ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและผลการเสริมสาหร่ายเตา ต่อการเจริญเติบโตของปลานิลในกระชัง

Antioxidant activity of *Spirogyra* sp. and effect of its supplementation on growth performance of Tilapia in cage culture

ธีระวัฒน์ รัตนพจน์[1] เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน[1] ชุติมา ศรีมะเริง[2] รัตนาภรณ์ จันทร์ทิพย์[3] และดวงพร อมรเลิศพิศาล[1*]

[1]คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ 50290

[2] คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 50200

[3] คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ 50290

*doung_fishtech@hotmail.com

บทคัดย่อ

สาหร่ายเตาถูกนำมาประเมินหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและตรวจหากลุ่มสารสำคัญ โดยทำการเก็บตัวอย่างสาหร่าย 3 ครั้ง ในช่วงฤดูร้อน ฤดูฝน และฤดูหนาว แล้วนำมาสกัดแบบหยาบเป็นสารสกัดน้ำ ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดน้ำของสาหร่ายเตาจากฤดูร้อน ฤดูฝน และฤดูหนาว มีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% (IC50) ในแบบจำลองการขจัดอนุมูล ABTS โดยมีค่าเท่ากับ 0.117, 0.073 และ 0.053 มก./มล. ตามลำดับ สารสกัดน้ำจากสาหร่ายเตา 3 ฤดู ในขนาด 1 กรัม มีความสามารถในการขจัดอนุมูลอิสระเทียบเท่ากับสาร trolox ในขนาด 3.11, 4.97 และ 6.92 โมลาร์ (Trolox-Equivalent Antioxidant Capacity; TEAC) และตรวจพบกลุ่มสารประกอบฟีโนลิกจากสาหร่ายเตา 3 ฤดู ในขนาด 1 กรัม มีค่าเทียบกับ gallic acid ในขนาด 77.66, 84.41 และ 92.95 มก. (Gallic Acid Equivalent; GAE) ตามลำดับอีกด้วย ถึงแม้ว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารประกอบฟีโนลิกจะมีความสัมพันธ์ไปในทางเดียวกัน แต่จากผลการทดสอบพบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสาหร่ายเตาทั้ง 3 ฤดู ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากการที่สาหร่ายเตามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจึงนำไปประเมินผลต่อการเจริญเติบโตในปลา โดยให้อาหารเม็ดเสริมสาหร่ายเตาระดับ 0, 2.5, 5 และ 10% แก่ลูกปลานิลอายุ 2 เดือน เป็นเวลา 4 เดือน ผลการทดลองพบ ปลานิลในหน่วยทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมสาหร่ายเตาขนาด 2.5% มีอัตราการรอด 95% เมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงในเดือนที่ 4 โดยมีความแตกต่างจากหน่วยทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อไม่มีความแตกต่างทางสถิติในทุกหน่วยทดลอง ในขณะที่น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นและอัตราการเจริญเติบโตต่อวันของปลานิลดูเหมือนว่าจะเพิ่มขึ้นใน 3 หน่วยทดลองที่เสริมด้วยสาหร่ายเตา แต่ก็ไม่พบความแตกต่างกันทางทางสถิติ ผลจากการศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่า สาหร่ายเตามีศักยภาพในการนำมาใช้เป็นอาหารเสริมในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำได้

คำสำคัญ:สาหร่ายเตา ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สารประกอบฟีโนลิก การเติบโตของปลา การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

Abstract

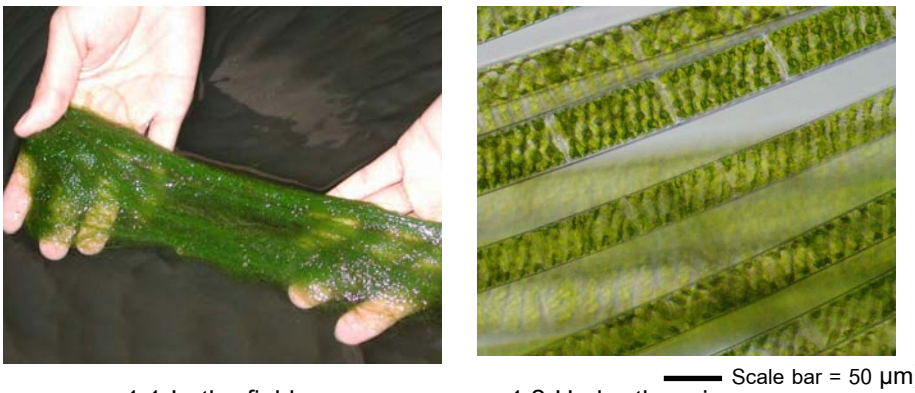
Spirogyra sp. was evaluated for antioxidant activity and assayed for active compounds. Alga samples collected three times during the summer, rainy and cool seasons were subjected to crude aqueous extraction. It was found that the algae extracts prepared from summer, rainy, and cool season showed the half maximal inhibitory concentration (IC50) for the ABTS assay 0.117, 0.073 and 0.053 mg/ml respectively. The free radical scavenging activities of one gram extract, collected from those seasons were 3.11, 4.97 and 6.92 M Trolox-Equivalent Antioxidant Activity (TEAC) and the phenolic content were 77.66, 84.41 and 92.95 mg Gallic Acid Equivalent (GAE). Although the order of antioxidant activity and the phenolic content of these extracts were correlated favorably, there was no statistical difference between values obtained from different seasons. The antioxidant virtue of the *Spirogyra* alga was further evaluated in terms of fish growth. Fish-feed supplemented with 0, 2.5, 5 and 10% alga were fed to 2-month old tilapia for 4 months. Results revealed that 95% of the fish treated with 2.5% alga supplemented feed survived at the end of the 4 month period and this rate was significantly different from those of other groups. However, the feed conversion rates in all groups were not significantly different. The weight gain as well as average daily weight gain seemed to be increased in all three supplement-treated groups but these changes were not statistically significant. All the above findings lead to the conclusion that the use of *Spirogyra* alga as a feed supplement in aquaculture is potentially possible.

Keywords : *Spirogyra* sp., antioxidant activity, phenolic compounds, fish growth, aquaculture

บทนำ

สาหร่ายเตา (*Spirogyra* sp.) เป็นสาหร่ายสีเขียวมีลักษณะเป็นเส้นสาย มีสีเขียวอ่อนจนกระทั่งถึงสีเขียวเข้ม อยู่ใน Division Chlorophyta Order Zygnematales Family Zygnemataceae ประกอบด้วยเซลล์แต่ละปล้องมาต่อกัน ไม่มีการแตกแขนง (Figure 1) เจริญได้ดีในแหล่งน้ำจืดทั่วไป พบในเขตร้อนและอบอุ่นในน้ำนิ่งหรือน้ำไหลไม่แรงนัก ลักษณะสาหร่ายเป็นเส้นตรงคล้ายเส้นผมบางๆ ลู่ไหลไปกับกระแสน้ำ เมื่อจับดูจะรู้สึกลื่นมือ ทั้งนี้เพราะผนังเซลล์ด้านนอกสุดทำให้เกิดเมือก เป็นสาหร่ายที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูงโดยประกอบด้วยโปรตีน 18.63% ไขมัน 5.21% คาร์โบไฮเดรต 56.31% เส้นใย 7.66% เถ้า 11.78% แร่ธาตุ วิตามิน และมีรงควัตถุหลายชนิด เช่น คลอโรฟิลล์เอ และบี เบต้าแคโรทีน และแซนโทฟิล นอกจากนี้ยังพบกลุ่มสารประกอบฟีโนลิกที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสาหร่ายเตา (Peerapornpisal *et al*., 2009a: Peerapornpisal *et al*., 2012) ในการเตรียมตัวอย่างสาหร่ายเตาเพื่อทำการทดสอบฤทธิ์ชีวภาพ ได้ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์แล้วพบว่าสาหร่ายเตาที่นำมาทดสอบคือ *Spirogyra neglecta* เนื่องจากฤดูกาลในการเก็บเกี่ยวอาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อปริมาณสารสำคัญที่พบในสาหร่ายเตา ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงทำการเก็บสาหร่ายเตาใน 3 ฤดูกาลคือ ฤดูร้อน ฤดูฝน และฤดูหนาว มาทำการเปรียบเทียบปริมาณสารสำคัญและการออกฤทธิ์ชีวภาพในการต้านอนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ (free radicals) เป็นโมเลกุลที่ไม่เสถียร ถูกปล่อยออกมาในรูปของโมเลกุลที่ไม่ครบวงจรและว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาเคมี จึงพร้อมที่จะทำปฏิกิริยากับโมเลกุลตัวอื่น มีการทำลายเนื้อเยื่อส่งผลให้เซลล์ได้รับความเสียหาย ทำให้เป็นต้นเหตุของการเกิดโรค (Halliwell *et al*., 1992; Vajraguta *et al*., 2007) ในภาวะที่มีสารอนุมูลอิสระมีมากไม่สมดุลกับสารต้านอนุมูลอิสระจะทำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) เกิดขึ้น ทำให้เกิดการทำลายเนื้อเยื่อ เกิดการอักเสบ และทำให้ปลาเป็นโรคง่าย เกิดการตายของปลาขึ้น มีรายงานการวิจัยพบว่า สารสกัดน้ำของสาหร่ายเตามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เมื่อทดสอบในการทดลองฤทธิ์กำจัดอนุมูล DPPH ฤทธิ์กำจัดอนุมูล superoxide และฤทธิ์ยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ในหลอดทดลอง (*in vitro*) (Peerapornpisal *et al*., 2006; Peerapornpisal *et al*., 2009b) และยังมีฤทธิ์ต้านการอักเสบในหนูขาว (Peerapornpisal *et al*., 2009a; Peerapornpisal *et al*., 2012) อีกด้วย



1.1 In the field 1.2 Under the microscope

Figure 1 *Spirogyra neglecta*

การเลี้ยงปลานิลในกระชังเป็นรูปแบบการเลี้ยงที่ให้ผลผลิตสูง ก่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดในเชิงเศรษฐศาสตร์ นอกจากนี้ยังสะดวกในการเก็บเกี่ยวผลผลิต โดยลงทุนต่ำกว่ารูปแบบการเลี้ยงอื่นๆ ในขณะที่ผลตอบแทนต่อพื้นที่สูง อย่างไรก็ตามการเลี้ยงปลานิลในกระชังอาจจะมีข้อเสียอยู่ เช่น ปัญหาเรื่องสภาพแวดล้อมจากคุณภาพน้ำ การเปลี่ยนแปลงของฤดูกาล โรคปลา การปนเปื้อนของสารพิษ เป็นต้น ทำให้ปลาเกิดภาวะ oxidative stress ขึ้น มีการสร้างอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น และส่งผลทำลายเซลล์ (Van der Oost, *et al*, 2003) ทำให้เกิดปัญหาตามมาคือ ปลาไม่กินอาหาร เจริญเติบโตช้า ไม่ทนต่อโรค อัตราการรอดลดลง ดังนั้นการนำสาหร่ายเตามาเสริมในอาหารปลานิลจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยส่งเสริมให้สุขภาพของปลาดีขึ้น โดยช่วยทำให้ปลานิลทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ ไม่เป็นโรคง่าย ทำให้ได้ผลผลิตปลาที่มีคุณภาพดี โตเร็ว และมีอัตราการรอดสูง ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการเพิ่มผลผลิตเชิงพาณิชย์ และเพิ่มศักยภาพในการแข่งขันในตลาดได้เป็นอย่างดี อีกทั้งยังเป็นการลดใช้สารเคมีในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ และยังเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับสาหร่ายเตาอีกทางหนึ่งด้วย

อุปกรณ์และวิธีการ

1. **การเก็บสาหร่าย 3 ฤดู** โดยเก็บตัวอย่างสาหร่ายสดอย่างน้อย 1 กก. จากนาเตาที่บ้านนาคูหา ตำบลสวนเขื่อน อำเภอเมือง จังหวัดแพร่ ทำการเก็บรวบรวมสาหร่ายในช่วงฤดูร้อนตั้งแต่เดือนมีนาคมถึงเมษายน ฤดูฝนเก็บในช่วงเดือนมิถุนายนถึงเดือนสิงหาคม และฤดูหนาวเก็บในช่วงเดือนพฤศจิกายนถึงธันวาคม นำสาหร่ายเตาที่เก็บได้ทั้ง 3 ฤดู มาล้างด้วยน้ำประปาหลายๆครั้งจนสะอาด จากนั้นนำมาผึ่งลมให้มีความหมาดพอสมควร แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส (°ซ) จนกว่าสาหร่ายจะแห้ง

2. **การเตรียมสารสกัดน้ำของสาหร่าย 3 ฤดู** โดยนำสาหร่ายแห้งจำนวน 200 กรัมมาต้มในน้ำร้อนปริมาตร 1 ลิตร ที่อุณหภูมิ 95-100 °ซ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง กรองด้วยผ้ากรองขนาดตา 70 ไมโครเมตร นำส่วนที่เป็นน้ำมาระเหยเอาน้ำออกโดยใช้เครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 60°ซ จากนั้นทำให้แห้งโดยใช้เครื่อง Freeze dryer ได้เป็นส่วนสกัดน้ำของสาหร่ายเตา (aqueous extract; Aq.*S*) คำนวณหา % yield ดังนี้

$$\% \text{ yield} = \frac{\text{น้ำหนักสารสกัดที่ได้}}{\text{น้ำหนักสาหร่ายที่ใช้ในการสกัด}} \times 100$$

3. **การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสาหร่ายเตา 3 ฤดู**

ทดสอบฤทธิ์ขจัดอนุมูล *ABTS (Scavenging activity of ABTS radical cation)*

โดยดัดแปลงวิธีการของ Re *et al*. (1999) ดังนี้ ผสมสารละลาย 2, 2'-azino-bis 3-ethylbenzthiazoline -6-sulfonic acid (ABTS) ความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร กับสารละลาย $K_2S_2O_8$ ความเข้มข้น 140 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 88 ไมโครลิตร ในขวดสีชาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 16 ชั่วโมง จะได้ stock ABTS radical cation ก่อนการทดสอบเจือจาง stock ABTS radical cation ด้วยน้ำกลั่น ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงในช่วง 0.700 ± 0.05 ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร เริ่มการทดสอบโดยเตรียมตัวอย่างสารสกัดน้ำสาหร่ายเตาปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง และใช้น้ำกลั่น เป็นชุดควบคุม ต่อมาเติมสารละลาย ABTS ปริมาตร 1.8 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 6 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร หลังจากนั้นนำค่าที่ได้ไปคำนวณหา % inhibition หรือการยับยั้งอนุมูลอิสระตามสมการดังนี้

$$\% \text{ Inhibition} = [(\text{Abs.}_{\text{control}} - \text{Abs.}_{\text{test sample}}) / \text{Abs.}_{\text{control}}] \times 100$$

$\text{Abs.}_{\text{control}}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม

$\text{Abs.}_{\text{test sample}}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างทดสอบ

เปรียบเทียบความเข้มข้นของสารทดสอบหรือสารสกัดน้ำสาหร่ายเตา 1 กรัมกับความเข้มข้นของสารมาตรฐานคือ trolox ซึ่งเป็นอนุพันธุ์ของวิตามินอี ที่มีหน่วยเป็น mM หรือเรียกว่าค่า TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) ที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเท่ากัน

4. การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีโนลิก (phenolic compounds) ของสาหร่ายเตา 3 ฤดู

ทำการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีโนลิกในสารสกัดของสาหร่ายโดยใช้สารละลาย Folin-Ciocalteu ตามวิธีการของ Sachindra *et al.* (2010) ดังนี้ ใช้ตัวอย่างสารสกัดน้ำของสาหร่ายเตาที่ละลายในน้ำกลั่น 0.2 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu ความเข้มข้น 10% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 6% ลงไป 0.80 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและทิ้ง เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นนำไปวัดความยาวคลื่นที่ 764 นาโนเมตร คำนวณปริมาณกลุ่มสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดน้ำสาหร่ายเตา 1 กรัม แสดงผลเป็นค่า gallic acid equivalents (GAE) โดยค่า GAE หมายถึง สารประกอบฟีโนลิกในสารสกัดน้ำสาหร่ายเตา 1 กรัม มีค่าฟีโนลิกเท่ากับ gallic acid ที่มีหน่วยเป็นมิลลิกรัม

5. การศึกษาผลของสาหร่ายเตาต่อการเจริญเติบโตของปลานิลในกระชัง

5.1 การเตรียมปลานิล

ปลานิลอายุประมาณ 2 เดือน น้ำหนักประมาณ 80-100 กรัม โดยซื้อมาจากฟาร์มเชียงใหม่พัฒนา อ.แม่แตง จ.เชียงใหม่ โดยนำปลามาพักให้ปรับตัวในกระชังก่อน ให้อาหารด้วยอาหารสำเร็จรูปปลากินพืชเป็นเวลาอย่างน้อย 7-14 วันเพื่อให้ปลาปรับสภาพ จากนั้นนำปลานิลมาแบ่งกลุ่มการทดลองโดยการวางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) แบ่งเป็น 4 หน่วยทดลองๆ ละ 3 ซ้ำ ปล่อยปลานิลจำนวน 30 ตัว/กระชัง หน่วยการทดลองที่ 1-4 เลี้ยงปลานิลด้วยอาหารเม็ดเสริมสาหร่ายเตาระดับ 0, 2.5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยเป็นสาหร่ายที่เก็บในช่วงฤดูฝน (เดือนมิถุนายน – เดือนสิงหาคม 2554)

5.2 การเตรียมอาหารปลานิล

เตรียมอาหารสำเร็จรูปที่มีปริมาณโปรตีน 30 % ประกอบด้วย ปลาป่น กากถั่วเหลือง ปลายข้าว รำข้าว และสาหร่ายเตา 4 ระดับคือ 0, 2.5, 5 และ 10% อัตราอาหารที่ให้ตลอดการทดลอง 3 % ของน้ำหนักตัว/วัน วันละ 2 ครั้ง (09.00-10.00 น. และ 15.00-16.00 น.)

5.3 การเตรียมกระชัง

เย็บกระชังโดยใช้อวนมุ้งฟ้า ขนาด 1.2 x 1.2 x 1.2 ม. ติดตั้งกระชังโดยแขวนให้กระชังลึก 1 เมตร และห่างกันประมาณ 1 เมตร จำนวน 12 กระชัง

5.4 การวัดการเจริญเติบโตของปลานิลในกระชัง

จากนั้นทำการตรวจวัดการเจริญเติบโต ได้แก่ น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นต่อวัน อัตราการเจริญเติบโตต่อวัน อัตราการแลกเนื้อ จากแต่ละหน่วยการทดลองทุกเดือน และเลี้ยงนาน 4 เดือน โดยแสดงการคำนวณการเจริญเติบโตดังนี้

น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (weight gain) = น้ำหนักปลาสุดท้าย - น้ำหนักปลาเริ่มต้น

$$\text{อัตราการเจริญเติบโตต่อวัน (average daily gain; ADG)} = \frac{\text{น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น}}{\text{จำนวนวัน}}$$

$$\text{อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (feed conversion rate; FCR)} = \frac{\text{น้ำหนักของอาหารที่ปลากิน}}{\text{น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น}}$$

$$\text{อัตราการรอด (\%survival rate)} = \frac{\text{จำนวนปลาที่มีชีวิต}}{\text{จำนวนปลาที่ปล่อย}} \times 100$$

6. การวิเคราะห์ทางสถิติ

ข้อมูลแสดงในรูปของ mean ± SE เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มทดลองโดยใช้สถิติ One Way ANOVA ตามด้วยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเป็นรายคู่ด้วยวิธีของ Duncan ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$ โดยใช้โปรแกรม SPSS เวอร์ชั่น 15

ผลการวิจัย

1. ปริมาณสารสกัดน้ำสาหร่ายเตา 3 ฤดู

สาหร่ายเตาแห้งที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำพบว่าสาหร่ายที่เก็บในฤดูร้อน ฤดูฝนและฤดูหนาว ในปริมาณ 100 กรัม สามารถสกัดได้เป็นสารสกัดน้ำสาหร่ายเท่ากับ 33.30, 28.02 และ 32.33 กรัม ตามลำดับ โดย % yield ของสารสกัดน้ำของฤดูฝนมีค่าต่ำสุด ในขณะที่ฤดูร้อนและฤดูหนาวให้ค่า % yield ใกล้เคียงกัน

2. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสาหร่ายเตา 3 ฤดู

ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS (% Inhibition) ของสารสกัดน้ำสาหร่ายเตาฤดูร้อนที่ช่วงความเข้มข้น 0.05 – 0.50 mg/ml ให้ % Inhibition ระหว่าง 25 – 97 % สารสกัดน้ำสาหร่ายเตาฤดูฝนที่ช่วงความเข้มข้น 0.02 – 0.20 mg/ml ให้ % Inhibition ระหว่าง 15 – 99 % และสารสกัดน้ำสาหร่ายเตาฤดูหนาวที่ช่วงความเข้มข้น 0.02 – 0.15 mg/ml ให้ % Inhibition ระหว่าง 20 – 99 % ส่วน trolox ที่ใช้เป็นสารมาตรฐานในช่วงความเข้มข้น 0.05 – 0.20 mg/ml ให้ % Inhibition ระหว่าง 26 – 100 % ผลแสดงในรูปที่ 2 (Figure 2)ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดน้ำของสาหร่ายเตาทั้ง 3 ฤดูเมื่อเทียบกับ trolox พบว่า สารสกัดของสาหร่ายเตาฤดูหนาวและฤดูฝนในขนาดความเข้มข้นน้อยกว่ามีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ได้ดีกว่า trolox ส่วนสารสกัดสาหร่ายเตาฤดูร้อนต้องใช้ขนาดความเข้มข้นสูงจึงจะมีค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ดีเท่า trolox และสารสกัดสาหร่ายเตาฤดูฝนและหนาว อย่างไรก็ตามหากเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดสาหร่ายเตาทั้ง 3 ฤดูมากขึ้น สามารถให้ผลการยับยั้งอนุมูลอิสระมากขึ้นได้ใกล้เคียงกับ trolox (97-99%) สารสกัดน้ำของสาหร่ายเตามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยมีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% (IC_{50}) ในฤดูหนาวดีที่สุด รองลงมาคือฤดูฝนและฤดูร้อน ตามลำดับ โดยค่า IC_{50} ที่มีค่าน้อยหมายถึงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง และได้เปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดน้ำจากสาหร่ายเตาปริมาณ 1 กรัม กับสารมาตรฐานคือ trolox หรือเรียกว่าค่า TEAC ผลการทดลองพบว่า สารสกัดน้ำจากสาหร่ายเตาในฤดูหนาวมีค่า TEAC สูงที่สุด รองลงมาคือ ฤดูฝน และฤดูร้อน ผลแสดงในตารางที่ 1 (Table 1)

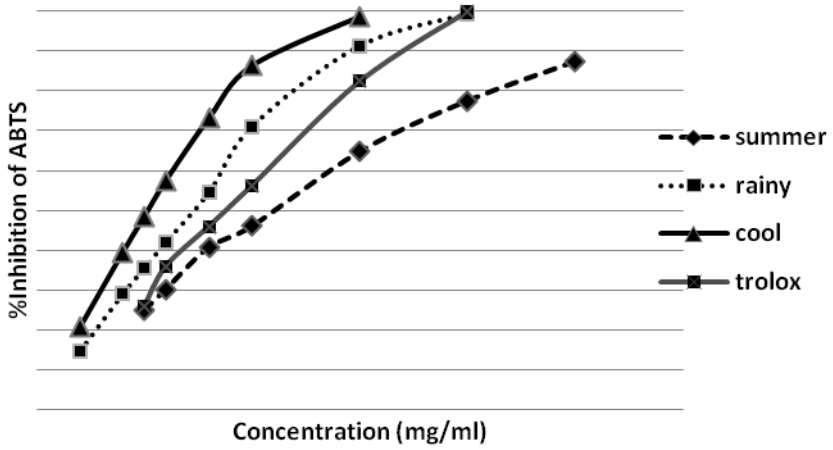


Figure 2 Scavenging activity of the *Spirogyra* sp. extracts in three season and trolox in ABTS radicals assay

3. ปริมาณกลุ่มสารประกอบฟีโนลิกของสาหร่ายเตา 3 ฤดู

สารสกัดน้ำของสาหร่ายเตาในฤดูหนาวมีปริมาณกลุ่มสารประกอบฟีโนลิกมากที่สุด รองลงมาคือ ฤดูฝน และฤดูร้อน ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1 (Table 1) จากผลการทดลองที่ได้พบว่า ปริมาณสารประกอบฟีโนลิกในฤดูหนาวมีค่าสูงที่สุดซึ่งมีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่แสดงจากค่า TEAC และ GAE ที่มีค่ามากที่สุดด้วย ดังนั้นกลุ่มสารประกอบฟีโนลิกในสาหร่ายเตาจึงเป็นกลุ่มสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ อย่างไรก็ตาม ค่าสูงสุดในการขจัดอนุมูลอิสระของสาหร่ายเตาทั้ง 3 ฤดู พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05)

Table 1 Comparison of IC_{50}, TEAC and GAE between three seasons extracts of *Spirogyra* sp.

Aq.S	IC_{50} (mg/ml)	TEAC (mM)	GAE(mg)
Summer season	0.117 ± 0.0022	3,108.27 ± 110.13	77.66 ± 3.56
Rainy season	0.073 ± 0.0006	4,968.88 ± 124.55	84.41 ± 0.42
Cool season	0.053 ± 0.0002	6,915.74 ± 157.87	92.95 ± 0.10

Data expressed as mean± SD, triplicate measurements; IC_{50}= Inhibitory Concentration at 50%

TEAC = Trolox Equivalent Antioxidant Capacity, GAE = Gallic Acid Equivalents

4. การศึกษาผลของสาหร่ายเตาต่อการเจริญเติบโตของปลานิลในกระชัง

การเลี้ยงปลานิลด้วยอาหารเม็ดเสริมสาหร่ายเตาระดับ 0, 2.5, 5 และ 10% ในกระชังเป็นเวลา 4 เดือน ผลการทดลองพบว่า ปลานิลในหน่วยทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมสาหร่ายเตาขนาด 2.5, 5 และ 10% มีน้ำหนักเพิ่มขึ้นมากกว่าหน่วยทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารปกติที่ไม่เสริมด้วยสาหร่ายเตา โดยหน่วยทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมสาหร่ายเตาขนาด 2.5% มีน้ำหนักมากที่สุดเมื่อเทียบกับหน่วยทดลองอื่นในเดือนสุดท้ายที่ปลานิลได้ขนาดตลาด (ประมาณ 500 กรัม) อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างระหว่างหน่วยการทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่พบว่าหน่วยทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมสาหร่ายเตาขนาด 2.5% มีอัตราการรอดในเดือนที่ 4 (95%) สูงกว่าหน่วยทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) ส่วนอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อไม่มีความแตกต่างทางสถิติในทุกหน่วยทดลอง ในขณะที่น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นและอัตราการเจริญเติบโตต่อวันของปลานิลดูเหมือนว่าจะเพิ่มขึ้นในหน่วยทดลองที่เสริมสาหร่ายเตา แต่ก็ไม่พบความแตกต่างกันทางทางสถิติในทุกหน่วยการทดลอง ผลแสดงในภาพที่ 3 (Figure 3)

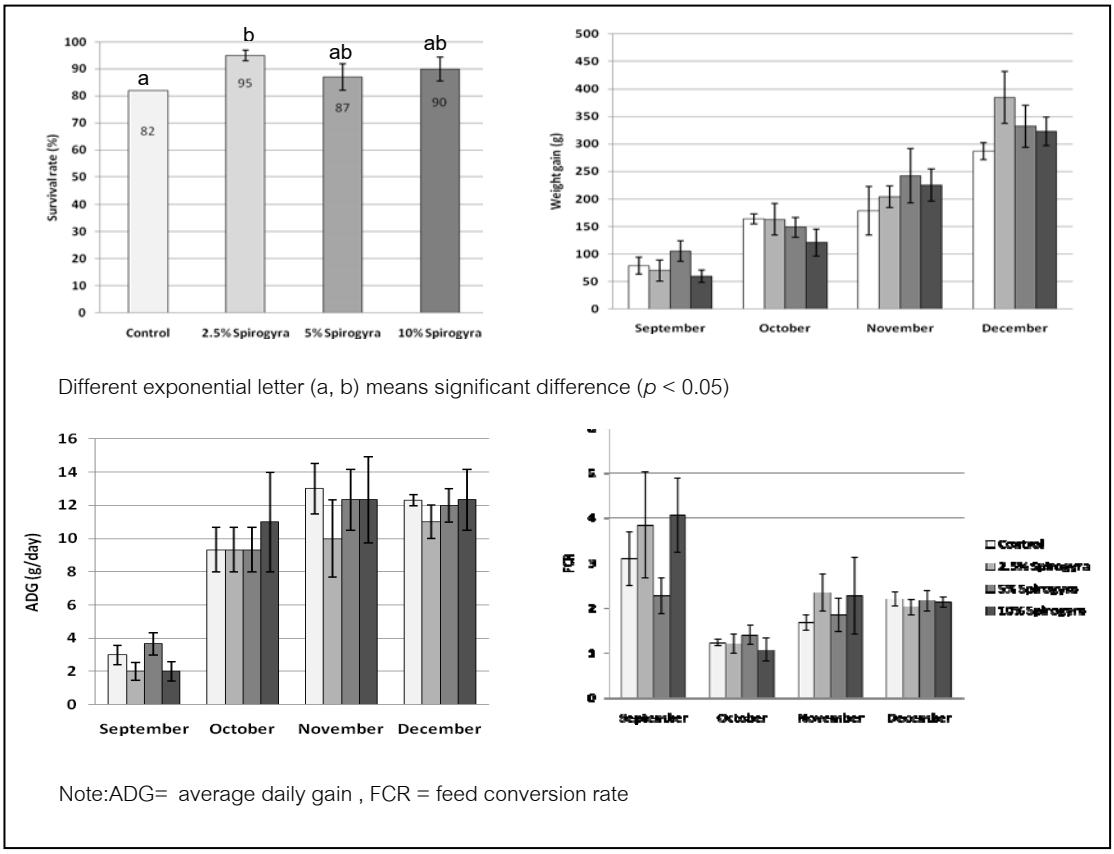


Figure 3 Effect of *Spirogyra* supplement on survival rate and growth parameters over a period of 4 months

วิจารณ์และสรุปผล

สารประกอบฟีโนลิกเป็นกลุ่มสารที่มีบทบาทสำคัญในการต้านแบคทีเรียต้านไวรัส ต้านการอักเสบ ต้านการแพ้ เป็นต้น ซึ่งคุณสมบัติดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เป็นกลุ่มสารที่พบได้ในพืชทั่วไป สามารถตรวจพบสารประกอบฟีโนลิกได้ในพืชผัก ผลไม้ ชา สาหร่าย เป็นต้น มีสูตรโครงสร้างทางเคมีเป็นวงแหวนที่มีหมู่ไฮดรอกซิลอย่างน้อยหนึ่งหมู่หรือมากกว่านั้น สามารถละลายน้ำได้ สารประกอบฟีโนลิกที่พบในธรรมชาติมีมากมายหลายชนิด มีลักษณะสูตรโครงสร้างทางเคมีที่แตกต่างกัน ซึ่งกลุ่มใหญ่ที่สุดที่พบจะเป็นสารประกอบพวกฟลาโวนอยด์ (flavonoids) สารประกอบฟีโนลิกหลายชนิดมีสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชัน เช่น ฟลาโวนอยด์ กรดฟีโนลิก และ แทนนิน เป็นต้น ทำหน้าที่ทั้งเป็นสารให้อิเล็กตรอน หรือเป็นตัวให้ไฮโดรเจน และกำจัดออกซิเจนทำให้สารประกอบฟีโนลิกเป็นสารต้านออกซิเดชันที่สำคัญชนิดหนึ่ง (Halliwell *et al*., 1992; Vajraguta *et al*., 2007)

มีรายงานการวิจัยการตรวจพบกลุ่มสารประกอบฟีโนลิกในสาหร่ายน้ำจืดขนาดใหญ่พบว่า ส่วนสกัดน้ำของสาหร่ายเตา (*Spirogyra neglecta*) มีปริมาณกลุ่มสารฟีโนลิกมากกว่าสาหร่ายไก (*Cladophora glomerata*) และสาหร่ายลอน (*Nostochopsis lobatus*) เมื่อเทียบกับสาร gallic acid ซึ่งมีความสัมพันธ์กับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ โดยสาหร่ายเตามีค่า IC_{50} ต่ำกว่าสาหร่ายไก และสาหร่ายลอน ซึ่งค่า IC_{50} ต่ำแสดงว่ามีความสามารถต้านอนุมูลอิสระสูงนั่นเอง (Peerapornpisal *et al*., 2009a; Peerapornpisal *et al*., 2010) มีรายงานการวิจัยของ Wu *et al*. (2005) พบว่า สารสกัดน้ำของสาหร่าย *Spirulina* sp. มีสารประกอบฟีโนลิกเป็นส่วนประกอบและมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS ด้วย และมีการนำ*Spirulina* sp. มาเสริมในอาหารเลี้ยงสัตว์น้ำพบว่า ช่วยเพิ่มการเจริญเติบโตและการเจริญพันธุ์ของปลาบึก ปลาเผาะ และปลาสวายได้ (Mengumphan and Saengkrachag, 2008; Mengumphan *et al.,* 2011) ส่วนรายงานเกี่ยวกับสาหร่ายทะเลต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระพบว่า สาหร่าย *Padina minor* Yamada มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเมื่อทดสอบในการกำจัดอนุมูล superoxide, hydroxyl, ABTS และฤทธิ์ยับยั้งการเกิด lipid peroxidation (Amornlerdpison *et al*., 2007; Peerapornpisal *et al*., 2010) โดยตรวจพบกลุ่มสารสำคัญเป็นสารกลุ่มฟีโนลิกและสารกลุ่มซัลเฟตโพลีแซคคาร์ไรด์ (sulfate polysaccharide) ส่วนสาหร่าย *Sargassum polysystum* มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH, ABTS และยับยั้งการเกิด lipid peroxidation (Amornlerdpison *et al*., 2008) โดยในปัจจุบันได้มีการนำสาหร่ายทะเลเหล่านี้มาใช้เป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์น้ำ

การตรวจหาปริมาณกลุ่มสารฟีโนลิกซึ่งเป็นสารต้านออกซิเดชันที่สำคัญชนิดหนึ่งที่พบในสาหร่ายอาจใช้เป็นประโยชน์ในการกำหนดมาตรฐาน (standardization) ในการนำสาหร่ายมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆได้อีกด้วย จากการศึกษาในหลอดทดลอง (*in vitro*) ครั้งนี้พบว่า สารสกัดน้ำสาหร่ายเตามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในแบบจำลองการขจัดอนุมูล ABTS โดยตรวจพบว่ามีกลุ่มสารสำคัญคือ สารประกอบฟีโนลิก ซึ่งมีค่ามากที่สุดในฤดูหนาวโดยมีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่เพิ่มขึ้นด้วย อย่างไรก็ตามค่าสูงสุดในการต้านอนุมูลอิสระของสาหร่ายเตาทั้ง 3 ฤดูไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นการเก็บสาหร่ายเตามาใช้ประโยชน์สามารถเก็บเกี่ยวได้ทั้ง 3 ฤดูกาล ซึ่งไม่มีผลต่อปริมาณสารสำคัญและการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

การนำสาหร่ายเตามาเสริมในอาหารปลาจะช่วยส่งเสริมสุขภาพของปลาให้ดีขึ้น เนื่องจากการเพิ่มระบบต้านอนุมูลอิสระจากคุณสมบัติของสาหร่ายเตาจะช่วยทำให้ปลามีภูมิต้านทานดี ทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ ทำให้ปลาไม่เป็นโรคง่าย โตเร็ว มีอัตราการรอดสูง ทำให้ได้ผลผลิตปลาที่มีคุณภาพ ในภาวะที่มีสารอนุมูลอิสระมีมากไม่สมดุลกับสารต้านอนุมูลอิสระจะทำให้ปลาเกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) ขึ้น โดยอาจเป็นผลมาจากการสร้างสารอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น และ/หรือมีการลดลงของสารและเอนไซม์ที่ต้านอนุมูลอิสระลดลงในตัวปลา เช่น superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) และ glutathione (GSH) เป็นต้น โดยภาวะ oxidative stress มีสาเหตุมาจากสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม การเปลี่ยนแปลงของฤดูกาลที่มีผลต่ออุณหภูมิของน้ำ การปนเปื้อนจากสารพิษหรือโลหะหนัก การได้รับอาหารไม่มีคุณค่าหรือไม่เพียงพอต่อความต้องการ ทำให้เกิดการสร้างอนุมูลอิสระที่มีผลเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxic effect) มีผลต่อ membrane phospholipids ที่มีทั่วตัวปลา เกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation ที่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงการทำงานของไขมัน โปรตีนต่างๆ ทั้งที่อยู่ในเซลล์และที่อยู่ที่ผนังของเซลล์ได้ (Van der Oost, *et al*, 2003) ซึ่งส่งผลเสียต่อสุขภาพปลา ทำให้ปลาเป็นโรคง่ายและเจริญเติบโตช้า

จากการที่สาหร่ายเตามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและตรวจพบสารประกอบฟีโนลิก จึงนำสาหร่ายเตามาใช้ประโยชน์ในการส่งเสริมสุขภาพของสัตว์น้ำโดยการเสริมสาหร่ายเตาระดับ 2.5, 5 และ 10% ในอาหารเลี้ยงปลานิล ผลการศึกษาพบว่า สาหร่ายเตาระดับ 2.5% มีผลเพิ่มน้ำหนักและอัตราการรอดได้ดีกว่าทุกกลุ่ม ถึงแม้ว่าจะเพิ่มระดับของสาหร่ายเตาเป็น 5 และ 10% ก็ตาม แสดงว่าการเสริมสาหร่ายเตาระดับ 2.5% ในอาหารปลาเป็นระดับที่ให้ผลสูงสุด (maximum response) ในการศึกษาครั้งนี้ โดยกลไกการออกฤทธิ์ของสาหร่ายเตาที่ทำให้ปลานิลมีการเจริญเติบโตและอัตราการรอดเพิ่มขึ้นอาจมาจากการควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระให้อยู่ในระดับสมดุล ได้แก่ สารต้านอนุมูลอิสระ เช่น สารประกอบฟีนอลิกในสาหร่ายเตา หรือจากการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ในการป้องกันอนุมูลอิสระ เช่น เอนไซม์ SOD, CAT และ GSH ซึ่งจะดำเนินการในการศึกษาครั้งต่อไป อย่างไรก็ตามจากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสาหร่ายเตาสามารถช่วยส่งเสริมสุขภาพสัตว์น้ำและนำไปใช้ประโยชน์เพิ่มประสิทธิภาพการเลี้ยงสัตว์น้ำได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ และสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ที่ให้การอุดหนุนงบประมาณในการทำวิจัย งานวิจัยในครั้งนี้สำเร็จลงได้ด้วยการสนับสนุน สถานที่ เครื่องมือ อุปกรณ์ และบุคลากรที่ช่วยในการดำเนินงานวิจัยจากคณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ และขอขอบคุณบริษัทเจริญโภคภัณฑ์อาหาร จำกัด (มหาชน) สำหรับการอนุเคราะห์ทุนการศึกษาให้กับนักศึกษาปริญญาโทที่เป็นผู้ช่วยวิจัยตลอดการทดลองในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

Amornlerdpison, D., Peerapornpisal, Y., Rujjanawate, C., Taesotikul, T., Nualchareon, M., Kanjanapothi, D. 2007. Antioxidant activity of *Padina minor* Yamada. KMITL Science and Technology Journal 7 (S1):1-7.

Amornlerdpison, D., Peerapornpisal, Y., Taesotikul, T., Utan J., Nualchareon, M., Kanjanapothi, D. 2008. Antioxidant activity of *Sargassum polysystum* C.Agardh. J Fish Tech Res 2 (2): 96-103. [in Thai]

Halliwell, B., Gutteridge, JMC., Cross CE. Free radicals, antioxidants and human disease: Where are we now? J Lab Clin Med 1992; 119: 598-620.

Mengumphan, K., Saengkrachang, J. 2008. Production of Generation 2 Mekong Giant Catfish (*Pangasinodon gigas*) Cultured with *Spirulina sp*. Maejo Int J Sci Tech 2(3): 559-567. [in Thai]

Mengumphan, K., Sorntako, J., Amornlerdpison, D. 2011Effect of Spirulina supplement on the growth and maturation of Pangasius Catfish brood stock and the nursery performance of four species of their fingerlings. J Fish Tech Res 5 (2):12-25. [in Thai]

Peerapornpisal, Y., Amornlerdpison, D., Jamjai, U., Taesotikul, T., Pongpaibul, Y., Nualchareon, M., Kanjanapothi, D. 2010. Antioxidant and anti-inflammatory activities of brown marine alga, *Padina minor* Yamada. Chiang Mai J. Sci 37(3): 507-516. [in Thai]

Peerapornpisal, Y., Amornlerdpison, D., Kanjanapothi, D., Taesotikul, T., Pongpaibul, Y., Tongsiri, S. 2009a. Final report “Potential of freshwater algae as nutraceutical and cosmeceuticals products” National Research Council of Thailand (NRCT), 62 pp. [in Thai]

Peerapornpisal, Y., Amornlerdpison, D., Rujjanawate, C., Ruangrit, K., Kanjanapothi, D. 2006. Two endemic species of macroalgae in Nan river, Northern Thailand, as therapeutic agents. Science Asia 32 supplement 1: 71-76.

Peerapornpisal, Y., Kanjanapothi, D., Taesotikul, T., Amornlerdpison, D. 2009b. Potential of some freshwater algae in Northern Thailand as nutraceutical. Phycologia 48(4) Suppl: 104.

Peerapornpisal, Y., Panyoyai T., Amornlerdpison, D. 2012. Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Spirogyra neglecta* (Hassall) Kutzing. KKU Sci J 40(1), 228-235. [in Thai]

Re, R., Pellegrini, N., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evan, C. 1999. Antioxidant activity applying an improve ABTS radical cation decolorisation assay. Free radical Bio Med 6(9/10): 1231-7.

Sachindra, N. M., Airanthi, M. K. W. A. , Hosokawa, M., Miyashita, K. 2010. Radical scavenging and singlet oxygen quenching activity of extracts from Indian seaweeds. J Food Sci Technol 47: 94–99.

Vajraguta, O., Boonchoong, P., Boonyarut, J., Utsintong, M. 2007. Radical scavenging agents. Newthaimit press, Bankok, 280 pp. [in Thai]

Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N. P. E. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review. Envirol Toxic Pharm 13, 57–149.

Wu LC., Ho J., Shieh MC, Lu I. 2005. Antioxidant and antiproliferative activities of *Spirulina* and *Chlorella* water extracts. J Agri Food Chem 53: 4207-4212.