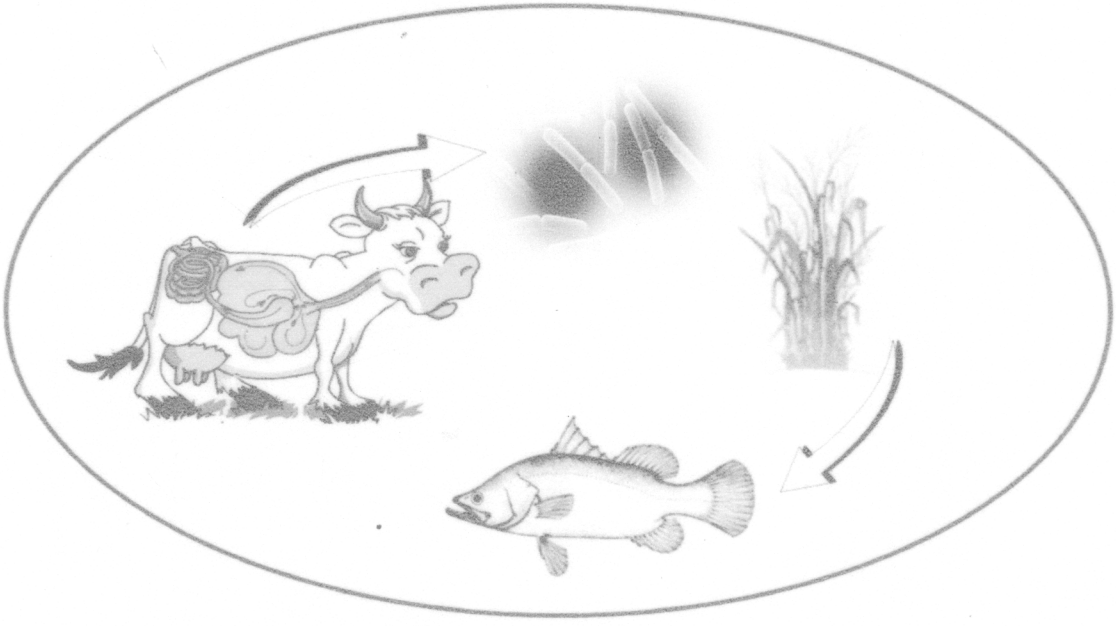
รายงานวิจัย

การใช้แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากรูเมนเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการใช้คาร์โบไฮเดรตในอาหารปลากะพงขาว (*Latescal carifer* Bloch)

Effective Rumen Cellulase Producing Bacteria for an Improvement OfCarbohydrate Utilization in Asian Seabass Diet (*Lates calcarifer* Bloch)



ผศ.ดร.ชุติมา ตันติกิตติ
รศ.ดร.อัจฉรา เพ็งหนู
รศ.ดร.วันวิศาข์ งามผ่องใส

ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

กรกฎาคม 2556

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ที่ให้การสนับสนุนงบประมาณในการทำวิจัย ขอบคุณภาควิชาวาริชศาสตร์ ภาควิชาธรณีศาสตร์ และภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ ที่ให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์ และสถานที่ทำวิจัย บริษัท เจริญโภคภัณฑ์อาหารจำกัด (มหาชน) ที่ให้ความอนุเคราะห์ปลาป่น กากถั่วเหลือง และน้ำมันปลา บริษัท ไทยยูเนียน ฟีดมิลล์ จำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์วิตามินผสม ในการทำวิจัยครั้งนี้

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	I
สารบัญ	II
สารบัญภาพ	IV
สารบัญตาราง	V
บทคัดย่อ	VI
บทนำ	1
วัตถุประสงค์	2
1. การตรวจเอกสาร	
1.1 ชนิดและประเภทของจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมนของสัตว์เคี้ยวเอื้อง	3
1.2 เอนไซม์และกระบวนการย่อยอาหารของปลา	5
1.3 ความสามารถในการใช้ประโยชน์จากคาร์โบไฮเดรตในปลา	9
1.4 เซลลูโลส	11
1.5 การศึกษาเอนไซม์เซลลูเลสในปลา	12
2. วิธีการศึกษา	
2.1 การเก็บตัวอย่างและการแยกเชื้อแบคทีเรียจากระบบทางเดินอาหารของโคพื้นเมือง และปลานิล	14
2.2 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส	15
2.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบพืช	16
2.4 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียในการย่อยสลายวัตถุดิบที่มีคาร์โบไฮเดรต และเยื่อใยสูง	16
2.5 การวัดกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส	17
2.6 การจำแนกชนิดของแบคทีเรีย *Bacillus* sp.	17
2.7 การศึกษาผลของเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสต่อประสิทธิภาพการใช้คาร์โบไฮเดรตในอาหารปลากะพงขาว	17
2.8 การศึกษาดัชนีไขมันในช่องท้อง และดัชนีตับ	21
2.9 การศึกษากิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส เซลลูเลส ทริปซิน และไลเปส	22
2.10 การศึกษาประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนในหลอดทดลอง	22
2.11 การศึกษาองค์ประกอบเลือด	23
2.12 การศึกษาปริมาณแบคทีเรียในลำไส้ปลากะพงขาว	24
2.13 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	24
3. ผลการศึกษา	

หน้า
3.1 เชื้อแบคทีเรียจากระบบทางเดินอาหารของโคพื้นเมืองและปลานิล 25
3.2 เชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส 25
3.3 ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียในการย่อยสลายวัตถุดิบที่มีคาร์โบไฮเดรต และเยื่อใยสูง 26
3.4 องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบพืช 28
3.5 กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ 29
3.6 ชนิดของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. 30
3.7 องค์ประกอบทางเคมีในอาหารทดลอง 31
3.8 อัตราการเจริญเติบโตและอัตราการรอดตายของปลากะพงขาว 32
3.9 ปริมาณการกินอาหาร อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ ประสิทธิภาพการใช้อาหาร 35
3.10 องค์ประกอบทางเคมีในตัวปลาสิ้นสุดการทดลอง 37
3.11 การใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน การใช้ประโยชน์จากไขมันสุทธิ และประสิทธิภาพการใช้ไขมัน 40
3.12 ดัชนีไขมันในช่องท้อง และดัชนีตับ 43
3.13 กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส เซลลูเลส ทริปซิน และไลเปสในปลากะพงขาว 45
3.14 ประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนในหลอดทดลอง 49
3.15 องค์ประกอบเลือดของปลากะพงขาว 51
3.16 ปริมาณแบคทีเรียในลำไส้ปลากะพงขาว 53
4. วิจารณ์ผลการทดลอง 57
5. สรุปผลการทดลอง 65
6. เอกสารอ้างอิง 66

สารบัญภาพ

หน้า

1. ลักษณะโครงสร้างของเซลลูโลสในพืช 12
2. น้ำหนักที่เพิ่มของปลากะพงขาว เมื่อคำนวณปริมาณการกินอาหารที่เพิ่มขึ้นเท่ากับชุดควบคุมที่เสริมเชื้อแบคทีเรียระดับต่างๆ 37

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. ชนิดของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนแบ่งตามการใช้ประโยชน์จากอาหารและลักษณะทางกายภาพ	5
2. การย่อยโปรตีนในทางเดินอาหารโดยเอนไซม์ต่าง ๆ	8
3. ผลการย่อยคาร์โบไฮเดรตโดยเอนไซม์จากแหล่งต่าง ๆ	11
4. องค์ประกอบทางโภชนาการของวัตถุดิบอาหาร และส่วนประกอบของอาหารทดลองแต่ละสูตร	19
5. จำนวนไอโซเลตเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากระบบทางเดินอาหารของโคพื้นเมือง ปลานิลแดงและปลานิลดำ	25
6. ความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อแบคทีเรีย ที่แยกได้จากระบบทางเดินอาหารของโคพื้นเมือง ปลานิลแดง และปลานิลดำ	27
7. ความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อแบคทีเรีย ที่แยกได้จากของระบบทางเดินอาหารโคพื้นเมือง ปลานิลแดง และปลานิลดำในการเลี้ยงด้วยวัตถุดิบ 5 ชนิด	28
8. องค์ประกอบทางเคมี (เปอร์เซ็นต์บนฐานวัตถุแห้ง) ของวัตถุดิบอาหารสัตว์	29
9. กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อแบคทีเรีย ที่แยกได้จากทางเดินอาหารโคพื้นเมือง ปลานิลแดง และปลานิลดำ ในอาหารแต่ละชนิด	30
10. การจำแนกชนิดของแบคทีเรีย *Bacillus* sp.	30
11. องค์ประกอบทางเคมีในอาหารทดลอง	31
12. น้ำหนักเฉลี่ยสุดท้าย เปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะและอัตราการรอดตายของปลากะพงขาว	33
13. น้ำหนักอาหารที่ปลากิน การเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ ประสิทธิภาพการใช้อาหารและประสิทธิภาพการใช้โปรตีนของปลากะพงขาว	36
14. องค์ประกอบทางเคมีในตัวปลาเริ่มต้นและสิ้นสุดการทดลอง	39
15. การใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน การใช้ประโยชน์จากไขมันสุทธิ และประสิทธิภาพการใช้ไขมัน ของปลากะพงขาว	42
16. ดัชนีไขมันในช่องท้อง และดัชนีตับ ในปลากะพงขาว	44
17. กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส เซลลูเลส ทริปซิน และไลเปสในปลากะพงขาว	47
18. ประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรต และโปรตีนในหลอดทดลองของอาหารทดลอง	50
19. องค์ประกอบเลือด ฮีมาโตคริต ฮีโมโกลบิน และซีรัมโปรตีน ในปลากะพงขาว	52
20. ปริมาณแบคทีเรียรวมที่พบในลำไส้ของปลากะพงขาว	54
21. ชนิดและปริมาณแบคทีเรียเด่นที่พบในลำไส้ปลากะพงขาว	55

บทคัดย่อ

การศึกษาประกอบด้วย 2 การทดลอง ได้แก่ การคัดเลือกแบคทีเรียจากโคพื้นเมืองและปลานิลที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลส และการประยุกต์ใช้แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในการผลิตอาหารสำหรับปลากะพงขาวต่ออัตราการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหาร และกิจกรรมเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึม

การทดลองที่ 1 การคัดเลือกแบคทีเรียจากธรรมชาติที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลส โดยแยกเชื้อแบคทีเรียจากตะกอนและของเหลวจากกระเพาะรูเมนของโคพื้นเมือง อายุเฉลี่ย 2.9±0.2 ปี กระเพาะอาหาร ลำไส้ตอนต้น และลำไส้ตอนปลายของปลานิลแดงและปลานิลดำ แล้วคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส รวมถึงทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียในการย่อยสลายวัตถุดิบที่มีคาร์โบไฮเดรตและมีเยื่อใยสูง (รำข้าว กากเนื้อในเมล็ดปาล์ม รำสาลี มันสำปะหลัง และกากถั่วเหลือง) พบว่าสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งหมด 67 ไอโซเลต โดยแยกได้จากกระเพาะรูเมนของโคพื้นเมือง 18 ไอโซเลต และปลานิลแดง 28 ไอโซเลต และปลานิลดำ 21 ไอโซเลต และมีแบคทีเรีย 16 ไอโซเลต ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดี เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียในการย่อยสลายวัตถุดิบที่มีคาร์โบไฮเดรตและมีเยื่อใยสูง แบคทีเรียไอโซเลต B9, 2Aia, A3, B3 และ Pia-4 มีแนวโน้มในการย่อยสลายวัตถุดิบทั้ง 5 ชนิดได้ดี

การทดลองที่ 2 การประยุกต์ใช้แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในการผลิตอาหารสำหรับปลากะพงขาว โดยวางแผนการทดลองแบบแฟคตอเรียลที่มี 2 ปัจจัย (5 x 3) ได้แก่ ชนิดของแหล่งคาร์โบไฮเดรต (แป้งสาลี กากเนื้อในเมล็ดปาล์มบด มันสำปะหลัง รำข้าว และกากเอทานอลข้าวโพด) และระดับของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต A3 (0, 10^4 และ 10^7 CFU/g) ซึ่งใช้แหล่งคาร์โบไฮเดรตที่ระดับ 35 เปอร์เซ็นต์ โดยกำหนดให้อาหารทดลองมีระดับโปรตีนและไขมันเท่ากับ 30 และ 12 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ใช้เลี้ยงปลากะพงขาวน้ำหนักเริ่มต้นเฉลี่ย 1.16-1.18 กรัมต่อตัว ในน้ำจืดเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าไม่มีอิทธิพลร่วมกันระหว่างแหล่งคาร์โบไฮเดรตและระดับของเชื้อแบคทีเรียต่ออัตราการเจริญเติบโต อัตราการรอดตาย อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ ประสิทธิภาพการใช้อาหาร การใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ และประสิทธิภาพการใช้โปรตีน โดยปลาที่ได้รับอาหารที่มีส่วนประกอบของแป้งสาลีมีอัตราการเจริญเติบโตดีที่สุด แต่ไม่มีความแตกต่างจากปลาที่ได้รับอาหารที่มีส่วนประกอบของมันสำปะหลัง และกากเอทานอลข้าวโพด (p>0.05) รองลงมาคือ กากเนื้อในเมล็ดปาล์มบด และรำข้าว ตามลำดับ ปลาที่ได้รับอาหารที่มีส่วนประกอบของแป้งสาลีและกากเอทานอลข้าวโพดมีค่าประสิทธิภาพการใช้อาหาร การใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ และประสิทธิภาพการใช้โปรตีน ดีกว่าปลาที่ได้รับอาหารที่มีส่วนประกอบของกากเนื้อในเมล็ดปาล์มบด มันสำปะหลัง และรำข้าว (p<0.05) โดยเฉพาะกากเนื้อในเมล็ดปาล์มบด มีอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ และประสิทธิภาพการใช้อาหารต่ำที่สุด ผลของกิจกรรมเอนไซม์ย่อยอาอาหาร คือ เอนไซม์อะไมเลส เซลลูเลส ทริปซิน และไลเปส พบว่าไม่มีอิทธิพลร่วมกันระหว่าง

แหล่งคาร์โบไฮเดรตและระดับของเชื้อแบคทีเรีย ยกเว้นกิจกรรมเอนไซม์ทริปซินที่ 2 สัปดาห์และไลเปสที่ 8 สัปดาห์ ดัชนีไขมันในช่องท้องและดัชนีตับ มีระดับสูงสุดในปลาที่ได้รับอาหารที่มีส่วนประกอบของรำข้าว ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับชนิดของแหล่งคาร์โบไฮเดรตอื่น ยกเว้นกากเนื้อในเมล็ดปาล์มบดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ปริมาณแบคทีเรียที่พบในลำไส้ของปลากะพงขาว มีค่าใกล้เคียงกันในทุกแหล่งของคาร์โบไฮเดรต ส่วนระดับของการเสริมเชื้อแบคทีเรีย มีแนวโน้มว่าปลาที่ได้รับอาหารที่ไม่เสริมเชื้อแบคทีเรียมีเปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เพิ่ม อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ดัชนีไขมันในช่องท้องและตับ และฮีโมโกลบิน สูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารที่มีการเสริมเชื้อแบคทีเรียทั้งสองระดับ ยกเว้น อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ ประสิทธิภาพการใช้อาหาร ที่พบว่าปลาที่ได้รับอาหารที่เสริมเชื้อแบคทีเรียทั้งสองระดับมีค่าสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ทั้งนี้เนื่องจากปลาในกลุ่มที่ได้รับอาหารที่เสริมเชื้อแบคทีเรียได้รับอาหารในปริมาณที่น้อยกว่า ซึ่งเกิดจากการให้อาหารที่มีความระมัดระวังในเรื่องการปนเปื้อน จากการศึกษาครั้งนี้ การใช้แป้งสาลีเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตและมีการเสริมเชื้อแบคทีเรีย ทำให้ปลากะพงขาวมีอัตราการเจริญเติบโต อัตราการรอดตาย อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ และประสิทธิภาพการใช้อาหาร รวมถึงประสิทธิภาพการใช้โปรตีนที่ดีกว่า

Abstract

A study consisted of two experiments, 1) isolation of cellulose-degrading bacteria from cattle and tilapia showing good cellulase digestion efficiency and 2) utilization of cellulase-producing bacteria in Asian seabass diet on growth rate, feed utilization and enzyme activity involving in metabolism.

In Experiment 1, the prospective cellulase-producing bacteria were isolated from sediment and liquid samples of the rumen of fistulated native cow (averaged age 2.9 ± 0.2 years) and gastro-intestinal tract of red tilapia and Nile tilapia. The cellulase-degrading bacteria were screened and tested for efficiency in digesting high fiber and carbohydrate in different feedstuff (rice bran, palm kernel meal, wheat bran, tapioca, and soybean meal). The results showed that there were 67 isolates of cellulolytic bacteria, 18 isolates from the rumen of fistulated native cow, 28 isolates from red tilapia and 21 isolates from Nile tilapia. Among them, 16 isolates produced high levels of cellulase. The B9-, 2Aia-, A3-, B3- and Pia4-isolates showed excellent cellulose digestion when subjected to the tested feedstuff.

In Experiment 2, utilization of cellulase-producing bacteria in diet for Asian seabass was carried out. The experiment consisted of two independent variables in a 5×3 factorial design. Five carbohydrate sources (wheat flour, palm kernel meal, tapioca, rice bran and corn-dried distillers grains with soluble (corn-DDGS) were supplemented with the three level of A3-strain (0, 10^4 and 10^7 CFU/g). The experimental diets were formulated to contain 30% of protein, 12% of lipid and 35% of carbohydrate. The feeding trial was conducted in fresh water using the fish of 1.16-1.18 g initial weight for 8 weeks. At the end of the feeding trial, it was found that there is no interaction of carbohydrate sources and bacterial level on growth rate, survival rate, feed conversion ratio, feed efficiency, protein productive value and protein efficiency ratio. The best growth rate were found in fish fed diet containing wheat flour, palm kernel meal and rice bran, respectively. However, there was not significantly different from those fed diets containing tapioca and corn-DDGS (p>0.05). Feed efficiency, productive protein value, and protein efficiency ratio of fish fed diets containing wheat flour and corn-DDGS were better than those of diet containing palm kernel meal, tapioca and rice bran (p < 0.05). Fish fed diet containing palm kernel meal had the worst feed conversion ratio and the lowest feed efficiency. No interaction effect of carbohydrate sources and level of bacteria were found on activity of amylase, cellulose, trypsin and lipase except on activity of trypsin in week 2 and activity of lipase

in week 8-feeding trial. Intraperitoneal fat ratio and hepatosomatic index were high in fish fed diet containing rice bran and significantly different when compared with those fed diet with palm kernel meal ($p<0.05$). Among dietary carbohydrate sources, there was no significant difference in total bacteria in the intestine of Asian seabass. Although supplementation of bacteria in diets resulted in decreased weight gain, specific growth rate, intraperitoneal fat ratio, hepatosomatic index and haematocrit compared with non-supplemented diet, feed conversion ratio and feed efficiency of fish fed bacterial supplemented diet were better than those of fish fed non-supplemented diet ($p<0.05$). Moreover, the fish in the bacterial supplemented diet fed group received lower amount of feed due to a careful feeding. If the fish was fed at a similar amount, a better performance could have been achieved according to the in vitro digestion test and specific growth rate. Considering growth performance and feed utilization, wheat flour with bacterial supplementation is a suitable carbohydrate source in the diet for Asian seabass.

บทนำ

ในปัจจุบันบทบาทและหน้าที่ของคาร์โบไฮเดรตต่อการผลิตอาหารปลา นับว่ามีความสำคัญอย่างมาก ทั้งนี้เพราะคาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งพลังงานที่ราคาถูกที่สุด และมีอยู่ทั่วไปในธรรมชาติ ทำให้มีการศึกษาถึงการนำคาร์โบไฮเดรตมาใช้เป็นแหล่งพลังงานเพื่อให้สัตว์น้ำนำโปรตีนไปใช้เพื่อการสร้างโปรตีนอย่างมีประสิทธิภาพ (Protein sparing action) ส่งผลให้ลดต้นทุนในการผลิตอาหารลง โดยชนิดของคาร์โบไฮเดรตมีผลต่อการนำไปใช้ประโยชน์ได้ของปลาทั้งนี้ขึ้นอยู่กับโครงสร้างของคาร์โบไฮเดรตและความสามารถในการย่อยและการนำไปใช้ประโยชน์ได้ของปลาแต่ละชนิด คาร์โบไฮเดรตเป็นผลผลิตจากการสังเคราะห์แสงของพืช โดยพบอยู่ในรูปของโมเลกุลขนาดใหญ่ (Macromolecule) เช่น แป้ง ไกลโคเจน และเซลลูโลส ปลาแต่ละชนิดสามารถย่อยคาร์โบไฮเดรตได้แตกต่างกันโดยคาร์โบไฮเดรตชนิดที่ปลาสามารถย่อยได้และมีการศึกษากันกว้างขวางคือ แป้ง เพราะปลามีเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ใช้ในการย่อยพันธะ α-1,4 ไกลโคซิดิกได้เป็นสารประกอบกลูโคสและมอลโตส แต่เซลลูโลสเป็นคาร์โบไฮเดรตอีกชนิดหนึ่งที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะที่มีความแข็งแรงมากคือพันธะ β-(1-4) ไกลโคซิดิก และเป็นวัตถุดิบที่สัตว์น้ำไม่สามารถย่อยได้ เนื่องจากไม่มีเอนไซม์เซลลูเลส ถึงแม้ว่าในกลุ่มปลากินพืชบางชนิดตรวจพบเอนไซม์เซลลูเลสแต่เป็นเอนไซม์ที่เกิดจากแบคทีเรียในลำไส้ของปลา ขณะที่สัตว์ในกลุ่มสัตว์เคี้ยวเอื้อง เช่น วัว และควาย จะมีแบคทีเรียในกระเพาะอาหารที่สามารถผลิตเอนไซม์ชนิดนี้อยู่ในปริมาณมาก ซึ่งหากมีการคัดแยกแบคทีเรียกลุ่มนี้มาช่วยในการย่อยเซลลูโลสในอาหารสัตว์น้ำจะทำให้เกิดการใช้ประโยชน์จากเซลลูโลสได้สูงสุด ทั้งนี้เพราะหากสัตว์น้ำสามารถย่อยเซลลูโลสได้ก็จะได้กลูโคสออกมาในปริมาณสูงเพราะในโมเลกุลของเซลลูโลสประกอบด้วยกลูโคสมากกว่า 15,000 โมเลกุล เพื่อให้นำมาใช้เป็นแหล่งของพลังงานเพื่อใช้ในการเจริญเติบโตของสัตว์น้ำต่อไป นอกจากนั้นยังเป็นการเพิ่มการใช้ประโยชน์ได้จากคาร์โบไฮเดรตที่ย่อยได้ โปรตีน และไขมัน เพราะพบว่าอาหารที่มีสารประกอบพวกสารประกอบโพลีแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้งซึ่งรวมถึงเซลลูโลสในอาหารมากเกินไปจะมีผลต่อการใช้ประโยชน์ได้จากคาร์โบไฮเดรตที่ย่อยได้ โปรตีน และไขมัน (Schwarz and Kirchgessner, 1995)

อย่างไรก็ตามแนวทางในการเพิ่มปริมาณคาร์โบไฮเดรตในสูตรอาหารเพื่อลดต้นทุนการผลิตอาหาร สามารถใช้ได้ดีกับปลากินพืช (Herbivorous) และปลากินพืชและสัตว์ (Carnivorous) เท่านั้น เนื่องจากมีเอนไซม์ย่อยคาร์โบไฮเดรตในปริมาณมาก ทำให้สามารถผสมคาร์โบไฮเดรตในสูตรอาหารได้มาก แต่ในปลากินเนื้อมีเอนไซม์ย่อยคาร์โบไฮเดรตในปริมาณจำกัด ซึ่งหากมีการหมักวัตถุดิบพืชที่เป็นแหล่งของคาร์โบไฮเดรตด้วยแบคทีเรียที่สามารถย่อยคาร์โบไฮเดรตชนิดเซลลูโลสได้ แล้วจึงผสมลงในอาหารปลากินเนื้อจึงเป็นแนวทางการเพิ่มการใช้ประโยชน์จากเซลลูโลสได้มากขึ้นรวมถึงเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยและการใช้คาร์โบไฮเดรต

วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียจากธรรมชาติที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลส

2. เพื่อประยุกต์ใช้แบคทีเรียในการย่อยสลายเซลลูโลสจากวัตถุดิบซึ่งมีคาร์โบไฮเดรตและเยื่อใยสูง

3. เพื่อให้สามารถใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งพลังงานได้อย่างมีประสิทธิภาพและลดการใช้พลังงานจากแหล่งโปรตีน

1. การตรวจเอกสาร

1.1 ชนิดและประเภทของจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมนของสัตว์เคี้ยวเอื้อง

สัตว์เคี้ยวเอื้อง (Ruminant) หรือสัตว์กระเพาะรวม มีวิวัฒนาการและพัฒนาการที่มีความเฉพาะตัว โดยเฉพาะความสามารถใช้ประโยชน์จากอาหารหยาบที่มีเยื่อใยสูง และไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีน (Non protein nitrogen, NPN) โดยอาศัยการทำงานร่วมกันของจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในกระเพาะรูเมน เทอดชัย (2548) รายงานว่า ภายในกระเพาะรูเมนของสัตว์เคี้ยวเอื้องมีจุลินทรีย์มากมายหลายชนิด ในแต่ละชนิดก็มีลักษณะเฉพาะตัวแตกต่างกันออกไป ที่ช่วยในการหมักย่อยอาหาร โดยจำนวนประชากรและชนิดของจุลินทรีย์จะมีการเปลี่ยนแปลง ขึ้นอยู่กับชนิดของอาหารที่สัตว์เคี้ยวเอื้องได้รับ (บุญล้อม, 2541) และสภาพแวดล้อม ที่เหมาะสมที่สุดต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ คือ ค่าความเป็นกรดด่าง 5.5-7.0 และอุณหภูมิ 39-40 องศาเซลเซียส โดยจุลินทรีย์ส่วนใหญ่เป็นพวกที่ไม่ต้องการออกซิเจน (Obligate anaerobes) แต่อาจมีพวกที่สามารถใช้ออกซิเจนได้ (Facultative anaerobes) อย่างไรก็ตาม การมีระดับออกซิเจนสูงเกินไปอาจเป็นพิษต่อจุลินทรีย์ได้เช่นกัน (เมธา, 2533) จุลินทรีย์เข้ามาอยู่ภายในตัวสัตว์ตั้งแต่อายุประมาณ 6 สัปดาห์ โดยติดมากับน้ำอาหาร หรือสัมผัสกับสัตว์ใหญ่ ซึ่งจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมน มี 3 ประเภทหลักๆ คือ แบคทีเรีย โปรโตซัว และเชื้อรา

1. แบคทีเรีย มีประมาณ 10^{9}-10^{11} เซลล์ต่อมิลลิลิตรของของเหลวจากกระเพาะรูเมน มีขนาด 0.3-50 ไมครอน แบคทีเรียจะเกิดขึ้นทันทีหลังจากสัตว์เกิดได้ประมาณ 38 ชั่วโมง จากการเลียของแม่ผ่านทางน้ำลาย (Church, 1993) โดยอยู่ในส่วนของของเหลวในกระเพาะรูเมน หลังจากนั้นจะเข้าเกาะยึดอยู่ตามผนังกระเพาะรูเมน แบคทีเรียกลุ่มแรกที่พบในสัตว์แรกเกิดคือ แบคทีเรียที่ย่อยเซลลูโลส (Cellulolytic bacteria) แบคทีเรียนับว่ามีบทบาทและความสำคัญมากเมื่อเทียบกับโปรโตซัวและเชื้อราในการทำหน้าที่ย่อยสลายสารอาหาร และมีจำนวนมากกว่า 200 ชนิด (Species) ชนิดที่สำคัญหลักๆ มีประมาณ 30 ชนิด โดยการแบ่งประเภทของแบคทีเรียจะแบ่งตามการทำงานของแบคทีเรีย คือ พวกที่ใช้เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส แป้ง น้ำตาล โปรตีน ไขมัน รวมทั้งพวกที่สร้างมีเทน และสร้างแอมโมเนีย ซึ่งมีแบคทีเรียบางชนิดอาจทำหน้าที่ได้หลายอย่าง เช่น *Butyrivibrio fibrisolvens* สามารถย่อยสลายเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส เพคติน ไขมัน และโปรตีนได้ (ตารางที่ 1)

2. โปรโตซัว มีขนาดใหญ่กว่าแบคทีเรีย มีจำนวนประมาณ 10^{6} เซลล์ต่อมิลลิลิตรของของเหลวจากกระเพาะรูเมน สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ Holotriches ซึ่งมีขนาดใหญ่ มีขน (Cilia) ปกคลุมอยู่เต็มรอบเซลล์ รูปร่างคล้ายรูปไข่ เคลื่อนไหวได้เร็ว และใช้น้ำตาลเป็นแหล่งพลังงาน และ Entodinomorphs ซึ่งมีขนาดและรูปร่างแตกต่างกัน แต่มีขนหรือพู่เฉพาะส่วนหน้าของลำตัว เพื่อใช้ในการกินอาหารและเคลื่อนไหว กลุ่มนี้ชอบกินอาหารที่เป็นแป้งมากกว่าน้ำตาล บางชนิดสามารถย่อยเยื่อใยได้เช่นเดียวกับแบคทีเรียและเชื้อรา แต่

กระบวนการย่อยสลายอาจไม่สมบูรณ์ (Russell, 2002) ชนิดและปริมาณโปรโตซัวมักแปรผันไปตามอาหารที่สัตว์เคี้ยวเอื้องกิน โดยหากให้อาหารข้นสูงจะมีโปรโตซัวมาก โดยทั่วไปโปรโตซัวมักจะอยู่ร่วมกับแบคทีเรีย นอกจากนี้โปรโตซัวยังกินแบคทีเรีย แป้ง โปรตีน และคลอโรพลาสเป็นอาหารด้วย ซึ่งการกินดังกล่าวมีทั้งข้อดีและข้อเสีย เพราะมีรายงานว่า โปรโตซัวสามารถเก็บคาร์โบไฮเดรตไว้ในรูปของอะไมโลเพคติน (Amylopectin) เพื่อเป็นแหล่งพลังงานในยามขาดแคลนได้ หากสัตว์ได้รับอาหารข้นสูง การเก็บแป้งและน้ำตาลไว้ในตัวโปรโตซัวสามารถลดความรุนแรงของการเกิดสภาวะกรด (Acidosis) ในกระเพาะรูเมนได้ อย่างไรก็ตาม มีรายงานว่า การกำจัดโปรโตซัว (Defaunation) จะทำให้ประชากรแบคทีเรียเพิ่มขึ้นและการย่อยเยื่อใยได้สูงขึ้น

3. เชื้อรา ที่พบในกระเพาะรูเมนเป็นชนิดที่ไม่ใช้ออกซิเจน มีประมาณ 8 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด ชื้อราสามารถสร้างเอนไซม์ในการย่อยสลายเยื่อใย ทำให้การใช้ประโยชน์จากเยื่อใยดีขึ้น โดยชนิดที่พบ ได้แก่ *Neocallimastix* sp., *Piromyces* sp., *Ceacomyces* sp., *Oprinomyces* sp. และ *Anaeromyces* sp. (Russell, 2002) เชื้อราเหล่านี้มียีนส์ที่สามารถสังเคราะห์เอนไซม์ที่สามาถย่อยสลายเยื่อใย ได้แก่ Ando-glucanase (CMCase) ย่อยเซลลูโลส และ Axo-glucanase (Cellobiohydrolase) ย่อยเซลลูโลสในส่วนของ Crystalline เอนไซม์ Xylanase (Hemicellulase) ที่สามารถย่อยเซลล์พืชในส่วนของเฮมิเซลลูโลส นอกจากนั้น เชื้อรายังมีไรซอยด์ (Rhizoid) ซึ่งมีลักษณะคล้ายรากไม้ โดยไรซอยด์จะแทงทะลุเข้าไปในผนังเซลล์ของพืช ทำให้เยื่อใยแตกออก แบคทีเรียสามารถเข้าไปย่อยเยื่อใยได้ดีขึ้น

ตารางที่ 1 ชนิดของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนแบ่งตามการใช้ประโยชน์จากอาหาร และลักษณะทางกายภาพ

Function	Organism	Gram strain	Shape
Cellulolytic Species	*Fibrobacter succinogenes*	G-	Rods
	Ruminococcus sp.	G+, variable	Cocci
Hemicellulolytic Species	*Butyrivibrio fibrisolvens*	G-	Curved rod
	Bacteroides ruminicola	G-	Rods
Amylolytic Species	*Bacteroides amylophilus*	G-	Rods
	Succinimonas amylolytica	G-	Curved rods
	Streptococcus bovis	G+	Coccus ovas
Pectinolytic Species	*Lachnospira multiparus*	G-	Curved rods
Sugar Utilizing Species	*Lactobacillus* sp.	G+	Rods
	Megaspaera elsdenii	G-	Very large coccus
Proteolytic Species	*Prevotella ruminicola*	G-	Rods
	Bacteroides amylophilus	G-	Rods
Lipid Utilizing Species	*Anaerovibrio lipolytica*	G-	Curved rods
Methane Producing Species	*Methanabrevibacter ruminantium*	G+	Coccus
Acid Utilizing Species	*Megaspaera elsdenii*	G-	Very large coccus
	Selenomas ruminantium	G-	Crescentic
Ammonia Producing Species	*Bacteroides ruminicola*	G-	Rods
	Megaspaera elsdenii	G-	Very large coccus

ที่มา: Van Soest (1984)

1.2 เอนไซม์และกระบวนการย่อยอาหารของปลา (Digestive enzyme)

การย่อยอาหารเป็นกระบวนการที่อาหารในท่อทางเดินอาหารถูกย่อยให้มีขนาดเล็กลง เพื่อดูดซึมเข้าผนังทางเดินอาหารเข้าไปในเลือด โดยโปรตีนจะถูกย่อยเป็นกรดอะมิโน ส่วนไขมันจะถูกย่อยเป็นกรดไขมันและกลีเซอรีน และคาร์โบไฮเดรตถูกย่อยเป็นน้ำตาล กระบวนการเหล่านี้จำเป็นต้องมีเอนไซม์ย่อยอาหารหรือน้ำย่อยมาทำหน้าที่ย่อยอาหารให้มีขนาดเล็กลงเพื่อนำไปเผาผลาญให้ได้พลังงานต่อไป การย่อยอาหารของปลาจะเกิดขึ้นที่กระเพาะอาหารและลำไส้โดยได้รับเอนไซม์ที่หลั่งจากกระเพาะ, ตับอ่อน และเซลล์บริเวณลำไส้ (Zambonino Infante and Cahu, 2001 อ้างโดยชุติมา, 2547) ซึ่ง กระเพาะอาหารสร้างและหลั่งเอนไซม์เปปซิน ในสภาพที่เป็นกรด ตับอ่อน สร้างและหลั่งเอนไซม์หลายชนิดในช่องทางเดินอาหารของลำไส้เช่น ไลเปส, ทริปซิน, ไคโมทริปซิน และอะไมเลส โดยทำงานในสภาพที่เป็นด่าง (Alkaline pH) และเซลล์บริเวณลำไส้สร้างและหลั่งเอนไซม์ 2 กลุ่ม ได้แก่ 1) Cytosolic enzyme พบในไซโตพลาสซึมของเซลล์ (Cell cytoplasm) เช่น เอนไซม์

ลิวซีน-อะลานีนเปปไทเดส (Leucine – alanine peptidase) 2) Brush border membrane enzymes สร้างโดยบริเวณเซลล์บุผิวของลำไส้ ได้แก่เปปไทเดส (Peptidase), ไดแซคคาริเดส (Disaccharidases) และเอสเตอร์เรส (Esterases)

เอนไซม์เหล่านี้ช่วยให้การย่อยสารอาหารเสร็จสมบูรณ์ ได้สารอาหารที่ร่างกายสามารถดูดซึมไปใช้ได้ ซึ่งการทำงานของเอนไซม์ จะมีประสิทธิภาพแตกต่างกันไปในปลาแต่ละชนิด

1.2.1 การย่อยโปรตีน

อาหารที่สัตว์น้ำกินจะผ่านปากและหลอดอาหารลงสู่กระเพาะอาหาร การย่อยโปรตีนจะเริ่มที่กระเพาะอาหาร โปรตีนบางส่วนจะถูกย่อยต่อที่ลำไส้ กระบวนการย่อยโปรตีนต้องอาศัยเอนไซม์และเป็นกระบวนการที่ค่อนข้างสลับซับซ้อน โดยเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีนถูกสร้างและหลั่งออกมาในรูปไซโมเจน โดยสามารถสรุปการย่อยในแต่ละส่วนของทางเดินอาหารได้ดังตารางที่ 2

1.2.1.1 การย่อยในกระเพาะอาหาร

เมื่ออาหารเข้าปากจะถูกบดให้ขนาดเล็กลงแล้วผ่านลงสู่กระเพาะอาหาร กระเพาะอาหารจะหลั่งกรดเกลือ (HCl) ไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์เปปซิโนเจน (Pepsinogen) ที่หลั่งจากเซลล์ที่ผลิตจากกระเพาะอาหารซึ่งอยู่ในสภาพที่ไม่สามารถย่อยโปรตีนได้ เรียกว่า Zymogen หรือ Pro-enzyme ให้เปลี่ยนเป็นเอนไซม์เปปซิน (Pepsin) ที่สามารถย่อยโปรตีนได้ ขณะเดียวกันกระเพาะอาหารจะหลั่งเมือก (Mucin) ออกมาคลุกเคล้าอาหารและคลุมผิวหน้าเซลล์ชั้นในของกระเพาะอาหาร ซึ่งทำหน้าที่ผลิตกรดเกลือและเปปซิโนเจนเพื่อป้องกันการถูกกรดเกลือย่อยตัวเอง

เปปซินเป็นเอนไซม์ชนิดหลักในการย่อยโปรตีนให้มีขนาดเล็กลง ในสภาพเป็นกรด โดยในปลาแต่ละชนิดจะมีระดับ pH ที่แตกต่างกันเช่น ปลา pike และ ปลา plaice มีระดับ pH ที่เหมาะสมคือ pH = 2 ปลากดอเมริกัน (*Lctalurus* sp.) มีระดับ pH = 3-4 และปลาแซลมอน มีระดับ pH 1.3 -3.5 (Kapoor *et al.*, 1975) โดยแยกพันธะเปปไทด์ระหว่างกรดอะมิโนออกจากกัน แต่อาจยังคงเป็นสายของกรดอะมิโนหลายขนาด ยาวบ้าง สั้นบ้าง เรียกว่า โปรตีโอส (Proteose) แล้วโปรตีโอสจะถูกส่งต่อไปยังลำไส้

1.2.1.2 การย่อยในลำไส้

การย่อยในลำไส้ได้รับเอนไซม์ที่ผลิตจาก 2 แหล่ง คือ จากตับอ่อน และการหลั่งจากผนังลำไส้ โดยโปรตีนจะถูกย่อยโดยเอนไซม์ในกลุ่ม Peptidase ซึ่งแบ่งเป็นสองประเภท คือ 1). Endopeptidase ซึ่งสลายพันธะเปปไทด์ที่อยู่ด้านในของสายโพลีเปปไทด์หรือ

โปรตีน ได้แก่ ทริปซิน ไคโมทริปซิน และอิลาสเตส และ 2). Exopeptidase ซึ่งสลายพันธะเปปไทด์จากปลายของเส้นเปปไทด์ ชนิดที่สลายจากปลายคาร์บอกซี (-COOH) เรียกว่า Carboxypeptidase และชนิดที่สลายจากปลายอะมิโน ($-NH_2$) เรียกว่า Aminopeptidase โดยในลำไส้มีเอนไซม์ซึ่งหลั่งจากตับอ่อน เรียกว่า ทริปซิโนเจน (Trypsinogen) และไคโมทริปซิโนเจน (Chymotrpysinogen) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่อยู่ในสภาพที่ยังไม่สามารถย่อยโปรตีนได้ ทริปซิโนเจนจะถูกกระตุ้นโดยเอนไซม์เอนเตอโรไคเนส (Enterokinase) ที่หลั่งจากผนังลำไส้ (Intestinal juice) เปลี่ยนเป็นทริปซิน ที่สามารถย่อยโปรตีนได้ (Rust, 2002) ส่วนไคโมทริปซิโนเจนจะเปลี่ยนเป็นไคโมทริปซินที่สามารถย่อยโปรตีนได้โดยการกระตุ้นโดยเอนไซม์ทริปซิน (เชาวน์ และพรรณี, 2540)

ทริปซินและไคโมทริปซินย่อยโปรติโอส ซึ่งถูกส่งมาจากกระเพาะให้เป็นโมเลกุลที่มีสายเปปไทด์สั้นลง เรียกว่าเปปโตน (Peptone) และโพลีเปปไทด์ (Polypeptide) ตามลำดับโดยเอนไซม์เหล่านี้จะมีความจำเพาะกับแขนงข้างของกรดอะมิโนแตกต่างกันออกไป (ตารางที่ 2) จากนั้นเอนไซม์หลายชนิดในกลุ่มอะมิโนเปปติเดส (Aminopeptidase) จากผนังลำไส้จะย่อยเปป โตนให้เป็นโพลีเปปไทด์ที่มีขนาดเล็กลงและโพลีเปปไทด์ถูกย่อยต่อเป็นไตรเปปไทด์และไดเปปไทด์ จนในที่สุดเหลือกรดอะมิโนแต่ละโมเลกุลซึ่งมีขนาดเล็กที่สุดของสารอาหารโปรตีน สำหรับปลาที่ไม่มีกระเพาะอาหาร (Stomach less fish) จะไม่มีการหลั่งกรดเกลือ และกระบวนการย่อยโปรตีนจะเกิดขึ้นเฉพาะในลำไส้เท่านั้น

นอกจากนั้นสารละลายจากตับอ่อน (Pancreatic juice) ยังช่วยในการปรับสภาพความเป็นกรดของอาหารที่ผ่านการย่อยมาจากกระเพาะให้เป็นสภาพเป็นกลางเพื่อให้สารอาหารสามารถย่อยต่อในลำไส้ได้ (De Silva and Anderson, 1995) เพราะเอนไซม์จากตับอ่อนเป็นสายละลายไอโซโทนิค pH 7.4-8.3 มี HCO_3^- สูงกว่าในพลาสมาถึง 3 เท่า ซึ่งจะช่วยในการทำลาย H^+ ที่ติดมากับอาหารได้ (มนตรี และคณะ, 2542)

1.2.2 การย่อยไขมัน

ไขมันในอาหารสัตว์ส่วนใหญ่อยู่ในรูปของไขมันธรรมชาติ โดยมีฟอสโฟลิปิด โคเลสเตอรอล และวิตามินที่ละลายในไขมันเป็นส่วนประกอบ ไขมันเหล่านี้จำเป็นต้องถูกย่อยให้มีขนาดเล็กลงก่อนที่ร่างกายจะดูดซึมไปใช้ได้

การย่อยไขมันในสัตว์น้ำเกิดขึ้นในลำไส้เป็นส่วนใหญ่ โดยไขมันจะผสมคลุกเคล้าเข้ากับน้ำดีจากตับ ทำให้ไขมันละลายโดยแตกตัวออกเป็นโมเลกุลเล็ก ๆ เกิดเป็นสารละลายอิมิลชัน ช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวของไขมันให้สัมผัสกับเอนไซม์ได้มากขึ้น จากนั้นเอนไซม์จากตับอ่อนชื่อแพนครีเอติกไลเปส (Pancreatic lipase) และเอนไซม์จากผนังลำไส้ชื่ออินเทสตินัลไลเปส (Intestinal lipase) จะทำการย่อยต่อเป็นโมโนกลีเซอไรด์ (Monoglyceride) กลีเซอรอล (Glycerol) และกรดไขมันอิสระ (Fatty acid) ให้มีขนาดของโมเลกุลเล็กพอที่ร่างกายจะดูดซึมไปใช้ได้

ตารางที่ 2 การย่อยโปรตีนในทางเดินอาหารโดยเอนไซม์ต่าง ๆ

อวัยวะและเอนไซม์	การทำงาน
กระเพาะอาหาร:	
เปปซิโนเจน	ถูกกรดเกลือกระตุ้นเป็นเปปซิน
เปปซิน	แยกหรือย่อยสลายสายกรดอะมิโนหรือพันธะเปปไทด์โดยเฉพาะตรงส่วนที่เป็นกรดอะมิโนฟีนิลอะลานีนหรือไทโรซีนโมเลกุลของ โปรตีนมีขนาดเล็กเรียกว่าโปรติโอส
ลำไส้:	
ทริปซิโนเจน	ถูกกระตุ้นโดยเอนเตอโรไคเนสกระตุ้นเป็นทริปซิน
ทริปซิน	แยกหรือย่อยสายกรดอะมิโนให้สั้นลง โดยเฉพาะตรงส่วนที่มีกรดอะมิโนไลซีน และอาร์จินีน
ไคโมทริปซิโนเจน	ถูกทริปซินกระตุ้นเป็นไคโมทริปซิน
ไคโมทริปซิน	ย่อยสายกรดอะมิโนให้สั้นลงอีก โดยเฉพาะตรงส่วนที่มีกรดอะมิโนทริปโตเฟน เมไธโอนีน ไทโรซีน หรือฟีนิลอะลานีน โมเลกุลของโปรตีนมีขนาดเล็กลงเรียกว่าเปปโตน
ผนังลำไส้:	
อะมิโนเปปติเดส	ย่อยโพลีเปปไทด์เป็นไตรเปปไทด์ ไดเปปไทด์ และกรดอะมิโนซึ่งเป็นโมเลกุลเล็กสุดของโปรตีน

ที่มา: เวียง, 2542

1.2.3 การย่อยคาร์โบไฮเดรต

คาร์โบไฮเดรตในอาหารสัตว์น้ำอาจแบ่งเป็นกลุ่มใหญ่ ๆ ได้ 3 กลุ่มคือ น้ำตาล แป้ง และกากอาหาร แป้งจะต้องถูกย่อยให้มีขนาดเล็กลงก่อนที่จะถูกดูดซึมได้ น้ำตาลซึ่งเป็นคาร์โบไฮเดรตที่มีขนาดของโมเลกุลเล็กอยู่แล้วและมักพบในอาหารสัตว์น้ำในปริมาณไม่มากนัก ร่างกายสัตว์น้ำจะดูดซึมไปใช้ได้โดยไม่ถูกย่อยอีก ส่วนกากอาหารเอนไซม์ของสัตว์เอนไซม์ไม่ได้ แต่ก็มีส่วนช่วยให้อาหารถูกย่อยได้มากขึ้นหากมีในอาหารไม่มากจนเกินไป

การย่อยคาร์โบไฮเดรตในสัตว์น้ำเกิดขึ้นในลำไส้เมื่ออาหารเหลว (Chyme) ซึ่งเกิดจากการคลุกเคล้าระหว่างอาหารกับเมือกและเอนไซม์ในกระเพาะถูกส่งผ่านเข้าลำไส้ตอนต้น อาหารเหลวนี้กระตุ้นให้ต่อมในผนังเยื่อเมือกของลำไส้ผลิตฮอร์โมนหลายชนิดเพื่อกระตุ้นต่อให้ต่อมในตับอ่อนและลำไส้ผลิตเอนไซม์ (ตารางที่ 3) เอนไซม์จากตับอ่อนที่มีหน้าที่ย่อยคาร์โบไฮเดรตในลำไส้คือเอนไซม์เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (α-amylase) เป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการย่อยคาร์โบไฮเดรตจำพวกแป้งและไกลโคเจนได้เป็นโมโนแซคคาไรด์ มอลโตไตรโอส และมอลโตส โดยจะย่อยแป้งที่ตำแหน่ง α-1,4 glucosidic สำหรับการย่อยไดแซคคาไรด์เป็นโมโนแซคคาไรด์เกิดขึ้นที่บริเวณผิวของเยื่อเมือกลำไส้ซึ่งเป็นบริเวณที่มีเอนไซม์พวกได

แซคคาริเดส (Disaccaridase) คือ ซูเครส (Sucrase) แลกเตส (Lactase) มอลเตส (Maltase) และไอโซมอลเตส (Isomaltase) เอนไซม์เหล่านี้ทำหน้าที่ย่อยไดแซคคาไรด์เป็นโมโนแซคคาไรด์ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นกลูโคส ฟรุกโตส และกาแลกโตส (เวียง, 2542) นอกจากนี้ก็ยังมีเอนไซม์เซลลูเลส (Cellulase) ซึ่งก็มีหน้าที่ย่อยเซลลูโลส ซึ่งโดยทั่วไปแล้วปลาส่วนมากไม่สามารถหลั่งเซลลูเลส ออกมาได้ด้วยตัวเองเช่นปลาเฉา ปลานิล ปลาหมอเทศ ปลาไน ปลานวลจันทร์ เป็นต้น แต่ปลาเหล่านี้ซึ่งกินพืชที่มีส่วนประกอบของเซลลูโลสสามารถย่อยเซลลูโลสได้ เนื่องจากจุลินทรีย์ในลำไส้ของปลาจะหลั่งเซลลูเลสออกมา จุลินทรีย์ดังกล่าวมักจะเป็นพวกที่เจริญได้ดีในที่มีออกซิเจน (Aerobic bacteria) หรือ พวกที่เจริญได้ในที่มีและไม่มีออกซิเจน (Facultative anaerobes) ซึ่งเป็นชนิดเดียวกับที่พบในแหล่งน้ำทั่วไป เช่น *Vibrio* และ *Aeromonas* เป็นต้น (วีรพงศ์, 2536)

1.3 ความสามารถในการใช้ประโยชน์ได้จากคาร์โบไฮเดรตในปลา

คาร์โบไฮเดรตถือเป็นแหล่งของพลังงานที่มีราคาถูก แต่ความสามารถในการใช้ประโยชน์จากคาร์โบไฮเดรตของปลาแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันทั้งนี้ขึ้นอยู่กับ นิสัยการกินอาหารของปลา แหล่งของคาร์โบไฮเดรต ชนิดของคาร์โบไฮเดรตที่เลือกใช้ โครงสร้างที่มีความซับซ้อนของคาร์โบไฮเดรต และระดับของคาร์โบไฮเดรตในอาหาร (NRC, 1993; Wilson, 1994; Shiau and Peng, 1997; Hemre *et al.*, 2005 อ้างโดย Deng *et al.*, 2005; Tan *et al.*, 2006) โดยพบว่าปลาที่กินทั้งพืชและเนื้อ มีความสามารถในการใช้คาร์โบไฮเดรตที่มีความซับซ้อนได้ดี (Tan *et al.*, 2006) และสามารถใช้คาร์โบไฮเดรตในอาหารได้ในระดับที่สูง เพราะปลามีความสามารถในการควบคุมการใช้กลูโคสได้ดี (Shikata *et al.*, 1994 อ้างโดย Tan *et al.*, 2006)

ประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรตของปลาขึ้นอยู่กับชนิดของปลา ชนิดของแป้ง ปริมาณแป้ง และความสุกดิบของแป้ง โดยปลากินพืชมีประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรตได้ดีกว่าปลากินพืชและเนื้อ และปลากินเนื้อ เนื่องจากปลากินพืชมีเอนไซม์ย่อยคาร์โบไฮเดรตในปริมาณที่มากกว่าปลากินเนื้อ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาโดย Hidalgo และคณะ (1999) ที่ศึกษาความสามารถของปลาที่มีพฤติกรรมการกินอาหารแตกต่างกัน ในการย่อยสารอาหารแต่ละชนิดในปลา 6 ชนิด คือ ปลา Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Gilthead seabream (*Sparus auratus*) ปลาไหลยุโรป (European eel) ปลาไน (Common carp, *Cyprinus carpio*) ปลาทอง (*Carassius auratus*) และปลาในกลุ่มเดียวกับปลาคาร์ฟ (Tench, *Tinca tinca*) ก็พบว่าปลากลุ่มที่กินทั้งพืชและสัตว์มีกิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสสูงกว่าปลากินเนื้ออย่างเห็นได้ชัด และในกลุ่มปลากินเนื้อด้วยกันปลาซีบรีมและไหลยุโรปมีความประสิทธิภาพในการย่อยคาร์โบไฮเดรตได้สูงกว่าปลา Trout และพบว่าปลา Trout มีกิจกรรมเอนไซม์ย่อยโปรตีนต่ำสุด และพบว่าปลาย่อยน้ำตาลได้ดีกว่าแป้ง และย่อยแป้งได้ดีกว่าเซลลูโลส แต่เมื่อพิจารณาถึงการดูดซึมสารอาหารไปใช้ประโยชน์กลับพบว่าปลาใช้ประโยชน์

จากแป้งได้มากที่สุด สาเหตุดังกล่าวเกิดจากแป้งเมื่อถูกย่อยเป็นน้ำตาล จะถูกดูดซึมไปใช้ประโยชน์ได้อย่างช้า ๆ เมื่อเปรียบเทียบกับการย่อยน้ำตาลซึ่งจะย่อยเร็วและดูดซึมเร็วกว่าทำให้น้ำตาลบางส่วนถูกขับออกทางปัสสาวะ โดยยังไม่ได้ใช้ประโยชน์ และปริมาณแป้งที่เหมาะสมในอาหารปลาแต่ละชนิดก็แตกต่างกันเนื่องจากปลากินพืชใช้แป้งได้ดีกว่าปลากินเนื้อ และปริมาณแป้งที่เหมาะสมในอาหารปลากินพืช ปลากินพืชและเนื้อ และปลากินเนื้อควรอยู่ในช่วงระหว่าง 40-50, 30-40 และ 10-20 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และการทำแป้งให้สุก เช่น การนึ่งจะช่วยให้ปลาใช้ประโยชน์จากแป้งได้ดีขึ้น (กลุ่มวิจัยอาหารสัตว์น้ำ, 2534)

การใช้ประโยชน์จากคาร์โบไฮเดรตของปลากินเนื้อก็ขึ้นอยู่กับชนิดของคาร์โบไฮเดรต โครงสร้างที่ซับซ้อนของคาร์โบไฮเดรต และระดับของคาร์โบไฮเดรตในอาหาร โดยปลากินเนื้อมีความสามารถในการใช้ประโยชน์จากคาร์โบไฮเดรตที่มีโครงสร้างซับซ้อน เช่น โพลีแซคคาไรด์ จำพวกแป้ง และเซลลูโลส ได้ไม่ดีเท่ากับพวกไดแซคคาไรด์ เช่น มอลโตส และซูโครส (Rawles and Gatlin, 1998; Tan *et al.*, 2006) และโพลีแซคคาไรด์ที่ผ่านกระบวนการให้ความร้อน เช่น เด็กซ์ตริน โดยเด็กซ์ตรินเป็นผลผลิตขั้นแรกที่เกิดจากการสลายตัวของแป้งโดยความร้อน (Dry heat) และละลายน้ำได้ ทำให้โครงสร้างของแป้งมีความซับซ้อนน้อยลง (ชุติมา, 2549) ทำให้ปลากินเนื้อสามารถใช้ประโยชน์เพื่อการเจริญเติบโตได้ดี (Rawles and Gatlin, 1998; Lee *et al.*, 2003; Lee and Lee, 2004; Tan *et al.*, 2006) ในปลา Chinese catfish longsnout (*Leiocassis longirostris* Gümther) สามารถใช้ได้ดีที่ระดับ 6 เปอร์เซ็นต์ (Tan *et al.*, 2006) ปลาไสตร์ปแบส (*Morone saxatilis*) สามารถใช้ได้ที่ระดับ 25 เปอร์เซ็นต์ ทำให้มีน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นสูงกว่าที่กินมอลโตส และกลูโคสในระดับเดียวกัน (Rawles and Gatlin, 1998) ปลา Flounder (*Paralichthys olivaceus*) สามารถใช้ได้ที่ระดับ 15-25 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ปลา Flounder มีน้ำหนักเพิ่มขึ้นที่ดี ประสิทธิภาพการใช้อาหาร ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน ประสิทธิภาพการสะสมโปรตีน และการสะสมพลังงาน มีค่าสูง เมื่อเทียบกับปลาที่กินเซลลูโลสที่ระดับ 15 เปอร์เซ็นต์ และเด็กซ์ตรินที่ระดับ 5 เปอร์เซ็นต์ (Lee *et al.*, 2003) ปลา Starry flounder (*Platichthys stellatus*) สามารถใช้ได้ที่ระดับ 20 เปอร์เซ็นต์ ทำให้มีน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นดีที่สุด (Lee and Lee, 2004)

ตารางที่ 3 ผลการย่อยคาร์โบไฮเดรตโดยเอนไซม์จากแหล่งต่าง ๆ

แหล่งผลิตเอนไซม์	สิ่งกระตุ้น	ชนิดของเอนไซม์ที่ผลิต	คาร์โบไฮเดรตที่ถูกย่อย	ผลผลิตจากการย่อย
ตับอ่อน	ฮอร์โมนซีครีตินและแพนครีโอไซมินจากผนังเยื่อเมือกในลำไส้	อะไมเลส	แป้ง ไกลโคเจน	โอลิโกแซคคาไรด์ มอลโตไตรโอส มอลโตส
ลำไส้	ฮอร์โมนเอนเตอโรครินิน จากผนังเยื่อเมือกในลำไส้	ซูเครส แลกเตส มอลเตส ไอโซมอลเตส	ซูโครส แลกโตส มอลโตส ไอโซมอลโตส โอลิโกแซคคาไรด์	กลูโคสและฟรุกโตส กลูโคสและกาแลกโตส กลูโคส กลูโคส

ที่มา: เวียง, 2542

1.4 เซลลูโลส $(C_6H_{10}O_5)_n$

เซลลูโลส (Cellulose) เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ (Cell wall) ในพืช เป็นโปลิแซคาไรด์ขนาดใหญ่ที่มีมากที่สุดในธรรมชาติ มีลักษณะเป็นโพลีเมอร์สายตรง (Linear polymer) เกิดจากหน่วยของ D–กลูโคส มาจับต่อกันด้วยพันธะโควาเลนท์ประเภท β–1, 4' ไกลโคซิดิก (β–1, 4' glycosidic bond) ตั้งแต่ 15,000 โมเลกุลเป็นต้นไป (วุฒิพร, 2545) สายเซลลูโลสในพืชวางตัวเป็นชั้นๆ มีพันธะไฮโดรเจนระหว่างหน่วยกลูโคสต่างๆ ที่อยู่ในชั้นที่ติดกัน และระหว่างหน่วยกลูโคสต่างๆ ในสายเดียวกันด้วย ทำให้เกิดเป็นแผ่นเซลลูโลสที่มีลักษณะเป็นเส้นใยที่เรียกว่า ไมโครไฟบริล (Microfibril) (ภาพที่1) เซลลูโลสไม่ละลายน้ำ ทนต่อปฏิกิริยาของเอนไซม์ กรดและด่างที่เจือจาง ถูกย่อยได้ด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ร่างกายของคนและสัตว์บางชนิดไม่สามารถย่อยเซลลูโลสจากพืชเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ได้ ส่วนสัตว์พวกที่กินพืชเป็นอาหาร (Herbivorous animals) เช่น โค และกระบือ สามารถย่อยเซลลูโลสได้ เนื่องจากในกระเพาะมีจุลินทรีย์ (Rumen microflora) ซึ่งมีเอนไซม์เซลลูเลสช่วยย่อยเซลลูโลสได้ (นิธิยา, 2549)

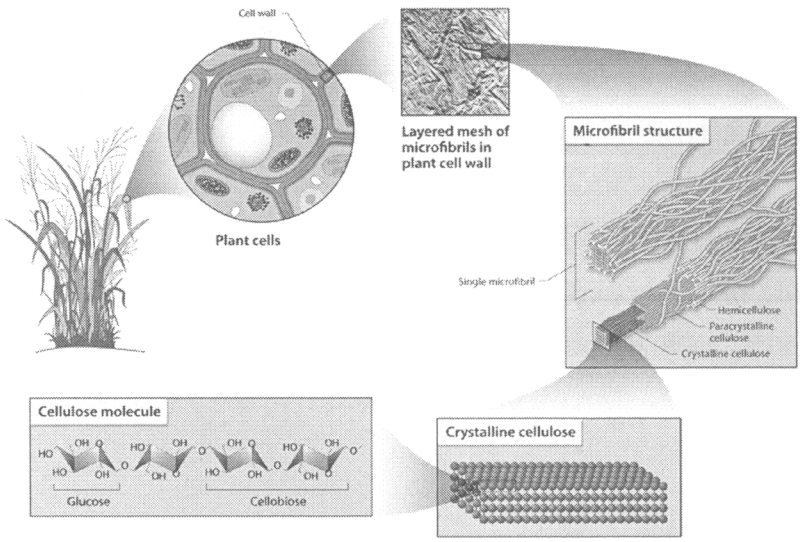
เซลลูโลสแบ่งได้เป็น 2 ชนิดคือ

1) เซลลูโลสธรรมชาติ (Native cellulose) เป็นสารให้โครงสร้างกับผนังเซลล์ของพืชและเนื้อเยื่อผัก รวมตัวอยู่กับพวกไซแลน (Xylan) และลิกนิน (Lignin) เซลลูโลสที่ได้จากแต่ละส่วนของพืชจะมีความความแข็งแรง (Strength) และความเหนียว (Toughless) แตกต่างกันขึ้นอยู่กับอายุ และชนิดของพืช

2) เซลลูโลสดัดแปลง (Modified cellulose) การนำเซลลูโลสธรรมชาติมาเปลี่ยนแปลงให้เป็นอนุพันธุ์ที่มีคุณสมบัติในการพองตัวที่ดี และมีสภาพการละลายดีขึ้นทำให้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างกว้างขวาง ตัวอย่างของเซลลูโลสดัดแปลงคือ

2.1) แอลคิลเซลลูโลสและไฮดรอกซีแอลคิลเซลลูโลส เป็นเซลลูโลสที่ทำปฏิกิริยากับเมทิลคลอไรด์ และหรือโพรพิลีนออกไซด์ในสภาวะที่มีด่างแก่จะทำให้หมู่เมทิลและหรือหมู่ไฮดรอกซี โพรพิลเข้าไปอยู่ในโมเลกุลของเซลลูโลส แล้วจึงเกิดเป็นอนุพันธ์คือเมทิลไฮดรอกวีโพรพิลเซลลูโลส หรือเมทิลเอทิลเซลลูโลสเป็นต้น ซึ่งสารเหล่านี้ที่เข้าไปอยู่ในโมเลกุลของเซลลูโลสนั้นจะมีผลต่อโครงสร้างโซ่ปกติของเซลลูโลสแตกต่างกันไปขึ้นกับธรรมชาติของสารเหล่านั้น เป็นผลให้เกิดเป็นอนุพันธ์ของเซลลูโลสที่มีกำลังในการพองตัวและมีสภาพละลายที่แตกต่างกัน และมีอุณหภูมิในการเกิดเจลแตกต่างกัน (Hadziyev, 1987 อ้างโดยเสาวลักษณ์, 2534)

2.2) คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส ได้จากปฏิกิริยาของแอลคาไลน์เซลลูโลสกับกรดคลอโรอะซีติก หรือโซเดียมคลอโรอะซีเตด สมบัติของผลผลิตที่ได้จะขึ้นกับระดับการแทนที่ และระดับการเกิดโพลิเมอร์ ถ้ามีการแทนที่ต่ำจะเป็นผลิตภัณฑ์ที่ไม่ละลายน้ำ แต่ละลายในด่าง ขณะที่ถ้ามีการแทนที่ในปริมาณสูงผลิตภัณฑ์ที่ได้ก็จะละลายได้ในน้ำ ซึ่งสภาพการละลายและความหนืดจะขึ้นอยู่กับค่าความเป็นกรดด่าง (Hadziyev, 1987 อ้างโดยเสาวลักษณ์, 2534)



ภาพที่ 1 ลักษณะโครงสร้างของเซลลูโลสในพืช

ที่มา: Van Soest, 1994

1.5 การศึกษาเอนไซม์เซลลูเลสในปลา

เซลลูเลสเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการย่อยเซลลูโลส มีการศึกษากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสในปลาหลายชนิดซึ่งชี้ให้เห็นว่าปลาอาจจะมีความสามารถในการใช้

ประโยชน์จากเซลลูโลสและคาร์โบไฮเดรตชนิดที่เป็นเยื่อใยได้ (Chakrabarti *et al.*, 1995) แต่ยังไม่มีรายงานยืนยันว่าปลามีการสร้างเอนไซม์ชนิดนี้ได้หรือไม่ (Rust, 2002) และยังเป็นที่ถกเถียงกันอยู่ถึงแหล่งของเอนไซม์ว่ามาจากตัวปลาเองหรือจากแบคทีเรียที่อาศัยอยู่บริเวณทางเดินอาหาร (Lindsay and Harris, 1980; Chiu and Benitez, 1981) โดยจากการศึกษาในปลาเฉา(*Ctenopharyngodon idella*) พบกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสทั้งในลำไส้และในตับอ่อน และระดับของเซลลูโลสในอาหารมีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์อย่างมีนัยสำคัญ ($p< 0.05$) (Das and Tripathi, 1991) ซึ่งเมื่อมีการศึกษาต่อมาโดยการผสมยาปฏิชีวนะชนิดเตตร้าซัยคลินลงในอาหารของปลาเฉาพบว่ามีผลให้กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงโดยกิจกรรมของเอนไซม์ 1 ใน 3 ส่วนได้รับมาจากแบคทีเรีย ซึ่งชี้ให้เห็นว่าเอนไซม์ส่วนใหญ่ได้รับมาจากแบคทีเรีย และกิจกรรมเอนไซม์ที่เหลืออาจจะมาจากการหลั่งมาจากตัวปลาเอง แต่อย่างไรก็ตามอาจมาจากแบคทีเรียกลุ่มที่ต้านต่อยาปฏิชีวนะเตตร้าซัยคลิน (Das and Tripathi, 1991) และนอกจากนี้มีการศึกษาในปลายี่สกเทศ (*Labeo rohita*) โดย Saha และ Ray (1998) พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสมีสูงที่สุดในปลาที่ได้รับเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบในอาหาร รองลงมาคือปลาที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของวัตถุดิบพืช (*Leucaena* leaf) ส่วนในปลาที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของยาปฏิชีวนะมีกิจกรรมเอนไซม์ลดลง แสดงให้เห็นว่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส ส่วนใหญ่ได้รับมาจากแบคทีเรียในลำไส้ ในปลากด (*Clarias isheriensis*) ที่ได้รับอาหารที่มีปริมาณของสาหร่าย Cyanophyceae เป็นวัตถุดิบหลัก ก็พบกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส เช่นกัน (Fagbenro, 1990) แต่กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสไม่พบในปลาหลายชนิดคือปลาไน, *Cyprinus carpio* (Bondi and Spannhof, 1954), ปลานิล, *Tilapia mossambica* (Fish, 1960), ปลาเรนโบว์เทราท์, *Oncorhynchus mykiss* (Kaitamikado and Tachino, 1960), ปลานวลจันทร์, *Chanos chanos* (Chiu and Benitez, 1981) ปลาลิ่น, *Hypophthalmichthys molitrix* (Bitterlich, 1985) และปลาช่อนแอฟริกา, *Parachanna Africans* (Kori-Siakpere, 2004) รวมทั้งในปลากินเนื้อก็ยังไม่มีรายงานว่าปลากินเนื้อสามารถย่อยสารประกอบโพลีแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้ง (Non-starch polysaccharides) อันประกอบด้วย เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส เบต้ากลูแคน เพคติน และกัมได้ (Krogdahl *et al.*, 2005) และในปลานวลจันทร์ทะเล (Milk fish) ก็ไม่สามารถย่อย Na-carboxymethyl cellulose ได้ (Chiu and Benitez, 1981)

2. วิธีการศึกษา

แบ่งการศึกษาเป็น 2 การทดลอง ดังนี้

การทดลองที่ 1: การคัดเลือกแบคทีเรียจากธรรมชาติที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลส

2.1 การเก็บตัวอย่างและการแยกเชื้อแบคทีเรียจากระบบทางเดินอาหารของโคพื้นเมืองและปลานิล

2.1.1 การเก็บตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะรูเมนของโคพื้นเมือง

ใช้โคพื้นเมืองภาคใต้เพศผู้ที่ผ่าตัดผนังท่ออาหารถาวรที่กระเพาะรเมน (Rumen fistulated animal) อายุเฉลี่ย 2.9$\pm$ 0.2 ปี และน้ำหนักเฉลี่ย 226 $\pm$ 5 กิโลกรัม จำนวน 5 ตัว มีสุขภาพสมบูรณ์ แข็งแรง ในช่วงปรับสัตว์ก่อนเข้างานทดลองโคทดลองทุกตัวได้รับการฉีดวัคซีนเพื่อป้องกันโรคติดต่อที่สำคัญได้แก่ วัคซีนโรคคอบวม และโรคปากและเท้าเปื่อย ถ่ายพยาธิภายในโดยใช้ยาถ่ายพยาธิภายในด้วยยาอัลเบนดาโซล (Albendazole) อัตราการใช้ยา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักตัว 171-225 กิโลกรัม โดยการกรอกให้กินทางปาก และฉีดวิตามินรวมที่ประกอบด้วย วิตามินเอ วิตามินดี และวิตามินอี อัตรา 2 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักตัว 100 กิโลกรัม

โคทดลองทุกตัวถูกเลี้ยงในคอกเดี่ยว มีรางอาหาร และที่ให้น้ำอยู่ด้านหน้าให้ดื่มน้ำได้ตลอดเวลา ให้โคได้รับอาหารวันละ 2 ครั้ง คือ เวลา 08.00 นาฬิกา และ 16.00 นาฬิกา โดยให้ได้รับหญ้าพลิแคททูลั่มแห้งเป็นแหล่งอาหารหยาบแบบเต็มที่ *(ad libitum)* เสริมด้วยอาหารข้น (โปรตีนรวม 14 เปอร์เซ็นต์) ในปริมาณ 0.5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัวเมื่อคิดเป็นวัตถุแห้ง

ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะรูเมนของโคทดลองแต่ละตัวหลังให้อาหาร 4 ชั่วโมง ผ่านทางท่ออาหารถาวร สุ่มเก็บปริมาณ 100 มิลลิลิตร นำมาวัดค่าความเป็นกรด-ด่างทันที โดยใช้ pH electrode MP 125 LE 413 (Mettler Toleds AG.) จากนั้นนำของเหลวจากกระเพาะรูเมนของโคทั้ง 5 ตัวมาผสมรวมกัน แช่ในอ่างน้ำอุ่นที่มีอุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส เพื่อรักษาให้อุณหภูมิของของเหลวจากกระเพาะรูเมนคงที่ คัดแยกแบคทีเรียที่มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส ต่อไปในหัวข้อ 2.1.2 โดยใช้ผ้าขาวบางกรองของเหลวออกจากตะกอนของกระเพาะรูเมน

2.1.2 การเก็บตัวอย่างของเหลวจากทางเดินอาหารของปลานิล

สุ่มเก็บตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียจากปลานิลแดงและปลานิลดำโดยการผ่าตัดกระเพาะอาหาร ลำไส้ตอนต้น และลำไส้ตอนปลาย มาบดในโกร่งที่ปราศจากเชื้อและเจือจางครั้งละ 10 เท่า (10-fold dilution) ด้วยน้ำเกลือปลอดเชื้อความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์

2.1.3 การแยกเชื้อแบคทีเรียจากระบบทางเดินอาหารของโคพื้นเมืองและปลานิล

ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียจากตะกอนและของเหลวจากกระเพาะรูเมนของโคพื้นเมือง กระเพาะอาหาร ลำไส้ตอนต้น และลำไส้ตอนปลาย ของปลานิลแดงและปลานิลดำ ด้วยวิธี Dilution plate method ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ โดยดูดตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่บรรจุ NaCl 0.85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันโดยใช้เครื่องเขย่าหลอด (Vortex mixer) เป็นเวลา 1-2 นาที จากนั้นทำ 10-fold dilution ให้ได้ความเข้มข้น 10^{-3} และ 10^{-4} แล้วทำการ Pour plate ด้วยอาหาร Nutrient agar (NA) ที่เติม Carboxy methyl cellulose (CMC) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการคัดเลือกเฉพาะเชื้อแบคทีเรียที่เจริญเติบโตเร็วและมีลักษณะโคโลนีแตกต่างกันมา Streak plate บนอาหาร NA ที่เติม CMC เพื่อแยกเป็นโคโลนีเดี่ยว และเก็บเชื้อไว้ในหลอดที่บรรจุอาหาร NA slant ที่เติม CMC เพื่อใช้ในการทดสอบการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

2.2 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

2.2.1 การเลี้ยงและปั่นแยกเซลล์แบคทีเรีย

นำเชื้อแบคทีเรียไอโซเลตบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้จากข้อ 2.1 มาเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ที่บรรจุอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงจุลินทรีย์ปริมาตรขวดละ 100 มิลลิลิตร โดยใช้ลูปเขี่ยเชื้อแบคทีเรียปริมาณ 2 ลูปต่อขวด และนำไปวางเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน ถ่ายเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงในขวดชมพู่ ใส่ในหลอดเหวี่ยงพลาสติกปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 2,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เพื่อปั่นแยกเซลล์ จากนั้นนำส่วนใสที่ได้ไปทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

2.2.2 การทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

เตรียมอาหารวุ้นที่ใช้ทดสอบโดย เทอาหารวุ้น CMC-Na ใส่ในจานเพาะเชื้อ เมื่อวุ้นแข็งตัว เจาะรูตรงกลางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร และปิเปตส่วนใสที่ได้จากการปั่นแยกเซลล์จากข้อ 2.1 จำนวน 50 ไมโครลิตร หยอดลงในรูที่เจาะไว้ และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วเติมสารละลาย Congo red ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ลงในจานอาหารวุ้นจนท่วมอาหารวุ้น วางไว้ 30 นาที เทสารละลาย Congo red ทิ้ง แล้วล้างอาหารวุ้นด้วยน้ำกลั่น จากนั้นใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 1 โมลาร์ ล้างอาหารวุ้นเป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น ทำซ้ำ 2 ครั้ง บันทึกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสที่เกิดขึ้น (Clear zone)

2.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบพืช

วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของรำสาลี มันสำปะหลัง รำข้าว กากถั่วเหลือง กากเนื้อในเมล็ดปาล์มบด ได้แก่ วัตถุแห้ง อินทรียวัตถุ โปรตีนรวม ไขมันรวม เยื่อใยรวม และเถ้า โดยวิธี Proximate Analysis (AOAC, 1999) ส่วนการวิเคราะห์ผนังเซลล์ ลิกโนเซลลูโลส และลิกนิน ใช้วิธี Detergent method ซึ่งดัดแปลงจาก Goering และ Van Soest (1970) และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์เฮมิเซลลูโลส และเซลลูโลสในวัตถุดิบพืชแต่ละชนิด

2.4 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียในการย่อยสลายวัตถุดิบที่มีคาร์โบไฮเดรตและเยื่อใยสูง

2.4.1 การเลี้ยงและปั่นแยกเซลล์จุลินทรีย์

นำเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการคัดเลือกจากข้อ 2.2 ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดี มาทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายวัตถุดิบที่มีคาร์โบไฮเดรตและเยื่อใยสูง ได้แก่ รำข้าว กากเนื้อในเมล็ดปาล์มบด มันสำปะหลัง กากถั่วเหลือง และรำสาลี โดยนำเชื้อแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตมาเลี้ยงในอาหารเหลว NB ที่ผสมกับวัตถุดิบแต่ละชนิด คือ อาหารเหลว NB ผสมกับรำข้าว อาหารเหลว NB ผสมกับกากปาล์ม อาหารเหลว NB ผสมกับมันสำปะหลัง อาหารเหลว NB ผสมกับกากถั่วเหลือง และ อาหารเหลว NB ผสมกับรำสาลี ทำตัวอย่างละ 3 ซ้ำ อาหารแต่ละชนิดบรรจุในขวดรูปชมพู่ ปริมาตรขวดละ 100 มิลลิลิตร โดยใช้ลูปเขี่ยเชื้อแบคทีเรียปริมาณ 2 ลูปต่อขวด และนำไปวางเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน ถ่ายเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงในขวดชมพู่ ใส่ในหลอดเหวี่ยงพลาสติก ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 2,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เพื่อปั่นแยกเซลล์ จากนั้นนำส่วนใสที่ได้ไปทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

2.4.2 การทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

เตรียมอาหารเช่นเดียวกับข้อ 2.2.2 โดยเทอาหารวุ้น CMC-Na ใส่ในจานเพาะเชื้อ เมื่อวุ้นแข็งตัว เจาะรูตรงกลางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร และปิเปตส่วนใสที่ได้จากการปั่นแยกเซลล์จากข้อ 2.4.1 จำนวน 50 ไมโครลิตร หยอดลงในรูที่เจาะไว้ และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส แล้วเติมสารละลาย Congo red ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ลงในจานอาหารวุ้นจนท่วมอาหารวุ้น วางไว้ 30 นาที เทสารละลาย Congo red ทิ้ง แล้วล้างอาหารวุ้นด้วยน้ำกลั่น จากนั้นใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 1โมลาร์ ล้างอาหารวุ้นเป็นเวลา 5 นาที

แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น ทำซ้ำ 2 ครั้ง บันทึกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสที่เกิดขึ้น (Clear zone)

2.5 การวัดกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส

นำเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการคัดเลือกจากข้อ 2.4.2 เลี้ยงในอาหารเหลว NB เช่นเดียวกับการศึกษาข้อ 2.4.1 เพื่อนำส่วนใสซึ่งเป็นสารละลายเอนไซม์มาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ ทำตัวอย่างละ 3 ซ้ำ โดยผสมสารละลายเอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร กับ 1 มิลลิลิตร ของสารละลาย CMC ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ใน 0.05 โมลาร์ Citrate Buffer pH 4.8 จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 10 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการเติมสารละลาย DNS (Dinitrosalicylic acid reagent) ลงไป 3.0 มิลลิลิตร ต้มในน้ำให้เดือด 15 นาที ทำให้เย็นโดยการแช่น้ำเย็นแล้วเติมน้ำกลั่น 7.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร จากนั้นคำนวณกิจกรรมเอนไซม์โดยเปรียบเทียบค่ามาตรฐานจากกราฟน้ำตาลกลูโคส (Cheah and Ooi , 1984)

2.6 การจำแนกชนิดของแบคทีเรีย *Bacillus* sp.

นำเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.5 มาจำแนกชนิดของเชื้อ โดยการตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ 16S ribosomal RNA gene ทั้งสาย Forward และ Reverse ด้วยเครื่องอ่านลำดับเบสอัตโนมัติ นำข้อมูลลำดับเบสที่ได้เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลทางพันธุกรรม NCBI (ส่งวิเคราะห์ที่สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยี กรมวิชาการเกษตร)

การทดลองที่ 2: การประยุกต์ใช้แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในการผลิตอาหารสำหรับปลากะพงขาว

2.7 การศึกษาผลของเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสต่อประสิทธิภาพการใช้คาร์โบไฮเดรตในอาหารปลากะพงขาว

2.7.1 การเตรียมวัตถุดิบพืช

บดวัตถุดิบพืชแต่ละชนิด ได้แก่ กากเอทานอลข้าวโพด (Corn-DDGS, Corn Dried Distillers Grains with Soluble) กากเนื้อในเมล็ดปาล์ม และมันสำปะหลัง ให้ละเอียด และร่อนรำข้าว แป้งสาลี ด้วยตะแกรงขนาด 30 เมช และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อเตรียมนำไปทำเป็นวัตถุดิบในการทำอาหารปลาต่อไป

2.7.2 การเตรียมอาหารทดลอง

กำหนดอาหารทดลองให้มีระดับโปรตีน 30 เปอร์เซ็นต์ และไขมัน 12 เปอร์เซ็นต์ และมีพลังงานใกล้เคียงกันทุกสูตร โดยมีแหล่งคาร์โบไฮเดรตที่แตกต่างกัน คือ สูตรที่ 1-3 ใช้แป้งสาลี สูตรที่ 4-6 ใช้กากเนื้อในเมล็ดปาล์มบด สูตรที่ 7-9 ใช้มันสำปะหลัง สูตรที่ 10-12 ใช้รำข้าว และสูตรที่ 13-15 ใช้กากเอทานอลข้าวโพด (ตารางที่4) เตรียมอาหารโดยชั่งวัตถุดิบอาหารแต่ละชนิดของแต่ละสูตร และผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมอาหาร อัดเม็ดอาหารขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร ทำให้แห้งโดยการอบที่อุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส เวลา 12-18 ชั่วโมง จากนั้นนำอาหารไปบรรจุในถุงพลาสติกโพลีเอทธีลีนและเก็บในถุงดำเพื่อป้องกันแสง เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อรอการใช้งาน นำตัวอย่างอาหารทุกสูตรวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ตามวิธีการของ AOAC (1999)

2.7.3 การนับจำนวนและการสเปรย์เชื้อแบคทีเรียในอาหารทดลอง

นับจำนวนเชื้อแบคทีเรียในอาหารทดลองด้วยการเพาะบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (Plate count) โดยการสุ่มชั่งน้ำหนักอาหารทดลอง 1 กรัม จากนั้นนำไปเจือจางแบบลำดับส่วนๆ ละ 10 เท่า (Serial dilution) ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ สำหรับอาหารที่เสริมเชื้อ 10^4 และ 10^7 CFU/g ใช้ตัวอย่างที่ความเข้มข้น 10^{-2} และ 10^{-4} นำมา Spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (Potato dextrose agar) และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 20-24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำ Plate มานับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหาร และคำนวณจำนวนแบคทีเรียในตัวอย่างด้วยสูตร

$$\text{จำนวนแบคทีเรียต่อ 1 มิลลิลิตร} = \frac{\text{จำนวนโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ}}{\text{ปริมาตรสารละลายเชื้อ} \times \text{ความเจือจางของตัวอย่าง}}$$

สเปรย์เชื้อแบคทีเรียลงบนอาหารทดลอง โดยเช็คปริมาณเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นในขวด Stock ด้วยวิธีการทำ Serial dilution โดยทำการเจือจางด้วยน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ครั้งละ 10 เท่า แล้วคำนวณเซลล์ต่อ 1 มิลลิลิตร โดยวิธี Drop plating method (Collins and Lyne, 1976) เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เมื่อทราบปริมาณเชื้อจาก Stock แล้ว จึงเจือจางเชื้อให้ได้ตามสัดส่วน โดยสำหรับการศึกษานี้มีเชื้อเริ่มต้นอยู่ที่ $A3\times10^{17}$ CFU/ml จึงเจือจางเชื้ออยู่ที่ 10^{11}และ 10^{15} CFU/ml ปริมาตร 10 มิลลิลิตร สเปรย์บนอาหารน้ำหนัก 100 กรัม นำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เวลา 1 ชั่วโมง และเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส รอนำไปใช้ในการเลี้ยงปลาต่อไป

ตารางที่ 4 องค์ประกอบทางโภชนาการของวัตถุดิบ และส่วนประกอบของอาหารทดลองแต่ละสูตร

วัตถุดิบ	องค์ประกอบทางโภชนาการ (เปอร์เซ็นต์)		
	ความชื้น	โปรตีน	ไขมัน
ปลาป่น	5.31±0.23	63.35±0.22	5.63±0.00
กากถั่วเหลือง	9.09±0.37	49.30±0.17	2.21±0.19
เครื่องในปลาทูน่า	13.43±0.16	65.21±0.26	10.76±1.07
แกลบ	0.00	0.00	0.00
กากเอทานอลข้าวโพด	14.11±0.16	25.14±0.27	9.40±0.50
มันสำปะหลังบด	10.38±0.79	2.37±0.08	0.11±0.19
แป้งสาลี	8.12±1.89	14.16±0.36	2.64±0.00
กากเนื้อในเมล็ดปาล์มบด	6.04±0.35	16.15±0.08	5.85±0.17
รำข้าว	10.32±0.03	12.68±0.20	14.55±0.03

	ส่วนประกอบของอาหารทดลอง (กรัม/อาหาร 100 กรัม)				
	แป้งสาลี	กากเนื้อในเมล็ดปาล์มบด	มันสำปะหลัง	รำข้าว	กากเอทานอลข้าวโพด
ปลาป่น	26.90	26.20	31.30	27.50	22.80
เครื่องในปลาทูน่า	8.80	8.50	10.20	8.90	7.50
กากถั่วเหลือง	5.10	5.00	6.00	5.30	4.30
น้ำมันปลา	9.60	7.60	9.20	4.40	6.70
วิตามินรวม[1]	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60
แร่ธาตุรวม[2]	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00
CMC	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50
แกลบ	7.30	10.40	1.00	11.60	16.40
เกลือ	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
วัตถุดิบคาร์โบไฮเดรต	35.00	35.00	35.00	35.00	35.00
รวม	100	100	100	100	100

[1]วิตามินผสม: ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท ไทยยูเนี่ยนฟีดมิลล์ จำกัด

[2]แร่ธาตุผสม (กรัม/อาหาร1 กิโลกรัม):$NaH_2PO_4.2H_2O$ 15 ; $CaHPO_4$ 8; KCl 5; KH_2PO_4 10

2.7.4 การเตรียมปลากะพงขาว

นำปลากะพงขาวที่มีความยาวประมาณ 2 เซนติเมตร น้ำหนักเฉลี่ยประมาณ 0.5 กรัม/ตัว จำนวน 3,000 ตัว อนุบาลในถังไฟเบอร์กลาสทรงกลมขนาดความจุน้ำ 1,000 ลิตร จำนวน 3 ถัง ถังละประมาณ 1,000 ตัว ให้ออกซิเจนตลอดเวลา โดยค่อยๆปรับให้อาหารสำเร็จรูปที่มีส่วนผสมของแป้งสาลีเพื่อฝึกให้ปลาเคยชินกับอาหารสำเร็จรูป จากนั้นจึงคัดปลาให้มีขนาดใกล้เคียงกัน ใส่ตู้ทดลองที่มีความจุน้ำประมาณ 100 ลิตร จำนวน 47 ตู้ เพื่อให้ปลา

คุ้นเคยกับสภาพแวดล้อมและอาหารทดลอง โดยให้อาหารวันละ 2 มื้อ คือ ช่วงเช้า เวลา 08.00 น. และช่วงเย็น เวลา 16.00 น. จนปลาอิ่ม เป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นจึงคัดปลาขนาดใกล้เคียงกันโดยมีน้ำหนักเฉลี่ย เท่ากับ 1.16-1.20 กรัม/ตัว ใส่ตู้จำนวน 14 ตัว/ตู้

2.7.5 การศึกษาการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหาร

ให้อาหารตามชุดการทดลอง โดยให้อาหารแบบให้ปลากินจนอิ่ม (Satiation) สำหรับอาหารที่ไม่มีการเสริมเชื้อแบคทีเรีย แต่อาหารที่มีการเสริมเชื้อแบคทีเรีย ชั่งน้ำหนักอาหารให้ปลากินประมาณ 5-10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว หากอาหารเหลือจะไม่นำมาใช้ใหม่ วันละ 2 มื้อ (เช้า-เย็น) บันทึกน้ำหนักอาหารที่ปลากินในแต่ละวัน เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ ภายในตู้ทดลองให้อากาศและมีน้ำไหลเวียนตลอดเวลา ทำความสะอาดและการดูดตะกอนทุกวันตลอดการทดลอง ในระหว่างการเลี้ยงชั่งน้ำหนักปลาในสัปดาห์ที่ 2 โดยก่อนชั่งน้ำหนักจะสลบปลาด้วยน้ำมันกานพลู ความเข้มข้น 0.5 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร โดยชั่งน้ำหนักปลารวมในแต่ละตู้ ด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง ตลอดการเลี้ยง สังเกตอาการผิดปกติ และบันทึกการตายของปลาทุกวัน หากมีอาการผิดปกติจะนำไปตรวจเชื้อ แบคทีเรีย และปรสิต

เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ชั่งน้ำหนักปลาทุกตัวในแต่ละตู้ทดลอง นับจำนวนปลาที่เหลือ และสังเกตอาการพร้อมทั้งบันทึกและเก็บตัวอย่างปลาจากทุกตู้ทดลองเพื่อนำมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของปลาตามวิธีมาตรฐานของ AOAC (1999) และนำข้อมูลที่ได้มาคำนวณค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ได้แก่ น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น (Weight gain) อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific growth rate) อัตราการรอดตาย (Survival rate) ประสิทธิภาพการใช้อาหาร (Feed efficiency) การใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ (Protein Productive Value, PPV) ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน (Protein Efficiency Ratio, PER) การใช้ประโยชน์จากไขมันสุทธิ (Lipid Productive Value, LPV) ประสิทธิภาพการใช้ไขมัน (Lipid Efficiency Ratio, LER) (Halver, 1989) ของปลาในแต่ละชุดการทดลอง จากสูตรดังนี้

อัตราการรอดตาย (เปอร์เซ็นต์)

$$= \text{จำนวนปลาที่เหลือ} / \text{จำนวนปลาเริ่มต้น} \times 100$$

น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (เปอร์เซ็นต์)

$$= \frac{\text{น้ำหนักปลาสุดท้าย (กรัม/ตัว)} - \text{น้ำหนักปลาเริ่มต้น (กรัม/ตัว)}}{\text{น้ำหนักปลาเริ่มต้นเฉลี่ย (กรัม/ตัว)}} \times 100$$

ประสิทธิภาพการใช้อาหาร

$$= \frac{\text{น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น (กรัม)}}{\text{น้ำหนักอาหารที่ปลากินทั้งหมด (กรัม)}}$$

สำนักทรัพยากรการเรียนรู้ อุทยานวิทยาศาสตร์ อรรถกระวีสุนทร

อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (เปอร์เซ็นต์ต่อวัน)

$$= \frac{\ln W_2 - \ln W_1 \times 100}{t_2 - t_1}$$

W_1 = น้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้น W_2 = น้ำหนักเฉลี่ยสุดท้าย

t_1 = วันเริ่มต้นทำการทดลอง t_2 = วันที่สิ้นสุดการทดลอง

อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ

$$= \frac{\text{น้ำหนักอาหารที่ปลากิน (กรัม/ตัว)}}{\text{น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (กรัม/ตัว)}}$$

ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน

$$= \frac{\text{น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น (กรัม)}}{\text{น้ำหนักโปรตีนที่ปลากิน (กรัม)}}$$

การใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ

$$= \frac{\text{โปรตีนของตัวปลาที่เพิ่มขึ้น (กรัม)}}{\text{น้ำหนักโปรตีนที่ปลากินตลอดการทดลอง (กรัม)}} \times 100$$

การใช้ประโยชน์จากไขมันสุทธิ

$$= \frac{\text{ไขมันของตัวปลาที่เพิ่มขึ้น (กรัม)}}{\text{น้ำหนักไขมันที่ปลากินตลอดการทดลอง (กรัม)}} \times 100$$

ประสิทธิภาพการใช้ไขมัน

$$= \frac{\text{น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น (กรัม)}}{\text{น้ำหนักไขมันที่ปลากิน (กรัม)}}$$

2.8 การศึกษาดัชนีไขมันในช่องท้อง และดัชนีตับ

เก็บตัวอย่างเมื่อสิ้นสุดการทดลอง โดยใช้ปลาหลังจากเจาะเลือดเรียบร้อยแล้ว โดยการผ่าส่วนท้อง ตัดส่วนของไขมันในช่องท้อง นำมาชั่งน้ำหนัก และตัดส่วนของตับมาชั่งน้ำหนัก เพื่อนำข้อมูลมาคำนวณค่าดัชนีไขมันในช่องท้อง (Intraperitoneal fat ratio, IPF) (Rawles and Gatlin, 1998) และดัชนีของตับ (Hepatosomatic index, HSI) ตามลำดับ

IPF (%) = [น้ำหนักไขมันในช่องท้อง (กรัมน้ำหนักสด)/น้ำหนักตัวปลา (กรัมน้ำหนักสด)] ×100

HIS (%) = [น้ำหนักตับ (กรัมน้ำหนักสด) /น้ำหนักตัวปลา (กรัมน้ำหนักสด)] × 100

2.9 การศึกษากิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส เซลลูเลส ทริปซิน และไลเปส

เก็บตัวอย่างปลา 3 ตัวต่อตู้ ใช้ตัวอย่างปลาที่อดอาหารเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้ทางเดินอาหารปราศจากอาหารทดลอง โดยการผ่าตัดเอาไส้ติ่งและลำไส้ ชั่งน้ำหนักแล้วเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลว แล้วนำมาสกัดเอนไซม์ด้วยน้ำกลั่นเย็น (อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส) โดยใช้น้ำหนักไส้ติ่งและลำไส้เท่ากัน ผสมน้ำกลั่นในสัดส่วน เนื้อเยื่อ: น้ำกลั่น 1:5 W/V บดให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ดูดส่วนใส เพื่อหาปริมาณโปรตีนรวมด้วยวิธี Modified Lowry Method (Lowry *et al.*, 1951) วิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส ทริปซิน ไลเปส ดัดแปลงตามวิธีการของ Bergmeyer และคณะ (1974) และกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส ดัดแปลงตามวิธีการของ Ghose (1987)

2.10 การศึกษาประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนในหลอดทดลอง (*In vitro* carbohydrate and protein digestibility)

เตรียมอาหารทดลองเพื่อเป็นซับสเตรตในการทำปฏิกิริยาการย่อยคาร์โบไฮเดรตในหลอดทดลอง โดยใช้ตัวอย่างเอนไซม์สกัดจากข้อ 2.9 ชั่งตัวอย่างอาหารทดลองให้ได้ปริมาณ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใส่บีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วเติม 50 mM Phosphate buffer pH 8.0 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ผสมอาหารทดลองและบัฟเฟอร์ให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่อง Magnetic Stirrer ดูดซับเสตรตที่เตรียมได้ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่ในไมโครทิว แล้วเติม 1 เปอร์เซ็นต์ Chloramphenical ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เติมเอนไซม์สกัดที่เจือจางให้มีความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บตัวอย่างนาทีที่ 0 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วหยุดปฏิกิริยาโดยนำหลอดแช่ในน้ำแข็ง อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำหลอดตัวอย่างใส่เครื่อง Rotator เพื่อทำการย่อย ที่อุณหภูมิ 26±1 องศาเซลเซียส และเก็บตัวอย่างที่เวลา 6 ชั่วโมง แล้วหยุดปฏิกิริยาเช่นเดียวกัน นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บส่วนใส เพื่อวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (reducing-sugar) เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานมอลโตส (Maltose) (Modified from Benfeld, 1951 อ้างโดย Supannapong *et al.*, 2008) และกราฟมาตรฐานกลูโคส (Glucose) (Ghose, 1987)

เตรียมอาหารทดลองเพื่อเป็นซับสเตรตในการทำปฏิกิริยาการย่อยโปรตีนในหลอดทดลอง ชั่งตัวอย่างอาหารทดลองให้ได้ปริมาณ 2.5 มิลลิกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร ใส่บีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วเติม 50 mM Phosphate buffer pH 8.0 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ผสมอาหารทดลองและบัฟเฟอร์ให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่อง Magnetic Stirrer ดูดซับเสตรทที่เตรียมได้ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่ในไมโครทิว แล้วเติม 1 เปอร์เซ็นต์ Chloramphenical ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เติมเอนไซม์สกัดที่เจือจางให้มีความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำหลอดตัวอย่างใส่เครื่อง Rotator เพื่อทำ

การย่อย ที่อุณหภูมิ 26±1 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างที่เวลาที่ 0 ชั่วโมง เพื่อวัดปริมาณกรดอะมิโนอิสระก่อนการย่อย และที่เวลา 6 ชั่วโมงเพื่อวัดปริมาณผลผลิตของกรดอะมิโนที่ย่อยได้ ซึ่งเก็บตัวอย่างโดยการดูดตัวอย่างปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาเติม TCA 40 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 41 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากันด้วย vortex แล้วนำสารละลายนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาทีเก็บส่วนใส เพื่อวัดปริมาณกรดอะมิโนอิสระ (Amino Group) ที่ได้หลังจากการย่อยในหลอดทดลอง โดยใช้ TNBS's method (Ihekoronye, 1986; Benjakul and Morissey, 1997)

2.11 การศึกษาองค์ประกอบเลือดปลากะพงขาว

เก็บตัวอย่างเลือดปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารทดลองที่มีการเสริมและไม่เสริมเชื้อแบคทีเรียที่ระดับต่างๆ เป็นเวลา 56 วัน จำนวน 9 ตัวต่อชุดการทดลอง โดยสลบปลาด้วยน้ำมันกานพลูเข้มข้น 20 พีพีเอ็ม ชั่งน้ำหนักปลา และเจาะเลือดจากเส้นเลือดบริเวณคอดหาง (Caudal vein) ด้วยกระบอกฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร เข็มฉีดยาขนาด 25G×1 นิ้ว ตัวอย่างเลือดที่ได้นำมาวิเคราะห์องค์ประกอบเลือด ได้แก่ ฮีมาโตคริต (Larsen and Sneizsko, 1961) ปริมาณฮีโมโกลบิน และโปรตีนในซีรัม (Lowry *et al.*, 1951)

2.11.1 การหาค่าฮีมาโตคริต

นำเลือดที่เจาะใหม่ๆ ใส่ในหลอด Capillary tube ประมาณครึ่งหลอด อุดปลายด้านหนึ่งด้วยดินน้ำมัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยฮีมาโตคริตเซนตริฟิวจ์ (Haematocrit centreifuge) ที่ 10,000 รอบต่อนาที 5 นาที แล้วนำมาคำนวณหาอัตราส่วนของปริมาณเม็ดเลือดกับปริมาณเลือดทั้งหมด และคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ฮีมาโตคริต ดังสูตร

ฮีมาโตคริต (เปอร์เซ็นต์) = [ปริมาณเม็ดเลือด (ม.ม.)/ปริมาณเลือดทั้งหมด (ม.ม.)] × 100

2.11.2 การหาค่าปริมาณฮีโมโกลบิน

ใช้ไมโครปิเปตดูดเลือด 20 ไมโครลิตร ผสมรวมกับ Drabkin's solution 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งไว้ประมาณ 20 นาที หลังจากนั้นนำไปเซนตริฟิวจ์เพื่อขจัดเซลเม็ดเลือดและ Fibrin ที่ 5,000 รอบต่อนาที 10 นาที นำส่วนใสมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ค่าที่ได้นำมาเปรียบเทียบกับค่าฮีโมโกลบินมาตรฐาน โดยใช้ Drabkin's solution เป็น Blank

2.11.3 การหาค่าโปรตีนรวมในซีรัม

ใช้ไมโครปิเปตดูดซีรัม 5 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 995 ไมโครลิตร แล้วเติม Alkaline copper 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้วจึงเติม Follin reagent 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ 5 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร ค่าที่ได้นำมาเปรียบเทียบกับค่าแอลบูมิน (Bovine Serum Albumin) มาตรฐาน

2.12 การศึกษาปริมาณแบคทีเรียในลำไส้ปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารทดลอง

ศึกษาปริมาณแบคทีเรียในลำไส้ปลากะพงขาวโดยผ่าตัดแยกลำไส้ปลาด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ (Aseptic technique) นำมาชั่งน้ำหนัก บดให้ละเอียดด้วยโกร่งและเจือจางครั้งละ 10 เท่าด้วยน้ำเกลือปลอดเชื้อเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำแต่ละความเข้มข้นไปเกลี่ย (Spread) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar (PDA) เพื่อศึกษาปริมาณแบคทีเรียกลุ่มที่เสริมในอาหาร *Bacillus* spp. และอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Agar (TSA) เพื่อศึกษาปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสสำหรับแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* spp. และ 30 องศาเซลเซียสสำหรับแบคทีเรียทั้งหมด

เมื่อแบคทีเรียเจริญบนจานเพาะเชื้อ นับจำนวนและคัดเลือกแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ที่เจริญบนจานเพาะเชื้อ จากนั้นนำไปทำบริสุทธิ์และจำแนกชนิดโดยใช้เทคนิคเบื้องต้น ได้แก่การย้อมสีแกรม การทดสอบเอนไซม์คาตาเลส และใช้ชุดทดสอบ API20E (bioMérieux®, Marcy l' Etoile, France)

2.13 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลการเจริญเติบโต อัตราการรอดตาย ประสิทธิภาพการใช้อาหาร การใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน การใช้ประโยชน์จากไขมันสุทธิ ประสิทธิภาพการใช้ไขมัน ดัชนีในช่องท้อง ดัชนีไขมัน กิจกรรมเอนไซม์ ประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนในหลอดทดลอง องค์ประกอบเลือด และปริมาณของเชื้อแบคทีเรีย นำมาหาค่าเฉลี่ย และวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลแบบสองทาง (Two-way ANOVA) และเปรียบเทียบหาความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย Turkey's HSD ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

3. ผลการศึกษา

การทดลองที่ 1: การคัดเลือกแบคทีเรียจากธรรมชาติที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลส

3.1 เชื้อแบคทีเรียจากระบบทางเดินอาหารของโคพื้นเมืองและปลานิล

เมื่อทำการแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างกระเพาะรูเมนของโคพื้นเมือง ปลานิลดำ และปลานิลแดง ด้วยวิธีการ Dilution plate method และทำการ Pour plate บนอาหาร NA พบว่าสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งหมด 67 ไอโซเลต โดยแยกได้จากกระเพาะรูเมนของโคพื้นเมืองได้ 18 ไอโซเลต (ตะกอนจากกระเพาะรูเมนของโคพื้นเมือง มี 7 ไอโซเลต ของเหลวจากกระเพาะรูเมนของโคพื้นเมือง มี 11 ไอโซเลต) และปลานิล 49 ไอโซเลต (กระเพาะของปลานิลแดง 6 ไอโซเลต ลำไส้ส่วนต้นของปลานิลแดง 10 ไอโซเลต ลำไส้ส่วนปลายของปลานิลแดง 12 ไอโซเลต กระเพาะอาหารของปลานิลดำ 6 ไอโซเลต ลำไส้ส่วนต้นของปลานิลดำ 8 ไอโซเลต และส่วนปลายของปลานิลดำ 7 ไอโซเลต) (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 จำนวนไอโซเลตเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากระบบทางเดินอาหารของโคพื้นเมือง ปลานิลแดงและปลานิลดำ

แหล่งที่มา	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนไอโซเลต	รหัสไอโซเลต
ตะกอนจากกระเพาะรูเมนของโคพื้นเมือง	3	7	A
ของเหลวจากกระเพาะรูเมนของโคพื้นเมือง	3	11	B
กระเพาะอาหารของปลานิลแดง	5	6	Sa
ลำไส้ส่วนต้นของปลานิลแดง	5	10	Aia
ลำไส้ส่วนปลายของปลานิลแดง	5	12	Pia
กระเพาะอาหารของปลานิลดำ	5	6	Sb
ลำไส้ส่วนต้นของปลานิลดำ	5	8	Aib
ลำไส้ส่วนปลายของปลานิลดำ	5	7	Pib
รวม		67	

3.2 เชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากข้อ 3.1 จำนวน 67 ไอโซเลต มาทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ด้วยวิธีการ Congo-red agar พบว่า มีเชื้อแบคทีเรียจำนวน 25 ไอโซเลต ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้แตกต่างทางสถิติอย่างมี

นัยสำคัญยิ่งกับชุดควบคุม โดยมีแบคทีเรีย 16 ไอโซเลต ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดี คือ แบคทีเรียจากกระเพาะรูเมนของโคพื้นเมือง 8 ไอโซเลต (ตะกอนจากกระเพาะรูเมนของโคพื้นเมือง มี 3 ไอโซเลต ของเหลวจากกระเพาะรูเมนของโคพื้นเมือง มี 5 ไอโซเลต) และปลานิล 8 ไอโซเลต (กระเพาะของปลานิลแดง 2 ไอโซเลต ลำไส้ส่วนต้นของปลานิลแดง 2 ไอโซเลต ลำไส้ส่วนปลายของปลานิลแดง 2 ไอโซเลต และลำไส้ส่วนปลายของปลานิลดำ 2 ไอโซเลต โดยไอโซเลต A3 (แยกได้จากตะกอนจากกระเพาะรูเมนของโค) ให้ค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสมากที่สุด รองลงมาคือไอโซเลต B2 และ B9 (แยกได้จากของเหลวจากกระเพาะรูเมนของโค) โดยให้ค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสเท่ากับ 1.83, 1.76 และ 1.76 เซนติเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 6)

3.3 ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียในการย่อยสลายวัตถุดิบที่มีคาร์โบไฮเดรตและมีเยื่อใยสูง

เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากข้อ 3.2 จำนวน 16 ไอโซเลต มาทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส โดยเลี้ยงในอาหารเหลว NB ที่ผสมกับวัตถุดิบพืชทั้ง 5 ชนิด ผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียทั้ง 16 ไอโซเลต สามารถผลิตเอนไซม์ได้ดี โดยมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับชุดควบคุม (น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ) โดยแบคทีเรียไอโซเลต B9, 2Aia, A3, B3 และ Pia-4 มีแนวโน้มในการย่อยสลายวัตถุดิบทั้ง 5 ชนิดได้ดี (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 6 ความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากระบบทางเดินอาหารของโคพื้นเมือง ปลานิลแดง และปลานิลดำ

ไอโซเลตเชื้อแบคทีเรีย	ความกว้างของ Clear zone (ซม.)
1. A2	1.40 ± 0.10 [a-f]
2. A3	1.83 ± 0.05 [a]
3. A5	1.06 ± 0.49 [def]
4. A6	1.26 ± 0.23 [a-f]
5. A7	1.23 ± 0.05 [b-f]
6. B2	1.76 ± 0.20 [ab]
7. B3	1.56 ± 0.28 [a-e]
8. B4	1.73 ± 0.11 [abc]
9. B5	1.60 ± 0.10 [a-d]
10. B6	1.53 ± 0.05 [a-e]
11. B7	1.33 ± 0.15 [a-f]
12. B8	0.86 ± 0.75 [f]
13. B9	1.76 ± 0.15 [ab]
14. B10	1.10 ± 0.10 [def]
15. B11	1.16 ± 0.15 [c-f]
16. 4Sa	1.33 ± 0.11 [a-f]
17. 5Sa	1.00 ± 0.26 [ef]
18. 2Aia	1.50 ± 0.20 [a-e]
19. 4Aia	1.10 ± 0.10 [def]
20. Pia-1	1.10 ± 0.10 [def]
21. Pia-3	1.06 ± 0.15 [def]
22. Pia-4	1.40 ± 0.10 [a-f]
23. 3Aia	1.63 ± 0.05 [a-d]
24. 2Pib-2	1.33 ± 0.05 [a-f]
25. 3Pib-1	1.50 ± 0.26 [a-e]
26. control	0 [g]

** แตกต่างทางสถิติที่ $p<0.01$ อักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติจากการตรวจสอบโดย DMRT

ตารางที่ 7 ความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อแบคทีเรีย ที่แยกได้จากของระบบทางเดินอาหารโคพื้นเมือง ปลานิลแดง และปลานิลดำในการเลี้ยงด้วยวัตถุดิบพืช 5 ชนิด

ไอโซเลตเชื้อ	ความกว้างของ Clear zone (ซม.)				
	รำข้าว	กากเนื้อในเมล็ดปาล์มบด	มันสำปะหลังบด	กากถั่วเหลือง	รำสาลี
1. A3	2.30 ± 0.00 ^{bc}	2.60 ± 0.14 ^{abc}	2.45 ± 0.07 ^{ab}	2.75 ± 0.35 ^{a}	2.65 ± 0.21 ^{a}
2. A2	2.30 ± 0.00 ^{bc}	2.90 ± 0.14 ^{a}	1.90 ± 0.14 ^{cde}	1.95 ± 0.07 ^{abc}	2.30 ± 0.00 ^{abc}
3. B2	2.85 ± 0.07 ^{a}	2.85 ± 0.07 ^{a}	2.50 ± 0.14 ^{ab}	2.30 ± 0.14 ^{ab}	2.25 ± 0.07 $^{a-d}$
4. B3	2.20 ± 0.00 ^{bc}	2.75 ± 0.07 ^{ab}	2.20 ± 0.14 ^{abc}	2.40 ± 0.14 ^{ab}	2.35 ± 0.07 ^{abc}
5. B4	2.00 ± 0.00 ^{cd}	2.50 ± 0.28 ^{abc}	1.65 ± 0.21 ^{ef}	2.10 ± 0.28 ^{ab}	2.50 ± 0.00 ^{a}
6. B5	1.50 ± 0.28 ^{efg}	2.15 ± 0.07 $^{a-d}$	1.50 ± 0.00 ^{ef}	2.05 ± 0.64 ^{abc}	2.00 ± 0.14 $^{b-e}$
7. B6	1.80 ± 0.14 ^{def}	2.50 ± 0.00 ^{abc}	1.65 ± 0.21 ^{ef}	1.55 ± 0.35 ^{bc}	2.00 ± 0.14 $^{b-e}$
8. B9	2.50 ± 0.00 ^{b}	3.00 ± 0.42 ^{a}	2.35 ± 0.21 ^{ab}	2.65 ± 0.07 ^{a}	2.50 ± 0.28 ^{a}
9. 5Sa	1.85 ± 0.07 ^{de}	2.45 ± 0.21 ^{abc}	2.65 ± 0.07 ^{a}	2.70 ± 0.00 ^{a}	2.25 ± 0.07 $^{a-d}$
10. Pia-3	1.30 ± 0.00 ^{g}	1.80 ± 0.57 ^{bcd}	1.45 ± 0.21 ^{ef}	1.60 ± 0.14 ^{bc}	1.85 ± 0.21 ^{def}
11. 2Pib-2	1.55 ± 0.07 ^{efg}	1.65 ± 0.07 ^{cd}	1.40 ± 0.14 ^{f}	1.15 ± 0.07 ^{c}	1.55 ± 0.07 ^{fg}
12. 4Aia	1.89 ± 0.14 ^{def}	1.25 ± 0.07 ^{d}	2.10 ± 0.14 ^{bcd}	2.10 ± 0.57 ^{ab}	1.70 ± 0.00 ^{efg}
13. Pia-4	2.20 ± 0.14 ^{bc}	2.55 ± 0.07 ^{abc}	2.65 ± 0.07 ^{a}	2.10 ± 0.42 ^{ab}	2.40 ± 0.14 ^{ab}
14. 4Sa	1.65 ± 0.07 ^{efg}	1.70 ± 0.00 ^{cd}	1.30 ± 0.00 ^{f}	1.55 ± 0.07 ^{bc}	1.40 ± 0.14 ^{g}
15. 3Pib-1	1.45 ± 0.21 ^{fg}	2.10 ± 0.14 $^{a-d}$	1.70 ± 0.00 ^{def}	1.65 ± 0.07 ^{bc}	1.95 ± 0.21 $^{c-f}$
16. 2Aia	2.85 ± 0.07 ^{a}	2.60 ± 0.85 ^{abc}	2.65 ± 0.21 ^{a}	2.35 ± 0.07 ^{ab}	2.45 ± 0.07 ^{a}
17. control	0 ^{h}	0 ^{e}	0 ^{g}	0 ^{d}	0 ^{h}
F-test	**	**	**	**	**
C.V. (%)	5.88	13.22	7.48	13.40	6.83

** แตกต่างทางสถิติที่ $p< 0.01$ อักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติจากการตรวจสอบโดย DMRT

3.4 องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบพืช

องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบพืช ได้แก่ วัตถุแห้ง อินทรียวัตถุ โปรตีน ไขมัน เถ้า เยื่อใย ผนังเซลล์ ลิกโนเซลลูโลส ลิกนิน เฮมิเซลลูโลส และเซลลูโลส ของรำสาลี มันสำปะหลังบด รำข้าว กากถั่วเหลือง กากเนื้อในเมล็ดปาล์มบด ดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 องค์ประกอบทางเคมี (เปอร์เซ็นต์บนฐานวัตถุแห้ง) ของวัตถุดิบอาหารสัตว์

องค์ประกอบทางเคมี	รำสาลี	มันสำปะหลังบด	รำข้าว	กากถั่วเหลือง	กากเนื้อในเมล็ดปาล์มบด
วัตถุแห้ง	95.87	91.10	92.25	93.81	95.25
อินทรียวัตถุ	91.49	88.98	80.86	87.53	90.67
โปรตีนรวม	17.23	2.69	21.20	51.63	17.80
ไขมันรวม	3.54	0.33	1.38	0.77	10.50
เถ้า	4.75	2.21	12.51	6.69	4.81
เยื่อใยรวม	8.02	1.92	9.86	6.49	9.95
ผนังเซลล์	38.78	12.09	44.74	16.9	64.47
ลิกโนเซลลูโลส	10.83	3.23	15.04	9.22	36.60
ลิกนิน	2.79	0.58	6.60	1.23	7.96
เฮมิเซลลูโลส[1/]	27.94	8.86	29.71	7.68	27.87
เซลลูโลส[2/]	8.05	2.66	8.44	7.99	28.64

[1/]เฮมิเซลลูโลส = ผนังเซลล์-ลิกโนเซลลูโลส

[2/]เซลลูโลส = ลิกโนเซลลูโลส-ลิกนิน

3.5 กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้

เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากข้อ 3.3 จำนวน 6 ไอโซเลต ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูง โดยเลี้ยงในอาหารเหลว NB วัตถุดิบพืชทั้ง 5 ชนิด อาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสม CMC และ อาหารปลา พบว่า แบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลต สามารถผลิตเอนไซม์ได้ดี โดยแบคทีเรียไอโซเลต A3 และ B3 เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อผสม CMC มีจำนวนกิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุด เท่ากับ 0.4090 ยูนิตต่อมิลลิลิตร แบคทีเรียไอโซเลต B3 เลี้ยงในรำข้าว มีกิจกรรมเอนไซม์ต่ำที่สุด เท่ากับ 0.0560 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 9 กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อแบคทีเรีย ที่แยกได้จากระบบทางเดินอาหารของโคพื้นเมือง ปลานิลแดง และปลานิลดำ ในอาหารแต่ละชนิด

ไอโซเลตเชื้อแบคทีเรีย	กิจกรรมเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)							
	อาหารเหลว	รำข้าว	กากปาล์ม	มันสำปะหลังบด	กากถั่วเหลือง	รำสาลี	อาหารเลี้ยงเชื้อ+CMC[1]	อาหารปลา
A3	0.3665	0.0785	0.3550	0.1295	0.0970	0.1100	0.4090	0.3215
B2	0.4430	0.1680	0.3215	0.1100	0.1165	0.1295	0.2280	0.2945
B3	0.3445	0.0560	0.3010	0.1425	0.0970	0.1295	0.4090	0.2745
B9	0.3775	0.0785	0.3480	0.1295	0.1230	0.1425	0.3685	0.3010
2Aia	0.2675	0.0675	0.3010	0.1035	0.1620	0.1035	0.0905	0.0670
Pia-4	0.1900	0.1570	0.2880	0.1620	0.1100	0.1620	0.4025	0.3685

[1]CMC= Carboxy methyl cellulose

3.6 ชนิดของแบคทีเรีย *Bacillus* sp.

นำเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.5 มาจำแนกชนิดของเชื้อ โดยการตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสและนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลทางพันธุกรรม NCBI ปรากฏผลดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10 การจำแนกชนิดของแบคทีเรีย *Bacillus* sp.

ไอโซเลท	Species	% Homology
A3	*Bacillus subtilis*	100 (*Bacillus subtilis* strain WF1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence)
B2	*Bacillus amyloliquefaciens*	100 (*Bacillus amyloliquefaciens* strain KOPRI 25811 16S ribosomal RNA gene, partial sequence)
B3	*Bacillus amyloliquefaciens*	100 (*Bacillus subtilis* strain WF1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence)
B9	*Bacillus subtilis*	100 (*Bacillus subtilis* strain WF1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence)
2Aia	*Bacillus subtilis*	100 (*Bacillus subtilis* strain CJ2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence)
Pia-4	*Bacillus subtilis*	100 (*Bacillus subtilis* strain WF1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence)

การทดลองที่ 2: การประยุกต์ใช้แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในการผลิตอาหารสำหรับปลากะพงขาว

3.7 องค์ประกอบทางเคมีในอาหารทดลอง

อาหารทดลองที่มีแหล่งคาร์โบไฮเดรต 5 ชนิด ได้แก่ แป้งสาลี กากเนื้อในเมล็ดปาล์มบด มันสำปะหลังบด รำข้าว และกากเอทานอลข้าวโพด และมีการเสริมเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต A3 3 ระดับ คือ 0, 10^4 และ 10^7 CFU/g พบว่า มีความชื้นอยู่ในช่วง 5.26±0.48-6.95±1.02 เปอร์เซ็นต์ โปรตีน 31.51±0.16-33.46±0.19 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 11.84±0.11-14.46±0.18 เปอร์เซ็นต์ เถ้า 12.64±0.20-16.01±0.07 เปอร์เซ็นต์ และ เยื่อใย 2.34±0.21-21.71±1.62 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 11)

ตารางที่ 11 องค์ประกอบทางเคมีในอาหารทดลอง

อาหารทดลอง (ระดับเชื้อ CFU/g)	องค์ประกอบทางโภชนาการ (เปอร์เซ็นต์)				
	ความชื้น	โปรตีน	ไขมัน	เถ้า	เยื่อใย
แป้งสาลี (0)	5.82±0.01	33.40±0.16	11.84±0.11	13.89±0.49	4.90±0.29
แป้งสาลี (10^4)	6.34±0.27	33.63±0.05	12.69±1.25	12.84±0.60	5.19±0.42
แป้งสาลี (10^7)	6.40±0.22	33.46±0.19	13.74±0.23	12.64±0.20	5.79±0.84
กากเนื้อในเมล็ดปาล์มบด (0)	5.26±0.48	32.21±0.12	13.30±0.12	13.30±0.20	18.04±0.37
กากเนื้อในเมล็ดปาล์มบด (10^4)	5.50±0.43	31.62±0.20	14.18±0.07	13.91±0.39	21.71±1.62
กากเนื้อในเมล็ดปาล์มบด (10^7)	5.66±0.02	31.88±0.19	14.46±0.18	14.88±0.37	19.38±0.31
มันสำปะหลังบด (0)	5.49±0.51	31.67±0.01	12.75±0.04	13.71±0.56	2.40±0.28
มันสำปะหลังบด (10^4)	6.08±0.74	31.51±0.16	12.98±0.31	13.30±0.14	2.79±0.14
มันสำปะหลังบด (10^7)	5.65±0.06	32.40±0.17	12.57±0.29	13.89±0.04	2.34±0.21
รำข้าว (0)	6.37±0.20	32.28±0.28	13.48±0.25	16.01±0.07	9.24±0.09
รำข้าว (10^4)	6.45±0.25	32.28±0.19	13.83±0.07	15.37±0.67	10.14±0.20
รำข้าว (10^7)	6.60±0.03	32.43±0.25	13.52±0.07	14.65±0.25	9.33±0.06
กากเอทานอลข้าวโพด (0)	6.46±0.76	32.16±0.03	13.22±0.33	14.73±0.10	11.89±0.28
กากเอทานอลข้าวโพด (10^4)	6.95±1.02	32.47±0.14	12.47±0.27	14.24±0.26	12.57±0.56
กากเอทานอลข้าวโพด (10^7)	6.62±0.03	32.40±0.19	13.22±0.33	14.40±0.30	12.67±0.29

3.8 อัตราการเจริญเติบโตและอัตราการรอดตายของปลากะพงขาว

ปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่มีแหล่งคาร์โบไฮเดรตแตกต่างกัน 5 ชนิด คือ แป้งสาลี กากเนื้อในเมล็ดปาล์มบด มันสำปะหลังบด รำข้าว และกากเอทานอลข้าวโพด และมีการเสริมเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต A3 3 ระดับ คือ 0, 10^4 และ 10^7 CFU/g เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า แหล่งของคาร์โบไฮเดรตและระดับของเชื้อแบคทีเรียไม่มีอิทธิพลร่วมต่อการเจริญเติบโตและอัตราการรอดตายของปลา แต่แหล่งของคาร์โบไฮเดรต มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตและอัตราการรอดตาย โดยปลาที่ได้รับอาหารที่มีส่วนประกอบแป้งสาลี มีน้ำหนักเฉลี่ยสุดท้าย น้ำหนักที่เพิ่ม เปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เพิ่ม อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ และอัตราการรอดตายสูงที่สุดเท่ากับ 32.57±3.95 กรัม 31.39±3.95 กรัม/ตัว 2661.08±348.24, 5.91±0.21 เปอร์เซ็นต์/วัน และ 97.62±5.05 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งมีความใกล้เคียงกับปลาที่ได้รับอาหารที่มีส่วนประกอบของกากเอทานอลข้าวโพด และมันสำปะหลังบด แต่มีค่าสูงกว่า ปลาที่ได้รับอาหารที่มีส่วนประกอบของกากเนื้อในเมล็ดปาล์มบด และรำข้าว อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดยเฉพาะปลาที่ได้รับอาหารที่มีกากเนื้อในเมล็ดปาล์มบดมีน้ำหนักเฉลี่ยสุดท้าย น้ำหนักที่เพิ่ม เปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เพิ่ม อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะต่ำที่สุด เท่ากับ 26.02±2.16 กรัม 24.84±2.16 กรัม 2103.60±260.28 และ 5.52±0.15 เปอร์เซ็นต์/วัน ตามลำดับ และปลาที่ได้รับอาหารไม่เสริมเชื้อแบคทีเรีย มีน้ำหนักเฉลี่ยสุดท้าย เปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เพิ่ม และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงที่สุด เท่ากับ 31.33±4.73 กรัม 2559.58±413.60 เปอร์เซ็นต์ และ 5.84±0.28 เปอร์เซ็นต์/วัน ซึ่งแตกต่างจากปลาที่ได้รับอาหารที่เสริมเชื้อแบคทีเรียทั้งสองระดับอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) ส่วนปลาที่ได้รับอาหารที่ประกอบด้วยรำข้าว มีอัตราการรอดตายต่ำที่สุด เท่ากับ 80.16±9.96 เปอร์เซ็นต์ แต่ระดับของการเสริมเชื้อแบคทีเรียไม่มีผลต่ออัตราการรอดตาย (ตารางที่ 12)

ตารางที่ 12 น้ำหนักเฉลี่ยสุดท้าย น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น เปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะและอัตราการรอดตายของปลากะพงขาว ที่ได้รับอาหารที่ประกอบด้วยแหล่งคาร์โบไฮเดรต 5 ชนิด ที่เสริมเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต A3 ในระดับต่างๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์[1]

แหล่งของคาร์โบไฮเดรต	ระดับเชื้อ (CFU/g)	น้ำหนักเฉลี่ยสุดท้าย (กรัม/ตัว)	น้ำหนักที่เพิ่ม (กรัม/ตัว)	เปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เพิ่ม[2]	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ[3] (เปอร์เซ็นต์/วัน)	อัตราการรอดตาย[4] (เปอร์เซ็นต์)
แป้งสาลี	0	37.29±2.37	36.12±2.39	3071.75±243.28	6.17±0.13	100.00±0.00
	10^4	29.22±0.43	28.04±0.43	2376.55±36.22	5.73±0.03	100.00±0.00
	10^7	31.18±1.84	29.99±1.84	2534.93±162.18	5.84±0.11	92.86±7.14
กากเนื้อในเมล็ดปาล์มบด	0	26.22±2.75	25.04±2.76	2123.46±252.21	5.53±0.20	88.10±4.12
	10^4	26.30±2.29	25.12±2.29	2128.41±180.10	5.54±0.14	78.57±12.37
	10^7	25.55±2.30	24.37±2.30	2058.92±190.91	5.48±0.16	88.10±10.91
มันสำปะหลังบด	0	33.58±2.36	32.40±2.36	2753.68±196.41	5.98±0.12	97.62±4.12
	10^4	26.96±3.94	25.78±3.93	2183.64±317.41	5.53±0.09	90.48±10.91
	10^7	26.17±1.32	24.99±1.32	2111.70±107.34	3.26±0.05	92.86±7.14
รำข้าว	0	29.55±3.15	28.37±3.16	2405.87±288.55	5.74±0.21	83.33±14.87
	10^4	29.74±4.63	28.56±4.62	2417.97±371.01	5.75±0.26	73.81±4.12
	10^7	25.25±3.04	24.07±3.03	2038.63±245.06	5.46±0.21	83.33±8.25
กากเอทานอลข้าวโพด	0	29.98±4.49	28.80±4.50	2443.13±402.15	5.76±0.27	90.48±4.12
	10^4	29.02±3.14	27.84±3.14	2351.63±253.99	5.71±0.18	88.10±10.91
	10^7	29.61±2.91	28.43±2.90	2408.05±225.01	5.50±0.30	85.71±7.14

ตารางที่ 12 (ต่อ)

แหล่งของคาร์โบไฮเดรต	น้ำหนักเฉลี่ยสุดท้าย (กรัม/ตัว)	น้ำหนักที่เพิ่ม (กรัม/ตัว)	เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักที่เพิ่ม	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (เปอร์เซ็นต์/วัน)	อัตราการรอดตาย (เปอร์เซ็นต์)
ANOVA					
Probability level					
แหล่งของคาร์โบไฮเดรต	0.001	0.001	0.001	0.002	0.010
ระดับเชื้อ	0.003	0.003	0.002	0.005	0.180
แหล่งของคาร์โบไฮเดรต x ระดับเชื้อ	0.111	0.111	0.153	0.153	0.764
แหล่งของคาร์โบไฮเดรต					
แป้งสาลี	32.57±3.95^{a}	31.39±3.95^{a}	2661.08±348.24^{a}	5.91±0.21^{a}	97.62±5.05^{a}
กากเนื้อในเมล็ดปาล์มบด	26.02±2.16^{b}	24.84±2.16^{b}	2103.60±185.07^{b}	5.52±0.15^{b}	84.92±9.74^{bc}
มันสำปะหลังบด	28.91±4.27^{ab}	27.73±4.26^{ab}	2349.67±361.24^{ab}	5.70±0.26^{ab}	93.65±7.53^{ab}
รำข้าว	28.18±3.87^{b}	27.00±3.87^{b}	2287.49±324.20^{b}	5.65±0.24^{b}	80.16±9.96^{c}
กากเอทานอลข้าวโพด	29.54±3.13^{ab}	28.36±3.13^{ab}	2400.94±266.11^{ab}	5.74±0.19^{ab}	88.09±7.14^{abc}
ระดับเชื้อ					
0	31.33±4.73^{A}	30.15±4.73^{A}	2559.58±413.60^{A}	5.84±0.28^{A}	91.90±8.90
10^{4}	28.25±0.01^{B}	27.07±3.07^{B}	2291.64±249.08^{B}	5.66±0.18^{B}	86.19±12.21
10^{7}	27.55±0.01^{B}	26.37±3.18^{B}	2230.45±265.06^{B}	5.61±0.20^{B}	88.57±8.01

น้ำหนักเริ่มต้นเฉลี่ย เท่ากับ 1.16 -1.18 กรัม/ตัว

[1]ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยค่าเฉลี่ยในสดมภ์เดียวกันที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (p>0.05)

[2]เปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น = [(น้ำหนักปลาสิ้นสุดการทดลอง (กรัม/ตัว) - น้ำหนักปลาเริ่มต้นการทดลอง (กรัม/ตัว))/น้ำหนักปลาเริ่มต้นการทดลอง (กรัม/ตัว)] × 100

[3]อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ = [(lnน้ำหนักปลาสิ้นสุดการทดลอง (กรัม/ตัว) – lnน้ำหนักปลาเริ่มต้นการทดลอง (กรัม/ตัว)/ระยะเวลา (วัน)] × 100

[4]อัตราการรอดตาย = [จำนวนปลาที่เหลือ (ตัว) / จำนวนปลาเริ่มต้น (ตัว)] × 100

3.9 ปริมาณการกินอาหาร อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ ประสิทธิภาพการใช้อาหาร

อิทธิพลร่วมระหว่างแหล่งของคาร์โบไฮเดรตและระดับของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต A3 มีผลต่อปริมาณการกินอาหารของปลา ($p<0.05$) โดยปลาที่ได้รับอาหารที่มีส่วนประกอบของมันสำปะหลังบดไม่เสริมเชื้อแบคทีเรีย มีปริมาณการกินอาหารสูงสุด เท่ากับ 45.77±2.20 กรัม ซึ่งใกล้เคียงกับปลาที่ได้รับอาหารที่มีคาร์โบไฮเดรตแหล่งอื่นๆ ที่ไม่เสริมเชื้อแบคทีเรีย กากเนื้อในเมล็ดปาล์มบด และรำข้าว เสริมเชื้อแบคทีเรีย 10^4 CFU/g แต่สูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารที่มีส่วนประกอบของแป้งสาลี มันสำปะหลังบด และกากเอทานอลข้าวโพดเสริมเชื้อแบคทีเรีย 10^4 CFU/g รวมถึงปลาที่ได้รับอาหารเสริมเชื้อแบคทีเรีย 10^7 CFU/g ทั้งหมด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ซึ่งปลาที่ได้รับอาหารที่มีส่วนประกอบของรำข้าวเสริมเชื้อแบคทีเรีย 10^7 CFU/g มีปริมาณการกินอาหารต่ำที่สุด เท่ากับ 31.94±0.91 กรัม (ตารางที่ 13)

อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ พบว่า ปลาที่ได้รับอาหารที่มีส่วนประกอบของแป้งสาลีมีอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อดีที่สุด เท่ากับ 1.19±0.55 ใกล้เคียงกับปลาที่ได้รับอาหารที่มีส่วนประกอบของกากเอทานอลข้าวโพด และดีกว่าปลาที่ได้รับอาหารที่ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรตแหล่งอื่น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ส่วนระดับของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต A3 พบว่า ปลาที่ได้รับอาหารเสริมเชื้อแบคทีเรีย มีอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อดีกว่าปลาที่ได้รับอาหารไม่เสริมเชื้อแบคทีเรีย อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ประสิทธิภาพการใช้อาหาร พบว่า แหล่งของคาร์โบไฮเดรตมีผลต่อประสิทธิภาพการใช้อาหาร โดยปลาที่ได้รับอาหารที่มีส่วนประกอบของแป้งสาลีมีประสิทธิภาพการใช้อาหารสูงที่สุด เท่ากับ 0.84±0.04 ไม่แตกต่างกับปลาที่ได้รับอาหารที่มีส่วนประกอบของกากเอทานอลข้าวโพด แต่มีค่าสูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารที่มีกากเนื้อในเมล็ดปาล์มบด มันสำปะหลังบด และรำข้าวอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) สำหรับปลาที่ได้รับอาหารเสริมเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต A3 มีแนวโน้มสูงขึ้นตามระดับการเสริมเชื้อในปริมาณที่สูงขึ้น ซึ่งปลาที่ได้รับอาหารเสริมเชื้อแบคทีเรีย 10^7 CFU/g มีประสิทธิภาพการใช้อาหารสูงกว่า ปลาที่ได้รับอาหารไม่เสริมเชื้อแบคทีเรีย อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) (ตารางที่ 13)

จากผลการศึกษาในส่วนของอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ และประสิทธิภาพการใช้อาหาร เมื่อนำผลการศึกษาที่ได้มาพิจารณา พบว่า อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ มีแนวโน้มลดลงเมื่อมีการเสริมเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต A3 รวมถึงประสิทธิภาพการใช้อาหารของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่มีการเสริมเชื้อแบคทีเรียมีแนวโน้มสูงกว่าการที่ไม่เสริมเชื้อแบคทีเรียด้วย ดังนั้น หากปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่เสริมเชื้อแบคทีเรีย ได้รับอาหารเพิ่มขึ้นในปริมาณที่เท่ากับชุดการทดลองที่ไม่เสริมเชื้อแบคทีเรีย จะทำให้น้ำหนักที่เพิ่มของปลากะพงขาวเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (ภาพที่ 2) อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อมีค่าลดลง และประสิทธิภาพการใช้อาหารที่มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ตามระดับการเสริมเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งจะส่งผลให้อัตราการเจริญเติบโตของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่มีการเสริมเชื้อแบคทีเรียเพิ่มขึ้นด้วย

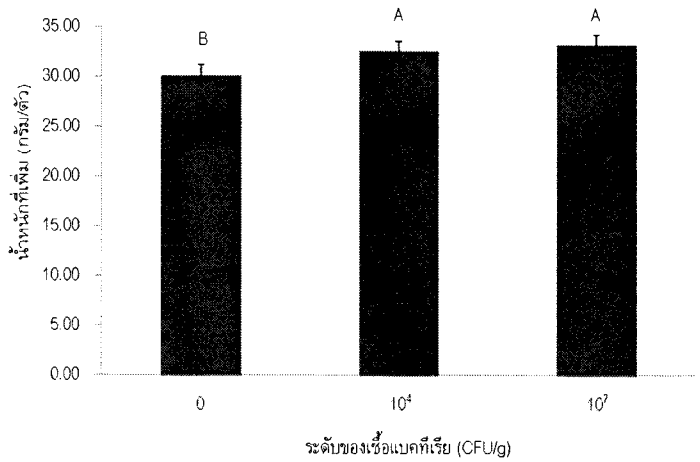
ตารางที่ 13 น้ำหนักอาหารที่ปลากิน อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ และประสิทธิภาพการใช้อาหาร ของปลากะพงขาว ที่ได้รับอาหารที่ประกอบด้วยแหล่งคาร์โบไฮเดรต 5 ชนิด ที่เสริมเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต A3 ระดับต่างๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ [1]

แหล่งของคาร์โบไฮเดรต	ระดับเชื้อ (CFU/g)	น้ำหนักอาหารที่ปลากิน (กรัม/ตัว)	อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ[2]	ประสิทธิภาพการใช้อาหาร[3]
แป้งสาลี	0	44.87±3.22^{a}	1.24±0.01	0.81±0.01
	10^4	32.68±0.42^{d}	1.17±0.01	0.86±0.01
	10^7	34.53±1.25^{cd}	1.15±0.07	0.87±0.05
กากเนื้อในเมล็ดปาล์มบด	0	42.97±3.58^{ab}	1.72±0.06	0.58±0.02
	10^4	38.72±2.21^{a-d}	1.55±0.12	0.65±0.05
	10^7	35.59±3.35^{bcd}	1.46±0.06	0.68±0.03
มันสำปะหลังบด	0	45.77±2.20^{a}	1.41±0.05	0.71±0.03
	10^4	34.91±3.84^{bcd}	1.36±0.06	0.74±0.03
	10^7	33.72±1.42^{d}	1.35±0.03	0.74±0.02
รำข้าว	0	42.48±3.52^{abc}	1.50±0.08	0.67±0.04
	10^4	39.25±1.93^{a-d}	1.39±0.18	0.73±0.10
	10^7	31.94±0.91^{d}	1.34±0.14	0.75±0.07
กากเอทานอลข้าวโพด	0	39.33±4.15^{a-d}	1.37±0.07	0.73±0.04
	10^4	34.24±3.06^{d}	1.23±0.08	0.81±0.05
	10^7	35.19±2.30^{bcd}	1.24±0.08	0.81±0.05
ANOVA				
Probability level				
แหล่งของคาร์โบไฮเดรต		0.284	< 0.001	< 0.001
ระดับเชื้อ		< 0.001	< 0.001	< 0.001
แหล่งของคาร์โบไฮเดรต x ระดับเชื้อ		0.023	0.742	0.946
แหล่งคาร์โบไฮเดรต				
แป้งสาลี		37.36±5.94	1.19±0.55^{d}	0.84±0.04^{a}
กากเนื้อในเมล็ดปาล์มบด		39.09±4.18	1.58±0.14^{a}	0.64±0.05^{d}
มันสำปะหลังบด		38.13±6.20	1.38±0.05^{bc}	0.73±0.03^{bc}
รำข้าว		37.89±5.11	1.41±0.14^{b}	0.72±0.07^{c}
กากเอทานอลข้าวโพด		36.25±3.67	1.28±0.09^{cd}	0.78±0.06^{ab}
ระดับเชื้อ				
0		43.08±3.68	1.45±0.17^{A}	0.70±0.08^{B}
10^4		35.96±3.44	1.34±0.16^{B}	0.76±0.09^{A}
10^7		34.19±2.19	1.31±0.13^{B}	0.77±0.08^{A}

[1]ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยค่าเฉลี่ยในสดมภ์เดียวกันที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (p>0.05)

[2]อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ = น้ำหนักอาหารที่ปลากิน (กรัม/ตัว) / น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (กรัม/ตัว)

[3]ประสิทธิภาพการใช้อาหาร =น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น (กรัม/ตัว) น้ำหนักอาหารที่ปลากินตลอดการทดลอง (กรัม/ตัว)



ภาพที่ 2 น้ำหนักที่เพิ่ม ของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่เสริมเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต A3 ระดับต่างๆ เมื่อคำนวณปริมาณการกินอาหารที่เพิ่มขึ้นเท่ากับชุดควบคุมที่ไม่เสริมเชื้อแบคทีเรีย

3.10 องค์ประกอบทางเคมีในปลากะพงขาว

ปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่มีแหล่งคาร์โบไฮเดรตแตกต่างกัน 5 ชนิด และมีการเสริมเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต A3 3 ระดับ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ มีองค์ประกอบของโปรตีน ไขมัน และเถ้า สูงกว่าปลาเริ่มต้นการทดลอง โดยองค์ประกอบของความชื้นในปลาเริ่มต้นการทดลองมีค่ามากกว่าในตัวปลาสิ้นสุดการทดลอง

องค์ประกอบของความชื้น พบว่า แหล่งของคาร์โบไฮเดรต มีผลต่อองค์ประกอบของความชื้น โดยปลาที่ได้รับอาหารที่มีส่วนประกอบของกากเนื้อในเมล็ดปาล์มบด มีค่าองค์ประกอบของความชื้นสูงที่สุด เท่ากับ 73.12±0.56 เปอร์เซ็นต์ ใกล้เคียงกับแป้งสาลี มันสำปะหลังบด และรำข้าว ซึ่งมีความชื้นสูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารที่มีส่วนประกอบของกากเอทานอลข้าวโพด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

องค์ประกอบของโปรตีน พบว่า มีผลของอิทธิพลร่วมระหว่างแหล่งของคาร์โบไฮเดรตและระดับของการเสริมเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต A3 (p<0.05) โดยปลาที่ได้รับอาหารที่มีส่วนประกอบของกากเอทานอลข้าวโพด ที่เสริมเชื้อแบคทีเรีย 10^4 CFU/g มีโปรตีนสูงที่สุด เท่ากับ 16.93±0.11 เปอร์เซ็นต์ ใกล้เคียงกับปลาที่ได้รับอาหารที่มีส่วนประกอบของแป้งสาลีไม่เสริมเชื้อและเสริมเชื้อแบคทีเรีย 10^4 CFU/g, รำข้าวไม่เสริมเชื้อและเสริมเชื้อแบคทีเรีย 10^7 CFU/g และกากเอทานอลข้าวโพดเสริมเชื้อแบคทีเรีย 10^7 CFU/g (p>0.05) ส่วนปลาที่ได้รับอาหารมีมีส่วนประกอบของมันสำปะหลังบดเสริมเชื้อแบคทีเรีย 10^4 CFU/g มีค่าโปรตีนต่ำที่สุด เท่ากับ 15.39±0.23 เปอร์เซ็นต์

สำหรับองค์ประกอบของไขมัน พบว่า แหล่งของคาร์โบไฮเดรต มีผลต่อองค์ประกอบของไขมัน โดยปลาที่ได้รับอาหารที่มีส่วนประกอบของกากเอทานอลข้าวโพด มี

ระดับไขมันสูงที่สุด เท่ากับ 20.12±1.78 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งใกล้เคียงกับปลาได้รับอาหารที่มีส่วนประกอบของรำข้าว และมีค่าสูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารที่มีส่วนประกอบของแป้งสาลี กากเนื้อในเมล็ดปาล์มบด และมันสำปะหลังบด โดยเฉพาะอย่างยิ่งปลาที่ได้รับอาหารที่มีส่วนประกอบของมันสำปะหลังมีค่าไขมันต่ำที่สุด เท่ากับ 15.55±1.33 เปอร์เซ็นต์

องค์ประกอบของเถ้า พบว่า แหล่งของคาร์โบไฮเดรต มีผลต่อองค์ประกอบของเถ้า โดยปลาที่ได้รับอาหารที่มีส่วนประกอบของกากเอทานอลข้าวโพด มีองค์ประกอบของเถ้าสูงกว่าแหล่งของคาร์โบไฮเดรตอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เท่ากับ 16.25±0.97 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 14)

ตารางที่ 14 องค์ประกอบทางเคมีในตัวปลาเริ่มต้น และสิ้นสุดการทดลองของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่ประกอบด้วยแหล่งคาร์โบไฮเดรต 5 ชนิด ที่เสริมเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต A3 ระดับต่างๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์[1] (ฐานน้ำหนักสด)

แหล่งของคาร์โบไฮเดรต	ระดับเชื้อ (CFU/g)	องค์ประกอบทางเคมี (เปอร์เซ็นต์)			
		ความชื้น	โปรตีน	ไขมัน	เถ้า
เริ่มต้นการทดลอง		78.04±0.89	14.58±0.87	2.36±0.36	3.57±0.14
แป้งสาลี	0	71.88±0.97	16.65±0.04^{abc}	4.69±0.74	4.42±0.06
	10^4	71.62±1.10	16.88±0.10^{a}	5.00±0.31	4.31±0.08
	10^7	73.18±0.26	15.94±0.75^{def}	4.69±0.45	4.34±0.12
กากเนื้อในเมล็ดปาล์มบด	0	72.86±0.90	16.17±0.19^{b-e}	4.68±0.45	4.37±0.36
	10^4	73.40±0.34	15.72±0.07^{ef}	4.88±0.21	4.24±0.11
	10^7	73.12±0.31	15.90±0.04^{def}	5.14±0.35	4.42±0.19
มันสำปะหลังบด	0	73.20±0.68	15.83±0.06^{def}	4.56±0.22	4.22±0.22
	10^4	73.04±0.99	15.39±0.23^{f}	4.12±0.34	4.27±0.25
	10^7	72.87±0.74	16.31±0.18^{a-e}	4.01±0.26	4.47±0.15
รำข้าว	0	72.41±0.92	16.31±0.05^{a-e}	5.14±0.03	4.13±0.14
	10^4	72.92±0.55	16.00±0.04^{c-f}	5.11±0.28	4.18±0.12
	10^7	72.26±0.59	16.48±0.04^{a-d}	5.74±0.55	4.15±0.33
กากเอทานอลข้าวโพด	0	71.52±0.66	16.21±0.14^{b-e}	5.66±0.72	4.49±0.16
	10^4	71.89±0.78	16.93±0.11^{a}	5.62±0.30	4.89±0.21
	10^7	71.87±0.66	16.79±0.04^{ab}	6.00±0.52	4.58±0.25
ANOVA					
Probability level					
แหล่งของคาร์โบไฮเดรต		0.002	< 0.001	< 0.001	< 0.001
ระดับเชื้อ		0.558	0.487	0.467	0.641
แหล่งของคาร์โบไฮเดรต x ระดับเชื้อ		0.352	< 0.001	0.338	0.299
แหล่งของคาร์โบไฮเดรต					
แป้งสาลี		72.23±1.04^{ab}	16.49±0.57	4.79±0.49^{bc}	4.36±009^{b}
กากเนื้อในเมล็ดปาล์มบด		73.12±0.56^{a}	15.93±0.22	4.90±0.37^{b}	4.35±0.22^{b}
มันสำปะหลังบด		73.04±0.72^{a}	15.84±0.43	4.23±0.35^{c}	4.32±0.21^{b}
รำข้าว		72.53±0.68^{ab}	16.26±0.21	5.33±0.43^{ab}	4.16±0.19^{b}
กากเอทานอลข้าวโพด		71.76±0.64^{b}	16.64±0.34	5.76±0.50^{a}	4.65±0.26^{a}
ระดับเชื้อ					
0		72.37±0.95	16.23±0.29	4.94±0.61	4.33±0.22
10^4		72.57±0.99	16.18±0.65	4.95±0.56	4.38±0.30
10^7		72.66±0.70	16.28±0.45	5.11±0.83	4.39±0.24

[1]ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยค่าเฉลี่ยในสดมภ์เดียวกันที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (p>0.05)

3.11 การใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน การใช้ประโยชน์จากไขมันสุทธิ และประสิทธิภาพการใช้ไขมัน

การใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ พบว่า แหล่งของคาร์โบไฮเดรตและระดับของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต A3 มีผลต่อการใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ โดยปลาที่ได้รับอาหารที่มีส่วนประกอบของแป้งสาลีมีการใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิสูงที่สุด เท่ากับ 41.28±1.77 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับปลาที่ได้รับอาหารที่มีส่วนประกอบของกากเอทานอลข้าวโพด โดยมีค่าการใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ เท่ากับ 39.81±3.80 เปอร์เซ็นต์ แต่มีความแตกต่างทางสถิติ (p<0.05) กับปลาที่ได้รับอาหารที่มีส่วนประกอบของกากเนื้อในเมล็ดปาล์มบด มันสำปะหลังบด และรำข้าว โดยเฉพาะปลาที่ได้รับอาหารที่มีส่วนประกอบของรำข้าวมีค่าการใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิต่ำที่สุด เท่ากับ 2.21±0.23 เปอร์เซ็นต์ ส่วนของระดับของเชื้อแบคทีเรีย พบว่า ปลาที่ได้รับอาหารเสริมเชื้อแบคทีเรีย 10^4 CFU/g มีการใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิสูงที่สุด เท่ากับ 37.82±4.92 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับปลาที่ได้รับอาหารเสริมเชื้อแบคทีเรีย 10^7 CFU/g แต่มีความแตกต่างทางสถิติ (p<0.05) กับปลาที่ได้รับอาหารที่ไม่เสริมเชื้อแบคทีเรีย (ตารางที่ 15)

ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน พบว่า แหล่งของคาร์โบไฮเดรตและระดับของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต A3 มีผลต่อประสิทธิภาพการใช้โปรตีน โดยปลาที่ได้รับอาหารที่มีส่วนประกอบของแป้งสาลี มีประสิทธิภาพการใช้โปรตีนสูงที่สุด เท่ากับ 2.52±0.12 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับปลาที่ได้รับอาหารที่มีส่วนประกอบของกากเอทานอลข้าวโพด แต่มีค่าสูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารที่มีส่วนประกอบของกากเนื้อในเมล็ดปาล์มบด มันสำปะหลังบด และรำข้าว โดยเฉพาะปลาที่ได้รับอาหารที่มีส่วนประกอบของกากเนื้อในเมล็ดปาล์มบด มีประสิทธิภาพการใช้โปรตีนต่ำที่สุด เท่ากับ 2.00±0.17 เปอร์เซ็นต์ ส่วนของระดับของเชื้อแบคทีเรีย พบว่า ปลาที่ได้รับอาหารเสริมเชื้อแบคทีเรีย 10^7 CFU/g มีประสิทธิภาพการใช้โปรตีนสูงที่สุด เท่ากับ 2.37±0.21 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับปลาที่ได้รับอาหารเสริมเชื้อแบคทีเรีย 10^4 CFU/g แต่แต่มีความแตกต่างทางสถิติ (p<0.05) กับปลาที่ได้รับอาหารเสริมเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งมีประสิทธิภาพการใช้โปรตีน เท่ากับ 2.15±0.21 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 15)

การใช้ประโยชน์จากไขมันสุทธิ พบว่า แหล่งของคาร์โบไฮเดรตและระดับของการเสริมเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต A3 มีอิทธิพลร่วมกัน โดยปลาที่ได้อาหารที่มีส่วนประกอบของกากเอทานอลข้าวโพดที่เสริมเชื้อแบคทีเรีย 10^7 CFU/g มีการใช้ประโยชน์จากไขมันสุทธิสูงสุด เท่ากับ 37.42±0.15 เปอร์เซ็นต์ ไม่แตกต่างทางสถิติ (p>0.05) กับปลาที่ได้อาหารที่มีส่วนประกอบของแป้งสาลีไม่เสริมเชื้อและเสริมเชื้อ10^4 CFU/g และปลาที่ได้อาหารที่มีส่วนประกอบของกากเอทานอลข้าวโพดเสริมเชื้อแบคทีเรีย 10^4 CFU/g ซึ่งมีค่าการใช้ประโยชน์จากไขมันสุทธิ เท่ากับ 32.12±0.38, 34.19±0.25 และ 36.50±2.27 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่มีความแตกต่างทางสถิติ (p<0.05) กับปลาที่ได้รับอาหารที่มีส่วนประกอบของแป้งสาลีเสริมเชื้อแบคทีเรีย 10^7 CFU/g, กากเนื้อในเมล็ดปาล์มบดเสริมเชื้อแบคทีเรียทั้งสอง

ระดับ, มันสำปะหลังบด, รำข้าวไม่เสริมเชื้อแบคทีเรียและเสริมเชื้อแบคทีเรีย 10^4 CFU/g และกากเอทานอลข้าวโพดไม่เสริมเชื้อแบคทีเรีย โดยเฉพาะปลาที่ได้รับอาหารที่มีส่วนประกอบของกากเนื้อในเมล็ดปาล์มบดเสริมเชื้อแบคทีเรียมีการใช้ประโยชน์จากไขมันสุทธิต่ำที่สุด เท่ากับ 19.69±0.61 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 15)

ประสิทธิภาพการใช้ไขมัน พบว่า แหล่งของคาร์โบไฮเดรตและระดับของการเสริมเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต A3 มีอิทธิพลร่วมกัน โดยปลาที่ได้อาหารที่มีส่วนประกอบของแป้งสาลีที่ไม่เสริมเชื้อแบคทีเรียมีประสิทธิภาพการใช้ไขมันสูงที่สุด เท่ากับ 6.80±0.08 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่าใกล้เคียง (p>0.05) กับปลาที่ได้อาหารที่มีส่วนประกอบของแป้งสาลีเสริมเชื้อแบคทีเรีย มันสำปะหลังบดเสริมเชื้อแบคทีเรีย 10^7 CFU/g และกากเอทานอลข้าวโพดที่เสริมเชื้อแบคทีเรียทั้งสองระดับ และมีความแตกต่างทางสถิติ (p<0.05) กับปลาที่ได้รับอาหารที่มีส่วนประกอบของกากเนื้อในเมล็ดปาล์มบด มันสำปะหลังบดไม่เสริมเชื้อแบคทีเรียและเสริมเชื้อแบคทีเรีย 10^4 CFU/g รำข้าว และกากเอทานอลข้าวโพดไม่เสริมเชื้อแบคทีเรีย โดยเฉพาะปลาที่ได้รับอาหารที่มีส่วนประกอบของกากเนื้อในเมล็ดปาล์มบดที่เสริมเชื้อแบคทีเรียมีประสิทธิภาพการใช้ไขมันต่ำที่สุด เท่ากับ 4.15±0.14 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 15)

ตารางที่ 15 การใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ (PPV) ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน (PER) การใช้ประโยชน์จากไขมันสุทธิ (LPV) ประสิทธิภาพการใช้ไขมัน (LER) ของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่มีแหล่งคาร์โบไฮเดรต 5 ชนิด ที่เสริมเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต A3 ระดับต่างๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์[1]

แหล่งของคาร์โบไฮเดรต	ระดับเชื้อ (CFU/g)	เปอร์เซ็นต์			
		PPV[2]	PER[3]	LPV[4]	LER[5]
แป้งสาลี	0	39.90±0.45	2.41±0.03	32.12±0.38^{a-d}	6.80±0.08^{a}
	10^4	42.79±0.32	2.55±0.02	34.19±0.25^{abc}	6.76±0.05^{a}
	10^7	41.15±2.44	2.60±0.15	30.02±1.75^{cde}	6.32±0.38^{ab}
กากเนื้อในเมล็ดปาล์มบด	0	29.38±0.98	1.83±0.06	19.69±0.61^{h}	4.15±0.14^{d}
	10^4	31.80±2.40	2.03±0.15	24.85±1.84^{e-h}	5.00±0.38^{cd}
	10^7	34.03±1.31	2.15±0.08	22.34±0.84^{gh}	4.27±0.16^{d}
มันสำปะหลังบด	0	34.94±1.32	2.22±0.08	24.96±0.92^{e-h}	5.42±0.21^{bc}
	10^4	36.51±1.63	2.39±0.11	23.26±0.98^{fgh}	5.58±0.25^{bc}
	10^7	37.71±0.94	2.32±0.06	25.08±0.61^{efg}	6.17±0.15^{ab}
รำข้าว	0	33.41±1.83	2.06±0.11	26.00±1.38^{efg}	4.99±0.27^{cd}
	10^4	35.78±4.97	2.25±0.31	27.88±3.79^{def}	5.38±0.75^{bc}
	10^7	37.60±3.71	2.31±0.23	32.33±3.10^{a-d}	5.56±0.55^{bc}
กากเอทานอลข้าวโพด	0	35.56±1.80	2.22±0.11	31.58±1.50^{bcd}	5.52±0.28^{bc}
	10^4	42.22±2.68	2.51±0.16	36.50±2.27^{ab}	6.40±0.41^{ab}
	10^7	41.66±2.54	2.50±0.23	37.42±2.15^{a}	6.16±.038^{ab}
ANOVA					
Probability level					
แหล่งของคาร์โบไฮเดรต		< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
ระดับเชื้อ		< 0.001	< 0.001	< 0.001	0.004
แหล่งของคาร์โบไฮเดรต x ระดับเชื้อ		0.481	0.915	< 0.001	0.016
แหล่งของคาร์โบไฮเดรต					
แป้งสาลี		41.28±1.77^{a}	2.52±0.12^{a}	32.11±2.02	6.63±0.30
กากเนื้อในเมล็ดปาล์มบด		31.73±2.48^{c}	2.00±0.17^{d}	22.29±2.47	4.47±0.46
มันสำปะหลังบด		36.39±1.67^{b}	2.31±0.10^{bc}	24.43±1.15	5.72±0.38
รำข้าว		35.60±3.71^{b}	2.21±0.23^{c}	28.74±3.80	5.31±0.55
กากเอทานอลข้าวโพด		39.81±3.80^{a}	2.41±0.19^{ab}	35.17±3.24	6.03±0.50
ระดับเชื้อ					
0		34.64±3.71^{B}	2.15±0.21^{B}	26.87±4.84	5.38±0.91
10^4		37.82±4.92^{A}	2.35±0.25^{A}	29.34±5.67	5.82±0.77
10^7		38.43±3.52^{A}	2.37±0.21^{A}	29.44±5.75	6.03±0.84

[1]ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยค่าเฉลี่ยในสดมภ์เดียวกันที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p>0.05$)

[2]PPV = โปรตีนของตัวปลาที่เพิ่มขึ้น (กรัม)/น้ำหนักโปรตีนที่ปลากินตลอดการทดลอง (กรัม) x 100

[3]PER = น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น (กรัม)/น้ำหนักโปรตีนที่ปลากิน (กรัม)

[4]LPV = ไขมันของตัวปลาที่เพิ่มขึ้น (กรัม)/น้ำหนักไขมันที่ปลากินตลอดการทดลอง (กรัม) x 100

[5]LER = น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น (กรัม)/น้ำหนักไขมันที่ปลากิน (กรัม)

3.12 ดัชนีไขมันในช่องท้อง และดัชนีตับ

ดัชนีไขมันในช่องท้อง และดัชนีตับ พบว่า แหล่งของคาร์โบไฮเดรตมีผลต่อค่าดัชนีไขมันในช่องท้อง และดัชนีตับ โดยปลาที่ได้รับอาหารที่มีส่วนประกอบของกากเอทานอลข้าวโพดมีดัชนีไขมันในช่องท้อง และดัชนีตับสูงที่สุด เท่ากับ 2.53±0.67 และ1.92±0.43 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ มีค่าใกล้เคียงกับปลาที่ได้รับอาหารที่มีส่วนประกอบของแป้งสาลี กากเนื้อในเมล็ดปาล์มบด และรำข้าว แต่มีความแตกต่างทางสถิติ (p<0.05) กับปลาที่ได้รับอาหารที่มีส่วนประกอบของมันสำปะหลังบด ซึ่งมีค่าดัชนีไขมันในช่องท้อง และดัชนีตับต่ำที่สุด คือ เท่ากับ 2.12±0.67 และ1.70±0.37 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 16) ส่วนระดับของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต A3 พบว่าปลาที่ได้รับอาหารที่ไม่เสริมเชื้อแบคทีเรียมีดัชนีไขมันในช่องท้องสูงที่สุด เท่ากับ 2.66±0.57 เปอร์เซ็นต์ มีค่าใกล้เคียงกับปลาที่ได้รับอาหารที่เสริมเชื้อแบคทีเรีย 10^7 CFU/g และมีความแตกต่างทางสถิติ (p<0.05) กับปลาที่ได้รับอาหารที่เสริมเชื้อแบคทีเรีย 10^4 CFU/g ในส่วนของดัชนีตับ ปลาที่ได้รับอาหารที่ไม่เสริมเชื้อแบคทีเรียมีดัชนีไขมันในช่องท้องสูงที่สุด เท่ากับ 2.01±0.46 เปอร์เซ็นต์ มีค่าใกล้เคียงกับปลาที่ได้รับอาหารที่เสริมเชื้อแบคทีเรีย 10^4 CFU/g และมีความแตกต่างทางสถิติ (p<0.05) กับปลาที่ได้รับอาหารที่เสริมเชื้อแบคทีเรีย 10^7 CFU/g (ตารางที่ 16)

ตารางที่ 16 ดัชนีไขมันในช่องท้อง และดัชนีตับในปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่มีแหล่งวัตถุดิบคาร์โบไฮเดรตแตกต่างกัน 5 ชนิด ที่เสริมเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต A3 ระดับต่างๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์[1]

แหล่งของคาร์โบไฮเดรต	ระดับเชื้อ (CFU/g)	ดัชนีไขมันในช่องท้อง[2] (เปอร์เซ็นต์)	ดัชนีตับ[3] (เปอร์เซ็นต์)
แป้งสาลี	0	2.59±0.57	1.90±0.31
	10^4	2.39±0.69	1.90±0.48
	10^7	2.38±0.68	1.71±0.19
กากเนื้อในเมล็ดปาล์มบด	0	2.73±0.71	2.04±0.76
	10^4	2.10±0.39	1.87±0.35
	10^7	2.15±0.66	1.84±0.36
มันสำปะหลังบด	0	2.29±0.57	1.97±0.45
	10^4	1.95±0.94	1.56±0.27
	10^7	2.13±0.42	1.58±0.24
รำข้าว	0	2.91±0.57	2.15±0.38
	10^4	2.63±0.48	2.18±0.46
	10^7	2.64±0.87	1.82±0.25
กากเอทานอลข้าวโพด	0	2.77±0.27	1.97±0.26
	10^4	2.06±0.84	1.84±0.67
	10^7	2.75±0.55	1.96±0.28
ANOVA			
Probability level			
แหล่งของคาร์โบไฮเดรต		0.012	0.038
ระดับเชื้อ		0.007	0.037
แหล่งของคาร์โบไฮเดรต x ระดับเชื้อ		0.737	0.638
แหล่งของคาร์โบไฮเดรต			
แป้งสาลี		2.45 ± 0.63^{ab}	1.84 ± 0.35^{ab}
กากเนื้อในเมล็ดปาล์มบด		2.33 ± 0.65^{ab}	1.92 ± 0.52^{ab}
มันสำปะหลังบด		2.12 ± 0.67^{b}	1.70 ± 0.37^{b}
รำข้าว		2.73 ± 0.65^{a}	2.05 ± 0.40^{a}
กากเอทานอลข้าวโพด		2.53 ± 0.67^{ab}	1.92 ± 0.43^{ab}
ระดับเชื้อ			
0		2.66 ± 0.57^{A}	2.01 ± 0.46^{A}
10^4		2.23 ± 0.71^{B}	1.87 ± 0.49^{AB}
10^7		2.41 ± 0.68^{AB}	1.78 ± 0.29^{B}

[1]ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยค่าเฉลี่ยในสดมภ์เดียวกันที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p>0.05$)

3.13 กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส เซลลูเลส ทริปซิน และไลเปส

กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส พบว่า ปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่แตกต่างกันเป็นเวลา 2 สัปดาห์ แหล่งของวัตถุดิบคาร์โบไฮเดรตและระดับเชื้อแบคทีเรียในอาหารทดลองไม่มีผลต่อกิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส (p>0.05) ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 1.25-1.88 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน แต่ที่เวลา 8 สัปดาห์ ปลาที่ได้รับอาหารที่มีส่วนประกอบของกากเอทานอลข้าวโพดที่เสริมเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต A3 10^7CFU/g มีค่ากิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสสูงที่สุดเท่ากับ 3.19±1.37 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน โดยแตกต่างกับปลาที่ได้รับอาหารที่มีแป้งสาลีไม่เสริมเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งมีค่าต่ำที่สุดเท่ากับ 0.77±0.59 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) (ตารางที่ 17)

กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส พบว่า แหล่งของวัตถุดิบคาร์โบไฮเดรต และระดับเชื้อแบคทีเรียในอาหารทดลองไม่มีผลต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส (p>0.05) ของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่แตกต่างกันทั้ง ที่ 2 และ 8 สัปดาห์ ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 0.03-0.20 และ 0.04-0.23 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ (ตารางที่ 17)

กิจกรรมเอนไซม์ทริปซิน พบว่า ที่เวลา 2 สัปดาห์ ปลาที่ได้รับอาหารที่มีส่วนประกอบของรำข้าวที่ไม่เสริมเชื้อแบคทีเรีย มีกิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุดเท่ากับ 12.05±0.89 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ไม่แตกต่างกับกากเนื้อในเมล็ดปาล์มบดเสริมเชื้อแบคทีเรีย 10^4และ 10^7CFU/g มันสำปะหลังบดที่ไม่เสริมเชื้อแบคทีเรีย เสริมเชื้อแบคทีเรีย 10^4 และ 10^7CFU/g รำข้าวที่เสริมเชื้อแบคทีเรีย 10^4 และ 10^7CFU/g และ กากเอทานอลข้าวโพดที่เสริมเชื้อแบคทีเรีย 10^7CFU/g ที่มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ในช่วง 10.04-11.63 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน แต่แตกต่างจากแป้งสาลีที่ไม่เสริมเชื้อแบคทีเรีย เสริมเชื้อแบคทีเรีย 10^4 และ 10^7CFU/g กากเนื้อในเมล็ดปาล์มบดที่ไม่เสริมเชื้อแบคทีเรีย และกากเอทานอลข้าวโพดที่ไม่เสริมเชื้อแบคทีเรีย เสริมเชื้อแบคทีเรีย 10^4CFU/g ที่มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ในช่วง 6.30-9.19 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) โดยปลาที่ได้รับอาหารที่มีแป้งสาลีเสริมเชื้อแบคทีเรีย 10^4CFU/g มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ต่ำที่สุดเท่ากับ 6.30±0.17 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน (ตารางที่ 18) ที่เวลา 8 สัปดาห์ พบว่าปลาที่ได้รับอาหารที่มีส่วนประกอบของมันสำปะหลังบดเสริมเชื้อแบคทีเรีย 10^7CFU/g มีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุดเท่ากับ 15.76±1.22 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งแตกต่างกับปลาที่ได้รับอาหารที่มีกากเอทานอลข้าวโพดไม่เสริมเชื้อแบคทีเรีย และเสริมเชื้อแบคทีเรีย 10^7CFU/g ที่มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ต่ำที่สุดใกล้เคียงกันเท่ากับ 10.78-11.06 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน (ตารางที่ 17)

กิจกรรมเอนไซม์ไลเปส พบว่าปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่แตกต่างกันทั้ง 15 ชุดการทดลอง เป็นเวลา 2 สัปดาห์ แหล่งของวัตถุดิบคาร์โบไฮเดรต และระดับเชื้อแบคทีเรียในอาหารทดลองไม่มีผลต่อกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (p>0.05) ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 1.11-2.61 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน แต่ที่เวลา 56 วัน ปลาที่ได้รับอาหารที่มีกากเนื้อในเมล็ดปาล์มบดและกากเอทานอลข้าวโพดไม่เสริมเชื้อแบคทีเรีย มีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุดเท่ากับ

2.33±0.40 และ 2.36±0.15 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกับปลาที่ได้รับอาหารที่มีแป้งสาลีเสริมเชื้อแบคทีเรีย 10^4 CFU/g ที่มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ต่ำที่สุดเท่ากับ 0.65±0.15 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) (ตารางที่ 17)

ตารางที่ 17 กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส เซลลูเลส ทริปซินและไลเปสในปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่มีการใช้แหล่งวัตถุดิบคาร์โบไฮเดรต 5 ชนิด ที่เสริมเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต A3 ระดับต่างๆ เป็นเวลา 2 สัปดาห์ และ 8 สัปดาห์[1]

แหล่งของคาร์โบไฮเดรต	ระดับเชื้อ (CFU/g)	กิจกรรมเอนไซม์[2] (ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน)							
		อะไมเลส		เซลลูเลส		ทริปซิน		ไลเปส	
		2 สัปดาห์	8 สัปดาห์	2 สัปดาห์	8 สัปดาห์	2 สัปดาห์	8 สัปดาห์	2 สัปดาห์	8 สัปดาห์
แป้งสาลี	0	1.66±0.33	0.77±0.59	0.13±0.06	0.04±0.04	7.06±0.23^{de}	13.54±0.71	2.61±0.69	1.80±0.54^{ab}
	10^4	1.70±0.41	1.15±0.39	0.07±0.01	0.17±0.06	6.30±0.17^{e}	12.73±1.14	1.20±0.17	0.65±0.15^{b}
	10^7	1.48±0.40	1.71±0.55	0.10±0.00	0.23±0.17	8.79±0.73^{cde}	15.76±1.22	2.58±0.41	1.64±0.36^{ab}
กากเนื้อในเมล็ดปาล์มบด	0	1.49±0.14	1.30±0.72	0.03±0.01	0.10±0.04	9.11±0.36^{bcd}	13.58±1.89	2.05±0.55	2.33±0.40^{a}
	10^4	1.25±0.25	1.62±0.45	0.09±0.00	0.09±0.05	11.02±1.09^{abc}	13.47±2.25	1.67±0.31	1.33±0.53^{ab}
	10^7	1.83±0.51	1.52±0.23	0.20±0.08	0.10±0.14	10.16±0.70^{abc}	13.97±1.50	1.61±0.85	1.25±0.62^{ab}
มันสำปะหลังบด	0	1.53±0.17	1.17±0.68	0.09±0.10	0.15±0.08	10.90±0.87^{abc}	11.54±1.10	1.49±0.71	1.22±0.64^{ab}
	10^4	1.60±0.37	1.58±0.56	0.07±0.04	0.11±0.08	11.63±0.51^{ab}	14.08±1.50	1.76±0.22	1.66±0.78^{ab}
	10^7	1.88±0.59	1.29±1.44	0.11±0.04	0.17±0.04	11.04±1.05^{abc}	11.35±1.58	1.11±0.75	1.67±0.41^{ab}
รำข้าว	0	1.32±0.33	2.33±0.33	0.07±0.02	0.09±0.05	12.05±0.89^{a}	13.83±1.67	2.27±0.12	1.53±0.79^{ab}
	10^4	1.41±0.14	1.63±0.09	0.07±0.02	0.11±0.01	10.04±0.69^{abc}	14.46±1.81	1.72±0.01	2.03±0.87^{ab}
	10^7	1.35±0.67	2.38±1.54	0.11±0.01	0.07±0.05	11.48±1.62^{ab}	15.55±1.39	1.67±0.14	1.86±0.50^{ab}
กากเอทานอลข้าวโพด	0	1.66±0.33	1.23±0.57	0.09±0.01	0.11±0.05	9.19±1.09^{bcd}	10.78±2.08	1.16±0.61	2.36±0.15^{a}
	10^4	1.54±0.60	1.13±0.75	0.10±0.10	0.12±0.03	9.19±0.98^{bcd}	12.02±0.30	1.95±0.84	1.14±0.17^{ab}
	10^7	1.85±0.59	3.19±1.37	0.08±0.00	0.18±0.08	10.41±0.51^{abc}	11.06±1.22	1.45±0.52	2.08±0.59^{ab}

ตารางที่ 17 (ต่อ)

แหล่งของคาร์โบไฮเดรต	กิจกรรมเอนไซม์[3] (ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน)							
	อะไมเลส		เซลลูเลส		ทริปซิน		ไลเปส	
	2 สัปดาห์	8 สัปดาห์	2 สัปดาห์	8 สัปดาห์	2 สัปดาห์	8 สัปดาห์	2 สัปดาห์	8 สัปดาห์
ANOVA								
Probability level								
แหล่งของคาร์โบไฮเดรต	0.469	0.126	0.895	0.359	< 0.000	< 0.000	0.072	0.301
ระดับเชื้อ	0.489	0.061	0.198	0.182	0.037	0.254	0.360	0.061
แหล่งของคาร์โบไฮเดรต x ระดับเชื้อ	0.864	0.260	0.243	0.449	0.006	0.155	0.028	0.036
แหล่งของคาร์โบไฮเดรต								
แป้งสาลี	1.61±0.34	1.21±0.61	0.10±0.04	0.15±0.11	7.39±1.17	14.01±1.63^{ab}	2.13±0.81	1.36±0.63
กากเนื้อในเมล็ดปาล์มบด	1.53±0.39	1.48±0.46	0.11±0.08	0.10±0.06	10.09±1.07	13.67±1.66^{ab}	1.77±0.57	1.64±0.69
มันสำปะหลังบด	1.67±0.39	1.35±0.86	0.09±0.06	0.14±0.07	11.19±0.80	12.32±1.80^{bc}	1.45±0.60	1.52±0.59
รำข้าว	1.36±0.38	2.12±0.87	0.08±0.02	0.09±0.04	11.19±1.33	14.61±1.60^{a}	1.88±0.30	1.81±0.67
กากเอทานอลข้าวโพด	1.69±0.47	1.85±1.30	0.09±0.05	0.14±0.06	9.60±0.99	11.29±1.34^{c}	1.52±0.68	1.86±0.63
ระดับเชื้อ								
0	1.53±0.27	1.36±0.74	0.08±0.05	0.10±0.06	9.66±1.88	12.66±1.85	1.92±0.73	1.85±0.65
10^4	1.50±0.37	1.42±0.48	0.08±0.04	0.12±0.05	9.63±2.03	13.35±1.60	1.66±0.44	1.36±0.69
10^7	1.68±0.52	2.02±1.2	0.12±0.05	0.15±0.10	10.38±1.27	13.54±2.38	1.68±0.71	1.70±0.51

[1]ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยค่าเฉลี่ยในสดมภ์เดียวกันที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (p>0.05)

[2]กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส เซลลูเลส ทริปซินและไลเปสในปลาเริ่มต้นมีค่าเท่ากับ 1.55±0.32, 0.05±0.01, 7.80±0.33 และ1.50±0.20 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน

3.14 ประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนในหลอดทดลอง (*In vitro* carbohydrate and protein digestibility)

จากการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนในหลอดทดลองของอาหารทดลองที่มีการใช้แหล่งวัตถุดิบคาร์โบไฮเดรตแตกต่างกัน 5 ชนิด ที่เสริมเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต A3 ระดับต่างๆ ด้วยเอนไซม์สกัดจากไส้ติ่งและลำไส้ของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารทดลองแต่ละชุดการทดลองดังกล่าวเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ในส่วนของประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรต พบว่า ชนิดของแหล่งคาร์โบไฮเดรตมีผลต่อผลผลิตน้ำตาลมอลโตสและน้ำตาลกลูโคส โดยปลาที่ได้รับอาหารที่มีส่วนประกอบของรำข้าว มีประสิทธิภาพการย่อยสูงที่สุด มีค่าผลผลิตเท่ากับ 1.18±0.73 มิลลิโมล-มอลโตส และ 1.88±1.13 มิลลิโมล-กลูโคส ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) กับปลาที่ได้รับอาหารที่ประกอบด้วยแหล่งคาร์โบไฮเดรตอื่นๆ โดยเฉพาะปลาที่ได้รับอาหารที่ประกอบของกากเอทานอลข้าวโพด มีประสิทธิภาพการย่อยต่ำที่สุด มีค่าผลผลิตเท่ากับ 0.31±0.24 มิลลิโมล-มอลโตส และ 0.53±0.40 มิลลิโมล-กลูโคส ตามลำดับ และระดับการเสริมแบคทีเรียไอโซเลต A3 ไม่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรต (ตารางที่ 18)

ประสิทธิภาพการย่อยโปรตีน จากการวัดปริมาณผลผลิตกรดอะมิโนลิวซีนที่ได้จากการย่อยโปรตีน พบว่า ชนิดของแหล่งคาร์โบไฮเดรตและระดับของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต A3 มีอิทธิพลร่วมกัน โดยปลาที่ได้รับอาหารที่มีรำข้าวเสริมเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต A3 10^4 CFU/g มีประสิทธิภาพการย่อยสูงที่สุด ที่มีค่าผลผลิตเท่ากับ 2.06±0.34 มิลลิโมล-ลิวซีน ซึ่งแตกต่างกับชุดที่ได้รับอาหารที่มีแป้งสาลีไม่เสริมเชื้อแบคทีเรีย กากเนื้อในเมล็ดปาล์มบดเสริมเชื้อแบคทีเรีย 10^7 CFU/g มันสำปะหลังบดเสริมเชื้อแบคทีเรีย 10^7 CFU/g รำข้าวไม่เสริมเชื้อแบคทีเรีย และกากเอทานอลข้าวโพดไม่เสริมและเสริมเชื้อแบคทีเรีย 10^4 CFU/g โดยเอนไซม์จากปลาที่ได้รับอาหารที่มีแป้งสาลีไม่เสริมเชื้อแบคทีเรีย 10^4 CFU/g ให้ค่าผลผลิตต่ำที่สุดเท่ากับ 0.41±0.18 มิลลิโมล-ลิวซีน (ตารางที่ 18)

ตารางที่ 18 ประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนในหลอดทดลอง ของอาหารทดลองที่มีการใช้แหล่งวัตถุดิบคาร์โบไฮเดรต 5 ชนิด ที่เสริมเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต A3 ระดับต่างๆ ด้วยเอนไซม์สกัดจากไส้ติ่งและลำไส้ของปลากะพงขาว เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ด้วยเวลาในการย่อย 6 ชั่วโมง[1]

แหล่งของคาร์โบไฮเดรต	ระดับเชื้อ (CFU/g)	ประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรต มิลลิโมล-มอลโตส	มิลลิโมล-กลูโคส	ประสิทธิภาพการย่อยโปรตีน มิลลิโมล-ลิวซีน
แป้งสาลี	0	0.58±0.32	1.00±0.56	0.41±0.18^{d}
	10^4	0.60±0.17	1.03±0.30	0.79±0.26^{cd}
	10^7	0.39±0.16	0.68±0.29	0.86±0.31^{cd}
กากเนื้อในเมล็ดปาล์มบด	0	0.66±0.16	1.08±0.26	1.06±0.44^{bcd}
	10^4	0.59±0.30	0.42±0.25	0.82±0.39^{cd}
	10^7	0.24±0.15	0.99±0.51	0.97±0.38^{bcd}
มันสำปะหลังบด	0	0.54±0.31	0.93±0.53	1.30±0.86^{a-d}
	10^4	0.43±0.17	0.67±0.27	1.76±0.30^{ab}
	10^7	0.23±0.07	0.41±0.13	1.00±0.49^{bcd}
รำข้าว	0	0.95±0.49	1.60±0.82	1.14±0.46^{bcd}
	10^4	1.51±1.14	2.35±1.77	2.06±0.34^{a}
	10^7	1.08±0.27	1.68±0.42	1.32±0.59^{abc}
กากเอทานอลข้าวโพด	0	0.23±0.12	0.39±0.21	1.05±0.40^{bcd}
	10^4	0.19±0.05	0.33±0.09	0.87±0.19^{bcd}
	10^7	0.49±0.32	0.82±0.54	1.28±0.44^{a-d}
ANOVA				
Probability level				
แหล่งของคาร์โบไฮเดรต		< 0.001	< 0.001	< 0.001
ระดับเชื้อ		0.214	0.228	0.057
แหล่งของคาร์โบไฮเดรต x ระดับเชื้อ		0.144	0.200	0.003
แหล่งของคาร์โบไฮเดรต				
แป้งสาลี		0.52±0.24^{b}	0.90±0.41^{b}	0.70±0.31
กากเนื้อในเมล็ดปาล์มบด		0.49±0.28^{b}	0.83±0.45^{b}	0.95±0.39
มันสำปะหลังบด		0.40±0.23^{b}	0.67±0.39^{b}	1.35±0.63
รำข้าว		1.18±0.73^{a}	1.88±1.13^{a}	1.51±0.61
กากเอทานอลข้าวโพด		0.31±0.24^{b}	0.53±0.40^{b}	1.07±0.38
ระดับเชื้อ				
0		0.59±0.37	1.00±0.63	1.00±0.55
10^4		0.68±0.68	1.10±1.06	1.26±0.62
10^7		0.49±0.38	0.81±0.58	1.10±0.46

[1]ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยค่าเฉลี่ยในสดมภ์เดียวกันที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (p>0.05)

3.15 องค์ประกอบเลือดปลากะพงขาว

ค่าฮีมาโตคริต พบว่า แหล่งของคาร์โบไฮเดรตและระดับของการเสริมเชื้อแบคทีเรียมีอิทธิพลร่วมกัน โดยปลาที่ได้รับอาหารที่มีส่วนประกอบของแป้งสาลีไม่เสริมเชื้อแบคทีเรีย มีค่าสูงที่สุดเท่ากับ 36.93±4.51 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแตกต่างกับปลาที่ได้รับอาหารที่มีส่วนประกอบของกากเนื้อในเมล็ดปาล์มบดเสริมเชื้อแบคทีเรีย 10^4 CFU/g แป้งมันสำปะหลังบดไม่เสริมเชื้อแบคทีเรีย รำข้าวไม่เสริมเชื้อแบคทีเรีย เสริมเชื้อแบคทีเรีย 10^4 และ 10^7 CFU/g และกากเอทานอลข้าวโพดเสริมเชื้อแบคทีเรีย 10^7CFU/g อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดยปลาที่ได้รับอาหารที่มีรำข้าวเสริมเชื้อแบคทีเรีย 10^4 CFU/g และกากเอทานอลข้าวโพดที่เสริมเชื้อแบคทีเรีย 10^7 CFU/g มีค่าฮีมาโตคริตต่ำสุดใกล้เคียงกัน (p>0.05) เท่ากับ 26.95±4.29 และ 27.65±2.14 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 19)

ค่าฮีโมโกลบิน พบว่า แหล่งของคาร์โบไฮเดรตมีผลต่อค่าฮีโมโกลบิน โดยปลาที่ได้รับอาหารที่มีส่วนประกอบของแป้งสาลีมีค่าสูงที่สุด เท่ากับ 6.98±0.91 กรัมต่อเดซิลิตร ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับปลาที่ได้รับอาหารที่มีส่วนประกอบของกากเนื้อในเมล็ดปาล์มบด มันสำปะหลังบด และกากเอทานอลข้าวโพด (p>0.05) แต่แตกต่างทางสถิติ (p<0.05) กับปลาที่ได้รับอาหารที่มีส่วนประกอบของรำข้าว ซึ่งมีค่าฮีโมโกลบินต่ำที่สุด เท่ากับ 5.95±0.79 กรัมต่อเดซิลิตร ส่วนระดับของเชื้อแบคทีเรีย พบว่า ปลาที่ได้รับอาหารที่ไม่เสริมเชื้อแบคทีเรียมีค่าฮีโมโกลบินสูงที่สุด รองลงมา คือ ปลาที่ได้รับอาหารที่เสริมเชื้อแบคทีเรีย 10^7 และ 10^4 CFU/g ตามลำดับ มีค่าฮีโมโกลบิน เท่ากับ 6.88±1.08, 6.84±0.79 และ 6.47±0.86 กรัมต่อเดซิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 19)

ปริมาณซีรัมโปรตีน พบว่า แหล่งของคาร์โบไฮเดรตมีผลต่อปริมาณซีรัมโปรตีน โดยปลาที่ได้รับอาหารที่มีส่วนประกอบของแป้งสาลีมีปริมาณซีรัมโปรตีนสูงที่สุด เท่ากับ 6.47±0.62 กรัมโปรตีน ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับปลาที่ได้รับอาหารที่มีส่วนประกอบของกากเนื้อในเมล็ดปาล์มบด (p>0.05) และมีความแตกต่างทางสถิติ (p<0.05) กับปลาที่ได้รับอาหารที่มีส่วนประกอบของมันสำปะหลังบด รำข้าว และกากเอทานอลข้าวโพดโดยเฉพาะปลาที่ได้รับอาหารที่มีส่วนประกอบของรำข้าวที่มีค่าปริมาณซีรัมโปรตีนต่ำที่สุด เท่ากับ 5.49±0.69 กรัมโปรตีน (ตารางที่ 19)

ตารางที่ 19 ฮีมาโตคริต (Haematocrit) ฮีโมโกลบิน (Hemoglobin) และซีรัมโปรตีน (Serum protein) ในปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่มีแหล่งวัตถุดิบคาร์โบไฮเดรตแตกต่างกัน 5 ชนิด ที่เสริมเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต A3 ระดับต่างๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์[1]

แหล่งของคาร์โบไฮเดรต	ระดับเชื้อ (CFU/g)	ฮีมาโตคริต[3] (เปอร์เซ็นต์)	ฮีโมโกลบิน (กรัมต่อเดซิลิตร)	ซีรัมโปรตีน (กรัมโปรตีน)
แป้งสาลี	0	36.93±4.51^{a}	7.43±1.08	6.49±0.78
	10^4	34.31±4.34^{ab}	6.65±0.95	6.42±0.69
	10^7	34.88±5.24^{ab}	6.88±0.50	6.50±0.37
กากเนื้อในเมล็ดปาล์มบด	0	32.47±3.51^{abc}	7.55±0.84	6.17±0.50
	10^4	30.12±2.38^{bc}	6.62±0.91	5.72±0.55
	10^7	32.43±3.66^{abc}	7.34±0.54	6.13±0.55
มันสำปะหลังบด	0	30.49±3.68^{bc}	6.90±1.14	6.24±0.76
	10^4	30.97±3.66^{abc}	6.47±0.66	5.44±0.52
	10^7	34.98±4.10^{ab}	6.71±1.22	5.62±0.95
รำข้าว	0	28.74±1.20^{bc}	5.83±0.86	5.62±0.54
	10^4	26.95±4.29^{c}	5.69±0.83	5.80±0.46
	10^7	29.42±2.84^{bc}	6.34±0.56	5.04±0.83
กากเอทานอลข้าวโพด	0	31.22±4.25^{abc}	6.70±0.68	5.53±0.77
	10^4	32.56±5.93^{abc}	6.89±0.63	5.88±0.61
	10^7	27.65±2.14^{c}	6.91±0.70	5.57±0.59
ANOVA				
Probability level				
แหล่งของคาร์โบไฮเดรต		< 0.001	< 0.001	< 0.001
ระดับเชื้อ		0.423	0.039	0.208
แหล่งของคาร์โบไฮเดรต x ระดับเชื้อ		0.022	0.423	0.061
แหล่งของคาร์โบไฮเดรต				
แป้งสาลี		35.37±4.67	6.98±0.91^{a}	6.47±0.62^{a}
กากเนื้อในเมล็ดปาล์มบด		31.67±3.30	7.17±0.86^{a}	6.01±0.55^{ab}
มันสำปะหลังบด		32.10±4.18	6.69±1.01^{a}	5.77±0.81^{bc}
รำข้าว		28.37±3.12	5.95±0.79^{b}	5.49±0.69^{c}
กากเอทานอลข้าวโพด		30.48±4.72	6.83±0.65^{a}	5.66±0.65^{bc}
ระดับเชื้อ				
0		32.00±4.45	6.88±1.09^{A}	6.01±0.75
10^4		30.98±4.78	6.47±0.87^{B}	5.86±0.64
10^7		31.80±4.63	6.84±0.79^{A}	5.77±0.83

[1]ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยค่าเฉลี่ยในสดมภ์เดียวกันที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (p>0.05)

3.16 ปริมาณแบคทีเรียในลำไส้ปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารทดลอง

การศึกษาปริมาณแบคทีเรียในลำไส้ปลากะพงขาว ที่ได้รับอาหารที่มีแหล่งคาร์โบไฮเดรตแตกต่างกัน 5 ชนิด และเสริมเชื้อแบคทีเรีย 3 ระดับ คือ 0, 10^4 และ10^7 CFU/g พบว่า ชนิดของแหล่งคาร์โบไฮเดรตและระดับของเชื้อแบคทีเรียไม่มีอิทธิพลร่วมกัน โดยไม่พบความแตกต่างของปริมาณแบคทีเรียรวมและปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* spp. ซึ่งปริมาณแบคทีเรียรวม ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA มีค่า 2.73 – 4.26 Log CFU/g และปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* spp. ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA มีค่า 0-1.72 Log CFU/g (ตารางที่ 20) เมื่อจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่พบในลำไส้ปลากะพงขาวที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ไม่พบความแตกต่างของปริมาณแบคทีเรียแต่ละชนิดในปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารทดลองสูตรต่าง ๆ โดยพบแบคทีเรีย *Plesiomonas shigelloides, Staphylococcus* sp. และ *Pseudomonas fluorescens/putida* เป็นแบคทีเรียเด่นในทางเดินอาหารปลากะพงขาว (ตารางที่ 21)

ตารางที่ 20 ปริมาณแบคทีเรียรวมที่พบในลำไส้ของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่มีแหล่งคาร์โบไฮเดรต 5 ชนิด ที่เสริมเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต A3 ระดับต่างๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์[1]

แหล่งของคาร์โบไฮเดรต	ระดับเชื้อ (CFU/g)	Total *Bacillus* spp. (Log CFU/g)	Total Bacteria (Log CFU/g)
แป้งสาลี	0	1.06 ± 0.92	3.66 ± 0.90
	10^4	1.55 ± 0.13	2.73 ± 0.72
	10^7	1.39 ± 0.36	3.23 ± 1.04
กากเนื้อในเมล็ดปาล์มบด	0	1.43 ± 0.51	2.73 ± 0.91
	10^4	0.87 ± 0.81	3.29 ± 0.80
	10^7	1.63 ± 0.55	3.43 ± 0.52
มันสำปะหลังบด	0	0.93 ± 0.81	4.26 ± 1.00
	10^4	0.33 ± 0.58	3.23 ± 0.53
	10^7	1.53 ± 0.56	3.07 ± 0.77
รำข้าว	0	0.33 ± 0.58	3.38 ± 0.83
	10^4	0.00 ± 0.00[2]	3.67 ± 0.84
	10^7	1.58 ± 0.81	3.53 ± 0.30
กากเอทานอลข้าวโพด	0	1.72 ± 0.99	2.97 ± 0.65
	10^4	0.95 ± 1.64	2.98 ± 1.17
	10^7	0.83 ± 0.75	3.29 ± 1.10
ANOVA			
Probability level			
แหล่งของคาร์โบไฮเดรต		0.323	0.731
ระดับเชื้อ		0.091	0.793
แหล่งของคาร์โบไฮเดรต x ระดับเชื้อ		0.361	0.671
แหล่งของคาร์โบไฮเดรต			
แป้งสาลี		1.34±0.55	3.21±0.87
กากเนื้อในเมล็ดปาล์มบด		1.31±0.65	3.20±0.68
มันสำปะหลังบด		0.93±0.77	3.52±0.89
รำข้าว		0.52±0.80	3.50±0.62
กากเอทานอลข้าวโพด		1.16±1.11	3.08±0.88
ระดับเชื้อ			
0		1.09±0.82	3.45±0.90
10^4		0.74±0.92	3.14±0.76
10^7		1.38±0.59	3.29±0.72

[1] ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยค่าเฉลี่ยในสดมภ์เดียวกันที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (p>0.05)

[2] ไม่พบการเจริญของเชื้อบนอาหาร PDA

ตารางที่ 21 ชนิดและปริมาณแบคทีเรียเด่นแต่ละชนิดที่พบในลำไส้ปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่มีแหล่งคาร์โบไฮเดรต 5 ชนิด ที่เสริมเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต A3 ระดับต่างๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์[1]

แหล่งของคาร์โบไฮเดรต	ระดับเชื้อ (CFU/g)	*Plesiomonas shigelloides* (Log CFU/g)	*Staphylococcus* sp. (Log CFU/g)	*Pseudomonas fluorescens/putida* (Log CFU/g)	Unidentified strain[2] (Log CFU/g)
แป้งสาลี	0	3.27 ± 0.89	1.51 ± 2.62	0.59 ± 1.03	1.56 ± 1.39
	10^4	1.56 ± 0.31	0.59 ± 1.03	0.49 ± 0.85	1.42 ± 0.39
	10^7	2.94 ± 1.28	0.00 ± 0.00	0.90 ± 1.56	1.26 ± 1.41
กากเนื้อในเมล็ดปาล์มบด	0	2.60 ± 1.07	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	1.35 ± 0.49
	10^4	3.27 ± 0.81	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	1.10 ± 1.15
	10^7	3.38 ± 0.58	0.33 ± 0.58	0.00 ± 0.00	1.19 ± 1.14
มันสำปะหลังบด	0	4.25 ± 1.01	0.00 ± 0.00	0.49 ± 0.85	0.59 ± 1.03
	10^4	3.21 ± 0.51	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	10^7	3.04 ± 0.80	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	1.43 ± 0.51
รำข้าว	0	3.36 ± 0.87	0.00 ± 0.00	0.59 ± 1.03	0.67 ± 1.15
	10^4	3.66 ± 0.85	0.00 ± 0.00	0.50 ± 0.71	0.00 ± 0.00
	10^7	3.51 ± 0.30	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	2.01 ± 0.57
กากเอทานอลข้าวโพด	0	2.62 ± 0.79	0.00 ± 0.00	2.20 ± 1.05	0.00 ± 0.00
	10^4	2.97 ± 1.17	0.00 ± 0.00	0.67 ± 1.15	0.00 ± 0.00
	10^7	2.52 ± 2.29	0.00 ± 0.00	0.77 ± 1.3	0.53 ± 0.93

ตารางที่ 21 (ต่อ)

แหล่งของคาร์โบไฮเดรต	*Plesiomonas shigelloides* (Log CFU/g)	*Staphylococcus* sp. (Log CFU/g)	*Pseudomonas fluorescens/putida*	Unidentified strain[2] (Log CFU/g)
ANOVA				
Probability level				
แหล่งของคาร์โบไฮเดรต	0.236	0.279	0.063	0.056
ระดับเชื้อ	0.769	0.713	0.330	0.086
แหล่งของคาร์โบไฮเดรต x ระดับเชื้อ	0.511	0.733	0.786	0.645
แหล่งของคาร์โบไฮเดรต				
แป้งสาลี	2.59±1.11	0.70±1.55	0.66±1.04	1.41±1.02
กากเนื้อในเมล็ดปาล์มบด	3.14±0.75	0.13±0.35	0.00±0.00	1.20±0.89
มันสำปะหลังบด	3.50±0.90	0.00	0.16±0.49	0.68±0.85
รำข้าว	3.49±0.64	0.00	0.40±0.71	0.86±1.10
กากเอทานอลข้าวโพด	2.70±1.36	0.00	1.21±1.27	0.18±0.53
ระดับเชื้อ				
0	3.27±0.98	0.32±1.21	0.83±1.10	0.80±1.01
10^4	2.88±0.99	0.13±0.48	0.32±0.67	0.54±0.81
10^7	3.05±1.16	0.07±0.27	0.36±0.91	1.23±0.96

[1]ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยค่าเฉลี่ยในสดมภ์เดียวกันที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p>0.05$)

[2]เป็นแบคทีเรียเด่นที่พบในลำไส้ปลากะพงขาวแต่ไม่สามารถจำแนกได้

4. วิจารณ์ผลการศึกษา

การทดลองส่วนที่ 1 การคัดเลือกแบคทีเรียจากธรรมชาติที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลส โดยแยกเชื้อแบคทีเรียจากตะกอนและของเหลวจากกระเพาะรูเมนของโคพื้นเมือง กระเพาะอาหาร ลำไส้ตอนต้น และลำไส้ตอนปลายของปลานิลแดงและปลานิลดำ โดยเมื่อทำการแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างกระเพาะรูเมนของโคพื้นเมือง ปลานิลดำ และปลานิลแดง จากการทดลอง พบว่า สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งหมด 67 ไอโซเลต โดยแยกได้จากกระเพาะรูเมนของโคพื้นเมือง 18 ไอโซเลต และปลานิลแดง 28 ไอโซเลต และปลานิลดำ 21 ไอโซเลต แล้วนำมาทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ซึ่งการศึกษาครั้งนี้ พบว่า มีเชื้อแบคทีเรียจำนวน 25 ไอโซเลต ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับชุดควบคุม และมีแบคทีเรีย 16 ไอโซเลต ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดี โดยนำแบคทีเรียที่มาจากกระเพาะรูเมนของโคพื้นเมืองได้ 8 ไอโซเลต และปลานิล 8 ไอโซเลต ให้ค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสมากที่สุด หลังจากนั้นนำเชื้อแบคทีเรีย จำนวน 16 ไอโซเลตดังกล่าว มาทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยเลี้ยงในอาหารเหลว NB ที่ผสมกับวัตถุดิบพืชทั้ง 5 ชนิด พบว่า แบคทีเรียทั้ง 16 ไอโซเลต สามารถผลิตเอนไซม์ได้ดี โดยมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับชุดควบคุม (น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ) โดยแบคทีเรียไอโซเลต A3, B2, B3, B9, 2Aia และ Pia-4 มีแนวโน้มในการย่อยสลายวัตถุดิบทั้ง 5 ชนิดได้ดี ซึ่งแบคทีเรียไอโซเลต A3 ให้ค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสมากที่สุด รองลงมาคือไอโซเลต B2 และ B9 และเมื่อนำเชื้อแบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลต มาจำแนกชนิดของเชื้อ โดยการตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสและนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลทางพันธุกรรม NCBI พบว่า ทั้ง 6 ไอโซเลตเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* sp. ได้แก่ *Bacillus subtilis* และ *Bacillus amyloliquefaciens* ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ ชัยชนะ และคณะ (2553) ซึ่งคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยเซลลูโลส ซึ่งคัดเลือกได้จากกระเพาะรูเมนโคนมลูกผสม โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Med2 ด้วยวิธี Anaerobic roll tube method พบแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus spp.* จำนวน 8 ไอโซเลต และนอกจากนี้ยังศึกษาการใช้แบคทีเรีย *Bacillus licheniformis* ที่คัดแยกได้จากกระเพาะรูเมนเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยในระบบ *In vitro* โดยใช้เมล็ดข้าวโพด ฟางข้าว กากถั่วเหลือง และมันสำปะหลัง เป็นต้น เป็นวัตถุดิบในอาหาร พบว่า การใช้ *Bacillus licheniformis* ที่ระดับ 10^7 CFU/กรัม มีความสามารถในการเพิ่มการย่อยได้ให้สูงขึ้น ซึ่งการใช้จุลินทรีย์เสริมโดยตรง (Direct feed microbial, DFM) มีผลต่อการเพิ่มการย่อย การย่อยได้เยื่อใย NDF (Weinberg *et al.*, 2007) ส่วนการคัดแยกเชื้อจากปลานิล ตรี และคณะ (2549) ได้ทำการศึกษาจำนวนของเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดในปลานิลจากบริเวณผิวหนัง เหงือก และเครื่องใน พบแบคทีเรียทั้งหมด 12 ไอโซเลต ได้แก่ *Aeromonas sobria*, *Bordetell alcaligenes*, *Edwardsiella tarda*, *Flavimonas oryzihaditans*, *Plesiomonas shigelloids*, *Proteus mirabilis*, *Proteus penneri*, *Proteus vulgaris*, *Providencia alcaligenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putrefaciens* และ

Weeksella virosa ซึ่งไม่พบแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus subtilis* และ *Bacillus amyloliquefaciens* ที่สามารถย่อยสลายวัตถุดิบที่มีคาร์โบไฮเดรตและมีเยื่อใยสูงได้ดี ซึ่งจากผลการศึกษาข้างต้น ผู้ทำการศึกษาได้คัดเลือกแบคทีเรียไอโซเลต A3 ซึ่งเป็น *Bacillus subtilis* (Strain WF1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence) เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป โดย *Bacillus subtilis* เป็นแบคทีเรียที่ได้จากกระเพาะรูเมนของโคพื้นเมือง สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ทำให้สามารถย่อยสลายวัตถุดิบที่มีคาร์โบไฮเดรตและมีเยื่อใยสูงได้ เช่น รำข้าว รำสาลี กากเนื้อในเมล็ดปาล์ม มันสำปะหลังบด และกากถั่วเหลือง เป็นต้น นอกจากนี้ยังสามารถสร้างและหลั่งเอนไซม์พวก Carbohydrase และ Protease ออกจากเซลล์ ทำให้สามารถย่อยสลายสารต่างๆ ได้หลายชนิด เช่น เซลลูโลส แป้ง และโปรตีนต่างๆ ให้เป็นกรดอะมิโน แบคทีเรียในกลุ่ม Bacillus ส่วนใหญ่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิปานกลาง (Mesophilic bacteria) 30-45 องศาเซลเซียส แต่บางสายพันธุ์เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูง (Thermophilic bacteria) และบางสายพันธุ์เจริญได้ดีที่อุณหภูมิต่ำ (Psychrophilic bacteria) เจริญได้ใน pH 2-11 ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ (พิมพ์เพ็ญ, 2556)

การทดลองส่วนที่ 2 การศึกษาแหล่งของคาร์โบไฮเดรตที่แตกต่างกัน 5 ชนิด คือ แป้งสาลี กากเนื้อในเมล็ดปาล์มบด มันสำปะหลังบด รำข้าว และกากเอทานอลข้าวโพด ซึ่งเสริมเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต A3 3 ระดับ คือ 0, 10^4 และ 10^7 CFU/g ต่ออัตราการเจริญเติบโต อัตราการรอดตาย และประสิทธิภาพการใช้อาหารในปลากะพงขาว ระยะเวลา 8 สัปดาห์ โดยใช้แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากการทดลองในส่วนที่ 1 ได้แก่ *Bacillus subtilis* ไอโซเลต A3 ซึ่งจากการทดลอง พบว่า ไม่มีอิทธิพลร่วมระหว่างแหล่งของคาร์โบไฮเดรตและระดับของเชื้อแบคทีเรีย แต่แหล่งของคาร์โบไฮเดรต มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตและอัตราการรอดตาย โดยปลาที่ได้รับอาหารที่มีส่วนประกอบแป้งสาลี มีน้ำหนักเฉลี่ยสุดท้าย น้ำหนักที่เพิ่ม เปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เพิ่ม อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ และอัตราการรอดตายสูงที่สุด ซึ่งมีความใกล้เคียงกับปลาที่ได้รับอาหารที่มีส่วนประกอบของกากเอทานอลข้าวโพด และมันสำปะหลังบด แต่มีค่าสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ปลาที่ได้รับอาหารที่มีส่วนประกอบของกากเนื้อในเมล็ดปาล์มบด และรำข้าว โดยเฉพาะกากเนื้อในเมล็ดปาล์มบดมีน้ำหนักเฉลี่ยสุดท้าย น้ำหนักที่เพิ่ม เปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เพิ่ม อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะต่ำที่สุด แต่ในปลาที่ได้รับอาหารที่ประกอบด้วยรำข้าว มีอัตราการรอดตายต่ำที่สุด ดังนั้นแป้งสาลี มันสำปะหลังบด และกากเอทานอลข้าวโพด จึงเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตในอาหารปลากะพงขาว เนื่องจากทำให้ปลากะพงขางมีอัตราการเจริญเติบโตที่ดี แต่เมื่อพิจารณาถึงการใช้ประโยชน์จากสารอาหาร พบว่า อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ ประสิทธิภาพการใช้อาหาร ของปลาที่ได้รับอาหารที่มีส่วนประกอบของแป้งสาลีและกากเอทานอลข้าวโพด มีค่าการใช้ประโยชน์จากสารอาหารดีกว่าปลาที่ได้รับอาหารที่มีส่วนประกอบอื่นๆ ซึ่งเมื่อคำนวณการใช้ประโยชน์จากอาหาร ปลาที่ได้รับอาหารที่มีส่วนประกอบของแป้งสาลีจึงมีการใช้ประโยชน์จากอาหารที่ดีกว่าแหล่งคาร์โบไฮเดรตชนิดอื่นๆ เนื่องจากแป้งสาลีเป็นคาร์โบไฮเดรตที่มีโครงสร้างซับซ้อน (Complexity cabohydrate) ที่มีอัตราส่วนของอะ

ไมโลสต่ออะไมโลแพคตินในโครงสร้างแป้งต่ำ จึงอาจมีผลให้ปลามีประสิทธิภาพการย่อยสารอาหารได้สูง นอกจากนี้โครงสร้างภายในเมล็ดแป้ง (Granule) ของแป้งสาลี ง่ายต่อการทำลายด้วยกระบวนการผลิตภายในโรงงานอุตสาหกรรม จึงส่งผลให้เอนไซม์อะไมเลสเข้าไปย่อยได้ง่าย (สร้อยแก้ว, 2555) ส่วนอาหารที่มีส่วนประกอบของรำข้าวและกากเนื้อในเมล็ดปาล์ม มีโครงสร้างและองค์ประกอบของวัตถุดิบที่มีองค์ประกอบของเยื่อใยค่อนข้างสูง ซึ่งอาจจะส่งผลต่อประสิทธิภาพการย่อย การดูดซึม และประสิทธิภาพการใช้อาหาร โดย Shiau และ Peng (1997) ได้ศึกษาในปลานิล (Hybrid tilapia) (*Oreochromisniloticus bogaraveo*) พบว่า การดูดซึมคาร์โบไฮเดรตในลำไส้มีค่าต่ำ เมื่ออาหารมีส่วนประกอบของเยื่อใย โดยเยื่อใยมักมีผลต่อการย่อยและลดการใช้ประโยชน์ของสารอาหารชนิดอื่น (Hilton *et al.*, 1983; Anderson *et al.*, 1984; NRC, 1993; Lee *et al.*, 2003) ปลา Gibel carp ที่ได้รับอาหารที่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบ 20 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหารที่ดี (Ten *et al.*, 2006) เนื่องจากระดับของเยื่อใยที่เหมาะสมในอาหาร สามารถทำให้อาหารในลำไส้เดินทางช้าลง จึงช่วยเพิ่มการดูดซึมสารอาหาร โดยปลาที่กินทั้งพืชและเนื้อสามารถใช้ประโยชน์จากคาร์โบไฮเดรตได้ในระดับสูงกว่าปลากินเนื้อ เพราะกิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสในทางเดินอาหารที่สูง (Hidalgo *et al.*, 1999; Kumar *et al.*, 2008) แต่ในการศึกษาครั้งนี้เป็นปลากะพงขาวซึ่งเป็นปลากินเนื้อ การใช้รำข้าวในระดับ 35 เปอร์เซ็นต์ อาจเป็นระดับที่สูงเกินไป เนื่องจากในลำไส้ของปลากะพงขาวอาจจะมีกิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสที่ต่ำ เพราะมีลำไส้สั้น จึงทำให้ไม่สามารถใช้รำข้าวเป็นแหล่งของคาร์โบไฮเดรตได้ดี เช่นเดียวกับปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่มีส่วนประกอบของกากเนื้อในเมล็ดปาล์ม มีการเจริญเติบโต อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ และประสิทธิภาพการใช้อาหารต่ำที่สุด เนื่องจากโครงสร้างและองค์ประกอบของวัตถุดิบ มีองค์ประกอบของเยื่อใยสูงกว่าวัตถุดิบอื่นๆ ทำให้ปลากะพงขาวไม่สามารถนำสารอาหารที่มีมาใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ส่วนระดับของการเสริมเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต A3 มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโต โดยการเสริมเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต A3 ส่งผลให้น้ำหนักสุดท้าย น้ำหนักที่เพิ่ม อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ และอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อมีแนวโน้มลดต่ำลง แต่ไม่มีผลต่ออัตราการรอดตาย โดยปลาที่ได้รับอาหารไม่เสริมเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต A3 มีน้ำหนักเฉลี่ยสุดท้าย เปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เพิ่ม และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงที่สุด ซึ่งแตกต่างจากปลาที่ได้รับอาหารที่เสริมเชื้อแบคทีเรียทั้งสองระดับอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ซึ่งแตกต่างกับการศึกษาของ Essa และคณะ (2010) ที่ได้ทำการศึกษาการใช้โปรไบโอติกได้แก่ *Bacillus subtilis, Lactobacillus plantarum* และยีสต์ในปลานิล ซึ่งพบว่าการเสริมโปรไบโอติกส่งผลให้ปลานิลมีอัตราการเจริญเติบโตดีขึ้น เช่นเดียวกับการศึกษาของ Yanbo และ Zirong (2006) ที่ได้ศึกษาการใช้โปรไบโอติกในปลาไน (Common Carp; *Cyprinus carpio*) ซึ่งพบว่าอัตราการเจริญเติบโต อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ ของปลาที่ได้มีการเสริมโปรไบโอติกดีกว่าปลาที่ไม่ได้รับการเสริมโปรไบโอติกอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) รวมถึงการศึกษาของ Aly และคณะ (2008a) ได้นำแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* มาใช้เป็นโปรไบโอติก พบว่า หลังจากนำมาผสมในอาหาร ปริมาณ 10^7 CFU/ กรัม

เลี้ยงปลานิล มีอัตราการเติบโต และอัตรารอดตายของปลานิลในกลุ่มที่ใช้โปรไบโอติก สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ Aly และคณะ (2008b) ศึกษาผลของการนำ *Bacillus pumilus* ซึ่งแยกเชื้อจาก Gonad ของปลานิล มาใช้เป็นโปรไบโอติก พบว่า เมื่อนำมาผสมในอาหารปริมาณ 10^6 CFU/g เลี้ยงปลานิลน้ำหนัก 6.5 กรัม เป็นเวลา 8 สัปดาห์ อัตราการเจริญเติบโตของปลานิลในกลุ่มที่ใช้โปรไบโอติก สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และ EL-Haroun และคณะ (2006) ศึกษาผลของโปรไบโอติก Biogen ซึ่งประกอบด้วย *Bacillus licheniformis* และ *Bacillus subtilis* ต่ออัตราการเจริญเติบโต พบว่า ภายหลังผสมอาหารเลี้ยงปลานิล น้ำหนักประมาณ 22.96-26.4 กรัม เป็นเวลา 12 สัปดาห์ กลุ่มที่ใช้โปรไบโอติก มีอัตราการเติบโตสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้สาเหตุที่ผลการศึกษาเป็นดังกล่าว ผู้ทำการศึกษาจึงคาดว่า อาจเนื่องมาจากหลายๆ ปัจจัยที่ส่งผลต่อการทำงาน และการอาศัยอยู่ของเชื้อแบคทีเรียในทางเดินอาหารของปลากะพงขาว เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียที่ใช้เป็นโปรไบโอติกในครั้งนี้ได้คัดแยกจากตะกอนกระเพาะรูเมนของโค ซึ่งมีอุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส และพีเอช 6.5-7 ซึ่งแตกต่างจากในปลากะพงขาว ซึ่งปลากะพงขาวเป็นสัตว์เลือดเย็นทำให้อุณหภูมิร่างกายเปลี่ยนแปลงตามอุณหภูมิของน้ำ ซึ่งระหว่างการเลี้ยงอยู่ในช่วงฤดูฝน มีอุณหภูมิอยู่ในช่วง 26-28 องศาเซลเซียส และพีเอชในกระเพาะอาหารอยู่ในช่วง 3-9 และในลำไส้พีเอชอยู่ในช่วง 8-9 (Walford and Lam, 1993) อาจจะทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของเชื้อแบคทีเรียลดลง นอกจากนี้การให้อาหารของผู้ทำการทดลองที่มีการจำกัดปริมาณอาหารในชุดการทดลองที่มีการเสริมเชื้อแบคทีเรีย โดยแยกอาหารของแต่ละมื้อ เพื่อป้องกันการปนเปื้อนและการเพิ่มจำนวนของเชื้อแบคทีเรีย เนื่องจากความชื้นจากภายนอก อาจเป็นปัจจัยที่ทำให้ปริมาณเชื้อในอาหารมีการเพิ่มขึ้นทำให้ปริมาณเชื้อแบคทีเรียเปลี่ยนไป ซึ่งสาเหตุนี้อาจจะทำให้ปลากะพงขาวในชุดการทดลองดังกล่าวได้รับอาหารไม่เต็มที่ จึงทำให้ได้ผลการศึกษาแตกต่างกับการศึกษาอื่นๆ แต่เมื่อพิจารณาประสิทธิภาพการใช้อาหาร อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ พบว่า ประสิทธิภาพการใช้อาหารของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่มีการเสริมเชื้อแบคทีเรียมีแนวโน้มสูงกว่าปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่ไม่เสริมเชื้อแบคทีเรีย รวมถึงอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ ก็มีแนวโน้มลดลงเมื่อมีการเสริมเชื้อแบคทีเรีย ดังนั้นหากปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่เสริมเชื้อแบคทีเรีย ได้รับอาหารเพิ่มขึ้นโดยไม่มีการจำกัดปริมาณอาหารหรือได้รับอาหารในปริมาณที่เท่ากับชุดการทดลองที่ไม่เสริมเชื้อแบคทีเรีย (ภาพที่ 2) ซึ่งจะเห็นได้ว่า การเสริมเชื้อแบคทีเรียส่งผลต่อน้ำหนักที่เพิ่มของปลา โดยปลาที่ได้รับอาหารที่มีการเสริมเชื้อแบคทีเรียจะมีน้ำหนักที่เพิ่ม สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อมีการเสริมเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งจะสอดคล้องกับค่าของอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ และประสิทธิภาพการใช้อาหาร โดยอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อที่มีแนวโน้มลดลง และประสิทธิภาพการใช้อาหารที่มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ตามระดับการเสริมเชื้อแบคทีเรีย ดังนั้น อัตราการเจริญเติบโตของปลากะพงขาวที่เสริมเชื้อแบคทีเรียก็จะเพิ่มขึ้นด้วยเช่นกัน

นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบจากการศึกษาของ สร้อยแก้ว (2555) ที่ศึกษาผลของชนิดและระดับของคาร์โบไฮเดรตต่อการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหาร และ

เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับเมแทบอลิซึมในการใช้คาร์โบไฮเดรตของปลากะพงขาว พบว่า แป้งมันสำปะหลังและแป้งสาลีเป็นคาร์โบไฮเดรตที่เหมาะสมต่อการใช้ประโยชน์ในอาหาร และระดับของคาร์โบไฮเดรตที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต เท่ากับ 25 เปอร์เซ็นต์ โปรตีน 39 เปอร์เซ็นต์ และไขมัน 12 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งทำให้ปลากะพงขาวมีอัตราการเจริญเติบโต อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ ประสิทธิภาพการใช้อาหารได้สูงกว่าที่ระดับของของคาร์โบไฮเดรต 35 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้แหล่งคาร์โบไฮเดรตที่ระดับ 35 เปอร์เซ็นต์ และมีการเสริมเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต A3 ในระดับ 0, 10^4 และ 10^7 CFU/g พบว่า ปลากะพงขาวมีอัตราการเจริญเติบโตที่ดี และสามารถนำสารอาหารมาใช้ได้เพิ่มขึ้น ส่งผลให้มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น ชี้ให้เห็นว่า การใช้แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* เป็นโปรไบโอติก สามารถช่วยให้ผลิตเอนไซม์และย่อยสลายวัตถุดิบที่มีคาร์โบไฮเดรตและมีเยื่อใยสูงได้

องค์ประกอบทางเคมีในตัวปลาสิ้นสุดการทดลอง พบว่า ระดับของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต A3 ไม่มีผลต่อองค์ประกอบทางเคมีในตัวปลา ($p>0.05$) แต่แหล่งของคาร์โบไฮเดรตมีผลต่อองค์ประกอบของโปรตีน ไขมัน และเถ้า ($p<0.05$) โดยองค์ประกอบของโปรตีน ไขมัน และเถ้า ในตัวปลาสิ้นสุดการทดลองของปลาที่ได้รับอาหารที่ประกอบด้วยกากเอทานอลข้าวโพดมีค่าสูงที่สุด และทำให้มีอัตราการเจริญเติบโตสูง ใกล้เคียงกับปลาที่รับอาหารที่มีแป้งสาลี และมันสำปะหลังบด เนื่องจากแหล่งของคาร์โบไฮเดรตแต่ละชนิดมีองค์ประกอบที่ต่างกัน ซึ่งแป้งสาลี กากเอทานอลข้าวโพด และมันสำปะหลังบด มีแป้งเป็นองค์ประกอบหลัก ส่วนรำข้าวและกากเนื้อในเมล็ดปาล์มบดมีองค์ประกอบของเยื่อใยที่ค่อนข้างสูง โดยจากการศึกษา การเพิ่มระดับของคาร์โบไฮเดรตที่สามารถย่อยได้ มีผลทำให้องค์ประกอบในตัวสิ้นสุดเพิ่มสูงขึ้น (Kaushik and Oliva-Teles, 1985; Grisdale-Helland and Helland, 1997; Dias *et al.*, 1998; Venou *et al.*, 2003) ดังนั้นรำข้าวและกากเนื้อในเมล็ดปาล์มบดที่มีเยื่อใยที่สูง ซึ่งทำให้ไม่สามารถย่อยและนำสารอาหารมาใช้ประโยชน์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ Ogino และคณะ (1976) พบว่าการสะสมของไขมันในร่างกายปลาจะสัมพันธ์กับปริมาณไขมันในอาหารของปลา Rainbow trout เช่นเดียวกับผลการวิจัยในปลาซีกเดียว ปลากดอเมริกัน ปลาคาร์พ และปลา Turbot

การศึกษาประสิทธิภาพการใช้ประโยชน์โปรตีนสุทธิ (PPV) ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน (PER) พบว่า แหล่งของคาร์โบไฮเดรตและระดับของการเสริมเชื้อแบคทีเรียไม่มีอิทธิพลร่วมกัน แต่มีผลต่อการใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ และประสิทธิภาพการใช้โปรตีน ส่วนการใช้ประโยชน์จากไขมันสุทธิ (LPV) และประสิทธิภาพการใช้ไขมัน (LER) แหล่งของคาร์โบไฮเดรตและระดับของการเสริมเชื้อแบคทีเรียมีอิทธิพลร่วมกัน โดยปลาที่ได้รับอาหารที่ประกอบด้วยแป้งสาลีและกากเอทานอลข้าวโพด มีค่าสูงกว่าปลาที่ได้รับแหล่งคาร์โบไฮเดรตอื่น โดยสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตได้อย่างมีประสิทธิภาพและสำรองโปรตีนเพื่อใช้ในการเจริญเติบโต Hemre และคณะ (2002) ได้รายงานว่าการเกิดการสำรองโปรตีน วัดจากการเพิ่มขึ้นของการสะสมโปรตีน และประสิทธิภาพการใช้โปรตีน ซึ่งสัตว์น้ำสามารถใช้ประโยชน์จากโปรตีนให้มีประสิทธิภาพสูงสุดได้ ถ้าพัฒนาอาหารโดยการแทนที่โปรตีนบางส่วนด้วย

คาร์โบไฮเดรตและไขมันที่เหมาะสมในอาหาร เพื่อให้เกิดการสำรองโปรตีน ซึ่งคาร์โบไฮเดรตที่ถูกดูดซึมอาจใช้เป็นแหล่งพลังงาน หรือเก็บไว้ในรูปแบบของไกลโคเจนในตับหรือในกล้ามเนื้อ รวมทั้งสังเคราะห์เป็นสารประกอบอื่นๆ เช่น ไตรกลีเซอไรด์ (Triglyceride) กรดอะมิโนไม่จำเป็น และบางส่วนอาจขับทิ้ง (Furuichi, 1983; Lovell, 1988 อ้างโดย Stone *et al.*, 2003) และจากการศึกษาของ Dias และคณะ (1998) พบว่า อาหารที่ประกอบด้วยโปรตีนในระดับที่เท่ากัน เมื่อเพิ่มแหล่งพลังงานที่สามารถย่อยได้ (Digestible energy) จะมีผลเพิ่มประสิทธิภาพการใช้โปรตีน การสะสมโปรตีน และลดการสูญเสียไนโตรเจน

ดัชนีไขมันในช่องท้อง (IPF) และดัชนีตับ (HIS) พบว่า แหล่งของคาร์โบไฮเดรตและระดับของการเสริมเชื้อแบคทีเรียไม่มีอิทธิพลร่วมกัน แต่มีผลต่อดัชนีไขมันในช่องท้อง และดัชนีตับ โดยปลาที่ได้รับอาหารที่มีส่วนประกอบของกากเอทานอลข้าวโพด มีดัชนีไขมันในช่องท้อง และดัชนีตับสูงที่สุด และมีค่าใกล้เคียงกับปลาที่ได้รับอาหารที่มีส่วนประกอบของแป้งสาลี กากเนื้อในเมล็ดปาล์มบด และรำข้าว แต่มีความแตกต่างทางสถิติ (p<0.05) กับปลาที่ได้รับอาหารที่มีส่วนประกอบของมันสำปะหลังบด ซึ่งมีค่าดัชนีไขมันในช่องท้อง และดัชนีตับต่ำที่สุด แสดงให้เห็นว่า มันสำปะหลัง เป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตที่ดี โดยมีการสะสมเป็นดัชนีไขมันในช่องท้อง และดัชนีตับ ในระดับต่ำ เนื่องจากดูดซึมคาร์โบไฮเดรต หากไม่มีการใช้เป็นแหล่งพลังงานจะทำให้มีการสะสมในตับอาจเป็นไขมัน และอาจไปสะสมเป็นไขมันในตัว เนื่องจากมีการเปลี่ยนรูปแล้ว (Brauge *et al.*, 1995) สำหรับปลาที่ได้รับอาหารที่มีส่วนประกอบของรำข้าว พบว่า ไม่สามารถใช้รำข้าวเพื่อการเจริญเติบโตได้ดี โดยมีการสะสมเป็นดัชนีไขมันในช่องท้อง และดัชนีตับในระดับที่สูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) ในปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่ประกอบด้วยรำข้าว นอกจากมีดัชนีท้อง และดัชนีตับที่สูงแล้ว ยังมีองค์ประกอบของไขมันในตัวค่อนข้างสูง แสดงให้เห็นว่าคาร์โบไฮเดรตที่ดูดซึมได้นอกจากใช้เป็นแหล่งพลังงานยังสามารถเปลี่ยนรูปด้วยกระบวนการลิโปจีนีซิส (Lipogenesis) เป็นไขมันสะสมในตัวหรือในตับ (Mokoginta *et al.*, 2004) เช่นเดียวกับผลการศึกษาในปลา Blackspot seabream (*P. bogavaveo*) ที่ได้รับอาหารที่มีส่วนประกอบของรำข้าว เหนี่ยวนำให้มีการเพิ่มไขมันในตับอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับปลาที่ได้รับอาหารที่มีส่วนประกอบของแป้งสาลี (Valente *et al.*, 2010) ส่วนของระดับของเชื้อแบคทีเรีย พบว่า ปลาที่ได้รับอาหารที่ไม่เสริมเชื้อแบคทีเรียมีดัชนีไขมันในช่องท้องสูงที่สุด มีค่าใกล้เคียงกับปลาที่ได้รับอาหารที่เสริมเชื้อแบคทีเรีย 10^7 CFU/g และมีความแตกต่างทางสถิติ (p<0.05) กับปลาที่ได้รับอาหารที่เสริมเชื้อแบคทีเรีย 10^4 CFU/g ในส่วนของดัชนีตับ ปลาที่ได้รับอาหารที่ไม่เสริมเชื้อแบคทีเรียมีดัชนีไขมันในช่องท้องสูงที่สุด เท่ากับ 2.01±0.46 เปอร์เซ็นต์ มีค่าใกล้เคียงกับปลาที่ได้รับอาหารที่เสริมเชื้อแบคทีเรีย 10^4 CFU/g และมีความแตกต่างทางสถิติ (p<0.05) กับปลาที่ได้รับอาหารที่เสริมเชื้อแบคทีเรีย 10^7 CFU/g ดังนั้นการเสริมเชื้อแบคทีเรียในอาหารปละกะพงขาวทำให้มีการสะสมเป็นดัชนีไขมันในช่องท้อง และดัชนีตับ ในระดับที่ต่ำ ทำให้สามารถนำสารอาหารมาใช้เป็นแหล่งพลังงานที่ใช้ในการเจริญเติบโตได้

ในการศึกษากิจกรรมเอนไซม์ ได้ศึกษากิจกรรมเอนไซม์ 4 ชนิด คือ เอนไซม์อะไมเลส โดยตับอ่อนเป็นอวัยวะที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลส ซึ่งย่อยแป้งให้เป็น Oligo และ Disaccharide ซึ่งจะถูกย่อยต่อในลำไส้ ก่อนดูดซึมผ่านผนังลำไส้เข้าสู่ร่างกาย (ปราณี, 2547) เอนไซม์เซลลูเลส (เอนไซม์ที่ย่อยเซลลูโลส) เอนไซม์ทริปซิน (เอนไซม์ที่ย่อยเพปไทด์ให้เป็นกรดอะมิโน ควบคุมการย่อยโปรตีน โดยทำหน้าที่กระตุ้นโปรเอนไซม์ (Proenzyme) หรือไซโมเจน (Zymogen) ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยโปรตีน) และเอนไซม์ไลเปส (เป็นเอนไซม์ที่ช่วยย่อยไขมัน โดยเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ระหว่างกรดไขมันโมเลกุลยาวกับกลีเซอรอลให้เป็นไตรกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ โมโนกลีเซอไรด์ กรดไขมัน หรือกลีเซอรอล ไลเปสทำงานร่วมกับน้ำดี (Bile Salt) ซึ่งทำให้ไขมันแตกตัวเป็นโมเลกุลเล็ก ก่อนที่จะเกิดการย่อยทางเคมี (Chemical Digestion) ซึ่งเอนไซม์ไลเปสจะช่วยเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ โดยทำหน้าที่ได้ดีที่ พีเอช 7-8.8 (จันทกานต์ และคณะ, 2549) โดยการย่อยไขมันจะเกิดบริเวณไส้ติ่งและลำไส้ตอนต้น เมื่อย่อยแล้วจะได้กรดไขมันเป็นสายสั้นๆ (Halver and Hardy, 2002) โดยเอนไซม์ย่อยอาหารเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อประสิทธิภาพของการใช้อาหาร ซึ่งลักษณะของของเอนไซม์มีความสามารถในการย่อยที่ต่างกัน เพื่อให้ปลาสามารถใช้ประโยชน์จากคาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมันของอาหาร (Lemieux *et al.*, 1999) ซึ่งในการศึกษากิจกรรมเอนไซม์ ที่เวลา 2 และ 8 สัปดาห์ พบว่า แหล่งของคาร์โบไฮเดรตมีผลต่อกิจกรรมเอนไซม์ทริปซิน โดยปลาที่ได้รับอาหารที่มีส่วนประกอบของรำข้าวมีค่าสูงที่สุด นอกจากนั้นระดับของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต A3 มีผลต่อกิจกรรมเอนไซม์ทริปซิน ที่ 2 สัปดาห์ โดยการเสริมเชื้อแบคทีเรียที่สูงขึ้นมีค่าใกล้เคียงกัน แต่มีแนวโน้มให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงขึ้น สอดคล้องกับการทดลองของ Essa และคณะ (2010) ที่ได้ทำการศึกษาการใช้โปรไบโอติก ในปลานิล ซึ่งพบว่า การเสริมโปรไบโอติกด้วย *Bacillus subtilis, Lactobacillus plantarum* ซึ่งให้ผลกิจกรรมเอนไซม์ โปรติเอส อะไมเลส และไลเปส แตกต่างจากชุดควบคุม ($p<0.05$) โดยเอนไซม์และเชื้อแบคทีเรียมีบทบาทในกระบวนการย่อยอาหาร (Munilla-moran *et al.*, 1990) โดยการเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์รวมของลำไส้ และกระตุ้นการผลิตเอนไซม์ภายนอก (Ochoa-Salano and Olmos-Soto, 2006; Wang *et al.*, 2005) ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับประสิทธิภาพการย่อยสารอาหารในหลอดทดลอง ด้วยเอนไซม์สกัดจากไส้ติ่งและลำไส้ของปลากะพงขาว เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ผลผลิตที่ได้จากการย่อย พบว่า แหล่งของคาร์โบไฮเดรตและระดับของเชื้อแบคทีเรียมีอิทธิพลร่วมกัน แต่แหล่งของคาร์โบไฮเดรตมีผลต่อประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตในหลอดทดลอง โดยปลาที่ได้รับอาหารที่มีรำข้าวเสริมเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต A3 10^4 CFU/g มีประสิทธิภาพการย่อยสูงที่สุด และอาหารที่มีแป้งสาลีไม่เสริมเชื้อแบคทีเรีย ให้ค่าผลผลิตต่ำที่สุด ซึ่งขัดแย้งกับการทดลองของ Peres และ Oliva-Teles (2002) ที่ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยด้วยวิธี *In vivo* พบว่า ประสิทธิภาพการย่อยโปรตีน ไม่มีผลมาจากอาหารทดลองในปลากะพงยุโรป รวมถึงการศึกษาของ Gouveia และคณะ (1995) อ้างโดย Peres และ Oliva-Teles (2002) ที่รายงานว่าประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนในปลากะพงขาว ไม่ขึ้นอยู่กับลักษณะทางกายภาพของแป้ง ส่วนประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรตในหลอด

ทดลอง พบว่าปลาที่ได้รับอาหารที่ประกอบด้วยรำข้าว มีประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรต สูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้ปลากะพงขาวมีค่าการย่อยคาร์โบไฮเดรตที่ค่อนข้างต่ำเป็นส่วนใหญ่ อาจเนื่องจากการใช้แหล่งคาร์โบไฮเดรตที่ระดับ 35 เปอร์เซ็นต์ อาจเป็นระดับที่สูงเกินไป ดังเช่นการศึกษาของ Fernandez และคณะ (2007) พบว่า ปลาที่ได้รับอาหารที่ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรตในระดับสูง (High carbohydrate diet) จะมีค่าประสิทธิภาพการย่อยได้ (ADC) ของคาร์บอน โปรตีน และวัตถุแห้ง (Dry matter) ที่ต่ำ และจากการศึกษาครั้งนี้ ดูเหมือนว่าประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรตมีความสัมพันธ์กับการนำสารอาหารที่ได้รับไปใช้ประโยชน์ในการเจริญเติบโต มีการเปลี่ยนรูปและนำไปสะสมในตัวปลา ในรูปแบบต่างๆ เช่น ค่าองค์ประกอบเคมีในตัวปลา ดัชนีไขมัน เป็นต้น โดยจากการศึกษาดังกล่าว ชี้ให้เห็นว่าการเสริมเชื้อแบคทีเรียมีผลต่อกิจกรรมเอนไซม์ และประสิทธิภาพการย่อย โดยทำให้มีแนวโน้มสูงขึ้นเมื่อมีการเสริมเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต A3 แสดงว่าแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ที่ใช้เป็นโปรไบโอติก สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส และสามารถย่อยคาร์โบไฮเดรต เพื่อให้ปลากะพงขาวสามารถนำสารอาหารไปใช้ประโยชน์ได้เพิ่มขึ้น

การศึกษาปริมาณแบคทีเรียในลำไส้ปลากะพงขาว พบว่า ชนิดของแหล่งคาร์โบไฮเดรตและระดับของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต A3 ไม่มีอิทธิพลร่วมกัน โดยการศึกษาครั้งนี้ไม่พบความแตกต่างของปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* spp. ในลำไส้ปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารทดลองสูตรต่างๆ โดยแบคทีเรียเด่นที่พบในลำไส้ปลาจำแนกได้เป็นชนิด *Plesiomonas shigelloides, Staphylococcus* sp. และ *Pseudomonas fluorescens/putida* สอดคล้องกับการทดลองของ Ayaz และคณะ (2010) Wei และคณะ (2010) ที่พบแบคทีเรีย *Psuedomonas* spp. และแบคทีเรียอื่น ๆ ในปลากะพงยุโรป (*Dicentrarchus labrax*) วัยอ่อนและในน้ำเลี้ยงปลากะพงขาว ตามลำดับ นอกจากนั้น Austin (2006) ยังรายงานว่าแบคทีเรีย *Plesiomonas shigelloides, Pseudomonas fluorescens* เป็นแบคทีเรียเด่นที่พบที่ผิวหนังของปลา และ *Staphylococcus* sp. เป็นแบคทีเรียเด่นที่พบที่ทางเดินอาหารของปลา pike perch ซึ่งเชื้อแบคทีเรียในทางเดินอาหารบางชนิดจะช่วยในการย่อยสารอาหารที่มีโครงสร้างซับซ้อนและนำสารอาหารไปใช้ประโยชน์ได้ในปลา (Austin, 2006) การทดลองครั้งนี้ไม่พบแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มักพบได้บ่อยในปลากะพงขาว ทั้งนี้เนื่องจากเลี้ยงปลาทดลองในน้ำจืดทำให้แบคทีเรีย *Vibrio* spp. ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ชอบความเค็ม (Halophilic bacteria) ไม่เจริญในลำไส้ปลาทดลอง การทดลองครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่เสริมในอาหารทดลองไม่สามารถยึดเกาะหรือเพิ่มจำนวนได้ในลำไส้ปลากะพงขาว การศึกษาต่อไปเกี่ยวกับการคัดเลือกชนิดของแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่สามารถดำรงชีวิตในลำไส้ปลากะพงขาวและมีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตและกระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลาจึงนับเป็นสิ่งสำคัญ

5. สรุปผลการศึกษา

ปลากะพงขาวสามารถใช้คาร์โบไฮเดรตที่มีโครงสร้างซับซ้อน คือ แป้งสาลี และกากเอทานอลข้าวโพดได้ดีที่สุด โดยทำให้ปลามีอัตราการเจริญเติบโต อัตราการรอดตาย อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ และประสิทธิภาพการใช้อาหาร รวมถึงประสิทธิภาพการใช้โปรตีน แต่แป้งสาลีมีความเหมาะสมสำหรับใช้เป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตในอาหารสำหรับปลากะพงขาว เนื่องจากปลาที่ได้รับอาหารที่มีส่วนประกอบของแป้งสาลีมีอัตราการเจริญเติบโต อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ ประสิทธิภาพการใช้อาหาร รวมถึงประสิทธิภาพการใช้โปรตีนสูงกว่าแหล่งคาร์โบไฮเดรตอื่นๆ ส่วนการเสริมเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต A3 ซึ่งแยกได้จากตะกอนกระเพาะรูเมนของโคพื้นเมือง มีแนวโน้มว่าปลาที่ได้รับอาหารที่ไม่เสริมเชื้อแบคทีเรียมีอัตราการเจริญเติบโตดีกว่า ทั้งนี้อาจเกิดเนื่องจากความระมัดระวังของผู้ทำการทดลอง ที่มีการให้อาหารที่ไม่เพียงพอต่อความต้องการของปลากะพงขาว แต่พบว่าการเสริมเชื้อแบคทีเรีย A3 ส่งผลให้อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ และประสิทธิภาพการใช้อาหารที่ดีกว่าการไม่เสริมเชื้อแบคทีเรียในอาหาร และจากการคำนวณปริมาณการกินอาหาร จะพบว่าการเสริมเชื้อแบคทีเรียทั้งสองระดับ มีผลทำให้อัตราการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น ดังนั้นการใช้แป้งสาลีเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตและมีการเสริมเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต A3 ทำให้ปลากะพงขาวมีอัตราการเจริญเติบโต อัตราการรอดตาย อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ และประสิทธิภาพการใช้อาหาร รวมถึงประสิทธิภาพการใช้โปรตีนที่ดีกว่าการไม่เสริมเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต A3 ในอาหาร

6. เอกสารอ้างอิง

กลุ่มวิจัยอาหารสัตว์น้ำ. 2534. อาหารสัตว์น้ำ. เอกสารพิมพ์เผยแพร่โดยฝ่ายฝึกอบรม กองส่งเสริมการประมง กรมประมง.

จันทกานต์ นุชสุข, อรุณี อิงคากุล, อุทัยวรรณ โกวิทวที และอรพินท์ จินตสถาพร. 2549. คุณลักษณะของเอนไซม์ย่อยอาหารในปลาสวายหนู *Helicophagus leptorhynchus* Ng&Kottelat, 2000.ใน รายงานการประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร.

ชัยชนะ ตรีทิตย์นิภา, วิโรจน์ ภัทรจินดา, มนต์ชัย ดวงจินดา, ยุพิน ผาสุข และงามนิจ นนทโส. 2553. การใช้ *Bacillus licheniformis* ที่คัดแยกได้จากกระเพาะรูเมนเพื่อเพิ่มการย่อยได้ของอาหารสูตรรวมในระบบ *In vitro*. วารสารแก่นเกษตร 38: 1-5.

ชุติมา ตันติกิตติ. 2547. กายวิภาคและสรีรวิทยาการย่อยอาหารของลูกปลาวัยอ่อน. เอกสารประกอบการฝึกอบรมเรื่อง "Molecular Biological Approaches to Digestion and Feeding in Larval Marine Fish and Shrimp" 6-8 กรกฎาคม 2547. ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ชุติมา ตันติกิตติ. 2549. หลักโภชนศาสตร์และการวิจัยด้านอาหารสัตว์น้ำ. ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ตรี วาทกิจ, บวรศักดิ์ ลีนานนท์ และจันทนี อุริยะพงศ์สรรค์. 2549. การแยกและจำแนกเชื้อแบคทีเรียในปลานิลหลังการเก็บเกี่ยวและการเหลือรอดของเชื้อกลุ่ม *Aeromonas hydrophila* ระหว่างการแปรรูปโดยการรมควันแบบเย็น. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 37: 333-336.

เทอดชัย เวียรศิลป์. 2548. โภชนศาสตร์สัตว์เคี้ยวเอื้อง. ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

นิธิยา รัตนาปนนท์. 2549. เคมีอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์.

บุญล้อม ชีวอิสระกุล. 2541. ชีวเคมีทางสัตวศาสตร์. ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ปราณี อ่านเปรื่อง. 2547. เอนไซม์ทางอาหาร. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรมหาวิทยาลัย.

พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์. 2556. แบคทีเรียที่มีบทบาทสำคัญในอาหาร. http://www.foodnetworksolution.com. (สืบค้นเมื่อ 25 มีนาคม 2556).

เมธา วรรณพัฒน์. 2533 .โภชนศาสตร์สัตว์เคี้ยวเอื้อง. กรุงเทพฯ: ฟันนี่พับบลิชชิ่ง.

มนตรี จุฬาวัฒนทล, ชิษณุสรร สวัสดิวัตน์, ยงยุทธ ยุทธวงศ์, ภิญโญ พานิชพันธ์, ประหยัด โกมารทัต, พิณทิพ รื่นวงษา, ธีรยศ วิทิตสุวรรณกุล, บุรชัย สนธยานนท์, สุมาลี ตั้งประดับกุล และมธุรส พงษ์ลิขิตมงคล. 2542. ชีวเคมี. ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. กรุงเทพฯ: จิรรัชการพิมพ์.

วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. 2536. อาหารปลา Fish nutrition. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์. กรุงเทพฯ.

วุฒิพร พรหมขุนทอง. 2541. โภชนศาสตร์สัตว์น้ำ. ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

เวียง เชื้อโพธิ์หัก. 2542. โภชนศาสตร์สัตว์น้ำและการให้อาหารสัตว์น้ำ. ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. พิมพ์ครั้งที่ 1. 255 หน้า.

สร้อยแก้ว เอียงอุบล. 2555. ผลของชนิดและระดับของคาร์โบไฮเดรตต่อการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหาร และเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับเมแทบอลิซึมในการใช้คาร์โบไฮเดรตของปลากะพงขาว. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรบัณฑิต, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

เสาวลักษณ์ จิตรบรรเจิดกุล. 2534. เคมีอาหารเบื้องต้น. ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

Anderson, J. A., Jackson, J. Matty, A. J. and Copper, B. S. 1984. Effects of dietary carbohydrate and fiber on the tilapia (*Oreochromis niloticus)*. Aquaculture 37: 303-314.

AOAC 1999. Official Methods of Analysis. 15th Ed. The Association of Official Analytical Chemists: Washington, DC.

Aly, S.M., Andel-Galil Ahmed, Y., Andel-Aziz Ghareeb, A., and Mohamed, M.F. 2008a. Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of Tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*) to challenge infection. Immunology 25: 128-136.

Aly, S.M., Mohamed, M.F. and John, G. 2008b. Effect of probiotics on the survival, growth and challenge infection in Tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture Research 39: 647-656.

Austin, B. 2006. The Bacterial Microflora of Fish, Revised. The Scientific World Journal 6: 931–945.

Ayaz, A. and Karatas, S. 2010. Dominant aerobic bacterial community of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L. 1758) larvae during weaning from Artemia to dry feed in culture conditions. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences 34: 501-506.

Benjakul, S. and Morrissey, M.T. 1997. Protein hydrolysates from Pacific whiting solid waste. Journal of Agricultural and Food Chemistry 61: 131-138.

Bergmeyer, H.U., Brent, E., Schmidt, E. and Stork, H. 1974. D-Glucose: Determination with hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. In Bergmeyer, H.U., Bergmeyer, J. and Graßl, M. (Eds.) Methods of Enzymatic Analysis, Volume 3. New York. Academic Press.

Bitterlich, G. 1985. Digestive enzyme pattern of two stomachless filter feeders, silver carp, *Hypophthalmichthys molitrix* Val., and bighead carp, *Aristichthys nobilis* Rich. Journal of Fish Biology 27: 103–112.

Bondi, A. and Spannhof, A. 1954. Action of the digestive enzymes of the carp. British Journal of Nutrition 8: 240–246.

Brauge, C., Corraze, G. and Medale, F. 1995. Effects of dietary levels of carbohydrates and lipid on glucose oxidation and lipogenesis from glucose in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss,* reared in freshwater or in seawater. Comparative Biochemistry and Physiology, Part A 111: 117-124.

Chakrabarti, I., Gani, M.A., Chaki, K.K., Sur, R. and Misra, K.K. 1995. Digestive enzymes in 11 freshwater teleost fish species in relation to food habit and niche segregation. Comparative Biochemistry and Physiology A 112: 167–177.

Chiu, Y.N. and Benitez, L.V. 1981. Studies on the carbohydrates in the digestive tract of the milk fish, *Chanos chanos.* Marine Biology 61: 247–254.

Church, D.C. 1993. The Ruminant Animal Digestive Physiology and Nutrition. Ilinois :Waveland Press, Inc.

Collins, C.H. and Lyne, P.M. 1976. Microbiological Methods. Boston, USA: Butterworth.

Das, K.M. and Tripathi, S.D. 1991. Studies on the digestive enzymes of grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Val.). Aquaculture 92: 21–32.

De Silva, S.S. and Anderson, T.A. 1995. Fish nutrition in aquaculture, London, Chapman & Hall, 319 pp.

Dias, J., Alvarez, M.J., Diez, A., Arzel, J., Corraze, G., Bautista, J.M. and Kaushik, S.J. 1998. Regulation of hepatic lipogenesis by dietary protein/energy in juvenile European seabass (*Dicentrararchus labrax*). Aquaculture 161: 169-186.

EL-Haroun, E.R., A-S Goda, A.M. and Kabir Chowdhury, M.A. 2006. Effect of dietary probiotic Biogens supplementationn as a growth promoter on growth performance and feed utilization of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture Research 37: 1473-1480.

Essa, M.A., El-Serafy, S.S., El-Ezabi, M.M., Daboor, S.M., Esmael, N.A. and Lall, S.P. 2010. Effect of different dietary probiotics on growth, feed utilization and digestive enzymes activityes of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus.* Aquaculture 5: 143-162.

Fagbenro, O.A. 1990. Food composition and digestive enzymes in the gut of pond-cultured *Clarias isheriensis* (Sydenham 1980), (*Siluriformes Clariidae*). Journal of applied ichthyology 6: 91–98.

Fernandez, F., Miquel, A.G., Cordoba, M., Varas, M., Meton, I., Caseras, A. and Baanante, I.V. 2007. Effect of diets with distinct protein-to-carbohydrite ratios on nutrient digestibility, growth performance, body composition and liver intermediary enzyme activities in gilthead sea bream (*Sparus aurata,* L.) fingerlings. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 343: 1-10.

Fish, G.K. 1960. Comparative activity of some digestive enzymes in the alimentary canal of Tilapia and perch. Hydrobiologia 15: 161–178.

Fu, S.J. 2005. The growth performance of southern catfish fed diets with raw, precooked cornstarch and glucose at two levels. Aquaculture Nutrition 11: 257-261.

Furuichi, M. 1983. Studies on the utilisation of carbohydrates. Report of the Fish Research Laboratory, Kyushu University, 6: 1–59.

Fynn-Aikins, K., Hung, S.S.O., Liu, W. and Li, H. 1992. Growth, lipogenesis and liver composition of juvenile white sturgeon fed different level of D-glucose. Aquaculture 105: 61-72.

Ghose, T.K. 1987. Measurement of cellulase activities. International Union of Pure and Applied Chemistry 59.

Goering, H.K. and Van Soest, P.J. 1970. Forage analyses. Agriculture Handbook 379. Agriculture Research Service. United State Department of Agriculture.

Gouveia, A., Oliva-Teles, A., Gomes, E., Peres, M.H., 1995. The effect of two dietary levels of raw and gelatinized starch on growth and food utilization by the European sea bass. In: Castello´ , I., Orvay, F., Calderer, I., Reig, A. (Eds.), Proc. of the Fifth National Congress on Aquaculture, University of Barcelona, Spain, 516– 521.

Grisdale-Helland, B. and Helland, S.J. 1997. Replacement of protein by fat and carbohydrate in diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*) at the end of the freshwater stage. Aquaculture 152: 167-180.

Halver J.E. 1989. Fish Nutrition. Academic Press. San Diego.

Halver, J.E. and Hardy, R.W. 2002. Fish Nutrition. Academic Press. United States of America.

Hemre, G.I., Mommsen, T.P. and Krogdahl, A. 2002. Carbohydate in fish nutrition: Effect on growth, glucose metabolism and hepatic enzyme. Aquaculture Nutrition 8: 175-194.

Hemre, G.I., Sanden M., Bakke-McKellep, A. M., Sagstad, A., and Krogdahl, A. 2005. Growth, feed utilization and health of Atlantic salmon *Salmo salar* L. fed genetically modified compared to non-modified commercial hybrid soybeans. Aquaculture Nutrition 11: 157-167.

Hidalgo, M.C., Urea, E. and Sanz, A. 1999. Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities. Aquaculture 170: 267-283.

Hilton, J.W., Atkinson, J.I. and Singer, S.J. 1983. Effect of increased dietary fiber on the growth of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 40: 81-85.

Ihekoronye, I.A. 1986. Rapid in vitro enzymatic predictive model for the in vivo digestibility of food protein. Journal of Food Technology 21: 81-87.

Kaitamikado, M. and Tachino, S. 1960. Studies on digestive enzymes of rainbow trout. I. Carbohydrases. Bulletin of the Japanese Society for Scientific Fisheries 26: 679–684.

Kapoor, B.B., Smit, H. and Verighina, I.A. 1975. The alimentary canal and digestion in teleosts. Advances in Marine Biology 13: 109-239.

Kaushik, S.J. and Oliva-Teles, A.D. 1985. Effect of digestible energy on nitrogen and energy balance in rainbow trout. Aquaculture 50: 89-101.

Kori-Siakpere, O. 2004. Carbohydrases in the alimentary canal and associated organs of the Africans snakehead, *Parachanna africans* (Osteichthyes: Channidae). The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh 56: 22-28.

Krogdahl, A., Hemre, G-I. and Mommsen, T.P. 2005. Carbohydrates in fish nutrition: digestion and absorption in postlarval stages. Aquaculture Nutrition 11: 103-122.

Kumar, V., Sahu, N.P., Pal, A.K., Kumar, S. and Gupta, S.K. 2008. Gelatinized to non-gelatinized starch ratio in the diet of *Labeo rohita* : Effect on digestive and metabolic response and on growth. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition 92: 492-353.

Larsen, H.N. and Snieszko, S.F. 1961. Modification of the microhematocrit technique with trout blood. Transactions of the American Fisheries Society 90: 139-142.

Lee, S.M. and Lee, J.H. 2004. Effect of dietary glucose, dextrin and starch on growth and body composition of juvenile starry flounder *Platichthys stellatus*. Fisheries Science 70: 53-58.

Lee, S.M., Kima K.D., Lall, S.P. 2003. Utilization of glucose, maltose, dextrin and cellulose by juvenile flounder (*Paralichthys olivaceus*). Aquaculture 70: 53-58.

Lemieux, H., Blier, P. and Dutil, J.D. 1999. Do digestive enzymes set a physiological limit on growth rate and food conversion efficiency in the Atlantic cod (*Gadus morhua*)? Journal of Fish Biology 20: 293-303.

Lindsay, G.J.H. and Harris, J.E. 1980. Carboxymethylcellulase activity in the digestive tracts of fish. Journal of Fish Biology 16: 219–233.

Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Follin Phenol Reagent. The Journal of Biological Chemistry 193: 265-275.

Mokoginta, I., Takeuchi, T., Hadadi, A. and Dedi, J. 2004. Different capabilities in utilizing dietary carbohydrate by fingerling and subadult giant gouramy *Osphronemus gouramy.* Fisheries Science 70: 996-1002.

Munilla-Moran, R., Stark, J.R. and Barbour, A. 1990. The role of exogenous enzymes in digestion in cultured turbot larvae (*Scopthalmus maximus* L.). Aquaculture 88: 337-350.

National Research Council (NRC). 1993. *Nutrient requirements of fish.* Washington, D.C., National Academy Press, 114 pp.

Ochoa-Solano, L.J., and Olmos-Soto, J. 2006. The Functional property of *Bacillus* for shrimps feeds. Food microbiology 23: 519-535.

Ogino, C., Chiou, J.Y. and Takeuchi, T. 1976. Protein nutrition in fish. VI. Effect of dietary energy sources on the utilization of protein by rainbow trout and carp. Bulletin Japaness Society Scientific fisheries 42: 213-218.

Peres, H. and Oliva-Teles, A. 2002. Utilization of raw and gelatinized starch by European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. Aquaculture 205: 287-299.

Rawles, S.D. and Gatlin, D.M. 1998. Carbohydrate utilization in striped bass (*Morone saxatilis*) and sunshine bass (*M. chrysops* x *M. Saxatilis*). Aquaculture 161: 201-212.

Russell, J.B. 2002. Rumen Microbiology and Its Role in Ruminant Nutrition. New York: Cornell University Press.

Rust, M. 2002. Nutritional Physiology. In: Halver, J.E and Hardy, R.W. (Eds.). Fish Nutrition. 3rd edition. Academic Press. California. USA.

Saha, A.K. and Ray, A.K. 1998. Cellulase activity in rohu fingerlings. Aquaculture International 6: 281-291.

Schwarz, F.J. and Kirchgessner, M. 1995. Effects of different diets and levels of feeding on retention and efficiency of utilization of energy and protein by carp (*Cyprinus carpio* L.). Journal of Applied Ichthyology 11: 363–366.

Shiau, S.Y. and Peng, J.C. 1997. Protein sparing effect by carbohydrate in diets for tilapia, *Oreochiomis niloticus* x *O. aureus.* Aquaculture 133: 249-256.

Stone, D. A. J. 2003. Dietary carbohydrate utilization by fish. Reviews in Fisheries Science 11: 337–369.

Supannapong, P., Pimsalee, T., A-komol, T., Engkagul, A., Kovitvadhi, U., Kovitvadhi, S. and Rungruangsak-Torrissen, K. 2008. Digestive enzymes and *in-vitro* digestibility of different species of phytoplankton for culture of the freshwater pearl mussel, *Hyriopsis (Hyriopsis) bialatus.* Aquaculture International 16: 437-453.

Tan, Q., Xie, S., Zhu, X., Lei, W. and Yang, Y. 2006. Effect of dietary carbohydrate sources on growth performance and utilization for gibel carp (*Carassius auratus gibelio*) and Chinese longsnout catfish (*Leiocassis longirostris* Günther). Aquaculture Nutrition 12: 61–70.

Valente, L.M.P., Olmedo, M., Borges, P., Soares, S. Gomes, E.F.S., Alvarez-Blazquez, B., Pazos, G. and Linares, F. 2010. Effects of carbohydrate sources on growth, body composition and tissue lipid deposition of blackspot seabream, *Pagellus bogaraveo* (Brunnich). Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition 94: 212-219.

Van Soest, P.J. 1994. Nutritional Ecology of the Ruminant. สืบค้นจาก http://flickr.com. (สืบค้นเมื่อวันที่ 20 มิถุนายน พ.ศ. 2552).

Venou, B., Alexis, M.N., Fountoulaki, E., Nengas, I., Apostolopoulou, M. and Castritsi-Cathariou, I. 2003. Effect of extrusion of wheat and corn on gilthead sea bream (*Sparus aurata*) growth, nutrient utilization efficiency, rates of gastric evacuation and digestive enzyme activities. Aquaculture 225: 207-223.

Walford, J. and Lam, T.J. 1993. Development of digestive tract and proteolytic enzyme activity in sea bass (*Lates calcarifer*) larvae and juveniles. Aquaculture 109: 187-205.

Wang, Y., Liu, Y.J., Tian, L.X., Du, Z.Y., Wang, J.T., Wang, S. and Xiao, W.P. 2005. Effects of dietary carbohydrate level on growth and body composition of juvenile tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O.aureus*. Aquaculture Research 36: 1408-1413.

Wei, L.S., Musa, N. and Wee, W. 2010. Bacterial flora from a healthy freshwater Asian sea bass (*Lates calcarifer*) fingerling hatchery with emphasis on their antimicrobial and heavy metal resistance pattern. Veterinarski Arhiv 80: 411-420.

Weinberg, Z.G., Shatz, O., Chen, Y., Yosef, E., Nikbahat, M., Ben-Ghedalia, D. and Miron, J. 2007. Effect of lactic acid bacteria inoculants on *in vitro* digestibility of wheat and corn silages. Journal of Dairy Science 90: 4754-4762.

Wilson, R. P. 1994. Utilization of dietary carbohydrate by fish. Aquaculture 124: 67–80.

Yanbo, W. and Zirong, X. 2006. Effect of probiotics for common carp (*Cyprinus carpio*) based on growth performance and digestive enzyme activities. Animal Feed Science and Technology 127: 283-292