



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: การใช้เทคนิค FTIR-spectroscopy และ RAMAN spectroscopy ในการวิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ รูปแบบปริมาณกรดไขมัน ที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและลายพิมพ์ดีเอ็นเอของไดอะตอมเพื่อประโยชน์ในการประยุกต์ใช้ในเชิงพาณิชย์และการอนุรักษ์สายพันธุ์ในจังหวัดชลบุรี

(Evaluation of FTIR-spectroscopy and RAMAN spectroscopy for Carotenoids content, Fatty acid profile effect on pharmacological activity and DNA fingerprint of diatom to apply for commercial and conservation in Chonburi Province)

แผนการวิจัย: การพัฒนาศักยภาพทางเภสัชวิทยาของสาหร่ายทะเลขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอมในจังหวัดชลบุรี

ชื่อหัวหน้าโครงการผู้รับทุน / ผู้วิจัย

ดร. ขวัญชญาณาวิศ มาชนะนา	(หัวหน้าโครงการวิจัย)
ดร. กาญจนา ธรรมนุ	ดร. วราภรณ์ ตัณฑนุช
ดร. อมรรัตน์ กนกรุ่ง	ดร. นิชกานต์ ภิระคำ
ภก.ผศ.ดร. บุญดิศย์ วงศ์ศักดิ์	ภญ.ผศ.ดร. แคทรียา สุทธานุช
ดร. อนุสรณ์ ธรรมพิทักษ์	ภญ. ดร. นปภัช รัตนะชิตธวัช

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562 มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ ๕๙๙๖๐

เลขที่สัญญา สัญญา ๑.๑/ ๒๕๖๒

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: การใช้เทคนิค FTIR-spectroscopy และ RAMAN spectroscopy ในการวิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ รูปแบบปริมาณกรดไขมัน ที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและลายพิมพ์ดีเอ็นเอของไดอะตอมเพื่อประโยชน์ในการประยุกต์ใช้ในเชิงพาณิชย์และการอนุรักษ์สายพันธุ์ในจังหวัดชลบุรี

(Evaluation of FTIR-spectroscopy and RAMAN spectroscopy for Carotenoids content, Fatty acid profile effect on pharmacological activity and DNA fingerprint of diatom to apply for commercial and conservation in Chonburi Province)

แผนการวิจัย: การพัฒนาศักยภาพทางเภสัชวิทยาของสาหร่ายทะเลขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอมในจังหวัดชลบุรี

ชื่อหัวหน้าโครงการผู้รับทุน / ผู้วิจัย

ดร. ขวัญชญาณิศา มาชนะนา	(หัวหน้าโครงการวิจัย)
ดร. กาญจนา ธรรมนุ	ดร. วราภรณ์ ตันตานุช
ดร. อมรรัตน์ กนกรุ่ง	ดร. นิชกานต์ ภิระคำ
ภก.ผศ.ดร. บุญดิศย์ วงศ์ศักดิ์	ภญ.ผศ.ดร. แคทรียา สุทธานุช
ดร. อนุสรณ์ ธรรมพิทักษ์	ภญ. ดร. นปภัช รัตนะชิตธวัช

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562 มหาวิทยาลัยบูรพา

หน่วยงานที่รับผิดชอบโครงการ

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ตำบลแสนสุข อำเภอเมือง
จังหวัดชลบุรี 20131 โทรศัพท์ 0-3810-2610 / โทรสาร 038-102610

หน่วยงานสนับสนุน

1. สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี
2. สถาบันวิจัยแสงซินโครตรอน (องค์การจำกัดมหาชน) จังหวัดนครราชสีมา

ผู้รับผิดชอบโครงการวิจัย

- | | |
|----------------------------------|---------------------|
| 1. ดร. ขวัญชญาณวิศ มาชนะนา | หัวหน้าโครงการวิจัย |
| 2. ดร. กาญจนา ธรรมนุ | ผู้ร่วมวิจัย |
| 3. ดร. วราภรณ์ ตันทนุช | ผู้ร่วมวิจัย |
| 4. ดร. อมรรัตน์ กนกรุ่ง | ผู้ร่วมวิจัย |
| 5. ดร. นิชกานต์ ภิระคำ | ผู้ร่วมวิจัย |
| 6. ภก.ผศ.ดร. บุญดิศย์ วงศ์ศักดิ์ | ผู้ร่วมวิจัย |
| 7. ภญ.ผศ.ดร. แคทรียา สุทธานุช | ผู้ร่วมวิจัย |
| 8. ดร. อนุสรณ์ ธรรมพิทักษ์ | ผู้ร่วมวิจัย |
| 9. ภญ.ดร. นปภัช รัตนะชิตธวัช | ผู้ร่วมวิจัย |

กิตติกรรมประกาศ

รายงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบุคคลและกลุ่มบุคคลต่างๆ ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำและสนับสนุนช่วยเหลือทั้งทางด้านวิชาการและการดำเนินงานวิจัยเป็นอย่างดี

ขอขอบพระคุณสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ และหน่วยงานต่างๆ ที่ได้สนับสนุนการดำเนินงานวิจัยในครั้งนี้เป็นอย่างดี ได้แก่ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา, สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา และสถาบันวิจัยแสงซินโครตรอน (องค์การมหาชน) ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ในการเข้าใช้บริการ BL4.1 IR spectroscopy and Imaging ที่สนับสนุนการวิจัยในครั้งนี้

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๖๒ (งบบุคลากรวิจัยและนวัตกรรม) มหาวิทยาลัยบูรพา เลขที่สัญญา ๑.๑/ ๒๕๖๒

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร

(Executive Summary)

ข้าพเจ้า ดร. ขวัญชญาณิวศ มาชนะนา ได้รับทุนสนับสนุนโครงการวิจัย จากมหาวิทยาลัยบูรพา ประเภทงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562 มหาวิทยาลัยบูรพา โครงการวิจัย เรื่อง การใช้เทคนิค FTIR-spectroscopy และ RAMAN spectroscopy ในการวิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ รูปแบบปริมาณกรดไขมัน ที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและลายพิมพ์ดีเอ็นเอของไดอะตอมเพื่อประโยชน์ในการประยุกต์ใช้ในเชิงพาณิชย์และการอนุรักษ์สายพันธุ์ในจังหวัดชลบุรี (Evaluation of FTIR-spectroscopy และ RAMAN spectroscopy for Carotenoids content, Fatty acid profile effect on pharmacological activity and DNA fingerprint of diatom to apply for commercial and conservation in Chonburi Province) รหัสโครงการ 59960 สัญญาเลขที่ 1.1/ 2562 ได้รับงบประมาณรวมทั้งสิ้น 908,200 บาท (เก้าแสนแปดพันสองร้อยบาทถ้วน) ระยะเวลาการดำเนินงาน 1 ปี 5 เดือน (ระหว่างวันที่ 1 ตุลาคม 2561 ถึงวันที่ 25 กุมภาพันธ์ 2562)

บทคัดย่อ

การสำรวจและระบุสายพันธุ์ดีเอ็นเอของไดอะตอมที่สำรวจพบในชายฝั่งทะเล จังหวัดชลบุรี จำนวน 3 ชนิด พบว่าดีเอ็นเอของไดอะตอมมีเปอร์เซ็นต์ความใกล้เคียงเมื่อเทียบกับฐานข้อมูลจากการใช้โปรแกรม BLAST ได้แก่ *Chaetoceros tenuissimus* (%ident 96.27%), *Thalassiosira pseudonana* (%ident 99.82%) และ *Odontella* sp. (< 90% ไม่ทำการระบุชนิด) โดยทำการแยกเซลล์เดี่ยวแล้วเลี้ยงในอาหารที่ความเค็ม 3 ระดับ ได้แก่ 20 ppt, 30 ppt และ 40 ppt และเก็บรวบรวมไดอะตอมในระยะเวลาเจริญเติบโต lag, exponential, retardation และ stationary phase เพื่อศึกษาปริมาณสารสีกลุ่มแคโรทีนอยด์และกรดไขมันในสารสกัดจากไดอะตอมที่สภาวะต่างๆ ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) และแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรสโกปี (GC-MS) พบว่า ความเค็มส่งผลต่อการสังเคราะห์สารสีกลุ่มแคโรทีนอยด์และกรดไขมันที่แตกต่างกัน อีกทั้งยังมีผลต่อการสังเคราะห์สารประกอบกลุ่มฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ที่แตกต่างกันอีกด้วย โดยไดอะตอมชนิด *C. tenuissimus* ในระยะ stationary ที่เลี้ยงในความเค็มที่ 20 ppt มีปริมาณสารสีกลุ่มแคโรทีนอยด์และสารประกอบฟลาโวนอยด์สูงสุด และมีกรดไขมันไม่อิ่มตัวกลุ่ม EPA เป็นองค์ประกอบไม่พบ DHA สอดคล้องกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สูงที่สุดที่ค่า IC_{50} เท่ากับ 0.015 mg/ml ซึ่งดีกว่าสารมาตรฐาน Trolox (0.020 mg/ml) แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และในไดอะตอมชนิด *T. pseudonana* ในระยะ stationary ที่เลี้ยงในความเค็มที่ 20 และ 40 ppt มีปริมาณสารสีกลุ่มแคโรทีนอยด์และสารประกอบกลุ่มฟีนอลิกค่อนข้างสูง ซึ่งให้ฤทธิ์สอดคล้องกับการต้านอนุมูลอิสระ FRAP ที่สูงที่สุด ส่วนในไดอะตอม *Odontella* sp. ในระยะ stationary และ exponential phase ที่เลี้ยงในความเค็มที่ 30 ppt ซึ่งมีปริมาณสารสีกลุ่มแคโรทีนอยด์สูงและสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์สูง และมีกรดไขมันไม่อิ่มตัวกลุ่มทั้ง EPA และ DHA เป็นส่วนประกอบ สอดคล้องกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สูง ทั้งนี้การวิเคราะห์ปริมาณสารสีแคโรทีนอยด์และกรดไขมันด้วยเทคนิค Synchrotron FTIR-microspectroscopy ให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาก่อนนี้และสามารถวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างระยะการเจริญเติบโตและการเลี้ยงความเค็มแต่ละระดับความเค็ม และยังพบว่าสารสกัดไดอะตอม THA30exp ODO30exp ODO30ret และ CHE30sta มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส อีลาสเทสและคอลลาจีเนส และส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ไลน์ผิวหนังที่แตกต่างกัน โดยมีเพียงสารสกัด ODO30Exp ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส ซึ่งจากผลการวิจัยนี้สามารถนำไปศึกษาต่อยอดการพัฒนาสูตรตำรับผลิตภัณฑ์บำรุงผิวจากสารสกัดจากไดอะตอมต่อไปได้

คำสำคัญ: ไดอะตอม ชลบุรี ซินโครตรอน FTIR การต้านริ้วรอย ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

Abstract

The results from surveys and identification of DNA fingerprints from 3 diatoms from the East coast of Chonburi province showed % identification; *Chaetoceros tenuissimus* (96.27%), *Thalassiosira pseudonana* 99.82% and *Odontella* sp. (< 90% not identification). Three diatoms were separate as single cells and cultured in different salinities medium such as 20 ppt, 30 ppt and 40 ppt and then diatoms were collected at different growth phases i.e. lag, exponential, retardation and stationary phase. The diatoms at different conditions were used to determine carotenoids content, fatty acid profile using High performance liquid chromatography (HPLC) and GC-MS. The present study evaluated the effect of different salinities on the growth and chemical composition of 3 diatoms at four culture phases, under laboratory conditions. The results showed salinities induced the differentiation of metabolite to produce carotenoids content, fatty acid and other chemical compounds (total phenolic content and flavonoids content) which effected on pharmacological activity. The low salinities (20 ppt) media to culture *C. tenuissimus* extracts at stationary phase (CHE20Sta) showed high carotenoids content and flavonoids content, and the extract presented fatty acid of PUFA i.e. eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5, n-3) without decosahexaenoic acid (DHA, 22:6, n-3) content. Antioxidant activity of the CHE20Sta extract showed correlation to the chemical profile with the highest antioxidant effect by ABTS assay at IC₅₀ value is 0.015 mg/ml, which showed higher activity and a significant difference from standard Trolox (IC₅₀ is 0.020 mg/ml). The low to high salinities (20 and 40 ppt) media to culture *T. pseudonana* extracts at stationary phase (THA20Sta) showed high carotenoids content and total phenolic contents. The chemical contents of THA20Sta resulting in the highest antioxidant capacity by FRAP assay. The *Odontella* sp. showed high carotenoids, total phenolic and flavonoids content in medium (30 ppt) salinity medium at stationary and exponential phase. Moreover, high antioxidant activity of both *Odontella* sp and *T. pseudonana* were involved with chemical content and fatty acid of PUFA i.e. omega-3 (EPA and DHA) content. To evaluation of SR-FTIR-spectroscopy for carotenoids content and fatty acid profile showed correlation with chemical profile of diatom in different salinities and growth phase conditions. In addition, diatom extracts i.e. THA30exp ODO30exp ODO30ret and CHE30sta showed different effects of each sample extract on tyrosinase, elastase and collagenase inhibition activity and cell proliferation of human skin cell line (HaCaT cell). Acetylcholinesterase inhibitor showed only in the ODO30Exp extract. Knowledge from this study will be future useful to develop skin products from diatom extracts.

Keywords: Diatom Marine Chonburi Synchrotron FTIR Anti-aging Antioxidant activity

Output/ Outcome

- ลายพิมพ์อินฟราเรด (IR finger print) ของไดอะตอมโดยการใช้เทคนิค Scynchrotron FTIR microspectroscopy ในการวิเคราะห์องค์ประกอบทางชีวโมเลกุลโดยรวม (ได้แก่ ลิพิด, โปรตีน และคาร์โบไฮเดรต) ตลอดจนสารต้านอนุมูลอิสระ โดยเน้นสารกลุ่ม carotenoids และ กรดไขมันไม่อิ่มตัว (PUFA) เช่น ESP และ DHA เป็นต้น ในสาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอมพบในทะเลฝั่งตะวันออก ของจังหวัดชลบุรี
- ฐานข้อมูลทางดีเอ็นเอเพื่อใช้อ้างอิงชนิดสาหร่ายขนาดเล็กในกลุ่มไดอะตอมที่พบในทะเลฝั่งตะวันออก ของจังหวัดชลบุรี ของไดอะตอมจำนวน 3 ชนิด ได้แก่ *Chaetoceros tenuissimus*, *Thalassiosira pseudonana* และ *Odontella* sp.
- ตัวอย่างไดอะตอมในสภาวะการเลี้ยงที่มีผลต่อการเพิ่มสารสีและที่มีศักยภาพในการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ได้แก่ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ elastase, และเอนไซม์ tyrosinase รวมถึงฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งที่จะนำมาพัฒนาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์ต้นแบบต่อไป

ข้อเสนอแนะ

- 1) การระบุชนิดของสาหร่ายทะเลกลุ่มไดอะตอมในทะเลมีฐานข้อมูลที่จำกัด ดังนั้นการศึกษาสำรวจและเก็บรวบรวมข้อมูลของจุลสาหร่ายในประเทศจึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งในการพัฒนาสภาพแวดล้อมและเชิงพาณิชย์ในอนาคต
- 2) จากผลงานวิจัยนี้เห็นควรให้มีการทำฐานข้อมูลทั้งลายพิมพ์ดีเอ็นเอ และลายพิมพ์อินฟราเรดในระดับเซลล์เดี่ยวที่ทำการวิเคราะห์ด้วย (SR-FTIR-finger print) รวมถึงการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญในจุลสาหร่าย เพื่อเก็บรวบรวมชนิดจุลสาหร่ายในชายฝั่งทะเลของประเทศไทยต่อไป
- 3) จากผลการศึกษาครั้งนี้ควรมีการนำผลการศึกษานี้ไปใช้ประโยชน์ในการพัฒนาสูตรตำรับต่อไป โดยทำการศึกษาเพิ่มเติมในการพัฒนาสูตรตำรับและความสามารถในการซึมผ่านผิว เนื่องจากสารสกัดมีประสิทธิภาพในการช่วยชะลอการเกิดริ้วรอยได้ในหลอดทดลอง ซึ่งควรทำการศึกษาในผิวหนังมนุษย์ต่อไป
- 4) งานวิจัยนี้ ไม่ได้ดำเนินการทดสอบด้วยเทคนิค RAMAN- spectroscopy เนื่องจากต้องใช้ระยะเวลาในการขอใช้เครื่องมือดังกล่าว อีกทั้งเทคนิค Synchrotron FTIR microspectroscopy เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพ มีความแม่นยำสูง และรวดเร็ว และสามารถวิเคราะห์ปริมาณสาร carotenoid และกรดไขมันได้ในระดับเซลล์เดี่ยวๆ ได้ มีประสิทธิภาพมากกว่า RAMAN- spectroscopy

สารบัญเรื่อง

	หน้า
บทสรุปสำหรับผู้บริหาร	ก
บทคัดย่อ ภาษาไทย	ข
บทคัดย่อ ภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญเรื่อง	จ
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 เนื้อเรื่อง	
- สารเคมี	23
- วิธีดำเนินการวิจัย	23
- ผลการทดลอง	39
บทที่ 3 อภิปรายและวิจารณ์ผลการทดลอง	74
บทที่ 4 บทสรุปและข้อเสนอแนะ	83
บรรณานุกรม	89

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
ตารางที่ 1 โปรแกรมการตั้งค่าอุณหภูมิของ Column oven ที่ใช้ในการแยกองค์ประกอบในตัวอย่าง	28
ตารางที่ 2 แสดงผลการ blast ของลำดับเบสดีเอ็นเอจาก GenBank (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)	40
ตารางที่ 3 แสดงปริมาณเชิงสัมพัทธ์ (%Relative abundance) ของกรดไขมันที่พบในตัวอย่าง <i>Chaetoceros</i> sp.	52
ตารางที่ 4 แสดงปริมาณเชิงสัมพัทธ์ (%Relative abundance) ของกรดไขมันที่พบในตัวอย่าง <i>Odontella</i> sp.1	53
ตารางที่ 5 แสดงปริมาณเชิงสัมพัทธ์ (%Relative abundance) ของกรดไขมันที่พบในตัวอย่าง <i>Thalassiosira</i> sp.1	54
ตารางที่ 6 ผลของสารสกัดไดอะตอมต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ต่างๆ	71
ตารางที่ 7 ผลของสารสกัดเมทานอลจากไดอะตอมต่ออัตราการรอดชีวิตของเซลล์ human keratinocytes, (HaCaT) ด้วยวิธี MTT assay	72

สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปภาพที่ 1 โครงสร้างของเซลล์ไดอะตอม	5
รูปภาพที่ 2 แนวโน้มในการพัฒนาผลิตภัณฑ์จากไดอะตอม	6
รูปภาพที่ 3 โครงสร้างทางเคมีของเบต้าแคโรทีน	12
รูปภาพที่ 4 โครงสร้างทางเคมีของฟูโคแซนทีน	13
รูปภาพที่ 5 กระบวนการดูดซึมและเมตาบอลิซึมของฟูโคแซนทีนในร่างกาย	14
รูปภาพที่ 6 โครงสร้างทางเคมีของสารแอสตาแซนธิน	14
รูปภาพที่ 7 โครงสร้างทางเคมีของกรดไขมันต่างๆ	17
รูปภาพที่ 8 IR spectra ของสารร้าย <i>H. pluvialis</i> สารเบต้าแคโรทีน และแอสตาแซนทีน ที่ทดสอบด้วยเทคนิค FTIR spectroscopy และ RAMAN-microspectroscopy	22
รูปภาพที่ 9 แผนผังการสกัดไดอะตอม	26
รูปภาพที่ 10 กราฟสารละลายมาตรฐานแคโรทีนอยด์ของ fucaxanthin, astaxanthin, zeaxanthin และ canthaxanthin	27
รูปภาพที่ 11 กราฟมาตรฐานเปรียบเทียบของสาร Gallic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆที่ ความยาวคลื่น 750 nm	29
รูปภาพที่ 12 กราฟมาตรฐานเปรียบเทียบของสาร Quercetin ที่ความเข้มข้นต่างๆที่ ความยาวคลื่น 405 nm	30
รูปภาพที่ 13 กราฟมาตรฐานเปรียบเทียบของสาร Trolox ที่ความเข้มข้นต่างๆที่ความ ยาวคลื่น 520 nm	32
รูปภาพที่ 14 กราฟมาตรฐานเปรียบเทียบของสาร Trolox ที่ความเข้มข้นต่างๆที่ความ ยาวคลื่น 734 nm	33
รูปภาพที่ 15 กราฟมาตรฐานเปรียบเทียบของสาร Trolox ที่ความเข้มข้นต่างๆที่ความ ยาวคลื่น 600 nm	34
รูปภาพที่ 16 ลักษณะของไดอะตอมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้	38
รูปภาพที่ 17 แอบริเอ็นเอที่ได้จากการสกัด <i>C. tenuissimus</i> lane 1-2 และ <i>T.</i> <i>pseudonana</i> lane 3-4	39
รูปภาพที่ 18 แอบริเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR ของ <i>C.</i> <i>tenuissimus</i> และ <i>T. pseudonana</i>	39

	หน้า
รูปภาพที่ 19 ลำดับดีเอ็นเอของ <i>C. tenuissimus</i> เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล	41
รูปภาพที่ 20 ลำดับดีเอ็นเอของ <i>T. pseudonana</i> เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล HF56511	41
รูปภาพที่ 21 กราฟฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดในตัวทำละลายต่างๆ ด้วยวิธี ABTS	42
รูปภาพที่ 22 ปริมาณสารสกัดเมทานอล (% yield of MeOH extract) ของไดอะตอม	43
รูปภาพที่ 23 ปริมาณฟีนอลิกรวมและฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดเมทานอลของไดอะตอม <i>Chaetoceros</i> sp. ที่สภาวะความเค็มและระยะเวลาเจริญเติบโตต่างๆ	44
รูปภาพที่ 24 ปริมาณฟีนอลิกรวมและฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดเมทานอลของไดอะตอม <i>Odontella</i> sp. ที่สภาวะความเค็มและระยะเวลาเจริญเติบโตต่างๆ	45
รูปภาพที่ 25 ปริมาณฟีนอลิกรวมและฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดเมทานอลของไดอะตอม <i>Thalassiosira</i> sp. ที่สภาวะความเค็มและระยะเวลาเจริญเติบโตต่างๆ	46
รูปภาพที่ 26 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานที่ retention time ต่างๆ และโครมาโทแกรมจากการวิเคราะห์ HPLC ของสารสกัดไดอะตอม	47
รูปภาพที่ 27 แสดงสัดส่วนของปริมาณสารสีกลุ่มแคโรทีนอยด์ ($\mu\text{g}/\text{g}$ น้ำหนักเปียก) ที่พบในสารสกัดไดอะตอมทั้ง	50
รูปภาพที่ 28 เปรียบเทียบ Total Ion Chromatogram ระหว่าง 37-FAME mix standard และ PUFA No. 1	51
รูปภาพที่ 29 แสดงตัวอย่าง Total Ion Chromatogram ของตัวอย่าง THA40-EXP เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน 37-FAME และ PUFA No.1	55
รูปภาพที่ 30 ไดอะตอมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ต่อกับ Synchrotron FTIR microscopy ที่ทำการแยกและจำแนกชนิดได้จากน้ำทะเลในเขตจังหวัดชลบุรี	56
รูปภาพที่ 31 แสดง IR spectrum จากสารมาตรฐาน carotenoids (สาร astaxanthin) และสารมาตรฐานกรดไขมัน PUFA marine	57
รูปภาพที่ 32 Principle component analysis (PCA) ของ <i>C. tenuissimus</i>	58
รูปภาพที่ 33 1 st และ 2 nd spectrum ของไดอะตอม <i>C. tenuissimus</i> และ Integral area สเปคตรัม	59
รูปภาพที่ 34 Principle component analysis (PCA) ของ <i>Thalassiosira</i> sp.	61
รูปภาพที่ 35 1st และ 2nd ของไดอะตอม <i>Thalassiosira</i> sp. ที่ระยะเวลาเจริญเติบโตต่างๆ และ Integral area สเปคตรัม	62
รูปภาพที่ 36 1 st Integral area ของไดอะตอม <i>Chaetoceros</i> sp. สเปคตรัมด้วยเทคนิค	63

	หน้า
SR-FTIR microspectroscopy	
รูปภาพที่ 37 1 st Integral area ของไดอะตอม <i>Thalassiosira</i> sp. สเปกตรัมด้วย เทคนิค SR-FTIR microspectroscopy	64
รูปภาพที่ 38 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจาก <i>Chaetoceros</i> sp. ในสภาวะต่างๆ ด้วยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP assay	65
รูปภาพที่ 39 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจาก <i>Odontella</i> sp. ในสภาวะต่างๆ ด้วยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP assay	67
รูปภาพที่ 40 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจาก <i>Thalassiosira</i> sp. ในสภาวะต่างๆ ด้วยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP assay	69

บทที่ 1

บทนำ

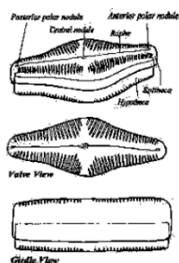
1. การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

ประเทศไทยตั้งอยู่ในเขตร้อนแถบอินโด-แปซิฟิกทำให้มีระบบนิเวศทางทะเลที่มีความหลากหลายทางชีวภาพค่อนข้างสูง รวมถึงความหลากหลายของสาหร่ายขนาดเล็กในกลุ่มไดอะตอมที่สำรวจพบว่ามีศักยภาพในการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา (Mekjaruskul et al. 2016) จากโครงการการพัฒนาคูณค่าความหลากหลายทางชีวภาพของจุลสาหร่ายในแถบชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกของประเทศไทย (สนองพระราชดำรินโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี) ประจำปีงบประมาณ 2558 จึงนำมาสู่การศึกษาสาหร่ายกลุ่มไดอะตอมเพื่อพัฒนาศักยภาพในทางเภสัชวิทยาในทะเลฝั่งตะวันออกของจังหวัดชลบุรี

1. สาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอม

ไดอะตอมเป็นสาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มหนึ่งที่ลอยอยู่ในน้ำสุดแต่คลื่นลมจะพัดพาไป มีความสำคัญโดยเป็นผู้ผลิตขั้นต้นในระบบนิเวศ โดยผลผลิตเบื้องต้นที่เกิดจากไดอะตอมมากถึง 20-25 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณสุทธิของผลผลิตขั้นต้นของโลก (Werner,1977) และมีจำนวนชนิดของไดอะตอมทะเลมากถึง 1,400-1,800 ชนิด ข้อมูลด้านความหลากหลายมีประโยชน์อย่างยิ่งต่อการศึกษาระบบนิเวศทางทะเล เนื่องจากความหลากหลายของไดอะตอมขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม ซึ่งไดอะตอมแต่ละชนิดมีสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตแตกต่างกันไดอะตอมจัดอยู่ใน Division Chromophyta และจัดอยู่ใน Class Bacillariophyceae ซึ่งเป็นแพลงตอนพืช ที่มีขนาด 5-500 ไมครอน ไดอะตอมมีการแพร่กระจายอย่างกว้างขวาง ทั้งน้ำจืด น้ำกร่อยและน้ำเค็ม โดยไดอะตอมมีลักษณะพิเศษคือ ผนังหุ้มเซลล์ประกอบด้วยซิลิกา ซึ่งปริมาณซิลิกาที่อยู่บนผนังเซลล์มีความแตกต่างกัน จึงทำให้เซลล์ของไดอะตอมแต่ละชนิดมีลวดลายที่แตกต่างกัน โครงสร้างของไดอะตอม ประกอบด้วยผนังเซลล์ ที่เป็นซิลิกอกอนออกไซด์ 96.5% อลูมิเนียมออกไซด์ 11.5% และเฟอริกออกไซด์ ไดอะตอมมีลักษณะเด่นที่แตกต่างจากแพลงก์ตอนพืชในกลุ่มอื่น ๆ คือ โครงสร้างของเซลล์ประกอบด้วยฝา 2 ฝาคงรูปกันพอดีเรียกว่า ฟรัสตูล (frustule) (ดังรูปที่ 1) ผนังของฟรัสตูลเป็นสารประกอบพวกซิลิกา (silica, $\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$) และเพคติน ขนาดของเซลล์ประมาณ 2 ไมครอน-2 มิลลิเมตร ส่วนใหญ่อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว ๆ และมีหลายชนิดอยู่ต่อกันเป็นกลุ่ม (colony) หรือเรียงกันเป็นสายโซ่ (chain) การเรียงต่อกันของเซลล์มีหลายแบบด้วยกัน เช่น ใช้หน้าฝาดูกัน

หรือใช้หนามบนหน้าผาเดียวกัน เซลล์อาจเชื่อมต่อกันโดยใช้สายไฟเบอร์ที่ประกอบด้วยไคติน หรือแผ่นโพลีแซคคาไรด์ซึ่งอยู่ที่มุมเซลล์ไดอะตอมสี่พันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยการแบ่งเซลล์แบบ binary fission คือแบ่งจาก 1 เซลล์เป็น 2 เซลล์ ซึ่งในการแบ่งแต่ละครั้งขนาดของเซลล์จะเล็กลงจนเซลล์มีขนาดวิกฤต ไดอะตอมมีวิธีการรักษาขนาดในแต่ละชนิดโดยการเพิ่มขนาดเซลล์ด้วยการสร้างออกโซสปอร์ (auxospore) และการสี่พันธุ์แบบอาศัยเพศ ในเซนทริกไดอะตอม (centric diatom) เป็นแบบ oogamous โดยเซลล์สี่พันธุ์เพศผู้มีขนาด 1 เส้น และเพนแทนต์ไดอะตอม (pennate diatom) เป็นแบบ isogamous ลักษณะของเซลล์สี่พันธุ์เป็นแบบ amoeboid gamete ทั้งเพศผู้และเพศเมีย นอกจากนี้ในพวกเซนทริกไดอะตอมมีการสร้างเรสติงสปอร์ (resting spore) ซึ่งเกิดขึ้นในขณะที่เซลล์มีขนาดใกล้เคียงกับขนาดวิกฤต หรืออยู่ในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม (ลัดดา, 2542; and Syvertsen, 1997)



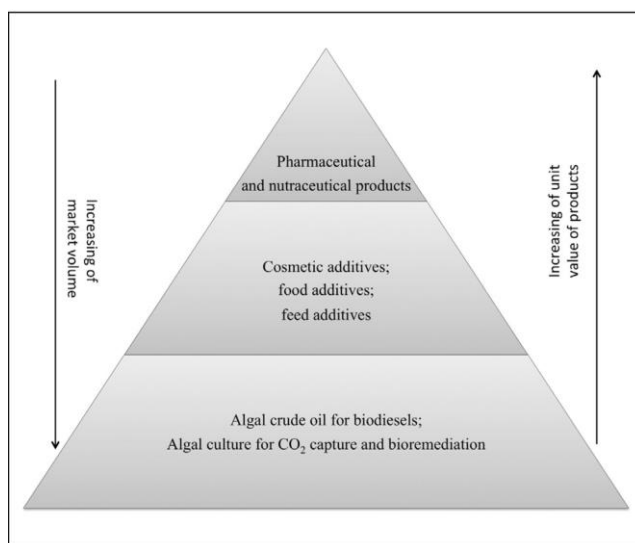
รูปภาพที่ 1 โครงสร้างของเซลล์ไดอะตอม (ลัดดา, 2542)

ไดอะตอมพบแพร่กระจายทั้งในน้ำจืด น้ำกร่อย และน้ำเค็ม โดยมีการประมาณว่ามีไดอะตอมกลุ่มที่เป็นแพลงก์ตอนทะเลมีมากถึง 1,400-1,800 ชนิด มีความสำคัญในแหล่งน้ำโดยจัดเป็นผู้ผลิตเบื้องต้นในระบบนิเวศ เซลล์มีสารสีหลัก คือ คลอโรฟิลล์ เอ และซี สารสีประกอบ ได้แก่ เบตาแคโรทีน (β -carotene) และเอปซีลอน-แคโรทีน (ϵ -carotene) ฟุโคแซนธิน (fucoxanthin) ไดอะโตแซนธิน (diatoxanthin) และ ไดอะไดโนแซนธิน (diadinoxanthin) สำหรับขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอม เช่น Chaetoceros sp., และ Skeletonema sp. มีคุณค่าทางโภชนาการสูงสำหรับสัตว์น้ำเศรษฐกิจของประเทศไทยโดยเฉพาะลูกกุ้ง ทะเล การที่สาหร่ายฯ ถูกนำไปใช้อย่างหลากหลาย เนื่องจากมีองค์ประกอบทางชีวเคมีที่สำคัญ เช่น มีโปรตีนสูง มีกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวสูง มีสารออกฤทธิ์ที่สำคัญ (bioactive compounds) มีรงควัตถุ และบางชนิดยังมีไขมัน และ/หรือน้ำมันในปริมาณสูงและมีศักยภาพที่จะนำไปสู่การพัฒนาให้เป็นแหล่งพลังงานทดแทนต่อไปได้ การเพาะเลี้ยงสาหร่ายฯ ในระดับเชิงพาณิชย์ (Large scale/ commercial scale production) โดยอาศัยแสงอาทิตย์และคาร์บอนไดออกไซด์เป็นส่วนสำคัญต่อการพัฒนาอย่างยั่งยืน ประเทศไทยมีข้อได้เปรียบเนื่องจากสภาวะภูมิอากาศที่อำนวยต่อการเพาะเลี้ยง รวมถึง

ต้นทุนแรงงานที่ยังแข่งขันได้ หากมีการพัฒนาเทคโนโลยีเพิ่มเติมอย่างจริงจังโดยเฉพาะอย่างยิ่งระบบการเพาะเลี้ยงที่มีประสิทธิภาพ จะทำให้ประเทศไทยมีศักยภาพในการนำสาหร่ายฯ ชนิดต่าง ๆ ไปใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุด สอดคล้องกับนโยบายของรัฐในการสนับสนุนให้เกิดการพัฒนาทรัพยากรมนุษย์และการพัฒนาเทคโนโลยีของประเทศ

2. การศึกษาการเพิ่มมูลค่าเพิ่ม และปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของสาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอม

ปัจจุบันไดอะตอมมีศักยภาพในการพัฒนาไปเป็นผลิตภัณฑ์หลากหลายชนิดในท้องตลาด ข้อมูลทั่วไปทางตามรูปแบบการตลาดพบแนวโน้มในการพัฒนาผลิตภัณฑ์จากไดอะตอมเป็น 3 ระดับ ดังรูปที่ 1 การศึกษาไดอะตอมส่วนมากจะเป็นการสำรวจแหล่งไดอะตอมในธรรมชาติ อย่างไรก็ตามยังคงมีไดอะตอมอีกเป็นจำนวนมากที่ยังไม่มีการศึกษาการเพิ่มมูลค่าในทางด้านเศรษฐกิจสังคม รวมทั้งการพัฒนาศักยภาพของไดอะตอมไปเป็นเครื่องสำอาง อาหาร หรือยานั้นยังมีน้อยมาก (Fu et al., 2015)



รูปภาพที่ 2 แนวโน้มในการพัฒนาผลิตภัณฑ์จากไดอะตอม

สาหร่ายขนาดเล็กดำรงชีวิตแบบ Autotrophic organism เป็นสิ่งมีชีวิตที่ผลิตออกซิเจนให้แก่สิ่งแวดล้อม สาหร่ายจัดเป็นผู้ผลิต (producer) ที่มีจำนวนมากที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับกระบวนการสังเคราะห์แสงเกิดขึ้นมากกว่า 50% โดยสาหร่าย ทำให้สาหร่ายและแพลงก์ตอนที่อาศัยอยู่ในน้ำนั้นจัดเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีจำนวนมาก และยังเจริญเติบโตได้เป็นจำนวนมากอย่างรวดเร็ว จากการศึกษาซากฟอสซิลพบว่าเมื่อประมาณ 3.5 พันล้านปีหรือ

อาจจะนานกว่านั้น ไชยาโนแบคทีเรียอาศัยอยู่ในชั้นบรรยากาศโลกที่เต็มไปด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ ในปริมาณที่มากกว่าปัจจุบันถึง 10-100 เท่า และมีออกซิเจนอยู่ในปริมาณที่น้อยมาก โดยอาศัยอยู่ด้วยกระบวนการสังเคราะห์แสง จึงทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงบรรยากาศของโลกให้มีปริมาณออกซิเจนที่เพิ่มมากขึ้นในปัจจุบัน และอาจเป็นที่มาของวิวัฒนาการของกระบวนการหายใจใช้ออกซิเจน (Aerobic respiration) นอกจากนี้ยังพบว่าไชยาโนแบคทีเรียสามารถตรึงไนโตรเจนในชั้นบรรยากาศ และออกซิเจนที่เพิ่มขึ้นในชั้นบรรยากาศมีผลต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ nitrogenase โดยสาหร่ายขนาดเล็กมีบทบาทในกระบวนการตรึงไนโตรเจน โดยสามารถเปลี่ยนอนินทรีย์ไนโตรเจน เช่น แอมโมเนีย (NH_4^+) และ ไนเตรต (NO_3) ไปเป็นอินทรีย์ไนโตรเจน ในรูปของกรดอะมิโนได้ ดังนั้นจึงทำให้สาหร่ายขนาดเล็กและไชยาโนแบคทีเรียบางชนิดสามารถเจริญเติบโตได้ในสิ่งแวดล้อมที่มีปริมาณไนโตรเจนต่ำๆ (Glaham และ Wilcox, 2000) ปัจจุบันผู้บริโภคให้ความสนใจผลิตภัณฑ์ที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพที่ทำมาจากธรรมชาติ เนื่องจากมีรายงานถึงอันตรายน้อยกว่าการใช้ผลิตภัณฑ์สังเคราะห์ทางเคมี แคโรทีนอยด์ เป็นตัวอย่างหนึ่งที่อุตสาหกรรมอาหารมีความต้องการใช้แคโรทีนอยด์ในปริมาณสูง เช่นอุตสาหกรรมอาหารที่จำเป็นต้องใช้สารสีจากแคโรทีนอยด์ หรืออาหารเสริมเพื่อสุขภาพ ซึ่งนอกจากจะให้สีเหลืองที่มาจากธรรมชาติแล้ว แคโรทีนอยด์ยังประกอบด้วยเบต้าแคโรทีน ซึ่งเป็นสารเริ่มต้นในการสังเคราะห์วิตามินเอของร่างกาย และเบต้าแคโรทีนยังมีคุณสมบัติเป็นแอนต้ออกซิแดนต์ ซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระอีกด้วย นอกจากนี้ในอุตสาหกรรมอาหารแล้ว แคโรทีนอยด์ยังเป็นสารที่มีการใช้มากในอุตสาหกรรมยาและเครื่องสำอาง อย่างไรก็ตาม แคโรทีนอยด์มีราคาสูงถึงประมาณกิโลกรัมละ 5,000-100,000 บาท เนื่องจากต้องนำเข้าจากต่างประเทศ แม้ว่าในปัจจุบันจะมีการผลิตเบต้าแคโรทีนโดยวิธีการสังเคราะห์ซึ่งมีราคาถูกกว่าเบต้าแคโรทีนที่สกัดได้จากธรรมชาติแต่ผู้บริโภคทั่วไปให้ความสนใจและยอมรับแคโรทีนอยด์ที่มาจากธรรมชาติมากกว่า

3. การศึกษาสาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอมในประเทศไทย

การศึกษาแพลงก์ตอนพืชทะเลในประเทศไทยได้เริ่มมาเป็นเวลาประมาณหนึ่งศตวรรษแล้ว โดย Schmidt (1901) ทำการสำรวจบริเวณหมู่เกาะช้าง และเกาะกูด ซึ่ง Ostenfeld (1902) รายงานว่าพบไดอะตอมทะเลสกุล Rhizosolenia 16 ชนิด และมีนักวิชาการไทยศึกษาความหลากหลายของแพลงก์ตอนพืชทะเลในอ่าวไทยและทะเลอันดามันเรื่อยมา โดยผลการศึกษาคั้งนั้น ได้ตีพิมพ์ในหนังสือ “Flora of Koh Chang. Contributions to the knowledge of the vegetation in the Gulf of Siam” (Schmidt, 1900-1916) ซึ่งในหนังสือเล่มนี้ได้มีงานวิจัยย่อยเกี่ยวกับไดอะตอมทะเล 2 เรื่องคือ (1) แพลงก์ตอนไดอะตอมทะเล (Marine Plankton Diatoms) (Ostenfeld, 1902) โดยได้ทำการศึกษาในตัวอย่างที่ Johs. Schmidt (1901) ทำการศึกษาไดโนแฟลเจลเลต ในอันดับ Peridinales จำนวน 10 ตัวอย่างเก็บตัวอย่างที่ผิวน้ำ ด้วยผ้าไหมช่องตาถี่ (fine silk-nets) ตัวอย่างเก็บรักษาในน้ำยาฟอร์มาลิน 4 เปอร์เซ็นต์ จำแนกชนิดตาม Cleve (1900) เรื่อง “The Seasonal Distribution of

Atlantic Plankton Organisms” ซึ่งตัวอย่าง แพลงก์ตอนส่วนใหญ่เป็นชนิดที่พบบริเวณชายฝั่งเขตร้อน จากการศึกษาพบไดอะตอมทั้งสิ้น 28 สกุล 77 ชนิด ในจำนวนนี้มีชนิดใหม่ 5 ชนิด คือ *Rhizosolenia amputate* Ostenfeld, *R. clevei* Ostenfeld, *Chaetoceros clavigera* Ostenfeld, *C. siamense* Ostenfeld และ *Schmidtella pelagica* Ostenfeld ซึ่งสกุล *Schmidtella* Ostenfeld ตั้งขึ้นเพื่อเป็นเกียรติ ให้กับ Johs. Schmidt ที่เป็นผู้เก็บตัวอย่างจากประเทศไทย สำหรับสกุลที่มีชนิดมาก ได้แก่ *Chaetoceros* (23 ชนิด), *Rhizosolenia* (14 ชนิด) และ *Coscinodiscus* (6 ชนิด) เป็นต้น (2) ไดอะตอมทะเล (Marine Diatoms) (Östrup, 1904) เก็บตัวอย่าง 14 สถานี พบ ไดอะตอม 66 สกุล 274 ชนิด พบชนิดใหม่ 11 ชนิด ได้แก่ *Glyphodesmis siamensis* Östrup, *Cyclophora siamensis* Östrup, *Navicula (Pinnularia) farcimen* Östrup, *Navicula (Caloneis) siamensis* Östrup, *Navicula (Diploneis) ocellata* Östrup, *Van Heurckia siamensis* Östrup, *Navicula subglabra* Östrup, *Scolioleura siamensis* Östrup, *Mastogloia quadrinotata* Östrup, *M. parvula* Östrup และ *Rhoicosphenia tenuissima* Östrup สำหรับสกุลที่มีจำนวนชนิดมาก ได้แก่ *Mastogloia* (26 ชนิด), *Amphora* (21 ชนิด), *Diploneis* (21 ชนิด), *Navicula* (18 ชนิด), *Nitzschia* (17 ชนิด), *Pleurosigma* (12 ชนิด), *Plagiogramma* (12 ชนิด) และ *Campylodiscus* (12 ชนิด) เป็นต้น ต่อมาในปี 2546 ได้มีทำการสำรวจแพลงก์ตอนทะเลในจังหวัดชุมพรและตราด โดยในจังหวัดตราดได้เก็บรวบรวมตัวอย่างจากเกาะกูดด้านทิศใต้ ทิศตะวันออก และทิศตะวันตก ซึ่งเป็นอาณาเขตที่อยู่ในความดูแลของกองทัพเรือ เก็บตัวอย่างในเวลากลางวันและกลางคืน ระหว่างวันที่ 4-11 เมษายน 2545 จำนวน 10 สถานี ในบริเวณอ่าวคลองเจ้า อ่าวพร้าวแหลมเทียน อ่าวกระทิง อ่าวกระลัง อ่าวใหญ่ อ่าวกล้วย อ่าวจาก อ่าวไทร และบริเวณปากคลองเจ้า (น้ำกร่อย) พบแพลงก์ตอนพืชทั้งสิ้น 119 ชนิด 50 สกุล เป็นไดอะตอม 85 ชนิด 37 สกุล และได้รายงานความถี่ในการพบตามพื้นที่ (เปอร์เซ็นต์) (ลัดดา และคณะ, 2546) และเมื่อเปรียบเทียบกับกรายงานของ Schmidt (1901) และ Ostenfeld (1902) ปรากฏว่าพบแพลงก์ตอนเพิ่มเติมจากที่ได้รายงานไว้แล้ว (additional record) จำนวน 80 ชนิด ในปี 2547 บัณฑิตา ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างคุณภาพน้ำและการแพร่กระจายของแพลงก์ตอนพืชบริเวณหมู่เกาะช้าง จังหวัดตราดในรอบปี (เม.ย. 2545-มี.ค. 2546) พบว่าองค์ประกอบของแพลงก์ตอนพืชในกลุ่มไดอะตอมมีปริมาณมากที่สุด รองลงมาคือ ไดโนแฟลเจลเลต สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน และสาหร่ายสีเขียวตามลำดับ คือพบไดอะตอมอย่างน้อย 151 ชนิด 64 สกุล โดย *Bacteriastrum*, *Chaetoceros* และ *Rhizosolenia* เป็นสกุลที่เด่น สำหรับค่าดัชนีความหลากหลายในเดือนมีนาคม 2546 มีค่าในช่วง 3.42-5.34 สาหร่ายทะเลขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอม จัดเป็นกลุ่มผู้ผลิตขั้นต้นในระดับชั้นอาหาร (trophic level) ลำดับล่างสุดของโซ่อาหารที่มีความสำคัญที่สุดในทะเล ไดอะตอมมีความหลากหลายของชนิดและปริมาณสูงโดยเฉพาะอย่างยิ่งในสกุล *Chaetoceros*, *Bacteriastrum* และ *Rhizosolenia* สำหรับสกุล

Rhizosolenia พบทั่วไปในทะเลและมีปริมาณรองลงมาจาก 2 สกุลแรก และบางครั้งอาจพบเป็นสกุลเด่นเฉพาะพื้นที่ที่มีผลผลิตสูง สกุลนี้เป็นสมาชิกในกลุ่มเซนทริกไดอะตอมที่เป็นแพลงก์ตอน (planktonic centric diatom) ซึ่งมีความใกล้ชิดกับสกุล *Pseudosolenia* และ *Proboscia* ซึ่งทั้ง 3 สกุลจัดอยู่ใน Division Chromophyta, Class Bacillariophyceae, Order Biddulphiales และ Family Rhizosoleniaceae Sundström (1986) ได้ทำการศึกษาไดอะตอมทะเลสกุล *Rhizosolenia* Brightwell ที่เก็บตัวอย่างจากพื้นที่หลายแห่งรวมถึงประเทศไทย ด้วย ภายใต้อกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง (LM) และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (EM) ผลการศึกษาพบชนิดใหม่ 5 ชนิด คือ *R. acicularis*, *R. borealis*, *R. ostenfeldii*, *R. fallax* และ *R. decipiens* และชนิดที่มีความแตกต่างภายในชนิด (infraspecific taxa) 4 ชนิด คือ *R. polydactyla f. squamosa*, *R. castracanei var. neglecta*, *R. antennata f. semispina* และ *R. sima f. silicea* ซึ่งแต่เดิม Hustedt (1930) ได้รายงานไว้ทั้งหมด 27 ชนิด เป็นชนิดที่อยู่ในทะเล 24 ชนิด และน้ำจืด 3 ชนิด นอกจากนี้ยังได้ศึกษารายละเอียดของชนิด *Pseudosolenia calcar-avis* และ *Proboscia alata* ไว้อีกด้วย

การเจริญเติบโตของสาหร่าย แบ่งได้ 5 ระยะ (ลัดดา วงศ์รัตน์, 2543) ดังนี้

1) ระยะปรับตัว (Lag Phase) ระยะปรับตัวเป็นระยะที่เซลล์สาหร่ายปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อม เช่น แสง อุณหภูมิ ธาตุอาหาร ระยะนี้จะไม่เกิดการแบ่งเซลล์ของสาหร่าย ถ้าเซลล์สาหร่ายไม่สามารถปรับตัวได้เซลล์จะตาย สาหร่ายจะผ่านระยะนี้ไปได้เร็วหรือช้าขึ้นอยู่กับความแข็งแรงของเซลล์สาหร่าย และความอุดมสมบูรณ์ของอาหารที่ใช้เลี้ยง ถ้าสภาพทั้ง 2 อย่างนี้มีความเหมาะสมก็จะเข้าสู่ระยะ exponential phase ได้เร็วยิ่งขึ้น

2) ระยะเอกซ์โพเนนเชียล (Exponential Phase) ระยะเอกซ์โพเนนเชียลเป็นระยะที่สาหร่ายเจริญเติบโตและขยายพันธุ์อย่างรวดเร็ว ซึ่ง ขึ้นอยู่กับปริมาณสารอาหาร และ สมบัติทางฟิสิกส์ เคมี ของสิ่งแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ ความเข้มแสง ช่วงแสง การเจริญเติบโตของระยะนี้จะรวดเร็วในระยะแรก และจะค่อย ๆ ช้าลงตามลำดับ

3) ระยะเฉื่อย (Retardation Phase หรือ Phase of Declining Relative Growth) ระยะเฉื่อยเป็นช่วงที่สาหร่ายเจริญเติบโตช้าลงเนื่องจากขาดแคลนอาหาร เช่น ไนโตรเจน คาร์บอน หรือออกซิเจน เพราะมีปริมาณของสาหร่ายหนาแน่นเกินไป pH จะเสียสมดุล เนื่องจากเกิดแอมโมเนียเพิ่มขึ้นอย่างมาก หรือแสงสว่างลดลงเนื่องจากการบังกันเองของสาหร่าย (autoshading)

4) ระยะคงที่ (Stationary Phase) ระยะคงที่เป็นระยะที่สารอาหารลดลง และเกิดสารพิษจากกระบวนการเมแทบอลิซึม หรือการสลายตัวของสาหร่ายเพิ่มขึ้น ทำให้การเจริญเติบโตของสาหร่ายหยุดนิ่ง

5) ระยะตาย (Death Phase) ระยะตายเป็นระยะที่สาหร่ายหยุดการเจริญเติบโต เนื่องจากสารอาหารหมดลง สภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต และเกิดของเสียจำนวนมาก สาหร่ายจะตายเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว

4. ลักษณะทางพันธุกรรมของสาหร่ายขนาดเล็ก

สาหร่ายขนาดเล็กหรือจุลสาหร่ายมีความหมายรวมถึง สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินซึ่งเป็นโพรคาริโอต และสาหร่ายที่เป็นยูคาริโอต ซึ่งมีความแตกต่างกันของลักษณะทางพันธุกรรมอย่างมาก โดยสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินหรือไซยาโนแบคทีเรียจะมีลักษณะทางพันธุกรรมคล้ายกับแบคทีเรียโดยมีสารพันธุกรรมเป็น DNA ที่ต่อกันเป็นวงแหวนแขวนลอยอยู่ในไซโตพลาสซึม ไม่มีโปรตีนฮิสโตน (Protein histone) มีจำนวน DNA 1 ชุดต่อเซลล์ และไรโบโซมขนาด 70s (Graham and Wilcox, 2000) ถึงแม้ว่ารูปแบบการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศพบได้ในแบคทีเรียบางชนิด แต่ในไซยาโนแบคทีเรียไม่มี พบว่าไวรัสสามารถเข้าไปอาศัยในไซยาโนแบคทีเรียและมีการถ่ายทอดสารพันธุกรรมไปยังไซยาโนแบคทีเรียอีกชนิดหนึ่งได้โดยการถ่ายโอนยีน (Transduction) (วันเพ็ญ, 2549) ส่วนสาหร่ายที่เป็นยูคาริโอตสามารถพบสารพันธุกรรมที่ได้จาก 3 บริเวณ คือ นิวเคลียส พบสารพันธุกรรมในรูปของโครมาติน หรือโครโมโซม โดยเป็นส่วนของสาย DNA ที่มีโปรตีนฮิสโตนห่อหุ้มโดยรอบ โครโมโซมของสาหร่ายขนาดเล็กจะมีจำนวนตั้งแต่ 5-48 แท่ง หรือมากกว่าและพบสารพันธุกรรมในอีก 2 บริเวณ คือ ไมโทคอนเดรียและคลอโรพลาสต์ ซึ่งเป็น DNA ที่ต่อกันเป็นวงแหวนและไม่มีโปรตีนฮิสโตน (Graham and Wilcox, 2000)

ในประเทศไทยมีรายงานการศึกษาการแยกชนิดของสายพันธุ์จุลสาหร่ายอย่างจำกัด ทั้งนี้เนื่องจากต้องใช้ความชำนาญและประสบการณ์ในการวิจัย วิธีการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอเป็นอีกหนึ่งเทคนิคที่นิยมใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ของสาหร่ายทะเล ตัวอย่างเช่นการศึกษาการแยกชนิดของสาหร่ายสีเขียว ได้แก่ *Chlorella* spp. และ *Scenedesmus* spp. โดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยวิธี RAPD-PCR ใช้ไพรเมอร์ CRL-7 หรือ 27f หรือ 1492r เพื่อจำแนกชนิดของจุลสาหร่ายดังกล่าวพบว่า เทคนิค RAPD-PCR สามารถแยกชนิดของจุลสาหร่ายได้ทั้งหมด 5 สายพันธุ์ (สุภัทรวณิช แสงวดี. 2549) นอกจากนี้ยังมีรายงานความสัมพันธ์ระหว่างสารปริมาณ β -carotene และ 18sDNA ในสาหร่ายสกุล *Dunaliella* spp. ซึ่งเป็นสกุลที่สำคัญในการผลิตสาร β -carotene (Takaichi, 2011; Olmos, 2009) ดังนั้นในการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอของจุลสาหร่ายแต่ละชนิดนอกจากจะใช้แยกความแตกต่างในแต่ละชนิดแล้วยังสามารถใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสาร carotene ที่พบในสาหร่ายแต่ละชนิดได้ ทั้งนี้จุลสาหร่ายและพวกไซยาโนแบคทีเรีย จัดเป็นโพรคาริโอตที่มีข้อมูลลักษณะสมบัติ ในระดับโมเลกุลที่จำเพาะเจาะจง ดังนั้นข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอในจุลสาหร่ายไม่เพียงแต่เป็นประโยชน์ต่อการประยุกต์ในอุตสาหกรรม แต่ยังมีส่วนเสริม

ความก้าวหน้างานวิจัยด้านพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุลของไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายขนาดเล็กในประเทศไทยอีกด้วย

ปัจจุบันได้มีการใช้วิธีทางอนุชีววิทยาในการจัดจำแนกสาหร่าย โดยใช้วิธี RFLP analysis, RAPDs, Microsatellite DNA และ Nucleic acid sequencing วิธีทางอนุชีววิทยาที่เหมาะสมในการจัดจำแนกและหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสาหร่าย คือการหาลำดับเบสของนิวคลีโอไทด์ ในส่วนของ Ribosomal RNA gene ในบริเวณ 18S และ Internal transcribed spacer region (ITS) ซึ่งสามารถหาข้อมูลในการเทียบได้จาก GenBank (Graham and Wilcox, 2000)

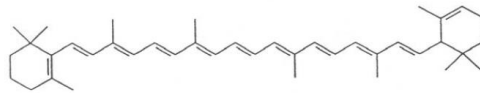
5. สารสำคัญที่มีประโยชน์ในไคอะตอม

แคโรทีนอยด์ (carotenoid) เป็นรงควัตถุที่มีสีเหลือง ส้ม หรือแดง พบได้ทั่วไปในสิ่งมีชีวิต เช่น พืชชั้นสูง สาหร่าย สัตว์ และจุลินทรีย์ ซึ่งแคโรทีนอยด์ในพืชนั้นสามารถพบได้ในส่วนต่างๆ เช่น ผล ดอก และราก ส่วนแคโรทีนอยด์เป็นรงควัตถุที่เป็นสารตั้งต้นของวิตามินเอ (provitamin A) มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ จึงทำให้สารกลุ่มแคโรทีนอยด์นี้ได้รับความสนใจที่จะนำมาใช้ในการเพิ่มผลิตภัณธ์ อาหารในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อาหาร เนยเทียม น้ำส้ม เครื่องดื่มที่ไม่มีแอลกอฮอล์ อาหารสัตว์ และเครื่องสำอาง () แคโรทีนอยด์จัดอยู่ในกลุ่มสารประกอบไฮโดรคาร์บอนและอนุพันธ์ของไฮโดรคาร์บอนที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ อาจจะอยู่ในรูปอะลิฟาติก (aliphatic) หรืออะโรมาติก (aromatic) โดยหน่วยย่อยสุดของแคโรทีนอยด์จะประกอบด้วย isoprene unit เชื่อมต่อกัน 8 หน่วย (Young, 1993,)

แคโรทีนอยด์แบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ แคโรทีน (carotene) จะเป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอน และออกซิแคโรทีนอยด์ (oxycarotenoid) หรือแซนโทฟิลล์ (xanthophyll) จะเป็นกลุ่มสารที่ประกอบไปด้วยไฮโดรคาร์บอนและออกซิเจน โดยในกลุ่มแคโรทีนมีอยู่ 3 ชนิด ได้แก่ แอลฟา (α) เบต้า (β) และเอปซีลอน (ϵ) ชนิดที่พบมากที่สุดและได้รับความสนใจมาก คือเบต้าแคโรทีน (β -carotene) ถูกนำมาใช้เป็นอาหารเสริมเพื่อใช้ในการป้องกันอนุมูลอิสระ ช่วยเพิ่มภูมิคุ้มกันของร่างกาย และมีฤทธิ์รักษาโรคต่างๆ นอกจากนี้ยังใช้ในอุตสาหกรรมเภสัชกรรมโดยผสมในอาหารสัตว์น้ำ และสัตว์ปีก เพื่อให้สัตว์น้ำมีสีส้มที่สวยงามขึ้น และยังส่งผลต่อการปรับปรุงระบบสืบพันธุ์ของสัตว์ ในสาหร่ายขนาดเล็กประกอบไปด้วยแคโรทีนอยด์แต่ละชนิดแตกต่างกันไป สารในกลุ่มแซนโทฟิลล์ที่พบว่ามีฤทธิ์สำคัญทางเภสัชวิทยา ได้แก่ fucoxanthin astaxanthin, diadinoxanthin, diatoxanthin เป็นต้น (Xia et al., 2013)

1) เบต้าแคโรทีน (β -carotene)

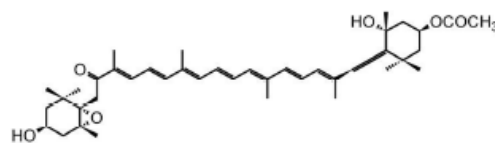
เบต้าแคโรทีนเป็นสารชนิดหนึ่งในกลุ่มแคโรทีนอยด์ มีสีส้ม แดง มีคุณสมบัติไม่ละลายทั้งในน้ำและในแอลกอฮอล์ แต่สามารถละลายได้ดีในคลอโรฟอร์ม โดยเบต้าแคโรทีนจะพบได้ในพืชและสาหร่ายทุกชนิด (กาญจนภาชน์ ลีวมนอนต์, 2527) โครงสร้างทางเคมีของเบต้าแคโรทีนจะประกอบด้วยโมเลกุลของไฮโดรคาร์บอนที่ต่อกันเป็นสายยาวด้วยโมเลกุลของ isoprene unit ต่อกัน ดังรูปที่ เป็นโมเลกุลที่ไม่อิ่มตัว มีองค์ประกอบเป็นคาร์บอน 40 อะตอม และไฮโดรเจน 56 อะตอม สารเบต้าแคโรทีนมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 536.7 ลักษณะทาง stereoisomer ของเบต้าแคโรทีนที่ได้จากธรรมชาติมีอยู่ 2 รูปแบบ คือ all-trans β -carotene และ 9-cis β -carotene โดยทั่วไป β -carotene ที่อยู่ในรูปผลึกจะมีสีม่วงแดง แต่เมื่ออยู่ในสารละลายพวกน้ำมันจะให้สีที่แตกต่างกัน ในการสังเคราะห์ β -carotene โดยวิธีทางเคมีจะได้ all-trans β -carotene มากถึง 90% โดย และ 9-cis β -carotene ไม่สามารถสังเคราะห์ได้และจะพบได้ในธรรมชาติเท่านั้น (Goiris et al. 2012)



รูปภาพที่ 3 โครงสร้างทางเคมีของเบต้าแคโรทีน (Goiris et al. 2012)

2) Fucoxanthin

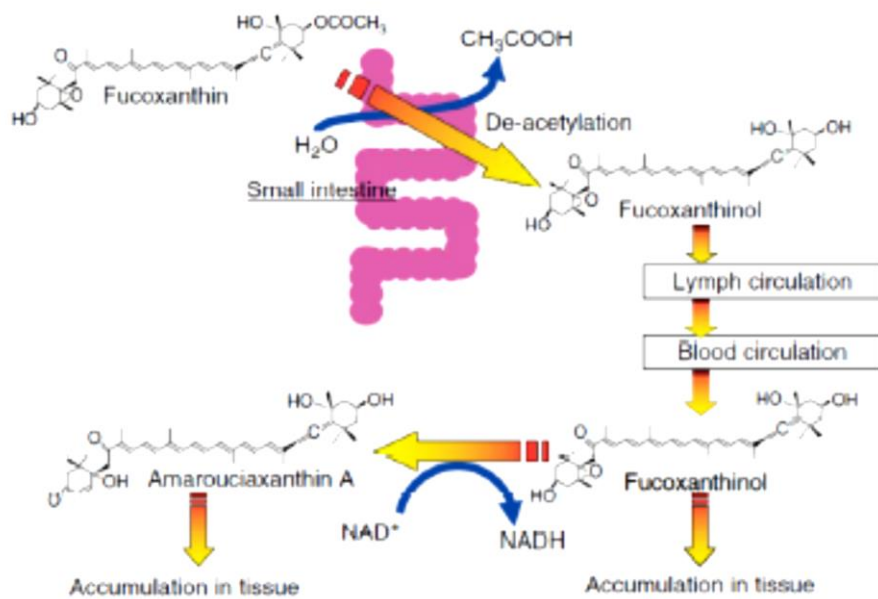
นอกจากสารในกลุ่มโพลีฟีนอลแล้วในสาหร่ายยังพบสารฟุโคแซนทิน ซึ่งเป็นสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ ที่พบได้มากในสาหร่ายสีน้ำตาล เช่น Undaria (wakame) และ Laminaria (combu) สาหร่ายทั้งสองชนิดนี้เป็นสาหร่ายที่นิยมรับประทานเป็นอาหารในประเทศญี่ปุ่น เกาหลี และจีน จึงทำให้ มีผู้สนใจศึกษาคุณค่าทางโภชนาการมาเป็นเวลานาน สารฟุโคแซนทิน (Fucoxanthin) โครงสร้างของฟุโคแซนทินจะมีหมู่ functional อยู่ที่ terminal ring (รูปที่ 5) นี้มีผลต่อการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่น่าสนใจมากมาย



รูปภาพที่ 4 โครงสร้างทางเคมีของฟุโคแซนทิน ที่มา: Gammon et al., 2015

มีรายงานพบว่าสารฟุโคแซนทินที่พบในสาหร่ายสีน้ำตาลนั้นสามารถดูดซึมเข้าสู่ร่างกายได้ โดยจะเป็นจากฟุโคแซนทินไปเป็นฟุโคแซนทินอล (fucoxanthinol) ได้ในลำไส้เล็ก และจากนั้นจะเปลี่ยนไปเป็น

amarouciaxanthin A และถูกดูดซึมไปยังระบบต่างๆ ของร่างกายดังรูปที่ 6 (Miyashita et al., 2012) มีผลในการยับยั้งทางชีวภาพหลายประการ เช่น ยับยั้งการเกิดภาวะโรคอ้วน (Maeda et al. , 2005; Hosokawa et al., 2010) ยับยั้งการเกิดภาวะโรคเบาหวาน (Maeda et al., 2009) และยับยั้งมะเร็งได้ (เช่น มะเร็งลำไส้, มะเร็งปอด และมะเร็งเต้านม) เป็นต้น นอกจากนี้ผลในการยับยั้งเซลล์มะเร็งแล้วยังพบว่าฟูโคแซนทินยังมีส่วนช่วยเพิ่มจำนวนของ docosahexaenoic acid (DHA) และ arachidonic acid (AA) ในตับของหนูทดลองได้ ซึ่งกรดไขมันทั้งสองชนิดนี้มีคุณสมบัติที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพ เช่น ลดระดับไตรกลีเซอไรด์ และโคเลสเตอรอลในเลือด ด้านการอักเสบ และมีผลในการต้านเซลล์มะเร็ง เช่นกัน (Tsukui et al., 2009) และจากรายงานของ Heo และ Jeon (2009) พบว่าฟูโคแซนทินที่สกัดได้จาก *Sargassum siliquastrum* นั้นมีความสามารถป้องกันเซลล์จากการถูกทำลายด้วย UV-B ได้ถึง 81.47% ซึ่งแสดงให้เห็นว่าฟูโคแซนทินนั้นสามารถใช้เพื่อเป็นสารป้องกันการเกิด oxidative stress ที่ถูกกระตุ้นด้วยรังสี UV-B และสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางได้ต่อไปในอนาคต



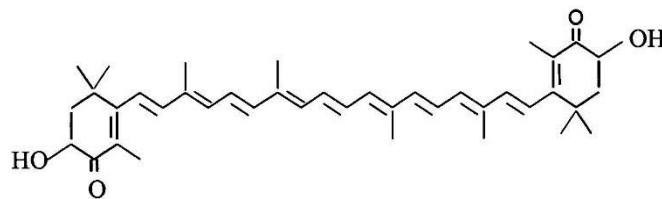
รูปภาพที่ 5 กระบวนการดูดซึมและเมตาบอลิซึมของฟูโคแซนทินในร่างกาย

ที่มา: Miyashita et al. (2010)

นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า สารฟุโคแซนทินที่พบในสาหร่ายสีน้ำตาลนี้มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้สูงกว่าวิตามินอีถึง 13.5 เท่า และผลจากการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูล superoxide ด้วยการใช้ electron spin resonance (ESR) พบว่าสารฟุโคแซนทินมีความสัมพันธ์กับความสามารถในการออกฤทธิ์เช่นเดียวกับสารโพลีฟีนอล (Miyashita et al., 2012) การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูล DPPH, peroxy และ ABTS ของสารสกัดเมทานอลจากสาหร่าย 5 ชนิด ผลการศึกษาพบว่า *Sargassum honeri* และ *Cystoseira hakodatensis* มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุดโดยมีความสัมพันธ์ในเชิงบวกกับปริมาณโพลีฟีนอล และฟุโคแซนทินที่พบได้สูงในสารสกัดของสาหร่ายทั้งสองชนิดนี้ (Widjaja-Adhi et al., 2011a) Yan et al. (1999) ได้รายงานว่าฟุโคแซนทินนั้นมีความสามารถในการยับยั้งอนุมูล DPPH ได้สูง โดยโครงสร้างของฟุโคแซนทินนั้นมีผลต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ดังนั้นผลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้จะมีประโยชน์อย่างยิ่งในการจะค้นพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญๆ จากสาหร่ายสีน้ำตาลในประเทศไทย และข้อมูลที่ได้จะสามารถนำไปเผยแพร่ให้แก่ผู้ที่สนใจ และนำไปใช้ประโยชน์ในการประยุกต์ใช้สาหร่ายสีน้ำตาลในด้านต่างๆ ได้ ซึ่งจะเป็นการเพิ่มมูลค่าให้แก่ทรัพยากรสาหร่ายของประเทศไทยซึ่งยังมีผู้ศึกษาอยู่น้อย และยังขาดข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญอีกหลายประการ

3) Astaxanthin

แอสตาแซนธิน เป็นสารในกลุ่มแซนโทโรฟิลล์ตระกูลแคโรทีนอยด์ที่มีสีชมพูถึงแดง คล้ายสีทับทิม มีสูตรเคมีคือ 3, 3'-dihydroxy- β , β -carotene-4,4'-dione ดังแสดงในรูปที่ 7 (Martin, et al., 2003) ซึ่งพบได้ในปลาแซลมอน กุ้งมังกร ปู ไช้ปลาเคียว รวมไปถึงนกฟลามิงโกสีชมพู จึงทำให้สิ่งมีชีวิตเหล่านี้มีสีชมพูถึงสีแดงแต่สิ่งที่มีชีวิตเหล่านี้ไม่สามารถสังเคราะห์สารแอสตาแซนธินนี้ได้ด้วยตัวเอง จึงต้องได้รับจากอาหาร (Capelli and Cysewski, 2007; Suseela and Toppo, 2006; Lorenz and Cysewski, 2000)



Astaxanthin

รูปภาพที่ 6 โครงสร้างทางเคมีของสารแอสตาแซนธิน ที่มา Martin, et al., 2003

โดยในธรรมชาติแอสตาแซนธินสามารถผลิตได้จากพืช สาหร่าย ยีสต์ และแบคทีเรียบางชนิดเท่านั้น การศึกษาถึงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของแอสตาแซนธิน ด้วยวิธี Singlet oxygen quenching activities เทียบกับตัวต้านอนุมูลอิสระอื่น ๆ เช่นกลุ่มแคโรทีนอยด์แอสคอบิกแอซิด โพลีฟีนอล โคเอนไซม์ คิวเทน พบว่าแอสตาแซนธินมีค่าการต้านอนุมูลอิสระหรือความสามารถในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของออกซิเจนโมเลกุลเดี่ยว (1O₂) ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่มีความไวต่อการเกิดปฏิกิริยาสูงที่สุด โดยมีประสิทธิภาพยับยั้งการเกิดออกซิเดชันสูงกว่า โคเอนไซม์คิวเทน 800 เท่า สูงกว่าสารคาทีชินจากชาเขียว 560 เท่าและมีค่าสูงกว่าวิตามินซีถึง 6,000 เท่า (Nishida, Yamashita, and Miki, 2007) นอกจากนี้ยังมีจากการศึกษาเพิ่มเติมของ Nobuyoshi และคณะ พบว่ามีประสิทธิภาพสูงกว่าวิตามินอี 550 เท่าและสูงกว่าเบต้าแคโรทีน 40 เท่า (Shimidzu, Goto, and Miki, 1996) เนื่องจากประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระนี้เอง ทำให้นักวิจัยจำนวนมากให้ความสนใจนำแอสตาแซนธินไปศึกษาและทำวิจัยทางคลินิกในด้านการชะลอวัยอย่างก้าวขวาง โดยปริมาณที่มีผลการศีกษาทางคลินิกนั้นอยู่ในช่วงระหว่าง 1 - 40 มิลลิกรัมต่อวัน (Kidd, 2011) ในปี 2002 มีการศึกษาผลค่าดัชนีชี้วัดสุขภาพผิวโดยให้กลุ่มทดลองรับประทานแอสตาแซนธิน 2 มิลลิกรัมคู่กับวิตามินอี 40 มิลลิกรัม ทุกวันเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าความชุ่มชื้นของผิวหนัง เพิ่มขึ้นริ้วรอยลดลง การเกิด สิวลดลงอย่างมีนัยสำคัญ โดยการศึกษาทำการวิจัยทางคลินิกด้วยวิธี Double Blind Placebo Control ในอาสาสมัครหญิงที่อายุประมาณ 40 ปี จำนวน 16 คน และให้รับประทานแอสตาแซนธิน เทียบกับกลุ่มควบคุมที่ให้รับประทานยาหลอก (Yamashita, 2002) ต่อมาในปี 2006, Yamashita ได้ทำการวิจัยทางคลินิกโดยศึกษาแบบ Single Blind Randomized Control ในอาสาสมัครหญิงที่อายุประมาณ 47 ปี จำนวน 49 คน ศึกษาผลต่อสุขภาพผิวโดยให้รับประทานแอสตาแซนธิน 2 มิลลิกรัม 2 ครั้งต่อวันเป็นเวลา 6 สัปดาห์ เทียบกับกลุ่มควบคุม ผลการศึกษาพบว่าตั้งแต่สัปดาห์ที่ 3 จนถึงสัปดาห์ที่ 6 ของการทดลอง อาสาสมัคร รู้สึก ีว่าสุขภาพผิว ดีขึ้น คือ ความแห้งและหยาบกระด้างของผิวลดลง ผิวมีความชุ่มชื้นเพิ่มขึ้น ความยืดหยุ่นมากขึ้น ริ้วรอยลดลง (Yamashita, 2006) ในปี 2010 มีการศึกษาฤทธิ์ของแอสตาแซนธินในการปกป้องรังสียูวีเอ โดยใช้การเพาะเลี้ยงไฟโบรบลาสต์ของเซลล์ผิวหนังมนุษย์ พบว่าแอสตาแซนธินจะช่วยยับยั้งผลของรังสียูวีเอที่มีผลให้เกิดการเสื่อมของเซลล์ผิวได้ (Suganuma, et al., 2010) ล่าสุดในปี 2012 กลุ่มนักวิจัยชาวญี่ปุ่นได้ทำการศึกษาทางคลินิกเกี่ยวกับประโยชน์ของแอสตาแซนธินด้านผิวพรรณ โดยทำการศึกษา 2 งานวิจัย คือ การศึกษาที่มีอาสาสมัครเป็นผู้หญิงสุขภาพดีจำนวน 30 คน โดยให้รับประทานแอสตาแซนธินเสริม 6 มิลลิกรัมต่อวัน และให้ทาแอสตาแซนธิน 2 มิลลิกรัมต่อวันต่อเนื่องกันเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า ริ้วรอยบริเวณหางตา ขนาดของจุดด่างดำที่บริเวณแก้ม ความยืดหยุ่นของผิว ความเรียบเนียน ความชุ่มชื้นของผิว เซลล์ผิวหนัง คอโรนีโอไซต์ (Corneocyte) ในชั้นผิวหนังกำพร้า เปลี่ยนแปลงไปในทางที่ดีขึ้น จึงอาจกล่าวได้ว่าแอสตาแซนธินสามารถช่วยให้สภาพผิวดีขึ้นในทุกระดับชั้นผิว เช่น ผิวหนังกำพร้า ผิวหนังชั้นนอก ผิวหนังชั้นใน โดยการ

รับประทานและทาแอสตาแซนธิน อีกงานวิจัยหนึ่งทำการศึกษาระบบ Randomized double blind placebo control ในอาสาสมัครเป็นผู้ชายสุขภาพดีจำนวน 36 คน โดยให้รับประทานแอสตาแซนธินเสริม 6 มิลลิกรัมต่อวัน ต่อเนื่องกันเป็นเวลา 6 สัปดาห์พบว่า รังรอยบริเวณทางตา ความยืดหยุ่นของผิว ความชุ่มชื้นของผิวดีขึ้น การสูญเสียน้ำจากผิวลดลง จึงอาจสรุปได้ว่าการรับประทานแอสตาแซนธิน เสริมอาจให้ผลดีกับสุขภาพผิวทั้งในผู้หญิง และผู้ชาย (Tominaga, et al., 2012)

4) กรดไขมัน (Fatty acid)

เป็นกรดอินทรีย์ที่ประกอบด้วย คาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน โดยมักจะมีจำนวนคาร์บอนเป็นเลขคู่ ตั้งแต่ 2 อะตอมขึ้นไป มีสูตรทั่วไป คือ $R - COOH$ สูตรโครงสร้างของกรดไขมันประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนที่เรียกว่าคาร์บอกซิล ($COOH$) ซึ่งมีธาตุคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจนรวมตัวกันอยู่ อีกส่วนหนึ่งเรียกว่า ห่วงโซ่คาร์บอน (R) โดยมีธาตุคาร์บอนยึดเหนี่ยวกันเป็นห่วงโซ่ โดยปกติธาตุคาร์บอนจะมีอยู่ 4 แขน แขนที่เหลือจากการจับธาตุคาร์บอนด้วยกันจะไปจับกับธาตุไฮโดรเจน กรดไขมันมีอยู่หลายชนิด ทุกชนิดจะมีหน่วยคาร์บอกซิลอยู่หนึ่งหน่วยเหมือนกัน ส่วนที่แตกต่างกันคือลักษณะทางเคมีในส่วนของโซ่คาร์บอน ทำให้กรดไขมันมีชื่อแตกต่างกันไป

กรดไขมันแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ

1. กรดไขมันอิ่มตัว (Saturated fatty acid) หมายถึง กรดไขมันที่คาร์บอนใน โมเลกุลมีไฮโดรเจนจับเกาะอยู่เต็มที่แล้วไม่สามารถรับไฮโดรเจนหรือธาตุอื่นใดเข้าไปในโมเลกุลได้อีก โดยที่ห่วงโซ่คาร์บอน(R) เท่ากับ C_nH_{2n+1} และ n เป็นตัวเลขที่แสดงถึงจำนวนคาร์บอนอะตอม กรดไขมันชนิดนี้พบมากในไขมันสัตว์ น้ำมันมะพร้าว และน้ำมันปาล์ม 8

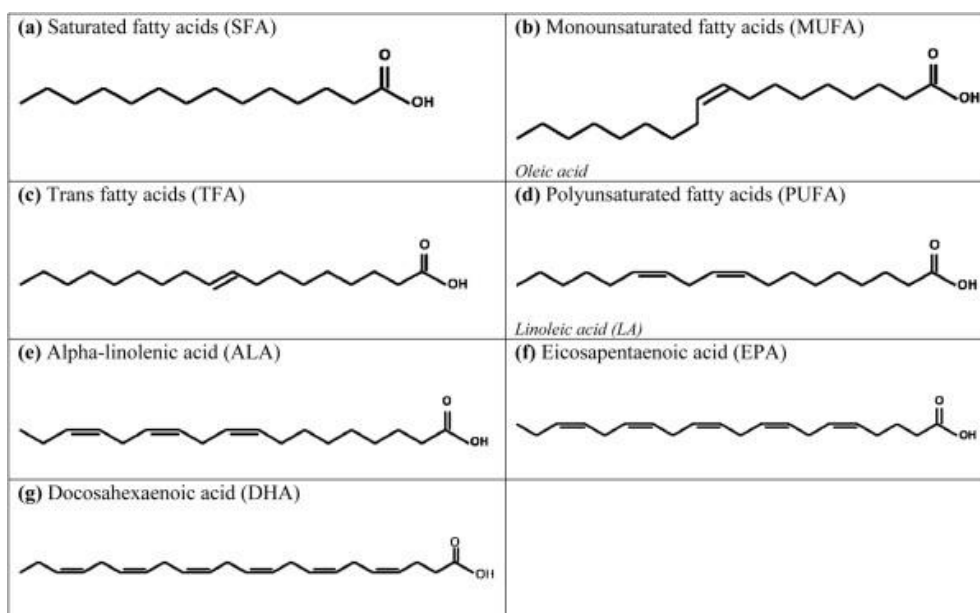
2. กรดไขมันไม่อิ่มตัว (Unsaturated fatty acid) หมายถึง กรดไขมันที่มีคาร์บอนในโมเลกุลมีไฮโดรเจนน้อยกว่าชนิดอิ่มตัว โดยที่มีคาร์บอนในโมเลกุล 2 อะตอมจับกันเองด้วยพันธะคู่การมีพันธะคู่ 1 แห่ง จะทำให้มีไฮโดรเจนน้อยลงกว่าชนิดอิ่มตัว 2 อะตอม มีสายคาร์บอนยาว 18-22 อะตอม และมีพันธะคู่ตั้งแต่ 1-6 คู่ ซึ่งจุดหลอมเหลวของไขมันแต่ละชนิดขึ้นอยู่กับจำนวนพันธะคู่ ตำแหน่งของพันธะคู่ และจำนวนของคาร์บอนอะตอม

กรดไขมันไม่อิ่มตัวแบ่งตามจำนวนพันธะคู่มี 2 ชนิด คือ

1. Monounsaturated Fatty Acid คือกรดไขมันที่มีจำนวนพันธะคู่เพียงคู่เดียวเช่น palmitoleic acid (16: 1n-7) , oleic acid (18: 1n-9) เป็นต้น กรดไขมันเหล่านี้สามารถสังเคราะห์ขึ้นมาได้โดยกรดไขมันไม่อิ่มตัว

2. Polyunsaturated Fatty Acid (PUFA) คือกรดไขมันที่มีจำนวนพันธะคู่ตั้งแต่ 2 คู่ขึ้นไป เช่น linoleic acid (18:2n-6) และ γ -linolenic acid (18:3n-6)

ส่วนกรดไขมันที่มีจำนวนคาร์บอนตั้งแต่ 20 อะตอมขึ้นไป และจำนวนพันธะคู่ตั้งแต่ 3 คู่ขึ้นไปจะเรียกว่า กรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง (highlyunsaturated fatty acid ; HUFA) โดยทั่วไปจะใช้เรียกรดไขมันในกลุ่มโอเมก้า-3 ซึ่งประกอบด้วย eicosapentaenoic acid (EPA ; 20:5n-3) และ docosahexaenoic acid (DHA ; 22:6n-3) แสดงโครงสร้างทางเคมีดังรูป 8



รูปภาพที่ 7 โครงสร้างทางเคมีของกรดไขมันต่างๆ

แหล่งของกรดไขมันไม่อิ่มตัวกลุ่มโอเมก้า-3 เช่น eicosapentaenoic acid และ docosahexaenoic acid ที่ใช้เป็นแหล่งผลิตหลักในทางการค้าคือน้ำมันปลาทะเล เช่น anchovy, tuna, herring, cod, sardine, salmon และ menhaden (Ward, 1989) แต่เนื่องจากปริมาณของกรดไขมันในน้ำมันปลามีอยู่จำกัดประมาณ 7-14 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ในการผลิตต้องใช้ปลาจำนวนมาก ฤดูกาล ลักษณะของภูมิอากาศและภูมิประเทศที่จับปลารวมทั้งพันธุ์ปลา และชนิดของอาหารประเภทจุลินทรีย์ในทะเลต่างก็มีผลต่อปริมาณของกรดไขมัน รวมทั้งในปัจจุบันมีมลภาวะเป็นพิษเกิดขึ้นในทะเลการปนเปื้อนโดยสารฆ่าแมลงและโลหะหนัก จึงส่งผลกระทบต่อทั้งคุณภาพและปริมาณของกรดไขมันที่ได้รวมไปถึงปัญหาที่เกิดขึ้นระหว่างขั้นตอนการสกัดและการทำให้บริสุทธิ์ ซึ่ง

ต้องมีการกำจัดคอเลสเทอรอลและสิ่งเจือปนที่เป็นพิษ ปัญหาด้านกลิ่นคาวปลา รสชาติ และความคงตัว กระบวนการผลิตกรดไขมันจากน้ำมันปลาทะเลมีค่าใช้จ่ายสูง การผลิตขนาดใหญ่ทำได้ยาก (Yokochi et al., 1998) นอกจากนี้องค์ประกอบของกรดไขมันในสาหร่ายขนาดเล็กยังมีความหลากหลายสูง และปริมาณของกรดไขมันแต่ละชนิดมีการผันแปรตามสายพันธุ์ของสาหร่ายด้วย ดังเห็นได้จากการศึกษาไดอะตอมชนิด *Chaetoceros muelleri* สายพันธุ์ต่าง ๆ ก็มีรายงานว่ามีความแตกต่างระหว่างปริมาณไขมัน EPA และ DHA (Johansen et al., 1990 อ้างตาม ชัชฎาภรณ์ สรรคอนุรักษ์ 2545) แหล่งกรดไขมันทดแทนกรดไขมันจากปลาทะเลจึงเป็นเรื่องที่มีความจำเป็นที่ต้องศึกษาวิจัยเพื่อให้ได้กรดไขมันที่มีคุณภาพและเพื่อลดต้นทุนการผลิตอาหารสำหรับสัตว์น้ำ กรดไขมันจากสาหร่ายน้ำเค็มเซลล์เดียวเป็นแหล่งของกรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายพันธะที่มีศักยภาพในการผลิตสูง โดยเฉพาะ thraustochytrids ซึ่งมีวิวัฒนาการใกล้เคียงกับไดอะตอม โดยพบทั่วไปในแหล่งน้ำเค็มโดยเฉพาะ บริเวณป่าชายเลน (Porter, 1990) พบกระจายทั่วไปในหลายประเทศและภาคพื้นทวีป ทั้งในแถบแอนตาร์กติก (Bahnweg and Sparrow, 1974) ทะเลเหนือ (Raghukumar and Gaertner, 1980) อินเดีย (Raghukumar, 1988) ญี่ปุ่น (Naganuma et al., 1998) ออสเตรเลีย (Lewis et al., 1998) ฮองกง (Fan et al., 2002) พูจี (Huang et al., 2003) รวมทั้งในประเทศไทย (Wassana et al., 2007) มีรายงานการค้นพบทรอสโทโคตริคส์ซึ่งสามารถผลิตกรดไขมันดีเอชเอได้สูงถึง 30-40 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณไขมันทั้งหมด (Bowles, Bremer, Duchars & Eaton, 1999)

6) ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอมในประเทศไทยและเทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบในจุลสาหร่าย

เนื่องจากสาหร่ายขนาดเล็กในกลุ่มไดอะตอมมีขนาดเล็กและต้องใช้ความเชี่ยวชาญในการเพาะเลี้ยงเพื่อให้ได้ผลิตปริมาณมากๆ ให้เพียงพอต่อการศึกษา ดังนั้นจึงทำให้งานวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสาหร่ายกลุ่มไดอะตอมนี้อยู่มีปริมาณน้อยอยู่ จากการผลการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดเมทานอลของสาหร่ายขนาดเล็กที่พบในจังหวัดชลบุรี ได้แก่ *Spirulina sp.*, *Amphora sp.*, *Cheatocheros sp.* พบว่า *Amphora sp.* ซึ่งจัดเป็นไดอะตอมมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารสกัดจาก *Spirulina sp.* และ *Chaetoceros sp.* มีค่า IC50 เป็น 285.22 ± 3.59, 452.33 ± 18.44 and 406.86 ± 201.39 µg/ml ตามลำดับ (Catheeya et al., 2016)

ไดอะตอมมีองค์ประกอบทางชีวเคมีโครงสร้างระดับเซลล์และวงจรชีวิตที่แตกต่างกัน คุณสมบัติทั่วไปของไดอะตอมที่ใช้ในการจำแนกกลุ่มของสาหร่าย เช่น เม็ดสีที่ใช้ในการสังเคราะห์แสง, สารที่สะสมภายในเซลล์, ผนังเซลล์, มีการจัดจำแนกชนิดของจุลสาหร่ายทำได้โดยการเปรียบเทียบลำดับของ DNA ซึ่งนำไปสู่การปรับปรุงการ

จำแนกกลุ่มของสาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอมชนิดใหม่ การศึกษาด้านโมเลกุลระดับจีโนมช่วยในการยืนยัน กระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงของสาหร่ายขนาดเล็กได้ (สรวิศ เผ่าทองสุข. 2543) ซึ่งนำไปสู่การจัดจำแนกความ หลากหลายของไดอะตอม สาหร่ายที่อยู่สภาพแวดล้อมที่คล้ายกันจะมีสารพันธุกรรมที่คล้ายกันกับพวกสิ่งมีชีวิตที่ ไม่สามารถสังเคราะห์ด้วยแสงดังนั้นจึงจำเป็นอย่างยิ่งในการพัฒนาเครื่องมือและเทคนิคใหม่ๆ เพื่อใช้ในการศึกษา การเปลี่ยนแปลง หรือพันธุวิศวกรรมของกลุ่มจุลสาหร่าย (สุภัทรวณิช แสงวดี. 2549; Han et al., 2009) ทั้งนี้ใน ปัจจุบันมีการใช้กล้องจุลทรรศน์ในการระบุชนิดของจุลสาหร่าย หรืออาจใช้วิธีการวัดชนิดของสารอาหารและการ เปลี่ยนแปลงทางกายภาพของจุลสาหร่ายเหล่านี้ ซึ่งยังมีข้อจำกัดในการวัดและวิเคราะห์เซลล์จุลสาหร่ายทั้งหมด เทคนิคอื่นๆ ในการวัดและจำแนกความแตกต่างของจุลสาหร่าย (Galhano et al., 2011;) สารกลุ่มลิพิดที่เป็น องค์ประกอบของสาหร่ายมีความสำคัญต่อคุณสมบัติทางชีวเคมีสำหรับการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพจากชีวมวลของ สาหร่าย ความแม่นยำของวิธีการหาปริมาณลิพิดซึ่งเป็นองค์ประกอบที่สำคัญในสาหร่ายจำเป็นต้องเลือกชนิดของ สาหร่ายที่เหมาะสมและสภาวะการเจริญเติบโต การเพาะเลี้ยงสาหร่าย มีผลต่อปริมาณของลิพิดและส่วนประกอบ ต่างๆ ในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย เช่น ความเข้มข้นของสารอาหารที่อยู่ในอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่ายจำนวนมาก (วิทวัส แจ่มเยี่ยม. 2553) มีงานวิจัยเชื้อเพลิงชีวภาพจากสาหร่ายทะเลเป็นจำนวนมากที่ต้องการเทคนิคการ วิเคราะห์ปริมาณลิพิดที่ให้ผลอย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งโดยทั่วไปการวิเคราะห์หาลิพิดและกรดไขมันต้องคิดเป็น ความสัมพันธ์ของจำนวนชีวมวลขนาดใหญ่ทั้งหมด (>1 กรัม ของน้ำหนักแห้ง) ซึ่งปกติการวิเคราะห์ผลเหล่านี้ต้องใช้ ระยะเวลาและการวิเคราะห์ที่ไม่มีประสิทธิภาพเพราะต้องใช้ตัวอย่างสาหร่ายจำนวนมาก การพัฒนาเทคนิค การวิเคราะห์ที่สามารถวัดและหาปริมาณได้โดยใช้ตัวอย่างปริมาณน้อยและประหยัดเวลา จากโครงการวิจัยการ สืบสวนทางชีวภาพ พบว่าสิ่งที่จำเป็นที่สุดที่ใช้แยกความแตกต่างนี้จากกันและการแยกสาหร่ายสายพันธุ์ที่มีน้ำมัน ปริมาณสูงได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ซึ่งวิธีการที่ใช้ในการคัดกรองส่วนประกอบพวกกลีปิดเบื้องต้นโดยใช้สารสีฟลูออเรสเซนต์ ได้แก่ Nile red, TLC, HPLC และ MS เป็นต้น วิธี Nile red เป็นการคัดกรองสารเบื้องต้นในสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงไว้ อย่างไรก็ตาม วิธีการวัดด้วย ฟลูออเรสเซนต์มีผลต่อการรับสีที่ย้อมเข้าสู่เซลล์และ เป็นวิธีที่ใช้ศึกษาความแตกต่างกันระหว่างชนิด และระหว่างสภาวะที่เจริญเติบโตเพราะความแตกต่างระหว่างส่วนประกอบของผนังเซลล์, และข้อจำกัดของวิธีการ ทดสอบนี้ นอกจากนี้ ในสาหร่ายสีเขียว ยังพบว่ามีระดับของ chlorophyll ที่สูงซึ่งจะรบกวนการเรืองแสงของ สัญญาณฟลูออเรสเซนต์ทำให้สัญญาณของ background สูงกว่าปกติ

เทคนิคอื่นที่สามารถใช้แยกวิเคราะห์สารกลุ่มลิพิดโดยทั่วไปมีการวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง HPLC, TLC และ MS อย่างไรก็ตามวิธีเหล่านี้ขึ้นอยู่กับการขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างและการแยกสารส่วนลิพิดออกมาก่อนทำการ วิเคราะห์สารอื่นๆที่พบในธรรมชาติปัจจุบันมีการวิจัยจำนวนมากในการนำจุลสาหร่ายมาเป็นแหล่งผลิตภัณฑ์จาก

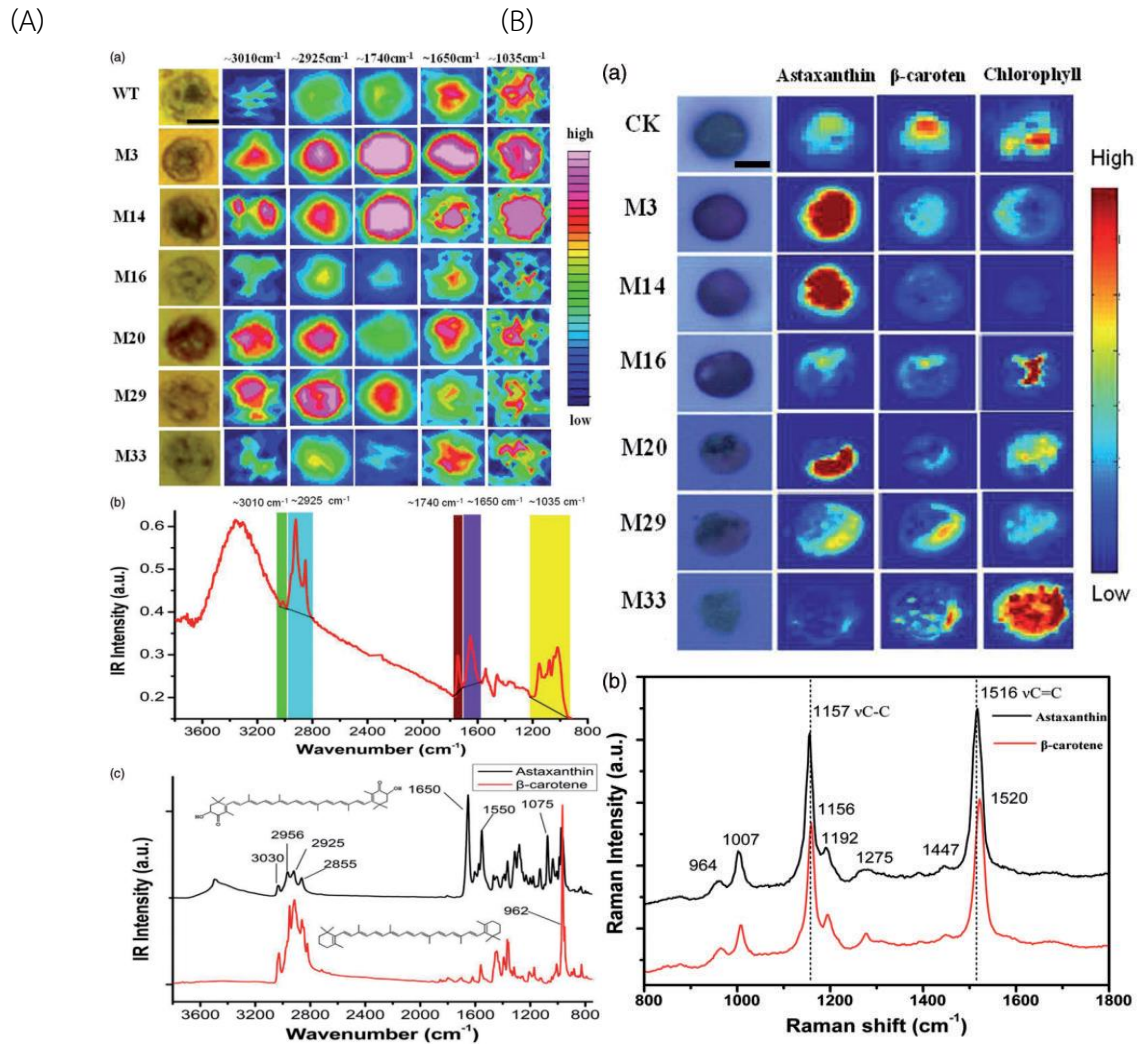
ธรรมชาติเพื่อศึกษาคุณค่าจากสารชีวโมเลกุลขนาดใหญ่ (macromolecules) (Dean et al., 2010; Kim และ Wijesekara, 2010) ซึ่งรวมถึงแคโรทีนอยด์ (carotenoids), กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนที่มีสายโซ่ยาว (long-chain polyunsaturated fatty acids) และไฟโคคอลลอยด์ (phycocolloids) ซึ่งจากกระบวนการสังเคราะห์แสง (photoautotrophs) ของจุลสาหร่ายเหล่านี้เป็นผลให้มีการสร้างสารที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่น่าสนใจเป็นอย่างมาก (Sivathanua & Palaniswamy, 2012; Guedes et al., 2011)

7) การประยุกต์ใช้เทคนิค FTIR spectroscopy ในการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของไดอะตอม

ปัจจุบันมีการใช้เทคนิค vibrational microspectroscopy ในการวิเคราะห์สารชีวโมเลกุลภายในเซลล์สิ่งมีชีวิต เนื่องจากเป็นเทคนิคที่มีศักยภาพในการวัดระดับของชีวโมเลกุลและไวต่อการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้าง, องค์ประกอบและปริมาณขององค์ประกอบต่างๆ ภายในเซลล์ที่มีขนาดเล็กๆ ได้ เช่น เซลล์ไลน์มะเร็งชนิดต่างๆ (cancer cell lines) เซลล์ต้นกำเนิด (stem cells) และเซลล์แบคทีเรีย (bacterial cell) ที่มีขนาดระหว่างหรือมากกว่า 5-10 μm (Dean et al., 2010) เทคนิคการวิเคราะห์สเปกตรัมรังสีอินฟราเรด (Infrared spectroscopy) เป็นเทคนิคที่นิยมใช้อย่างแพร่หลายในการวิเคราะห์ชนิดของสารจากหลักการการดูดกลืนแสงอินฟราเรดที่แตกต่างกันของสารแต่ละชนิด สารต่างชนิดกันจะมีรูปแบบการดูดกลืนแสงที่แตกต่างกัน การศึกษารูปแบบการดูดกลืนแสงอินฟราเรดนี้จึงเปรียบเสมือนการเปรียบเทียบกับลักษณะลายนิ้วมือของคน โดยเครื่อง FTIR spectrometer มักใช้ในการวิเคราะห์การสั่นของโมเลกุลที่หมู่ฟังก์ชันต่างๆ เช่น O-H, N-H, C=O, =C-H, -CH₂, -CH₃, C-O-C and >P=O ที่พบในตัวอย่างทางชีววิทยา อีกทั้งเทคนิคนี้ยังสามารถแยกความแตกต่างของสารชีวโมเลกุลทั้งขนาดใหญ่และโมเลกุลเชิงซ้อน เช่น กรดนิวคลีอิก, โปรตีน, ลิพิด, โพลีแซคคาไรด์ และเซลล์เนื้อเยื่ออื่นๆ (Holman et al., 2000) โดยมีการศึกษาถึงส่วนประกอบของต่างๆ สิ่งมีชีวิต ได้แก่ แบคทีเรียสาหร่ายทะเล, พืช, ฟังไจ และยีสต์ เป็นต้น (Horton et al, 2011) จากการรายงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าเทคนิค FTIR spectroscopy เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ความแตกต่างและจำแนกสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กได้ และยังสามารถบอกชนิดของสารชีวโมเลกุลขนาดใหญ่ที่พบในสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กนั้นได้ ทั้งนี้มีรายงานการใช้เทคนิค FTIR spectroscopy ในการวิเคราะห์ความแตกต่างของกลุ่มสารเคมีที่พบในจุลสาหร่ายและพบว่าเทคนิคนี้สามารถแยกความแตกต่างของสารชีวโมเลกุลที่ประกอบในจุลสาหร่ายได้ (Andrew et al., 2010; Duygu et al., 2012) โดยอินฟราเรดสเปกตรัม ที่ได้จากการวิเคราะห์อยู่ในช่วงการสั่นของหมู่ฟังก์ชันของสารประกอบทางเคมี ได้แก่ โมเลกุลของน้ำ (O-H), ลิพิด (-CH₂), เซลลูโลส (-C=O), โปรตีน (amide), กรดนิวคลีอิก (>P=O),

และแป้ง (-C-O) จึงสามารถทำการวิเคราะห์และแยกความแตกต่างของสารชีวโมเลกุลที่พบในจุลสาหร่ายได้ (Singh et al., 2012) เทคนิค FTIR microspectroscopy เป็นการนำเอาเครื่อง FTIR spectrometer มาต่อเข้ากับกล้อง microscope จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการศึกษาขององค์ประกอบระดับ sub-cellular, เซลล์และเนื้อเยื่อ โดยที่ไม่ต้องทำลายตัวอย่าง ยิ่งไปกว่านั้นสเปกตรัมที่ได้จากการวิเคราะห์สามารถแสดงให้เห็นการเปลี่ยนแปลงระดับชีวโมเลกุลต่างๆ ได้แก่ โปรตีน ลิพิดและไขมัน คาร์โบไฮเดรต กรดนิวคลีอิกและสารคัดหลั่งที่เป็นองค์ประกอบภายในเซลล์ได้ (Giordano et al., 2001; Dean et al., 2010) เทคนิค FTIR microspectroscopy จึงสามารถนำมาประยุกต์ใช้เพื่อเลือกวิเคราะห์เซลล์สาหร่ายได้อย่างจำเพาะเจาะจง โดยการนำแสงย่านพลังงานอินฟราเรดมาใช้กับเทคนิค FTIR Spectroscopy ร่วมกับการใช้กล้องจุลทรรศน์ หรือที่เรียกว่า Synchrotron Fourier transform infrared microspectroscopy (SR-FTIR microspectroscopy) เป็นการช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของเทคนิค FTIR Spectroscopy ให้มีความสามารถนำไปใช้ตรวจวิเคราะห์สารตัวอย่างที่มีขนาดเล็ก หรือสารตัวอย่างที่มีความเข้มข้นต่ำมาก ๆ ได้ ซึ่งแสงซินโครตรอนเป็นแสงที่มีขนาดลำแสงที่เล็กและคม สามารถใช้ติดตามการเปลี่ยนแปลงและแยกความแตกต่างในระดับเซลล์ได้ เป็นผลให้การวัดการดูดกลืนมีความแม่นยำกว่าการใช้แสงจากแหล่งกำเนิดโดยทั่วไป เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ความแตกต่างและองค์ประกอบทางเคมีและชีวโมเลกุลในเซลล์ของจุลสาหร่ายที่พบในประเทศไทย โดยเฉพาะสารกลุ่มลิพิด ซึ่งสารกลุ่มนี้พบได้มากในจุลสาหร่ายและนำมาใช้อย่างกว้างขวางในทางการแพทย์และอุตสาหกรรม (Duygu et al., 2012) แตกต่างจากการเทคนิคการวิเคราะห์ทางชีวเคมีทั่วไป ได้แก่ เทคนิค High-performance liquid chromatography (HPLC) และเทคนิค Gas chromatography-Flame ionization detector (GC-FID) และเทคนิคที่อาศัยปฏิกิริยาทางเคมีอื่นๆ เป็นต้น ที่มีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างยุ่งยาก ใช้สารเคมีราคาสูง และไม่สามารถทำเป็นฐานข้อมูลลายนิ้วมือของสารชีวโมเลกุลในเซลล์สิ่งมีชีวิตได้ นอกจากนี้ Jungandreas et al., 2012 รายงานการศึกษาไดอะตอม 2ชนิด ได้แก่ *Cyclotella meneghiniana* and *Skeletonema costatum* ด้วยเทคนิค FTIR-spectroscopy ในการวัดสารประกอบที่อยู่ในเซลล์ที่มีการเจริญเติบโตในสภาวะที่ขาด silicon พบว่าเซลล์ไดอะตอมทั้งสองชนิดมีการเปลี่ยนแปลงของอัตราส่วนของ C:N อย่างเห็นได้ชัด และจาก FTIR spectrum ที่บริเวณ 1750 cm^{-1} ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณลิพิดในเซลล์ไดอะตอมที่มีการเปลี่ยนแปลงไป โดยในสภาวะที่ขาด Si พบว่า *C. meneghiniana* มีลิพิดสัดส่วนเพิ่มมากขึ้นในขณะที่ *S. costatum* ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของลิพิดในเซลล์ซึ่งเห็นได้จากสเปกตรัมของ FTIR ที่แสดงของไดอะตอมทั้งสองชนิดซึ่งผลสอดคล้องกับการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของลิพิดในเซลล์ด้วยวิธี Su et al. (2012). นอกจากนี้เทคนิค FTIR spectroscopy ยังมีการใช้ทั้งเทคนิค FTIR-microspectroscopy และ RAMAN microspectroscopy ในการวิเคราะห์องค์ประกอบของสาร chlorophyll, astaxanthin และ β -carotene ใน *Haematococcus pluvialis*

โดยพบว่าสาร astaxanthin ในสาหร่ายสายพันธุ์ที่มีปริมาณ astaxanthin สูงมีส่วนของ IR absorption ที่ความยาวคลื่น 1740 cm^{-1} ต่อ 1156 cm^{-1} สูงซึ่งทั้งสองเทคนิคมีประสิทธิภาพในการวัดปริมาณของสารดังกล่าวได้ดังรูป



รูปภาพที่ 8 IR spectra ของสารร้าย *H. pluviialis* สารเบต้าแคโรทีน และแอสตาแซนทีน ที่ทดสอบด้วยเทคนิค FTIR spectroscopy (A) และ RAMAN-microspectroscopy (B) ที่มา: Liu and Huang, 2016

จากงานวิจัยการประยุกต์ใช้เทคนิค Synchrotron FTIR microspectroscopy ในการหารสารชีวโมเลกุลรวมของ ลิพิด โปรตีน และคาร์โบไฮเดรต และองค์ประกอบทางเคมีของสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ในสาหร่ายขนาดเล็กมีจำนวนมากขึ้น (Kaczor A and Baranska M. 2011) งานวิจัยนี้จึงเล็งเห็นการนำเทคนิคดังกล่าวมาใช้ประโยชน์ในการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารกลุ่ม carotenoids และ กรดไขมันไม่อิ่ม (PUFA) เช่น ESP และ DHA เป็นต้น ในสาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอมที่พบในชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกของจังหวัดชลบุรี เพื่อเป็นประโยชน์ในการวิจัยรวมถึงศึกษาความแตกต่างของสารพันธุกรรมในไดอะตอมแต่ละชนิดทั้งนี้เพื่อนำไปใช้ในการพัฒนาเภสัชภัณฑ์ต่อไปในอนาคต

2. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

แนวโน้มงานวิจัยและการใช้ผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติเพิ่มสูงขึ้นในช่วงสี่ทศวรรษที่ผ่านมาได้มีการค้นพบสารที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่น่าสนใจเป็นจำนวนมากที่ถูกแยกจากสิ่งมีชีวิตในทะเล เนื่องจากสิ่งมีชีวิตในทะเลจัดเป็นทรัพยากรทางธรรมชาติที่มีศักยภาพสูงในการสังเคราะห์สารทุติยภูมิ (secondary metabolites) ที่มีฤทธิ์สำคัญทางชีวภาพมากมาย ซึ่งนำไปสู่การค้นพบและพัฒนาสารต่างๆที่น่าสนใจทั้งทางด้านทั้งด้านโภชนาการ เภสัชกรรม และการแพทย์ อุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม และอุตสาหกรรมผลิต พลาสติก รวมทั้งด้านพลังงานทดแทนสาหร่ายขนาดเล็ก (microalgae) กลุ่มไดอะตอม (diatom) ในระบบนิเวศทางทะเลนั้นจัดเป็นผู้ผลิตเบื้องต้นที่สำคัญของห่วงโซ่อาหารและยังจัดเป็นกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่มีความหลากหลายสูงทั้งในระดับความหลากหลายชนิดและความหลากหลายทางด้านนิเวศวิทยา เช่น การที่มีถิ่นที่อยู่อาศัยย่อย (micro-habitats) ที่หลากหลายในระบบนิเวศชายฝั่ง นอกจากนี้ยังเป็นกลุ่มสิ่งมีชีวิตในทะเลจัดเป็นกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่ยังมีความรู้ความเข้าใจน้อย เนื่องจากสัณฐานวิทยาที่มีขนาดเล็กมองด้วยตาเปล่าไม่เห็น จากการสำรวจสาหร่ายขนาดเล็กหรือจุลสาหร่าย (microalgae) ที่เก็บรวบรวมในชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกของจังหวัดชลบุรี (สนองพระราชดำรินโยบายอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี) ของปี 2558 นั้นพบว่าในแถบชายฝั่งตะวันออกของจังหวัดชลบุรีมีความหลากหลายของจุลสาหร่ายเป็นจำนวนมากรวมถึงไดอะตอม ได้แก่ *Chaetoceros* sp. *Amphora* sp., *Nitzschia* sp. และ *Lithodesmium* sp. เป็นต้น และสารสกัดเมทานอลจากสาหร่ายขนาดเล็กชนิด *Amphora* sp. แต่ทั้งนี้การแยกเซลล์เดี่ยวและเพาะเลี้ยงสาหร่ายให้เจริญเติบโตในห้องปฏิบัติการทำได้ยากและมีความสำคัญอย่างมากต่อการศึกษาในอนาคต โดยเฉพาะการศึกษาศักยภาพของสาหร่ายขนาดเล็กในกลุ่มไดอะตอมที่มีรายงานองค์ประกอบทางเคมีของสารออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่มีประโยชน์

กับมนุษย์ ได้แก่ สารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ เช่น เบต้าแคโรทีน (β -carotene) แอสตาแซนทิน (astaxanthin) ฟุโคแซนทิน (fucoxanthin) และกรดไขมันที่มีประโยชน์ เช่น กรดไขมันไม่อิ่มตัวกลุ่มโอเมก้า-3 (n-3-PUFAs) ได้แก่ eicosapentaenoic acid และ docosahexaenoic acid ทั้งนี้เพื่อนำมาใช้ประโยชน์จำเป็นต้องมีการเก็บรวบรวมสายพันธุ์ การศึกษาด้านชีววิทยาและชีวเคมี การคัดเลือกสายพันธุ์ รวมทั้งการศึกษาเกี่ยวปัจจัยสภาพแวดล้อมหรือสารอาหารของสาหร่ายที่ช่วยให้สาหร่ายเติบโตดี และสามารถสะสม/สร้างสารประกอบที่มีประโยชน์กับมนุษย์ รวมถึงการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาอื่นๆ ที่สามารถต่อยอดในทางเภสัชภัณฑ์ได้ เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (anti-oxidant activity) ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (anti-tyrosinase activity) ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อีลาสเทส (anti-elastase activity) และฤทธิ์ยับยั้งเซลล์ไลน์มะเร็ง (anti-cancer activity) เป็นต้น ประกอบกับสภาพภูมิศาสตร์ของจังหวัดชลบุรีที่มีแถบชายฝั่งทะเลที่ทอดยาวในฝั่งตะวันออกของประเทศไทยและเป็นพื้นที่ที่ได้รับผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงสภาพอากาศอย่างเห็นได้ชัดจากปรากฏการณ์ซึ่ปลาวาฬ (Red tide) ที่เกิดขึ้นประกอบกับการศึกษาความหลากหลายของจุลสาหร่ายของคณะวิจัยก่อนหน้านี้จึงเห็นว่าควรมีการเร่งการศึกษาและเก็บรวบรวมสายพันธุ์ของสาหร่ายขนาดเล็กในกลุ่มไดอะตอม อีกทั้งมีรายงานวิจัยในการใช้เทคนิค FTIR-spectroscopy, RAMAN spectroscopy และ Synchrotron FTIR microspectroscopy ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพ และใช้จำนวนตัวอย่างสาหร่ายกลุ่มไดอะตอมในการวิเคราะห์ห้องค์ประกอบทางเคมีปริมาณน้อย ในการวิเคราะห์การแยกชนิดของสาหร่ายขนาดเล็กได้สอดคล้องกับข้อมูลทางพันธุกรรมโดยการวิเคราะห์ดังกล่าว ดังนั้นในการศึกษารั้งนี้จึงเน้นการเก็บรวบรวมสายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอมและหาสภาวะการเพาะเลี้ยงในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมในห้องปฏิบัติการ เพื่อเก็บรวบรวมข้อมูลทางพันธุกรรม และการศึกษาเกี่ยวปัจจัยสภาพแวดล้อมหรือสารอาหารของสาหร่ายที่ช่วยให้สาหร่ายเติบโตดี และสามารถสะสม/สร้างสารประกอบที่มีประโยชน์ในสาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอม ทั้งนี้เพื่อนำไปสู่การเก็บรวบรวมข้อมูลองค์ประกอบทางเคมีที่มีฤทธิ์ที่น่าสนใจทางเภสัชวิทยา รวมทั้งการศึกษาสภาวะการเลี้ยงในห้องปฏิบัติการของไดอะตอม เช่น ผลของความเค็ม และ ปริมาณไนโตรเจน ต่อการเจริญเติบโตและการสร้างสารดังกล่าว เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาศักยภาพทางเภสัชวิทยาของไดอะตอมที่พบในจังหวัดชลบุรีและเผยแพร่ข้อมูลทรัพยากรทางทะเลของสาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอม นำไปสู่การอนุรักษ์และหวงแหนทรัพยากรธรรมชาติทางทะเลในประเทศพร้อมกับก่อให้เกิดการใช้ประโยชน์ที่ยั่งยืนต่อไปในอนาคตต่อไป

3. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อเก็บรักษาพันธุกรรมของสาหร่ายขนาดเล็กในกลุ่มไดอะตอมที่พบในทะเลฝั่งตะวันออก ของจังหวัด ชลบุรี
2. ประยุกต์การใช้เทคนิค Synchrotron FTIR microspectroscopy ในการวิเคราะห์องค์ประกอบทางชีวโมเลกุลโดยรวม (ได้แก่ ลิพิด, โปรตีน และคาร์โบไฮเดรต) ตลอดจนสารต้านอนุมูลอิสระ โดยเน้นสารกลุ่ม carotenoids และ กรดไขมันอิสระ (PUFA) เช่น ESP และ DHA เป็นต้น ในสาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอม
3. เพื่อคัดเลือกสาหร่ายขนาดเล็กในกลุ่มไดอะตอมที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ได้แก่ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ elastase, และเอนไซม์ tyrosinase รวมถึงฤทธิ์ความเป็นพิษของเซลล์ไลน์

4. ขอบเขตของโครงการวิจัย

- ทำการสกัดและวิเคราะห์หาสารชีวโมเลกุลโดยรวม (ได้แก่ ลิพิด, โปรตีน และคาร์โบไฮเดรต) และสารที่มีฤทธิ์ สอดคล้องกับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา โดยเน้นสารกลุ่ม carotenoids และ กรดไขมันอิสระ (PUFA) เช่น ESP และ DHA เป็นต้นด้วยเทคนิค synchrotron FTIR microspectroscopy ที่คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา และสถาบันวิจัยแสงซินโครตรอน จังหวัดนครราชสีมา
- สกัดดีเอ็นเอของจุลสาหร่ายและวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอในจุลสาหร่ายแต่ละชนิดที่ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
- ทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ได้แก่ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ elastase, และเอนไซม์ tyrosinase รวมถึงฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ โดยคณะผู้ร่วมวิจัย

5. ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวคิดของโครงการวิจัย

การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอม เพื่อให้มีการสร้างชีวมวลของสาหร่ายในปริมาณที่สูง เพื่อจะได้มีการใช้ประโยชน์จากสาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอมสูงที่สุด ในการวิจัยครั้งนี้จะนำไปสู่ความรู้เชิงบูรณาการต่อการพัฒนาคุณค่าความหลากหลายของสาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอม เพื่อสร้างฐานข้อมูลของสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอม ฐานข้อมูลของชนิดและปริมาณกรดไขมันที่มีการสร้างและสะสมเซลล์ของสาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอม ซึ่งโดยเฉพาะกรด

ไขมันกลุ่ม PUFA (Polyunsaturated fatty acid) อีกทั้งยังได้ฐานข้อมูลในส่วนของข้อมูลของ ชนิด และ ปริมาณของแคโรทีนอยด์ ที่มีการสะสมอยู่ในสาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอม เพื่อก่อให้เกิดประโยชน์ในการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของสาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอม ที่พบในบริเวณจังหวัดชลบุรี

6. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- ได้ลายพิมพ์อินฟราเรด (IR finger print) ของไดอะตอมโดยการใช้เทคนิค Scynchrotron FTIR microspectroscopy ในการวิเคราะห์องค์ประกอบทางชีวโมเลกุลโดยรวม (ได้แก่ ลิพิด, โปรตีน และคาร์โบไฮเดรต) ตลอดจนสารต้านอนุมูลอิสระ โดยเน้นสารกลุ่ม carotenoids และ กรดไขมันอิสระ (PUFA) เช่น ESP และ DHA เป็นต้น ในสาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอมพบในทะเลฝั่งตะวันออก ของจังหวัดชลบุรี
- ได้ฐานข้อมูลทางดีเอ็นเอเพื่อใช้อ้างอิงชนิดสาหร่ายขนาดเล็กในกลุ่มไดอะตอมที่พบในทะเลฝั่งตะวันออก ของจังหวัดชลบุรี ได้ตัวอย่างไดอะตอมที่มีศักยภาพในการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ได้แก่ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ elastase, และเอนไซม์ tyrosinase รวมถึงฤทธิ์ยับยั้งเซลล์ไขมันมะเร็งที่จะนำมาพัฒนาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์ต้นแบบต่อไป

บทที่ 2

วิธีการดำเนินงานวิจัยและผลการวิจัย

สารเคมี

อาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์ใช้ Dulbecco's modi-fied Eagle's medium (DMEM), high glucose, fetal bovine serum, 0.25% trypsin-EDTA, penicillin-streptomycin solution จาก Gibco BRL Life Technologies (Grand Island, NY, USA) และ MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) จาก Invitrogen, 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-Azino-bis(3ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS), FeCl₂ สาร 2, 4, 6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ), gallic acid, EGCG, kojic acid และ trolox จาก Sigma Aldrich. BaF2 window (Crystran Ltd, UK)

สารมาตรฐาน Astaxanthin (3,30-dihydroxy- β -carotene-4,40-dione, CAS: 472- 61-7), สารมาตรฐาน PUFA marine NO. 1, Fucoxanthin, Canthaxanthin, Zeaxanthin จาก Sigma Aldrich Acetylcholinesterase from electric eel (Type V-S lyophilized powder) 480 U/mg solid, 530 U/mg protein, acetylthiocholine iodide (ATCI), bovine serum albumin (BSA), 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), sodium chloride and Tris (hydroxymethyl) methylamine were obtained from Sigma (USA). methyl ester form (FAME 37, Cat. No. 47885-U, Supelco), สารมาตรฐาน methyl ester form (PUFA from Marine source No.1, Cat. No. 47033, Supelco) และสารมาตรฐานอื่นๆจาก Suppleco, sigma-aldrich. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ HPLC (HPLC grade) จาก Lab Scan.

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเก็บรวบรวมเซลล์โตอะตอม

จากบริเวณที่ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างในพื้นที่ริมชายฝั่งของทะเลในจังหวัดชลบุรี ทำการแยกชนิดและทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอม ในพื้นที่ริมชายฝั่งทะเลของจังหวัดชลบุรี บันทึกรูปร่างและลักษณะของจุลสาหร่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อใช้ในการระบุชนิดสาหร่าย จากนั้นทำการแยกและเลี้ยงเพื่อ

เพิ่มปริมาณสำหรับย่ำ ติดตามการเติบโตของไตอะตอมด้วยการนับจำนวนด้วยสไลด์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และคำนวณอัตราการเติบโตจำเพาะของไตอะตอมโดย ดร. อมรรัตน์ กนกรุ่งและทีมวิจัย โดยการทดลองนี้ได้ทำการเก็บรวบรวมเซลล์ไตอะตอมแต่ละชนิดที่เลี้ยงในสภาวะความเค็มต่างๆ ได้แก่ 20 ppt (part per thousand), 30 ppt และ 40 ppt เป็นต้น ในขณะที่เซลล์ไตอะตอมเจริญเติบโตในช่วงระยะปรับตัว (lag phase) ระยะเอ็กซ์โพเนนเชียล (Exponential Phase) ระยะเฉื่อย (Retardation Phase) และระยะคงที่ (stationary phase)

เซลล์ไตอะตอมแต่ละชนิดที่สภาวะต่างๆ จะถูกนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยน้ำกลั่นเพื่อล้างอาหารเลี้ยงเซลล์ไตอะตอมออกจำนวน 3 รอบ จากนั้นนำไตอะตอมแต่ละชนิดไปสกัดดีเอ็นเอเพื่อระบุชนิดด้วยลายพิมพ์นิวมีอดีเอ็นเอ และสกัดด้วยตัวทำลายที่เหมาะสมเพื่อวิเคราะห์หาองค์ประกอบสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ กรดไขมัน สารกลุ่มฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ รวมถึงฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ ต่อไป

2. การสกัดดีเอ็นเอและการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของไตอะตอมด้วยเทคนิค PCR

ซึ่งตัวอย่างไตอะตอม 40 มิลลิกรัมลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตรที่ผ่านการฆ่าเชื้อมาแล้ว ผสมกับ resuspension buffer (R₂) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ตามมาด้วย 20% SDS และ 20mg/ml RNase อย่างละ 15 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันดีด้วยเครื่อง vortex และเอามาบ่มที่ 55 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นนำมา centrifuge ที่ 12000 rpm ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ปิดเอาเฉพาะส่วนที่เป็นของเหลวมาใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตรและเติม precipitation buffer (N₂) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันดีด้วยเครื่อง vortex แล้วบ่มในที่เย็นนาน 5 นาที จึงนำมา centrifuge ที่ 10000 rpm ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที ให้เปิดเอาส่วนที่เป็นของเหลวมา 250 ไมโครลิตรผสมกับ binding buffer (B₄) ปริมาตร 375 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันดีแล้วเปิดสารทั้งหมดมาใส่ใน spin cartridge tube และ centrifuge ที่ 12000 rpm 25 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ทั้งส่วนที่เป็นของเหลวด้านล่าง จากนั้นเติม wash buffer (W₄) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร centrifuge ที่ 10000 rpm rpm ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที ตามมาด้วย wash buffer (W₅) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วนำมา centrifuge ด้วยความเร็วรอบเช่นเดียวกันกับ W₄ ทั้งส่วนที่เป็นของเหลวและทำซ้ำในขั้นตอนนี้อีกครั้ง โดยขั้นตอนที่นำมา centrifuge นั้น ให้เพิ่มความเร็วรอบเป็น 12000 rpm และนาน 2 นาที เมื่อทิ้งของเหลวแล้วในน้ำ spin cartridge tube มาใส่หลอดทดลองอันใหม่ เติม elution buffer (E₁) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที แล้วนำไป centrifuge ที่ 12000 rpm ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที เก็บส่วนที่เป็นของเหลวนี้ไว้ให้ระบุเป็น elution ครั้งนี้ 1 ทำซ้ำอีกครั้งโดยจะทำการเติม E₁ ลงไปใน spin cartridge tube ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ส่วนที่เป็นของเหลวในครั้งนี้นำให้ระบุเป็น elution ครั้งที่ 2 และทำการตรวจคุณภาพขอดีเอ็นเอด้วยวิธี gel electrophoresis (0.8% agarose gel) ใช้กระแสไฟฟ้า 35 โวลต์นาน 40 นาที

การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของสาหร่ายด้วยเทคนิค PCR โดยการนำตัวอย่าง *C. tenuissimus* และ *T. pseudonana* มาทำตามขั้นตอนของชุดสกัดสำเร็จรูป และตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี gel electrophoresis โดยกระแสไฟฟ้าตรงความต่างศักย์ 35 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที จากนั้นนำสารสกัดดีเอ็นเอมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR และไพรเมอร์คู่ที่เหมาะสม ได้แก่ D3B-R/D1R-F และ rL66F/rL587R ทำปฏิกิริยาในปริมาตร 50 μ l ประกอบด้วย ONE PCR Ultra 25 μ l, ultra-pure water 13 μ l, genomic DNA 10 μ l, 10 μ M Forward primer (D3B-R และ rL66F) และ 10 μ M reverse primer (D1R-F และ rL587R) อย่างละ 1 μ l ในสภาวะที่เหมาะสม คือ 1. Pre - Denaturation 5 นาที 94 °C 2. Denaturation 30 วินาที 94 °C 3. Annealing 30 วินาที 50 °C สำหรับคู่ไพรเมอร์ D3B-R/D1R-F และไพรเมอร์ rL66F/rL587R 4. Extension 1 นาที 30 วินาที 72 °C 5. Final extension 5 นาที 72 °C จำนวน 35 รอบ นำผลของปฏิกิริยา PCR มาตรวจสอบขนาดโดยเทคนิค gel electrophoresis ผ่านกระแสไฟฟ้าตรงความต่างศักย์ 35 โวลต์ นาน 50 นาที

3. การสกัดสาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอม

3.1 การหาประสิทธิภาพของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดไดอะตอม

นำไดอะตอมแต่ละชนิดที่ระยะ stationary phase และเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ความเค็ม 30 ppt มาล้างด้วยน้ำกลั่นโดยการปั่นเหวี่ยงให้ตกตะกอนจำนวน 3 รอบ จากนั้นนำเซลล์ไดอะตอมที่ได้มาสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ ดังนี้ 1) เมทานอลต่ออะซีโตน (50 % v/v) 2) เมทานอลต่อเอทิลอะซีเตท (50% v/v) และ 3) เมทานอล 100% ทำการสกัดไดอะตอมซ้ำอย่างน้อย 3 รอบ หรือจนกว่าสารสกัดจะใส จากนั้นนำส่วนของสารสกัดรวมกันแล้วนำไประเหยแห้งด้วยเครื่อง evaporator จนได้สารสกัดหยาบของตัวทำละลายต่างๆ

ทำการทดสอบประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant activity) ของสารสกัดไดอะตอมที่ความเข้มข้นต่างๆ (1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.06125 mg/ ml) ด้วยวิธี ABTS assay และบันทึกผลการทดลอง

3.2 การเตรียมสารสกัดเมทานอลของไดอะตอม

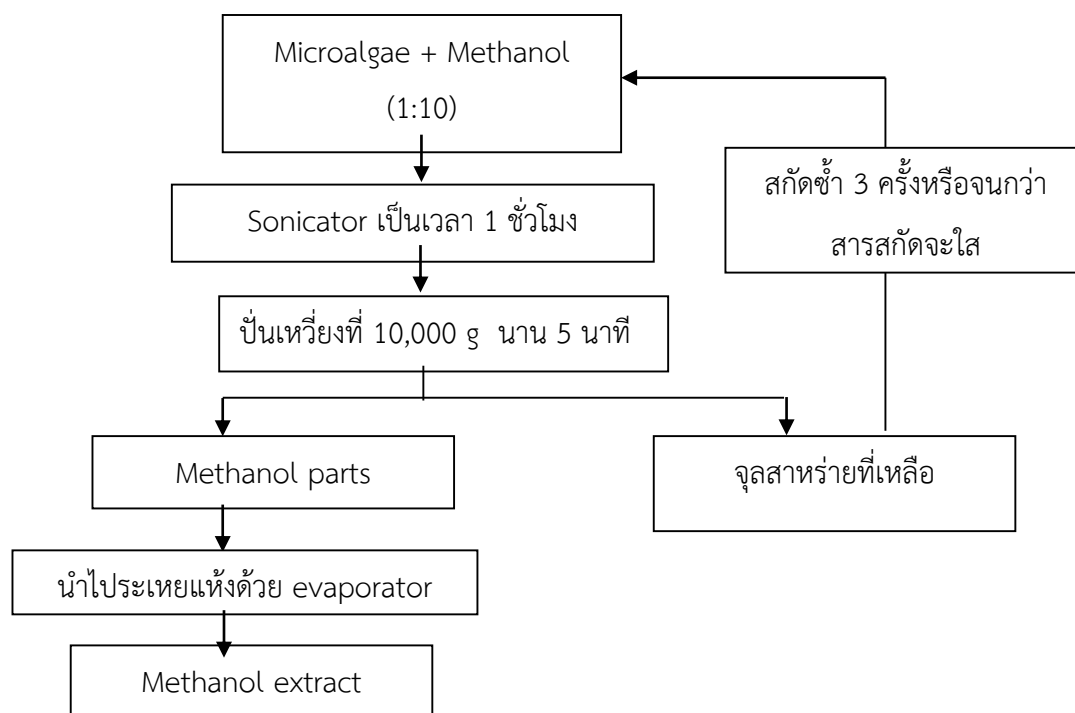
นำไดอะตอมที่เพาะเลี้ยงในแต่ละสภาวะความเค็มต่าง ได้แก่ 20 ppt, 30 ppt และ 40 ppt ทั้ง 4 ระยะการเจริญเติบโต ได้แก่ lag phase, exponential phase, retardation phase และ stationary phase มาล้างด้วยน้ำกลั่นเพื่อล้างผลึกเกลือออกให้หมด จากนั้นนำไดอะตอมแต่ละสภาวะมาสกัดหยาบด้วยเมทานอลอัตราส่วน (1:25) นำสารสกัดไป sonicate นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 g นาน 5 นาที เพื่อแยกสารสกัดเมทานอลออกจากสาหร่ายทำการสกัดด้วย sonicator ซ้ำ 3 รอบ หรือจนกว่าสารสกัดจะใส นำ

ส่วนของสารสกัดเมทานอลที่ได้รวมกันแล้วนำมาระเหยแห้งด้วยเครื่อง evaporator จนได้สารสกัดหยาบเมทานอลของสาหร่ายแต่ละชนิด บันทึกน้ำหนักสารสกัดหยาบของไดอะตอมและคำนวณร้อยละผลผลิตตามสูตรที่ 1

$$\% \text{yield} = (\text{น้ำหนักสารสกัด} / \text{น้ำหนักเปียกของตัวอย่าง}) \times 100 \text{ ----- (1)}$$

สารสกัดหยาบไดอะตอมจะถูกเก็บไว้ในตู้เย็นจนกว่าจะนำออกมาวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญกลุ่มแคโรทีนอยด์และทดสอบทดสอบฤทธิ์อื่นๆ ต่อไป

แผนภาพการสกัดสาหร่าย

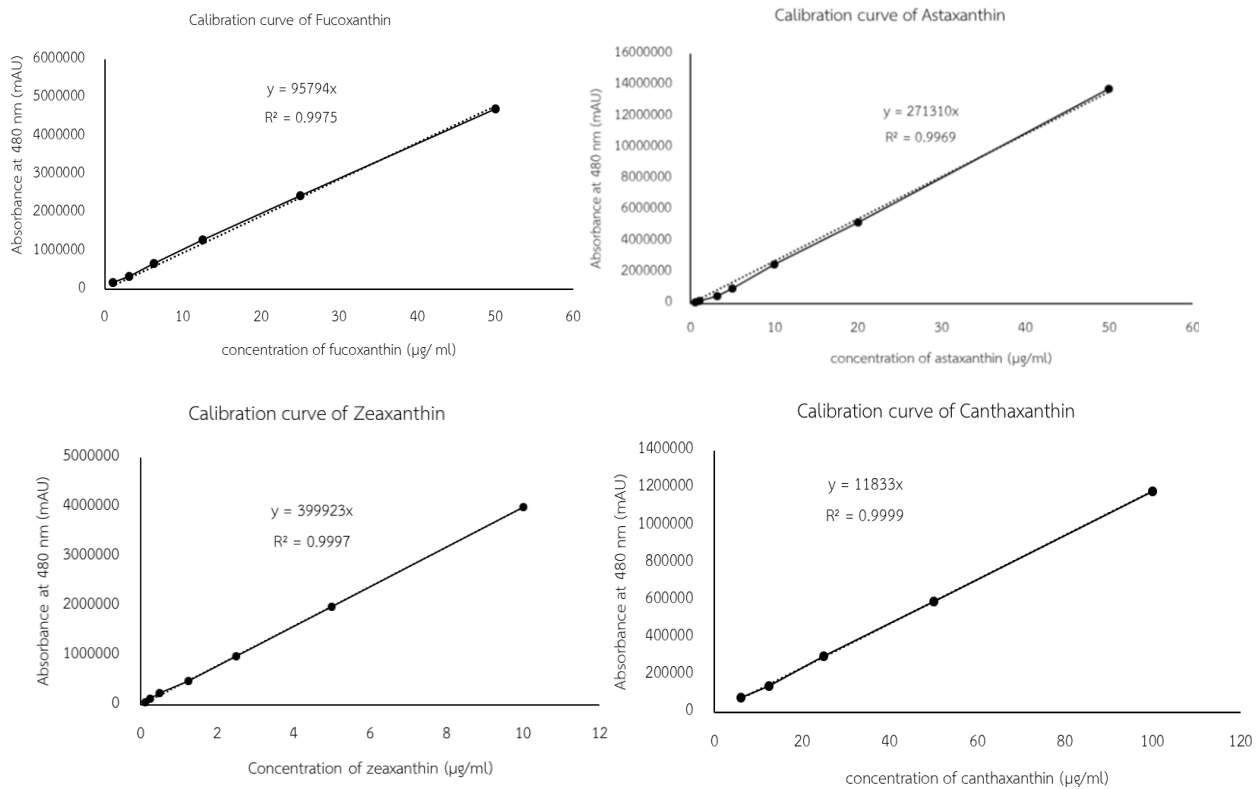


รูปภาพที่ 9 แผนผังการสกัดไดอะตอมด้วยเมทานอล

4. การวิเคราะห์สารกลุ่มแคโรทีนอยด์ด้วยเทคนิค High performance liquid chromatography (HPLC)

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Astaxanthin, Fucoxanthin, Canthaxanthin และ Zeaxanthin ซึ่งน้ำหนักสารมาตรฐาน 2 มิลลิกรัม ละลายด้วยตัวทำละลาย Dichloromethane หรือ Methanol ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ได้ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Stock solution) เตรียมสารละลายมาตรฐานเพื่อฉีด HPLC

ด้วยตัวทำละลายเดียวกันที่ความเข้มข้น 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 และ 1.56 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำสารสกัดหยาบจากไดอะตอมละลายสารสกัดด้วยตัวทำละลาย methanol 1 ml และเตรียมเตรียมสารสกัดหยาบไดอะตอมความเข้มข้น 1 mg/ml กรองสารละลายที่ทำการวิเคราะห์ด้วย syring microfilter ขนาด 0.45 ไมโครเมตร นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) โดยเครื่องตรวจวัดชนิด photodiode array detector ที่ความยาวคลื่น 480 นาโนเมตร ภายใต้สภาวะ : คอลัมน์ C₁₈ Hypersil BDS (ขนาด 4.6 X 300 มิลลิเมตร, I.D., 5 ไมโครเมตร) สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแยกสาร โดยเฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย Methanol: Acetonitrile :Dichloromethane: น้ำ (82:7.5:6.5:4.0) ที่อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาตรที่ฉีด 20 ไมโครลิตร วิเคราะห์หาปริมาณสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ในสารสกัดหยาบไดอะตอมเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน Astaxanthin, Fucoxanthin, Canthaxanthin และ Zeaxanthin จากกราฟสารละลายมาตรฐานดังแสดงในรูปที่



รูปภาพที่ 10 กราฟสารละลายมาตรฐานแคโรทีนอยด์ของ fucoxanthin, astaxanthin, zeaxanthin และ canthaxanthin

5. การวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันของไดอะตอมด้วยเทคนิค Gas Chromatography – Mass Spectroscopy (GC-MS)

การเตรียมตัวอย่างและสารมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ โดยใช้สารมาตรฐานกรดไขมัน 37 ชนิดในรูปแบบ methyl ester form (FAME 37, Cat. No. 47885-U, Supelco), สารมาตรฐานกรดไขมันไม่อิ่มตัวจาก Marine Source ในรูปแบบ methyl ester form (PUFA from Marine source No.1, Cat. No. 47033, Supelco) ตัวอย่างกรดไขมันในรูปแบบ methyl ester form จากไดอะตอมแต่ละชนิดที่สภาวะการเจริญต่าง ๆ จำนวน 15 ตัวอย่าง รายละเอียดตัวอย่างแสดงในตารางที่ S1 ในเอกสารสนับสนุน (Supplementary Information) จากนั้นเตรียมสารละลายสำหรับวิเคราะห์ ละลายตัวอย่างด้วยเฮกเซน (n-Hexanes; Gas Chromatography MS SupraSolv® Grade, 1.00795 EMD Millipore, Merck) ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ก่อนนำไปฉีดเข้าวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS แต่ละตัวอย่าง ทำการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ โดยในแต่ละตัวอย่างจะประกอบด้วย Internal standard (Pentadecanoic acid methyl ester) ความเข้มข้นเท่ากันทุกหลอด เพื่อใช้เป็น Internal check ในส่วนของ peak shifting

ทำการฉีดตัวอย่างทั้งหมด 3 ซ้ำ วิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS ด้วยเครื่อง GC รุ่น TRACE 1300 ที่ต่อเข้ากับชุดอุปกรณ์ฉีดสารอัตโนมัติรุ่น TriPlus RSH Autosampler และต่อกับเครื่องตรวจวัดชนิด Triple Quadrupole Mass Spectrometer รุ่น TSQ 8000 Evo (Thermo Scientific) ภายใต้สภาวะในการตรวจวิเคราะห์ ปริมาณสารละลายตัวอย่างที่ฉีดเข้าเครื่อง GC 1 μ L ด้วย Split ratio 1:20 โดยมีอุณหภูมิของ Injector เท่ากับ 250 °C (2) คอลัมน์ที่ใช้แยกสาร คือ TR5-MS (5% phenyl methyl polysiloxane; 30 m \times 0.25 mm ID, 0.25 μ m film thickness, Thermo Fisher Scientific) โดยมีโปรแกรมในการตั้งค่าอุณหภูมิของ column oven ดัง ตารางที่ 1 และ Carrier gas คือ Helium ด้วยอัตราการไหล 1 mL/min และสภาวะของแมสสเปกโตรเมตรี Mass Ionization เป็น Electron Impact 70 eV โดยใช้อุณหภูมิของ Transfer Line เท่ากับ 250 °C และอุณหภูมิของ Ion Source เท่ากับ 220 °C เก็บข้อมูล Mass Spectrum ในโหมด Full Scan MS โดยมีช่วงมวลในการวิเคราะห์ 40-500 amu ที่ Scan time (Dwell Time) 0.2 วินาที

ตารางที่ 1 โปรแกรมการตั้งค่าอุณหภูมิของ Column oven ที่ใช้ในการแยกองค์ประกอบในตัวอย่าง

Step	Rate (C/ min)	Target Temp. (C)	Hold Time (min)
Initial		70	2
1	10	150	0
2	4	280	0
3	10	300	2

ในการวิเคราะห์กรดไขมันในตัวอย่างแบ่งเป็น 2 ขั้นตอน ได้แก่ 1) การระบุชนิดของกรดไขมัน โดยเปรียบเทียบ Retention time ของพีคที่แยกได้จากตัวอย่างกับสารมาตรฐาน กรดไขมัน 37-FAME และ PUFA No. 1 ร่วมกับการเปรียบเทียบ Mass Spectra ของพีคต่างๆ กับ Mass Spectra ของสารมาตรฐาน โดยใช้ฐานข้อมูล NIST (The NIST Mass Spectral Search Program version 2.3, May 4 2017) เพื่อยืนยันชนิดกรดไขมันด้วย 2) การคำนวณสัดส่วนหรือปริมาณเชิงสัมพัทธ์ของกรดไขมันที่พบในตัวอย่าง (% Relative Abundance) ซึ่ง คำนวณจากสมการด้านล่างนี้

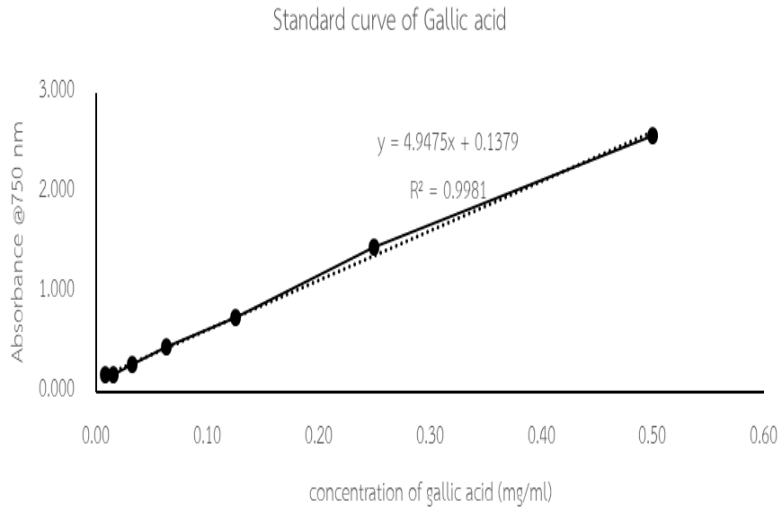
$$\% \text{Relative abundance ของกรดไขมันที่สนใจ} = \frac{\text{FAME Area}}{\sum \text{FAME Area}} \times 100$$

เมื่อ FAME Area คือ พื้นที่ใต้พีคหรือ Total ion intensity ของ fatty acid methyl ester นั้นๆ

FAME Area คือ ผลรวมของพื้นที่ใต้พีคหรือผลรวมของ Total ion intensity ของ fatty acid methyl ester ที่ตรวจพบในตัวอย่างนั้นๆ

6. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก

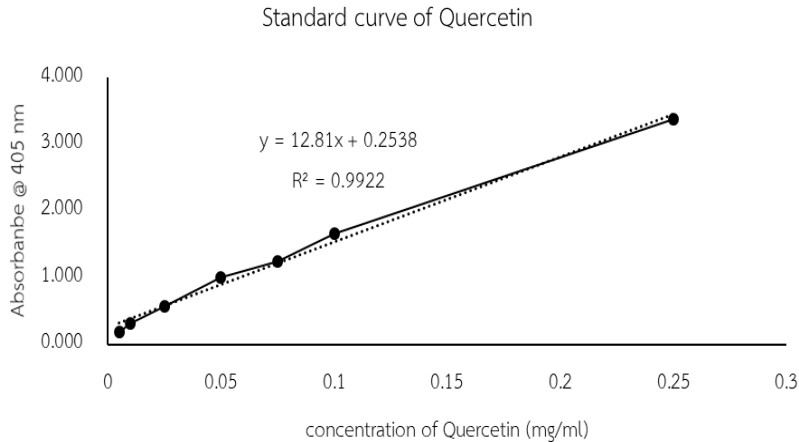
การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (total phenolic content) ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu (ดัดแปลงจาก Vonsak et al. (2013) นำตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร ผสมกับ Folin-Ciocalteu reagent ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและทิ้งไว้ 1 นาที จากนั้นเติม 7.5% (w/v) Na_2CO_3 ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้ Microplate reader ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานความเข้มข้นของ Gallic acid (ดังรูปที่ 4) นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ในแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน gallic acid ที่ได้โดยแสดงปริมาณ ฟีนอลิกเป็น gallic acid equivalent (mg GAE/g dry weight สารตัวอย่าง)



รูปที่ 11 กราฟมาตรฐานเปรียบเทียบของสาร Gallic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆที่ความยาวคลื่น 750 nm

7. การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์

การหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม (total flavonoid content) ด้วย aluminum chloride colorimetric method มาจากการศึกษาของ Chang et al. (2002) เตรียมสารสกัดหยาบจากไดอะตอมที่ความเข้มข้น 1000 $\mu\text{g/ml}$ ปริมาตร 100 μl ผสมกับ 100 μl ของ aluminum chloride (AlCl_3) solution ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 nm ด้วยเครื่อง spectrophotometer จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ในแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน quercetin solution (1-1000 $\mu\text{g/ml}$) ที่ได้ โดยแสดงปริมาณ quercetin เป็น quercetin equivalent (QE) ต่อกรัมของตัวอย่าง



รูปที่ 12 กราฟมาตรฐานเปรียบเทียบของสาร Quercetin ที่ความเข้มข้นต่างๆที่ความยาวคลื่น 405 nm

8. การวิเคราะห์ ด้วยเทคนิค Synchrotron FTIR microspectroscopy

การวิเคราะห์ที่ได้อะตอมด้วยเทคนิค Synchrotron FTIR microspectroscopy จำนวน 2 ชนิด ได้แก่ *C. tenuissimus*, *Thalassiosira sp* ที่ความเค็ม 3 ระดับ และระยะการเจริญเติบโต 4 ระยะ เพื่อการวิเคราะห์องค์ประกอบของลิพิด โปรตีน คาร์โบไฮเดรต เป็นต้น โดยนำตัวอย่างไดอะตอมหยดลงบน BaF₂ window แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วย Synchrotron FTIR microspectroscopy ดัดแปลงจาก Duygu et al., (2012) และ Xia et al., 2015 โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อินฟราเรด (Hyperion 2000, Bruker Optik GmbH, Ettlingen) และเครื่องอินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ (Vertex 70, Bruker Optik GmbH, Ettlingen) ควบคุมโดย โปรแกรม Opus 7.2, Bruker Optik GmbH, Ettlingen ณ สถานีทดลอง BL 4.1 Infrared spectroscopy and Imaging สถาบันวิจัยแสงซินโครตรอน (องค์การมหาชน) จังหวัดนครราชสีมา โดยสเปกตรัม IR ของสารมาตรฐาน astaxanthin และ PUFA marine ในสาหร่ายสายพันธุ์ที่มีปริมาณ astaxanthin สูงมีส่วนของ IR absorption ที่ความยาวคลื่น 3000-2800 cm⁻¹ และ 1740 cm⁻¹ สูง ด้วยเทคนิค Synchrotron FTIR microspectroscopy สามารถบอกความแตกต่างของไดอะตอมได้ในแต่ละระยะ ตามปริมาณสารกลุ่มแคโรทีนอยด์และกรดไขมันได้ โดยทดลองที่ 300 mW , 4 cm⁻¹, 300 scans แล้วนำมาวิเคราะห์ โดยใช้โปรแกรม OPUS 7.5 และทำการวิเคราะห์สเปกตรัมและ integral area เพื่อวิเคราะห์ความแตกต่างของแต่ละกลุ่มโดยใช้สเปกตรัม IR ของไดอะตอมในแต่ละสภาวะด้วยการวิเคราะห์ PCA analysis ด้วยโปรแกรม unscrambler x (10.1)

9. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดเมทานอลจากไดอะตอม

9.1 . ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant activity) การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณเป็นการวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระในสารละลายตัวอย่าง วิธีที่นิยม ได้แก่ การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH•) วิธีการฟอกสี อนุมูลอิสระเอบีทีเอส (ABTS•+) และการวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารต้านอนุมูลอิสระ (FRAP assay) ซึ่งวิธีการดังกล่าวจะมีการสร้างอนุมูลอิสระที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน และวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งหรือกำจัด อนุมูลอิสระของสารตัวอย่างที่สนใจ โดยวัดปริมาณ อนุมูลอิสระที่ลดลงหรือที่เหลือจากการดูดกลืนแสง ดังนี้

9.1.1 การทดสอบด้วยวิธีการ DPPH Radical Scavenging Assay

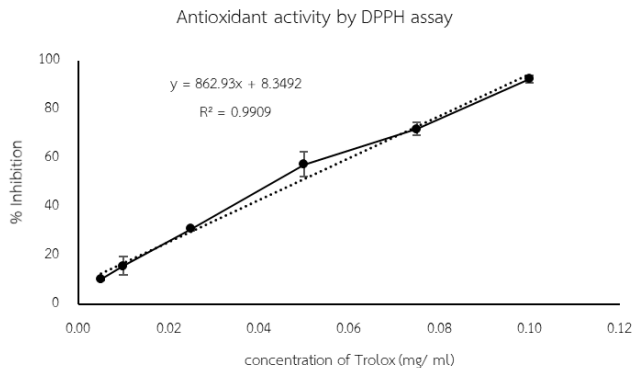
การวัดความสามารถของ free radical scavenger ของสารสกัดตัวอย่างไดอะตอม โดยใช้ stable radical DPPH ทำปฏิกิริยากับกับสารละลายตัวอย่าง หากสารตัวอย่างมีคุณสมบัติสามารถรับ hydrogen atom (H•) จะทำให้ DPPH• กลายเป็น non-radical เกิดเป็นสารไม่มีสีที่ absorbance 520 nm โดยทำการทดสอบปรับตามวิธีของ Zhang et al. (2007) การศึกษาฤทธิ์ต่อต้านอนุมูลอิสระ โดยใช้ 1 mM 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ในสารละลายเมทานอลเป็นสารทดสอบและใช้สารมาตรฐานเป็นอนุพันธ์ของวิตามินซี (Trolox) เป็นสารมาตรฐาน เตรียมสารสกัดไดอะตอมที่ความเข้มข้นต่างกัน และสารละลายอนุพันธ์ของวิตามินซี หรือ trolox (10-1000 µg/ml) ผสม 20 µl ของสารละลายมาตรฐาน trolox หรือสารสกัดหยาบจากวงตาลตัวผู้กับ 180 µL ของ 1.0 mM DPPH ใน methanol solution ลงใน 96-well plate ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm และนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหา % radical scavenging activity ตามสมการ

$$\% \text{ radical scavenging activity} = \frac{A_{\text{control}} - (A_{\text{sample}} - A_{\text{sample blank}})}{A_{\text{control}}} \times 100$$

โดยที่ A control คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ Methanolic DPPH radical ผสมกับตัวทำละลายที่ใช้

A sample และ A sample blank คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดไดอะตอมที่เติมสารละลาย DPPH และ ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดไดอะตอมที่ไม่เติม DPPH ตามลำดับ

จากนั้นเปรียบเทียบ % radical scavenging activity ของสารละลายตัวอย่างกับกราฟสารละลายมาตรฐาน Trolox เพื่อหาความเข้มข้นที่ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ 50% (IC₅₀) จากสมการเส้นตรงของสารละลายมาตรฐาน Trolox ดังรูปที่



รูปภาพที่ 13 กราฟมาตรฐานเปรียบเทียบของสาร Trolox ที่ความเข้มข้นต่างๆที่ความยาวคลื่น 520 nm

9.1.2 การทดสอบด้วยวิธีการ ABTS free radical-scavenging activity

การทดสอบการวิธีการฟอกสีอนุมูลอิสระเอบีทีเอส (ABTS^{•+}) โดย ABTS (2,2'-Azino-bis-(3ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid diammonium salt) จะถูกเปลี่ยนเป็นอนุมูลอิสระที่มีประจุบวกด้วยการเติมโปแตสเซียมเปอร์ซัลเฟต เมื่อทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระจะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นไม่มีสี ปรับตามวิธีทดสอบของ Rahim et al. (2008) เตรียมสารละลาย ABTS ผสม 7 mM ABTS กับ 2.45 mM K₂S₂O₈ (Dipotassium peroxodisulphate) ให้เข้ากันแล้วเจือจางด้วยสารละลายเมทานอล ในอัตราส่วน ABTS : สารละลายเมทานอล เท่ากับ 1 ต่อ 4 วัดค่าการดูดกลืนแสงให้อยู่ในช่วง 0.7-0.9 ที่ความยาว คลื่น 734 nm และเตรียมสารสกัดตัวอย่างให้ได้ความเข้มข้น 1 mg/ml ด้วยตัวทำละลาย ผสมสารละลาย ABTS ที่เจือจางแล้วกับสารสกัดตัวอย่างผสมให้เข้ากัน โดยให้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 200 µl วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหา % radical scavenging activity เทียบกับกราฟสารละลายมาตรฐาน Trolox เพื่อหาความเข้มข้นที่ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ 50% (IC₅₀) ตามสมการ

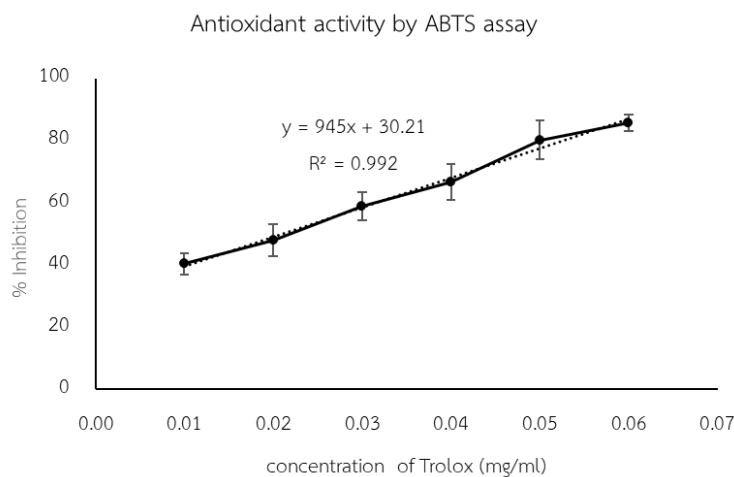
$$\% \text{ radical scavenging activity} = \frac{A_{\text{control}} - (A_{\text{samples}} - A_{\text{sample blank}})}{A_{\text{control}}} \times 100$$

A_{control} และ A_{sample} เท่ากับค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย ABTS และสารสกัด

โดยที่ A_{control} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ ABTS^{•+} ผสมกับตัวทำละลายที่ใช่

A_{sample} และ A_{sample blank} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดไดอะตอมที่เติมสารละลาย ABTS และ ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดไดอะตอมที่ไม่เติม ABTS ตามลำดับ

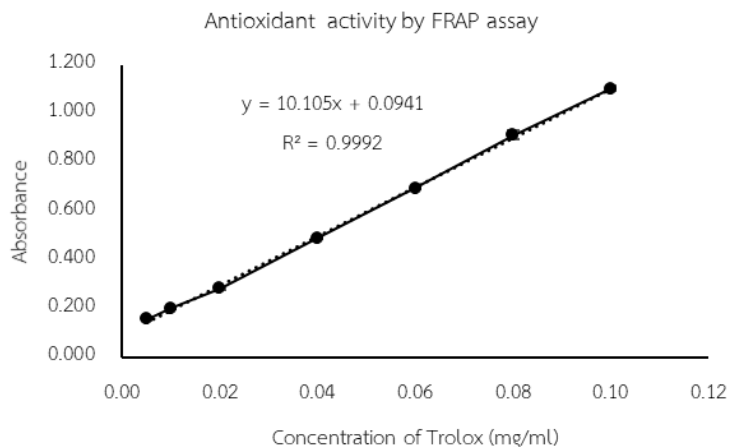
จากนั้นเปรียบเทียบ % radical scavenging activity ของสารละลายตัวอย่างกับกราฟ สารละลายมาตรฐาน Trolox เพื่อหาความเข้มข้นที่ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ 50% (IC₅₀) จากสมการ เส้นตรงของสารละลายมาตรฐาน Trolox ดังรูปที่ 14



รูปภาพที่ 14 กราฟมาตรฐานเปรียบเทียบของสาร Trolox ที่ความเข้มข้นต่างๆที่ความยาวคลื่น 734 nm

9.1.3 การวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารต้านอนุมูลอิสระ (ferric ion reducing antioxidant power (FRAP) assay)

การตรวจหาประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ จากสารละลายตัวอย่าง โดยดูประสิทธิภาพของตัวอย่าง ในการ Reduce ferric tripyridyltriazine (Fe^{3+} -TPTZ) complex (สี เท ลี อ ง) ไป เป็น Ferrous tripyridyltriazine (Fe^{2+} -TPTZ) (สีน้ำเงิน) การเปลี่ยนแปลงของสีที่เกิดขึ้นจะทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ตามวิธีดัดแปลงมาจาก Al-Mansoub et al. (2014) เตรียม FRAP solution โดยผสมสารละลาย 3 ชนิดในอัตราส่วน 1:1:10 ตามลำดับ ดังนี้ 20 mM $FeCl_2$ สาร 2, 4, 6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ) ละลายใน 40 mM HCl และ 300 mM acetate buffer pH 3.6 นำสารสกัดไดอะตอมที่ความเข้มข้นต่างๆ และเตรียมสารสกัดตัวอย่างให้ได้ความเข้มข้น 1 mg/ml นำตัวอย่างสารสกัด 20 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย FRAP (Ferric reducing antioxidant power) reagent ปริมาตร 180 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาในที่มืด นาน 15 นาทีที่อุณหภูมิห้อง วัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้ microplate reader ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำโดยเปรียบเทียบกับ กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของ Trolox (ดังรูปที่ 15) และรายงานผล เป็นปริมาณ Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC)



รูปภาพที่ 15 กราฟมาตรฐานเปรียบเทียบของสาร Trolox ที่ความเข้มข้นต่างๆที่ความยาวคลื่น 600 nm

9.2 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ Acetylcholinesterase (AChE)

การทดสอบสารสกัดจากไดอะตอมที่มีฤทธิ์ยับยั้ง AChE ตามวิธีการของ Ellman และคณะ (1961) และดัดแปลงตามวิธีของ Bruhlmann และคณะ (2004) การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส (Ellman, Courtney, Andres, & Featherstone, 1961) โดยใช้อะซิติลไทโอโคลีน ไอโอไดด์ (acetylthiocholine iodide, ATCI) เป็นสารตั้งต้น ทำได้โดยผสมสารละลายตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ (ความเข้มข้นเริ่มต้น 1 mg/ml) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร กับสารละลายบัฟเฟอร์ (Tris-HCl buffer, pH 8.0) ความเข้มข้น 50 mM ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และ 3.0 mM 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) จากนั้นเติมสารละลายเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส ความเข้มข้น 0.28 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร (U/ml) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงก่อนใส่ซับสเตรทที่ 405 nm จากนั้นเติมสารละลาย 15 mM ATCI ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันบ่มที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร ด้วย เครื่อง microplate reader ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ และคำนวณหาค่าร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ AChE (% inhibition AChE) ตามสมการ

$$\% \text{ inhibition AChE} = \frac{[(\text{Enz} - \text{Enz}_{\text{blank}}) - (\text{Test} - \text{Test}_{\text{blank}})]}{(\text{Enz} - \text{Enz}_{\text{blank}})} \times 100$$

เมื่อ Enz คือ ค่าการดูดกลืนแสงของเอนไซม์ AChE ที่ไม่มีสารทดสอบ

Enz_{Blank} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของเอนไซม์ AChE กับบัฟเฟอร์ที่ไม่มีสารทดสอบ

Test คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างที่ทำปฏิกิริยากับเอนไซม์และสารตั้งต้น
Test_{blank} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวทำละลายสารตัวอย่างกับเอนไซม์และสารตั้งต้น

9.3 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase inhibitor)

การทดสอบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยใช้สารไทโรซิน (L-tyrosine) เป็นสารตั้งต้น (substrate) ดัดแปลงตามวิธีของ โดยเติมสารละลายเอนไซม์ไทโรซิเนสเข้มข้น 500 U/ml ลงไป 20 μ l ผสมกับ สารทดสอบ 20 μ l และ [20 mM] phosphate buffer pH 6.8 ปริมาตร 140 μ l บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 10 นาที จากนั้น ทำการเติมซับสเตรท [0.85 mM] L-DOPA ปริมาตร 20 μ l บ่มต่ออีก 20 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 nm เปรียบเทียบกับ kojic acid ที่ใช้เป็นตัวควบคุมผลบวก คำนวณ %inhibition และค่า IC₅₀ จากสมการ

$$\%inhibition = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

โดยที่ A₀ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวควบคุม และ A₁ คือค่าการดูดกลืนแสงของสารทดสอบ

9.4 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส Collagenase

การทดลองนี้ดัดแปลงมาจากงานวิจัยของ Widowati W และคณะ ทำได้โดยเตรียมสารทดสอบและ EGCG ปริมาตร 60 ไมโครลิตร สารละลายเอนไซม์คอลลาจีเนสที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 1 ยูนิตต่อมิลลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตรและเติม 50 mM Tricine buffer pH 7.5 ปริมาตร 120 ไมโครลิตรนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที จากนั้นเติมซับสเตรทที่มีความเข้มข้น 1 mM FALGPA ลงไป 20 ไมโครลิตร บ่มต่ออีก 10 นาที นำสารตัวอย่างไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร คำนวณ %inhibition และหาค่า IC₅₀ จากสมการ

$$\%inhibition = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

โดยที่ A₀ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวควบคุม และ A₁ คือค่าการดูดกลืนแสงของสารทดสอบ

9.5 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส Elastase

การทดลองนี้ดัดแปลงมาจากงานวิจัยของ Sahasrabudhe A และ Deodhar M. โดยเตรียมสารสารทดสอบและเคอซีติน ปริมาตร 30 ไมโครลิตร สารละลายเอนไซม์อีลาสเตสที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 0.3 ยูนิตต่อมิลลิตร ปริมาตร 30 ไมโครลิตรและเติม 2mM Tris-HCl pH 8.0 ปริมาตร 110 ไมโครลิตรนำไปบ่มที่อุณหภูมิ

37 องศาเซลเซียสนาน 20 นาที จากนั้นเติมซบสเตรท SuchAla3-pNa ที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรลงไป 30 ไมโครลิตร บ่มต่ออีก 20 นาที นำสารตัวอย่างไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร คำนวณ %inhibition และหาค่า IC₅₀ จากสมการ

$$\%inhibition = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100]$$

โดยที่ A₀ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวควบคุม และ A₁ คือค่าการดูดกลืนแสงของสารทดสอบ

9.6. ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cell cytotoxicity)

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยวิธี MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณการเจริญเติบโตและการอยู่รอดของเซลล์ โดยเซลล์ที่มีชีวิตจะยังคงมีกระบวนการเมแทบอลิซึมอยู่ และสามารถเปลี่ยนสารสีเหลือง (tetrazolium salt (MTT) ไปเป็นสารสีม่วง (formazan product) โดยสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ human keratinocyte (HaCaT) ในอาหารเพาะเลี้ยง Dulbecco's modified Eagles culture medium (DMEM) ในตู้บ่ม CO₂ incubator ที่มี 5% CO₂ อุณหภูมิ 37°C เลี้ยงเซลล์ HaCaT ที่ความหนาแน่นจำนวน 10,000 เซลล์ในจานเลี้ยงชนิด 96-well เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารสกัดไดอะตอมแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นที่ต่างกัน (< 0.1% MeOH) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นตรวจสอบความมีชีวิตของเซลล์ (cell viability) ด้วยวิธี MTT assay โดยดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากจานเพาะเลี้ยง แล้วเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสาร MTT (0.5 mg/mL) ละลายอยู่และนำไปบ่มใน CO₂ incubator เป็นเวลา 30 นาที แล้วเปลี่ยนถ่ายอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากจานเพาะเลี้ยง แล้วเติม DMSO ปริมาณ 200 µL ต่อหลุม เพื่อละลายผลึก formazan เขย่าจานเลี้ยงเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำสารละลายไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 570 nm คำนวณหาค่าร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับเฉพาะ โดยกลุ่มควบคุมมีค่า cell viability เท่ากับ 100% ดังสมการ

$$\% \text{ Cell viability} = (A_1 / A_0) \times 100]$$

โดยที่ A₀ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มควบคุมที่ 570 nm และ A₁ คือค่าการดูดกลืนแสงของสารทดสอบที่ 570 nm

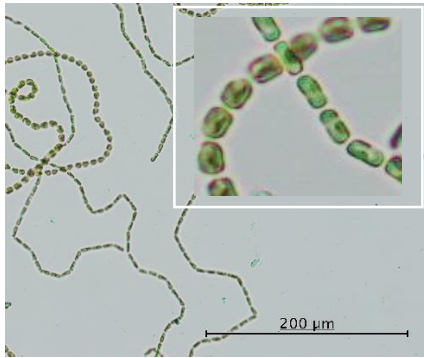
10. ขั้นตอนและสถิติการในการวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ความแปรปรวนข้อมูลทางสถิติ (Analysis of Variance, ANOVA) ด้วยโปรแกรม SPSS for windows version 10.0 และทำการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มการทดลอง ด้วย Tukey's honestly significant difference (HSD) post hoc test

ผลการทดลอง

1. ลักษณะของไดอะตอมที่ใช้ในการศึกษา

การแยกและเพาะเลี้ยงสาหร่ายไดอะตอมด้วยเทคนิค Single cell isolation โดย ดร. อมรรัตน์ กนกรุ่ง และคณะ สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา สามารถทำการแยกและเพาะเลี้ยงเซลล์เดี่ยวของสาหร่ายไดอะตอมจำนวน 3 ชนิด ได้แก่ *Chaetoceros tenuissimus* Meunier, *Odontella* sp. (*Odontella sinensis* (Greville) Grunow*) และ *Thalassiosira pseudonana* Hasle & Heimdal (ดังแสดงในรูปที่ 16) จากน้ำทะเล ในจังหวัดชลบุรี เพื่อทำการศึกษาสภาวะของความเค็มของไดอะตอมต่อปริมาณสารแคโรทีนอยด์และกรดไขมัน รวมถึงฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ



Chaetoceros tenuissimus

Class Coscinodiscophyceae

Subclass Chaetocerotophycidae

Order Chaetocerotales

Family Chaetocerotaceae



Odontella sp.

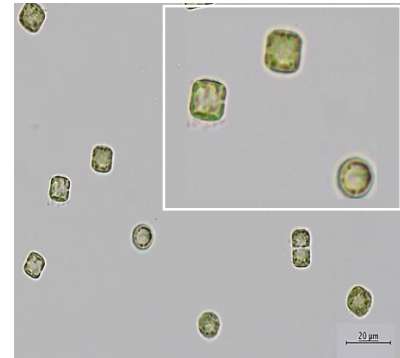
(*Odontella sinensis* (Greville) Grunow*)

Class Coscinodiscophyceae

Subclass Biddulphiophycidae

Order Triceratiales

Family Triceratiaceae



Thalassiosira pseudonana

Class Coscinodiscophyceae

Subclass Thalassiosirophycidae

Order Thalassiosirales

Family Thalassiosiraceae

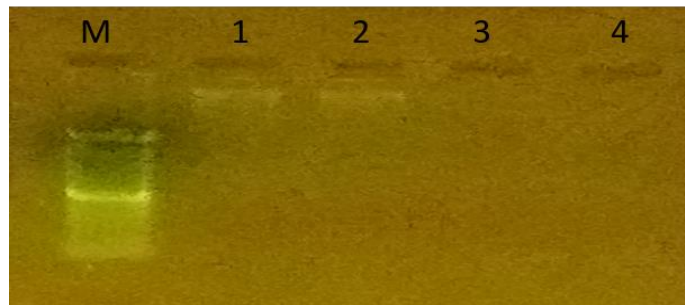
ที่มารูปภาพจาก: ดร. อมรรัตน์ กนกรุ่งและคณะ

รูปภาพที่ 16 ลักษณะของไดอะตอมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ใช้ในการศึกษาคั้งนี้

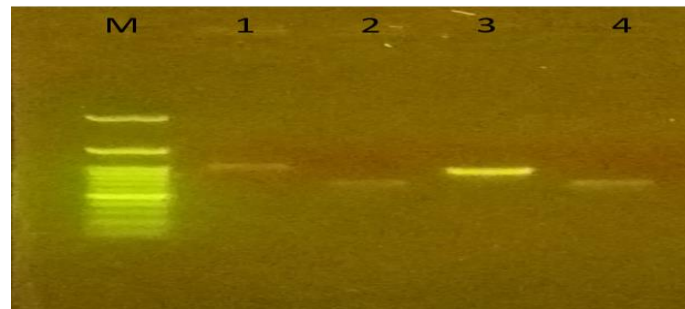
การระบุลายพิมพ์นิ้วมือดีเอ็นเอของไดอะตอม

เมื่อนำตัวอย่าง *Chaetoceros tenuissimus* และ *Thalassiosira pseudonana* มาทำตามขั้นตอนของชุดสกัดสำเร็จรูป และตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี gel electrophoresis โดยกระแสไฟฟ้าตรงความต่างศักย์

35 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที จากนั้นนำสารสกัดดีเอ็นเอมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR และไพรเมอร์คู่ที่เหมาะสม ได้แก่ D3B-R/D1R-F และ rL66F/rL587R ทำปฏิกิริยาในปริมาตร 50 μ l ประกอบด้วย ONE PCR Ultra 25 μ l, ultra-pure water 13 μ l, genomic DNA 10 μ l, 10 μ M Forward primer (D3B-R และ rL66F) และ 10 μ M reverse primer (D1R-F และ rL587R) อย่างละ 1 μ l ในสภาวะที่เหมาะสม คือ 1. Pre - Denaturation 5 นาที 94 °C 2. Denaturation 30 วินาที 94 °C 3. Annealing 30 วินาที 50 °C สำหรับคู่ไพรเมอร์ D3B-R/D1R-F และไพรเมอร์ rL66F/rL587R 4. Extension 1 นาที 30 วินาที 72 °C 5. Final extension 5 นาที 72 °C จำนวน 35 รอบ นำผลของปฏิกิริยา PCR มาตรวจสอบขนาดโดยเทคนิค gel electrophoresis ผ่านกระแสไฟฟ้าตรงความต่างศักย์ 35 โวลต์ นาน 50 นาที



รูปภาพที่ 17 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัด *C. tenuissimus* lane 1-2 และ *T. pseudonana* lane 3-4



รูปภาพที่ 18 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR ของ *C. tenuissimus* และ *T. pseudonana*

Lane 1 คือ *C. tenuissimus* ไพรเมอร์ D3B-R/D1R-F ขนาดประมาณ 1000 bp

Lane 2 คือ *C. tenuissimus* ไพรเมอร์ rL66F/rL587R ขนาดประมาณ 7000 bp

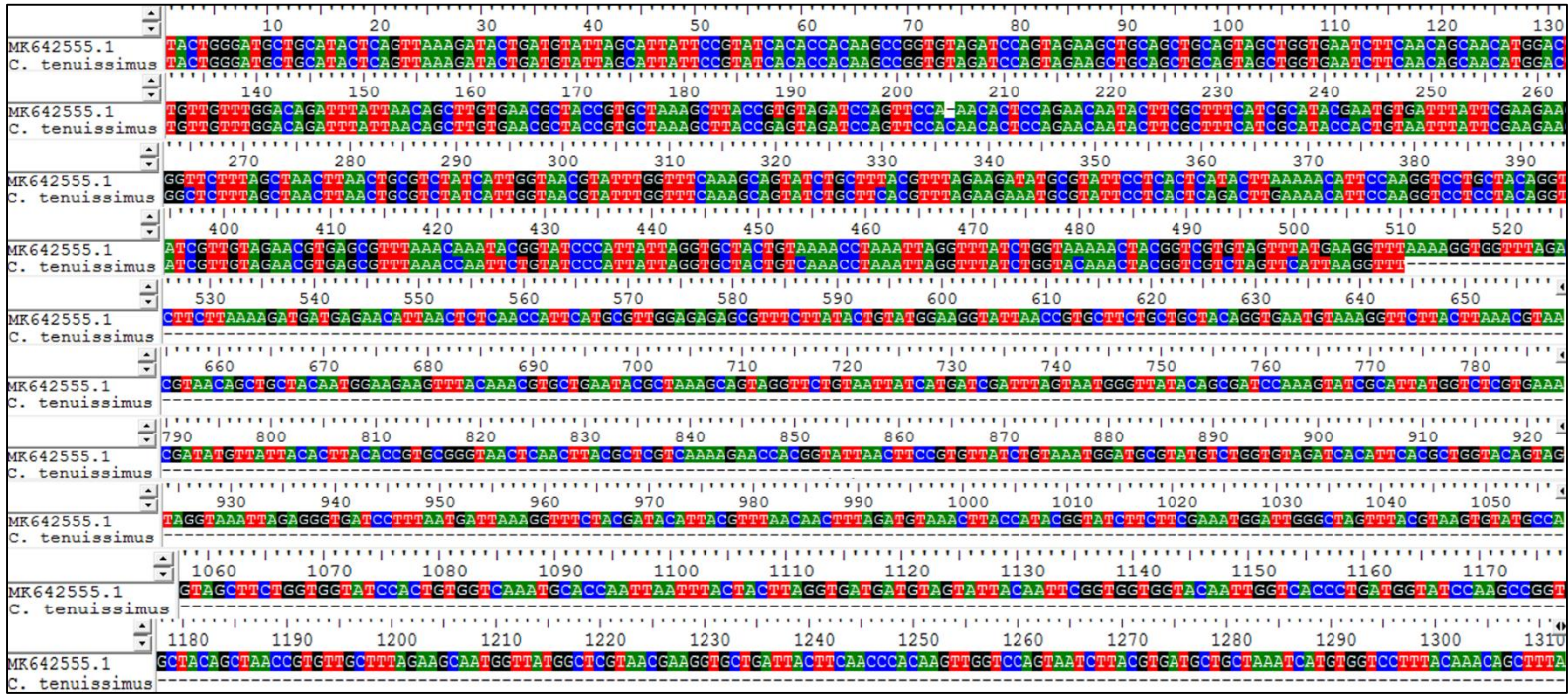
Lane 3 คือ *T. pseudonana* ไพรเมอร์ D3B-R/D1R-F ขนาดประมาณ 1000 bp

Lane 4 คือ *T. pseudonana* ไพรเมอร์ rL66F/rL587R ขนาดประมาณ 700 bp

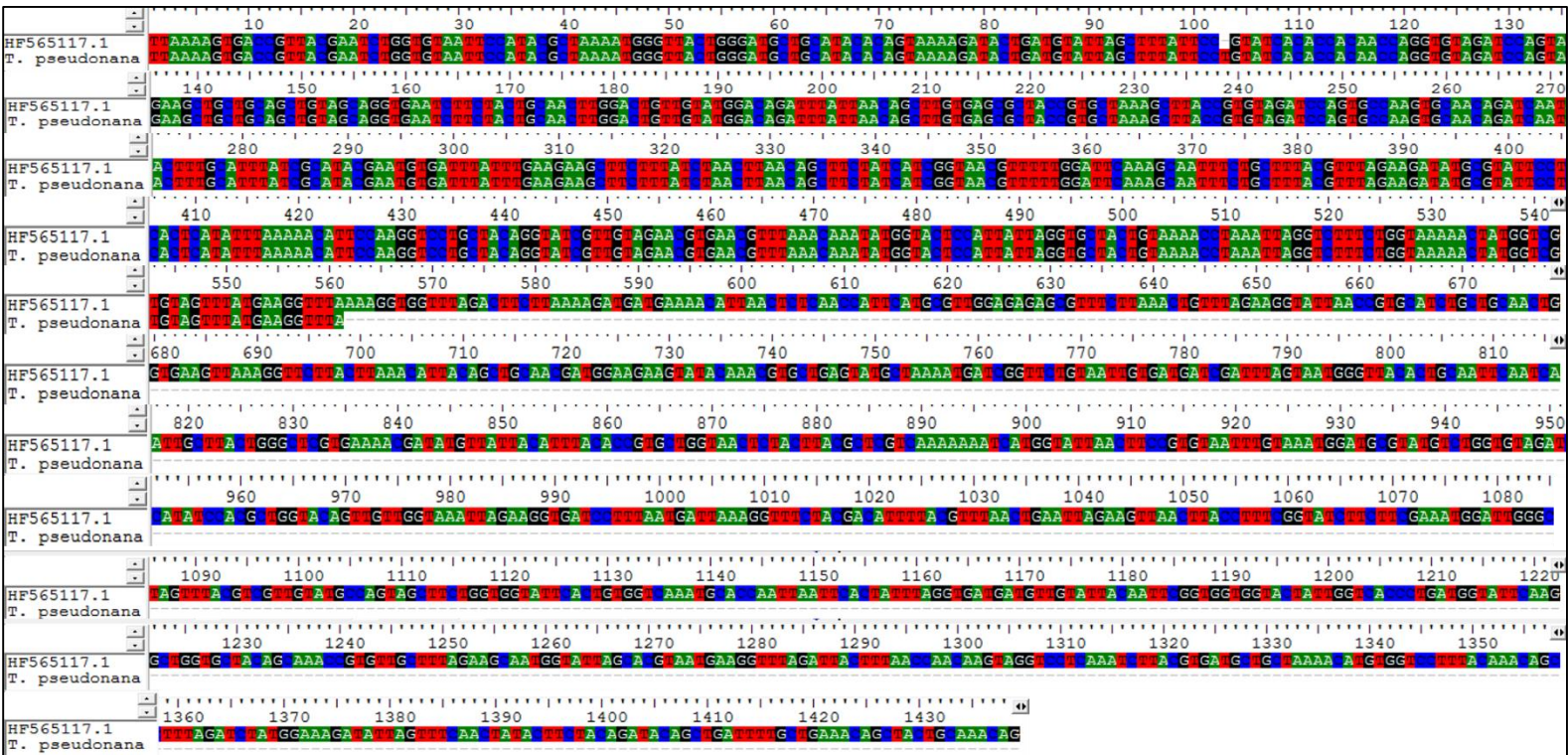
ตารางที่ 2 แสดงผลการ blast ของลำดับเบสดีเอ็นเอจาก GenBank(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

Name	Length (bp.)	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Database accession
<i>C. tenuissimus</i>	510	831	831	100%	0.0	96.27%	MK642557.1
<i>T. pseudonana</i>	561	1004	1004	100%	0.0	99.82%	HF565117.1

สำหรับการสกัดดีเอ็นเอของ *C. tenuissimus* และ *T. pseudonana* มาทำการเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR แล้วพบว่า ดีเอ็นเอของตัวอย่างทั้งสองมีขนาดประมาณ 500 bp. จากนั้น PCR product ไปตรวจหาลำดับเบสดี-เอ็นเอและนำมาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน Genbank (NCBI) เพื่อยืนยันความเหมือนหรือความแตกต่างของลำดับเบสดีเอ็นเอ พบว่า สารสกัดดีเอ็นเอของ *C. tenuissimus* และ *T. pseudonana* นี้มี %ident หรือเปอร์เซ็นต์ความใกล้เคียงเมื่อเทียบกับฐานข้อมูลจากการใช้โปรแกรม BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) อยู่ที่ 96.27% และ 99.82% ตามลำดับ



รูปภาพที่ 19 ลำดับดีเอ็นเอของ *C. tenuissimus* เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล KY306597.1

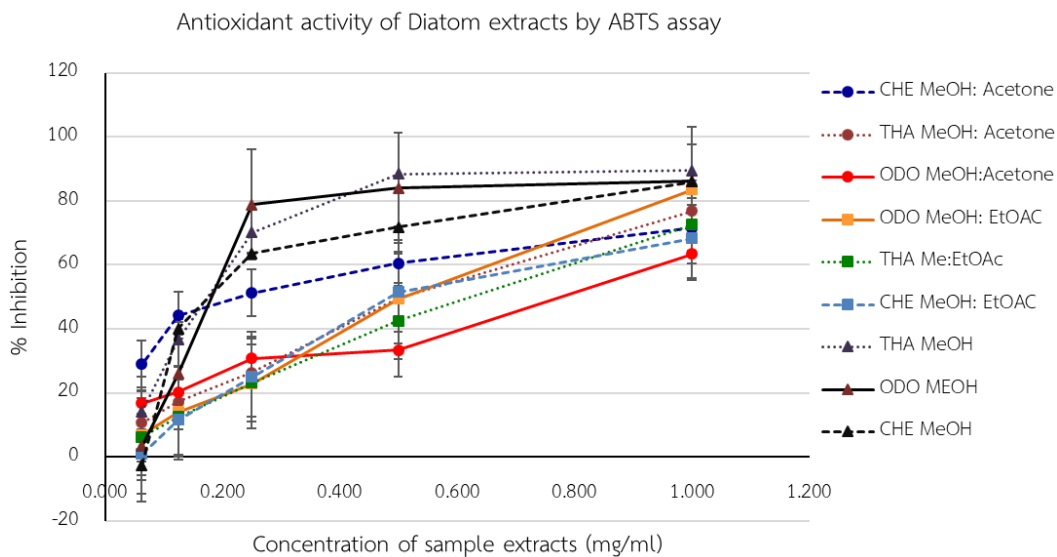


รูปภาพที่ 20 ลำดับดีเอ็นเอของ *T. pseudonana* เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล HF56511

ทั้งนี้ไดอะตอมชนิด *Odontella* sp. ยังไม่สามารถระบุชนิดที่แน่ชัดได้ เนื่องจากปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ มีจำนวนน้อยกว่าไดอะตอมชนิดอื่นๆ และ%ident เมื่อเทียบกับฐานข้อมูลมีค่าต่ำกว่า 90%

2. ประสิทธิภาพของตัวทำละลายในการสกัดไดอะตอม

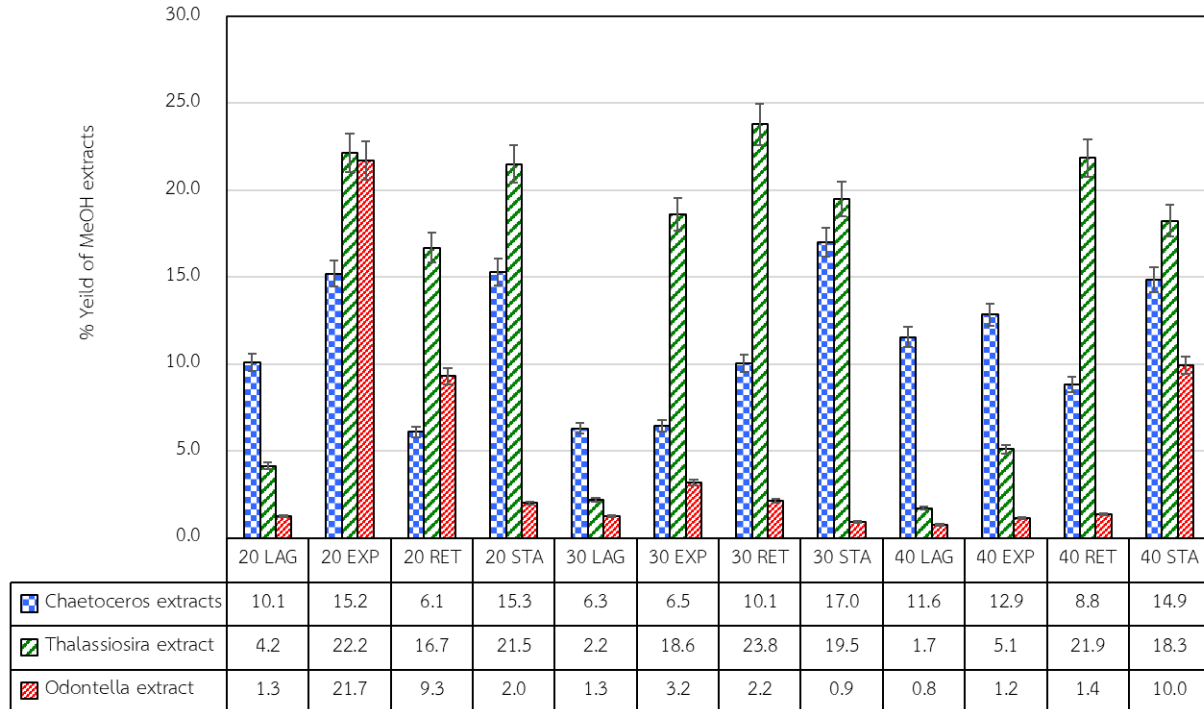
การศึกษาประสิทธิภาพของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสาหร่ายไดอะตอม ระยะ stationary phase ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay จากตัวอย่างไดอะตอมทั้ง 3 ชนิดที่ความเค็ม 30 ppt ในตัวทำละลายต่างๆกัน ได้แก่ เมทานอลต่ออะซิโตน 50% (v/v) เมทานอลต่อเอทิลอะซิเตท 50% (v/v) และ 100% เมทานอล พบว่าประสิทธิภาพของสารสกัดไดอะตอมทั้งสามชนิดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุดเมื่อสกัดด้วยตัวทำละลาย เมทานอล > เมทานอลต่อเอทิลอะซิเตท 50% (v/v) และ เมทานอลต่ออะซิโตน 50% (v/v) ดังแสดงดังรูป



รูปภาพที่ 21 กราฟแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดในตัวทำละลายต่างๆ ด้วยวิธี ABTS

ดังนั้นการศึกษารุ่นนี้จึงทำการวิเคราะห์ปริมาณสารแคโรทีนอยด์ สารประกอบฟีนอลิก สารประกอบฟลาโวนอยด์ และกรดไขมัน ที่มีผลต่อฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดเมทานอลจากไดอะตอมทั้ง 3 ชนิดที่เลี้ยงในความเค็ม 20 ppt, 30 ppt และ 40 ppt ในแต่ละระยะการเจริญเติบโตต่างๆ ได้แก่ lag phase, exponential phase, retardation phase และ stationary phase เป็นต้น

ปริมาณของสารสกัดเมทานอลของไดอะตอม จากการสกัดเมทานอลของสาหร่ายไดอะตอมแต่ละชนิด จำนวน 0.2 กรัม น้ำหนักเปียก แสดงผลปริมาณสารสกัด (% Yield of MeOH Extract) ของไดอะตอมแต่ละชนิด ดังรูปที่ 22

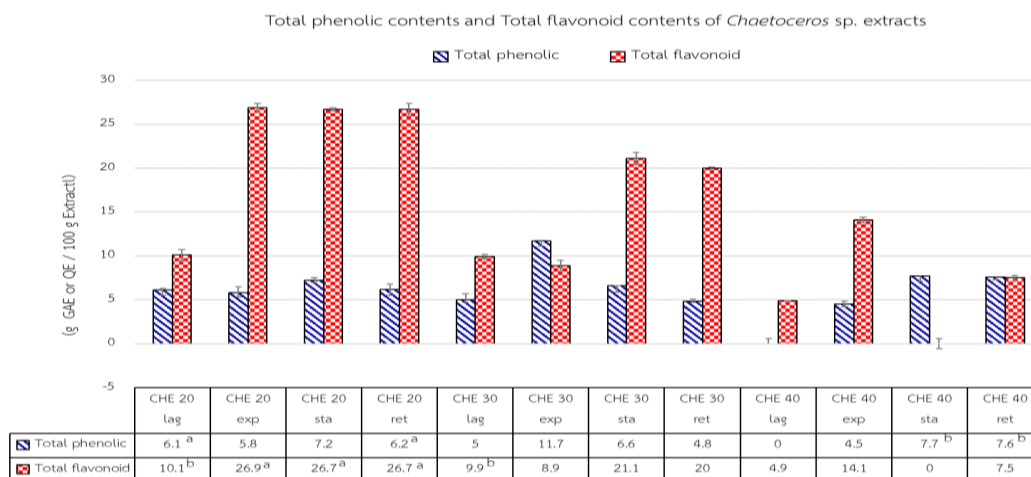


รูปภาพที่ 22 ปริมาณสารสกัดเมทานอล (% yield of MeOH extract) ของไดอะตอม *C. tenuissimus*, *Odontella* sp และ *Thalassiosira* sp. แต่ละระยะการเติบโต ได้แก่ lag (Lag), exponential (Exp), retardation (Ret) และ stationary (Sta) phase ที่เลี้ยงในสภาวะความเค็ม 20 ppt, 30 ppt และ 40 ppt

จากปริมาณสารสกัดเมทานอลของไดอะตอมแต่ละชนิดพบว่าปริมาณสารสกัดต่อน้ำหนักเปียกของไดอะตอมชนิด *T. pseudonana* ในสภาวะต่างๆ มีปริมาณสารสกัดสูงกว่าไดอะตอมชนิด *C. tenuissimus* และ *Odontella* sp. ตามลำดับ โดยสารสกัดเมทานอลจาก *T. pseudonana* เพาะเลี้ยงด้วยอาหารที่ความเค็ม 30 ppt (RET) 20 ppt (EXP) และ 40 ppt (RET) มีปริมาณสารสกัดเมทานอลสูงที่สุดที่ 23.8% 22.2% และ 21.9% ตามลำดับ สารสกัดเมทานอลจาก *Odontella* sp. มีปริมาณสารสกัดเมทานอลต่ำที่สุดที่ 40 ppt (LAG) ที่ 0.8%

3. ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมในสารสกัดไคอะตอม

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมจากสารสกัดเมทานอลของไคอะตอมทั้ง 36 ตัวอย่าง พบว่าในสารสกัดจากไคอะตอม ODO30Sta (18.9±0.7 g GAE/ 100 g extract) มีปริมาณฟีนอลิกรวมสูงสุด รองลงมาคือ THA40Sta (18.2±0.5 g GAE/100 g extract) THA30Sta (16.6±0.7 g GAE/ 100 g extract) THA30Ret (12.4±0.9 g GAE/ 100 g extract) ODO30Exp (11.5±1.0 g GAE/ 100 g extract) และ CHE 30 Exp (11.7±0.6 g GAE/ 100 g extract) ตามลำดับ เมื่อพิจารณาในสารสกัดจากไคอะตอม *C. tenuissimus* พบว่ามีปริมาณฟีนอลิกรวมสูงสุดที่เพาะเลี้ยงในความเค็ม 30 ppt ที่ระยะ exponential phase หรือ CHE 30 Exp (11.7±0.6 g GAE/ 100 g extract) รองลงมาคือ CHE ที่เลี้ยงในความเค็ม 40 ppt ที่ระยะ stationary (CHE40Sta) และ retardation phase (CHE40Ret) มีปริมาณเท่ากับ 7.7±0.6 และ 7.6±0.3 g GAE/ 100 g extract ตามลำดับ ดังแสดงในกราฟ รูปที่ 23 .ในขณะที่ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมพบสูงสุดจากสารสกัด *C. tenuissimus* ที่เพาะเลี้ยงในความเค็ม 20 ppt ที่ระยะ exponential phase (CHE20Exp), stationary phase (CHE20Sta) และ retardation phase (CHE20Ret) มีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมเท่ากับ 26.9±0.5, 26.7±0.2 และ 26.7±0.7 g QE/ 100 g extract ตามลำดับ ซึ่งพบว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ดังแสดงในรูปที่ 23

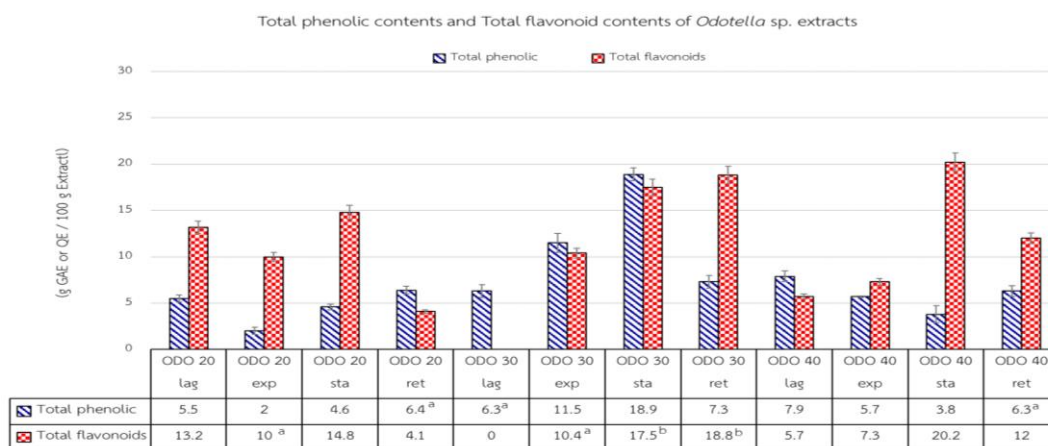


รูปภาพที่ 23 ปริมาณฟีนอลิกรวมและฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดเมทานอลของไคอะตอม *Chaetoceros* sp. ที่สภาวะความเค็มและระยะการเจริญเติบโตต่างๆ

หมายเหตุ ข้อมูลแสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

อักษรภาษาอังกฤษแต่ละแถวแสดงค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ด้วยการใช้การวิเคราะห์ One way ANOVA ด้วยวิธี tukey-HSD

ในสารสกัดจากไดอะตอม *Odontella* sp. มีปริมาณฟีนอลิกรวมสูงสุดที่เพาะเลี้ยงในความเค็ม 30 ppt ที่ระยะ stationary phase หรือ ODO30Sta (18.9 ± 0.7 g GAE/ 100 g extract) รองลงมาคือ ODO30Exp มีปริมาณฟีนอลิกรวมเท่ากับ 11.5 ± 1.0 g GAE/ 100 g extract ซึ่งพบว่าปริมาณฟีนอลิกรวมแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ดังแสดงในกราฟ รูปที่ 23 . ในขณะที่ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมพบสูงสุดจากสารสกัด *Odontella* sp. ที่เพาะเลี้ยงในความเค็ม 40 ppt ที่ระยะ stationary phase (ODO40Sta) มีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมเท่ากับ 20.2 ± 0.8 g QE/ 100 g extract รองลงมาคือสารสกัด ODO30Ret และ ODO30Sta (18.8 ± 1.0 และ 17.5 ± 0.6 g QE/ 100 g extract) ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ xx



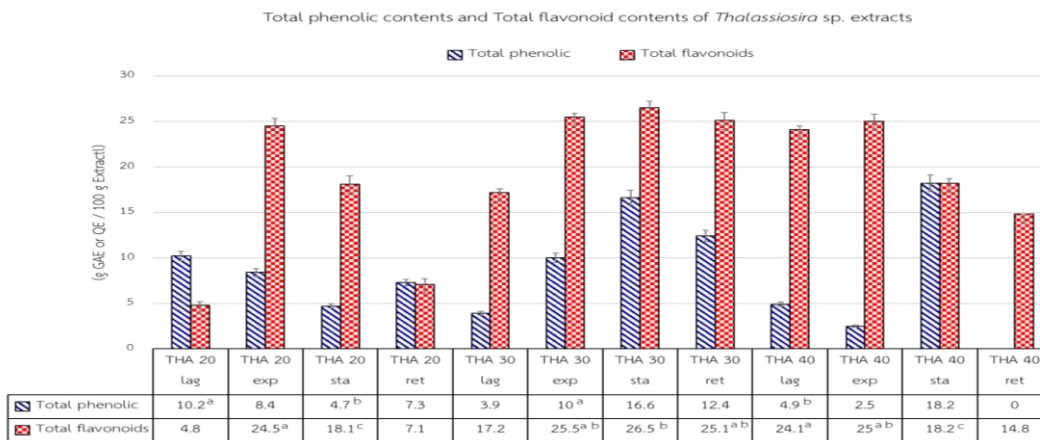
รูปภาพที่ 24 ปริมาณฟีนอลิกรวมและฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดเมทานอลของไดอะตอม *Odontella* sp. ที่สภาวะความเค็มและระยะการเจริญเติบโตต่างๆ

หมายเหตุ ข้อมูลแสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

อักษรภาษาอังกฤษแต่ละแถวแสดงค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ด้วยการวิเคราะห์ One way ANOVA ด้วยวิธี tukey-HSD

สารสกัดจากไดอะตอม *Thalassiosira* sp. มีปริมาณฟีนอลิกรวมสูงสุดที่เพาะเลี้ยงในความเค็ม 40 ppt ที่ระยะ stationary (THA40Sta) มีค่าเท่ากับ 18.2 ± 0.5 g GAE/ 100 g extract รองลงมาคือสารสกัด THA30Sta, THA30Ret, THA20Lag และ THA30Exp (16.6 ± 0.7 , 12.4 ± 0.9 , 10.2 ± 0.4 และ 10.0 ± 0.4 g GAE/ 100 g extract) ดังแสดงในรูปที่24 . ในขณะที่ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมพบสูงสุดสูงสุดที่เพาะเลี้ยงในความเค็ม 30 ppt ที่ระยะ stationary (THA30Sta) มีค่าเท่ากับ 26.5 ± 1.0 g QE/ 100 g extract รองลงมาคือสารสกัด THA30Exp, THA30Ret และ THA40Exp (25.5 ± 0.7 , 25.1 ± 0.9 และ 25.0 ± 0.9 g QE/ 100 g

extract) ตามลำดับ ซึ่งพบว่าปริมาณฟลาโวนอยด์รวมไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ดังแสดงในรูปที่ 24



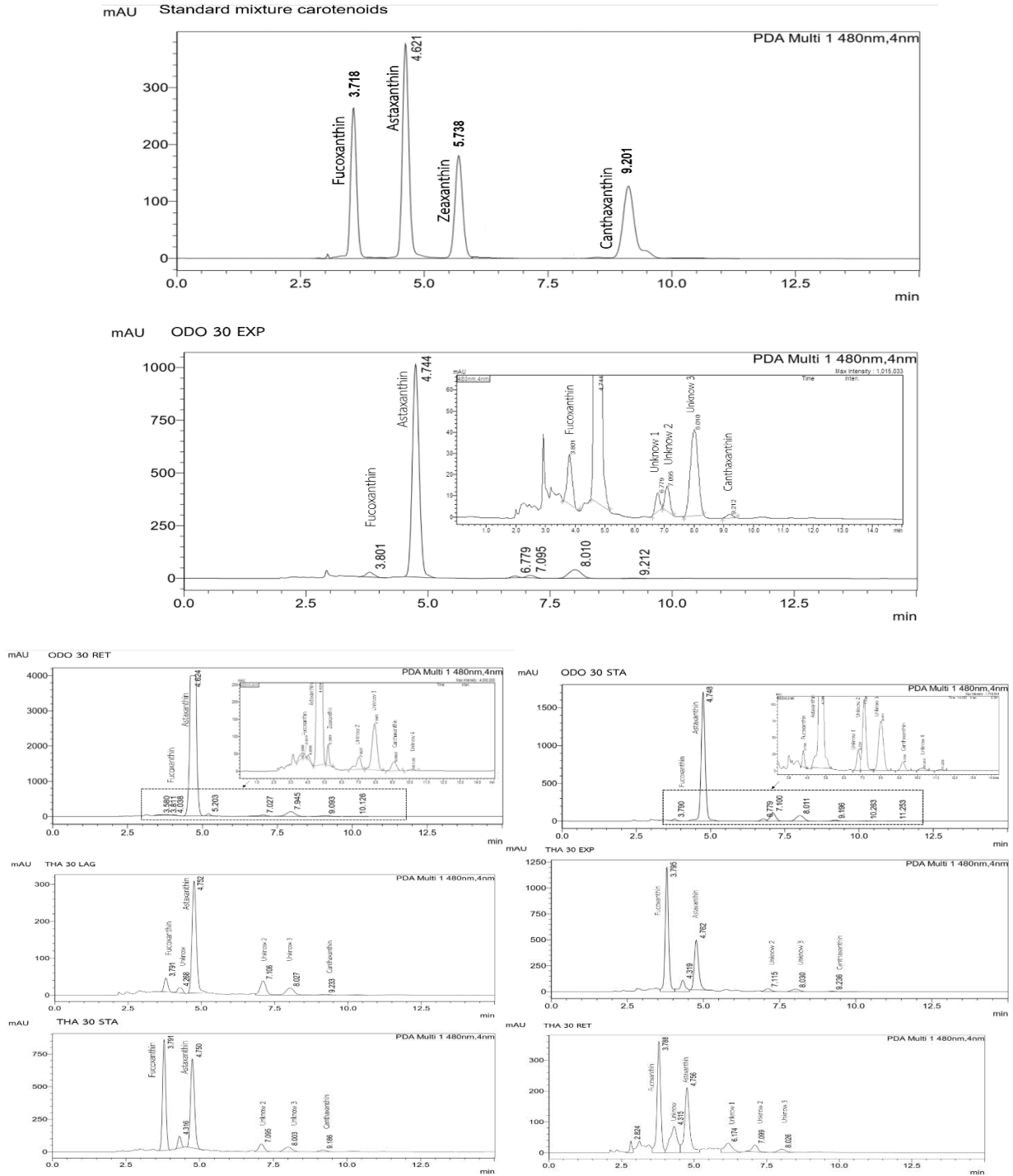
รูปภาพที่ 25 ปริมาณฟีนอลิกรวมและฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดเมทานอลของไดอะตอม *T. pseudonana* ที่สภาวะความเค็มต่างๆ

หมายเหตุ ข้อมูลแสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
อักษรภาษาอังกฤษแต่ละแถวแสดงค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ด้วยการใช้การวิเคราะห์ One way ANOVA ด้วยวิธี tukey-HSD

3. ปริมาณสารกลุ่มแคโรทีนอยด์และกรดไขมันในสารสกัดจากไดอะตอม

3.1 การศึกษาชนิดและปริมาณของสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ในไดอะตอมด้วยเครื่อง โครมาโตกราฟชนิดของเหลวความดันสูง

จากการศึกษาชนิดและปริมาณของแคโรทีนอยด์ด้วยระบบของเครื่องโครมาโตกราฟชนิดของเหลวความดันสูง หรือ High pressure liquid chromatography (HPLC) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานกลุ่มแคโรทีนอยด์จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ สารมาตรฐาน Fucoxanthin (R_t 3.7 min), Astaxanthin (R_t 4.6 min), Zeaxanthin (R_t 5.7 min), และ Canthaxanthin (R_t 9.2 min) ดังรูปที่



รูปภาพที่ 25 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานที่ retention time ต่างๆ และโครมาโทแกรมจากการวิเคราะห์ HPLC ของสารสกัดไดอะตอม *Odontella* sp. (ODO30Exp, ODO30Ret และ ODO30Sta) และ *Thalassiosira* sp. (THA30Lag, THA30Exp, THA30Sta และ THA30Ret)

จากผลการทดลองพบว่าปริมาณสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ในสารสกัดไดอะตอมรวมมีปริมาณสูงสุดใน *T. pseudonana* ระยะ stationary phase ที่เลี้ยงในความเค็ม 20 ppt มีปริมาณสารกลุ่มแคโรทีนอยด์รวมมากที่สุด เท่ากับ ประกอบด้วย fucoxanthin (201.50 µg/ g wet weight), astaxanthin (372.00 µg/ g wet weight), canthaxanthin (123.10 µg/ g wet weight) และ zeaxanthin (0.50 µg/ g wet weight) รองลงมาคือ *Odontella* sp. ที่ระยะ stationary phase เลี้ยงในความเค็ม 30 ppt ประกอบด้วยสารสีกลุ่มแคโรทีนอยด์ ได้แก่ fucoxanthin (63.50 µg/ g wet weight), astaxanthin (382.50 µg/ g wet weight), canthaxanthin (237.25 µg/ g wet weight) และ zeaxanthin (5.30 µg/ g wet weight) โดยสารสกัดจากไดอะตอม *Cheatoceeros* sp. พบว่ามีปริมาณสารสีกลุ่มแคโรทีนอยด์ค่อนข้างต่ำ โดยในสารสกัดไดอะตอม ที่ระยะ stationary phase เลี้ยงในความเค็ม 20 ppt ประกอบด้วยสารสีกลุ่มแคโรทีนอยด์ fucoxanthin (77.50 µg/ g wet weight), astaxanthin (18.50 µg/ g wet weight), canthaxanthin (17.50 µg/ g wet weight) และ zeaxanthin (0.75 µg/ g wet weight)

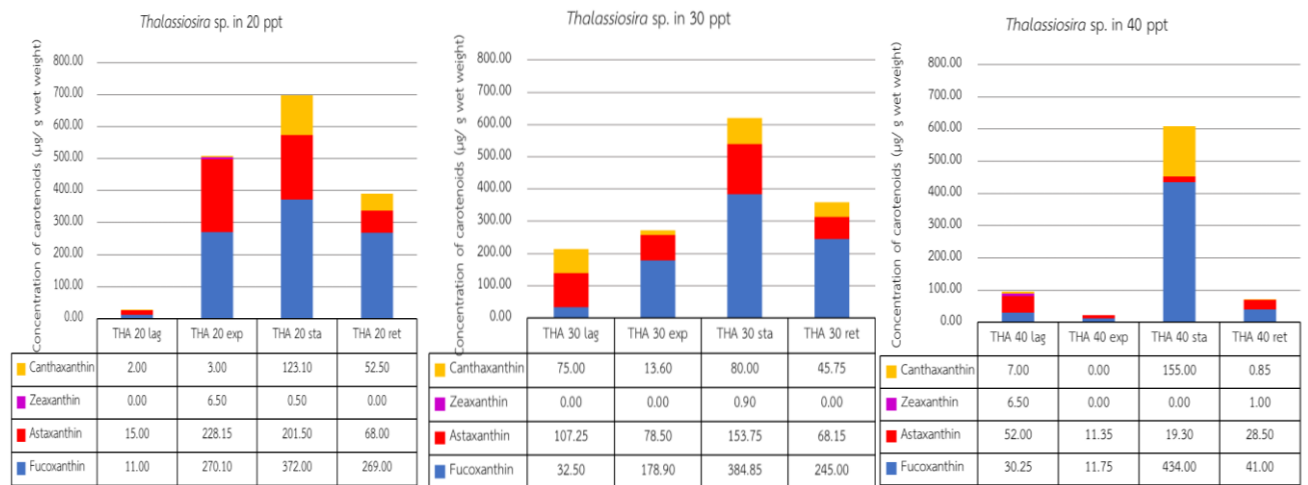
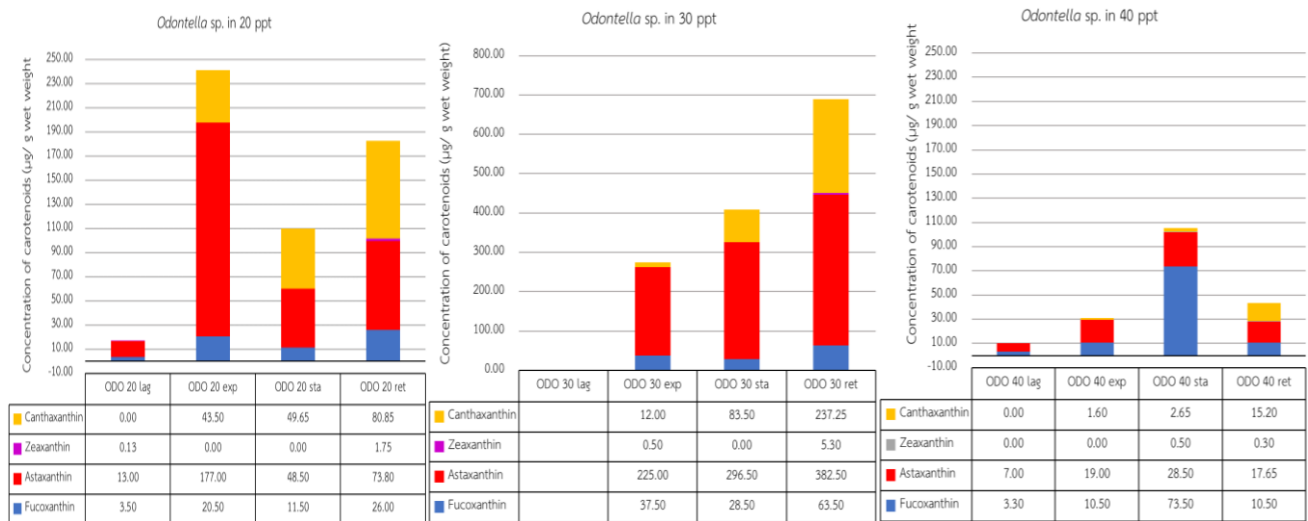
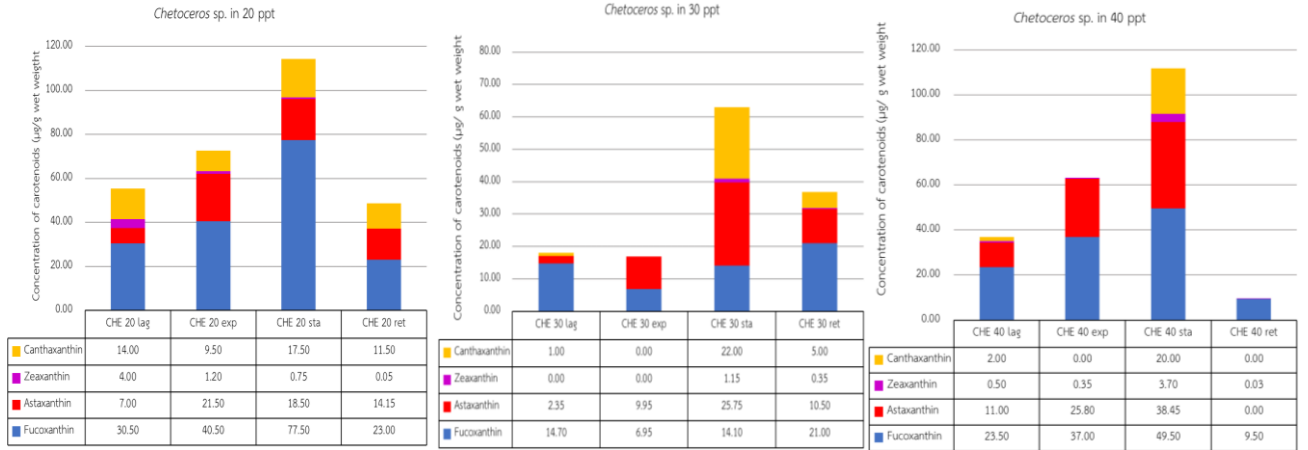
เมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ในสารสกัดไดอะตอมแต่ละชนิด พบว่าสารสีชนิด Fucoxanthin มีปริมาณสูงสุดในไดอะตอมชนิด *T. pseudonana* ที่สภาวะความเค็ม 40 ppt ระยะ stationary phase (THA40Sta, 434.00 µg/ g wet weight) พบรองลงมาคือ THA30Sta (384.85 µg/ g wet weight), THA20Sta (372.00 µg/ g wet weight) ตามลำดับ ในสารสกัดไดอะตอม *Odontella* sp. พบว่ามีสารสี fucoxanthin อยู่มีปริมาณสูงสุดใน ODO40STA (73.50 µg/ g wet weight) รองลงมาคือ ODO30Ret (63.50 µg/ g wet weight), ODO30Exp (37.50 µg/ g wet weight) และ ODO30Sta (28.50 µg/ g wet weight) ตามลำดับ ในขณะที่ไดอะตอมชนิด *Chaetoceros* sp. มีปริมาณสารสี fucoxanthin สูงสุดในสภาวะความเค็ม 20 ppt ระยะ stationary phase (CHE20Sta, 77.50 µg/ g wet weight) รองลงมา คือ CHE40Sta (49.50 µg/ g wet weight) และ CHE20Exp (40.50 µg/ g wet weight) ดังแสดงในรูปที่ 25

สารสี Astaxanthin มีปริมาณสูงสุดในสารสกัดไดอะตอมชนิด *Odontella* sp. สภาวะความเค็ม 30 ppt ระยะ retardation phase (ODO30Ret, 76.5 µg/ g wet weight) รองลงมาคือ ODO30Sta (59.3 µg/ g wet weight), THA20Exp (45.6 µg/ g wet weight) และ THA20Sta (40.3 µg/ g wet weight) ส่วนในไดอะตอมชนิด *Chaetoceros* sp. พบ astaxanthin สูงสุดในสารสกัด CHE40Sta (38.45 µg/ g wet weight) CHE40Exp (25.80 µg/ g wet weight) และ CHE30Sta (25.75 µg/ g wet weight) ตามลำดับ

สารสี Zeaxanthin มีปริมาณมากที่สุดในสารสกัดไดอะตอม THA20Sta (6.50 µg/ g wet weight), THA40Lag (6.50 µg/ g wet weight) ODO30Ret (5.30 µg/ g wet weight) และ CHE20Lag (4.00 µg/ g

wet weight) ตามลำดับ ดังรูปที่ โดยในสารสกัดไดอะตอม CHE30Lag, CHE30Exp, ODO20Exp, ODO20Sta, ODO30Sta, ODO40Lag, ODO40Exp, THA30Lag THA30Sta, THA30Ret, THA40Exp, THA40Sta ไม่พบ สารสี zeaxanthin ในสารสกัดไดอะตอม

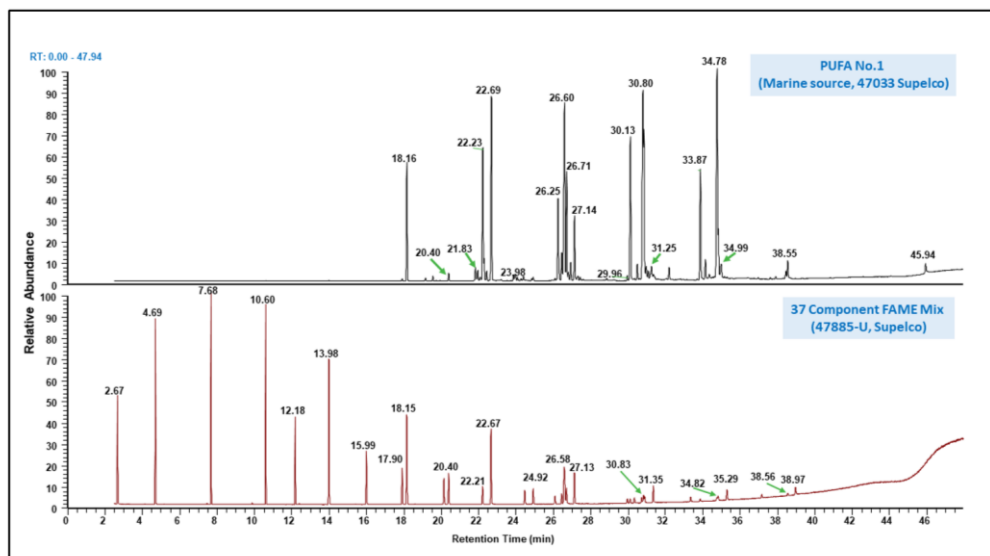
สารสี Canthaxanthin มีปริมาณสูงสุดในสารสกัดไดอะตอม ODO30Ret (237.25 $\mu\text{g}/\text{g}$ wet weight) รองลงมา คือ THA40Sta (155.00 $\mu\text{g}/\text{g}$ wet weight), THA20Sta (123.10 $\mu\text{g}/\text{g}$ wet weight), ODO30Sta (83.50 $\mu\text{g}/\text{g}$ wet weight), ODO20REet (80.85 $\mu\text{g}/\text{g}$ wet weight) THA30Sta (80.00 $\mu\text{g}/\text{g}$ wet weight) , THA30Lag (75.00 $\mu\text{g}/\text{g}$ wet weight), THA20Ret (52.50 $\mu\text{g}/\text{g}$ wet weight) ตามลำดับ โดยในไดอะตอม *Chaetoceros* sp. มีสารสี cathaxanthin อยู่ค่อนข้างต่ำ ระหว่าง 22.00 -1.00 $\mu\text{g}/\text{g}$ wet weight ดังแสดงใน รูปที่ 27



รูปภาพที่ 27 แสดงสัดส่วนของปริมาณสารสีกลุ่มแคโรทีนอยด์ ($\mu\text{g/g}$ น้ำหนักเปียก) ที่พบในสารสกัดไดอะตอม ทั้ง 3 ชนิดที่เลี้ยงในระดับความเค็ม 20 ppt, 30 ppt และ 40 ppt และเก็บรวบรวมที่ระยะเวลาเจริญเติบโตต่างๆ ของไดอะตอม

3.2 การศึกษาชนิดและปริมาณของกรดไขมันในไดอะตอมด้วยเครื่อง แก๊สโครมาโตกราฟ (GC-MS)

ผลการวิเคราะห์ชนิดของกรดไขมันที่ตรวจพบในตัวอย่างและปริมาณเชิงสัมพัทธ์ (% Relative abundance) แสดงได้ดังตารางที่ 3 ถึง 5 ทั้งนี้ ณ เวลาในการแยก (Retention time) 26.58 นาที นั้นกรดไขมัน 3 ชนิดถูกแยกด้วยคอลัมน์พร้อมกัน คือ Oleic acid , α -Linolenic acid และ Linoleic acid (ดังแสดงได้ใน ตาราง S2 และรูปที่ S1 และ S2) เนื่องจาก จากกรดไขมันทั้ง 3 ชนิดมีจุดเดือดเท่ากันและโครงสร้างคล้ายกัน ทำให้ไม่สามารถแยกออกได้ด้วยคอลัมน์ชนิด TR5MS (5% phenyl methyl polysiloxane) ซึ่งอาศัยหลักการแยกสารด้วยจุดเดือดของสารเป็นหลักสำคัญ



รูปภาพที่ 28 เปรียบเทียบ Total Ion Chromatogram ระหว่าง 37-FAME mix standard และ PUFA No. 1 (Marine source) โดยระบุ retention time เหนือพีค

ในสารสกัดไดอะตอม *Chaetoceros* sp. ที่สภาวะต่างๆ ได้แก่ CHE20Ret, CHE30Lag, CHE30Exp, CHE30Ret, CHE30Sta และ CHE40Ret พบว่ามีกรดไขมันชนิด Myristic acid สูงสุด รองลงมาคือ Palmitic acid และ Margaric acid ตามลำดับ โดยพบกรดไขมันไม่อิ่มตัวกลุ่มโอเมก้า-3 ได้แก่ EPA ในสารสกัด CHE30Lag (1.07 ± 0.28 %), CHE30Ret (0.80 ± 0.16 %) และ CHE40Ret (0.34 ± 0.07 %) ตามลำดับ โดยในสารสกัดไดอะตอมทั้ง 6 ตัวอย่างนี้ไม่พบกรดไขมันไม่อิ่มตัว DHA ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงปริมาณเชิงสัมพัทธ์ (%Relative abundance) ของกรดไขมันที่พบในตัวอย่าง *Chaetoceros* sp.1

กรดไขมัน	Formula	% Relative abundance (Average \pm STDEV)					
		CHE20-RET	CHE30-LAG	CHE30-EXP	CHE30-RET	CHE30-STA	CHE40-RET
Tridecadic acid	C13:0	1.24 \pm 0.16	0.76 \pm 0.09	0.96 \pm 0.09	0.64 \pm 0.07	0.45 \pm 0.10	1.00 \pm 0.22
Myristic acid (Tetradecanoic acid)	C14:0	48.75 \pm 0.93	26.16 \pm 0.29	23.91 \pm 1.13	31.00 \pm 3.32	39.96 \pm 2.94	15.61 \pm 2.37
Palmitoleic acid (<i>cis</i> -9-Hexadecenoic acid)	C16:1n7	7.52 \pm 0.11	12.78 \pm 0.13	10.88 \pm 0.10	13.90 \pm 0.19	27.19 \pm 0.96	11.83 \pm 0.58
Palmitic acid (Hexadecanoic acid)	C16:0	26.06 \pm 1.12	26.48 \pm 1.80	29.22 \pm 0.12	25.26 \pm 0.19	24.02 \pm 1.02	27.03 \pm 3.22
Margaric acid (Heptadecanoic acid)	C17:0	14.45 \pm 0.60	13.73 \pm 0.34	14.97 \pm 0.49	12.94 \pm 1.00	7.63 \pm 1.01	19.08 \pm 1.16
Linoleic acid (<i>cis</i> - 9,12-Octadecadienoic acid)	C18:2n6c						0.37 \pm 0.10
*Oleic acid (<i>cis</i> -9-Octadecenoic acid)	C18:1n9c		8.41 \pm 0.43	9.28 \pm 0.36	6.24 \pm 0.75		12.75 \pm 2.78
Elaidic acid (<i>trans</i> - 9-Octadecenoic acid)	C18:1n9t		3.42 \pm 0.29	4.02 \pm 0.22	2.92 \pm 0.54		4.50 \pm 0.83
Stearic acid (Octadecanoic acid)	C18:0	1.98 \pm 0.36	5.94 \pm 0.24	6.22 \pm 0.36	5.67 \pm 0.81	0.75 \pm 0.19	6.38 \pm 0.97
EPA (<i>cis</i> -5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic acid)	C20:5n3		1.07 \pm 0.28		0.80 \pm 0.16		0.34 \pm 0.07
<i>cis</i> -11-Eicosenoic acid	C20:1n9		0.82 \pm 0.17	0.52 \pm 0.02	0.46 \pm 0.15		0.92 \pm 0.37
Arachidic acid (Eicosanoic acid)	C20:0		0.26 \pm 0.02		0.16 \pm 0.04		0.20 \pm 0.04
Erucic acid (<i>cis</i> -13-Docosenoic acid)	C22:1n9		0.17 \pm 0.02				

สารสกัดไดอะตอม *Odontella* sp. ที่สภาวะต่างๆ ได้แก่ ODO20Ret, ODO30Exp, ODO30Ret, ODO30Sta, ODO40Ret และ ODO40Sta พบว่ามีกรดไขมันชนิด Palmitic acid สูงสุด รองลงมาคือ Palmitoleic acid, Margaric acid และ Myristic acid ตามลำดับ โดยพบกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนกลุ่มโอเมก้า-3 ได้แก่ eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5, n-3) ในสารสกัด ODO30Ret สูงสุด (12.32 \pm 0.17%) รองลงมาคือ ODO40Sta (6.74 \pm 0.33%) ODO40Ret (6.59 \pm 0.19%) ODO20Ret (6.06 \pm 0.17%) และ ODO30Sta (6.00 \pm 0.33%) ตามลำดับ และพบกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนกลุ่มโอเมก้า-3 decosahexaenoic acid (DHA, 22:6, n-3) สูงสุดในสารสกัดไดอะตอม ODO20Ret (0.73 \pm 0.04%) รองลงมาคือสารสกัดจาก ODO30Ret (0.52 \pm 0.03%), ODO40Ret (0.46 \pm 0.34%), ODO40Sta (0.38 \pm 0.02%) และ ODO30Sta (0.35 \pm 0.08%) ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงปริมาณเชิงสัมพัทธ์ (%Relative abundance) ของกรดไขมันที่พบในตัวอย่าง *Odontella* sp.1

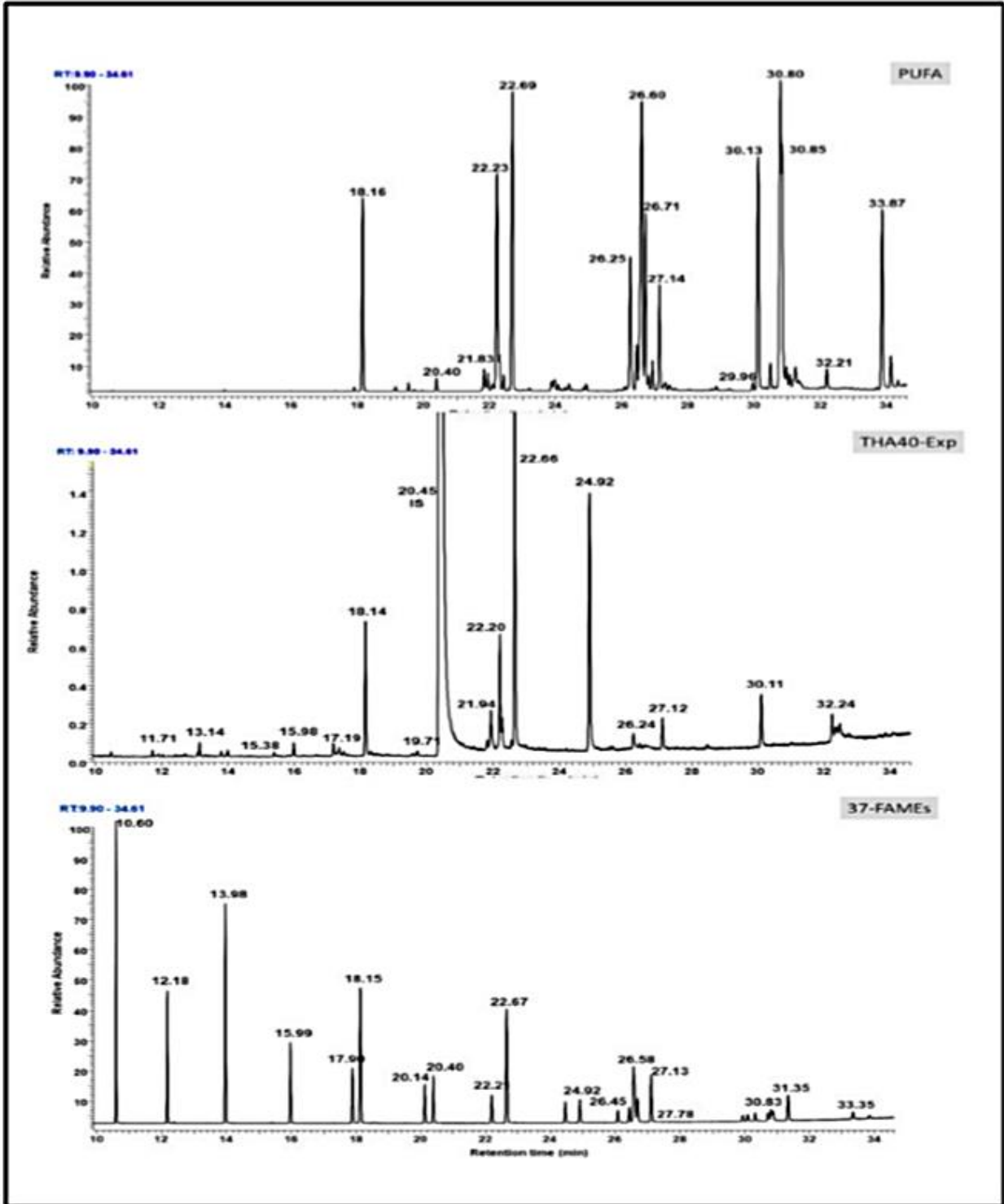
กรดไขมัน	Formula	% Relative abundance (Average \pm STDEV)				
		ODO20-RET	ODO30-RET	ODO30-STA	ODO40-RET	ODO40-STA
Capric acid (Decanoic acid)	C10:0		0.02 \pm 0.00			
Undecanoic acid	C11:0	0.03 \pm 0.00	0.03 \pm 0.00		0.03 \pm 0.00	
Tridecanoic acid	C13:0	0.55 \pm 0.02	0.52 \pm 0.03	0.62 \pm 0.05	0.54 \pm 0.01	1.02 \pm 0.05
Myristic acid (Tetradecanoic acid)	C14:0	11.49 \pm 0.50	10.97 \pm 0.14	14.61 \pm 0.45	11.14 \pm 0.23	11.84 \pm 0.38
Palmitoleic acid (<i>cis</i> -9-Hexadecenoic acid)	C16:1n7	16.25 \pm 0.15	15.84 \pm 0.27	19.62 \pm 0.16	16.17 \pm 0.31	13.30 \pm 0.12
Palmitic acid (Hexadecanoic acid)	C16:0	34.80 \pm 0.41	26.55 \pm 0.55	39.78 \pm 1.01	33.91 \pm 0.58	32.49 \pm 0.27
Margaric acid (Heptadecanoic acid)	C17:0	12.84 \pm 0.29	13.04 \pm 0.15	15.03 \pm 0.41	13.51 \pm 0.14	27.55 \pm 0.37
γ -Linolenic acid (6,9,12-Octadecatrienoic acid)	C18:3n6	0.77 \pm 0.05	1.50 \pm 0.01	0.78 \pm 0.03	0.71 \pm 0.04	0.46 \pm 0.04
Linoleic acid (<i>cis</i> - 9,12-Octadecadienoic acid)	C18:2n6c	0.97 \pm 0.01	1.05 \pm 0.02	0.67 \pm 0.07	1.13 \pm 0.07	0.64 0.03
*Oleic acid (<i>cis</i> -9-Octadecenoic acid)	C18:1n9c	6.06 \pm 0.30	7.78 \pm 0.21		5.90 \pm 0.14	0.21 \pm 0.02
Elaidic acid (<i>trans</i> - 9-Octadecenoic acid)	C18:1n9t	3.14 \pm 0.65	2.96 \pm 0.14		2.50 \pm 0.09	0.40 \pm 0.04
Stearic acid (Octadecanoic acid)	C18:0	5.01 \pm 0.20	5.26 \pm 0.05	2.34 \pm 0.16	5.16 \pm 0.24	4.51 \pm 0.26
Arachidonic acid (<i>cis</i> -5,8,11,14-Eicosatetraenoic acid)	C20:4n6	0.22 \pm 0.03	0.29 \pm 0.04	0.19 \pm 0.03	0.25 \pm 0.02	0.31 \pm 0.03
EPA (<i>cis</i> -5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic acid)	C20:5n3	6.06 \pm 0.33	12.32 \pm 0.17	6.00 \pm 0.67	6.59 \pm 0.19	6.74 \pm 0.33
<i>cis</i> -8,11,14-Eicosatrienoic acid	C20:3n6		0.08 \pm 0.01		0.10 \pm 0.01	
<i>cis</i> -11-Eicosenoic acid	C20:1n9	0.68 \pm 0.03	1.00 \pm 0.05		0.52 \pm 0.25	
Arachidic acid (Eicosanoic acid)	C20:0	0.24 \pm 0.01	0.28 \pm 0.02		0.60 \pm 0.26	
DHA (<i>cis</i> -4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic acid)	C22:6n3	0.73 \pm 0.04	0.52 \pm 0.03	0.35 \pm 0.08	0.46 \pm 0.34	0.38 \pm 0.02
Erucic acid (<i>cis</i> -13-Docosenoic acid)	C22:1n9				0.58 \pm 0.28	0.15 \pm 0.02
Lignoceric acid (Tetracosanoic acid)	C24:0	0.18 \pm 0.04			0.21 \pm 0.01	

สารสกัดไดอะตอม *Thalassiosira* sp. ที่สภาวะต่างๆ ได้แก่ THA20Ret, THA30Ret, THA40Exp และ THA40Sta พบว่ามีกรดไขมันชนิด Palmitoleic acid สูงสุดในสารสกัด THA30Ret (90.89 \pm 0.43%) และในสารสกัดพบว่ามี Palmitic acid และ Margaric acid ค่อนข้างสูงตามลำดับ โดยพบกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนกลุ่มโอเมก้า-3 ได้แก่ eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5, n-3) ในสารสกัด THA40Sta (18.15 \pm 0.13%) THA20Ret

(15.58±0.25%), THA40Exp (4.65±0.70%) และ THA30Ret (0.28±0.03%) ตามลำดับ ไม่พบกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน DHA ในสารสกัดโตอะตอม THA30Ret และ THA40Exp ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงปริมาณเชิงสัมพัทธ์ (%Relative abundance) ของกรดไขมันที่พบในตัวอย่าง *Thalassiosira* sp.1

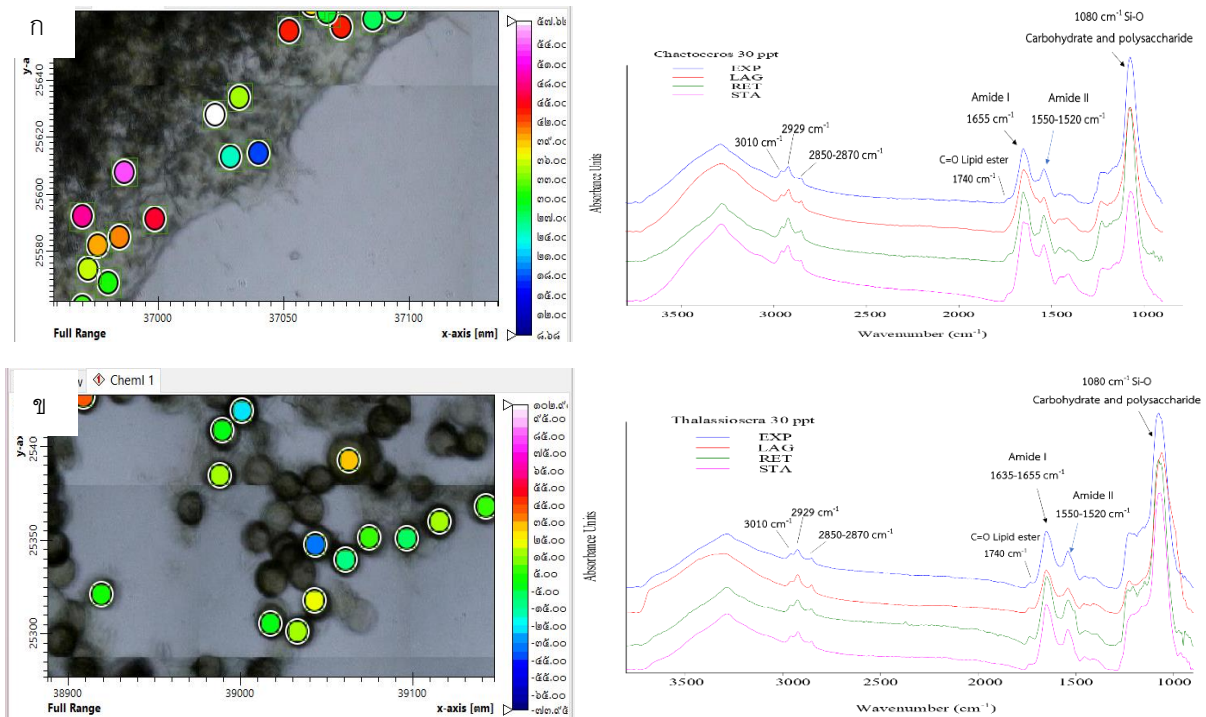
กรดไขมัน	Formula	% Relative abundance (Average ± STDEV)			
		THA20-RET	THA30-RET	THA40-EXP	THA40-STA
Capric acid (Decanoic acid)	C10:0				0.02 ± 0.00
Undecanoic acid	C11:0				0.03 ± 0.00
Lauric acid (Dodecanoic acid)	C12:0		0.03 ± 0.00		
Tridecadenic acid	C13:0	0.43 ± 0.01	0.09 ± 0.09	1.23 ± 0.28	0.56 ± 0.03
Myristic acid (Tetradecanoic acid)	C14:0	7.90 ± 0.05		12.92 ± 1.50	10.27 ± 0.12
Palmitoleic acid (<i>cis</i> -9-Hexadecenoic acid)	C16:1n7	16.00 ± 0.22	90.89 ± 0.43	9.37 ± 0.25	12.28 ± 0.18
Palmitic acid (Hexadecanoic acid)	C16:0	25.67 ± 0.31	3.73 ± 0.13	42.64 ± 0.41	21.59 ± 0.50
Margaric acid (Heptadecanoic acid)	C17:0	11.50 ± 0.05	1.91 ± 0.09	24.77 ± 0.93	9.49 ± 0.07
γ-Linolenic acid (6,9,12-Octadecatrienoic acid)	C18:3n6	0.22 ± 0.01	0.02 ± 0.00		0.23 ± 0.01
Stearidonic acid (<i>cis</i> - 6,9,12,15-Octadecatetraenoic acid)	C18:4n3	2.09 ± 0.17		1.63 ± 0.08	6.07 ± 0.35
Linoleic acid (<i>cis</i> - 9,12-Octadecadienoic acid)	C18:2n6c	1.12 ± 0.03	0.06 ± 0.00		0.85 ± 0.04
*Oleic acid (<i>cis</i> -9-Octadecenoic acid)	C18:1n9c	8.47 ± 0.04	1.37 ± 0.07		8.82 ± 0.04
Elaidic acid (<i>trans</i> - 9-Octadecenoic acid)	C18:1n9t	3.02 ± 0.15	0.58 ± 0.04		3.07 ± 0.07
Stearic acid (Octadecanoic acid)	C18:0	4.21 ± 0.15	0.74 ± 0.05	2.80 ± 0.20	4.11 ± 0.06
Arachidonic acid (<i>cis</i> -5,8,11,14-Eicosatetraenoic acid)	C20:4n6	0.78 ± 0.03	0.06 ± 0.01		0.22 ± 0.03
EPA (<i>cis</i> -5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic acid)	C20:5n3	15.58 ± 0.25	0.28 ± 0.03	4.65 ± 0.70	18.15 ± 0.13
<i>cis</i> -8,11,14-Eicosatrienoic acid	C20:3n6				0.30 ± 0.00
<i>cis</i> -11-Eicosenoic acid	C20:1n9	1.00 ± 0.11	0.16 ± 0.01		1.61 ± 0.07
Arachidic acid (Eicosanoic acid)	C20:0	0.22 ± 0.02	0.03 ± 0.01		0.32 ± 0.03
DHA (<i>cis</i> -4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic acid)	C22:6n3	1.64 ± 0.04			1.45 ± 0.05
Erucic acid (<i>cis</i> -13-Docosenoic acid)	C22:1n9	0.17 ± 0.04	0.04 ± 0.01		0.36 ± 0.01
Nervonic acid (<i>cis</i> -15-Tetracosenoic acid)	C24:1n9		0.02 ± 0.00		
Lignoceric acid (Tetracosanoic acid)	C24:0				0.20 ± 0.03



รูปภาพที่ 29 แสดงตัวอย่าง Total Ion Chromatogram ของตัวอย่าง THA40-EXP เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน 37-FAME และ PUFA No.1 (หมายเหตุ ณ เวลา 20.45 นาที ของตัวอย่าง คือ Internal Standard)

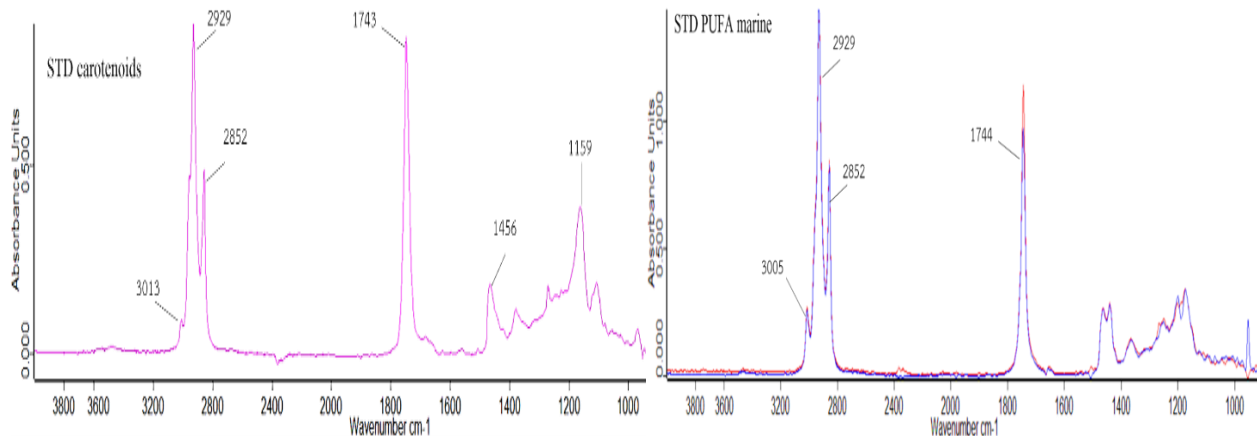
4. การประยุกต์ใช้เทคนิค Synchrotron FTIR microspectroscopy ในการวิเคราะห์สารสีแคโรทีนอยด์ กรดไขมัน และสารชีวโมเลกุลต่างๆ ในไดอะตอมที่สภาวะต่างๆ

เทคนิค synchrotron FTIR microspectroscopy เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพในการวิเคราะห์สารชีวโมเลกุลในเซลล์สาหร่ายทะเลขนาดเล็ก โดยเฉพาะสารกลุ่มแคโรทีนอยด์และกรดไขมัน จากการทดลองได้ผลแสดงดังรูปที่ 1 จากกล้องจุลทรรศน์อินฟราเรดสามารถจำแนกลักษณะของไดอะตอมทั้งสองชนิดได้ดังรูป โดยเซลล์ของไดอะตอมชนิด *Thalassiosira* sp. มีลักษณะกลมคล้ายเหรียญบาท เซลล์มีขนาดใหญ่ มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10-20 μm และเซลล์ *Chaetoceros* sp. มีลักษณะต่อกันเป็นสี่เหลี่ยมผืนผ้าขนาดมากกว่า 20 μm ทำให้สามารถวิเคราะห์เซลล์เดี่ยวๆ ได้ด้วยเทคนิค synchrotron FTIR microspectroscopy ดังแสดงในรูป



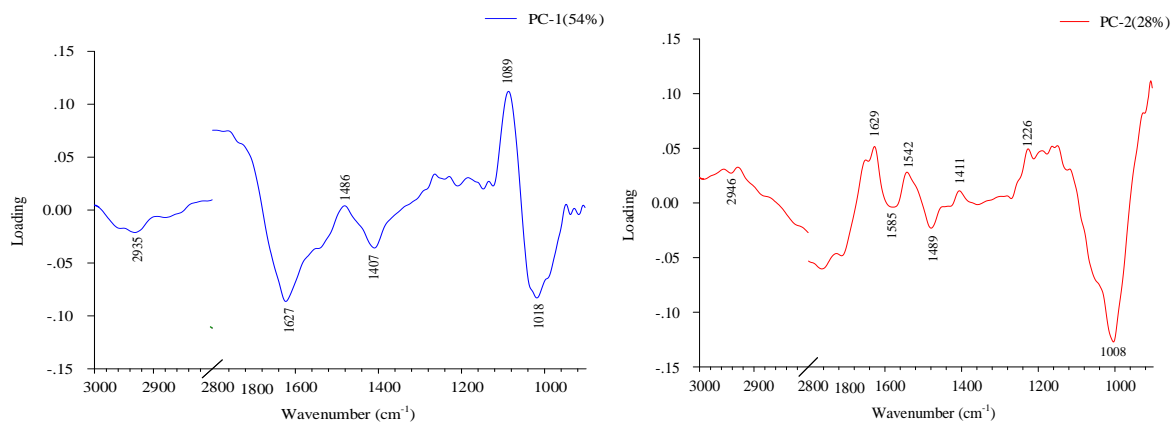
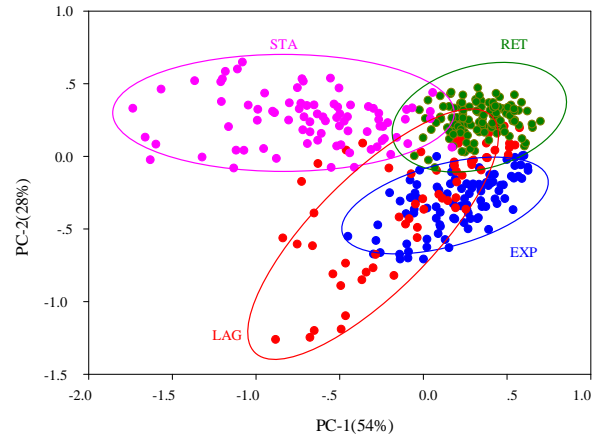
รูปภาพที่ 30 ไดอะตอมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ต่อกับ Synchrotron FTIR microscopy ที่ทำการแยกและจำแนกชนิดได้จากน้ำทะเลในเขตจังหวัดชลบุรี ได้แก่ ก) *Chaetoceros tenuissimus* ข) *Thalassiosira pseudonana*

โดยที่ช่วงคลื่นที่ 3013 cm^{-1} , 2929 cm^{-1} และ 2852 cm^{-1} เป็นช่วงคลื่นที่มีการสั่นของ C-H asymmetric stretching of-CH₃ และ CH₂ ของกรดไขมัน และช่วงคลื่นที่ 1743 cm^{-1} ของ C=O stretching of lipid ester 1456 cm^{-1} เบี่ยงช่วงของ C-H deformation of >CH₂ ของกรดไขมัน ซึ่งตรงกับช่วงคลื่นของสารมาตรฐาน astaxanthin และกรดไขมันไม่อิ่มตัว (PUFA marine) ดังแสดงในรูปที่ 31



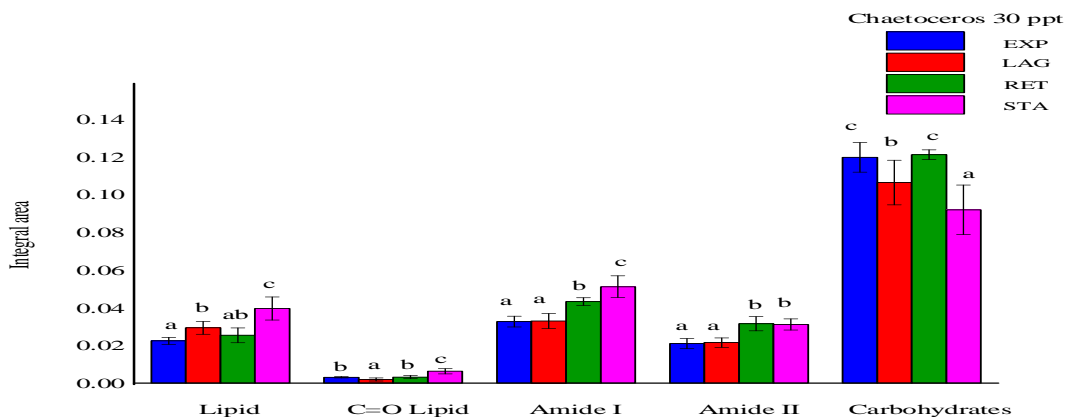
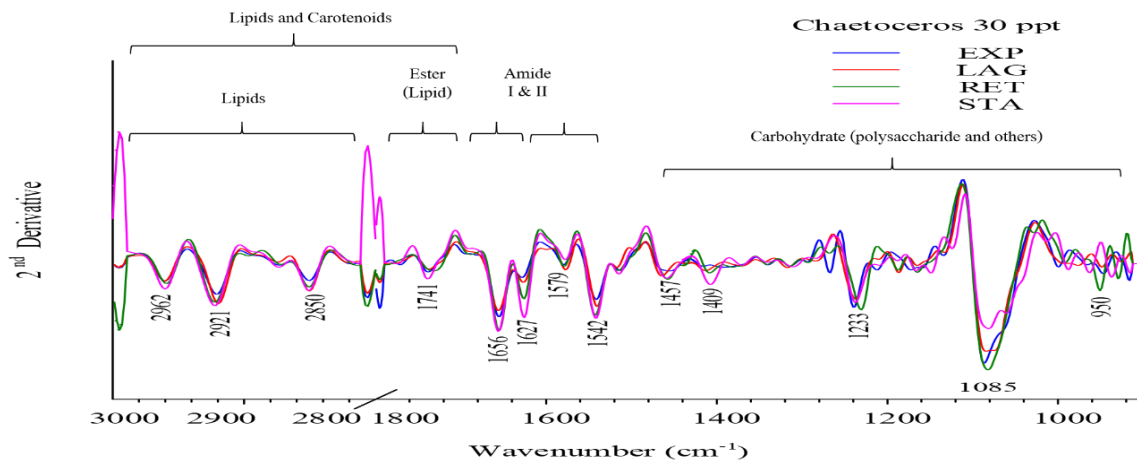
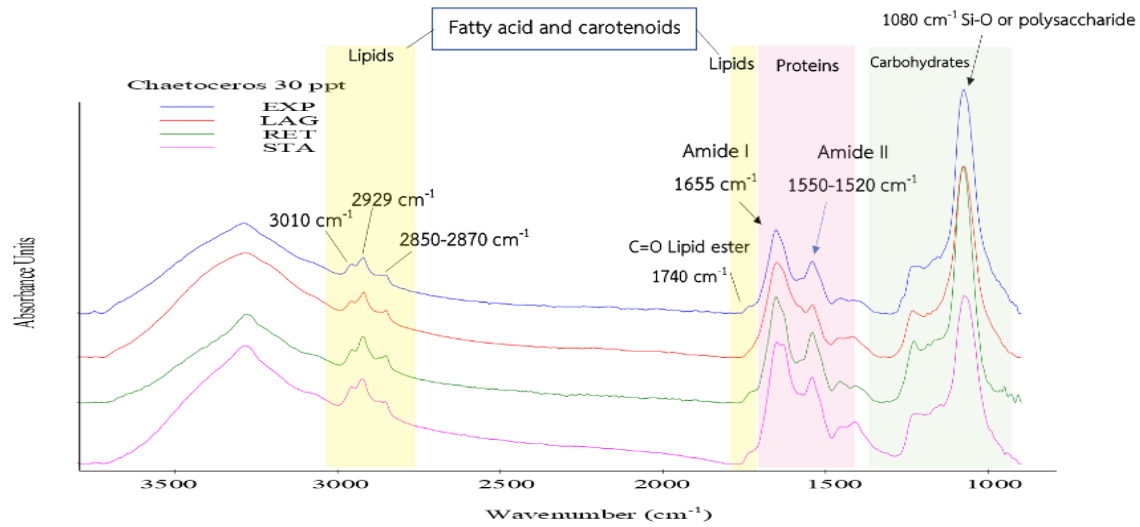
รูปภาพที่ 31 แสดง IR spectrum จากสารมาตรฐาน carotenoids (สาร astaxanthin) และสารมาตรฐานกรดไขมัน PUFA marine ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค SR-FTIR microspectroscopy.

เมื่อทำการวิเคราะห์ความแตกต่างของไดอะตอมแต่ละชนิดที่เพาะเลี้ยงที่ความเค็ม 30 ppt ในแต่ละระยะการเจริญเติบโตของไดอะตอม ได้แก่ lag, exponential, retardation และ stationary phase ด้วย PCA analysis ของอินฟราเรดสเปกตรัม 2nd derivative พบว่าไดอะตอมชนิด *Chaetoceros tenuissimus* ในแต่ละระยะการเจริญเติบโตมีความแตกต่างกันดังแสดงในรูปภาพที่ 31 โดยพิกจาก IR spectrum จะแสดงถึงการสั่นของหมู่ฟังก์ชันที่สอดคล้องกับสารชีวโมเลกุลต่างๆ แตกต่างกันว่า PC1 (54%) โดย *C. tenuissimus* ที่ระยะ stationary phase แยกออกจากระยะอื่นๆ ที่ loading plot ของ PC1 สูงสุดที่สเปกตรัม 1018 cm^{-1} , 1089 cm^{-1} และ 1627 cm^{-1} ซึ่งเป็นช่วงของคาร์โบไฮเดรต ซิลิกาและ amide I of β -plated sheet structure ของโปรตีนที่ใช้แยกความแตกต่างจากไดอะตอมระยะอื่นๆ ตามลำดับ และที่ PC 2 ใช้แยกความแตกต่างของ *C. tenuissimus* ที่ระยะ stationary phase ออกจาก lag phase ได้ 28% มี loading plot ของ PC 2 ที่ใช้แยกความแตกต่างของไดอะตอมในช่วงความยาวคลื่น 1629 cm^{-1} และ 1008 cm^{-1} ซึ่งตรงกับ amide I of β -plated sheet structure ของโปรตีนและ fingerprint region ดังแสดงในรูปที่ 32



รูปภาพที่ 32 Principle component analysis (PCA) ของ *C. tenuissimus* ที่ระยะ lag phase (LAG) exponential phase (EXP) retardation phase (RET) และ stationary phase (STA) และ loading plot

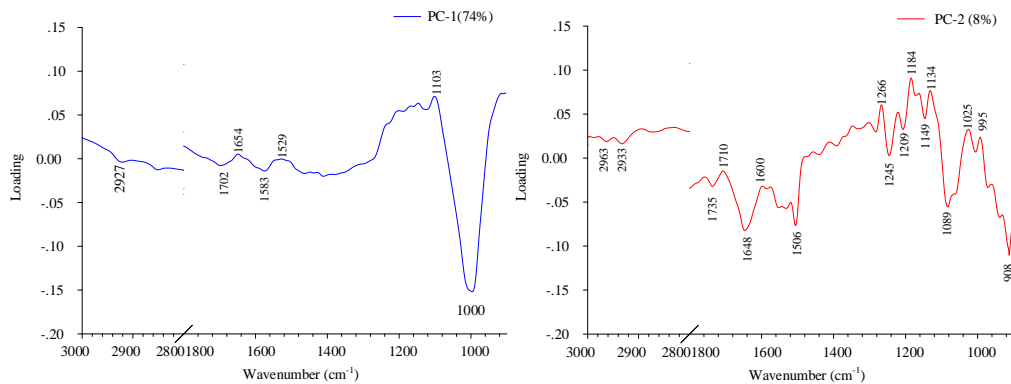
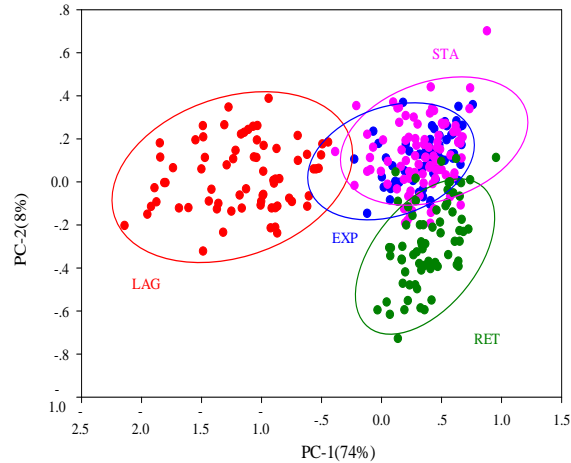
การวิเคราะห์ปริมาณของกรดไขมัน ($3000-2800\text{ cm}^{-1}$) สารสีแคโรทีนอยด์ (1740 cm^{-1}) โปรตีน (amide I 1655 cm^{-1}) คาร์โบไฮเดรต ($1400-900\text{ cm}^{-1}$) และ ในตัวอย่างไดอะตอมที่เลี้ยงในอาหารที่ความเค็ม 30 ppt ในระยะการเจริญเติบโตระยะต่างๆ ของไดอะตอม *Chaetoceros tenuissimus* แสดงผลการวิเคราะห์ integral area ที่ช่วงความยาวคลื่นต่างๆ ดังรูปที่ 33



รูปภาพที่ 33 1st และ 2nd spectrum ของไดอะตอม *Chaetoceros tenuissimus* และ Integral area สเปกตรัมด้วยเทคนิค SR-FTIR microspectroscopy ที่เพาะเลี้ยงในความเค็ม 30 ppt ระยะการเจริญเติบโตต่างๆ

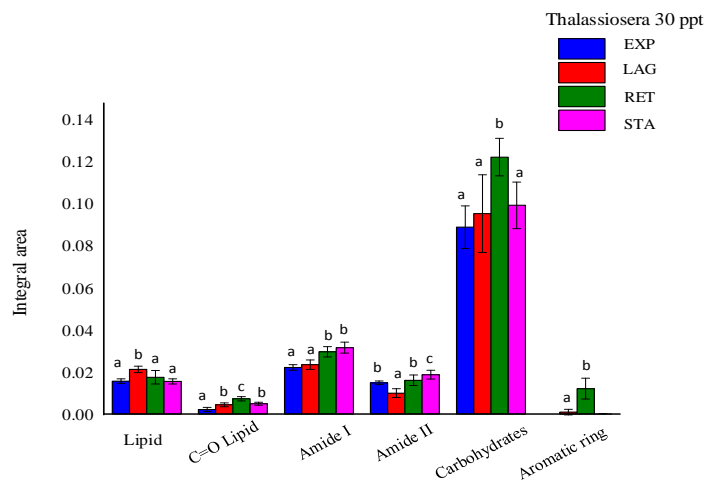
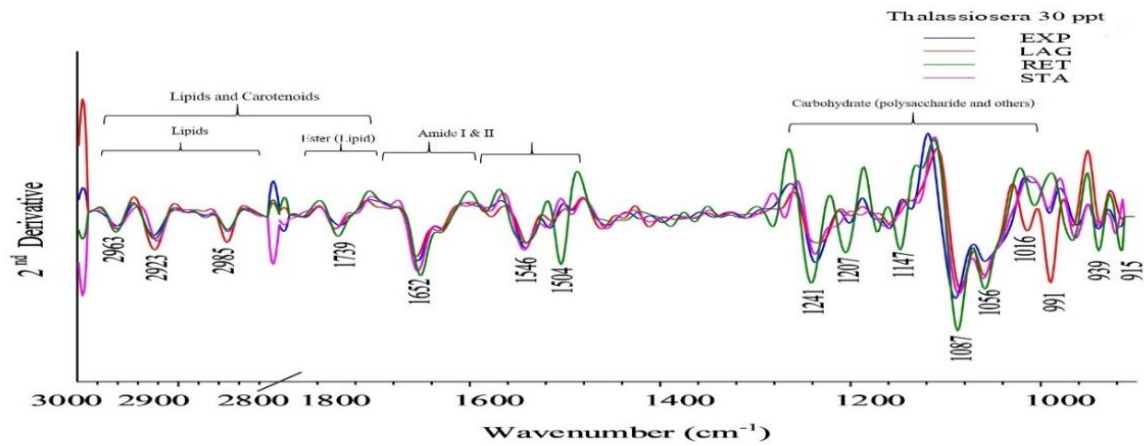
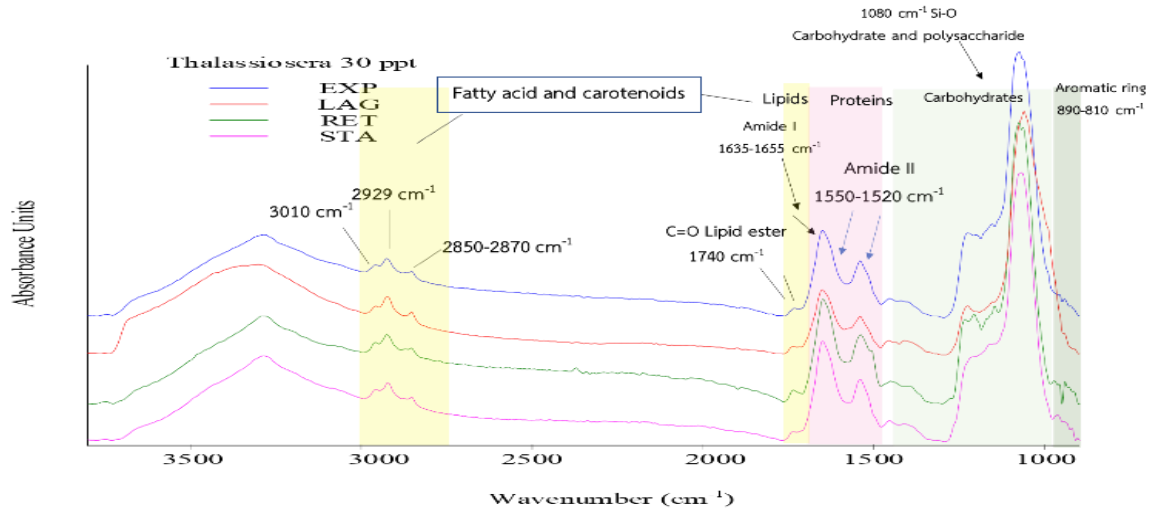
จากผลการวิเคราะห์ SR-FTIR microspectroscopy และหาพื้นที่ใต้กราฟในช่วงความยาวคลื่นต่างๆ integral area ด้วยโปรแกรม OPUS 7.5 และ unscrambler x 10.1 จากผลการวิเคราะห์พบว่าเซลล์ไดอะตอม *C. tenuissimus* ในระยะ stationary phase (CHE30Sta) มีปริมาณของกรดไขมันและสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ในช่วงความยาวคลื่น 3010 cm^{-1} - 2850 cm^{-1} และ 1740 cm^{-1} สูงสุดรองลงมาได้แก่ CHE30Ret CHE30Exp และ CHE30Lag ตามลำดับ ปริมาณโปรตีน amide I (1630 cm^{-1}) และ II (1554 cm^{-1}) พบมากสุดในไดอะตอม CHE30Sta และ CHE30Ret รองลงมาคือ CHE30Lag และ CHE30Exp ตามลำดับ ปริมาณคาร์โบไฮเดรต ในช่วงความยาวคลื่น $1500\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ (Deformation of $\text{CH}_2/\text{C-C-H}/\text{H-C-O}$) และ $1200\text{-}950\text{ cm}^{-1}$ พบมากที่สุด ใน CHE30Ret และ CHE30Exp ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) รองลงมาใน CHE30Lag และ CHE30Sta ตามลำดับ ดังแสดงในรูปภาพที่ 32

ในขณะที่ *Thalassiosira* sp. ที่เลี้ยงในความเค็ม 30 แต่ระยะการเจริญเติบโต เมื่อวิเคราะห์แยกความแตกต่างของอินฟราเรดสเปกตรัมด้วย PCA analysis พบว่าไดอะตอมในระยะ Lag phase แยกออกจากไดอะตอมในระยะต่างๆ ที่ PC1 (74%) ที่ช่วงความยาวคลื่น $1000, 1654, 1583\text{ cm}^{-1}$ ซึ่งตรงกับ carbohydrate polysaccharide หรือ SiO บริเวณ fingerprint region และ amide I of α -plated sheet structure ของโปรตีนใน Lag phase ที่มีต่ำกว่าไดอะตอมที่ระยะอื่นๆ และที่ PC-2 แยกไดอะตอม *Thalassiosira* ที่ระยะ retardation phase ออกจากระยะอื่นในช่วงความยาวคลื่นของกรดไขมันหรือช่วงของสารแคโรทีนอยด์ที่ $2963, 2933$ และ 1735 cm^{-1} และช่วงของ α -plated sheet structure ของโปรตีนที่ 1648 cm^{-1} และช่วงของคาร์โบไฮเดรตที่ $1266, 1089\text{ cm}^{-1}$ ที่สูงกว่าไดอะตอมในระยะอื่นๆ ดังรูปที่ 34



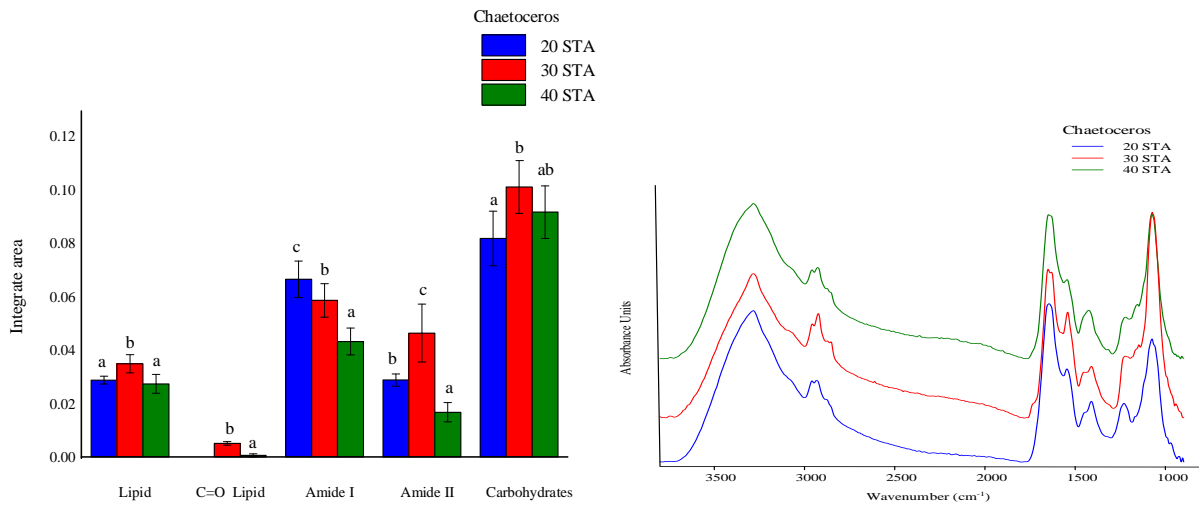
รูปภาพที่ 34 Principle component analysis (PCA) ของ *Thalassiosira* sp. ที่ระยะ lag phase (LAG) exponential phase (EXP) retardation phase (RET) และ stationary phase (STA) และ loading plot

เมื่อทำการวิเคราะห์พื้นที่ที่ได้กราฟของช่วงต่างๆ (interactive area) จากอินฟราเรดสเปกตรัมของกรดไขมันและสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ ที่ช่วงความยาวคลื่น 3010, 2930, 2870 สำหรับ C-H asymmetric stretching of-CH₃ และ CH₂ ของกรดไขมัน และช่วงคลื่นที่ 1743 cm⁻¹ ของ C=O stretching of lipid ester พบว่า THA30Ret มีปริมาณกรดไขมันและสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ที่สูงที่สุด รองลงมาได้แก่ THA30Sta, THA30Lag และ THA30Exp ตามลำดับ และช่วงความยาวคลื่นของ amide I β- plated sheet structure ของโปรตีนที่ 1652 cm⁻¹, amide II (1546 cm⁻¹) และปริมาณของคาร์โบไฮเดรตที่ช่วงความยาวคลื่น 1241, 1087 cm⁻¹ พบมากที่สุดในไดอะตอม *Thalassiosira* sp. 30 ppt ที่ระยะ stationary phase รองลงมาคือ THA30Ret, THA30Exp และ THA30Lag ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบช่วงความยาวคลื่นที่ 890-810 เป็นช่วงการสั่นของหมู่ฟังก์ชัน CH ในวงแหวนอะโรมาติกในไดอะตอม THA30Ret ที่สูงอีกด้วยดังแสดงในรูปที่ แสดง IR spectrum และ 2nd derivative ของไดอะตอม *Thalassiosira* sp. ดังรูปที่ 35



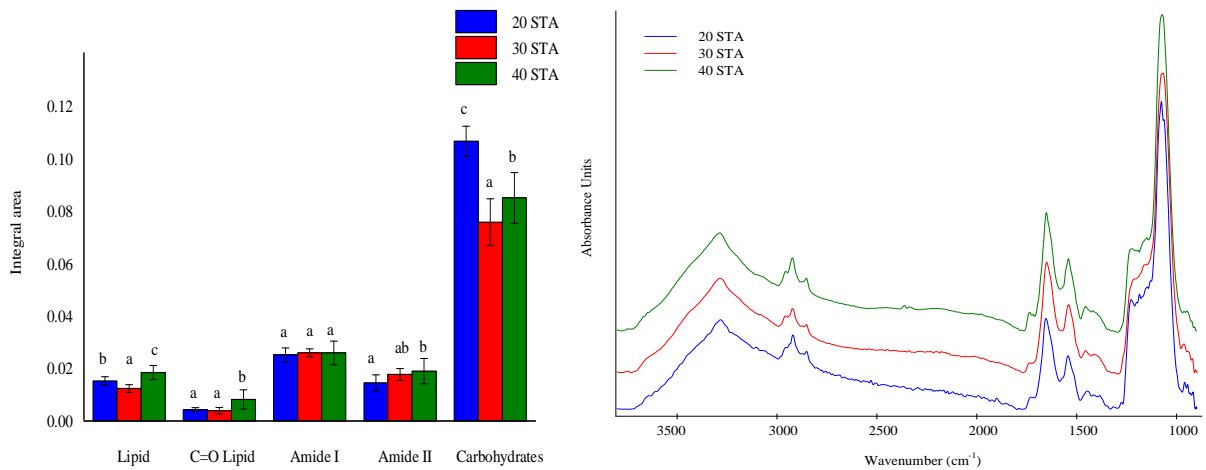
รูปภาพที่ 35 1st และ 2nd ของไดอะแกรม *Thalassiosira* sp. ที่ระยะการเจริญเติบโตต่างๆ และ Integral area สเปกตรัมด้วยเทคนิค SR-FTIR microspectroscopy

ผลการวิเคราะห์พื้นที่ใต้กราฟจาก IR spectrum ในเซลล์ไดอะตอมที่เลี้ยงในแต่ละสถานะความเค็มที่แตกต่างกันแสดงผลการทดลองดังรูปที่ xx ของไดอะตอมชนิด *Chaetoceros* sp. ในระยะ stationary phase ที่ความเค็ม 20 ppt, 30 ppt และ 40 ppt พบว่าเซลล์ไดอะตอมที่ความเค็ม 30 ppt มีปริมาณกรดไขมันและสารกลุ่มแคโรทีนอยด์สูงสุด รองลงมาคือ 40 ppt และ 20 ppt ตามลำดับ โดยปริมาณโปรตีน amide I พบมากที่สุด ใน ไดอะตอมที่เลี้ยงในความเค็ม 20 ppt, 30 ppt และ 40 ppt ตามลำดับ และปริมาณ amide II และคาร์โบไฮเดรต (โพลีแซคคาไรด์ และซิลิกา) มีการสังเคราะห์มากที่สุดในไดอะตอมที่เลี้ยงในอาหารที่ความเค็ม 30 ppt และ 40 ppt ตามลำดับ



รูปภาพที่ 36 1st Integral area ของไดอะตอม *Chaetoceros* sp. สเปกตรัมด้วยเทคนิค SR-FTIR microspectroscopy

ผลการวิเคราะห์พื้นที่ใต้กราฟจาก IR spectrum ในเซลล์ไดอะตอมที่เลี้ยงในแต่ละสถานะความเค็มที่แตกต่างกันแสดงผลการทดลองดังรูปที่ xx ของไดอะตอมชนิด *Thalassiosira* sp. พบว่าที่ความเค็ม 40 ppt ไดอะตอมมีการสังเคราะห์กรดไขมันและสารสีกลุ่มแคโรทีนอยด์มากกว่าที่เลี้ยงในความเค็ม 20 ppt และ 30 ppt ตามลำดับ และในไดอะตอมที่เลี้ยงในความเค็ม 20 ppt จะมีการสังเคราะห์สารพวกคาร์โบไฮเดรต ได้แก่ polysacchhalide และ SiO มากกว่าในความเค็ม 40 ppt และ 30 ppt ทั้งนี้ปริมาณโปรตีน amide I และ amide II ในไดอะตอมที่เลี้ยงในทุกความเค็มไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ดังรูปที่ 37



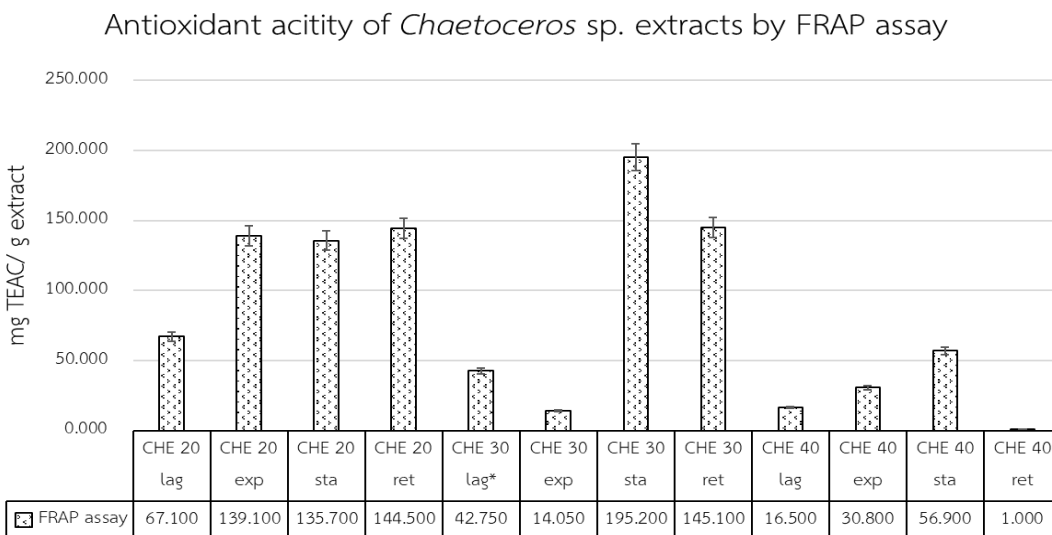
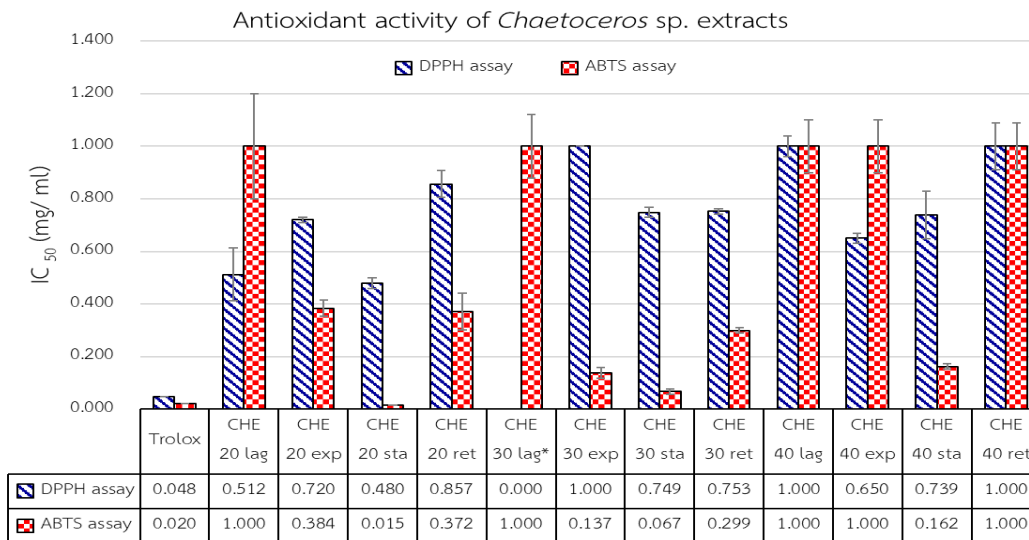
รูปภาพที่ 37 1st Integral area ของไดอะตอม *Thalassiosira* sp. สเปกตรัมด้วยเทคนิค SR-FTIR microspectroscopy

5.ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

จากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดไดอะตอมทั้ง 3 ชนิดในแต่ละสภาวะการเพาะเลี้ยงพบว่าในสารสกัดเมทธานอลของไดอะตอม *Chaetoceros* sp. ระยะ stationary phase เลี้ยงในสภาวะความเค็ม 20 ppt (CHE20Sta) มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH สูงสุด โดยมีความเข้มข้นที่สามารถกำจัดอนุมูลอิสระได้ที่ 50 % (IC₅₀) สูงสุดเท่ากับ 0.48±0.02 mg/ml รองลงมาคือ CHE20Lag (0.51±0.10 mg/ml), CHE40Exp (0.65±0.02 mg/ml), CHE20Exp (0.72±0.01 mg/ml) และ CHE40Sta (0.74±0.09 mg/ml) ตามลำดับ นอกจากนี้สารสกัด CHE30Sta ยังมีความสามารถกำจัดอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} ดีที่สุดและสามารถกำจัดอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} มากกว่าสารมาตรฐาน Trolox (0.02±0.00 mg/ml) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) ที่ IC₅₀ เท่ากับ 0.015±0.00 mg/ml รองลงมาคือสารสกัด CHE30Exp (0.137±0.02 mg/ml) CHE40Sta (0.167±0.09 mg/ml) และ CHE30Ret (0.299±0.01 mg/ml) ตามลำดับ โดยสารสกัด CHE ในทุกความเค็มที่ระยะ Lag phase ไม่สามารถกำจัดอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} ได้ โดยมีค่า IC₅₀ > 1.00 mg/ml

นอกจากนี้ความสามารถในการให้อิเล็กตรอนเมื่อทดสอบด้วย FRAP assay ของสารสกัดเมทธานอลจากไดอะตอม *Chaetoceros* sp. พบว่าสารสกัด CHE30Sta มีความสามารถในการให้อิเล็กตรอนเทียบเท่ากับสารละลายมาตรฐาน Trolox แสดงในค่า mg Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC)/ g extract

สูงที่สุดเท่ากับ 195.2 ± 0.01 mg/ml รองลงมาคือสารสกัด CHE30Ret (145.1 ± 0.01 mg/ml), CHE20Ret (144.5 ± 0.05 mg/ml), CHE20Exp (139.1 ± 0.01 mg/ml) และ CHE20Sta (137.5 ± 0.02 mg/ml) ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 38



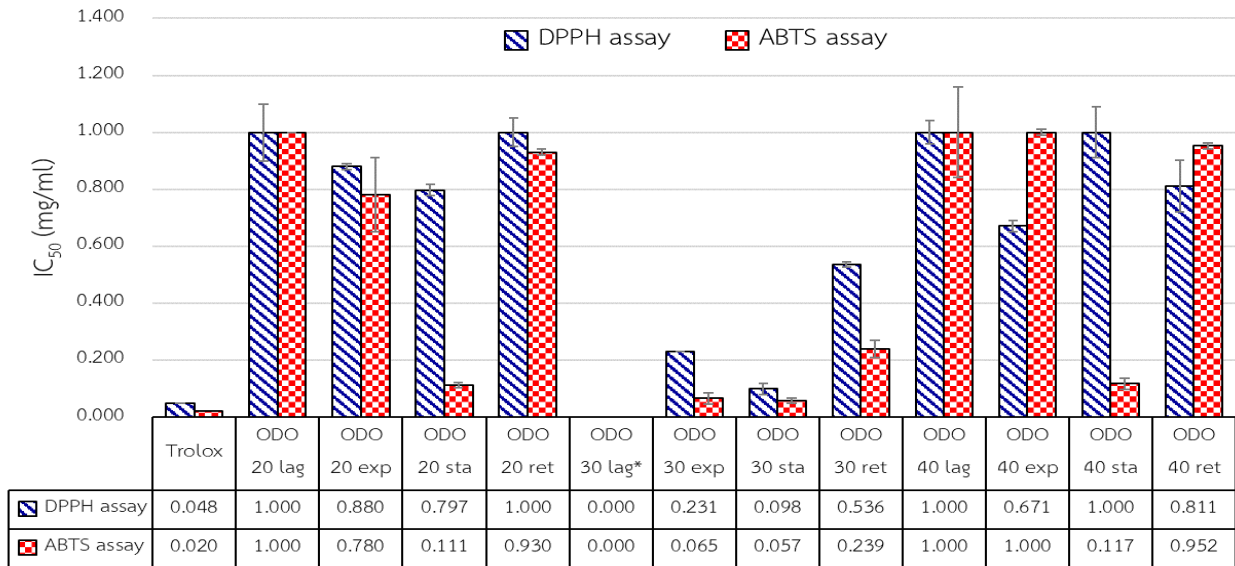
รูปภาพที่ 38 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจาก *Chaetoceros* sp. ในสภาวะต่างๆ ด้วยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP assay

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดเมทธานอลของไโดอะตอม *Odontella* sp. ระยะ stationary phase เลี้ยงในสภาวะความเค็ม 30 ppt (ODO30Sta) มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH สูงสุด โดยมีความเข้มข้นที่สามารถกำจัดอนุมูลอิสระได้ที่ 50 % (IC_{50}) สูงสุดเท่ากับ 0.098 ± 0.04 mg/ml รองลงมาคือ ODO30Exp (0.231 ± 0.02 mg/ml), ODO30Ret (0.536 ± 0.06 mg/ml), ODO40Exp (0.671 ± 0.02 mg/ml) และ ODO20Sta (0.797 ± 0.05 mg/ml) ตามลำดับ นอกจากนี้สารสกัด ODO30Sta ยังมีความสามารถกำจัดอนุมูลอิสระ ABTS⁺ ดีที่สุดที่ IC_{50} เท่ากับ 0.057 ± 0.04 mg/ml รองลงมาคือสารสกัด ODO30Exp (0.065 ± 0.02 mg/ml) ODO20Sta (0.111 ± 0.01 mg/ml) และ ODO40Sta (0.117 ± 0.02 mg/ml) ตามลำดับ โดยสารสกัด ODO ในที่ความเค็ม 20 ppt และ 40 ppt ที่ระยะ Lag phase ไม่สามารถกำจัดอนุมูลอิสระ ABTS⁺ ได้ โดยมีค่า $IC_{50} > 1.00$ mg/ml

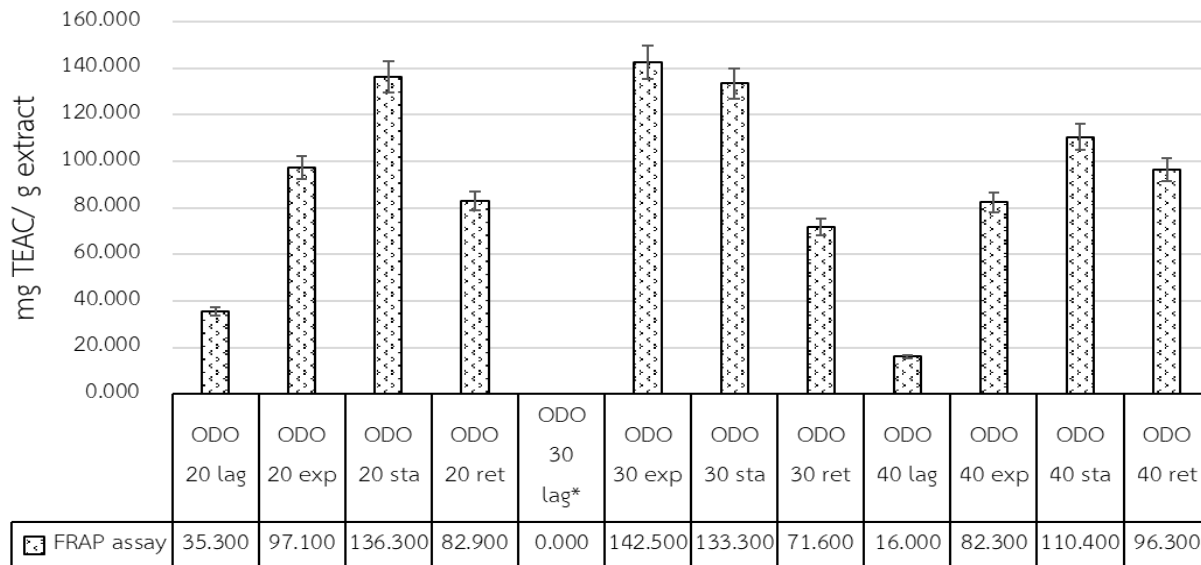
นอกจากนี้ความสามารถในการให้อิเล็กตรอนเมื่อทดสอบด้วย FRAP assay ของสารสกัดเมทธานอลจากไโดอะตอม *Odontella* sp. พบว่าสารสกัด ODO30Exp มีความสามารถในการให้อิเล็กตรอนเทียบเท่ากับสารละลายมาตรฐาน Trolox สูงที่สุดเท่ากับ 142.5 ± 4.8 mg/ml รองลงมาคือสารสกัด ODO20Sta (136.0 ± 2.0 mg/ml), ODO30Sta (133.1 ± 0.6 mg/ml) และ ODO40Sta (110.4 ± 0.02 mg/ml) ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่

39

Antioxidant activity of *Odontella* sp. extracts



Antioxidant activity of *Odontella* sp. extracts by FRAP assay

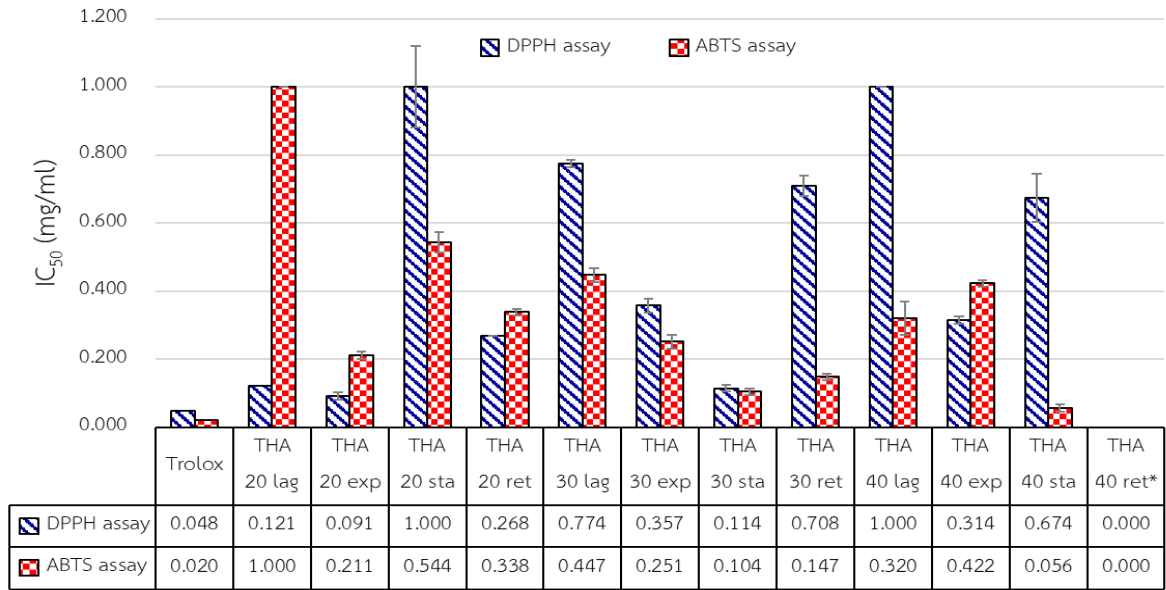


รูปภาพที่ 39 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจาก *Odontella* sp. ในสภาวะต่างๆ ด้วยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP assay

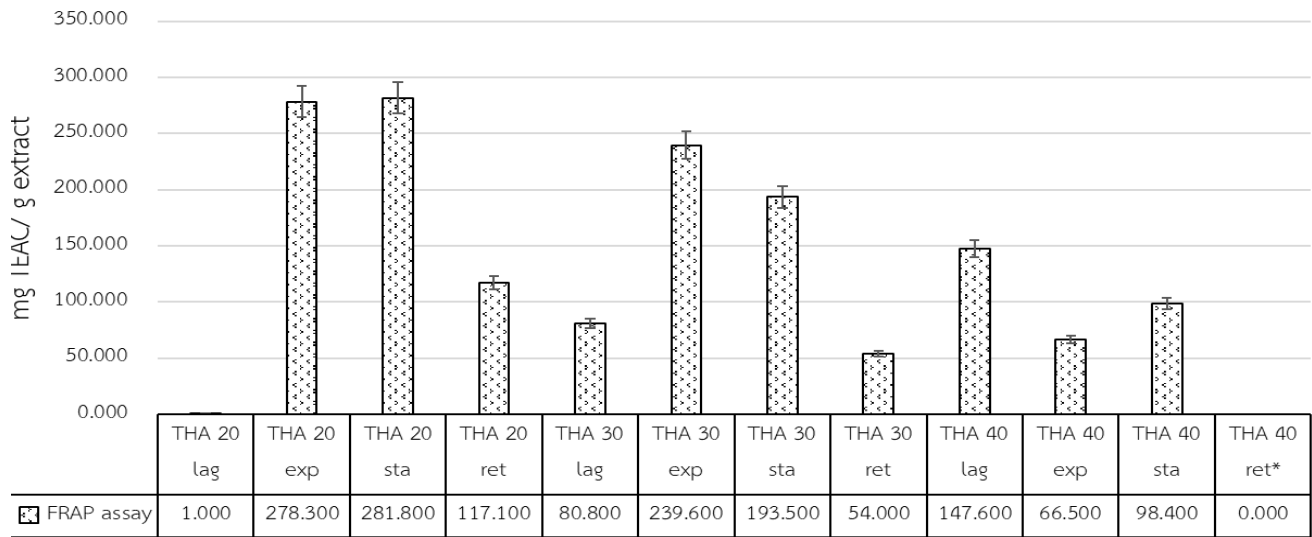
การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดเมทธานอลของไดอะตอม *Thalassiosira* sp. ระยะ stationary phase เลี้ยงในสภาวะความเค็ม 20 ppt (THA20Exp) มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH สูงสุด โดยมีความเข้มข้นที่สามารถกำจัดอนุมูลอิสระได้ที่ 50 % (IC₅₀) สูงสุดเท่ากับ 0.091±0.01 mg/ml รองลงมาคือ THA30Sta (0.114±0.01 mg/ml), THA20Lag (0.121±0.06 mg/ml), THA40Exp (0.314±0.02 mg/ml) และ THA30Exp (0.357±0.05 mg/ml) ตามลำดับ นอกจากนี้สารสกัด THA40Sta ยังมีความสามารถกำจัดอนุมูลอิสระ ABTS⁺ ดีที่สุดที่ IC₅₀ เท่ากับ 0.056±0.07 mg/ml รองลงมาคือสารสกัด THA30Sta (0.104±0.01 mg/ml) THA30Rea (0.147±0.01 mg/ml) และ THA20Exp (0.211±0.02 mg/ml) ตามลำดับ

นอกจากนี้ความสามารถในการให้อิเล็กตรอนเมื่อทดสอบด้วย FRAP assay ของสารสกัดเมทธานอลจากไดอะตอม *Thalassiosira* sp. พบว่าสารสกัด THA20Sta มีความสามารถในการให้อิเล็กตรอนเทียบเท่ากับสารละลายมาตรฐาน Trolox สูงที่สุดเท่ากับ 281.80±5.7 mg/ml รองลงมาคือสารสกัด THA20Exp (278.30±3.5 mg/ml) THA30Exp (239.0±8.8 mg/ml), THA30Sta (193.50±9.2 mg/ml) ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 40

Antioxidant activity of *Thalassiosira* sp. extracts



Antioxidant activity of *Thalassiosira* sp. extracts by FRAP assay



รูปภาพที่ 40 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจาก *Thalassiosira* sp. ในสภาวะต่างๆ ด้วยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP assay

5. ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการลดเลือนริ้วรอย (Anti-elastase และ Anti-collagenase) การยับยั้งการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานิน (Anti-tyrosinase) และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง

กับความจำ (Anti-acetylcholinesterase) ในสารสกัดเมทธานอลจากไดอะตอมทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ CHE 30 sta, ODO 30 ret, ODO 30 exp และ THA 30 exp ให้ผลการทดสอบฤทธิ์ดังแสดงในตารางที่ xx

เอนไซม์ไทโรซิเนสเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในกระบวนการสังเคราะห์เมลานิน ซึ่งเป็นสารที่ทำให้เกิดสีบนผิวหนังของเราเอนไซม์ เป็นการวิเคราะห์สารทำให้มีผิวขาวหรือสารที่ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสให้ ทำงานน้อยลง เพื่อรักษาภาวะ การเกิดฝ้า กระ และรอยดำ จากผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสในสารสกัดเมทธานอลของไดอะตอม พบว่าสารสกัดเมทธานอลจากไดอะตอม CHE30Sta มีความเข้มข้นที่ยับยั้งการทำงานเอนไซม์ไทโรซิเนส 50% (IC_{50}) ต่ำสุดเท่ากับ $79.30 \pm 1.14 \mu\text{g/ml}$ ซึ่งพบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสดีกว่าสารมาตรฐานโคจิก (Kojic acid, IC_{50} $88.92 \pm 0.71 \mu\text{g/ml}$) รองลงมาคือ สารสกัด ODO 30 ret, ODO 30 exp และ THA 30 exp ตามลำดับโดยมีค่า IC_{50} ดังแสดงในตารางที่ 6

เอนไซม์ elastase และ collagenase เป็นเอนไซม์สำคัญที่ทำให้เกิดริ้วรอย และทำลายความยืดหยุ่นของผิวหนัง โดยเอนไซม์ ทั้ง 2 ชนิดนี้จะไปทำลายคอลลาเจนและอีลาสติน ที่เป็นส่วนประกอบสำคัญของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของผิว หากเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้ถูกทำลายจะส่งผลให้เกิดความหย่อนคล้อยและเกิดริ้วรอยที่บริเวณผิวหนังขึ้นได้ ดังนั้นจากการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ elastase และ collagenase ของสารสกัดเมทธานอลของไดอะตอม พบว่าสารสกัดจากไดอะตอม THA30exp ($13.43 \pm 1.27 \mu\text{g/ml}$), ODO30exp $15.68 \pm 0.45 \mu\text{g/ml}$, ODO30ret $22.02 \pm 0.44 \mu\text{g/ml}$ และ CHE30sta $22.23 \pm 1.74 \mu\text{g/ml}$ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ elastase ที่ 50% หรือ IC_{50} ดีกว่าสารมาตรฐาน Quercetin ($40.44 \pm 0.86 \mu\text{g/ml}$) ตามลำดับ โดยสารสกัดไดอะตอมทุกชนิดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากสารมาตรฐาน ($p < 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 6 นอกจากนี้ยังพบว่าที่ความเข้มข้น 250 $\mu\text{g/ml}$ ของสารสกัดจากไดอะตอม THA30exp ODO30exp และ CHE30sta สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ collagenase ได้มากกว่าสารมาตรฐาน EGCG มีแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และสารสกัดจากไดอะตอม ODO30exp มีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ collagenase ต่ำกว่าสารมาตรฐาน EGCG โดย ในสารสกัด THA30exp CHE30sta, ODO30exp และ ODO30exp ที่ความเข้มข้น 250 $\mu\text{g/ml}$ มีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ collagenase เท่ากับ $96.00 \pm 0.48 \%$ $94.85 \pm 0.66\%$ และ $92.95 \pm 0.48 \%$ และ $69.30 \pm 1.19\%$ ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ผลของสารสกัดไดอะตอมต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ต่างๆ

สารทดสอบ	Anti Elastase IC50 (µg/ml)	Anti Tyrosinase IC50 (µg/ml)	Anti Collagenase %inhibition at 250 µg/ml	Acetylcholinesterase Inhibitor at 1 mg/ml
CHE 30 sta	22.23±1.74	79.30±1.14	94.85±0.66	NA
ODO 30 ret	22.02±0.44	96.07±1.31	92.95±0.48	NA
ODO 30 exp	15.68±0.45	346.61±13.49	69.30±1.19	24.99±0.90
THA 30 exp	13.43±1.27	465.64±5.72	96.00±0.48	NA
Quercetin	40.44±0.86	-	-	72.30±1.78
Kojic acid	-	88.92±0.71	-	-
EGCG	-	-	89.48±0.96	-

*mean ± S.D. ** NA = No activity

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ Acetylcholinesterase (AChE) ด้วยการวัดสีที่พัฒนาขึ้นจากวิธีของเอลแมน พบว่าสารสกัดจาก ODO30Exp ที่ความเข้มข้น 1 mg/ml มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ Acetylcholinesterase (AChE) เท่ากับ 24.99±0.90 % และสารสกัด CHE30Sta, ODO30Ret, THA30Exp ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ AChE ดังตารางที่ 2 เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Quercetin ที่ 1 mg/ml ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ AChE เท่ากับ 72.30±1.78% ดังแสดงในตารางที่ 6

6. ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ผิวหนังมนุษย์ human keratinocytes (HaCAT)

การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ human keratinocytes, (HaCaT) ด้วยวิธี MTT พบว่าที่ความเข้มข้น 10 µg/ml ของสารสกัดไดอะตอม ODO30Exp และ THA30Exp ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ผิวหนังมนุษย์ โดยมีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์เท่ากับ 107.3 7.20% และ 105.18±3.93% ตามลำดับ ในขณะที่สารสกัดไดอะตอม CHE30Sta และ ODO30Ret ที่ความเข้มข้น 10 µg/ml มีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์เท่ากับ 98.87±8.84% และ 86.07±7.98% ตามลำดับ ทั้งนี้พบว่าที่ความเข้มข้นสุดท้ายที่ 250 µg/ml สารสกัดจากไดอะตอมมีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ต่ำกว่าความเข้มข้นที่ 10 µg/ml ในทุกสารสกัด ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ผลของสารสกัดเมทธานอลจากไดอะตอมต่ออัตราการรอดชีวิตของเซลล์ human keratinocytes, (HaCaT) ด้วยวิธี MTT assay

สารทดสอบ	% Cell viability		
	10 µg/ml	100 µg/ml	250 µg/ml
CHE 30 sta	86.07±7.98	26.85±0.72	14.68±0.67
ODO 30 ret	98.87±7.84	70.20±0.72	20.14±1.59
ODO 30 exp	107.3±7.2	97.4±3.8	93.0±4.9
THA 30 exp	105.18±3.93	82.77±2.86	57.77±0.66

*mean ± S.D.

บทที่ 3

อภิปรายและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากรายงานวิจัยก่อนนี้พบว่าสาหร่ายกลุ่มไดอะตอมแต่ละชนิดสามารถทนต่อ ระดับของความทนเค็มที่แตกต่างกัน โดยผลของความเค็มเคลื่อนนอกจากจะส่งผลกระทบต่อการสะสมของมวลชีวภาพแล้ว ความเค็มยังส่งผลให้สาหร่ายกลุ่มไดอะตอมยังมีกระบวนการทำงานของเอนไซม์บางชนิดที่จะทำให้สาหร่ายเปลี่ยนจากการสะสมแป้งไปสะสม สารอาหารในรูปของไขมัน และ/หรือ รงควัตถุแทน (Ramos et al., 2011) ดังนั้นการวิจัยนี้จึงสังเกตเห็นความสำคัญในการศึกษาผลของความเค็มที่ส่งผลต่อการสร้างสารสำคัญต่างๆ ได้แก่ สารกลุ่มโพลีฟีนอล (สารประกอบฟีนอลิกและสารประกอบฟลาโวนอยด์) สารสีกลุ่มแคโรทีนอยด์ และกรดไขมัน ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อเปลี่ยนแปลงสารชีวโมเลกุลในระดับเซลล์ ทำการทดสอบด้วยเทคนิค synchrotron FTIR-spectromicroscopy (SR-FTIR spectromicroscopy) รวมถึงคณะผู้ทำวิจัยได้ทำการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากไดอะตอมที่สภาวะความเค็มต่างๆ เพื่อเป็นฐานข้อมูลในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ในอนาคต ดังนี้

1. ลายพิมพ์นิ้วมือดีเอ็นเอของไดอะตอม

การสำรวจชนิดของไดอะตอมในชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกของจังหวัดชลบุรี เมื่อทำการวิเคราะห์ลายพิมพ์นิ้วมือดีเอ็นเอของไดอะตอมทั้ง 3 ชนิด เพื่อตรวจหาลำดับเบสดี-เอ็นเอและนำมาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน Genbank (NCBI) เพื่อยืนยันความเหมือนหรือความแตกต่างของลำดับเบสดีเอ็นเอ พบว่า สารสกัดดีเอ็นเอของ *Chaetoceros tenuissimus* Meunier (Family Chaetocerotaceae) และ *Thalassiosira pseudonana* Hasle & Heimdal (Family Thalassiosiraceae) นี้มี %ident หรือเปอร์เซ็นต์ความใกล้เคียงเมื่อเทียบกับฐานข้อมูลจากการใช้โปรแกรม BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) อยู่ที่ 96.27% และ 99.82% ตามลำดับ ทั้งนี้ไดอะตอมชนิด *Odontella* sp. ยังไม่ได้ทำการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลเนื่องจากมีปริมาณดีเอ็นเอที่น้อยและอาจทำให้ได้ผลการวิเคราะห์ที่คาดเคลื่อน อีกทั้งเปอร์เซ็นต์ความใกล้เคียงเมื่อเทียบกับฐานข้อมูลจากการใช้โปรแกรม BLASTต่ำกว่า 90% จึงไม่รายงานการระบุชนิดของไดอะตอมดังกล่าวในการทดลองนี้ อย่างไรก็ตามจากลักษณะสัณฐานวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์ของไดอะตอมชนิด *Odontella* sp.1 จากรายงานตามความหลากหลายของเซนทริคไดอะตอม บริเวณเกาะสีชังและเกาะแสมสาร (อัจฉราภรณ์ เปี่ยมสมบูรณ์ 2559) พบว่าไดอะตอมมีลักษณะเซลล์ด้านข้างเป็น รูปสี่เหลี่ยมผืนผ้ายาว เรียงต่อกัน ด้านผานูนเล็กน้อย ปลายสองข้างของหน้าผายกขึ้นเป็นเส้น เรียว ส่วนยื่น (processes) สองเส้นอยู่ ใกล้ส่วนปลายที่ยกขึ้นทั้งสองข้าง อาจเป็นไดอะตอมชนิด

Odontella sinensis (Greville) Grunow (Family Triceratiaceae) ซึ่งไดอะตอมทั้ง 3 ชนิดพบว่ามียางานในบริเวณหมู่เกาะสีชังและแสมสาร ดังนั้นจึงนำไดอะตอมทั้ง 3 ชนิดนี้ ทำการศึกษาการเลี้ยงภายใต้สภาวะความเค็มที่ 20 ppt 30 ppt และ 40 ppt เพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารสีกลุ่มแคโรทีนอยด์ กรดไขมัน สารประกอบฟลาโวนอยด์รวม และสารประกอบฟีนอลิกรวมในไดอะตอมที่ระยะการเจริญเติบโตต่างๆ ได้แก่ lag, exponential, retardation และ stationary phase เป็นต้น

2. ประสิทธิภาพการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระในไดอะตอม ด้วยตัวทำละลายที่ต่างกัน

จากผลการศึกษาพบว่าสารสกัดเมทานอลมีประสิทธิภาพในการสกัดไดอะตอม ทั้ง 3 ชนิดที่ความเค็ม 30 ppt ระยะ stationary phase มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (ABTS assay) มากกว่าสารสกัดไดอะตอมจากเมทานอลต่อเอทิลอะซีเตท 50% (v/v) และสารสกัดไดอะตอมจากเมทานอลต่ออะซีโตน 50% (v/v) ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Hemalatha et al. (2013) และ Uma et al., 2011 โดยปริมาณสารสกัดไดอะตอมที่สกัดด้วยเมทานอลจะพบปริมาณของสารประกอบกลุ่มฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ที่มากกว่าสารสกัดไดอะตอมที่สกัดด้วย เมทานอลต่อเอทิลอะซีเตท 50% (v/v) และสารสกัดไดอะตอมจากเมทานอลต่ออะซีโตน 50% (v/v) ตามลำดับ สารประกอบกลุ่มฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์เป็นโพลีฟีนอลที่มีคุณสมบัติสารต้านอนุมูลอิสระ (Chankaew et al., 2018) ดังนั้นการศึกษานี้จึงเลือกใช้สารสกัดเมทานอลจากไดอะตอมในแต่ละสภาวะ ทำการศึกษาต่อไป โดยพบว่าในไดอะตอมแต่ละชนิดมีปริมาณสารสกัดต่อน้ำหนักเปียกของไดอะตอมที่แตกต่างกัน โดยไดอะตอมชนิด *Thalassiosira* sp. ในสภาวะต่างๆ มีปริมาณสารสกัดสูงกว่าไดอะตอมชนิด *Chaetoceros* sp. และ *Odontella* sp. ตามลำดับ สารสกัดเมทานอลจาก *Thalassiosira* s. เพาะเลี้ยงด้วยอาหารที่ความเค็ม 30 ppt (RET) 20 ppt (EXP) และ 40 ppt (RET) มีปริมาณสารสกัดเมทานอลสูงที่สุดตามลำดับ สารสกัดเมทานอลจาก *Odontella* sp. มีปริมาณสารสกัดเมทานอลต่ำที่สุดที่ 40 ppt (LAG) ทั้งนี้ อาจเกิดจากขนาดของเซลล์ไดอะตอม *Thalassiosira* ที่มีขนาดใหญ่กว่าไดอะตอมอื่นๆ

3. ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมในสารสกัดไดอะตอม

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมจากสารสกัดเมทานอลของไดอะตอมทั้ง 36 ตัวอย่าง พบว่าในสารสกัดจากไดอะตอม ODO30Sta มีปริมาณฟีนอลิกรวมสูงสุด รองลงมาคือ THA40Sta THA30Sta THA30Ret ODO30Exp และ CHE 30 Exp ตามลำดับ ในขณะที่ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมพบสูงสุดจากสารสกัดพบสูงสุดจากสารสกัด *Chaetoceros* sp. ที่เพาะเลี้ยงในความเค็ม 20 ppt ที่ระยะ exponential phase (CHE20Exp), stationary phase (CHE20Sta) และ retardation phase (CHE20Ret) THA30Sta THA30Exp, THA30Ret THA40Exp ODO40Sta ODO30Ret และ ODO30Sta ตามลำดับ ทั้งนี้ ปริมาณฟีนอลิกที่ได้จากการ

สกัดนั้นจะขึ้นอยู่กับ ตัวแปรหลายอย่าง เช่น อุณหภูมิ เวลา อัตราส่วนของ ตัวทำละลายต่อปริมาณของไดอะตอม ที่สกัด (Pinelo et al., 2005) และชนิดของตัวทำละลาย ซึ่งลักษณะทางเคมี และโครงสร้างของตัวทำละลายแต่ ละชนิดจะเป็น ตัวแปรที่สำคัญเพราะเป็นตัวกำหนดปริมาณและชนิด ของสารประกอบฟีนอลิกที่สกัดได้ (อิสรระ วัฒน์ และ เฉลิม, 2556) รวมทั้งคุณสมบัติการมีขั้วและไม่มีขั้วของตัวทำละลายมีผลต่อการสกัดสารประกอบฟีนอลิกได้แตกต่างกัน (วรศิรา และคณะ, 2553)

3. ปริมาณสารกลุ่มแคโรทีนอยด์และกรดไขมันในสารสกัดจากไดอะตอม

3.1 ชนิดและปริมาณสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ในสารสกัดจากไดอะตอม

สารสีในกลุ่มแคโรทีนอยด์ จัดเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่พบในธรรมชาติ ซึ่งสามารถพบได้ทั่วไปในพืชผักที่มีสีเหลืองส้ม ส้มแดง และแดง เช่น แครอท ฟักทอง มะเขือเทศ รวมไปถึง สาหร่าย มีรายงานการศึกษาและพบอนุพันธ์ของแคโรทีนอยด์ในธรรมชาติแล้วมากกว่า 750 ชนิด (Sakagami et al., 2010) แคโรทีนอยด์จะเป็นรงควัตถุสำคัญใน การสังเคราะห์แสง ช่วยดูดซับรับพลังงาน ในขณะเดียวกันก็ป้องกันอันตรายที่จะเกิดจากพลังงานส่วนเกินจาก แสง อีกทั้งดักจับอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในระหว่างการ สังเคราะห์แสง Miller et al., 1996 ในมนุษย์ แคโรทีนอยด์เป็นสารต้าน อนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ ตลอดจนช่วยส่งเสริม ระบบภูมิคุ้มกัน (Rao and Rao 2007) จากผลการทดลองพบว่าปริมาณสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ในสารสกัดไดอะตอมรวมมีปริมาณสูงสุดใน *Thalassiosira* sp. ระยะ stationary phase ที่เลี้ยงในความเค็ม 20 ppt มีปริมาณสารกลุ่มแคโรทีนอยด์รวมสูงสุด รองลงมาคือ *Odontella* sp. ที่ระยะ stationary phase เลี้ยงในความเค็ม 30 ppt โดยสารสกัดจากไดอะตอม *Cheatoceeros* sp. พบว่ามีปริมาณสารสีกลุ่มแคโรทีนอยด์รวมต่ำกว่าไดอะตอมทั้งสองชนิดข้างต้น ซึ่ง *Chaetoceros* sp. ในระยะ stationary phase ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ระดับความเค็ม 20 ppt และ 40 ppt พบปริมาณของสารสีกลุ่มแคโรทีนอยด์มากที่สุด โดยการศึกษาค้นคว้าเพิ่มเติมพบว่ามีงานวิจัย หลายชิ้นระบุถึงผลของการเติมแหล่งคาร์บอนภายนอก ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อว่าสามารถกระตุ้นให้สาหร่าย สร้างและสะสมสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ได้ รวมไปถึงการ สังเคราะห์คีโตแคโรทีนอยด์ที่เกิดขึ้นเนื่องจากเอนไซม์ ที่มีส่วนช่วยในการเปลี่ยนสารเบต้าแคโรทีนไปเป็น แอสตาแซนธินถูกกระตุ้นระดับการทำงานให้มากขึ้น โดยเอนไซม์เหล่านี้จะมีตำแหน่งของการทำปฏิกิริยา ทางชีวเคมีอยู่ที่เม็ดสี (plastid) ซึ่งเป็นแหล่งเก็บสะสม สารเบต้าแคโรทีน ผลการทดลองครั้งนี้ สอดคล้องกับรายงาน การวิจัยก่อนหน้าซึ่งเกือบทั้งหมดมีวัตถุประสงค์ที่จะ กระตุ้นไดอะตอมให้ผลิตและสะสมสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ที่มีมูลค่าสูง

ทั้งนี้ผลของสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ที่พบในไดอะตอม *Chaetoceros* sp. ให้ผลต่างจากปริมาณสารพลาไวโนอยด์ที่สูงสุดในสารสกัดของไดอะตอมชนิดนี้ จึงสามารถสรุปได้ว่าสารกลุ่มพลาไวโนอยด์ที่พบในไดอะตอม *Chaetoceros* sp. อาจเป็นสารกลุ่มอื่น

3.2 ชนิดและปริมาณกรดไขมันในสารสกัดจากไดอะตอม

ในสารสกัดไดอะตอม *Chaetoceros* sp. ที่สภาวะต่างๆ พบว่ามีกรดไขมันชนิด Myristic acid สูงสุด รองลงมาคือ Palmitic acid และ Margaric acid ตามลำดับ โดยพบกรดไขมันไม่อิ่มตัวกลุ่มโอเมก้า-3 ได้แก่ eicosapentaenoic acid (EPA) ในสารสกัด CHE30Lag (1.07 ± 0.28 %), CHE30Ret (0.80 ± 0.16 %) และ CHE40Ret (0.34 ± 0.07 %) ตามลำดับ โดยในสารสกัดไดอะตอมทั้ง 6 ตัวอย่างนี้ไม่พบกรดไขมันไม่อิ่มตัว DHA ดังแสดงในตารางที่ xxx ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาของ Thompson, (1992) และ Seto et al., (1984) ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า linolenic acid มีการสังเคราะห์ไปเป็น EPA มากจึงทำให้มีปริมาณ EPA ค่อนข้างมาก ส่วนสารสกัดไดอะตอม *Odontella* sp. ที่สภาวะต่างๆ พบว่ามีกรดไขมันชนิด Palmitic acid สูงสุด รองลงมาคือ Palmitoleic acid, Margaric acid และ Myristic acid ตามลำดับ โดยพบกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนกลุ่มโอเมก้า-3 ได้แก่ eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5, n-3) ในสารสกัด ODO30Ret สูงสุด (12.32 ± 0.17 %) รองลงมาคือ ODO40Sta (6.74 ± 0.33 %) ODO40Ret (6.59 ± 0.19 %) และ ODO30Sta (6.00 ± 0.33 %) ตามลำดับ และพบกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนกลุ่มโอเมก้า-3 decosahexaenoic acid (DHA, 22:6, n-3) สูงสุดในสารสกัดไดอะตอม ODO20Ret (0.73 ± 0.04 %) รองลงมาคือสารสกัดจาก ODO30Ret (0.52 ± 0.03 %), ODO40Ret (0.46 ± 0.34 %) ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ xxx ส่วนสารสกัดไดอะตอม *Thalassiosira* sp. ที่สภาวะต่างๆ พบว่ามีกรดไขมันชนิด Palmitoleic acid สูงสุดในสารสกัดและในสารสกัดพบว่ามี Palmitic acid และ Margaric acid ค่อนข้างสูงตามลำดับ โดยพบกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนกลุ่มโอเมก้า-3 ได้แก่ eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5, n-3) ในสารสกัด THA40Sta (18.15 ± 0.13 %) THA20Ret (15.58 ± 0.25 %) ตามลำดับ ไม่พบกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน DHA ในสารสกัดไดอะตอม THA30Ret และ THA40Exp ดังแสดงในตารางที่ xx

ทั้งนี้ปัจจัยในการเพาะเลี้ยงไดอะตอมแต่ละชนิด มีผลต่อการผลิตองค์ประกอบทางเคมีชนิดต่างๆ ในเซลล์ จะเห็นได้จากไดอะตอมที่เลี้ยงในสภาวะความเค็มต่างๆกันมีผลต่อการสร้างกรดไขมันไม่อิ่มตัวเพิ่มขึ้นซึ่งอาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของของเหลวในชั้นฟอสโฟลิพิดในเซลล์เมมเบรนจากสภาวะเครียดในอาหารเลี้ยง โดยขึ้นกับระดับของกรดไขมันไม่อิ่มตัว ด้วยการเพิ่มระดับของของเหลวที่สัมพันธ์กับการเพิ่มจำนวนพื้หน่ในโมเลกุลของกรด

ไขมัน โดยเมื่อไดอะตอมถูกเลี้ยงในสภาวะเครียดที่เพิ่มมากขึ้น จะเห็นว่ากรดไขมันอิ่มตัวจะเพิ่มมากขึ้น ในขณะที่กรดไขมันไม่อิ่มตัวจะลดลง (Renaud et al., 2002) ทั้งนี้การหาสภาวะความเค็มที่ 30 ppt และ 40 ppt พบว่ามีผลต่อการเพิ่มจำนวนกรดไขมันไม่อิ่มตัวมากขึ้น ในขณะที่ระดับความเค็ม 40 ppt มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของกรดไขมันไม่อิ่มตัว EPA ในไดอะตอม *Odontella* sp และ *Thalassiosira* sp. นอกจากความเค็ม ยังพบว่าความเข้มแสง อุณหภูมิ สภาวะขาดแคลนไนโตรเจนและซิลิเกต ยังส่งผลต่อการผลิตกรดไขมันชนิดต่างๆ อีกด้วย (Shifrin and Chrisholm (1981); Reitan et al., 1994)

4. การประยุกต์ใช้เทคนิค SR-FTIR spectromicroscope ในการวิเคราะห์ปริมาณสารสีแคโรทีนอยด์และกรดไขมันในไดอะตอมที่เลี้ยงในความเค็มต่างๆ

งานวิจัยนี้ ไม่ได้ดำเนินการทดสอบด้วยเทคนิค RAMAN- spectroscopy เนื่องจากต้องใช้ระยะเวลาในการขอใช้เครื่องมือดังกล่าว อีกและเทคนิค Synchrotron FTIR microspectroscopy เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพ มีความแม่นยำสูง และรวดเร็ว และสามารถวิเคราะห์ปริมาณสาร carotenoid และกรดไขมันได้ในระดับเซลล์เดี่ยวๆ ได้ มีประสิทธิภาพมากกว่า RAMAN- spectroscopy (Thumanu et al., 2009) จากการวิเคราะห์ IR spectrum ของสารมาตรฐาน astaxanthin และกรดไขมันไม่อิ่มตัว (PUFA marine) พบว่าในช่วงคลื่นที่ 3013 cm^{-1} , 2929 cm^{-1} และ 2852 cm^{-1} เป็นช่วงคลื่นที่มีการสั่นของ C-H asymmetric stretching of-CH₃ และ CH₂ ของกรดไขมัน และช่วงคลื่นที่ 1743 cm^{-1} ของ C=O stretching of lipid ester ซึ่งตรงช่วงความยาวคลื่นของสารเบต้าแคโรทีนในการศึกษาของ Liu and Huang, 2016 ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกใช้ช่วงความยาวคลื่นนี้ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณของสารสีกลุ่มแคโรทีนอยด์และกรดไขมันในไดอะตอมที่เลี้ยงในระดับความเค็มต่างๆ นอกจากนี้จากการวิเคราะห์ IR spectrum ของไดอะตอมแต่ละระยะแสดงช่วงความยาวคลื่นของ Amide I of α -helical structure ของโปรตีน ตรงกับช่วง 1655 cm^{-1} หรือ Amide I of β -plated sheet structure ของโปรตีนตรงช่วงความยาวคลื่น 1637 cm^{-1} และที่ช่วง $1550\text{-}1520\text{ cm}^{-1}$ Amide II band ของโปรตีน ในช่วงความยาวคลื่นของคาร์โบไฮเดรตที่ 1427 cm^{-1} และ 1355 cm^{-1} เป็นช่วงคลื่นที่มีการสั่นของหมู่ฟังก์ชัน O-CH และ C-H ในโครงสร้างคาร์โบไฮเดรต หรือการสั่นของหมู่ฟังก์ชัน OH ที่อยู่ในหมู่ C-OH ช่วงความยาวคลื่นที่ $1259\text{ -}1153\text{ cm}^{-1}$ เป็นช่วงคลื่นที่มีการสั่นของหมู่ฟังก์ชัน C-H stretching หรือ CO ของคาร์โบไฮเดรต ช่วงความยาวคลื่นที่มากที่สุดที่ $1107\text{ ถึง }1080\text{ cm}^{-1}$ และ $1062\text{ ถึง }970\text{ cm}^{-1}$ เป็นช่วงที่มีการสั่นของหมู่ฟังก์ชัน C-O ใน C-O-C ของคาร์โบไฮเดรตและซิลิกา (SiO) และที่ช่วง $890\text{-}810$ เป็นช่วงการสั่นของหมู่ฟังก์ชัน CH ในวงแหวนอะโรมาติก ที่เป็นองค์ประกอบในไดอะตอมแสดงความแตกต่างของไดอะตอมแต่ละชนิดที่เพาะเลี้ยงที่ความเค็ม 30

ppt ในแต่ละระยะการเจริญเติบโตของไดอะตอม ได้แก่ lag, exponential, retardation และ stationary phase ด้วย PCA analysis ของอินฟราเรดสเปกตรัม 2nd derivative สามารถสรุปได้ดังนี้

1. ไดอะตอมชนิด *Chaetoceros tenuissimus* ในแต่ละระยะการเจริญเติบโตมีความแตกต่างกัน โดยพิกัดจาก IR spectrum จะแสดงถึงการสั่นของหมู่ฟังก์ชันที่สอดคล้องกับสารชีวโมเลกุลต่างๆ แตกต่างกันในช่วงความยาวคลื่น 1018 cm⁻¹, 1089 cm⁻¹ และ 1627 cm⁻¹ ซึ่งสอดคล้องกับช่วงของคาร์โบไฮเดรต ซิลิกาและ amide I of β -plated sheet structure ของโปรตีนที่ใช้แยกความแตกต่างจากไดอะตอมระยะอื่นๆ นอกจากนี้ *C. tenuissimus* ที่ระยะ stationary phase แตกต่างจาก lag phase ช่วงความยาวคลื่น 1629 cm⁻¹ และ 1008 cm⁻¹ ซึ่งตรงกับ amide I of β -plated sheet structure ของโปรตีนและ fingerprint region ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาก่อนนี้ (ซึ่งพบว่าในไดอะตอม *Chaetoceros* sp. มีปริมาณของโปรตีนที่สูงและที่ระยะ stationary phase เป็นระยะที่มีปริมาณโปรตีน amide I of β -plated sheet structure สูงกว่าระยะอื่นๆ โดยในระยะ lag phase เป็นระยะที่ไดอะตอมมีการสังเคราะห์โปรตีนดังกล่าวต่ำจึงสามารถแยกความแตกต่างระหว่าง stationary phase และ lag phase ได้

นอกจากนี้จากผลการวิเคราะห์ SR-FTIR microspectroscopy และหาพื้นที่ใต้กราฟในช่วงความยาวคลื่นต่างๆ integral area ด้วยโปรแกรม OPUS 7.5 และ unscrambler 10x พบว่าเซลล์ไดอะตอม *C. tenuissimus* ที่เลี้ยงในอาหารความเค็ม 30 ppt ในระยะ stationary phase มีปริมาณของกรดไขมันและสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ (ที่ความยาวคลื่น 3010, 2929, 2850 และ 1740 cm⁻¹) สูงสุดรองลงมาได้แก่ retardation, exponential และ lag phase ตามลำดับ ปริมาณโปรตีน amide I (1630 cm⁻¹) และ II (1554 cm⁻¹) พบมากที่สุดระยะ stationary phase และ retardation phase ตามลำดับ ส่วนปริมาณคาร์โบไฮเดรต ที่ช่วงความยาวคลื่น 1500-1200 cm⁻¹ (Deformation of CH₂/C-C-H/H-C-O) และ 1200-950 cm⁻¹ พบมากที่สุดในระยะ retardation และ exponential phase ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

2. ไดอะตอม *Thalassiosira* sp. ที่เลี้ยงในความเค็ม 30 ppt แต่ละระยะการเจริญเติบโต เมื่อวิเคราะห์แยกความแตกต่างของอินฟราเรดสเปกตรัมด้วย PCA analysis พบว่าไดอะตอมในระยะ Lag phase แยกออกจากไดอะตอมในระยะต่างๆ ที่ PC1 (74%) ที่ช่วงความยาวคลื่น 1000, 1654, 1583 cm⁻¹ ซึ่งตรงกับ carbohydrate polysaccharide หรือ SiO บริเวณ fingerprint region และ amide I of α -plated sheet structure ของโปรตีน และที่ PC-2 แยกไดอะตอม *Thalassiosira* ที่ระยะ retardation phase ออกจากระยะอื่นที่ช่วงความยาวคลื่นของกรดไขมันหรือช่วงของสารแคโรทีนอยด์ที่ 2963, 2933 และ 1735 cm⁻¹ และช่วงของ α -plated sheet structure ของโปรตีนที่ 1648 cm⁻¹ และช่วงของคาร์โบไฮเดรต polysaccharide และซิลิกา

ในช่วงความยาวคลื่น 1266, 1089 cm^{-1} ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kamalanathan et al., (2019) รายงานผลของการเปลี่ยนแปลงสภาวะของ

เมื่อทำการวิเคราะห์พื้นที่ใต้กราฟของช่วงต่างๆ (interactive area) จากอินฟราเรดสเปกตรัมของกรดไขมันและสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ ที่ช่วงความยาวคลื่น 3010, 2930, 2870 สำหรับ C-H asymmetric stretching of- CH_3 และ CH_2 ของกรดไขมัน และช่วงคลื่นที่ 1743 cm^{-1} ของ C=O stretching of lipid ester พบว่า THA30Ret มีปริมาณกรดไขมันและสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ที่สูงที่สุด รองลงมาได้แก่ THA30Sta, THA30Lag และ THA30Exp ตามลำดับ และช่วงความยาวคลื่นของ amide I β - plated sheet structure ของโปรตีนที่ 1652 cm^{-1} , amide II (1546 cm^{-1}) และปริมาณของคาร์โบไฮเดรตในช่วงความยาวคลื่น 1241, 1087 cm^{-1} พบมากที่สุดในไดอะตอม *Thalassiosira* sp. 30 ppt ที่ระยะ stationary phase รองลงมาคือ THA30Ret, THA30Exp และ THA30Lag ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบช่วงความยาวคลื่นที่ 890-810 เป็นช่วงการสั่นของหมู่ฟังก์ชัน CH ในวงแหวนอะโรมาติกในไดอะตอม THA30Ret ที่สูงอีกด้วยดังแสดงในรูปที่ แสดง IR spectrum และ 2nd derivative ของน้ำผึ้ง ดังรูปที่ 13 สอดคล้องกับการศึกษาก่อนนี้ของ Meksiarun และคณะ 2015

อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้ ไม่ได้ดำเนินการทดสอบด้วยเทคนิค RAMAN- spectroscopy เนื่องจากต้องใช้ระยะเวลาในการขอใช้เครื่องมือดังกล่าว และเทคนิค Synchrotron FTIR microspectroscopy เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพ มีความแม่นยำสูง และรวดเร็ว และสามารถวิเคราะห์ปริมาณสาร carotenoid และกรดไขมันได้ในระดับเซลล์เดี่ยวๆ ได้

5. ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดไดอะตอมที่เลี้ยงในความเค็มระดับต่างๆ

จากการเพาะเลี้ยงไดอะตอมในสภาวะความเค็มที่แตกต่างกัน นำไปสู่การสังเคราะห์สารสีแคโรทีนอยด์และกรดไขมันที่ต่างกัน ซึ่งสารดังกล่าวส่งผลต่อการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ สารต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ ตลอดจนช่วยส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกัน ต้านการเกิดริ้วรอย รวมถึงช่วยป้องกันความเสื่อมของระบบประสาท () จึงนำมาสู่การศึกษาฤทธิ์ต่างๆทางชีวภาพ ของสารสกัดจากไดอะตอม ได้แก่

จากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ในสารสกัดของไดอะตอมทั้งสามชนิดพบว่า สารสกัดเมทานอลของไดอะตอม *Chaetoceros* sp. ระยะ stationary phase เลี้ยงในสภาวะความเค็ม 20 ppt (CHE20Sta) มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH สูงสุด โดยมีความเข้มข้นที่สามารถกำจัดอนุมูลอิสระได้ที่ 50 % (IC_{50}) สูงสุดเท่ากับ 0.48 ± 0.02 mg/ml และสารสกัด CHE30Sta ยังมีความสามารถกำจัดอนุมูลอิสระ $\text{ABTS}^{\cdot+}$ ดี

ที่สุดและสามารถกำจัดอนุมูลอิสระ ABTS⁺ มากกว่าสารมาตรฐาน Trolox (0.02±0.00 mg/ml) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) ที่ IC₅₀ เท่ากับ 0.015±0.00 mg/ml โดยสารสกัด CHE ในทุกความเค็มที่ระยะ Lag phase ไม่สามารถกำจัดอนุมูลอิสระ ABTS⁺ ได้ โดยมีค่า IC₅₀ > 1.00 mg/ml ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมพบสูงสุดจากสารสกัดพบสูงสุดจากสารสกัด *Chaetoceros* sp. ที่เพาะเลี้ยงในความเค็ม 20 ppt อย่างไรก็ตามจากการทดลองนี้พบว่าในสารสกัดจากไดอะตอม *Chaetoceros* มีสารสีกลุ่มแคโรทีนอยด์เป็นส่วนประกอบน้อยกว่า *Odontella* และ *Thalassiosira* ดังนั้นฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอาจเกิดจากสารประกอบฟลาโวนอยด์ชนิดอื่นที่พบในสารสกัด *Chaetoceros* ซึ่งมีคุณสมบัติในการเป็นตัวกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ซึ่งเป็นอนุมูลไนโตรเจนที่คงตัว สีม่วง ในขณะที่อนุมูลอิสระ ABTS⁺ เป็นการวัดความสามารถของสารทดสอบในการกำจัดอนุมูลอิสระโดยวิธีให้ไฮโดรเจนอะตอม เป็นการกำจัดอนุมูลอิสระชนิดเปอร์ออกซี () ซึ่งเป็นการศึกษาในตัวทำละลายอินทรีย์ ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในตัวกลางน้ำซึ่งจำลองสภาวะในร่างกายของมนุษย์ด้วย เช่น การวัดการเกิดปฏิกิริยา reduction ของ Fe³⁺-TPTZ ไปเป็น Fe²⁺-TPTZ ด้วยวิธี FRAP () ซึ่งผลการศึกษาพบว่าสารสกัดไดอะตอม *Thalassiosira* และ *Odontella* sp. ซึ่งประกอบด้วยสารฟีนอลิกสูงสุดตามลำดับ แสดงว่ามีสารที่มีโครงสร้างหลักประกอบด้วย Aromatic ring แทนที่ด้วย hydroxy group ซึ่งกลไกของสารจำพวกฟีนอลในการต้านอนุมูลอิสระคือจะเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนไปทั่วโครงสร้าง (delocalization) และทำให้โครงสร้างนั้นเสถียรไม่เกิดเป็นอนุมูลอิสระได้ (Pietta, 2000) จึงทำให้สารสกัดจาก *Thalassiosira* และ *Odontella* sp. มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีทดสอบ FRAP assay นอกจากนี้ในการวิเคราะห์ SR-FTIR microscopy ยังพบโครงสร้างของ aromatic ring ในไดอะตอม *Thalassiosira* สูงสุดในระยะ retardation phase ซึ่งสอดคล้องกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดังกล่าว

ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์และความเป็นพิษต่อเซลล์

จากผลการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส เอนไซม์ elastase และ collagenase พบว่าสารสกัดจากไดอะตอม ได้แก่ THA30exp ODO30exp, ODO30ret และ CHE30sta มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ tyrosinase, elastase และ collagenase โดย สารสกัดจากไดอะตอม *Chaetoceros* sp. ที่ระยะ stationary phase เลี้ยงในอาหารที่ความเค็ม 30 ppt มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสดีกว่าสารมาตรฐานโคจิก (Kojic acid, IC₅₀ 88.92±0.71 µg/ml) สารสกัดจากไดอะตอม *Thalassiosira* sp. เลี้ยงในอาหารความเค็ม 30 ppt ที่ระยะ exponential phase มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ elastase ดีที่สุด นอกจากนี้สารสกัดจากไดอะตอมที่ใช้ในการทดสอบทุกชนิดสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ collagenase ได้ดีกว่าสารมาตรฐาน EGCG โดยฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์สอดคล้องกับ

สารฟลาโวนอยด์และปริมาณสารสีกลุ่มแคโรทีนอยด์ ที่พบในสารสกัดไโดอะตอมชนิดต่างๆ ได้แก่ fucoxanthin, astaxanthin, canthaxanthin และ zeaxanthin โดยสารสกัดไโดอะตอมทุกชนิดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากสารมาตรฐาน ($p < 0.05$)

เอนไซม์ elastase และ collagenase เป็นเอนไซม์สำคัญที่ทำให้เกิดริ้วรอย และทำลายความยืดหยุ่นของผิวหนัง โดยเอนไซม์ ทั้ง 2 ชนิดนี้จะไปทำลายคอลลาเจนและอีลาสติน ที่เป็นส่วนประกอบสำคัญของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของผิว หากเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้ถูกทำลายจะส่งผลให้เกิดความหย่อนคล้อยและเกิดริ้วรอยที่บริเวณผิวหนังขึ้นได้ ดังนั้นจากการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ elastase และ collagenase ของสารสกัดเมธานอลของไโดอะตอม พบว่าสารสกัดจากไโดอะตอม THA30exp ($13.43 \pm 1.27 \mu\text{g/ml}$), ODO30exp $15.68 \pm 0.45 \mu\text{g/ml}$, ODO30ret $22.02 \pm 0.44 \mu\text{g/ml}$ และ CHE30sta $22.23 \pm 1.74 \mu\text{g/ml}$ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ elastase ที่ 50% หรือ IC_{50} ต่ำกว่าสารมาตรฐาน Quercetin ($40.44 \pm 0.86 \mu\text{g/ml}$) ตามลำดับ โดยสารสกัดไโดอะตอมทุกชนิดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากสารมาตรฐาน ($p < 0.05$) ซึ่งผลการศึกษาสอดคล้องกับรายงานของ Liu et al. 2014 และ Peng et al. 2011 โดยรายงานว่ไโดอะตอม *Chaetoceros* sp. และ *Odontella aurita* มีฤทธิ์ antioxidant (via Nrf2 signalling), antiinflammatory, และ anti-melanogenic (whitening) เนื่องจากสารสีกลุ่มแคโรทีนอยด์ ได้แก่ fucoxanthin, astaxanthin และกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (PUFA) ที่อยู่ในไโดอะตอมดังกล่าว นอกจากนี้ทางผู้วิจัยยังได้ทำการศึกษาฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังปกติ human keratinocytes, (HaCaT) ด้วยวิธี MTT พบว่าที่ความเข้มข้น $10 \mu\text{g/ml}$ ของสารสกัดไโดอะตอม ODO30Exp และ THA30Exp ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ผิวหนังมนุษย์ โดยมีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์มากกว่าเซลล์กลุ่มควบคุม ในขณะที่สารสกัดไโดอะตอม CHE30Sta และ ODO30Ret ที่ความเข้มข้น $10 \mu\text{g/ml}$ มีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมเล็กน้อย และพบว่าที่ความเข้มข้นมากขึ้นที่ $250 \mu\text{g/ml}$ สารสกัดจากไโดอะตอมมีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ต่ำกว่าความเข้มข้นที่ $10 \mu\text{g/ml}$ ในทุกสารสกัด ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนนี้ของ Jung et al., 2018 จากการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากไโดอะตอม *Chaetoceros gracilis*, *Nanochloris oculata*, *Scenedemus obliquus* ที่ความเข้มข้น 0.01, 0.1, 1.0 และ $10 \mu\text{g/ml}$ เป็นเวลา 6 วัน พบว่ามีสารสกัดจากไโดอะตอมมีฤทธิ์กระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ผิวหนัง HaCaT และเซลล์ฟอลลิเคิล (HFDPC, hair follicle dermal papilla cell line) อย่างไรก็ตามควรมีการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังในช่วงความเข้มข้น ต่ำกว่า 10 และ ช่วง 10- 100 $\mu\text{g/ml}$ เพื่อยืนยันผลการทดสอบอีกครั้ง นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Acetylcholinesterase inhibitor (AChE) :ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับโรคที่เกิดจากความเสื่อมของระบบประสาท โดยเอนไซม์ AChE จะทำหน้าที่ hydrolyze สารสื่อประสาท Acetylcholine (ACh) ทำให้ปริมาณสารสื่อประสาทลดลง เป็นสาเหตุ

ของความจำเสื่อม ดังนั้นการยับยั้ง AChE จึงมีบทบาทสำคัญในการชะลอการเกิดโรคอัลไซเมอร์ได้ (Lomlim 2011) โดยจากการทดสอบพบว่ามีเพียงสารสกัดจากไดอะตอม *Odontella* sp ที่ความเข้มข้น 1 mg/ml ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ AchE โดยสารสกัดจากไดอะตอมอื่นที่ใช้ในการทดสอบไม่พบว่ามีฤทธิ์ดังกล่าว

บทที่ 4

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

จากผลการศึกษาที่สรุปได้ว่าความเค็มและระยะเวลาเจริญเติบโตของไดอะตอมแต่ละช่วงมีผลต่อการสร้างสารสีกลุ่มแคโรทีนอยด์ สารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ กรดไขมัน และสารชีวโมเลกุลต่างๆ ในไดอะตอม และมีความจำเพาะต่อชนิดของไดอะตอม โดยจากการศึกษาครั้งนี้พบว่าการสร้างสารสีและสารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ ในไดอะตอมยังมีผลต่อฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ tyrosinase, elastase, acetylcholinesterase (AChE) และ collagenase เป็นต้น ในการวิเคราะห์ปริมาณสารสีแคโรทีนอยด์ในไดอะตอมแต่ละชนิดยังพบว่า *Thalassiosira pseudonana*, *Chaetoceros tenuissimus* และ *Odontella* sp. สามารถสร้างสารสีในสภาวะความเค็มต่างๆกัน โดยไดอะตอมชนิด *C. tenuissimus* ในระยะ stationary ที่เลี้ยงในความเค็มที่ 20 ppt มีปริมาณสารสีกลุ่มแคโรทีนอยด์และสารประกอบฟลาโวนอยด์สูงสุด และมีกรดไขมันไม่อิ่มตัวกลุ่ม EPA เป็นองค์ประกอบไม่พบ DHA สอดคล้องกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สูงที่สุดที่ค่า IC_{50} เท่ากับ 0.015 mg/ml ซึ่งดีกว่าสารมาตรฐาน Trolox (0.020 mg/ml) แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และในไดอะตอมชนิด *T. pseudonana* ในระยะ stationary ที่เลี้ยงในความเค็มที่ 20 และ 40 ppt มีปริมาณสารสีกลุ่มแคโรทีนอยด์และสารประกอบกลุ่มฟีนอลิกค่อนข้างสูง ซึ่งให้ฤทธิ์สอดคล้องกับการต้านอนุมูลอิสระ FRAP ที่สูงที่สุด ส่วนในไดอะตอม *Odontella* sp. ในระยะ stationary และ exponential phase ที่เลี้ยงในความเค็มที่ 30 ppt ซึ่งมีปริมาณสารสีกลุ่มแคโรทีนอยด์สูงและสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์สูง และมีกรดไขมันไม่อิ่มตัวกลุ่มทั้ง EPA และ DHA เป็นส่วนประกอบ สอดคล้องกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สูง

โดยจากการศึกษาครั้งนี้พบว่าเทคนิค Synchrotron FTIR microspectroscopy สามารถใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณของสารสีแคโรทีนอยด์รวมและกรดไขมันในไดอะตอมที่เลี้ยงในสภาวะเครียดต่างๆได้ อย่างรวดเร็ว และมีประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ในระดับเซลล์ โดยสารสีแคโรทีนอยด์รวมและกรดไขมันในช่วงความยาวคลื่น $3000-2800\text{ cm}^{-1}$ และ 1740 cm^{-1} เป็นช่วงที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์จากการวิเคราะห์เทียบกับสารมาตรฐานกลุ่มแคโรทีนอยด์และกรดไขมัน นอกจากสารดังกล่าวเทคนิค SR- FTIR microspectroscopy ยังใช้วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน คาร์โบไฮเดรต การสร้างสารโพลีแซคคาไรด์ และซิลิกาในไดอะตอมได้อีกด้วย

จากการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดไดอะตอม THA30exp ODO30exp ODO30ret และ CHE30sta พบว่าสารสกัดทุกตัวมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส อีลาสเทสและคอลลาจีเนส ซึ่งช่วยในการลดเลื้อนริ้วรอย และช่วยปกป้องผิวจากการถูกทำลาย และเกิดความหย่อนคล้อยของผิว

ได้ ซึ่งผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ไลน์ผิวหนังพบว่าที่ความเข้มข้นต่ำๆ (< 10 µg/ml) มีการศึกษาก่อนหน้านี้ ในการกระตุ้นการเจริญของเซลล์ผิวหนังได้ในระดับที่แตกต่างกัน และในการทดสอบผลของสารสกัดไคอะตอมในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ AChE พบว่ามีเพียงสารสกัดจาก *Odontella* sp เท่านั้นที่มีฤทธิ์ดังกล่าวทั้งนี้ ต้องใช้ในความเข้มข้นที่ค่อนข้างสูง อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับฤทธิ์ดังกล่าวเพื่อนำไปสู่การพัฒนาสารสกัดจากไคอะตอมสู่การพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง เพื่อช่วยในการลดเลือนริ้วรอย และป้องกันการเกิดริ้วรอยใหม่ได้ ทั้งนี้การนำเทคนิค SR-FTIR microspectroscopy มาช่วยในการติดตามปริมาณสารสีแคโรทีนอยด์และการเปลี่ยนแปลงเชิงโมเลกุลในไคอะตอม สารสกัดและในเซลล์ผิวหนังควรมีการศึกษาต่อไป นอกจากนี้ควรมีการศึกษาประสิทธิภาพ หรือกลไกการเพิ่มศักยภาพการสังเคราะห์สาร 2nd metabolite ในสาหร่ายทะเล หรือไคอะตอมจากชายฝั่งทางภาคตะวันออก เพื่อกระตุ้นให้มีการสร้างสารที่มีคุณประโยชน์เชิงพานิชย์ สิ่งที่ต้องทำการศึกษาเพิ่มเติม ได้แก่ การควบคุมคุณภาพของสารสกัด และหาวิธีการสกัดไคอะตอมในช่วงที่เหมาะสม และ การทำ method validation ของเทคนิค SR-FTIR microspectroscopy เพื่อให้เกิดการนำไปใช้ในการศึกษา ระดับเซลล์ไคอะตอมต่อไป

ผลผลิต (Output)

- อยู่ระหว่างการเตรียมงานวิจัยเพื่อตีพิมพ์เผยแพร่ในระดับประเทศ และนานาชาติ
- จากข้อมูลข้างต้นมีการศึกษาต่อยอดในการเตรียมพัฒนาสูตรตำรับจากสารสกัดไคอะตอมต่อไป

รายงานสรุปการเงิน

เลขที่โครงการระบบบริหารงานวิจัย(NRMS) สัญญาเลขที่ 1.1/ 2562

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562 มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ การใช้เทคนิค FTIR-spectroscopy และ RAMAN spectroscopy ในการวิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ รูปแบบปริมาณกรดไขมัน ที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและลายพิมพ์ดีเอ็นเอของไดอะตอมเพื่อประโยชน์ในการประยุกต์ใช้ในเชิงพาณิชย์และการอนุรักษ์สายพันธุ์ในจังหวัดชลบุรี

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน ดร. ขวัญชญาณิศา มาชะนา

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2561 ถึงวันที่ 25 กุมภาพันธ์ 2563

ระยะเวลาดำเนินการ 1 ปี 5 เดือน

รายรับ

งวดที่ 1 (50%)454,100.....	บาท	เมื่อวัน เดือน ปี.....มกราคม 2562.....
งวดที่ 2 (40%)363,300.....	บาท	เมื่อวัน เดือน ปี.....พฤษภาคม 2562.....
งวดที่ 3 (10%)90,800.....	บาท	เมื่อวัน เดือน ปี.....กุมภาพันธ์ 2563.....
รวม908,200.....	บาท	

รายจ่าย

รายการ	งบประมาณ ที่ตั้งไว้	งบประมาณที่ ใช้จริง	จำนวนเงิน คงเหลือ/เกิน
1. ค่าตอบแทน	90,800	90,800	0
2. ค่าจ้าง	-	-	0
3. ค่าวัสดุ 1. สำหรับการสกัด (ethanol, hexane, acetronitril, nylon membrane, beaker, flask, test tube, vial, pipette, tip, syringe,) 35,000 2. สารมาตรฐาน carotenoids, astaxanthin, fucoxanthin และสารมาตรฐาน fatty acid (HPLC grade) อุปกรณ์และค่าวิเคราะห์ GC-MS อื่นๆ 190,000 3. วัสดุอุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์ความแตกต่างของเซลล์จุลสำหรับรายชนิดต่างๆ ด้วยเทคนิค FTIR-microspectroscopy (น้ำกลั่น, NaCl, สไลด์ BaF ₂ เป็นต้น) 100,000 4. สำหรับสกัดและวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ เช่นชุดสกัดดีเอ็นเอ agarose gel buffer primers 50,000 7. สารเคมีและอุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์ฤทธิ์ Anti-oxidant, Antityrosinase, Antielastase, Anticancer activity 120,000 8. เซลล์ไลน์มะเร็งและเซลล์ไลน์ปกติเพื่อวิเคราะห์ฤทธิ์ anticancer activity 80,000 9. สารเคมีและอุปกรณ์สำหรับทดสอบการตั้งตำรับผลิตภัณฑ์ 20,800 9. ค่าจ้างรับเหมาทำอุปกรณ์ 40,000	649,800	649,800	0

รายการ	งบประมาณ ที่ตั้งไว้	งบประมาณที่ ใช้จริง	จำนวนเงิน คงเหลือ/เกิน
10. วัสดุสำนักงาน (กระดาษหมึกพิมพ์และเครื่องเขียน) 10,000			
11. วัสดุเชื้อเพลิงและหล่อลื่น (ค่าโทรศัพท์ และไปรษณีย์ ใน กิจกรรมงานวิจัย) 2,000			
12. วัสดุคอมพิวเตอร์ เช่น CD-ROM, memory card, card reader 2,000			
4. ค่าใช้สอย	76,800	76,800	0
1. ค่าใช้จ่ายในการเดินทางไปต่างจังหวัด (ชลบุรี-นครราชสีมา) - ค่าเบี้ยเลี้ยง (จำนวน 2 คนๆ ละ 240 บาท x 10 วัน) 4,800 - ค่าที่พัก (จำนวน 2 คนๆ ละ 500 บาท x 30 วัน) 30,000 - ค่าพาหนะชลบุรี-นครราชสีมา (280 กม x 4 บาท x 2 เที่ยว x 4 ครั้ง) 8,960			
2. ค่าซ่อมแซมครุภัณฑ์ 10,000			
3. ค่าจ้างเหมาเตรียมสารสกัดจุลสาหร่าย 10,000			
4. ค่าถ่ายเอกสารและสืบค้นข้อมูล 7,000			
5. ค่าจัดทำรูปเล่ม 6,040			
5. ค่าครุภัณฑ์	-	-	
6. ค่าใช้จ่ายอื่น ๆ			0

รายการ	งบประมาณ ที่ตั้งไว้	งบประมาณที่ ใช้จริง	จำนวนเงิน คงเหลือ/เกิน
ค่าธรรมเนียมอุดหนุนสถาบัน ปี 2562	90800	90800	
รวม	908,200	908,200	0

(.....)

ดร.ขวัญชฎานวิศ มาชะนา

ลงนามหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

บรรณานุกรม

- กาญจนภาชน์ ลีวมโนมนต์ ชัชวีร์ แก้วสุริลิขิต และธิดารัตน์ น้อยรักษา. 2550. สาหร่ายทะเลและหญ้าทะเล บริเวณ
เกาะครามและเกาะใกล้เคียง. โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพ
รัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี, กรุงเทพฯ. 112 หน้า.
- ธิดารัตน์ น้อยรักษา และสุพัชรา ตะเหลบ. 2549. การศึกษาการแพร่กระจายและความชุกชุมของแพลงก์ตอนพืช
บริเวณชายฝั่งทะเลภาคตะวันออก ปี 2548. ทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี
งบประมาณ 2548. 43 หน้า.
- ธิดารัตน์ น้อยรักษา, กาญจนภาชน์ ลีวมโนมนต์ และชัชวีร์ แก้วสุริลิขิต. 2550. ความหลากหลายของสาหร่ายทะเล
บริเวณหมู่เกาะแสมสาร. การประชุมวิชาการทรัพยากรไทย : ประโยชน์แท้แก่มหาชน, พิพิธภัณฑ
ธรรมชาติวิทยาเกาะและทะเลไทย, จังหวัดชลบุรี, 30 ตุลาคม – 5 พฤศจิกายน 2550, หน้า 148-160.
- วรศรา ชื่นอารมณ, อรพิน เกิดชูชื่น และณัฏฐา เลาหกุลจิตต์. 2553. สารต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสาร ฟีนอลิก
ทั้งหมดของสาหร่ายจากทะเล (Suaeda maritime). วิทยาศาสตร์เกษตร. 41(3/1)(พิเศษ): 621-624.
- วิทวัส แจ่มเยี่ยม. 2553. กระบวนการผลิตแก๊สไฮโดรเจนโดยจุลสาหร่าย. วารสารมหาวิทยาลัยทักษิณ. ปีที่ 13,
ฉบับที่ 1. หน้า 68-77
- สรวิศ เผ่าทองสุข. 2543. สาหร่าย: ศักยภาพการวิจัยและพัฒนาเพื่อการใช้ประโยชน์จาก สาหร่ายในประเทศไทย.
เอกสารเผยแพร่ชุดโครงการอุตสาหกรรมสัตว์น้ำ ชุดที่ 2. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย.
- สิริกุล บรรพพงศ์ และ ชัชชัย ศิลปะสุนทร. 2552. รายงานการประชุมหารือ เรื่อง การทบทวนทะเบียนรายการ
สาหร่ายและแพลงก์ตอนพืชในประเทศไทย. 64 หน้า. พิมพ์ครั้งแรก
- สุภัทรวนิช แสงดี. 2549. ลายพิมพ์ดีเอ็นเอและปริมาณบีตา-แคโรทีนและเคอร์ซีทีนในสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก
Chlorella spp. และ *Scenedesmus* spp. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุล
ชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. ISBN 974-14-
2604-6.
- อัจฉราภรณ์ เปี่ยมสมบูรณ์, ชลธยา ทรงรูป และ ชูวงศ์ ตมิศานนท์. 2545. สาหร่ายหน้าดินขนาดเล็กในป่าชายเลน
และระบบนิเวศชายฝั่ง (Benthic microalgae in mangrove and coastal ecosystems). โครงการ
ศึกษาวิจัย เพื่ออนุรักษ์ พัฒนาและติดตามการใช้ประโยชน์ทรัพยากรธรรมชาติชายเลน. สำนักงาน
คณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.
- อนุวัฒน์ นทีวัฒนา. 2551. รายงานผลการดำเนินงาน สำนักอนุรักษ์ทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง 2550. สำนัก
อนุรักษ์ทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง. ISBN 978-974-286-286-2.

- อรพรรณ เสลามาศสกุล, ภัฏฐา เลาทกุลจิตต์, อรพิน เกิดชูชื่น, และ ปนิตา บรรจงสินศิริ. 2553. การผลิตซอสปรุงรสจากโปรตีนไฮโดรไลเซตสาหร่ายจากการไฮโดรไลซ์ด้วยกรด (Production of Seasoning Sauce from Acid-Seaweed Protein Hydrolysate). ว. วิทย์. กษ. 41(3/1)(พิเศษ): 697-700
- เอกพล รัตนพันธ์. 2550. ความหลากหลายชนิดของไดอะตอมสกุล *Chaetoceros* บริเวณหมู่เกาะเสมสาร จังหวัดชลบุรี. วทิ ยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์.
- อิสระวัฒน์ ฤทธนพงศธร และ เฉลิม เรื่องวิริยะชัย. 2556. การแยกสารประกอบฟีนอลิกและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจากผลสุบุดำดิบ. วิชากำร Veridian E-Journal. 6(3): 887-902.
- Bruhlmann C, Marston A, Hosteltmann K, Carrupt PA, Testa B. 2004 Screening of Non-Alkaloidal Natural Compounds as Acetylcholinesterase Inhibitors. Chemistry and Biodiversity. 1: 819-829.
- Burja A.M., Tamagnini P., Bustard L.S., Wright P.C. 2001. Identification of the green algae, *Chlorella vulgaris* (SDC1) using cyanobacterial derived 16S rDNA primer: targeting the chloroplast. FEMS Microbiol. Lett. 202: 195-203.
- Chankaew W, Penpapi P, Pood-ngam J and Luaelae W. 2018. Phycobiliprotein, Polyphenol contents and Antioxidation Activity of Two Red Algae, *Compsopogon coeruleus* Montagne and *Sirodotia suecica* Kylin. KHON KAEN AGR. J. 46 SUPPL. 1: 279-285.
- Dean AP, Sigee DC, Estrada B, Pittman JK. 2010. Using FTIR spectroscopy for rapid determination of lipid accumulation in response to nitrogen limitation in freshwater microalgae. Bioresource Technology 101. 4499-4507
- Duygu DY, Udoh AU, Ozer T, Akbulut A, I Erkaya AI, Yildiz K and Guler D. 2012 Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy for identification of *Chlorella vulgaris* Beijerinck 1890 and *Scenedesmus obliquus* (Turpin) Kützing 1833. African Journal of Biotechnology 11 (16), pp. 3817-3824.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., and Featherstone, R.M. 1961. A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity. Biochemical Pharmacology. 7: 88-95
- Galhano, V., Figueiredo, D., Alves, A., Correia, A., Pereira, M., Gomes-Laranjo, J., Peixoto, F. 2011. Morphological, biochemical and molecular characterization of *Anabaena*,

- Aphanizomenon and Nostoc strains (Cyanobacteria, Nostocales) isolated from Portuguese freshwater habitats. *Hydrobiologia*. 663 (1): 187-203.
- Guedes AC, Amaro HM and Malcata FX. 2011. Microalgae as Sources of Carotenoids. *Mar. Drugs*, 9, 625-644.
- Giordano M, Kansiz M, Heraud P, Beardall J, Wood B and McNaughton D. (2001) Fourier transform infrared spectroscopy as a novel tool to investigate changes in intracellular macromolecular pools in the marine microalga *Chaetoceros muellerii* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.* 37, 271–279.
- Goiris K, Muylaert K, Fraeye I, Foubert I. 2012. Antioxidant potential of microalgae in relation to their phenolic and carotenoid content. *J. Applied Phyco.* 24: 1477-1486. DOI 10.1007/s10811-012-9804-6
- Han, D., Fan, Y., Hu, Z. 2009. An evaluation of four phylogenetic markers in Nostoc: Implications for cyanobacterial phylogenetic studies at the intrageneric level. *Curr Microbiol.* 58: 170-176.
- Holman HY, Martin MC, Blakely EA, Bjornstad K, McKinney WR. 2000. IR spectroscopic characteristics of cell cycle and cell death probed by synchrotron radiation based Fourier transform IR spectromicroscopy. *Biopolymers.*;57(6):329-35.
- Horton RB, Duranty E, McConico M, Vogt F. 2011 .Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy and improved principal component regression (PCR) for quantification of solid analytes in microalgae and bacteria. *Appl Spectrosc.* 65(4):442-53.
- Heraud, P., Wood, B.R., Tobin, M.J., Beardall, J., McNaughton, D. 2005. Mapping of nutrient-induced biochemical changes in living algal cells using synchrotron infrared microspectroscopy. *FEMS Microbiol Lett.* 249 (2): 219-25.
- Hemalatha A., Girija K., Parthiban C., Saranya C. and Anantharaman P. 2013. Antioxidant properties and total phenolic content of a marine diatom, *Navicula clavata* and green microalgae, *Chlorella marina* and *Dunaliella salina*. *Advances in Applied Science Research*, , 4(5): 151-157.

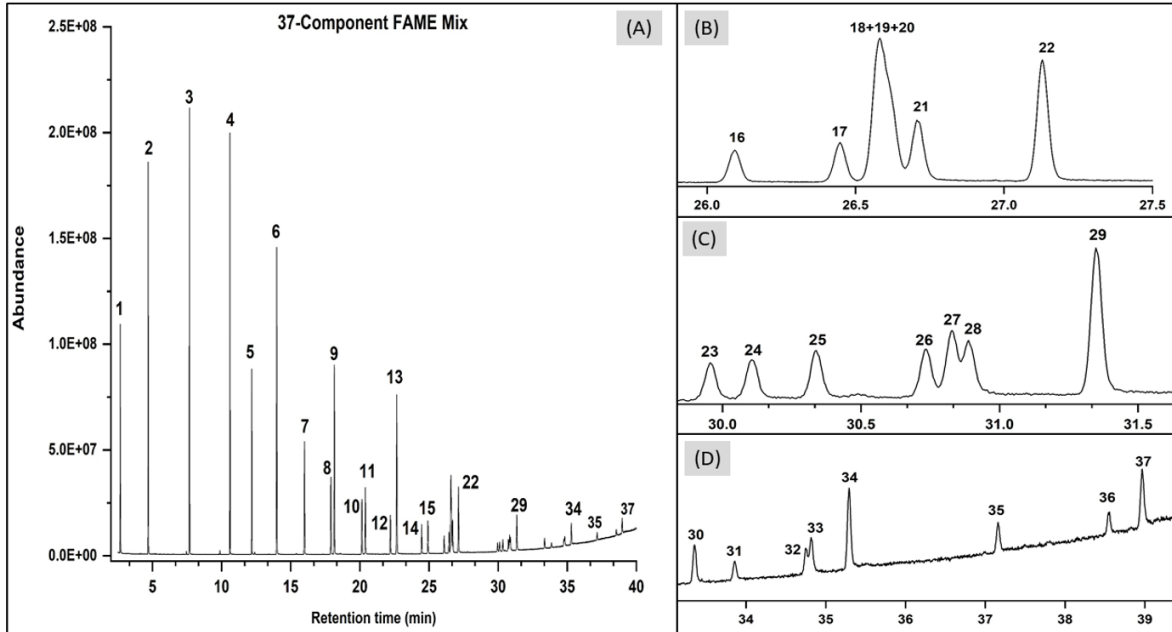
- Kim SK and Wijesekara I. 2010. Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review. *J. Funct. Foods*, 2, 1–9.
- Kulshreshtha A, Zacharia AJ, Jarouliya U, Bhadauriya P, Prasad GB, Bisen PS. 2008. Spirulina in health care management. *Curr Pharm Biotechnol*. 9(5):400-5.
- Jung MH, Lee SS, Kim HA and Hwan HJ. 2018. Comparative Study on the Effects of Six Species of Microalgae Extracts on Hair Loss Prevention and Scalp Improvement. *Journal of Life Science* 2018 Vol. 28. No. 3. 345~350.
- Kamalanathan M, Chiu MH, Bacosa H, Schwehr K, Tsai SM, Doyle S, Yard A, Mapes S, Vasequez C, Bretherton L, Sylvan JB, Santschi P, Chin WC, and Quigg A. 2019. Role of Polysaccharides in Diatom *Thalassiosira pseudonana* and its Associated Bacteria in Hydrocarbon Presence. *Plant Physiology*, Vol. 180, pp. 1898–1911,
- Liu J, Sun Z, Gerken H, Liu Z, Jiang Y, Chen F. *Chlorella zofingiensis* as an alternative microalgal producer of astaxanthin: biology and industrial potential. *Mar Drugs* 2014;12:3487–3515
- Meksiarun P, Spegazzini N, Matsui H, Nakajima K, Matsuda Y, Sato H. 2015. In Vivo Study of Lipid Accumulation in the Microalgae Marine Diatom *Thalassiosira pseudonana* Using Raman Spectroscopy. *Applied Spectroscopy*. 69(1): 49-51.
- Murdock, J.N. and Wetzel, D.L. (2009). FT-IR Microspectroscopy Enhances Biological and Ecological Analysis of Algae. *Applied Spectroscopy Reviews*. 44 (4)
- Murdock JN, Dodds WK, Reffner JA, Wetzel DL. 2010. Measuring cellular scale-nutrition distribution in algal biofilms with synchrotron confocal infrared microspectroscopy. *Spectroscopy* 25(10): 32-41.
- Nonticha Jamkangwan. 2004. Molecular characterization of cyanobacteria *Synechococcus* sp. And microalgae *Chlorella* spp. And *Scenedesmus* spp. Isolated in Thailand. M.Sc. thesis. Industriail Microbiology Program. Chulalongkorn University.
- Olmos J, Ochoa L, Paniagua-Michel J, Contreras R. 2009. DNA fingerprinting differentiation between beta-carotene hyperproducer strains of *Dunaliella* from around the world. *Saline Systems*. 5:5. doi: 10.1186/1746-1448-5-5.

- Pangestuti R and Kim S.K. 2011. Neuroprotective effects of marine algae. *Mar. Drugs* 9(5), 803-818
- Peng J, Yuan JP, Wu CF, Wang JH. Fucoxanthin, a marine carotenoid present in brown seaweeds and diatoms: metabolism and bioactivities relevant to human health. *Mar Drugs* 2011;9:1806–1828.
- Pinelo, M., M. Rubilar, M. Jerez, J. Sineiro, and M.J. Núñez. 2005. Effect of solvent, temperature, and solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace. *Agricultural and Food Chemistry*. 53: 2111-2117.
- Renaud SM, Thinh LV, Lambrinidis and Parry DL. 2002. Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch culture. *Aquaculture*. 211: 195-214.
- Sian M. La Vars, Martin R. Johnston, John Hayles, Jason R. Gascooke, Melissa H. Brown, Sophie C. Leterme & Amanda V. Ellis. 2013. $^{29}\text{Si}\{^1\text{H}\}$ CP-MAS NMR comparison and ATR-FTIR spectroscopic analysis of the diatoms *Chaetoceros muelleri* and *Thalassiosira pseudonana* grown at different salinities. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (405): 3359–3365
- Singh B, Gautam R, Kumar S, Kumar BN V, Nongthomba U, Nandi D, Mukherjee G, Santosh, V, Somasundaram K, Umamathy, S. (2012) Application of vibrational microspectroscopy to biology and medicine. In: *Current Science (Bangalore)*, 102 (2). pp. 232-244.
- Sivathanu B and Palaniswamy S. 2012. Purification and characterization of carotenoids from green algae *Chlorococcum humicola* by HPLC-NMR and LC-MS-APCI. *Biomedicine & Preventive Nutrition*. 2: Pages 276–282
- Takaichi S. 2011. Carotenoids in Algae: Distributions, Biosyntheses and Functions. *Mar Drugs*. 2011; 9(6): 1101–1118.
- Thumanu, K. Tanthanuch, W., Lorthongpanich, J, Heraud, P and Parnpai, R. (2009) FTIR Microspectroscopic Imaging as a New Tool to Distinguish the Chemical Composition of Mouse Blastocyst. *J. of Mol. Struc.* 933 (1-3): 104-111.

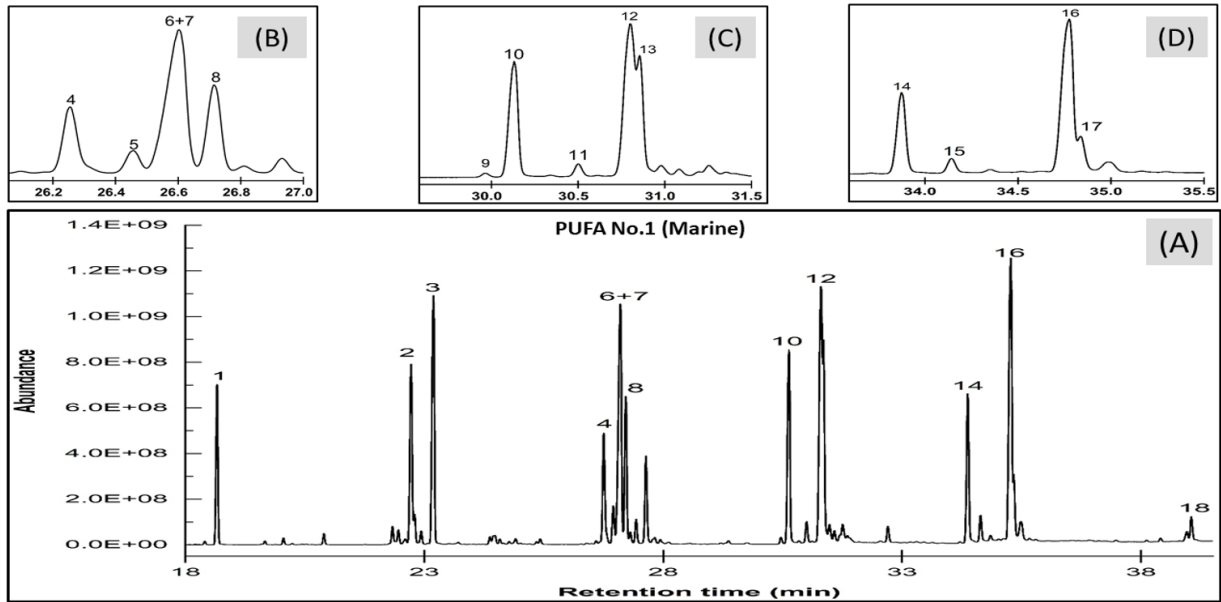
Wagner H, Liu Z, Langner U, Stehfest K, Wilhelm C. 2010. The use of FTIR spectroscopy to assess quantitative changes in the biochemical composition of microalgae. *J Biophotonics*. 3(8-9):557-66.

Yang LL, Zhou QJ, Wang Y, Gao Y, Wang YQ. (2012). Comparison of the therapeutic effects of extracts from *Spirulina platensis* and amnion membrane on inflammation-associated corneal neovascularization. *Int J Ophthalmol*. 5(1):32-7.

ภาคผนวก



แสดง Total Ion Chromatogram (TIC) ของสารมาตรฐาน 37-FAME mix ตามลำดับการแยกด้วยเครื่อง GC-MS โดยชนิดของกรดไขมันเป็นดังตารางที่ S2 ตามลำดับที่แสดงบนพีค โดยรูป (A) แสดง TIC ของทั้งการวิเคราะห์; (B) (C) และ (D) แสดงภาพขยายของ TIC(A) ในแต่ละช่วงเวลาดังค่า retention time ที่ระบุ



แสดง Total Ion Chromatogram (TIC) ของสารมาตรฐาน PUFA No.1 (Marine Source) ตามล าดับการแยก ด้วยเครื่อง GC-MS โดยชนิดของกรดไขมัน เป็นดังตารางที่ S2 ตามล าดับที่แสดงบนพีค โดยรูป (A) แสดง TIC ของทั้งการวิเคราะห์; (B) (C) และ (D) แสดงภาพขยายของ TIC(A) ในแต่ละช่วงเวลาดังค่า retention time ที่ระบุ