

การศึกษาฤทธิ์การยับยั้ง **NE** - (carboxymethyl) lysine (CML)  
และ **NW** - (carboxymethyl) arginine (CMA) โดยใช้สารสกัดจาก  
สาหร่าย *Chlorella* spp.



นางสาว ธมลวรรณ นันทดีพิลาศ

นางสาว ธัญชนก นาไชย

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต(จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)  
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2565

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Inhibition N $\epsilon$  - (carboxymethyl) lysine (CML) and N $\omega$  -  
(carboxymethyl) arginine (CMA) Formation by using  
*Chlorella* spp. crude extracts



Thamolwan Nuntawadeepilas

Tanchanok Nachai

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF  
THE REQUIREMENT OF THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE  
(INDUSTRIAL MICROBIOLOGY)

DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษานานาชาติไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
LADKRABANG ACADEMIC YEAR 2022  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ การศึกษาฤทธิ์การยับยั้ง NE - (carboxymethyl) lysine (CML) และ N $\omega$  - (carboxymethyl) arginine (CMA) โดยใช้สารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella* spp. Inhibition NE - (carboxymethyl) lysine (CML) and N $\omega$  - (carboxymethyl) arginine (CMA) Formation by using *Chlorella* spp. crude extracts

ชื่อนักศึกษา นางสาวธมลวรรณ นันทวัตพิลาศ รหัสนักศึกษา 62050601  
นางสาวธัญชนก นาไชย รหัสนักศึกษา 62050602


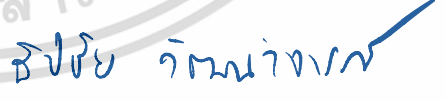

ปริญญา วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)

ภาควิชา ชีววิทยา

ปีการศึกษา 2565

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.วิภาวี เดชตีสักดิ์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม) ประจำปีการศึกษา 2565

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
รศ.ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตน์รุ่งโรจน์ ประธานกรรมการ	
ผศ.ดร.ธิปชัย วัฒนวิจารณ์ กรรมการ	
ผศ.ดร.วิภาวี เดชตีสักดิ์ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**หัวข้อโครงการพิเศษ** การศึกษาฤทธิ์การยับยั้ง **NE** - (carboxymethyl) lysine (CML) และ **NW** - (carboxymethyl) arginine (CMA) โดยใช้สารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella* spp. Inhibition **NE** - (carboxymethyl) lysine (CML) and **NW** - (carboxymethyl) arginine (CMA) Formation by using *Chlorella* spp. crude extracts

**ชื่อนักศึกษา** นางสาวธมลวรรณ นันทวดีพิลาศ รหัสนักศึกษา 62050601

นางสาวธัญชนก นาไชย รหัสนักศึกษา 62050602

**ปริญญา** วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

**ภาควิชา** ชีววิทยา

**ปีการศึกษา** 2565

**อาจารย์ที่ปรึกษา** ผศ.ดร.วิภาวี เดชดีศักดิ์

#### บทคัดย่อ

Advanced glycation endproducts (AGEs) เกิดจากการทำปฏิกิริยาของสารตั้งต้นจำพวกโปรตีนหรือไขมันกับน้ำตาลรีดิวซิง ซึ่งเรียกปฏิกิริยานี้ว่าปฏิกิริยาไกลเคชัน AGEs ส่งผลทำให้เกิดความเสื่อมสภาพของเซลล์ในร่างกาย ส่งผลทำให้เกิดโรคทางเมแทบอลิซึม ไขมันอุดตันในเส้นเลือด และอื่นๆ โครงการพิเศษนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อยับยั้งการก่อตัวของ AGEs 2 ชนิด ได้แก่ **NE** - (carboxymethyl) lysine (CML) และ **NW** - (carboxymethyl) arginine (CMA) โดยใช้สารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella* spp. ทั้ง 3 สปีชีส์ (สาหร่าย *Chlorella* G4, *Chlorella* sp. KLSc59 และ *Chlorella* sp. KLSc61) และนำไปทดสอบด้วยวิธี Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ผลการทดลองพบว่า *Chlorella* G4 ที่สกัดด้วยสารละลายเอทานอลความเข้มข้น 60% มีฤทธิ์ในการยับยั้ง CML ได้ดีที่สุด และมีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง CML เท่ากับ 95% จากนั้นจึงนำสารสกัดของสาหร่าย *Chlorella* G4 ที่สกัดด้วยสารละลายเอทานอลความเข้มข้น 60% มาแยกส่วนด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟีด้วยตัวทำละลายน้ำกลั่น, เอทานอล 25%, 50%, 75%, 100% และ อะซิโตน จากนั้นนำไปทดสอบด้วยวิธี ELISA อีกครั้ง ผลการทดลองพบว่า สารสกัดที่สามารถยับยั้ง CML ได้ดีที่สุดคือ ส่วนของสารสกัดสาหร่าย G4 ที่ละลายด้วยตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้น 100% และ 25% ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง CML อยู่ที่ 89% และ เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง CMA อยู่ที่ 77% ตามลำดับ การทดลองเบื้องต้นนี้แสดงให้เห็นเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เห็นว่า สารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella* G4 อาจประกอบไปด้วยสารสำคัญบริสุทธิ์ที่สามารถยับยั้งสาร CML และ CMA ซึ่งจะทำการศึกษาสารสำคัญต่อไป

**คำสำคัญ :** สาหร่าย *Chlorella* spp., สารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella* spp., NE - (carboxymethyl) lysine (CML), N $\omega$  - (carboxymethyl) arginine (CMA), การยับยั้ง AGEs, การทดสอบ ELISA



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<b>Title</b>	Inhibition <b>NE</b> - (carboxymethyl) lysine (CML) and <b>N<math>\omega</math></b> - (carboxymethyl) arginine (CMA) Formation by using <i>Chlorella</i> spp. crude extracts
<b>Students</b>	Miss Thamolwan Nuntawadeepilas Student ID 62050601 Miss Tanchanok Nachai Students ID 62050602
<b>Degree</b>	Bachelor of Science (Microbiology)
<b>Department</b>	Biology
<b>School</b>	Science
<b>University</b>	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
<b>Academic Year</b>	2022
<b>Advisor</b>	Asst. Prof. Dr. Wipawee Dejtsakdi

### Abstract

Advanced glycation end-products are from the reactions between proteins, nucleic acid and lipid and reducing sugars, named glycation reaction. AGEs cause degeneration of cells that leads to aging disease, metabolic syndromes, or hyperlipidemia etc. In this project, we aimed to investigate the inhibitory effect of CML and CMA formation by using *Chlorella* spp. (*Chlorella* G4, *Chlorella* sp. KLSc59 and *Chlorella* sp. KLSc61) crude extracts and finally tested by ELISA technique. The results showed that *Chlorella* G4 with 60% ethanol extraction could inhibit CML formation at 95%. After that we did column chromatography to separate 60% ethanolic *Chlorella* crude extract to be several fractions and then did ELISA detection. We found that the best inhibition of CML and CMA formation were 100% and 25% of *Chlorella* G4-ethanolic extract with 89% and 77% inhibition formation value, respectively. This preliminary findings suggested that *Chlorella*-ethanolic extract might contain some significant compounds that could possibly inhibit CML and CMA formation. We propose to further analysis these bioactive compounds

**Keyword:** *Chlorella* spp., Algal extract, **NE** - (carboxymethyl) lysine (CML), **N $\omega$**  -

(carboxymethyl) arginine (CMA), Inhibition AGEs, ELISA นั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษฉบับนี้สำเร็จลุล่วงลงได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความกรุณาอย่างสูงจาก ผศ.ดร.วิภาวี เดช  
ติศักดิ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษ ที่คอยให้ความช่วยเหลือดูแล แนะนำแนวทางแก้ไขปัญหาและ  
ข้อบกพร่องต่างๆ ตลอดการทำโครงการพิเศษ รวมทั้งยังให้ความรู้แก่ ผู้จัดทำ และขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร.  
เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์ ประธานกรรมการ ที่คอยแนะนำและช่วยเหลือดูแลต่างๆ และมอบสาหร่าย  
*Chlorella* spp. ทั้ง 3 สปีชีส์ และ ผศ.ดร.ธิปชัย วัฒนวิจารณ์ กรรมการ ที่มีความกรุณาให้คำแนะนำข้อมูล  
และข้อคิดเห็น ทำให้โครงการพิเศษฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ได้ด้วยดี จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ภาคชีววิทยาทุกท่าน ที่มอบความรู้และทักษะการปฏิบัติงาน ต่างๆ ซึ่ง  
สามารถนำมาใช้ในการทำโครงการพิเศษฉบับนี้ได้เป็นอย่างดี และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ ห้องปฏิบัติการที่ได้ให้  
ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกเกี่ยวกับอุปกรณ์ และเครื่องมือ รวมทั้ง การให้คำแนะนำในการ  
ปฏิบัติการ สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ที่ให้การสนับสนุนและส่งเสริมการศึกษา คอยช่วยเหลือ  
และให้กำลังใจ ตลอดจนขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ ที่คอยช่วยเหลือและเป็นกำลังใจให้เสมอ จนทำให้โครงการ  
พิเศษฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ชมลวรรณ นันทดีพิลาศ

ชญชนก นาไชย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ

บทคัดย่อ.....	ก
Abstract .....	ค
กิตติกรรมประกาศ.....	ง
สารบัญ .....	จ
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญรูปภาพ.....	ญ
คำย่อ/สัญลักษณ์.....	ฎ
<b>บทที่ 1 บทนำ.....</b>	<b>1</b>
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ.....	2
1.3 ขอบเขตของโครงการพิเศษ.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
<b>บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....</b>	<b>3</b>
2.1 สาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กสกุล <i>Chlorella</i> spp. ....	3
2.1.1 การจัดจำแนก.....	3
2.1.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา.....	3
2.1.3 สรีรวิทยาของสาหร่ายสกุล <i>Chlorella</i> spp. ....	4
2.1.4 แหล่งที่พบ.....	4
2.1.5 วงจรชีวิตของ <i>Chlorella</i> spp. ....	4
2.1.6 การเจริญเติบโตของสาหร่าย.....	5
2.1.7 ประโยชน์จากสาหร่าย <i>Chlorella</i> spp. ....	6
2.1.8 การเพาะเลี้ยงสาหร่าย <i>Chlorella</i> spp. ....	7
2.1.9 การเก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่าย.....	7
2.1.10 การวัดการเจริญเติบโตของสาหร่าย.....	7
2.2 ไกลเคชั่น.....	8
2.2.1 ปัจจัยที่ส่งผลของการสะสมของความเสียหายของโปรตีนที่เกิดจากไกลเคชั่น.....	9
2.2.2 กระบวนการเกิดไกลเคชั่น (Glycation process) ในอาหาร.....	9
2.2.3 ผลของปฏิกิริยาไกลเคชั่นต่อสุขภาพ.....	10
2.2.4 การลดโอกาสการเกิดสาร AGES.....	10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้เฉพาะเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.5 การยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาไกลเคชั่น.....	10
2.2.6 NE - (carboxymethyl) lysine (CML) .....	11
2.2.7 N $\omega$ - (carboxymethyl) arginine (CMA) .....	11
2.3 การตรวจวัดด้วย ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay).....	12
2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	14
<b>บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....</b>	<b>18</b>
3.1 สาหร่าย.....	18
3.2 อาหารเลี้ยงสาหร่าย.....	18
3.3 สารเคมี.....	18
3.3.1 สารเคมีสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อสาหร่าย.....	18
3.3.2 สารเคมีสำหรับการสกัดสาหร่าย.....	18
3.3.3 สารเคมีสำหรับการทำปฏิกิริยา AGEs.....	18
3.3.4 สารเคมีสำหรับทดสอบ ELISA.....	18
3.3.5 สารเคมีสำหรับการแยกคอลัมน์.....	19
3.4 อุปกรณ์และเครื่องมือ.....	19
3.4.1 อุปกรณ์.....	19
3.4.2 เครื่องมือ.....	20
3.5 ขั้นตอนในการดำเนินงาน.....	21
3.5.1 Algal extract .....	21
3.5.1.1 การเตรียมอาหาร Tris - Acetate - Phosphate Medium (TAP Media) .....	21
3.5.1.2 การเพาะเลี้ยงสาหร่าย.....	21
3.5.1.3 การเก็บเกี่ยวและการสกัดสารจากสาหร่าย.....	21
3.5.2 AGEs formation reaction .....	21
3.5.2.1 เตรียมสารสำหรับทำปฏิกิริยา.....	21
3.5.2.2 การทำปฏิกิริยา.....	22
3.5.3 AGEs detection by ELISA.....	22
3.5.4 C18 Chromatography.....	22
3.5.5 การวิเคราะห์ทางสถิติ.....	23
<b>บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล.....</b>	<b>24</b>
4.1 กราฟมาตรฐานแสดงระยะการเจริญเติบโตของสาหร่าย <i>Chlorella</i> G4, <i>Chlorella</i> sp. KLS59 และ <i>Chlorella</i> sp. KLS61.....	24

เอกสารนี้เป็นเอกสารต้นฉบับของงานวิจัยที่จัดทำขึ้นโดยคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ไม่อนุญาตให้เผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาตจากเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้  
 มากกว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้ง CML โดยใช้สารสกัดจากสาหร่าย <i>Chlorella</i> spp. 3 ชนิด	24
4.3 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้ง CMA และ CML โดยใช้สารสกัดจากสาหร่าย <i>Chlorella</i> G4.....	26
<b>บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....</b>	<b>29</b>
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	29
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	29
<b>เอกสารอ้างอิง.....</b>	<b>30</b>
<b>ภาคผนวก.....</b>	<b>34</b>
ภาคผนวก ก.....	35
ภาคผนวก ข.....	40
ภาคผนวก ค.....	41
ภาคผนวก ง.....	44
ภาคผนวก จ.....	46
ภาคผนวก ฉ.....	50
ภาคผนวก ช.....	52
ภาคผนวก ซ.....	53

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญตาราง

ตารางที่ ก-1	สารละลายขนาดเล็ก.....	35
ตารางที่ ก-2	อาหารเลี้ยงเชื้อ TAP Media สำหรับ 1 L pH 7.0.....	35
ตารางที่ ก-3	อาหารเลี้ยงเชื้อ TAP Agar สำหรับ 1 L pH 7.0.....	36
ตารางที่ ค-1	การทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของการทดสอบฤทธิ์การยับยั้ง CML โดยใช้สารสกัดจาก <i>Chlorella</i> spp. 3 สปีชีส์ คือ <i>Chlorella</i> G4 ( Code: G4 ), <i>Chlorella</i> sp. KLSc59 ( Code: KS ) และ <i>Chlorella</i> sp. KLSc61 ( Code: SR ) สกัดที่ความเข้มข้นเอทานอล 30% และ 60% โดยใช้การทดสอบ ELISA.....	41
ตารางที่ ค-2	การทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของการทดสอบฤทธิ์การยับยั้ง CMA โดยใช้สารสกัดจาก <i>Chlorella</i> G4 ( Code: G4 ) ที่ตัวทำละลายความเข้มข้นต่างๆ หลังจากแยกคอลัมน์ โดยใช้การทดสอบ ELISA	42
ตารางที่ ค-3	การทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของการทดสอบฤทธิ์การยับยั้ง CML โดยใช้สารสกัดจาก <i>Chlorella</i> G4 ( Code: G4 ) ที่ตัวทำละลายความเข้มข้นต่างๆ หลังจากแยกคอลัมน์ โดยใช้การทดสอบ ELISA	43
ตารางที่ ง-1	ตารางจำนวนเซลล์ของสาหร่าย <i>Chlorella</i> G4 ( Code: G4 ), <i>Chlorella</i> sp. KLSc59 ( Code: KS ) และ <i>Chlorella</i> sp. KLSc61 ( Code: SR ) การเพาะเลี้ยงวันที่ 5 ก่อนนำไปเก็บเกี่ยว.....	44
ตารางที่ ง-2	ตารางค่าการดูดกลืนแสงของสาหร่าย <i>Chlorella</i> G4 ( Code: G4 ), <i>Chlorella</i> sp. KLSc59 ( Code: KS ) และ <i>Chlorella</i> sp. KLSc61 ( Code: SR ) การเพาะเลี้ยงวันที่ 5 ก่อนนำไปเก็บเกี่ยว.....	45
ตารางที่ จ-1	แสดงผลการวัดค่า OD ของการทดสอบฤทธิ์การยับยั้ง CML โดยใช้สารสกัดจาก <i>Chlorella</i> G4 ( Code: G4 ), <i>Chlorella</i> sp. KLSc59 ( Code: KS ) และ <i>Chlorella</i> sp. KLSc61 ( Code: SR ) สกัดที่ความเข้มข้นเอทานอล 30% และ 60% ก่อนการแยกคอลัมน์ โดยใช้การทดสอบ ELISA ทดลอง 3 ซ้ำ	46
ตารางที่ จ-2	แสดงค่า OD เฉลี่ย และ เปอร์เซ็นการยับยั้ง CML ของสาหร่ายสีเขียว 3 สปีชีส์ คือ <i>Chlorella</i> G4 ( Code: G4 ), <i>Chlorella</i> sp. KLSc59 (Code: KS) และ <i>Chlorella</i> sp. KLSc61 ( Code: SR ) สกัดที่ความเข้มข้นเอทานอล 30% และ 60% โดยใช้การทดสอบ ELISA วัดค่า OD ที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร.....	47
ตารางที่ จ-3	แสดงผลการวัดค่า OD ของการทดสอบฤทธิ์การยับยั้ง CML และ CMA โดยไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้	48

<p>ใช้สารสกัดจาก <i>Chlorella</i> G4 ( Code: G4 ) ที่ตัวทำละลายความเข้มข้นต่าง หลังการแยกคอลัมน์ โดยใช้การทดสอบ ELISA ทดลอง 3 ซ้ำ.....</p>	
<p><b>ตารางที่ จ-4</b> แสดงค่า OD เฉลี่ย และ เปอร์เซ็นการยับยั้ง CMA และ CML ของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> G4. ( Code: G4 ) ที่ตัวทำละลายความเข้มข้นต่างๆ โดยใช้การทดสอบ ELISA วัดค่า OD ที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร.....</p>	<p>49</p>
<p><b>ตารางที่ ข-1</b> นำหน้าสารสกัดจาก <i>Chlorella</i> G4 ( Code: G4 ) ที่ความเข้มข้นตัวทำละลายต่างๆ หลังการแยกคอลัมน์.....</p>	<p>52</p>



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญรูปภาพ

รูปที่ 2.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสาหร่าย <i>Chlorella</i> spp.....	3
รูปที่ 2.2 แสดงวงจรชีวิตของ <i>Chlorella</i> spp.....	4
รูปที่ 2.3 ระยะการเจริญเติบโตของสาหร่าย.....	5
รูปที่ 2.4 แผนผังของผลิตภัณฑ์ขั้นสุดท้ายของไกลเคชั่น.....	9
รูปที่ 2.5 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) ทั้ง 4 รูปแบบ.....	14
รูปที่ 4.1 การเจริญเติบโตของสาหร่าย <i>Chlorella</i> G4, <i>Chlorella</i> sp. KLSc59 และ <i>Chlorella</i> sp. KLSc61.....	24
รูปที่ 4.2 อัตราการยับยั้ง CML (a - ค่าการยับยั้งจากการวัดด้วย microplate reader และ b - เปอร์เซ็นการยับยั้ง) ของ <i>Chlorella</i> spp. 3 สปีชีส์ สกัดด้วยเอทานอล 2 ความเข้มข้น.....	25
รูปที่ 4.3 อัตราการยับยั้ง CMA (a - ค่าการยับยั้งจากการวัดด้วย microplate reader และ b - เปอร์เซ็นการยับยั้ง) ของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> G4 ( Code: G4 ) ที่ตัวทำละลายความเข้มข้นต่างๆ.....	26
รูปที่ 4.4 อัตราการยับยั้ง CML (a - ค่าการยับยั้งจากการวัดด้วย microplate reader และ b - เปอร์เซ็นการยับยั้ง) ของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> G4 ( Code: G4 ) ที่ตัวทำละลายความเข้มข้นต่างๆ.....	27
รูปที่ ฉ-1 ตรวจสอบฤทธิ์การยับยั้ง CML โดยใช้สารสกัดจากสาหร่าย <i>Chlorella</i> spp. 3 ชนิด ด้วยเทคนิค ELISA (สีของปฏิกิริยาการตรวจจับCML).....	50
รูปที่ ฉ-2 ตรวจสอบฤทธิ์การยับยั้ง CMA โดยใช้สารสกัดจากสาหร่าย <i>Chlorella</i> G4 ด้วยเทคนิค ELISA (สีของปฏิกิริยาการตรวจจับ CMA).....	50
รูปที่ ฉ-3 ตรวจสอบฤทธิ์การยับยั้ง CML โดยใช้สารสกัดจากสาหร่าย <i>Chlorella</i> G4 ด้วยเทคนิค ELISA (สีของปฏิกิริยาการตรวจจับ CML).....	51
รูปที่ ซ-1 กราฟการเจริญเติบโตของสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. KLSc59 ( Code: KS ) ( a – จำนวนเซลล์ และ b - วัดค่าการดูดกลืนแสง ( $A_{750}$ ) ) ในช่วง 0 วัน ถึง 10 วัน....	53
รูปที่ ซ-2 กราฟการเจริญเติบโตของสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. KLSc61 ( Code: SR ) ( a – จำนวนเซลล์ และ b - วัดค่าการดูดกลืนแสง ( $A_{750}$ ) ) ในช่วง 0 วัน ถึง 10 วัน....	54
รูปที่ ซ-3 กราฟการเจริญเติบโตของสาหร่าย <i>Chlorella</i> G4 ( Code: G4 ) ( a – จำนวนเซลล์ และ b - วัดค่าการดูดกลืนแสง ( $A_{750}$ ) ) ในช่วง 0 วัน ถึง 10 วัน.....	55

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้ ห้ามเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาตจากเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## คำย่อ/สัญลักษณ์

คำย่อ/สัญลักษณ์	คำอธิบาย
AG	Aminoguanidine
AGEs	Advanced Glycation End Products
AVG	Average
CMA	N $\omega$ - (carboxymethyl) arginin
CML	NE - (carboxymethyl) lysine
Dw0	บ่มที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน
Dw7	บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
HRP	Horseradish peroxidase
IgG	Immunoglobulin G
Sol.A	Solution A
TAP	Tris-Acetate-Phosphate medium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันการดูแลสุขภาพเพื่อให้ร่างกายแข็งแรงและห่างไกลจากโรคที่อาจเกิดขึ้นเมื่อมีอายุมากขึ้น ไม่ว่าจะเป็น โรคเบาหวาน โรคไต ความจำเสื่อม สุขภาพกระดูก ฯลฯ ทำให้มีการศึกษาและพบข้อมูลที่ตีพิมพ์จำนวนมากเกี่ยวข้องกับบทบาทของ Advanced glycation end products (AGEs) หรือที่เรียกว่า glycotoxins ซึ่งเป็นกลุ่มของสารประกอบออกซิไดซ์สูงที่มีนัยสำคัญต่อการเกิดภาวะแทรกซ้อนในโรคเบาหวานและในโรคเรื้อรังอื่นๆ (ปรีญรัชต์, 2559 และ Uribarri et al., 2010) อีกทั้งยังส่งผลต่อความสมดุลของผิวหนังและเป็นปัจจัยที่ทำให้เกิดโรคภาวะแทรกซ้อนทางผิวหนังอีกด้วย (Chen et al., 2022) เมื่อมีการผลิต AGEs มากเกินไป ความไม่สมดุลระหว่าง AGEs (การผลิตภายในร่างกายและการบริโภคจากภายนอก) ทำให้เกิดภาวะเมตาบอลิซึมสะสม ทั้งภาวะน้ำตาลในเลือดสูงและไขมันในเลือดสูง (Perrone et al., 2020) ซึ่ง AGEs เป็นผลผลิตสุดท้ายที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาของสารตั้งต้น 2 ชนิด คือ amino group ของโปรตีน กับ carbonyl group ของน้ำตาลรีดิวซิง (reducing sugar) หรือสารประกอบคาบอนิล (carbonyl compounds) อื่นๆ เรียกปฏิกิริยานี้ว่า Glycation หรือปฏิกิริยา Maillard เป็นกระบวนการเกิดสารสีน้ำตาลที่ไม่ใช่เอนไซม์ (non-enzymatic browning reaction) (ปรีญรัชต์, 2559 และ Uribarri et al., 2010) โดยกลุ่มของ AGEs ที่พบมากและมีการศึกษาอย่างกว้างขวางคือ NE - (carboxymethyl) lysine (CML), NE - (carboxyethyl) lysine (CEL), pentosidine and pyrrole เนื่องจาก CML พบได้มากที่สุดจึงเป็นตัวเลือกหลักที่ใช้ในการศึกษา (Contreras and Novakofski, 2010 และ Li et al., 2012)

การศึกษาที่ผ่านมาได้มีการนำสารสกัดสมุนไพรมาใช้ทดสอบเพื่อยับยั้งการก่อตัวของไกลเคชัน จากผลการทดสอบพบว่า *Helichrysum melaleucum*, *Argyranthemum pinnatifidum* และ *Phagnalon lowei* เป็นตัวเลือกที่ดีสำหรับการพัฒนาเพื่อเป็นทางเลือกในการควบคุมโรคเบาหวาน (Spínola et al. 2017) งานวิจัยของ Manabe et al. (2020) กล่าวถึงการยับยั้งการอักเสบที่เกิดจาก AGEs ด้วย Siphonaxanthin ซึ่งเป็นคีโตแคโรทีนอยด์ที่มักพบในสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กบางชนิด (ปีลด้า, 2558) จากการทดสอบ 17 แคโรทีนอยด์ และ Li et al., (2012) ทำการศึกษาผลการยับยั้งของสารยับยั้ง 5 ชนิดต่อการสร้าง CML พบว่า Thiamine Rutin และ Quercetin ให้ผลการยับยั้งต่อการเกิด CML ที่ดี ซึ่งโทอามีนนั้นสามารถพบได้ในสาหร่ายสีเขียว ไม่นานมานี้มีการศึกษาเพิ่มมากขึ้นเกี่ยวกับการยับยั้ง AGEs งานวิจัยที่หยิบ *Parachlorella beijerinckii* มาใช้ในการทดสอบ AGEs ซึ่งให้ผลการยับยั้งที่ดีและกล่าวถึงแนวโน้มที่สามารถใช้สาหร่าย *Chlorella* เป็นสารต้านไกลเคชันได้ในอนาคต (Imai et al., 2022) หลายบทความกล่าวถึงการยับยั้ง AGEs เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยใช้สารสกัดจากสาหร่าย งานวิจัยนี้จึงเลือกศึกษาฤทธิ์ยับยั้ง CML และ CMA โดยใช้สารสกัดจาก *Chlorella* spp. 3 สปีชีส์ คือ *Chlorella* G4, *Chlorella* sp. KLSc59 และ *Chlorella* sp. KLSc61 โดยใช้การทดสอบ ELISA ทดสอบ 2 ความเข้มข้น ซึ่งผลที่ได้นำไปวิเคราะห์หาค่าด้วยการแยกคอลัมน์ด้วยตัวทำละลาย น้ำกลั่น, เอทานอล 25%, 50%, 75%, 100% และ อะซิโตน เพื่อศึกษาฤทธิ์การยับยั้ง CMA และ CML ของสารประกอบภายในสารสกัดที่ได้จากตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้นต่างๆ

## 1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ

1. เพื่อศึกษาฤทธิ์การยับยั้ง CML และ CMA โดยใช้สารสกัดจาก *Chlorella* spp. 3 สปีชีส์ โดยใช้ เอทานอล 30% และ 60% ในการสกัด

2. เพื่อศึกษาฤทธิ์การยับยั้ง CMA และ CML ของสารประกอบภายในสารสกัดที่ได้จากตัวทำละลาย น้ำกลั่น, เอทานอล 25, 50%, 75%, 100 และ อะซิโตน ด้วยการแยกคอลัมน์

## 1.3 ขอบเขตของโครงการพิเศษ

ศึกษาความสามารถในการยับยั้งการสร้าง CMA และ CML ของสาหร่าย *Chlorella* spp. ทำการศึกษา โดย เปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งการสร้าง CMA และ CML ของ *Chlorella* spp. ทั้ง 3 สปีชีส์ ได้แก่ *Chlorella* sp. KLSc61 , *Chlorella* sp. KLSc59 และ *Chlorella* G4 โดยใช้ Ethanol ที่มีความเข้มข้น 30 และ 60 เปอร์เซ็นต์ เพื่อศึกษาพารามิเตอร์ที่คาดว่าจะมีผลต่อความสามารถในการสกัดสารสกัดที่สามารถยับยั้ง CMA และ CML สารสกัดที่ให้ผลดีที่สุด โดยนำไปประเหยแห้งและแยกสารสกัดในคอลัมน์ด้วยตัวทำละลาย น้ำกลั่น, เอทานอล ที่ 25%, 50%, 75%, 100% และ อะซิโตน เพื่อศึกษาฤทธิ์การยับยั้งของสารประกอบภายในสารสกัดที่ได้จากตัวทำละลาย Ethanol ความเข้มข้นต่างๆ

## 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบวิธีการทดสอบฤทธิ์การยับยั้ง CML และ CMA โดยใช้สารสกัดจาก *Chlorella* sp. 3 สปีชีส์
2. ทราบความเข้มข้นที่ให้ผลดีระหว่างตัวทำละลายเอทานอล 30% และ 60% ที่ใช้ในการสกัด *Chlorella* spp. 3 สปีชีส์
3. ทราบความเข้มข้นของตัวทำละลายเอทานอล ที่ใช้ในการแยกคอลัมน์เพื่อศึกษาฤทธิ์การยับยั้ง CMA และ CML จากสารประกอบภายในสารสกัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 2

# ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### 2.1 สาหร่าย *Chlorella* spp.

#### 2.1.1 การจัดจำแนก

อนุกรมวิธานของสาหร่ายคลอเรลลา

Kingdom Plantae

Division Chlorophyta

Class Trebouxiophyceae

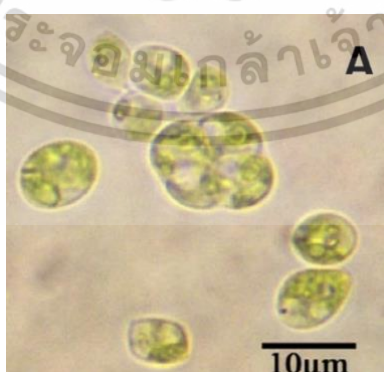
Order Chlorellales

Family Chlorellaceae

Genus *Chlorella*

#### 2.1.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เป็นสาหร่ายเซลล์เดี่ยว มีขนาดประมาณ 1-10 ไมโครเมตร อาจอยู่เป็นเซลล์เดี่ยวหรือเป็น กลุ่มก้อน ลักษณะเซลล์มีรูปร่างหลายแบบ เช่น ทรงกลม รูปรี หรือรูปไข่ ไม่มีแฟลกเจลลา มีคลอโรพลาสต์เป็นรูปถ้วยหรือเป็นแถบข้าง ภายในมีริบควัตถุที่เป็นคลอโรฟิลล์เอและคลอโรฟิลล์บี ที่ใช้ในการสังเคราะห์แสง พบไพรีนอยด์อยู่ในเมมตลอร์พลาสต์ ไม่มีรยางค์และคอนแทคไทล์ แวกิวโอล ผนังเซลล์หนาและแข็ง มี 3 ชั้น ชั้นในสุดเป็นชั้นของเยื่อหุ้มเซลล์ ชั้นกลางเป็นชั้นที่หนา ที่สุดประกอบด้วยเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส ผนังเซลล์ชั้นนอกเป็นสารประกอบโพลีเมอร์ทำหน้าที่ ดักจับโลหะหรือสารพิษต่างๆ (พงษ์ไพฑ, 2560 )



รูปที่ 2.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสาหร่าย *Chlorella* spp.

ที่มา : สามารถ , (2563)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.1.3 สรีรวิทยาของสาหร่ายสกุล *Chlorella* spp.

เป็นสาหร่ายที่มีระบบกระบวนการสังเคราะห์แสงคล้ายคลึงกับกลุ่มพวกพืชดอก ด้วยเหตุผลนี้ทำให้สาหร่าย *Chlorella* spp. กลายเป็นสิ่งสำคัญในการศึกษาวิจัยทางสรีรวิทยาในเรื่องของคลอโรฟิลล์ กระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง และการหายใจ เพราะสามารถเจริญเติบโตได้ง่ายและรวดเร็ว

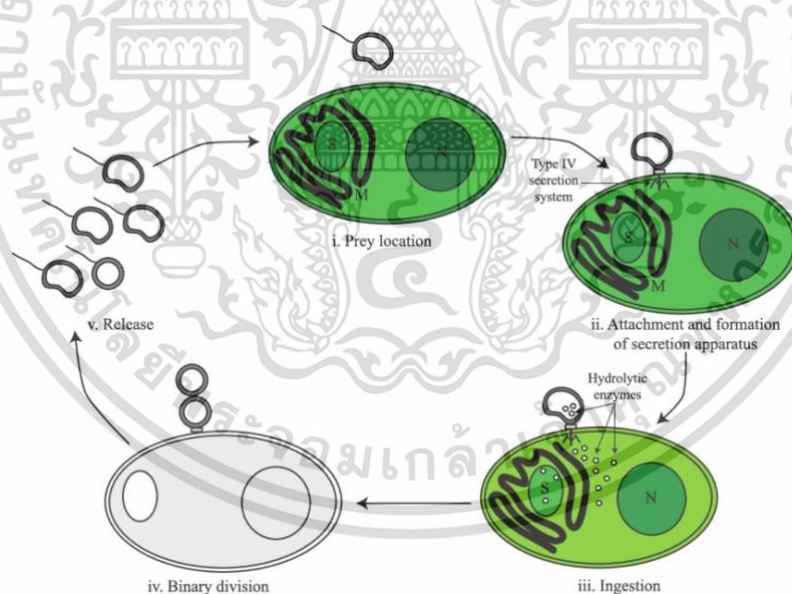
สารอาหารหลักที่มีบทบาทสำคัญในสาหร่าย *Chlorella* spp. ขึ้นกับปัจจัยคือ มีโปรตีนที่สูงมากและประกอบด้วยกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกายให้สัดส่วนเท่ากับพืชสีเขียวด้วยเหตุผลนี้เองทำให้สาหร่าย *Chlorella* sp. จึงเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญของมนุษย์ (ศิริภรณ์, 2553)

### 2.1.4 แหล่งที่พบ

สาหร่ายชนิดนี้พบได้ทั้งในน้ำจืด น้ำเค็มและน้ำเสีย เนื่องจากสามารถเจริญเติบโตได้ในแหล่งที่มีความเข้มข้นของสารอาหารในช่วงกว้าง (กานต์ธิดา, 2560)

### 2.1.5 วงจรชีวิตของ *Chlorella* spp.

วงจรชีวิตหรือการสืบพันธุ์ของ *Chlorella* spp. เป็นแบบไม่อาศัยเพศโดยการสร้างออสปอร์ (Autospore) มีจำนวน 4 8 หรือ 16 ภายในเซลล์ที่เจริญเต็มวัย



รูปที่ 2.2 แสดงวงจรชีวิตของ *Chlorella* spp.

ที่มา : <https://pt.slideshare.net/PonSutha1/chlorellapptx>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.1.6 การเจริญเติบโตของสาหร่าย

การเจริญเติบโตของสาหร่าย แบ่งได้ 5 ระยะ(พงษ์ผิว, 2560) ดังนี้

#### 2.1.6.1 ระยะปรับตัว (Lag Phase)

ระยะปรับตัวเป็นระยะที่เซลล์สาหร่ายปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อม เช่น แสง อุณหภูมิ ธาตุอาหาร ระยะนี้จะไม่เกิดการแบ่งเซลล์ของสาหร่าย ถ้าเซลล์สาหร่ายไม่สามารถปรับตัวได้เซลล์จะตาย สาหร่ายจะผ่านระยะนี้ไปได้เร็วหรือช้าขึ้นอยู่กับความแข็งแรงของเซลล์สาหร่าย และความอุดมสมบูรณ์ของอาหารที่ใช้เลี้ยง ถ้าสภาพทั้ง 2 อย่างนี้มีความเหมาะสมก็จะเข้าสู่ระยะ exponential phase ได้เร็วยิ่งขึ้น

#### 2.1.6.2 ระยะเอกซ์โพเนนเชียล (Exponential Phase)

ระยะเอกซ์โพเนนเชียลเป็นระยะที่สาหร่ายเจริญเติบโต และขยายพันธุ์อย่างรวดเร็ว ซึ่งขึ้นอยู่กับปริมาณสารอาหาร และ สมบัติทางฟิสิกส์ เคมี ของสิ่งแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ ความเข้มแสง ช่วงแสง การเจริญเติบโตของระยะนี้จะรวดเร็วในระยะแรก และจะค่อย ๆ ช้าลงตามลำดับ

#### 2.1.6.3 ระยะเฉื่อย (Phase of Declining Relative Growth)

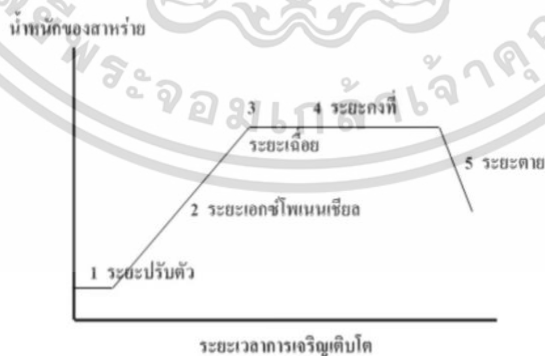
ระยะเฉื่อยเป็นช่วงที่สาหร่ายเจริญเติบโตช้าลงเนื่องจากขาดแคลนอาหาร เช่น ไนโตรเจน คาร์บอน หรือออกซิเจน เพราะมีปริมาณของสาหร่ายหนาแน่นเกินไป pH จะเสียสมดุล เนื่องจากเกิดแอมโมเนียเพิ่มขึ้นอย่างมาก หรือแสงสว่างลดลง เนื่องจากการบังกันเองของสาหร่าย (autoshading)

#### 2.1.6.4 ระยะคงที่ (Stationary Phase)

ระยะคงที่เป็นระยะที่สารอาหารลดลง และเกิดสารพิษจากกระบวนการเมแทบอลิซึม หรือการสลายตัวของสาหร่ายเพิ่มขึ้น ทำให้การเจริญเติบโตของสาหร่ายหยุดนิ่ง

#### 2.1.6.5 ระยะตาย (Death Phase)

ระยะตายเป็นระยะที่สาหร่ายหยุดการเจริญเติบโต เนื่องจากสารอาหารหมดลง สภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต และเกิดของเสียจำนวนมาก สาหร่ายจะตายเพิ่มขึ้น



### รูปที่ 2.3 ระยะการเจริญเติบโตของสาหร่าย

ที่มา : <https://doi.nrct.go>

และในการทดลองของโครงการพิเศษนี้ได้มีการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella* ssp. 5 วัน และทำการเก็บเกี่ยว เพราะว่าเป็นช่วงเวลา 0-1 เป็นช่วง Lag phase และวันที่ 1-4 เป็นช่วง Log phase เป็นช่วงที่เซลล์

สาหร่ายมีการเพิ่มจำนวนมากที่สุด และเมื่อเข้าสู่วันที่ 5 จะเป็นช่วง Stationary phase ซึ่งเป็นระยะคงที่ สารอาหารเริ่มลดลง ทำให้การโตของสาหร่ายหยุดนิ่ง เป็นเหตุให้ต้องทำการเก็บเกี่ยว ณ ช่วงเวลานี้ เพื่อให้ได้ เซลล์สาหร่ายที่มีสภาพที่สมบูรณ์ เพื่อนำไปทดสอบต่อไป (พงษ์ผไท, 2560)

### 2.1.7 ประโยชน์จากสาหร่าย *Chlorella* spp.

*Chlorella* เป็นพืชน้ำจืดเซลล์เดียวสีเขียวที่ประกอบด้วยสารคลอโรฟิลล์ในปริมาณที่สูงกว่าพืชชนิดอื่น ซึ่งมีส่วนประกอบอันทรงคุณค่าอาหารและมีประโยชน์ต่อสุขภาพ *Chlorella* มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 6 ใน 1,000 มิลลิเมตรหรือเท่ากับเม็ดโลหิตแดงของมนุษย์ จากการวิจัยขององค์การอวกาศรัสเซีย พบว่า *Chlorella* สามารถเปลี่ยนแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ให้กลายเป็นแก๊สออกซิเจนได้ในทันที *Chlorella* สามารถพบได้ตามแหล่งน้ำจืดสะอาดทั่วโลก และมีชีวิตนานกว่า 2,500 ล้านปีแล้ว แต่เพิ่งเริ่มมีการศึกษาและวิจัยอย่างกว้างขวางเพื่อนำมาผลิตในการบริโภคประมาณ 30 กว่าปีมานี้เอง สารอาหารที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกายที่พบใน *Chlorella* มีดังนี้ โปรตีน มีสูงถึง 60 เปอร์เซ็นต์ หรือ 3 เท่าของโปรตีนจากเนื้อสัตว์ ซึ่งช่วยเสริมสร้างและซ่อมแซมเนื้อเยื่อ คลอโรฟิลล์ มีปริมาณสูงกว่าพืชชนิดอื่นๆ ให้ธาตุเหล็ก เสริมสร้างเม็ดโลหิตแดง และขจัดสิ่งมีพิษออกจากร่างกาย สารซี.จี.เอฟ. (*Chlorella Growth Factor*) พบเฉพาะใน *Chlorella* เท่านั้น ให้พลังมหาศาลแก่มนุษย์ ช่วยสร้างความแข็งแกร่งให้กับเซลล์ เสริมสร้างระบบต่อต้านโรคและกระตุ้นร่างกายให้มีชีวิตชีวา

ผนังเซลล์ *Chlorella* มีผลช่วยในการต่อต้านมะเร็งและกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน มีคุณลักษณะพิเศษในการกำจัดสารไฮโดรคาร์บอนและสารโลหะที่เป็นพิษออกจากร่างกายมนุษย์ได้ แต่ผนังเซลล์ของ *Chlorella* มีความแข็งแกร่งมากจึงทำให้ร่างกายย่อยสลาย *Chlorella* ได้ในปริมาณน้อย จากการวิจัยพบว่า การใช้วิธี Dyno Mill สามารถแตกผนังเซลล์ได้มากถึง 95 เปอร์เซ็นต์ โดยที่ไม่สูญเสียคุณค่าทางโภชนาการเลยทำให้ร่างกายสามารถดูดซึมอาหารได้มากกว่าเดิมถึงสองเท่า กรดโฟลิกช่วยป้องกันมิให้สตรีแท้งบุตร วิตามินเอและสารเบต้าแคโรทีน เป็นโปรวิตามินเอ ย่อยง่าย ไม่สะสมจนเกิดพิษในร่างกาย บำรุงสายตา ช่วยให้ปอดแข็งแรง และสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ ไนอาซิน ช่วยบำบัดโรคจิตประสาทคิทโซเพรเนีย ทำให้ร่างกายกระชุ่มกระชวยและยังช่วยเสริมการบำบัดโรคหัวใจ แคลเซียม เสริมสร้างกระดูกและฟัน ทั้งช่วยให้ระบบประสาททำงานได้เต็มที่ เหล็ก ช่วยสร้างเม็ดโลหิตแดงและเป็นตัวนำออกซิเจนไปเลี้ยงร่างกาย นอกจากนี้ก็มีสังกะสี ที่ช่วยสร้างสมรรถภาพของสมองและช่วยให้ร่างกายฟื้นไข้เร็ว *Chlorella* กำลังได้รับความนิยมอย่างกว้างขวาง ปัจจุบันมีผู้บริโภคถึงวันละ 4 ล้านคนทั่วโลก โดยทำออกมาในรูปแบบเม็ด ผงและน้ำ จำนวนที่รับประทานตั้งแต่ 1- 30 เม็ดต่อครั้ง โดยจะเริ่มเห็นผลหลังจากบริโภคต่อกันนาน 3 เดือน

จากการศึกษาวิจัยอย่างกว้างขวางในประเทศต่างๆ โดยเฉพาะสหรัฐอเมริกาและญี่ปุ่นพบว่า คลอเรลล่าเป็นแหล่งอาหารเสริมจากธรรมชาติที่ทรงคุณค่าครบถ้วน ช่วยเสริมสร้างสุขภาพ ป้องกันและขับถ่ายสารพิษออกจากร่างกายมนุษย์ เหมาะสำหรับการดำรงชีวิตที่ต้องอยู่ท่ามกลางสิ่งแวดล้อมเป็นพิษในปัจจุบัน เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.1.8 การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella* spp.

สาหร่าย *Chlorella* เป็นแพลงตอนพืชขนาดเล็ก ที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า แต่ถ้ามีเป็นจำนวนมากจะสามารถมองเห็นได้ มีผนังหนา สัตว์น้ำวัยอ่อนเมื่อกินเข้าไปจะไม่สามารถย่อยได้ แต่เป็นอาหารที่ดีของโรติเฟอร์ และสัตว์น้ำที่พ้นวัยอ่อนมาแล้วมีทั้งในน้ำเค็มและน้ำจืด เป็นพืชที่ชอบแสงแดดเพื่อสังเคราะห์อาหาร แต่ไม่ชอบอุณหภูมิที่สูงเกิน 30 องศาเซลเซียส เหตุที่ไม่ชอบอุณหภูมิสูงเพราะยิ่งอุณหภูมิสูงเท่าไรจะยิ่งทำให้โปรโตซัวเพิ่มจำนวนเร็วเท่านั้น ซึ่งเป็นอุปสรรคต่อการเพิ่มจำนวนของ *Chlorella* ทำให้ปริมาณของ *Chlorella* ลดลง ซึ่งสามารถแก้ปัญหาได้ด้วยการใช้คลอรีน เพื่อกำจัดสิ่งปนเปื้อนแต่ต้องอยู่ในปริมาณที่เหมาะสม (ศิริภรณ์, 2553)

### 2.1.9 การเก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่าย

กระบวนการเก็บเกี่ยวเซลล์จุลสาหร่ายโดยการหมุนเหวี่ยง (centrifugation) เป็นกระบวนการที่ใช้แรงหนีศูนย์กลาง โดยกระบวนการแยกจะขึ้นอยู่กับขนาดของเซลล์และความแตกต่างของความหนาแน่นระหว่างชีวมวลกับอาหารเพาะเลี้ยง โดยเครื่องหมุนเหวี่ยงสร้างแรงหนีศูนย์กลางขึ้นเพื่อเร่งให้อนุภาคตกตะกอนได้เร็วขึ้น ดังนั้นภายใต้สนามแรงเหวี่ยงหนีศูนย์กลาง แรงนอนกันของอนุภาคจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับแรงหนีศูนย์กลาง ทำให้อนุภาคนอนกันเคลื่อนที่ด้วยอัตราเร็วที่แตกต่างกัน ซึ่งสามารถคำนวณหาอัตราเร็วในการนอนกันได้จาก

$$\text{อัตราเร็วในการนอนกัน (v)} = \frac{mw^2 r (1 - v_p)}{f}$$

กระบวนการนี้เป็นกระบวนการที่ใช้พลังงานสูง มักใช้เก็บเกี่ยวเซลล์ที่มีมูลค่า วิธีนี้เป็นวิธีที่รวดเร็วและมีประสิทธิภาพในการแยกสูง สามารถใช้ได้กับสาหร่ายหลายสายพันธุ์ แต่ก็มีราคาสูง และในการเก็บเกี่ยวอาจเกิดการแตกหักหรือมีความเสียหายของเซลล์สาหร่ายเนื่องมาจากแรงเหวี่ยง (กานต์ธิดา, 2560)

### 2.1.10 การวัดการเจริญเติบโตของสาหร่าย

การวิเคราะห์การเจริญเติบโตของสาหร่ายสามารถทำได้หลายวิธี ดังนี้ (พงษ์ไพบ, 2560)

#### 2.1.10.1 การนับเซลล์ (Cell Counting)

เป็นการวิเคราะห์โดยตรง โดยการนับเซลล์สาหร่ายผ่านกล้องจุลทรรศน์โดยใช้ haemocytometer ซึ่งสามารถนับได้ทั้งเซลล์สาหร่ายที่มีชีวิตและไม่มีชีวิต และสามารถศึกษารูปร่าง ของเซลล์สาหร่าย แต่ต้องเสียเวลาในการทำการเจือจางก่อนหากเซลล์สาหร่ายมีปริมาณมากเกินไป

#### 2.1.10.2 การวิเคราะห์การกระจายของแสงหรือความขุ่น (Optical Density Measurement)

เป็นการวิเคราะห์ความหนาแน่นของเซลล์สาหร่ายด้วยค่าการดูดกลืนแสงจากเครื่อง

spectrophotometer พบว่า สาหร่ายสีเขียวมีความยาวคลื่นในช่วง 500-600 nm เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ซึ่งเป็นวิธีวิเคราะห์ที่สะดวกรวดเร็ว แต่ไม่สามารถบอกถึงการมีชีวิตหรือการไม่มีชีวิตของเซลล์ได้  
ไม่รวมกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.1.10.3 การวิเคราะห์น้ำหนักแห้ง (Dry Weight Measurement)

เป็นการวิเคราะห์การเจริญเติบโตของสาหร่ายจากน้ำหนักแห้งของเซลล์ที่เพิ่มขึ้น โดยการนำสาหร่ายไปอบแห้งจนน้ำหนักคงที่ และนำมาวิเคราะห์น้ำหนักของเซลล์สาหร่ายที่เพิ่มขึ้น นำผลที่ได้มา plot กราฟ รายงานผลเป็นน้ำหนักแห้งต่อปริมาตรของอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง

### 2.1.10.4 การวิเคราะห์คลอโรฟิลล์ (Chlorophyll Determination)

สาหร่ายประกอบไปด้วยคลอโรฟิลล์เอและบี การวิเคราะห์คลอโรฟิลล์ทำได้โดยการสกัด คลอโรฟิลล์จากสาหร่าย โดยการใช้ acetone, ethanol หรือ diethyl ether เป็นตัวสกัด บางครั้ง อาจมีการใช้ความร้อนมาช่วยในการสกัดให้ได้ผลดีขึ้น และวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ด้วยเครื่อง spectrophotometer สารที่ใช้ในการสกัดคลอโรฟิลล์จะมีค่าการดูดกลืนแสงที่แตกต่างกัน สูตรที่ใช้ ในการคำนวณคลอโรฟิลล์ และค่าการดูดกลืนแสงของ acetone, ethanol และ diethyl ether มีงานวิจัยรายงานว่า การวิเคราะห์คลอโรฟิลล์เป็นวิธีที่ดีกว่าการ วิเคราะห์การเจริญเติบโตของสาหร่ายด้วยน้ำหนักแห้ง เนื่องจากการวิเคราะห์การเจริญเติบโตของ สาหร่ายด้วยน้ำหนักแห้งอาจจะมีน้ำหนักแห้งของ bacteria และ zooplankton รวมอยู่ด้วย

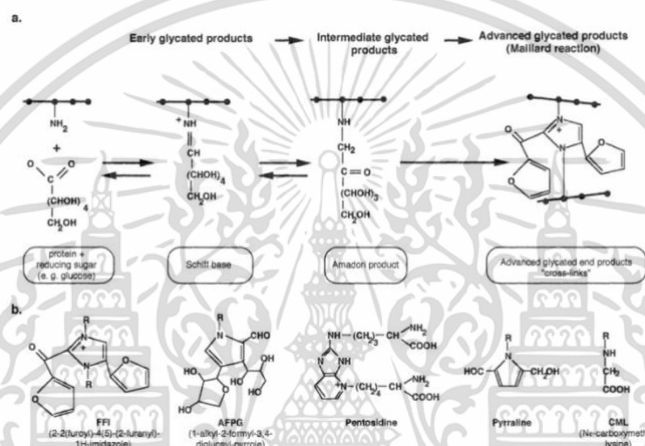
## 2.2 ไกลเคชั่น

ไกลเคชั่น (Glycation) เป็นปฏิกิริยา เมลลาร์ด ซึ่งเป็นขบวนการเกิดสารสีน้ำตาลที่ไม่ต้องเอนไซม์ (non-enzymatic browning reaction) เกิดจากการทำปฏิกิริยาของสารตั้งต้น 2 ชนิด คือ amino group ของโปรตีน (ที่สำคัญคือ  $\epsilon$ - amino group ของ lysine และ guanidine group ของ arginine) กับ carbonyl group ของน้ำตาลรีดิวซิ่ง (reducing sugar) หรือสารประกอบคาบอนิล (carbonyl compounds) อื่นๆ 1-2 สารสีน้ำตาลที่เกิดขึ้นในระยะสุดท้ายของปฏิกิริยาจะเรียกว่า Advanced glycation end products (AGEs) Advanced glycation end products (AGEs) เป็นสารประกอบที่เป็นพิษต่อเซลล์ที่เรียกว่า ไกลโคท็อกซิน (glycotoxins) สามารถเข้าทำปฏิกิริยากับเนื้อเยื่อต่างๆ เกิดเป็นสารประกอบตัวใหม่ที่แข็งแรงและแตกเปราะง่าย ส่งผลให้ผิวหนังมีความยืดหยุ่นลดลง โครงสร้างคอลลาเจนถูกทำลายจนเกิดเป็นริ้วรอยเหี่ยวย่นและยังส่งผลต่อประสิทธิภาพการทำงานของอวัยวะนั้นให้ทำงานน้อยลง จนเกิดโรคแทรกซ้อนในผู้ป่วยเบาหวานและนำไปสู่การเสียชีวิตได้ และไกลเคชั่นเป็นปฏิกิริยาที่อยู่ทั้งภายในและภายนอกร่างกาย นอกจากนี้ยังสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ซึ่งเมื่อเกิดขึ้นแล้วจะสะสมอยู่ และร่างกายไม่สามารถกำจัดออกไปได้ แต่ในวัยที่ไม่มากอาจยังเห็นผลน้อยเพราะมีปัจจัยเสี่ยงไม่มาก แต่เมื่ออายุเพิ่มขึ้นไกลเคชั่นยิ่งแสดงออกชัดเจนขึ้น เกิดความเสียหายของเซลล์และการตายของเซลล์มากขึ้น จึงเป็นสาเหตุที่บางคนอายุน้อยแต่กลับดูแก่กว่าคนวัยเดียวกัน ดังนั้นการบริโภคน้ำตาลหรือแป้งในปริมาณมากเกินไปจะส่งผลให้เราดูแก่กว่าวัย เพราะโครงสร้างคอลลาเจนถูกทำลาย

กระบวนการไกลเคชั่น มีความสัมพันธ์กับความเสื่อมของเซลล์ รวมไปถึงการเกิดโรคแทรกซ้อนในผู้ป่วยเบาหวาน สารดังกล่าวจะเข้าไปจับกับ receptors for advanced glycation end products (RAGES) บริเวณเซลล์หรือเนื้อเยื่อโปรตีนในร่างกายทำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชั่นและกระบวนการอักเสบเกิดขึ้นใช้

โดยจับกับตัวรับบริเวณเซลล์หรือเชื่อมข้ามสายโมเลกุลกับโปรตีนในร่างกายทำให้โครงสร้างและหน้าที่ของอวัยวะนั้นเปลี่ยนไป (ขนาด และ ไมตรี, 2559)

การเกิดไกลเคชันในผู้ป่วยเบาหวานขึ้นอยู่กับระดับน้ำตาลในเลือด ระยะเวลาของภาวะน้ำตาลในเลือดสูง และเกิดอนุมูลอิสระในระหว่างการดำเนินกลไกของปฏิกิริยาไกลเคชันในขั้นตอนการเกิดสารประกอบแอมาดอริ (Amadori product) อนุมูลอิสระดังกล่าวทำให้เกิดภาวะเครียดของเซลล์ (Glycoxidation) ที่ทำลายเนื้อเยื่อโปรตีน ไขมัน กรดนิวคลีอิก นำไปสู่ความเสียหายที่เกิดกับเนื้อเยื่อและพยาธิสภาพในผู้ป่วยโรคเบาหวาน เช่น โรคหลอดเลือดแข็งตัว โรคไต โรคต่อกระจก เป็นต้น ดังนั้นผู้ป่วยเบาหวานที่ไม่สามารถควบคุมระดับน้ำตาลให้อยู่ในระดับปกติ หรือมีภาวะน้ำตาลในเลือดสูงเรื้อรัง จะเกิดปฏิกิริยาไกลเคชันได้มาก ทำให้อนุมูลอิสระและสาร AGEs สูงขึ้นตามไปด้วย



รูปที่ 2.4 แผนผังของผลิตภัณฑ์ขั้นสุดท้ายของไกลเคชัน

ที่มา : A. Bierhaus et al., 1998

### 2.2.1 ปัจจัยที่ส่งผลต่อการสะสมของความเสียหายของโปรตีนที่เกิดจากไกลเคชัน

ปัจจัยที่ส่งผลต่อการสะสมของความเสียหายของโปรตีนที่เกิดจากไกลเคชันในร่างกาย

มีหลายปัจจัยที่ส่งผลต่อการสะสมของผลิตภัณฑ์ไกลเคชันในร่างกาย สิ่งที่สำคัญที่สุดคือการหมุนเวียนของโปรตีนและความเข้มข้นของสารตั้งต้นจำพวกคาร์บอนิล (Carbonyl) และความพร้อมใช้งานและความว่องไวต่อปฏิกิริยาของกลุ่มอะมิโนบนโปรตีน การย่อยสลายทางเคมีหรือเอนไซม์ของผลิตภัณฑ์ไกลเคชัน แม้ว่าปัจจัยเหล่านี้จะอธิบายแยกกันในการทบทวนนี้ แต่ต้องระบุอย่างชัดเจนว่าปัจจัยเหล่านี้ส่งผลต่ออัตราการเกิดปฏิกิริยาไกลเคชันไม่ว่าจะโดยประสานกันหรือตรงกันข้าม

### 2.2.2 กระบวนการเกิดไกลเคชัน (Glycation process) ในอาหาร

งานวิจัยในปัจจุบันให้ความสนใจกับสารที่มีชื่อว่า AGEs ย่อมาจาก Advanced Glycation End Products สารนี้เกิดขึ้นได้ในร่างกายของเรา แต่ถ้าร่างกายมีระดับ AGEs สูงมากในเนื้อเยื่อและระบบไหลเวียนแล้วละก็ อาจส่งผลกระทบต่อสุขภาพได้ โดยสารนี้จะส่งเสริมให้มี Oxidative stress และการอักเสบ มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและหน้าที่ของโปรตีนในร่างกาย นอกจากสาร AGEs จะเกิดขึ้นภายในร่างกายแล้ว สาร AGEs ยังพบได้ในอาหาร โดยอาหารธรรมชาติเช่นเนื้อสัตว์ดิบมีสาร AGEs อยู่ใน ปริมาณหนึ่ง แต่กระบวนการ

ประกอบอาหารทำให้เกิดสาร AGEs ในอาหารชนิดนั้นๆมากขึ้น เพราะ AGEs หรือ glycotoxins จะเกิด ในอาหารที่ผ่านกระบวนการใช้ความร้อน (thermal processing) ส่งผลให้อาหารนั้นเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาลแบบที่ไม่ใช่เอนไซม์ (non-enzymatic browning reaction) หรือที่เราเรียกว่าปฏิกิริยาเมลลาร์ด สีของอาหารจากการผ่านการปรุงอาหารด้วยความร้อนจะได้สารในกลุ่ม 1-amino acid-2-carbonyl และที่สำคัญได้สารในกลุ่ม  $\alpha$ -carbonyl ที่จะเกิดการเปลี่ยนแปลงได้เป็นสารในกลุ่ม AGEs ซึ่งคือภาพรวมของการเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ด ในอาหาร (ปรัชรัทธ์, 2559)

### 2.2.3 ผลของปฏิกิริยาไกลเคชั่นต่อสุขภาพ

ผลของปฏิกิริยาไกลเคชั่นต่อสุขภาพการเกิดไกลเคชั่นของโปรตีนสามารถรบกวนการทำงานตามปกติของร่างกายได้ ได้แก่ การขัดขวางโครงสร้างในระดับโมเลกุล (disrupting molecular conformation) เกิดการเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์ (altering enzymatic activity) โดยการลด proteolytic activity มีผลลดประสิทธิภาพในการสลายโปรตีน (protein catabolism) และส่งผลลดประสิทธิภาพของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการกำจัดโปรตีนที่เสื่อมสภาพและที่เสียหายระหว่างขบวนการแก่ ส่งผลทำให้เกิดการสะสมของ AGEs เกิดการจับตัวกับโครงสร้างของเซลล์และเนื้อเยื่อ ทำให้เห็นเป็นรอยสีน้ำตาล เกิดการแข็งและขาดความยืดหยุ่นของเนื้อเยื่อ AGEs ที่เกิดขึ้นยังมีผลเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบและเกิด reactive oxygen species ที่มีผลต่อความเสียหายของ DNA และโปรตีน

### 2.2.4 การลดโอกาสการเกิดสาร AGEs

เพื่อลดโอกาสการเกิดสาร AGEs ได้ จากการศึกษาทดลองพบว่าปัจจัยหลักคืออุณหภูมิและปริมาณน้ำ โดยการใช้อุณหภูมิที่ต่ำลง และมีน้ำเป็นส่วนประกอบในการปรุงประกอบอาหารนั้นช่วยลดปริมาณการเกิดสาร AGEs ได้ เช่น พบว่าไก่ย่าง มีปริมาณสาร AGEs มากกว่า ไก่ต้มถึง 4 เท่า ส่วนเฟรนช์ฟรายนั้น มีสาร AGEs มากกว่ามันฝรั่งต้มถึง 90 เท่า ทั้งนี้ผู้วิจัยกล่าวว่าในอาหารทุกชนิด การใช้อุณหภูมิที่สูงกว่าและมีความชื้นที่น้อยกว่า จะมีปริมาณ AGEs ได้มากกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารที่เตรียมโดยใช้อุณหภูมิต่ำกว่าและใช้น้ำหรือความชื้นที่มากกว่า ในปริมาณน้ำหนักของเนื้อสัตว์ที่เท่าๆกัน ดังนั้น การทอด การปิ้งย่าง และการอบจะทำให้เกิดสาร AGEs มากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการต้ม การเคี้ยว การตุ๋น และการนึ่ง ส่วนการใช้ไมโครเวฟนั้นไม่ได้เพิ่มปริมาณ AGEs เมื่อใช้เวลาสั้นๆคือน้อยกว่า 6 นาที นอกจากการเลือกใช้อุณหภูมิต่ำและการใช้น้ำในการปรุงประกอบอาหารแล้วนั้น การศึกษายังพบว่าน้ำมะนาว และน้ำส้มสายชู ซึ่งมีความเป็นกรดนั้น สามารถยับยั้งการเกิดสาร AGEs ได้อีกด้วย

### 2.2.5 การยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาไกลเคชั่น

การศึกษาเกี่ยวกับการต้านปฏิกิริยาไกลเคชั่น หรือต้านการเกิด AGEs นั้นได้ทำการศึกษา ทั้ง ในสารสังเคราะห์ (synthetic compounds) และ ผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ (natural products) โดย synthetic AGEs inhibitors ที่มีการค้นพบจนถึงขณะนี้ สามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่

- 1) carbonyl trapping agents ช่วยลดการ เกิด AGEs
- 2) metal ion chelators ช่วยลดการเกิดออกซิเดชัน
- 3) cross-link breakers ช่วยสลายAGE cross-link

มีข้อมูลจากงานวิจัยแสดงถึงความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติความสามารถในการต้านไกลโคเซชัน จากสารในกลุ่มฟีนอลิก (phenolic) ในพืชผัก รวมถึงมีรายงานว่าสาร oligo , polysaccharides ,carotenoids และ unsaturated fatty acid สามารถต้านไกลโคเซชันได้เช่นกัน ดังนั้นการป้องกันการเกิด AGEs ควรเลือกบริโภคพืชอาหารที่มีแหล่งของสารประกอบกลุ่มฟีนอลิก และยังมีข้อแนะนำในการหลีกเลี่ยงการได้รับ glycotoxin จากอาหาร และลดการบริโภคน้ำตาลเพื่อลดภาวะน้ำตาลในเลือดสูง (ปรัญรัตน์, 2559)

### 2.2.6 NE - (carboxymethyl) lysine (CML)

NE – (carboxymethyl) lysine (CML) เป็นหนึ่งใน AGEs ที่มีลักษณะเฉพาะที่ดีที่สุด มีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการหลายอย่างที่นำไปสู่การพัฒนาของโรคเหล่านี้ เช่น ภาวะแทรกซ้อนจากเบาหวาน อัลไซเมอร์ และโรคที่เกี่ยวกับความเสื่อมของระบบประสาทและเป็นตัวบ่งชี้การตรวจจับที่แพร่หลายที่สุดสำหรับ AGEs ในการวิเคราะห์อาหาร การก่อตัวของ CML ขึ้นอยู่กับส่วนผสมของอาหารและสภาวะการแปรรูป เช่น อุณหภูมิ และเวลาในการให้ความร้อน แหล่งที่มาทั่วไปของอาหาร CML ได้แก่ เนื้อย่าง ซีเรียล มันฝรั่งทอด และชีสหลายชนิดที่ผ่านกรรมวิธีทางความร้อน และ CML ในอาหารอาจก่อให้เกิดความเสี่ยงต่อสุขภาพของมนุษย์ เนื่องจากมันเพิ่มความเครียดของออกซิเดชันและเริ่มการตอบสนองการอักเสบที่เกี่ยวข้องในการเกิดโรคของโรคเบาหวานและความผิดปกติของการเผาผลาญอื่น ๆ (Wu et al., 2019)

### 2.2.7 N $\omega$ – (carboxymethyl) arginine (CMA)

N $\omega$  – (carboxymethyl) arginine (CMA) เป็นโครงสร้าง AGEs ที่ไม่มีกรดซึ่งถูกค้นพบในเอนไซม์ ไฮโดรไลสของไกลโคเตตคอลลลาเจน ต่อจากนั้น ยังตรวจพบ CMA ในซีรัมของมนุษย์ด้วยเครื่อง chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) และพบว่าระดับ CMA ในผู้ป่วยเบาหวาน สูงกว่าในคนปกติ และ CMA ในเนื้อเยื่อยังไม่ชัดเจนเนื่องจากความไม่เสถียรของกรด ดังนั้นจึงไม่ค่อยมีใครรู้เกี่ยวกับระดับ CMA ในอวัยวะ คอลลลาเจนเป็นหนึ่งในโปรตีนที่สำคัญในร่างกายมนุษย์และมีบทบาทสำคัญในการทำงานทางชีววิทยาหลายอย่าง เช่น การก่อตัวของเมทริกซ์นอกเซลล์ซึ่งประกอบด้วยส่วนใหญ่ของผิวหนัง และให้ความแข็งแรงและความยืดหยุ่น และมีส่วนทำให้คุณสมบัติเชิงกลและการเผาผลาญของกระดูก ดังนั้น การวัดระดับ CMA อาจเป็นเครื่องมือที่มีประโยชน์ในการประเมินการเสื่อมของคอลลลาเจน เพื่อชี้แจงความสำคัญทางชีวภาพของ CMA เราได้ตรวจสอบทั่วโลกที่ CMA ถูกสร้างขึ้นในคอลลลาเจนไกลโคเตต นอกจากนี้ เพื่อกำหนดปริมาณ CMA ในเนื้อเยื่อ ได้มีการพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อและทำการวัดโดยใช้ LC-MS/MS พร้อมกับมาตรฐานภายใน (Bierhaus, 1997)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.3 การตรวจวัดด้วย ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)

หลายปีที่ผ่านมาได้มีการใช้ antibody ที่ติดฉลากเอนไซม์ เพื่อตรวจหา antigen ของไวรัสในส่วนเนื้อเยื่อในรูปแบบต่างๆ เป็นที่นิยมในการทดสอบโดยใช้ปริมาณตัวอย่างที่ไม่มาก และมีตัวอย่างที่ถูกล้างออกน้อยกว่าเมื่อเทียบกับวิธีทั่วไป เช่น TLC และ HPLC เอนไซม์อิมมูโนแอสเซย์ถูกนำมาใช้มากขึ้นในพยาธิวิทยาคลินิกและภูมิคุ้มกันวิทยา ซึ่งเทคนิค Elisa เป็นเทคนิคที่มีความรวดเร็ว เฉพาะเจาะจง และพกพาได้สำหรับใช้ในการตรวจหาสารพิษจากเชื้อราในอาหารและอาหารสัตว์ภาคสนาม (Zheng et al., 2006 และ Clark et al., 1977) โดยหลักการทั่วไปด้านภูมิคุ้มกันวิทยาของ ELISA คือการนำ antibody หรือ antigen ตรึงโดยใช้วัสดุประเภท solid phase (ณรงค์พัชร, 2555) ทำการตรวจการจับกันอย่างจำเพาะระหว่าง antigen และ antibody ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ เมื่อเอนไซม์ทำปฏิกิริยากับ substrate จะเกิดการเปลี่ยนสีขึ้น เทคนิคนี้เป็นการตรวจสอบปฏิกิริยา antigen และ antibody โดยใช้เอนไซม์เป็นตัวบ่งชี้แทนสารเรืองแสง (พรธมทิพา, 2551 และ ณรงค์พัชร, 2555)

### เทคนิค ELISA 4 แบบ

#### 1. Direct ELISA

antigen ถูกตรึงในหลุมของเพลต ELISA ทำการตรวจจับ antigen โดย antibody ที่ติดฉลากเอนไซม์ เช่น horseradish peroxidase (HRP) enzyme ซึ่ง Direct ELISA เร็วกว่าเทคนิค ELISA อื่นๆ มาก เนื่องจากต้องมีขั้นตอนน้อยกว่า การทดสอบยังมีแนวโน้มที่จะเกิดข้อผิดพลาดน้อยกว่า เนื่องจากต้องใช้อีเจนต์และขั้นตอนน้อยลง ไม่จำเป็นต้องใช้ antibody ทดสอบที่อาจทำปฏิกิริยาข้ามกัน แม้ว่าวิธีนี้จะมีข้อเสียอยู่บ้าง เนื่องจากการตรึงแอนติเจนไม่เฉพาะเจาะจง เปรียบเทียบกับ Indirect ELISA มีความยืดหยุ่นน้อยกว่าเนื่องจากจำเป็นต้องใช้ antibody ปฐมภูมิแบบคอนจูเกตที่จำเพาะสำหรับโปรตีนเป้าหมายแต่ละชนิด เนื่องจากไม่มีการใช้ antibody ทดสอบ เทคนิค Direct ELISA มักใช้เมื่อต้องวิเคราะห์การตอบสนองของภูมิคุ้มกันต่อแอนติเจน

#### 2. Indirect ELISA

เป็นเทคนิคที่ใช้กระบวนการสองขั้นตอนในการตรวจจับ ขั้นแรก antigen ถูกตรึงในหลุมของเพลต ELISA นำ antibody ปฐมภูมิที่ไม่มีฉลากจับกับ antigen จำเพาะและใช้ antibody ทดสอบที่ติดฉลากเอนไซม์กับสปีชีส์โฮสต์ของ antibody ปฐมภูมิทำการจับกับ antibody ปฐมภูมิ Indirect ELISA มีความไวสูงและประหยัดกว่าวิธี Direct ELISA เนื่องจากสามารถใช้ antibody ปฐมภูมิที่แตกต่างกันกับ antibody ทดสอบที่มีฉลากเอนไซม์เดียว ข้อเสียอย่างหนึ่งคือความเป็นไปได้ที่จะเกิดปฏิกิริยาข้ามระหว่าง antibody ทดสอบกับ antigen ที่ถูกดูดซับ นอกจากนี้ การตรวจด้วยวิธี Indirect ELISA ใช้เวลาในการทดสอบนานกว่า Direct ELISA เนื่องจากจำเป็นต้องมีขั้นตอนเพิ่มเติมสำหรับ antibody ทดสอบ Indirect ELISA เหมาะสมสำหรับการตรวจสอบความเข้มข้นของ antibody ทั้งหมดในตัวอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

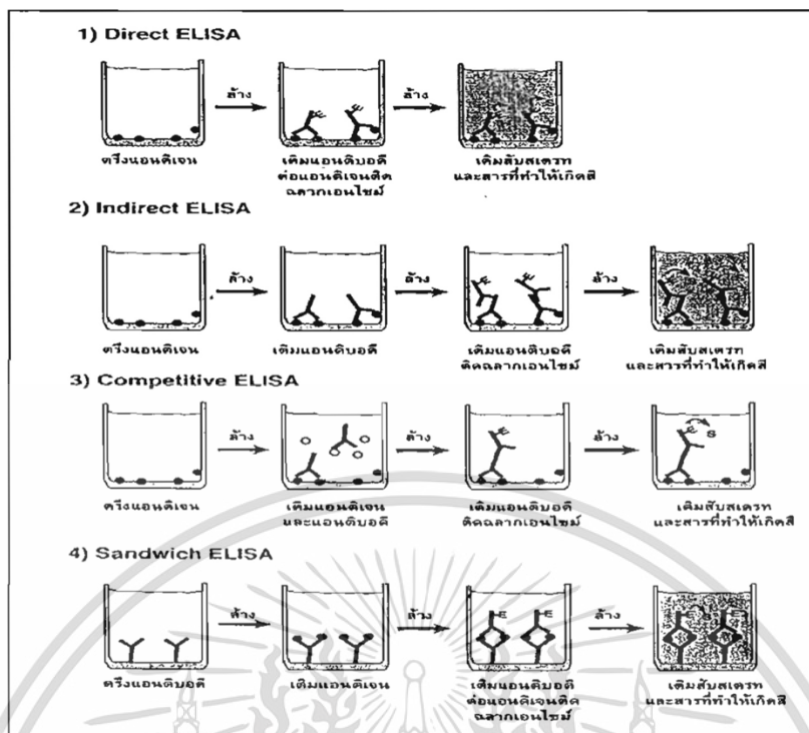
### 3. Sandwich ELISA

เป็นรูปแบบที่ใช้บ่อยที่สุด รูปแบบนี้ต้องการ antibody สองตัวที่จำเพาะสำหรับ epitope ที่แตกต่างกันของ antigen ซึ่ง antibody ทั้งสองนี้โดยปกติจะเรียกว่าคู่ antibody ที่เข้าคู่กัน antibody ตัวหนึ่งเคลือบอยู่บนพื้นผิวของหลุมเพลตและใช้ในการตรึง antigen ส่วน antibody อีกตัวหนึ่งถูกเชื่อมเข้าด้วยกันและใช้ในการตรวจหา antigen Sandwich ELISA จำเป็นต้องใช้คู่ antibody ที่เข้าคู่กัน ดังนั้น antibody แต่ละตัวจึงมีความจำเพาะสำหรับ epitope ของ antigen ที่แตกต่างกันและไม่ทับซ้อนกัน สิ่งสำคัญคือต้องมีการทดสอบคู่ antibody ที่ตรงกันโดยเฉพาะใน Sandwich ELISA เพื่อให้แน่ใจว่าพวกมันตรวจพบ epitopes ที่แตกต่างกัน เพื่อให้ได้ผลลัพธ์ที่แม่นยำ ข้อได้เปรียบของ Sandwich ELISA คือความไวสูง มีความไวมากกว่า Direct และ Indirect 2-5 เท่า Sandwich ELISA ยังให้ความจำเพาะสูงเนื่องจากการใช้ antibody สองตัวเพื่อตรวจหา antigen มีความยืดหยุ่นเนื่องจากสามารถใช้ทั้งวิธี Direct และ Indirect ได้ ซึ่งมีข้อเสียเล็กน้อย หากไม่มีชุดตรวจ ELISA ที่เป็นมาตรฐานหรือคู่ antibody ที่ทดสอบแล้ว จำเป็นต้องมีการเพิ่มประสิทธิภาพ antibody เนื่องจากเป็นสิ่งสำคัญที่จะต้องลดปฏิกิริยาข้ามระหว่าง antibody ที่จับและตรวจจับ Sandwich ELISA เหมาะอย่างยิ่งสำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่างที่ซับซ้อน เนื่องจาก antigen ไม่จำเป็นต้องถูกทำให้บริสุทธิ์ก่อนการทดสอบ แต่ยังคงให้ความไวและความจำเพาะสูง เช่น การวัดระดับไซโตไคน์ในการตอบสนองของภูมิคุ้มกัน

### 4. Competition ELISA

เป็นเทคนิคที่ซับซ้อนที่สุดในบรรดาเทคนิค ELISA ทั้งหมด ใช้สำหรับวิเคราะห์ antigen ที่ขนาดเล็ก ประเภทของการทดสอบแต่ละประเภทข้างต้นสามารถปรับให้เข้ากับรูปแบบ Competition ได้ การทดสอบ ELISA แบบแข่งขันจะวัดความเข้มข้นของ antigen โดยการตรวจจับสัญญาณรบกวนในเอาต์พุตสัญญาณที่คาดหวัง โดยทั่วไปจะใช้ antibody ในการเคลือบบนผิวเพลต เพื่อทำปฏิกิริยากับ antigen ที่ต้องการตรวจ (ไม่ติดฉลาก เอนไซม์) และ antigen อ่างอิงที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ หรืออาจใช้ antigen อ่างอิงเคลือบบนเพลตหลุม และเติม antigen อย่างตัวที่ผสมกับ antibody ลงไปและใช้ antibody ทุติยภูมิที่ติดฉลากเอนไซม์ในการตรวจจับ ยิ่งความเข้มข้นของ antigen ในตัวอย่างสูง บ่งชี้ว่าสัญญาณเอาต์พุตมีความสัมพันธ์กับปริมาณแอนติเจนในตัวอย่างแบบผกผัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.5 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) ทั้ง 4 รูปแบบ  
ที่มา : ณรงค์พีช (2555)

## 2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ศิริภรณ์ (2553) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจ เพื่อนำมาทำเป็นส่วนผสมของอาหารปลา โดยใช้น้ำทิ้งจากโรงงานผักและผลไม้กระป๋องที่ผ่านการบำบัดจากระบบบำบัดน้ำเสียแบบไร้อากาศด้วยระบบบ่อเติมอากาศ จากการศึกษาพบว่ามีสาหร่ายทั้งสิ้น 11 วงศ์ 15 สกุล และทำการคัดเลือกสาหร่าย *Chlorella vulgaris* มาใช้ในการเพาะเลี้ยง เมื่อนำสาหร่าย *Chlorella vulgaris* ที่ได้มาเป็นส่วนผสมของอาหารปลานิล โดยแบ่งการทดลองเป็น 2 ชุดการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ ชุดการทดลองที่ 1 ให้อาหารเม็ดสำเร็จรูป ในขณะที่ชุดการทดลองที่ 2 ให้อาหารเม็ดสำเร็จรูปพร้อมกับสาหร่าย ในอัตรา 0.1 % ของน้ำหนักปลา หรือประมาณ 2% ของอาหารปลา โดยทำการเลี้ยงปลานิลในกระชังในบ่อพักน้ำทิ้งของโรงงานผักและผลไม้กระป๋อง เป็นเวลา 3 เดือน พบว่าน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นเมื่อสิ้นสุดการทดลองเท่ากับ  $124.3 \pm 5.19$  กรัม และ  $150 \pm 7.58$  กรัม ตามลำดับ มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเท่ากับ 2.16%/วัน และ 2.37%/วัน ตามลำดับ มีอัตราการรอดเท่ากับ  $61.7 \pm 9.5\%$  และ  $76.3 \pm 5.5\%$  ตามลำดับ มีอัตราการแลกเนื้อ (FCR) 0.5 และ 0.44 ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ( $P < 0.05$ ) พบว่าอัตราการรอดมีความแตกต่างทางสถิติ

เอกสารนี้พึ่งชีพ (2560) วัสดุศึกษาการเจริญเติบโต การบำบัดขั้วต่ออาหาร และการผลิตไขมันของสาหร่าย *Chlorella vulgaris* TISTR 8580 ที่เลี้ยงในน้ำเสียจากโรงฆ่าสุกรของบริษัทสามพรานสอท์เทอร์แฮาส์ จำกัด

จังหวัดนครปฐม ที่เจือจาง 3 ความเข้มข้น (ร้อยละ 75, 50 และ 25) ณ วันที่ 4 ซึ่ง เป็นวันสุดท้ายของการทดลองภายใต้หลอดไฟแบบ fluorescent ที่ 3,000 ลักซ์ ช่วงสว่าง : ช่วงมืด เท่ากับ 12 ชั่วโมง : 12 ชั่วโมง ที่  $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$  พบว่าสาหร่ายที่เลี้ยงในน้ำเสียที่เจือจางที่ความเข้มข้น ร้อยละ 25 มีการเจริญเติบโตที่ดีที่สุด โดยมีความหนาแน่นเซลล์เป็น  $8.51 \pm 2.77 \times 10^6$  เซลล์/มล. ซึ่ง สามารถอธิบายได้อย่างดีด้วยแบบจำลองของ Gompertz ที่ดัดแปลงดังสมการ

$$y = 0.55 \cdot \exp \{- \exp [(0.92 \cdot e / 0.55)(1.88 - t) + 1]\}$$

อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาจากประสิทธิภาพการกำจัดธาตุอาหารและการผลิตไขมันสุทธิ พบว่าสาหร่ายที่เลี้ยงในน้ำเสียที่ความเข้มข้น ร้อยละ 50 ให้ผลการทดลองที่ดีที่สุด โดยสามารถ กำจัดไนโตรเจนได้ร้อยละ 28.69 กำจัดฟอสฟอรัสทั้งหมดได้ร้อยละ 28.75 มีการผลิตไขมันได้ 15.2 มก./ มก. น้ำหนักแห้งของสาหร่าย และมีปริมาณไขมันร้อยละ 20.9 ดังนั้นสาหร่าย *Chlorella vulgaris* เป็นทางเลือกหนึ่งที่สามารถกำจัดธาตุอาหารจากน้ำเสียของโรงฆ่าสัตว์ และนำมาผลิตเป็นเชื้อเพลิงชีวภาพ

นุชนาด (2557) ศึกษาการนำศักยภาพของสาหร่ายขนาดเล็กมาใช้ประโยชน์ในการลดปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ โดยสาหร่ายขนาดเล็ก สามารถดูดซับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เพื่อใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสง ซึ่งในการใช้ประโยชน์จาก สาหร่ายขนาดเล็ก มี 2 รูปแบบ คือ ใช้ผลิตเป็นอาหาร และใช้ในเชิงพาณิชย์ โดยในการเพาะเลี้ยง สาหร่ายขนาดเล็กให้ได้ปริมาณผลผลิตชีวมวลสูง ขึ้นอยู่กับปัจจัย ดังนี้ 1) รูปแบบของการเพาะเลี้ยง ได้แก่ การเพาะเลี้ยงในบ่อเปิด และการเพาะเลี้ยงโดยใช้ถังปฏิกรณ์แบบต่างๆ 2) อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงประกอบด้วย ธาตุอาหารหลักได้แก่ คาร์บอน ไนโตรเจนและฟอสฟอรัส ซัลเฟอร์ โปตัสเซียม และธาตุอาหารอื่นๆ ได้แก่ เกลือแร่ต่างๆ และ 3) แหล่งของคาร์บอน (คาร์บอนไดออกไซด์) มาจาก ระบบการย่อยสลายแบบไร้อากาศ ก๊าซสังเคราะห์ที่มีขายในเชิงพาณิชย์ หรือก๊าซร้อนจากกระบวนการเผาไหม้เชื้อเพลิง นอกจากนี้ ยังมีปัจจัยอื่นอีก ได้แก่ แสง ค่าความเป็นกรดต่าง อุณหภูมิ ออกซิเจน ค่าสัดส่วนระหว่างไนโตรเจนและฟอสฟอรัส ทั้งนี้ กระบวนการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายขนาดเล็ก จะเกิดขึ้นอย่างมีประสิทธิภาพสูงสุดในช่วงความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ระหว่าง 1-5% (โดย ปริมาตร) และในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็ก ควรมีการควบคุมค่าความเป็นกรดต่าง เนื่องจาก มีอิทธิพลต่อความหลากหลายของสารอนินทรีย์คาร์บอนในรูปต่างๆ ได้แก่  $\text{CO}_2$  และ  $\text{HCO}_3^-$  รวมทั้ง อุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ซึ่งจะมีผลแตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ของสาหร่ายขนาดเล็ก ส่วนปริมาณออกซิเจนที่ละลายสะสมอยู่ในอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง หากมีปริมาณสูงเกินไป จะส่งผลต่อการอยู่รอดของสาหร่ายขนาดเล็ก กล่าวโดยสรุป นอกจากสาหร่ายขนาดเล็กจะมีศักยภาพในการลดปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์แล้ว ยังมีศักยภาพในด้านการใช้เป็นพืชพลังงานโดยเฉพาะเพื่อการสกัดผลผลิต น้ำมัน ดังนั้น การใช้ประโยชน์จากสาหร่ายขนาดเล็ก จึงเป็นทางเลือกที่น่าสนใจในอนาคต เพื่อการลด ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และเป็นแหล่งพลังงานทดแทนอีกด้วย

พงษ์พันธุ์ (2560) ศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็กสายพันธุ์จากสระอโนดาต มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ เพื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโตสาหร่าย ดังกล่าวจากการเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร

ต่างกัน 4 สูตร ได้แก่ 1) สูตรปุ๋ยยูเรียผสม ปุ๋ยนา อัตรา 0.005 และ 0.015 กรัมต่อลิตร 2) สูตรปุ๋ยยูเรียผสมปุ๋ยนา อัตรา 0.15 และ 0.1 กรัมต่อลิตร 3) สูตร Algae Culture Broth M342 และ 4) สูตรปุ๋ย ไฮโดรโพนิคส์ การศึกษาใช้เวลาทั้งสิ้น 4 สัปดาห์ภายใต้การให้แสงสว่างและเติมอากาศตลอด 24 ชั่วโมง การวิจัยมีการตรวจวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ปริมาณ น้ำหนักเซลล์แห้ง ชนิดและปริมาณของสาหร่ายขนาดเล็กทุกๆ 7 วัน ผลการวิจัย พบว่า ในสัปดาห์ที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตรที่ 4 มีปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ และปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งที่สูงที่สุด และสาหร่ายขนาดเล็กชนิดเด่นที่พบ ได้แก่ *Chlorella* sp., *Monoraphidium* sp., *Pediastrum* sp., *Nitzschia* sp. และ *Scenedesmus* sp. สาหร่ายเหล่านี้สามารถ นำไปใช้เพื่อผลิตมวลชีวภาพที่เป็นประโยชน์ได้

ศุกลภัทร (2561) ศึกษาผลของ ฮอโมนพืชต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายทั้ง 2 ชนิด โดยใช้ NAA และ BA ที่ความเข้มข้น 0, 0.5, 1, 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร และวัดการเจริญเติบโต อัตราการเจริญ น้ำหนักเซลล์แห้ง และขนาดเซลล์ ในสาหร่าย *H. pluvialis* พบว่า NAA และ BA มีผลต่อการเจริญเติบโต ซึ่ง NAA ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลเพิ่มจำนวนเซลล์ในระยะคงที่ คิดเป็น 1.73 และ 1.19 เท่า ตามลำดับ นอกจากนี้ NAA และ BA ยังมีผลต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และ ขนาดเซลล์ โดยพบว่า NAA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลเพิ่มน้ำหนักเซลล์แห้งในระยะคงที่ คิดเป็น 1.86 และ 1.93 เท่า ตามลำดับ และมีผลทำให้ใน ระยะคงที่มีขนาดเซลล์เล็กลง คิดเป็น 1.24 และ 1.44 เท่า ตามลำดับ แต่พบว่า NAA และ BA ทำให้ อัตราการเจริญไม่แตกต่างกัน และในสาหร่าย *Chlorella* sp. พบว่า NAA และ BA มีผลต่อการ เจริญเติบโตเช่นเดียวกัน ซึ่ง NAA ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลเพิ่มจำนวนเซลล์ในระยะคงที่ คิดเป็น 1.14 และ 1.21 เท่า ตามลำดับ และมีผลเพิ่มอัตราการเจริญในระยะเอ็กซ์โปเนนเชียล โดย BA ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด คิดเป็น 2.26 เท่า นอกจากนี้ NAA และ BA ยังมีผลต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยพบว่า BA ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลเพิ่มน้ำหนักเซลล์แห้งในระยะคงที่ คิดเป็น 2.01 เท่า แต่พบว่า NAA และ BA ทำให้ขนาดเซลล์ไม่แตกต่างกัน และจากการศึกษาผลของการใช้ ฮอโมนพืชร่วมกัน พบว่าไม่ส่งเสริมการเจริญเติบโตเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ฮอโมนเพียงชนิดเดียว ดังนั้นจากการทดลองชี้ให้เห็นว่าฮอโมนพืชออกซิน (NAA) และไซโตไคนิน (BA) มีผลช่วยส่งเสริมการ เจริญเติบโตของสาหร่ายทั้ง 2 ชนิด ทั้งในด้านของจำนวนเซลล์สะสมในระยะคงที่ น้ำหนักเซลล์แห้ง และขนาดเซลล์ของสาหร่าย อย่างไรก็ตามจำเป็นต้องมีการศึกษาผลของฮอโมนพืชต่อปริมาณของ องค์ประกอบต่าง ๆ ภายในเซลล์สาหร่าย เช่น โปรตีน กรดไขมัน หรือรงควัตถุ เพื่อเป็นข้อมูลและเป็น ประโยชน์ในทางอุตสาหกรรมต่อไป

กานต์ธิดา (2560) งานวิจัยนี้ได้ประยุกต์ใช้เทคนิคการแยกด้วยแรงแม่เหล็กมาใช้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการเก็บเกี่ยวเซลล์ การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาคอมโพสิตของอนุภาคแม่เหล็กและแป้งมันสำปะหลัง ประจุบวกที่มีศักยภาพและมีประสิทธิภาพในการเก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่าย โดยดัดแปลงแป้งมันสำปะหลัง ประจุบวกจากแป้งมันสำปะหลังดิบ โดยการใช้ไกลซิดิลไตรเมทิลแอมโมเนียมคลอไรด์ (GTMAC) ต่อหน่วยแอนไฮโดรกลูโคส (AUG) ในอัตราส่วนที่ต่างกัน พบว่าแป้งมันสำปะหลังประจุบวกมีค่า ระดับการแทนที่ตั้งแต่ 0.22 ถึง 0.91 ซึ่งค่าระดับการแทนที่แปรผันตามอัตราส่วนของ GTMAC ที่ เพิ่มขึ้น การศึกษาหมูฟังกซ์ชัน

ของแป้งมันสำปะหลังประจุบวกพบหมู่ฟังก์ชัน C-N ที่เลขคลื่น 1482 เซนติเมตร-1 ซึ่งแสดงถึงหมู่ควอเทอร์นารี แอมโมเนียม นอกจากนี้ศึกษาโครงสร้างของแป้งโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่าโครงสร้างของแป้งมันสำปะหลังประจุบวกถูกทำลายมาก ขึ้นเมื่อมีค่าระดับการแทนที่เพิ่มขึ้น งานวิจัยนี้ได้พัฒนาคอมโพสิตของอนุภาคแม่เหล็กกับแป้งมันสำปะหลังประจุบวกที่มีระดับการแทนที่ต่างๆ ได้สำเร็จ และเมื่ออนุภาคคอมโพสิตของอนุภาคแม่เหล็กกับแป้งประจุบวกที่มีค่าระดับการแทนที่แตกต่างกันปริมาณ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร มาทดลองเก็บเกี่ยว เซลล์สาหร่าย *Chlorella sp.* TISTR 8236 ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร ที่พีเอช 9.5 พบว่าอนุภาค คอมโพสิตของอนุภาคแม่เหล็กกับแป้งประจุบวกที่มีค่าระดับการแทนที่เท่ากับ 0.76 0.82 และ 0.91 มีประสิทธิภาพในการเก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่ายมากกว่า 96 เปอร์เซ็นต์ ( $p > 0.05$ ) เมื่อพิจารณาต้นทุนของการผลิตอนุภาคคอมโพสิตและประสิทธิภาพในการเกิดปฏิกิริยาของการตัดแปรรแป้งมันสำปะหลัง งานวิจัยนี้จึงได้เลือกอนุภาคคอมโพสิตของอนุภาคแม่เหล็กกับแป้งมันสำปะหลังที่มีค่าระดับการแทนที่เท่ากับ 0.76 มาใช้เก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่ายต่อไป จากนั้นศึกษาปริมาณอนุภาคคอมโพสิต (200- 800 มิลลิกรัมต่อลิตร) และพีเอช (4-10) ที่เหมาะสมในการเก็บเกี่ยวสาหร่าย *Chlorella sp.* TISTR 8236 ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร พบว่าอนุภาคคอมโพสิตของอนุภาคแม่เหล็กกับแป้งมันสำปะหลังที่มีค่าระดับการแทนที่เท่ากับ 0.76 ปริมาณ 300 มิลลิกรัมต่อลิตร มีประสิทธิภาพในการเก็บเกี่ยวเซลล์ สาหร่ายความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร ที่พีเอช 10 ภายในเวลา 2 นาที สูงถึง 95 เปอร์เซ็นต์ และมี รูปแบบการดูดซับสอดคล้องกับสมการของแลงเมียร์ ส่วนการศึกษาการแยกเซลล์สาหร่ายโดยการ ปรับค่าพีเอชของอาหาร พบว่าที่พีเอช 12 มีประสิทธิภาพการแยกเซลล์สาหร่ายออกจากคอมโพสิต สูงสุดเท่ากับ 9.69 เปอร์เซ็นต์ จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าคอมโพสิตชนิดใหม่ของอนุภาค แม่เหล็กและแป้งมันสำปะหลังประจุบวกที่มีค่าระดับการแทนที่เท่ากับ 0.76 นี้มี ประสิทธิภาพสูงใน การเก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่าย *Chlorella sp.* TISTR 8236 สามารถนำไปประยุกต์ใช้ใน อุตสาหกรรม การผลิตชีวมวลของสาหร่าย และส่งผลให้ช่วยลดพลังงานและระยะเวลาในการเก็บเกี่ยวเซลล์ สาหร่าย ได้ อย่างไรก็ตามการแยกเซลล์สาหร่ายจากอนุภาคคอมโพสิตยังคงมีประสิทธิภาพต่ำ ดังนั้นจึงควรมี การศึกษากระบวนการแยกเซลล์สาหร่ายจากอนุภาคคอมโพสิตเพิ่มเติมในอนาคต

ปรัญรัตน์ (2559) การศึกษาวิจัยในหลอดทดลองเกี่ยวกับการต้านไกลโคเซชันหรือค้นหา AGEs inhibitor จากแหล่งอาหารธรรมชาติในต่างประเทศมีการศึกษาค่อนข้างมาก โดยทำการศึกษาพืชหลากหลายชนิด อาทิ เช่น สารสกัดจากใบฝรั่ง (*Psidium guajava* L.) herbal infusion ชนิดต่างๆของประเทศไต้หวันเทียบกับชาเขียว และสารสกัดจาก Lemon balm (*Melissa officinalis* L.) และ tropical medicinal herb ของสหราชอาณาจักร ซึ่งพบความสัมพันธ์แบบ strong correlation ระหว่าง Total phenolic กับ Anti-glycation สำหรับประเทศไทยพบว่ามีการศึกษาแบบ In vitro anti-glycation เช่นกัน

ขมนาด และ ไมตรี (2560) ศึกษาพืชสมุนไพร 17 ชนิดที่ป้องกันการสะสมของ AGEs ซึ่งเป็นผลผลิตของปฏิกิริยาไกลโคเซชันในหลอดทดลอง พบว่ามีพืชสมุนไพร 5 ชนิดที่ให้ผลในการยับยั้งการเปลี่ยนแปลงและการลดการสะสม AGEs ได้แก่ ขิง ยี่หระ อบเชย พริกไทยดำและชาเขียว นอกจากนี้ยังพบสารสำคัญที่ต้านปฏิกิริยาไกลโคเซชัน เช่น สารประกอบแทนนิน (tannin) ในชาเขียวที่นิยมดื่มกันทั่วไปสามารถเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งการเกิด AGEs ในกระบวนการไกลโคเซชันได้

## บทที่ 3

### วิธีการดำเนินงานวิจัย

#### 3.1 สาหร่าย

สาหร่าย *Chlorella* G4, *Chlorella* sp. KLSc59 และ *Chlorella* sp. KLSc61

#### 3.2 อาหารเลี้ยงสาหร่าย

อาหารเลี้ยงเชื้อ TAP Media pH 7.0

#### 3.3 สารเคมี

##### 3.3.1) สารเคมีสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อสาหร่าย

- 1) 1M Tris Base
- 2) Dipotassium phosphate ( $K_2HPO_4$ )
- 3) Potassium Dihydrogen phosphate ( $KH_2PO_4$ )
- 4) Ammonium chloride ( $NH_4Cl$ )
- 5) Magnesium Sulfate Heptahydrate ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )
- 6) Calcium Chloride Dihydrate ( $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ )
- 7) Hutner's trace elements
- 8) Glacial acetic acid
- 9) Agar powder

##### 3.3.2) สารเคมีสำหรับการสกัดสาหร่าย

Ethanol 99%

##### 3.3.3) สารเคมีสำหรับการทำปฏิกิริยา AGEs

- 1)  $KH_2PO_4$
- 2) Gelatin
- 3) Ribose
- 4) Aminoguanidine

##### 3.3.4) สารเคมีสำหรับทดสอบ ELISA

- 1) Sodium chloride

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่จัดทำขึ้นเพื่อการเรียนการสอนเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3) Sodium phosphate dibasic
- 4) Potassium phosphate monobasic
- 5) Citric acid
- 6)  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$
- 7) 0.05% Tween 20
- 8) 0.5% hydrolyzed casein
- 9) Anti-CML
- 10) Anti-CMA
- 11) 5,000 folds dilution 2<sup>nd</sup> -antibody (IgG-HRP)
- 12)  $\text{H}_2\text{O}_2$
- 13) OPD • 2HCl
- 14)  $\text{H}_2\text{SO}_4$

### 3.3.5) สารเคมีสำหรับการแยกคอลัมน์

- 1) อะซีโตน
- 2) เอทานอล

## 3.4 อุปกรณ์และเครื่องมือ

### 3.4.1) อุปกรณ์

- 1) ปีกเกอร์ ขนาด 100, 250, 600 และ 1,000 mL (Beaker)
- 2) ฟลasks ขนาด 250 และ 500 mL (Flask)
- 3) กระบอกตวง (Cylinder)
- 4) สำลี (Cotton)
- 5) ผ้าก๊อซ (Gauze)
- 6) หนังสยาง (Rubber band)
- 7) ฟอยล์อลูมิเนียม (Aluminium foil)
- 8) พาราฟิล์ม (Parafilm)
- 9) หลอดทดลอง (Test tube)
- 10) จานเพาะเชื้อ (Petri dish)

เอกสารนี้เป็นเอกสารลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี (Loop) งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 12) ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol lamp)
- 13) ชุดย้อมสีแกรม (Gram Stain set)
- 14) ไมโครปิเปตต์ (Micropipettes)
- 15) ไมโครปิเปตต์แบบหลายช่อง (Multichannel micropipettes)
- 16) ปิเปตทิป (Pipette tip)
- 17) สไลด์นับเซลล์ (Hemocytometer)
- 18) คิวเวทพลาสติก (Plastic cuvette)
- 19) หลอดเซนติฟิวก์พลาสติก ขนาด 50 mL (Centrifuge tube)
- 20) หลอดไมโครเซนติฟิวก์ (Micro centrifuge tube)
- 21) กระจกฉีดยาพลาสติก (Plastic syringe)
- 22) ตัวกรองสารละลาย 0.22 um (Syringe Filter Sterile)
- 23) ไมโครเพลท (96-well plate)
- 24) เพลทสำหรับเทคนิค ELISA (ELISA plate)
- 25) คอลัมน์แก้ว (Glass Chromatography column)
- 26) Diaion HP-20 (Supelco code 13606)

#### 3.4.2) เครื่องมือ

- 1) เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Mettler toledo)
- 2) กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light Microscope)
- 3) เครื่องวัดค่าพีเอช (pH Meter)
- 4) หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)
- 5) ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar)
- 6) ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)
- 7) เครื่องเขย่า (Shaker)
- 8) เครื่องวัดความเข้มของแสง (Spectrophotometer)
- 9) เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)
- 10) เครื่องปั่นเหวี่ยงสารละลายปริมาตรน้อย (Microcentrifuge)
- 11) เครื่องแยกเซลล์ (Sonicator)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ส่งมอบให้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 12) ตู้เย็น (Refrigerator)  
 13) ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) ให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

14) เครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ (Microplate reader)

### 3.5 ขั้นตอนในการดำเนินงาน

#### 3.5.1) Algal extract

##### 3.5.1.1) การเตรียมอาหาร Tris – Acetate – Phosphate Medium (TAP Media)

เตรียม TAP broth โดยใช้ 1 M Tris Base 20 mL/L, Phosphate Buffer II 1.0 mL/L, Solution A 10 mL/L, Hutner's Trace Element 1.0 mL/L และ Glacial acetic acid 1.0 mL/L ละลายให้เข้ากันด้วยน้ำกลั่น ปรับ pH 7.0 และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1 L การเตรียม TAP agar มีขั้นตอนเหมือนกับการเตรียม TAP broth เติม agar 15 g/L จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

##### 3.5.1.2) การเพาะเลี้ยงสาหร่าย

ใช้ห้วงเชื้อเชื้อสาหร่าย *Chlorella* spp. ทั้งสายพันธุ์ *Chlorella* G4, *Chlorella* sp. KLSc59 และ *Chlorella* sp. KLSc61 จากอาหารแข็ง TAP มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TAP ปริมาตร 250 mL ในขวดรูปชมพู่ 500 mL นำไปเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที โดดให้แสงอยู่ตลอดเวลา ภายใต้อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน

##### 3.5.1.3) การเก็บเกี่ยวและการสกัดสารจากสาหร่าย

เก็บเกี่ยวโดยนำสาหร่าย *Chlorella* spp. ทั้ง 3 สายพันธุ์ ปริมาณ 250 mL มาปั่นเหวี่ยงเซลล์ตกตะกอนที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ทำการแยกส่วนใสและส่วนเซลล์ออกจากกัน นำส่วนเซลล์สาหร่ายมาแตกเซลล์ โดยนำเซลล์สาหร่ายมาเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อเพื่อจะทำการแตกเซลล์ โดยทำการแตกเซลล์ด้วยเครื่องแยกเซลล์อัลตราโซนิค (Sonicator) ทำการแตกเซลล์ 10 วินาที และหยุด 10 วินาที สลับกันเป็นจำนวน 30 รอบ รวมเป็นเวลา 10 นาที และเติมสารละลายเอทานอลความเข้มข้น 30 % และ 60 % ในหลอดเก็บเซลล์สาหร่ายที่ผ่านการแตกเซลล์มาแล้ว บ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปทดสอบต่อไป

#### 3.5.2) AGEs formation reaction

##### 3.5.2.1) เตรียมสารสำหรับทำปฏิกิริยา

1. เตรียม 200 mM K-PO<sub>4</sub> buffer pH 7.2 ปริมาณ 500 mL จากนั้นเตรียม 0.4% gelatin ใน 25 mL K-PO<sub>4</sub> buffer และ 60 mM ไรโบส ใน 25 mL K-PO<sub>4</sub> buffer ผสม Gelatin และ Ribose เข้าด้วยกัน กรองส่วนผสมผ่านฟیلเตอร์ 25 mm ได้เป็น Solution A ปริมาณ 50 mL อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. เตรียม Aminoguanidine (AG) 100 mg/mL สำหรับ positive control ทำการเจือจางให้เป็น 10 mg/mL และ 1 mg/mL

### 3.5.2.2) การทำปฏิกิริยา

ใช้หลอดไมโครเซนติพิวที่ผ่านการฆ่าเชื้อผสมปฏิกิริยาดังนี้

1. Sol.A 495 uL + น้ำกลั่น 5 uL (สำหรับ negative control บ่ม 0 วัน)
2. Sol.A 495 uL + AG 10 mg/mL 5 uL (สำหรับ positive control)
3. Sol.A 495 uL + AG 1 mg/mL 5 uL (สำหรับ positive control)
4. Sol.A 495 uL + น้ำกลั่น 5 uL (สำหรับ negative control บ่ม 7 วัน)
5. Sol.A 495 uL + ตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ 5 uL

เก็บ negative control 1 ชุด ที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน และหลอดอื่นๆเก็บไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

### 3.5.3) AGEs detection by ELISA

1. ทำการเจือจางตัวอย่างด้วย 1XPBS 200เท่า สำหรับทดสอบ CML และ CMA ใน 96 well plate จากนั้นดูดตัวอย่างที่เจือจางแล้ว 100 uL ลงใน เพลท ELISA บ่ม 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ทั้งส่วนที่เกินออก
2. เติม 0.5% hydrolyzed casein ละลายใน 1XPBS ในแต่ละหลุม หลุมละ 200 uL บ่ม 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ทั้งส่วนที่เกินออก ล้างด้วย washing buffer หลุมละ 200 uL 3 ครั้ง
3. เติม anti-CML และ anti-CMA หลุมละ 100 uL บ่ม 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ทั้งส่วนที่เกินออก ล้างด้วย washing buffer หลุมละ 200 uL 3 ครั้ง
4. เติม 2<sup>nd</sup>-antibody เจือจาง 5,000 เท่า (IgG-HRP) หลุมละ 100 uL บ่ม 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ทั้งส่วนที่เกินออก ล้างด้วย washing buffer หลุมละ 200 uL 3 ครั้ง
5. เติม substrate solution ที่เตรียมไว้ หลุมละ 100 uL บ่ม 6 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> หลุมละ 100 uL และอ่านค่าด้วย microplate reader ที่ค่า A492 แล้วนำค่าที่ได้ไปทำกราฟ

### 3.5.4) C18 Chromatography

นำตัวอย่างที่ให้ผลการยับยั้งดีที่สุดจากการทดสอบ ELISA มาระเหยเพื่อนำเอทานอลออกด้วยเครื่อง Rotary Evaporator แล้วจึงนำไปแยกในคอลัมน์ที่เตรียมไว้ โดยใช้ Diaion HP-20 matrix (C-18 surface resin) (Supelco code 13606) เป็น Stationary phase แบบไม่มีขั้ว และใช้น้ำกลั่น, เอทานอล 25%, 50%, 75%, เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า 99.9% และ อะซิโตน  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็น mobile phase ได้ออกมา 6 fraction แล้วจึงนำทั้ง 6 fraction มาทดสอบ AGEs และเช็คผลของฤทธิ์การยับยั้ง CML และ CMA ด้วย ELISA Kit ซ้ำอีกรอบ

### 3.5.5) การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยออกแบบชุดทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ Complete Randomized Design (CRD) วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนด้วยวิธี one way ANOVA และวัดค่าความแตกต่างของข้อมูลด้วยวิธี Duncan โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS statistics version 29 (SPSS software, New York, USA) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

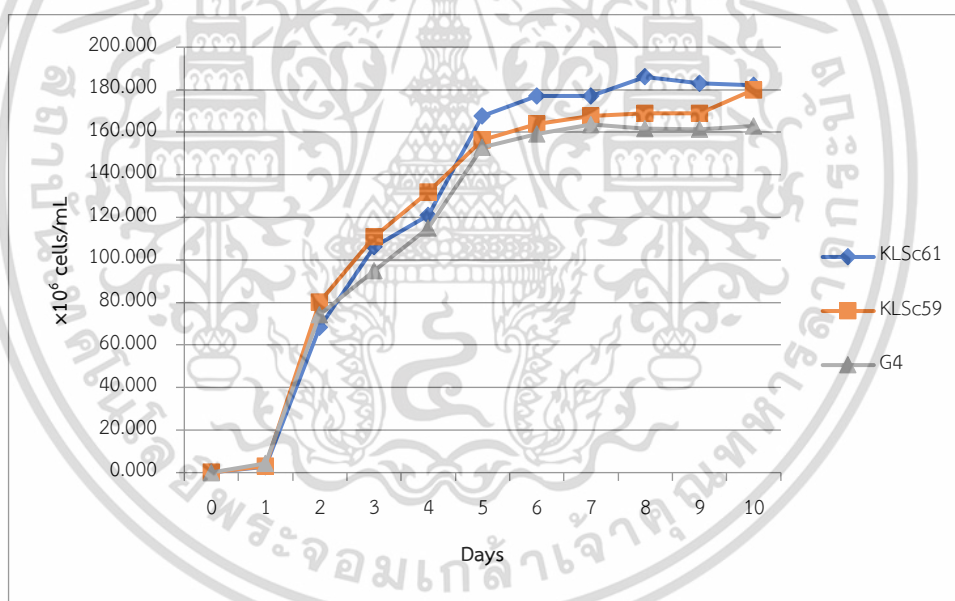
## บทที่ 4

### ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

#### 4.1 กราฟมาตรฐานแสดงระยะการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Chlorella* G4, *Chlorella* sp. KLSc59 และ *Chlorella* sp. KLSc61

การทดลองเบื้องต้นได้ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายเพื่อทราบถึงระยะต่างๆ ในการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Chlorella* spp. ทั้ง 3 ชนิด จากผลการทดลองพบว่า สาหร่ายมีการเจริญเติบโตช่วง log phase อยู่ในวันที่ 1 จนถึงวันที่ 5 ซึ่งมี mid-log phase อยู่ในวันที่ 3-4 และ early stationary อยู่ในช่วงวันที่ 5 (รูปที่ 4.1)

ผู้วิจัยได้เลือกระยะ early stationary เพื่อเป็นระยะเวลาในการเก็บเกี่ยวสาหร่ายและนำมาใช้ในการทดลองถัดไป เนื่องจากคาดว่าเป็นระยะที่สาหร่ายเริ่มเจริญเติบโตเต็มที่ และอาจจะสะสมสำคัญที่มีผลต่อการยับยั้ง CML และ CMA (พงษ์ผไท, 2560)



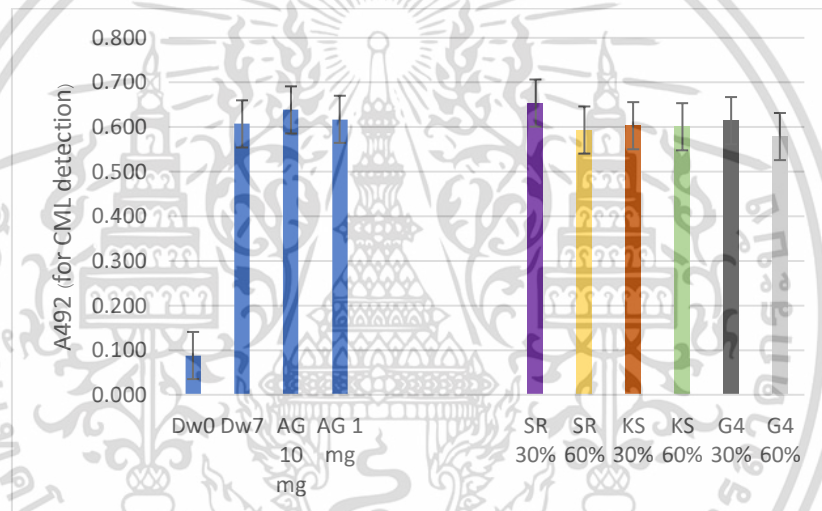
รูปที่ 4.1 การเจริญเติบโตของสาหร่าย *Chlorella* G4, *Chlorella* sp. KLSc59 และ *Chlorella* sp. KLSc61

#### 4.2 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้ง CML โดยใช้สารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella* spp. 3 ชนิด

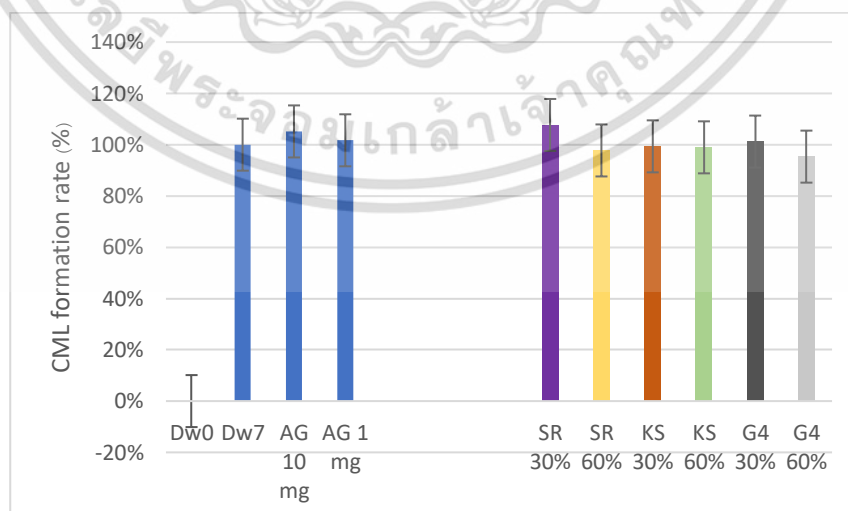
จากการทดลองเพื่อศึกษาฤทธิ์การยับยั้ง CML โดยใช้สารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella* spp. ทั้ง 3 สปีชีส์ โดยสกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้น 30% และ 60% เพื่อทดสอบการยับยั้งของกระบวนการเกิด AGEs โดยในการทดลองครั้งที่ 1 ได้ทำทดสอบกับ AGEs จำลอง โดยเช็คผลของฤทธิ์การยับยั้ง CML ด้วย ELISA Kit และเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า วัตถุประสงค์การดักกลืนแสงที่ 495 นาโนเมตร *Chlorella* sp. KLSc61 ที่สกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้น 30% มีไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.654 และมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 108% , *Chlorella* sp. KLSc61 ที่สกัดด้วยเอทานอล ความเข้มข้น 60% มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.593 และมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 98% , *Chlorella* sp. KLSc59 ที่สกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้น 30% มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.603 และมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 99% , *Chlorella* sp. KLSc59 ที่สกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้น 60% มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.601 และมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 99% , *Chlorella* G4 ที่สกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้น 30 % มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.614 และมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 101% และสุดท้าย *Chlorella* G4 ที่สกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้น 60 % มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.579 และมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 95 % (รูปที่ 4.2) จากผลการทดลองสรุปได้ว่า สำหรับ *Chlorella* G4 ที่สกัดด้วยสารละลายเอทานอลความเข้มข้น 60 % มีฤทธิ์ในการยับยั้ง CML ได้ดีที่สุด

(a)



(b)



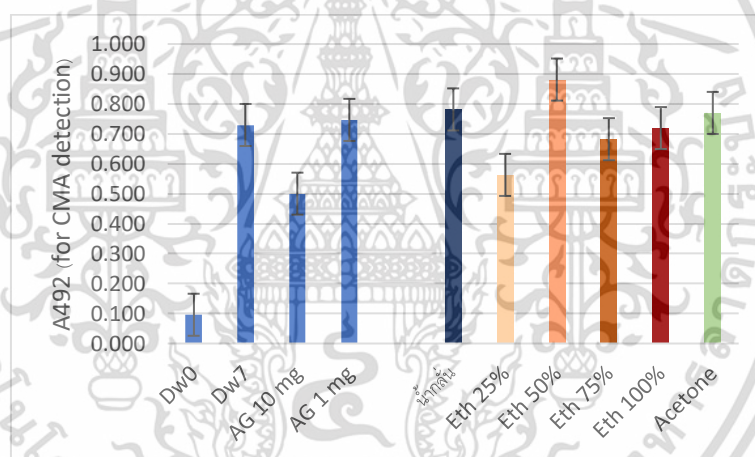
รูปที่ 4.2 อัตราการยับยั้ง CML (a - ค่าการยับยั้งจากการวัดด้วย microplate reader และ b - เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง) ของ *Chlorella* spp. 3 สปีชีส์ สกัดด้วยเอทานอล 2 ความเข้มข้น

ไม่มีการฉีดยา... ที่ส่งผล... อีกทั้ง... ยังมี... ให้ต... และต... อย่างอ... ถึงเจ้า... ของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

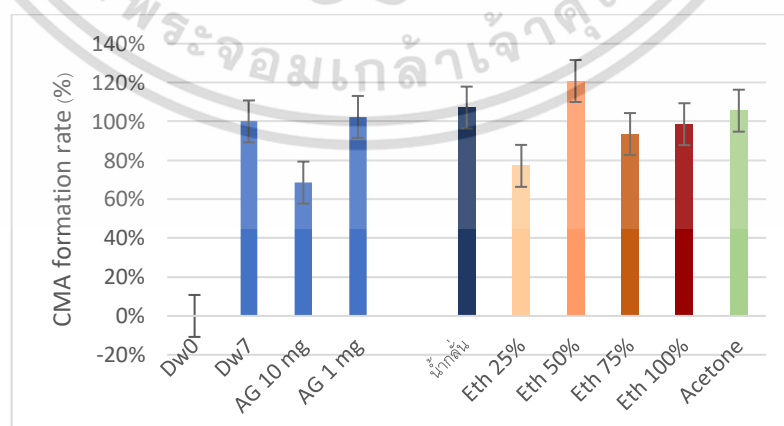
### 4.3 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้ง CMA และ CML โดยใช้สารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella* G4

จากผลการทดลอง 4.1 *Chlorella* G4 หรือ G4 สกัดที่ความเข้มข้นเอทานอล 60% ให้ผลการยับยั้งดีที่สุดจากตัวอย่างทั้งหมด หลังจากแยกสารสกัด *Chlorella* G4 ด้วยคอลัมน์โคมาโตกราฟีและนำมาทดสอบฤทธิ์การยับยั้ง CMA และ CML ด้วยวิธี ELISA อีกรอบ ผลการทดลองพบว่า ที่ Fraction ซึ่งทำละลายด้วยตัวทำละลาย น้ำกลั่น, เอทานอล 50% และ อะซิโต ที่มีค่าเฉลี่ยการวัดค่าการดูดกลืนแสง 0.782, 0.881 และ 0.770 และไม่สามารถยับยั้งการสร้าง CMA ได้ เนื่องจากมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้าง CMA อยู่ที่ 107%, 121% และ 106% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ Positive control และ Negative control ในขณะที่ Fraction ซึ่งทำละลายด้วยตัวทำละลายเอทานอล 75% และ เอทานอล 100% สามารถยับยั้ง CMA ได้เพียงเล็กน้อย มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้าง CMA ที่ 94% และ 99% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับ Fraction ที่ให้ผลการยับยั้งการสร้าง CMA ได้ดีที่สุด คือ Fraction ซึ่งละลายในตัวทำละลายเอทานอล 25% ซึ่งได้ค่าเฉลี่ยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ( $A_{492}$ ) คือ 0.563 และมีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้าง CMA อยู่ที่ 77% เมื่อเทียบกับ Negative control และ Positive control 1 mg/ml (รูปที่ 4.3)

(a)



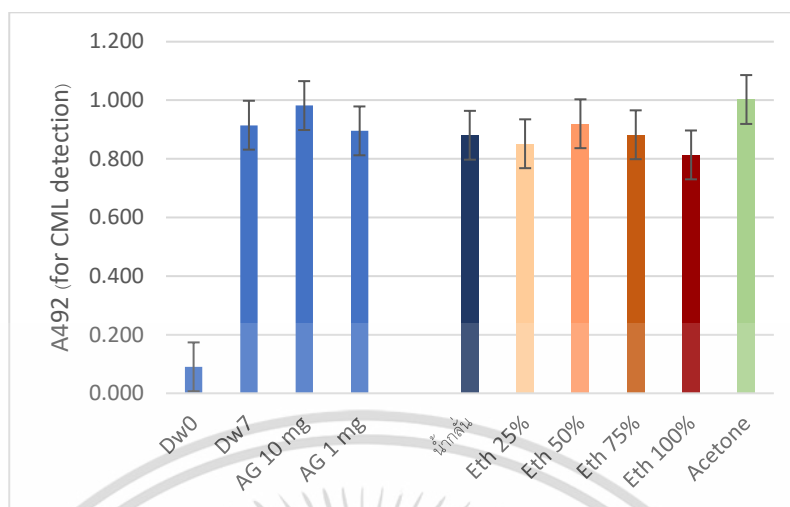
(b)



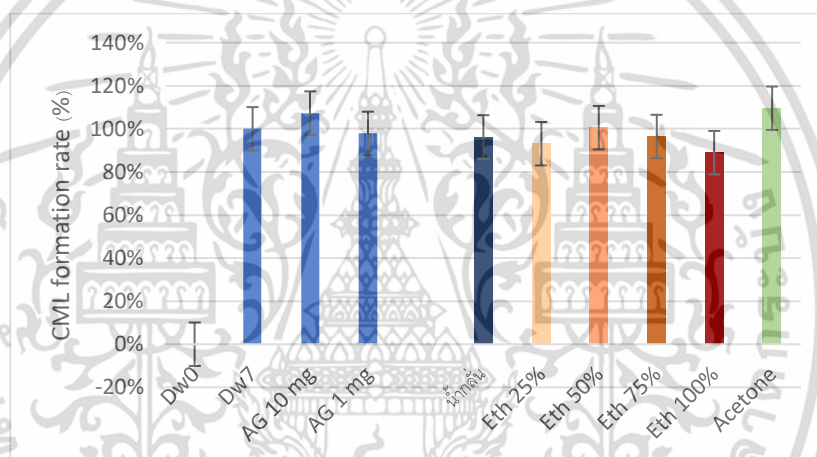
รูปที่ 4.3 อัตราการยับยั้ง CMA (a - ค่าการยับยั้งจากการวัดด้วย microplate reader และ b - เปอร์เซ็น

การยับยั้ง) ของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* G4 ( Code: G4 ) ที่ตัวทำละลายความเข้มข้นต่างๆ เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(a)



(b)



รูปที่ 4.4 อัตราการยับยั้ง CML (a - ค่าการยับยั้งจากการวัดด้วย microplate reader และ b - เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง) ของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* G4 ( Code: G4 ) ที่ตัวทำละลายความเข้มข้นต่างๆ

จากการทดสอบฤทธิ์การยับยั้ง CML โดยใช้ *Chlorella* G4 ผลการทดลองพบว่า ที่ Fraction ซึ่งทำละลายด้วยตัวทำละลายเอทานอล 50% และ อะซิโตน ที่มีค่าเฉลี่ยการวัดค่าการดูดกลืนแสง 0.920 และ 1.003 และไม่สามารถยับยั้งการสร้าง CML ได้ เนื่องจากมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้าง CML อยู่ที่ 101% และ 110% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ Positive control และ Negative control ในขณะที่ Fraction ซึ่งทำละลายด้วยตัวทำละลาย น้ำกลั่น, เอทานอล 25% และ เอทานอล 75% สามารถยับยั้ง CML ได้เพียงเล็กน้อย มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้าง CML ที่ 96%, 93% และ 96% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับ Fraction ที่ให้ผลการยับยั้งการสร้าง CML ได้ดีที่สุด คือ Fraction ซึ่งละลายในตัวทำละลายเอทานอล 100% ซึ่งได้ค่าเฉลี่ยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ( $A_{492}$ ) คือ 0.814 และมีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้าง CML อยู่ที่ 89% เมื่อเทียบกับ Negative control และ Positive control (รูปที่ 4.4).

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้ง CML ด้วย *Chlorella* G4 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Sun et al., (2010) ที่แสดงการยับยั้งการก่อตัวของ AGE โดยสารสกัดจากสาหร่ายหลายชนิดอย่างมีนัยสำคัญทางชีวภาพ และในการศึกษาพบว่าสาหร่าย *Chlorella* และ *Nitzschia laevis* (ไดอะตอม) แสดงอัตราการยับยั้งสูงสุดจากสาหร่าย 20 ชนิดที่ทดสอบศักยภาพในการยับยั้ง AGE

ในการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งโดยใช้ตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้นต่างๆ เช่นเดียวกับผลการศึกษาของ Ruen-ngam et al., (2012) ซึ่งเลือกเป็นตัวทำละลายเป็นเอทานอลและเมทานอล พบว่าเอทานอลเหมาะสมที่สุดสำหรับกระบวนการชะหรือการปรับสภาพปริมาณลูทีนและสารประกอบอื่นๆ

จากผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง CMA และ CML ด้วย *Chlorella* G4 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Imai et al., (2022) ที่ใช้สาหร่าย *Parachlorella beijerinckii* ในการทดสอบ AGEs โดย AGE ที่งานวิจัยเลือกใช้คือ BSA-กลูโคส ซึ่งผลที่ได้ให้การยับยั้ง CMA และ CML ได้เป็นอย่างดี แสดงให้เห็นถึงความสามารถของสาหร่าย *Chlorella* ในการยับยั้งการสร้างและการสะสมของ AGEs ได้ ในงานวิจัยนี้ยังมีการวิเคราะห์แคโรทีนอยด์ที่มีความเข้มข้นมากที่สุดภายในตัวอย่างสาหร่ายนั้นคือ ลูทีน โดยใช้ HPLC โครงการพิเศษนี้ยังไม่มีการศึกษาและวิเคราะห์สารประเภทแคโรทีนอยด์ภายในสารสกัดสาหร่าย ซึ่งแคโรทีนอยด์อาจมีฤทธิ์ต้านไกลเซชันอย่างมีนัยสำคัญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

#### 5.1 สรุปผลการวิจัย

การศึกษาเพื่อทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการสร้าง CML โดยใช้สารสกัดจาก *Chlorella* G4 (Code: G4), *Chlorella* sp. KLSc59 (Code: KS) และ *Chlorella* sp. KLSc61 (Code: SR) ที่สกัดด้วยเอทานอล 30% และ 60% พบว่า สารสกัดจาก *Chlorella* SR ที่สกัดด้วยเอทานอล 30% และ *Chlorella* G4 ที่สกัดด้วยเอทานอล 30% มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ( $A_{492}$ ) คือ 0.654 และ 0.614 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้าง CML อยู่ที่ 108% และ 101% ตามลำดับ ไม่สามารถยับยั้งการสร้าง CML ได้อย่างมีนัยสำคัญ ( $p\text{-value} > 0.05$ ) โดยสารสกัดที่ให้ผลการยับยั้ง CML ได้ดี มีผลการยับยั้งการสร้าง CML ดีที่สุดจากทั้ง 6 ตัวอย่าง คือ สารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella* G4 ที่สกัดด้วยเอทานอล 60% มีค่าการดูดกลืนแสง ( $A_{492}$ ) 0.579 และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้าง CML อยู่ที่ 95%

หลังจากแยกสารสกัด *Chlorella* G4 ด้วยคอลัมน์โคมาโตกราฟีและนำมาทดสอบฤทธิ์การยับยั้ง CMA และ CML ด้วยวิธี ELISA อีกรอบ ผลการทดลองพบว่า สารสกัดสาหร่าย G4 ที่ Fraction ตัวทำละลายเอทานอล 25% มีค่าเฉลี่ยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ ( $A_{492}$ ) คือ 0.563 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้าง CMA อยู่ที่ 77% ซึ่งให้ผลการยับยั้งดีที่สุดจากทั้ง 6 Fractions โดย Fraction ตัวทำละลาย น้ำกลั่น, เอทานอล 50% และ อะซิโต ไม่สามารถยับยั้งการสร้าง CMA ได้ มีค่าเฉลี่ยการวัดค่าการดูดกลืนแสง 0.782, 0.881 และ 0.770 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้าง CMA อยู่ที่ 107%, 121% และ 106% ตามลำดับ จากผลการทดสอบการยับยั้ง CML พบว่า สารสกัดสาหร่าย G4 ที่ Fraction ตัวทำละลายเอทานอล 100% มีค่าเฉลี่ยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 0.814 และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้าง CML อยู่ที่ 89% มีการยับยั้งการสร้าง CML ดีที่สุดจากทั้ง 6 Fractions และ Fraction ที่ไม่สามารถยับยั้งการสร้าง CML ได้ คือ ตัวทำละลายเอทานอล 50% และ อะซิโต ค่าเฉลี่ยการวัดค่าการดูดกลืนแสงอยู่ที่ 0.920 และ 1.003 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้าง CML อยู่ที่ 101% และ 110% ตามลำดับ

#### 5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับองค์ประกอบภายในของสาหร่าย *Chlorella* sp. แต่ละสปีชีส์ เพื่อให้ทราบว่าองค์ประกอบไหนที่ทำให้สาหร่าย *Chlorella* sp. มีความสามารถในการยับยั้งแตกต่างกัน

2. ควรศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับสารละลายที่นำมาสกัดสาหร่าย เช่น อาจเพิ่มให้มีหลายตัวอย่างมากขึ้น หรือ เพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดที่นำมาทดลองให้มากขึ้น

3. ควรวิเคราะห์สารประกอบภายในสารสกัดด้วยวิธี HPLC เพิ่มเติมในอนาคต เพื่อให้ได้ผลการทดลองเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าที่นำเชื่อถือมากยิ่งขึ้น  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## เอกสารอ้างอิง

- กานต์ธิดา แจ้งยุบล. 2560. การเก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่าย *Chlorella* sp. TISTR 8236 โดยใช้คอมโพสิตของอนุภาคแม่เหล็กและแป้งมันสำปะหลังประจุบวก. วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ. มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.
- เจนจิรา แซ่คู และ ธนวรรณ พาณิชพัฒน์. 2560. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กในน้ำทิ้งฟาร์มสุกรและการผลิตน้ำมันจากสาหร่าย. *Veridian E-Journal, Science and Technology Silpakorn University*. 4(4): 2408 - 1248.
- ชมนาด สิงห์หัตต์ และ ไมตรี สทุธิจิตต์. 2559. การยับยั้งออกซิเดชันและไกลเคชันในโรคเบาหวาน โดยผักพื้นบ้านไทย. *Naresuan University Journal: Science and Technology*. 2017: (25)3.
- ณรงค์พัชร น้ำใจสุข. 2555. การศึกษาระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในกระแสเลือดจากการใช้อุปกรณ์สอดช่องคลอดเพื่อควบคุมการเป็นสัดในโคนม. *ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาสัตวศาสตร์*. มหาวิทยาลัยแม่โจ้.
- นุชนาถ แซ่มซ้อย. 2557. สาหร่ายขนาดเล็ก : การเพาะเลี้ยงและการนำมาใช้ประโยชน์. *วารสาร มฉก.วิชาการ*. 34: 169-189.
- ปริญรัชต์ ธนวนิทุ์ภักดิ์. 2559. ไกลเคชันกับการเกิดโรคในมนุษย์. *วารสารพิษวิทยาไทย* 2559. 31(2): 84-96.
- ปีลดดา เชิดชูเกียรติศักดิ์. 2558. การจัดจำแนกและการประเมินศักยภาพของสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก *Chlorosarcinopsis* spp. ที่คัดแยกจากดินเพื่อการผลิตคีโตแคโรทีนอยด์. วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา. มหาวิทยาลัยศิลปากร.
- พรรณทิพา ศรีวิรุฬห์โชติ. 2551. การประเมินวิธี Enzyme-Linked Immunosorbent Assay วิธี Particle Agglutination และ วิธี Immunochromatography สำหรับการตรวจวินิจฉัยโรคไข้เลือดออก. วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- พงษ์ไพไท กิจรังโรจนาวร. 2560. การเจริญเติบโตและการผลิตไขมันของสาหร่าย *Chlorella vulgaris* ที่เลี้ยงในน้ำเสียจากโรงฆ่าสุกร. *ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม ภาควิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม*. บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร.
- พงษ์พันธุ์ สีนทเกรียงไกร, ชลนิตา จุ่มจันทร์, ประภาพร วงษ์แก้ว และ ทัดพร คุณประดิษฐ์. 2560. การเปรียบเทียบสูตรอาหารในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็ก สายพันธุ์ผสมจากสหรอบโนดาด มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่. *ครุศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา*. มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้เฉพาะเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้วางไปเผยแพร่บนด้านการค้า  
 วิชระ เวียงแก้ว. 2552. การสกัดไขมันจากจุลสาหร่าย. *คณะวิศวกรรมศาสตร์*. มหาวิทยาลัยศรีนครินทร  
 ไม่ว่างกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นทรวิโรฒ องครักษ์.

วีณา ชูโชติ. 2556. ผลของสารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella* spp. ในการยับยั้งการเจริญของ

จุลินทรีย์ก่อโรค. วารสารวิทยาศาสตร์ลาดกระบัง. 22(2): 102 – 114.

ศิริภรณ์ ชื่นบาล และ รุปน ชื่นบาล. 2552. การเพาะเลี้ยงสาหร่ายที่มีประโยชน์ทางเศรษฐกิจจาก  
น้ำเสียโรงงานผักและผลไม้กระป๋อง. รายงานผลการวิจัย. มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

ศุภกมล ทัศนกรรม, สกฤษณ์ฐิตะนันทน์ และ อโรชา น้อยวิมล. 2561. การศึกษาผลของฮอริโมนพืชที่มี

ผลต่อเจริญเติบโตและชีวมวลของสาหร่าย *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS* และ

*CHLORELLA* SP.. วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. สถาบัน

เทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ABCAM progress happens together. ELISA principles and types. [Online]. เข้าถึงได้จาก

<https://www.abcam.com/kits/elisa-principle>.

Bierhaus, A, Hofmann, M.A, Ziegler, R. and Nawroth, P.P. 1997. AGEs and their  
interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I.

The AGE concept. Cardiovascular Research. 37 (1998): 586–600.

Bio-Rad Laboratories, Inc. ELISA: Types of ELISA. [Online]. เข้าถึงได้จาก

[https://www.bio-rad-antibodies-com.translate.goog/elisa-types-direct-indirect-sandwich-competition-elisa-formats.html?\\_x\\_tr\\_sl=en&\\_x\\_tr\\_tl=th&\\_x\\_tr\\_hl=th&\\_x\\_tr\\_pto=sc](https://www.bio-rad-antibodies-com.translate.goog/elisa-types-direct-indirect-sandwich-competition-elisa-formats.html?_x_tr_sl=en&_x_tr_tl=th&_x_tr_hl=th&_x_tr_pto=sc).

Chen, C.Y, Zhang, J.Q, Li, L, Guo, M.M, He, Y.F, Dong, Y.M, Meng, H. and Yi, F. 2022.

Advanced Glycation End Products in the Skin: Molecular Mechanisms, Methods  
of Measurement, and Inhibitory Pathways. Front Med (Lausanne). 9: 837222.

Clark, M.F and Adams, A.N. 1977. Characteristics of the Microplate Method of

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Plant Viruses. J  
Gen Virol. 34(3): 475-83.

Contreras, C.L and Novakofski, K.C. 2010. Dietary Advanced Glycation End Products

and Aging. Nutrients. 2: 1247-1265.

Imai, Y, Nakashima, Y. and Kanno, T. 2022. Inhibitory Effects of *Parachlorella*

*Beijerinckii* Extracts on the Formation of Advanced Glycation End Products  
and Glycative Stress-Induced Inflammation in an In Vitro Skin Dermis-Like

Model. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. vol. 2022.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
Li, L, Han, L, Fu, Q, Li, Y, Liang, Z, Su, J. and Li, B. 2012. Formation and Inhibition of  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

NE-(Carboxymethyl) lysine in Saccharide-Lysine Model Systems during Microwave Heating. *Molecules*. 17: 12758-12770.

Manabe, Y, Takii, Y. and Sugawara, T. 2020. Siphonaxanthin, a carotenoid from green algae, suppresses advanced glycation end product-induced inflammatory responses. *Journal of Natural Medicines*. 74: 127–134.

Park, H.Y, Oh, M.J, Park, Y. and Kim, Y. 2019. NE-(carboxymethyl)lysine formation from the Maillard reaction of casein and different reducing sugars. *Food Science and Biotechnology*. 29 (2020); 487-491.

Perrone, A, Giovino, A, Benny, J. and Martinelli, F. 2020. Advanced Glycation End Products (AGEs): Biochemistry, Signaling, Analytical Methods, and Epigenetic Effects. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2020: 3818196.

Ruen-ngam, D, Shotipruk, A, Pavasant, P, Machmudah, S and Goto, M. 2012. Selective Extraction of Lutein from Alcohol Treated *Chlorella vulgaris* by Supercritical CO<sub>2</sub>. *Chemical Engineering & Technology*. Volume 35 Issue 2: 255-260.

Sci-Ins KMITL Scientific Instruments Centre. 2018. [HP] :: High Performance Liquid Chromatograph. [Online]. เข้าถึงได้จาก <https://sciins.science.kmitl.ac.th>.

Spínola, V and Castilho, P.C. 2017. Evaluation of Asteraceae herbal extracts in the management of diabetes and obesity. Contribution of caffeoylquinic acids on the inhibition of digestive enzymes activity and formation of advanced glycation end-products (in vitro). *Phytochemistry*. 143 (2017): 29-35.

Sun, Z, Peng, X, Liu, J, Fan, K.W, Wang, M. and Chen, F. 2010. Inhibitory effects of microalgal extracts on the formation of advanced glycation endproducts (AGEs). *Food Chemistry*. 120(1): 261-267.

Tessier F.J. 2009. The Maillard reaction in the human body. The main discoveries and factors that affect glycation. *Pathologie Biologie*. 58 (2010); 214-219.

Uribarri, J, Woodruff, S, Goodman, S, Cai, W, Chen, X, Pyzik, R, Yong, A, Striker, G.E. and Vlassara, H. 2010. Advanced Glycation End Products in Foods and a Practical Guide to Their Reduction in the Diet. American Dietetic Association.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
110(6): 911-916.e12.

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Wu, Y, Li, Y, Zheng, L, Wang, P, Liu, Y, Wu, Y. and Gong, Z. 2019. The neurotoxicity of **NE**- (carboxymethyl) lysine in food processing by a study based on animal and organotypic cell culture. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 190 (2020): 110077.

Zheng, M.Z, Richard, J.L. and Binder, J. 2006. A review of rapid methods for the analysis of mycotoxins. *Mycopathologia*. 161(5): 261-73.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



## ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ก

### อุปกรณ์และสูตรอาหารที่ใช้ในการทำโครงการพิเศษ

#### 1 จุลินทรีย์

ตารางที่ ก-1 สำหรับรายขนาดเล็ก

Samples	
Code	Description
G4	<i>Chlorella</i> G4
KS	<i>Chlorella</i> sp. KLSc59
SR	<i>Chlorella</i> sp. KLSc61

#### 2 สารเคมี

ตารางที่ ก-2 อาหารเลี้ยงเชื้อ TAP Media สำหรับ 1 L pH 7.0

สารเคมี	ปริมาณ (mL)
1M Tris Base	20
Phosphate Buffer II (สำหรับ 100 mL)	1
- ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต ( $K_2HPO_4$ )	10.8 กรัม
- โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $KH_2PO_4$ )	5.6 กรัม
Solution A (สำหรับ 500 mL)	10
- แอมโมเนียมคลอไรด์ ( $NH_4Cl$ )	20 กรัม
- แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไดไฮเดรต ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )	5 กรัม
- แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ( $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ )	2.5 กรัม
Hutner's trace elements	1
Glacial acetic acid	1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก-3 อาหารเลี้ยงเชื้อ TAP Agar สำหรับ 1 L pH 7.0

สารเคมี	ปริมาณ (mL)
1M Tris Base	20
Phosphate Buffer II (สำหรับ 100 mL)	1
- ไดโทแทสเซียมฟอสเฟส ( $K_2HPO_4$ )	10.8 g
- โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $KH_2PO_4$ )	5.6 g
Solution A (สำหรับ 500 mL)	10
- แอมโมเนียมคลอไรด์ ( $NH_4Cl$ )	20 g
- แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไดไฮเดรต ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )	5 g
- แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ( $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ )	2.5 g
Hutner's trace elements	1
Glacial acetic acid	1
Agar powder	15 g

### 2.3 น้ำกลั่น

### 2.4 สารละลายเอทานอล 99%

### 2.5 AGEs

200 mM K-PO4 buffer pH 7.2 (สำหรับ 500 mL)

$KH_2PO_4$  13.61 g

Solution A (สำหรับ 50 mL)

gelatin 0.1 g/ 25 ml

ribose 0.225 g/ 25 ml

Aminoguanidine 100 mg/ mL

### 2.6 ELISA

1X PBS pH 7.4 (สำหรับ 1 L)

Sodium chloride 8 g

Potassium chloride 0.2 g

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้ภายในเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Sodium phosphate dibasic 1.44 g

Potassium phosphate monobasic 0.245 g

Substrate buffer pH 5.0

Sol 1 : Citric acid 2.1 g/ 100 mL

Sol 2 :  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  7.16 g/ 200 mL

Washing buffer

1X PBS pH 7.4 (สำหรับ 1 L)

Sodium chloride 8 g

Potassium chloride 0.2 g

Sodium phosphate dibasic 1.44 g

Potassium phosphate monobasic 0.245 g

0.05% Tween 20 0.5 mL

0.5% hydrolyzed casein 0.1 g/ 20 mL

Anti-CML 1.27  $\mu\text{L}$ / 10 mL

Anti-CMA 16.23  $\mu\text{L}$ / 10 mL

5,000 folds dilution 2<sup>nd</sup> -antibody (IgG-HRP) 2.2  $\mu\text{L}$ / 11 mL

$\text{H}_2\text{O}_2$  6.6  $\mu\text{L}$ / 11 mL substrate

OPD  $\cdot$  2HCl 5.5 mg/ 11 mL substrate

$\text{H}_2\text{SO}_4$

2.7 อะซีโตน

### 3 อุปกรณ์และเครื่องมือ

#### 3.1 อุปกรณ์

1. ปีกเกอร์ ขนาด 100, 250, 600 และ 1,000 mL (Beaker)

2. ฟลาสก์ ขนาด 250 และ 500 mL (Flask)

3. กระจกบอขวด (Cylinder)

4. สำลี (Cotton)

5. ผ้าก๊อซ (Gauze)

6. หนังสติ๊ก (Rubber band)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ หากมีข้อสงสัยหรือต้องการข้อมูลเพิ่มเติม กรุณาติดต่อเจ้าหน้าที่ของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 7.ฟอยล์อลูมิเนียม (Aluminium foil)
- 8.พาราฟิล์ม (Parafilm)
- 9.หลอดทดลอง (Test tube)
- 10.จานเพาะเชื้อ (Petri dish)
- 11.เข็มเย็บเชื้อปลายกลม (Loop)
- 12.ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol lamp)
- 13.ชุดย้อมสีแกรม (Gram Stain set)
- 14.ไมโครปิเปตต์ (Micropipettes)
- 15.ไมโครปิเปตต์แบบหลายช่อง (Multichannel micropipettes)
- 16.ปิเปตทิป (Pipette tip)
- 17.สไลด์นับเซลล์ (Hemocytometer)
- 18.คิวเวทท์พลาสติก (Plastic cuvette)
- 19.หลอดเซนติฟิวจ์พลาสติก ขนาด 50 mL (Centrifuge tube)
- 20.หลอดไมโครเซนติฟิวจ์ (Micro centrifuge tube)
- 21.กระบอกฉีดยาพลาสติก (Plastic syringe)
- 22.ตัวกรองสารละลาย 0.45  $\mu\text{m}$  (Syringe Filter Sterile)
- 23.ไมโครเพลท (96-well plate)
- 24.เพลทสำหรับเทคนิค ELISA (ELISA plate)
- 25.คอลัมน์แก้ว (Glass Chromatography column)
26. Diaion HP-20 (Supelco code 13606)

### 3.2 เครื่องมือ

- 1.เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Mettler toledo)
- 2.กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light Microscope)
- 3.เครื่องวัดค่าพีเอช (pH Meter)
- 4.หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)
- 5.ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar)
- 6.ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)

### 7. เครื่องเขย่า (Shaker)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์หรือการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ **8. เครื่องวัดความเข้มของแสง (Spectrophotometer)** ถ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

9. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)
10. เครื่องปั่นเหวี่ยงสารละลายปริมาณน้อย (Microcentrifuge)
11. เครื่องแยกเซลล์ (Sonicator)
12. ตู้เย็น (Refrigerator)
13. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)
14. เครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ (Microplate reader)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ข

### การคำนวณปริมาณเซลล์สำหรับ

$$C1V1=C2V2$$

C1= จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตที่นับได้จากเครื่อง หน่วย cell/ml หรือ cell/ $\mu$ l

C2=จำนวนเซลล์ที่เราต้องการที่การ คือ 20,000 cell/ml

V1=ปริมาตรที่จะต้องดูออกมาจากจำนวนเซลล์ตั้งต้น หน่วย ml หรือ  $\mu$ l

V2= ปริมาตรสุดท้ายที่เราจะต้องการทั้งหมด หน่วย ml หรือ  $\mu$ l



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ค

### การทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA

การทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ IBM SPSS Statistics version 26 วิเคราะห์ผลความแปรปรวนทางสถิติของการทดสอบฤทธิ์การยับยั้ง CML และ CMA โดยใช้สารสกัดจาก *Chlorella* spp. ( เทคนิค Elisa ) ด้วย One-way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยความแตกต่างของข้อมูลด้วยวิธี Duncan's multiple range test

**ตารางที่ ค-1** การทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของการทดสอบฤทธิ์การยับยั้ง CML โดยใช้สารสกัดจาก *Chlorella* spp. 3 สปีชีส์ คือ *Chlorella* G4 ( Code: G4 ), *Chlorella* sp. KLS59 ( Code: KS ) และ *Chlorella* sp. KLS61 ( Code: SR ) สกัดที่ความเข้มข้นเอทานอล 30% และ 60% โดยใช้การทดสอบ ELISA

Duncan <sup>a</sup>		Subset for alpha = 0.05			
conditio	N	1	2	3	4
Dw0	3	.08800			
G4 30%	3		.57867		
SR30%	3		.59333	.59333	
KS30%	3		.60067	.60067	
KS60%	3		.60300	.60300	
Dw7	3		.60700	.60700	.60700
G4 60%	3		.61433	.61433	.61433
AG1mg	3		.61733	.61733	.61733
AG10mg	3			.63833	.63833
SR60%	3				.65367
Sig.		1.000	.125	.076	.060

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค-2 การทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของการทดสอบฤทธิ์การยับยั้ง CMA โดยใช้สารสกัดจาก *Chlorella* G4 ( Code: G4 ) ที่ตัวทำละลายความเข้มข้นต่างๆ หลังจากแยกคอลัมน์ โดยใช้การทดสอบ ELISA

Duncan<sup>a</sup>

Condition	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
Dw0	3	.09600				
AG10mg	3		.50033			
Eth25%	3		.56300			
Eth75%	3			.68233		
Eth100%	3			.71933	.71933	
Dw7	3			.72967	.72967	
AG1mg	3			.74667	.74667	
Acetone	3				.77000	
Water	3				.78167	
Eth50%	3					.88133
Sig.		1.000	.061	.074	.089	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค-3 การทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของการทดสอบฤทธิ์การยับยั้ง CML โดยใช้สารสกัดจาก *Chlorella* G4 ( Code: G4 ) ที่ตัวทำละลายความเข้มข้นต่างๆ หลังจากแยกคอลัมน์ โดยใช้การทดสอบ ELISA

Duncan<sup>a</sup>

Condition	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
Dw0	3	.0903333			
Eth100%	3		.8136667		
Eth25%	3		.8516667		
Water	3		.8806667	.8806667	
Eth75%	3		.8823333	.8823333	
AG 1 mg	3		.8956667	.8956667	.8956667
Dw7	3		.9150000	.9150000	.9150000
Eth50%	3		.9200000	.9200000	.9200000
AG 10 mg	3			.9820000	.9820000
Acetone	3				1.0026667
Sig.		1.000	.070	.080	.062

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ง

### จำนวนเซลล์และค่าการดูดกลืนแสงวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง

ตารางที่ ง-1 ตารางจำนวนเซลล์ของสาหร่าย *Chlorella* G4 ( Code: G4 ), *Chlorella* sp. KLSc59 ( Code: KS ) และ *Chlorella* sp. KLSc61 ( Code: SR ) การเพาะเลี้ยงวันที่ 5 ก่อนนำไปเก็บเกี่ยว

	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	เฉลี่ย
สำหรับ SR 30% เอทานอล	167.00	158.00	145.00	156.67
สำหรับ SR 60% เอทานอล	161.00	155.00	158.00	158.00
สำหรับ KS 30% เอทานอล	147.00	149.00	162.00	152.67
สำหรับ KS 60% เอทานอล	154.00	151.00	143.00	149.33
สำหรับ G4 30% เอทานอล	176.00	171.00	169.00	172.00
สำหรับ G4 60% เอทานอล	167.00	175.00	179.00	173.67

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง-2 ตารางค่าการดูดกลืนแสงของสาหร่าย *Chlorella* G4 ( Code: G4 ), *Chlorella* sp. KLSc59 ( Code: KS ) และ *Chlorella* sp. KLSc61 ( Code: SR ) การเพาะเลี้ยงวันที่ 5 ก่อนนำไปเก็บเกี่ยว

สาหร่าย 3 สปีชีส์	ค่าการดูดกลืนแสง (OD750)
สำหรับ SR 30% เอทานอล	0.413
สำหรับ SR 60% เอทานอล	0.410
สำหรับ KS 30% เอทานอล	0.386
สำหรับ KS 60% เอทานอล	0.383
สำหรับ G4 30% เอทานอล	0.344
สำหรับ G4 60% เอทานอล	0.313

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก จ

### ตารางผลการทดลอง

ตารางที่ จ-1 แสดงผลการวัดค่า OD ของการทดสอบฤทธิ์การยับยั้ง CML โดยใช้สารสกัดจาก *Chlorella* G4 ( Code: G4 ), *Chlorella* sp. KLSc59 ( Code: KS ) และ *Chlorella* sp. KLSc61 ( Code: SR ) สกัดที่ความเข้มข้นเอทานอล 30% และ 60% ก่อนการแยกคอลัมน์ โดยใช้การทดสอบ ELISA ทดลอง 3 ซ้ำ

	Dw0	Dw7	AG 10 mg	AG 1 mg	SR 30%	SR 60%	KS 30%	KS 60%	G4 30%	G4 60%
CML	0.091	0.596	0.642	0.622	0.603	0.575	0.599	0.591	0.647	0.576
	0.092	0.616	0.641	0.616	0.634	0.601	0.638	0.594	0.604	0.565
	0.081	0.609	0.632	0.614	0.724	0.604	0.572	0.617	0.592	0.595

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ-2 แสดงค่า OD เฉลี่ย และ เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง CML ของสาหร่ายสีเขียว 3 สปีชีส์ คือ *Chlorella* G4 ( Code: G4 ), *Chlorella* sp. KLSc59 ( Code: KS )และ *Chlorella* sp. KLSc61 ( Code: SR ) สกัดที่ความเข้มข้นเอทานอล 30% และ 60% โดยใช้การทดสอบ ELISA วัดค่า OD ที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร

	CML	
	ค่า OD เฉลี่ย	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง
Dw0	0.088	0%
Dw7	0.607	100%
AG 10 mg	0.638	105%
AG 1 mg	0.617	102%
SR 30%	0.654	108%
SR 60%	0.593	98%
KS 30%	0.603	99%
KS 60%	0.601	99%
G4 30%	0.614	101%
G4 60%	0.579	95%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ-3 แสดงผลการวัดค่า OD ของการทดสอบฤทธิ์การยับยั้ง CML และ CMA โดยใช้สารสกัด จาก *Chlorella G4* ( Code: G4 ) ที่ตัวทำละลายความเข้มข้นต่าง หลังการแยกคอลัมน์ โดยใช้การ ทดสอบ ELISA ทดลอง 3 ซ้ำ

	Dw0	Dw7	AG 10 mg	AG 1 mg	น้ำกลั่น	Eth 25%	Eth 50%	Eth 75%	Eth 100%	Acetone
CMA	0.096	0.704	0.537	0.720	0.817	0.519	0.933	0.658	0.752	0.780
	0.096	0.752	0.476	0.746	0.728	0.514	0.856	0.691	0.681	0.766
	0.096	0.733	0.488	0.774	0.800	0.656	0.855	0.698	0.725	0.764
CML	0.090	0.870	0.986	0.835	0.952	0.890	0.891	0.939	0.891	0.971
	0.084	0.906	0.935	0.921	0.837	0.887	0.949	0.780	0.703	0.980
	0.097	0.969	1.025	0.931	0.853	0.778	0.920	0.928	0.847	1.057

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ-4 แสดงค่า OD เฉลี่ย และ เปอร์เซ็นการยับยั้ง CMA และ CML ของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* G4 ( Code: G4 ) ที่ตัวทำละลายความเข้มข้นต่างๆ โดยใช้การทดสอบ ELISA วัดค่า OD ที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร

	CMA		CML	
	ค่า OD เฉลี่ย	เปอร์เซ็นการยับยั้ง	ค่า OD เฉลี่ย	เปอร์เซ็นการยับยั้ง
Dw0	0.096	0%	0.090	0%
Dw7	0.730	100%	0.915	100%
AG 10 mg	0.500	69%	0.982	107%
AG 1 mg	0.747	102%	0.896	98%
น้ำกลั่น	0.782	107%	0.881	96%
Eth 25%	0.563	77%	0.852	93%
Eth 50%	0.881	121%	0.920	101%
Eth 75%	0.682	94%	0.882	96%
Eth 100%	0.719	99%	0.814	89%
Acetone	0.770	106%	1.003	110%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

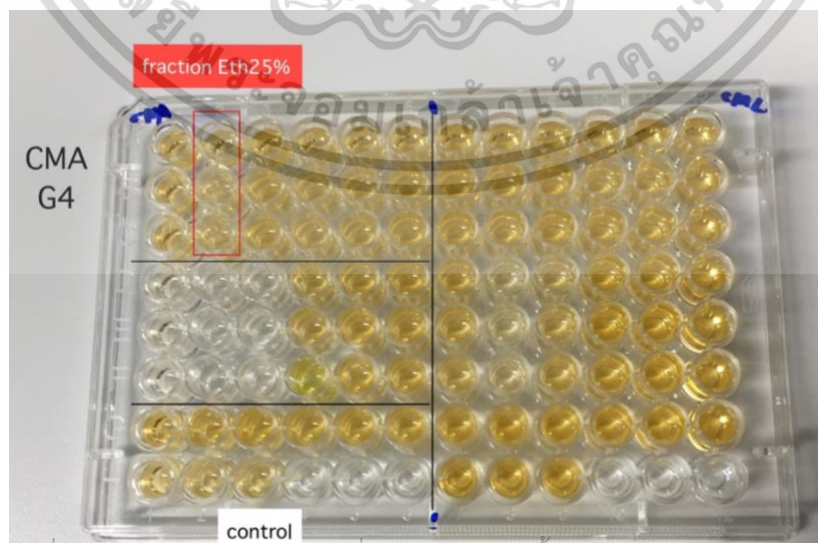
## ภาคผนวก ฉ

### ผลการทดลองหลัก ELISA

รูปที่ ฉ-1 ตรวจสอบฤทธิ์การยับยั้ง CML โดยใช้สารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella* spp. 3 ชนิด ด้วยเทคนิค ELISA (สีของปฏิกิริยาการตรวจจับ CML)

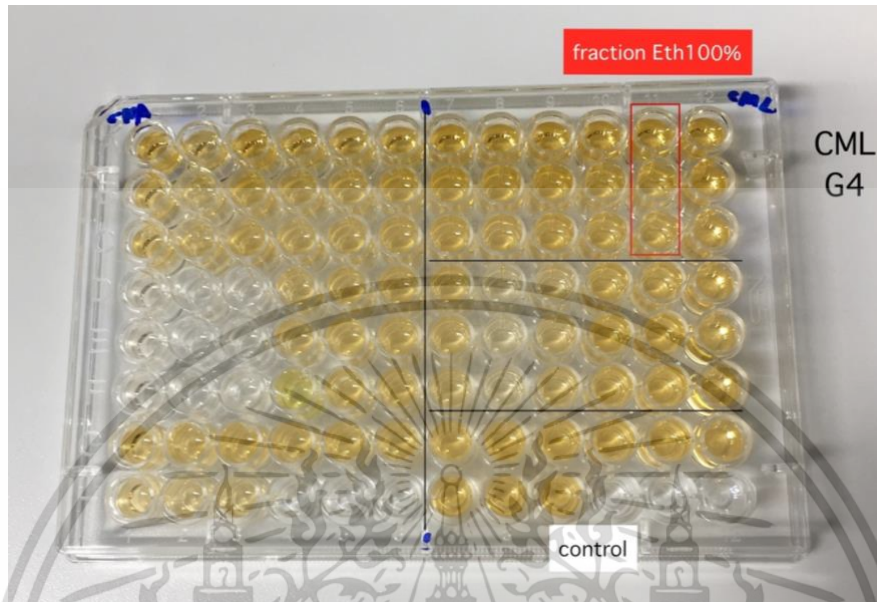


รูปที่ ฉ-2 ตรวจสอบฤทธิ์การยับยั้ง CMA โดยใช้สารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella* G4 ด้วยเทคนิค ELISA (สีของปฏิกิริยาการตรวจจับ CMA)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ ๓-3 ตรวจสอบฤทธิ์การยับยั้ง CML โดยใช้สารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella* G4 ด้วยเทคนิค ELISA (สีของปฏิกิริยาการตรวจจับ CML)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ข

### น้ำหนักสารสกัด

ตารางที่ ข-1 น้ำหนักสารสกัดจาก *Chlorella* G4 ( Code: G4 ) ที่ความเข้มข้นตัวทำละลายต่างๆ หลังการแยกคอลัมน์

ตัวอย่าง	ก่อน Evap (g) หลอดเปล่า	หลัง Evap (g)	น้ำหนักของสารสกัด (g)
น้ำกลั่น	0.9108	1.9007	0.9899
เอทานอล 25%	0.9152	1.6903	0.7751
เอทานอล 50%	0.9184	1.8125	0.8941
เอทานอล 75%	0.9149	1.7882	0.8733
เอทานอล 100%	0.9225	1.6290	0.7065
Acetone	0.9155	1.1849	0.2694

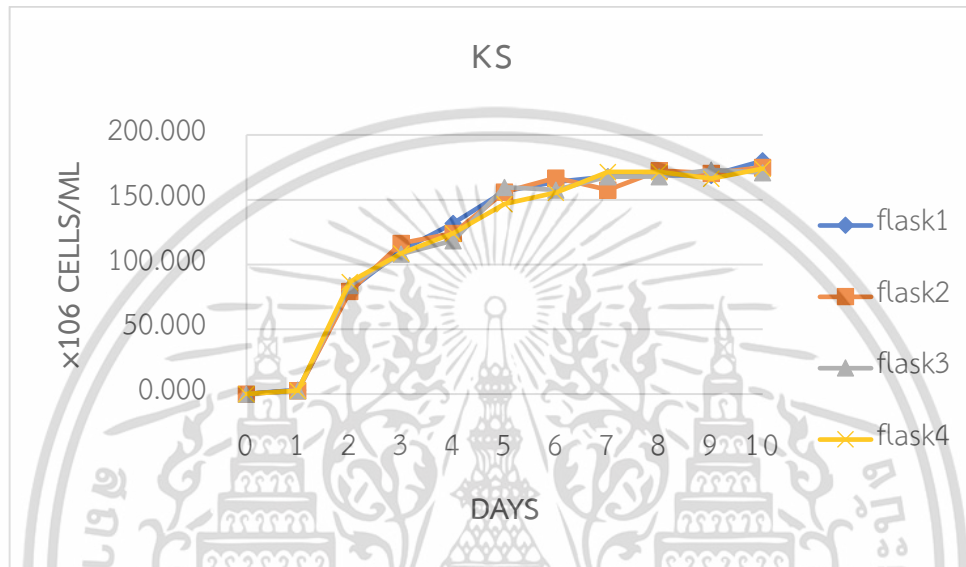
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ข

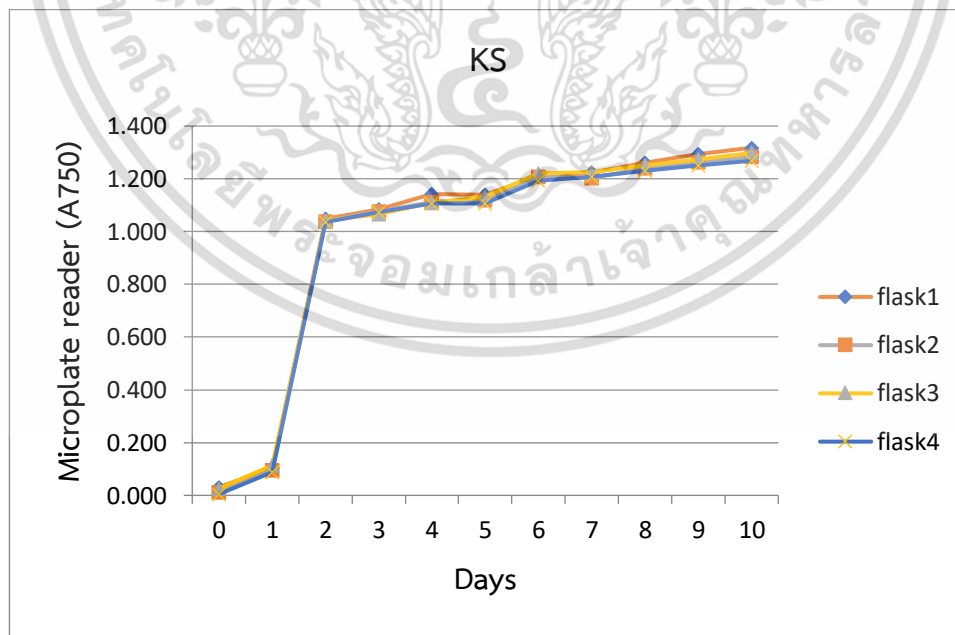
### Growth curve

รูปที่ ข-1 กราฟการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Chlorella* sp. KLSc59 ( Code: KS ) ( a - จำนวนเซลล์ และ b - วัดค่าการดูดกลืนแสง ( $A_{750}$ ) ) ในช่วง 0 วัน ถึง 10 วัน

(a)



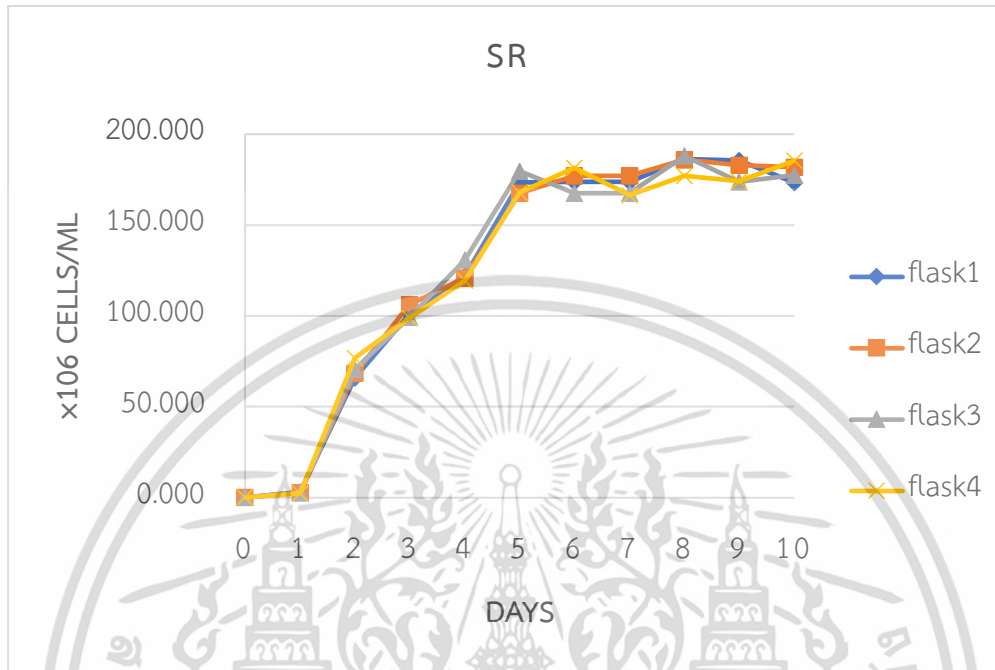
(b)



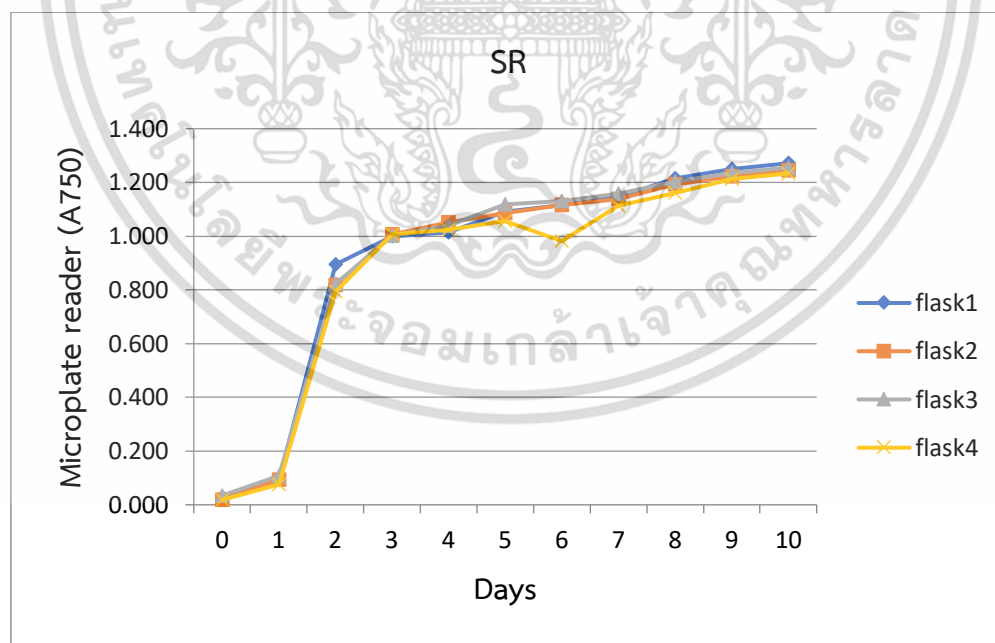
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ ข-2 กราฟการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Chlorella* sp. KLSc61 ( Code: SR ) ( a - จำนวนเซลล์ และ b - วัดค่าการดูดกลืนแสง ( $A_{750}$ ) ) ในช่วง 0 วัน ถึง 10 วัน

(a)



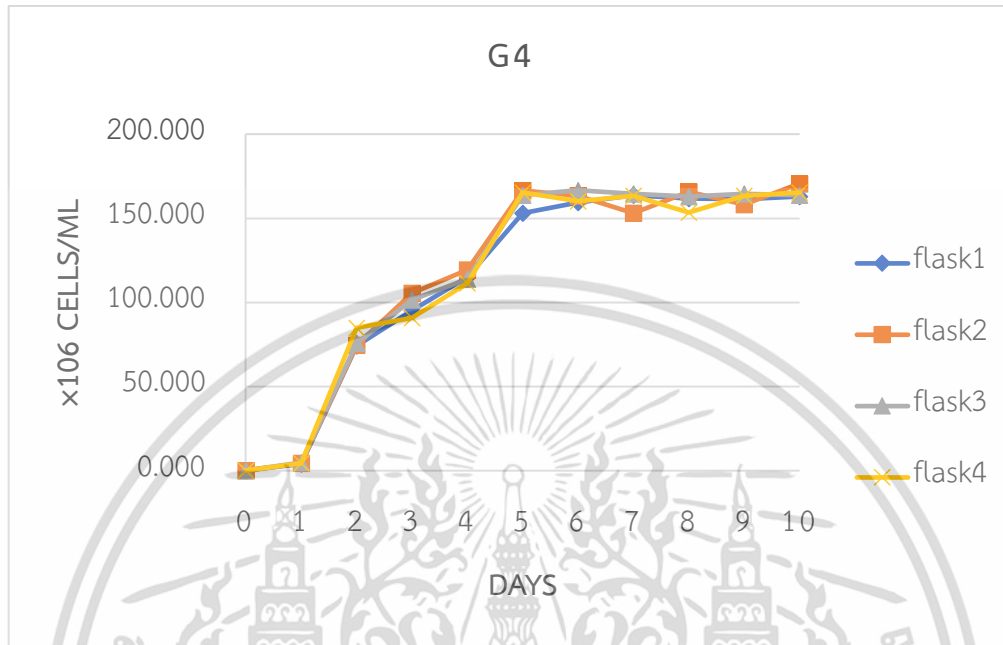
(b)



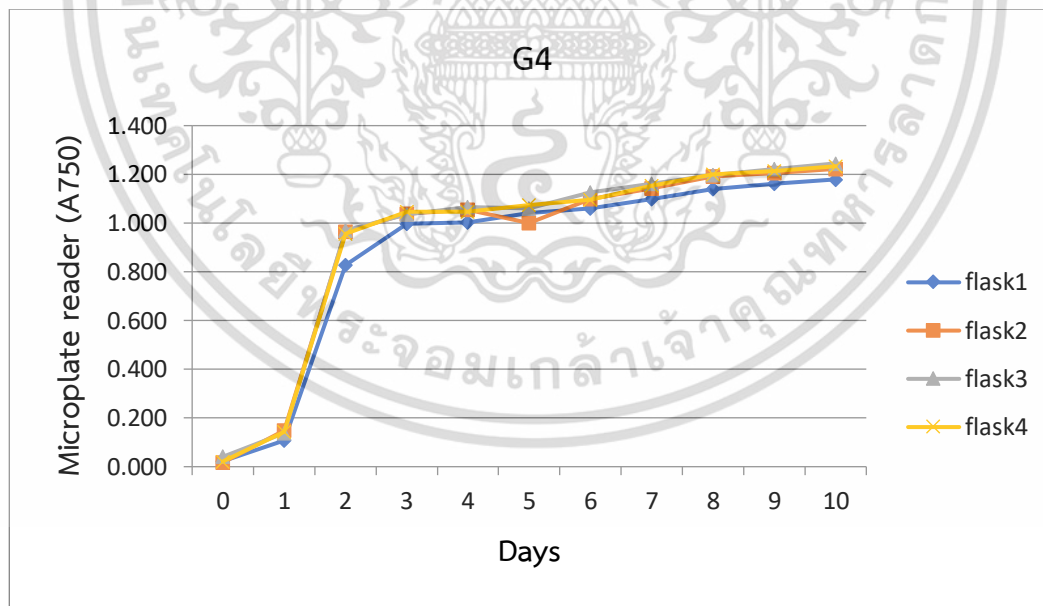
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ ข-3 กราฟการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Chlorella* G4 ( Code: G4 ) ( a - จำนวนเซลล์ และ b - วัดค่าการดูดกลืนแสง ( $A_{750}$ ) ) ในช่วง 0 วัน ถึง 10 วัน

(a)



(b)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



งานทะเบียนคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

คำรับรองเล่มโครงการพิเศษ / ปัญหาพิเศษ / สหกิจศึกษา

วันที่ 30 เดือน มิถุนายน พ.ศ. 2566

ข้าพเจ้า นางสาวธมลวรรณ นันทวุฒิพิลาศ รหัสนักศึกษา 62050601

นางสาวธัญชนก นาไชย รหัสนักศึกษา 62050602

นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชา จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ภาควิชา ชีววิทยา

ขอรับรองว่าโครงการพิเศษ เรื่อง

ชื่อภาษาไทย การศึกษาฤทธิ์การยับยั้ง NE - (carboxymethyl) lysine (CML) และ N $\omega$  - (carboxymethyl) arginine (CMA) โดยใช้สารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella* spp.

ชื่อภาษาอังกฤษ Inhibition NE - (carboxymethyl) lysine (CML) and N $\omega$  - (carboxymethyl) arginine (CMA) Formation by using *Chlorella* spp. crude extracts

ปีการศึกษา 2565

เป็นผลงานวิจัยที่ได้คัดลอกหรือละเมิดลิขสิทธิ์ของผู้อื่นและได้ผ่านการตรวจสอบความซ้ำซ้อนเรียบร้อยแล้ว และได้แนบเอกสารการตรวจสอบการลอกเลียนงานวรรณกรรมที่ตรวจสอบจากเล่มโครงการพิเศษ / ปัญหาพิเศษ / สหกิจศึกษาฉบับสมบูรณ์แล้ว

โปรแกรมอักขราวิสุทธิ์ 6.10%

ลงชื่อ.....ธมลวรรณ นันทวุฒิพิลาศ..... ลงชื่อ.....ธัญชนก นาไชย.....

(นางสาว ธมลวรรณ นันทวุฒิพิลาศ)

(นางสาว ธัญชนก นาไชย)

นักศึกษา

นักศึกษา

ข้าพเจ้า ผศ.ดร.วิภาวี เดชตติศักดิ์ อาจารย์ที่ปรึกษา โครงการพิเศษ ได้ตรวจสอบโครงการพิเศษของนักศึกษา

ข้างต้นแล้ว ขอรับรองว่าเป็นผลงานวิจัยของนักศึกษาจริงและมีเนื้อหาสมบูรณ์ จึงลงชื่อไว้เป็นหลักฐาน

ลงชื่อ.....[Signature].....

(ผศ.ดร.วิภาวี เดชตติศักดิ์)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้เผยแพร่หรือใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้