

**การประเมินประสิทธิภาพการยับยั้งเอนไซม์ไลเปส ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด
และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากสาหร่ายเตา *Spirogyra* sp.
จากโรงเรือนระบบปิดแบบน้ำหมุนเวียน**

**Assessment of Lipase Inhibitory Efficiency, Total Phenolic Content and Antioxidant
Activity of *Spirogyra* sp. Extract from Closed-Circulation Cultivation System**

รวินิภา ศรีมูล^{1*} และ วราทิติย์ ดลสุจิต²

Rawinipa Srimoon^{1*} and Waratit Donsujit²

¹คณะเทคโนโลยีอุตสาหกรรมและการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออกวิทยาเขตจันทบุรี ประเทศไทย

² คณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก ประเทศไทย

¹ Faculty of Agro-Industrial Technology, Rajamangala University of Technology Tawan-ok Chanthaburi Campus, Thailand

² Faculty of Agriculture and Natural Resources, Rajamangala University of Technology Tawan-ok, Thailand

Received : 2 April 2025, Received in revised form : 27 August 2025, Accepted : 16 October 2025

Available online : 20 October 2025

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์และที่มา : โรคอ้วนเกิดจากความผิดปกติของสมดุลไขมันในร่างกายและมีภาวะไขมันในเลือดสูง นำไปสู่การเกิดโรคเรื้อรังต่าง ๆ เช่น โรคหัวใจและหลอดเลือด โรคเบาหวาน และความดันโลหิตสูง เอนไซม์ที่สำคัญในการย่อยไขมันคือเอนไซม์ไลเปส การยับยั้งเอนไซม์ไลเปสช่วยลดการย่อยไขมันที่จะถูกดูดซึมเข้าสู่เซลล์ร่างกายทำให้ระดับไขมันในเลือดลดลง การศึกษาสารสกัดจากธรรมชาติหลายชนิดที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไลเปสจึงช่วยลดสัดส่วนการใช้ยาสังเคราะห์ที่มีผลข้างเคียงต่อร่างกายเมื่อใช้ยาต่อเนื่องได้ ดังนั้น วัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้ คือ ศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งเอนไซม์ไลเปส ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสาหร่ายเตา (*Spirogyra* sp.) ซึ่งเป็นสาหร่ายสีเขียวน้ำจืดขนาดใหญ่ที่มีคุณค่าทางโภชนาการและสารต้านอนุมูลอิสระเช่น สารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ในปริมาณสูง แต่ปริมาณสารสำคัญต่างๆ จะแตกต่างกันออกไปตามแหล่งน้ำที่สาหร่ายอาศัยอยู่ ทำให้คุณภาพและปริมาณผลผลิตของสาหร่ายตามธรรมชาติไม่คงที่ในการศึกษานี้จึงใช้สาหร่ายเตาได้จากการเพาะเลี้ยงในโรงเรือนระบบปิดแบบน้ำหมุนเวียนซึ่งมีการควบคุมสภาวะการเพาะเลี้ยงให้ปริมาณผลผลิตและคุณภาพสาหร่ายคงที่ และไม่มีสารปนเปื้อนจากสารพิษเนื่องจากมีการปรับปรุงคุณภาพน้ำก่อนและหลังใช้งาน ซึ่งยังไม่มีการศึกษาที่ทำการประเมินประสิทธิภาพการยับยั้งเอนไซม์ไลเปส ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสาหร่ายเตาที่เพาะเลี้ยงในโรงเรือนระบบปิดแบบน้ำหมุนเวียนมาก่อน

วิธีดำเนินการวิจัย : ตัวอย่างสาหร่ายเตาได้จากการเพาะเลี้ยงในโรงเรือนระบบปิดแบบน้ำหมุนเวียน ปริมาตร 1,000 ลิตร หลังคาอะคริลิกใสแสงผ่านได้ มีการบำบัดน้ำก่อนและหลังด้วยการตกตะกอนร่วมกับการพ่นอากาศ เก็บตัวอย่างสาหร่ายนำไปล้างให้สะอาด แล้วนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 2 วัน บดให้ละเอียด นำตัวอย่างผงแห้งไปสกัดแบบ

มาซเซอร์ชันด้วยเอทานอลร้อยละ 70 ในอัตราส่วนตัวอย่างผงแห้งต่อตัวทำละลาย=1:5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร นาน 48 ชั่วโมง แล้วระเหยแห้งให้ได้สารสกัดหยาบ จากนั้นนำสารสกัดหยาบไปวิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไลเปสจากตับอ่อนด้วยวิธีวัดอัตราการปล่อยกรดโอเลอิกจากการสลายของไตรโอเลอินเทียบกับยา Xenical (สารมาตรฐานออร์ลิสแตท) ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin–Ciocalteu phenol reagent ฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระดีพีพีเอช จลนศาสตร์การยับยั้งเอนไซม์ด้วย Lineweaver-Burg plot จากสมการ Michaelis-Menten และความสัมพันธ์ของฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไลเปสกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยใช้สหสัมพันธ์ของ Pearson

ผลการวิจัย : ผลการวิจัยพบว่า ร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ไลเปสเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัด ($p \leq 0.05$) ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเปสของสารสกัดสาหร่ายเตาและยารักษาโรคอ้วนยี่ห้อ Xenical ที่ความเข้มข้นเท่ากันคือ 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าเท่ากับร้อยละ 23.81 ± 0.97 และ 85.71 ± 2.33 ตามลำดับ, IC_{50} เท่ากับ 90.91 ± 1.83 และ 16.67 ± 1.87 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จะเห็นว่า ร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ของยา Xenical สูงกว่าสารสกัดสาหร่ายเตา 3.59 เท่า ค่า IC_{50} (ความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ไลเปสได้ร้อยละ 50) ของยา Xenical ต่ำกว่าสารสกัดสาหร่ายเตา 5.45 เท่า ค่า IC_{50} ที่ต่ำกว่าแสดงว่ามีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ได้ดีกว่า แม้ว่าประสิทธิภาพการยับยั้งเอนไซม์ของสารสกัดจากสาหร่ายเตาจะต่ำกว่ายา Xenical แต่ก็ถือว่าสารสกัดสาหร่ายเตามีศักยภาพในการยับยั้งเอนไซม์ไลเปสได้ พฤติกรรมการยับยั้งเอนไซม์ของสารสกัดเป็นการยับยั้งแบบไม่แข่งขันเมื่อพิจารณาจากค่า V_{max} , K_m , K_i และ K_i' ที่ได้จาก Lineweaver-Burg plot นั่นคือ V_{max} (อัตราเร็วการเกิดปฏิกิริยาสูงสุด) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) แต่ K_m (ค่าคงที่ Michaelis-Menten constant) คงที่ ($p > 0.005$) และค่า K_i มากกว่าค่า K_i' (ค่าคงที่การยับยั้ง) พฤติกรรมการยับยั้งแบบนี้หมายความว่า ตัวยับยั้งจะจับได้ทั้งเอนไซม์หรือเอนไซม์-ซับสเตรตคอมเพล็กซ์ที่ตำแหน่งอัลโลสเตอริกทำให้เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้ นอกจากนี้ สารสกัดสาหร่ายเตามีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด 36.65 ± 0.25 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัม ฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระดีพีพีเอช เท่ากับ 3.13 ± 0.03 มิลลิกรัมทริลอคซ์ต่อกรัม หรือคิดเป็นร้อยละ 70.30 ± 0.64 จากสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของ Pearson พบว่า ร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไลเปสกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดมีความสัมพันธ์กันสูง ($r = 0.8224$) และมีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลดีพีพีเอชปานกลาง ($r = 0.7145$) ซึ่งให้เห็นว่า สารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดมีบทบาทสำคัญในการยับยั้งเอนไซม์ไลเปส โดยทั่วไปสารสกัดธรรมชาติที่มีสารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง ๆ มักตรวจพบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเปสสูงตามไปด้วย

สรุปผลการวิจัย : ผลการวิจัยในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า สารสกัดจากสาหร่ายเตาที่เพาะเลี้ยงในโรงเรือนระบบปิดแบบน้ำหมุนเวียนซึ่งมีการควบคุมสภาวะการเพาะเลี้ยงให้ปริมาณและคุณภาพสาหร่ายคงที่ มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไลเปสได้ สารสกัดมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงซึ่งมีผลต่อประสิทธิภาพการยับยั้งเอนไซม์ สารสกัดจากสาหร่ายเตาจึงมีศักยภาพในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพได้ อย่างไรก็ตาม การวิจัยนี้เป็นเพียงการประเมินประสิทธิภาพการยับยั้งเอนไซม์ไลเปสในหลอดทดลอง (*in vitro*) เท่านั้น การศึกษาตัวยับยั้งเอนไซม์ไลเปสจากสารสกัดธรรมชาติควรทำการทดลอง

เพิ่มเติมอาจทำในเซลล์เพาะเลี้ยง (*in vitro*) รวมถึงในสัตว์ทดลอง (*in vivo*) เพื่อยืนยันประสิทธิภาพที่แท้จริง ผลข้างเคียง และความปลอดภัยของการใช้สารสกัดต่อไป

คำสำคัญ : เอนไซม์ไลเปส ; สาหร่ายเตา ; ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ; สารประกอบฟีนอลิก

Abstract

Background and Objectives : Obesity is a lipid homeostasis dysfunction and hyperlipidemia condition, leading to the occurrence of the other chronic diseases such as cardiovascular disease, diabetes and hypertension. The enzyme which is importance in lipid digestion is lipase. Inhibition of lipase enzyme decreases the digestion and the absorption of lipid to the cells, causing in lower level of the lipid in blood. The studies of many natural lipase inhibitors may help the reduction of synthetic drug which causes long-term adverse side effects. Thus, the objectives of this research were to assess the lipase inhibitory efficiency, total phenolic content and antioxidant activity in *Spirogyra* sp. extract. *Spirogyra* sp. was the green-fresh water macroalgae with high nutrition values and antioxidants content such as phenolic and flavonoids compounds. But the phytochemicals containing in algae were variation because of the different aquatic habitat of algae. It made the unstable quality and productivity of algae from natural sources. In this study, *Spirogyra* sp. sample was cultivated from closed-circulating system, which the culture conditions were controlled for both productivity and quality of algae. Moreover, algae were non-contaminated from any toxic substances because there was the water treatment process both before and after cultivation. There has been no previous study on the assessment of lipase inhibitory efficiency, total phenolic content and antioxidant activity in *Spirogyra* sp., which was cultivated in the closed-circulation cultivation system.

Methodology : *Spirogyra* sp. sample was cultured in 1,000 L closed-circulating raceway pond type in transparent acrylic roof greenhouse. Water treatment was done using precipitation method coupled with the aerator before and after each cultivation cycle. Algae sample was picked, washed, dried at 50°C for 2 days and blended. Dried powder sample was macerated with 70% ethanol at a ratio of dried powder : solvent was 1:5 weight by volume for 48 h, and evaporated to produce the crude extract. Afterthat, crude extract was determined the lipase inhibitory efficiency by measuring the rate of oleic acid released from triolein breakdown by pancreatic lipase enzyme, compared with the drug named Xenical (standard Orlistat). Total phenolic content was performed using Folin–Ciocalteu phenol reagent method. The antioxidant activity was conducted using the DPPH radical scavenging activity method. The enzyme inhibition kinetic was evaluated using the Lineweaver-Burg plot derived from the Michaelis-Menten equation. The relationship between lipase inhibition efficiency and, total phenolic content and DPPH antioxidant activity was also investigated using Pearson correlation coefficient.

Main Results : The results showed that lipase inhibition efficiency increased with increasing the extract concentration ($p \leq 0.05$). The inhibitory efficiency of *Spirogyra* sp. extract and the anti-obesity drug named Xenical at the same concentration of 40 mg/mL were $23.81 \pm 0.97\%$ and $85.71 \pm 2.33\%$, respectively, and the IC_{50} value (the 50% lipase inhibition concentration) were 90.91 ± 1.83 and 16.67 ± 1.87 mg/mL, respectively. In comparison, the percentage of lipase inhibition of Xenical was 3.59 times higher than that of *Spirogyra* sp. extract while the IC_{50} value of Xenical was 5.45 times lower than that of the extract. The lower IC_{50} value showed the higher enzyme inhibition. Although the enzyme inhibitory efficiency of *Spirogyra* sp. extract was lower than Xenical, it is still counted that *Spirogyra* sp. extract had the lipase inhibition power. The behavior of lipase inhibition of *Spirogyra* sp. extract was non-competitive manner, with consideration to V_{max} , K_m , K_i and K_i' values derived from the Lineweaver-Burg plot. The V_{max} values (maximum reaction rate) were significantly decreased ($p \leq 0.05$), the K_m values (Michaelis-Menten constant) were significantly unchanged ($p > 0.005$) and the K_i value was more than the K_i' value (Inhibition constant). This inhibition behavior meant that the inhibitor bound to both enzyme or enzyme-substrate complex at the allosteric sites, resulting in the decrease of the enzyme activity. In addition, the total phenolic content of *Spirogyra* sp. extracts was 36.65 ± 0.25 mg gallic acid/g extract and the DPPH antioxidant activity was 3.13 ± 0.03 mg Trolox/g extract. The percentage of DPPH radical scavenging was 70.30 ± 0.64 . Pearson correlation coefficient showed that the percentage of lipase inhibition was strong correlation with total phenolic content ($r = 0.8224$), and moderate correlation with DPPH radical scavenging activity ($r = 0.7145$) of the extract. It indicated that phenolic compounds and antioxidant activity in the extract play an important role in the efficiency of lipase inhibition. Generally, natural extract that contained high content of phenolic and flavonoid compounds, and high antioxidant activity, also showed the high lipase inhibition efficiency.

Conclusions : The results of this research provided that the extract of *Spirogyra* sp. cultivated in closed-circulating system, which the culture conditions were controlled for both quantity and quality of algae, was potential used as a lipase inhibitor. The extract had high content of total phenolic and antioxidant activity, influenced on the lipase enzyme inhibition capacity. Therefore, *Spirogyra* sp. extract has the potential development to the healthy product. However, this study was the assessment of lipase inhibitory potential of *Spirogyra* sp. extract only in test tube (*in vitro*), the studies on lipase inhibitors from natural extract should be done in cultured cells (*in vitro*) or a laboratory animal (*in vivo*) in order to confirm the exactly efficiency, possible side effects and the use safe of the extract.

Keywords : lipase enzyme ; *Spirogyra* sp. ; antioxidant activity ; phenolic compounds

*Corresponding author. E-mail : rawinipa_sr@rmutto.ac.th

Introduction

โรคอ้วน (Obesity) เป็นภาวะที่ร่างกายมีไขมันอยู่มากกว่าปกติ ไขมันในเลือดที่สำคัญมี 2 ชนิด คือ คอเลสเตอรอล และไตรกลีเซอไรด์ คอเลสเตอรอลจะไปสะสมอยู่ตามผนังหลอดเลือดแดงในร่างกาย เช่น หลอดเลือดสมองและหลอดเลือดหัวใจ ทำให้เกิดเส้นเลือดแข็งตัว และการตีบตันของหลอดเลือด ส่วนไตรกลีเซอไรด์ในเลือดสูง จะมีโอกาสเป็นโรคหลอดเลือดเลี้ยงหัวใจตีบมากขึ้น ส่งผลเสียทำให้เกิดโรคแทรกซ้อนต่าง ๆ ตามมา เช่น ภาวะไขมันในเลือดสูง (Hyperlipidemia) ไขมันในเลือดผิดปกติ (dyslipidemia) โรคหัวใจและหลอดเลือด เบาหวาน ความดันโลหิตสูง ข้อกระดูกเสื่อม โรคเกี่ยวกับระบบทางเดินหายใจ ทางเดินอาหาร โรคเมะเร็งบางชนิด ในเพศหญิงอาจทำให้เกิดปัญหาประจำเดือนไม่สม่ำเสมอ (Bjerregaard & Baker, 2018; Liu *et al.*, 2020) เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยไขมัน ได้แก่ เอนไซม์ไลเปส (Lipase) ช่วยย่อยไขมันเป็นกรดไขมันกับกลีเซอรอล และถูกดูดซึมเข้าสู่เนื้อเยื่อต่าง ๆ ภายในเซลล์ การยับยั้งเอนไซม์ไลเปสช่วยในการรักษาโรคอ้วนและโรคไขมันในเลือดสูง ยาลดไขมันที่นิยมใช้ในปัจจุบันเป็นยาที่มีฤทธิ์ยับยั้งการย่อยอาหาร (Digestion inhibitors) โดยจะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเปสเพื่อลดการดูดซึมอาหารจำพวกไขมัน ได้แก่ ออร์ลิสแตท (Orlistat หรือ Tetrahydrolipstatin) ซึ่งเป็นยาออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไลเปสในทางเดินอาหารยับยั้งการย่อยและดูดซึมไขมันได้ประมาณร้อยละ 30 ของอาหารประเภทไขมันที่รับประทานเข้าไป จัดเป็น Digestion Inhibitors (Lunagariya *et al.*, 2014) โดยปกติแพทย์จะพิจารณาใช้ยาไขมันกลุ่มนี้ในผู้ป่วยโรคอ้วนที่มีค่าดัชนีมวลกาย (Body mass index, BMI) อยู่ระหว่าง 25-30 และมีโรคต่าง ๆ ร่วมด้วย เช่น ความดันโลหิตสูง โรคเบาหวาน ภาวะหยุดหายใจขณะหลับ เป็นต้น แต่ยาสังเคราะห์เมื่อใช้เป็นระยะเวลานานอาจก่อให้เกิดผลข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์ได้ เช่น ภาวะตับเป็นพิษ (Hepatotoxicity) ท่อทางเดินน้ำดีอุดตัน (Cholestasis) และโรคกล้ามเนื้อลายสลาย (Rhabdomyolysis) เป็นต้น (Duangjai *et al.*, 2016) ปัจจุบันจึงมีงานวิจัยที่มุ่งแสวงหาสารสกัดจากธรรมชาติทั้งจากพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเปสเพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพที่ช่วยลดระดับไขมันในเลือด ตัวอย่างเช่น พืชในสกุลราชพฤกษ์ (Habtemariam, 2013) กาแฟ (Cao *et al.*, 2024) ชาลาเซีย (*Salacia reticulata*) ในตำรับยาอายุรเวท (Koga *et al.*, 2013) สารสกัดสีน้ำตาล (Eom *et al.*, 2013; Chater *et al.*, 2016) เป็นต้น เมื่อวิเคราะห์สารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบหลักในสารสกัดเหล่านี้จะพบสารกลุ่มเด่นเป็นสารประกอบฟีนอลิก เช่น กรดฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ โพรแอนโทไซยานิดิน เคอร์ซีทีน คาเทชิน นอกจากนี้ยังพบว่า สารสกัดที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงจะมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเปสจึงมีส่วนช่วยในการลดระดับไขมันในเลือดได้ (Gonzalez-Castejon & Rodriguez-Casado, 2011; Srimoon, 2020) ผู้วิจัยจึงมีความสนใจศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไลเปสในสารสกัดจากสาหร่ายเตาซึ่งยังไม่มีผู้ทำการศึกษายับยั้งเอนไซม์ไลเปสในสาหร่ายชนิดนี้มาก่อนโดยเฉพาะอย่างยิ่งสาหร่ายที่มีการเพาะเลี้ยงในโรงเรือนระบบปิดที่มีการหมุนเวียนน้ำที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง

สาหร่ายเตาหรือเทาน้ำ มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Spirogyra* sp. (Class Zygnematophyceae Order: Zygnematales Family: Zygnemataceae Genus *Spirogyra*) เป็นสาหร่ายน้ำจืดขนาดใหญ่ที่จัดอยู่ในกลุ่มสาหร่ายสีเขียว มีสีเขียวอ่อนจนถึงสีเขียวเข้ม ลักษณะเป็นสายยาวรูปทรงกระบอกไม่แตกแขนง มีเมือกปกคลุม สามารถพบได้ในแหล่งน้ำนิ่งในเขตร้อนจนถึงเขต

อบอุ้ม พบได้ทั้งแบบลอยอยู่ที่ผิวน้ำ หรือยึดเกาะติดกับก้อนหินและก้นแหล่งน้ำก็ได้ (Peerapornpisal, 2015; Wongsawad & Peerapornpisal, 2015) จากงานวิจัยของ Das & Ghosh (2023) พบว่าสาหร่ายเตามีองค์ประกอบทางโภชนาการดังนี้ โปรตีน ร้อยละ 30.8 คาร์โบไฮเดรต ร้อยละ 42.07 ไขมัน ร้อยละ 3.04 เส้นใย ร้อยละ 15.74 เถ้า ร้อยละ 16.60 มีธาตุเหล็กในปริมาณสูง 295.3 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดอะมิโนจำเป็น เช่น ไลซีน ไอโซลิวซีน ทรีโอนีน และกรดไขมันจำเป็น เช่น กรดไลโนเลนิก กรดโอเลอิก ดีเอชเอ และอีพีเอ พบวิตามินและรงควัตถุหลายชนิด เช่น วิตามินซี คลอโรฟิลล์เอและบี เบตาแคโรทีน และแซนโทฟิลล์ ยังมีรายงานว่าสารสกัดจากสาหร่ายเตามีสารประกอบฟีนอลิกที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในปริมาณสูง (Peerapornpisal *et al.*, 2009; Peerapornpisal *et al.*, 2012; Sirirustananun & Chanartaeparporn, 2015) แต่ปริมาณที่พบก็แตกต่างกันออกไปตามสถานที่เก็บตัวอย่างสาหร่าย ดังแสดงใน Table 1

Table 1 Phenolic compounds and antioxidant activity in *Spirogyra* sp. from various habitats in Thailand

Species and habitat	Phenolic compounds and antioxidant activity	References
<i>Spirogyra</i> <i>varians</i> from Ban Pang Yang, Chiang Mai	Phenolic compounds = 44.52±1.08 mg/g (Methanolic extract)	Tipnee <i>et al.</i> (2015)
<i>Spirogyra</i> sp. from Nan River, Nan	Phenolic compounds = 204.29±0.25 mg/g DPPH antioxidant activity (IC ₅₀) = 323.71±0.72 mol/mL (Ethanol extract)	Phonrin (2017)
<i>Spirogyra</i> sp. from Ban Nakhua, Phrae	Phenolic compounds = 36.07±0.27 mg/g DPPH antioxidant activity as (IC ₅₀) = 130.04±0.55 mol/mL (Water extract)	Phattarasupa <i>et al.</i> (2018)

จากการศึกษาของ Yosboonruang *et al.* (2020) ยังพบว่าสารสกัดจาก *Spirogyra neglecta* มีศักยภาพในการยับยั้งเอนไซม์คอเลสเทอรอลเอสเตอเรสจากตับอ่อนสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบได้หลายชนิดและมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูง 157.92 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัม ฤทธิ์ต้านอนุมูลดีฟิฟิเอช และเอทีพีเอสในรูปของค่า IC₅₀ เท่ากับ 7.46 และ 224.20 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ จะเห็นได้ว่า สาหร่ายสาหร่ายเตามีคุณค่าทางโภชนาการและมีสารประกอบฟีนอลิกสูงและมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ จึงมีการนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางและผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร ซึ่งเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับสาหร่ายเตา อย่างไรก็ตามปริมาณสารสำคัญต่าง ๆ ที่พบมีความแตกต่างกัน เนื่องจากความหลากหลายของสายพันธุ์ และสภาพแวดล้อมที่สาหร่ายเตาเจริญเติบโต วิธีการสกัด การเลือกใช้ตัวทำละลาย เป็นต้น การเพาะเลี้ยงสาหร่ายเตาจึงเป็นวิธีการหนึ่งในการควบคุมคุณภาพของสาหร่ายที่จะนำไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ให้มีคุณภาพคงที่ตลอดการผลิต

การเพาะเลี้ยงสาหร่ายเตามีทั้งเลี้ยงในบ่อดินระบบเปิดซึ่งใช้แหล่งน้ำจืดธรรมชาติ การเพาะเลี้ยงแบบนี้มีข้อจำกัดเรื่องการควบคุมปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย เช่น การเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำจากแหล่งธรรมชาติที่นำมาใช้เพาะเลี้ยงและปริมาณสารอาหารในน้ำตามฤดูกาลทำให้ทั้งคุณภาพและปริมาณผลผลิตสาหร่ายเตาไม่คงที่ การเพาะเลี้ยงสาหร่ายแบบเปิดนี้อาจมีการปนเปื้อนจากสารเคมีทางการเกษตรและจากสารต่างๆ ที่อยู่ในน้ำทำให้อาจเกิดความไม่ปลอดภัย

ต่อการนำมาบริโภคได้ (Amornlirdpisarn *et al.*, 2013) การเพาะเลี้ยงสาหร่ายเตาในโรงเรือนระบบปิดแบบน้ำหมุนเวียนถือเป็นทางเลือกหนึ่งที่สามารถผลิตสาหร่ายเตาได้ตลอดทั้งปี เนื่องจากสามารถควบคุมคุณภาพของผลผลิตได้ น้ำที่ใช้ในโรงเรือนเป็นระบบน้ำหมุนเวียนผ่านกระบวนการปรับปรุงคุณภาพน้ำก่อนและหลังการใช้งาน และสามารถหมุนเวียนน้ำกลับมาใช้ใหม่ ทำให้ไม่มีการปนเปื้อนจากสารพิษจึงมีความปลอดภัยต่อการนำไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์อาหาร จากข้อมูลการเพาะเลี้ยงสาหร่ายเตาในรูปแบบโรงเรือนระบบปิดด้วยบ่อน้ำวนที่เป็นบ่อปูนของ Donsujit *et al.* (2023) พบว่าสามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตสาหร่ายเตาได้ต่อหนึ่งรอบการผลิตในระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 10 วัน รวมทั้งสามารถแก้ปัญหาการมีพื้นที่จำกัดและการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำตามฤดูกาลในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายเตาตามธรรมชาติได้ ดังนั้นในการวิจัยนี้ ผู้วิจัยจึงได้นำสาหร่ายเตาที่ทำการเพาะเลี้ยงในโรงเรือนหมุนเวียนน้ำแบบปิด มาศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งเอนไซม์ไลเปส ทั้งนี้ยังไม่มีผู้ศึกษาการยับยั้งเอนไซม์นี้ในสาหร่ายเตาที่ทำการเพาะเลี้ยงในโรงเรือนระบบปิดแบบระบบน้ำหมุนเวียนซึ่งมีการควบคุมสภาวะการเพาะเลี้ยงให้ผลผลิตคงที่มาก่อน เปรียบเทียบประสิทธิภาพการยับยั้งเอนไซม์กับสารมาตรฐานออร์ลิสแตทีทือ Xenical[®] รวมทั้งหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสาหร่ายด้วย ผลจากการวิจัยจะนำไปสู่การพัฒนาสารสกัดจากสาหร่ายเตาเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสุขภาพ ซึ่งเป็นการเพิ่มมูลค่าเชิงพาณิชย์ให้กับสาหร่ายเตาได้เป็นอย่างดี

Methodology

1. การเตรียมตัวอย่างสาหร่ายเตาในบ่อเพาะเลี้ยง

สาหร่ายเตา (*Spirogyra* sp.) ที่ใช้ในการทดลองนี้มาจากบ่อบัวของสถาบันบัว มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก จังหวัดชลบุรี ก่อนนำมาเพาะเลี้ยงทำการย่นย่นทางกายภาพและส่องดูลักษณะคลอโรพลาสต์ใต้กล้องจุลทรรศน์ลักษณะบิดเป็นเกลียว นำมาล้างให้สะอาดด้วยน้ำที่ปราศจากคลอรีน การเพาะเลี้ยงทำในโรงเรือนเพาะเลี้ยงระบบหมุนเวียนน้ำแบบปิด (Figure 1) ตามรูปแบบโรงเรือนและวิธีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายเตาของ Donsujit *et al.* (2023) ซึ่งดำเนินการอยู่ ณ สาขาวิชาประมง คณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก วิทยาเขตบางพระ จังหวัดชลบุรี บ่อเพาะเลี้ยงเป็นแบบระบบน้ำวน (Raceway pond) มีลักษณะเป็นลู มีสันตรงกลาง ปริมาตรความจุประมาณ 1,000 ลิตร หลังคาโรงเรือนเป็นอะคริลิกใสแสงส่องผ่านลงมาได้ ติดตั้งใบพัดไว้บ่อละ 1 ชุด หมุนที่ความเร็ว 12-15 รอบต่อนาที เพื่อหมุนวนน้ำในบ่อและช่วยเพิ่มออกซิเจนในน้ำ น้ำที่ใช้ในระบบเป็นน้ำดิบจากบ่อดินภายในมหาวิทยาลัยซึ่งเติมสารโพอลิอะลูมิเนียมคลอไรด์ (Polyaluminium chloride, PAC) ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อกำจัดสารแขวนลอยในน้ำ ร่วมกับการพ่นอากาศลงในน้ำ 2-3 ชั่วโมง ทั้งให้ตกตะกอน 1 วัน จากนั้นดูดน้ำส่วนใสด้านบนเข้าสู่บ่อเตรียมและเติมคลอรีนเข้มข้นร้อยละ 65 ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร พ่นอากาศลงในน้ำอีก 2-3 ชั่วโมง แล้วทั้งให้ตกตะกอน จากนั้นดูดน้ำส่วนใสด้านบนเข้าสู่บ่อเตรียมและบำบัดน้ำ พ่นอากาศลงในน้ำประมาณ 2-3 วัน เพื่อให้คลอรีนสลายตัว แล้วทั้งให้ตกตะกอน จากนั้นดูดน้ำส่วนใสด้านบนมาใส่ถังเก็บน้ำที่บึงแสงเพื่อใช้เพาะเลี้ยงสาหร่ายในบ่อน้ำวน น้ำที่เพาะเลี้ยงสาหร่ายแล้วต้องผ่านการบำบัดด้วยกระบวนการเดียวกับการเตรียมน้ำดิบ ควบคุมความเป็นกรดต่างของน้ำอยู่

ระหว่าง 7.5-8.0 เก็บเกี่ยวผลผลิตสาหร่ายได้ทุก 10 วัน วิธีการเพาะเลี้ยงนี้สาหร่ายจะมีอัตราการเจริญเติบโตอยู่ที่ 246.3 กรัม น้ำหนักสดต่อวัน

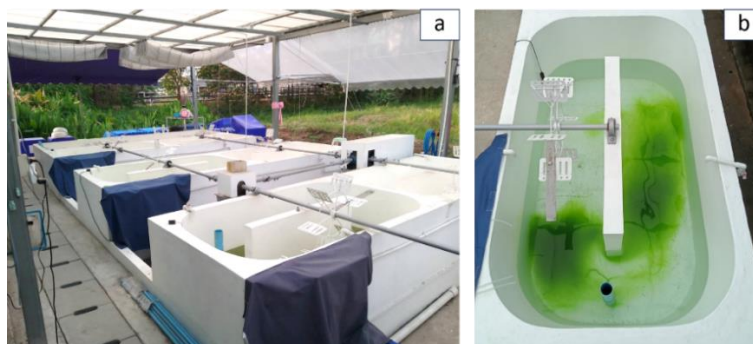


Figure 1 Closed-circulating system for of *Spirogyra* sp. cultivation (a) Cultivation pond and (b) *Spirogyra* sp. in circulating pond

2. การเตรียมสารสกัดหยาบของสาหร่ายเตา

ตัวอย่างสาหร่ายเตาสด (Figure 2a) ที่เก็บมาจากโรงเรือนเพาะเลี้ยง นำไปล้างด้วยน้ำให้สะอาด ผึ่งให้แห้งแล้วอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 2 วัน บดด้วยโถปั่น (Waring blender, USA) ให้เป็นผงละเอียด (Figure 2b) จากนั้นนำตัวอย่างที่เป็นผงแห้งไปสกัดด้วยวิธีดั้งเดิมหรือมาซเซอเรชัน (Maceration) ตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Abdel-Aal *et al.* (2015) โดยใช้ตัวอย่าง 100 กรัม สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 70 ปริมาตร 500 มิลลิลิตร (อัตราส่วนตัวอย่างต่อตัวทำละลาย = 1:5) นาน 48 ชั่วโมง จากนั้นกรองและนำไประเหยด้วยเครื่องระเหยสารแบบลดความดัน (Labora 4003 Heidolph, Germany) เพื่อให้ได้สารสกัดหยาบ

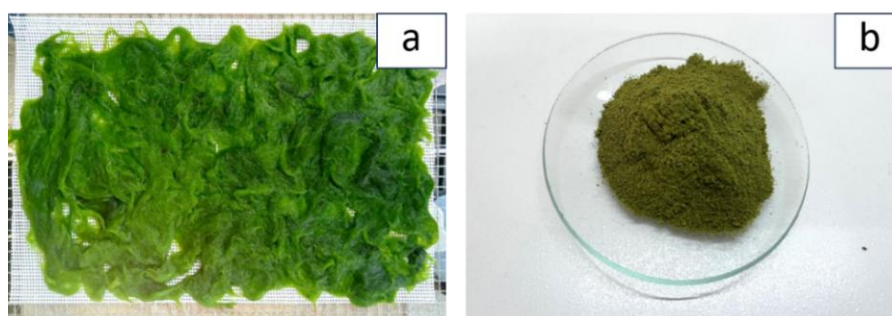


Figure 2 *Spirogyra* sp. sample (a) Fresh sample and (b) Dried and blended sample

3. การวิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไลเปสในสารสกัด

การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเปสใช้วิธีของ Sharma *et al.* (2005), Huerta *et al.* (2007) และ Khatchapuridze *et al.* (2023) โดยการวัดอัตราการปล่อยกรดโอเลอิก (Oleic acid) จากไตรโอเลอีน (Triolein) ไทเทรตเทียบกับสารมาตรฐาน ออร์ลิสแตทซึ่งในการวิจัยนี้ใช้ยา Xenical® (Pharmaceutical Standard, CHEPLAPHARM Arzneimittel GmbH, Germany) ซึ่งเป็นยาลดการดูดซึมไขมันที่แพทย์สั่งจ่ายให้ผู้ป่วยโรคอ้วน 1 เม็ด มีตัวยาออร์ลิสแตท 120 มิลลิกรัม การวิเคราะห์ทำได้โดยเตรียมสารมาตรฐานยา Xenical® หรือสารสกัดสารหว่ายาปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร เติมนไตรโอเลอีนในทวิน 40 (Tween 40) เข้มข้นร้อยละ 1 ลงไป 3 มิลลิลิตร ตามด้วยโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8 เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ 1 มิลลิลิตร นำไปเขย่าและบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นใส่เอนไซม์ไลเปสลงไป 1 มิลลิลิตร ซึ่งเตรียมจาก Pancreatin Porcine enzyme มี lipase activity = 6 ยูนิตต่อมิลลิกรัมผงแห้ง (Sisco Research Laboratories, India) ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในแต่ละชุดทดลองมีค่า lipase activity = 200 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เขย่าและบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เมื่อครบเวลา เติมนเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 95 ลงไป 3 มิลลิลิตรเพื่อยุติปฏิกิริยา จากนั้นนำไปไทเทรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เข้มข้น 0.025 โมลาร์ โดยใช้ฟีนอล์ฟทาลีน (Phenolphthalein) เป็นอินดิเคเตอร์ ไทเทรตสารละลายแบบลงค์โดยใช้โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8 เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ คำนวณร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ (% inhibition) และค่าความเข้มข้นของสารมาตรฐานและของสารสกัดที่ยับยั้งเอนไซม์ไลเปสได้ร้อยละ 50 (50% inhibition concentration; IC₅₀) ศึกษาจลนศาสตร์การยับยั้งเอนไซม์(Inhibition kinetic) เพื่อหาพฤติกรรมของการยับยั้งของเอนไซม์ไลเปส โดยใช้ไตรโอเลอีนเข้มข้น 0.5-2.5 มิลลิโมลาร์ ยา Xenical® 10-40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดสารหว่ายา 20-80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พล็อตกราฟ Lineweaver-Burg plot (1) จากสมการ Michaelis-Menten (2)

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (1)$$

$$V = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} \quad (2)$$

เมื่อ V_{max} คือ อัตราเร็วการเกิดปฏิกิริยาสูงสุด, K_m (Michaelis-Menten constant) คือ ค่าคงที่การแตกตัวของสารเกิดเอนไซม์-ซับสเตรต ซึ่งบ่งบอกการจับตัวของเอนไซม์-ซับสเตรต, K_i และ K_i' (Inhibition constant หรือค่าคงที่การยับยั้ง) โดย K_i ได้จากการพล็อตกราฟความชันของกราฟ Lineweaver-Burg plot กับความเข้มข้นของตัวยับยั้ง ส่วน K_i' ได้จากการพล็อตกราฟจุดตัดแกน Y ของ Lineweaver-Burg plot กับความเข้มข้นของตัวยับยั้ง แนวโน้มของค่า V_{max} และ K_m ใช้บอกพฤติกรรมการยับยั้งเอนไซม์ด้วยสารสกัดได้ว่าเป็นการยับยั้งแบบใด

4. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

วิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu phenol reagent อ้างอิงจาก Wong *et al.* (2006) ปิเปตสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก (0.01-0.10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) หรือสารสกัดสาหร่ายเตา (1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu phenol reagent เข้มข้นร้อยละ 10 ลงไป 5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) เข้มข้นร้อยละ 7.5 ลงไป 2 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Visible spectrometer (Lambda 365 Perkin Elmer, USA) คำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในรูปของมิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด (mg GAE/g)

5. การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอช

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay ตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Shimada *et al.* (1992) ทำโดยผสมสารละลายมาตรฐานโทรลอคซ์ (Trolox) (0.002-0.040 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) หรือสารสกัดสาหร่ายเตา (1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) กับสารละลายดีพีพีเอช เข้มข้น 0.04 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 4.5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 5.0 มิลลิลิตร เขย่าและตั้งทิ้งไว้ในที่มืดนาน 20 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร พร้อมทั้งทำตัวอย่างควบคุมโดยใช้ น้ำกลั่น คำนวณค่า % DPPH inhibition (ร้อยละของอนุมูลดีพีพีเอชที่ถูกยับยั้ง) คำนวณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเทียบกับสารมาตรฐานโทรลอคซ์ (mg Trolox/g)

6. ศึกษาความสัมพันธ์ของฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไลเปสกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัด

ความสัมพันธ์ของฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไลเปสกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยเตรียมสารสกัดจากสาหร่ายเตาความเข้มข้น 10, 20 และ 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอชและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไลเปส จากนั้นหาความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไลเปสกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดโดยใช้ Pearson correlation coefficient

7. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ปริมาณต่าง ๆ ในสารสกัดได้จากการทดลองซ้ำ 3 ซ้ำ (Experimental triplicate) รายงานในรูปค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±SD.) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple range test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

Results

ตัวอย่างสาหร่ายเตาที่เป็นผงแห้งผ่านการสกัดด้วยวิธีมาซเซอเรชันโดยใช้เอทานอลร้อยละ 70 เป็นตัวทำละลาย ได้สารสกัดหยาบคิดเป็นร้อยละ 10.49 ± 2.17 โดยน้ำหนักของสาหร่ายแห้ง ซึ่งใกล้เคียงกับร้อยละของการสกัดของ Peerapornpisarn *et al.* (2009) ซึ่งได้ร้อยละ 18 โดยน้ำหนักของสาหร่ายแห้ง แต่ถ้าใช้สาหร่ายสด ร้อยละของการสกัดจะต่ำกว่านี้ เช่น Phonrin (2017) สกัดสาหร่ายเตาสด ได้ร้อยละของการสกัดเพียง ร้อยละ 2.19 ± 0.06 โดยน้ำหนักสาหร่ายสด เนื่องจากมีน้ำเป็นองค์ประกอบในตัวอย่าง

1.ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไลเปส

จากการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไลเปสของสารสกัดสาหร่ายเตา พบว่า ร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ไลเปสเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัด ($p \leq 0.05$) ดังแสดงใน Figure 3 เมื่อเปรียบเทียบร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไลเปสและค่า IC_{50} ระหว่างสารสกัดสาหร่ายเตาและสารมาตรฐานออร์ลิสแตทซึ่งในการวิจัยนี้ใช้ยารักษาโรคอ้วนยี่ห้อ Xenical[®] ที่ลดการย่อยไขมันที่มีความเข้มข้นเท่ากันคือ 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร (Table 2) พบว่า มีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยค่า IC_{50} ของยา Xenical[®] มีค่าต่ำกว่าค่า IC_{50} ของสารสกัดสาหร่ายเตาประมาณ 5.45 เท่า ค่า IC_{50} ต่ำกว่า แสดงว่ามีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ได้ดีกว่า ส่วนร้อยละของการยับยั้ง (%inhibition) ของยา Xenical[®] มีค่าสูงกว่าร้อยละของการยับยั้งของสารสกัดสาหร่ายเตาประมาณ 3.59 เท่า

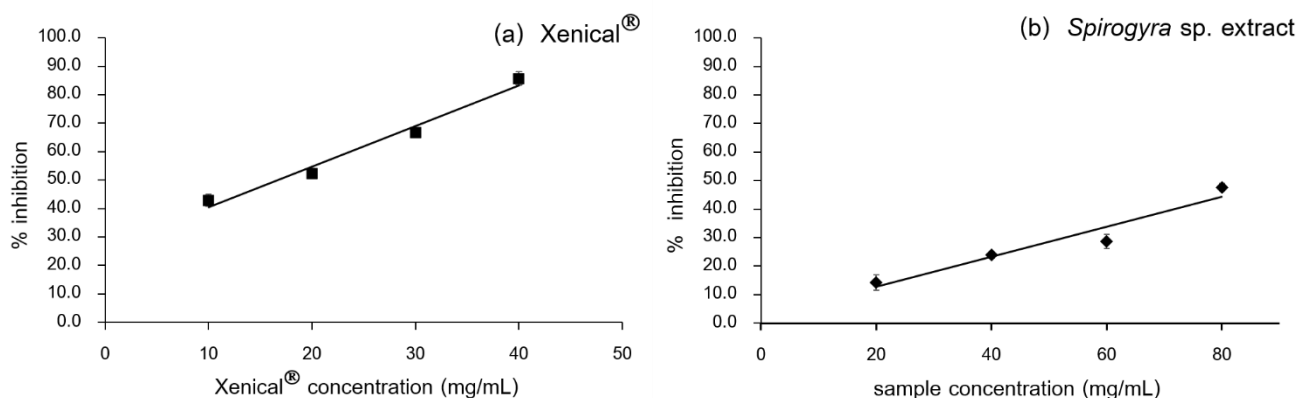


Figure 3 Percentage of lipase inhibition of *Spirogyra* sp. extract (a) Xenical[®] (Standard orlistat) and (b) *Spirogyra* sp. extract

Table 2 Lipase inhibition efficiency of *Spirogyra* sp. extract and Xenical[®] at 40 mg/mL (n=3)

sample	% inhibition	IC_{50} (mg/mL)
<i>Spirogyra</i> sp. extract	23.81±0.97 ^a	90.91±1.83 ^a
Xenical [®] (standard orlistat)	85.71±2.33 ^b	16.67±1.87 ^b

Different superscript letters in each column (^{a, b}) shows the significant difference ($p \leq 0.05$)

2. จลนศาสตร์การยับยั้งเอนไซม์ไลเปส

ค่าคงที่ทางจลนศาสตร์การยับยั้งเอนไซม์ไลเปสของสารสกัด ได้แก่ V_{max} , K_m , K_i และ K_i' ที่ได้จากการพล็อตกราฟ Lineweaver-Burg plot จากสมการ Michaelis-Menten แสดงดัง Table 3 จากกราฟ Lineweaver-Burg plot (Figure 4) แสดงถึงการยับยั้งเอนไซม์ไลเปสด้วยสารสกัดจากสาหร่ายเตาเป็นการยับยั้งแบบไม่แข่งขัน (Non-competitive inhibition) เนื่องจากค่า V_{max} ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) แต่ค่า K_m คงที่ ($p > 0.005$) และค่า $K_i > K_i'$ ซึ่งเป็นลักษณะของการยับยั้งแบบไม่แข่งขัน ค่า K_i ต่ำแสดงว่าตัวยับยั้งจับกับเอนไซม์ [E] ที่บริเวณเร่งได้ดี แต่ถ้าค่า K_i' ต่ำ แสดงว่าตัวยับยั้งจับกับเอนไซม์-สับสเตรตคอมเพล็กซ์ [ES] ได้ดี ดังนั้น การที่ค่า $K_i > K_i'$ จึงบ่งบอกพฤติกรรมของการยับยั้งแบบไม่แข่งขัน อย่างไรก็ตามค่าคงที่ต่าง ๆ ที่แสดงในตารางไม่ใช่ ค่าคงที่จลนศาสตร์สัมบูรณ์ (absolute kinetic constant) เนื่องจากอาจมีผลจากองค์ประกอบทางเคมีอื่น ๆ ที่อยู่ในสารสกัดด้วย แต่ก็สามารถใช้อธิบายพฤติกรรมของการยับยั้งเอนไซม์ไลเปสของสารสกัดได้

Table 3 Enzyme kinetic parameters of *Spirogyra* sp. extract (n=3)

Type of inhibition	Concentration (mg/mL)	V_{max} (mM/min)	K_m (mM)	K_i (mg/mL)	K_i' (mg/mL)
Non-competitive	20	0.049±0.007 ^a	2.160±0.016 ^a	22.0238	19.4908
	40	0.030±0.001 ^b	2.195±0.091 ^a		
	60	0.016±0.004 ^c	2.160±0.020 ^a		
	80	0.015±0.002 ^c	2.149±0.039 ^a		

Different superscript letters in each column (^{a, b, c}) shows the significant difference ($p \leq 0.05$)

3. ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดและความสัมพันธ์กับฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไลเปส

ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดที่วิเคราะห์ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu phenol reagent method และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่วิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH assay แสดงใน Table 4 และการศึกษาความสัมพันธ์ของฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไลเปสกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลดีฟิเคซโดยใช้สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของ Pearson (Pearson correlation coefficient) พบว่า รั้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไลเปสกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดจากสาหร่ายเตามีความสัมพันธ์กันสูง ($r=0.8224$) แต่มีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลดีฟิเคซปานกลาง ($r=0.7145$) นั่นคือ ประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ไลเปสขึ้นกับกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัด

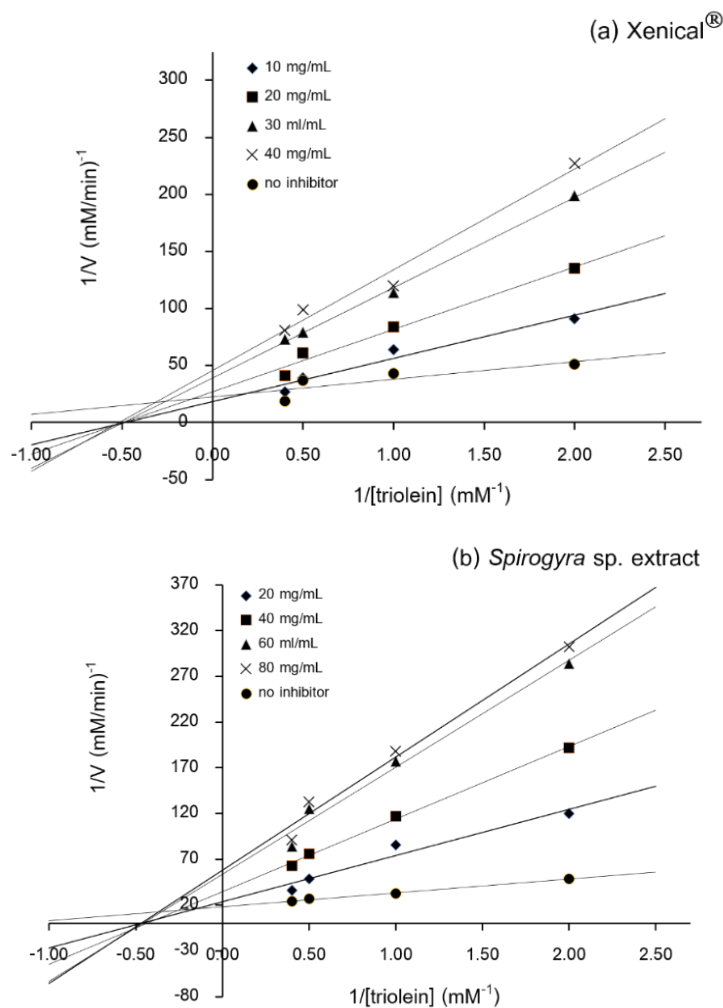


Figure 4 Lineweaver-Burk plots of lipase inhibition (a) Xenical® (Standard orlistat) and (b) *Spirogyra* sp. extract

Table 4 Total phenolic content and DPPH radical scavenging activity of *Spirogyra* sp. extract (n=3)

compounds	content
Total phenolic content (mg GAE/g)	36.65±0.25
DPPH radical scavenging activity (mg Trolox/g)	3.13±0.03
% DPPH inhibition	70.30±0.64

Discussion

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไลเปสและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากสาหร่ายเตา (*Spirogyra* sp.) ในระบบเพาะเลี้ยงระบบปิดแบบน้ำหมุนเวียน พบว่า ร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัด ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสารมาตรฐานออร์ลิสแตทที่หือ Xenical[®] กับสารสกัดสาหร่ายเตาที่ความเข้มข้นเท่ากันคือ 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร ร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ของยา Xenical[®] มีค่าสูงกว่าสารสกัดสาหร่ายเตาประมาณ 3.59 เท่า ($p \leq 0.05$) และค่า IC_{50} ของยา Xenical[®] มีค่าต่ำกว่าค่า IC_{50} ของสารสกัดสาหร่ายเตาประมาณ 5.45 เท่า ($p \leq 0.05$) ซึ่งค่า IC_{50} ต่ำกว่า แสดงว่ามีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ได้ดีกว่า (ความเข้มข้นน้อยก็สามารถยับยั้งได้ดี) ยา Xenical[®] เป็นยาลดไขมันกลุ่มสแตติน (Statin) ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเปส ลดการดูดซึมอาหารจำพวกไขมัน ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไลเปสในระบบทางเดินอาหาร สามารถยับยั้งการดูดซึมของอาหารไขมันได้ประมาณร้อยละ 30 ของอาหารไขมันที่รับประทานเข้าไป (Lunagariya *et al.*, 2014) ถึงแม้ว่า ประสิทธิภาพการยับยั้งเอนไซม์ไลเปสของสารสกัดจากสาหร่ายเตาจะต่ำกว่ายา Xenical[®] แต่ก็ยังถือว่าสารสกัดจากสาหร่ายเตามีศักยภาพในการยับยั้งเอนไซม์ไลเปสได้ อย่างไรก็ตาม การศึกษาความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไลเปสของสาหร่ายในสกุล *Spirogyra* sp. มีน้อยมาก มีการศึกษาของ Duangjai *et al.* (2016) ที่พบว่าสารสกัดของ *Spirogyra neglecta* ที่เก็บจากลำน้ำธรรมชาติในจังหวัดแพร่ สามารถยับยั้งเอนไซม์ HMGR-CoA reductase (HMGR) ซึ่งเป็นเอนไซม์ในกระบวนการสังเคราะห์คอเลสเตอรอลจึงช่วยลดการดูดซึมคอเลสเตอรอลในเซลล์ทดลอง Caco-2 cells ได้

การศึกษาจลนศาสตร์การยับยั้งเอนไซม์ไลเปสของสารสกัดจากสาหร่ายเตาเป็นการยับยั้งแบบไม่แข่งขัน โดยพิจารณาจากค่าคงที่ทางจลนศาสตร์ได้แก่ ค่า V_{max} หรือ อัตราเร็วการเกิดปฏิกิริยาสูงสุด, K_m หรือค่าคงที่ Michaelis-Menten แสดงการจับกันระหว่างเอนไซม์-ซับสเตรต, K_i และ K_i' หรือค่าคงที่การยับยั้ง โดย K_i ได้จากการพล็อตกราฟความชันของกราฟ Lineweaver-Burg plot กับความเข้มข้นของตัวยับยั้ง ส่วน K_i' ได้จากการพล็อตกราฟจุดตัดแกน Y ของ Lineweaver-Burg plot กับความเข้มข้นของตัวยับยั้ง พบว่า ค่า V_{max} ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) แต่ค่า K_m คงที่ ($p > 0.005$) และค่า $K_i > K_i'$ ซึ่งเป็นลักษณะของการยับยั้งแบบไม่แข่งขัน ค่า K_i ต่ำแสดงว่าตัวยับยั้งจับกับเอนไซม์ [E] ที่บริเวณเร่งได้ดี แต่ถ้าค่า K_i' ต่ำแสดงว่าตัวยับยั้งจับกับเอนไซม์-ซับสเตรตคอมเพล็กซ์ [ES] ได้ดี ซึ่งในการยับยั้งแบบไม่แข่งขันนี้ ตัวยับยั้งจะไม่จับที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ แต่จะจับได้ทั้งกับเอนไซม์หรือเอนไซม์-ซับสเตรตคอมเพล็กซ์ที่ตำแหน่งอัลโลสเตอริก (Allosteric site) ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้ ดังนั้น การที่ค่า $K_i > K_i'$ จึงบ่งบอกพฤติกรรมการยับยั้งแบบไม่แข่งขัน เมื่อเปรียบเทียบกับพฤติกรรมการยับยั้งเอนไซม์ไลเปสด้วยยา Xenical[®] หรือสารมาตรฐานออร์ลิสแตท ซึ่งมีพฤติกรรมการยับยั้งแบบแข่งขัน (Competitive inhibition) แสดงถึงการที่ยา Xenical[®] เข้าจับกับเอนไซม์ [E] ที่บริเวณเร่ง (Active site) ทำให้เอนไซม์จับกับซับสเตรตได้น้อยลง การย่อยไขมันจึงลดลง (Liu *et al.*, 2020; Candela *et al.*, 2021) พฤติกรรมการยับยั้งเอนไซม์ไลเปสของสารสกัดจากสาหร่ายเตาจากการวิจัยในครั้งนี้สอดคล้องกับพฤติกรรมการยับยั้งเอนไซม์แบบไม่แข่งขันโดยสารสกัดแอสตาแซนทินจากยีสต์ *Phaffia rhodozyma* (Du *et al.*, 2018) สารสกัดจากใบรางแดง (*Ventilago denticulata* Willd.) (Srimoon *et al.*,

2020) และสารสกัดจากเอื้องเงินหลวง (*Dendrobium formosum*) (Inthongkaew, 2016) อย่างไรก็ตามพฤติกรรมการยับยั้งเอนไซม์ของสารสกัดแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันออกไป บางชนิดอาจมีพฤติกรรมการยับยั้งเอนไซม์แบบอื่น ตัวอย่างเช่น สารสกัดจากใบกาแฟด้วยเอทิลแอลกอฮอล์มีพฤติกรรมการยับยั้งเอนไซม์ไลเปสแบบแข่งขันตัวยับยั้งมีโครงสร้างคล้ายสับสเตรตและจะแข่งขันกับสับสเตรตจับกับเอนไซม์ที่บริเวณเร่งทำให้เอนไซม์ทำงานไม่ได้ (Cao *et al.*, 2024) เป็นต้น

สำหรับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีฟิฟิเซในสารสกัดมีค่า 36.65 ± 0.25 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัม และ 3.13 ± 0.03 มิลลิกรัมโพลีฟีนอลต่อกรัม คิดเป็นร้อยละการยับยั้งอนุมูลดีฟิฟิเซ เท่ากับร้อยละ 70.30 ± 0.64 ตามลำดับ และพบความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไลเปสกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในสารสกัดจากสาหร่ายเตามีความสัมพันธ์กันสูง ($r=0.8224$) แต่มีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลดีฟิฟิเซปานกลาง ($r=0.7145$) นั่นคือประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ไลเปสขึ้นกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดจากการศึกษาชนิดของสารพิษเคมีสำคัญในสาหร่ายเตา พบสารประกอบฟีนอลิก เช่น กรดแกลลิก ฟลาโวนอยด์ แทนนิน รูทีน สารกลุ่มคูมาริน สารกลุ่มแอลคาลอยด์ เทอร์ปีนอยด์ แคมเฟอรอล สเตอรอล รวมทั้งแคโรทีนอยด์ (Peerapornpisarn *et al.*, 2009; Wizi *et al.*, 2022; Mohammed & Al-Katib, 2023) โดยทั่วไปสารสกัดธรรมชาติที่มีสารต้านอนุมูลอิสระกลุ่มฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์สูง ๆ มักตรวจพบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเปสสูงตามไปด้วย ช่วยลดการดูดซึมอาหารจำพวกไขมันในลำไส้เล็ก ทำให้ระดับไขมันและคอเลสเตอรอลลดลงได้ สอดคล้องกับการศึกษาของ Dechakhamphu & Wongchum (2022) พบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารโพลีฟีนอล ฟลาโวนอยด์ และแอลคาลอยด์ในสารสกัดจาก *Phyllanthus chamaepeuce* Ridl. กับร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไลเปส เช่นเดียวกับ Chater *et al.* (2016) ศึกษาการยับยั้งเอนไซม์ไลเปสจากสาหร่ายทะเล 3 ชนิด ได้แก่ *Ascophyllum nodosum*, *Fucus vesiculosus* และ *Pelvetia canaliculata* พบว่า มีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.932, 0.159 และ 1.822 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม เท่ากับ 34.9, 61.3 และ 53.2 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัม ตามลำดับ และพบว่าฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไลเปสสารสกัดจากสาหร่ายทั้งสามชนิดมีความสัมพันธ์กับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่พบ นั่นคือ สารสกัดสาหร่ายที่มีสารประกอบฟีนอลิกสูง ๆ จะมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไลเปสสูงด้วย งานวิจัยสารสกัดจากพืชหลายชนิดก็รายงานไว้ว่า สารกลุ่มกรดฟีนอลิก เช่น กรดคาเฟอิก กรดคลอโรเจนิก กรดแกลลิก สารกลุ่มคูมาริน สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ เช่น เควอซีทิน คาเทชิน และรูทีน มีบทบาทสำคัญในการยับยั้งเอนไซม์ไลเปส (Hsu & Yen, 2008; Gonzalez-Castejon & Rodriguez-Casado, 2011; Oboh *et al.*, 2015)

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่าง *Spirogyra* sp. ที่พบในงานวิจัยนี้มีความแตกต่างกับที่พบในงานวิจัยอื่น เนื่องจากความหลากหลายของสายพันธุ์สาหร่าย สภาพแวดล้อมของแหล่งน้ำที่อยู่ ปริมาณสารอาหารในแหล่งน้ำ และอุณหภูมิของน้ำ ซึ่งเป็นเรื่องยากที่จะควบคุมสภาวะเหล่านี้ให้เหมือนกันหรือใกล้เคียงกัน ส่งผลถึงคุณภาพของสาหร่ายที่นำมาใช้ประโยชน์ (Eseberri *et al.*, 2022) รวมถึงวิธีการและสภาวะในการสกัดด้วย สาหร่ายเตา (*Spirogyra varians*) ที่เก็บจากลำน้ำบ้านปางยาง จังหวัดเชียงใหม่ มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม 44.52 ± 1.08 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัม (Tipnee *et al.*, 2015) แต่สาหร่ายเตาที่เก็บจากแม่น้ำน่าน จังหวัดน่าน มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงถึง

204.29±0.25 มิลลิกรัมต่อกรัม และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีฟิฟิเอช ในรูปของค่า IC₅₀ เท่ากับ 323.71±0.72 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม (Phonrin, 2017) ในขณะที่สาหร่ายเตาจากแหล่งน้ำในจังหวัดบึงกาฬ มีปริมาณฟีนอลิกรวมอยู่ระหว่าง 11.16-18.43 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัม (Sitthiwong *et al.*, 2024) จะเห็นได้ว่า ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสาหร่ายเตาจากแหล่งน้ำธรรมชาติมีค่าไม่คงที่ การเพาะเลี้ยงสาหร่ายเตาในโรงเรือนจึงเป็นทางเลือกในการควบคุมคุณภาพของสาหร่ายเตาให้ได้ผลผลิตของสาหร่ายคงที่และมีปริมาณสารต่าง ๆ ในสารสกัดคงที่เพื่อการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ ประการสำคัญการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในโรงเรือนแบบปิดระบบน้ำหมุนเวียนลดปัญหาการปนเปื้อนในผลผลิตสาหร่ายได้

Conclusions

การวิจัยในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า สารสกัดจากสาหร่ายเตา (*Spirogyra* sp.) ที่เพาะเลี้ยงในโรงเรือนระบบปิดแบบน้ำหมุนเวียนมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไลเปสได้ดี แม้ว่าประสิทธิภาพการยับยั้งจะต่ำกว่ายา Xenical[®] ซึ่งเป็นยาลดไขมันที่แพทย์สั่งจ่ายในผู้ป่วยโรคอ้วนก็ตาม และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์มีความสัมพันธ์กับสารสำคัญที่อยู่ในสารสกัด ตัวอย่างเช่น สารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ สารกลุ่มเหล่านี้จะไปจับได้ทั้งเอนไซม์และเอนไซม์-ซับสเตรตคอมเพล็กซ์ ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้ ลดการดูดซึมไขมันจึงช่วยลดระดับไขมันในหลอดเลือดได้ อย่างไรก็ตาม การวิจัยนี้เป็นเพียงการประเมินประสิทธิภาพของสารสกัดสาหร่ายเตาในการยับยั้งเอนไซม์ไลเปสในหลอดทดลอง (*in vitro*) ดังนั้น เพื่อให้ทราบศักยภาพที่แท้จริงของการยับยั้งเอนไซม์ไลเปสควรมีการแยกองค์ประกอบของสารสกัดให้ได้สารบริสุทธิ์และทดลองเพิ่มเติมในเซลล์เพาะเลี้ยง (*in vitro*) รวมถึงในสัตว์ทดลอง (*in vivo*) และผลด้านพิษวิทยาของสารสกัดต่อไป

Acknowledgments

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากคณะเทคโนโลยีอุตสาหกรรมและการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก วิทยาเขตจันทบุรี และผู้วิจัยขอขอบคุณคณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออกวิทยาเขตบางพระ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่โรงเรือนในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายเตา

References

- Abdel-Aal, E.I., Haroon, A.M., & Mofeed, J. (2015). Successive solvent extraction and GC–MS analysis for the evaluation of the phytochemical constituents of the filamentous green alga *Spirogyra longata*. *Egyptian Journal of Aquatic Research*, 41, 233–246. doi.org/10.1016/j.ejar.2015.06.001
- Amornlirdpisarn, D., Mengumpun, K., & Rattanapoj, T. (2013). Cultivation of organic *Spirogyra* for use in health supplements and cosmeceutical products. *Cooperative Research Program Report*, 98 p. (in Thai)

- Bjerregaard, L.H., & Baker, J.L. (2018). Change in overweight from childhood to early adulthood and risk of type 2 diabetes. *The New England Journal of Medicine*, 378(26), 2537–2538.
doi.org/10.1056/NEJMoa1713231
- Candela, M.F., Arenas, N.E., Caicedo, O., & Malagón, A. (2021). Inhibition of lipase by orlistat: kinetics combined with in silico approaches to visualize interactions. *Journal of Chemical Education*, 98, 1762-1767. doi:10.1021/acs.jchemed.0c01184
- Cao, Q.W., Mei, S., Mehmood, A., Sun, Y., & Chen, X.M. (2024). Inhibition of pancreatic lipase by coffee leaves-derived polyphenols: a mechanistic study. *Food Chemistry*, 444, 138514.
doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.138514
- Chater, P.I., Wilcox, M., Cherry, P., Herford, A., Mustar, S., Wheeler, H., Brownlee, I., Seal, C., & Pearson, J. (2016). Inhibitory activity of extracts of Hebridean brown seaweeds on lipase activity. *Journal of Applied Phycology*, 28, 1303-1313. doi:10.1007/s10811-015-0619-0
- Das, J., & Ghosh, K. (2023). Nutrient profiling of five freshwater algae for their prospective use as fish feed ingredients. *Algal Research*, 74, 103173. doi.org/10.1016/j.algal.2023.103173
- Dechakhamphu, A., & Wongchum, N. (2022). Investigation of the kinetic properties of *Phyllanthus chamaepeuce* Ridl. extracts for the inhibition of pancreatic lipase activity. *Journal of Herbal Medicine*, 32, 100508. doi.org/10.1016/j.hermed.2021.100508
- Donsujit, W., Saetia, W., & Lirdwitayaprasit, T. (2023). Cultivation of Toa macroalgae (*Spirogyra* sp.) in greenhouse with water from rearing Nile Tilapia, *Burapha Science Journal*, 28(1), 570-587. (in Thai)
- Duangjai, A., Limpeanchob, N., Trisat, K., & Amornlerdpison, D. (2016). *Spirogyra neglecta* inhibits the absorption and synthesis of cholesterol *in vitro*. *Integrative Medicine Research*, 5, 301–308.
doi.org/10.1016/j.imr.2016.08.004
- Du, X.P., Bai, M.L., Huang, Y., Jiang, Z.D., Chen, F., Ni, H., & Li, Q.B. (2018). Inhibitory effect of astaxanthin on pancreatic lipase with inhibition kinetics integrating molecular docking simulation. *Journal of Functional Foods*, 48, 551-557. doi.org/10.1016/j.jff.2018.07.045

- Eom, S.H., Lee, M.S., Lee, E.W., Kim, Y.M., & Kim, T.H. (2013). Pancreatic lipase inhibitory activity of phlorotannins isolated from *Eisenia bicyclis*. *Phytotherapy Research*, 27, 148–151. doi.org/10.1002/ptr.4694
- Eseberri, I., Trepiana, J., Léniz, A., Gómez-García, I., González, M.C.U., & Portillo, M.P. (2022). Variability in the beneficial effects of phenolic compounds: a review. *Nutrients*, 14(9), 1925.
- Gonzalez-Castejon, M., & Rodriguez-Casado, A. (2011). Dietary phytochemicals and their potential effects on obesity: a review. *Pharmacology Research*, 64, 438-455. doi.org/10.1016/j.phrs.2011.07.004
- Habtemariam, S. (2013). Antihyperlipidemic components of *Cassia auriculata* aerial parts: identification through in vitro studies. *Phytotherapy Research*, 27, 152-155. doi.org/10.1002/ptr.4711
- Hsu, C.L., & Yen, G.C. (2008). Phenolic compounds: evidence for inhibitory effects against obesity and their underlying molecular signaling mechanisms. *Molecular Nutrition & Food Research*, 52, 53-61. doi.org/10.1002/mnfr.200700393
- Huerta, V., Mihalik, K., Maitin, V., Crixell, S.H., & Vatter, D.A. (2007). Effect of Central/South American medicinal plants on energy harvesting ability of the mammalian GI tract. *Journal of Medicinal Plants Research*, 1(2), 38-49.
- Inthongkaew, P. (2016). *Alpha-glucosidase and Lipase Inhibitors from Dendrobium formosum*. M.S. Thesis. Chulalongkorn University. Bangkok. (in Thai)
- Khatchapuridze, Z., Ploeger, A., & Gulua, L. (2023). Kinetic behavior of pancreatic lipase inhibition by wine. *Food Research*, 7(3), 157-164. doi.org/10.26656/fr.2017.7(3).151
- Koga, K., Hisamura, M., Kanetaka, T., Yoshino, K., Matsuo, Y., & Tanaka, T. (2013). Proanthocyanidin oligomers isolated from *Salacia reticulata* leaves potentially inhibit pancreatic lipase activity. *Journal of Food Science*, 78, 105–111. doi.org/10.4236/ojped.2013.32020
- Liu, T.T., Liu, X.T., Chen, Q.X., & Shi, Y. (2020). Lipase inhibitors for obesity: a review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 128, 110314. doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110314

- Lunagariya, N.A., Patel, N.K., Jagtap, S.C., & Bhutani, K.K. (2014). Inhibitors of pancreatic lipase: state of art and clinical perspectives. *EXCLI Journal*, 13, 897-921.
- Mohammed, D.H. & Al-Katib, M.A. (2023). Active and phenolic compounds in *Spirogyra* sp. PDNA1 is an antibiotic for some bacteria and fungi. *Al-Kitab Journal for Pure Sciences*, 7(1), 100-113.
doi.org/10.32441/kjps.07.01.p9
- Oboh, G., Agunloye, O.M., Adefegha, S.A., Akinyemi, A.J., & Ademiluyi, A.O. (2015). Caffeic and chlorogenic acids inhibit key enzymes linked to type-2 diabetes (*in vitro*): a comparative study. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, 26(2), 165-70. doi.org/10.1515/jbcpp-2013-0141
- Peerapornpisal, Y., Kanjanapothi, D., Taesotikul, T., & Amornlerdpison, D. (2009). Potential of some freshwater algae in Northern Thailand as nutraceutical. *Phycologia*, 48(4)Suppl, 104-112. (in Thai)
- Peerapornpisal, Y., Panyoyai, T., & Amornlerdpison, D. (2012). Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Spirogyra neglecta* (Hassall) Kutzinger. *KKU Science Journal*, 40(1), 228-235. (in Thai)
- Peerapornpisal, Y. (2015). *Freshwater Algae in Thailand*. (3rd ed.). Chiang Mai: Chotana Print.
- Phattarasupa, P., Rimkeeree, H., & Dhamvithee, P. (2018). Effect of the extraction conditions on antioxidant activity and total phenolic contents of *Spirogyra* spp. liquid extract. In *Proceedings of 56th Kasetsart University Annual Conference: Science and Genetic Engineering, Architecture and Engineering, Agro-Industry, Natural Resources and Environment*. (pp. 663-670). Thailand. (in Thai)
- Phonrin, A. (2017). *Determination of Total Phenolic and Antioxidant Activity in Freshwater Macroalgae from Nan Province*. M.S. Thesis. Burapha University. (in Thai)
- Sharma, N., Sharma, V.K., & Seo, S.Y. (2005). Screening of some medicinal plants for anti-lipase activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 97(3), 453-456. doi.org/10.1016/j.jep.2004.11.009
- Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K., & Nakamura, T. (1992). Antioxidative properties of xanthans on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(6), 945-948. doi.org/10.1021/jf00018a005

- Sirirustananun, N., & Chanartaeparporn, P. (2015). Nutrient contents and growth of *Spirogyra* spp. in water resources of Phetchabun province. *Journal of Agricultural Research and Extension*, 32(1), 58-66.
- Sitthiwong, N., Sumangka, J., Michaitrakun, S., & Sotthisawad, K. (2024). Total phenolic compound and antimicrobial activity of *Spirogyra* spp. *Progress in applied science and technology*, 14(1), 65-72.
doi.org/10.60101/past.2024.252833
- Srimoon, R., Anartgnam, P., & Tilarux, P. (2020). *In vitro* inhibitory efficiency of *Ventilago denticulata* Willd. dried leaves extract on alpha-glucosidase, alpha-amylase and lipase and antioxidant activities. *Science & Technology Asia*, 25(4), 135-149.
- Srimoon, R. (2020). *Phenolic Compounds and Antioxidant activity in Plants*. Bangkok: OS Printing House.
(in Thai)
- Tipnee, S., Ramaraj, R., & Unpaprom, Y. (2015). Nutritional evaluation of edible freshwater green macroalga *Spirogyra* varians. *Emergent Life Sciences Research*, 1(2), 1-7.
- Wizi, J., Ni, L., Darkwah, W.K., & Xianglan, L. (2022). Analysis of bioactive compounds from different algae samples extracted with ultrasound: characterization, phytochemical contents and antioxidant potentials. *Pharmacognosy Research*, 14(1), 35-44. doi.org/10.5530/pres.14.1.7
- Wongsawad, P., & Peerapornpisal, Y. (2015). Morphological and molecular profiling of *Spirogyra* from Northeastern and Northern Thailand using inter simple sequence repeat (ISSR) markers. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22, 382–389. doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.10.004
- Wong, S.P., Leong, L.P., & Koh, J.H.W. (2006). Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. *Food Chemistry*, 99, 775-783. doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.058
- Yosboonruang, A., Duangjai, A., Amornlerdpison, D., & Viyoach, J. (2020). Screening for biological activities of *Spirogyra neglecta* water extract. *Walailak Journal of Science and Technology*, 17(4), 359-368.