

สภาวะการสกัดต่อปริมาณสารสกัดหยาบซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์
สารประกอบฟีนอลิก และฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสาหร่ายพวงองุ่น
EXTRACTION CONDITIONS ON A CRUDE SULFATED
POLYSACCHARIDE EXTRACT CONTENT, PHENOLIC COMPOUNDS,
AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF *CAULERPA LENTILLIFERA*

นัฏฐา คเชนทร์ภักดี¹ ธเนศ สิ้นธุ์ประจิม¹ สุแพรวพันธ์ โลหะลักษณาเดช¹ ธงชัย นิตีรัฐสุวรรณ¹
หทัยทิพย์ ทองด้วง¹ และน้ำฝน ไทยวงษ์^{2*}

Natta Kachenpukdee¹, Tanayt Sinprachim¹, Supraewpan Lohalaksanadech¹,
Thongchai Nitiratsuan¹, Hathaitip Tongdoun¹ and Numphon Thaiwong^{2*}

บทคัดย่อ

สาหร่ายพวงองุ่นเป็นสาหร่ายที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพของผู้บริโภคทำให้มีราคาค่อนข้างสูง สาหร่ายพวงองุ่นจึงได้รับการส่งเสริมให้มีการเพาะเลี้ยงเชิงพาณิชย์ การศึกษานี้จึงสนใจนำสาหร่าย พวงองุ่นมาสกัดเป็นสารสกัดหยาบซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์ซึ่งมีสมบัติเป็นสารออกฤทธิ์ชีวภาพ โดยศึกษา สภาวะการสกัดสารสกัดหยาบซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์จากอัตราส่วนสาหร่ายต่อน้ำ (1:5, 1:10 และ 1:15) และเวลาในการสกัด (30, 60 และ 90 นาที) ที่ต่างกัน ผลการทดลองพบว่าการใช้อัตราส่วน 1:10 นาน 60 นาที เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารสกัดหยาบซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์ โดยมีร้อยละ การผลิต ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน (วิธี ABTS และ DPPH) มากที่สุด เท่ากับร้อยละ 0.85 ± 0.10 , 31.99 ± 0.46 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิก/กรัมสารสกัด ร้อยละการยับยั้ง 44.19 ± 1.51 และ 30.55 ± 1.30 ตามลำดับ ($p \leq 0.05$) การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบ

¹คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง วิทยาเขตตรัง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย อำเภอสิเกา จังหวัดตรัง 92510

¹Faculty of Science and Fisheries Technology, Trang Campus, Rajamangala University of technology Srivijaya, Sikao District, Trang Province 92150

²คณะนวัตกรรมและเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา 30000

²Faculty of Agricultural Innovation and Technology, Rajamangala University of Technology Isan, Muang District, Nakhon Ratchasima Province 30000

*corresponding author e-mail: numphon.th@rmuti.ac.th

Received: 11 June 2024; Revised: 9 December 2024; Accepted: 11 December 2024

DOI: <https://doi.org/10.14456/lsej.2024.36>

ซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์พบว่ามีปริมาณความชื้น โปรตีน ไขมัน และเถ้า เท่ากับร้อยละ 2.37 ± 0.18 , 1.49 ± 0.18 , 0.17 ± 0.03 และ 12.23 ± 0.06 ตามลำดับ และมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเท่ากับ 31.99 ± 0.46 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิก/กรัมสารสกัด มีค่าร้อยละการยับยั้งจากวิธี ABTS และ DPPH เท่ากับร้อยละ 44.19 ± 1.51 และ 30.55 ± 1.30 ตามลำดับ ($p \leq 0.05$) การเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันระหว่างสารสกัดหยาบซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์กับสารต้านออกซิเดชันมาตรฐาน ได้แก่ กรดแกลลิก บิวทิลไฮดรอกซีโทลูอีน สามารถเรียงลำดับประสิทธิภาพการต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ได้จากวิธี ABTS และ DPPH จากมากไปน้อยได้ดังนี้ บิวทิลไฮดรอกซีโทลูอีน กรดแกลลิก และสารสกัดหยาบซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์ตามลำดับ

คำสำคัญ: สาหร่ายพวงอุ้งน สารสกัดหยาบซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์ สารต้านออกซิเดชันมาตรฐาน

Abstract

Caulerpa lentillifera is a type of seaweed that benefits the consumer's health, so its price is quite high. Then, *C. lentillifera* is encouraged to be commercially cultivated. This study focused on the extraction of crude sulfated polysaccharide extract from *C. lentillifera* (SFPS), which is a bioactive compound. The study examined the extraction conditions of SFPS using different ratios of *C. lentillifera* to water (1:5, 1:10, and 1:15) and different extraction times (30, 60, and 90 minutes). The results showed that a ratio of 1:10 and an extraction time of 60 minutes were optimal conditions for obtaining the highest values of yield, phenolic compounds, and antioxidant activity (using the ABTS and DPPH methods). These values were about $0.85 \pm 0.10\%$, 31.99 ± 0.46 mg GAE/g extract, $44.19 \pm 1.51\%$ inhibition of the ABTS method, and $30.55 \pm 1.30\%$ inhibition of the DPPH method, respectively ($p \leq 0.05$). The proximate analysis of SFPS revealed moisture, protein, fat, and ash contents of approximately 2.37 ± 0.18 , 1.49 ± 0.18 , 0.17 ± 0.03 and $12.23 \pm 0.06\%$, respectively. The SFPS had a phenolic compound content of 31.99 ± 0.46 mg GAE/g extract, and exhibited antioxidation activities of $44.19 \pm 1.51\%$ inhibition by the ABTS method and $30.55 \pm 1.30\%$ inhibition by the DPPH method ($p \leq 0.05$). Comparing the antioxidation activities among SFPS and standard antioxidant agents such as gallic acid and butylated hydroxytoluene (BHT), the % inhibition by ABTS and DPPH methods could be ordered from highest to lowest as follows: BHT, gallic acid, and SFPS, respectively.

Keywords: *Caulerpa lentillifera*, crude sulfated polysaccharide extract, standard antioxidant agents

บทนำ

สาหร่ายทะเลมีพอลิแซ็กคาไรด์เป็นส่วนประกอบในปริมาณสูง และมีมิวโคพอลิแซ็กคาไรด์ ซึ่งเป็นกลุ่มของพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีน้ำตาลเอมิโนเป็นส่วนประกอบอีกด้วย พอลิแซ็กคาไรด์และมิวโคพอลิแซ็กคาไรด์ประกอบอยู่ในผนังเซลล์ของสาหร่าย พอลิแซ็กคาไรด์ในสาหร่ายทะเลมีอยู่ประมาณ 4-76% ของน้ำหนักแห้งทั้งหมด (Usman et al., 2017) ซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์เป็นสารประกอบประเภทหนึ่งที่มีหมู่เอมิ-เอสเทอร์ซัลเฟต (hemi-ester sulfate) บนแกนกลางของพอลิแซ็กคาไรด์ (Mollah et al., 2009) ซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์ที่สังเคราะห์ได้จากสาหร่ายเป็นส่วนประกอบสำคัญของผนังเซลล์สาหร่าย เป็นสารออกฤทธิ์ชีวภาพ (Ciancia et al., 2020) มีฤทธิ์ต้านการแข็งตัวของเลือด ต้านการเกิดลิ่มเลือด ต้านมะเร็ง ต้านจุลินทรีย์ ต้านการกลายพันธุ์ ต้านการอักเสบ กระตุ้นภูมิคุ้มกัน และต้านไวรัส (Mišurcová et al., 2012, Figueroa et al., 2022) นอกจากนี้ ซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายยังมีสมบัติลดการสูญเสียความชุ่มชื้น เป็นสารลดการระคายเคืองจากภายนอก โครงสร้างของซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์อาจกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนจึงส่งผลให้ผิวกระชับและเรียบเนียนได้ รวมถึงมีความเป็นไปได้ในการปิดกั้นรังสีอัลตราไวโอเล็ต ซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายจึงเป็นวัตถุดิบที่มีศักยภาพในอุตสาหกรรมยา เวชสำอาง อาหารเพื่อสุขภาพ และเทคโนโลยีชีวภาพ (Nagahawatta et al., 2023) ทั้งนี้ ซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้จากสาหร่ายอาจมีความแตกต่างกันตามชนิดของสาหร่าย ฤดูเก็บเกี่ยว และปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อม (Nagahawatta et al., 2021; Jiksing et al., 2022; Yang & Kim, 2022) อย่างไรก็ตาม การออกฤทธิ์ชีวภาพของซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์จะแตกต่างกันตามชนิดของสาหร่ายซึ่งมีส่วนประกอบและน้ำหนักโมเลกุล รวมถึงปริมาณซัลเฟตที่อยู่ในส่วนแกนกลางของพอลิแซ็กคาไรด์ (Srimongkol et al., 2023) ยกตัวอย่าง เช่น ซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์ที่พบในสาหร่าย *Enteromorpha compressa* (Ulvaes, Chlorophyta) มีค่าเท่ากับ 25% (Chattopadhyay et al., 2007) สาหร่าย *Ascophyllum nodosum* มีค่าเท่ากับ $9.15 \pm 0.23\%$ (Chen et al., 2018) เป็นต้น ปัจจัยที่ส่งผลต่อปริมาณและคุณภาพของซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้จากสาหร่ายมีหลายปัจจัย เช่น สารละลาย อุณหภูมิและเวลาในการสกัด การใช้เทคนิคช่วยสกัดด้วยไมโครเวฟ หรือคลื่นอัลตราโซนิค การใช้เอนไซม์ เป็นต้น งานวิจัยที่สกัดซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายจึงมีหลากหลาย เช่น การสกัดซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์ (fucoidan) จากสาหร่ายสีน้ำตาล *Fucus vesiculosus* ที่ออกแบบการทดลองแบบ 2^2 Central Composite Design โดยใช้อุณหภูมิสกัด $160-200^\circ\text{C}$ และเวลา 10-30 นาที การใช้อุณหภูมิ 180°C นาน 20 นาที เป็นสภาวะที่มีร้อยละการผลิตมากที่สุดเท่ากับ $16.5\% \text{ w/w}$ (Rodríguez-Jasso et al., 2013) การสกัดซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายสีแดง (*Gracilaria fisheri*) ที่เก็บในเดือนกรกฎาคม และตุลาคม โดยกำหนดอัตราส่วนระหว่างสาหร่ายกับน้ำ 1:25, 1:35 และ 1:50 (w/v) อุณหภูมิ 90, 100 และ 110°C และเวลา 40, 60 และ 90 นาที โดยอัตราส่วน 1:50 (w/v) อุณหภูมิ 100°C และเวลา 60 นาที เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการสกัด (Rormwong et al., 2023) และ

การสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายพวงองุ่น โดยใช้ 0.007M HCl (pH4) น้ำร้อน (pH 6) และ 0.01 M sodium hydroxide (pH 8) ที่เวลาต่างกัน 20, 60 และ 120 นาที พบว่าการใช้น้ำร้อนในการสกัดนาน 20 นาที เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายพวงองุ่น (Honwichit et al., 2022) สาหร่ายพวงองุ่น (*C. lentillifera*) เป็นสาหร่ายทะเลสีเขียว อยู่ในวงศ์ Caulerpaceae มีลักษณะเป็น เม็ดกลมเล็ก รวมกันเป็นช่อคล้ายกับพวงองุ่น (Phetchaburi Coastal Fisheries Research and Development Center, 2019) จากการรวบรวมงานวิจัยของ Tesvichian et al. (2024) รายงานว่า ซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายพวงองุ่นมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ต้านเบาหวาน ต้านมะเร็ง และ ต้าน SARS-CoV-2 ในประเทศไทยสาหร่ายพวงองุ่นพบมากตามชายฝั่งทะเลอ่าวไทย ฝั่งตะวันออก ฝั่งอันดามัน และอ่าวไทยตอนบน แม้ว่าสาหร่ายพวงองุ่นจะเจริญได้ในน้ำทะเล แต่สามารถเจริญได้ดีใน บ่อเลี้ยงด้วยเช่นกัน เพราะสามารถทนการเปลี่ยนแปลงความเค็มในช่วงกว้างได้ประมาณ 25-35 ppm เนื่องจากสาหร่ายพวงองุ่นมีประโยชน์ต่อสุขภาพของผู้บริโภคทำให้มีราคาค่อนข้างสูง จึงมีการเพาะเลี้ยง สาหร่ายพวงองุ่นเพื่อจำหน่ายในหลายประเทศ กรมประมงจึงส่งเสริมให้เกษตรกรไทยเพาะเลี้ยงสาหร่าย พวงองุ่นเชิงพาณิชย์ (Phetchaburi Coastal Fisheries Research and Development Center, 2019) จากปริมาณสาหร่ายพวงองุ่นที่พบในท้องตลาดมากขึ้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะ การสกัดสารสกัดหยาบซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์จาก 2 ปังจ้ย ได้แก่ อัตราส่วนสาหร่ายต่อน้ำ (1:5, 1:10 และ 1:15) เวลาในการสกัด (30, 60 และ 90 นาที) โดยคำนวณร้อยละการผลิต ปริมาณสารประกอบ ฟีนอลิก และฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดหยาบซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้เพื่อพิจารณาสภาวะ การสกัดที่เหมาะสม และนำสารสกัดหยาบซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์จากสภาวะที่เหมาะสมมาศึกษา องค์ประกอบทางเคมีและเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันกับสารต้านออกซิเดชันมาตรฐาน (กรดแอสคอร์บิก และบิวทิลไฮดรอกซีโทลูอีน) การศึกษาสภาวะการสกัดสารสกัดหยาบซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์ ของสาหร่ายพวงองุ่นในงานวิจัยนี้ใช้น้ำร้อน 95°C ซึ่งมีการใช้ตัวทำละลายเดียวกันกับงานวิจัยของ Romwong et al. (2023) ที่สกัดซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายสีแดง (*Gracilaria fisheri*) โดยมีการ ยืนยันว่าสารสกัดดังกล่าวมีซัลเฟตเป็นส่วนประกอบการเลือกใช้น้ำเป็นตัวทำละลายในงานวิจัยนี้ เนื่องจากน้ำเป็นหนึ่งในตัวทำละลายที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม (green solvents) ไม่ก็ชนิดที่สามารถ ปรับเปลี่ยนสมบัติได้โดยการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ (Castro-Puyana et al., 2017) ทั้งนี้ การเพิ่ม อุณหภูมิจะทำให้ค่าคงที่ไดอิเล็กตริกของน้ำลดลง (ความสามารถในการเกิดขั้วของน้ำสามารถถูกปรับ เปลี่ยนได้โดยการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ) ช่วยส่งเสริมให้น้ำสามารถแทรกซึมเข้าไปในตัวอย่างได้ดีขึ้น และ ช่วยปรับปรุงการแพร่และการถ่ายเทมวลสาร โดยที่น้ำไม่มีพิษ และราคาถูก (Richter et al., 1996; Lu et al., 2002; Castro-Puyana et al., 2017)

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมสาหร่ายพวงอุ้ง

นำสาหร่ายพวงอุ้งสดจากฟาร์มเพาะเลี้ยงสาหร่ายพวงอุ้งในพื้นที่ตำบลไม้ฝาด อำเภอสีเกา จังหวัดตรัง นำมาล้างทำความสะอาด พักให้สะเด็ดน้ำ แบ่งส่วนหนึ่งใส่ในถุงเย็นเพื่อแช่เยือกแข็งที่ -20°C เพื่อนำไปเตรียมตัวอย่างและวิเคราะห์ตามข้อ 2, 3, 5 และ 6 อีกส่วนหนึ่งนำไปอบในตู้อบลมร้อน (Tray dryer) ที่ 50°C กำหนดความชื้นสุดท้ายน้อยกว่า 8% บั่นให้ละเอียดเก็บในถุงพอยซีลปากถุงเพื่อป้องกันความชื้น และนำไปสกัดตามข้อ 4

2. การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสาหร่ายพวงอุ้ง

วิเคราะห์ปริมาณความชื้น เถ้า ไขมัน และปริมาณโปรตีน ตามวิธีของ AOAC (2000)

3. การเตรียมสารสกัดหยาบจากสาหร่ายพวงอุ้งเพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

ชั่งสาหร่ายพวงอุ้งสด 10 กรัม ผสมเอทานอล (Ethanol Absolute, Q RêC™, New Zealand) ที่อัตราส่วนตัวอย่าง: เอทานอล เท่ากับ 1:10 (w/v) เขย่าตัวอย่างต่อเนื่องที่ความเร็ว 150 rpm นาน 2 ชั่วโมง (WS-200D orbital shaker W/31523-W multi-purpose tray, WIGGENS GmbH, Germany) แล้วนำมารองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 2 (Whatman™ no.2, Whatman, UK) นำสารละลายไปวิเคราะห์ตาม ข้อ 5 และ 6

4. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารสกัดหยาบซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายพวงอุ้ง

นำสาหร่ายพวงอุ้งแห้งมาผสมกับน้ำร้อน 95°C ตามอัตราส่วนที่ต่างกัน ได้แก่ 1:5, 1:10 และ 1:15 สกัดในอ่างน้ำร้อนแบบเขย่า (Shaking Water Bath WNB 22, Memmert, Germany) ที่ 100°C ความเร็วในการเขย่า 150 rpm กำหนดเวลาการสกัดแตกต่างกัน 30, 60 และ 90 นาที นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 rpm นาน 10 นาที (Thermo Scientific Sorvall RT1, Thermo Fisher Scientific, US) นำของเหลวที่ได้มาตกตะกอนด้วยเอทานอลเข้มข้น 95% (Q RêC™, New Zealand) ทิ้งไว้ 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง นำตะกอนไปปั่นเหวี่ยงที่ 8000 rpm อุณหภูมิ 4°C นาน 30 นาที แล้วนำตะกอนที่ได้มาทำให้แห้งด้วยตู้อบลมร้อน ที่ 60°C นาน 2 ชั่วโมง ได้เป็นสารสกัดหยาบซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์ (SFPS) ซึ่งนำห้สกัดหยาบ SFPS ที่ได้ และคำนวณค่าร้อยละการผลิตดังสมการ (1) ดัดแปลงวิธีจาก Rormwong et al. (2023)

$$\text{ร้อยละการผลิต (\% yield)} = \frac{\text{น้ำหนัก SFPS หลังอบแห้ง} \times 100}{\text{น้ำหนักสาหร่ายที่นำมาใช้สกัด}} \quad (1)$$

5. การเตรียมสารสกัดหยาบซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์

ชั่ง SFPS น้ำหนัก 0.5 กรัม ละลายในเอทานอลเข้มข้น 50% ปริมาตร 25 mL ผสมให้ละลายจนเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บในถุงเย็นเพื่อแช่เยือกแข็งที่ -20°C เพื่อนำไปวิเคราะห์ในลำดับต่อไป

6. วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก

ปิเปต SFPS ที่ได้ หรือสารสกัดหยาบจากสาหร่ายพวงองุ่น (ข้อ 3) หรือสารละลายมาตรฐาน กรดแกลลิก (Sigma-Aldrich, US) ปริมาตร 1 mL เติมน้ำกลั่น 1.5 mL เติม 10% Folin & Ciocalteu's phenol reagent (Sigma-Aldrich, US) ปริมาตร 5 mL ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 1 นาที เติมโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) เข้มข้น 7.5% (Loba Chemie™, India) ปริมาตร 1 mL บ่มที่ 37°C นาน 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 740 nm (Double Beam Spectrophotometer UH5300, Hitachi, Japan) นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลิก โดยใช้สมการที่ได้จากกราฟมาตรฐาน ระหว่างสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก (x) และค่าการดูดกลืนแสง (y) โดยปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมีหน่วยเป็นมิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิก/กรัมของสารสกัด (mg GAE/g extract)

7. การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดหยาบเซลล์เพคโตลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายพวงองุ่น

7.1 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี ABTS

เตรียม 2,2'-azino-bis (3-ethylbenz-thiazoline-6-sulphonic acid) (Sigma-Aldrich, USA) ความเข้มข้น 7 mM ผสมกับ dipotassium peroxodisulphate ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) (Q R&C, New Zealand) ความเข้มข้น 2.45 mM ที่อัตราส่วน 1: 0.5 เก็บให้พ้นแสง ที่อุณหภูมิห้อง นาน 12 ชั่วโมง เจือจางสารละลายดังกล่าวด้วยเมทานอลเข้มข้น 95% กำหนดการดูดกลืนแสงของสารละลายให้มีค่าเท่ากับ 0.700 ± 0.05 ที่ความยาวคลื่น 734 nm ได้เป็นสารละลาย ABTS (ตามวิธีของ Manok & Limcharoen, 2015)

ปิเปต SFPS หรือสารสกัดหยาบจากสาหร่ายพวงองุ่น (ข้อ 3) ปริมาตร 500 μL เติมสารละลาย ABTS ปริมาตร 4.5 mL ผสมให้เข้ากัน เก็บในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที เมื่อครบเวลาให้นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 nm (A_{sample}) และตัวอย่างควบคุม โดยปิเปตเมทานอล 500 μL ผสมกับสารละลาย ABTS ปริมาตร 4.5 mL นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 nm (A_{control}) คำนวณฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเป็นร้อยละของการยับยั้งดังสมการ [2]

$$\text{ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน (\% inhibition)} = \left(\frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \right) \times 100 \quad [2]$$

เมื่อ A_{control} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย ABTS หรือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH; A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ทำปฏิกิริยากับสารละลาย ABTS หรือ สารละลาย DPPH

7.2 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH

ปิเปต SFPS หรือสารสกัดจาก ข้อ 3 หรือตัวอย่างควบคุม (Methanol Absolute, Q R&C™, New Zealand) ปริมาตร 200 μL ผสมกับ 0.1 mM DPPH (Sigma-Aldrich, US) ที่ละลายใน

เมทานอล (Methanol Absolute) ปริมาตร 5.8 mL ผสมให้เข้ากัน เก็บที่มีด 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm (A_{sample}) คำนวณร้อยละของการยับยั้งตามสมการ [2]

8. วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์

วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของ SFPS จากสภาวะสกัดที่เหมาะสมตามข้อ 2 และเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของ SFPC จากสภาวะสกัดที่เหมาะสมกับสารต้านออกซิเดชันมาตรฐาน โดยใช้บิวทิเลตไฮดรอกซีโทลูอิน (Butylated Hydroxytoluene) หรือ BHT (Loba Chemie™, India) เข้มข้น 1 กรัม/ลิตร และกรดแกลลิกเข้มข้น 1 กรัม/ลิตร ตามวิธีวิเคราะห์ข้อ 6

9. วิเคราะห์ผลทางสถิติ

ออกแบบการทดลองแบบ 3^2 factorial experiments in CRD โดยศึกษาปัจจัย 2 ปัจจัย ซึ่งอัตราส่วนสารหย่อนน้ำเป็นปัจจัยแรก มี 3 ระดับ ได้แก่ 1:5, 1:10 และ 1:15 และเวลาในการสกัด เป็นปัจจัยที่ 2 มี 3 ระดับ ได้แก่ 30, 60 และ 90 นาที จำนวนการทดลอง 3 ซ้ำ ผลที่ได้จากการทดลอง ทำการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance หรือ ANOVA) และวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างตัวอย่างด้วยวิธี Duncan's new multiple's range test (DMRT) โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ IBM SPSS Statistics 26

ผลการวิจัย

1. ร้อยละการผลิตปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดหยาบซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์

ค่าร้อยละการผลิต ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของ SFPS ที่สภาวะการสกัดต่างกัน แสดงดังตารางที่ 1 (Table 1)

ผลการทดลองพบว่า SFPS ที่อัตราส่วน 1:10 นาน 60 นาที มีค่าร้อยละการผลิตมากที่สุด เท่ากับ $0.85 \pm 0.10\%$ ($p \leq 0.05$) และที่สภาวะสกัดเดียวกัน SFPS มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากที่สุดเท่ากับ 31.99 ± 0.46 mg GAE/g extract และอัตราส่วน 1:10 นาน 30 นาที มีค่าอยู่ในระดับเดียวกัน การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของ SFPS พบว่า SFPS จากอัตราส่วน 1:10 เป็นเวลา 60 นาที มีค่าร้อยละการยับยั้ง (วิธี ABTS) มากที่สุดเท่ากับ $44.19 \pm 1.51\%$ เช่นกัน อย่างไรก็ตาม SFPS จากอัตราส่วน 1:5 นาน 60 นาที อัตราส่วน 1:10 นาน 30 นาที และอัตราส่วน 1:15 นาน 60 นาที มีค่าอยู่ในระดับเดียวกัน และ SFPS จากอัตราส่วน 1:10 นาน 60 นาที เป็นสภาวะที่มีค่าร้อยละการยับยั้ง (วิธี DPPH) มากที่สุดเท่ากับ $30.55 \pm 1.30\%$ ซึ่ง SFPS จากอัตราส่วน 1:10 นาน 30 นาที มีค่าอยู่ในระดับเดียวกัน

Table 1 Yield, phenolic compounds, and antioxidant activities of crude sulfated polysaccharide extract from *C. lentillifera* under different extraction methods.

Ratio (sample: water)	Extraction Time (min)	%Yield	Total phenolic content (mg GAE/g extract)	ABTS (% inhibition)	DPPH (% inhibition)
1:5	30	0.19±0.01 ^e	24.68±0.70 ^f	33.39±0.42 ^{cd}	21.66±0.88 ^d
1:5	60	0.49±0.04 ^c	29.71±0.62 ^b	41.78±0.68 ^a	26.34±0.50 ^c
1:5	90	0.28±0.02 ^d	26.56±0.58 ^e	31.69±1.61 ^d	23.04±1.04 ^d
1:10	30	0.54±0.07 ^c	31.25±0.58 ^a	43.45±2.90 ^a	29.17±1.07 ^{ab}
1:10	60	0.85±0.10 ^a	31.99±0.46 ^a	44.19±1.51 ^a	30.55±1.30 ^a
1:10	90	0.71±0.02 ^b	28.40±0.79 ^{cd}	38.03±1.09 ^b	28.08±0.70 ^b
1:15	30	0.27±0.04 ^{de}	28.80±0.35 ^{bc}	33.58±1.05 ^{cd}	24.69±0.57 ^c
1:15	60	0.49±0.05 ^c	27.51±0.50 ^{de}	41.58±0.50 ^a	25.88±0.84 ^c
1:15	90	0.35±0.03 ^d	26.74±0.32 ^e	35.92±1.24 ^{bc}	25.06±0.92 ^c

Remark Means ± standard deviations with different letters in the same column indicated statistically significant differences at the 95% confidence level.

2. องค์ประกอบทางเคมีของสาหร่ายพวงองุ่นและสารสกัดหยาบซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายพวงองุ่น

สาหร่ายพวงองุ่นและ SFPS ที่สกัดได้จากสถานะที่เหมาะสมมีองค์ประกอบทางเคมีดังตารางที่ 2 (Table 2) พบว่า สาหร่ายพวงองุ่นมีความชื้น โปรตีน ไขมัน และเถ้าเท่ากับ 82.63 ± 0.08 , 3.88 ± 0.96 , 1.75 ± 0.97 และ $12.84 \pm 0.23\%$ ตามลำดับ ขณะที่ SFPS มีปริมาณความชื้น โปรตีน ไขมัน และเถ้าเท่ากับ 2.34 ± 0.18 , 1.49 ± 0.18 , 0.17 ± 0.03 และ $12.23 \pm 0.06\%$ ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสาหร่ายพวงองุ่นด้วยวิธี ABTS และ DPPH มีค่าเท่ากับ 37.28 ± 2.06 mg GAE/g extract, $13.81 \pm 1.09\%$ และ $6.07 \pm 0.85\%$ ตามลำดับ ขณะที่ SFPS มีค่าเท่ากับ 31.99 ± 0.46 mg GAE/g extract, $44.19 \pm 1.51\%$ และ $30.55 \pm 1.30\%$ ตามลำดับ การวิเคราะห์สถิติ t-test ระหว่างสาหร่ายพวงองุ่นและ SFPS พบว่าค่า p-value ของความชื้น ไขมัน และฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี ABTS และ DPPH มีค่าน้อยกว่า $\alpha=0.05$ แสดงให้เห็นว่าปริมาณความชื้น ไขมัน และฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี ABTS และ DPPH ของสาหร่ายพวงองุ่นและ SFPS มีค่าแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

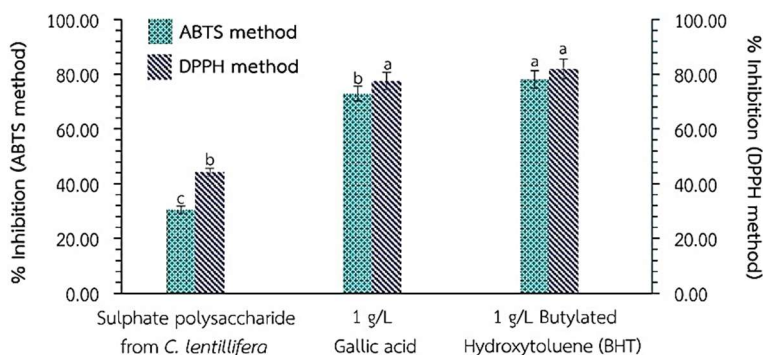
Table 2 Chemical composition, phenolic compound content, and antioxidant activities of *C. lentillifera* and its crude sulfated polysaccharide extract.

Chemical Composition	Raw material (<i>C. lentillifera</i>)	SFPS from <i>C. lentillifera</i>	T	Sig (p-value)
Moisture (%)	82.55±5.20	2.37±0.18	55.37*	<0.0001
Protein (%)	3.92±1.08	1.49±0.18	3.86	0.09
Fat (%)	1.75±0.97	0.17±0.03	2.82*	0.02
Ash (%)	12.84±0.23	12.23±0.06	4.37	0.06
Phenolic compounds (mg GAE/g extract)	37.28±2.06	31.99±0.46	4.34	0.06
% inhibition (ABTS method)	13.81±1.09	44.19±1.51	-17.07*	<0.0001
% inhibition (DPPH method)	6.07±0.85	30.55±1.30	-48.08*	<0.0001

Remark SFPS = crude sulfated polysaccharide extract; Values with an asterisk (*) in the same row indicated statistically significant differences at the 95% confidence level.

3. การเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดหยาบซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์กับสารต้านออกซิเดชันมาตรฐาน

ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของ SFPS ที่สกัดได้จากสมวาะที่เหมาะสม กรดแกลลิก และ BHT แสดงดังภาพที่ 1 (Figure 1)

**Figure 1** Antioxidant activities of crude sulfated polysaccharide extract from *C. lentillifera* compared with standard antioxidant agents.

ผลการทดลองพบว่า BHT มีค่าร้อยละการยับยั้งที่วิเคราะห์ด้วยวิธี ABTS และ DPPH มีค่ามากกว่า SFPS เท่ากับ 78.18±3.24 และ 82.05±3.58% โดยกรดแกลลิกมีค่าร้อยละการยับยั้ง (วิธี DPPH) อยู่ในระดับเดียวกับ BHT ($p>0.05$) ขณะที่ SFPS มีค่าร้อยละการยับยั้งที่วิเคราะห์ด้วยวิธี ABTS และ DPPH น้อยที่สุดเท่ากับ 30.55±1.30 และ 44.19±1.5% ตามลำดับ

อภิปรายผล

การสกัดซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายแห้งด้วยน้ำร้อนเป็นวิธีพื้นฐานที่สะดวกและง่าย เพราะซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์จะหลุดออกจากสาหร่ายและปนกับน้ำที่เป็นตัวทำละลาย (Nagahawatta et al., 2023) เนื่องจากสาหร่ายเจริญในน้ำ อัตราส่วนสาหร่ายต่อน้ำและเวลาที่ใช้ในการสกัดซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์จึงเป็นปัจจัยสำคัญ (Yu et al., 2013) จากตารางที่ 1 (Table 1) การใช้อัตราส่วนตัวอย่างต่อน้ำร้อน 95°C ในการสกัด SFPS ที่อัตราส่วน 1:10 เป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมที่สุด เนื่องจากที่อัตราส่วน 1:5 มีน้ำเป็นส่วนผสมน้อยจึงทำให้ตัวอย่างมีความหนืดมากเกินไป ทำให้การสกัด SFPS มีประสิทธิภาพต่ำ ร้อยละการผลิตจึงมีค่าน้อย (Sun et al., 2018) ขณะที่การใช้อัตราส่วน 1:15 มีค่าร้อยละการผลิตน้อยเช่นกัน อาจเป็นผลมาจากปริมาณน้ำที่ใช้เป็นส่วนผสมมากเกินไปทำให้ตัวอย่างสาหร่ายเกิดการเดือดจน จึงสกัดซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ในปริมาณต่ำ (Yuan et al., 2017) เมื่อพิจารณาเวลาที่นำมาใช้ในการสกัดพบว่า การเพิ่มเวลาในการสกัดจาก 30 เป็น 60 นาที เป็นการเพิ่มระยะเวลาให้ซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์สามารถละลายหลุดออกจากโครงสร้างสาหร่ายได้มากขึ้น การใช้เวลากัดนาน 60 นาที ทำให้ร้อยละการผลิตมีค่ามากที่สุด ดังตารางที่ 1 (Table 1) อย่างไรก็ตาม การเพิ่มเวลาการสกัดที่ 90 นาที อาจทำให้สารสกัดหยาบซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์ได้รับความร้อนนานเกินไปจึงทำให้เกิดการสลายตัว ส่งผลให้ร้อยละการผลิตมีค่าลดลง การสลายตัวของพอลิแซ็กคาไรด์ทำให้โครงสร้างโมเลกุลของพอลิแซ็กคาไรด์เกิดการเปลี่ยนแปลง (Zhang et al., 2020) เป็นผลให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และฤทธิ์ต้านออกซิเดชันลดลง อย่างไรก็ตาม สภาวะการสกัดสารสกัดหยาบซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์ในงานวิจัยนี้สอดคล้องกับการสกัดซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายพวงอุ้งของ Tesvichian et al. (2024) ที่ศึกษา 3 ปัจจัย (อัตราส่วนตัวอย่างต่อน้ำ เวลา และอุณหภูมิ) โดยใช้วิธีการพื้นผิวตอบสนอง การใช้อัตราส่วนสาหร่ายต่อน้ำ 1:10 อุณหภูมิ 90°C และเวลา 45 นาที เป็นสภาวะที่เหมาะสม โดยมีค่าร้อยละการผลิตระหว่าง 0.440 ถึง 1.571% และร้อยละการยับยั้งด้วยวิธี DPPH ระหว่าง 18.41 ± 0.92 ถึง $32.75 \pm 0.05\%$ ตามลำดับ ทั้งนี้ ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์จะขึ้นอยู่กับระดับการเกิดซัลเฟต (degree of sulfation) เนื่องจากซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์มีความสามารถในการให้อิเล็กตรอนจึงมีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระ (Nagahawatta et al., 2023) จากตารางที่ 1 (Table 1) ค่าร้อยละการยับยั้งจากวิธี ABTS มีค่าสูงกว่าวิธี DPPH เพราะอนุมูลแอนไอออนของ ABTS ทำปฏิกิริยากับสารต้านออกซิเดชันได้อย่างรวดเร็ว และสามารถใช้ได้ในช่วงค่าพีเอชกว้าง ขณะที่การทดสอบด้วยวิธี DPPH จะขึ้นอยู่กับปฏิกิริยาการถ่ายโอนอิเล็กตรอนเป็นหลัก และโครงสร้างของสารกำจัดอนุมูลอิสระยังเป็นตัวกำหนดการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารกำจัดอนุมูลอิสระกับอนุมูล DPPH (Martysiak-Zurowska & Wenta, 2012) การต้านออกซิเดชันของซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยวิธี ABTS เกิดจากปฏิกิริยาถ่ายโอนอิเล็กตรอนในพอลิแซ็กคาไรด์ที่จับกับไฮโดรเจนอะตอมหรืออิเล็กตรอนเพื่อให้โมเลกุลมีความเสถียร (Wang et al., 2022) การต้านออกซิเดชันวิธีนี้

มีความเชื่อมโยงกับจำนวนหมู่คาร์บอนิลของกลุ่มกรดคาร์บอกซิลิกที่จับอยู่กับกรดยูโรนิก และจำนวนไฮโดรเจนอะตอมในหมู่ไฮดรอกซิลที่แกนกลางพอลิแซ็กคาไรด์ (Mousavian et al., 2022) ขณะที่การต้านออกซิเดชันของซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยวิธี DPPH เกิดจากไฮโดรเจนอะตอมในหมู่ไฮดรอกซิลที่อยู่ในซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์สามารถให้ไฮโดรเจนอะตอมได้ดี (Mousavian et al., 2022) การเปรียบเทียบประสิทธิภาพฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดหยาบซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์กับสารต้านออกซิเดชันมาตรฐานดังภาพที่ 1 (Figure 1) พบว่าสารสกัดหยาบซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์มีค่าร้อยละการยับยั้งน้อยกว่ากรดแกลลิก และ BHT เช่นเดียวกับ Nwude et al. (2024) ที่รายงานว่า BHT มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันจากวิธี DPPH ดีกว่ากรดแกลลิก โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 68.9 และ 27.4 mg/mL ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม การทำให้ซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์บริสุทธิ์มากขึ้นจะทำให้ซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีคุณภาพสูงขึ้น (Nagahawatta et al., 2023)

สรุปผลการวิจัย

การใช้อัตราส่วนสาหร่ายต่อน้ำ 1:10 สกัดนาน 60 นาที เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารสกัดหยาบซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายพวงองุ่น สภาวะการสกัดนี้มีค่าร้อยละการผลิตปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ด้วยวิธี ABTS และ DPPH มากที่สุด อย่างไรก็ตาม สารสกัดหยาบซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายพวงองุ่นมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันต่ำกว่ากรดแกลลิก และบิวทิเลตไฮดรอกซีโทลูอีน (BHT) ซึ่งเป็นสารต้านออกซิเดชันมาตรฐาน

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2561 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตตรัง

เอกสารอ้างอิง

- AOAC. Official method of analysis (17th ed.). Washington, DC: Association of the Official Analytical Chemists. (2000).
- Castro-Puyana M, Marina ML, Plaza M. Water as green extraction solvent: Principles and reasons for its use. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry* 2017;5:31-36.
- Chattopadhyay K, Mandal P, Lerouge P, Driouich A, Ghosal P, Ray B. Sulphated polysaccharides from Indian samples of *Enteromorpha compressa* (Ulvaes, Chlorophyta): Isolation and structural features. *Food Chemistry* 2007;104:928-935.
- Chen L, Wang Y, Yang H, Li H, Xu W, Chen G, Zhu H. Physicochemical characterization, antioxidant and immunostimulatory activities of sulfated polysaccharides extracted from *Ascomyllum nodosum*. *Molecules* 2018;23(8):1912.

- Ciancia M, Fernández PV, Leliaert F. Diversity of sulfated polysaccharides from cell walls of coenocytic green algae and their structural relationships in view of green algal evolution. *Frontiers in Plant Science* 2020;11,554585.
- Figueroa FA, Abdala-Díaz RT, Pérez C, Casas-Arrojo V, Nesic A, Tapia C, et al. Sulfated polysaccharide extracted from the green algae *Codium bernabei*: physicochemical characterization and antioxidant, anticoagulant and antitumor activity. *Marine Drugs* 2022;20:458.
- Honwicht O, Ruengsaengrob P, Buathongjan C, Charoensiddhi S. Influence of extraction methods on the chemical composition and antioxidant activity of polysaccharide extracts from discarded sea grape (*Caulerpa lentillifera*). *Journal of Fisheries and Environment* 2022;46(1):169-179.
- Jiksing C, Ongkudon MM, Thien VY, Rodrigues KF, Yong WTL. Recent advances in seaweed seedling production: a review of eucheumatoids and other valuable seaweeds. *Algae* 2022;37:105-121.
- Lu J, Brown JS, Boughner EC, Liotta CL, Eckert CA. Solvatochromic characterization of near-critical water as a benign reaction medium. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 2002;41:2835-2841.
- Manok S, Limcharoen P. Investigating antioxidant activity by DPPH, ABTS and FRAP assay and total phenolic compounds of herbal extracts in Ya-Hom Thepphachit. *Advanced Science* 2015;15(1): 106-117.
- Martysiak-Zurowska D, Wenta W. A comparison of ABTS and DPPH methods for accessing the total antioxidant capacity of human milk. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria* 2012;11(1):83-89.
- Mišurcová L, Orsavová J, Ambrožová JV. Algal polysaccharides and health. *Advances in Food and Nutrition Research* 2012;66:75-145.
- Mollah MZI, Khan MA, Khan RA. Effect of gamma irradiated sodium alginate on red amaranth (*Amaranthus cruentus* L.) as growth promoter. *Radiation Physics and Chemistry* 2009;78(1):61-64.
- Mousavian Z, Safavi M, Azizmohseni F, Hadizadeh M, Mirdamadi S. Characterization, antioxidant and anticoagulant properties of exopolysaccharide from marine microalgae. *AMB Express* 2022;12:27.
- Nagahawatta DP, Liyanage NM, Jayawardena TU, Yang F, Jayawardena HHACK, Kurera MJMS, et al. Functions and values of sulfated polysaccharides from seaweed. *Algae* 2023;38(4):217-240.
- Nwude DO, Osamudiamen PM, Enessy SM. Phytochemical investigation of *Mezoneuron benthamianum* Baill, isolation, *in vitro* antioxidant, alpha-amylase inhibition, and *in silico* modelling studies. *South African Journal of Botany* 2024;165:256-237.
- Phetchaburi Coastal Fisheries Research and Development Center. Cultivation and processing of grape seaweed, 2019. Available at: https://www4.fisheries.go.th/local/file_document/20190619091640_1_file.pdf. Accessed June 13, 2024.
- Richter BE, Jones BA, Ezzell JL, Porter NL, Avdalovic N, Pohl C. Accelerated solvent extraction: a technique for sample preparation. *Analytical Chemistry* 1996;68:1033-1039.

- Rodríguez-Jasso RM, Mussatto SI, Pastrana L, Aguilar CN, Teixeira JA. Extraction of sulfated polysaccharides by autohydrolysis of brown seaweed *Fucus vesiculosus*. *Journal of Applied Phycology* 2013;25:31-39.
- Rormwong T, Sakpetch P, Choojit S, Kanjan P. Extraction of sulfated polysaccharide from red seaweed (*Gracilaria fisheri*) and growth promotion of probiotic bacteria. *Burapha Science Journal* 2023;28(2): 752-771.
- Srimongkol P, Songserm P, Kuptawach K, Puthong S, Sangtanoo P, Thitiprasert S, et al. Sulfated polysaccharides derived from marine microalgae, *Synechococcus* sp. VDW, inhibit the human colon cancer cell line Caco-2 by promoting cell apoptosis via the JNK and p38 MAPK signaling pathway. *Algal Research* 2023;69:102919.
- Sun Y, Liu Z, Song S, Zhu B, Zhao L, Jiang J, et al. Anti-inflammatory activity and structural identification of a sulfated polysaccharide CLGP4 from *Caulerpa lentillifera*. *International Journal of Biological Macromolecules* 2020;146:931-938.
- Tesvichian S, Sangtanoo P, Srimongkol P, Saisavoey T, Buakeaw A, Puthong S, et al. Sulfated polysaccharides from *Caulerpa lentillifera*: Optimizing the process of extraction, structural characteristics, antioxidant capabilities, and anti-glycation properties. *Heliyon* 2024;10:e24444.
- Usman A, Khalid S, Usman A, Hussain Z, Wang Y. Chapter 5 - Algal polysaccharides, novel application, and outlook. In Zia KM, Zuber M, Ali M. (Eds.), *Algae based polymers, blends, and composites*. Netherlands: Elsevier; 2017:115-153.
- Wang W-N, Li T, Li Y, Zhang Y, Wu HL. Exopolysaccharides from the energy microalga strain. *Foods* 2022;11(1):110.
- Yang MY, Kim MS. Phylogeography of the economic seaweeds *Chondrus* (Gigartinales, Rhodophyta) in the northwest Pacific based on *rbcl* and COI-5P genes. *Algae* 2022;37:135-147.
- Yu F, Li H, Meng Y, Yang D. Extraction optimization of *Angelica sinensis* polysaccharides and its antioxidant activity *in vivo*. *Carbohydrate Polymers* 2013;94:114-119.
- Yuan Y, Liu Y, Liu M, Chen Q, Jiao Y, Liu Y, et al. Optimization extraction and bioactivities of polysaccharide from wild *Russula griseocarnosa*. *Saudi Pharmaceutical Journal* 2017;25:523-530.
- Zhang M, Zhao M, Qing Y, Luo Y, Xia G, Li Y. Study on immunostimulatory activity and extraction process optimization of polysaccharides from *Caulerpa lentillifera*. *International Journal of Biological Macromolecules* 2020;143:677-684.