



## รายงานฉบับสมบูรณ์

### ชื่อโครงการวิจัย

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กและการประยุกต์ใช้ร่วมกับแผ่นฟิล์มเซลลูโลสเพื่อชะลอการเหม็นหืนในผลิตภัณฑ์เนื้อ

Antioxidant properties of crude extracts from green microalgae and applying incorporated with bacterial cellulose film for retarding oxidative rancidity in meat product

### คณะผู้วิจัย

ผศ. ลินจง สุล้ำกู

ผศ. วีณา ชูโชติ

รศ. ดวงใจ โอชัยกุล

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2553-2554  
(ต่อเนื่อง 2 ปี)

ประเภทงานวิจัยเชิงบูรณาการและเชิงพาณิชย์

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อใช้ในการเรียนการสอนและเพื่อประโยชน์ในการพัฒนาเป็นประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



## รายงานฉบับสมบูรณ์

### ชื่อโครงการวิจัย

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กและการประยุกต์ใช้ร่วมกับแผ่นฟิล์มเซลลูโลสเพื่อชะลอการเหม็นหืนในผลิตภัณฑ์เนื้อ

Antioxidant properties of crude extracts from green microalgae and applying incorporated with bacterial cellulose film for retarding oxidative rancidity in meat product

### คณะผู้วิจัย

ผศ. ลินจง สุล้ำภู  
ผศ. วีณา ชูโชติ  
รศ. ดวงใจ โอชัยกุล

IC ๓

12๗41954

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2553-2554  
(ต่อเนื่อง 2 ปี)

ประเภทงานวิจัยเชิงบูรณาการและเชิงพาณิชย์  
คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก และการประยุกต์ใช้ร่วมกับแผ่นฟิล์มเซลลูโลสเพื่อชะลอการเหม็นหืน ในผลิตภัณฑ์เนื้อ

ชื่อโครงการ (ภาษาอังกฤษ) Antioxidant properties of crude extracts from green microalgae and applying incorporated with bacterial cellulose film for retarding oxidative rancidity in meat product

แหล่งเงิน เงินรายได้ คณะวิทยาศาสตร์

ประจำปีงบประมาณ 2553-2554(2 ปีต่อเนื่อง)จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 200,000 บาท

ระยะเวลาการทำวิจัย 1 ตุลาคม 2552-30 กันยายน 2554

หัวหน้าโครงการวิจัย ผศ. ลินจง สุขลำภู

ผู้ร่วมวิจัย ผศ. วีนา ชูโชติ

รศ. ดวงใจ โอชัยกุล

หน่วยงานต้นสังกัด คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

### บทคัดย่อ

จากการนำสารสกัดด้วยน้ำร้อนและเอทานอลร้อยละ 95 ของสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก จำนวน 10 สายพันธุ์ มาประเมินปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธีทดสอบความสามารถในการกำจัดอนุมูล 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ความสามารถในการแย่งจับเฟอร์รัสไอออน และความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน พบว่าโดยทั่วไปสารสกัดด้วยเอทานอลจากสาหร่ายมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารสกัดด้วยน้ำ โดยสารสกัดด้วยเอทานอลจากสาหร่าย *Chlamydomonas* sp. W53 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงสุดเท่ากับ  $54.70 \pm 2.97$  มิลลิกรัมสมมูลย์กรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด สารสกัดด้วยเอทานอลจาก *Monoraphidium* sp. W53 แสดงความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH สูงสุด ( $EC_{50}$  เท่ากับ 1.1492 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ในขณะที่สารสกัดด้วยเอทานอลจาก *Chlorella* sp. W54 มีความสามารถในการแย่งจับเฟอร์รัสไอออนที่ดี โดยมีค่า  $C_{50}$  เท่ากับ 0.3665 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดด้วยเอทานอลจากสาหร่าย *Scenedesmus* sp. W53 และ *Chlorella* sp. ED 53 มีฤทธิ์ในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันได้สูงโดยมีร้อยละของการยับยั้งเท่ากับ  $88.79 \pm 3.54$  และ  $87 \pm 0.59$  ตามลำดับ และค่าที่ได้ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) กับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน BHT (ร้อยละ 94.42  $\pm$  1.39) ที่ได้จากการเลือกสารสกัดด้วยเอทานอลจากสาหร่าย *Scenedesmus* sp. W53 มาใช้ ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชุบแผ่นฟิล์มเซลลูโลสจากแบคทีเรียเพื่อใช้ชะลอการเกิดปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันในผลิตภัณฑ์เนื้อ โดยนำแผ่นฟิล์มเซลลูโลสมาแช่ในสารสกัดที่ความเข้มข้น 4.0 - 8.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำแผ่นฟิล์มที่ได้มาห่อหุ้มผลิตภัณฑ์กุนเชียงหมูขึ้นรูปและทำการประเมินการเกิดปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันในตัวอย่างโดยวัดจากค่า TBARS ที่เกิดขึ้นในระหว่างการเก็บรักษา ผลการทดลองพบว่าค่า TBARS ของตัวอย่างที่ห่อหุ้มด้วยแผ่นฟิล์มเซลลูโลสที่แช่สารสกัดมีค่าต่ำกว่าตัวอย่างควบคุม (ไม่ห่อหุ้มแผ่นเซลลูโลสหรือห่อหุ้มด้วยแผ่นฟิล์มเซลลูโลส) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารสกัดด้วยเอทานอลของ *Scenedesmus* sp. W53 มีศักยภาพที่จะใช้เป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติสำหรับป้องกันการเกิดปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันในอาหารได้

คำสำคัญ : สาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน แผ่นฟิล์มเซลลูโลสจากแบคทีเรีย



## Abstract

Aqueous and ethanolic extracts of 10 green microalgae strains were evaluated for total phenolic contents and antioxidant activities using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical-scavenging, ferrous ion chelating and inhibition of lipid peroxidation. In general, ethanolic extracts of algae had more phenolic contents and antioxidant activities than aqueous extracts. The ethanolic extract of *Chlamydomonas* sp. W53 found to have the highest total phenolic contents ( $54.70 \pm 2.97$  mg GAE/g extract). The maximum DPPH radical scavenging was exhibited in the ethanolic extract of *Monoraphidium* sp. W53 with  $EC_{50}$  values of  $1.1492$  mg ml<sup>-1</sup>, while the ethanolic extract of *Chlorella* sp. W54 showed good ferrous ion chelating ability with  $IC_{50}$  values of  $0.3665$  mg ml<sup>-1</sup>. In addition, the ethanolic extract of *Scenedesmus* sp. W53 and *Chlorella* sp. ED 53 showed excellent activities for inhibition of lipid peroxidation. The percentage of inhibition were  $88.97 \pm 3.54$  and  $87.96 \pm 0.59$ , respectively with no significant difference ( $p \leq 0.05$ ) of the standard antioxidant BHT ( $94.42 \pm 1.39\%$ ). Subsequently, the ethanolic extract of *Scenedesmus* sp. W53 was selected to impregnate bacterial cellulose film for retarding lipid peroxidation in meat product. The cellulose films were soaked with the ethanolic microalgal extract at the concentrations of  $4.0 - 8.0$  mg ml<sup>-1</sup> and wrapped the restructured Chinese sausages. Samples were evaluated for lipid peroxidation measured by TBARS values during storage. The results indicated that TBARS values of the samples wrapped with the ethanolic algal extract active films were significantly ( $p \leq 0.05$ ) lower than those of controls (no wrapped or wrapped with cellulose film) throughout storage time. These findings suggested that the ethanolic extract of *Scenedesmus* sp. W53 could have a potential to use as a rich source of the natural antioxidants for the protection of the foods against lipid peroxidation.

**Keywords:** green microalgae, total phenolic compounds, antioxidant activities, lipid peroxidation, bacterial cellulose film

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินรายได้ของคณะวิทยาศาสตร์ ประจำปี 2553-2554 (2 ปีต่อเนื่อง) ซึ่งสำเร็จด้วยความร่วมมือของนักศึกษาปริญญาตรี สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ขอขอบคุณผู้ช่วยวิจัย และเจ้าหน้าที่ของสาขาวิชาชีววิทยาทุกท่านที่ได้ช่วยเหลือในด้านต่างๆทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงมาด้วยดี



ผศ. ลินจง สุขสำภู  
หัวหน้าโครงการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ

|  | หน้า      |
|--|-----------|
| บทคัดย่อภาษาไทย  | I         |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ   | III       |
| กิตติกรรมประกาศ  | IV        |
| สารบัญ   | V         |
| สารบัญตาราง  | VIII      |
| สารบัญรูป  | IX        |
| <b>บทที่ 1 บทนำ</b>  | <b>1</b>  |
| 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย  | 1         |
| 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย  | 2         |
| 1.3 ขอบเขตของงานวิจัย  | 3         |
| 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย   | 3         |
| <b>บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง</b>   | <b>4</b>  |
| 2.1 สารอนุมูลอิสระ   | 4         |
| 2.2 สารต้านอนุมูลอิสระ   | 8         |
| 2.3 สาหร่ายสีเขียว   | 19        |
| 2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากสาหร่าย               | 27        |
| 2.5 เซลลูโลสจากแบคทีเรีย   | 34        |
| 2.6 บรรจุภัณฑ์แอคทีฟ (Active packaging)  | 39        |
| 2.7 กุนเชียง   | 40        |
| 2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการใช้สารสกัดจากธรรมชาติในการยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์อาหาร | 41        |
| <b>บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย</b>   | <b>44</b> |
| 3.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษา   | 44        |
| 3.2 วัตถุประสงค์   | 44        |
| 3.3 สารเคมี  | 44        |
| 3.4 อุปกรณ์  | 45        |
| 3.5 วิธีการทดลอง   | 46        |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ (ต่อ)

|   | หน้า |
|---|------|
| 3.5.1 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายน้ำจืดขนาดเล็กที่คัดแยกได้จากธรรมชาติ<br>10 สายพันธุ์   | 46   |
| 3.5.2 การสกัดสารสกัดหยาบจากสาหร่าย  | 47   |
| 3.5.3 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด<br>(Total phenolic content)   | 48   |
| 3.5.4 การประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากสาหร่าย  | 48   |
| 3.6 การประยุกต์ใช้สารสกัดจากสาหร่ายร่วมกับแผ่นฟิล์มเซลลูโลสในการยับยั้ง<br>ปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน                      | 50   |
| 3.7 การใช้สารสกัดจากสาหร่ายร่วมกับแผ่นฟิล์มเซลลูโลสในการยับยั้งปฏิกิริยา<br>ออกซิเดชันของไขมันในผลิตภัณฑ์กุนเชียงหมูชิ้นรูป | 54   |
| 3.8 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ  | 56   |
| บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล  | 57   |
| 4.1 ผลการเพาะเลี้ยงสาหร่ายน้ำจืดขนาดเล็กที่คัดแยกได้จากธรรมชาติ<br>10 สายพันธุ์   | 57   |
| 4.2 ผลได้ของสารสกัดหยาบจากสาหร่ายขนาดเล็ก 10 สายพันธุ์  | 62   |
| 4.3 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content)  | 68   |
| 4.4 การประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากสาหร่าย 10 สายพันธุ์   | 73   |
| 4.4.1 ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH (Scavenging activity<br>on DPPH radical)   | 73   |
| 4.4.2 การวิเคราะห์ความสามารถในการแย่งจับกับเฟอร์รัสไอออน (Ferrous<br>ion chelating ability assay)                           | 77   |
| 4.4.3 ความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันด้วยวิธี<br>Thiobarbituric acid reactive substance              | 80   |
| 4.5 การประยุกต์ใช้สารสกัดจากสาหร่ายร่วมกับแผ่นฟิล์มเซลลูโลสจากแบคทีเรียใน<br>การยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน     | 85   |
| 4.5.1 การเตรียมเซลลูโลสที่ได้จากการหมักของเชื้อ <i>Gluconacetobacter xylinus</i><br>TISTR 976                               | 86   |

## สารบัญ (ต่อ)

|  | หน้า |
|--|------|
| 4.5.2 ความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันของสารสกัด<br>ด้วยเอทานอลจากสาหร่าย <i>Scenedesmus</i> sp. W53 ที่ความเข้มข้นต่างๆ                       | 87   |
| 4.5.3 การศึกษาความเข้มข้นของสารสกัดจากสาหร่ายร่วมกับแผ่นฟิล์มเซลลูโลสใน<br>การยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน  | 89   |
| 4.6 การประยุกต์ใช้สารสกัดจากสาหร่าย <i>Scenedesmus</i> sp. W53 ร่วมกับแผ่นฟิล์ม<br>เซลลูโลสในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันในผลิตภัณฑ์กุนเชียงหมูชิ้นรูป | 90   |
| บทที่ 5 สรุปผลวิจัยและข้อเสนอแนะ   | 96   |
| บรรณานุกรม   | 98   |
| ภาคผนวก ก  | 108  |
| ภาคผนวก ก-1  | 108  |
| ภาคผนวก ก-2  | 109  |
| ภาคผนวก ก-3  | 109  |
| ภาคผนวก ก-4  | 110  |
| ภาคผนวก ก-5  | 111  |
| ภาคผนวก ข  | 112  |
| ภาคผนวก ข-1  | 112  |

## สารบัญตาราง

| ตารางที่  | หน้า |
|---|------|
| 3.1 ส่วนผสมในการทำกุนเชียงขึ้นรูป   | 55   |
| 4.1 ร้อยละของผลได้และลักษณะของสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยน้ำร้อนจากสาหร่ายสีเขียวจำนวน 10 สายพันธุ์  | 65   |
| 4.2 ร้อยละของผลได้และลักษณะของสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยเอทานอลจากสาหร่ายสีเขียวจำนวน 10 สายพันธุ์  | 67   |
| 4.3 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดด้วยน้ำจากสาหร่ายจำนวน 10 สายพันธุ์  | 69   |
| 4.4 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดด้วยเอทานอลจากสาหร่าย 10 สายพันธุ์   | 71   |
| 4.5 ร้อยละของความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันของสารสกัดด้วยน้ำจากสาหร่าย 10 สายพันธุ์และสารมาตรฐาน BHT ที่ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร     | 81   |
| 4.6 ร้อยละของความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันของสารสกัดด้วยเอทานอลจากสาหร่าย 10 สายพันธุ์และสารมาตรฐาน BHT ที่ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร | 82   |
| 4.7 ร้อยละของการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันของสารสกัดจากสาหร่ายที่ความเข้มข้นต่างๆ  | 87   |
| 4.8 ร้อยละของการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันของ BHT ที่ความเข้มข้นต่างๆ  | 88   |
| 4.9 ร้อยละของการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันของแผ่นเซลลูโลสที่แ่สารสกัดจากสาหร่ายที่ความเข้มข้นต่างๆ   | 89   |
| 4.10 ค่า TBARS ของตัวอย่างกุนเชียงหมูขึ้นรูปในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 15 วัน  | 93   |
| 4.11 ค่า TBARS ที่เพิ่มขึ้นของตัวอย่างกุนเชียงหมูขึ้นรูปในวันที่ 15 ของการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส  | 95   |

## สารบัญรูป

| รูปที่ | หน้า   |    |
|--------|--|----|
| 2.1    | อนุมูลอิสระ และการเกิดปฏิกิริยากับสารโมเลกุลอื่น   | 4  |
| 2.2    | กลไกการต้านอนุมูลอิสระของสารต้านออกซิเดชัน   | 9  |
| 2.3    | สูตรโครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิกแบบง่ายบางชนิด   | 11 |
| 2.4    | โครงสร้างทางเคมีของ Gallic acid  | 13 |
| 2.5    | โครงสร้างทางเคมีของ EDTA   | 14 |
| 2.6    | โครงสร้างของบิวไทเลตไฮดรอกซีโทลูอิน  | 15 |
| 2.7    | ปฏิกิริยาระหว่างสารต้านอนุมูลอิสระกับอนุมูลอิสระ DPPH  | 16 |
| 2.8    | ปฏิกิริยาการเกิดทีบีเออาร์เอส (TBARS)  | 19 |
| 2.9    | ลักษณะเซลล์ของ <i>Chlorococcum</i> sp.   | 22 |
| 2.10   | ลักษณะเซลล์ของ <i>Ankistrodesmus</i> sp.   | 23 |
| 2.11   | ลักษณะเซลล์ของ <i>Chlorella</i> sp.  | 23 |
| 2.12   | ลักษณะเซลล์ของ <i>Monoraphidium</i> sp.  | 24 |
| 2.13   | ลักษณะเซลล์ของ <i>Scenedesmus</i> sp.  | 26 |
| 2.14   | ลักษณะเซลล์ของ <i>Chlamydomonas</i> sp.  | 27 |
| 2.15   | โครงสร้างทางเคมีของเซลล์ูโลส   | 34 |
| 2.16   | เส้นใยเซลล์ูโลสที่ผลิตโดย <i>A. xylinum</i> เมื่อส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (กำลังขยาย 10,000 เท่า): (ก) เส้นใยเซลล์ูโลสที่ถูกปล่อยออกจากเซลล์ (ครี): (ข) เส้นใยเซลล์ูโลสล้อมรอบ และหุ้มตัวเซลล์ | 35 |
| 2.17   | ขั้นตอนการผลิตเซลล์ูโลสจากแบคทีเรีย <i>A. xylinum</i>  | 37 |
| 2.18   | ลักษณะของเซลล์ูโลสจากแบคทีเรีย   | 37 |
| 2.19   | ลักษณะของแบคทีเรียเซลล์ูโลสที่นำมาใช้ประโยชน์: (ก), (ข) ลักษณะสด; (ค), (ง) ลักษณะแห้งจากกระบวนการทำแห้งแบบ Freeze - dried  | 38 |
| 4.1    | ลักษณะเซลล์ของ <i>Ankistrodesmus</i> sp. W53 ที่กำลังขยายของภาพ 400 เท่า   | 57 |
| 4.2    | ลักษณะเซลล์ของ <i>Chlamydomonas</i> sp. W53 ที่กำลังขยายของภาพ 400 เท่า  | 58 |

## สารบัญรูป (ต่อ)

| รูปที่   | หน้า |
|--|------|
| 4.3 ลักษณะเซลล์ของ <i>Chlorella</i> sp. E53 ที่กำลังขยายของภาพ 400 เท่า  | 58   |
| 4.4 ลักษณะเซลล์ของ <i>Chlorella</i> sp. ED53 ที่กำลังขยายของภาพ 400 เท่า   | 59   |
| 4.5 ลักษณะเซลล์ของ <i>Chlorella</i> sp. W53 ที่กำลังขยายของภาพ 400 เท่า  | 59   |
| 4.6 ลักษณะเซลล์ของ <i>Chlorella</i> sp. W54 ที่กำลังขยายของภาพ 400 เท่า  | 60   |
| 4.7 ลักษณะเซลล์ของ <i>Chlorella</i> sp. W55 ที่กำลังขยายของภาพ 400 เท่า  | 60   |
| 4.8 ลักษณะเซลล์ของ <i>Chlorococcum</i> sp. C53 ที่กำลังขยายของภาพ 400 เท่า   | 61   |
| 4.9 ลักษณะเซลล์ของ <i>Monoraphidium</i> sp. W53 ที่กำลังขยายของภาพ 400 เท่า  | 61   |
| 4.10 ลักษณะเซลล์ของ <i>Scenedesmus</i> sp. W53 ที่กำลังขยายของภาพ 400 เท่า   | 62   |
| 4.11 ปริมาณผลได้และลักษณะของสารสกัดด้วยน้ำร้อนจากสาหร่ายจำนวน 10 สายพันธุ์   | 64   |
| 4.12 ปริมาณผลได้ของสารสกัดด้วยเอทานอลจากสาหร่ายจำนวน 10 สายพันธุ์  | 66   |
| 4.13 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกรดแกลลิกและค่าการดูดกลืนแสงที่ 760 นาโนเมตร   | 68   |
| 4.14 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด(มิลลิกรัมสมมูลย์กรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัดของสารสกัดด้วยน้ำร้อนและเอทานอลจากสาหร่าย จำนวน 10 สายพันธุ์ | 72   |
| 4.15 ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ( $EC_{50}$ ) ของสารสกัดด้วยน้ำจากสาหร่าย 10 สายพันธุ์                                       | 74   |
| 4.16 ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ( $EC_{50}$ ) ของสารสกัดด้วยเอทานอลจากสาหร่ายจำนวน 10 สายพันธุ์                              | 75   |
| 4.17 ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ( $EC_{50}$ ) ของสารสกัดด้วยเอทานอลและน้ำจากสาหร่าย 10 สายพันธุ์                             | 75   |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญรูป (ต่อ)

| รูปที่  | หน้า |
|---|------|
| 4.18 ความสามารถในการแย่งจับเฟอร์รัสไอออน ( $IC_{50}$ ) (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ของสารสกัดด้วยน้ำจากสาหร่าย 10 สายพันธุ์   | 78   |
| 4.19 ความสามารถในการแย่งจับเฟอร์รัสไอออน ( $IC_{50}$ ) (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ของสารสกัดด้วยเอทานอลจากสาหร่าย 10 สายพันธุ์                                       | 79   |
| 4.20 ความสามารถในการแย่งจับเฟอร์รัสไอออน ( $IC_{50}$ ) (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ของสารสกัดด้วยน้ำและเอทานอลจากสาหร่าย 10 สายพันธุ์                                 | 80   |
| 4.21 ร้อยละของความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันของสารสกัดด้วยน้ำร้อนและเอทานอลจากสาหร่ายขนาดเล็ก 10 สายพันธุ์                                | 84   |
| 4.22 ลักษณะของแผ่นเซลล์โลสที่ได้จากการหมักเชื้อ <i>Gluconacetobacter xylinus</i> TISTR 976  | 86   |
| 4.23 ลักษณะของแผ่นฟิล์มเซลล์โลสที่ได้จากการรีดน้ำออกจากแผ่นเซลล์โลสด้วยเครื่องรีดน้ำ  | 86   |
| 4.24 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดจากสาหร่าย <i>Scenedesmus</i> sp. W53 และร้อยละของการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน                     | 88   |
| 4.25 ร้อยละของการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันโดยใช้สารสกัดจากสาหร่ายที่ความเข้มข้น 4 6 และ 8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร                                     | 90   |
| 4.26 การเปลี่ยนแปลงค่า TBARS (มิลลิกรัมมาโลนัลดีไฮด์ต่อกิโลกรัมตัวอย่าง) ของกุนเชียงหมูชิ้นรูปทรีเหลี่ยมต่างๆ ที่เก็บรักษาอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 วัน | 94   |

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

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

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

วันมะพร้าวหรือเซลลูโลสที่ผลิตจากแบคทีเรีย (Bacterial cellulose) เป็นผลิตภัณฑ์ที่เตรียมได้จากการหมักในอาหารน้ำมะพร้าวด้วยเชื้อ *Gluconacetobacter xylinus* (ชื่อเดิม *Acetobacter xylinum*) ซึ่งจะสร้างแผ่นฟิล์มสีขาว หรือครีมที่บริเวณส่วนบนของผิวหน้าอาหารน้ำมะพร้าว แผ่นเซลลูโลสมีเส้นใยประสานกันคล้ายร่างแห มีคุณสมบัติเป็นไฮโดรฟิลิก (hydrophilic) สามารถอุ้มน้ำได้ดีจึงทำให้สามารถดูดซับสารต่างๆ ไว้ในเส้นใยได้ (วรารุณ, 2551) และมีการนำแผ่นฟิล์มเซลลูโลสไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆเช่นการใช้แผ่นฟิล์มร่วมกับสารสกัดโรสแมรี่ในการทำเป็น Active packaging ของผลิตภัณฑ์เนื้อแกะ (Camo และคณะ, 2008) การใช้แผ่นฟิล์มเซลลูโลสร่วมกับสารสกัดจากออริกานในการทำเป็น Active packaging ของผลิตภัณฑ์เนื้อวัว (Camo และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อใช้ในการศึกษาวิจัยเท่านั้น ไม่สามารถนำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

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

เนื่องจากงานวิจัยที่ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กจากแหล่งน้ำธรรมชาติในประเทศไทยยังมีค่อนข้างน้อย ดังนั้นโครงการวิจัยนี้มีแนวคิดที่จะทำการสกัดสารสกัดจากสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กที่คัดแยกจากแหล่งน้ำธรรมชาติจำนวน 10 สายพันธุ์และทดสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านออกซิเดชันของสารสกัดที่ได้ จากนั้นคัดเลือกสารสกัดจากสาหร่ายสายพันธุ์ที่แสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงมาเพียง 1 สายพันธุ์เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ร่วมกับเซลล์ลูโลสที่ได้จากแบคทีเรียเพื่อผลิตเป็น Active packaging ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันในผลิตภัณฑ์กุนเชียงหมูขึ้นรูป ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์เนื้อที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบค่อนข้างสูง และมักเกิดการเหม็นหืนได้ง่าย ทำให้ช่วยยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ได้นานขึ้นรวมทั้งลดการเติมสารกันหืนสังเคราะห์

## 1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

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

2. วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจากสารสกัดด้วยน้ำและเอทานอลที่ได้จากสาหร่ายทั้ง 10 สายพันธุ์

3. ประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดด้วยน้ำและเอทานอลจากสาหร่าย 10 สายพันธุ์ด้วยวิธีการต่างๆ ได้แก่ ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH (Scavenging activity on DPPH radical) ความสามารถในการแย่งจับกับเฟอร์รัสไอออน (Ferrous ion chelating ability assay) และความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันด้วยวิธี Thiobarbituric acid reactive substance

4. ศึกษาความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันของสารสกัดจากสาหร่ายสายพันธุ์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงร่วมกับแผ่นฟิล์มเซลล์ลูโลส

5. ประยุกต์ใช้สารสกัดจากสาหร่ายสายพันธุ์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงร่วมกับแผ่นฟิล์มเซลล์ลูโลสในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันในผลิตภัณฑ์กุนเชียงหมูขึ้นรูปในระหว่างการเก็บรักษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 1.3 ขอบเขตการวิจัย

ทำการสกัดสารสกัดหยาบจากสาหร่ายที่คัดแยกจากแหล่งน้ำธรรมชาติภายในสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังจำนวน 10 สายพันธุ์ ได้แก่ *Ankistrodesmus* sp. W53, *Chlamydomonas* sp. W53, *Chlorella* sp. E53, *Chlorella* sp. ED53, *Chlorella* sp. W53, *Chlorella* sp. W54, *Chlorella* sp. W55, *Chlorococcum* sp. C53, *Monoraphidium* sp. W53 และ *Scenedesmus* sp. W53 โดยใช้ตัวทำละลาย 2 ชนิด คือน้ำร้อนและเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 จากนั้นนำสารสกัดหยาบที่ได้มาทำการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดโดยใช้วิธีทดสอบ 3 วิธี ได้แก่ ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH (Scavenging activity on DPPH radical) ความสามารถในการแย่งจับกับเฟอร์รัสไอออน (Ferrous ion chelating ability assay) และศึกษาความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันของสารสกัดจากสาหร่ายสายพันธุ์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงมาประยุกต์ใช้ร่วมกับแผ่นฟิล์มเซลลูโลสในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันในผลิตภัณฑ์กุนเชียงหมูขึ้นรูปในระหว่างการเก็บรักษา

### 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีต่างๆของสารสกัดจากสาหร่ายทั้ง 10 สายพันธุ์ สามารถนำมาใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการวิจัยประยุกต์ด้านอื่นๆต่อไป นอกจากนี้อาจนำเอาสารสกัดจากสาหร่ายสายพันธุ์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงมาเป็นสารสกัดจากธรรมชาติทดแทนสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์เพื่อใช้ยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันในผลิตภัณฑ์ที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบทำให้ยืดอายุการเก็บผลิตภัณฑ์เนื้อให้ได้นานขึ้น และมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค

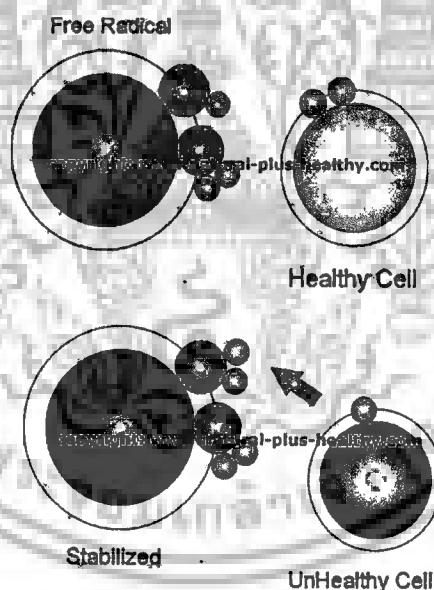
## บทที่ 2

### ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 สารอนุมูลอิสระ (โสภา และคณะ, 2549)

##### 2.1.1 ความหมายของสารอนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ คือ อะตอม โมเลกุล หรือสารประกอบที่มีอิเล็กตรอนเดี่ยวอยู่ในออร์บิทัลวงนอกสุดของอะตอม หมายถึงอะตอมของไฮโดรเจนและไอออนของโลหะทรานซิชันส่วนใหญ่ นอกจากนี้ยังรวมถึงโมเลกุลของออกซิเจนซึ่งนับว่าเป็นอนุมูลเพราะอิเล็กตรอนจำนวน 2 อิเล็กตรอนซึ่งแยกกันอยู่เป็นอิเล็กตรอนเดี่ยวในแต่ละวงโคจรหรือออร์บิทัล อนุมูลที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำจะไวต่อการเกิดปฏิกิริยามากกว่าอนุมูลที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง เนื่องจากอิเล็กตรอนเดี่ยวจะไม่เสถียรและพยายามจับคู่กับอิเล็กตรอนเดี่ยวอื่น ดังนั้นอนุมูลอิสระจึงมีคุณสมบัติจำเพาะ คือ มีความไวสูงในการเกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลของสารข้างเคียง หากร่างกายไม่สามารถควบคุมได้ ปฏิกิริยาจะเกิดต่อเนื่องเป็นลูกโซ่ ส่งผลให้มีอนุมูลอิสระหลายล้านโมเลกุลเกิดขึ้นในช่วงพริบตา แสดงให้เห็นการเปิดปฏิกิริยาดังรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 อนุมูลอิสระ และการเกิดปฏิกิริยากับสารโมเลกุลอื่น

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อนุมูลอิสระที่เป็นกลาง (neutral radical) เช่น อนุมูลอิสระของ peroxy radical (ROO<sup>•</sup>) เป็นต้น สามารถแบ่งชนิดอนุมูลอิสระที่มีบทบาทสำคัญทางชีววิทยาเป็น 4 กลุ่ม ดังนี้

1. Reactive oxygen species (ROS) หมายถึง สารก่อปฏิกิริยาที่ประกอบด้วยอะตอมออกซิเจนซึ่งเป็นสารอนุมูลอิสระ เช่น superoxide anion radical (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), hydroxyl radical (HO<sup>•</sup>) และที่ไม่ใช่อนุมูลอิสระแต่มีคุณสมบัติในการออกซิไดซ์หรือถูกเปลี่ยนเป็นอนุมูลอิสระได้ง่าย เช่น hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), hypochlorous acid (HOCl) และ ozone (O<sub>3</sub>) เป็นต้น

2. Reactive nitrogen species (RNS) หมายถึง สารก่อปฏิกิริยาที่ประกอบด้วยอะตอมไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญ เช่น nitric oxide radical (NO<sup>•</sup>) และ nitrogen dioxide radical (NO<sub>2</sub><sup>•</sup>) เป็นต้น

3. Reactive chlorine species (RCS) หมายถึง สารก่อปฏิกิริยาที่ประกอบด้วยอะตอมคลอรีน เช่น hypochlorous acid (HOCl) และ nitryl chloride (NO<sub>2</sub>Cl) เป็นต้น

4. Reactive bromine species (RBS) หมายถึง สารก่อปฏิกิริยาที่ประกอบด้วยอะตอมโบรมีน เช่น hypobromous (HOBr) และ bromine gas (Br<sub>2</sub>)

### 2.1.2 การเกิดสารอนุมูลอิสระ

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

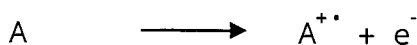
1. การแตกของพันธะโคเวเลนต์แบบโฮโมไลซิส



2. การเพิ่มอิเล็กตรอน 1 ตัวให้แก่อะตอมที่เป็นกลางทางไฟฟ้า



3. การสูญเสียอิเล็กตรอน 1 ตัวจากอะตอมที่เป็นกลางทางไฟฟ้า



สาเหตุการเกิดอนุมูลอิสระในร่างกายของมนุษย์แบ่งได้เป็น 2 แบบ คือ

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยังสามารถรวมตัวกับสารบางชนิดในร่างกายก่อให้เกิดสารพิษที่ทำลายเนื้อเยื่อ หรืออาจไปเปลี่ยนแปลงข้อมูลทางพันธุกรรมในดีเอ็นเอ ทำให้เซลล์ปกติเปลี่ยนสภาพไปเป็นเซลล์มะเร็ง เป็นต้น

2. อนุมูลอิสระที่มาจากนอกร่างกาย เกิดได้หลายปัจจัยด้วยกันคือ จากการได้รับเชื้อโรค เช่นการติดเชื้อไวรัสหรือเชื้อแบคทีเรีย โรคเกี่ยวกับภูมิคุ้มกัน (Autoimmune Diseases) เช่น ข้ออักเสบ รูมาตอยด์ จากรังสี เช่น รังสีอัลตราไวโอเล็ต รังสีเอ็กซ์ รังสีแกมมา จากมลภาวะ เช่นควันบุหรี่ แก๊สจากท่อไอเสียรถยนต์ จากกระบวนการประกอบอาหาร เช่น การย่างเนื้อสัตว์ ที่มีส่วนประกอบของไขมันสูง การนำน้ำมันที่ใช้ทอดอาหารที่มีอุณหภูมิสูงๆกลับมาใช้อีก จากยาบางชนิด เช่น โดโซรูบิซิน (Doxorubicin) เพนนิซิลามิน (Penicillamine) พาราเซตามอล (Paracetamol) เป็นต้น

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

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

### 2.1.3 การเกิดออกซิเดชันในอาหาร

ปฏิกิริยาออกซิเดชันของน้ำมันและไขมัน มีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมอาหารมาก เนื่องจากเป็นสาเหตุให้เกิดกลิ่นเหม็นหืนและเป็นปฏิกิริยาที่สามารถเกิดขึ้นได้เอง หรือ ออกซิเดชัน (Auto-oxidation) โดยออกซิเจนเป็นตัวการสำคัญที่ทำให้ผลิตภัณฑ์ไขมันและน้ำมันเกิดปฏิกิริยาที่พันธะคู่ของกรดไขมันไม่อิ่มตัว ยิ่งถ้ามีพันธะคู่มากปฏิกิริยาออกซิเดชันจะยิ่งเกิดขึ้นได้เร็วมากอีกด้วย ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเป็นแบบลูกโซ่ของกรดไขมันไม่อิ่มตัวกับออกซิเจนและอนุมูลอิสระ เกิดเป็นสารไฮโดรเปอร์ออกไซด์ (Hydroperoxide) สารเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นนี้จะสลายเป็นสารที่มีโมเลกุลเล็กๆ ที่ทำให้มีกลิ่นเหม็นหืนและเกิดเป็นสารอนุมูลอิสระที่เริ่มต้นของปฏิกิริยาลูกโซ่ต่อไปอีกด้วย (สุภาร, 2552)

#### ปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระในอาหาร

กลไกการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของน้ำมันและไขมันในอาหารเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (Chain reaction) สามารถแบ่งออกเป็นขั้นต่างๆได้ 3 ขั้นตอนเหมือนการเกิดอนุมูลอิสระภายในเซลล์สิ่งมีชีวิตและมีรายละเอียดดังนี้ (ศิวพร, 2546)

#### 1. ปฏิกิริยาขั้นต้น (Initiation step)

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



2. กรดไขมันอิสระ – กรดไขมันที่อยู่ในรูปอิสระ (Free fatty acid) จะถูกออกซิไดส์ได้ง่ายกว่าที่อยู่ในรูปไตรกลีเซอไรด์

3. ปริมาณออกซิเจนและพื้นที่ผิวที่สัมผัสกับออกซิเจน ออกซิเจนเข้าร่วมในปฏิกิริยาออกซิเดชัน หากอาหารอยู่ในบรรยากาศมีปริมาณออกซิเจนมาก หรือมีพื้นที่ผิวที่สัมผัสกับออกซิเจนได้มาก ก็จะทำให้เกิดปฏิกิริยาได้รวดเร็ว ดังนั้นการกำจัดออกซิเจนออกจากบรรจุภัณฑ์ด้วยการบรรจุสุญญากาศ (Vacuum packaging) การบรรจุแบบปรับสภาพบรรยากาศ (Modified atmosphere packaging) หรือใช้สารกำจัดออกซิเจน (Oxygen scavenger) ในบรรจุภัณฑ์จะช่วยชะลอการเสื่อมเสียได้

4. อุณหภูมิ อุณหภูมิสูงจะเร่งให้เกิดปฏิกิริยาได้เร็วกว่าอุณหภูมิต่ำ การเก็บอาหารแช่เย็น แช่แข็ง (Freezing) จะลดอัตราการเกิดปฏิกิริยาได้

5. วอเตอร์แอกทิวิตี้ (Water activity) ของอาหาร

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

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

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

## 2.2 สารต้านอนุมูลอิสระ

### 2.2.1 ความหมายของสารต้านอนุมูลอิสระ

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



ออกซิเดชัน โดยจะเข้าทำปฏิกิริยากับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ อนุมูล hydroxyl และอนุมูล peroxy นอกจากนี้วิตามินซีสามารถยังทำหน้าที่เป็นตัวส่งเสริมประสิทธิภาพของสารต้านออกซิเดชันของวิตามินอีด้วย โดยทำให้อนุมูล  $\alpha$ -tocopherol $\cdot$  (TO $\cdot$ ) เปลี่ยนกลับไปเป็น  $\alpha$ -tocopherol (TOH) ดังเดิม ดังสมการ



### 3. วิตามินอี

วิตามินอีเป็นวิตามินที่ละลายได้ในไขมัน เป็นสารต้านออกซิเดชันที่สำคัญ โดยวิตามินอีทำงานร่วมกับสารต้านออกซิเดชันตัวอื่นๆ เช่น วิตามินซีและซีลีเนียม เป็นต้น วิตามินอีช่วยปรับให้ร่างกายสามารถนำวิตามินเอมาใช้ ช่วยในการป้องกันสารที่เป็นพิษที่มีผลมาจากโลหะ เช่น ตะกั่ว ในธรรมชาติมีวิตามินอีอยู่หลายชนิด ปัจจุบันแบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ โทโคฟีรอล และ โทโคโทอินอล แต่ละกลุ่มยังแยกเป็นวิตามินย่อยๆ อีก 4 ชนิด ได้แก่ อัลฟา ( $\alpha$ -) เบต้า ( $\beta$ -) แกมมา ( $\gamma$ -) และเดลต้า ( $\delta$ -) วิตามินอี ทำหน้าที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอนแก้อนุมูล peroxy ดังสมการ



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



### 4. ซีลีเนียม ทองแดง และสังกะสี

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

### 5. แคโรทีนอยด์

แคโรทีนอยด์เป็นรงควัตถุที่พบทั่วไปในธรรมชาติ จะถูกสังเคราะห์ขึ้นใน คลอโรพลาสต์ของพืช และพบมากในผักและผลไม้สุก โครงสร้างพื้นฐานของแคโรทีนอยด์ประกอบด้วยโครงสร้างหลักที่เรียกว่า tetraterpene skeleton ซึ่งอาจมีวงแหวนห้าหรือหกเหลี่ยม ก็ได้ ที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

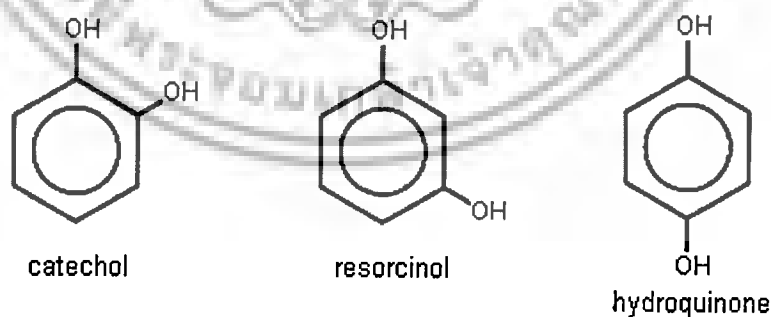
บริเวณปลายด้านใดด้านหนึ่งหรือทั้งสองด้านของโมเลกุล แคโรทีนอยด์สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ตามองค์ประกอบของโครงสร้างโมเลกุล ดังนี้

1. แคโรทีน (Carotene) เป็นแคโรทีนอยด์ที่โครงสร้างโมเลกุล ประกอบด้วย คาร์บอนและไฮโดรเจนเท่านั้น เช่น เบต้าแคโรทีน ( $\beta$ -carotene) อัลฟาแคโรทีน ( $\alpha$ -carotene) แกมมาแคโรทีน ( $\gamma$ -carotene) ลีโคปีน (lycopene) เป็นต้น และซึ่ง เบต้าแคโรทีน เป็นสารตั้งต้นของวิตามินเอ การเปลี่ยนรูปจากเบต้าแคโรทีนไปเป็นวิตามินเอโดยการแตกพันธะคู่ที่ตำแหน่งกึ่งกลางของโมเลกุล โดยเอนไซม์ carotene deoxygenase เมื่อเบต้าแคโรทีน สามารถดักจับอนุมูลอิสระเข้าไว้ในโมเลกุลแล้ว โมเลกุลของเบต้าแคโรทีนจะอยู่ในลักษณะที่มีความเสถียร

2. ออกโซแคโรทีนอยด์ หรือ แซนโทฟิล เป็นแคโรทีนอยด์ที่โครงสร้างโมเลกุล บริเวณวงแหวนประกอบด้วยกลุ่มอื่นนอกเหนือจากคาร์บอนและไฮโดรเจน เช่น เบต้าคริปโทแซนทิน ( $\beta$ -cryptoxanthin) และลูทีน (lutein)

#### 6. สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds)

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



รูปที่ 2.3 สูตรโครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิกแบบง่ายบางชนิด

ที่มา : [http://www.dss.go.th/dssweb/st-articles/files/pep\\_12\\_2546\\_phenolic.pdf](http://www.dss.go.th/dssweb/st-articles/files/pep_12_2546_phenolic.pdf)

สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารกลุ่มใหญ่มีสูตรโครงสร้างและคุณสมบัติแตกต่างกันในสามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มได้ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

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

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

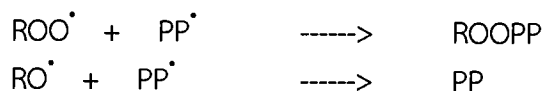
4 ฟลาโวนอยด์ (flavonoid) เป็นสารประกอบกลุ่มใหญ่ มีสูตรโครงสร้างคือ  $-C_6-C_3-C_6-$  หรือ  $-C_6-C_1-C_6-$  หรือ  $-C_6-C_2-C_6-$  (C6 คือ หมู่ฟีนอล) พบมากในชา มะนาว ไวน์ เปลือกของผลไม้ต่างๆ ผักใบเขียว สารในกลุ่มนี้ได้แก่ flavanes, flavanones, flavanols, flavones, flavonols, anthocyanidins, isoflavanes,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

ความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอล

คุณสมบัติของสารประกอบฟีนอลที่ได้รับความสนใจมากในปัจจุบัน คือ การเป็นสารต้านออกซิเดชันหรือสารต้านอนุมูลอิสระ และการใช้สารประกอบฟีนอลในการป้องกันโรคต่างๆ โดยสารประกอบฟีนอลจะทำหน้าที่กำจัดอนุมูลอิสระและไอออนของโลหะที่สามารถเร่งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันและโมเลกุลอื่นๆ ด้วยการให้อะตอมไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระอย่างรวดเร็ว ดังปฏิกิริยาต่อไปนี้



เมื่อสารประกอบฟีนอลให้อะตอมไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระไปแล้ว อนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลจะค่อนข้างมีเสถียรภาพ ดังนั้นจึงไม่ทำปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นต่อไป ยิ่งไปกว่านั้นอนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลบางชนิดยังคงสามารถรวมตัวกับอนุมูลอิสระอื่นได้อีกด้วยจึงทำให้สารประกอบฟีนอลสามารถลดจำนวนอนุมูลอิสระได้ถึงสองเท่าดังปฏิกิริยาต่อไปนี้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พบว่าสารประกอบฟีนอลหลายชนิดมีสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชัน เช่น ฟลาโวนอยด์ กรดฟีนอลิก และ แทนนิน เป็นต้น สารประกอบฟีนอลิกทำหน้าที่เป็นตัวจับอนุมูลอิสระที่สำคัญคือ อนุมูล peroxy (Packer และคณะ, 1999) โดยมีกลไก 2 แบบคือ เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีความเข้มข้นต่ำเมื่อเทียบกับสารออกซิไดซ์ สารประกอบฟีนอลิกจะป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน นอกจากนี้ อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาจะถูกทำให้เป็นสารที่มีความเสถียร ดังนั้นจึงสามารถป้องกันการเกิดขึ้นตอนพลอพาเกินได้ นอกจากนี้สารประกอบฟีนอลิกบางชนิดยังทำหน้าที่เป็นสารคีเลต ดักจับไอออนของโลหะเข้าไว้ในโมเลกุล เช่น เคอร์ซีทิน (quercetin)

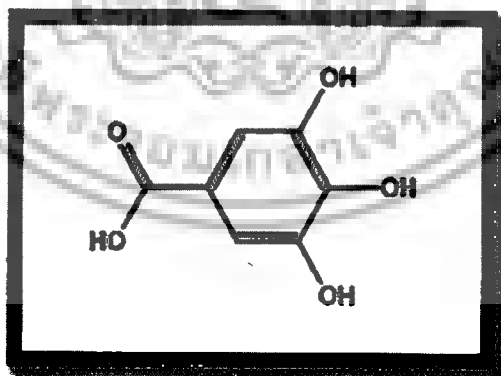
สารประกอบฟีนอลิกยังทำหน้าที่ทั้งเป็นสารให้อิเล็กตรอน หรือเป็นตัวให้อิโตรเจน และกำจัดออกซิเจนที่อยู่ในรูปแอกทีฟ ด้วยหน้าที่ต่างๆ ดังกล่าวจึงทำให้สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารต้านออกซิเดชัน ที่สำคัญชนิดหนึ่งในพืชทั่วไป

#### 2.2.4 สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์

สารต้านอนุมูลอิสระหรือสารต้านออกซิเดชันที่พัฒนาสังเคราะห์ขึ้นส่วนใหญ่จะออกแบบให้มีโมเลกุลขนาดเล็ก และใช้โครงสร้างของสารต้านออกซิเดชันที่มีในธรรมชาตินำมาดัดแปลงให้มีคุณสมบัติทางเคมีและมีฤทธิ์ที่ดีขึ้น เช่น สารต้านออกซิเดชันที่พัฒนามาจากโครงสร้างของวิตามินอี และโครงสร้างสารโพลีฟีนอล ตัวอย่างของสารต้านออกซิเดชันสังเคราะห์ เช่น

##### 1. Gallic acid

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



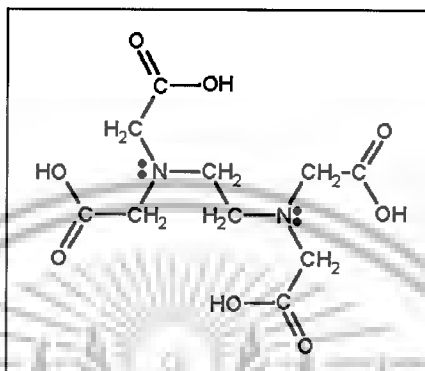
รูปที่ 2.4 โครงสร้างทางเคมีของ Gallic acid

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2. EDTA

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



รูปที่ 2.5 โครงสร้างทางเคมีของ EDTA

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

## 3. BHA

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

จากประวัติความเป็นมา จะเห็นว่า Salicylic acid ซึ่งใช้ชื่อในการโฆษณาว่า BHA ไม่ใช่สารใหม่ แต่เป็นสารที่มีการใช้มานานแล้ว โดยเฉพาะการใช้ในทางการแพทย์และเครื่องสำอาง

## 4. Butylated hydroxytoluene (BHT)

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

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

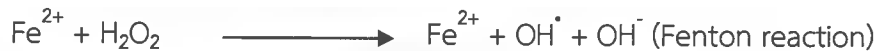




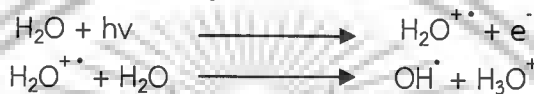
## 2. วิธี Hydroxyl (OH) radical scavenging activity

Hydroxyl radical (OH<sup>•</sup>) เป็นอนุมูลอิสระที่ว่องไว สามารถโจมตีชีวโมเลกุลที่สำคัญในร่างกายโดยการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่อย่างต่อเนื่อง สิ่งมีชีวิตสามารถสร้าง OH<sup>•</sup> radical โดย 2 กลไกได้แก่

1) ปฏิกิริยาของไฮดรอกซิลไอออนโลหะทรานซิชันกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) แม้ว่าเกลือของโลหะทรานซิชันทั่วไปทำปฏิกิริยากับ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ได้ OH<sup>•</sup> แต่ในร่างกายนั้น เป็นไปได้ว่าเกิดจากเหล็ก Fe<sup>2+</sup> ทำปฏิกิริยากับ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ได้ OH<sup>•</sup> โดยเรียกปฏิกิริยานี้ว่า Fenton reaction ดังสมการ



2) การแตกตัวของน้ำ เนื่องจากการถูกแสงหรือรังสี ดังสมการ



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

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

## 3. วิธี Metal chelating activity

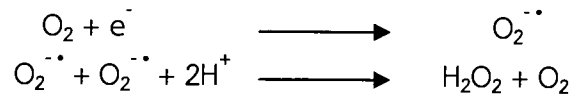
การวัดความสามารถในการแย่งจับกับโลหะเป็นวิธีหนึ่งที่ยิยมใช้ในการหาความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสารที่ต้องการทดสอบ เพราะโลหะไอออนเป็นตัวการสำคัญในการเร่งปฏิกิริยาทำให้เกิดอนุมูลอิสระต่างๆมากมายหลายชนิด โดยเฉพาะธาตุเหล็กที่อยู่ในรูปเฟอร์รัส หรือ Fe<sup>2+</sup> จะทำปฏิกิริยาออกซิเดชันกับออกซิเจนในอากาศ เกิดเป็นอนุมูล Superoxide anion radical (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระตัวเริ่มต้นที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระตัวอื่นๆต่อไป ดังนั้นวิธีการวัดความสามารถในการแย่งจับโลหะ Fe<sup>2+</sup> ของสารที่ต้องการทดสอบนั้น อาศัยจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ 562 nm ที่มีค่าลดลง โดยเมื่อเติมสาร Ferrozine ลงไป สารนี้จะไปจับกับ Fe<sup>2+</sup> แล้วอยู่ในรูป Ferrozine - Fe<sup>2+</sup> complex ซึ่งจะให้สีแดง และถ้าสารที่ต้องการทดสอบมีความสามารถในการแย่งจับกับ Fe<sup>2+</sup> จะอยู่ในรูป Antioxidant - Fe<sup>2+</sup> complex แล้วจะทำให้สีแดงของ Ferrozine - Fe<sup>2+</sup> complex จางลงได้ เมื่อได้ค่าการดูดกลืนแสงแล้วนำไปคำนวณหา % inhibition ตามสมการ

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4. วิธี Superoxide radical scavenging

Superoxide anion radical ( $O_2^{\cdot -}$ ) เป็นอนุมูลเริ่มแรกที่เกิดขึ้นในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต และเป็นตัวเริ่มต้นที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระตัวอื่นๆอีกมากมายจากการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ นอกจากจะทำให้อนุมูลอิสระมีปริมาณเพิ่มมากขึ้นแล้ว ฤทธิ์และความแรงของอนุมูลอิสระที่เกิดจากปฏิกิริยา ลูกโซ่เป็นอันตรายสูงขึ้นด้วย แต่ตัวของ  $O_2^{\cdot -}$  จะมีความว่องไวน้อยกว่า  $OH^{\cdot}$  ซึ่งการเกิด  $O_2^{\cdot -}$  เป็นดัง สมการ



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



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

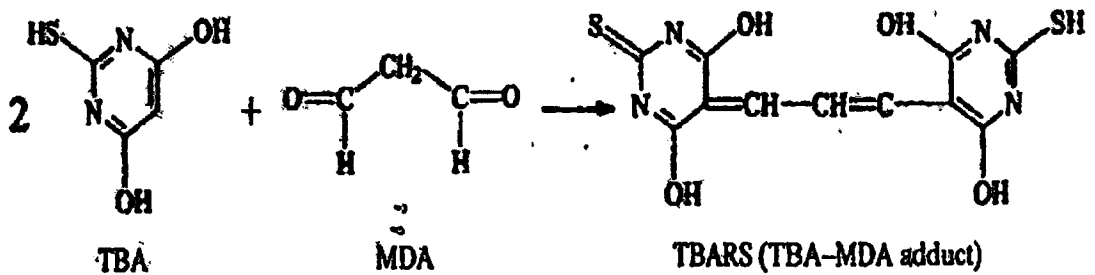
$$\% \text{ Inhibition} = [(A_{560 \text{ control}} - A_{560 \text{ test sample}}) / A_{560 \text{ control}}] \times 100$$

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

เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันแบบลูกโซ่ของกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว อนุมูลอิสระเพียง 1 อนุมูล สามารถทำให้เกิดลิปิดเปอร์ออกไซด์ เป็นจำนวนหลายร้อยโมเลกุลก่อนที่จะสิ้นสุดปฏิกิริยา เนื่องจากปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันสามารถเกิดได้ง่ายกับเยื่อหุ้มเซลล์ที่ประกอบด้วยลิปิด 2 ชั้นการเกิดลิปิดออกซิเดชันกับลิปิดในเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์มีคุณสมบัติที่เปลี่ยนไป นอกจากนี้ยังส่งผลกระทบต่อเอนไซม์และตัวรับ (Receptor) ที่ฝังตัวอยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เอนไซม์และตัวรับมีการทำงานที่เสียไปเป็นสาเหตุในเกิดโรคต่างๆ ได้อีกด้วย ผลผลิตที่เกิดขึ้นมาจากปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน ได้แก่ สารไฮโดรคาร์บอน เช่น อีเทน อีทีน และเพนเทน รวมถึง สารคีโตน และสารอัลดีไฮด์ เป็นต้น ซึ่งสารอัลดีไฮด์ที่มีความสำคัญ คือ มาลอนไดอัลดีไฮด์

วิธีนี้เป็นการศึกษาความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันของสาร สกัดทดสอบ โดยใช้ตับหนูมาทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน แล้วทำให้เกิดผลผลิตจากปฏิกิริยาเปอร์ ออกซิเดชันของไขมันได้เป็นสารมาลอนไดอัลดีไฮด์ จากนั้นเติมกรดไทโอบาร์บิทูริกในสภาวะกรดสาร มาลอนไดอัลดีไฮด์จะทำปฏิกิริยากับกรดไทโอบาร์บิทูริก ได้เป็นสารมีสีเรียกว่า ทีบิอาร์เอส (Thiobarbituric acid reactive substances) (ดังรูปที่ 2.8) เมื่อเติมสารสกัดทดสอบที่มี ความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันลงไป จะทำให้สารสีจางลง จากการวัดค่าการ ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.8 ปฏิกิริยาการเกิดทีบีเออาร์เอส (TBARS)

ที่มา : โอภา และคณะ (2549)

### 2.3 สาหร่ายสีเขียว (Green algae)

#### 2.3.1 ดิวิชันคลอโรไฟตา (ยวดี, 2538; ศิริเพ็ญ, 2537)

สาหร่ายสีเขียวจัดอยู่ในดิวิชันคลอโรไฟตา (Division Chlorophyta) สาหร่ายดิวิชันนี้ส่วนใหญ่มีสีเขียวเหมือนหญ้า (Grass green algae) ทั้งนี้เพราะภายในคลอโรพลาสต์มีรงควัตถุพวกคลอโรฟิลล์เอ และคลอโรฟิลล์บีจำนวนมาก ซึ่งจะบดบังรงควัตถุสีอื่นๆไว้ นอกจากนั้นก็มีรงควัตถุพวกแคโรทีนอยด์และแซนโทฟิลล์อีกหลายชนิด รงควัตถุทั้งหมดอยู่ในคลอโรพลาสต์ ซึ่งมีรูปร่างได้หลายแบบ คุณสมบัติเหล่านี้สามารถนำมาจัดจำแนกสาหร่ายสีเขียวได้อย่างชัดเจน สาหร่ายสีเขียวส่วนใหญ่จะมีไพเรินอยด์ (Pyrenoid) ในคลอโรพลาสต์ ซึ่งเป็นศูนย์กลางของการสร้างแป้งในเซลล์สาหร่าย

สาหร่ายสีเขียวนี้จะพบได้ทั่วไปแทบทุกหนทุกแห่ง ประมาณกันว่าร้อยละ 10 ของสาหร่ายทั้งหมดเป็นสาหร่ายทะเล ซึ่งจะเจริญแตกต่างกันตามสภาพอุณหภูมิของน้ำ ความเข้มของแสงและความสมบูรณ์ของสารอาหาร ส่วนอีกร้อยละ 90 ของสาหร่ายทั้งหมดจะเป็นสาหร่ายน้ำจืดหรือสาหร่ายที่ขึ้นอยู่บนภายใต้สภาพแวดล้อมที่เป็นอากาศก็ได้ สาหร่ายที่อยู่ในน้ำจืดอาจจะเจริญอยู่ในน้ำตื้นๆ หรือน้ำลึกที่แสงส่องถึง และหลายชนิดมีสภาพเป็นแพลงก์ตอนพืช บางชนิดก็ขึ้นอยู่บนก้อนหิน หวาย โคลน เปลือกหอย บนพืช หรือสัตว์อื่น หรืออาจเจริญอยู่ในพืช หรือสัตว์อื่นก็ได้ อาจขึ้นอยู่ในดิน หรือในเปลือกไม้แตก บางชนิดสปอร์ของมันอาจจะปนมากับฝุ่นละออง และบางชนิดอาจจะพบอยู่ในหิมะ หรือน้ำแข็งก็ได้สาหร่ายสีเขียวในดิวิชันคลอโรไฟตา พบได้ในแหล่งน้ำจืด ในทะเล และบนพื้นดินพวกที่มีขนาดเล็กมักพบในลักษณะเป็นแพลงก์ตอนพืชส่วนใหญ่พบในแหล่งน้ำจืด สารที่พบมากจะเป็นพวกคลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี และ เบต้า - แคโรทีน

#### ก. โครงสร้างของเซลล์

1. ผนังเซลล์มี 2 ชั้น ผนังชั้นในเป็นพวกเซลลูโลส ผนังชั้นนอกเป็นเพกติน นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์ปกติหรือเซลล์สืบพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียวบางชนิดไม่มีผนังเซลล์

2. รงควัตถุ และคลอโรพลาสต์ รงควัตถุของสาหร่ายสีเขียวประกอบด้วย

(1) คลอโรฟิลล์เอ และ คลอโรฟิลล์บี

(2) แคโรทีนอยด์ ได้แก่ แคโรทีนประกอบด้วย อัลฟา - แคโรทีน เบต้า - แคโร

ทีน และแกมมา - แคโรทีน ส่วนแซนโทฟิลล์ ได้แก่ ลูทีน ไวโอลาแซนทิน และนีโอแซนทิน

คลอโรพลาสต์ของสาหร่ายสีเขียวมีรูปร่างลักษณะต่างๆ เช่น

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งยังมีให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

(3) อาหารสะสมของสาหร่ายสีเขียวจะอยู่ในรูปของแป้ง ประกอบด้วยอะไมโลส (Amylose) และอะไมโลเพกติน (Amylopectin) โดยจะเก็บสะสมแป้งไว้ในพริโนอยด์ สำหรับสาหร่ายที่ไม่มี พริโนอยด์จะสะสมอาหารไว้ในรูปของน้ำมัน

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

ข. รูปร่างลักษณะ

สาหร่ายสีเขียวมีรูปร่างลักษณะหลายแบบด้วยกัน มีทั้งเซลล์เดี่ยว กลุ่มเซลล์ เส้นสาย หลอดหรือท่อ

ค. การสืบพันธุ์

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

ชั้นคลอโรไฟซี (Class Chlorophyceae) (วันเพ็ญ, 2549)

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

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

การจัดจำแนกชั้นคลอโรไฟซีออกเป็นอันดับ (Order) อันดับที่สำคัญ ได้แก่ เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 1. อันดับคลอโรคอกคาเลส (Order Chlorococcales)

ในอันดับคลอโรคอกคาเลส เป็นสาหร่ายสีเขียวที่เคลื่อนที่ไม่ได้ ทลัสสปกติประกอบด้วยเซลล์เพียงเซลล์เดียว หรือซีโนเบียมที่มีจำนวนเซลล์แน่นอน และมีการจัดเรียงตัวอย่างจำเพาะในแต่ละชนิด การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการสร้างซูโอสปอร์หรืออะพลาโนสปอร์หรือพบทั่วไปคือสร้างออโตสปอร์ (Autospores) ซึ่งออโตสปอร์น่าจะเกิดขึ้นได้มากกว่าเซลล์ลูกที่สร้างจากทลัสสปอแม่ม โดยที่ออโตสปอร์จะเป็นอะพลาโนสปอร์ที่มีขนาดเท่ากับเซลล์พ่อแม่ ส่วนการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศสามารถเป็นได้ทั้งแบบไอโซแกมี แอนไอโซแกมี หรือโอโอแกมี สาหร่ายในอันดับนี้พบมากในน้ำจืด ต้นกำเนิดของอันดับนี้มาจากอนุพันธุ์ของสาหร่าย *Chlamydomonas* sp. ที่เกี่ยวข้องกับการสูญเสียการสร้างแฟลกเจลลาในเซลล์ระยะยังชีพ แต่มีหลักฐานการสืบเนื่องทางวิวัฒนาการอยู่ได้แก่ *Scenedesmus* sp. มีเซนทริโอลอยู่ แต่พบได้ยากในเซลล์ที่เคลื่อนที่ได้

การประกอบกันของเซลล์หลายเซลล์ในอันดับคลอโรคอกคาเลสแตกต่างกันขึ้นอยู่กับอายุของเซลล์และสภาวะการเจริญ เมื่อถึงระยะที่การเติบโตคงที่ เซลล์หยุดการแบ่งตัว และในหลายๆกรณีที่มีผนังหนาขึ้น มีการสะสมไขมันและแคโรทีนอยด์ในโพโรพลาสซึมเมื่อไนโตรเจนลดน้อยลง ผลของการเพิ่มอัตราส่วนของแคโรทีนอยด์ต่อคลอโรฟิลล์ทำให้สีเปลี่ยนเป็นสีแดงหรือสีส้ม

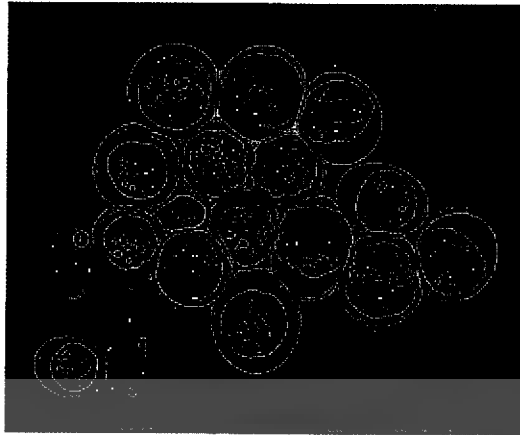
อันดับนี้แบ่งออกได้เป็น 5 วงศ์ คือ วงศ์คลอโรคอกคาซีอี วงศ์แคราเซียซีอี วงศ์โพโรไซไพนาคีอี วงศ์ไฮโดรดิคไทอาซีอี และวงศ์โอโอซิสทาซีอี แต่ในงานวิจัยนี้จะกล่าวถึงวงศ์คลอโรคอกคาซีอี และวงศ์โอโอซิสทาซีอี

### 1.1 วงศ์คลอโรคอกคาซีอี (Family Chlorococcaceae)

สาหร่ายสีเขียววงค์นี้เป็นชนิดคลอโรคอกคาเลียน (Chlorococcalean) ที่มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการสร้างซูโอสปอร์ ถึงแม้ว่าบางชนิดอาจจะสร้างอะพลาโนสปอร์ด้วย เป็นสาหร่ายเซลล์เดียว มีนิวเคลียส 1 อัน ต่อมาก่อนการสืบพันธุ์อาจจะเป็นแฮพลอยด์และมีคลอโรพลาสต์รูปร่างหลายแบบ การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศแบบไอโซแกมี แอนไอโซแกมี หรือโอโอแกมี ตัวอย่างของสกุลสาหร่ายในวงค์นี้ คือ

#### ก. *Chlorococcum* sp. (Siver, 2009)

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



รูปที่ 2.9 ลักษณะเซลล์ของ *Chlorococcum* sp.

ที่มา : Siver (2009)

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

ในระยะเวลาที่มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ เซลล์พ่อแม่จะมีการแบ่งเซลล์ไซโทพลาซึมและนิวเคลียส สร้างซุโอสปอร์จากผนังเซลล์ของเซลล์พ่อแม่ มีแฟลกเจลลา 2 เส้น ผนังเซลล์ของซุโอสปอร์ในระยะแรกมีอายุสเปตและคอนแทร็กไทล์แควคิโวล ก่อนจะมีการพัฒนาไปเป็นตัวเซลล์ ถ้าในสภาพแวดล้อมที่ขาดน้ำตัวเซลล์ที่เกิดจากอะพลาโนสปอร์ (Aplanospore) จะมีมากกว่าซุโอสปอร์ ผนังเซลล์ของไซโกตจะหนาหรือฮิฟโนสปอร์ (Hyphospore) ที่พัฒนาไปเป็นเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับเจริญเติบโต (Vegetative cells) ในระยะที่สืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ

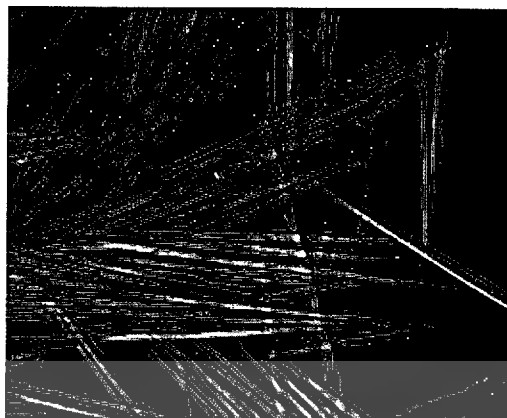
#### 1.2 วงศ์โอโอซิสทาซีอี (Family Oocystaceae)

เป็นสาหร่ายสีเขียวที่สร้างเซลล์ลูกได้เหมือนกัน และเท่ากันกับเซลล์พ่อแม่หรือออโตสปอร์ ส่วนใหญ่อยู่ในน้ำจืดที่มีไนเตรตและฟอสเฟตปริมาณสูง จัดเป็นแพลงก์ตอนพืชหลักในทะเลสาบน้ำจืด ตัวอย่างของสาหร่ายในวงศ์นี้ คือ

##### ก. *Ankistrodesmus* sp. (Siver, 2009)

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.10 ลักษณะเซลล์ของ *Ankistrodesmus* sp.

ที่มา : Siver (2009)

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

ข. *Chlorella* sp. (Siver, 2009)

*Chlorella* sp. ลักษณะเซลล์จะอยู่เดี่ยวๆ เป็นสาหร่ายสีเขียวที่ไม่มีการเคลื่อนที่ มีรูปร่างกลมและรูปร่างรี ปกติเซลล์มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 - 12 ไมโครเมตร แต่ขนาดอาจจะต่างกันแม้จะอยู่ในกลุ่มเดียวกัน เซลล์จะอยู่เดี่ยวๆ หรือเป็นกระจุกไม่สม่ำเสมอ มีคลอโรพลาสต์อยู่แถบข้างเซลล์มีลักษณะเป็นรูปถ้วย หรือคล้ายจาน บางครั้งก็มีไพรีนอยด์ (รูปที่ 2.11)



รูปที่ 2.11 ลักษณะเซลล์ของ *Chlorella* sp.

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไมออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

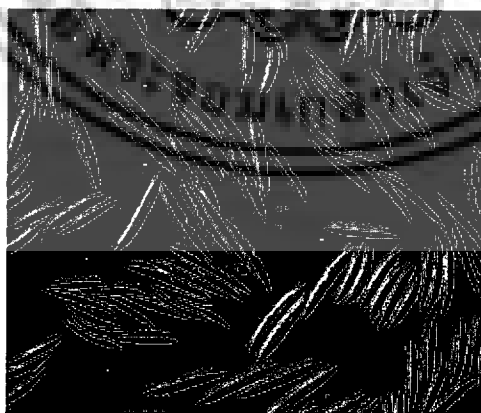
*Chlorella* sp. มีอัตราการเจริญเติบโตที่สูง ทำให้เป็นที่น่าสนใจมากสำหรับนักวิจัยในด้านต่างๆ *Chlorella* sp. มีปริมาณคลอโรฟิลล์สูง และอุดมไปด้วยโปรตีน วิตามิน (โดยเฉพาะวิตามินบี) และแร่ธาตุ เป็นแหล่งอาหารที่มีศักยภาพ *Chlorella* sp. สามารถใช้เป็นอาหารเสริมทางโภชนาการได้

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

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

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

*Monoraphidium* sp. มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยวหรือโคโลนีที่มีจำนวนไม่คงที่ ตัวเซลล์มีรูปร่างแหลม แขนยาวตรง หรือโค้งแหลม ไม่มีเมือกหุ้ม (Mucilage envelope) มีคลอโรพลาสต์ 1 อันหรือมากกว่าที่มีรูปร่างแหลมและมีผนังหุ้ม เซลล์มีขนาด 2 - 182 × 1 - 8 ไมโครเมตร ผนังเซลล์เรียบ ไม่มีไพรีนอยด์หรือเมื่อมีไพรีนอยด์ ก็จะไม่ยึดเกาะ (รูปที่ 2.12)



รูปที่ 2.12 ลักษณะเซลล์ของ *Monoraphidium* sp.

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยใช้ออโตสปอร์หรือออโตซีโนเบียม (Autocoenobium) 2 - 16 สปอร์ตต่อสปอร์แรงเกียม 1 เซลล์ซึ่งปล่อยออกมาในลักษณะตามยาวหรือตามขวางจากผนังเซลล์พ่อแม่ การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศและระยะที่มีการใช้แฟลกเจลลายังไม่ทราบแน่ชัด

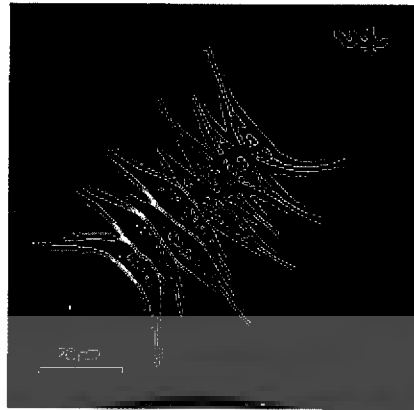
### 1.3 วงศ์ซีนีเดสมาชีอี (Family Scenedesmaceae) (ยุวดี, 2549)

เป็นโคโลนีที่ประกอบด้วยเซลล์จำนวน 2, 4, 8 หรือ 16 เซลล์ มาเรียงต่อกันด้านข้างตามความยาวของเซลล์ แต่ละเซลล์มีลักษณะเป็นรูปไข่ หรือทรงกระบอก หรือพระจันทร์ครึ่งซีก เซลล์ที่อยู่ด้านริมสุดทั้งสองด้านอาจมีหนาม (Spine) ยื่นออกมา บางชนิดก็ไม่มีคลอโรพลาสต์เป็นแผ่นเต็มเซลล์มีไพรีนอยด์และมีนิวเคลียสเซลล์ละ 1 อันซึ่งเท่ากับจำนวนเซลล์ปกติของ *Scenedesmus* ชนิดนั้น เมื่อแก่ก็จะหลุดออกมาจากผนังเซลล์ของแม่จับกันเป็นโคโลนีใหม่ ส่วนการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ โดยการสร้างแกมีตที่มีแฟลกเจลลัม 2 เส้น แล้วมีการรวมแบบไอโซแกมี เป็นสาหร่ายที่มีชีวิตแบบแพลงก์ตอนพืช หรืออาจพบในดินบ้าง ถ้านำมาเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงสาหร่ายมักไม่จับกันเป็นโคโลนี แต่มักจะอยู่เป็นเซลล์เดี่ยวๆ ตัวอย่างของสาหร่ายในวงศ์นี้ คือ

#### ก. *Scenedesmus* sp. (Siver, 2009)

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

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



รูปที่ 2.13 ลักษณะเซลล์ของ *Scenedesmus* sp.

ที่มา : Alster และ Zohary (1902)

*Scenedesmus* sp. ปกติจะเป็นตัวบ่งชี้สภาวะแวดล้อมที่มีการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและทางเคมี เป็นที่นิยมที่ใช้ในการตรวจสอบสารอาหารและสารพิษที่เกิดจากมนุษย์ในการใช้แหล่งน้ำ

*Scenedesmus* sp. มีทั้งที่เป็นเซลล์เดี่ยวและเป็นโคโลนี (Coenobium) แต่ละเซลล์ของเซลล์พ่อแม่จะมีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยไม่มีแฟลกเจลลาที่จะพัฒนาไปเป็นเซลล์ลูก เหมือนกับเซลล์พ่อแม่โคโลนีใหม่ที่ได้ยังคงเกาะกันแน่นภายในผนังเซลล์จนกว่าจะปล่อยออกมาทำลายผนังเซลล์

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

ในอันดับวอลโวคาเลส เซลล์ยังชีพมีแฟลกเจลลาและเคลื่อนที่ได้ มีทั้งเซลล์เดี่ยวหรือหลายเซลล์ ถ้าเป็นพวกหลายเซลล์ จำนวนเซลล์ในกลุ่มเซลล์ยังชีพจะเป็นทวีคูณของสอง สาหร่ายในอันดับนี้เกือบทั้งหมดอยู่ในน้ำจืด จะเพิ่มจำนวนได้มากในแหล่งน้ำที่มีไนโตรเจนสูง แบ่งได้เป็น 2 วงศ์ คือ วงศ์แคลมิโดโมนาดาซีอี และ วงศ์วอลโวเคซีอี แต่ในงานวิจัยนี้จะกล่าวถึงวงศ์แคลมิโดโมนาดาซีอี

### 2.1 วงศ์แคลมิโดโมนาดาซี (Family Chlamydomonaceae)

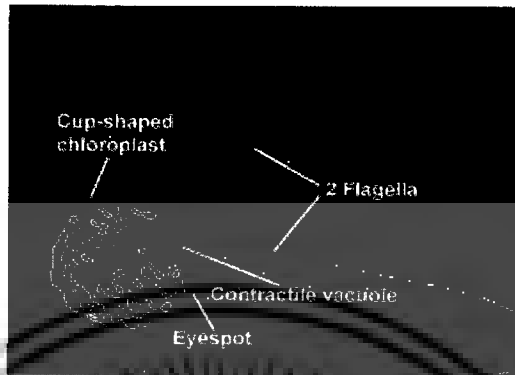
สาหร่ายในวงศ์นี้เป็นสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดี่ยวทั้งหมด ทุกสกุลมีนิวเคลียส 1 อัน และโดยปกติคลอโรพลาสต์เป็นรูปถ้วย ตัวอย่างของสกุลสาหร่ายในวงศ์นี้คือ

#### ก. *Chlamydomonas* sp. (Siver, 2009)

*Chlamydomonas* sp. เป็นสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก ลักษณะเป็นเซลล์อยู่เดี่ยวๆ มีลักษณะกลม เซลล์รูปไข่หรือรูปวงรี มีแฟลกเจลลา 2 เส้น และคอนแทร็กไทล์แวกคิวโอล 2 อัน บริเวณด้านหน้า คลอโรพลาสต์มีลักษณะรูปถ้วย เป็นแถบข้างเซลล์ ซึ่งอาจมีไพริโนอยด์เพียง 1 อัน หรือมากกว่า บริเวณเซลล์มักมีอวัยวะเพียงอันเดียว ผนังเซลล์แข็ง ชั้นของผนังเป็นพวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไกลโคโปรตีนมากกว่าเซลลูโลส แพลกเจลลาทั้งสองยื่นออกมาจากรูของผนังเซลล์ อาจมีการป้องกันตัวเองจากสาหร่ายชนิดอื่นๆ มีการเคลื่อนที่แบบหมุนไปข้างหน้า (รูปที่ 2.14)



รูปที่ 2.14 ลักษณะเซลล์ของ *Chlamydomonas* sp.

ที่มา : Siver (2009)

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

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

#### 2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากสาหร่าย

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

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

จากการศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากสาหร่ายสีน้ำตาล *Ecklonia cava* โดยทำการวิเคราะห์ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ความสามารถในการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ ความสามารถในการยับยั้งการเกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความสามารถในการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล ความสามารถในการรวมตัวกับเฟอร์รัสไอออน ศึกษาความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์ และการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน พบว่าสารสกัดด้วยเมทานอลร้อยละ 70 มีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ทุกวิธี และมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่สูง และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกพบมากในสารละลายที่มีขี้ผึ้งสูงกว่าสารละลายที่มีขี้ผึ้งต่ำ (Senevirathne และคณะ, 2006)

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

จากการศึกษาสาหร่ายขนาดเล็กทั้ง 14 ชนิดจากมาเลเซียมาคัดแยกให้บริสุทธิ์และเพาะเลี้ยงในน้ำที่สะอาด น้ำกร่อยและน้ำทะเล ซึ่งทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทางเคมี 3 วิธีคือ วิเคราะห์คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีเฟอร์ริกไทโอไซยาเนต (Ferric thiocyanate) วิเคราะห์คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระจากค่ากรดไทโอบาบิฟูริก วิเคราะห์ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH พบว่าสาหร่ายขนาดเล็กเหล่านี้มีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ โดยพบว่าสารสกัดจากสาหร่ายขนาดเล็ก 6 ชนิด ได้แก่ *Isochrysis galbana*, *Chaetoceros calcitrans*, *Scenedesmus quadricauda*, *Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis oculata* และ *Tetraselmis tetraathele* มีฤทธิ์ในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิก ซึ่ง *I. galbana* และ *C. calcitrans* มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดจากการวิเคราะห์คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีเฟอร์ริกไทโอไซยาเนต และวิเคราะห์คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระจากค่ากรดไทโอบาบิฟูริกมากกว่าร้อยละ 90 ซึ่งให้เห็นว่าสาหร่ายขนาดเล็กเหล่านี้มีสารที่ออกฤทธิ์ป้องกันการเกิดปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของกรดไขมัน (Natrash และคณะ, 2007)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

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

Zubia และคณะ (2007) ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากสาหร่ายทะเลขนาดใหญ่ 48 ชนิด (ดิวิชันคลอโรไฟต้า 17 ชนิด ดิวิชันไฟโอไฟต้า 8 ชนิดและดิวิชันโรโดไฟต้า 23 ชนิด) จากชายฝั่งของคาบสมุทรยูคาทานและกินตานาโร ประเทศเม็กซิโก จากการตรวจสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี วัดความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และปริมาณฟีนอลิกของสารสกัดแต่ละชนิด พบว่าสาหร่าย *Avrainvillea longicaulis*, *Chondria baileyana* และ *Lobophora variegata* แสดงความสามารถในการสารต้านออกซิเดชันที่ดี โดยมีค่า  $EC_{50}$  ต่ำ ( $1.44 \pm 0.01$ ,  $2.84 \pm 0.07$  และ  $0.32 \pm 0.01$  มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ  $EC_{50}$  ของสารต้านอนุมูลอิสระทางการค้าบางชนิด เช่น อัลฟา - โทโคฟีรอล กรดแอสคอร์บิก บีเอชเอ และบีเอชที นอกจากนี้สารสกัดส่วนใหญ่ยังแสดงฤทธิ์ในการรีดิวซ์ กำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน และยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน

จากการศึกษาการสกัดสารสกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอลและสารละลายเมทานอลร้อยละ 50 จากสาหร่ายทะเล ได้แก่ *Padina antillarum*, *Caulerpa racemosa* และ *Kappaphycus alvarezzi* จากนั้นนำสารสกัดที่ได้มาวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน โดยทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี วิธี Folin-Ciocalteu และการทดสอบความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กของสารต้านอนุมูลอิสระ ความสามารถในการรวมตัวกับเฟอร์รัสไอออน (Ferrous ion chelating) และการต้านออกซิเดชันโดยการฟอกจางสีเบต้าแคโรทีน พบว่า *P. antillarum* มีสารประกอบฟีนอลิกสูงที่สุด  $2430 \pm 208$  มิลลิกรัมสมมูลย์ของกรดแกลลิกต่อตัวอย่างแห้ง 100 กรัม และ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของกรดแอสคอร์บิกสมมูลย์ มีค่าเท่ากับ  $1140 \pm 85$  มิลลิกรัมสมมูลย์ของกรดแอสคอร์บิกต่อตัวอย่างแห้ง 100 กรัม *C. racemosa* และ *K. alvarezzi* มีสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของกรดแอสคอร์บิกสมมูลย์ต่ำกว่า พบว่า *C. racemosa* มีสารประกอบฟีนอลิก  $144 \pm 22$  มิลลิกรัมสมมูลย์ของกรดแกลลิกต่อตัวอย่างแห้ง 100 กรัมและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของกรดแอสคอร์บิกสมมูลย์  $14.3 \pm 2.0$  มิลลิกรัมสมมูลย์ของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่จัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการศึกษาวิจัยเท่านั้น ไม่สามารถนำไปใช้ในเชิงพาณิชย์ การคัดลอกหรือการนำข้อมูลไปใช้โดยไม่ได้รับอนุญาตถือว่าผิดกฎหมาย

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรดแกลลิกต่อตัวอย่างแห้ง 100 กรัม นอกจากนี้ *P. antillarum* มีความสามารถในการลดทอนฤทธิ์อนุมูลอิสระ  $15.7 \pm 2.6$  มิลลิกรัมสมมูลย์ของกรดแกลลิกต่อกรัมของตัวอย่างแห้ง และความสามารถในจับกันของอนุมูลอิสระสูงที่สุด *C. racemosa* และ *K. alvarezii* มีความสามารถในการลดทอนฤทธิ์อนุมูลอิสระได้  $0.737 \pm 0.423$  และ  $0.561 \pm 0.269$  มิลลิกรัมสมมูลย์ของกรดแกลลิกต่อกรัมของน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ซึ่งมีความสามารถในการจับกันของอนุมูลอิสระต่ำกว่าและการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยการฟองจางสีเบต้าแคโรทีนของสาหร่ายทะเลทั้ง 3 สายพันธุ์มีประสิทธิภาพสูงเท่าเทียมกัน (Chew และคณะ, 2008)

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

Kumar และคณะ (2008) ได้ศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากสาหร่าย *Kappaphycus alvarezii* ที่ใช้ตัวทำละลายต่างๆ โดยทำการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ความสามารถในการรวมตัวกับเพอร์สไอออน การลดทอนฤทธิ์อนุมูลอิสระ และการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมันด้วยวิธีเฟอร์ริกไทโอไซยาเนต จากการศึกษาพบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดมีค่าตั้งแต่ร้อยละ  $0.683 \pm 0.040$  ถึง  $2.05 \pm 0.038$  ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระของสารสกัดที่สกัดด้วยเอทานอลมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $3.03$  มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่สารสกัดด้วยน้ำมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $4.76$  มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดด้วยเมทานอลที่ความเข้มข้น  $5$  มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรมีความสามารถในการแย่งจับเพอร์สไอออนได้ดีโดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $3.08$  มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีความสามารถในการแย่งจับเพอร์สไอออนคิดเป็นร้อยละ  $67 \pm 0.924$  จากการวิเคราะห์ความสามารถในการลดทอนฤทธิ์อนุมูลอิสระมีฤทธิ์มากตามลำดับดังนี้ สารสกัดจากเมทานอล เอทานอล เอทิลอะซิเตต น้ำ และเฮกเซน แต่การยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมัน พบว่าสารสกัดด้วยเอทานอลมีความสามารถสูงกว่าสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ BHT

จากการศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและปริมาณฟีนอลิกของสารสกัดด้วยเมทานอลและไดเอทิลอีเทอร์จากสาหร่ายทะเล 8 ชนิดทางเหนือของเกาะบอร์เนียว ประเทศมาเลเซีย ได้แก่ สาหร่ายทะเลสีแดง 3 ชนิด (*Eucheuma cottonii*, *E. spinosum* และ *Halymenia durvillae*) สาหร่ายทะเลสีเขียว 2 ชนิด (*Caulerpa lentillifera* และ *C. racemosa*) ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งยังมีให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และสาหร่ายทะเลสีน้ำตาลจำนวน 3 ชนิด (*Dictyota dichotoma*, *Sargassum polycystum* และ *Padina* sp.) ทำการวิเคราะห์ฤทธิ์ของสารต้านอนุมูลอิสระ 2 วิธี ได้แก่ การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเทียบกับสารมาตรฐานโทโรลิกซ์ และการวิเคราะห์ฤทธิ์ของสารต้านอนุมูลอิสระในการรีดิวซ์ไอออนของโลหะ (Ferric reducing antioxidant power, FRAP) ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดหยาบถูกวิเคราะห์ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu จากการทดลองพบว่าสาหร่ายสีเขียว (*C. lentilifera* และ *C. racemosa*) และสาหร่ายสีน้ำตาล (*S. polycystum*) มีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระและความสามารถในการรีดิวซ์สูง รวมทั้งมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงกว่าสาหร่ายชนิดอื่นๆ (Matanjun และคณะ, 2008)

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

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

Wang และคณะ (2009) ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดด้วยน้ำและเอซิโตน ความเข้มข้นร้อยละ 70 จากสาหร่ายทะเล 10 สายพันธุ์ที่พบบนเกาะไอซ์แลนด์ โดยวิเคราะห์ปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดด้วยวิธี ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ตรวจวัดปริมาณการดูดจับอนุมูลออกซิเจน (ORAC) และไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความสามารถในการแย่งจับเฟอร์รัสไอออน ผลการทดลองพบว่าสารสกัดด้วยอะซีโตนจากสาหร่ายสายพันธุ์ Fuucid 3 สายพันธุ์ มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงสุดและแสดงความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้สูงสุดเช่นเดียวกัน และพบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดจากสาหร่ายมีความสัมพันธ์สูงกับความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และอนุมูลเพอร์ออกซิด สารสกัดด้วยน้ำมีความสามารถในการรวมตัวกับเฟอร์รัสไอออนได้ดีกว่าสารสกัดด้วยอะซีโตนแต่ไม่มีความสัมพันธ์กับสารประกอบฟีนอลิกที่วิเคราะห์ได้ ทั้งนี้เป็นเพราะสารประกอบอื่นๆ เช่น โพลีแซคคาไรด์ โปรตีน หรือ เปปไทด์ ที่มีอยู่ในสารสกัดที่มีผลต่อความสามารถในการแย่งจับเฟอร์รัสไอออน

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดด้วยเมทานอลหรือคลอโรฟอร์มจากสาหร่ายทะเลสีน้ำตาล 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Sargassum fusiforme*, *Sargassum kjellmanianum*, *Sargassum pallidum*, *Sargassum thunbergii* และ *Sargassum horneri* จากประเทศจีน โดยทำการทดสอบความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH และการลดทอนอนุมูลอิสระ วิเคราะห์หาสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วย วิธี Folin-Ciocalteu พบว่าสารสกัดด้วยเมทานอลจาก *S. kjellmanianum* มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสาหร่ายสายพันธุ์อื่น ซึ่งสารสกัดของสาหร่ายทะเลสีน้ำตาลทั้งหมดมีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่ำกว่ากรดแกลลิกและกรดแอสคอบิก จากนั้นนำสารสกัดสาหร่ายทะเลที่สกัดด้วยเมทานอลแยกให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครโมโทกราฟีโดยใช้ตัวทำละลาย 4 ชนิด ได้แก่ บีโตรเลียมอีเทอร์ เอทิลอะซิเตท บิวทานอล และน้ำ พบว่าส่วนสกัดจากเอทิลอะซิเตทมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่ากรดแอสคอบิก ยกเว้นสาหร่าย *S. thunbergii* ซึ่งมีฤทธิ์ในการลดทอนอนุมูลอิสระต่ำกว่ากรดแกลลิก สารสกัดที่สกัดด้วยเมทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นในช่วงความเข้มข้น 15 - 45 กรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสกัดจากเอทิลอะซิเตทมีสารประกอบฟีนอลิกสูงที่สุดและมีช่วงปานกลาง (Luo และคณะ, 2010)

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากงานวิจัยเปรียบเทียบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสาหร่ายทะเลสีเขียว *Enteromorpha* 3 สายพันธุ์คือ *E. compressa*, *E. linza* และ *E. tubulosa* ที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ จากการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกพบว่า *E. compressa*, *E. linza* และ *E. tubulosa* ที่สกัดด้วยตัวทำละลายอะซีโตน เมทานอล และ อะซีโตน มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงสุด เท่ากับ  $11.63 \pm 0.39$   $3.45 \pm 0.18$  และ  $6.30 \pm 0.06$  ตามลำดับ สารสกัดด้วยเมทานอลจากสาหร่าย *E. compressa* แสดงความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH สูงสุด ( $IC_{50}$  1.89 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) สารสกัดด้วยอะซีโตนจาก *E. tubulosa* แสดงการลดทอนฤทธิ์ของอนุมูลอิสระได้ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดจาก *E. compressa* และ *E. linza tubulosa* ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดด้วยเมทานอลและโพรพานอลจาก *E. compressa* แสดงความสามารถในการรวมตัวกับเพอร์สไอออนได้ดี นอกจากนี้สารสกัดของสาหร่ายทะเล 3 สายพันธุ์ยังมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน (Ganesan และคณะ, 2011)

Shanab และคณะ (2012) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ในการต้านมะเร็งของสารสกัดจากสาหร่าย 9 สายพันธุ์ โดยทำการหาร้อยละของสารทุติยภูมิที่สำคัญ (ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด เทอร์พีนอยด์ และอัลคาลอยด์) รวมถึงรงควัตถุกลุ่มไฟโคไบลิโปรตีน (ไฟโคไซยานิน แอลโลไฟโคไซยานิน และไฟโคอีริทริน) ในสารสกัดจากสาหร่าย รวมทั้งศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากสาหร่ายโดยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) และ 2,2-azino-bis(ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid (ABTS)) radical cation assay พบว่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากสาหร่ายที่ได้จากการทดสอบ DPPH และ ABTS มีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 30.1 - 72.4 และร้อยละ 32.0 - 75.9 ตามลำดับ ร้อยละ 87.25 และร้อยละ 89.4 ตามลำดับ จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ *Nostoc muscorum* และ *Oscillatoria* sp. โดยศึกษาการเพิ่มขึ้นของปริมาณไนเตรตในอาหาร BG 11 ความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นเป็น 3 6 และ 9 กรัมต่อลิตร มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของสารสีไฟโคบิลิน และมีผลต่อการเพิ่มกิจกรรมในการต้านอนุมูลอิสระในไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์

Vijayabaskar และVaseela (2012) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด sulfate polysaccharide จากสาหร่ายทะเลสีน้ำตาล *Sargassum tenerrimum* โดยการนำสารสกัด sulfate polysaccharide ทำการวิเคราะห์ลักษณะทางเคมีกายภาพ ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระทั้งหมด คุณสมบัติในการเป็นตัวรีดิวซ์ ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (DPPH, ABTS และอนุมูล  $H_2O_2$ ) พบว่าสารสกัดที่ได้มีคาร์โบไฮเดรตสูงถึงร้อยละ  $55 \pm 3.61$  รองลงมาได้แก่ ซัลเฟตร้อยละ  $6.6 \pm 1.42$  และโปรตีน ร้อยละ  $0.86 \pm 0.42$  และพบว่าสารสกัดมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยใช้วิธีการ ABTS มีค่าสูงสุดเท่ากับร้อยละ  $70.33 \pm 2.33$  รองลงมาได้แก่ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ซึ่งมีค่าเท่ากับร้อยละ  $64.66 \pm 2.08$  และความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ  $H_2O_2$  มีค่าเท่ากับร้อยละ  $61.56 \pm 2.05$  จากการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระทั้งหมดมีค่าเท่ากับร้อยละ  $62.55 \pm 1.40$

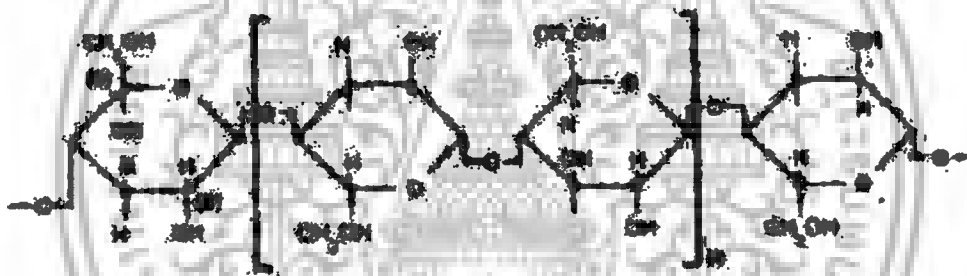
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.5 เซลลูโลสจากแบคทีเรีย (วรารุณี, 2551)

### 2.5.1 ความหมายของเซลลูโลส

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

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



รูปที่ 2.15 โครงสร้างทางเคมีของเซลลูโลส  
ที่มา : วรารุณี (2551)

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

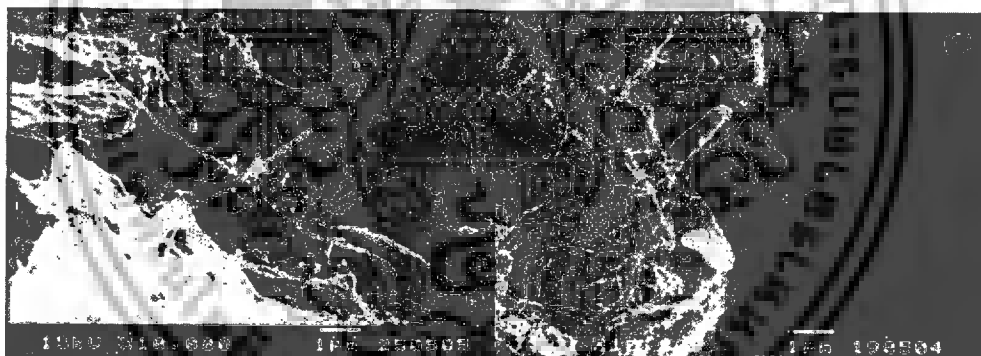
โดยธรรมชาติเซลลูโลสจากแบคทีเรียสามารถสานตัวกันจนเป็นแผ่นลอยอยู่ผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อได้ ทั้งนี้เนื่องจากโพลิเมอร์ที่เกิดขึ้นนั้นสามารถปล่อยออกมาจากนอกเซลล์ของแบคทีเรียที่สร้างได้ สำหรับเหตุผลที่เซลลูโลสเกิดการลอยตัวมาที่ผิวนั้น สันนิษฐานว่าเกิดจากผลของฟองก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ถูกจับอยู่ในโครงร่างแหเซลลูโลส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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่ในช่องทางอื่น  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

### 2.5.2 *Acetobacter xylinum* (*Gluconacetobacter xylinus*) : แบคทีเรียที่สร้างเซลลูโลส

สายพันธุ์ของ *Acetobacter* spp. ที่เป็นที่รู้จักและใช้ในการผลิตเซลลูโลสกันอย่างกว้างขวาง คือ *A. aceti* ssp. *xylinum* มักเรียกว่า "*A. xylinum*" แบคทีเรีย *A. xylinum* นี้เป็นแบคทีเรียที่มีรูปร่างท่อน เซลล์อาจอยู่เรียงต่อกัน หรือเป็นเซลล์เดี่ยว ในการสังเคราะห์เซลลูโลสจากแบคทีเรีย *A. xylinum* จะผลิตเส้นใยเซลลูโลส (cellulose microfibrils) ซึ่งมีขนาดเล็ก และขับออกมาภายนอกเซลล์ เส้นใยเซลลูโลสเล็กๆ เหล่านี้จะมาต่อกันเป็นสายยาว โดยความกว้างของเส้นใยประมาณ  $3.2 \times 133$  นาโนเมตร (รูปที่ 2.16) ส่วนความยาวแปรผันตามระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก อัตราการเจริญของเส้นใยนี้ประมาณ 2 นาโนเมตรต่อนาที เส้นใยเซลลูโลสที่แบคทีเรีย *A. xylinum* ปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ และเมื่อเส้นใยเซลลูโลสนี้มีจำนวนมากขึ้นเส้นสายเหล่านี้จะล้อมรอบและหุ้มตัวเซลล์ของแบคทีเรีย *A. xylinum* ไว้ภายใน



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

### 2.5.3 การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียเซลลูโลส

การเตรียมหัวเชื้อจุลินทรีย์นิยมนำจุลินทรีย์ที่เก็บรักษาไว้ในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสมาถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อหลอดใหม่จากนั้นนำไปถ่ายไว้ในอาหารเหลว เมื่อสังเกตเห็นว่าเชื้อจุลินทรีย์นั้นมีการเจริญเติบโตเต็มที่ วิธีการนี้สามารถนำมาใช้ได้กับการเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียเซลลูโลส *A. xylinum* ได้เช่นกันแต่มักนิยมใช้ในการศึกษาในห้องปฏิบัติการเท่านั้น โดยอาจเลี้ยงในอาหารเหลวที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที อาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรของ Hestrin และ Schramm (1954) ประกอบด้วยกลูโคส 20 กรัม

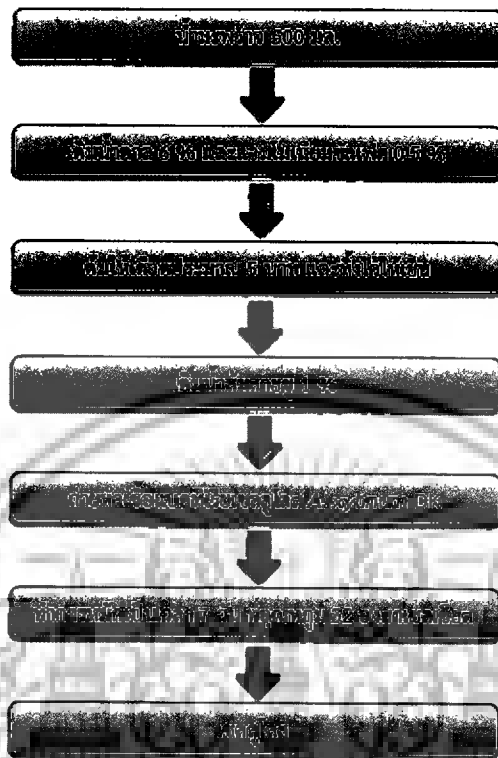
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 5 กรัมต่อลิตร เปปโตน 5 กรัมต่อลิตร ไคโอดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 2.7 กรัมต่อลิตร กรดซิตริก 1.2 กรัมต่อลิตร และปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.0 และมีอาหารเลี้ยงเชื้อจากน้ำมะพร้าวแก่ (coconut water medium) ซึ่งนิยมใช้มาก แต่มีข้อแม้น้ำมะพร้าวนั้นควรผ่านการเก็บมาไม่เกิน 3 ชั่วโมง (นับตั้งแต่ผ่าลูกมะพร้าว) อาหารเลี้ยงเชื้อจากน้ำมะพร้าวนี้มักไม่ต้องเติมสารอาหารใดๆ หรือถ้าต้องการปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 5.0 ก็สามารทำได้

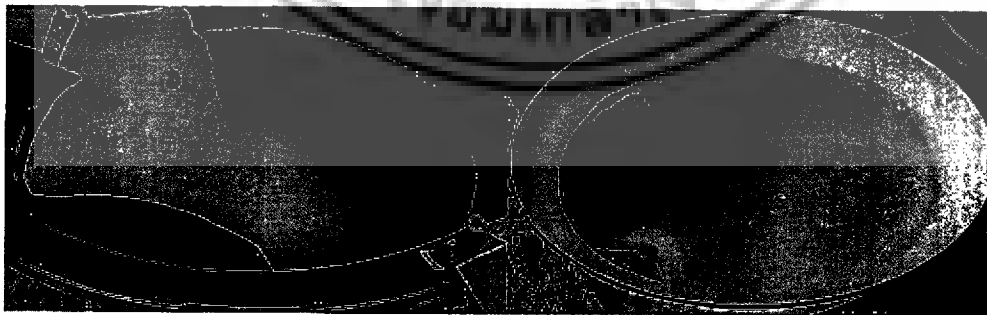
#### 2.5.4 กระบวนการผลิตเซลล์ูโลสจากแบคทีเรีย

โดยทั่วไปกระบวนการผลิตเซลล์ูโลสจากแบคทีเรีย หรือที่นิยมเรียกว่า "วุ้นน้ำมะพร้าว หรือวุ้นสรวง" นิยมใช้การหมักในสภาพนิ่ง การผลิตภายในประเทศมักเลือกใช้น้ำมะพร้าวเป็นวัตถุดิบ โดยที่ต้องควบคุมให้เวลาหลังการเก็บรวบรวมน้ำมะพร้าวจากแหล่งผลิตไม่ให้เกิน 3 ชั่วโมง เนื่องจากน้ำมะพร้าวอาจเกิดการเสื่อมเสียได้ อย่างไรก็ตามถ้าไม่สามารถนำมาใช้ในกระบวนการผลิตได้ทันหรือวางแผนใช้น้ำมะพร้าวเกินช่วง 3 ชั่วโมงดังกล่าวทั้งนี้จำเป็นต้องมีการเติมน้ำส้มสายชู หรือกรดอะซิติกเพื่อป้องกันการเสื่อมเสียของน้ำมะพร้าว เพราะน้ำส้มสายชูมีคุณสมบัติในการยับยั้ง หรือทำลายการเจริญเติบโตของแบคทีเรียโดยทั่วไปอยู่แล้ว อีกทั้งในการผลิตเซลล์ูโลสจากแบคทีเรียมีการเติมน้ำส้มสายชูประมาณร้อยละ 1 อยู่แล้ว ดังนั้นในกรณีนี้จึงเลือกใช้การปรับน้ำมะพร้าวด้วยน้ำส้มสายชูให้มีปริมาณความเป็นกรดประมาณร้อยละ 2

วัตถุดิบที่เหมาะสมและนิยมใช้ นอกจากน้ำมะพร้าวแล้วยังมีวัตถุดิบชนิดอื่นที่สามารถนำมาใช้ในการผลิตเซลล์ูโลสจากแบคทีเรียได้ เช่น น้ำผลไม้ (อาทิเช่น น้ำสับปะรด น้ำแตงโม) น้ำกะทิ น้ำหางกะทิ น้ำหางนมจากโรงงานผลิตเนย น้ำกากสาจากโรงงานผลิตแอลกอฮอล์ ซึ่งมีงานวิจัย Kurosumi และคณะ (2009) ได้ศึกษาการใช้น้ำผลไม้ชนิดต่างๆ ได้แก่ น้ำส้ม น้ำสับปะรด น้ำลูกแพร์ ญีปุ่น และน้ำองุ่น เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตแบคทีเรียเซลล์ูโลส พบว่าน้ำส้ม และน้ำลูกแพร์ญี่ปุ่น เป็นอาหารที่เหมาะสมในการผลิตแบคทีเรียเซลล์ูโลส และพบว่าเซลล์ูโลสจะเพิ่มขึ้นเมื่อเติมแหล่งไนโตรเจนเพิ่มลงไปใน้ำผลไม้ นอกจากนี้แบคทีเรียเซลล์ูโลสสามารถผลิตได้จากส่วนต่างๆ ของส้ม เช่น เปลือก และส่วนที่เหลือจากการคั้น พบว่าสามารถผลิตแบคทีเรียเซลล์ูโลสได้ 0.65 กรัม (น้ำหนักแห้ง) จากส้ม 100 กรัม และของแข็งที่เหลือจากส้มประมาณ 17.2 กรัม ซึ่งขั้นตอนการผลิตเซลล์ูโลสจากแบคทีเรีย *A. xylinum* และลักษณะของเซลล์ูโลสจากแบคทีเรียแสดงในรูปที่ 2.17 และ 2.18



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



รูปที่ 2.18 ลักษณะของเซลลูโลสจากแบคทีเรีย

ที่มา : วราวุฒิ (2551)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.5.5 การใช้ประโยชน์เซลลูโลสจากแบคทีเรีย

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



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

#### 1. การใช้ประโยชน์เซลลูโลสจากแบคทีเรียในด้านอาหาร

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

#### 2. การใช้เซลลูโลสจากแบคทีเรียเพื่อผลิตสารเพิ่มความคงตัว (stabilizer)

ตามปกติแล้วคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (ซีเอ็มซี; CMC) เป็นสารที่มีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมหลายประเภทรวมถึงอุตสาหกรรมอาหาร และมีแนวโน้มนำเข้าสูงขึ้นทุกปี การผลิต CMC จำเป็นต้องใช้วัตถุดิบที่มีปริมาณแอลฟาเซลลูโลสสูง วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตส่วนใหญ่มาจากพืชชนิดต่างๆ เช่น ผ้าย ชานอ้อย ฟางข้าว กระจดาชและไม้ ดังนั้นเซลลูโลสจากแบคทีเรียจึงเป็นวัตถุดิบทางเลือกหนึ่ง เนื่องจากเซลลูโลสที่ได้จากแบคทีเรีย *A. xylinum* มีคุณสมบัติทางกายภาพ เช่น ระดับการรวมตัว (degree of polymerization) และการเกิดผลึก (crystallinity) ใกล้เคียงกับเซลลูโลสที่ไม่ผ่านการหมักใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งยังมีให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้จากฝ้าย แต่เซลลูโลสจากแบคทีเรียมีข้อได้เปรียบจากฝ้าย คือ เป็นเซลลูโลสที่มีองค์ประกอบเป็น แอลฟาเซลลูโลสสูงไม่มีลิกนิน และเฮมิเซลลูโลสเจือปนอยู่จึงมีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็น วัตถุดิบในการผลิต CMC

#### ง. การใช้เซลลูโลสจากแบคทีเรียเป็นวัตถุดิบในการผลิตกระดาษ

กระดาษที่ผลิตขึ้นจะมีคุณสมบัติที่ดี แต่เดิมฟีนอลเรซิน หรือเส้นใยคาร์บอนซึ่งโดยปกติไม่สามารถทำให้เป็นแผ่นได้ แต่เมื่อนำเซลลูโลสจากแบคทีเรีย *A. xylinum* ที่ผ่านการอบแห้ง และบด เป็นผงแล้วมาผสมเพื่อใช้เป็นตัวเชื่อมจะทำให้เส้นใยเหล่านี้ขึ้นเป็นแผ่นได้ ในการผลิตกระดาษ คาร์บอน (activated carbon fiber sheets) เพื่อใช้ในการดูดซับสารพิษ การเติมเซลลูโลสจาก แบคทีเรียลงไปจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการดูดซับสารพิษให้ดีขึ้น นอกจากนี้แล้วยังได้มีการนำ เซลลูโลสจากแบคทีเรียมาพัฒนาใช้ในการผลิตกระดาษสา หรือเพิ่มคุณภาพของกระดาษสาอีกด้วย เซลลูโลสจากแบคทีเรียยังได้รับการพัฒนาขึ้นเป็นกระดาษกรอง เนื่องจากคุณสมบัติด้านการจับกับน้ำ ที่ดีจึงทำให้เหมาะสมกับการกรองสารแขวนลอยได้

#### จ. การใช้แบคทีเรียเซลลูโลสเป็นหนังเทียม (temporary skin substitute)

โดยอาศัยคุณภาพของเซลลูโลส และเบต้า-ดี-ไฮโมโพลีกลูแคนของแผ่นวุ้นเซลลูโลสของ แบคทีเรีย *Acetobacter* spp. ทั้งนี้ได้ผลิตเป็น "ฟิล์มชีวภาพ (biofilm)" ใช้ในการรักษาแผลไหม้ และปัญหาด้านผิวหนัง อย่างไรก็ตามในการพัฒนาอย่างต่อเนื่องมีแนวโน้มที่จะมีการนำเซลลูโลสจาก แบคทีเรียไปประยุกต์ร่วมกับเทคโนโลยีทางด้านนาโน เพื่อผลิตหนังเทียมที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับ ธรรมชาติยิ่งขึ้น

#### ฉ. การนำเซลลูโลสจากแบคทีเรียผสมกับโพลิเมอร์อื่นๆ เช่น โพลีไวนิลแอลกอฮอล์

เพื่อผลิตวัสดุที่มีความแข็งแรง และทนทานใช้เป็นสารให้ความหนืด และความคงตัวใน อุตสาหกรรมอาหาร และเครื่องสำอาง และใช้เป็นอาหารเสริมสุขภาพในด้านของเยื่อใย และกาก อาหาร ทั้งยังเหมาะสำหรับผู้ที่ต้องการควบคุมน้ำหนักอีกด้วย เนื่องจากคุณสมบัติของเซลลูโลสจาก แบคทีเรียที่ดี และเป็นผลิตภัณฑ์ชีวภาพ ดังนั้นจึงมีแนวโน้มที่ดีที่จะมีการนำไปพัฒนาผลิตภัณฑ์ต่างๆ ทั้งในด้านอาหาร และไม่ใช่อาหาร เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ต่อไป

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

บรรจุภัณฑ์แอคทีฟ คือ นวัตกรรมที่ทำการควบคุมองค์ประกอบต่างๆ ของผลิตภัณฑ์ ทางด้านอาหาร เช่น ทางกายภาพ และทางเคมี เป็นต้น และยังมีการเติมสารทั้งที่เป็นสารเคมี และ สารสกัดจากธรรมชาติลงไป เพื่อควบคุมให้ผลิตภัณฑ์มีการยืดอายุในการเก็บรักษาออกไปได้นานขึ้น ซึ่งการทำบรรจุภัณฑ์แอคทีฟนั้นจะมีการเติมสารต่างๆ ลงตามความเหมาะสมของผลิตภัณฑ์ เช่น สาร ดูดออกซิเจน สารต้านอนุมูลอิสระ สารยับยั้งการเกิดเชื้อรา สารยับยั้งจุลินทรีย์

### หน้าที่ของบรรจุภัณฑ์แอคทีฟ

หน้าที่ของบรรจุภัณฑ์แอคทีฟ คือ ปกป้องอาหาร และควบคุมสภาพบรรยากาศภายใน บรรจุภัณฑ์ โดยการยอม หรือสกัดกั้นไม่ให้มีการแพร่ผ่านของก๊าซต่างๆ เข้าสู่ผลิตภัณฑ์ตามความ เหมาะสมของผลิตภัณฑ์ ทั้งนี้เพื่อยืดอายุในการเก็บรักษา และรักษาคุณภาพของผลิตภัณฑ์

ในปัจจุบันการพัฒนาบรรจุภัณฑ์ที่สามารถกินได้ได้รับความสนใจเพิ่มมากขึ้น เนื่องจาก แอ็กสาร เป็นแอ็กสารที่สังเคราะห์ขึ้นเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ทางการค้า เป็นการลดขยะพลาสติกแล้วยังเพิ่มคุณภาพของอาหารอีกด้วย โดยบรรจุภัณฑ์ทำหน้าที่ปกป้อง ไม่วางกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งยังมีให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลิตภัณฑ์กับสภาพแวดล้อมโดยรอบ (Yu และคณะ, 2013) แนวคิดดั้งเดิมของบรรจุภัณฑ์ คือ การรักษาคุณภาพของผลิตภัณฑ์โดยที่มีปฏิสัมพันธ์ระหว่างผลิตภัณฑ์กับบรรจุภัณฑ์น้อยที่สุด อย่างไรก็ตามในปีที่ผ่านมาบรรจุภัณฑ์มีความหลากหลายมากขึ้น เทคโนโลยีบรรจุภัณฑ์แอคทีฟค่อนข้างใหม่ แนวคิดที่มุ่งเน้นสำหรับยืดอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์การรักษาคุณภาพทางโภชนาการ และทางประสาทสัมผัส รวมทั้งความปลอดภัยจากจุลินทรีย์ ได้มีการศึกษาความสามารถของฟิล์มบริโภาคได้ หรือความสามารถของบรรจุภัณฑ์ที่เคลือบด้วยวัตถุเจือปนอาหารบางชนิด เช่น สารต้านอนุมูลอิสระ ยาต้านจุลชีพ สารสี กลิ่นรส วิตามิน สารอาหาร และเครื่องเทศต่างๆ เป็นต้น (Sayanjali และคณะ, 2011)

## 2.7 กุนเชียง (รุจริน, 2555)

กุนเชียงเป็นผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แบบลดรูปชนิดบดหยาบ คือ ชิ้นเนื้อถูกบดด้วยเครื่องบดแบบธรรมดา เพื่อย่อยขนาดโครงสร้างของชิ้นเนื้อลง แต่ไม่ถึงระดับเส้นใยกล้ามเนื้อ

กุนเชียงเป็นผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ในกลุ่มไส้กรอกประเภทไส้กรอกกึ่งแห้ง (semi-dry) มีส่วนผสมที่สำคัญได้แก่ เนื้อหมู และมันหมู มีการปรุงรสด้วยไวน์ น้ำตาล ซอสถั่วเหลือง เป็นต้น ไม่มีการหมักด้วยจุลินทรีย์พวกที่สร้างกรดแลคติก (Chen และคณะ, 2007) ทำให้กุนเชียงมีเนื้อสัมผัสรสชาติ และกลิ่นรสที่เป็นเอกลักษณ์ นอกจากนี้ยังมีการเติมวัตถุเจือปนที่ใช้ในอาหารลงไปในกุนเชียง ได้แก่ ไนไตรต์ ผงเพรก เกลือฟอสเฟต โซเดียมอิริโทรเบท เป็นต้น

### 2.7.1 วัตถุเจือปนที่ใช้ในการผลิตกุนเชียง

#### ก. ไนไตรต์

ไนไตรต์ช่วยให้ผลิตภัณฑ์มีสีสวยขึ้น มีกลิ่นรสที่ดีขึ้น และช่วยลดการเกิดกลิ่นเหม็นหืน นอกจากนี้ยังช่วยยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ โดยเฉพาะเชื้อ *Clostridium botulinum* ที่ตรวจพบเป็นปัญหาในหน่อไม้บ๊อบเมื่อหลายปีก่อน แต่การใช้เกลือไนไตรต์นั้นจะต้องมีความระมัดระวัง เนื่องจากการใช้ในปริมาณมากเกินไปอาจมีปัญหาก่อให้เกิดการตกค้างในผลิตภัณฑ์ เมื่อรวมตัวกับสารประกอบเอมีนในอาหารสามารถเปลี่ยนเป็นสารก่อมะเร็งได้ ซึ่งสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาได้กำหนดให้ใช้ไนไตรต์ในปริมาณไม่เกิน 125 มิลลิกรัมต่อเนื้อ 1 กิโลกรัม

#### ข. ผงเพรก

ผงเพรก คือส่วนผสมของเกลือบริโภาค (โซเดียมคลอไรด์) และสารประกอบไนไตรต์ เนื่องจากความลำบากในการชั่งเกลือไนไตรต์ปริมาณน้อยๆ ให้มีความถูกต้อง จึงได้มีการผสมเกลือไนไตรต์เข้ากับเกลือบริโภาคเพื่อให้ชั่งตวงได้สะดวกขึ้น ซึ่งส่วนนี้มีชื่อเรียกทางการค้าแตกต่างกันไป โดยทั่วไปจะมีส่วนผสมของไนไตรต์ประมาณร้อยละ 0.5 ถึง 20 ขึ้นอยู่กับผู้ผลิต

#### ค. เกลือฟอสเฟต (มิกซ์ฟอสเฟต)

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้ในเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้ผู้ใดเห็นไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### ง. โซเดียมอริโธเรเบท

โซเดียมอริโธเรเบทช่วยให้ไนไตรต์สลายตัวได้เร็วขึ้น ลดปัญหาการตกค้าง และลดโอกาสการเกิดสารก่อมะเร็งเพิ่มความปลอดภัยให้กับผลิตภัณฑ์ ช่วยปรับปรุงสีของผลิตภัณฑ์ และยืดอายุการเก็บรักษา สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาอนุญาตให้ใช้ได้ปริมาณ 300 มิลลิกรัม ต่อเนื้อ 1 กิโลกรัม

#### 2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการใช้สารสกัดจากธรรมชาติในการยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์อาหาร

ในอุตสาหกรรมอาหารการใช้สารเคลือบแผ่นฟิล์มที่สามารถรับประทานได้กำลังเป็นเรื่องที่น่าสนใจอย่างมาก เนื่องจากศักยภาพของแผ่นฟิล์มที่เคลือบสารสามารถเพิ่มอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์อาหาร รักษาคุณภาพของผลิตภัณฑ์ และผู้บริโภคปลอดภัยจากจุลินทรีย์ จึงส่งผลให้นักวิจัยหลายคนได้มุ่งเน้นศึกษาบรรจุภัณฑ์อาหารจากแผ่นฟิล์มที่ย่อยสลายได้จากโพลิเมอร์ธรรมชาติ เช่น โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไขมัน (Norajit และคณะ, 2010)

Abreu และคณะ (2011) ได้ศึกษาการใช้ active packaging film ที่ใช้สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติจากเปลือกข้าวบาร์เลย์ โดยศึกษาการเกิดออกซิเดชันของไขมันในฉลามสีน้ำเงินแซ่แซ็ง (*Prionace glauca*) ในการตรวจสอบการชะลอการเกิดออกซิเดชันของกรดไขมันไม่อิ่มตัว PUFA ของเนื้อฉลามสีน้ำเงิน ชิ้นปลาฉลามสีน้ำเงินจะถูกบรรจุในฟิล์มชนิด low density polyethylene (LDPE) ที่มีสารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติ (ตัวอย่าง  $C_1=7 \text{ mg/dm}^2 \text{ film}$  และตัวอย่าง  $C_2=24 \text{ mg/dm}^2 \text{ film}$ ) หรือในฟิล์ม LDPE โดยไม่มีสารต้านอนุมูลอิสระ (ตัวอย่างควบคุม) และนำไปแช่แข็งเป็นเวลา 12 เดือน จากการศึกษาพบว่าค่าเปอร์ออกไซด์เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในตัวอย่างควบคุมในช่วง 6 เดือนแรก มากกว่าในตัวอย่าง  $C_1$  และ  $C_2$  และกรดไขมันอิสระมีปริมาณสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในตัวอย่างควบคุมมากกว่าในตัวอย่าง  $C_1$  และ  $C_2$  ในระหว่างระยะเวลา 12 เดือนที่ทำการศึกษาเมื่อพิจารณาระยะเวลา 6 เดือนที่ทำการเก็บรักษา พบว่าความเข้มข้นของกรด thiobarbituric ในตัวอย่าง  $C_1$  และ  $C_2$  มีค่าต่ำกว่าตัวอย่างควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าปฏิกิริยา hydrolytic และการเกิดออกซิเดชันของไขมันมีความไวต่อสารต้านอนุมูลอิสระและระยะเวลาในการเก็บรักษา และผลที่ได้ยืนยันถึงประสิทธิภาพของ active packaging ที่มีสารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติที่ได้มาจากเปลือกข้าวบาร์เลย์สามารถชะลอกระบวนการย่อยไขมันและเพิ่มความคงตัวของเกิดการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในเนื้อฉลามสีน้ำเงิน

จากการศึกษา antioxidant active packaging สำหรับผลิตภัณฑ์เนื้อไก่แปรรูป โดยใช้สภาวะแรงดันสูง ซึ่งผลิตภัณฑ์เนื้อไก่ทำจากอกไก่บด และสะโพกไก่จะถูกบรรจุในสภาวะสุญญากาศ (ชุดควบคุม) หรือในภาชนะจากนั้นนำไปให้แรงดันสูง (800 MPa เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส) และเก็บรักษาเป็นเวลา 25 วัน ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส ทำการศึกษาการเกิดออกซิเดชันของไขมันบนพื้นผิว และด้านในของก้อนเนื้ออบ (meat patties) พบว่าบริเวณพื้นผิวด้านนอกของก้อนเนื้ออบจะเกิดออกซิเดชันของไขมันสูง และการใช้ active packaging สามารถที่จะชะลอการเกิดออกซิเดชันของไขมันได้ถึง 25 วัน ซึ่งการเกิดออกซิเดชันของไขมันบริเวณด้านในของ meat patties จะถูกจำกัด แต่จะถูกยับยั้งบริเวณพื้นผิวของ active packaging นอกจากนี้ยังพบว่าผลของการเกิดออกซิเดชันของไขมันเมื่อใช้แรงดันสูงไม่สามารถอธิบายได้ว่าเกิดจากความเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์เพียงอย่างเดียว แต่อาจเกิดจากอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในเนื้อสัตว์ในระหว่างการให้แรงดันสูง (Bolumar และคณะ, 2011)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Camo และคณะ (2011) ได้ศึกษาอายุการเก็บรักษาของ สตีกเนื้อสดที่ถูกพ่นด้วยสารสกัด ออริกาโนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 1 2 และ 4 โดยตัวอย่างควบคุมสตีกเนื้อสดที่ไม่ถูกพ่นด้วยสาร สกัดออริกาโนจะใช้เป็นตัวอย่างควบคุม จากนั้นบรรจุสตีกเนื้อสดในภาชนะบรรจุ ซึ่งจะถูกเติมด้วย แก๊ส CO<sub>2</sub> ร้อยละ 80 O<sub>2</sub> ร้อยละ 20 และเก็บภายใต้แสงสว่าง (14 ชั่วโมง) ที่อุณหภูมิ 1 ± 1 องศา เซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน ทำการตรวจสอบการสลาย Metmyoglobin การเกิดออกซิเดชันของ ไขมัน (TBARS) การเปลี่ยนแปลงสี (CIE *a*\*) และประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสในด้านสี กลิ่น รวมทั้งกลิ่นออริกาโน จากการศึกษาพบว่าตัวอย่างเนื้อที่พ่นด้วยสารสกัดออริกาโนจะช่วยเพิ่มความคง ตัวของการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารสกัดออริกาโน สำหรับอายุการ เก็บรักษาของตัวอย่างเนื้อพบว่าต้องใช้สารสกัดออริกาโนที่มีความเข้มข้นอย่างน้อยร้อยละ 1 ซึ่ง สามารถเพิ่มอายุการเก็บรักษาอย่างมีนัยสำคัญที่ 14 - 23 วัน และพบว่าที่ความเข้มข้นของสารสกัด ออริกาโนร้อยละ 4 จะก่อให้เกิดกลิ่นที่ไม่ยอมรับ ดังนั้นความเข้มข้นของสารสกัดออริกาโนที่ เหมาะสมที่สุดในการทำ active packaging ควรจะอยู่ในช่วงร้อยละ 1 - 2

Contini และคณะ (2012) ได้ศึกษาการพัฒนาบรรจุภัณฑ์ที่ประกอบด้วยสารต้านอนุมูล อิสระจากธรรมชาติ 2 ชนิด ได้แก่ ภาชนะพลาสติกที่ได้จาก PET และฉีดยาพ่นด้วยสารสกัดจากผล citrus และ  $\alpha$ -tocopherol ทำการทดสอบเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของทั้งสองบรรจุภัณฑ์ โดยบรรจุเนื้อสัตว์ปรุงสุก และนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากผลการวิเคราะห์การ เกิดออกซิเดชันของไขมันในตัวอย่างที่บรรจุในภาชนะบรรจุที่เคลือบด้วยสารสกัดจากผล citrus ด้วย วิธี TBARS พบว่าการเกิดออกซิเดชันของไขมันต่ำกว่าแบบที่ไม่เคลือบอย่างมีนัยสำคัญที่ ( $p < 0.01$ ) ส่วนตัวอย่างเนื้อที่บรรจุในภาชนะที่เคลือบด้วย  $\alpha$ -tocopherol ไม่ได้แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระใดๆ

Contini และคณะ (2012) ได้ศึกษาการพัฒนาบรรจุภัณฑ์ที่ประกอบด้วยสารต้านอนุมูล อิสระจากธรรมชาติ 2 ชนิด ได้แก่ ภาชนะพลาสติกที่ได้จาก PET และฉีดยาพ่นด้วยสารสกัดจากผล citrus และ  $\alpha$ -tocopherol ทำการทดสอบเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของทั้งสองบรรจุภัณฑ์ โดยบรรจุเนื้อสัตว์ปรุงสุก และนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากผลการวิเคราะห์การ เกิดออกซิเดชันของไขมันในตัวอย่างที่บรรจุในภาชนะบรรจุที่เคลือบด้วยสารสกัดจากผล citrus ด้วย วิธี TBARS พบว่าการเกิดออกซิเดชันของไขมันต่ำกว่าแบบที่ไม่เคลือบอย่างมีนัยสำคัญที่ ( $p < 0.01$ ) ส่วนตัวอย่างเนื้อที่บรรจุในภาชนะที่เคลือบด้วย  $\alpha$ -tocopherol ไม่ได้แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระใดๆ

Hadder และคณะ (2012) ได้ศึกษาการทำงาน และคุณสมบัติสารต้านอนุมูลอิสระของ แผ่นฟิล์มเจลลาตินที่ทำจากหนังปลาทูน่า (*Thunnus thynnus*) ร่วมกับสารสกัดจากสาหร่ายสีน้ำตาล (*Cystoseira barbata*) ที่สกัดด้วยน้ำ หรือสกัดด้วยเมธานอลโดยทำการวิเคราะห์คุณสมบัติการต้าน อนุมูลอิสระ (ferric-reducing ability และ DPPH-radical-scavenging capacity) โดย เปรียบเทียบแผ่นฟิล์มเจลลาตินที่ทำจากหนังปลาทูน่าที่ผสมด้วย BHA จากการศึกษาพบว่าคุณสมบัติ ด้านอนุมูลอิสระของฟิล์มเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเพิ่มสารสกัดจากสาหร่ายลงไปบนแผ่นฟิล์ม

Jung และคณะ (2009) ได้ศึกษาการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของเนื้อหมู และเนื้อปลาโดยใช้แผ่นฟิล์มพลาสติกที่เคลือบด้วยไมโครแคปซูลที่บรรจุสารระเหยของสารสกัดด้วยเมธานอล horseradish จากผลการวิเคราะห์ HPLC ได้ยืนยันว่าในสารสกัดมีสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ อยู่ และจากการทดลองพบว่าการห่อหุ้มเนื้อหมู และเนื้อปลาด้วยแผ่นฟิล์มที่มีฤทธิ์ยับยั้งปฏิกิริยา ออกซิเดชันมีผลทำให้การเปลี่ยนแปลงสีเนื่องจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน รวมทั้งการเหม็นหืนที่ช้าลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ในการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าการใช้สารสกัดจาก horseradish เคลือบแผ่นฟิล์มซึ่ง เป็นสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติมีประสิทธิภาพในการเพิ่มความคงตัวของเนื้อหมู และเนื้อปลาได้

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



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 3

### วิธีการดำเนินการวิจัย

#### 3.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษา

3.1.1 สาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กที่คัดแยกจากแหล่งน้ำธรรมชาติภายในสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังจำนวน 10 สายพันธุ์ได้แก่

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

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

#### 3.2 วัสดุดิบ

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

#### 3.3 สารเคมี

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่จัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการศึกษาวิจัยเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

### 3.4 อุปกรณ์

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.5 วิธีการทดลอง

#### 3.5.1 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายน้ำจืดขนาดเล็กที่คัดแยกได้จากธรรมชาติ 10 สายพันธุ์

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

##### 3.5.1.1 การเก็บรักษาสาหร่ายสายพันธุ์

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

##### 3.5.1.2 การเตรียมหัวเชื้อของสาหร่าย

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

##### 3.5.1.3 การเพาะเลี้ยงสาหร่าย เพื่อเพิ่มปริมาณที่มีขนาดใหญ่

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

#### 3.5.1.4 การเก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่าย

1. ปิดเครื่องเติมอากาศ เอาสายยางที่ให้อากาศออก จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้เซลล์สาหร่ายตกตะกอนลงมาที่ก้นถังเพาะเลี้ยงเป็นเวลาประมาณ 1 - 2 วัน สังเกตสารละลายส่วนบนของอาหารหากมีความขุ่นหรือเขียวอยู่ ให้ตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งสารละลายส่วนบนใส

2. เทสารละลายใสส่วนบนออก นำส่วนตะกอนของสาหร่ายบริเวณก้นถังไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที

3. เทสารละลายใสส่วนบนทิ้งไป และนำตะกอนเซลล์ที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4. นำตัวอย่างสาหร่ายแห้งที่ได้มาบดให้ละเอียดด้วยโกร่งบดเป็นเวลาประมาณ 15 นาทีด้วยแรงที่คงที่ และเก็บตัวอย่างสาหร่ายที่บดแล้วในภาชนะบรรจุที่สะอาดที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปศึกษาต่อไป

#### 3.5.2 การสกัดสารสกัดหยาบจากสาหร่าย

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

##### 3.5.2.1 การสกัดด้วยน้ำ

1. นำตัวอย่างสาหร่าย 5 กรัม มาสกัดด้วยน้ำร้อน 50 มิลลิลิตร นำส่วนผสมมาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสและทำการเขย่าในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่าความเร็ว 130 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที

2. นำส่วนผสมที่ได้จากการสกัดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส

3. แยกสารละลายส่วนด้านบนออกและนำส่วนเซลล์ (Pellet) ไปสกัดซ้ำอีก 2 ครั้งด้วยวิธีเดิม จากนั้นนำส่วนของสารละลายที่ได้จากการสกัดทั้ง 3 ครั้งไปทำให้แห้งด้วยวิธีทำแห้งแบบเยือกแข็ง เก็บสารสกัดหยาบที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกระทั่งทำการวิเคราะห์ ทำการทดลองตัวอย่างละ 2 ซ้ำ

##### 3.5.2.2 การสกัดด้วยเอทานอล

1. นำตัวอย่างสาหร่าย 5 กรัม มาสกัดด้วยเอทานอลปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำส่วนผสมมาเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง

2. นำส่วนผสมที่ได้จากการสกัดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส

3. แยกสารละลายส่วนบนออกและนำส่วนเซลล์ไปสกัดซ้ำอีก 2 ครั้งด้วยวิธีเดิม นำส่วนของสารละลายที่ได้จากการสกัดทั้ง 3 ครั้งไปทำให้แห้งโดยระเหยเอาเอทานอลออกด้วยไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน เก็บสารสกัดหยาบที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกระทั่งทำการวิเคราะห์ ทำการทดลองตัวอย่างละ 2 ซ้ำ

### 3.5.3 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content)

นำตัวอย่างสารสกัดหยาบด้วยน้ำร้อนและเอทานอลของสาหร่ายทั้ง 10 สายพันธุ์มาทำการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu method ที่ดัดแปลงมาจาก Kumar และคณะ (2008) มีวิธีการวิเคราะห์ดังนี้

1. นำสารสกัดหยาบจากสาหร่ายที่ละลายด้วยเอทานอลความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรผสมกับน้ำกลั่นปริมาตร 6 มิลลิลิตรในหลอดทดสอบ
2. เติม Folin-Ciocalteu phenol reagent ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้ส่วนผสมเข้ากัน
3. เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้นร้อยละ 20 ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร เขย่าส่วนผสมให้เข้ากัน
4. ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 10 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นแล้วเขย่าส่วนผสมให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที
5. นำส่วนผสมไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร
6. นำค่าดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในรูปมิลลิกรัมสมมูลย์กรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัด โดยเทียบจากกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของกรดแกลลิกและค่าดูดกลืนแสง ทำการทดลองตัวอย่างละ 6 ซ้ำ

### 3.5.4 การประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากสาหร่าย

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้สำหรับอาจารย์และบุคลากรของงานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

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

$A = A_{517}$  ของตัวอย่างสารสกัดผสมกับ DPPH

$A_b = A_{517}$  ของตัวอย่างสารสกัดที่ไม่เติม DPPH

8. คำนวณหาค่าความเข้มข้นของตัวอย่างที่สามารถกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ได้ร้อยละ 50 (50 % Effective concentration : EC<sub>50</sub>) จากกราฟระหว่างร้อยละการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH และความเข้มข้นของสารสกัดจากสาหร่ายหรือสารมาตรฐาน BHT

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

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

2. เติมสารละลายเฟอร์รัสคลอไรด์เตตระไฮเดรต (FeCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O) ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เขย่าส่วนผสมให้เข้ากัน

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

4. นำส่วนผสมของสารละลายไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ทำการทดลองตัวอย่างละ 6 ซ้ำ

5. นำค่าดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณความสามารถในการจับเฟอร์รัสไอออน โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน EDTA-Na<sub>2</sub> ที่ความเข้มข้น 0.00005 0.0001 0.0005 0.001 0.005 และ 0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรดังนี้

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

โดยที่  $A_0$  = ค่าดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาควบคุม

$A_1$  = ค่าดูดกลืนแสงของตัวอย่างหรือสารมาตรฐาน EDTA-Na<sub>2</sub>

$A_2$  = ค่าดูดกลืนแสงของ blank

หมายเหตุ 1. ปฏิกิริยาควบคุม (Control) ให้ใช้ตัวทำละลาย 2 มิลลิลิตรแทนสารสกัด

2. blank ให้ใช้น้ำกลั่นปริมาตร 0.2 มิลลิลิตรแทนสารละลาย ferrozine

3.5.4.3 การวิเคราะห์การยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิกของสารสกัดด้วยวิธี Thiobarbituric acid reactive substances ดัดแปลงจาก Panphadung (2004) และ Ismail และคณะ (2010)

1. การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

1. เตรียมสารละลายกรดลิโนเลอิกความเข้มข้นร้อยละ 2.5 น้ำหนักโดยปริมาตรในเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. นำสารละลายกรดลิโนเลอิกความเข้มข้นร้อยละ 2.5 ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ พีเอช 7 ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 4 มิลลิลิตร และน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วผสมสารละลายด้วยเครื่องกวนสารละลาย

3. เติมสารละลายของสารสกัดหยาบสาหร่ายที่สกัดด้วยน้ำร้อนและเอทานอลที่มีความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในขวดไวแอล แล้วตามด้วยสารละลายผสมข้อ 2 จากนั้นทำการผสมให้เข้ากัน

4. นำสารละลายตัวอย่างข้อ 3 ไปปั่นในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

5. ชุดควบคุมมีวิธีการเตรียมเช่นเดียวกับขั้นตอนดังกล่าวข้างต้นแต่ไม่เติมสารสกัดจากสาหร่าย และใช้ BHT เป็นชุดควบคุมเชิงบวก

## 2. การวิเคราะห์ปฏิบัติการ

1. ปิเปตสารละลายตัวอย่างปริมาตร 2 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลอง

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

3. นำสารละลายผสมลงในน้ำต้มเดือดเป็นเวลา 20 นาที เพื่อเร่งการเกิดปฏิบัติการ

4. ทำให้สารละลายผสมให้เย็นลงและนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที

5. ปิเปตส่วนใส นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร ทำการทดลองตัวอย่างละ 6 ซ้ำ

6. นำค่าที่ได้มาคำนวณหาร้อยละการยับยั้งปฏิบัติการ ดังนี้

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

โดยที่  $A_{\text{control}}$  คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 532 นาโนเมตรของตัวควบคุม

$A_{\text{sample}}$  คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 532 นาโนเมตรของตัวอย่าง

## 3.6 การประยุกต์ใช้สารสกัดจากสาหร่ายร่วมกับแผ่นฟิล์มเซลลูโลสในการยับยั้งปฏิบัติการเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน

ในการศึกษาการประยุกต์ใช้สารสกัดหยาบจากสาหร่ายมาใช้ร่วมกับแผ่นฟิล์มเซลลูโลส จะทำการคัดเลือกสารสกัดจากสาหร่ายสีเขียวเพียง 1 สายพันธุ์ ที่แสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ดีโดยเฉพาะความสามารถในการยับยั้งปฏิบัติการเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน เพื่อนำไปใช้ศึกษาการยับยั้งปฏิบัติการออกซิเดชันของไขมันในผลิตภัณฑ์เนื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.6.1 การเตรียมแผ่นฟิล์มเซลลูโลส (ดวงใจ, 2549)

#### 3.6.1.1 การเตรียมหัวเชื้อ

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

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

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

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

#### 3.6.1.2 การผลิตแผ่นเซลลูโลสโดยใช้อาหารสูตรน้ำมะพร้าว

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

2. นำไปบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

#### 3.6.1.3 การทำให้แผ่นเซลลูโลสบริสุทธิ์

1. ทำการเก็บเกี่ยวแผ่นเซลลูโลสออกจากอาหาร แล้วนำไปล้างด้วยน้ำเพื่อกำจัดองค์ประกอบของอาหารและเศษเซลล์ออก

2. นำแผ่นเซลลูโลสมาต้มด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ที่อุณหภูมิ 90-100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อกำจัดเซลล์แบคทีเรียออกจากแผ่นเซลลูโลส

3. จากนั้นนำมาแช่น้ำทิ้งไว้โดยเปิดน้ำไหลผ่านเป็นเวลา 2 วัน เพื่อให้ได้ค่า pH ที่เป็นกลางและแผ่นเซลลูโลสที่มีสีขาว

#### 3.6.1.4 การผลิตแผ่นฟิล์มเซลลูโลส

1. นำแผ่นเซลลูโลสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วมาเข้าเครื่องอัดรีดน้ำ โดยใช้แรง 7 ตัน จะได้แผ่นเซลลูโลสที่มีลักษณะบาง โดยมีความหนา 0.5 มิลลิเมตร

2. นำแผ่นเซลลูโลสที่ได้มาฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แผ่นฟิล์มเซลลูโลสที่ได้จะนำมาใช้ศึกษาร่วมกับสารสกัดจากสาหร่ายต่อไป

3.6.2 การใช้สารสกัดจากสาหร่ายร่วมกับแผ่นฟิล์มเซลลูโลสในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6.2.1 การศึกษาความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันของสารสกัดจากสาหร่ายที่ความเข้มข้นต่างๆด้วยวิธี Thiobarbituric acid reactive substance โดยดัดแปลงตามวิธีการของ Panphadung (2004) และ Ismail และคณะ (2010)

1. การเตรียมสารละลายกรดลิโนเลอิก

1. เตรียมสารละลายกรดลิโนเลอิกความเข้มข้นร้อยละ 2.5 น้ำหนักโดยปริมาตร ในเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95

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

2. การเตรียมสารละลายของสารสกัดหยาบจากสาหร่าย

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

3. การเตรียมสารละลายตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบ

1. ปิเปตสารละลายกรดลิโนเลอิก ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ลงไปในขวดสี่ขาขนาด 60 ซีซี จากนั้นเติมสารละลายของสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆลงไป ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมสารละลายทั้งสองให้เข้ากันโดยใช้ Vortex

2. นำสารละลายตัวอย่างของแต่ละความเข้มข้น ไปบ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

3. สำหรับชุดควบคุมมีวิธีการเตรียมเช่นเดียวกับขั้นตอนดังกล่าวข้างต้น แต่ไม่ใส่สารสกัดหยาบจากสาหร่าย

4. การวิเคราะห์ปฏิกิริยา

1. ปิเปตสารละลายตัวอย่างปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดสอบ

2. เติมกรดไตรคลอโรอะซีติกเข้มข้นร้อยละ 20 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และสารละลายกรด ไทโอบาร์บิทูริกความเข้มข้นร้อยละ 1 ที่ละลายในโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.05 นอร์มอล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทำการผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากันด้วย Vortex สำหรับแบบกลิ้งใช้เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 แทนสารละลายตัวอย่างปริมาตร 2 มิลลิลิตร

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

4. เมื่อครบเวลา นำสารละลายผสมมาทำให้เย็นลงและนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที

5. ดูดส่วนใสออกมาแล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร ทำการทดสอบตัวอย่างละ 6 ซ้ำ

6. นำค่าดูดกลืนแสงที่ได้มาทำการคำนวณหาร้อยละการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันดังนี้

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยที่  $A_{\text{control}}$  คือ ค่าดูดกลืนแสงที่ 532 นาโนเมตรของตัวควบคุม

$A_{\text{sample}}$  คือ ค่าดูดกลืนแสงที่ 532 นาโนเมตรของตัวอย่าง

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

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

1. การเตรียมสารสกัดหยาบจากสาหร่ายที่ใช้ร่วมกับแผ่นฟิล์มเซลลูโลส

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

2. นำแผ่นฟิล์มเซลลูโลสที่เตรียมเอาไว้มาแช่ในสารสกัดหยาบจากสาหร่ายแต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 35 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้แผ่นฟิล์มเซลลูโลสดูดซับสารสกัด

3. จากนั้นนำแผ่นฟิล์มเซลลูโลสออก นำไปผึ่งให้แห้งแล้วนำไปจุ่มลงในกลีเซอรอลความเข้มข้นร้อยละ 15 เพื่อให้แผ่นฟิล์มเซลลูโลสมีความยืดหยุ่น

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

6. จากนั้นนำแผ่นฟิล์มไปทดสอบการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันด้วยวิธี Thiobarbituric acid reactive substance

2. การเตรียมสารละลายของสารสกัด

1. นำแผ่นฟิล์มเซลลูโลสที่ผ่านการแช่สารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ จากนั้นนำแผ่นฟิล์มที่ได้มา 0.1 กรัม เติมเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 99.5 (absolute ethanol) ลงไปปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมส่วนผสมให้เข้ากัน

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

3. การเตรียมสารละลายกรดลิโนเลอิก

1. เตรียมสารละลายกรดลิโนเลอิกความเข้มข้นร้อยละ 2.5 น้ำหนักโดยปริมาตรในเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4. การเตรียมสารละลายตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบ

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

2. นำสารละลายตัวอย่าง ไปบ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

3. สำหรับชุดควบคุมมีวิธีการเตรียมเช่นเดียวกับขั้นตอนดังกล่าวข้างต้น แต่ไม่ใส่สารสกัดหยาบจากสาหร่าย

#### 5. การวิเคราะห์ปฏิกิริยา

1. ปิเปตสารละลายตัวอย่างปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดสอบ

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

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

4. นำสารละลายผสมมาทำให้เย็นลงแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที

5. ตูดส่วนใสออกมาแล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

6. นำค่าดูดกลืนแสงที่ได้มาทำการคำนวณหาร้อยละการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันดังนี้

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

โดยที่  $A_{\text{control}}$  คือ ค่าดูดกลืนแสงที่ 532 นาโนเมตรของตัวควบคุม

$A_{\text{sample}}$  คือ ค่าดูดกลืนแสงที่ 532 นาโนเมตรของตัวอย่าง

### 3.7 การใช้สารสกัดจากสาหร่ายร่วมกับแผ่นฟิล์มเซลลูโลสในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันในผลิตภัณฑ์กุนเชียงหมูชั้นรูป

#### 3.7.1 การเตรียมแผ่นเซลลูโลสที่ซุบสารสกัดหยาบจากสาหร่ายที่ความเข้มข้นต่างๆ

1. ทำการเตรียมแผ่นฟิล์มเซลลูโลส โดยเลี้ยงเชื้อ *G. xylinus* TISTR 976 ในอาหารสูตรน้ำมะพร้าวโดยทำการเพาะเลี้ยงในภาตสี่เหลี่ยมผืนผ้าขนาดกว้างxยาว เท่ากับ 9.2x7 นิ้ว ใส่อาหารสูตรน้ำมะพร้าวปริมาตร 900 มิลลิลิตรและเติมหัวเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มที่สภาวะนิ่ง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน แล้วจึงตัดแผ่นฟิล์มเซลลูโลสให้มีขนาด กว้างxยาว เท่ากับ

2.4x1.6 นิ้ว การที่ส่งมอบไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. จากนั้นนำแผ่นฟิล์มเซลลูโลสที่ได้ไปทำการซบสารสกัดหยาบจากสาหร่ายที่มีความเข้มข้น เป็น 2 3 และ 4 เท่าของ  $IC_{50}$  โดยใช้ระยะเวลาในการแช่ 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง

3. นำแผ่นฟิล์มที่ได้ไปผึ่งให้แห้งแล้วนำไปจุ่มลงในกลีเซอรอลความเข้มข้นร้อยละ 15 เพื่อให้แผ่นฟิล์มเซลลูโลสมีความยืดหยุ่น

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

### 3.7.2 การผลิตกุนเชียงหมูขึ้นรูป (รุจริน, 2555)

ทำการผลิตกุนเชียงหมูขึ้นรูปโดยมีสูตรส่วนผสมและวิธีการทำกุนเชียงหมูขึ้นรูปมีดังต่อไปนี้

#### ตารางที่ 3.1 ส่วนผสมในการทำกุนเชียงหมูขึ้นรูป

| ส่วนผสม                               | น้ำหนัก (กรัม) |
|---------------------------------------|----------------|
| หมูเนื้อแดงส่วนสะโพก                  | 100.0          |
| มันแข็ง                               | 25.0           |
| น้ำตาลทราย                            | 26.5           |
| ผงเพรก (ในไตรท์ความเข้มข้นร้อยละ 0.5) | 3.0            |
| เกลือฟอสเฟต                           | 0.3            |
| โซเดียมอริโธเรบเท                     | 0.03           |

#### วิธีการทำ

- นำหมูเนื้อแดงส่วนสะโพก และมันแข็งล้างน้ำให้สะอาด จากนั้นซับน้ำด้วยผ้าสะอาด
- หั่นหมูเนื้อแดงส่วนสะโพก และมันแข็งให้เป็นชิ้นเล็กๆ แล้วนำไปแช่แข็งข้ามคืน
- บดหมูเนื้อแดงด้วยเครื่องบด
- บดมันหมูแข็งด้วยเครื่องบด
- เติมผงเพรกลงในเนื้อแดง นวดคลุกให้เข้ากัน (ควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส)
- เติมเกลือฟอสเฟต และโซเดียมอริโธเรบเท นวดคลุกให้เข้ากัน (ควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส)
- เติมมันหมูแข็ง นวดให้เข้ากันโดยทั่วถึง (ควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส)
- เติมน้ำตาล นวดให้เข้ากันจะได้เป็นส่วนผสมกุนเชียง
- จากนั้นนำส่วนผสมกุนเชียงที่ได้มาบดให้เข้ากันมากขึ้น เพื่อลดขนาดของมันแข็งไม่ให้เป็นก้อน (ควบคุมอุณหภูมิให้เย็น)

10. บรรจุส่วนผสมกุนเชียง 350 กรัมลงในถุงพลาสติกขนาด 8x12 นิ้ว เคลี่ยให้ทั่วถุง ให้ความยาวจากกันถุงมาทางปากถุงได้ประมาณ 11 นิ้ว และรีดให้เป็นแผ่นควบคุมความหนาของส่วนผสมกุนเชียงให้สม่ำเสมอ (ประมาณ 4 มิลลิเมตร) เพื่อให้ได้กุนเชียงหมูขึ้นรูปที่มีความหนาใกล้เคียงกัน และสุกสม่ำเสมอเมื่อเข้าอบ

11. จากนั้นนำเข้าสู่แช่แข็ง จนเนื้อแข็งเป็นแผ่นดีนำออกมาตัดถุงออกให้หมด แล้วตัดส่วนผสมกุนเชียงแช่แข็งให้เป็นชิ้นขนาด 1x1.5 นิ้ว (ขั้นตอนนี้ควรทำด้วยความรวดเร็ว และไม่วางเอกสารเป็นเอกสารที่ส่งงานไว้สำหรับกรังงานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนุญาดเห็นาเบไซบระเยชชนต่านการคร้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 4

### ผลการวิจัยและอภิปรายผล

#### 4.1 ผลการเพาะเลี้ยงสาหร่ายน้ำจืดขนาดเล็กที่คัดแยกได้จากธรรมชาติจำนวน 10 สายพันธุ์

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

##### 4.1.1 การเพาะเลี้ยง *Ankistrodesmus* sp. W53

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

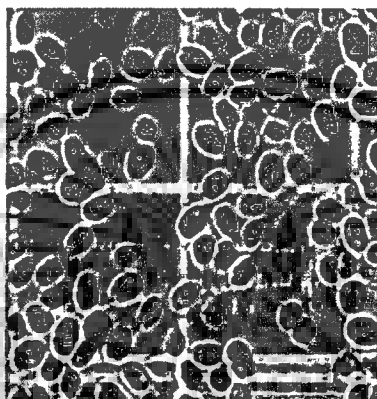


รูปที่ 4.1 ลักษณะเซลล์ของ *Ankistrodesmus* sp. W53 ที่กำลังขยายของภาพ 400 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้เพื่อการศึกษาด้านนี้ ไม่อนุญาตให้เผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาตจากเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.1.2 การเพาะเลี้ยง *Chlamydomonas* sp. W53

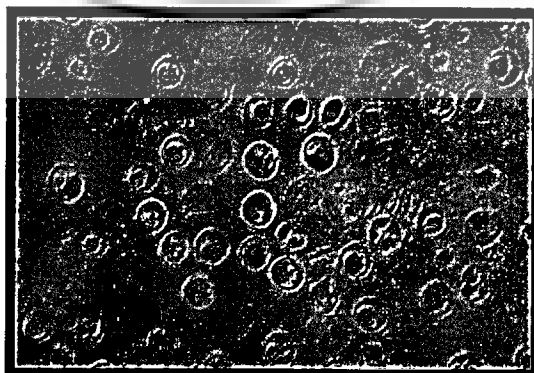
การเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กสายพันธุ์ *Chlamydomonas* sp. W53 ในอาหารสูตร BG - 11 พบว่ามีลักษณะเซลล์เป็นทรงกลม มีคลอโรพลาสต์ที่เป็นรูปถ้วย ในระยะเริ่มการเจริญเติบโตในระยะปรับตัว ลักษณะภายนอกของเซลล์มีขนาดเล็ก เมื่อเพาะเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรไปจนถึงระยะการเจริญเติบโตผนังเซลล์เริ่มหนาขึ้น จนกระทั่งเมื่อเข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตคงที่ สีเขียวภายในเซลล์จะค่อยๆจางลงเป็นสีเหลือง มีผนังเซลล์หนา และเห็นอายุสพอตชัดเจนขึ้น ดังรูปที่ 4.2



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

#### 4.1.3 การเพาะเลี้ยง *Chlorella* sp. E53

การเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กสายพันธุ์ *Chlorella* sp. E53 ในอาหารสูตร N-8 พบว่าลักษณะของเซลล์เป็นทรงกลม ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ภายในเซลล์มีคลอโรพลาสต์ ที่เป็นรูปถ้วยอยู่ภายในเซลล์ 1 อัน เมื่อทำการเพาะเลี้ยงไปประมาณ 3 วัน พบว่าขนาดของเซลล์มีขนาดใหญ่ขึ้นจากระยะแรก ในระหว่างการเพาะเลี้ยงจำนวนเซลล์มีอัตราการเจริญที่สูงขึ้นอย่างรวดเร็ว และเมื่อเข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตคงที่ สีเขียวภายในเซลล์จะค่อยๆจางลงเป็นสีเหลือง และขนาดของเซลล์ค่อยๆ เล็กลง จนใกล้เคียงกับระยะปรับตัว ดังรูปที่ 4.3

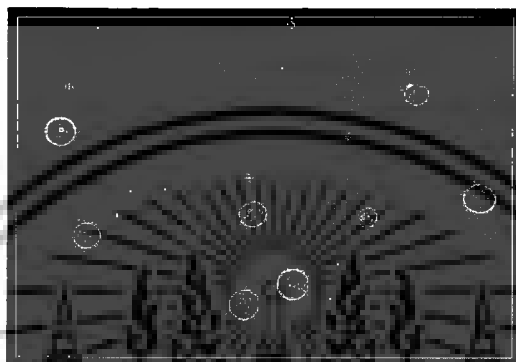


รูปที่ 4.3 ลักษณะเซลล์ของ *Chlorella* sp. E53 ที่กำลังขยายของภาพของภาพ 400 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.1.4 การเพาะเลี้ยง *Chlorella* sp. ED53

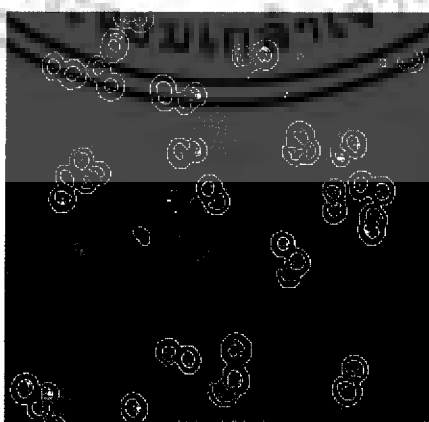
การเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กสายพันธุ์ *Chlorella* sp. ED53 ในอาหารสูตร BB พบว่าลักษณะเซลล์เป็นทรงกลม ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ภายในมีคลอโรพลาสต์ที่เป็นรูปถ้วยอยู่ภายในเซลล์ 1 อัน ในระยะปรับตัวจนกระทั่งเข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตคงที่ ขนาดของเซลล์ไม่มีการเปลี่ยนแปลง สีเขียวของเซลล์จางลงเล็กน้อย ค่าการดูดกลืนแสงที่สามารถวัดได้ก็ลดลงเช่นกัน ดังรูปที่ 4.4



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

#### 4.1.5 การเพาะเลี้ยง *Chlorella* sp. W53

จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กสายพันธุ์ *Chlorella* sp. W53 ด้วยอาหารสูตร N-8 พบว่าเซลล์มีลักษณะทรงกลม ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ภายในมีคลอโรพลาสต์รูปถ้วย สาหร่ายชนิดนี้มักอยู่เป็นกระจุกไม่สม่ำเสมอ ในระยะปรับตัว เซลล์มีจำนวนน้อยแต่เมื่อระยะเวลาผ่านไปปริมาณเซลล์ของสาหร่ายชนิดนี้เพิ่มขึ้นในปริมาณไม่มากนักจนกระทั่งถึงระยะการเจริญเติบโตคงที่ สีของเซลล์จะมีสีเขียวจางลงเรื่อยๆ จนถึงระยะใกล้ตาย ดังรูปที่ 4.5



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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.1.6 การเพาะเลี้ยง *Chlorella* sp. W54

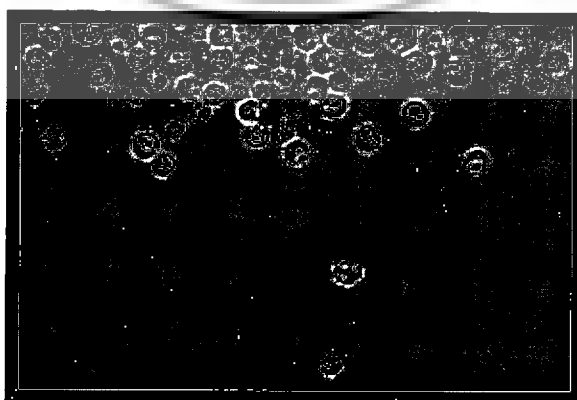
การเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กสายพันธุ์ *Chlorella* sp. W54 ในอาหารสูตร N - 8 พบว่าลักษณะเซลล์เป็นทรงกลม ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ภายในมีคลอโรพลาสต์ที่เป็นรูปถ้วยอยู่ภายในเซลล์ ในระยะเริ่มต้นการเจริญเติบโตจนกระทั่งเข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตคงที่ ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ไม่มีการเปลี่ยนแปลง แต่มีปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว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



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

#### 4.1.7 การเพาะเลี้ยง *Chlorella* sp. W55

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



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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นับญาติเห็นาไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.1.8 การเพาะเลี้ยง *Chlorococcum* sp. C53

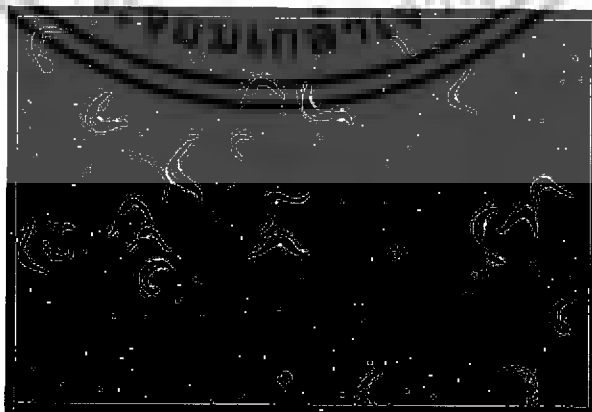
การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorococcum* sp. C53 ด้วยอาหารสูตร N - 8 พบว่า เซลล์มีลักษณะเป็นรูปทรงกลม ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ภายในมีคลอโรพลาสต์รูปถ้วย โดยในระยะเริ่มต้นของการเจริญเซลล์ของสาหร่ายชนิดนี้มีการเพิ่มจำนวนเซลล์ค่อนข้างมากจนกระทั่งถึงระยะการเจริญเติบโตคงที่ โดยที่ลักษณะทางกายภาพไม่เปลี่ยนแปลง ดังรูปที่ 4.8



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

#### 4.1.9 การเพาะเลี้ยง *Monoraphidium* sp. W53

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



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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.1.10 การเพาะเลี้ยง *Scenedesmus* sp. W53

การเพาะเลี้ยง *Scenedesmus* sp. W53 ในอาหารสูตร N-8 พบว่าเซลล์อยู่กันเป็นโคโลนี ลอยตามน้ำ ไม่มีแฟลกเจลลาที่สามารถเคลื่อนที่ได้ มีรูปร่างคล้ายพระจันทร์เสี้ยว คลอโรพลาสต์มีลักษณะคล้ายจานแบน ซึ่งช่วงระยะปรับตัวของสาหร่ายสายพันธุ์นี้จะมีปริมาณเซลล์ค่อนข้างน้อย แต่เมื่อเริ่มเข้าระยะการเจริญเซลล์จะค่อยๆ เพิ่มจำนวนเซลล์ขึ้นไปจนกระทั่งถึงระยะการเจริญเติบโตคงที่ สีเขียวของตัวเซลล์จะค่อยๆ จางลง ในช่วงที่สาหร่ายสายพันธุ์นี้มีการสืบพันธุ์เซลล์ที่เกาะกลุ่มกันเป็นโคโลนีจะหลุดออกเป็นเซลล์เดี่ยว ดังรูปที่ 4.10



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

#### 4.2 ผลได้ของสารสกัดหยาบจากสาหร่ายขนาดเล็ก 10 สายพันธุ์

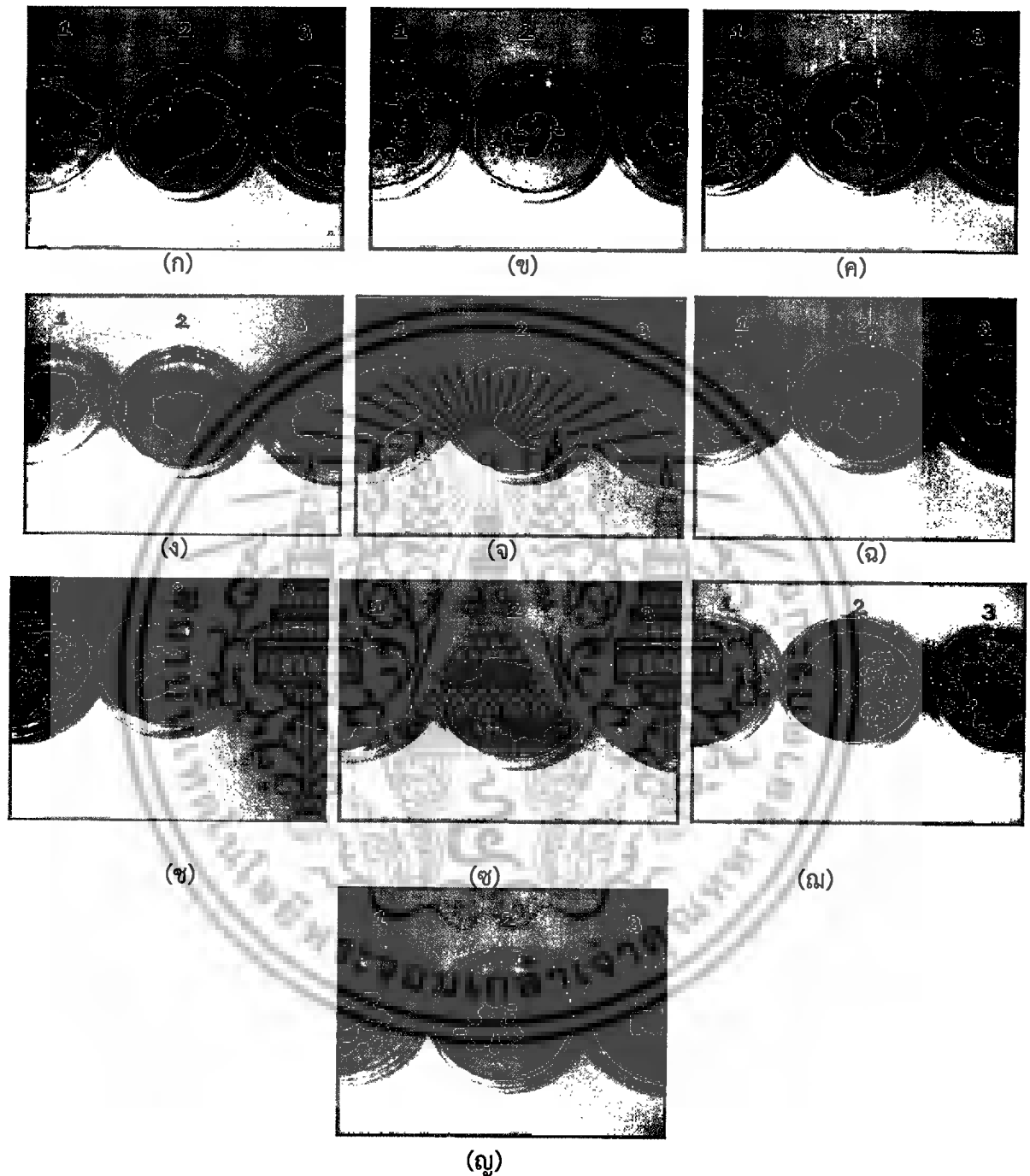
ในการศึกษาผลได้ของสารสกัดหยาบของสาหร่ายขนาดเล็กจำนวน 10 สายพันธุ์ ได้แก่ *Ankistrodesmus* sp. W53, *Chlamydomonas* sp. W53, *Chlorella* sp. E53, *Chlorella* sp. ED53, *Chlorella* sp. W53, *Chlorella* sp. W54, *Chlorella* sp. W55, *Chlorococcum* sp. C53, *Monoraphidium* sp. W53 และ *Scenedesmus* sp. W53 โดยนำเซลล์สาหร่ายที่ผ่านการทำแห้งแล้วมาบดเป็นผงเพื่อให้เซลล์สาหร่ายแตก จากนั้นนำไปสกัดด้วยน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เซลเซียส และสกัดด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 95 เป็นตัวทำละลาย พบว่า สารสกัดจากสาหร่ายที่ใช้น้ำร้อนเป็นตัวทำละลายจะมีลักษณะเป็นผงแห้ง มีสีเขียวจนถึงสีเขียวอมเหลือง ในขณะที่สารสกัดหยาบจากสาหร่ายที่ใช้เอทานอลร้อยละ 95 เป็นตัวทำละลาย สารสกัดที่ได้มีลักษณะเหนียวข้นหนืดและมีสีเขียวเข้มจนถึงสีเขียวเข้มอมดำ (รูปที่ 4.11 และ 4.12)

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

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

เป็นที่รู้กันดีว่าผลได้ของสารสกัดหยาบขึ้นอยู่กับชนิดของตัวทำละลายที่มีขั้วต่างกัน พีเอช เวลาในการสกัด และอุณหภูมิ เป็นต้น เช่นเดียวกับองค์ประกอบทางเคมีในตัวอย่าง โดยการสกัดภายใต้สภาวะของเวลากับอุณหภูมิเดียวกัน ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดและคุณสมบัติทางเคมีของตัวอย่างเป็น 2 ตัวแปรที่สำคัญที่สุด และการสกัดด้วยน้ำร้อนให้ร้อยละของสารสกัดแห้งสูงกว่าการสกัดด้วยเอทานอล เนื่องจากน้ำเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วสูงกว่าเอทานอล ทำให้ในการสกัดนั้นโมเลกุลของน้ำสามารถดึงเอาปริมาณสารประกอบต่างๆที่อยู่ในสาหร่ายออกมาได้ในปริมาณมากกว่าเอทานอล ซึ่งมีความเป็นขั้วต่ำกว่า (Waters และคณะ, 1996) นอกจากนี้น้ำร้อนยังสามารถละลายสารอื่น เช่น คาร์โบไฮเดรต กรดอินทรีย์ เป็นต้น (Macheix และคณะ, 1990) ทำให้ร้อยละของสารสกัดแห้งด้วยน้ำร้อนสูงกว่าการสกัดด้วยเอทานอล ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ López และคณะ (2011) พบว่าผลได้ของสาหร่ายสีน้ำตาล *Stypocaulon scoparium* ที่สกัดด้วยน้ำมากกว่าที่สกัดด้วยเอทานอล ซึ่งมีร้อยละของผลได้เท่ากับ 16.6 และ 2.36

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.11 ปริมาณผลได้และลักษณะของสารสกัดด้วยน้ำร้อนจากสาหร่ายสีเขียวจำนวน 10 สายพันธุ์  
 (ก) *Ankistrodesmus* sp. W53    (ข) *Chlamydomonas* sp. W53    (ค) *Chlorella* sp. E53  
 (ง) *Chlorella* sp. ED53    (จ) *Chlorella* sp. W53    (ฉ) *Chlorella* sp. W54  
 (ช) *Chlorella* sp. W55    (ซ) *Chlorococcum* sp. C53    (ณ) *Monoraphidium* sp. W53  
 (ญ) *Scenedesmus* sp. W53

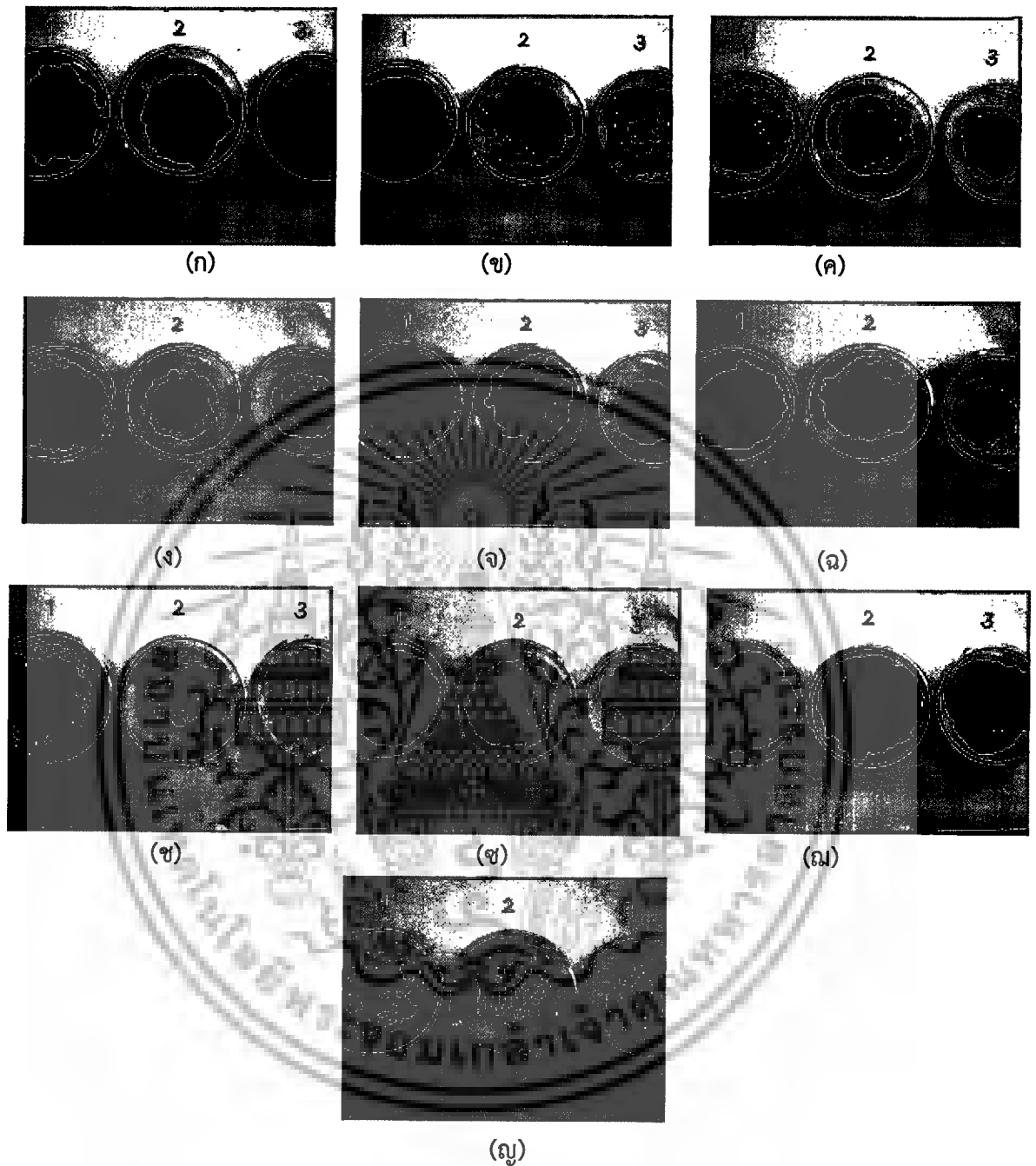
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ร้อยละของผลได้และลักษณะของสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยน้ำร้อนจากสาหร่ายสีเขียวจำนวน 10 สายพันธุ์

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

หมายเหตุ

- <sup>1</sup> ค่าเฉลี่ยน้ำหนักของผลได้รวมของสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยน้ำร้อนซ้ำ 3 ครั้ง โดยทำการทดลองตัวอย่างละ 2 ซ้ำ
- <sup>2</sup> ค่าเฉลี่ยของร้อยละของผลได้ของสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยน้ำร้อน โดยแสดงในรูปค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=2)
- <sup>3</sup> a,b,c.... ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่มีตัวอักษรต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)



รูปที่ 4.12 ปริมาณผลได้ของสารสกัดหยาบด้วยเอทานอลจากสาหร่ายจำนวน 10 สายพันธุ์

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ร้อยละของผลได้และลักษณะของสารสกัดหายาบที่สกัดด้วยเอทานอลจากสาหร่ายสีเขียวจำนวน 10 สายพันธุ์

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

หมายเหตุ

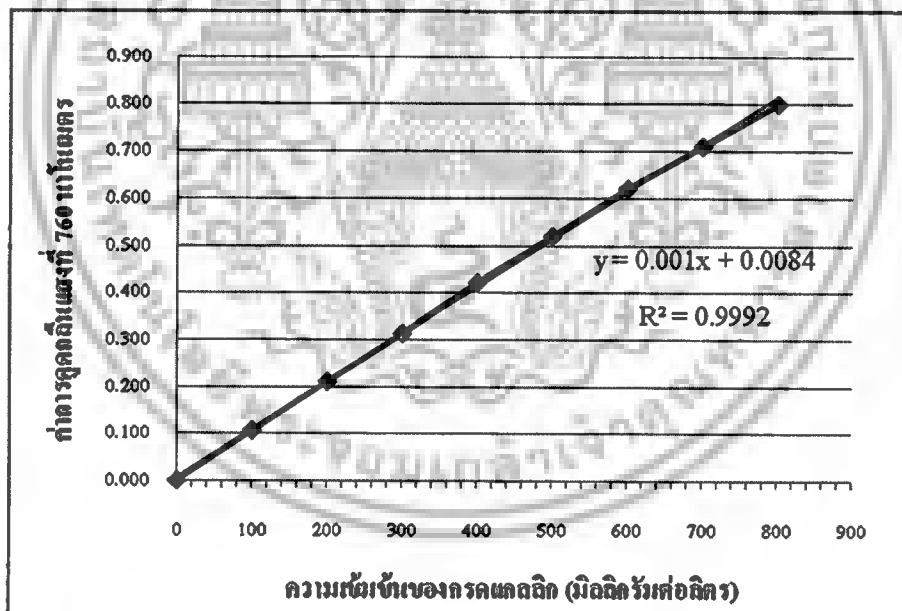
<sup>1</sup> ค่าเฉลี่ยน้ำหนักของผลได้รวมของสารสกัดหายาบที่สกัดด้วยเอทานอลซ้ำ 3 ครั้ง โดยทำการทดลองตัวอย่างละ 2 ซ้ำ

<sup>2</sup> ค่าเฉลี่ยของร้อยละของผลได้ของสารสกัดหายาบที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล แสดงในรูปค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n = 2)

<sup>3</sup> a,b,c,d ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่มีตัวอักษรต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

#### 4.3 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content)

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



รูปที่ 4.13 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกรดแกลลิกและค่าการดูดกลืนแสงที่ 760 นาโนเมตร

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

สามารถกำจัดอนุมูลอิสระต่างๆโดยตรง เช่น อนุมูลไฮดรอกซี (OH) ไนโตรเจนไดออกไซด์ ( $\text{NO}_2^-$ ) และกรดเปอร์ออกซีไนตริก (ONOOH) เป็นต้น 2) สามารถหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน (lipid peroxidation) หรือ 3) สารประกอบฟีนอลิกสามารถจับหรือรวมตัวกับไอออนของโลหะ เช่น  $\text{Fe}^+$  และ  $\text{Cu}^{2+}$  ซึ่งเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการสร้างอนุมูลอิสระตัวอื่นๆ ( กล่าวขวัญ และคณะ, 2553) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงทำการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจากสารสกัดของสาหร่าย

จากการนำสารสกัดจากสาหร่ายน้ำจืดขนาดเล็กจำนวน 10 สายพันธุ์ที่สกัดด้วยเอทานอล และน้ำร้อนมาวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดโดยวิธี Folin-ciocalteu ที่ความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เทียบกับสารมาตรฐานกรดแกลลิกพบว่า สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสาหร่ายแต่ละสายพันธุ์มีปริมาณแตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดด้วยน้ำจากสาหร่าย 10 สายพันธุ์

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

หมายเหตุ

<sup>1</sup> ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่ได้เทียบกับสารมาตรฐานกรดแกลลิกในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลย์กรดแกลลิกต่อกรัมของ

สารสกัด โดยแต่ละค่าจะแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=6)

a,b ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่มีตัวอักษรต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดด้วยเอทานอลจากสาหร่าย  
10 สายพันธุ์

| ตัวอย่างสาหร่าย              | ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด <sup>1</sup><br>(มิลลิกรัมสมมูลย์กรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด) |
|------------------------------|---|
| <i>Ankistrodesma</i> sp. W53 | 19.73 <sup>e2</sup> ± 9.98  |
| <i>Chlamydomonas</i> sp. W53 | 54.70 <sup>a</sup> ± 2.97   |
| <i>Chlorella</i> sp. E53     | 35.50 <sup>bc</sup> ± 0.14  |
| <i>Chlorella</i> sp. ED53    | 29.10 <sup>bcde</sup> ± 1.27  |
| <i>Chlorella</i> sp. W53     | 39.70 <sup>b</sup> ± 10.32  |
| <i>Chlorella</i> sp. W54     | 21.83 <sup>e</sup> ± 2.12   |
| <i>Chlorella</i> sp. W55     | 34.43 <sup>bcd</sup> ± 0.71   |
| <i>Chlorococcum</i> sp. C53  | 23.60 <sup>de</sup> ± 0.57  |
| <i>Monoraphidium</i> sp. W53 | 25.06 <sup>cde</sup> ± 2.44   |
| <i>Scenedesmus</i> sp. W53   | 27.90 <sup>cde</sup> ± 2.69   |

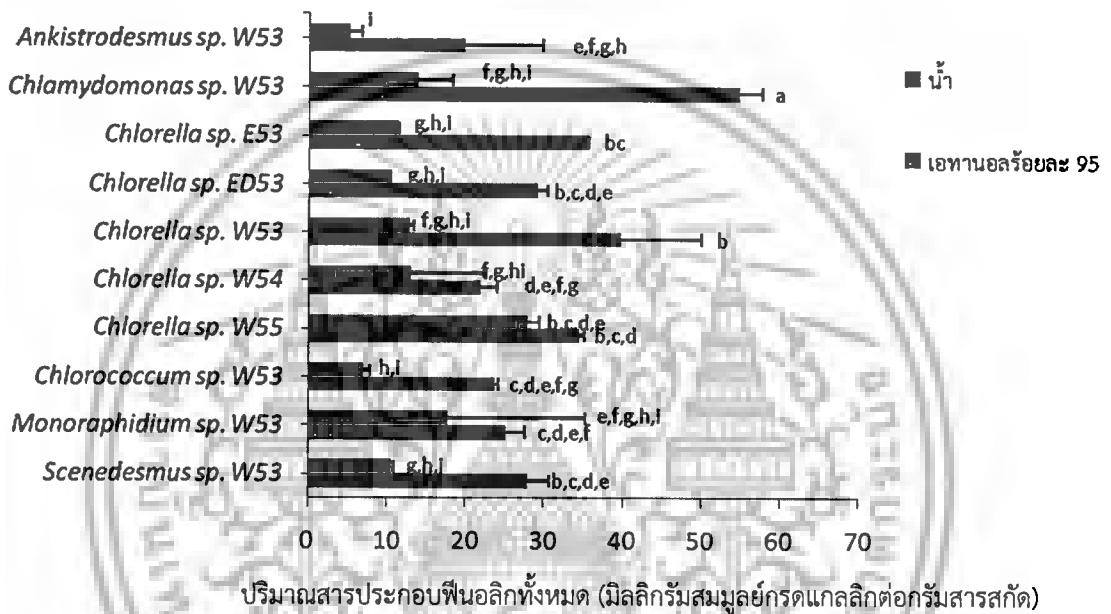
หมายเหตุ

<sup>1</sup> ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่ได้เทียบกับสารมาตรฐานกรดแกลลิกในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลย์กรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัด โดยแต่ละค่าจะแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=6)

<sup>2</sup> a,b,c,... ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่มีตัวอักษรต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดด้วยน้ำร้อนและเอทานอลพบว่าเมื่อพิจารณาสาหร่ายชนิดเดียวกัน สารสกัดด้วยเอทานอลมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงกว่าสารสกัดด้วยน้ำร้อนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) (รูปที่ 4.14) การที่สารสกัดหยาบที่ใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากกว่าสารสกัดหยาบที่ใช้น้ำเป็นตัวทำละลายอาจเนื่องมาจากสารประกอบฟีนอลิกเป็นสารประกอบที่มีวงแหวนเบนซีนเป็นองค์ประกอบ โครงสร้างของสารประเภทฟีนอลมีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ต่อกับหมู่แอริล (Ar) ทำให้มีสูตรทั่วไปคือ ArOH \* เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่จนดานการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และสารประกอบอินทรีย์กลุ่มนี้มีสูตรโมเลกุลเป็น  $C_6H_5OH$  ทำให้มีความเป็นขี้สูงจึงสามารถสกัดได้ด้วยตัวทำละลายที่มีขี้ โดยส่วนใหญ่สารประกอบฟีนอลิกจะละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีสภาพขี้สูงและละลายได้เล็กน้อยในน้ำแต่จะละลายได้ดีขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่พบว่าการสกัดสารสกัดโดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงกว่าการสกัดด้วยน้ำร้อน ถึงแม้ว่าการสกัดด้วยน้ำร้อนจะให้ปริมาณผลได้ของสารสกัดสูงกว่าการใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย



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

จากรายงานการวิจัยของ Wang และคณะ (2009) ซึ่งได้ทำการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกจากสารสกัดด้วยน้ำและสารละลายอะซีโตนเข้มข้นร้อยละ 70 ได้กล่าวไว้ว่าการใช้สารละลายอะซีโตนเข้มข้นร้อยละ 70 มีประสิทธิภาพในการสกัดสารประกอบฟีนอลิกในตัวอย่างสาหร่ายส่วนใหญ่ได้ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำ ทั้งนี้ เนื่องจากโดยทั่วไปสารประกอบฟีนอลิกสามารถละลายในตัวทำละลายที่เป็นสารอินทรีย์ที่มีขี้ได้ดีกว่าในน้ำ นอกจากนี้ Sabeena Farvin และ Jacobsoen (2013) ได้วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดด้วยน้ำและเอทานอลของสาหร่าย 16 สายพันธุ์จากชายฝั่งเดนิชพบว่าการใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายสามารถสกัดสารประกอบฟีนอลิกออกมาได้มากกว่าการใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย

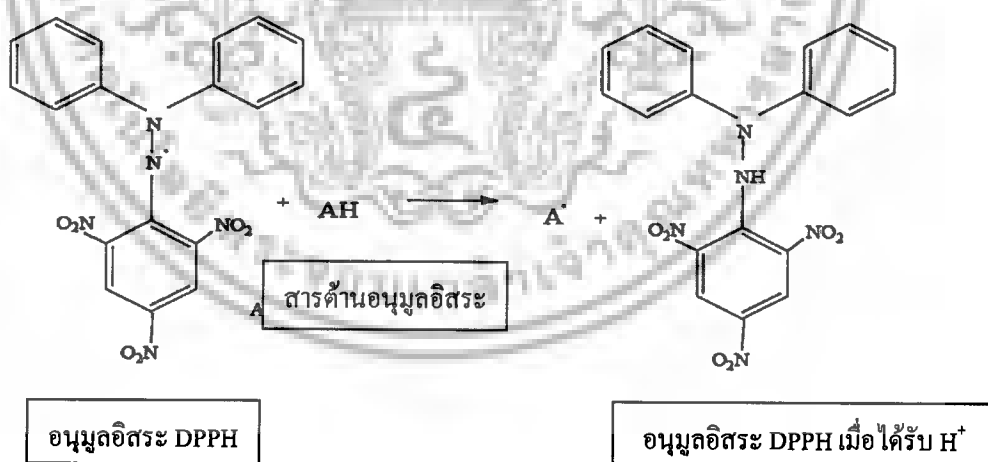
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.4 การประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากสาหร่าย 10 สายพันธุ์

##### 4.4.1 ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH (Scavenging activity on DPPH radical)

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

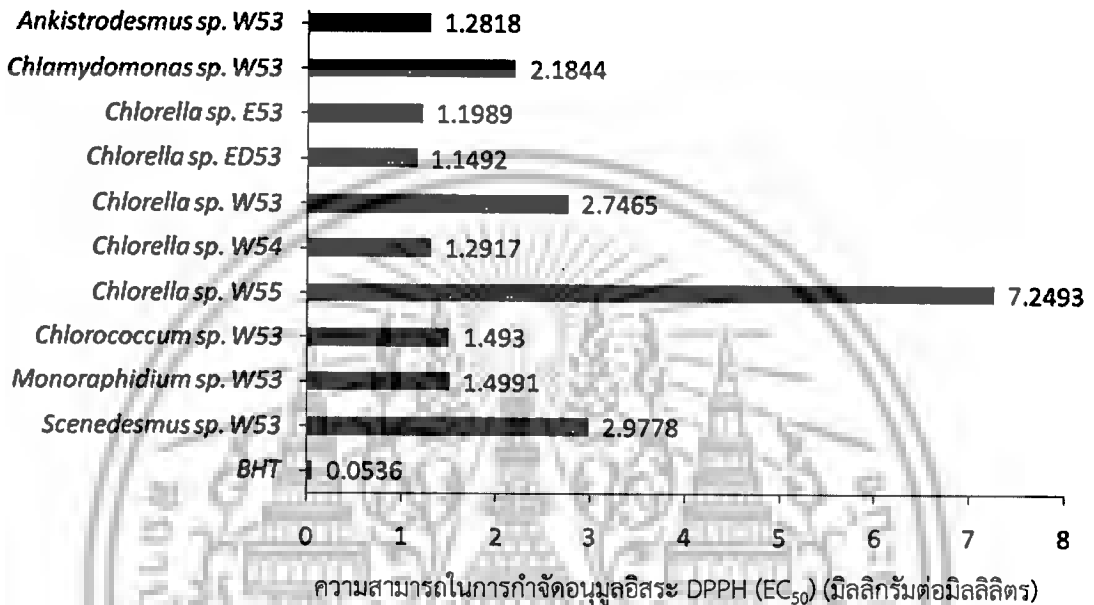
ในการศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดด้วยน้ำร้อนและ เอทานอลของสาหร่ายน้ำจืดขนาดเล็กทั้ง 10 สายพันธุ์ โดยผลการทดลองพบว่าสารละลายสีม่วงของอนุมูลอิสระ DPPH เมื่อทำปฏิกิริยากับสารสกัดหยาบจากสาหร่าย สีของสารละลายผสมเปลี่ยนไปเป็นสีเขียวอมเหลืองมากขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัดที่เพิ่มขึ้น หรือมีค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตรที่ลดลง และเมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณเป็นร้อยละในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH พบว่าร้อยละในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดด้วยน้ำร้อนและเอทานอลของสาหร่ายทุกสายพันธุ์มีค่าเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัดที่เพิ่มขึ้น นั่นแสดงว่าสารสกัดหยาบจากสาหร่ายมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระได้ ซึ่งแสดงคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ดังสมการ



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

เมื่อเปรียบเทียบค่า *Chlorella* sp. ED53 ของสารสกัดด้วยน้ำร้อนจากสาหร่ายจำนวน 10 สายพันธุ์ พบว่า  $EC_{50}$  ของสารสกัดมีค่าอยู่ในช่วง 1.1412-7.2493 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและค่าทั้งหมดไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

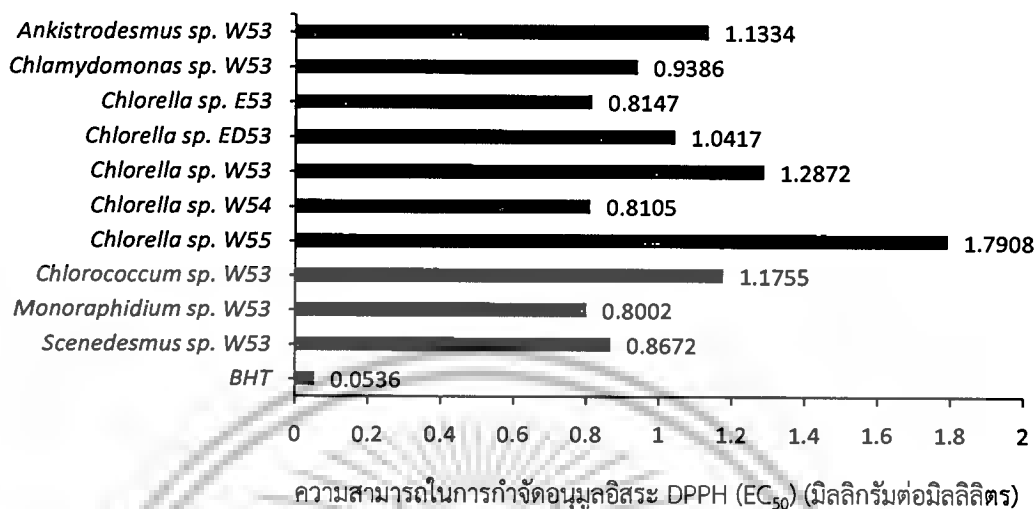
มีค่ามากเมื่อเปรียบเทียบกับ  $EC_{50}$  ของสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน BHT ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.0536 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจาก *Chlorella* sp. ED53 มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH สูงที่สุดคือมีค่า  $EC_{50}$  เท่ากับ 1.1492 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดจาก *Chlorella*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



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

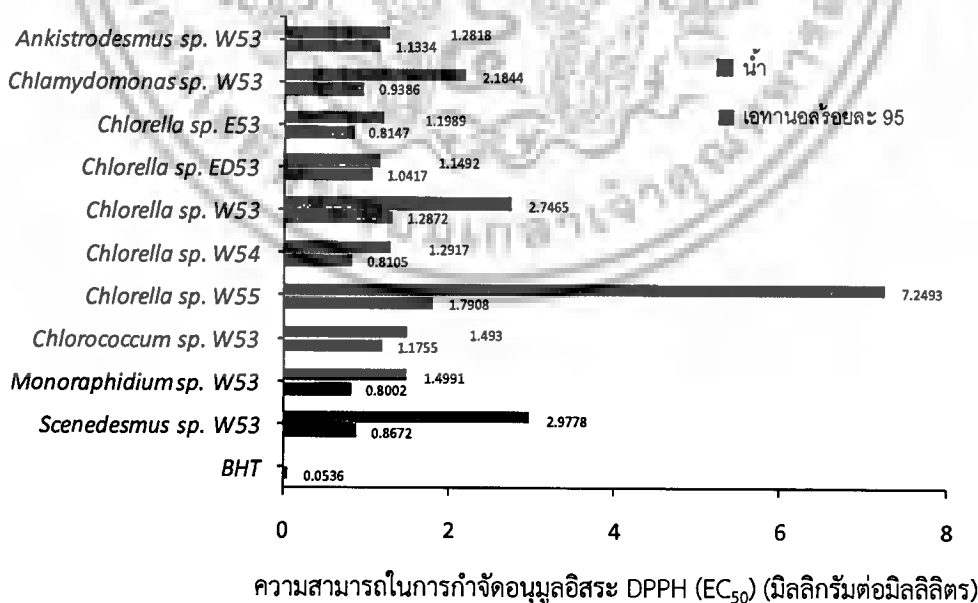
สำหรับค่า  $EC_{50}$  ของสารสกัดด้วยเอทานอลจากสาหร่ายจำนวน 10 สายพันธุ์พบว่าสารสกัดจาก *Monoraphidium* sp. W53 มีค่า  $EC_{50}$  ต่ำสุดเท่ากับ 0.8002 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาได้แก่ สารสกัดจาก *Chlorella* sp. W54, *Chlorella* sp. E53, *Scenedesmus* sp. W53, *Chlamydomonas* sp. W53, *Chlorella* sp.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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.16 ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH (EC<sub>50</sub>) ของสารสกัดด้วยเอทานอลจากสาหร่ายจำนวน 10 สายพันธุ์

แต่อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบค่า EC<sub>50</sub> ของสารสกัดด้วยน้ำและเอทานอลจากสาหร่ายทั้ง 10 สายพันธุ์แล้ว สารสกัดด้วยเอทานอลจากสาหร่ายทุกสายพันธุ์มีค่า EC<sub>50</sub> ต่ำกว่าสารสกัดด้วยน้ำ (รูปที่ 4.17) แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากเอทานอลมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารสกัดด้วยน้ำ



รูปที่ 4.17 ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH (EC<sub>50</sub>) ของสารสกัดด้วยเอทานอลและน้ำจากสาหร่าย 10 สายพันธุ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีรายงานวิจัยที่ศึกษาความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดที่ใช้ น้ำ และอะซิโตนร้อยละ 70 เป็นตัวทำละลายของสาหร่ายที่พบในประเทศไอร์แลนด์ พบว่าสารสกัดที่สกัดด้วยอะซิโตนร้อยละ 70 ของ *Fucus vesiculosus* Linnaeus และ *Fucus serratus* Linnaeus มีร้อยละในการกำจัดอนุมูลอิสระสูงที่สุดคือ 93.9 และ 90.8 มีค่า  $EC_{50}$  เท่ากับ  $10.7 \times 10^{-3}$  และ  $11.0 \times 10^{-3}$  มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนสารสกัดที่สกัดด้วยน้ำของ *Fucus vesiculosus* Linnaeus และ *Fucus serratus* Linnaeus มีร้อยละในการกำจัดอนุมูลอิสระประมาณ 60 และ 50 ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารสกัดที่สกัดด้วยน้ำมีร้อยละในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ต่ำกว่าสารสกัดที่สกัดด้วยอะซิโตนร้อยละ 70 ซึ่งอาจเนื่องจากการเปลี่ยนความเป็นขี้ของตัวทำละลายมีผลต่อประสิทธิภาพในการสกัดกลุ่มของสารประกอบที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันซึ่งมีผลต่อคุณสมบัติในการต้านออกซิเดชันของสารสกัดที่ได้ (Wang และคณะ, 2009)

อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดกับความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระของสารสกัดจากสาหร่ายแต่ละสายพันธุ์พบว่าไม่มีความสัมพันธ์กันในเชิงบวก นั่นคือปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงแต่ให้ผลของค่า  $EC_{50}$  สูง (ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระของสารสกัดต่ำ) เช่น สารสกัดด้วยน้ำจากสาหร่าย *Chlorella* sp. W55 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงสุดเท่ากับ  $27.93 \pm 1.14$  มิลลิกรัมสมมูลย์กรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด เมื่อนำมาวิเคราะห์ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH พบว่ามีค่า  $EC_{50}$  เท่ากับ 7.2493 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรซึ่งเป็นค่าสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับสาหร่ายสายพันธุ์อื่นๆ หรือสารสกัดด้วยเอทานอลของ *Chlamydomonas* sp. W53 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงสุดเท่ากับ  $54.70 \pm 2.97$  มิลลิกรัมสมมูลย์กรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัดมีค่า  $EC_{50}$  เท่ากับ 0.9386 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรซึ่งเป็นค่าที่สูงกว่าสารสกัดด้วยเอทานอลจาก *Monoraphidium* sp. W53 ซึ่งมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเท่ากับ  $25.06 \pm 2.44$  มิลลิกรัมสมมูลย์กรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด แต่มีค่า  $EC_{50}$  ต่ำกว่าเท่ากับ 0.8002 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สาเหตุอาจเนื่องมาจากสารสำคัญที่มีอยู่ในสารสกัดจากสาหร่ายนอกจากจะมีสารประกอบฟีนอลิกแล้วยังมีสารจำพวกโพลีแซคาไรด์ รงควัตถุต่างๆ โปรตีนหรือเปปไทด์ (Kumar และคณะ, 2008) นอกจากนี้มีรายงานการวิจัยการตรวจหาปริมาณสารแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย *Dunaliella salina* และทำการวิเคราะห์คุณสมบัติในการต้านออกซิเดชันของสารสกัดแคโรทีนอยด์ของสาหร่ายชนิดนี้ซึ่งแยกโดยเทคนิค HPLC ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า ร้อยละความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดแคโรทีนอยด์รวมของสาหร่าย, *trans-form* ทั้งหมดของ Zeaxanthin, Lutein,  $\beta$ -carotene,  $\alpha$ -carotene และ  $\alpha$ -tocopherol มีค่าเป็น 64.14 26.23 25.75 24.38 24.01 และ 82.41 ตามลำดับ และมีค่า  $EC_{50}$  เป็น 8.36 22.82 23.04 24.17 24.54 และ 2.88 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และที่ความเข้มข้นของสารสกัดแคโรทีนอยด์เป็น 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่ามีแนวโน้มในการกำจัดอนุมูล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์หรือมีทรัพย์สินทางปัญญาอื่นใดอยู่ หากมีผู้ละเมิดลิขสิทธิ์โดยไม่ได้รับอนุญาต  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อิสระที่เพิ่มมากขึ้น(Hu และคณะ, 2008) นอกจากนี้ Cho และคณะ (2011) ได้ทำการศึกษากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากสาหร่ายทะเลสีเขียว *Enteromorpha prolifera* ที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ ได้แก่ เฮกเซน คลอโรฟอร์ม และเอทิลอะซิเตท พบว่าสารสกัดที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์มมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลสูงสุด เมื่อเทียบกับตัวควบคุมเชิงบวก BHT และ  $\alpha$ -tocopherol ที่ความเข้มข้น 0.25-1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคสเปคโตรสโคปิกแดงแสดงให้เห็นว่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากสาหร่ายทะเลสีเขียว *Enteromorpha prolifera* เกิดขึ้นเนื่องจากสารประกอบคลอโรฟิลล์ และฟิโอฟิโอบีเอ

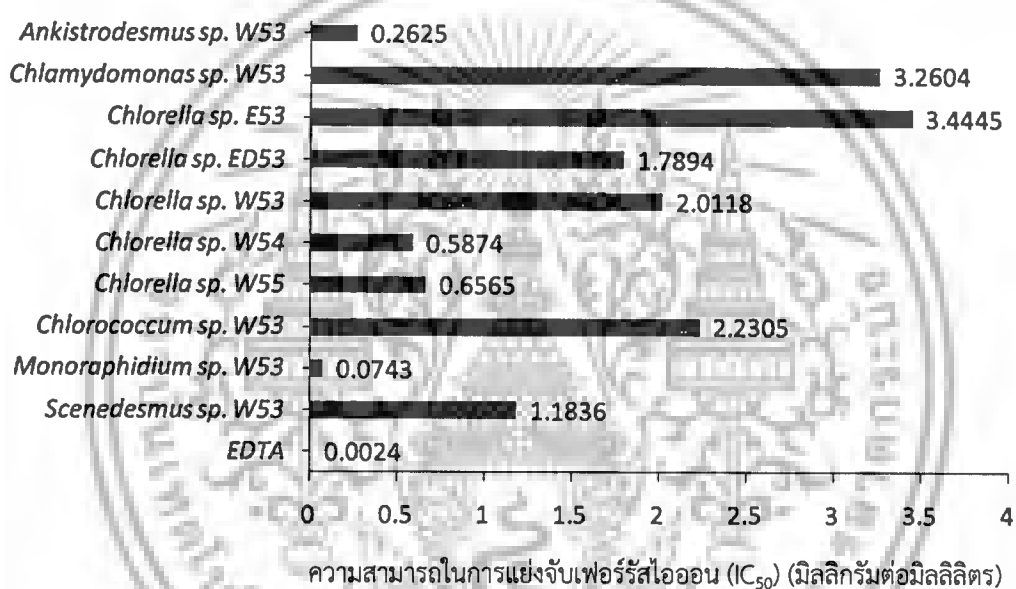
แต่เมื่อมองภาพโดยรวมแล้วจะพบว่าโดยทั่วไปสารสกัดจากน้ำร้อนมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดต่ำ ฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ (ค่า  $EC_{50}$ ) มีค่าสูงกว่าสารสกัดด้วยเอทานอล

#### 4.4.2 การวิเคราะห์ความสามารถในการแย่งจับกับเฟอร์รัสไอออน (Ferrous ion chelating ability assay)

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

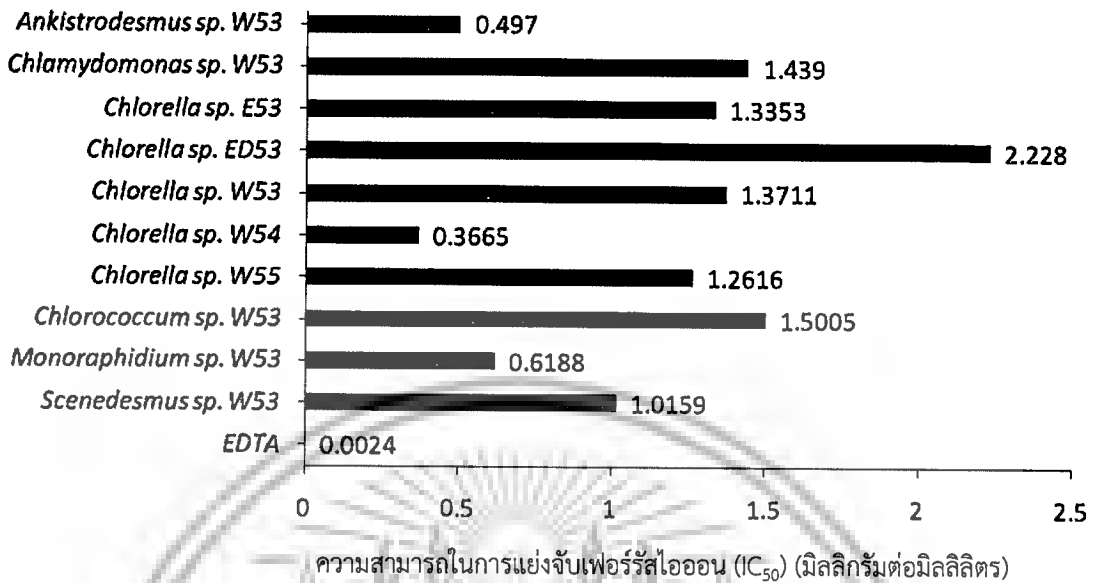
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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



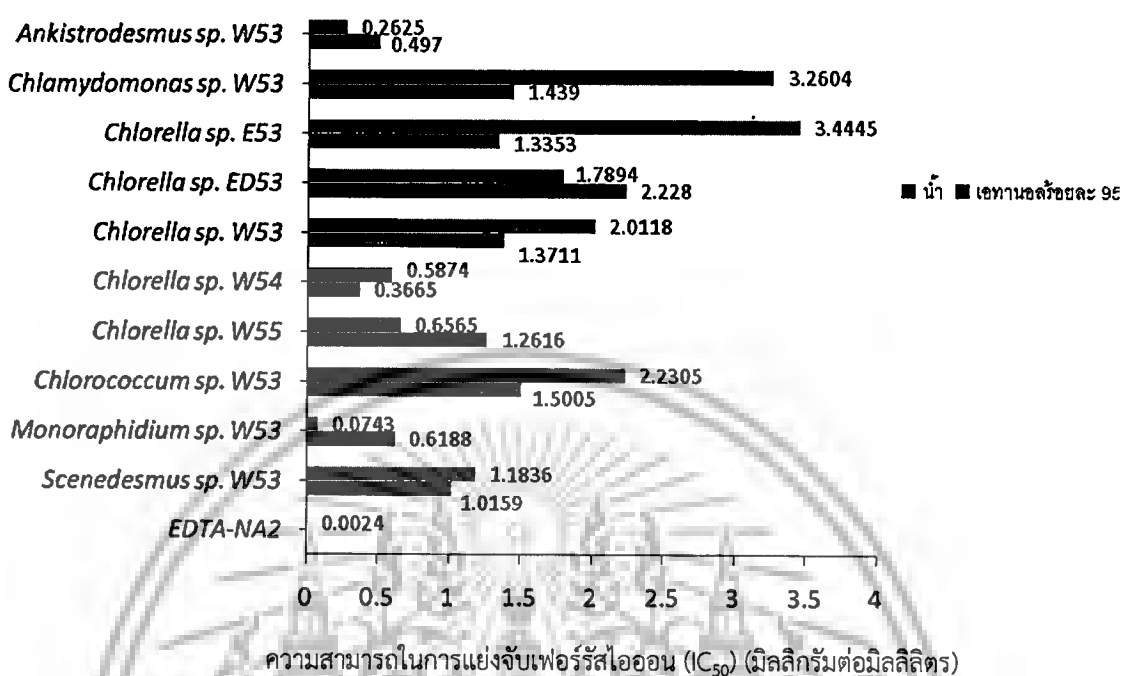
รูปที่ 4.18 ความสามารถในการยับยั้งเฟอร์รัสไอออน ( $IC_{50}$ ) (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ของสารสกัดด้วยน้ำจากสาหร่าย 10 สายพันธุ์

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



รูปที่ 4.19 ความสามารถในการแย่งจับเฟอร์รัสไอออน (IC<sub>50</sub>) (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ของสารสกัดด้วยเอทานอลจากสาหร่าย 10 สายพันธุ์

แต่เมื่อเปรียบเทียบค่า IC<sub>50</sub> ของสารสกัดด้วยน้ำร้อนและเอทานอลจากสาหร่ายชนิดเดียวกัน ทั้ง 10 สายพันธุ์จะเห็นได้ว่าสารสกัดด้วยเอทานอลแสดงความสามารถในการจับกับเฟอร์รัสไอออนได้ดีกว่าสารสกัดด้วยน้ำ ยกเว้นสารสกัดจาก *Monoraphidium* sp. W53 ซึ่งพบว่าสารสกัดด้วยน้ำจะมีค่า IC<sub>50</sub> ต่ำกว่าสารสกัดด้วยเอทานอล (รูปที่ 4.20) ซึ่งผลการทดลองที่ได้ตรงกันข้ามกับรายงานผลการทดลองของ Kuda และคณะ (2006) ที่รายงานว่าสารสกัดด้วยน้ำของสาหร่ายสีน้ำตาล *Petalonia binghamiae* แสดงความสามารถในการจับกับเฟอร์รัสไอออนได้ดีกว่าสารสกัดด้วยเอทานอล และจากผลการศึกษาของ Wang และคณะ (2009) ที่พบว่าสารสกัดด้วยน้ำของสาหร่าย 10 สายพันธุ์จากไอล์แลนด์มีประสิทธิภาพในการจับกับเฟอร์รัสไอออนได้ดีกว่าสารสกัดด้วยสารละลายอะซีโตนเข้มข้นร้อยละ 70 และเมื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดกับความสามารถในการแย่งจับกับเฟอร์รัสไอออนของสารสกัดด้วยน้ำและเอทานอลพบว่าไม่มีความสัมพันธ์กันในเชิงบวกเช่นเดียวกับการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH



รูปที่ 4. 20 ความสามารถในการยับยั้งเพอร์ออกซิเดชัน (IC<sub>50</sub>) (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ของสารสกัดด้วยน้ำและเอทานอลจากสาหร่าย 10 สายพันธุ์

#### 4.4.3 ความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันด้วยวิธี Thiobarbituric acid reactive substance

เป็นการศึกษาความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันของสารสกัดจากสาหร่ายโดยใช้กรดไขมันลิโนเลอิกมาทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ทำให้ผลผลิตจากปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันได้เป็นสารมาลอนไดอัลดีไฮด์ (MDA) จากนั้นเติมกรดไทโอบาร์บิทูริกในสภาวะกรด สารมาลอนไดอัลดีไฮด์จะทำปฏิกิริยากับกรดไทโอบาร์บิทูริกได้เป็นสารมีสีที่เรียกว่า ทีบีเออาร์เอส (Thiobarbituric acid reactive substance, TBARS) และเมื่อเติมสารสกัดจากสาหร่ายที่มีความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันลงไปจะมีผลทำให้สีจางลง สามารถตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันได้จากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณเป็นร้อยละของความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.5 และ 4.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 ร้อยละของความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันของสารสกัดด้วยน้ำจากสาหร่าย 10 สายพันธุ์และสารมาตรฐาน BHT ที่ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

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

หมายเหตุ

<sup>1</sup> ร้อยละของความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันแสดงในรูปค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n = 6)

<sup>2</sup> a,b,c ... ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่มีตัวอักษรต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

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

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันของสารสกัดด้วยเอทานอลจากสาหร่าย 10 สายพันธุ์และสารมาตรฐาน BHT พบว่าสารสกัดส่วนใหญ่มีค่าร้อยละไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

ตารางที่ 4.6 ร้อยละของความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันของสารสกัดด้วยเอทานอลจากสาหร่าย 10 สายพันธุ์และสารมาตรฐาน BHT ที่ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

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

หมายเหตุ

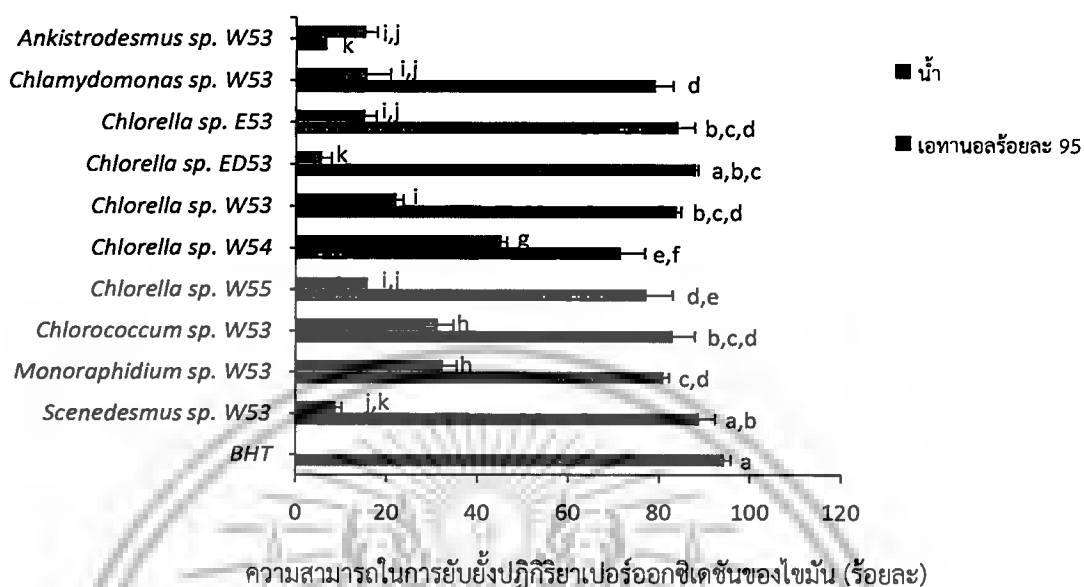
- 1 ร้อยละความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของสารสกัดแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ( $n = 6$ )
- 2 a, b, c, d, e ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่มีตัวอักษรต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่จัดทำขึ้นเพื่อการเรียนการสอนเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ทางการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และเมื่อเปรียบเทียบร้อยละความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของสารสกัดด้วยน้ำและเอทานอลจะพบว่าสารสกัดด้วยเอทานอลของสาหร่ายทุกชนิดยกเว้นสารสกัดจาก *Ankistrodesmus* sp. W53 มีร้อยละในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันสูงกว่าสารสกัดจากน้ำร้อนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P \leq 0.05$ ) ดังแสดงในรูปที่ 4.21 ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันของสารสกัดที่สกัดด้วยน้ำมีฤทธิ์ต่ำ เช่นเดียวกับกับ Nakayama และคณะ (1999) ซึ่งใช้สารสกัดจากสาหร่ายสีแดงชูซาบิโนริ (*Porphyra yezoensis*) ที่สกัดด้วยเฮกเซน เอทิลอะซิเตต อะซีโตน อัตราส่วนของคลอโรฟอร์มต่อเมทานอล (2:1) เมทานอล และน้ำร้อน (อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส) พบว่าสารสกัดจากน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส มีฤทธิ์ในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันโดยวิธี TBARS เพียงเล็กน้อย ซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกับสารสกัดด้วยน้ำร้อนของสาหร่ายขนาดเล็กที่ใช้ในการทดลองนี้

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



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

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

Silva และคณะ (2011) ได้ทำการสกัดโพลีแซ็กคาไรด์เพื่อต้านปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันในการทำลายเซลล์ลำไส้ของหนูจากสาหร่ายสีแดง *Gracilaria caudate* พบว่าโพลีแซ็กคาไรด์จะไปลดความเข้มข้นของสารมาลอนไดอัลดีไฮด์ซึ่งเป็นตัวการในการทำลายเซลล์ลำไส้หนู

จากการทดลองของ Guedes และคณะ (2011) พบว่า *Scenedesmus almeriensis* มีสารจำพวกลูทีน และเบต้า - แคโรทีนในปริมาณสูง ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าสารเหล่านี้มีผลในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากนี้ Sánchez และคณะ (2008) พบว่า *Scenedesmus almeriensis* สามารถผลิตแคโรทีนอยด์ได้หลายชนิดได้แก่ ลูทีน เบต้า - แคโรทีน แอสต้าแซนทีน ไวโอแซนทีน และแคนตาแซนทีน ซึ่งมีปริมาณแคโรทีนอยด์ร้อยละ 0.53 0.07 0.05 0.03 และ 0.01 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าเป็นสามารถผลิตลูทีนสูงที่สุด อาจกล่าวได้ว่าลูทีนเป็นสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันได้นั่นเอง

อย่างไรก็ตามในสาหร่ายขนาดเล็กยังพบรงควัตถุอีกชนิดหนึ่งที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันได้ นั่นก็คือ คลอโรฟิลล์เอและคลอโรไฟลิน (Dietary fiber food, 2012) นอกจากนี้ Shanab (2007) รายงานว่า คลอโรฟิลล์ เอ จะไปจับกับประจุลบของอนุมูลเปอร์ออกซิเลทำหน้าที่ช่วยเสริมฤทธิ์ให้กับวิตามินอี ซึ่งอาจพบวิตามินอีในสาหร่ายที่สกัดด้วยเอทานอลก็เป็นได้

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

#### 4.5 การประยุกต์ใช้สารสกัดจากสาหร่ายร่วมกับแผ่นฟิล์มเซลลูโลสจากแบคทีเรียในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากสาหร่าย 10 สายพันธุ์ได้แก่ *Ankistrodesmus* sp. W53, *Chlamydomonas* sp. W53, *Chlorella* sp. E53, *Chlorella* sp. ED53, *Chlorella* sp. W53, *Chlorella* sp. W54, *Chlorella* sp. W55, *Chlorococcum* sp. C53, *Monoraphidium* sp. W53 และ *Scenedesmus* sp. W53 โดยทำการตรวจสอบความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ความสามารถในการรวมตัวกับเฟอร์รัสไอออนและความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน พบว่าสารสกัดด้วยเอทานอลจากสาหร่าย *Scenedesmus* sp. W53 มีความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันสูงที่สุดเท่ากับร้อยละ 88.80 นอกจากนี้ยังมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ที่ดี (EC<sub>50</sub> เท่ากับ 0.8672 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) รวมทั้งมีความสามารถในการรวมตัวกับเฟอร์รัสไอออนได้ระดับปานกลางเมื่อเทียบกับสาหร่ายสายพันธุ์อื่น (IC<sub>50</sub> เท่ากับ 1.0159 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ซึ่งคุณสมบัติในการต้านออกซิเดชันเหล่านี้มีความสำคัญต่อการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันที่เกิดขึ้นในผลิตภัณฑ์อาหารที่มีส่วนผสมของไขมันสูง ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกสารสกัดด้วยเอทานอลจากสาหร่าย *Scenedesmus* sp. W53 มาศึกษาความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษเท่านั้น เมื่อผู้ใดเห็นใบแจ้งประชาสัมพันธ์นี้ กรุณา  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ออกซิเดชันของไขมันร่วมกับเซลลูโลสที่ผลิตจากแบคทีเรีย และทดลองใช้กับผลิตภัณฑ์เนื้อแปรรูปเพื่อชะลอการเหม็นหืนที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน ซึ่งได้ผลการทดลองดังนี้

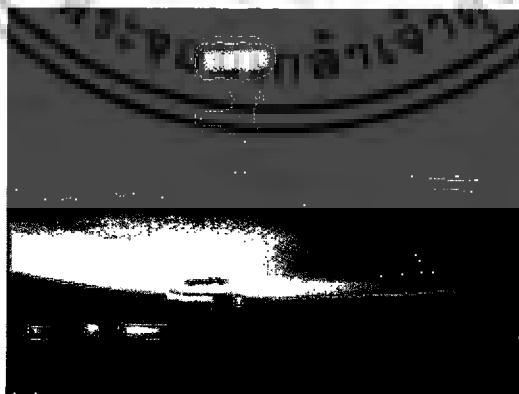
4.5.1 การเตรียมเซลลูโลสที่ได้จากการหมักของเชื้อ *Gluconacetobacter xylinus* TISTR 976

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



รูปที่ 4.22 ลักษณะของแผ่นเซลลูโลสที่ได้จากการหมักเชื้อ *Gluconacetobacter xylinus* TISTR 976

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



รูปที่ 4.23 ลักษณะของแผ่นฟิล์มเซลลูโลสที่ได้จากการรีดน้ำออกจากแผ่นเซลลูโลสด้วยเครื่อง รีดน้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5.2 ความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันของสารสกัดด้วยเอทานอลจากสาหร่าย *Scenedesmus* sp. W53 ที่ความเข้มข้นต่างๆ

โดยเตรียมสารสกัดจากสาหร่ายให้มีความเข้มข้นเป็น 1.0 1.5 2.0 2.5 3.0 3.5 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน ซึ่งผลการทดลองพบว่าร้อยละของการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันแปรผันโดยตรงกับความเข้มข้นของสารสกัดสาหร่ายนั้นคือ เมื่อใช้ความเข้มข้นของสารสกัดมากขึ้นความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันจะเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) โดยมีความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันอยู่ในช่วงร้อยละ  $29.31 \pm 4.12$  ถึง  $88.48 \pm 2.47$  ดังแสดงในตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 ร้อยละของการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันของสารสกัดจากสาหร่ายที่ความเข้มข้นต่างๆ

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

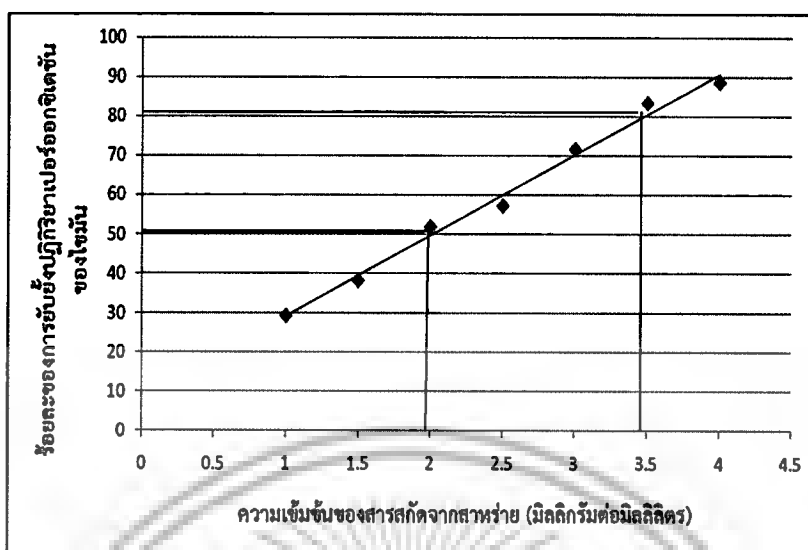
หมายเหตุ

<sup>1</sup> ร้อยละของการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันของสารสกัดจากสาหร่าย แสดงในรูปค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

<sup>2</sup> เมื่อพิจารณาในแนวตั้งตัวอักษร a-g ที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

และเมื่อนำความเข้มข้นของสารสกัดจากสาหร่ายและค่าร้อยละการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันมาพล็อตกราฟ เพื่อหาความเข้มข้นของสารสกัดสาหร่ายที่มีความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันได้ร้อยละ 50 (IC<sub>50</sub>) พบว่ามีค่าเท่ากับ 1.95 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 4.24)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.24 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดจากสาหร่าย *Scenedesmus* sp. W53 และร้อยละของการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน

และเมื่อเปรียบเทียบร้อยละของการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันของสารกันหืนสังเคราะห์ BHT ที่ความเข้มข้น 1.0-4.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเช่นเดียวกัน พบว่ามีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ  $82.38 \pm 0.27$  ถึง  $93.52 \pm 1.23$  (ตารางที่ 4.8) โดยที่ความเข้มข้นของสารละลาย BHT ที่ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าร้อยละของการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันเป็น  $82.38 \pm 0.27$  ซึ่งเทียบเท่ากับการใช้สารสกัดจากสาหร่ายที่ความเข้มข้น 3.45 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 4.24)

ตารางที่ 4.8 ร้อยละของการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันของ BHT ที่ความเข้มข้นต่างๆ

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

หมายเหตุ

<sup>1</sup> ร้อยละของการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันของสารละลาย BHT โดยแสดงในรูปค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

<sup>2</sup> a,b,c เมื่อพิจารณาในแนวตั้งตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.5.3 การศึกษาความเข้มข้นของสารสกัดจากสาหร่ายร่วมกับแผ่นฟิล์มเซลลูโลสในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน

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

ตารางที่ 4.9 ร้อยละของการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันของแผ่นเซลลูโลสที่แช่สารสกัดจากสาหร่ายที่ความเข้มข้นต่างๆ

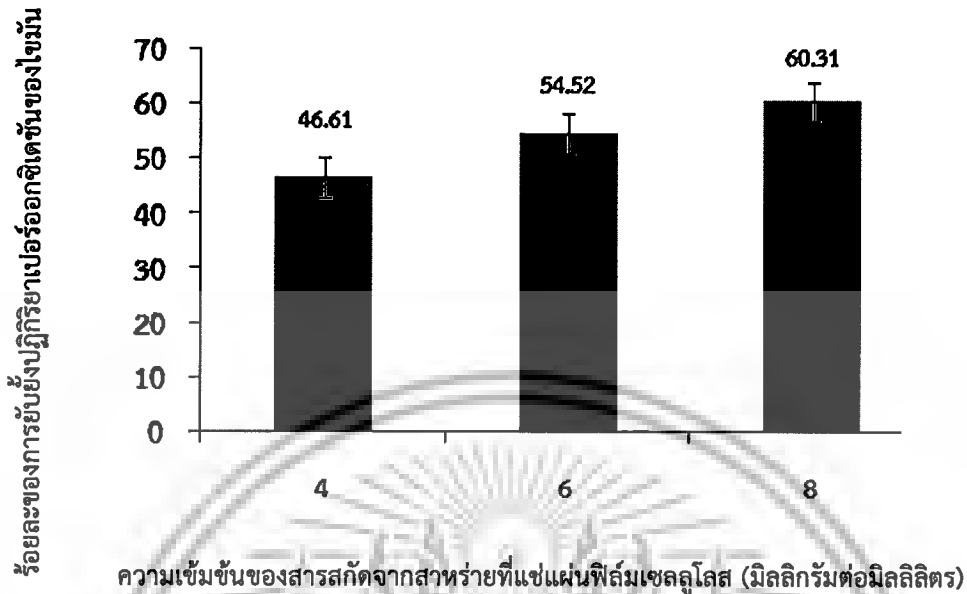
| ความเข้มข้นของสารสกัดสาหร่าย (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) | ร้อยละของการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน <sup>1</sup> |
|--|--|
| 4.0  | $46.61^{c2} \pm 3.55$  |
| 6.0  | $54.52^b \pm 3.62$   |
| 8.0  | $60.31^a \pm 3.36$   |

หมายเหตุ

<sup>1</sup> ร้อยละของการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันของสารสกัดจากสาหร่าย แสดงในรูปค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=6)

<sup>2</sup> เมื่อพิจารณาในแนวตั้งตัวอักษร a-c ที่แตกต่างกันตามแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.25 ร้อยละของการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันโดยใช้สารสกัดจากสาหร่ายที่ความเข้มข้น 4 6 และ 8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ซึ่งจากการผลึกษาความเข้มข้นของสารสกัดสาหร่ายที่มีความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันได้ร้อยละ 50 ( $IC_{50}$ ) พบว่ามีค่าเท่ากับ 1.95 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นหากใช้สารสกัดสาหร่ายที่มีความเข้มข้น 4.0 6.0 และ 8.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปแช่แผ่นฟิล์มเซลลูโลส แผ่นฟิล์มเซลลูโลสที่แช่สารสกัดจากสาหร่ายด้วยความเข้มข้นดังกล่าวควรมีความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันได้ร้อยละ 100 150 และ 200 ตามลำดับ แต่จากผลการทดลองพบว่าสามารถยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันได้เพียงร้อยละ  $46.61 \pm 3.55$   $54.52 \pm 3.62$  และ  $60.31 \pm 3.36$  ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันในแผ่นฟิล์มเซลลูโลสที่แช่สารสกัดจากสาหร่ายที่ความเข้มข้น 4.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ลดลงไปมากกว่าครึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับประสิทธิภาพของสารสกัดของสารสกัดที่ความเข้มข้น 4.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรซึ่งมีค่าเท่ากับร้อยละ  $88.48 \pm 2.47$

#### 4.6 การประยุกต์ใช้สารสกัดจากสาหร่าย *Scenedesmus* sp. W53 ร่วมกับแผ่นฟิล์มเซลลูโลสในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันในผลิตภัณฑ์กุนเชียงหมูชิ้นรูป

ค่า TBARS เป็นการทดสอบการเกิดปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันโดยการวัดสารประกอบพวกมาโลนัลดีไฮด์ (malonaldehyde, MDA) ซึ่งเป็นตัวที่เกิดจากการเสื่อมของ lipid hydroperoxide สารประกอบนี้ทำให้เกิดกลิ่นเหม็นหืนในผลิตภัณฑ์อาหารที่มีไขมันสูง (Laguerre และคณะ, 2007) ในการวิเคราะห์จะเติมกรดไทโอบาร์บิทูริกในสภาวะกรด สาร MDA จะทำปฏิกิริยากับกรดไทโอบาร์บิทูริกได้เป็นสารมีสี เรียกว่า TBARS (thiobarbituric acid reactive substances)

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

ในการทดลองได้ทำการเตรียมแผ่นฟิล์มเซลลูโลสที่ผ่านการแช่สารสกัดจากสาหร่ายที่ความเข้มข้น 4 6 และ 8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำแผ่นฟิล์มที่ได้มาห่อหุ้มกุนเชียงหมูชิ้นรูปที่มีขนาด 1x1.5 นิ้ว โดยเปรียบเทียบกับกุนเชียงหมูชิ้นรูปที่ไม่ห่อหุ้มด้วยแผ่นฟิล์มเซลลูโลส และกุนเชียงหมูชิ้นรูปที่ห่อหุ้มด้วยแผ่นฟิล์มเซลลูโลสที่ไม่แช่สารสกัด จากนั้นนำตัวอย่างกุนเชียงหมูทั้งหมดไปเก็บรักษาโดยใช้สภาวะเร่งที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน ทำการตรวจวิเคราะห์ค่า TBARS ทุกๆ 3 วัน ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.10 และรูปที่ 4.26 ซึ่งพบว่าใน 3 วันแรกของการเก็บรักษาตัวอย่างกุนเชียงหมูชิ้นรูปทุกชนิดมีค่า TBARS เพิ่มขึ้นจากระยะเวลาเริ่มต้นซึ่งมีค่าเท่ากับ  $161.50 \pm 3.89$  มิลลิกรัมมาโลนัลดีไฮด์ต่อกิโลกรัมของตัวอย่าง โดยกุนเชียงหมูชิ้นรูปที่ไม่ห่อหุ้มด้วยแผ่นฟิล์มเซลลูโลส กุนเชียงหมูชิ้นรูปที่ห่อหุ้มด้วยแผ่นฟิล์มเซลลูโลสที่ไม่แช่สารสกัด กุนเชียงหมูชิ้นรูปที่ห่อหุ้มด้วยแผ่นฟิล์มเซลลูโลสที่แช่สารสกัด 4 6 และ 8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่า TBARS ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \geq 0.05$ ) โดยมีค่าเท่ากับ  $245.65 \pm 2.94$   $245.65 \pm 1.47$   $258.78 \pm 3.87$   $242 \pm 5.10$  และ  $241.40 \pm 5.30$  มิลลิกรัมมาโลนัลดีไฮด์ต่อกิโลกรัมของตัวอย่างตามลำดับ และตั้งแต่วันที่ 6 ของการเก็บรักษา ค่า TBARS ของตัวอย่างมีการเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง แต่การเพิ่มขึ้นของค่า TBARS ในตัวอย่างกุนเชียงที่ไม่ห่อหุ้มแผ่นเซลลูโลสและตัวอย่างห่อหุ้มด้วยแผ่นฟิล์มเซลลูโลสที่ไม่แช่สารสกัดมีค่าสูงกว่ากุนเชียงหมูชิ้นรูปที่ห่อหุ้มด้วยแผ่นฟิล์มเซลลูโลสที่แช่สารสกัดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) และในวันสุดท้ายของการเก็บรักษา (วันที่ 15) ตัวอย่างกุนเชียงที่ไม่ห่อหุ้มแผ่นเซลลูโลสและตัวอย่างห่อหุ้มด้วยแผ่นฟิล์มเซลลูโลสที่ไม่แช่สารสกัดมีค่า TBARS เพิ่มขึ้นเป็น  $289.85 \pm 10.30$  และ  $280.50 \pm 2.55$  มิลลิกรัมมาโลนัลดีไฮด์ต่อกิโลกรัมของตัวอย่าง ตามลำดับ ส่วนกุนเชียงหมูชิ้นรูปที่ห่อหุ้มด้วยแผ่นฟิล์มเซลลูโลสที่แช่สารสกัด 4 6 และ 8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่า TBARS ที่เพิ่มขึ้นในวันที่ 15 ของการเก็บรักษาเป็น  $246.50 \pm 3.89$   $253.30 \pm 8.95$  และ  $255.85 \pm 10.61$  ตามลำดับซึ่งพบว่าค่าที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ )

ดังนั้นจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ากุนเชียงหมูชิ้นรูปที่ห่อหุ้มด้วยสารสกัดจากสาหร่าย *Scenedesmus* sp. W53 สามารถชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันในระหว่างการเก็บรักษาเมื่อเปรียบเทียบกับกุนเชียงหมูชิ้นรูปที่ไม่ได้ห่อหุ้มแผ่นฟิล์มเซลลูโลส หรือกุนเชียงหมูชิ้นรูปที่ห่อหุ้มแผ่นเซลลูโลสที่ไม่ผ่านการแช่สารสกัดจากสาหร่าย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความสามารถในการชะลอการเกิดออกซิเดชันของไขมันในกุนเชียงหมูขึ้นรูประหว่างการเก็บรักษา อาจเนื่องมาจากองค์ประกอบที่เป็นสารออกฤทธิ์ในสารสกัดจากสาหร่าย เช่น สารประกอบฟีนอลิก สารสีคลอโรฟิลล์ แคโรทีนอยด์ และ ฟิโอฟราไบด์ เอ เป็นต้น ซึ่งจากผลการทดลองปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดด้วยเอทานอลจาก *Scenedesmus* sp. W53 พบว่ามีค่าเท่ากับ  $27.90 \pm 2.69$  มิลลิกรัมสมมูลย์กรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด และจากการศึกษาของระพีพันธ์และคณะ (2554) ได้ศึกษาปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมดของ *Scenedesmus* sp. W53 พบว่ามีค่าเท่ากับ  $2.5523 \pm 0.53$  มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และเมื่อวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันพบว่ามีค่าเท่ากับร้อยละ  $88.80 \pm 3.54$  นอกจากนี้ยังมีการศึกษาของ Lopez และคณะ (2011) ได้ทำการสกัดสารสกัดจากสาหร่ายสีน้ำตาล *Stypocaulon scoparium* โดยใช้ตัวทำละลายชนิดต่างๆ และเมื่อนำสารสกัดที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ พบว่ามีความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่วิเคราะห์ได้กับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

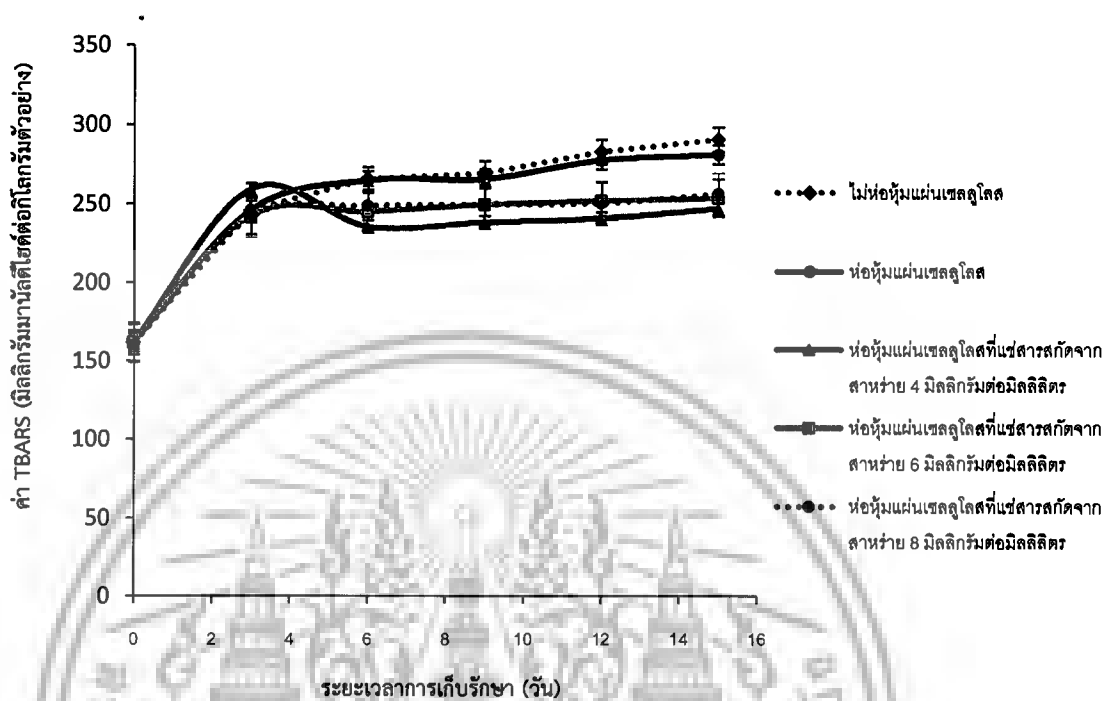
ตารางที่ 4.10 ค่า TBARS ของตัวอย่างกุ้งแช่แข็งที่ขึ้นรูปในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 15 วัน

| ตัวอย่างกุ้งแช่แข็งที่ขึ้นรูป       | ค่า TBARS (มิลลิกรัมของมาโลนัลดีไฮด์ต่อกิโลกรัมตัวอย่าง) <sup>1</sup> |                            |                             |                            |                            |                             |
|-------------------------------------|---|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|
|                                     | ระยะเวลาการเก็บรักษา (วัน)  |                            |                             |                            |                            |                             |
|                                     | 0   | 3                          | 6                           | 9                          | 12                         | 15                          |
| ไม่ห่อหุ้มแผ่นเซลล์โลส              | 161.50 <sup>a, 2</sup> ± 3.89   | 245.65 <sup>a</sup> ± 2.94 | 265.20 <sup>a</sup> ± 2.55  | 268.60 <sup>a</sup> ± 2.94 | 282.20 <sup>a</sup> ± 3.89 | 289.85 <sup>a</sup> ± 10.30 |
| ห่อหุ้มแผ่นเซลล์โลสที่ไม่แซสสารสกัด | 161.50 <sup>a</sup> ± 3.89  | 245.65 <sup>a</sup> ± 1.47 | 264.35 <sup>a</sup> ± 3.89  | 265.20 <sup>a</sup> ± 6.75 | 277.10 <sup>a</sup> ± 5.31 | 280.50 <sup>a</sup> ± 2.55  |
| ห่อหุ้มแผ่นเซลล์โลสที่แซสสารสกัด    | 161.50 <sup>a</sup> ± 3.89  | 258.78 <sup>a</sup> ± 3.87 | 235.45 <sup>b</sup> ± 5.89  | 238.00 <sup>b</sup> ± 6.42 | 240.55 <sup>c</sup> ± 5.31 | 246.50 <sup>b</sup> ± 3.89  |
| 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร             |   |                            |                             |                            |                            |                             |
| ห่อหุ้มแผ่นเซลล์โลสที่แซสสารสกัด    | 161.50 <sup>a</sup> ± 3.89  | 242.25 <sup>a</sup> ± 5.10 | 244.67 <sup>b</sup> ± 11.02 | 249.05 <sup>b</sup> ± 3.89 | 251.60 <sup>b</sup> ± 1.47 | 253.30 <sup>b</sup> ± 8.95  |
| 6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร             |   |                            |                             |                            |                            |                             |
| ห่อหุ้มแผ่นเซลล์โลสที่แซสสารสกัด    | 161.50 <sup>a</sup> ± 3.89  | 241.40 <sup>a</sup> ± 5.30 | 248.20 <sup>b</sup> ± 10.62 | 249.05 <sup>b</sup> ± 7.79 | 249.90 <sup>b</sup> ± 2.55 | 255.85 <sup>b</sup> ± 10.61 |
| 8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร             |   |                            |                             |                            |                            |                             |

หมายเหตุ

<sup>1</sup> ค่า TBARS (มิลลิกรัมมาโลนัลดีไฮด์ต่อกิโลกรัมตัวอย่าง) ที่ได้แสดงในรูปค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

<sup>2</sup> เมื่อพิจารณาในแนวตั้งตัวอักษร a-c ที่แตกต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.5)



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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.11 ค่า TBARS ที่เพิ่มขึ้นของตัวอย่างกุ้งแช่แข็งรูปชิ้นในวันที่ 15 ของการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

| ตัวอย่างกุ้งแช่แข็งรูปชิ้น                               | ค่า TBARS ที่เพิ่มขึ้น <sup>1</sup> |
|--|-------------------------------------|
| ไม่ห่อหุ้มแผ่นเซลลูโลส                                   | 128.35 <sup>a2</sup> ± 7.65         |
| ห่อหุ้มแผ่นเซลลูโลสที่ไม่แซ่สารสกัด                      | 119.00 <sup>a</sup> ± 5.89          |
| ห่อหุ้มแผ่นเซลลูโลสที่แซ่สารสกัด 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร | 84.87 <sup>b</sup> ± 3.94           |
| ห่อหุ้มแผ่นเซลลูโลสที่แซ่สารสกัด 6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร | 89.25 <sup>b</sup> ± 8.83           |
| ห่อหุ้มแผ่นเซลลูโลสที่แซ่สารสกัด 8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร | 94.35 <sup>b</sup> ± 12.75          |

หมายเหตุ

<sup>1</sup>ค่า TBARS ที่เพิ่มขึ้นในกุ้งแช่แข็งรูปชิ้นแสดงในรูปค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

<sup>2</sup>เมื่อพิจารณาในแนวตั้งตัวอักษร a-b ที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

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

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

#### ข้อเสนอแนะ

สำหรับการศึกษาในครั้งนี้นับว่าสารสกัดด้วยเอทานอลจากสาหร่ายสีเขียวที่คัดแยกมาจากแหล่งน้ำธรรมชาติจำนวน 10 สายพันธุ์มีความสามารถต้านอนุมูลอิสระแตกต่างกัน เช่น บางสายพันธุ์มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH สูงแต่มีความสามารถในการแย่งจับกับเฟอร์รัสไอออนต่ำ ในขณะที่บางสายพันธุ์มีความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันสูงแต่มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ไม่สูงมากนัก ดังนั้นควรเลือกใช้สารสกัดจากสาหร่ายแต่ละสายพันธุ์ให้เหมาะกับวัตถุประสงค์ที่นำสารสกัดมาใช้งาน นอกจากนี้พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารต้นฉบับที่จัดทำขึ้นเพื่อการศึกษานี้เท่านั้น ไม่สามารถนำเอกสารฉบับนี้ไปใช้  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิเคราะห์ได้ในสารสกัดไม่มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ใช้ทดสอบ ดังนั้นควรมีการศึกษาหาสารประกอบทางเคมีที่ออกฤทธิ์สำคัญ รวมทั้งทำให้สารสกัดที่ได้มีความบริสุทธิ์ยิ่งขึ้น นอกจากนี้อาจจะต้องมีการปรับปรุงคุณสมบัติของแผ่นฟิล์มเซลลูโลสจากแบคทีเรียเพื่อให้สามารถดูดซับสารสกัดจากสาหร่ายได้มากขึ้นและปลดปล่อยสารออกฤทธิ์ออกมาอย่างช้าๆ เพื่อยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันในระหว่างการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ได้นานขึ้น เช่นการใช้เทคนิคไมโครเอ็นแคปซูลชัน (Microencapsulation) เป็นต้น



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บรรณานุกรม

- กล่าวขวัญ ศรีสุข ปรีดาพรรณ สาลี เยาวลักษณ์ เจริญสุด และเอกรัฐ ศรีสุข. 2553. ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งไทโรซิเนสของส่วนสกัดจากเหง้าของว่านสาวหลง. วารสารพฤกษศาสตร์ไทย 2 (ฉบับพิเศษ). หน้า 143-150.
- ดวงใจ โอชัยกุล. 2549. การพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารมังสวิรัตชนิดใหม่โดยใช้เชื้อ *Monascus Purpurcus* TISTR 3090 หมักร่วมกับวุ้นมะพร้าว และนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ทดแทนไนโตรเจนในผลิตภัณฑ์กุนเชียง. งบประมาณประจำปีงบประมาณ 2549 ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- ประมวล ศรีกาหลง. 2552. เอกสารประกอบการสอนวิชาการประเมินอายุการเก็บของอาหาร. สาขาวิศวกรรมแปรรูปอาหาร. คณะอุตสาหกรรมเกษตร. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- ยุวดี พีรพรพิศาล. 2538. สำหรับาย. ตอนที่ 1 : ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินและสาหร่ายสีเขียว. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. พิมพ์ครั้งที่ 3. เชียงใหม่ : บุคลิกดคอมพิวเตอร์.
- ศิริเพ็ญ ตรีชัยยาพร. 2537. สำหรับายวิทยาประยุกต์. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 149-159.
- รุจริน ลี้มศุภวานิช. 2555. การผลิตเนื้อเจอร์เกี และกุนเชียงหมูขึ้นรูปพร้อมทานอย่างง่าย. เอกสารประกอบการอบรมเชิงวิชาการ. สาขาวิชาคหศาสตร์เกษตร. คณะคหศาสตร์อุตสาหกรรม. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- ระพีพันธ์ ศรีบัว วิศววุธ ชีวะประไพ และศิริรัตน์ ฤทธิเดช. 2554. การผลิตแคโรทีนอยด์และการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันจากสาหร่ายขนาดเล็ก. โครงการงานพิเศษนักศึกษาปริญญาตรี สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- วรารุณี ครูสง. 2551. การบริหารจัดการจุลินทรีย์ในอุตสาหกรรมอาหาร. พิมพ์ครั้งที่1. กรุงเทพฯ: สถาบันอาหาร.
- วิศรา ชื่นอารมณ์ อรพิน เกิดชูชื่น และ ณีภูษา เลาทกุลจิตต์. 2553. การวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากชะคราม (*Suaeda maritima*). วารสารวิทยาศาสตร์การเกษตร. 41(3): 621-624.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- วาริน แสงกิตติโกมล. 2543. ปริมาณรวมของสารต้านอนุมูลอิสระในผัก ผลไม้และสมุนไพร. วารสาร สหเวชศาสตร์. 1: 11-18.
- วันเพ็ญ ภูติจันทร์. 2549. วิทยาสาหร่าย. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : โอเดียนสโตร์.
- ศิวาพร ศิวเวชช. 2546. วัตถุเจือปนในอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 1. นครปฐม : โรงพิมพ์ศูนย์ส่งเสริมและฝึก อบรมการเกษตรพรศิวแห่งชาติ.
- สุภาธร ศรีเนาวรัตน์กุล. 2552. ประสิทธิภาพของฟิล์มด้านจุลินทรีย์และปฏิกิริยาออกซิเดชันซึ่งมีสาร สกัดจากธรรมชาติพืชสำหรับบรรจุอาหาร. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ พ.ศ. 2552.
- โอภา วัชรคุปต์ ปรีชา บุญจง จันทนา บุญยะรัตน์ และมาลีรักษ์ อัดต์สินทอง. 2549. สารต้าน อนุมูลอิสระ. กรุงเทพฯ : พีเอสพรีนท์.
- Aboul-Enein, A.M. Baz, F.K.E., El-Baroty, G.S. Youssef, A.M. and El-baky, H.H.A. 2003. Antioxidant activity of algal extracts on lipid peroxidation. Journal Medicine Science. 3(1): 87-98.
- Abreu, D.A.P., Losada, P.P., Maroto, J. and Cruz, J.M. 2011. Natural antioxidant active packaging film and its effect on lipid damage in frozen blue shark (*Prionace glauca*). Innovative Food Science and Emerging Technologies. 12: 50-55.
- Alster, A. and Zohary, T. 1902. *Scenedesmus acuminatus* (Lagerheim) Chodat. <[http://planktonnet.awi.de/index.php?contenttype=image\\_details&itemid=57975#content](http://planktonnet.awi.de/index.php?contenttype=image_details&itemid=57975#content)>. สืบค้นวันที่ 24 เมษายน 2555
- Bolumar,T., Andersen, M.L. and VibekeOrlien, V. 2011. Antioxidant active packaging for chicken meat processed by high pressure treatment. Food Chemistry. 129: 1406-1412.
- Buege, J.A. and Aust, S.D. 1978. Microsomal lipid peroxidation. Methods Enzymol. 52: 302-310.
- Burton, G.W. and Ingold, K.U. 1981. Autoxidation of biological molecules. 1. Antioxidant activity of vitamin E and related chain-breaking phenolic antioxidants in vitro. Journal of the American Chemical Society. 103: 6472-6477.
- Camo, J., Beltran, J.A. and Roncales, P. 2008. Extension of the display life of lamb with an antioxidant active packaging. Meat Science. 80: 1086-1091.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Camo, J., Lores, A., Djenane, D., Beltran, J.A. and Roncales, P. 2011. Display life of beef packaged with an antioxidant active film as a function of the concentration of oregano extract. *Meat Science*. 88: 174-178.
- Chakraborty, K., Praveen, N.K., Vijayan, K.K. and Rao, G.S. 2013. Evaluation of phenolics contents and antioxidant activities of brown seaweeds belonging of *Turbinaria* spp. (Phaeophyta, Sargassaceae) collected from Gulf of Mannar. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 3(1): 8-16.
- Chew, Y.L., Lima, Y.Y., Omara, M. and Khoob, K.S. 2008. Antioxidant activity of three edible seaweeds from two areas in South East Asia. *LWT - Food Science and Technology*. 41(6): 1067-1072.
- Chen, B., Huang, J., Wang, J., and Huang, L. 2008. Ultrasound effects on the antioxidative defense systems of *Porphyridium cruentum*. *Colloids and Surfaces*. 61: 82-92.
- Chen, W., Rui, H., Yuan, H. and Zhang, L. 2007. Analysis of dynamic chemical changes in Chinese cantonese sausage: Factors influencing content of nitrite and formation of flavor substances . *Journal of Food Engineering*. 79: 1191–1195.
- Cho, M., Lee, H.S., Kang, I.J., Won, M.H. and You, S. 2011. Antioxidant properties of extract and fractions from *Enteromorpha prolifera*, a type of green seaweed. *Food Chemistry*. 127: 999-1006.
- Contini, C., Katsikogianni, M.G., O'Neill, F.T., O'Sullivan, M., Dowling, D.P. and Monahan, F.J. 2012. PET trays coated with citrus extract exhibit antioxidant activity with cooked turkey meat. *LWT - Food Science and Technology*. 47: 471-477.
- Dietaryfiberfood. 2012. Chlorophyll: definition, chlorophyll health benefits, Photosynthesis and other uses. <<http://www.dietaryfiberfood.com/amtioxidant/chlorophyll-health-benefits.php>> สืบค้นวันที่ 16 พฤษภาคม 2555.
- Dorta, E., Lobo, M.G. and Gonzalez, M. 2012. Reutilization of mango byproduct: study of the effect of extraction solvent and temperature on their antioxidant properties. *Journal of food Science*. 71(1): 80-88.
- Ganesan, K., Kumar, K.S. and Bhaskar, N. 2008. Antioxidant properties of methanol extract and its solvent fractions obtained from selected Indian red seaweeds. *Bioresource Technology*. 99: 2717–2723.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Ganesan K., Kumer K.S. and Subba Rao P.V. 2011. Comparative assessment of antioxidant activity in three edible species of green seaweed, *Enteromorpha* from Okha, Northwest coast of India. *Innovative Food Science and Emerging Technology*. 12: 73-78.
- Guedes, A.C., Amaro, H.M. and Malcata, F.X. 2011. Microalgae as sources of carotenoids. *Marine Drugs*. 9: 625-644.
- Guiry, M.D. and Guiry, G.M. 2011. AlgaeBase. < <http://www.algaebase.org> > World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. สืบค้นวันที่ 15 สิงหาคม 2554.
- Hadder, A., Sellimi, S., Ghannouchi, R., Alvarez, O.M., Nasri, M. and Bougatef, A. 2012. Functional, antioxidant and film-forming properties of tuna-skin gelatin with a brown algae extract. *Journal of Biological Macromolecules*. 51: 477-483.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. and Aruoma, L. 1987. The deoxyribose method: a simple test-tube assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Journal Analytical Biochemistry*. 165(1): 215-219.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4<sup>th</sup> ed. Oxford University Press, New York.
- Hu, C.C, Lin, J.T., Lu, F.J., Chou, F.P. and Yang, D.J. 2008. Determination of carotenoids in *Dunaliella salina* cultivated in Taiwan and antioxidant capacity of the algal carotenoid extract. *Food Chemistry*. 109: 439 - 446.
- Ikhsan, M. and Fatin, N. 2006. Antioxidative properties and nutritional contents of selected indigenous microalgae. Masters thesis. University Putra Malaysia.
- Ismail, H.I., Chan, K.W., Mariod, A.A. and Ismail, M. 2010. Phenolic content and antioxidant activity of cantaloupe (*Cucumis melo*) methanolic extracts. *Food Chemistry* 119: 643-647.
- Jaime, L., Rodriguez-Meizoso, I., Cifuentes, A., Santoyo, S., Suarez, S., Ibanez, E. and Francisco, F. J. 2010. Pressurized liquids as an alternative process to antioxidant carotenoids extraction from *Haematococcus pluvialis* micro algae. *Food Science and Technology*. 43: 105 -112.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Jung, D.C., Lee, S.Y., Yoon, J.H., Hong, K.P., Kang, Y.S., Park, S.R., Park, S.K., Ha, S.D., Kim, G.H. and Bae, D.H. 2009. Inhibition of pork and fish oxidation by novel plastic film coated with horseradish extract. *LWT-Food Science and Technology*. 42: 856-861.
- Komárková-Legnerová, J. 1969. The systematics and ontogenesis of the genera *Ankistrodesmus* Corda and *Monoraphidium* gen. nov. In: Fott B. (ed) *Studies in phycology*. Academia Praha. 262-292.
- Kosar, M., Gögerb, F. and Başer, K.H.C. 2011. In vitro antioxidant properties and phenolic composition of *Salvia halophila* Hedge from Turkey. *Food Chemistry*. 129(2): 374-379.
- Kuda, T., Tsunekawa, M., Goto, H. and Araki, Y. 2005. Antioxidant properties of four edible algae harvested in the Noto Peninsula, Japan. *Journal of Food Composition and Analysis*. 625-633.
- Kuda, T., Hishi, T. and Mackawa, S. 2006. Antioxidant properties of dried product of 'haba-nori', an edible brown alga, *Petalonia binghamiae* (J. Agarah) Vinogradova. *Food Chemistry*. 98: 545-550.
- Kumar, K.S., Ganesan, K., Subba Rao, P.V. 2008. Antioxidant potential of solvent extracts of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty – An edible seaweed. *Food Chemistry*. 107: 289-295.
- Lee, S.H., Kim, A.D., Kang, M.C., Lee, J. B. and Jeon, Y.J. 2009. Potential antioxidant Activities of enzymatic digests from fresh water microalgae, *Pediastrum duplex* and *Dactylococcopsis fascicularis*. *Algae*. 24(3): 169-177.
- Li, H.B., Cheng, K.W., Wong, C.C., Fan, K.W., Chen, F. and Jiang, Y. 2007. Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chemistry* . 102: 771-776.
- López, A., Rico, M., Rivero, A. and Tangil, M.S. 2011. The effects of solvents on the phenolic contents and antioxidant activity of *Stypocaulon scoparium* algae extracts. *Food Chemistry*. 125: 1104-1109.
- Luo, H.Y., Wang, B., Yu, C.G., Qu, Y.L. and Su, C.L. 2010. Evaluation of antioxidant activities of five selected brown seaweeds from China. *Journal of Medicinal Plants Research*. 4(18): 2557-2565.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Lupu, A. 2006. Natural Food Additive from Algae.<<http://news.softpedia.com/news/Natural-Food-Additive-from-Algae-36535.shtml>>. สืบค้นวันที่ 5 พฤษภาคม 2555.
- Mann, J.A. and Fowkes, S.W. 1983. Wipe Out Herpes with BHT. Manhattan Beach, Calif: MegaHealth Society.
- Matanjun, P., Mohamed, S., Mustapha, N.M., Muhammad, K. and Ming, C.H. 2008. Antioxidant activities and phenolics content of eight species of seaweeds from North Borneo. *Journal of Applied Phycology*. 20(4): 367-373.
- Mathew, S. and Abraham, T.E. 2006. Studies on the antioxidant activities of cinnamon (*Cinnamomum verum*) bark extracts, through various in vitro models. *Food Chemistry*. 94, 520-528.
- Maxcheix, J-J., Fleuriet, A. and Billot, J. 1990. Fruit Phenolic. CRC Press. Inc., Florida.
- Moktan, B., Saha, J. and Sarkar, K.P. 2008. Antioxidant activities of soybean as affected by Bacillus-fermentation to kinema. *Food research International*. 41: 586-593.
- Nakayama, R., Tamuraa, Y., Kikuzakib, H. and Nakatani, N. 1999. Antioxidant effect of the constituents of Susabinori (*Porphyra yezoensis*). *American Oil Chemists' Society Journal*. 76(5): 649-653.
- Natrah, F.M.I., Yusoff, F.M., Shariff, M., Abas, F. and Mariana, N.S. 2007. Screening of Malaysian indigenous microalgae for antioxidant properties and nutritional value. *Journal of Applied Phycology*. 19: 711-718.
- Naveena, B.M., Sen, A.R., Vaithiyathan, S., Babji, Y. and Kondaiah, N. 2008. Comparative efficacy of pomegranate juice, pomegranate rind powder extract and BHT as antioxidants in cooked chicken patties. *Meat Science*. 80: 1304-1308.
- Norajit, K., Kim, K.M. and Ryu, G.H. 2010. Comparative studies on the characterization and antioxidant properties of biodegradable alginate film containing ginseng extract. *Journal of Food Engineering*. 98: 377-384.
- O'Sullivan, A.M., O'Callaghan, Y.C., O'Grady, M.N., Queguineur, B., Hanniffy, D., Troy, D.J., Kerry, J.P. and O'Brien, N.M. 2010. In vitro and cellular antioxidant activities of seaweed extract prepared five brown seaweeds harvested in spring from the west coast of Ireland. *Food Chemistry*. 126: 1064-1065.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Packer, L., Hiramatsu, M. and Yoshikawa, T. 1999. Antioxidant food supplements in human health. Academic Press. U.S.A.
- Panphadung, T. 2004. Antioxidant activity and quality control by HPLC method of constituents from *Boesenbergia pandurata* rhizomes. Faculty of Pharmaceutical Sciences (Pharmaceutical Sciences). Thesis. Prince of Songkla University.
- Qi, S. and Zhou, D. 2013. Lotus seed epicarp extract as potential antioxidant and anti-obesity additive in Chinese cantonese sausage. *Meat Science*. 93, 257–262.
- Rastian, Z., Mehranian, M., Vahabzadeh, F. and Sartavi, K. 2007. Antioxidant activity of extract from a brown alga, *Sargassum boveanum*. *African Journal of Biotechnology*. 6 (24): 2740-2745.
- Rhim, J.W. and Ng, P., K.W. 2007. Natural biopolymer-based nanocomposite films for packaging applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 47: 411-433.
- Sabatini, S.E., Jua'rez, A.B. Eppis, M.R., Bianchi, L., Lugget, C.M. and Molina, M.C.R. 2009. Oxidative stress and antioxidant defenses in two green microalgae exposed to copper. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 72: 1200-1206.
- Sabeena Farvin, K.H. and Jacobsen, C. 2013. Phenolic compounds and antioxidant activities of selected species of seaweeds from Danish coast. *Food Chemistry*. 138: 1670-1681.
- Sánchez, J.F., Fernández, J.M., Acie'n, F.G., Pérez-Parra, J. and Molina, E. 2008. Influence of culture conditions on the productivity and lutein content of the new strain *Scenedesmus atmeriensis*. *Process Biochemistry*. 43: 398-405.
- Sayanjali, S., Ghanbarzadeh, B. and Ghiassifar. 2011. Evaluation of antimicrobial and physical properties of edible film based on carboxymethyl cellulose containing potassium sorbate on some mycotoxigenic *Aspergillus* species in fresh pistachios. *LWT-Food Science and Technology*. 44: 1133-1138.
- Selamassakul, O., Laohakunjit, N. and Kerdchoechuen, O. 2009. Antioxidant capacity of extracts from *Gracilaria fisheri*. *Agricultural Science Journal*. 40(3): 25-28.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Senevirathne, M., Kim, S.H., Siriwardhana, N., Ha, J.H., Lee, K.W. and Jeon, Y. J. 2006. Antioxidant potential of *Ecklonia cava* on reactive oxygen species scavenging, metal chelating, reducing power and lipid peroxidation inhibition. *Journal Food Science Technology*. 12: 27 - 38.
- Shanab, S. M. M. 2007. Antioxidant and antibiotic activities of some seaweeds (Egyptian Isolates). *International Journal Agriculture and Biology*. 9(2): 220-225.
- Shanab, S.M.M., Mostafa, S.S.M., Shalady, E.A. and Mahmoud, G.I. 2012. Aqueous extract of microalgae exhibit antioxidant and anticancer activities. *Journal of Tropical Biomedicine*. 1: 608-615.
- Silva, R.O., Santos, G.M.P.D., Nicolau, L.A.D., Lucetti, L.T., Santana, A.P.M., Chaves, L.D.S., Barros, F.C.N., Freitas, A.L.P., Souza, M.H.L.P. and Medeiros, J.V.R. 2011. Sulfated-polysaccharide fraction from red algae *Gracilaria caudata* protects mice gut against ethanol-induced damage. *Marine Drugs*. 9 : 2188-2200.
- Siver, P.A. 2009. [http://silicasecchidisk.conncoll.edu/LucidKeys/Carolina\\_Key/html/Ankistrodesmus\\_Main.html](http://silicasecchidisk.conncoll.edu/LucidKeys/Carolina_Key/html/Ankistrodesmus_Main.html) >. สืบค้นวันที่ 6 กันยายน 2554.
- Siver, P.A. 2009. < [http://silicasecchidisk.conncoll.edu/LucidKeys/Carolina\\_Key/html/Chlamydomonas\\_Main.html](http://silicasecchidisk.conncoll.edu/LucidKeys/Carolina_Key/html/Chlamydomonas_Main.html) >. สืบค้นวันที่ 6 กันยายน 2554
- Siver, P.A. 2009. <[http://silicasecchidisk.conncoll.edu/LucidKeys/Carolina\\_Key/html/Chlorella\\_Main.html](http://silicasecchidisk.conncoll.edu/LucidKeys/Carolina_Key/html/Chlorella_Main.html) >. สืบค้นวันที่ 6 กันยายน 2554.
- Siver, P.A. 2009. < [http://silicasecchidisk.conncoll.edu/LucidKeys/Carolina\\_Key/html/Chlorococcum\\_Main.html](http://silicasecchidisk.conncoll.edu/LucidKeys/Carolina_Key/html/Chlorococcum_Main.html) >. สืบค้นวันที่ 6 กันยายน 2554.
- Siver, P.A. 2009. < [http://silicasecchidisk.conncoll.edu/LucidKeys/Carolina\\_Key/html/Scenedesmus\\_Main.html](http://silicasecchidisk.conncoll.edu/LucidKeys/Carolina_Key/html/Scenedesmus_Main.html) >. สืบค้นวันที่ 6 กันยายน 2554.
- Siripatrawan, U. and Noipha, S. 2012. Active film from chitosan incorporating green tea extract for shelf life extension of pork sausages. *Food Hydrocolloids*. 27: 102-108.
- Tan, F.J., Liao, F.Y., Jhan, Y.J. and Liu, D.C. 2007. Effect of replacing pork backfat with yams (*Dioscoreaalata*) on quality characteristics of Chinese sausage. *Journal of Food Engineering*. 79: 858-863.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Vijayabaskar, P. and Vaseela, N. 2012. In vitro antioxidant properties of sulfated Polysaccharide from brown marine algae *Sargassum tenerrimum*. *Journal of Tropical Disease*. 1: 5890-5896.
- Wang, T., Jonsdottir, R. and Olafsdottir, G. 2009. Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelating of extracts from Icelandic seaweeds. *Food chemistry*. 116: 240-248.
- Waters, M.G.J., Jagger, R.G. and Winter, R.W. 1996. Water absorption of (RTV) silicone denture soft lining material. Elsevier. 105-108.
- Williams, G.M. and Iatropoulos, M.J. 1996. Inhibition of the hepatocarcinogenicity of aflatoxin B1 in rats by low levels of the phenolic antioxidants butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *Cancer Letters*. 104(1): 49-53.
- Yangthong, M., Hutadilok-Towatana, N. and Phromkunthong, W. 2009. Antioxidant activities of four edible seaweeds from the Southern Coast of Thailand. *Plant Foods Human and Nutrient*. 64: 218 – 223.
- Zhang, Z., Wang, F., Wang, X., Liu, X., Hou, Y. and Zhang, Q. 2010. Extraction of the polysaccharides from five algae and their potential antioxidant activity in vitro. *Carbohydrate Polymers*. 82: 118-121.
- Zubia, M., Robledo, D. and Freile-Pelegrin, Y. 2007. Antioxidant activities in tropical marine macroalgae from the Yucatan Peninsula, Mexico. *Journal of Applied Phycology*. 19(5): 449-458.
- [Online].Available: <http://www.knowabouthealth.com> สืบค้นวันที่ 18 พฤศจิกายน 2553.
- [Online].Available: <http://www.naturalsolution.co.kr.tech21e.html> สืบค้นวันที่ 14 กุมภาพันธ์ 2554
- [Online].Available: <http://protist.i.hosei.ac.jp/pdb/Images/Chlorophyta/Monoraphid> สืบค้นวันที่ 20 กรกฎาคม 2554.
- [Online].Available: <http://www.fda.moph.go.th/prac/watch/product/bha.shtml> สืบค้นวันที่ 7 สิงหาคม 2554.
- [Online].Available: [http:// th.wikipedia.org/wiki/สารต้านอนุมูลอิสระ](http://th.wikipedia.org/wiki/สารต้านอนุมูลอิสระ) สืบค้นวันที่ 7 สิงหาคม 2554.
- [Online].Available: <http://www.naturalsolution.co.kr/tech21e.html> สืบค้นวันที่ 14 สิงหาคม 2554.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

[Online].Available: <http://www.osnanet.de/tegelhuetter/chlorella.jpg> สืบค้นวันที่ 15 สิงหาคม 2554.

[Online].Available: <http://www.natural-plus-healthy.com/antioxidantfacts.htm>  
[Ural-plus-healthy.com/antioxidant-facts.html](http://www.natural-plus-healthy.com/antioxidant-facts.html). สืบค้นวันที่ 15 สิงหาคม 2554.

[Online].Available: <http://www.phytochemicals.info/phytochemicals/gallic-acid.php>  
 สืบค้นวันที่ 30 สิงหาคม 2554.

[Online].Available <http://www.chm.bris.ac.uk/motm/edta/edtah.htm> สืบค้นวันที่ 2 กันยายน 2554.

[Online].Available :[http://www.dss.go.th/dssweb/starticles/files/pep\\_12\\_2546\\_phenolic.pdf](http://www.dss.go.th/dssweb/starticles/files/pep_12_2546_phenolic.pdf) สืบค้นวันที่ 4 กันยายน 2554.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ก

### การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

ก-1 อาหารสูตร BG-11 สำหรับใช้ในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย (Schneegurt, 2005)

|                                      |       |           |
|--------------------------------------|-------|-----------|
| NaNO <sub>3</sub>                    | 1.5   | กรัม      |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>      | 0.04  | กรัม      |
| MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O | 0.075 | กรัม      |
| CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O | 0.036 | กรัม      |
| Citric acid                          | 0.006 | กรัม      |
| Ferric ammonium citrate              | 0.006 | กรัม      |
| EDTA (disodium salt)                 | 0.001 | กรัม      |
| NaCO <sub>3</sub>                    | 0.02  | กรัม      |
| Trace metal mix A5                   | 1.0   | มิลลิลิตร |
| วุ้น                                 | 10.0  | กรัม      |
| น้ำกลั่น                             | 1.0   | ลิตร      |

หลังจากกระบวนการนึ่งฆ่าเชื้อและทำให้เย็นลง ปรับพีเอชให้มีค่าเป็น 7.1

#### Trace metal mix A5:

|  |       |           |
|--|-------|-----------|
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                       | 2.86  | กรัม      |
| MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O                 | 1.81  | กรัม      |
| ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O                 | 0.222 | กรัม      |
| NaMoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O                | 0.39  | กรัม      |
| CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O                 | 0.079 | กรัม      |
| Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O | 49.4  | มิลลิกรัม |
| น้ำกลั่น   | 1.0   | ลิตร      |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### ก-2 อาหารสูตร N-8 สำหรับใช้ในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย (Schneegurt, 2005)

|   |        |           |
|---|--------|-----------|
| $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 260.0  | มิลลิกรัม |
| $\text{KH}_2\text{PO}_4$                            | 740.0  | มิลลิกรัม |
| $\text{CaCl}_2$                                     | 10.0   | มิลลิกรัม |
| Fe EDTA   | 10.0   | มิลลิกรัม |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$           | 50.0   | มิลลิกรัม |
| $\text{KNO}_3$                                      | 1000.0 | มิลลิกรัม |
| Trace element mixture                               | 1.0    | มิลลิลิตร |
| น้ำกลั่น  | 1.0    | ลิตร      |

หลังจากกระบวนการนึ่งฆ่าเชื้อและทำให้เย็นลง ปรับพีเอชให้มีค่าเป็น 6.8

#### Trace element mixture

|   |       |      |
|---|-------|------|
| $\text{Al}(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$ | 3.58  | กรัม |
| $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$             | 12.98 | กรัม |
| $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$             | 1.83  | กรัม |
| $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$             | 3.20  | กรัม |
| น้ำกลั่น  | 1.0   | ลิตร |

### ก-3 อาหารสูตร BB (Schneegurt, 2005)

|  |      |           |
|--|------|-----------|
| $\text{NaNO}_3$ (5.0 g/200 ml)                           | 10.0 | มิลลิลิตร |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1.5 g/200 ml) | 10.0 | มิลลิลิตร |
| NaCl (0.5 g/200 ml)                                      | 10.0 | มิลลิลิตร |
| $\text{K}_2\text{HPO}_4$ (1.5 g/200 ml)                  | 10.0 | มิลลิลิตร |
| $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (3.5 g/200 ml)                  | 10.0 | มิลลิลิตร |
| $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.5 g/200 ml) | 10.0 | มิลลิลิตร |
| $\text{H}_3\text{BO}_3$ (1.14 g/100 ml)                  | 1.0  | มิลลิลิตร |
| Trace elements solution                                  | 1.0  | มิลลิลิตร |
| EDTA stock   | 1.0  | มิลลิลิตร |
| Fe solution  | 1.0  | มิลลิลิตร |
| น้ำกลั่น   | 1.0  | ลิตร      |
| วุ้น   | 15   | กรัม      |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**Trace elements solution:**

|  |      |      |
|--|------|------|
| ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O                 | 8.82 | กรัม |
| MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O                 | 1.44 | กรัม |
| MoO <sub>3</sub>                                     | 0.71 | กรัม |
| CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O                 | 1.57 | กรัม |
| Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O | 0.49 | กรัม |
| น้ำกลั่น   | 1.0  | ลิตร |

**EDTA stock:**

|                     |     |           |
|---------------------|-----|-----------|
| EDTANa <sub>2</sub> | 5.0 | กรัม      |
| KOH                 | 3.1 | กรัม      |
| น้ำกลั่น            | 100 | มิลลิลิตร |

**Fe solution:**

|                                      |      |           |
|--------------------------------------|------|-----------|
| FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O | 4.98 | กรัม      |
| conc H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>  | 1.0  | มิลลิลิตร |
| น้ำกลั่น                             | 1.0  | ลิตร      |

**วิธีการเตรียมอาหาร**

ซึ่งสารเคมีตามอัตราส่วนที่กำหนด ละลายด้วยน้ำกลั่นสะอาดปรับปริมาตรให้ได้ตามความเข้มข้นที่ต้องการ จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอที่สภาวะอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

**ก-4 อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสูตรน้ำมะพร้าว**

|                   |    |                  |
|-------------------|----|------------------|
| น้ำมะพร้าวแก่     | 1  | ลิตร             |
| น้ำตาลทราย        | 50 | กรัมต่อลิตร      |
| แอมโมเนียมซัลเฟต  | 1  | กรัมต่อลิตร      |
| กรดอะซิติคเข้มข้น | 10 | มิลลิลิตรต่อลิตร |

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากันด้วยน้ำมะพร้าวแก่และปรับ pH ให้มีค่าเป็น 5.0 จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาทีด้วยหม้อนึ่งอัดไอ

ก-5 อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย HS medium (Ruka และคณะ, 2012)

|                       |      |             |
|-----------------------|------|-------------|
| กลูโคส                | 20   | กรัมต่อลิตร |
| ยีสต์สกัด             | 50   | กรัมต่อลิตร |
| เปปโตน                | 50   | กรัมต่อลิตร |
| โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต | 2.7  | กรัมต่อลิตร |
| กรดซิตริก             | 1.15 | กรัมต่อลิตร |
| น้ำกลั่น              | 1    | ลิตร        |

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากันด้วยน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ด้วยหม้อนึ่งอัตโนมัติ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ข

### กราฟมาตรฐานสารละลายมาโลนัลดีไฮด์

#### การเตรียมสารละลายมาโลนัลดีไฮด์

1. มาโลนัลดีไฮด์ 0.1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร
2. เจือจางโดยนำปริมาณสารมาโลนัลดีไฮด์ที่เตรียมได้จากข้อที่ 1 มาปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร
3. นำสารละลายที่ได้มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้

|                                     |   |     |     |     |     |     |     |
|-------------------------------------|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) | 0 | 1   | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   |
| มาโลนัลดีไฮด์ (มิลลิลิตร)           | 0 | 0.1 | 0.2 | 0.3 | 0.4 | 0.5 | 0.6 |
| น้ำกลั่น (มิลลิลิตร)                | 1 | 0.9 | 0.8 | 0.7 | 0.6 | 0.5 | 0.4 |

4. เติมสารละลายผสมของกรดโทโอบาบิทูริก 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส
5. ทำให้เย็น และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปสร้างกราฟเพื่อหาสมการเส้นตรงจากกราฟ

#### การคำนวณ (รายงานค่าเป็นมิลลิกรัมของมาโลนัลดีไฮด์ต่อกิโลกรัมตัวอย่าง)

คำนวณปริมาณ TBARS (thiobarbituric reactive substances) ในรูปของมาโลนัลดีไฮด์ โดยเปรียบเทียบกับสมการที่ได้จากกราฟมาตรฐาน

$$\text{ความเข้มข้นมิลลิกรัมของมาโลนัลดีไฮด์ต่อกิโลกรัมตัวอย่าง} = \text{ค่า OD วัดที่ได้} = \frac{X/1000\text{ml}}{Y}$$

หมายเหตุ X คือ มิลลิกรัมมาโลนัลดีไฮด์ของตัวอย่าง

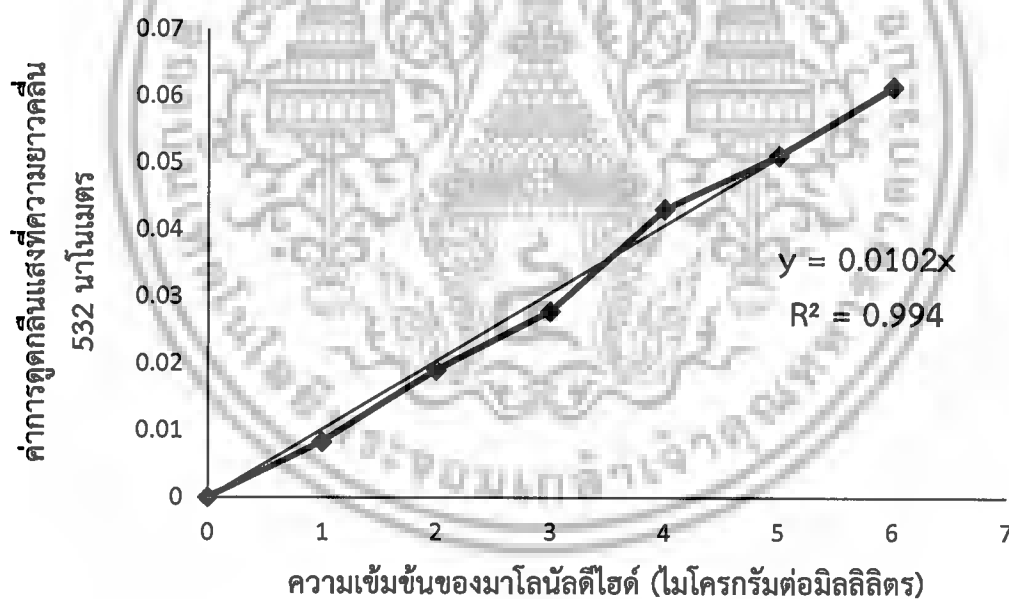
1000 ml คือ การเปลี่ยนหน่วยจากไมโครกรัม ( $\mu\text{g}$ ) ไปเป็นมิลลิกรัม (mg)

Y คือ ค่าความชันที่ได้จากกราฟมาตรฐานมาโลนัลดีไฮด์ ดังรูปที่ ฉ-1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข-1 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตรของสารละลายมาตรฐานมาโลนดีไฮด์

| ความเข้มข้นของมาโลนดีไฮด์<br>(ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) | ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร |       |       |        |
|--|--|-------|-------|--------|
|  | 1  | 2     | 3     | เฉลี่ย |
| 0  | 0.000  | 0.000 | 0.000 | 0.000  |
| 1  | 0.008  | 0.008 | 0.009 | 0.0083 |
| 2  | 0.019  | 0.018 | 0.020 | 0.0190 |
| 3  | 0.028  | 0.028 | 0.027 | 0.0277 |
| 4  | 0.045  | 0.041 | 0.044 | 0.0433 |
| 5  | 0.052  | 0.052 | 0.049 | 0.0510 |
| 6  | 0.060  | 0.063 | 0.061 | 0.0613 |



รูปที่ ข-1 แสดงกราฟมาตรฐานของสารละลายมาโลนดีไฮด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้