



รายงานผลการวิจัย

เรื่อง ผลของสาหร่ายเตาต่อระบบต้านอนุมูลอิสระและเอนไซม์กำจัดสารพิษในปลานิล
Effect of Spirogyra on antioxidant system and detoxifying enzyme in Nile tilapia
(*Oreochromis niloticus*)

โครงการย่อยภายใต้ชุดโครงการ : การพัฒนาระบบการผลิตปลานิลเพื่อเข้าสู่มาตรฐานการส่งออก

ได้รับการจัดสรรงบประมาณวิจัย ประจำปี 2554
จำนวน 170,000 บาท

หัวหน้าโครงการ อาจารย์ ดร.ดวงพร อมรเลิศพิศาล
ผู้ร่วมโครงการ อาจารย์ ดร.ชุตินา ศรีมะเร็ง
อาจารย์ ดร.สุดาพร ตงศิริ
อาจารย์ ดร.บัญชา ทองมี

สารบัญเรื่อง

	หน้า
สารบัญตาราง	ก
สารบัญภาพ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
บทคัดย่อ	ง
ABSTRACT	จ
บทที่ 1 บทนำ	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
กรอบแนวคิดการวิจัย	4
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร	5
สำหรับเรา	5
อนุมูลอิสระ	7
สารด้านอนุมูลอิสระ	9
สารด้านออกซิเคชันสังเคราะห์	13
เอนไซม์ในการป้องกันและควบคุมปริมาณสารด้านอนุมูลอิสระ	14
ปลานิล	16
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย	18
การตรวจคัดกรองทางพฤกษเคมี	18
การศึกษาผลของสารร้ายเดาต์ระบบด้านอนุมูลอิสระในปลานิล	20
บทที่ 4 ผลการวิจัย	24
การพิสูจน์เอกลักษณ์สำหรับเรา	24
ตรวจคัดกรองทางพฤกษเคมี (phytochemical screening)	25
การเตรียมอาหารปลานิล	27
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย	28
เอกสารอ้างอิง	29

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1	คุณค่าทางอาหารของ <i>Spirogyra</i> sp. ที่พบในบริเวณภาคเหนือของประเทศไทย	6
ตารางที่ 2	อนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้อง	8
ตารางที่ 3	ขนาดของอาหารสำหรับปลานิลขนาดต่าง ๆ	17
ตารางที่ 4	แผนการดำเนินงานตลอดโครงการวิจัยในปีที่ 1	23
ตารางที่ 5	ปริมาณ carbohydrate และ sulfate content จากการสกัดลำต้นส่วน	26

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 สาหร่ายเตา	5
ภาพที่ 2 หลักการเกิด TBARS	16
ภาพที่ 3 ปลานิล	17
ภาพที่ 4 แผนภูมิแสดงวิธีการเตรียมสารสกัดน้ำของสาหร่ายเตา	18
ภาพที่ 5 แสดงวิธีการสกัดลำดับส่วนของสาหร่ายเตา	20
ภาพที่ 6 ภาพถ่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์	24
ภาพที่ 7 Fingerprint ของส่วนสกัดน้ำของสาหร่ายเตา	25
ภาพที่ 8 เปรียบเทียบอาหารที่ใช้เลี้ยงปลานิลทั้ง 4 สูตร	27

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลงได้ด้วยความอนุเคราะห์และความร่วมมือจากหลายฝ่ายด้วยกัน ซึ่งทางคณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณทุกท่านไว้ดังนี้

สำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ และสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ที่ให้การสนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัยในครั้งนี้

รองศาสตราจารย์ ดร.ยุวดี พิรพรพิศาล สาขาวิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ชนิดของสาหร่ายเตา รองศาสตราจารย์ ดร.เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ช่วยเป็นนักวิจัยที่เคียงคอยให้คำแนะนำวิธีการดำเนินการวิจัยรวมทั้งอนุเคราะห์สถานที่ในการทำงานวิจัย ณ ฐานเรียนรู้ปลาปักแบบบูรณาการ และคณาจารย์ภาควิชาสัตววิทยาและเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้การสนับสนุนอุปกรณ์ วิธีการวิเคราะห์ทางชีวเคมี อีกทั้งคอยสนับสนุนและให้กำลังใจมาโดยตลอด

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณคณาจารย์ และเจ้าหน้าที่ คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ได้ให้การสนับสนุนอนุเคราะห์สถานที่ และอำนวยความสะดวกในการทำงานวิจัยในครั้งนี้จนสำเร็จ

คณะผู้วิจัย

ผลของสาหร่ายเตาต่อระบบต้านอนุมูลอิสระและเอนไซม์กำจัดสารพิษในปลานิล

Effect of Spirogyra on antioxidant system and detoxifying enzyme

In Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)

ดวงพร อมรเลิศพิศาล¹ สุดาพร ตงศิริ¹ บัญชา ทองมี¹ และชุตินา ศรีมะเร็ง²
Doungporn Amornlerdpison¹, Sudaporn Tongsir¹, Buncha Tongmee¹,
and Chutima Srimaroeng²

¹คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ 50290

²คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 50200

บทคัดย่อ

สาหร่ายเตาที่นำมาใช้ในการศึกษาคือ *Spirogyra neglecta* (Hassall) Kützing และถูกนำมาตรวจคัดกรองทางพฤกษเคมีพบว่า กลุ่มสารสำคัญที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยมีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระคือ สารกลุ่มฟีนอลิก และสารกลุ่มซัลเฟตโพลีแซคคาไรด์ โดยส่วนใหญ่สารกลุ่มหลักที่พบมากเป็นสารกลุ่มฟีนอลิก ในขณะที่สารกลุ่มซัลเฟตโพลีแซคคาไรด์พบในปริมาณเล็กน้อย ดังนั้นในการดำเนินการวิจัยในปีที่ 2 จึงนำสาหร่ายเตามาเสริมในอาหารปลาเม็ดที่ใช้เลี้ยงปลานิล เพื่อช่วยส่งเสริมสุขภาพของปลาให้ดีขึ้น เนื่องจากสาหร่ายเตามีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระซึ่งจะช่วยทำให้ปลามีภูมิคุ้มกันที่ดี และทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ จึงทำให้ปลาไม่เป็นโรคร่าง เจริญเติบโตเร็ว และมีอัตราการรอดสูง ถ้าหากผลการทดลองที่ได้เป็นไปตามสมมติฐานที่กำหนดไว้ก็จะเป็นประโยชน์ต่อการเพิ่มผลผลิตปลานิลให้กับเกษตรกรผู้เลี้ยงปลาได้เป็นอย่างดี

คำสำคัญ: สาหร่ายเตา สารต้านอนุมูลอิสระ ปลานิล การเพิ่มผลผลิต

ABSTRACT

Spirogyra neglecta Hassall Kützing was used and investigated the phytochemical screening in this study. The results showed that the phenolic compounds and sulfate polysaccharide were active compounds which their antioxidant activity. In addition, the phenolic compound was found to be the main compound whereas sulfate polysaccharide was a little amount. Therefore, the *S. neglecta* was supplemented in pellet fish feed to promote the health of fish in further study. Due to the fact that its antioxidant activity of *S. neglecta* stimulate the immune response and tolerate to the poor environment. Then, the culturing of Nile tilapia with *S. neglecta* supplemented pellet feed could be non-infected disease, improve the growth and increase the survival rate. In case that the hypothesis is success, the results of this study could be a significant benefit in order to achieve higher quality of production for fish farmer.

Key words: *Spirogyra neglecta*, antioxidant, Nile tilapia, productivity

บทที่ 1

บทนำ

ที่มาและความสำคัญของปัญหา

ปลานิลเป็นปลาน้ำจืดที่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจเป็นอันดับ 1 ของประเทศไทย เนื้อปลามีรสชาติดี มีผู้นิยมบริโภคกันอย่างกว้างขวางเป็นที่ต้องการของตลาดทั้งในและต่างประเทศ โดยกรมประมงจะสร้างเป็นจุดแข็งทางการผลิตสินค้าประมงของประเทศตามยุทธศาสตร์การพัฒนาปลานิล พ.ศ. 2553-2557 โดยมีวิสัยทัศน์ คือ "เป็นผู้นำในการผลิตสินค้าปลานิลที่มีคุณภาพและได้มาตรฐาน" โดยมีแนวโน้มปริมาณความต้องการการบริโภคของตลาดต่างประเทศที่สูงขึ้นอย่างต่อเนื่องทั้งในตลาดยุโรป ตะวันออกกลาง สหรัฐอเมริกา ออสเตรเลีย และเอเชีย (กรมประมง, 2553) ดังนั้นการสนับสนุนให้มีการพัฒนาศักยภาพการผลิตปลานิลอย่างครบวงจร ตั้งแต่กระบวนการเพาะเลี้ยงจนถึงการแปรรูป โดยคำนึงถึงคุณภาพและมาตรฐานเป็นสิ่งสำคัญ จะช่วยยกระดับให้สินค้าปลานิลเป็นที่ต้องการของตลาดทั้งในประเทศและต่างประเทศมากยิ่งขึ้น ในการศึกษาครั้งนี้จึงนำปลานิลมาใช้ในการทดลอง เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตปลานิลที่มีคุณภาพ มีการเจริญเติบโตดี มีความต้านทานโรคสูง และให้ผลผลิตดี เพื่อการเพิ่มผลผลิตปลานิลให้เพียงพอต่อการบริโภคและเพิ่มผลผลิตในเชิงพาณิชย์ต่อไป

สาหร่ายเตา (*Spirogyra* sp.) เป็นสาหร่ายที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง ประกอบด้วยโปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต แร่ธาตุ และวิตามิน มีรงควัตถุหลายชนิด เช่น คลอโรฟิลล์ เอ และบี เบต้าแคโรทีน และเซโนโทฟิล นอกจากนี้ยังพบกลุ่มสารประกอบฟีนอลิกที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสาหร่ายเตาอีกด้วย (ยูวดี และคณะ, 2549; ยูวดี และคณะ, 2552) โดยอนุมูลอิสระมีบทบาทในการเกิดการอักเสบ และการทำลายเนื้อเยื่อ มีผลต่อความเสื่อมหรือการแก่ของเซลล์ ทำให้เป็นต้นเหตุของการเกิดโรค (โอภา และคณะ, 2549) มีรายงานการวิจัยพบว่า ส่วนสกัดน้ำของสาหร่ายเตามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เมื่อทดสอบในการทดลองฤทธิ์กำจัดอนุมูล DPPH ฤทธิ์กำจัดอนุมูล superoxide และฤทธิ์ยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ในหลอดทดลอง (*in vitro*) (ยูวดี และคณะ, 2552) และมีฤทธิ์ต้านการอักเสบในหนูขาว (Peerapompisal et al., 2009)

การเลี้ยงปลานิลในกระชังเป็นรูปแบบการเลี้ยงที่ให้ผลผลิตสูง ก่อให้เกิดประโยชน์สูงสุด ในเชิงเศรษฐศาสตร์ นอกจากนี้ยังสะดวกในการเก็บเกี่ยวผลผลิต โดยลงทุนต่ำกว่ารูปแบบการเลี้ยงอื่นๆ ในขณะที่ผลตอบแทนต่อพื้นที่สูง อย่างไรก็ตามการเลี้ยงปลานิลในกระชังอาจจะมีข้อเสียอยู่

เช่น ปัญหาเรื่องโรค สภาพแวดล้อมจากการปนเปื้อนของสารพิษ อัตราการปล่อยที่หนาแน่นเกินไป อีกทั้งการเลี้ยงยังขึ้นอยู่กับอาหารสำเร็จรูปเพียงอย่างเดียวทำให้สิ้นเปลืองในการลงทุน ซึ่งเป็นปัญหาหลักของการจำหน่ายปลานิล คือ มีต้นทุนในการผลิตสูง เนื่องจากราคาอาหารปลาสำเร็จรูปมีราคาแพง เกษตรกรบางรายจึงมีการทำอาหารขึ้นใช้เองภายในฟาร์มโดยการทำน้ำเขียวเพื่อผลิตอาหารธรรมชาติให้กับปลา ซึ่งทำให้เกิดปัญหาตามมาคือ ปลานิลเจริญเติบโตช้า ไม่ทนต่อโรค ขยายไม่ได้ราคา และส่งออกต่างประเทศไม่ได้เนื่องจากไม่ผ่านมาตรฐานอาหารปลอดภัย

ดังนั้นการนำสาหร่ายเตามาเป็นอาหารเสริมในอาหารปลานิลจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยส่งเสริมให้สุขภาพของปลานิลดีขึ้น เนื่องจากสาหร่ายเตามีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งอนุมูลอิสระจะทำลายเซลล์ส่งผลทำให้ปลาเป็นโรคร่าง เกิดการตายของปลาขึ้น ในภาวะที่มีสารอนุมูลอิสระมีมากไม่สมดุลกับสารต้านอนุมูลอิสระจะทำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) เกิดขึ้น โดยอาจเป็นผลมาจากการสร้างสารอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น และ/หรือมีการลดลงของสารและเอนไซม์ที่ต้านอนุมูลอิสระลดลงในตัวปลา โดยภาวะ oxidative stress มีสาเหตุมาจากสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม การปนเปื้อนจากสารพิษหรือโลหะหนัก การได้รับอาหารไม่มีคุณค่าหรือไม่เพียงพอต่อความต้องการ ทำให้เกิดการสร้างอนุมูลอิสระที่มีผลเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxic effect) มีผลต่อ membrane phospholipids ที่มีทั่วตัวปลา เกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation ที่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงการทำงานของไขมัน โปรตีนต่างๆ ทั้งที่อยู่ในเซลล์และที่อยู่ที่ผนังของเซลล์ได้ (van der Oost et al, 2003) การนำสาหร่ายเตามาเป็นอาหารเสริมในอาหารปลานิลจึงน่าจะช่วยให้ปลานิลมีภูมิคุ้มกันต้านทานดีขึ้น ทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ ไม่เป็นโรคร่าง ทำให้ได้ผลผลิตปลาที่มีคุณภาพ โตเร็ว และมีอัตราการรอดสูง ซึ่งจะเพิ่มประโยชน์ต่อการเพิ่มผลผลิตเชิงพาณิชย์ และเพิ่มศักยภาพในการแข่งขันในตลาดได้เป็นอย่างดี อีกทั้งยังเป็นการลดใช้สารเคมีในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ และยังเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับสาหร่ายเตาอีกทางหนึ่งด้วย

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาผลของสาหร่ายเตาต่อการเจริญเติบโตของปลานิล
2. เพื่อศึกษาผลของสาหร่ายเตาต่อระบบต้านอนุมูลอิสระในปลานิล
3. เพื่อศึกษากลุ่มสารสำคัญของสาหร่ายเตา

หลักการและเหตุผล

สาหร่ายเตามีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูง การนำสาหร่ายเตามาเป็นอาหารเสริมในอาหารปลานิลจึงน่าจะช่วยให้ปลานิลมีภูมิคุ้มกันต้านทานดีขึ้น ทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่

เหมาะสมได้ ไม่เป็นโรคง่าย ทำให้ได้ผลผลิตปลาที่มีคุณภาพ โตเร็ว และมีอัตราการรอดสูง ซึ่งจะ
เป็นประโยชน์ต่อการเพิ่มผลผลิตเชิงพาณิชย์ เนื่องจากอนุมูลอิสระจะทำลายเซลล์หรือเป็นพิษต่อ
เซลล์ ทำให้ปลาเป็นโรคง่าย เกิดการตายของปลาขึ้น ในภาวะที่มีสารอนุมูลอิสระมีมากไม่สมดุลกับ
สารต้านอนุมูลอิสระจะทำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) โดยภาวะดังกล่าวมี
สาเหตุมาจากสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม การปล่อยปลาหนาแน่นเกินไปในกระชัง การปนเปื้อน
จากสารพิษหรือโลหะหนัก การได้รับอาหารไม่มีคุณค่าหรือไม่เพียงพอต่อความต้องการ ดังนั้นการ
นำสาหร่ายเตามาพัฒนาเป็นอาหารเริ่มในปลาจะช่วยเพิ่มระบบต้านอนุมูลอิสระของปลาได้ ทำให้
ปลามีภูมิคุ้มกัน สามารถเจริญเติบโตได้ดี ไม่เป็นโรคง่าย ทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม
ได้ ทำให้ได้ผลผลิตปลาที่มีคุณภาพ และยังเป็นทางเลือกการใช้สารเคมีในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำอีก
ด้วย

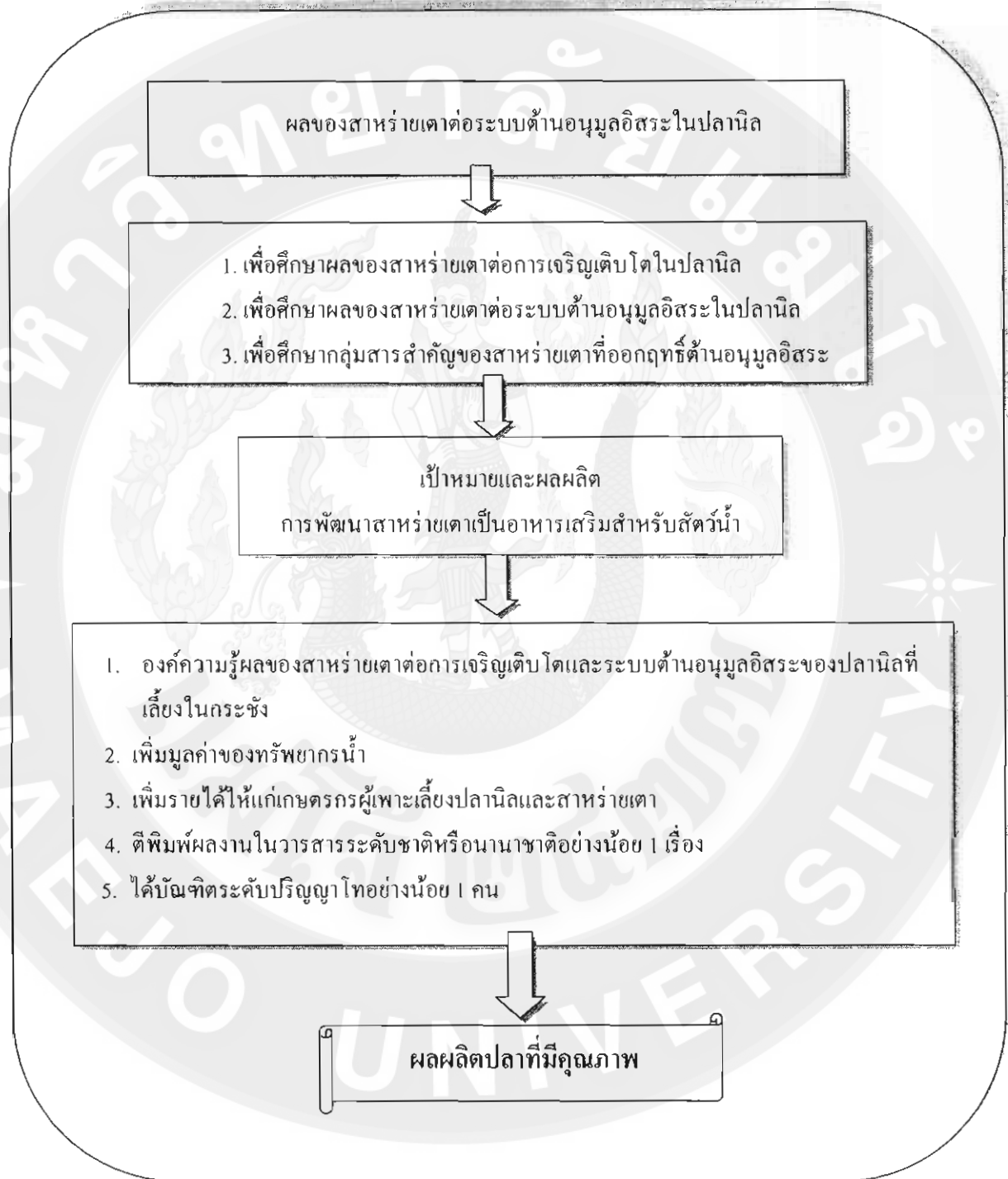
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้องค์ความรู้ผลของสาหร่ายเตาต่อการเจริญเติบโตและระบบต้านอนุมูลอิสระในปลา
นิล
2. นำองค์ความรู้ที่ได้ไปต่อยอดพัฒนาสาหร่ายเตาเป็นอาหารปลานิลหรือปลาชนิดอื่นๆ
3. ช่วยเพิ่มมูลค่าของทรัพยากรน้ำและลดการใช้ยาและสารเคมีในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ
4. เป็นการสร้างโอกาสทางอาชีพและเพิ่มรายได้ให้แก่เกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงปลานิลและ
สาหร่ายเตา
5. ได้ผลงานวิจัยตีพิมพ์ในวารสารระดับชาติหรือนานาชาติอย่างน้อย 1 เรื่อง
6. ได้บัณฑิตระดับปริญญาโทอย่างน้อย 1 คน

ขอบเขตการวิจัย

ทำการทดสอบผลของสาหร่ายเตาที่ใช้ให้เป็นส่วนผสมของอาหารปลานิลเพื่อเพิ่มการต้าน
อนุมูลอิสระช่วยป้องกันภาวะเครียดจากออกซิเดชันจากการเลี้ยงปลานิลในกระชัง ทำให้ปลานิล
เจริญเติบโตดี ทนโรค และปรับตัวต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม ทำให้ได้ผลผลิตปลานิล
ที่มีคุณภาพ

กรอบแนวคิดการวิจัย



บทที่ 2

การตรวจเอกสาร



ภาพที่ 1 สาหร่ายเตา

สาหร่ายเตา (*Spirogyra* sp.) เป็นกลุ่มสาหร่ายน้ำจืดที่เป็นเส้นสาย เจริญได้ในแหล่งน้ำจืดทั่วไป เช่น คูน้ำ คลอง หนองน้ำ บึง นาข้าว ทะเลสาบน้ำจืด เป็นต้น การกระจายของสาหร่ายชนิดนี้พบในเขตร้อนและอบอุ่น และจะพบในน้ำนิ่งหรือน้ำไหลเอื่อยๆ ไม่แรงนัก Bold and Wynne (1978) ได้จัดลำดับทางด้านอนุกรมวิธาน *Spirogyra* sp. ดังนี้

Kingdom	Protista
Division	Chlorophyta
Class	Chlorophyceae
Order	Zygnematales
Family	Zygnemataceae
Genus	<i>Spirogyra</i>

ลักษณะทั่วไป

สาหร่ายเตา (*Spirogyra* sp.) เป็นสาหร่ายสีเขียวมีลักษณะเป็นเส้นสาย (ภาพที่ 1) ซึ่งประกอบด้วยเซลล์แต่ละปล้องมาต่อกัน โดยทั่วไปมีลักษณะความกว้างของเซลล์ประมาณ 60 - 160 ไมครอน และมีความยาวของเซลล์ประมาณ 65 - 250 ไมครอน ไม่มีการแตกแขนง ลักษณะเป็นเส้นตรงคล้ายเส้นผมบางๆ ฐานไปกับกระแสน้ำ มีสีเขียวอ่อนจนกระทั่งถึงสีเขียวเข้มเมื่อจับดูจะรู้สึกลื่นมือ ทั้งนี้เพราะผนังเซลล์ด้านนอกสุดทำให้เกิดเมือก (pectose mucilage) ภายในเซลล์

ประกอบไปด้วยเซลล์รูปกระบอกมาเรียงต่อกัน ซึ่งมีคลอโรพลาสต์ (chloroplast) เป็นเส้นบิดกัน เป็นเกลียว (ยิวดี, 2530)

สาหร่ายเตามีคลอโรพลาสต์เป็นรูปรีแบนและมีไพรินอยด์เรียงตามยาวของแถบคลอโรพลาสต์ นิวเคลียสจะลอยอยู่ตรงจุดกึ่งกลางเซลล์ ทุกๆ เซลล์ในสายยกเว้นส่วนฐานจะสามารถแบ่งเซลล์ได้ การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการขาดเป็นท่อนๆ ของสาย ส่วนการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศนั้นจะเริ่มจากสาย 2 สายมาอยู่ใกล้กัน แล้วเชื่อมต่อกันด้วยชั้นของเมือก เซลล์หนึ่งจะยื่นพาลิลลี (papillae) เข้าหาเซลล์ของสายตรงกันข้าม ทำให้พาลิลลีของทั้งสองสายจะมาอยู่ใกล้ชิดกัน ก่อให้เกิดการรวมตัวครั้งแรก ต่อจากนั้นสายทั้งสองจะถูกดันให้ห่างกันเมื่อพาลิลลียาวขึ้น จะเกิดรูขุมที่ส่วนยอดของพาลิลลีทำให้เกิดคอนจูเกชันทิวบ์ที่ต่อเนื่องกันของเซลล์หนึ่งกับอีกเซลล์หนึ่ง เซลล์สืบพันธุ์เพศผู้หรือโพโรพลาสต์ที่เคลื่อนย้ายผ่านคอนจูเกชันทิวบ์ จากนั้นจะไปรวมกับเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียได้เป็นไซโกต และจะมีการจับผนังเซลล์ 3 ชั้นหุ้มตัวเองได้เป็นไซโกสปอร์ มีผนังชั้นนอกคือเอกไซสปอร์ (exospores) ชั้นกลาง คือ มีไซสปอร์ (mesospore) และชั้นใน คือ เอนโดสปอร์ (endospore) รงควัตถุ (pigment) ของสาหร่ายเตาประกอบด้วยคลอโรฟิลล์เอ และบี แคโรทีนชนิดแอลฟาและแกมมาแคโรทีน (กาญจนภาชนัน, 2527) ในตารางที่ 1 แสดงคุณค่าทางอาหารของสาหร่ายที่พบในบริเวณภาคเหนือของประเทศไทย

ตารางที่ 1 คุณค่าทางอาหารของสาหร่ายเตา (หน่วย: ร้อยละของน้ำหนักแห้ง)

คุณค่าทางอาหาร	บุญมี (2530)	Peerapompisal et al (2008)
โปรตีน	23.82	18.65
ไขมัน	3.08	5.21
คาร์โบไฮเดรต	52.04	56.31
เถ้า	14.34	7.66
เส้นใย	6.72	11.78

ที่มา: จงกล, 2552

อนุมูลอิสระ (Free Radical)

อนุมูลอิสระ คือ อะตอมหรือโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนไม่เป็นคู่ อยู่ในวงอิเล็กตรอนวงนอกสุด (outer orbital) เนื่องจากการมีอิเล็กตรอนที่โคจรเดี่ยว (unpaired electron) อยู่ในวงโคจรของโมเลกุลทำให้ไม่เสถียร ทำให้อนุมูลอิสระเป็นสารที่มีความไวในการเข้าทำปฏิกิริยาทางเคมีกับสารอื่นสูงมาก โดยอนุมูลอิสระจะไปแย่งจับหรือดึงเอาอิเล็กตรอนจากโมเลกุลหรืออะตอมสารที่อยู่ข้างเคียงเพื่อให้ตัวมันเสถียร โมเลกุลที่อยู่ข้างเคียงที่สูญเสียหรือรับอิเล็กตรอนจะกลายเป็นอนุมูลอิสระชนิดใหม่ขึ้น ซึ่งอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นใหม่จะไปทำปฏิกิริยากับสารโมเลกุลอื่นต่อไป เกิดเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (chain reaction) ต่อกันไปเรื่อยๆ โดยที่อนุมูลอิสระก็มีสมบัติเหมือนสารต่างๆ ไปตรงที่ความสามารถในการเข้าทำปฏิกิริยากับสารอื่นสามารถเปลี่ยนแปลงได้ตามอุณหภูมิ ความเป็นกรดด่าง (pH) และความชื้น เป็นต้น

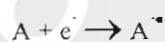
อนุมูลอิสระมีทั้งที่อยู่ในสภาวะที่เป็นกลางทางไฟฟ้า และอนุมูลในสภาวะที่มีประจุไฟฟ้า โดยมีทั้งประจุบวกและประจุลบ สัญลักษณ์ทางเคมีของอนุมูลอิสระ คือ อิเล็กตรอนเดี่ยวของอนุมูลอิสระซึ่งจะแสดงด้วยจุดในตำแหน่งข้างบนของสัญลักษณ์ทางเคมี เช่น อนุมูล R^{\bullet} แทนอะตอมหรือโมเลกุลของอนุมูลอิสระที่ไม่จำเพาะเจาะจง ซึ่งอนุมูลอิสระมีทั้งที่เป็นประจุบวก ($R^{+\bullet}$) เช่น อนุมูล pyridinyl ($NAD^{+\bullet}$) และประจุลบ ($R^{-\bullet}$) เช่น อนุมูล superoxide ($O_2^{-\bullet}$) หรือเป็นกลาง เช่น อนุมูล peroxy (ROO^{\bullet}) หรือ อนุมูล thiyl (RS^{\bullet}) เป็นต้น ซึ่งจากคำจำกัดความนี้ส่งผลให้อะตอมของธาตุและสารละลายหลายชนิดถูกจัดเป็นอนุมูลอิสระด้วย เช่น ไฮโดรเจนอะตอม (H^{\bullet}) คลอรีนอะตอม (Cl^{\bullet}) และซิลเวอร์อะตอม (Ag^{\bullet}) เป็นต้น

อนุมูลอิสระที่มีความสำคัญในทางชีวภาพ ได้แก่ Hydrogen radical (H^{\bullet}), hydroxyl radical (HO^{\bullet}), superoxide anion radical ($O_2^{-\bullet}$) เป็นต้น อนุมูลเหล่านี้จัดเป็นอนุมูลที่ไวในการเกิดปฏิกิริยาทางเคมีกับสารอื่นสูงมาก การเกิดอนุมูลอิสระมีได้หลายกลไกที่แตกต่างกัน ดังนี้

ก. การแตกของพันธะ โควาเลนต์แบบโฮโมไลซิส (Homolysis)



ข. การเพิ่มอิเล็กตรอน 1 ตัว ให้แก่อะตอมที่เป็นกลางทางไฟฟ้า



ค. การสูญเสียอิเล็กตรอน 1 ตัว จากอะตอมที่เป็นกลางทางไฟฟ้า



อนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้องต่างๆ ในทางชีววิทยาที่สามารถเป็นตัวตั้งต้นที่ทำให้เกิดเป็นอนุมูลอิสระได้อีกหลายชนิด สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ คือกลุ่มที่มีออกซิเจนเป็น

องค์ประกอบสำคัญ (reactive oxygen species, ROS) กลุ่มที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (reactive nitrogen species, RNS) และกลุ่มที่มีคลอรีนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (reactive chlorine species, RCS) สารบางชนิดสามารถจัดอยู่ได้ 2 กลุ่ม เช่น เปอร์ออกซีไนไตรท์ (peroxynitrite) ตัวอย่างอนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้องแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 อนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้อง

อนุมูลอิสระ	สารที่เกี่ยวข้อง
Reactive oxygen species (ROS)	
Superoxide, Superoxide anion ($O_2^{\bullet -}$)	H_2O_2 , Ozone (O_3)
Hydroxyl (HO^{\bullet})	Hypobromous acid (HOBr)
Hydroperoxyl (HO_2^{\bullet})	Hypochlorous acid (HOCl)
Peroxyl (RO_2^{\bullet})	Singlet oxygen ($O_2^1\Delta_g$)
Alkoxy (RO^{\bullet})	Organic peroxides (ROOH)
Carbonate ($CO_3^{\bullet -}$)	Peroxynitrite (ONOO)
Carbon dioxide ($CO_2^{\bullet -}$)	Peroxyntous acid (ONOOH)
Reactive nitrogen species (RNS)	
Nitric oxide (NO^{\bullet})	Nitrous acid (HNO_2)
Nitrogen dioxide (NO_2^{\bullet}), ($NO_2^{\bullet -}$)	Nitrosyl cation (NO^+), Nitroxyl anion (NO^-)
	Dinitrogen tetroxide (N_2O_4)
	Dinitrogen trioxide (N_2O_3)
	Peroxynitrite (ONOO)
	Peroxyntous acid (ONOOH)
	Nitronium (nitryl) cation (NO_2^+)
	Alkyl peroxynitrites (ROONO)
Reactive chlorine species (RCS)	
Atomic chlorine (Cl)	Hypochlorous acid (HOCl)
	Chloramines
	Chlorine gas (Cl_2)
Thiyl radical (RS^{\bullet})	

สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidants)

สารต้านออกซิเดชัน (antioxidant) คือสารที่ยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันหรือสารที่สามารถขจัดอนุมูลอิสระออกจากร่างกาย ร่างกายมีระบบต้านออกซิเดชัน ขจัดสารอนุมูลอิสระอยู่แล้ว แบ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ ประเภทแรกจะยับยั้งหรือป้องกันการเกิดสารอนุมูลอิสระ ได้แก่ เอนไซม์ superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase, peroxidase, cytochrome C peroxidase ทองแดง สังกะสี เซเลเนียม โปรตีนซึ่งมีทองแดงอยู่ในโมเลกุล (ceruloplasmin) ส่วนอีกประเภทหนึ่งคือ สารต้านออกซิเดชัน ในกลุ่มที่ทำลายปฏิกิริยาถูกโซ่นี้ได้แก่ วิตามินอี เบต้า-แคโรทีน วิตามินซี ubiquinone, uric acid, bilirubin, albumin, sulfhydryl groups ในกรดอะมิโน cysteine ซึ่งมีอยู่ในโปรตีน เช่น เนื้อสัตว์ นอกจากนี้ยังมี สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) และสารกลุ่ม flavanoids ที่เป็นสารต้านออกซิเดชันที่สำคัญอีกด้วย

สารต้านออกซิเดชัน สามารถแบ่งตามกลไกการยับยั้งได้เป็น 3 ชนิด ดังนี้ (Strain and Benzie, 1999)

- | | |
|-------------------------------|---|
| 1. Preventive antioxidant | ป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระ |
| 2. Scavenging antioxidant | ทำลายหรือยับยั้งอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น |
| 3. Chain breaking antioxidant | ทำให้ลูกโซ่ของการเกิดอนุมูลอิสระสิ้นสุดลง |

สารต้านออกซิเดชันในธรรมชาติ ได้แก่

สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds)

สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารที่พบได้ในพืชทั่วไป มีสูตรโครงสร้างทางเคมีเป็นวงแหวนที่มีหมู่ไฮดรอกซิลอย่างน้อยหนึ่งหมู่หรือมากกว่านั้น สามารถละลายน้ำได้ ที่พบในพืชมักจะรวมอยู่ในโมเลกุลของน้ำตาลในรูปของสารประกอบไกลโคไซด์ (glycosides) และพบได้ในส่วนของช่องว่างภายในเซลล์ (cell vacuole) สารประกอบฟีนอลิกที่พบในธรรมชาติมีมากมายหลายชนิด มีลักษณะสูตรโครงสร้างทางเคมีที่แตกต่างกัน ซึ่งกลุ่มใหญ่ที่สุดที่พบจะเป็นสารประกอบฟลาโวนอยด์ (flavonoids) นอกจากนั้นยังมีสารประกอบต่างๆ เช่น simple monocyclic phenol, phenyl propanoid, phenolic quinone และ polyphenolic ซึ่งได้แก่พวก lignin, tannin เป็นต้น รวมทั้งยังพบว่ามีสารประกอบที่มีกลุ่มฟีนอล (phenolic unit) รวมอยู่ในโมเลกุลของโปรตีนอัลคาลอยด์ (alkaloid) และเทอร์พีนอยด์ (terpenoid) เป็นต้น

สารประกอบฟีนอลิกหลายชนิดมีสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชัน เช่น ฟลาโวนอยด์ กรดฟีนอลิก และ แทนนิน เป็นต้น สารประกอบฟีนอลิกทำหน้าที่เป็นตัวจับไล่อนุมูลอิสระที่สำคัญคือ

อนุมูล peroxy โดยมีกลไก 2 แบบคือ เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีความเข้มข้นต่ำเมื่อเทียบกับสารออกซิไดซ์ สารประกอบฟีนอลิกจะป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน นอกจากนี้อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาจะถูกทำให้เป็นสารที่มีความเสถียร ดังนั้นจึงสามารถป้องกันการเกิดชั้นตอนพลอพาเกชัน ได้ นอกจากนี้สารประกอบฟีนอลิกบางชนิดยังทำหน้าที่เป็นสารคีเลต ดักจับไอออนของโลหะเข้าไว้ในโมเลกุล เช่น เคอร์ซีทิน (quercetin)

สารประกอบฟีนอลิกยังทำหน้าที่ทั้งเป็นสารให้อิเล็กตรอน หรือเป็นตัวให้อิโคโนโรเจน และกำจัดออกซิเจนที่อยู่ในรูปแอกทีฟ ด้วยหน้าที่ต่างๆ ดังกล่าวจึงทำให้สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารต้านออกซิเดชัน ที่สำคัญชนิดหนึ่งในพืชทั่วไป

ฟลาโวนอยด์ (ไบโอฟลาโวนอยด์)

พบมากในพืช มีหน้าที่สองอย่าง คือ เป็นรงควัตถุ ทำหน้าที่กรองแสงที่มีความยาวคลื่นที่จำเพาะเจาะจง และทำหน้าที่เป็นสารต้านออกซิเดชัน โดยไปกำจัดอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในเซลล์พืชออกไป และคุณสมบัติของฟลาโวนอยด์ ยังสามารถช่วยลดการอักเสบ ช่วยให้หลอดเลือดแข็งตัว ทำให้การไหลเวียนเลือดดีขึ้น ต่อด้านแบคทีเรียและไวรัส ลดโคเลสเตอรอล และช่วยเสริมการทำงานของวิตามินซี พบได้ในพืชหลายชนิด เช่น ส้ม พริกไทย และพริกเบอร์รี่ต่างๆ เป็นต้น ฟลาโวนอยด์แบ่งได้เป็น 5 ประเภทใหญ่ๆ (รุ่งนภา, อุดมรัตน์, 2547)

1. แอนโทไซยานิดิน (anthocyanidin) เป็นรงควัตถุในพืชให้สีน้ำเงินแดง(red-blue) คือ ให้สีช่วงสีแดงถึงสีน้ำเงินขึ้นกับชนิดของพืช พบใน บลูเบอร์รี่ เชอร์รี่ องุ่นแดง หัวหอม กะหล่ำปลี เป็นต้น แอนโทคัลอรอส เป็นรงควัตถุที่ให้สีเหลือง พบมากในดอกไม้

2. ฟลาโวนอยด์ที่พบน้อย (minor flavonoid) ฟลาโวนอยด์ที่พบน้อยในธรรมชาติ ได้แก่ ฟลาโวนอน (flavonones) ฟลาโวน-3-อล (flava-3-ols) ไดไฮโดรฟลาโวน (dihydroflavone) และไดไฮโดรชาลโคน (dihydrochalcones) กลุ่มนี้พบในพืชตระกูลส้ม (citrus) ได้แก่ ส้ม องุ่น แต่จะพบในส่วนที่เป็นน้ำ

3. ฟลาโวน (flavone) และฟลาโวนอล (flavonols) เป็นกลุ่มที่พบบ่อยที่สุดของฟลาโวนอยด์ พบในบลูเบอร์รี่ เชอร์รี่หวาน บลอคคอลลี หัวหอม ซาด้า ซาเซียว ไวน์แดง มันฝรั่ง มะเขือเทศ แครอท ผักขม ส้ม ลูกแพร แอปเปิ้ล องุ่น เป็นต้น

4. ไอโซฟลาโวนอยด์ (isoflavonoid) พบมากในพืชตระกูลถั่ว (Leguminosae; Legume) พวกนี้สามารถเปลี่ยนเป็นไอโซฟลาโวน (isoflavone) เทอโรคาร์แปนส์ (terocarpans) ไอโซฟลาโวน

(isoflavans) และโรทีนอยด์ (rotenoid) ได้ โดยทั่วไปจะรวมถึง เจนิสทิน (genistein) ไบโอชานิน เอ (biochanin a) และไดด์ซีน (daidzein)

5. **แทนนิน (Tannin)** หรือ โพรแอนโทไซยานิดิน เป็นสารประเภทโพลีฟีนอล (polyphenols) สามารถเพิ่มค่าแอนติออกซิแดนซ์ แอคทีวิตี เนื่องจากสามารถจับกับโปรตีนได้

วิตามินเอ

ในธรรมชาติวิตามินเอจะพบเฉพาะในสัตว์เท่านั้น แต่ในพืชจะมีสารประกอบแคโรทีนอยด์ที่สามารถเปลี่ยนเป็นวิตามินเอได้ จัดเป็น Precursor ของวิตามินเอ เรียกว่า โปรวิตามินเอ มักพบในพืชผักใบเขียว ผักและผลไม้ที่มีสีเหลือง หรือสีส้มแดง

วิตามินซี

มีชื่อทางเคมีว่า กรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid) เป็นวิตามินที่ละลายได้ในน้ำ จะสลายตัวเมื่อถูกความร้อนหรือหากทิ้งไว้ในอากาศที่มีความชื้นนานๆ วิตามินซีมีสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชัน โดยจะเข้าทำปฏิกิริยากับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ อนุมูล hydroxyl และอนุมูล peroxy นอกจากวิตามินซีสามารถเข้าทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระแล้ว ยังทำหน้าที่เป็นตัวส่งเสริมประสิทธิภาพของสารต้านออกซิเดชัน ของวิตามินอีด้วย โดยทำให้อนุมูล α -tocopherol^{*} (TO^{*}) เปลี่ยนกลับไปเป็น α -tocopherol (TOH) ดังเดิม ดังสมการ



วิตามินอี

เป็นวิตามินที่ละลายได้ในไขมันเป็นสารต้านออกซิเดชัน ที่สำคัญ โดยวิตามินอีทำงานร่วมกับสารต้านออกซิเดชัน ตัวอื่นๆ เช่น วิตามินซีและซิลิเนียมเป็นต้น วิตามินอีช่วยปรับให้ร่างกายสามารถนำเอาวิตามินเอมาใช้ ซึ่งจะช่วยในการป้องกันสารที่เป็นพิษที่มีผลมาจากโลหะ เช่น ตะกั่ว ในธรรมชาติมีวิตามินอีอยู่หลายชนิด ปัจจุบันแบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ โทโคฟีรอล และ โทโคโทอินอล แต่ละกลุ่มยังแยกเป็นวิตามินย่อยๆ อีก 4 ชนิด ได้แก่ อัลฟา (α) เบต้า (β) แกมมา (γ) และเดลต้า (δ -) วิตามินอีทำหน้าที่เป็นตัวให้ไฮโดรเจนแก่อนุมูล peroxy ดังสมการ



อนุมูล α -tocopherol^{*} ที่เกิดขึ้น สามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูล peroxy! ตัวอื่นทำให้ได้สารที่มีความเสถียร (LOO- α -tocopherol) ดังสมการ เป็นผลให้ปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันหยุดลง



ซิลิเนียม ทองแดง และสังกะสี

เป็นสารต้านออกซิเดชัน ทางอ้อม เนื่องจากเป็นส่วนประกอบของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เป็นสารต้านออกซิเดชัน มีการศึกษาวิจัยที่แสดงว่าการใช้ซิลิเนียม และวิตามินอีร่วมกันช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการป้องกันการเกิดโรคมะเร็งบางชนิด ที่กล่าวมานี้เป็นตัวอย่างของสารต้านออกซิเดชัน ซึ่งพบได้ในอาหารตามธรรมชาติ เนื่องจากสารต้านออกซิเดชัน มีหน้าที่หลายอย่าง เช่น ทำหน้าที่เป็นสารรีดิวซ์ (reducing agent) เป็นตัวจับไล่ออนุมูลอิสระ จับกับไอออนโลหะที่เร่งให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ด้วยหน้าที่ต่างๆเหล่านี้ จึงทำให้มีผลต่อการชะลอหรือยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน หรือสามารถหยุดปฏิกิริยาถูกใจ และทำให้เป็นสารที่มีความเสถียร หรือเป็นสารที่ไม่ทำปฏิกิริยาออกซิเดชันอีกต่อไป หรือเป็นสารที่ไม่ใช่อนุมูลอิสระ (non-radical product)

แคโรทีนอยด์

แคโรทีนอยด์เป็นรงควัตถุที่พบทั่วไปในธรรมชาติ จะถูกสังเคราะห์ขึ้นในคลอโรพลาสต์เป็นปริมาณมากเนื่องจากเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์มีมาก โครงสร้างพื้นฐานของแคโรทีนอยด์ประกอบด้วยโครงสร้างหลักที่เรียกว่า tetraterpene skeleton ซึ่งอาจมีวงแหวนที่บริเวณปลายด้านใดด้านหนึ่งหรือทั้งสองด้านของโมเลกุล วงแหวนนี้อาจเป็นวงแหวนห้าหรือหกเหลี่ยมก็ได้

แคโรทีนอยด์สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ตามองค์ประกอบของโครงสร้างในโมเลกุลดังนี้

แคโรทีน (Carotene) เป็นแคโรทีนอยด์ที่โครงสร้างโมเลกุลประกอบด้วยคาร์บอนและไฮโดรเจนเท่านั้น เช่น เบต้า-แคโรทีน (β -carotene) อัลฟา-แคโรทีน (α -carotene) แกมมา-แคโรทีน (γ -carotene) ไลโคปีน (lycopene) เป็นต้น

เบต้า-แคโรทีน เป็นสารตั้งต้นของวิตามินเอ การเปลี่ยนรูปจากเบต้า-แคโรทีนไปเป็นวิตามินเอโดยการแตกพันธะคู่ที่ตำแหน่งกึ่งกลางของโมเลกุล โดยเอนไซม์ carotene deoxygenase เมื่อเบต้า-แคโรทีน สามารถดักจับอนุมูลอิสระเข้าไปในโมเลกุลแล้ว โมเลกุลของเบต้า-แคโรทีนจะอยู่ในลักษณะที่มีความเสถียร

ออกโซแคโรทีนอยด์ (oxocarotenoid) หรือ แซนโทฟิลล์ (xanthophyll) เป็นแคโรทีนอยด์ที่โครงสร้างโมเลกุลบริเวณวงแหวนประกอบด้วยกลุ่มอื่นนอกเหนือจากคาร์บอนและไฮโดรเจน เช่น เบต้า-คริปโทแซนทิน (β -cryptoxanthin) และลูทีน (lutein)

สารต้านออกซิเดชันสังเคราะห์ (โอภาและคณะ, 2549)

สารต้านออกซิเดชันที่พัฒนาสังเคราะห์ขึ้นส่วนใหญ่จะออกแบบให้มีโมเลกุลขนาดเล็ก และใช้โครงสร้างของสารต้านออกซิเดชัน ที่มีในธรรมชาติ นำมาดัดแปลงให้มีคุณสมบัติทางเคมี และมีฤทธิ์ที่ดีขึ้น เช่นสารต้านออกซิเดชันที่พัฒนาจากสารต้านออกซิเดชันจากธรรมชาติ โดยพัฒนามาจากโครงสร้างของวิตามินอี และโครงสร้างสารโพลีฟีนอล

Trolox (6-Hydroxy-2, 5, 7, 8- tetramethylchroman-2-carboxylic acid)

มีสูตรโมเลกุลทางเคมีคือ $C_{14}H_{18}O_4$ เป็นอนุพันธ์ของวิตามินอีที่ดัดแปลงโครงสร้างโดยการเปลี่ยนสายอัลเคนเป็นหมู่คาร์บอกซิลิก มีสูตรโครงสร้างทำให้มีความสามารถละลายได้ดีในน้ำ แต่เนื่องจากความสามารถในการละลายน้ำได้ดีจึงทำให้การออกฤทธิ์เร็วกว่าวิตามินอี โดยวิตามินอี ต้องใช้เวลานานเป็นชั่วโมงหรือเป็นวัน ในขณะที่ Trolox ออกฤทธิ์เกือบจะทันทีในวิธีการตรวจสอบหลายวิธี ในการวิจัยนิยมใช้ Trolox เป็นสารมาตรฐานในการตรวจสอบกิจกรรมต้านออกซิเดชัน

Gallic acid (3,4,5-hydroxybenzoic acid)

เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีสูตรโมเลกุลทางเคมีคือ $C_7H_6O_5$ Gallic acid เป็นส่วนประกอบของแทนนิน พบมากในองุ่น ใบชา เปลือกไม้โอ๊ค และพืชอื่นๆ โดยทั่วไปจะเกี่ยวข้องกับอุตสาหกรรมทางยา (Reynolds and Wilson, 1991) คุณสมบัติของ Gallic acid คือ สามารถยับยั้งเชื้อรา เชื้อไวรัส และมีคุณสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชันได้ดี

EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid)

มีสูตรโมเลกุลทางเคมีคือ $C_{10}H_{16}N_2O_8$ มีคุณสมบัติเป็นสารคีเลต โดยการจับกับธาตุโลหะที่มีประจุ เช่น ตะกั่ว เหล็ก สังกะสี แคลเซียม แมงกานีส และ ทองแดง ซึ่งประโยชน์ทางการแพทย์สามารถนำมาใช้กำจัดไอออนของโลหะต่างๆได้

เอนไซม์ในการป้องกันและควบคุมปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ (โอภาและคณะ, 2549)

โดยธรรมชาติแล้วจะมีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นในเซลล์และร่างกายหลายชนิด มีทั้งเป็นประโยชน์และโทษอันประกอบด้วย อนุมูลที่หลุดรอดออกมาจากการเผาผลาญออกซิเจนเป็นพลังงานและในระดับเซลล์เอนไซม์เป็นกลไกสำคัญขั้นแรกที่ทำหน้าที่ควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระให้อยู่ในสมดุล เอนไซม์ที่สำคัญได้แก่

1. Superoxides dismutase (SOD)

เอนไซม์ SOD จะทำหน้าที่ขจัดอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในร่างกาย คือ อนุมูลซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน $O_2 \cdot^-$ โดยเร่งปฏิกิริยาคาตาลิซิสในการเปลี่ยน O_2 ให้เป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์



ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะถูกกำจัดโดยเอนไซม์คาร์ตาเลสและเอนไซม์กลูตาไทโอนเปอร์ออกซิเดส ลักษณะสำคัญของเอนไซม์ SOD คือมีโลหะทรานซิชันที่บริเวณที่ใช้จับซับสเตรท ทำหน้าที่ในการออกซิไดส์และรีดิวส์กลับไปมา

2. Catalase (CAT)

เอนไซม์ CAT เป็นเอนไซม์ซึ่งอยู่ในเปอร์ร็อกซิโซมมี ฮีม คือ ferriprotoporphyrin เป็นองค์ประกอบ โครงสร้างเอนไซม์ CAT ประกอบด้วยหน่วยย่อยของโปรตีน ฮีม 4 หน่วยย่อยที่เหมือนกัน แต่ละหน่วยมีขนาด 60 กิโลดัลตัน การจัดเรียงตัวของหน่วยทั้งสี่เป็นแบบเตตระฮีดรัล ดังนั้นเอนไซม์นี้จึงมีฮีมจำนวน 4 กลุ่มต่อ 1 โมเลกุลของเอนไซม์ มีน้ำหนักโมเลกุลรวมเท่ากับ 240 กิโลดัลตัน เอนไซม์ CAT ทำหน้าที่เปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นโมเลกุลของน้ำและออกซิเจน โดยใน 1 นาทีสามารถเปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 1 ล้านโมเลกุลไปเป็นน้ำและออกซิเจน



3. Glutathione (GSH)

กลูตาไทโอนจัดเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในกลุ่มที่มีหมู่ไทออล GSH มีโครงสร้างเป็นเปปไทด์ที่ประกอบด้วยอะมิโน 3 ตัว โดยในร่างกายมีกลูตาไทโอนอยู่ใน 2 รูปแบบ คือ กลูตาไทโอนในรูปรีดิวส์ (GSH) และกลูตาไทโอนในรูปออกซิไดส์ คือ กลูตาไทโอนไดซัลไฟด์ (GSSH)

GSH ละลายน้ำได้ดีมีอยู่ในปริมาณมากในเซลล์ โดยอยู่ที่ไซโตโซลในปริมาณความเข้มข้น 1-11 มิลลิโมลาร์ และอยู่ในนิวเคลียสและไมโทคอนเดรียในปริมาณ 3-15 มิลลิโมลาร์ และ 5-11 มิลลิโมลาร์ตามลำดับ

กลูตาไทโอนมีบทบาทสำคัญในการป้องกันเซลล์จากภาวะถูกออกซิไดส์ดังนี้ คือ

- 1) เป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์หลายชนิดที่ทำหน้าที่กำจัดอนุมูลและการเกิดออกซิเดชัน ได้แก่ เอนไซม์กลูตาไทโอนเปอร์ออกซิเดสและเอนไซม์กลูตาไทโอนทรานซ์เฟอเรส เป็นต้น
- 2) ช่วยในการขนส่งกรดอะมิโนผ่านพลาสมาเมมเบรน
- 3) จัดหรือสลายอนุมูลไฮดรอกซีโดยตรง และเร่งการทำงานของเอนไซม์ในการกำจัดอนุมูล ลิพิดเปอร์ออกไซด์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยตรง
- 4) รีคิวิต อนุมูลวิตามินซีและอนุมูลวิตามินอีให้กลับอยู่ในรูปที่ต้านอนุมูลอิสระ

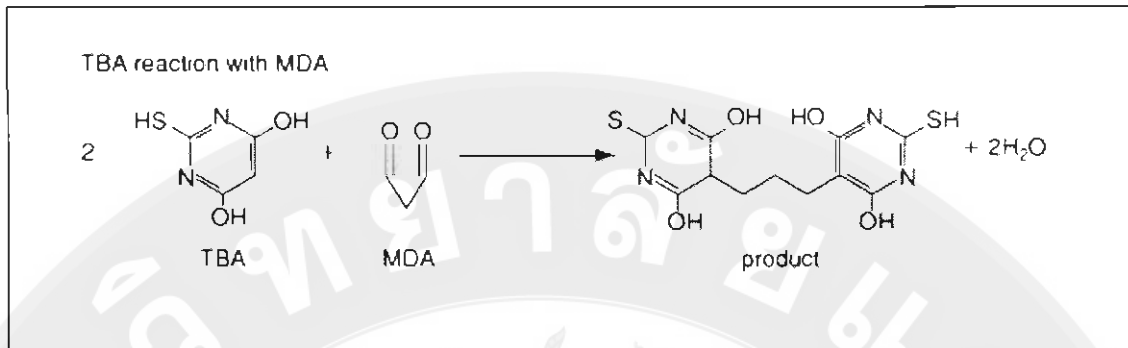
การเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน (Lipid peroxidation)

การศึกษาวิจัยจำนวนมากพบว่า การเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชันและภาวะถูกออกซิไดส์มีบทบาทสำคัญในการเกิดและพัฒนาของโรค หากมีการใช้ปริมาณลิพิดเปอร์ออกซิเดชันที่เกิดขึ้นมากจึงเป็นดัชนีบ่งชี้ถึงภาวะถูกออกซิไดส์ที่มากเกินไปจนผิดปกติ วิธีการวัดหาลิพิดเปอร์ออกซิเดชันที่สามารถวัดได้รวดเร็วที่ง่ายและไม่ซับซ้อน คือ

มาลอนไดอัลดีไฮด์ (Malondialdehyde, MDA)

เป็นวิธีที่หาผลผลิตที่เกิดจากการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชันระดับ MDA เป็นดัชนีที่ใช้อย่างกว้างขวางเพราะการหาปริมาณเป็นวิธีที่ง่ายไม่ซับซ้อน การหาปริมาณ MDA ที่เกิดขึ้น ทำได้โดยการเติมกรดไทโอบาร์บิทูริก ในสภาวะกรด MDA จะทำปฏิกิริยากับกรดไทโอบาร์บิทูริกที่ได้เป็นสารสีเรียกว่า TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) ดังภาพที่ 2

ข้อดีของการหาปริมาณการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชันโดยใช้ปริมาณ MDA เป็นดัชนีชี้วัด คือ ความไม่เฉพาะเจาะจง โดย MDA ไม่เป็นสารเฉพาะที่ได้จากการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน โดยอนุมูล นอกจากนี้ TBARS ที่เกิดจากกรดจากกรดไทโอบาร์บิทูริกเกิดเป็นสารมีสีได้เช่นเดียวกัน ดังนั้น MDA จึงเป็นวิธีการที่ไม่เฉพาะเจาะจง อย่างไรก็ตามเนื่องจากวิธีนี้ทำได้ง่าย สะดวก และไม่ต้องใช้มีอราคาสูง MDA จึงยังคงเป็นที่นิยมใช้เป็นดัชนีชี้วัดภาวะออกซิเดชันของร่างกายและมีการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ให้มีความเจาะจง โดยการวัดแสงฟลูออเรสเซนซ์หรือการใช้เครื่อง LC² หรือ LCMS



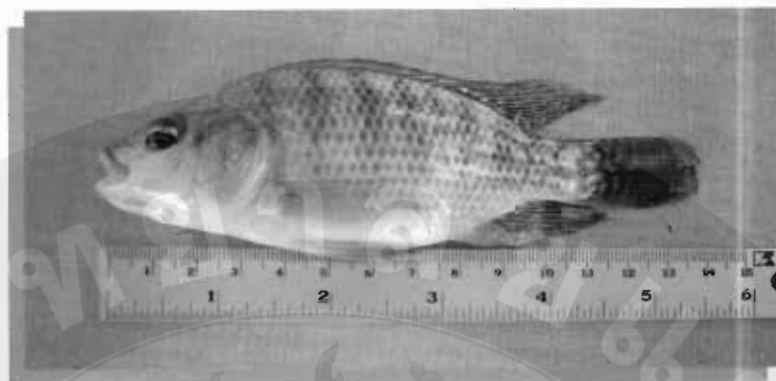
ภาพที่ 2 หลักการเกิด TBARS

ที่มา : <http://www.currentprotocols.com/protocol/ns0717>

ปลานิล (*Oreochromis niloticus*)

ปลานิลเป็นปลาน้ำจืดที่อยู่ในตระกูลซิกลิทิดี (Cichlidae) มีถิ่นกำเนิดเดิมอยู่ที่ทวีปแอฟริกา พบทั่วไปตามหนอง บึง และทะเลสาบ ในประเทศซูดาน ยูกันดา แทนแกนยีกา โดยที่ปลานิลชนิดนี้ เจริญเติบโตเร็วและเลี้ยงง่าย เหมาะสมที่จะนำมาเพาะเลี้ยงในบ่อได้ จึงได้รับความนิยมและเลี้ยงกันอย่างแพร่หลายในภาคพื้นเอเชีย แม้แต่ในสหรัฐอเมริกาก็นิยมเลี้ยงปลานิลชนิดนี้ รูปร่างลักษณะของปลานิลคล้ายกับปลาหมอเทศ แต่ลักษณะพิเศษของปลานิลมีดังนี้คือ ริมฝีปากบนและร่างเสมอกัน ที่บริเวณแก้มมีเกล็ด 4 แถว ตามลำตัวมีลายพาดขวางจำนวน 9 – 10 แถบ นอกจากนั้นลักษณะทั่วไป มีดังนี้ ครีบหลังมีเพียง 1 ครีบ ประกอบด้วยก้านครีบแข็งและก้านครีบอ่อนเป็นจำนวนมาก ครีบกันประกอบด้วยก้านครีบแข็งและอ่อนเช่นกัน มีเกล็ดตามแนวเส้นข้างตัว ลำตัวมีสีเขียวปนน้ำตาล ตรงกลางเกล็ดมีสีเข้ม ที่กระดุกแก้มมีจุดสีเข้มอยู่จุดหนึ่งบริเวณส่วนอ่อนของครีบหลัง ครีบกัน และครีบหางนั้นจะมีจุดสีขาวและสีดำคั่นขวางแลดูคล้ายลายข้าวตอกอยู่โดยทั่วไป (ภาพที่ 3)

ปลานิลเป็นปลาน้ำจืดชนิดหนึ่งที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจสามารถเลี้ยงได้ในทุกสภาพ ใช้เวลาในการเพาะเลี้ยง 6 เดือน – 1 ปี จะสามารถเจริญเติบโตได้ถึงขนาด 600-1,000 กรัม เนื้อปลามีสีขาวรสชาติดี เป็นที่ต้องการของผู้บริโภคกันทั้งในประเทศและต่างประเทศ ขนาดปลานิลที่ตลาดต้องการจะมีน้ำหนักตัวประมาณ 500 – 800 กรัม ปลานิลเลี้ยงง่าย เจริญเติบโตเร็วแต่ปัจจุบันปลานิลพันธุ์แท้ค่อนข้างจะหายาก เพื่อให้ได้ปลานิลพันธุ์ดีกรมประมงจึงได้ดำเนินการปรับปรุงพันธุ์ปลานิลในด้านต่างๆ อาทิ เจริญเติบโตเร็ว ปริมาณความคอกของไข่สูง ให้ผลผลิตเนื้อมาก และมีความต้านทานโรคสูง เป็นต้น



ภาพที่ 3 ปลานิล

ปลานิลมีนิสัยชอบอยู่รวมกันเป็นฝูง (ยกเว้นเวลาสืบพันธุ์) มีความอดทนและปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี จากการศึกษาพบว่า ปลานิลทนต่อความเค็มได้ถึง 20 ส่วนในพันส่วน ทนต่อค่าความเป็นกรด - ด่าง (pH) ได้ดีในช่วง 6.5 - 8.3 และสามารถทนต่ออุณหภูมิได้ถึง 40 องศาเซลเซียส ($^{\circ}\text{C}$) แต่ในอุณหภูมิที่ต่ำกว่า 10°C พบว่าปลานิลปรับตัวและเจริญเติบโตได้ไม่ดีนักทั้งนี้เป็นเพราะถิ่นกำเนิดเดิมของปลาชนิดนี้อยู่ในเขตร้อน

ปลานิลต้องการสารอาหารที่มีโปรตีนสูงกว่าสัตว์บก ซึ่งใช้เป็นแหล่งพลังงาน และการเจริญเติบโต แต่โปรตีนเป็นแหล่งที่ให้พลังงานที่แพงที่สุด อาหารที่ใช้เลี้ยงปลานิลควรมีคุณภาพดี และราคาไม่แพงมาก การนำเอาวัตถุดิบที่แพร่หลายในท้องถิ่นมาใช้จะช่วยลดต้นทุนอาหาร ปลานิลกินอาหารได้หลายรูปแบบ เช่น อาหารธรรมชาติ อาหารผง อาหารเปียก อาหารจม และอาหารเม็ดลอย ปลานิลเป็นปลาที่กินอาหารต่อเนื่องตลอดวัน การย่อยจะเป็นไปอย่างช้า ๆ และจะเสร็จสมบูรณ์ใช้เวลาประมาณ 18-24 ชั่วโมง ดังนั้น การให้อาหารน้อย ๆ แต่ให้บ่อยครั้งจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการใช้อาหารได้มากขึ้น ขนาดอาหารควรให้ตามน้ำหนักของตัวปลา (สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุ์กรรมสัตว์น้ำ, 2540) ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ขนาดของอาหารสำหรับปลานิลขนาดต่าง ๆ

น้ำหนักปลานิล (กรัม)	ขนาดอาหาร (มิลลิเมตร)
1-30	1-2
20-120	2
100-250	3
> 250	4

ที่มา : สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุ์กรรมสัตว์น้ำ, 2540

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การตรวจคัดกรองทางพฤกษเคมี (phytochemical screening)

1.1 เก็บรวบรวมสาหร่าย

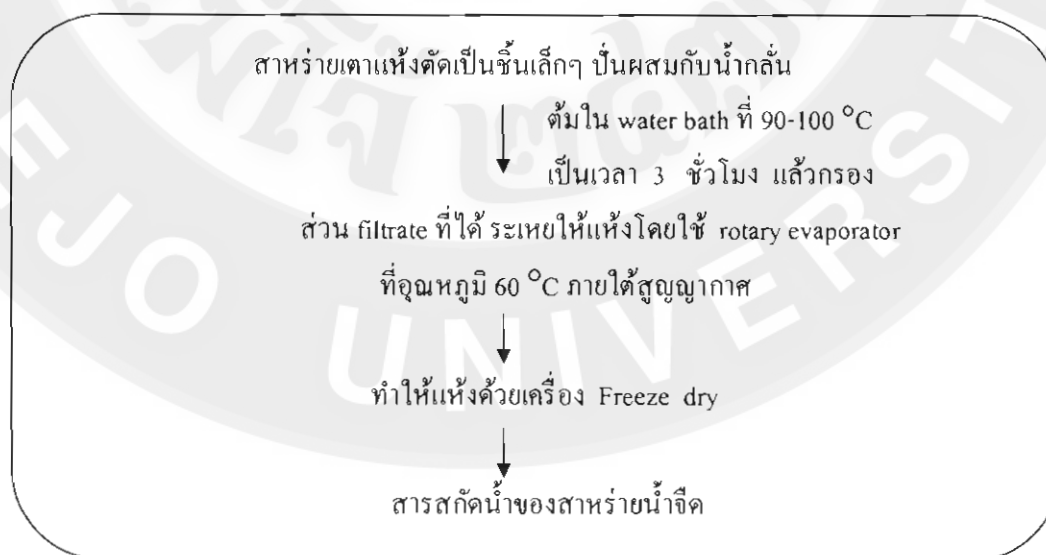
เก็บสาหร่ายเตา จากบ้านนาคูหา ตำบลสวนเขื่อน อำเภอเมือง จังหวัดแพร่ นำสาหร่ายที่เก็บได้มาล้างด้วยน้ำประปาหลายๆครั้งจนสะอาด จากนั้นนำมาผึ่งลมให้มีความเหมาะสมแล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 50 °C จนกว่าสาหร่ายจะแห้ง

1.2 พิสูจน์เอกลักษณ์ของสาหร่าย

โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) ทั้งจากเซลล์ปกติ และเซลล์สืบพันธุ์ รวมถึงที่อยู่อาศัย (habitat) โดยสาหร่ายเตา (*Spirogyra neglecta*) ต้องทำให้เซลล์เกิดความเครียด เพื่อให้สร้างท่อคอนจูเกชัน (conjugation tube) ซึ่งเป็นส่วนสำคัญในการบ่งชี้ชนิด (species) จากนั้นศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ ทำการตรวจสอบกับหนังสือและเอกสารที่เกี่ยวข้อง

1.3 เตรียมสารสกัดน้ำของสาหร่ายเตา

นำสาหร่ายแห้งตัดเป็นชิ้นเล็กๆ บดผสมกับน้ำกลั่นนำไปต้มที่ 90-100 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นกรองเอากากออก ส่วน filtrate ที่ได้ ระเหยให้แห้งโดยใช้ rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 60 °C ภายใต้สุญญากาศทำให้แห้งด้วยเครื่อง Freeze dry เก็บสารสกัดน้ำของสาหร่ายที่ได้ในตู้เย็น 4 °C วิธีการเตรียมสารสกัดน้ำของสาหร่ายน้ำจืด แสดงในภาพที่ 4



ภาพที่ 4 แผนภูมิแสดงวิธีการเตรียมสารสกัดน้ำของสาหร่ายเตา

1.4 การตรวจหาชนิดและปริมาณสารสำคัญในสาหร่ายเตา โดยทำ 3 ซ้ำ

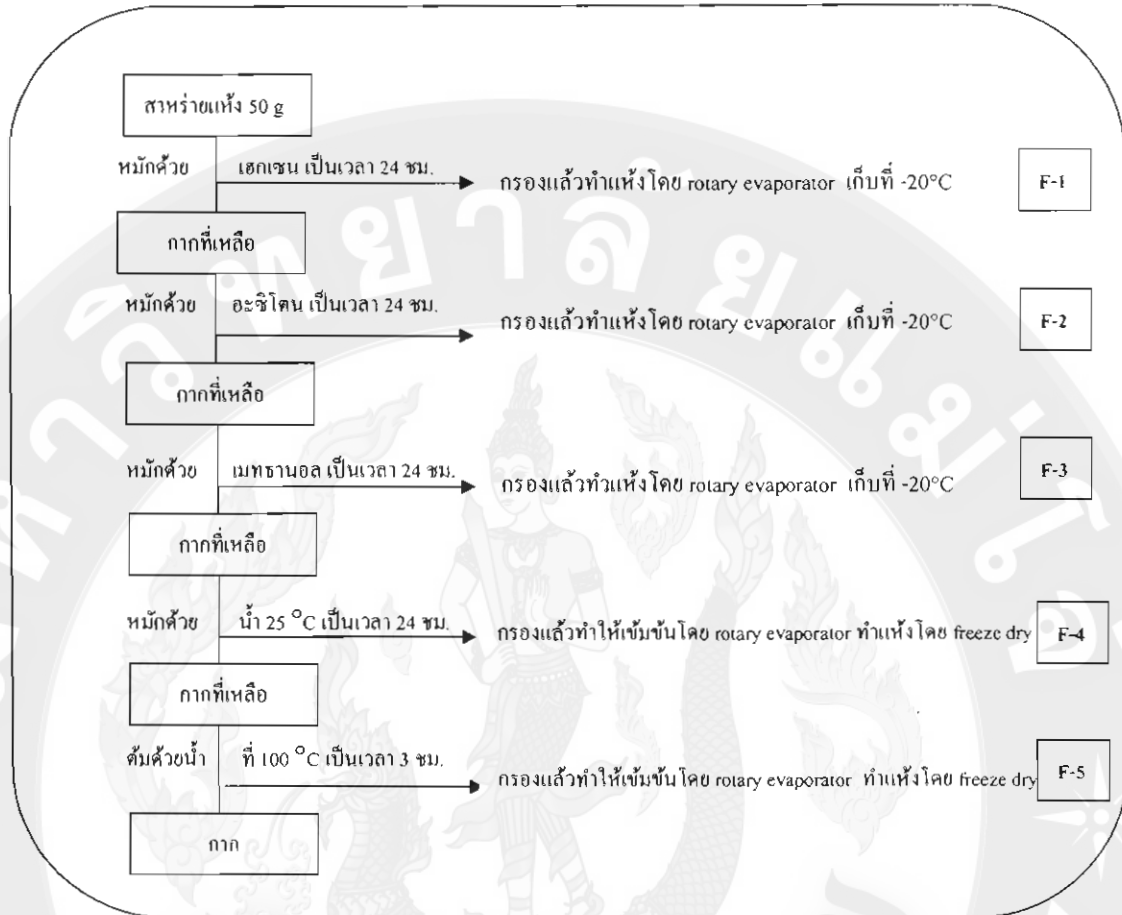
1) การวิเคราะห์ปริมาณโพลีฟีนอล

ตรวจวิเคราะห์ปริมาณของโพลีฟีนอลทั้งหมดในสารสกัดของสาหร่ายสามารถวิเคราะห์ได้โดยใช้สารละลาย Folin-Ciocalteu ตามวิธีการของ Sachindra *et al.* (2010) โดยใช้ตัวอย่างที่ละลายในเมทานอล 0.1 ml ผสมกับ สารละลาย Folin-Ciocalteu ความเข้มข้น 10% ปริมาตร 0.75 ml และนำไปบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 6% ลงไป 0.75 ml ผสมให้เข้ากันและทิ้งไว้ที่ 37°C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดความยาวคลื่นที่ 750 นาโนเมตร คำนวณปริมาณกลุ่มสารประกอบฟีนอลิกโดยเทียบกับ gallic acid ปริมาณของสาร โพลีฟีนอลรายงานผลเป็น gallic acid equivalents (GAE)

2) การวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตและซัลเฟตโพลีแซคคาไรด์

นำตัวอย่างสาหร่ายแห้ง 50 กรัม มาสกัดด้วยเฮกเซน อะซิโตน และเมทานอล เรียงตามลำดับ ใช้ตัวทำละลาย 500 มิลลิลิตร สกัดโดยใช้เครื่อง Soxhlet extractor เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และสกัดซ้ำอีกครั้งด้วยวิธีการเดิม จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ทั้งสองครั้งมารวมกันและกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 2 จากนั้นนำไปทำแห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 40 °C เก็บตัวอย่างที่ได้ในขวดสีชาและเป่าด้วยก๊าซไนโตรเจน จากนั้นนำไปแช่ที่ -20 °C จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์ กากที่เหลือนำไปสกัดต่อด้วยน้ำ ในอัตราส่วนสาหร่าย:น้ำ เท่ากับ 1: 50 ที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นกรองตัวอย่างและสกัดกากที่เหลือด้วยวิธีการเดียวกันอีกครั้งหนึ่ง นำสารละลายที่ได้ทั้งสองครั้งมารวมกัน และนำไปทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 40 °C และนำไปทำแห้งด้วย freeze dryer กากที่เหลือจากขั้นตอนนี้นำไปสกัดต่อโดยการต้มในขวดก้นกลมขนาด 2 ลิตร ที่ต่อด้วย condenser เป็นเวลา 3 ชั่วโมง กรองแยกสารละลายที่ได้ นำไปทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 40 °C และนำไปทำแห้งด้วย freeze dryer การสกัด F1-F3 เป็นขั้นตอนที่ใช้ในการสกัดสีออกจากสาหร่าย ส่วน F4-F5 เป็นวิธีที่ใช้ในการสกัดโพลีแซคคาไรด์ โดยสารที่ได้จะมีลักษณะต่างกันโดยเฉพาะในเรื่องของ molecular weight และปริมาณซัลเฟต ขั้นตอนการสกัดแบบลำดับส่วนแสดงในภาพที่ 5

ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณของ total carbohydrate ใช้วิธีการ phenol-sulfuric acid โดย ใช้ D-glucose เป็นสารมาตรฐาน (Dubolis *et al.*, 1956) ส่วนการตรวจวิเคราะห์ปริมาณของซัลเฟตของสารสกัดใช้วิธีการ BaCl₂-Gelatin turbidimetric (Craigie and Wen, 1984) โดยใช้ K₂SO₄ เป็นสารมาตรฐาน



ภาพที่ 5 แสดงวิธีการสกัดลำดับส่วนของสาหร่ายเตา

2. การศึกษาผลของสาหร่ายเตาต่อระบบต้านอนุมูลอิสระในปลานิล

2.1 การเตรียมสาหร่ายเตา

นำสาหร่ายเตามาพิสูจน์เอกลักษณ์ (identification) และเก็บรวบรวมให้เพียงพอต่อการวิจัย โดยนำสาหร่ายเตาสดที่เก็บมาได้มาล้างด้วยน้ำประปาหลายๆ ครั้งจนสะอาด จากนั้นนำมาผึ่งลมให้มีความหมาดพอสมควร แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 50°C จนกว่าสาหร่ายจะแห้ง จากนั้นนำสาหร่ายเตาแห้งไปบดให้ละเอียดเพื่อเตรียมผสมในอาหารปลาต่อไป

2.2 การเตรียมอาหารปลานิล

เตรียมอาหารสำเร็จรูปที่ผสมสาหร่ายเตา 3 ขนาดคือ 2.5, 5 และ 10% ซึ่งประกอบด้วย ปลาป่น กากถั่วเหลือง ปลาขี้ขาว รำข้าว และสาหร่ายเตา โดยมีปริมาณ โปรตีน 30 % อัตราอาหารที่ให้ตลอดการทดลอง 3 % ของน้ำหนักตัว/วัน วันละ 2 ครั้ง (09.00-10.00 น. และ 15.00-16.00 น.)

2.3 การเตรียมปลานิล (ดำเนินการในปีที่ 2)

ปลานิลอายุประมาณ 2 เดือนที่มีขนาดใกล้เคียงกันประมาณ 80-100 กรัม จากคณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่ อัตราการปล่อย 50 ตัว/ตารางเมตร โดยนำปลามาพักให้ปรับตัวในกระชังก่อน และให้อาหารสำเร็จรูปชนิดปลากินพืชเป็นเวลาอย่างน้อย 7-14 วัน

2.4 ศึกษาผลของสาหร่ายเตาต่อการเจริญเติบโตของปลานิล (ดำเนินการในปีที่ 2)

โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) แบ่งการทดลองเป็น 4 หน่วยการทดลองๆ ละ 3 ซ้ำ

หน่วยการทดลองที่ 1	อาหารที่มีสาหร่ายเตาเป็นส่วนผสม	0	เปอร์เซ็นต์
หน่วยการทดลองที่ 2	อาหารที่มีสาหร่ายเตาเป็นส่วนผสม	2.5	เปอร์เซ็นต์
หน่วยการทดลองที่ 3	อาหารที่มีสาหร่ายเตาเป็นส่วนผสม	5	เปอร์เซ็นต์
หน่วยการทดลองที่ 4	อาหารที่มีสาหร่ายเตาเป็นส่วนผสม	10	เปอร์เซ็นต์

ทำการตรวจการเจริญเติบโตเช่น น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นต่อวัน อัตราการเจริญเติบโตต่อวัน อัตราการแลกเนื้อ จากแต่ละหน่วยการทดลองทุก 2-4 สัปดาห์ และเลี้ยงนานไม่น้อยกว่า 12 สัปดาห์

การคำนวณการเจริญเติบโต

$$\begin{aligned} \text{น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น} &= \text{น้ำหนักสิ้นสุดการทดลอง} - \text{น้ำหนักเริ่มต้น} \\ \text{น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นต่อวัน} &= \frac{\text{น้ำหนักสิ้นสุดการทดลอง} - \text{น้ำหนักเริ่มต้น}}{\text{ระยะเวลาเลี้ยง}} \\ \text{อัตราการเจริญเติบโตต่อวัน (ADG)} &= \frac{\text{น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น}}{\text{จำนวนวัน}} \\ \text{อัตราการแลกเนื้อ (FCR)} &= \frac{\text{น้ำหนักของอาหารที่ปลากิน}}{\text{น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น}} \end{aligned}$$

2.5 ศึกษาผลของสาหร่ายเตาต่อระบบต้านอนุมูลอิสระในปลานิล (ดำเนินการในปีที่ 2)

โดยสุ่มเก็บตัวอย่างเลือด และเก็บตัวอย่างอวัยวะได้แก่ ตับ เพื่อวัดระดับ Malondialdehyde (MDA) ที่บ่งบอกภาวะ oxidative stress วัดเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ catalase (CAT), glutathione (GSH), superoxide dismutase (SOD) จากแต่ละหน่วยการทดลองทุก 4-8 สัปดาห์

วิธีการเก็บเลือด (ดำเนินการในปีที่ 2)

1) การเก็บเลือดเพื่อหาปริมาณ Malondialdehyde (MDA)

เก็บตัวอย่างเลือดปลาที่เส้นเลือดบริเวณเหงือกหรือตำแหน่งบริเวณกระดูกสันหลังมา 100 – 150 ไมโครลิตร โดยใส่ในหลอดที่มี EDTA นำเลือดที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 g เป็นเวลา 1 นาทีที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นดูดส่วนที่เป็น supernatant ไปใส่ใน new trip แล้วนำไปเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส (°C) เพื่อรอการวิเคราะห์ต่อไป

2) การเก็บเลือดเพื่อหาปริมาณของ GSH

เก็บตัวอย่างเลือดปลาที่เส้นเลือดบริเวณเหงือกหรือตำแหน่งบริเวณกระดูกสันหลังมา 100 – 150 ไมโครลิตร โดยใส่ในหลอดที่มี EDTA นำเลือดที่ได้ปั่นที่ความเร็ว 1,000 g ที่ 4 °C 10 นาที เก็บส่วน supernatant เป็น plasma lysate 100 ul ใส่ใน microcentrifuge tube แล้ว แล้วเติม สารละลาย metaphosphoric acid (MPA) 100 ul กลับหลอดไปมาเพื่อผสมให้เข้ากัน แล้วนำไป vortex บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 g เป็นเวลา 4 นาทีที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเก็บส่วน supernatant เป็น plasma และ erythrocyte lysate ที่ -20 °C เพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไป

3) การเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อหาปริมาณของ CAT และ SOD

เก็บส่วนกลาง (middle part) จากข้อ 2 ที่เป็น erythrocytes (red blood cells) ที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงมา 200 ul ใส่ใน microcentrifuge tube อันใหม่ และเติม HPLC water grade ในอัตราส่วน 1:5 (~ 800 ul) นำไปปั่นที่ความเร็ว 10,000 g ที่ 4 °C 10 นาที ดูดส่วนบนของเลือดที่ปั่นแล้วมา 200 ul และใส่ MPA เข้าไปอีก 200 ul นำไป vortex บ่มที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 g เป็นเวลา 4 นาทีที่อุณหภูมิห้อง เก็บส่วน supernatant เป็น plasma และ erythrocyte lysate ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไป

วิธีเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อเพื่อวิเคราะห์เอนไซม์ (ดำเนินการในปีที่ 2)

เมื่อแยกตับและไตของปลาออกมาแล้ว ให้ทำการชั่งน้ำหนักชิ้นเนื้ออย่างละ 0.04 กรัมใน 400 ul ของ fresh Lytic buffer ที่มี protease inhibitor แล้ว homogenate tissue ประมาณ 20 strokes นำ lysed sample ไป centrifuge ที่ 1,600 g 4°C 10 นาที เก็บ supernatant ทั้งหมด ที่ -20 °C (days) หรือ -80 °C (months) ก่อนนำไปทำ MDA-TBAR assay ส่วนตับและไตที่ตัดแล้วนำไปแช่ในไนโตรเจนเหลวเพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์แล้วนำไปเก็บที่ -80 °C เพื่อนำไปตรวจการ แสดงออกของเอนไซม์ที่ด้านอนุโมลิสระยะต่อไป

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ข้อมูลทั้งหมดจะแสดงในรูปของ $\text{mean} \pm \text{SE}$ เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองโดยใช้สถิติ One way ANOVA ตามด้วย post hoc test วิธีของ Tukey ด้วยโปรแกรม SPSS ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$

ระยะเวลาทำการวิจัย และแผนการดำเนินงาน

ตารางที่ 4 แผนการดำเนินงานตลอดโครงการวิจัยในปีที่ 1

งานที่ปฏิบัติ	ปีที่ 1					
	เดือนที่					
	1-2	3-4	5-6	7-8	9-10	11-12
1. เตรียมวัสดุ/วัตถุดิบต่างๆและเครื่องมือที่ใช้	←→					
2. เตรียมส่วนสกัดสำหรับเรา		←→				
3. ตรวจสอบกลุ่มสารสำคัญในสารเรา			←→			
4. เตรียมอาหารสำเร็จรูปที่ผสมสารเราแห้ง				←→	←→	
5. เขียนรายงานประเมินผลปีที่ 1						←→

สถานที่ทำการวิจัย

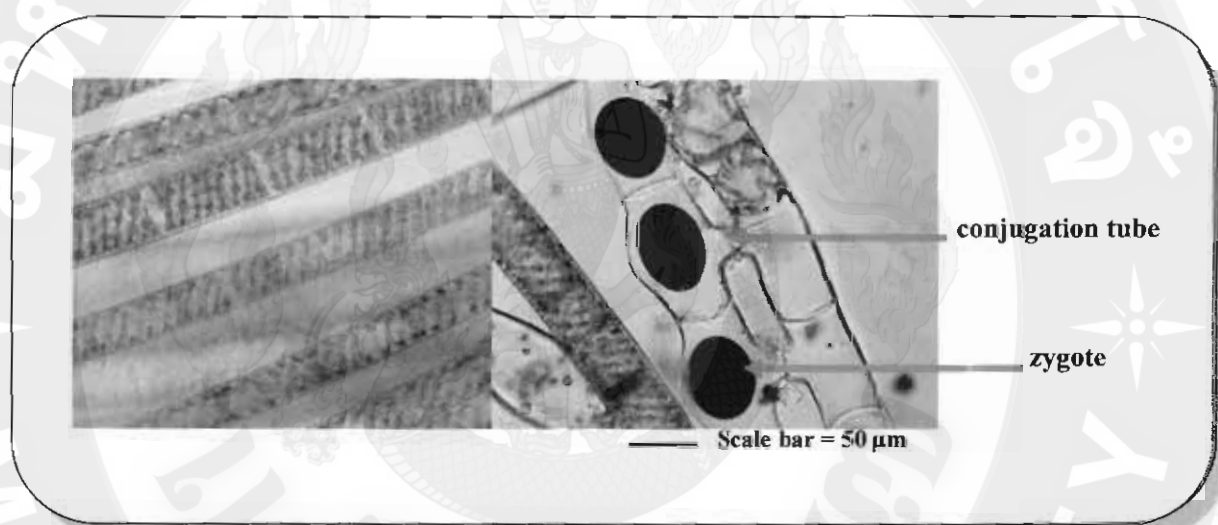
- 1) คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้
- 2) ภาควิชาสัตววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่

บทที่ 4

ผลการวิจัย

1. การพิสูจน์เอกลักษณ์ชนิดของสาหร่ายเตา

สาหร่ายที่นำมาทดลองคือ *Spirogyra neglecta* (Hassall) Kützing โดยได้ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์จาก รองศาสตราจารย์ ดร.ยุวดี พิรพรพิศาล หัวหน้าห้องปฏิบัติการวิจัยสาหร่ายประยุกต์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่



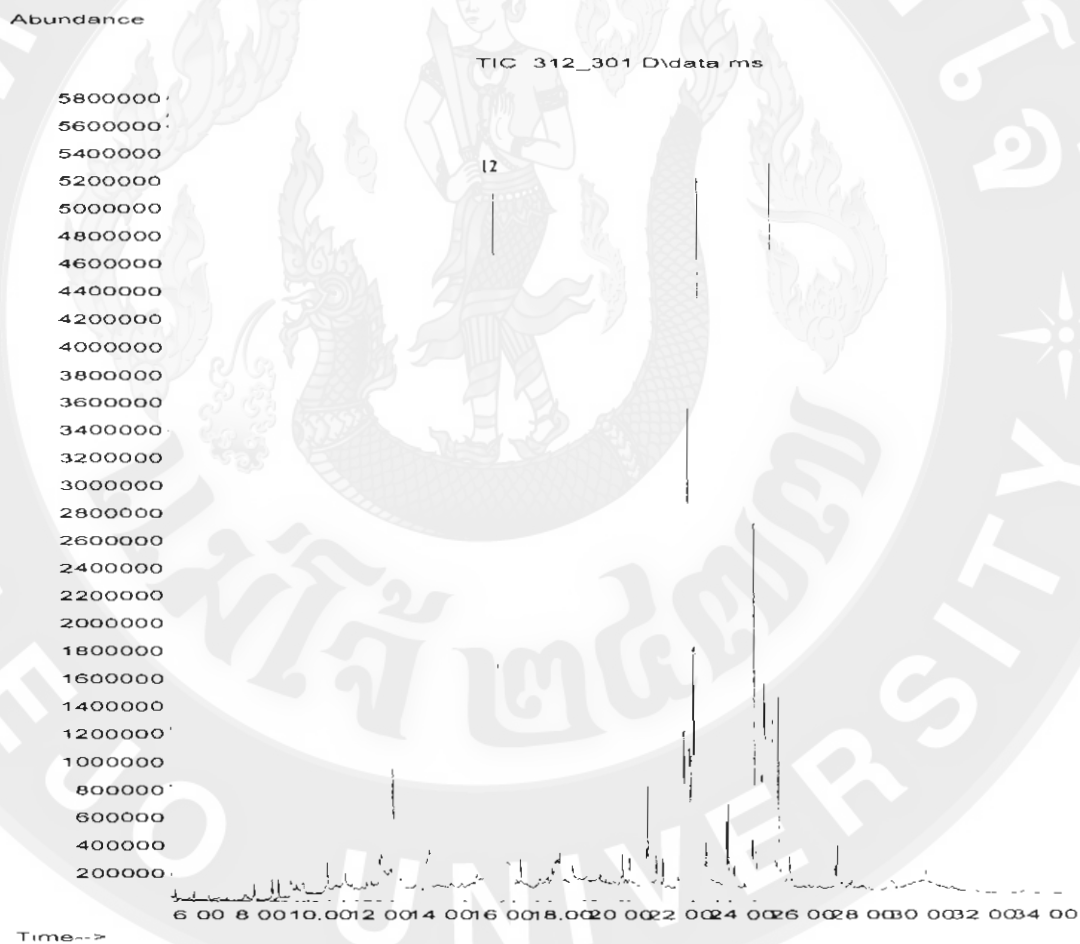
ภาพที่ 6 ภาพถ่ายภาพได้กล้องจุลทรรศน์

สาหร่ายเตาชนิด *Spirogyra neglecta* (Hassall) Kützing เป็นสาหร่ายสีเขียวที่มีลักษณะเป็นเส้นสายไม่แตกแขนง มีสีเขียวสด ขนาดของเซลล์คือ กว้าง 50-67 μm ยาว 100-300 μm ผนังระหว่างเซลล์เป็นแบบระนาบ (end wall plane) มีคลอโรพลาสต์ 3-4 เส้น จำนวนของรอบหมุนเป็นเกลียวของคลอโรพลาสต์เท่ากับ 1.5-3.5 รอบต่อเซลล์ ลักษณะของการคอนจูเกชันเป็นแบบ ladder-like ท่อคอนจูเกชันสร้างมาจากเส้นสายทั้งสองมาเชื่อมกัน ลักษณะของไซโกสปอร์มีขนาดความกว้าง ประมาณ 54-64 μm ความยาวประมาณ 75-100 μm รูปร่างเป็นรูปไข่ ผนังชั้นนอกบางและเรียบ มีสีน้ำตาลเข้ม ภาพที่ 6 เป็นภาพถ่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่แสดงลักษณะเฉพาะของสาหร่ายเตาชนิดนี้

2. การตรวจคัดกรองทางพฤกษเคมี (phytochemical screening)

จากการเตรียมสารสกัดน้ำสำหรับยาโดยการต้มสำหรับยาแห้งในน้ำร้อนเป็นเวลา 3 ชม. พบว่า สำหรับยาแห้ง 100 กรัม ทำเป็นสารสกัดน้ำของสำหรับยาได้ 32.33 กรัม (yield ของสารสกัดน้ำของสำหรับยาเท่ากับ 32.33%) โดยสำหรับยาแห้ง 100 กรัม ได้มาจากสำหรับยาสดประมาณ 1 กก.

2.1 การทำ GC-MS (Gas-chromatography-Mass spectrometry)



ภาพที่ 7 Fingerprint ของส่วนสกัดน้ำของสำหรับยา

องค์ประกอบทางเคมีของส่วนสกัดน้ำของสาหร่ายเตาที่ได้จากการทำ GC-MS ในครั้งนี้พบว่า มีองค์ประกอบของสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพใน peak 12 คือ 1,2,3-benzenetriol (ภาพที่ 7) ซึ่งเป็นสารกลุ่มฟีนอลิกที่มีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

2.2 การตรวจสอบหาสารสำคัญในสาหร่ายเตา

ทำการตรวจปริมาณโพลีฟีนอลในสารสกัดน้ำสาหร่ายเตาพบว่า สารสกัดน้ำของสาหร่ายเตา 1 กรัมมีปริมาณโพลีฟีนอล 115.06 มิลลิกรัม (มก.) เมื่อเทียบกับปริมาณ gallic acid ในปริมาณ 1 มก. ส่วนสาหร่ายเตาแห้ง 1 กรัมมีปริมาณโพลีฟีนอล 10.45 มก. เมื่อเทียบกับปริมาณ gallic acid ในปริมาณ 1 มก.

จากตารางที่ 5 แสดงปริมาณ % yield โพลีฟีนอล (phenolic compound) carbohydrate และ sulfate content จากการสกัดลำดับส่วนของสาหร่ายเตา พบว่า fraction 3 (F3) ส่วนสกัดเมทานอล มีปริมาณ yield มากที่สุด รองลงมาคือ fraction 5 (F5) สารที่พบในสาหร่ายเตาส่วนใหญ่เป็น carbohydrate โดยพบในส่วนสกัดน้ำร้อน (F5) และน้ำเย็น (F4) มีปริมาณ 31-39% ส่วนปริมาณ sulfate content ใน F5 มีปริมาณ 15% ส่วน F4 พบน้อยมาก (0.94%)

ตารางที่ 5 ปริมาณ carbohydrate และ sulfate content จากการสกัดลำดับส่วนของสาหร่ายเตา

Fraction	% yield	phenolic compound (mgGAE/g extract)	% carbohydrate	% sulfate content
Hexane: F1	2.26	168.92 ± 19.66	-	-
Acetone: F2	2.41	224.15 ± 27.25	-	-
MeOH: F3	21.11	56.34 ± 1.66	-	-
CW (25°C): F4	4.03	27.51 ± 0.85	30.84 ± 1.40	14.70 ± 0.64
HW (100°C): F5	11.62	115.06 ± 1.77	38.86 ± 4.66	0.94 ± 0.02

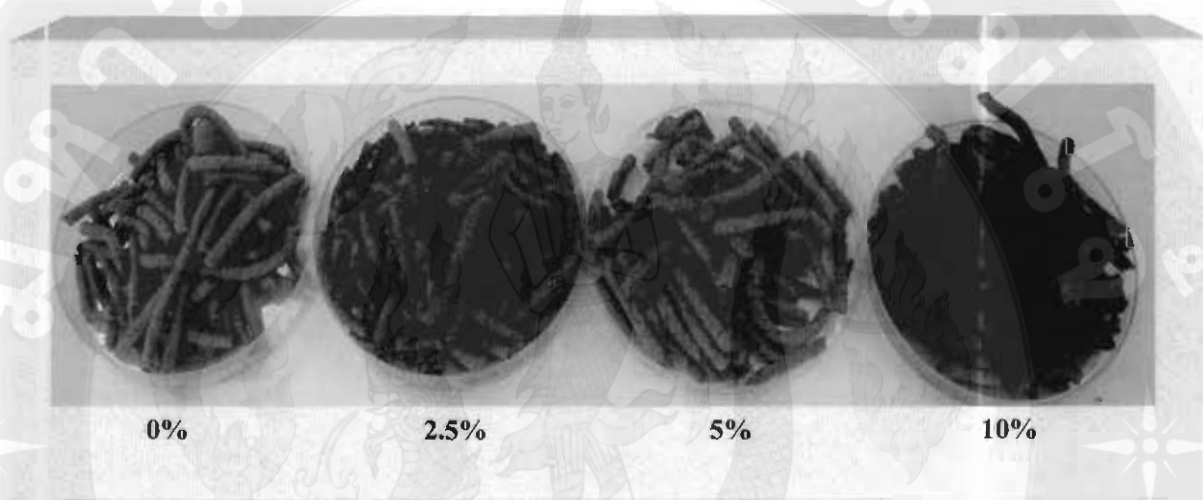
ค่าที่แสดงเป็นค่า Mean ± SE (n=3)

ปริมาณ carbohydrate และ sulfate content วิเคราะห์เฉพาะ CW และ HW

mgGAE/g extract หมายถึง สารสกัดสาหร่ายเตา 1 กรัมมีปริมาณโพลีฟีนอลเมื่อเทียบกับปริมาณ gallic acid 1 มิลลิกรัม

3. การเตรียมอาหารปลานิล

เตรียมอาหารเม็ดผสมสาหร่ายเตา 3 ขนาดคือ 2.5, 5 และ 10% ซึ่งประกอบด้วย ปลาป่น กากถั่วเหลือง ปลาขี้ขาว รำข้าว และสาหร่ายเตา โดยมีปริมาณโปรตีน 30 % จากภาพที่ 8 แสดงลักษณะของอาหารเม็ดผสมสาหร่ายเตาในระดับต่างกัน



ภาพที่ 8 อาหารเม็ดผสมสาหร่ายเตา 4 สูตร

บทที่ 5

สรุปผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

สาหร่ายเตาที่นำมาศึกษาคือ *Spirogyra neglecta* (Hassall) Kützing และาตรวจพบกลุ่มสารสำคัญที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพคือ สารกลุ่มฟีโนลิกซึ่งมีมากเป็นกลุ่มหลัก และมีสารกลุ่มซัลเฟต โพลีแซคคาร์ไรด์ในปริมาณเล็กน้อย โดยสารทั้ง 2 กลุ่มนี้มีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงนำสาหร่ายเตามาเสริมในอาหารเม็ดสำหรับเลี้ยงปลานิล โดยจะดำเนินการวิจัยในปีที่ 2 เพื่อช่วยส่งเสริมสุขภาพของปลาให้ดีขึ้น เนื่องจากสาหร่ายเตามีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งจะช่วยให้ปลามีภูมิคุ้มกันที่ดี และทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ ทำให้ปลาไม่เป็นโรครง่าย เจริญเติบโตเร็ว และมีอัตราการรอดสูง ทำให้ได้ผลผลิตปลาที่มีคุณภาพซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการเพิ่มผลผลิตให้กับเกษตรกรผู้เลี้ยงปลาได้เป็นอย่างดี

ในการนำสาหร่ายเตามาเป็นส่วนผสมของอาหารปลานอกจากจะเป็นการทำให้เกิดคุณค่าเพิ่ม (Value Creation) ให้กับเกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงสาหร่ายโดยตรงแล้ว ยังช่วยเพิ่มผลผลิตเชิงพาณิชย์และเพิ่มศักยภาพในการแข่งขันได้เป็นอย่างดีให้กับเกษตรกรผู้เลี้ยงปลานิลอีกด้วย หากผลการทดลองในปีที่ 2 เป็นไปตามที่ตั้งสมมติฐานไว้

เอกสารอ้างอิง

- Current protocols. Measurement of Oxygen Radicals and Lipid Peroxidation in Neural Tissues (ออนไลน์). สืบค้นจาก : <http://www.currentprotocols.com/protocol/ns0717> [5 สิงหาคม 2554]
- Peerapompisal Y., Kanjanapothi, D, Taesotikul, T., Amornlerdpison D. 2009. Potential of some freshwater algae in Northern Thailand as nutraceutical. *Phycologia* 48(4) Suppl: 104.
- van der Oost, R., Beyer, J., & Vermeulen, N. P. E. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13, 57–149.
- กรมประมง (2553). ยุทธศาสตร์การพัฒนาปลานิล (พ.ศ. 2553-2557) (ออนไลน์). สืบค้นจาก : www.fisheries.go.th/freshwater/web3/images/download/yutasat.pdf [5 สิงหาคม 2554]
- กาญจนกาชณี ลีวมนมต. 2527. สาหร่าย. คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- จงกล พรหมยะ. 2552. การเพาะเลี้ยงสาหร่าย. คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้.
- บุวดี พีรพรพิศาล ดวงพร อมรเลิศพิศาล ดวงตา กาญจนโพธิ์ ธวัช เต๋โตธิกุล ญาณี พงษ์ไพบูลย์ และสุดาพร ตงศิริ. 2552. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์โครงการ “ศึกษาของสาหร่ายน้ำจืดขนาดใหญ่ในการเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารและเวชสำอาง” สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) 62 หน้า.
- บุวดี พีรพรพิศาล, สนิท มกรแก้วเกตุ, อิศรพงษ์ พงษ์ศิริกุล, ดวงพร อมรเลิศพิศาล, จีรพร เพกเกาะ, สุดาพร ตงศิริ. และคณะ. 2549. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์โครงการ “ศึกษาของสาหร่ายน้ำจืดขนาดใหญ่ในการนำมาเป็นอาหารและยา” สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.). 189 หน้า.
- โอภา วัชรคุปต์ ปรีชา บุญจุง จันทนา บุญชะรัตน์ และมาลีนีย์ อัดดีสินทอง. 2549. สารต้านอนุมูลอิสระ. พี.เอส.พรินท์. กรุงเทพฯ.