รายงานการวิจัย

การใช้ถั่วเหลืองหมักด้วยเชื้อรา *Aspergillus niger* ในอาหารผสมต่อการเจริญเติบโต ค่าโลหิตวิทยา และการต้านอนุมูลอิสระของปลากะพงขาว

Utilization of Fermented Soybean Meal by Fungi *Aspergillus niger* in Formulated Diets on Growth Performances, Haematological Parameters and Total Antioxidant Capacity in Asian Seabass (*Lates culcarifer* Bloch, 1970)

วรวุฒิ เกิดปราง Worawut Koedprang

อุทร เจริญเดช Uton Charoendat

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

งบประมาณแผ่นดิน ประจำปีพุทธศักราช 2560

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย งบประมาณแผ่นดิน ประจำปีพุทธศักราช 2560 ผู้วิจัยขอขอบคุณ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตตรัง ในการสนับสนุนทุนวิจัย รวมทั้งอุปกรณ์และสถานที่ในการวิจัยครั้งนี้ ขอขอบคุณ ผู้ช่วยการวิจัย นักศึกษาสาขาวิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและเจ้าหน้าที่ศูนย์วิสาหกิจศึกษา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง ที่ให้การสนับสนุนต่าง ๆ จนกระทั่งการวิจัยสำเร็จลุล่วง

วรวุฒิ เกิดปราง

อุทร เจริญเดช

กรกฎาคม 2561

การใช้ถั่วเหลืองหมักด้วยเชื้อรา *Aspergillus niger* ในอาหารผสมต่อการเจริญเติบโต ค่าโลหิตวิทยา และการต้านอนุมูลอิสระของปลากะพงขาว

วรวุฒิ เกิดปราง[1] อุทร เจริญเดช[1]

บทคัดย่อ

การศึกษาผลของเชื้อรา *Aspergillus niger* ท้องถิ่น จากพื้นที่การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเพื่อปรับปรุงคุณภาพของถั่วเหลืองป่น ด้วยการหมักและผสมในอาหารปลากะพงขาว และผลิตเป็นอาหารเม็ดชนิดจมน้ำปริมาณโปรตีน 40 เปอร์เซ็นต์ โดยแหล่งโปรตีนหลักของอาหารมาจากปลาป่น และใช้โปรตีนจากถั่วเหลืองป่นหมักแทนที่ในปริมาณ 0, 25, 75 และ 100 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนถั่วเหลืองป่น 4 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารสูตร D1-D4 และ ใช้โปรตีนจากถั่วเหลืองป่นหมักแทนที่ในปริมาณ 0, 25, 75 และ 100 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนถั่วเหลืองป่น 8 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารสูตร D5-D8 เลี้ยงปลากะพงขาวน้ำหนักเริ่มต้น 12.83-12.90 กรัม ในตู้กระจกขนาด 100 ลิตร จำนวนตู้ละ 10 ตัว ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ ให้อาหารจนอิ่มวันละ 2 ครั้ง เป็นเวลา 10 สัปดาห์ เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่าน้ำหนัก อัตราการเจริญเติบจำเพาะ อัตราการแลกเนื้อ ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน และต้นทุนค่าอาหารต่อหน่วยการผลิต ปริมาณเม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาว ค่าฮีมาโตคริต และการต้านอนุมูลอิสระโดยรวม มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ขณะที่ความยาว อัตรารอดตาย อัตราการกินอาหาร อัตราส่วนที่บริโภคได้ และค่าดัชนีตับ ปริมาณฮีโมโกลบิน ปริมาณเม็ดเลือดแดงเฉลี่ย ปริมาณฮีโมโกลบินต่อเซลล์เม็ดเลือดแดง ความเข้มข้นเฉลี่ยของฮีโมโกลบินในเซลล์เม็ดเลือดแดงของทุกชุดการทดลองไม่ความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าอาหารที่ใช้โปรตีนจากถั่วเหลืองป่นหมักทดแทน 25-100 เปอร์เซ็นต์ ของโปรตีนจากถั่วเหลืองป่น 4 เปอร์เซ็นต์ (D2-D4) มีผลต่อการเพิ่มการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหาร ปริมาณเม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาว และการต้านอนุมูลอิสระโดยรวมของปลากะพงขาว แลขณะที่ต้นทุนค่าอาหารต่อหน่วยการผลิตลดลงตามลำดับ โดยอาหารที่ใช้ถั่วเหลืองป่นหมัก 100 เปอร์เซ็นต์ มีต้นทุนการผลิตที่ต่ำที่สุด ดังนั้นจึงเป็นทางเลือกหนึ่งในการเพิ่มผลผลิตและต้นทุนค่าอาหารของเกษตรกรผู้เลี้ยงปลากะพงขาว

คำสำคัญ : เชื้อราท้องถิ่น ถั่วเหลืองป่นหมัก ปลากะพงขาว

---

[1]สาขาเทคโนโลยีการประมง คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตตรัง

Utilization of Fermented Soybean Meal by Fungi *Aspergillus niger* in Formulated Diets on Growth Performances, Haematological Parameters and Total Antioxidant Capacity in Asian Seabass (*Lates culcarifer* Bloch, 1970)

Worawut Koedprang[1] **Uton Charoendat**[1]

Abstract

The utilization of indigenous mold *Aspergillus niger* from aquaculture area to improve the quality of soybean meal (SM) by fermentation and replacement in Asian seabass diet was studied on growth performances and feed utilization in juvenile Asian seabass, *Lates calcalifer*. The sinking diets with 40% of protein were formulated. The main sources of protein in diets were from a fish meal (FM). The 4% of protein from SM, 10% of total protein was used in diets D1-D4 with replacement of fermented soybean meal (FSM) at 0, 25, 75 and 100%, respectively and 8% of protein from SM, 20% of total protein was used in diets D5-D8 with replacement of FSM at 0, 25, 75 and 100%, respectively. An initial weight of juvenile Asian seabass was 12.83-12.90 g. The 10 fish were stocked in 100 L glass tank with triplicate groups. Each diet was fed *ad libitum* twice daily for 10 weeks. The results presented that, the final body weight, specific growth rate, feed conversion ratio, protein efficiency ratio, feed capital, red and white blood cell, haematocrit and total antioxidant capacity shown significant difference ($P<0.05$) while final total length, survival rate, carcass percentage and hepatosomatic index, haemoglobin, mean corpuscular volume, mean corpuscular haemoglobin and mean corpuscular haemoglobin concentration were not significant differences ($P>0.05$). The 4% of protein from SM able to replaced by 25-100% of FSM with increased growth performances and feed utilization while feed cost (Thai baht kg^{-1} of fish) was reduced, respectively. The *A. niger* FSM is alternative protein source for growth, feed utilization improvement, and feed cost reduction of Asian seabass farmers.

Keyword: Fermented soybean meal, Indigenous *Aspergillus niger*, Asian seabass

[1] Department of Fisheries Technology, Faculty of Science and Fisheries Technology, Rajamangala University of Technology Srivijaya, Trang Campus

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(ก)
สารบัญตาราง	(ข)
สารบัญภาพ	(ค)
บทนำ	1
วัตถุประสงค์	5
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	6
วิธีดำเนินการวิจัย	7
ผลการวิจัย	12
วิจารณ์ผลการวิจัย	40
สรุปผลการวิจัย	44
เอกสารอ้างอิง	45

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	องค์ประกอบของวัตถุดิบอาหาร คุณค่าทางโภชนาการ และต้นทุนการผลิตอาหารปลากะพงขาว 8 สูตร (D1-D8)	8
2	น้ำหนัก ความยาว อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (SGR) อัตรารอดตาย (SR) ±SE ของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารผสมถั่วเหลืองป่นหมักด้วยเชื้อรา *Aspergillus niger* ในอัตราส่วนที่ต่างกัน เป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์	13
3	อัตราการกินอาหาร (FI) อัตราแลกเนื้อ (FCR) ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน (PER) อัตราส่วนที่บริโภคได้ (Carcass) ค่าดัชนีตับ (HIS) และต้นทุนค่าอาหาร ±SE ของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารผสมถั่วเหลืองป่นหมักด้วยเชื้อรา *Aspergillus niger* อัในตราส่วนที่ต่างกัน เป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์	19
4	ปริมาณเม็ดเลือดแดง (RBC) และเม็ดเลือดขาว (WBC) ทั้งหมด ฮีมาโตคริต (Hct) ปริมาณฮีโมโกลบิน (Hb) ปริมาตรเฉลี่ยของเม็ดเลือดแดง (MCV) ปริมาณฮีโมโกลบินเฉลี่ยต่อเซลล์เม็ดเลือดแดง (MCH) ความเข้มข้นเฉลี่ยของฮีโมโกลบินในเซลล์เม็ดเลือดแดง (MCHC) และการต้านอนุมูลอิสระโดยรวม (TAC) ±SE ของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารผสมถั่วเหลืองป่นหมักด้วยเชื้อรา *Aspergillus niger* ในอัตราส่วนที่ต่างกันเป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์	29
5	ชนิดเม็ดเลือดขาวของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารผสมถั่วเหลืองป่นหมักด้วยเชื้อรา *Aspergillus niger* ในอัตราส่วนที่ต่างกัน เป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์	30

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	น้ำหนักปลากะพงขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร D1-D8 เป็นเวลา 10 สัปดาห์	14
2	ความยาวของปลากะพงขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร D1-D8 เมื่อเวลา 10 สัปดาห์	15
3	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (SGR) ของปลากะพงขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร D1-D8 เมื่อเวลา 10 สัปดาห์	16
4	อัตรารอดตาย (SR) ของปลากะพงขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร D1-D8 เมื่อเวลา 10 สัปดาห์	17
5	อัตราการกินอาหาร (FI) เฉลี่ยของปลากะพงขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร D1-D8 เป็นเวลา 10 สัปดาห์	20
6	อัตราแลกเนื้อ (FCR) ของปลากะพงขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร D1-D8 เมื่อเวลา 10 สัปดาห์	21
7	ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน (PER) ของปลากะพงขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร D1-D8 เมื่อเวลา 10 สัปดาห์	22
8	อัตราส่วนที่บริโภคได้ (Carcass) เฉลี่ยของปลากะพงขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร D1-D8 เมื่อเวลา 10 สัปดาห์	23
9	ค่าดัชนีตับ (HSI) ของปลากะพงขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร D1-D8 เมื่อเวลา 10 สัปดาห์	24
10	ต้นทุนค่าอาหารในการผลิตปลากะพงขาว 1 กิโลกรัม เฉลี่ยของปลากะพงขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร D1-D8 เป็นเวลา 10 สัปดาห์	25
11	ปริมาณเม็ดเลือดแดง (RBC) ของปลากะพงขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร D1-D8 เมื่อเวลา 10 สัปดาห์	31
12	ปริมาณเม็ดเลือดขาว (WBC) ของปลากะพงขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร D1-D8 เมื่อเวลา 10 สัปดาห์	32
13	ค่าฮีมาโตคริต (Hct) ของปลากะพงขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร D1-D8 เมื่อ เมื่อเวลา 10 สัปดาห์	33

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
14	ปริมาณฮีโมโกลบิน (Hb) ของปลากะพงขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร D1-D8 เมื่อเวลา 10 สัปดาห์	34
15	ปริมาตรเฉลี่ยของเม็ดเลือดแดง (MCV) ของปลากะพงขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร D1-D8 เมื่อเวลา 10 สัปดาห์	35
16	ปริมาณฮีโมโกลบินเฉลี่ยต่อเซลล์เม็ดเลือดแดง (MCH) ของปลากะพงขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร D1-D8 เมื่อเวลา 10 สัปดาห์	36
17	ความเข้มข้นเฉลี่ยของฮีโมโกลบินในเซลล์เม็ดเลือดแดง (MCHC) ของปลากะพงขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร D1-D8 เมื่อเวลา 10 สัปดาห์	37
18	ชนิดเม็ดเลือดของปลากะพงขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร D1-D8 เมื่อเวลา 10 สัปดาห์	38
19	การต้านอนุมูลอิสระโดยรวม (TAC) ของปลากะพงขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร D1-D8 เมื่อเวลา 10 สัปดาห์	39

บทนำ

ปลากะพงขาวเป็นปลาน้ำกร่อยขนาดใหญ่ มีชื่อสามัญว่า Giant Perch หรือ Seabass และมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Lates calcarifer* (Bloch, 1970) เจริญเติบโตได้ดีทั้งในน้ำจืด น้ำกร่อยและน้ำเค็ม มีการเลี้ยงกันอย่างแพร่หลายในบริเวณพื้นที่ชายฝั่งทะเลของประเทศไทย เนื่องจากเลี้ยงง่ายและโตเร็ว ปัจจุบันประเทศไทยสามารถเพาะพันธุ์ปลากะพงขาวเพื่อเลี้ยงในประเทศและส่งออกไปต่างประเทศ เช่น ไต้หวัน สิงค์โปร์ มาเลเซีย ฮ่องกง และประเทศจีน เป็นต้น (กรมประมง, 2536) ปลากะพงขาวจัดเป็นปลากินเนื้อ อาหารที่ให้ควรมีโปรตีนประมาณ 40-45 เปอร์เซ็นต์ (อมรรัตน์ และคณะ, 2548)

ปลากะพงขาวเป็นปลากินเนื้อจึงมีความต้องการโปรตีนในอาหารสูง แหล่งโปรตีนหลักในอาหารปลากะพงขาว คือ ปลาป่นซึ่งสภาวะปัจจุบันปริมาณการผลิตปลาป่นมีไม่เพียงพอต่อความต้องการใช้ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์และการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ส่งผลให้ปลาป่นขาดแคลนและทำให้ราคาของปลาป่นเพิ่มสูงขึ้นตามความต้องการของตลาด ส่งผลให้ราคาอาหารสัตว์น้ำมีราคาสูงขึ้นตามไปด้วย (Hardy, 2010) กากถั่วเหลืองเป็นวัตถุดิบที่เป็นแหล่งโปรตีนจากพืชที่นิยมนำมาใช้ทดแทนการใช้ปลาป่นอย่างกว้างขวางเนื่องจากมีโปรตีนสูง และมีราคาถูกกว่าปลาป่น (Bonaldo et al., 2006 ; Carter and Hauler, 2000) แม้ว่ากากถั่วเหลืองเป็นแหล่งทดแทนปลาป่นในอาหารสัตว์น้ำได้ดี แต่กากถั่วเหลืองยังขาดความสมดุลของกรดอะมิโน และมีสารต้านโภชนะ (antinutritional factors; ANFs) หลายชนิด ได้แก่ protease inhibitors จำพวก trypsin inhibitors, lectins, phytic acid, saponins, phytoestrogens, antivitamins และ allergens (Francis et al., 2001; Deng et al., 2006 ; Wang et al., 2006) และสาร oligosaccharides ที่มีผลต่อการลดอัตราการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้สารอาหารในสัตว์ (Anderson et al. 1979)

การศึกษาการใช้กากถั่วเหลืองในอาหารสัตว์น้ำ ได้แก่ Wee and Shu (1989) ใช้กากถั่วเหลืองทดแทนปลาป่นในอัตรา 55 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารปลานิล มีผลให้การเจริญเติบโตลดลง Reigh and Ellis (1992) ใช้กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันด้วยตัวทำละลายทดแทนปลาป่น 53 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารปลา Red drum มีผลให้อัตราการกินอาหารและการเจริญเติบโตลดลง อัตราการตายสูงขึ้น ขณะที่ Romarheim et al. (2008) และ Merrifield et al. (2009) รายงานการใช้กากถั่วเหลืองในอาหารปลาเรนโบว์เทราท์ (Rainbow trout) มีผลให้สัณฐานวิทยาของลำไส้เปลี่ยนแปลงไปเช่นเดียวกับที่ Bakke-McKellep et al. (2007) รายงานในปลาแอตแลนติก แซลมอน (Atlantic salmon) Tantikitti et al. (2005) ศึกษาการทดแทนปลาป่นด้วยกากถั่วเหลืองในปลากะพงขาว พบว่าสามารถทดแทนโปรตีนจากปลาป่นด้วยโปรตีนจากกากถั่วเหลืองได้ 10 เปอร์เซ็นต์ โดยไม่มีผลต่อการเจริญเติบโต หากผสมกากถั่วเหลืองมากกว่านี้ทำให้ปลามีการเจริญเติบโตช้าลง

การกำจัดสารต่อต้านโภชนะในวัตถุดิบอาหารมีด้วยกันหลายวิธี เช่น การให้ความร้อน (Barrows et al., 2007) การให้ความร้อนด้วยหม้อนึ่งความดัน 15-30 นาที สามารถลดปริมาณของ trypsin ininbitors ในกากถั่วเหลืองให้ต่ำกว่าระดับวิกฤตได้ (Norton, 1991) แต่การใช้ความร้อนควรกระทำอย่างระมัดระวัง เนื่องจากความร้อนนอกจากจะทำลายสารต้านโภชนะต่าง ๆ แล้วยังมีผลต่อคุณภาพของสารอาหารในวัตถุดิบอาหารด้วย เช่น การทำให้โปรตีนเสียสภาพ ได้แก่ การเสื่อมสภาพของกรดอะมิโนไลซีนส่งผลต่อการนำไปใช้ประโยชน์ได้ลดลง เพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาดังกล่าว การหมักด้วยจุลินทรีย์ (fermentation) เป็นอีกวิธีที่สามารถลดปริมาณสารต้านโภชนะกากถั่วเหลืองได้ (Francis et al., 2001) แบคทีเรียจะใช้น้ำตาลจากพืชโดยการย่อยเซลลูโลส และคาร์โบไฮเดรตให้มีโมเลกุลเล็กลง เพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานและสร้าง volatile fatty acids (VFAs) เช่น กรดอะซีติก กรดแลคติก และกรดโปรปิโอนิค เป็นต้น ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ จุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเน่าเสียได้ ช่วยรักษาคุณค่าทางอาหารไม่ให้สูญสลาย และสามารถเก็บอาหารหมักไว้ได้นานโดยไม่ต้องใช้วิธีการถนอมอื่น ๆ (Moran, 2005 ; Chiba et al., 2005) และโปรตีนจะถูกย่อยเป็นกรดอะมิโน (Allagheny et al., 1996) นอกจากนี้แบคทีเรียหลายชนิดในการหมักสามารถสร้างวิตามิน เช่น *Lactobacillus* sp. สร้างกรดโฟลิค และวิตามินบี 3 นอกจากนี้การหมักในสภาวะที่เหมาะสมจะช่วยเพิ่มความอยากอาหารและเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยอาหารให้แก่สัตว์ได้ อีกทั้งการหมักยังช่วยลดสารต้านโภชนะ (anti-nutritional factors; ANFs) ในวัตถุดิบอาหารจากผลของกรดแลคติก (Cruz et al., 2011) รวมทั้งลดความเป็นพิษของสารไนเตรทที่สะสมอยู่ในพืชที่ได้รับการใส่ปุ๋ยมากเกินไป (FAO, n.d.) การศึกษาของ Hong et al. (2004) พบว่าทำให้ขนาดโมเลกุลเปปไทด์ (peptide) มีขนาดเล็กลงด้วย จากการใช้เชื้อรา *Aspegillus oryzea* หมักถั่วเหลืองและกากถั่วเหลืองมีผลทำให้ มีปริมาณโปรตีนสูงกว่าถั่วเหลืองและกากถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการหมัก 10 เปอร์เซ็นต์ สามารถกำจัดสาร trypsin inhibitors และทำให้ขนาดของเปปไทด์ที่น้อยกว่า 20 kDa มีปริมาณมากขึ้น และลดปริมาณเปปไทด์ขนาดมากกว่า 60 kDa

นอกจากนี้เส้นใยของเชื้อรามีสารกลูแคน (glucans) หลายชนิดเป็นองค์ประกอบ โดยเฉพาะเบต้ากลูแคน (β-glucans) (Ruiz-Herrera, 1991; Rop et al. 2009) ซึ่งสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน ช่วยป้องกันสิ่งแปลกปลอม ลดการอักเสบของเซลล์ในสิ่งมีชีวิตรวมถึงมนุษย์ (Rop et al. 2009) ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมีการศึกษาการใช้อาหารผสมกากถั่วเหลืองที่หมักด้วยเชื้อรา *A. oryzae* และอาหารผสมเชื้อราโดยตรง มีผลทำให้ปลามีการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหาร จำนวนเม็ดเลือดแดง ปฏิกิริยาการต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) สูงกว่ากลุ่มควบคุม ในปลานกแก้ว, *Oplegnathus fasciatus* (Kim et al., 2009) และ ปลา flounder, *Paralichthys olivaceus* (Kim et al., 2010) เป็นต้น

นอกจากเชื้อรา *A. oryzae* สามารถใช้ในการหมักกากถั่วเหลืองเพื่อใช้ในการเลี้ยงสัตว์น้ำแล้ว เชื้อรา *A. niger* เป็นเชื้อราอีกชนิดหนึ่งที่มีคุณสมบัติคล้ายคลึงกับ *A. oryzae* ดังรายงานคุณสมบัติในการสร้างสารต่าง ๆ ของ *A. niger* ได้แก่ protese (Yang and Lin, 1998; Kalpana et al., 2008; Paranthaman et al., 2009) cellulose (Kang et al., 2004; Sohail et al., 2009) hemicellulases (Kang et al., 2004) lipase (Mahadik et al., 2002) phytase (Ahmad et al., 2000; Mandviwala and Khire, 2000; Casey and Walsh, 2003) และ tannase (Aguilar et al., 2001) เป็นต้น และเชื้อรา *A. niger* ยังเป็นเชื้อราที่มีความปลอดภัยมีการนำมาใช้ในการผลิต extracellular เอนไซม์ และกรดซิตริก เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร และได้รับการรับรองจากองค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา (Schuster et al., 2002)

วรวุฒิ และชาคริยา (2558) ศึกษาชนิดของจุลินทรีย์ในพื้นที่เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตตรัง พบจุลินทรีย์จำนวน 10 สายพันธุ์ จุลินทรีย์เหล่านี้สามารถพบได้โดยทั่วไปในสภาพแวดล้อมทั้งบนบกและในน้ำ และจุลินทรีย์เหล่านี้จัดอยู่ในกลุ่มที่ก่อให้เกิดประโยชน์ และอาจรวมถึงการใช้ประโยชน์ทางการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ซึ่งรวมถึงเชื้อรา *Aspergillus niger* แต่อย่างไรก็ตามการนำจุลินทรีย์เหล่านี้มาใช้ควรศึกษาประสิทธิภาพของจุลินทรีย์เหล่านั้นต่อสัตว์น้ำ เพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำให้สอดคล้องตามหลักเกษตรธรรมชาติอย่างเหมาะสมและมีประสิทธิภาพต่อไป โดย อานัฐ (2547) อธิบายว่าการทำเกษตรแบบธรรมชาติไม่ยอมรับการนำจุลินทรีย์จากต่างพื้นที่ เข้ามาใช้ในกระบวนการผลิต ทั้งนี้จะรวมถึงจุลินทรีย์ที่ได้จากการผลิต เพาะเลี้ยงและคัดแยกจนเป็นสายพันธุ์บริสุทธิ์ ซึ่งมีจำหน่ายตามท้องตลาด เนื่องจากจุลินทรีย์ดังกล่าวจะไม่แข็งแรงและไม่มีประสิทธิภาพเมื่อนำไปสู่ธรรมชาติอีกครั้งไม่เหมือนกับจุลินทรีย์ดั้งเดิมในท้องถิ่นที่อาศัยอยู่เป็นเวลานานจนสามารถปรับตัวและมีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ภายในพื้นที่ ดังนั้นการเกษตรธรรมชาติจึงมุ่งเน้นการใช้จุลินทรีย์ที่เกษตรกรผลิตขึ้นเองจากจุลินทรีย์ในท้องถิ่น ซึ่งปลอดภัย ใช้ได้ง่าย ผลิตง่าย ราคาถูก มีประสิทธิภาพสูง และทำให้เกิดความสมดุลของระบบนิเวศในพื้นที่นั้น ๆ

ขณะที่ในพื้นที่เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมงมีการสำรวจชนิดของจุลินทรีย์ท้องถิ่นเพื่อการนำมาใช้ประโยชน์ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำแบบอินทรีย์ตามหลักเกษตรธรรมชาติซึ่งยึดหลักการใช้ประโยชน์จากทรัพยากรในท้องถิ่น ลดการนำเข้าวัตถุดิบในการผลิตจากภายนอก รวมถึงการใช้จุลินทรีย์ที่พบในพื้นที่เพื่อการใช้ประโยชน์ที่ยั่งยืน ป้องกันการปนเปื้อนหรือการรุกรานจากจุลินทรีย์ต่างถิ่น ซึ่งการสำรวจชนิดจุลินทรีย์ท้องถิ่น พบเชื้อรา *A. niger* กระจายอยู่ในบริเวณพื้นที่เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ และจากคุณสมบัติของเชื้อรา *A. niger* ที่กล่าวข้างต้น จึงได้ศึกษาการนำเชื้อรา *A. niger* ในการหมักถั่วเหลืองสำหรับเป็นวัตถุดิบในการผลิตอาหาร และศึกษาการ

เจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหาร ค่าโลหิตวิทยา และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของปลากะพงขาว เพื่อเป็นการปรับปรุงคุณภาพของวัตถุดิบอาหารให้มีคุณสมบัติเหมาะสมต่อการนำไปใช้ประโยชน์ของปลากะพงขาวและส่งผลต่อการเพิ่มผลผลิตปลากะพงขาว อีกทั้งยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับสัตว์น้ำอื่น ๆ ต่อไป

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาการเจริญเติบโต อัตรารอดตาย ประสิทธิภาพการใช้อาหาร ค่าโลหิตวิทยา และการต้านอนุมูลอิสระของปลากะพงขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมถั่วเหลืองหมักในอัตราส่วนต่างกัน

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Aspergillus niger* ในการปรับปรุงคุณภาพถั่วเหลืองสำหรับใช้ในการผลิตอาหารปลากะพงขาว
2. ทราบสัดส่วนถั่วเหลืองหมักที่เหมาะสมในการในส่วนผสมอาหารสำหรับปลากะพงขาว
3. การใช้ประโยชน์จุลินทรีย์ท้องถิ่นเพื่อนำไปสู่การเกษตรแบบธรรมชาติ
4. สถาบันการศึกษาและหน่วยงานที่เกี่ยวข้องทางด้านการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำสามารถนำความรู้ที่ได้ไปเผยแพร่และถ่ายทอดให้กับผู้สนได้อย่างเหมาะสม
5. การเผยแพร่ข้อมูลในการประชุมวิชาการ หรือตีพิมพ์ในวาสารวิชาการ

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมถั่วเหลืองหมัก

1.1 เชื้อรา *Aspergillus niger*

ทำการขยายเชื้อรา *A. niger* ที่เก็บได้จากพื้นที่เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง จังหวัดตรัง ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ให้มีปริมาณเส้นใย และการสร้างสปอร์เพียงพอสำหรับการหมักกากถั่วเหลือง

1.2 หัวเชื้อถั่วเหลืองป่นหมัก

ทำการหมักถั่วเหลืองป่น โดยดัดแปลงวิธีการหมักของ Yamamoto *et al.* (2010) และ Kim *et al.* (2009) โดยบดถั่วเหลืองให้ละเอียด เติมน้ำกลั่น 30 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนัก เพื่อเพิ่มความชื้นในถั่วเหลืองตั้งทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที บรรจุใส่ถุงพลาสติกทนความร้อนประมาณถุงละ 300 กรัม ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นและเติมเชื้อรา *A. niger* บ่มที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1 สัปดาห์ หรือสังเกตจนกระทั่งเส้นใยเดินจนเต็มถั่วเหลืองบด สามารถใช้เป็นหัวเชื้อในการหมักถั่วเหลือง

1.3 ถั่วเหลืองป่นหมัก

นำถั่วเหลืองบดที่เติมน้ำกลั่นเพื่อเพิ่มความชื้นแล้วบรรจุใส่ถุงพลาสติก เติมหัวเชื้อถั่วเหลืองหมักประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักถั่วเหลืองป่น บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการหยุดกิจกรรมของเชื้อราโดยการนำถั่วเหลืองหมักเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของถั่วเหลืองหมักและไม่หมัก ได้แก่ ปริมาณโปรตีน ด้วยวิธี Kjeldahl ไขมัน ด้วยวิธี Soxhlet ความชื้น และเถ้า (AOAC, 1990) เพื่อใช้ในการคำนวณสูตรอาหารต่อไป

2. การศึกษาสัดส่วนทดแทนถั่วเหลืองป่นของถั่วเหลืองป่นหมักในอาหารปลากะพงขาว

2.1 ผลิตอาหารผสมที่มีปริมาณโปรตีน 40 เปอร์เซ็นต์ ที่มีปลาป่นเป็นแหล่งโปรตีนหลัก อาหารสูตร D1-D4 ใช้โปรตีนจากถั่วเหลืองป่น 10 เปอร์เซ็นต์ (4 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนในอาหาร) และแทนที่ถั่วเหลืองป่นด้วยถั่วเหลืองป่นหมัก ที่ระดับ 0, 25, 75 และ 100 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนจากถั่วเหลืองป่น และอาหารสูตร D5-D8 ใช้โปรตีนจากถั่วเหลืองป่น 20 เปอร์เซ็นต์ (8 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนในอาหาร) และแทนที่ถั่วเหลืองป่นด้วยถั่วเหลืองป่นหมัก ที่ระดับ 0 25 75 และ 100

เปอร์เซ็นต์ของถั่วเหลืองป่นรวมทั้งสิ้น 8 ชุดการทดลอง (ตารางที่ 1) และวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของอาหารที่ผลิต ได้แก่ ปริมาณโปรตีน ด้วยวิธี Kjeldahl ไขมัน ด้วยวิธี Soxhlet ความชื้น และเถ้า (AOAC, 1990) และวิเคราะห์พลังงานในอาหารด้วยเครื่อง Oxygen Bomb Calorimeter (CAL2K-E2K)

2.2 เตรียมตู้เลี้ยงปลา ขนาด 80x40x50 เซนติเมตร ระดับน้ำ 30 เซนติเมตร และให้อากาศตลอดเวลา จำนวน 24 ใบ

2.3 คัดเลือกปลากะพงขาวขนาดประมาณ 10 เซนติเมตร จำนวนหน่วยการทดลองละ 10 ตัว ชั่งน้ำหนักรวมของปลาแต่ละหน่วยการทดลอง โดยแบ่งเป็น 8 ชุดการทดลอง จำนวนชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ

2.4 ให้อาหารวันละ 2 เวลา เช้า และเย็น ให้อาหารทดลองจนปลากินอิ่ม และเศษอาหารน้อยที่สุด ทำการเปลี่ยนถ่ายน้ำ 50 เปอร์เซ็นต์ ทุก 2 วัน เพื่อควบคุมการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำ ทำการเลี้ยงปลาเป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์

2.5 การเก็บข้อมูล

1) การเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหาร

ทำการชั่งน้ำหนักรวมทุก 2 สัปดาห์ และชั่งน้ำหนักและความยาวแต่ละตัว และนับจำนวนปลาที่เหลือ เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ชั่งน้ำหนักตับ น้ำหนักเนื้อปลา วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในเนื้อปลาเริ่มต้นและสิ้นสุดการทดลอง บันทึกปริมาณอาหารที่กินของปลาแต่ละหน่วยการทดลอง เพื่อใช้คำนวณประสิทธิภาพการใช้อาหาร ตามสูตรการคำนวณ ดังนี้

การเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific growth rate: SGR)

$$SGR = \frac{\ln(\text{น้ำหนักปลาสิ้นสุดการทดลอง}) - \ln(\text{น้ำหนักปลาเริ่มต้น}) \times 100}{\text{จำนวนวันที่เลี้ยงปลา}}$$

ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน (Protein efficiency ratio: PER)

$$PER = \frac{\text{น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น}}{\text{ปริมาณโปรตีนที่ปลากิน}}$$

อัตราการกินอาหาร (Feed intake: FI)

$$FI\ (g/ตัว) = \frac{\text{น้ำหนักอาหารที่ปลากินทั้งหมด}}{\text{จำนวนปลาทั้งหมด}}$$

ตารางที่ 1 องค์ประกอบของวัตถุดิบอาหาร คุณค่าทางโภชนาการ และต้นทุนการผลิตอาหารปลากะพงขาว 8 สูตร (D1-D8)

วัตถุดิบ (%)	สูตรอาหาร							
	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8
ปลาป่น	55.62	55.62	55.62	55.62	49.44	49.44	49.44	49.44
ถั่วเหลืองป่น	9.66	7.25	2.41	0	19.33	14.50	4.83	0
ถั่วเหลืองป่นหมัก	0	2.68	8.04	10.72	0	5.36	16.08	21.44
รำละเอียด	0	9.90	11.70	12.65	14.30	16.20	19.80	21.67
ปลายข้าวต้มสุก	17.12	15.90	13.46	12.19	9.93	7.40	2.51	0
น้ำมันปาล์ม	1.60	1.65	1.77	1.82	0	0.10	0.34	0.45
วิตามินรวม[a]	1	1	1	1	1	1	1	1
แร่ธาตุรวม[b]	1	1	1	1	1	1	1	1
สารเหนียว (CMC)	5	5	5	5	5	5	5	5
คุณค่าทางอาหาร (% น้ำหนักแห้ง)								
โปรตีน	41.60	41.31	41.02	41.48	41.09	41.16	41.07	41.01
ไขมัน	10.73	10.35	10.29	10.42	10.40	10.39	10.35	10.40
เถ้า	18.26	18.21	18.22	18.30	18.00	18.21	18.09	18.17
ความชื้น	9.20	9.89	9.54	9.53	9.40	9.39	9.69	9.53
พลังงาน (MJ ต่อ กก.)	17.35	17.68	17.81	17.70	17.13	17.68	17.85	17.19
ต้นทุน (บาทต่อ กก.)	35.88	35.87	35.86	35.85	34.93	34.91	34.88	34.86

[a] 1 กิโลกรัมของวิตามินรวมประกอบด้วย vitamin A 10,000,000 IU, D3 2,000,000 IU, E 1,500 IU, thiamine 2 กรัม riboflavin 2.5 กรัม pantothenic acid 14 กรัม pyridoxine กรัม cyanocobalamin 10 มิลลิกรัม folic 0.5 กรัม niacin 12 กรัม K_3 2 กรัม และ C 20 กรัม

[b] 1 กิโลกรัมของแร่ธาตุรวมประกอบด้วย Ca 100,000 มิลลิกรัม P 80,000 มิลลิกรัม Cu 2,500 มิลลิกรัม Fe 1,200 มิลลิกรัม Mn 1,200 มิลลิกรัม Zn 1,540 มิลลิกรัม K 260 มิลลิกรัม I 740 มิลลิกรัม Mg 2,160 มิลลิกรัม Se 10 มิลลิกรัม และ Co 240 มิลลิกรัม

อัตราแลกเนื้อ (Feed conversion ratio: FCR)

$$FCR = \frac{\text{น้ำหนักอาหารที่กินต่อตัว}}{\text{น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้นต่อตัว}}$$

อัตรารอดตาย (Survival rate: SR)

$$SR\ (\%) = \frac{\text{จำนวนปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง}}{\text{จำนวนปลาเมื่อเริ่มทดลอง}} \times 100$$

อัตราส่วนที่บริโภคได้ หรือเปอร์เซ็นต์ซาก (Carcass percentage: CP)

$$CP\ (\%) = \frac{\text{น้ำหนักเนื้อปลา}}{\text{น้ำหนักของปลาทั้งตัว}} \times 100$$

ดัชนีตับ (Hepatosomatic index: HSI)

$$HSI\ (\%) = \frac{\text{น้ำหนักตับ}}{\text{น้ำหนักตัวของปลา}} \times 100$$

2) ค่าโลหิตวิทยา (Hematological parameters)

เก็บตัวอย่างปลาหลังจากสิ้นสุดการทดลองเลี้ยง ชุดการทดลองชุดละ 10 ตัวโดยสลบปลาด้วยสารละลาย clove oil ความเข้มข้น 30 ppm แล้วเก็บเลือดปลาด้วยเข็มขนาด 25Gx1 ดูดเลือดจากเส้นเลือดบริเวณโคนหาง (caudal vein) ของปลาตัวละประมาณ 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปวิเคราะห์ค่าโลหิตวิทยาดังนี้

2.1) ปริมาณเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาวทั้งหมด (Total erythrocyte; RBC and leucocyte; WBC count) โดยเก็บเลือดปลาด้วยเข็มที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด นับปริมาณเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาวของปลาตามวิธีการของ Blaxhall and Daisley (1973)

2.2) ค่าฮีมาโตคริต (Haematocrit; Hct) โดยเก็บเลือดปลาด้วยเข็มที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด วัดปริมาตรของเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (packed red blood cell volume) ในปลาด้วยเครื่อง microhaematocrit centrifuge ตามวิธีของ Larsen and Snieszko (1971)

2.3) ปริมาณฮีโมโกลบิน (Haemoglobin determination; Hb) โดยเก็บเลือดปลาด้วยเข็มที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด วิเคราะห์ปริมาณฮีโมโกลบินของเลือดปลาโดยใช้วิธี Cyanmethemoglobin method ของ Larsen and Snieszko (1961)

2.4) ดัชนีเม็ดเลือดแดง (Wintrobe Erythrocyte Indices) ประกอบด้วย

ปริมาตรเฉลี่ยของเม็ดเลือดแดง (Mean corpuscular volume; MCV) มีหน่วยเป็นเฟมโตลิตร (femtoliter: 10^{-15} L)

MCV = Hct (ml dl^{-1})/RBC (10^{6} cells ml^{-1}) x 10 (นพดล, 2549)

ปริมาณฮีโมโกลบินเฉลี่ยต่อเซลล์เม็ดเลือดแดง (Mean corpuscular haemoglobin; MCH) มีหน่วยเป็นพิโคกรัมต่อเซลล์ (pictogram/cell: 10^{-12} g $cell^{-1}$)

MCH = Hb (g dl^{-1})/RBC (10^{6} cells ml^{-1}) x 10 (นพดล, 2549)

ความเข้มข้นเฉลี่ยของฮีโมโกลบินในเซลล์เม็ดเลือดแดง (Mean corpuscular haemoglobin concentration; MCHC) มีหน่วยเป็นกรัมต่อเดซิลิตร (g/dl)

MCHC = Hb (g dl^{-1})/Hct (ml dl^{-1}) x 100 (นพดล, 2549)

2.5) การนับค่าร้อยละแยกตามประเภทของเม็ดเลือดขาว (Differentiate leukocyte count) โดยนำเลือดปลาที่ไม่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดมาป้ายบนสไลด์ (blood smear) แล้วย้อมด้วยสีไรท์-จิมซ่า (Wright Giemsa staining set) จากนั้นนำมานับแยกชนิดของเม็ดเลือดขาวภายใต้กล้องจุลทรรศน์ตามวิธีของ Stoskopf (1993)

2.6) การต้านอนุมูลอิสระโดยรวม (Total Antioxidant Capacity)

เก็บตัวอย่างปลาชุดการทดลองชุดละ 10 ตัว โดยสลบปลาด้วยสารละลาย clove oil ความเข้มข้น 30 ppm แล้วทำการเก็บเลือดปลา โดยใช้เข็มขนาด 25Gx1 ดูดเลือดจากเส้นเลือดบริเวณโคนหาง (caudal vein) ของปลาตัวละประมาณ 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำเลือดใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปล่อยให้เลือดแข็งตัวประมาณ 1 ชั่วโมง แล้วปั่นตกตะกอนเพื่อแยกส่วนของซีรั่มออกมาด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็วรอบ 3,000 rpm 10 นาที นำซีรั่มที่ได้ไปวิเคราะห์หาค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยรวมด้วยชุดวิเคราะห์ทดสอบ OxiSelect™ Total Antioxidant Capacity (TAC) Assay Kit (Cell Biolabs, Inc., USA)

2.7) ทำการวิเคราะห์ข้อมูลการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหาร ค่าโลหิตวิทยา และการต้านอนุมูลอิสระโดยรวม โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบ 1 ปัจจัย ตามแผนการทดลองแบบ CRD (one-way Analysis of Variance in Complete Randomize Design) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ผลการวิจัย

การเจริญเติบโตและอัตรารอดตายของปลากะพงขาว

ปลากะพงขาวเมื่อเริ่มทดลองมีน้ำหนักเฉลี่ย (Initial weight) ระหว่าง 12.81-12.90 กรัม และความยาวรวมเริ่มต้น (Initial length) ระหว่าง 10.17-10.32 เซนติเมตร เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์ พบว่าปลากะพงขาวมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 2) โดยมีน้ำหนักเฉลี่ย (Final weight) ระหว่าง 35.53-46.30 กรัม (ภาพที่ 1) ความยาวรวมเฉลี่ย (Final length) ระหว่าง 13.46-14.66 เซนติเมตร (ภาพที่ 2) อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (SGR) ระหว่าง 1.44-1.83 เปอร์เซ็นต์ต่อวัน (ภาพที่ 3) และอัตรารอดตาย (SR) ระหว่าง 70-100 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4) โดยเมื่อสิ้นสุดการทดลองปลากะพงขาวที่กินอาหารสูตร D2-D4 มีน้ำหนักเฉลี่ย 45.39, 45.81 และ 46.30 กรัม ตามลำดับ และมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเฉลี่ย 1.79, 1.82 และ 1.83 เปอร์เซ็นต์ต่อวัน ซึ่งสูงกว่าปลากะพงขาวที่กินอาหารสูตร D1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ขณะที่ปลากะพงขาวที่กินอาหารสูตร D5-D8 ไม่มีความแตกต่างจากปลากะพงขาวที่กินอาหารสูตร D1 ($P>0.05$) แต่แตกต่างจากสูตร D2-D4 ($P<0.05$) ส่วนความยามรวมและอัตรารอดตายเฉลี่ย ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) ระหว่างทุกชุดการทดลอง (ตารางที่ 2)

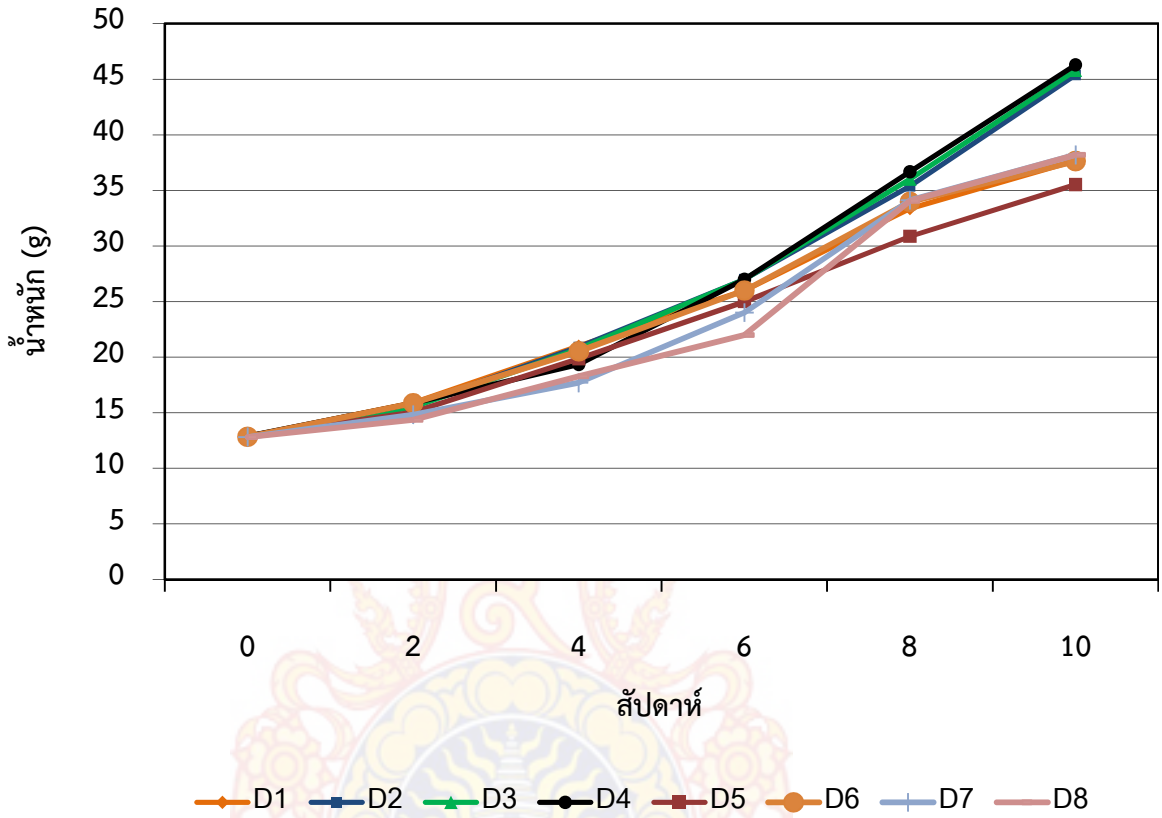
จากผลการทดลองแสดงว่า การทดแทนโปรตีนจากถั่วเหลืองป่นหมัก 25-100 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณโปรตีน 10 เปอร์เซ็นต์ จากถั่วเหลืองป่น (อาหารสูตร D2-D4) มีผลให้ปลากะพงขาวมีน้ำหนักเฉลี่ย และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารสูตรควบคุม (D1) ขณะที่ การทดแทนโปรตีนจากถั่วเหลืองป่นหมัก 25-100 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณโปรตีน 29 เปอร์เซ็นต์ จากถั่วเหลืองป่น (อาหารสูตร D6-D8) ไม่มีผลต่อการการเจริญเติบโตของปลากะพงขาว

ตารางที่ 2 น้ำหนัก ความยาว อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (SGR) อัตรารอดตาย (SR) ±SE ของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารผสมถั่วเหลืองป่นหมักด้วยเชื้อรา *Aspergillus niger* ในอัตราส่วนที่ต่างกัน เป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์

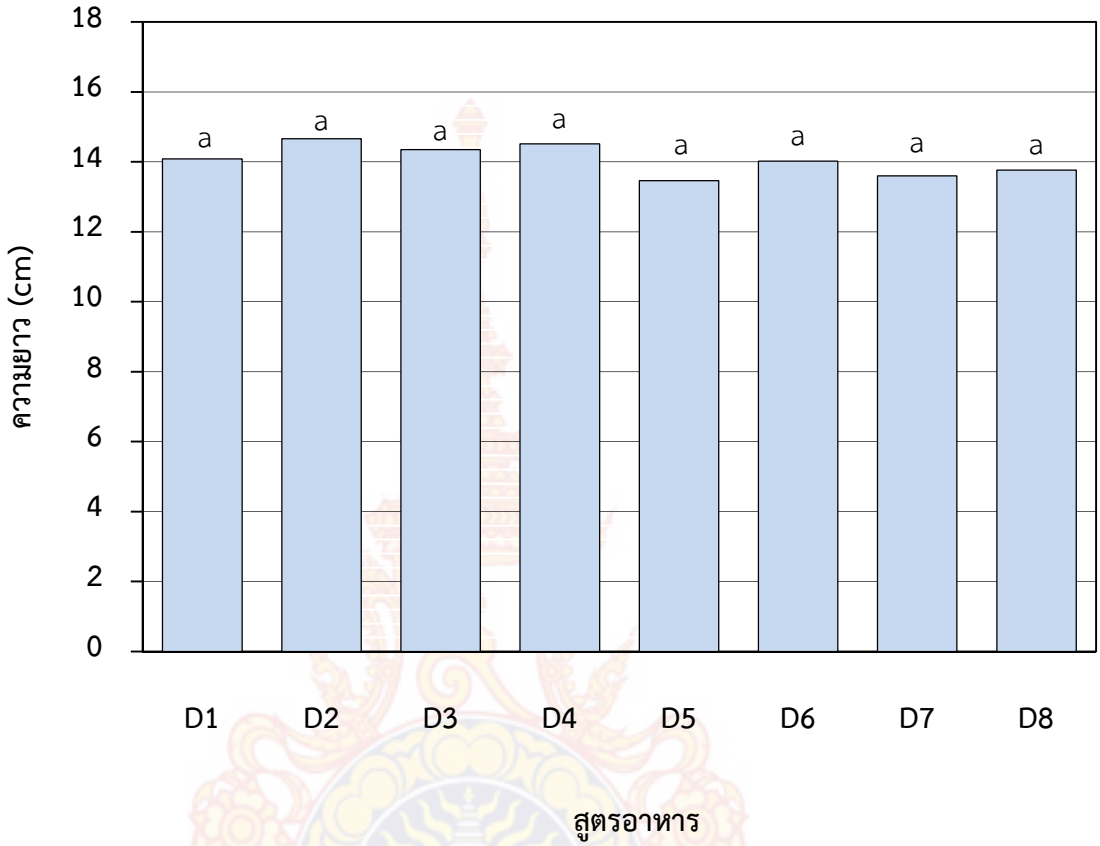
สูตรอาหาร*	การเจริญเติบโต					SR (%)
	Initial weight (g)	Final weight (g)	Initial length (cm)	Final length (cm)	SGR (% day^{-1})	
D1	12.87±0.04a	37.68±0.08b	10.21±0.05a	14.08±0.38a	1.53±0.01b	80±5.00a
D2	12.88±0.05a	45.39±1.24a	10.32±0.08a	14.66±0.38a	1.79±0.04a	95±5.00a
D3	12.83±0.04a	45.81±2.66a	10.19±0.07a	14.35±0.47a	1.82±0.09a	80±0.00a
D4	12.90±0.05a	46.30±1.08a	10.18±0.07a	14.51±0.24a	1.83±0.04a	85±5.00a
D5	12.90±0.05a	35.53±0.84b	10.17±0.06a	13.46±0.48a	1.44±0.03b	100a
D6	12.83±0.04a	37.64±1.79b	10.23±0.07a	14.02±0.45a	1.54±0.07b	80±5.77a
D7	12.82±0.04a	38.19±2.69b	10.18±0.04a	13.60±0.40a	1.55±0.11b	70±1.00a
D8	12.81±0.03a	38.21±1.97b	10.21±0.06a	13.76±0.46a	1.56±0.07b	85±5.00a

***** สูตรอาหาร D1-D4 เป็นอาหารที่มีส่วนผสมของโปรตีนจากถั่วเหลืองป่น 10 เปอร์เซ็นต์ และแทนที่ด้วยถั่วเหลืองป่นหมัก 0, 25, 75 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และอาหารสูตร D5-D8 เป็นอาหารที่มีส่วนผสมของโปรตีนจากถั่วเหลืองป่น 20 เปอร์เซ็นต์ และแทนที่ด้วยถั่วเหลืองป่นหมัก 0, 25, 75 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

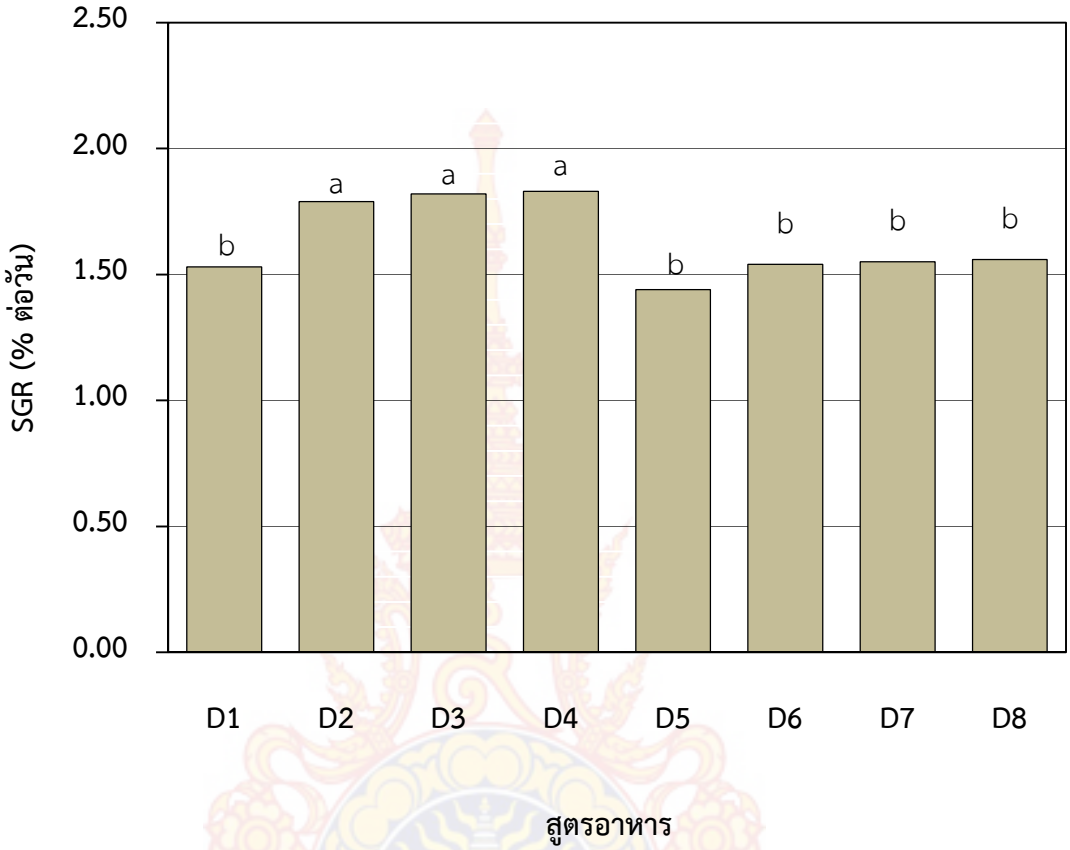
ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในสดมภ์เดียวกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)



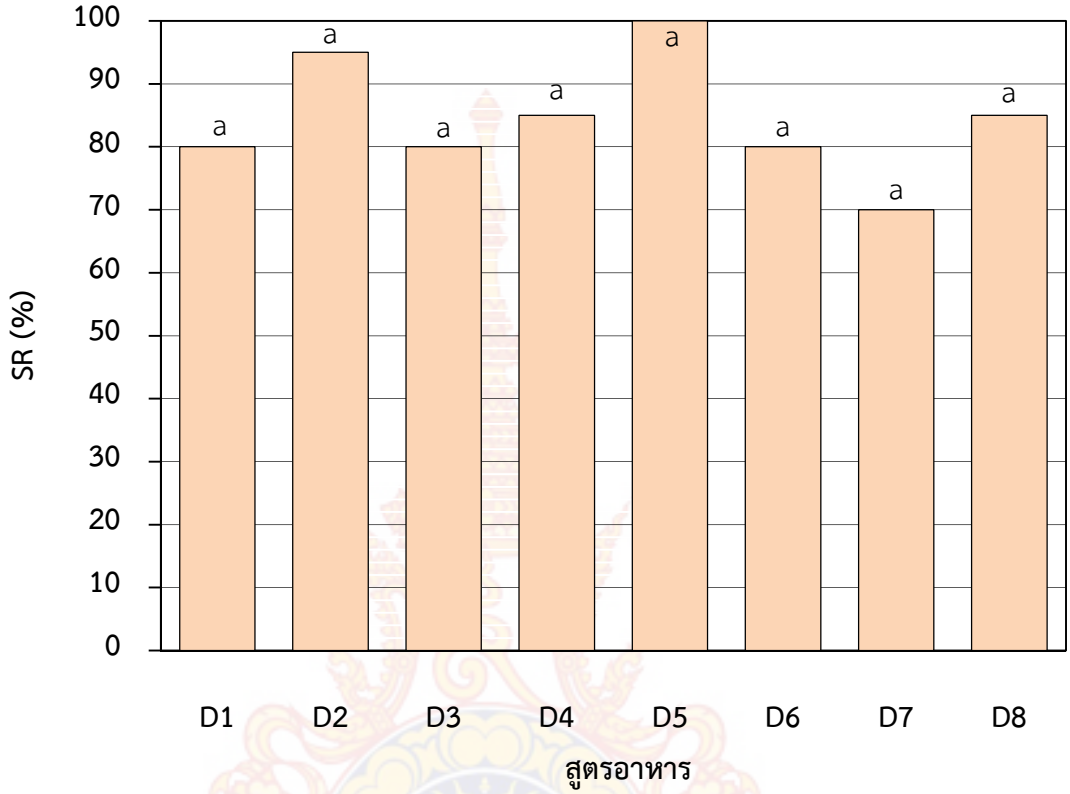
ภาพที่ 1 น้ำหนักปลากะพงขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร D1-D8 เป็นเวลา 10 สัปดาห์



ภาพที่ 2 ความยาวของปลากะพงขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร D1-D8 เมื่อเวลา 10 สัปดาห์



ภาพที่ 3 อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (SGR) ของปลากะพงขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร D1-D8 เมื่อเวลา 10 สัปดาห์



ภาพที่ 4 อัตรารอดตาย (SR) ของปลากะพงขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร D1-D8 เมื่อเวลา 10 สัปดาห์

ประสิทธิภาพการใช้อาหารของปลากะพงขาว

ปลากะพงขาวตลอดการทดลองปลามีอัตราการกินอาหาร (FI) ระหว่าง 48.59-50.93 กรัมต่อตัว (ตารางที่ 3 และภาพที่ 5) ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) และอัตราแลกเนื้อ (FCR) ระหว่าง 1.53-2.15 (ตารางที่ 3 และภาพที่ 6) โดยอัตราแลกเนื้อของปลากะพงขาวที่กินอาหารสูตร D2-D4 เฉลี่ยเท่ากับ 167, 1.61 และ 1.53 ตามลำดับ ซึ่งลดลงตามลำดับและต่ำกว่าปลากะพงขาวที่กินอาหารสูตรอื่น ๆ อย่ามีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ส่วนประสิทธิภาพการใช้โปรตีน (PER) ระหว่าง 1.1-1.59 (ตารางที่ 3 และภาพที่ 7) โดยปลากะพงขาวที่กินอาหารสูตร D2-D4 มีประสิทธิภาพการใช้โปรตีนในอาหารเฉลี่ย 1.45, 1.51 และ 1.59 ซึ่งเพิ่มสูงขึ้นตามลำดับ และมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับปลากะพงขาวที่กินอาหารสูตร D1 และ D5-D8

อัตราส่วนที่บริโภคได้ หรือเปอร์เซ็นต์ซาก (Carcass percentage) ของปลากะพงขาวที่กินอาหารสูตร D1-D8 ระหว่าง 44.32-48.25 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3 และภาพที่ 8) และค่าดัชนีตับ (HSI) ระหว่าง 1.90-2.30 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3 และภาพที่ 9) โดยทั้งอัตราส่วนที่บริโภคได้ และค่าดัชนีดับของปลากะพงขาวที่กินอาหารทุกสูตรไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$)

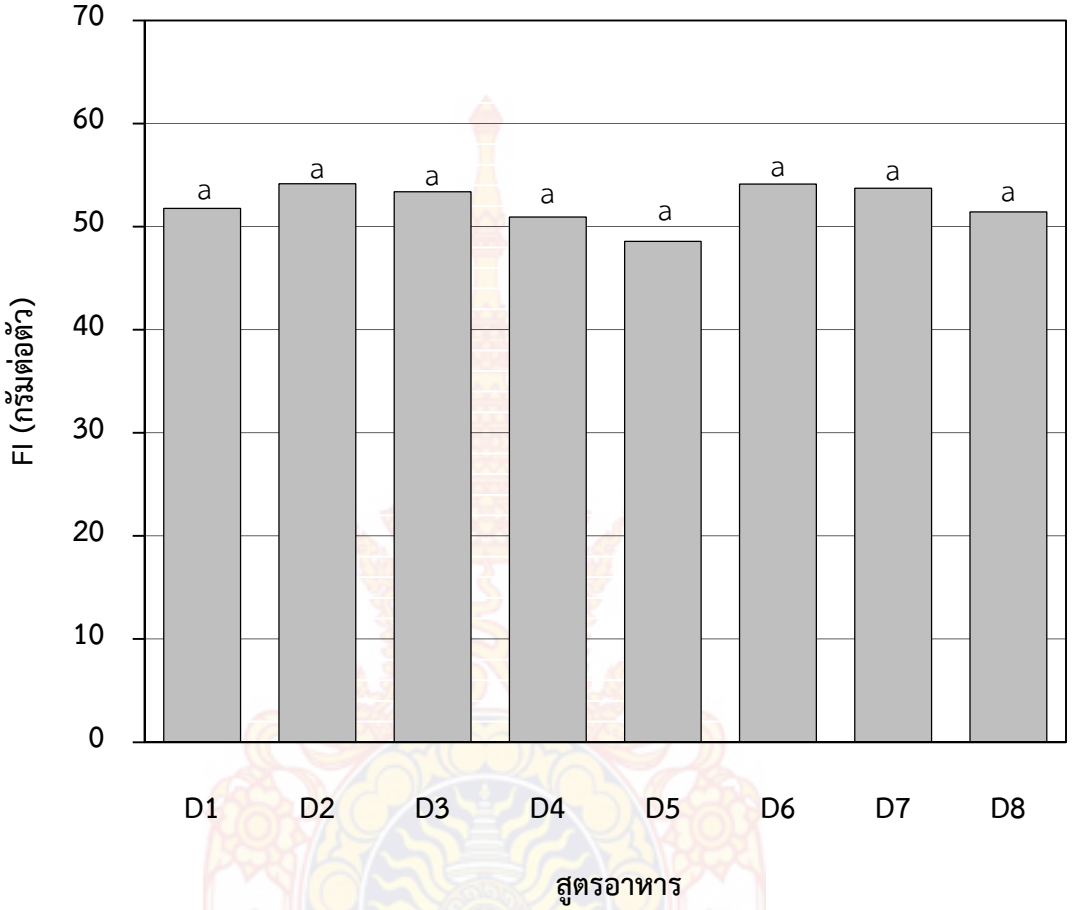
เมื่อคำนวณต้นทุนค่าอาหารในการเลี้ยงปลา โดยคำนวณจากราคาอาหารที่ผลิตและอัตราแลกเนื้อพบว่า ต้นทุนค่าอาหารในการผลิตปลากะพงขาวน้ำหนัก 1 กิโลกรัม มีต้นทุนของอาหารแต่ละสูตรระหว่าง 54.73-76.74 บาท (ตารางที่ 3 และภาพที่ 10) โดยปลากะพงขาวที่กินอาหารสูตร D4 มีต้นทุนค่าอาหารต่อปลา 1 กิโลกรัม ต่ำที่สุด คือ 54.73 บาท และแตกต่างจากต้นทุนค่าอาหารของปลากะพงขาวที่กินอาหารสูตร D1 และ D5-D8 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ตารางที่ 3 อัตราการกินอาหาร (FI) อัตราแลกเนื้อ (FCR) ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน (PER) อัตราส่วนที่บริโภคได้ (Carcass) ค่าดัชนีตับ (HSI) และต้นทุนค่าอาหาร ±SE ของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารผสมถั่วเหลืองป่นหมักด้วยเชื้อรา *Aspergillus niger* ในอัตราส่วนที่ต่างกัน เป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์

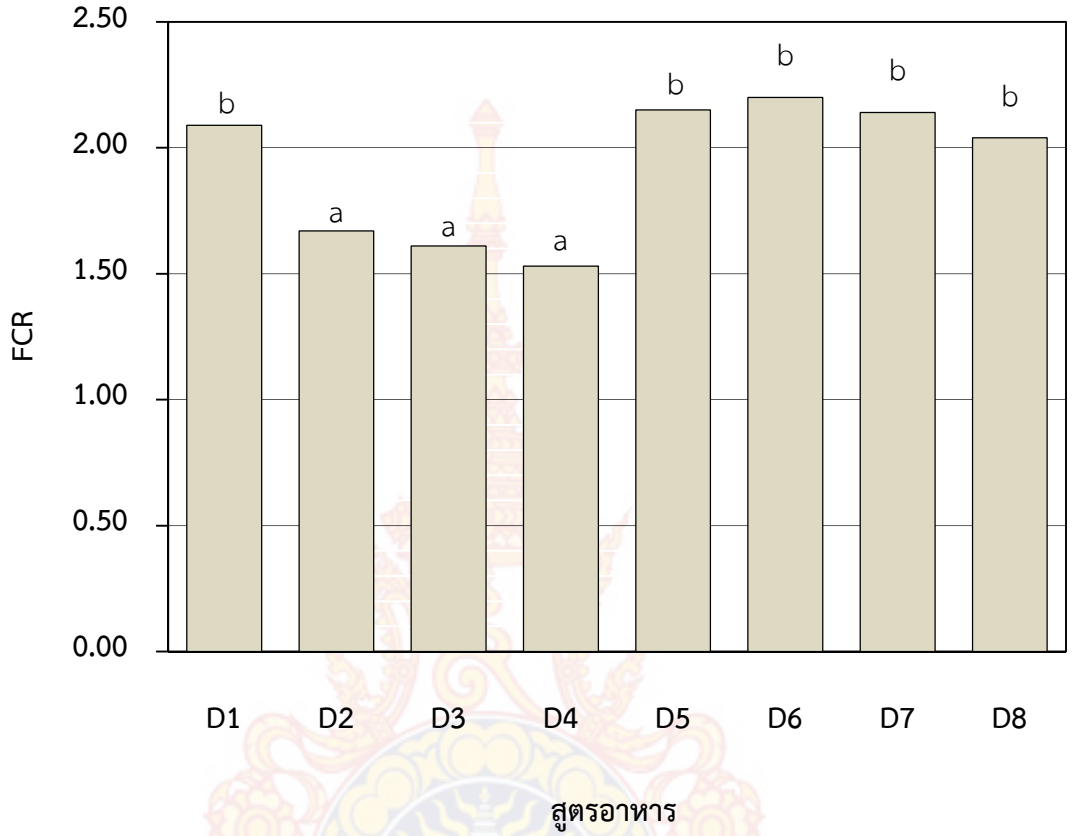
สูตรอาหาร*	ประสิทธิภาพการใช้อาหาร					ต้นทุนค่าอาหาร (บาทต่อกิโลกรัม)
	FI (กรัมต่อตัว)	FCR	PER	Carcass (%)	HSI (%)	
D1	51.77±0.19a	2.09±0.02b	1.15±0.01b	44.32±1.04a	2.14±0.15a	74.96±0.63c
D2	54.16±0.84a	1.67±0.09a	1.45±0.08a	47.77±0.27a	2.30±0.62a	59.95±3.31ab
D3	53.39±0.65a	1.61±0.04a	1.51±0.04a	48.25±0.79a	1.90±0.33a	57.82±1.42ab
D4	50.93±1.22a	1.53±0.12a	1.59±0.12a	47.75±0.39a	2.06±0.07a	54.73±2.12a
D5	48.59±1.69a	2.15±0.05b	1.13±0.02b	48.13±1.51a	2.03±0.29a	75.06±1.58c
D6	54.12±1.33a	2.20±0.14b	1.11±0.07b	45.90±0.85a	2.22±0.18a	76.74±2.76c
D7	53.72±1.62a	2.14±0.17b	1.14±0.0b	45.44±1.16a	2.17±0.06a	74.70±2.96c
D8	51.43±1.06a	2.04±0.15b	1.21±0.09b	46.51±0.68a	2.15±0.18a	70.94±3.26bc

***** สูตรอาหาร D1-D4 เป็นอาหารที่มีส่วนผสมของโปรตีนจากถั่วเหลืองป่น 10 เปอร์เซ็นต์ และแทนที่ด้วยถั่วเหลืองป่นหมัก 0, 25, 75 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และอาหารสูตร D5-D8 เป็นอาหารที่มีส่วนผสมของโปรตีนจากถั่วเหลืองป่น 20 เปอร์เซ็นต์ และแทนที่ด้วยถั่วเหลืองป่นหมัก 0, 25, 75 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

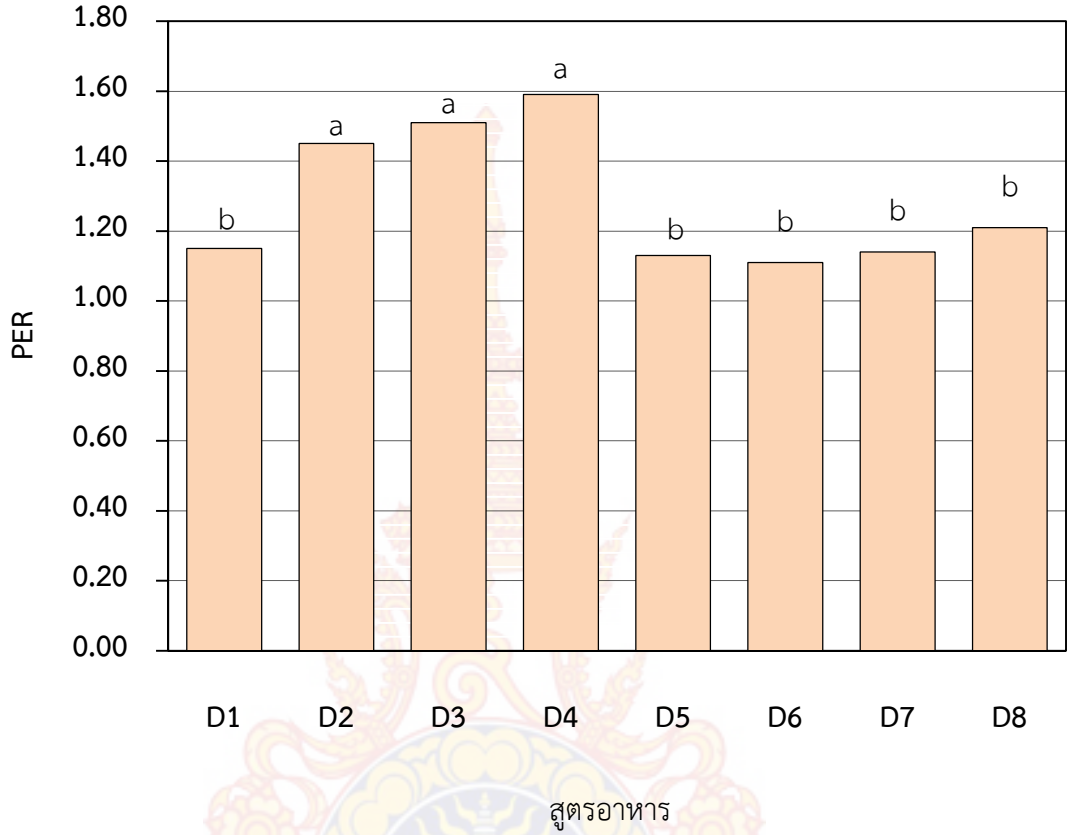
ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในสดมภ์เดียวกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)



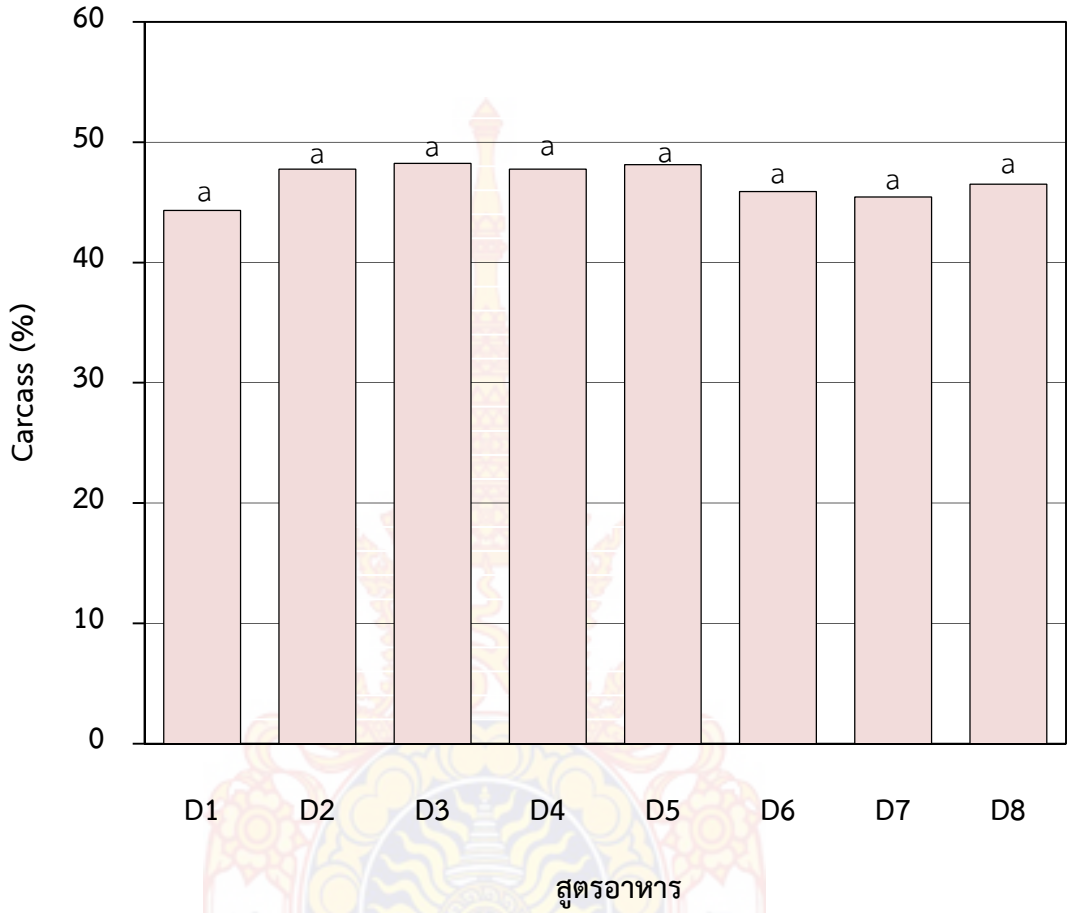
ภาพที่ 5 อัตราการกินอาหาร (FI) เฉลี่ยของปลากะพงขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร D1-D8 เป็นเวลา 10 สัปดาห์



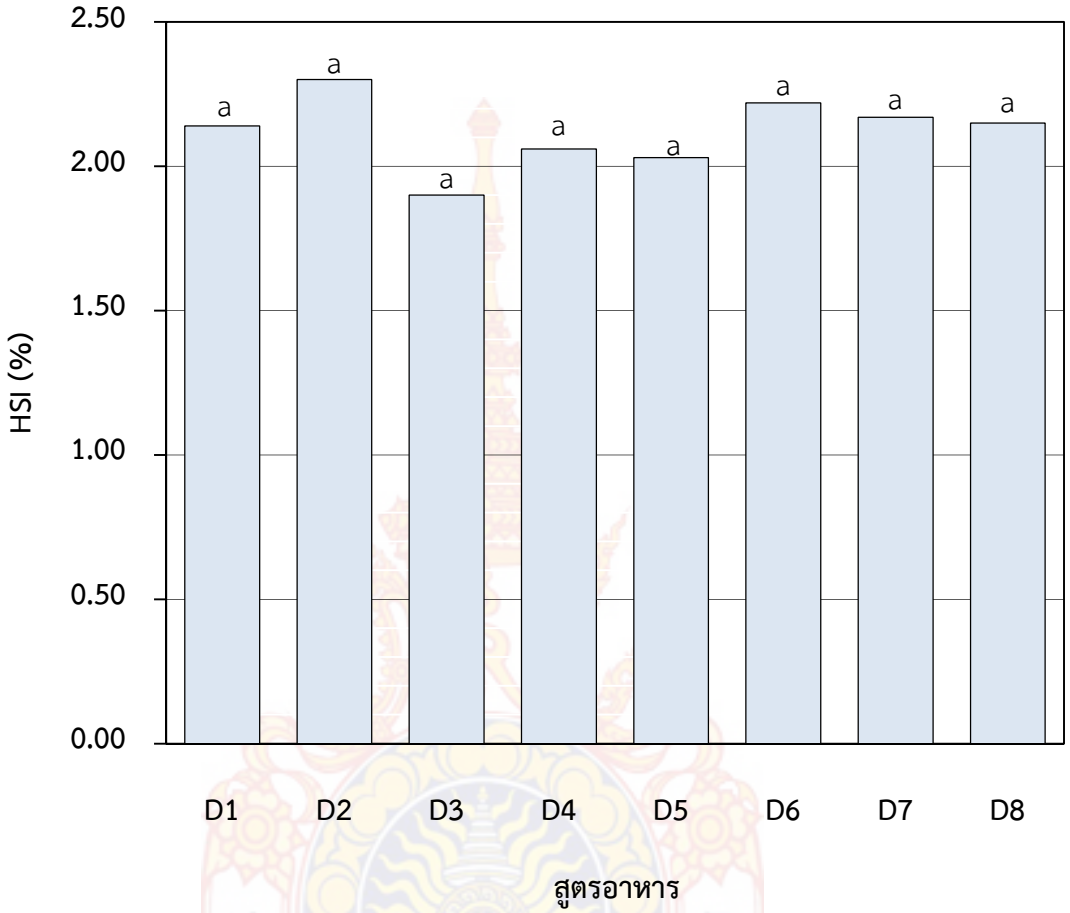
ภาพที่ 6 อัตราแลกเนื้อ (FCR) ของปลากะพงขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร D1-D8 เมื่อเวลา 10 สัปดาห์



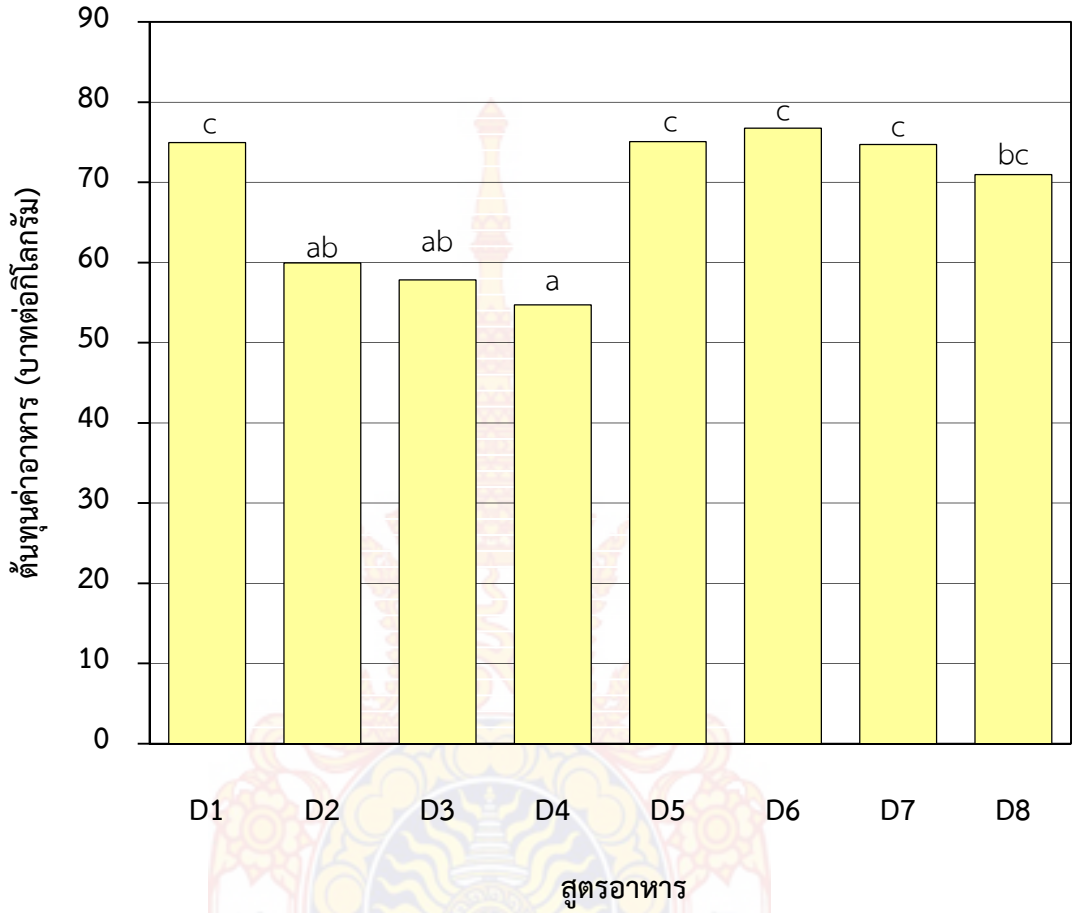
ภาพที่ 7 ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน (PER) ของปลากะพงขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร D1-D8 เมื่อเวลา 10 สัปดาห์



ภาพที่ 8 อัตราส่วนที่บริโภคได้ (Carcass) เฉลี่ยของปลากะพงขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร D1-D8 เมื่อเวลา 10 สัปดาห์



ภาพที่ 9 ค่าดัชนีตับ (HSI) ของปลากะพงขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร D1-D8 เมื่อเวลา 10 สัปดาห์



ภาพที่ 10 ต้นทุนค่าอาหารในการผลิตปลากะพงขาว 1 กิโลกรัม ของปลากะพงขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร D1-D8 เป็นเวลา 10 สัปดาห์

ค่าโลหิตวิทยาและการต้านอนุมูลอิสระโดยรวมของปลากะพงขาว

การศึกษาปริมาณเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาวทั้งหมด (Total erythrocyte; RBC and leucocyte; WBC count) พบว่าปลากะพงขาวที่กินอาหารแต่ละสูตรมีปริมาณเม็ดเลือดแดงระหว่าง $2.51x10^{9}$-$5.23x10^{9}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปลากะพงขาวกลุ่มที่ได้รับอาหารผสมถั่วเหลืองป่นหมักมีแนวโน้มที่มีปริมาณเม็ดเลือดแดงเพิ่มขึ้นตามปริมาณการทดแทน โดยปลากะพงขาวที่กินอาหารสูตร D6-D8 มีปริมาณเม็ดเลือดแดง $5.16x10^{9}$, $5.23x10^{9}$ และ $4.19x10^{9}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจากปลาที่ได้รับอาหารสูตร D1 ($2.51x10^{9}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ขณะที่ปลากะพงขาวที่กินอาหารสูตร D6-D7 มีปริมาณเม็ดเลือดแดงแตกต่างจากปลาที่ได้รับอาหารสูตร D5 ($2.86x10^{9}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) เช่นกัน (ตารางที่ 4 และภาพที่ 11) และปลากะพงขาวมีปริมาณเม็ดเลือดขาว ระหว่าง $9.21x10^{7}$-$1.18x10^{8}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปลากะพงขาวกลุ่มที่ได้รับอาหารผสมถั่วเหลืองป่นหมักมีแนวโน้มที่มีปริมาณเม็ดเลือดขาวเพิ่มขึ้นตามปริมาณการทดแทน เช่นเดียวกับเม็ดเลือดแดง โดยปลากะพงขาวที่กินอาหารสูตร D3, D4, D7 และ D8 มีปริมาณเม็ดเลือดขาว $1.06x10^{8}$, $1.06x10^{8}$, $1.14x10^{8}$ และ $1.18x10^{8}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจากปลาที่ได้รับอาหารสูตร D1, D2, D5 และ D6 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ดังตารางที่ 4 และภาพที่ 12

ค่าฮีมาโตคริต (Haematocrit; Hct) ของปลากะพงขาวที่กินอาหารแต่ละสูตร ระหว่าง 23.00-29.44 เปอร์เซ็นต์ โดยค่าฮีมาโตคริตของปลากะพงขาวที่กินอาหารผสมถั่วเหลืองป่นหมักจะเพิ่มขึ้นสอดคล้องกับปริมาณเม็ดเลือดแดง โดยปลากะพงขาวที่กินอาหารสูตร D4 และ D7 มีค่าฮีมาโตคริต 29.44 และ 28.40 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจากสูตร D1, D2, D5 และ D6 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ดังตารางที่ 4 และภาพที่ 13 ขณะที่ค่าปริมาณฮีโมโกลบิน (Haemoglobin determination; Hb) ของปลากะพงขาวที่กินอาหารทดลองแต่ละสูตร ระหว่าง 9.24-11.17 กรัมต่อเดซิลิตร ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) ดังตารางที่ 4 และภาพที่ 14

ดัชนีเม็ดเลือดแดง (Wintrobe Erythrocyte Indices) ของปลากะพงขาวที่กินอาหารแต่ละสูตร ประกอบด้วย ปริมาตรเฉลี่ยของเม็ดเลือดแดง (Mean corpuscular volume; MCV) ระหว่าง 56.87-97.31 เฟมโตลิตร ปริมาณฮีโมโกลบินเฉลี่ยต่อเซลล์เม็ดเลือดแดง (Mean corpuscular haemoglobin; MCH) ระหว่าง 23.00-36.54 พิโคกรัมต่อเซลล์ และความเข้มข้นเฉลี่ยของฮีโมโกลบินในเซลล์เม็ดเลือดแดง (Mean corpuscular haemoglobin concentration;

MCHC) ระหว่าง 35.65-43.48 กรัมต่อเดซิลิตร ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) ดังตารางที่ 4 และภาพที่ 15, 16 และ 17

การนับค่าร้อยละแยกตามประเภทของเม็ดเลือดขาว (Differentiate leukocyte count) ของปลากะพงขาวที่กินอาหารแต่ละสูตร ประกอบด้วย (ตารางที่ 5 ภาพที่ 18)

1. Monocyte ระหว่าง 0.20-1.21 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

2. Lymphocyte ระหว่าง 6.90-47.17 เปอร์เซ็นต์ โดยพบว่าปลากะพงขาวที่กินอาหารสูตร D1 และ D2 มีปริมาณ Lymphocyte 47.17 และ 45.71 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับปลากะพงขาวที่กินอาหารสูตร D3-D8 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

3. Thrombocyte ระหว่าง 41.76- 60.67 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

4. Eosinophil ระหว่าง 0.00-16.80 เปอร์เซ็นต์ โดยไม่พบ Eosinophil ในปลากะพงขาวที่กินอาหารสูตร D2 และปลากะพงขาวที่กินอาหารสูตร D3, D4 และ D8 มีปริมาณ Eosinophil 15.33, 16.60 และ 16.80 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับปลากะพงขาวที่กินอาหารสูตรอื่นอย่างมนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

5. Basophil ระหว่าง 1.61-46.50 เปอร์เซ็นต์ เปอร์เซ็นต์ โดยพบว่าปลากะพงขาวที่กินอาหารสูตร D6 และ D7 มีปริมาณ Basophil 46.57 และ 36.18 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับปลากะพงขาวที่กินอาหารสูตร D1-D5 และ D8 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

6. Neutrophil ระหว่าง 0.01-1.85 เปอร์เซ็นต์ โดยพบว่าปลากะพงขาวที่กินอาหารสูตร D4 และ D8 มีปริมาณ Neutrophil 1.70 และ 1.85 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับปลากะพงขาวที่กินอาหารสูตร D1-D3 และ D5-D7 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

การต้านอนุมูลอิสระโดยรวม (Total Antioxidant Capacity; TAC) ของปลากะพงขาวที่กินอาหารแต่ละสูตร ระหว่าง 309.69-440.06 ไมโครโมลต่อลิตร โดยพบว่าการต้านอนุมูลอิสระของปลากะพงขาวมีแนวโน้มสูงขึ้นตามปริมาณของถั่วเหลืองป่นหมักในสูตรอาหาร และปลากะพงขาวที่กิน

อาหารสูตร D3, D4, D7 และ D8 มีค่าการต้านอนุมูลอิสระโดยรวม 412.40, 409.53, 418.75 และ 440.06 ไมโคลโมลต่อลิตร ตามลำดับ และมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบสูตร D1, D2, D5 และ D6 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ดังตารางที่ 4 ภาพที่ 19

ตารางที่ 4 ปริมาณเม็ดเลือดแดง (RBC) และเม็ดเลือดขาว (WBC) ทั้งหมด ค่าฮีมาโตคริต (Hct) ปริมาณฮีโมโกลบิน (Hb) ปริมาตรเฉลี่ยของเม็ดเลือดแดง (MCV) ปริมาณฮีโมโกลบินเฉลี่ยต่อเซลล์เม็ดเลือดแดง (MCH) ความเข้มข้นเฉลี่ยของฮีโมโกลบินในเซลล์เม็ดเลือดแดง (MCHC) และการต้านอนุมูลอิสระโดยรวม (TAC) ±SE ของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารผสมถั่วเหลืองป่นหมักด้วยเชื้อรา *Aspergillus niger* ในอัตราส่วนที่ต่างกันเป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์

สูตรอาหาร*	ค่าโลหิตวิทยา							
	RBC (cells ml^{-1})	WBC (cells ml^{-1})	Hct (%)	Hb (g dL^{-1})	MCV (fL)	MCH (pg $cell^{-1}$)	MCHC (g dL^{-1})	TAC (μmol L^{-1})
D1	$2.51x10^{9}$±$3.95x10^{8}$c	$9.27x10^{7}$±$4.08x10^{6}$b	23.00±0.53d	9.24±0.30**a**	84.24±10.86a	35.33±3.75a	39.75±0.85a	309.69±33.29b
D2	$3.84x10^{9}$±$6.53x10^{8}$abc	$9.21x10^{7}$±$5.21x10^{6}$b	25.62±2.74cd	9.80±0.45a	92.10±17.68a	28.65±4.74a	37.03±1.48a	320.19±20.49b
D3	$3.31x10^{9}$±$2.19x10^{8}$bc	$1.06x10^{8}$±$8.12x10^{6}$a	26.56±1.35abc	10.13±0.54a	97.31±10.84a	36.54±4.13a	37.63±1.03a	412.40±10.95a
D4	$3.99x10^{9}$±$3.45x10^{8}$abc	$1.06x10^{8}$±$4.95x10^{6}$a	29.44±1.19a	11.03±0.35a	80.95±10.63a	29.25±1.66a	39.80±1.45a	409.53±43.30a
D5	$2.86x10^{9}$±$3.22x10^{8}$bc	$9.28x10^{7}$±$7.95x10^{6}$b	23.65±0.83cd	10.06±0.49a	83.17±11.75a	32.06±4.81a	40.28±0.97a	325.09±21.61b
D6	$5.16x10^{9}$±$8.09x10^{8}$a	$9.24x10^{7}$±$5.47x10^{6}$ b	25.08±1.43cd	11.17±0.38a	60.59±4.82a	26.25±2.66a	43.48±0.51a	379.01±8.98ab
D7	$5.23x10^{9}$±$5.52x10^{8}$a	$1.14x10^{8}$±$8.46x10^{6}$a	28.40±1.33ab	10.07±0.50a	56.87±7.14a	23.00±1.42a	35.65±2.42a	418.75±23.06a
D8	$4.19x10^{9}$±$6.31x10^{8}$a	$1.18x10^{8}$±$5.71x10^{6}$a	27.29±0.78abc	10.17±0.52**a**	72.07±12.35a	27.89±3.72a	36.48±1.58a	440.06±16.40**a**

***** สูตรอาหาร D1-D4 เป็นอาหารที่มีส่วนผสมของโปรตีนจากถั่วเหลืองป่น 10 เปอร์เซ็นต์ และแทนที่ด้วยถั่วเหลืองป่นหมัก 0, 25, 75 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และอาหารสูตร D5-D8 เป็นอาหารที่มีส่วนผสมของโปรตีนจากถั่วเหลืองป่น 20 เปอร์เซ็นต์ และแทนที่ด้วยถั่วเหลืองป่นหมัก 0, 25, 75 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

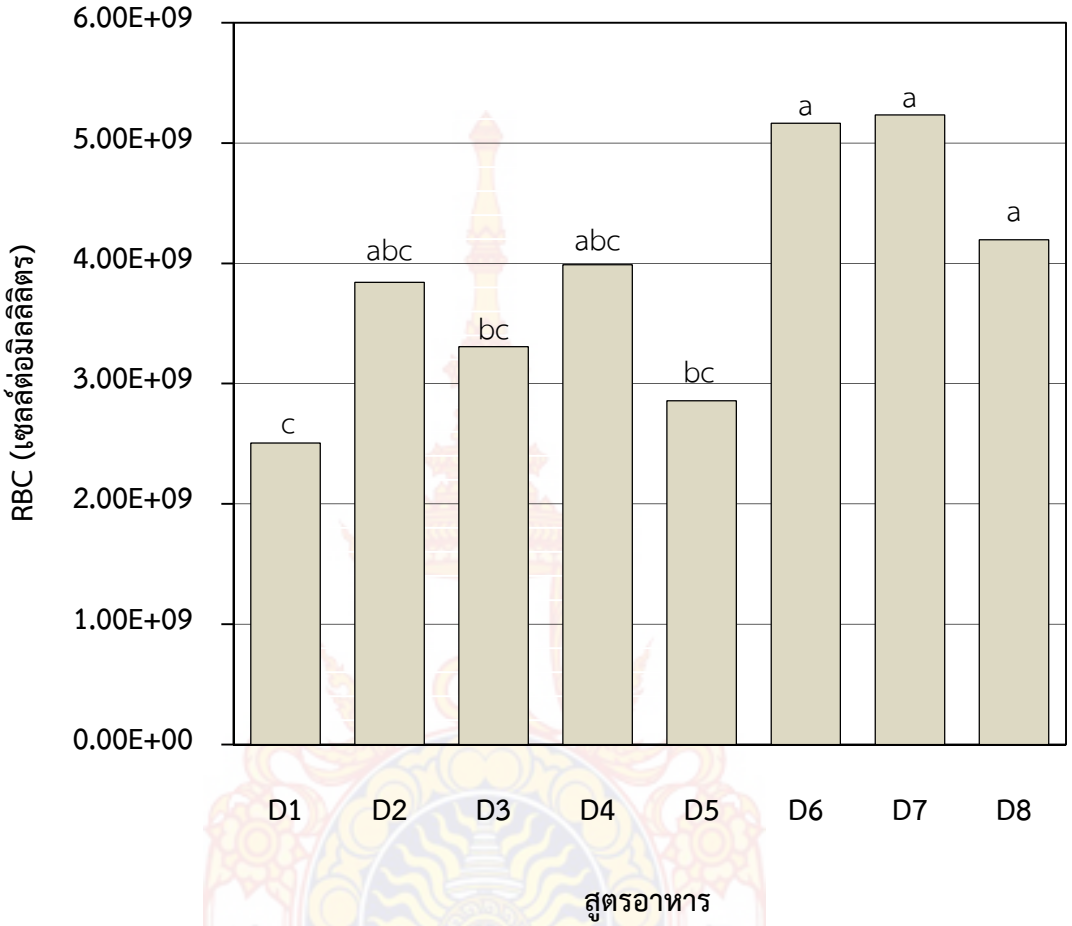
ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในสดมภ์เดียวกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

ตารางที่ 5 ชนิดเม็ดเลือดขาวของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารผสมถั่วเหลืองป่นหมักด้วยเชื้อรา *Aspergillus niger* ในอัตราส่วนที่ต่างกัน เป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์

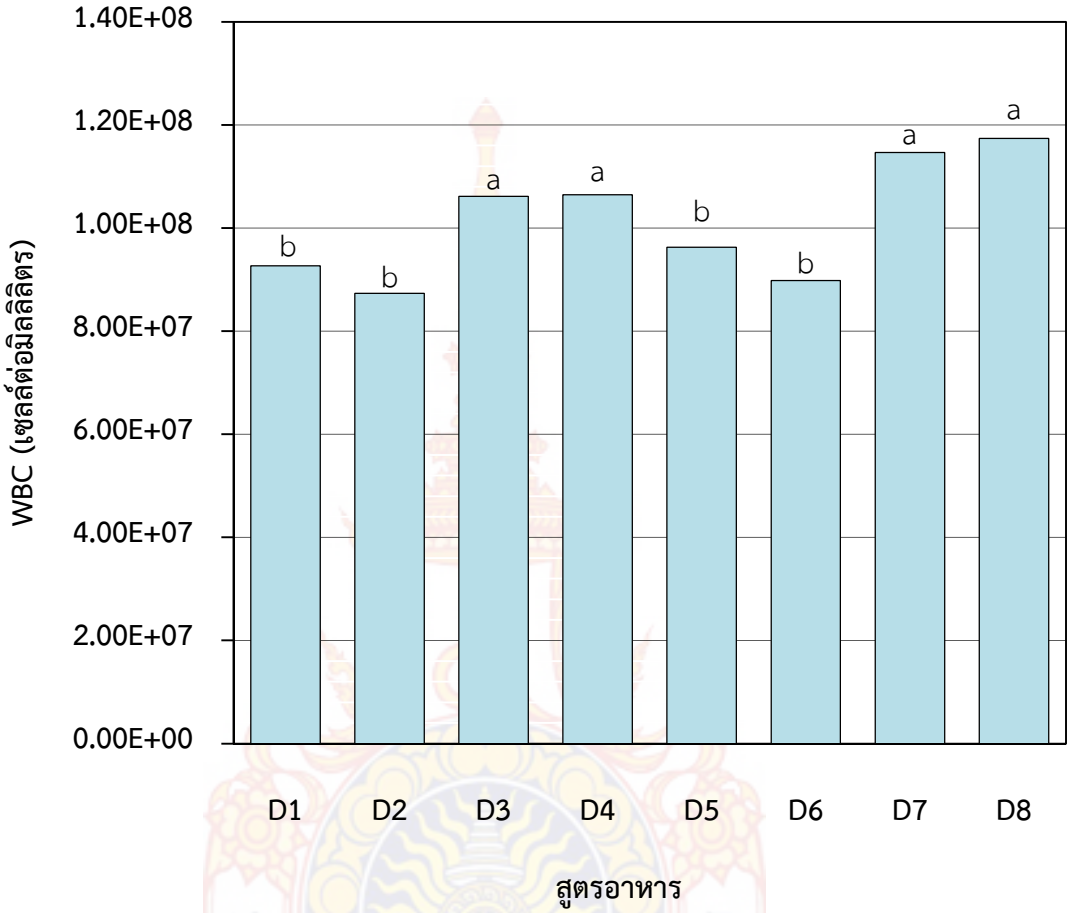
สูตรอาหาร*	เม็ดเลือดขาว (%±SE)					
	Monocyte	Lymphocyte	Thrombocyte	Eosinophil	Basophil	Neutrophil
D1	1.21±0.77a	47.17±10.38a	44.08±10.59a	3.21±1.36c	3.90±2.22b	0.43±0.30ab
D2	1.17±0.93a	45.71±6.11a	50.18±6.69a	0.00±0.00d	1.61±0.60b	1.33±0.80ab
D3	0.83±0.66a	9.67±1.36b	60.67±4.06a	13.33±2.48a	14.06±1.75b	1.44±0.23ab
D4	0.20±0.15a	6.90±0.77b	58.70±2.31a	16.60±1.55a	15.90±2.22b	1.70±0.45a
D5	0.22±0.10a	12.65±4.69b	60.67±4.55a	11.77±3.12ab	13.15±3.67b	1.54±0.41ab
D6	0.00±0.00a	9.08±1.74b	42.55±6.81a	1.77±1.01c	46.50±6.23a	0.10±0.10b
D7	0.82±0.46a	13.00±2.77b	41.76±8.29a	7.32±3.02bc	36.18±9.55a	0.92±0.48ab
D8	0.60±0.15a	8.30±1.09b	58.95±3.08a	16.80±0.98a	13.50±1.67b	1.85±0.24a

***** สูตรอาหาร D1-D4 เป็นอาหารที่มีส่วนผสมของโปรตีนจากถั่วเหลืองป่น 10 เปอร์เซ็นต์ และแทนที่ด้วยถั่วเหลืองป่นหมัก 0, 25, 75 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และอาหารสูตร D5-D8 เป็นอาหารที่มีส่วนผสมของโปรตีนจากถั่วเหลืองป่น 20 เปอร์เซ็นต์ และแทนที่ด้วยถั่วเหลืองป่นหมัก 0, 25, 75 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

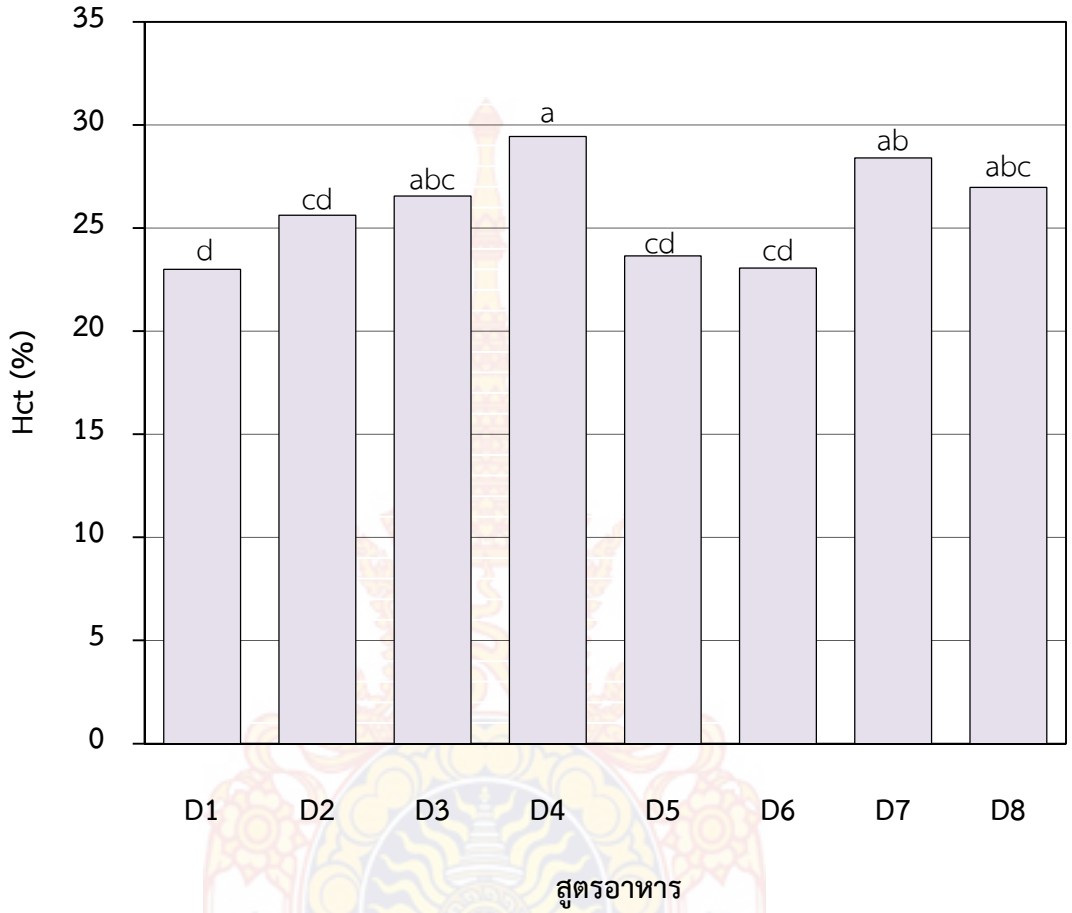
ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในสดมภ์เดียวกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)



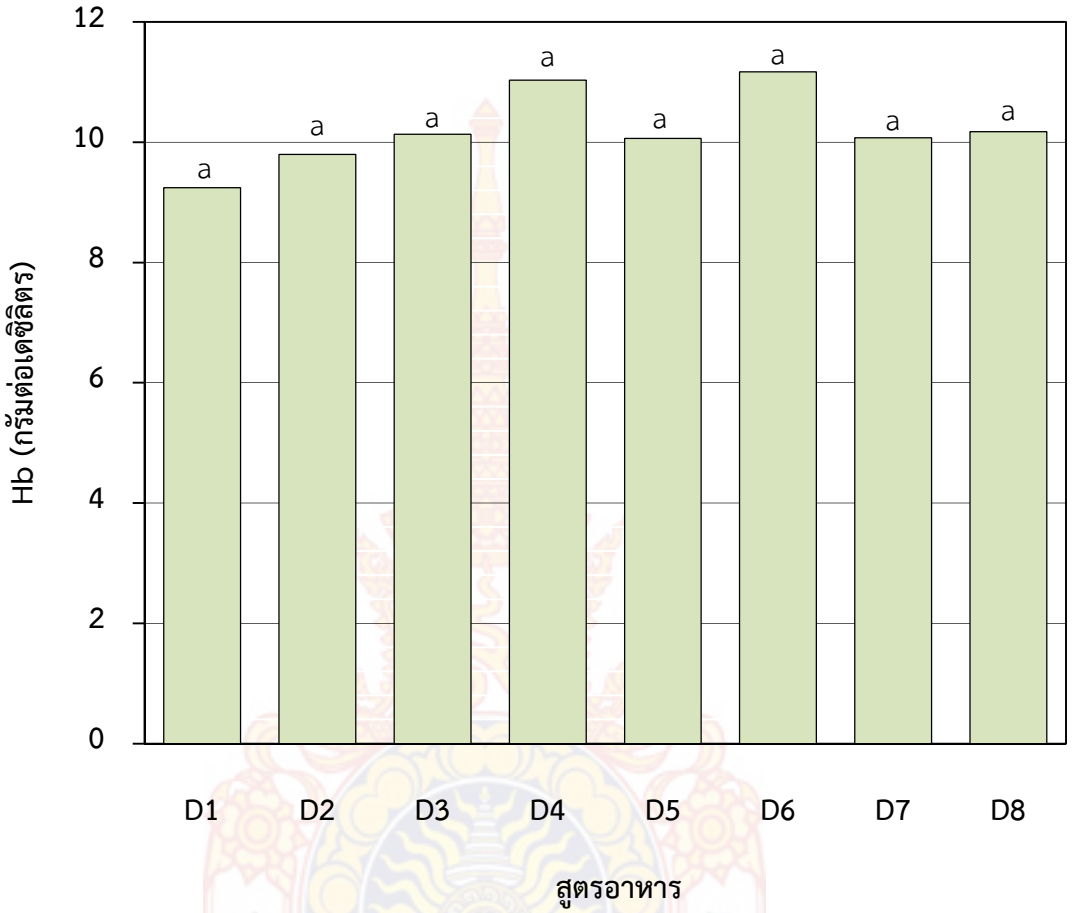
ภาพที่ 11 ปริมาณเม็ดเลือดแดง (RBC) ของปลากะพงขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร D1-D8 เมื่อเวลา 10 สัปดาห์



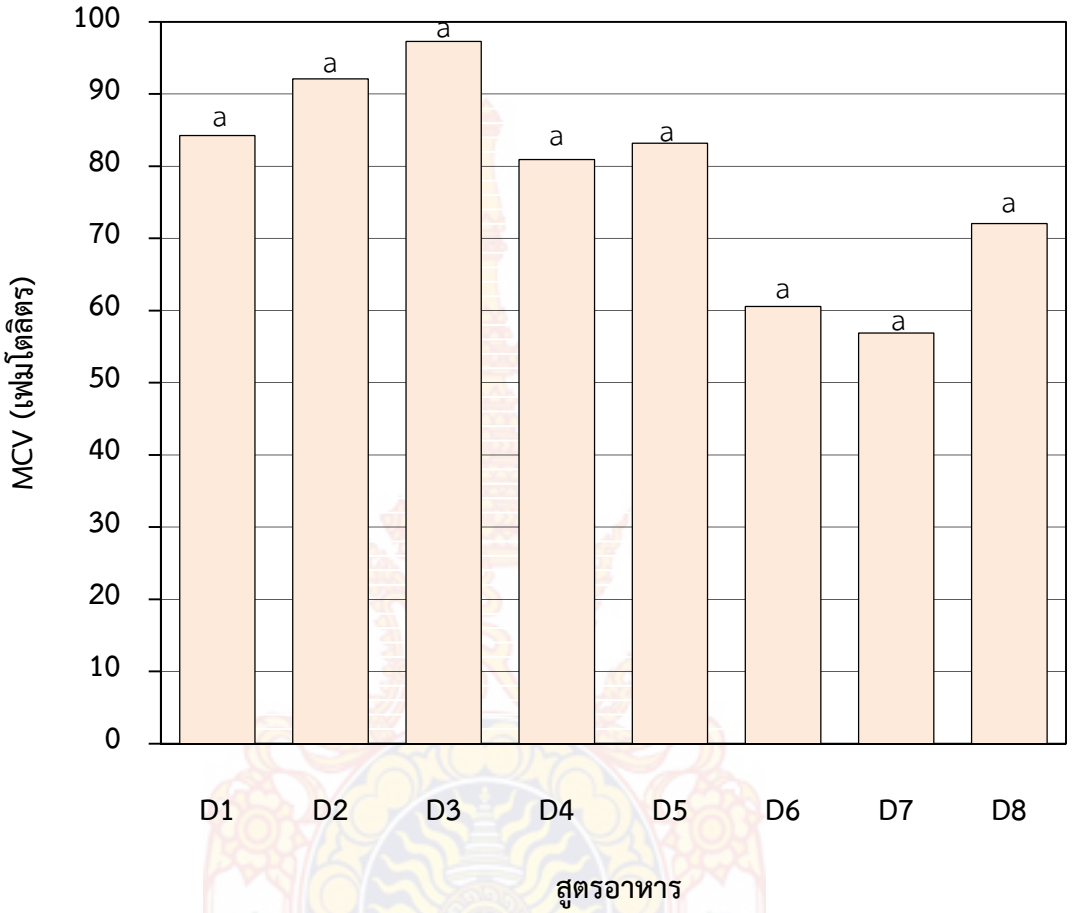
ภาพที่ 12 ปริมาณเม็ดเลือดขาว (WBC) ของปลากะพงขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร D1-D8 เมื่อเวลา 10 สัปดาห์



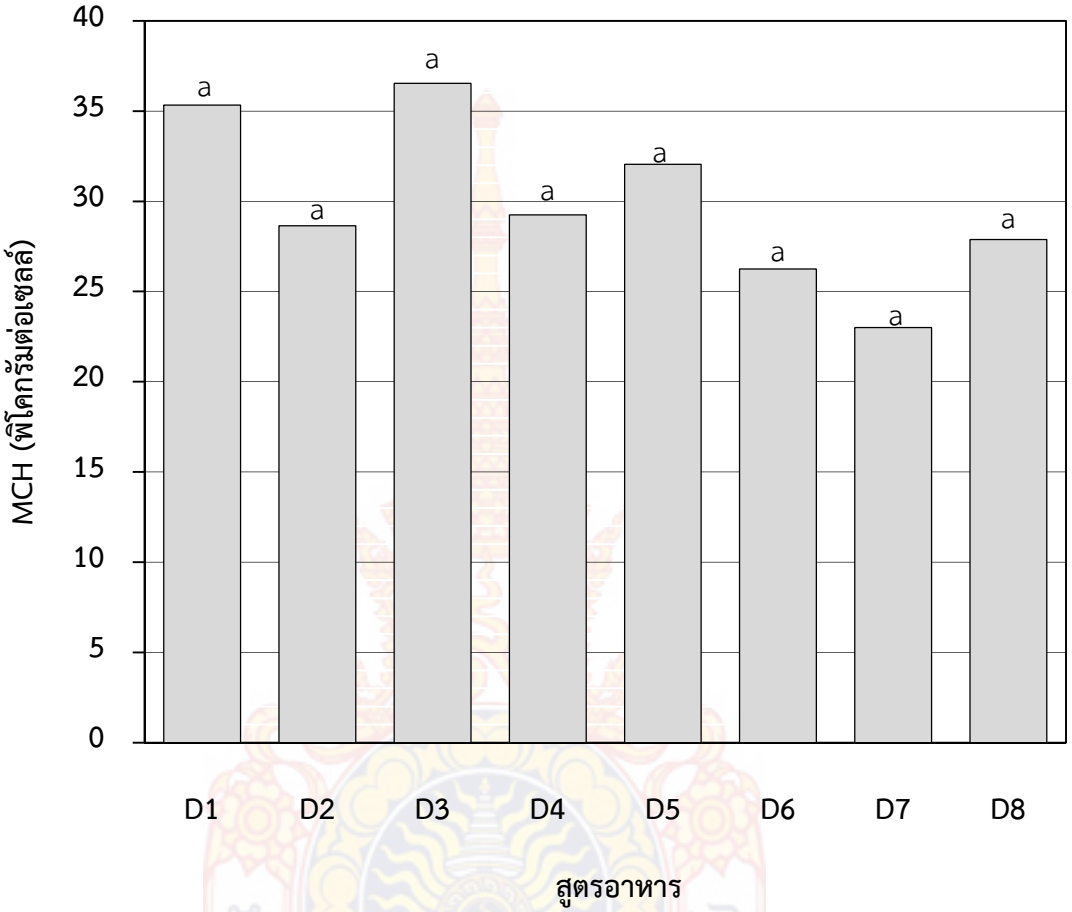
ภาพที่ 13 ค่าฮีมาโตคริต (Hct) ของปลากะพงขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร D1-D8 เมื่อเวลา 10 สัปดาห์



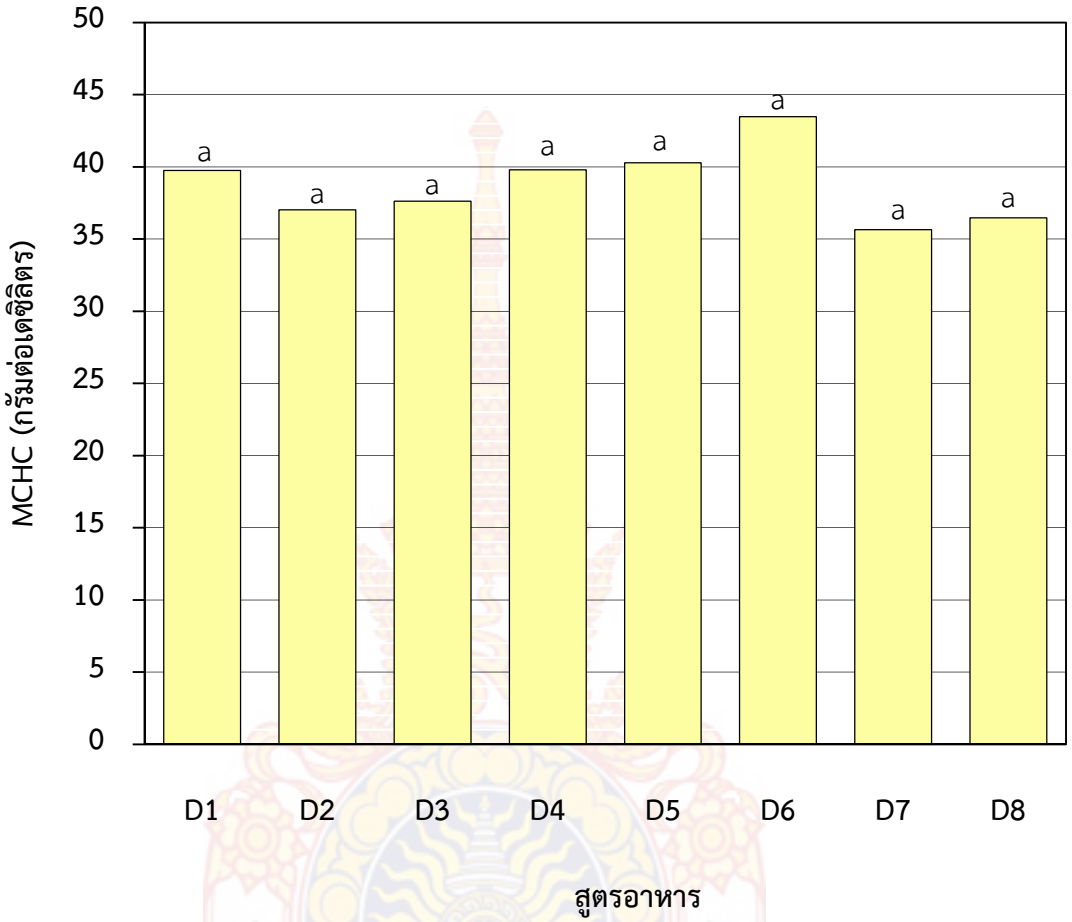
ภาพที่ 14 ปริมาณฮีโมโกลบิน (Hb) ของปลากะพงขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร D1-D8 เมื่อเวลา 10 สัปดาห์



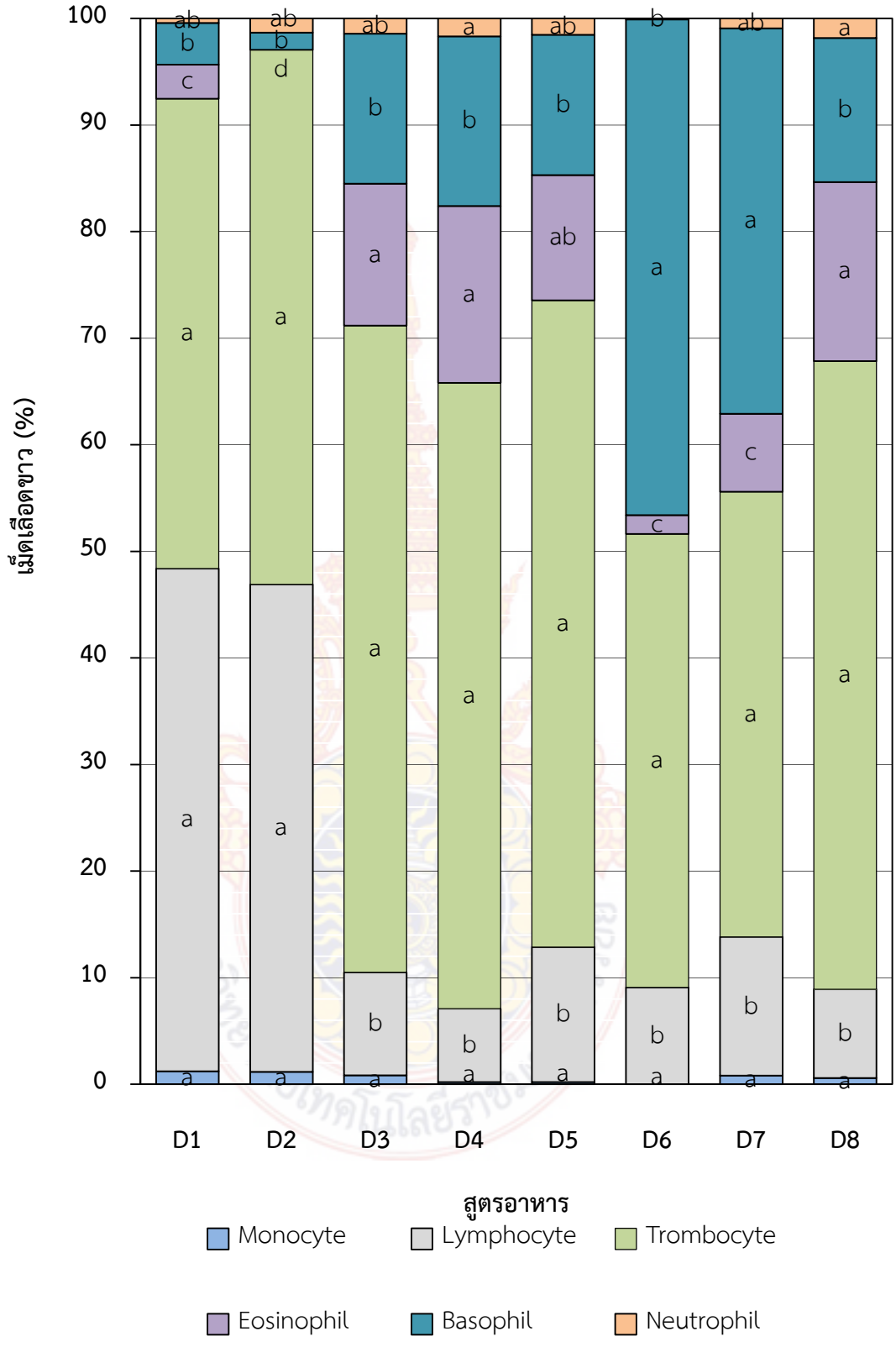
ภาพที่ 15 ปริมาตรเฉลี่ยของเม็ดเลือดแดง (MCV) ของปลากะพงขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร D1-D8 เมื่อเวลา 10 สัปดาห์



ภาพที่ 16 ปริมาณฮีโมโกลบินเฉลี่ยต่อเซลล์เม็ดเลือดแดง (MCH) ของปลากะพงขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร D1-D8 เมื่อเวลา 10 สัปดาห์



ภาพที่ 17 ความเข้มข้นเฉลี่ยของฮีโมโกลบินในเซลล์เม็ดเลือดแดง (MCHC) ของปลากะพงขาว ที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร D1-D8 เมื่อเวลา 10 สัปดาห์



ภาพที่ 18 ชนิดเม็ดเลือดของปลากะพงขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร D1-D8 เมื่อเวลา 10 สัปดาห์

ภาพที่ 19 การต้านอนุมูลอิสระโดยรวม (TAC) ของปลากะพงขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร D1-D8 เมื่อเวลา 10 สัปดาห์

วิจารณ์ผลการวิจัย

จากผลการทดลองทดแทนปริมาณโปรตีนจากถั่วเหลืองป่น 4 เปอร์เซ็นต์ (10 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณโปรตีนในอาหาร) ด้วยถั่วเหลืองป่นที่หมักด้วยเชื้อรา *Aspergillus niger* 25-100 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารสูตร D2-D4 มีผลต่อน้ำหนักตัว อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ อัตราการแลกเนื้อ และประสิทธิภาพการใช้โปรตีน แต่ไม่มีผลต่ออัตรารอดตาย อัตราส่วนที่บริโภคได้ และค่าดัชนีตับของปลากะพงขาว ซึ่ง Cruz et al. (2011) ให้เหตุผลว่า การใช้แบคทีเรียในการหมักวัตถุดิบอาหารในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมมีผลในการลดปริมาณสารต้านโภชนะและปรับปรุงความอยากอาหาร รวมถึงการเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยอาหารของสัตว์ ซึ่งในระหว่างกระบวนการหมักแบคทีเรียจะผลิตสารต่าง ๆ เช่น กรดอะซิติก กรดแลคติก กรดโปรปิโอนิค (Chiba et al., 2005) โดยกรดแลคติกสามารถทำลายสารต้านโภชนะในถั่วเหลือง (Cruz et al., 2011) ขณะที่การใช้เชื้อรา *A. oryzea* ในการหมักกากถั่วเหลือง สามารถปริมาณสารต้านทริปซิน และเพิ่มปริมาณเปปไทด์ขนาดเล็ก ซึ่งมีผลต่อประสิทธิภาพการใช้อาหาร (Hong et al., 2004) ขณะที่การทดแทนปลาป่นด้วยถั่วเหลืองที่หมักด้วยเชื้อ *Bacillus* spp. ในปลา rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Yamamoto et. al., 2010) และปลา red sea bream, *Pagrus major* (Kader et al., 2011) และการใช้ถั่วเหลืองที่หมักด้วยเชื้อรา *A. oryzea* และการผสมเชื้อรา *A. oryzea* โดยตรงในอาหารเลี้ยงปลา parrotfish, *Oplegnathus fasciatus* (Kim et al., 2009) และปลา olive flounder, *Paralichthys olivaceus* (Kim et al., 2010) มีผลให้ปลามีอัตราการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหารสูงกว่ากลุ่มควบคุม ดังนั้นการใช้เชื้อรา *A. niger* ในการหมักถั่วเหลืองอาจมีการผลิตสารต่าง ๆ เช่น protease (Couri et al., 2000; Yang and Lin, 1998) cellulase และ hemicellulases (Couri et al., 2000) lipase (Mahadik et al., 2002) phytase (Casey and Walsh, 2003) และ tannase (Aguilar et al., 2001) ระหว่างกระบวนการหมัก

ในขณะที่การทดลองใช้ปริมาณโปรตีนจากถั่วเหลืองป่น 8 เปอร์เซ็นต์ (20 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณโปรตีนในอาหาร) ในอาหารสูตร D5 และการแทนที่ด้วยโปรตีนจากถั่วเหลืองป่นหมักด้วยเชื้อรา *A. niger* ในปริมาณ 25-100 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารสูตร D6-D8 พบว่าไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหารของปลากะพงขาว ($P>0.05$) ซึ่งอาจเป็นผลเนื่องจากข้อจำกัดในประสิทธิภาพการใช้ถั่วเหลืองของปลากะพงขาว โดย Tantikitti et al. (2005) รายงาน

การทดแทนปลาป่นด้วยถั่วเหลืองในปลากะพงขาวสามารถใช้ได้ไม่เกิน 10 เปอร์เซ็นต์ โดยไม่ส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโต ขณะที่การใช้ในปริมาณมากเกินจะส่งผลให้การเจริญเติบโตลดลง เช่นเดียวกับการศึกษาในปลา pompano, *Trachinotus ovatus* (Lin et al., 2013) และปลา orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides* (Luo et al., 2004) พบว่าสามารถใช้ถั่วเหลืองหมักในการทดแทนปลาป่นได้ในปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ โดยไม่มีผลกระต่อปลา ซึ่งการใช้ถั่วเหลืองในปริมาณสูงในอาหารปลา rockfish, *Sebastes schlegeli* (Lee, et al., 2016) ปลา silver perch, *Bidyanus bidyanus* (Drew et. al., 2007) และปลา rainbow trout (Heikkinen et al., 2006; Romarheim et. al., 2008) มีผลให้ประสิทธิภาพการใช้อาหาร และการเจริญเติบโตของปลาลดลง นอกจากนี้ยังมีผลต่อความผิดปกติของสัณฐานวิทยาของลำไส้เล็ก รวมถึงประชาคมแบคทีเรียในลำไส้ใหญ่ในปลา rainbow trout (Heikkinen et. al., 2006; Merrifield et al., 2009) Drew et al. (2007) ได้ให้เหตุผลของการลดอัตราการเจริญเติบโตเมื่อมีการใช้ถั่วเหลืองในปริมาณเพิ่มขึ้น เนื่องจากถั่วเหลืองมีกรดอะมิโนจำป็นบางชนิด เช่น methionine และ lysine ในปริมาณน้อย ซึ่งมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของปลา นอกจากนี้ Azam and Lee (2014) รายงานว่า การทดแทนโปรตีนจากปลาป่นด้วยถั่วเหลืองหมักในปริมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารปลา black sea bream, *Acanthopagrus schlegeli* สามารถทำได้แต่ต้องมีการเสริมกรดอะมิโน methionine, lysine และ taurine โดยไม่มีผลต่อการเจริญเติบโต และ Yang et al. (2009) ได้ทดลองผสมกรดอะมิโน methionine และ lysine ในอาหารปลา silver perch, *Bidyanus bidyanus* ที่แทนที่โปรตีนจากปลาป่นด้วยถั่วเหลืองหมัก 60 เปอร์เซ็นต์ พบว่าสามารถเพิ่มการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหาร และประสิทธิภาพการใช้โปรตีนของปลาได้ดีกว่ากลุ่มที่ไม่เสริมกรดอะมิโน อย่างไรก็ตาม Martínez-Llorens et al. (2007) รายงานว่าปลาที่มีขนาดใหญ่สามารถใช้โปรตีนจากพืชในอาหารได้ดีกว่าปลาขนาดเล็ก เช่นเดียวกับการศึกษาของ Lee et al. (2016) พบว่าการทดแทนปลาป่นด้วยถั่วเหลืองหมัก 40 เปอร์เซ็นต์ ไม่มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโต อัตราการกินอาหาร ประสิทธิภาพการใช้อาหาร ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน และอัตรารอดตายของปลา rockfish ขนาดใหญ่ ซึ่ง Francis et al. (2001) ให้เหตุผลว่า ความสามารถในการใช้โปรตีนจากพืชในปลาแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับความต้องการปริมาณกรดอะมิโนจำเป็นซึ่งมีจำกัดในพืชแต่ละชนิด เช่นการศึกษาของ Lee et al. (2016) พบว่า ปลา rockfish วัยรุ่น สามารถใช้โปรตีนจากถั่วเหลืองหมักได้น้อยกว่าปลา black sea bream ภายใต้สภาวะแวดล้อมเดียวกัน

จากผลการศึกษาค่าโลหิตวิทยา และการต้านอนุมูลอิสระโดยรวมของปลากะพงขาวที่กินอาหารผสมถั่วเหลืองป่นหมักด้วย เชื้อรา *A. niger* ในปริมาณที่แตกต่างกัน พบว่าปริมาณเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาวของปลากะพงขาวมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามปริมาณของถั่วเหลืองหมักที่ผสมในอาหาร โดยปลากะพงขาวที่กินอาหารที่มีถั่วเหลืองป่นหมักสูตร D6- D8 มีปริมาณเม็ดเลือดแดงสูงกว่าปลากะพงขาวที่กินอาหารสูตร D1 และ D5 ซึ่งเป็นสูตรอาหารที่ไม่มีการผสมถั่วเหลืองป่นหมักอย่างชัดเจน เช่นเดียวกับการศึกษาของ Kim et al. (2009) พบว่า parrot fish (*Oplegnathus fasciatus*) วัยรุ่นที่กินอาหารมีส่วนผสมของเชื้อรา *A. oryzae* มีปริมาณเม็ดเม็ดเลือดขาวสูงกว่าปลาในกลุ่มควบคุม ซึ่งยังไม่มีข้อมูลที่แน่ชัดเกี่ยวกับกลไกที่ทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของปริมาณเม็ดเลือดแดง ขณะที่ปริมาณเม็ดเลือดขาวของปลากะพงขาวที่กินอาหารสูตร D3, D4, D7 และ D8 สูงกว่าปลากะพงขาวที่กินอาหารสูตรอื่น ซึ่ง Ruiz-Herrera (1991) และ Rop et al. (2009) อธิบายว่าเส้นใยของเชื้อรามีสารกลูแคน (glucans) หลายชนิดเป็นองค์ประกอบ โดยเฉพาะเบต้ากลูแคน (β-1, 3-glucans) ซึ่งสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน ช่วยป้องกันสิ่งแปลกปลอม ลดการอักเสบของเซลล์ในสิ่งมีชีวิต โดยเมื่อเบต้ากลูแคนถูกตัวจับ (glucan receptors) ของเซลล์ macrophage ที่อยู่บนผนังของลำไส้ จะกระตุ้นให้มีการสร้างสารต้านจุลชีพ (bactericidal compounds) หลาย ๆ ชนิด เช่น lysozyme, reactive oxygen radicals และ N-oxides รวมถึงสารไซโตไคน์ (cytokine) ซึ่งเป็นโปรตีนโมเลกุลขนาดเล็ก เช่น interferon, interleukins และ tumor necrotic factor (TNF) เป็นต้น และทำหน้าที่กระตุ้นเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน รวมถึงเม็ดเลือดขาว (Rop et al. 2009) นอกจากนี้เบต้ากลูแคนยังกระตุ้นเซลล์ในไขกระดูก ทำให้มีการสร้างเม็ดเลือดขาวเข้าสู่กระแสเลือดมากขึ้น (Hong et al., 2003) แต่อย่างไรก็ตามจากผลการนับจำนวนชนิดของเม็ดเลือดขาวยังไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณการกินอาหารที่มีส่วนผสมของถั่วเหลืองป่นหมักด้วยเชื้อรา *A. niger* กับชนิดของเม็ดเลือดขาวอย่างชัดเจน แต่เมื่อศึกษาผลของถั่วเหลืองป่นหมักด้วยเชื้อรา *A. niger* ต่อการต้านอนุมูลอิสระโดยรวมของปลากะพงขาว พบว่าระดับการต้านอนุมูลอิสระของปลากะพงขาวเพิ่มขึ้นตามปริมาณถั่วเหลืองป่นหมักในสูตรอาหาร โดยปลากะพงขาวที่กินอาหารสูตร D3, D4, D7 และ D8 มีค่าการต้านอนุมูลอิสระมากว่าปลากะพงขาวที่กินอาหารสูตรอื่น ๆ แสดงให้เห็นว่า นอกจากเชื้อรา *A. niger* สามารถกระตุ้นให้ปลากะพงขาวมีประมาณเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาวเพิ่มขึ้นแล้ว ยังสามารถกระตุ้นการต้านอนุมูลอิสระให้เพิ่มสูงได้ เช่นเดียวกับการศึกษาการผสมถั่วเหลืองหมักด้วยเชื้อรา *A. oryzea* ในอาหารปลา olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) (Kim et al., 2009;

Kim et al., 2010) และปลา parrot fish *Oplegnathus fasciatus* (Pham and Lee, 2007) พบว่าปลาที่กินอาหารที่มีส่วนผสมของถั่วเหลืองหมักด้วยเชื้อรา *A. oryzea* มีค่าการต้านอนุมูลอิสระในตับ (Liver superoxide activity) สูงกว่ากลุ่มควบคุม

สรุปผลกาวิจัย

จากผลการวิจัยในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการทดแทนปริมาณโปรตีนจากถั่วเหลืองป่น 4 เปอร์เซ็นต์ (10 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณโปรตีนในอาหาร) ด้วยถั่วเหลืองป่นที่หมักด้วยเชื้อรา *Aspergillus niger* ปริมาณ 100 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารสูตร D4 เป็นปริมาณการทดแทนที่เหมาะสมที่สุด ที่สามารถเพิ่มการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหาร และยังมีผลในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันและการต้านอนุมูลอิสระของปลากะพงขาวให้เพิ่มสูงขึ้น รวมถึงสามารถลดต้นทุนค่าอาหารในการผลิตปลากะพงขาวได้ต่ำที่สุด ดังนั้นการใช้เชื้อรา *A. niger* ซึ่งเป็นจุลชีพที่พบในธรรมชาติ และมีความปลอดภัยในการใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร น่าจะเป็นอีกทางเลือกที่จะนำมาใช้ในการเพิ่มประสิทธิภาพการใช้ถั่วเหลืองในอาหารปลากะพงขาวต่อไป

เอกสารอ้างอิง

กรมประมง. 2536. **การเลี้ยงปลาน้ำกร่อย**. โรงพิมพ์ชุมุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทยจำกัด. กรุงเทพมหานคร. 43 น.

นภดล ศุกระกาญจน์. 2549. **คู่มือปฏิบัติการโรคสัตว์น้ำ.** ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ. สงขลา. 104 น.

วรวุฒิ เกิดปราง และ ชาคริยา ฉลาด. 2558. จุลินทรีย์ท้องถิ่นในพื้นที่เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำตามหลักเกษตรธรรมชาติ กรณีศึกษา : ฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืด คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตตรัง. **วารสารวิจัยมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก** 8(1): 52-58.

อมรรัตน์ เสริมวัฒนากุล พิสมัย สมสืบ นุชนรี ทองศรี และสาวิตรี วงศ์สุวรรณ. 2548. **อาหารและการผลิตอาหารสัตว์น้ำ**. โรงพิมพ์ชุมุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทยจำกัด. กรุงเทพมหานคร. 69 น.

อานัฐ ตันโช. 2547. **เกษตรธรรมชาติ.** พิมพ์ครั้งที่ 3. สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ. 146 น. *แปลจาก* Han K. C. 2003. Natural Farming. Janong Natural Farming Institute, Korea.

Aguilar, C.N., Augur, C, Favela-Torres, E. and Viniegra-González, G. 2001. Production of tannase by *Aspergillus niger* Aa-20. In submerged and solod-state fermentation: influence of glucose and tannic acid. **J. Industrial Microbiol. Biotechnol.** 26(5): 296-302.

Allagheny, N., Obanu, Z.A., Campbell-Platt, G. and Owens, J.D. 1996. Control of ammonia formation during *Bacillus subtilis* fermentation of legume. **Food Microbiol.** 29(3) : 321-333.

Ahmad, T., Rasool, S., Sarwar, M., Haq, A. and Hasan, Z. 2000. Effect of microbial phytase produced from a fungus *Aspergillus niger* on bioavailability of phosphorus and calcium in broiler chickens. **Animal Feed Sci. and Technol.** 83(2): 103-114.

Anderson, R.L., Rackis, J.J. and Tallent, W. H. 1979. Biologically active substances in soy products. In: Wilcke, H.L., Hopkins, D.T. and Waggle, D.H. (Eds.). **Soy Protein and Human Nutrition**. pp. 209-133. Academic Press New York.

AOAC. 1990. **Official Methods of Analysis (Volume 1)**. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Inc. Verginia, USA.

Azarm, H.M. and Lee, S.M. 2014. Effects of partial substitution of dietary fish meal by fermented soybean meal on growth performance, amino acid and biochemical parameters of juvenile black seabream *Acanthopagrus schlegeli*. **Aquac. Res.** 45(6): 994–1003.

Bakke-McKellep, A.M., Penn, M.H., Salas, P.M., Refstie, S., Sperstad, S., Landsverk, T., Ringo, E. and Krogdahl, Å. 2007. Effects of dietary soyabean meal, inulin and oxytetracycline on intestinal microbiota and epithelial stress, apoptosis and proliferation in the teleost Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **British J. Nutrition** 97(4): 699-713.

Barrows, F.T., Stone, D.A.J. and Hardy, R.W. 2007. The effects of extrusion conditions on the nutritional value of soybean meal for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture** 265(3): 244-252.

Blaxhall, P.C. and Daisley, K.W. 1973. Routine haematological methods for use with fish blood. **J. Fish Biol.** 5(6): 771-781.

Bonaldo, A., Roem, A.J., Pecchini, A., Grilli, E. and Gatta, P.P. 2006. Influence of dietary soybean meal levels on growth, feed utilization and gut histology of Egyptian sole (*Solea aegyptiaca*) juveniles. **Aquaculture** 261(2) : 580-586.

Carter, C.G. and Hauler, R.C. 2000. Fish meal replacement by plant meals in extruded feeds for Atlantic salmon, *Salmo salar* L. **Aquaculture** 185(3): 299-311.

Casey, A. and Walsh, G. 2003. Purification and characterization of extracellular phytase from *Asperillus niger* ATTCC 9142. **Bioresource Technol.** 86(2): 183-188.

Chiba, S., Chiba, H. and Yagi, M. 2005. **A Guide for Silage Making and Utilization in the Tropical Regions**. Japan Livestock Technology Association. Japan. 29 p.

Couri, S., Terzi, S.C., Pinto, G.S., Freitas, S.P. and Costa. A.C.A. 2000. Hydrolytic enzyme production in solid-state fermentation by *Aspergillus niger* 3T5B8. **Process Biochemistry** 36(3):255–261.

Cruz, Y., Kijora, C., Wedler, E., Danier, J. and Schulz, C. 2011. Fermentation properties and nutritional quality of selected aquatic macrophytes as alternative fish feed in rural areas of the Neotropics. **Livestock Research for Rural Development** 23(11): Article No. 239. [online] http://www.lrrd.org/lrrd23/11/cruz23239.htm (accessed on June 12, 2018)

Deng, J., Mai K., Ai Q., Zhang W., Wang X., Xu W. And Liufu, Z. 2006. Effects of replacing fish meal with soy protein concentrate on feed intake and growth of juvenile Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. **Aquaculture** 258(4): 503-513.

Drew, M.D., Borgeson, T.L. and Thiessen, D.L. 2007. A review of processing of feed ingredients to enhance diet digestibility in finfish. **Anim. Feed Sci. Technol.** 138(2): 118–136.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. n.d. **Silage making for small scale farmers**. United States Agency for International Development. [online] http://pdf.usaid.gov/pdf_docs/PNADQ897.pdf (accessed on April 12, 2018)

Francis, G., Makkar, H.P.S. and Becjer, K. 2001. Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. **Aquaculture** 199(3): 197-227.

Hardy, R.W. 2010. Utilization of plant proteins in fish diets: effects of global demand and supplies of fishmeal**. Aquaculture Research** 41(5): 770-776.

Heikkinen, J., Vielma, J., Kemiläinen, O., Tiirola, M., Eskelinen, P., Kiuru, T., Naiva-Paldanius, D. and Wright. A. 2006. Effects of soybean meal based diet on growth performance, gut histopathology, and intestinal microbiota of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture** 261(1): 259-268.

Hong, F., Hansen, R.D., Yan, J., Allendorf, D.J., Baran, J.T., Ostorff, G.R., Ross, G.D. 2003. Glucan functions as an adjuvant for monoclonal antibody immunotherapy by Recruiting tumoricidal granulocytes as killer cells. **Cancer Res.** 63(24): 9023-9031.

Hong, K.J., Lee, C.H. and Kim, S.W. 2004. *Aspergillus oryzae* GB-107 fermentation improves nutritional quality of food soybeans and feed soybean meals. **J. Medicinal Food 7**(4): 403-435.

Kader, M.A., Koshio, S., Ishikawa, M., Yokoyama, S., Bulbul, M., Honda, Y., Mamauag R.E. and Laining, A. 2011. Growth, nutrient utilization, oxidative condition, and element composition of juvenile red sea bream *Pagrus major* fed with fermented soybean meal and scallop byproduct blend as fishmeal replacement. **Fisheries Science** 77(1): 119-128.

Kalpana, D.K., Rasheedha, B.A., Gnanaprabhal, G.R., Pradeep, B.V. and Palaniswamy, M. 2008. Purification, characterization of alkaline protease enzyme from native isolate *Aspergillus niger* and its compatibility with commercial detergents. **Indian J. Sci. Technol.** 1(7): 1-6.

Kang, S.W., Park, Y.S., Lee, J.S., Hong, S.I. and Kim, S.W. 2004. Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology** 91(2): 153-156.

Kim, S.S., Galaz, G.B., Pham, M.A., Jang, J.W., Oh, D.H., Yeo, I.K. and Lee, K.J. 2009. Effects of dietary supplementation of meju, fermented soybean meal, and

Aspergillus oryzae for juvenile parrot fish (*Oplegnathus fasciatus*). **Asian Australian J. of Animal Sciences** 22(6): 849-856.

Kim, S.S., Pham, M.A., Kim, K.W., Son. M.H. and Lee, K.J. 2010. Effects of microbial fermentation of soybean on growth performances, phosphorous availability, and antioxidant activity in diets for juvenile olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). **Food Sci. Biotechnol.** 19(6): 1605-1610.

Larsen, H.N. and Snieszko, S.F. 1961. Comparison of various methods of determination of hemoglobin in trout blood. **Progve. Fish Cult**. 23(1): 8-17.

Larsen, H.N. and Snieszko, S.F. 1971. Modification of the microhematocrit technique with trout blood. **Trans. Am. Fish. Soc.** 90(2): 139 -142.

Lee, S.M., Azarm, H.M. and Chang, K.H. 2016. Effects of dietary inclusion of fermented soybean meal on growth, body composition, antioxidant enzyme activity and disease resistance of rockfish (*Sebastes schlegeli*). **Aquaculture** 459(1): 110–116.

Lin, H., Chen, X., Chen, S., Zhuojia, L., Huang, Z., Niu, J., Wu, K. and Lu, X. 2013. Replacement of fish meal with fermented soybean meal in practical diets for pompano *Trachinotus ovatus*. **Aquac. Res**. 44(1):151–156.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J, Farr, A.L. and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenolreagent. **J. Biol. Chem.** 140: 879-885.

Luo, Z., Liu, Y.J., Mai, K.S., Tian, L.X., Liu, D.H. and Tan, X.Y. 2004. Partial replacement of fish meal by soybean protein in diets for grouper *Epinephelus coioides* juveniles. **J. Fish. China**. **28**: 175–181.

Mahadik, N.D., Puntambekar, U.S., Bastawde, K.B., Khire, J.M. and Gokhale, D. V. 2002. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. **Process Biochemistry** 38(5): 715-721.

Mandviwala, T.N. and Khire, J. M. 2000. Production of high activity thermostable phytase from thermotolerant *Aspergillus niger* in solid state fermentation. **J. Industrial Microbiology and Biotechnol.** 24(4): 237-243.

Martínez-Llorens, S., Monino, A.V., Vidal, A.V., Salvador, V.J.M., Torres M.P. and Cerda, M.J. 2007. Soybean meal as a protein source in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) diets: effects on growth and nutrient utilization. **Aquac. Res.** 38(1): 82–90.

Merrifield, D.L., Dimitroglou, A., Bradley, G., Baker, R.T.M. and Davies, S.J. 2009. Soybean meal alters autchthonous microbial populations, microvilli morphology and compromises intestinal enterocyte integrity of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **J. Fish Diseases** 32(9): 755-766.

Moran, J. 2005. **Topical Dairy Farming : Feeding management for small dairy farmers in the humid tropics**. Landlinks Press. 312 p.

Norton G., 1991. Proteinase inhibitors. In: D'Mello, F.J.P., Duffus, C.M. and Duffus, J. H. (Eds.). **Toxic Substances in Crop Plants**. The Royal Society of Chemistry, Thomas Graham House, Science Park, Cambridge, pp. 68–106.

Paranthaman, R., Alagusundaram, K. and Indhumathi, J. 2009. Production of protease from rice mill wastes by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. **World J. Agri. Sci.** 5(3): 308-312.

Pham, M.A. and Lee, K.J. 2007. Effects of dietary cheonggukjang on liver superoxide dismutase activity of parrot fish *Oplegnathus fasciatus*. **J. Aquacult.** 20: 132-139.

Reigh, R.C. and Ellis, S.C. 1992. Effects of dietary soybean and fish-protein ratios on growth and body composition of red drum *Sciaenops ocellatus* fed isonitrogenous diets. **Aquaculture** 104(3): 279–292.

Romarheim, O.H., Skrede, A., Gao, Y., Krogdahl, Å ., Denstadli V., Lilleeng E., and Storebakken T. 2008. Comparison of white flakes and toasted soybean meal

partly replacing fish meal as protein source in extruded feed for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture** 256(3): 354-364.

Rop, O., Mlcek, J. and Jurikova, T. 2009. Beta-glucans in higher fungi and their health effects**. Nutr. Rev.** 67(11): 624-631.

Ruiz-Herrere, J. 1991. Biosynthesis of beta-glucans in fungi. **Antonie Van Leeuwenhoek** 60(2): 72-81.

Schuster, E., Dunn-Coleman, N. and Frisvad, J.C. 2002. On the safety of *Aspergillus niger.* **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 59(4-5): 426-435.

Sohail, M., Siddiqi, R., Ahmad, A. and Khan, S.A. 2009. Cellulase production from *Aspergillus niger* MS82: effect of temperature and pH. **New Biotechnol.** 25(6): 437-441.

Stoskopf, M.K. 1993. **Fish Medicine**. 9th ed. Harcourt Brace Jovanovich, Inc. press. Pennsylvania,USA. pp. 127-130.

Tantikitti, C., Sangpong, W. and Chiavareesajja, S. 2005. Effects of defatted soybean protein levels on growth performance and nitrogen and phosphorus excretion in Asian seabass (*Lates calcarifer*). **Aquaculture** 248(1): 41-50.

Wang, Y., Kong, L.J., Li, C. and Bureau, D.P. 2006. Effect of replacing fish meal with soybean meal on growth, feed utilization and carcass composition of cuneate drum (*Nibea miichthioides*). **Aquaculture** 261(4): 1307-1313.

Wee, K.L. and Shu, S.W. 1989. The nutritive value of boiled full-fat soybean in pelleted feed for Nile tilapia. **Aquaculture** 81(3): 303–314.

Yamamoto, T., Iwashita, Y., Matsunari, H., Sugita, T., Furuita, H., Akimoto, A., Okamatsu, K. and Suzuki, N. 2010. Influence of fermentation conditions for soybean meal in a non-fish meal diet on the growth performance and physiological condition of rainbow trout *Oncorhychus mykiss.* **Aquaculture** 309(1): 173-180.

Yang, F.C. and Lin, I.H. 1998. Production of acid protease using thin stillage from a rice-spirit distillery by *Aspergillus niger*. **Enzyme and Microbial Technol.** 23(6): 397-402.

Yang, S.D., Lin, T.S., Liu, F.G. and Liou, C.H. 2009. Dietary Effects of Fermented Soybean Meal on Growth Performance, Body Composition and Hematological Characteristics of Silver Perch (*Bidyanus bidyanus*). **J. Taiwan Fish. Res.** 17(1): 53-63.