

บทความวิจัย (Research Article)

ผลของสารอาหารต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสาหร่ายสไปรูลินา พลาเทนซิส

อรพรรณ พรหมชนพันธ์¹, คมศักดิ์ พิณะ², รัฐภูมิ พรหมณะ^{1*}Effect of cultural media on antioxidative activity of *Spirulina platensis*Arraphun Phomtanaphun¹, Komsak Pinta², Rattapoom Prommana^{1*}¹ School of Energy and Environment, University of Phayao, Phayao Province 56000² School of Medical Science, University of Phayao, Phayao Province 56000

* Corresponding author, E-mail: smartrattapoom@yahoo.com

Naresuan Phayao J. 2015;8(3):150-154.

บทคัดย่อ

กำหนดหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสาหร่าย *Spirulina platensis* เพาะเลี้ยงจากสารเพาะเลี้ยงแตกต่างกัน 8 ชนิด ประกอบด้วยสารเพาะเลี้ยงการค้า-1 (C1), สารเพาะเลี้ยงการค้า-2 (C2), สารเพาะเลี้ยงมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (Chiangmai University – CMU), สารเพาะเลี้ยงมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ปราศจากปุ๋ยแร่ธาตุ (CMU free fertilizer), สารเพาะเลี้ยงสถาบันวิจัยเทคโนโลยีอาหารกลาง (Central Food Technological Research Institute - CFTRI), สารเพาะเลี้ยง CMU กับร้อยละ 10 น้ำเสียปลาหมัก, สารเพาะเลี้ยง CMU free fertilizer กับร้อยละ 10 น้ำเสียปลาหมัก และสารเพาะเลี้ยง CFTRI กับร้อยละ 10 น้ำเสียปลาหมัก ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าสารเพาะเลี้ยงที่มีน้ำเสียสารอินทรีย์ทำให้สาหร่ายมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารเพาะเลี้ยงปราศจากน้ำเสียสารอินทรีย์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) สารเพาะเลี้ยงสามอันดับแรกได้แก่ สารเพาะเลี้ยง CMU กับร้อยละ 10 น้ำเสียปลาหมัก/สารเพาะเลี้ยง C2/สารเพาะเลี้ยง CFTRI กับร้อยละ 10 น้ำเสียปลาหมัก ที่ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัม (มก.) ต่อมิลลิลิตร (มล.) สามารถฟอกสีอนุมูลอิสระเอบีทีเอสสูงสุดเท่ากับร้อยละ 93/92/84 เช่นเดียวกับลดเฟอริคของสารต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 122 (5)/104 (3)/88 (4) ไมโครโมล (ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ดังนั้นสารอินทรีย์ในน้ำเสียปลาหมักเพิ่มพูนชีวมวลของสาหร่ายและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

คำสำคัญ: สไปรูลินา พลาเทนซิส, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, น้ำเสียปลาหมัก

Abstract

Antioxidative activities of *Spirulina platensis*, cultivated from the eight different culture media, were determined. The media included commercial-1 (C1), commercial-2 (C2), Chiangmai University (CMU), CMU with 10% fermented fish (Plasom) wastewater, CMU free fertilizer (CMU free), CMU free with 10% fermented wastewater, Central Food Technological Research Institute (CFTRI), and CFTRI with 10% fermented wastewater. The result demonstrated that the media with organic wastewater provided the algae which had significant antioxidant activity more than those did not ($p < 0.05$). The first three media included CMU with 10% wastewater/C2/CFTRI with 10% wastewater at concentration of 0.3 milligram (mg)/milliliter (mL) showed highest 2,2A-Azinobis(3-ethylbenzthiazoline)-6-sulfonic acid (ABTS) decolorization assay of 93/92/84%, as

¹ วิทยาลัยพลังงานและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยพะเยา จังหวัดพะเยา 56000² คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยพะเยา จังหวัดพะเยา 56000

รับต้นฉบับวันที่ 2 มีนาคม 2558, รับลงตีพิมพ์วันที่ 12 พฤศจิกายน 2558

well as the ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay of 122 (5)/104(3)/88 (4) micromole (μM) (standard deviation), respectively. Besides, the increased concentration of the algae yielded higher antioxidant activity. Thus the organic substance of wastewater enhanced the biomass of the algae, and antioxidant activity.

Keywords: *Spirulina platensis*, antioxidative activity, fermented fish wastewater

บทนำ

สาหร่ายสไปรูลิน พลาเทนิส (*Spirulina platensis*) เป็นสาหร่ายน้ำจืดสีเขียวแกมน้ำเงินชนิดเซลล์เดี่ยว, เติบโตในที่อุ่น ในเชิงการค้าเป็นผลิตภัณฑ์สำหรับการบริโภค มีคุณสมบัติทั้งโภชนาการและยา [1-4] มีฤทธิ์ทางชีววิทยาหลากหลาย เนื่องจากประกอบด้วยสารปริมาณสูงเป็นต้นว่า แร่ธาตุ (mineral), กรดไขมัน (fatty acid), กรดอะมิโน (amino acid), วิตามิน (vitamin) นอกจากนี้ประกอบด้วยกรดฟีนอลิก (phenolic acid), วิตามินอี (tocopherol) และเบต้าแคโรทีน (beta-carotene) สารทั้งหมดนี้มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ [5] หลายปีที่ผ่านมาพบว่าสาหร่ายมีคุณสมบัติทางเภสัชวิทยา ประกอบด้วยสารออกฤทธิ์เช่น ซี-ไฟโคไซยานิน (C-phyocyanin) อันแสดงออกฤทธิ์ต้านอักเสบ (anti-inflammation), ปกป้องประสาท (neuroprotection), ปรับภูมิคุ้มกัน (immunomodulatory), ต้านมะเร็ง และต้านการสร้างหลอดเลือดใหม่ (anti-angiogenic) นอกจากนี้ยังทำให้ภาวะพิษต่ออวัยวะจากโลหะหนักดีขึ้น [6]

การศึกษามุ่งหมายกำหนดหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสาหร่ายสไปรูลิน พลาเทนิส เพาะเลี้ยงจากต่างสารเพาะเลี้ยงและความเข้มข้นเชิงเปรียบเทียบ

วัสดุและวิธีการ

เพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลิน พลาเทนิสด้วยสารเพาะเลี้ยงแตกต่างกัน 8 ชนิด ประกอบด้วย

- สารเพาะเลี้ยงการค้า-1 (C1)
- สารเพาะเลี้ยงการค้า-2 (C2)
- สารเพาะเลี้ยงมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (Chiangmai University - CMU)

- สารเพาะเลี้ยงมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปราศจากปุ๋ยแร่ธาตุไนโตรเจน, ฟอสฟอรัส, โพแทสเซียม (CMU free fertilizer – N:P:K free)
- สารเพาะเลี้ยงสถาบันวิจัยเทคโนโลยีอาหารกลาง (Central Food Technological Research Institute - CFTRI)
- สารเพาะเลี้ยง CMU กับร้อยละ 10 น้ำเสียปลาหมัก
- สารเพาะเลี้ยง CMU free fertilizer กับร้อยละ 10 น้ำเสียปลาหมัก และ
- สารเพาะเลี้ยง CFTRI กับร้อยละ 10 น้ำเสียปลาหมัก

เพาะเลี้ยงในสภาวะมีแสงตลอด 24 ชั่วโมง (ชม.) นาน 3 สัปดาห์ กรองชีวมวลของสาหร่ายด้วยผ้ากรองและอบแห้งที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส (องศาซี) นาน 6 ชม. และเก็บไว้ที่ -4 องศาซี [7]

ทดสอบโคลิฟอร์มแบคทีเรีย (coliform bacteria) ในตัวอย่างสาหร่ายด้วยน้ำซุปลอเรียลทริปโทส (lauryl tryptose broth) ในหลอดแก้ว 3 หลอด บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาซี นาน 24 ชม. การทดสอบเบื้องต้นได้ผลบวกต่อเมื่อมีก๊าซในหลอดแก้ว ทดสอบต่อโดยเกลี่ยตัวอย่างบนสารเพาะเลี้ยง eosin methylene blue เพื่อกำหนดหาการปรากฏกลุ่มแบคทีเรีย (colony) บ่มกลุ่มแบคทีเรียในน้ำซุปลอเรียลทริปโทส ที่อุณหภูมิ 37 องศาซี นาน 24 ชม. เพื่อกำหนดหาโคลิฟอร์มแบคทีเรียอันมีรูปร่างลักษณะเฉพาะและย้อมสีแกรม (Gram stain)

เจือจางชีวมวลสาหร่าย 5 กรัมในน้ำปราศจากประจุ 10 มิลลิลิตร (มล.) เขย่าและเก็บที่ -20 องศาซี นาน 2 ชม. จากนั้นบ่มที่ 80 องศาซี นาน 1 ชม. ทำ 5 ครั้ง

กำหนดหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสาหร่ายด้วยการฟอกสีอนุมูลอิสระเอบีทีเอส (2,2'-azino-bis

(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) – ABTS; Sigma, USA} [8,9] เตรียมสารละลายเอบีทีเอส ด้วยการละลายเอบีทีเอส 0.0129 กรัมและโปแตสเซียมเพอซัลเฟต 0.0033 ในน้ำปราศจากประจุ 5 มล. เก็บในห้องมืด ที่อุณหภูมิห้อง นาน 12 ชม. แล้วละลายด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 400 มล.

เตรียมกราฟมาตรฐาน 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid {Trolox; Sigma, USA} ใช้ Trolox 0.0025 กรัมละลายในร้อยละ 80 เอทานอล จนมีปริมาตร 1 มล. และเจือจางด้วยร้อยละ 80 เอทานอล จนได้ความเข้มข้น 6.25, 12.5, 25, 50, 100 และ 200 ไมโครโมล (μM) ผสมกับเอบีทีเอสนาน 8 นาทีในที่มืด วัดด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ที่ 731 นาโนเมตร (nm) เพื่อกำหนดกราฟมาตรฐานความเข้มข้นของ Trolox แสดงจำนวนการดูดกลืนแสง

กำหนดหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานของวิตามินซี {ascorbic acid; Sigma, USA}, บีเอชเอ 1-butylated hydroxyanisole {BHA; Sigma, USA} และวิตามินอี {Tocopherol; Sigma, USA} ด้วยการละลายสารทั้งสาม 0.01, 0.1 และ 0.05 กรัมตามลำดับ ในร้อยละ 80 เอทานอล 1 มล. และเจือจางจนได้ความเข้มข้น 3, 6, 12 และ 24 μM ผสมกับเอบีทีเอสนาน 8 นาทีในที่มืด วัดด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ที่ 731 nm เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน Trolox และคำนวณความสัมพันธ์กับร้อยละของการยับยั้งอนุมูลอิสระ

กำหนดหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสำหรับความเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.2 และ 0.3 มิลลิกรัม (มก.) ต่อ มล. แต่ละความเข้มข้นใช้ปริมาณ 300 ไมโครลิตร (μL) ผสมกับเอบีทีเอส 2,700 μL นาน 8 นาทีในที่มืด วัดด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ที่ 731 nm คำนวณการดูดกลืนเพื่อหาความสัมพันธ์ของการยับยั้งอนุมูลอิสระ เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน Trolox

การวิเคราะห์ความสามารถในการลดเฟอริกของสารต้านอนุมูลอิสระ {ferric reducing antioxidant power – FRAP assay} [10,11]

- เตรียมสารละลายอะซีเตทบัฟเฟอร์ด้วยการละลาย 2.3 กรัมโซเดียมอะซีเตทใน 7.6 มล. กรดอะซีติก, ปรับปริมาตรเป็น 100 มล. ด้วยน้ำปราศจากประจุ และให้มีความเป็นกรดต่างเท่ากับ 3.6 เก็บที่อุณหภูมิห้อง
- เตรียมสารละลาย 2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ) ใช้ TPTZ 0.0310 กรัม ละลายใน 10 มล. ของ 40 มิลลิโมล (mM) และบ่มในอ่างน้ำที่อุณหภูมิ 50 องศา
- เตรียมสารละลายเฟอริกไตรคลอไรด์เฮกซะไฮเดรตด้วยการละลายเฟอริกไตรคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต 0.054 กรัมในน้ำ 10 มล.
- เตรียมสารละลายลดเฟอริกของสารต้านอนุมูลอิสระ ด้วยการละลายสารละลายอะซีเตทบัฟเฟอร์ กับสารละลาย TPTZ 10 มล. และอะซีเตทบัฟเฟอร์ 10 มล. เก็บในที่มืด

วิเคราะห์ข้อมูลเป็นร้อยละ, ค่าเฉลี่ย, ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation – SD) ใช้การทดสอบ paired-t test เปรียบเทียบข้อมูลภายในกลุ่ม ส่วนการวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance – ANOVA) ใช้ทดสอบเพื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของข้อมูลระหว่างหลายกลุ่ม โดยกำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า $p < 0.05$

ผลการศึกษา

ไม่พบโคลิฟอร์มแบคทีเรียในตัวอย่างสารสกัดสำหรับไลนิน พลาเทนซิส

Trolox ความเข้มข้น 6.25, 12.5, 25, 50, 100 และ 200 μM ผสมกับเอบีทีเอสแสดงจำนวนการดูดกลืนแสง (ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน – standard deviation; SD) เท่ากับ 0.6961 (0.00), 0.6758 (0.01), 0.6504 (0.01), 0.588 (0.01), 0.4658 (0.01) และ 0.2048 (0.04) และยับยั้งอนุมูลอิสระเอบีทีเอสเท่ากับร้อยละ (SD) เท่ากับ 10 (1), 14 (1), 16 (1), 25 (0), 39 (3) และ 77 (3) ตามลำดับ

วิตามินซี/บีเอชเอ/วิตามินอีความเข้มข้น 3, 6, 12 และ 24 ไมโครโมลผสมกับเอบีทีเอสแสดงค่าดูดกลืนแสง (SD) เท่ากับ 24 (3)/21 (4)/18 (7), 33 (4)/27 (4)/18 (6), 41 (6)/38 (4)/19 (8) และ 66 (8)/63 (5)/23 (7) ตามลำดับ

สารเพาะเลี้ยงกับน้ำเสียสารอินทรีย์ให้สาหร่ายที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารเพาะเลี้ยงที่ไม่มีน้ำเสียสารอินทรีย์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แสดงดังตาราง 1. และ 2.

ส่วนการยับยั้งอนุมูลอิสระเอบีทีเอสและการลดเฟอริกของสาหร่ายเพาะเลี้ยงด้วยสารเพาะเลี้ยงแตกต่างกัน 8 ชนิด ที่ความเข้มข้นต่างๆ แสดงดังตาราง 1. และ 2. พบว่าสาหร่ายเพาะเลี้ยงด้วยสารเพาะเลี้ยงสามอันดับแรก CMU กับน้ำเสียปลาหมัก/สารเพาะเลี้ยงการค้ำ C2/สารเพาะเลี้ยง CFTRI กับน้ำเสียปลาหมัก ความเข้มข้น 0.3 มก. ต่อมล. ยับยั้งอนุมูลอิสระเอบีทีเอสเท่ากับร้อยละ 93/92/84 ตามลำดับ ขณะที่ลดเฟอริกหน่วยเป็น μM (SD) เท่ากับ 122 (5)/104 (3)/88 4) μM ตามลำดับ

ตาราง 1. การยับยั้งอนุมูลอิสระเอบีทีเอสของสาหร่ายต่างสารเพาะเลี้ยงและต่างความเข้มข้น

สารเพาะเลี้ยง	ยับยั้งเอบีทีเอส ร้อยละ			
	ต่างความเข้มข้น (มก. ต่อ มล.)			
	0.05	0.1	0.2	0.3
C1	12	24	32	48
C2	38	55	76	92*
CMU	14	15	16	24
CMU และปลาหมัก	48	74	88	93*
CMU free	15	17	21	34
CMU free และปลาหมัก	21	30	43	56
CFTRI	16	17	25	36
CFTRI และปลาหมัก	30	42	65	84*

* นัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$

ตาราง 2. การลดเฟอริกซัลเฟตของสาหร่ายต่างสารเพาะเลี้ยงและต่างความเข้มข้น

สารเพาะเลี้ยง	ลดเฟอริก μM (SD)		
	ต่างความเข้มข้น (มก. ต่อ มล.)		
	0.1	0.2	0.3
C1	3 (1)	5 (1)	30 (3)
C2	10 (1)	19 (2)	104 (3)*
CMU	2 (1)	4 (1)	20 (1)
CMU และปลาหมัก	16 (4)	25 (5)	122 (5)*
CMU free	3 (1)	4 (1)	25 (1)
CMU free และปลาหมัก	7 (1)	13 (2)	70 (2)
CFTRI	3 (1)	6 (1)	31 (1)
CFTRI และปลาหมัก	8 (2)	18 (40)	88 (4)*

* นัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$

วิจารณ์

การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลินา พลาแทนซิสด้วยน้ำเสียปลาหมักให้ชีวมวลอันมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากขึ้น ยกเว้นใช้ร่วมกับสารเพาะเลี้ยงปราศจากปุ๋ยแร่ธาตุ แสดงว่าปัจจัยของสำคัญของการเพาะเลี้ยงคือสารเพาะเลี้ยงต้องอุดมด้วยปุ๋ยแร่ธาตุหรือสารอินทรีย์ อันสอดคล้องกับหลายศึกษาของประเทศไทย ใช้น้ำเสียจากโรงงานผลิตถั่วเขียวทำจากข้าวเจ้า [12] น้ำเสียจากคอกเลี้ยงหมู [7,13] อนึ่ง การศึกษาระยะต่อไปเชิงลึกควรเป็นการกำหนดหาความเข้มข้นสารต่างๆเชิงคุณภาพเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสาหร่ายสไปรูลินา

โดยสรุป สารเพาะเลี้ยงที่มีปุ๋ยแร่ธาตุหรือสารอินทรีย์เพิ่มพูนชีวมวลของสาหร่ายและฤทธิ์อนุมูลอิสระ

เอกสารอ้างอิง

- Deng R, Chow TJ. Hypolipidemic, antioxidant, and antiinflammatory activities of microalgae Spirulina. Cardiovasc Ther. 2010;28(4):e33–e45.
- Kulshreshtha A, Zacharia AJ, Jarouliya U, Bhadauriya P, Prasad GB, Bisen PS. Spirulina in health care management. Curr Pharm Biotechnol. 2008;9(5):400–5.
- Pabon MM, Jernberg JN, Morganti J, Contreras J, Hudson CE, Klein RL, et al. A spirulina-enhanced diet provides neuroprotection in an α -synuclein model of Parkinson's disease. PLoS One. 2012;7(9):e45256.
- Karkos PD, Leong SC, Karkos CD, Sivaji N, Assimakopoulos DA. Spirulina in clinical practice: evidence-based human applications. Evid Based Complement Alternat Med. 2011;2011:531053.
- Belay A. The potential application of Spirulina (Arthrospora) as a nutritional and therapeutic supplement in health management. JANA. 2002;5(2):27-48.

6. Kumar N, Singh S, Patro N, Patro I. Evaluation of protective efficacy of *Spirulina platensis* against collagen-induced arthritis in rat. *Inflammopharmacol.* 2009;17(3):181-90.
7. Cheunbarn S, Peerapompisal Y. Cultivation of *Spirulina platensis* using anaerobically swine wastewater treatment effluent. *Int J Agri Biol.* 2010;12(4):586-90.
8. Miller NJ, Rice-Evans CA, Davies MJ, Gopinathan V, Milner AA. Novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci.* 1993;84(4):407–12.
9. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biol Med.* 1999;26(9-10):1231–7.
10. Benzie IF. An automated, specific, spectrophotometric method for measuring ascorbic acid in plasma (EFTSA). *Clin Biochem.* 1996;29(2):111-6.
11. Liu TZ, Chin N, Kiser MD, Bigler WN. Specific spectrophotometry of ascorbic acid in serum or plasma by use of ascorbate oxidase. *Clin Chem.* 1982;28(11):2225–8.
12. Vetayasuporn S. The potential for using wastewater from household scale fermented Thai rice noodle factories for cultivating *Spirulina platensis*. *Pakistan J Biol Sci.* 2004;7(9):1554-8.
13. Chaiklahan R, Chirasuwan, Siangdung W, Paithoonrangsarid K, Bunnag B. Cultivation of *Spirulina platensis* using pig wastewater in a semicontinuous process. *J Microbiol Biotechnol* 2010;20(3):609-14.