



KKU SCIENCE JOURNAL

Journal Home Page : <https://ph01.tci-thaijo.org/index.php/KKUSciJ>

Published by the Faculty of Science, Khon Kaen University, Thailand



การสกัดและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่ายทะเล ขนาดเล็ก *Tetraselmis gracilis* BIMS-PP017

Extraction and Antioxidant Activity of Bioactive Compounds from Marine Microalgae *Tetraselmis gracilis* BIMS-PP017

อภิญญา รุจาคม¹ สรภัทร ชูสุวรรณ¹ ปองชนก นวลนาถ¹ และ สุนทนต์ ชูลักษณ์^{1*}Apinya Rujakom¹, Sarunpat Chusuwan¹, Pongchanok Nualnat¹ and Sunthorn Chooluck^{1*}¹ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี 20131¹Department of Biochemistry, Faculty of Science, Burapha University, Chonburi, 20131, Thailand

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในสารสกัดจากสาหร่ายทะเลขนาดเล็ก *Tetraselmis gracilis* BIMS-PP017 โดยสกัดไขมันด้วยวิธี Bligh and Dyer สกัดสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยน้ำร้อน 95% เอทานอล และ ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล (2:1 v/v) จากนั้นตรวจสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin-Ciocalteu method พบปริมาณสารฟีนอลิกสูงสุดในสารสกัด ไดคลอโรมีเทน:เมทานอลส่วนตะกอน (29.69 mg GAE/gDW) ศึกษาปริมาณ ฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี Aluminum chloride colorimetric method พบปริมาณฟลาโวนอยด์รวมสูงสุดในสารสกัดน้ำร้อนส่วน ตะกอน (95.67 mg QE/gDW) จากนั้นทำการศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดทั้งหมดด้วยวิธี DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical) assay และ ABTS (2,2-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate)) assay พบสารสกัดเอทานอลส่วนใสโดยมี % inhibition สูงสุดอยู่ที่ $6.03 \pm 0.22\%$ และ $88.95 \pm 1.44\%$ ตามลำดับ เมื่อ ทดสอบด้วยวิธี Potassium ferricyanide reducing power assay พบว่าสารสกัดเอทานอลส่วนใสมีความสามารถในการ ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด คิดเป็นปริมาณเทียบเท่าวิตามินซีเข้มข้น $343 \pm 13.99 \mu\text{g/ml}$ การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford assay พบว่าในสารสกัดน้ำร้อนส่วนตะกอนมีปริมาณโปรตีนมากที่สุดคือ $68.83 \pm 1.49 \text{ mg BSA/gDW}$ และ วิเคราะห์ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยวิธี Dopachrome method สารสกัดจากสาหร่ายทะเลด้วย ไดคลอโรมีเทน: เมทานอล มี % inhibition สูงที่สุดคือ $38.77 \pm 0.90\%$ จะเห็นได้ว่าสาหร่ายทะเลขนาดเล็ก *T. gracilis* สามารถเป็นแหล่ง ของสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติและมีศักยภาพที่จะนำไปพัฒนาเป็นส่วนประกอบทางชีวภาพในเวชสำอางและ โภชนเภสัชได้

ABSTRACT

In this study, naturally occurring bioactive compounds from marine microalgae *Tetraselmis gracilis* BIMS-PP017 were investigated. The Bligh and Dyer method was used for lipid extraction. Crude extracts of *T. gracilis* were prepared using hot water, 95% ethyl alcohol and Dichloromethane/Methanol (2:1 v/v) as

*Corresponding Author, E-mail: sunthornc@buu.ac.th

extraction solvent. Analysis of total phenolic compounds was carried out using Folin-Ciocalteu method and flavonoids were quantified by aluminum chloride colorimetric method. Results indicated that *T. gracilis*'s Dichloromethane/Methanol hydrolysate (pellet) exhibited the highest polyphenolic content (29.69 mg GAE/gDW) whereas hot water extract (pellet) had the most flavonoid content (95.67 mg QE/gDW). Antioxidant capacity of all extracts was analyzed by DPPH assay, ABTS assay and Potassium ferricyanide reducing power assay. The results revealed that crude ethanol extract (supernatant) showed highest antioxidant activity with DPPH assay ($6.03 \pm 0.22\%$ inhibition) as well as ABTS assay ($88.95 \pm 1.44\%$ inhibition). The crude ethanol extract (supernatant) showed the highest reducing ability (Vitamin C equivalent = $343 \pm 13.99 \mu\text{g/ml}$). The anti-tyrosinase activity was also studied using Dopachrome method. The results suggested that Dichloromethane/Methanol extract possesses the highest inhibitory effect ($38.77 \pm 0.90\%$ inhibition). Results from this study suggested that *T. gracilis* could potentially be a valuable source for bio-ingredients for cosmeceutical and nutraceutical applications.

คำสำคัญ: สาหร่ายทะเลขนาดเล็ก สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

Keywords: Marine Microalgae, Bioactive Compound, Antioxidant Activity, Anti-Tyrosinase Activity

บทนำ

สาหร่ายขนาดเล็ก (Microalgae) มีความหลากหลายทางชีวภาพสูงและมีลักษณะเฉพาะ มีขนาดเล็กมากจนไม่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่า โดยสาหร่ายขนาดเล็กบางชนิดจัดอยู่ในรูปแบบของสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียว หลายเซลล์ เส้นใยหรือจุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์แสงได้ โดยกลุ่มของสาหร่ายยังเป็นผู้ผลิตรายใหญ่ที่สุดในโลกมากกว่าสองแสนสปีชีส์ มีปริมาณสารอาหารและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสูง สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้อย่างหลากหลาย ทั้งในทางเภสัชกรรม เชื้อเพลิงชีวภาพ การบำบัดน้ำเสีย อาหารสัตว์รวมถึงเวชสำอางอีกด้วย เนื่องจากความสามารถของสาหร่ายในการปรับตัวให้ดำรงชีวิตอยู่ได้แม้ในสภาพแวดล้อมที่รุนแรง เช่น อุณหภูมิ ความเค็ม แสง ความดันออสโมติกหรือสภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ ส่งผลให้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สาหร่ายผลิตขึ้นมาเพื่อตอบสนองต่อสภาวะแวดล้อมที่ดำรงชีวิตมีความหลากหลายและสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่างๆ ได้ เช่น กรดไขมัน แคโรทีนอยด์ วิตามิน แร่ธาตุ โพลีแซ็กคาไรด์ โปรตีน คาร์โบไฮเดรต สารต้านอนุมูลอิสระและรงควัตถุต่างๆ (Mavrommatis *et al.*, 2023) ในปัจจุบันมีการค้นพบสาหร่ายขนาดเล็กแล้วกว่า 40,000 ชนิด โดยจำแนกเป็นกลุ่มย่อยได้หลายกลุ่ม เช่น ไซยาโนแบคทีเรีย (Cyanobacteria) สาหร่ายสีเขียว (Green algae) ไดอะตอม (Diatoms) สาหร่ายสีเขียวแกมเหลือง (Yellow-green algae) สาหร่ายสีทอง (Golden algae) สาหร่ายสีแดง (Red algae) สาหร่ายสีน้ำตาล (Brown algae) สาหร่ายไดโนแฟลกเจลเลต (Dinoflagellates) และพืโคแพลงก์ตอน (Picoplankton) เป็นต้น (Khan *et al.*, 2018; Dolganyuk *et al.*, 2020) สาหร่ายขนาดเล็กมีสารเมแทบอไลต์หรือโมเลกุลของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญและเป็นประโยชน์ต่อผิวหนัง เช่น สารที่มีฤทธิ์ป้องกันการเกิดริ้วรอยก่อนวัย ซึ่งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมีหลายชนิด เช่น สารกลุ่มโพลีฟีนอล (Polyphenol) ฟลาโวนอยด์ (Flavonoid) แอนโทไซยานิน (Anthocyanin) ลูทีน (Lutein) และไบโอแอคทีฟเพปไทด์ (Bioactive peptide) เป็นต้น ล้วนเป็นสารประกอบที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพ หนึ่งในสาระสำคัญอย่างสารประกอบฟีนอลหลายชนิดมีฤทธิ์เป็นสารต้านออกซิเดชัน (Antioxidant) ยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันและเป็นสารต้านการกลายพันธุ์ (Anti-mutagen) มีสรรพคุณที่ดีต่อสุขภาพป้องกันโรคต่างๆ โดยเฉพาะโรคหัวใจขาดเลือดและมะเร็ง โดยสารประกอบฟีนอล จะทำหน้าที่กำจัดอนุมูลอิสระ (Free radical) และไอออนของโลหะที่สามารถเร่งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันและโมเลกุลอื่นได้ (Dolganyuk *et al.*, 2020)

สาหร่ายขนาดเล็กได้รับความนิยมเป็นอย่างมากในฐานะแหล่งพลังงานทดแทนที่ยั่งยืน อย่างไรก็ตามการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพจากมวลชีวภาพของสาหร่ายขนาดเล็กประกอบด้วยหลายขั้นตอน เนื่องจากสาหร่ายมีความหลากหลายทางชีวภาพสูง เมื่อไม่นานมานี้ได้มีการค้นคว้าและวิจัยเพื่อพัฒนาศักยภาพของสาหร่ายทะเลขนาดเล็กสำหรับการเป็นแหล่งพลังงานทางเลือกโดยมีการคัดเลือกสาหร่ายสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการสังเคราะห์แสง ผลิตไขมันและน้ำมันในปริมาณมากและทนทานต่อสภาวะแวดล้อมที่แปรปรวน มีการใช้เทคโนโลยีชีวภาพเพื่อปรับปรุงประสิทธิภาพการดูดซับสารอาหารโดยการควบคุมปัจจัยต่างๆ เช่น แสง อุณหภูมิ ธาตุอาหาร และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโตของสาหร่าย รวมถึงพัฒนาเทคนิคการดัดแปลงพันธุกรรมเพื่อเพิ่มปริมาณการผลิตไขมันและน้ำมันในเซลล์สาหร่ายนอกจากนี้ยังได้พัฒนาวิธีการสกัดน้ำมันจากสาหร่ายที่มีต้นทุนต่ำและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม (Sundaram *et al.*, 2023) อีกทั้งยังมีการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธีการสกัดไขมันสามวิธีที่แตกต่างกัน (อัลตราโซนิก Soxhlet และใช้ตัวทำละลาย) ในสาหร่ายขนาดเล็ก 2 ชนิด ได้แก่ *Chlorella* sp. และ *Spirulina* sp. จากการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธีการสกัดไขมันสามวิธีพบว่าวิธีการสกัดไขมันที่ได้เปอร์เซ็นต์น้ำมันสูงสุด คือ การอัลตราโซนิก โดย *Chlorella* sp. และ *Spirulina* sp. มีเปอร์เซ็นต์น้ำมันต่อน้ำหนักแห้งเป็น 9.4% และ 6.6% ตามลำดับ รองลงมาคือการสกัดโดยใช้ Soxhlet (3.5 และ 4.1% ตามลำดับ) ส่วนการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายได้ปริมาณไขมันน้อยมาก (2.7 และ 2.5% ตามลำดับ) โดยน้ำมันดิบที่ได้จากกระบวนการอัลตราโซนิกสามารถนำไปผ่านกระบวนการ Transesterification เป็นเวลา 5 ชั่วโมง โดยใช้เอนไซม์ไลเปส (Novozyme 435) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งไตรกลีเซอไรด์ที่สกัดได้จากสาหร่ายขนาดเล็กถูกเปลี่ยนเป็นกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์และกลีเซอรอล ดังนั้นการสกัดไขมันด้วยอัลตราโซนิกสามารถนำไปใช้ในกระบวนการผลิตไบโอดีเซลจากสาหร่ายทั้งสองชนิดได้ (Fattah *et al.*, 2020)

ปัจจุบันในอุตสาหกรรมเวชสำอาง สาหร่ายได้รับความนิยมอย่างมากเพราะสาหร่ายทะเลขนาดเล็กสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ภายใต้สภาวะแวดล้อมที่หลากหลาย ทำให้เป็นแหล่งที่สำคัญของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีโครงสร้างและคุณสมบัติแตกต่างจากที่พบในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ โดยมีรายงานว่าสาหร่ายขนาดเล็กมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลากหลายมากกว่าที่พบในพืชบกถึง 10 เท่า (Fu *et al.*, 2017; Thiyagarasaiyar *et al.*, 2020) เช่น กรดไขมัน วิตามิน รังควัตถุชนิดต่างๆ และสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์เป็นต้น นอกจากนี้สาหร่ายขนาดเล็กยังมีสารต้านอนุมูลอิสระในกลุ่ม Phlorotannin ที่มีโครงสร้างเป็นเอกลักษณ์แตกต่างจากสารในกลุ่มเดียวกันที่พบในพืชบก (Fu *et al.*, 2017) นอกจากนี้สาหร่ายทะเลขนาดเล็กยังสามารถผลิตสาร Primary metabolites ได้หลากหลาย เช่น กรดไขมันไม่อิ่มตัว โพลีแซ็กคาไรด์ วิตามินและกรดอะมิโนที่จำเป็นและยังมีผลการวิจัยชี้ให้เห็นว่า Secondary metabolites ที่ได้จากสาหร่ายขนาดเล็ก เช่น Fucoidan Fucoxanthin Sulphated polysaccharide Polyphenol และ Fecosterol มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ ต้านอนุมูลอิสระ ต้านการเจริญของเซลล์มะเร็ง ต้านเชื้อแบคทีเรียและต่อต้านริ้วรอย (Mavrommatis *et al.*, 2023)

จากที่ได้กล่าวไปข้างต้นแล้ว จะเห็นได้ว่าสาหร่ายเป็นสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อสภาพแวดล้อมของโลกและความเป็นอยู่ของมนุษย์ เป็นส่วนหนึ่งของห่วงโซ่อาหารในระบบนิเวศ ช่วยในการรักษาสมดุลทางธรรมชาติ สามารถสร้างสารบางชนิดที่มีประโยชน์ต่อมนุษย์ ซึ่งทางภาคตะวันออกของประเทศไทยนั้นมีภูมิประเทศอยู่ใกล้แหล่งน้ำซึ่งเป็นที่อยู่ของสาหร่ายทะเลขนาดเล็กมากมายหลายสายพันธุ์ และมีความน่าสนใจสำหรับการนำไปใช้งานด้านต่างๆ งานวิจัยนี้เป็นศึกษาวิธีการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ หาปริมาณและทดสอบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในสาหร่ายขนาดเล็กสายพันธุ์ *Tetraselmis gracilis* BIMS-PP0 17 ที่พบในแถบชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกของประเทศไทย ซึ่ง *T. gracilis* จัดเป็นสาหร่ายสีเขียวกลุ่มแพลงก์ตอนพืชในลำดับ Chlorodendrales มีคลอโรพลาสต์สีเขียว มักอาศัยอยู่บริเวณที่มีสภาพแวดล้อมหลากหลาย มีอาหารและแสงเพียงพอสำหรับใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสง เป็นสาหร่ายขนาดเล็กที่สามารถผลิตตรงควัตถุจำพวกแคโรทีนอยด์ได้ในปริมาณมากด้วยกระบวนการภายในเซลล์ของสาหร่ายและเป็นสายพันธุ์ที่นิยมนำมาใช้ประโยชน์ทางด้านการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อหาวิธีการ

สกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่ายทะเลขนาดเล็กที่มีประสิทธิภาพสูงสุดและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม รวมถึงวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *T. gracilis* เพื่อประเมินว่าสาหร่ายชนิดนี้มีศักยภาพและคุณสมบัติที่เหมาะสมเพียงพอสำหรับการพัฒนาไปใช้แทนสารเคมีในส่วนประกอบผลิตภัณฑ์เวชสำอาง ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร อาหารสัตว์ หรืออุตสาหกรรมยาได้อย่างมีประสิทธิภาพ

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. ตัวอย่างสาหร่ายทะเลขนาดเล็กที่ใช้ทดสอบ

สาหร่ายทะเลขนาดเล็กที่ใช้ทดสอบได้รับความอนุเคราะห์จาก Bangsaen Institute of Marine Science (BIMS) Microalgal Culture Collection โดย ดร.อมรรัตน์ กนกรุ่ง คือ สาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก *Tetraselmis gracilis* BIMS-PP017 ซึ่งทำการเก็บตัวอย่างระบุสายพันธุ์และเพาะเลี้ยงโดยสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

2. การเตรียมตัวอย่างสาหร่ายทะเลขนาดเล็ก

นำตัวอย่างสาหร่ายไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาบดให้ละเอียดก่อนนำไปชั่งน้ำหนัก

3. การเตรียมสารสกัดหยาบจากตัวอย่างสาหร่ายด้วยน้ำร้อนและเอทานอล โดยการดัดแปลงจากวิธีของ Choochote et al. (2014)

การเตรียมสารสกัดหยาบจากตัวอย่างสาหร่ายด้วยน้ำกลั่น นำตัวอย่างสาหร่าย 0.05 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปให้ความร้อนใน Water bath ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 9,500 xg อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใสแล้วนำตะกอนไปทำการสกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง นำส่วนใสมารวมกันแล้วนำไปเพิ่มความเข้มข้นของสารด้วยด้วยระบบ Centrifuge vacuum evaporation (SpeedVac-SC110: Savant) ให้ปริมาตรเหลือ 1 มิลลิลิตร (สารสกัดส่วนใส) และนำส่วนตะกอนที่เหลืออยู่มาเติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร เก็บไว้เพื่อทำการวิเคราะห์ (สารสกัดส่วนตะกอน)

การเตรียมสารสกัดหยาบจากสาหร่ายขนาดเล็กโดยใช้เอทานอล นำตัวอย่างสาหร่าย 0.05 กรัม มาเติม 95% (v/v) Ethanol ปริมาตร 3 มิลลิลิตร นำไปบ่มใน Shaking incubator 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้วนำไปใส่ในเครื่องอัลตราโซนิกเคเตอร์ (Ultrasonicator) เป็นเวลา 20 นาที โดยใช้ Amplitude 35% 500 W แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 9,500 xg อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใสแล้วนำตะกอนไปทำการสกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง นำส่วนใสมารวมกันแล้วนำไปเพิ่มความเข้มข้นของสารด้วยด้วยระบบ Centrifuge Vacuum Evaporation (SpeedVac-SC110: Savant) ให้ปริมาตรเหลือ 1 มิลลิลิตร (สารสกัดส่วนใส) และนำส่วนตะกอนที่เหลืออยู่มาเติม 95% (v/v) Ethanol 1 มิลลิลิตร เก็บไว้เพื่อทำการวิเคราะห์ (สารสกัดส่วนตะกอน)

4. การเตรียมสารสกัดหยาบจากสาหร่ายทะเลขนาดเล็กโดยใช้ Dichloromethane/Methanol โดยดัดแปลงจากวิธีของ Bligh and Dyer (1959) และ Ren et al. (2017)

นำตัวอย่างสาหร่าย 0.05 กรัม มาเติม Dichloromethane/Methanol (2:1 v/v) 7.5 มิลลิลิตร นำไปใส่ในเครื่องอัลตราโซนิกเคเตอร์เป็นเวลา 30 นาที โดยใช้ Amplitude 35% 500 W แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 9,500 xg อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใสขึ้นบน (Methanol) ใส่หลอดใหม่แล้วเติม 0.88% (w/v) Potassium chloride ปริมาตร 1.625 มิลลิลิตร ลงในส่วน Dichloromethane จากนั้นนำไป Vortex แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 9,500 xg อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำชั้น Dichloromethane ที่มีไขมันที่สกัดได้ชั้นล่างนำไปใส่ Aluminum foil ระบายให้แห้งแล้วทำการชั่งน้ำหนักไขมันแล้วละลายเก็บไว้ใน 95% (v/v) Ethanol 1 มิลลิลิตร (Bligh and

Dyer, 1959; Ren *et al.*, 2017) และนำส่วนตะกอนที่เหลืออยู่มาเติม Absolute methanol 1 มิลลิลิตร เก็บไว้เพื่อทำการวิเคราะห์ (สารสกัดส่วนตะกอน)

5. การสกัดไขมันจากสาหร่ายทะเลขนาดเล็กโดยวิธี Bligh and Dyer + UAE (Ultrasound-assisted Extraction)

ทำการสกัดไขมันจากสาหร่ายทะเลขนาดเล็กโดยการดัดแปลงมาจากวิธี Bligh and Dyer (1959) ซึ่งจะทำได้โดยนำตัวอย่างสาหร่าย 0.05 กรัม มาเติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร นำไปใส่เครื่องอัลตราโซนิเคเตอร์ เป็นเวลา 30 นาที โดยใช้ Amplitude 35% 500 W จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 9,500 xg 10 องศาเซลเซียส 10 นาที เก็บส่วนใสนำไปทำซ้ำอีก 2 ครั้ง แล้วนำส่วนใสมารวมกันแล้วเติม Chloroform/Ethanol (2:1 v/v) ปริมาตร 6 มิลลิลิตร นำไปคนด้วยเครื่องกวนสาร 5 นาที แล้วเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) อิ่มตัวปริมาตร 200 ไมโครลิตร บน stirrer อีก 10 นาที หลังจากนั้นตั้งทิ้งไว้ 30 นาที เพื่อให้สารละลายแยกชั้น แล้วเก็บชั้นที่เป็น Chloroform มาใส่หลอดใหม่ทำการระเหยสารสกัดให้แห้งแล้วละลายสารสกัดด้วย 95% (v/v) Ethanol 1 มิลลิลิตร และนำส่วนตะกอนที่เหลืออยู่มาเติม 95% (v/v) Ethanol 1 มิลลิลิตร เก็บไว้เพื่อทำการวิเคราะห์ (สารสกัดส่วนตะกอน)

6. การทดสอบหาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (Anti-tyrosinase Activity) (Ji *et al.*, 2021)

นำสารละลายตัวอย่างที่สกัดปริมาตร 200 ไมโครลิตร เติมสารละลาย 0.1 M Potassium phosphate buffer (pH 6.8) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมกับเอนไซม์ Mushroom tyrosinase (0.1 units/ml) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืด 10 นาที แล้วเติม L- 3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) (1 mg/ml) ในสารละลาย 0.1 M Potassium phosphate buffer (pH 6.8) เป็น Substrate ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืด 10 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 475 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปวิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของวิตามินซี แสดงในค่าความเข้มข้น ไมโครกรัมสมมูลของวิตามินซี (Vitamin C equivalent: VCE) และนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหา % inhibition ดังสมการ

$$\% \text{ inhibition} = \frac{(A - B) - (C - D)}{(A - B)} \times 100$$

A = ค่าการดูดกลืนแสงของหลอดที่มีเอนไซม์ไทโรซิเนสและไม่เติมสารสกัดจากสาหร่าย

B = ค่าการดูดกลืนแสงของหลอดควบคุม (0.1 M Potassium phosphate buffer pH 6.8)

C = ค่าการดูดกลืนแสงของหลอดที่มีเอนไซม์ไทโรซิเนสและสารสกัดจากสาหร่าย

D = ค่าการดูดกลืนแสงของหลอดที่มีสารสกัดจากสาหร่ายและไม่เติมเอนไซม์ไทโรซิเนส

7. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Determination of Total phenolic content) ตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Singleton *et al.* (1999)

นำสารละลายตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 1,580 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลาย Folin-Cioncalteu's reagent ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที แล้วเติม 20% (w/v) Sodium carbonate ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ตั้งในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง 60 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร และใช้กรดแกลลิก (GA) เป็นสารละลายมาตรฐาน (Singleton *et al.*, 1999) นำไปคำนวณหาปริมาณโพลีฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัด โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานกรดแกลลิกในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารตัวอย่าง (mg GAE/g)

คำนวณปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมดจากสมการ $C = cV/g$

เมื่อ C = ปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมด (mg GAE/g)
 c = ความเข้มข้นของกรดแกลลิกที่เทียบจากกราฟมาตรฐาน (mg/ml)
 V = ปริมาตรของสารสกัด (ml)
 g = น้ำหนักแห้งของสาหร่าย (กรัม)

8. การวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ (Determination of Total flavonoid content) ตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Chandra *et al.* (2014) และ Ordonez *et al.* (2006)

โดยนำสารละลายตัวอย่างปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 500 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่น 2% (w/v) Aluminum chloride 600 ไมโครลิตร บ่มสารในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง 60 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร (ONILAB: SP-UV1100) โดยเติมน้ำกลั่นแทนสารละลายตัวอย่างเพื่อใช้เป็นหลอดเปรียบเทียบ (blank) และใช้เคอควิทิน (Quercetin) ที่ความเข้มข้น 0 25 50 100 200 และ 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นสารมาตรฐานทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วนำไปคำนวณหาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ในสารสกัด โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานเคอควิทิน ในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของเคอควิทินต่อกรัมของสารตัวอย่าง (mg QE/g) (Chandra *et al.*, 2014; Ordonez *et al.*, 2006)

คำนวณปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดจากสมการ $C = cV/g$

เมื่อ C = ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (mg QE/g)
 c = ความเข้มข้นของเคอควิทินที่เทียบจากกราฟมาตรฐาน (mg/ml)
 V = ปริมาตรของสารสกัด (ml)
 g = น้ำหนักแห้งของสาหร่าย (กรัม)

9. การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS decolorization scavenging effect assay

เตรียมสารละลาย ABTS โดยเตรียมสารละลายโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต ($K_2S_2O_8$) ความเข้มข้น 2.45 มิลลิโมลาร์ ละลายในน้ำกลั่นผสมกับ ABTS ความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ ละลายในน้ำกลั่นด้วยอัตราส่วน 1:1 เก็บในที่มืดอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จะได้สารละลาย ABTS ก่อนนำไปใช้ต้องเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร เท่ากับ 0.70 ± 0.02 วิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ โดยเติมสารสกัด 50 ไมโครลิตร ในน้ำกลั่น 200 ไมโครลิตร แล้วเติม ABTS 1,500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร โดยใช้เอทานอล เป็น blank นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ ไปวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของวิตามินซี (0 4 8 12 16 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) แสดงในค่าความเข้มข้น ไมโครกรัมสมมูลของวิตามินซี (Vitamin C equivalent: VCE) และนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหา % inhibition ดังสมการ (Payet *et al.*, 2005)

จากสมการ $ABTS^{++} + AH \text{ (antioxidant)} \rightarrow ABTS \text{ (สีจางลง)} + A^{\cdot}$

คำนวณเป็น % inhibition = $[(A - B/A)] \times 100$

โดยที่ A = ค่าการดูดกลืนแสงของ $ABTS^{++}$
 B = ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างที่ทำปฏิกิริยากับ $ABTS^{++}$

10. การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay

โดยการเตรียมสารละลาย 2,2- diphenyl-1-picryl-hydrazyl radical (DPPH) ในเอทานอลความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ เก็บในที่มืด จากนั้นนำสารละลายตัวอย่าง 50 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายเอทานอลปริมาตร 950 ไมโครลิตร

แล้วเติมสารละลาย DPPH ที่ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืด 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยใช้เอทานอลเป็น blank และใช้วิตามินซีที่ความเข้มข้น 0 2 4 6 8 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นสารมาตรฐานแสดงในค่าความเข้มข้นไมโครกรัมสมมูลของวิตามินซี จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (Blois, 1958)

$$\text{คำนวณเป็น DPPH radical scavenging capacity (\%)} = [A_0 - (A_1 - A_2) / A_0] \times 100\%$$

โดยที่ A_0 คือ ค่าการดูดกลืนแสงของหลอดควบคุมของที่เติม DPPH และเอทานอล

A_1 คือ ค่าการดูดกลืนแสงของหลอดที่มีสารสกัดจากสาหร่ายและเติม DPPH

A_2 คือ ค่าการดูดกลืนแสงของหลอดที่มีสารสกัดจากสาหร่ายและเอทานอลโดยไม่มี DPPH

11. การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Potassium ferricyanide reducing power assay

เป็นการศึกษาความสามารถในการรีดิวซ์หรือให้อิเล็กตรอนของสารสกัด โดยอาศัยจากการวัดปฏิกิริยา Reduction ของเฟอโรไซยาไนด์ ($\text{Fe}^{3+}(\text{CN})_6$) ที่มีสีเหลืองไปเป็นเฟอโรไซยาไนด์ ($\text{Fe}^{2+}(\text{CN})_6$) สารละลายจะมีสีน้ำเงินที่เข้มข้นและทำการตรวจหาปริมาณของเฟอโรไซยาไนด์ ($\text{Fe}^{2+}(\text{CN})_6$) ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยารีดิวซ์ของเฟอริก-เฟอร์รัส (Prussian blue) โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร วิเคราะห์โดยนำสารสกัดตัวอย่างปริมาตร 40 ไมโครลิตร เติม Phosphate buffer ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ (pH 6.6) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วเติม 1% (w/v) $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไป Vortex แล้วเอาไปบ่มที่ 50 องศาเซลเซียส 20 นาที จากนั้นนำมาผสมด้วย 10% (w/v) TCA นำไปปั่นเหวี่ยง 95.3 xg เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนบนมา 500 ไมโครลิตร แล้วเติมน้ำกลั่น 500 ไมโครลิตร จากนั้นเติม 1% (w/v) FeCl_3 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร โดยใช้วิตามินซีเป็นสารมาตรฐาน (El Jemli *et al.*, 2016)

12. การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

ในการวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพแต่ละวิธีทดสอบจะทำการวิเคราะห์โดยการทำซ้ำ 3 ครั้ง (Triplicate) แสดงข้อมูลในรูปแบบ ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงมาตรฐาน (Mean $\pm$ SD, $n = 3$) และวิเคราะห์ความแปรปรวนโดยใช้ One-way ANOVA เพื่อดูความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยอย่างมีนัยสำคัญและใช้ Duncan's multiple range test (DMRT) เพื่อหาความแตกต่างที่สำคัญระหว่างค่าเฉลี่ย โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS (Statistical Package for the Social Sciences เวอร์ชัน 26) ตั้งค่าความสำคัญทางสถิติที่ $p \leq 0.05$

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

1. การสกัดไขมันจากสาหร่ายทะเลขนาดเล็ก

เมื่อทำการสกัดไขมันจากสาหร่ายทะเลขนาดเล็กด้วยวิธีของ Bligh and Dyer และวิธีที่ดัดแปลง โดยใช้สารสกัดส่วนใส ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ปริมาณไขมันรวมของสาหร่ายขนาดเล็ก

<i>Tetraselmis gracilis</i> BIMS-PP017	ปริมาณไขมัน (กรัม)	ปริมาณไขมันรวมต่อสาหร่าย 1 กรัม (กรัม)
Chloroform/Ethanol	0.0053	0.106
Dichloromethane/Methanol	0.0216	0.432

2. การวิเคราะห์ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (Anti-tyrosinase Activity)

ทำการวิเคราะห์ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในสารสกัดสาหร่ายทะเลขนาดเล็ก ผลการวิเคราะห์แสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส จากสารสกัด Dichloromethane ส่วนใสของสาหร่ายทะเลขนาดเล็ก

<i>Tetraselmis gracilis</i> BIMS-PP017	A ₄₇₅	Vitamin C equivalent (µg/ml)	%inhibition
สารสกัดส่วนใส Dichloromethane	0.282±0.004	133.73±3.12	38.77±0.90

3. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content)

จากการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดสาหร่ายทะเลขนาดเล็ก ผลการวิเคราะห์แสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดสาหร่ายทะเลขนาดเล็ก

<i>Tetraselmis gracilis</i> BIMS-PP017	ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (mg GAE/g dry weight)	
สารสกัดน้ำร้อน	ส่วนใส	3.94±0.09 ^d
	ส่วนตะกอน	18.71±0.87 ^s
สารสกัดเอทานอล	ส่วนใส	4.22±0.26 ^e
	ส่วนตะกอน	3.29±0.12 ^c
สารสกัด Chloroform/Ethanol	ส่วนใส	2.23±0.38 ^a
	ส่วนตะกอน	3.23±0.12 ^b
สารสกัด Dichloromethane/Methanol	ส่วนใส	11.78±0.25 ^f
	ส่วนตะกอน	29.69±0.49 ^h

^{a-h} ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n = 3) ที่มีตัวอักษรพิมพ์เล็ก a-h ที่ต่างกัน แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p \leq 0.05$ โดยใช้ one-way ANOVA และ Duncan's multiple range test (DMRT)

ผลจากการตรวจสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของสารตัวอย่างที่สกัดด้วยวิธีต่างๆ พบว่าสารสกัด Dichloromethane/Methanol ส่วนตะกอนมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากที่สุด โดยมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเป็น 29.69 mg GAE/g dry weight

4. การวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ (Total flavonoid content)

จากการวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในสารสกัดสาหร่ายทะเลขนาดเล็ก ผลการวิเคราะห์แสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ในสารสกัดสาหร่ายทะเลขนาดเล็ก

<i>Tetraselmis gracilis</i> BIMS-PP017	ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (mg QE/g dry weight)	
สารสกัดน้ำร้อน	ส่วนใส	1.61±0.02 ^a
	ส่วนตะกอน	95.67±1.14 ^h
สารสกัดเอทานอล	ส่วนใส	30.44±0.63 ^d
	ส่วนตะกอน	6.07±0.47 ^c
สารสกัด Chloroform/Ethanol	ส่วนใส	3.70±0.17 ^b
	ส่วนตะกอน	45.00±1.51 ^e
สารสกัด Dichloromethane/Methanol	ส่วนใส	45.27±1.61 ^f
	ส่วนตะกอน	58.71±2.12 ^g

^{a-h} ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n = 3) ที่มีตัวอักษรพิมพ์เล็ก a-h ที่ต่างกัน แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p \leq 0.05$ โดยใช้ one-way ANOVA และ Duncan's multiple range test (DMRT)

จากการทดสอบหาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ของสาหร่ายทะเลขนาดเล็ก จะเห็นได้ว่าสารสกัดน้ำร้อนส่วนตะกอน มีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์สูงสุด 95.67 mg QE/g dry weight

5. การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

5.1 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดของสาหร่ายทะเลขนาดเล็ก พบว่าสารสกัดเอทานอลส่วนใสมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงสุด 6.03% ผลการวิเคราะห์แสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay ของสารสกัดสาหร่ายทะเลขนาดเล็ก

<i>Tetraselmis gracilis</i> BIMS-PP017		Vitamin C equivalent ($\mu\text{g/ml}$)	% inhibition
สารสกัดน้ำร้อน	ส่วนใส	0.43 ± 0.02	1.862 ± 0.19^e
	ส่วนตะกอน	0.31 ± 0.02	0.94 ± 0.17^c
สารสกัดเอทานอล	ส่วนใส	0.97 ± 0.03	6.03 ± 0.22^f
	ส่วนตะกอน	0.42 ± 0.19	1.83 ± 1.53^d
Chloroform/Ethanol	ส่วนใส	0.29 ± 0.04	0.84 ± 0.38^b
	ส่วนตะกอน	0.28 ± 0.05	0.90 ± 0.62^a
Dichloromethane/Methanol	ส่วนใส	ไม่มีฤทธิ์ยับยั้ง	ไม่มีฤทธิ์ยับยั้ง
	ส่วนตะกอน	ไม่มีฤทธิ์ยับยั้ง	ไม่มีฤทธิ์ยับยั้ง

^{a-f} ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($n = 3$) ที่มีตัวอักษรพิมพ์เล็ก a-f ที่ต่างกัน แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p \leq 0.05$ โดยใช้ one-way ANOVA และ Duncan's multiple range test (DMRT)

5.2 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS decolorization scavenging effect assay

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดสาหร่ายทะเลขนาดเล็ก พบว่าสารสกัดเอทานอลส่วนใสมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงสุดเท่ากับ 88.95% แสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS decolorization scavenging effect ของสารสกัดสาหร่ายทะเลขนาดเล็ก

<i>Tetraselmis gracilis</i> BIMS-PP017		Vitamin C equivalent ($\mu\text{g/ml}$)	%inhibition
สารสกัดน้ำร้อน	ส่วนใส	19.60 ± 0.55	71.92 ± 2.04^g
	ส่วนตะกอน	6.15 ± 0.48	21.77 ± 1.79^d
สารสกัดเอทานอล	ส่วนใส	24.31 ± 0.27	88.95 ± 1.44^h
	ส่วนตะกอน	6.60 ± 0.27	23.43 ± 1.00^e
สารสกัด Chloroform/Ethanol	ส่วนใส	1.68 ± 0.13	5.07 ± 0.49^a
	ส่วนตะกอน	5.04 ± 0.50	17.59 ± 1.88^c
สารสกัด Dichloromethane/Methanol	ส่วนใส	18.31 ± 0.06	67.10 ± 0.21^f
	ส่วนตะกอน	4.87 ± 1.86	16.97 ± 6.96^b

^{a-h} ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($n = 3$) ที่มีตัวอักษรพิมพ์เล็ก a-h ที่ต่างกัน แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p \leq 0.05$ โดยใช้ one-way ANOVA และ Duncan's multiple range test (DMRT)

5.3 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Potassium ferricyanide reducing power assay

จากการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดของสาหร่ายทะเลขนาดเล็ก พบว่าสารสกัดเอทานอลส่วนใส มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงสุดโดยมี Vitamin C equivalent อยู่ที่ 343.73 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการวิเคราะห์แสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วย Potassium ferricyanide reducing power assay ของสารสกัดสาหร่ายทะเลขนาดเล็ก

<i>Tetraselmis gracilis</i> BIMS-PP017		Vitamin C equivalent ($\mu\text{g/ml}$)
สารสกัดน้ำร้อน	ส่วนใส	90.40 $\pm$ 8.73 ^c
	ส่วนตะกอน	223.73 $\pm$ 0.91 ^e
สารสกัดเอทานอล	ส่วนใส	343.73 $\pm$ 13.99 ^h
	ส่วนตะกอน	39.48 $\pm$ 3.44 ^b
สารสกัด Chloroform/ethanol	ส่วนใส	36.45 $\pm$ 2.40 ^a
	ส่วนตะกอน	302.21 $\pm$ 7.35 ^g
สารสกัด Dichloromethane/Methanol	ส่วนใส	242.82 $\pm$ 23.64 ^f
	ส่วนตะกอน	126.46 $\pm$ 40.98 ^d

^{a-h} ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n = 3) ที่มีตัวอักษรพิมพ์เล็ก a-h ที่ต่างกัน แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p \leq 0.05$ โดยใช้ one-way ANOVA และ Duncan's multiple range test (DMRT)

5.4 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford assay

ทำการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนจากสารสกัดสาหร่ายทะเลขนาดเล็ก พบว่าสารสกัดน้ำร้อนในส่วนตะกอน มีปริมาณโปรตีนมากที่สุดเท่ากับ 68.36 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักแห้ง (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford assay ของสารสกัดสาหร่ายทะเลขนาดเล็ก

<i>Tetraselmis gracilis</i> BIMS-PP017		ความเข้มข้นของโปรตีน ($\mu\text{g BSA/ml}$)	ปริมาณโปรตีน/กรัม (mg/g DW)
น้ำร้อน	ส่วนใส	52.57 $\pm$ 10.02	11.27 $\pm$ 2.28 ^e
	ส่วนตะกอน	347.57 $\pm$ 7.51	68.36 $\pm$ 0.91 ^h
เอทานอล	ส่วนใส	60.90 $\pm$ 6.08	6.04 $\pm$ 0.60 ^d
	ส่วนตะกอน	259.57 $\pm$ 14.36	25.75 $\pm$ 1.43 ^g
สารสกัด Chloroform/Ethanol	ส่วนใส	7.57 $\pm$ 0.58	0.15 $\pm$ 0.01 ^a
	ส่วนตะกอน	20.57 $\pm$ 5.31	0.41 $\pm$ 0.11 ^b
สารสกัด Dichloromethane/Methanol	ส่วนใส	689.80 $\pm$ 32.18	13.66 $\pm$ 0.64 ^f
	ส่วนตะกอน	115.80 $\pm$ 10.58	2.29 $\pm$ 0.21 ^c

^{a-h} ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n = 3) ที่มีตัวอักษรพิมพ์เล็ก a-h ที่ต่างกัน แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p \leq 0.05$ โดยใช้ one-way ANOVA และ Duncan's multiple range test (DMRT)

วิจารณ์ผลการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากสาหร่ายทะเลขนาดเล็ก *Tetraselmis gracilis* BIMS-PP017 โดยทำการสกัดตามวิธีของ Bligh and Dyer (Bligh and Dyer, 1959) และ Dichloromethane/Methanol (Ren *et al.*, 2017) และสกัดสารออกฤทธิ์ชีวภาพด้วยน้ำร้อนและเอทานอล แล้วนำมาทำการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและฟลาโวนอยด์รวม ศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay ABTS decolorization scavenging effect assay Potassium ferricyanide reducing power assay

สาหร่ายนั้นจะมีความคล้ายคลึงกันกับพืชทั้งทางด้านชีววิทยาและนิเวศวิทยาถึงแม้ว่าจะมีความแตกต่างกันในสายของวิวัฒนาการ ซึ่งกระบวนการการตอบสนองต่อสารเคมีหรือสภาวะแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไปก็มีความคล้ายคลึงกันกับในพืชเช่นกัน รวมไปถึงความสามารถในการสร้าง Secondary metabolite ในกลุ่มของ Phenolic compounds และฟลาโวนอยด์เช่นเดียวกับในพืช แต่โครงสร้างและชนิดของ Phenolic compounds นั้นอาจจะแตกต่างกันไป สำหรับสาร Catechins และ Flavanols มีรายงานว่าพบมากในสาหร่ายขนาดใหญ่ ส่วน Anthocyanins และ Flavones ซึ่งพบมากในพืชบกนั้นแทบไม่พบในเซลล์สาหร่ายเลย สาร Phlorotannin ซึ่งโครงสร้างเป็น Oligomer ของ Phloroglucinol นั้นจะพบเป็นองค์ประกอบของสาหร่ายทะเลสีน้ำตาลมากถึง 25% ของน้ำหนักแห้ง (Freile-Pelegrin and Robledo, 2014) Bromophenols เป็น Phenolic compounds ที่พบได้ในสาหร่ายแทบทุกชนิด เช่นเดียวกับสารในกลุ่ม Phenolic terpenoids โดยที่สาหร่ายสีน้ำตาลจะพบสาร Mero-diterpenoids เช่น Plastoquinone Chromanols และ Chromenes อยู่มาก ส่วนในสาหร่ายสีแดงจะพบสาร Phenolic terpenoids พวก Diterpenes และ Sesquiterpenes อยู่สูง โดยสาร Diterpene-benzoate macrolides ที่พบในสาหร่ายสีแดง *Callophycus serratus* มีฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อ *Plasmodium falciparum* (Human malaria parasite) ได้อย่างมีประสิทธิภาพ Phenolic compounds อีกกลุ่มที่พบมากในสาหร่าย คือ Mycosporine-like amino acids (MAAs) สารในกลุ่มนี้จะละลายได้ดีในน้ำและพบในปริมาณที่สูงในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน และ Rhodophyta รวมถึงในสาหร่ายขนาดเล็ก *Prasiola* spp. Phenolic compounds ชนิดอื่นๆ ที่พบในสาหร่าย ได้แก่ Colpol ซึ่งพบในสาหร่ายสีน้ำตาล *Colpomenia inuosa* สาร Tichocarpols หรืออนุพันธ์ของ Phenylpropanoid พบในสาหร่ายสีแดง *Tichocarpus crinitus* สาร Coumarins พบในสาหร่ายสีเขียว *Dasycladus vermicularis* อนุพันธ์ของ Vanillic acid ที่พบในสาหร่ายสีเขียว *Cladophora socialis* สาร Marennine ซึ่งเป็น Polyphenolic pigment พบในไดอะตอม *Haslea ostrearia* เป็นต้น (Freile-Pelegrin and Robledo, 2014) การสกัดสารโพลีฟีนอลและฟลาโวนอยด์จากสาหร่ายสามารถทำได้หลายวิธี ส่วนใหญ่มักจะใช้ตัวทำละลายหลายๆ กับวิธีที่ใช้สกัดสารสำคัญจากพืช โดยตัวทำละลายที่นิยมใช้กันมากในการสกัด คือตัวทำละลายที่มีขั้ว เช่น น้ำ สารผสมระหว่างน้ำกับเอทานอล เมทานอล หรืออะซิโตนที่มีขั้วแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับโครงสร้างของสารที่ต้องการสกัด ตัวอย่างเช่น ตัวทำละลายที่ใช้กันมากที่สุดในการสกัดสาร Phlorotannin จากสาหร่าย คือ การสกัดด้วยน้ำหรือสารละลายผสมระหว่างน้ำกับอะซิโตน เป็นต้น โดยปัจจัยหลักๆ ที่มีผลต่อประสิทธิภาพของการสกัด คือ ความเป็นขั้วของตัวทำละลาย ความสามารถในการละลายของสารสกัดและอุณหภูมิที่ใช้ในกระบวนการสกัด (Aminina *et al.*, 2020; Imbs and Zvyagintseva, 2018) ปัจจุบันนี้มีความพยายามในการที่จะนำเทคนิคการสกัดสารโพลีฟีนอลจากพืช มาประยุกต์ใช้กับเซลล์สาหร่ายเช่น Soxhlet extraction และ Heat reflux extraction แต่ก็เป็นวิธีที่ใช้ระยะเวลาในการสกัด และยังมีประสิทธิภาพต่ำ จึงได้มีการพัฒนาเทคนิคที่มีประสิทธิภาพในการสกัดที่ดีกว่ามาใช้ เช่น Microwave-assisted extraction (MAE) และ Ultrasound-assisted extraction (UAE) โดยวิธี UAE จะใช้คลื่นเสียงความถี่สูงในการทำลายผนังเซลล์ของสาหร่าย ทำให้ Particle size มีขนาดเล็กลงและสัมผัสกับตัวทำละลายมากขึ้นทำให้สามารถสกัดโพลีฟีนอลออกมาอยู่ในสารสกัดส่วนใสได้ดี (Herrera and de Castro, 2005; Ibáñez *et al.*, 2012)

การสกัดไขมันจากสาหร่ายทะเลขนาดเล็ก *Tetraselmis gracilis* BIMS-PP017 ด้วยวิธี Bligh and Dyer (Bligh and Dyer, 1959) และ Dichloromethane/ Methanol (Bligh and Dyer, 1959; Ren *et al.*, 2017) วิธีการที่ใช้ในการสกัดไขมันจากตัวอย่างทางชีวภาพที่สามารถสกัด Polyunsaturated fatty acids (PUFAs) ออกมาได้อย่างมีประสิทธิภาพสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ อาทิเช่น อุตสาหกรรมอาหาร ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร เป็นต้น เมื่อทำการทดลองหาปริมาณไขมันจากการสกัดส่วนใสของสาหร่ายทะเลขนาดเล็ก *T. gracilis* BIMS-PP017 พบว่าปริมาณไขมันรวมสูงสุดในสารสกัด Dichloromethane/Methanol เท่ากับ 0.432 กรัม เมื่อคิดเทียบเป็นตัวอย่างสาหร่าย 1 กรัม (น้ำหนักแห้ง) (ตารางที่ 1) ซึ่งปริมาณไขมันที่ได้สูงกว่าการสกัดด้วยวิธี Bligh and Dyer + UAE (Ultrasound-assisted Extraction) อาจเนื่องจากประสิทธิภาพการสกัดไขมันจะแตกต่างกันไปตามประเภทของตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้สกัด เช่น ตัวทำละลายที่มีขั้วปานกลางจะสกัดสารในกลุ่มโพลีฟีนอลที่มีขั้วปานกลางได้ดี ส่วนโพลีฟีนอลที่มีขั้วสูงมักจะละลายออกมาได้ดีในน้ำ เป็นต้น นอกจากนี้โครงสร้างและองค์ประกอบของสาหร่ายแต่ละชนิด รวมไปถึงความแตกต่างขั้นตอนและวิธีการที่ใช้ในการสกัดก็เป็นปัจจัยที่สำคัญเช่นกัน (Shen *et al.*, 2009) และเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยที่ทำการสกัดไขมันจากสาหร่ายขนาดเล็ก 2 ชนิด ได้แก่ *Chlorella* sp. และ *Spirulina* sp. ด้วยวิธีอัลตราโซนิกนั้น ปริมาณไขมันที่ได้จาก *T. gracilis* ในงานวิจัยนี้ยังมีค่าสูงใกล้เคียงกันอีกด้วย (Fattah *et al.*, 2020) ดังนั้น *T. gracilis* จึงเหมาะที่จะเป็นอีกสายพันธุ์หนึ่งในการนำไปพัฒนาเป็นแหล่งพลังงานทางเลือกที่ยั่งยืน

จากการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจากสาหร่ายทะเลขนาดเล็ก *Tetraselmis gracilis* BIMS-PP017 โดยวิธี Dopachrome (Ji *et al.*, 2021) พบว่าสารสกัดส่วนใสในชั้นของ Dichloromethane สามารถแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ค่อนข้างดี ($38.77 \pm 0.90\%$ inhibition) แต่ไม่พบฤทธิ์การยับยั้งในส่วนของสารสกัดด้วยน้ำและเอทานอล (ตารางที่ 2) เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของ *T. gracilis* กับสาหร่ายขนาดเล็กสายพันธุ์ *Nannochloropsis* sp. พบว่ามีค่าใกล้เคียงกันโดย *Nannochloropsis* sp. มีฤทธิ์ในการยับยั้งเท่ากับ $40.16 \pm 0.55\%$ เมื่อใช้สารสกัดจากสาหร่ายเข้มข้น 750 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และถ้าเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดเป็น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะมีฤทธิ์ในการยับยั้งอยู่ที่ $59.2 \pm 0.48\%$ (Kim *et al.*, 2021)

การทดสอบหาปริมาณฟีนอลิกรวม ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu พบว่าสารสกัดด้วย Dichloromethane/Methanol ส่วนตะกอนและสารสกัดด้วยน้ำร้อนส่วนตะกอนมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากที่สุด โดยมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดอยู่ที่ 29.69 และ 18.71 ± 0.87 mg GAE/g dry weight ตามลำดับ (ตารางที่ 3) ซึ่งปริมาณฟีนอลิกรวมจาก *T. Gracilis* นั้นมีค่าต่ำกว่าเมื่อเทียบกับการวิเคราะห์ใน *Nannochloropsis* sp. ที่มีปริมาณฟีนอลิกรวมอยู่ถึง 77.29 ± 1.25 mg GAE/g dry weight (Kim *et al.*, 2021) แต่มีค่าสูงกว่าเมื่อเทียบกับสาหร่ายขนาดเล็ก *Scenedesmus* sp. ซึ่งมีปริมาณฟีนอลิกรวมอยู่ 5.40 ± 0.28 mg GAE/g dry weight (Cichonski and Chrzanowski, 2022) และสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก *Dunaliella salina* ซึ่งมีปริมาณฟีนอลิกรวมอยู่ 8.78 ± 1.49 mg GAE/g dry weight (Andriopoulos *et al.*, 2022)

การวิเคราะห์สารฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี Aluminium chloride colorimetric assay ในโครงงานวิจัยนี้พบว่าสารสกัดน้ำร้อนส่วนตะกอนและสารสกัดด้วย Dichloromethane/Methanol โดยมีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมสูงสุด อยู่ที่ 95.67 ± 1.14 และ 58.71 ± 2.12 mg QE/g dry weight ตามลำดับ (ตารางที่ 4) เมื่อเทียบกับในสาหร่ายขนาดเล็ก *Euglena tuba* ที่มีรายงานว่าปริมาณฟลาโวนอยด์ถึง 157.7 ± 2.38 mg QE/g (Gupta *et al.*, 2022) จัดว่ามีฟลาโวนอยด์อยู่ปริมาณน้อยอย่างมาก อย่างไรก็ตามมีงานวิจัยที่ทำการวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ในสาหร่ายขนาดเล็ก 7 ชนิด คือ *Amphidinium carterae* *Coccolithophorid* sp. *Navicula* sp. *Dunaliella tertiolecta* *Microchloropsis salina* *Proteomonas sulcata* และ *Tetraselmis suecica* ซึ่งพบปริมาณฟลาโวนอยด์อยู่ในช่วง 0.04 ± 0.01 ถึง 1.61 ± 0.15 (mg QE/g) ซึ่งจัดว่าพบในปริมาณต่ำกว่าที่พบใน *T. gracilis* จากการทดลองนี้มาก (Zhou *et al.*, 2023) โดยสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์หรือ Non-hydrolysable tannins นั้นมีรายงานว่าพบในสาหร่ายทะเล 27 ชนิด และมีองค์ประกอบที่แตกต่างจากสารกลุ่ม

เดียวกันที่พบในผักและผลไม้ โดยฟลาโวนอยด์ที่พบมากในสาหร่าย ได้แก่ Rutin Caffeic acid Catechol Hesperidin Quercitrin และ Morin ส่วน Anticarcinogenic flavonoids ที่พบมากในพืช เช่น Kaempferol Apigenin Luteolin และ Myricetin นั้นมีรายงานว่าพบในสาหร่ายเพียงเล็กน้อยเท่านั้น (Mena et al., 2021; Zhou et al., 2022)

เมื่อทำการศึกษากิจกรรมต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay ABTS decolorization scavenging effect assay และ Potassium ferricyanide reducing power assay จากผลการทดลองพบว่า สารสกัดเอทานอลส่วนใสมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ABTS และ Potassium ferricyanide reducing power assay ดีที่สุด ค่า % inhibition อยู่ที่ 6.03 ± 0.22 และ 88.95 ± 1.44 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และ Reducing power เทียบเท่ากับ สารมาตรฐานวิตามินซีเข้มข้น 343.73 ± 13.99 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม (ตารางที่ 5 - 7) สารสกัดเอทานอลส่วนใสของสาหร่ายทะเลขนาดเล็ก *Tetraselmis gracilis* BIMS-PP017 มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารสกัดเอทานอลส่วนตะกอนและ สารสกัดน้ำร้อน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Choochote et al. (2014) ที่รายงานว่าปริมาณฟีนอลิกและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเอทานอลจะมีค่าที่สูงกว่าสารสกัดน้ำร้อน หรือในสารสกัดบางชนิดมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและปริมาณฟลาโวนอยด์รวมแตกต่างกันแต่กลับมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ใกล้เคียงกัน อาจเป็นเพราะสารสกัดเหล่านี้มีสารต้านการออกซิไดซ์ เช่น สารประกอบฟีนอลิก แคโรทีนอยด์ คลอโรฟิลล์เอ และคลอโรฟิลล์บี โดยตรงวัตถุเหล่านี้มีคุณสมบัติเป็น สารต้านอนุมูลอิสระและมีรายงานว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีความสัมพันธ์ในเชิงบวกกับปริมาณของสารประกอบฟีนอลิก แคโรทีนอยด์ คลอโรฟิลล์ ลูทีน และฟิโอฟิตินเอ นั่นคือ ถ้าพบปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพดังกล่าวอยู่มากจะส่งผลให้มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงตามไปด้วย ซึ่งผลการทดลองจากงานวิจัยนี้ สารสกัดสาหร่ายทะเลขนาดเล็กด้วยน้ำร้อนมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระเมื่อทดสอบด้วยวิธี ABTS assay และ Potassium ferricyanide reducing power assay ในระดับที่สูงพอสมควร อีกทั้งขั้นตอนในการสกัดไม่ซับซ้อนและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม จึงมีศักยภาพที่จะนำไปใช้ต่อยอดในการพัฒนาไปเป็นส่วนประกอบในเวชสำอางต่างๆ

การคำนวณหาปริมาณโปรตีนในสารสกัดตัวอย่างโดยวิธี Bradford assay จากการทดลองพบว่าสารสกัดน้ำร้อนส่วนตะกอนและสารสกัดเอทานอลส่วนตะกอนมีปริมาณโปรตีนสูงสุด คือ 68.36 ± 0.91 mg/ml และ 25.75 ± 1.43 mg/ml ตามลำดับ (ตารางที่ 8) โดยมีรายงานว่า เปปไทด์สายสั้นมีคุณสมบัติเป็น Bioactive peptide และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระผ่านกลไก Metal chelating ได้ (Hu et al., 2019) และในสารสกัดจาก *Tetraselmis gracilis* จากงานวิจัยนี้ ก็พบโปรตีนอยู่ในปริมาณมาก อย่างไรก็ตามซึ่งผลจากงานวิจัยนี้พบว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพรวมถึงโปรตีนบางส่วนจะอยู่ใน สารสกัดส่วนที่เป็นตะกอน เห็นได้จากการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพที่สารสกัดในส่วนตะกอนจะมีประสิทธิภาพดีพอสมควรเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดส่วนใส ซึ่งชี้ให้เห็นว่าในขั้นตอนการสกัดนั้นอาจยังไม่สามารถทำลายผนังเซลล์สาหร่ายได้อย่างสมบูรณ์ จึงจำเป็นต้องพัฒนาวิธีการสกัดที่มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้นในอนาคต นอกจากนี้ยังได้มีงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ในการต้านการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคของ Bacterial-free culture ของสาหร่ายขนาดเล็ก พบว่า *Asteromonas gracilis* และ *Tetraselmis* sp. RED-PAPPAS สามารถยับยั้งการเจริญของ *Aeromonas veronii* *Vibrio alginolyticus* *Vibrio anguillarum* และ *Vibrio harveyi* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ก่อโรคในปลาได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Androutsopoulou and Makridis, 2023) แสดงให้เห็นถึงฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลายของสาหร่ายทะเลขนาดเล็กได้เป็นอย่างดี

สรุปผลการวิจัย

สารสกัดจากสาหร่ายทะเลขนาดเล็ก *Tetraselmis gracilis* BIMS-PP017 มีศักยภาพในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารหรือเป็นองค์ประกอบในเวชสำอางเนื่องจากมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในปริมาณมาก โดยปริมาณสารสกัดที่ได้ คือ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ฟลาโวนอยด์รวม รวมถึงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ จะขึ้นอยู่กับวิธีการสกัดและตัวทำละลายที่ใช้ เมื่อได้ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ABTS และ Potassium ferricyanide reducing

power assay พบว่าสารสกัดเอทานอลส่วนใสมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้สูงที่สุด ส่วนปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดจะพบในสารสกัด Dichloromethane/Methanol ส่วนตะกอนสูงที่สุด ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมและปริมาณโปรตีนที่วิเคราะห์ด้วยวิธี Bradford assay จะพบมากที่สุดในการสกัดน้ำร้อนส่วนตะกอน และสารสกัดส่วนใสด้วย Dichloromethane มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสอีกด้วย

เอกสารอ้างอิง

- Aminina, N.M., Karaulova, E.P., Vishnevskaya, T.I., Yakush, E.V., Kim, Y.K., Nam, K.H. and Son, K.T. (2020). Characteristics of Polyphenolic Content in Brown Algae of the Pacific Coast of Russia. *Molecules* 25(17): 3909. doi:10.3390/molecules25173909.
- Andriopoulos, V., Gkioni, M.D., Koutra, E., Mastropetros, S.G., Lamari, F.N., Hatziantoniou, S. and Kornaros, M. (2022). Total Phenolic Content, Biomass Composition, and Antioxidant Activity of Selected Marine Microalgal Species with Potential as Aquaculture Feed. *Antioxidants* 11(7): 1320. doi: 10.3390/antiox11071320.
- Androutopoulou, C. and Makridis, P. (2023). Antibacterial Activity against Four Fish Pathogenic Bacteria of Twelve Microalgae Species Isolated from Lagoons in Western Greece. *Microorganisms* 11(6): 1396. doi: 10.3390/microorganisms11061396.
- Bligh, E.G. and Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37(8): 911 - 917. doi:10.1139/o59-099.
- Blois, M.S. (1958). Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature* 181(4617): 1199 - 1200. doi: 10.1038/1811199a0.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248 - 254. doi: 10.1006/abio.1976.9999.
- Cichonski, J. and Chrzanowski, G. (2022). Microalgae as a Source of Valuable Phenolic Compounds and Carotenoids. *Molecules* 27(24): 8852. doi: 10.3390/molecules27248852.
- Chandra, S., Khan, S., Avula, B., Lata, H., Yang, M.H., Elsohly, M.A. and Khan, I.A. (2014). Assessment of total phenolic and flavonoid content, antioxidant properties, and yield of aeroponically and conventionally grown leafy vegetables and fruit crops: a comparative study. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM* 2014: 253875. doi: 10.1155/2014/253875.
- Choochote, W., Suklampoo, L. and Ochaikul, D. (2014). Evaluation of antioxidant capacities of green microalgae. *Journal of Applied Phycology* 26(1): 43 - 48. doi: 10.1007/s10811-013-0084-6.
- Dolganyuk, V., Belova, D., Babich, O., Prosekov, A., Ivanova, S., Katserov, D., Patyukov, N. and Sukhikh, S. (2020). Microalgae: A Promising Source of Valuable Bioproducts. *Biomolecules* 10(8): 1153. doi: 10.3390/biom10081153.
- El Jemli, M., Kamal, R., Marmouzi, I., Zerrouki, A., Cherrah, Y. and Alaoui, K. (2016). Radical scavenging activity and ferric reducing ability of *Juniperus thurifera* (L.), *J. oxycedrus* (L.), *J. phoenicea* (L.) and

- Tetraclinis articulata* (L.). *Advances in Pharmacological Sciences* 2016: 6392656 - 6392661. doi: 10.1155/2016/6392656.
- Fattah, I.M.R., Noraini, M.Y., Mofijur, M., Silitonga, A.S., Badruddin, I.A., Khan, T.M.Y., Ong, H.C. and Mahlia, T.M.I. (2020). Lipid Extraction Maximization and Enzymatic Synthesis of Biodiesel from Microalgae. *Applied Sciences* 10(17): 6103.
- Freile-Pelegrín, Y. and Robledo, D. (2013). Bioactive Phenolic Compounds from Algae. In: Hernández-Ledesma, B. and Herrero, M. (Eds.) *Bioactive Compounds from Marine Foods: Plant and Animal Sources*. Chichester: John Wiley & Sons Ltd. 113 – 129.
- Fu, W., Nelson, D.R., Yi, Z., Xu, M., Khraiweh, B., Jijakli, K. Chaiboonchoe, A., Alzahmi, A., Al-Khairi, D., Brynjolfsson, S. and Salehi-Ashtiani, K. (2017). Chapter 6 - Bioactive Compounds From Microalgae: Current Development and Prospects. In: Rahman, A-u. (Ed.) *Studies in Natural Products Chemistry* 54: 199 - 225. doi: 10.1016/B978-0-444-63929-5.00006-1.
- Gupta, S.P., Siddiqi, N.J., Khan, H.A., Alrokayan, S.H., Alhomida, A.S., Singh, R.K., Verma, P.K., Kumar, S., Acharya, A. and Sharma, B. (2022). Phytochemical Profiling of Microalgae *Euglena tuba* and Its Anticancer Activity in Dalton's Lymphoma Cells. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)* 27(4): 120. doi: 10.31083/j.fbl2704120.
- Herrera, M. C., and de Castro, M. D. (2005). Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from strawberries prior to liquid chromatographic separation and photodiode array ultraviolet detection. *Journal of Chromatography A* 1100(1): 1 - 7. doi: 10.1016/j.chroma.2005.09.021.
- Hu, X., Yang, X.Q., Wu, Q., Li, L., Wu, Y., Chen, S., Li, R. and Ren, J. (2019). Purification and Identification of Antioxidant Peptides from *Schizochytrium limacinum* Hydrolysates by Consecutive Chromatography and Electrospray Ionization-Mass Spectrometry. *Molecules* 24(16): 3004. doi: 10.3390/molecules24163004.
- Ibáñez, E., Herrero, M., Mendiola, J. and Castro-Puyana, M. (2012). Extraction and Characterization of Bioactive Compounds with Health Benefits from Marine Resources: Macro and Micro Algae, Cyanobacteria, and Invertebrates. In: Hayes, M. (eds) *Marine Bioactive Compounds*. Boston: Springer MA. doi: 10.1007/978-1-4614-1247-2_2.
- Imbs, T. and Zvyagintseva, T. (2018). Phlorotannins are Polyphenolic Metabolites of Brown Algae. *Russian Journal of Marine Biology* 44: 263 - 273. doi: 10.1134/S106307401804003X.
- Ji, K., Kim, Y. and Kim, Y. (2021). A Study on the Tyrosinase Inhibitory and Antioxidant Effect of Microalgae Extracts. *Microbiology and Biotechnology Letters* 49: 167 - 173. doi: 10.48022/mb.2012.12001.
- Khan, M.I., Shin, J.H. and Kim, J.D. (2018). The Promising Future of Microalgae: Current Status, Challenges, and Optimization of a Sustainable and Renewable Industry for Biofuels, Feed, and Other products. *Microbial Cell Factories* 17(1): 36. doi: 10.1186/s12934-018-0879-x.
- Kim, S.Y., Kwon, Y.M., Kim, K.W. and Kim, J.Y.H. (2021). Exploring the Potential of *Nannochloropsis* sp. Extract for Cosmeceutical Applications. *Marine drugs* 19(12): 690. doi: 10.3390/md19120690.

- Mavrommatis, A., Tsiplakou, E., Zerva, A., Pantiora, P. D., Georgakis, N. D., Tsintzou, G. P., Madesis, P. and Labrou, N.E. (2023). Microalgae as a Sustainable Source of Antioxidants in Animal Nutrition, Health and Livestock Development. *Antioxidants* 12(10): 1882. doi: 10.3390/antiox12101882.
- Menaa, F., Wijesinghe, U., Thiripuranathar, G., Althobaiti, N.A., Albalawi, A.E., Khan, B.A. and Menaa, B. (2021). Marine Algae-Derived Bioactive Compounds: A New Wave of Nanodrugs? *Marine Drugs* 19(9). doi: 10.3390/md19090484.
- Ordoñez, A.A.L., Gomez, J.D., Vattuone, M.A. and Isla, M.I. (2006). Antioxidant activities of *Sechium edule* (Jacq.) Swartz extracts. *Food Chemistry* 97(3): 452 - 458. doi: 10.1016/j.foodchem.2005.05.024.
- Payet, B., Sing, A. S. C. and Smadja, J. (2005). Assessment of antioxidant activity of cane brown sugars by ABTS and DPPH radical scavenging assays: determination of their polyphenolic and volatile constituents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(26): 10074 - 10079. doi: 10.1021/jf0517703.
- Ren, X., Zhao, X., Turcotte, F., Deschênes, J.-S., Tremblay, R. and Jolicœur, M. (2017). Current lipid extraction methods are significantly enhanced adding a water treatment step in *Chlorella protothecoides*. *Microbial Cell Factories* 16(1): 1 - 13. doi: 10.1186/s12934-017-0633-9.
- Shen, Y., Yuan, W., Pei, Z.J., Wu, Q. and Mao, E. (2009). Microalgae Mass Production Methods. *Transactions of the ASABE* 52: 1275 - 1287. doi: 10.13031/2013.27771.
- Singleton, V.L., Orthofer, R. and Lamuela-Raventós, R.M. (1999). [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods Enzymology* 299: 152 – 178.
- Sundaram, T., Rajendran, S., Gnanasekaran, L., Rachmadona, N., Jiang, J.J., Khoo, K.S. and Show, P.L. (2023). Bioengineering strategies of microalgae biomass for biofuel production: recent advancement and insight. *Bioengineered* 14(1): 2252228. doi: 10.1080/21655979.2023.2252228.
- Thiyagarasaiyar, K., Goh, B-H., Jeon, Y-J. and Yow, Y-Y. (2020). Algae metabolites in cosmeceutical: an overview of current applications and challenges. *Marine Drugs* 18(6): 323.
- Zhou, L., Duan, X., Li, K., Hill, D.R.A., Martin, G.J.O. and Suleria, H.A.R. (2023). Extraction and Characterization of Bioactive Compounds from Diverse Marine Microalgae and Their Potential Antioxidant Activities. *Chemistry & Biodiversity* 20(11): e202300602. doi: 10.1002/cbdv.202300602.
- Zhou, L., Li, K., Duan, X., Hill, D., Barrow, C., Dunshea, F., Martin, G. and Suleria, H. (2022). Bioactive compounds in microalgae and their potential health benefits. *Food Bioscience* 49: 101932. doi: 10.1016/j.fbio.2022.101932.

