

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

รายงานการวิจัย
ประจำปีงบประมาณ 2556

การพัฒนาการผลิตวัคซีนและสารเสริมอาหารโดยเทคนิคการตรึงเพื่อกระตุ้น
ภูมิคุ้มกันของปลาทะเลต่อปรสิตสัตว์น้ำหรือแบคทีเรีย

The development of vaccination and feed additive inclusion via
encapsulation techniques to stimulate the immune system of marine fish species
infected with parasitic and bacterial pathogens.

ภายใต้แผนงานวิจัย

จุลินทรีย์ทะเล: แหล่งใหม่ของสารตัวยาและผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร

Marine Microbes as the New Sources of Drug Agents and Food Supplements

สุพรรณณี ลิโทชวลิต
จันทร์จรัส วัฒนะโชติ
จารุพันธ์ ประทุมยศ
ศรันยู คำเมือง
รักฤดี สารธิมา

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ผ่านงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2556
สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

22 ส.ค. 2558

347433

๒๐๗ 75321

เริ่มบริการ

27 ส.ค. 2559

การพัฒนาการผลิตวัคซีนและสารเสริมอาหารโดยเทคนิคการตรึงเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลา
ทะเลต่อปรสิตตัวน้ำหรือแบคทีเรีย

สุพรรณิ ลิโทขวลิต จันทร์จรัส วัฒนะโชติ จารุพันธ์ ประทุมยศ ศรีณยู คำเมือง รักรฤดี สารธิมา *

สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา อ. เมือง ชลบุรี

* ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม อำเภอ กันทรวิชัย มหาสารคาม

บทคัดย่อ

การเลี้ยงยีสต์ *Pichia* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อกากขานอ้อยที่ความเค็ม 25 พีพีที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง มีการเจริญสูงสุดในระยะเวลากการเลี้ยงที่ 72 ชั่วโมง และมีจำนวนเซลล์เท่ากับ 2.45×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดไขมันจากเม็ดเจลที่ตรึงยีสต์ *Pichia* sp. ด้วยแคลเซียมอัลจิเนต พบกรดปาล์มิติกเป็นองค์ประกอบหลักมากที่สุดร้อยละ 21.20 ± 0.57 กรดโอเลอิกและกรดไลโนเลอิกร้อยละ 17.83 ± 0.35 และ 3.14 ± 0.10 ตามลำดับ ในขณะที่พบกรดไขมันอิ่มตัวและกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยวทั้งหมดในเม็ดเจลแห้งร้อยละ 32.61 และ 20.36 ตามลำดับ ในการตรึงเซลล์ยีสต์พบว่าโซเดียมอัลจิเนตที่ความเข้มข้นร้อยละ 1.2 และแคลเซียมคลอไรด์ร้อยละ 1.5 มีความเหมาะสมมากที่สุด

The development of vaccination and feed additive inclusion via encapsulation techniques to stimulate the immune system of marine fish species infected with parasitic and bacterial pathogens.

Supanee Leethochavalit Janjarus Watanachote Jarunan Pratoomyot Saranyu Khammuang

Rakrudee Samthima

Institute of Marine Science, Burapha University, Bangsaen Chonburi, 20131 Thailand

Department of chemistry, Faculty of Science, Mahasarakham University, Kantarawichai District
Maha Sarakham, 44150 Thailand

Abstract

The marine yeast *Pichia* sp. was cultured in a sugarcane bagass media adjusted to a salinity of 25 ppt. for a period of 96 h. Peak growth was observed at 72 h when the cell number reached 2.45×10^8 cells/ml. The immobilized yeast cells in calcium alginate beads were analyzed for fatty acid components. Palmitic represented the majority components of the total fatty acid component with values of $21.20 \pm 0.57\%$. While oleic and linoleic acids were detected in the amount of $17.83 \pm 0.35\%$, and $3.14 \pm 0.10\%$ respectively. Whilst the total saturated and total monounsaturated fatty acid components of dried yeast cells beads were 32.61 and 20.36% respectively. Effective immobilization of *Pichia* sp. cells was achieved using a combination of 1.2% w/v sodium alginate and 1.5% w/v calcium chloride for the appropriate restriction of gross nutrients within the yeast cells.

กิตติกรรมประกาศ

รายงานวิจัยฉบับนี้ได้รับการสนับสนุนด้านงบประมาณจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติผ่านงบประมาณแผ่นดินมหาวิทยาลัยบูรพาประจำปี 2556 ซึ่งคณะผู้วิจัยใคร่ขอขอบพระคุณเป็นอย่างมาก และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเลทุกท่านซึ่งมีส่วนช่วยให้งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

คณะผู้วิจัย

สิงหาคม 2557

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	
Abstract	
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
บทนำ	1
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
วิธีการทดลอง	18
ผลการทดลอง	28
สรุปและอภิปรายผลการทดลอง	40
เอกสารอ้างอิง	47
ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี	62
ภาคผนวก ข การคำนวณ การวิเคราะห์ และการนับจำนวนเซลล์ยีสต์	64
ภาคผนวก ค ตัวอย่างภาพโครมาโทแกรมของกรดไขมัน	65

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	วิธีดักจับเซลล์ด้วยการทำให้เกิดเจลโดยพอลิเมอร์ของสารอินทรีย์	7
2.2	ไอออนิกพอลิแซคคาไรด์และไอออนสำหรับสำหรับการเกิดเจลแบบเชื่อมไขว้	8
4.1	ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำทะเลเทียมที่ได้จากการแช่เม็ดเจลตรึงสารพอลิเมอร์ 4 ชนิด คือ ปาเปน, ทริปซิน, อัลบูมิน และบลูเดกซ์แทรน ด้วยแคลเซียมอัลจีเนต ในน้ำทะเลเทียมที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 8.0	31
4.2	ค่าการดูดกลืนแสงของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ได้จากการแช่เม็ดเจลตรึงสารพอลิเมอร์ 4 ชนิด คือ ปาเปน, ทริปซิน, อัลบูมิน และบลูเดกซ์แทรนด้วยแคลเซียมอัลจีเนต ใน 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffered saline, PBS) ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.4	32
4.3	ค่าการดูดกลืนแสงของอะซิเตตบัฟเฟอร์ที่ได้จากการแช่เม็ดเจลตรึงสารพอลิเมอร์ 4 ชนิด คือ ปาเปน, ทริปซิน, อัลบูมิน และบลูเดกซ์แทรนด้วยแคลเซียมอัลจีเนต ในอะซิเตตบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.0	33
4.4	ปริมาณโปรตีนจากปลาบ่นที่หลุดออกมาเมื่อตรึงด้วยแคลเซียมอัลจีเนตที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน	34
4.5	ค่าดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เพื่อตรวจสอบการหลุดของเซลล์ยีสต์ <i>Pichia</i> sp. จากแคลเซียมอัลจีเนตในน้ำตัวอย่าง	35

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

แบคทีเรียและยีสต์พบได้ทั่วไปในธรรมชาติรวมทั้งในทะเล แต่ละชนิดมีคุณสมบัติแตกต่างกัน ปัจจุบันพบว่าจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถนำมาใช้เป็นอาหารสำหรับสัตว์ และยีสต์ก็เป็นจุลินทรีย์อีกชนิดที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากยีสต์บางชนิดมีคุณสมบัติของการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (immunostimulatory properties) และบางชนิดเป็นแหล่งสารอาหารโปรตีน ไขมัน และวิตามิน (Kutty และ Phillip, 2008) การนำยีสต์มาเป็นส่วนผสมของอาหารสัตว์ โดยใช้เป็นแหล่งโปรตีนที่เราเรียกว่า โปรตีนเซลล์เดียว (single cell protein) หรือใช้เป็นโปรไบโอติก (probiotic) ช่วยเสริมสุขภาพให้กับสัตว์เลี้ยง ทำให้สัตว์แข็งแรง และมีภูมิต้านทานโรคสูงขึ้น (Moore และ Landecker, 1996)

ยีสต์สามารถเจริญเติบโตและขยายพันธุ์ในปริมาณมากโดยใช้แหล่งคาร์บอนได้หลากหลายชนิดอย่างรวดเร็ว ทำให้มีต้นทุนในการผลิตต่ำ วัสดุที่เหลือทิ้งจากการเกษตรเช่นกากชานอ้อยนับว่าเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญและการสร้างพลังงานที่ดี ทั้งยังลดต้นทุนและเป็นการใช้ทรัพยากรอย่างคุ้มค่า ซึ่งการวิจัยครั้งนี้ได้นำกากชานอ้อยมาใช้เลี้ยงยีสต์ *Pichia* sp.(BS 6-2) ที่แยกได้จากน้ำทะเลบริเวณชายหาดบางแสน ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์เชื้อจากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา ณ สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี (Srivibool และคณะ, 2011) จากการศึกษาองค์ประกอบของกรดไขมันในยีสต์ (BS 1-2 และ *Pichia* sp.) ที่แยกได้จากน้ำทะเลแล้วเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อกากชานอ้อย พบว่ายีสต์ *Pichia* sp. มีองค์ประกอบของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงกว่ายีสต์ BS 1-2 (อิงสุรัจจ์ และชนิดาภา, 2554, นิษา และคณะ, 2556) ยีสต์ *Pichia* sp. ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อกากชานอ้อยที่มีความเค็ม 25 พีพีทีเป็นเวลา 72 ชั่วโมง มีการเจริญสูงสุด และผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวโดยเฉพาะกรดไขมันไลโนเลอิก (Linoleic acid, C18:2n6) มากกว่ายีสต์ *Pichia* sp. ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อกากชานอ้อยที่มีความเค็ม 30 และ 35 พีพีที (อัญชัญ และอมรรัตน์, 2555)

ในการนำยีสต์ทะเลหรือปรสิติที่มีคุณสมบัติในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันมาใช้เสริมในอาหารสัตว์น้ำ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการนำมาผลิตอาหารโดยวิธีการตรึงเซลล์ พบว่างานวิจัยด้านนี้ใน

ประเทศไทยมีปริมาณน้อย การใช้ประโยชน์จากเทคนิควิธีการตรึงโดยทั่วไปมีวัตถุประสงค์เพื่อที่จะตรึงเซลล์หรือสารปริมาณน้อยที่สำคัญไว้ภายใน ให้อยู่ในบริเวณที่ต้องการ และไม่สูญเสียความสามารถในการเป็นตัวเร่ง สามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้หลายครั้ง หรือใช้ได้อย่างต่อเนื่อง ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมีความพยายามใช้เทคนิคการตรึงในการผลิตอาหารสำเร็จรูปเพื่อลดปริมาณการใช้อาหารที่มีชีวิตในการอนุบาลสัตว์น้ำวัยอ่อนในรูปแบบต่างๆ เช่น microsphere diets, microencapsulated diets หรือ microparticulated diets (Lazo, 2000; Teshima และคณะ, 2000; Koven, และคณะ, 2001; Kolkovski, S. 2004) หรือการใช้เทคนิคการตรึงในการป้องกันรักษาโรค เช่น การพัฒนาวัคซีนรักษาโรคโดยวิธีการให้กิน แทนการแช่ หรือการใช้สารเคมีรักษาโรค (Polk และคณะ, 1994) อย่างไรก็ตาม การให้วัคซีนโดยวิธีการให้กินนั้น วัคซีนอาจจะถูกทำลายในกระเพาะอาหารแทนที่จะถูกดูดซึมไปใช้ประโยชน์ทั้งหมดที่ลำไส้ถ้าใช้วัสดุและเทคนิคในการตรึงวัคซีนนั้นไม่เหมาะสม ดังนั้นในกระบวนการที่จะตรึงสารอาหารไว้ภายในให้ได้มากที่สุดและให้ถูกปล่อยออกมาในระยะเวลาที่เหมาะสม รวมถึงการนำวัสดุที่ใช้เป็นอาหารสัตว์น้ำมาทำการตรึงจะต้องมีการศึกษาทั้งเทคนิคในการตรึงและวัสดุที่จะนำมาตรึง ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจนำยีสต์ *Pichia* sp. และปรสิต *Cryptocaryon irritans* มาทำการตรึงเซลล์ โดยศึกษาวิธีการตรึงเซลล์และประสิทธิภาพของสารที่นำมาใช้ในการตรึงเซลล์

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

เพื่อศึกษาชนิดของวัสดุและวิธีในการตรึงเซลล์ยีสต์และปรสิต *Cryptocaryon irritans* เพื่อตายไม่ให้หลุดออกมาในน้ำ

ขอบเขตของโครงการวิจัย

เซลล์ที่นำมาตรึงได้แก่เซลล์ยีสต์ *Pichia* sp. และปรสิต *Cryptocaryon irritans* ระยะ theront โดยใช้เทคนิคการตรึงเซลล์แบบห่อหุ้ม (encapsulation)

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 การตรึง (Immobilization)

การพัฒนาเทคนิคการตรึงในเริ่มแรกนั้นได้มีการใช้อย่างกว้างขวางทางด้านเอนไซม์เทคโนโลยี ซึ่งเป็นการนำเอนไซม์ที่มีความสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดี (activity) และมีความเสถียรสูงมาตรึงแทนการใช้เอนไซม์อย่างอิสระ เพื่อให้ง่ายต่อการนำไปใช้ในอุตสาหกรรม เพราะเอนไซม์ถูกยึดไว้จึงสามารถใช้ได้ในรูปของของแข็ง และสามารถแยกผลิตภัณฑ์ออกได้ง่าย ซึ่งในช่วงเวลา 10 ปีนี้ ได้มีการใช้เอนไซม์ตรึงในอุตสาหกรรมอาหารและยา เช่น การตรึง glucose isomerase เพื่อผลิตกลูโคส-ฟรักโตสไซรัป การตรึง β -galactosidase เพื่อผลิตกลูโคส-กาแลคโตสไซรัป การตรึง lipase เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมยา และเครื่องสำอาง เป็นต้น ข้อดีของการใช้เอนไซม์ตรึง ได้แก่

1. สามารถนำกลับมาใช้ได้อีก ทำให้ลดต้นทุนในการผลิต
2. สามารถควบคุมความเสถียรของเอนไซม์ รวมทั้งการใช้งานเอนไซม์ตรึงได้ต่อเนื่องและมีประสิทธิภาพ

3. สามารถแยกผลิตภัณฑ์ได้ง่ายขึ้น

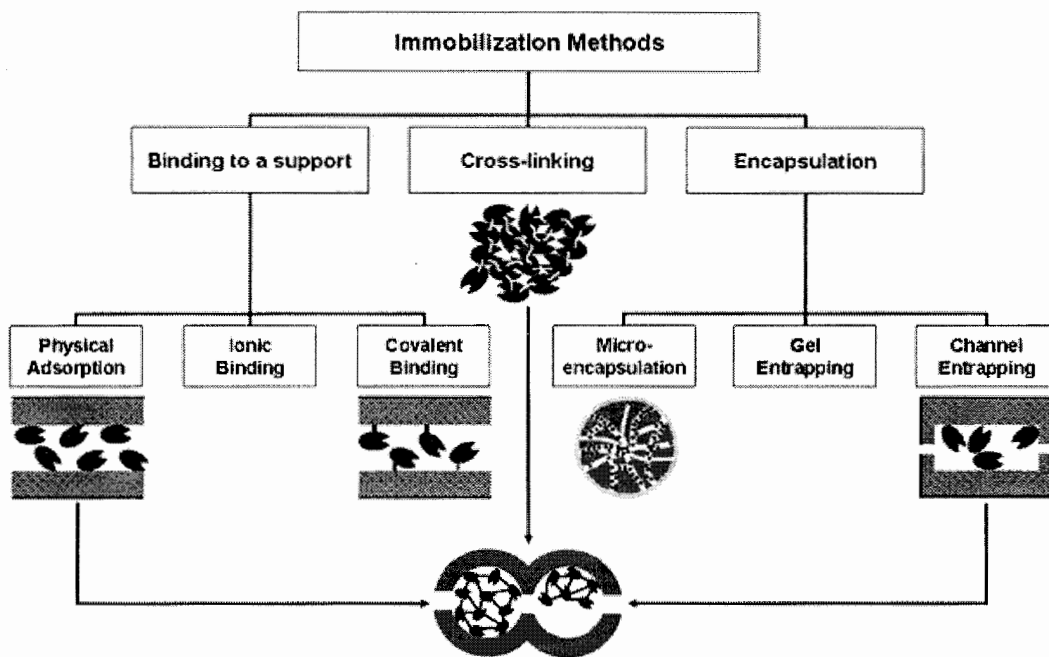
อย่างไรก็ตามการใช้เอนไซม์ตรึงมีข้อจำกัดในเรื่องของเอนไซม์ที่ใช้ส่วนใหญ่เป็นเอนไซม์ที่ผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ซึ่งต้องใช้เวลา และมีค่าใช้จ่ายสูง ในบางกรณีเอนไซม์ที่บริสุทธิ์มีความเสถียรต่ำ และอาจต้องการโคแฟกเตอร์ (cofactor) เพื่อช่วยในการเร่งปฏิกิริยาได้เต็มประสิทธิภาพ ทำให้ผลผลิตที่ได้ต่ำไปด้วย ผลิตภัณฑ์บางชนิดต้องการใช้เอนไซม์หลายชนิดในกระบวนการผลิต ดังนั้นเอนไซม์บริสุทธิ์จึงไม่เหมาะที่จะใช้ในระดับอุตสาหกรรม เพื่อที่จะแก้ไขปัญหานี้แนวคิดเรื่องการตรึงเซลล์ (immobilized cells) ไวบนสารพาหะที่เป็นของแข็งได้ถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรม (Buchholz และคณะ, 2012)

การตรึงเซลล์ คือ การจำกัดขอบเขตของจุลินทรีย์ให้อยู่ที่บริเวณใดบริเวณหนึ่ง โดยจุลินทรีย์ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ และเซลล์จุลินทรีย์ไม่สูญเสียคุณสมบัติการทำงาน และยังสามารถนำเซลล์กลับมาใช้ใหม่ได้อย่างต่อเนื่อง สภาพของเซลล์ที่ถูกตรึงนั้นอาจจะกำลังเจริญ กำลังพักตัวหรือตายก็ได้ ในกรณีที่นำเซลล์มีชีวิตมาตรึงนั้น ถ้าเซลล์ผลิตเอนไซม์ได้หลายชนิดจะทำให้ได้เซลล์ตรึงที่ประกอบด้วยเอนไซม์ผสม ซึ่งมีประโยชน์ในกระบวนการหมักที่ต้องอาศัยเอนไซม์หลายชนิด (multienzyme

systems) รวมทั้งไม่ต้องใช้โคเอนไซม์ (coenzyme) หรือโคแฟกเตอร์ และสามารถประยุกต์ใช้การตรึงเซลล์หลายชนิดไว้ด้วยกันได้ (ภาวิณี, 2531; สมใจ, 2550)

2.2 เทคนิคการตรึงเซลล์

วิธีการตรึงเซลล์หรือเอนไซม์แบ่งได้เป็น 3 วิธีใหญ่ๆ ดังแสดงในภาพที่ 2.1



ภาพที่ 2.1 รูปแบบการตรึงเซลล์ด้วยวิธีต่างๆ (Hartmann และคณะ, 2010)

1) การตรึงเซลล์แบบยึด (Binding to a support)

เป็นวิธีตรึงเซลล์ที่ง่ายที่สุด ซึ่งแบ่งย่อยได้เป็น 3 วิธี คือ

ก) การดูดติด (Physical adsorption) เป็นการตรึงเซลล์ไว้กับวัสดุที่มีรูพรุนและไม่ละลายน้ำ มีการประยุกต์ใช้ทั้งในห้องปฏิบัติการและในอุตสาหกรรม

ข) การ ยึดเซลล์ไว้กับตัวกลาง ด้วยพันธะไอออนิก โดยอาศัยหลักการพื้นฐานของผนังเซลล์ของแบคทีเรียหรือยีสต์ที่ประกอบด้วย diaminopimelic acid และ hexosamines ซึ่งสามารถเกิดพันธะไอออนิกกับสารพาหะได้ ความสามารถในการดูดซับขึ้นอยู่กับชนิด ขนาด และอายุของเซลล์ รวมทั้งปัจจัยแวดล้อมทางเคมีที่อาจมีผลต่อการหลุดของเซลล์กับสารพาหะ สารพาหะที่ใช้ยึดต้องไม่ละลาย

น้ำ เช่น EDTA เรซินแลกเปลี่ยนประจุ พอลิไวนิลคอลลอยด์ เป็นต้น สารที่ใช้เป็นตัวดูดซับเซลล์ที่มาจากธรรมชาติ ได้แก่ พอลิแซ็กคาไรด์ที่ไม่ละลายน้ำ เช่น อนุพันธ์ของเซลลูโลส เดกซ์แทรน และอะกาโรส เป็นต้น ส่วนโปรตีน เช่น เจลาติน และอัลบูมิน การเลือกใช้สารพาหะต้องคำนึงถึงความสามารถในการเกาะยึด และไม่ทำให้เซลล์สูญเสียกิจกรรม เซลล์บางส่วนอาจหลุดได้เพราะไม่มีการใช้สารอื่นช่วย อาศัยเพียงพันธะไฮโดรเจนหรือแรงแรงแควเตอร์วัลส์ และการตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้บางครั้งใช้การยึดเกาะด้วยแรงโคเวเลนต์ ซึ่งเป็นการตรึงเซลล์โดยใช้ประจุร่วมกันระหว่างสารพาหะ

ค) การตรึงเซลล์ด้วย พันธะโคเวเลนต์ (Covalent binding method) วิธีนี้ค่อนข้างรุนแรง เนื่องจากการสร้างพันธะโคเวเลนต์ตามปกติจำเป็นต้องใช้สารพาหะที่มีการดัดแปลงโดยใช้สารเคมี ซึ่งมักจะมีความเป็นพิษ อาจทำให้เซลล์มีความสูญเสียได้ แต่เซลล์จะเชื่อมอยู่กับผิวหน้าของตัวนำอย่างสม่ำเสมอ มีความคงตัวดี และมีการหลุดของเซลล์ ออกจากสารพาหะ ได้น้อย ดังนั้นวิธีนี้จึงเหมาะสำหรับการตรึงเซลล์ในกรณีที่ต้องการใช้เอนไซม์ในกระบวนการผลิต

2) การตรึงเซลล์แบบเชื่อมไขว้ (Cross-linking)

เป็นการเชื่อมเซลล์จุลินทรีย์เข้าด้วยกันโดยมีพันธะทางเคมีเกิดขึ้นระหว่างเซลล์หรือโมเลกุลกับสารพาหะ ส่วนใหญ่สารพาหะใช้สารพวก bi หรือ multifunctional reagent เช่น glutaraldehyde และ toluene diisocyanate เป็นต้น วิธีนี้เซลล์ไม่ได้ถูกยึดไว้กับสารพาหะหรือถูกห่อหุ้มอยู่ภายในเจลหรือเยื่อเลือกผ่าน แต่เป็นการเชื่อมเซลล์เข้าด้วยกันโดยใช้สารเคมี ซึ่งอาจทำให้เซลล์ตายได้ ดังนั้นจึงเหมาะสำหรับนำไปใช้ในกลไกที่มีปฏิกิริยาเดียว

3) การตรึงเซลล์แบบการห่อหุ้ม (Encapsulation)

การตรึงเซลล์โดยวิธีการห่อหุ้มโดยทั่วไปจะหมายถึงการดักจับและล้อมรอบโมเลกุลของเซลล์หรือเอนไซม์ไว้ภายในช่องระหว่างการเชื่อมไขว้ของตาข่ายพอลิเมอร์ วิธีนี้เป็นที่นิยมและประสบความสำเร็จมากที่สุด เนื่องจากใช้ได้กับเซลล์เกือบทุกชนิด เทคนิคในการตรึง (encapsulation) สามารถทำได้โดยเทคนิคทางเคมี เช่น coacervation, liposome และเทคนิคทางกายภาพ เช่น spray drying, extrusion, spray chilling และ cooling, fluidized bed coating และ freeze drying (Porzio, 2004) สารพาหะที่นิยมใช้ในการตรึงเซลล์ด้วยวิธีห่อหุ้ม ได้แก่ สารพวก biochemically inert hydrogel โดยใช้หลักการเกิดเจลซึ่งทำให้เกิดโครงร่างสามมิติที่มีลักษณะเป็นรูพรุน และกลไกในการเกิดเจลนั้นมีหลายแบบ ได้แก่ Covalent binding เช่น การพอลิเมอไรซ์ของพอลิอะคริลามิด์ Ionic forces เช่น แคลเซียมอัลจิเนต (calcium alginate) Precipitation โดย pH อุณหภูมิ หรือโดยการเปลี่ยนแปลงตัวทำละลาย (solvent change) เช่น คอลลาเจน (collagen) คาร์ราจีแนน (carragenan)

การตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้แบ่งได้เป็น 3 แบบ ดังนี้

การตรึงเซลล์หรืออนุภาคไว้ในรูปของแคปซูล (Microencapsulation) หมายถึงกระบวนการที่ของเหลวหรืออนุภาคถูกห่อหุ้มด้วยพอลิเมอร์เป็นชั้นบางๆ เกิดเป็นไมโครแคปซูลซึ่งมีขนาดประมาณ 1-1,000 ไมครอน ชั้นพอลิเมอร์บางๆ นี้เปรียบได้กับการห่อหุ้มเซลล์ไว้ใน semipermeable membrane เช่น คอลโลอิดีเยน (collodian) หรือซิลิโคน (silicone) ซึ่งป้องกันการซึมผ่านของเซลล์ได้แต่ยอมให้สับสเตรทหรือผลผลิตซึมผ่านได้อย่างอิสระ จึงเป็นตัวป้องกันหรือปลดปล่อยสารสำคัญภายในออกมาเมื่อเราต้องการ

ขั้นตอนสำคัญๆ ทางเทคนิคไมโครเอนแคปซูลชัน คือ 1. ทำให้เกิดฟิล์มบางๆ รอบอนุภาคหรือทำให้เกิดเป็นอิมัลชัน 2. ทำให้ฟิล์มนั้นแข็งแรง 3. แยกแคปซูลและทำให้แห้ง ไมโครแคปซูลมักจะมีลักษณะเป็นทรงกลม อยู่ในรูปผงแห้งที่สามารถนำไปทำผลิตภัณฑ์ต่างๆ ได้ดี สารสำคัญที่อยู่ภายในไมโครแคปซูลจะถูกเรียกว่า คอร์ (core) และผนังบางๆ ที่ห่อหุ้มสารสำคัญจะถูกเรียกว่า วอลล์ (wall) ลักษณะของวอลล์ (wall) ที่ดีควรจะต้องมีความสามารถแผ่เป็นแผ่นฟิล์มบางๆ ได้ มีความยืดหยุ่นและแข็งแรงเพียงพอ มีความสามารถทำให้เกิดอิมัลชัน มีคุณสมบัติในการยึดติดกับคอร์ (core) ได้ดี โดยไม่ทำปฏิกิริยากัน มีความเหนียวดีเมื่ออยู่ในสถานะของแข็งต้องไม่ขึ้นง่าย นอกจากนี้ยังต้องมีความคงตัวสูง เพื่อป้องกันคอร์ (core) จากสภาพแวดล้อมต่างๆ และ ปลดปล่อยคอร์ (core) ได้ตามวัตถุประสงค์ของการใช้งาน สารที่สามารถนำมาทำเป็นวอลล์ (wall) ได้มีมากมายหลายชนิดทั้งชนิดที่ได้จากธรรมชาติ เช่น pectin, chitosan, gum arabic, gelatin และ ชนิดที่เป็นสารสังเคราะห์ เช่น polyvinyl acetate, ethyl cellulose, synthetic wax เป็นต้น (ฉันทรา, 2549)

การตรึงเซลล์แบบการดักจับ (Gel Entrapping)

การตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้ใช้ปฏิกิริยาที่ต่างกัน ได้แก่ การใช้สารเคมีเชื่อม เป็นโครงข่ายพอลิเมอร์แล้วกัก เซลล์จุลินทรีย์เข้าไว้ด้วยกัน การเชื่อมเซลล์กับสาร พาหะ โดยใช้สารเคมีพวก glutaraldehyde toluene ดูดเกาะเซลล์ที่ผิวหน้าสารยึดเกาะ การเชื่อมเซลล์กับเซลล์ หรือการดักจับเซลล์ด้วยสารพาหะที่มีลักษณะเป็นเจล ซึ่งอาจเป็นสารอินทรีย์ที่พบในธรรมชาติหรือได้จากการสังเคราะห์

การตรึงเซลล์โดยการห่อหุ้มเซลล์ไว้ในช่องว่างสามมิติ (Channel entrapping)
โดยเซลล์จะอยู่ภายในช่องว่างของสายโซ่พอลิเมอร์

ในการแบ่งประเภทของเทคนิคการตรึงเซลล์แบบดักจับโดยใช้กลไกการเกิดเจล สามารถสรุปได้ดังแสดงไว้ในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 วิธีดักจับเซลล์ด้วยการทำให้เกิดเจลโดยพอลิเมอร์ของสารอินทรีย์

กลไกการเกิดเจล	พอลิเมอร์
พอลิเมอไรเซชัน	พอลิเอคริเลไมด์ พอลิเมทาโครเลท
การเชื่อมไข้ว	พรีพอลิเมอร์ โปรตีน
พอลิคอนเดนเซชัน (polycondensation)	พอลิยูเรเทน เอพอกซีเรซิน
การเกิดเจลเนื่องจากความร้อน	คอลลาเจน เจลาติน เอการ์/อคาโรส เคปปาร์-คาร์ราจีแนน
การเกิดเจลแบบไอออนโทปิก (Ionotropic gelation)	อัลจิเนต ไคโทซาน
การตกตะกอน	เซลลูโลส เซลลูโลสไตรอะซิเตต

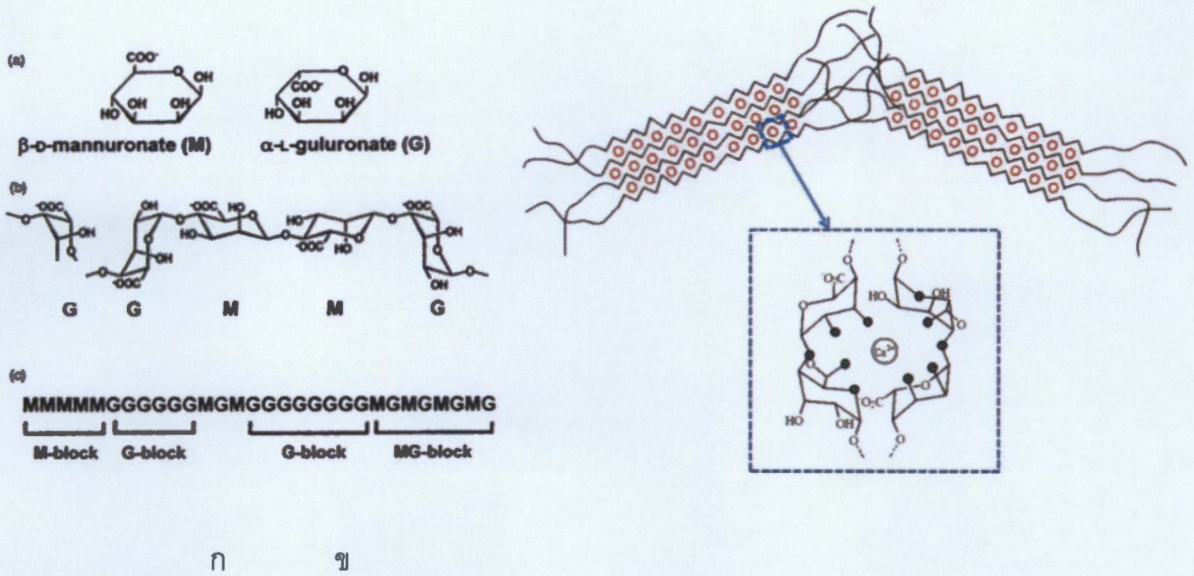
2.3 การตรึงเซลล์ด้วยแคลเซียมอัลจิเนต

พอลิเมอร์ธรรมชาติบางชนิดสามารถทำให้เป็นเจลได้เมื่อมีการเชื่อมไข้วเข้ากับไอออนของโลหะ เรียกการเกิดเจลแบบนี้ว่าไอออนโทปิก ในการดักจับด้วยการเกิดร่างแหไอออนิก (Entrapment by ionic network formation) ต้องการไอออนที่มีประจุสูงอยู่ในสารละลายระหว่างการเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันของพอลิอิเล็กโทรไลต์ (polyelectrolyte) ไอออนของโลหะที่มีประจุสูงที่นิยมใช้ได้แก่ Ca^{2+} และ K^+ ส่วนประจุลบได้แก่พอลิฟอสเฟต ซึ่งในทางทฤษฎี Al^{3+} และ Fe^{3+} ก็สามารถใช้ได้แต่มีการควบคุมการใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องสำอาง ดังแสดงในตารางที่ 2.2 เนื่องจากเทคนิคนี้สามารถทำได้ง่าย ใช้สารที่ไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์ และสภาวะที่ใช้ในการเตรียมเจลโดยกลไกนี้ไม่รุนแรง จึงนิยมใช้สำหรับตรึงเซลล์ พอลิเมอร์ที่นิยมใช้ได้แก่ อัลจิเนต และไคโทซาน โดยเฉพาะอย่างยิ่งการดักจับเซลล์ด้วยการใช้อัลจิเนตเป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากที่สุด (Calinescu และคณะ, 2012; Duarte และคณะ, 2013)

ตารางที่ 2.2 ไอออนิกพอลิแซ็กคาไรด์และไอออนสำหรับสำหรับการเกิดเจลแบบเชื่อมไขว้

ไอออนของสารพาหะ	สารพาหะ	เคาน์เตอร์ไอออน
R-COO-	อัลจิเนต	Ca ²⁺ (Al ³⁺ , Zn ²⁺ , Fe ²⁺ , Fe ³⁺)
	เพคติน	Ca ²⁺ (Al ³⁺ , Zn ²⁺ , Mg ²⁺)
	คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส	Ca ²⁺ (Al ³⁺)
R-SO ₃ ²⁻	คาราจีแนน	Ca ²⁺ , K ⁺
R-NH ₃ ⁺	ไคโตแซน	พอลิฟอสเฟต

ไซเดียมอัลจิเนตเป็นพอลิแอนไอออน (polyanion) ที่ประกอบด้วย D-mannuronic acid และ L-guluronic acid สกัดได้จากสาหร่ายทะเลสีน้ำตาล ไซเดียมอัลจิเนตสามารถเกิดเป็นเจลได้เมื่ออยู่ในสารละลายที่มีไอออนของโลหะ ที่เป็นพอลิวาเลนท์ เช่น Al³⁺, Ba²⁺ และ Ca²⁺ ดังแสดงในภาพที่ 2.2 การตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้ทำได้ง่ายและรวดเร็ว ไม่ต้องใช้เครื่องมือที่มีความซับซ้อน แต่การตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้มีข้อควรระวังจากการสลายตัวของเม็ดเจล ซึ่งสารที่สามารถทำปฏิกิริยากับแคลเซียมไอออนแล้วทำให้เม็ดเจลละลายได้แก่ ฟอสเฟต ซิเตรท Mg²⁺ หรือ K⁺ เป็นต้น การตรึงเซลล์ด้วยแคลเซียมอัลจิเนตสามารถทำได้โดยผสมสารแขวนลอยของเซลล์ลงในสารละลายไซเดียมอัลจิเนต แล้วนำไปหยดลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ จะเกิดแคลเซียมอัลจิเนตเจลขึ้นทันที หลังจากนั้นแช่เจลไว้ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์อย่างน้อย 20 นาที เพื่อให้เกิดเจลอย่างสมบูรณ์



ภาพที่ 2.2 โครงสร้างทางเคมีและการเกิดพอลิเมอร์ของอัลจิเนต

ก) โครงสร้างทางเคมีของอัลจิเนต (ที่มา : Phillips และ Williams, 2000)

ข) การเกิดเจลแบบไอโอโนโทรปิก ระหว่างหมู่ประจุลบของอัลจิเนต (COO^-) กับประจุบวกของโลหะแคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) (<http://www.intechopen.com/books/progress-in-molecular-และ-environmental-bioengineering>)

2.4 การประยุกต์ใช้เทคนิคการตรึงสารในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

การผลิตอาหารสำเร็จรูปสำหรับสัตว์น้ำ การใช้เทคนิคการตรึงสารไว้ภายในเม็ดแคปซูลในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ถูกนำมาใช้ในกระบวนการผลิตอาหารเพื่อที่จะตรึงสารที่สำคัญไว้ภายในแคปซูลและไม่ให้สารเหล่านั้นรั่วไหลออกมาจากเม็ดอาหารและละลายในน้ำก่อนเวลาที่ต้องการ ในการอนุบาลลูกสัตว์น้ำวัยอ่อนใช้เทคนิคการตรึงในการผลิตอาหารสำเร็จรูปขนาดเล็กเพื่อให้สารอาหารคงสภาพเมื่ออยู่ในน้ำในระยะเวลาสั้นขึ้น โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อทดแทนหรือลดปริมาณการใช้อาหารมีชีวิตวัยอ่อนได้ในระยะเวลาที่เร็วขึ้น ซึ่งขนาดและชนิดของอาหารสำเร็จรูปที่ผลิตได้แตกต่างกันไปขึ้นกับเทคนิคการผลิต เช่น microsphere diets, microencapsulated diets หรือ microparticulated diets (Lazo, 2000; Teshima และคณะ, 2000; Koven และคณะ, 2001; Kolkovski, 2004)

การป้องกันและรักษาโรค ได้มีการใช้เทคนิคการตรึงสารในการพัฒนาวัคซีนรักษาโรคโดยวิธีการให้กินเพื่อลดการใช้สารเคมีในการรักษาโรค ซึ่งเทคนิคการให้ปลากินยาเพื่อเป็นการป้องกันโรคนั้นเป็นเทคนิคที่ดีในการเพาะเลี้ยง แต่อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพของยาที่ให้อาจลดลงได้เนื่องมาจากยาถูกย่อยเมื่ออยู่ในระบบทางเดินอาหารก่อนเวลาอันควร ดังนั้นเทคนิคการตรึงตัวยา หรือวัคซีน เพื่อ

ห่อหุ้มตัวยาไว้ภายในเม็ดแคปซูล (อาหาร) สามารถแก้ปัญหาเหล่านี้ได้ (Polk และคณะ, 1994) ซึ่งในขั้นตอนการผลิตอาหารสัตว์น้ำ มีวัตถุดิบหลายชนิดที่นำมาใช้ในกระบวนการเลี้ยงสัตว์ เช่น คาราจีแนน (Baskerville-Bridges และ Kling, 2000) เซลลูลอส (Baskerville-Bridges และ Kling, 2000; Kanazawa และคณะ, 1982 cited by Chu และ Ozkizilcik, 1999) โซเดียมอัลจิเนต (Lopez และคณะ, 1994) สารผสมระหว่างโซเดียมอัลจิเนตและโคโตแซน (Polk และคณะ, 1994) ซึ่งการตรึงสารโดยการใส่โซเดียมอัลจิเนต หรือของผสมระหว่างโซเดียมอัลจิเนตและโคโตแซนเป็นสารตรึง เป็นเทคนิคการผลิตที่ง่าย รวดเร็วและราคาไม่แพง นอกจากนี้แคปซูลที่ได้สามารถนำไปทำแห้ง บดละเอียดและผสมกับอาหารซึ่งเป็นการสะดวกในการนำไปใช้ต่อไป (Polk และคณะ, 1994)

2.5 อาหารและระบบภูมิคุ้มกันของปลา

สารอาหารที่ผสมในอาหารมีผลอย่างมากต่อการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในปลา (Waagbo, 1994) มีการวิจัยถึงชนิดและปริมาณสารอาหารต่อการต้านทานโรคของสัตว์น้ำมาเป็นระยะเวลาานาน Blazer (1992) ต่อมา Trichet (2010) ทบทวนงานวิจัยถึงบทบาทของสารอาหารหลักและสารอาหารปริมาณน้อยต่อระบบภูมิคุ้มกันของปลา สารอาหารหลักเหล่านี้ประกอบด้วย คาร์โบไฮเดรต โปรตีน กรดอะมิโน กรดไขมัน และสารอาหารปริมาณน้อย เช่น วิตามินซี วิตามินบี6 วิตามินอี วิตามินเอ และแร่ธาตุ เช่น ธาตุเหล็กและฟลูออไรด์ ซึ่งบทบาทของวิตามินและแร่ธาตุไม่ได้กระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยตรงแต่ช่วยเสริมการป้องกันโรคแต่ให้ระบบภูมิคุ้มกันทำงานได้เหมาะสมดียิ่งขึ้นไป (Grannam และ Schrock, 2001) สารอาหารและปริมาณอาหารที่ร่างกายได้รับมีผลต่อการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์บกและสัตว์น้ำ ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม สิ่งหนึ่งที่บ่งบอกว่าสัตว์ได้รับอาหารที่มีคุณค่าทางอาหารไม่เหมาะสม (malnutrition) คือระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์เหล่านั้นลดลง (immunosuppression) (Hudson และคณะ, 1974 cited by Erdal, และคณะ, 1991) ในลักษณะเดียวกันสัตว์น้ำที่กินอาหารที่มีคุณค่าทางอาหารเหมาะสมและได้รับในปริมาณเพียงพอ สัตว์น้ำนั้นแข็งแรง สมบูรณ์ และสามารถต้านทานโรคได้ดีแสดงว่าระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์มีประสิทธิภาพสูง แต่เมื่อสัตว์น้ำได้รับอาหารไม่เหมาะสมต่อความต้องการมีผลให้ประสิทธิภาพของระบบภูมิคุ้มกันลดลง (Alcorn และคณะ, 2003) ดังนั้นสารอาหารที่ผสมในสัตว์น้ำ (nutritional status) จึงมีผลต่อระบบภูมิคุ้มกัน ดังเช่นการทดลองในกุ้งขาว *Litopenaeus vannamei* ที่ให้กินอาหารเป็นระยะเวลาหนึ่งหลังจากนั้นจึงอดอาหารเป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์ พบว่ากุ้งขาวมีภูมิคุ้มกันลดลงและผู้วิจัยสรุปว่าสารอาหารในสัตว์น้ำ (nutritional status) ก่อนอดอาหารมีผลอย่างมากต่อภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำ (Pascual, และคณะ, 2006)

2.6 บทบาทของไขมันและกรดไขมันต่อระบบภูมิคุ้มกันสัตว์น้ำ

การศึกษาบทบาทของไขมันและกรดไขมันต่อภูมิคุ้มกันของมนุษย์ (Calder 2007) และสัตว์น้ำ (Balfry และ Higgs, 2001) ได้มีรายงานไว้ว่ากลไกการทำงานของกรดไขมันที่อาจมีผลในการต้านทานโรคและมีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำคล้ายคลึงกับในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม กล่าวคือ

1) กลไกการทำงานในด้านองค์ประกอบไขมันของเซลล์เมมเบรนฟอสโฟลิปิดของเม็ดเลือดขาว เนื่องมาจากการตอบสนองของภูมิคุ้มกันเกี่ยวข้องกับกิจกรรมการทำงานบนเซลล์เมมเบรนของเม็ดเลือดขาว (e.g. phagocytosis, antigen-antibody binding, activation steps involving cytokine production)

2) กรดไขมันอาจไปเปลี่ยนแปลงกลไกการสื่อสาร (signal transduction) ที่เกี่ยวข้องกับ protein kinase C

3) องค์ประกอบไขมันในอาหารอาจมีผลต่อการต้านทานโรคโดยทางการผลิต eicosanoids จากกรดไขมัน arachidinic acid, eicosapentaenoic acid, docosahexaenoic acid และ dihomogamma - eicosatrienoic acid Eicosanoids products in fish e.g. lipoxins (LXA4, LXB4), leucostrienes (LTB4, LTB5), prostaglandins (PGE2, PGE3), thromboxanes (TX) (Balfry และ Higgs, 2001)

จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้นจะเห็นได้ว่าไขมันมีบทบาทอย่างมากต่อระบบภูมิคุ้มกันเพราะนอกจากบทบาทความสัมพันธ์ (interaction) ระหว่างไขมันในอาหารและระบบภูมิคุ้มกันแล้ว ไขมันยังเป็นองค์ประกอบในระดับเซลล์ (cellular level) ดังนั้นในเม็ดเลือดขาว (lymphocytes) จึงมีกรดไขมันที่จำเป็นและไม่จำเป็นต่อร่างกายเป็นองค์ประกอบ (Gurr, 1983) เนื่องจากว่าคุณสมบัติหนึ่งของไขมันทำให้เซลล์มีความยืดหยุ่นและมีคุณสมบัติในการให้สารซึมผ่านได้ (fluidity และ permeability) ดังนั้นกิจกรรมต่างๆของเซลล์เมมเบรนที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ membrane receptors, และ the binding of mitogens, antigens, และ soluble mediators จึงเกี่ยวข้องกับกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์ (Johnston, 1988) ในน้ำที่มีอุณหภูมิต่ำปริมาณกรดไขมันกลุ่ม n-3 FAs ที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์เมมเบรนเพิ่มมากขึ้น (Hazel, 1979 cited by Erdal, และคณะ, 1991) ซึ่งการเพิ่มขึ้นของกรดไขมันในเซลล์เมมเบรนเป็นการเพิ่มความยืดหยุ่นของเซลล์เมมเบรน (Bakhle, 1983 cited by Erdal, และคณะ, 1991) ซึ่งกรดไขมันเหล่านี้เป็นสื่อกลางที่สำคัญในการตอบสนองต่อการ inflammatory และในการควบคุมการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน (immune response) Schroit และ Gallily (1979) อธิบายว่าการยืดหยุ่นของเซลล์เมมเบรน (fluidity membrane) จากการที่มีไขมัน

เป็นองค์ประกอบที่มีผลให้การเคลื่อนที่ การกระจายตัว (diffusability) ในเมมเบรนสะดวกรวดเร็วขึ้นซึ่งกระบวนการเหล่านี้มีความจำเป็นในกระบวนการทำลายเชื้อโรคของ macrophages (ingestion process of macrophages) ดังนั้นปลาเรนโบว์เทราท์ที่กินอาหารที่มี PUFA จึงสามารถตอบสนองต่อแบคทีเรียได้ดี แต่อย่างไรก็ตามถ้าในอาหารมี PUFA มากเกินไปจากความต้องการก็มีผลให้การตอบสนองต่อภูมิคุ้มกันของปลาลดลง โดยที่อาหารมีกรดไขมัน n-3PUFAs ในปริมาณมากเกินไป จะไปลดบทบาทการทำงานของ thymus และ ม้าม (spleen) และระงับการตอบสนองของ lymphocyte (Erdal และคณะ, 1991)

จากการทบทวนเอกสารงานวิจัยของ Gross และ Newberne, 1980 (cited by Kiron และคณะ, 1995) ระบุว่าส่วนหนึ่งของ PUFA ถูกนำไปใช้ในกลไกควบคุมภูมิคุ้มกันในม้าม (spleen) หรือนำไปใช้โดยตรงทาง lymphocytes หรือโดยทางอ้อมโดยการเป็นสารตั้งต้นของการสังเคราะห์ฮอร์โมนพอสตาแกรนดิน ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบไขมันในอาหารอาจมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงชนิดและระดับการผลิตฮอร์โมนกลุ่ม eicosanoid ซึ่งมีผลต่อสุขภาพสัตว์ ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม หนูทดลอง (rodents) ที่ให้กินอาหารเสริมกรดไขมัน n-3 PUFAs ทำให้ภูมิคุ้มกันลดลง กิจกรรมการทำงานของ lymphocyte ช้าลง (Jeffery และคณะ, 1996) หนูจึงมีความต้านทานโรคลดลง (Change และคณะ, 1992) ซึ่ง Costa Rosa และคณะ, 1996 สรุปว่า immunosuppressive ของหนู (rats) ที่เพิ่มขึ้นหลังจากที่ให้กินอาหารที่มี n-3 PUFAs ซึ่งการเพิ่มขึ้นของ immunosuppressive นี้อาจส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการเมตาบอลิซึมของ glucose และ glutamine และมีผลกระทบต่อการทำงานของ macrophages และ lymphocytes สำหรับในสัตว์น้ำผลของกรดไขมัน n-3 PUFAs ในอาหารต่อการตอบสนองระบบภูมิคุ้มกันของปลายังไม่ไปในแนวทางเดียวกันเช่นเดียวกับในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ซึ่งผลของกรดไขมันต่อระบบภูมิคุ้มกันมีทั้งการกระตุ้นและการลดประสิทธิภาพระบบภูมิคุ้มกันของปลา ทั้งนี้อาจเกี่ยวข้องกับปัจจัยกลไกต่างๆที่มีผลในการเปลี่ยนแปลงในการต้านทานโรคของปลา เช่น ฤดูกาล สารอาหาร ฮอรโมน สิ่งแวดล้อม (Fletcher 1986) แหล่งของกรดไขมัน (Li และคณะ, 1994) ปริมาณไขมัน (Kiron และคณะ, 1995) อัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่าง n-3 PUFAs และ n-6 PUFAs (Fracalossi และ Lovell, 1994) ความต้องการกรดไขมัน n-3 PUFA ที่แตกต่างกันในปลาแต่ละชนิด (Gannam และ Schrock, 2001) อุณหภูมิน้ำที่เลี้ยงปลา โดยปลาที่เลี้ยงในน้ำที่มีอุณหภูมิต่ำมีประสิทธิภาพในการต้านทานโรคลดลง (Waagbo และคณะ, 1993a) โดยอุณหภูมิมีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันอาจจะเกี่ยวเนื่องกับบทบาทของ n-3 PUFAs ในการรักษาความยืดหยุ่นของเมมเบรน (maintaining membrane fluidity) ซึ่งเป็นสิ่งจำเป็นในขั้นตอนการ ingestion stage of phagocytosis (Fracalossi และ Lovell, 1994)

2.7 ผลของกรดไขมันในอาหารต่อระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำ

ไขมันและกรดไขมันในอาหารมีความสำคัญต่อระบบภูมิคุ้มกันโรคของปลาและมีผลต่อการหมุนเวียนของแอนติบอดีในปลา (Blazer และคณะ, 1989) ในการศึกษาประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อโรคของ macrophage ในปลาเรนโบว์เทราท์ในห้องปฏิบัติการลดลงเมื่อปลาเรนโบว์เทราท์กินอาหารที่ไม่มีกรดไขมัน แต่ปลาเรนโบว์เทราท์ที่กินอาหารที่มี linolenic acid และ n-3 HUFA มีผลให้ macrophage มีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อโรคได้ดีขึ้น ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้ไม่พบว่าระบบภูมิคุ้มกันของปลาเรนโบว์เทราท์มีประสิทธิผลลดลง (immunosuppressive) เนื่องจากจากว่าในอาหารปลาเรนโบว์เทราท์มีกรดไขมัน n-3 HUFA ประมาณ 10% ซึ่งเป็นระดับที่ไม่มากเกินไปจากความต้องการของปลาเรนโบว์เทราท์ (Kiron และคณะ, 1995) แต่ระดับกรดไขมันในอาหารที่มากเกินไปความต้องการ มีผลให้ต่อระบบภูมิคุ้มกัน ดังเช่นในการศึกษาของ Erdal และคณะ (1991) ที่ให้ปลาแอตแลนติกแซลมอน ระยะวัยรุ่น (*Salmo salar*) กินอาหารที่มี n-3 PUFAs และวิตามินซีสูงเกินกว่าความต้องการ (ระดับกรดไขมันที่เหมาะสมของปลากลุ่มนี้คือ 0.5 เปอร์เซ็นต์ในอาหารหรือ 10 เปอร์เซ็นต์ในปริมาณไขมันในอาหาร (Watanabe, 1982) เป็นระยะเวลา 52 และ 72 วัน หลังจากนั้น นำไปทดสอบเชื้อ *Vibrio salmonicida* พบว่าปลาที่กินอาหารที่มี n-3 PUFAs สูงเกินความต้องการมีแนวโน้มทำให้มีระบบภูมิคุ้มกันลดลง (immunosuppressive) และมี antibody titers ลดลง ในทำนองเดียวกัน ปลาแซลแนลแคทฟิช (*Ictalurus punctatus*) ที่กินอาหารที่มีปริมาณไขมัน 2 เปอร์เซ็นต์ของวัตถุดิบอาหาร จากแหล่งไขมัน 3 ชนิด ประกอบด้วยไขมันวัว (beef tallow) ที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยวเป็นองค์ประกอบสูง (มากกว่า 40 เปอร์เซ็นต์แต่ไม่มีกรดไขมัน n-3 HUFA) น้ำมันปลาแคทฟิชที่เหลือจากโรงงานผลิตอาหาร (catfish offal) มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยวเป็นองค์ประกอบสูง (มากกว่า 40 เปอร์เซ็นต์ และมีกรดไขมัน n-3 HUFA ประมาณ 2 เปอร์เซ็นต์) หรือน้ำมันปลาเมนฮาเดน (menhaden oil) ที่มีกรดไขมัน n-3 HUFA เป็นองค์ประกอบมากกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ หลังจากการทดลองระยะเวลา 8 และ 10 สัปดาห์ หลังจากนั้นนำปลาทดสอบกับเชื้อ *Edwardsiella ictaluri* เป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์ พบว่าปลาแซลแนลแคทฟิชที่กินอาหารที่มีน้ำมันปลาเมนฮาเดนเป็นแหล่งไขมันรอดตายต่ำที่สุดและปลาที่มีความต้านทานต่อเชื้อ *E. Ictaluri* น้อยที่สุด ซึ่งคณะผู้วิจัยสรุปว่าอาจเป็นผลมาจากสัดส่วนระหว่างกรดไขมัน n-3 ต่อ n-6 ในอาหารที่มีน้ำมันปลาเมนฮาเดนเป็นแหล่งพลังงานนั้นไม่เหมาะสมต่อปลาแซลแนลแคทฟิช เนื่องจากปลาชนิดนี้เป็นปลาน้ำจืดที่ต้องการทั้งกรดไขมันกลุ่ม n-3 และ n-6 เพื่อการเจริญเติบโต (Li และคณะ, 1994) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Fracalossi และ Lovell (1994) ที่พบว่าปลาแซลแนลแคทฟิช (*I. punctatus*) ที่กินอาหารที่มีน้ำมันเมนฮาเดน (มี n-3 HUFA สูง) หรือกินอาหารที่มีน้ำมันลินซีด (มี C18:3n-3 สูง) เป็นแหล่งพลังงานนั้น ปลาเหล่านี้ติดเชื้อ

แบคทีเรีย *Edwardsiella ictaluri* ง่ายขึ้นและมีความต้านทานโรคลดลง ซึ่ง Li และคณะ, 1994 แนะนำ กลไกที่ปลาแซลมอนแอตแลนติกกินอาหารที่มี n-3 PUFAs สูงและมีผลให้ immunosuppression อาจ เกี่ยวข้องกับกลไกการทำงานของ macrophages และ neutrophils และผลิต LTB4 ลดลงแต่ผลิต LTB5 เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ Blazer และคณะ (1989) ระบุว่าสัดส่วนระหว่างกรดไขมัน n-3 และ n-6 มีผล อย่างมากต่อการผลิตแอนติบอดี (antibody titres) ซึ่งปริมาณกรดไขมันในอาหารที่มากเกินไปกว่าความ ต้องการก็มีผลให้ประสิทธิภาพการทำงานของภูมิคุ้มกันลดลง จากรายงานวิจัยของ Thompson และ คณะ (1996) ศึกษาสัดส่วนของกรดไขมัน n-3 PUFA ต่อ n-6 PUFA ในอาหารต่อระบบภูมิคุ้มกันของ ปลาแอตแลนติกแซลมอน (*Salmo salar*) ซึ่งมีแหล่งไขมันจากน้ำมันปลาและดอกทานตะวันที่มี อัตราส่วนกรดไขมัน n-3 PUFA ต่อ n-6 PUFA เท่ากับ 5.2 และ 0.3 ตามลำดับ ซึ่งพบว่าปลา แอตแลนติกแซลมอนที่กินอาหารที่มีสัดส่วนของกรดไขมัน n-3 ต่อ n-6 PUFA ต่ำ มีความต้านทานโรค ได้ต่ำกว่าปลาที่กินอาหารที่มี n-3 ต่อ n-6 PUFA สูง โดยปลาแอตแลนติกแซลมอน มี lymphocytes response เพิ่มขึ้นและมีการรอดตายเพิ่มขึ้นหลังจากที่ challenge with *Aeromonas salmonicida* และ *Vibrio anguillarum*

Li และคณะ (1994) และ Fracalossi และ Lovell (1994) พบว่าปลาแซลมอนแอตแลนติกที่กิน อาหารที่มี n-3 PUFA สูง (น้ำมันปลามาเหนเดน oil) รอดตายน้อยหลังจากที่ challenge with *Edwardsiella ictaluri* ผลทางลบที่เกิดจากการเลี้ยงด้วยอาหารที่มี n-3 PUFA สูงในปลาแซลมอนแอตแลนติก แต่ไม่เกิดในปลาแซลมอน อาจจะเป็นเนื่องมาจากความต้องการกรดไขมัน n-3 PUFA ที่แตกต่างกันในปลา แต่ละชนิด (Gannam และ Schrock, 2001)

นอกจากนี้ Wu และ Chen (2012) ศึกษาสัดส่วนของกรดไขมันลิโนลิติก (n-3 PUFA) และกรด ไขมันลิโนลิติก (n-6 PUFA) ในอาหารปลาเก๋าระยะวัยรุ่น (*Epinephelus malabaricus*) ต่อการ ตอบสนองระบบภูมิคุ้มกัน พบว่าภูมิคุ้มกันชนิดไม่เฉพาะเจาะจงเพิ่มขึ้นเมื่อสัดส่วนของกรดไขมันลิโนลิติก ต่อกรดไขมันลิโนลิติกเพิ่มขึ้น และคณะผู้วิจัยสรุปว่ากรดไขมันลิโนลิติกและลิโนลิติกที่ระดับ 2% ใน อาหารหรือที่สัดส่วนระหว่างกรดไขมันลิโนลิติกต่อกรดไขมันลิโนลิติก 3:1 เป็นอัตราที่เหมาะสมต่อการ เจริญเติบโตและการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของปลาเก๋าระยะวัยรุ่น Kiron และคณะ (1995) รายงานว่ากรดไขมันที่จำเป็นสามารถเพิ่มการต้านทานโรคของปลาเรนโบว์เทราท์ (enhance immunocompetence) ศึกษาการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของปลาเรนโบว์เทราท์หลังจากให้ปลา กินอาหาร 4 และ 6 สัปดาห์ก่อนนำปลาไปเผชิญเชื้อโรค และทำการศึกษากการผลิตแอนติบอดี (antibody production) และการฆ่าแบคทีเรียของ macrophage ปลาที่กินอาหารที่มีกรดไขมันอิ่มตัว

และไม่อิ่มตัวและปลาที่กินอาหารที่ขาดกรดไขมัน พบว่าปลาเรนโบว์เทราท์ที่กินอาหารที่มี linoleic acid และ linolenic acid เป็นแหล่งไขมันสามารถต้านทานโรคได้ดีขึ้น (resisting pathogens) ในขณะที่ปลาเรนโบว์เทราท์ที่ได้รับอาหารที่มีกรดไขมัน n-3 PUFAs สูงเกินความต้องการ ปลาผลิตแอนติบอดีน้อยลง ทำให้ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อโรคลดลง ปลาต้านทานโรคลดลง

Wu และคณะ, (2003; 2012) รายงานว่าในปลาเก๋าระยะวัยรุ่น กรดไขมันดีเอสเอมีความสำคัญในการเจริญเติบโตมากกว่ากรดไขมันอีพีเอเนื่องจากว่ากรดไขมันดีเอสเอเพิ่ม phagocytic functions of leucocytes และ T cell proliferation ซึ่งอาหารที่มี n-3 HUFA ในปริมาณ 1-1.5% นั้นเพียงพอต่อความต้องการของลูกปลาเก๋าระยะวัยรุ่นในการเจริญเติบโตและปลามีระบบภูมิคุ้มกันที่เหมาะสมเมื่ออาหารมีกรดไขมันดีเอสเอในอาหารเพียงอย่างเดียวในปริมาณอย่างน้อย 0.75% (Williams, 2009) ในรายงานการศึกษาระบบภูมิคุ้มกันของปลากระพงขาว Japanese seabass, *Lateolabrax japonicas* ระยะวัยรุ่นที่เลี้ยงในกระชังในทะเลเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์และกินอาหารที่มีระดับกรดไขมันเออาร์เอหลายระดับ พบว่าปลากระพงขาวที่กินอาหารที่มีกรดไขมันเออาร์เอในอาหารที่ระดับปานกลาง 0.22-0.56% (ARA น้ำหนักแห้ง) สามารถต้านทานต่อความเครียดได้ดีขึ้นและมีการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันเพิ่มขึ้น (enhanced immune response) แต่เมื่อปลากระพงขาวได้รับอาหารที่มีกรดไขมันเออาร์เอในปริมาณมากขึ้น (1.33 และ 2.12%) มีผลให้ระบบภูมิคุ้มกันลดลง (Xu และคณะ, 2010) ซึ่งเกี่ยวข้องเนื่องกับการผันแปรของกรดไขมันและสัดส่วนของกรดไขมัน n-3 PUFA ต่อ n-6 PUFA หรือปริมาณ eicosanoids ที่สังเคราะห์จากเออาร์เอมีปริมาณมากเกินไป มีผลให้การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของปลาเปลี่ยนแปลงไป (Bell และคณะ, 1995)

ปลาแซลมอนแอตแลนติกที่เลี้ยงในน้ำที่มีอุณหภูมิ 20 °C และ 28 °C และปลากินอาหารมีน้ำมันปลาเมนฮาเดน น้ำมันถั่วเหลืองและไขมันวัวเป็นแหล่งไขมัน หลังจากนั้นฉีดวัคซีนเชื้อตาย (*E. ictaluri*) เข้าสู่ตัวปลา ซึ่งผู้วิจัยพบว่าปลาที่เลี้ยงในอุณหภูมิต่ำ (20 °C) การฉีดวัคซีนไม่ได้เพิ่ม intracellular killing ในปลาที่กินอาหารที่มีไขมันวัวเป็นแหล่งพลังงาน แต่การฉีดวัคซีนเพิ่ม intracellular killing ในปลากลุ่มที่กินอาหารที่มีน้ำมันปลาและน้ำมันถั่วเหลืองในอาหาร สำหรับปลาที่กินอาหารที่มีน้ำมันเมนฮาเดนเป็นแหล่งไขมัน มีการผลิตแอนติบอดีมากกว่าปลาที่กินอาหารที่มีน้ำมันถั่วเหลืองและไขมันวัวเป็นแหล่งพลังงาน ในขณะที่ปลาที่เลี้ยงในอุณหภูมิสูงขึ้น (28 °C) มีระบบภูมิคุ้มกันเพิ่มขึ้น ปลากลุ่มที่กินอาหารที่มีน้ำมันปลาเป็นแหล่งพลังงานมี killing index (percentage of phagocytized bacteria killed after 4 h) ดีที่สุด ในการเลี้ยงปลาทั้งสองอุณหภูมิ พบว่า bactericidal activity มีความสัมพันธ์ทางบวกกับระดับของกรดไขมันไม่อิ่มตัวโซ่ยาว (Sheldon และ Blazer, 1991)

ปลาแอตแลนติกแซลมอน (*Salmo salar*) ที่กินอาหารที่มีแหล่งไขมันต่างกันมีผลต่อระดับของ Ig ในซีรัม ปลาที่กินอาหารที่มีน้ำมันปลาจาก North Sea (Fosol) และน้ำมันดอกทานตะวันมีระดับของ Ig ในซีรัมมากแต่ปลาที่กินอาหารที่มีน้ำมันปลา Southern hemisphere (ที่มีกรดไขมันอีพีเอและดีเอชเอสูง) และน้ำมันลินซีด (C18:3n-3สูง) มีระดับของ Ig ในซีรัมต่ำ (Bell และคณะ, 1995)

2.8 ผลของกรดไขมันต่อระบบภูมิคุ้มกันในการต้านทานปรสิต

รายงานการศึกษาผลของกรดไขมันในอาหารปลาต่อการต้านทานปรสิตหลายชนิด เช่น การต้านทานพยาธิชนิด *Myxobolus* sp. ในปลาซีบรีม sharpsnout sea bream (*Diplodus puntazzo*) (Karagouni, และคณะ, 2005) การทดลองการฆ่าตัวอ่อน dog round worm (Kiuchi และคณะ, 1987) กรดไขมัน caprylic acid เป็นองค์ประกอบที่สำคัญในน้ำมันมะพร้าวและผลิตภัณฑ์จากนม เนย เป็นต้น ซึ่งมีรายงานการวิจัยว่าสามารถควบคุมปรสิตชนิด *Cryptocaryon irritans* ได้

Hirazawa, และคณะ (2001) ศึกษาผลของกรดไขมันที่มีความยาวโซ่ขนาดสั้น (C2 และ C4) และขนาดกลาง (C6- C10) ในการทดสอบกับ *Cryptocaryon irritans* ในห้องปฏิบัติการ ซึ่งคณะผู้วิจัยพบว่ากรดไขมัน C8 (caprylic acid) มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการต้านทานต่อ *C. irritans* โดย *C. irritans* ที่รักษาด้วย C8 caprylic acid หยุดการเคลื่อนที่เร็วกว่าการรักษาด้วยกรดไขมันชนิดอื่นๆ หลังจากนั้น จึงขยายผลการทดลองในปลา sea bream *Pargus major* ที่เลี้ยงในน้ำที่มีอุณหภูมิ 17°C เป็นระยะเวลา 60 วัน และ 24 °C เป็นระยะเวลา 22 วัน โดยให้ปลากินอาหารทดลองที่มีกรดไขมัน C8 (caprylic acid) ระดับความเข้มข้นต่างๆกัน (0, 1.25, 2.5 กรัม/กก. อาหาร หรือ 0, 37.5 และ 75 มก. C8 caprylic acid/ กกน้ำหนักตัว/วัน) ในอัตราการให้อาหาร 3 % น้ำหนักตัวเป็นระยะเวลา 5 วัน หลังจากนั้น ใส่ *C. irritans* ระยะ theronts ในตู้ทดลองจำนวน 100 theronts/ml โดยที่อุณหภูมิ 17°C เมื่อสิ้นสุดการทดลองไม่พบปลาตายในระหว่างการทดลอง แต่พยาธิบริเวณเหงือกและตาในปลาที่กินอาหารที่มีกรดไขมัน C8 caprylic acid ทุกความเข้มข้นมีจำนวนลดลง ในขณะที่การทดลองในอุณหภูมิ 24°C พบว่าปลาในทุกกลุ่มการทดลองตายในวันเดียวกันแต่พยาธิที่พบในปลาที่กินอาหารที่มีกรดไขมัน 75 มก. C8 caprylic acid/ กกน้ำหนักตัว/วันมีจำนวนลดลงกว่าที่พบปลาที่กินอาหารควบคุม แต่ในที่สุดปลาก็ตายทั้งหมดเนื่องจากการ heavily infection อย่างไรก็ตาม คณะผู้วิจัยสรุปว่ากรดไขมัน C8 (caprylic acid) มีผลในการต้านทานต่อพยาธิ *C. irritans* คณะผู้วิจัยคาดว่ากรดไขมัน caprylic acid เข้าสู่พยาธิโดยผ่านทางเลือด (peripheral blood) ของปลา หลังจากนั้นจึงมีผลต่อพยาธิที่ดูดกินเลือดปลา เนื่องมาจากการเมตตะบอลิซึมของปลาเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิน้ำสูงขึ้น จึง

เป็นไปได้ว่ากรดไขมัน caprylic acid อาจจะถูกเมตตะบอลไลต์อย่างรวดเร็วหลังจากกินอาหารเมื่ออุณหภูมิในน้ำสูง (24°C) ประสิทธิภาพในการต้านทานปรสิตจึงลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับปลาที่เลี้ยงที่อุณหภูมิต่ำ (17°C) ดังนั้นจึงอาจจะต้องพิจารณาเพิ่มปริมาณการใช้ caprylic acid มากขึ้น หรืออีกด้านหนึ่ง ในน้ำที่อุณหภูมิสูง (24°C) *C. irritans* มีความสมบูรณ์ แข็งแรงมากขึ้น สามารถขยายพันธุ์ได้รวดเร็วมากขึ้นจึงมีผลให้ประสิทธิภาพของกรดไขมัน caprylic acid ลดลง

บทที่ 3

อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีการทดลอง

1. ยีสต์ที่ใช้ในการทดลอง

ยีสต์ *Pichia* sp. เป็นชนิดที่แยกได้จากน้ำทะเลบริเวณชายหาดบางแสน จังหวัดชลบุรี
ได้รับความอนุเคราะห์จาก คุณ รัตนาภรณ์ ศรีวิบูลย์ ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา สถาบัน
วิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี

2. สารเคมี

2.1 สารเคมีวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี แบริดฟอร์ด (Bradford, 1976)

- 1) สารโปรตีนมาตรฐานใช้ bovine serum albumin (99%, Sigma, USA)
- 2) Comassie dye reagent (Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad, USA)

2.2 สารเคมีสำหรับวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Dintrosalicylic acid assay

- 1) DNS (3,5- dinitrosalicylic acid: $C_7H_4N_2O_7$)
- 2) โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทต (sodium potassium tartrate:
 $KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$)
- 3) โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide: NaOH)
- 4) กลูโคส (glucose: $C_6H_{12}O_6$)

2.3 สารเคมีวิเคราะห์กรดไขมันด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (GC Agilent Technologies 7820A)

- 1) สารมาตรฐานกรดไขมัน (PUFA) NO. 3, Menhaden oil, Supelco, USA
ประกอบด้วยกรดไขมันจำนวน 35 ชนิด
กรดบิวทริก (Butyric acid, C4:0)
กรดคาไพอิก (caproic acid, C6:0)
กรดคาไพริก (caprylic acid, C8:0)
กรดคาปริก (capric acid, C10:0)
กรดอันเดคาโนอิก (Undecanoic acid, C11:0)

- กรดลอริก (lauric acid, C12:0)
- กรดไตรเดคาโนอิก (Tridecanoic acid, C13:0)
- กรดไมริสติก (Myristic acid, C14:0)
- กรดไมริสโอยเลอิก (Myristoleic acid, C14:1)
- กรดเพนตะเดคาโนอิก (Pentadecanoic acid, C15:0)
- กรดซีส10 – เพนตะเดเคนอิก (Pentadecenoic acid, C15:1)
- กรดปาล์มิติก (palmitic acid, C16:0)
- กรดปาล์มิตโอยเลอิก (palmitoleic acid, C16:1)
- กรดเฮปาทเดคาโนอิก (heptadecaenoic acid, C17:0)
- กรดเฮปทาเดคาโนอิก (heptadecenoic acid, C17:1)
- กรดสเตียริก (Stearic acid, C18:0)
- กรดโอยเลอิก (Oleic acid, C18:1n9)
- กรดไลโนเลอิก (Linoleic acid, C18:2n6c)
- กรดทรานส์ – ไลโนเลอิก (trans-Linoleic acid, C18:2n6t)
- กรดแกมมา – ไลโนเลอิก (γ -Linolenic acid, C18:3n6)
- กรดแอลฟาไลโนเลนิก (α – Linoenic acid, C18: 3n3)
- กรดอะราคิโดนิก (Arachidonic acid, C20:0)
- กรดไอโคซีนอิก (Eicosenoic acid, C20:1n9)
- กรดอีโคซาดิอีนอิก (ecosadienoic acid, C20:2)
- กรดซีส 8, 11, 14,- ไอโคซาไตรอีนอิก (cis-8,11,14-Eicosatrienoic acid, C20:3n6)
- กรดเฮเนโคซานอิก (Heneicosanoic acid, C21:0)
- กรดอะราคิโดนิก (Arachidonic acid, C20:4n6)
- กรดซีส 11, 14, 17– ไอโคซาไตรอีนอิก (cis-11,14,17-Eicosatrienoic acid, C20:3n3)
- กรดอีโคซะเพนตะอีนอิก (Eicosapentaenoic acid, C20:5n3)
- กรดบีฮีนิก (Behenic acid, C22:0)
- กรดอีรูสิค (Erucic acid, C22:1n9)
- กรดโดโคซาไดอีนอิก (Docosadienoic acid, C22:2)

กรดไตรโคซานอิก (Tricosanoic acid, C23:0)

กรดลิกโนซีริก (Lignoceric acid, C24:0)

กรดโดโคซะเฮกซะอีโนอิก (Docosahexaenoic acid, C22:6n3)

กรดเนอร์โวอิก (Nervonic acid, C24:1n9)

2.4 สารเคมีสำหรับเตรียมน้ำทะเลเทียม (Artificail Sea Water) 25 พีพีที

- 1) โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride: NaCl)
- 2) แมกนีเซียมซัลเฟต (Magnesium sulfate: $Mgso_4 \cdot 7H_2O$)
- 3) แมกนีเซียมคลอไรด์ (Magnesium choride: $Mgcl_2 \cdot 6H_2O$)
- 4) แคลเซียมคลอไรด์ (Calcium choride: $CaCl_2 \cdot 2H_2O$)
- 5) โพแทสเซียมคลอไรด์ (Potassium chloride: KCl)
- 6) โซเดียมไบคาร์บอเนต (Sodium bicarbonate: $NaHCO_3$)
- 7) ไดโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (di – Sodium hydrogen phosphate:

$Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$)

8) โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Potassium ditassium dihydrogen phosphate: KH_2PO_4)

- 9) น้ำกลั่น (Distilled water)

2.5 สารเคมีสำหรับการตรึง

- 1) อัลจีเนต (Alginate) เกรดการต้า (Brightmoon, China)
- 2) โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride: NaCl)
- 3) แคลเซียมคลอไรด์ (Calcium choride: $CaCl_2 \cdot 2H_2O$)

2.6 สารเคมีสำหรับทดสอบประสิทธิภาพการตรึง

- 1) ทริปซิน
- 2) ปาเปน
- 3) อัลบูมิน
- 4) บลูเดกซ์แทรน

3. อุปกรณ์

- 1) เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Analytical balance): Sartorius laboratory balance, ประเทศเยอรมัน
- 2) เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (Analytical balance): Sartorius laboratory balance, ประเทศอเมริกา
- 3) กล้องจุลทรรศน์ (microscope): Olympus, ประเทศญี่ปุ่น
- 4) ออโตเมติกปิเปต (Automatic pipette): Boeco, ประเทศเยอรมัน
- 5) เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge): Model CD – 100R TOMY SEIKO, ประเทศญี่ปุ่น
- 6) เครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixer model VX – 100): Arkansas, ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 7) เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer): spekol 2000 Analytikjena, ประเทศอังกฤษ
- 8) เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas chromatograph): Agilent Technologies 7820A GC sytem, Walt Jennnigs, ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 9) แคปิลลารีคอลัมน์ชนิด HP - INNOWax เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 0.25 มิลลิเมตร เคลือบด้วย Polyethylene glycol หนา 0.25 ไมโครเมตร ความยาว 30 เมตร: Walt Jenning, ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 10) เครื่องวัดการดูดกลืนแสงแบบไมโครเพลต (Microtiter plate reader): บริษัท Bio-RAD, ประเทศญี่ปุ่น
- 11) เครื่องกลั่น (Distillator): ยี่ห้อ Foss TECATOR, ประเทศสวีเดน
- 12) เครื่องวิเคราะห์ปริมาณไขมัน (Fat extraction): ยี่ห้อ Foss Soxtec 2043, ประเทศสวีเดน
- 13) ตู้อบ (hot air oven): รุ่น 1375FX ของ SHEL LAB, ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 17) เตาให้ความร้อน (Hot plate): บริษัท Imarflex รุ่น IF – 830, ประเทศอังกฤษ
- 18) กระดาษกรองเบอร์ 1 (filter paper) บริษัท Whatman, ประเทศอังกฤษ

4. วิธีการทดลอง

4.1 การเตรียมหัวเชื้อ

เตรียมหัวเชื้อยีสต์ *Pichia* sp. โดยการเขี่ยหัวเชื้อจากอาหารแข็งลงใน อาหารเลี้ยงเชื้อ YM medium แบบเหลว ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้เชื้อโต จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.2 จากนั้นปิเปตหัวเชื้อ 1,000 ไมโครลิตร ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM medium ที่มีปริมาตร 20 มิลลิลิตร

4.2 การเตรียมวัตถุดิบ

4.2.1 กากชานอ้อย

ตัดกากชานอ้อยให้เป็นชิ้นลูกเต๋า ขนาดใกล้เคียงกันโดยใช้อัตราส่วนของ กากชานอ้อย 1 กรัมต่อน้ำทะเลเทียม (Artificial Sea Water) 10 มิลลิลิตร ที่ระดับความเค็ม 25 พีพีที

4.2.2 น้ำทะเลเทียม (Artificial Sea Water)

องค์ประกอบและวิธีการเตรียมน้ำทะเลเทียม (แสดงในภาคผนวก ก)

4.2.3 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจากกากชานอ้อยในน้ำทะเลเทียม (Artificial Sea Water) ที่ความเค็ม 25พีพีที

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อตามวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ กรอง เอากากชานอ้อยออก 3 ครั้ง (กรองด้วยบุชเนอร์ ตามด้วยผ้าขาวบาง และสุดท้ายกรองด้วยเมมเบรนขนาด 0.2 ไมครอน) นำอาหารไปหนึ่งในหม้อความดันอัตโนมัติ องค์ประกอบและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ (แสดงในภาคผนวก ก)

4.3 การเลี้ยงยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อกากชานอ้อยที่ระดับความเค็ม 25 พีพีที

นำหัวเชื้อยีสต์ที่เตรียมไว้ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดฝาเกลียว ขนาด 1,000 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 500 มิลลิลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 องศาเซลเซียส) เก็บตัวอย่างที่ 72 ชั่วโมง

4.4 การวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Dintrosalicylic acid assay (ตามวิธีของ Miller, 1959)

ปิเปตตัวอย่างปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในหลอด พลาสติก ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลาย DNS (dintrosalicylic acid reagent) 1 มิลลิลิตร ลงในหลอด eppendorf เขย่า

ให้เข้ากันนำไปต้มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water baths) ที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
แช่ตัวอย่างในน้ำแข็ง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความ
ยาวคลื่น 550 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เชิงเดี่ยวโดย
เทียบจากกราฟมาตรฐาน (แสดงในภาคผนวก ข)

4.5 การตรึง

4.5.1 การตรึงปาเปน (Papain), ทริปซิน (Trypsin), อัลบูมิน (Albumin), บลู
เดกซ์แทรน (Blue Dextran)

1) ชั่งตัวอย่าง(ปาเปน, ทริปซิน, อัลบูมิน, บลูเดกซ์แทรน) 0.1 กรัม ลงใน
บีกเกอร์ ขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำ 0.85 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคลอไรด์ 10 มิลลิลิตร และ 1.5
เปอร์เซ็นต์ โซเดียมอัลจิเนต ใน 0.85 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคลอไรด์ 40 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ได้
เป็น 1.2 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมอัลจิเนต

2) ใช้กระบอกฉีดยาขนาด 10 มิลลิลิตร ดูดสารละลายผสม ในข้อ 1) ฉีด
สารผ่านสายยางลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร
เม็ดเจลจะเกิดขึ้นทันทีในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ตั้งไว้ 1 ชั่วโมง เพื่อให้เม็ดเจลคงตัว

3) เทสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ออกจากเม็ดเจล นำ
เม็ดเจลที่ได้ใส่กรวยบุษเนออร์ ล้างเม็ดเจลด้วย 0.85 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคลอไรด์ ประมาณ 200 มิล
ลิลิตร

4) ชั่งน้ำหนักและนับเม็ดเจล

การตรวจวัดโปรตีนที่หลุดออกมา

1) นำเม็ดเจลใส่หลุมของแผ่นไมโครแพลทขนาด 6 หลุม หลุมละ 10 เม็ด เติมน้ำ
0.85 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคลอไรด์ลงไป 10 มิลลิลิตร

2) บีบตัวอย่างน้ำ 1000 ไมโครลิตร (เก็บตัวอย่างที่เวลา 0 ชั่วโมง 15
นาที 30 นาที 1 ชั่วโมง 2 ชั่วโมง 3 ชั่วโมง 4 ชั่วโมง 5 ชั่วโมง 24 ชั่วโมงและ 48 ชั่วโมง

3) นำน้ำตัวอย่างที่เก็บได้ตรวจหาปริมาณโปรตีน โดยที่เม็ดเจลที่เตรียมโดย
ใช้ปาเปน (Papain), ทริปซิน (Trypsin), อัลบูมิน (Albumin) วัดปริมาณโปรตีนในน้ำตัวอย่างด้วย
วิธีของแบรดฟอร์ดที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร สำหรับบลูเดกซ์แทรน (Blue Dextran) วัดการ
หลุดของสารที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (ภาคผนวก ข)

347433

579.5b

ก 494

น 3

4.5.2 การตรึงปลาป่น

ชั่งปลาป่น 0.15 กรัม ลงในบีกเกอร์ 100 มิลลิลิตร เติม 0.85 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคลอไรด์ 10 มิลลิลิตร และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมอัลจิเนต 40 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เตรียมเมล็ดเจลข้อ 4.5.1

การตรวจวัดโปรตีนที่หลุดออกมา

- 1) แบ่งเมล็ดเจลใส่บีกเกอร์ 50 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ 3 ใบ ปริมาตรเท่าๆกัน เติม 0.85 เปอร์เซ็นต์โซเดียมคลอไรด์ ลงไป 15 มิลลิลิตร
- 2) ปิเปตตัวอย่างน้ำ 1000 ไมโครลิตร ลงในหลอดพลาสติกขนาด 1.5 มิลลิลิตร (เก็บตัวอย่างที่เวลา 0 ชั่วโมง 15 นาที 30 นาที 1 ชั่วโมง 2 ชั่วโมง 3 ชั่วโมง 4 ชั่วโมง 5 ชั่วโมง 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง)
- 3) นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที วัดปริมาณโปรตีนในตัวอย่างที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร (ภาคผนวก ข)

4.5.3 การเตรียมตัวอย่างและการตรึงเซลล์ยีสต์ *Pichia sp.*

นำตัวอย่างเซลล์ยีสต์ *Pichia sp.* ที่ได้จากการเลี้ยง ปริมาตร 30 มิลลิลิตร มาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 7000 รอบต่อ นาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง หลังจากนั้นทำการล้างเซลล์ยีสต์จำนวน 2 ครั้ง โดยการเติมสารละลาย 0.85 เปอร์เซ็นต์ Normal saline (NaCl) ปริมาตร 30 มิลลิลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 7000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้งก่อนนำเซลล์ยีสต์ไปทำเซลล์ตรึงและวิเคราะห์คุณค่าทางอาหาร

การตรึงเซลล์ยีสต์ *Pichia sp.*

ชั่งเซลล์ยีสต์ *Pichia sp.* ให้ได้เซลล์ ประมาณ 2.5×10^5 เซลล์ (ภาคผนวก ข) เติม 0.85 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคลอไรด์ 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในบีกเกอร์ 100 มิลลิลิตร ผสมกับ 1.5 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมอัลจิเนต 40 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ได้เป็น 1.2 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมอัลจิเนต เตรียมเมล็ดเจลตามข้อ 4.5.1

การวัดจำนวนเซลล์ยีสต์ *Pichia sp.* ที่หลุดออกมา

- 1) แบ่งเมล็ดเจลใส่บีกเกอร์ 50 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ 3 ใบ ปริมาตรเท่าๆกัน เติม 0.85 เปอร์เซ็นต์โซเดียมคลอไรด์ ลงไป 15 มิลลิลิตร
- 2) ปิเปตตัวอย่างน้ำ 1000 ไมโครลิตร ลงในหลอด พลาสติกขนาด 1.5 มิลลิลิตร (เก็บตัวอย่างที่เวลา 0 ชั่วโมง 15 นาที 30 นาที 1 ชั่วโมง 2 ชั่วโมง 3 ชั่วโมง 4

ชั่วโมง 5 ชั่วโมง 24 ชั่วโมงและ 48 ชั่วโมง) นับจำนวนเซลล์ที่หลุดออกมาด้วยกล้องจุลทรรศน์ (ภาคผนวก ข) และวัดความขุ่นโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร (ภาคผนวก ข)

4.5.4 การเตรียมตัวอย่างและการตรึงเซลล์ปรสิต

1) การเก็บรวบรวมปรสิตที่ก่อให้เกิดโรคจุดขาวน้ำเค็ม

(*Cryptocaryon* sp.)

1.1) ทำการตรวจปลาทะเลที่ป่วยด้วยโรคจุดขาวน้ำเค็ม นำปลาทะเลที่ป่วยมาแช่ใน SM 30 (ส่วนผสมแสดงในภาคผนวก ก) เพื่อให้ปรสิตหลุดออกจากตัวปลาเป็นระยะ trophont

1.2) ทำการคัดแยกปรสิต *Cryptocaryon* sp. ด้วยหลอดดูดปลายแหลม (Pasture pipette) ที่ปลอดเชื้อ ล้างด้วย SM 30 ให้สะอาด ประมาณ 3 ครั้ง

1.3) นำปรสิต *Cryptocaryon* sp. ระยะ trophont จากข้อ 1.2 มาเลี้ยงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเลี้ยงใน SM 30 จำนวนจานละ 50 เซลล์ ปรสิตจะเข้าสู่ระยะ tomont

1.4) ตรวจสอบพัฒนาการของปรสิต *Cryptocaryon* sp. ที่เลี้ยงไว้ใน SM 30 ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อทุกวัน เพื่อดูการแบ่งเซลล์จนกระทั่งฟักออกมาเป็นตัว ได้ปรสิตระยะ theronts

2) การตรึงเซลล์ปรสิตระยะ theronts

นำ เซลล์ปรสิตระยะ theronts ประมาณ 25000 เซลล์ เดิมโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ 10 มิลลิตร ใส่ลงในปิ๊กเกอร์ 100 มิลลิตร ผสมกับ 1.5 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมอัลจินต 40 มิลลิตร ผสมให้เข้ากันได้เป็น 1.2 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมอัลจินต เตรียมเม็ดเจลตามข้อ 4.5.1

4.6 การสกัดไขมันในตัวอย่างเซลล์ยีสต์ *Pichia* sp. ที่ตรึงด้วยแคลเซียมอัลจินต

1) ชั่งตัวอย่างเม็ดเจลที่ตรึงเซลล์ยีสต์ (น้ำหนักแห้ง) โดยประมาณ 1.0 กรัม ใส่ Thimbles

2) นำ Thimbles ใส่ในชุดสกัดไขมัน (Extraction Unite) เติมนสารละลายปิโตเลียมอิเทอร์ 50 มิลลิตร ใน Extraction cups

3) นำ Extraction cups ใส่ในชุดสกัดไขมันจากนั้นนำไปเข้าเครื่องสกัดไขมัน ประมาณ 1 ชั่วโมง

4) อบ Extraction cups ที่ 103 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทิ้งให้เย็นใน desiccators ซึ่งน้ำหนัก จากนั้นคำนวณหาร้อยละไขมัน (ภาคผนวก ข)

5) ละลายไขมันด้วยสารละลายผสมคลอโรฟอร์ม : เมทานอล (2:1) ที่ผสม BHT 0.01 เปอร์เซ็นต์ เพื่อนำไปทรานเอสเทอร์ฟิเคชันต่อไป

4.7 การวิเคราะห์หาชนิดและร้อยละกรดไขมัน

ขั้นตอนการทำทรานเอสเทอร์ฟิเคชันด้วยกรด (acid - catalysed transesterification) หลังจากนั้นนำไปวัดปริมาณกรดไขมันด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (ดัดแปลงวิธีของ Christie, 2003)

4.7.1 การทรานเอสเทอร์ฟิเคชัน

1) ปิเปตไขมันปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร ชนิดฝาเกลียว (ไขมันที่เหลือเก็บใส่ขวด vial ที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส) จากนั้นเติม สารละลาย 1 เปอร์เซ็นต์ กรดซัลฟูริกในเมทานอล 10 มิลลิลิตร ปิดฝาให้แน่นเขย่าเพื่อผสมให้เข้ากัน คลายฝาออก นำไปสูบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 16 ชั่วโมง

2) นำสารละลายออกจากตู้อบทิ้งไว้ให้เย็น ถ่ายสารละลายใส่กรวยแยก ขะ สารที่ตกค้างในหลอดทดลองด้วยไซเดียมคลอไรด์ 5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และเก็บรวมกันในกรวยแยก

3) เติม เฮกเซน (hexane AR) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในกรวยแยก และ เขย่า 1 นาที ปล่อยไว้ให้แยกชั้น เก็บสารละลายชั้นบนไว้ (เฮกเซน) และถ่ายสารละลายชั้นล่างลงในหลอดทดลองเดิม เพื่อนำมาสกัดด้วยเฮกเซน ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และเขย่า 1 นาที ปล่อยไว้ให้แยกชั้น ใช้หลอดดูดสารดูดสารละลายชั้นบน ใส่รวมกับสารละลายในกรวยแยกอันเดิม

4) เติมสารละลายโพแทสเซียมโบคาร์บอเนต 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ลงในกรวยแยก และเขย่าเล็กน้อย 1 นาที ปล่อยไว้ให้แยกชั้น ก่อนถ่ายสารละลายชั้นล่างทิ้ง และเก็บสารละลายชั้นบนไว้ในกรวยแยก

5) เทสารละลายที่เก็บไว้ในกรวยแยกลงในฟลากลัสกันกลมผ่านกรวยแก้วที่บรรจุไซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส

6) นำฟลากลัสกันกลมไประเหยตัวทำละลายโดยใช้เครื่องระเหยแบบ สูญญากาศ และเป่าแห้งด้วยแก๊สไนโตรเจน หลังจากนั้นละลายด้วยเฮกเซน (n-hexane) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ก่อนถ่ายลงในขวด Vial ขนาด 2 มิลลิลิตร และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอที่จะนำไปฉีดด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี

7) นำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์หาชนิด และปริมาณกรดไขมัน ด้วย เครื่องแก๊สโครโมโตกราฟี และชนิดของอุปกรณ์ตรวจวัดเป็น Flame Ionization Detector (FID) คอลัมน์ที่ใช้เป็นคอลัมน์ชนิด HP-INNOWax ความยาว 30 เมตร เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 0.25 มิลลิเมตร และเคลือบด้วย Polyethylene glycol หนา 0.25 ไมโครลิตร ปริมาณที่ฉีด 1 ไมโครลิตร สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์มีดังนี้ ฉีดด้วยระบบ spit เท่ากับ 10 :1 อัตราการไหลของแก๊สฮีเลียม (แก๊สพา) 1.2 มิลลิเมตรต่อนาที อุณหภูมิ ณ จุด ฉีดสารเท่ากับ 230 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิที่ อุปกรณ์ตรวจวัด (ดีเทคเตอร์) เท่ากับ 250 องศาเซลเซียส โปรแกรมอุณหภูมิเริ่มต้นที่ 150 องศาเซลเซียส คงอุณหภูมิไว้เป็นเวลา 0.50 นาที จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิไปที่ 170 องศาเซลเซียส ในอัตราการเพิ่ม 5 องศาเซลเซียสต่อนาที และคงอุณหภูมิไว้ 10 นาที หลังจากนั้นเพิ่มอุณหภูมิไปที่ 190 องศาเซลเซียส ในอัตราการเพิ่ม 3 องศาเซลเซียสต่อนาที และคงอุณหภูมิ 25 นาที รวมระยะเวลา ทั้งหมดในการวิเคราะห์ 49 นาที

บทที่ 4

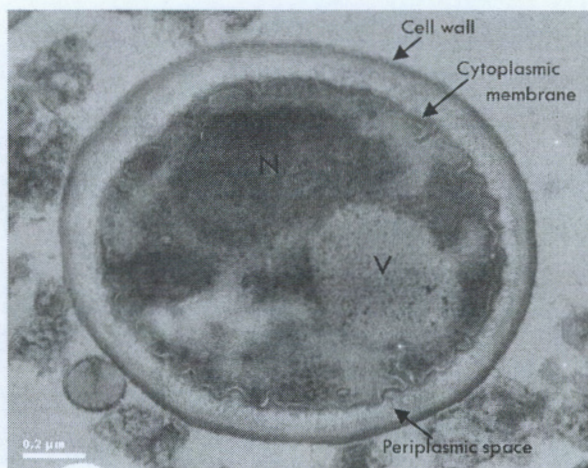
ผลการทดลอง

4.1 รูปร่างและโครงสร้างภายในเซลล์ของยีสต์ *Pichia* sp. ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อกากชานอ้อย

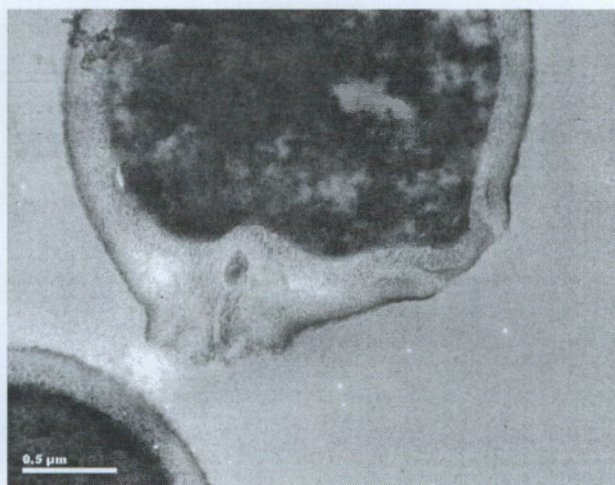
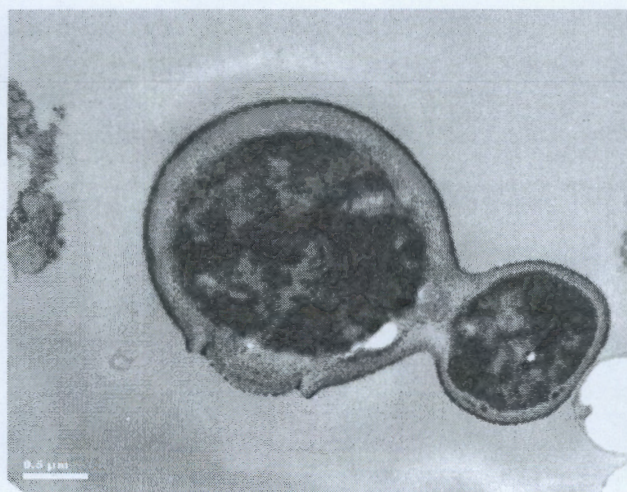
ยีสต์ *Pichia* sp. เป็นราที่มีการดำรงชีวิตเป็นเซลล์เดี่ยว มีรูปร่างเป็นรูปไข่ (oval, ovoidal) ดังแสดงในภาพที่ 4.1 มีขนาดประมาณ 2-3 ไมโครเมตร ภายในเซลล์ยีสต์ประกอบด้วยผนังเซลล์ (cell wall) เยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane หรือ plasma membrane) เพอริพลาซึม (periplasm) หรือเรียกอีกอย่างหนึ่งว่าช่องว่างเพอริพลาซึม (periplasmic space) ไซโทพลาซึม (cytoplasm) นิวเคลียส (nucleus) ไมโทคอนเดรีย (mitochondria) แวกิวโอล (vacuole) และเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม (endoplasmic reticulum) ดังแสดงในภาพที่ 4.2 การเจริญของยีสต์เกิดโดยการเพิ่มขนาดจนถึงขนาดที่ใหญ่ที่สุด (critical size) หลังจากนั้นจึงจะมีการแบ่งเซลล์เพื่อเพิ่มจำนวน ซึ่งการแบ่งเซลล์ของยีสต์ *Pichia* sp. เป็นการเพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อ (budding) การแตกหน่อของยีสต์ *Pichia* sp. เป็นการแตกหน่อหลายขั้ว (multipolar หรือ multilateral budding) โดยการแตกหน่อเกิดขึ้นได้โดยรอบเซลล์ทุกๆ ด้าน ดังแสดงในภาพที่ 4.3



ภาพที่ 4.1 รูปร่างของยีสต์ *Pichia* sp.



ภาพที่ 4.2 โครงสร้างภายในเซลล์ของยีสต์ *Pichia* sp. เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (N= นิวเคลียส, V = แวคิวโอล)



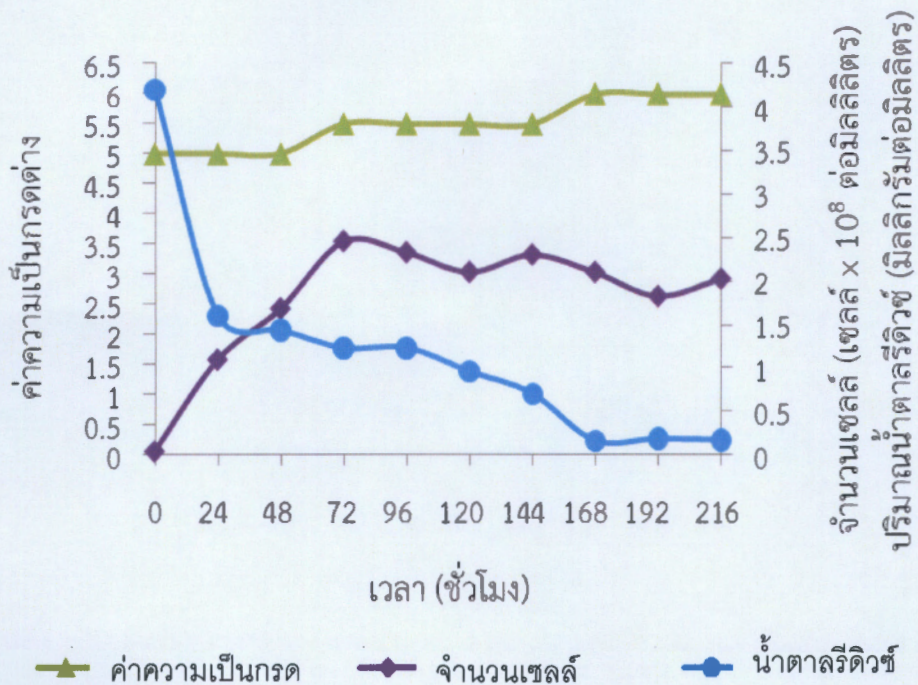
ภาพที่ 4.3 การแตกหน่อของยีสต์ *Pichia* sp.

4.2 การเจริญของยีสต์ *Pichia* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อกากชานอ้อยที่มีความเค็ม 25 พีพีที

การศึกษาการเจริญของยีสต์ *Pichia* sp. ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อกากชานอ้อยที่มีความเค็ม 25 พีพีที ระหว่างเวลา 96 ชั่วโมง วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ยีสต์ใช้เพื่อการเจริญเติบโตโดยวิธี

Dinitrosalicylic acid assay วัดค่าความหวาน และติดตามการเจริญของยีสต์โดยการนับจำนวนเซลล์ยีสต์ด้วย Hemocytometer ผลการทดลองพบว่าค่าความหวานตลอดการทดลองมีค่าระหว่าง 3 – 4 ปริกซ์

ความสัมพันธ์ระหว่างน้ำตาลรีดิวซ์และการเจริญเติบโตของยีสต์เป็นแบบผกผัน โดยที่ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงอย่างมากภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมงแรกของการทดลอง และลดลงอย่างต่อเนื่องจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง ในขณะที่จำนวนเซลล์ยีสต์ได้เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วตั้งแต่เริ่มต้นการทดลอง และมีการเพิ่มขึ้นสูงสุดที่ 72 ชั่วโมง และมีจำนวนเซลล์เท่ากับ 2.45×10^8 เซลล์ ต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นจำนวนเซลล์ค่อยๆ ลดลง เมื่อสิ้นสุดการทดลอง มีจำนวนเซลล์ 2.02×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในภาพที่ 4.4



ภาพที่ 4.4 การเจริญของยีสต์ *Pichia* sp. ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อกากชานอ้อยที่มีความเค็ม 25 พีพีที

4.3 การตรึง (immobilization)

4.3.1 การทดสอบความคงตัวของเม็ดเจลที่ตรึงสารพอลิเมอร์ในน้ำทะเลเทียมที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างแตกต่างกัน

การวิเคราะห์การตรึงสาร พอลิเมอร์ 4 ชนิด คือ ปาเปน (papain), ทริปซิน (trypsin), อัลบูมิน (albumin) และบลูเดกซ์แทรน (Blue Dextrane) ด้วยแคลเซียมอัลจินต ที่ความเข้มข้นของโซเดียมอัล

จินตระหว่างกาเกิดปฏิกิริยาร้อยละ 1.2 (ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจินตที่เตรียมตั้งต้น คือ ร้อยละ 1.5) พบว่าโปรตีน ปาเปน, ทริปซิน, อัลบูมิน และบลูเดกซ์แทรนที่ผ่านการตรึงด้วยแคลเซียมอัลจินต แล้วนำเม็ดเจลที่เตรียมได้แช่ในน้ำทะเลเทียมที่มีความเป็นกรด-ด่าง 8.0 ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีความเป็นกรด-ด่าง 7.4 และอะซิเตตบัฟเฟอร์ที่มีความเป็นกรด-ด่าง 4.0 เก็บตัวอย่างบัฟเฟอร์ในช่วงเวลาที่ทำการทดลอง ตั้งแต่เริ่มทำการทดลองจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลองที่ 48 ชั่วโมง พบการหลุดของโปรตีน ออกมาในปริมาณเล็กน้อย ส่วน บลูเดกซ์แทรน ที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่กว่าไม่พบการหลุดของสารภายในเวลา 1 ชั่วโมง ดังแสดงในตารางที่ 4.1 4.2 และ 4.3 ดังนั้นแคลเซียมอัลจินตที่ความเข้มข้นร้อยละ 1.2 จึงมีประสิทธิภาพและความเหมาะสมสำหรับการตรึง สารที่เป็นพอลิเมอร์ของกรดอะมิโนและพอลิเมอร์ของแอนไฮโดรกลูโคส (anhydroglucose)

ตารางที่ 4.1 ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำทะเลเทียมที่ได้จากการแช่เม็ดเจลตรึง สารพอลิเมอร์ 4 ชนิด คือ ปาเปน, ทริปซิน, อัลบูมิน และบลูเดกซ์แทรนด้วยแคลเซียมอัลจินต ในน้ำทะเลเทียมที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 8.0

เวลา	ค่าการดูดกลืนแสง (นาโนเมตร)			
	595		280	
	ปาเปน (มวลโมเลกุล~ 23000 ดัลตัน)	ทริปซิน (มวลโมเลกุล~ 23300ดัลตัน)	อัลบูมิน (มวลโมเลกุล~ 67000 ดัลตัน)	บลูเดกซ์แทรน (มวลโมเลกุล~ 2000000 ดัลตัน)
0 นาที	0	0	0.016	0
10 นาที	0.011	0.009	0.004	0
20 นาที	0	0	0.033	0
30 นาที	0.014	0.010	0.048	0
1 ชั่วโมง	0.052	0.013	0.050	0
24 ชั่วโมง	0.010	0.011	0.074	0.003
48 ชั่วโมง	0.005	0.070	0.005	0.002

ตารางที่ 4.2 ค่าการดูดกลืนแสงของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ได้จากการแช่เม็ดเจลตริง สารพอลิเมอร์ 4 ชนิด คือ ปาเปน, ทริปซิน, อัลบูมิน และบลูเดกซ์แทรนด้วยแคลเซียมอัลจินต ใน 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffered saline,PBS) ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.4

เวลา	ค่าการดูดกลืนแสง (นาโนเมตร)			
	595		280	
	ปาเปน (มวลโมเลกุล~ 23000 ดัลตัน)	ทริปซิน (มวลโมเลกุล~ 23300 ดัลตัน)	อัลบูมิน (มวลโมเลกุล~ 67000 ดัลตัน)	บลูเดกซ์แทรน (มวลโมเลกุล~ 2000000 ดัลตัน)
0 นาที	0.006	0.004	0.021	0
10 นาที	0.002	0.019	0.050	0.013
20 นาที	0.017	0.018	0.006	0.122
30 นาที	0.030	0.025	0.078	0.284
1 ชั่วโมง	0.024	0.023	0.087	0.592
24 ชั่วโมง	0.054	0.024	0.099	0.800
48 ชั่วโมง	0.022	0.013	0.018	0.860

ตารางที่ 4.3 ค่าการดูดกลืนแสงของอะซิเตตบัพเฟอร์ที่ได้จากการแช่เม็ดเจลดรีงสารพอลิเมอร์ 4 ชนิด คือ ปาเปน, ทริปซิน, อัลบูมิน และบลูเดกซ์แทรนด้วยแคลเซียมอัลจิเนต ในอะซิเตตบัพเฟอร์ที่มีความเป็นกรด-ด่าง 4.0

เวลา	ค่าการดูดกลืนแสง (นาโนเมตร)			
	595		280	
	ปาเปน (มวลโมเลกุล~ 23000 ดัลตัน)	ทริปซิน (มวลโมเลกุล~ 23300 ดัลตัน)	อัลบูมิน (มวลโมเลกุล~ 67000 ดัลตัน)	บลูเดกซ์แทรน (มวลโมเลกุล~ 2000000 ดัลตัน)
0 ชั่วโมง	0	0	0.009	0
10 นาที	0.013	0.014	0.034	0
20 นาที	0.006	0.012	0.049	0.0035
30 นาที	0.022	0.006	0.038	0.0026
1 ชั่วโมง	0.009	0.008	0.023	0.007
24 ชั่วโมง	0.011	0.018	0.012	0.011
48 ชั่วโมง	0.034	0.033	0.013	0

4.3.2 การทดสอบความคงตัวของเม็ดเจลดรีงที่ตรึงปลาปนด้วยแคลเซียมอัลจิเนตที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

การศึกษาความคงตัวของเม็ดเจลดรีงแคลเซียมอัลจิเนตที่ตรึงปลาปนโดยใช้แคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 1.5 และ 2 สำหรับความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตขณะเกิดปฏิกิริยาคือร้อยละ 0.8, 1.2 และ 1.6 (โซเดียมอัลจิเนตที่เตรียมตั้งต้นมีความเข้มข้นร้อยละ 1.0 1.5 และ 2 ตามลำดับ) นำเม็ดเจลดรีงที่เตรียมได้แช่ในโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 0.85 แล้วเก็บตัวอย่างน้ำเกลือวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนเพื่อตรวจหาการหลุดของโปรตีนออกจากเม็ดเจลดรีง ผลการทดลองพบว่า โซเดียมอัลจิเนตที่ใช้ขณะเกิดปฏิกิริยาเข้มข้นร้อยละ 0.8, 1.2 และ 1.6 และแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 1.5 และ 2 สามารถทำให้เม็ดเจลดรีงมีความคงตัว และกักปลาปนไว้ในตาข่ายพอลิเมอร์ของแคลเซียมอัลจิเนตได้ในเวลา 2 ชั่วโมง และเริ่มมีโปรตีนจากปลาปนหลุดออกมามากขึ้นที่เวลา 3 ชั่วโมง จนถึง 48 ชั่วโมง ดังแสดงในตารางที่ 4.4

จากผลการทดสอบความคงตัวของเม็ดเจลที่ตริงโปรตีน บลูเดกซ์แทรน และปลาป่น พบว่าไม่มีการหลุดของสาร ดังนั้นการ ตริงเซลล์ จะได้ทดลอง ใช้โซเดียม อัลจีเนต ขณะเกิดปฏิกิริยาร้อยละ 1.2 และแคลเซียมคลอไรด์ร้อยละ 1.5 ในการทดลองตริงเซลล์ยีสต์และปรสิติ

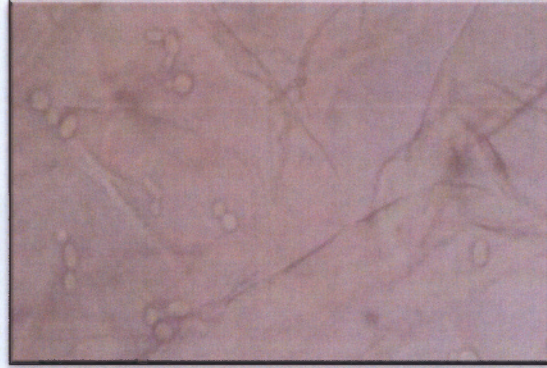
ตารางที่ 4.4 ปริมาณโปรตีนจากปลาป่นที่หลุดออกมาเมื่อตริงด้วยแคลเซียมอัลจีเนตที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

ร้อยละความเข้มข้นของโซเดียมอัลจีเนต	ร้อยละความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์	ปริมาณโปรตีน (ปลาป่น) ที่หลุดจากการตริง (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
0.8	1	0.88 ± 0.00
1.2	1	0.80 ± 0.00
1.6	1	0.78 ± 0.00
0.8	1.5	0.77 ± 0.05
1.2	1.5	0.02 ± 0.00
1.6	1.5	0.01 ± 0.00
0.8	2	0.04 ± 0.00
1.2	2	0.01 ± 0.00
1.6	2	0.00 ± 0.00

4.4 การตริงเซลล์ยีสต์ *Pichia* sp. ด้วยแคลเซียมอัลจีเนต

4.4.1 การตรวจสอบประสิทธิภาพการตริงเซลล์ยีสต์ *Pichia* sp. ด้วยแคลเซียมอัลจีเนต

การตริงเซลล์ยีสต์ *Pichia* sp. ด้วยโซเดียมอัลจีเนตที่ความเข้มข้นร้อยละ 1.2 และแคลเซียมคลอไรด์ร้อยละ 1.5 ตรวจสอบเซลล์ตริงภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ได้ผลดังแสดงในภาพที่ 4.5 ยีสต์ *Pichia* sp. ที่ตริงด้วยแคลเซียมอัลจีเนตเมื่อดูใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเซลล์ยีสต์ถูกกักอยู่ในเส้นพอลิเมอร์ของแคลเซียมอัลจีเนต



ภาพที่ 4.5 ภาพตัดขวางเม็ดเจลที่ตรึงยีสต์ *Pichia* sp. ด้วยแคลเซียมอัลจิเนตภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 4X

จากข้อมูลการตรวจหาการหลุดของเซลล์ยีสต์ *Pichia* sp. จากการตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างน้ำเกลือที่ได้จากการแช่เม็ดเจล ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร พบว่าในช่วงเวลาที่ทำการทดลอง ตั้งแต่เริ่มทำการทดลองจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลองที่ 48 ชั่วโมง ไม่พบการหลุดของเซลล์ยีสต์ *Pichia* sp. ที่ตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต ดังแสดงในตารางที่ 4.5 ดังนั้นไฮเดียม อัลจิเนตที่ความเข้มข้น 1.2 เปอร์เซ็นต์ และแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1.5 มีประสิทธิภาพสำหรับใช้ตรึงเซลล์ยีสต์

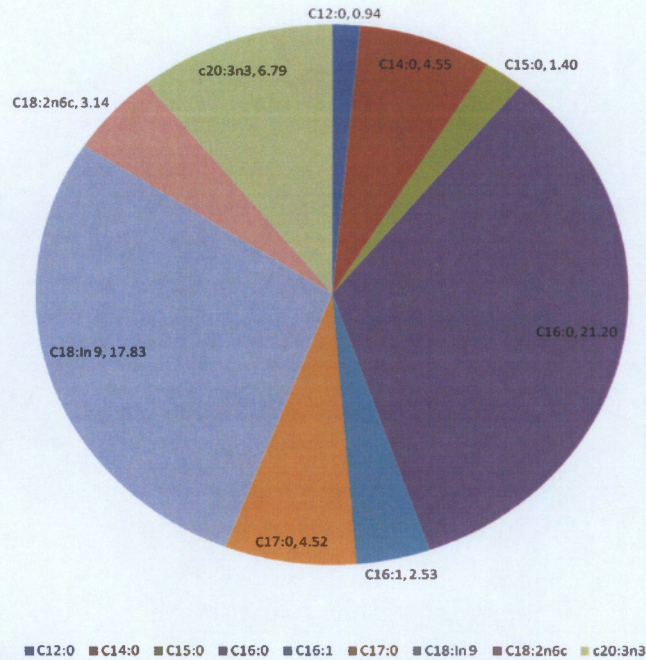
ตารางที่ 4.5 ค่าดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เพื่อตรวจสอบการหลุดของเซลล์ยีสต์ *Pichia* sp. จากแคลเซียมอัลจิเนตในน้ำตัวอย่าง

เวลา	ค่าดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร			ค่าดูดกลืนแสงเฉลี่ย
0 ชั่วโมง	0	0	0	0
10 นาที	0.001	0.003	0.001	0.002
20 นาที	0.007	0.003	0.006	0.005
30 นาที	0.007	0.005	0.004	0.005
1 ชั่วโมง	0.020	0.015	0.017	0.017
2 ชั่วโมง	0.009	0.016	0.020	0.015
24 ชั่วโมง	0.021	0.013	0.028	0.020
48 ชั่วโมง	0.037	0.025	0.019	0.027

4.4.2 ชนิดและร้อยละกรดไขมันชนิดทรานส์ (trans fatty acids, TFA) ในยีสต์

Pichia sp. ที่ตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต

การวิเคราะห์องค์ประกอบกรดไขมันในเชื้อยีสต์ *Pichia* sp. ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อกากชานอ้อยที่ความเค็ม 25 พีพีที ที่เวลา 72 ชั่วโมง แล้วนำเซลล์ยีสต์ ตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต สกัดไขมันจากเม็ดเจล และวิเคราะห์กรดไขมันเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานกรดไขมัน 35 ชนิด ผลการทดลองพบกรดไขมัน 9 ชนิด ได้แก่ กรดลอริก (lauric acid, C12:0), กรดไมริสติก (Myristic acid, C14:0), กรดเพนตะเดคานอิก (Pentadecanoic acid, C15:0), กรดปาล์มิติก (palmitic acid, C16:0), กรดปาล์มิโอะเลอิก (palmitoleic acid, C16:1), กรดเฮปาทอเดคานอิก (heptadecaenoic acid, C17:0), กรดโอเลอิก (Oleic acid, C18:1n9), กรดไลโนเลอิก (Linoleic acid, C18:2n6c), กรดซีส 11, 14, 17- ไอโคซาไตรอีนอิก (cis-11,14,17-Eicosatrienoic acid, C20:3n3) โดยพบกรดไขมันอิ่มตัวทั้งหมดสูงสุด (saturated fatty acid: SFA) ร้อยละ 32.61 มี กรดปาล์มิติก (palmitic acid, C16:0) เป็นองค์ประกอบมากที่สุด ประมาณร้อยละ 21.20±0.57 ของกรดไขมันทั้งหมด รองลงมาคือ กรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยวทั้งหมด (Monounsaturated fatty acid) ร้อยละ 20.36 ของกรดไขมันทั้งหมดและมี กรดไขมันโอเลอิก (Oleic acid, C18:1n9) เป็นองค์ประกอบที่มากที่สุดประมาณร้อยละ 17.83±0.58 นอกจากนี้ยังพบ กรดไลโนเลอิก (Linoleic acid, C18:2n6c) ร้อยละ 3.14±0.10 และกรดซีส 11, 14, 17- ไอโคซาไตรอีนอิก (cis-11,14,17-Eicosatrienoic acid, C20:3n3) ร้อยละ 6.79±0.21 ของกรดไขมันทั้งหมด ซึ่งเป็นองค์ประกอบในกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนทั้งหมด ดังแสดงในภาพที่ 4.6

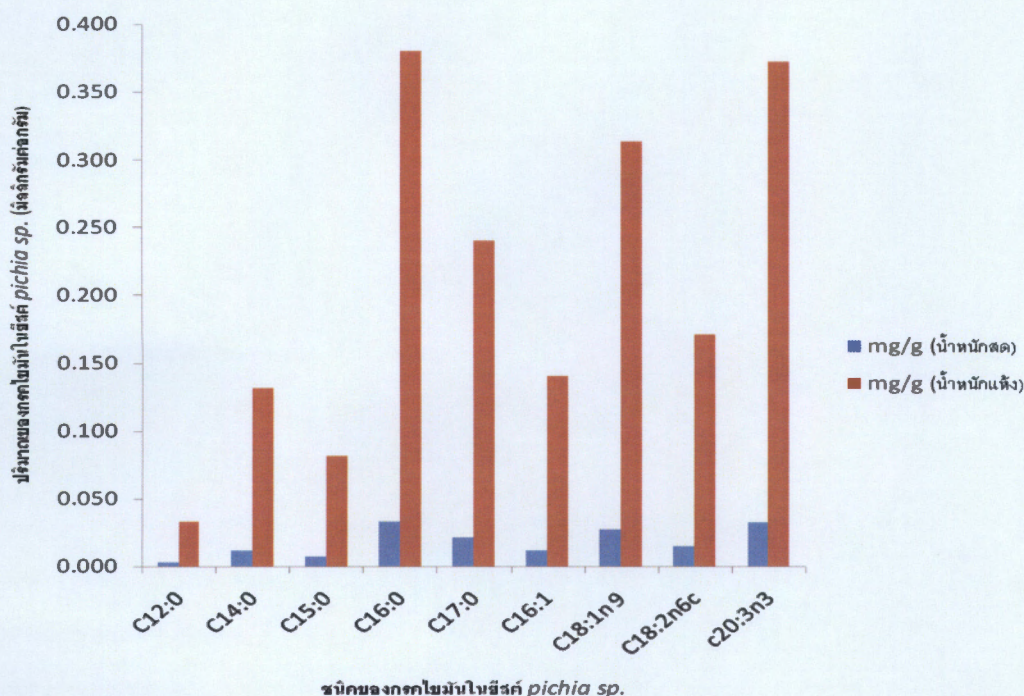


ภาพที่ 4.6 ชนิดและร้อยละของกรดไขมันแต่ละชนิดในกรดไขมันทั้งหมดที่สกัดได้จากเซลล์ตรึงยีสต์ *Pichia* sp. ด้วยแคลเซียมอัลจิเนต

4.4.3 ชนิดและปริมาณกรดไขมันในยีสต์ *Pichia* sp.

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบกรดไขมันในตัวอย่างเซลล์ยีสต์ *Pichia* sp. ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อกากขานอ้อยที่ความเค็ม 25 พีพีที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วเปรียบเทียบกับกรดไขมันที่สกัดจากเมล็ดเจลดึงเซลล์ยีสต์กับสารมาตรฐานกรดไขมัน 35 ชนิด น้ำหนักเมล็ดเจลดึงเซลล์ยีสต์แห้งที่ใช้ในการสกัดคือ 1.0260 กรัม ผลการทดลองพบกรดไขมัน 9 ชนิด ได้แก่กรดลอริก (lauric acid, C12:0), กรดไมริสติก (Myristic acid, C14:0), กรดเพนตะเดคาโนอิก (Penta- decanoic acid, C15:0), กรดปาล์มิติก (palmitic acid, C16:0), กรดปาล์มิโอเลอิก (palmitoleic acid, C16:1), กรดเฮปทาโทเดคาโนอิก (hepatodecaenoic acid, C17:0), กรดโอเลอิก (Oleic acid, C18:1n9), กรดไลโนเลอิก (Linoleic acid, C18:2n6c), กรดซีส 11, 14, 17- ไอโคซาไตรอีนอิก (cis-11, 14, 17Eicosatrienoic acid, C20:3n3) โดยพบกรดไขมันอิ่มตัวทั้งหมด (saturated fatty acid: SFA) สูงสุด 0.08 mg/g (น้ำหนักสด), 0.87 mg/g (น้ำหนักแห้ง) มีกรดปาล์มิติก (palmitic acid, C16:0) เป็นองค์ประกอบมากที่สุด 0.033 mg/g (น้ำหนักสด), 0.38 mg/g (น้ำหนักแห้ง) ของกรดไขมันทั้งหมด รองลงมาคือ กรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนทั้งหมด (Polyunsaturated Fatty Acid: PUFA) 0.05 mg/g (น้ำหนักสด), 0.54 mg/g (น้ำหนักแห้ง) ของกรดไขมัน

ทั้งหมดและมีกรดไลโนเลอิก (Linoleic acid, C18:2n6c) เป็นองค์ประกอบที่มากที่สุด 0.015 mg/g (น้ำหนักสด), 0.17 mg/g (น้ำหนักแห้ง) ของกรดไขมันทั้งหมด นอกจากนี้ยังพบกรดไขมันโอเลอิก (Oleic acid, C18:1n9) เป็นองค์ประกอบที่มากที่สุด 0.027 mg/g (น้ำหนักสด), 0.31 mg/g (น้ำหนักแห้ง) ของกรดไขมันทั้งหมด ซึ่งเป็นองค์ประกอบในกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยวทั้งหมด ดังแสดงในภาพที่ 4.7



ภาพที่ 4.7 ปริมาณกรดไขมันแต่ละชนิดในเม็ดเจลแคลเซียมอัลจิเนตที่ตรึงเซลล์ยีสต์ *Pichia* sp. ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อกากขานอ้อยที่มีความเค็ม 25 พีพีที ที่เวลา 72 ชั่วโมง

4.5 การตรึงเซลล์ปรสิต *Cryptocaryon irritans* ด้วยแคลเซียมอัลจิเนต

ปรสิตที่ทำให้เกิดโรคจุดขาวน้ำเค็ม มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *C. irritans* เป็นปรสิตกลุ่มโปรโตซัวซิลิเกต *C. irritans* ระยะ theront เป็นระยะที่พร้อมจะเข้าเกาะที่เหงือกและผิวหนังของปลา theront เป็นระยะตัวอ่อนที่ว่ายน้ำเป็นอิสระ มีรูปร่างเป็นรูปกระสวย ด้านบนแหลมด้านล่างมน มีขนาดประมาณ 23.88 – 40.59 μm . มีขนรอบตัวเช่นเดียวกับตัวเต็มวัย ระยะนี้สามารถว่ายน้ำเป็นอิสระได้ ประมาณ 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจะลงเกาะกับปลาที่เป็นเจ้าบ้าน เพื่อเจริญเติบโตเป็นตัวเต็มวัยต่อไป ดังแสดงในภาพที่ 4.8 เซลล์ปรสิต theront มีขนาด 23.88 X 40.59 ไมโครเมตร ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าเซลล์ยีสต์ ดังนั้นจึง

สามารถตรึงเซลล์ปรสิตระยะ theront ด้วยโซเดียมอัลจิเนตเข้มข้นร้อยละ 1.2 และแคลเซียมคลอไรด์ร้อยละ 1.5



ภาพที่ 4.8 Theront ของ *Cryptocaryon* sp. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกลับ (300X)

บทที่ 5

อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

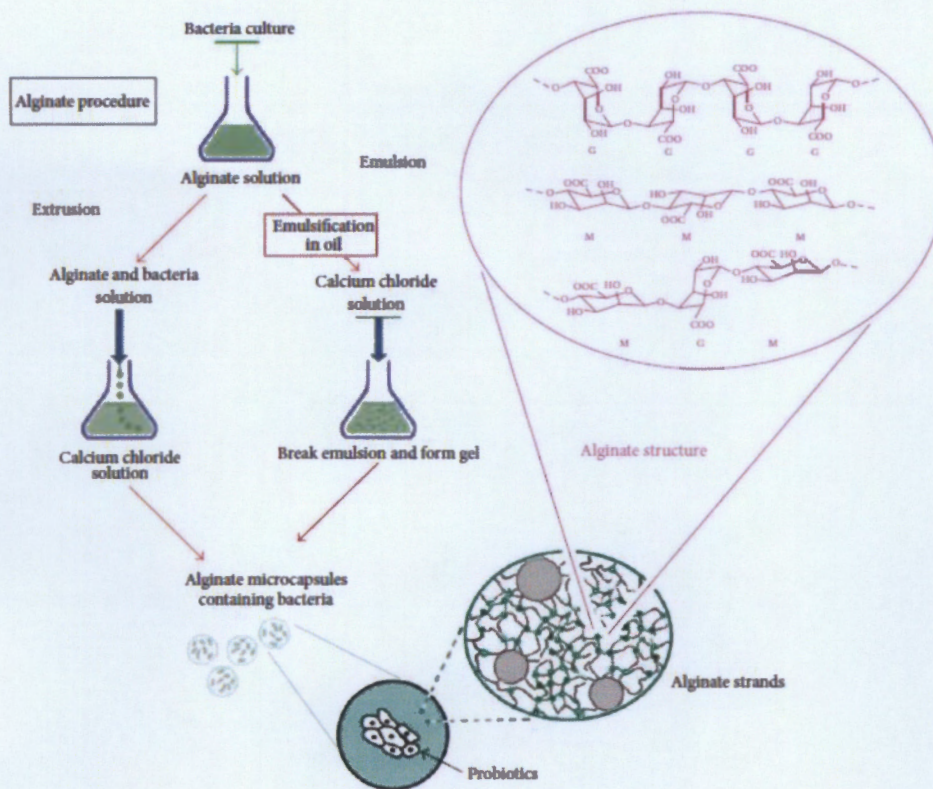
5.1 การเจริญของยีสต์ *Pichia sp.*

จากการศึกษาการเจริญพบว่าเชื้อยีสต์ *Pichia sp.* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อกากขาน อ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน สภาวะการหมักที่เหมาะสมที่สุดในการหมักยีสต์เพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์ คือ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งใช้ระยะเวลาการหมักเพียง 72 ชั่วโมง ที่ความเค็ม 25 พีพีที เนื่องจากยีสต์ *Pichia sp.* เป็นยีสต์ที่แยกได้จากน้ำทะเลบางแสน จากข้อมูลความเค็มของน้ำทะเลบริเวณหาดบางแสนพบว่ามีความเค็มตลอดปีประมาณ 23-33 พีพีที ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับฤดูกาล (งานวิจัยสิ่งแวดล้อมทางทะเล สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล, 2555, นนทวิทย์ และคณะ, 2546) ที่สภาวะการเลี้ยงดังกล่าวยีสต์ *Pichia sp.* มีเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วภายใน 24 ชั่วโมง และมีการเพิ่มขึ้นสูงสุดที่ 72 ชั่วโมง มีจำนวนเซลล์เท่ากับ 2.45×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นจำนวนเซลล์ลดลง เมื่อสิ้นสุดการทดลองมีจำนวนเซลล์เท่ากับ 2.02×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร การเพิ่มขึ้นของจำนวนยีสต์แปรผกผันกับ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ซึ่งลดลงอย่างมากภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมงแรกของการทดลอง และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงอย่างต่อเนื่องจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง โดยปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลง มากที่ 96 ชั่วโมง การศึกษาของอัญชัญ พบว่ายีสต์ *Pichia sp.* สามารถเจริญได้ดีที่ความเค็ม 25 และ 30 พีพีที (อัญชัญ และอมรรรัตน์, 2555) ข้อดีของการใช้กากขานอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนทำให้ลดต้นทุนในการเลี้ยงเชื้อยีสต์ และยังพบว่าเชื้อยีสต์นั้นสามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นของเหลือใช้ทางการเกษตร อาทิเช่น ฟางข้าว ชังข้าวโพด ขานอ้อย กากน้ำตาล (Gutierrez และคณะ, 1993) หรือแม้กระทั่งเอทานอล (Evans และ Ratledge, 1992)

5.2 การตรึงเซลล์

เป็นเวลากว่าสองทศวรรษที่เมื่อนักวิทยาศาสตร์จากหลายประเทศพยายามที่จะพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตอาหารสำเร็จรูปเพื่อใช้ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันหรือใช้เป็นวัคซีนป้องกันโรคในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์น้ำ เพื่อทดแทนอาหารมีชีวิตที่มีราคาสูง และต้องเสี่ยงกับการปนเปื้อนเชื้อโรคต่างๆ ทำให้นักวิทยาศาสตร์ทั้งหลายพยายามออกแบบสารอาหารที่มีลักษณะเฉพาะเจาะจงและเหมาะสมต่อการการเลี้ยงสัตว์น้ำต่างๆ โดยพัฒนาอาหารสำเร็จรูปให้อยู่ในรูปแบบของไมโครแคปซูล (Luzardo-Alvarez, Otero-Espinar และ Blanco-Méndez, 2010)

สารพาหะที่นิยมใช้ในการตรึงเซลล์ เพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์ คือโซเดียมอัลจิเนตและทำให้เกิดเป็นเม็ดเจลด้วยสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ เนื่องจากอัลจิเนตเป็นพอลิเมอร์ที่พบมากในธรรมชาติ มีคุณสมบัติในการดูดซับสารที่มีประจุได้ และสามารถใช้เป็นวัสดุตรึงเซลล์ได้ (Bajpai and Sharma, 2004; Chiou and Li, 2002 and Ngah and Fatinathan, 2008) ความเข้มข้นของอัลจิเนตและแคลเซียมคลอไรด์ที่ใช้ในการขึ้นรูปเจลมีความหลากหลายขึ้นกับวัตถุประสงค์ของการใช้งาน จากการทดลองเตรียมเม็ดเจลโดยใช้ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ร้อยละ 1.0 1.5 และ 2 โซเดียมอัลจิเนตที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.8 1.2 และ 1.6 เม็ดเจลที่ได้มีลักษณะเป็นเจลมีสีขาวขุ่น มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางอยู่ในช่วง 3.5 - 4.8 มิลลิเมตร ซึ่งการขึ้นรูปเป็นเม็ด เจลนี้เกิดขึ้นจากการบรรจุสารเนื้อผสมโซเดียมอัลจิเนตใส่ในหลอดฉีดยา แล้วฉีดสารให้หยดลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ (Syringe method) Zhou และคณะ (2010) ได้อธิบายว่าเนื่องจากสารละลายอัลจิเนตมีโครงสร้างที่เป็นประจุลบ ที่เกิดจากหมู่คาร์บอกซิลของอัลจิเนต คือ α -L-guluronic acid และ β -D-mannuronic acid เมื่ออยู่ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ทำให้เกิดการเชื่อมไขว้ ของ α -L-guluronic acid และ Ca^{2+} ไอออนของ CaCl_2 วิธีการนี้สอดคล้องกับรายงานของ Mitropoulou และคณะ (2013) ที่อธิบายขั้นตอนตรึงเซลล์แบคทีเรียโดยใช้โซเดียมอัลจิเนต เพื่อใช้ในการผลิตอาหารเสริมโปรไบโอติก (ภาพที่ 5.1)



ภาพที่ 5.1 กระบวนการทำเซลล์ตรึงและโครงสร้างทางเคมีของโซเดียมอัลจีเนตพร้อมแผนภาพของจุลินทรีย์และไฮโดรเจล (Mitropoulou และคณะ, 2013)

จากผลการทดลองพบว่า เมื่อใช้โซเดียม อัลจีเนตที่ความเข้มข้นร้อยละ 1.2 หรือ 1.6 แคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1.5 และ 2 ตรึงสาร 4 ชนิด คือ ปาเปน ทริปซิน อัลบูมิน บลูเดกซ์แทรน และปลาป่น พบว่าที่ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจีเนตร้อยละ 1.2 และ 1.6 สารที่นำมาตรึงดังกล่าว ไม่มีการหลุด ออกจากเม็ดเจล ตั้งแต่เริ่มต้นการทดลองจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลองที่ 48 ชั่วโมง แสดงว่าแคลเซียมอัลจีเนตที่ความเข้มข้นดังกล่าวมีประสิทธิภาพในการตรึงสารพอลิเมอร์ และปลาป่น แต่เมื่อใช้โซเดียมอัลจีเนตเข้มข้นร้อยละ 1.6 และแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 2 เม็ดเจลที่ได้มีลักษณะแข็งไม่เหมาะสำหรับใช้เป็นอาหารปลา ในงานวิจัยครั้งนี้ผู้ทดลองจึงได้ทำการตรึงเซลล์ยีสต์และโปรตีนโดยใช้อัลจีเนตที่ความเข้มข้นร้อยละ 1.2 แคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1.5 เพราะเป็นความเข้มข้นน้อยที่สุดที่เจลไม่เสียสภาพเพราะไม่มีการหลุดของสารออกมา การศึกษาโดยทั่วไปใช้อัลจีเนตความเข้มข้นร้อยละ 1-2 และทำให้แข็งตัวในแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 0.05 – 1.5 (Krasaekoopt และคณะ, 2003)

5.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันจากยีสต์ที่ตรึงในแคลเซียมอัลจิเนต

การวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันจากตัวอย่างเซลล์ยีสต์ *Pichia sp.* ที่ผ่านการตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต พบว่ากรดปาล์มิติก (palmitic acid, C16:0) เป็นองค์ประกอบมากที่สุด รองลงมาคือกรดไขมันโอเลอิก (Oleic acid, C18:1n9) ตามลำดับ โดยพบกรดไขมันไม่อิ่มตัวทั้งหมด (unsaturated fatty acid : USFA) ร้อยละ 30.29 ของกรดไขมันทั้งหมด เป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว (Monounsaturated Fatty Acid: MUFA) ร้อยละ 20.26 ของกรดไขมันทั้งหมด มีกรดไขมันโอเลอิก (Oleic acid, C18:1n9) เป็นองค์ประกอบที่มากที่สุดประมาณร้อยละ 17.83 ของกรดไขมันทั้งหมด กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (Polyunsaturated Fatty Acid: PUFA) ร้อยละ 9.93 ของกรดไขมันทั้งหมดและมี กรดไลโนเลอิก (Linoleic acid, C18:2n6c) เป็นองค์ประกอบที่มากที่สุดประมาณร้อยละ 3.14 ของกรดไขมันทั้งหมด ปริมาณและองค์ประกอบของกรดไขมันที่พบจะมีความแตกต่างกันตามปัจจัยการเลี้ยง ส่วนปริมาณมีความแตกต่างกันไปตามชนิดของยีสต์ (อัจฉราวรรณ , 2530) Evans และ Ratledge (1992) ได้ศึกษาอาหารที่ใช้เลี้ยงยีสต์และองค์ประกอบของกรดไขมันในยีสต์ *Candida curvata* โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน แหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการศึกษาคือ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลซูโครส น้ำตาลแลคโตส น้ำตาลไซโลส และเอทานอล ซึ่งพบว่ากรดไขมันจากเชื้อยีสต์ *C. curvata* ในแหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำตาลไซโลส ให้กรดไขมันอิ่มตัวชนิด กรดปาล์มิติก (Palmitic acid, C16:0) และกรดสเตียริก (Stearic acid, C18:0) สูงที่สุด แต่กลับให้กรดไลโนเลอิก (Linoleic acid, C18:2n6) ที่เป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวน้อยที่สุด ตรงกันข้ามกับแหล่งคาร์บอนที่เป็นเอทานอล เพราะกรดไขมันจากยีสต์ *C. curvata* ในเอทานอลให้กรดไขมันอิ่มตัวจำพวกกรดปาล์มิติกน้อยที่สุด แต่กลับให้กรดไขมันไม่อิ่มตัวจำพวกกรดไลโนเลอิกสูงที่สุด

5.4 การใช้ประโยชน์จากสารสกัดหรือเซลล์สิ่งมีชีวิตในการศึกษาระบบภูมิคุ้มกันสัตว์น้ำ

ยีสต์ซึ่งเป็นโปรตีนเซลล์เดี่ยว (Single cell protein) เป็นจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งที่มีความสนใจอย่างมากในยุโรปและอเมริกา เนื่องจากสามารถผลิตได้มากในระยะเวลาสั้นและใช้พื้นที่การผลิตน้อย การนำยีสต์ไปประยุกต์ใช้ในด้านอุตสาหกรรมต่างๆ โดยเฉพาะอุตสาหกรรมอาหารหรือการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ การใช้ยีสต์ต้องคำนึงถึง ความบริสุทธิ์ปลอดภัยและไม่มีสารพิษจึงจะสามารถนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารได้ ส่วนการใช้ยีสต์เสริมในอาหารสัตว์สามารถใช้ได้ทั้งในลักษณะเชื้อเป็นและเชื้อตาย (พันทิพา, 2539)

การศึกษาการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำมีรายงานการใช้สารประกอบที่ได้มาจากสิ่งมีชีวิตมาเป็นระยะเวลาเกินกว่า 10 ปี เช่น โคติน เบต้ากลูแคน สารสกัดกลุ่มพอลิแซคคาไรด์จากสาหร่าย (และ erson, 1996; Sakai, 1999) โซเดียมอัลจิเนต และ k-คาราจีแนน (Fujiki และคณะ, 1994; Fujiki และ Yano, 1997; Cheng และคณะ, 2007; 2008) ในปลาชนิดต่างๆ เช่น การใช้เบต้ากลูแคน (β -glucan) การใช้เซลล์ยีสต์เพื่อกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของปลา gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) (Ortuño และคณะ, 2002) ปลา channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Chen และ Ainsworth, 1992) ปลา Atlantic salmon, *Salmo salar* (Engstad และคณะ, 1992) ปลา rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Verlhac และคณะ, 1996) ปลา gilthead seabream, *Sparus auratus* (Castro และคณะ, 1999) และปลา European seabass, *Dicentrarchus labrax* (Bagni และคณะ, 2005)

การใช้โซเดียมอัลจิเนต และ k-คาราจีแนน ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลาคาร์พ (*Cyprinus carpio*) (Fujiki และคณะ, 1994; Fujiki และ Yano, 1997) และปลาเก๋า (Cheng และคณะ, 2007; 2008)

การใช้ Ergosan, สารสกัดจากสาหร่ายที่มี alginic acid เป็นองค์ประกอบ ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดไม่เฉพาะเจาะจง (non-specific immune) ของปลา striped snakehead, *Channa striata* (Miles และคณะ, 2001) ปลา rainbow trout, *O. mykiss* (Peddie และคณะ, 2002) และปลา European seabass, *D. labrax* (Bagni และคณะ, 2005)

วิธีใช้ประโยชน์จากสารประกอบดังกล่าวทั้งวิธีการผสมในอาหารหรือการฉีดเข้าสู่ร่างกายของสัตว์น้ำ พบว่าสารประกอบเหล่านี้สามารถเปลี่ยนแปลงระบบภูมิคุ้มกัน เพิ่มการตอบสนองระบบภูมิคุ้มกันของปลาและเพิ่มความสามารถในการต้านทานโรคของปลา เช่น การศึกษาภูมิคุ้มกันชนิดไม่เฉพาะเจาะจง (non-specific disease resistance) ในการต้านทานโรคแอตแลนติกแซลมอนโดยวิธีการฉีด glucan เข้าสู่กล้ามเนื้อซึ่งพบว่าปลาแอตแลนติกแซลมอนต้านทานโรคดีขึ้น แต่อย่างไรก็ตาม ต้องคำนึงถึงระดับของความเข้มข้นของ glucan เพราะปริมาณ glucan ที่มากเกินไปมีผลต่อการทำงานของ macrophage (Robertsen, และคณะ, 1990)

การศึกษาการฉีดคาราจีแนนซึ่งเป็นพอลิแซคคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบหลักในสาหร่ายสีแดงเข้าไปในปลาปลาแคร์ฟ (*Cyprinus capio*) พบว่าสามารถกระตุ้นการทำงานของ macrophage (macrophage phagocytic activity) และปลาแคร์ฟสามารถต้านทานโรคได้ดีขึ้น (Fujiki และ Yano, 1997)

การศึกษาการใช้ k-คาราจีแนน หรือไฮเดียมอัลจีเนตที่สกัดจากสาหร่ายทะเลผสมในอาหารปลาเก่า brawn-marbled grouper, *Epinephelus fuscoguttatus* ในอัตราส่วน 5 10 และ 25 กรัมต่อ 1 กิโลกรัมอาหารเป็นระยะเวลา 14 สัปดาห์ หลังจากนั้นจึงเผชิญเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio alginolyticus* ที่มีอัตราส่วน 5.0×10^9 colony-forming units (cfu) ต่อปลา 1 ตัว พบว่าปลาเก่าที่กินอาหารที่มีส่วนผสมของไฮเดียมอัลจีเนตในอัตราส่วน 10 กรัมต่อกิโลกรัมอาหารหรือน้อยกว่า 10 กรัมต่อ 1 กิโลกรัมอาหาร และปลาเก่าที่กินอาหารที่มีส่วนผสมของ k-คาราจีแนนมีการรอดตายสูงและปลาเหล่านี้มีภูมิคุ้มกันเพิ่มขึ้นและสามารถต้านทานต่อการติดเชื้อ *V. alginolyticus* ได้ดีขึ้น (Cheng และคณะ, 2008)

นอกจากนี้ Chiu และคณะ (2008) รายงานว่าการใช้ไฮเดียมอัลจีเนตผสมในอาหารปลาเก่าระยะวัยรุ่น *E. fuscoguttatus* ในปริมาณมากกว่า 1 กรัมต่อ 1 กิโลกรัมอาหารและให้ปลากินอาหารเป็นระยะเวลา 9 วัน พบว่าปลาเก่าที่กินอาหารเหล่านี้มีภูมิคุ้มกันเพิ่มขึ้นและการต้านทานต่อเชื้อ *Streptococcus* sp. ได้ดีขึ้น

สำหรับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันปลาโดยใช้ปรสิตนั้นได้มีรายงานของ Yambot และ Song (2006) ศึกษาเกี่ยวกับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลากะรังจุดส้ม (*Epinephelus coioides*) ในการป้องกันการติดเชื้อปรสิต *C. irritans* การกระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลากะรังจุดส้มทำโดยให้ปลาสัมผัสกับเชื้อปรสิต *C. irritans* ระยะ theront ซึ่งได้จากระยะ tomont และโดยการฉีดเชื้อตายซึ่งประกอบด้วย *C. irritans* ระยะ theront ที่ถูกฆ่าด้วยฟอร์มาลีนเข้าทางช่องท้อง นอกจากนี้ Bai และคณะ (2008) ศึกษาเกี่ยวกับ *C. irritans* โดยแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการตอบสนองระบบภูมิคุ้มกันของปลาต่อปรสิต *C. irritans* และการป้องกันการติดเชื้อ เปรียบเทียบการตอบสนองภูมิคุ้มกันในปลากะรัง จากการชักนำให้เกิดการต้านเชื้อปรสิต *C. irritans* โดยใช้ปรสิตระยะ theront, tomont และ trophont นอกจากนี้ Xu และคณะ (2009) ได้ทดลองการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลาดุกด้วยปรสิตระยะ trophonts ที่อ่อนแอ

โครงการวิจัยการพัฒนาการผลิตวัคซีนและสารเสริมอาหารโดยเทคนิคการตรึงเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลาทะเลต่อปรสิตสัตว์น้ำหรือแบคทีเรียในปีที่ 1 นั้นสามารถตรึงเซลล์ยีสต์และปรสิต *C. irritans* ระยะ theront ด้วยแคลเซียมอัลจินเต สำหรับนำไปใช้ในการผลิตอาหารสัตว์น้ำเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันปลาให้สามารถต้านเชื้อปรสิต *C. irritans* ที่ทำให้เกิดโรคจุดขาวน้ำเค็มในโครงการปีที่ 2 ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- ฉันทรา พูนศิริ. 2549. เทคนิคไมโครเอนแคปซูเลชัน. วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. หน้า 57-60.
- ณิชา สิรินนท์ธนา จารุพันธ์ ประทุมยศ และจันทร์จรัส วัฒนะโชติ. 2556. ศักยภาพของจุลินทรีย์ทะเล: แหล่งกรดไขมันชนิดจำเป็น. รายงานวิจัยประจำปีงบประมาณ 2556 สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล, มหาวิทยาลัยบูรพา.
- พันธิพา พงษ์เพี้ยจันทร์. 2539. หลักอาหารสัตว์ เล่ม 2: หลักโภชนาศาสตร์และการประยุกต์. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์ กรุงเทพมหานคร.
- ภาวิณี คณาสวัสดิ์. 2531. การตรึงเอนไซม์และเซลล์ ภาควิชาเคมี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 211 หน้า.
- สุพรรณณี ลิขิตวาลิต จันทร์จรัส วัฒนะโชติ นารัตน์ ฤทธิธมน์ วิลยา แก่นจันทร์ และนันทิกา คงเจริญพร. 2554. การศึกษาโรคจุดขาวน้ำเค็มที่เกิดจากโปรโตซัว *Cryptocaryon* sp. ในปลาทะเลในประเทศไทย. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา บางแสน.
- สมใจ ศิริโชค. 2547. จุลชีวอุตสาหกรรม. ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ. 340 หน้า.
- อิงสุรจักษ์ สังข์เงิน และชนิดาภา ยิ่งประยูร. 2554. การศึกษาองค์ประกอบของกรดไขมันในยีสต์ (BS1-2 และ BS6-2) ที่แยกได้จากน้ำทะเลในอาหารเลี้ยงเชื้อจากกากขานอ้อย. บัณฑิตวิทยาลัย, สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.
- อัจฉราวรรณ ทองมี. 2530. การสกัดกรดไขมันจากยีสต์ *Rhodotorula gracilis*. คุชฎินิพนธ์ สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะพลังงานและวัสดุ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.
- อัญชัญ ธนบุญรุ่งเรือง และนางสาวอมรรัตน์ อุดรไชย 2555. การศึกษาองค์ประกอบของกรดไขมันในยีสต์ BS 6-2 ที่แยกได้จากน้ำทะเลในอาหารเลี้ยงเชื้อจากกากขานอ้อยที่มีความเค็มแตกต่างกัน 3 ระดับ. บัณฑิตวิทยาลัย, สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.
- Alcorn, S.W., Pascho, R.J., Murray, A. L. and Shearer, K.D. 2003. Effects of ration level on immune functions in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) *Aquaculture* 217, 529-545.
- Anderson, D.P., 1996. Environmental factors in fish health: immunological aspects. In: Iwama, G., Nakanishi, T. (Eds.), *The Fish Immune System, Organism, Pathogen, and Environment*. Academic Press, San Diego, CA, pp. 289-310.

- Anderson, M. and Fritsche, K.L. 2002. N-6 fatty acids and infectious disease resistance. *Journal of nutrition* 132, 3566-3576.
- Bach, A.C. and Babayan, V.K. 1982. Medium-chain triglycerides: an update. *AM. J. Clin. Nutr.* 36, 950-962.
- Bagni, M., Romano, N., Finioia, M.G., Abelli, L., Scapigliati, G., Tiscar, P.G., Sarti, M., Marino, G., 2005. Short- and long-term effects of a dietary yeast β -glucan (Macrogard) and alginic acid (Ergosan) preparation on immune response in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Fish Shellfish Immunol.* 18, 311-325.
- Bajpai, S. K. and Sharma, S. 2004. Investigation of swelling degradation behavior of alginate beads crosslinked with Ca^{2+} and Ba^{2+} ions. *Reactive and Functional Polymers*, 59 (2), 129-140.
- Bakhle, Y.S. 1983. Synthesis and catabolism of cyclo-oxygenase products. *Br. Med. Bull.* 39, 214-218.
- Balfry, S. K. and Higgs, D. A. 2001. Influence of dietary lipid composition on the immune system and disease resistance of finfish. *In* Lim, C. and Webster, C. D. (eds.) *Nutrition and fish health*. The Haworth Press, Inc. Binghamton, NY. pp. 213-234.
- Balzer, V.S., Ankley, G.T. and Finco-Kent, D. 1989. Dietary influences on disease resistance factors in channel catfish. *Development and Comparative Immunology* 116B, 263-267.
- Baskerville-Bridge, B. and Kling, L.J. 2000. Development and evaluation of microparticulate diets for early weaning of Atlantic cod *Gadus morhua* larvae. *Aquaculture nutrition* 6, 171-182.
- Blazer, V.S. 1992. Nutrition and disease resistances in fish. *Annual review of fish diseases* 2, 309-323.
- Bell, J.G., McVicar, A.H., Park, M.T. and Sargent, J.R. 1991. High dietary linoleic acid affects the fatty acid compositions of individual phospholipids from tissues of Atlantic salmon (*Salmo salar*): Association with stress susceptibility and cardiac lesion. *Journal of nutrition* 121, 1163-1172.

- Bell, J.G., Sargent, J.R. and Raynard, R. S. 1992. Effects of increasing dietary linoleic acid on phospholipid fatty acid composition and eicosanoid production in leucocytes and gill cells in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty acids 45: 197-206.
- Bell, J.G., Dick, J.R., McVicar, A.H., Sargent, J.R. and Thompson, K.D. 1993. Dietary sunflower, linseed and fish oils affect phospholipid fatty acid composition, development of cardiac lesions, phospholipase activity and eicosanoid production in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids 49, 665-673.
- Bell, J.G., Tocher, D.R., MacDonald, F. M. and Sargent, J.R. 1994. Effects of diets rich in linoleic (18:2n-6) and α -linolenic (18:3n-3) acids on the growth, lipid class and fatty acid compositions and eicosanoids production in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.). Fish Physiology and Biochemistry 13: 105-118.
- Bell, J.G., Castell, J.D., Tocher, D.R., MacDonald, F.M. and Sargent, J.R. 1995. Effects of different dietary arachidonic acid:Docosahexaenoic acid ratios on phospholipid fatty acid compositions and prostaglandin production in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). Fish physiology and biochemistry 14, 139-151.
- Bell, J.G., Ashton, I., Secombes, C.J., Weitzel, B.R., Dick, J.R. and Sargent, J.R. 1996. Dietary lipid affects phospholipid fatty acid compositions, eicosanoid production and immune function in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty acids 54: 173-182.
- Blazer, V.S. 1992. Nutrition and disease resistance in fish. Annual. Rev. of Fish Diseases 2, 309-232.
- Blazer, V.S. Ankley, G.T. and Finco-Kent, D. 1989. Dietary influences on disease resistance factor in channel catfish. Devl. Comp. Immunol. 13, 43-48.
- Buchholz, K., Kasche, V. and Bornscheuer, U. T. 2012. Biocatalysts and Enzyme Technology. Wiley-VCH Verlag & Co. Germany. 606 pp.

- Calder, P.C., Bond, J.A., Bevan, S.J., Hunt, S. V. and Newsholme, E.A. 1991. Effects of fatty acids on the proliferation of concanavalin A-stimulated rat lymph node lymphocytes. *International Journal of Biochemistry* 23, 579-588.
- Calder, P.C., Yaqoob, P., Thie, F. Wallace, F.A. and Miles, E.A. 2002. Fatty acids and lymphocytes functions. *British Journal of Nutrition*, 87, S31-S48.
- Calder, P.C. 2007. Immunomodulation by omega-3 fatty acids. *Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids* 77, 327-335.
- Calinescu, I., Chipurici, P., Trifan, A. and Badoiu, C. 2012. Immobilisation of *Saccharomyces cerevisiae* for the production of bioethanol. *U.P.B. Sci> Bull., Series B*, 74, 33-40.
- Castell, J.D., Bell, J.G., Tocher, D.R. and Sargent, J.R. 1994. Effects of purified diets containing different combinations of arachidonic acid and docosahexaenoic acid on survival, growth and fatty acid composition of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture* 128, 315-333.
- Castro, R., Couso, N., Obach, A., Lamas, J., 1999. Effect of different beta-glucans on the respiratory burst of turbot (*Psetta maxima*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*) phagocytes. *Fish Shellfish Immunol.* 9, 529-541.
- Change, H.R., Dullo, A.G., Dullo, A.G., Vladoianu, I.R., Piguët, P.F., Arsenijevic, D., Girardier, L. and Pechère, J.C. 1992. Fish oil decreases natural resistance of mice to infection with *Salmonella typhimurium*. *Metabolism* 41, 1-2.
- Chen, D., Ainsworth, A.J., 1992. Glucan administration potentiates immune defense mechanisms of channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque. *J. Fish Dis.* 15, 295-304.
- Cheng, A.C., Tu, C.W., Chen, Y.Y. Nan, F.H. and Chen, J.C. 2007. The immunostimulatory effects of sodium alginate and iota-carrageenan on orange-spotted grouper *Epinephelus coioides* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Fish Shellfish Immunology* 22, 197-205.

- Cheng, A.C., Chen, Y.Y, and Chen, J.C. 2008. Dietary administration of sodium alginate and k-carrageenan enhances the innate immune response of brown-marbled grouper *Epinephelus fuscoguttatus* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Veterinary immunology and immunopathology* 121, 206-215.
- Chiu, S.T., Tsai, R.T., Hsu, J.P., Liu, C.H. and Cheng, W. 2008. Dietary sodium alginate administration to enhance the non-specific immune response, and disease resistance of the juvenile grouper *Epinephelus fuscoguttatus* 277, 66-72.
- Claesson, H-E., Odlander, B., Jakobsson, P-J. 1992. Leukotriene B4 in the immune system, *Int. Immunopharm*, 14,441-449.
- Coloni, A. 1987. Biology of *Cryptocaryon irritans* Brown. In: Ludvik, J., Lom, J., Vavra, J. (eds.), *Progress in protozoology proceedings of the 1st international congress on protozoology*. Academic press, New York, pp. 284-287.
- Costa-Rosa, L.F.B.P., Safi, D.A. and Guimarães, A.R.P. 1996. The effect of n-3 PUFA rich diet upon macrophage and lymphocytes metabolism and function. *Biochemistry and molecular biology international* 40, 833-742.
- Crawford, M.A. 1983. A background to essential fatty acids and their prostanoid derivatives. *Br. Med. Bull.* 39, 210-213.
- Dickerson, H.W. and Dawe, D.L. 1995. *Ichthyophthirius multifiliis* and *Cryptocaryon irritans* (Phylum Ciliophora). In: Woo, P.T.K. (ed.), *Fish diseases and disorders. Protozoan and Metazoan Infection*, vol. 1, CAB International, UK, pp. 181-227.
- Duarte, J. C., Rodrigues, J. A. R., Moran, P. J. S., Valença, G. P. and Nunes, J. R., 2013. Effect of immobilized cells in calcium alginate beads in alcoholic fermentation. *AMB Express*, a SpringerOpen Journal.
- Ellis, A.E. 1999. Immunity to bacteria in fish. *Fish Shellfish Immunol.* 9, 291-308.
- Ellis, A.E. 2001. Innate host defence mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Dev. Comp. Immunol.* 25, 827-839.
- Engstad, R., Robertsen, B., Frivold, E., 1992. Yeast glucan induces increase in lysozyme and complement-mediated haemolytic activity in Atlantic salmon blood. *Fish Shellfish Immunol.* 2, 287-297.

- Erdal, J. I., Evensen, O., Kaurstad, O.K., Lillehaug, A., Solbakken, R. and Thorud, K. 1991. Relationship between diet and immune response in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) after feeding various levels of ascorbic acid and omega-3 fatty acids. *Aquaculture* 98, 363-379.
- Evans, C.T. and Ratledge, C. (1992). A Comparison of Oleaginous Yeast, *Conidia curvata*, Grown on Different Carbon Sources in Continuous and Batch Culture. *Lipids*, 18 (9), 623 - 629.
- Fontagne, S., Robin, J., Corraze, G. and Bergot, P. 2000. Growth and survival of European sea bass (*Decentrachus labrax*) larvae fed from first feeding on compound diets containing medium-chain triacylglycerols. *Aquaculture* 190, 261-271.
- Fracalossi, D.M. and Lovell, R.T. 1994. Dietary lipid sources influences responses of challel catfish (*Ictalurus punctatus*) to challenge with the pathogen *Edwardsiella ictaluri*. *Aquaculture* 119, 287-298.
- Fujiki, K. and Yano, T. 1997. Effects of sodium alginate on the non-specific defence system of the common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish Shellfish Immunology* 7, 319-330.
- Fukiji, K., Matsuyama, H. and Yano, T. 1994. Protective effect of sodium alginates against bacterial infection in common carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Fish Diseases* 17, 349-355.
- Fuchs, B. C. and Bode, B. P. 2006. Stressing out over survival: glutamine as an apoptotic modulator. *Journal of surgical research* 131, 26-40.
- Fletcher, T.C. 1986. Modulation of non-specific host defenses in fish. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 12, 59-67
- FuKuda, Y., Nguyen, H.D., Furuhashi, M., Nakai, T. 1999. Mass mortality of cultured sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus*, associated with viral nervous necrosis. *Fish Pathol.* 31, 165-170

- Gannam, A.L. and Schrock, R.M. 2001. Immunostimulants in fish diets. *In* Lim, C. and Webster, C. D. (eds.) Nutrition and fish health. The Haworth Press, Inc. Binghamton, NY. pp. 213-234.
- Grinde, B. 1989. Lysozyme from rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, as an antibacterial agent against fish pathogens. *J. Fish Dis.* 12, 95-104.
- Gross, R. L. and Newberne, P M. 1980. Role of nutrition in immunologic function. *Physiol. Rev.* 60, 188-302.
- Gulrez, S. K. H. and Al-Assaf, S. Hydrogels: Methods of Preparation, Characterisation and Applications. <http://www.intechopen.com/books/progress-in-molecular-and-environmental-bioengineering-from-analysis-and-modeling-to-technology-applications/hydrogels-methods-of-preparation-characterisation-and-applications>.
- Gurr, M.I. 1983. The role of lipids in the regulation of the immune system. *Progr. Lipid Res.* 22, 257-287.
- Gutierrez, L.E. and Da Silva, R.C.M. (1993). Fatty acid composition of cane molasses and yeasts. *Sci.agric*, 50 (3), 473 - 477.
- Hartmann, M. and Jung, D., 2010. Biocatalysis with enzymes immobilized on mesoporous hosts: the status quo and future trends. *Journal of Materials Chemistry.* 20, 844-857.
- Hawley, H. P. and Gordon, G.B. 1976. The effects of long chain free fatty acids on human neutrophil function and structure. *Lab. Invest.* 34, 216-222.
- Hazel, J.R. 1979. Influence of thermal acclimation on membrane lipid composition of rainbow trout liver. *Am. J. Physiol.* 263, R91-R101.
- Hirazawa, N., Ohtaka, T., Hata, K., 2000. Challenge trials on the anthelmintic effect of drugs and natural agents against the monogenean *Heterobothrium okamotoi* in the tiger puffer *Takifugu rubripes*. *Aquaculture* 188, 1–13.
- Hirazawa, N., Oshima, S., Hara, T., Mitsuboshi, T. and Hata, K. 2001. Antiparasitic effect of medium-chain fatty acids against the ciliate *Cryptocaryon irritans* infestation in the red sea bream *Pagrus major*. *Aquaculture* 198, 219-228.

- Horrobin, D.F. 1983. The regulation of prostaglandin biosynthesis by the manipulation of essential acid metabolism. *Rev. Pure Appl. Sci.* 4, 339-383.
- Hudson, R.J., Saben, H.S. and Emslie, D. 1974. Physiological and environmental influences on immunity. *Vet. Bull.* 44, 119-128.
- Jeffery, N.M., Yaqoob, P., Newsholme, E.A. and Calder, P.C. 1996. The effects of olive oil upon rat serum lipid levels and lymphocyte functions are due to oleic acid, *Annals of Nutrition and Metabolism* 40, 71-80.
- Jeffery, N. M., Sanderson, P., Sherrington, E.J., Newsholme, E.A. and Calder, P.C. 1996. The ratio of n-6 to n-3 polyunsaturated fatty acids in the rat diet alters serum lipid levels and lymphocyte functions. *Lipids*, 31, 737-745.
- Johnston, P.V. 1988. Lipids modulation of immune responses. In: Chandra, R.K. (ed.) *Nutrition and immunology*, Alan R. Liss, Inc., New York, NY, pp. 37-86.
- Jolly, C.A., Jiang, Y.H., Chapkin, R.S. and McMurray, D.N. 1997. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids suppress murine lymphoproliferation, interleukin-2 secretion and the formation of diacylglycerol and ceramide. *Journal of Nutrition* 127, 37-43.
- Kanazawa, A., Teshima, S.-I., Inamori, S., Sumida, S. and Iwashita, T. 1982. Rearing of larval Red Sea Bream and Ayu with artificial diets. *Mem. Fac. Fish., Kagoshima Univ.* 3, 185-192.
- Karagouni, E., Athanassopoulou, F., Lytra, A., Komis, C. and Dotsika, E. 2005. Antiparasitic and immunomodulatory effect of innovative treatments against *Myxobolus* sp. Infection in *Diplodus puntazzo*. *Veterinary parasitology* 134, 215-228.
- Kelley, D.S. 2001. Modulation of human immune and inflammatory responses by dietary fatty acids. *Nutrition* 17, 669-673
- Kim, K.H. and Choi, E.S. 1998. Treatment of *Microcotyle sebastis* (Monogenea) on the gills of cultured rockfish (*Sebastes schlegelii*) with oral administration of mebendazole and bithionol. *Aquaculture* 167, 115-121.

- Kinsella, J.E., Lokesh, B., Broughton, S. and Whelan, J. 1990. Dietary polyunsaturated fatty acids and eicosanoil: Potential effects on the modulation inflammatory and immune cells: An overview. *Nutrition* 6, 24-44.
- Kiron, V., Fukuda, H., Takeuchi, T. and Watanabe, T. 1995. Essential fatty acid nutrition and defense mechanisms in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Comparative biochemistry and physiology* 111A, 361-367.
- Kiuchi, F., Miyashita, N., Tsuda, Y., Kondo, K., Yoshimura, H., 1987. Studies on crude drugs effective on visceral larva migrans: I. Identification of larvicidal principles in betel nuts. *Chem. Pharm. Bull.* 35, 2880–2886.
- Kolkovski, S., 2004. Marine fish larvae diets – current status and future directions. 11th international symposium on nutrition and feeding in fish, Phuket, Thailand. pp112.
- Koven, W., Kolkovski, S. Hadas, E., Gamsiz, K. and Tandler, A. 2001. Advances in the development of microdiets for gilthead seabream, *Sparus aurata*: A review. *Aquaculture*, 194:107-121.
- Krasaekoot, W., Bhandari, B. and Deeth, H. 2003. The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. *Journal of Biological Chemistry*. 14, 737-743.
- Kutty, S.N. and Philip, R. 2008. Marine yeasts - a review. *Yeast*. 25:465-483.
- Lall, S. P. and Milley, J.E. 2002. Dietary lipids, immune function and pathogenesis of disease in fish. In: Driedzic, W., Mckinley, S. and Mackinlay, D (eds). *Biochemical and physiological advances in finfish aquaculture. Symposium proceedings. International Congress on the Biology fish.* 19-23.
- Landolt, M.L. 1989. The relationship between diet and the immune response of fish. *Aquaculture* 79, 193-206.
- Lazo, J. P., Dinis, M. T., Holt, G. J., Faulk, C., Arnold, C. R. 2000. Co-feeding microparticulate diets with algae: toward eliminating the need of zooplankton at first feeding in larval red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture*. 188, 339-351.

- Li, M.H., Wise, D.J., Jonhson, M.R. and Robinson, E.H. 1994. Dietary menhaden oil reduced resistance of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) to *Edwardsiella ictaluri*. *Aquaculture* 128, 335-344.
- Lie, O., Evensen, O., Sorensen, A. and Frogsadal, E. 1989. Study on lysozyme activity in some fish species. *Dis. Aquat. Org.* 6, 1-5.
- Lin, F.M. and Shiau, S. Y. 2005. Dietary L-ascorbic acid affects growth, nonspecific immune response and disease resistance in juvenile grouper, *Epinephelus malabaricus*. *Aquaculture* 244, 215-221.
- Lom, J., Dykova, I. and Feist, S. 1989. Mysosporea-induced xenoma formation in pike (*Esox Lucius L.*) renal corpuscles associated with *Mysidium lieberkunhi* infection. *Eur. J. Protistol.* 24, 271-280.
- Lopez Alvarado, J. Langdon, C. J., Teshima, S. I. and Kanazawa, A. 1994. Effect of coating and encapsulation of crystalline amino acids on leaching in larval feeds. *Aquaculture*. 122, 335-346.
- Luzardo-Alvarez, A., Otero-Espinar, F.J. and Blanco-Méndez, J. 2010. Microencapsulation of diets and vaccines for cultured fishes, crustaceans and bivalve mollusks. *J. Drug Del. Sci. Tech.*, 20:277-288.
- MacConnell, E., Smith, C.E., Hedrick, R. P. and Speer, C. A. 1989. Cellular inflammatory response of rainbow trout to the protozoan parasite that causes proliferative kidney disease. *J. Aquat. Anim. Health* 1, 108-190.
- Meade, C. J. and Mertin, J. 1978. Fatty acids and immunity. *Adv. Lipid Res.* 16, 127-165.
- Miles, D.C., Polchana, J., Lilley, J.H., Kanchankhan, S., Thompson, K.D., Adams, A., 2001. Immunostimulation of striped snakehead *Channa striata* against epizootic ulcerative syndrome. *Aquaculture* 195, 1–15.
- Miller, G.L., 1959, Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*. 31(3), 426-428
- Mitropoulou, M., Nedovic, V., Goyal, A and Kourkoutas, Y. 2013. Immobilization Technologies in Probiotic Food Production. *J. Nutr. Metab.* 716861: 15 p.

- Moore and Landecker E. (1996). *Fundamentals of the Fungi*. Retrieved December 15, 2012, from <http://th.wikipedia.org/wiki/>
- Ogawa, K, and Yokoyama, H. 1998. Parasitic diseases of cultured marine fish in Japan. *Fish Pathol.* 33, 303-309.
- Ortuño, J., Cuesta, A., Rodríguez, A., Esteban, M.A., Mesequer, J. 2002. Oral administration of yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, enhances the cellular innate immune response of gilthead seabream (*Sparus auratus* L.). *Veterinary immunology and immunopathology* 85, 41-50.
- Pauscual, C., Sánchez, A., Zenteno, E., Cuzon, G., Gaxiola, G., Brito, R., Gelabert, R., Hidalgo, E. and Rosas, C. 2006. Biochemical, physiological and immunological changes during starvation in juveniles of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 251, 416-429.
- Pauscual, C., Zenteno, E., Cuzon, G., Suárez, J., Sánchez, A., Gaxiola, G., Taboada, G., Suárez, J., Maldonado, T. and Rosas, C. 2004. *Litopenaeus vannamei* juveniles energetic balance and immunological response to dietary protein. *Aquaculture* 236, 431-450.
- Phillips, G.O. and Williams, P.A. 2000. *Handbook of Hydrocolloids*. Cambridge, UK: CRC Woodhead Publishing Limited.
- Peddie, S., Zou, J., Secombes, C.J., 2002. Immunostimulation in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following intraperitoneal administration of Ergosan. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 86, 101-113.
- Piomelli, D. 1993. Arachidonic acid in cell signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5, 274-280.
- Polk, A.E., Amsden, B., Scarratt, D., Gonzal, A., Okhamafe, A.O. and Goosen, M. F. A. 1994. Oral delivery in aquaculture: controlled release of proteins from chitosan-alginate microcapsules. *Aquaculture engineering.* 13: 311-323
- Robertsen, B., Rørstad, G., Engstad, R. and Raa, J. 1990. Enhancement of nonspecific disease resistance in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., by a glucan from *Saccharomyces cerevisiae* cell walls. *Journal of fish diseases* 13, 391-400.

- Robertsen, N. 1999. Modulation of the non-specific defense of fish by structurally conserved microbial polymers. *Fish Shellfish Immunology* 9, 269-290.
- Rosa-Pleszczynski.M. 1989. Leukotrienes and the immune system, *J. Lipid Mediators* 1, 149-159.
- Rohrer, L., Winterhalter, K.H., Eckert, J. and Kohler, P. 1986. Killing of *Giardia lamblia* by human milk is mediated by unsaturated fatty acids. *Antimicrob. Agents Chemother.* Aug; 30, 254-257.
- Roth, E. 2007. Immune and cell modulation by amino acids. *Clinical nutrition* 26, 535-544.
- Rowley, A.F., Knight, J., Lloyd-Evans, P., Holland, J.W. and Vickers, P.J. 1995. Eicosanoids and their role in immune modulation in fish- A brief overview. *Fish & shellfish immunology* 5, 549-567.
- Sakai, M., 1999. Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture* 172, 63-92.
- Samuelsson, B. 1983. Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity and inflammation. *Science* 20, 568-575.
- Sanderson, P., Yaqoob, P. and Calder, P.C. 1995a. effects of dietary lipid manipulation upon rat spleen lymphocyte functions and expression of cell surface molecules. *Journal of nutritional and environmental medicine* 5, 119-132.
- Sanderson, P., MacPherson, G.G., Jenkins, C.H. and Calder, P.C. 1998. Dietary fish oil diminished lymphocytes adhesion to macrophage and endothelial cell monolayers. *Immunology* 94, 79-87.
- Schroit, A.J. and Gallily, R. 1979. Macrophage fatty acid composition and phagocytosis: Effect of unsaturation on cellular phagocytic activity. *Immunology*, 36, 199-205.
- Sheldon, W.M. and Blazer, V.S. 1991. Influence of dietary lipid and temperature on bactericidal activity of channel catfish macrophages. *J. Aquat. Anim. Health* 3, 87-93.

- Sperling, R.I., Benincaso, A.I., Knoell, C.T., Larkin, J.K., Austen, K.F. and Robinson, D.R. 1993. Dietary ω -3 polyunsaturated fatty acids inhibit phosphoinositide formation and chemotaxis in neutrophils. *Journal of clinical investigation* 91, 651-660.
- Srivibool, R., Watanachote, J. And Teramoto, Y. 2011. Isolation, identification of marine yeasts and their amylase activity. The 4th International Conference FerVAAP 2011 on Fermentation Technology for value added agricultural products. August 29th-31st, 2011. Kosa Hotel, Khon Kaen, Thailand.
- Tang, D.G. and Chen, Y.Q., Honn, K.V. 1996. Arachidonate lipoxygenases as essential regulators of cell survival and apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 5241-5246.
- Teshima, S. Ishikawa, M. and Koshio, S. 2000. Nutritional assessment and intake of microparticulate diets in crustaceans and fish. *Aquaculture research*. 31, 691-702.
- Thompson, K.D., Tatner, M.F. and Henderson, R.J. 1996. Effects of dietary (n-3) and (n-6) polyunsaturated fatty acid ratio on the immune response of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Aquaculture nutrition* 2, 21-31.
- Trichet, V.V. 2010. Nutrition and immunity: and update. *Aquaculture research* 41, 356-372.
- Waagbo, R. 1994. The impact of nutritional factors on the immune system in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. A review. *Aquaculture and fisheries management* 25, 175-197.
- Verhac, V., Gabaudan, J., Obach, A., Schuep, W., Hole, R., 1996. Influence of dietary glucan and vitamin C on non-specific responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 143, 123-133.
- Waagbø, R., Sandnes, K., Lie, Ø. and Nilsen, E. R. 1993b. Health aspects of dietary lipid sources and vitamin E in Atlantic salmon (*Salmo salar*). I. Erythrocyte and total lipid fatty acid composition, haematology and humoral immune response.
- Watanabe, T. 1982. Lipid nutrition in fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 73B, 3-15.

- Wallace, F.A., Miles, E.A. and Calder, P.C. 2000a. Activation state alters the effect of dietary lipids on proinflammatory mediator production by murine macrophages. *Cytokine* 12, 1374-1379.
- Wallace, F.A., Miles, E.A., Evans, C., Stock, T.E., Yaqoob, P. and Calder, P.C. 2001. Dietary fatty acids influence the production of Th1-but not Th2-type cytokines. *Journal of leukocyte biology* 69, 449-457.
- Willaims, K.C. 2009. A review of feeding practices and nutritional requirements of postlarval groupers. *Aquaculture* 292, 141-152.
- Wu, F.C. and Chen, H.Y. 2012. Effects of dietary linolenic acid to linoleic acid ratio on growth, tissue fatty acid profile and immune response of the juvenile grouper *Epinephelus malabaricus*. *Aquaculture* 325, 111-117.
- Wu, F.C., Ting, Y.Y., Chen, H.Y. 2003. Dietary docosahexaenoic acid is more optimal than eicosapentaenoic acid affecting the level of cellular defense responses of the juvenile grouper *Epinephelus malabaricus*. *Fish and Shellfish Immunology* 14, 223-238
- Xu, H., Ai, Q., Mai, K., Wang, W. X., Wang, J., Ma, H. and Zhang, W. 2010. Effects of dietary arachidonic acid on growth performance, survival, immune response and tissues fatty acid composition of juvenile Japanese seabass, *Lateolabrax japonicus*. *Aquaculture* 307, 75-82.
- Yambot, A. Y. and Song, Y. L., 2006. Immunization of grouper, *Epinephelus coioides*, confers protection against a protozoan parasite, *Cryptocaryon irritans*. *Aquaculture* 260, 1-9.
- Yaqoob, P. and Calder, 1995a. Effects of dietary lipid manipulation upon inflammatory mediator production by murine macrophages. *Cellular Immunology* 163, 120-128.
- Yaqoob, P. and Calder, 1995b. The effects of dietary lipid manipulation on the production of murine T-cell-derived cytokines. *Cytokine* 7, 548-553.
- Yaqoob, P. 2003a. Fatty acids as gatekeepers of immune cell regulation. *Trends in immunology* 24, 639-645.

- Yaqoob, P. 2004. Fatty acids and the immune system: from basic science to clinical applications. *Proceeding of the nutrition society* 63, 89-104.
- Yii, K.C., Yang, T. I. and Lee, K. K. 1997. Isolation and characterization of *vibrio carchariae*, a causative agent of gastroenteritis in the groupers, *Epinephelus coioides*. *Curr. Microbiol.* 35, 109-115.
- Yoshinaga, T., Dickerson, H.W. 1994. Laboratory propagation of *Cryptocaryon irritans* Brawn, 1951 on saltwater-adapted black mollies (*Poecilia latipinna*). *J. Aquat. Anim. Health* 6, 197-201.

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ YM medium แบบเหลว ประกอบด้วย

yeast extract	0.6	กรัม
Malt extract	0.6	กรัม
Peptone	1	กรัม
Glucose	2	กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร ปิดปากฟลากลูบรุ่มพู่ น้ำเข้าเครื่องหม้อนึ่งความดันอัตโนมัติ ที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ YM medium แบบแข็ง ประกอบด้วย

yeast extract	0.9	กรัม
Malt extract	0.9	กรัม
Peptone	1.5	กรัม
Glucose	3	กรัม
Ager	4.5	กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร ปิดปากฟลากลูบรุ่มพู่ น้ำเข้าเครื่องหม้อนึ่งความดันอัตโนมัติ ที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

3. การเตรียมน้ำทะเลเทียมความเค็ม 25 พีพีที ประกอบด้วย

NaCl	20.24	กรัม
MgSO ₄ · 7H ₂ O	4.04	กรัม
MgCl ₂ · 6H ₂ O	2.91	กรัม
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.98	กรัม
KCl	0.64	กรัม
NaHCO ₃	0.32	กรัม
Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O	0.06	กรัม
KH ₂ PO ₄	0.04	กรัม

ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร และปรับที่พีเอช 7.4

4. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อกากขานอ้อย (สูตรกากขานอ้อยต่อ SM 25 1:10)

ชั่งกากขานอ้อย 100 กรัม ลงในบีกเกอร์ 3,000 มิลลิลิตร เติมน้ำทะเลเทียม ที่มีความเค็ม 25 พีพีที กวนและบดกากขานอ้อยเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นกรองกากขานอ้อยออกเอาเฉพาะส่วนน้ำใส่

ขวดฝาเกลียว ขนาด 1000 มิลลิลิตร ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ปิดปากขวดฝาเกลียว จากนั้น
นำเข้าหม้อเนื่องความดันอัตโนมัติ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

ภาคผนวก ข

การคำนวณ การวิเคราะห์และการนับจำนวนเซลล์ยีสต์

1. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Dinitrosalicylic acid assay (Miller, 1959)

1.1 การเตรียมสารละลาย 0.1 % Dinitrosalicylic acid

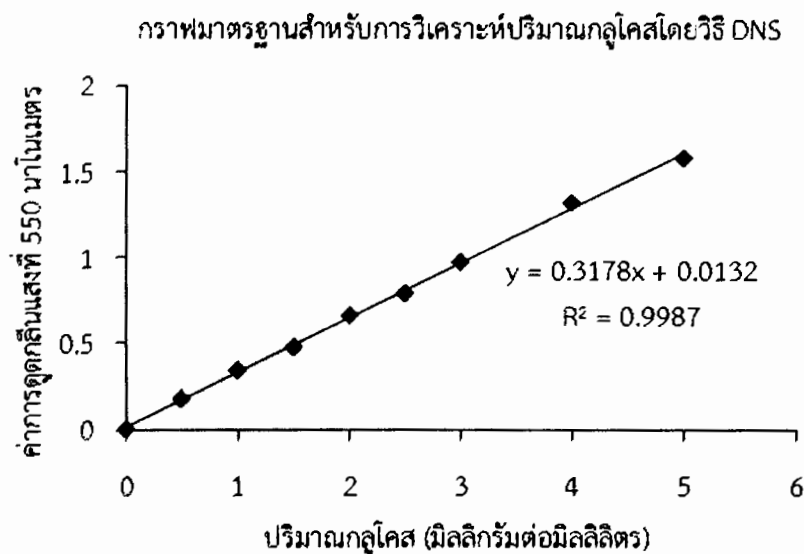
- การเตรียม 2M Sodium hydroxide: NaOH ชั่ง NaOH 20 กรัม ละลายน้ำ แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 250 มิลลิลิตร
 - ชั่ง 3, 5 - dinitrosalicylic acid: $C_7H_4N_2O_7$ 0.25 กรัม ละลายใน 2M NaOH ปริมาตร 100 มิลลิลิตร คนจนสารละลายหมด
 - ชั่ง Sodium potassium tartate: $KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$ 75 กรัม ละลายใน 2M NaOH ปริมาตร 100 มิลลิลิตร คนจนสารละลายหมด
- นำสารละลาย 3, 5 - dinitrosalicylic acid และ Sodium potassium tartate เทลง

ในขวดปรับปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วเติม 2M NaOH จนได้ปริมาตร 250 มิลลิลิตร

1.2 กราฟมาตรฐานกลูโคสและการวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS

ปิเปตสารละลายกลูโคส (ตารางภาคผนวกที่ ข.1) 100 ไมโครลิตร ลงในหลอด eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และเติม Dinitrosalicylic acid reagent 1 มิลลิลิตรลงในหลอด eppendorf ผสมสารละลายให้เข้ากัน และนำไปต้มที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 10 นาที จากนั้นนำไปแช่น้ำแข็ง และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร

ผลของกราฟมาตรฐานการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคสโดยวิธี DNS



ภาพภาคผนวกที่ ข. 1 กราฟมาตรฐานกลูโคสและการวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์

1.3 การคำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

คำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (มก./มล.) จากสมการ $y = 0.3178x + 0.0132$

เมื่อ $y =$ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตรของสารตัวอย่าง

$x =$ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (มก./มล.) โดยนำค่า x ที่ได้คูณด้วยอัตราการใช้ของสารตัวอย่างได้เป็นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของสารตัวอย่างในหน่วย (มก./มล.)

2. การคำนวณการนับจำนวนเซลล์ด้วย Haemocytometer

$$\text{การคำนวณ ปริมาตร 1 ช่อง} = 0.2 \text{ มม.} \times 0.2 \text{ มม.} \times 0.1 \text{ มม.}$$

$$= 0.04 \text{ ตร.ม.}$$

$$= 4 \times 10^{-3} \text{ ลบ.ม.}$$

$$\text{ปริมาตร 1 ซีซี} = 1 \text{ ลบ.ซม.} = 10^{-3} \text{ ลบ.มม.}$$

$$\text{ปริมาตร } 10^{-3} \text{ ลบ.มม.} = 1 \text{ มล.}$$

$$\text{ปริมาตร } 4 \times 10^{-3} \text{ ลบ.มม.} = \frac{1 \times 4 \times 10^{-3}}{10^3}$$

$$= 4 \times 10^{-6} \text{ มล.}$$

$$\text{ปริมาตร 1 ช่อง} = 4 \times 10^{-6} \text{ มล.}$$

เช่น ถ้านับจำนวนเซลล์จุลินทรีย์ทั้งหมด 5 ช่องได้ 80 เซลล์

$$1 \text{ ช่อง} = 80/5 = 16 \text{ เซลล์}$$

$$1 \text{ ช่อง หรือ } 4 \times 10^{-6} \text{ มล. นับได้ } 16 \text{ เซลล์}$$

$$1 \text{ ช่อง หรือ } 1 \text{ มล. นับได้ } = \frac{16 \times 1}{4 \times 10^{-6}} = 4 \times 10^6 \text{ เซลล์ต่อมิลลิลิตร}$$

ดังนั้น มีเซลล์จุลินทรีย์เท่ากับ 4×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

3. การคำนวณหาปริมาณความชื้น (Moisture)

$$\text{ร้อยละของน้ำหนักตัวอย่างแห้ง} \quad D = (C - A) \times 100$$

$$\text{ร้อยละของน้ำหนักน้ำในตัวอย่างเปียก} \quad E = (B \times 100) - D$$

โดย A คือ น้ำหนัก Crucible เปล่า (ก่อนอบ)

B คือ น้ำหนักตัวอย่างเปียก

C คือ น้ำหนักตัวอย่าง + น้ำหนัก Crucible เปล่า (หลังอบ)

D คือ ร้อยละของน้ำหนักตัวอย่างแห้ง

E คือ ร้อยละของน้ำหนักน้ำในตัวอย่าง

$$\text{ปริมาณความชื้น (ร้อยละโดยน้ำหนัก)} = \frac{100 - \{(\text{น้ำหนักตัวอย่างแห้ง}) \times 100\}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเปียก}}$$

4. การคำนวณหาปริมาณไขมันรวม (Crude fat)

$$\text{น้ำหนักไขมัน} = (\text{น้ำหนักไขมัน} + \text{น้ำหนัก flask}) - \text{น้ำหนัก flask เปล่า}$$

$$\text{ปริมาณไขมันทั้งหมด (ร้อยละโดยน้ำหนัก)} = \frac{\text{น้ำหนักไขมัน} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง(แห้ง)}}$$

5. การจำแนกชนิดกรดไขมันและการคำนวณร้อยละกรดไขมัน

1) นำ Ret time ของกรดไขมันแต่ละชนิดของตัวอย่างเซลล์ยีสต์ BS 6-2 ที่แสดงผลจากเครื่อง GC มาเปรียบเทียบกับ Ret time ของสารมาตรฐานที่เวลาเดียวกัน (ดังแสดงในตารางภาคผนวกที่ ข. 3)

$$\text{การคำนวณร้อยละกรดไขมัน} = \text{ASIN}(\text{SQRT}(\text{CELL}/100)) * 180 / \text{PI}()$$

หมายเหตุ : การคำนวณใช้ใน Microsoft Excel โดยกำหนดให้ CELL คือ Area ในกราฟโครมาโทแกรม

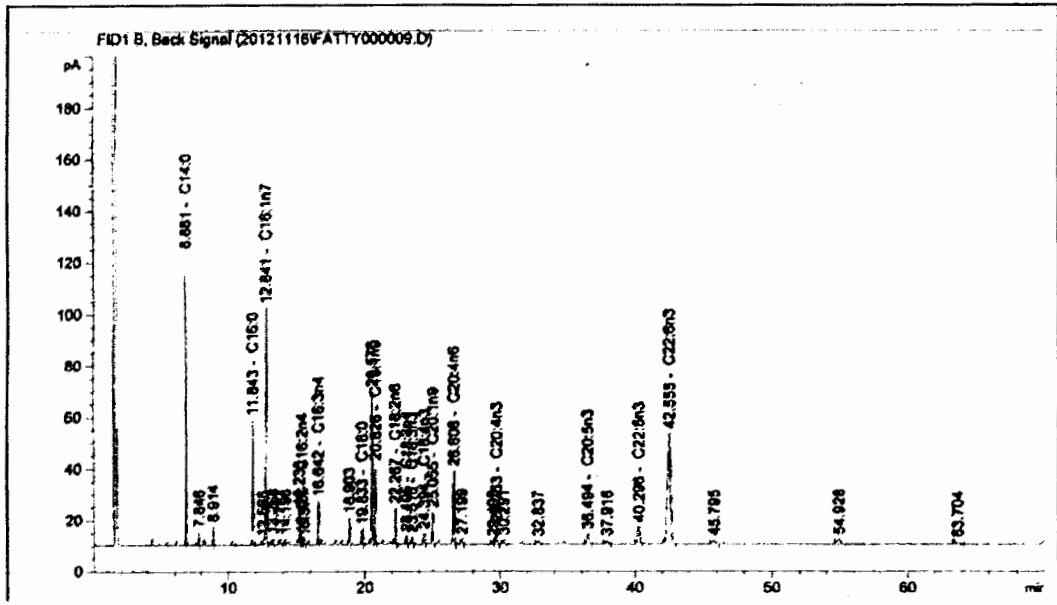
ที่มา : (Sokal and Rohlf, 1995)

ตารางภาคผนวกที่ ข. 1 สารมาตรฐานกรดไขมัน (PUFA) NO. 3 Menhaden oil ที่แสดงผลจาก
เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ

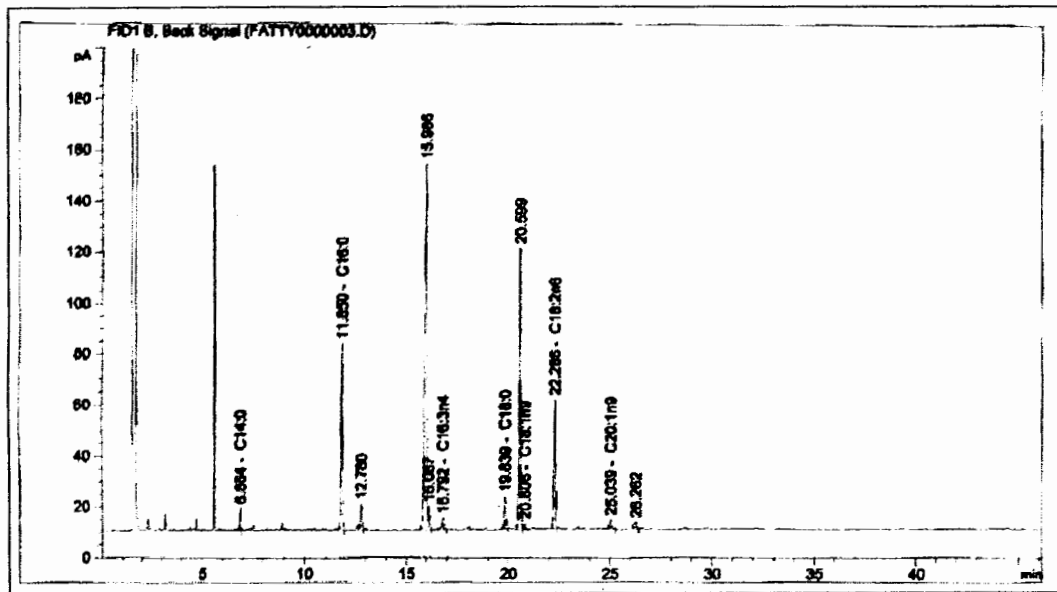
Ret Time	Area	Type	Width	Ret#	Amount%	Name
6.8	10.173	BV	0.042	1-R	0	C14:0
11.8	9.465	BB	0.072	1-R	0	C16:0
12.7	19.696	VB	0.073	1-R	0	C16:1n7
15.3	2.562	VV	0.087	1-R	0	C16:2n4
16.7	2.738	BV	0.075	1-R	0	C16:3n4
19.8	1.228	BB	0.072	1-R	0	C18:0
20.5	12.867	VV	0.078	1-R	0	C18:1n9
20.8	0.000	-	0.000	1-R	0	C18:1n7
22.2	2.645	BB	0.074	1-R	0	C18:2n6
23.1	0.522	BB	0.000	1-R	0	C18:3n4
23.6	0.459	BB	0.000	1-R	0	C18:3n3
24.5	0.863	BV	0.000	1-R	0	C18:4n3
25.0	2.757	BB	0.093	1-R	0	C20:1n9
26.5	5.246	BB	0.087	1-R	0	C20:4n6
29.7	2.336	VB	0.106	1-R	0	C20:4n3
36.5	1.286	BB	0.149	1-R	0	C20:5n3
40.3	2.185	BB	0.156	1-R	0	C22:5n3

ภาคผนวก ค

ตัวอย่างภาพโครมาโทแกรมกรดไขมัน



ภาพภาคผนวกที่ ค. 1 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานกรดไขมัน (PUFA) NO. 3 Menhaden oil



ภาพภาคผนวกที่ ค. 2 โครมาโทแกรมของตัวอย่างเซลล์ยีสต์ BS 6-2 ที่ 72 ชั่วโมง ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อกากขานอ้อยที่มีความเค็ม 25 พีพีที