**นิพนธ์ต้นฉบับ**

# ผลของคาโรทีนอยด์จากสไปรูไลนาต่อการสะสมคาโรทีนอยด์และภูมิคุ้มกันในปลานิลแดงแปลงเพศ

วุฒิพร พรหมขุนทอง[1] อุดมนันท์ อุดม[2] กิจการ ศุภมาตย์[3] และ สุภฎา คีรีรัฐนิคม[4]

## Abstract

**Phromkunthong, W.[1], Udom, U.[1], Supamattaya, K.[1] and Kiriratnikom, S.[2]**

**Effects of spirulina carotenoid on carotenoid deposition and immunity in sex-reversed red tilapia**

**Songklanakarin J. Sci. Technol., 2007, 29(5) : 1301-1319**

**A study was conducted in 235-l glass tanks filled with 180-l water using closed recirculation water system of 1.2 l/min flow rate to determine the effects of spirulina carotenoid on its accumulation and immune in sex-reversed red tilapia. Feeding trial comprised 8 treatments with 3 replications each. Twenty fish of 21 g initial weight were stocked in each tanks into which feed were given in 2 rations daily over an 8 weeks period of study with completely randomized design. All feeds tested contained 30% protein, 6% lipid and 3,400 Kcal digestible energy/kg feed. Formula 1 feed was control, i.e., without fortified carotenoid; formulae 2, 3 and 4 were with 200 mg/kg feed of fortified synthetic carotenoids, i.e., astaxanthin, zeaxanthin and bata-carotene, respectively. Dried spirulina were incorporated in feed formulae 5 to 8 to obtain carotenoid concentration 50, 100, 150 and 200 mg/kg feed, respectively. Results showed that neither synthetic nor**

**[1]Department of Aquatic Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, 90112 Thailand. [2]Department of Biology, Faculty of Science, Thaksin University, Pha Payom, Phatthalung, 93110 Thailand.**

[1]Ph.D. (Aquatic Animal Nutrition) รองศาสตราจารย์ [2]วท.ม. (วาริชศาสตร์) [3]Ph.D. (Aquatic Animal Pathology) รองศาสตราจารย์ ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112 [4]ปร.ด. (เทคโนโลยีชีวภาพ) ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ อำเภอป่าพะยอม จังหวัดพัทลุง 93110

Corresponding e-mail: yh27394@yahoo.com

รับต้นฉบับ 26 ตุลาคม 2549 รับลงพิมพ์ 18 พฤษภาคม 2550

**spirulina carotenoid produced an effect on fish growth or survival. Analysis of total carotenoid showed both sources of carotenoid elevated carotenoid content and color index in proportional to carotenoid level fortification. Highest accumulated carotenoid content was noted in feed with zeaxanthin in the feed though not different from that with 150 mg/kg spirulina carotenoid. Antibody against *Streptococcus agalactiae* was enhanced with carotenoid fortification in all formulae except that with beta-carotene. Carotenoid in the feed has no effect on total hemoglobin and hematocrit, though it increases red blood cell and white blood cell ($p<0.05$).**

**Key words :** carotenoid, Spirulina, immunity, sex-reversed red tilapia

## บทคัดย่อ

**วุฒิพร พรหมขุนทอง อุดมนันท์ อุดม กิจการ ศุภมาตย์ และ สุภฎา คีรีรัฐนิคม**

## ผลของคาโรทีนอยด์จากสไปรูไลนาต่อการสะสมคาโรทีนอยด์และภูมิคุ้มกันในปลานิลแดงแปลงเพศ

**ว. สงขลานครินทร์ วทท. 2550 29(5) : 1301-1319**

**ศึกษาผลของคาโรทีนอยด์จากสไปรูไลนาต่อการสะสมคาโรทีนอยด์และภูมิคุ้มกันในปลานิลแดงแปลงเพศ ในตู้กระจกขนาด 235 ลิตร ที่มีปริมาตรน้ำ 180 ลิตร ระบบน้ำเป็นระบบไหลเวียนแบบปิด มีอัตราการไหลของน้ำ 1.2 ลิตร/นาที แบ่งเป็น 8 ชุดการทดลอง การทดลองละ 3 ซ้ำ โดยใช้ปลานิลแดงแปลงเพศน้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้นตัวละ 21 กรัม จำนวน 20 ตัวต่อซ้ำ ให้อาหารทดลองวันละ 2 มื้อ ระยะเวลาในการทดลอง 8 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด กำหนดให้สูตรอาหารทุกสูตรมีระดับโปรตีน 30% ไขมัน 6% พลังงานที่ย่อยได้ 3,400 กิโลคาลอรี/อาหาร 1 กก. โดยสูตรที่ 1 เป็นชุดควบคุม (ไม่เสริมคาโรทีนอยด์) สูตรที่ 2, 3 และ 4 เสริมคาโรทีนอยด์สังเคราะห์ 200 มก./อาหาร 1 กก. โดยได้จาก แอสตาแซนทิน (astaxanthin), ซีแซนทิน (zeaxanthin) และเบตา-แคโรทีน (beta-carotene) ตามลำดับ สูตรที่ 5-8 เสริมสไปรูไลนาบดแห้งในอาหารทดลองให้ได้ระดับคาโรทีนอยด์ 50, 100, 150 และ 200 มก./อาหาร 1 กก. ตามลำดับ หลังจากเลี้ยงปลาเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าการเสริมคาโรทีนอยด์สังเคราะห์และสไปรูไลนาไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตและอัตราการรอด จากการวิเคราะห์คาโรทีนอยด์รวมในตัวปลา พบว่าการเสริมคาโรทีนอยด์สังเคราะห์และคาโรทีนอยด์จากสไปรูไลนาทำให้การสะสมคาโรทีนอยด์รวมในตัวปลาและค่าสีสูงขึ้นตามปริมาณคาโรทีนอยด์ที่เสริมโดยสูตรที่เสริมซีแซนทินจะมีค่าสูงที่สุดแต่ไม่แตกต่าง ($p>0.05$) กับสูตรที่เสริมคาโรทีนอยด์จากสไปรูไลนา 150 มก./อาหาร 1 กก. ส่วนการสร้างแอนติบอดีต่อเชื้อ *Streptococcus agalactiae* จะเพิ่มขึ้นเมื่อปลาได้รับอาหารเสริมคาโรทีนอยด์จากทุกสูตรยกเว้นปลาที่ได้รับอาหารในสูตรที่เสริมเบตา-แคโรทีน การเสริมคาโรทีนอยด์จะไม่ส่งผลต่อค่าฮีโมโกลบินรวมและฮีมาโตคริต แต่ส่งผลให้เม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาวเพิ่มขึ้นสูงกว่าชุดควบคุม ($p<0.05$)**

สไปรูไลนา (*Spirulina* sp.) เป็นสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (blue-green algae) ที่ไม่มีผนังเซลล์ สัตว์สามารถย่อยได้ง่าย (Hill, 1980) และมีความสำคัญทางเศรษฐกิจ มีคุณค่าทางโภชนาการสูง มีโปรตีน 60-70% ของน้ำหนักแห้ง (Pelizer *et al.*, 2003; Jimenez *et al.*, 2003) มีไขมัน 6-8% (Vonshak, 1997 อ้างโดย Varga *et al.*, 2002) โดยเฉพาะอย่างยิ่งกรดลิโนลินิค (γ-(gamma)-linolenic acid, 18:3 ω3) มีอยู่ถึง 35% ของไขมันทั้งหมด (Venkataraman, 1983) มีวิตามินและแร่ธาตุที่สำคัญที่ร่างกายต้องการอีกหลายชนิด เช่น วิตามินเอ อิโนซิทอล (inositol) วิตามินบี โดยเฉพาะวิตามินบี 12 (Richmond, 1987) และภายในเซลล์ยังประกอบด้วยเม็ดสีต่างๆ ที่สำคัญ และมีประโยชน์ เช่น คลอโรฟิลล์ (chlorophyll) ไฟโคไซยานิน (phycocyanin) และคาโรทีนอยด์ (Richmond, 1987) โดย

คาโรทีนอยด์เป็นกลุ่มรงควัตถุที่ให้สีเหลือง ส้ม และชมพูถึงแดง พบในธรรมชาติมากกว่า 600 ชนิด สร้างขึ้นจากวิถีเทอร์พีนอยด์ (terpenoid pathway) ในเซลล์พืช สาหร่าย แบคทีเรีย และรา สัตว์น้ำไม่สามารถสังเคราะห์ได้ แต่คาโรทีนอยด์เป็นสารเสริมที่จำเป็นต่อร่างกาย ดังนั้นสัตว์น้ำจึงต้องกินอาหารที่มีคาโรทีนอยด์และเก็บสะสมไว้ในส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย และยังพบว่าสารสีเหล่านี้สามารถนำมาใช้ในทางการแพทย์ได้ เช่น ไฟโคไซยานิน สามารถนำมาใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และสามารถเหนี่ยวนำการผลิตไซโตไคน์ (cytokines) ที่มีผลต่อการลดการอักเสบของเซลล์สมอง (Gemma *et al*., 2002) ส่วนคาโรทีนอยด์ จำพวกเบตา-แคโรทีน (β-carotene) ซีแซนทิน (zeaxanthin) และเบตา-คริปโตแซนทิน (β-cryptoxanthin) เป็นคาโรทีนอยด์ชนิดเด่นที่มีอยู่ในสไปรูไลนา มีการรายงานว่าคาโรทีนอยด์เป็นสารเสริมที่สำคัญในอาหารของมนุษย์เพราะมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและต้านมะเร็ง (Careri *et al*., 2001) สามารถเพิ่มภูมิต้านทานให้กับมนุษย์ (Hughes, 2001) และปลาเรนโบว์เทราท์ โดยช่วยทำให้ระบบภูมิคุ้มกันสูงขึ้น โดยทำให้ค่าปฏิกิริยาไลโซไซม์ในซีรัมและค่าอัตราการกินแบบฟาโกไซติกและดัชนีฟาโกไซติกสูงขึ้น (Amar *et al*., 2004) ในปลาหางนกยูง คาโรทีนอยด์มีผลกับสีในเรื่องการแบ่งเพศของปลา (Grether *et al*., 2004) และจากการศึกษาพบว่าสีสันของปลาเกิดจากการสะสมของรงควัตถุ (pigments) พวกคาโรทีนอยด์ โดยคาโรทีนอยด์เหล่านี้จะสะสมอยู่ในร่างกายปลา เป็นผลให้เกิดสีขึ้นในส่วนต่าง ๆ และปลาสามารถเก็บเม็ดสีเหล่านี้ไว้ในตัว หรืออาจเปลี่ยนคาโรทีนอยด์เป็นสารสีรูปอื่นได้ (Fox, 1957) ซึ่งคาโรทีนอยด์จะทำให้ปลามีสีสันสดใสไม่ว่าจะเป็นปลาสวยงามหรือปลาที่ใช้เพื่อบริโภคเป็นอาหาร ทำให้ได้รับความนิยมและมีโอกาสจำหน่ายได้ในราคาที่สูงขึ้น จึงมีผู้คิดหาวิธีที่จะทำให้ปลามีสีเข้มขึ้น เช่น การใช้สารเคมีให้ปลากิน การย้อมสี การเสริมคาโรทีนอยด์ลงในอาหาร (Lastcha, 1991) ดังนั้นจึงมีการผลิตอาหารที่มีส่วนผสมของคาโรทีนอยด์เพื่อเร่งสีของปลาให้เข้มขึ้น ในการผลิตปลาสวยงามผู้เลี้ยงนิยมใช้คาโรทีนอยด์สังเคราะห์ผสมในอาหารปลาซึ่งจะทำให้ปลามีสีเข้มขึ้น สามารถจำหน่ายได้ในราคาสูง เช่น ปลาทอง ปลาคาร์พ ปลาหมอสี และปลากระดี่เป็นต้น (วันเพ็ญ และกาญจนา, 2547) ส่วนปลาที่นิยมบริโภคเป็นอาหารนิยมเร่งสีเนื้อ ได้แก่ ปลาแซลมอนและปลาเรนโบว์เทราท์ เนื่องจากความต้องการลักษณะทางกายภาพของผลิตภัณฑ์อาหารจากสัตว์น้ำนั้นในตลาดโลก ผลิตภัณฑ์เนื้อปลาในกลุ่มปลาแซลมอน (*Salmo* sp., *Oncorhynchus* sp., *Salvelinus* sp.) ควรจะมีสีชมพูถึงแดง เช่นเดียวกับปลาเรดซีบรีม (*Chrysophrys major*) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงควรมีสีชมพูแดงซึ่งจะคล้ายกับปลาที่จับมาจากธรรมชาติเพื่อให้สีสันน่ารับประทานมากขึ้น (Sommer *et al*., 1991b) นอกจากนี้ในผลผลิตกุ้งจากการเพาะเลี้ยงมักพบว่ากุ้งที่ได้รับอาหารที่มีคาโรทีนอยด์ไม่เพียงพอจะมีสีซีด (สีฟ้า) และเมื่อนำไปผ่านกระบวนการแปรรูปจะได้ผลิตภัณฑ์กุ้งต้มที่มีสีเหลืองส้ม ซึ่งไม่เป็นที่ต้องการของตลาด การเสริมคาโรทีนอยด์ลงไปในอาหารกุ้งถือเป็นแนวทางในการแก้ไขปัญหาดังกล่าวได้ เนื่องจากคาโรทีนอยด์มีส่วนเกี่ยว ข้องโดยตรงกับการสะสมแอสตาแซนทินในกุ้ง ซึ่งจะทำให้กุ้งมีสีเข้มขึ้น และเมื่อผ่านการต้มในกระบวนการแปรรูป จะให้ผลิตภัณฑ์ที่มีสีแดงส้มที่ตรงกับความต้องการของผู้บริโภค (Lastcha, 1991)

งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของคาโรทีนอยด์จากสไปรูไลนา (*Spirulina* sp.) เปรียบเทียบกับคาโรทีนอยด์สังเคราะห์ เพื่อใช้เป็นแหล่งของคาโรทีนอยด์ในการเร่งสีและเพิ่มภูมิคุ้มกัน โดยทดลองในปลานิลแดงแปลงเพศ ซึ่งเป็นปลาน้ำจืดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจที่เป็นที่นิยมบริโภคทั้งภายในและต่างประเทศ โดยผลที่ได้รับจากการทดลองครั้งนี้ทำให้ทราบถึงชนิดของคาโรทีนอยด์สังเคราะห์ที่ปลานิลแดงแปลงเพศสามารถนำไปใช้ได้และระดับของคาโรทีนอยด์จากสไปรูไลนาที่เหมาะสมในปลานิลแดงแปลงเพศ และใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อศึกษาเรื่องคาโรทีนอยด์ในปลานิลแดงแปลงเพศและสัตว์น้ำชนิดอื่น และประยุกต์ใช้กับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำได้

## อุปกรณ์และวิธีการ

### 1. การเตรียมอุปกรณ์การทดลอง

อุปกรณ์การทดลอง ประกอบด้วย ตู้กระจกขนาด 100x50x47 ซม. ความจุน้ำ 235 ลิตร โดยทำความสะอาดและติดตั้งอุปกรณ์ให้อากาศ เติมน้ำจากบ่อพักน้ำที่ปราศจากคลอรีนลงในตู้ทดลองให้ได้ปริมาตร 180 ลิตร ระบบเลี้ยงเป็นระบบปิด ประกอบด้วย ถังกรองน้ำซึ่งเป็นถังไฟเบอร์

กลาสกลมปริมาตร 1 ลบ.เมตร บรรจุถ่าน เปลือกหอย ทรายละเอียด และแผ่นใยกรองจำนวน 2 ถัง บ่อพักน้ำเป็นบ่อคอนกรีต บรรจุถ่าน เปลือกหอย ทรายละเอียด และเครื่องให้อากาศ มีน้ำไหลเวียนตลอดเวลา โดยมีอัตราการไหลของน้ำ 1.2 ลิตร/นาที น้ำที่ไหลเวียนในระบบจะล้นออกทางท่อน้ำล้นซึ่งติดอยู่ในตู้ทดลอง และไหลไปรวมกันในท่อน้ำทิ้งลงสู่ถังกรองน้ำจากถังกรองน้ำไหลลงสู่บ่อบำบัดน้ำ จากนั้นก็จะถูกสูบขึ้นไปยังบ่อพักน้ำ และไหลกลับมายังตู้ทดลอง

**2. การเตรียมปลาทดลอง**

ลูกปลานิลแดงแปลงเพศ น้ำหนักเฉลี่ย 13-15 กรัม จำนวน 3,000 ตัว จากฟาร์มเอกชน ต.ลำป่า อ.เมือง จ.พัทลุง อนุบาลในถังไฟเบอร์กลาสขนาดความจุ 1 ลบ.เมตร โดยให้อาหารเม็ดสำเร็จรูปยี่ห้อไทยลักซ์เบอร์ 8941 ซึ่งเป็นอาหารปลาดุกเล็ก (รุ่น) โดยมีคุณค่าทางโภชนาการคือ โปรตีน 30% ไขมันไม่น้อยกว่า 3% ความชื้น 12% และเยื่อใย 8% วันละ 2 ครั้ง คือ เวลา 9.00 น. และ 16.00 น. จนลูกปลามีน้ำหนักประมาณ 21 กรัม หลังจากนั้นจึงทำการคัดลูกปลาที่ทำการอนุบาลไว้ทำการชั่งน้ำหนักเริ่มต้น

**3. การเตรียมอาหารทดลอง**

การเตรียมสาหร่ายสไปรูไลนาดำเนินการตามวิธีการของ วุฒิพร และอัญชลี (2548) จากนั้นจึงนำวัตถุดิบอาหารไปวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการ ได้แก่ ความชื้น โปรตีน ไขมัน เถ้า และเยื่อใย โดยวิธีของ AOAC (1990) (Table 1) วิเคราะห์ปริมาณคาโรทีนอยด์รวมในสไปรูไลนา ตามวิธีการของ Sommer และคณะ (1991a) ใช้แคโรฟิลล์พิงค์ซึ่งมีแอสตาแซนทิน 10% ซีแซนทินสังเคราะห์ที่มีซีแซนทิน 5% โดยเป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท DSM Nutritional Products และเบตา-แคโรทีนสังเคราะห์มีเบตา-แคโรทีน 10% ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัทบีเอเอสเอฟ (BASF) และสร้างสูตรอาหารทั้ง 8 สูตร ให้มีระดับโปรตีน 30% ไขมัน 6% พลังงานที่ย่อยได้ 3,400 กิโลคาลอรี/อาหาร 1 กก. (Table 2) โดยค่าพลังงานที่ย่อยได้คำนวณโดยใช้ค่าต่าง ๆ ซึ่งประยุกต์มาจากค่าที่ใช้ในปลานิล คือ 4.4 กิโลคาลอรี/อาหาร 1 กก. สำหรับโปรตีน 9.0 กิโลคาลอรี/อาหาร 1 กก. สำหรับไขมัน และ 3.7 กิโลคาลอรี/อาหาร 1 กก. สำหรับคาร์โบไฮเดรต (Stickney, 1979) จากนั้นชั่งวัตถุดิบอาหารที่ผ่านการร่อนจากตะแกรง ขนาด 30 เมช (mesh) ส่วนน้ำมัน วิตามินและแร่ธาตุชั่งแยกใส่ถุงไว้สำหรับอาหารทดลองแต่ละสูตร ผสมส่วนประกอบวัสดุอาหารให้เข้ากันดีด้วยเครื่องผสมอาหาร (Hobart Model A200T) ประมาณ 6-7 นาที จึงเติมน้ำมันลงไป เมื่อส่วนผสมเข้ากันดี เติมน้ำกลั่นประมาณ 40% (วุฒิพร และคณะ, 2547) นำวัตถุดิบอาหารที่ผสมกันดีแล้วเข้าเครื่องอัดเม็ดอาหาร ผ่านหน้าแว่นขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 มม. โดยตัดเม็ดอาหารให้มีขนาดใกล้เคียงกัน อบอาหารที่อุณหภูมิ 60°C นาน 24 ชั่วโมง เก็บอาหารที่ผ่านการอบแล้วบรรจุในถุงพลาสติก เก็บรักษาไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C นำอาหารทดลองไปวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการตามวิธีมาตรฐานของ AOAC (1990) วิเคราะห์ปริมาณคาโรทีนอยด์รวม ตามวิธีการของ Sommer และคณะ (1991a) ส่วนปริมาณคาร์โบไฮเดรต (ไนโตรเจนฟรีเอกซ์แทรกซ์, nitrogen free extract, NFE) คำนวณได้จาก สูตร 100 - (%ความชื้น + %โปรตีน + %ไขมัน + %เถ้า + %เยื่อใย)

**Table 1. Proximate analysis of feed ingredients (% air-dry basis)[1]**

| Feed ingredients | Moisture | Protein | Fat | Ash | Crude fiber | NFE | Carotenoid (mg/kg) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Fish meal | 5.97±0.01 | 70.90±0.94 | 9.53±0.06 | 19.14±0.12 | 0.76±0.01 | 0.29±0.08 | - |
| Palm kernel cake | 4.50±0.01 | 16.86±0.33 | 10.60±0.35 | 4.25±0.01 | 16.93±0.21 | 51.36±0.20 | - |
| Soybean meal | 7.91±0.01 | 45.74±0.55 | 2.59±0.18 | 7.36±0.00 | 5.73±0.07 | 38.58±0.43 | - |
| Rice flour | 7.90±0.36 | 7.97±0.12 | 1.24±0.11 | 0.29±0.00 | 0.27±0.01 | 90.24±0.23 | - |
| Broken rice | 9.54±0.03 | 9.03±0.01 | 2.69±0.05 | 4.33±0.05 | 0.81±0.01 | 83.15±0.11 | - |
| *Spirulina* sp. | 4.57±0.07 | 54.29±0.01 | 5.36±0.00 | 6.87±0.04 | 1.96±0.05 | 31.54±0.01 | 1,706.86 |

[1]**Mean ± standard deviation of three replications**
**NFE: nitrogen free extract**

**Table 2. Composition of experimental diets (% as fed basis)**

| Ingredients (g/100 g feed) | Diet formulae (%) | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| Soybean meal | 40 | 40 | 40 | 40 | 38 | 35 | 32 | 29 |
| Fish meal | 12 | 12 | 12 | 12 | 10 | 9 | 8 | 7 |
| Broken rice | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Palm kernel cake | 14 | 14 | 14 | 14 | 14 | 14 | 14 | 14 |
| Rice flour | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Fish oil | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Vitamin mixtures | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Mineral mixtures | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| Choline chloride | 0.6 | 0.6 | 0.6 | 0.6 | 0.6 | 0.6 | 0.6 | 0.6 |
| Astaxanthin | | 0.24 | | | | | | |
| Zeaxanthin | | | 0.48 | | | | | |
| β-carotene | | | | 0.24 | | | | |
| *Spirulina* sp. | | | | | 3.57 | 7.14 | 10.71 | 14.28 |
| Rice hull | 7.4 | 7.16 | 6.92 | 7.16 | 7.83 | 8.26 | 8.69 | 9.12 |
| Total | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| Digestible Energy (Kcl/1 kg feed) | 3,393.5 | 3,393.5 | 3,393.5 | 3,393.5 | 3,385.9 | 3,381.8 | 3,377.7 | 3373.6 |

**Vitamin mixture (mg/kg feed): Thiamine ($B_1$) 10; Riboflavin ($B_2$) 20; Pyridoxine ($B_6$) 10; Cobalamine ($B_{12}$) 2; Retinal (A) 4,000 IU; Cholecalciferol ($D_3$) 2,000 IU; Menadione sodium bisulfite ($K_3$) 80; Folic acid 5; Calcium pantothenate 40; Inositol 400 ; Niacin 150; Tocopherol (E) 50; Biotin 1; Ascorbic acid (C) 500**
**Mineral mixture (g/kg feed) : Na 3.278; Mg 25.25; K 76.612; Ca 49.096; Fe 4.821; Zn 0.667; Mn 0.433; Cu 0.069; Co 0.00198; I 0.01**

**Table 3. Proximate analysis of experimental diets (% air-dry basis)[1]**

| Experimental group | Composition (%) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Moisture | Protein | Fat | Ash | Crude fiber | NFE | Carotenoid (mg/kg) |
| 1 (Control) | 6.76±0.02 | 30.70±0.26 | 6.13±0.23 | 10.24±0.01 | 7.80±0.03 | 45.13±0.07 | 3.79±0.24 |
| 2 (astaxanthin) | 7.25±0.00 | 30.66±0.43 | 6.35±0.42 | 10.30±0.03 | 7.56±0.35 | 45.14±0.37 | 185.63±3.94 |
| 3 (zeaxanthin) | 5.55±0.15 | 30.32±0.52 | 6.27±0.38 | 10.17±0.05 | 7.52±0.67 | 45.72±0.75 | 199.18±1.17 |
| 4 (β-carotene) | 5.25±0.06 | 30.17±0.20 | 6.38±0.36 | 10.19±0.03 | 7.63±0.10 | 45.62±0.22 | 200.42±4.31 |
| 5 (carotenoid of spirulina 50 mg/kg) | 8.16±0.14 | 30.88±0.15 | 6.50±0.48 | 9.98±0.05 | 7.83±0.20 | 44.82±0.38 | 56.71±2.83 |
| 6 (carotenoid of spirulina 100 mg/kg) | 6.61±0.09 | 30.57±0.09 | 6.37±0.10 | 9.95±0.10 | 7.86±0.16 | 45.24±0.25 | 108.22±1.49 |
| 7 (carotenoid of spirulina 150 mg/kg) | 8.22±0.06 | 30.45±0.84 | 6.29±0.16 | 9.80±0.02 | 7.93±0.03 | 45.54±0.63 | 150.51±4.94 |
| 8 (carotenoid of spirulina 200 mg/kg) | 6.47±0.03 | 30.35±0.18 | 6.13±0.07 | 9.82±0.00 | 7.96±0.23 | 45.74±0.49 | 201.66±1.26 |

**[1]Mean ± standard deviation of three replications**
**NFE: nitrogen free extract**

(Table 3)

**4. เตรียมวัคซีนจากเชื้อสเตรฟโตคอคคัส (Klesius *et al.*, 2000)**

นำเชื้อสเตรฟโตคอคคัส (*Streptococcus agalactiae*) บริสุทธิ์ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70°C จากศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ tryptic soy agar (TSA) บ่มที่อุณหภูมิ 35°C นาน 18-24 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำเชื้อที่ได้มาเลี้ยงต่อในอาหาร tryptic soy broth (TSB) บ่มที่อุณหภูมิ 35°C นาน 18-24 ชั่วโมง เติมฟอร์มาลินให้ได้ความเข้มข้น 1% ของปริมาตร TSB เพื่อฆ่าเชื้อแบคทีเรีย เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบการเจริญเติบโตของเชื้อ โดยการเกลี่ยสารละลายแบคทีเรียลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA บ่มที่อุณหภูมิ 35°C นาน 18-24 ชั่วโมง ถ้ามีเชื้อเจริญให้นำสารละลายมาเติมฟอร์มาลินให้ได้ความเข้มข้น 1% แต่ถ้าเชื้อไม่เจริญ ทำการปั่นล้างเซลล์ด้วยความเร็ว 10,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30°C นาน 10 นาที เพื่อให้เชื้อแบคทีเรียตกตะกอน เทส่วนสารละลายทิ้ง และล้างด้วยน้ำเกลือ 0.85% ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จนครบ 3 ครั้ง จากนั้นทดสอบการปลอดเชื้อ (sterile) ของวัคซีน โดยนำวัคซีนที่ได้เกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 35°C นาน 24 ชั่วโมง สังเกตการเจริญเติบโตของเชื้อบนอาหาร เพื่อทดสอบว่าเชื้อที่เป็นวัคซีนไม่สามารถเจริญเติบโตได้ ถ้าหากเชื้อไม่เจริญก็สามารถนำมาเป็นวัคซีนได้ โดยจะทำการเติมฟอร์มาลินให้ได้ 0.1% เก็บวัคซีนที่อุณหภูมิ 4°C จนกว่าจะนำมาใช้

**5. แผนการทดลอง**

ศึกษาผลของคาโรทีนอยด์จากสาหร่ายสไปรูไลนา โดยใส่สาหร่ายสไปรูไลนาบดแห้งในอาหารทดลองให้ได้คาโรทีนอยด์ จากสไปรูไลนา 5 ระดับ คือ 0, 50, 100, 150 และ 200 มก./อาหาร 1 กก. เปรียบเทียบกับอาหารชุดที่เสริมคาโรทีนอยด์สังเคราะห์ 3 ชนิดคือ แอสตาแซนทิน ซีแซนทิน และเบตา-แคโรทีน 200 มก./อาหาร 1 กก. ทดลองใช้เลี้ยงปลานิลแดงแปลงเพศ โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design : CRD) ปัจจัยที่ทำการศึกษา ได้แก่ การเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหาร องค์ประกอบทางเคมีของตัวปลา ผลต่อระบบภูมิคุ้มกัน องค์ประกอบเลือด การวัดค่าสีและปริมาณคาโรทีนอยด์รวมในตัวปลา ระยะเวลาในการเลี้ยง 8 สัปดาห์ โดยแบ่งการทดลองเป็น 8 ชุดการทดลอง (treatment) แต่ละชุดการทดลองประกอบด้วย 3 ซ้ำ (replication) ดำเนินการทดลองโดยเติมน้ำลงในตู้ที่เตรียมไว้ประมาณ 180 ลิตร/ตู้ ระบบน้ำเป็นแบบไหลเวียนแบบปิด เมื่อเริ่มต้นทดลอง สุ่มปลาที่เตรียมไว้ลงเลี้ยงในตู้ทดลอง โดยใช้ปลาเริ่มต้นน้ำหนักประมาณ 21 กรัม/ตัว ตู้ละ 20 ตัว ทำการสุ่มหน่วยทดลองโดยวิธีจับฉลาก โดยจับหน่วยทดลองทั้งหมด 24 หน่วยทดลอง ให้อาหารวันละ 2 ครั้ง คือ ช่วงเช้าเวลา 9.00 น. และช่วงเย็นเวลา 16.00 น. โดยในแต่ละมื้อให้ปลากินจนอิ่ม บันทึกน้ำหนักอาหารที่ให้ทุก 2 สัปดาห์ตลอดการทดลอง ทำการชั่งปลาทุกๆ 2 สัปดาห์ ก่อนให้อาหารช่วงเย็นจะดูดตะกอนทำความสะอาดตู้ปลาโดยวิธีกาลักน้ำแล้วเติมน้ำจากบ่อพักน้ำให้เท่าเดิมทุกครั้ง เพื่อควบคุมคุณภาพน้ำให้เหมาะสมตลอดการทดลอง

**6. การเก็บรวบรวมข้อมูลและวิเคราะห์ข้อมูล**

**6.1 การตรวจสอบพฤติกรรมและลักษณะที่แสดงออกภายนอก**

ในระหว่างการทดลองสังเกตพฤติกรรมของปลาทุกชุดการทดลอง ได้แก่ การว่ายน้ำ การยอมรับอาหาร และสังเกตลักษณะภายนอก ได้แก่ สีของลำตัว การตกเลือด การคดงอของครีบและกระดูก และการเกิดบาดแผลที่ครีบ ผิวหนัง และอวัยวะภายนอกอื่นๆ ใช้ยาและสารเคมีเพื่อป้องกันโรคตามสภาพของปลา

**6.2 การตรวจสอบการเจริญเติบโตของปลา**

ชั่งน้ำหนักปลาและบันทึกอัตรารอดตายของปลาทุกชุดการทดลองทุก 2 สัปดาห์ โดยการชั่งน้ำหนักรวมของปลาแต่ละซ้ำด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง (ก่อนวันที่ชั่งน้ำหนักงดให้อาหารตอนเย็น 1 มื้อ) นับจำนวนปลาที่เหลืออยู่ สังเกตลักษณะอาการของปลาตลอดการทดลอง พร้อมจดบันทึกจนสิ้นสุดการทดลอง 8 สัปดาห์ นำข้อมูลที่ได้มาคำนวณอัตราการรอดตายอ้างตามวิธีการของ Nankervis และคณะ (2000) และการเจริญเติบโต ได้แก่ น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโต/ตัว/วัน คำนวณอ้างตามวิธีการของ Jantrarotai และคณะ (1994) คำนวณอัตราการเปลี่ยน

อาหารเป็นเนื้อ ตามวิธีการของ Dupree และ Sneed (1966) และอัตราการกินอาหาร คำนวณตามวิธีการของ Yone และ Fujii (1975)

**6.3 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของปลาทดลอง**

สุ่มตัวอย่างปลาก่อนเริ่มการทดลองจำนวน 20 ตัว นำไปวิเคราะห์ความชื้นในร่างกายทันที และนำตัวอย่างปลาไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของตัวปลา ได้แก่ ปริมาณโปรตีน ไขมัน เถ้า ตามวิธีมาตรฐานของ AOAC (1990) เมื่อสิ้นสุดการทดลองสุ่มตัวอย่างปลาจากแต่ละตู้ทดลองตู้ละ 2 ตัว ไปวิเคราะห์ความชื้น โปรตีน ไขมัน และเถ้า ตามวิธีการของ AOAC (1990) และนำข้อมูลน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น น้ำหนักอาหารที่ปลากิน ปริมาณโปรตีนในอาหาร และค่าโปรตีนในซากปลาที่ได้ไปคำนวณประสิทธิภาพการใช้โปรตีนตามวิธีการของ Zeitoun และคณะ (1973) และการใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิตามวิธีของ Robinson และ Wilson (1985)

**6.4 การวัดการเปลี่ยนแปลงของสีตัวปลา**

หลังจากสิ้นสุดการทดลองทำการเก็บตัวอย่างปลาชุดการทดลองละ 6 ตัว สลบด้วยควินาลดิน (quinaldin) และนำปลาไปแช่น้ำแข็ง นำตัวอย่างปลาเพื่อไปตรวจสอบสีโดยวัดค่าความสว่าง (L) ความแดง (a) ความเหลือง (b) ด้วยเครื่องวัดค่าสี (Hunter® Colormeter )

**6.5 การวัดปริมาณสะสมคาโรทีนอยด์ในตัวปลา**

นำตัวอย่างปลาก่อนทดลอง 10 ตัว และเมื่อสิ้นสุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 6 ตัวมาทำให้แห้งด้วยความเย็น (freeze dry) และบดตัวอย่างให้ละเอียด จากนั้นจึงนำไปสกัดด้วยอะซิโตน (acetone) น้ำกลั่น และอีเธอร์ (ether) ตั้งทิ้งไว้จนแยกชั้นโดยใช้กรวยแยก และทำการแยกเอาชั้นที่เป็นอีเธอร์นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงแบบสแกน นำค่าการดูดกลืนแสงที่สูงที่สุดมาคำนวณหาค่าปริมาณคาโรทีนอยด์รวมตามวิธีการของ Sommer และคณะ (1991a)

**6.6 การศึกษาองค์ประกอบเลือด**

เมื่อสิ้นสุดการทดลองสุ่มปลาจากทุกชุดการทดลอง ตู้ทดลองละ 3 ตัว มาสลบด้วยควินาลดีน เจาะเลือดจากบริเวณโคนหางโดยใช้กรดเอทีลินไดอะมีนเตตราอะซีติก (ethylenediaminetetraacetic acid : EDTA) 1% ป้องกันการแข็งตัวของเลือด เพื่อศึกษาองค์ประกอบของเลือดปลาแต่ละตัวและนำมาหาค่าเฉลี่ยในแต่ละชุดการทดลอง คือ

- ฮีโมโกลบินโดยใช้วิธี Cyanmet-haemoglobin ของ Larsen และ Snieszko (1961)
- ฮีมาโตคริต โดยวิธีดัดแปลงจาก Blaxhall และ Daisley (1973)
- โปรตีนในพลาสมา โดยวิธีดัดแปลงจาก Lowry และคณะ (1951)
- เม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาว โดยวิธีดัดแปลงจาก Blaxhall และ Daisley (1973)

**6.7 การศึกษาภูมิคุ้มกัน**

สุ่มตัวอย่างปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 15 ตัว ทำการสลบโดยใช้ ควินาลดิน 1-2 หยด/น้ำ 1 ลิตร จากนั้นจึงฉีดวัคซีนที่ผลิตจากเชื้อ *Streptococcus agalactiae* หลังจากฉีดวัคซีน 15 วัน จึงทำการเก็บซีรัมตามวิธีของ Roberts (1978) โดยทำการสลบปลาด้วยควินาลดิน เจาะเลือดบริเวณหาง (caudal vein) โดยใช้หลอดฉีดยาขนาด 1 มล. และเข็มฉีดยาขนาด 25 กรัม x 1 นิ้ว โดยเลือดที่เจาะตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปใส่ตู้เย็นอุณหภูมิ 4°C นาน 2 ชั่วโมง (Robertsen *et al.*, 1990) ตรวจวัดค่า reciprocal titer (Klesius *et al.*, 2000) โดยเจือจางซีรัมแบบ 2 เท่า (two-fold dilution) โดยใช้สารเจือจางซีรัม (diluent; 0.85% NaCl+0.1% formalin) ปริมาตรสุทธิ 50 ไมโครลิตร (µl) ในถาดหาค่าไตเตอร์ชนิดหลุมก้นกลม (microtiter plate) นำแอนติเจนที่เตรียมจากเชื้อ *Streptococcus agalactiae* เช่นกันใส่ลงในถาดไตเตอร์หลุมละ 50 ไมโครลิตร ผสมโดยใช้ไมโครปิเปต (micropipet) ให้เข้ากันดี ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมง แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4°C นาน 22 ชั่วโมง ศึกษาการตกตะกอนและบันทึกผล (Klesius *et al.*, 2000)

**6.8 การวิเคราะห์ข้อมูล**

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA แบบ CRD) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (Steel and Torrie, 1980) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

**ผลการทดลอง**

**1. ลักษณะภายนอกและพฤติกรรมของปลาที่ได้รับอาหารทดลองสูตรต่าง ๆ**

จากการสังเกตลักษณะภายนอก และพฤติกรรมระหว่างการทดลอง พบว่า ปลานิลแดงแปลงเพศที่ได้รับอาหารที่ผสมคาโรทีนอยด์สังเคราะห์ และคาโรทีนอยด์จากสไปรูไลนาทุกระดับ ไม่มีความผิดปกติของลักษณะภายนอกและปลาทุกตัวมีพฤติกรรมปกติ เมื่อเปรียบเทียบกับปลาที่ได้รับอาหารชุดควบคุม (คาโรทีนอยด์ 0%, ชุดการทดลองที่ 1) ส่วนสีบริเวณลำตัวพบว่าเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเลี้ยงในปลาที่ได้รับคาโรทีนอยด์ยกเว้นชุดการทดลองที่เสริมเบตา-แคโรทีน

**2. การเจริญเติบโต**

**2.1 น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัว**

น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวของปลานิลแดงแปลงเพศที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง 8 สูตร ตลอดระยะเวลาการทดลอง 8 สัปดาห์ แสดงไว้ใน Table 4 ซึ่งน้ำหนักปลาเริ่มต้นอยู่ในช่วง 21.25±0.15 - 21.30±0.10 กรัม เมื่อพิจารณาพบว่าปลามีน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวเพิ่มสูงขึ้นตามระยะเวลาของการทดลอง โดยพบว่าการเจริญเติบโตในแต่ละสัปดาห์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p$>0.05) ระหว่างปลาที่ได้รับอาหารที่เสริมคาโรทีนอยด์สังเคราะห์ 3 ชนิด คือ แอสตาแซนทิน ซีแซนทิน และเบตา-แคโรทีน ที่ระดับ 200 มก./กก. และเสริมคาโรทีนอยด์จากสไปรูไลนาในระดับ 50, 100, 150 และ 200 มก./กก. กับชุดควบคุม (คาโรทีนอยด์ 0 มก./กก.) และในสัปดาห์ที่ 8 ของการทดลองพบว่าน้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้นไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p$>0.05) ระหว่างชุดการทดลอง

**3. น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตต่อวัน อัตราการกินอาหาร และอัตราการรอดตาย**

น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตต่อวัน อัตราการกินอาหาร และอัตราการรอดตายของปลานิลแดงแปลงเพศที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง 8 สูตร เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ แสดงใน Table 5 พบว่า น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นและอัตราการเจริญเติบโตต่อวันของปลานิลแดงแปลงเพศทั้ง 8 ชุดการทดลอง เป็นไปในแนวทางเดียวกับน้ำหนักเฉลี่ยของปลา แต่พบว่าอัตราการกินอาหารของปลาในกลุ่มที่เสริมคาโรทีนอยด์จากสไปรูไลนามีค่าสูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารเสริมคาโรทีนอยด์จากแหล่งอื่น ๆ ($p$<0.05) (Table 5) โดยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติระหว่างชุดการทดลอง ($p$<0.05)

อัตราการรอดตายของปลาที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง 8 สูตร พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติระหว่างชุดการทดลอง ($p$<0.05) โดยมีค่าอยู่ในช่วง 98.33±2.89 - 100% (Table 5)

**4. อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน และการใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ**

อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ ประสิทธิภาพการใช้

**Table 4. Average body weight of sex-reversed red tilapia fed the experimental diets for 8 weeks (g)[1]**

| Experimental group | Rearing period (week) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 0 | 2 | 4 | 6 | 8 |
| 1 (Control) | 21.27±0.16 | 36.08±1.92[a] | 53.56±4.96[a] | 77.20±6.50[a] | 101.70±8.32[a] |
| 2 (astaxanthin) | 21.27±0.18 | 35.49±1.46[a] | 52.05±2.59[a] | 73.59±3.44[a] | 95.27±6.44[a] |
| 3 (zeaxanthin) | 21.27±0.09 | 34.85±0.43[a] | 51.95±3.51[a] | 75.08±7.25[a] | 96.58±10.31[a] |
| 4 (β-carotene) | 21.27±0.12 | 34.82±1.79[a] | 51.52±5.27[a] | 73.20±7.95[a] | 95.92±10.24[a] |
| 5 (carotenoid of spirulina 50 ppm) | 21.25±0.15 | 34.72±0.38[a] | 50.67±1.86[a] | 71.99±5.58[a] | 94.43±9.24[a] |
| 6 (carotenoid of spirulina 100 ppm) | 21.26±0.13 | 34.34±0.98[a] | 49.95±2.49[a] | 71.99±2.98[a] | 95.28±5.16[a] |
| 7 (carotenoid of spirulina 150 ppm) | 21.30±0.10 | 35.57±1.51[a] | 53.42±4.84[a] | 77.06±8.86[a] | 99.13±9.69[a] |
| 8 (carotenoid of spirulina 200 ppm) | 21.27±0.04 | 35.41±0.64[a] | 52.09±1.50[a] | 74.16±2.64[a] | 97.38±5.30[a] |

**[1]Mean ± standard deviation of three replications**
**Mean within each column not sharing a common superscript are significantly different ($p$<0.05)**

**Table 5. Weight gain, average daily gain, rate of feed intake and survival of sex-reversed red tilapia fed the experimental diets[1]**

| Experimental group | Weight gain (%) | average daily gain (%/body weight/day) | rate of feed intake (g/ body weight/day) | survival (%) |
|---|---|---|---|---|
| 1 (control) | 378.23±38.64[a] | 1.44±0.15[a] | 3.14±0.08[a] | 100±0.00[a] |
| 2 (astaxanthin) | 348.12±33.80[a] | 1.32±0.12[a] | 3.21±0.03[ab] | 100±0.00[a] |
| 3 (zeaxanthin) | 354.30±50.42[a] | 1.34±0.19[a] | 3.15±0.07[a] | 100±0.00[a] |
| 4 (β-carotene) | 351.09±48.53[a] | 1.33±0.18[a] | 3.23±0.03[abc] | 100±0.00[a] |
| 5 (carotenoid of spirulina 50 ppm) | 344.20±41.40[a] | 1.31±0.16[a] | 3.39±0.05[d] | 100±0.00[a] |
| 6 (carotenoid of spirulina 100 ppm) | 348.28±25.40[a] | 1.32±0.09[a] | 3.28±0.10[bc] | 100±0.00[a] |
| 7 (carotenoid of spirulina 150 ppm) | 365.34±43.34[a] | 1.39±0.17[a] | 3.28±0.05[bc] | 100±0.00[a] |
| 8 (carotenoid of spirulina 200 ppm) | 357.91±24.06[a] | 1.36±0.09[a] | 3.33±0.05[cd] | 98.33±2.89[a] |

**[1]Mean ± standard deviation of three replications**
**Mean within each column not sharing a common superscript are significantly different ($p<0.05$)**

**Table 6. Feed conversion ratio (FCR), protein efficiency ratio (PER) and apparent net protein utilization (ANPU) of sex-reversed red tilapia fed the experimental diets[1]**

| Experimental group | FCR | PER | ANPU (%) |
|---|---|---|---|
| 1 (Control) | 1.35±0.07[a] | 2.42±0.13[b] | 51.45±1.17[e] |
| 2 (astaxanthin) | 1.42±0.04[abc] | 2.30±0.07[ab] | 43.10±0.04[cd] |
| 3 (zeaxanthin) | 1.39±0.10[ab] | 2.38±0.17[b] | 43.75±0.21[cd] |
| 4 (β-carotene) | 1.43±0.07[abc] | 2.33±0.11[ab] | 45.43±1.22[d] |
| 5 (carotenoid of spirulina 50 ppm) | 1.51±0.07[c] | 2.15±0.11[a] | 43.53±1.82[cd] |
| 6 (carotenoid of spirulina 100 ppm) | 1.45±0.04[abc] | 2.26±0.06[ab] | 41.14±0.35[b] |
| 7 (carotenoid of spirulina 150 ppm) | 1.42±0.05[abc] | 2.31±0.08[ab] | 45.38±0.04[d] |
| 8 (carotenoid of spirulina 200 ppm) | 1.47±0.03[bc] | 2.24±0.03[ab] | 37.63±0.44[a] |

**[1]Mean ± standard deviation of three replications**
**Mean within each column not sharing a common superscript are significantly different ($p<0.05$)**

โปรตีน และการใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิของปลานิลแดงแปลงเพศที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง 8 สูตร แสดงดัง Table 6 โดยพบว่าแม้อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อและประสิทธิภาพการใช้โปรตีนจะมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$) แต่ก็ไม่ได้แสดงถึงความสัมพันธ์ของค่าดังกล่าวกับแหล่งของคาโรทีนอยด์ทั้ง 4 แหล่งที่เสริมในอาหาร ส่วนปลาที่ได้รับอาหารที่เสริมสไปรูไลนาในความเข้มข้นสูง (สูตรที่ 8, คาโรทีนอยด์ 200 มก./อาหาร 1 กก.) มีค่าการใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิต่ำกว่าปลาที่ได้รับอาหารเสริมคาโรทีนอยด์จากแหล่งอื่นๆ ($p<0.05$) (Table 6)

**5. องค์ประกอบทางโภชนาการของปลาทั้งตัว**

องค์ประกอบทางโภชนาการของปลาทั้งตัวก่อนทดลองและปลาที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง 8 สูตร เมื่อสิ้นสุดการทดลอง แสดงไว้ใน Table 7 โดยพบว่าความชื้น โปรตีน ไขมัน และเถ้า มีความแตกต่างกันระหว่างชุดการทดลอง ปลาที่ได้รับสารสีสังเคราะห์ แอสตาแซนทิน และซีแซนทิน รวมทั้งปลาที่ได้รับอาหารที่มีคาโรทีนอยด์จากสไปรูไลนาตั้งแต่ 100 มก./อาหาร 1 กก. ขึ้นไป มีความชื้นสูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารชุดควบคุม (Table 7) ปริมาณโปรตีนในตัวปลาที่ได้รับแอสตาแซนทิน ซีแซนทิน และคาโรทีนอยด์จากสาหร่าย

**Table 7. Whole body composition (%) of sex-reversed red tilapia fed the experimental diets for 8 week 1 (% on dry matter basis)**

| Experimental group | Moisture | Protein | Fat | Ash |
|---|---|---|---|---|
| Fish initial | 72.61±1.18 | 50.50±0.33 | 23.08±0.65 | 15.91±0.45 |
| 1 (Control) | 71.32±0.33$^{a}$ | 57.49±0.26$^{b}$ | 24.10±0.46$^{e}$ | 13.79±0.08$^{a}$ |
| 2 (astaxanthin) | 73.84±0.55$^{bcd}$ | 58.76±0.39$^{cd}$ | 17.45±0.01$^{a}$ | 16.89±0.24$^{de}$ |
| 3 (zeaxanthin) | 73.30±0.69$^{bcd}$ | 59.54±0.37$^{d}$ | 20.89±0.91$^{c}$ | 15.03±0.59$^{b}$ |
| 4 (β-carotene) | 72.16±0.73$^{ab}$ | 56.03±0.09$^{a}$ | 22.43±0.08$^{d}$ | 15.45±0.30$^{bc}$ |
| 5 (carotenoid of spirulina 50 ppm) | 72.94±0.80$^{abc}$ | 56.24±0.14$^{a}$ | 21.15±0.56$^{c}$ | 15.58±0.01$^{bc}$ |
| 6 (carotenoid of spirulina 100 ppm) | 74.88±1.69$^{de}$ | 58.04±0.59$^{bc}$ | 20.58±0.08$^{c}$ | 16.05±0.19$^{cd}$ |
| 7 (carotenoid of spirulina 150 ppm) | 74.41±0.85$^{cd}$ | 59.40±0.70$^{d}$ | 18.79±0.31$^{b}$ | 17.50±0.19$^{e}$ |
| 8 (carotenoid of spirulina 200 ppm) | 76.08±1.04$^{e}$ | 57.61±0.36$^{b}$ | 18.55±0.31$^{b}$ | 17.35±0.76$^{e}$ |

**[1]Mean ± standard deviation of three replications**
**Mean within each column not sharing a common superscript are significantly different ($p$<0.05)**

**Table 8. Blood parameters of sex-reversed red tilapia fed the experimental diets[1]**

| Experimental group | Hemoglobin (g/dl) | Hematocrit (%) | White blood cell (x10$^{4}$ cell/mm$^{3}$) | Red blood cell (x10$^{6}$cell/mm$^{3}$) | Plasma protein (g/dl) |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 (Control) | 7.14±0.37$^{a}$ | 35.52±5.37$^{a}$ | 8.11±0.29$^{a}$ | 1.64±0.28$^{a}$ | 4.16±0.50$^{b}$ |
| 2 (astaxanthin) | 7.13±1.03$^{a}$ | 29.84±3.60$^{a}$ | 12.62±2.28$^{cd}$ | 2.60±0.59$^{b}$ | 3.56±0.32$^{a}$ |
| 3 (zeaxanthin) | 7.74±0.88$^{a}$ | 32.44±3.59$^{a}$ | 11.18±1.62$^{bc}$ | 2.86±0.59$^{b}$ | 3.25±0.46$^{a}$ |
| 4 (β-carotene) | 7.38±0.57$^{a}$ | 32.10±3.89$^{a}$ | 10.80±2.28$^{abc}$ | 2.73±0.98$^{b}$ | 3.63±0.19$^{ab}$ |
| 5 (carotenoid of spirulina 50 ppm) | 7.64±1.00$^{a}$ | 33.63±7.43$^{a}$ | 14.19±1.62$^{d}$ | 2.64±0.41$^{b}$ | 3.67±0.16$^{ab}$ |
| 6 (carotenoid of spirulina 100 ppm) | 7.81±1.19$^{a}$ | 31.72±6.24$^{a}$ | 12.67±2.42$^{cd}$ | 2.62±1.26$^{b}$ | 3.70±0.39$^{ab}$ |
| 7 (carotenoid of spirulina 150 ppm) | 7.51±0.75$^{a}$ | 33.49±5.88$^{a}$ | 11.73±1.20$^{bcd}$ | 2.74±0.30$^{b}$ | 3.51±0.86$^{a}$ |
| 8 (carotenoid of spirulina 200 ppm) | 7.68±0.61$^{a}$ | 33.78±7.05$^{a}$ | 12.72±2.54$^{cd}$ | 2.61±0.30$^{b}$ | 3.46±0.17$^{a}$ |

**[1]Mean ± standard deviation of three replications**
**Mean within each column not sharing a common superscript are significantly different ($p$<0.05)**

สไปรูไลนา 150 มก./อาหาร 1 กก. สูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารชุดควบคุม (Table 7) ส่วนปริมาณไขมันในตัวปลาที่ได้รับอาหารเสริมคาโรทีนอยด์สังเคราะห์ทั้ง 3 แหล่ง และปลาที่ได้รับคาโรทีนอยด์จากสไปรูไลนาทุกระดับมีค่าต่ำกว่าปลาที่ได้รับอาหารชุดควบคุม (Table 7) โดยตรงกันข้ามกับปริมาณเถ้าในตัวปลาที่พบว่าปลาที่ได้คาโรทีนอยด์สังเคราะห์และสไปรูไลนามีค่าสูงกว่าปลาในชุดควบคุม (Table 7)

### 6. องค์ประกอบเลือดปลา

องค์ประกอบเลือดปลาที่ได้รับอาหารทั้ง 8 สูตร แสดงไว้ใน Table 8 โดยพบว่าปลาที่ได้รับสารสีสังเคราะห์ทั้ง 3 แหล่ง และปลาที่ได้รับคาโรทีนอยด์จากสไปรูไลนาทุกความเข้มข้นมีค่าจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวและเซลล์เม็ดเลือดแดงสูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารชุดควบคุม ($p$<0.05) (Table 8) ขณะที่ปริมาณโปรตีนในพลาสมีแนวโน้มต่ำกว่าในกลุ่มปลาที่ได้รับสารสีสังเคราะห์และคาโรทีนอยด์จากสไปรูไลนาเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ($p$<0.05) (Table 8) ค่าฮีโม-โกลบินและฮีมาโตคริตของปลาที่ได้รับคาโรทีนอยด์จากแหล่งต่าง ๆ ไม่มีความแตกต่างกัน ($p$<0.05) (Table 8)

### 7. สีบริเวณลำตัวของปลานิล

จากการวัดค่าสีบริเวณลำตัวของปลาที่ได้รับอาหารสูตรต่าง ๆ พบว่ามีความแตกต่างกันดังแสดงไว้ใน Table 9 โดยพบว่า ค่าความสว่าง (L-value) ของปลาที่ได้รับอาหารเสริมคาโรทีนอยด์จากทุกแหล่ง ยกเว้นจากเบตา-แคโรทีนมีค่าต่ำกว่าปลาที่ได้รับอาหารชุดควบคุม ($p$<0.05) (Table 9)

**Table 9. Color values (L, a, b) of sex-reversed red tilapia fed the experimental diets for 8 week[1]**

| Experimental group | L value | a value | b value |
|---|---|---|---|
| 1 (Control) | 52.37±3.66$^{cd}$ | -1.86±0.80$^{a}$ | -2.12±1.02$^{a}$ |
| 2 (astaxanthin) | 47.83±2.51$^{b}$ | 3.09±1.88$^{b}$ | 6.36±2.68$^{cd}$ |
| 3 (zeaxanthin) | 40.04±4.13$^{a}$ | 9.10±2.19$^{e}$ | 4.92±1.67$^{c}$ |
| 4 (β-carotene) | 55.12±3.75$^{d}$ | -1.46±1.33$^{a}$ | 0.33±2.22$^{b}$ |
| 5 (carotenoid of spirulina 50 ppm) | 49.82±2.08$^{bc}$ | 2.26±1.03$^{b}$ | 7.13±1.94$^{cd}$ |
| 6 (carotenoid of spirulina 100 ppm) | 48.50±3.85$^{bc}$ | 3.79±2.67$^{bc}$ | 5.55±1.49$^{c}$ |
| 7 (carotenoid of spirulina 150 ppm) | 41.84±2.15$^{a}$ | 7.17±0.98$^{d}$ | 6.03±1.30$^{c}$ |
| 8 (carotenoid of spirulina 200 ppm) | 46.71±2.55$^{b}$ | 5.33±0.73$^{cd}$ | 8.44±2.85$^{d}$ |

**[1]Mean ± standard deviation of three replications**
**Mean within each column not sharing a common superscript are significantly different ($p$<0.05)**
**L value (Brightness), a value (Red-Green), b value (Yellow-Blue)**

**Table 10. Antibody titer of sex-reversed red tilapia fed the experimental diets for 8 week [1]**

| Experimental group | Antibody titer |
|---|---|
| 1 (Control) | 1:8$^{a}$ |
| 2 (astaxanthin) | 1:16$^{b}$ |
| 3 (zeaxanthin) | 1:32$^{c}$ |
| 4 (β-carotene) | 1:8$^{a}$ |
| 5 (carotenoid of spirulina 50 ppm) | 1:16$^{b}$ |
| 6 (carotenoid of spirulina 100 ppm) | 1:32$^{c}$ |
| 7 (carotenoid of spirulina 150 ppm) | 1:64$^{d}$ |
| 8 (carotenoid of spirulina 200 ppm) | 1:64$^{d}$ |

**[1]Mean ± standard deviation of three replications**
**Mean within each column not sharing a common superscript are significantly different (p<0.05)**

ซึ่งสอดคล้องกับที่พบว่าเมื่อ L-value ต่ำ จะทำให้ค่า a-value และ b-value ในปลากลุ่มที่ได้รับอาหารเสริมคาโรทีนอยด์จากทุกแหล่งมีค่าสูงกว่าชุดควบคุม (p<0.05) ทั้งนี้รวมถึงปลาที่ได้รับอาหารเสริมคาโรทีนอยด์จากเบตา-แคโรทีนด้วยแม้ว่าจะมีค่าต่ำกว่าปลาที่ได้รับคาโรทีนอยจากแหล่งอื่น ๆ ก็ตาม (Table 9)

### 8. ค่าแอนติบอดี ไตเตอร์

จากการศึกษาพบว่า ค่าแอนติบอดี ไตเตอร์สูงขึ้นเมื่อปลาได้รับอาหารเสริมคาโรทีนอยด์สังเคราะห์จากแอสตาแซนทินและซีแซนทิน และคาโรทีนอยด์จากสไปรูไลนา ทั้งนี้ค่าดังกล่าวมีค่าสูงขึ้นเมื่อปลาได้รับอาหารที่มีคาโรทีนอยด์จากสไปรูไลนาในความเข้มข้นที่สูงขึ้นด้วย ($p$<0.05) (Table 10) ส่วนปลาที่ได้รับอาหารเสริมเบตา-แคโรทีนมีค่าแอนติบอดี ไตเตอร์ไม่แตกต่างจากชุดควบคุม ($p$<0.05) (Table 10)

### 9. ปริมาณคาโรทีนอยด์รวมที่สะสมในตัวปลา

ปริมาณคาโรทีนอยด์รวมที่สะสมในตัวปลาที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง 8 สูตร เมื่อสิ้นสุดการทดลอง แสดงไว้ใน Table 11 โดยพบว่าปลาที่ได้รับอาหารเสริมคาโรทีนอยด์จากแอสตา แซนทินและซีแซนทิน และคาโรทีนอยด์จากสไปรูไลนา มีค่าสูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารชุดควบคุม ($p$<0.05)

**Table 11. Carotenoid content in whole body of sex-reversed red tilapia fed the experimental diets for 8 week (%on dry matter basis)[1]**

| Experimental group | Carotenoid content (ppm) |
|---|---|
| 1 (Control) | 7.28±0.49a |
| 2 (Astaxanthin) | 18.58±1.22c |
| 3 (Zeaxanthin) | 31.69±1.66f |
| 4 (β-carotene) | 8.37±2.65a |
| 5 (carotenoid of spirulina 50 ppm) | 15.58±1.05b |
| 6 (carotenoid of spirulina 100 ppm) | 21.40±1.00d |
| 7 (carotenoid of spirulina 150 ppm) | 30.55±0.59 f |
| 8 (carotenoid of spirulina 200 ppm) | 28.10±0.23 e |

**[1]Mean ± standard deviation of three replications**
**Mean within each column not sharing a common superscript are significantly different ($p<0.05$)**

(Table 11) โดยที่ปลามีคาโรทีนอยด์รวมในตัวปลาสูงขึ้นเมื่อปลาได้รับคาโรทีนอยด์จากสไปรูไลนาในความเข้มข้นที่สูงขึ้น และเริ่มลดต่ำลงเมื่อปลาได้รับอาหารที่มีคาโรทีนอยด์จากสไปรูไลนาเกิน 150 มก./อาหาร 1 กก. (Table 11) ส่วนปลาที่ได้รับอาหารเสริมที่มีเบตา-แคโรทีน มีปริมาณคาโรทีนอยด์รวมในตัวปลาไม่แตกต่างจากปลาที่ได้รับอาหารชุดควบคุม ($p<0.05$) (Table 11)

## วิจารณ์ผลการทดลอง

จากผลการทดลองครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า การเสริมคาโรทีนอยด์สังเคราะห์จากแอสตาแซนทิน ซีแซนทิน เบตา-แคโรทีน และคาโรทีนอยด์จากสาหร่ายสไปรูไลนา ไม่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตและอัตราการรอดตายของปลานิลแดงแปลงเพศ ซึ่งสอดคล้องกับ ดาราวรรณ และคณะ (2546) ที่ทดลองเสริมแอสตาแซนทินในปลากระแห และยังสอดคล้องกับการทดลองของ Choubert and Storebakken (1989) ที่ทดลองเสริมแอสตาแซนทินในปลาเรนโบว์เทร้าท์ ส่วนการทดลองในกุ้งกุรุมาที่ได้รับแอสตาแซนทิน ก็ให้ผลเช่นเดียวกัน (Yamada *et al*., 1990; Chien and Jeng, 1992; Negre-Sadargues *et al*., 1993) ถึงแม้ว่าในการทดลองนี้มีการเสริมสไปรูไลนาในความเข้มข้นสูงสุดถึง 14% (สูตรที่ 8) และลดปลาป่นลงเหลือ 7% เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของคาโรทีนอยด์รวมในอาหารเป็น 200 มก./ อาหาร 1 กก. แต่ก็ไม่ทำให้การเจริญเติบโตของปลาต่างจากปลาที่ได้รับอาหารชุดควบคุมซึ่งใช้ปลาป่น 12% แสดงให้เห็นว่าปลาสามารถใช้โปรตีนจากสไปรูไลนาทดแทนโปรตีนจากปลาป่นได้ ทั้งนี้ Ehrenberg (1980) รายงานว่า สไปรูไลนาเป็นแหล่งโปรตีนที่มีศักยภาพเนื่องจากมีกรดอะมิโนที่จำเป็น และยังประกอบด้วยวิตามินและเกลือแร่ในปริมาณสูง นอกจากนี้ยังไม่มีผนังเซลล์จึงไม่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบทำให้ง่ายต่อการย่อยและดูดซึม (Hill 1980; Nakamura, 1982)

จากการทดลองนี้พบว่าปลาที่ได้รับอาหารเสริมคาโรทีนอยด์จากสไปรูไลนามีอัตราการกินอาหารดีกว่าปลาที่ได้รับอาหารคาโรทีนอยด์สังเคราะห์ เนื่องจากสไปรูไลนามีกลิ่นที่ดึงดูดให้ปลายอมรับอาหารมากขึ้น โดย Hirano และ Sugama (1905) รายงานว่า การเสริมสไปรูไลนาในอาหารปลาอายูช่วยปรับปรุงรสและกลิ่นของอาหารปลาได้ อย่างไรก็ตามแม้การเสริมสไปรูไลนาในความเข้มข้นสูงจะไม่ส่งผลต่อการเจริญเติบโต แต่พบว่าปลาที่ได้รับอาหารเสริมสไปรูไลนา 14% (สูตรที่ 8) มีค่าการใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิต่ำที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองอื่น ๆ ซึ่งสอดคล้องกันกับการทดลองของ วุฒิพร และอัญชลี (2548) ที่พบว่าปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารเสริมสไปรูไลนา 15% ขึ้นไป มีผลทำให้การเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหารไม่ดี ทั้งนี้เนื่องจากเมื่อเสริมสไปรูไลนาในอาหารสูงเกินไปส่งผลต่อความสมดุลของกรดอะมิโนรวมในอาหาร โดยพบว่าในสไปรูไลนามีไลซีนน้อยกว่าปลาป่น เมื่อเพิ่มสไปรูไลนาและลด

ปลาป่นจะทำให้ไลซีนในอาหารต่ำลง (Olvera-Novia *et al.*, 1998) มีผลทำให้ปลามีประสิทธิภาพการใช้อาหารลดลง (Halver *et al.*, 2002)

จากการศึกษาค่าองค์ประกอบเลือด พบว่า ค่าฮีโมโกลบินรวม ค่าฮีมาโตคริต ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างชุดการทดลอง ส่วนค่าปริมาณเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาวมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อเสริมคาโรทีนอยด์ จากคาโรทีนอยด์สังเคราะห์ และคาโรทีนอยด์จากสไปรูไลนา เนื่องจากคาโรทีนอยด์ช่วยป้องกันการเสื่อมสภาพของเซลล์เม็ดเลือดขาวจากกระบวนการออกซิเดชัน เม็ดเลือดขาวจึงถูกทำลายน้อยลง นอกจากนี้คาโรทีนอยด์ส่งผลให้ร่างกายมีการสร้างเซลล์ชนิดกรานูลาร์(granular) เพิ่มขึ้น เช่น แมคโครฟาจ ที ลิมโฟไซท์ และ บี ลิมโฟไซท์ (Gabaduan, 1996) ทำให้ปริมาณเม็ดเลือดขาวสูงกว่าชุดที่ไม่เสริมคาโรทีนอยด์ และคาโรทีนอยด์ยังมีการกระตุ้นการทำงานของ ซีรัมแอนติโปรติเอส (serum antiprotease) และ ซีรัมคอมพลีเมน (serum complement) ให้มีความว่องไวขึ้น สอดคล้องกับการทดลองของ Duncan และ Klesius (1996) พบว่า เม็ดเลือดขาวชนิด ลิมโฟไซด์ (lymphocyte) เพิ่มขึ้นเมื่อปลากดอเมริกัน ได้รับอาหารเสริมสาหร่ายสไปรูไลนา 2.7% และสอดคล้องกับ วุฒิพร และ อัญชลี (2548) ที่ทดลองใช้สไปรูไลนาทดแทนปลาป่นในอาหารปลาดุกพันธ์ผสม นอกจากนี้จากการทดลองของ มะลิ และคณะ (2543) ที่พบว่าการเสริมแอสตาแซนทิน ส่งผลให้ปริมาณเม็ดเลือดในระบบไหลเวียนเลือดของกุ้งกุลาดำสูงขึ้น

ค่าสีของตัวปลา พบว่า การเสริมแอสตาแซนทินสังเคราะห์ ซีแซนทินสังเคราะห์ และคาโรทีนอยด์จากสไปรูนา ทำให้สีของตัวปลาเพิ่มขึ้น ยกเว้นชุดการทดลองที่เสริมเบตา-แคโรทีนสังเคราะห์ที่ไม่มีความแตกต่างกับชุดควบคุม โดยทำให้ปลามีสีแดงและสีเหลืองเพิ่มมากขึ้น โดยที่สีขาวหรือความสว่าง (L) ลดลง โดยการเพิ่มขึ้นของค่าระดับสีแดง-เขียว (a) และเหลือง-น้ำเงิน (b) จะสัมพันธ์กับสีแดงและสีเหลืองที่เพิ่มขึ้นของตัวปลา สอดคล้องกับการทดลองของ Smith และคณะ (1992) ที่พบว่าปลาโคโฮแซลมอนที่ได้รับอาหารเสริมแอสตาแซนทิน มีค่าสีแดงและสีเหลืองเพิ่มขึ้นตามระดับของแอสตาแซนทินที่เพิ่มขึ้น จากการทดลองครั้งนี้ชุดการทดลองที่เสริมแอสตาแซนทิน ปลาจะมีค่าความแดงและความเหลืองสูงกว่าชุดควบคุม เนื่องจากแอสตาแซนทินจะให้สีเหลืองส้มและแดงในเนื้อ ผิวหนัง และครีบ (NRC, 1993) ส่วนชุดการทดลองที่เสริมซีแซนทินและคาโรทีนอยด์จากสไปรูไลนา ซึ่งมีเบตา-คาโรทีน เบตา-คริปโตแซนทิน และซีแซนทินเป็นคาโรทีนอยด์ที่เป็นองค์ประกอบหลัก โดย Lorenz (1998) รายงานว่า สไปรูไลนาที่ผ่านกระบวนการ spray-dried มีปริมาณคาโรทีนอยด์รวม 346 มก./ 100 ก. ซึ่งประกอบด้วยเบตา-แคโรทีน 52%, ซีแซนทิน 21%, อิชินีโนน (echinenone) 10%, เบตา-คริบโตแซนทิน 6%, 3′-ไฮดรอกซีอิชินีโนน (3′-hydroxyechinenone) 5% และคาโรทีนอยด์ย่อยอื่นๆ ที่ไม่ได้แยกอีก 7% ซึ่งเบตา-แคโรทีน เบตา-คริปโตแซนทิน และซีแซนทิน จะให้สีเหลือง ซึ่งปลานิลแดงแปลงเพศนั้นสามารถเปลี่ยนแปลงคาโรทีนอยด์จากอาหารและสะสมในรูปของโรโดแซนทิน (rhodoxanthin) ได้ จึงทำให้เกิดสีแดงที่ตัวปลา (Katsuyama and Matsuno, 1979) ทำให้ปลามีสีเหลืองและสีแดงแตกต่างกับชุดควบคุม สอดคล้องกับ Ohkubo และคณะ (1999) รายงานว่าปลาทองจะเปลี่ยนแปลงคาโรทีนอยด์ในอาหารและสะสมในรูปแอสตาแซนทินและเบตา-แคโรทีนเป็นหลัก จึงทำให้เกิดสีส้ม-เหลืองในตัวปลาทอง สอดคล้องกับการทดลองของ สุภฎา (2548) ที่เสริมสไปรูไลนาเปรียบเทียบกับชุดที่ไม่เสริมสไปรูไลนาในอาหารปลาทอง พบว่า ค่า L ในชุดที่ไม่เสริมสไปรูไลนามีค่าสูงที่สุด ส่วนค่า a และ ค่า b ในชุดที่เสริมสไปรูไลนามีค่าสูงขึ้นที่ระดับความเข้มข้นของสไปรูไลนาแห้งในอาหาร 3-5% เช่นเดียวกับในปลาเรดซีบรีมที่สามารถเมแทบอไลซ์ (metabolize) ลูทีนหรือซีแซนทิน แต่ไม่สามารถเมแทบอไลซ์เบตา-แคโรทีนหรือแคนตาแซนทิน ไปเป็นทูน่าแซนทิน (tunaxanthin) หรือแอสตาแซนทินได้ เหมือนกับปลาแฟนซี คาร์ฟ มีการรายงานว่าไม่สามารถเมแทบอไลซ์เบตา-คาโรทีนได้ แต่สามารถเปลี่ยนซีแซนทินหรือลูทีนไปเป็นแอสตาแซนทินได้ (Boonyaratpalin, 2000) โดย Chein และ Jeng (1992) รายงานว่าจะต้องมีกระบวนการหลายขั้นตอนในการเปลี่ยนเบตา-แคโรทีนเป็นแอสตาแซนทิน ซึ่งขั้นตอนของวิธีเมแทบอลิซึมดังกล่าวจะเป็นเหตุให้การเปลี่ยนรูปของคาโรทีนอยด์เป็นไปอย่างช้าๆ ทำให้ระดับความเข้มข้นของคาโรทีนอยด์ในอาหารไม่มีผลโดยตรงต่อระดับของแอสตาแซนทิน ทั้งนี้คาโรทีนอยด์แต่ละชนิดมีประสิทธิภาพการใช้งานในสัตว์น้ำ (bioavailability) แตกต่างกัน

จากการศึกษาพบว่าการเสริมคาโรทีนอยด์ในอาหาร

ปลานิลแดงแปลงเพศ มีผลในการเพิ่มระดับแอนติบอดี โดยเมื่อปลานิลแดงแปลงเพศได้รับอาหารที่เสริมคาโรทีนอยด์สังเคราะห์ทั้ง 3 แหล่ง และคาโรทีนอยด์จากสไปรูไลนาในแต่ละระดับ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ทำให้แอนติบอดีไตเตอร์สูงกว่าค่าของปลาที่ได้รับอาหารทดลองในชุดควบคุม (ไม่เสริมคาโรทีนอยด์ ) ยกเว้นชุดการทดลองที่เสริม เบตา-แคโรทีน พบว่าไม่มีผลต่อค่าแอนติบอดีไตเตอร์ โดยคาโรทีนอยด์จะช่วยเพิ่มจำนวนเซลล์ต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน เช่น เซลล์เม็ดเลือด เม็ดเลือดขาวชนิดบี และที มาโครฟาจ ฟิกฟาโกซัย เป็นต้น ช่วยส่งเสริมให้เซลล์เหล่านี้รวมทั้งสารน้ำอื่น ๆ ในระบบทำงานได้ดีขึ้น แอนติบอดีเกิดจากบีเซลล์แบ่งตัวเป็นพลาสมาเซลล์แล้วสร้างแอนติบอดีขึ้นมา เพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกายเป็นครั้งที่ 2 โดยเมื่อสิ่งแปลกปลอมเข้าสู่ร่างกายอีก พลาสมาเซลล์จะทำการสร้างแอนติบอดี ขึ้นมาจับกับสิ่งแปลกปลอมเกิดเป็นแอนติเจนแอนติบอดีคอมเพล็ก ต่อจากนั้นระบบคอมพลีเมนต์ จะทำงานเกิดการทำลายสิ่งแปลกปลอม (Belay, 2002) สอดคล้องกับการทดลองของ Direkbusarakom และ Danayadol (1999) ที่ศึกษาการเสริมสาหร่ายสไปรูไลนาในอาหารปลากะพงขาว (seabass, *Lates calcarifer*) ขนาด 200 กรัม พบว่าเมื่อเสริมสาหร่ายสไปรูไลนา 0.5% ทำให้เกิดการตกตะกอนระหว่างแอนติบอดีและแอนติเจนต่อเชื้อ *Streptococcus* sp. ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งชลธิชา (2541) รายงานว่าปลานิลสีแดงที่ได้รับแอสตาแซนทินจะมีความต้านทานต่อโรคสูงขึ้น โดยจะไปเพิ่มปริมาณของ ที มาโครฟาจ และบี ลิมโฟไซท์ ให้มากขึ้นก็จะส่งผลให้ระบบภูมิคุ้มกันมีประสิทธิภาพในการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมสูงขึ้น เช่นเดียวกันกับ Duncan และ Klesius (1996) พบว่าเม็ดเลือดขาวชนิด ลิมโฟไซท์ (lymphocyte) เพิ่มขึ้นเมื่อปลากดอเมริกัน (channel catfish, *Ictalurus punctatus*) ได้รับอาหารเสริมสาหร่ายสไปรูไลนา 2.7% ของน้ำหนักอาหาร และ Lee (1999) ที่พบว่าเมื่อเสริมสาหร่ายสไปรูไลนาผง 0.1% ในอาหารกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ส่งผลให้กุ้งมีระบบภูมิต้านทานดีขึ้น โดยมีค่าการจับกินโดยวิธีการโอบล้อม (phagocytotic activity) สูงขึ้น นอกจากนี้จากการทดลองนำสาหร่ายชนิดอื่น เช่น เบตา-แคโรทีนที่สกัดจากสาหร่าย ดูนาลิเอลา (*Dunaliella salina*) และแอสตาแซนทินจากยีสต์ฟาฟเฟีย (*Phaffia rhodozyma*) เสริมในอาหารปลาเรนโบว์เทราท์ พบว่าส่งผลต่อระบบภูมิคุ้มกันโดย lysozyme activity, phagocytic activity หรือการจับกินเชื้อโรค ฮิวมูรอลเฟกเตอร์ (humural factors) และซีรัมอัลเตอร์เนทีพคอมพลีเมนต์เอกติวิตี (serum alternative complement activity) มีค่าสูงขึ้น (Amar *et al.*, 2004) นอกจากนี้ Richmond (1986) ยังพบว่าที่บริเวณผนังเซลล์ของสาหร่ายสไปรูไลนามีพอลิแซ็คคาไรด์เป็นองค์ประกอบ ซึ่งมีลักษณะเหมือนผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ดังนั้นเมื่อร่างกายได้รับสาหร่ายสไปรูไลนา ทำให้ระบบภูมิคุ้มกันกระตุ้นการสร้าง บี ลิมโฟไซท์ ที่บริเวณม้ามและไขสันหลัง เพื่อกำจัดและจดจำ (memory) เมื่อได้รับเชื้อโรคก็จะส่งผลให้กระบวนการกำจัดเชื้อเกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็ว มีการจับกินหรือค่าฟาโกซัยติก แอคติวิตีเพิ่มขึ้น (Sakai, 1999) ดังนั้นในปลาที่ได้รับอาหารที่เสริมคาโรทีนอยด์จากสไปรูไลนาจึงมีค่าแอนติบอดีไตเตอร์สูงกว่าในชุดที่เสริมแอสตาแซนทินสังเคราะห์และซีแซนทินสังเคราะห์ เนื่องจากมีส่วนอื่นของสไปรูไลนาในการช่วยเพิ่มระบบภูมิคุ้มกันได้จากการทดลองครั้งนี้ และพบว่าคาโรทีนอยด์จากสไปรูไลนาที่ระดับ 150 และ 200 มก./อาหาร 1 กก. ส่งผลให้แอนติบอดีมีค่าเจือจางที่สุดที่สามารถเกิดตะกอนกับแอนติเจนได้

การสะสมของคาโรทีนอยด์ในตัวปลามีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อมีการเสริมคาโรทีนอยด์ลงไปในอาหาร โดยระดับคาโรทีนอยด์เพิ่มขึ้นตามระดับของคาโรทีนอยด์ในอาหารที่เพิ่มขึ้น โดยพบว่าค่าคาโรทีนอยด์รวมในตัวปลาที่ได้รับอาหารที่เสริมซีแซนทินและคาโรทีนอยด์จากสไปรูไลนาที่ระดับ 150 มก./อาหาร 1 กก. มีค่าใกล้เคียงกัน การเสริมคาโรทีนอยด์ในอาหารให้ปลากินจะทำให้มีการสะสมคาโรทีนอยด์เพิ่มขึ้นสอดคล้องกับการทดลองของ วุฒิพร และอัญชลี (2548) ที่ทดลองในปลาดุกพันธุ์ผสม และ Smith และคณะ (1992) ในปลาโคโฮ-แซลมอน จากการทดลองนี้พบว่าปลานิลแดงแปลงเพศที่ได้รับอาหารเสริมคาโรทีนอยด์จากสไปรูไลนาที่ระดับ 200 มก./อาหาร 1 กก. มีค่าคาโรทีนอยด์รวมต่ำกว่าชุดการทดลองที่เสริมคาโรทีนอยด์จากสไปรูไลนาที่ระดับ 150 มก./อาหาร 1 กก. ซึ่งการลดลงของคาโรทีนอยด์รวมในตัวปลาหรือประสิทธิภาพการนำคาโรทีนอยด์ไปสะสมในตัวสัตว์น้ำ อาจเนื่องมาจากประสิทธิภาพการย่อยและข้อจำกัดของอัตราการดูดซึม ความเพียงพอของคาโรทีนอยด์ที่ปลาได้รับ (Kalinowski *et al.*, 2005) ทั้งนี้ปัจจัยที่มีผลต่อความเพียงพอ

ของคาโรทีนอยด์ที่ปลาได้รับจะขึ้นกับพันธุกรรม ปัจจัยทางชีววิทยา เช่น ขนาดและชนิดของสัตว์ และสารอาหาร (Torrissen, 1985) โดยเฉพาะกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวจะช่วยในการดูดซึมคาโรทีนอยด์ เนื่องจากคาโรทีนอยด์ละลายได้ในไขมัน (Fox and Vevers, 1960) ด้วยเหตุนี้การดูดซึมและเมแทบอลิซึมอาจจะสัมพันธ์กับไขมัน โดย Babosa และคณะ (1999) รายงานว่าระดับไขมันในอาหารมีส่วนเกี่ยว ข้องอย่างมากในการดูดซึมแอสตาแซนทินของปลาเรนโบว์เทราท์ ทั้งนี้ในอาหารที่มีไขมันสูงปลาจะสามารถดูดซึมและนำเอาแอสตาแซนทินเอสเทอร์ไปใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ไม่แตกต่างกับแอสตาแซนทินอิสระ และจากอัตราการเจริญเติบโตที่เร็วกว่าอัตราการได้รับและอัตราการสะสมคาโรทีนอยด์ในตัวปลา (Menasveta *et al.*, 1993) ก็ทำให้การสะสมคาโรทีนอยด์ลดลงเช่นกัน โดยในปลาเรดซีบรีมที่ได้รับอาหารที่เสริมเบตา-แคโรทีน หรือแคนตาแซนทิน จะทำให้ระดับคาโรทีนอยด์ที่สะสมในผิวหนังลดลง (Lorenz, 1998) และพบในปลาเรด พอร์กี หลังจากให้อาหารผสมคาโรทีนอยด์ไป 105 วัน ปลาจะมีสีแดงลดลง (Kalinowski *et al.*, 2005)

## สรุปผลการทดลอง

1. การใช้คาโรทีนอยด์สังเคราะห์ 3 ชนิด คือแอสตาแซนทิน เบตา-แคโรทีน และซีแซนทินที่เสริมในอาหารที่ระดับ 200 มก./อาหาร 1 กก. และสไปรูไลนาเป็นแหล่งคาโรทีนอยด์ที่ระดับต่าง ๆ เสริมในอาหารปลานิลแดงแปลงเพศทั้ง จะไม่ส่งผลต่อการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพของอาหาร และอัตราการรอด

2. แอสตาแซนทิน ซีแซนทิน และคาโรทีนอยด์จากสไปรูไลนา ทำให้ปลานิลแดงแปลงเพศมีสีที่เข้มขึ้น โดยซีแซนทินจะทำให้ปลามีสีเหลืองและสีแดง ส่วนแอสตาแซนทินจะให้ค่าสีเหลืองและแดงเช่นเดียวกับชุดที่เสริมคาโรทีนอยด์จากสไปรูไลนา ส่วนการสะสมคาโรทีนอยด์ในตัวปลา พบว่าชุดที่เสริมซีแซนทิน และคาโรทีนอยด์จากสไปรูไลนา 150 มก./อาหาร 1 กก.สูงที่สุด

3. แอสตาแซนทิน และซีแซนทิน มีผลต่อระบบภูมิคุ้มกัน คือทำให้ค่าแอนติบอดีไตเตอร์สูงกว่าชุดควบคุม และปลาที่ได้รับอาหารที่เสริมคาโรทีนอยด์จากสไปรูไลนาทำให้ค่าแอนติบอดีไตเตอร์ สูงขึ้นตามระดับของคาโรทีนอยด์ที่เพิ่มขึ้น

4. ปลาที่ได้รับอาหารที่เสริมเบตา-แคโรทีนสังเคราะห์ พบว่าไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสี การสะสมคาโรทีนอยด์ในตัวปลา และระบบภูมิคุ้มกัน

5. จากการศึกษาการใช้คาโรทีนอยด์สังเคราะห์ พบว่าปลานิลแดงแปลงเพศ สามารถใช้ประโยชน์จากแอสตาแซนทินและซีแซนทิน แต่ไม่สามารถใช้เบตา-แคโรทีน และพบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของคาโรทีนอยด์จากสไปรูไลนาที่เสริมในอาหารคือ 150 มก./อาหาร 1 กก.

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ Dr. Jacques Gabaudan, Director of DSM Aquaculture Center Asia Pacific ที่สนับสนุนคาโรทีนอยด์สังเคราะห์ แอสตาแซนทิน และซีแซนทิน และเอื้อเฟื้อในการจัดเตรียมวิตามินและแร่ธาตุที่ใช้เตรียมอาหารทดลอง และขอขอบคุณบริษัทบีเอเอสเอฟประเทศไทยที่เอื้อเฟื้อเบตาคาโรทีนสังเคราะห์

## เอกสารอ้างอิง

ชลธิชา โชติสิทธิพงษ์. 2541. ผลของแอสตาแซนทินต่อสี การเจริญเติบโต อัตรารอดและความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus*. sp. ของปลานิลสีแดง (*Tilapia nilotica* Linn.). วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ดาราวรรณ ยุทธยงค์ จูอะดี พงศ์มณีรัตน์ และสนธิพันธ์ ผาสุกดี. 2546. ผลของแอสตาแซนทินในอาหารต่อสีปลากระแห. บทคัดย่อ การสัมมนาวิชาการประมง ประจำปี 2546 7-9 ก.ค. หน้า 45.

ทิพวรรณ ปริพัฒนานนท์ จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์ อัจจริยา ไสละสุต และนันทริกา ซันซื่อ. 2541. ผลของแอสตาแซนทินต่อสีของปลาทอง. รายงานผลงานวิจัยเสนอต่อมหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ ประจำปี 2541.

นิรุทธิ์ สุขเกษม. 2544. ผลของกากเนื้อเมล็ดในปาล์มน้ำมันต่อการเจริญเติบโตของปลานิล. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบันฑิต สาขาวาริชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

มะลิ บุณยรัตผลิน กิจการ ศุภมาตย์ และชูศักดิ์ บริสุทธิ์. 2543. ระบบภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำ. ว. สงขลานครินทร์ 22 : 641-652.

วันเพ็ญ มีนกาญจน์ และกาญจนา จิรพันธ์พิพัฒน์. 2547. การปรับปรุงคุณภาพปลารันชูโดยใช้รงควัตถุคาโรทีนอยด์จากสาหร่ายสไปรูไลนา. ว.การประมง 57 : 107-115.

วุฒิพร พรหมขุนทอง วรรณชัย พรหมเกิด กิจการ ศุภมาตย์ วุฒิกรณ์ จิตติวรรณ และดุสิต นาคะชาต. 2547. การแทนที่ปลาป่นในอาหารปลานิลแดงแปลงเพศ (*Oreochromis niloticus* Linn.) ด้วยกากเนื้อเมล็ดในปาล์มน้ำมัน. ว.สงขลานครินทร์ วทท. 26 : 167-179.

วุฒิพร พรหมขุนทอง และอัจฉริยา มูสโกภาศ. 2548. ผลของเอนไซม์ไฟเตสต่อการเพิ่มการใช้ฟอสฟอรัสจากวัตถุดิบพืชในปลานิลแดงแปลงเพศ ว.สงขลานครินทร์ วทท. 27(1) : 151-170.

วุฒิพร พรหมขุนทอง และอัญชลี พิพัฒนวัฒนากุล. 2548. ผลของสาหร่ายสไปรูไลนาต่อการเจริญเติบโตและระดับแอนติบอดีในปลาดุกพันธุ์ผสม. ว.สงขลานครินทร์ วทท. 27(1) : 115-132.

สุภฎา คีรีรัฐนิคม. 2548. ระดับของสไปรูลินาในอาหารต่อการเจริญเติบโตและการเร่งสีปลาทอง (*Carassius auratus*). ว.สงขลานครินทร์ วทท. 27 (1) : 133-139.

Amar, E. C., Kiron, V., Satoh, S. and Watanabe, T. 2004. Enhancement of innate immunity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) associated with dietary intake of carotenoids from natural products. Fish & Shellfish Immunology. 16 : 527-537.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 1990. Official Methods of Analysis. Washington DC.

Barbosa, M. J., Morais, R. and Choubert, G. 1999. Effect of carotenoid source and dietary lipid content on blood astaxanthin concentration in rainbow trout (*Oncorhychus mykiss*). Aquaculture 176 : 331-341.

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

Belay, A. 2002. The potential application of Spirulina (Arthrospira) as a nutritional and therapeutic supplement in health management. The Journal of American Nutraceutical Association 5(2): 27-48.

Boonyaratpalin, M. 2000. Application of carotenoids in aquaculture. **In** First South East Asia and Pacific Regional Meeting on carotenoids, p.18. Bangkok Thailand 2-5 August 2000, Mahidol University. Bangkok.

Boonyaratpalin, M. and Phromkunthong, W. 2000. Bioavailability of ascorbyl phosphate calcium in hybrid catfish, *Clarias macrocephalus* (Gunther) x *Clarias gariepinus* (Burchell) feed. Aquaculture Research 32(suppl. 1) : 126-134.

Careri, M., Furlattini, L., Mangia, A., Musci, M., Anklam, E., Theobald, A., and Holst, C. V. 2001. Supercritical fluid extraction for liquid chromatographic determination of carotenoids in *Spirulina pacifica* algae : a chemometric approach. J. Chromatogr. 912 : 61-71.

Chien, Y.H. and Jeng, S.C. 1992. Pigmentation of kuruma prawn, *Penaeus japonicus* Bate, by various pigment soures and levels and feeding regimes. Aquaculture 102 : 333-346.

Choubert, G. and Storebakken. T. 1989. Dose response to astaxanthin and canthaxanthin pigmentations of rainbow trout fed various dietary carotenoid concentrations. Aquaculture 84 : 69-77.

Cuzon, Z., Dos Santos, R., Hew, M. and Roullaouec, G. 1985. Use of Spirulina in shrimp (*Penaeus japonicus*) diet. ASFA 1. 15(2) : 345-352.

Direkbusarakom, S. and Danayadol, Y. 1999. Effect of *Spirulina* sp. on antibody titer of seabass, *Lates calcarifer*. Fourth Symposium on diseases in Asian Aquaculture Aquatic animal Health for Sustainability. Philippines, 22-26 November 1999.

Duncan, P.L. and Klesius, P.H. 1996. Dietary immunostimulants nonspecific immune responses in channel catfish but not resistance to *Edwardsiella ictaluri*. J. of Aquat. Anim. Health. 8 : 241-248.

Dupree, H.K. and Sneed, K.P. 1966. Response of channel catfish fingerling to different levels of major nutrients in purified diets. U.S. Bureau of Sports Fish and Wildlifte Tech. Pap. No. 9.

Ehrenberg, M. 1980. Microalgae: a fish farm feed for the future. Fish Farming International 7: 15-18.

Fox, D.L. 1957. The pigment of fish. **In** Brown, M.E. (ed.).Physiology of Fish. New York : Academic press.

Fox, H.M. and Vevers, G. 1960. The Nature of Animal Colours. London : Sidgwick and Jackson Limited.

Gabauduan, J. 1996. Dietary astaxanthin improves production yield in shrimp farming. Fish. Chem. 16(1) : 37-39.

Gemma, C., Mesches, M.H., Sepesi, B., Choo, K., Holmes, D.B. and Bickford, P. 2002. Diets enriched in foods with high antioxidant activity reverse age-induced decreases incerebellar β-adrenergic function and increases in proinflammatory cytokines. J. Neurosci. 22 : 6114-6120.

Grether, G.F., Karahara, S., Kolluru, G.R. and Cooper, E.L. 2004. Sex-specific effects of carotenoid intake on the immunological response to allografts in guppies (*Poecilia reticulata*). Proc. R. Soc. Lond. 271 : 45-49.

Halver, J.E., Hardy, R.W. and Hardy, D.M. 2002. Fish Nutrition. New York : Academic Press.

Hata, M. and Hata, M. 1975. Carotenoid pigments in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. J. Agric. Res. 26 : 25-40.

Hill, C. 1980. The secrete of Spirulina. California : University of the Tress Press.

Hirano, T. and Suyama, M. 1985. Effect of dietary microalgae on the quality of cultured ayu. J. of the Tokyo University of Fisheries 72 : 21-41.

Hughes, D.A. 2001. Dietary carotenoids and human immune function. Nutrition 17 : 823-827.

Jantrarotai, W., Sitasit, P. and Rajchapakdee, S. 1994. The optimum carbohydrate to lipid ratio in hybrid Clarias catfish (*Clarias macrocephalus* x *C. gariepinus*) diets containing raw broken rice. Aquaculture 127 : 61-68.

Jimenez, C., Cossio, B.R., Labella, D. and Xavier Niell, F. 2003. The feasibility of industrial production of *Spirulina* (*Arthospira*) in Southern Spain. Aquaculture 217 : 179-190.

Kalinowski, C.T., Robaina, L.E., Fernandez-Palacios, H., Schuchardt, D. and Izquierdo, M.S. 2005. Effect of different carotenoid sources and their dietary levels on red porgy (*Pagrus pagrus*) growth and skin colour. Aquaculture 244 : 223-231.

Katayama, T., Ikeda, N. and Harada, K. 1965. Carotenoids in sea breams, *Chrysophrys major* and schlegel. Bull. Jpn. Soc. Sci.Fish. 31 : 947-952.

Katsuyama, M. and Matsuno, T. 1979. Isolation and identification of rhodoxanthin from the fish *Tilapia niloticus*. Bull. Jsp. Soc. Sci 45 : 1045.

Klesius, P.H., Shoemaker, C.A. and Evans, J.J. 2000. Efficacy of single and combined *Streptococcus iniae* isolate vaccine administered by intra-peritoneal and intramuscular routes in tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture 188 : 237-246.

Larsen, H.N. and Snieszko, S.F. 1961. Modification of microhematocrit technique with trout blood. Trans. Amer. Fish. Soc. 90 : 139-142.

Lastcha, T. 1991. Carotenoids in aquatic animal nutrition. Proceeding of the Aquaculture Feed Processing and Nutrition Workshop, Bangkok, Thailand, 19-25 September. 1991. pp. 68-78.

Lee, K. 1999. Spirulina and immunological activity of cultured prawn. Book of Abstracts.

Second Asia Pacific Psychological Forum. Chinese University of Hong Kong, China, 21-25 June 1999. 10 p.

Liao, W. L., Nur E Borhan, S., Okada, S., Matsui, T. and Yamaguchi, K. 1993. Pigmentation of culture black tiger prawn by feeding a *Spirulina* sp. supplemented diet. Nippon Suisan Gakkaishi 59(1) : 165-159.

Lorenz, R.T. 1998. A review of astaxanthin as a carotenoid and vitamin source for sea bream. Naturerose Technical Bulletin, vol. 052. Cyanotech, Hawaii, USA.

Lorenz, R.T. 1998. A review of Spirulina as a carotenoid and vitamin source for cultured shrimp. *Spirulina pacifica*. Technical Bulletin, vol.050. Cyanotech, Hawaii, USA.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193 : 265-275.

Mensaveta, P., Worawattanamateekul, W., Latscha, Y. and Clark, J.S. 1993. Correction of tiger prawn (*Penaeus monodon* Fabricus) coloration by astaxanthin. Aquac. Eng. 12 : 203-213.

Nakano, T., Yamaguchi, T., Sato, M. and Iwama, G.K. 2003. Biological effects of carotenoids in fish. International Seminar "Effective Utilization of Marine Food Resources". Songkhla, Thailand. 18 December. pp. 1-15.

Nakamura, H. 1982. Spirulina: Food for Hungry World. California: University of the Tress Press, Boulder Creek.

Nakazoe, J., Ishii, S., Kamimoto, H. and Takeuchi, M. 1984. Effects of supplemental carotenoid pigments on the carotenoid accumulation in young red sea bream *Chrysophrys major*. Bull. Tokai. Reg. Fish. Res. Lab. 113 : 29-41.

Nankervis, L., Matthews, S.J. and Appleford, P. 2000. Effect of dietary non-protein energy source on growth, nutrient and circulating insulin-like growth factor I and triiodothyronine levels in juvenile barramundi, *Lates calcarifer*. Aquaculture 191 : 323-335.

Negre-Sadargues, G., Castillo, R., Petit, H., Sance, S., Martinez, R.G., Milicua, J.C.G., Choubert, G. and Trilles, J.P. 1993. Utilization of synthetic carotenoids by the prawn *Penaeus japonicus* reared under laboratory conditions. Aquaculture 110 : 151-159.

NRC. 1993. Nutrient Requirement of Fish. National Academy Press. Washington, D.C.: Academic Press

Ohkubo, M., Tsushima, M., Maoka, T. and Matsuno, T. 1999. Carotenoids and metabolism in the goldfish *Carassius aurata* (Hibuna). Comp. Biochem. Physiol. 124 B : 333-340.

Olvera-Novoa, M.A., Dominguez-Cen, L.J., Olivera-Castillo, L. And Martinez-Palacios, C.A. 1998. Effect of the use of the microalga *Spirulina maxima* as fish meal replacement in diets for tilapia, *Oreochromis mossambicus* Peters, Fry. Aquaculture Research. 29 : 709-715.

Pan, C.H., Chien, Y.H. and Cheng, J.H. 2001. Effects of light regime, algae in the water, and dietary astaxanthin on pigmentation, growth, and survival of black tiger prawn *Penaeus monodon* post-larvae. Zool. Stud. 40 : 371-382.

Pelizer, L.H., Danesi, E.G., Rangel, C.O., Sassano, C. N., Carvalho, J.M., Sato, S. and Moraes, I.O. 2003. Influence of inoculum age and concentration in *Spirulina platensis* cultivation. J. of Food Engineering. 56 : 371-375.

Richmond, A. 1986. Handbook of Microalgae Mass Cuture. pp. 528. Boca Raton Florida : Press, Ine.

Richmond, A. 1987. Spirulina. **In** Borowitzka M.A. and Borowitzka L.J., eds Micro-algal Biotechnology pp. 85-121. Cambridge : Cambridge University Press.

Roberts, R.J. 1978. Fish Pathology. London : Bailliere Tindall.

Robertsen, B., Rorstad, G., Engetad, R. and Raa, J. 1990. Enhancement of non-specific disease resistance in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., by a glucan from *Saccharomyces cerevisiae* cell walls. Journal of Fish Disease 13 : 391-400.

Robinson, E.H. and Wilson, R.P. 1985. Nutrition and feeding. **In** Tucker C.S. (ed.) Channel Catfish Culture. Development in Aquaculture and Fisheries Science, 15 : 323-404.

Sakai, M. 1999. Current research status of fish immunostimulants. Aquaculture 172 : 63-92.

Smith, B.E., Hardy, R.W. and Torrissen, O.J. 1992. Synthetic astaxanthin deposition in pan-size coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). Aquaculture104 : 105-119.

Sommer, T.R., Morrissy, N.M. and Potts, W.T . 1991a. Growth and pigmentation of marron (*Cherax tenuimanus*) fed a reference ration supplemented with the microalga *Dunaliella salina*. Aquaculture 99 : 285-295.

Sommer, T.R., Potts, W.T. and Morrissy, N.M. 1991b. Utilization of microalgal astaxanthin by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture 94 : 79-88.

Steel, R.G.D. and Torrie, J.H. 1980. Principle and Procedures of Statistices. 2nd ed. New York : McGraw Hill.

Stickney, R.R. 1979. Principles of Warmwater Aquaculture. New York : John Wiley & Sons.

Tanaka, Y., Matsuguchi, H., Katayama, T., Simpson, K. L. and Chichester, C.O. 1976. The biosynthesis of astaxanthin. XVIII. The metabolism of the carotenoids in the prawn, *Penaeus japonicus* Bate. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 42 : 197-202.

Thompson, I., Choubert, G., Houlihan, D.F. and Secombes, C.J. 1995. The effect of dietary

vitamin A and astaxanthin on the immunocompetence of rainbow trout. Aquaculture. 133 : 91-102.

Torrissen, O.J. 1985. Pigmentation of salmonids: factors affecting carotenoid deposition in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Aquaculture 46 : 133-142.

Torrissen, O.J., Hardy, R.W., Shearer, K.D., Scott, T.M. and Stone, F.E. 1990. Effects of dietary canthaxanthin level and lipid level on apparent digestibility coefficients for canthaxanthin in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture 88 : 351-362.

Torrissen, O.J. and Naevdal, G. 1984. Pigmentation of salmonids genetical variation in carotenoid deposition in rainbow trout. Aquaculture 38 : 59- 66.

Varga, L., Szigeti, J., Kovacs, R., Foldes, T., and Buti, S. 2002. Influence of a *Spirulina platensis* biomass on the microflora of fermented ABT milks during storage (R1). J. Dairy Sci. 85 : 1031-1038.

Venkataraman, L.V. 1983. Blue-green algae Spirulina. Central Food Technological Research Institue. Mysore, India.

Yamada, S., Tanaka, Y., Sameshima, M. and Ito, Y. 1990. Pigmentation of prawn (*Penaeus japonicus*) with carotenoids I. Effect of dietary astaxanthin, β-carotene and canthaxanthin on pigmentation. Aquaculture 87 : 323-330.

Yone, Y. and Fujii, M. 1975. Studies on nutrition of red sea bream-XI: Effect of ω 3 fatty acid supplement in a corn oil diet on growth rate and feed efficiency. Bull. Jpn. Soc. Fish 41 : 73-77.

Zeitoun, I. H., Jack, P. I., Halver, I. E. and Ullrey, D.E. 1973. Influence of salinity on protein requirements of rainbow trout fingerling. J. Fish. Res. Board Can. 30 : 1867-1873.