รายงานการวิจัย

สารอาหารและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการแปรรูปสาหร่ายก้ามกุ้งแผ่น ที่ผ่านการไฮโดรไลเซท

Nutrients and bioactive compounds in Dried Seaweed Crispy products from hydrolyzed Edible Freshwater algae, Kamkung

อุไรวรรณ วัฒนกุล Uraiwan Wattanakul
วัฒนา วัฒนกุล Wattana Wattanakul
วรรณิณี จันทร์แก้ว Wanninee Chankaew
ผ่องศรี พัฒนมณี Pongsri Pattanamanee

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย
งบประมาณเงินกองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม
ประจำปี พ.ศ. 2563

สารอาหารและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการแปรรูปสาหร่ายก้ามกุ้งแผ่น ที่ผ่านการไฮโดรไลเซท

อุไรวรรณ วัฒนกุล[1] วัฒนา วัฒนกุล[1] วรรณิณี จันทร์แก้ว[2] และ ผ่องศรี พัฒนมณี[1]

บทคัดย่อ

การศึกษาวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาคุณค่าทางโภชนาการ กรดอะมิโน และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสาหร่ายก้ามกุ้ง (*C. corallina*) ก่อนและหลังการนำไปผ่านกรรมวิธีไฮโดรไลเซท โดยวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการ ได้แก่ ความชื้น โปรตีน ไขมัน เยื่อใย เถ้า คาร์โบไฮเดรต ปริมาณฟินอลิก กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ แร่ธาตุ และชนิดกรดอะมิโน ผลการวิจัย พบว่าคุณค่าทางโภชนาการในสาหร่ายดังกล่าวต่อน้ำหนักฐานแห้งปริมาณ 100 กรัม มีปริมาณความชื้นร้อยละ 12.04 ปริมาณโปรตีนร้อยละ 18.76 ปริมาณไขมันร้อยละ 2.32 ปริมาณเถ้าร้อยละ 25.39 ปริมาณเยื่อใยร้อยละ 10.77 ปริมาณคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 41.47 แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH Assay และ ABTS assay เท่ากับ 2.6866 และ 0.1733 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนปริมาณฟินอลิก มีค่าเท่ากับ 2.84 มิลลิกรัมต่อกรัมตัวอย่าง การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากสาหร่ายก้ามกุ้ง โดยการย่อยสลายโปรตีนในสาหร่ายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ (ef-FAPH) ร้อยละ 15 (%w/w ของสาหร่าย) แปรระยะเวลาการย่อยสลาย 0.5, 3, 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง พบว่าการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ร้อยละ 15 ระยะเวลา 24 ชั่วโมง มีปริมาณผลผลิตสูงสุดเท่ากับ 89.10 ปริมาณฟินอลิก และค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ใน ef-FAPH มีค่าสูงกว่าในสาหร่ายเริ่มต้น พบปริมาณกรดอะมิโนในสาหร่าย จำนวน 20 ชนิด มีปริมาณรวมเท่ากับ 61,768 มก./ 100 ก. สูงกว่าในสาหร่ายที่ไม่ผ่านการไฮโดรไลเซท จัดเป็นกรดอะมิโนจำเป็น 10 ชนิด กรดอะมิโนที่พบในปริมาณมาก ได้แก่ อาร์จินีน, กรดแอสพาติก, ไลซีน, ไอโซลูซีน, กลูตามีน, อะลานีน และโพรลีน ตามลำดับ ไม่พบกรดอะมิโนทริปโตเฟน กับไฮดรอกซีโพรลีน ส่วนปริมาณแร่ธาตุเหล็กและแคลเซียมใน ef-FAPH มีค่าสูงกว่าในสาหร่ายที่ไม่ไฮโดรไลเซท เมื่อนำมาแปรรูปเป็นสาหร่ายแผ่นปรุงรส พบว่า สูตรที่ 1 มีแนวโน้มให้คุณค่าทางโภชนาการดีที่สุด

คำสำคัญ : สารอาหาร สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ สาหร่ายก้ามกุ้ง (*C. corallina*) การไฮโดรไลเซท

[1]คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย อ.สิเกา จ.ตรัง
[2]คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตนครศรีธรรมราช จ.นครศรีธรรมราช

Nutrients and bioactive compounds in Dried Seaweed Crispy products from hydrolyzed Edible Freshwater algae, Kamkung

Uraiwan Wattanakul[1] Wattana Wattanakul[1]
Wanninee Chankaew[2] and Pongsri Pattanamanee[1]

Abstract

This research aims to study nutritional values, amino acids profiles and radical scavenging activity of edible freshwater algae; Kamkung before and after hydrolyzed processing. Nutritional values analyzed including moisture content, protein content, lipid content, ash content, fiber, carbohydrate, phenolic compound, radical scavenging activity, mineral and amino acid profiles. The results showed that freshwater algae; Kamkung amount 100 grams dry weight had percentage of moisture content, protein, lipid, ash content, fiber and carbohydrate were 12.04, 18.76, 2.32, 25.39, 10.77 and 41.47, respectively. Antioxidant activity by DPPH Assay and ABTS assay showed 2.6866 and 0.1733 mg/ml., respectively. The phenolic content was 2.84 mg per gram sample. Enzymatic flavourzyme of freshwater algae (Kamkung) protein hydrolysate (ef-FAPH) were hydrolyzed by enzyme concentrate at 15% (w/w of algae) and hydrolysated times at 0.5, 3, 6, 12, 18 and 24 hours. The results showed that the optimum hydrolysis condition to produced ef-FAPH with the highest percentage of yield (%Y) was 89.10. Total phenolic compounds and radical scavenging activity in ef-FAPH were higher than freshwater algae before hydrolyzed. Amino acids were found in 20 types with total content of 61,768 mg/100 g, higher than that unhydrolyzed algae. It was classified as 10 essential amino acids. Highly quantities included arginine, aspartic acid, lysine, isoleucine, glutamine, alanine and proline, respectively. Tryptophan and hydroxyproline was not found in ef-FAPH sample. The iron and calcium content of ef-FAPH were higher than non-hydrolyzated algae. The formular of dried algae crispy products was found likely to provide the best nutritional value.

Keywords : Nutrients, bioactive compounds, freshwater algae (Kamkung), hydrolyzed

[1]Faculty of Science and Fisheries Technology, Rajamangala University of Techonology Srivijaya, Sikao, Trang
[2]Faculty of Agriculture, Rajamangala University of Techonology Srivijaya, Nakhonsrithammarach

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจาก มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย งบประมาณเงินกองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม ประจำปี 2563 งานวิจัยนี้ เป็นแนวทาง เพื่อนำสาหร่ายก้ามกุ้ง (*Chara corollina*) ที่ทำการเพาะเลี้ยงแบบอินทรีย์ มาทำการศึกษาใน 2 รูปแบบ ได้แก่ การนำสาหร่ายมาดัดแปลงรูปแบบโครงสร้าง เพื่อลดข้อด้อยของสาหร่ายชนิดนี้ ที่อาจส่งผลต่อความสามารถในการย่อย และการดูดซึม ทำให้การใช้ประโยชน์จากสารอาหารในสาหร่ายเกิดได้ดีขึ้น ด้วยการนำมาผลิตเป็นโปรตีนไฮโดรไลเซท และศึกษาคุณค่าทางอาหารที่เกิดขึ้น รวมทั้งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง และการนำสาหร่ายที่ผ่านการไฮโดรไลเซทมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์สาหร่ายแผ่นปรุงรส เพื่อศึกษาสารอาหาร สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ยังคงหลงเหลืออยู่ รวมถึงการคงสภาพของสารเหล่านั้น ในรูปแบบของผลิตภัณฑ์อาหารว่าง คาดว่าผลการวิจัยเบื้องต้นจะนำไปสู่การพัฒนาการใช้ประโยชน์จากสาหร่ายชนิดนี้เพิ่มมากขึ้นทั้งในอาหารหารมนุษย์ หรือ อาหารสัตว์น้ำ เพื่อส่งเสริมอาชีพการเลี้ยงสาหร่ายและการใช้ประโยชน์เชิงพาณิชย์ได้อย่างกว้างขวางขึ้น

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย ที่ได้ให้การสนับสนุนทุนในการทำวิจัยนี้ ขอขอบคุณผู้เกี่ยวข้องทุกฝ่ายที่ได้ให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ ทั้งความสะดวกในการใช้อุปกรณ์และเครื่องมือวิเคราะห์ ตลอดจนสถานที่ในการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่าง ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการที่ให้การช่วยเหลืออำนวยความสะดวกด้วยดีตลอดมา ขอขอบคุณผู้ร่วมวิจัยที่อุทิศกำลังกายและกำลังใจช่วยในการวิจัยครั้งนี้ลุล่วงได้ด้วยดี ตลอดจนครอบครัวและผองเพื่อนที่ให้ความห่วงใย เป็นกำลังใจให้เสมอมา ความดีของรายงานฉบับนี้ ขอมอบแด่ อาจารย์ทุกท่านที่ได้คอยประสิทธิ์ประสาทวิชาการให้แก่ข้าพเจ้า ประโยชน์อันใดที่เกิดจากงานวิจัยนี้ย่อมเป็นผลมาจากความกรุณาของท่านและหน่วยงาน ผู้วิจัยจึงใคร่ขอขอบพระคุณมา ณ โอกาสนี้

อุไรวรรณ วัฒนกุล
วัฒนา วัฒนกุล
วรรณิณี จันทร์แก้ว
ผ่องศรี พัฒนมณี
มกราคม 2564

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย	ช
บทนำ	1
วิธีดำเนินการวิจัย	14
ผลการวิจัยและวิจารณ์	20
สรุปผลการวิจัย	35
บรรณานุกรม	37
ภาคผนวก	41
ภาคผนวก ก ภาพการวิเคราะห์ค่าต่างๆ	42
ภาคผนวก ข วิธีการวิเคราะห์ค่าต่างๆ	55

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

1	ส่วนผสมของผลิตภัณฑ์สาหร่ายก้ามกุ้งแผ่นปรุงรสจำนวน 3 สูตร	19
2	องค์ประกอบทางเคมีในสาหร่ายน้ำจืด ก้ามกุ้ง *Chara corollina* อบแห้ง	22
3	ปริมาณผลผลิต ระดับการย่อยสลายและปริมาณโปรตีนในสาหร่ายก้ามกุ้ง (*C. corollina*) ที่ผ่านการไฮโดรไลเซตด้วยเอนไซม์ Flavourzyme เข้มข้นร้อยละ 15	24
4	องค์ประกอบทางเคมีในสาหร่าย *Chara corollina* ที่ผ่านการไฮโดรไลเซทด้วยเอนไซม์ Flavourzyme เข้มข้นร้อยละ 15	24
5	สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในสาหร่ายก้ามกุ้ง (*C. corollina*) ที่ผ่านการไฮโดรไลเซตด้วยเอนไซม์ Flavourzyme เข้มข้นร้อยละ 15	26
6	ปริมาณกรดอะมิโนในสาหร่ายก้ามกุ้ง และสาหร่ายก้ามกุ้งที่ผ่านการไฮโดรไลเซท	31
7	องค์ประกอบทางเคมีในสาหร่ายก้ามกุ้งแผ่นปรุงรส	33
8	สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในสาหร่ายก้ามกุ้งแผ่นปรุงรส	34

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	สาหร่ายไฟชนิดสาหร่ายก้ามกุ้ง (*Chara corallina*)	2
2	สาหร่ายก้ามกุ้ง	20

ภาพผนวกที่		หน้า
1	การเตรียมตัวอย่างสาหร่าย *Chara corollina*	43
2	การเตรียมตัวอย่างสาหร่าย *Chara corollina* (ต่อ)	44
3	การเตรียมตัวอย่างสาหร่าย *Chara corollina* (ต่อ)	45
4	การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากสาหร่าย *Chara corollina* ด้วยเอนไซม์ Flavourzyme	46
5	สาหร่ายแผ่นปรุงรสจากสาหร่าย *Chara corollina*	47
6	การวิเคราะห์ปริมาณเยื่อใยในสาหร่าย *Chara corollina*	48
7	การวิเคราะห์ปริมาณไขมันในสาหร่าย *Chara corollina*	49
8	การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในตัวอย่างสาหร่าย *Chara corollina*	50
9	การวิเคราะห์ปริมาณเถ้าและปริมาณความชื้นในตัวอย่างสาหร่าย *Chara corollina*	51
10	การวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์และปริมาณฟินอลิก ในตัวอย่างสาหร่าย *Chara corollina*	52
11	การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างสาหร่าย *Chara corollina*	53
12	การวิเคราะห์ค่าต่างๆในสาหร่าย *Chara corollina*	54

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

ก.	=	กรัม
กก.	=	กิโลกรัม
ชม.	=	ชั่วโมง
ซม.	=	เซนติเมตร
มล.	=	มิลลิลิตร
มม.	=	มิลลิเมตร
มก./ก.	=	มิลลิกรัมต่อกรัม
%	=	เปอร์เซ็นต์
A	=	Absorbance
ABTS	=	2, 2’ –Azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)
AOAC	=	Association of Official Analytical Chemists
$^{\circ}$C	=	degree Celsius
CRD	=	Analysis of Variance in Completely Randomized Design
DMRT	=	Duncan’s New multiple range test:
DPPH	=	2,2-dipheyl-l-picrylhydrazl
g	=	grams
Kg	=	kilograms
IC50	=	Inhibitory concentration at 50%
N	=	Normal
µl	=	microliter
µg/ml	=	micrograms/ milliliter
HPLC	=	High Performance Liquid Chromatography
M	=	Molar
ml	=	milliliter
mg/g	=	milligrams/grams
mg/ml	=	milligrams/ milliliter
mg/100g	=	milligrams/100 grams
mM	=	millimolar
mM/g	=	millimolar/grams
mgGAE/100g	=	milligrams Gallic/100 grams
mgCE	=	milligrams Catechin
nm	=	nanometre
pH	=	Potential of Hydrogen ion
ppm	=	Part Per Million

บทนำ

สาหร่ายก้ามกุ้ง (*Chara corallina*)

การจำแนกหมวดหมู่

สาหร่ายไฟชนิดสาหร่ายก้ามปู จัดอนุกรมวิธานตาม John *et al*., (2002) ได้ดังนี้

Division Charophyta
Class Charophyceae
Order Charales
Family Characeae
Genus *Chara*
Specices *corallina*

สาหร่ายก้ามกุ้ง จัดอยู่ในกลุ่มสาหร่ายไฟ มีความใกล้เคียงกับพืชชั้นสูงมาก มีส่วนที่เป็นข้อ (node) และปล้อง (internode) ชัดเจน เป็นสาหร่ายเจริญเติบโตในน้ำจืด มีไรซอยด์ยึดเกาะอยู่กับพื้น ซึ่งอาจเป็นดินหรือทราย พบได้ในแหล่งน้ำตื้นๆ หรือริมฝั่ง คู คลอง หนอง บึง ซึ่งมีน้ำท่วมถึงและไม่ลึกมาก พบบ่อยในบ่อเลี้ยงปลาน้ำตื้น มีพื้นที่เป็นดินโคลน มีการปลูกพืชน้ำ เช่น บัว หรือบางครั้งอาจพบในนาข้าวช่วงที่น้ำยังท่วม บางครั้งจึงถูกจัดเป็นวัชพืช (ยุวดี, 2546) ลักษณะสำคัญของสาหร่ายในดิวิชั่นนี้ มีดังนี้

(๑) มีรงควัตถุและอาหารสะสมตลอดจนคลอโรพลาสต์ เช่นเดียวกับสาหร่ายสีเขียว คือ มีคลอโรฟิลล์เอ และคลอโรฟิลล์บี รวมถึง แคโรทีนอยด์ ซึ่งประกอบด้วย แคโรทีนและแซนโธฟิลล์ อาหารสะสมจะเก็บไว้ในรูปแป้งชนิดต่างๆ

(๒) ลักษณะทั่วไป ทัลลัสของสาหร่ายชนิดนี้ลู่ไปตามน้ำอาจจะสั้นหรืออาจจะยาวกว่า 1 เมตร ปล้องประกอบด้วยเซลล์เพียงเซลล์เดียวเรียกว่า เซลล์กลาง (central cell) ที่ยืดยาวออก ส่วนของข้อนั้นจะมีหลายเซลล์มาล้อมรอบเซลล์กลาง เรียกเซลล์ที่มาล้อมรอบนี้ว่า เซลล์เพอริเซนทรัล (pericentral cell) หรือ เซลล์ปล้อง (nodal cell) ในสกุล *Chara* จะมีคอร์ติเคชัน (cortication) โดยเซลล์ข้อจะยืดยาวออกโดยเจริญไปด้านบนครึ่งหนึ่งลงมาด้านล่างครึ่งหนึ่งหุ้มส่วนที่เป็นข้อไว้ ทำให้ปล้องมีลักษณะเป็นลอน เรียกเซลล์เหล่านี้ว่า เซลล์คอร์ติเคติง (corticating cell) ซึ่งเซลล์คอร์ติเคติงนี้เกิดในแขนงย่อยด้วย บริเวณที่เซลล์คอร์ติเคติงมาบรรจบกัน อาจมีติ่งเล็ก เกิดขึ้นเรียกว่า เซลล์หนาม (spine cell) ในสกุล *Chara* มีแขนงย่อยแตกออกจากแกนกลางเป็นวงโดยรอบ ลักษณะคล้ายใบรองรับแขนงที่แตกออกมา โดยอาจจะมีแถวเดียวหรือ 2 แถว บางแถวสั้น บางแถวยาว แล้วแต่สปีชีส์

ภาพที่ 1 สาหร่ายไฟชนิดสาหร่ายก้ามกุ้ง (*Chara corallina*)

องค์ประกอบทางเคมีในสาหร่ายทั่วไป

คาร์โบไฮเดรต

สาหร่าย ประกอบด้วยสารพอลิแซคคาไรด์จำนวนมาก โดยส่วนใหญ่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ ซึ่งมีการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตไฮโดรคอลลอยด์ สารพอลิแซคคาไรด์นี้ ไม่สามารถย่อยได้ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ จึงเรียกว่า dietary fibres (Lahaye *et, al*., 1991) สารพอลิแซคคาไรด์ที่พบรองลงมาคือ ulvans ในสาหร่ายสีเขียว จากการเปรียบเทียบปริมาณคาร์โบไฮเดรตและเยื่อใย (fiber) ของสาหร่ายกับพืชอาหารทั่วไป พบว่าสาหร่ายมีปริมาณเยื่อใยที่ละลายน้ำ (suluble fiber) และเยื่อใยที่ไม่ละลายน้ำ (insoluble fiber) สูงกว่าพืชอาหารทั่วไปบางชนิด (Burtin, 2003; MacArtain *et,al.,* 2007)

โปรตีน

สาหร่ายมีปริมาณโปรตีนมาก ประมาณร้อยละ 5-15 ของน้ำหนักแห้ง ซึ่งปริมาณโปรตีนและกรดอะมิโนแตกต่างกันไปตามฤดูกาล และสายพันธุ์ โดยเฉพาะกรดอะมิโนกลูตามิกและแอสปาร์ติกสามารถพบได้ในสาหร่ายเกือบทุกสายพันธุ์ พบมากที่สุดในสาหร่ายสีน้ำตาลรองลงมาคือสาหร่ายสีแดง กรดอะมิโนทั้งสองชนิดนี้มีบทบาทในการเสริมรสชาติทำให้เกิดรสอร่อย หรือ รสอุมามิ ส่วนกรดอะมิโนที่จำเป็นที่พบในสาหร่าย ได้แก่ ฮิสติดีน ลิวซีน ไอโซลินซีน และ วาลีน แต่พบ ซิสทิอีนในปริมาณต่ำ (Fleurence, 1999)

ไขมัน

สาหร่ายประกอบด้วยไขมันเพียงร้อยละ 1-5 ของน้ำหนักแห้ง กรดไขมันที่พบในสาหร่ายมีทั้งกรดไขมันอิ่มตัว (saturated monounsaturated) และกรดไขมันไม่อิ่มตัว (polyunsaturated fatty acid) ในอัตราส่วนต่างกัน โดยกรดไขมันอิ่มตัวที่พบมากที่สุดคือ กรดปาล์มิติก รองลงมาคือกรดไมริสติก (myristic acid) กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยวที่พบมากในสาหร่ายคือกรดโอเลอิก ส่วนกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนที่พบส่วนใหญ่อยู่ในรูปกรดไขมันสายยาวมีมากถึงร้อยละ 90 ของกรดไขมัน

ทั้งหมด และไม่พบกรดไขมันสายสั้นในสาหร่ายแต่ละสายพันธุ์ นอกจากนี้สาหร่ายยังประกอบด้วยกรดไขมันจำเป็นเช่น omega-3 และ omega-6 มีสมบัติในการป้องกันโรคเส้นเลือดหัวใจอุดตัน โรคไขข้ออักเสบ และโรคเบาหวาน ในสาหร่ายสีเขียวพบในรูป alpha linolenic acid ส่วนในสาหร่ายสีแดงและสีน้ำตาล พบอยู่ในรูปของ eicosapentanoic acid และ arachidonic acid (Burtin, 2003; MacArtain *et, al*., 2007)

แร่ธาตุและวิตามิน

สาหร่ายประกอบด้วยแร่ธาตุที่สำคัญหลายชนิด ได้แก่ แคลเซียม โปแตสเซียม แมกนีเซียม โซเดียม คอปเปอร์ เหล็ก ไอโอดีน และสังกะสี โดยเฉพาะแคลเซียมและไอโอดีน มีปริมาณมากกว่าพืชอาหารทั่วไป ปริมาณของแร่ธาตุนี้ขึ้นกับสิ่งแวดล้อมและสายพันธุ์ สาหร่ายบางชนิดมีปริมาณแร่ธาตุถึงร้อยละ 36 ของน้ำหนักแห้ง ทั้งนี้ไอโอดีนและแมกนีเซียมเป็นแร่ธาตุที่สำคัญพบมากในสาหร่ายสีน้ำตาล จึงนำสาหร่ายสีน้ำตาลมาใช้ในการรักษาโรคไทรอยด์ (Suzuki *et, al*., 1965) สาหร่ายยังเป็นแหล่งของแคลเซียมที่ดี เนื่องจากปริมาณแคลเซียมในสาหร่ายสูงถึงร้อยละ 7 ของน้ำหนักแห้ง และอาจมากกว่าในสาหร่ายบางชนิด (Burtin, 2003)

วิตามินที่พบในสาหร่ายได้แก่ วิตามิน B1, B2, B3, B6, B8, B9, B12, วิตามินซี และวิตามินอี อาจมีปริมาณแตกต่างกันในสาหร่ายแต่ละสายพันธุ์ วิตามินซีมีสมบัติช่วยให้ระบบภูมิคุ้มกันดีขึ้น ช่วยดักจับอนุมูลอิสระ และเสริมสร้างการสร้างวิตามินอี ส่วนวิตามินอีมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระพบมากที่สุดในสาหร่ายสีน้ำตาล โดยพบในรูปแอลฟา (alpha), เบต้า (beta) และแกมมา (gamma) โทโคเฟอรอล (tocopherol) ซึ่งช่วยในการป้องกันการเกิดโรคเส้นเลือดหัวใจอุดตัน (Burtin, 2003) ส่วนวิตามินบี 12 ช่วยป้องกันการแก่ของเซลล์ ใช้รักษาโรคอ่อนเพลียเรื้อรัง และมะเร็งเม็ดเลือดขาว สาหร่ายได้ชื่อว่าเป็นแหล่งของวิตามินบี (MacArtain *et, al*., 2007)

สารอาหารที่สำคัญในสาหร่ายน้ำจืด ก้ามกุ้ง

จากการตรวจสอบคุณค่าทางโภชนาการและสารอาหารเบื้องต้นในสาหร่ายก้ามกุ้ง (ยังไม่ได้ตีพิมพ์เผยแพร่) พบว่า มีสารอาหารสำคัญที่น่าจะนำไปพัฒนาเพื่อการใช้ประโยชน์ได้ ดังนี้

องค์ประกอบทางเคมีในสาหร่ายก้ามกุ้งน้ำหนักแห้ง ได้แก่ ความชื้น เถ้า โปรตีน ไขมัน เยื่อใย และคาร์โบไฮเดรต มีค่าเท่ากับร้อยละ 14.15, 24.95, 19.55, 2.54, 7.29 และ 38.82 ตามลำดับ มีค่าพลังงานทั้งหมด เท่ากับ 238.71 กิโลแคลอรี เป็นที่น่าสนใจว่าสาหร่ายน้ำจืดชนิดนี้มีปริมาณโปรตีนค่อนข้างสูง เมื่อนำสาหร่ายก้ามกุ้งน้ำหนักแห้งมาวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโน พบว่ามีกรดอะมิโนทั้งชนิดที่เป็นกรดอะมิโนจำเป็น และกรดอะมิโนไม่จำเป็น รวมถึงอนุพันธ์ของกรดอะมิโน รวมทั้งสิ้น 20 ชนิด ได้แก่ กรดอะมิโนอาร์จินีน ฮีสติดีน ไอโซลิวซีน ลิวซีน ไลซีน เมทไธโอนีน ฟีนิลอะลานีน ทรีโอนีน ทริปโตเฟน วาลีน อะลานีน กรดแอสพาติก กรดกลูตามิก ไกลซีน โพรลีน เซรีน ไทโรซีน ซีสตีน กลูตามีน และ ไฮดรอกซีโพรลีน ผลที่ได้มีความน่าสนใจ คือ มีปริมาณกรดอะมิโนจำเป็น ในสัดส่วนที่มากกว่ากรดอะมิโนไม่จำเป็น เท่ากับ 1.63 เท่า ส่วนปริมาณกรดไขมัน พบว่า มีกรดไขมันในกลุ่มโอเมก้า 3 สูงกว่ากรดไขมันในกลุ่มโอเมก้า 6 ถึงประมาณ 4 เท่า ทั้งนี้กรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่ตำแหน่งเดียว (MUFAs) มีปริมาณต่ำกว่ากรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีหลายพันธะ (PUFAs) อีกทั้งสาหร่ายก้ามกุ้งจัดในกลุ่มสาหร่ายน้ำจืดสีเขียว ดังนั้นการนำมาวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์

พบว่ามีปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ (chlorophyll A) เท่ากับ 2.931±0.16 มก/ก.น้ำหนักแห้ง และมีปริมาณแคโรทีนอยด์ (carotenoids) เท่ากับ 0.408±0.04 มก/ก ของน้ำหนักแห้ง ส่วนแร่ธาตุ มีทั้งแร่ธาตุหลัก ซึ่งร่างกายต้องการในปริมาณมาก และแร่ธาตุรองซึ่งร่างกายต้องการในปริมาณน้อย ดังนี้ แคลเซียม (Ca), โปตัสเซียม (K) แมงกานีส (Mn), แมกนีเซียม (Mg), โซเดียม (Na), เหล็ก (Fe), สังกะสี (Zn),ซีลีเนียม (Se) คลอไรด์ (Cl) และทองแดง (Cu) โดยเฉพาะสาหร่ายชนิดนี้ มีปริมาณแต่ธาตุที่สำคัญในปริมาณสูงมาก ได้แก่ Ca, K, Mn และ Fe

โปรตีนไฮโดรไลเซท (Hydrolysate Vegetable Protein, HVP)

Hydrolysate Vegetable Protein (HVP) หรือ Hydrolysed Plant Protein (HPP) คือ สารปรับปรุงและเสริมกลิ่นรสที่นำมาใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารอย่างกว้างขวาง เป็นผลิตภัณฑ์ซึ่งได้จากปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสโปรตีนจากพืช ด้วยกรด ด่างหรือ เอนไซม์ ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ HVP ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนเพปไทด์และสารประกอบอื่น เนื่องจากองค์ประกอบทางเคมีของ HVP คล้ายคลึงกับสารประกอบที่เกิดขึ้นในระหว่างการหุงต้มเนื้อ ทำให้ HVP มีสมบัติในการปรับปรุงและเสริมกลิ่นรสของผลิตภัณฑ์อาหารประเภทเนื้อสัตว์ การใช้ HVP เป็นสารปรุงแต่งอาหารเริ่มต้นครั้งแรกในทวีปเอเชีย ได้แก่ ประเทศญี่ปุ่น จีนและอินโดนีเซีย ซึ่งใช้วิธีการหมักเพื่อถนอมอาหารและปรับปรุงรสชาติของอาหารที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบ ที่รู้จักกันดีคือ ซอสถั่วเหลือง แต่วิธีการหมักใช้เวลานาน จึงใช้วิธีการไฮโดรไลซ์ด้วยสารเคมี ได้แก่ กรดไฮโดรคลอริก แทนการหมัก (Olsman, 1979) แหล่งของโปรตีนต่างชนิดกันให้ HVP ที่มีสมบัติในการให้กลิ่นรสหรือเสริมกลิ่นรสของอาหารแตกต่างกัน

ชนิดของการย่อยสลายโปรตีน

กลิ่นรสของ HVP ที่ได้ขึ้นกับชนิดของวัตถุดิบ องค์ประกอบของกรดอะมิโนในโปรตีนนั้นและกระบวนการผลิต (Aaslyng *et, al*., 1999) การผลิตทั่วไปมี 2 วิธี ได้แก่ การย่อยสลายด้วยสารเคมี และการย่อยสลายด้วยเอนไซม์

ก. การย่อยสลายด้วยกรด

กระบวนการผลิต HVP โดยย่อยสลายด้วยกรดเป็นที่นิยมอย่างกว้างขวาง เนื่องจากมีกระบวนการทำง่าย ได้ ผลผลิตจำนวนมาก และมีกลิ่นรสที่แรง เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค (Nagodawithana, 1994) กรดที่นิยมใช้ได้แก่ กรดไฮโดรคลอริก และกรดซัลฟูริก กระบวนการผลิต HVP โดยย่อยสลายด้วยกรด ส่วนใหญ่ได้จากไฮโดรไลซ์แหล่งโปรตีนจากพืชด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 4-6 นอร์มัล ที่อุณหภูมิ 100-130 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-24 ชั่วโมงจากนั้นทำให้เป็นกลางด้วยสารละลายด่าง เช่น โซเดียมคาร์บอเนตหรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ (Peterson, 1974; Rao, 1976; Velisek *et, al*., 1993 และ อัญชลี, 2548) เวลาที่ใช้ขึ้นกับชนิดของโปรตีน ในขั้นนี้สารอาหารที่ถูกย่อยโดยกรด คือ แป้งและโปรตีน แป้งถูกย่อยเป็นน้ำตาล ส่วนโปรตีนถูกย่อยสลายเป็นกรดอะมิโน การย่อยสลายด้วยกรดทำให้กรดอะมิโน ทริปโตเฟน เซอรีน ทรีโอนีน กรดอะมิโนที่มีกำมะถันเป็นองค์ประกอบ เช่น ซีสทิอีน และกรดอะมิโนที่มีหมู่ไฮดรอกซิลถูกทำลาย นอกจากนี้ยังทำให้กรดอะมิโน แอสปาราจีนและกลูตามีนถูกเปลี่ยนไปอยู่ในรูปกรด เป็นกรดอะมิโนแอสปาร์ติก และกลูตามิก (Peterson and Johnson, 1978) หรืออาจใช้กรดซัลฟุริกเข้มข้น 6-7

โมลาร์ ในการย่อยสลายโปรตีนที่อุณหภูมิ 100 ถึง 125 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง (Peterson, 1974) แต่การย่อยสลายด้วยกรดซัลฟุริกมักพบปัญหาการตะกอนของแคลเซียมซัลเฟต หลังจากปรับ pH เป็นกลาง โดยการเติมแคลเซียมออกไซด์(CaO) เนื่องจากแคลเซียมซัลเฟตที่เกิดขึ้นสามารถดูดซับกรดอะมิโนหรือสารประกอบอื่นที่ได้จากการย่อยโปรตีนได้ ส่งผลให้เกิดกลิ่นรสที่ไม่ดีของ HVP

กระบวนการผลิต HVP ในระดับโรงงานอุตสาหกรรม เริ่มต้นนำโปรตีนจากพืชมาทำปฏิกิริยาย่อยสลายด้วยกรดที่อุณหภูมิสูงภายใต้ความดันปกติหรือความดันสูง หลังจากปฏิกิริยาเสร็จสิ้นจึงนำ HVP ที่ได้ไปทำให้เย็น แล้วจึงเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เพื่อปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 5.5-6.2 แล้วจึงนำกรองเพื่อกำจัดสารฮิวมิน (humin) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ของกรดอะมิโนและคาร์โบไฮโดรเดรตที่เกิดขึ้นในระหว่างการย่อยสลายและขั้นตอนการปรับ pH ขั้นต่อไปนำ HVP มาทำให้เข้มข้นมากขึ้น แล้วนำไปกรองอีกครั้งหนึ่ง นำส่วนใสของ HVP ที่ได้ไปรวมกับสารให้กลิ่นรสอื่นๆ แล้วจึงผ่านขั้นตอนทำให้แห้ง (Manley and Fagerson, 1971)

ข. การย่อยสลายด้วยด่าง

การย่อยสลายด้วยด่างที่นิยมใช้ ได้แก่ โซเดียมไฮดรอกไซด์ และแคลเซียมไฮดรอกไซด์ โดยวารยา (2539) รายงานว่าการใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.0 โมลาร์ ให้อัตราการย่อยสลายที่ดีและเร็วกว่า 0.2 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ แต่การใช้ด่างไม่เป็นที่นิยม เนื่องจากกรดอะมิโนบางชนิดเกิดปฏิกิริยา racemization เปลี่ยนจาก L-form ไปเป็น D-form ร่างกายไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ แม้ว่าการสลายตัวของทริปโตเฟนน้อย (Peterson, 1974) การย่อยสลายด้วยสารละลายด่างที่สภาวะรุนแรงทำให้เกิดปฏิกิริยาเบต้า-อิลิมิเนชัน (B-elimination) ของกรดอะมิโนเซอรีนและซีสทีอีน เป็นผลให้เกิดสารประกอบดีไฮโดรอะลานีน (dehydroalanine) ซึ่งสามารถทำให้ปฏิกิริยากับกรดอะมิโนชนิดอื่น ๆ เช่น ซีสทีอีนและไลซีน ทำให้เกิดสารประกอบหลายชนิด เช่น แลนทิโอนีน (lanthionine) และไลซิโนอะลานีน (lysinoalaninde) ทำให้เกิดการสูญเสียสารอาหารที่สำคัญรวมทั้งเกิดสารพิษขึ้น และทำให้เกิดกลิ่นรสไม่ดี (Hill, 1965)

ค. การย่อยสลายด้วยเอนไซม์

ปัจจุบันมีการนำเอนไซม์มาประยุกต์ใช้ในการผลิต HVP อย่างกว้างขวาง เนื่องจากกระบวนการผลิต HVP ด้วยกรด และด่าง ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีการปนเปื้อนของสารก่อมะเร็งและมีเกลือปริมาณสูง สารเหล่านี้เป็นอันตรายต่อร่างกาย Rao (1976) และคงศักดิ์ (2544) พบว่า HVP ที่ได้จากการย่อยสลายโปรตีนจากพืชด้วยเอนไซม์แอลฟา-อะมัยเลส มีปริมาณเกลือและสารน้อยกว่าสาร HVP ที่ได้จากการย่อยสลายด้วยกรด จึงมีการนำเอนไซม์มาใช้ในการย่อยสลายโปรตีนจากพืช เนื่องจากกระบวนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ เป็นการย่อยสลายในภาวะที่ไม่รุนแรง เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ เพราะเอนไซม์มีความจำเพาะต่อสารตั้งต้น ค่า pH มีความคงทนต่อความร้อนที่ใช้ผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซท สามารถควบคุมระดับการย่อยสลาย จึงสามารถเลือกใช้ชนิดของเอนไซม์และสภาวะการย่อยสลายได้ตามความเหมาะสม โดยเฉพาะเอนไซม์ในกลุ่ม protease ซึ่งมีสมบัติในการย่อยสลายพันธะเพปไทด์ของโปรตีนเกิดเป็นผลิตภัณฑ์ คือ เพปไทด์ที่มีขนาดเล็ก และกรดอะมิโนอิสระ เมื่อเปรียบเทียบโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้จากการย่อยสลายด้วยสารเคมีและเอนไซม์ โปรติเอสพบว่า การย่อยสลายด้วยเอนไซม์นั้นสามารถกำหนดขอบเขตการย่อยสลายและขนาดได้ แต่การย่อยสลายด้วยสารเคมีนั้นไม่สามารถกำหนดการทำละลายของพันธะและขนาดของเพปไทด์ (Adler-

Nissen, 1986) โดย HVP ที่ได้จากกระบวนการย่อยสลายที่แตกต่างกันมีสารหอมระเหยที่ให้กลิ่นหลักแตกต่างกัน (Weir, 1992) เอนไซม์ที่นิยมใช้ในการผลิต HVP ได้แก่ Flavorzyme (ไพลิน, 2548; Aslang *et, al*., 1998; Lee *et, al*., 2001; GirOn-Callec *et, al*., 2008 ; Kong *et, al*., 2008) โบรมิเลน (ณัฐวุฒิ, 2550; ชนิกานต์, 2552) และแอลฟา-อะมัยเลส (Rao, 1976; คงศักดิ์, 2544) เป็นต้น

จากรายงานของ Fang and Keith (2002) พบว่าการผลิตเป็นโปรตีนไฮโดรไลเซทจากถั่วเหลืองสกัดน้ำมันโดยใช้เอนไซม์ Flavourzyme ได้ HVP ซึ่งมีสมบัติเป็นสารปรุงแต่งอาหารกลิ่นรสเนื้อ และมีกรดอะมิโนอิสระทั้งหมดเพิ่มขึ้น 40 เท่า โดยเฉพาะกรดอะมิโนลิวซีน รองลงมา คือ ฟีนิลอะลานีน ไลซีน กลูตามีนต่อกรดกลูตามิค และอะลานีน การใช้เอนไซม์มีผลกระทบต่อโครงสร้างทางเคมีของผลิตภัณฑ์น้อยกว่าการย่อยด้วยสารเคมี โดยการย่อยด้วยสารเคมีมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนรูปของกรดอะมิโนจาก L-form เป็น D-form ซึ่งร่างกายมนุษย์ไม่สามารถใช้ประโยชน์ได้ จึงเป็นสาเหตุให้คุณค่าทางโภชนาการของโปรตีนลดลง (Hall and Ahmad, 1992) ทำให้เกิดสาร 3-MCPD ซึ่งเป็นพิษต่อร่างกาย (Manley *et, al.,* 1981) แต่การย่อยของเอนไซม์ มีข้อเสีย คือ โปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้มีรสขม เนื่องจากเกิดเพปไทด์ของกลุ่มกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic amino acid) เช่น ลิวซีน วาลีน ไอโซลิวซีน ไทโรซีน ฟีนิลอะลานีน และทริปโตเฟน เป็นเพปไทด์ที่มีรสขม (Bertoldi *et, al.,* 2004)

เอนไซม์ที่นำมาใช้นั้นมีหลายชนิดทั้งเอนโดโปรติเนสและเอกโซเพปติเอส ดังนี้

เอนไซม์โปรติเอส ช่วยในการสลายโปรตีน โดยตัดบริเวณพันธะเปปไทด์ที่เชื่อมระหว่างกรดอะมิโนแต่ละตัวในสายเปปไทด์ ให้กลายเป็นกรดอะมิโนหรือสายเปปไทด์สั้นๆ

เอนไซม์โบรมิเลน มีความสามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายโมเลกุลของโปรตีน เปปไทด์ สารเอไมด์ และเอสเทอร์ของกรดอะมิโนและเปปไทด์ (Murachi, 1960) จึงมีการนำมาใช้ในการย่อยสลายโปรตีนเพื่อประโยชน์เชิงหน้าที่ และผลิตเป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรส การใช้เอนไซม์นี้จึงเป็นแนวทางหนึ่งในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากสาหร่าย

ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซท

โปรตีนไฮโดรไลเซทที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนและอนุพันธ์ของกรดอะมิโนบางชนิด เช่น ไทโรซีน เมทไธโอนีน ไกลซีน ซีสเตอีน ทริปโตเฟน ไลซีน อาร์จีนีน ลิงซีน วาลีน เป็นต้น มีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และเมื่อมีกรดอะมิโนเหล่านี้ในปริมาณสูง จึงเกิดสมบัติเป็นสาร pro-oxidants (Marcuse, 1960)

สารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระในร่างกายสิ่งมีชีวิต มีการจำแนกได้หลายกลุ่ม ได้แก่ กลุ่มเอนไซม์ (enzyme) เช่น catalase, glutathione peroxidase และ superoxide dismutase รวมทั้งสารกลุ่มโปรตีนหรือสารประกอบโปรตีนบางอย่างเช่น glutathione, urate, bilirubin, ubiquinol, albumin, ceruloplasmin และ transferrin เป็นต้น สารเหล่านี้ทำหน้าที่ในการควบคุมอนุมูลอิสระให้อยู่ในระดับที่สมดุล แต่หากมีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นในปริมากเกินกว่าที่ระบบป้องกันจะยับยั้งได้หมด อนุมูลอิสระนั้นจะทำอันตรายต่ออวัยวะและเนื้อเยื่อของร่างกาย จนอาจนำไปสู่ความผิดปกติหรือพยาธิ

สภาพหลายอย่าง เช่น โรคมะเร็ง โรคหลอดเลือดหัวใจ โรค Parkinson โรค Alzheimer ไขข้ออักเสบ และต้อกระจกเป็นต้น (Ames และคณะ, 1993) ทั้งนี้การศึกษาพบว่า สารประกอบกลุ่มแทนนิน (tannins) หรือกลุ่ม polyphenols โดยเฉพาะกลุ่มแซนโทนิน (xanthones) และฟลาโวนอยด์ (flavonoids) สามารถออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดี ทั้งการทดลองในหลอดทดลองและในสัตว์ทดลอง (Rice-Evans และคณะ, 1996) แม้ว่าสารสังเคราะห์มีประสิทธิภาพและความคงตัวสูงกว่าสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ แต่ยังมีข้อกังวลในด้านความปลอดภัย (Yang *et al*., 2000) แตกต่างจากสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ ที่มีความเชื่อมั่นว่าปลอดภัยกว่า โดยเฉพาะกลุ่ม polyphenols ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการดักจับอนุมูลอิสระชนิดต่างๆ (Van Acker และคณะ, 2000)

ดังนั้น สารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านการอักเสบ มีศักยภาพเหมาะสมที่จะพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร ปัจจุบันมีการนำเอาสมุนไพรและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์บำรุงผิวและเครื่องสำอาง โดยมุ่งเน้นไปที่ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านการอักเสบ เนื่องจากอนุมูลอิสระมีบทบาทในการก่อให้เกิดการอักเสบ และการทำลายเนื้อเยื่อ มีผลต่อความเสื่อมหรือการแก่ของเซลล์ ทำให้เป็นสาเหตุของความแก่ชรา เกิดริ้วรอยเหี่ยวย่น สารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านการอักเสบจึงมีบทบาทสำคัญ ในการชะลอความแก่ มีศักยภาพเหมาะสมที่จะพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์บำรุงร่างกายต่างๆ ได้

วิธีการวิเคราะห์กิจกรรมของสารต้านอนุมูลอิสระ

การตรวจวัดกิจกรรมของสารต้านอนุมูลอิสระสามารถทำได้หลายวิธี การวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระนิยมใช้ 2 วิธีขึ้นไป เพื่อเป็นการยืนยันประสิทธิผลของการวิเคราะห์ (ประสาร, 2547)

1. วิธี DPPH (Leong and Shui, 2002)

DPPH เป็นอนุมูลอิสระที่เสถียรและมีสีม่วง มีค่าการดูดกลืนแสงในช่วง 515-517 นาโมเมตร เมื่ออนุมูลอิสระ DPPH ได้รับอิเล็กตรอนจะกลับคืนสู่สภาพปกติซึ่งมีสีเหลือง DPPH เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการประเมินกิจกรรมของสานต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดที่มีคุณสมบัติในการจับอนุมูลอิสระที่ถูกกระตุ้นด้วย Chain-breaking mechanism เช่น สารประกอบ ฟีนอลิคและวิตามินซี (Niki, 1987; Lu and Foo, 2000) นิยมใช้วิธีกันมาก เนื่องจากความคงตัวของ DPPH ทำให้สามารถวิเคราะห์ผลได้ อีกทั้งใช้เวลาน้อยในการทดลอง (ประสาร, 2547)

2. วิธี ABTS assay (Rice-Evans และคณะ, 1999)

ABTS assay เป็นวิธีการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระโดยใช้รีเอเจนท์ (reagent) คือ 2, 2’ –Azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) เมื่อละลายน้ำจะได้สารละลายสีเขียวอ่อน เมื่อทำให้เกิดเป็น stable radical ในตัวทำละลายน้ำ สารละลายจะมีสีเขียวเข้มของ $ABTS^{+}$ ซึ่งดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 414 นาโนเมตร รองลงมาคือ ความยาวคลื่น 645, 734 และ 815 นาโนเมตร การทดลองจะวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร เพราะปฏิกิริยาจะถูกรบกวนจากภาวะต่างๆ น้อยมาก

ถ้าสารตัวอย่างที่ทดสอบมีความสามารถในการจับกับอนุมูลอิสระได้สูง ความเข้มของสีเขียวจะลดลง โดยรายงานผลการทดลองเป็นค่า IC_{50} ซึ่งหมายถึง ปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ความเข้มข้นของ ABTS เหลืออยู่ 50% หรือรายงานผลโดยเปรียบเทียบหาความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระกับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน

สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds)

สารประกอบฟีนอลิก เป็นสารที่พบตามธรรมชาติในพืชหลายชนิด ถูกสร้างขึ้นเพื่อประโยชน์ในการเจริญเติบโต สารประกอบฟีนอล มีสรรพคุณที่ดีต่อสุขภาพคือ มีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ สามารถละลายได้ในน้ำ สารประกอบฟีนอลิกที่พบในธรรมชาติมีมากมายตั้งแต่กลุ่มที่มีโครงสร้างอย่างง่าย เช่น กรดฟีนอลิก (phenolic acids) จนถึงกลุ่มที่มีโครงสร้างพอลิเมอร์ เช่น ลิกนิน (lignin) กลุ่มใหญ่คือ สารประกอบฟลาโวนอยด์ (flavonoid) สารประกอบฟีนอลที่พบในพืชมักจะรวมอยู่ในโมเลกุลของน้ำตาลในรูปของสารประกอบไกลโคไซด์ (glycoside) น้ำตาลชนิดที่พบมากที่สุดในโมเลกุลของสารประกอบฟีนอล คือ น้ำตาลกลูโคส และพบว่าอาจมีการรวมตัวกันระหว่างสารประกอบฟีนอลด้วยกันเอง หรือสารประกอบฟีนอลกับสารประกอบอื่นๆ เช่น กรดอินทรีย์ รวมอยู่ในโมเลกุลของโปรตีน แอลคาลอยด์ (alkaloid) และเทอร์พีนอยด์ (terpenoid) เป็นต้น ซึ่งประโยชน์ของสารประกอบฟีนอลิกต่อสุขภาพ ได้แก่ การเป็นที่มีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ สารต้านการกลายพันธุ์ มีความสามารถการป้องกันโรคต่างๆ โดยเฉพาะโรคหัวใจขาดเลือด และมะเร็ง โดยสารประกอบฟีนอล จะทำหน้าที่กำจัดอนุมูลอิสระและไอออนของโลหะที่สามารถเร่งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันและโมเลกุลอื่นๆ โดยใช้ตัวเองเป็นตัวรับอนุมูลอิสระทำให้ยับยั้งปฏิกิริยาลูกโซ่ ที่มีอนุมูลอิสระเป็นสาเหตุ แต่สารต้านอนุมูลอิสระจะถูกทำลายไปด้วย สารประกอบฟินอลิก สามารถละลายน้ำได้ ทำให้สารประกอบฟินอลิก ยังทำหน้าที่ทั้งเป็นสารให้อิเล็กตรอน หรือเป็นตัวให้ไฮโดรเจนและกำจัดออกซิเจนที่อยู่ในรูปแอคทีฟ ด้วยหน้าที่ต่างๆดังกล่าวจึงทำให้สารประกอบฟีโนลิกเป็นสารต้านออกซิเดชันที่สำคัญชนิดหนึ่ง (Halliwell. *et al* ., 1987)

การทำแห้ง

เป็นการแปรรูป โดยการใช้ความร้อนภายใต้สภาวะควบคุม เพื่อกำจัดน้ำส่วนใหญ่ที่มีอยู่ในอาหารโดยการระเหย การระเหิด หรือการสกัดน้ำออกด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม อาจใช้กระบวนการออสโมติคด้วยน้ำตาลหรือเกลือแกง โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อยืดอายุการเก็บรักษาของอาหาร จากการลดค่า Aw (Water activity) มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์และการทำงานของเอนไซม์

กระบวนการอบแห้ง แบ่งได้เป็น 3 แบบ ได้แก่

1. การตากแห้ง (sun drying) การตากแห้งเป็นการทำแห้งโดยวิธีธรรมชาติที่ง่ายที่สุด โดยใช้พลังงานความร้อนจากแสงอาทิตย์ และกระแสลมที่พัดผ่านอาหารทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของไอน้ำ

2. การทำแห้งแบบบรรยากาศ (atmospheric dehydration process) แบบไม่ต่อเนื่อง (stationary หรือ batch process) เช่น klin,tower และ cabinet dryer และแบบต่อเนื่อง (continuous process) เช่น continuous belt,fluidized bed,spray dryer และ drum dryer

3. การทำแห้งแบบสุญญากาศ (vacuum dehydration process) เป็นการทำแห้งโดยใช้อุณหภูมิต่ำ (ใช้อุณหภูมิได้ต่ำกว่าปกติ) และทำภายใต้ระบบสุญญากาศ เช่น vacuum shelf และ freeze dryer

การเปลี่ยนแปลงของอาหารจากการทำแห้ง

การทำแห้งทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของอาหารมากหรือน้อยขึ้นกับธรรมชาติของอาหารและสภาวะที่ใช้ในการทำแห้ง ดังนี้

1. การหดตัว โดยธรรมชาติเซลล์ในอาหารจะอยู่ในลักษระของเซลล์เต่งเสมอ และผนังเซลล์มีความยืดหยุ่น เมื่อน้ำระเหยออกไป จะทำให้เกิดช่องว่างระหว่างผิวเซลล์ ทำให้เกิดการหดตัว อาหารที่มีน้ำมากจะหดตัวบิดเบี้ยวมาก การทำแห้งอย่างรวดเร็วจะหดตัวน้อยกว่าการทำแห้งอย่างช้าๆง

2. การเปลี่ยนสี อาหารที่ผ่านการทำแห้งจะมีสีเข้มขึ้น เนื่องจากความร้อนหรือปฏิกิริยาเคมีต่อการเกิดสีน้ำตาล

3. การเกิดเปลือกแข็ง เป็นลักษณะที่ผิวอาหารแข็งเป็นเปลือกหุ้มส่วนในที่ยังไม่แห้ง เกิดจากใน ช่วงแรกน้ำระเหยเร็วเกินไป น้ำจากด้านในเคลื่อนมาที่ผิวไม่ทัน หรือมีสารละลายน้ำตาล โปรตีนเคลื่อนที่มาแข็งที่ผิว หลีกเลียงได้โดยการไม่ใช้อุณหภูมิสูง

4. การเสียความสามารถในการคืนสภาพ อาหารแห้งบางชนิดต้องนำมาคืนสภาพ แต่การคืนสภาพโดยการเติมน้ำจะไม่ได้เหมือนเดิม เพราะเซลล์อาหารเสียความยืดหยุ่นของผนังเซลล์ สตาร์ชและโปรตีนเสียความสามารถ ในการดูดน้ำ อาหารแห้งที่ทำด้วยกรแช่เยือกแข็งจะมีความสามารถในการคืนสภาพดีทีสุด

5. การสูญเสียคุณค่าอาหารและสารระเหย ซึ่งอาจมีการสูญเสียคุณค่าได้แตกต่างกันขึ้นกับสมบัติของวัตถุดิบที่นำมาผลิต และองค์ประกอบอื่นที่เกี่ยวข้อง

ผลของการทำแห้งต่อปัจจัยต่าง ๆ ในอาหาร

1. โปรตีน โดยลักษณะธรรมชาติของโปรตีนถ้าได้รับความร้อนสูงนานๆ จะทำให้เสียสภาพทางธรรมชาติไป (Denature) คุณค่าทางอาหารของโปรตีนจะเหลืออยู่มากหรือน้อย ขึ้นกับวิธีการทำแห้ง การเลือกอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสม จะช่วยให้คุณค่าของโปรตีนคงอยู่มากขึ้น

2. ไขมัน ไขมันในอาหารทั่วไป จะทำให้อาหารมีกลิ่นเหม็นหืน และที่อุณหภูมิสูงจะทำให้การเหม็นหืนเกิดได้เร็วขึ้น ถ้าอาหารมีไขมันสูง ควรหลีกเลี่ยง การทำแห้งที่ใช้อุณหภูมิสูง

3. คาร์โบไฮเดรต แป้งและน้ำตาลในอาหารจะเกิดการเปลี่ยนแปลงเมื่อได้รับความร้อนสูงในช่วง ความเข้มข้นที่เหมาะสม คือการเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาล (Browning)

4. เอนไซม์ ในการทำอาหารแห้ง มีเอนไซม์หลายชนิดที่มีผลต่ออาหารแห้ง ที่สำคัญ 2 ตัว คือ เปอร์ออกซิเดส (peroxidase) และ แคทาเลส (catalase) ซึ่งทนต่อความร้อนได้สูง จึงใช้เอนไซม์ 2 ชนิด นี้เป็นตัวบ่งชี้ สำหรับการทดสอบว่าเอนไซม์มีความสามารถในการทำงานหรือไม่

ผักแผ่น

ผักแผ่นจัดเป็นการถนอมอาหารอีกประเภทหนึ่ง มีลักษณะการเตรียมคล้ายผลไม้กวน คือ นำผักที่ได้มาลวกในน้ำร้อน มาตีป่นแล้วทำให้เป็นแผ่นบางๆ ก่อนนำไปผ่านกระบวนการอบแห้งการคัดเลือกผักที่จะนำมาทำผักแผ่น ขึ้นอยู่กับความเหมาะสม หาง่าย ผักที่นิยมนำมาทำผักแผ่น คือ ฟักทอง มะเขือเทศ คื่นช่าย มีการใช้เครื่องเทศเพื่อปรุงรส เช่น พวกกานพลูอบเชย ดอกจันทน์เทศ สะระแหน่ เป็นต้น (Reynold, 1998) ตัวอย่างและวิธีการทำผักแผ่น ได้แก่

1.1 ฟักทองแผ่น (Pumpkin Leather) ประกอบด้วยฟักทองลวก 2 ถ้วยตวง น้ำผึ้ง ½ ถ้วยตวง ลูกจันทร์ 1/8 ช้อนชา อบเชย 1/4 ช้อนชา กานพลู 1/8 ช้อนชา นำปั่นผสมให้เข้ากัน เทลงบนถาดหุ้มพลาสติก อบที อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

1.2 ผักรวมแผ่น (Mixed Vegetable Leather) ประกอบด้วยมะเขือเทศสับ 2 ถ้วยตวง คืนช่ายสับ 1/4 ถ้วยตวง หอมหัวใหญ่หัวเล็ก 1 หัว เกลือ ผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน นำไปทำให้ร้อนด้วยไฟอ่อนบนกระทะประมาณ 15-20 นาที นำไปกรองเอาแต่น้ำเทลงบนถาดหุ้มพลาสติก อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

การใช้ประโยชน์จากสาหร่ายน้ำจืดและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

สาหร่ายน้ำจืดที่มีงานวิจัยและการใช้งานอย่างแพร่หลายทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศ มีหลายชนิดได้แก่ สาหร่ายนอสตอค *Nostoc commune* หรือเห็ดลาบ เป็นสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวที่มีการบริโภคในหลายประเทศทั่วโลก มีลักษณะเป็นแผ่นวุ้นแบนบางคล้ายเห็ดหูหนูสีเขียวที่ขึ้นบนดิน มีความเชื่อว่าการบริโภคสาหร่ายนี้จะช่วยรักษาระบบกระเพาะอาหารและลำไส้ การใช้ประโยชน์จาก *Nostoc* พบว่า บางชนิดรับประทานได้ บางชนิดใช้เป็นยารักษาโรคมะเร็ง โรคเก๊าต์ ลดคอเลสเตอรอลในซีรั่มหนูทดลอง คาดว่าความสามารถในการลดคอเลสเตอรอลน่าจะมาจากใยอาหารของ *Nostoc* (Hori *et,al.,* 1994) นอกจากนี้ยังนำมาใช้ในการบำบัดโรคตาบอดในเวลากลางคืน และแผลไฟไหม้น้ำร้อนลวก มีการวิจัยพบว่าสารสกัดด้วยน้ำร้อนของ *N. flagelliforme* มีสมบัติต่างๆ อันเป็นผลมาจากองค์ประกอบของสารพอลิแซ็กคาโรด์ ยังมีงานวิจัยของ *N. commune* พบว่าองค์ประกอบหลักของสารพอลิแซ็กคาไรด์จากแหล่งธรรมชาติจะมีกลูโคส ไซโรส และกาแลคโตส ในสัดส่วน 2:1:1 โดยประมาณ (Huang *et,al.,* 1998)

สุภาจรี (2542) กล่าวถึงการใช้ประโยชน์จากสาหร่ายทะเลชนิดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจในภาคใต้ของไทยว่า ได้มีการนำสาหร่ายมาใช้ประโยชน์ทั้งแบบการใช้บริโภคเป็นอาหารเป็นสมุนไพร สกัดวุ้น หรือใช้เลี้ยงสัตว์ เช่น สาหร่ายผมนาง (*Gracilaria* sp.) สาหร่ายมงกุฎหนาม (*Acanthophora* sp.) สาหร่ายพวงองุ่น (*Caulerpa* sp.), สาหร่ายทุ่น (*Sargassum* sp.) และสาหร่ายใบ (*Ulva* sp.) แต่การใช้ประโยชน์จากสาหร่ายเหล่านี้ยังอยู่ในแวดวงที่จำกัดและยังขึ้นกับฤดูกาล

อนุวัตร (2547) ได้พัฒนาผลิตภัณฑ์ผักแผ่น เริ่มโดยการศึกษาพฤติกรรม ทัศนคติ และความต้องการ เกี่ยวกับผลิตภัณฑ์สาหร่ายปรุงรสอบแห้งและผักแผ่น พบว่าผู้บริโภคต้องการ ให้พัฒนาผลิตภัณฑ์ผักแผ่น ปรุงรสอบแห้ง โดยใช้วัตถุดิบผัก ประเภทใบและลำต้น โดยชนิดผัก ที่ต้องการมากที่สุด 3 อันดับ คือ ผักคะน้า ผักตำลึง และผักบุ้งโดยคะน้าถูกเลือกมาพัฒนาให้เป็นผักแผ่นต่อโดยนำผักคะน้ามาทำความสะอาดด้วยน้ำ หันเป็นท่อนขนาด 1 นิ้ว ลวกในน้ำเดือด 3 นาที ทำให้เย็นด้วยน้ำที่อุณหภูมิห้อง บดคะน้าต่อด้วยน้ำสะอาดที่อัตราส่วน 1 : 2.5 ปรุงรสด้วย น้ำตาลเกลือ ซีอิ๊วขาว พริกป่น พริกไทย และแป้งสาลี ร้อยละ 6, 0.7, 0.4, 0.05, 0.1 และ 1 ตามลำดับและนำไปอบแห้งแล้วบรรจุ คุณภาพคะน้าแผ่นที่ได้คือ ลักษณะเป็นแผ่นสีเขียว ค่าสี L*, a* และ b* เท่ากับ 39.40, -12.40 และ 16.90 ตามลำดับ มีความหนา 0.25 มิลลิเมตร ค่า aw 0.26 ปริมาณร้อยละความชื้น ไขมัน เส้นใย โปรตีน เถ้า และคาร์โบไฮเดรต เท่ากับ 5.46, 3.23, 15.97, 16.54, 10.31 และ 48.49 ตามลำดับ วัฒนา (2548) ได้พัฒนาผลิตภัณฑ์ผักแผ่น ด้วยเครื่องอบลม

ร้อน พบว่า อัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างผักคะน้าและผักตำลึง คือ 75:25 และไม่ต้องเติมสารปรับปรุงเนื้อ สัมผัสเป็นผลิตภัณฑ์ผักแผ่นที่เหมะสม ในส่วนการพัฒนาผลิตภัณฑ์ผักแผ่น ด้วยเครื่องให้ความร้อนแบบกดทับ พบว่าผักแผ่น ที่เติมแป้งสาลี 5 เปอร์เซ็นต์เป็นสิ่งทดลองที่เหมาะสมที่สุด จากการ ทดสอบการยอมรับของผู้บริโภค พบว่าผู้บริโภคส่วนใหญ่ไม่ชอบผลิตภัณฑ์ผักแผ่น ต้องการให้ผักแผ่นมีรูปแบบเป็นสี่เหลี่ยมผืนผ้าคล้ายสาหร่ายแผ่นปรุงรส และยินดีจะซื้อผลิตภัณฑ์ผักแผ่นที่ราคา 3 บาท/5 แผ่น อีกทั้งร้านสะดวกซื้อเป็นสถานที่ที่ผู้บริโภคสะดวกในการซื้อผักแผ่นมากที่สุด และ สื่อโทรทัศน์เป็นสื่อที่สามารถทำให้ผลิตภัณฑ์ผักแผ่นเป็นที่รู้จักได้ครอบคลุมทั้ง 3 กลุ่มอายุ อนุวัตร และคณะ (2550) ได้พัฒนาผลิตภัณฑ์พริกหวานแผ่น โดยใช้กรรมวิธีการอบแห้ง พบว่ากรรมวิธีในการผลิตพริกหวานแผ่น คือการนำพริกหวานไปลวกที่ อุณหภูมิน้ำเดือดนาน 3 นาทีแล้วนำไปปั่นให้ละเอียด นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เทลงถาดขนาด 22*29 ตารางเซนติเมตร ทีปูด้วยถุงพลาสติกร้อน อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 6 – 8 ชั่วโมง ในการทดสอบผู้บริโภค พบว่าความชอบที่มีต่อพริกหวานแผ่นห่อข้าวอยู่ในระดับปานกลาง และผู้บริโภคร้อยละ 78 ยอมรับในผลิตภัณฑ์

ความสำคัญ ที่มาและวัตถุประสงค์

สาหร่ายมีบทบาทต่อเศรษฐกิจของประเทศไทยเพิ่มมากขึ้นทุกปี เพราะสาหร่ายประกอบด้วยสารอาหารที่มีประโยชน์มากมาย การบริโภคสาหร่ายจึงส่งผลดีต่อสุขภาพ โดยประเทศญี่ปุ่นนำสาหร่ายทะเลมาใช้ประโยชน์ด้านอาหารมาก เช่น กินแทนผัก เครื่องปรุงรส เครื่องเคียงห่อซูชิ นอกจากนั้นยังนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร ยา และเครื่องสำอาง ฯลฯ (Burtin, 2003) ประเทศไทยพบสาหร่ายได้ทั่วไปบริเวณภาคใต้ชายฝั่งทะเลอ่าวไทยและอันดามัน ซึ่งสาหร่ายมีสัดส่วนของคุณค่าทางอาหารแตกต่างกันไปในแต่ละกลุ่ม สารอาหารสำคัญที่พบเจอในสาหร่ายได้แก่ คาร์โบไฮเดรต โปรตีน กรดอะมิโนจำเป็น กรดไขมันจำเป็น เยื่อใย วิตามินและแร่ธาตุ ซึ่งให้ปริมาณสูงกว่าพืชอาหารที่ปลูกทั่วไป (Burtin, 2003) ทั้งนี้ในสาหร่ายมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนค่อนข้างสูง โดยเฉพาะสารโพลีแซคคาไรด์ และ ไฟเบอร์ชนิดไม่ละลายน้ำปริมาณมาก ซึ่งระบบทางเดินอาหารมนุษย์ย่อยได้น้อย การบริโภคสาหร่ายในรูปสดหรือปรุงอาหาร ทำให้ร่างกายรับสารอาหารชนิดอื่นๆ ที่มีในสาหร่ายได้น้อยลง ดังนั้นการแปรรูปสาหร่ายให้อยู่ในรูปโปรตีนขนาดเล็กลง หรือโปรตีนไฮโดรไลเซท นอกจากจะทำให้ได้สารอาหารที่มีประโยชน์ เช่น โปรตีน เปปไทด์ กรดอะมิโนจำเป็น และแร่ธาตุจำนวนมากแล้ว โปรตีนไฮโดรไลเซทยังให้กลิ่นรสที่ดีแก่อาหารและสามารถใช้เป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสได้อีกด้วย

สาหร่ายแผ่นปรุงรส เป็นการแปรรูปสาหร่ายอย่างหนึ่งในการเพิ่มมูลค่า โดยมีแนวคิดในการพัฒนาเป็นอาหารขบเคี้ยวซึ่งมีคุณค่าทาง โภชนาการ (nutritious snack product) และเป็นอาหารว่างของผู้บริโภค เนื่องจากสาหร่ายมีสารอาหารที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย เช่น เกลือแร่ วิตามิน และใยอาหาร สามารถช่วยให้ร่างกายแข็งแรงป้องโรคต่างๆ ได้ (กมลและคณะ, 2544) เพื่อเป็นการสร้างศักยภาพของอาหารท้องถิ่น และการพัฒนาเศรษฐกิจชุมชน ผู้วิจัยพบว่า ฝั่งอันดามัน มีกลุ่มสาหร่ายสีเขียวหลายนิด ทั้งสาหร่ายทะเล และสาหร่ายน้ำจืด ที่มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิด เช่น กลุ่มรงควัตถุคาโรทีนอยด์ สารประกอบฟินอลิก สารโพลีแซคคาไรด์ และ สารต้านอนุมูลอิสระ ฯ ดังนั้นนักวิจัยจึง ได้สนใจในการนำสาหร่ายก้ามกุ้ง ซึ่งเป็นสาหร่ายสีเขียวที่หาได้ง่ายในท้องถิ่น รับประทานได้

และเป็นที่นิยมบริโภคในรูปสาหร่ายสดของประชาชนท้องถิ่นในจังหวัดกระบี่ มาทำการศึกษา เพราะจากการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการเบื้องต้น พบว่ามีสารอาหารซึ่งให้คุณค่าทางโภชนาการ โดยมีโปรตีน ใยอาหาร กรดไขมันและแร่ธาตุในปริมาณที่มาก โดยเฉพาะแคลเซียมและเหล็กในปริมาณที่สูง เหมาะต่อการนำมาพัฒนาเป็นอาหารเสริมแคลเซียมและธาตุเหล็กในกลุ่มคนที่ไม่ดื่มนม หรือดื่มนมน้อย การนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สาหร่ายแผ่น โดยผ่านการไฮโดรไลเซทก่อนแปรรูป จะเป็นการช่วยให้สารอาหารโปรตีนถูกเปลี่ยนไปเป็นกรดอะมิโน ซึ่งช่วยให้การใช้ประโยชน์ในร่างกายเกิดได้ดีขึ้น เป็นการพัฒนาองค์ความรู้ เพื่อการพัฒนาเศรษฐกิจชุมชนอย่างยั่งยืน โดยการทำผลิตภัณฑ์สาหร่ายก้ามกุ้งแผ่นปรุงรส คาดหวังว่าจะสามารถต่อยอดภูมิปัญญาท้องถิ่นให้เกิดประโยชน์เชิงพาณิชย์ต่อไป

งานวิจัยนี้ จึงสนใจนำสาหร่ายก้ามกุ้ง *(Chara corollina)* ที่ทำการเพาะเลี้ยงแบบอินทรีย์มาทำการศึกษาใน 2 รูปแบบ ได้แก่ (1) การนำสาหร่ายมาดัดแปลงรูปแบบโครงสร้าง เพื่อลดข้อด้อยของสาหร่ายชนิดนี้ ที่อาจส่งผลต่อความสามารถในการย่อย และการดูดซึม ทำให้การใช้ประโยชน์จากสารอาหารในสาหร่ายเกิดได้ดีขึ้น (Alajaji and El-Adawy, 2006) ด้วยการนำมาผลิตเป็นโปรตีนไฮโดรไลเซท และศึกษาคุณค่าทางอาหารที่เกิดขึ้น รวมทั้งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง และ (2) การนำสาหร่ายที่ผ่านการไฮโดรไลเซทมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์สาหร่ายแผ่นปรุงรส เพื่อศึกษาสารอาหาร สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ยังคงหลงเหลืออยู่ รวมถึงการคงสภาพของสารเหล่านั้น ในรูปแบบของผลิตภัณฑ์อาหารว่าง ทั้งนี้ คาดว่าผลการวิจัยเบื้องต้นจะนำไปสู่การพัฒนาการใช้ประโยชน์จากสาหร่ายชนิดนี้เพิ่มมากขึ้นทั้งในอาหารหรมนุษย์ หรือ อาหารสัตว์น้ำ เพื่อส่งเสริมอาชีพการเลี้ยงสาหร่ายและการใช้ประโยชน์เชิงพาณิชย์ได้อย่างกว้างขวางขึ้น นับว่าเปนประโยชนตอผู้ประกอบการด้านสาหร่าย ถือไดวาเปนอีกแนวทางหนึ่งในการดำเนินงานการผลิตตามแนวทางเกษตรอินทรีย ที่ลดการใชหรือไมใชสารเคมี เพื่อรองรับนโยบายประเทศไทย 4.0 สงผลใหผลิตภัณฑ์สาหร่ายปลอดจากสารตกค้าง เป็นที่ยอมรับของตลาดทั้งในประเทศ และตางประเทศมากขึ้น

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อหาความเหมาะสมของการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากสาหร่ายก้ามกุ้ง *(Chara corollina)* ด้วยการใช้เอนไซม์
2. เพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและสารทางชีวภาพของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่สกัดได้จากสาหร่าย
3. เพื่อวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสาหร่ายก้ามกุ้ง *(Chara corollina)* ที่ผ่านการไฮโดรไลเซทในสภาวะที่ต่างกัน
4. ศึกษาสูตรที่เหมาะสมในการผลิตสาหร่ายก้ามกุ้งแผ่นปรุงรส จากสาหร่ายที่ผ่านการไฮโดรไลเซท
5. เพื่อหาคุณค่าทางโภชนาการ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและสารต้านอนุมูลอิสระของผลิตภัณฑ์สาหร่ายก้ามกุ้งแผ่นปรุงรส

ขอบเขตของโครงการวิจัย

1. ใช้สาหร่ายก้ามกุ้ง *(Chara corollina)* ที่เพาะเลี้ยงด้วยวิธีการเกษตรอินทรีย์มาผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทด้วยการใช้เอนไซม์

2. เตรียมสาหร่ายโดยวิเคราะห์วัตถุดิบเริ่มต้น ได้แก่ สมบัติทางกายภาพ องค์ประกอบทางเคมี สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และ สารต้านอนุมูลอิสระของสาหร่ายก้ามกุ้ง
3. ผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากการไฮโดรไลซ์สาหร่ายก้ามกุ้งด้วยเอนไซม์กลุ่มโปรติเอส และวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ องค์ประกอบทางเคมี สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ แร่ธาตุแคลเซียม ธาตุเหล็กและสารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสาหร่ายก้ามกุ้ง *(C. corollina)* ที่ผ่านการไฮโดรไลเซท
4. วิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนในโปรตีนไฮโดรไลเซทเปรียบเทียบกับสาหร่ายก้ามกุ้ง *(Chara corollina)* ที่ไม่ผ่านกระบวนการ ด้วยเครื่อง HPLC
5. เพื่อศึกษาสูตรที่เหมาะสมในการผลิตสาหร่ายก้ามกุ้งแผ่นปรุงรส จากสาหร่ายที่ผ่านการไฮโดรไลเซท
6. วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ ความชื้น เถ้า โปรตีน ไขมัน เส้นใย คาร์โบไฮเดรต แร่ธาตุแคลเซียม ธาตุเหล็ก ในสาหร่ายก้ามกุ้ง *(C. corollina)* ก่อนและภายหลังการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์สาหร่ายแผ่นปรุงรส
7. เพื่อหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ สารประกอบฟินอลิก คลอโรฟิลล์ และสารต้านอนุมูลอิสระในสาหร่ายก้ามกุ้ง *(C. corollina)* ก่อน และภายหลังการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์สาหร่ายแผ่นปรุงรส

วิธีดำเนินการวิจัย

แบ่งวิธีการดำเนินการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล ดังนี้

การศึกษาเรื่อง สารอาหารและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการแปรรูปสาหร่ายก้ามกุ้งแผ่น ที่ผ่านการไฮโดรไลเซท แบ่งการทดลองออกเป็น 2 ตอน โดยมีวิธีการดำเนินการวิจัย ดังนี้

ตอนที่ 1 การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากสาหร่ายก้ามกุ้ง ได้แก่

1. การเตรียมตัวอย่างสาหร่าย

นำสาหร่ายสดที่ได้มาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปา แล้วอบให้แห้งด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง บดให้ละเอียด ด้วยเครื่อง hammer mill ร่อนผ่านตะแกรงขนาด 40 เมซ จากนั้นบรรจุในถุงสุญญากาศ เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ภาพผนวกที่ 1-3) นำกากสาหร่ายที่ได้มาวิเคราะห์ดังนี้

1.1 องค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ ความชื้น โปรตีน ไขมัน เถ้า เยื่อใย และคาร์โบไฮเดรต ตามวิธีของ AOAC (2000)

วิธีการวิเคราะห์ (ภาพผนวกที่ 6-9)

1) โปรตีน โดยวิธี Kjeldahl method (AOAC, 2000)

2) ไขมัน โดยวิธี Soxhlet extraction method (AOAC, 2000)

3) เถ้า โดยวิธี dry ashing method (AOAC, 2000)

4) ความชื้น โดยวิธี Loss on drying at 135°C (AOAC, 2000)

5) เยื่อใย โดยวิธี Glass crucible method (AOAC, 2000)

6) คาร์โบไฮเดรต โดยวิธีการคำนวณ (Calculation)

1.2 ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลสารอิสระ

นำสารสกัดจากสาหร่าย ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลสารอิสระ ดังนี้

1) ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลสารอิสระโดยวิธี DPPH radical scavenging assay ดัดแปลงตามวิธีการของ Fenglin (2004)

วิธี DPPH scavenging activity method ดังนี้ (ภาพผนวกที่ 11)

นำสารสกัดแต่ละชนิดในเมทานอลที่มีความเข้มข้นต่างๆ กัน ปริมาตร 100 ไมโครลิตรแล้วเติมสารละลาย 1 mM DPPH ในเมทานอลปริมาตร 900 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันบ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดนาน 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ค่าความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งใช้เมทานอล แทนสารสกัดเป็น blank และสารละลาย 10 mM ascorbic acid เป็น positive control ทำการทดลอง3 ซ้ำ นำค่าที่วัดได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การดักจับอนุมูลอิสระ DPPH° จากสมการ

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

A_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดทดสอบ

$A_{control}$ = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม

จากนั้นคำนวณหาค่า IC_{50} (ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถดักจับอนุมูลอิสระ DPPH° ได้ 50 เปอร์เซ็นต์) จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง % scavenging กับความเข้มข้นของสารละลาย

2) ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลสารอิสระโดยวิธี ABTS assay ดัดแปลงตามวิธีการของ Rice-Evans. (1999)

วิธี ABTS Assay ดังนี้ (ภาพผนวกที่ 11)

เตรียมสารละลาย $ABTS^+$ จากการผสม 7 mM ABTS กับ 2.45 mM potassium persulfate ($K_2S_2O_8$) ในอัตราส่วน 1:1 แล้วตั้งทิ้งไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นเจือจาง $ABTS^+$ ด้วยน้ำกลั่น บันทึกค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร จนได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.7±0.02 เตรียมสารละลาย ascorbic acid ที่ความเข้มข้น 2, 4, 6, 8 และ 10 µg/ml จากนั้นปิเปตสารละลาย ascorbic แต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 20 µl ผสมกับสารละลาย $ABTS^+$ ปริมาตร 180 µl ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 5 นาที แล้วนำไปบันทึกค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาหาค่า IC_{50} จากกราฟของการคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง ABTS cation radical ที่ได้จากสมการต่อไปนี้

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

เมื่อ $A_{control}$ = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม

A_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างหรือสารสกัด

1.3 วิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ ตามวิธีการ Becker ,(1994) อ้างโดย ยุวดีและคณะ, (2548)

วิเคราะห์คลอโรฟิลล์ (ภาพผนวกที่ 10) โดยการชั่งตัวอย่างสาหร่ายแห้ง 500 มิลลิกรัม บดละเอียดด้วยตัวทำละลาย 90% เอทานอล ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลา กรองสารละลาย แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็น ปรับปริมาตรด้วย 90% เอทานอล ให้เป็น 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปเซนตริฟิวจ์ ด้วยความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสที่ได้ วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 nm และ 665 nm นำค่าที่วัดได้มาคำนวณหาปริมาณคลอโรฟิลล์ A และ คลอโรฟิลล์ B จากสมการ

$$\text{คลอโรฟิลล์ A (มิลลิกรัม/ลิตร)} = \frac{[16.5A_{665} - 8.3A_{650}] \times 10}{\text{mg cell dry}}$$

$$\text{คลอโรฟิลล์ B (มิลลิกรัม/ลิตร)} = \frac{[33.8A_{650} - 12.5A_{665}] \times 10}{\text{mg cell dry}}$$

เมื่อ : A665 = ค่า absorbance ที่คลื่นแสง 665 นาโนเมตร

A 650 = ค่า absorbance ที่คลื่นแสง 650 นาโนเมตร

mg = น้ำหนักตัวอย่าง

1.4 วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟินอลิก โดยดัดแปลงวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric method ตามวิธีของ Wolfe *et, al.* (2003) (ภาพผนวกที่ 10)

โดยการนำตัวอย่างสารสกัดมา 125 ไมโครลิตร เติมลงในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่นอยู่ 500 ไมโครลิตร แล้วเติมสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent ปริมาตร 125 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ในที่มืดนาน 6 นาที หลังจากนั้นเติมโซเดียมคาร์บอเนตร้อยละ 7 ปริมาตร 1250 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น 1000 ไมโครลิตร วางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 90 นาที นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก

2. ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากสาหร่ายด้วยเอนไซม์

ใช้เอนไซม์ Flavozyme เข้มข้นร้อยละ 15 มาทำการย่อยสลายสาหร่าย โดยใช้สาหร่าย 4กรัม ใส่ลงในขวดก้นกลม เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตร 200 มล. ปรับค่า pH เป็น 7 เตรียมเอนไซม์ในขวดรูปชมพู่ 10% อุ่นที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 10 นาที เพื่อให้เอนไซม์พร้อมทำงาน แล้วจึงเติมเอนไซม์ลงไปในขวดที่เตรียมไว้ ใช้เวลาในการย่อยเป็น 0.5, 3, 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาด้วยความร้อน แล้วนำไปเซนตริฟิวจ์ที่ 6,000 rpm นาน 15 นาที กรองของเหลวส่วนใส มาทำให้เข้มข้น (ภาพผนวกที่ 4) แล้ววิเคราะห์ปริมาณร้อยละของผลผลิต วางแผนการทดลองแบบ CRD ทดลอง 3 ซ้ำ นำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์หาค่าองค์ประกอบทางเคมีและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ตามข้อ 1 และคัดเลือกตัวอย่างที่ดีที่สุดจากการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตเพื่อนำตัวอย่างที่ได้ส่งวิเคราะห์ชนิดของกรดอะมิโน (Amino acid profile) โดยเครื่องมือ HPLC ณ ห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด สาขาสงขลา เปรียบเทียบกับตัวอย่างก่อนการทำไฮโดรไลเซท

การวิเคราะห์ Amino acid profile โดย LC/MSD

สภาวะของเครื่อง HPLC

Column	:	EZ:faast 4u AAA-MS 250x2.0 mm
Flow rate	:	0.25 mL / min
Run time	:	20 min
Column temperature	:	35 ^{O}C
Injection volume	:	1 µL
Mobile phase	:	A: 10mM Ammonium formate in water
		B: 10mM Ammonium formate in methanol

สภาวะเครื่อง MS

MS	:	model
Mode	:	Positive Ion
Scan range	:	100-600 m/z
Neubulizer pressure	:	40 psi
ESI ion source temperature:		365 ^{O}C

2.1 การหาปริมาณผลผลิต (% yield)

วิเคราะห์ปริมาณผลผลิตของทุกสภาวะการไฮโดรไลซ์ โดยระเหยแห้งด้วยเครื่องกลั่นระเหยสุญญากาศ (rotary evaporator) ที่ความดัน 50 มิลลิบาร์ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง จนได้สารละลายข้นหนืด นำมาชั่งน้ำหนักและคำนวณจากน้ำหนักของสารละลายข้นหนืดที่ได้เทียบกับน้ำหนักสาหร่ายเริ่มต้น ตามสูตร (ภาพผนวกที่ 12)

$$\text{ปริมาณร้อยละผลผลิต} = \frac{\text{น้ำหนัก SWPH ข้นหนืด} \times 100}{\text{น้ำหนักเริ่มต้น}}$$

2.2 ระดับการย่อยสลาย (% degree of hydrolysis; %DH)

นำตัวอย่างสาหร่ายที่ไม่ผ่านการระเหย 2 มิลลิลิตร ใส่หลอดเซนตริฟิวส์ เติมกรดไตรคลอโรอะซิติก (trichloroaceticacid: TCA) เข้มข้นร้อยละ 20 ในปริมาตร 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันประมาณ 2 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 4000 × g นาน 15 นาที นำส่วนของเหลวใสด้านบนไปวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดด้วยวิธี Kjeldahl method วัดระดับการย่อยสลายตามวิธีของ Netto and Galeazzi (1998) และนำค่าที่ได้มาคำนวณตามสูตร

$$\text{ระดับการย่อยสลาย} = \frac{\text{20 \% TCA soluble-N} \times 100}{\text{Total-N}}$$

โดยที่ Total-N = ร้อยละไนโตรเจนทั้งหมดในวัตถุดิบ

20 % TCA soluble-N = ร้อยละไนโตรเจนที่ละลายได้ใน TCA

2.3 วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน (Lowry , 1957)

ปริมาณโปรตีนในสารตัวอย่างวิเคราะห์โดยใช้วิธีการของ Lowry และคณะ (1957) โดยใช้ Folin- Ciocalteu phenol's reagent ดังนี้

นำสารละลายตัวอย่างปริมาตร 100 ไมโครลิตรในหลอดแก้ว ผสมกับสารละลายแอลคาไลน์ (2% Na_2CO_3 ใน 0.1 N NaOH : 1% potassium sodium tartrate : 0.5% $CuSO_4$ อัตราส่วน 100:1:1) 3 มิลลิลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาเป็นเวลา 10 นาที แล้วเติมสารละลายโฟลิน-ฟีนอล (Folin- Ciocalteu phenol reagent : น้ำกลั่น เท่ากับ 1:1) ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันอย่างรวดเร็ว ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์ จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร คำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีนในสารตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานโดยใช้โบวีนซีรัมอัลบูมิน (bovine serum albumin) เป็นโปรตีนมาตรฐาน

การวิเคราะห์ทางสถิติ

นำผลที่ได้มาวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของข้อมูลตามแผนการทดลองโดยวิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่าง treatment ด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยโปรแกรมคอมพิวเตอร์

ตอนที่ 2 การแปรรูปสาหร่ายก้ามกุ้งที่ผ่านการไฮโดรไลเซทเป็นสาหร่ายแผ่นปรุงรส มีวิธีการศึกษา ดังนี้

2.1 การเตรียมตัวอย่างสาหร่าย

นำสาหร่ายก้ามกุ้งสดจากบ่อเพาะเลี้ยงด้วยระบบเกษตรอินทรีย์ ชั่งน้ำหนักในรูปน้ำหนักสด 5 กิโลกรัม มาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปา และนำมาผลิตเป็นสาหร่ายไฮโดรไลเซทด้วยสภาวะที่เหมาะสมที่สุดจากการคัดเลือกในการทดลองที่ 2 จากนั้นจึงนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา นาน 48 ชั่วโมง แบ่งบางส่วน บดให้ละเอียด เพื่อนำไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของสาหร่ายก่อนการแปรรูป ดังนี้ ความชื้น โปรตีน เถ้า เยื่อใย คาร์โบไฮเดรต ตามวิธีของ AOAC (2000) และสารอออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลสารอิสระโดยวิธี DPPH radical scavenging assay ตามวิธีของ Fenglin (2004) และ ABTS assay ดัดแปลงตามวิธีการของ Rice-Evans *et,al*. (1999) ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ และ บี ตามวิธีการ Becker ,(1994) อ้างโดย ยุวดีและคณะ, (2548) ปริมาณสารประกอบฟินอลิก ตามวิธีการ Folin-Ciocalteu phenol test (AOAC, 1990) และส่งวิเคราะห์แร่ธาตุเหล็ก กับแคลเซียม

2.2 ศึกษาวิธีการแปรรูปสาหร่ายก้ามกุ้งแผ่น

ศึกษากระบวนการแปรรูปสาหร่ายก้ามกุ้งแผ่น จากการใช้สูตรการทำผลิตภัณฑ์ผักแผ่นจำนวน 3 สูตร โดยการนำสาหร่ายก้ามกุ้งที่ผ่านการไฮโดรไลเซท จากการทดลองข้างต้น มาผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที แล้วทำให้เย็นทันที จากนั้นปั่นผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Blender เป็นเวลา 1.30 นาที ผสมส่วนผสมต่างๆ ที่แสดงในตารางที่ 1 ปั่นต่ออีก 1 นาที จากนั้นเทส่วนผสมจำนวน 100 กรัม ที่ปั่นได้ลงบนถาดอะลูมิเนียมขนาด 27 × 36 เซนติเมตร ที่รองก้นถาดด้วยพลาสติก เกลี่ยให้เรียบบาง และได้ระดับเสมอกันทั่วทั้งถาด นำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6-8 ชั่วโมง (ภาพผนวกที่ 5)

จากนั้นนำสาหร่ายแผ่นที่ผ่านการแปรรูปทั้ง 3 สูตร ด้วยเครื่องบด ร่อนผ่านตะแกรงขนาด 40 เมซ และวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่นเดียววิธีการก่อนแปรรูป นำผลที่ได้มาเปรียบเทียบหาความแตกต่างระหว่างชุดการทดลอง วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของข้อมูลตามแผนการทดลองโดยวิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยของข้อมูลระหว่าง treatment ด้วยวิธี Duncan’s New multiple range test: DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยโปรแกรมคอมพิวเตอร์

ตารางที่ 1 ส่วนผสมของผลิตภัณฑ์สาหร่ายก้ามกุ้งแผ่นปรุงรสจำนวน 3 สูตร

วัตถุดิบ	ปริมาณส่วนผสม (ร้อยละ)		
	สูตรที่ 1	สูตรที่ 2	สูตรที่ 3
น้ำตาล	6.00	10.00	6.00
เกลือ	0.70	0.50	
ซีอิ๊วขาว	0.40	-	-
ซอสคิดโค่แมน	-	8.00	3.50
พริกไทย	0.05	0.50	0.10
แป้งสาลี	1.00	-	-
พริกป่น		-	-
แป้งเปียก	1.0	2.0	3.50
สาหร่าย	20	20	20

หมายเหตุ : แป้งเปียก หมายถึง แป้งเปียกที่เป็นส่วนผสมของแป้งมันกับแป้งข้าวเหนียว อัตราส่วน 3:1 จำนวน 5 กรัม ผสมในน้ำ 100 กรัม ตั้งไฟจนมีลักษณะเป็นแป้งเปียก

ที่มา : สูตรที่ 1 ดัดแปลงจาก อนุวัตร และคณะ (2550)

สูตรที่ 2,3 ดัดแปลงจากวิลาสินี (2555)

สถานที่ทำการทดลอง

ทำการทดลอง ณ ห้องปฏิบัติการชีวเคมี สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ และอาคารแปรรูป สาขาอุตสาหกรรมอาหารและผลิตภัณฑ์ประมง คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตตรัง อ. สิเกา จ.ตรัง ในปีงบประมาณ 2563

ผลการวิจัยและวิจารณ์

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นในสาหร่ายก้ามกุ้ง (*Chara corollina*)

จากการนำสาหร่ายสด (รูปที่ 2 ก) ล้างทำความสะอาด และอบแห้ง บดละเอียด (รูปที่ 2 ข) จากนั้นจึงนำไปทำการไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ (รูปที่ 2 ค) เมื่อนำสาหร่ายก้ามกุ้งแบบผงแห้ง โดยการอบลดความชื้นจนได้เท่ากับร้อยละ 12.06 น้ำหนักเริ่มต้น 50 กรัม มาผลิตเป็นโปรตีนไฮโดรไลเซท จากการไฮโดรไลซ์สาหร่ายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ ร้อยละ 15 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จนได้ผลิตภัณฑ์ที่ลักษณะข้นเปียก มีความชื้นเท่ากับร้อยละ 69.91 ได้น้ำหนักผลิตภัณฑ์เพิ่มขึ้น เท่ากับ 540 กรัม เมื่อนำสาหร่ายก้ามกุ้งแบบผงแห้ง วิเคราะห์หาคุณค่าทางโภชนาการและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 2

(ก) (ข) (ค)

ภาพที่ 2 สาหร่ายก้ามกุ้ง **(ก)** สาหร่ายสด **(ข)** สาหร่ายอบแห้ง **(ค)** สาหร่ายก้ามกุ้งไฮโดรไลเซท

องค์ประกอบทางเคมีและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในสาหร่ายก้ามกุ้ง

องค์ประกอบทางเคมีในสาหร่ายก้ามกุ้ง (*C. corollina*) รูปแบบสาหร่ายแห้ง มาทำการหาปริมาณความชื้น เถ้า ไขมัน โปรตีน เยื่อใย และคาร์โบไฮเดรต (A.O.A.C., 2000) กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด ตรวจสอบโดยวิธี DPPH radical scavenging assay และวิธี ABTS radical scavenging assay ปริมาณคลอโรฟิลล์เอและบี และปริมาณฟินอลิก โดยทำการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ ได้ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 2 พบว่า ปริมาณความชื้นมีค่าร้อยละ 12.04 ปริมาณเถ้ามีค่าเท่ากับร้อยละ 25.39 ปริมาณไขมันมีค่าเท่ากับร้อยละ 2.32 ปริมาณโปรตีนมีค่าเท่ากับร้อยละ 18.76 ปริมาณเยื่อใย มีค่าเท่ากับร้อยละ 10.77 ส่วนปริมาณคาร์โบไฮเดรต มีค่าเท่ากับร้อยละ 41.47 ผลการทดลองแสดงให้เห็นถึงคุณค่าทางโภชนาการในสาหร่ายน้ำจืดสีเขียวชนิดนี้ จัดว่ามีคุณค่าทางสารอาหารที่ดี เพราะมีปริมาณโปรตีนและเยื่อใยสูง ส่วนไขมันต่ำ มีกรดอะมิโนจำเป็นครบถ้วน เหมาะสำหรับการทำเป็นอาหารสุขภาพ เป็นไปในทำนองเดียวกับรายงานเบื้องต้นของการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในสาหร่ายก้ามกุ้งของ วรรณิณี (มปป.) ที่มีค่าปริมาณความชื้น เถ้า ไขมัน โปรตีน เยื่อใย และคาร์โบไฮเดรต เท่ากับร้อยละ 14.15, 24.95, 2.54, 19.55, 7.29 และ 38.82 ตามลำดับ รวมถึงคุณค่าทางโภชนาการใกล้เคียงกับสาหร่ายขนนก โดยงานวิจัยของอุไรวรรณ และคณะ (2558) พบว่าองค์ประกอบทางเคมีในสาหร่ายขนนก (*Caulerpa racemosa*) รูปแบบสาหร่ายแห้ง เมื่อนำมา

วิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมี พบว่าสาหร่ายแห้งมีค่าความชื้นร้อยละ 12.19 ปริมาณเถ้า โปรตีน ไขมัน เยื่อใย และคาร์โบไฮเดรต มีค่าเท่ากับร้อยละ 13.57, 17.58, 0.88, 9.82 และ 45.96 ตามลำดับ แต่ผลทดสอบองค์ประกอบทางเคมีในสาหร่ายก้ามกุ้งมีปริมาณโปรตีนและเยื่อใยต่ำกว่าสาหร่ายพวงองุ่นแห้งที่รายงานโดย อุไรวรรณ และคณะ (2561) ซึ่งมีค่าความชื้นมีค่าร้อยละ 8.96 ส่วนปริมาณเถ้า โปรตีน ไขมัน และเยื่อใย มีค่าเท่ากับร้อยละ 6.43, 24.84, 1.76 และ 16.13 ตามลำดับ แต่ทั้งนี้ปริมาณสารอาหารยังอยู่ในช่วงเดียวกับเอกสารทางวิชาการ ที่กล่าวว่า สาหร่ายจะมีปริมาณไขมันที่อยู่ในช่วงระหว่างร้อยละ 1-8 ของน้ำหนักแห้ง สาหร่ายสีเขียวจะมีปริมาณไขมันสูงกว่าสาหร่ายสีแดงและสาหร่ายสีน้ำตาล (Rohani-Ghadikolaei *et al.,* 2010) ปริมาณโปรตีนที่พบในสาหร่ายมีค่าประมาณร้อยละ 1-25 ของน้ำหนักแห้ง ส่วนคาร์โบไฮเดรตในสาหร่ายมีปริมาณร้อยละ 4-80 ของน้ำหนักแห้ง ขึ้นกับชนิดของสาหร่ายซึ่งปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่พบในสาหร่ายพวงองุ่น มีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 12.80-59.27 ของน้ำหนักแห้ง

กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด ตรวจสอบโดยวิธี DPPH radical scavenging assay รายงานผลในหน่วยค่าความเข้มข้นที่ให้ผลต้านออกซิเดชันครึ่งหนึ่ง (IC_{50}) จากผลการทดลองพบว่า สาหร่ายก้ามกุ้ง (*C. corollina*) แสดงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ มีค่าเท่ากับ 2.6866 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด ตรวจสอบโดยวิธี ABTS radical scavenging assay แสดงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ มีค่าเท่ากับ 0.1733 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ มีค่าเท่ากับ 5.58 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณคลอโรฟิลล์บี มีค่าเท่ากับ 3.55 มิลลิกรัมต่อลิตร และปริมาณฟินอลิก มีค่าเท่ากับ 2.84 มก.สมมูลกรดแกลลิกต่อกรัมตัวอย่าง การทดลองครั้งนี้พบว่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของสาหร่ายก้ามกุ้งมีค่าใกล่เคียงกับสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน โดยจากงานทดลองของ รจนา และคณะ (2550) พบว่าสาหร่ายสไปรูลินามีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 0.552-2.045 mg/ml ซึ่งปริมาณรงควัตถุสารสีในสาหร่าย ส่งผลต่อปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระเช่นเดียวกับสารสีในพืชอื่น (Suttajit *et al.,* 2006) โดยเฉพาะในสาหร่ายสีเขียวประกอบด้วยคลอโรฟิลล์ชนิด เอ และ บี ซึ่งคลอโรฟิลล์ เอ จัดเป็น primary photosynthetic pigment ส่วนคลอโรฟิลล์ บีและคลอโรฟิลล์อื่นๆ จัดเป็น secondary photosynthetic pigment ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ ที่พบในสาหร่ายส่วนใหญ่อยู่ในช่วง 0.1-2.0 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักแห้ง (Stewart, 1974) คลอโรฟิลล์เอ จะมีคุณสมบัติละลายในแอลกอฮอล์ ไดเอทธิลอีเทอร์ เบนซีน และอะซีโตน แต่ไม่ละลายในน้ำ โดยปริมาณคลอโรฟิลล์ในสาหร่ายชนิดต่างๆ จะเป็นปฏิภาคกลับกับความเข้มแสง ซึ่งแสงจะเป็นตัวกำหนดการสร้างคลอโรฟิลล์ และจะถูกทำลายถ้าได้รับแสงที่ความเข้มแสงสูงเป็นเวลานานๆ แต่ที่ความเข้มแสงต่ำ ปริมาณคลอฟิลล์จะสูง (Fogg, 1975) จากผลการทดลองครั้งนี้ให้ค่าที่ต่างกันเล็กน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับผลการประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและสารพฤกษเคมีของสาหร่ายก้ามกุ้ง (วรรณิณี และคณะ, 2563) ที่พบว่าสารสกัดสาหร่ายก้ามกุ้งด้วยตัวทำละลายเมทานอล มีปริมาณฟีนอลิกรวม เท่ากับ 13.316 mg GAE/g extract ค่า IC_{50} ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH เท่ากับ 0.774 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร การยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS มีค่าเท่ากับ 4.074 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งอาจเกิดจากปัจจัยที่ต่างกัน ได้แก่อายุสาหร่ายที่เก็บเกี่ยวมาทดลอง พื้นที่และฤดูกาลที่เก็บตัวอย่าง มีและวิธีการสกัดตัวอย่าง อีกทั้งมีรายงานกล่าวว่าปริมาณสารชีวเคมีภายในเนื้อเยื่อของ

สาหร่ายมีการผันแปรตามช่วงเวลาของการเติบโต แต่ทั้งนี้ผลการทดลองบ่งชี้ถึงปริมาณสารอาหารที่มีประโยชน์

กล่าวได้ว่า สาหร่ายก้ามกุ้งให้คุณค่าทางโภชนาการเป็นไปในทำนองเดียวกัน อาจมีค่าแตกต่างกันกันเล็กน้อย มาจากการผันแปรขององค์ประกอบทางเคมีระยะเวลาและช่วงระยะการเก็บตัวอย่าง โดยมีรายงานกล่าวว่าปริมาณสารชีวเคมีภายในเนื้อเยื่อของสาหร่ายมีการผันแปรตามช่วงเวลาของการเติบโต จากผลการทดลองครั้งนี้จะพบว่าโปรตีนและเยื่อใยในสาหร่าย จัดเป็นสารอาหารที่ส่งผลดีต่อสุขภาพ และมีปริมาณโปรตีนใกล้เคียงกับสาหร่ายผมนาง (ร้อยละ 18.04) (อรพรรณ, 2553) อีกทั้งโปรตีนในสาหร่ายมักจะอุดมไปด้วยกรดอะมิโนจำเป็นครบถ้วน เหมาะในการนำไปใช้เป็นอาหารเสริมสุขภาพและลดน้ำหนัก

ตารางที่ 2 องค์ประกอบทางเคมีในสาหร่ายน้ำจืด ก้ามกุ้ง (*Chara corollina*) แบบแห้ง

องค์ประกอบทางเคมี	สาหร่ายก้ามกุ้ง (น้ำหนักแห้ง)
ความชื้น (%)	12.04±0.71
เถ้า (%)	25.39±0.27
ไขมัน (%)	2.32±0.04
โปรตีน (g/100g)	18.76±0.12
เยื่อใย (%)	10.77±0.74
คาร์โบไฮเดรต (%)	41.47±0.48
คลอโรฟิลล์ A (mg/L)	5.58±0.04
คลอโรฟิลล์ B (mg/L)	3.55±0.13
ฤทธิ์ต้านอนุมูลสารอิสระDPPH (IC50mg/ml)	2.6866±0.12
ฤทธิ์ต้านอนุมูลสารอิสระABTS (IC50mg/ml)	0.1733±0.02
ฟินอลิก (mg gallic acid /g sample)	2.84±0.10

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกันในแนวนอนไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's multiple test (DMRT)

การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากสาหร่ายก้ามกุ้ง

การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ (Flavourzyme)

เมื่อนำผงสาหร่ายแห้ง ไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์ ฟลาโวไซม์ ที่ความเข้มข้นเอนไซม์ร้อยละ 15 แปรระยะเวลาการย่อยเป็น 0.5, 3, 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง โปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้ เรียกว่า ef-FAPH ผลการวิเคราะห์ แสดงดังตารางที่ 3 และ 4 ดังนี้

ปริมาณผลผลิต (% yield) ของสาหร่ายที่ผ่านการไฮโดรไลเซทด้วยเอนไซม์ (ef-FAPH)

เมื่อวิเคราะห์ปริมาณผลผลิตของ ef-FAPH ที่ได้ (ตารางที่ 3) พบว่า ระยะเวลาการไฮโดรไลซ์มีอิทธิพลต่อปริมาณผลผลิต โดยผลการทดลองมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($P \leq 0.05$)

เมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากัน แต่ระยะเวลาการย่อยสลายนานขึ้น ทำให้ปริมาณผลผลิตมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นตามไปด้วย ซึ่งการทดลองนี้ ใช้เอนไซม์ฟลาโวไซม์เข้มข้นร้อยละ 15 เมื่อทำการไฮโดรไลซ์เป็นเวลา 0.5, 3, 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง มีปริมาณร้อยละผลผลิต ef-FAPH เท่ากับ 79.74, 80.30, 80.13, 83.38, 81.52 และ 89.10 ตามลำดับ ดังนั้น สภาวะการไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ร้อยละ 15 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงให้ค่าผลผลิตสูงที่สุด เท่ากับร้อยละ 89.10 เช่นเดียวกับการทดลองของอุไรวรรณ และคณะฯ (2557) ศึกษาการไฮโดรไลซ์สาหร่าย *Nostoc commune* ด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์เข้มข้นร้อยละ 15 พบว่าปริมาณผลผลิตมีค่าสูงสุดที่สภาวะการไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ร้อยละ 15 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เท่ากับร้อยละ 35.63

ระดับการย่อยสลาย (%DH) ของ ef-FAPH

การวิเคราะห์ระดับการย่อยสลายของ ef-FAPH (ตารางที่ 3) การทดลองให้ผลดังนี้ ที่ระยะเวลาการไฮโดรไลซ์เป็นเวลา 0.5, 3, 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง มีค่าร้อยละของระดับการย่อยสลาย เท่ากับ 62.02, 66.19, 74.03, 90.62, 66.60 และ 69.12 ตามลำดับ พบว่าค่าระดับการย่อยสลายเพิ่มขึ้นตามเวลาการไฮโดรไลซ์ โดยเฉพาะอัตราการไฮโดรไลซ์เพิ่มขึ้นอย่างเร็วในช่วงเวลา 0-12 ชั่วโมง หลังจากนั้นอัตราการย่อยสลายจะเริ่มลดลง ทั้งนี้เพราะอัตราการเกิดปฏิกิริยาขึ้นกับปริมาณเอนไซม์ตั้งต้นและระยะเวลาการเข้าทำปฏิกิริยา เมื่อเอนไซม์ทำงานจนถึงระดับหนึ่งแล้ว ค่าการย่อยสลายจะคงที่เพราะปริมาณเอนไซม์มีมากเกินพอ และมากกว่าโปรตีนที่มีอยู่ จึงทำให้ค่าระดับการย่อยสลายที่วิเคราะห์ได้จึงมีค่าคงที่ (Cohen *et, al.,* 1965) แสดงให้เห็นว่าปริมาณเอนไซม์และระยะเวลาในการย่อยสลายมีผลต่อความสามารถในการย่อยสลายของเอนไซม์ในช่วงระยะเวลาหนึ่งเท่านั้น เนื่องจากการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์กับโปรตีนลดลง (Wilkinson, 1961, Jack และ Mona, 1966) และเวลาในการย่อยสลายเพิ่มขึ้นส่งผลให้ได้โปรตีนละลายน้ำได้มากขึ้น ผลิตภัณฑ์ที่ได้อาจไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

ปริมาณโปรตีน ของ ef-FAPH

ผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในสาหร่ายที่ย่อยด้วยเอนไซม์ Flavourzyme (ef-FAPH) โดยวิธีการของ Lowry และคณะ (1957) แสดงเป็นหน่วยมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (mg/ml) แสดงในตารางที่ 3 พบว่า ปริมาณโปรตีนที่ระยะเวลาการไฮโดรไลซ์ต่างกัน มีค่าแตกต่างกันทางสถิติ ($P \leq 0.05$) โดยปริมาณโปรตีนใน ef-FAPH ที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ ร้อยละ 15 เป็นเวลา 0.5, 3, 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 0.56, 0.43, 0.36, 0.35, 0.27 และ 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แสดงว่า ระยะเวลาการย่อยสลายที่ต่างกัน ส่งผลต่อความสามารถของเอนไซม์ ต่อการไฮโดรไลซ์สาหร่าย หรือการตัดพันธะเพปไทด์ของโปรตีนให้กลายเป็นสายเปปไทด์ และกรดอะมิโนอิสระได้ต่างกัน โดยระยะเวลาการย่อยสลายนานขึ้น จะส่งผลให้โปรตีนลดลง เมื่อวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน จึงพบได้ในปริมาณที่แตกต่างกัน ทั้งนี้มีแนวโน้มตัวอย่างเหมาะสม ซึ่งมีปริมาณโปรตีนลดลง แสดงว่าน่าจะเกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นกรดอะมิโนอิสระมากขึ้น ได้แก่ ef-FAPH ที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ นาน 24 ชั่วโมง ซึ่งจะได้ทำการคัดเลือกตัวอย่างส่งวิเคราะห์หาปริมาณกรดอะมิโน

ในตัวอย่างต่อไป ทั้งนี้เมื่อปริมาณเอนไซม์มากเกินพอกับปริมาณโปรตีนที่มีอยู่อัตราการเกิดปฏิกิริยาไม่ขึ้นกับปริมาณเอนไซม์ (zero order reaction) ดังทฤษฎีของ Michaelis และ Menten

การทดลองครั้งนี้ให้ผลเช่นเดียวกับการทดลองของอุไรวรรณ และคณะฯ (2557) ศึกษาการไฮโดรไลซ์สาหร่าย *Nostoc commune* ด้วยกรดไฮโดรคลอริกและเอนไซม์ฟลาโวไซม์เข้มข้นร้อยละ 15 พบว่าตัวอย่างสาหร่ายที่มีปริมาณโปรตีนต่ำสุด ได้แก่สาหร่ายที่ย่อยสลายด้วยกรดไฮโดรคลอริก 6 นอร์มัล นาน 24 ชั่วโมง ส่วนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ Flavourzyme ร้อยละ 15 เป็นเวลา 0.5 - 24 ชั่วโมง มีปริมาณโปรตีนไม่แตต่างกัน อยู่ในช่วง เท่ากับ 11.13 - 11.83 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 3 ปริมาณผลผลิต ระดับการย่อยสลายและปริมาณโปรตีนในสาหร่ายก้ามกุ้ง (*C. corollina*) ที่ผ่านการไฮโดรไลเซตด้วยเอนไซม์ Flavourzyme เข้มข้นร้อยละ 15

ระยะเวลาย่อยสลาย(ชม.)	ปริมาณผลผลิต (% yield)	ระดับการย่อยสลาย (%)	ปริมาณโปรตีน (mg/ml)
0.5	79.74±2.57^{b}	62.02±5.99^{b}	0.56±0.01^{a}
3	80.30±2.46^{b}	66.19±13.48^{b}	0.43±0.01^{b}
6	80.13±0.51^{b}	74.03±14.71^{ab}	0.36±0.04^{c}
12	83.38±2.01^{b}	90.62±4.42^{a}	0.35±0.03^{c}
18	81.52±1.62^{b}	66.60±17.12^{b}	0.27±0.02^{d}
24	89.10±2.86^{a}	69.12±9.92^{b}	0.25±0.01^{d}

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบโดยวิธี Duncan’s multiple test (DMRT

ตารางที่ 4 องค์ประกอบทางเคมีในสาหร่าย (*C. corollina*) ที่ผ่านการไฮโดรไลเซทด้วยเอนไซม์ Flavourzyme เข้มข้นร้อยละ 15

ระยะเวลาย่อย (ชม.)	ความชื้น (%)	เถ้า (%)	ไขมัน (%)	โปรตีน (%)	เยื่อใย (%)	คาร์โบไฮเดรต (%)
0.5	72.20±1.58^{b}	1.67±0.39^{b}	0.82±0.13^{b}	9.38±0.69^{a}	7.44±0.29	15.93±0.58^{ab}
3	72.33±0.58^{b}	2.09±0.14^{ab}	0.83±0.04^{b}	8.58±0.41^{ab}	7.39±0.77	16.17±0.42^{a}
6	72.29±0.23^{b}	2.35±0.02^{a}	0.86±0.05^{b}	8.31±0.32^{b}	7.37±0.51	16.19±0.61^{a}
12	72.34±0.67^{b}	1.80±0.36^{b}	0.93±0.21^{ab}	8.97±0.32^{ab}	7.45±0.53	15.96±0.47^{ab}
18	73.12±1.70^{a}	1.95±0.09^{ab}	0.91±0.09^{ab}	8.86±0.77^{ab}	7.39±0.69	15.15±0.50^{b}
24	73.91±0.71^{a}	1.90±0.21^{ab}	1.09±0.14^{a}	9.07±0.20^{ab}	7.36±0.88	14.03±0.49^{c}

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบโดยวิธี Duncan’s multiple test (DMRT)

องค์ประกอบทางเคมีในสาหร่ายก้ามกุ้ง (ef-FAPH) ที่ผ่านการไฮโดรไลเซท

องค์ประกอบทางเคมีในตัวอย่าง ef-FAPH ให้ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4 พบว่าตัวอย่างใน ef-FAPH ที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์ Flavourzyme ร้อยละ 15 เป็นเวลา 0.5, 3, 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง มีปริมาณความชื้นเท่ากับร้อยละ72.20, 72.33, 72.29, 72.34, 73.12 และ 73.91 ตามลำดับ โดยความชื้นในตัวอย่างที่ย่อยสลายระหว่างระยะเวลา 0.5 – 12 ชั่วโมง มีค่าไม่ต่างกัน แต่ต่างจากที่เวลาการย่อย 18 -24 ชั่วโมง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่งผลให้ปริมาณเถ้า ไขมัน โปรตีน และคาร์โบไฮเดรตมีความแตกต่างกันตามไปด้วย ปริมาณเถ้ามีค่าสูงสุดที่ระยะเวลาย่อยสลาย 6 ชั่วโมง เท่ากับร้อยละ 2.35 แต่ต่ำที่สุดที่ระยะเวลาย่อยสลาย 0.5 ชั่วโมง เท่ากับร้อยละ 1.67 ปริมาณไขมันมีค่าเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการย่อยสลาย โดยระยะเวลา 0.5, 3, 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับร้อยละ 0.82, 0.83, 0.86, 0.93, 0.91 และ 1.09 ตามลำดับ ขณะที่ปริมาณโปรตีนมีค่าลดลงตามระยะเวลาการย่อยสลาย โดยระยะเวลา 0.5, 3, 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับร้อยละ 9.38, 8.58, 8.31, 8.97, 8.86 และ 9.07 ตามลำดับ ส่วนปริมาณเยื่อใย มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ อยู่ในช่วงระหว่างร้อยละ 7.36 - 7.45 ปริมาณคาร์โบไฮเดรตมีค่าสูงสุดที่ระยะเวลาย่อยสลาย 3 - 6 ชั่วโมง เท่ากับร้อยละ 16.17 ต่ำที่สุดที่ระยะเวลาย่อยสลาย 24 ชั่วโมง เท่ากับร้อยละ 14.03 การทดลองนี้ บ่งชี้ว่าการไฮโดรไลเซท ด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของปริมาณเยื่อใยในสาหร่ายก้ามกุ้ง แต่มีผลต่อการลดลงของโปรตีน แต่ต่างจากงานวิจัยของสุณิสา และคณะ (2561) ทำการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเศษเหลือส่วนหัวและหนังของปลาดุกบิ๊กอุยสดก่อนการย่อยด้วยเอนไซม์ และโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้หลังจากการย่อยด้วยเอนไซม์ โดยการวิเคราะห์ปริมาณความชื้น โปรตีน ไขมัน และเถ้า พบว่าเศษเหลือของปลาดุกบิ๊กอุยสดที่ใช้เป็นวัตถุดิบมีปริมาณความชื้น (59.18 เปอร์เซ็นต์) โปรตีน (16.01 เปอร์เซ็นต์) ปริมาณไขมัน (12.40 เปอร์เซ็นต์) และเถ้า (5.08 เปอร์เซ็นต์) และเมื่อทำการย่อยด้วยเอนไซม์พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปนและโบรมิเลน ด้วยอัตราส่วนที่ต่างกัน 3 ระดับ (70:30, 50:50, 30:70) ทั้งสามอัตราส่วนมีปริมาณความชื้นลดลงกว่าตัวอย่างก่อนการไฮโดรไลเซท แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เนื่องจากโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ผลิตขึ้นมีการทำให้เป็นผงโดยการนำความชื้นออกด้วยการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ส่งผลให้ปริมาณโปรตีนในโปรตีนไฮโดรไลเซทสูงกว่าในเศษปลาสด แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นกัน ขณะที่พบปริมาณไขมันในโปรตีนไฮโดรไลเซทของ P30:B70 และ P70:B30 ต่ำกว่าเศษปลาสด และ P50:B50 เนื่องจากในกระบวนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์จะเกิดการรวมกันของเมมเบรนเกิดเป็นเวสิเคลที่ไม่ละลายน้ำจึงสามารถถูกแยกออกจากโปรตีนไฮโดรไลเซทที่มีความสามารถในการละลายน้ำในขั้นตอนของการหมุนเหวี่ยง ส่วนปริมาณเถ้าของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ทุกอัตราส่วนของเอนไซม์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่มีปริมาณสูงกว่าที่พบในเศษเหลือปลาสด ซึ่งผลการทดลองที่มีความแตกต่างกัน ไม่สามารถนำมาใช้เทียบเคียงกันได้ สืบเนื่องมาจากความชื้นในตัวอย่าง และตัวอย่างที่นำมาใช้ไฮโดรไลซ์แตกต่างกัน เช่นเดียวกับงานทดลองของลีนา (2555) พบว่า องค์ประกอบทางเคมีของโปรตีนถั่วหรั่งเข้มข้น (BPC) โปรตีนถั่วหรั่งเข้มข้นย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (BPCH-A) ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ (%DH) 10, 20 และ 30 และโปรตีนถั่วหรั่งเข้มข้นย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ (BPCH-F) ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ (%DH) 5, 10 และ 15 พบว่า BPC มีโปรตีน คาร์โบไฮเดรตทั้งหมด ไขมัน และเถ้า เป็นองค์ประกอบร้อยละ 66.83, 30.23, 2.28 และ 1.66 ตามลำดับ ขณะที่ตัวอย่างที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ คือ

BPCH-A และ BPCH-F มีปริมาณโปรตีน และคาร์โบไฮเดรตอยู่ในช่วงร้อยละ 45.57-65.78 และ 26.20-48.84 ตามลำดับ

ตารางที่ 5 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในสาหร่าย *Chara corollina* ที่ผ่านการไฮโดรไลเซทด้วยเอนไซม์ Flavourzyme เข้มข้นร้อยละ 15

ระยะเวลาย่อยสลาย (ชม.)	ฤทธิ์ต้านอนุมูลสารอิสระDPPH (IC50mg/ml)	ฤทธิ์ต้านอนุมูลสารอิสระABTS (IC50mg/ml)	คลอโรฟิลล์ เอ (mg/L)	คลอโรฟิลล์ บี (mg/L)	ฟินอลิก (mg/g sample)
0.5	3.0384±0.05^{c}	1.2951±0.05^{c}	0.261±0.002^{a}	0.129±0.002^{a}	56.16±1.50^{d}
3	2.9863±0.08^{c}	1.0655±0.03^{b}	0.221±0.003^{b}	0.088±0.002^{b}	61.07±7.09^{cd}
6	2.1888±0.06^{ab}	1.1573±0.01^{b}	0.183±0.004^{d}	0.027±0.002^{e}	65.20±3.08^{c}
12	2.2609±0.06^{b}	0.8834±0.11^{a}	0.204±0.001^{c}	0.027±0.003^{e}	60.24±2.77^{cd}
18	2.1586±0.05^{ab}	0.8240±0.07^{a}	0.203±0.002^{c}	0.036±0.001^{d}	73.35±0.66^{b}
24	2.1094±0.08^{a}	0.8206±0.07^{a}	0.184±0.004^{d}	0.078±0.002^{c}	90.86±4.83^{a}

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบโดยวิธี Duncan’s multiple test (DMRT)

กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ ของ ef-FAPH

กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด ตรวจสอบโดยวิธี DPPH radical scavenging assay รายงานผลในหน่วยค่าความเข้มข้นที่ให้ผลต้านออกซิเดชันครึ่งหนึ่ง (IC_{50}) (ตารางที่ 5) จากผลการทดลองพบว่า ef-FAPH ของสาหร่ายก้ามกุ้งที่ผ่านการย่อยด้วยระยะเวลาแตกต่างกัน แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแตกต่างกัน โดยมีแนวโน้มฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีค่าเพิ่มขึ้น เมื่อระยะเวลาการไฮโดรไลซ์เพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้ที่ระยะเวลาการย่อยสลาย 24 ชั่วโมง ให้ค่าการต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด เท่ากับ 2.1094 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วน ef-FAPH จากการใช้เอนไซม์ฟลาโวไซม์ร้อยละ 15 ไฮโดรไลซ์เป็นเวลา 0.5 ชั่วโมง ให้ค่าการต้านอนุมูลอิสระต่ำที่สุด เท่ากับ 3.0384 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P\leq0.05$) เช่นเดียวกับการตรวจสอบโดยวิธี ABTS assay พบว่าการใช้เอนไซม์ฟลาโวไซม์ร้อยละ 15 ไฮโดรไลซ์ เป็นเวลา 18 -24 ชั่วโมง แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระรวมสูงที่สุด เท่ากับ 0.8206 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P\leq0.05$) กับชุดการทดลองอื่น ดังนั้น การใช้เวลาในการไฮโดรไลซ์นานขึ้น สามารถส่งผลให้สาหร่ายแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีขึ้น ทั้งนี้การใช้เอนไซม์ฟลาโวไซม์ร้อยละ 15 ไฮโดรไลซ์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีผลต่อปริมาณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด อีกทั้งฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากโปรตีนไฮโดรไลเซทของสาหร่ายก้ามกุ้งมีแนวโน้มให้ค่าที่ดีกว่าสาหร่ายที่ไม่ผ่านการไฮโดรไลเซท สอดคล้องกับงานวิจัยของ Betty *et. al*, (2014) ที่รายงานว่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจะเพิ่มตามความสามารถในการละลายและระดับการย่อยสลาย แต่ต่างจากรายงานของสุณิสา และคณะ (2561) ทำการวิเคราะห์ความสามารถใน

การต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเศษเหลือส่วนหัวและหนังปลาดุกบิ๊กอุยทั้งสามอัตราส่วนที่ทำการย่อยด้วยเอนไซม์ พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปนและโบรมิเลน อัตราส่วนต่างกัน 3 ระดับ (70:30, 50:50, 30:70) พบว่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของ P50:B50 และ P70:B30 เท่ากับร้อยละ 36.69 และ 35.59 ตามลำดับ ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่มากกว่า P30:B70 (ร้อยละ 28.02) ซึ่ง P50:B50 มีระดับการย่อยสลายต่ำ แต่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูง

ทั้งนี้ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่ต่างกัน อาจเนื่องมาจากโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ผลิตได้อาจมีกรดอะมิโนชนิดที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในปริมาณแตกต่างกัน เช่น ฮีสทิดีน ลิวซีน ไทโรซีน เมทไทโอนีน และซีสเทอีน เป็นต้น

การวิเคราะห์ปริมาณ ปริมาณคลอโรฟิลล์ ของ ef-FAPH

ปริมาณคลอโรฟิลล์ในสาหร่ายก้ามกุ้งที่ผ่านการไฮโดรไลเซท ที่วิเคราะห์ได้แสดงในตารางที่ 5 พบว่า สาหร่ายที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ร้อยละ 15 เป็นเวลา 0.5, 3, 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง มีปริมาณคลอโรฟิลล์เอ เท่ากับ 0.261, 0.221, 0.183, 0.204, 0.203 และ 0.184 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนคลอโรฟิลล์บี มีค่าเท่ากับ 0.129, 0.088, 0.027, 0.027, 0.036 และ 0.078 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ จากการทดลองพบว่า ปริมาณคลอโรฟิลล์มีค่าลดต่ำลงตามระยะเวลาของการย่อยสลาย ทั้งนี้คลอโรฟิลล์เป็นรงควัตถุที่มีบทบาทในกระบวนการสังเคราะห์แสงของพืช (Gross, 1991) ตลอดจนการตอบสนองต่อปัจจัยด้านต่างๆ (วิรัตน์, 2539) โดยสาหร่ายสีเขียวประกอบด้วยคลอโรฟิลล์ชนิดเอ และ บี พบปริมาณคลอโรฟิลล์เอในสาหร่ายประมาณ 0.1-2.0 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง (Stewart, 1974) ทั้งนี้ปริมาณคลอโรฟิลล์ในสาหร่ายชนิดต่างๆ จะเป็นปฏิภาคกลับกับความเข้มแสง ซึ่งแสงจะเป็นตัวกำหนดการสร้างคลอโรฟิลล์ ที่ความเข้มแสงต่ำ ปริมาณคลอโรฟิลล์จะสูง (Fogg, 1975) อีกทั้งประโยชน์ที่ได้จากการรับประทานคลอโรฟิลล์มีมากมาย เช่น การช่วยเพิ่มปริมาณเม็ดเลือดแดงในร่างกาย ช่วยบำรุงผิวพรรณให้สดใส ช่วยให้ภูมิต้านทานร่างกายแข็งแรงขึ้น มีฤทธิ์ต้านสารพิษในการก่อมะเร็ง ป้องกันหรือลดความรุนแรงของโรคติดเชื้อในทางเดินทางอาหาร ช่วยเพิ่มการดูดซึมแคลเซียมของร่างกาย ทำให้บาดแผลหายเร็ว เสริมสมรรถภาพการทำงานของตับ ควบคุมความเป็นกรดในกระเพาะอาหาร ควบคุมการย่อยอาหาร ปรับระดับน้ำตาลในเลือดในผู้ป่วยที่เป็นเบาหวาน ที่สำคัญคือมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ Hayatsu *et al.,* (1993) ดังนั้นการที่สาหร่ายแห้งยังคงมีปริมาณคลอโรฟิลล์ในระดับที่สูง ก็จะเป็นการดีต่อการนำสาหร่ายไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารส่งเสริมสุขภาพในอนาคต

การวิเคราะห์ปริมาณ Total phenolics ของ ef-FAPH

วิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ในสาหร่ายไฮโดรไลเซทด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ โดยวิธี Folin-Ciocalteu คำนวณปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด เทียบจากกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก (mg. gallic acid/g sample) ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 5 พบว่า ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดใน ef-FAPH ของสาหร่ายก้ามกุ้งที่มีค่าสูงที่สุด เท่ากับ 90.86 มก.สมมูลกรดแกลลิก/กรัม คือ สาหร่ายไฮโดรไลเซท

ที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง รองลงมาคือ สาหร่ายไฮโดรไลเซทที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ เป็นเวลา 018 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 73.35 มก.สมมูลกรดแกลลิก/กรัม ส่วนระยะเวลาการย่อยสลายที่ 0.5 ชั่วโมง ให้ค่าปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดต่ำที่สุด เท่ากับ 56.16 มก.สมมูลกรดแกลลิก/กรัม แตกต่างกันทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ทั้งนี้ ระยะเวลาการย่อยสลายนานขึ้น มีแนวโน้มปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด จะมีค่าเพิ่มสูงขึ้นตามไปด้วย อีกทั้งปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดจากโปรตีนไฮโดรไลเซทของสาหร่ายก้ามกุ้งมีแนวโน้มให้ค่าที่สูงกว่าสาหร่ายที่ไม่ผ่านการไฮโดรไลเซท

การทดลองครั้งนี้ ต่างจากงานวิจัยของอรพรรณ (2553) ซึ่งทำการวิเคราะห์ปริมาณฟินอลิกทั้งหมดของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากสาหร่ายสกุลกราซิลาเรีย (*Gracilaria spp.*) พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซทจากภาวะที่เหมาะสมของการย่อยสลายแต่ละสภาวะมีปริมาณสารฟินอลิกทั้งหมดแตกต่างกันทางสถิติ โดยการย่อยสลายสาหร่าย *(Gracilaria spp.)* ด้วยเอนไซม์โบรบิเลนร้อยละ 20 เวลาย่อย 3 ชั่วโมง มีปริมาณสารฟินอลิกทั้งหมดมากที่สุดมีค่าเท่ากับ 283.63 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ส่วนการย่อยสลายสาหร่ายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ มีปริมาณสารฟินอลิกทั้งหมด 129.88 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม เมื่อความเข้มข้นเอนไซม์มากขึ้นประสิทธิภาพในการย่อยสลายได้เพปไทด์ และสารฟินอลิกเพิ่มมากขึ้น ทำให้โปรตีนไฮโดรไลเซทมีปริมาณฟินอลิกทั้งหมดมากขึ้นด้วย ทั้งนี้ พืชทะเลจำพวกสาหร่ายทะเลมีปริมาณสารฟินอลิกในปริมาณสูงเช่นกัน

การวิเคราะห์ชนิดและกรดอะมิโน

การวิเคราะห์ชนิดและกรดอะมิโนด้วยเครื่อง LC-MS โดยใช้คอลัมน์ EZ:faast 4u AAA-MS 250x2.0 mm วิเคราะห์กรดอะมิโนเทียบกับสารละลายกรดอะมิโนมาตรฐาน โดยการนำตัวอย่างสาหร่ายก้ามกุ้งผงแห้ง วิเคราะห์หาปริมาณกรดอะมิโน (amino acid profile) ตามตารางที่ 8 พบว่าปริมาณกรดอะมิโนในสาหร่าย มีจำนวน 20 ชนิด แบ่งเป็นกรดอะมิโนจำเป็น ได้แก่ Arginine, Histidine, Isoleucine, Leucine, Lysine, Methionine, Phenylalanine, Threonine, Tryptophan, Valine มีปริมาณเท่ากับ 3,244, 251, 1,429, 2,435, 2,920, 5,318, 1,055, 2,091, 265, 1,669 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง กรดอะมิโนไม่จำเป็น ได้แก่ Alanine, Aspartic acid, Glutamic acid, Glycine, Proline, Serine, Tyrosine มีปริมาณเท่ากับ 2,661, 2,359, 1,874, 1,855, 1,649, 1,660, 640 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง ส่วนกรดอะมิโนอื่นได้แก่ Cystine, Glutamine และ Hydroxyproline มีปริมาณเท่ากับ 222, 821 และ 1.80 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง รวมมีปริมาณกรดอะมิโนรวมเท่ากับ 34,427 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม จัดอยู่ในกลุ่มกรดอะมิโนจำเป็น จำนวน 10 ชนิด กรดอะมิโนที่พบในปริมาณสูง ได้แก่ Methionine, Arginine, Lysine, Alanine, Leucine, Aspartic acid ตามลำดับ ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่มีผลต่อการนำไปผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซต เพราะผลการวิเคราะห์ได้ค่าปริมาณสูง

เมื่อนำสาหร่ายแห้งไปผ่านการไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์ Flavourzyme ร้อยละ 15 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ได้ผลิตภัณฑ์ ef-FAPH พบว่า กรดอะมิโนที่วิเคราะได้จาก ef-FAPH มีปริมาณเพิ่มสูงกว่าสาหร่ายแห้งก่อนนำไปไฮโดรไลเซท โดยแบ่งเป็นกรดอะมิโนจำเป็น ได้แก่ Arginine, Histidine,

Isoleucine, Leucine, Lysine, Methionine, Phenylalanine, Threonine, , Valine มีปริมาณเท่ากับ 9,720, 1,728, 3,888, 2,376, 4,320, 2,376, 1,080, 1,944, 3,024 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง ไม่พบกรดอะมิโนทริปโตเฟน ส่วนกรดอะมิโนไม่จำเป็น ได้แก่ Alanine, Aspartic acid, Glutamic acid, Glycine, Proline, Serine, Tyrosine มีปริมาณเท่ากับ 3,456, 4,968, 2,808, 2,592, 3,024, 2,800, 1,512 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง ส่วนกรดอะมิโนอื่น ได้แก่ Cystine และ Glutamine มีปริมาณเท่ากับ3,240 และ 3,672 มิลลิกรัมต่อ100 กรัมน้ำหนักแห้ง และไม่พบกรดอะมิโนไฮดรอกซีโพรลีน รวมมีปริมาณกรดอะมิโนรวม เท่ากับ 61,768 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม กรดอะมิโนที่พบในปริมาณมาก ได้แก่ Arginine, Aspartic acid, Lysine, Isoleucine, Glutamine, Alanine, Proline เมื่อเปรียบเทียบกับกรดอะมิโนเริ่มต้นพบว่า กรดอะมิโนหลายชนิดมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นกว่าปริมาณที่มีในตัวอย่างสาหร่ายก่อนการผ่านกรรมวิธีไฮโดรไลเซท โดยเฉพาะกรดอะมิโนอาร์จินีนซึ่งพบมากที่สุดใน ef-FAPH ทั้งนี้การไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์ Flavourzyme ผลการวิเคราะห์จะให้กรดอะมิโนอิสระทั้งชนิดและปริมาณมากกว่า ดังนั้น การทดลองบ่งชี้ว่า สาหร่ายที่ได้ภายหลังการไฮโดรไลซ์ ส่งผลต่อการเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการที่ดีเหมาะในการนำไปเพื่อพัฒนาและแปรรูปสาหร่ายต่อไป เช่นเดียวกับ จรินทร์ (2544) ได้พัฒนาซุปกึ่งสำเร็จรูปรสกุ้งจากหัวกุ้ง โดยการไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์โบรมิเลน ร่วมกับฟลาโวไซม์ในอัตราส่วนร้อยละ 1.5:1 ที่สภาวะ pH 6 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบว่า กรดอะมิโนอิสระและกรดอะมิโนทั้งหมด มีปริมาณ 66.8 และ 109.3 ต่อ 100 กรัม ตามลำดับ กรดอะมิโนที่พบสูงสุดตามลำดับ ได้แก่ อาร์จินีน กรดแอสปาร์ติก กรดกลูตามิก และไกลซีน ส่วนแพรวไพลิน (2552) พบว่า สารปรุงแต่งกลิ่นรสจากโปรตีนไฮโดรไลเซทเห็ด ย่อยสลายด้วยเอนไซม์โบรมิเลน สกัดด้วยน้ำอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง มีกรดอะมิโน 17 ชนิด โดยมีกรดกลูตามิกปริมาณสูงสุด

ผลการทดลองที่ได้ สอดคล้องกับการทดลองของ อุไรวรรณ และคณะ (2557) ที่ทำการไฮโดรไลซ์สาหร่ายนอสตอค ด้วยกรดไฮโดรคลอริก ได้ผลิตภัณฑ์ a-SWPH พบว่า กรดอะมิโนที่พบใน a-SWPH มีจำนวน 16 ชนิด ได้แก่ Arginine, Alanine, Glutamic acid, Aspartic acid Isoleucine , Glycine Leucine Serine Tyrosine, Proline, Threonine, Valine, Lysine, Methionine, Phenylalanine และ Histidine จัดอยู่ในกลุ่มกรดอะมิโนจำเป็น จำนวน 9 ชนิด กรดอะมิโนที่พบในปริมาณมาก ได้แก่ Arginine, Alanine, Glutamic acid, Aspartic acid, Lysine, Glycine, Leucine และ Methionine และกรดอะมิโนหลายชนิดมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นจากตัวอย่างสาหร่ายนอสตอคก่อนการผ่านกรรมวิธีไฮโดรไลเซท รวมถึงกรดกลูตามิกด้วย แต่กรดอะมิโนอาร์จินีนซึ่งพบมากที่สุดใน a-SWPH กลับไม่พบในสาหร่ายเริ่มต้น ขณะที่การไฮโดรไลซ์สาหร่ายนอสตอคด้วยด้วยเอนไซม์ Flavourzyme ร้อยละ 15 ได้ผลิตภัณฑ์ ef-SWPH พบว่า กรดอะมิโนที่พบใน ef-SWPH มีจำนวน 15 ชนิด ได้แก่ Alanine, Arginine, Aspartic acid, Glutamic acid, Glycine, Isoleucine, Leucine, Lysine, Methionine, Phenylalanine, Proline, Serine, Threonine, Tyrosine และ Valine โดยมีปริมาณเท่ากับ 604.98, 5669.34, 511.40, 332.64, 745.88, 23.26, 286.32, 887.14, 1883.76, 18.06, 240.76, 515.62, 231.54, 151.36 และ 72.16 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม จัดอยู่ในกลุ่มกรดอะมิโนจำเป็น จำนวน 8 ชนิด กรดอะมิโนที่พบในปริมาณมาก ได้แก่ Arginine,

Alanine, , Serine, Lysine, Glycine, และ Methionine เมื่อเปรียบเทียบกับกรดอะมิโนเริ่มต้นพบว่ากรดอะมิโนหลายชนิดมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นกว่าปริมาณที่มีในตัวอย่างสาหร่ายก่อนการผ่านกรรมวิธีไฮโดรไลเซท โดยเฉพาะกรดอะมิโนอาร์จินีนซึ่งพบมากที่สุดใน ef-SWPH แต่การทดลองครั้งนี้ต่างจากรายงานกรดอะมิโนในสาหร่ายเห็ดลาบ ที่พบปริมาณกรดอะมิโนจำนวน 17 ชนิด เป็นกรดอะมิโนจำเป็น 9 ชนิด แต่ไม่พบซีสทีน ส่วนอาร์จินีนพบในปริมาณต่ำ ขณะที่ Chanput *et, al*. (2009) พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ จะได้เปปไทด์ที่มีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เนื่องจากน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ดูดซึมได้ง่าย มี activity สูง สอดคล้องกับรายงานของ Xie *et, al*. (2008) ศึกษากรดอะมิโนบางชนิด และอนุพันธ์ของซิสทิอีน ฮีสติดีน ทริปโตแฟน ไลซีน อาร์จินีน ลิวซีน วาลีน เป็นต้น พบว่ามีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และยังมีรายงานกล่าวถึงสายพอลิเพปไทด์โดยเพปไทด์ที่มีกรดอะมิโน โนวาลีน ลิวซีน ไฮโซลิวซีน ไทโรซีน ทริปโตแฟน ฮิสทิดีน เมทไธโอนีน ไกลซีนและฟินิลอะลานีน สามารถแสดงสมบัติการต้านอนุมูลอิสระได้สูง (Zhang *et, al*., 2010)

เมื่อวิเคราะห์ปริมาณธาตุแคลเซียมและเหล็กในสาหร่ายก้ามกุ้งแบบผงแห้ง และสาหร่ายไฮโดรไลเซทด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ พบว่า ปริมาณแร่ธาตุในสาหร่ายที่ผ่านการไฮโดรไลเซทด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์มีปริมาณแร่ธาตุสูงกว่า แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยแคลเซียมในสาหร่ายที่ผ่านการไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ มีค่าเท่ากับ 2,715.710 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม สูงกว่าสาหร่ายก้ามกุ้งแบบผงแห้ง (2,036.995 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม) ส่วนแร่ธาตุเหล็กในสาหร่ายที่ผ่านการไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ มีค่าเท่ากับ 316.883 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม สูงกว่าสาหร่ายก้ามกุ้งแบบผงแห้ง (246.335 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม) แสดงว่าการไฮโดรไลซ์สาหร่ายด้วยเอนไซม์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของแร่ธาตุเหล็กและแคลเซียมในตัวอย่าง

ตารางที่ 6 ปริมาณกรดอะมิโนในสาหร่ายก้ามกุ้ง และสาหร่ายก้ามกุ้งที่ผ่านการไฮโดรไลเซท

Amino acid	สาหร่าย *C. corallina* (mg/ 100 กรัมตัวอย่างแห้ง)	สาหร่ายไฮโดรไลเซท (ef-FAPH) (mg/ 100 กรัมตัวอย่าง)
Essential amino acids (EAA)		
Arginine	3,244±11.28[b]	9,720±14.50[a]
Histidine	251±0.18[b]	1,728±4.21[a]
Isoleucine	1,429±7.51[b]	3,888±10.37[a]
Leucine	2,335±7.35	2,346±6.58
Lysine	2,920±4.15[b]	4,320±5.28[a]
Methionine	5,318±10.14[b]	2,376±6.74[a]
Phenylalanine	1,055±5.22	1,060±6.68
Threonine	2,091±1.36[a]	1,944±1.72[b]
Tryptophan	265±1.58	ND
Valine	1,669±2.51[b]	3,024±4.27[a]
Nonessential amino acids (Non-EAA)		
Alanine	2,661±4.29[b]	3,456±6.35[a]
Aspartic acid	2,359±2.32[b]	4,968±8.42[a]
Glutamic acid	1,874±3.98[b]	2,808±4.31[a]
Glycine	1,855±4.40[b]	2,592±3.84[a]
Proline	1,649±3.54[b]	3,024±6.11[a]
Serine	1,660±4.77[b]	2,800±4.25[a]
Tyrosine	640±1.08[b]	1,512±3.61[a]
Other amino acids		
Cystine	222±1.18[b]	3,240±5.46[a]
Cysteine	ND	3,240±5.41
Glutamine	821±1.12[b]	3,672±5.23[a]
Hydroxyproline	1.80±1.58	ND
Total amino acid	**34,427**	**61,768**
ปริมาณแร่ธาตุ		
แคลเซียม (mg/100g)	2,036.995±7.64[b]	2,715.710±5.72[a]
เหล็ก (mg/100g)	246.335±6.51[b]	316.883±1.04[a]

การแปรรูปสาหร่ายก้ามกุ้งที่ผ่านการไฮโดรไลเซทเป็นสาหร่ายแผ่นปรุงรส

สาหร่ายแผ่นอบแห้ง มีลักษณะแผ่นบาง สีเขียวเข้ม เมื่อนำไปทอด มีสีเขียวอ่อนลง มีความกรอบ และหอมกลิ่นพืชในสาหร่ายอย่างชัดเจน การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในสาหร่ายแผ่นปรุงรสทั้ง 3 สูตร (แสดงในตารางที่ 7) พบว่าความชื้นในสาหร่ายแผ่นปรุงรส สูตรที่ 3 มีค่าสูงที่สุด เท่ากับร้อยละ 15.65 ต่างจากสูตรที่ 1 และ 2 ที่มีค่าความชื้นต่ำลงมา ($P<0.05$) ทั้งนี้ แม้ว่าการใช้อุณหภูมิในการทำแห้งจะเท่ากัน แต่วัตถุดิบส่วนผสมที่ใช้แตกต่างกันจึงมีผลต่อการลดลงของน้ำผลิตภัณฑ์ไม่เท่ากันด้วย ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงสารอาหารและคุณภาพด้านต่างๆ ของสาหร่ายแผ่นปรุงรส รวมถึงส่งผลให้ปริมาณเถ้า โปรตีน ไขมัน และ เยื่อใยในสาหร่ายแผ่นปรุงรสมีค่าแตกต่างกัน ดังนี้ ปริมาณไขมันในสาหร่ายแผ่นปรุงรสสูตรที่ 1 และ 2 มีค่าอยู่ในช่วงระหว่างร้อยละ 0.50 – 0.57 สูงกว่าสูตรที่ 3 ซึ่งมีค่าเท่ากับร้อยละ 0.38 ($P<0.05$) ปริมาณโปรตีนสูงที่สุดในสูตรที่ 1 เท่ากับร้อยละ 13.19 และสูตรที่ 3 มีค่าต่ำที่สุด เท่ากับร้อยละ 7.57 ปริมาณเถ้าในสูตรที่ 1 และ 3 มีค่าไม่ต่างกันอยู่ในช่วงระหว่างร้อยละ 7.41 – 7.88 ต่างจากสูตรที่ 2 ที่มีค่าต่ำกว่า เท่ากับร้อยละ 5.63 ส่วนปริมาณเยื่อใย พบว่าสูตรที่ 1 มีค่าสูงที่สุด เท่ากับร้อยละ 3.08 ส่งผลให้ปริมาณคาร์โบไฮเดรตในสาหร่ายแผ่นปรุงรสทั้ง 3 สูตรมีค่าแตกต่างกัน โดยสูตรที่ 2 ให้ค่าสูงที่สุดเท่ากับ 71.95 แตกต่างจากสูตรที่ 1 และ 3 ซึ่งให้ค่าต่ำกว่า (66.31 – 68.52) อาจเนื่องมาจากการผลิตสาหร่ายปรุงรสใช้วัตถุดิบแป้งเป็นส่วนส่วนผสมในการผลิตในแต่ละสูตรไม่เท่ากัน ผลการวิเคราะห์ แสดงว่า การผลิตสาหร่ายแผ่นปรุงรสโดยใช้กระบวนการอบแห้ง ส่งผลต่อปริมาณสารอาหารในสาหร่ายแปรรูปในแต่ละสูตรไม่เท่ากัน มีแนวโน้มว่าสูตรที่ 1 จะให้คุณค่าทางโภชนาการดีกว่าสูตรอื่น

เมื่อเปรียบเทียบกับสาหร่ายแผ่นปรุงรส ที่ผลิตจากสาหร่ายพวงองุ่นที่ไม่ผ่านการไฮโดรไลเซทของอุไรวรรณ และคณะ (2561) ได้ลักษณะผลิตภัณฑ์มีความกรอบ และหอมกลิ่นสาหร่ายทะเลอย่างชัดเจน พบว่า องค์ประกอบทางเคมีในสาหร่ายแผ่นปรุงรส และสาหร่ายทอดปรุงรส มีค่าความชื้นต่ำกว่าการทดลองนี้ อาจเพราะสูตรการผลิต สาหร่ายที่ใช้ และอุณหภูมิในการทำแห้ง มีผลต่อการลดลงของน้ำในเซลล์สาหร่าย การอบและการทอดทำให้ปริมาณน้ำหรือความชื้นลดลง ทำให้ปริมาณเถ้า โปรตีน ไขมัน และ เยื่อใยในสาหร่ายแผ่นปรุงรส มีค่าต่างกัน โดยสาหร่ายแผ่นปรุงรส และสาหร่ายทอดปรุงรส มีค่าเท่ากับร้อยละ 5.01, 9.16, 1.89, 3.68 และ 1.68, 5.59, 65.37, 2.70 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองจะเห็นได้ว่าสาหร่ายก้ามกุ้งแผ่นปรุงรส สูตรที่ 1 มีค่าความชื้น ปริมาณเถ้า และปริมาณโปรตีนสูงกว่าสาหร่ายแผ่นปรุงรสที่ผลิตจากสาหร่ายขนนกที่ไม่ผ่านการไฮโดรไลเซทส่วยเยื่อใยมีปริมาณใกล้เคียงกัน ขณะที่ปริมาณไขมันมีค่าต่ำกว่า บ่งชี้ว่าคุณค่าทางโภชนาการในสาหร่ายก้ามกุ้งแผ่นปรุงรส สูตรที่ 1 ให้คุณค่าที่ดีกว่า สาหร่ายแผ่นปรุงรสที่ผลิตจากสาหร่ายพวงองุ่นและสาหร่ายแผ่นปรุงรสทอดกรอบที่ผลิตจากสาหร่ายขนนกที่ไม่ผ่านการไฮโดรไลเซท ซึ่งมีองค์ประกอบทางเคมีได้แก่ ปริมาณความชื้น เถ้า โปรตีน ไขมัน เยื่อใย และ คาร์โบไฮเดรต เท่ากับร้อยละ 7.05, 0.84, 4.61, 32.35, 1.89 และ 53.26 ตามลำดับ (อุไรวรรณ และคณะ, 2558)

ตารางที่ 7 องค์ประกอบทางเคมีในผลิตภัณฑ์สาหร่ายก้ามกุ้งแผ่นปรุงรส

องค์ประกอบทางเคมี	สาหร่ายก้ามกุ้งแผ่นปรุงรส		
	สูตรที่ 1	สูตรที่ 2	สูตรที่ 3
ความชื้น (%)	12.52±0.44[b]	12.16±0.02[b]	15.65±0.36[a]
เถ้า (%)	7.41±0.50[a]	5.63±0.57[b]	7.88±0.10[a]
ไขมัน (%)	0.57±0.03[a]	0.50±0.05[a]	0.38±0.03[b]
โปรตีน (%)	13.19±0.86[a]	9.76±0.78[b]	7.57±0.31[c]
เยื่อใย (%)	3.08±0.06[a]	2.30±0.30[b]	2.57±0.09[b]
คาร์โบไฮเดรต(%)	66.31±1.10[b]	71.95±1.42[a]	68.52±0.61[b]

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกันในแนวนอนไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's multiple test (DMRT)

การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (ตารางที่ 8) โดยวิธี DPPH assay และ ABTS assay ในสาหร่ายแผ่นปรุงรส พบว่า สูตรที่ 1 มีค่า IC_{50} เท่ากับ 2.3773 และ 0.1465 มก./มล. ตามลำดับ ให้ค่าการต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด ส่วนสูตรที่ 3 มีค่า IC_{50} เท่ากับ 3.1949 และ 0.4400 มก./มล. ตามลำดับ ให้ค่าการต้านอนุมูลอิสระต่ำที่สุด ทั้งนี้อาจเป็นเพราะสูตรที่ 1 ใช้อัตราส่วนสาหร่ายต่อแป้งเป็นส่วนผลิตที่สูงกว่าสูตรอื่น ปริมาณคลอโรฟิลล์ในสาหร่ายแผ่นปรุงรสทั้ง 3 สูตรมีค่าแตกต่างกันทางสถิติ พบว่า สูตรที่ 2 มีค่าปริมาณคลอโรฟิลล์เอ และบีสูงที่สุดเท่ากับ 0.258 และ 0.137 มก./ล. รองลงมาได้แก่สูตรที่ 1 (0.245 และ 0.117 มก./ล.) และสูตรที่ 3 (0.187 และ 0.047 มก./ล.) ตามลำดับ ขณะที่ปริมาณสารประกอบฟินอลิก ในสูตรที่ 2 มีค่าสูงที่สุดเท่ากับ 10.89 มก.สมมูลกรดแกลลิก/กรัมตัวอย่าง ส่วนสูตรที่ 1 และ สูตรที่ 3 มีค่าไม่แตกต่างกัน อยู่ในช่วงระหว่าง 6.49-6.57 มก.สมมูลกรดแกลลิก/กรัม ขณะที่ปริมาณแร่ธาตุทั้ง 3 สูตร มีค่าแตกต่างกันทางสถิติ โดยแร่ธาตุเหล็กและแคลเซียมพบสูงที่สุดในสูตรที่ 3 มีค่าเท่ากับ 66.48 และ 633.330 มก./100 ก. ตามลำดับ รองลงมาคือ สูตรที่ 1 มีค่าเท่ากับ 60.29 และ 606.30 มก./100 ก. ตามลำดับ และสูตรที่ 2 มีค่าเท่ากับ 46.02 และ 447.19 มก./100 ก. ตามลำดับ เมื่อพิจารณาคุณค่าทางโภชนาการพบว่าทั้ง 3 สูตร มีค่าปริมาณสารอาหารแต่ละกลุ่มสูงสุดต่างกันออกไป แต่หากดูผลโดยรวมจะพบว่าสูตรที่ 1 มีแนวโน้มว่าจะให้สารอาหารที่มีปริมาณสูง และเหมาะสมกับการบริโภคกว่าสูตรอื่น

จากผลการทดลองนี้ จะพบว่าสาหร่ายแผ่นปรุงรสจากสาหร่ายก้ามกุ้งที่ผ่านการไฮโดรไลเซทยังคงให้ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่ดี เช่นเดียวกับสาหร่ายแผ่นปรุงรสที่ผลิตจากสาหร่ายพวงองุ่นที่ไม่ผ่านการไฮโดรไลเซทของอุไรวรรณ และคณะ (2561) ซึ่งมีค่าการต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH assay และ ABTS assay อยู่ในช่วงร้อยละ 45.27 - 50.69 และสาหร่ายแผ่นทอดกรอบ เท่ากับร้อยละ 54.05 - 62.19 การออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ อาจมาจากสาหร่ายแผ่นปรุงงรสยังคงมีสารรงควัตถุ สารประกอบฟินอลิก กรดอะมิโน และสารพอลิแซ็กคาไรด์ ที่สามารถทำหน้าที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ ขณะที่สาหร่ายแผ่นปรุงรสสาหร่ายก้ามกุ้งที่ผ่านการไฮโดรไลเซท ยังให้ฤทธิ์การต้านอนุมูล

อิสระดีกว่า สาหร่ายแผ่นปรุงรสจากสาหร่ายขนนก ของอุไรวรรณ และคณะ (2558) ซึ่งให้ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ มีค่า IC_{50} เท่ากับ 210.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนผลิตภัณฑ์สาหร่ายแผ่นทอดกรอบ มีค่า IC_{50} เท่ากับ 329.43 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

ตารางที่ 8 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในผลิตภัณฑ์สาหร่ายก้ามกุ้งแผ่นปรุงรส

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	สาหร่ายก้ามกุ้งแผ่นปรุงรส		
	สูตรที่ 1	สูตรที่ 2	สูตรที่ 3
ฤทธิ์ต้านอนุมูลสารอิสระ DPPH (IC50 mg/ml)	2.3773±0.04[a]	2.9291±0.05[b]	3.1949±0.09[c]
ฤทธิ์ต้านอนุมูลสารอิสระ ABTS (IC50mg/ml)	0.1465±0.03[a]	0.3151±0.03[b]	0.4400±0.03[c]
คลอโรฟิลล์ เอ (mg/L)	0.245±0.001[b]	0.258±0.000[a]	0.187±0.001[c]
คลอโรฟิลล์ บี (mg/L)	0.117±0.005[b]	0.137±0.002[a]	0.047±0.002[c]
ฟินอลิก (mg/g sample)	6.57±0.31[b]	10.89±0.85[a]	6.49±0.42[b]
แร่ธาตุเหล็ก (mg/100g)	60.29±0.00[b]	46.02±0.00[c]	66.48±0.00[a]
แคลเซียม (mg/100g)	606.30±0.00[b]	447.19±0.00[c]	633.330.00[a]

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกันในแนวนอนไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's multiple test (DMRT)

ผลิตภัณฑ์สาหร่ายแผ่นปรุงรส จัดได้ว่ามีคุณลักษณะที่ตรงตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนของสาหร่ายทะเลอบ คือ มีสีที่ดี ตามธรรมชาติของส่วนประกอบที่ใช้ กลิ่นรสเป็นกลิ่นที่ดีตามธรรมชาติของส่วนประกอบที่ใช้ปราศจากกลิ่นรสอื่นที่ไม่พึงประสงค์ ลักษณะเนื้อสัมผัสไม่เหนียวหรือแข็งกระด้าง และไม่มีสิ่งแปลกปลอมที่ไม่ใช่ส่วนประกอบที่ใช้ (สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, 2547) แม้ว่าทั้ง 3 สูตร จะให้องค์ประกอบทางเคมีและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ต่างกัน

สรุปผลการวิจัย

จากผลการทดลอง เรื่อง สารอาหารและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการแปรรูปสาหร่ายก้ามกุ้งแผ่น ที่ผ่านการไฮโดรไลเซท สรุปได้ว่า

1. องค์ประกอบทางเคมีในสาหร่ายก้ามกุ้ง ก่อนการนำมาไฮโดรไลเซท มีปริมาณความชื้นมีค่าร้อยละ 12.04 ปริมาณเถ้ามีค่า เท่ากับร้อยละ 25.39 ปริมาณไขมันมีค่าเท่ากับร้อยละ 2.32 ปริมาณโปรตีนมีค่าเท่ากับร้อยละ 18.76 ปริมาณเยื่อใย มีค่าเท่ากับร้อยละ 10.77 ส่วนปริมาณคาร์โบไฮเดรต มีค่าเท่ากับร้อยละ 41.47

2. สาหร่ายก้ามกุ้ง (*C. corollina*) แสดงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH Assay มีค่าเท่ากับ 2.6866 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และวิธี ABTS radical scavenging assay มีค่าเท่ากับ 0.1733 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ มีค่าเท่ากับ 5.58 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณคลอโรฟิลล์บี มีค่าเท่ากับ 3.55 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณฟินอลิก มีค่าเท่ากับ 2.84 มิลลิกรัมต่อกรัมตัวอย่าง

3. ระยะเวลาการไฮโดรไลซ์ มีผลต่อปริมาณผลผลิต ให้มีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) เมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากัน ระยะเวลาการย่อยสลายที่นานขึ้นทำให้ผลผลิตมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นตามไปด้วย โดยปริมาณผลผลิตมีค่าสูงสุดที่สภาวะการไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์ Flavourzyme ร้อยละ 15 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4. ค่าระดับการย่อยสลายเพิ่มขึ้นตามเวลาการไฮโดรไลซ์ โดยเฉพาะอัตราการไฮโดรไลซ์เพิ่มขึ้นอย่างเร็วในช่วงเวลา 0-12 ชั่วโมง หลังจากนั้นอัตราการย่อยสลายจะเริ่มลดลง

6. ปริมาณโปรตีนที่ระยะเวลาการไฮโดรไลซ์ต่างกัน มีค่าแตกต่างกันทางสถิติ ($P \leq 0.05$) โดยปริมาณโปรตีนใน ef-FAPH ที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ร้อยละ 15 เป็นเวลา 0.5, 3, 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 0.56, 0.43, 0.36, 0.35, 0.27 และ 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

7. องค์ประกอบทางเคมีในตัวอย่าง ef-FAPH มีปริมาณความชื้นที่ย่อยสลายระหว่างระยะเวลา 0.5 – 12 ชั่วโมง ไม่ต่างกัน แต่ต่างจากที่เวลาการย่อย 18 -24 ชั่วโมง ส่งผลให้ปริมาณเถ้า ไขมัน โปรตีน และคาร์โบไฮเดรต มีความแตกต่างกันตามไปด้วย ปริมาณเถ้ามีค่าสูงสุดที่ระยะเวลาย่อยสลาย 24 ชั่วโมง ปริมาณไขมันมีค่าเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการย่อยสลาย ตรงข้ามกับปริมาณโปรตีนมีค่าลดลงตามระยะเวลาการย่อยสลาย ส่วนปริมาณเยื่อใยไม่แตกต่างกันทางสถิติ

8. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีค่าเพิ่มขึ้น เมื่อระยะเวลาการไฮโดรไลซ์เพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้ที่ระยะเวลาการย่อยสลาย 24 ชั่วโมง ให้ค่าการต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด สอดคล้องกับปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดใน ef-FAPH ของสาหร่ายก้ามกุ้งที่มีค่าสูงที่สุด เท่ากับ 90.86 มก.สมมูลกรดแกลลิก/กรัม ในตัวอย่างที่ย่อยด้วยเอนไซม์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

9. กรดอะมิโนใน ef-FAPH มีปริมาณเพิ่มสูงกว่าสาหร่ายแห้งก่อนนำไปไฮโดรไลเซท โดยแบ่งเป็นกรดอะมิโนจำเป็น ได้แก่ Arginine, Histidine, Isoleucine, Leucine, Lysine, Methionine, Phenylalanine, Threonine, , Valine มีปริมาณเท่ากับ 9,720**,** 1,728**,** 3,888**,** 2,376**,** 4,320, 2,376, 1,080, 1,944, 3,024 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ไม่พบกรดอะมิโนทริปโตเฟน

และกรดอะมิโนไฮดรอกซีโพรลีน มีปริมาณกรดอะมิโนรวม เท่ากับ 61,768 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม กรดอะมิโนที่พบในปริมาณมาก ได้แก่ Arginine, Aspartic acid, Lysine, Isoleucine, Glutamine, Alanine, Proline

10. การผลิตสาหร่ายแผ่นปรุงรส โดยใช้กระบวนการอบแห้ง ส่งผลต่อปริมาณสารอาหารในสาหร่ายแปรรูปในแต่ละสูตรไม่เท่ากัน มีแนวโน้มว่าสูตรที่ 1 จะให้คุณค่าทางโภชนาการดีกว่าสูตรอื่น ปริมาณคลอโรฟิลล์ในสาหร่ายแผ่นปรุงรสสูตรที่ 2 มีค่าสูงที่สุด สารประกอบฟีนอลิก ในสูตรที่ 2 มีค่าสูงที่สุด ขณะที่ปริมาณแร่ธาตุเหล็กและแคลเซียมพบสูงที่สุดในสูตรที่ 3

ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาระยะเวลาการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์สาหร่ายแผ่นปรุงรสต่อคุณภาพทางเคมี กายภาพ และจุลชีววิทยา
2. ควรพัฒนาสูตรการผลิตที่เพิ่มปริมาณสาหร่ายและรสชาติที่หลากหลายขึ้น เพื่อประเมินความพึงพอใจและเป็นทางเลือกของผู้บริโภคสาหร่ายแผ่นปรุงรส

บรรณานุกรม

คงศักดิ์ สหะศักดิ์มนตรี, 2544, การพัฒนากรรมวิธีการผลิตน้ำซอสปรุงรสโดยใช้เอนไซม์เพื่อลดสาร 3-MCPD, วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 106 หน้า.

จรินทร์ สว่างแจ้ง. 2544. การพัฒนาซุปกึ่งสำเร็จรูปรสกุ้งรสกุ้งจากหัวกุ้ง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 77 หน้า.

ชนิกานต์ ซ่อนกลิ่น. 2552. การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากกากถั่วเขียวโดยใช้โปรติเอส. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี. 150 หน้า.

ณัฐวุฒิ ส่งแสง. 2550. การผลิตสารปรุงแต่งกลิ่นรสทะเลจากโปรตีนไฮโดรไลเซทกากถั่วเขียวโดยเอนไซม์โปรติเอส. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี, 168 น.

ประสาร สวัสดิ์ชิตัง. 2547. การสำรวจความความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของน้ำผลไม้. ขอนแก่น: ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 92 น.

ไพลิน เพ็ชรทวีพรเดช, 2548, การผลิตสารปรุงแต่งกลิ่นรสจากกากถั่วเขียวโดยใช้เอนไซม์โปรติเอส, วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี, 132 หน้า.

แพรวไพลิน ตันติบุตร. 2552. การผลิตสารปรุงแต่งกลิ่นรสจากโปรตีนไฮโดรไลเซทเห็ดย่อยสลายด้วยเอนไซม์โบรมีเลน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

ยุวดี พรพรพิศาล. 2549. สาหร่ายวิทยา. ห้องปฏิบัติการวิจัยสาหร่ายประยุกต์ภาควิชาชีววิทยาคณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, พิมพ์ครั้งที่ 2. เชียงใหม่. 545 หน้า.

วัฒนา ดำรงรัตน์กุล . 2548. การพัฒนาผลิตภัณฑ์ผักแผ่น. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท ม.เกษตรศาสตร์.

วารยา บุษปธำรง. 2539. เครื่องดื่มโปรตีนไฮโดรไลเซทจากกากถั่ว. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 103 หน้า.

วิลาสินี ดีปัญญา. 2555. การพัฒนาผลิตภัณฑ์ไข่น้ำแผ่น. รายงานการวิจัยคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์. 45 น.

วิรัตน์ ภูวิวัฒน์. 2539. การศึกษาเปรียบเทียบวิธีการสกัดคลอฟิลล์จากใบพืช. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า, กรุงเทพฯ. 14(3) น. 3-7.

สุภาจรี นิยะมานนท์. 2542. การศึกษาสัณฐานวิทยากายวิภาคศาสตร์และการใช้ประโยชน์ของสาหร่ายทะเลในภาคใต้ของประเทศไทย. คณะวิทยาศาสตร์, ม.ทักษิณ. หน้า 6– 15.

สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม. 2547. มผช.ชุมชน : สาหร่ายทะเลอบ. กรุงเทพฯ.

ศิริลักษณ์ สินธวาลัย. 2523. หลักการถนอมอาหาร. ทฤษฎีอาหารเล่ม 3 . ภาควิชาคหกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 255 น.

อัญชลี กนีกรัตน์. 2548. การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากกากถั่วเหลืองและกากถั่วเขียวเพื่อใช้เป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรส. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท ม.เทคโนโลยีพระจอมเหล้าธนบุรี, 110 หน้า.

อนุวัตร แจ้งชัด. 2547. โครงการอบรมถ่ายทอดเทคโนโลยีการผลิตผักแผ่น และผลไม้แผ่น. ภาควิชาพัฒนาผลิตภัณฑ์ คณะอุตสาหกรรมเกษตร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อนุวัตร แจ้งชัด นรลักษณ์ รัตนฐิตินันต์ และวัณณิตา จิรังรัตน์. 2550. การพัฒนาผลิตภัณฑ์พริกหวานแผ่น. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45. หน้า 697-704.

อรพรรณ เสลามาศสกุล. 2553. การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากสาหร่ายด้วยเอนไซม์เพื่อใช้เป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสอาหารและสารเสริมสุขภาพ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท ม. เทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี. กรุงเทพฯ.

อุไรวรรณ วัฒนกุล, วัฒนา วัฒนกุล และพีรพงษ์ พึ่งแย้ม. 2557. ผลผลิตคุณภาพการบริโภคและการแปรรูปต่อสารอาหารในข้าวนึ่งสังข์หยดพัทลุงที่ปลูกนอกฤดูกาล. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตตรัง, ตรัง.

อุไรวรรณ วัฒนกุล, วัฒนา วัฒนกุล และพีรพงษ์ พึ่งแย้ม. 2558. ผลิตภัณฑ์และคุณค่าทางโภชนาการที่ได้จากการแปรรูปสาหร่ายทะเลขนาดใหญ่ (*C. racemosa*). รายงานการวิจัยคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย, ตรัง.

อุไรวรรณ วัฒนกุล, วัฒนา วัฒนกุล และพีรพงษ์ พึ่งแย้ม. 2561. สารอาหารและสารชีวกิจกรรมในผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการแปรรูปสาหร่ายพวงองุ่น (*C.lentillifera*). รายงานการวิจัยคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย, ตรัง.

Aaslang, D.M., Elmore, S.J. and Donald, S.M., 1998. Comparison of the aroma characteristics of acid-hydrolyzed vegetable proteins produced from soy. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 46, pp. 481-489.

Aaslyng, M.D., Poll, L., Nielsen, P.M., and Flyge, H. 1999. Sensory, chemical and sensometric studies of sydrolyzed vegetable protien produced by various processes. European Food Research and Technology. Vol. 209, pp.227-236.

Alajaji, S.A., El-Adawy, T.A. 2006. Nutritional composition of chickpea (*C. arietinum* L.) as affected by microwave cooking and other traditional cooking methods. J. Food Comp. Anal. 19: 806–812.

Adler-Nissen, J.1986. Enzymatic hydrolysis of food protein. Vanderbilt, New York. 421p.

Ames, B.M., Shigena, M.K. and Hagen, T.M. 1993. Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90: 7915-7922.

AOAC (Association of official Analytical I Chemists). 2000. Official Methods of Analysis. Association of official Analytical I Chemists, Washington D.C.

Bertoldi, F.C., Sant, Anna, E.S. and Beirao, L.H. 2004. Reducing the Bitterness of Tuna (*Euthynnus pleamis*) Dark Meat with *Lactobacillus casei* Subsp. *Casei* ATCC 393. Food Technology and Biotechnology. Vol. 42, No. 1, pp. 41-45.

Burtin, P. 2003. Nutritional value of seaweeds. Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Chemistry. Vol. 2, No. 4, pp. 498-503.

Fenglin, H., Ruili, L., Bao, H. and Liang, M. 2004. Free radical scavenging activity of extracts prepared from fresh leaves of selected Chinese medicinal plants. Fitoterapia 75: 14-23.

Fleurence, J. 1990. Seaweed protein: biochemical, nutritional aspects and potentioa uses. Trends in Food Science and Technology. Vol. 10 (1). Pp 25-28

Fleurence, J. (1999) Seaweed Proteins: Biochemical, Nutritional Aspects and Potential

Uses. Trends in Food Science and Technology, 10, 25-28.

Fogg, G.E. 1966. Algae Culture and and Phytoplankton Ecology. London : The University of Wisconsin Press.

Hayatsu, H., Negishi, T., Arimoto, S. 1993. Porphyrins as potential inhibitors against exposure to carcinogens and mutagens. J. of Mutation Research. 29:79-85.

Hill, R.L., 1965, Advances in Protein Chemistry. John Wiley and Sons, New York.

Gross, J. 1991. Pigments in Vegetables : Chlorophylls and Carotenoid. Van Nostrand Reinhold. Newyork.

Kong, X., Guo M., Hua Y., Cao, D. and Zhang, C. 2008. Enzymatic preparation of immune-modulating hydrolysates from soy proteins. Bioresource Technology, Vol. 99, No.18, pp. 8873-8879.

Lahaye, M. and C. Rochas. 1991. Chemical structure and physico-chemical properties of agar. Hydrobiologia 221: 137-148.

Lee, J.Y., Lee, H.D. and Lee, C.H. 2001. Characterization hydrolysates produced by mild-acid treatment and enzymatic hydrolysis of defatted soybean flour. Food Research International. Vol, 34. pp. 217-222.

Leong, L. P. and Shui, G. 2002. An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. Food Chemistry, 76: 69-75.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. of Biological Chemistry. 193(1): 265-275.

Lu, Y., Foo, L.Y., Molan, A.L., Wood ®eld, D.R., McNabb, W.C. 2000. The phenols and prodelphinidins of white clover towers. Phytochemistry 54, 539-548.

MacArtain, P., PhD, Gill, C.I.R., Brooks, M., Campbell, R. and Rowland, I.R., PhD. 2007. Nutritional Value of Edible Seaweeds. Nutrition Reviews, 65: (12) pp. 535-543.

Manley, C.H.and Fagerson, I.S. 1971. Aspects of aroma and taste characteristics of hydrolyzed vegetable protein. The Flavor Industry. 2: (12) pp. 686-690.

Murcuse, R. 1960. Antioxidant effect of amino acids. Nature. Vol. 186. Pp. 886-887.

Murachi, T. and H. Neurath. 1960. Fractionation and specificity studies on stem bromelain. Journal of Biological Chemistry. Vol. 335, pp. 99.

Nagodawithana, T.W. 1994. Savory flavor. A Wiley-Interscience Publication, p.235-285

Niki, E. 1987. Antioxidants in relation tolipid peroxidation. Chem. and Phys. of Lipid. 44: 227-253.

Olsman, H. 1979. Hydrolyzed and autolyzed vegetable protien as functional food ingredients. Journol of American Oil Chemists'Society. Vol, 56. No.3, pp. 375-376.

Peterson, J. 1974. Encyclopedia of Food Technology. Van Nostrand reinhold company, New York, p. 150.

Peterson, M.S. and Johnson, A.H. 1978. Encyclopedia of Food Science, AVI Publishing Company, Connecticut, p. 1005.

Rao, G., 1976. Low salt protein hydrolysate. United States Patent, 3, 952, 109.

Rice-Evans C.A., Miler N.J., Paganga G. 1996. Structure-antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids. Free Radical Biology & Medicine,20: 933–956.

Rice-Evans , C. 1999. Implications of the mechanisms of action of tea polyphenols as anti-oxidations in vitro for chemoprevention in humans. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 220, 262-266.

Rohani-Ghadikolaei, K., Abdulalian, E. and Ng, W. K. 2010. Evaluation of the proximate, fatty acid and mineral composition of representative green, brown and red seaweeds from the Persian Gulf of Iran as potential food and feed resources. J Food Sci Technol Original Article.

Suzuki, M., Y. EGAWA, and T. OKUDA . 1965. Studies on Streptomyces antibiotic, cycloheximide. XV. Hydroxycarbonylation of optically active 2,4-dimethylcyclohexanones with glutarimide-β-acetaldehyde. (Synthesis of isocycloheximide and its isomers.) Chem. Pharm. Bull. 11, 582-588 .

Suttajit M., S. Immark, S. Teerajan, S. Suttajit and C. Chiyasut. 2006. Antioxidative activity and polyphenol content in different varieties of Thai rice grains. Proceedings of Asia Pacific Clinical Nutrition Society. Joint 8th ISCN and 5th APCNS conference 2006. http://www.healthy eating club.com/APJCN/ Volume15/Vol15 apcns/ Vol15 apcns.htm.June 2007.

Stewart, W. D. P. 1974, Algae Physiology and Biochemistry. Scientific Publication, Oxford. 989 p. Blackwell.

Van Acker, B. A., Hulsewe, K. W., Wagenmakers, A. J., Von Meyenfeldt, M. F. & Soeters, P. B. 2000. Response of glutamine metabolism to glutaminesupplemented parenteral nutrition. Am. J. Clin. Nutr. 72: 790–795.

Velisek, J., Ledahudcova, K., Pudil, F.; Davidek, J. and Kubelka, V. 1993. Chlorine-containing compounds derived from saccharides in protein hydrolysates. Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie. Vol. 26, No. 5, pp. 38-41.

Weir, G.S.D. 1986. Protein hydrolysates as flavourings. *In* Development in Food Proteins. Hudson, B.J.F., Ed.; Elsevier Applied Science Publisher, London, New York, P.175-217

Yang, C. Y., Hua, Q. H., Shimizu, K. 2000. Energetics and carbon metabolism during growth of microalgal cells under photoautotrophic, mixotrophic and cyclic light-autotrophic/ dark-heterotrophic conditions. Biochem. Eng. J. 6, 87-102.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ภาพการวิเคราะห์ค่าต่างๆ

สาหร่าย *Chara corollina*

สาหร่าย *Chara corollina*

เก็บสาหร่าย *Chara corollina*

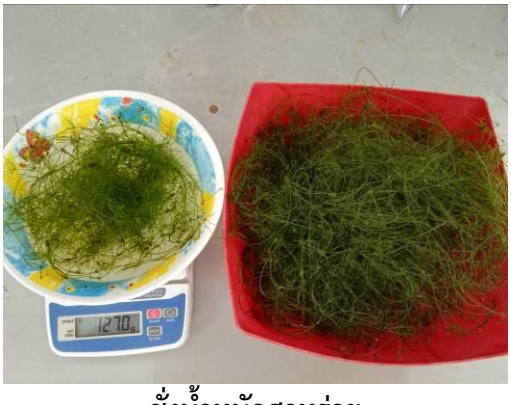
เก็บสาหร่าย *Chara corollina*

ล้างทำความสะอาดสาหร่าย

ล้างทำความสะอาดสาหร่าย

ภาพผนวกที่ 1 การเตรียมตัวอย่างสาหร่าย *Chara corollina*

สาหร่าย *Chara corollina* **สด**



ชั่งน้ำหนักสาหร่าย

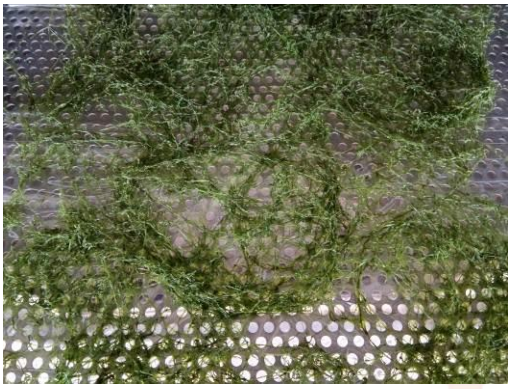
เกลี่ยสาหร่ายในถาดอบ

นำสาหร่ายเข้าตู้อบแห้ง

อบสาหร่ายที่อุณหภูมิ 55 °C

สาหร่าย *Chara corollina* **แห้ง**

ภาพผนวกที่ 2 การเตรียมตัวอย่างสาหร่าย *Chara corollina* (ต่อ)



สาหร่าย *Chara corollina* **แห้ง**

บดสาหร่ายด้วยเครื่องบด

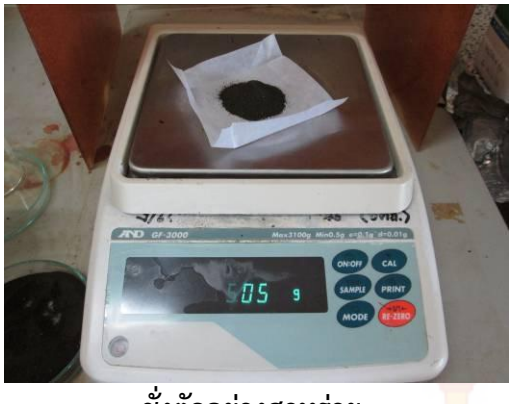
บดสาหร่ายด้วยเครื่องบด

บดสาหร่ายด้วยเครื่องบด

สาหร่าย *Chara corollina* **บดละเอียด**

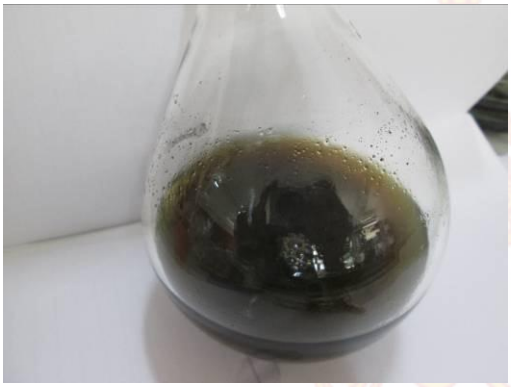
สาหร่าย *Chara corollina* **บดละเอียด**

ภาพผนวกที่ 3 การเตรียมตัวอย่างสาหร่าย *Chara corollina* (ต่อ)



ชั่งตัวอย่างสาหร่าย

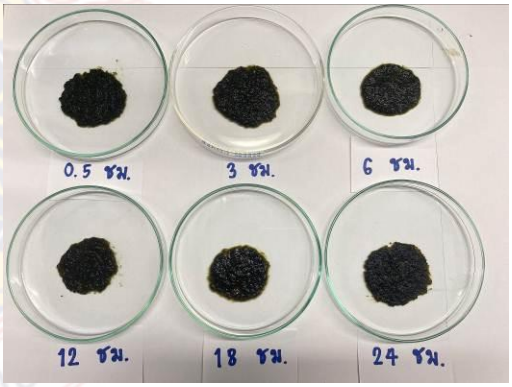
นึ่งฆ่าเชื้อน้ำกลั่น



เติมเอนไซม์ลงในตัวอย่าง

อุ่นให้ความร้อนเพื่อให้เอนไซม์ทำงาน

ย่อยตัวอย่างสาหร่าย



โปรตีนไฮโดรไลเซทด้วยเอนไซม์

ภาพผนวกที่ 4 การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากสาหร่าย *Chara corollina* ด้วยเอนไซม์ Flavourzyme

ส่วนผสมเครื่องปรุงสาหร่ายแผ่นสูตรที่ 1

ส่วนผสมเครื่องปรุงสาหร่ายแผ่นสูตรที่ 2

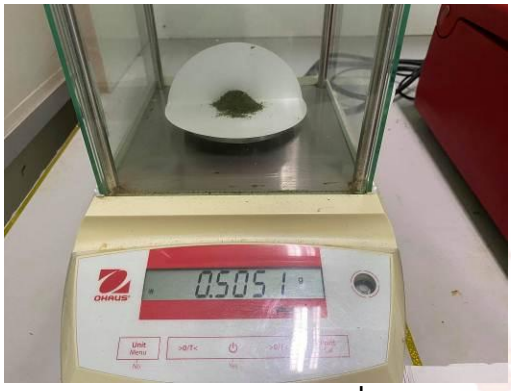
ส่วนผสมเครื่องปรุงสาหร่ายแผ่นสูตรที่ 3

ตั้งไฟอ่อนคนจนส่วนผสมเข้ากัน

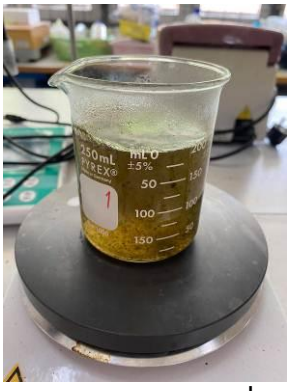
นำไปอบแห้ง

สาหร่ายแผ่นปรุงรส

ภาพผนวกที่ 5 สาหร่ายแผ่นปรุงรสจากสาหร่าย *Chara corollina*

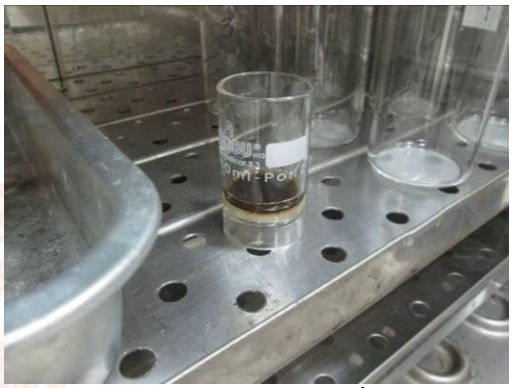


การวิเคราะห์ปริมาณเยื่อใย



การวิเคราะห์ปริมาณเยื่อใย

การวิเคราะห์ปริมาณเยื่อใย



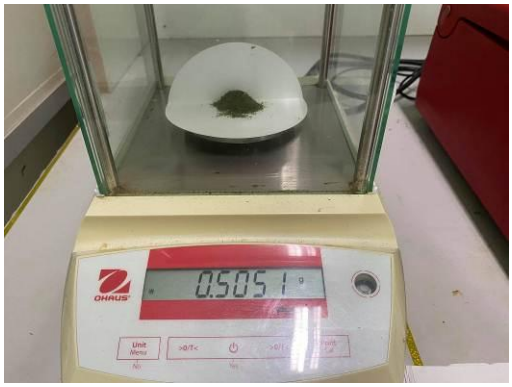
การวิเคราะห์ปริมาณเยื่อใย

การวิเคราะห์ปริมาณเยื่อใย

การวิเคราะห์ปริมาณเยื่อใย

ภาพผนวกที่ 6 การวิเคราะห์ปริมาณเยื่อใยในสาหร่าย *Chara corollina*

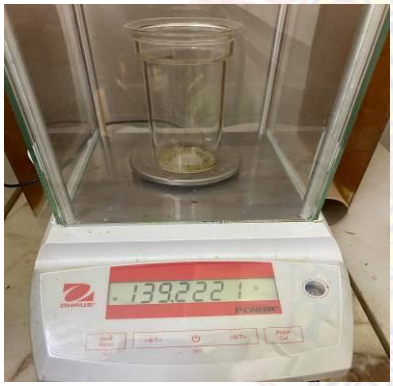
การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน



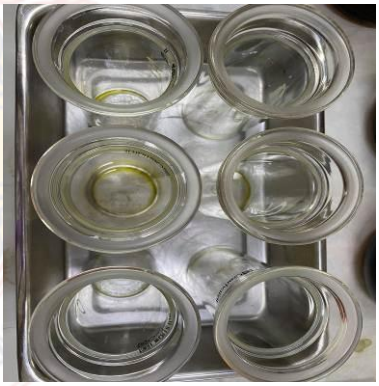
การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน

การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน

การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน



การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน



การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน

ภาพผนวกที่ 7 การวิเคราะห์ปริมาณไขมันในสาหร่าย *Chara corollina*

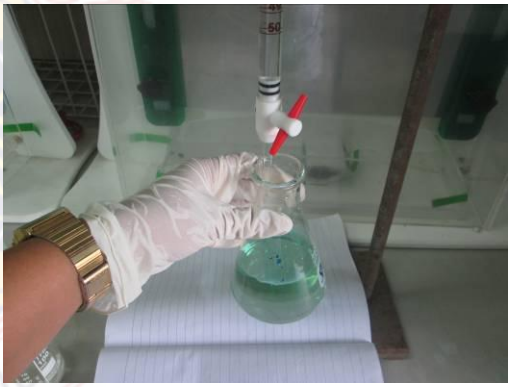
การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน



การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

ภาพผนวกที่ 8 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในตัวอย่างสาหร่าย *Chara corollina*

การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า

การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า

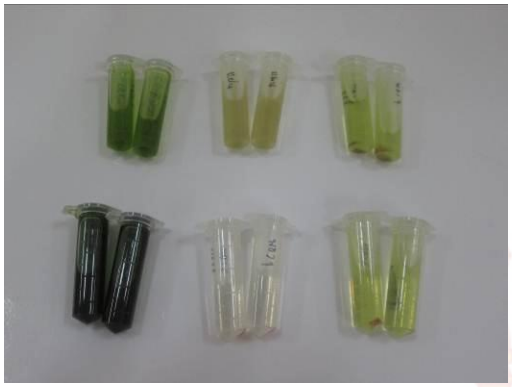
การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า

การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น

การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น

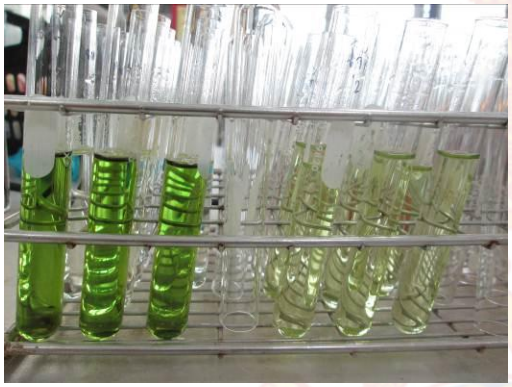
การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น

ภาพผนวกที่ 9 การวิเคราะห์ปริมาณเถ้าและปริมาณความชื้นในตัวอย่างสาหร่าย *Chara corollina*

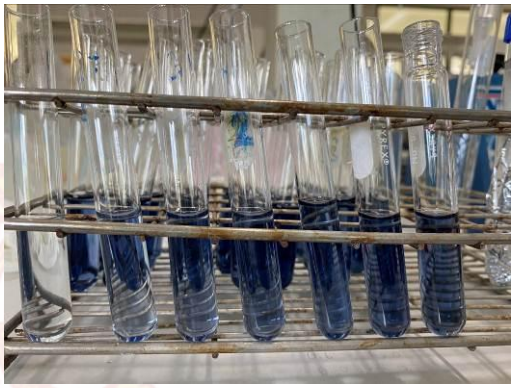


การวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์

การวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์



การวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์



การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิก

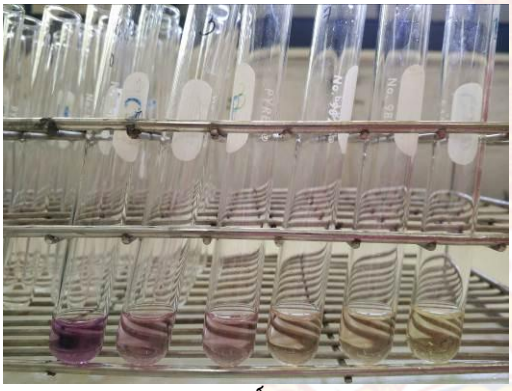
การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิก

การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิก

ภาพผนวกที่ 10 การวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์และปริมาณฟีนอลิก ในตัวอย่างสาหร่าย *Chara corollina*

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ



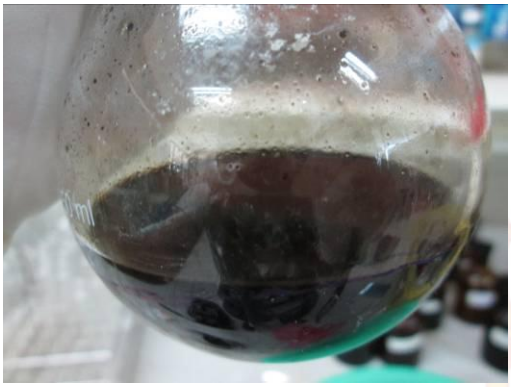
การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ภาพผนวกที่ 11 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างสาหร่าย *Chara corollina*

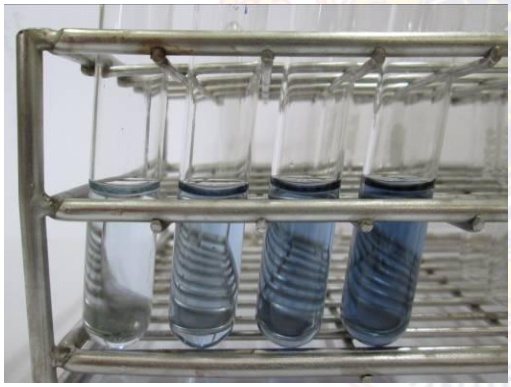


การวิเคราะห์ปริมาณผลผลิต

การวิเคราะห์ปริมาณผลผลิต

การวิเคราะห์ระดับการย่อยสลาย

การวิเคราะห์ระดับการย่อยสลาย



การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

ภาพผนวกที่ 12 การวิเคราะห์ค่าต่างๆในสาหร่าย *Chara corollina*

ภาคผนวก ข

วิธีการวิเคราะห์ค่าต่างๆ

1. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (AOAC , 2000)

อุปกรณ์เครื่องมือ

1. หลอดย่อยโปรตีน (kjeldalh flask)
2. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง
3. ชุดย่อยโปรตีน
4. ชุดกลั่นโปรตีน
5. ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 และ 500 มิลลิลิตร
6. ปิเปต ขนาด 25 มิลลิลิตร
7. บิวเรต (burret) ขนาด 25 มิลลิลิตร
8. กระบอกตวงขนาด 100 มิลลิลิตร

สารเคมี

1. กรดซัลฟิวริก (Sulfuric acid ,H_2SO_4) เข้มข้น 98%
2. โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 40 (Sodium hydroxide ,NaOH)
   - เตรียมโดยชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 400 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร
3. สารละลายมาตรฐานกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 นอร์มัล
   - เตรียมโดยใช้ปิเปตดูดกรดเกลือ 8.28 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร
4. สารเร่งรวม (catalyst mixture)
   - เตรียมโดยชั่ง คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4$) 7 กรัม และ โพแทสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4) 100 กรัม ผสมให้เข้ากัน
5. สารละลายกรดบอริกเข้มข้นร้อยละ 4 (boric acid , H_3BO_3)
   - เตรียมโดยต้มน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ให้ร้อน ใส่กรดบอริกลงไป 4 กรัม คนจนละลายหมด เมื่อสารละลายเย็นลง แล้วจึงเติมน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

     mixed indicator (methyl red 0.1 กรัม ผสมกับ bromocresol green 0.1 กรัม ละลายใน ethyl alcohol 95 เปอร์เซ็นต์ ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร
6. อินดิเคเตอร์รวม (mixed indicator)
   - เตรียมโดย ละลาย methyl red 0.2 กรัม ในแอลกอฮอล์ 95% ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร และละลาย methylene blue 0.2 กรัมในแอลกอฮอล์ 95% ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลาย methyl red 2 ส่วน ผสมกับสารละลาย methylene blue 1 ส่วน เขย่าให้เข้ากัน

วิธีการวิเคราะห์

1. ขั้นตอนการย่อย (digestion)

1.1 ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักแน่นอน 0.5 - 1 กรัม ใส่ลงในหลอดย่อยโปรตีน

1.2 เติมสารเร่งปฏิกิริยา 3 กรัม และเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 20 มิลลิลิตร

1.3 นำ insert rack ที่มีหลอดย่อยตัวอย่างวางครบทุกช่องวางประกอบเข้ากับเครื่องย่อย และเปิดเครื่องกำจัดไอกรด ตั้งอุณหภูมิในการย่อยตัวอย่างที่อุณหภูมิ 350 เซลเซียส ทำการย่อยตัวอย่างจนได้สารละลายใส ใช้เวลาประมาณ 90 นาที ทิ้งให้เย็น

2. ขั้นตอนการกลั่น (distillation)

2.1 เมื่อสารละลายเย็นลง ต่อหลอดย่อยโปรตีนเข้ากับเครื่องกลั่นที่มีขวดปากแคบวัดปริมาตร ซึ่งบรรจุสารละลายกรดบอริกเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร และหยด mixed indicator 2 – 3 หยด โดยให้ส่วนปลายของอุปกรณ์ควบแน่นจุ่มอยู่ในสารละลาย

2.2 เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ ลงไปในหลอดย่อยจนได้สารละลายสีดำ

2.3 ทำการกลั่นจนกระทั่งไม่มีแก๊สแอมโมเนียออกมา ประมาณ 7 นาที

3. ขั้นตอนการไตเตรท (titrion)

3.1 นำสารละลายที่กลั่นได้ ไปไทเทรตด้วยสารละลายมาตรฐานกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 นอร์มอล จนกระทั่งสีของสารละลายเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีม่วงอมชมพู (ทำตัวอย่างละ 3 ซ้ำ)

3.2 บันทึกปริมาตรที่ได้ เพื่อใช้คำนวณต่อไป

3.3 ทำ blank ตามวิธีการในข้อ 2 - 10 โดยไม่ใส่ตัวอย่าง

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณไนโตรเจน (ร้อยละโดยน้ำหนัก)} = \frac{(A-B) \times N\ HCL \times 1.4 \times 100}{W \times 100}$$

ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (ร้อยละโดยน้ำหนัก) = ปริมาณไนโตรเจน x F

เมื่อ A = ปริมาณสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ในการไทเทรตตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

B = ปริมาตรสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ในการไทเทรต blank (มิลลิลิตร)

N = ความเข้มข้นของสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (นอร์มอล)

Wt = น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น (กรัม)

F = 6.25

ตารางผนวก แฟกเตอร์ที่ใช้คำนวณปริมาณโปรตีนสำหรับอาหารชนิดต่างๆ

อาหาร	แฟกเตอร์
ธัญพืช	
แป้งสาลีจากข้าวทั้งเมล็ด	5.83
มักกะโรและสปาเก็ตตี้	5.70
ข้าวเจ้าและผลิตภัณฑ์	5.95
ข้าวไรน์และผลิตภัณฑ์	5.83
ข้าวบาเลย์และผลิตภัณฑ์	5.83
นัทและเมล็ดพืช	
ถั่วเหลืองและผลิตภัณฑ์	5.71
แอลมอนด์	5.18
บราซิลนัท	5.46
มะพร้าว	5.30
เมล็ดงา ทานตะวัน คำฝอย และอื่นๆ	5.30
นมและผลิตภัณฑ์	6.38
อาหารอื่นๆ	6.25

2. **การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น** (A.O.A.C., 2000)

. อุปกรณ์และเครื่องมือ

1) ตู้อบไฟฟ้า (hot air oven)
2) ภาชนะอะลูมิเนียมสำหรับหาปริมาณความชื้น (aluminium can/moisture can)
3) โถดูดความชื้น (desiccator)
4) เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง

วิธีการวิเคราะห์

1) อบถ้วยอะลูมิเนียมพร้อมฝา ในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 100 -105 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง วางให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักแล้วนำไปอบซ้ำเป็นเวลา 30 นาที จนทราบน้ำหนักที่แน่นอน

2) ชั่งน้ำหนักให้ได้ตัวอย่างแน่นอนประมาณ 1 - 3 กรัม ใส่ลงในถ้วยอะลูมิเนียมเกลี่ยตัวอย่างให้กระจาย

3) นำไปอบในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง นำออกมาวางให้เย็นในโถดูดความชื้นนาน 30 นาที แล้วชั่งน้ำหนัก นำไปอบซ้ำครั้งละ 30 นาที จนได้น้ำหนักที่แน่นอนชั่งทั้งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 0.001 - 0.003 มิลลิกรัม แล้วนำค่าที่ได้ไปคำนวณปริมาณความชื้นจากสูตร

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณความชื้น (ร้อยละ)} = \frac{(W_1-W_2)\times 100}{W_2}$$

W_1 = น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ (กรัม)
W_2 = น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ (กรัม)

3. การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า (A.O.A.C., 2000)

อุปกรณ์และเครื่องมือ

1) เตาเผา (muffle furnace)
2) ถ้วยกระเบื้องเคลือบ (porcelain crucible)
3) โถดูดความชื้น (desiccator)
4) เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง

วิธีการวิเคราะห์

1) เผาถ้วยกระเบื้องเคลือบเตาเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 3 ชั่วโมง ปิดสวิตซ์เตาเผาแล้วรอประมาณ 30 – 45 นาที เพื่อให้อุณหภูมิภายในเตาเผาลดลงก่อนแล้วนำออกจากเตาเผาใส่โถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้องแล้วชั่งน้ำหนัก

2) เผาซ้ำอีกครั้งละประมาณ 1 ชั่วโมงและกระทำเช่นข้อ 1 จนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งติดต่อกัน 2 ครั้ง ไม่เกิน 0.001 - 0.003 มิลลิกรัม

3) ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักแน่นอน (4 ตำแหน่ง) ประมาณ 2 กรัม ใส่ในถ้วยกระเบื้องเคลือบที่รู้น้ำหนักแน่นอน แล้วนำไปเผาในตู้ดูดควันจนควันหมด แล้วจึงนำเข้าเตาเผาอุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส และกระทำซ้ำเช่นเดียวกันกับข้อ 1-2

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณเถ้า (ร้อยละ)} = \frac{\text{น้ำหนักตัวอย่างหลังเผา} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น}}$$

4. **การวิเคราะห์หาปริมาณไขมัน** (ดัดแปลงจาก A.O.A.C., 2000)

อุปกรณ์ เครื่องมือและสารเคมี

1) เครื่องวิเคราะห์ไขมัน
2) เครื่องทำความเย็น (cooling bath)
3) บีกเกอร์สาหรับวิเคราะห์หาปริมาณไขมัน (glass extraction beader)
4) หลอดใส่ตัวอย่าง (thimble)
5) ตู้อบไฟฟ้าทศนิยม 4 ตาแหน่ง
6) โถดูดความชื้น (desiccator)
7) ปิโตรเลียมอีเทอร์

วิธีการวิเคราะห์

1) อบบีกเกอร์สาหรับวิเคราะห์หาปริมาณไขมันในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 2-3 ชั่วโมง แล้วทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนัก และทำซ้ำจนได้น้ำหนักคงที่ (ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 0.001-0.003 กรัม บันทึกน้ำหนักที่ได้

2) ชั่งตัวอย่างที่อบแห้งแล้ว 1-2 กรัม ลงบนกระดาษกรอง บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน แล้วห่อใส่ใน ทิมเบิล (thimble) นาทิมเบิลใส่ลงในลวดรองแล้ววางลงในบีกเกอร์สำหรับวิเคราะห์หาปริมาณไขมัน เติมปิโตรเลียมอีเทอร์ 150 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์สำหรับวิเคราะห์หาปริมาณไขมัน

3) ประกอบบีกเกอร์เข้ากับตัวเครื่องวิเคราะห์ไขมัน ทำการสกัดเป็นเวลา 30 นาที และชะล้างเป็นเวลา 60 นาที

4) จากนั้นนำบีกเกอร์ไปอบในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที วาง บีกเกอร์ให้เย็นในโถดูดความชื้นหรือจนกระทั่งอุณหภูมิของภาชนะลดลงเท่ากับอุณหภูมิห้อง ชั่งน้ำหนัก แล้วคำนวณปริมาณไขมัน ดังสมการ

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณไขมัน (ร้อยละ)} = \frac{\text{น้ำหนักไขมันหลังอบ} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น}}$$

5. การวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรต โดยวิธีการคำนวณ (Calculation)

$$\text{คาร์โบไฮเดรต (ร้อยละ)} = 100 - (\text{ความชื้น}+\text{โปรตีน}+\text{ไขมัน}+\text{เถ้า}+\text{เยื่อใย})$$

6. การวิเคราะห์ปริมาณเยื่อใย (AOAC, 2000)

การเตรียมสารเคมี

- สารละลายกรดซัลฟูริกร้อยละ 1.25 เตรียมโดยตวงสารละลายกรดซัลฟูริก (H_2SO_4) ปริมาตร 7.01 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1,000 มิลลิลิตร

- สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 1.25 เตรียมโดยชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 12.5 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1,000 มิลลิลิตร

- แอลกอฮอล์ร้อยละ 95 เตรียมโดยละลายแอลกอฮอล์ 960 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1,000 มิลลิลิตร

วิธีการวิเคราะห์

ชั่งตัวอย่างผงสาหร่าย 0.5 กรัม บันทึกน้ำหนักตัวอย่างที่แน่นอน (w) เติมสารละลายกรดซัลฟูริกร้อยละ 1.25 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ต้มให้เดือด เป็นเวลา 30 นาที กรองและล้างกากด้วยน้ำร้อน เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 1.25 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ต้มให้เดือด เป็นเวลา 30 นาที กรองและล้างกากด้วยน้ำร้อน นำกรวยกรองอบใน hot air oven ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เวลา 1 คืน นำมาวางให้เย็นใน desiccator และชั่งน้ำหนัก (w_1) และนำไปเผา ที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำมาวางให้เย็นใน desiccator และชั่งน้ำหนัก (w_2) คำนวณหาปริมาณเยื่อใยจากสูตรคำนวณดังนี้

$$\text{ปริมาณเยื่อใย (ร้อยละ)} = \frac{(w_2-w_1) \times 100}{w}$$

โดย w = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

w_1 = น้ำหนักหลังจากอบแห้ง (กรัม)

w_2 = น้ำหนักหลังจากเผา (กรัม)

7. ปริมาณผลผลิต (% yield)

วิเคราะห์ปริมาณผลผลิตของสาหร่าย โดยระเหยแห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่ความ ดัน 50 มิลลิบาร์ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง จนได้สารละลายข้นหนืด นำมาชั่งน้ำหนักและคำนวณจากน้ำหนักของสารละลายข้นหนืดที่ได้เทียบกับน้ำหนักสาหร่ายเริ่มต้น ตามสูตร

$$\text{ปริมาณร้อยละผลผลิต} = \frac{\text{น้ำหนัก SWPH ข้นหนืด} \times 100}{\text{น้ำหนักเริ่มต้น}}$$

8. ระดับการย่อยสลาย (% degree of hydrolysis; %DH)

นำตัวอย่างสาหร่ายที่ไม่ผ่านการระเหย 2 มิลลิลิตร ใส่หลอดเซนตริฟิวส์ เติมกรดไตรคลอโรอะซิติก (trichloroaceticacid: TCA) เข้มข้นร้อยละ 20 ในปริมาตร 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันประมาณ 2 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 4000 × g นาน 15 นาที นำส่วนของเหลวใสด้านบนไปวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดด้วยวิธี Kjeldahl method วัดระดับการย่อยสลายตามวิธีของ Netto and Galeazzi (1998) และนำค่าที่ได้มาคำนวณตามสูตร

$$\text{ระดับการย่อยสลาย} = \frac{\text{20 \% TCA soluble-N}}{\text{Total-N}} \times 100$$

โดยที่ Total-N = ร้อยละไนโตรเจนทั้งหมดในวัตถุดิบ

20 % TCA soluble-N = ร้อยละไนโตรเจนที่ละลายได้ใน TCA

9. การวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระ (DPPH scavenging activity method)ดัดแปลงจาก Fengiln (2004)

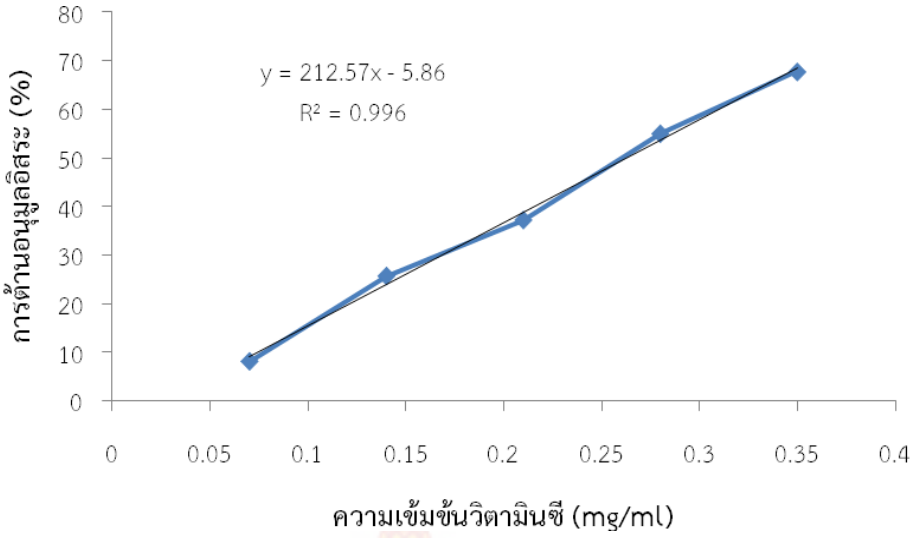
วิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระโดยนำสารสกัดแต่ละชนิดในเมทานอลที่มีความเข้มข้นต่างๆ กัน ปริมาตร 100 ไมโครลิตรแล้วเติมสารละลาย 1 mM DPPH ในเมทานอลปริมาตร 900 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันบ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดนาน 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ค่าความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่ง ใส่เมทานอลเท่านั้นแทนสารสกัดเป็น blank และสารละลาย 10 mM ascorbic acid เป็น positive control การทดลองทำซ้ำ 3 ชุดการทดลอง นำค่าที่วัดได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การดักจับอนุมูลอิสระ DPPH° จากสมการ

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

A_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดทดสอบ

$A_{control}$ = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม

จากนั้นคำนวณหาค่า IC_{50} (ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถดักจับอนุมูลอิสระ DPPH° ได้ 50 เปอร์เซ็นต์) จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง % scavenging กับความเข้มข้นของสารละลาย



กราฟมาตรฐานสารต้านอนุมูลอิสระ DPPH scavenging activity

10. การวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี ABTS ทำตามวิธี สุริสา และคณะ (2557)

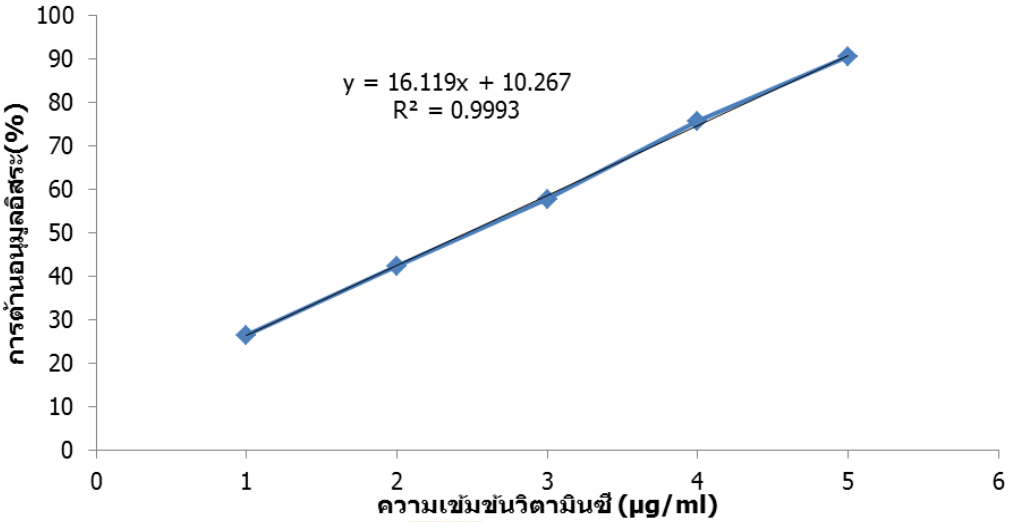
วิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระโดยนำสารสกัดแต่ละชนิดในเมทานอลที่มีความเข้มข้นที่ 200, 400, 600, 800, 1000 μg/ml อย่างละ 2 ml และละลาย Vitamin C เพื่อใช้เป็นสารมาตรฐาน ด้วยตัวทำละลายเมทานอล ให้มีความเข้มข้นที่ 1, 2, 3, 4, 5, 6 μg/ml อย่างละ 2 ml ผสมสารละลายตัวอย่างหรือสารมาตรฐาน ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และสารละลาย ABTS cation radical ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วนำสารผสมที่ได้เก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร นำค่าที่วัดได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง จากสูตร

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

A_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดทดสอบ

$A_{control}$ = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม

จากนั้นคำนวณหาค่า IC_{50} (ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถดักจับอนุมูลอิสระ DPPH° ได้ 50 เปอร์เซ็นต์) จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง % scavenging กับความเข้มข้นของสารละลาย



กราฟมาตรฐานสารต้านอนุมูลอิสระ ABTS scavenging activity

11. การวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ (Becker ,1994 อ้างโดย ยุวดีและคณะ,2548)

วิเคราะห์คลอโรฟิลล์โดยการชั่งตัวอย่างสาหร่ายแห้ง 500 มิลลิกรัม บดละเอียดด้วยตัวทำละลาย 90% เอทานอล ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลา กรองสารละลาย แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็น ปรับปริมาตรด้วย 90% เอทานอล ให้เป็น 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปเซนตริฟิวจ์ ด้วยความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสที่ได้ วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 nm และ 665 nm นำค่าที่วัดได้มาคำนวณหาปริมาณคลอโรฟิลล์ A และ คลอโรฟิลล์ B จากสมการ

$$\text{คลอโรฟิลล์ A (มิลลิกรัม/ลิตร)} = \frac{[16.5A_{665} - 8.3A_{650}] \times 10}{\text{mg cell dry}}$$

$$\text{คลอโรฟิลล์ B (มิลลิกรัม/ลิตร)} = \frac{[33.8A_{650} - 12.5A_{665}] \times 10}{\text{mg cell dry}}$$

เมื่อ : A_{665} = ค่า absorbance ที่คลื่นแสง 665 นาโนเมตร

A_{650} = ค่า absorbance ที่คลื่นแสง 650 นาโนเมตร

mg = น้ำหนักตัวอย่าง

12. วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน (Lowry , 1957)

ปริมาณโปรตีนในสารตัวอย่างวิเคราะห์โดยใช้วิธีการของ Lowry และคณะ (1957) โดยใช้ Folin- Ciocalteu phenol's reagent ดังนี้

นำสารละลายตัวอย่างปริมาตร 100 ไมโครลิตรในหลอดแก้ว ผสมกับสารละลายแอลคาไลน์ (2% Na_2CO_3 ใน 0.1 N NaOH : 1% potassium sodium tartrate : 0.5% $CuSO_4$ อัตราส่วน 100:1:1) 3 มิลลิลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาเป็นเวลา 10 นาที แล้วเติมสารละลายโฟลิน-ฟีนอล (Folin- Ciocalteu phenol reagent : น้ำกลั่น เท่ากับ 1:1) ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันอย่างรวดเร็ว ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์ (ภาพผนวกที่ 8E) จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร (ภาพผนวกที่ 9E) คำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีนในสารตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานโดยใช้โบวีนซีรัมอัลบูมิน (bovine serum albumin) เป็นโปรตีนมาตรฐาน

100 ไมโครลิตร ของ Crude enzyme

↓

เติม 3 มิลลิลิตร ของสารละลายแอลคาไลน์

↓

(2% Na_2CO_3 ใน 0.1 N NaOH : 1% potassium sodium tartrate : 0.5% $CuSO_4$ อัตราส่วน 100:1:1)

↓

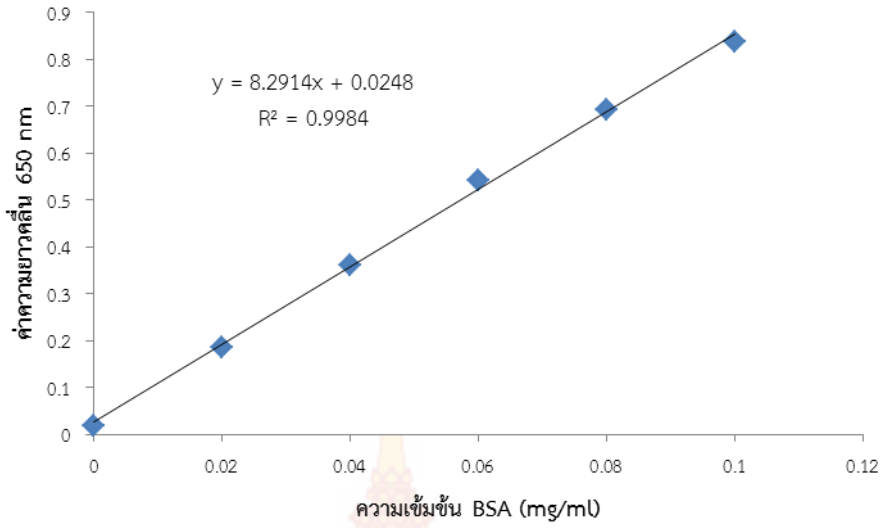
ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที

เติม 0.3 มิลลิลิตร ของ สารละลายฟอลิน-ฟีนอล (Folin-phenol regent Folin : น้ำกลั่นอัตราส่วน 1:1)

↓

บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที

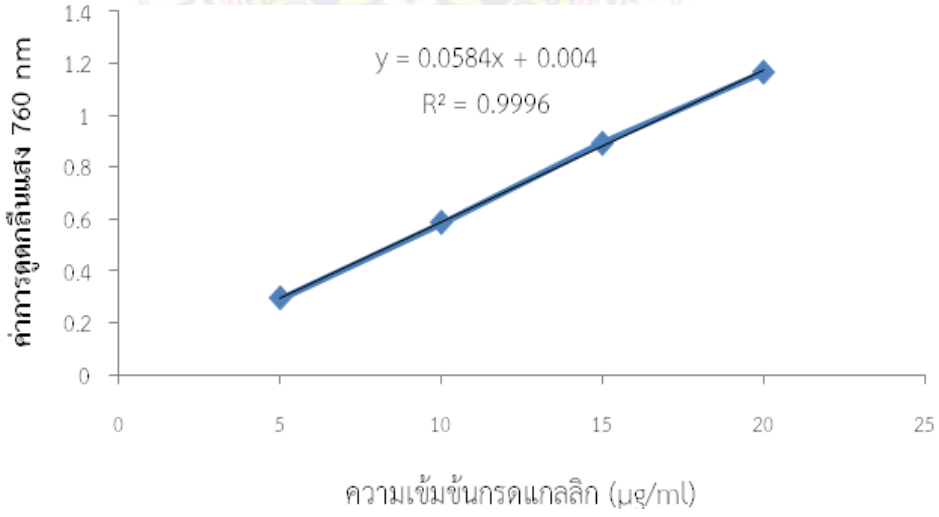
วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร



กราฟมาตรฐานปริมาณโปรตีน

13. **ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก**

วิเคราะห์ปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกโดยดัดแปลงวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric method ตามวิธีของ Wolfe *et al.*(2003) โดยนำตัวอย่างสารสกัดมา 125 ไมโครลิตร เติมลงในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่นอยู่ 500 ไมโครลิตร แล้วเติม Folin-Ciocalteu reagent 125 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ในที่มืดนาน 6 นาที หลังจากนั้นเติมโซเดียมคาร์บอเนตร้อยละ 7 ปริมาตร 1250 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น 1000 ไมโครลิตร วางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 90 นาที นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก



กราฟมาตรฐานปริมาณของสารประกอบฟีนอลิก