วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา ปีที่ 28 (ฉบับที่ 2) พฤษภาคม – สิงหาคม พ.ศ. 2566
BURAPHA SCIENCE JOURNAL Volume 28 (No.2) May – August 2023 บทความวิจัย

การสกัดซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายสีแดง (*Gracilaria fisheri*) และการส่งเสริมการเจริญเติบโตของแบคทีเรียโพรไบโอติก

Extraction of Sulfated Polysaccharide from Red Seaweed (*Gracilaria fisheri*) and Growth Promotion of Probiotic Bacteria

ธนภรณ์ เริ่มวงศ์[1],ภัทร ศักดิ์เพชร[2], เสาวนีย์ ชูจิต[3] และ พจนารถ แก่นจันทร์[1*]

Thanaporn Rormwong[1], Phat Sakpetch[2], Saovanee Choojit[3] and Pochanart Kanjan[1*]

[1] *สาขาวิชาวิทยาการเกษตรและประมง คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี*

[2] *สำนักงานเกษตรอำเภอแว้ง จังหวัดนราธิวาส*

[3] *สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ทั่วไป คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏหมู่บ้านจอมบึง*

[1]*Department of Agriculture and Fishery Science, Faculty of Science and Technology, Prince of Songkla University, Pattani Campus*

[2]*Waeng Agricultural Extension Office, Narathiwat*

[3]*Department of General Science, Faculty of Science and Technology, Muban Chombueng Rajabhat University*

Received : 16 August 2022

Revised : 20 October 2022

Accepted : 21 October 2022

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษากระบวนการสกัดซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายสีแดง (*Gracilaria fisheri*) ที่เก็บในเดือนกรกฎาคม (SP1) และเดือนตุลาคม (SP2) โดยศึกษาสภาวะในการสกัดด้วยน้ำที่สภาวะต่าง ๆ ได้แก่ อัตราส่วนระหว่างสาหร่ายกับน้ำ 1:25, 1:35 และ 1:50 (w/v) อุณหภูมิในการสกัด 90, 100 และ 110 องศาเซลเซียส และระยะเวลาในการสกัด 40, 60 และ 90 นาที พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายสีแดง คือ อัตราส่วนระหว่างสาหร่ายกับน้ำ 1:50 (w/v) อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส และระยะเวลาในการสกัด 60 นาที ให้ปริมาณผลผลิตของสารสกัดเท่ากับ 13.80±4.24 เปอร์เซ็นต์ (SP1) และ 18.52±0.93 เปอร์เซ็นต์ (SP2) และเมื่อนำมาทดสอบการเจริญของแบคทีเรียโพรไบโอติก *Lactobacillus paracasei* TISTR 2389 และ *Lactobacillus acidophilus* TISTR 875 พบว่าสารสกัดซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายสีแดงสามารถส่งเสริมการเจริญของ *L. acidophilus* TISTR 875 ได้ดีกว่าชุดกว่าชุดควบคุมที่ใช้น้ำตาลกลูโคสและ GOS เป็นแหล่งคาร์บอนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารสกัดซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายสีแดงมีศักยภาพที่จะใช้เป็นพรีไบโอติกในผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพต่อไป

คำสำคัญ : ซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์ ; พรีไบโอติก ; โพรไบโอติก ; สาหร่ายสีแดง

Abstract

The objective of this study was to optimize conditions to increase the yield of sulfated polysaccharides from red seaweed (*Gracilaria fisheri*) harvested between July (SP1) and October (SP2) 2020, extracted with distilled water. The effects of algae to water ratio (1:25, 1:35, and 1:50 (w/v), extraction time (40, 60, and 90 min), and extraction temperature (90, 100, and 110 °C) were investigated. The optimal conditions for sulfated polysaccharide extraction from red seaweed were algae materials to water 1:50 (w/v) at a temperature of 100 ºC for 60 minutes, with an obtained the yields of 13.80±4.24% (SP1) and 18.52±0.93% (SP2). The utilization of sulfated polysaccharide derived from red seaweed was performed for the growth of *Lactobacillus paracasei* TISTR 2389 and *Lactobacillus acidophilus* TISTR 875. *L. acidophilus* TISTR 875 significantly utilized the sulfated polysaccharide for growth when compared with glucose and GOS as carbon sources ($p<0.05$). These results indicated that the sulfated polysaccharides from red seaweed could act as a potential prebiotic compound for development of the functional foods.

Keywords : sulfated polysaccharide ; prebiotic ; probiotic ; red seaweed

***Corresponding author. E-mail** : pochanart.k@psu.ac.th

บทนำ

ในปัจจุบันพฤติกรรมการบริโภคอาหารของมนุษย์เปลี่ยนแปลงไปตามสภาพสังคม เศรษฐกิจ และสิ่งแวดล้อม ส่งผลต่อความสมดุลของจุลินทรีย์ภายในลำไส้และเป็นสาเหตุของการเกิดโรคต่างๆ โดยเฉพาะกลุ่มโรคไม่ติดต่อเรื้อรัง เช่น โรคมะเร็ง โรคหัวใจ โรคท้องผูกและท้องร่วง จากความเสี่ยงของโรคต่างๆ ที่เกิดขึ้นทำให้มนุษย์หันมาให้ความสำคัญต่อสุขภาพมากขึ้น วิธีการหนึ่งที่กำลังเป็นที่สนใจและศึกษากันมาก คือ การรับประทานอาหารที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพ โดยเฉพาะอย่างยิ่งอาหารฟังก์ชั่น (functional foods) หรือที่อาจเรียกว่าอาหารเชิงหน้าที่ ซึ่งเป็นอาหารที่ได้รับการยอมรับว่าเป็นอาหารที่มนุษย์บริโภคเข้าไปแล้วให้ประโยชน์หรือคุณสมบัติอื่น ๆ ต่อสุขภาพนอกเหนือจากคุณค่าทางโภชนาการพื้นฐาน และเป็นการช่วยลดอัตราเสี่ยงในการเกิดโรคด้วย (Santad *et al*., 2011) และอาหารฟังก์ชั่นที่ได้รับความนิยมเป็นอย่างมากคือ กลุ่มสารพรีไบโอติก (prebiotics) โดยพรีไบโอติก เป็นคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ย่อยและไม่ถูกดูดซึมในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็ก แต่แบคทีเรียชนิดดีหรือโพรไบโอติกที่อาศัยอยู่ในลำไส้ใหญ่สามารถหมักสารอาหารเหล่านั้นได้เพื่อการเจริญเติบโตและมีผลต่อการส่งเสริมสุขภาพให้ดีขึ้น (Fook & Gibson, 2003) เช่น *Bifidobacterium* และ *Lactobacillus* และไม่ส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์กลุ่มที่ก่อโรค (Pathogenic bacteria) เช่น *Salmonella* นอกจากนี้สารพรีไบโอติกยังต้องมีความคงตัวต่อสภาวะที่ใช้ในกระบวนการแปรรูปอาหารอีกด้วย (Gibson, 2004)

สาหร่ายผมนาง (*Gracilaria* spp.) หรือสาหร่ายวุ้น เป็นสาหร่ายทะเลสีแดง (red seaweed) ที่อยู่ใน Gracilariaceae family เป็นแหล่งของสารซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์ที่เป็นสารประกอบพอลิเมอร์ชีวภาพธรรมชาติซึ่งประกอบด้วย sulfated galactan, methylated galactan และ pyruvated galactan โครงสร้างพอลิแซ็คคาไรด์ที่พบในสาหร่ายสกุล *Gracilaria* ประกอบด้วยหน่วยซ้ำของ agarobiose ที่ต่อสลับกันระหว่าง 3-linked-β-D-galactopyranose (Gal) และ 4-linked-3,6-anhydro-α-L-galactopyranose (Maciel และคณะ, 2008) ซึ่ง Gal จะถูกแทนที่ด้วยหมู่เมททิลหรือซัลเฟต (Rees, 1961) ปัจจุบันสารสกัดซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์ได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจากมีคุณสมบัติสำคัญในการเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น เป็นสารต้านมะเร็ง ต้านเชื้อแบคทีเรีย ต้านไวรัส ต้านอนุมูลอิสระ และต้านการอักเสบ (Lekshmi and Kurup, 2019) เป็นต้น Chen *et al*. (2018) สกัดซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายทะเล *Grateloupia filicina* (GFP) และ *Eucheuma spinosum* (ESP) ด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล ปริมาณซัลเฟต และตรวจสอบคุณสมบัติการเป็นพรีไบโอติก พบว่าสารสกัดซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์จาก GFP และ ESP มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 41.85±0.26 และ 62.11±0.16 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ปริมาณซัลเฟต 20.55±0.18 และ 21.35±0.21เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และสารสกัดซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จากสาหร่ายทั้งสองสายพันธุ์สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของแบคทีเรียกลุ่ม *Bifidobacterium* ได้ดี แต่อย่างไรก็ตามการสกัดซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายสีแดงถือเป็นขั้นตอนที่สำคัญที่จะส่งผลต่อปริมาณสารสกัดที่สูงขึ้นและยังคงรักษาสารออกฤทธิ์ทางชีภาพของสาร

สกัดเอาไว้ได้ ปัจจุบันการสกัดซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายทะเลมีหลายวิธีด้วยกัน เช่น การสกัดด้วยน้ำ การสกัดด้วยเอนไซม์ และการสกัดด้วยความดันสูง (Chi *et al*., 2018) เป็นต้น ซึ่งแต่ละวิธีมีข้อดีข้อเสียแตกต่างกัน การเลือกใช้วิธีการสกัดที่เหมาะสมไม่เพียงแต่จะสามารถเพิ่มผลผลิตสารสกัดได้แล้วนั้นยังสามารถรักษาคุณสมบัติของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเอาไว้ได้อีกด้วยและวิธีที่เลือกใช้ควรมีต้นทุนในการสกัดไม่สูงจนเกินไป (Chikari *et al*., 2020) ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษากระบวนการสกัดซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายสีแดง *G. fisheri* ด้วยความร้อนเพื่อให้ได้ปริมาณสารสกัดซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์ในปริมาณสูง และศึกษาผลของสารสกัดซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์ต่อการเจริญของแบคทีเรียโพรไบโอติก

วิธีดำเนินการวิจัย

1. แหล่งที่มาและการเตรียมตัวอย่างสาหร่าย

สาหร่ายสีแดง *G. fisheri* จากฟาร์มที่เลี้ยงในบ่อดิน ในพื้นที่อำเภอระโนด จังหวัดสงขลา ทำการเก็บตัวอย่าง 2 ครั้ง ในเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2563 (SP1) และเดือนตุลาคม พ.ศ. 2563 (SP2) จากนั้นนำมาล้างทำความสะอาด คัดแยกเศษหินหรือลูกสัตว์น้ำที่ติดมากับสาหร่ายออก และนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60±2 °C องศาเซลเซียสด้วยเครื่องอบแห้งด้วยตู้อบลมร้อน (ยี่ห้อ Memmert, ประเทศเยอรมัน) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ปริมาณความชื้น 10 เปอร์เซ็นต์) จากนั้นนำไปบดด้วยเครื่องบดแบบละเอียด (ยี่ห้อ Ausa, ประเทศไต้หวัน) เป็นเวลา 2 นาที แล้วบรรจุลงในถุงอลูมิเนียมฟอยด์และเก็บไว้ในโถดูดความชื้น เพื่อนำไปใช้ในการสกัดซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์ต่อไป

2. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

นำตัวอย่างสาหร่ายจากข้อ 1 มาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีตามวิธีของ AOAC (2000) ได้แก่ปริมาณความชื้นด้วยตู้อบลมร้อน (hot air oven) ปริมาณโปรตีน ด้วยเครื่องมือวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนแบบ Kjedahl (รุ่น Vapodest 20, ยี่ห้อ Gerhardt, ประเทศเยอรมัน) ปริมาณไขมันด้วยเครื่องมือวิเคราะห์ปริมาณไขมัน (ยี่ห้อ Velp Scientifica, ประเทศอิตาลี) ปริมาณเถ้าใช้เตาเผา (ยี่ห้อ Lenton, ประเทศอังกฤษ) ปริมาณเส้นใยหยาบด้วยเครื่องวิเคราะห์ปริมาณใยอาหาร (ยี่ห้อ Velp Scientifica, ประเทศอิตาลี) สำหรับปริมาณคาร์โบไฮเดรต หาได้โดยวิธีการคำนวณส่วนต่างตามวิธี AOAC (2000)

3. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายสีแดง G. fisheri

3.1. ศึกษาผลของอัตราส่วนของสาหร่ายต่อน้ำที่เหมาะสม

นำตัวอย่างสาหร่ายจากข้อ 1 มาทำการสกัดซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์โดยดัดแปลงตามวิธีการของ Yun *et al*. (2013) ดังนี้ นำตัวอย่างสาหร่ายที่บดละเอียด 1 กรัมผสมกับน้ำกลั่นที่อัตราส่วนของสาหร่ายต่อน้ำที่แตกต่างกัน 3 ระดับ คือ 1:25, 1:35 และ 1:50 (w/v) และสกัดที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 (Whatman No.4) แยกเฉพาะสารละลายส่วนใสมาตกตะกอนด้วยเอทานอลความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 3 เท่าของ

สารสกัด ทิ้งไว้ 12 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แยกตะกอนโดยนำเข้าปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที นำตะกอนที่ได้ไปทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (ยี่ห้อ FAITHFUL, ประเทศจีน) จะได้สารสกัดซัลเฟตพอลิแซ็คคาไรด์ (crude SP) ก่อนที่จะนำไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ผลผลิต (% yield)

$$\text{เปอร์เซ็นต์ผลผลิต} = \frac{\text{น้ำหนักของสารสกัด (กรัม)}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}} \times 100$$

3.2. ศึกษาผลของระยะเวลาในการสกัดที่เหมาะสม

นำตัวอย่างสาหร่ายที่เตรียมได้จากข้อ 1 มาทำการสกัดซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์โดยสกัดที่เวลาแตกต่างกัน 3 ระดับ คือ 40, 60 และ 90 นาที (Yun *et al*., 2013) ที่อัตราส่วนสาหร่ายต่อน้ำ 1:50 (w/v) (คัดเลือกมาจากข้อ 3.1) ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เมื่อครบระยะเวลาเก็บเกี่ยวสารสกัดซัลเฟตพอลิแซ็คคาไรด์และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ผลผลิต (% yield) ตามวิธีการข้อ 3.1

3.3 ศึกษาผลของอุณหภูมิที่เหมาะสม

นำตัวอย่างสาหร่ายที่เตรียมได้จากข้อ 1 มาทำการสกัดซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์โดยสกัดที่อุณหภูมิแตกต่างกัน 3 ระดับ คือ 90, 100 และ 110 องศาเซลเซียส (Yun *et al*., 2013) ที่อัตราส่วนของสาหร่ายต่อน้ำ 1:50 (w/v) เป็นเวลา 60 นาที (คัดเลือกมาจากข้อ 3.2) เมื่อครบระยะเวลาเก็บเกี่ยวสารสกัดซัลเฟตพอลิแซ็คคาไรด์และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ผลผลิต (% yield) ตามวิธีการข้อ 3.1

4. การวิเคราะห์ปริมาณของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบ

4.1. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

นำสารสกัดที่ได้จากข้อ 3 มาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธี Modified phenol sulfuric method (Dubois *et al*., 1956) โดยชั่งตัวอย่างสารสกัดปริมาณ 0.001 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร (วางบน Hot plate ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เพื่อทำให้ตัวอย่างละลายเป็นเนื้อเดียวกัน) จะได้ความเข้มข้น 0.0001 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นดูดสารสกัดมา 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มีฝาปิด เติมสารละลายฟีนอลความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เมื่อผสมเข้ากันแล้ว เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวางในอ่างน้ำร้อนอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้ววางทิ้งไว้ให้เย็นในน้ำแข็งเพื่อหยุดปฏิกิริยา นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (ยี่ห้อ biochrom, รุ่น EZ read 2000 ประเทศสหรัฐอเมริกา) โดยใช้น้ำตาลกาแลคโตสเป็นสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน

4.2. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Modified dinitrosalicylic acid method (Miller, 1959) โดยชั่งตัวอย่างสารสกัดปริมาณ 0.01 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร (วางบน Hot plate อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เพื่อทำให้ตัวอย่างละลายเป็นเนื้อเดียวกัน) จากนั้นดูดสารสกัดมา 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรจนได้ 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันจะได้ความเข้มข้น 0.001 เปอร์เซ็นต์ ดูดสารสกัดมา 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลองที่มีฝาปิด เติมสารละลาย 3, 5 Dinitrosalicylic acid (DNS) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปวางในอ่างน้ำร้อนอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้ววางทิ้งไว้ให้เย็นในน้ำแข็งเพื่อหยุดปฏิกิริยา นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 575 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (ยี่ห้อ biochrom, รุ่น EZ read 2000 ประเทศสหรัฐอเมริกา) โดยใช้น้ำตาลกาแลคโตสเป็นสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน

4.3. การวิเคราะห์หาปริมาณซัลเฟต

วิเคราะห์หาปริมาณซัลเฟตด้วยวิธี $BaCl_2$-gelatin turbidimetric (Xu *et al.,* 2019) โดยนำตัวอย่างสารสกัดมา 0.02 กรัม ย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 2 นอร์มอล จำนวน 0.5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (ใส่หลอด vial สีชา ขนาด 2 มิลลิลิตรปิดฝาให้สนิทกันการระเหย) จากนั้นนำสารที่ย่อยได้มาปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร (สังเกตว่าตัวอย่างละลายเป็นเนื้อเดียวกัน และย่อยหมด) และนำสารละลายไปปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้ 2 มิลลิลิตร เติมกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.5 นอร์มอล ลงไป 2 มิลลิลิตร และเติมสารละลาย $BaCl_2$-gellatin ลงไป 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้ 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (ยี่ห้อ biochrom, รุ่น EZ read 2000 ประเทศสหรัฐอเมริกา) และปริมาณซัลเฟตที่เกิดขึ้นคำนวณจากกราฟมาตรฐานของสารละลายโพแทสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4) ความเข้มข้น 10, 20, 30, 40 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (สมการเส้นตรง y = 0.0024-0.0025; R^2 = 0.9952)

$$\%SO_4^{2} = \frac{X \times K \times 10 \times 1 \times 100}{20 \times \text{sample} \times 10^3}$$

X คือค่าความเข้มข้นซัลเฟตของตัวอย่างที่คำนวณได้จากกราฟมาตรฐาน (standard curve)

K คือ สัดส่วนของซัลเฟตกับโพแทสเซียมซัลเฟต เท่ากับ 3

Sample คือ น้ำหนักเริ่มต้นของตัวอย่าง (กรัม) จดนำหนักที่แน่นอนไว้ตอนชั่งตัวอย่าง

5. การทดสอบผลของซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์ต่อการเจริญของโพรไบโอติก

ถ่ายแบคทีเรียโพรไบโอติก ได้แก่ *L. acidophilus* TISTR 875 และ *Lactobacillus paracasei* TISTR 2389 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว De Man Rogosa and Sharpe (MRS) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในโถบ่มไร้ออกซิเจน (Anaerobic jar) หลังจากนั้นถ่ายเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้น 10^5-10^6 CFU/ml ลงในอาหาร Minimal medium ที่ไม่เติมแหล่งคาร์บอน (ชุดควบคุมทางลบ)เติมน้ำตาลกลูโคส (ชุดควบคุมทางบวก) เติม galacto oligosaccharides (GOS) และสารสกัดจากสาหร่ายสีแดง ทั้ง SP1 และ SP2 โดยเติมแหล่งคาร์บอนแต่ละชนิด 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการเพาะเลี้ยงในโถบ่มไร้ออกซิเจน (Anaerobic jar) เก็บตัวอย่างที่เวลาต่าง ๆ คือ 0, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง เพื่อตรวจนับจำนวนโพรไบโอติกแต่ละชนิดด้วยวิธีการ Spread plate บนอาหาร MRS agar และวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่เปลี่ยนแปลงไปโดยใช้เครื่อง pH meter (ยี่ห้อ OHAUS, รุ่น Starter 2100, ประเทศสหรัฐอเมริกา) (Fook & Gibson, 2003; Olano-Martin *et al*., 2000)

6. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely randomized design, CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวน Analysis of variance: ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดย Duncan's new multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป SPSS Version 16

ผลการวิจัย

1. องค์ประกอบทางเคมีของสาหร่ายสีแดง

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ ปริมาณความชื้น โปรตีน ไขมัน เถ้า เยื่อใย และคาร์โบไฮเดรตของสาหร่ายสีแดงทั้ง 2 ตัวอย่าง คือ SP1 และ SP2 พบว่าสาหร่ายสีแดง SP2 มีปริมาณเถ้า ไขมัน โปรตีน และเยื่อใยสูงกว่าสาหร่ายสีแดง SP1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) แต่อย่างไรก็ตามปริมาณคาร์โบไฮเดรตของตัวอย่างสาหร่าย SP1 สูงกว่าตัวอย่าง SP2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) (ตารางที่ 1 ข้อมูลทั้งหมดแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าคลาดเคลื่อนมาตรฐาน และค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรไม่เหมือนกันในแต่ละสดมภ์มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์)

Table 1 Proximate composition of red seaweed *G. fisheri* powder (based on dry basis)

Samples	Content (%)					
	Moisture	Ash	Crude fat	Crude protein	Crude fiber	Carbohydrate
SP1	5.70±0.17[a]	25.58±0.51[b]	0.25±0.00[b]	16.84±0.96[b]	4.42±0.78[b]	51.63±0.47[a]
SP2	4.93±0.21[b]	36.23±0.19[a]	0.30±0.00[a]	23.71±1.03[a]	5.05±0.05[a]	34.82±1.01[b]

Data are expressed as the mean ± SD for proximate composition. Different superscripts indicate significant differences (p<0.05) within the same column.

2. การสกัดซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยอัตราส่วนของสาหร่ายต่อน้ำที่เหมาะสม

จากการศึกษาผลของอัตราส่วนของสาหร่ายต่อน้ำที่เหมาะสมในการสกัดซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายสีแดงด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 2 พบว่าอัตราส่วนของสาหร่ายต่อน้ำที่ระดับ 1:50 (w/v) มีปริมาณสารสกัดซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์สูงกว่าอัตราส่วนของสาหร่ายต่อน้ำที่ระดับ 1:25 และ 1:35 (w/v) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดยปริมาณสารสกัดซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายสีแดงทั้ง SP1 และ SP2 เท่ากับ 16.19±3.37 และ 17.76±2.54 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ (ตารางที่ 2 ข้อมูลทั้งหมดแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าคลาดเคลื่อนมาตรฐาน และค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรไม่เหมือนกันในแต่ละสดมภ์มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมัน 95 เปอร์เซ็นต์)

Table 2 Effect of seaweed-to-water ratio on the sulfated polysaccharide yield

Samples	seaweed-to-water ratio (w/v)	Yield (% dw)
SP1	1:25	11.26±4.97[ab]
	1:35	16.82±6.33[a]
	1:50	16.19±3.37[a]
SP2	1:25	6.66±3.78[b]
	1:35	14.55±0.89[a]
	1:50	17.76±2.54[a]

Data are expressed as the mean ± SD for sulfated polysaccharide yield. Different superscripts indicate significant differences (p<0.05) within the same row.

3. การสกัดซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยระยะเวลาที่แตกต่างกัน

จากการศึกษาผลของระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัดซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายสีแดงด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียสและอัตราส่วนของสาหร่ายต่อน้ำ 1:50 (w/v) ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 3 พบว่าตัวอย่างสาหร่ายสีแดง SP1 เวลาในการสกัด 60 นาที ให้ปริมาณสารสกัดสูงที่สุด คือ 18.755±1.76 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ในขณะเดียวกันตัวอย่างสาหร่ายสีแดง SP2 เวลาในการสกัด 90 นาที ได้ปริมาณสารสกัดสูงที่สุด คือ 15.45±2.27 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง (ตารางที่ 3 ข้อมูลทั้งหมดแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าคลาดเคลื่อนมาตรฐาน และค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรไม่เหมือนกันในแต่ละสดมภ์มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมัน 95 เปอร์เซ็นต์)

Table 3 Effect of extraction time on the sulfated polysaccharide yield

Samples	Time (min)	Yield (% dw)
SP1	40	12.95±1.88^{b}
	60	18.75±1.76^{a}
	90	15.70±1.79^{ab}
SP2	40	11.16±4.22^{b}
	60	12.25±2.26^{b}
	90	15.45±2.27^{ab}

Data are expressed as the mean ± SD for sulfated polysaccharide yield. Different superscripts indicate significant differences (p<0.05) within the same row.

4. การสกัดซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยอุณหภูมิที่แตกต่างกัน

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมในการสกัดซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายสีแดงด้วยน้ำที่อัตราส่วนของสาหร่ายต่อน้ำ 1:50 (w/v) ระยะเวลาในการสกัด 60 นาที ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4 โดยพบว่าตัวอย่างสาหร่ายสีแดง SP1 มีปริมาณสารสกัดซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) เมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการสกัด และตัวอย่างสาหร่ายสีแดง SP2 สกัดที่อุณหภูมิ 100 และ 110 องศาเซลเซียส พบว่าสารสกัดที่ได้มีปริมาณไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) (ตารางที่ 4 ข้อมูลทั้งหมดแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าคลาดเคลื่อนมาตรฐาน และค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรไม่เหมือนกันในแต่ละสดมภ์มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมัน 95 เปอร์เซ็นต์)

Table 4 Effect of extraction temperatures on the sulfated polysaccharide yield

Samples	Temperature (°C)	Yield (% dw)
SP1	90	12.21±1.60[b]
	100	13.80±4.24[b]
	110	14.18±2.78[ab]
SP2	90	10.49±2.31[b]
	100	18.52±0.93[a]
	110	18.52±1.42[a]

Data are expressed as the mean ± SD for sulfated polysaccharide yield. Different superscripts indicate significant differences (p<0.05) within the same row.

5. ปริมาณซัลเฟตของสารสกัดซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์

จากการวิเคราะห์ปริมาณซัลเฟตของตัวอย่างสารสกัดจากสาหร่ายสีแดงทั้ง SP1 และSP2 ที่สกัดด้วยน้ำอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส อัตราส่วนของสาหร่ายต่อน้ำ 1:50 (w/v) เป็นเวลา 60 นาที พบว่าสารสกัดจาก SP1 และ SP2 มีปริมาณซัลเฟตไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) (ภาพที่ 1)

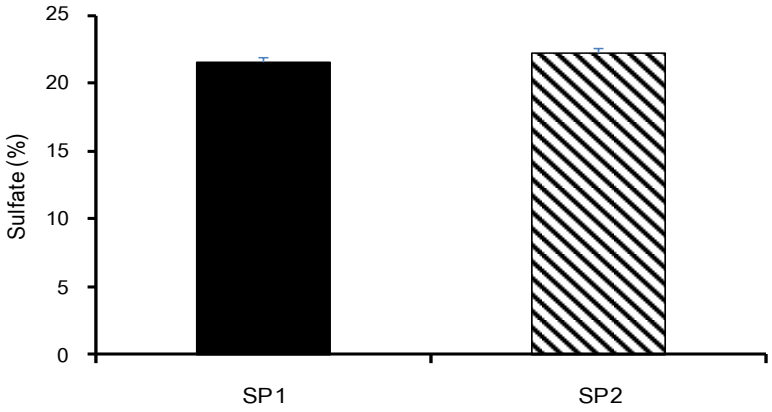

Figure 1 Sulfate content of sulfated polysaccharides from *G. fisheri*

6. ปริมาณน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์

เมื่อนำสารสกัดจากสาหร่ายสีแดง SP1 และ SP2 มาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และน้ำตาลรีดิวซ์ เปรียบเทียบกับ GOS ดังแสดงในตารางที่ 5 พบว่า GOS มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดสูงกว่าตัวอย่างสาหร่ายสีแดง SP1 และ SP2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจากสารสกัด SP1 และ SP2 บ่งบอกถึงปริมาณของคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดที่มีอยู่ในสารสกัด โดยแสดงเป็นค่าที่คิดเทียบกับน้ำตาลกาแลคโตส แสดงให้เห็นว่า GOS มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตอยู่ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ และมีองค์ประกอบอื่นอยู่น้อยมาก และจากการทดสอบหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นของสารสกัดจากสาหร่ายสีแดง SP1 และ SP2 พบว่าตัวอย่างสาหร่ายสีแดง SP2 มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงกว่าตัวอย่างสาหร่ายสีแดง SP1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) (ตารางที่ 5 ข้อมูลทั้งหมดแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าคลาดเคลื่อนมาตรฐาน และค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรไม่เหมือนกันในแต่ละสดมภ์มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมัน 95 เปอร์เซ็นต์)

Table 5 Total sugar and reducing sugar of sulfated polysaccharides from *G. fisheri*

Samples	Total sugar content (mg/g)	Reducing sugar content (mg/g)
SP1	995.77±8.98^{b}	214.87±1.53^{c}
SP2	823.12±5.33^{c}	237.87±1.53^{b}
GOS	1068.85±3.85^{a}	496.87±0.58^{a}

All data are mean values of triple determinations ± standard deviation (SD). Different superscripts indicate significant differences (p<0.05) within the same column.

7. การทดสอบสารสกัดซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์ต่อการเจริญของจุลินทรีย์โพรไบโอติก

เมื่อนำสารสกัดจากสาหร่ายสีแดง SP1, SP2 และ GOS มาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมบวกที่เติมน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และกลุ่มควบคุมทางลบที่ไม่เติมแหล่งคาร์บอน มาเพาะเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียโพรไบโอติก 2 สายพันธุ์ คือ *L. paracasei* TISTR 2389 และ *L. acidophilus* TISTR 875 โดยใช้เชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 10^{5}-10^{6} CFU/ml บ่มในสภาวะที่ไม่มีอากาศ พบว่า ภายใต้การเพาะเลี้ยงเชื้อที่ 24 ชม. เชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติก *L. acidophilus* TISTR 875 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ใช้สารสกัด SP1 และ SP2 เป็นแหล่งคาร์บอน มีการเจริญสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) เมื่อเปรียบเทียบกับการเจริญของเชื้อที่เพาะเลี้ยงในอาหารกลุ่มควบคุมที่เติมกลูโคส และ GOS ซึ่งเป็นตัวแทนพรีไบโอติกทางการค้าเป็นแหล่งคาร์บอน (ตารางที่ 6) แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากสาหร่ายสีแดงทั้ง SP1 และ SP2 สามารถช่วยส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกซึ่งเป็นคุณสมบัติที่สำคัญอย่างหนึ่งของสารพรีไบโอติก ซึ่งสอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงค่า pH ที่เกิดขึ้นในระหว่างการเจริญเติบโตของเชื้อ *L. acidophilus* TISTR 875 เกิดการเปลี่ยนแปลงของค่า pH

มากใน SP1 โดยมีค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.56±0.00 (ตารางที่ 7) เมื่อเวลาผ่านไปค่า pH ค่อย ๆ ลดลง จนเมื่อครบ 48 ชั่วโมง โดยมีค่า pH สุดท้ายเท่ากับ 4.45±0.00 ในขณะที่การเจริญของ *L. paracasei* TISTR 2389 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ใช้สาร SP1 และ SP2 เป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า *L. paracasei* TISTR 2389 มีการเจริญได้น้อยกว่าที่เพาะเลี้ยงในอาหารกลุ่มควบคุมที่เติมกลูโคสและ GOS เป็นแหล่งคาร์บอน (ตารางที่ 6) สอดคล้องกับค่า pH ที่เปลี่ยนแปลงน้อยมากในชุดการทดลองที่เติมสารสกัดจากสาหร่ายสีแดงทั้ง SP1 และ SP2

Table 6 Growth of *L. acidophilus* TISTR 875 and *L. paracasei* TISTR 2389 in minimal medium containing different carbon sources

Samples	Growth (log CFU/ml)					
	L. acidophilus TISTR 875			*L. paracasei* TISTR 2389		
	0 h	24 h	48 h	0 h	24 h	48 h
Control (-)	5.51±0.01^{d}	6.85±0.02^{d}	6.34±0.00^{a}	6.11±0.16^{a}	6.96±0.07^{bc}	7.10±0.10^{c}
Control (+)	5.83±0.03^{b}	6.78±0.02^{e}	6.32±0.05^{a}	5.78±0.50^{ab}	7.79±0.03^{a}	7.65±0.02^{a}
GOS	5.73±0.01^{c}	7.00±0.05^{c}	6.08±0.05^{b}	6.36±0.40^{a}	7.66±0.03^{ab}	7.36±0.06^{b}
SP1	5.86±0.04^{b}	7.12±0.00^{b}	6.36±0.01^{a}	5.82±0.30^{ab}	6.23±0.93^{c}	7.19±0.03^{c}
SP2	5.93±0.04^{a}	7.24±0.01^{a}	5.04±0.04^{c}	5.37±0.47^{b}	7.17±0.07^{ab}	7.13±0.03^{c}

All data are mean values of triple determinations ± standard deviation (SD). Different superscripts indicate significant differences (p<0.05) within the same column.

Table 7 pH change in the culture broth of *L. acidophilus* TISTR 875 and *L. paracasei* TISTR 2389 in minimal medium containing different carbon sources

ตัวอย่าง	pH value					
	L. acidophilus TISTR 875			*L. paracasei* TISTR 2389		
	0 h	24 h	48 h	0 h	24 h	48 h
Control (-)	5.59±0.00^{c}	4.61±0.01^{b}	4.37±0.00^{b}	7.16±0.02^{a}	7.15±0.06^{a}	7.17±0.09^{a}
Control (+)	5.63±0.00^{a}	4.45±0.00^{d}	4.33±0.00^{c}	7.15±0.02^{a}	4.18±0.23^{c}	3.67±0.04^{d}
GOS	5.62±0.00^{ab}	4.58±0.00^{c}	4.33±0.00^{c}	7.17±0.02^{a}	6.28±0.01^{b}	4.40±0.02^{c}
SP1	5.56±0.00^{d}	4.73±0.00^{a}	4.45±0.00^{a}	7.02±0.01^{b}	7.00±0.00^{a}	6.98±0.02^{b}
SP2	5.61±0.01^{b}	4.43±0.00^{e}	4.36±0.01^{b}	7.04±0.02^{b}	7.02±0.02^{a}	7.02±0.00^{b}

All data are mean values of triple determinations ± standard deviation (SD). Different superscripts indicate significant differences (p<0.05) within the same column.

วิจารณ์ผลการวิจัย

1. องค์ประกอบทางเคมีของสาหร่ายสีแดง

จากผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสาหร่ายสีแดงทั้ง SP1 และ SP2 พบว่าปริมาณความชื้น โปรตีน ไขมัน เถ้า เยื่อใย และคาร์โบไฮเดรตที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาของ Ruangchuay *et al*. (2006) รายงานว่าองค์ประกอบทางเคมีของสาหร่าย *Gracilaria tenuistipitata* มีปริมาณความชื้น โปรตีน ไขมัน เถ้า เยื่อใย และคาร์โบไฮเดรตอยู่ในช่วง 7.24 - 8.10, 6.30 - 18.55, 2.94 - 3.85, 17.54 - 28.04 และ 48.10 - 63.80 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เช่นเดียวกับการศึกษาของ Rosemary *et al*. (2019) พบว่าสาหร่าย *Gracilaria* sp. มีความชื้น โปรตีน ไขมัน เถ้า และคาร์โบไฮเดรตเท่ากับ 6.54, 25.29, 4.76, 7.36 และ 4.71 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้ Suvimol *et al.* (2017) รายงานว่าปริมาณคาร์โบไฮเดรตในกลุ่มสาหร่ายสีแดงอยู่ในช่วง 17 - 24 เปอร์เซ็นต์

2. สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายสีแดง

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายสีแดง พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์ คือ อัตราส่วนระหว่างสาหร่ายกับน้ำ 1:50 (w/v) อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส และระยะเวลาในการสกัด 60 นาที ให้ปริมาณผลผลิตของสารสกัดซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์สูงสุดเท่ากับ 18.52±0.93 เปอร์เซ็นต์ (SP2) และ13.80±4.24 เปอร์เซ็นต์ (SP1) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Mehta *et al.* (2010) ที่ได้นำสาหร่ายทะเลสีแดง 2 ชนิด คือ *Gracilaria debilis* และ *Gracilaria salicornia* สกัดโดยมีอัตราส่วนสาหร่ายต่อน้ำ 1:30 (w/v) อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง พบว่าได้ปริมาณสารสกัดเท่ากับ 14.8 และ 15.2 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับ Souza *et al.* (2012) ซึ่งได้ทำการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายสีแดง (*Gracilaria birdiae*) ด้วยอัตราส่วนสาหร่ายต่อน้ำ 1.5:100 (w/v) อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส พบว่าได้ปริมาณสารสกัดเท่ากับ 27.2 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ Chi *et al.* (2018) รายงานว่าจากการศึกษาเปรียบเทียบวิธีการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่าย *Enteromorpha prolifera* พบว่าวิธีการสกัดด้วยน้ำร้อนที่อัตราส่วนสาหร่ายต่อน้ำ 1:30 (w/v) อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ให้ปริมาณสารสกัดซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์เท่ากับ 21.3 เปอร์เซ็นต์ และ Barros *et al.* (2013) ทำการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่าย *Gracilaria caudate* ด้วยอัตราส่วนสาหร่ายต่อน้ำ 1:5 (w/v) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส พบว่าได้ปริมาณสารสกัดเท่ากับ 32.8 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง แต่อย่างไรก็ตามปริมาณสารสกัดซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์ที่แตกต่างกันอาจเนื่องมาจากคุณภาพของสาหร่าย ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม ช่วงชีวิตของสาหร่าย (Ruangchuay *et al*., 2006) และวิธีในการสกัด เป็นต้น

3. ปริมาณซัลเฟตของสารสกัดซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์

จากการวิเคราะห์หาปริมาณซัลเฟตในสารสกัดซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์ในตัวอย่าง SP1 และ SP2 พบว่าปริมาณซัลเฟตในสารสกัดจากตัวอย่าง SP1 ไม่มีความแตกต่างจากตัวอย่าง SP2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) เช่นเดียวกับ

การศึกษาของ Imjongjairak *et al*. (2014) พบว่าปริมาณซัลเฟตของสารสกัดลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายสีแดงสกัดที่อุณหภูมิห้อง มีค่าเท่ากับ 6.86 เปอร์เซ็นต์ และสกัดที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส มีค่าเท่ากับ 8.95 เปอร์เซ็นต์ Han *et al*. (2020) พบว่าปริมาณซัลเฟตจากพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดจากสาหร่าย *Gracilaria lemaneiformis* มีค่าเท่ากับ 29.82±0.13 เปอร์เซ็นต์ และ Chen *et al*. (2018) พบว่าสารสกัดพอลิแซคคาไรด์จากสาหร่าย *Eucheuma spinosum* และ *Grateloupia filicina* ซึ่งเป็นสาหร่ายสีแดงมีปริมาณซัลเฟตเท่ากับ 21.35±0.21 และ 20.55±0.18 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีการรายงานว่าสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดจากสาหร่ายสีแดงพันธุ์อื่น ๆ เช่น *Porphyra haitanensis* มีปริมาณซัลเฟตเท่ากับ 12.61±0.44 เปอร์เซ็นต์ (Xu *et al*, 2019)

4. ปริมาณน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัด SP1 และ SP2 พบว่ามีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์อยู่ในช่วง 823 -995 mg/g และ 214-237 mg/g ตามลำดับ จากการศึกษาของ Imjongjairak *et al*. (2014) พบว่าสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จาก *G. fisheri* สกัดที่อุณหภูมิห้องและที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 66.38 และ 86.79 เปอร์เซ็นต์ Poliana *et al*. (2019) วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในสารสกัดซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดจากสาหร่าย *G. caudate* พบว่ามีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 85.60 เปอร์เซ็นต์ และยังพบปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดจากสาหร่าย *Ecklonia radiata* มีค่าเท่ากับ 430 มิลลิกรัมต่อกรัมของสารสกัด (Suvimol *et al*., 2016) Chen *et al*. (2018) วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในสารสกัดซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดจากสาหร่าย *Eucheuma spinosum* และ *Grateloupia filicina* ซึ่งเป็นสาหร่ายสีแดง พบว่ามีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 62.11±0.16 และ 41.85±0.26 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

5. ผลของสารสกัดซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์ต่อการเจริญของจุลินทรีย์โพรไบโอติก

จากการนำสารสกัดจากสาหร่ายสีแดงทั้ง SP1 และ SP2 มาทดสอบคุณสมบัติความเป็นพรีไบโอติก พบว่าสารสกัดซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์ที่ใช้แทนที่น้ำตาลกลูโคสในอาหาร minimal medium ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ *Lactobacilus* ได้บางสายพันธุ์ จากผลการทดลองอาจสรุปได้ว่าสารสกัดซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายสีแดงมีศักยภาพในการเป็นพรีไบโอติก เนื่องจากสามารถกระตุ้นการทำงานและส่งเสริมการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์จำเพาะได้ (Poliana *et al*., 2019) โดยจะพบว่า *L. acidophilus* TISTR 875 มีการเจริญเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้สารสกัดจากสาหร่ายสีแดงทั้ง SP1 และ SP2 เป็นแหล่งคาร์บอนและมีประสิทธิภาพสูงกว่าพรีไบโอติกทางการค้า (GOS) จากการทดลองของ Fook & Gibson (2003) พบว่าสารกลุ่มพรีไบโอติกจะมีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในร่างกาย เช่น *Lactobacillus* ซึ่งเมื่อจุลินทรีย์กลุ่มนี้เจริญจะผลิตกรดอินทรีย์ ส่งผลให้ลำไส้มีสภาวะความเป็นกรด ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค อีกทั้ง *Lactobacillus* ยังสามารถผลิตสารต้านจุลชีพ ซึ่งมีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค ดังนั้น

จึงช่วยปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ ลดความรุนแรงและอุบัติการณ์การติดเชื้อก่อโรค Charoensiddhi *et al*. (2017) รายงานว่าสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำจากสาหร่ายสีน้ำตาล *Ecklonia radiata* สามารถเพิ่มจำนวนแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์ได้เมื่อทำการหมักเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง แต่จำนวนของ *Escherichia coli* และ *Enterococcus* มีจำนวนลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมทางลบ และสอดคล้องกับการศึกษาของ Han *et al*. (2019) พบว่าเมื่อนำสารสกัดซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่าย *Gracilaria lemaneiformis* เป็นแหล่งคาร์บอนในการหมักตัวอย่างอุจจาระของมนุษย์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม Bacteroidetes และ Proteobacteria เพิ่มขึ้น ในขณะที่ Firmicutes และ Actinobacteria ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เช่นเดียวกันกับการศึกษาของ Kong *et al*. (2016) พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่าย *Laminaria japonica* สามารถส่งเสริมการเจริญของเชื้อในสายพันธุ์ที่เป็นประโยชน์ คือ *Lactobacillus* และ *Bifidobacterium* หลังจากการหมักในหลอดทดลองเป็นเวลา 48 ชั่วโมง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่อย่างไรก็ตามการที่แบคทีเรียโพรไบโอติกแต่ละชนิดมีความสามารถในการใช้สารที่มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติกแตกต่างกันนั้น เนื่องจากความหลากหลายในเรื่องของโครงสร้างและการสร้างเอนไซม์ขึ้นมาย่อยโมเลกุลคาร์โบไฮเดรต ซึ่งสารที่มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติกมีองค์ประกอบและการเชื่อต่อกันระหว่างพันธะภายในต่างกัน ดังนั้นแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์จะต้องสร้างเอนไซม์ขึ้นมาย่อยสารเหล่านี้และนำสารเหล่านี้ไปใช้ ซึ่งเอนไซม์ที่แบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ผลิตขึ้นมาล้วนมีความจำเพาะต่อสารแต่ละชนิดแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของแบคทีเรีย (Kanjan and Hongpattarakere, 2017 และ Buntin *et al*., 2017)

สรุปผลการวิจัย

จากงานวิจัยนี้พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการสกัด คือ อัตราส่วนระหว่างสาหร่ายกับน้ำ 1:50 (w/v) สกัดที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 60 นาที ให้ปริมาณผลผลิตของสารสกัดซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์สูงสุดเท่ากับ 18352±0.93 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำสารสกัดซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายสีแดง SP1 และ SP2 รวมทั้ง GOS มาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญของแบคทีเรียโพรไบโอติก ได้แก่ *L. paracasei* TISTR 2389 และ *L. acidophilus* TISTR 875 พบว่าสารสกัดซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายสีแดงสามารถส่งเสริมการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ *Lactobacillus* ได้บางสายพันธุ์ คือ *L. acidophilus* TISTR 875 แสดงว่าสารสกัดซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายสีแดงสามารถนำมาเป็นพรีไบโอติกเพื่อส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียโพรไบโอติกในมนุษย์ได้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยบัณฑิตศึกษาด้านการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตรจากสำนักงานพัฒนาการวิจัยเกษตร (องค์การมหาชน) ประจำปีงบประมาณ 2564 และได้รับการสนับสนุนทุนยกเว้นค่าธรรมเนียมการศึกษาในระดับบัณฑิตศึกษาจากคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี

เอกสารอ้างอิง

A.O.A.C. (2000). Official method of analysis of association of official analysis chemist (17th Edition). Virginia: The Association of Official Analysis Chemist. Inc.

Barros, F.C.N.,.da Silva, D.C, Sombra, V.G., Maciel, J.S., Feitosa, J.P.A., Freitas, A.L.P., and de Paula, R.C.M. (2013). Structural characterization of polysaccharide obtained from red seaweed *Gracilaria caudata* (J Agardh). *Carbohydrate Polymers*, *92*, 598-603.

Buntin, N, de Vos WM., and Hongpattarakere, T. (2017). Variation of mucin adhesion, cell surface characteristics, and molecular mechanisms among *Lactobacillus plantarum* isolated from different habitats. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *101*, 7663–7674.

Charoensiddhi, S., Conlon, M.A., Vuaran, M.S., Franco, C.M.M., and Zhang, W. (2019). Impact of extraction processes on prebiotic potential of the brown seaweed *Ecklonia radiate* by in vitro human gut bacteria fermentation. *Journal of Functional Foods*, *24*, 221–230.

Chen, X., Sun, Y., Hu, L., Liu, S., Yu, H., Li. R., and Wang, X., Li, P. (2018). In vitro prebiotic effects of seaweed polysaccharides. *Journal of Oceanology and Limnology*, *36*, 926–932

Chi, Y., Li, Y., Zhang, G., Gao, Y., Ye, H., Gao J., and Wang, P. (2018). Effect of extraction techniques on properties of polysaccharides from *Enteromorpha prolifera* and their applicability in iron chelation. *Carbohydrate Polymers*, *181*, 616–623.

Chikari, F., Han, J., Wang, Y., and Ao, W. (2020). Synergized subcritical-ultrasound-assisted aqueous two-phase extraction, purification, and characterization of *Lentinus edodes* polysaccharides. *Process Biochemistry*, *95*, 297–306.

Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., and Smith, F. (1956). Calorimetric method for determination of sugars and related substance. *Analytical Chemistry*. *28*, 350-356.

Fooks, L.J., and Gibson, G.R. (2003). Mixed culture fermentation studies on the effects of synbiotics on the human intestinal pathogens *Campylobacter jejuni* and *Escherichia coli. Anaerobe*, *9*, 231-242.

Gibson, G.R. (2004). Prebiotic. *Journal of Gastroenterology Supplement*, *18*, 287-298.

Han, R., Pang, D., Wen, L., You, L., Huang, R., and Kulikouskaya, V. (2019). In vitro digestibility and prebiotic activities of a sulfated polysaccharide from *Gracilaria Lemaneiformis*. *Journal of Functional Foods*, *64*, 103652.

Imjongjairak, S., Tachaapaikoon, C., Pason, P., Waeonukul, R., Laohakunchit, N., and Ratanakhanokchai, K. (2014). Antioxidant activity of sulfate polysaccharide extracts of red seaweed (*Gracilaria fisheri*). *Agricultural Science Journal*, *45*, 325-328.

Kong, Q., Dong, S., Gao, J., and Jiang, C. (2016). In vitro fermentation of sulfated polysaccharides from *E. prolifera* and *L. japonica* by human fecal microbiota. *International Journal of Biological Macromolecules*, *91*, 867-871.

Kanjan, P., and Hongpattarakere, T. (2017). Prebiotic efficacy and mechanism of inulin combined with inulin-degrading *Lactobacillus paracasei* I321 in competition with *Salmonella*. *Carbohydrate Polymers*, *169,* 236-244.

Lekshmi, V.S., and Kurup, G.M. (2019). Sulfated polysaccharides from the edible marine algae *Padina tetrastromatica* protects heart by ameliorating hyperlipidemia, endothelial dysfunction and inflammation in isoproterenol induced experimental myocardial infarction. *Journal of Functional Foods*, *54*, 22–31.

Maciel, J.S., Chaves, L.S., Souza, B.W.S., Teixeira, D.I.A., Freitas, A.L.P., Feitosa, J.P.A., and de Paula, R.C.M., (2008). Structural characterization of cold extracted fraction of soluble sulfated polysaccharide from red seaweed *Gracilaria birdiae*, *Carbohydrate Polymer*, *71*, 559-565.

Mehta, G.K., Meena, R., Prasad, K., Ganesan, M., and Siddhanta, A.K. (2010). Preparation of galactans from *Gracilaria debilisand Gracilaria salicornia* (Gracilariales, Rhodophyta) of Indian waters. *Journal of Applied Phycology*, *22*, 623–627.

Miller, G.L. (1959). Use of denitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytic Chemistry*, *31,* 426-428.

Olano-Martin, E., Mountzouris, K.C., Gibson, G.B., and Rastall, R.A. (2000). Development of prebiotic based on dextran and oligodextran. *British Journal of Nutrition*, *83*, 247-255.

Poliana, O., Cavalcante, A., Glauber, C.L., Francisco, C.N.B., Luís E.C.C., Carla V.P.E.R., Willer, M.S., Venícios G.S., Clara, M.W.S.A., Ewerton, S.A., Edivânia, O.B.P., Ariclécio, C.O., Regina, C.M.P., and Ana, L.P.F. (2019). A novel antioxidant sulfated polysaccharide from the algae *Gracilaria caudata*: In vitro and in vivo activities. *Food Hydrocolloids*, *90,* 28-34.

Rees, D.A. (1961). Enzymic Synthesis of 3, 6-anhydro-L-galactose within Porphyran from L-galactose 6-sulphate units, *Biochemical Journal*, *81*, 347-352.

Rosemary, T., Arulkumar, A., Paramasivam, S., Portocarrero, A.M., and Miranda, J.M. 2019. Biochemical, micronutrient and physicochemical properties of the dried red seaweeds *Gracilaria edulis and Gracilaria corticate*. *Molecules*, *24*, 1-14.

Ruangchuay, R., Luangthuvanit, C., Petsupa, N., Benjama, O., and Masniyom, P. (2006). Cultivation of pom nang seaweeds *(Gracilaria spp.)* as an alternative occupation for the lacal fishermen in Pattani bay, Pattani province. *Thailand Science Research and Innovation*.

Santad, W., Paiboon, T., Akkasit, J., Worrapanit, C., Preeya, H., Tipparat, H., Arunporn, I., and Buncha, O. (2011). Extraction and analysis of prebiotics from selected plants from southern Thailand. Songklanakarin *Journal of Science and Technology (SJST)*, *33*, 517-523.

Souza, B.W.S., Cerqueira, M.A., Bourbon, A.I., Pinheiro, A.C., Martins, J.T., Teixeira, J.A., Coimbra, M.A., and Vicente, A.A. (2012). Chemical characterization and antioxidant activity of sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria birdiae*. *Food Hydrocolloids*, *27*, 287-292.

Suvimol, C., Michael, A.C., Christopher, M.M.F., and Wei, Z. (2017). The development of seaweed-derived bioactive compounds for use as prebiotics and nutraceuticals using enzyme technologies. *Trends in Food Science and Technology*, *70,* 20-33.

Xu, S.Y., Aweya, J.J., Li, N., Deng, R.Y., Chen, W.Y., Tang, J., and Cheong, K.L. (2018). Microbial catabolism of *Porphyra haitanensis* polysaccharides by human gut microbiota. *Food Chemistry*, *289,* 177-186.

Yun, L.Y., Li, D.Z., Yang, L., and Zhang, M. (2013). Hot water extraction and artificial simulated gastrointestinal digestion of wheat germ polysaccharide. *International Journal of Biological Macromolecules*, *123,* 174-181.