สารสำคัญและการป้องกันภาวะออกซิเดชันของสาหร่ายไกในปลาหนังลูกผสม

ดวงพร อมรเลิศพิศาล[1*] เมธัส เงินจันทร์[2] เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน[3] รัตนาภรณ์ จันทร์ทิพย์[4]
มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ต.หนองหาร อ.สันทราย จ.เชียงใหม่ 50290
และ ชุติมา ศรีมะเริง[5]
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ถนนห้วยแก้ว ต.สุเทพ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ 50200

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการประเมินความสามารถของสาหร่ายไก (*Cladophora* spp.) ซึ่งเป็นสาหร่ายน้ำจืด ในการต้านอนุมูลอิสระ นอกจากนี้ยังทำการตรวจหาสารสำคัญในการออกฤทธิ์ โดยเปรียบเทียบระหว่างสาหร่ายไกที่เก็บจากแม่น้ำน่านและจากการเพาะเลี้ยง ซึ่งพบว่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกจากทั้ง 2 แหล่ง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ส่วนสารสำคัญที่ตรวจพบเป็นสารกลุ่มฟีนอลิกลายชนิดด้วยกัน ได้แก่ ไอโซเคอร์ซิติน แคทิชิน กรดแทนนิก ไฮโดรควินิน เคอร์ซิติน รูติน กรดแกลลิก และแคมเฟอรอล จากนั้นนำสาหร่ายไกที่เก็บจากธรรมชาติมาเสริมในอาหารปลาที่ระดับ 0, 2.5, 5 และ 10% โดยทำการเลี้ยงในกระชังเป็นระยะเวลา 7 เดือน พบว่าปลาหนังลูกผสม (ปลาบึก × ปลาสวาย) ที่ได้รับอาหารเสริมสาหร่ายไกที่ระดับ 5% และ 10% สามารถเพิ่มการเจริญเติบโตได้ดี โดยมีผลลดระดับการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชันในตับลงได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในเดือนที่ 5 และเดือนที่ 7 อย่างไรก็ตาม การเสริมสาหร่ายไกไม่มีผลต่อระดับกลูตาไทโอนในเม็ดเลือดแดงของปลาหนังลูกผสม ผลจากการศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่า สาหร่ายไกสามารถลดภาวะเครียดออกซิเดชันในปลา ดังนั้นจึงมีศักยภาพในการนำมาใช้เสริมในอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำได้

คำสำคัญ : สาหร่ายไก / สารประกอบฟีนอลิก / ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ / ปลาหนังลูกผสม / การป้องกันภาวะออกซิเดชัน

---

* *Corresponding Author : doungpornfishtech@gmail.com*
1 *ผู้ช่วยศาตราจารย์ คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ*
2 *นักศึกษาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากร*
3 *รองศาสตราจารย์ คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ*
4 *นักศึกษาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์*
5 *ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์*

Active Compounds and Oxidative Defense of *Cladophora* spp. in Hybrid Catfish

Doungporn Amornlerdpison[1*], Metas Ngernjan[2], Kriangsak Mengumphan[3], Rattanapon Junthip[4]

Maejo University, Nongharn, Sansai, Chiang Mai 50290

and Chutima Srimaroeng[5]

Chiang Mai University, Huay Kaew Road, Muang District, Chiang Mai, Thailand 50200

Abstract

Cladophora spp., a freshwater alga, was evaluated for its antioxidant activity and active compounds. The alga collected from natural source (Nan River) and cultivated alga were compared in terms of radical inhibition ability and phenolic compounds; the results showed no significant differences in these evaluated quantities. The active compounds of alga consisted of several phenolic compounds, including isoquercetin, catechin, tannic acid, hydroquinin, quercetin, rutin, gallic acid and kaempferol. The alga collected from the natural source was further evaluated for its oxidative defense ability in hybrid catfish (*Pangasianodon gigas* × *Pangasianodon hypophthalmus*). Fish-feed supplemented with 0%, 2.5%, 5% and 10% alga was fed to hybrid catfish, which was cultured in cage for 7 months. The fish fed with 5% and 10% alga supplemented feed had significantly increased growth and decreased level of lipid peroxidation in liver when evaluated at the 5th and 7th months. However, all groups that received alga supplement did not show significant changes in the level of glutathione in erythrocyte. The findings concluded that *Cladophora* spp. led to reduced oxidative stress in fish. Therefore, the alga has a potential to be used as a feed supplement in aquaculture.

Keywords : *Cladophora* spp. / Phenolic Compounds / Antioxidant Activity / Hybrid Catfish / Oxidative Defense

* *Corresponding Author : doungpornfishtech@gmail.com*

1 *Assistant Professor, Faculty of Fisheries Technology and Aquatic Resources.*

2 *Student, Faculty of Fisheries Technology and Aquatic Resources.*

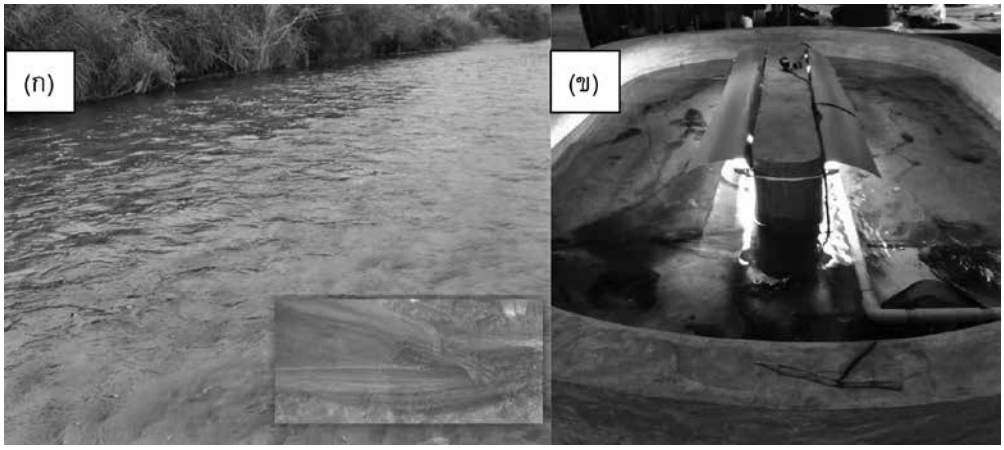
3 *Associate Professor, Faculty of Fisheries Technology and Aquatic Resources.*

4 *Student, Department of Chemistry, Faculty of Science.*

5 *Assistant Professor, Department of Physiology, Faculty of Medicine.*

1. บทนำ

สาหร่ายไก (*Cladophora* spp.) เป็นสาหร่ายน้ำจืดสีเขียวขนาดใหญ่มีลักษณะเป็นเส้นสายยาวมีสีเขียวสด (รูปที่ 1) โดยสามารถเจริญเติบโตได้ดีในช่วงฤดูหนาวฤดูร้อน ไปจนถึงต้นฤดูฝน และจะลดจำนวนลงน้อยมากในธรรมชาติช่วงฤดูฝน พบมากในภาคเหนือและตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย แหล่งน้ำที่พบสาหร่ายชนิดนี้คือ แม่น้ำน่าน และแม่น้ำโขง โดยชาวบ้านนิยมนำสาหร่ายสดมาบริโภคเป็นอาหาร และนำสาหร่ายแห้งมาแปรรูปเพิ่มมูลค่า สาหร่ายไกมีคุณค่าทางโภชนาการประกอบด้วยโปรตีนประมาณ 21% คาร์โบไฮเดรต 31% ไขมัน 6% และเส้นใยอาหาร 21% มีวิตามินซี บี1 บี2 และแร่ธาตุต่างๆ โดยเฉพาะแคลเซียมและซิลิเนียม ซึ่งวิตามินซีและซิลิเนียมมีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ [1] นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ชีวภาพในการต้านอนุมูลอิสระ และต้านการอักเสบ [2-3] โดยกลุ่มสารสำคัญที่พบในสารสกัดน้ำของสาหร่ายไกคือ สารประกอบฟีนอลิก [3-4]



รูปที่ 1 สาหร่ายไกในแม่น้ำน่าน (ก) และบ่อเลี้ยง (ข)

อนุมูลอิสระมีบทบาททำให้เกิดการอักเสบ และการทำลายเนื้อเยื่อ มีผลต่อความเสื่อมหรือการแก่ของเซลล์ ทำให้เป็นต้นเหตุของการเกิดโรคต่างๆ มีรายงานการวิจัยพบว่า สารสกัดน้ำของสาหร่ายไกมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเมื่อทดสอบในการทดลองฤทธิ์กำจัดอนุมูล DPPH ฤทธิ์กำจัดอนุมูล superoxide และฤทธิ์ยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ในหลอดทดลอง และยังมีฤทธิ์ต้านการอักเสบในหนูขาวอีกด้วย [4] ในภาวะที่สารอนุมูลอิสระมีมากไม่สมดุลกับสารต้านอนุมูลอิสระจะทำให้เกิดภาวะเครียดจากการถูกออกซิไดส์ (oxidative stress) เกิดขึ้น โดยอาจเป็นผลมาจากการสร้างสารอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นหรือมีการลดลงของสารและเอนไซม์ที่ต้านอนุมูลอิสระลดลงในตัวปลา โดยภาวะ oxidative stress มีสาเหตุมาจากสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม การปนเปื้อนจากสารพิษหรือโลหะหนัก การได้รับอาหารไม่มีคุณค่าทางโภชนาการหรือมีแต่ไม่เพียงพอ ทำให้เกิดการสร้างอนุมูลอิสระที่มีผลเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxic effect) ทำให้ปลาสุขภาพไม่ดี กินอาหารได้น้อย โตช้า และเป็นโรคง่าย [5]

ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงทำการเปรียบเทียบปริมาณกลุ่มสารสำคัญ ฤทธิ์ชีวภาพในการต้านอนุมูลอิสระ และการนำสาหร่ายไกมาเสริมในอาหารปลาหนังลูกผสม โดยตั้งสมมติฐานว่า สาหร่ายไกมีสมบัติช่วยป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระช่วยทำให้ปลามีสุขภาพดี ทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม และเพิ่มอัตราการรอดได้ ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ ประเมินการเจริญเติบโตและผลต่อภาวะออกซิเดชันของสาหร่ายไกที่เสริมในอาหารปลาตลอดการเลี้ยง 7 เดือน และเปรียบเทียบปริมาณสารสำคัญของสารสกัดน้ำสาหร่ายไกที่เก็บมาจากธรรมชาติและจากการเพาะเลี้ยงเพื่อเป็นข้อมูลวิชาการสนับสนุนการนำไปใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์ต่อไป

2. อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

2.1 การเตรียมสารสกัดน้ำของสาหร่ายไก ความอนุเคราะห์ตัวอย่างสาหร่ายไกที่เก็บจากแหล่งน้ำธรรมชาติ (แม่น้ำน่าน) โดยกลุ่มวิสาหกิจชุมชนแปรรูปสาหร่ายน้ำจืดบ้านหนองบัว อำเภอท่าวังผา จังหวัดน่าน และตัวอย่างสาหร่ายไกจากการเพาะเลี้ยงที่ฐานเรียนรู้สาหร่ายคณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ โดยนำสาหร่ายสดมาล้างด้วยน้ำประปาหลายๆ ครั้งจนสะอาด จากนั้นนำมาผึ่งลมให้มีความหมาดพอสมควรนำไปอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส (°C) ประมาณ 24 ชั่วโมง หรือจนกว่าสาหร่ายจะแห้ง จากนั้นนำสาหร่ายมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ เติมน้ำกลั่นด้วยอัตราส่วนสาหร่ายแห้ง 100 กรัม ต่อน้ำ 1 ลิตร ปั่นผสมกับน้ำกลั่นแล้วนำไปต้มที่ 90-100°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นกรองเอากากออก นำส่วนใสด้านบน (filtrate) ไประเหยให้แห้งโดยใช้ rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 60°C ภายใต้สุญญากาศ ทำให้แห้งด้วยเครื่อง freeze dryer เก็บสารสกัดน้ำของสาหร่ายที่ได้ในตู้เย็น 4°C

2.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบ ฟีนอลิกของสารสกัดน้ำสาหร่ายไกที่เก็บจากแหล่งธรรมชาติและจากการเพาะเลี้ยง ตามวิธีการของ Sachindra et al. [6] โดยใช้สารละลาย Folin-Ciocalteu จากนั้นนำไปวัดความยาวคลื่นที่ 750 นาโนเมตร คำนวณปริมาณกลุ่มสารประกอบฟีนอลิกโดยเทียบกับสารฟีนอลิกมาตรฐานคือ gallic acid โดยปริมาณของสารโพลีฟีนอลรายงานผลเป็น gallic acid equivalents (GAE) ต่อปริมาณสารสกัด 1 กรัม วัดจำนวน 3 ซ้ำ จากนั้นวิเคราะห์องค์ประกอบของสารประกอบกลุ่มฟีนอลิกด้วยเทคนิค LC-MS/MS ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง LC-MS (Agilent 1100 series, USA) แยกสารด้วย Zorbax SB C18 column ขนาด 150 × 4.6 mm, 5 micron ในสภาวะ mobile phase เป็น acetonitrile และ 10 mM ammonium formate เปลี่ยนสัดส่วนตามเวลาการแยกเป็นเวลา 60 นาที ที่อัตราการไหล 1 ml/min. อุณหภูมิ 40°C ต่อคู่กับเครื่องวิเคราะห์ชนิดมวลโมเลกุล LC/MSD SL (Agilent, USA) โดยคำนวณปริมาณสารจากพื้นที่ใต้กราฟและวิเคราะห์เปรียบเทียบกับสารฟีนอลิกมาตรฐาน

2.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดน้ำสาหร่ายไกที่เก็บจากแหล่งธรรมชาติและจากการเพาะเลี้ยง โดยใช้วิธีทดสอบฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระ ABTS scavenging activity ตามวิธีการของ Re et al [7] ดังนี้ ผสมน้ำยา ABTS ลงในหลอดที่มีสารทดสอบ ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 6 นาที วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร วัดจำนวน 3 ซ้ำ เปรียบเทียบความเข้มข้นของสารทดสอบกับความเข้มข้นของ Trolox ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของวิตามินอี โดยแสดงผลเป็นค่า Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) ต่อปริมาณสารสกัด 1 กรัม ทำการเปรียบเทียบผลการต้านอนุมูลอิสระระหว่างไกที่เก็บจากแหล่งธรรมชาติและจากการเพาะเลี้ยง

2.4 ศึกษาผลการเจริญเติบโตของปลาหนังลูกผสมที่เสริมสาหร่ายไกแห้งในอาหารเม็ด 4 ระดับคือ 0%, 2.5%, 5% และ 10% ซึ่งวัตถุดิบอาหารปลาประกอบด้วย ปลาป่น (15%) กากถั่วเหลือง (37%) ปลายข้าว (26%) รำข้าว (20%) น้ำมันพืช (1%) วิตามินรวม (1%) โดยให้มีปริมาณโปรตีนเท่ากันที่ 30% อัตราอาหารที่ให้ตลอดการทดลอง 3% ของน้ำหนักตัว/วัน วันละ 2 ครั้ง ทำการทดลองในปลาหนังลูกผสม (พ่อปลาบึก × แม่ปลาสวาย) อายุ 1 เดือนที่มีน้ำหนักเฉลี่ย 50 กรัม จากคณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่ เลี้ยงในกระชังขนาด 1.2×1.2×1.2 ลบ.ม. อัตราการปล่อยที่ 50 ตัว/กระชัง โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) แบ่งการทดลองเป็น 4 หน่วยการทดลองๆ ละ 3 ซ้ำ ดังนี้

หน่วยการทดลองที่ 1 อาหารที่มีสาหร่ายไกเป็นส่วนผสม 0%

หน่วยการทดลองที่ 2 อาหารที่มีสาหร่ายไกเป็นส่วนผสม 2.5%

หน่วยการทดลองที่ 3 อาหารที่มีสาหร่ายไกเป็นส่วนผสม 5%

หน่วยการทดลองที่ 4 อาหารที่มีสาหร่ายไกเป็นส่วนผสม 10%

ทำการสุ่มตัวอย่างปลาทุกเดือนเพื่อ ประเมินการเจริญเติบจำนวน 10 ตัว/กระชัง รวม 30 ตัว/หน่วยการทดลอง นำมาวิเคราะห์หาน้ำหนักตัว น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นต่อวัน อัตรา

การเจริญเติบโตต่อวัน อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อเป็นเวลา 7 เดือน

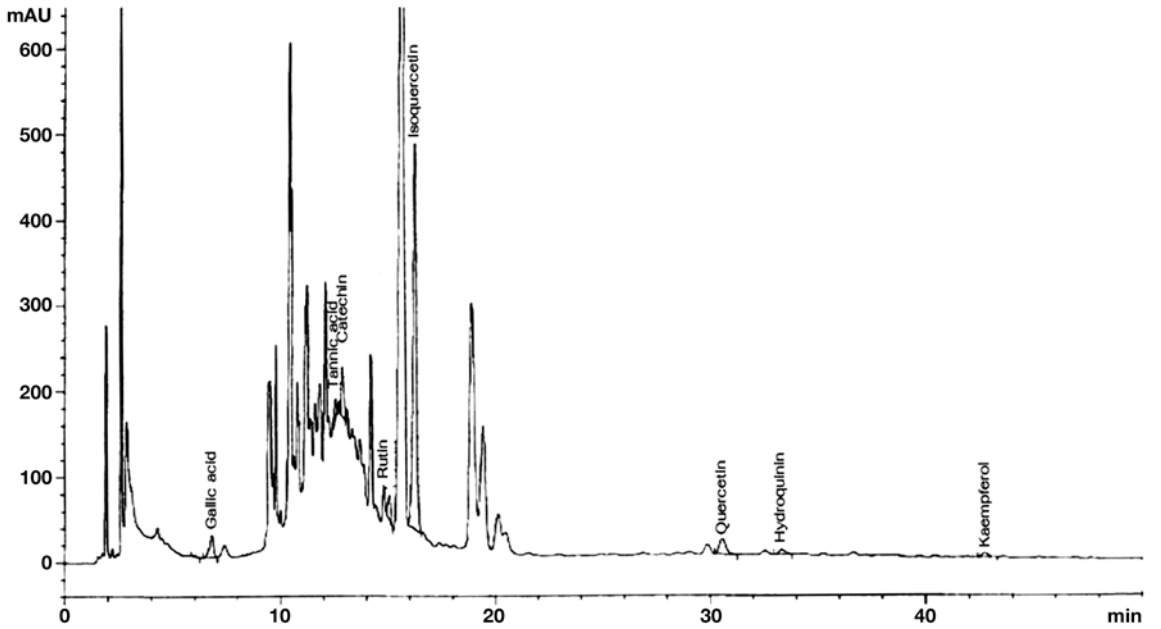
2.5 ศึกษาผลของสาหร่ายไกต่อการป้องกันภาวะออกซิเดชัน โดยสุ่มเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อวัดระดับ Malondehyde (MDA) ที่บ่งบอกภาวะ oxidative stress และวัดสารต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ Glutathione (GSH) โดยมีรายละเอียดดังนี้

2.5.1 การวัดปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์เพื่อหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากปฏิกิริยา Lipid peroxidation ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป TBARS Assay Kit ของ Cayman Chemical [8] โดยนำเนื้อเยื่อตับของปลา 40 มก. ใส่ในสารละลายบัฟเฟอร์และบดด้วยเครื่อง homogenizer ที่ 1,600 g อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสด้านบน (supernatant) ผสมกับ sodium dodecyl sulfate (SDS) อย่างละ 100 ไมโครลิตร แล้วเติม color reagent 4 มล. จากนั้นนำไปต้มที่อุณหภูมิ 90°C เป็นเวลา 60 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,600 g อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที ตั้งสารละลายทิ้งไว้ 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง ดูดส่วนใสด้านบน 150 ไมโครลิตรลงใน 96 well plate แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader เทียบหาความเข้มข้นจากกราฟมาตรฐาน แล้วนำค่าที่ได้เทียบกับปริมาณโปรตีนซึ่งหาได้จากวิธี Bradford assay

2.5.2 การวัดปริมาณกลูตาไธโอนเพื่อหาสารต้านอนุมูลอิสระด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป Glutathione Assay Kit ของ Cayman Chemical [9] โดยเก็บตัวอย่างเลือดปลาใส่ในหลอดที่มี EDTA นำเลือดที่ได้ปั่นที่ความเร็ว 1,300 g ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 10 นาที แล้วนำส่วน erythrocyte ของเซลล์เม็ดเลือดแดง มาตกตะกอนโปรตีนแล้วนำส่วนใสด้านบน 50 ไมโครลิตร ผสมกับชุดน้ำยาสำเร็จรูป (cocktail) 150 ไมโครลิตร โดยชุดน้ำยาประกอบด้วย buffer, co-factor mixture, enzyme mixture, DTNB (dithiobis (2-nitrobenzoic acid) และน้ำ แล้วนำสารละลายมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร คำนวณค่า total glutathione, oxidized glutathione และ reduced glutathione เทียบหาความเข้มข้นจากกราฟมาตรฐาน แล้วนำค่าที่ได้เทียบกับปริมาณโปรตีน

3. ผลการทดลอง

3.1 สารประกอบฟีนอลิก ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดน้ำสาหร่ายไกที่ได้จากการเพาะเลี้ยงมีปริมาณที่สูงกว่าสาหร่ายไกที่เก็บจากแหล่งธรรมชาติเล็กน้อย จึงไม่มีค่าแตกต่างกันทางสถิติ (p>0.05) ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 1 โดยที่สารสกัดน้ำสาหร่ายไกจากการเพาะเลี้ยงและจากแหล่งธรรมชาติปริมาณ 1 กรัม มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเทียบกับสาร gallic acid ที่ 16.33 และ 15.95 mg (GAE) ตามลำดับ โดยสารสำคัญที่ตรวจพบในสารสกัดน้ำสาหร่ายไกที่เก็บจากธรรมชาติเมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC พบองค์ประกอบของสารกลุ่ม ฟีนอลิกลายชนิดด้วยกัน ได้แก่ ไฮโซเคอร์ซิติน แคทิชิน กรดแทนนิก ไฮโดรควินิน เคอร์ซิติน รูติน กรดแกลลิก และแคมเฟอรอล โดยแสดงชนิดของสารฟีโนลิกในโครมาโตแกรมรูปที่ 2 และแสดงชนิดและปริมาณของสารฟีนอลิกในตารางที่ 1



รูปที่ 2 ชนิดของสารฟีนอลิกในสารสกัดน้ำสาหร่ายไกที่เก็บจากแม่น้ำน่าน

ตารางที่ 1 ชนิดและปริมาณของสารฟีนอลิกในสารสกัดน้ำสาหร่ายไกที่เก็บจากแม่น้ำน่าน

ลำดับที่ Peak No.	Time of retention (min)	ชนิดของสารฟีนอลิก	ปริมาณ (mg/kg)
1	5.9-6.7	Gallic acid	578.25
2	12.50	Tannic acid	1278.03
3	12.80	Catechin	2196.34
4	15.00	Rutin	629.85
5	16.20	Isoquercetin	7875.57
6	23.80	Eriodictyol	-
7	30.65	Quercetin	1014.58
8	33.10	Hydroquinin	1118.32
9	41.20	Apiginin	-
10	42.65	Kaempferol	138.55

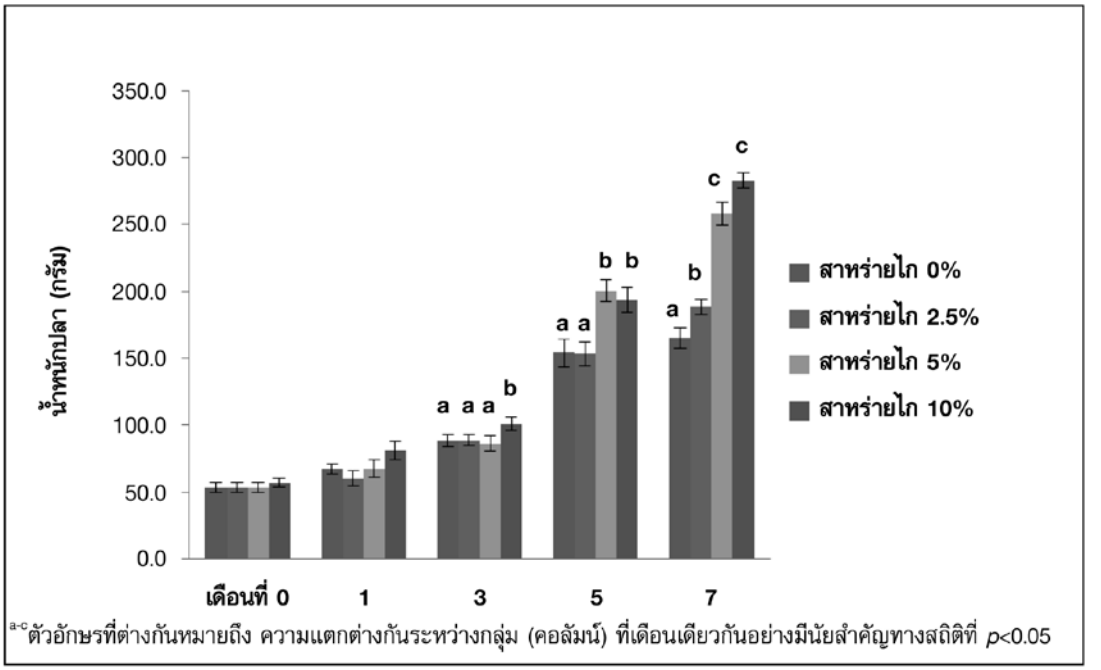
3.2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS แสดงผลการทดลองในตารางที่ 2 พบว่า ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดน้ำสาหร่ายไกที่เก็บจากที่มาต่างกัน 2 แหล่ง มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ (p<0.05) โดยพบว่า สารสกัดน้ำสาหร่ายไกที่เก็บจากการเพาะเลี้ยงและจากการเก็บจากแหล่งน้ำธรรมชาติในขนาด 1 กรัมมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่ากับวิตามินอีหรือ trolox ที่ 139.85 และ123.15 mM (TEAC) ตามลำดับ

ตารางที่ 2 การเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS และปริมาณสารประกอบฟินอลิกจากแหล่งที่มา 2 แห่ง

สาหร่ายไก	GAE (mg)	TEAC (mM)
การเพาะเลี้ยง	16.33 $\pm$ 0.17	139.85 $\pm$ 29.42
แหล่งน้ำธรรมชาติ	15.95 $\pm$ 0.31	123.15 $\pm$ 24.41

หมายเหตุ ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean SD)

3.3 ผลการเสริมสาหร่ายไกต่อการเจริญเติบโตของปลาหนังลูกผสมในกระชัง จากการเลี้ยงปลาหนังลูกผสมด้วยอาหารเสริมสาหร่ายไกจากแหล่งน้ำน่านที่ระดับ 0%, 2.5%, 5% และ 10% ในกระชังเป็นเวลา 7 เดือน โดยเริ่มตั้งแต่เดือนธันวาคมถึงเดือนมิถุนายนปี พ.ศ.2555 ผลการทดลองพบว่า ปลาหนังลูกผสมในหน่วยทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมสาหร่ายไกขนาด 2.5%, 5% และ 10% มีน้ำหนักเพิ่มขึ้นตามลำดับ ซึ่งปลาหนังที่ได้รับสาหร่ายไกที่ระดับ 10% มีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้นเริ่มตั้งแต่เดือนที่ 3 จนถึงเดือนที่ 7 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) เมื่อเปรียบเทียบกับปลาหนังลูกผสมกลุ่มที่ไม่ได้รับการเสริมสาหร่ายไก (สาหร่ายไกที่ระดับ 0%) ส่วนปลาหนังลูกผสม ที่ได้รับสาหร่ายไกที่ระดับ 5% พบว่ามีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ตั้งแต่เดือนที่ 5 จนถึงเดือนที่ 7 อย่างไรก็ตามน้ำหนักตัวของปลาหนังลูกผสม ที่ได้รับอาหารเสริมสาหร่ายไกที่ระดับ 5% และ 10% ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกันในเดือนที่ 5 และ 7 ส่วนปลาหนังที่ได้รับสาหร่ายไกที่ระดับ 2.5% มีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในเดือนที่ 7 เท่านั้น โดยพบอัตราการรอด 100% ในทุกหน่วยการทดลอง ผลการเจริญเติบโตแสดงในรูปที่ 3 และตารางที่ 3 ส่วนผลของการเสริมสาหร่ายไกต่อการเจริญเติบโตต่อวัน (ADG) ของปลาหนังลูกผสม พบว่า ผลการทดลองมีความสอดคล้องกับน้ำหนักตัว โดยปลาหนังกลุ่มที่ได้รับการเสริมสาหร่ายไก 10% มี ADG มากที่สุดในเดือนที่ 7 นอกจากนี้ปลาหนังกลุ่มที่ได้รับการเสริมสาหร่ายไก 5% และ 10% ยังมีค่าการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (FCR) น้อยที่สุดตลอดการทดลอง (ตารางที่ 3)



รูปที่ 3 ผลของการเสริมสาหร่ายไกต่อน้ำหนักตัวของปลาหนังลูกผสม

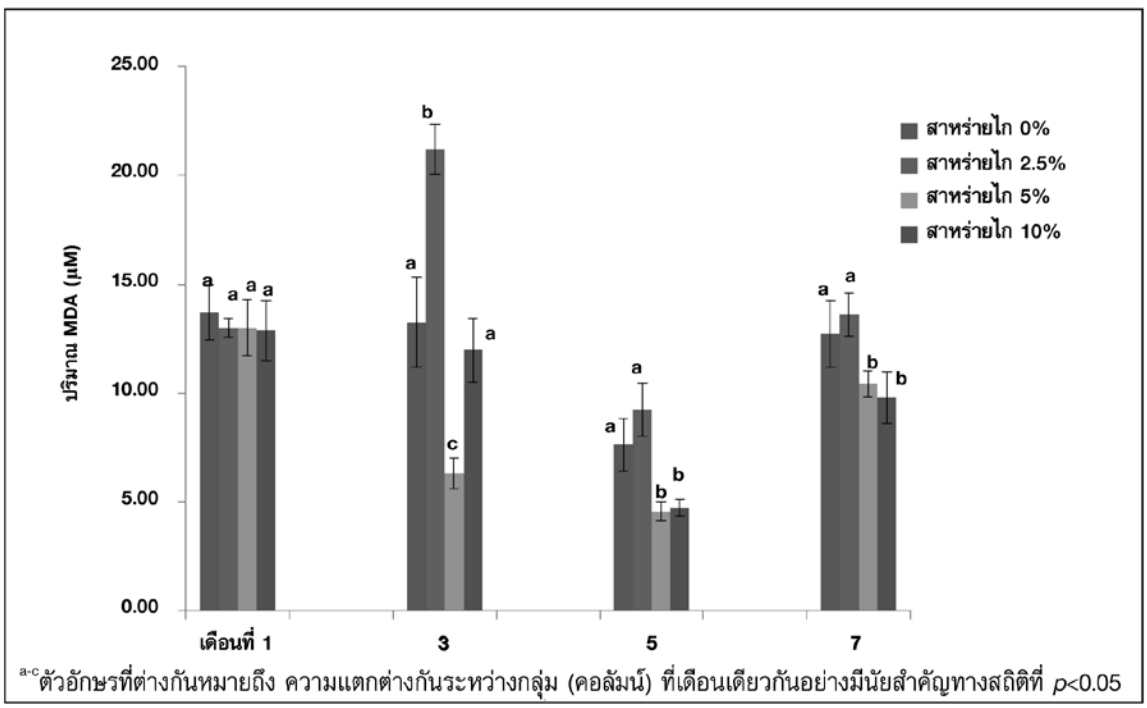
ตารางที่ 3 ผลการเจริญเติบโตของปลาหนังลูกผสมที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมสาหร่ายไกเมื่อสิ้นสุดการทดลอง

สาหร่ายไก	น้ำหนักตัว (กรัม)	น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น (กรัม)	อัตราการเจริญเติบโตต่อวัน (กรัม/วัน)	อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ
0%	165.2±7.7^{a}	128.9±4.2^{a}	0.62±0.02^{a}	1.72±0.06^{a}
2.5%	188.3±7.2^{b}	134.7±2.8^{a}	0.66±0.02^{a}	1.64±0.04^{a}
5.0%	257.8±11.9^{c}	204.2±3.9^{b}	0.98±0.02^{b}	1.08±0.02^{b}
10%	282.8±12.6^{c}	226.6±4.1^{c}	1.08±0.01^{c}	1.00±0.04^{b}

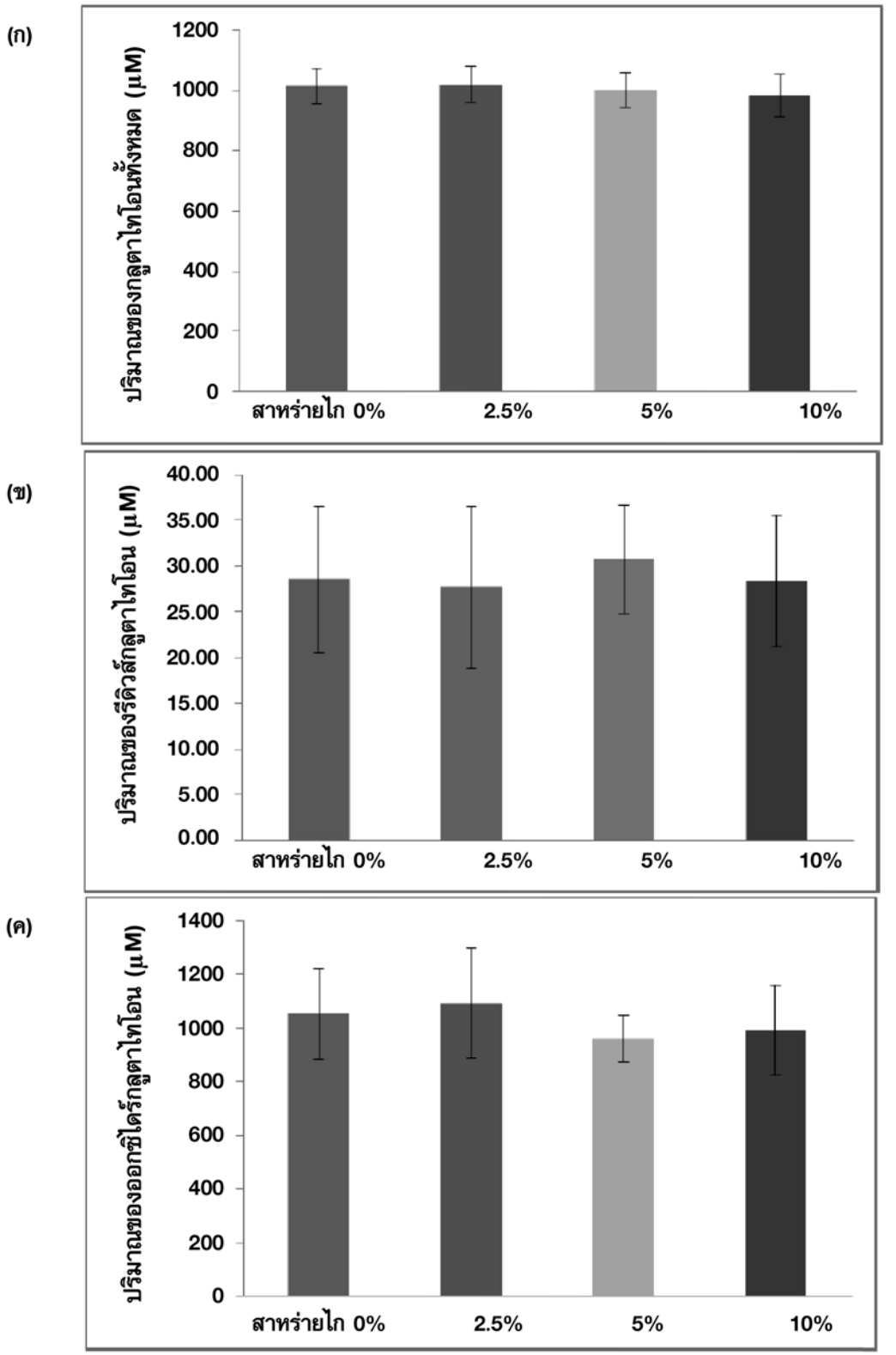
ค่าที่แสดงคือค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±SD)

$^{a-c}$ ตัวอักษรที่ต่างกันหมายถึง ความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มในคอลัมภ์เดียวกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p<0.05$

3.4 การประเมินผลของการเสริมสาหร่ายไกต่อระบบต้านอนุมูลอิสระ โดยประเมินภาวะเครียดออกซิเดชันหรือการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชันในเลือดของปลาหนังลูกผสมที่แสดงในรูปแบบของระดับ malondialdehyde (MDA) ซึ่งเป็นผลผลิตจากการเกิด lipid peroxidation พบว่าปลาหนังลูกผสมที่เลี้ยงด้วยสาหร่ายไกที่ระดับ 5% และ 10% ให้ระดับ MDA ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในเดือนที่ 5 และเดือนที่ 7 ของการเลี้ยง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้เสริมสาหร่ายไก (รูปที่ 4) โดยปลาหนังลูกผสมกลุ่มที่ให้สาหร่ายไกที่ 5% มีระดับ MDA ลดลงสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในเดือนที่ 5 เมื่อเทียบกับกลุ่มการทดลองอื่นในเดือนเดียวกัน จากนั้นได้ทำการตรวจวัดระดับกลูตาไทโอน (GSH) ในเลือด พบว่าในเดือนที่ 7 ซึ่งเป็นเดือนสุดท้ายของการทดลอง ระดับกลูตาไทโอนรวม (Total GSH) ออกซิไดส์กลูตาไทโอน (GSSG) และรีดิวส์กลูตาไทโอน (Reduce GSH) ในปลาหนังลูกผสมทั้ง 4 กลุ่มไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 5)



รูปที่ 4 ผลของสาหร่ายไกต่อระดับลิปิดเปอร์ออกซิเดชันในเลือดปลาหนังลูกผสม



รูปที่ 5 ระดับของกลูตาไทโอนทั้งหมด (ก) รีดิวส์กลูตาไทโอน (ข) และออกซิไดร์กลูตาไทโอน (ค) ในปลาหนังลูกผสมที่ให้อาหารผสมสาหร่ายไกระดับต่างกันในเดือนที่ 7 (มิถุนายน)

4. วิจารณ์ผลการทดลอง

สาหร่ายไกที่เก็บจากทั้งแหล่งธรรมชาติและจากการเพาะเลี้ยงมีสารประกอบฟีนอลิกเป็นองค์ประกอบที่สำคัญ และยังมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระอีกด้วย เมื่อนำสาหร่ายไกมาเพิ่มมูลค่าเป็นอาหารเม็ดสำหรับเลี้ยงปลา พบว่าเพิ่มการเจริญเติบโตของปลาได้ดี ช่วยลดระดับภาวะเครียดออกซิเดชันในปลาได้ ทำให้ปลามีสุขภาพดี ไม่เป็นโรคง่าย โดยมีรายงานการวิจัยพบว่า สารสกัดแอลกอฮอล์ของสาหร่ายไกมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ ต้านการเกิดแผลในกระเพาะอาหาร ขยายหลอดลม ยับยั้งการหดเกร็งของกล้ามเนื้อเรียบ ระงับปวดและลดความดันโลหิต [10] ส่วนสารสกัดน้ำของสาหร่ายไกมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยสามารถกำจัดอนุมูล DPPH อนุมูล superoxide และยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ได้ นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ต้านการอักเสบในหนูขาวอีกด้วย [2, 4, 10] โดยทั้งสารสกัดแอลกอฮอล์และสารสกัดน้ำของสาหร่ายไกมีการตรวจพบว่ามีสารประกอบฟีนอลิกเป็นสารสำคัญอยู่ในปริมาณสูง มีการศึกษาตรวจวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในการสกัดหยาบของสาหร่ายเตาด้วยตัวทำละลาย 5 ชนิด คือ เฮกเซน อะซิโตน เมทานอล น้ำที่อุณหภูมิห้องและน้ำร้อน และทำการศึกษาพฤกษเคมีของสารสกัดน้ำและเมทานอลของสาหร่ายเตา พบว่ายังมีสารประกอบกลุ่มแทนนิน คาร์ดิแอคไกโคไซด์ และ สารกลุ่มซาโปนิน เป็นส่วนประกอบอีกด้วย [11]

มีรายงานการใช้สาหร่ายในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ โดยมีการนำสาหร่าย *Spirulina* sp. มาเสริมในอาหารเลี้ยงปลาพบว่า ช่วยเพิ่มการเจริญเติบโตและการเจริญพันธุ์ของปลาบึก ปลาเผาะ และปลาสวายได้ดี [12] โดย Wu et al. [13] พบว่า สารสกัดน้ำของสาหร่าย *Spirulina* sp. มีสารประกอบฟีนอลิกเป็นส่วนประกอบและมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS และจากรายงานการวิจัยของธีระวัฒน์ และคณะ [14] ได้นำสาหร่ายเตา (*Spirogyra* spp.) มาเสริมในอาหารเลี้ยงปลานิล ซึ่งผลการศึกษาพบว่า สาหร่ายเตาสามารถเพิ่มน้ำหนักและอัตราการรอดได้ดี เนื่องจากมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และยังพบสารประกอบฟีนอลิกเป็นสารสำคัญในสาหร่ายเตาอีกด้วยซึ่งในสาหร่ายเตามีมากกว่าสาหร่ายไกถึง 6 เท่า ส่วนรายงานเกี่ยวกับสาหร่ายทะเล *Sargassum polycystum* มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH, ABTS และยับยั้งการเกิด lipid peroxidation [15] โดยในปัจจุบันได้มีการนำสาหร่ายทะเลเหล่านี้มาใช้เป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์น้ำ ส่วนสาหร่ายไกถูกนำมาใช้เป็นอาหารของปลาน้ำจืดหลายชนิด โดยเฉพาะปลาบึก [16] ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาในครั้งนี้ที่พบสารประกอบฟีนอลิกเป็นกลุ่มสารสำคัญที่ตรวจพบในสาหร่ายไกและช่วยเพิ่มการเจริญเติบโตของปลาได้ดี

การให้สาหร่ายไกมีผลต่อการลดลงของระดับลิพิดเปอร์ออกซิเดชันในเลือดของปลาหนังลูกผสม ซึ่งสอดคล้องกับผลของการเจริญเติบโตซึ่งมีระดับแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยผลการทดลองในครั้งนี้สอดคล้องกับงานของธีระวัฒน์ และคณะ [14] ที่ได้ทำการศึกษาระดับลิพิดเปอร์ออกซิเดชันในปลานิลที่ให้อาหารเสริมสาหร่ายเตาผลการศึกษาพบว่าการให้สาหร่ายเตาที่ระดับ 5%, 10% เป็นระยะเวลา 4 เดือนมีผลต่อการลดลงของระดับลิพิดเปอร์ออกซิเดชันในไตและตับของปลานิลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และมีรายงานการวิจัย การให้อาหารที่ผสมคาโรทีนอยด์ที่สกัดจากสาหร่าย *Aspergillus carbonarius* ที่ความเข้มข้น 250 ppm ในหนูขาว พบว่าทำให้ระดับลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน (MDA) ในตับลงลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับหนูที่ไม่ให้อาหารที่ผสมคาโรทีนอยด์ และมีรายงานว่าในหนูแก่จะมีค่า MDA ในระดับที่สูงขึ้นแต่เมื่อให้สารสกัดสาหร่าย *Porphyra haitanesis* ทำให้ระดับ MDA ลดลงอย่างมีนัยสำคัญในตับ ซึ่งให้ผลเทียบเท่ากับวิตามินซี [17]

กลูตาไทโอนจัดเป็นสารต้านอนุมูลอิสระโดยในร่างกายมีกลูตาไทโอนอยู่ใน 2 รูปแบบ คือ กลูตาไทโอนในรูปรีดิวส์ (GSH) และกลูตาไทโอนในรูปออกซิไดส์ คือ กลูตาไทโอนไดซัลไฟด์ (GSSH) กลูตาไทโอนเป็นตัวช่วยในการกำจัดอนุมูลอิสระออกจากร่างกายของคนหรือสัตว์ มีรายงานว่าการศึกษาในปลาทองหลังจากการสัมผัสสารเคมี 2,4-dichlorophenol พบว่าทำให้ระดับของกลูตาไทโอนเพิ่มมากขึ้นแสดงให้เห็นบทบาทของกลูตาไทโอนในการกำจัดอนุมูลอิสระจากการปนเปื้อนของสารพิษในตัวปลา [18] จากการศึกษาระดับกลูตาไทโอนในเลือดของปลาหนังลูกผสมที่ได้รับสาหร่ายไกเสริมในอาหารเป็นเวลา 7 เดือน พบว่า กลูตาไทโอนรวม รีดิวส์กลูตาไทโอน และระดับกลูตาไทโอนออกซิไดส์ในทุกๆ กลุ่มการทดลอง ไม่มีความ

แตกต่างอย่างมีนัยทางสถิติ ดังนั้นสาหร่ายไกที่เสริมลงในอาหารของปลานั้น ไม่ได้ส่งผลต่อระดับกลูต้าไทโอนในปลา ซึ่งต่างจากรายงานการวิจัยของ Li et al. [19] พบว่าเมื่อให้สารสกัด Domoic acid (DA) ในระดับความเข้มข้นที่มากจะทำให้ระดับกลูตาไทโอนในตับและเหงือกของปลานิลเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในปลานิล และรายงานการวิจัยของ ธีระวัฒน์ และคณะ [14] ได้เสริมสาหร่ายเตาในอาหารเลี้ยงปลานิล ซึ่งผลการศึกษาพบว่าระดับของกลูตาไทโอนรวม และ รีดิวส์กลูตาไทโอน เพิ่มขึ้น ส่วนระดับกลูตาไทโอนออกซิไดส์นั้นลดลงอย่างมีนัยทางสถิติ

5. สรุปผลการวิจัย

สาหร่ายไกจากแหล่งน้ำธรรมชาติและจากการเพาะเลี้ยงมีศักยภาพไม่แตกต่างกันในการนำมาใช้เป็นอาหารเสริมในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำได้ เนื่องจากสาหร่ายไกทั้ง 2 แหล่ง มีสารสำคัญกลุ่มฟีนอลิกและมีฤทธิ์ชีวภาพในการต้านอนุมูลอิสระที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ นอกจากนี้ยังมีสารอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการ ที่ช่วยเพิ่มการเจริญเติบโตและเป็นประโยชน์ต่อสุขภาพสัตว์น้ำ และสามารถช่วยลดระดับภาวะเครียดออกซิเดชันในปลาได้ เป็นการป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระจะช่วยทำให้ปลามีสุขภาพดี ทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ ทำให้ไม่เป็นโรคง่าย ส่งผลต่อการผลิตปลาที่มีคุณภาพ และมีอัตราการรอดสูง โดยการเสริมสาหร่ายไกที่ระดับ 5% ในอาหารปลามีความเหมาะสมที่สุด เพราะให้ผลการเจริญเติบโตดีมีน้ำหนักตัวไม่ต่างจากระดับ 10% ซึ่งช่วยลดต้นทุนค่าสาหร่ายไกในสูตรอาหารปลา และช่วยเพิ่มผลผลิตเชิงพาณิชย์ได้ต่อไป

6. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ประจำปีงบประมาณ 2557

7. เอกสารอ้างอิงวารสาร

1. Peerapornpisal, Y., 2007, Kai algae : General Knowledge and Food Processing, Chotanaprint Ltd., Chiangmai, 58 p. (In Thai)

2. Peerapornpisal, Y., Amornlerdpison, D., Kanjanapothi, D., Taesotikul, T., et al., 2009, "Final Report : Potential of Freshwater Macroalgae as Nuraceutical and Cosmeceutical Products," NRCT, Bangkok, 62 p. (In Thai)

3. Srimaroeng, C., Atcharaporn, O., Naruwan, S., Pornpun, V., Anchalee, P., Doungporn, A., Sunhapas, S. and Varanuj, C., 2015, "Antidiabetic and Renoprotective Effects of *Cladophora glomerata* Kützing Extract in Experimental Type 2 Diabetic Rats: A Potential Nutraceutical Product for Diabetic Nephropathy," *Journal of Diabetic Research*, 2015, Article ID 320167, pp. 1-15.

4. Amornlerdpison, D., Mengumphan, K., Thumvijit, S. and Peerapornpisal, Y., 2011, "Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of Freshwater Macroalga, Cladophora glomerata Kützing," *Thai Journal of Agricultural Science*, 44 (5), pp. 283-291.

5. Van der Oost, R., Beyer, J. and Vermeulen, N., 2003, "Fish Bioaccumulation and Biomarkers in Environmental Risk Assessment," *Journal Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13 (2), pp. 57-149.

6. Sachindra, N., Airanthi, M., Hosokawa, M. and Miyashita, K., 2010, "Radical Scavenging and Singlet Oxygen Quenching Activity of Extracts from Indian Seaweeds," *Journal of Food Science and Technology*, 47, pp. 94-99.

7. Re, R., Pellegrini, N., Pannala, Y. and Rice-Evan, C., 1999, "Antioxidant Activity Applying an Improve ABTS Radical Cationdecolorisation Assay," Free Radical Biology and Medicine, 9/10 (6), pp. 1231-1237.

8. https://www.caymanchem.com/pdfs/10009055.pdf

9. https://www.caymanchem.com/pdfs/703002.pdf

10. Peerapornpisal, Y., Amornlerdpison, D.,

Rujjanawate, C., Ruangrit, K. and Kanjanapothi, D., 2006, "Two Endemic Species of Macroalgae in Nan River, Northern Thailand, as Therapeutic Agents," *Science Asia*, No. 32, Vol. Supplement 1, pp. 71-76.

11. Junthip, R., Amornlerdpison, D. and Chimsook, T., 2013, "Phytochemical Screening, Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of *Spirogyra* spp," *Advanced Materials Research*, 699, pp. 693-697.

12. Mengumphan, K., Sorntako, J. and 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," *Journal of Fisheries Technology Research*, 5 (2), pp. 12-25. (In Thai)

13. Wu, L.C., Ho, J., Shieh, M.C. and Lu, I., 2005, "Antioxidant and Antiproliferative Activities of Spirulina and Chlorella Water Extracts," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, pp. 4207-4212.

14. Teerawat, R., Kriangsak M., Chutima, S., Rattanapon, J. and Amornlerdpison, D., "Antioxidant Activity of *Spirogyra* sp. and Effect of its Supplementation on Growth Performance of Tilapia in Cage Culture," *Journal of Fisheries Technology Research*, 6 (2), pp. 23-34. (In Thai)

15. Amornlerdpison, D., Peerapornpisal, Y., Taesotikul, T., Utan J., Nualchareon, M. and Kanjanapothi, D., 2008, "Antioxidant activity of *Sargassum polycystum* C. Agardh," Journal of Fisheries Technology Research, 2 (2), pp. 96-103. (In Thai)

16. Khuantrairong, T. and Traichaiyaporn S., 2010, "Efficiency of Carotenoid and Nutritional Values Production of an Alga Kai (*Cladophora* sp.) for Economic Utilization (I)," *Journal of Fisheries Technology Research*, 4 (2), pp. 54-64. (In Thai)

17. Quanbin, Z., Ning, L., Gefei, Z., Xiaolan, L., Zuhong, X. and Zhien, Li., 2003, "In vivo Antioxidant Activity of Polysaccharide Fraction from *Porphyra haitanesis* (Rhodephyta) in Aging Mice," *Pharmacological Research*, 48, pp. 151-155.

18. Yonar, M. and Sakin, F., 2011, "Ameliorative Effect of Lycopene on Antioxidant Status in *Cyprinus carpio* during Pyrethroiddeltamethrin Exposure," *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 99, pp. 226-231.

19. Birgül, M. and Tolga, C., 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 (4), pp. 734-738.