

ผลของการเสริมราแดง (*Monascus* spp.) ในอาหารต่อการเจริญเติบโต
องค์ประกอบเลือด และความต้านทานเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ใน
ปลานิลแดง (*Oreochromis niloticus* × *O. mossambicus*)
Effects of Dietary Red Yeast Rice (*Monascus* spp.) Supplementation
on Growth Performance, Haematological Parameters, and Disease
Resistance Against *Streptococcus agalactiae* in Red Tilapia
(*Oreochromis niloticus* × *O. mossambicus*)

กิริติ ธนากรรัฐ¹ นปภัทร พระคุณเลิศ¹ นัทธ์ นันทพงษ์^{2*} นเรศ ช้วนยุค³

ยุทธพงษ์ สังข์น้อย³ และวุฒิพร พรหมขุนทอง⁴

Keerati Tanakan¹, Napaphat Prakunlerd¹, Nutt Nuntapong^{2*}, Naraid Suanyuk³,

Yutthapong Sangnoi³ and Wutiporn Phromkunthong⁴

บทคัดย่อ

ศึกษาผลของการเสริมราแดง (*Monascus* spp.) ต่อการเจริญเติบโต องค์ประกอบเลือด และ
ความต้านทานเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ในปลานิลแดง (*Oreochromis niloticus* × *O. mossambicus*)
อาหารทดลองมี 4 สูตร กำหนดให้แต่ละสูตรมีโปรตีน (ร้อยละ 30) และไขมัน (ร้อยละ 7) ใกล้เคียงกัน
เสริมราแดงลงในอาหารร้อยละ 0 0.5 1 และ 2 ใช้ปลานิลแดงน้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้น 0.795 ± 0.003 กรัมต่อตัว
จำนวน 20 ตัวต่อตู้ทดลองในตู้กระจกปริมาตรน้ำ 75 ลิตร ให้อาหารทดลองวันละ 2 ครั้งโดยให้ปลากินจนอิ่ม
เป็นเวลา 50 วัน จากการทดลองพบว่า น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัว อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ อัตราการเปลี่ยน
อาหารเป็นเนื้อ และประสิทธิภาพการใช้โปรตีน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติระหว่างชุดการทดลอง ($p > 0.05$)

¹ นักศึกษาระดับปริญญาตรี, สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และนวัตกรรมการจัดการ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
สงขลา 90112

² อ.ดร., สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และนวัตกรรมการจัดการ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา 90112

³ ผศ.ดร., สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และนวัตกรรมการจัดการ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา 90112

⁴ รศ.ดร., สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และนวัตกรรมการจัดการ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา 90112

¹ Undergraduate student, Aquatic Science and Innovative Management Division, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Songkhla, 90112, Thailand

² Lecturer, Dr., Aquatic Science and Innovative Management Division, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Songkhla, 90112, Thailand

³ Asst. Prof. Dr., Aquatic Science and Innovative Management Division, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Songkhla, 90112, Thailand

⁴ Assoc. Prof. Dr., Aquatic Science and Innovative Management Division, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Songkhla, 90112, Thailand

* Corresponding author: Tel.: 0814782429. E-mail address: nutt.n@psu.ac.th, nut_aqua@hotmail.com

(Received: April 17, 2020; Revised: June 20, 2020; Accepted: June 23, 2020)

แต่ปริมาณอาหารที่กินมีค่าลดลง ($p < 0.05$) เมื่อปลาได้รับอาหารเสริมราแดงร้อยละ 1 และ 2 ด้านองค์ประกอบเลือดพบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ไลโซไซม์และซีรั่มโปรตีนของปลาที่ได้รับอาหารเสริมราแดงร้อยละ 0.5 มีค่าสูงสุด ($p < 0.05$) ไม่พบความแตกต่างของอัตราการตายระหว่างชุดการทดลองภายหลังได้รับเชื้อ *S. agalactiae* ($p > 0.05$) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสามารถเสริมราแดงในอาหารปลานิลแดงร้อยละ 0.5 โดยไม่ส่งผลกระทบต่ออาการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหาร และองค์ประกอบเลือด อย่างไรก็ตามการเสริมราแดงไม่มีผลต่อการป้องกันเชื้อ *S. agalactiae*

คำสำคัญ: ราแดง ปลานิลแดง การเจริญเติบโต องค์ประกอบเลือด *Streptococcus agalactiae*

Abstract

This study investigated the effects of the dietary supplementation of red yeast rice (*Monascus* spp.) on growth performance, haematological parameters, and disease resistance against *Streptococcus agalactiae* of red tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. mossambicus*). Four isonitrogenous (30 % crude protein) and isolipidic (7 % crude lipid) experimental diets were formulated to contain graded levels (0, 0.5, 1, and 2 %) of red yeast rice. The fish with initial body weight 0.795 ± 0.003 g were randomly distributed at 20 fish per each 75 L glass aquarium and fed twice daily to apparent satiation for 50 days. The results indicated that there were no significant differences ($p > 0.05$) in the mean body weight, specific growth rate, feed conversion ratio and protein efficiency ratio among dietary treatments. However, feed intake was significantly decreased by dietary supplementation of 1 and 2 % red yeast rice ($p < 0.05$). For the blood parameters, highest serum lysozyme activity and serum protein were reported in fish fed 0.5 % red yeast rice ($p < 0.05$). No significant differences in survival rate were demonstrated among the dietary treatments after challenge with *S. agalactiae*. The results indicated that red yeast rice at 0.5 % can be supplemented in red tilapia diets without negative effects on growth, nutrient utilization and blood parameters. However, the supplementation of red yeast rice was not effective in protecting red tilapia against *S. agalactiae* infection.

Keywords: Red Yeast Rice (*Monascus* spp.), Red Tilapia, Growth Performance, Haematological Parameters, *Streptococcus agalactiae*

บทนำ

สัตว์น้ำที่ได้จากการเพาะเลี้ยงจัดเป็นแหล่งโปรตีนที่สำคัญเพื่อรองรับการเพิ่มขึ้นของประชากรโลก จุดเด่นของแหล่งโปรตีนที่ได้จากสัตว์น้ำคือ เป็นโปรตีนคุณภาพสูง ย่อยง่าย และมีราคาถูกเมื่อเทียบกับโปรตีนจากแหล่งอื่น ๆ [1] ปลานิล (*Oreochromis niloticus*) จัดเป็นสัตว์น้ำที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เนื่องจากเป็นปลาที่เลี้ยงง่าย เจริญเติบโตเร็ว ผลิทดูกพันธุ์ได้ปริมาณมาก กินอาหารได้หลากหลาย และสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี นอกจากนี้ยังมีรสชาติดีและมีราคาถูกซึ่งคนทั่วไปสามารถเข้าถึงได้ จึงมีผู้นิยมเลี้ยงอย่างแพร่หลาย ทำให้อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงปลานิลมีการแข่งขันสูง ผู้เลี้ยงจึงต้องมีการจัดการเพื่อให้ปลามีการเจริญเติบโตที่ดีและมีอัตราการสูง สารเสริม (Feed Additive) จึงเข้ามามีบทบาท

สำคัญเพื่อใช้ส่งเสริมการเจริญเติบโต สุขภาพ และพัฒนาคุณภาพผลิตภัณฑ์ ปัจจุบันมีสารเสริมหลายชนิดที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงปลานิลเช่น สมุนไพร สารสกัดจากธรรมชาติ จุลินทรีย์ และสารสี เป็นต้น การศึกษาสารเสริมที่มีศักยภาพชนิดใหม่เพื่อนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงปลานิลจึงเป็นหัวข้อศึกษาที่มีการวิจัยอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน

ราแดง (*Monascus* spp.) จัดอยู่ในวงศ์ (Family) Monascaceae กลุ่ม (Class) Ascomycetes เป็นราที่พบในธัญพืชและผลผลิตทางการเกษตร มนุษย์ใช้ประโยชน์จากราแดงมาอย่างยาวนาน โดยใช้เป็นยาพื้นบ้าน สารให้กลิ่นรส และสารสี (Colorant) ในอุตสาหกรรมอาหาร [2] ราแดงสามารถผลิตสารเมตาบอไลต์ที่มีประโยชน์ได้หลายชนิดเช่น เมวิลอนิน (Mevilonin) โมนาสคอลินเค (Monascolin K) ซึ่งถูกนำมาใช้ทางการแพทย์เพื่อลดระดับคอเลสเตอรอลและไขมันที่ความหนาแน่นต่ำ (Low Density Lipoprotein, LDL) ในเลือด [3] นอกจากนี้ยังมีการนำมาใช้ประโยชน์ในแง่ของสารต้านอนุมูลอิสระ สารต้านจุลชีพ สารต้านการอักเสบและเนื้องอก [4] มีรายงานวิจัยพบว่า ราแดงช่วยลดความเสียหายของเซลล์ตับที่เกิดจากพิษของแอลกอฮอล์ในหนูทดลอง [5] และช่วยเพิ่มปริมาณไข่ที่ผลิตได้ในนกกระทาญี่ปุ่น (Japanese Quail, *Coturnix japonica*) [6] อย่างไรก็ตามการนำราแดงมาใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำยังมีข้อมูลค่อนข้างจำกัด โดยพบรายงานการเสริมราแดงในอาหารที่ช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงสีของปลาแฟนซีคาร์พและกุ้งขาวได้ [7] จากคุณประโยชน์ของสารเมตาบอไลต์ที่ราแดงผลิตขึ้น จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงความเป็นไปได้ที่จะนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการเสริมราแดงในอาหารปลานิลแดง ซึ่งเป็นปลาลูกผสมที่เกิดจากการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์ระหว่างปลานิล (*O. niloticus*) กับปลาหมอเทศ (*O. mossambicus*) ทำให้ได้ลักษณะเด่นคือ เจริญเติบโตเร็ว เนื้อมีรสชาติดี และให้ผลตอบแทนที่คุ้มค่าทางเศรษฐกิจ [8-9] และด้วยลักษณะเด่นของปลาชนิดนี้ที่มีลำตัวสีชมพูแดง จึงอาจเห็นการเปลี่ยนแปลงสีของตัวปลาดังที่เคยพบรายงานในปลาแฟนซีคาร์พ นอกจากนี้ยังได้ศึกษาผลที่มีต่อความต้านทานเชื้อ *S. agalactiae* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อแบคทีเรียที่สร้างความเสียหายต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงปลานิลทั่วโลก [10-11] ผลการวิจัยที่ได้ในครั้งนี้จะเป็นข้อมูลในการใช้ราแดงเพื่อเป็นสารเสริมทางเลือกใหม่ในอาหารปลานิลแดงต่อไปในอนาคต

วิธีดำเนินการ

แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มทดลอง (Completely Randomized Design : CRD) แบ่งเป็น 4 ชุดการทดลอง ๆ ละ 3 ซ้ำ ใช้ปลานิลแดงน้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้น 0.795 ± 0.003 กรัมต่อตัว จำนวน 20 ตัวต่อตู้ ทำการทดลองในตู้กระจกขนาด $40 \times 60 \times 50$ เซนติเมตร โดยเติมน้ำประปาที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยคลอรีนให้ได้ปริมาตร 75 ลิตร ให้อาหารวันละ 2 ครั้งเวลา 9.00 น. และ 16.00 น. โดยให้ปลากินจนอิ่ม บันทึกน้ำหนักอาหารที่ให้ตลอดการทดลอง ก่อนให้อาหารช่วงเย็นจะทำความสะอาดตู้ทดลองและเติมน้ำใหม่ให้มีปริมาตรเท่าเดิมทุกครั้ง เพื่อควบคุมคุณภาพน้ำให้เหมาะสมตลอดการทดลอง ระยะเวลาทดลอง 50 วัน

ราแดง (*Monascus* spp.)

ราแดง (*Monascus* spp.) ที่ใช้เป็นผลิตภัณฑ์ทางการค้าที่ผลิตขึ้นจากการหมักข้าว *Oryza sativa* สายพันธุ์ Indica โดยราแดงจะเจริญเติบโตอยู่บนเมล็ดข้าวที่ผ่านการอบแห้ง ก่อนนำมาใช้จะนำไปบดให้ละเอียด

ร่อนผ่านตะแกรงขนาด 30 เมช (Mesh) และเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาใช้ ทั้งนี้เนื่องจาก ราแดงมีการผลิตสารพิษซิทรินิน (Citrinin) ซึ่งมีรายงานวิจัยในสัตว์ทดลองว่าเป็นอันตรายต่อดับและได้ ก่อนนำมาใช้จะนำผงราแดงไปผสมน้ำสะอาดที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 75 เปอร์เซ็นต์ (w/v) และอบที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาทีเพื่อลดปริมาณสารพิษ

การเตรียมอาหารทดลอง

วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของราแดงและวัตถุดิบอาหารตามวิธีมาตรฐานของ AOAC [12] เพื่อใช้ในการสร้างสูตรอาหาร กำหนดให้แต่ละสูตรมีโปรตีนร้อยละ 30 และไขมันร้อยละ 7 (ตารางที่ 1) อาหารทดลองเป็นแบบเม็ดจมที่จัดเตรียมขึ้นเองในห้องปฏิบัติการ โดยใช้เครื่อง Hobart Legacy® mixer (Ohio, USA) ในขั้นตอนการทำอาหารจะนำวัตถุดิบไปผสมให้เข้ากัน นำไปอัดเม็ดผ่านหน้าแวนขนาดเส้น ผ่านศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสจนกระทั่งเหลือความชื้นประมาณร้อยละ 10 จากนั้น บรรจุใส่ถุงพลาสติกเก็บไว้ในตู้แช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สุ่มเก็บตัวอย่างอาหารแต่ละสูตร ไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีตามวิธีมาตรฐานของ AOAC [12] ดังรายละเอียดที่แสดงไว้ในตารางที่ 1

การเตรียมปลาทดลอง

นำปลานิลแดงน้ำหนักเฉลี่ย 0.5 - 1 กรัมจากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์ประมงน้ำจืด เขต 12 (สงขลา) มาอนุบาลในถังไฟเบอร์กลาสความจุ้น้ำ 300 ลิตร ให้อาหารเม็ดสำเร็จรูปวันละ 2 ครั้ง เวลา 09.00 น. และ 16.00 น. เปลี่ยนถ่ายน้ำร้อยละ 60 ของปริมาตรเดิมทุกวัน ก่อนเริ่มทดลองจะสุ่มปลาที่อนุบาล มาตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียและปรสิตภายนอก เมื่อพบว่าปลามีสุขภาพแข็งแรง จึงคัดปลาที่มีขนาดใกล้เคียง กันสำหรับใช้ในการทดลอง โดยชั่งน้ำหนักเริ่มต้นของปลาทุกตัวในแต่ละตู้ด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง (งดให้อาหาร 1 มื้อก่อนชั่งน้ำหนัก)

การเก็บรวบรวมข้อมูล

การตรวจสอบการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหาร และอัตราการรอด เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ทำการสลับปลาโดยใช้น้ำมันกานพลูความเข้มข้น 50 ส่วนในล้านส่วน จากนั้นชั่งน้ำหนักรวมของปลาทุกตัว ในแต่ละตู้ด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง (งดให้อาหาร 1 มื้อก่อนชั่งน้ำหนัก) นำข้อมูลน้ำหนักปลาและ น้ำหนักอาหารที่ปลากินตลอดการทดลองไปคำนวณอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific Growth Rate, SGR) อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (Feed Conversion Ratio, FCR) ปริมาณอาหารที่กิน และอัตราการตาย (Survival Rate)

การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ของปลา

สุ่มตัวอย่างปลาก่อนเริ่มการทดลองจำนวน 9 ตัว และเมื่อสิ้นสุดการทดลองสุ่มการทดลองละ 9 ตัว (3 ตัวต่อตู้) นำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของตัวปลาได้แก่ ความชื้น โปรตีน ไขมัน และเถ้าตามวิธีการ ของ AOAC [12] นำค่าที่ได้ไปคำนวณประสิทธิภาพการใช้โปรตีน (Protein Efficiency Ratio, PER) และการใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ (Apparent Net Protein Utilization, ANPU) ตามวิธีการของ Hardy & Barrows [13]

การวิเคราะห์องค์ประกอบเลือด

เมื่อสิ้นสุดการทดลอง สุ่มปลาชุดการทดลองละ 9 ตัว (3 ตัวต่อตู้) สลับด้วยน้ำมันกานพลู เจาะเลือดจากบริเวณโคนหางด้วยเข็มขนาด 25G×1 ใส่ในหลอด Microcentrifuge Tube นำไปวิเคราะห์

ปริมาณเมล็ดเลือดแดงอัดแน่นทันทีตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Blaxhall & Daisley [14] เลือดส่วนที่เหลือวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาทีเพื่อให้เกิดการแข็งตัว จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,500 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใส (ซีรัม) ไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลโซไซม์ตามวิธีการของ Demers & Bayne [15] และซีรัมโปรตีนตามวิธีการของ Bradford [16]

ความสามารถในการต้านทานเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae*

ใช้ Stock เชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* จากศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำกักการ ศุภมาตย์ สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ และนวัตกรรมการจัดการ นำเชื้อโคโลนีเดี่ยวที่เจริญบนอาหารแข็งไปเลี้ยงในอาหารเหลว (Tryptic Soy Broth) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 18 ชั่วโมง นำไปแยกเซลล์โดยการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบ/นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ล้างตะกอนเซลล์แบคทีเรียและเจือจางด้วย Phosphate Buffer Saline (PBS) pH 7.4 นำ Stock เชื้อแบคทีเรียไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรให้มีค่าอยู่ในช่วง 0.8-0.9 เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 1×10^9 โคโลนี/มิลลิลิตร ซึ่งเป็นปริมาณเชื้อที่ทำให้ปลาตายครึ่งหนึ่ง (LD_{50}) ที่ 14 วันจากการทดสอบก่อนการทดลองจริง สุ่มปลาทดลองจำนวน 30 ตัวต่อชุดการทดลอง (ชุดละ 10 ตัว) แบ่งเป็น 3 ซ้ำ ฉีดเชื้อแบคทีเรียปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรเข้าช่องท้อง เก็บตัวอย่างปลาที่ตายมาเพาะเชื้อเพื่อยืนยันสาเหตุการตายว่ามาจากเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* บันทึกข้อมูลอัตราการรอดตายเป็นเวลา 14 วัน

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลจากการทดลองไปวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance: ANOVA) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธีของ Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS (Version 11.5)

ตารางที่ 1 สูตรอาหารที่ใช้ในการทดลอง

วัตถุดิบ (กรัม/อาหาร 100 กรัม)	ชุดการทดลอง			
	ชุดควบคุม (ไม่เสริมราแดง)	ราแดง ร้อยละ 0.5	ราแดง ร้อยละ 1	ราแดง ร้อยละ 2
ปลาป่น	18	18	18	18
กากถั่วเหลือง	30	30	30	30
รำข้าว	10	10	10	10
ปลายข้าว	9.2	8.7	8.2	7.2
แป้งสาลี	25	25	25	25
น้ำมันปลา	1.75	1.75	1.75	1.75
น้ำมันถั่วเหลือง	1.75	1.75	1.75	1.75
วิตามินและแร่ธาตุผสม ¹	0.15	0.15	0.15	0.15
ไคแคลเซียมฟอสเฟต	2	2	2	2

ตารางที่ 1 สูตรอาหารที่ใช้ในการทดลอง (ต่อ)

วัตถุดิบ (กรัม/อาหาร 100 กรัม)	ชุดการทดลอง			
	ชุดควบคุม (ไม่เสริมราแดง)	ราแดง ร้อยละ 0.5	ราแดง ร้อยละ 1	ราแดง ร้อยละ 2
โคลีนคลอไรด์	0.1	0.1	0.1	0.1
อินโนซิทอล	0.05	0.05	0.05	0.05
Carboxymethyl Cellulose (CMC)	2	2	2	2
ราแดง	0	0.5	1	2
องค์ประกอบทางเคมีของอาหารทดลอง (ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการวิเคราะห์ตัวอย่าง 3 ซ้ำ)				
ความชื้น (ร้อยละ, as fed basis)	8.83 $\pm$ 0.93	7.83 $\pm$ 0.02	7.57 $\pm$ 0.12	7.90 $\pm$ 0.10
โปรตีน (ร้อยละ, as fed basis)	30.33 $\pm$ 0.039	29.82 $\pm$ 1.09	30.63 $\pm$ 0.61	31.32 $\pm$ 0.15
ไขมัน (ร้อยละ, as fed basis)	7.56 $\pm$ 0.35	7.07 $\pm$ 0.12	7.50 $\pm$ 0.21	7.17 $\pm$ 0.13
เถ้า (ร้อยละ, as fed basis)	8.06 $\pm$ 0.15	7.83 $\pm$ 0.02	7.80 $\pm$ 0.01	7.90 $\pm$ 0.10
GE (เมกะจูล/กก. อาหาร, as fed basis) ²	18.20	18.20	18.20	18.19

¹วิตามินและแร่ธาตุผสม (ในหน่วยต่อกิโลกรัมอาหาร) ประกอบด้วย: Retinal (A) 8,000 IU; Cholecalciferol (D3) 1,500 IU; Tocopherol (E) 100 mg; Menadione Sodium Bisulfite (K3) 5 mg; Thiamine (B1) 10 mg; Riboflavin (B2) 15 mg; Pyridoxine (B6) 15 mg; Cobalamin (B12) 0.02 mg; Niacin 80 mg; Calcium Pantothenate 40 mg; Ascorbic Acid (C) 150 mg; Biotin 0.5 mg; Folic Acid 4 mg; Cu 5 mg; Fe 30 mg; Zn 40 mg; Mn 25 mg; Co 0.05 mg; I 1 mg; Se 0.25 mg.

²ค่า GE (Gross Energy) (เมกะจูล/กก.อาหาร) คำนวณจากค่าคงที่ของโปรตีน ไขมัน และคาร์โบไฮเดรต เท่ากับ 5.64 9.44 และ 4.11 กิโลแคลอรี/ก. ตามลำดับ (NRC, 1993) โดยที่ 1 กิโลแคลอรี = 0.0041868 เมกะจูล (MJ)

ผลการทดลอง

การเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหาร และอัตราการตาย

เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่า น้ำหนักเฉลี่ยสุดท้าย อัตราการเจริญเติบโตเฉพาะ อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน และอัตราการรอดไม่แตกต่างทางสถิติ ($p > 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างชุดการทดลอง (ตารางที่ 2) แต่ปริมาณอาหารที่กินมีค่าลดลง ($p < 0.05$) เมื่อปลาได้รับอาหารเสริมราแดงร้อยละ 1 และ 2 การใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิมีค่าลดลง ($p < 0.05$) เมื่อปลาได้รับอาหารเสริมราแดงร้อยละ 2 (ตารางที่ 2) ทั้งนี้ไม่พบความแตกต่างของสีลำตัวปลาจากการสังเกตด้วยตาเปล่า

ตารางที่ 2 การเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหาร และอัตราการตายของปลานิลแดงที่ได้รับอาหารทดลองเป็นเวลา 50 วัน

ปัจจัยที่ทำการศึกษา	ชุดการทดลอง			
	สูตรควบคุม	ราแดง ร้อยละ 0.5	ราแดง ร้อยละ 1	ราแดง ร้อยละ 2
น้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้น (กรัม/ตัว)	0.796 ± 0.001 ^a	0.795 ± 0.001 ^a	0.796 ± 0.001 ^a	0.795 ± 0.003 ^a
น้ำหนักเฉลี่ยสุดท้าย (กรัม/ตัว)	9.70 ± 1.37 ^a	10.73 ± 1.86 ^a	8.73 ± 0.68 ^a	9.72 ± 1.42 ^a
อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ร้อยละ/วัน)	4.99 ± 0.28 ^a	5.18 ± 0.37 ^a	4.78 ± 0.16 ^a	4.99 ± 0.3 ^a
ปริมาณอาหารที่กิน (กรัม/ตัว)	11.41 ± 1.16 ^b	10.64 ± 0.73 ^b	8.97 ± 0.66 ^a	10.33 ± 0.66 ^a
อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ	1.29 ± 0.16 ^a	1.09 ± 0.14 ^a	1.13 ± 0.11 ^a	1.18 ± 0.22 ^a
ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน	2.58 ± 0.33 ^a	3.11 ± 0.39 ^a	2.83 ± 0.29 ^a	2.83 ± 0.48 ^a
การใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ (ร้อยละ)	37.58 ± 4.23 ^a	47.22 ± 3.70 ^b	58.47 ± 4.81 ^b	40.88 ± 7.88 ^a
อัตราการอด (ร้อยละ)	68.33 ± 10.41 ^a	81.67 ± 7.64 ^a	81.67 ± 7.64 ^a	80.00 ± 8.66 ^a

ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3) ค่าเฉลี่ยในแถวที่มีตัวอักษร (a, b) เหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

องค์ประกอบทางเคมีในตัวปลา

ปริมาณความชื้น ไขมัน และโปรตีนในตัวปลาที่ได้รับอาหารทดลองทุกสูตรไม่แตกต่างทางสถิติ ($p > 0.05$) (ตารางที่ 3) แต่พบว่าปลาที่ได้รับอาหารเสริมราแดงร้อยละ 1 มีโปรตีนในตัวร้อยละ 58.39 ± 1.86 ซึ่งสูงกว่า ($p < 0.05$) ปลาที่ได้รับอาหารสูตรควบคุมและอาหารเสริมราแดงร้อยละ 0.5 ซึ่งมีค่าโปรตีนในตัวร้อยละ 55.44 ± 1.45 และ 54.09 ± 0.63 ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 องค์ประกอบทางเคมีในตัวปลานิลแดงที่ได้รับอาหารทดลองเป็นเวลา 50 วัน

ปัจจัยที่ทำการศึกษา	ชุดการทดลอง			
	สูตรควบคุม	ราแดง ร้อยละ 0.5	ราแดง ร้อยละ 1	ราแดง ร้อยละ 2
ความชื้น (ร้อยละบนฐานน้ำหนักสด)	76.67 ± 1.03 ^a	76.59 ± 0.52 ^a	73.89 ± 5.48 ^a	71.08 ± 1.39 ^a
โปรตีน (ร้อยละบนฐานน้ำหนักแห้ง)	55.44 ± 1.45 ^{ab}	54.09 ± 0.63 ^a	58.39 ± 1.86 ^c	57.35 ± 0.81 ^{bc}
ไขมัน (ร้อยละบนฐานน้ำหนักแห้ง)	10.47 ± 1.53 ^a	10.59 ± 0.72 ^a	10.89 ± 1.28 ^a	10.08 ± 0.31 ^a
เถ้า (ร้อยละบนฐานน้ำหนักแห้ง)	11.65 ± 1.02 ^a	12.69 ± 0.90 ^a	12.47 ± 1.32 ^a	11.83 ± 1.18 ^a

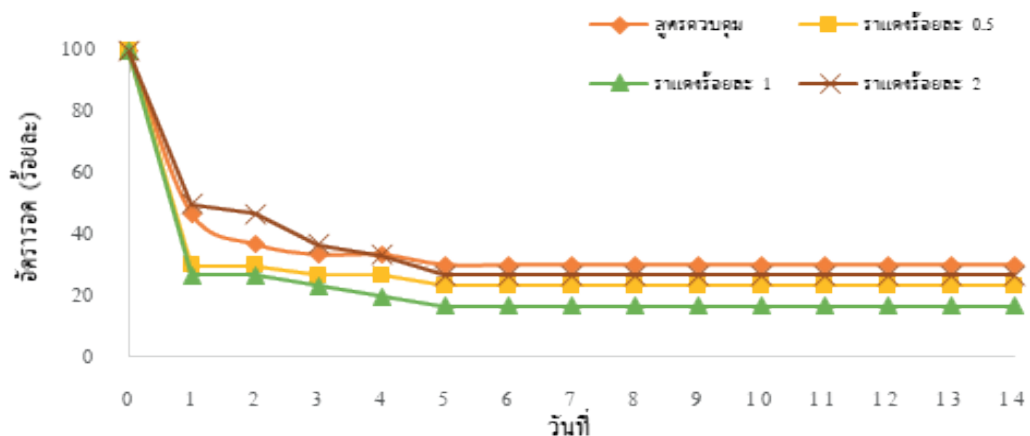
ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3) ค่าเฉลี่ยในแถวที่มีตัวอักษร (a, b, c, ab, bc) เหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

องค์ประกอบเลือด

ไม่พบความแตกต่างทางสถิติของปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่นระหว่างชุดการทดลอง ($p > 0.05$) (ตารางที่ 4) ปลาที่ได้รับอาหารเสริมราแดงร้อยละ 0.5 มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลโซไซม์สูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารสูตรควบคุม ($p < 0.05$) แต่ไม่แตกต่างทางสถิติ ($p > 0.05$) กับสูตรที่เสริมราแดงร้อยละ 1 และ 2 (ตารางที่ 4) ปลาที่ได้รับอาหารเสริมราแดงร้อยละ 0.5 มีซีรั่มโปรตีนสูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารสูตรควบคุมและอาหารเสริมราแดงร้อยละ 2 ($p < 0.05$) แต่ไม่แตกต่าง ($p > 0.05$) กับสูตรที่เสริมราแดงร้อยละ 1 (ตารางที่ 4)

ความต้านทานเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae*

อัตราการตายของปลาจากการทดสอบความต้านทานเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* เป็นเวลา 14 วัน ไม่พบความแตกต่างทางสถิติระหว่างชุดการทดลอง ($p > 0.05$) โดยปลาได้รับอาหารเสริมราแดงร้อยละ 0.5 1 และ 2 มีอัตราการตายร้อยละ 23.33 ± 15.28 16.67 ± 11.55 และ 26.67 ± 25.17 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับสูตรควบคุมซึ่งมีอัตราการตายร้อยละ 30.00 ± 10.00 (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 อัตรารอดของปลานิลแดงจากการทดสอบความต้านทานเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* เป็นเวลา 14 วัน

ตารางที่ 4 องค์ประกอบเลือดของปลานิลแดงที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง 4 สูตรเป็นเวลา 50 วัน

ปัจจัยที่ทำการศึกษา	ชุดการทดลอง			
	สูตรควบคุม	ราแดง ร้อยละ 0.5	ราแดง ร้อยละ 1	ราแดง ร้อยละ 2
ปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (ร้อยละ)	37.39 ± 5.23^a	37.77 ± 4.76^a	36.15 ± 3.39^a	39.37 ± 3.61^a
กิจกรรมของเอนไซม์ไลโซไซม์ (ยูนิต/มิลลิลิตร)	458.67 ± 29.52^a	511.33 ± 32.61^b	481.00 ± 28.16^{ab}	475.00 ± 29.00^{ab}
ซีรั่มโปรตีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	22.85 ± 0.79^a	24.67 ± 0.27^b	24.32 ± 0.98^b	22.84 ± 0.74^a

ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($n=9$ ตัว/ชุดการทดลอง) ค่าเฉลี่ยในแถวที่มีตัวอักษร (a, b, ab) เหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า การเสริมราแดงตั้งแต่ร้อยละ 0.5-2 ในอาหารปลานิลแดงไม่ส่งผลกระทบต่อในเชิงลบต่อการเจริญเติบโตและสุขภาพของปลา จากรายงานของ Kumari *et al.* [17] ระบุว่าไม่พบความผิดปกติในหนูขาว (Albino Rats) ที่ได้รับอาหารเสริมราแดงร้อยละ 2-12 นอกจากนี้ Kosolwach [7] พบว่าปลาแฟนซีคาร์พที่ได้รับอาหารเสริมราแดงร้อยละ 0.25-2 มีการเจริญเติบโตที่ดีกว่าปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ไม่เสริมราแดง สามารถผลิตสารเมตาบอไลต์เช่น Monascin และ Monacolin K ซึ่งเกี่ยวข้องกับการนำสารอาหารไปใช้ประโยชน์ [7, 18] แต่ราแดงก็ผลิตสารเมตาบอไลต์ที่ให้โทษบางชนิดเช่น จิตรีนินซึ่งไปรบกวนกระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอนในไมโทคอนเดรีย ส่งผลให้เกิดความผิดปกติในอวัยวะต่าง ๆ [19] ดังรายงานที่พบว่าการเสริมราแดงร้อยละ 8 ทำให้น้ำหนักตัวและผลผลิตไข่ของไก่พันธุ์เล็กฮอร์นขาวหงอนจักรลดลง [20] นอกจากนี้ Thongprajukaew *et al.* [21] รายงานว่า การเจริญเติบโตและการกินอาหารของปลากัดไทย (*Betta splendens*) ลดลงเมื่อเสริมราแดงในอาหารในระดับที่สูงเกินกว่าร้อยละ 0.5 ดังนั้นปริมาณจิตรีนินที่ตกค้างอยู่ อาจเป็นสาเหตุที่ทำให้การให้ราแดงเป็นสารเสริมในอาหารได้ผลการทดลองที่แตกต่างกัน

จากการทดลองครั้งนี้ไม่พบความแตกต่างของการเปลี่ยนแปลงสปีริเวนค่าตัวของปลานิลแดง โดยทั่วไปการเปลี่ยนแปลงของสีที่เกิดขึ้นในตัวสัตว์เกี่ยวข้องโดยตรงกับการสะสมของรงควัตถุในกลุ่มแคโรทีนอยด์ [22] อย่างไรก็ตาม Lin *et al.* [23] รายงานว่า ราแดงสกุล *Monascus* sp. มีรงควัตถุหลัก 6 ชนิด ได้แก่ Rubropunctamine, Monascorubramine, Rubropunctatin, Monascorubrin, Monascin และ Ankaflavin ซึ่งไม่จัดอยู่ในกลุ่มของแคโรทีนอยด์ ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงสีที่เกิดในสัตว์ทดลองที่ได้รับราแดงอาจมีปัจจัยอื่น มาเกี่ยวข้อง โดย Wang & Pan [20] อธิบายว่า สีของไข่แดงที่เข้มขึ้นในไก่ที่ได้รับอาหารเสริมราแดง อาจเกิดจากสุขภาพของไก่ที่ดีขึ้นเนื่องจากอิทธิพลของสารเมตาบอไลต์ที่ออกฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระจากราแดง

เอนไซม์ไลโซไซม์เป็นระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะที่มีกลไกในการเข้าไปทำลายพันธะไกลโคซิดิกในชั้น peptidoglycan ของผนังเซลล์แบคทีเรีย ราแดงมีโครงสร้างของเส้นใยที่ประกอบด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์และเบต้ากลูแคนซึ่งมีประสิทธิภาพในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ [24] ส่งผลให้กิจกรรมของเอนไซม์ไลโซไซม์ในปลานิลแดงที่ได้รับอาหารเสริมราแดงร้อยละ 0.5 มีค่าสูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารสูตรควบคุม ในส่วนของผลที่มีต่อปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น พบรายงานการศึกษาในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไข้เลือดออกของ Adnan *et al.* [25] ว่าราแดงช่วยกระตุ้นการสร้างอินเตอร์ลิวคิน ส่งผลให้ผู้ป่วยมีปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่นสูงขึ้น จากการวิเคราะห์ค่าซีรั่มโปรตีนพบว่า เมื่อเสริมราแดงในระดับร้อยละ 2 ในอาหาร ค่าซีรั่มโปรตีนจะลดลง เนื่องมาจากสารพิษเมตาบอไลต์ที่ราแดงผลิตขึ้นส่งผลต่อเซลล์ตับซึ่งเป็นอวัยวะสำคัญในการกำจัดสารพิษและการนำโปรตีนไปใช้ประโยชน์ ทำให้ค่าซีรั่มโปรตีนลดลง

เชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* เป็นสาเหตุสำคัญของโรคสเตรปโตคอคโคซิส (Streptococcosis) ที่สร้างความเสียหายอย่างมากต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงปลานิลทั่วโลก [10] ผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่าการเสริมราแดงในระดับไม่เกินร้อยละ 1 แม้จะช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกันบางประการแต่ไม่เพียงพอต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* สอดคล้องกับรายงานของ Kim *et al.* [26] ที่พบว่า สารออกฤทธิ์ที่ได้จากราแดง (*Monascus* sp.) มีการตอบสนองค่อนข้างต่ำต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ

การทดลองครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการเสริมราแดงร้อยละ 0.5 ไม่ส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโตและสุขภาพ แต่ไม่มีผลต่อการป้องกันเชื้อ *S. agalactiae* ในปลานิลแดง ทั้งนี้ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในระดับที่ต่ำกว่าร้อยละ 0.5 และควรศึกษาผลที่มีต่อองค์ประกอบทางเคมีของตัวปลาเช่น กรดไขมันชนิดต่างๆ หรือคลอเลสเตอรอล และควรทำลายพิษที่มีอยู่ในราแดงก่อนนำมาใช้เพื่อลดผลกระทบต่อสัตว์น้ำ

References

- [1] Pradeepkiran, J.A. (2019). Aquaculture role in global food security with nutritional value: a review. *Translational Animal Science*, 3(2), 903–910.
- [2] Pinthong, R., Rujanakraikarn, L., & Pattanagul, P. (2000). Production of pork sausages by adding Ang-kak to increase coloring. *Khon Kaen Agriculture Journal*, 28, 89–96.
- [3] Baigent, C., Blackwell, L., Emberson, J., Holland, L.E., Reith, C., Bhala, N., Peto, R., Barnes, E.H., Keech, A., Simes, J., & Collins, R. (2010). Efficacy and safety of more intensive lowering of LDL cholesterol: a meta-analysis of data from 170,000 participants in 26 randomised trials. *The Lancet*, 376(9753), 1670–1681.
- [4] Hsu, L.C., Liang, Y.H., Hsu, Y.W., Kuo, Y.H., & Pan, T.M. (2013). Anti-inflammatory properties of yellow and orange pigments from *Monascus purpureus* NTU 568. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(11), 2796–2802.
- [5] Cheng, C.F., & Pan, T.M. (2011). Protective effect of *Monascus*-fermented red mold rice against alcoholic liver disease by attenuating oxidative stress and inflammatory response. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(18), 9950–9957.
- [6] Kongbuntad, W., & Saenphet, S. (2016). Effects of red mold rice produced from *Monascus purpureus* CMU002U on growth performances and antioxidant activity of Japanese quail. *International Journal of Poultry Science*, 15(1), 8–14.
- [7] Kosolwach, S. (2014). *Effects of pigment from Monascus sp. on color intensity and growth of fancy carp (Cyprinus carpio Linn) and Pacific white shrimp (Litopenaeus vannamei Boone)*. Master's thesis. Kasetsart University.
- [8] Pongthana, N., Nguyen, N.H., & Ponzoni, R.W. (2010). Comparative performance of four red tilapia strains and their crosses in fresh- and saline water environments. *Aquaculture*, 308(Supplement 1), 109–114.
- [9] Kohinoor, A.H.M., Modak, P.C., & Hussain, M.G. (1999). Growth and production performance of red tilapia and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* Lin.) under low-input culture system. *Bangladesh Journal of Fisheries Research*, 3(1), 11–17.
- [10] Suanyuk, N., Kong, F., Ko, D., Gilbert, G.L., & Supamattaya, K. (2008). Occurrence of rare genotypes of *Streptococcus agalactiae* in cultured red tilapia *Oreochromis* sp. and Nile tilapia *O. niloticus* in Thailand-Relationship to human isolates? *Aquaculture*, 284(1–4), 35–40.
- [11] Liu, G., Zhu, J., Chen, K., Gao, T., Yao, H., Liu, Y., Zhang, W., & Lu, C. (2016). Development of *Streptococcus agalactiae* vaccines for tilapia. *Diseases of Aquatic Organisms*, 122(2), 163–170. DOI: 10.3354/dao03084.

- [12] Association of Official Analytical Chemists. (1990). *Official Methods of Analysis*. 15th Edition. Washington D.C.: Association of Official Analytical Chemists.
- [13] Hardy, R.W., & Barrows, F.T. (2002). Diet formulation and manufacture. In: J.E. Halver & R.W. Hardy (eds.) *Fish Nutrition*. 505–600. San Diego, CA: Academic Press.
- [14] Blaxhall, P.C., & Daisley, K.W. (1973). Routine haematological methods for use with fish blood. *Journal of Fish Biology*, 5(6), 771–781.
- [15] Demers, N.E., & Bayne, C.J. (1997). The immediate effects of stress on hormones and plasma lysozyme in rainbow trout. *Developmental and Comparative Immunology*, 21(4), 363–373.
- [16] Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254.
- [17] Kumari, H.P.M., Naidu, K.A., Vishwanatha, S., Narasimhamurthy, K., & Vijayalakshmi, G. (2009). Safety evaluation of *Monascus purpureus* red mould rice in albino rats. *Food and Chemical Toxicology*, 47(8), 1739–1746.
- [18] Agboyibor, C., Kong, W.B., Zhang, A.M., & Niu, S.Q. (2019). Nutrition regulation for the production of *Monascus* red and yellow pigment with submerged fermentation by *Monascus purpureus*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 21, 101276. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101276>.
- [19] Ribeiro, S.M.R., Chagas, G.M., Campello, A.P., & Kluppel, M.L.W. (1997). Mechanism of citrinin-induced dysfunction of mitochondria. V. Effect on the homeostasis of the reactive oxygen species. *Cell Biochemistry and Function*, 15(3), 203–209.
- [20] Wang, J.J., & Pan, T.M. (2003). Effect of red mold rice supplements on serum and egg yolk cholesterol levels of laying hens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(16), 4824–4829.
- [21] Thongprajukaew, K., Kovitvadhi, U., Somsueb, P., & Kovitvadhi, S. (2013). Effects of red monascus rice supplementation on growth, digestive function and oocyte maturation in Siamese fighting fish (*Betta splendens* Regan, 1910). *African Journal of Biotechnology*, 12(45), 6400–6410.
- [22] Yuangsoi, B., Jintasataporn, O., Areechon, N., & Tabthipwon, P. (2008). Validated TLC-densitometric analysis for determination of carotenoids in fancy carp (*Cyprinus carpio*) serum and the application for pharmacokinetic parameter assessment. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 30(6), 693–700.
- [23] Lin, Y.L., Wang, T.H., Lee, M.H., & Su, N.W. (2008). Biologically active components and nutraceuticals in the *Monascus*-fermented rice: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77(5), 965–973.
- [24] Alexopoulos, C.J., Mims, C.W., & Blackwell, M. (1996). *Introductory mycology*. New York: John Wiley & Sons.
- [25] Adnan, A.R., Suharto, & Triyono, E.A. (2012). Red yeast rice (*Monascus purpureus*) extract increases interleukin-2 level in dengue infection patients. *Folia Medica Indonesiana*, 48(2), 58–66.
- [26] Kim, C., Jung, H., Kim, Y.O., & Shin, C.S. (2006). Antimicrobial activities of amino acid derivatives of *Monascus* pigments. *FEMS Microbiology Letters*, 264(1), 117–124.