รายงานผลการวิจัย

เรื่อง ผลของสาหร่ายเตาต่อระบบต้านอนุมูลอิสระและเอนไซม์กำจัดสารพิษในปลานิล

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

โครงการย่อยภายใต้ชุดโครงการ : การพัฒนาระบบการผลิตปลานิลเพื่อเข้าสู่มาตรฐานการส่งออก

ได้รับการจัดสรรงบประมาณวิจัย ประจำปี 2555

จำนวน 235,000 บาท

หัวหน้าโครงการ อาจารย์ ดร.ดวงพร อมรเลิศพิศาล

ผู้ร่วมโครงการ อาจารย์ ดร.ชุติมา ศรีมะเริง

อาจารย์ ดร.สุดาพร ตงศิริ

รองศาสตราจารย์ ดร. เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน

งานวิจัยเสร็จสิ้นสมบูรณ์

9 ตุลาคม 2555

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลงได้ด้วยความอนุเคราะห์และความร่วมมือจากหลายฝ่ายด้วยกัน ซึ่งทางคณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณทุกท่านไว้ดังนี้

สำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ และสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ที่ให้การสนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัยในครั้งนี้ เป็นเวลา 2 ปี

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ช่วยเป็นนักวิจัยพี่เลี้ยงคอยให้คำแนะนำวิธีการดำเนินวิจัยรวมทั้งอนุเคราะห์สถานที่ในการทำงานวิจัย ณ ฐานเรียนรู้ปลาบึกแบบบูรณาการ ขอบคุณ นายธีระวัฒน์ รัดนพจน์ และนางสาวรัตนาภรณ์ จันทร์ทิพย์ นักศึกษาปริญญาโทจากคณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ และคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ที่ช่วยงานวิจัยนี้ตลอดโครงการ ขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้การสนับสนุนอุปกรณ์ วิธีการวิเคราะห์ทางชีวเคมี ซึ่งเป็นเครือข่ายงานวิจัยที่คอยสนับสนุนและให้กำลังใจมาโดยตลอด

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณคณาจารย์ และเจ้าหน้าที่ คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ได้ให้การสนับสนุนอนุเคราะห์สถานที่ และอำนวยความสะดวกในการทำงานวิจัยตลอดระยะเวลา 2 ปี จนงานสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

คณะผู้วิจัย

สารบัญ

หน้า

สารบัญตาราง	ข
สารบัญภาพ	ค
บทคัดย่อ	จ
Abstract	ฉ
บทนำ	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
การตรวจเอกสาร	3
อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย	18
ผลการวิจัย	28
วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง	45
ข้อเสนอแนะ	49
เอกสารอ้างอิง	50
ภาคผนวก	54

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 คุณค่าทางอาหารของ *Spirogyra* sp. ที่พบในบริเวณภาคเหนือของประเทศไทย 4
ตารางที่ 2 อนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้อง 6
ตารางที่ 3 ขนาดของอาหารสำหรับปลานิลขนาดต่าง ๆ 16
ตารางที่ 4 ลำดับไพรเมอร์และขนาดของ RT-PCR ในยีนที่ทำการศึกษา 26
ตารางที่ 5 แผนการดำเนินงานตลอดโครงการวิจัยในปีที่ 2554-55 27
ตารางที่ 6 ปริมาณสารสกัดจากสาหร่ายเตา 29
ตารางที่ 7 เปรียบเทียบการต้านอนุมูลอิสระที่ 50 % ของสาหร่ายเตา 3 ฤดู 30
ตารางที่ 8 ปริมาณ carbohydrate และ sulfate content จากการสกัดลำดับส่วน 30
ตารางที่ 9 ผลของระดับกลูตาไทโอนรวม ออกซิไดส์ดาไทโอน และรีดิวส์กลูตาไทโอน 44

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 สาหร่ายเตา 5
ภาพที่ 2 หลักการเกิด TBARS 12
ภาพที่ 3 วัฏจักรการต้านออกซิเดชันของสารต้านอนุมูลอิสระส่วนใหญ่ 13
ภาพที่ 4 ปลานิล 14
ภาพที่ 5 แผนภูมิแสดงวิธีการเตรียมสารสกัดน้ำของสาหร่ายเตา 21
ภาพที่ 6 แสดงวิธีการสกัดลำดับส่วนของสาหร่ายเตา 22
ภาพที่ 7 ภาพถ่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์ 28
ภาพที่ 8 ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ของสาหร่ายเตา 3 ฤดูเมื่อเทียบกับ trolox 31
ภาพที่ 9 อาหารเม็ดผสมสาหร่ายเตา 4 สูตร 32
ภาพที่ 10 ผลของการเสริมสาหร่ายเตาต่ออัตราการเจริญเติบโตของปลานิลในช่วงเวลา 4 เดือน 33
ภาพที่ 11 ผลของการเสริมสาหร่ายเตาต่ออัตราการรอดในช่วงเวลา 4 เดือน 33
ภาพที่ 12 ผลของสาหร่ายเตาต่อลิปิดเปอร์ออกซิเดชั่นในเนื้อเยื่อไตปลานิล 34
ภาพที่ 13 ผลของสาหร่ายเตาต่อลิปิดเปอร์ออกซิเดชั่นในตับปลานิล 34
ภาพที่ 14 กราฟผลของสาหร่ายเตาต่อลิปิดเปอร์ออกซิเดชั่นในพลาสมาของปลานิล 35
ภาพที่ 15 จำนวนรอบที่เหมาะสมต่อปริมาณการแสดงออกของยีนแอนติออกซิแดนซ์เอนไซม์ในเนื้อเยื่อไตของปลานิล 36
ภาพที่ 16 จำนวนรอบที่เหมาะสมต่อปริมาณการแสดงออกของยีนแอนติออกซิแดนซ์เอนไซม์ในเนื้อเยื่อตับของปลานิล 37
ภาพที่ 17 ระดับแสดงออกของ mRNA ของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD)ในเนื้อเยื่อไตปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมสาหร่ายเตาระดับต่างกัน 38
ภาพที่ 18 ระดับแสดงออกของ mRNA ของเอนไซม์ glutathione peroxidase (GPx) ในเนื้อเยื่อไตปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมสาหร่ายเตาระดับต่างกัน 39
ภาพที่ 19 ระดับแสดงออกของ mRNA ของเอนไซม์ catalase (CAT) ในเนื้อเยื่อไตปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมสาหร่ายเตาระดับต่างกัน 40

สารบัญภาพ (ต่อ)

หน้า

ภาพที่ 20 ระดับแสดงออกของ mRNA ของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) ในเนื้อเยื่อตับปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมสาหร่ายเตาระดับต่างกัน 41

ภาพที่ 21 ระดับแสดงออกของ mRNA ของเอนไซม์ glutathione peroxidase (GPx) ในเนื้อเยื่อตับปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมสาหร่ายเตาระดับต่างกัน 42

ภาพที่ 22 ระดับแสดงออกของ mRNA ของเอนไซม์ catalase (CAT) ในเนื้อเยื่อตับปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมสาหร่ายเตาระดับต่างกัน 43

ภาพที่ 23 ระดับของรีดิวส์กลูตาไทโอนในปลานิลที่ให้อาหารเสริมสาหร่ายเตาเป็นเวลา 4 เดือน 44

ผลของสาหร่ายเตาต่อระบบต้านอนุมูลอิสระและเอนไซม์กำจัดสารพิษในปลานิล

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

ดวงพร อมรเลิศพิศาล[1] เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน[1] สุดาพร ตงศิริ[1] และชุติมา ศรีมะเริง[2]

Doungporn Amornlerdpison[1], Kriangsak Mengumphan[1] Sudaporn Tongsiri[1], and Chutima Srimaroeng[2]

[1]คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ 50290

[2]คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 50200

บทคัดย่อ

สาหร่ายเตาเป็นสาหร่ายน้ำจืดสีเขียวขนาดใหญ่ถูกนำมาประเมินหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและตรวจหากลุ่มสารสำคัญ โดยทำการเก็บตัวอย่างสาหร่าย 3 ครั้ง ในช่วงฤดูร้อน ฤดูฝน และฤดูหนาว แล้วนำมาสกัดแบบหยาบเป็นสารสกัดน้ำ ผลการศึกษาพบว่า สารสกัดน้ำของสาหร่ายเตาทั้ง 3 ฤดู มีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ดีในแบบจำลองการขจัดอนุมูล ABTS และตรวจพบกลุ่มสารประกอบฟีโนลิกจากสาหร่ายเตาที่เก็บในช่วงฤดูหนาวมีค่ามากที่สุด อย่างไรก็ตามฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติระหว่างสาหร่ายเตาทั้ง 3 ฤดู จากนั้นจึงทำการประเมินผลของสาหร่ายเตาต่อการเจริญเติบโตและการป้องกันภาวะเครียดออกซิเดชั่น (oxidative stress) ด้วยการให้อาหารเม็ดเสริมสาหร่ายเตาระดับ 2.5, 5 และ 10% แก่ลูกปลานิลอายุ 2 เดือน โดยเลี้ยงในกระชังเป็นเวลา 4 เดือน ผลการทดลองพบว่า ปลานิลในหน่วยทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมสาหร่ายเตาระดับ 2.5% มีอัตราการรอด 95% เมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงในเดือนที่ 4 โดยมีความแตกต่างจากหน่วยทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ พบการลดลงของระดับลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน (lipid peroxidation) ในเนื้อเยื่อไต ตับ และพลาสมาของปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมสาหร่ายเตาทั้ง 3 ระดับ ส่วนระดับเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ superoxide dismutase (SOD), catalase และ glutathione peroxidase มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะระดับ SOD ในเนื้อเยื่อไตของปลานิลกลุ่มที่ได้รับอาหารเสริมสาหร่ายเตาที่ระดับ 10% มีระดับเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ยังพบว่ามีการเพิ่มขึ้นของระดับกลูตาไทโอนรวม (total GSH) และรีดิวส์กลูตาไทโอน (reduced GSH) ร่วมกับมีการลดลงของระดับออกซิไดส์กลูตาไทโอน (GSSG) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในเม็ดเลือดแดงของปลานิลที่เสริมสาหร่ายเตาระดับ 2.5 และ 5% อีกด้วย ผลจากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า การเสริมสาหร่ายเตาในอาหารปลาช่วยให้มีการลดลงของอนุมูลอิสระจากการลดการเกิดอนุมูลอิสระ ช่วยเพิ่มการสร้างสารและเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระในตัวปลา จึงช่วยป้องกันภาวะเครียดออกซิเดชั่นได้ ส่งผลให้ปลามีอัตราการรอดสูง และเจริญเติบโตดี

คำสำคัญ : สาหร่ายเตา สารประกอบฟีโนลิก ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ การเจริญเติบโต

Abstract

Spirogyra sp., a green freshwater macroalga, 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 extracts prepared from three seasons algae showed inhibitory activity for the ABTS assay. The phenolic content obtained maximum level in cool season. 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 *Spirogyra* sp. was further evaluated in terms of fish growth and oxidative defense. Fish-pellet feed supplemented with 2.5, 5 and 10% alga were fed to 2-month old tilapia and cultured in cages 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. A decrease in lipid peroxidation has been shown in kidney, liver and plasma of tilapia treated with 3 levels of alga. The superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx) seemed to be increased in tilapia treated with alga, especially the increase of SOD level was statistically significant in kidney of tilapia treated with 10% alga. It was also found that a significant increase in total glutathione and reduced glutathione and decrease in oxidized glutathione (GSSG) were observed in erythrocyte of tilapia treated with 2.5 and 5% alga. All the above findings lead to the conclusion that the supplementation of *Spirogyra* sp. in fish feed caused the reduction of free radicals, increase antioxidant compounds and antioxidant enzymes in fish. The oxidative defense of *Spirogyra* sp. affected the increase in survival rate and growth in fish.

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

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

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

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

การเลี้ยงปลานิลในกระชังเป็นรูปแบบการเลี้ยงที่ให้ผลผลิตสูง ก่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดในเชิงเศรษฐศาสตร์ นอกจากนี้ยังสะดวกในการเก็บเกี่ยวผลผลิต โดยลงทุนต่ำกว่ารูปแบบการเลี้ยงอื่นๆ ในขณะที่ผลตอบแทนต่อพื้นที่สูง อย่างไรก็ตามการเลี้ยงปลานิลในกระชังอาจจะมีข้อเสียอยู่ เช่น ปัญหาเรื่องโรค สภาพแวดล้อมจากการปนเปื้อนของสารพิษ อัตราการปล่อยที่หนาแน่นเกินไป เกษตรกรผู้เลี้ยงปลานิลส่วนใหญ่ มักประสบปัญหาการตายของปลาที่รุนแรงในปลาขนาดใหญ่อายุตั้งแต่ 3-4 เดือน ซึ่งการตายของปลามักจะเกิดในช่วงหน้าร้อนไปจนถึงต้นฤดูฝน นับตั้งแต่เดือนมีนาคมจนถึงเดือนกรกฎาคมของทุกปี โดยปลาที่เลี้ยงในกระชังอัตราการตายอาจสูงถึง 85-90% ภายใน 5-7 วัน และมักพบว่าก่อนการเกิดโรคระบาดในปลานิลนั้นน้ำในบริเวณแหล่งเลี้ยงจะนิ่งไม่มีการไหลเวียนของมวลน้ำ หรือมักมีมวลน้ำใหม่สีขุ่นไหลลงมาในแหล่งเลี้ยงปลาอย่างต่อเนื่องเป็นเวลานาน ซึ่งถือว่าเป็นช่วงระยะวิกฤติของการเลี้ยงปลา เหตุดังกล่าวจะเป็น

ส่วนสำคัญที่ก่อให้เกิดสภาวะเครียดในปลาเนื่องจากปลาจะประสบกับภาวะที่ต้องใช้พลังงานในการปรับตัวเองให้อยู่รอดในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม ส่งผลให้ปลามีสุขภาพอ่อนแอและยอมรับเชื้อโรคต่าง ๆ ได้ง่าย และส่งผลนำไปสู่การตายของปลาในรูปแบบต่าง ๆ ในที่สุด (ประพันธ์ศักดิ์ และ นนทวิทย์, 2552) อีกทั้งการเลี้ยงยังขึ้นอยู่กับอาหารสำเร็จรูปเพียงอย่างเดียวทำให้สิ้นเปลืองในการลงทุน ซึ่งเป็นปัญหาหลักของการจำหน่ายปลานิล คือ มีต้นทุนในการผลิตสูง เนื่องจากราคาอาหารปลาสำเร็จรูปมีราคาแพง

ดังนั้นการนำสาหร่ายเตามาเป็นอาหารเสริมในอาหารปลานิลจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยส่งเสริมให้สุขภาพของปลานิลดีขึ้น เนื่องจากสาหร่ายเตามีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งอนุมูลอิสระจะทำลายเซลล์ส่งผลทำให้ปลาเป็นโรคง่าย เกิดการตายของปลาขึ้น ในภาวะที่มีสารอนุมูลอิสระมีมากไม่สมดุลกับสารต้านอนุมูลอิสระจะทำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชั่น (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) การนำสาหร่ายเตามาเป็นอาหารเสริมในอาหารปลานิลจึงน่าจะช่วยทำให้ปลานิลมีภูมิต้านทานดีขึ้น ทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ ไม่เป็นโรคง่าย ทำให้ได้ผลผลิตปลาที่มีคุณภาพ โตเร็ว และมีอัตราการรอดสูง ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการเพิ่มผลผลิตเชิงพาณิชย์ และเพิ่มศักยภาพในการแข่งขันในตลาดได้เป็นอย่างดี อีกทั้งยังเป็นการลดใช้สารเคมีในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ และยังเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับสาหร่ายเตาอีกทางหนึ่งด้วย

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาผลของสาหร่ายเตาต่อการเจริญเติบโตและอัตราการรอดของปลานิล
2. เพื่อศึกษาผลของสาหร่ายเตาต่อระบบต้านอนุมูลอิสระในปลานิล
3. เพื่อศึกษากลุ่มสารสำคัญของสาหร่ายเตา

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้องค์ความรู้ผลของสาหร่ายเตาต่อการเจริญเติบโตและระบบต้านอนุมูลอิสระในปลานิล
2. นำองค์ความรู้ที่ได้ไปต่อยอดพัฒนาสาหร่ายเตาเป็นอาหารปลานิลหรือปลาชนิดอื่นๆ
3. ช่วยเพิ่มมูลค่าของทรัพยากรน้ำและลดการใช้ยาและสารเคมีในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ
4. เป็นการสร้างโอกาสทางอาชีพและเพิ่มรายได้ให้แก่เกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงปลานิลและสาหร่ายเตา
5. ได้ผลงานวิจัยตีพิมพ์ในวารสารระดับชาติหรือนานาชาติอย่างน้อย 1 เรื่อง
6. ได้บัณฑิตระดับปริญญาโทอย่างน้อย 1 คน

การตรวจเอกสาร

สาหร่ายเตาเป็นกลุ่มสาหร่ายน้ำจืดที่เป็นเส้นสาย 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 *Spirogyra*

ลักษณะทั่วไป

ภาพที่ 1 สาหร่ายเตา

สาหร่ายเตา (*Spirogyra* sp.) เป็นสาหร่ายสีเขียวมีลักษณะเป็นเส้นสาย (ภาพที่ 1) ซึ่งประกอบด้วยเซลล์แต่ละปล้องมาต่อกัน โดยทั่วไปมีลักษณะความกว้างของเซลล์ประมาณ 60 - 160 ไมครอน และมีความยาวของเซลล์ประมาณ 65 - 250 ไมครอน ไม่มีการแตกแขนง ลักษณะเป็นเส้นตรงคล้ายเส้นผมบางๆ ลู่ไหลไปกับกระแสน้ำ มีสีเขียวอ่อนจนกระทั่งถึงสีเขียวเข้มเมื่อจับดูจะรู้สึกลื่นมือ ทั้งนี้เพราะผนังเซลล์ด้านนอกสุดทำให้เกิดเมือก (pectose mucilage) ภายในเซลล์ประกอบไปด้วยเซลล์รูปกระบอกมาเรียงต่อกัน ซึ่งมีคลอโรพลาสต์ (chloroplast) เป็นเส้นบิดกันเป็นเกลียว (ยุวดี, 2530)

สาหร่ายเตามีคลอโรพลาสต์เป็นรูปริบบิ้นและมีไพรีนอยด์เรียงตามยาวของแถบคลอโรพลาสต์ นิวเคลียสจะลอยอยู่ตรงจุดกึ่งกลางเซลล์ ทุกๆ เซลล์ในสายยกเว้นส่วนฐานจะสามารถแบ่งเซลล์ได้ การ

สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการขาดเป็นท่อนๆ ของสาย ส่วนการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศนั้นจะเริ่มจากสาย 2 สายมาอยู่ใกล้กัน แล้วเชื่อมต่อกันด้วยชั้นของเมือก เซลล์หนึ่งจะยื่นพาพิลลี (papillae) เข้าหาเซลล์ของสายตรงกันข้าม ทำให้พาพิลลีของทั้งสองสายจะมาอยู่ใกล้ชิดกันก่อให้เกิดการรวมตัวครั้งแรก ต่อจากนั้นสายทั้งสองจะถูกดันให้ห่างกันเมื่อพาพิลลียาวขึ้น จะเกิดรูขึ้นที่ส่วนยอดของพาพิลลีทำให้เกิดคอนจูเกชันทิวบ์ที่ต่อเนื่องกันของเซลล์หนึ่งกับอีกเซลล์หนึ่ง เซลล์สืบพันธุ์เพศผู้หรือโพรโทพลาสต์ที่เคลื่อนย้ายผ่านคอนจูเกชันทิวบ์ จากนั้นจะไปรวมกับเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียได้เป็นไซโกต และจะมีการขับผนังเซลล์ 3 ชั้นหุ้มตัวเองได้เป็นไซโกสปอร์ มีผนังชั้นนอกคือเอกโซสปอร์ (exospores) ชั้นกลาง คือ มีโซสปอร์ (mesospore) และชั้นใน คือ เอนโดสปอร์ (endospore) รงควัตถุ (pigment) ของสาหร่ายเตาประกอบด้วยคลอโรฟิลล์เอ และบีแคโรทีนชนิดแอลฟาและแกมมาแคโรทีน (กาญจนภาชน์, 2527) ในตารางที่ 1 แสดงคุณค่าทางอาหารของสาหร่ายที่พบในบริเวณภาคเหนือของประเทศไทย

ตารางที่ 1 คุณค่าทางอาหารของสาหร่ายเตา (หน่วย: ร้อยละของน้ำหนักแห้ง)

คุณค่าทางอาหาร	บุญมี (2530)	Peerapornpisal *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

ฤทธิ์ทางชีวภาพของสาหร่ายเตา

ยุวดีและคณะ (2552) ได้ทำการศึกษาศักยภาพของสาหร่ายน้ำจืดขนาดใหญ่ในการผลิตเป็นอาหารเสริมและเวชสำอาง โดยทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันและทดสอบการระคายเคืองต่อผิว จากผลการวิจัยพบว่า สารสกัดน้ำของสาหร่ายเตาพบว่ามีความปลอดภัยในการนำมาบริโภคหรือพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์อาหารสุขภาพ เนื่องจากเมื่อทำการทดสอบความเป็นพิษแบบเฉียบพลันในหนูขาว ไม่พบอาการผิดปกติของหนูภายใน 14 วัน และตรวจไม่พบอาการผิดปกติของพยาธิสภาพของอวัยวะต่างๆ ภายในร่างกายของหนูขาวอีกด้วย และสารสกัดน้ำของสาหร่ายเตาเมื่อทำการทดสอบการระคายเคืองต่อผิวในกระต่าย ไม่พบอาการบวม แดง หรือเป็นผื่นบนผิวหนังจากการระคายเคืองจึงมีความปลอดภัยในการนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สำหรับผิวหนังได้

สาหร่ายเตามีฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระ เมื่อนำสารสกัดน้ำของสาหร่ายเตามาทดสอบในการทดลองฤทธิ์กำจัดอนุมูลDPPH ฤทธิ์กำจัดอนุมูล superoxide และฤทธิ์ยับยั้งการเกิด lipid peroxidation และมีฤทธิ์ยับยั้ง

การเกิดการอักเสบเมื่อทดสอบในหนูขาวที่กระตุ้นให้เกิดการบวมบริเวณใบหูหนูด้วยสาร ethyl phenyl propiolate (ยุวดีและคณะ, 2555)

สาหร่ายเตามีฤทธิ์ปกป้องแผลกระเพาะอาหาร จากการนำเอาสารสกัดน้ำของสาหร่ายเตามาทดสอบฤทธิ์ปกป้องแผลกระเพาะอาหาร ซึ่งทำการเหนี่ยวนำให้เกิดแผลในกระเพาะอาหารหนูขาวโดยทำให้เกิดความเครียดจากการขังกรงและแช่น้ำสารผสม HCl/ethanol และยา indomethacin พบว่าส่วนสกัดน้ำของสาหร่ายเตาที่ป้อนให้ทางปากในขนาด 500 มก. ต่อ น้ำหนักหนู 1 กก. สามารถยับยั้งการการเกิดแผลในกระเพาะอาหารได้ทั้ง 3 การทดลอง (ดวงพรและคณะ, 2555)

อนุมูลอิสระ (Free Radical)

อนุมูลอิสระ คือ อะตอมหรือโมเลกุลที่มีอิเล็คตรอนไม่เป็นคู่ อยู่ในวงอิเล็คตรอนวงนอกสุด (outer orbital) เนื่องจากการมีอิเล็กตรอนที่โคดเดี่ยว (unpaired electron) อยู่ในวงโคจรของโมเลกุลทำให้ไม่เสถียร ทำให้อนุมูลอิสระเป็นสารที่มีความไวในการเข้าทำปฏิกิริยาทางเคมีกับสารอื่นสูงมาก โดยอนุมูลอิสระจะไปแย่งจับหรือดึงเอาอิเล็กตรอนจากโมเลกุลหรืออะตอมสารที่อยู่ข้างเคียงเพื่อให้ตัวมันเสถียร โมเลกุลที่อยู่ข้างเคียงที่สูญเสียหรือรับอิเล็กตรอนจะกลายเป็นอนุมูลอิสระชนิดใหม่ขึ้น ซึ่งอนุมูลอิสระที่เกิดมาใหม่นี้จะไปทำปฏิกิริยากับสาร โมเลกุลอื่นต่อไป เกิดเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (chain reaction) ต่อกันไปเรื่อยๆ โดยที่อนุมูลอิสระก็มีสมบัติเหมือนสารทั่วๆไป ตรงที่ความสามารถในการเข้าทำปฏิกิริยากับสารอื่นสามารถเปลี่ยนแปลงได้ตามอุณหภูมิ ความเป็นกรดด่าง (pH) และความชื้นเป็นต้น

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 peroxyl ($ROO^{\bullet}$) 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. การแตกของพันธะโควาเลนท์แบบไอโมไลซิส (Imolysis)

$A{:}B \longrightarrow A^{\bullet} + B^{\bullet}$

ข. การเพิ่มอิเล็กตรอน 1 ตัว ให้แก่อะตอมที่เป็นกลางทางไฟฟ้า

$A + e^{-} \longrightarrow A^{-\bullet}$

ค. การสูญเสียอิเล็กตรอน 1 ตัว จากอะตอมที่เป็นกลางทางไฟฟ้า

$$A \longrightarrow A^{+\bullet} + e^{-}$$

อนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้องต่างๆในทางชีววิทยาที่สามารถเป็นตัวตั้งต้นที่ทำให้เกิดเป็นอนุมูลอิสระได้อีกหลายชนิด สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ คือกลุ่มที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (reactive oxygen species, ROS) กลุ่มที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (reactive nitrogen species, RNS) และกลุ่มที่มีคลอรีนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (reactive chlorine species, RCS) สารบางชนิดสามารถจัดอยู่ได้ 2 กลุ่ม เช่น เปอร์ออกซีไนไตรท์ (peroxynitrite) ตัวอย่างอนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้องแสดงในตารางที่ 2

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 ในกลุ่มที่ทำลายปฏิกิริยาลูกโซ่นี้ได้แก่ วิตามินอี เบต้า-แคโรทีน วิตามินซี ubiquinone, uric acid, bilirubin, albumin, sulfhydryl groups ในกรดอะมิโน cysteine ซึ่งมีอยู่ในโปรตีน เช่น เนื้อสัตว์ นอกจากวิธีนี้ยังมีสารประกอบฟีโนลิก (phenolic compounds) และสารกลุ่ม flavanoids ที่เป็นสารต้านออกซิเดชันที่สำคัญอีกด้วย

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 ($O_2{}^1\Delta g$)
Alkoxyl ($RO^{\bullet}$)	Organic peroxides (ROOH)
Carbonate ($CO_3^{-\bullet}$)	Peroxynitrite ($ONOO^-$)
Carbon dioxide ($CO_2^{-\bullet}$)	Peroynitrous 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 ($ONOO^-$)
	Peroynitrous 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)

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

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

สารต้านออกซิเดชันในธรรมชาติ ได้แก่

สารประกอบฟีโนลิก (phenolic compounds)

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

สารประกอบฟีโนลิกหลายชนิดมีสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชัน เช่น ฟลาโวนอยด์ กรดฟีโนลิก และ แทนนิน เป็นต้น สารประกอบฟีโนลิกทำหน้าที่เป็นตัวขับไล่อนุมูลอิสระที่สำคัญคืออนุมูล peroxy โดยมีกลไก 2 แบบคือ เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีความเข้มข้นต่ำเมื่อเทียบกับสารออกซิไดซ์ สารประกอบฟีโนลิกจะป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน นอกจากนี้อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาจะถูกทำให้เป็นสารที่มีความ

เสถียร ดังนั้นจึงสามารถป้องกันการเกิดขั้นตอนพลอพาเกชัน ได้ นอกจากนี้สารประกอบฟีโนลิกบางชนิดยังทำหน้าที่เป็นสารคีเลต ดักจับไอออนของโลหะเข้าไว้ในโมเลกุล เช่น เคอร์ซิทิน (quercetin)

สารประกอบฟีโนลิกยังทำหน้าที่ทั้งเป็นสารให้อิเล็กตรอน หรือเป็นตัวให้ไฮโดรเจน และกำจัดออกซิเจนที่อยู่ในรูปแอคทีฟ ด้วยหน้าที่ต่างๆ ดังกล่าวจึงทำให้สารประกอบฟีโนลิกเป็นสารต้านออกซิเดชันที่สำคัญชนิดหนึ่งในพืชทั่วไป

วิตามินเอ

ในธรรมชาติวิตามินเอจะพบเฉพาะในสัตว์เท่านั้น แต่ในพืชจะมีสารประกอบแคโรทีนอยด์ที่สามารถเปลี่ยนเป็นวิตามินเอได้ จัดเป็น Precursor ของวิตามินเอ เรียกว่า โปรวิตามินเอ มักพบในพืชผักใบเขียว ผักและผลไม้ที่มีสีเหลือง หรือสีส้มแดง

วิตามินซี

มีชื่อทางเคมีว่า กรดแอสคอร์บิค (Ascorbic acid) เป็นวิตามินที่ละลายได้ในน้ำ จะสลายตัวเมื่อถูกความร้อนหรือหากทิ้งไว้ในอากาศที่มีความชื้นนานๆ วิตามินซีมีสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชัน โดยจะเข้าทำปฏิกิริยากับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ อนุมูล hydroxyl และอนุมูล peroxyl
นอกจากวิตามินซีสามารถเข้าทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระแล้ว ยังทำหน้าที่เป็นตัวส่งเสริมประสิทธิภาพของสารต้านออกซิเดชัน ของวิตามินอีด้วย โดยทำให้อนุมูล α-tocopherol$^{\bullet}$ ($TO^{\bullet}$) เปลี่ยนกลับไปเป็น α-tocopherol (TOH) ดังเดิม ดังสมการ

$$TO^{\bullet} + AH^{-} \longrightarrow TOH + A^{-}$$

วิตามินอี

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

$$\alpha\text{- tocopherol} + LOO^{\bullet} \longrightarrow \alpha\text{- tocopherol}^{\bullet} + LOOH$$

อนุมูล α- tocopherol$^{\bullet}$ ที่เกิดขึ้น สามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูล peroxyl ตัวอื่นทำให้ได้สารที่มีความเสถียร (LOO- α- tocopherol) ดังสมการ เป็นผลให้ปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันหยุดลง

$$\alpha\text{- tocopherol}^{\bullet} + LOO^{\bullet} \longrightarrow LOO\text{- }\alpha\text{- tocopherol}$$

ซิลิเนียม ทองแดง และสังกะสี

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

แคโรทีนอยด์

แคโรทีนอยด์เป็นรงควัตถุที่พบทั่วไปในธรรมชาติ จะถูกสังเคราะห์ขึ้นในคลอโรพลาสต์เป็นปริมาณมากเนื่องจากเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์มีมาก โครงสร้างพื้นฐานของแคโรทีนอยด์ประกอบด้วยโครงสร้างหลักที่เรียกว่า tetraterpene skeleton ซึ่งอาจมีวงแหวนที่บริเวณปลายด้านใดด้านหนึ่งหรือทั้งสองด้านของโมเลกุล วงแหวนนี้อาจเป็นวงแหวนห้าหรือหกเหลี่ยมก็ได้

แคโรทีนอยด์สามารถแบ่งตามองค์ประกอบของโครงสร้างในโมเลกุลดังนี้

แคโรทีน (Carotene) เป็นแคโรทีนอยด์ที่โครงสร้างโมเลกุลประกอบด้วยคาร์บอนและไฮโดรเจนเท่านั้น เช่น เบต้า-แคโรทีน (β-carotene) อัลฟ่า-แคโรทีน (α-carotene) แกมม่า-แคโรทีน (γ-carotene) ไลโคปีน (lycopene) เป็นต้น

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

ออกโซแคโรทีนอยด์ (oxocarotenoid) หรือ แซนโทฟิล (xanthophyll) เป็นแคโรทีนอยด์ที่โครงสร้างโมเลกุลบริเวณวงแหวนประกอบด้วยกลุ่มอื่นนอกเหนือจากคาร์บอนและไฮโดรเจน เช่น เบต้า-คริบโทแซนทิน (β-cryptoxanthin) และลูทีน (lutein)

สารต้านออกซิเดชันสังเคราะห์ (โอภาและคณะ, 2549)

สารต้านออกซิเดชันที่พัฒนาสังเคราะห์ขึ้นส่วนใหญ่จะออกแบบให้มีโมเลกุลขนาดเล็ก และใช้โครงสร้างของสารต้านออกซิเดชัน ที่มีในธรรมชาติ นำมาดัดแปลงให้มีคุณสมบัติทางเคมีและมีฤทธิ์ที่ดีขึ้น เช่นสารต้านออกซิเดชันที่พัฒนาจากสารต้านออกซิเดชันจากธรรมชาติ โดยพัฒนามาจากโครงสร้างของวิตามินอี และโครงสร้างสารโพลีฟีนอล

Glutathaione (GSH)

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

GSH ละลายน้ำได้ดีมีอยู่ในปริมาณมากในเซลล์ โดยอยู่ที่ไซโตโซลในปริมาณความเข้มข้น 1-11 มิลลิโมลาร์ และอยู่ในนิวเคลียสและไมโตคอนเตรียในปริมาณ 3-15 มิลลิโมลาร์ และ 5-11 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ

กลูตาไทโอนมีบทบาทสำคัญในการป้องกันเซลล์จากภาวะถูกออกซิไดส์ดังนี้ คือ

1) เป็นโคแฟคเตอร์ของเอนไซม์หลายชนิดที่ทำหน้าที่กำจัดอนุมูลและการเกิดออกซิเดชั่นได้แก่ เอนไซม์กลูตาไทโอนเปอร์ออกซิเดสและเอนไซม์กลูตาไทโอนทรานซ์เฟอเรส เป็นต้น
2) ช่วยในการขนส่งกรดอะมิโนผ่านพลาสมาเมมเบรน
3) ขจัดหรือสลายอนุมูลไฮดรอกซีโดยตรง และเร่งการทำงานของเอนไซม์ในการกำจัดอนุมูลลิพิดเปอร์ออกไซด์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยตรง
4) รีดิวส์ อนุมูลวิตามินซีและอนุมูลวิตามินอีให้กลับอยู่ในรูปที่ต้านอนุมูลอิสระ

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

มีสูตรโมเลกุลทางเคมีคือ $C_{14}H_{18}O_4$ เป็นอนุพันธ์ของวิตามินอีที่ดัดแปลงโครงสร้างโดยการเปลี่ยนสายอัลเคนเป็นหมู่คาร์บอกซิลิก มีสูตรโครงสร้างทำให้มีความสามารถละลายได้ดีในน้ำ แต่เนื่องจากความสามารถในการละลายน้ำได้ดีดีจึงทำให้การออกฤทธิ์เร็วกว่าวิตามินอี โดยวิตามินอีต้องใช้เวลานานเป็นชั่วโมงหรือเป็นวัน 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 โดยทั่วไปจะใช้เกี่ยวกับอุตสาหกรรมทางยา

(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 แคดเมียม แมงกานีส และ ทองแดง ซึ่งประโยชน์ทางการแพทย์สามารถนำมาใช้กำจัดไอออนของโลหะต่างๆได้

เอนไซม์ในการควบคุมปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ (โอภาและคณะ, 2549)

โดยธรรมชาติแล้วจะมีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นในเซลล์และร่างกายหลายชนิด มีทั้งเป็นประโยชน์และโทษอันประกอบด้วย อนุมูลที่หลุดรอดออกมาจากการเผาผลาญออกซิเจนเป็นพลังงานและในระดับเซลล์เอนไซม์เป็นกลไกสำคัญขั้นแรกที่ทำหน้าที่ควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระให้อยู่ในสมดุล เอนไซม์ที่สำคัญได้แก่

1. **Superoxides dismutase (SOD)**

เอนไซม์ SOD จะทำหน้าที่ขจัดอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในร่างกาย คือ อนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน $O_2^{-\bullet}$ โดยเร่งปฏิกิริยาดิสมิวเตสในการเปลี่ยน O_2 ให้เป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

$$2O_2 + 2H^+ \xrightarrow{\text{SOD}} H_2O_2 + O_2$$

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะถูกกำจัดโดยเอนไซม์คาร์ตาเลสและเอนไซม์กลูต้าไทโอนเปอร์ออกซิเดส ลักษณะสำคัญของเอนไซม์ SOD คือมีโลหะทรานซิสชั่นที่บริเวณที่ใช้จับซับสเตรท ทำหน้าที่ในการออกซิไดส์และรีดิวส์กลับไปมา

2. **Catalase (CAT)**

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

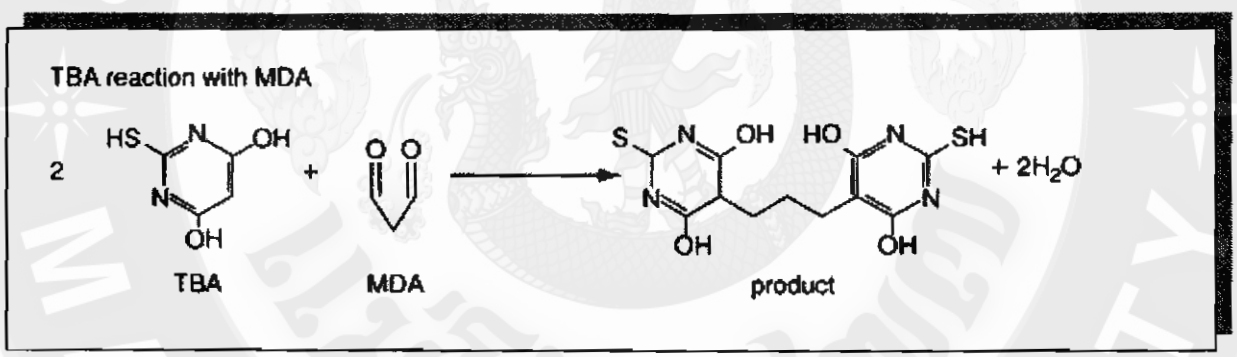
$$2H_2O_2 + 2H^+ \xrightarrow{CAT} 2H_2O + O_2$$

การเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชั่น (Lipid peroxidation)

การศึกษาวิจัยจำนวนมากพบว่า การเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชั่นและภาวะถูกออกซิไดส์มีบทบาทสำคัญในการเกิดและพัฒนาของโรค หากมีการใช้ปริมาณลิปิดเปอร์ออกซิเดชั่นที่เกิดขึ้นมากจึงเป็นดัชนีบ่งชี้ถึงภาวะถูกออกซิไดส์ที่มากเกินสมดุล วิธีการวัดหาลิปิดเปอร์ออกซิเดชันที่ทำได้รวดเร็วที่ง่ายและไม่ซับซ้อน คือ

มาลอนไดอัลดีไฮด์ (Malondialdehyde, MDA)

เป็นวิธีที่หาผลผลิตที่เกิดจากการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชันระดับ MDA เป็นดัชนีที่ใช้อย่างกว้างขวางเพราะการหาปริมาณเป็นวิธีที่ง่ายไม่ซับซ้อน การหาปริมาณ MDA ที่เกิดขึ้น ทำได้โดยการเติมกรดไทโบอาร์บิทูริก ในสีภาวะกรด MDA จะทำปฏิกิริยากับกรดไทโอบาร์ทูริกที่ได้เป็นสารสีเรียกว่า TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) ดังภาพที่ 2



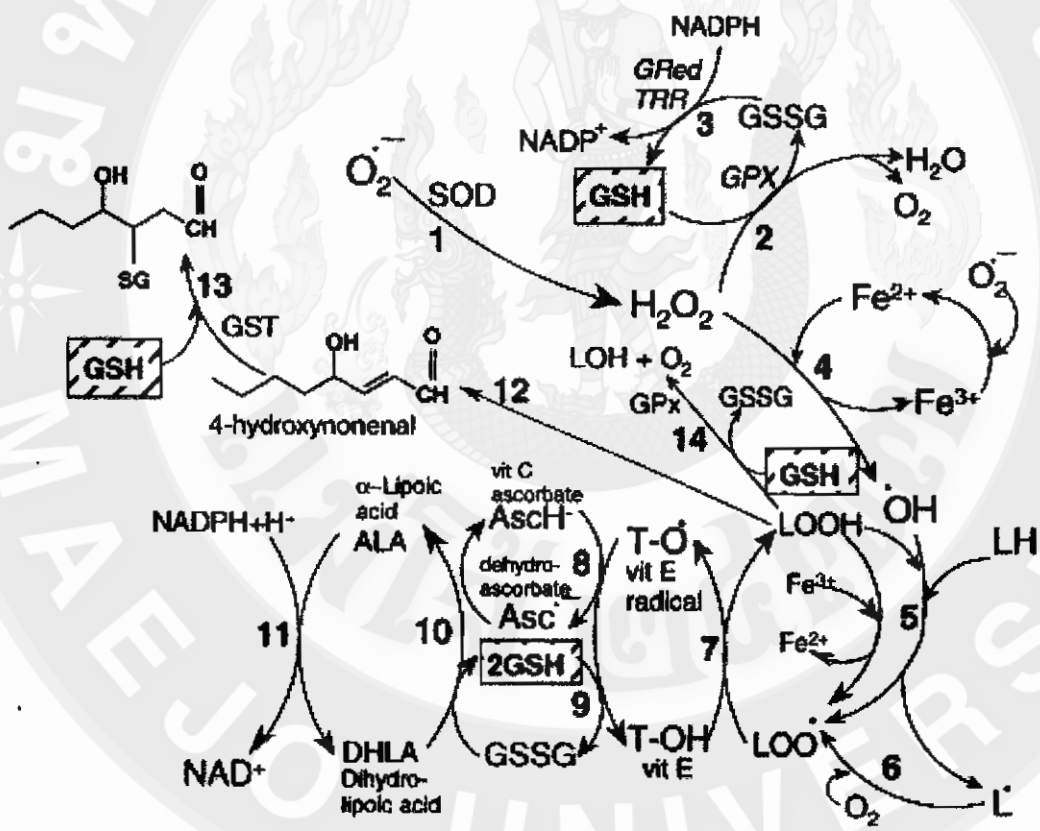
ภาพที่ 2 หลักการเกิด TBARS

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

ภาวะเครียดออกซิเดชั่น (oxidative stress)

อนุมูลอิสระเกิดขึ้นได้จากขบวนการเมตาบอลิซึมจากการใช้ออกซิเจนหรือเกิดจากสิ่งแวดล้อมภายนอก เช่น การปรับเปลี่ยนอุณหภูมิของน้ำ ภาวะขาดออกซิเจน ความเครียด ยาและสารเคมีบางชนิดเป็นต้น อนุมูลอิสระมีบทบาทในการก่อให้เกิดการอักเสบ และการทำลายเนื้อเยื่อ มีผลต่อความเสื่อมของเซลล์ทำให้เกิดโรคต่าง ๆ โดยอนุมูลอิสระ (free radicals) หรือ Reactive Oxygen Species จัดเป็นโมเลกุลที่ไม่เสถียรและว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาเคมี ในภาวะที่มีสารอนุมูลอิสระมากไม่สมดุลกับสารต้านอนุมูลอิสระทำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชั่น (Oxidative stress)จากสาเหตุดังกล่าวจะส่งผลให้เกิดการถูกทำลายของดีเอ็นเอโปรตีนและไขมันจากอนุมูลอิสระ มีการทำลายเนื้อเยื่อส่งผลให้เซลล์ได้รับความเสียหาย ทำให้เป็น

ต้นเหตุของการเกิดโรค (Halliwell *et al.*, 1992; Vajraguta *et al.*, 2007) ในภาวะที่มีสารอนุมูลอิสระมีมากไม่สมดุลกับสารต้านอนุมูลอิสระจะทำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress)โดยอาจเป็นผลมาจากการสร้างสารอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น และ/หรือมีการลดลงของสาร และเอนไซม์ที่ต้านอนุมูลอิสระลดลงในตัวปลา 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 ภาพที่ 3 แสดงวงจรการต้านออคซิเดชันของกลูตาไทโอนและสารต้านอนุมูล



ภาพที่ 3 วัฏจักรการต้านออกซิเดชันของสารต้านอนุมูลอิสระส่วนใหญ่

ที่มา: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009279705004333

วิธีการปกป้องการเกิดภาวะออกซิไดส์เกินสมดุลโดยกลูตาไทโอนและสารต้านอนุมูลอิสระเริ่มจากปฏิกิริยาที่ (1) เอนไซม์ SOD เปลี่ยนซุปเปอร์ออกไซด์แอนอิออนเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ปฏิกิริยาที่ (2) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ถูกเอนไซม์กลูตาไทโอนรีดักเตสสลายเป็นน้ำและออกซิเจนโดยใช้กลูตาไทโอนเป็นตัวให้อิเล็กตรอนที่มีผลทำให้กลูตาไทโอนเปลี่ยนไปอยู่ในรูปออกซิไดส์หรือไดซัลไฟด์(GSSG) ปฏิกิริยาที่ (3) GSSG ถูกเปลี่ยนกลับไปเป็นกลูตาไทโอนโดยเอนไซม์กลูตาไทโอนรีดักเตส (GR) โดย NADH เป็นตัวให้อิเล็กตรอน ปฏิกิริยาที่ (4) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในสภาวะที่มีโลหะทรานซิชัน เช่น เหล็ก ทองแดง ทำให้เกิดอนุมูลไฮดรอกซีจากปฏิกริยาเฟนตัน ปฏิกิริยาที่ (5)อนุมูลไฮดรอกซิลจะดึงอิเล็กตรอนออกจากอะตอมคาร์บอนของกรดไขมันไม่อิ่มตัว (LH) เกิดเป็นอนุมูลลิพิด

ปฏิกิริยาที่ (6)อนุมูลลิพิดทำปฏิกริยากับออกซิเจนได้เป็นอนุมูลลิพิดเปอร์ออกไซด์(LOO˙) ปฏิกิริยาที่ (7) LOO ถูกวิตามินเอที่เมมแบรนรีดิวซ์ได้เป็นลิพิดเปอร์ออกไซด์และอนุมูลวิตามินอี ปฏิกิริยาที่ (8)อนุมูลวิตามินอีถูกรีดิวซ์กลับโดยวิตามีนซีในร่างกายอยู่ในรูปโมโนแอนอิออน วิตามินซีหลังจากการทำหน้าที่จะอยู่ในรูปอนุมูลวิตามินซี ปฏิกิริยาที่ (9)กลูตาไทโอนทำหน้าที่รีดิวซ์อนุมูลวิตามินอีกลับคืนเพื่อให้อยู่ในรูปที่ทำหน้าที่ต้านอนุมูลต่อ ปฏิกิริยาที่ (10)ไดไฮโดรไลโพอิค(DHLA) ทำหน้าที่รีดิวซ์อนุมูลวิตามินซีและกลูตาไทโอนในรูปออกไซด์ให้กลับไปอยู่ในรูปรีดิวซ์เพื่อทำหน้าที่ต้านอนุมูล DHLA จะเปลี่ยนไปเป็นกรดกรดไลโออิค(ALA) ปฏิกิริยาที่ (11)NADH จะรีดิวซ์ ALA กลับไปเป็น DHLA เพื่อทำหน้าที่ใหม่ปฏิกิริยาที่ (12)เป็นปฏิกิริยาที่ LOOH สลายตัวได้อัลดิไฮด์ที่มีฤทธิ์ออกซิเดชันสูงคือ ไฮดรอกซีโนนีนอล(4-HNE) ปฏิกิริยาที่ (13)4-HNE ทำปฏิกิริยากับกลูตาไทโอนได้เป็นกลูตาไทอิลแอดดักส์โดยใช้เอนไซม์กลูตาไทโอนเอสทรายเฟอเรส(GST) ปฏิกิริยาที่ (14)กรดลิพิดเปอร์ออกไซด์ถูกริดิวซ์โดยเอนไซม์กลุตาไทโอนเปอร์ออกซิเดส(GPx)ไปเป็นแอลกอฮอล์โดยมีกลูตาไทโอนทำหน้าที่ให้อิเล็กตรอน

ปลานิล (*Oreochromis niloticus*)

ภาพที่ 4 ปลานิล

ปลานิลเป็นปลาน้ำจืดที่อยู่ในตระกูลซิคลิดี (Cichlidae) มีถิ่นกำเนิดเดิมอยู่ทวีปแอฟริกา พบทั่วไปตามหนอง บึง และทะเลสาบ ในประเทศซูดาน ยูกันดา แทนแกนยีกา โดยที่ปลานิลชนิดนี้เจริญเติบโตเร็วและเลี้ยงง่าย เหมาะสมที่จะนำมาเพาะเลี้ยงในบ่อได้ จึงได้รับความนิยมและเลี้ยงกันอย่างแพร่หลายในภาคพื้นเอเชีย แม้แต่ในสหรัฐอเมริกาก็นิยมเลี้ยงปลาชนิดนี้ รูปร่างลักษณะของปลานิลคล้ายกับปลาหมอเทศ แต่ลักษณะพิเศษของปลานิลมีดังนี้คือ ริมฝีปากบนและร่างเสมอกัน ที่บริเวณแก้มมีเกล็ด 4 แถว ตามลำตัวมีลายพาดขวางจำนวน 9 – 10 แถบ นอกจากนั้นลักษณะทั่วไปมีดังนี้ ครีบหลังมีเพียง 1 ครีบ ประกอบด้วยก้านครีบแข็งและก้านครีบอ่อนเป็นจำนวนมาก ครีบก้นประกอบด้วยก้านครีบแข็งและอ่อนเช่นกัน มีเกล็ดตามแนวเส้นข้างตัว ลำตัวมีสีเขียวปนน้ำตาล ตรงกลางเกล็ดมีสีเข้ม ที่กระดูกแก้มมีจุดสีเข้มอยู่จุดหนึ่ง บริเวณส่วนอ่อนของครีบหลัง ครีบก้น และครีบหางนั้นจะมีจุดสีขาวและสีดำตัดขวางแลดูคล้ายลายข้าวดอกอยู่โดยทั่วไป (ภาพที่ 4)

ปลานิลเป็นปลาน้ำจืดชนิดหนึ่งที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจสามารถเลี้ยงได้ในทุกสภาพ ใช้เวลาในการเพาะเลี้ยง 6 เดือน – 1 ปี จะสามารถเจริญเติบโตได้ถึงขนาด 600-1,000 กรัม เนื้อปลามีสีขาว รสชาดีดี เป็นที่ต้องการของผู้บริโภคกันทั้งในประเทศและต่างประเทศ ขนาดปลานิลที่ตลาดต้องการจะมีน้ำหนักตัวประมาณ 500 – 800 กรัม ปลานิลเลี้ยงง่าย เจริญเติบโตเร็วแต่ปัจจุบันปลานิลพันธุ์แท้ค่อนข้างจะหายาก เพื่อให้ได้ปลานิลพันธุ์ดีกรมประมงจึงได้ดำเนินการปรับปรุงพันธุ์ปลานิลในด้านต่างๆอาทิ เจริญเติบโตเร็ว ปริมาณความดกของไข่สูง ให้ผลผลิตเนื้อมาก และมีความด้านทานโรคสูง เป็นต้น

ปลานิลมีนิสัยชอบอยู่รวมกันเป็นฝูง (ยกเว้นเวลาสืบพันธุ์) มีความอดทนและปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี จากการศึกษาพบว่า ปลานิลทนต่อความเค็มได้ถึง 20 ส่วนในพันส่วน ทนต่อค่าความเป็นกรด – ด่าง (pH) ได้ดีในช่วง 6.5 – 8.3 และสามารถทนต่ออุณหภูมิได้ถึง 40 องศาเซลเซียส ($^{\circ}$C) แต่ใน

อุณหภูมิที่ต่ำกว่า 10 °C พบว่าปลานิลปรับตัวและเจริญเติบโตได้ไม่ดีนักทั้งนี้เป็นเพราะถิ่นกำเนิดเดิมของปลาชนิดนี้อยู่ในเขตร้อน

ปลานิลต้องการสารอาหารที่มีโปรตีนสูงกว่าสัตว์บก ซึ่งใช้เป็นแหล่งพลังงาน และการเจริญเติบโต แต่โปรตีนเป็นแหล่งที่ให้พลังงานที่แพงที่สุด อาหารที่ใช้เลี้ยงปลานิลควรมีคุณภาพดีและราคาไม่แพงมาก การนำเอาวัตถุดิบที่แพร่หลายในท้องถิ่นมาใช้จะช่วยลดต้นทุนอาหาร ปลานิลกินอาหารได้หลายรูปแบบ เช่น อาหารธรรมชาติ อาหารผง อาหารเปียก อาหารจม และอาหารเม็ดลอย ปลานิลเป็นปลาที่กินอาหารต่อเนื่องตลอดวัน การย่อยจะเป็นไปอย่างช้า ๆ และจะเสร็จสมบูรณ์ใช้เวลาประมาณ 18-24 ชั่วโมง ดังนั้น การให้อาหารน้อย ๆ แต่ให้บ่อยครั้งจะช่วยเพิ่ม ประสิทธิภาพการใช้อาหารได้มากขึ้น ขนาดอาหารควรให้ตามน้ำหนักของตัวปลา (สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ, 2540) ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ขนาดของอาหารสำหรับปลานิลขนาดต่าง ๆ

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

ที่มา : สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ, 2540

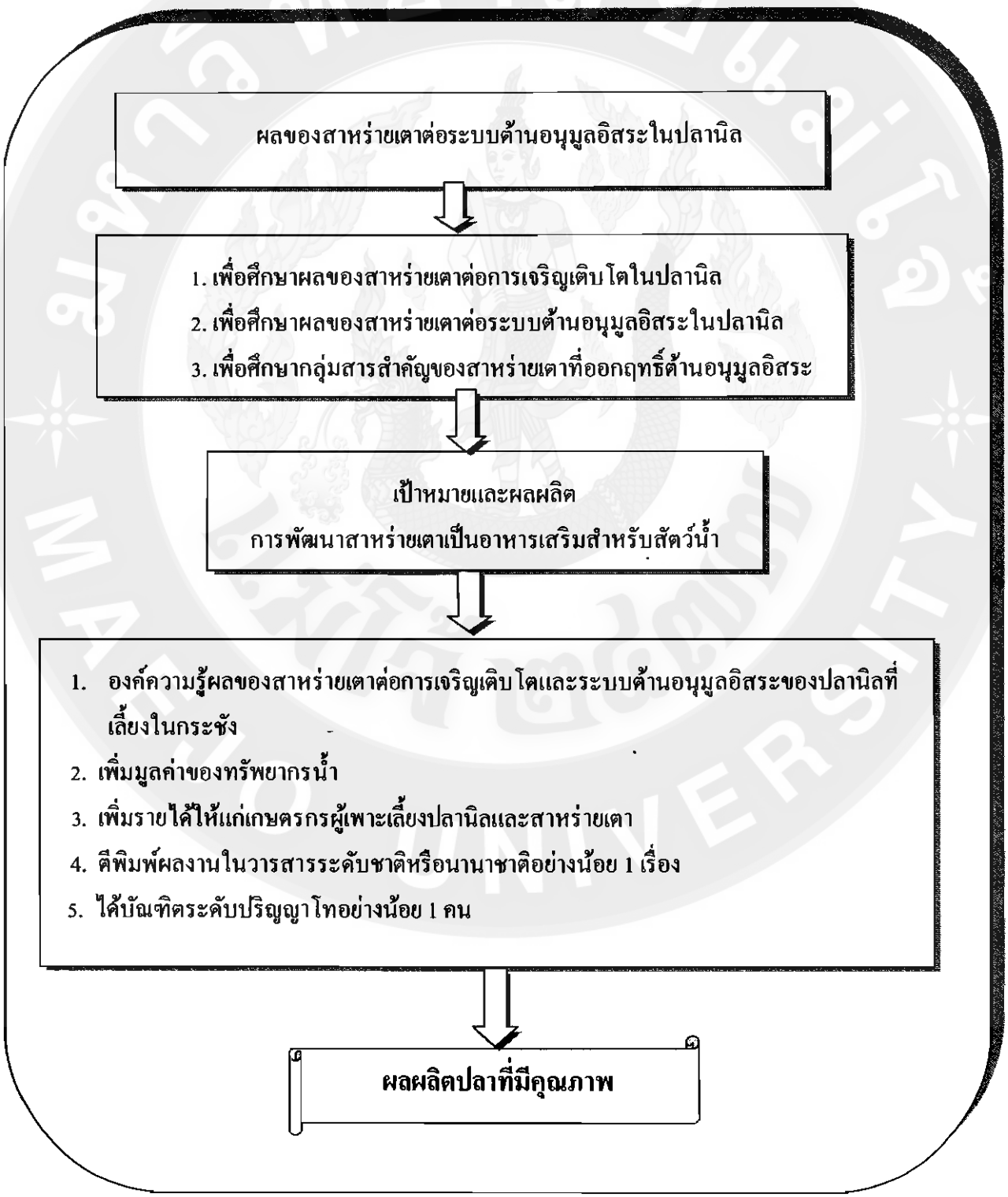
หลักการและเหตุผล

สาหร่ายเตามีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูง การนำสาหร่ายเตามาเป็นอาหารเสริมในอาหารปลานิลจึงน่าจะช่วยทำให้ปลานิลมีภูมิต้านทานดีขึ้น ทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ ไม่เป็นโรคง่าย ทำให้ได้ผลผลิตปลาที่มีคุณภาพ โตเร็ว และมีอัตราการรอดสูง ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการเพิ่มผลผลิตเชิงพาณิชย์ เนื่องจากอนุมูลอิสระจะทำลายเซลล์หรือเป็นพิษต่อเซลล์ ทำให้ปลาเป็นโรคง่าย เกิดการตายของปลาขึ้น ในภาวะที่มีสารอนุมูลอิสระมีมากไม่สมดุลกับสารต้านอนุมูลอิสระจะทำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชั่น (oxidative stress) โดยภาวะดังกล่าวมีสาเหตุมาจากสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม การปล่อยปลาหนาแน่นเกินไปในกระชัง การปนเปื้อนจากสารพิษหรือโลหะหนัก การได้รับอาหารไม่มีคุณค่าหรือไม่เพียงพอต่อความต้องการ ดังนั้นการนำสาหร่ายเตามาพัฒนาเป็นอาหารเริมในปลาจะช่วยเพิ่มระบบต้านอนุมูลอิสระของปลานิล ทำให้ปลานิลมีภูมิต้านทาน สามารถเจริญเติบโตได้ดี ไม่เป็นโรคง่าย ทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ ทำให้ได้ผลผลิตปลานิลที่มีคุณภาพ และยังเป็นการลดการใช้สารเคมีในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำอีกด้วย

ขอบเขตการวิจัย

ทำการทดสอบผลของสาหร่ายเตาที่ใช้ให้เป็นส่วนผสมของอาหารปลานิลเพื่อเพิ่มการต้านอนุมูลอิสระช่วยป้องกันภาวะเครียดจากออกซิเดชั่นจากการเลี้ยงปลานิลในกระชัง ทำให้ปลานิลเจริญเติบโตดี ทนโรค และปรับตัวต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม ทำให้ได้ผลผลิตปลานิลที่มีคุณภาพ

กรอบแนวคิดการวิจัย



อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

อุปกรณ์และเครื่องมือทดลอง

1.ด้านการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสาหร่ายเตา

1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

1.1.1 ตู้อบ

1.1.2 สาหร่ายเตาแห้ง

1.1.3 ผ้าขาวบาง

1.1.4 water bath

1.1.5 rotary evaporator

1.1.6 freeze dryer

1.1.7 หลอดทดลอง

1.1.8 spectrophotometer

1.2 สารเคมี

1.2.1 2, 2'-azino-bis 3-ethylbenzthiazoline -6-sulfonic acid (ABTS)

1.2.2 trolox

1.2.3 folin-Ciocalteu

1.2.4 โซเดียมคาร์บอเนต

1.2.5 gallic aeid

2. ด้านการเพาะเลี้ยงปลานิล

2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

2.1.1 กระชังขนาด 1.2 x 1.2 x 1.2 เมตร

2.1.2 สายอากาศ

2.1.3 สาหร่ายเตาผง

2.1.4 เครื่องให้อากาศ (Yamano AP-80)

2.1.5 อาหารปลานิลไฮเกรดชนิดเม็ดลอยน้ำ

2.1.6 พันธุ์ปลานิล

2.1.7 หัวทราย

2.1.8 ไม้ไผ่

2.1.9 ท่อลม

2.1.10 เครื่องบดอาหาร

2.1.11 เครื่องอัดอาหารเม็ดจม

2.1.12 เชือก

3. ด้านการวัดการเจริญเติบโต

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.1.1 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 1 ตำแหน่ง

3.1.2 กะละมัง

3.1.3 สวิง

3.1.4 ไม้บรรทัด

4. ด้านการประเมินระบบการทำงานของสารและเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระในปลานิล

4.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

4.1.1 กรรไกร

4.1.2 ตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส (Hitachi)

4.1.3 ตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส

4.1.4 ตู้เย็น -80 องศาเซลเซียส

4.1.5 ปากคีบ

4.1.6 มีดผ่าตัด

4.1.7 หลอดฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร

4.1.8 เข็มฉีดยาเบอร์ 20, 21, 23

4.1.9 autoclave (Becthai hirayama)

4.1.10 เครื่องปั่นเหวี่ยง

4.1.11 เครื่องปั่นเหวี่ยง

4.1.12 ไมโครปิเปต

4.1.13 อลูมิเนียมฟอยด์

4.1.14 micro tubes

4.1.15 pipet tips

4.1.16 นาฬิกาจับเวลา

4.1.17 เครื่องให้สารผสม (Votex)

4.1.18 tissue rupture (Qiagen)

4.1.19 ตู้ปลอดเชื้อ

4.1.20 เครื่อง PCR (Biorad)

4.1.21 เครื่อง gel electrophoresis

4.1.22 เครื่อง gel documentation

4.1.23 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง

4.1.24 plate

4.2 สารเคมี

4.2.1 น้ำกลั่น

4.2.2 EDTA

4.2.3 RIPA Buffer

4.2.4 protinase inhibitors

4.2.5 mycophenolic acid (*MPA*)

4.2.6 น้ำมันกานพลู

4.2.7 primer

4.2.8 ชุดน้ำยาสำเร็จรูปในการทำ cDNA

วิธีการวิจัย

1. การตรวจคัดกรองทางพฤกษเคมี (phytochemical screening)

1.1 เก็บรวบรวมสาหร่าย

ทำการเก็บรวบรวมสาหร่ายในช่วงฤดูร้อนตั้งแต่เดือนมีนาคมถึงเมษายน ฤดูฝนเก็บในช่วงเดือนมิถุนายนถึงเดือนสิงหาคม และฤดูหนาวเก็บในช่วงเดือนพฤศจิกายนถึงธันวาคม จากบ้านนาคูหา ตำบลสวนเขื่อน อำเภอเมือง จังหวัดแพร่ นำสาหร่ายที่เก็บได้มาล้างด้วยน้ำประปาหลายๆครั้งจนสะอาด จากนั้นนำมาผึ่งลมให้มีความหมาดพอสมควร แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 50 °C จนกว่าสาหร่ายจะแห้ง

1.2 พิสูจน์เอกลักษณ์ของสาหร่าย

โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) ทั้งจากเซลล์ปกติ และเซลล์สืบพันธุ์ รวมถึงที่อยู่อาศัย (habitat) จากนั้นศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ ทำการตรวจสอบกับหนังสือและเอกสารที่เกี่ยวข้องเพื่อการบ่งชี้ชนิด (species)

1.3 เตรียมสารสกัดน้ำของสาหร่ายเตา

นำสาหร่ายแห้งตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ปั่นผสมกับน้ำกลั่นนำไปต้มที่ 90-100 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นกรองเอากากออก ส่วน filtrate ที่ได้ ระเหยให้แห้งโดยใช้ rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 60°C ภายใต้

สูญญากาศทำให้แห้งด้วยเครื่อง Freeze dry เก็บสารสกัดน้ำของสาหร่ายที่ได้ในตู้เย็น 4°C วิธีการเตรียมสารสกัดน้ำของสาหร่ายน้ำจืด แสดงในภาพที่ 5

ภาพที่ 5 แผนภูมิแสดงวิธีการเตรียมสารสกัดน้ำของสาหร่ายเตา

1.4 การตรวจหาชนิดและปริมาณสารสำคัญในสาหร่ายเตา โดยทำ 3 ซ้ำ

1) การวิเคราะห์ปริมาณโพลีฟีนอล

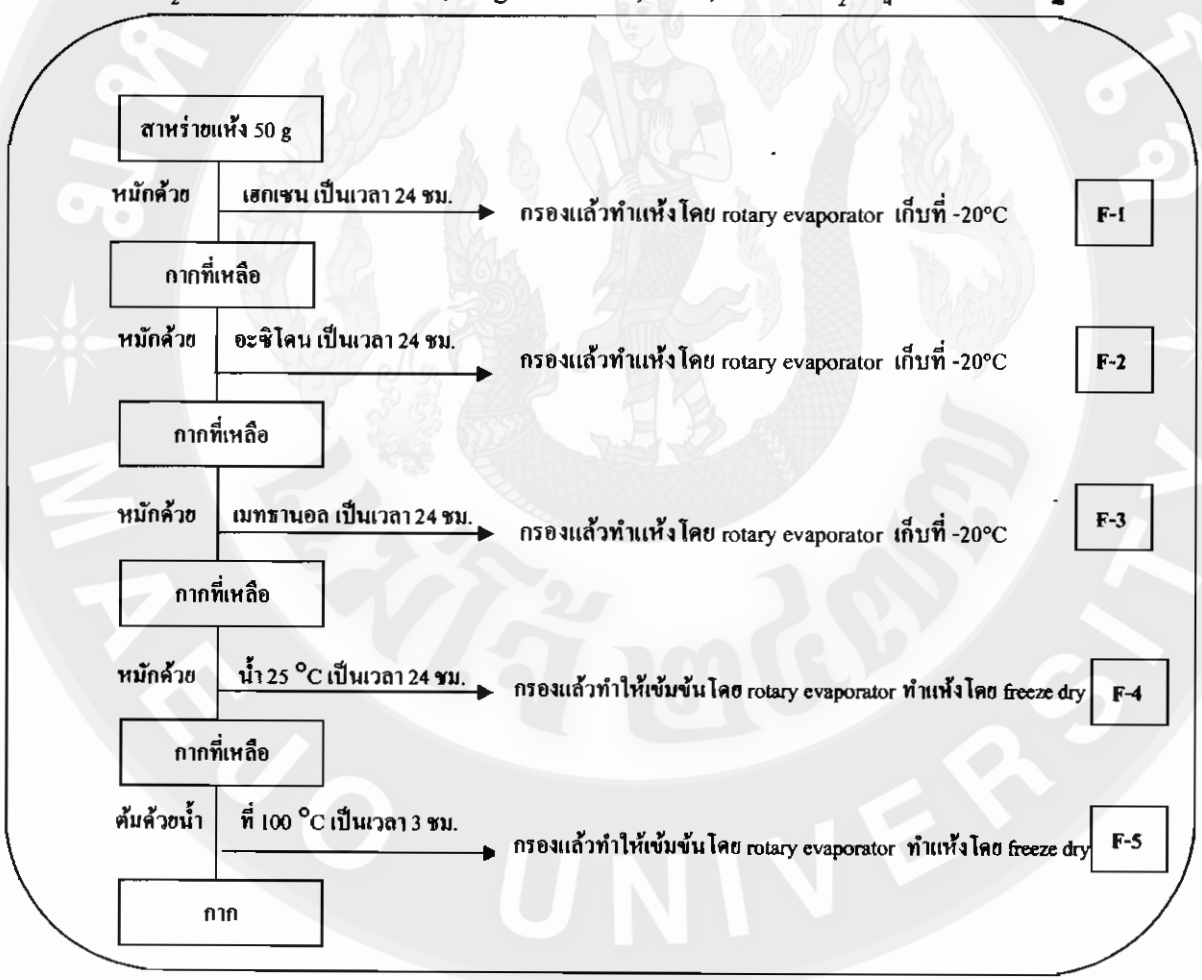
ตรวจวิเคราะห์ปริมาณของโฟลีฟีนอลทั้งหมดในสารสกัดของสาหร่าย 3 ฤดูกาล คือ ฤดูร้อน ฝน และหนาว ทำการวิเคราะห์โดยใช้สารละลาย Folin-Ciocalteu ตามวิธีการของ Sachindra *et al.* (2010) โดยใช้ตัวอย่างที่ละลายในเมธานอล 0.1 ml ผสมกับ สารละลาย Folin-Ciocalteu ความเข้มข้น 10% ปริมาตร 0.75 ml และนำไปบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 6% ลงไป 0.75 ml ผสมให้เข้ากันและทิ้งไว้ที่ 37°C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดความยาวคลื่นที่ 750 นาโนเมตร คำนวณปริมาณกลุ่มสารประกอบฟีนอลิกโดยเทียบกับ gallic acid ปริมาณของสารโพลีฟีนอลรายงานผลเป็น gallic acid equivalents (GAE)

2) การวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตและซัลเฟตโพลีแซคคาไรด์

นำตัวอย่างสาหร่ายแห้ง 50 กรัม มาสกัดด้วยเฮกเซน อะซิโตน และเมทธานอล 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 จากนั้นกรองตัวอย่างและสกัด

กากที่เหลือด้วยวิธีการเดียวกันอีกครั้งหนึ่ง 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 6

ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณของ total carbohydrate ใช้วิธีการ phenol-sulfuric acid โดยใช้ D-glucose เป็นสารมาตรฐาน (Dubolis *et al.*, 1956)ส่วนการตรวจวิเคราะห์ปริมาณของซัลเฟตของสารสกัดใช้วิธีการ $BaCl_2$-Gelatin turbidimetric (Craigie and Wen, 1984) โดยใช้ K_2SO_4 เป็นสารมาตรฐาน



ภาพที่ 6 แสดงวิธีการสกัดลำดับส่วนของสาหร่ายเตา

2. การศึกษาผลของสาหร่ายเตาต่อระบบต้านอนุมูลอิสระ

2.1 การเตรียมสาหร่ายเตา

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

2.2 การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสาหร่ายเตา 3 ฤดู ในหลอดทดลอง (*in vitro*)

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 ในขวดสีชา ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 16 ชั่วโมง จะได้ stock ABTS radical cation ก่อนการทดสอบเจือจาง stock ABTS radical cation ด้วยน้ำกลั่น ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงในช่วง 0.700 ± 0.05 ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร เริ่มการทดสอบโดยเตรียมตัวอย่างสารสกัดน้ำสาหร่ายเตา ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง และใช้ น้ำกลั่น เป็นชุดควบคุม ต่อมาเติมสารละลาย ABTS ปริมาตร 1.8 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 6 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร หลังจากนั้นนำค่าที่ได้ไปคำนวณหา % inhibition หรือการยับยั้งอนุมูลอิสระตามสมการดังนี้

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

$Abs._{control}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม

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

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

2.3 การเตรียมอาหารปลานิล

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

2.4 การเตรียมปลานิล

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

2.5 ศึกษาผลของสาหร่ายเตาต่อการเจริญเติบโตของปลานิล

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 4 สัปดาห์ และเลี้ยงนาน 16 สัปดาห์

การคำนวณการเจริญเติบโต

น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น = น้ำหนักสิ้นสุดการทดลอง-น้ำหนักเริ่มต้น

น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นต่อวัน = $\frac{\text{น้ำหนักสิ้นสุดการทดลอง-น้ำหนักเริ่มต้น}}{\text{ระยะเวลาเลี้ยง}}$

อัตราการเจริญเติบโตต่อวัน (ADG) = $\frac{\text{น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น}}{\text{จำนวนวัน}}$

อัตราการแลกเนื้อ (FCR) = $\frac{\text{น้ำหนักของอาหารที่ปลากิน}}{\text{น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น}}$

2.6 ศึกษาผลของสาหร่ายเตาต่อระบบต้านอนุมูลอิสระในปลานิล

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

2.6.1 การวิเคราะห์หาปริมาณ MDA

เก็บตัวอย่างเลือดปลาที่เส้นเลือดบริเวณเหงือกหรือตำแหน่งบริเวณกระดูกสันหลังมา 100 – 150 ไมโครลิตรโดยใส่ในหลอดที่มี EDTA นำเลือดที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 g เป็นเวลา 1 นาทีที่อุณหภูมิห้อง

จากนั้นดูดส่วนที่เป็น supernatant ไปใส่ใน new trip แล้วนำไปเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส (°C) เพื่อรอการวิเคราะห์ต่อไป ส่วนตับและไตของปลาเมื่อแยกออกมาแล้วทำการ อย่างละ 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 ที่ 4°C 10 นาที เก็บ supernatant ทั้งหมด ที่ -80°C ก่อนนำไปทำการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ MDA-TBAR โดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูปต่อไป (รายละเอียดอยู่ในภาคผนวก)

2.6.2 การวิเคราะห์ปริมาณกลูตาไธโอน

เก็บตัวอย่างเลือดปลาที่เส้นเลือดบริเวณเหงือกหรือตำแหน่งบริเวณกระดูกสันหลังมาปริมาณ 100 – 150 ไมโครลิตร โดยใส่ในหลอดที่มี EDTA นำเลือดที่ได้ปั่นที่ความเร็ว 1,300 g ที่ 4 °C 10 นาที และเก็บส่วนกลาง (middle part) ที่เป็น erythrocytes (red blood cells) ที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงมา ใส่ใน microcentrifuge tube อันใหม่ และเติมน้ำเกรด HPLC ในอัตราส่วน 1:5 นำไปปั่นที่ความเร็ว 13,000 g ที่ 4 °C 10 นาที ดูดส่วน supernatant ที่ปั่นแล้วมาใส่ Metaphospholic acid ในอัตราส่วน 1:1 นำไป vortex แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 g เป็นเวลา 4 นาทีที่อุณหภูมิห้อง เก็บส่วน supernatant เป็น erythrocyte lysate ที่ -20 °C เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณ GSH โดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูปต่อไป (รายละเอียดอยู่ในภาคผนวก)

2.6.3 การวัดปริมาณเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ

การวิเคราะห์ ปริมาณเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ เช่น catalase (CAT), glutathione (GSH) และ superoxide dismutase (SOD) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่บ่งบอกถึงภาวะ oxidative stress ทำโดยใช้เทคนิคทาง Polymerase chain reaction (PCR) โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

1) การสกัด Ribonucleic acid (RNA)

การสกัด RNA ของเนื้อเยื่อตับและไต ของปลานิลโดยใช้ชุดสกัดปริมาณ RNA (Amresco, OH, USA) โดยชั่ง 0.1 มิลลิกรัมของเนื้อเยื่อ ตับ ไต แล้วนำมาบดด้วยเครื่อง homoginizer ใน 1 มิลลิลิตรของ Amresco @ RNA extraction แล้วเติมคลอโรฟอร์มจะได้สารสกัดที่แยกเป็นสามชั้น โดยที่ RNA จะอยู่ชั้นบนสุดของสารสกัดข้างต้น หลังจากนั้นผสมด้วยแอลกอฮอล์ 70% เพื่อสกัด RNA ออกจากโมเลกุลอื่นและดูดสารที่ได้มาใส่ column หลังจากนั้นทำการล้างด้วยบัฟเฟอร์ และทำการดึง RNA ที่บริสุทธิ์ด้วยบัฟเฟอร์ออกจาก column ความบริสุทธิ์ของ RNA วัดด้วย Synergy H4 spectrophotometer (Biotek, VA, USA) ปริมาณของ RNA และความหนาแน่นของ RNA คำนวณจากการดูดกลืนแสงที่ 260/280 nm ความบริสุทธิ์ของ RNA ที่ยอมรับได้จะต้องอยู่ในช่วง 1.8 – 2.0 จะสามารถนำไปใช้ในการทดลองได้

2) การสังเคราะห์ RNA เป็น cDNA

การสังเคราะห์ให้ RNA เป็น cDNA จะใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป iScript™ cDNA synthesis (Bio-rad, CA, USA) โดยเติม 1 ไมโครกรัมของปริมาณ RNA template ใส่ลงใน reaction mixture ที่มี cDNA master mix และ reverse transcriptase หลังจากนั้นทำการปั่นเหวี่ยง และนำเข้าเครื่อง PCR MJ Mini™ Gradient

Thermal Cycler machine (Bio-Red, CA, USA) ในการสังเคราะห์ที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 5 นาที , 42 °C เป็นเวลา 30 นาที และ 85 °C เป็นเวลา 5 นาที

3) Polymerase chain reaction (PCR)

การทำ PCR จะใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป (Vivantis, Selangor Darul Ehsan, Malaysia) โดยเติม 0.5 ไมโครกรัมของ cDNA template ใน PCR mastermix ที่มีสารบัฟเฟอร์คือ tag polymerase และ specific primers ที่แสดงในตารางที่ 4 โดยที่การตั้งขั้นตอนการขยายของ DNA ไว้ที่ อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 2 นาที, 94 °C เป็นเวลา 2 วินาที, 58 °C เป็นเวลา 30 วินาที, 72 °C เป็นเวลา 30 วินาที และ 72 °C เป็นเวลา 7 นาที ที่ 25-35 รอบ ขึ้นอยู่กับการขยายของยีน ผลที่ได้จากการทำ PCR นำไป run ใน 2% Agarose gel eletropholysis และแถบที่เกิดขึ้นสามารถนำไปวัดปริมาณได้ด้วยโปรแกรม Image J จาก RSB NIMH/NIH, (MD, USA) โดยใช้ยีน actin เป็นตัวเปรียบเทียบ

การเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อหาปริมาณของเอนไซม์ 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 votex บ่มที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 g เป็นเวลา 4 นาทีที่อุณหภูมิห้อง เก็บส่วน supernatant เป็น plasma และ erythrocyte lysate ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไป

ตารางที่ 4 ลำดับไพรเมอร์และขนาดของ RT-PCR ในยีนที่ทำการศึกษา

cDNA	Gnnbank Acesssion NO.	Forword primers	Reverse primers	RT-PCR product size
SOD	JF801727.1	5′TGGAGGCGGCCACATTA	5′AGCCACCGTAACAGCAGACAT	151 bp
CAT	GR657924.1	5′AGATCCATCAGGAAAGGCTCAA	5′GCAAAACGCAAGTGCTGACA	121 bp
GPx	GQ853451	5′CGACCTGACAGCTAAGCTGTTG	5′GGCGGAGTAGCGAGAATGAA	151 bp
Actin	EU887951	5′TCTGGTCGTACCACTGGTATCG	5′AGGAGTAGCCACGCTCTGTCA	166 bp

SOD – superoxide dismutase ; CAT – Catalase ; GPx – glutathione peroxidase ; Actin- β -actin

วิธีเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อเพื่อวิเคราะห์เอนไซม์

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 ส่วนตับและไตที่ตัดแล้วนำไปแช่ใน ไนโตรเจนเหลวเพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์แล้วนำไปเก็บที่ -80 °C เพื่อนำไปตรวจการแสดงออกของเอนไซม์ที่ต้านอนุมูลอิสระต่อไป

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ข้อมูลทั้งหมดจะแสดงในรูปของ mean ± SE เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองโดยใช้สถิติ One way ANOVA ตามด้วย post hoc test วิธีของ Tukey ด้วยโปรแกรม SPSS ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$

ระยะเวลาทำการวิจัย และแผนการดำเนินงาน

ระยะเวลา 2 ปี เริ่มตั้งแต่เดือนสิงหาคม พ.ศ.2553- เดือนตุลาคม พ.ศ.2555 แสดงรายละเอียดในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แผนการดำเนินงานตลอดโครงการวิจัยในปีที่ 2554-55

งานที่ปฏิบัติ	ปีที่1-2554						ปีที่2-2555					
	เดือนที่						เดือนที่					
	1-2	3-4	5-6	7-8	9-10	11-12	1-2	3-4	5-6	7-8	9-10	11-12
1. เตรียมวัสดุ /วัตถุดิบต่างๆ และเครื่องมือที่ใช้	←	→										
2. เตรียมส่วนสกัดสาหร่าย		←	→									
3.ตรวจหากลุ่มสารสำคัญในสาหร่ายเตา			←	→								
4.เตรียมอาหารสำเร็จรูปที่ผสมสาหร่ายเตา				←	→							
5. เขียนรายงานประเมินผลปีที่1						←	→					
6. ทดสอบผลของสาหร่ายเตาต่อระบบต้านอนุมูลอิสระในปลานิล							←	→				
7.ตรวจหาเอนไซม์กำจัดสารพิษในปลานิล										←	→	
8. ถ่ายทอดองค์ความรู้จากงานวิจัยสู่ชุมชน											←	→
9. เขียนรายงานประเมินผลปีที่2												← →

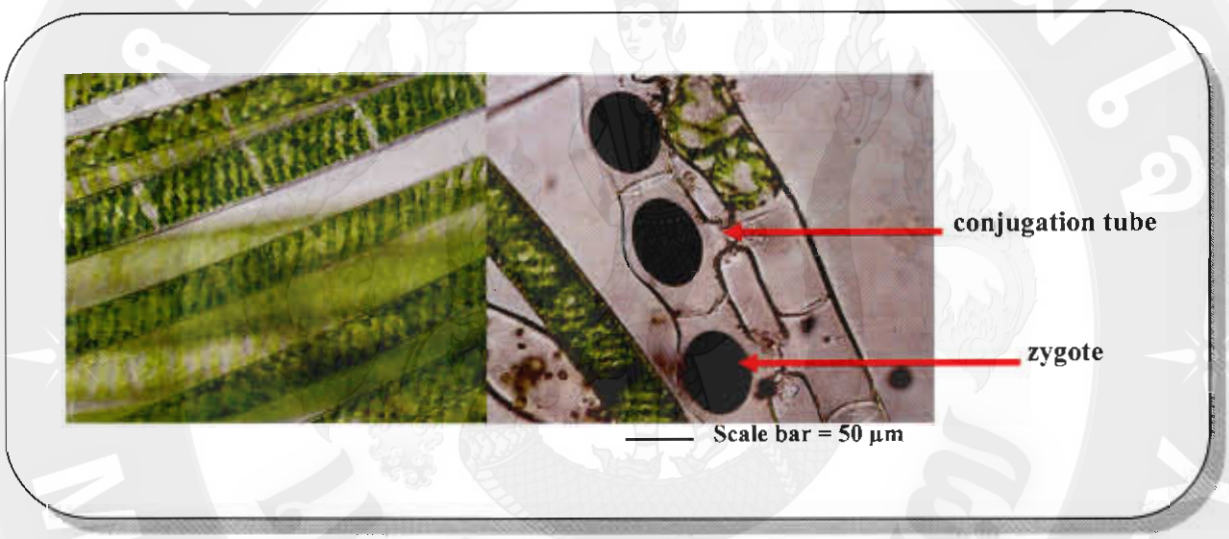
สถานที่ทำการวิจัย

1) คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้
2) ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่

ผลการวิจัย

1. การพิสูจน์เอกลักษณ์ชนิดของสาหร่ายเตา

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



ภาพที่ 7 ภาพถ่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์

สาหร่ายเตาชนิด *Spirogyra neglecta* (Hassall) Kützing เป็นสาหร่ายสีเขียวที่มีลักษณะเป็นเส้นสายไม่แตกแขนง มีสีเขียวสด ขนาดของเซลล์คือ กว้าง 50-67 µm ยาว 100-300 µm ผนังกั้นระหว่างเซลล์เป็นแบบระนาบ (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 รูปร่างเป็นรูปไข่รี ผนังชั้นนอกบางและเรียบ มีสีน้ำตาลเข้ม ภาพที่ 7 เป็นภาพถ่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่แสดงลักษณะเฉพาะของสาหร่ายเตาชนิดนี้

2. การตรวจคัดกรองทางพฤกษเคมี (phytochemical screening)

สาหร่ายเตาถูกเก็บมา 3 ฤดูกาล เพื่อเปรียบเทียบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยเก็บสาหร่ายเตาในช่วงฤดูร้อนตั้งแต่เดือนมีนาคมถึงเมษายน ฤดูฝนเก็บในช่วงเดือนมิถุนายนถึงเดือนสิงหาคม และฤดูหนาวเก็บในช่วงเดือนพฤศจิกายนถึงธันวาคม ในปี พ.ศ.2554 จากนั้นนำมาศึกษาหา ปริมาณผลผลิตของสารสกัด ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS และปริมาณสารประกอบฟีโนลิก (phenolic compounds) ซึ่งเป็นกลุ่มสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ผลการทดลองแสดงดังนี้

2.1 ปริมาณสารสกัดน้ำสาหร่ายเตา 3 ฤดู

สาหร่ายเตาทั้ง 3 ฤดูกาล ถูกนำมาสกัดได้เป็นสารสกัดน้ำมีปริมาณผลผลิตแสดงในตารางที่ 6 โดยพบว่าสาหร่ายเตาแห้งที่เก็บในช่วงฤดูร้อนและหนาวให้ปริมาณผลผลิตของสารสกัดน้ำจากสาหร่ายเตามีค่าสูงใกล้เคียงกัน ส่วนสารสกัดน้ำในฤดูฝนมีผลผลิตน้อยที่สุดเมื่อเทียบจาก 3 ฤดูกาลเก็บ อย่างไรก็ตามสารสกัดที่ได้ให้ปริมาณผลผลิตอยู่ในเกณฑ์สูงทั้ง 3 ฤดูกาล

ตารางที่ 6 ปริมาณสารสกัดจากสาหร่ายเตา

ฤดูการเก็บเกี่ยว	ปริมาณสารสกัด (% yield)
ร้อน	33.30
ฝน	28.02
หนาว	32.33

หมายเหตุ: % yield หมายถึง ปริมาณสารสกัดน้ำจากสาหร่ายเตาต่อสาหร่ายเตาแห้ง 100 กรัม

2.2 ปริมาณกลุ่มสารประกอบฟีโนลิกของสาหร่ายเตา 3 ฤดู

สารประกอบฟีโนลิกเป็นกลุ่มสารที่มีบทบาทสำคัญในการออกฤทธิ์ชีวภาพโดยเฉพาะมีความสัมพันธ์กับการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ จึงทำการวิเคราะห์ปริมาณกลุ่มสารประกอบฟีโนลิกจากสารสกัดน้ำของสาหร่ายเตา 3 ฤดู เปรียบเทียบกัน จากผลการทดลองที่ได้พบว่า ปริมาณสารประกอบฟีโนลิกในฤดูหนาวมีค่าสูงที่สุดซึ่งมีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่แสดงจากค่า TEAC และ GAE ที่มีค่ามากที่สุดด้วย ดังนั้นกลุ่มสารประกอบฟีโนลิกในสาหร่ายเตาจึงเป็นกลุ่มสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ อย่างไรก็ตามค่าสูงสุดในการขจัดอนุมูลอิสระของสาหร่ายเตาทั้ง 3 ฤดู พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05)

สารสกัดน้ำของสาหร่ายเตามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยมีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% (IC_{50}) ในฤดูหนาวดีที่สุด รองลงมาคือ ฤดูฝนและฤดูร้อน ตามลำดับ โดยค่า IC_{50} ที่มีค่าน้อยหมายถึงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง และเมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดน้ำจาก

สาหร่ายเตาปริมาณ 1 กรัม กับสารมาตรฐานคือ trolox ที่มีหน่วยเป็น mM หรือเรียกว่าค่า TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) ที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเท่ากัน ผลการทดลองพบว่า สารสกัดน้ำจากสาหร่ายเตาในฤดูหนาวมีค่า TEAC สูงที่สุด รองลงมาคือ ฤดูฝน และฤดูร้อน ผลแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 เปรียบเทียบการต้านอนุมูลอิสระที่ 50 % ของสาหร่ายเตา 3 ฤดูเทียบกับTrolox และ Gallic Acid

ฤดู	IC_{50} (mg/ml)	TEAC (mM)	GAE (mg)
ร้อน	0.117 ± 0.0022	3,108.27 ± 110.13	77.66 ± 3.56
ฝน	0.073 ± 0.0006	4,968.88 ± 124.55	84.41 ± 0.42
หนาว	**0.053 ± 0.0002**	**6,915.74 ± 157.87**	**92.95 ± 0.10**

ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean± SD) วัดจำนวน 3 ซ้ำ

IC_{50}= Inhibitory Concentration at 50%, TEAC = Trolox Equivalent Antioxidant Capacity,

GAE = Gallic Acid Equivalents

2.3 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีโนลิก คาร์โบไฮเดรต และซัลเฟตโพลีแซคคาไรด์

ตารางที่ 8 แสดงปริมาณ % yield โพลีฟีนอล (phenolic compound) carbohydrate และ sulfate content จากการสกัดลำดับส่วนของสาหร่ายเตาที่เก็บมาในช่วงฤดูหนาว

ตารางที่ 8 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)

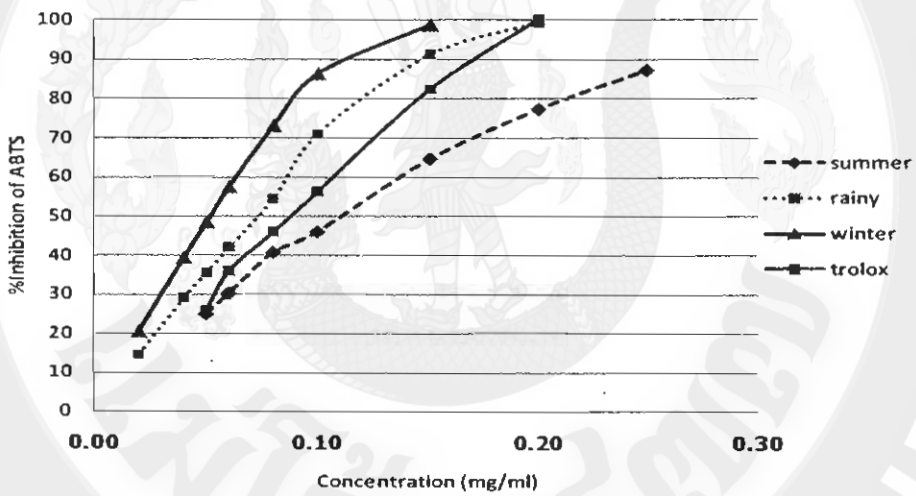
ปริมาณ carbohydrate และ sulfate content วิเคราะห์เฉพาะ CW และ HW

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

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%)

3. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสาหร่ายเตา 3 ฤดู

ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS (% Inhibition of ABTS) ของสารสกัดน้ำสาหร่ายเตาในฤดูร้อนที่ช่วงความเข้มข้น 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 (อนุพันธุ์ของวิตามินอี) ที่ใช้เป็นสารมาตรฐานในช่วงความเข้มข้น 0.05 – 0.20 mg/ml ให้ % Inhibition ระหว่าง 26 – 100 % ผลแสดงในภาพที่ 8



ภาพที่ 8 ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ของสาหร่ายเตา 3 ฤดูเมื่อเทียบกับ trolox

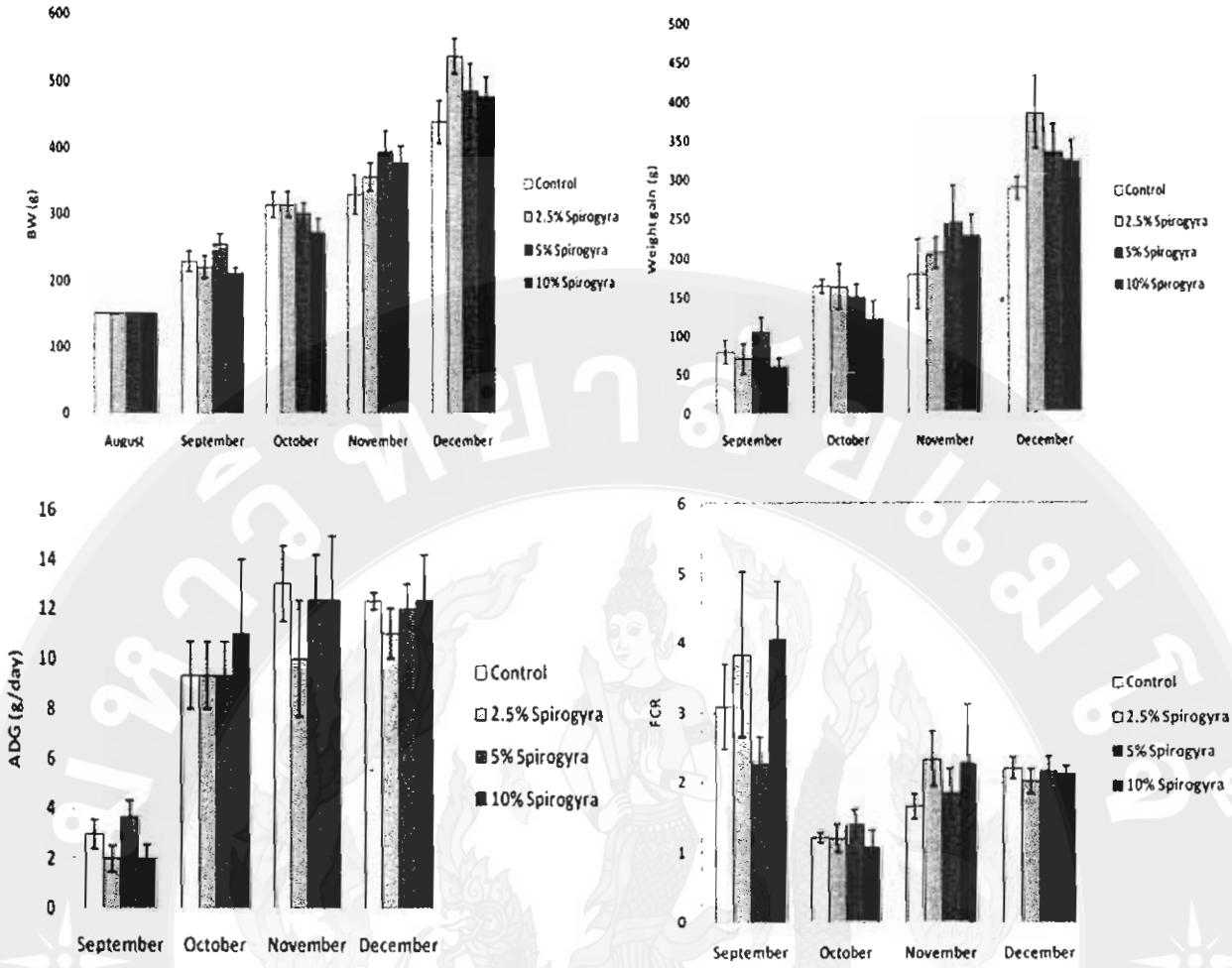
ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดน้ำของสาหร่ายเตาทั้ง 3 ฤดูเมื่อเทียบกับ trolox พบว่า สารสกัดของสาหร่ายเตาฤดูหนาวและฤดูฝนในขนาดความเข้มข้นน้อยกว่ามีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ได้ดีกว่า trolox ส่วนสารสกัดสาหร่ายเตาฤดูร้อนต้องใช้ขนาดความเข้มข้นสูงจึงจะมีค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ดีเท่า trolox และสารสกัดสาหร่ายเตาฤดูฝนและหนาว อย่างไรก็ตามหากเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดสาหร่ายเตาทั้ง 3 ฤดูมากขึ้น สามารถให้ผลการยับยั้งอนุมูลอิสระมากขึ้นได้ใกล้เคียงกับ trolox (97-99%)

4. ผลการเสริมสาหร่ายเตาต่อการเจริญเติบโตของปลานิลในกระชัง

เตรียมอาหารเม็ดผสมสาหร่ายเตา 3 ขนาดคือ 2.5, 5 และ 10% ซึ่งประกอบด้วย ปลาป่น กากถั่วเหลือง ปลายข้าว รำข้าว และสาหร่ายเตา โดยมีปริมาณโปรตีน 30%จากภาพที่9 แสดงลักษณะของอาหารเม็ดผสมสาหร่ายเตาในระดับต่างกัน

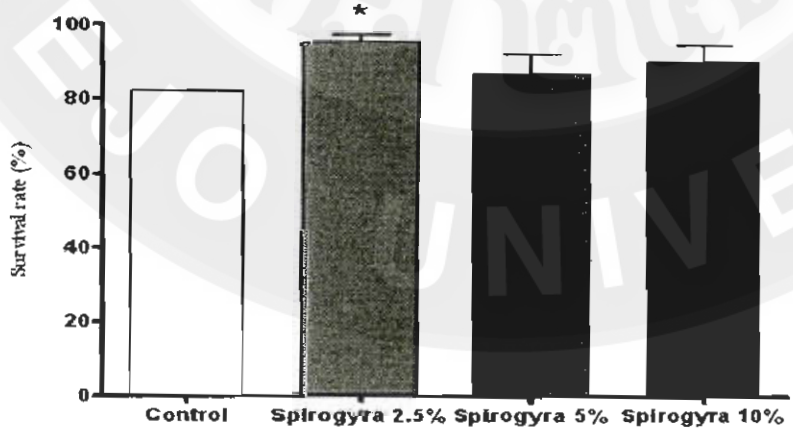
ภาพที่ 9 อาหารเม็ดผสมสาหร่ายเตา 4 สูตร

การเลี้ยงปลานิลด้วยอาหารเม็ดเสริมสาหร่ายเตาระดับ 0, 2.5, 5 และ 10% ในกระชังเป็นเวลา 4 เดือน โดยเริ่มตั้งแต่เดือนสิงหาคมจนถึงเดือนตุลาคม ของปี พ.ศ.2554 ผลการทดลองพบว่า ปลานิลในหน่วยทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมสาหร่ายเตาขนาด 5 และ 10% มีแนวโน้มของน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้นมากกว่าหน่วยทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารปกติที่ไม่เสริมด้วยสาหร่ายเตาในเดือนที่ 3 และ 4 ของการทดลอง ส่วนหน่วยทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมสาหร่ายเตาขนาด 2.5% มีแนวโน้มของน้ำหนักเพิ่มมากที่สุดในเดือนสุดท้ายของการทดลองซึ่งปลานิลมีน้ำหนักประมาณ 500 กรัม และยังพบว่ามีอัตราการรอดสูงกว่าหน่วยทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) อีกด้วย ส่วนค่า WG, ADG และ FCR ของทุกหน่วยการทดลองเมื่อเปรียบเทียบกันในแต่ละเดือนไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ผลแสดงในภาพที่ 10 และ 11



Note: WG= weight gain, ADG= average daily gain, FCR = feed conversion rate

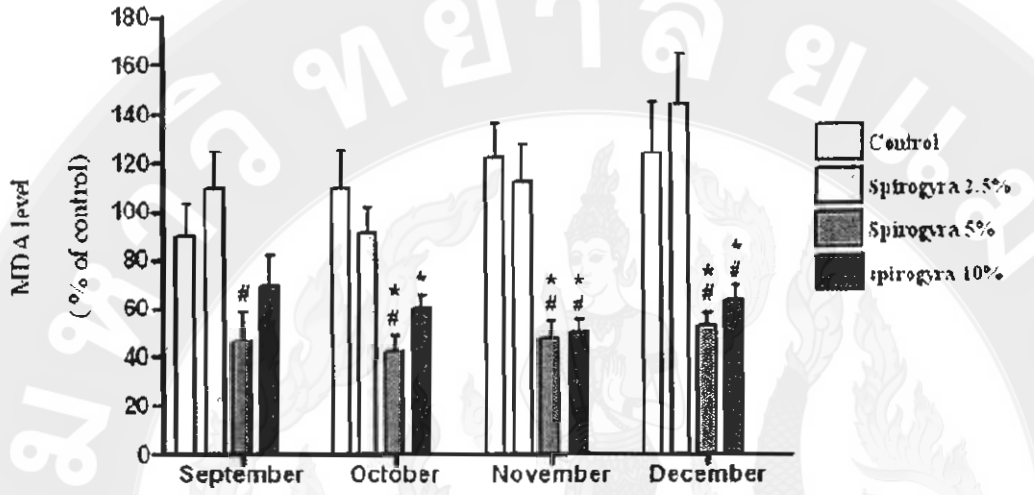
ภาพที่ 10 ผลของการเสริมสาหร่ายเตาต่ออัตราการเจริญเติบโตของปลานิลในช่วงเวลา 4 เดือน



ภาพที่ 11 ผลของการเสริมสาหร่ายเตาต่ออัตราการรอดในช่วงเวลา 4 เดือน

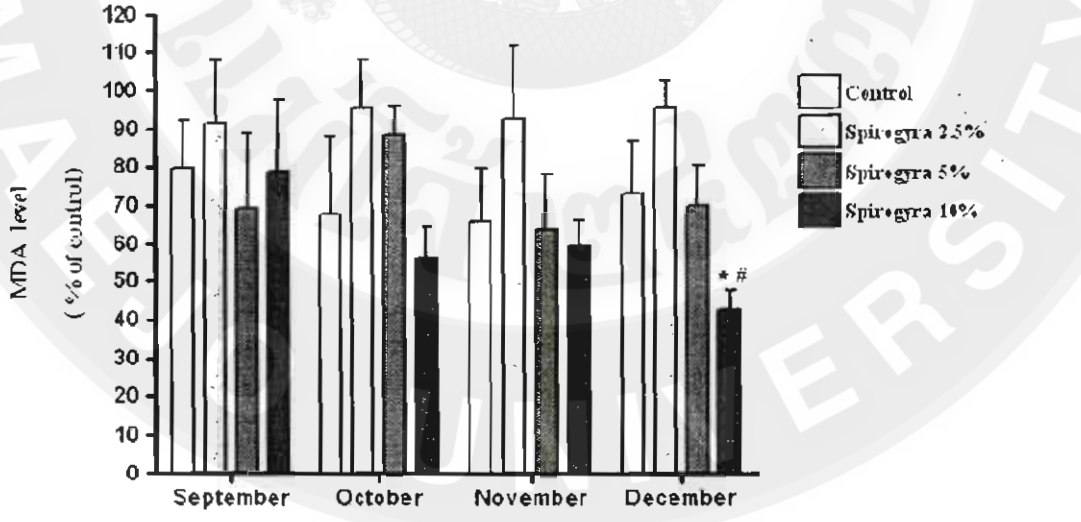
5. ผลการเสริมสาหร่ายเตาต่อระบบต้านอนุมูลอิสระในปลานิล

ทำการประเมินภาวะเครียดออกซเดชั่น (oxidative stress) ในปลานิล โดยการตรวจวัดผลผลิตของการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชั่น (lipid peroxidation) ที่แสดงในรูปแบบของระดับ malondialdehyde (MDA level) ผลแสดงในภาพที่ 12 พบว่า ปลานิลที่เลี้ยงเสริมด้วยสาหร่ายเตาที่ระดับ 5 และ 10% ให้ผลลดระดับ MDA ในไตอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในเดือนที่ 2-4 ของการเลี้ยง(เดือนตุลาคม-ธันวาคม)



ข้อมูลแสดง mean± SE, (n=9) * $p<0.05$; มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม, # $p<0.05$; มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ให้สาหร่ายเตา 2.5%

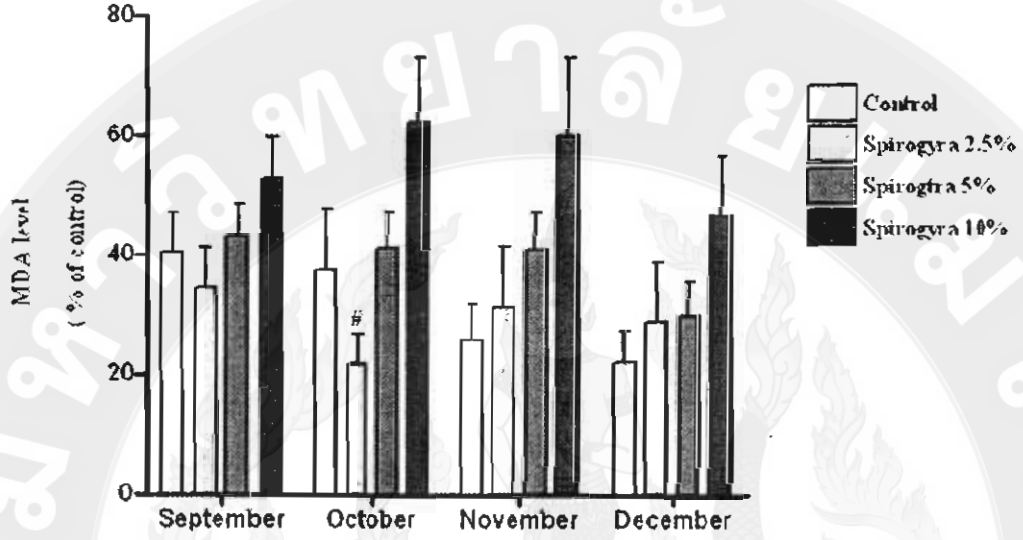
ภาพที่ 12 ผลของสาหร่ายเตาต่อลิปิดเปอร์ออกซิเดชั่นในเนื้อเยื่อไตปลานิล



ข้อมูลแสดง mean± SE, (n=9) * $p<0.05$; มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม, # $p<0.05$; มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ให้สาหร่ายเตา 2.5 และ 5 %

ภาพที่ 13 ผลของสาหร่ายเตาต่อลิปิดเปอร์ออกซิเดชั่นในตับปลานิล

จากภาพที่ 13 พบว่า มีเพียงปลานิลที่เลี้ยงเสริมด้วยสาหร่ายเตาที่ระดับ 10% ที่ให้ผลลดระดับ MDA ในตับอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในเดือนสุดท้ายของการเลี้ยง (เดือนธันวาคม) ส่วนระดับ MDA ในพลาสมาของปลานิลที่เลี้ยงเสริมด้วยสาหร่ายเตาที่ระดับ 2.5% ให้ผลลดระดับ MDA ในพลาสมาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในเดือนที่ 2 ของการเลี้ยง (ตุลาคม) ผลแสดงในภาพที่ 14

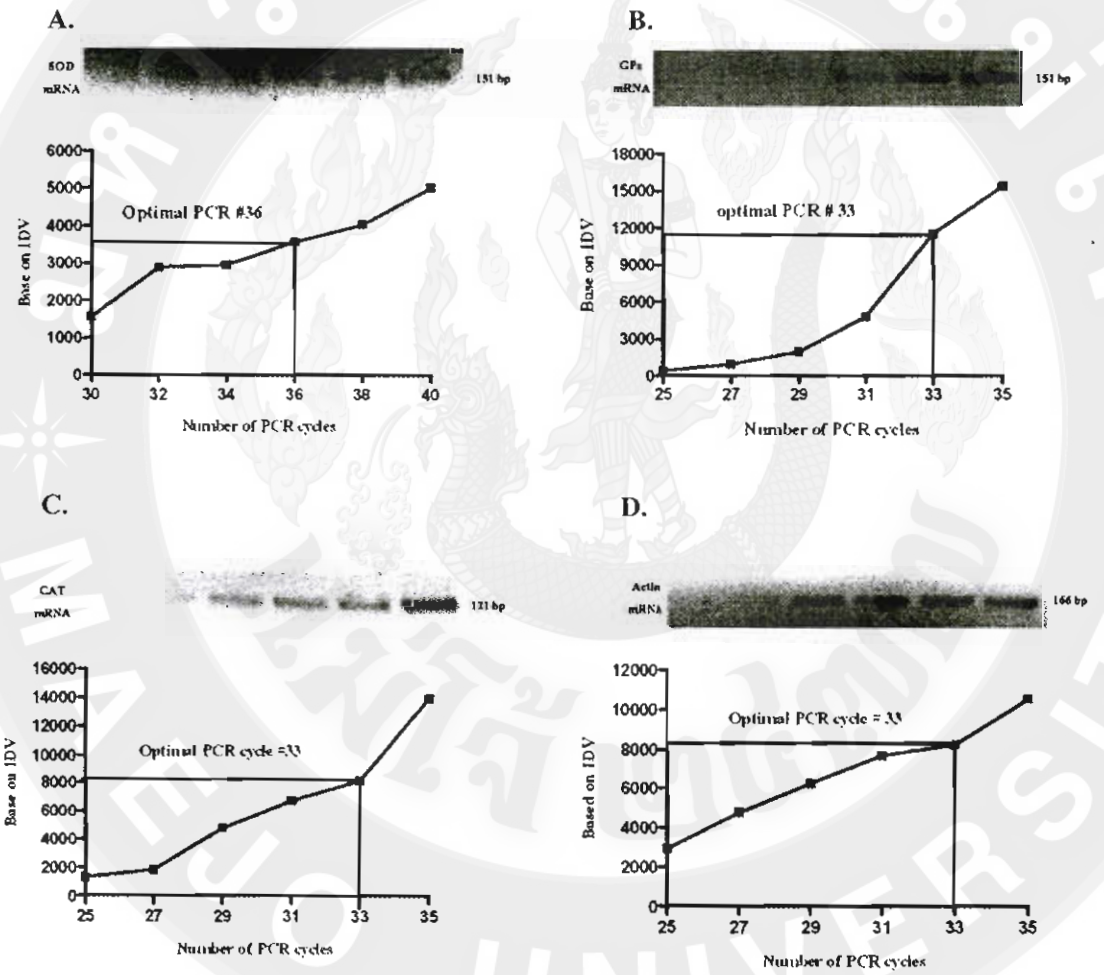


ข้อมูลแสดง mean± SE, (n=9) $\#p<0.05$; มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ให้สาหร่ายเตา 5 และ 10%

ภาพที่ 14 กราฟผลของสาหร่ายเตาต่อลิปิดเปอร์ออกซิเดชั่นในพลาสมาของปลานิล

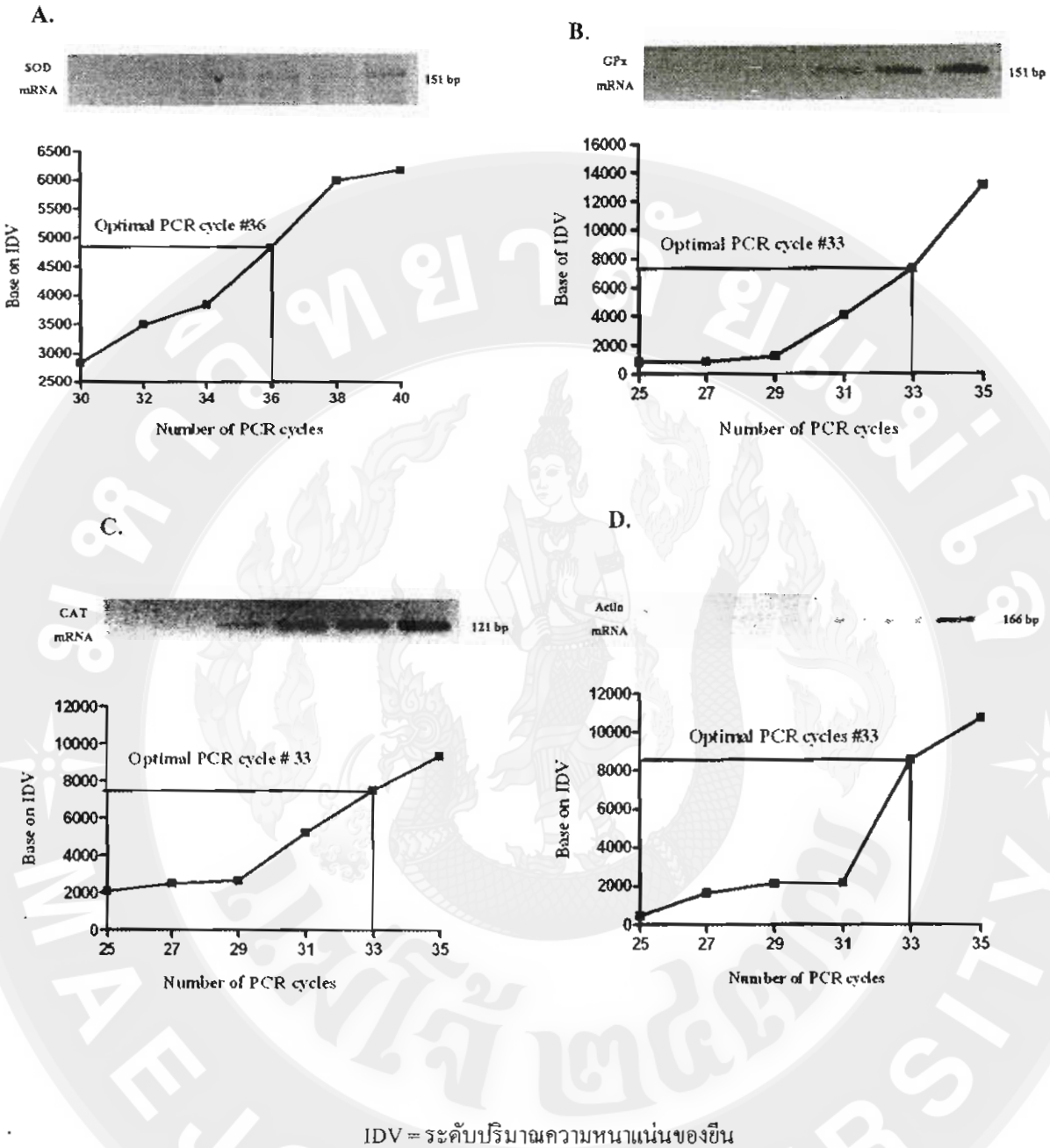
จำนวนรอบที่เหมาะสมของ PCR ต่อ การวัดปริมาณการแสดงออกของยีนแอนติออกซิแดนซ์เอนไซม์

ปริมาณของ mRNA ที่แสดงออกมานั้นขึ้นอยู่กับจำนวนรอบของ PCR ที่เหมาะสมต่อยีนแอนติออกซิแดนซ์เอนไซม์ที่ใช้เป็น maker โดยในภาพที่ 15 แสดงกราฟของ PCR amplification จากเนื้อเยื่อไตในปลานิลกลุ่มที่ไม่ให้สาหร่ายเตาสำหรับพบว่า จำนวนรอบที่เหมาะสมของปริมาณการแสดงออกของยีน Superoxide dismutase (SOD) แสดงที่ 36 รอบ (ภาพที่ 15 A) ส่วน glutathione peroxidase (GPx), Catalase (CAT) และ β – actin อยู่ที่ 33 รอบ (ภาพที่ 15 B, C และ D ตามลำดับ) โดยที่จะใช้จำนวนรอบดังกล่าวเท่ากับการวิเคราะห์ปริมาณของยีนแอนติออกซิแดนซ์เอนไซม์ทุกยีนในเนื้อเยื่อไต (ภาพที่ 15)



IDV = ระดับปริมาณความหนาแน่นของยีน

ภาพที่ 15 จำนวนรอบที่เหมาะสมต่อปริมาณการแสดงออกของยีนแอนติออกซิแดนซ์เอนไซม์ในเนื้อเยื่อไตของปลานิล

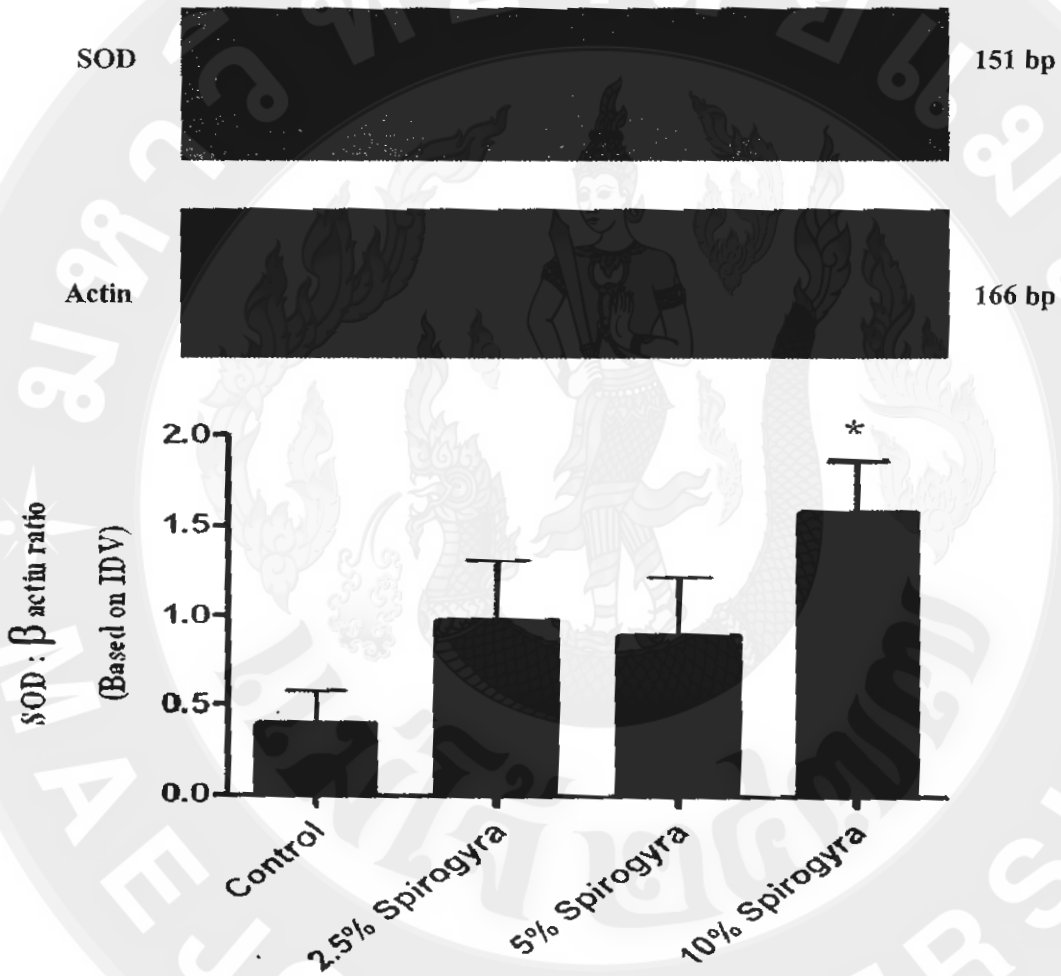


IDV = ระดับปริมาณความหนาแน่นของยีน

ภาพที่ 16 จำนวนรอบที่เหมาะสมต่อปริมาณการแสดงออกของยีนแอนติออกซิแดนซ์เอนไซม์ในเนื้อเยื่อตับของปลานิล

ผลของสาหร่ายเตาต่อการแสดงออกของยีนแอนติออกซิแดนซ์เอนไซม์ในเนื้อเยื่อไตปลานิล

ผลของ RT-PCR ของเอนไซม์ Mn-SOD, glutathione peroxidase และ catalase ในเนื้อเยื่อไตของปลานิลที่ให้อาหารเสริมด้วยสาหร่ายเตาที่ระดับ 0, 2.5, 5 และ 10% เป็นเวลา 4 เดือน แสดงในภาพที่ 17-19 ตามลำดับ โดยพบว่า การให้อาหารเสริมสาหร่ายเตาทุกระดับมีแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ Mn-SOD โดยในปลานิลกลุ่มที่ได้รับสาหร่ายเตาที่ระดับ 10 % มีการเพิ่มของเอนไซม์ขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (1.576±0.288) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ให้สาหร่ายเตา (ภาพที่ 17)

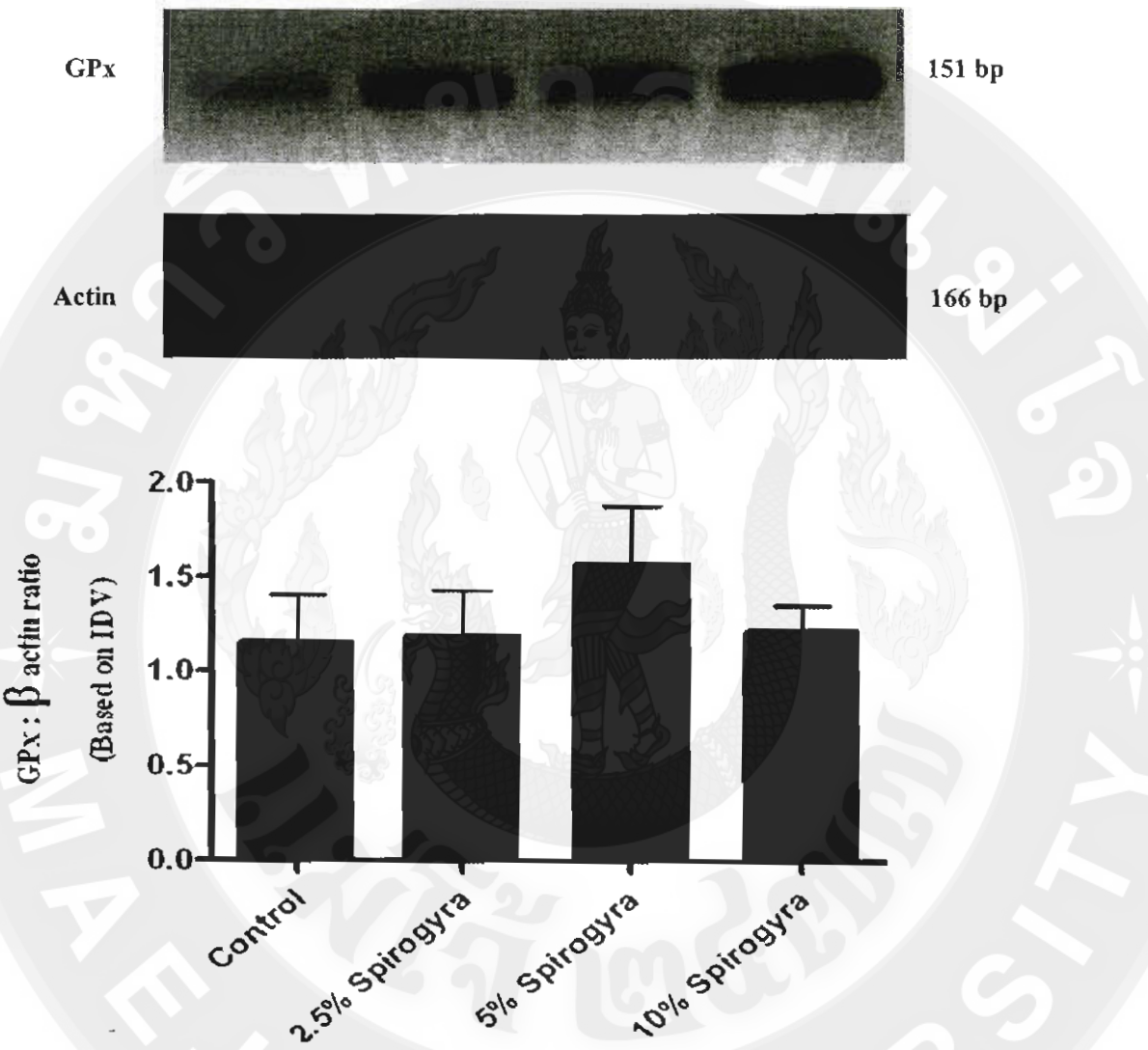


ข้อมูลแสดง mean± SE, (n = 5), IDV = ระดับปริมาณความหนาแน่นของยีน

* $p<0.05$ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ให้สาหร่ายเตา (control)

ภาพที่ 17 ระดับแสดงออกของ mRNA ของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) ในเนื้อเยื่อไตปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมสาหร่ายเตาระดับต่างกัน

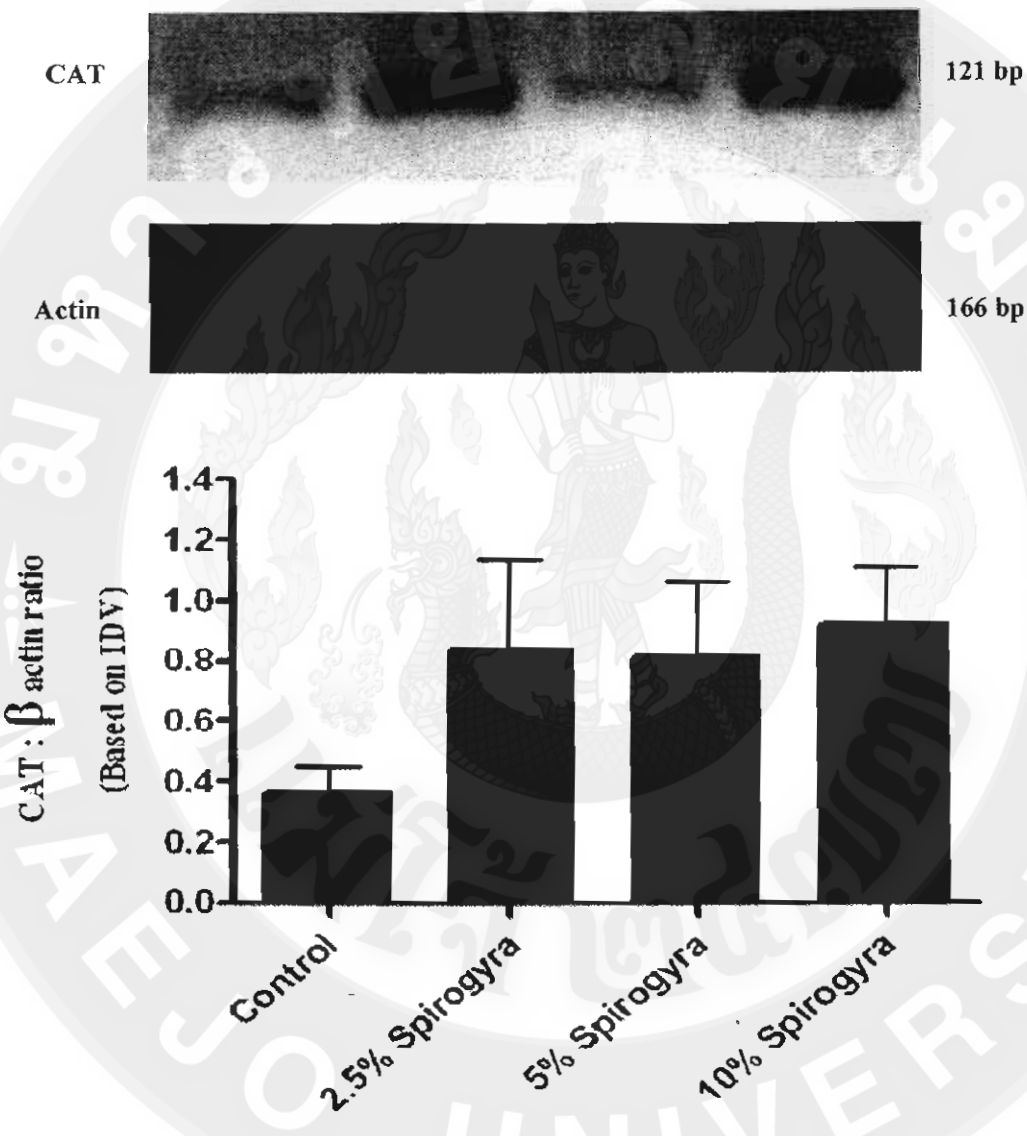
การให้อาหารเสริมสาหร่ายเตาระดับ 5 % มีแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ glutathione peroxidase ในเนื้อเยื่อไตของปลานิล อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างทางสถิติเมื่อเทียบกับทุกกลุ่ม (p>0.05) ผลแสดงในภาพที่ 18



ข้อมูลแสดง mean± SE, (n = 5), IDV = ระดับปริมาณความหนาแน่นของยีน

ภาพที่ 18 ระดับแสดงออกของ mRNA ของเอนไซม์ glutathione peroxidase (GPx) ในเนื้อเยื่อไตปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมสาหร่ายเตาระดับต่างกัน

การให้อาหารเสริมสาหร่ายเตาระดับ 2.5, 5 และ 10% ในปลานิล มีแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ catalase ในเนื้อเยื่อไต อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p > 0.05$) ผลแสดงในภาพที่ 19

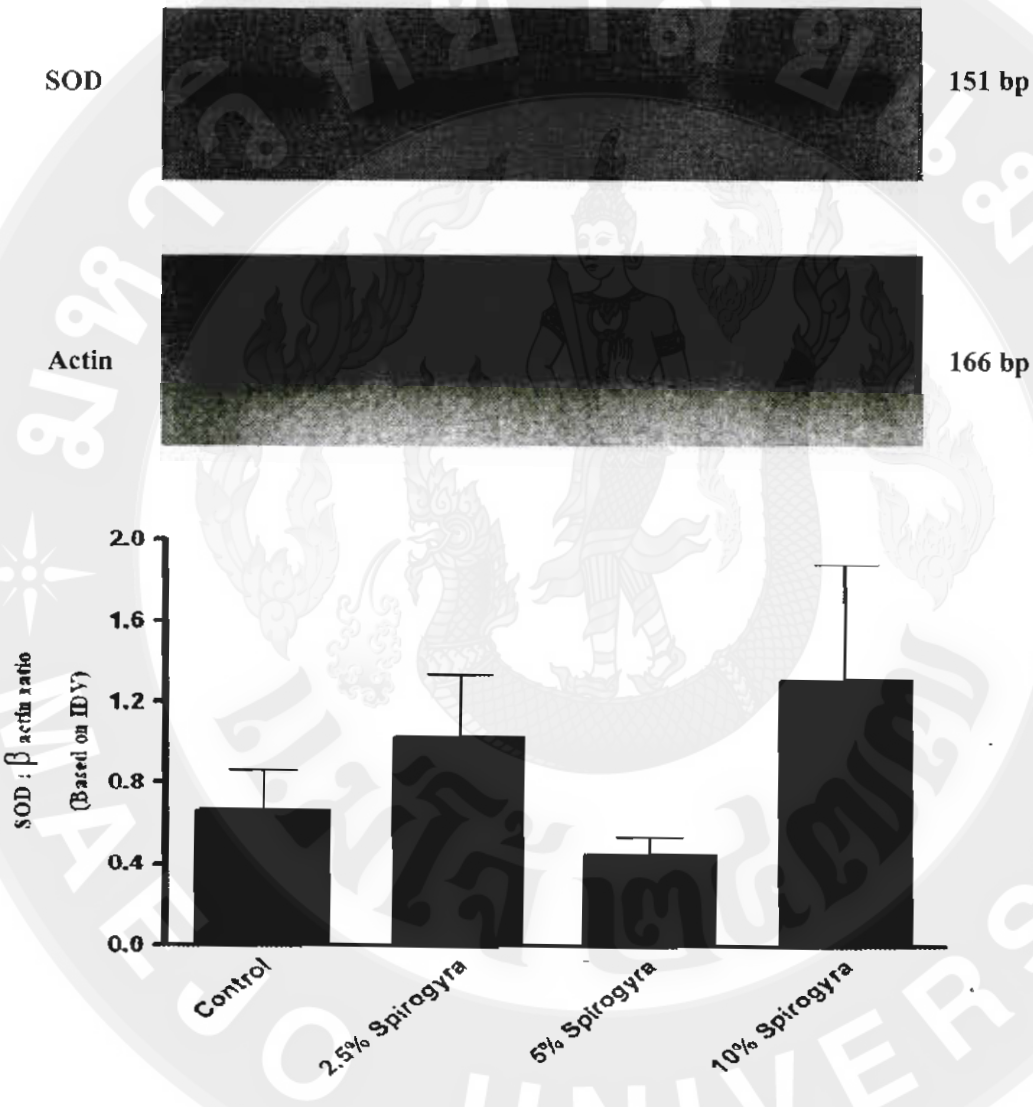


ข้อมูลแสดง mean± SE, (n = 5), IDV = ระดับปริมาณความหนาแน่นของยีน

ภาพที่ 19 ระดับแสดงออกของ mRNA ของเอนไซม์ catalase (CAT) ในเนื้อเยื่อไตปลานิล ที่ได้รับอาหารเสริมสาหร่ายเตาระดับต่างกัน

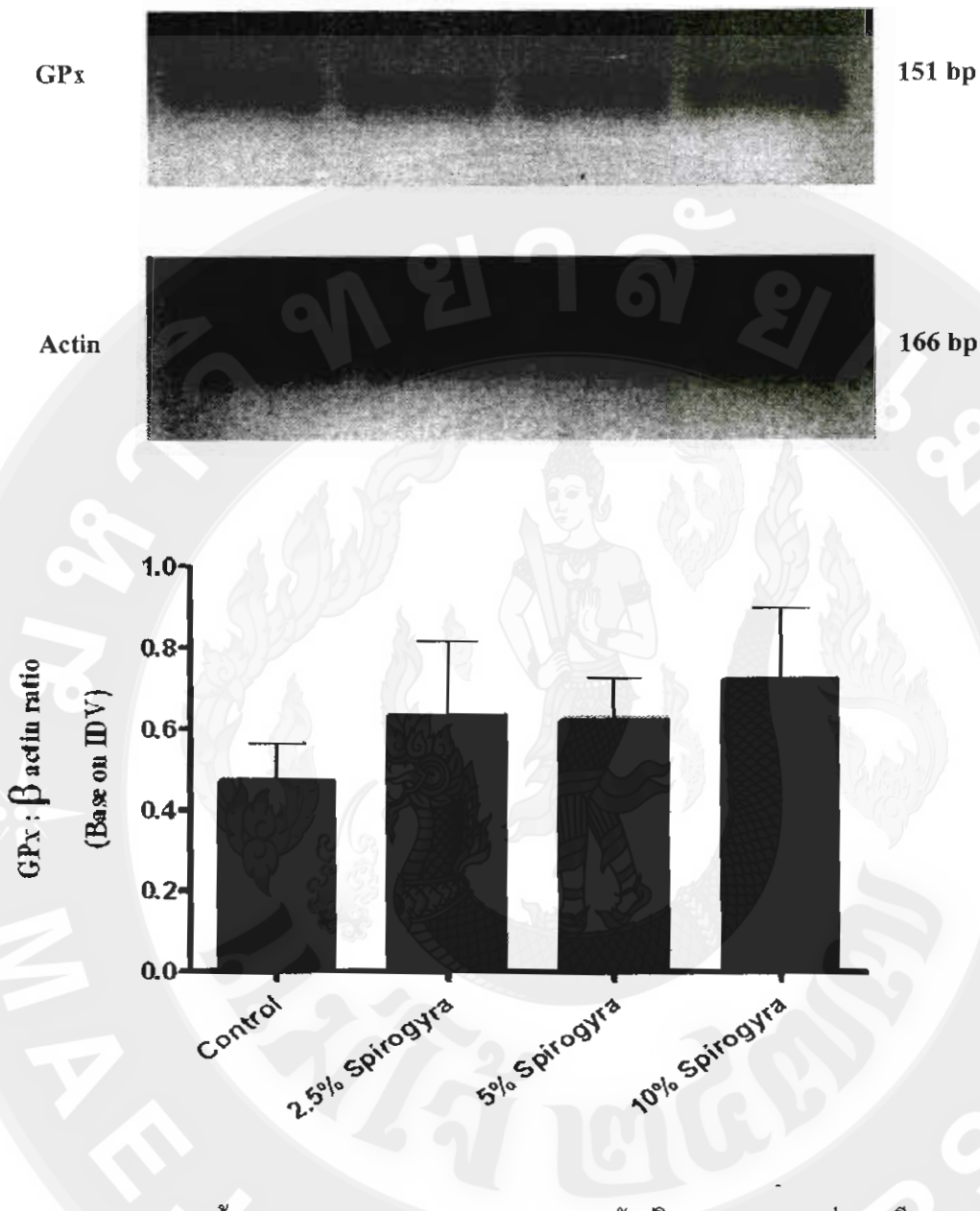
ผลของสาหร่ายเตาต่อการแสดงออกของยีนแอนติออกซิแดนซ์ในเนื้อเยื่อตับปลานิล

ผลของ RT-PCR ของเอนไซม์ Mn-SOD, glutathione peroxidase และ catalase ในเนื้อเยื่อตับของปลานิลที่ให้อาหารเสริมด้วยสาหร่ายเตาที่ระดับ 0, 2.5, 5 และ 10% เป็นเวลา 4 เดือน แสดงในภาพที่ 20-22 ตามลำดับ โดยพบว่า การให้อาหารเสริมสาหร่ายเตามีแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตามไม่มีความแตกต่างกันทางทางสถิติในทุกหน่วยการทดลอง



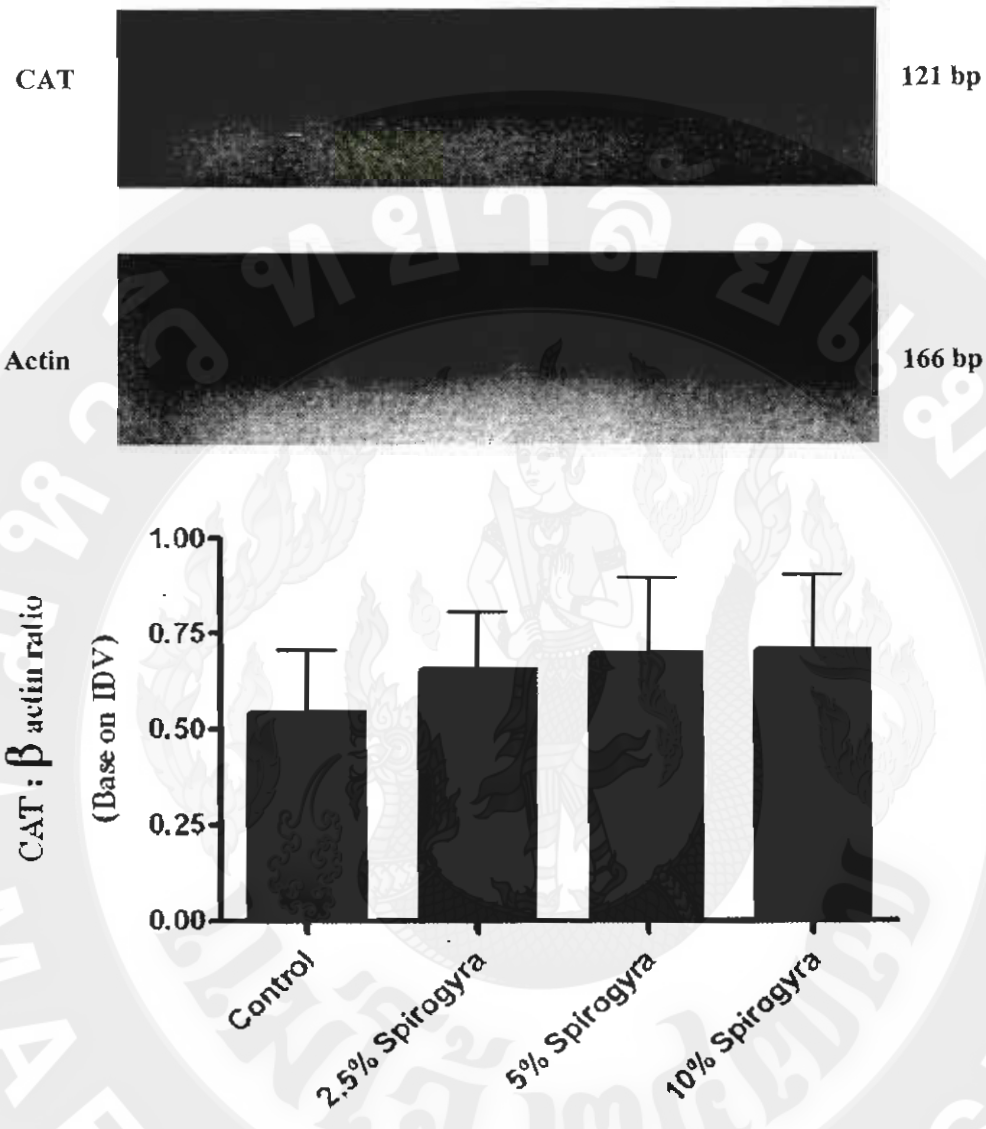
ข้อมูลแสดง mean± SE, (n = 5), IDV = ระดับปริมาณความหนาแน่นของยีน

ภาพที่ 20 ระดับแสดงออกของ mRNA ของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) ในเนื้อเยื่อตับปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมสาหร่ายเตาระดับต่างกัน



ข้อมูลแสดง mean± SE, (n = 5), IDV = ระดับปริมาณความหนาแน่นของยีน

ภาพที่ 21 ระดับแสดงออกของ mRNA ของเอนไซม์ glutathione peroxidase (GPx) ในเนื้อเยื่อตับปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมสาหร่ายเตาระดับต่างกัน



ข้อมูลแสดง mean± SE, (n = 5), IDV = ระดับปริมาณความหนาแน่นของยีน

ภาพที่ 22 ระดับแสดงออกของ mRNA ของเอนไซม์ catalase (CAT) ในเนื้อเยื่อตับปลานิล ที่ได้รับอาหารเสริมสาหร่ายเตาระดับต่างกัน

ผลของการเสริมสาหร่ายเตาต่อระดับกลูต้าไทโอน (GSH) ในปลานิล

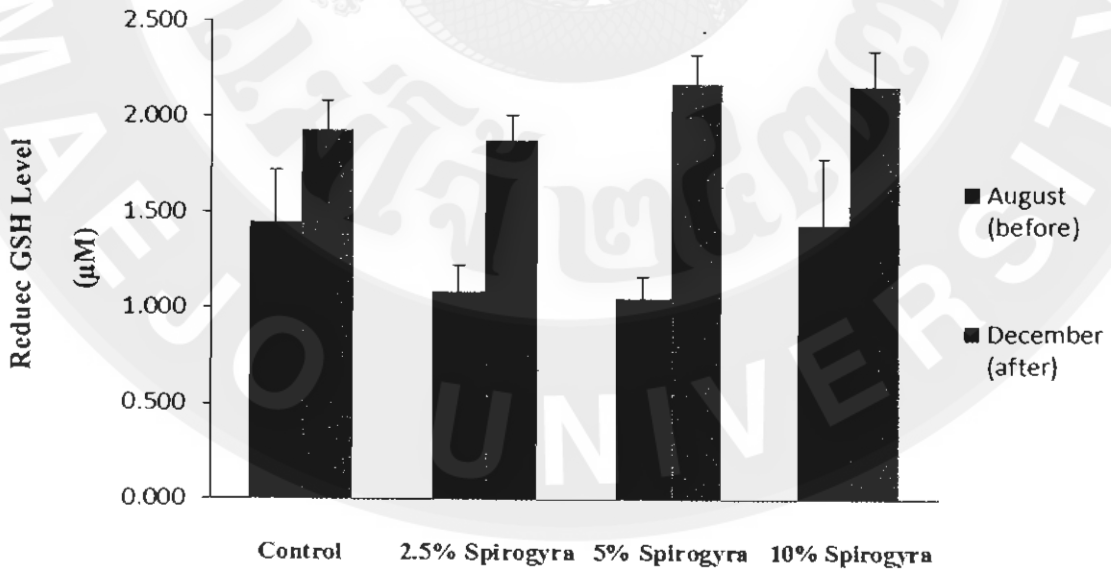
จากการเลี้ยงปลานิลในกระชังด้วยอาหารเสริมสาหร่ายเตาที่ระดับ 0, 2.5, 5 และ 10% พบว่า ปลานิลที่ให้อาหารเสริมสาหร่ายเตาในระดับ 2.5 และ 5 % เป็นเวลา 4 เดือน มีระดับกลูตาไทโอนรวม (total GSH) และรีดิวส์กลูตาไทโอน (reduce GSH) เพิ่มขึ้น และมีการลดลงของระดับออกซิไดส์กลูตาไทโอน (GSSG) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ต่างจากระดับก่อนการให้สาหร่าย ผลแสดงในตารางที่ 9 และภาพที่ 23

ตารางที่ 9 ผลของระดับกลูตาไทโอนรวม ออกซิไดส์ดาไทโอน และรีดิวส์กลูตาไทโอน

		Spirogyra sp.			
		0%	**2.5%**	**5%**	**10%**
Total GSH	ก่อนให้	14.60±1.21	15.80±1.82	15.60±0.93	18.40±2.15
	หลังให้	21.80±0.89*	21.60±1.16*	20.40±0.67*	22.20±0.96
GSSG	ก่อนให้	11.12±1.49	14.76±0.79	15.94±0.77	14.06±1.32
	หลังให้	11.59±1.04	11.59±0.50*	9.59±0.75*	10.65±1.15
Reduce GSH	ก่อนให้	1.450±0.26	1.087±0.13	1.051±0.11	1.438±0.34
	หลังให้	1.934±0.15	1.879±0.12*	2.171±0.15*	2.159±0.18

ค่าที่แสดงคือ mean±S.E. (n=5)

* $p<0.05$ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบก่อนให้และหลังให้ในกลุ่มเดียวกัน



ภาพที่ 23 ระดับของรีดิวส์กลูตาไทโอนในปลานิลที่ให้อาหารเสริมสาหร่ายเตาเป็นเวลา 4 เดือน

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

สารประกอบฟีโนลิกเป็นกลุ่มสารที่มีบทบาทสำคัญในการออกฤทธิ์ชีวภาพ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ ต้านเชื้อแบคทีเรียและไวรัส เป็นต้น ซึ่งคุณสมบัติดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ กลุ่มสารประกอบฟีโนลิกสามารถตรวจพบได้ในพืชผัก ผลไม้ ชา สาหร่าย เป็นต้น โดยมีสูตรโครงสร้างทางเคมีเป็นวงแหวนที่มีหมู่ไฮดรอกซิลอย่างน้อยหนึ่งหมู่หรือมากกว่านั้น สามารถละลายน้ำได้ สารประกอบฟีโนลิกที่พบในธรรมชาติมีมากมายหลายชนิด มีลักษณะสูตรโครงสร้างทางเคมีที่แตกต่างกัน ซึ่งกลุ่มใหญ่ที่สุดที่พบจะเป็นสารประกอบพวกฟลาโวนอยด์ (flavonoids) สารประกอบฟีโนลิกเป็นสารต้านออกซิเดชันที่สำคัญชนิดหนึ่งมีสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชัน ทำหน้าที่ทั้งเป็นสารให้อิเล็กตรอน หรือเป็นตัวให้ไฮโดรเจน และกำจัดออกซิเจน (Halliwell *et al.*, 1992; Vajraguta *et al.*, 2007)

ได้มีรายงานการวิจัยการตรวจพบกลุ่มสารประกอบฟีโนลิกในสาหร่ายน้ำจืดขนาดใหญ่พบว่า 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.*, 2009; Peerapornpisal *et al.*, 2010) สารสกัดน้ำของสาหร่ายเตามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเมื่อนำมาทดสอบในการทดลองฤทธิ์กำจัดอนุมูล DPPH ฤทธิ์กำจัดอนุมูล superoxide และฤทธิ์ยับยั้งการเกิด lipid peroxidation และมีฤทธิ์ยับยั้งการเกิดการอักเสบเมื่อทดสอบในหนูขาวที่กระตุ้นให้เกิดการบวมบริเวณใบหูหนูด้วยสาร ethyl phenyl propiolate (ยุวดีและคณะ, 2555)

มีรายงานการวิจัยของ Wu *et al.* (2005) พบว่า สารสกัดน้ำของสาหร่าย *Spirulina* sp. มีสารประกอบฟีโนลิกเป็นส่วนประกอบและมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระDPPH 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) ในปัจจุบันได้มีการนำสาหร่ายทะเลเหล่านี้มาใช้เป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์น้ำ

จากการศึกษาในหลอดทดลอง (*in vitro*) ในครั้งนี้พบว่า สารสกัดน้ำสาหร่ายเตามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในแบบจำลองการขจัดอนุมูลABTS โดยตรวจพบว่ามีกลุ่มสารสำคัญคือ สารประกอบฟีโนลิก ซึ่งมีค่ามากที่สุดในฤดูหนาวโดยมีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่เพิ่มขึ้นด้วย อย่างไรก็ตามค่าสูงสุดในการต้านอนุมูลอิสระของสาหร่ายเตาทั้ง 3 ฤดูไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นการเก็บสาหร่ายเตามาใช้ประโยชน์สามารถเก็บเกี่ยวได้ทั้ง 3 ฤดูกาลหรือตลอดปี ซึ่งไม่มีผลต่อปริมาณสารสำคัญและการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ อีกทั้งผลจากการวิจัยในครั้งนี้สามารถใช้ปริมาณกลุ่มสารฟีโนลิกซึ่งเป็นสารต้านออกซิเดชันที่สำคัญชนิดหนึ่งที่พบในสาหร่ายเตามาเป็นตัวกำหนดมาตรฐาน (standardization) เพื่อบ่งบอกความสามารถในการออกฤทธิ์ชีวภาพในแต่ละครั้ง (batch) ของการเก็บเกี่ยวได้ ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการนำสาหร่ายเตามาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์อาหารสุขภาพของคนและสัตว์ต่อไป

อนุมูลอิสระมีบทบาทในการเกิดการอักเสบ และการทำลายเนื้อเยื่อ มีผลต่อความเสื่อมหรือการแก่ของเซลล์ ทำให้เป็นต้นเหตุของการเกิดโรค (Lee *et al.*, 2004) อนุมูลอิสระที่มีความสำคัญทางชีวภาพได้แก่ Superoxide radicals ($O_2^{-\bullet}$) และ Hydroxyl radicals ($OH^{\bullet}$) เป็นต้น ส่วน lipid peroxidation (LPO) เป็นกระบวนการที่อนุมูลอิสระเข้าทำลายไขมันชนิดต่างๆ เช่น triglyceride, diglyceride และ phospholipid รวมถึงกรดไขมันไม่อิ่มตัว ทำให้ได้ lipid peroxides ที่เป็นผลิตภัณฑ์อันดับต้น แล้วสามารถเปลี่ยนเป็น 4-hydroxyalkenals และ malondialdehyde ซึ่งเป็นสารที่มีพิษต่อเซลล์ โดย LPO สามารถบ่งชี้บอกถึงปริมาณของอนุมูลอิสระในเซลล์ได้ (Yusong *et al.*, 2003) จากการที่สาหร่ายเตามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและตรวจพบสารประกอบฟีโนลิกซึ่งเป็นสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ จึงนำสาหร่ายเตามาใช้ประโยชน์ในการส่งเสริมสุขภาพของสัตว์น้ำโดยการเสริมสาหร่ายเตาระดับ 2.5, 5 และ 10% ในอาหารเลี้ยงปลานิล ผลการศึกษาพบว่า สาหร่ายเตาระดับ 2.5% มีผลเพิ่มน้ำหนักและอัตราการรอดได้ดีกว่าทุกกลุ่ม ถึงแม้ว่าจะเพิ่มระดับของสาหร่ายเตาเป็น 5 และ 10% ก็ตาม แสดงว่าการเสริมสาหร่ายเตาระดับ 2.5% ในอาหารปลาเป็นระดับที่ให้ผลสูงสุด (maximum response) ในการศึกษาครั้งนี้

การเกิดอนุมูลอิสระในปลาเกิดขึ้นได้จากขบวนการเมตาบอลิซึมจากการใช้ออกซิเจนหรือเกิดจากสิ่งแวดล้อมภายนอก เช่น การปรับเปลี่ยนอุณหภูมิของน้ำ ภาวะขาดออกซิเจน ความเครียด ยาและสารเคมีบางชนิดเป็นต้น อนุมูลอิสระมีบทบาทในการก่อให้เกิดการอักเสบ และการทำลายเนื้อเยื่อ มีผลต่อความเสื่อมของเซลล์ ทำให้เกิดโรคต่าง ๆโดยอนุมูลอิสระ หรือ) จัดเป็นโมเลกุลที่ไม่เสถียรและว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาเคมี ในภาวะที่มีสารอนุมูลอิสระมากไม่สมดุลกับสารต้านอนุมูลอิสระทำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชั่น (oxidative stress) จากสาเหตุดังกล่าวจะส่งผลให้เกิดการถูกทำลายของดีเอ็นเอโปรตีนและไขมันจากอนุมูลอิสระ มีการทำลายเนื้อเยื่อส่งผลให้เซลล์ได้รับความเสียหาย ทำให้เป็นต้นเหตุของการเกิดโรค (Halliwell *et al.*, 1992; Vajraguta *et al.*, 2007)

ภาวะ oxidative stress มีสาเหตุมาจากสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม การเปลี่ยนแปลงของฤดูกาลที่มีผลต่ออุณหภูมิของน้ำ การปนเปื้อนจากสารพิษหรือโลหะหนัก การได้รับอาหารไม่มีคุณค่าหรือไม่เพียงพอ

ต่อความต้องการ ทำให้เกิดการสร้างอนุมูลอิสระที่มีผลเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxic effect) มีผลต่อ membrane phospholipids ที่มีทั่วตัวปลา เกิดปฏิกิริยาลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน(lipid peroxidation)ที่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงการทำงานของไขมัน โปรตีนต่างๆ ทั้งที่อยู่ในเซลล์และที่อยู่ที่ผนังของเซลล์ได้ ทำให้เกิดผลเสียต่อตัวปลาโดยทำให้ปลามีอัตราการเจริญเติบโตช้าและภูมิคุ้มกันลดลงทำให้เป็นโรคได้ง่าย ในภาวะที่มีสารอนุมูลอิสระมีมากไม่สมดุลกับสารต้านอนุมูลอิสระจะทำให้ปลาเกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) ขึ้น โดยอาจเป็นผลมาจากการสร้างสารอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น และ/หรือมีการลดลงของสารและเอนไซม์ที่ต้านอนุมูลอิสระลดลงในตัวปลา เช่น superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) และ glutathione (GSH) เป็นต้น (Van der Oost *et al*, 2003)

วิธีการปกป้องการเกิดภาวะ oxidative stress โดยกลูตาไทโอนและสารต้านอนุมูลอิสระเริ่มจากปฏิกิริยาที่เอนไซม์ SOD เปลี่ยนซุปเปอร์ออกไซด์แอนอิออน ($O_2^{-\bullet}$) เป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) จากนั้น H_2O_2ถูกสลายเป็นน้ำและออกซิเจนได้ 2 ปฏิกิริยา ด้วยเอนไซม์ CAT และ Glutathione peroxidase (GPx) โดยมีกลูตาไทโอน (GSH) เป็นตัวให้อิเล็กตรอนที่มีผลทำให้กลูตาไทโอนเปลี่ยนไปอยู่ในรูปออกซิไดส์หรือไดซัลไฟด์ (GSSG) จากนั้น GSSG ถูกเปลี่ยนกลับไปเป็นกลูตาไทโอนโดยเอนไซม์กลูตาไทโอนรีดักเตส (GR) ดังนั้นเมื่อเกิดภาวะ oxidative stress ระดับของ GSSG (oxidised glutathione) จะมีเพิ่มมากขึ้นและระดับ reduced GSH (reduced glutathione) จะลดลง ส่วนอนุมูลลิพิดเมื่อทำปฏิกริยากับออกซิเจนได้เป็นอนุมูลลิพิดเปอร์ออกไซด์ ($LOO^{\cdot}$) ซึ่งเป็นอันตรายต่อเซลล์ แต่สามารถถูกขจัดได้โดยเอนไซม์ (GPx) และกลูตาไทโอน (โอภาและคณะ, 2549; Van der Oost *et al*, 2003)

มีรายงานการวิจัยของยุวดี และคณะ (2555) พบว่า สารสกัดน้ำสาหร่ายเตาที่ความเข้มข้น 5-18 มก./มล. สามารถยับยั้งการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชันได้ระหว่าง 24-95% (ยุวดี, 2555) และมีรายงานว่า ในหนูแก่จะมีค่า MDA ซึ่งแสดงการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชันในระดับที่สูงขึ้น แต่เมื่อให้สาร โพลีแซคคาไลด์ที่สกัดด้วยสาหร่าย *Porphyra haitanesis* ทำให้ระดับ MDA ในตับลดลงอย่างมีนัยสำคัญ โดยให้ผลเทียบเท่ากับวิตามินซี (Quanbin Zhang, 2003) ส่วน Anbarasu (2011) รายงานว่า หนูที่ให้อาหารผสมคาโรทีนอยด์ที่สกัดจากสาหร่าย *Aspergillu carbonarius* ที่ความเข้มข้น 250 ppm ทำให้ระดับ MDA ในตับลงลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

มีรายงานการวิจัยพบว่า หนูแก่ที่ได้รับสาร polysaccharide ที่สกัดจากสาหร่ายทะเล *Porphyra haitanesis* ทำให้ระดับของเอนไซม์ SOD เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยสามารถตรวจพบได้จากเนื้อเยื่อปอด ตับ หัวใจ และสมอง (Quanbin Zhang, 2003) และมีรายงานว่าสาร polysaccharide ที่สกัดจากสาหร่าย *Coriolus versicolor* ทำให้สภาวะออกซิเดชันลดลงโดยการเพิ่มขึ้นของระดับการแสดงออกใน mRNA ของเอนไซม์ Mn-SOD และ GSH-Px (Pang Z. J., 2000) ส่วน Mazmanc (2010) ได้รายงานว่า ผลของสารสกัดจาก Pseudo-nitzschia ซึ่งเป็นไดอะตอมชนิดหนึ่ง ช่วยเพิ่มระดับของเอนไซม์ SOD ในตับและเหงือกของปลานิลเอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามปริมาณของเอนไซม์ที่วิเคราะห์ได้นั้นขึ้นอยู่กับ

ปัจจัยหลายอย่าง ได้แก่ การออกแบบการทดลอง อายุของสัตว์ทดลอง ความรุนแรงของพยาธิสภาพ การเก็บอวัยวะที่เกี่ยวข้อง และเทคนิคในการวัด (Limaye *et al*, 2003; Maritim *et al*, 2003)

กลูต้าไทโอน (GSH) เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ร่างกายสามารถผลิตได้เอง และพบได้ในอาหาร เช่น ผัก ผลไม้ เป็นต้น มีหน้าที่ช่วยสร้างและกระตุ้นการทำงานของเอ็นไซม์หลายชนิดเพื่อให้ร่างกายต่อต้านสิ่งแปลกปลอมและกำจัดพิษออกจากร่างกาย รวมถึงเชื้อแบคทีเรียและไวรัสด้วย ช่วยให้วิตามินซีและอี ทำงานได้เต็มที่ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกันในร่างกาย นอกจากนี้ยังช่วยสร้างและซ่อมแซม DNA สร้างโปรตีน และ prostaglandin สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพและบ่งบอกระดับการกำจัดอนุมูลอิสระในสิ่งมีชีวิต (โอภาและคณะ, 2549; Cheung *et al*, 2001; Van der Oost, *et al*, 2003) มีรายงานการศึกษาในปลาทอง พบว่า ระดับของกลูตาไทโอนเพิ่มมากขึ้นเมื่อปลาทองปนเปื้อนสารพิษ 2,4-dichlorophenol เป็นเวลา 40 นาที (Yonar and Sakin, 2011) และพบว่ามีการลดลงของกลูตาไทโอนเปอร์ออกซิเดส (GPx) ในตับของปลา bluegill sunfish ที่สัมผัสสารพิษ atrazine (Oropesa *et al*, 2009) นอกจากนี้มีการศึกษาพบว่า กลูต้าไทโอนยังเป็นตัวช่วยในการสร้างกลูต้าไทโอนรีดักเตส (GR) ที่เป็นเอนไซม์ในการกำจัดสารพิษอีกด้วย (Jamall and Sporwis, 1987) การมีกลูต้าไทโอนในปริมาณมากจะช่วยเสริมให้ปลามีสภาวะที่ทนต่อโรคหรือช่วยให้ปลามีการเจริญเติบโตดีขึ้น (Elia *et al*, 2006) อย่างไรก็ตามสภาวะความเครียดในปลาและการต้านอนุมูลอิสระขึ้นอยู่กับชนิด ที่อยู่อาศัย และพฤติกรรมการกินอาหารของปลา โดยที่การทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระจะถูกชักนำจากภาวะออกซิเดชั่น หากเกิดภาวะออกซิเดชั่นระดับรุนแรง อาจไปมีลดการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระและสูญเสียการควบคุมของระบบต้านอนุมูลอิสระได้ (Zhang *et al*, 2004)

จากการทดลองครั้งนี้ได้ให้สาหร่ายเตาเสริมในอาหารปลานิลโดยเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 เดือน พบว่ามีการลดลงของระดับลิพิดเปอร์ออกซิเดชันในเนื้อเยื่อไตและตับของปลานิล โดยที่ระดับ MDA หรือการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชันในเนื้อเยื่อไตของปลานิลที่ให้อาหารเสริมสาหร่ายเตาที่ 5 และ 10% พบการลดลงของระดับ MDA ได้ตั้งแต่เดือนที่ 2 ของการทดลอง ส่วนในเนื้อเยื่อตับจะพบการลดลงในเดือนที่ 4 เท่านั้น และในพลาสมาให้ผลลดระดับ MDA จากการเลี้ยงอาหารเสริมสาหร่ายเตาที่ระดับ 2.5% ในเดือนที่ 2 ของการเลี้ยงเท่านั้น อย่างไรก็ตามผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับระดับเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระในเนื้อเยื่อไตและตับของปลานิล พบว่ามีระดับของเอนไซม์ SOD, CAT และ GPx ที่มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นโดยเฉพาะระดับ SOD ในไตของปลานิลมีระดับเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในปลานิลกลุ่มที่ได้รับอาหารเสริมสาหร่ายเตาที่ระดับ 10% นอกจากนี้ยังพบว่ามีการเพิ่มขึ้นของระดับกลูตาไทโอนรวม (total GSH) และรีดิวส์กลูตาไทโอน (reduced GSH) เพิ่มขึ้น ร่วมกับมีการลดลงของระดับออกซิไดส์กลูตาไทโอน (GSSG) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเสริมสาหร่ายเตาที่ระดับ 2.5 และ5% อีกด้วย ผลจากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า การเสริมสาหร่ายเตาในอาหารปลาช่วยให้มีการลดลงของอนุมูลอิสระจากการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชันและเพิ่มการ

สร้างสารกลูตาไทโอนและเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ SOD ในตัวปลา ส่งผลให้ลดหรือป้องกันภาวะ oxidative stress ได้ ช่วยทำให้ปลามีอัตราการรอดสูง ทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้

ดังนั้นจากผลการทดลองดังกล่าวสามารถสรุปได้ว่า สาหร่ายเตามีศักยภาพในการเป็นอาหารเสริมในปลา สามารถช่วยส่งเสริมสุขภาพสัตว์น้ำ และเพิ่มประสิทธิภาพการเลี้ยงสัตว์น้ำได้

ข้อเสนอแนะ

1. สาหร่ายเตาที่ระดับ 2.5% มีความเหมาะสมในการเสริมในอาหารเลี้ยงปลานิล เนื่องจากให้ผลการเจริญเติบโตไม่ต่างจากเมื่อเพิ่มระดับขึ้นเป็น 5 และ 10% นอกจากจะช่วยประหยัดค่าใช้จ่ายในการลงทุนค่าอาหารแล้ว ยังพบอัตราการรอดดีที่สุดอีกด้วย
2. การเสริมสาหร่ายเตาในอาหารปลาปลานิลควรให้ตั้งแต่เดือนแรกของการเลี้ยงเพื่อป้องกันการเกิดภาวะเครียด (oxidative stress) เนื่องจากลูกปลายังมีระบบต้านอนุมูลอิสระทำงานได้ไม่ดีพอ ซึ่งจะส่งผลต่ออัตราการรอดของลูกปลา
3. การเพิ่มระยะเวลาในการเลี้ยงปลานิลด้วยอาหารเสริมสาหร่ายเตาเป็นระยะเวลามากกว่า 4 เดือน หรือเพิ่มจำนวนสัตว์ทดลองเพิ่มขึ้น อาจให้ผลแสดงระดับเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระได้ชัดเจนมากขึ้น อย่างไรก็ตามค่าใช้จ่ายจะเพิ่มมากขึ้นด้วย
4. การวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระสามารถตรวจพบได้จากเนื้อเยื่อไต ตับ และพลาสมา โดยมีความสัมพันธ์กัน แต่พบว่าในเนื้อเยื่อไตพบมีปริมาณสูงกว่าตับ และพลาสมา ในการทดลองครั้งต่อไปหากต้องการวัดปริมาณเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระในปลา ควรเลือกวิเคราะห์จากเนื้อเยื่อไตหรือตับเพียงอย่างเดียวในช่วงก่อนและหลังการทดลอง หรืออาจเลือกวิเคราะห์ห่างประมาณ 2-3 เดือนเพื่อลดค่าใช้จ่าย
5. จากผลการวิจัยในปลานิล สามารถนำสาหร่ายมาใช้ในการเลี้ยงสัตว์น้ำชนิดอื่นๆ ได้

เอกสารอ้างอิง

Ahmad, I., Pacheco, M., Santos, M.A. 2004. Enzymatic andnonenzymatic antioxidants as an adaptation to phagocyte-induced damage in *Anguilla anguilla* L. following in situ harbor water exposure. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 57: 290-302.

Amornlerdpison, D., Peerapornpisal, Y., Rujjanawate, C., Taesotikul, T., Nualchareon, M., Kanjanapothi, D. 2007. Antioxidant of *Padina minor* Yamada. **KMITL Sci. Tech. J. 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.

Anbarasu, K., Akshatha, H.S., Muthukumar, S.P., Umesh-Kumar, S., Vijayalakshmi, G. 2011. Antioxidant and lipid peroxidation activities in rats fed with *Aspergillus carbonarius* carotenoid. **Food. Chem. Toxic.** 49: 3098-3103.

Birgu, M., Tolga, Ç. 2010. Antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in liver and gill tissues of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) following in vivo exposure to domoic acid. **Toxicon** 55: 734-738.

Blakely, S.R., Slaughter, L., Adkins, J., Knight, E.V., 1988. Effects of b-carotene and retinyl palmitate on corn oil-induced superoxide dismutase and catalase in rats. **J. Nutr.** 118: 152-158.

Bold, H.C., Wynne, M.J., 1987. **Introduction to the algae: Structure and Reproduction.** Prentice-Hall of India private Limited, New Delhi.

Cheung, C.C.C., Zheng, G.J., Li, A.M.Y., Richardson, B.J., Lam, P.K.S. 2001. Relationships between tissue concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*. **Aquat. Toxicol.** 52: 189-203.

Current protocols. **Measurement of Oxygen Radicals and Lipid Peroxidation in Neural Tissues.** Available from: http://www.currentprotocols.com/protocol/ns0717 [2011 August 5].

Elia, A.C., Anastasi, V., Dorr, A.J.M., 2006. Hepatic antioxidant enzymes and total glutathione dismutase activity and mRNA expression in mouse peritoneal macrophages. **Am. J. Chin. Med.** 28: 331-41.

Fritsch, F.E. 1935. The Structure and Reproduction of the Algae. Cambridge University. Press,Great Britain. after eto si. **Environ. Toxicol. Pharmacol.** 27: 30–38.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., Cross, C.E. 1992. Free radicals, antioxidants and human disease: Where are we now. **J. Lab. Clin. Med.** 119: 598-620.

Lailerd, N., Pongchaidecha, A., Amornlerdpison, D., Peerapornpisal, Y. 2009. Beneficial effects of *Spirogyra neclecta* extract on glycemic and lipidemic status in streptozotocin-induced Diabetic rats fed a diet enriched in fat. **Annals of Nutrition&Metabolism.** 55(S1): 609.

Limaye, P.V., Raghuram, N., Sivakami, S. 2003. Oxidative stress and gene expression of antioxidants enzyme in the renal cortex of streptozotocin-induced diabetic rat. **Molecular and Cellular Biochemistry.** 243: 147-152.

Maritim, A.C., Sanders, R.A., Watkins, J.B., 3rd, 2003. Diabetes, oxidative stress, and lipid antioxidants: a review. J Biochem Mol Toxicol. 17:24-38.

Mengumphan, K., Sorntako, J., Amornlerdpison, D. 2011. Effect 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.

Ognjanivic, B.I., Milovanovie, J.G., Dordevic, N.Z., Markovic, S.D., Zikic, R.V., Stajn, A.S., Saicic, Z.S., 2008. Parameters of oxidative stress in livcr and white Musile of hakc (*Merluccius merluccius* L.) from the Adriatic Sea. **Kragujevac J. Sci.** 30: 137-144.

Oropesa, A.L., Garcia-Cambero, J.P., Soler, F. 2009. Glutathione and malondialdehyde levels in common carp after exposurc to simazine. **Environ. Toxicol. Pharmacol.** 27: 30-38.

Pang, Z., Chen, Y., Zhou, M. 1999. The effect of polysaccharide krestin on GPx gene expression in macrophages. **Acta. Biochim. Biophys. Sinica.** 31: 284-8.

Pang, Z.J., Chen, Y., Zhou, M., Wan, J. 2000. Effeet of polysaccharide krestin on glutathione peroxidase genc cxpression in mouse peritoneal macrophages. **Br. J. Biomed. Sci.** 57: 130-6.

Peerapornpisal, Y., Amornlerdpison, D., Jamjai, U., Taesotikul, T., Pongpaibul, Y., Nualchareon, M. and Kanjanapothi, D. 2010. Antioxidant and anti-inflammatory activities of brown marinc alga, *Padina minor* Yamada. **Chiang Mai J. Sci.** 37(3): 1.

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

Pcerapornpisal, Y., Amornlerdpison, D., Rujjanawatc, C., Ruangrit, K. and Kanjanapothi, D. 2006. Two endemic species of macro algae in Nan River, Northern Thailand, as therapeutic. **Science Asia.** 32 Supplement 1: 71-76.

Quanbin, Z., Ning, Li., Gefei, Z., Xiaolan, L., Zuhong, X., Zhien, L. 2003. In vivo antioxidant activity of polysaccharide fraction from *Porphyra haitanesis* (Rhodephyta) in aging mice. **Pharmacological Research.** 48: 151-155.

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.

Valko, M., Rhodes, C.J., Moncola, J., Izakovic, M., Mazur, M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer: mini review. **Chemico-Biological Interactions.** 160: 1-40.

Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review. **Environ. Toxicol. Pharmacol.** 13: 57-149.

Wu, L.C., Ho, J., Shieh, M.C, Lu, I. 2005. Antioxidant and anti-proliferative activities of *Spirulina* and *Chlorella* water extracts. **J. Agri. Food Chem.** 53: 4207-4212.

Yonar, M.E., Sakin, F. 2011. Ameliorative effect of lycopene on antioxidant status in *Cyprinus carpio* during pyrethroid deltamethrin exposure. **Pest. Biochem. Physiol.** 99: 226-231.

Yusong, Y., Rajendra, S., Abha, S., Sanjay, A. Yogesh, C. 2003. Lipid peroxidation and cell cycle signaling: 4-hydroxynonenal, a key molecule in stress mediated signaling. **Acta. Biochimica. Polonia.** 50(2): 319-336.

Zhang, J.F., Shen, H., Wang, X.R., Wu, J.C., Xue, Y.Q. 2004. Effects of chronie exposure of 2,4-dichlorophenol on the antioxidant system in liver of freshwater fish *Carassius auratus*. **Chemosphere.** 55: 167-174.

กรมประมง 2553. ยุทธศาสตร์การพัฒนาปลานิล (พ.ศ. 2553-2557) (ออนไลน์). สืบค้นจาก: *www.fisheries.go.th/freshwater/web3/images/download/yutasat.pdf* [5 สิงหาคม 2554].

กาญจนกาชน์ ลิ่วมโนมนต์. 2527. **สาหร่าย.** คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

จงกล พรมยะ. 2552. **การเพาะเลี้ยงสาหร่าย.** คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

ฐิติกานต์ ปัญโญใหญ่. 2551. **กิจกรรมต้านออกซิเดชันของสาหร่ายเตา.** การค้นคว้าแบบอิสระ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาชีววิทยาวิทยา ภาควิชาชีววิทยาวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ดวงพร อมรเลิศพิศาล กฤษณา ดวงจันทร์ ดวงตา กาญจนโพธิ์ ธวัช แต้โสตถิกุล และยุวดี พีรพรพิศาล.2555. ฤทธิ์ปกป้องแผลกระเพาะอาหารของสาหร่ายเตา. **ว.วิทยาศาสตร์ มข.** 40(1): 236-241.

ปิยนันท์ เผ่าม่วง นันทยา จงใจเทศ และอัญชลี มหาเทียน.2551. ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในผลไม้. **วารสารการส่งเสริมสุขภาพและอนามัยสิ่งแวดล้อม.** 31(1): 92-101.

ยุวดี พีรพรพิศาล. 2530. **สาหร่ายตอนที่ 1: สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินและสาหร่ายสีเขียว.** ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ยุวดี พีรพรพิศาล ฐิติกานต์ ปัญโญใหญ่ และดวงพร อมรเลิศพิศาล. 2555. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบของสาหร่ายเตา. **ว.วิทยาศาสตร์ มช.** 40 (1): 228-235.

ยุวดี พีรพรพิศาล ดวงพร อมรเลิศพิศาล ตวงตา กาญจณโพธิ์ ธวัช แต้โสถิกุล ญาณี พงษ์ไพบูลย์ และสุดาพร ตงศิริ. 2552. **ศักยภาพของสาหร่ายน้ำจืดขนาดใหญ่ในการเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารและเวชสำอาง.** รายงานผลการวิจัย. สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) 62 หน้า.

ยุวดี พีรพรพิศาล สนิท มกรแก้วเกยูร อิศรพงษ์ พงษ์ศิริกุล ดวงพร อมรเลิศพิศาล จีรพร เพกเกาะ สุดาพร ตงศิริ. และคณะ. 2549. **ศักยภาพของสาหร่ายน้ำจืดขนาดใหญ่ในการนำมาเป็นอาหารและยา.** รายงานผลการวิจัย. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.). 189 หน้า.

วัญเพ็ญ ภูติจันทร์. 2549. **วิทยาสาหร่าย (Phycology).** กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์.

โอภา วัชรคุปต์ ปรีชา บุญจูง จันทนา บุณยะรัตน์ และมาลีรักษ์ อัตต์สินทอง. 2549. **สารต้านอนุมูลอิสระ.** พี.เอส.พริ้นท์. กรุงเทพฯ.

โอภา วัชรคุปต์ ปรีชา บุญจูง จันทนา บุณยะรัตน์ และมาลีรักษ์ อัตต์สินทอง. 2550. **สารต้านอนุมูลอิสระ.** นิวไทยมิตรการพิมพ์, กรุงเทพฯ:

ภาคผนวก

1. การเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์หากลูต้าไทโอน

1.1 การเก็บพลาสมา และ Erythrocyte

1. เตรียม microcentrifuge tube ขนาด 1.5ml ที่มีสาร anticoagulant เช่น heparin, citrate หรือ EDTA
2. เก็บเลือดใน microcentrifuge ที่ 500 µl กลับ microcentrifuge tube ไป-มา เพื่อให้สารผสมเข้ากับเลือด
3. ปั่นเลือดที่ความเร็ว 1,300 x g 4 องศาเซลเซียส 10 นาที
4. เก็บส่วน supernatant เป็น Plasma lysate 100 ul ใส่ใน microcentrifuge tube แล้ว deproteinated protein ตาม Step 7 (deproteinated protocol) เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปทำ Glutathione assay
5. เก็บส่วนกลาง (middle part) ที่เป็น Erythrocytes (red blood cells) 200 ul ใส่ new microcentrifuge tube และเติมน้ำ HPLC water grade ในอัตราส่วน 1: 5 (~ 800 ul)
6. นำไปปั่นที่ความเร็ว 13,000 x g 4 องศาเซลเซียส 10 นาที
7. เก็บส่วน supernatant เพื่อทำ deproteinated ดังนี้

   Deproteinated protocol

   a. เตรียม MPA reagent: ละลาย metaphosphoric acid (Sigma-Aldrich 239275) 5 กรัม ในน้ำ 50 ml
   b. จากนั้นใส่ MPA reagent ลงไปใน sample 1 volume (plasma 100 ul of MPA, erythrocyte 200 ul) และ mix ด้วย vortex
   c. Incubate 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง และนำไปปั่นที่ความเร็ว 3,000 x g 4 นาที
   d. เก็บส่วน supernatant เป็น Plasma และ Erythrocyte lysate ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปทำ Glutathione assay ตาม commercial kit protocol ต่อไป

2. การเตรียมตัวอย่างเพื่อทำ MDA-TBAR และ เอนไซม์ SOD, CAT, GPX

2.1 การเก็บพลาสมา

1. เตรียม microcentrifuge tube ขนาด 1.5ml ที่มีสาร anticoagulant EDTA
2. เก็บเลือดใน microcentrifuge ประมาณ 500 µl กลับ microcentrifuge tube ไป-มา เพื่อให้สารผสมเข้ากับเลือด
3. ปั่นเลือดที่ความเร็ว 10,000 x g ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที

4. เก็บส่วน supernatant ทั้งหมดเป็น Plasma lysate เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปทำ MDA-TBAR assay

2.2 การเก็บเนื้อเยื่อตับและไต

1. การเตรียม Lytic buffer+ Protease inhibitor (Fresh preparation before use) โดยการละลาย 25X stock protease inhibitor (Protease inhibitor cocktail (Roche) 1 เม็ด + น้ำ ddH2O 2 ml = concentrated stock 25X) ใน CelLytic™ MT mammalian Tissue Lysis/ Extraction reagent (Sigma Aldrich, St. Louis, MO)
2. ชั่ง tissue 0.04 g ใน 400 ul ของ fresh Lytic buffer ที่มี Protease inhibitor แล้ว Homogenate tissue ประมาณ 20 strokes
3. นำ lysed sample ไป centrifuge ที่ 1,600 g 4°C 10 นาที
   เก็บ supernatant ทั้งหมด ที่ -20 องศาเซลเซียส (days) หรือ -80 องศาเซลเซียส (months) ก่อนนำไปทำ MDA-TBAR assay และ เอนไซม์ SOD , CAT, GPX

3. การวิเคราะห์ปริมาณ Thiobarbituric acid assay (TBARS assay)

1.1 สารเคมี

1.1.1 Thiobarbituric acid

1.1.2 TBA Acetic Acid

1.1.3 TBA Sodium Hydroxide

1.1.4 TBA Malondialdehyde Standard

1.1.5 TBA SDS Solution

โดยชั่ง TBA 530 mg ลงใส่ในบีกเกอร์ขนาด 150 ml เติมด้วย 50 ml ของ TBA Acetic acidที่เจือจางแล้ว และ TBA Sodiume hydroxide ที่เจือจางแล้วและทำการผสมให้เข้ากันโดยที่สารดังกล่าวอยู่ได้นาน 24 ชั่งโมง

1.2 การเตรียมตัวอย่าง

1.2.1 ชั่งตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ 40 mg ใส่ใน หลอดทดลองขนาด 1.5 ml

1.2.2 ใส่ 250 µl ของ RIPA buffer ที่มี protease inhibitors

1.2.3 นำไป Sonicate 15 นาทีที่ 40 V ในน้ำแข็ง

1.2.4 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1600 g เป็นเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสโดยจะส่วนใสด้านบนในการวิเคราะห์โดยเก็บไว้ในน้ำแข็งหรือยังไม่ทำการวิเคราะห์ให้เก็บที่ -80

1.2.5 ถ้าใช้เนื้อเยื่อที่ homogenate ห้ามทำการ diluted

1.3 การเตรียม Standard

จะทำการ diluted MDA โดยใส่ 250 µl ในน้ำ 750 µl ได้ Stock ของสารละลายที่ 125 µM โดยใส่ Stock MDA ในน้ำตามความเข้มข้นดังตาราง

Tube	MDA(µl)	น้ำ (µl)	ความเข้มข้นของ MDA µM
A	0	1,000	0
B	5	995	0.625
C	10	990	1.25
D	20	980	2.5
E	40	960	5
F	80	920	10
G	200	800	25
H	400	600	50

1.4 วิธีการ

1.4.1 ใส่ตัวอย่างหรือ Standard 100 มโครลิตรในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml

1.4.2 เติม SDS 100 ไมโครลิตรและ mix

1.4.3 เติม Colour reagent 4 ml ลงในหลอดที่เติมสารข้างตน

1.4.4 นำไปต้มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

1.4.5 หลังจากการต้ม 1 ชั่วโมงแล้วนำไปหยุดการทำงานของปฏิกิริยาในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที

1.4.6 หลังจาก 10 นาทีแล้วนำหลอดที่ใส่สารไปปั่นเหวี่ยงที่ 1600 g ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

1.4.7 สารที่ได้นั้นคงรูปที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที

1.4.8 ดูดสารที่ได้ 150 ไมโครลิตร (in duplicate) ลงใน 96 wall plate

1.4.9 นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 530-540 nm โดย micro plate reader

4. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Bradford ใน (Bio-Rad U.S.)

หลักการของวิธีการนี้เป็นวิธีการที่วัดค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนแปลงในสี Coomassie โดยจะเปลี่ยนจากสีแดงกลายเป็นสีน้ำเงินโดยโปรตีน ในการทำปฏิกิริยานี้จะเกิดสีแดงจาก Coomassie จะเข้าไปจับกับอิเล็กตรอนอิสระของโปรตีนทำให้เกิดปฏิกิริยาการเปลี่ยนสีเกิดขึ้นทำให้โปรตีนหยุดการทำงาน ทำให้เห็นการแสดงออกของสารเหล่านี้ในรูป Hydrophobic โดยที่สีที่เกิดขึ้นจากการที่โปรตีนจับกับ Coomassie dye ให้เกิดเป็นสีน้ำเงินเกิดขึ้นและทำการวัดความเข้มข้นของโปรตีนโดยการใช้เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง

ขั้นตอนการทดสอบโปรดีน

1. การเตรียมน้ำยาทดสอบปฏิกิริยายาเคมีของโปรตีนโดยผสม dye : น้ำ DDI เท่ากับ 1:4 เท่าแล้วนำมากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์1 เพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอมโดยที่น้ำยาดังกล่าวนี้สามารถใช้ได้ประมาณ 2 อาทิตย์เมื่อเก็บไว้ในอุณหภูมิห้อง
2. ทำการเจือจางสารมาตรฐานโปรตีนประมาณสามถึงห้าเท่าเพื่อนำมาเทียบกับปริมาณของโปรดีนที่ทำการทดสอบ โดยช่วงของการเจือจางอยู่ที่ 0.05-0.5 mg/ml ในการทดสอบโปรตีนนี้จะทำ 2 ซ้ำ
3. ดูดสารมาตรฐานและตัวอย่าง 10 ไมโครลิตรลงใน microplate wells
4. ใส่สารละลาย dye reagent ที่ทำการเจือจางแล้ว 140 µl ลงในแต่ละหลุมของ Microplate wells และทำการ Mix โดย Microplate mixer
5. เมื่อหยอดสารเสร็จแล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที โดยที่ค่าดูดกลืนแสงจะเพิ่มขึ้นและตัวอย่างทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องห้ามเกิน 1 ชั่วโมง
6. วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร

5. การวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์กลูต้าไทโอน (Cayman Chemical, USA)

กลูต้าไทโอน(GSH) เป็น Tripeptide ที่พบในพืชและสัตว์ GSH ทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้น ของ กลูต้าไทโอนเอสทรานเฟอเรสในการขับพิษของ Xenobiotics และเป็นตัวให้อิเล็กตรอนแก่ กลูต้าไทโอนเปอร์ออกซิเดส ในการลด Hydroperoxides

1.1 สารเคมี

1.1.1 2-(N-morpholino)ethanesulphonic (MES)

1.1.2 GSSG standard

1.1.3 GSH Co-factors Mixture

1.1.4 GSH Enzyme Mixture

1.1.5 GSH DTNB

1.2 วิธีการ

1.2.1 เติม 50 µl ของ Standard (Tube A-H) ลงในหลุม (ดังรูป)

1.2.2 ใส่ตัวอย่าง 50 µl ลงในหลุมของตัวอย่างใน Microplate

1.2.3 ปิด plate ด้วยแผ่นปิด Plate

1.2.4 เตรียม Cocktail ในหลอดขนาด 20 ml โดยใช้ MES 11.25 ml Co-factor mixture o.45 ml, enzyme mixture 2.1 ml , น้ำ 2.3 ml และ DTNB 0.45 ml แล้วเข่าด้วย vortex

1.2.5 เมื่อเตรียม Cocktail แล้วดูด Cocktail ที่เตรียมลงในหลุมของไมโครเพลสที่มีตัวอย่างและ Standard หลุมละ 150 µl

1.2.6 นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 405-414 nm โดยทำการวัดค่าทุกๆ 5 นาที่เป็นเวลา 30 นาที

6. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลิก (Polyphenolic compounds)

ตรวจวิเคราะห์ปริมาณของโฟลีฟีนอลทั้งหมด ตามวิธีการของHammerschmidt และ Pratt (1978) ซึ่งดัดแปลงจาก Folin-Ciocalteu method ดังนี้

1. ผสมสารสกัด 0.2 ml. กับ 10% Folin-Ciocalteu solution 1 ml
2. เติม 7.5% sodium carbonate solution 0.8 ml ทิ้งส่วนผสมที่ได้ไว้นาน 1 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง
3. วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตร คำนวณปริมาณกลุ่มสารประกอบฟีนอลิกโดยเทียบกับ gallic acid (กรัม/100 กรัม)

รูปการทดลอง

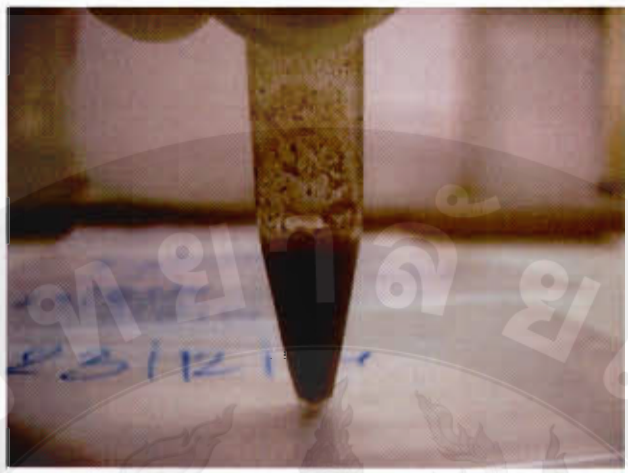
ภาพ ก กระชังที่ใช้เลี้ยงปลาในการทดลอง

ภาพ ข อาหารผสมสาหร่ายเตาที่ใช้ในการทดลอง

ภาพ ค การวัดการเจริญเติบโต

ภาพ ง การเก็บเนื้อเยื่อตับและไตปลานิล

ภาพ จ การเก็บเลือดและพลาสมาของปลานิล

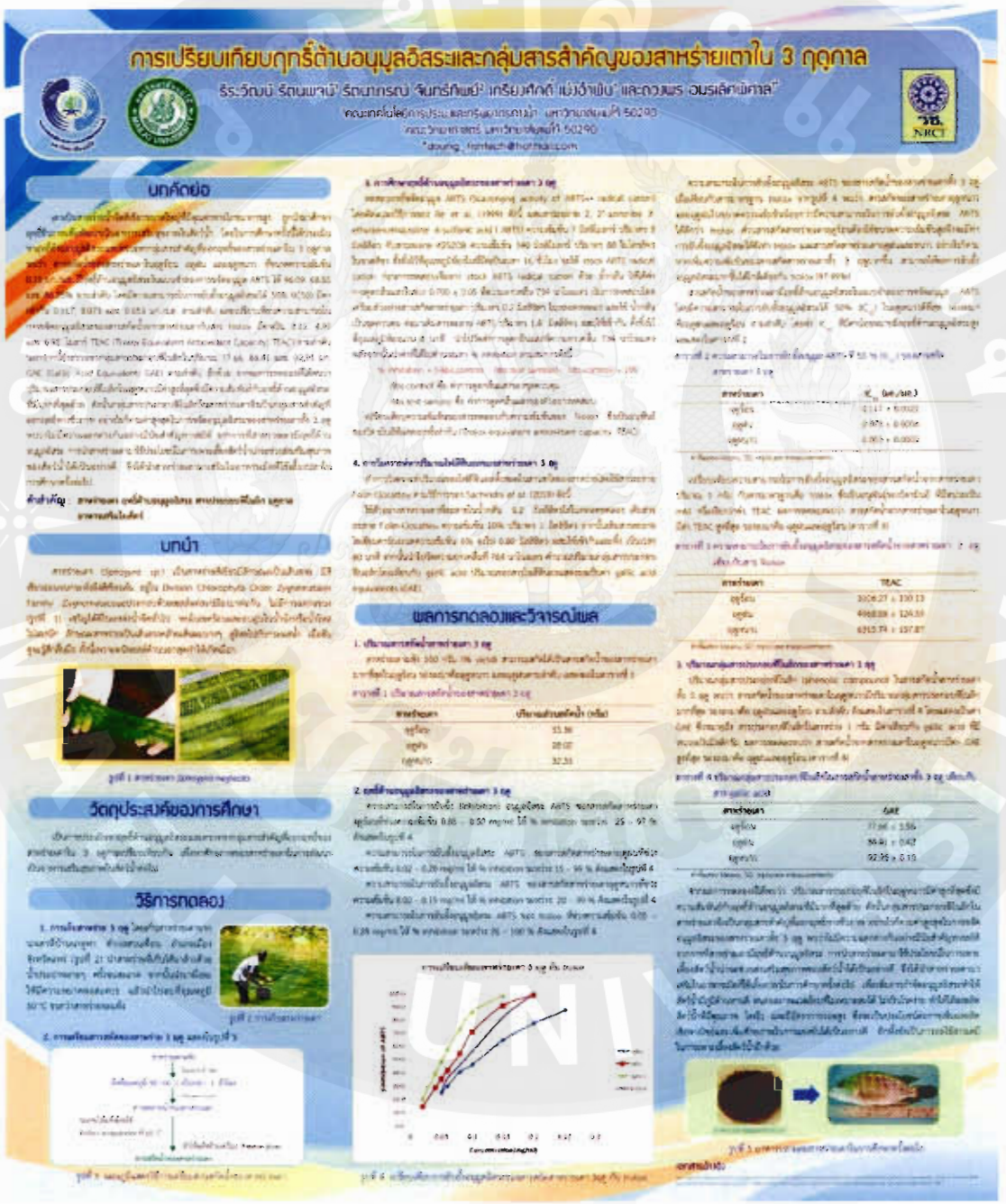


ภาพ ฉ การเก็บ Erytocyte จากเลือดแดงของปลานิล

ภาพ ช ปลานิลหลังสิ้นสุดการทดลอง

การนำเสนอผลงานทางวิชาการ

1.นำเสนอผลงานทางวิชาการภาคโปสเตอร์ เรื่องการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและกลุ่มสารสำคัญของสาหร่ายเตาใน 3 ฤดูกาลในงานการประชุมวิชาการประมงครั้งที่ 6 “เพื่อความมั่นคงด้านการประมงและทรัพยากรทางน้ำ” ระหว่างวันที่ 1-3 ธันวาคม 2554 ณ คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่



2. นำเสนอผลงานในโครงการอบรมเชิงปฏิบัติการเพื่อบ่มเพาะนักประดิษฐ์รุ่นใหม่ เรื่อง การวิจัยเชิงบูรณาการสู่การประดิษฐ์และนวัตกรรมประจำปี 2555 (ภาคเหนือ) ครั้งที่ 2 วันที่ 20-21 กรกฎาคม 2555ณ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

ผลิตภัณฑ์อาหารปลาผสมสาหร่ายเตา

3. ตีพิมพ์ผลงานทางวิชาการเรื่องฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและผลการเสริมสาหร่ายเตาต่อการเจริญเติบโตของปลานิลในกระชัง ในวารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง ปีที่ 6 เล่มที่ 2 (กรกฎาคม – ธันวาคม 2555) โดย ธีระวัฒน์ รัตนพจน์เกรียงศักดิ์ เม่งอำพันชุติมา ศรีมะเริงรัตนาภรณ์ จันทร์ทิพย์และดวงพร อมรเลิศพิศาล

บทคัดย่อ

สาหร่ายเตาถูกนำมาประเมินหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและตรวจหากลุ่มสารสำคัญ โดยทำการเก็บตัวอย่างสาหร่าย 3 ครั้ง ในช่วงฤดูร้อน ฤดูฝน และฤดูหนาว แล้วนำมาสกัดแบบหยาบเป็นสารสกัดน้ำ ผลการศึกษาพบว่า สารสกัดน้ำของสาหร่ายเตาจากฤดูร้อน 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) ตามลำดับ อีกด้วย ถึงแม้ว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารประกอบฟีโนลิกจะมีความสัมพันธ์ไปในทางเดียวกัน แต่จากผลการทดสอบพบว่า ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสาหร่ายเตาทั้ง 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 ส่วนอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อไม่มีความแตกต่างทางสถิติในทุกหน่วยทดลองในขณะที่น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นและอัตราการเจริญเติบโตต่อวันของปลานิลดูเหมือนว่าจะเพิ่มขึ้นใน 3 หน่วยทดลองที่เสริมด้วยสาหร่ายเตา แต่ก็ไม่พบความแตกต่างกันทางทางสถิติ ผลจากการศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่า สาหร่ายเตามีศักยภาพในการนำมาใช้เป็นอาหารเสริมในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำได้

คำสำคัญ: สาหร่ายเตา ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สารประกอบฟีโนลิก การเจริญเติบโตของปลา การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

ที่ ศธ ๐๕๒๓.๓/๒๐๙

คณะเทคโนโลยีการประมงและ
ทรัพยากรทางน้ำมหาวิทยาลัยแม่โจ้
ต.หนองหาร อ.สันทราย จ.เชียงใหม่
๕๐๒๙๐

๒๘ สิงหาคม ๒๕๕๕

เรื่อง ตอบรับผลงานลงตีพิมพ์ในวารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง

เรียน คุณธีระวัฒน์ รัตนพจน์

ตามที่ท่านได้ส่งผลงานวิจัยเรื่อง "ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและผลการเสริมสาหร่ายเตาต่อการเจริญเติบโตของปลานิลในกระชัง (Antioxidant activity of *Spirogyra* sp. and effect of its supplementation on growth performance of Tilapia in cage culture)" โดยมีคณะผู้วิจัยซึ่งประกอบด้วย เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน ชุติมา ศรีมะเริง รัตนาภรณ์ จันทร์ทิพย์และดวงพร อมรเลิศพิศาล เพื่อลงตีพิมพ์ในวารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง (ISSN ๑๙๐๕-๓/๓๙๓)

ทางกองบรรณาธิการและคณะผู้ทรงคุณวุฒิได้พิจารณาแล้วลงความเห็นว่าผลงานวิจัยเรื่องดังกล่าวจะได้รับการลงพิมพ์ในวารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง ฉบับปีที่ ๖ เล่มที่ ๒ (กรกฎาคม – ธันวาคม ๒๕๕๔) ซึ่งทางกองบรรณาธิการจะจัดส่งเล่มวารสารฯ ฉบับดังกล่าวให้ต่อไป

จึงเรียนมาเพื่อโปรดทราบ

ขอแสดงความนับถือ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชนกันต์ จิตมนัส)
รองคณบดีฝ่ายวิชาการและวิจัย

กองบรรณาธิการ
โทรศัพท์ ๐ ๕๓๘๗ ๓๔๗๐-๒
โทรสาร ๐ ๕๓๔๙ ๘๑๗๘ ต่อ ๑๓๐