



การเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อของทางเดินอาหารและการพัฒนาอาหารสำเร็จรูป
ขนาดเล็กสำหรับปลากะพงขาว (*Lates calcarifer* Bloch) วัยอ่อน
**Histological Changes of Digestive Tract and Development of Microparticulate
Diets for Asian Seabass (*Lates calcarifer* Bloch) Larvae**

จุฑารัตน์ คชเวช

Jutharat Khochchawech

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวาริชศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of
Master of Science in Aquatic Science
Prince of Songkla University**

2556

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อของทางเดินอาหารและการพัฒนาอาหารสำเร็จรูป
ขนาดเล็กสำหรับปลากะพงขาว (*Lates calcarifer* Bloch) วัยอ่อน

ผู้เขียน นางสาวจุฑารัตน์ คชเวช

สาขาวิชา วาริชศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

คณะกรรมการสอบ

.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชุตินา ตันติกิตติ)

.....ประธานกรรมการ
(ดร.จูอะดี พงศ์มณีรัตน์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชุตินา ตันติกิตติ)

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.ฤดีกร วิวัฒน์ปฐพี)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ฤดีกร วิวัฒน์ปฐพี)

.....กรรมการ
(ดร.จำเริญศรี ถาวรสุวรรณ)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยเป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวาริชศาสตร์

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.ธีระพล ศรีชนะ)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชุติมา ตันติกิตติ)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ลงชื่อ.....

(นางสาวจุฑารัตน์ คชเวช)

นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และ
ไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....

(นางสาวจุฑารัตน์ คชเวช)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์	การเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อของทางเดินอาหารและการพัฒนาอาหารสำเร็จรูปขนาดเล็กสำหรับปลากะพงขาว (<i>Lates calcarifer</i> Bloch) วัยอ่อน
ผู้เขียน	นางสาวจุฑารัตน์ คชเวช
สาขาวิชา	วาริชศาสตร์
ปีการศึกษา	2555

บทคัดย่อ

การศึกษาประกอบด้วย 2 การทดลอง ได้แก่ การศึกษาพัฒนาการทางเนื้อเยื่อวิทยาของระบบย่อยอาหารในปลากะพงขาววัยอ่อนอายุแรกฟักออกเป็นตัว จนถึงอายุ 30 วัน และการศึกษาผลของชนิดสารเชื่อมประสานและระดับโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุแกต่ออัตราการรอดตาย การเจริญเติบโต กิจกรรมเอนไซม์ย่อยอาหารหลัก และการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อวิทยาในปลากะพงขาววัยอ่อน

การทดลองที่ 1 ศึกษาพัฒนาการทางเนื้อเยื่อวิทยาของระบบย่อยอาหาร โดยสุ่มเก็บตัวอย่างลูกปลาทุกวันก่อนให้อาหารตั้งแต่อายุแรกฟัก-7 วัน และทุก 2 และ 3 วัน สำหรับลูกปลาอายุ 8-21 วัน และ 22-30 วัน ตามลำดับ พบว่าลูกปลาอายุแรกฟักออกเป็นตัว มีระบบย่อยอาหารเป็นแบบท่อตรง และถุงสะสมอาหารขนาดใหญ่อยู่บริเวณส่วนหน้าติดกับส่วนหัว ในระยะนี้ลูกปลาจึงอาศัยอาหารภายในถุงสะสมอาหาร จนกระทั่งมีอายุ 2 วัน จึงสามารถกินอาหารจากภายนอกได้ ช่องปากและคอหอยมีการพัฒนาขึ้น แต่ยังไม่สามารถแยกกระเพาะอาหารและลำไส้ออกจากกันได้ชัดเจน จนกระทั่งอายุ 4 วัน เมื่อลูกปลาอายุ 3 วัน เริ่มกินโรติเฟอร์เป็นอาหาร ระบบทางเดินอาหารจึงเริ่มพัฒนามากขึ้น โดยพบเยื่อบุผิวบริเวณหลอดอาหารมีการยกตัวขึ้น และพบ Goblet cell เล็กน้อย พบเซลล์ตับอยู่บริเวณใต้ถุงสะสมอาหารตั้งแต่มูลูกปลาอายุ 1 วัน เมื่อลูกปลาอายุ 4 วัน จึงพบเซลล์ตับอ่อนอยู่รวมกันเป็นกลุ่มแทรกอยู่ระหว่างเซลล์ตับ เมื่อถุงสะสมอาหารยุบลงในวันที่ 5 พบถุงลมพัฒนาขึ้นมาแทน พบพิน และตุ่มรับรสในวันที่ 6 และ 11 หลังฟักออกเป็นตัว จากนั้นมีการเพิ่มขนาด และปริมาณเซลล์ของอวัยวะในระบบย่อยอาหารตามการเจริญเติบโตของลูกปลา โดยเมื่อลูกปลาอายุ 17 วัน พบต่อมแกสตริก (Gastric gland) บริเวณกระเพาะอาหารตอนต้น ซึ่งเป็นลักษณะบ่งชี้ถึงการเจริญเป็นปลาเต็มวัยที่มีระบบย่อยอาหารสมบูรณ์

การทดลองที่ 2 ใช้ปลากะพงขาวอายุ 16 วัน หลังฟักเป็นตัว ที่มีน้ำหนักเริ่มต้นเฉลี่ย 0.0031-0.0042 กรัมต่อตัว ศึกษาการใช้อาหารที่มีการแทนที่โปรตีนปลาป่นด้วยโปรตีน

ไฮโดรไลเสด จากปลาทุแวกที่ระดับ 0, 15 และ 30 เปอร์เซ็นต์ ใช้เจลาติน และคาราจีแนน เป็นสารเชื่อมประสาน กำหนดระดับโปรตีนและไขมันในอาหาร เท่ากับ 50 และ 20 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีชุดการทดลองอ้างอิงเป็นเนื้อปลาทุสดและอาหารอนุบาลปลาทะเลทางการค้า ชุดการทดลอง ละ 3 ชั่วโมง เลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ภายหลังจากให้อาหารเป็นเวลา 7 วัน พบว่า ปลาที่ได้รับอาหาร แต่ละชุดการทดลองมีอัตราการรอดตายไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) แต่ปลาที่ได้รับเนื้อปลาทุสดและอาหารอนุบาลปลาทะเลทางการค้าทยอยตายจนหมดในสัปดาห์ที่ 3 เนื่องจากไม่ยอมรับอาหาร เมื่อสิ้นสุดการทดลองในสัปดาห์ที่ 4 พบว่า ไม่มีอิทธิพลร่วมระหว่าง ชนิดของสารเชื่อมประสานและระดับของโปรตีนไฮโดรไลเสด ($P>0.05$) ต่ออัตราการรอดตาย น้ำหนักสุดท้าย น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ แต่ปลาที่ได้รับอาหารที่มีโปรตีนไฮโดรไลเสดที่ระดับ 0 เปอร์เซ็นต์ (ชุดควบคุม) และ 30 เปอร์เซ็นต์ มีค่าสูงกว่าที่ระดับ 15 เปอร์เซ็นต์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีน มีผลจากอิทธิพลร่วมระหว่างชนิดของสารเชื่อมประสานและระดับของโปรตีนไฮโดรไลเสด ($P<0.05$) โดยกิจกรรมเอนไซม์เปปซินในปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่มีโปรตีนไฮโดรไลเสด 30 เปอร์เซ็นต์ และใช้คาราจีแนนเป็นสารเชื่อมประสานในอาหาร มีค่าสูงสุด ($P<0.05$) และกิจกรรมเอนไซม์ทริปซินในปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่ใช้คาราจีแนนเป็นสารเชื่อมประสานและไม่มีสารแทนที่โปรตีนปลาป่น มีค่าสูงสุด แตกต่างจากชุดการทดลองอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสในปลาที่ได้รับอาหารที่มีโปรตีนไฮโดรไลเสด 30 เปอร์เซ็นต์ มีระดับของกิจกรรมต่ำที่สุด ($P<0.05$) สำหรับการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อวิทยาของระบบย่อยอาหาร พบการเพิ่มขนาดของอวัยวะ ปริมาณและขนาดของเซลล์ในเนื้อเยื่อ ตามการเจริญเติบโตของปลากะพงขาว

ดังนั้น อาหารเม็ดจืดที่มีการแทนที่โปรตีนปลาป่นด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสดจากปลาทุแวก และใช้เจลาติน และคาราจีแนน เป็นสารเชื่อมประสาน ส่งผลให้ปลากะพงขาวอายุ 16-17 วัน ที่มีระบบย่อยอาหารเจริญสมบูรณ์ สามารถยอมรับอาหารได้ดี เมื่อพิจารณาอัตราการรอดตาย การเจริญเติบโต กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีน และต้นทุนของสารเชื่อมประสาน พบว่า อาหารที่มีการแทนที่โปรตีนปลาป่นด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสดจากปลาทุแวกที่ระดับ 30 เปอร์เซ็นต์ และใช้เจลาตินเป็นสารเชื่อมประสาน มีความเหมาะสมสำหรับการเลี้ยงปลากะพงขาวในช่วงอายุนี้

Thesis Title	Histological changes of digestive tract and development of microparticulate diets for Asian seabass (<i>Lates calcarifer</i> Bloch) larvae
Author	Miss Jutharat Khochchawech
Major Program	Aquatic Science
Academic Year	2012

ABSTRACT

The study consisted of two experiments: Experiment 1, the study on histological changes of the digestive systems in Asian seabass (*Lates calcarifer*) larval stages (0-30 days post hatch, DPH) and Experiment 2, the study on types of binders and levels of round scad mackerel hydrolysate on acceptability, survival rate, growth, enzyme activity and histological changes in Asian seabass larvae.

In the first experiment, samples of larvae for histological study were collected randomly before morning feeding every day at first hatch–7 DPH and every 2 to 3 days at 8-21 and 22-30 DPH, respectively. At hatching, the digestive system was a simple tube with a large yolk sac. During yolk sac absorption (1-2 DPH), the oral cavity and pharynx was develop but stomach and intestine were not differentiated until 4 DPH. At 3 DPH, started feeding on rotifer, the epithelium lining of digestive tract was folding and goblet cell well developed. The liver appeared at hatching and continued to develop and at 4 DPH, the exocrine cells of the pancreas were found. At 5 DPH, the yolk sac is depleted while the swim bladder was developed. The teeth and taste buds were developing at 6 and 11 DPH. The digestive system was well developed with extension and increase in size paralleled with the growth of fish larvae. Gastric glands were indentified in submucosa of interior stomach which was indicative of the full functional digestive system.

The second experiment, 16 DPH seabass (initial body weight of 0.0031-0.0042 g fish⁻¹) were used to study utilization of round scad mackerel hydrolysate to replace fish meal protein at 0, 15 and 30 % using either gelatin or carrageenan as binders. The experimental diets were formulated containing protein and lipid at 50% and 12%, respectively. Minced fresh mackerel and commercial diet were included as reference diets. Each treatment consisted of

three replicate groups of fish that were fed with respective diets for four weeks. After seven days of feeding, survival rate of fish fed the experimental diets were not significantly different ($P>0.05$). During the third week, all fish in the reference groups died. After four weeks, the survival rate, final weight, weight gain and specific growth rate were not influenced by combination factors of type of binders and level of round scad mackerel hydrolysate ($P>0.05$) however, 0% (control group) and 30 % fishmeal protein substitution fed groups showed better performance than those fed 15 % substitution ($P<0.05$). Proteolytic enzyme activity were influenced by type of binders and level of round scad mackerel hydrolysate ($P<0.05$). Pepsin activity level in fish fed the diet with 30 % substitution for fishmeal protein and with carrageenan as a binder was the highest ($P<0.05$). Level of trypsin activity of fish fed the diet using carrageenan as a binder at 0% replacement level was significantly the highest ($P<0.05$). Amylase activity level in fish fed the diet with 30 % fish protein hydrolysate was significantly the lowest ($P<0.05$). The digestive system of the fish in this experiment was well developed with extension and increase in size paralleling the fish growth.

Therefore, the microbound diets that replaced fish meal protein with round scad mackerel hydrolysate using gelatin and carrageenan as a binder were effective diet showing good acceptability in 16-17 DPH Asian seabass which posed the full functional digestive system. Considering survival rate, growth performance, proteolytic enzyme activity and binder cost, the diet containing round scad mackerel hydrolysate at 30 % replacing fishmeal protein using gelatin as a binder was suitable for the fish at this stage.

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชุตินา ตันตติกิตติ ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์เป็นอย่างสูง ที่มอบความรู้ ให้คำปรึกษา และชี้แนะแนวทางในการศึกษา การทำงาน การปฏิบัติตน กรณแก่ไขข้อบกพร่องต่างๆ จนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี นอกจากนี้ท่านได้อบรมสั่งสอนและให้ข้อคิดแก่ข้าพเจ้า ซึ่งข้าพเจ้าจะนำไปใช้ในการดำเนินชีวิตและการทำงานต่อไปในอนาคต

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ฤดีกร วิวัฒน์ปฐพี กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ซึ่งให้คำแนะนำ ชี้แนะแนวทางและแก้ไขข้อบกพร่องแก่ข้าพเจ้าตลอดมา ขอขอบพระคุณ ดร.จู่อะดี พงศ์มณีรัตน์ และ ดร.จำเริญศรี ถาวรสุวรรณ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่มีส่วนเสนอแนะและแก้ไขวิทยานิพนธ์ทำให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณสถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง สงขลา ที่ให้ความอนุเคราะห์พันธุ์ปลากะพงขาว และอำนวยความสะดวกต่างๆ ตลอดการเก็บตัวอย่างในช่วงที่ทำการทดลองที่ 1 ขอขอบพระคุณศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งสตูล ที่ให้ความอนุเคราะห์พันธุ์ปลากะพงขาวสำหรับการทดลองที่ 2 ขอขอบพระคุณศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งนครศรีธรรมราช ที่ให้ความอนุเคราะห์อาหารอนุบาลปลาทะเลทางการค้า ขอขอบพระคุณบริษัทเจริญโภคภัณฑ์อาหาร จำกัด (มหาชน) โรงงานผลิตอาหารสัตว์น้ำบ้านพรุ ที่ให้ความอนุเคราะห์น้ำมันปลา และบริษัท ไทยยูเนี่ยน ฟีดมิลล์ จำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์วิตามินผสม และเลซิดิน

ขอขอบคุณนักศึกษาปริญญาเอก ปริญญาโท และเจ้าหน้าที่ศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำกิจการ สุขุมมาตย์ ทุกคน ที่คอยให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ ทั้งความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำ และกำลังใจ จนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์ และเจ้าหน้าที่ภาควิชาวาริชศาสตร์ที่ให้ความช่วยเหลือเป็นอย่างดีจนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย คณะทรัพยากรธรรมชาติ ที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัย และวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้รับการสนับสนุนส่วนหนึ่งจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ

สุดท้ายนี้ที่สำคัญอย่างยิ่ง ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัวของข้าพเจ้า ที่ให้การสนับสนุนด้านทุนการศึกษา และเพื่อนๆ ของข้าพเจ้าที่คอยเป็นกำลังใจให้ข้าพเจ้าตลอดมา ทำให้ข้าพเจ้าได้ประสบความสำเร็จในการศึกษาครั้งนี้

จุฬารัตน์ คชเวช

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(10)
รายการตาราง	(13)
รายการตารางภาคผนวก	(15)
รายการภาพ	(16)
บทที่	
1 บทนำ	
1.1 บทนำตั้งเรื่อง	1
2 ตรวจสอบเอกสาร	
2.1 ปลากระพงขาว	4
2.2 พัฒนาการทางเนื้อเยื่อวิทยาของระบบย่อยอาหารในลูกปลาวัยอ่อน	11
2.3 ความต้องการสารอาหารในลูกปลาทะเลวัยอ่อน	16
2.4 การใช้อาหารสำเร็จรูปในลูกปลาวัยอ่อน	18
2.5 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	27
3 การทดลองที่ 1 การศึกษาพัฒนาการทางเนื้อเยื่อวิทยาของระบบย่อยอาหารในปลา กระพงขาววัยอ่อนอายุแรกฟักออกเป็นตัว จนถึงอายุ 30 วัน	28
3.1 บทคัดย่อ	28
3.2 บทนำ	29
3.3 วัตถุประสงค์	30
3.4 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง	30
3.4.1 ลูกปลากระพงขาว	30
3.4.2 ระบบการเลี้ยงและให้อาหารปลากระพงขาววัยอ่อน	30
3.4.3 การเก็บตัวอย่างปลากระพงขาว	31
3.5 ผลการศึกษา	32
3.5.1 การเจริญเติบโต	32
3.5.2 การพัฒนาทางเนื้อเยื่อวิทยาของระบบย่อยอาหาร	34
3.6 วิเคราะห์ผลการศึกษา	45
3.7 สรุปผลการศึกษา	50

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4 การทดลองที่ 2 การศึกษาผลของชนิดสารเชื่อมประสานและระดับโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุแวกต่ออัตราการตาย การเจริญเติบโต กิจกรรมเอนไซม์ย่อยอาหารหลัก และการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อวิทยาในปลากระพงขาววัยอ่อน	52
4.1 บทคัดย่อ	52
4.2 บทนำ	53
4.3 วัตถุประสงค์	55
4.4 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการศึกษา	55
4.4.1 การผลิต และวิเคราะห์ระดับการย่อยสลาย ปริมาณกรดอะมิโนอิสระ และน้ำหนักโมเลกุลของเปปไทด์ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุแวก	55
4.4.2 การศึกษาระดับของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุแวก และชนิดของสารเชื่อมประสานในอาหารปลากระพงขาว	57
4.4.3 การศึกษาคุณสมบัติของอาหารทดลอง	60
4.4.4 การศึกษาการยอมรับอาหาร อัตราการตาย และการเจริญเติบโต	61
4.4.5 การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหารหลัก	62
4.4.6 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อวิทยา	62
4.4.7 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	63
4.5 ผลการศึกษา	63
4.5.1 องค์ประกอบทางเคมี ระดับการย่อยสลาย ปริมาณกรดอะมิโนอิสระ และน้ำหนักโมเลกุลของเปปไทด์ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุแวก	63
4.5.2 องค์ประกอบทางเคมีและกายภาพของอาหารทดลอง	65
4.5.3 การยอมรับอาหาร อัตราการตาย และการเจริญเติบโต	68
4.5.4 กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหารหลัก	72
4.5.5 ผลการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา	76
4.5.6 คุณภาพน้ำในตู้ทดลอง	81

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.6 วิจารณ์ผลการศึกษา	81
4.7 สรุปผลการศึกษา	89
5 สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ	90
เอกสารอ้างอิง	93
ภาคผนวก	109
ก การเตรียมตัวอย่างและการศึกษาพยาธิสภาพเนื้อเยื่อด้วยเทคนิคทางเนื้อเยื่อวิทยา	110
ข การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีโดยประมาณ (Proximate analysis) ในวัตถุดิบอาหารและอาหารปลา	113
ค การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เปปซิน ทริปซิน อะไมเลส และไลเปส	119
ง การเก็บตัวอย่างลูกปลากะพงขาวอายุแรกฟัก-30 วัน หลังฟักออกเป็นตัว สำหรับการทดลองที่ 1	128
จ ราคาวัตถุดิบอาหารปลากะพงขาว	129
ประวัติผู้เขียน	130

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	องค์ประกอบของสารอาหารในอาหารมีชีวิต	17
2	การใช้โปรตีนไฮโดรไลเสตและกรดอะมิโนอิสระในอาหารลูกปลาขนาดเล็ก	21
3	สารเชื่อมประสานที่ใช้ในการผลิตอาหารอนุภาคขนาดเล็กสำหรับลูกปลาวัยอ่อน	25
4	ความยาวลำตัวเฉลี่ย และน้ำหนักตัวเฉลี่ยของลูกปลา การให้อาหาร และคุณภาพน้ำในระบบเลี้ยงลูกปลากะพงขาวอายุแรกฟัก-30 วัน หลังฟักออกเป็นตัว	33
5	องค์ประกอบทางโภชนาการของวัตถุดิบอาหาร	59
6	องค์ประกอบของอาหารทดลองที่ใช้สารเชื่อมประสาน 2 ชนิด ที่มีกรรมแทนที่โปรตีนปลาปนด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุแวกปนที่ระดับต่างๆ	59
7	วิธีการให้อาหารปลากะพงขาวด้วยการปรับลดสัดส่วนของอาร์ทีเมีย และเพิ่มสัดส่วนของอาหารทดลองในช่วง 7 วัน เมื่อเริ่มการทดลอง	62
8	องค์ประกอบทางเคมี กรดอะมิโน และขนาดเปปไทด์ ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุแวก	64
9	องค์ประกอบทางเคมีและกายภาพของอาหารทดลอง	66
10	องค์ประกอบของกรดอะมิโน (เปอร์เซ็นต์โปรตีนในอาหาร) ในอาหารทดลอง	67
11	อัตราการตายของปลากะพงขาว ที่ได้รับอาหารเม็ดจืดที่ใช้สารเชื่อมประสาน 2 ชนิด และแทนที่โปรตีนปลาปนด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุแวกที่ระดับต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์	70
12	น้ำหนักสุดท้าย น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของปลากะพงขาวอายุ ที่ได้รับอาหารเม็ดจืดที่ใช้สารเชื่อมประสาน 2 ชนิด และแทนที่โปรตีนปลาปนด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุแวกที่ระดับต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์	71

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
13	กิจกรรมเอนไซม์เปปซิน ทริปซิน อะไมเลส และไลเปส ในปลากะพงขาว ที่ได้รับอาหารเม็ดจืดที่ใช้สารเชื่อมประสานทั้ง 2 ชนิด และแทนที่โปรตีนปลาปนด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุกระดับต่างๆ เป็นเวลา 1 สัปดาห์	73
14	กิจกรรมเอนไซม์เปปซิน ทริปซิน อะไมเลส และไลเปส ในปลากะพงขาว ที่ได้รับอาหารเม็ดจืดที่ใช้สารเชื่อมประสานทั้ง 2 ชนิด และแทนที่โปรตีนปลาปนด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุกระดับต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์	75

รายการตารางภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่		หน้า
ง.1	ความยาวลำตัวเฉลี่ย และน้ำหนักตัวเฉลี่ยของลูกปลา การให้อาหาร และคุณภาพน้ำในระบบเลี้ยงลูกปลากะพงขาวอายุแรกฟัก-30 วัน หลังฟักออกเป็นตัว	128
จ.1	ราคาวัตถุดิบอาหารที่ใช้ในการทดลองที่ 2	129

รายการภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะทั่วไปของปลากะพงขาว	5
2	การพัฒนาทางเดินอาหารของปลาในกลุ่ม Cyprinid	13
3	การเจริญเติบโตของปลากะพงยุโรปวัยอ่อนอายุ 14 วัน ที่ได้รับอาหารที่มีระดับโปรตีนเท่ากัน แต่มีระดับไขมัน 10, 15, 20, 25 และ 30 เปอร์เซ็นต์ และอัตราการรอดตายที่อายุ 39 วัน	22
4	การสูญเสียกรดอะมิโนของอาหารขนาดอนุภาคแต่ละชนิด ภายหลังจากลอยตัวในน้ำ 2 นาที	26
5	การเจริญเติบโตของลูกปลากะพงขาวตั้งแต่แรกฟักออกเป็นตัว-30 วัน หลังฟักออกเป็นตัว	34
6	ลูกปลาอายุ 0 และ 1 วัน หลังฟักออกเป็นตัว	35
7	ระบบย่อยอาหาร ลูกปลาอายุ 2 และ 3 วัน หลังฟักออกเป็นตัว	36
8	ระบบย่อยอาหาร ลูกปลาอายุ 4 วัน หลังฟักออกเป็นตัว	37
9	ระบบย่อยอาหาร ลูกปลาอายุ 5 วัน หลังฟักออกเป็นตัว	38
10	ลูกปลาอายุ 6 และ 7 วัน หลังฟักออกเป็นตัว	39
11	ลูกปลาอายุ 11 และ 15 วัน หลังฟักออกเป็นตัว	40
12	ลูกปลาอายุ 17, 19 และ 21 วัน หลังฟักออกเป็นตัว	41
13	คอหอย หลอดอาหาร และกระเพาะอาหารตอนต้น ลูกปลาอายุ 24, 27 และ 30 วัน หลังฟักออกเป็นตัว	43
14	ลำไส้ ลูกปลาอายุ 24, 27 และ 30 วัน หลังฟักออกเป็นตัว	44
15	ลักษณะภายนอกของอาหารอนุบาลปลาทะเลทางการค้า อาหารเม็ดจืดที่มีเจลาติน และการาจีแนนเป็นสารเชื่อมประสาน	65
16	อัตราการรอดตายของปลากะพงขาวอายุ 23 DPH ที่ได้รับเนื้อปลาหุสด อาหารอนุบาลปลาทะเลทางการค้า อาหารทดลองที่มีเจลาตินและแทนที่โปรตีนปลาป่นด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาหุแซกที่ระดับ 0, 15 และ 30 เปอร์เซ็นต์ และอาหารทดลองที่มีการาจีแนนและแทนที่โปรตีนปลาป่นด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาหุแซกที่ระดับ 0, 15 และ 30 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 7 วัน	68

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
17	ลูกปลาเริ่มดำเนินการทดลอง อายุ 16 วัน หลังฟักออกเป็นตัว	77
18	หลดอาหาร ลูกปลาอายุ 44 วัน หลังฟักออกเป็นตัว ที่ได้รับอาหารเม็ดจืดที่ใช้เจลาติน และคาร์ราจีแนนเป็นสารเชื่อมประสาน และแทนที่โปรตีนปลาปนด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุแวกที่ระดับ 0, 15 และ 30 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ	78
19	กระเพาะอาหารตอนต้น ลูกปลาอายุ 44 วัน หลังฟักออกเป็นตัว ที่ได้รับอาหารเม็ดจืดที่ใช้เจลาติน และคาร์ราจีแนนเป็นสารเชื่อมประสาน และแทนที่โปรตีนปลาปนด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุแวกที่ระดับ 0, 15 และ 30 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ	79
20	ลำไส้ ลูกปลาอายุ 44 วัน หลังฟักออกเป็นตัว ที่ได้รับอาหารเม็ดจืดที่ใช้เจลาติน และคาร์ราจีแนนเป็นสารเชื่อมประสาน และแทนที่โปรตีนปลาปนด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุแวกที่ระดับ 0, 15 และ 30 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ	80

บทที่ 1

บทนำ

1.1 บทนำต้นเรื่อง

ปลากะพงขาว (*Lates calcarifer* Bloch, 1790) เป็นปลาน้ำกร่อยขนาดใหญ่ที่สามารถอาศัยอยู่ได้ทั้งในพื้นที่น้ำจืด น้ำกร่อย และน้ำเค็ม ปัจจุบันมีการเลี้ยงอย่างแพร่หลายในเขตจังหวัดชายทะเลของประเทศไทย โดยคิดเป็น 97 เปอร์เซ็นต์ และการจับจากธรรมชาติ 3 เปอร์เซ็นต์ (นเรศ, 2553) เนื่องจากปลากะพงขาวเป็นปลาที่เลี้ยงง่าย โตเร็ว เนื้อปลามีรสชาติดี และมีราคาสูงคุ้มค่ากับการลงทุน โดยจะมีราคาเฉลี่ยประมาณ 165 บาทต่อกิโลกรัม จึงทำให้มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย ซึ่งผลิตผลส่วนใหญ่เป็นการเลี้ยงในกระชัง 78 เปอร์เซ็นต์ (9.7 พันตัน) และเลี้ยงในบ่อดิน 22 เปอร์เซ็นต์ (2.7 พันตัน) นอกจากนี้จะเป็นที่นิยมบริโภคของประชาชนภายในประเทศแล้ว ยังมีการส่งออกไปต่างประเทศอีกด้วย โดยตลาดส่งออกปลากะพงขาวที่สำคัญของไทยปี 2552 ได้แก่ ประเทศจีนปริมาณ 139.32 ตัน (50%) รองลงมาคือเวียดนาม 57.48 ตัน (21%) ออสเตรเลีย 57.26 ตัน (21%) และประเทศอื่นๆ 3.24 ตัน (8%) (นเรศ, 2553)

การเลี้ยงปลากะพงขาวส่วนใหญ่เกษตรกรนิยมใช้ปลาเปิดและปลาสดเป็นอาหาร โดยเฉพาะกลุ่มเกษตรกรผู้อนุบาลลูกปลากะพงขาวในกระชังบริเวณทะเลสาบ ปากแม่น้ำ ลำคลอง ในจังหวัดชายแดนภาคใต้ เช่น จังหวัดสงขลา ปัตตานี นราธิวาส และสตูล เนื่องจากทำให้ปลาเจริญเติบโตและอัตราการรอดตายสูงถึง 90 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งบุญชูและคณะ (2530) อ่างโดย ธวัช และคณะ (2543) รายงานว่าปลากะพงขาววัยรุ่นที่เลี้ยงด้วยปลาเปิดมีการเจริญเติบโตสูงกว่าการใช้อาหารสำเร็จรูปสูตรที่มีโปรตีน 35, 40 และ 45 เปอร์เซ็นต์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) แต่ในช่วงฤดูมรสุมเรือประมงไม่สามารถออกทำการประมงได้ เกษตรกรมักประสบปัญหาการขาดแคลนปลาสดและมีราคาสูงมาก ซึ่งหากอาหารมีคุณค่าทางโภชนาการที่ไม่สมดุล คุณภาพและปริมาณไม่แน่นอนขึ้นอยู่กัฤดูกาล อาจส่งผลให้ปลาที่เลี้ยงอ่อนแอ เป็นโรคง่าย อัตราการตายสูง และยังมีผลให้แหล่งน้ำเสื่อมโทรม น่าเสียดายจึงส่งผลให้ในปัจจุบันปลากะพงขาวที่เลี้ยงในกระชังบริเวณดังกล่าวมีอัตราการรอดตายไม่ถึง 40 เปอร์เซ็นต์ (นเรศ, 2555) การพัฒนารูปแบบของอาหารจากอาหารธรรมชาติเป็นอาหารสำเร็จรูปจึงมีความสำคัญมาก จากการศึกษาของธวัช (2538) ได้ศึกษาชนิดของอาหารเพื่อทดแทนการใช้ปลาสด พบว่าการใช้ปลาหลังเขียวครบถ้วนกับอาหาร

สำเร็จรูปสำหรับกึ่งกุลาคำ ทำให้ลูกปลากะพงขาวเจริญเติบโต และมีอัตราการรอดตายสูงกว่าการให้อาหารผสมอัดเม็ด อาหารปลาคุณภาพ และอาหารกบ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) และการศึกษาของรัชและคณะ (2543) ได้ศึกษาการใช้อาหารเม็ดแทนปลาสด ในการอนุบาลลูกปลากะพงขาวจากขนาด 1 นิ้ว ให้มีขนาด 3 นิ้ว ในกระชัง พบว่า การใช้ปลาหลังเขียวสดมีอัตราการเจริญเติบโตสูงกว่าการใช้อาหารเม็ดกึ่งกุลาคำ และอาหารเม็ดลอยน้ำ แต่มีอัตราการรอดตายไม่แตกต่างกัน ดังนั้นการใช้อาหารสำเร็จรูปจึงเข้ามามีบทบาทสำคัญในการพัฒนาการเลี้ยงสัตว์น้ำเศรษฐกิจให้ประสบความสำเร็จได้ในเชิงธุรกิจ

ในปัจจุบันการขยายตัวการเพาะเลี้ยงปลากะพงขาวเพิ่มสูงขึ้น จึงมีความต้องการลูกพันธุ์เพื่อการเลี้ยงเป็นจำนวนมาก แต่การเพาะเลี้ยงปลาดังกล่าวจะต้องอนุบาลลูกปลาไว้ก่อนเป็นจำนวนมากตั้งแต่ลูกปลาไว้อ่อนถึงปลาวัยรุ่น ซึ่งระหว่างการเจริญเติบโตจะต้องผ่านภาวะวิกฤติที่เรียกว่า Bottle neck ที่ส่งผลให้ลูกปลามีอัตราการตายสูง คือ การเปลี่ยนอาหาร ซึ่งในการอนุบาลลูกปลากะพงขาวตามโรงเพาะฟักทั่วไปมี 3 ช่วง คือ เปลี่ยนจากการได้รับอาหารสำรองจากถุงสะสมอาหาร (Endogenous feeding) เป็นได้รับอาหารจากภายนอก (Exogenous feeding) ซึ่งเป็นโรติเฟอร์น้ำกร่อยและอาร์ทีเมีย การเปลี่ยนจากอาหารมีชีวิตดังกล่าวเป็นปลาสด และเปลี่ยนเป็นการให้อาหารสำเร็จรูป (สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง, สงขลา) ซึ่งหากลูกปลาไม่สามารถกินอาหารได้ในแต่ละช่วงดังกล่าว ลูกปลาจะอยู่ในสภาวะอดอาหารและตาย นอกจากนี้ถ้าลูกปลาสามารถกินอาหารได้แต่ไม่สามารถนำสารอาหารไปใช้ประโยชน์ได้ ก็อาจจะทำให้ลูกปลาไว้อ่อนอยู่ในสภาวะที่มีอัตราการตายสูงได้เช่นเดียวกัน ดังนั้นความรู้และความเข้าใจด้านความสมบูรณ์ของโครงสร้างและการทำงานของอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับระบบย่อยอาหารจึงมีความสำคัญในการพัฒนารูปแบบ และวิธีการเพาะเลี้ยงปลาให้มีประสิทธิภาพสูงสุด

นอกจากความรู้เกี่ยวกับความสมบูรณ์ของโครงสร้างและการทำงานของอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับระบบย่อยอาหารแล้ว ปัจจัยสำคัญที่ทำให้คน สัตว์ และสิ่งมีชีวิตทุกชนิดสามารถดำรงชีวิต และเจริญเติบโตได้คือ อาหาร ซึ่งอาหารสำหรับอนุบาลลูกปลากะพงขาวไว้อ่อนส่วนใหญ่ยังใช้อาหารธรรมชาติจำพวกตัวอ่อนอาร์ทีเมีย ไรแดง และปลาสดเป็นอาหารอนุบาล แต่ต้องใช้ปริมาณมากจึงทำให้ค่าใช้จ่ายในการผลิตอาหารมีชีวิตสูง คิดเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ ของต้นทุนค่าอาหารทั้งหมด (Person-Le Ruyet *et al.*, 1993) นอกจากนี้ตลอดการผลิตยังไม่สามารถควบคุมคุณค่าทางโภชนาการในอาหารให้คงที่ได้ และขั้นตอนการผลิตอาจเกิดเชื้อแบคทีเรียซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคในลูกปลาด้วย (Langdon, 2003) จึงมีการพัฒนาอาหารสำเร็จรูปขนาดเล็กเพื่อทดแทน หรือใช้ควบคู่กับอาหารมีชีวิตในลูกปลาทะเลหลายชนิด (Rosenlund *et al.*, 1997; Canavate and Fernandez-Diaz, 1999; Cahu and Zambonino-Infante, 2001; Kolkovski, 2001;

Koven *et al.*, 2001; Liao *et al.*, 2001) โดยสิ่งที่จะต้องคำนึงถึงในการผลิตอาหารสำหรับลูกปลาวัยอ่อน คือ วัตถุดิบโปรตีน ซึ่งการผลิตอาหารลูกปลาวัยอ่อนจะนิยมใช้โปรตีนไฮโดรไลเสต เนื่องจากเป็นผลิตภัณฑ์ที่ผ่านการย่อยก่อน (Pre-digested protein source) ด้วยสารเคมีหรือเอนไซม์กลุ่มโปรติเอสที่จะได้ผลิตภัณฑ์ที่ประกอบด้วยเปปไทด์สายสั้นๆ ช่วยให้ลูกปลาสามารถดูดซึมสารอาหารได้ง่ายขึ้น และดึงดูดการกินอาหารเพิ่มขึ้น (Carvalho *et al.*, 1997; Zambonino-Infante *et al.*, 1997; Cahu *et al.*, 1999; Kolkovski and Tandler, 2000) นอกจากนี้การอนุบาลลูกปลากะพงขาวจนสามารถจำหน่ายให้แก่เกษตรกรเพื่อนำไปเลี้ยงในบ่อดิน หรือกระชัง ต้องใช้เวลาประมาณ 30-45 วัน หากเราทราบความความสมบูรณ์ของโครงสร้างและการทำงานของอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับระบบย่อยอาหาร และพัฒนาอาหารเม็ดสำเร็จรูปที่เหมาะสมสำหรับการอนุบาลลูกปลากะพงขาววัยอ่อนแล้ว จะทำให้สามารถลดระยะเวลาการอนุบาล ปัจจัยเสี่ยงที่ส่งผลให้ลูกปลามีอัตราการตายสูง และลดต้นทุนค่าอาหารสด ความเสี่ยงของความไม่แน่นอนทางธรรมชาติ

บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

2.1 ปลากะพงขาว

2.1.1 ลำดับอนุกรมวิธานของปลากะพงขาว

ปลากะพงขาวมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ *Lates calcarifer* (Bloch) มีชื่อสามัญ ปลากะพงขาว ปลากะพงน้ำจืด และมีชื่อสามัญภาษาอังกฤษ Giant perch, seabass (กรมประมง, 2530) และมีชื่อสามัญในแต่ละประเทศแตกต่างกัน แต่ชื่อที่นิยมใช้ คือ Baramundi (ออสเตรเลีย) Asian seabass, sea bass

ลำดับอนุกรมวิธานของปลากะพงขาว (Fishbase, 2012)

Phylum Chordata

Class Actinopterygii

Order Perciformes

Family Latidae

Genus *Lates*

Species *calcarifer* (Bloch, 1790)

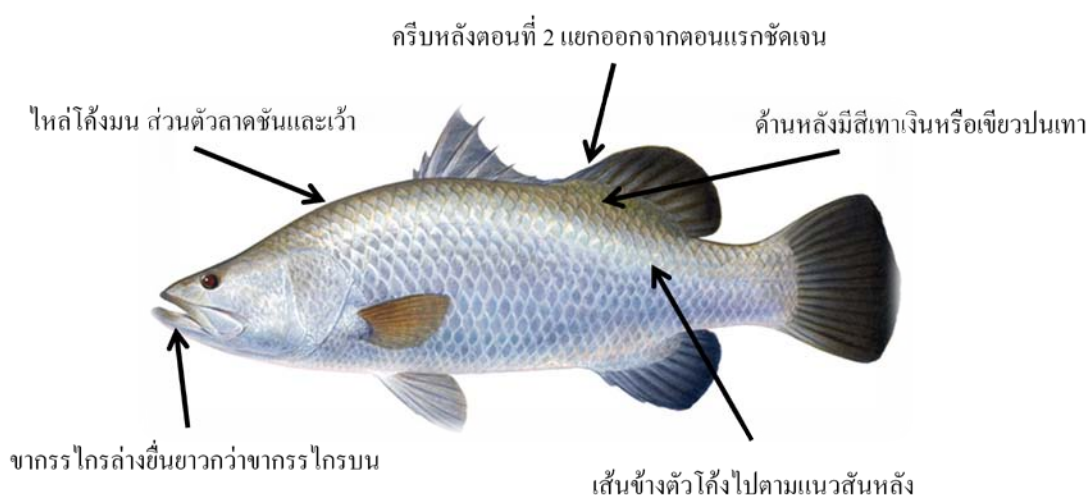
2.1.2 ลักษณะทั่วไปของปลากะพงขาว

ลำตัวค่อนข้างยาวและหนาแบนข้างเล็กน้อย หัวโต บริเวณไหล่จะโค้งมน ส่วนตัวจะลาดชันและเว้า จะงอยปากค่อนข้างยาวและแหลม ส่วนของขากรรไกรล่างยื่นยาวกว่าขากรรไกรบนเล็กน้อย ปากกว้าง ขอบปากบนเป็นแผ่นใหญ่ แยกเป็นแนวตอนต้น และตอนท้ายอย่างชัดเจน บริเวณส่วนปากจะยึดหดได้บ้าง ช่องปากเฉียงลงด้านล่างเล็กน้อย มีฟันเล็กละเอียดบนขากรรไกรบนและล่างและเพดานปาก ตาของปลาชนิดนี้มีขนาดกลาง ไม่มีเยื่อที่เป็นไขมันหุ้มแผ่นปิดเหงือกมีขนาดใหญ่ มีขอบหลังเป็นหนามแหลม 4 ซี่ และเรียงต่อกันด้วยซี่เล็กๆ จัดตามแนวหลัง ด้านบนส่วนหัวและแผ่นปิดเหงือกมีเกล็ดขนาดต่างๆ กัน เกล็ดบริเวณลำตัวค่อนข้างใหญ่มีขอบหยักเป็นหนามเมื่อลูบจะสากมือ (Ctenoid) ด้านหลังมีสีเทาเงินหรือเขียวปนเทา ส่วนท้องมีสีเงินแกมเหลือง บริเวณด้านข้างของลำตัวมีสีเงิน ครีบก้น ครีบกัน ครีบหางจะมีสีเทาปนดำบางๆ มีครีบก้น 2 ตอน ตอนแรกอยู่ตรงตำแหน่งของครีบท้องมีก้านครีบแข็งที่แหลมและคมขนาดใหญ่

7-8 ก้าน เชื่อมต่อกันด้วยเยื่อต่างๆ ครีบหลังตอนที่ 2 แยกจากตอนแรกอย่างเห็นได้ชัด มีก้านครีบแข็ง 1 ก้าน ก้านครีบอ่อนมีปลายแตกแขนงมี 10-11 ก้าน ครีบหูและครีบอกยาวไม่ถึงรูก้น ครีบก้นมีตำแหน่งใกล้เคียงกับครีบหลังตอนที่ 2 ซึ่งประกอบด้วยก้านครีบแข็ง 3 ก้าน ก้านครีบอ่อน 7-8 ก้าน ขื่อหางสั้น ครีบหางค่อนข้างกลม เส้นข้างตัวโค้งไปตามแนวสันหลัง มีเกล็ดบนเส้นข้างลำตัว 52-61 เกล็ด (ภาพที่ 1)

2.1.3 การแพร่กระจาย และแหล่งที่อยู่อาศัย

ปลากระพงขาวมีการแพร่กระจายอยู่ทั่วไปในบริเวณชายฝั่งและในน้ำจืดทางตะวันตกของมหาสมุทรอินโดแปซิฟิก ซึ่งโดยธรรมชาติปลากระพงขาวสามารถอาศัยอยู่ในทะเลและน้ำจืดได้ พบบริเวณประเทศอินเดีย พม่า ศรีลังกา บังกลาเทศ ไทย มาเลเซีย บอร์เนียว ฟิลิปปินส์ ปาปัวนิวกินี ทางตอนเหนือของออสเตรเลีย และตอนใต้ของจีน (Greenwood, 1976; Moore, 1979) ในประเทศไทยพบแพร่กระจายอยู่ทั่วไปบริเวณชายฝั่งทั้งทะเลอันดามันและทะเลสาบสงขลา รวมทั้งแม่น้ำบางปะกง (Ruangpanit, 1986) โดยเฉพาะบริเวณปากแม่น้ำใหญ่ๆ ทางออกติดต่อกับทะเลที่มีป่าชายเลนขึ้นปกคลุมทางจังหวัดตราด จันทบุรี ฉะเชิงเทรา สมุทรปราการ สมุทรสงคราม เป็นต้น ปลากระพงขาวสามารถอาศัยอยู่ได้ทั้งในน้ำเค็ม น้ำกร่อย และน้ำจืด ซึ่งจัดว่าเป็นปลาประเภท 2 น้ำ โดยปลากระพงขาวขนาดใหญ่จะอาศัยอยู่ในแหล่งน้ำที่ไม่ห่างไกลออกไปจากชายฝั่งมากนัก พบมากบริเวณปากแม่น้ำ ทะเลสาบและปากอ่าวบริเวณป่าชายเลนที่มีน้ำเค็มท่วมถึง



ภาพที่ 1 ลักษณะทั่วไปของปลากระพงขาว

ที่มา: ดัดแปลงจาก ไทยเกษตรศาสตร์ (2555)

2.1.4 การอนุบาลลูกปลากะพงขาว

ในการอนุบาลปลากะพงขาววัยอ่อนสิ่งสำคัญคือ การเตรียมอาหารสำหรับลูกปลา โดยการอนุบาลลูกปลาในระยะงุไข่แดงยังไม่ยุบตัว (อายุ 1-2 วัน หลังฟักเป็นตัว) ปากยังไม่เปิด และไม่ต้องให้อาหารจากภายนอก ระยะนี้จะใช้น้ำเค็มประมาณ 28-30 ส่วนต่อพันส่วน เมื่อลูกปลาอายุ 3 วัน ปากจะเปิด และงุไข่แดงมีขนาดเล็กลงจึงเริ่มให้โรติเฟอร์เป็นอาหารเพราะมีขนาดเหมาะสมกับขนาดปากของลูกปลา โดยโรติเฟอร์ที่ใช้เป็นโรติเฟิร์นน้ำกร่อย มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Brachionus* sp. S type มีขนาดเฉลี่ยเท่ากับ 160 ไมโครเมตร และ L type มีขนาดเฉลี่ยเท่ากับ 239 ไมโครเมตร (Moretti *et al.*, 1999) โดยจะให้โรติเฟอร์เป็นอาหารสำหรับลูกปลากะพงขาวอายุ 3-8 วัน เมื่อลูกปลาอายุได้ 8 วัน เปลี่ยนเป็นอาร์ทีเมีย เพราะมีขนาดเหมาะสมกับขนาดปากของลูกปลา และทำให้ลูกปลาโตเร็ว แข็งแรง และมีอัตราการรอดสูง จนกระทั่งลูกปลามีอายุ 30 วัน จะเริ่มให้อาร์ทีเมียผสมกับเนื้อปลาบด แล้วปรับลดปริมาณอาร์ทีเมียและเพิ่มเนื้อปลาบด จนลูกปลาสามารถกินเนื้อปลาบดได้อย่างเดียวซึ่งตลอดระยะเวลาการอนุบาลต้องควบคุมสภาพแวดล้อมต่างๆ ให้เหมาะสม โดยน้ำที่ใช้อนุบาลลูกปลาที่มีความเค็มประมาณ 28-30 ส่วนต่อพันส่วน อุณหภูมิในบ่อเฉลี่ยอยู่ที่ 27 องศาเซลเซียส ไม่ควรสูงหรือต่ำเกินไป เพราะจะทำให้ลูกปลากินอาหารมากและไม่ค่อยกินอาหารจนทำให้อ่อนแอเป็นโรคได้ง่าย นอกจากนี้ต้องดูแลตะกอนและเปลี่ยนถ่ายน้ำวันละ ประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ และต้องคัดขนาดปลา เพื่อแยกปลาที่มีขนาดใกล้เคียงกันมาเลี้ยงในบ่อเดียวกัน เพื่อลดปัญหาการกินกันเอง (โรงเพาะฟัก สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง; ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งจันทบุรี, 2549)

2.1.5 การพัฒนาของลูกปลากะพงขาววัยอ่อน (ชลอ และคณะ, 2528)

1) การพัฒนารูปร่างภายนอก

- ลูกปลาอายุ 1 วัน มีความยาวประมาณ 1.5 มิลลิเมตร ลำตัวมีลักษณะบางใสเมื่อมองด้วยตาเปล่า ส่วนหัวยังไม่แยกออกจากถุงสะสมอาหาร ถุงสะสมอาหารมีลักษณะเรียวยาวเป็นรูปไข่ มีขนาดยาวประมาณครึ่งหนึ่งของความยาวลำตัว บริเวณขอบรอบนอกสีม่วง ส่วนด้านในมีสีเหลือง Fin fold ติดกันเป็นแผ่นรอบลำตัว ด้านท้ายลำตัวมีลักษณะแหลม Notochord ตรงและยาวตลอดลำตัว

- ลูกปลาอายุ 2 วัน ลำตัวมีลักษณะสีขาวขุ่น เริ่มมีจุดสี (Melanophore) เกิดบริเวณก้น (Ventral contour) 2-3 จุด ส่วนหัวแยกออกห่างจากถุงสะสมอาหาร ถุงสะสมอาหารมีลักษณะค่อนข้างกลมมีสีเข้มขึ้นจนเกือบเป็นสีดำ มีความยาว 1 ใน 6 ส่วนของความยาวลำตัว เห็น

Fin fold ชัดเจนขึ้นและยังคงยาวตั้งแต่หัวจรดหาง ครีบหูเริ่มเกิดเป็นดิ่งสั้นๆ ลูกตาเป็นจุดสีดำ ชัดเจน ปากเริ่มอ้า ทางเดินอาหารเป็นท่อตรงสั้น

- ลูกปลาอายุ 3-4 วัน ถุงสะสมอาหารมีขนาดเล็กลง Notochord ตรงและยาวตลอดลำตัว ปากอ้ามากขึ้น มีเม็ดสีกระจายทั่วลำตัว เห็นครีบหูชัดเจน

- ลูกปลาอายุ 5 วัน ลำตัวมีสีน้ำตาลอ่อน ถุงสะสมอาหารยุบหมดแล้ว ลำไส้ขดเป็น Caudal fin fold เริ่มโค้งเว้าแต่ด้านปลายยังคงแหลมอยู่ บริเวณลำตัวมีเม็ดสีม่วงและสีน้ำตาลมากขึ้นและมีขนาดใหญ่ขึ้น

- ลูกปลาอายุ 6-7 วัน ลำตัวมีสีน้ำตาลอ่อน ถุงสะสมอาหารยุบหมด เห็นอวัยวะภายในชัดเจน Notochord ตรงและยาวตลอดลำตัว เริ่มเกิดก้านครีบหาง

- ลูกปลาอายุ 10 วัน ลำตัวมีสีน้ำตาลเข้มขึ้นเล็กน้อย เริ่มเห็นกระดูกสันหลังแบ่งเป็นข้อๆ นับได้ 20-21 ข้อ ก้านครีบก้นมี 8 ก้าน ก้านครีบหลังมี 9-10 ก้าน Notochord ตอนปลายเริ่มโค้งงอ

- ลูกปลาอายุ 12-13 วัน ลำตัวมีสีน้ำตาลเข้มขึ้น ครีบต่างๆ ยังคงเชื่อมติดกัน Notochord เริ่มหดสั้นลง ฟันที่ปากเริ่มเจริญดี

- ลูกปลาอายุ 20-27 วัน ลำตัวมีสีเทาปนดำ ครีบทุกครีบเจริญเหมือนตัวเต็มวัย โดยแยกจากกันหมด มีก้านครีบหาง 17 ก้าน ก้านละ 13 ข้อ มีก้านครีบก้น 11 ก้าน ก้านละ 10 ข้อ ครีบอกมีก้านครีบ 6-7 ก้าน

2) การพัฒนาทางเนื้อเยื่อวิทยา

- ลูกปลาอายุ 1 วัน ส่วนหัวติดกับถุงสะสมอาหาร สมองเริ่มเจริญ อวัยวะภายในระบบย่อยอาหารและอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับระบบย่อยอาหารยังไม่เจริญ แต่เริ่มมีการเจริญของหัวใจ โดยเห็นเป็นกลุ่มเม็ดเลือดแดงอยู่บริเวณด้านบนของถุงสะสมอาหาร

- ลูกปลาอายุ 2 วัน ลำไส้มีลักษณะเป็นท่อตรงสั้นๆ ยังเจริญไม่สมบูรณ์ มีการแยกของปากเป็นริมฝีปากบนและล่าง สมองเจริญดีขึ้นเห็นเป็นส่วนๆ ชัดเจน หัวใจมีการเจริญเติบโตดีขึ้น

- ลูกปลาอายุ 3-4 วัน หลอดอาหารมีลักษณะตรงและสั้น มีการยกตัวเล็กน้อยของชั้นมิวโคซา (Mucosa) ยังไม่เห็นชั้นมัสคิวลาริส (Muscularis) ของหลอดอาหาร เริ่มมีการเจริญของกระดูกเหงือกแต่ยังไม่สมบูรณ์

- ลูกปลาอายุ 5-6 วัน เริ่มเกิดท่อไตประมาณ 2-3 ท่อ บริเวณท่อไตพบ Hematopoietic tissue มีการเจริญของเหงือกมากขึ้น มีลักษณะกลม พบเหงือก 4 คู่ เจริญมากขึ้นอยู่

ภายใน Pharyngeal cavity เหนือแต่ละคู่มิแขนงยื่นออกไป ภายในช่องท้องหลายตำแหน่งเริ่มพบ Exocrine pancreas โดยเห็น Pancreatic tissue และเนื้อเยื่อเกี่ยวพันชัดเจน แต่ยังไม่พบ Exocrine pancreas ภายในตับ เริ่มเห็น Pharyngeal teeth ในตำแหน่ง Pharyngeal bone ชัดเจน หัวใจมีการเจริญขึ้นจนเห็นลักษณะที่จะแยกเป็น Atrium และ Ventricle เริ่มเห็นถุงลมบริเวณด้านหลังเหนือระดับของอวัยวะในระบบย่อยอาหาร ลำไส้ขยายใหญ่มากขึ้น กระเพาะอาหารยังไม่เจริญ

- ลูกปลาอายุ 7 วัน ท่อไตมีจำนวนเพิ่มมากขึ้น ท่อทางเดินอาหารเจริญดีขึ้นเป็นหลอดอาหารเริ่มตั้งแต่คอหอยจนถึงลำไส้ หลอดอาหารมีลักษณะยาว ตรง และมีการยกตัวของชั้นต่างๆ มากขึ้น มีช่องว่างทางเดินอาหาร (Lumen) แคบๆ เริ่มพบ Goblet cells เล็กน้อยที่ผนังชั้นนอกสุด ส่วนผนังชั้นอื่นๆ ยังแบ่งไม่ชัดเจน ลำไส้เจริญดีและแบ่งเป็นชั้นๆ ชัดเจน ผนังชั้นมิวโคซา มีการยกตัวสูงและค่อนข้างถี่ มีเซลล์เยื่อบุผิวแบบทรงกระบอก (Columnar epithelium) หัวใจเจริญมากขึ้นแยกเป็น Atrium และ Ventricle อย่างชัดเจน ส่วนของหัวใจขยายใหญ่ขึ้นจนชิดกับตับและติดด้านล่างของช่องท้อง

- ลูกปลาอายุ 8 วัน ถุงลมมีการเจริญดีขึ้น โดยเริ่มขยายยาวลงมาจากด้านหลังตามความยาวของลำตัวถึงบริเวณลำไส้ตอนกลาง ภายในถุงมีช่องว่างขนาดใหญ่พบ Exocrine pancreas มากขึ้น โดยอยู่เป็นกลุ่มๆ หนาแน่นติดกับท่อทางเดินอาหารและบริเวณตับ ผนังชั้นมิวโคซา ชั้นมิวโคซา (Submucosa) และมัดกล้ามเนื้อ ของลำไส้มีความหนาเพิ่มขึ้น

- ลูกปลาอายุ 9-10 วัน เริ่มมีการโค้งงอของ Notochord ตอนปลายบริเวณใกล้หาง Notochord ยาวตลอดลำตัว เริ่มมีการเจริญของท่อไตส่วนท้ายและมีจำนวนท่อไตมากขึ้น ลำไส้มีความยาวมากขึ้น พร้อมกับพบ Goblet cells เป็นจำนวนมากและเจริญคล้ายกับตัวเต็มวัย หลอดอาหารมีการยกตัวและแบ่งเป็นชั้นๆ และพบ Goblet cells ตลอดแนวชั้นมิวโคซา Exocrine pancreas อยู่ชิดกับตับมากขึ้น มีการแบ่งแยกของ Atrium และ Ventricle ของหัวใจชัดเจน ในระบบย่อยอาหาร Pharyngeal teeth เจริญดีและยาวขึ้น Pharyngeal bone มากขึ้น พบ Pseudobranchiae

- ลูกปลาอายุ 11-13 วัน ถุงลมมีลักษณะยาวไปทางด้านท้ายมากขึ้น หัวใจมีขนาดใหญ่ขึ้น ท่อทางเดินอาหารช่วงต่อระหว่างหลอดอาหารกับลำไส้มีลักษณะยาวและตรงมากขึ้น แสดงให้เห็นว่าเริ่มมีการเจริญของกระเพาะอาหาร

- ลูกปลาอายุ 14-15 วัน เริ่มมีการเจริญของกระเพาะอาหารมากขึ้นเห็นเป็นรูปตัวเจ (J-shape) มีผนังบางๆ เพียงชั้นเดียว มีการเรียงของเซลล์แบบทรงกระบอก ภายในกระเพาะอาหารมีอาหารจำนวนมาก

- ลูกปลาอายุ 20 วัน พบ Exocrine pancreas เริ่มเข้ามาอยู่ภายในตับ และเห็นเส้นเลือด Portal vein ชัดเจน Olfactory organ เจริญดี เห็นชั้นมีวโคซา ชั้นมีวโคซา และ Olfactory lamellae ชัดเจน Pharyngeal teeth เจริญดีเห็นชัดเจน หลอดอาหารมีการยกตัวเหมือนตัวเต็มวัยและมี Goblet cells จำนวนมาก กระจกอาหารยังเจริญไม่เต็มที่ ชั้นชั้นมีวโคซา และมัสคูลาเรียส มีลักษณะค่อนข้างบาง มีการยกตัวของกระจกอาหาร เริ่มพบต่อมแกสตริก (Gastric gland) ที่กระจกอาหารตอนต้น (Fundic region) และพบ Goblet cells บริเวณชั้นมีวโคซา บริเวณกระจกอาหารตอนท้าย (Pyloric region)

- ลูกปลาอายุ 23-27 วัน อวัยวะในระบบย่อยอาหารและอวัยวะต่างๆ เจริญเต็มที่เหมือนตัวเต็มวัย กระจกอาหารแบ่งเป็นชั้นๆ ชัดเจน พบต่อมแกสตริกในกระจกอาหารส่วนต้นมากขึ้น ภายในช่องปิดเหงือก (Opercular region) ใกล้ขอบด้านบนของเหงือกจะพบต่อมไทมัส เจริญดีมาก บริเวณท่อไตพบเม็ดเลือดขาวจำนวนมาก พบ Pancreatic islets กระจายอยู่ใน Exocrine pancreas อยู่ใน Mesentary

2.1.6 ความต้องการสารอาหารของปลากะพงขาว

1) โปรตีน (Protein)

โปรตีนเป็นสารอาหารที่จำเป็นต่อการมีชีวิตและการเจริญเติบโต ปริมาณโปรตีนที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงปลา คือ ปริมาณโปรตีนที่น้อยที่สุดที่ทำให้สัตว์น้ำมีการเจริญเติบโตดีที่สุด (เวียง, 2542) ในปลาวัยอ่อนต้องการ โปรตีนระดับที่สูง และความต้องการโปรตีนจะลดลงเมื่อปลาโตขึ้น ส่วนระดับพลังงานในอาหาร พบว่าอาหารที่มีระดับพลังงานในอาหารสูงจะทำให้ปลากินอาหารลดลง อาหารควรมีระดับพลังงานและโปรตีนที่เหมาะสม จะทำให้ปลาเจริญเติบโตเร็วที่สุด (วีรพงศ์, 2536) โดย Cuzon (1988) และ Sakaras และคณะ (1989) อ้างโดย Glencross (2006) รายงานว่า ระดับโปรตีนที่เหมาะสมในปลากะพงขาวขนาด 7.5 กรัม คือ 45-50 เปอร์เซ็นต์ Catacutan และ Coloso (1995) รายงานว่า ระดับโปรตีนและไขมันที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของปลาน้ำหนักเริ่มต้น 1.34 กรัม คือ 42.5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

2) ไขมัน (Lipid)

ไขมันเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญในกระบวนการเมแทบอลิซึมต่างๆ ของร่างกาย เป็นส่วนประกอบของเนื้อเยื่อ เพราะไขมันทุกชนิดมีกรดไขมันเป็นองค์ประกอบ โดยเฉพาะกรดไขมันที่มีความไม่อิ่มตัวสูง และยังช่วยเกี่ยวกับการลำเลียงและดูดซึม (Biological carrier) วิตามินที่ละลายในไขมัน รวมทั้งเป็นองค์ประกอบของคอเลสเตอรอลและกรดน้ำดี Sakaras และคณะ

(1988) รายงานว่า ที่ระดับโปรตีน 45-50 เปอร์เซ็นต์ ปลากระพงขาวจะมีการเจริญเติบโตดีที่สุดเมื่อได้รับอาหารที่มีไขมันในระดับ 15-18 เปอร์เซ็นต์ Tucker และคณะ (1988) อ้างโดย Glencross (2006) รายงานว่า ที่ระดับโปรตีน 45-50 เปอร์เซ็นต์ และไขมัน 9-13 เปอร์เซ็นต์ จะส่งผลให้ปลามีการเจริญเติบโตดีที่สุด เช่นเดียวกัน Catacutan และ Coloso (1995) รายงานว่า ไขมันในระดับ 10 เปอร์เซ็นต์ และโปรตีนในระดับ 42.5 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้ปลาขนาด 1.3 กรัม มีการเจริญเติบโตดีที่สุด Catacutan และ Coloso (1997) รายงานว่า ปลากระพงขาวขนาดเริ่มต้น 0.9 กรัม มีการเจริญเติบโตดีที่สุด เมื่อได้รับอาหารที่มีไขมันในระดับ 6-18 เปอร์เซ็นต์ และคาร์โบไฮเดรตในระดับ 20 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ ปลากระพงขาวขนาด 1.3 กรัม มีความต้องการกรดไขมัน n-3 HUFA อยู่ที่ 1 เปอร์เซ็นต์ (Wanakwat *et al.*, 1993 อ้างโดย Boonyaratpalin and Williams, 2002) มีความต้องการกรดไขมัน ω -3 : ω -6 ในอัตราส่วน 1.5-1.7 : 1 และมีความต้องการกรดไขมัน Eicosapentaenoic acid (EPA) และ Docosahexaenoic acid (DHA) ประมาณ 1.8 เปอร์เซ็นต์ในสูตรอาหาร (Boonyaratpalin and Williams, 2002)

3) คาร์โบไฮเดรต (Carbohydrate)

จากการศึกษาพบว่าปลาสามารถสังเคราะห์คาร์โบไฮเดรตจากสารอาหารประเภทไขมันและโปรตีน (Glencross, 2006) อย่างไรก็ตามสารอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรตสามารถใช้เป็นแหล่งพลังงานในอาหารปลาแทนแหล่งพลังงานจากไขมันได้ เนื่องจากมีราคาถูกกว่าและยังสามารถใช้เป็นสารเชื่อมประสานเพื่อความคงรูปของเม็ดอาหาร จึงมีการนำสารอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรตมาใช้เพื่อลดต้นทุน แต่ไม่ควรใช้ในอาหารลูกปลากระพงขาวมากกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ (Boonyaratpalin, 1991) โดยการศึกษาของ Catacutan และ Coloso (1997) รายงานว่า คาร์โบไฮเดรตระดับ 20 เปอร์เซ็นต์ และไขมันระดับ 6-18 เปอร์เซ็นต์ เป็นระดับที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของปลากระพงขาว

4) วิตามิน (Vitamins)

วิตามินที่ปลากระพงขาวต้องการ ได้แก่ วิตามินเอ วิตามินบี วิตามินซี วิตามินดี วิตามินอี วิตามินเค วิตามินซี โดยสิทธิ และคณะ (2532) ศึกษาผลของวิตามินซีต่อการเจริญเติบโต องค์ประกอบเลือดและความต้านทานโรคของปลากระพงขาวขนาดความยาว 1.2-1.7 เซนติเมตร พบว่าปลากระพงขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีระดับวิตามินซี 0.10-0.25 เปอร์เซ็นต์ มีองค์ประกอบเลือดและค่าไกลโคเจนใกล้เคียงกันและอยู่ในเกณฑ์ปกติ มีการเจริญเติบโตดีและมีความต้านทานโรคสูง และ Boonyaratpalin (1991) ศึกษา

ความต้องการวิตามินไพริดอกซีน และกรดแพนโททีนิก พบว่ามีความต้องการปริมาณ 700 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

5) แร่ธาตุ (Mineral)

การศึกษาชนิดและปริมาณความต้องการแร่ธาตุในปลากระพงขาวมีการศึกษาน้อย เนื่องจากวิธีการศึกษาต้องใช้อาหารบริสุทธิ์ (Purified diet) จึงทำให้ปลากระพงขาวรับประทานอาหารได้น้อย แร่ธาตุที่มีการศึกษา คือ โมโนโซเดียมฟอสเฟต และฟอสฟอรัส โดยพบว่าปลากระพงขาวมีความต้องการโมโนโซเดียมฟอสเฟต 0.5-1.0 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร และฟอสฟอรัส 0.55-0.65 เปอร์เซ็นต์ (มะลิ และจู่อะดี, 2533)

2.2 พัฒนาการทางเนื้อเยื่อวิทยาของระบบย่อยอาหารในลูกปลาวัยอ่อน

การพัฒนาของอวัยวะในระบบย่อยอาหารมีความสำคัญต่อการกิน การย่อย และการดูดซึมสารอาหารต่อลูกปลาวัยอ่อนมาก โดยการพัฒนาจะมีการเปลี่ยนแปลงทั้งทางด้านสรีรวิทยาและทางเนื้อเยื่อวิทยาของเซลล์ไปพร้อมกัน ซึ่งสามารถแบ่งการพัฒนาได้ 3 ระยะ (Buddington, 1985; Boulhic and Gabaudan, 1992; Bisbal and Bengtson, 1995; Santamaria *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2006) คือ

ระยะที่ 1 ลูกปลาเพิ่งฟักออกจากไข่ และได้รับอาหารสำรองจากไข่แดง (Endogenous feeding)

ระยะที่ 2 หลังจากไข่แดงยุบหมดและเริ่มกินอาหารจากภายนอก ก่อนสร้างต่อมแกสตริก ในกระเพาะอาหาร ในระยะนี้ยังไม่สามารถย่อยอาหารได้สมบูรณ์ เป็นการย่อยและดูดซึมอาหารแบบ Pinocytosis และย่อยภายในเซลล์ (Intracellular digestion) เท่านั้น (Watanabe, 1982)

ระยะที่ 3 ลูกปลามีอวัยวะในระบบย่อยอาหารสมบูรณ์ โดยเริ่มพบต่อมแกสตริกและไส้ติ่ง

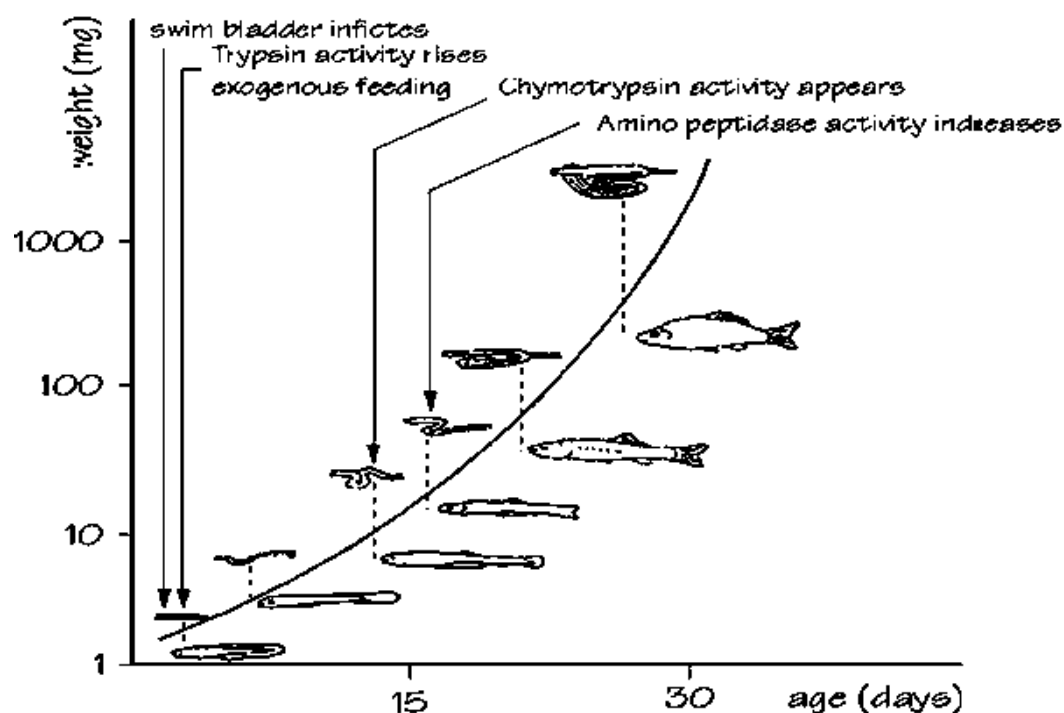
นอกจากนี้ Dabrowski (1984) อ้างโดย ชุตติมา (2547) ได้แบ่งลักษณะตัวอ่อนของลูกปลาวัยอ่อนตามลักษณะของทางเดินอาหารและน้ำย่อยชนิดต่างๆ ที่หลั่งออกมาบริเวณทางเดินอาหารเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่

กลุ่มที่ 1 ลูกปลาที่มีกระเพาะอาหารที่ทำงานได้ก่อนจะมีการเปลี่ยนแปลงการได้รับสารอาหารจากอาหารสำรองเป็นการกินอาหาร เช่น ลูกปลาแซลมอน (Salmon) และปลากัดอเมริกัน (Channel catfish)

กลุ่มที่ 2 กลุ่มลูกปลาที่มีทางเดินอาหารเป็นท่อตรง ไม่มีกระเพาะอาหารหรือต่อมแกสตริกหลังสารช่วยย่อย โดยกลุ่มนี้จะมีการพัฒนาเปลี่ยนแปลงอวัยวะและหน้าที่ของทางเดินอาหารที่ซับซ้อน (Complex metamorphosis) เช่น ลูกปลาทะเลชนิดต่างๆ

กลุ่มที่ 3 กลุ่มลูกปลาที่มีการพัฒนาระบบทางเดินอาหารที่ดี โดยในระยะที่เริ่มกินอาหาร จะมีทางเดินอาหารที่มีโครงสร้างและหน้าที่ของแต่ละส่วนที่ชัดเจน แต่ปลากลุ่มนี้เป็นปลาที่ไม่มีกระเพาะอาหารตลอดชีวิต และเป็นกลุ่มที่มีปัญหาน้อยที่สุดในระยะที่เริ่มกินอาหาร

การเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อของอวัยวะในระบบย่อยอาหารของปลาแต่ละชนิดจะมีความคล้ายคลึงกัน แต่ช่วงเวลาในการเปลี่ยนแปลงของปลาแต่ละชนิดจะแตกต่างกัน โดยปลาในเขตร้อนจะมีระยะเวลาในการเปลี่ยนเร็วกว่าในปลาเขตหนาว ซึ่งสามารถสรุปเหตุการณ์สำคัญที่เกิดขึ้นระหว่างการพัฒนา คือ ลูกปลาที่เพิ่งฟักออกจากไข่จะมีท่อทางเดินอาหารแบบท่อตรงสั้นๆ ยาวตลอดถึงปาก เมื่อลูกปลาใช้สารอาหารสำรองจนหมดไข่แดงยุบ หลอดอาหารจึงเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงและพัฒนาเป็น Buccopharynx ทางเดินอาหารส่วนหน้า (Foregut) ทางเดินอาหารส่วนกลาง (Midgut) และทางเดินอาหารส่วนท้าย (Hindgut หรือ Rectum) จากนั้นจะมีการสร้างต่อมแกสตริก และอวัยวะช่วยย่อยต่างๆ โดยตับและตับอ่อนจะพบตั้งแต่แรกฟักซึ่งเริ่มทำงานเมื่อให้อาหาร มีการเพิ่มความยาวและความซับซ้อนของทางเดินอาหารขึ้นตามการเจริญเติบโตของลูกปลา (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 การพัฒนาทางเดินอาหารของปลาในกลุ่ม Cyprinid
ที่มา: Dabrowski (1984) อ้าง โดย Patrick and Patrick (1996)

2.2.1 ท่อทางเดินอาหาร (Digestive tract)

ลูกปลาส่วนใหญ่ เช่น ปลากัด (สุปราณี และคณะ, 2534) ปลาช่อน (สุปราณี และคณะ, 2536) ปลากดเหลือง (อุมาพร, 2542) ปลาดุก (ชาตรี, 2543) ปลาบู่ทราย (เบญจสุกฤษณ์, 2545) ปลาซีกเดียว (*Solea solea*) (Boulhic and Gabaudan, 1992) ปลา Summer flounder (Bisbal and Bengtson, 1995) ปลา Walleye pollock (Porter and Theilacker, 1999) ปลา Dover sole (Ribeiro *et al.*, 1999) และปลา Spotted sand bass (Pena *et al.*, 2003) เมื่อแรกฟักออกจากไข่ ระบบการย่อยอาหารยังพัฒนาไม่สมบูรณ์ โดยท่อทางเดินอาหารยังเป็นท่อตรง ปากและทวารหนักยังไม่เปิด ส่วนของริมฝีปากยังไม่แยกออกจากกัน แต่จะมีการพัฒนาไปเป็นริมฝีปากบนและล่าง โดยการเปิดปากของลูกปลาจะมีความสัมพันธ์กับการยุบตัวของถุงไข่แดง คือ จะเปิดปากก่อนที่ถุงไข่แดงจะยุบหมด เพื่อเตรียมพร้อมที่จะกินอาหารจากภายนอก (Boulhic and Gabaudan, 1992; Kjorsvik and Reiersen, 1992; Segner *et al.*, 1994; Bisbal and Bengtson, 1995; Sarasquete *et al.*, 1995; Porter and Theilacker, 1999; Ribeiro *et al.*, 1999)

2.2.2 ช่องปาก คอหอย

ระยะแรกที่เพิ่งฟักออกจากไข่ ริมฝีปากบนและล่างของลูกปลายังไม่แยกออกจากกัน โดยจะมีเนื้อเยื่อเกี่ยวพันบางๆ เชื่อมติดไว้ (ชโล และคณะ, 2530; วันเพ็ญ และนางนุช, 2530; นันทนา, 2531; จันทวัชร, 2532) มีเยื่อบุผิวแบบแบนบางเรียงตัวชั้นเดียว (Simple squamous epithelium) และมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์บุผิวแบบแบนบางเรียงตัวหลายชั้น (Stratified squamous epithelium) เพื่อป้องกันการเสียดสีที่เกิดจากการกินอาหาร

เมื่อถุงไข่แดงเริ่มเล็กลงและลูกปลาเริ่มกินอาหารจากภายนอก จะเกิดช่องว่างภายในลำตัวขึ้น ริมฝีปากเริ่มแยกออกจากกัน โดยจะมี Oral valve ยื่นยาวออกจากเยื่อบุริมฝีปากด้านบนและด้านล่างงอโค้งเข้าไปในช่องปาก และพบตุ่มรับรสกระจายอยู่แต่มีจำนวนน้อย ถัดเข้าไปจากช่องปากเริ่มแยกเป็นส่วนของคอหอย (Pharynx) พบฟันบริเวณคอหอย และตุ่มรับรสแทรกอยู่ในชั้นเยื่อบุผิว และจะเพิ่มจำนวนและขนาดตามการเจริญเติบโต และจะพบฟันโผล่ยื่นขึ้นพื้นเยื่อบุผิวเมื่อลูกปลามีอายุมากขึ้น บริเวณช่องปากจะพบลิ้นมีลักษณะเป็นแผ่นติดกับคอหอยด้านล่าง ประกอบด้วยเซลล์บุผิวแบบแบนบางเรียงตัวหลายชั้นยึดติดกับแกนกระดูกอ่อน (เบญจศุภลักษณ์, 2545; Bisbal and Bengtson, 1995)

2.2.3 หลอดอาหาร

หลอดอาหารจะมีลักษณะเป็นท่อตรงยังไม่แบ่งเป็นส่วนต่างๆ มีเซลล์บุผิวแบบแบนบางเรียงตัวหลายชั้น พบตุ่มรับรส ต่อมผลิตเมือก และพบ Goblet cells แทรกอยู่ระหว่างเซลล์บุผิว โดยจะพบเมื่อปลาอายุ 2 วันหลังฟักออกเป็นตัว พร้อมกับการเปิดปาก (เบญจศุภลักษณ์, 2545; Ferraris *et al.*, 1987; Boulhic and Gabaudan, 1992; Ribeiro *et al.*, 1999) การเกิด Goblet cell ในลูกปลาวัยอ่อนส่วนใหญ่จะเกิดก่อนกินอาหารจากภายนอก แต่ในลูกปลา Turbot และปลา Sea bream (Cousin and Baudin-Laurencin, 1985; Sarasquete *et al.*, 1995) จะพบ Goblet cell หลังจากกินอาหารจากภายนอก จะพบปรากฏขึ้นเล็กน้อย และมีปริมาณมากขึ้น เมื่อปลามีการเจริญเติบโตขึ้น Goblet cell บริเวณหลอดอาหารเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่ในการสร้างสารเมือกจำพวก Acid glycoprotein เพื่อใช้ในการหล่อลื่นให้อาหารเคลื่อนผ่านท่อทางเดินอาหารได้สะดวก และเคลือบลำไส้ป้องกันการกักร้อนจากกรดในกระเพาะอาหาร เมื่อปลาเจริญเป็นตัวเต็มวัย ภายในเซลล์จะประกอบด้วยสารจำพวก Acid mucosubstance (เบญจศุภลักษณ์, 2545; Boulhic and Gabaudan, 1992) ในขณะที่ในปลาบางชนิดจะพบสารพวก Sulphate mucosubstance และ Carboxylate mucosubstance (Ribeiro *et al.*, 1999) การยกตัวของเยื่อบุหลอดอาหารชั้นมิวโคซา จะเริ่มพบแตกต่างกันในปลาแต่ละชนิด เช่น ปลาบู๋และปลานวลจันทร์ทะเลจะพบวันที่ 7 หลังฟัก

ออกเป็นตัว (เบญจสุภักดิ์, 2545; Ferraris *et al.*, 1987) แต่ปลาช่อนจะพบวันที่ 2 หลังฟัก
ออกเป็นตัว และจะยกตัวมากขึ้นเมื่อปลามีการเจริญเติบโตขึ้น สำหรับเยื่อบุผิวหลอดอาหารส่วน
ปลายบริเวณที่ต่อกับกระเพาะอาหารส่วนต้น จะค่อยๆ เปลี่ยนจากเซลล์แบบแบนบางเรียงตัวหลาย
ชั้น ไปเป็นเซลล์แบบทรงกระบอกเรียงตัวชั้นเดียว (Simple columnar epithelium)

2.2.4 กระเพาะอาหาร

กระเพาะอาหารจะมีการพัฒนาช้ากว่าอวัยวะอื่นๆ ซึ่งในช่วงแรกจะไม่สามารถ
แยกจากลำไส้ได้ชัดเจน มีเซลล์บุผิวแบบทรงกระบอกเรียงตัวชั้นเดียว นิวเคลียสติดสีน้ำเงิน เมื่อ
ย้อมด้วยสี H&E อยู่ที่ฐานของเซลล์ พบ Brush border ที่เซลล์เยื่อบุผิว เริ่มมีการยกตัวของเยื่อบุผิว
กระเพาะอาหาร และมีการยกตัวมากขึ้นเมื่ออายุมากขึ้น การเกิดต่อมแกสตริกบริเวณกระเพาะ
อาหารมีส่วนสำคัญในการย่อยอาหาร โดยต่อมแกสตริกจะหลั่งกรดไฮโดรคลอริก (HCl) เพื่อ
กระตุ้นเปปซินโนเจน (Pepsinogen) ให้เปลี่ยนเป็นเอนไซม์เปปซิน (Kapoor *et al.*, 1976) ช่วยใน
การย่อยโปรตีนให้มีโมเลกุลขนาดเล็กลง ซึ่งในปลาแต่ละชนิดจะพบการพัฒนาของต่อมแกสตริก
ช้า เร็วแตกต่างกัน เช่น ในปลาบูทราจะเริ่มพบต่อมแกสตริกในวันที่ 30 หลังฟักออกเป็นตัว ซึ่ง
ช้ากว่าในปลาช่อนที่พบในวันที่ 3 (สุปราณี และคณะ, 2536) ปลากดเหลืองพบในวันที่ 4-5 (อุมา
พร, 2542) ปลาตุ๊กตูปพบในวันที่ 4 (ชาติศรี, 2543) ปลา Siberian sturgeon (Gisbert *et al.*, 1998)
ปลา Dover sole พบในวันที่ 22 (Ribeiro *et al.*, 1999) และปลา Yellowtail kingfish พบในวันที่ 15
(Chen *et al.*, 2006) แต่พบเร็วกว่าในปลานวลจันทร์ทะเลพบในวันที่ 42 (Ferraris *et al.*, 1987) และ
ปลา Summer flounder พบในวันที่ 31 (Bisbal and Bengtson, 1995) ในขณะที่ปลา Walleye
pollock ยังไม่พบการพัฒนาของต่อมแกสตริกแม้จะมีอายุ 31 วัน (Porter and Theilacker, 1999)

2.2.5 ลำไส้

ในวันแรกหลังฟักออกจากไข่ พบว่าส่วนของลำไส้เป็นท่อตรง เซลล์ของเยื่อบุ
ผนังลำไส้เป็นเซลล์แบบทรงกระบอกเรียงตัวชั้นเดียว ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีคุณสมบัติในการดูดซึม
สารอาหารได้ดี เมื่อพบว่าทวารเริ่มแยกออกจากกัน จะสามารถแบ่งลำไส้ได้เป็น 2 ส่วน คือ ลำไส้
ส่วนต้น (Anterior intestine) และส่วนท้ายชัดเจน (Posterior intestine) โดยมี Intestinal valve กั้นอยู่
ระหว่างลำไส้ทั้ง 2 ส่วน เยื่อบุผิวบริเวณลำไส้จะยกตัวขึ้นตั้งแต่ลูกปลากินอาหารจากภายนอก และ
ยกตัวมากขึ้นเมื่อเจริญเติบโตขึ้น ทำให้เกิดเป็น Villi จำนวนมากซึ่งเป็นการเพิ่มพื้นที่ในการดูดซึม
อาหาร (Grizzle and Rogers, 1976) นอกจากนี้บริเวณลำไส้ยังประกอบด้วยเซลล์ Enterocyte และ
พบ Goblet cells ในลำไส้เมื่อปลามีอายุ 15 วัน หลังฟักออกเป็นตัว (เบญจสุภักดิ์, 2545; Ribeiro

et al., 1999) โดย Goblet cell จะเกิดขึ้นก่อนที่กระเพาะอาหารจะเริ่มทำงาน เพื่อหลั่งเมือกมาเคลือบลำไส้ป้องกันการกัดของกรดจากกระเพาะอาหาร (เบญจศุภลักษณ์, 2545; Boulhic and Gabaudan, 1992; Sarasquete *et al.*, 1995)

ลำไส้ส่วนต้น มีการสะสมของ Lipid vacuole ในชั้นมิวโคซา (เบญจศุภลักษณ์, 2545; Boulhic and Gabaudan, 1992; Sarasquete *et al.*, 1995; Gisbert *et al.*, 1998; Porter and Theilacker, 1999; Ribeiro *et al.*, 1999) เป็นการแสดงถึงการดูดซึมไขมันในท่อทางเดินอาหาร ส่วนในลำไส้ตอนท้าย มีการสะสม Eosinophilic granule (Cousin and Baudin-Laurencin, 1985; Boulhic and Gabaudan, 1992; Bisbal and Bengtson, 1995) ซึ่งแสดงถึงการดูดซึมโปรตีน โดยเป็นการนำโปรตีนเข้าสู่เซลล์แบบ Pinocytosis และหลุดออกเป็น Vesicle ปรากฏอยู่ในลำไส้ตอนท้าย (Govoni *et al.*, 1986)

2.2.6 อวัยวะช่วยย่อยอาหาร (Accessory gland)

การเจริญของตับ และตับอ่อน จะพบตั้งแต่วันแรกหลังฟักออกจากไข่ (วันเพ็ญและนางนุช, 2530; นันทนา, 2531; สุปราณี และคณะ, 2536; Cousin and Baudin-Laurencin, 1985; Govoni *et al.*, 1986; Boulhic and Gabaudan, 1992; Sarasquete *et al.*, 1995; Falk-Peterson and Hansen, 2001; Kolkovski, 2001) ท่อน้ำดีจะเริ่มเจริญอยู่ใกล้เซลล์ตับซึ่งพัฒนาไปพร้อมๆ กับตับ พบเซลล์ตับ (Hepatocyte) เกิดขึ้น พบการเจริญของ Sinusoid และเริ่มมีเม็ดเลือดแทรกอยู่ ตับอ่อนจะประกอบด้วยเซลล์มารวมกลุ่มกันเป็น Acinar cell และจะค่อยๆ ม้วนไปตามลำไส้ ในขณะที่เดียวกันพบว่ามีโครงสร้างต่อมไร้ท่อ (Islet of Langerhans) ที่ทำหน้าที่ในการหลั่งฮอร์โมนเพื่อกระตุ้นการหลั่งเอนไซม์จำพวก เอนไซม์ไทโรซีน, ไลซีน, อาร์จินีน และเอนไซม์ทริปโตเฟน จากตับอ่อน เพื่อช่วยย่อยอาหารเมื่อกินอาหารจากภายนอก

2.3 ความต้องการสารอาหารในลูกปลาทะเลวัยอ่อน

การศึกษาความต้องการสารอาหารในลูกปลาวัยอ่อนมีข้อจำกัด เนื่องจากลูกปลา มีขนาดเล็กจึงยากต่อการประเมินปริมาณการกิน ย่อยและดูดซึมสารอาหาร ส่วนใหญ่จึงเป็นการศึกษาความต้องการด้านคุณภาพ (Qualitative requirement) มากกว่าความต้องการด้านปริมาณ (Quantitative requirement) โดยยึดองค์ประกอบของสารอาหารต่างๆ ในอาหารมีชีวิตที่ใช้ในการอนุบาล เช่น โคพีพอด (Copepods) โรติเฟอร์ (Rotifer) และอาร์ทีเมีย (*Artemia* sp.) (ตารางที่ 1) เป็นหลักในการผลิตอาหาร

1) โปรตีน

ลูกปลาทะเลวัยอ่อนจะมีความต้องการโปรตีนระดับที่สูง และความต้องการโปรตีนจะลดลงเมื่อปลาโตขึ้น โดยปริมาณโปรตีนที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตประมาณ 50-70 เปอร์เซ็นต์ เช่น ในอาหารลูกปลา Sea bream มีระดับโปรตีน 73 เปอร์เซ็นต์ (Salhi *et al.*, 1994) อาหารลูกปลา Red drum (*Sciaenops ocellatus*) (Brinkmeyer and Holt, 1995) และอาหารลูกปลากะพงยุโรป (*Dicentrarchus labrax*) (Peres *et al.*, 1996) ที่ระดับโปรตีน 50 เปอร์เซ็นต์ ลูกปลาที่มีการเจริญเติบโตดีที่สุดสำหรับความต้องการกรดอะมิโนสามารถประมาณได้จากองค์ประกอบของกรดอะมิโนจำเป็นในตัวปลา

ตารางที่ 1 องค์ประกอบของสารอาหารในอาหารมีชีวิต (Hamre, 2006)

	Copepods	Rotifers ³		<i>Artemia</i> ⁴
		Rotimac	Yeast and oil	
Protein (Lowry)	38-57*	24*	-	28-32*
Protein ¹ (N×6.25)	72	61	58	62
Lipid	6-16*	25	27	25*
Glycogen	0.5	-	7	7
Ash	10*	17	16	10*
∑	89-99	103	108	104*
Thiamine ²	13-20	11	30	6-12
Riboflavin	14-27	30	25	30-60
Pyridoxine	2-6	9.3	8.2	2-13
Folic acid	3-5	3.7	5.0	6-10
Vitamin C	600-1000	230	704	400-500
Vitamin E	50-200	2080	1126	100-500
Vitamin A	nd	0	4.9	0
Astaxanthin	627*	24*	-	nd
Canthaxanthin	nd	nd	-	654-752*
Iodine	50-350	2.9	3.7	0.5-2.0

¹สารอาหารปริมาณมาก (Macronutrients) % dry weight

²สารอาหารปริมาณน้อย (Micronutrients) µg g⁻¹ dry weight

³เลี้ยงด้วยอาหารเสริม Rotimac (Bio-Marine Aquafauna) และยีสต์กับน้ำมัน

⁴เสริมด้วยสารละลายกรดไขมัน Super SelcoTM และ DHA-SelcoTM

* van der Meeren (2003) อ้างโดย Hamre (2006)

- = not determined, nd = not detected

2) ไขมัน

การศึกษาความต้องการไขมันส่วนใหญ่จะมุ่งเน้นความต้องการฟอสโฟลิพิด (Phospholipid) และกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง (Highly Unsaturated Fatty Acid, HUFA) โดย การศึกษาระดับไขมันในอาหารลูกปลาทะเลวัยอ่อน โดยทั่วไปมักจะค่อนข้างสูง เพราะในไข่ปลา มี ปริมาณของไขมันสูงประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ (Cahu and Zambonino-Infante, 2001) เช่น อาหาร สำหรับลูกปลา Red seabream วัยอ่อนมีระดับไขมัน 18 เปอร์เซ็นต์ของส่วนประกอบอาหาร (Salhi *et al.*, 1999) ในอาร์ทีเมียสำหรับใช้อุบาลลูกปลา Sea bream และปลา Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) มีระดับไขมันสูงถึง 29-37 เปอร์เซ็นต์ (Koven *et al.*, 1992) และ 25 เปอร์เซ็นต์ (Furuita *et al.*, 1998) ตามลำดับ และในการศึกษาของ Brinkmeyer และ Holt (1995) ในลูกปลา Red drum พบว่าที่ระดับไขมัน 18 เปอร์เซ็นต์ ลูกปลามีการเจริญเติบโตดีที่สุด

สำหรับการศึกษาความต้องการฟอสโฟลิพิดของ Sargent และคณะ (1993) ใน อาหารลูกปลาทะเลวัยอ่อนจะประกอบด้วยฟอสโฟลิพิดจากปลาทะเลระดับ 10 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากไข่ปลาและถุงไข่แดงมีปริมาณฟอสโฟลิพิด 10 เปอร์เซ็นต์ และในอาหารลูกปลาทะเล พง ยูโรป มีระดับฟอสโฟลิพิด 6.6 เปอร์เซ็นต์ (Zambonino-Infante and Cahu, 1999) ส่งผลให้ลูกปลา มีการเจริญเติบโตและอัตราการรอดตายดีที่สุด

ความต้องการกรดไขมันจำเป็นในอาหารสำหรับลูกปลาทะเลวัยอ่อนจะมุ่งเน้น กรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง Eicosapentaenoic (EPA=C20:5n-3) และ Docosahexaenoic (DHA=C22:6n-3) เนื่องจากพบปริมาณมากในเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งระดับ DHA:EPA ที่เหมาะสมใน อาหารลูกปลามีค่าประมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง (Izquierdo *et al.*, 1989; Watanabe and Kiron, 1994; Zambonino-Infante and Cahu, 1999)

2.4 การใช้อาหารสำเร็จรูปในลูกปลาวัยอ่อน

2.4.1 แหล่งวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตอาหารสำเร็จรูป

1) โปรตีน

วัตถุดิบโปรตีนเป็นส่วนประกอบปริมาณมากที่สำคัญและราคาแพงในการผลิต อาหาร ซึ่งในอาหารปลาจะประกอบด้วยวัตถุดิบโปรตีนหลายชนิด แหล่งโปรตีนที่สำคัญ คือ ปลา ปั่น แต่เนื่องจากปลาคุ้งเป็นแหล่งโปรตีนที่กำลังขาดแคลน จึงต้องนำวัตถุดิบตัวเลือกอื่นๆ มา แทนที่เพื่อลดการใช้ปลาคุ้ง เช่น การใช้แหล่งโปรตีนจากปลาคุ้งและหมึกคุ้ง ในอาหารอนุบาล

ลูกปลากระพงขาว (*Lates calcarifer*) ว่ายอ่อน ให้การเจริญเติบโตสูงกว่าปลาชุดที่ได้รับอาหารที่ใช้วัตถุดิบจากหอยป่นหรือกุ้งเคียบป่น (Nankervis and Southgate, 2006) และการศึกษาของ Kanazawa และ Teshima (1988; อ้างโดย Langdon, 2003) ใช้ปลาป่น ยีสต์ กุ้งเคียบป่น ปูป่น และกลูเตนเป็นแหล่งโปรตีนในอาหารปลาซีกเดียว (*P. olivaceus*) ส่งผลให้การเจริญเติบโตและอัตราการรอดตายเพิ่มขึ้น รูปแบบของโปรตีนที่ใช้ในการผลิตอาหารสำหรับลูกปลาว่ายอ่อน ได้แก่

- โปรตีนไฮโดรไลเสต (Protein hydrolysate) นิยมใช้เป็นวัตถุดิบในการทำอาหารลูกปลาว่ายอ่อน เนื่องจากเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) ของโปรตีนที่ผ่านการย่อยก่อน (Pre-digested protein source) ด้วยสารเคมีหรือเอนไซม์กลุ่มโปรติเอส (ทริปซินและแพนครีเอติน) ที่ตัดพันธะเปปไทด์ (Peptide bond) ของโปรตีนที่มีเป็นสายโซ่ยาวให้เป็นเปปไทด์สายสั้นๆ ช่วยให้ลูกปลาสามารถดูดซึมสารอาหารได้ง่ายขึ้น โดยโปรตีนไฮโดรไลเสตส่วนใหญ่มีปริมาณโปรตีนสูงกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ (Carvalho *et al.*, 1997; Zambonino-Infante *et al.*, 1997; Cahu *et al.*, 1999; Kolkovski and Tandler, 2000) เช่น Jany (1976) ศึกษาการใช้โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์โปรติเอสในอาหารปลาไม่มีกระเพาะอาหาร (*Carassius auratus gibelio*) พบว่าปลาสามารถย่อยอาหารบริเวณลำไส้ได้ดีขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับปลาชุดที่ได้รับอาหารที่มีโปรตีนตามธรรมชาติ ดังนั้นจึงมีการศึกษาเพื่อนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตอาหารสำหรับลูกปลาว่ายอ่อนมากขึ้น เนื่องจากมีผลดีต่อลูกปลา (Gabaudan *et al.*, 1980) มีผลดีต่อลักษณะทางกายภาพของอาหารสำเร็จรูปในด้านการทำให้อาหารมีความคงตัวสูงขึ้น (Kolkovski, 2001) และมีศักยภาพช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโต กระตุ้นการกินอาหารซึ่งทำให้อาหารมีความน่ากินขึ้น (Kolkovski and Tandler, 2000)

จากการศึกษาของ Kolkovski และ Tandler (2000) ทำการทดลองใช้โปรตีนไฮโดรไลเสตจากหมึกเป็นแหล่งโปรตีนในอาหารปลากะพงแดง (*Sparus aurata*) ว่ายอ่อน พบว่าสามารถใช้โปรตีนไฮโดรไลเสต จากหมึกในอาหารร่วมกับโปรตีนจากหมึกป่นได้ที่ระดับ 50 เปอร์เซ็นต์ โดยไม่ส่งผลต่ออัตราการรอดตาย แต่ถ้าใช้ในระดับที่สูงขึ้นถึง 100 เปอร์เซ็นต์ จะส่งผลให้การเจริญเติบโตลดลง (ตารางที่ 2) สำหรับการศึกษาเลี้ยงปลากะพงยุโรป (*Dicentrarchus labrax*) และปลาไน (*Cyprinus carpio*) ว่ายอ่อนด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตร่วมกับยีสต์แทนที่โปรตีนจากปลาป่น พบว่าปลาไม่อัตราการรอดตายสูงกว่าการใช้โปรตีนเข้มข้นจากถั่วเหลืองและยีสต์ และการใช้ปลาป่นอย่างเดียว ส่วนในปลาไน ว่ายอ่อนพบว่าปลาสามารถใช้โปรตีนไฮโดรไลเสตปริมาณ 40 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง ร่วมกับยีสต์ปริมาณ 40 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง แทนที่โปรตีนปลาป่นในอาหาร โดยมีการเจริญเติบโตและอัตราการรอดตายสูงสุด (Cahu *et al.*, 1998) และปลากะพงยุโรป ว่ายอ่อนที่ได้รับอาหารที่ใช้โปรตีนไฮโดรไลเสต แทนที่โปรตีนปลาป่นที่ระดับ 25 เปอร์เซ็นต์ ส่งผล

ให้การเจริญเติบโตไม่แตกต่างปลาชุดควบคุม และมีอัตราการรอดตายสูงกว่าชุดควบคุม (Cahu *et al.*, 1999)

- กรดอะมิโนอิสระ (Free amino acids) ลูกปลาวัยอ่อนในระยะแรกช่วงที่กระเพาะอาหารยังไม่พัฒนา มีความต้องการกรดอะมิโนอิสระเนื่องจากขาดกรดเกลือ และเอนไซม์เปปซินที่สังเคราะห์จากกระเพาะอาหารช่วยในการย่อยโปรตีน Naess และคณะ (1995) รายงานว่า ในอาร์ทีเมียที่มีปริมาณกรดอะมิโนอิสระ 7 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักแห้ง เพียงพอต่อการเจริญเติบโตของลูกปลา Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) แต่การเสริมกรดอะมิโนจำเป็นในปลาป่นระดับ 10 เปอร์เซ็นต์ พบว่าไม่เพิ่มการเจริญเติบโตและอัตราการรอดตายในปลา กะพงวัยอ่อน เมื่อเปรียบเทียบกับลูกปลาที่ได้รับอาหารที่มีเปอร์เซ็นต์โปรตีนเท่ากัน (Cahu and Zambonino-Infante, 1995) กรดอะมิโนอิสระนอกจากจะมีผลให้เพิ่มการหลั่งเอนไซม์ทริปซินแล้ว ยังมีบทบาทสำคัญในการเป็นสารดึงดูดการกินอาหารทางเคมี (Chemo-attractant) ในอาหารลูกปลาวัยอ่อน (Cahu and Zambonino-Infante, 2001) จากการศึกษาการใช้โปรตีนไฮโดรไลเสตและกรดอะมิโนอิสระในอาหารลูกปลา พบว่าสามารถแทนที่โปรตีนได้ไม่เกิน 30 เปอร์เซ็นต์ ของโปรตีนทั้งหมดในอาหาร (Kolkovski, 2001) เพราะจะลดการเจริญเติบโตของลูกปลาวัยอ่อน เช่น การเสริมกรดอะมิโนอิสระในอาหารที่ระดับ 54 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนในอาหาร พบว่าไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของปลา Rainbow trout (Rodehutsord *et al.*, 1995) แต่การใช้กรดอะมิโนอิสระที่ระดับ 100 เปอร์เซ็นต์ในอาหาร จะลดการเจริญเติบโตของปลา Atlantic salmon (Espe and Njaa, 1991) (ตารางที่ 2)

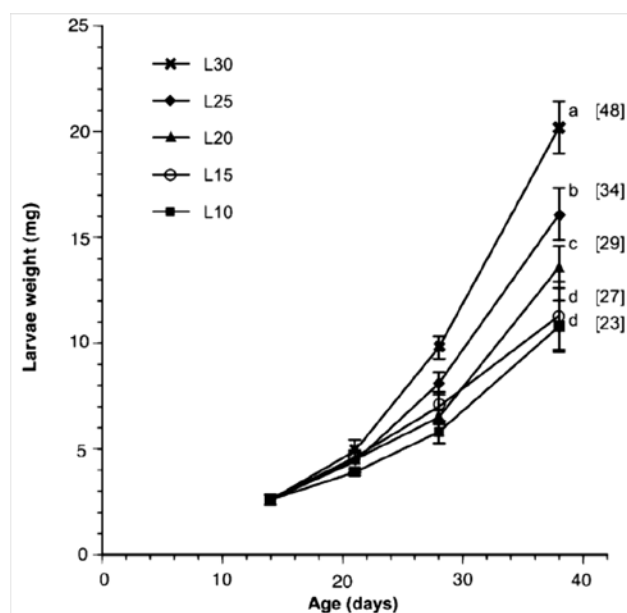
2) ไขมัน

ส่วนประกอบของวัตถุดิบแหล่งไขมันในอาหารสัตว์น้ำวัยอ่อนบางส่วนจะได้มาจากปลาป่นหรือ ส่วนประกอบอื่นที่ใช้เป็นแหล่งโปรตีนในอาหาร แต่ส่วนใหญ่เป็นน้ำมันจากพืชหรือผลิตภัณฑ์ที่ได้มาจากการแปรรูปสัตว์ทะเล เช่น น้ำมันตับปลา (Cod liver oil) หรือน้ำมันปลา ที่มีการเสริมไตรกลีเซอไรด์และฟอสโฟลิพิด ด้วยเลซิธินจากถั่วเหลือง (Soya lecithin) หรือฟอสโฟลิพิดจากปลาทะเล (Geurden *et al.*, 1995) โดยแหล่งฟอสโฟลิพิดในอาหารที่สำคัญ คือ เลซิธินจากถั่วเหลือง จากการศึกษาของ Zambonino-Infante และ Cahu (1999) ในอาหารลูกปลา กะพงยุโรปวัยอ่อน โดยใช้ไขมันตับปลา และเลซิธินจากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไขมัน พบว่า การเจริญเติบโตและอัตราการรอดตายของลูกปลามีความสัมพันธ์กับระดับไขมันที่เพิ่มขึ้นในอาหาร (ภาพที่ 3) ซึ่งที่ระดับไขมัน 30 เปอร์เซ็นต์ ลูกปลามีการเจริญเติบโตและอัตราการรอดตายดีที่สุด

ในอาหารลูกปลาวัยอ่อนส่วนประกอบของไขมันเป็นแหล่งพลังงานหลักที่สำคัญ ต่อพัฒนาการของลูกปลา (Cahu and Zambonino-Infante, 2001) ระดับของไขมันในอาหาร โดยทั่วไปมักมีระดับค่อนข้างสูง เพราะในไข่ปลาที่มีปริมาณของไขมันสูงประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ เช่น ในอาหารสำหรับลูกปลา Red seabream วัยอ่อนมีระดับไขมัน 18 เปอร์เซ็นต์ของ ส่วนประกอบอาหาร (Salhi *et al.*, 1999) และในอาร์ทีเมียสำหรับใช้ออนุบาลลูกปลา Seabream และ ปลา Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) มีระดับไขมันสูงถึง 29-37 เปอร์เซ็นต์ (Koven *et al.*, 1992) และ 25 เปอร์เซ็นต์ (Furuita *et al.*, 1998) ตามลำดับ ในการศึกษาของ Brinkmeyer และ Holt (1995) ใช้แหล่งไขมันจากน้ำมันปลาโดยใช้อาหารแบบกึ่งบริสุทธิ์ (Semi-purified diet) ใน ลูกปลา Red drum (*Sciaenops ocellatus*) พบว่า ที่ระดับไขมัน 18 เปอร์เซ็นต์ ลูกปลามีการ เจริญเติบโตดีที่สุด

ตารางที่ 2 การใช้โปรตีนไฮโดรไลเสตและกรดอะมิโนอิสระในอาหารลูกปลาขนาดเล็ก (Kolkovski, 2001)

Species	Hydrolysate or free amino acids supplemented	Findings	Authors
Atlantic salmon (<i>S. salar</i>)	fish meal and mixture of free amino acids (<40%)	double weight gain	Espe and Lied (1994)
Rainbow trout (<i>O. mykiss</i>)	54% mixture of free amino acids	no effect	Rodehutsord <i>et al.</i> (1995)
Atlantic salmon (<i>S. salar</i>)	100% free amino acids	reduced weight gain	Espe and Njaa (1991)
Gilthead seabream (<i>S. aurata</i>)	50% and 100% squid protein hydrolysate	reduced growth	Kolkovski and Tandler (2000)
Seabass (<i>D. labrax</i>)	20% and 40% fish meal hydrolysate	increase final weight with 20% hydrolysate	Zambonino-Infante <i>et al.</i> (1997)
Seabass (<i>D. labrax</i>)	40% fish protein hydrolysate (CPSP-G)	double final weight	Cahu <i>et al.</i> (1998)
Seabass (<i>D. labrax</i>)	casein hydrolysate (partially hydrolysed)	survival improvement	Cahu and Zambonino-Infante (1995)
Dover sole (<i>S. solea</i>)	20-80% hydrolysed fish protein concentrate	no correlation between growth rates and levels of HFPC; positive correlation between survival and HFPC percentages	Day <i>et al.</i> (1997)



ภาพที่ 3 การเจริญเติบโตของปลากะพงยุโรปวัยอ่อนอายุ 14 วัน ที่ได้รับอาหารที่มีระดับ โปรตีน เท่ากัน แต่มีระดับไขมัน 10, 15, 20, 25 และ 30 เปอร์เซ็นต์ และอัตราการรอดตายที่อายุ 39 วัน (ภายในวงเล็บ) (Zambonino-Infante and Cahu, 1999)

2.4.2 รูปแบบของอาหารสำเร็จรูปขนาดเล็ก (Microdiet) ที่ใช้ในการอนุบาลลูกปลาวัยอ่อน

การกำหนดสูตรอาหารปลาที่มีคุณภาพดีต้องมีสัดส่วนของโปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต วิตามิน และแร่ธาตุครบถ้วนทั้งคุณภาพและปริมาณเพียงพอต่อความต้องการของปลา โดยเฉพาะอาหารลูกปลาวัยอ่อนจะต้องมีความพิเศษ คือ ต้องมีขนาดเล็กมาก เพื่อให้เหมาะสมต่อขนาดปากของลูกปลาวัยอ่อนที่มีขนาดเล็ก โดยอาหารควรมีขนาด 40-700 ไมโครเมตร (Hardy and Barrows, 2002) เช่น การอนุบาลลูกปลากะพงยุโรประยะแรก อายุ 14-25 วัน และ 40 วัน ด้วยอาหารเม็ดขนาด 50-125 ไมโครเมตร, 125-200 ไมโครเมตร และ 400 ไมโครเมตร ตามลำดับ (Cahu and Zambonino-Infante, 1994) สำหรับปลาที่กินอาหารแบบกรองกินควรมีขนาดของอาหารเล็กกว่า คือ 5-150 ไมโครเมตร (Hardy and Barrows, 2002) ซึ่งอาหารลูกปลาวัยอ่อนจะมีคุณค่าทางโภชนาการสูงมาก และมีราคาค่อนข้างแพงเพราะต้องใช้กรรมวิธีและเทคโนโลยีสูงในการผลิตให้ได้อาหารอนุภาคขนาดเล็ก และอาหารบางชนิดต้องเคลือบผิวด้วยเยื่อบาง เพื่อป้องกันการละลายน้ำของสารอาหารในเม็ดอาหารเพราะอาหารมีขนาดเล็ก จึงมีพื้นที่ผิวในการสัมผัสกับน้ำมากจึงทำให้เม็ดอาหารละลายน้ำได้เร็ว ในการผลิตอาหารสำหรับลูก

ปลาไว้อ่อนมีจุดมุ่งหมายเพื่อให้ลูกปลาสามารถนำสารอาหารในเม็ดอาหารไปใช้ในการเจริญเติบโตได้เต็มที่ มีการสูญเสียสารอาหาร (Leaching) ในน้ำน้อยที่สุด

อาหารสำเร็จรูปขนาดเล็กที่มีการผลิตสำหรับการอนุบาลลูกปลาไว้อ่อนมีทั้งหมด 3 รูปแบบ (Person-Le Ruyet, 1989) แต่ละชนิดมีข้อดีข้อเสียแตกต่างกันดังนี้

1) อาหารแผ่น (Flakes and expanded diets)

อาหารแผ่นสำหรับลูกปลาไว้อ่อนจะต้องมีคุณค่าทางโภชนาการครบถ้วน มีความน่ากิน ลอยน้ำหรือจมน้ำช้า และไม่ละลายน้ำเร็ว ในขั้นตอนการทำอาหาร วัตถุดิบและส่วนประกอบของอาหารจะต้องบดให้มีอนุภาคขนาดเล็กในเครื่องบดอาหารและนำมาผสมกับน้ำจนเป็นเนื้อเดียวกัน หลังจากนั้นอาหารผสมนี้จะถูกฉีดด้วยแรงดันไปบนเครื่อง Spray dry ซึ่งมีจานทรงกลม (Rotative drum) ความร้อนสูง (130-190 องศาเซลเซียส) เป็นอุปกรณ์ที่ทำให้อาหารแห้งและเป็นแผ่นบาง (Person-Le Ruyet, 1989) อาหารที่ติดอยู่บริเวณ Drum จะถูกเก็บออกอย่างต่อเนื่อง อาหารที่ได้จะมีลักษณะเป็นแผ่น แห้ง ขนาดเล็ก การนำไปใช้ต้องมีการบดอาหารให้เป็นอนุภาคขนาดเล็กตามความต้องการ ในการทำอาหารแผ่นส่วนประกอบที่สำคัญจะต้องมีส่วนประกอบของ Hydrocolloid ซึ่งทำให้อาหารมีลักษณะยึดหยุ่นมากยิ่งขึ้น Hydrocolloid ที่ใช้ได้แก่ Chitin ซึ่งเป็นส่วนประกอบของเปลือกกุ้ง และมีการผสมสารสี เช่น Astaxanthin และ Canthaxanthin ในอาหารเพื่อเร่งสีชมพู-แดงในปลา และ Xanthophyll เพื่อเร่งสีเหลือง-ส้มในปลาสวยงาม (Lovell, 1998)

2) อาหารเม็ดจิ๋วที่มีสารเชื่อมประสาน (Microbound diets)

อาหารที่มีสารเชื่อมประสานจะมีความคงตัวในน้ำนาน ซึ่งการทำอาหารจะมีการใส่สารเชื่อมประสาน (Binder) เพื่อช่วยให้อาหารเกาะตัวกันแน่นขึ้น มีความคงตัวในน้ำได้ดีขึ้น ลดการสูญเสียสารอาหารได้ช้าลง ซึ่งส่งผลต่อการยอมรับอาหารและความสามารถในการย่อยอาหารของลูกปลา (Person- Le Ruyet *et al.*, 1993; Partridge and Southgate, 1999) ส่วนใหญ่สารเชื่อมประสานจะเป็นสารประเภทโปรตีน หรือแป้งที่เป็นส่วนประกอบของอาหารสำเร็จรูป หรือสารที่มีคุณสมบัติเฉพาะใช้เป็นสารเชื่อมประสานเพียงอย่างเดียว เช่น ซีน (Zein) อัลจิเนท (Alginate) วุ้น (Agar) และเจลาติน (Gelatin) (ตารางที่ 3) โดยปลาแต่ละชนิดมีความสามารถในการใช้สารเชื่อมประสานแต่ละชนิดได้แตกต่างกัน เช่น Tashima และคณะ (1982; อ้างโดย Langdon, 2003) รายงานว่าปลา Ayu (*Plecoglossus altivelis*) สามารถใช้อาหารที่มีคาร์ราจีแนนเป็นสารเชื่อมประสาน (Carrageenan-bound particles) ได้ แต่สำหรับปลา Red seabream

(*Chrysophrase major*) สามารถใช้อาหารที่มีซินเป็นสารเชื่อมประสาน (Zein-bound diets) ได้ดี และจากการศึกษาของ Partridge และ Southgate (1999) ในปลากระพงขาว (*L. calcarifer*) ว่ายอ่อน พบว่าลูกปลามีประสิทธิภาพการย่อยและดูดซึมสารอาหารได้สูงเมื่อใช้เจลาตินและคาราจีแนนเป็นสารเชื่อมประสานในอาหาร 2-3 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งของอาหาร แต่คาราจีแนนไม่เหมาะสมในการเป็นสารเชื่อมประสานในอาหารอนุบาลลูกปลา White sturgeon (*Acipenser transmontanus*) และปลา Walleye (*Stizostedion vitreum*) เนื่องจากมีประสิทธิภาพการย่อยและการยอมรับอาหารได้ต่ำ (Gawlicka *et al.*, 1996; Guthrie *et al.*, 2000)

นอกจากการใช้สารเชื่อมประสานเพิ่มความคงตัวของอาหารในน้ำแล้ว การอัดเม็ดอาหารด้วยวิธีที่ใช้ไอน้ำ และวิธีเอ็กซ์ทรูชัน (Extrusion) ยังสามารถช่วยปรับปรุงการคงตัวของอาหารในน้ำให้ดีขึ้น ลดการใช้สารเชื่อมประสาน ปัจจุบันการอัดเม็ดส่วนใหญ่ใช้วิธีใช้ไอน้ำ เนื่องจากการใช้วิธีเอ็กซ์ทรูชัน ทำให้ต้นทุนการผลิตเพิ่มขึ้น ดังนั้นสารเชื่อมประสานจึงมีความสำคัญในการทำให้อาหารคงตัวในน้ำ แต่การจับตัวกันของอาหารไม่ได้ขึ้นอยู่กับสารเชื่อมประสานเพียงอย่างเดียว ยังขึ้นอยู่กับสถานะต่างๆ ในกระบวนการผลิต คือ เครื่องอัดเม็ดแบบใช้ไอน้ำ จะใช้ความร้อนสูงสำหรับการให้ความชื้นแก่อาหาร ทำให้แป้งในอาหารเกิดเป็นเจล (Gelatinization) เคลือบอาหารไว้ภายใน ขนาดของอนุภาควัตถุดิบ อุณหภูมิและระยะเวลาในการอัดเม็ด ขนาดของรูบนหน้าแวน และความหนาของหน้าแวนมีอิทธิพลต่อความคงตัวของเม็ดอาหารทั้งสิ้น (Lovell, 1998)

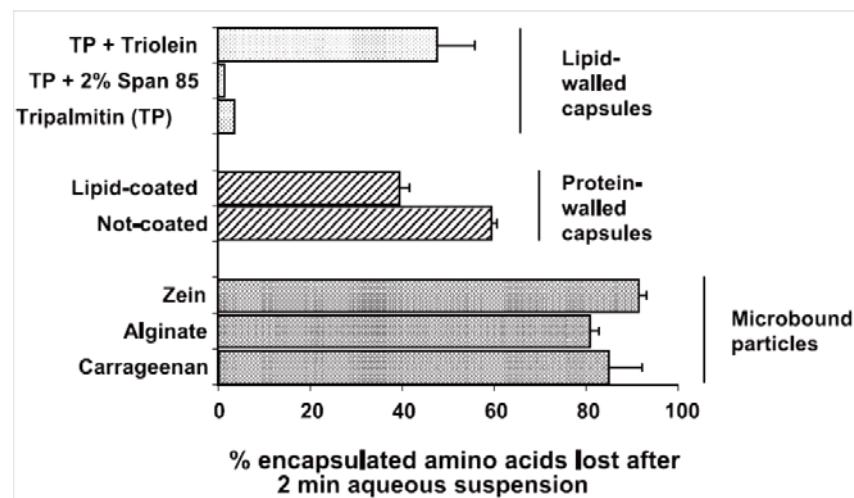
ข้อดีในการใช้อาหารที่มีสารเชื่อมประสาน คือ ใช้ง่าย ต้นทุนการผลิตต่ำจึงสามารถผลิตเป็นอุตสาหกรรมได้ และไม่มีส่วนประกอบของสารที่เป็นพิษ อาหารลูกปลาวัยอ่อนส่วนใหญ่ที่มีจำหน่ายในตลาดจะเป็นอาหารชนิดนี้ และสามารถนำอาหารนี้ไปใช้ในการอนุบาลลูกปลาวัยอ่อนเพื่อลดการใช้อาหารมีชีวิต เช่น จากการศึกษาศึกษาของ Holt (1993) พบว่าสามารถใช้อาหารสำเร็จรูปขนาดเล็กอนุบาลลูกปลา Red drum ได้ตั้งแต่อายุ 5 วัน และมีอัตราการรอดตายสูงถึง 60 เปอร์เซ็นต์ และการศึกษาของ Baskerville-Bridges และ Kling (2000a) พบว่าสามารถใช้อาหารสำเร็จรูปอนุบาลลูกปลา Atlantic cod (*Gadus morhua*) ได้ตั้งแต่อายุ 8 วัน และมีอัตราการรอดตาย 35 เปอร์เซ็นต์

แต่การใช้อาหารที่มีสารเชื่อมประสานนี้ยังพบปัญหาเกี่ยวกับการสูญเสียกรดอะมิโน สารอาหารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ และสารอาหารที่ละลายในน้ำได้อย่างรวดเร็ว โดยพบว่าการใช้อัลจิเนท ซิน และคาราจีแนนเป็นสารเชื่อมประสานในอาหาร จะสูญเสียกรดอะมิโน 81, 85 และ 91 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ภายหลังให้อาหารเพียง 2 นาที (Lopez-Alvarado *et al.*, 1994) (ภาพที่ 4) และการใช้คาราจีแนน และเจลาตินเป็นสารเชื่อมประสานในอาหาร และใช้ซินเคลือบอาหาร

พบการสูญเสียกรดอะมิโนอิสระ 81 เปอร์เซ็นต์ ภายหลังจากให้อาหารเพียง 1 นาที (Baskerville-Bridges and Kling, 2000b)

ตารางที่ 3 สารเชื่อมประสานที่ใช้ในการผลิตอาหารอนุภาคขนาดเล็กสำหรับลูกปลาวัยอ่อน (Langdon, 2003)

Binder type	Species	Reference
Alginate	Seabass <i>Dicentrachus labrax</i>	Person Le Ruyet <i>et al.</i> (1993)
	Barramundi <i>Lates calcarifer</i>	Partridge and Southgate (1999)
	Walleye <i>Stizostedion vitreum</i>	Guthrie <i>et al.</i> (2000)
	Zebrafish <i>Brachydanio rerio</i>	Önal and Langdon (2000)
Agar	Barramundi <i>Lates calcarifer</i>	Partridge and Southgate (1999)
Carrageenan	Ayu <i>Plecoglossus altivelis</i>	Kanazawa <i>et al.</i> (1982)
	White sturgeon <i>Acipenser transmontanus</i>	Gawlicka <i>et al.</i> (1996)
	Barramundi <i>Lates calcarifer</i>	Partridge and Southgate (1999)
	Atlantic cod <i>Gadus morhua</i>	Baskerville-Bridges and Kling (2000a,b)
Walleye <i>Stizostedion vitreum</i>		Guthrie <i>et al.</i> (2000)
Fish meal	Seabass <i>Dicentrachus labrax</i>	Cahu <i>et al.</i> (1999)
Gelatin	Plaice <i>Pleuronectes platessa</i>	Adron <i>et al.</i> (1974)
	Dover sole <i>Solea solea</i>	Appelbaum (1985)
	Gilthead seabream <i>Sparus aurata</i>	Kolkovski and Tandler (2000)
	Barramundi <i>Lates calcarifer</i>	Partridge and Southgate (1999)
Zein	Red seabream <i>Pagrus major</i> and Japanese Flounder <i>Paralichthys olivaceus</i>	Teshima <i>et al.</i> (1982)
	Ayu <i>Plecoglossus altivelis</i>	Kanazawa <i>et al.</i> (1982)
	Seabass <i>Dicentrachus labrax</i>	Person Le Ruyet <i>et al.</i> (1993)
	Barramundi <i>Lates calcarifer</i>	Partridge and Southgate (1999)
	Walleye <i>Stizostedion vitreum</i>	Guthrie <i>et al.</i> (2000)



ภาพที่ 4 การสูญเสียกรดอะมิโนของอาหารขนาดอนุภาคแต่ละชนิด ภายหลังจากลอยตัวในน้ำ 2 นาที

3) อาหารเคลือบเม็ดจิ๋ว (Microcoated or Microencapsulated diets)

อาหารเคลือบเม็ดจิ๋วจะเคลือบผิวด้านนอกของอนุภาคเม็ดอาหารเป็นชั้นบาง เพื่อลดการละลายน้ำและลดการสูญเสียสารอาหารในน้ำ สารที่นำมาใช้ในการเคลือบผิวด้านนอกอาจเป็นไนลอนโปรตีน (N-N bonds) โปรตีนที่มีโครงสร้างเชื่อมต่อกัน (Cross-linked proteins) แคลเซียมอัลจิเนต (Calcium alginate) และไขมัน (Lipid wall) โดยคุณสมบัติส่วนใหญ่ของสารเคลือบผิวจะไม่มีความเป็นพิษ ไม่ละลายน้ำ และถูกปลาย่อยอ่อนสามารถย่อยได้ (Lovell, 1998) ซึ่งส่วนประกอบของสารอาหารที่อยู่ภายในจะอยู่ในรูปของสารละลาย สารแขวนลอย หรือคอลลอยด์ที่กักไว้ภายใน

การทำอาหารเคลือบเม็ดจิ๋วจะเตรียมสารที่ใช้เคลือบอาหารด้วยวิธีการ Cross-linking agent (Yufera *et al.*, 1999) อาศัยการเกิดกระบวนการเปลี่ยนแปลงของสารสองรูปแบบร่วมกันเป็นสารโพลีเมอร์ (Interfacial-polymerization) ที่มีโครงสร้างเชื่อมต่อกัน ซึ่งสารที่ใช้เคลือบแต่ละชนิดมีคุณสมบัติในการนำพาสารอาหารแตกต่างกัน เช่น สารเคลือบที่เป็นไขมัน (Lipid wall) จะใช้ในการนำพาสารอาหารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ที่ละลายน้ำได้ดีกว่าการใช้สารเชื่อมประสาน หรือโปรตีนที่มีโครงสร้างเชื่อมต่อกัน จากการศึกษาของ Nordgreen และคณะ (2008) พบว่าการใช้สารเคลือบที่เป็นโปรตีนที่มีโครงสร้างเชื่อมต่อกัน ในขั้นตอนการผลิตอาหารเกิดการสูญเสียของสารอาหารที่ละลายน้ำได้เกือบจะ 100 เปอร์เซ็นต์ ทั้งที่เป็นสารอาหารปริมาณมาก (Macronutrients) และวิตามิน แต่วิตามินที่ละลายในไขมันไม่พบการสูญเสีย ดังนั้นสารเคลือบที่เป็นไขมันจะมีประสิทธิภาพในการป้องกันการสูญเสียสารอาหารได้สูงกว่า

ลูกปลาแต่ละชนิดมีความสามารถในการย่อยอาหารที่มีสารเคลือบได้แตกต่างกัน Walford และคณะ (1991) รายงานว่าลูกปลากะพงขาว (*L. calcarifer*) วัยอ่อนสามารถย่อยอาหารที่มีสารเคลือบได้เมื่อให้ร่วมกับอาหารธรรมชาติที่มีชีวิต แต่ในปลา Striped bass วัยอ่อนอายุ 13 วัน ย่อยอาหารที่มีสารเคลือบเป็นเคซีนได้ช้า ลูกปลา Zebra (*Brachydanio rerio*) สามารถย่อยอาหารที่มีสารเคลือบเป็นโปรตีนที่มีโครงสร้างเชื่อมต่อกันได้ (Onal and Langdon, 2000)

2.5 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ศึกษาการพัฒนาทางเนื้อเยื่อวิทยาของระบบย่อยอาหารในปลากะพงขาววัยอ่อนอายุแรกฟักจนถึง 30 วัน หลังฟักออกเป็นตัว เพื่อทราบอายุของลูกปลากะพงขาวที่มีระบบย่อยอาหารสมบูรณ์
2. ศึกษาชนิดของสารเชื่อมประสานที่เหมาะสมสำหรับผลิตอาหารขนาดเล็ก เพื่ออนุบาลปลากะพงขาว
3. ศึกษาระดับของโปรตีนไฮโดรไลสจากปลาทุแวกที่เหมาะสมต่อการเป็นแหล่งโปรตีนในอาหารสำหรับปลากะพงขาว ที่สามารถนำมาใช้ทดแทนอาหารธรรมชาติที่มีชีวิตได้

บทที่ 3

การทดลองที่ 1 การศึกษาพัฒนาการทางเนื้อเยื่อวิทยาของระบบย่อยอาหารในปลา กะพงขาววัยอ่อนอายุแรกฟักออกเป็นตัว จนถึงอายุ 30 วัน

3.1 บทคัดย่อ

ศึกษาพัฒนาการทางเนื้อเยื่อวิทยาของระบบย่อยอาหารและการเจริญเติบโตในปลากระพงขาววัยอ่อนตั้งแต่อายุแรกฟักออกจากไข่จนถึงอายุ 30 วัน หลังฟักออกเป็นตัว (Days post hatch, DPH) โดยสุ่มเก็บตัวอย่างทุกวันก่อนให้อาหารตั้งแต่อายุแรกฟัก-7 วัน และทุก 2 และ 3 วัน สำหรับลูกปลา อายุ 8-21 วัน และ 22-30 วัน ตามลำดับ จากการชั่งน้ำหนักและวัดความยาวของลูกปลาเพื่อศึกษาการเจริญเติบโต พบว่าลูกปลาอายุแรกฟักออกเป็นตัว มีความยาวเฉลี่ยเท่ากับ 1.83 ± 0.29 มิลลิเมตร และเพิ่มขึ้นช้าๆ ในช่วง 13 วัน ($P > 0.05$) แต่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงอายุ 15-30 วัน ($P < 0.05$) จึงสามารถแบ่งช่วงการเจริญเติบโตของลูกปลากระพงขาววัยอ่อนได้เป็น 2 ช่วง คือ ช่วงอายุแรกฟักออกเป็นตัว-13 วัน และ 15-30 วัน จากการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา พบว่าลูกปลาอายุแรกฟักออกเป็นตัวมีถุงสะสมอาหารขนาดใหญ่อยู่บริเวณส่วนหน้าติดกับส่วนหัว ภายในข้อมติดสีแดงของอีโอซิน (Eosin) ในระยะนี้ปากลูกปลายังไม่เปิดจึงอาศัยอาหารภายในถุงสะสมอาหาร จนกระทั่งลูกปลามีอายุ 2 วัน ปากและทวารเริ่มเปิดจึงสามารถกินอาหารจากภายนอกได้ ช่องปากและคอหอยมีการพัฒนาขึ้นมีเยื่อผิวแบบแบนบางเรียงตัวชั้นเดียว ทางเดินอาหารยังคงเป็นแบบท่อตรง ไม่สามารถแยกกระเพาะอาหารและลำไส้ออกจากกันได้ชัดเจน มีเซลล์บุผิวแบบทรงกระบอกเรียงตัวชั้นเดียว และพบเซลล์ตับ (Hepatocyte cell) อยู่บริเวณใต้ถุงสะสมอาหารตั้งแต่วัยลูกปลาอายุ 1 วัน เมื่อลูกปลาอายุ 3 วัน เริ่มกินโรติเฟอร์เป็นอาหาร ระบบทางเดินอาหารเริ่มพัฒนามากขึ้น โดยพบเยื่อผิวบริเวณหลอดอาหารมีการยกตัวขึ้น มีเยื่อผิวแบบแบนบางเรียงตัวหลายชั้น และพบ Goblet cell เล็กน้อย เมื่อลูกปลาอายุ 4 วัน เห็นกระเพาะอาหารเป็นรูปตัวเจ มีเซลล์บุผิวแบบทรงกระบอกเรียงตัวชั้นเดียว และลำไส้มีเซลล์เยื่อผิวเป็นแบบทรงกระบอกเรียงตัวชั้นเดียว ที่มี Goblet cell แทรกอยู่ระหว่างเซลล์บุผิว พบเซลล์ตับอ่อน (Pancreas) อยู่รวมกันเป็นกลุ่มแทรกอยู่ระหว่างเซลล์ตับ เมื่อถุงสะสมอาหารยุบลงในวันที่ 5 พบถุงลมพัฒนาขึ้นมาแทน พบฟัน และตุ่มรับรสในวันที่ 6 และ 11 หลังฟักออกเป็นตัว จากนั้นอวัยวะในระบบย่อยอาหารมีการเพิ่มขนาด และปริมาณเซลล์มากขึ้นตามการเจริญเติบโตของลูกปลา โดยเมื่อลูกปลาอายุ 17 วัน สามารถแบ่งชั้นต่างๆ ของทางเดินอาหารได้เป็นชั้นมิวโคซา ชั้นมิวโคซา และมัสคิวลาริส และพบ

ต่อมแกสตริก บริเวณกระเพาะอาหารตอนต้น ซึ่งเป็นลักษณะบ่งชี้ถึงการเจริญเป็นปลาระยะวัยรุ่น (Juvenile) ที่มีลักษณะเหมือนปลาตัวเต็มวัย ผลการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าระบบย่อยอาหารของปลากะพงขาวเจริญสมบูรณ์เมื่ออายุ 17 วัน จึงสามารถนำไปใช้ในการจัดการด้านการใช้อาหารสำเร็จรูปเพื่ออนุบาลลูกปลากะพงขาวให้มีอัตราการตายลดลง และมีการเจริญเติบโตดีที่สุด

3.2 บทนำ

การเพาะเลี้ยงปลาทะเลเพื่อให้ได้ผลผลิตดี และมีคุณภาพตรงตามความต้องการของผู้บริโภคจะต้องคำนึงถึงปัจจัยสำคัญหลายด้าน เช่น แหล่งพันธุ์ปลา สถานที่เลี้ยง การคมนาคมและสาธารณูปโภค สภาพอากาศ และการให้อาหาร เป็นต้น นอกจากนี้ปัจจัยดังกล่าว สุขภาพและความสมบูรณ์ของลูกพันธุ์ปลายังเป็นปัจจัยที่สำคัญประการหนึ่งที่สามารถทำให้ประสบความสำเร็จหรือล้มเหลวได้ (Hamlin *et al.*, 2000) เนื่องจากการเพาะเลี้ยงปลาจะต้องอนุบาลลูกปลาวัยอ่อนเป็นจำนวนมากตั้งแต่ลูกปลาวัยอ่อนถึงปลาวัยรุ่น ซึ่งระหว่างการเจริญเติบโตจะต้องผ่านภาวะวิกฤติที่ส่งผลให้ลูกปลาที่มีอัตราการตายสูง คือ การเปลี่ยนอาหารซึ่งหากลูกปลาไม่สามารถกินอาหารได้ในระยะนี้ ลูกปลาจะอยู่ในสภาวะอดอาหารและตายได้ นอกจากนี้ถ้าลูกปลาสามารถกินอาหารได้แต่ไม่สามารถนำสารอาหารไปใช้ประโยชน์ได้ ก็อาจจะทำให้ลูกปลาวัยอ่อนอยู่ในสภาวะที่มีอัตราการตายสูงได้เช่นเดียวกัน ดังนั้นความรู้และความเข้าใจด้านความสมบูรณ์ของโครงสร้างและการทำงานของอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับระบบย่อยอาหารจึงมีความสำคัญในการพัฒนารูปแบบ และวิธีการเพาะเลี้ยงปลาให้มีประสิทธิภาพสูงสุด

การศึกษาที่เกี่ยวข้องกับพัฒนาการของระบบย่อยอาหารในลูกปลาวัยอ่อนจนถึงระยะปลาวัยรุ่นมีทั้งในปลาน้ำจืดและปลาทะเล จากการศึกษาของ Dabrowski และ Culver (1991) สามารถแบ่งลูกปลาตามลักษณะรูปร่างของทางเดินอาหารและน้ำย่อยที่หลังเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ลูกปลาที่มีกระเพาะอาหารตั้งแต่เกิด เช่น ปลาแซลมอน กลุ่มที่ 2 ลูกปลาที่ในระยะวัยอ่อนยังไม่มีการพัฒนาของกระเพาะอาหาร หรือ ต่อมแกสตริก แต่จะทำงานได้เมื่อมีการพัฒนาของอวัยวะในการย่อยอาหารสมบูรณ์ เช่น ลูกปลาทะเลชนิดต่างๆ และกลุ่มที่ 3 ลูกปลาที่ไม่มีกระเพาะอาหารตลอดชีวิต แต่มีทางเดินอาหารที่มีโครงสร้างและทำหน้าที่ชัดเจน การอนุบาลปลาทะเลวัยอ่อนส่วนใหญ่จึงต้องอนุบาลด้วยอาหารธรรมชาติที่มีชีวิตจำพวกอาร์ทีเมีย ไรแดง และปลาสด ซึ่งจะช่วยให้ปลาที่มีอัตราการรอดตายสูงขึ้นเนื่องจากลูกปลาวัยอ่อนสามารถกินและอาศัยเอนไซม์ย่อยที่มีอยู่ในอาหารมีชีวิตช่วยในกระบวนการย่อยอาหารในทางเดินอาหารได้ดี (Dabrowski, 1979) แต่ขั้นตอนการผลิตอาหารอนุบาลดังกล่าวมีข้อจำกัดและปัจจัยเสี่ยงหลายประการ จึงมีการศึกษา

การอนุบาลลูกปลาภายหลังจากทางเดินอาหารพัฒนาเต็มที่ ประมาณ 1-2 สัปดาห์ เพื่อลดอัตราการตายของลูกปลาและลดต้นทุนการผลิตอาหารที่มีชีวิตดังกล่าว (Galaviz *et al.*, 2011) และได้มีการศึกษาการพัฒนาการของทางเดินอาหารในลูกปลาทะเลวัยอ่อนอีกหลายชนิด เช่น ปลา Gilthead seabream (Sarasquete *et al.*, 1995) ปลา California halibut (Alvarez-Gonzalez *et al.*, 2006; Gisbert *et al.*, 2004) ปลา Yellow croaker (Ma *et al.*, 2005; Mai *et al.*, 2005) และปลา Spotted sand bass (Alvarez-Gonzalez *et al.*, 2008; Pena *et al.*, 2003) ดังนั้นการศึกษาเกี่ยวกับระบบย่อยอาหารเพื่อทราบถึงความพร้อมในการทำงานทั้งทางโครงสร้างและหน้าที่จะช่วยให้การเพาะเลี้ยงลูกปลาทะเลประสบความสำเร็จดียิ่งขึ้น

3.3 วัตถุประสงค์

ศึกษาการพัฒนาทางเนื้อเยื่อวิทยาของระบบย่อยอาหารในปลากะพงขาววัยอ่อน เพื่อทราบอายุของลูกปลากะพงขาวที่มีระบบย่อยอาหารสมบูรณ์ และนำความรู้ไปใช้ในการพัฒนาอาหารและการให้อาหารในการอนุบาลลูกปลากะพงขาววัยอ่อน

3.4 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการศึกษา

3.4.1 ลูกปลากะพงขาว

ตัวอย่างปลากะพงขาววัยอ่อนแรกฟักออกเป็นตัวถึงอายุ 30 วัน ได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง ถนนแก้วแสน ตำบลเขารูปช้าง อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา

3.4.2 ระบบการเลี้ยงและให้อาหารปลากะพงขาววัยอ่อน

การอนุบาลลูกปลาดำเนินการตามระบบการเลี้ยงของสถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง คือ การอนุบาลลูกปลาในระยะดูไข่แดงยังไม่ยุบตัว (อายุ 1-2 วัน DPH) ปากยังไม่เปิด และไม่ต้องการอาหารจากภายนอก ระยะนี้จะใช้น้ำเค็มประมาณ 28-30 ส่วนต่อพันส่วน เมื่อลูกปลาอายุ 2-9 วัน จะเริ่มให้โรติเฟอร์น้ำกร่อยเป็นอาหาร จนกระทั่งลูกปลาอายุ 10 วัน จะเริ่มปรับการให้อาหารจากโรติเฟอร์น้ำกร่อยเป็นอาร์ทีเมียตัวเล็ก (Eagle, Switzerland) โดยการปรับลดปริมาณลง 50 เปอร์เซ็นต์ ใช้เวลาประมาณ 3 วัน ลูกปลาจึงสามารถกินอาร์ทีเมียตัวเล็กเป็นอาหารได้ทั้งหมด เมื่อลูกปลาอายุ 15 วัน จึงเริ่มมีการคัดขนาดลูกปลาเพื่อลดการกินกันเอง และเริ่ม

ปรับเปลี่ยนอาหารจากอาร์ทีเมียตัวเล็กเป็นตัวโต ในระยะนี้จะปรับเปลี่ยนความเค็มของน้ำที่ใช้เลี้ยงลงทุกวันจนถึงระดับความเค็ม 15 ส่วนต่อพันส่วน และมีการเปลี่ยนถ่ายน้ำทุกวันๆ ละ 50-70 เปอร์เซ็นต์ เมื่อลูกปลา มีอายุประมาณ 30 วัน จึงฝึกให้กินเนื้อปลาเหยื่อเป็นอาหาร

3.4.3 การเก็บตัวอย่างปลากะพงขาว

1) การศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา

สุ่มเก็บตัวอย่างลูกปลากะพงขาวก่อนการให้อาหารจากบ่ออนุบาลของสถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง ตั้งแต่แรกฟักออกเป็นตัวจนกระทั่งถึงอายุ 30 วัน โดยสุ่มเก็บตัวอย่างทุกวันก่อนให้อาหารตั้งแต่อายุแรกฟัก-7 วัน ทุก 2 และ 3 วัน สำหรับลูกปลา อายุ 8-21 วัน และ 22-30 วัน ตามลำดับ จำนวน 40 ตัวต่อครั้ง (ตารางภาคผนวกที่ ง.1) โดยสลบลูกปลาทั้งตัวด้วยน้ำแข็งอุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-10 นาที จากนั้นจึงนำตัวอย่างปลาทั้งตัวใส่ในขวดที่มีน้ำยาแดง Bouin's fluid (Bio-optica, Milano Italy) ในอัตราส่วน ตัวอย่าง:น้ำยาแดง เท่ากับ 1:50 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบตามเวลาที่กำหนดแล้วจึงเปลี่ยนน้ำยาแดงเป็นแอลกอฮอล์ 50 และ 70 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยต้องเปลี่ยนน้ำยาใหม่ทุกๆ 24 ชั่วโมง จนกระทั่งไม่มีสีของ Bouin's fluid เพราะจะทำให้การย้อมสีเนื้อเยื่อไม่คงทน จากนั้นจึงนำไปสู่ขั้นตอนการดึงน้ำออกจากเซลล์ (Dehydration) ด้วยเครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติ (Automatic tissue processor) ของ Technicon Corporation รุ่น Autotechnicon Mono MOD.2A โดยนำตัวอย่างผ่านไอโซโพรพิลแอลกอฮอล์ (Isopropyl alcohol) และไซลีน (Xylene) และการฝังตัวอย่าง (Embedded) ในพาราฟิน (Paraffin) ด้วยเครื่องเอ็มเบดดิ้ง (Embedding center) นำเนื้อเยื่อไปตัดด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อไมโครโทม (Sliding microtome ยี่ห้อ Jung AG Heidelberg) ให้มีความหนา 3-5 ไมโครเมตร ติดลงบนสไลด์ จากนั้นจึงนำไปย้อมด้วยสีฮีมาทอกไซลีน (Hematoxylin) และอีโอซิน (Humason, 1979) (ภาคผนวก ก) หลังจากนั้นนำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ และบันทึกภาพ โดยศึกษาอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับระบบย่อยอาหาร ได้แก่ ช่องปากและคอหอย หลอดอาหาร กระเพาะอาหาร ลำไส้ ตับ และตับอ่อน

2) การศึกษาการเจริญเติบโต

เก็บตัวอย่างลูกปลากะพงขาวเช่นเดียวกับข้อ 3.4.3.1 จำนวน 30 ตัวต่อครั้งเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างอายุและขนาดลำตัวปลา โดยวัดความยาวลำตัว (Total length, มม.) ด้วยเครื่องเวอร์เนีย (Vernier caliper) และน้ำหนักตัว (Body wet weight, มก.) ด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Satorius รุ่น Research) ของปลาทุกตัวในแต่ละเวลาของการเก็บตัวอย่าง

นำมาหาค่าเฉลี่ยและทดสอบหาความสัมพันธ์ระหว่างอายุกับความยาวลำตัวเฉลี่ยและน้ำหนักตัวเฉลี่ย และศึกษาความแตกต่างของการเจริญเติบโตของปลาในแต่ละช่วงอายุ โดยการนำไปวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล (Analysis of Variance) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย Tukey's HSD Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

3.5 ผลการศึกษา

3.5.1 การเจริญเติบโต

จากการศึกษาการเจริญเติบโตของลูกปลากะพงขาวระหว่างอายุ 0-30 วันหลังฟักออกเป็นตัว ซึ่งเลี้ยงในน้ำที่มีความเค็ม 15-30 พีพีที (ppt) อุณหภูมิ 27-29 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 4) พบว่าที่อายุแรกฟักออกเป็นตัว มีความยาวลำตัวเฉลี่ยเท่ากับ 1.83 ± 0.29 มิลลิเมตร และเพิ่มขึ้นช้าๆ ในช่วง 13 วัน ($P > 0.05$) แต่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงอายุ 15-30 วัน ($P < 0.05$) โดยมีความสัมพันธ์ระหว่างอายุและความยาวเฉลี่ยเป็นแบบเอ็กซ์โพเนนเชียล มีค่า $R^2 = 0.9656$

สำหรับน้ำหนักตัวเฉลี่ยของลูกปลาอายุ 3-13 วัน มีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้นช้าๆ ($P > 0.05$) และเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงอายุ 15-30 วัน ($P < 0.05$) โดยมีความสัมพันธ์ระหว่างอายุและน้ำหนักตัวเฉลี่ยแบบเอ็กซ์โพเนนเชียล มีค่า $R^2 = 0.974$ สามารถแบ่งช่วงการเจริญเติบโตของลูกปลากะพงขาววัยอ่อนได้เป็น 2 ช่วง คือ ช่วงอายุแรกฟักออกเป็นตัว-13 วัน และ 15-30 วัน (ภาพที่ 5)

ตารางที่ 4 ความยาวลำตัวเฉลี่ย และน้ำหนักตัวเฉลี่ยของลูกปลา การให้อาหาร และคุณภาพน้ำในระบบเลี้ยงลูกปลากะพงขาวอายุแรกฟัก-30 วัน หลังฟักออกเป็นตัว (DPH¹)

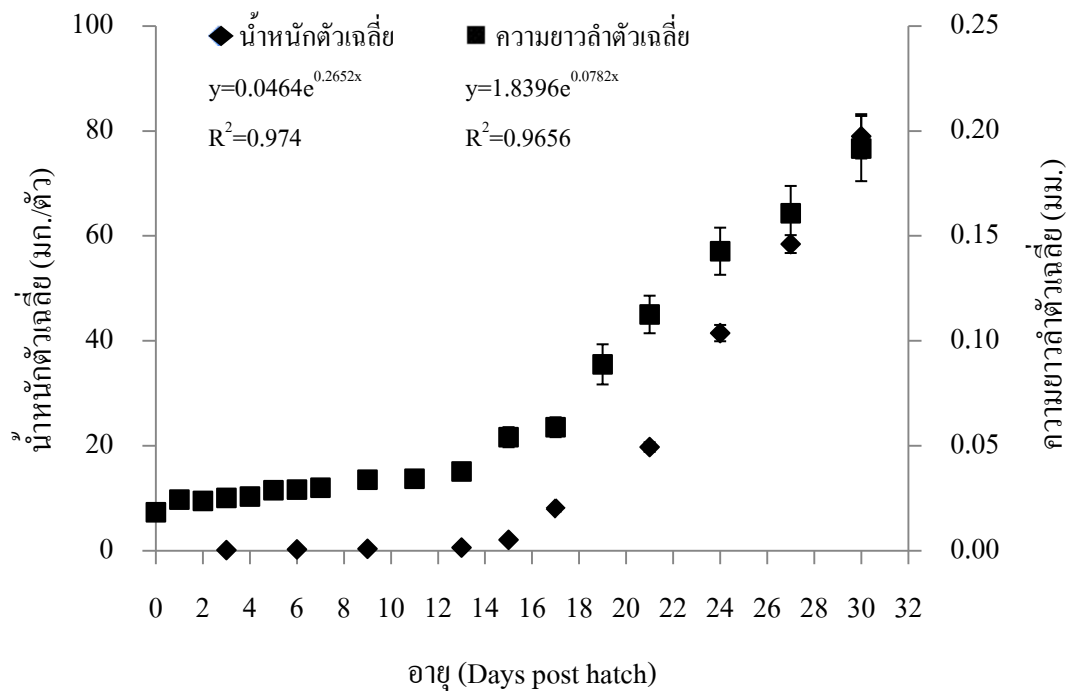
อายุของ ลูกปลา (DPH)	ความยาว เฉลี่ย (มม.ต่อตัว) ³	น้ำหนักเฉลี่ย (มก.ต่อตัว) ³	ชนิดของอาหาร		คุณภาพน้ำ	
			<i>Rotifer sp.</i>	<i>Artemia sp.</i> ⁴	ความเค็ม (ppt)	อุณหภูมิ (°C)
0	1.83±0.29 ^{k2}	-	-	-	30	27
1	2.44±0.08 ^{ij}	-	-	-	30	29
2	2.37±0.35 ^{jk}	-	-	-	30	29
3	2.52±0.12 ^{ij}	0.13±0.02 ^f	25%	-	25	28
4	2.58±0.08 ^{ij}	-	50%	-	25	28
5	2.88±0.12 ^{hij}	-	75%	-	25	28
6	2.91±0.10 ^{hij}	0.26±0.00 ^f	100%	-	25	27
7	3.00±0.12 ^{hi}	-	100%	-	25	28
9	3.39±0.11 ^{gh}	0.37±0.01 ^f	100%	-	25	28
11	3.43±0.23 ^{gh}	-	100%	-	15	28
13	3.78±0.26 ^g	0.60±0.05 ^f	75%	25%	15	28
15	5.41±0.48 ^f	2.08±0.11 ^f	50%	50%	15	28
17	5.89±0.47 ^f	8.02±0.54 ^c	25%	75%	15	27
19	8.88±0.96 ^c	-	-	100%	20	27
21	11.26±0.90 ^d	19.76±0.91 ^d	-	100%	20	27
24	14.27±1.12 ^c	41.48±1.55 ^c	-	100%	20	29
27	16.08±1.30 ^b	58.45±1.71 ^b	-	100%	20	29
30	19.16±1.55 ^a	78.99±4.23 ^a	-	100%	20	29

¹DPH = Days post hatch

²ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยค่าเฉลี่ยในสดมภ์เดียวกันที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$)

³จำนวนตัวอย่าง; ความยาวลำตัวเฉลี่ย = 30 ตัวต่อครั้ง; น้ำหนักตัวเฉลี่ย อายุ 3 และ 6 DPH = 250 ตัว, อายุ 9 DPH = 200 ตัว, อายุ 13 และ 15 DPH = 100 ตัว, อายุ 17, 21, 24, 27 และ 30 DPH = 10 ตัว

⁴อาร์ทีเมียน้ำเค็ม บริษัท Eagle Artemia Cysts (Switzerland)



ภาพที่ 5 การเจริญเติบโตของลูกปลากะพงขาวตั้งแต่แรกฟักออกเป็นตัว-30 วัน หลังฟักออกเป็นตัว

3.5.2 การพัฒนาทางเนื้อเยื่อวิทยาของระบบย่อยอาหาร

1) ลูกปลาอายุแรกฟักออกเป็นตัว จะอาศัยอาหารภายในถุงสะสมอาหาร โดยพบถุงสะสมอาหาร มีลักษณะเป็นรูปรีอยู่บริเวณส่วนหน้าติดกับส่วนหัว มีความยาวเป็นครึ่งหนึ่งของลำตัว ภายในล้อมติดสีแดงของอีโอซิน มีท่อทางเดินอาหารลักษณะเป็นท่อตรงบริเวณส่วนหลังของถุงสะสมอาหาร แต่ยังไม่พบอวัยวะภายในที่เกี่ยวข้องกับระบบย่อยอาหารอื่นๆ (ภาพที่ 6A)

2) ลูกปลาอายุ 1 วัน ถุงสะสมอาหารมีขนาดเล็กลงและปริมาณไข่แดงลดลงแต่ยังไม่หมด ระบายน้ำปากยังไม่เปิดลูกปลาจึงยังไม่กินอาหารจากภายนอก ช่องปากและคอหอยเริ่มเห็นชัดเจน มีเยื่อบุผิวเป็นแบบแบนบางเรียงตัวชั้นเดียว ท่อทางเดินอาหารมีลักษณะเริ่มโค้งงอ มีเยื่อบุผิวเป็นแบบทรงกระบอกเรียงตัวชั้นเดียว แต่ยังไม่สามารถแยกกระเพาะอาหารและลำไส้ออกจากกันได้ชัดเจน และเริ่มพบเซลล์ตับ และตับอ่อน อยู่บริเวณใต้ถุงสะสมอาหารค่อนข้างด้านหลังและทวารยังไม่เปิดออก (ภาพที่ 6B)



ภาพที่ 6 ลูกปลาอายุ 0 และ 1 วัน หลังฟักออกเป็นตัว

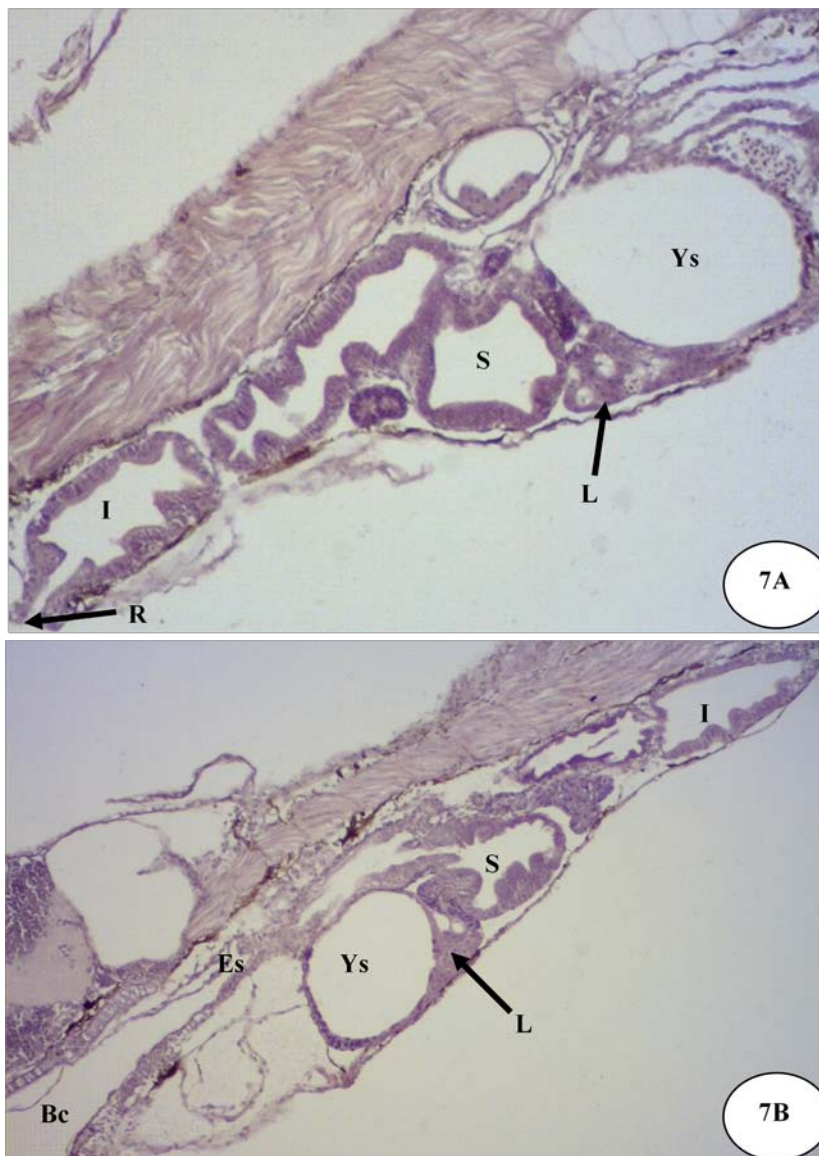
A = ลูกปลาอายุ 0 วัน หลังฟักออกเป็นตัว

B = ระบบย่อยอาหาร ลูกปลาอายุ 1 วัน หลังฟักออกเป็นตัว

Bc = Buccal cavity, GI = Gastro-Intestinal tract, L = Liver, Ys = Yolk sac (กำลังขยาย 40x)

3) ลูกปลาอายุ 2 วัน อุณหภูมิอาหารมีขนาดเล็กลงมากและปริมาณไข่แดงมีน้อยมากจนไม่พบติดสีช้อมอีไอซิน เยื่อบุผิวบริเวณปาก และทวาร (Anus) แยกออกจากกัน หลอดอาหาร (Esophagus) เริ่มพบเยื่อบุผิวมีการยกตัวขึ้น สามารถแยกกระเพาะและลำไส้ออกจากกันแต่ยังไม่ชัดเจน เยื่อบุผิวมีการยกตัวขึ้นเข้าสู่ช่องว่างทางเดินอาหารเล็กน้อย เริ่มเห็นเซลล์ตับมีรูปร่างหลายเหลี่ยม มีนิวเคลียสติดสีเข้มอยู่กลางเซลล์ (ภาพที่ 7A)

4) ลูกปลาอายุ 3 วัน อุณหภูมิอาหารมีขนาดเล็กลงแต่ยังไม่หมด ระยะนี้เริ่มให้โรติเฟอร์เป็นอาหารจึงพบก้อนอาหารบริเวณท่อทางเดินอาหาร หลอดอาหารเริ่มพบเยื่อบุผิวมีการยกตัวขึ้น มีเซลล์เยื่อบุผิวแบบแบนบางเรียงตัวหลายชั้น เพราะต้องสัมผัสกับอาหารจึงมีการหลุดลอกของเยื่อบุผิวจึงมีลักษณะหลายชั้นดังกล่าว และพบ Goblet cell ซึ่งเป็นเซลล์ผลิตเมือกแทรกอยู่ตามเซลล์เยื่อบุผิวของหลอดอาหารเล็กน้อย (ภาพที่ 7B)



ภาพที่ 7 ระบบย่อยอาหาร ลูกปลาอายุ 2 และ 3 วัน หลังฟักออกเป็นตัว

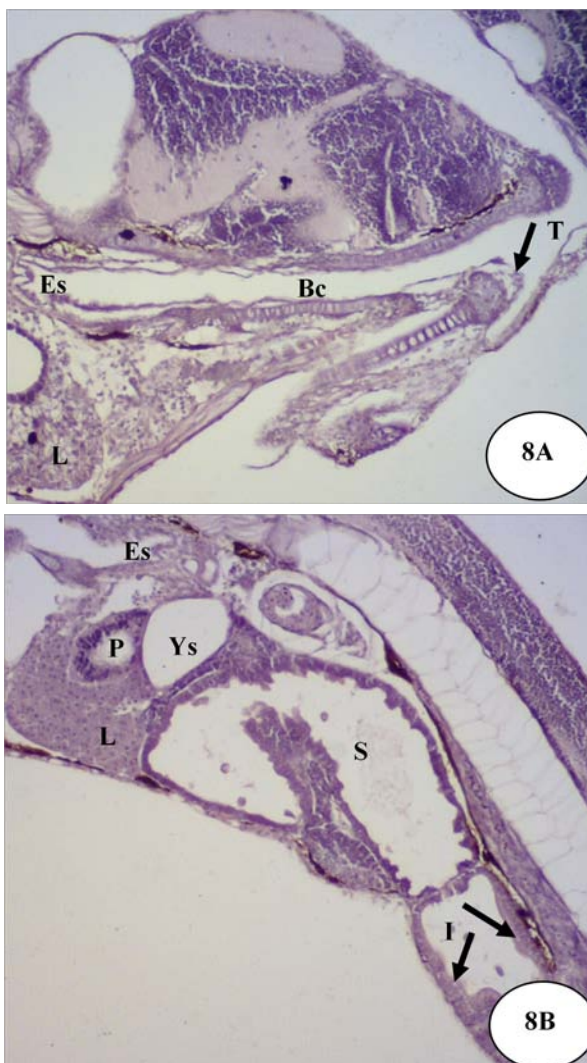
A = ลูกปลาอายุ 2 วัน หลังฟักออกเป็นตัว

B = ลูกปลาอายุ 3 วัน หลังฟักออกเป็นตัว

Bc = Buccal cavity, Es = Esophagus, I = Intestine, L = Liver, R = Rectum, S = Stomach, Ys = Yolk sac (กำลังขยาย 100x)

5) ลูกปลาอายุ 4 วัน กุณัสมอาหารยังขุบไม่หมด บริเวณช่องปากพบลินมีลักษณะเป็นแผ่น โดยมีแกนเป็นกระดูกอ่อน มีเซลล์เชื่อมุผิวแบบแบนบางเรียงตัวชั้นเดียว (ภาพที่ 8A) พบก้อนอาหารมากขึ้นแสดงว่าลูกปลาสามารถกินอาหารได้ดี สามารถเห็นกระเพาะอาหารโค้งงอเป็นรูปตัวเจ เชื่อมุผิวไม่มีการยกตัวขึ้นเนื่องจากภายในมีอาหารอยู่ภายใน และลำไส้เริ่มม้วนและเชื่อมุผิวยกตัวมากขึ้น โดยลำไส้มีเซลล์เชื่อมุผิวเป็นแบบทรงกระบอกเรียงตัวชั้นเดียว และเริ่ม

พบ Goblet cell บริเวณเยื่อผิวของลำไส้ และ Lipid vacuole ในชั้นมิวโคซา (ปลายลูกศร) พบลิ้น
 ก้นระหว่างกระเพาะอาหารกับลำไส้ พบเซลล์ตับอ่อน อยู่รวมกันเป็นกลุ่มแทรกอยู่ระหว่างเซลล์
 ตับ ซึ่งจะติดสีน้ำเงินของฮีมาทอกไซลินเข้มกว่าเซลล์ตับชัดเจน (ภาพที่ 8B)



ภาพที่ 8 ระบบย่อยอาหาร ลูกปลาอายุ 4 วัน หลังฟักออกเป็นตัว

Bc = Buccal cavity, Es = Esophagus, I = Intestine, L = Liver, P = Pancreas, S = Stomach, T = Tongue, Ys = Yolk sac

(กำลังขยาย 100x)

6) ลูกปลาอายุ 5 วัน ถุงสะสมอาหารขุบหมด เริ่มพบการพัฒนาของถุงลม (Swim bladder) ใกล้เคียงบริเวณด้านบนของทางเดินอาหาร เยื่อผิวบริเวณกระเพาะอาหารส่วนบนของชั้นมิวโคซา มีการยกตัวเพิ่มมากขึ้น ยังไม่พบส่วนของชั้นมัสติการิส ที่เป็นชั้นกล้ามเนื้อ เยื่อผิวลำไส้หนา

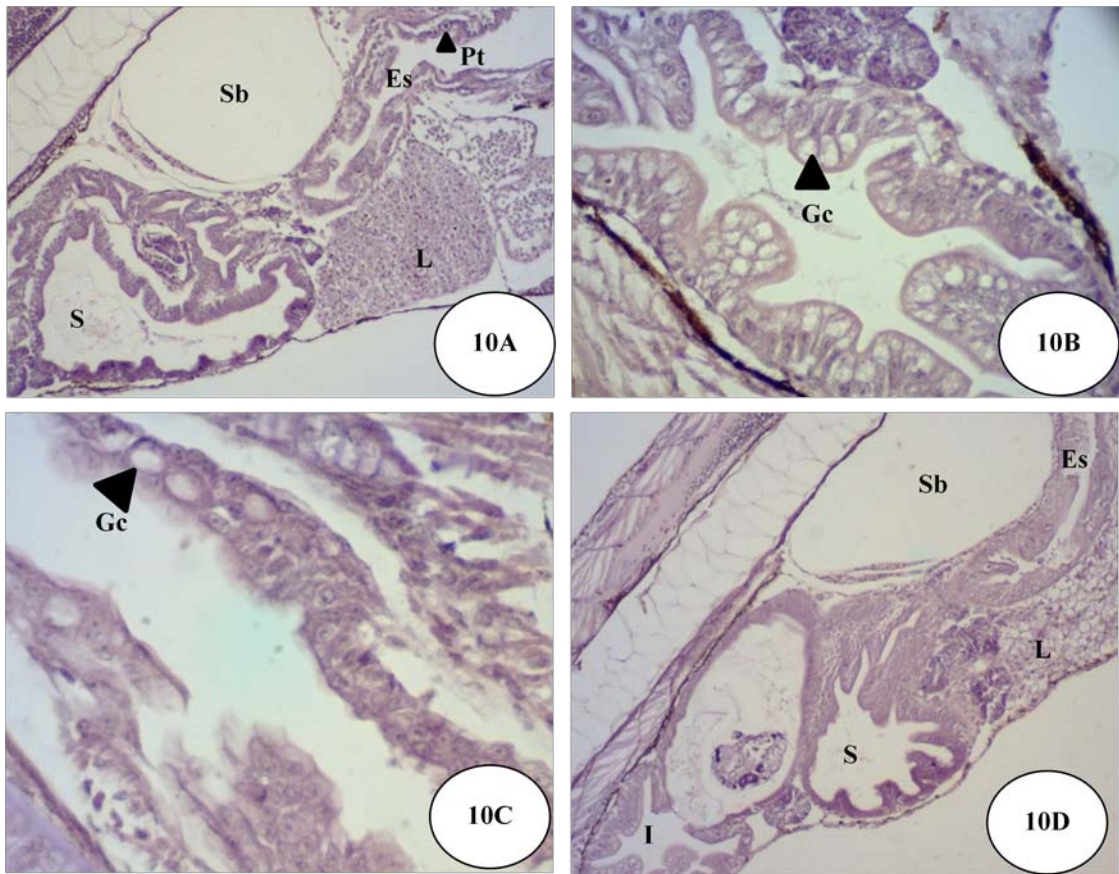
ขึ้นและมียกตัวมากขึ้นเช่นกัน พบ Goblet cell ในลำไส้มากขึ้น ตับและตับอ่อนมีขนาดใหญ่ขึ้น พบเซลล์ตับอ่อนม้วนตัวไปตามทางเดินอาหาร และพบกลุ่มเซลล์ที่เป็นต่อมไร้ท่อ เรียกว่า Islet of Langerhans ที่มีลักษณะติดสีจางในเนื้อเยื่อตับอ่อน (ปลายหัวลูกศร) (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 9 ระบบย่อยอาหาร ลูกปลาอายุ 5 วัน หลังฟักออกเป็นตัว

Es = Esophagus, I = Intestine, L = Liver, P = Pancreas, S = Stomach, Sb = Swim bladder (กำลังขยาย 100x)

7) ลูกปลาอายุ 6-7 วัน เริ่มพบพินบริเวณคอหอยเล็กน้อย แต่ยังไม่โผล่ยื่นพ้นเยื่อบุผิว ถุงลมมีขนาดใหญ่ขึ้น เยื่อบุผิวบริเวณหลอดอาหารมีการยกตัวมากขึ้น จึงทำให้ช่องว่างทางเดินอาหารแคบลง และมีปริมาณ Goblet cell มากขึ้น เยื่อบุผิวของหลอดอาหารส่วนปลายบริเวณที่ติดกับกระเพาะอาหารส่วนต้นจะเปลี่ยนจากเซลล์แบบแบนบางเรียงตัวหลายชั้นขึ้นไปเป็นเซลล์แบบทรงกระบอกเรียงตัวชั้นเดียวชัดเจน เริ่มพบ Brush border ที่เยื่อบุผิวลำไส้และพบ Goblet cell แทรกอยู่ระหว่างเซลล์บุผิวมากขึ้น (ภาพที่ 10A-D)



ภาพที่ 10 ลูกปลาอายุ 6 และ 7 วัน หลังฟักออกเป็นตัว

A = หลอดอาหาร กระเพาะอาหารและตับ ลูกปลาอายุ 6 วัน หลังฟักออกเป็นตัว (กำลังขยาย 100x)

B = ลำไส้ของลูกปลาอายุ 6 วัน หลังฟักออกเป็นตัว (กำลังขยาย 400x)

C = หลอดอาหาร ลูกปลาอายุ 7 วัน หลังฟักออกเป็นตัว (กำลังขยาย 400x)

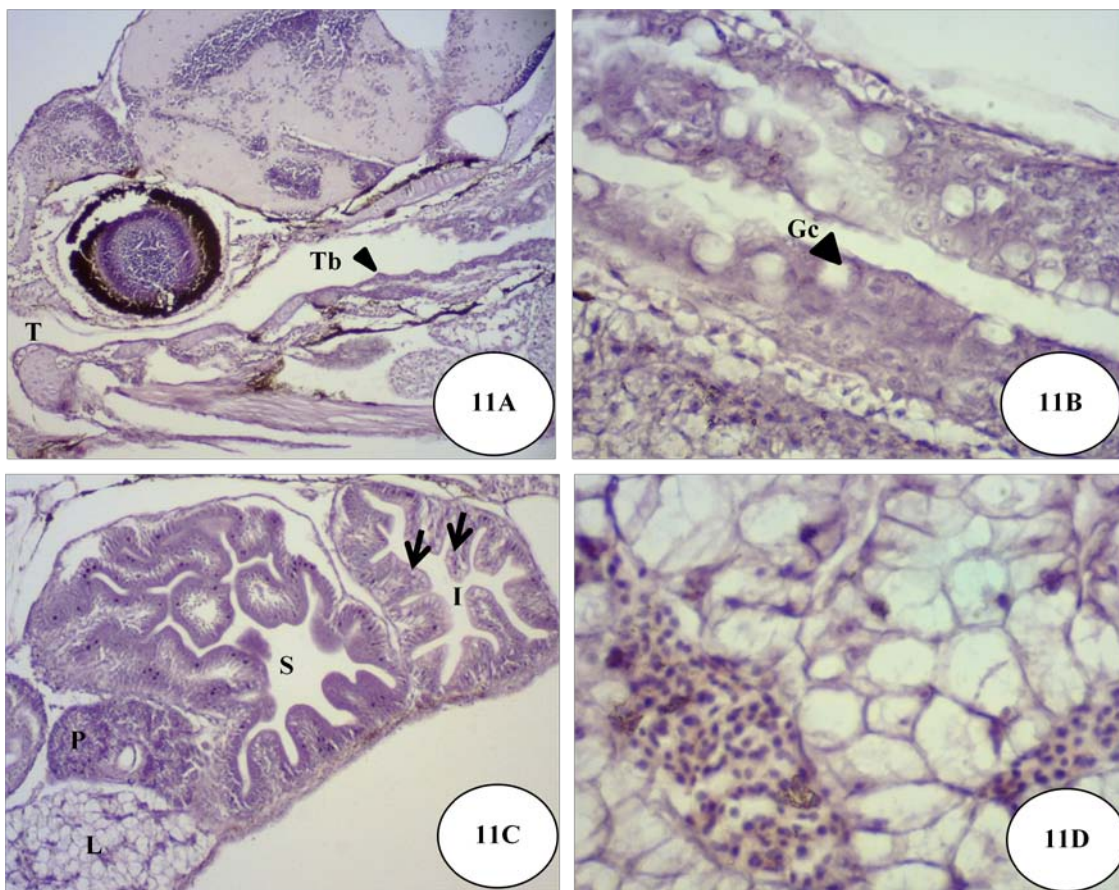
D = หลอดอาหาร กระเพาะอาหาร ตับ และลำไส้ ลูกปลาอายุ 7 วัน หลังฟักออกเป็นตัว (กำลังขยาย 100x)

Es = Esophagus, Gc = Goblet cell, I = Intestine, L = Liver, Pt = Pharyngeal teeth, S = Stomach, Sb = Swim bladder

8) ลูกปลาอายุ 9-11 วัน พบฟันบริเวณคอหอยมากขึ้น และเริ่มพบตุ่มรับรส (Taste bud) กระจายอยู่บริเวณช่องปาก และเยื่อหูหลอดอาหารมีการขยักตัวมากขึ้น และมีปริมาณ Goblet cell มากขึ้น ทางเดินอาหารพบการพัฒนาของชั้นชั้นฉนวนไขมัน โดยจะพบเส้นเลือดมาหล่อเลี้ยงบริเวณนี้ แต่ยังไม่พบชั้นกล้ามเนื้อที่ชัดเจน บริเวณลำไส้พบ Goblet cell แทรกอยู่ระหว่างเซลล์ผิวหนังมากขึ้น (ภาพที่ 11A-B)

9) ลูกปลาอายุ 13-15 วัน พบฟันบริเวณคอหอยโผล่ขึ้นพื้นเยื่อหูมากขึ้น พบ Goblet cell บริเวณหลอดอาหารมีขนาดใหญ่และปริมาณมากขึ้น ถุงลมมีขนาดยาวไปด้านท้ายของ

ลำตัว เชื้อบิวริเวณกระเพาะอาหารและลำไส้มีการยกตัวของเชื้อบิวริเวณสูงขึ้น และมีความยาวและขดงอไปมามากขึ้น พบ Lipid vacuole ในชั้นมิวโคซาบริเวณลำไส้มีปริมาณมากขึ้น (ปลายลูกศร) (ภาพที่ 11C) ตับและตับอ่อนมีขนาดใหญ่ขึ้นและพบเม็ดเลือดแดงแทรกอยู่ในแองเงอเลียด (Sinusoid) ของตับชัดเจน (ภาพที่ 11D)



ภาพที่ 11 ลูกปลาอายุ 11 และ 15 วัน หลังฟักออกเป็นตัว

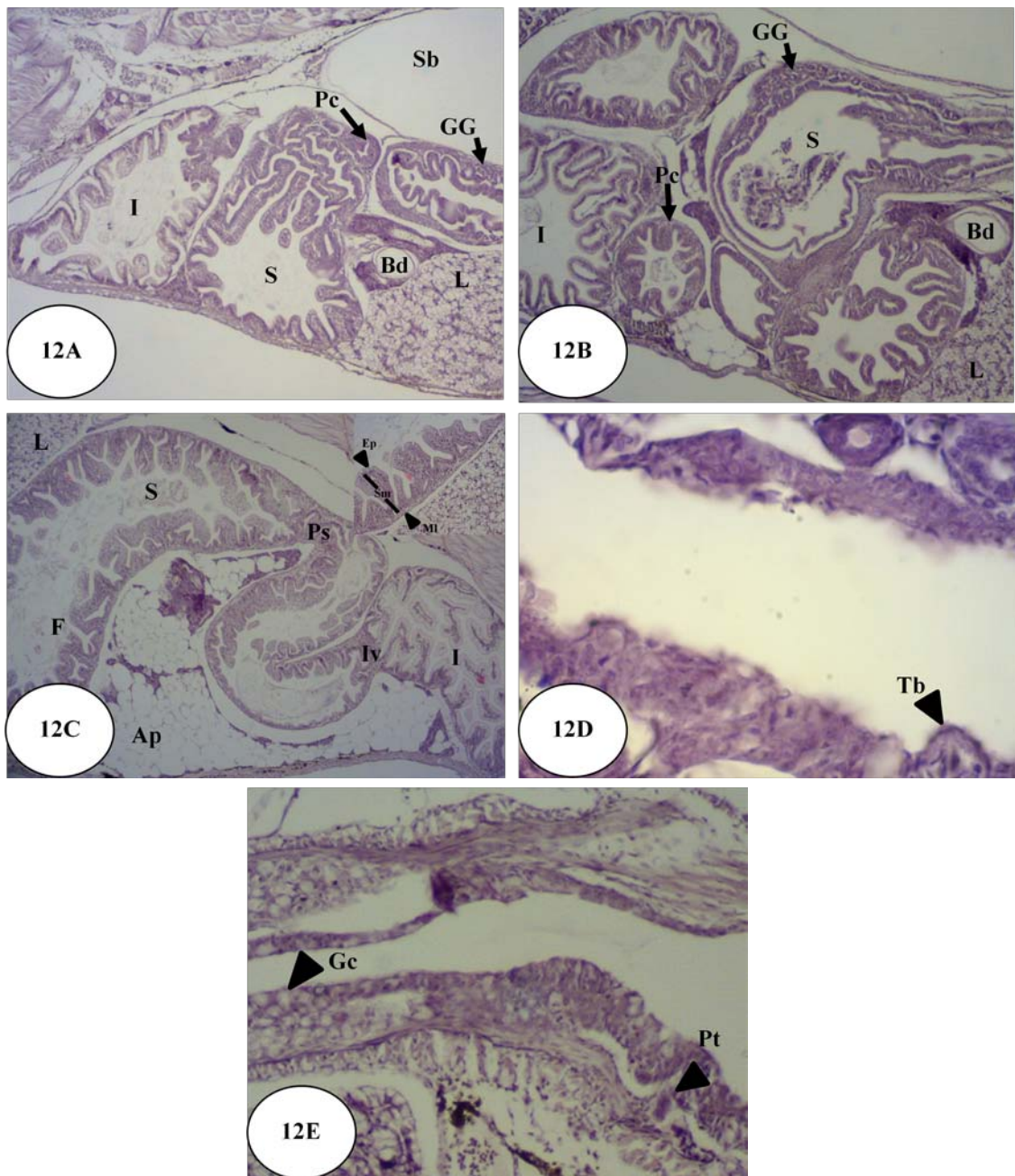
A = ช่องปากและคอหอย ลูกปลาอายุ 11 วัน หลังฟักออกเป็นตัว (กำลังขยาย 100x)

B = หลอดอาหารของลูกปลาอายุ 11 วัน หลังฟักออกเป็นตัว (กำลังขยาย 400x)

C = ทางเดินอาหารของลูกปลาอายุ 15 วัน หลังฟักออกเป็นตัว (กำลังขยาย 100x)

D = ตับของลูกปลาอายุ 15 วัน หลังฟักออกเป็นตัว (กำลังขยาย 400x)

Gc = Goblet cell, I = Intestine, L = Liver, P = Pancreas, S = Stomach, T = Tongue, Tb = Taste bud



ภาพที่ 12 ลูกปลาอายุ 17, 19 และ 21 วัน หลังฟักออกเป็นตัว

A และ B = ทางเดินอาหาร ลูกปลาอายุ 17 และ 19 วัน หลังฟักออกเป็นตัว (กำลังขยาย 40x)

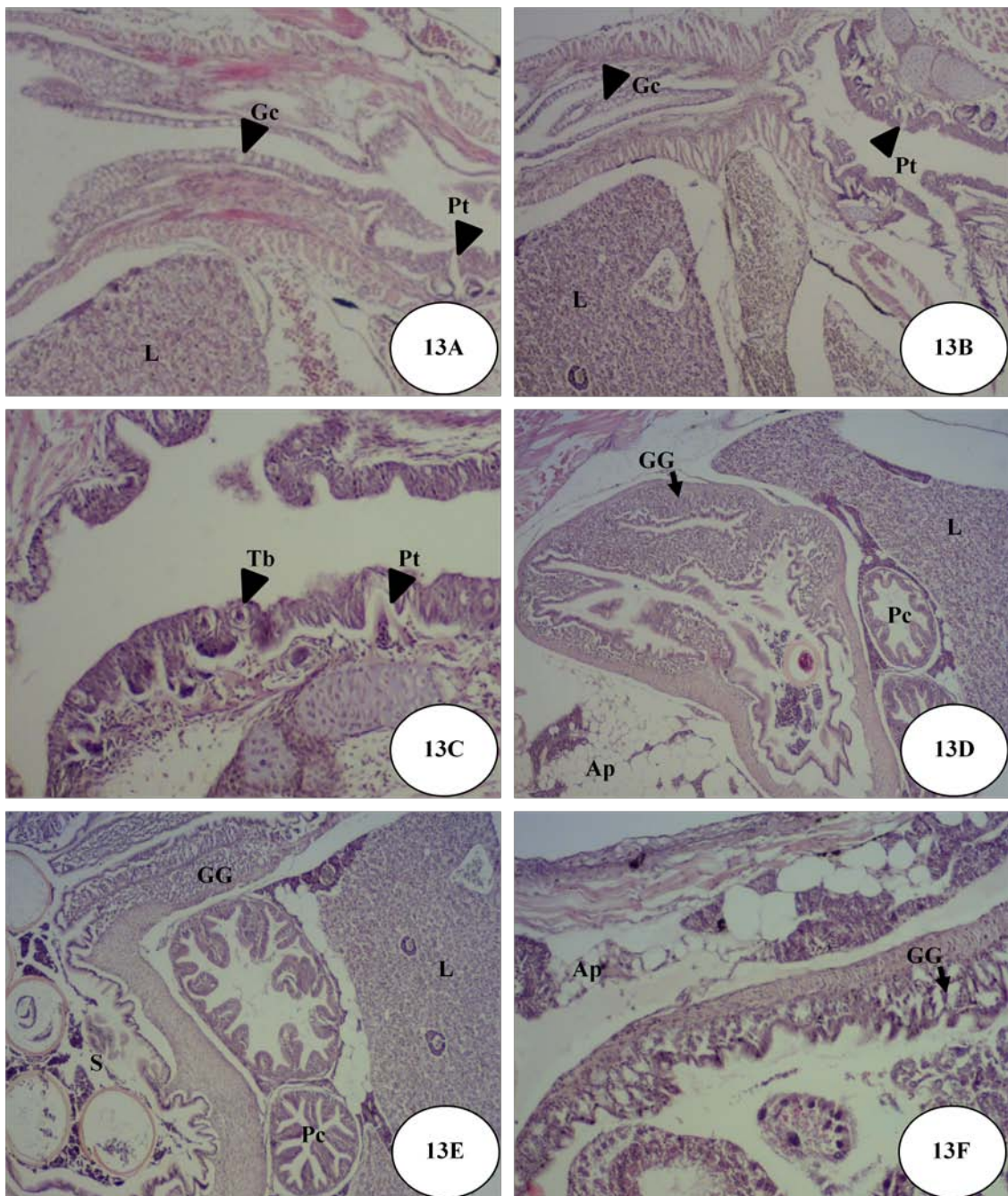
C = กระเพาะอาหารและลำไส้ ลูกปลาอายุ 21 วัน หลังฟักออกเป็นตัว (กำลังขยาย 40x)

D และ E = หลอดอาหารและช่องปาก ลูกปลาอายุ 17 และ 19 วัน หลังฟักออกเป็นตัว (กำลังขยาย 400x และ 100x)

Ap = Adipose tissue, Bd = Bile duct, Ep = Epithelium, F = Food, Gc = Goblet cell, GG = Gastric gland, I = Intestine, Iv = Intestinal valve, L = Liver, Ml = Muscularis layer, Pc = Pyloric caeca, Ps = Pyloric sphincter, Pt = Pharyngeal teeth, S = Stomach, Sb = Swim bladder, Sm = Submucosa, Tb = Taste bud

10) ลูกปลาอายุ 17-21 วัน เริ่มพบไส้ติ่ง (Pyloric caeca) ที่มีเซลล์บุผิวเป็นแบบทรงกระบอกเรียงตัวชั้นเดียว แต่ช่องว่างทางเดินอาหารยังมีขนาดแคบ ช่วงอายุนี้อุปลากะพงขาววัยอ่อนมีลักษณะภายนอกและอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับระบบย่อยอาหารเหมือนตัวเต็มวัย แต่ยังมีเจริญไม่เต็มที่ โดยจะพบชั้นต่างๆ ของทางเดินอาหาร ได้แก่ ชั้นมิวโคซา ชั้นมิวโคซา และมัสคิวลาริส เจริญดีขึ้นแต่มีลักษณะค่อนข้างบาง บริเวณช่องปากและหลอดอาหารพบ Goblet cell และต่อมรับรสขนาดใหญ่และปริมาณมากขึ้น พบฟันบริเวณคอหอยมีขนาดยาวโผล่พ้นเยื่อบุผิวมากขึ้น และจะมีการเพิ่มขนาดและปริมาณมากขึ้นเมื่อลูกปลามีอายุมากขึ้น เริ่มพบต่อมแกสตริก เมื่อลูกปลาอายุ 17 วัน บริเวณกระเพาะอาหารตอนต้น (Fundic region) เล็กน้อยในชั้นชั้นมิวโคซา โดยเซลล์บุผิวมีลักษณะเป็นแบบลูกบาศก์เรียงตัวชั้นเดียว (Simple cuboidal epithelium) เมื่อลูกปลาเจริญเติบโตขึ้นก็จะมีจำนวนเพิ่มมากขึ้น พบกล้ามเนื้อหูรูด (Pyloric sphincter) กั้นระหว่างกระเพาะอาหารและลำไส้ชัดเจน บริเวณลำไส้มีการยกตัวของเซลล์เยื่อบุผิวมากขึ้นจึงทำให้เกิดเป็น Villi จำนวนมาก ซึ่งเป็นการเพิ่มพื้นที่ในการดูดซึมสารอาหาร และมี Intestinal valve กั้นอยู่ระหว่างลำไส้ทั้ง 2 ตอน ชัดเจน นอกจากนี้จะพบท่อน้ำดี (Bile duct) บริเวณตับ และเนื้อเยื่อไขมัน (Adipose tissue) ที่เป็นส่วนของเนื้อเยื่อยึดอวัยวะภายในช่องท้อง ที่มีลักษณะเป็นเซลล์ขนาดใหญ่ที่มีนิวเคลียสแบนอยู่ขอบเซลล์ ภายในมีไซโทพลาสซึมเป็นฟิล์มบางๆ ล้อมรอบหยดไขมัน (Lipid droplet) ขนาดใหญ่รวมตัวกันเป็นกลุ่ม (ภาพที่ 12A-E)

11) ลูกปลาอายุ 24-30 วัน เป็นลูกปลาที่มีลักษณะภายนอกและอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับระบบย่อยอาหารเหมือนตัวเต็มวัยและเจริญเต็มที่ คือ ชั้นต่างๆ ของทางเดินอาหารจะแบ่งเป็นชั้นๆ ชัดเจน ซึ่งชั้นมัสคิวลาริสสามารถแบ่งเป็น Inner circular layer และ Outer longitudinal layer ได้ชัดเจน ช่องปากและคอหอย มีการยกตัวของเยื่อบุผิวมากขึ้น มีต่อมรับรสขนาดใหญ่และปริมาณมากขึ้น หลอดอาหารมี Goblet cell มากขึ้น และกระเพาะอาหารสามารถแบ่งเป็นกระเพาะอาหารตอนต้น และกระเพาะอาหารตอนท้าย (Pyloric region) ได้ชัดเจน โดยบริเวณกระเพาะตอนต้นจะมีปริมาณต่อมแกสตริกมากขึ้น เยื่อบุผิวมีการยกตัวทำให้กระเพาะอาหารมีพื้นที่เพิ่มมากขึ้น ดับและดับอ่อนมีขนาดใหญ่ขึ้นตามการเจริญเติบโตของปลา (ภาพที่ 13A-F) และมี Intestinal valve กั้นระหว่างลำไส้ทั้ง 2 ส่วนชัดเจน บริเวณลำไส้พบการยกตัวของเยื่อบุผิวมากขึ้น จึงทำให้มี Villi เพิ่มมากขึ้นเช่นกัน พบมีการสะสมของ Lipid vacuole ในชั้นมิวโคซามากขึ้น (ปลายลูกศร) และพบเนื้อเยื่อไขมัน บริเวณช่องท้องมากขึ้น (ภาพที่ 14A-E)

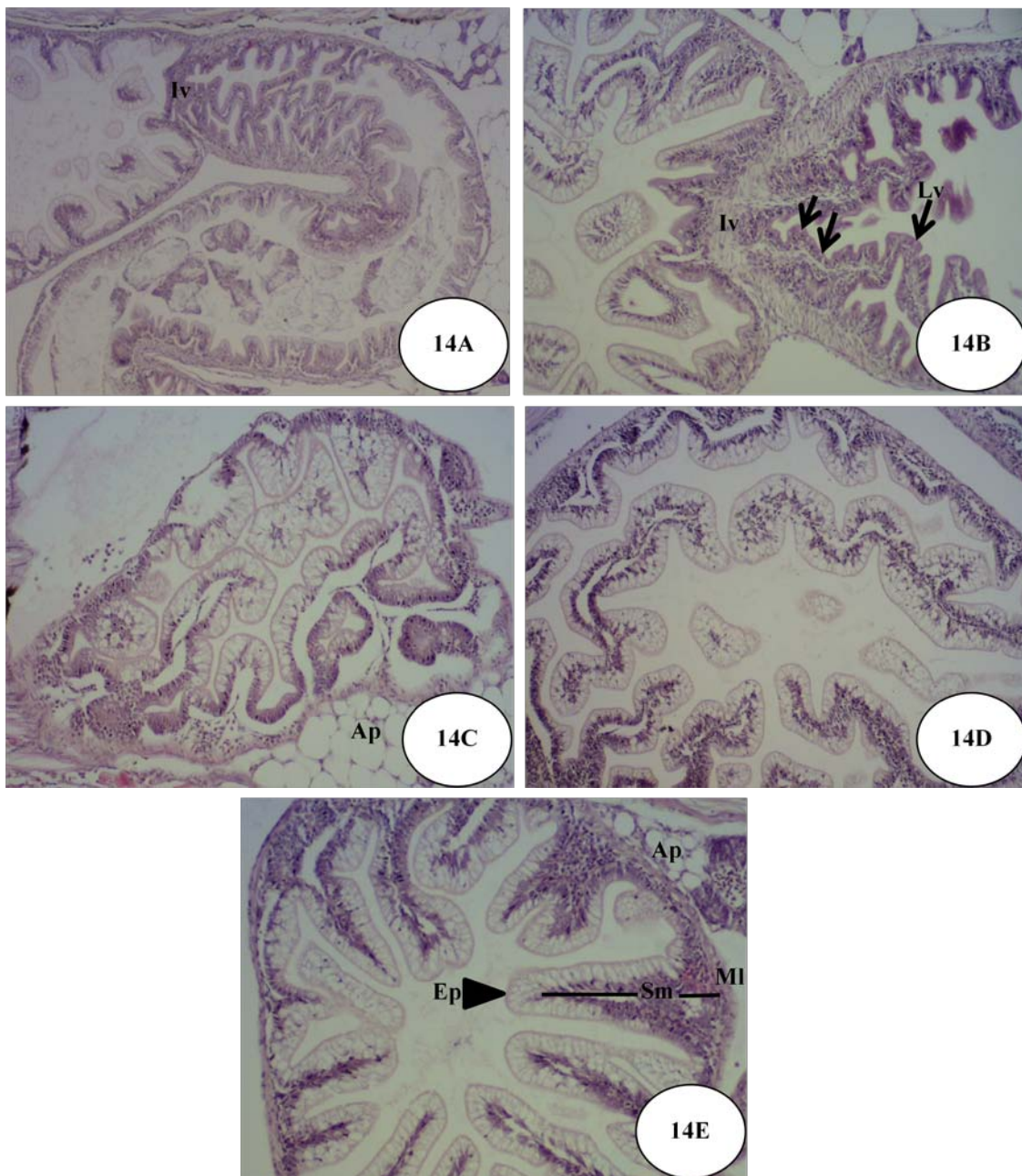


ภาพที่ 13 คอหอย หลอดอาหาร และกระเพาะอาหารตอนต้น ลูกปลาอายุ 24, 27 และ 30 วัน หลังฟัก
ออกเป็นตัว

A, B และ C = คอหอย และหลอดอาหาร (กำลังขยาย 40x, 100x และ 100x)

D, E และ F = ทางเดินอาหารตอนต้น (กำลังขยาย 40x, 40x และ 100x)

Ap = Adipose tissue, Gc = Goblet cell, GG = Gastric gland, L = Liver, Pc = Pyloric caeca, Pt = Pharyngeal teeth, S = Stomach,
Tb = Taste bud



ภาพที่ 14 ลำไส้ ลูกปลาอายุ 24, 27 และ 30 วัน หลังฟักออกเป็นตัว

A และ B = ลำไส้ตอนต้นและตอนท้าย ลูกปลาอายุ 27 และ 30 วัน หลังฟักออกเป็นตัว (กำลังขยาย 40x และ 100x)

C, D และ E = ลำไส้ ลูกปลาอายุ 24, 27 และ 30 วัน หลังฟักออกเป็นตัว (กำลังขยาย 100x)

Ap = Adipose tissue, Ep = Epithelium, Iv = Intestinal valve, Lv = Lipid vacuole, MI = Muscularis layer, Sm = Submucosa

จากผลการศึกษาพัฒนาการทางเนื้อเยื่อวิทยาของระบบย่อยอาหารจึงสามารถแบ่ง
ระยะการพัฒนาได้ 3 ระยะ คือ

ระยะที่ 1 ลูกปลากะพงขาวอายุแรกฟักออกเป็นตัว-2 วัน

เป็นระยะที่ลูกปลาเพิ่งฟักออกจากไข่ มีทางเดินอาหารแบบท่อตรง และได้รับอาหารสำรองจากถุงสะสมอาหาร

ระยะที่ 2 ลูกปลากะพงขาวอายุ 3-15 วัน

เป็นระยะที่ปากของลูกปลาเปิดแล้ว เริ่มกินอาหารจากภายนอก และอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับระบบย่อยอาหารมีการเจริญอย่างรวดเร็ว โดยพบเยื่อบุผิวบริเวณทางเดินอาหารมีการยกตัวมากขึ้น

ระยะที่ 3 ลูกปลากะพงขาวอายุ 17-30 วัน

เป็นระยะที่ลูกปลามีอวัยวะในระบบย่อยอาหารสมบูรณ์ โดยเริ่มพบต่อมแกสตริก และมีการเจริญของชั้นต่างๆ บริเวณทางเดินอาหารให้มีขนาดใหญ่ขึ้นชัดเจน

3.6 วิจารณ์ผลการศึกษา

จากผลการศึกษาการเจริญเติบโตของลูกปลากะพงขาวตั้งแต่แรกฟักออกเป็นตัวถึงอายุ 30 วัน พบว่าลูกปลาที่มีความยาวลำตัวเฉลี่ยเริ่มต้นเท่ากับ 1.83 ± 0.29 มิลลิเมตร สอดคล้องกับการศึกษาของ ชลอ และคณะ (2528) และ Walford และ Lam (1993) ที่ศึกษาในลูกปลากะพงขาวตั้งแต่แรกฟักพบว่ามีความยาวเริ่มต้นเฉลี่ยเท่ากับ 1.5-1.6 มิลลิเมตร และมีความยาวใกล้เคียงกับลูกปลาเห็ดโคน (*Sillago sihama*) ลูกปลาเก๋าเสือ (*Epinephelus fuscoguttatus*) ลูกปลา Greasy grouper (*E. tauvina*) ลูกปลากะรังจุดน้ำตาล (*E. malabaricus*) และลูกปลากะบอก (*Mugil cephalus*) (สุนิตย์ และคณะ, 2540; อาคม และคณะ, 2546; Ruangpanit *et al.*, 1993; Lavens and Sorgeloos, 1996) ที่เป็นปลาทะเลทั้งสิ้น โดยลูกปลากะพงขาวมีความยาวเพิ่มขึ้นในอัตราที่สม่ำเสมอในช่วง 13 วัน ($P > 0.05$) จากนั้นจึงมีความยาวเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วระหว่างอายุ 15-30 วัน ($P < 0.05$) โดยมีความสัมพันธ์ระหว่างอายุและความยาวเฉลี่ยแบบเอ็กซ์โพเนนเชียล จึงสามารถแบ่งช่วงการเจริญเติบโตของลูกปลากะพงขาววัยอ่อนได้เป็น 2 ช่วง คือ ช่วงอายุแรกฟักออกเป็นตัว-13 วัน และ 15-30 วัน เมื่อพิจารณาร่วมกับผลการศึกษาพัฒนาการทางเนื้อเยื่อวิทยา พบว่าเมื่อลูกปลากะพงขาวอายุ 17 วันหลังฟักออกเป็นตัว ปลาจะเข้าสู่ระยะวัยรุ่นที่มีลักษณะเหมือนตัวเต็มวัย แสดงให้เห็นว่าในช่วงอายุแรกฟักออกเป็นตัว-15 วัน ระบบย่อยอาหารของลูกปลายังมีโครงสร้างไม่สมบูรณ์ เมื่อได้รับอาหารจากภายนอก ลูกปลาจึงไม่สามารถใช้ประโยชน์จากอาหารได้เต็มที่ เพราะต้องอาศัยเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่มีอยู่ในอาหารมีชีวิตช่วยในกระบวนการย่อยอาหารในทางเดินอาหาร (Dabrowski, 1979) เพียงอย่างเดียว ลูกปลาจึงมีความยาวลำตัวและน้ำหนัก

เพิ่มขึ้นในอัตราคงที่สม่ำเสมอ เมื่อลูกปลามีอายุ 17-30 วัน ที่มีลักษณะเหมือนปลากะพงขาวตัวเต็มวัย ระบบย่อยอาหารมีโครงสร้างและหน้าที่สมบูรณ์สามารถย่อยและดูดซึมสารอาหารเพื่อนำไปใช้ในการเจริญเติบโตได้ดี จึงส่งผลให้ลูกปลามีความยาวลำตัวและน้ำหนักเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเป็น 2 เท่า ในแต่ละช่วงอายุที่มากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาในลูกปลาหลายชนิด เช่น ปลากะพงยุโรป (Zambonino-Infante and Cahu, 1994) ปลา Yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) (Ma *et al.*, 2005) ปลา Flatfish brill (*Scophthalmus rhombus*) (Hachero-Cruzado *et al.*, 2009) ปลา White seabass (*Atractoscion nobilis*) (Galaviz *et al.*, 2011) และปลากดเหลือง (*Mystus nemuru*) (Srichanun *et al.*, 2012)

พัฒนาการทางเนื้อเยื่อของระบบย่อยอาหารของลูกปลากะพงขาววัยอ่อนสามารถแบ่งระยะการพัฒนาได้ 3 ระยะ ได้แก่ ระยะที่ 1 ลูกปลาแรกฟักออกเป็นตัว-2 วัน และได้รับอาหารสำรองจากถุงสะสมอาหาร ระยะที่ 2 ลูกปลากะพงขาวอายุ 3-15 วัน ได้รับอาหารจากภายนอก และระยะที่ 3 ลูกปลามีอวัยวะในระบบย่อยอาหารสมบูรณ์ และเริ่มพบต่อมแกสตริก ซึ่งลูกปลาทะเลหลายชนิดจะมีลำดับการเปลี่ยนแปลง (การเกิด) ของอวัยวะเป็นรูปแบบเดียวกันข้างต้น โดยปัจจัยที่มีผลให้เกิดความแตกต่างกัน คือ เวลาในการเกิดซึ่งจะขึ้นอยู่กับสภาพและคุณภาพเซลล์สืบพันธุ์ของพ่อแม่พันธุ์ปลา สภาพแวดล้อม (อุณหภูมิและคุณภาพน้ำ) ในการฟักไข่ อาหารสำรองของลูกปลาวัยอ่อน วิธีการที่เหมาะสมในการให้อาหาร และปัจจัยเสี่ยงที่มีผลต่ออัตราการรอดตาย การเจริญเติบโต การเกิดอวัยวะ และการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง เช่น ช่วงการเปลี่ยนอาหารจากการอาศัยอาหารภายในถุงสะสมอาหาร เป็นการกินอาหารจากภายนอก (Gisbert *et al.*, 2008; Zambonino-Infante *et al.*, 2008) และชนิดของอาหารที่ให้ในช่วงที่ปากเปิด (First exogenous feeding) ซึ่งจะใช้อาหารมีชีวิตที่มีเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่มีผลช่วยกระตุ้นการกินอาหาร เพิ่มกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส และชักนำให้เซลล์และเนื้อเยื่อมีการพัฒนาได้ดีขึ้น (Kolkovski *et al.*, 1997; Lazo *et al.*, 2000; Engrola *et al.*, 2009)

ลูกปลากะพงขาวแรกฟักออกเป็นตัว มีระบบทางเดินอาหารและอวัยวะที่เกี่ยวข้องที่ยังไม่พัฒนา และอาศัยอาหารภายในถุงสะสมอาหาร และมีท่อทางเดินอาหารลักษณะเป็นท่อตรง เมื่อลูกปลาอายุ 1-2 วัน ถุงสะสมอาหารจึงจะเริ่มมีขนาดเล็กและปริมาณไขมันลดลงแต่ยังไม่หมด ระบบทางเดินอาหารและอวัยวะที่เกี่ยวข้องเริ่มมีการพัฒนา ได้แก่ ช่องปาก คอหอย หลอดอาหาร กระเพาะ ลำไส้ ตับ และตับอ่อน เยื่อบุผิวปากและทวารแยกออกจากกัน พร้อมกับการกินอาหารจากภายนอก ในวันที่ 3 หลังฟักออกเป็นตัว ซึ่งสอดคล้องกับการพัฒนาระบบย่อยอาหารในลูกปลาทะเลวัยอ่อนหลายชนิด เช่น ปลาช่อน ปลาทุบทราย ปลา Summer flounder ปลา Walleye pollock ปลา Spotted sand bass ปลา Yellow croaker และปลา White seabass (สุ

ปราณี และคณะ, 2536; เบญจสุภักดิ์, 2545; Bisbal and Bengtson, 1995; Porter and Theilacker, 1999; Pena *et al.*, 2003; Mai *et al.*, 2005; Galaviz *et al.*, 2011) ซึ่งพบว่าลูกปลาแรกฟักออกจากไข่ ระบบการย่อยอาหารยังพัฒนาไม่สมบูรณ์และมีท่อทางเดินอาหารเป็นท่อตรง จะเห็นว่าการเปิดปากและการพัฒนาของระบบย่อยอาหารของลูกปลามีความสัมพันธ์กับการยุบตัวของถุงสะสมอาหาร โดยลูกปลาจะเปิดปากและพัฒนาาระบบย่อยอาหารก่อนที่ถุงสะสมอาหารจะยุบหมด เพื่อเตรียมพร้อมสำหรับการกินอาหารจากภายนอก (Boulhic and Gabaudan, 1992; Kjorsvik and Reiersen, 1992; Segner *et al.*, 1994; Bisbal and Bengtson, 1995; Sarasquete *et al.*, 1995; Porter and Theilacker, 1999; Ribeiro *et al.*, 1999) แต่ระยะเวลาในการยุบตัวของถุงสะสมอาหารจะแตกต่างกันไปในลูกปลาแต่ละชนิดที่มีขนาดของลำตัวและถุงสะสมอาหารต่างกัน ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้พบว่าถุงสะสมอาหารจะยุบหมดในวันที่ 5

ปากของลูกปลากะพงขาวอายุแรกฟักออกเป็นตัว มีเยื่อหูผิวหุ้มบริเวณปากไว้ ไม่แยกออกจากกัน และริมฝีปากเริ่มแยกออกจากกันเมื่อลูกปลาอายุ 2 วันหลังฟักออกเป็นตัว สอดคล้องกับการศึกษาในปลาหลายชนิด เช่น ปลานู๋ทราย (เบญจสุภักดิ์, 2545) ปลา Dover sole (Boulhic and Gabaudan, 1992) ปลา Yellowtail kingfish (Chen *et al.*, 2006) ปลา Flatfish brill (Hachero-Cruzado *et al.*, 2009) ซึ่งจะเร็วกว่าในปลา Summer flounder ปลา Yellow croaker และปลา White seabass เริ่มเปิดปากในวันที่ 3 (Bisbal and Bengtson, 1995; Mai *et al.*, 2005; Galaviz *et al.*, 2011) และปลา Common dentex (Santamaria *et al.*, 2004) เริ่มเปิดในวันที่ 3 ซึ่งพบว่าปากของลูกปลาจะเริ่มเปิดก่อนกินอาหารจากภายนอก โดยขึ้นอยู่กับชนิดของปลาที่มีขนาดของถุงสะสมอาหารเล็ก และใหญ่แตกต่างกัน และอุณหภูมิที่ต่างกัน คือ ปลาส่วนใหญ่ที่อาศัยอยู่ในอุณหภูมิต่ำจะมีถุงสะสมอาหารขนาดใหญ่ จึงใช้เวลานานกว่าไข่แดงภายในจะหมดและทำให้ถุงสะสมอาหารยุบจนหมด

สำหรับช่องปากและคอหอยเริ่มเห็นชัดเจนเมื่อลูกปลากะพงขาวมีอายุ 1 วันหลังฟักออกเป็นตัว มีเยื่อหูผิวเป็นแบบแบนบางเรียงตัวชั้นเดียว พบคุ่มรับรส กระจายอยู่บริเวณช่องปาก ซึ่งเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่รับความรู้สึก พบลิ้นบริเวณช่องปากมีลักษณะเป็นแผ่น โดยมีแกนเป็นกระดูกอ่อน มีเยื่อหูผิวแบบแบนบางเรียงตัวชั้นเดียว เพราะลิ้นของปลาจะไม่เจริญและพัฒนาเหมือนสัตว์มีกระดูกสันหลังส่วนใหญ่ จึงมีโครงสร้างที่ไม่ซับซ้อน และพบฟันบริเวณคอหอยเล็กน้อย เมื่อลูกปลาอายุ 6 วันหลังฟักออกเป็นตัว แต่ยังไม่โผล่ขึ้นพื้นเยื่อหู จนกระทั่งอายุ 9-11 วันหลังฟักออกเป็นตัว และจะมีปริมาณมากขึ้น เมื่อลูกปลาเจริญเติบโตขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในปลากินเนื้อหลายชนิด เช่น ปลาช่อน ปลานู๋ทราย ปลา Siberian sturgeon และปลา Summer flounder (สุปราณี และคณะ, 2536; เบญจสุภักดิ์, 2545; Gisbert *et al.*, 1998; Bisbal

and Bengtson, 1995) จะพบพื้นที่มีลักษณะเรียว และแหลมบริเวณใต้เยื่อบุผิว และมีขนาดใหญ่ขึ้นตามการเจริญเติบโต

หลอดอาหารของลูกปลากะพงขาววัยอ่อนจะเริ่มพัฒนาเมื่ออายุ 2 วัน โดยเยื่อบุผิวยกตัวขึ้นเล็กน้อย มีเซลล์แบบแบนบางเรียงตัวหลายชั้น เพราะต้องสัมผัสกับอาหารจึงมีการหลุดลอกของเยื่อบุผิวที่เกิดจากการกินอาหาร และพบ Goblet cell ซึ่งเป็นเซลล์ทำหน้าที่ผลิตเมือก (Acid glycoprotein) เพื่อเคลือบป้องกันเยื่อบุผิวจากการหลุดลอก และคลุกเคล้ากับอาหารที่กินเข้าไป ให้สามารถเคลื่อนที่ไปยังกระเพาะอาหารได้สะดวกขึ้น ซึ่งจะพบแทรกอยู่ตามเซลล์เยื่อบุผิวของหลอดอาหาร บางครั้งในปลาบางชนิดจะพบเป็นสารพวก Sulphate mucosubstance และ Carboxylate mucosubstance (Ribeiro *et al.*, 1999) ซึ่งจะพบการพัฒนาของอวัยวะดังกล่าวพร้อมกับการเปิดปาก สอดคล้องกับในปลาบูทราย ปลา Milkfish ปลา Summer flounder และปลา *Solea senegalensis* (เบญจศุกฤกษ์, 2545; Ferraris *et al.*, 1987; Boulhic and Gabaudan, 1992; Ribeiro *et al.*, 1999) แต่ในลูกปลา Turbot และปลา Gilthead seabream (Cousin and Baudin-Laurencin, 1985; Sarasquete *et al.*, 1995) จะพบ Goblet cell หลังจากกินอาหารจากภายนอก

กระเพาะอาหารของลูกปลากะพงขาววัยอ่อนเริ่มพัฒนาเมื่ออายุ 2 วัน แต่มีการพัฒนาให้สมบูรณ์ทั้งโครงสร้างและการทำหน้าที่ช้ากว่าวัยอื่นๆ ซึ่งในช่วงแรกไม่สามารถแยกออกจากลำไส้ได้ชัดเจน หลังจากนั้นเมื่ออายุ 4 วัน จึงสามารถเห็นกระเพาะชัดเจนเป็นรูปตัวเจ และมีการพัฒนาลิ้นกั้นระหว่างกระเพาะอาหารกับลำไส้ เยื่อบุผิวชั้นมีวโคซา มีการยกตัวมากขึ้นจนกระทั่งเมื่อลูกปลาอายุ 17 วันหลังฟักออกเป็นตัว พบต่อมแกสตริก ที่เป็นเครื่องหมายแสดงถึงกระเพาะอาหารสามารถทำงานได้เต็มที่ (Stroband and Kroon, 1981) ซึ่งเป็นเกณฑ์ของการศึกษาการพัฒนาทางเนื้อเยื่อวิทยาที่จะบอกความแตกต่างระหว่างปลาวัยอ่อนกับวัยรุ่นได้ (Tanaka, 1971; Sarasquete *et al.*, 1995) สอดคล้องกับการศึกษาของ Walford และ Lam (1993) ที่ศึกษาการพัฒนาของระบบทางเดินอาหารและกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีนในปลากะพงขาววัยอ่อนและวัยรุ่น พบว่ากระเพาะอาหารจะสามารถทำหน้าที่ได้เต็มที่เมื่อลูกปลามีอายุ 17 วันหลังฟักออกเป็นตัว เนื่องจากตรวจพบค่ากิจกรรมของเอนไซม์เปปซินมีค่าสูงในช่วงลูกปลาอายุ 17-30 วันหลังฟักออกเป็นตัว เมื่อ พีเอช (pH) ในกระเพาะอาหารมีค่าลดลงเหลือ 3.2 แต่ให้ผลการศึกษาแตกต่างจากการศึกษาของ ชลอ และคณะ (2528) ซึ่งเริ่มพบต่อมแกสตริกบริเวณกระเพาะอาหารส่วนต้นในลูกปลากะพงขาวอายุ 20 วันหลังฟักออกเป็นตัว เนื่องจากการศึกษากำหนดช่วงอายุในการเก็บตัวอย่างลูกปลากะพงขาวต่างกัน คือ การศึกษาในครั้งนี้แบ่งการเก็บตัวอย่างเป็น 3 ช่วง คือ ลูกปลาตั้งแต่อายุแรกฟัก-7 วัน เก็บทุกวัน อายุ 8-21 วัน เก็บทุก 2 วัน และอายุ 22-30 วัน เก็บทุก 3 วัน ตามลำดับ แต่การศึกษาของ ชลอ และคณะ (2528) เก็บตัวอย่างเมื่อลูกปลาอายุ 1-15 วันติดต่อกัน

แล้วเก็บอีกครั้งเมื่อลูกปลาอายุ 20, 23 และ 27 วัน จึงทำให้ได้ผลการศึกษาที่แตกต่างกัน เพราะลูกปลาอาจมีการพัฒนาต่อมแกสตรีก่อนการเก็บตัวอย่างดังกล่าว ซึ่งในปลาแต่ละชนิดจะพบการพัฒนาของต่อมแกสตรีก้าว เร็วแตกต่างกัน เช่น ปลาช่อนพบในวันที่ 3 หลังฟักออกเป็นตัว (สุปราณี และคณะ, 2536) ปลา Yellowtail kingfish พบในวันที่ 15 หลังฟักออกเป็นตัว (Chen *et al.*, 2006) ปลา White seabass พบในวันที่ 16 หลังฟักออกเป็นตัว (Galaviz *et al.*, 2011) ซึ่งพบเร็วกว่าในปลานู๋ทรายซึ่งเริ่มพบต่อมแกสตรีกในวันที่ 30 หลังฟักออกเป็นตัว ปลา Siberian sturgeon (Gisbert *et al.*, 1998) ปลา Dover sole พบในวันที่ 22 (Ribeiro *et al.*, 1999) และปลานวลจันทร์ทะเลที่พบในวันที่ 42 (Ferraris *et al.*, 1987) และปลา Summer flounder พบในวันที่ 31 (Bisbal and Bengtson, 1995) ในขณะที่ปลา Walleye pollock ยังไม่พบการพัฒนาของต่อมแกสตรีกแม้จะมีอายุ 31 วัน (Porter and Theilacker, 1999) ซึ่งจากผลการศึกษาการพบเนื้อเยื่อต่อมแกสตรีกจะสอดคล้องกับการพบกิจกรรมเอนไซม์เปปซินที่เกี่ยวข้องในปลาหลายชนิดที่มีการศึกษาด้วยเทคนิคทางชีวเคมีควบคู่ไปด้วย เนื่องจากต่อมแกสตรีกจะประกอบด้วยเซลล์ที่สำคัญ 2 ชนิด ที่มีผลให้กระเพาะอาหารทำหน้าที่สมบูรณ์ คือ Parietal cell เป็นเซลล์ที่มีลักษณะกลมหรือรูปพีระมิด (Eosinophilia) ทำหน้าที่สร้างกรดเกลือ (HCl) เพื่อทำให้ Chief cell (Basophilia) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น Protein-secreting cell ภายในมีเอนไซม์ที่ยังทำงานไม่ได้ (Proenzyme) คือ เปปซิโนเจน (Pepsinogen) เมื่อหลั่งออกมาในกระเพาะอาหารที่มีสภาพเป็นกรด จึงถูกเปลี่ยนเป็นเอนไซม์เปปซิน (Pepsin) ที่ทำหน้าที่ได้และใช้ในการย่อยโปรตีนให้มีโมเลกุลเล็กลง (ปิยธำรงรัตน์, 2546) จึงสามารถวัดกิจกรรมเอนไซม์เปปซินดังกล่าวควบคู่กันเพื่อเป็นการยืนยันได้เช่นกัน

ถ้าไส้ของลูกปลากะพงขาววัยอ่อนเริ่มพัฒนาเมื่ออายุ 2 วัน โดยมีการม้วนตัวและเยื่อบุผิวยกตัวมากขึ้นเมื่ออายุ 4 วัน ลักษณะเซลล์เยื่อบุผิวเป็นแบบทรงกระบอกเรียงตัวชั้นเดียว ที่มี Goblet cell แทรกอยู่ระหว่างเซลล์บุผิว โดยที่ Goblet cell จะเกิดขึ้นก่อนที่กระเพาะอาหารจะเริ่มทำงาน เพื่อทำหน้าที่สร้างและหลั่งเมือกที่มีฤทธิ์เป็นเบสมาเคลือบถ้าไส้ป้องกันการกัดของกรดเกลือจากกระเพาะอาหาร (เบญจศุกุลลักษณ์, 2545; Boulhic and Gabaudan, 1992; Sarasquete *et al.*, 1995) และจะเห็นลักษณะของ Brush border จำนวนมากที่เกิดจากการยกตัวของเยื่อบุผิว เมื่อลูกปลาอายุ 6-7 วัน หลังฟักออกเป็นตัว ทำให้เกิดเป็น Villi จำนวนมาก ที่มีคุณสมบัติในการเพิ่มพื้นที่ผิวในการดูดซึมสารอาหาร เมื่อลูกปลาอายุ 21 วัน จะพบกล้ามเนื้อหูรูด กั้นระหว่างกระเพาะอาหารและถ้าไส้ และมี Intestinal valve กั้นระหว่างถ้าไส้ตอนต้นและตอนท้ายชัดเจน เพื่อป้องกันไม่ให้อาหารไหลย้อนกลับ แสดงว่าบริเวณถ้าไส้มีการพัฒนาให้มีขนาดและความยาวมากขึ้น นอกจากนี้ยังพบ Lipid vacuole ในชั้นมิวโคซาที่เป็นการแสดงถึงการดูดซึมไขมันในถ้าไส้ของลูกปลากะพงขาวเมื่ออายุ 4 วัน ซึ่งในปลาแต่ละชนิดจะพบการพัฒนาช้า เร็วต่างกัน เช่น ปลา

Yellowtail kingfish (Chen *et al.*, 2006) เริ่มพบ Lipid vacuole ใน Enterocytes บริเวณลำไส้ตอนต้นเมื่ออายุ 5 วัน ในขณะที่ปลาบุทราย (เบญจสุภลักษณ์, 2545) พบการสะสมของ Lipid vacuole เมื่อลูกปลาอายุ 17 วัน เมื่อลูกปลามีการเจริญเติบโตขึ้นก็จะพบ Lipid vacuole บริเวณลำไส้มากขึ้น ซึ่งจะสามารถพบได้ทั้งลำไส้ตอนต้นและลำไส้ตอนท้าย

การเจริญของตับ และตับอ่อน จะเริ่มพัฒนาตั้งแต่ลูกปลากะพงขาวอายุ 1 วันหลังฟักออกเป็นตัว ก่อนการกินอาหารจากภายนอก ซึ่งจะสอดคล้องกับการศึกษาในปลาหลายชนิดที่พบว่า จะมีการพัฒนาของตับเพื่อทำหน้าที่เก็บสะสมสารอาหาร สังกะหรี่โปรตีน สร้างน้ำดี และทำลายพิษ และตับอ่อนทำหน้าที่สร้างเอนไซม์ ตั้งแต่ลูกปลามีอายุ 1 วัน หลังฟักออกเป็นตัว (วันเพ็ญ และนงนุช, 2530; นันทนา, 2531; สุปราณี และคณะ, 2536; Cousin and Baudin-Laurencin, 1985; Govoni *et al.*, 1986; Boulhic and Gabaudan, 1992; Sarasquete *et al.*, 1995; Falk-Peterson and Hansen, 2001; Kolkovski, 2001; Chen *et al.*, 2006) จากนั้นตับและตับอ่อนจะมีขนาดใหญ่ขึ้น พบเม็ดเลือดแดงแทรกอยู่ในแอ่งเลือด และเริ่มพบท่อน้ำดี บริเวณตับที่มีการพัฒนาไปพร้อมๆ กัน ในขณะเดียวกันจะพบต่อมไร้ท่อที่ทำหน้าที่ในการหลั่งฮอร์โมน เพื่อกระตุ้นการหลั่งเอนไซม์จำพวก เอนไซม์ไทโรซีน ไลซีน อาร์จินีน และทริปโตเฟน จากตับอ่อน เพื่อช่วยย่อยอาหารเมื่อกินอาหารจากภายนอก นอกจากนี้จะพบเนื้อเยื่อไขมัน ที่เป็นส่วนของเนื้อเยื่อยึดอวัยวะภายในช่องท้อง เมื่อลูกปลามีอายุ 21 วัน หลังฟักออกเป็นตัว ซึ่งเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่ในการเก็บสะสมไขมันในรูปไตรกลีเซอไรด์ (Triglyceride) ไว้เป็นพลังงานของร่างกาย ที่มีลักษณะเป็นเซลล์ขนาดใหญ่ที่มีนิวเคลียสแบนอยู่ขอบเซลล์ ภายในมีไซโทพลาสซึมเป็นฟิล์มบางๆ ล้อมรอบหยดไขมันขนาดใหญ่ รวมตัวกันเป็นกลุ่ม (ปิยธำรงรัตน์, 2546) แสดงให้เห็นว่าลูกปลากะพงขาวมีการสะสมไขมันไว้เป็นพลังงานสำหรับการเจริญเติบโตของร่างกายมากขึ้น

3.7 สรุปผลการศึกษา

ปลากะพงขาวอายุ 17 วัน หลังฟักออกเป็นตัว จะมีระบบย่อยอาหารสมบูรณ์และการเจริญเติบโตของลูกปลาในช่วงอายุ 15-30 วัน มีความยาวและน้ำหนักเฉลี่ยเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ($P < 0.05$) แสดงให้เห็นว่าปลาสามารถย่อยและดูดซึมสารอาหารไปใช้ในการเจริญเติบโตได้ดี สอดคล้องกับผลการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาที่พบอวัยวะต่างๆ ในระบบย่อยอาหาร พัฒนาทั้งด้านโครงสร้าง ขนาดและปริมาณของเซลล์ จนกระทั่งสามารถแบ่งชั้นต่างๆ ของทางเดินอาหารได้ชัดเจน และพบต่อมแกสตริก บริเวณกระเพาะอาหารตอนต้น ซึ่งเป็นลักษณะบ่งชี้ถึงการเจริญเป็นปลาระยะวัยรุ่น ที่มีลักษณะของอวัยวะและการทำงานเหมือนปลาตัวเต็มวัย ดังนั้นจึงสามารถนำ

ผลการศึกษาครั้งนี้ไปใช้ในการจัดการด้านการใช้อาหารสำเร็จรูปเพื่ออนุบาลลูกปลากะพงขาวให้มี อัตรารอดตายสูงขึ้น และมีการเจริญเติบโตดีที่สุด

บทที่ 4

การทดลองที่ 2 การศึกษาผลของชนิดสารเชื่อมประสานและระดับโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุแวกต่ออัตราการรอดตาย การเจริญเติบโต กิจกรรมเอนไซม์ย่อยอาหารหลัก และการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อวิทยาในปลากะพงขาววัยอ่อน

4.1 บทคัดย่อ

ศึกษาผลของชนิดสารเชื่อมประสานและระดับของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุแวกต่อการยอมรับอาหาร อัตราการรอดตาย การเจริญเติบโต กิจกรรมเอนไซม์ย่อยอาหารหลัก และการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อวิทยาในปลากะพงขาววัยอ่อน ด้วยอาหารสำเร็จรูปเม็ดจิ๋ว (Microbound diet) ที่มีกรแทนโปรตีนปลาปนด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุแวกที่ระดับ 0, 15 และ 30 เปอร์เซ็นต์ และใช้เจลาติน และคาราจีแนน เป็นสารเชื่อมประสาน กำหนดระดับโปรตีนและไขมันในอาหารใกล้เคียงกันเท่ากับ 50 และ 20 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีชุดการทดลองอ้างอิงเป็นเนื้อปลาทุสดและอาหารอนุบาลปลาทะเลทางการค้า ทดลองในปลากะพงขาววัยอ่อนอายุ 16 วันหลังฟักเป็นตัว ที่มีน้ำหนักเริ่มต้นเฉลี่ย 0.0031 ± 0.0002 ถึง 0.0042 ± 0.0016 กรัมต่อตัว ที่ความหนาแน่น 5 ตัวต่อลิตร จำนวน 3 ชุดต่อชุดการทดลอง โดยให้อาหารจนอิ่มวันละ 3 มื้อ เลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าปลากะพงขาวทุกชุดการทดลองมีอัตราการรอดตายไม่แตกต่างกัน แต่ระหว่างการเลี้ยงสัปดาห์ที่ 3 ปลาที่ได้รับเนื้อปลาทุสดและอาหารอนุบาลปลาทะเลทางการค้าทยอยตายจนหมดเนื่องจากไม่ยอมรับอาหาร เมื่อสิ้นสุดการทดลองในสัปดาห์ที่ 4 พบว่า ไม่มีอิทธิพลร่วมระหว่างชนิดของสารเชื่อมประสานและระดับของโปรตีนไฮโดรไลเสต ($P > 0.05$) ต่ออัตราการรอดตาย น้ำหนักสุดท้าย น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ แต่ระดับของโปรตีนไฮโดรไลเสตมีผลต่อน้ำหนักสุดท้าย น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะโดยปลาชุดควบคุม (ระดับการแทนที่ 0 เปอร์เซ็นต์) มีค่าสูงที่สุด ไม่แตกต่างกับที่ 30 เปอร์เซ็นต์ ($P > 0.05$) แต่สูงกว่าที่ระดับ 15 เปอร์เซ็นต์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) จากผลกิจกรรมเอนไซม์ย่อยอาหารหลัก พบว่ากิจกรรมเอนไซม์เปปซิน และทริปซินมีผลจากอิทธิพลร่วมระหว่างชนิดของสารเชื่อมประสานและระดับของโปรตีนไฮโดรไลเสต ($P < 0.05$) กิจกรรมเอนไซม์เปปซิน

ในปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่มีโปรตีนไฮโดรไลเสตที่แทนที่โปรตีนปลาป่น 30 เปอร์เซ็นต์ และใช้การจี้แทนเป็นสารเชื่อมประสานในอาหาร มีค่าสูงกว่าที่ระดับ 15 เปอร์เซ็นต์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กิจกรรมเอนไซม์ทริปซินในปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่ใช้การจี้แทนเป็นสารเชื่อมประสานและไม่มีการแทนที่โปรตีนปลาป่น มีค่าสูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารที่ใช้เจลาตินเป็นสารเชื่อมประสานอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสและไลเปส ไม่มีผลจากอิทธิพลร่วมระหว่างชนิดของสารเชื่อมประสานและระดับของโปรตีนไฮโดรไลเสต ($P > 0.05$) แต่ระดับของโปรตีนไฮโดรไลเสตมีผลต่อกิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส ($P < 0.05$) โดยปลาที่ได้รับอาหารที่มีการแทนที่โปรตีนไฮโดรไลเสต 30 เปอร์เซ็นต์ มีระดับของกิจกรรมต่ำที่สุด ($P < 0.05$) สำหรับการศึกษากการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อวิทยา พบการเพิ่มขนาดของอวัยวะ ปริมาณและขนาดของเซลล์ในเนื้อเยื่อของระบบย่อยอาหารตามการเจริญเติบโตของปลากะพงขาว ดังนั้นปลากะพงขาววัยอ่อน อายุ 16 วัน สามารถยอมรับอาหารสำเร็จรูปที่ผลิตขึ้นได้ ที่มีการแทนที่โปรตีนปลาป่นด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุกแหล่งในอาหารได้ถึงระดับ 30 เปอร์เซ็นต์ และใช้เจลาตินเป็นสารเชื่อมประสาน โดยมีอัตราการรอดตาย การเจริญเติบโต ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีน ไม่แตกต่างจากชุดควบคุม และมีต้นทุนของสารเชื่อมประสานในการผลิตอาหารต่ำ

4.2 บทนำ

ปัจจุบันการเพาะเลี้ยงปลากะพงขาว (Asian seabass, *Lates calcarifer*) มีความต้องการลูกพันธุ์เพื่อการเลี้ยงเป็นจำนวนมาก แต่การอนุบาลลูกปลากะพงขาววัยอ่อนตั้งแต่แรกฟักจนถึงระยะพัฒนาเป็นปลาวัยรุ่นเพื่อการจำหน่าย ส่วนใหญ่ยังใช้อาหารธรรมชาติจำพวกตัวอ่อนอาร์ทีเมีย ไรแดง และปลาสดเป็นอาหารอนุบาล ซึ่งต้องใช้ปริมาณมากจึงทำให้ค่าใช้จ่ายในการผลิตอาหารมีชีวิตสูง คิดเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ ของต้นทุนค่าอาหารทั้งหมด (Person-Le Ruyet *et al.*, 1993) นอกจากนี้ยังไม่สามารถควบคุมคุณค่าทางโภชนาการในอาหารมีชีวิตได้คงที่ และอาจเกิดเชื้อแบคทีเรียในขั้นตอนการผลิต ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคในลูกปลาด้วย (Langdon, 2003) ดังนั้นการพัฒนาอาหารเม็ดสำเร็จรูปสำหรับการอนุบาลลูกปลากะพงขาววัยอ่อนจึงมีความสำคัญต่อการพัฒนาการเพาะเลี้ยงปลากะพงขาว

อาหารสำเร็จรูปขนาดเล็ก ที่ใช้ในการอนุบาลลูกปลาวัยอ่อนจะต้องมีขนาดเล็กเหมาะสมกับขนาดปากของลูกปลา และมีคุณสมบัติที่ปลายอมรับอาหารได้ดี ซึ่งอาหารลูกปลาวัยอ่อนส่วนใหญ่จะมีคุณค่าทางโภชนาการสูง และมีราคาค่อนข้างแพงเพราะต้องใช้กรรมวิธีและ

เทคโนโลยีที่มีต้นทุนการผลิตสูง ซึ่งมีทั้งหมด 3 รูปแบบ (Person-Le Ruyet, 1989) ได้แก่ อาหารแผ่น มักจะนิยมใช้ในการผลิตอาหารสำหรับปลาสวยงาม และสัตว์น้ำที่กินอาหารแบบกรองกิน อาหารเม็ดจืดที่มีสารเชื่อมประสาน จะใช้สารเชื่อมประสาน ที่เป็นสารประเภทโปรตีน หรือแป้งที่เป็นส่วนประกอบในอาหาร หรือสารที่มีคุณสมบัติเฉพาะใช้เป็นสารเชื่อมประสานเพียงอย่างเดียว เช่น ซีน อัลจิเนท วุ้น คาราจีแนน และเจลาติน ทำหน้าที่ช่วยให้ส่วนประกอบของอาหารทั้งหมดเกาะตัวกันดีขึ้น โดยปลาแต่ละชนิดมีความสามารถในการใช้สารเชื่อมประสานแต่ละชนิดได้แตกต่างกัน เช่น Partridge และ Southgate (1999) พบว่าปลากะพงขาว (*L. calcarifer*) วัยอ่อนสามารถใช้เจลาตินและคาร์ราจีแนนได้ดี ที่ระดับ 2-3 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งของอาหาร แต่ไม่เหมาะสมสำหรับอาหารอนุบาลลูกปลา White sturgeon (*Acipenser transmontanus*) และปลา Walleye (*Stizostedion vitreum*) เนื่องจากมีประสิทธิภาพการย่อยและการยอมรับอาหารได้ต่ำ (Gawlicka *et al.*, 1996; Guthrie *et al.*, 2000) เป็นต้น ส่วนอาหารเคลือบเม็ดจืด จะใช้สารเคลือบผิวเม็ดอาหารให้มีการละลายในน้ำช้าลง เช่น โปรตีนที่มีโครงสร้างเชื่อมต่อกัน แคลเซียมอัลจิเนท และไขมัน เป็นต้น นอกจากนี้ปัจจัยที่สำคัญต่อการผลิตอาหารสำหรับลูกปลาวัยอ่อนให้ประสบความสำเร็จ คือ ชนิดและประเภทวัตถุดิบโปรตีนในอาหาร ซึ่งจะประกอบด้วยแหล่งโปรตีนจากปลาป่นเป็นหลัก แต่เนื่องจากปลาป่นเป็นแหล่งโปรตีนที่กำลังขาดแคลนและมีคุณภาพต่ำลง จึงมีการนำวัตถุดิบตัวเล็กรวมมาแทนที่เพื่อลดการใช้ปลาป่น สำหรับการผลิตอาหารลูกปลาวัยอ่อนนิยมใช้โปรตีนไฮโดรไลเสต เนื่องจากเป็นผลิตภัณฑ์ที่ผ่านการย่อยด้วยสารเคมีหรือเอนไซม์กลุ่มโปรติเอสที่จะได้ผลิตภัณฑ์ที่ประกอบด้วยเปปไทด์สายสั้นๆ ช่วยให้ลูกปลาสามารถดูดซึมสารอาหารได้ง่ายขึ้น (Carvalho *et al.*, 1997; Zambonino-Infante *et al.*, 1997; Cahu *et al.*, 1999; Kolkovski and Tandler, 2000) เช่น Kolkovski และ Tandler (2000) ศึกษาการใช้โปรตีนไฮโดรไลเสตจากหมึกเป็นแหล่งโปรตีนในอาหารปลากะพงแดง (*Sparus aurata*) วัยอ่อน พบว่าสามารถใช้ในอาหารร่วมกับโปรตีนจากหมึกป่นได้ดีที่ระดับ 50 เปอร์เซ็นต์ โดยไม่ส่งผลกระทบต่ออัตราการรอดตาย Cahu (1998) ศึกษาการใช้โปรตีนไฮโดรไลเสตร่วมกับยีสต์แทนที่โปรตีนปลาป่นในปลากะพงยุโรป (*Dicentrarchus labrax*) และปลาไน (*Cyprinus carpio*) วัยอ่อน พบว่าปลาที่มีอัตราการรอดตายสูงกว่าการใช้โปรตีนเข้มข้นจากถั่วเหลืองและยีสต์ และการใช้ปลาป่นอย่างเดียว ส่วนในปลาไนวัยอ่อน พบว่าปลาสามารถใช้โปรตีนไฮโดรไลเสตร่วมกับยีสต์แทนที่โปรตีนปลาป่นในอาหาร โดยมีการเจริญเติบโตและอัตราการรอดตายสูงสุด และการศึกษาของ Cahu (1999) พบว่าปลากะพงยุโรปวัยอ่อนที่ได้รับอาหารที่ใช้โปรตีนไฮโดรไลเสตแทนที่โปรตีนปลาป่นที่ระดับ 25 เปอร์เซ็นต์ ให้การเจริญเติบโตไม่แตกต่างปลาชุดควบคุม และมีอัตราการรอดตายสูงกว่าชุดควบคุม

ดังนั้นการศึกษาและพัฒนาอาหารสำเร็จรูปสำหรับลูกปลากะพงขาววัยอ่อน เพื่อสามารถนำมาทดแทนอาหารธรรมชาติบางส่วน โดยลูกปลาสามารถกิน ย่อยและดูดซึมสารอาหารไปใช้ในการเจริญเติบโตได้เต็มที่ และมีการสูญเสียสารอาหาร (Leaching) ในน้ำน้อยที่สุด จะช่วยส่งเสริมให้การเพาะเลี้ยงลูกปลาทะเลตามโรงเพาะพันธุ์ทั่วไปประสบความสำเร็จและมีความยั่งยืนยิ่งขึ้น

4.3 วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาชนิดของสารเชื่อมประสานที่เหมาะสมสำหรับผลิตอาหารอนุบาลปลากะพงขาว
2. เพื่อศึกษาระดับของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุแวกที่เหมาะสมต่อการเป็นแหล่งโปรตีนในอาหารสำหรับปลากะพงขาว ที่สามารถนำมาใช้ทดแทนอาหารธรรมชาติที่มีชีวิตได้

4.4 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการศึกษา

4.4.1 การผลิต และวิเคราะห์ระดับการย่อยสลาย ปริมาณกรดอะมิโนอิสระ และน้ำหนักโมเลกุลของเปปไทด์ ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุแวก

ปลาทุแวก (Round scad mackerel) สดทั้งตัวจากตลาดนำมาล้างด้วยน้ำสะอาด แล้วตัดแยกหัวปลาเพื่อนำมาสับให้ละเอียดก่อนนำไปบดรวมกันกับส่วนอื่นด้วยเครื่องบดเนื้ออีกครั้ง จากนั้นบรรจุใส่ถุงโพลีเอทิลีนประมาณ 100 กรัมต่ถุง และนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ระหว่างรอการนำมาใช้

1) การผลิตและทำแห้งโปรตีนไฮโดรไลเสต

ผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสต โดยวิธีที่ดัดแปลงจาก Thiansilakul (2006) โดยชั่งน้ำหนักปลาทุแวกบดละเอียดผสมกับน้ำกลั่นมาเชื้ออัตราส่วน 1:2 (w/v) ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่น (Braun, MR 400 HC MultiQuick, UK) ปรับพีเอชเท่ากับ 8 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เติมเอนไซม์อัลคาเลส (Sigma. EC No. 232, Denmark) ปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ (w/w) จากนั้นนำไปย่อยสลายที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ด้วยเครื่องเขย่า หุดยการย่อยสลายที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที นำไปกรองด้วยผ้าขาวเพื่อแยก

เกลือ และกระดูกปลาออกจากสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสต จากนั้นนำมาทำแห้งโดยการนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนกระทั่งน้ำระเหยออกจนหมด แล้วนำไปบดให้ละเอียด บรรจุใส่ถุงโพลีเอทิลีนและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ ความชื้น โปรตีน ไขมัน และเถ้า (AOAC, 1990) (ภาคผนวก ข)

2) การวิเคราะห์ระดับการย่อยสลาย (Degree of hydrolysate, DH)

วิเคราะห์ระดับการย่อยสลายตามวิธีการของ Benjakul และ Morrissey (1997) โดยดูตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเสตที่เวลา 0 และ 60 นาที ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมใน 2 เปอร์เซ็นต์ SDS (Sodium dodecyl sulfate) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร นำหลอดไปแช่ที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ตั้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้องประมาณ 27 ± 1 องศาเซลเซียส จากนั้นนำตัวอย่างมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ ดูดตัวอย่างที่เจือจางแล้วปริมาตร 125 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติม 0.2125 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate buffer พีเอช 8.2) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และ 0.01 เปอร์เซ็นต์ TNBS (Trinitrobenzene sulfonic acid) 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ในที่มืด แล้วเติม 0.1 โมลาร์ โซเดียมซัลไฟท์ (Sodium sulfite, Na_2SO_3) ตั้งที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร ค่าที่ได้เทียบกับกราฟมาตรฐานของ L-leucine เป็นปริมาณกรดอะมิโนในตัวอย่าง และนำไปคำนวณค่าระดับการย่อยจากสูตร

$$\text{DH (\%)} = [(L_t - L_0) / (L_{\text{max}} - L_0)] \times 100$$

เมื่อ L_t = ปริมาณกรดอะมิโนที่ปลดปล่อย ที่เวลา 60 นาที

L_0 = ปริมาณกรดอะมิโนเริ่มต้นในตัวอย่างปลาทุบแช่แข็ง ที่เวลา 0 นาที

L_{max} = ปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดในตัวอย่างปลาทุบแช่แข็งด้วยกรดเกลือเข้มข้น (6 N HCl) ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

3) การวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนอิสระ

วิเคราะห์โดยใช้ High performance liquid chromatography (HPLC) ตามวิธีการของ Lindroth และ Mopper (1979) อ้างโดย Flynn (1988) โดยละลายไฮโดรไลเสตที่ผ่านการทำแห้งแล้วด้วย 0.05 โมลาร์ โซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ (Merck, Darmstadt, Germany) พีเอช 5.5 นำไปหมุนเหวี่ยงที่ $7840 \times g$ นาน 10 นาที (KUBOTA 3500, Tokyo, Japan) แยกโดยใช้เครื่อง

HPLC ด้วยคอลัมน์ NovaPak C18 (Water, Milford, MA, USA) และนำตัวอย่างมา Derivatization ด้วยวิธี OPA (*o*-phthaldialdehyde) ใช้ SIL-9A เป็นตัวฉีดตัวอย่าง LC-9A เป็น Liquid Chromatograph และ RF-530 Fluorescence (Shimadzu Corporation, Japan) เป็นตัวตรวจวัด

4) การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของเปปไทด์

เจลฟิльтраชัน (Gel filtration) เป็นวิธีการที่ใช้ในการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของเปปไทด์ โดยละลายไฮโดรไลเสต 10 มิลลิกรัม ด้วย 0.05 โมลาร์ โซเดียมอะซีเตทบัฟเฟอร์ (Merck, Darmstadt, Germany) พีเอช 5.5 นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 7840×*g* นาน 10 นาที (KUBOTA 3500, Tokyo, Japan) แยกโดยใช้เครื่อง FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) ผ่านคอลัมน์ Superdex™ peptide 10/300 GL (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) กำหนดน้ำหนักโมเลกุลของเปปไทด์และเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ไซโตโครมซี (Cytochrome c, $M_w = 12,384$) อโปรตีนิน (Aprotinin, $M_w = 6512$) และวิตามินบี 12 (Vitamin B12, $M_w = 1355$) (Sigma Chemical, MO, USA) รายงานผลเป็นเปอร์เซ็นต์ (Slizyte *et al.*, 2005)

4.4.2 การศึกษาระดับของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุแวก และชนิดของสารเชื่อมประสานในอาหารปลากะพงขาว

1) แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design, CRD) โดยจัดชุดการทดลองแบบแฟกทอเรียล 3×2 ประกอบด้วย 2 ปัจจัย คือ ระดับของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุแวกในอาหาร 3 ระดับ คือ 0, 15 และ 30 เปอร์เซ็นต์ และสารเชื่อมประสาน 2 ชนิด ได้แก่ เจลาติน และคาร์ราจีแนน ที่ระดับ 3 เปอร์เซ็นต์ มีชุดการทดลองอ้างอิงเป็นอาหารเนื้อปลาทุสด และอาหารอนุบาลปลาทะเลทางการค้า (Commercial diet, CMD) ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งนครศรีธรรมราช รวม 8 ชุดการทดลองๆ ละ 3 ซ้ำ ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 เนื้อปลาทุสด

ชุดการทดลองที่ 2 อาหารอนุบาลปลาทะเลทางการค้า

ชุดการทดลองที่ 3 อาหารที่มีเจลาตินเชื่อมประสาน+โปรตีนไฮโดรไลเสต 0 เปอร์เซ็นต์ (G0)

ชุดการทดลองที่ 4 อาหารที่มีเจลาตินเชื่อมประสาน+โปรตีนไฮโดรไลเสต 15 เปอร์เซ็นต์ (G15)

ชุดการทดลองที่ 5 อาหารที่มีเจลาตินเชื่อมประสาน+โปรตีนไฮโดรไลเสต 30 เปอร์เซ็นต์ (G30)

ชุดการทดลองที่ 6 อาหารที่มีคาร์โบไฮเดรต+โปรตีนไฮโดรไลเสต 0 เปอร์เซ็นต์ (C0)
 ชุดการทดลองที่ 7 อาหารที่มีคาร์โบไฮเดรต+โปรตีนไฮโดรไลเสต 15 เปอร์เซ็นต์ (C15)
 ชุดการทดลองที่ 8 อาหารที่มีคาร์โบไฮเดรต+โปรตีนไฮโดรไลเสต 30 เปอร์เซ็นต์ (C30)

2) การเตรียมอาหารทดลอง

ผลิตอาหารสำเร็จรูปเม็ดจิ๋วที่มีระดับโปรตีน 50 เปอร์เซ็นต์ และไขมัน 20 เปอร์เซ็นต์ โดยมีชุดการทดลองอ้างอิงเป็นอาหารเนื้อปลาสด และอาหารอนุบาลปลาทะเลทางการค้า (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-1.0 มม.) (ชุดการทดลองที่ 1 และ 2) ชุดการทดลองที่ 3-5 มีเจลาตินเป็นสารเชื่อมประสาน ที่มีโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาแซลมอนที่โปรตีนจากปลาป่นที่ระดับ 0, 15 และ 30 เปอร์เซ็นต์ และชุดการทดลองที่ 6-8 มีคาร์โบไฮเดรตเป็นสารเชื่อมประสาน ที่มีโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาแซลมอนที่โปรตีนจากปลาป่นที่ระดับ 0, 15 และ 30 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 6)

บดแล้วร่อนวัตถุดิบอาหารด้วยตะแกรงร่อนขนาด 125 ไมโครเมตร ซึ่งส่วนผสมตามปริมาณดังแสดงในตารางที่ 6 นำมาผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมอาหาร (Krupps, F417 PowerMix, France) 15 นาที เติมน้ำมันและเลซิทินผสมต่อ 15 นาที จากนั้นค่อย ๆ เติมน้ำจนอาหารสามารถจับตัวเป็นก้อนเล็กน้อย ผสมต่อ 10 นาที เมื่อวัตถุดิบอาหารทั้งหมดผสมเข้ากันดี จึงนำไปกดผ่านตะแกรงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 มิลลิเมตร จากนั้นจึงนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนแห้ง และนำมาร่อนแยกขนาดด้วยตะแกรงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 และ 1 มิลลิเมตร แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3) ระบบเลี้ยง

ตู้ทดลองที่ใช้มีขนาด 12×16×14 นิ้ว โดยใช้น้ำจืดที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยผงคลอรีน ความเข้มข้น 20 พีพีเอ็ม (ppm) อย่างน้อย 2 วัน แล้วกำจัดด้วยโซเดียมไทโอซัลเฟต (Sodium thiosulfate) และการให้อากาศ เมื่อน้ำสะอาดและปราศจากคลอรีนแล้วจึงนำไปใส่ตู้ทดลอง ที่มีการให้อากาศตลอดเวลา ตรวจวัดคุณภาพน้ำตลอดการทดลอง ได้แก่ อุณหภูมิด้วยเทอร์โมมิเตอร์ ออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (Dissolved oxygen, DO) ด้วยเครื่องวัด (HANNA รุ่น HI9147-04, Romania) และพีเอชด้วยเครื่องวัด (Mettler toledo, Seven easy) ปริมาณแอมโมเนียและไนไตรท์ด้วยชุดทดสอบ (Aqua-VBC, Thailand)

ตารางที่ 5 องค์ประกอบทางโภชนาการของวัตถุดิบอาหาร

วัตถุดิบ	องค์ประกอบทางโภชนาการ (เปอร์เซ็นต์)			
	โปรตีน	ไขมัน	เถ้า	ความชื้น
ปลาป่น	69.81±0.11	9.32±0.45	5.00±0.21	17.82±0.24
หมึกป่น	62.54±0.39	11.85±1.41	3.73±0.11	11.17±0.30
การาจีนแน	1.78±0.23	0.66±0.01	-	-
เจลาติน	96.16±0.19	0.33±0.23	-	-

ตารางที่ 6 องค์ประกอบของอาหารทดลองที่ใช้สารเชื่อมประสาน 2 ชนิด ที่มีการแทนที่โปรตีนปลาป่นด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาหมึกป่นที่ระดับต่าง ๆ (กรัมต่ออาหาร 100 กรัม)

วัตถุดิบ	สูตรอาหาร					
	G0 ¹	G15	G30	C0	C15	C30
ปลาป่น	60.75	51.64	42.53	64.40	54.75	45.08
หมึกป่น	7.53	7.53	7.53	7.98	7.98	7.98
โปรตีนไฮโดรไลเสต	0	7.81	15.63	0	8.28	16.57
สารเชื่อมประสาน	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
เด็กซ์ตริน	8.80	9.50	10.19	5.10	5.87	6.55
น้ำมันปลา	12.50	13.10	13.70	12.10	12.70	13.40
เลซิติน	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
วิตามินซี	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
วิตามินรวม ²	1.20	1.20	1.20	1.20	1.20	1.20
แร่ธาตุรวม ³	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00
NaCl	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
บีเอชที	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
ปริมาณรวม	100	100	100	100	100	100

¹G = Gelatin และ C = Carrageenan และระดับโปรตีนไฮโดรไลเสตปลา

²วิตามินรวม ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท ไทยยูเนี่ยน ฟีดมิลล์ จำกัด

³แร่ธาตุรวม (กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม): CaHPO₄ 8, , NaH₂PO₄ · 2H₂O 15, KH₂PO₄ 10, KCl 5

4) การเตรียมปลาทดลอง

ปลากะพงขาววัยอ่อนอายุ 9 วัน หลังฟักออกเป็นตัว ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งสตูล จ.สตูล จำนวน 20,000 ตัว นำมาอนุบาลในถังไฟเบอร์ขนาด

1 ตัน ด้วยอาร์ทีเมียและปรับลดความเค็มของน้ำจืดเป็น 0 พีพีที (ppt) ภายในเวลา 6 วัน จนกระทั่งลูกปลาอายุ 16 วัน หลังฟักออกเป็นตัว (เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1) จากนั้นจึงคัดปลาขนาดใกล้เคียงกันและชั่งน้ำหนัก ใส่ตู้ทดลองที่ความหนาแน่น 5 ตัวต่อลิตร จำนวน 150 ตัวต่อตู้ วัดความยาวลำตัวเฉลี่ย ความกว้างของช่องปาก (Mouth gap, มม.) และเก็บตัวอย่างปลาก่อนทดลองเพื่อศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เปปซิน ทริปซิน อะไมเลส และไลเปส และการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อวิทยา (ภาคผนวก ก และ ก)

4.4.3 การศึกษาคุณสมบัติของอาหารทดลอง

1) การศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพ

ส่วนผสมสำเร็จรูปทางการค้า และอาหารทดลอง เพื่อศึกษาความคงตัวของเม็ดอาหาร (Pellet stability) (Hasting and Higgs, 1978) โดยชั่งน้ำหนักอาหารประมาณ 10 กรัม (WO) ใส่ในถุงผ้าที่สามารถเคลื่อนไหวได้อิสระ นำไปใส่ตู้ทดลองและให้อากาศเป็นเวลา 10 นาที (ตั้งสภาพการทดลอง) เก็บตัวอย่างใส่ถาดฟอยล์แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น นำมาชั่งน้ำหนัก (WT) เพื่อคำนวณความคงทนของเม็ดอาหารในน้ำดังสมการ

$$\text{ความคงทนของอาหารเม็ดในน้ำ (\%, as-fed basis)} = (\text{WT}/\text{WO}) \times 100$$

2) การศึกษาคุณสมบัติทางเคมี

โดยการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ โปรตีน ไขมัน ความชื้น และเถ้า ตามวิธีมาตรฐานของ AOAC (1990) (ภาคผนวก ข) และวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนในอาหารทดลองตามวิธีการของ Hugli และ Moore (1972) โดยย่อยด้วยกรดเกลือ (HCl) เข้มข้น 6 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 23 ชั่วโมง สำหรับการวิเคราะห์กรดอะมิโนทริปโตเฟน (Tryptophan) และไทโรซีน (Tyrosine) ย่อยด้วยด่าง (NaOH) เข้มข้น 4.2 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3.5 ชั่วโมง รายงานผลกรดอะมิโนซิสตีนและเมทไธโอนีนในรูปของกรดซิสเตอิก (Cysteic acid) และ เมทไธโอนีนซัลโฟน (Methionine sulfone)

4.4.4 การศึกษาการยอมรับอาหาร อัตรารอดตาย และการเจริญเติบโต

ศึกษาการยอมรับอาหารโดยการปรับลดสัดส่วนของอาร์ทีเมียและเพิ่มสัดส่วนของอาหารทดลอง (ตารางที่ 7) ต่อเนื่องกันเป็นเวลา 7 วัน เมื่อเริ่มการทดลอง จากนั้นศึกษาการเจริญเติบโตเป็นเวลา 4 สัปดาห์ โดยชุดอ้างอิงปรับอาหารเป็นเนื้อปลาทุสดตามระบบการเลี้ยงในโรงเพาะฟักทั่วไป และอาหารอนุบาลปลาทะเลทางการค้า ซึ่งให้ปลากินอาหารจนอิ่มวันละ 3 มื้อ คือ เวลา 08.00, 12.00 และ 17.00 น. ก่อนให้อาหารทุกมื้อจะคลุกสิ่งขับถ่ายและเศษอาหารในตู้ทดลองออกให้หมด รวบรวมและบันทึกจำนวนปลาตาย และเปลี่ยนถ่ายน้ำประมาณ 50-70 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณน้ำทั้งหมด ทุกวันก่อนให้อาหารเวลา 17.00 น. ระหว่างการให้อาหารสังเกตพฤติกรรมต่างๆ และบันทึกน้ำหนักอาหารที่ปลากินทุกวัน สุ่มชั่งน้ำหนักและเก็บตัวอย่างปลาระหว่างการเลี้ยงทุก ๆ 7 วัน ด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง เมื่อสิ้นสุดการทดลองชั่งน้ำหนักปลาสุดท้าย (Final wet weight) และนับจำนวนปลาที่เหลือ และนำข้อมูลที่ได้อาหาร อัตรารอดตาย น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ดังนี้

1) อัตรารอดตาย (Survival rate, เปอร์เซ็นต์)

$$= \frac{\text{จำนวนปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (ตัว)} \times 100}{\text{จำนวนปลาเมื่อเริ่มต้น (ตัว)}}$$

2) น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (Weight gain, กรัมต่อตัว)

$$= \text{นน.ปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (กรัม)} - \text{นน.ปลาเมื่อเริ่มต้นการทดลอง (กรัม)}$$

3) อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific growth rate, เปอร์เซ็นต์ต่อวัน)

$$= \frac{(\ln W_2 - \ln W_1) \times 100}{T_2 - T_1}$$

โดยที่ W_1 = น้ำหนักปลาเมื่อเริ่มต้นการทดลอง

W_2 = น้ำหนักปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง

T_1 = วันที่เมื่อเริ่มต้นการทดลอง

T_2 = วันที่เมื่อสิ้นสุดการทดลอง

ตารางที่ 7 วิธีการให้อาหารปลากระพงขาวด้วยการปรับลดสัดส่วนของอาร์ทีเมียและเพิ่มสัดส่วนของอาหารทดลองในช่วง 7 วัน เมื่อเริ่มการทดลอง

อาหาร	สัดส่วนของอาหาร						
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5	วันที่ 6	วันที่ 7
อาร์ทีเมีย	100	80	60	50	50	40	20
(<i>Artemia sp.</i>) ¹	(30,000)	(24,000)	(18,000)	(15,000)	(15,000)	(12,000)	(6,000)
อาหารทดลอง ²	0	20	40	50	50	60	80
อายุของปลา (DPH ³)	16	17	18	19	20	21	22

¹อาร์ทีเมียน้ำเค็ม บริษัท Eagle Artemia Cysts (Switzerland) ปริมาณ 1 ตัว/มิลลิลิตร/มือ, ตัวเลขในวงเล็บ คือ จำนวนตัว/ตู้/มือ

²ปริมาณอาหาร 10 เปอร์เซ็นต์/ตัว/วัน

³DPH= Days post hatch

4.4.5 การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหาร

เก็บตัวอย่างปลากระพงขาวเริ่มต้นและทุก ๆ 7 วัน โดยใช้ตัวอย่างปลาที่อดอาหารเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้ทางเดินอาหารปราศจากอาหารทดลอง จากนั้นสุ่มเก็บตัวอย่างให้ได้น้ำหนักรวมประมาณ 0.05-0.20 กรัมต่อตู้ ซึ่งตัวอย่างปลาเริ่มต้นการทดลอง-สัปดาห์ที่ 3 ไม่สามารถผ่าตัดทางเดินอาหารได้จึงต้องสกัดเอนไซม์จากปลาทั้งตัว แต่สำหรับตัวอย่างของสัปดาห์ที่ 4 ผ่าตัดเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารเพื่อนำไปวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เปปซิน ไล้ดิงและลำไส้ นำไปวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ทริปซิน อะไมเลส และไลเปส ชั่งน้ำหนักแล้วเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เปปซิน ทริปซิน อะไมเลสและไลเปส ตามวิธีการของ Bergmeyer และคณะ (1974) (ภาคผนวก ก)

4.4.6 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อวิทยา

เก็บตัวอย่างปลากระพงขาวเริ่มต้นและทุก ๆ 7 วัน จำนวน 5 ตัวต่อตู้ โดยใช้ตัวอย่างที่อดอาหารเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำลูกปลาทั้งตัวมาสลับด้วยน้ำแข็งอุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-10 นาที จากนั้นจึงนำไปใส่ในขวดที่มีน้ำยาคอง Bouin's fluid (Bio-optica, Milano Italy) ในอัตราส่วน ตัวอย่าง:น้ำยาคองเท่ากับ 1:50 เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เมื่อปลา มีขนาดลำตัวใหญ่ขึ้นจะต้องตัดบริเวณคอคหาง (Caudal fin) หรือใช้เข็มฉีดน้ำยาคองเข้าสู่ตัวปลา เพื่อให้ น้ำยาคองเข้าสู่เนื้อเยื่อดีขึ้น เมื่อครบตามเวลาที่กำหนดแล้วจึงเปลี่ยนน้ำยาคองเป็นแอลกอฮอล์ 50 และ 70 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยต้องเปลี่ยนน้ำยาใหม่ทุก ๆ 24 ชั่วโมง จนกระทั่งไม่มีสีของ Bouin's fluid เพราะจะทำให้การย้อมสีเนื้อเยื่อไม่คงทน จากนั้นจึงดึงน้ำออกจากเซลล์

(Dehydration) ด้วยเครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติ ของ Technicon Corporation รุ่น Autotechnicon Mono MOD.2A โดยนำตัวอย่างผ่านไอโซโพรพิลแอลกอฮอล์ และไซลิน และการฝังตัวอย่าง ใน พาราฟิน ด้วยเครื่องอบเบด คิง นำเนื้อเยื่อไปตัดตามยาวด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อไมโครโทม (Sliding microtome บริษัท Jung AG Heidelberg) ให้มีความหนา 3-5 ไมโครเมตร ตัดลงบนสไลด์ จากนั้น จึงนำไปย้อมด้วยสีฮีมาทอกไซลิน และอีโอซิน (Humason, 1979) (ภาคผนวก ก) หลังจากนั้นนำไป ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ และบันทึกภาพ

4.4.7 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลอัตราการรอดตาย การเจริญเติบโต และกิจกรรมของเอนไซม์ นำมาหาค่าเฉลี่ย และวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล แบบ 2 ทาง (Two-way ANOVA) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย Tukey's HSD Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

4.5 ผลการศึกษา

4.5.1 องค์ประกอบทางเคมี ระดับการย่อยสลาย ปริมาณกรดอะมิโนอิสระ และ น้ำหนักโมเลกุลของเปปไทด์ ของโปรตีนไฮโดรไลสได้จากปลาทุแขก

องค์ประกอบทางเคมีของโปรตีนไฮโดรไลสได้จากปลาทุแขกรูปแบบแห้ง มีความชื้น 8.32 ± 0.15 โปรตีน 81.48 ± 0.03 ไขมัน 2.78 ± 0.72 และเถ้า 6.98 ± 0.00 เปอร์เซ็นต์ (As-fed basis) ตามลำดับ ระดับการย่อยสลาย เท่ากับ 71.73 ± 3.97 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 8)

องค์ประกอบของกรดอะมิโนอิสระ พบว่า มีกรดอะมิโนชนิดกรดกลูตามิกสูง ที่สุดเท่ากับ 111.98 ± 5.74 มิลลิกรัมต่อกรัม รองลงมา คือ อาร์จินีน/ไกลซีน กรดแอสพาร์ติก ไลซีน และลิวซีน เท่ากับ 102.03 ± 5.80 , 78.71 ± 4.29 , 75.64 ± 2.56 และ 61.91 ± 2.88 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ และมีปริมาณกรดอะมิโนเมทไซโอนีนต่ำที่สุดเท่ากับ 8.75 ± 10.62 มิลลิกรัมต่อกรัม (ตารางที่ 8)

น้ำหนักโมเลกุลของเปปไทด์ส่วนใหญ่ประกอบด้วย กรดอะมิโนอิสระ (< 200 Da) เท่ากับ 39.83 ± 6.39 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ ได/ไตรเปปไทด์ (200-500 Da) โอลิโกเปปไทด์ (500-2,500 Da) และ โพลีเปปไทด์ (> 2,500 Da) ตามลำดับ (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 องค์ประกอบทางเคมี (As-fed basis) กรดอะมิโน และขนาดเปปไทด์ (Peptide molecular weight) ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทูแอก¹

องค์ประกอบทางเคมี (เปอร์เซ็นต์)	
ความชื้น	8.32±0.15
โปรตีน	81.48±0.03
ไขมัน	2.78±0.72
เถ้า	6.98±0.00
กรดอะมิโน (มิลลิกรัมต่อกรัม)	
กรดอะมิโนจำเป็น (Essential Amino Acids, EAA)	
Arginine (Arg)/Glycine (Gly)	102.03±5.80
Histidine (His)	33.64±2.10
Isoleucine (Ile)	34.63±1.63
Leucine (Leu)	61.91±2.88
Lysine (Lys)	75.64±2.56
Methionine(Met)	8.75±10.62
Phenylalanine(Phe)	46.28±19.90
Threonine (Thr)	33.98±2.24
Valine (Val)	25.99±16.86
กรดอะมิโนที่ไม่จำเป็น (Non Essential Amino Acids, NEAA)	
Alanine (Ala)	47.25±3.06
Aspartic acid (Asp)	78.71±4.29
Glutamic Acid (Glu)	111.98±5.74
Serine (Ser)	27.87±1.68
Tyrosine (Tyr)	24.30±0.26
น้ำหนักโมเลกุลของเปปไทด์ (เปอร์เซ็นต์)	
< 200 Da	39.83±6.39
200-500 Da	26.82±16.08
500-2,500 Da	24.33±2.01
> 2,500 Da	9.02±11.69

¹ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=2)

4.5.2 องค์ประกอบทางเคมีและกายภาพของอาหารทดลอง

อาหารทดลองที่ผลิตขึ้น ใช้เจลาติน และคาราจีแนนเป็นสารเชื่อมประสาน เมื่อเปรียบเทียบลักษณะภายนอกกับอาหารอนุบาลปลาทะเลทางการค้า พบว่ามีขนาดใกล้เคียงกัน แต่อาหารที่ผลิตขึ้นเองจะมีขนาดของเม็ดอาหารแตกต่างกันมากกว่า และมีรูปร่างค่อนข้างเป็นทรงกระบอก ลักษณะผิวภายนอกจะขรุขระ และมีสีน้ำตาลค่อนข้างดำ ในขณะที่อาหารอนุบาลปลาทะเลทางการค้าจะมีสีส้มคล้ายกับสีของตัวอ่อนอาร์ทีเมีย (ภาพที่ 15)



ภาพที่ 15 ลักษณะภายนอกของอาหารอนุบาลปลาทะเลทางการค้า อาหารเม็ดจืดที่มีเจลาติน และคาราจีแนนเป็นสารเชื่อมประสาน

องค์ประกอบทางเคมีของอาหารทดลอง (ตารางที่ 9) พบว่า อาหารอนุบาลปลาทะเลทางการค้ามีปริมาณโปรตีนสูงที่สุดเท่ากับ 52.79 ± 0.27 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างกับอาหารเม็ดจืดที่ใช้สารเชื่อมประสานทั้ง 2 ชนิด และแทนที่ปลาป่นด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุแวกที่ระดับต่างๆ ที่มีค่าอยู่ระหว่าง $49.01-49.78$ เปอร์เซ็นต์ ปริมาณไขมันในอาหารอนุบาลปลาทะเลทางการค้ามีปริมาณไขมันต่ำที่สุดเท่ากับ 12.52 ± 0.74 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างกับอาหารเม็ดจืดที่ใช้สารเชื่อมประสานทั้ง 2 ชนิด และแทนที่ปลาป่นด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุแวกที่ระดับต่างๆ ที่มีค่าอยู่ระหว่าง $19.23-19.71$ เปอร์เซ็นต์

อาหารอนุบาลปลาทะเลทางการค้า และอาหารเม็ดจืดที่ใช้สารเชื่อมประสานทั้ง 2 ชนิด และแทนที่ปลาป่นด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุแวกที่ระดับต่างๆ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางระหว่าง $0.5-1.0$ มิลลิเมตร สำหรับค่าความคงตัวของเม็ดอาหารในน้ำของอาหารที่ใช้สารเชื่อมประสานทั้ง 2 ชนิด จะมีค่าลดลงตามระดับการแทนที่โปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุแวกที่สูงขึ้น โดยอาหารเม็ดจืดที่มีเจลาตินเชื่อมประสานและแทนที่ปลาป่นด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุแวกที่ 30 เปอร์เซ็นต์ (G30) มีค่าต่ำที่สุดเท่ากับ 80.20 ± 7.57 เปอร์เซ็นต์ แต่อาหารเม็ด

จิวที่มีคาราจีแนนเชื่อมประสานและแทนที่ปลาปนด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทูแวกที่ 0 เปอร์เซ็นต์ ที่มีค่าสูงที่สุดเท่ากับ 90.32 ± 2.78 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 9 องค์ประกอบทางเคมี (As-fed basis) และสมบัติทางกายภาพของอาหารทดลอง¹

ชุดการทดลอง	องค์ประกอบทางเคมี (เปอร์เซ็นต์)				ความคงตัวของเม็ดอาหาร ⁶ (เปอร์เซ็นต์)
	ความชื้น	โปรตีน	ไขมัน	เถ้า	
เนื้อปลาทูสด ²	75.79 ± 0.42^5	18.42 ± 0.03	0.19 ± 0.03	1.39 ± 0.05	-
CMD ³	8.89 ± 0.27	52.79 ± 1.71	12.52 ± 0.74	12.14 ± 0.23	83.30 ± 0.14
G0 ⁴	7.83 ± 0.11	49.01 ± 0.23	19.26 ± 0.14	13.52 ± 0.04	82.98 ± 3.35
G15	7.98 ± 0.19	49.56 ± 0.84	19.23 ± 0.26	12.59 ± 0.13	81.57 ± 3.45
G30	7.18 ± 0.01	49.78 ± 0.56	19.44 ± 1.14	13.88 ± 0.17	80.20 ± 7.57
C0	6.50 ± 0.09	49.69 ± 0.71	19.29 ± 1.29	14.03 ± 0.11	90.32 ± 2.78
C15	7.91 ± 0.24	49.32 ± 1.41	19.65 ± 0.80	13.19 ± 0.24	88.91 ± 1.24
C30	6.17 ± 0.28	49.77 ± 0.08	19.71 ± 0.23	14.74 ± 0.08	87.64 ± 5.03

¹อาหารทดลองมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-1.0 มิลลิเมตร

²เนื้อปลาทูสดผสมวิตามินซี 1 เปอร์เซ็นต์

³CMD = Commercial diet ขนาด 0.5-1.0 มิลลิเมตร ได้รับความอนุเคราะห์จาก ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งนครศรีธรรมราช

⁴G = Gelatin และ C = Carrageenan และระดับโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทูแวกปน

⁵ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

⁶ความคงตัวของเม็ดอาหาร (%) = $(\text{น้ำหนักสุดท้ายหลังจากแช่น้ำ} / \text{น้ำหนักก่อนแช่น้ำ}) \times 100$

องค์ประกอบของกรดอะมิโนในอาหารทดลองดังแสดงในตารางที่ 10 พบว่าอาหารเม็ดจิวที่ใช้สารเชื่อมประสานทั้ง 2 ชนิด และแทนที่ปลาปนด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทูแวกที่ระดับต่างๆ มีกรดอะมิโนชนิดกรดกลูตามิกสูงที่สุดระหว่าง 6.82-7.05 เปอร์เซ็นต์ โปรตีนในอาหาร รongลงมา คือ กรดแอสพาร์ติก และมีปริมาณกรดอะมิโนลิซีน ไลซีน และไกลซีนใกล้เคียงกัน ซึ่งปริมาณกรดอะมิโนแต่ละชนิดมีปริมาณใกล้เคียงกับอาหารอนุบาลปลาทะเลทางการค้า

ตารางที่ 10 องค์ประกอบของกรดอะมิโน (เปอรฺ์เซ็นต์โปรตีนในอาหาร) ในอาหารทดลอง

กรดอะมิโน	อาหารทดลอง							
	เนื้อปลา ทูลสด	CMD ¹	G0 ²	G15	G30	C0	C15	C30
Arginine	5.19	2.63	3.00(84) ³	2.99(83)	2.99(81)	2.93(81)	2.82(77)	2.81(76)
Histidine	4.02	1.18	1.34(37)	1.42(39)	1.54(42)	1.38(38)	1.45(40)	1.55(42)
Isoleucine	4.36	2.10	2.03(57)	2.01(56)	2.07(56)	2.09(57)	2.07(57)	2.08(56)
Leucine	6.98	3.56	3.36(94)	3.34(93)	3.43(93)	3.42(94)	3.41(94)	3.45(93)
Lysine	7.88	3.19	3.59(100)	3.61(100)	3.68(100)	3.64(100)	3.64(100)	3.71(100)
Methionine	2.67	1.31	1.35(38)	1.36(38)	1.39(38)	1.42(39)	1.38(38)	1.39(37)
Phenylalanine	3.75	2.05	1.90(53)	1.93(53)	1.94(53)	1.96(54)	1.98(54)	1.87(50)
Threonine	4.03	1.89	1.98(55)	1.97(55)	2.01(55)	2.00(55)	1.99(55)	2.01(54)
Tryptophan	1.18	0.54	0.54(15)	0.55(15)	0.55(15)	0.58(16)	0.56(15)	0.56(15)
Valine	4.84	2.34	2.32(65)	2.31(64)	2.36(64)	2.34(64)	2.31(63)	2.33(63)
Alanine	5.16	2.64	3.08(86)	3.13(87)	3.13(85)	2.97(82)	2.94(81)	2.95(80)
Aspartic acid	8.71	4.01	4.37(122)	4.37(121)	4.43(120)	4.40(121)	4.33(119)	4.36(118)
Cysteine	0.90	0.49	0.43(12)	0.43(12)	0.44(12)	0.46(13)	0.44(12)	0.44(12)
Glutamic Acid	13.57	8.90	6.94(193)	6.95(193)	7.05(192)	6.94(191)	6.82(187)	6.84(184)
Glycine	3.88	2.71	3.84(107)	3.92(109)	3.72(101)	3.29(90)	3.17(87)	3.11(84)
Hydroxylysine	0.09	0.12	0.23(6)	0.24(7)	0.22(6)	0.20(5)	0.18(5)	0.17(5)
Proline	3.41	3.15	2.94(82)	2.81(78)	2.85(77)	2.58(71)	2.31(63)	2.28(61)
Serine	3.51	2.01	1.91(53)	1.90(53)	1.91(52)	1.88(52)	1.84(51)	1.85(50)
Taurine	0.38	0.37	0.45(13)	0.45(12)	0.45(12)	0.45(12)	0.45(12)	0.45(12)
Tyrosine	3.13	1.64	1.51(42)	1.47(41)	1.49(40)	1.57(43)	1.55(43)	1.57(42)

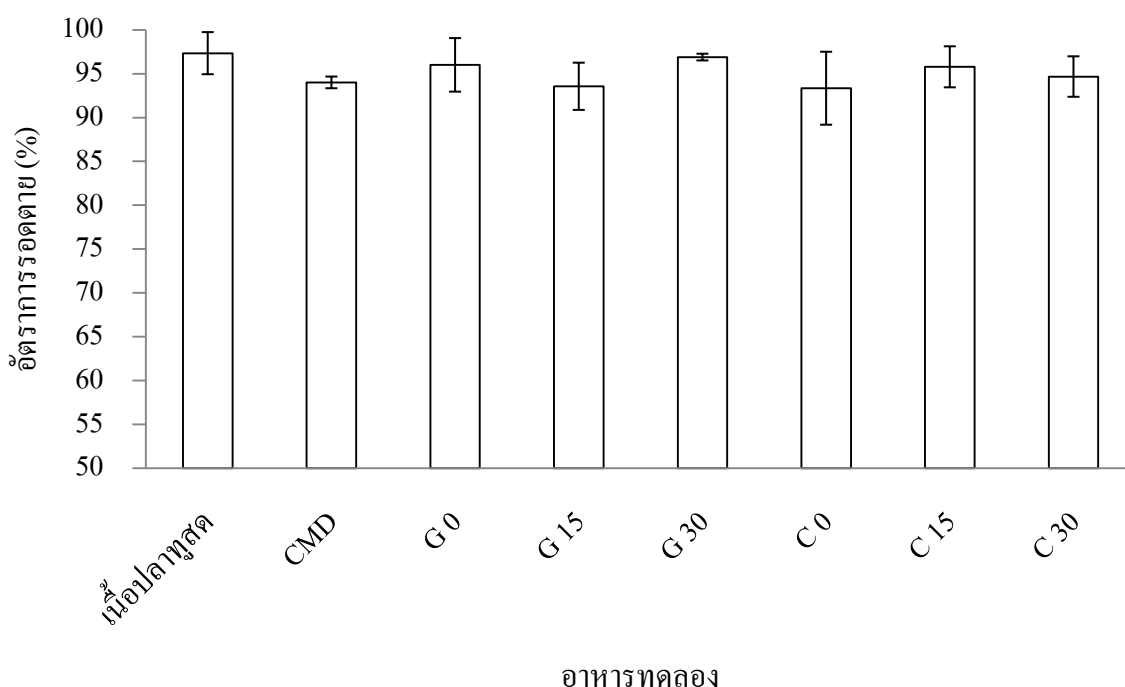
¹CMD = Commercial diet ได้รับความอนุเคราะห์จาก ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งนครศรีธรรมราช

²G = Gelatin และ C = Carrageenan และระดับโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทูแวกป่น

³Amino acid ratio

4.5.3 การยอมรับอาหาร อัตรารอดตาย และการเจริญเติบโต

ศึกษาการยอมรับอาหารในปลากะพงขาวอายุ 16 DPH ที่ได้รับอาหารเม็ดจืดที่มีสารเชื่อมประสาน 2 ชนิด คือ เจลาตินและคาราจีแนน และมีการแทนที่โปรตีนปลาปนด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุกระดับ 0, 15 และ 30 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 7 วัน พบว่า ปลากะพงขาว (อายุ 23 DPH) มีอัตราการรอดตายไม่แตกต่างกันในชุดการทดลองที่ได้รับอาหารทดลอง ซึ่งมีค่าระหว่าง 93.33-97.33 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 16) แต่ปลากะพงขาวชุดการทดลองที่ได้รับเนื้อปลาทุสด และอาหารอนุบาลปลาทะเลทางการค้าทยอยตายเป็นจำนวนมาก และตายทั้งหมดในสัปดาห์ที่ 3



ภาพที่ 16 อัตราการรอดตายของปลากะพงขาวอายุ 23 DPH ที่ได้รับเนื้อปลาทุสด อาหารอนุบาลปลาทะเลทางการค้า (Commercial diet, CMD) อาหารทดลองที่มีเจลาตินและแทนที่โปรตีนปลาปนด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุกระดับ 0, 15 และ 30 เปอร์เซ็นต์ (G0, G15 และ G30) และอาหารทดลองที่มีคาราจีแนนและแทนที่โปรตีนปลาปนด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุกระดับ 0, 15 และ 30 เปอร์เซ็นต์ (C0, C15 และ C30) เป็นเวลา 7 วัน

อัตราการรอดตายในปลากะพงขาวอายุ 44 DPH ที่ได้รับอาหารเม็ดจืดที่มีสารเชื่อมประสาน 2 ชนิด คือ เจลาตินและคาราจีแนน และมีการแทนที่โปรตีนปลาปนด้วยโปรตีนไฮโดรไล แสดงจากปลาทุแวกที่ระดับ 0, 15 และ 30 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (ตารางที่ 11) พบว่า ไม่มีผลจากอิทธิพลร่วมระหว่างชนิดของสารเชื่อมประสานและระดับของโปรตีนไฮโดรไลเสต ($P>0.05$) ซึ่งปลาที่ได้รับอาหารทดลองที่มีเจลาตินและแทนที่ด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุแวกที่ระดับต่างๆ มีแนวโน้มลดลงตามระดับการแทนที่ที่สูงขึ้น แต่ปลากลุ่มที่ได้รับอาหารทดลองที่มีคาราจีแนนและแทนที่ด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุแวกที่ระดับต่างๆ มีแนวโน้มสูงขึ้นตามระดับการแทนที่ที่สูงขึ้น

น้ำหนักสุดท้าย น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ตารางที่ 12) พบว่า ไม่มีอิทธิพลร่วมระหว่างชนิดของสารเชื่อมประสานและระดับของโปรตีนไฮโดรไลเสต ($P>0.05$) แต่ระดับของโปรตีนไฮโดรไลเสตมีผลต่อน้ำหนักสุดท้าย น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ โดยปลาที่ได้รับอาหารแทนที่โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ 0 เปอร์เซ็นต์ มีน้ำหนักสุดท้ายและน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นสูงที่สุดเท่ากับ 0.1719 ± 0.0234 และ 0.1679 ± 0.0232 กรัมต่อตัว ตามลำดับ ไม่แตกต่างกับที่ 30 เปอร์เซ็นต์ ($P>0.05$) แต่สูงกว่าที่ระดับ 15 เปอร์เซ็นต์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะในปลาที่ได้รับอาหารแทนที่โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ 30 เปอร์เซ็นต์ มีค่าสูงที่สุดเท่ากับ 13.56 ± 0.97 เปอร์เซ็นต์ต่อวัน ไม่แตกต่างกับที่ 0 เปอร์เซ็นต์ ($P>0.05$) แต่สูงกว่าที่ระดับ 15 เปอร์เซ็นต์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ตารางที่ 11 อัตรารอดตายของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารเม็ดจืดที่ใช้สารเชื่อมประสาน 2 ชนิด และแทนที่โปรตีนปลาปนด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาหูแหกที่ระดับต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (อายุ 44 DPH)

สารเชื่อมประสาน	ระดับการแทนที่ ¹ (%)	อัตราการรอดตาย ² (%)
เจลาติน	0	30.66±4.16 ³
เจลาติน	15	28.45±4.02
เจลาติน	30	26.89±4.44
คาราจีแนน	0	28.44±4.73
คาราจีแนน	15	30.00±6.36
คาราจีแนน	30	35.11±2.04
ANOVA		
สารเชื่อมประสาน		
<i>Probability level</i>		0.256
เจลาติน		28.67±3.99
คาราจีแนน		31.18±5.09
ระดับการแทนที่ (%)		
<i>Probability level</i>		0.770
0		29.55±4.17
15		29.22±4.83
30		31.00±5.46
สารเชื่อมประสาน×ระดับการแทนที่		
<i>Probability level</i>		0.166

¹ระดับโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาหูแหกปน

²อัตราการรอดตาย = (จำนวนปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (ตัว)/จำนวนปลาเมื่อเริ่มต้น (ตัว)) × 100

³ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3) ค่าเฉลี่ยในสมรภูมิที่มีตัวอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P>0.05)

ตารางที่ 12 น้ำหนักสุดท้าย น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารเม็ดจืดที่ใช้สารเชื่อมประสาน 2 ชนิด และแทนที่โปรตีนปลาป่นด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุกระดับต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์¹ (อายุ 44 DPH)

สารเชื่อม ประสาน	ระดับการแทนที่ ² (%)	น้ำหนักสุดท้าย ³ (กรัมต่อตัว)	น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น ³ (กรัมต่อตัว)	อัตราการเจริญเติบโต จำเพาะ ⁶ (%/วัน)
เจลาติน	0	0.1768±0.0112 ⁴	0.1727±0.0099	13.57±1.23
เจลาติน	15	0.1059±0.0157	0.1023±0.0162	12.10±1.15
เจลาติน	30	0.1652±0.0187	0.1621±0.0188	14.15±0.51
การจีแนน	0	0.1671±0.0343	0.1631±0.0344	13.46±1.51
การจีแนน	15	0.1029±0.0026	0.0992±0.0027	11.90±0.35
การจีแนน	30	0.1521±0.0297	0.1481±0.0297	12.97±1.02
ANOVA				
สารเชื่อมประสาน				
<i>Probability level</i>		0.414	0.400	0.333
เจลาติน		0.1493±0.0356	0.1457±0.0355	13.27±1.27
การจีแนน		0.1407±0.0369	0.1368±0.0368	12.78±1.16
ระดับการแทนที่ (%)				
<i>Probability level</i>		< 0.001	< 0.001	0.038
0		0.1719±0.0234 ^A	0.1679±0.0232 ^A	13.52±1.23 ^A
15		0.1044±0.0102 ^B	0.1008±0.0105 ^B	12.00±0.77 ^B
30		0.1587±0.0233 ^A	0.1551±0.0235 ^A	13.56±0.97 ^A
สารเชื่อมประสาน×ระดับการแทนที่				
<i>Probability level</i>		0.919	0.909	0.630

¹ปลากะพงขาวเริ่มทดลองอายุ 16 DPH มีความกว้างของปากเฉลี่ย 0.99±0.26 มม. และมีความยาวลำตัวเฉลี่ย 0.79±0.12 ซม. (n=10)

²ระดับโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุกระดับ

³น้ำหนักปลาเริ่มทดลองมีค่าในช่วง 0.0031-0.0042 กรัมต่อตัว ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติระหว่างชุดการทดลอง (P>0.05)

⁴ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3) ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีตัวอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P>0.05)

⁵น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น = นน.ปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (กรัม) - นน.ปลาเมื่อเริ่มต้นการทดลอง (กรัม)

⁶อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ = ((ln น้ำหนักสุดท้าย - ln น้ำหนักเริ่มต้น) / จำนวนวันที่เลี้ยง) × 100

4.5.4 กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหารหลัก

กิจกรรมเอนไซม์เปปซิน ทริปซิน อะไมเลส และไลเปส ของปลากะพงขาว เมื่อเริ่มต้นการทดลองอายุ 16 DPH เท่ากับ 123.37 ± 21.81 Unit/mg protein, 0.46 ± 0.24 mUnit/mg protein, 1.50 ± 0.14 Unit/mg protein และ 0.21 ± 0.04 mUnit/mg protein ตามลำดับ เมื่อปลากะพงขาวได้รับอาหารเนื้อปลาสด อาหารอนุบาลปลาทะเลทางการค้า และอาหารเม็ดจืดที่มีสารเชื่อมประสาน 2 ชนิด คือ เจลาตินและคาราจีแนน และมีการแทนที่โปรตีนปลาปนด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาแซลมอนที่ระดับ 0, 15 และ 30 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 สัปดาห์ (อายุ 23 DPH) พบมีการเพิ่มขึ้นของกิจกรรมเอนไซม์เปปซิน และทริปซิน ยกเว้นเอนไซม์อะไมเลส และไลเปสที่มีค่าลดลง (ตารางที่ 13)

ปลากะพงขาวอายุ 23 DPH ที่ได้รับอาหารเม็ดจืดที่มีสารเชื่อมประสาน 2 ชนิด คือ เจลาตินและคาราจีแนน และมีการแทนที่โปรตีนปลาปนด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาแซลมอนที่ระดับ 0, 15 และ 30 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 สัปดาห์ พบว่ากิจกรรมเอนไซม์เปปซินมีผลจากอิทธิพลร่วมระหว่างชนิดของสารเชื่อมประสานและระดับของโปรตีนไฮโดรไลเสต ($P < 0.05$) โดยปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่มีคาราจีแนนและแทนที่ปลาปนด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาแซลมอนที่ 30 เปอร์เซ็นต์ มีค่าสูงที่สุดเท่ากับ 251.83 ± 17.30 Unit/mg protein แตกต่างจากปลาในกลุ่มทดลองอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยปลาที่ได้รับอาหารที่มีเจลาตินและแทนที่ปลาปนด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาแซลมอนที่ 30 เปอร์เซ็นต์ มีค่าต่ำที่สุดเท่ากับ 159.42 ± 9.04 Unit/mg protein

กิจกรรมเอนไซม์ทริปซิน อะไมเลส และไลเปส ไม่มีผลจากอิทธิพลร่วมระหว่างชนิดของสารเชื่อมประสานและระดับของโปรตีนไฮโดรไลเสต ($P > 0.05$) โดยมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ ทริปซินอยู่ในช่วง $0.52 \pm 0.20 - 0.85 \pm 0.18$ mUnit/mg protein และกิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสอยู่ในช่วง $0.53 \pm 0.18 - 1.32 \pm 0.02$ Unit/mg protein แต่ระดับของโปรตีนไฮโดรไลเสตมีผลต่อกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส ($P < 0.05$) โดยมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ลดลงตามระดับการแทนที่ด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตที่สูงขึ้นในปลาที่ได้รับอาหารที่มีการแทนที่โปรตีนไฮโดรไลเสต 30 เปอร์เซ็นต์ มีค่าต่ำที่สุด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตารางที่ 13 กิจกรรมเอนไซม์เปปซิน ทริปซิน อะไมเลส และไลเปส ในปลากระพงขาวที่ได้รับอาหารเม็ดจืดที่ใช้สารเชื่อมประสานทั้ง 2 ชนิด และแทนที่โปรตีนปลาป่นด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสต จากปลาทูแวกที่ระดับต่างๆ เป็นเวลา 1 สัปดาห์¹ (อายุ 23 DPH)

ชุดการทดลอง	สารเชื่อม ประสาน	ระดับการ แทนที่ ⁵ (%)	Proteolytic enzyme activity		Carbohydrase	Lipase
			Pepsin	Trypsin	α -Amylase	Lipase
			(Unit/mg protein)	(mUnit/mg protein)	(Unit/mg protein)	(mUnit/mg protein)
เนื้อปลาทูแวก ²			161.75±11.03 ⁶	0.53±0.06	0.78±0.17	0.09±0.05
CMD ³			178.37±22.11	0.49±0.15	0.64±0.34	0.13±0.02
G0 ⁴	เจลาติน	0	175.63±22.77 ^b	0.58±0.14	0.53±0.18	0.12±0.04
G15	เจลาติน	15	184.55±7.88 ^b	0.52±0.20	0.86±0.73	0.07±0.02
G30	เจลาติน	30	159.42±9.04 ^b	0.85±0.18	0.99±0.43	0.07±0.02
C0	คาราจีแนน	0	182.65±6.34 ^b	0.61±0.15	0.87±0.19	0.13±0.05
C15	คาราจีแนน	15	192.72±35.27 ^b	0.61±0.15	0.76±0.42	0.12±0.01
C30	คาราจีแนน	30	251.83±17.30 ^a	0.78±0.09	1.32±0.02	0.09±0.02
ANOVA						
สารเชื่อมประสาน						
<i>Probability level</i>			0.003	0.839	0.420	0.087
เจลาติน			173.20±16.95	0.65±0.21	0.79±0.48	0.09±0.04
คาราจีแนน			203.72±36.24	0.65±0.14	0.95±0.36	0.12±0.03
ระดับการแทนที่ (%)						
<i>Probability level</i>			0.129	0.053	0.280	0.032
0			179.14±15.43	0.59±0.13	0.67±0.24	0.13±0.04 ^A
15			188.64±23.29	0.56±0.16	0.81±0.53	0.10±0.03 ^{AB}
30			196.38±51.74	0.82±0.14	1.12±0.35	0.07±0.02 ^B
สารเชื่อมประสาน×ระดับการแทนที่						
<i>Probability level</i>			0.007	0.698	0.656	0.466

¹กิจกรรมเอนไซม์เปปซิน ทริปซิน อะไมเลส และไลเปส ในปลากระพงขาวอายุ 16 DPH (เริ่มต้น) เท่ากับ 123.37±21.81 Unit/mg protein, 0.46±0.24 mUnit/mg protein, 1.50±0.14 Unit/mg protein และ 0.21±0.04 mUnit/mg protein ตามลำดับ

²เนื้อปลาทูแวกผสมวิตามินซี 1 เปอร์เซ็นต์ และปลาทดลองตายทั้งหมดในสัปดาห์ที่ 3 ของการทดลอง

³CMD = Commercial diet ได้รับความอนุเคราะห์จาก ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งนครศรีธรรมราช

⁴G = Gelatin และ C = Carrageenan และระดับโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทูแวกป่น

⁵ระดับโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทูแวกป่น

⁶ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3) ค่าเฉลี่ยในสมรรถกัที่มีตัวอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P>0.05)

สำหรับปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารทดลอง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ จนมีอายุ 44 DPH พบว่า กิจกรรมเอนไซม์เปปซิน และทริปซิน (ตารางที่ 14) มีผลจากอิทธิพลร่วมระหว่างชนิดของสารเชื่อมประสานและระดับของโปรตีนไฮโดรไลเสต ($P < 0.05$) กิจกรรมเอนไซม์เปปซินในปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่มีคาร์โบไฮเดรตและแทนที่ปลาป่นด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุแวกที่ 30 เปอร์เซ็นต์ มีค่าสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เท่ากับ 3515.52 ± 107.80 Unit/mg protein แตกต่างจากปลาที่ได้รับอาหารที่มีคาร์โบไฮเดรตและแทนที่ปลาป่นด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสต จากปลาทุแวกที่ 15 เปอร์เซ็นต์ ที่มีค่าต่ำที่สุดเท่ากับ 2215.72 ± 472.25 Unit/mg protein

กิจกรรมเอนไซม์ทริปซินในปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่มีคาร์โบไฮเดรตและไม่มีคาร์โบไฮเดรตที่ปลาป่นด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุแวก มีค่าสูงที่สุดเท่ากับ 3.89 ± 0.30 mUnit/mg protein แตกต่างจากปลาที่ได้รับอาหารที่มีเจลาตินมีการแทนที่ปลาป่นด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุแวกที่ระดับต่างๆ โดยที่ระดับ 15 เปอร์เซ็นต์ ที่มีค่าต่ำที่สุดเท่ากับ 1.09 ± 0.26 mUnit/mg protein อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส และไลเปส ไม่มีผลจากอิทธิพลร่วมระหว่างชนิดของสารเชื่อมประสานและระดับของโปรตีนไฮโดรไลเสต ($P > 0.05$) แต่ระดับของโปรตีนไฮโดรไลเสตมีผลต่อกิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส ($P < 0.05$) โดยปลาที่ได้รับอาหารที่มีการแทนที่โปรตีนไฮโดรไลเสต 30 เปอร์เซ็นต์ มีค่าต่ำที่สุด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) สำหรับกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสอยู่ในช่วง $0.26 \pm 0.033 - 0.36 \pm 0.10$ mUnit/mg protein ($P > 0.05$)

ตารางที่ 14 กิจกรรมเอนไซม์เปปซิน ทริปซิน อะไมเลส และไลเปส ในปลากระพงขาวที่ได้รับอาหารเม็ดจืดที่ใช้สารเชื่อมประสานทั้ง 2 ชนิด และแทนที่โปรตีนปลาปนด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาหูฉลามที่ระดับต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (อายุ 44 DPH)

สารเชื่อม ประสาน	ระดับการ แทนที่ ¹ (%)	Proteolytic enzyme activity		Carbohydrase	Lipase
		Pepsin (Unit/mg protein)	Trypsin (mUnit/mg protein)	α -Amylase (Unit/mg protein)	Lipase (mUnit/mg protein)
เจลาติน	0	2649.82±135.92 ^{ab2}	1.23±0.95 ^c	8.18±0.46	0.27±0.03
เจลาติน	15	2663.15±36.37 ^{ab}	1.09±0.26 ^c	8.01±1.82	0.30±0.09
เจลาติน	30	2734.55±216.35 ^{ab}	1.39±0.44 ^{bc}	5.45±1.87	0.36±0.10
คาราจีแนน	0	3009.47±625.74 ^{ab}	3.89±0.30 ^a	7.42±0.65	0.26±0.03
คาราจีแนน	15	2215.72±472.25 ^b	2.16±0.27 ^{bc}	6.61±0.43	0.32±0.08
คาราจีแนน	30	3515.52±107.80 ^a	2.58±0.34 ^{ab}	6.33±0.33	0.34±0.03
ANOVA					
สารเชื่อมประสาน					
<i>Probability level</i>		0.185	< 0.001	0.441	0.858
เจลาติน		2682.51±134.94	1.24±0.55	7.21±1.87	0.31±0.08
คาราจีแนน		2913.57±697.95	2.88±0.83	6.79±0.65	0.31±0.06
ระดับการแทนที่ (%)					
<i>Probability level</i>		0.017	0.020	0.034	0.122
0		2829.64±465.43	2.56±1.59	7.80±0.65 ^A	0.27±0.03
15		2439.43±387.03	1.63±0.63	7.31±1.41 ^{AB}	0.31±0.07
30		3125.04±454.25	1.99±0.74	5.89±1.29 ^B	0.35±0.06
สารเชื่อมประสาน×ระดับการแทนที่					
<i>Probability level</i>		0.029	0.027	0.244	0.872

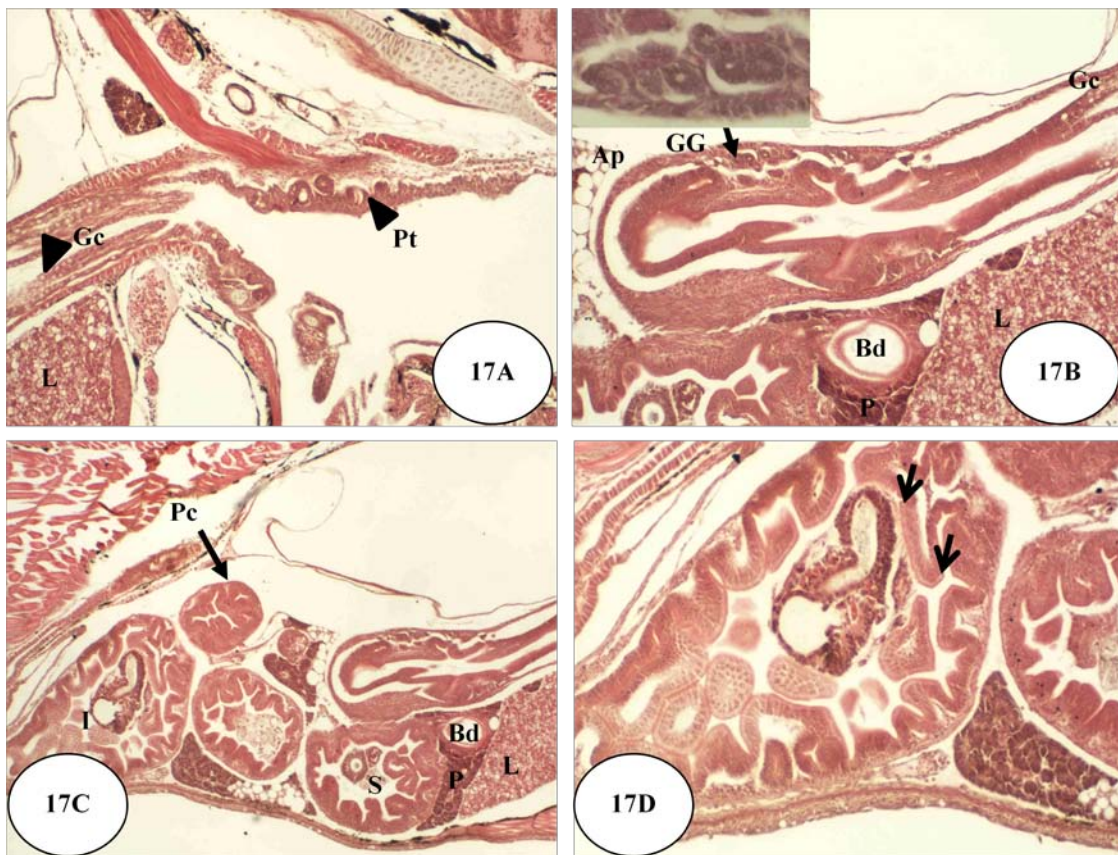
¹ระดับโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาหูฉลาม

²ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3) ค่าเฉลี่ยในสัปดาห์ที่มีตัวอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P>0.05)

4.5.5 ผลการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อระบบย่อยอาหารของปลากะพงขาว อายุ 16 DPH พบว่าปลากะพงขาวมีลักษณะภายนอกและอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับระบบย่อยอาหาร เหมือนตัวเต็มวัยแต่ยังเจริญไม่เต็มที่ โดยจะพบชั้นต่างๆ ของทางเดินอาหาร ได้แก่ ชั้นมิวโคซา ชั้นมิวโคซา ชั้นมิวโคซา และมัสคิวลาริส พัฒนาการแต่มีลักษณะค่อนข้างบาง พบพินบริเวณคอหอยโผล่ยื่นพื้นเยื่อ บุกิว Goblet cell บริเวณหลอดอาหารปริมาณมาก เริ่มพบต่อมแกสตริก บริเวณกระเพาะอาหาร ตอนต้น ในชั้นชั้นมิวโคซา โดยมีเซลล์บุกิวลักษณะเป็นแบบลูกบาศก์เรียงตัวชั้นเดียว เริ่มพบไส้ติ่ง ที่มีเซลล์บุกิวเป็นแบบทรงกระบอกเรียงตัวชั้นเดียวเหมือนกับกระเพาะอาหาร แต่ช่องว่างทางเดิน อาหารยังมีขนาดแคบ เยื่อบุกิวบริเวณกระเพาะอาหารและลำไส้มีการยกตัวของเยื่อบุกิวสูงขึ้น และ พบ Lipid vacuole ในชั้นมิวโคซาบริเวณลำไส้ (ปลายลูกศร) (ภาพที่ 17D) ตับและตับอ่อนมีขนาดใหญ่ นอกจากนี้จะพบท่อน้ำดี บริเวณตับ และเนื้อเยื่อไขมัน ที่เป็นส่วนของเนื้อเยื่ออวัยวะ ภายในช่องท้อง (ภาพที่ 17 A-D)

เมื่อสิ้นสุดการทดลองเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ไม่พบความแตกต่างของโครงสร้าง อวัยวะต่างๆ ที่เกี่ยวกับระบบย่อยอาหารของปลากะพงขาวอายุ 44 DPH ที่ได้รับอาหารทดลองที่มี สารเชื่อมประสาน 2 ชนิด คือ เจลาตินและคาร์ราจีแนน และมีการแทนที่โปรตีนปลาปนด้วยโปรตีน ไฮโดรไลเสตจากปลาทุบแช่ที่ระดับ 0, 15 และ 30 เปอร์เซ็นต์ แต่พบการเพิ่มขนาดของอวัยวะ ปริมาณและขนาดของเซลล์ในเนื้อเยื่อของระบบย่อยอาหารตามการเจริญเติบโตของปลากะพงขาว (ภาพที่ 18-20)



ภาพที่ 17 ลูกปลาเริ่มต้นการทดลอง อายุ 16 วัน หลังฟักออกเป็นตัว

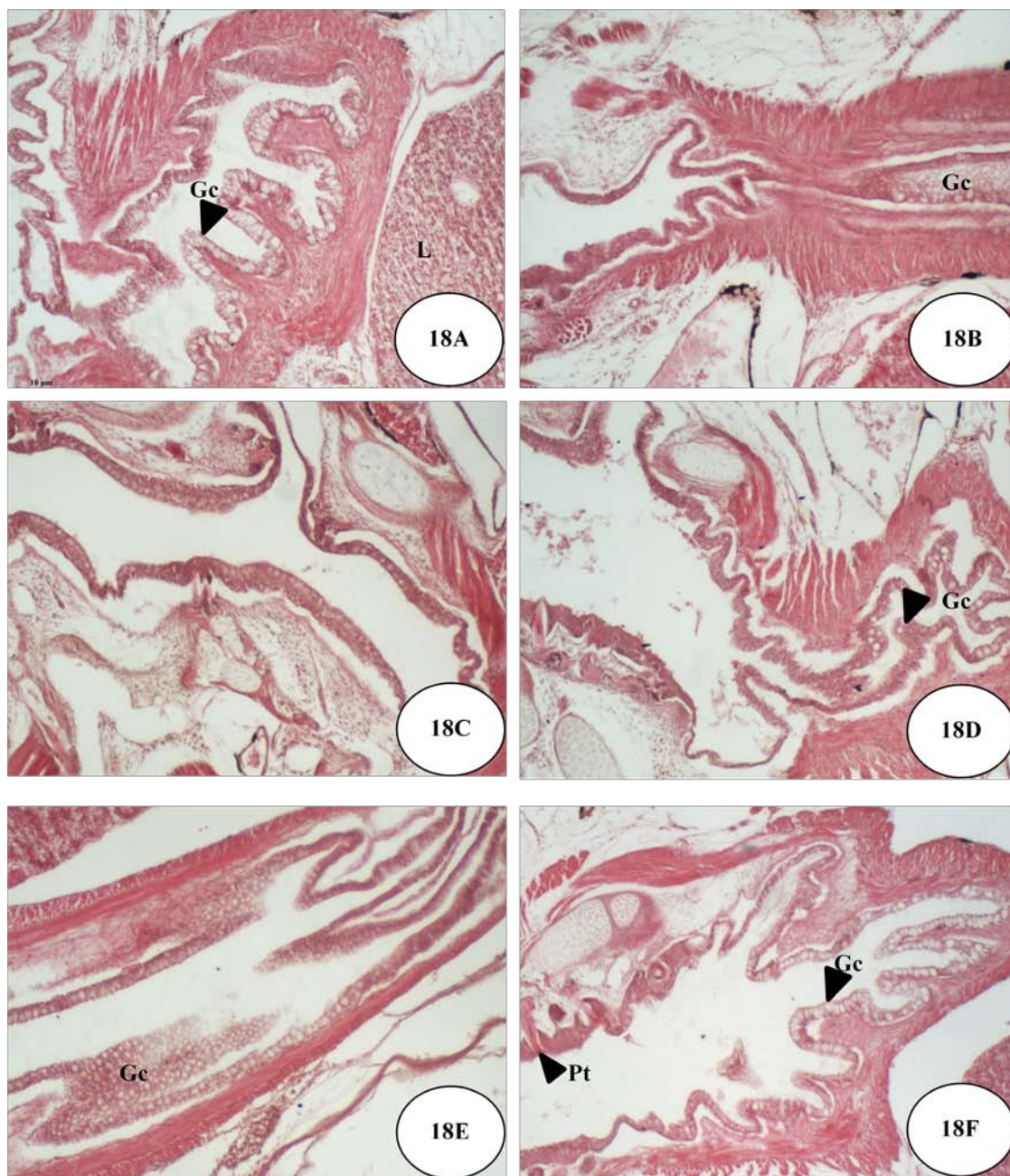
A = ช่องปากคอดหอย และหลอดอาหาร (กำลังขยาย 100x)

B = กระเพาะอาหารตอนต้น (กำลังขยาย 100x)

C = ทางเดินอาหาร (กำลังขยาย 40x)

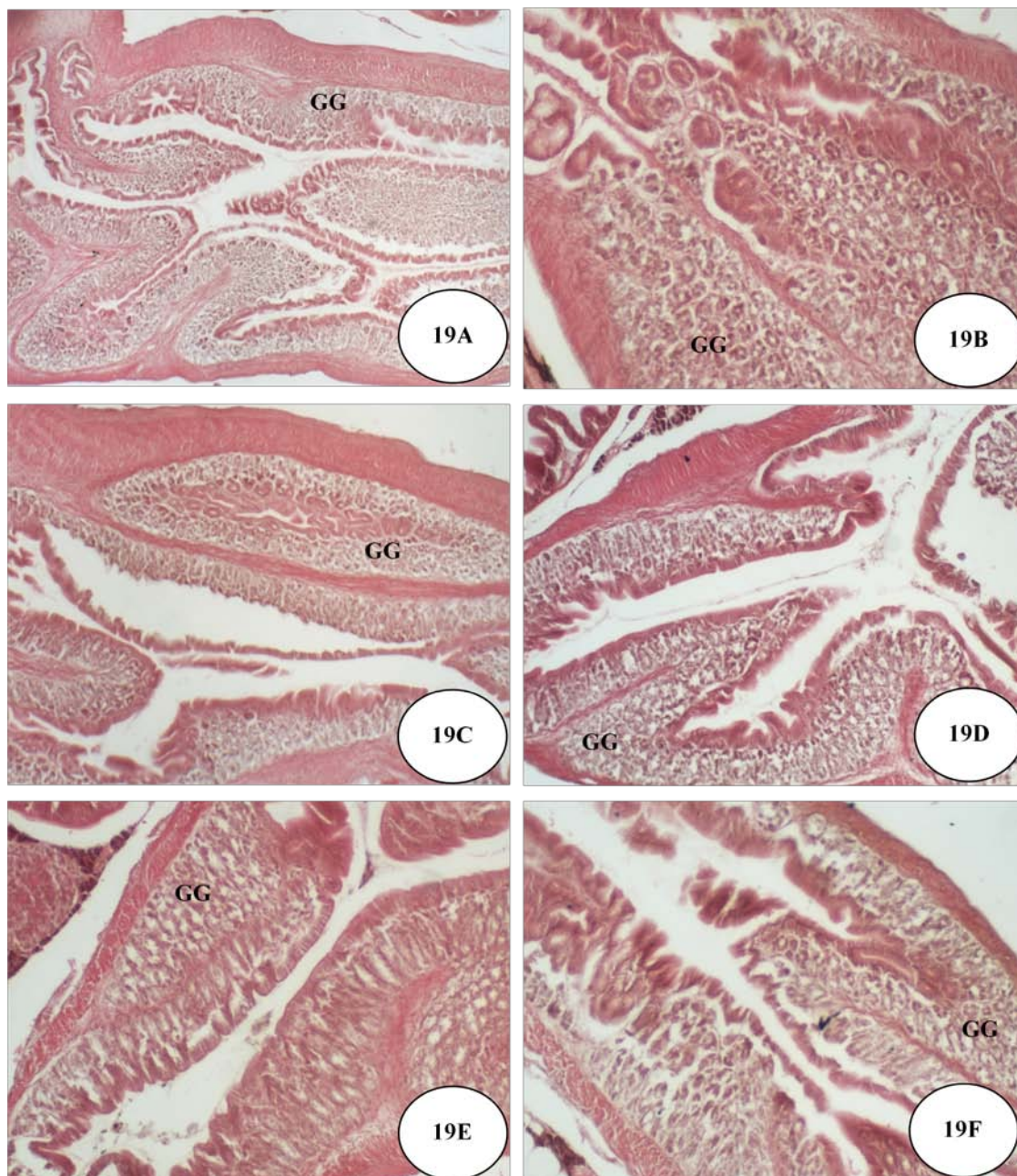
D = ลำไส้ (กำลังขยาย 100x)

Ap = Adipose tissue, Bd = Bile duct, Gc = Goblet cell, GG = Gastric gland, I = Intestine, L = Liver, P = Pancreas, Pc = Pyloric caeca, Pt = Pharyngeal teeth, S = Stomach

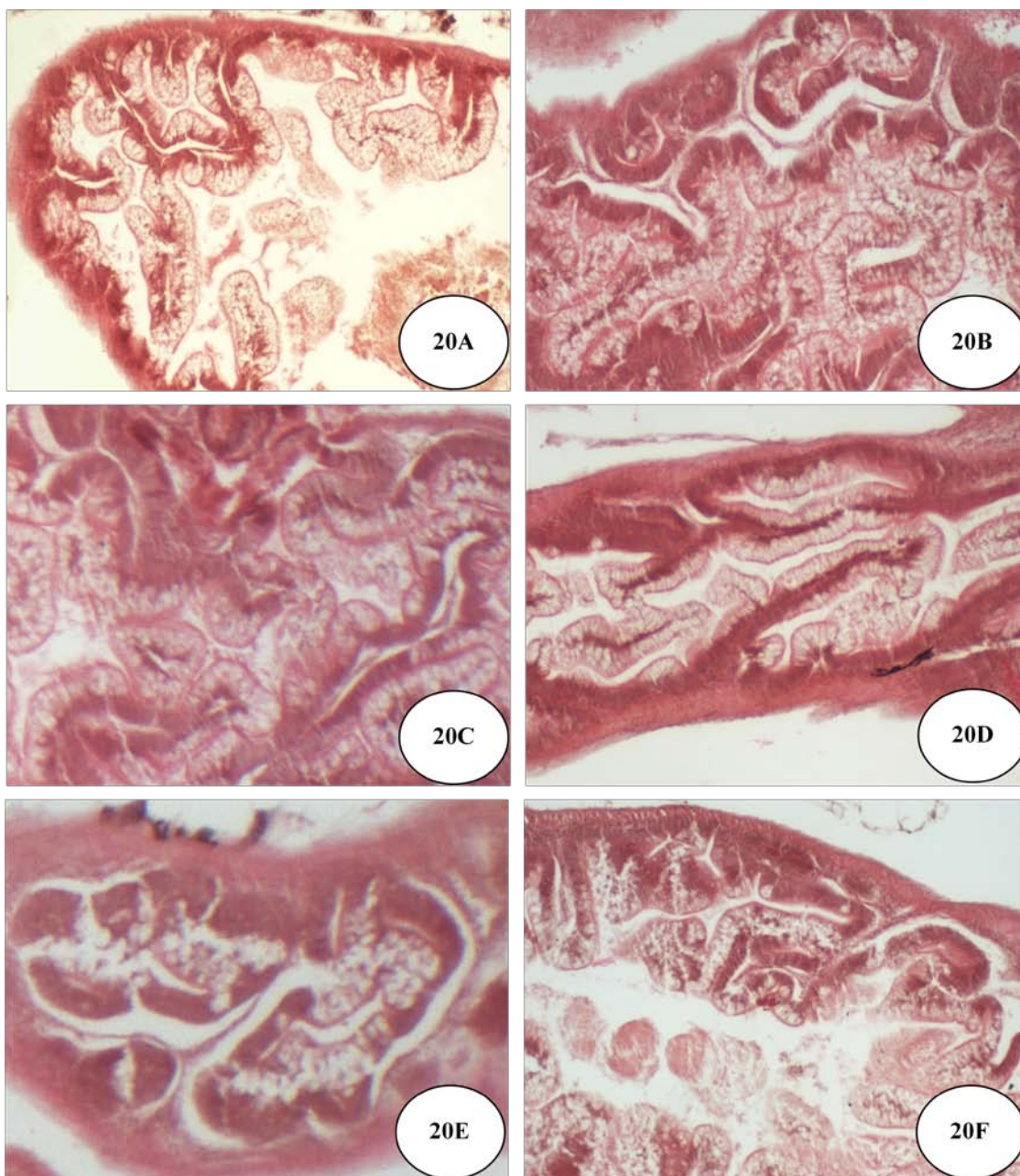


ภาพที่ 18 หลอดอาหาร ลูกปลาอายุ 44 วัน หลังฟักออกเป็นตัว ที่ได้รับอาหารเม็ดจืดที่ใช้เจลาติน (A, B และ C) (100x) และคาร์จีแนน (D, E และ F) (100x, 100x และ 40x) เป็นสารเชื่อมประสาน และแทนที่ปลาป่นด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาหูฉลามที่ระดับ 0, 15 และ 30 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Gc = Goblet cell, L = Liver, Pt = Pharyngeal teeth



ภาพที่ 19 ภาวะอาหารตอนต้น ลูกปลาอายุ 44 วัน หลังฟักออกเป็นตัว ที่ได้รับอาหารเม็ดจืดที่ใช่เจลาติน (A, B และ C) (40x, 100x และ 40x) และการาจีแนน (D, E และ F) (100x) เป็นสารเชื่อมประสานและแทนที่ปลาปนด้วยโปรตีนไฮโดรไลสได้จากปลาทุแวกที่ระดับ 0, 15 และ 30 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ
GG = Gastric gland



ภาพที่ 20 ลำไส้ ลูกปลาอายุ 44 วัน หลังฟักออกเป็นตัว ที่ได้รับอาหารเม็ดจืดที่ใช้เจลาติน (A, B และ C) (100x, 100x และ 40x) และคาราจีแนน (D, E และ F) (100x, 40x และ 100x) เป็นสารเชื่อมประสาน และแทนที่ปลาป่นด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาหมึกที่ระดับ 0, 15 และ 30 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

4.5.6 คุณภาพน้ำในตู้ทดลอง

ผลการวิเคราะห์คุณภาพน้ำตลอดการทดลอง พบว่าน้ำมีอุณหภูมิอยู่ในช่วง 26-29 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่างช่วง 6.72-7.43 ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ (Dissolved oxygen, DO) ช่วง 7.7-7.8 มก./ล. ปริมาณแอมโมเนีย (NH₃) 0.25-0.5 มก./ล. และปริมาณไนไตรท์ (NO₂) 0.05-0.1 มก./ล. ซึ่งแต่ละพารามิเตอร์อยู่ในช่วงที่เหมาะสม เนื่องจากการเปลี่ยนถ่ายน้ำทุกวัน

4.6 วิจารณ์ผลการศึกษา

จากผลการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุแวก (Round scad hydrolysate) รูปแบบแห้ง พบว่ามีปริมาณ โปรตีนเท่ากับ 81.48 ± 0.03 ไขมัน 2.78 ± 0.72 ความชื้น 8.32 ± 0.15 และเถ้า 6.98 ± 0.00 เปอร์เซ็นต์ (As-fed basis) เห็นได้ว่ามีระดับโปรตีนสูงเหมาะสมสำหรับเป็นแหล่งโปรตีนในอาหารลูกปลาวัยอ่อน สอดคล้องกับการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในโปรตีนปลาไฮโดรไลเสต (Fish protein hydrolysate) ที่ประกอบด้วยโปรตีน ไขมัน และเถ้า อยู่ในช่วง 70-90, 2-4 และ 6-7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Mackie, 1982; Liceaga-Gesualdo and Li-Chan, 1999; Dong *et al.*, 2005) แต่ให้ผลแตกต่างจากการศึกษาของ Thiansilakul (2006) ที่ศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากกล้ามเนื้อปลาทุแวก ที่มีปริมาณโปรตีน ไขมัน ความชื้น และเถ้า เท่ากับ 68.97 ± 3.57 , 0.15 ± 0.03 , 8.75 ± 0.40 และ 24.56 ± 2.56 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เนื่องจากวัตถุดิบที่นำมาใช้ในการผลิตไฮโดรไลเสตแตกต่างกัน ถึงแม้จะเป็นวัตถุดิบจากปลาชนิดเดียวกัน คือ ปลาทุแวก (*Decapterus* sp.) แต่การใช้ปลาทั้งตัว มีความครบถ้วนทางโภชนาการและมีค่าสูงกว่าการใช้เฉพาะเนื้อปลา (Fillet) เพียงอย่างเดียว หรืออาจเกิดจากการกรองส่วนของแข็งที่ไม่ละลายน้ำออก (Insoluble solid matter) จำพวกกระดูก เกล็ด ในขั้นตอนการเก็บผลผลิต สำหรับปริมาณไขมันที่สูงกว่า เนื่องจากการศึกษาที่เกี่ยวกับโปรตีนปลาไฮโดรไลเสตส่วนใหญ่ มีการกำจัดไขมันออกจากวัตถุดิบ ซึ่งมีหลายวิธี เช่น การใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ ความร้อน การใช้กรดหรือด่าง หรือการหมუნเหียงที่อุณหภูมิต่ำ 4 องศาเซลเซียส จนทำให้ไขมันแข็งและแยกชั้นกับสารละลายไฮโดรไลเสต จึงสามารถกำจัดไขมันออกได้ เนื่องจากวัตถุดิบส่วนใหญ่จะเป็นปลาทะเล หรือเศษเหลือจากอุตสาหกรรมที่มีปริมาณไขมันสูง เช่น ปลา Herring หัวกุ้งกุลาดำ เครื่องในปลา Mackerel และปลา Anchovy เป็นต้น เพราะไขมันดังกล่าวจะทำให้ไฮโดรไลเสต เกิดกลิ่นหืนและสารพิษจากปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ (ไตรตะวัน, 2542; Shahidi *et al.*, 1995; Liceaga-Gesualdo and Li-Chan, 1999; Thiansilakul, 2006)

นอกจากนั้นปริมาณเถ้าในตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ระดับ 6.98 ± 0.00 เปอร์เซ็นต์ เป็นระดับที่ต่ำกว่าที่มีการรายงานในการศึกษาของ สุภาพร (2549) Hoyle และ Merritt (1994) Shahidi และคณะ (1995) Liceaga-Gesualdo และ Li-Chan (1999) และ Thiansilakul (2006) ที่มีเถ้าอยู่ในช่วง 12.05-24.56 เปอร์เซ็นต์ อาจมีสาเหตุจากการใช้สารละลายบัฟเฟอร์ กรดหรือด่างเข้มข้นในการปรับความเป็นกรด-ด่างเพื่อให้มีความเหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ จึงเกิดเป็นสารอนินทรีย์ในปริมาณสูงขึ้นได้ แต่การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาหูแหกในการศึกษาครั้งนี้ผลิตโดยการใช้กากล้นมาซื้อเป็นตัวละลายวัตถุดิบแทนการใช้บัฟเฟอร์

ผลการศึกษาระดับการย่อยสลาย พบว่ามีค่าเท่ากับ 71.73 ± 3.97 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งค่อนข้างสูง โดยทั่วไประดับการย่อยสลายโปรตีนไฮโดรไลเสตขึ้นอยู่กับ ความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ ระยะเวลา ชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ ซึ่งความเป็นกรด-ด่างจะมีผลโดยตรงกับการทำงานของเอนไซม์ โดยพบว่า pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการย่อยสลายเปปไทด์ของเอนไซม์อัลคาเลส คือ pH 8-9.5 อุณหภูมิ 50-70 องศาเซลเซียส (Quaglia and Orban, 1990; Hoyle and Merritt, 1994; Baek and Cadwallader, 1995; Benjakul and Morrissey, 1997; Thiansilakul, 2006) ระยะเวลาในการย่อยสลายอยู่ที่ 1 ชั่วโมง และที่ pH เป็นกรดหรือ pH สูงกว่า 10 ที่อุณหภูมิสูง 80 องศาเซลเซียส จะสูญเสียสภาพธรรมชาติของเอนไซม์ส่งผลให้กิจกรรมการย่อยสลายลดลง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในครั้งนี้ที่ใช้ pH เท่ากับ 8 และย่อยสลายที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และพบว่าระดับการย่อยสลายจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วใน 10-20 นาทีแรกของการย่อยสลาย หลังจากนั้นระดับการย่อยสลายจะเพิ่มขึ้นเล็กน้อย และชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ คือ เอนไซม์อัลคาเลส ที่ 1 เปอร์เซ็นต์ (w/w) เพราะเอนไซม์อัลคาเลสจะมีคุณสมบัติในการตัดสายเปปไทด์แบบสุ่มและไม่มีความจำเพาะต่อกรดอะมิโน (Adler-Nissen, 1986) จึงทำให้สามารถย่อยสลายโปรตีนและตัดพันธะเปปไทด์ได้สูง การที่ระดับการย่อยสลายเกิดขึ้นสูงอาจเกิดจากวัตถุดิบที่นำมาใช้เป็นปลาทั้งตัวที่มีเอนไซม์อยู่ภายในด้วย จึงทำให้ในสภาพปกติวัตถุดิบมีความสามารถในการย่อยตัวเอง (Autolysis) อยู่แล้ว เมื่อนำมาผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจึงทำให้มีปริมาณเอนไซม์ที่ช่วยในการย่อยได้ดีขึ้นด้วย

องค์ประกอบของกรดอะมิโนอิสระ พบว่ามีกรดอะมิโนกรดกลูตามิกสูงที่สุดเท่ากับ 111.98 ± 5.74 มิลลิกรัมต่อกรัม รองลงมา คือ อาร์จินีน/ไกลซีน กรดแอสพาร์ติก ไลซีน และลิวซีน เท่ากับ 102.03 ± 5.80 , 78.71 ± 4.29 , 75.64 ± 2.56 และ 61.91 ± 2.88 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ และมีปริมาณกรดอะมิโนเมทไธโอนีนต่ำที่สุดเท่ากับ 8.75 ± 10.62 มิลลิกรัมต่อกรัม ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ อานัส (2551) ที่ศึกษาโปรตีนไฮโดรไลเสตจากเครื่องในรวมปลาหูแหกที่พบกรดอะมิโนกลูตามิกสูงที่สุด รองลงมาคือ โพรลีน ไกลซีน อะลานีน และไลซีน เท่ากับ 9.92, 4.79, 3.52

และ 3.13 กรัม/100 กรัม ตามลำดับ และการศึกษาของวันชัย (2545) และสุภาพร (2549) ที่พบว่า โปรตีนโครไลสได้จากเครื่องในรวมปลาทูลา ที่มีปริมาณของกรดอะมิโนกลูตามิกสูงที่สุด เท่ากับ 4.85 และ 6.16 กรัม/100 กรัม เมื่อนำไปผลิตอาหารทดลอง พบว่า องค์ประกอบของกรดอะมิโนในอาหารเม็ดจิวที่ใช้สารเชื่อมประสานทั้ง 2 ชนิด และแทนที่ปลาป่นด้วยโปรตีนไฮโดรไลสได้จากปลาทูแวกที่ระดับต่างๆ มีกรดอะมิโนชนิดกรดกลูตามิกสูงที่สุดระหว่าง 6.82-7.05 เปอร์เซ็นต์ โดยกรดอะมิโนที่จำเป็นไลซีน อาร์จินีน และฮีสติดีน สูงกว่า อาหารอนุบาลปลาทะเลทางการค้า จากการศึกษาในปลาทะเลหลายชนิด พบว่า กรดอะมิโนลิวซีน อะลานีน ฮีสติดีน และกรดกลูตามิก เป็นสารกระตุ้นการกินอาหารได้ดี นอกจากนี้กรดอะมิโนที่มีปริมาณมาก เป็นกรดอะมิโนชนิดที่ให้กลิ่นที่ดี คือ กรดกลูตามิก กรดแอสพาร์ติก ไกลซีน จึงทำให้อาหารเม็ดจิวที่ผลิตโดยใช้สารเชื่อมประสานทั้ง 2 ชนิด และแทนที่ปลาป่นด้วยโปรตีนไฮโดรไลสได้จากปลาทูแวกที่ระดับต่างๆ มีคุณสมบัติดึงดูดการกินอาหารในลูกปลาวัยอ่อนด้วย

น้ำหนักโมเลกุลของเปปไทด์ของโปรตีนไฮโดรไลสจากการผลิตครั้งนี้ ส่วนใหญ่ประกอบด้วย กรดอะมิโนอิสระ (< 200 Da) เท่ากับ 39.83 ± 6.39 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ ได/ไตรเปปไทด์ (200-500 Da) โอลิโกเปปไทด์ (500-2,500 Da) และโพลีเปปไทด์ (> 2,500 Da) เนื่องจากการผลิตใช้เอนไซม์อัลคาเลสซึ่งมีคุณสมบัติในการตัดสายเปปไทด์แบบสุ่มและไม่มี ความจำเพาะต่อกรดอะมิโน (Adler-Nissen, 1986) จึงทำให้สามารถย่อยสลายโปรตีนและตัดพันธะเปปไทด์ได้สูง จึงมีปริมาณกรดอะมิโนอิสระสูง นอกจากนี้วิธีในการเก็บผลผลิตใช้วิธีการกรองด้วยผ้าขาวซึ่งแตกต่างจากการศึกษาทั่วไป ที่จะนำสารละลายไฮโดรไลสที่หยุดปฏิกิริยาการย่อยสลายแล้ว มาหมุนเหวี่ยง และเก็บเฉพาะสารละลายส่วนบนเท่านั้น เพราะการศึกษาในครั้งนี้ นำโปรตีนไฮโดรไลสมาเป็นแหล่งโปรตีนในอาหาร จึงสามารถใช้ทั้งเปปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง และกรดอะมิโนอิสระที่มีคุณสมบัติเป็นสารดึงดูดการกินอาหาร

คุณสมบัติของอาหารสำเร็จรูปสำหรับอนุบาลปลาจะต้องมีลักษณะสำคัญ คือ รูปร่างและขนาดของอาหารต้องง่ายต่อการมองเห็นและกินของลูกปลา มีความน่ากินกระตุ้นการกินอาหารของปลา มีความคงตัวในน้ำสามารถนำส่งสารอาหารไปสู่ปลาได้ และปลาสามารถย่อยและนำสารอาหารไปใช้ได้ดี (Yufera *et al.*, 2000; Kvale *et al.*, 2006) ซึ่งการทดลองครั้งนี้ได้ผลิตอาหารสำเร็จรูปเม็ดจิว (Microbound diet) โดยใช้เจลาตินและคาราจีแนนเป็นสารเชื่อมประสาน ที่มีการแทนที่โปรตีนปลาป่นด้วยโปรตีนไฮโดรไลสได้จากปลาทูแวกที่ระดับ 0, 15 และ 30 เปอร์เซ็นต์ เม็ดอาหารมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางระหว่าง 0.5-1.0 มิลลิเมตร ซึ่งมีขนาดเหมาะสมกับขนาดปากของปลากะพงขาวอายุ 16 วัน ที่มีความกว้างของปากเฉลี่ย 0.99 ± 0.26 มม. ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับการศึกษาของ Curnow และคณะ (2006) ที่พบว่าปลากะพงขาวอายุ 18-20 วัน มีขนาด

ปากเท่ากับ 1.0-1.5 มิลลิเมตร ดังนั้นหากเม็คอาหารมีขนาดเล็กมากอาจจะทำให้ลูกปลาไม่สามารถมองเห็นและกินได้ หรือถ้ามีขนาดใหญ่เกินกว่าขนาดปากของลูกปลาอาจจะทำให้ลูกปลากินอาหารได้ยากเช่นกัน ขนาดของเม็คอาหารจึงต้องเหมาะสมกับความกว้างของปากลูกปลา โดยควรมีขนาด 25-50 เปอร์เซ็นต์ ของความกว้างปากลูกปลา (Hunter, 1984; Fernandez-Diaz *et al.*, 1994) นอกจากนี้ขั้นตอนและวิธีการผลิตอาหารเพื่อให้ได้ขนาดของเม็คอาหารตามที่ต้องการก็มีความสำคัญเช่นกัน เพราะจะทำให้ปลายอมรับเม็คอาหารที่เหมาะสมกับขนาดของปากได้ดีขึ้น โดยวิธีการสำหรับอาหารเม็คจืดที่มีสารเชื่อมประสานจะใช้วิธีกดผ่านตะแกรงที่มีขนาดตา 1 มิลลิเมตร ซึ่งจะดีกว่าการใช้ตะแกรงร้อนเพื่อแยกขนาดเม็คอาหารภายหลัง เพราะจะทำให้เม็คอาหารแตกและกร่อนมากขึ้น สำหรับความคงตัวของเม็คอาหารในน้ำของอาหารที่ใช้สารเชื่อมประสานทั้ง 2 ชนิด จะมีค่าลดลงตามระดับการแทนที่ด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาแซลมอนที่เพิ่มขึ้น โดยอาหารเม็คจืดที่มีเจลาตินเป็นสารเชื่อมประสานและแทนที่ปลาป่นด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาแซลมอนที่ 30 เปอร์เซ็นต์ มีความคงตัวต่ำที่สุดเท่ากับ 80.20 ± 7.57 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่อาหารเม็คจืดที่มีคาราจีแนนเป็นสารเชื่อมประสานและแทนที่ปลาป่นด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาแซลมอนที่ 0 เปอร์เซ็นต์ มีความคงตัวสูงที่สุดเท่ากับ 90.32 ± 2.78 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งการศึกษาการใช้คาราจีแนน และเจลาตินเป็นสารเชื่อมประสานในอาหาร และใช้ซินเคลือบอาหารพบการสูญเสียกรดอะมิโนอิสระ 81 เปอร์เซ็นต์ ภายหลังให้อาหารลูกปลาเพียง 1 นาที (Baskerville-Bridges and Kling, 2000b) แสดงให้เห็นว่าอาหารมีการละลาย (Leaching) ของกรดอะมิโนสูง ซึ่งจากผลการศึกษาจะเห็นว่า การใช้เจลาตินเป็นสารเชื่อมประสานจะมีความคงตัวต่ำกว่าการใช้คาราจีแนน เนื่องจากเจลาตินเป็นสารประเภทโปรตีนที่มีความสามารถในการละลายน้ำสูงกว่าคาราจีแนนที่จะมีความสามารถในการละลายขึ้นอยู่กับชนิดของเกลือของไอออน นอกจากนี้ความคงตัวของเม็คอาหารในน้ำยังมีค่าลดลงตามระดับการแทนที่ด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาแซลมอนที่เพิ่มขึ้น เพราะโปรตีนไฮโดรไลเสตผลิตจากการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส จนได้ปริมาณเปปไทด์เป็นกรดอะมิโนอิสระหรือเปปไทด์สายสั้นจำนวนมาก จึงมีความสามารถละลายน้ำได้ดี นอกจากการผลิตอาหารให้มีความครบถ้วนทางด้านโภชนาการ และสามารถดึงดูดการกินอาหารได้ดีแล้ว การผลิตอาหารให้มีสีส้มและการเคลื่อนไหว (การลอยตัว) คล้ายอาร์ทีเมีย จะสามารถเพิ่มปริมาณการกินอาหารให้สูงขึ้นได้ (Kolkovski *et al.*, 1997)

องค์ประกอบทางเคมีของอาหารทดลอง พบว่า อาหารอนุบาลปลาทะเลทางการค้ามีปริมาณโปรตีนสูงที่สุดเท่ากับ 52.79 ± 0.27 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างกับอาหารเม็คจืดที่ใช้สารเชื่อมประสานทั้ง 2 ชนิด และแทนที่ปลาป่นด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาแซลมอนที่ระดับต่างๆ ที่มีค่าอยู่ระหว่าง 49.01-49.78 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณไขมันในอาหารอนุบาลปลาทะเลทางการค้ามี

ปริมาณไขมันต่ำที่สุดเท่ากับ 12.52 ± 0.74 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างกับอาหารเม็ดจิวที่ใช้สารเชื่อมประสานทั้ง 2 ชนิด และแทนที่ปลาปนด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุขที่ระดับต่างๆ ที่มีค่าอยู่ระหว่าง 19.23-19.71 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องและมีค่าใกล้เคียงกับความต้องการของลูกปลาทะเลวัยอ่อนที่มีปริมาณโปรตีนในอาหารประมาณ 50-70 เปอร์เซ็นต์ เช่น อาหารลูกปลากะพงยุโรป (*Dicentrarchus labrax*) (Peres *et al.*, 1996) มีโปรตีนที่ระดับ 50 เปอร์เซ็นต์ ให้การเจริญเติบโตดีที่สุด และปริมาณไขมันประมาณไม่ต่ำกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ เช่น การศึกษาในอาหารสำหรับลูกปลา Red seabream วัยอ่อนมีระดับไขมัน 18 เปอร์เซ็นต์ของส่วนประกอบอาหาร (Salhi *et al.*, 1999) ในอาร์ทีเมียสำหรับใช้อุบาลลูกปลา Seabream และปลา Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) มีระดับไขมันสูงถึง 29-37 เปอร์เซ็นต์ (Koven *et al.*, 1992) และ 25 เปอร์เซ็นต์ (Furuita *et al.*, 1998) ตามลำดับ และในการศึกษาของ Brinkmeyer และ Holt (1995) ในลูกปลา Red drum พบว่าที่ระดับไขมัน 18 เปอร์เซ็นต์ ลูกปลาจะมีการเจริญเติบโตดีที่สุด ซึ่งองค์ประกอบทางเคมีที่นำมาอ้างอิงสำหรับผลิตอาหารสำหรับลูกปลาทะเลวัยอ่อนจะกำหนดให้มีความใกล้เคียงกับองค์ประกอบทางเคมีของอาร์ทีเมีย (Hamre, 2006)

จากการศึกษาการยอมรับอาหารในปลากะพงขาวอายุ 16 DPH ที่ได้รับอาหารเม็ดจิวที่มี เจลาตินและคาราจีแนน เป็นสารเชื่อมประสาน และมีการแทนที่โปรตีนปลาปนด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุขที่ระดับ 0, 15 และ 30 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 7 วัน พบว่าปลากะพงขาว (อายุ 23 DPH) มีอัตราการรอดตาย 93.33-97.33 เปอร์เซ็นต์ ไม่แตกต่างกันในทุกชุดการทดลอง แสดงให้เห็นว่าการให้อาหารสำเร็จรูปร่วมกับอาร์ทีเมีย ซึ่งเป็นอาหารมีชีวิต ส่งผลให้ลูกปลาสามารถกินและย่อยอาหารได้ สอดคล้องกับการศึกษาในลูกปลาวัยอ่อนหลายชนิดที่สามารถกินอาหารสำเร็จรูปได้ดีเมื่อให้ร่วมกับอาหารมีชีวิต (เจนจิตต์ และคณะ, 2546; มาวิทย์ และจิระยุทธ, 2551; Walford and Lam, 1991; Koven *et al.*, 2001; Blair *et al.*, 2003; Curnow *et al.*, 2006; Engrola *et al.*, 2009) การให้อาหารทดลองร่วมกับตัวอ่อนอาร์ทีเมีย จึงทำให้มีตัวกระตุ้นทางเคมีและการเคลื่อนไหวของอาร์ทีเมีย ช่วยดึงดูดการกินอาหารของลูกปลาให้สูงขึ้น และสามารถนำสารอาหารไปใช้ได้ดี เนื่องจากลูกปลากะพงขาวอายุ 16 DPH ที่นำมาศึกษาในครั้งนี้มีระบบย่อยอาหารสมบูรณ์ (จากผลการทดลองที่ 1) มีกิจกรรมเอนไซม์ย่อยอาหารหลัก ได้แก่ เอนไซม์เปปซิน ทริปซิน อะไมเลส และไลเปส ครบถ้วน สอดคล้องกับการพบอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับระบบย่อยอาหารต่างๆ ครบถ้วน นอกจากนี้อาหารทดลองเม็ดจิวที่ผลิตขึ้นเอง มีปริมาณโปรตีนต่ำกว่าอาหารอนุบาลปลาทะเลทางการค้า แต่ลูกปลาสามารถยอมรับอาหารได้ดี เพราะการผลิตใช้แหล่งวัตถุดิบโปรตีนที่มีคุณภาพดี ได้แก่ ปลาปน และหมึกปน ที่มีปริมาณโปรตีนสูงเท่ากับ 69.81 ± 0.11 และ 62.54 ± 0.39 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 5) และมีการแทนที่ด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุขที่เป็น

แหล่งโปรตีนคุณภาพดีที่มีปริมาณโปรตีนสูงเท่ากับ 81.48 ± 0.03 เปอร์เซ็นต์ และอาหารทดลองมีปริมาณกรดอะมิโนจำเป็น ได้แก่ อาร์จินีน ฮีสติดีน ไลซีน เมทไธโอนีน และทรีโอนีน และกรดอะมิโนไม่จำเป็น ได้แก่ อะลานีน กรดแอสพาร์ติก ไกลซีน ไฮดรอกซีไลซีน และทอรีน สูงกว่าอาหารอนุบาลทางการค้า ซึ่งเป็นสารตั้งคูดการกินอาหารและมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตสำหรับลูกปลา จึงทำให้ลูกปลากินอาหารและนำสารอาหารไปใช้ในการเจริญเติบโตได้ดีขึ้น

ระหว่างการเลี้ยงตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 พบว่าปลาอะพงขาวชุดการทดลองที่ได้รับเนื้อปลาทุสดและอาหารอนุบาลปลาทะเลทางการค้าทยอยตายเป็นจำนวนมาก และตายทั้งหมดในสัปดาห์ที่ 3 ให้ผลแตกต่างจากการศึกษาของ จุฑารัตน์ และคณะ (2556) ที่ศึกษาผลของรูปแบบอาหารสำเร็จรูปในปลาอะพงขาวอายุ 20 วัน (น้ำหนักเริ่มต้น 0.07 ± 0.01 กรัมต่อตัว) ซึ่งเป็นช่วงอายุที่มีระบบย่อยอาหารสมบูรณ์แล้ว โดยมีการนำเนื้อปลาทุสดและอาหารอนุบาลปลาทะเลทางการค้ามาเป็นอาหารชุดควบคุมและอ้างอิง เมื่อสิ้นสุดการศึกษาปลาอะพงขาวมีอัตราการรอดตายเท่ากับ 2.00 ± 0.00 และ 20.00 ± 5.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อพิจารณาน้ำหนักปลาอะพงขาวพบว่า ในการศึกษาครั้งนี้มีน้ำหนักเฉลี่ยเท่ากับ 0.01 ± 0.01 กรัมต่อตัว ซึ่งต่ำกว่าจึงอาจมีผลทำให้ความสามารถในการยอมรับอาหารแตกต่างกัน สำหรับพฤติกรรมการกินอาหาร พบว่า ปลาทั้ง 2 ชุดการทดลองนี้ จะว่ายน้ำตามอาหารลงไปในพื้นที่ทดลอง และว่ายน้ำวนเวียนใกล้อาหารในช่วงระยะเวลาสั้นๆ หลังจากนั้นจึงว่ายน้ำกลับไปยังบริเวณผิวน้ำเช่นเดิม ลูกปลาอาจจะต้องได้รับการกระตุ้นจากคุณสมบัติของอาหาร ทั้งทางเคมี และการมองเห็นมากกว่านี้ จึงจะทำให้การกินอาหารเพิ่มขึ้น (Kolkovski *et al.*, 1997) นอกจากนี้ อาจเกิดจากลักษณะเนื้อ (Texture) ของเม็ดอาหาร ที่มีความเหนียวหรือ แข็งเกินไปสำหรับลูกปลาอายุ 16 DPH

เมื่อเลี้ยงลูกปลาคั้วอาหารทดลองต่อเนื่องเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า อัตราการรอดตายของลูกปลาอะพงขาว มีแนวโน้มสูงขึ้นตามระดับการแทนที่ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในลูกปลาวัยอ่อนหลายชนิด พบว่า การใช้โปรตีนไฮโดรไลเสตเป็นแหล่งโปรตีนในอาหารลูกปลาในระดับไม่เกิน 50 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้อัตราการรอดตายและการเจริญเติบโตดีขึ้น เช่น การศึกษาของ Zambonino-Infante และคณะ (1997) และ Cahu และคณะ (1998) พบว่าการใช้โปรตีนไฮโดรไลเสตในอาหารสำหรับอนุบาลลูกปลาอะพงยุโรป (*Dicentrarchus labrax*) ที่ระดับ 20 และ 40 เปอร์เซ็นต์โปรตีน ตามลำดับ มีผลเพิ่มอัตราการรอดตายและการเจริญเติบโต และการศึกษาของ Kotzamanis และคณะ (2007) พบว่าการใช้โปรตีนไฮโดรไลเสตในอาหารสำหรับอนุบาลลูกปลาอะพงยุโรป ที่ระดับ 10 เปอร์เซ็นต์ในอาหาร มีผลเพิ่มอัตราการรอดตายและการเจริญเติบโตเช่นกัน เนื่องจากปลามีการพัฒนาระบบย่อยอาหารสมบูรณ์แล้ว และโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุสดที่นำมาใช้ เป็นโปรตีนจากปลาทั้งตัวที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส ที่มีปริมาณกรดอะมิโน

อิสระสูง เป็นสารตั้งต้นการกินอาหาร จึงทำให้อาหารมีความน่ากินมากขึ้น และอาจมีผลเพิ่มการย่อยและดูดซึมสารอาหารในทางเดินอาหารลูกปลาวัยอ่อนได้ดีขึ้น (Carvalho *et al.*, 1997; Zambonino-Infante *et al.*, 1997; Cahu *et al.*, 1999; Kolkovski and Tandler, 2000) ซึ่งสอดคล้องกับการเจริญเติบโตของลูกปลากะพงขาวที่ดีขึ้น พบว่าระดับของโปรตีนไฮโดรไลเสตมีผลต่อน้ำหนักสุดท้าย น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ โดยปลาที่ได้รับอาหารที่ไม่มีการแทนที่โปรตีนไฮโดรไลเสต มีน้ำหนักสุดท้ายและน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นสูงที่สุดเท่ากับ 0.1719 ± 0.0234 และ 0.1679 ± 0.0232 กรัมต่อตัว ตามลำดับ ไม่แตกต่างกับที่ 30 เปอร์เซ็นต์ ($P > 0.05$) แต่สูงกว่าที่ระดับ 15 เปอร์เซ็นต์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะในปลาที่ได้รับอาหารแทนที่โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ 30 เปอร์เซ็นต์ มีค่าสูงที่สุดเท่ากับ 13.56 ± 0.97 เปอร์เซ็นต์ต่อวัน ไม่แตกต่างกับที่ 0 เปอร์เซ็นต์ ($P > 0.05$) แต่สูงกว่าที่ระดับ 15 เปอร์เซ็นต์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เนื่องจากวัตถุดิบปลาป่นที่นำมาใช้ผลิตอาหารมีคุณภาพดี คือ มีปริมาณโปรตีน และไขมันสูง เท่ากับ 69.81 ± 0.11 และ 9.32 ± 0.45 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 5) จึงทำให้อาหารมีกลิ่นและความน่ากินสูง และมีความคงตัวของเม็ดอาหารที่ดีกว่าอาหารที่มีโปรตีนไฮโดรไลเสต ซึ่งมีความคงตัวของเม็ดอาหารในน้ำ ลดลงตามระดับการแทนที่ที่สูงขึ้น อาจมีสาเหตุจากโปรตีนและกรดอะมิโนที่จำเป็นละลายน้ำเร็ว ทำให้อาหารลูกปลากะพงขาวไม่สามารถนำสารอาหารไปใช้ในการเจริญเติบโตได้ ส่งผลให้ลูกปลาที่ได้รับอาหารที่ไม่มีการแทนที่ด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุแวก มีการเจริญเติบโตสูงที่สุด นอกจากนี้จะเห็นว่าลูกปลาที่ได้รับอาหารที่มีโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุแวกที่ 15 เปอร์เซ็นต์ มีการเจริญเติบโตต่ำแตกต่างออกไป อาจเกิดจากการเป็นปฏิปักษ์ของกรดอะมิโนชนิดจำเป็น (Antagonism) ในอาหาร เนื่องจากกรดอะมิโนจำเป็นและไม่จำเป็นบางชนิดมีผลต่อความต้องการกรดอะมิโนจำเป็นที่มีโครงสร้างทางเคมีที่คล้ายคลึงกัน และมีบทบาทในกระบวนการเมแทบอลิซึมในแง่ของการยับยั้งและแข่งขันกันทำปฏิกิริยา (Asgard and Austreng, 1986) และอาจมีผลต่อการเจริญเติบโตของสัตว์ลดลง ซึ่งจากสัดส่วนของกรดอะมิโนจำเป็นในอาหารทดลอง (ตารางที่ 10) พบว่า เมทไธโอนีนมีสัดส่วนที่ต่ำ จึงอาจทำให้ไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตของปลา เพราะในกระบวนการสังเคราะห์กรดอะมิโนซิสทีนจะใช้เมทไธโอนีนเป็นสารประกอบตั้งต้น ดังนั้นหากปลาได้รับอาหารที่มีซิสทีนในปริมาณน้อย เมทไธโอนีนส่วนหนึ่งจะถูกนำไปใช้ในการสังเคราะห์ซิสทีนเพื่อให้เพียงพอในการสังเคราะห์โปรตีน (ชุตินา และคณะ, 2545) นอกจากนี้อาจมีสาเหตุจากพฤติกรรมของปลากะพงขาวที่เป็นปลากินเนื้อ คือ หากลูกปลามีขนาดแตกต่างกันมากและอยู่ในช่วงการปรับเปลี่ยนอาหารจะมีอัตราการกินกันเองสูง อาจมีการเจริญเติบโตที่มาจากอาหารกินลูกปลากันเองด้วย จึงทำให้มีการเจริญเติบโตแตกต่างกัน ดังนั้นการเลี้ยงและอนุบาลปลากะพงขาวจึงต้องคำนึงถึง

วิธีการให้อาหาร คือ ความถี่ คุณภาพและปริมาณ ขนาด และการกระจายของอาหารจะต้องเหมาะสมและเพียงพอต่อการกินของปลา (Katavic *et al.*, 1989) จึงจะสามารถลดอัตราการกินกันเอง และอัตราการตายของลูกปลาได้

กิจกรรมเอนไซม์เปปซิน ทริปซิน อะไมเลส และไลเปส ในปลากระพงขาวอายุ 16 DPH เมื่อเริ่มต้นการทดลอง เท่ากับ 123.37 ± 21.81 Unit/mg protein, 0.46 ± 0.24 mUnit/mg protein, 1.50 ± 0.14 Unit/mg protein และ 0.21 ± 0.04 mUnit/mg protein ตามลำดับ โดยเอนไซม์เปปซิน และ ทริปซิน มีกิจกรรมเพิ่มขึ้น ขณะที่เอนไซม์อะไมเลส และไลเปส ลดลง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อวิทยาของระบบย่อยอาหารที่พบการเจริญของอวัยวะที่เกี่ยวข้องต่างๆ ครบถ้วน และมีการเพิ่มขนาดของอวัยวะ ปริมาณและขนาดของเซลล์ในเนื้อเยื่อของระบบย่อยอาหารตามการเจริญเติบโตของปลากระพงขาว เนื่องจากช่วงแรกที่ศึกษาการยอมรับอาหาร เมื่อลูกปลากินอาหารทดลองร่วมกับอาร์ทีเมียที่มีเอนไซม์ย่อยโปรตีนด้วย จึงมีผลช่วยกระตุ้นการกินอาหาร กระตุ้นการหลั่งเอนไซม์โปรติเอส และชักนำให้เซลล์และเนื้อเยื่อมีการพัฒนาเพื่อหลั่งเอนไซม์และย่อยอาหารได้ดีขึ้น (Person-Le Ruyet *et al.*, 1993; Kolkovski *et al.*, 1997; Lazo *et al.*, 2000; Engrola *et al.*, 2009) และสูงขึ้นตามการเจริญเติบโตของปลากระพงขาว ซึ่งการผลิตเอนไซม์ย่อยอาหารจะสอดคล้องการเกิดอวัยวะต่างๆ ที่เกี่ยวกับระบบย่อยอาหาร คือ เอนไซม์เปปซินผลิตจากกระเพาะอาหาร เอนไซม์อะไมเลส ไลเปส และทริปซินผลิตจากตับอ่อน (การุณ และ อุทัยวรรณ, 2555)

เมื่อปลากระพงขาวอายุ 44 DPH พบว่ากิจกรรมเอนไซม์เปปซิน และทริปซินมีผลจากอิทธิพลร่วมระหว่างชนิดของสารเชื่อมประสานและระดับของโปรตีนไฮโดรไลเซต ($P < 0.05$) โดยกิจกรรมเอนไซม์เปปซินในปลากระพงขาวที่ได้รับอาหารที่มีคาร์โบไฮเดรตและแทนที่ปลาป่นด้วยโปรตีนไฮโดรไลเซต จากปลาทุแวกที่ 30 เปอร์เซ็นต์ มีระดับสูงที่สุดเท่ากับ 3515.52 ± 107.80 Unit/mg protein ($P < 0.05$) และกิจกรรมเอนไซม์ทริปซินในปลากระพงขาวที่ได้รับอาหารที่มีคาร์โบไฮเดรตและไม่มีแทนที่ปลาป่นด้วยโปรตีนไฮโดรไลเซตจากปลาทุแวก มีค่าสูงที่สุดเท่ากับ 3.89 ± 0.30 mUnit/mg protein แตกต่างจากปลาที่ได้รับอาหารที่มีเจลาตินมีการแทนที่ปลาป่นด้วยโปรตีนไฮโดรไลเซตจากปลาทุแวกที่ระดับต่างๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) จากผลของชนิดของสารเชื่อมประสานที่พบว่าปลาที่ได้รับอาหารที่ใช้คาร์โบไฮเดรตมีกิจกรรมเอนไซม์ย่อยโปรตีนสูง สอดคล้องกับการศึกษาของ Partridge และ Southgate (1999) ที่ใช้เจลาติน คาร์โบไฮเดรตและสารอื่นๆ เป็นสารเชื่อมประสานในอาหารปลากระพง พบว่าปลามีประสิทธิภาพการย่อยและดูดซึมอาหารที่มีคาร์โบไฮเดรตที่มีค่าเท่ากับ 2.19 ± 0.29 $\mu\text{g}/\text{mg}/\text{h}$ สูงกว่า เจลาตินที่มีค่าเท่ากับ 1.60 ± 0.22 $\mu\text{g}/\text{mg}/\text{h}$ แต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อพิจารณาระดับการแทนที่ปลาป่นด้วย

โปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทูแวก พบว่ามีกิจกรรมเอนไซม์เปปซิน และทริปซินมีแนวโน้มสูงขึ้นตามระดับการแทนที่ที่สูงขึ้น สอดคล้องกับการศึกษาในลูกปลาวัยอ่อนหลายชนิดที่ พบว่าการใช้โปรตีนไฮโดรไลเสตหรือการเสริมเอนไซม์ลงในอาหารลูกปลาวัยอ่อน จะมีผลเพิ่มการย่อยและดูดซึมสารอาหารในระบบย่อยอาหาร (Carvalho *et al.*, 1997; Zambonino-Infante *et al.*, 1997; Cahu *et al.*, 1999; Kolkovski and Tandler, 2000) อาจทำให้กิจกรรมเอนไซม์เพิ่มขึ้น

สำหรับราคาของสารเชื่อมประสานทั้ง 2 ชนิด ที่ใช้ในอาหาร พบว่าการใช้เจลาติน และคาราจีแนน มีราคาเท่ากับ 11.40 และ 51.0 บาทต่อกิโลกรัมอาหาร ตามลำดับ ซึ่งเจลาตินมีราคาต่ำกว่าคาราจีแนนประมาณ 5 เท่า (ตารางที่ จ.1) นอกจากนี้เมื่อพิจารณาปริมาณการใช้วัตถุดิบแหล่งโปรตีนจากตารางที่ 6 พบว่า ในสูตรอาหารที่ใช้เจลาตินเป็นสารเชื่อมประสาน จะใช้ปริมาณต่ำกว่าสูตรที่ใช้คาราจีแนน เพราะเจลาตินมีโปรตีนสูงเท่ากับ 96.16 ± 0.19 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 5) เพื่อให้สูตรอาหารทุกสูตรมีปริมาณ โปรตีนใกล้เคียงกัน จึงต้องลดปริมาณวัตถุดิบโปรตีนลง ส่งผลให้ราคาต้นทุนในการผลิตอาหารสูตรที่ใช้เจลาตินมีราคาต่ำกว่า

4.7 สรุปผลการศึกษา

ปลากระพงขาวอายุ 16 วัน หลังฟักออกเป็นตัว ที่มีระบบย่อยอาหารสมบูรณ์ สามารถยอมรับอาหารเม็ดจืดที่มีการแทนที่โปรตีนปลาปนด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทูแวกที่ระดับ 0, 15 และ 30 เปอร์เซ็นต์ และใช้สารเชื่อมประสาน 2 ชนิด คือ เจลาตินและคาราจีแนน และพบว่าสามารถใช้เจลาตินเป็นสารเชื่อมประสาน และมีการแทนที่โปรตีนปลาปนด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทูแวกในอาหารได้ถึงระดับ 30 เปอร์เซ็นต์ โดยปลาไม่อัตราการรอดตาย การเจริญเติบโต และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีน ไม่แตกต่างจากชุดควบคุม แต่มีแนวโน้มสูงกว่า นอกจากนี้ยังมีต้นทุนของสารเชื่อมประสานในการผลิตอาหารต่ำกว่า

บทที่ 5

สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาพัฒนาการทางเนื้อเยื่อวิทยาของระบบย่อยอาหารในปลากะพงขาว วัยอ่อน อายุแรกฟักออกเป็นตัว จนถึงอายุ 30 วัน ในการทดลองที่ 1 พบว่าปลากะพงขาวอายุ 17 วัน หลังฟักออกเป็นตัว มีความยาวเฉลี่ยเท่ากับ 0.59 ± 0.47 เซนติเมตร และน้ำหนัก 0.0080 ± 0.54 กรัมต่อตัว มีระบบย่อยอาหารสมบูรณ์ เนื่องจากลูกปลามีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ในช่วงอายุ 15-30 DPH แสดงให้เห็นว่าลูกปลาสามารถย่อยและดูดซึมสารอาหารไปใช้ในการเจริญเติบโตได้ดี และสอดคล้องกับผลการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาที่พบอวัยวะต่างๆ ในระบบย่อยอาหารพัฒนาทั้งด้านโครงสร้าง ขนาดและปริมาณของเซลล์ จนกระทั่งสามารถแบ่งชั้นต่างๆ ของทางเดินอาหารได้ชัดเจน และพบต่อมแกสตริกบริเวณกระเพาะอาหารตอนต้น ซึ่งเป็นลักษณะบ่งชี้ถึงการเจริญเป็นปลาระยะวัยรุ่น

จากนั้นจึงนำข้อมูลมาศึกษาต่อเนื่องในการทดลองที่ 2 โดยนำลูกปลากะพงขาว อายุ 16 DPH มาศึกษาผลของชนิดสารเชื่อมประสานและระดับโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุแวก ต่ออัตราการรอดตาย การเจริญเติบโต กิจกรรมเอนไซม์ย่อยอาหารหลัก และการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อวิทยา พบว่าลูกปลามีอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับระบบย่อยอาหารต่างๆ ครบถ้วน มีความยาวเฉลี่ยเท่ากับ 0.79 ± 0.12 เซนติเมตร น้ำหนักอยู่ในช่วง $0.0031-0.0042$ กรัมต่อตัว และพบกิจกรรมเอนไซม์ย่อยอาหารหลัก ได้แก่ เอนไซม์เปปซิน ทริปซิน อะไมเลส และไลเปส เมื่อเริ่มต้นการทดลอง เท่ากับ 123.37 ± 21.81 Unit/mg protein, 0.46 ± 0.24 mUnit/mg protein, 1.50 ± 0.14 Unit/mg protein และ 0.21 ± 0.04 mUnit/mg protein ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาการเจริญเติบโตของลูกปลาอายุ 17 DPH ในการทดลองที่ 1 จะมีความยาวลำตัวต่ำกว่า แต่มีน้ำหนักสูงกว่า ลูกปลาอายุ 16 DPH ในการทดลองที่ 2 อาจมีสาเหตุจากในการทดลองที่ 2 จะต้องขนส่งลูกปลากะพงขาวตั้งแต่อายุ 9 DPH จากจังหวัดสตูล เพื่อนำมาอนุบาลต่อ จึงอาจทำให้การเจริญเติบโตหยุดชะงักไป แต่เมื่อนำมาอนุบาลพบว่าลูกปลาก็มีการเจริญเติบโตปกติ นอกจากนี้สาเหตุที่ทำให้ลูกปลาที่มีความยาวและน้ำหนักแตกต่างกัน ยังอาจเกิดจากปัจจัยที่เกี่ยวกับสุขภาพและคุณภาพเซลล์สืบพันธุ์ของพ่อแม่พันธุ์ปลา สภาพแวดล้อม (อุณหภูมิและคุณภาพน้ำ) ในการฟักไข่ วิธีการที่เหมาะสมในการให้อาหาร และปัจจัยเสี่ยงที่มีผลต่ออัตราการรอดตาย การเจริญเติบโต (Gisbert *et al.*, 2008; Zambonino-Infante *et al.*, 2008)

การเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อวิทยาที่เกี่ยวข้องกับระบบย่อยอาหาร พบว่ามีความสมบูรณ์ในอายุที่แตกต่างกัน 1 วัน เนื่องจากการเก็บตัวอย่างในการทดลองที่ 1 มีการเว้นช่วงที่อายุ 16 DPH ซึ่งลูกปลาอาจจะมีความสมบูรณ์แล้วเช่นกัน แต่เมื่อศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เปปซินที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของต่อมแกสตริกที่เป็นอวัยวะ และลักษณะบ่งชี้ถึงการเจริญเป็นปลาระยะวัยรุ่น ที่มีลักษณะของอวัยวะและการทำงานเหมือนปลาตัวเต็มวัย บ่งบอกว่ามีระบบย่อยอาหารสมบูรณ์แล้วในการทดลองที่ 2 การพบเนื้อเยื่อต่อมแกสตริกจะสอดคล้องกับการพบกิจกรรมเอนไซม์เปปซิน ซึ่งในปลาหลายชนิดมีการศึกษาด้วยเทคนิคทางชีวเคมีควบคู่ไปด้วย เนื่องจากต่อมแกสตริกจะประกอบด้วยเซลล์ที่สำคัญ 2 ชนิด ที่มีผลให้กระเพาะอาหารทำหน้าที่สมบูรณ์ คือ Parietal cell เป็นเซลล์ทำหน้าที่สร้างกรดเกลือเพื่อทำให้ Chief cell ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น Protein-secreting cell ภายในมีเอนไซม์ที่ยังทำงานไม่ได้ คือ เปปซิโนเจน เมื่อหลั่งออกมาในกระเพาะอาหารที่มีสภาพเป็นกรด จึงถูกเปลี่ยนเป็นเอนไซม์เปปซิน ที่ทำหน้าที่ได้และใช้ในการย่อยโปรตีนให้มีโมเลกุลเล็กลง (ปิยธำรงรัตน์, 2546) จึงสามารถวัดกิจกรรมเอนไซม์เปปซินดังกล่าวควบคู่กันเพื่อเป็นการยืนยันได้เช่นกัน นอกจากนี้ยังพบกิจกรรมเอนไซม์ทริปซิน อะไมเลส และไลเปส ซึ่งการตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์แต่ละตัว เป็นการแสดงการเกิดของอวัยวะในระบบย่อยอาหารเช่นเดียวกัน โดยเอนไซม์ทริปซิน ไลเปส และอะไมเลส จะผลิตจากตับอ่อน ซึ่งตับอ่อนจะพบตั้งแต่ลูกปลาฟักออกเป็นตัวและถุงไข่แดงเริ่มยุบ ซึ่งจะทำหน้าที่สร้างเอนไซม์ ตั้งแต่ลูกปลามีอายุ 1 วัน หลังฟักออกเป็นตัว (วันเพ็ญ และนนุช, 2530; นันทนา, 2531; สุปราณี และคณะ, 2536; Cousin and Baudin-Laurencin, 1985; Govoni *et al.*, 1986; Boulhic and Gabaudan, 1992; Sarasquete *et al.*, 1995; Falk-Peterson and Hansen, 2001; Kolkovski, 2001; Chen *et al.*, 2006) ดังนั้นลูกปลาที่นำมาใช้ศึกษาในการทดลองที่ 2 มีระบบย่อยอาหารเจริญทั้งทางด้านโครงสร้างและหน้าที่ เพราะตรวจพบต่อมแกสตริกบริเวณกระเพาะอาหารด้วยเทคนิคทางเนื้อเยื่อวิทยา และตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหารหลักครบถ้วนเป็นการยืนยัน จึงทำให้ลูกปลากะพงขาวอายุ 16 DPH มีความพร้อมในการใช้อาหารสำเร็จรูปที่ผลิตขึ้น โดยวิธีการให้อาหารสำเร็จรูปร่วมกับอาร์ทีเมีย

สรุปผลการศึกษา

1. ปลากะพงขาวอายุ 16-17 วัน หลังฟักออกเป็นตัว มีระบบย่อยอาหารสมบูรณ์ เนื่องจากพบต่อมแกสตริก บริเวณกระเพาะอาหารตอนต้น ซึ่งเป็นลักษณะบ่งชี้ถึงการเจริญเป็นปลาระยะวัยรุ่น ที่มีลักษณะของอวัยวะและการทำงานเหมือนปลาตัวเต็มวัย จึงทำให้ปลาสามารถ

ยอมรับอาหารเม็ดจืดที่มีสารเชื่อมประสาน 2 ชนิด คือ เจลาตินและคาราจีแนน และมีการแทนที่โปรตีนปลาปนด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุขกที่ระดับ 0, 15 และ 30 เปอร์เซ็นต์ ได้

2. อาหารที่มีการทดแทนโปรตีนปลาปนด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุขกที่ระดับ 30 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลให้ปลาที่มีอัตราการอดตาย การเจริญเติบโต และมีกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีนสูง ไม่แตกต่างจากปลาที่ได้รับอาหารที่ไม่มีการแทนที่โปรตีนปลาปนด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสต แต่มีแนวโน้มสูงกว่า

3. สารเชื่อมประสานอาหารที่เหมาะสมในการนำมาใช้ผลิตอาหารสำเร็จรูปสำหรับปลากะพงขาว คือ เจลาติน เนื่องจากมีต้นทุนในการผลิตอาหารต่ำ และปลาที่ได้รับอาหารที่ใช้เจลาตินเป็นสารเชื่อมประสาน มีอัตราการอดตาย การเจริญเติบโตไม่แตกต่างจากปลาที่ได้รับอาหารที่ใช้คาราจีแนน

ข้อเสนอแนะ

1. การศึกษานี้เป็นการศึกษาในตู้ทดลองขนาดเล็ก ซึ่งมีข้อจำกัดในพื้นที่และจำนวนปลาที่ใช้ จึงควรมีการทดลองในโรงเพาะพันธุ์ปลากะพงขาวทั่วไป และเนื่องจากปลากะพงขาวเป็นปลากินเนื้อ จึงควรมีการออกแบบตู้หรือถังเลี้ยงให้สามารถคัดขนาดได้ขณะทำการศึกษา โดยไม่มีผลกระทบต่อปลาทดลอง

2. ควรมีการศึกษากิจกรรมเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการดูดซึมกรดอะมิโนเพิ่มเติม และอาจมีการศึกษาประสิทธิภาพย่อยอาหารด้วย เพื่อยืนยันความสามารถในการใช้อาหารของลูกปลา

เอกสารอ้างอิง

- กนกธร ปิยธำรงรัตน์. 2546. เนื้อเยื่อวิทยา. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์.
- การุณ ทองประจุกแก้ว และอุทัยวรรณ โกวิทวที. 2555. เอนไซม์ย่อยอาหารกับการพัฒนาอาหารเพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ. วารสารวิชาการพระจอมเกล้าพระนครเหนือ 22: 710-720.
- กรมประมง. 2530. ภาพปลาและสัตว์น้ำของไทย. กรุงเทพฯ: องค์การข้าครุสภา.
- จันทวีจรรย์ จันทรสารทูล. 2532. ผลของฮอร์โมนต่อการพัฒนาของไข่ปลาอุกอุยและปลาอุกค้ำ และลักษณะทางเนื้อเยื่อของลูกปลาวัยอ่อน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- จุฑารัตน์ คชเวช, ชุติมา ตันตีกิตติ และฤดีกร วิวัฒน์ปฐพี. 2556. ผลของรูปแบบอาหารสำเร็จรูปต่อการยอมรับอาหาร อัตรารอดตาย และการเจริญเติบโตในปลากะพงขาววัยรุ่นตอนต้น (*Lates calcarifer* Bloch, 1790). วารสารการประมง 66: (กำลังอยู่ระหว่างการตีพิมพ์).
- เจนจิตต์ คงกำเนิด, สุนิตย์ โรจนพิทยากุล และอัครา ไชยมงคล. 2546. การอนุบาลลูกปลากะรัง (*Epinephelus coioides*, Hamilton) วัยอ่อนด้วยอาหารสำเร็จรูป. เอกสารวิชาการฉบับที่ 21 สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง.
- ชลอ ลิมสุวรรณ, ปวีณา กิจสวัสดิ์ และสุปราณี ชินบุตร. 2530. เนื้อเยื่อของปลาอุกค้ำ. กรุงเทพฯ: คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ชลอ ลิมสุวรรณ, สุปราณี ชินบุตร, นิตยา วชิรชัยไพศาล และทวี หอมขง. 2528. การศึกษาการเกิดวัยยะและลักษณะทางเนื้อเยื่อของปลากะพงขาววัยอ่อน. เอกสารวิชาการฉบับที่ 49 สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ.
- ชาติรี ฤทธิทอง. 2543. การศึกษาการเจริญของเนื้อเยื่อระบบย่อยอาหาร ตา และสมองในปลาอุกอุยวัยอ่อน Gunther's walking catfish, *Clarias macrocephalus*. โครงการงานทางชีววิทยาหลักสูตรปริญญาตรี, ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- ชุติมา ตันตีกิตติ. 2547. กายวิภาคและสรีรวิทยาการย่อยอาหารของลูกปลาอุกอุยวัยอ่อน. เอกสารประกอบการฝึกอบรมเรื่อง "Molecular Biological Approaches to Digestion and Feeding in Larval Marine Fish and Shrimp" 6-8 กรกฎาคม 2547. ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. หน้า 51-71.

ชุตินา ตันติภักดี, อมรรัตน์ เสริมวัฒนากุล, วิมล จันทโรทัย และกิจการ สุภมาตย์. 2545.

รายงานวิจัยเรื่อง “การศึกษาความต้องการกรดอะมิโนด้านปริมาณของปลากดเหลือง (*Mystus nemurus* Cuv.& Val.)”. ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ไทรตะวัน คงแก้ว. 2542. โพรตีนไฮโดรไลเสตและน้ำมันดิบจากหัวกุ้งกุลาดำ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาตร์มหาบัณฑิต, สาขาวิชาเทคโนโลยีผลิตภัณฑ์ประมง คณะอุตสาหกรรมเกษตร, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ไทยเกษตรศาสตร์. 2555. การเลี้ยงปลากะพงขาวในกระชัง. สืบค้นได้จาก:

<http://www.thaikasetsart.com/> (สืบค้นเมื่อ 10 ตุลาคม 2555).

ธวัช ศรีวีระชัย. 2538. การอนุบาลลูกปลากะพงขาวในกระชังด้วยอาหารต่างชนิด. เอกสารวิชาการฉบับที่ 45 สถานีเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งจังหวัดนครราชสีมา.

ธวัช ศรีวีระชัย, ฐานันดร ทัดตานนท์ และวิชัย ชัยชนะกสิกรรม. 2543. การใช้อาหารเม็ดทดแทนปลาสดในการอนุบาลปลากะพงขาว จากขนาด 1 นิ้ว ให้มีขนาด 3 นิ้ว ในกระชัง. เอกสารวิชาการฉบับที่ 50 ศูนย์พัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งนครราชสีมา.

นันทนา ศรีรัตนกุล. 2531. ผลของโซเดียมโซโอซัลเฟตต่ออัตราการฟักและลักษณะทางเนื้อเยื่อของปลาแพนซีคาร์พ็อยอ่อน (*Cyprinus carpio*). วิทยานิพนธ์วิทยาศาตร์มหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นเรศ กิจจาพัฒน์พันธ์. 2553. สถานการณ์ปลากะพงขาวไตรมาสที่ 1 ปี 2553. สืบค้นได้จาก

<http://fishco.fisheries.go.th/> (สืบค้นเมื่อ 2 มกราคม 2554).

นเรศ กิจจาพัฒน์พันธ์. 2555. ต้นทุนการเพาะเลี้ยงปลากะพงขาวขนาดใหญ่ที่เกาะยอ. สืบค้นได้จาก <http://fishco.fisheries.go.th/> (สืบค้นเมื่อ 17 ธันวาคม 2555).

เบญจศุภลักษณ์ อุดรโพธิ์. 2545. พัฒนาการทางเนื้อเยื่อวิทยาและฮิสโตเคมีของระบบย่อยอาหารในปลาบู่ทรายระยะวัยอ่อน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาตร์มหาบัณฑิต, สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

มะลิ บุญยรัตผลิน และจู่อะดี พงศ์มนิรัตน์. 2533. ความต้องการฟอสฟอรัสในอาหารปลากะพงขาว. เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 4 สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง.

มาวิทย์ อัศวอารีย์ และจิระยุทธ รื่นศิริกุล. 2551. การอนุบาลลูกปลากะรังดอกแดง (*Epinephelus coioides* Hamilton, 1822) โดยการใช้อาร์ทีเมียร่วมกับอาหารสำเร็จรูป. เอกสารวิชาการฉบับที่ 31 สำนักวิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง.

- วันชัย เกียรติพิมล. 2545. การผลิตและการใช้โปรตีนไฮโดรไลเสตและสารสกัดจากปลาจากวงศ์
 เศษเหลือโรงงานแปรรูปอาหารทะเล เป็นสารดึงดูดการกินอาหารของปลากดเหลือง
 (*Mystus nemurus*). วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
 คณะอุตสาหกรรมเกษตร, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- วันเพ็ญ มินกาญจน์ และนางนุช อ่องสุวรรณ. 2530. การผสมเทียมปลาทรงเครื่อง. เอกสารเผยแพร่
 ฉบับที่ 8 สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ.
- วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. 2536. อาหารปลา. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์.
- เวียง เชื้อโพธิ์หัก. 2542. โภชนศาสตร์สัตว์น้ำและการให้อาหารสัตว์น้ำ. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ:
 สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งจันทบุรี. 2549. การเพาะและอนุบาลลูกปลากะพงขาว. สืบค้นได้
 จาก <http://www.fisheries.go.th/cf-chan/hatch/seabass/seabass-nursing-page.htm>
 (สืบค้นเมื่อ 22 กุมภาพันธ์ 2553).
- สุนิตย์ โรจนพิทยากุล, เจนจิตต์ คงกำเนิด และสรนัญญ์ ศิริสวย. 2540. ชีววิทยาและพัฒนาการ
 ของลูกปลาเห็ดโคน *Sillago sihama* วัยอ่อนระยะแรก. เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 11
 ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งกระบี่.
- สิทธิ บุญรัตผลิน, กิจการ สุขมาตย์ และสถาพร ดิเรกบุษราคม. 2532. ผลของวิตามินซีต่อการ
 เจริญเติบโต องค์ประกอบเลือดและความต้านทานโรคของปลากะพงขาว. เอกสารวิชาการ
 ฉบับที่ 6 สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง.
- สุปราณี ชินบุตร, กัลยา จำเริญรัตน์ และชลอ ลิมสุวรรณ. 2536. เนื้อเยื่อปลาช่อน. พิมพ์ครั้งที่ 1.
 กรุงเทพฯ: ฟีนี พับลิชชิง.
- สุปราณี ชินบุตร, พรเลิศ จันทร์รัชชกุล และนางนุช เลหาะวิสุทธิ. 2534. การศึกษาการเกิดอวัยวะ
 และลักษณะทางเนื้อเยื่อของปลากัดวัยอ่อน *Betta splendens*, Regan. วิทยาศาสตร์
 25: 421-429.
- สุภาพร มหันต์กิจ. 2549. การใช้วัสดุเศษเหลือจากโรงงานอุตสาหกรรมแปรรูปสัตว์น้ำเป็นแหล่ง
 โปรตีนทดแทนปลาป่นในอาหารปลากะพงขาว (*Lates calcarifer* Bloch). วิทยานิพนธ์
 วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ,
 มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- อากม สิงหนุญ, ไพบุลย์ บุญลิปตานนท์ และสามารถ เดชสถิตย์. 2546. พัฒนาการคัพภะและลูก
 ปลาวัยอ่อนของปลาเก๋าเสื้อ *Epinephelus fuscoguttatus* (Forsskal, 1775). เอกสารวิชาการ
 ฉบับที่ 28 ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งกระบี่.

- อานัส แซะอาหลี .2551. การใช้เครื่องในปลาทูน่าไฮโดรไลเสดเป็นสารกระตุ้นการกินในอาหาร สำหรับกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) ที่มีฮีโมโกลบินปนแทนที่ปลาป่น. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต, สาขาวิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- อุมาพร เจริญกุล. 2542. การศึกษาลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยา และการเจริญของระบบย่อยอาหาร ตา และสมองในปลากดเหลือง, *Mystus nemurus*. โครงการงานทางชีววิทยา หลักสูตรปริญญาตรี, ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- Adler-Nissen, J. 1986. Enzymic Hydrolysis of Food Protein. UK: Elsevier Applied Science Publishers, Barking.
- Alvarez-Gonzalez, C.A., Cervantes-Trujano, M., Tovar-Ramirez, D., Conklin, D.E., Nolasco, H., Gisbert, E. and Piedrahita, R. 2006. Development of digestive enzymes in California halibut *Paralichthys californicus* larvae. Fish Physiology and Biochemistry 31: 83-93.
- Alvarez-Gonzalez, C.A., Moyano-Lopez, F.J., Civera-Cerecedo, R., Carrasco-Chavez, V., Ortiz-Galindo, J.L. and Dumas, S. 2008. Development of digestive enzymes activity in larvae of spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus*. I: Biochemical analysis. Fish Physiology and Biochemistry 34: 373-384.
- AOAC. 1990. Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists. 15th edition, Washington, D.C.
- Asgard, T. and Austreng, E. 1986. Blood, ensiled or frozen, as feed for salmonids. Aquaculture 55: 263-284.
- Baek, H.H. and Cadwallader, K.R. 1995. Enzymatic hydrolysis of crayfish processing by-products. Journal of Food Science. 60: 929-935.
- Bancroft, J.D. 1975. Histochemical Techniques. 2nd Edition. London: Butterworths.
- Baskerville-Bridges, B. and Kling, L.J. 2000a. Early weaning of Atlantic cod (*Gadus morhua*) larvae onto a microparticulate diet. Aquaculture 189: 109-117.
- Baskerville-Bridges, B. and Kling, L.J. 2000b. Development and evaluation of microparticulate diets for early weaning of Atlantic cod (*Gadus morhua*) larvae. Aquaculture Nutrition 6: 171-182.
- Bergmeyer, H.U., Bergmeyer, J. and Grassl, M. 1974. Methods of Enzymatic Analysis. 2nd Edition, volume II. New York: Academic Press.

- Benjakul, S. and Morrissey, M. T. 1997. Protein hydrolysates from Pacific whiting solid waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61: 131-138.
- Bisbal, G.A. and Bengtson, D.A. 1995. Development of digestive tract in larvae summer flounder. *Journal of Fish Biology* 47: 227-291.
- Blair, T., Castell, J., Neil, S., D'Abramo, L., Cahu, C., Harmon, P. and Ogunmoye, K. 2003. Evaluation of microdiets versus live feeds on growth, survival and fatty acid composition of larval haddock (*Melanogrammus aeglefinus*). *Aquaculture* 225: 451-461.
- Boonyaratpalin, M. 1991. Nutritional studies on seabass (*Lates calcarifer*). In *Fish Nutrition Research in Asia. Proceeding of the Fourth Asian Fish Nutrition Workshop* (ed. De Silva, S.S.). Philippines: Asian Fisheries Society. 33-41.
- Boonyaratpalin, M. and Williams, K. 2002. *Nutrient Requirement and Feeding of Finfish for Aquaculture*: CAB International. 40-49.
- Boulhic, M. and Gabaudan, J. 1992. Histological study of the organogenesis of the digestive system and swim bladder of the dover sole, *Solea solea* (Linnaeus, 1758). *Aquaculture* 102: 373-396.
- Brinkmeyer, R.L. and Holt, G.J. 1995. Response of red drum larvae to grade levels of menhaden oil in semipurified microparticulate diets. *Progress in Fish-Culture* 57: 30-36.
- Buddington, B.K. 1985. Digestive secretions of lake sturgeon, *Acipenser fulvescens*, during early development. *Journal of Fish Biology* 26: 715-723.
- Cahu, C.L. and Zambonino-Infante, J.L. 1994. Early weaning of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae with a compound diets: effect on digestive enzymes. *Comparative Biochemistry and Physiology* 109A: 213-222.
- Cahu, C.L. and Zambonino-Infante, J.L. 1995. Maturation of the pancreatic and intestinal digestive functions of sea bass (*Dicentrarchus labrax*): effect of weaning with different protein sources. *Fish Physiology and Biochemistry* 14: 431-437.
- Cahu, C.L. and Zambonino-Infante, J.L. 2001. Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae. *Aquaculture* 200: 161-180.

- Cahu, C.L., Zambonino-Infante, J.L., Escaffre, A.M., Bergot, P. and Kaushik, S. 1998. Preliminary results on sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae rearing with compound diet from first feeding comparison with carp larvae *Cyprinus carpio*. *Aquaculture* 169: 1-7.
- Cahu, C.L., Zambonino-Infante, J.L., Quazuguel, P. and Le Gall, M.M. 1999. Protein hydrolysate vs. fishmeal in compound diets for 10-day old sea bass *Dicentrarchus labrax* larvae. *Aquaculture* 171: 109-119.
- Cañavate JP and Fernández-Díaz, C. 1999. Influence of co-feeding larvae with live and inert diet on weaning the sole *Solea senegalensis* onto commercial dry feeds. *Aquaculture* 174: 255-263.
- Carvalho, A.P., Escaffre, A.M., Oliva Teles, A. and Bergot, P. 1997. First feeding of common carp larvae on diets with high levels of protein hydrolysates. *Aquaculture International* 5: 361-367.
- Catacutan, M.R. and Coloso, R.M. 1995. Effect of dietary protein to energy ratio on growth, survival and body composition of juvenile Asian seabass, *Lates calcarifer*. *Aquaculture* 131: 125-133.
- Catacutan, M.R. and Coloso, R.M. 1997. Growth of juvenile Asian seabass, *Lates calcarifer*, fed varying carbohydrate and lipid levels. *Aquaculture* 149: 137-144.
- Chen, B.N., Quin, J.G., Kumar, M.S., Hutchinson, W. and Clarke, S. 2006. Ontogenetic development of digestive system in yellowtail kingfish *Seriola lalandi* larvae. *Aquaculture* 256: 489-501.
- Cousin, J.C.B. and Baudin-Laurencin, F. 1985. Morphogenese de l'appareil digetif de la vassie gazeuse du turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). *Aquaculture* 47: 305-319.
- Curnow, J., King, J., Pertridge, G. and Kolkovski, S. 2006. Effects of two commercial microdiets on growth and survival of baramandi (*Lates calcarifer*) larvae within various early weaning protocols. *Aquaculture Nutrition* 12: 247-255.
- Dabrowski, K.R. 1979. The role of proteolytic enzymes in fish digestion. In Styczynska-Jurewicz, E., Backiel, E., Jaspers, T. and Persoone, E. (Eds). *Cultivation of Fish Fry and Its Live Food*. European Mariculture Society, Bredene. Belgium: Special Publication. 107-126.

- Dabrowski, K. and Culver, D. 1991. The physiology of larval fish: digestive tract and formulation of starter diets. *Aquaculture* 17: 49-61.
- Dabrowski, K. and Glogowski. 1977. Studies on the role exogenous proteolytic enzyme in digestion processes in fish. *Hydrobiologia* 54: 129-134.
- Dong, Y., Sheng, G., Fu, J. and Wen, K. 2005. Chemical characterization and anti-anaemia activity of fish protein hydrolysate from *Saurida elongate*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85: 2033-2039.
- Engrola, S., Figueira, L., Conceicao, L.E.C., Gavaia, P.J., Ribeiro, L. and Dinis, M.T., 2009. Co-feeding in *Senegalese sole* larvae with inert diet from mouth opening promotes growth at weaning. *Aquaculture* 288: 264-227.
- Espe, M. and Njaa, L.R. 1991. Growth and chemical composition in Atlantic salmon *Salmo salar* given a fish meal diet or corresponding free amino acid diet. *FiskeriDir. Skr., Ser. Ernæring* 4: 103–110.
- Falk-Petersen, I.B. and Hansen, T.K. 2001. Organ differentiation in newly hatched common wolffish. *Journal of Fish Biology* 59: 1465-1482.
- Fishbase. 2012. *Lates calcarifer* (Bloch, 1790) Barramundi. Available from: <http://www.fishbase.org/summary/Lates-calcarifer.html> (Accessed 17 December 2012).
- Fernandez-Diaz, C., Pascual, E. and Yufera, M. 1994. Feeding behavior and prey size selection of gilthead seabream, *Sparus aurata*, larvae fed on inert and live food. *Marine biology* 118: 323-328.
- Ferraris, R.P., Tan, T.D. and De la Cruz, M.C. 1987. Development of digestive tract of milkfish, *Chanos chanos* (Forsk.) histology and histochemistry. *Aquaculture* 61: 241-257.
- Flynn, K. J. 1988. Some practical aspects of measurements of dissolved free amino acids in natural waters and within microalgae by the use of HPLC. *Chemistry and Ecology* 3: 269-293.
- Furuuta, H., Takeuchi, T. and Uematsu, K. 1998. Effects of eicosapentaenoic and docohexaenoic acids on growth, survival and brain development of larval Japanese flounder (*Paralichthys oliaceus*). *Aquaculture* 161: 269–279.

- Gabaudan, J., Pigott, G. and Halver, J.E. 1980. The effect of processing on protein ingredients for larval diets: biological evaluation. *Proceedings of World Mariculture Society* 11: 424-432.
- Galaviz, M., Garcia-Gasca, A., Drawbridge, M., AlvarezGonzalez, C.A. and Lopez, L. 2011. Ontogeny of the digestive tract and enzymatic activity in white seabass, *Atractoscion nobilis*, larvae. *Aquaculture* 318: 162-168.
- Gawlicka, A., McLaughlin, L., Hung, S.S.O. and de la Noue, J. 1996. Limitations of carrageenan microbound diets for feeding white sturgeon, *Acipenser transmontanus*, larvae. *Aquaculture* 141: 245-265.
- Geurden, I., Raduñz-Neto, J. and Bergot, P. 1995. Essentiality of dietary phospholipids for carp (*Cyprinus carpio*) larvae. *Aquaculture* 131: 303–314.
- Gisbert, E., Ortiz-Delgado, J.B. and Sarasquete, C. 2008. Nutritional cellular biomarkers in early life stages of fish. *Histology and Histopathology* 23: 1525-1539.
- Gisbert, E., Piedrahita, R.H. and Conklin, D.E. 2004. Ontogenetic development of the digestive system in California halibut (*Paralichthys californicus*) with notes on feeding practices. *Aquaculture* 232: 455-470.
- Gisbert, E., Rodriquez, A., Castello-Orvay, F. and Williot, P. 1998. A histology study of development of the digestive tract of Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*) during early ontogeny. *Aquaculture* 167: 195-209.
- Glencross, B. 2006. The nutritional management of barramundi, *Lates calcarifer* - a review. *Aquaculture Nutrition* 12: 291-309.
- Govoni, J.J., Boehlert, G.W. and Watanabe, Y. 1986. The physiology of digestion in fish larvae. *Environmental Biology of Fisheries* 16: 59-77.
- Greenwood, P.H. 1976. A review of the family Centropomidae (Pisces perciformes). *Bulletin of the British Museum of Natural History (Zoology)* 29: 1-81.
- Grizzle, J.M. and Rogers, W.A. 1976. *Anatomy and Histology of the Channel Catfish*. Alabama: Auburn University Agricultural Experiment Station, Auburn.
- Guthrie, K.M., Rust, M.B., Langdon, C.L. and Barrows, F.T. 2000. Acceptability of various microparticulate diets to first feeding walleye (*Stizostedion vitreum*) larvae. *Aquaculture Nutrition* 6: 153-158.

- Hachero-Cruzado, I., Ortiz-Delgado, J.B., Borrega, B., Herrera, M., Navas, J.I. and Sarasquete, C. 2009. Larval organogenesis of flatfish brill *Scophthalmus rhombus* L: Histological and histochemical aspects. *Aquaculture* 286: 138-149.
- Hamlin, H.J., Hunt von Herbing, I. and Kling, L.J. 2000. Histological and morphological evaluations of the digestive tract and associated organs of haddock throughout post-hatching ontogeny. *Journal of Fish Biology* 57: 716-732.
- Hamre, K. 2006. Nutrition in cod (*Gadus morhua*) larvae and juveniles. *ICES Journal of Marine Science* 63: 267-274.
- Hardy, R.W. and Barrows, F.T. 2002. Diet formulation and manufacture. In Halver, J.E. and Hardy, R.W. (Eds.). *Fish Nutrition*. 3rd Edition. California: Academic Press.
- Hasting, W.H. and Higgs, D. 1978. Feed milling processes. In *Fish Feed Technology*, Chapter 18. FAO Publication ADCP/REP/80/11. Rome, Italy: FAO.
<http://www.fao.org/docrep/X5738E/x5738e0j.htm#4.%20pelleting> (Accessed 9 August 2011).
- Holt, G.J. 1993. Feeding larval red drum on microparticulate diets in a close recirculation water system. *Journal of World Aquaculture Society* 24: 225-230.
- Hoyle, N.T. and Merritt, J.H. 1994. Quality of fish protein hydrolysate from herring (*Clupea harengus*). *Journal of Food Science* 59: 309-314.
- Hugli, T.E. and Moore, S. 1972. Determination of the tryptophan content of proteins by ion-exchange chromatography of alkaline hydrolysates. *Journal of Biological Chemistry* 247: 2828-2834.
- Humason, G.L. 1979. *Animal Tissue Techniques*. 4th Edition. San Francisco: W.H. Freeman and Company.
- Hunter, J.R. 1984. Synopsis of culture methods for marine fish larvae. *American Society of Ichthyologists and Herpetologists Special Publication* 1: 24-27.
- Izquierdo, M.S., Watanabe, T., Takeuchi, T., Arakawa, T. and Kitajima, C. 1989. Requirement of larval seabream *Pagrus major* for essential fatty acids. *Nippon Suisan Gakkaishi* 55: 859-867.
- Jany, K.D. 1976. Studies on the digestive enzymes of the stomachless bonefish *Carassius auratus gibelio* endopeptidases. *Fish Physiology and Biochemistry* 53: 31-38.

- Kapoor, B.G., Smith, H. and Verghina, I.A. 1976. The alimentary canal and digestion in teleosts. *Advance in Marine Biology* 13: 109-239.
- Katavic, I., Jug-Dujakovic, J. and Glamuzina, B. 1989. Cannibalism as a factor affecting the survival of intensively cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fingerlings. *Aquaculture* 77: 135-143.
- Kjørsvik, E. and Reiersen, A.L. 1992. Histomorphology of the early yolk-sac larvae of the Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.)-an indication of the timing of functionality. *Journal of Fish Biology* 41: 1-19.
- Kolkovski, S. 2001. Digestive enzymes in fish larvae and juveniles-implications and applications to formulated diets. *Aquaculture* 200: 181-201.
- Kolkovski, S. and Tandler, A. 2000. The use of squid protein hydrolysate as a protein source in microdiets for gilthead seabream *Sparus aurata* larvae. *Aquaculture Nutrition* 6: 11-15.
- Kolkovski, S. and Tandler, A. and Izquierdo, M.S. 1997. Effect of live food and dietary digestive enzyme on the efficiency of microdiet for seabass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Aquaculture* 148: 313-322.
- Kotzamanis, Y.P., Gisbert, E., Gatesoupe, F.J., Zambonino-Infante, J. and Cahu, C. 2007. Effects of different dietary levels of fish protein hydrolysate on growth, digestive enzymes, gut microbiota, and resistance to *Vibrio anguillarum* in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology* 147: 205-214.
- Koven, M.W., Kolkovski, S., Hasas, E., Gamsiz, K. and Tandler, A. 2001. Advance in the development of microdiets for gilthead seabream, *Sparus aurata*: a review. *Aquaculture* 194: 107-121.
- Koven, W.M., Tandler, A., Kissil, W. and Sklan, D. 1992. The importance of n-3 highly unsaturated fatty acids for growth in larval *Sparus aurata* and their effect on survival, lipid composition and size distribution. *Aquaculture* 104: 91-104.
- Kvåle, A., Yufera, M., Nygard, E., Aursland, K., Harboe, T. and Hamre, K. 2006. Leaching properties of three different microparticulate diets and preference of the diets in cod (*Gadus morhua* L.) larvae. *Aquaculture* 251: 402-415.

- Langdon, C. 2003. Microparticle types for delivering nutrients to marine fish larvae. *Aquaculture* 227: 259-275.
- Lavens, P. and Sorgeloos, P. 1996. Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture. FAO, Fisheries Technical paper, No. 361. Rome: FAO.
- Lazo, J.P., Dinis, M.T., Holt, G.J., Faulk, C. and Arnold, C.R. 2000. Co-feeding microparticulate diets with algae: towards eliminating the need of zooplankton at first feeding in larval red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture* 188: 339-351.
- Liao, I.C., Su, H.M. and Chang, E.Y. 2001. Techniques in finfish larviculture in Taiwan. *Aquaculture* 200: 1-31.
- Liceaga-Gesualdo, A.M. and Li-Chan, E.C.Y. 1999. Functional properties of fish protein hydrolysates from herring (*Clupea harengus*). *Journal of Food Science*. 64: 1000-1004.
- Lopez-Alvarado, J., Langdon, C.J., Teshima, S. and Kanazawa, A. 1994. Effects of coating and encapsulation of crystalline amino acids on leaching in larval feeds. *Aquaculture* 122: 335-346.
- Lovell, T. 1998. Nutrition and Feeding of Fish. 2nd Edition. Boston: Kluwer Academic Publishers.
- Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Follin Phenol Reagent. *The Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275.
- Ma, H., Cahu, C., Zambonino-Infante, J., Yu, H., Duan, Q., Le Gall, M.M. and Mai, K. 2005. Activities of selected digestive enzymes during larval development of large yellow croaker *Pseudosciaena crocea*. *Aquaculture* 245: 239-248.
- Mackie, L.M. 1982. Fish protein hydrolysates. *Process Biochemistry* 17: 26-31.
- Mai, K., Yu, H., Ma, H., Duan, Q., Gisbert, E., Zambonino-Infante, J.L. and Cahu, C.L. 2005. A histological study on the development of the digestive system of *Pseudosciaena crocea* larvae and juveniles. *Journal of Fish Biology* 67: 1094-1106.
- Moore, R. 1979. Natural sex inversion in the giant perch (*Lates calcarifer*). *Australian Journal of Marine and Freshwater Research* 30: 803-813.
- Moretti, A., Fernandez-Criado, M.P., Cittolin, G. and Guidastrì, R. 1999. Manual on Hatchery Production of Seabass and Gilthead Seabream. Volume 1. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.

- Næss, T., Germain-Henry, M. and Naas, K.E. 1995. First feeding of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) using different combination of *Artemia* and wild plankton. *Aquaculture* 130: 235-250.
- Nankervis, L. and Southgate, P.C. 2006. An integrated assessment of gross marine protein sources used in formulated microbound diets for barramundi (*Lates calcarifer*) larvae. *Aquaculture* 257: 453-464.
- Nordgreen, A., Yufera, M. and Hamre, K. 2008. Evaluation of changes in nutrient composition during production of cross-linked protein microencapsulated diets for marine fish larvae and suspension feeders. *Aquaculture* 285: 159-166.
- Önal, U. and Langdon, C.J. 2000. Characterization of two microparticle types for delivery of food to altricial fish larvae. *Aquaculture Nutrition* 6: 159-170.
- Partridge, G.J. and Southgate, P.C. 1999. The effect of binder composition on ingestion and assimilation of microbound diets (MBD) by barramundi *Lates calcarifer* Bloch larvae. *Aquaculture Research* 30: 879-886.
- Patrick, L. and Patrick, S. 1996. Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture. Available from:
<http://www.fao.org/docrep/003/W3732E/w3732e02.htm#1.%20> (Accessed 10 August 2009).
- Peña, R., Dumas, S., Villalejo-Fuerte, M. and Ortíz-Galindo, J.L. 2003. Ontogenetic development of the digestive tract in reared spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* larvae. *Aquaculture* 219: 633-644.
- Peres, A., Cahu, C., Zambonino-Infante, J.L. Le Gall, M.M. and Quazuguel, P. 1996. Amylase and trypsin response to intake of dietary carbohydrate and protein depend on the development stage in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Fish Physiology and Biochemistry* 15: 237-242.
- Person-Le Ruyet, J. 1989. Early weaning of marine fish larvae onto microdiets: constraints and perspectives. In *Advances in Tropical Aquaculture*, Tahiti. February 20-March 4, 1989. IFREMER, Actes de Colloque Brest France. 625-642.

- Person-Le Ruyet, J., Alexander, J.C., Thebaud, L. and Mugnier, C. 1993. Marine fish larvae feeding: formulated diets or live prey? *Journal of World Aquaculture Society* 24: 211-224.
- Porter, S.M., and Thelilacker, G.H. 1999. The development of the digestive tract and eye in larval walleye pollock, *Theragra chalcogramma*. *Fishery Bulletin* 97: 722-729.
- Quaglia, G.B. and Orban, E. 1990. Influence of hydrolysis on structure and emulsifying properties of sardine (*Sardina pilchardus*) protein hydrolysates. *Journal of Food Science*. 55: 1571-1573.
- Ribeiro, L., Sarasquete, C. and Dinis, M.T. 1999. Histological and histochemistry development of digestive system of *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) larvae. *Aquaculture* 171: 293-308.
- Rosenlund, G., Stoss, J. and Talbot, C. 1997. Co-feeding marine fish larvae with inert and live diets. *Aquaculture* 155: 183-191.
- Rodehutschord, M., Mandel, S., Pack, M., Jacobs, S. and Pfeffer, E. 1995. Free amino acid can replace protein-bound amino acids in test diet for studies in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Nutrition* 125: 959-963.
- Ruangpanit, N. 1986. Biological characteristics of wild *Lates calcarifer* (Bloch) in Thailand. ACIAR Workshop on the Management of Wild and Cultured Seabass/barramundi. Darwin, Australia. 24 September-1 October 1986.
- Ruanpanit, N., Yashiro, R., Boonliptanon, P., Vattanakul, V., Techanarawong, S. and Nogami, K. 1993. Hatching and biology of early larval stages of grouper, *Epinephelus malabaricus*. In grouper culture. The Proceedings of Grouper Culture, November 30-December 1, 1993, Viva Hotel, Songkhla, Thailand. Japan International Cooperation Agency and National Institute of Coastal Aquaculture, Department of Fisheries, Thailand.
- Sakaras, W., Boonyaratpalin, M., Unprasert, N. and Kumpang, P. 1988. Optimum Dietary Protein Energy Ratio in Seabass Feed I. Technical paper No.7. Thailand: Rayong Brackishwater Fisheries Station.

- Salhi, M., Hernandez-Cruz, C.M., Bessonart, M., Izquierdo, M.S. and Fernandez-Palacios, H. 1999. Effect of different dietary polar lipid level and different n-3 HUFA content in polar lipids on gut and liver histological structure of gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae. *Aquaculture* 179: 253–263.
- Salhi, M., Izquierdo, M.S., Hernandez-Cruz, C.M., Gonzalez, M. and Fernandez-Palacios, H. 1994. Effect of lipid and n-3 HUFA levels in microdiets on growth, survival and fatty acids composition of larval gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 124: 275-282.
- Santamaria, C.A., Marin de Mateo, M., Traveset, R., Sala, R., Grau, A., Pastor, E., Sarasquete, C. and Crespo, S. 2004. Larval organogenesis in common dentex *Dentex dentex* L. (Sparidae): histological and histochemical aspects. *Aquaculture* 237: 207-228.
- Sarasquete, M.C., Polo, A. and Yufera, M. 1995. Histology and histochemistry of the development of digestive system of larval gilthead seabream, *Sparus aurata* L. *Aquaculture* 130: 79-82.
- Sargent, J., Bell, J.G., Bell, M.V., Henderson, R.J. and Tocher, D.R. 1993. The metabolism of phospholipids and polyunsaturated fatty acids in fish. In Lalhau, B. and Vitiello, P. (Eds.), *Aquaculture: Fundamental and Applied Research. Coastal and Estuarine Studies*, Volume 43. Washington D.C.: American Geophysical Union.
- Segner, H., Storch, V., Reinecke, M., Kloas, W. and Hanke, W. 1994. The development of functional digestive and metabolic organs in turbot, *Scophthalmus maximus*. *Marine Biology* 119: 471-486.
- Shahidi, F., Xiao-Qing, H. and Synowiecki, J. 1995. Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). *Food Chemistry* 53: 285-293.
- Slizyte, R., Dauklas, E., Falch, E., Storrol, I. and Rustad, T. 2005. Yield and composition of different fractions obtained after enzymatic hydrolysis of cod (*Gadus morhua*) by-products. *Process Biochemistry* 40: 1415-1424.
- Srichanun, M., Tantikitti, C., Vatanakul, V. and Musikarune, P. 2012. Digestive enzyme activity during ontogenetic development and effect of live feed in green catfish larvae (*Mystus nemurus* Cuv.&Val.). *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 34: 247-254.

- Stroband, H.W.J. and Kroon, A.G. 1981. The development of the stomach in *Clarias lazera* and the intestinal absorption of protein macromolecules. *Cell and Tissue Research* 215: 397-415.
- Walford, J. and Lam, T.J. 1993. Development of digestive tract and proteolytic enzyme activity in seabass (*Lates calcarifer*). *Aquaculture* 109: 187-205.
- Walford, J., Lim, T.M. and Lam, T.J. 1991. Replacing live foods with microencapsulated diets in the rearing of seabass (*Lates calcarifer*) larvae: do the larvae ingest and digest protein-membrane microcapsules? *Aquaculture* 92: 225–235.
- Watanabe, T. and Kiron, V. 1994. Prospects in larval fish dietetics. *Aquaculture* 124: 223-251.
- Tanaka, M. 1971. Studies on the structure and function of the digestive system in teleosts larvae. III. Development of the digestive system during postlarval stage. *Japanese Journal of Ichthyology* 18: 164-174.
- Thiansilakul, Y. 2006. Antioxidative Activity and Functional of Protein Hydrolysate from Round Scad (*Decapterus maruadsi*) Muscle. Master of Science Thesis, Prince of Songkla University.
- Yufera, M., Fernandez-Diaz, C., Pascual, E., Sarasquete, M.C., Moyano, F.J., Diaz, M., Alarcon, F.J., Garcia-Gallego, M. and Parra, G. 2000. Towards an inert diet for first-feeding gilthead sea bream *Sparus aurata* L. larvae. *Aquaculture Nutrition* 6: 143-152.
- Yufera, M., Pascual, E. and Fernandez-Diaz, C. 1999. A highly efficient microencapsulated food for rearing early larvae of marine fish. *Aquaculture* 177: 249-256.
- Zambonino-Infante, J.L. and Cahu, C.L. 1994. Development and response to a diet change of some digestive enzymes in seabass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Fish Physiology and Biochemistry* 12: 399-408.
- Zambonino-Infante, J.L. and Cahu, C.L. 1999. High dietary lipid levels enhance digestive tract maturation and improve *Dicentrarchus labrax* larval development. *Journal of Nutrition* 129: 1195-1200.
- Zambonino-Infante, J.L., Cahu, C.L. and Péres, A. 1997. Partial substitution of di- and tripeptides for native proteins in sea bass diet improves *Dicentrarchus labrax* larval development. *Journal of Nutrition* 127: 608-614.

Zambonino-Infante, J.L., Gisbert, E., Sarasquete, C., Navarro, I., Gutierrez, J. and Cahu, C.L.
2008. Ontogeny and physiology of the digestive system of marine fish larvae. In Cyrino,
J.E.O., Bureau, D., Kapoor, B.G. (Eds.), *Feeding and Digestive Functions of Fish*.
Enfield: Science Publishers, Inc.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

1. การเตรียมตัวอย่างและการศึกษาพยาธิสภาพเนื้อเยื่อด้วยเทคนิคทางเนื้อเยื่อวิทยา (Bancroft, 1975)

1.1 สารเคมี

1.1.1 น้ำยาดอง Bouin's fluid (Bio-optica, Milano Italy)

1.1.2 สีย้อมฮีมาทอกซิลิน (Hematoxylin) (Humason, 1979)

- ฮีมาทอกซิลิน (Hematoxylin crystal)	4	กรัม
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydrate)	0.8	กรัม
- อลูมิเนียมซัลเฟต (Potassium aluminium sulfate, Alum)	100	กรัม
- กรดซิตริก (Citric acid)	4	กรัม
- คลอรัลไฮเดรต (Chloral hydrate)	200	กรัม
- น้ำกลั่น	2,000	มิลลิลิตร

เตรียมโดย ละลายอลูมิเนียมซัลเฟตในน้ำกลั่น เติมฮีมาทอกซิลินแล้วคนให้สารทั้งสองละลายจนหมด จากนั้นเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ผสมให้เข้ากันแล้วเติมกรดซิตริกและคลอรัลไฮเดรต ละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน ตั้งไว้ประมาณ 1 สัปดาห์ ก่อนนำมาใช้งาน

1.1.3 สีย้อมอีโอซิน (Eosin) (Humason, 1979)

- อีโอซิน (Eosin Y. (CI 45380))	1	กรัม
- เอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์	1,000	มิลลิลิตร
- กรดอะซิติกเข้มข้น (Glacial acetic acid)	5	มิลลิลิตร

เตรียมโดย ละลายอีโอซินด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 100 มิลลิลิตร จนเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วจึงเติมส่วนที่เหลือ และเติมกรดอะซิติก

1.2 การเตรียมตัวอย่าง

สลบถูกปลาทั้งตัวด้วยน้ำแข็งอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-10 นาที จากนั้นจึงนำตัวอย่างใส่ในขวดที่มีน้ำยาดอง Bouin's fluid ให้น้ำยาท่วมตัวอย่าง 24 ชั่วโมง เมื่อครบตามเวลาแล้วจึงเปลี่ยนน้ำยาดองเป็นแอลกอฮอล์ 50 และ 70 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยต้อง

เปลี่ยนน้ำยาใหม่ทุกๆ 24 ชั่วโมง จนกระทั่งไม่มีสีของ Bouin's fluid เพราะจะทำให้การย้อมสีเนื้อเยื่อไม่คงทน จากนั้นจึงนำไปสู่ขั้นตอนการคั่งน้ำออกจากเซลล์และการฝังตัวอย่าง ต่อไป

1.3 การคั่งน้ำออกจากเซลล์ (Dehydration) และการฝังตัวอย่างลงในพาราฟิน (Embedding)

นำตัวอย่างไปผ่านขั้นตอนการคั่งน้ำออกจากเซลล์ด้วยเครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติ (Automatic tissue processor) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่ (ชั่วโมง)	สารละลาย	เวลา
1	แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์	2
2	แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์	2
3	แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์	2
4	แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์	2
5	แอลกอฮอล์ 100 เปอร์เซ็นต์ (Absolute alcohol)	2
6	ไอโซโพรพิล แอลกอฮอล์ (Isopropyl alcohol)	1
7	ไอโซโพรพิล แอลกอฮอล์	1
8	ไซลีน (Xylene)	1
9	ไซลีน	1
10	พาราพลาสติก (Paraplast)	1
11	พาราพลาสติก	1

นำตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ผ่านการคั่งน้ำออกจากเซลล์แล้วไปฝังลงในพาราฟิน (Paraffin) เก็บไว้ในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อให้ง่ายต่อการนำไปตกแต่ง จากนั้นนำไปตัดด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อ (Sliding microtome) ให้มีความหนาประมาณ 3-5 ไมโครเมตร นำชิ้นตัวอย่างไปลอยในน้ำอุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส เพื่อให้เนื้อเยื่อขยายตัว จากนั้นจึงใช้สไลด์ซ้อนตัวอย่างขึ้นและนำไปอบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน เพื่อให้เนื้อเยื่อติดกับสไลด์ดีขึ้น หลังจากนั้นจึงเข้าสู่ขั้นตอนการย้อมสี

1.4 การย้อมสี

ขั้นตอนที่	สารละลาย	เวลา (นาที)
1	โซลีน	2
2	โซลีน	2
3	โซลีน	2
4	ไอโซโพรพิล แอลกอฮอล์	1
5	ไอโซโพรพิล แอลกอฮอล์	1
6	แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์	1
7	แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์	1
8	แอลกอฮอล์ 50 เปอร์เซ็นต์	1
9	น้ำกลั่น	1
10	สีย้อมสีมาทอกซิลิน	15
11	น้ำประปา	3
12	น้ำกลั่น	1
13	แอลกอฮอล์ 50 เปอร์เซ็นต์	1
14	สีย้อมอีโอซิน	2
15	แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์	2
16	แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์	2
17	แอลกอฮอล์ 100 เปอร์เซ็นต์	2
18	ไอโซโพรพิล แอลกอฮอล์	2
19	ไอโซโพรพิล แอลกอฮอล์	2
20	โซลีน	2
21	โซลีน	2
22	โซลีน	2

นำสไลด์ที่ได้มาปิดด้วย Cover glass และน้ำยาเปอร์เมาท์ จากนั้นนำไปศึกษาพยาธิสภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์

ภาคผนวก ข

1. การวิเคราะห์หองค์ประกอบทางเคมีโดยประมาณ (Proximate analysis) ในวัตถุดิบอาหารและอาหารปลา (ตามวิธีการของ AOAC, 1990)

1.1 การวิเคราะห์ปริมาณเปอร์เซ็นต์โปรตีนรวม

1.1.1 อุปกรณ์

1. ชุดเครื่องย่อยโปรตีน (Gerhardt รุ่น Kjeldatherm)
2. ชุดเครื่องกลั่นโปรตีน (Gerhardt รุ่น Vapodest 1)
3. หลอดย่อยโปรตีน
4. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
5. กระดาษชั่งสาร
6. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask)
7. บิวเรต ขนาด 50 มิลลิลิตร พร้อมขาตั้ง

1.1.2 สารเคมี

1. กรดซัลฟิวริกเข้มข้น (Sulfuric acid, H_2SO_4) 93–98 เปอร์เซ็นต์
2. สารเร่งรวม (Catalyst mixture)
 - เตรียมโดย ชั่งคอปเปอร์ซัลเฟต (Copper sulfate, $CuSO_4$) 7 กรัม กับ โพแทสเซียมซัลเฟต (Potassium sulfate, K_2SO_4) 100 กรัม ผสมให้เข้ากัน
3. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide, NaOH) 45 เปอร์เซ็นต์
 - เตรียมโดย ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 450 กรัมในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร
4. สารละลายกรดเกลือ (Hydrochloric acid, HCl) 0.1 นอร์มอล
 - เตรียมโดย ละลายกรดเกลือ 9 มิลลิลิตรในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรจนครบ 1 ลิตร
5. สารละลายกรดบอริก (Boric acid, H_3BO_3) 4 เปอร์เซ็นต์

- เตรียมโดย ละลายกรดบอริก 4 กรัม ในน้ำกลั่น ต้มจนละลายหมด แล้ว
ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร

6. อินดิเคเตอร์รวม (Mixed indicator)

- เตรียมโดย ละลายเมทิลเรด (Methyl red) 0.2 กรัม ในแอลกอฮอล์ 95
เปอร์เซ็นต์ ปรับปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตร และละลายเมทิลินบลู (Methylene blue) 0.2 กรัม
ในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ปรับปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายเมทิลเรด 2
ส่วน ผสมกับสารละลายเมทิลินบลู 1 ส่วน เขย่าให้เข้ากัน

7. เมทิลออเรนจ์อินดิเคเตอร์ (Methyl orange indicator)

- เตรียมโดย ละลายเมทิลออเรนจ์ 0.1 กรัม ในน้ำกลั่น และปรับปริมาตร
จนครบ 100 มิลลิลิตร

8. สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate, Na_2CO_3) 0.1 นอร์

มอล

- เตรียมโดย อบโซเดียมคาร์บอเนตที่อุณหภูมิ 260–270 องศาเซลเซียส
เป็นเวลา 30 นาที ซึ่งสารดังกล่าว 1.325 กรัม ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 250 มิลลิลิตร

1.1.3 วิธีการวิเคราะห์

ก. ขั้นตอนการย่อย (Digestion)

1. ชั่งตัวอย่างด้วยกระดาษชั่งสารที่ปราศจากไนโตรเจน ให้ได้น้ำหนัก
0.3–0.5 กรัม บันทึกน้ำหนักโดยละเอียด (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) ใส่ตัวอย่างลงในขวดวิเคราะห์
โปรตีน

2. เติมสารเร่งรวม 3 กรัม

3. เติมกรดกำมะถันเข้มข้น 100 มิลลิลิตร

4. นำไปให้ความร้อนด้วยชุดเครื่องย่อยโปรตีนที่อุณหภูมิ 375 องศา
เซลเซียส จนกระทั่งสารละลายในขวดวิเคราะห์ใส (สีเขียวมรกต) ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น

ข. ขั้นตอนการกลั่น (Distillation)

1. นำหลอดโปรตีนที่เย็นและมีสารละลายตัวอย่างเติมน้ำกลั่น 20
มิลลิลิตร

2. ต่อขวดแก้ววิเคราะห์โปรตีนเข้ากับชุดเครื่องกลั่นที่มีขวดรูปชมพู่ที่
บรรจุกรดบอริก 40 มิลลิลิตร (ใส่อินดิเคเตอร์ 2–3 หยด) โดยให้ปลายของท่อจากกระบอก

แก้วควมแน่นจุ่มอยู่ในกรดบอริก เดิม โซเดียมไฮดรอกไซด์ 45 เปอร์เซ็นต์ ลงในขวดวิเคราะห์ซ้ำๆ จนมีปริมาตร 50 มิลลิลิตร จะเห็นสารละลายมีสีดำ

3. กลั่นจนกระทั่งไม่มีก๊าซเอมโมเนียออกมา เมื่อกรดบอริกเปลี่ยนเป็นสีเขียวแล้วจึงกลั่นต่อไปอีก 10 นาที จากนั้นนำขวดรูปชมพู่ออกจากเครื่องกลั่น

ค. ขั้นตอนการไตเตรท (Titration)

1. นำไปไตเตรทด้วยสารละลายกรดเกลือมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนจนกระทั่งกรดบอริกเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินอ่อน

2. บันทึกปริมาตรของกรดเกลือมาตรฐานที่ใช้เพื่อการคำนวณต่อไป

หมายเหตุ: ทำ Blank โดยใช้กระดาษชั่งสารอย่างเดี่ยวและทำการย่อยและกลั่นเหมือนตัวอย่างทุกขั้นตอน

การคำนวณ

$$\text{โปรตีน (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{1.4 (V_1 - V_2) N \times 6.25}{W}$$

โดย V_1 คือ ปริมาตรของกรดเกลือที่ใช้ในการไตเตรทกับตัวอย่าง

V_2 คือ ปริมาตรของกรดเกลือที่ใช้ไตเตรทกับ Blank

N คือ ความเข้มข้นของกรดเกลือ (นอร์มอล)

W คือ น้ำหนักตัวอย่าง

การตรวจหาความเข้มข้นของสารละลายกรดเกลือมาตรฐาน

ดูดสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 40 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร เติมนเมทิลออเรนจอินดิเคเตอร์ 2-3 หยด ทำการไตเตรทด้วยสารละลายกรดเกลือ 0.1 นอร์มอล (จากสารละลายสีเหลืองเปลี่ยนเป็นสีส้มแดง หรือจนสีไม่เปลี่ยน) คำนวณความเข้มข้นของสารละลายกรดเกลือโดยใช้สูตร $N_1V_1 = N_2V_2$ หรือ

$$\text{นอร์มอลลิตีของกรดเกลือ} = \frac{\text{น้ำหนัก (กรัม) ของโซเดียมคาร์บอเนต} \times 100}{\text{สารละลายกรดเกลือ (มิลลิลิตร)} \times 52.994}$$

หมายเหตุ: ควรทำ 3 ซ้ำเพื่อให้ได้ค่าที่แน่นอน

1.2 การวิเคราะห์ปริมาณไขมันรวม

1.2.1 อุปกรณ์

1. ชุดวิเคราะห์ไขมัน (Soxtec System HT6)
2. ถ้วยสกัดไขมัน (Cup) และลูกแก้ว
3. ไม้กรองสาร (Thimble)
4. โถดูดความชื้น
5. ตู้อบ

1.2.2 สารเคมี

1. สารละลายไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane)

1.2.3 วิธีการ

1. อบถ้วยสกัดไขมัน (Cup) ที่มีลูกแก้ว 2-3 เม็ด และตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ในตู้อบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส อบจนแห้งแล้วตั้งทิ้งไว้เย็นในโถดูดความชื้น
2. ชั่งน้ำหนักถ้วยสกัดไขมันพร้อมลูกแก้วให้ได้น้ำหนักคงที่ (W_1)
3. ชั่งตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ใส่กระดาษกรอง ประมาณ 1-2 กรัม (W_2) ห่อให้มิดชิด ใส่ลงในไม้กรองสารที่เตรียมไว้ นำไปใส่เข้าเครื่องสกัดไขมัน
4. นำถ้วยสกัดไขมันพร้อมลูกแก้วที่ชั่งไว้เติมสารละลายไดคลอโรมีเทน 25 มิลลิลิตร แล้วใส่เข้าเครื่องสกัดไขมันให้เรียบร้อย
5. เปิดเครื่องสกัดไขมัน ปรับอุณหภูมิไปที่ 180 องศาเซลเซียส เปิดน้ำเข้าเครื่อง ปิดวาล์ว และเลื่อนปุ่มไปที่ Boiling ต้มให้เดือดนาน 30 นาที
6. เลื่อนปุ่มไปที่ Rinsing เพื่อล้างตัวอย่าง 20 นาที
7. ปิดวาล์ว เปิดสวิทช์อากาศ เลื่อนปุ่มไปที่ Evaporation เพื่อให้สารละลายระเหยออกไป 5 นาที
8. ปิดเครื่อง ปิดอากาศและน้ำ แล้วเลื่อนปุ่ม Evaporation กลับที่เดิม นำถ้วยสกัดไขมันออกจากเครื่อง ตั้งไว้ให้เย็นแล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส จนแห้ง
9. นำถ้วยสกัดไขมันออกมาใส่ในโถดูดความชื้นทิ้งไว้ให้เย็นแล้วนำมาชั่งน้ำหนัก (W_3)

การคำนวณ

$$\text{ไขมัน (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{(W_3 - W_1) \times 100}{W_2}$$

โดยที่ W_1 คือ น้ำหนักถ้วยสกัดไขมันพร้อมลูกแก้ว

W_2 คือ น้ำหนักตัวอย่าง

W_3 คือ น้ำหนักถ้วยสกัดไขมันพร้อมลูกแก้วและตัวอย่างหลังอบ

1.3 การวิเคราะห์ความชื้น

1.3.1 อุปกรณ์

1. ถ้วย Crucible
2. เตาอบ
3. ตาชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
4. โถดูดความชื้น

1.3.2 วิธีการ

1. นำถ้วย Crucible เข้าสู่อบอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที และทำให้เย็นในโถดูดความชื้น
2. ชั่งและบันทึกน้ำหนัก Crucible โดยละเอียด (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง)
3. ชั่งตัวอย่างใส่ถ้วย Crucible ประมาณ 3 กรัม โดยบันทึกน้ำหนักอย่างละเอียด
4. นำตัวอย่างเข้าสู่อบ โดยใช้อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง
5. นำตัวอย่างที่อบแล้วใส่ใน โถดูดความชื้น ตั้งไว้ให้เย็น บันทึกน้ำหนักตัวอย่าง
6. ทำซ้ำข้อ 4-5 จนกระทั่งน้ำหนักที่ได้คงที่โดยน้ำหนักที่หายไป คือ น้ำหนักของความชื้น

การคำนวณ

$$\text{ความชื้น (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{(W_1 - W_2) \times 100}{W_1}$$

โดย W_1 คือ น้ำหนักตัวอย่างและ Crucible ก่อนอบแห้ง

W_2 คือ น้ำหนักของตัวอย่างและ Crucible หลังอบแห้ง

1.4 การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า

1.4.1 อุปกรณ์

1. ถ้วย Crucible
2. เตาเผา
3. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
4. โถดูดความชื้น

1.4.2 วิธีการ

1. ชั่งน้ำหนักตัวอย่าง 2 กรัม ใส่ถ้วยกระเบื้องเคลือบ บันทึกน้ำหนักโดยละเอียด

2. นำไปเผาในเตาเผาอุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จนเถ้าเป็นสีขาว นำเข้าโถดูดความชื้น ตั้งไว้ให้เย็น แล้วนำออกมาชั่งน้ำหนักโดยละเอียด

การคำนวณ

$$\text{เถ้า (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{(B - A)}{W} \times 100$$

โดย A คือ น้ำหนักตัวอย่างของถ้วยกระเบื้องเคลือบ

B คือ น้ำหนักตัวอย่างของถ้วยกระเบื้องเคลือบกับน้ำหนักของเถ้าหลังการเผา

W คือ น้ำหนักตัวอย่างก่อนเผา

ภาคผนวก ก

1. การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เปปซิน ทริปซิน อะไมเลส และไลเปส

ใช้ตัวอย่างปลาที่ออกอาหารเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้ทางเดินอาหารปราศจากอาหารทดลอง จากนั้นสุ่มเก็บตัวอย่างปลาทดลองทุกสัปดาห์ให้ได้น้ำหนักรวมประมาณ 0.05-0.2 กรัมต่อตัว ชั่งน้ำหนักแล้วเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เปปซิน ทริปซิน อะไมเลสและไลเปส ตามวิธีการของ Bergmeyer และคณะ (1974)

1.1 การสกัดเอนไซม์

ตัวอย่างปลาเริ่มต้นการทดลอง-สัปดาห์ที่ 3 ไม่สามารถผ่าตัดทางเดินอาหารได้จึงต้องสกัดเอนไซม์จากปลาทั้งตัว แต่สำหรับตัวอย่างของสัปดาห์ที่ 4 ผ่าตัดเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารเพื่อนำไปวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เปปซิน ไล้ตั้งและลำไส้นำไปวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ทริปซิน อะไมเลสและไลเปส

1.1.1 วิธีการ

1. ใช้น้ำหนักตัวอย่าง: น้ำกลั่นเย็น (อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส) ผสมกันในสัดส่วน 1:5 W/V
2. บดตัวอย่างให้เป็นเนื้อเดียวกันซึ่งทำในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อป้องกันการเสียสภาพของเอนไซม์ เมื่อตัวอย่างละเอียดเป็นเนื้อเดียวกันแล้ว นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที
3. ดูดส่วนใสเพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณ โปรตีนรวมด้วยวิธี Modified Lowry Method (Lowry *et al.*, 1951) และวัดกิจกรรมเอนไซม์ต่างๆ ต่อไป ซึ่งหากตัวอย่างเอนไซม์มีไขมันปะปนอยู่จะต้องนำไปหมุนเหวี่ยงอีกครั้ง

1.2 การวัดปริมาณโปรตีนรวมจากเอนไซม์สกัด

1.2.1 สารเคมี

1. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
2. Sodium tartrate
3. Na_2CO_3
4. NaOH
5. Follin phenol reagent
6. Bovine Serum Albumin (BSA)

1.2.2 การเตรียมสาร

1. Alkaline copper solution

- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.5 เปอร์เซ็นต์ 1 ส่วน

เตรียมโดย ชั่ง $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.5 กรัม ละลายในน้ำ 10 มิลลิลิตร

- Sodium tartrate 1 เปอร์เซ็นต์ 1 ส่วน

เตรียมโดย ชั่ง Sodium tartrate 0.1 กรัม ละลายในน้ำ 10 มิลลิลิตร

- Na_2CO_3 1 เปอร์เซ็นต์ ใน 0.5 โมลาร์ NaOH 50 ส่วน

เตรียมโดย ชั่ง NaOH 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร แล้วเติม Na_2CO_3 5 กรัม

กรัม

จากนั้นนำสารละลายทั้งหมดมาผสมกัน โดยเติม $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และ Sodium tartrate 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงใน Na_2CO_3 1 เปอร์เซ็นต์ และปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร

หมายเหตุ: ใช้น้ำกลั่นต้มในการเตรียมสารละลายทั้งหมด และเก็บสารละลายในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. Follin phenol reagent (1:10 v/v)

เตรียมโดย ผสม Follin phenol reagent 1 มิลลิลิตร ละลายในน้ำ DDW 10 มิลลิลิตร

3. สารละลายมาตรฐาน Bovine Serum Albumin (BSA) 1 มิลลิกรัมต่อ

มิลลิลิตร

เตรียมโดย ชั่ง BSA 10 มิลลิกรัม ละลายและปรับปริมาตรในน้ำ DDW 10

มิลลิลิตร

1.2.3 วิธีการ

1. เจือจางเอนไซม์สกัดด้วยน้ำ DDW ให้อยู่ในช่วงที่สามารถเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานได้
2. คูณเอนไซม์สกัดปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ถาดหลุมก้นแบน 96 ช่อง
3. เติมสารละลาย Alkaline copper 100 ไมโครลิตร ตั้งไว้ 10 นาที
4. เติมสารละลาย Follin phenol 150 ไมโครลิตร ตั้งไว้ 10 นาที
5. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 640 นาโนเมตร และคำนวณค่าที่ได้ด้วยการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน BSA

1.3 การวัดกิจกรรมเอนไซม์เปปซิน

1.3.1 สารเคมี

1. Glycine; A.R. $\text{CH}_2\text{NH}_2\text{COOH}$; M.W. = 75.068 กรัม/โมล
2. Sodium chloride; A.R. NaCl; M.W. = 58.4527 กรัม/โมล
3. L-Tyrosine; A.R. $\text{C}_9\text{H}_9\text{NO}_3$; M.W. = 181.19 กรัม/โมล
4. HCl 2 และ 1 นอร์มอล
5. Trichloroacetic acid, A.R. CCl_3COOH ; M.W. = 168.38 กรัม/โมล
6. Haemoglobin powder

1.3.2 การเตรียมสาร

1. บัฟเฟอร์: 0.2 M Glycine – NaCl. HCl
เตรียมโดย ชั่ง Glycine ($\text{CH}_2\text{NH}_2\text{COOH}$) 1.5014 กรัม และ NaCl 1.1691 กรัม ละลายในน้ำ DDW 80 มิลลิลิตร แล้วปรับ pH ให้เท่ากับ 2.8 ด้วย HCl 1 นอร์มอล จากนั้นจึงปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร
2. สารละลายมาตรฐาน Tyrosine 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
เตรียมโดย ชั่ง L-Tyrosine 50 มิลลิกรัม ละลายในน้ำ DDW 4 มิลลิลิตร จะได้สารละลายสีขาวขุ่น จากนั้นเติม HCl 2 นอร์มอล ปริมาตร 0.5-1 มิลลิลิตร ได้สารละลายจะใส และปรับปริมาตรให้ครบ 10 มิลลิลิตร
3. Trichloroacetic acid 5 เปอร์เซ็นต์

เตรียมโดย ชั่ง Trichloroacetic acid 5 กรัม ละลายและปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร

4. ซับสเตอร์ต: Haemoglobin 1 เปอร์เซ็นต์

เตรียมโดย ชั่ง Haemoglobin ผง 1 กรัม ละลายในน้ำ DDW และปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร

1.3.3 วิธีการ

1. เจือจางเอนไซม์สกัดด้วยน้ำ DDW ให้อยู่ในช่วงที่สามารถเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานได้

2. คูดสารละลายบัฟเฟอร์ 0.2 โมลาร์ Glycine – NaCl, HCl 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาดเล็ก (Microtube)

3. เติมซับสเตอร์ต Haemoglobin 1 เปอร์เซ็นต์ 125 ไมโครลิตร

4. เติมเอนไซม์สกัดปริมาตร 25 ไมโครลิตร ผสมและบ่มที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 26 ± 1 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที

5. หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย Trichloroacetic acid 5 เปอร์เซ็นต์ 375 ไมโครลิตร เพื่อตกตะกอนโปรตีนก้อนใหญ่

6. นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

7. จากนั้นดูดส่วนใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร และคำนวณค่าที่ได้ด้วยการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน L-Tyrosine

การคำนวณ

$$\text{Pepsin activity (Unit/ ml/min)} = \frac{\text{Tyrosine } (\mu\text{g/ml}) \times \text{V total (ml)} \times \text{Dilution factor of enzyme}}{\text{MW of Tyrosine} \times \text{time (min)} \times \text{V of enzyme (ml)}}$$

1.4 การวัดกิจกรรมเอนไซม์ทริปซิน

1.4.1 สารเคมี

1. Tris (hydroxymethyl) aminothane, A.R. $\text{H}_2\text{NC}(\text{CH}_2\text{OH})_3$; M.W.= 121.14 กรัม/โมล
2. Calcium chloride, A'R' $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; M.W.= 147.02 กรัม/โมล
3. N_α -Benzoyl-DL-arginine-4-nitroanilide hydrochloride, BAPNA; M.W.= 434.89 กรัม/โมล
4. Para-nitroanilide; M.W.= 138.13 กรัม/โมล

1.4.2 การเตรียมสาร

1. บัฟเฟอร์: 50mM Tris + 20mM CaCl_2 pH 8.0
เตรียมโดย ชั่ง Tris Ammonium 0.6057 กรัม และ $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.7351 กรัม ละลายในน้ำ DDW 80 มิลลิลิตร ปรับ pH เท่ากับ 8.0 แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร
2. ซับสเตรต: N_α -Benzoyl-DL-arginine-4-nitroanilide hydrochloride (BAPNA) 1 mM
เตรียมโดย ชั่ง BAPNA 0.0044 กรัม แล้วละลายด้วย Dimethyl Sulfoxide (DMSO) 100 ไมโครลิตร เติมบัฟเฟอร์ 50mM Tris + 20mM CaCl_2 pH 8.0 ให้ครบ 10 มิลลิลิตร
3. สารละลายมาตรฐาน Para-nitroanilide 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
เตรียมโดย ชั่ง Para-nitroanilide 0.01 กรัม ละลายและปรับปริมาตรในน้ำ DDW 10 มิลลิลิตร

1.4.3 วิธีการ

1. ดูดเอนไซม์สกัดปริมาตร 10 ไมโครลิตร ใส่ภาชนะหลุมก้นแบน 96 ช่อง
2. เติมสารละลาย BAPNA 1 mM 190 ไมโครลิตร
3. วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร ทุกๆ 15 วินาที เป็นเวลา 3 นาที
4. นำข้อมูลไปสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความยาวคลื่นและเวลา เพื่อหาค่า Initial velocity แล้วนำมาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน Para-nitroanilide

การคำนวณ

$$\text{Unit of Enzyme activity } (\mu\text{mol/ml}) = \frac{(\text{Abs at } 410 \text{ nm/ min}) \times 1000 \text{ ml} \times \text{ml of reaction volume}}{8800 \text{ mol/L} \cdot \text{cm} \times \text{ml of enzyme solution assay} \times 1 \text{ cm}}$$

$$\epsilon \text{ ของ } \rho\text{-nitroanilide} = 8800 \text{ mol/L} \cdot \text{cm}$$

$$\begin{aligned} \text{Specific trypsin activity} &= \text{Unit of enzyme activity/ mg protein} \\ &= \mu\text{mol/ ml/ mg protein} \end{aligned}$$

1.5 การวัดกิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส

1.5.1 สารเคมี

1. Tris (hydroxymethyl) aminothane, A.R. $\text{H}_2\text{NC}(\text{CH}_2\text{OH})_3$; M.W.= 121.14 กรัม/โมล
2. Sodium chloride; A.R. NaCl; M.W. = 58.4527 กรัม/โมล
3. Sodium hydroxide; A.R. NaOH; M.W. = 40 กรัม/โมล
4. Starch soluble; A.R. $(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n$
5. Potassium sodium tartrate; A.R. $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; M.W.= 282.22 กรัม/โมล
6. 3,5 Dinitrosalicylic acid (DNS); A.R. DNS; M.W.= 228.12 กรัม/โมล
7. Maltose; A.R. D-(+)-Maltose monohydrate, Grade I, Minimum 98%; M.W.= 360.32 กรัม/โมล

1.5.2 การเตรียมสาร

1. บัฟเฟอร์: 0.05M Tris-HCl + 10 mM NaCl pH 8.5
เตรียมโดย ชั่ง Tris Ammonium 1.2114 กรัม และ NaCl 0.1170 กรัม ละลายในน้ำ DDW 180 มิลลิลิตร ปรับ pH เท่ากับ 8.5 และปรับปริมาตรให้ครบ 200 มิลลิลิตร
2. ซับสเตรต: Starch 1 เปอร์เซ็นต์
เตรียมโดย ชั่ง Starch 1 กรัม ละลายในบัฟเฟอร์ 0.05M Tris-HCl 100 มิลลิลิตร นำไปต้มจนได้สารละลายใสไม่มีสี และปรับปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตร
3. NaOH 1 นอร์มอล

เตรียมโดย ชั่ง NaOH 4 กรัม ละลายและปรับปริมาตรในน้ำ DDW 100 มิลลิลิตร

4. 3,5 Dinitrosalicylic acid (DNS) 1 เปอร์เซ็นต์

เตรียมโดย ชั่ง DNS 1 กรัม ละลายในน้ำ DDW 40 มิลลิลิตร เติม NaOH 1 นอร์มอล 40 มิลลิลิตร คนให้ DNS ละลายหมด แล้วเติม Potassium sodium tartrate 30 กรัม และปรับปริมาตรด้วยน้ำ DDW

5. สารละลายมาตรฐาน Maltose 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เตรียมโดย ชั่ง Maltose 10 มิลลิกรัม ละลายและปรับปริมาตรในน้ำ DDW 10 มิลลิลิตร

1.5.3 วิธีการ

1. เตรียมสารละลายต่างๆ ในหลอดตามลำดับดังนี้

ลำดับที่	สารละลาย	ปริมาตร (ไมโครลิตร)		
		Sample	Blank	Control
1	บัฟเฟอร์ 0.05M Tris-HCl pH 8.5	125	125	125
2	เอนไซม์สกัด	25	น้ำ DDW 25	25
3	ซัสเตรต	125	125	125
บ่มที่อุณหภูมิ 26±1 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที				ไม่บ่ม
4	DNS 1 เปอร์เซ็นต์	125	125	125

2. ต้มในน้ำเดือด 100 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที

3. เจือจางด้วยน้ำกลั่น 250 ไมโครลิตร ทำให้เย็น และวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

4. นำข้อมูล Sample-Control และเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน Maltose

การคำนวณ

$$\alpha\text{-amylase activity} = \frac{[(\text{OD sample} - \text{mean blank}) - \text{ค่าคงที่สมการ}] \times V \text{ total (ml)} \times \text{Dilution factor of enzyme}}{m \text{ ของสมการ} \times V \text{ of enzyme} \times \text{time (min)}}$$

1.6 การวัดกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส

1.6.1 สารเคมี

1. Tris (hydroxymethyl) aminothane, A.R. $\text{H}_2\text{NC}(\text{CH}_2\text{OH})_3$; M.W.= 121.14 กรัม/โมล
2. Calcium chloride, A'R' $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; M.W.= 147.02 กรัม/โมล
3. Para-nitrophenyl palmitate (p-NPP); MW.= 377.5 กรัม/โมล
4. Gum arabic
5. 2-Propanol
6. Para-nitrophenol; M.W.= 139.11 กรัม/โมล
7. Triton x-100

1.6.2 การเตรียมสาร

1. บัฟเฟอร์: 50mM Tris + 20mM CaCl_2 pH 8.0
เตรียมโดย ชั่ง Tris Ammonium 0.6057 กรัม และ $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.7351 กรัม ละลายในน้ำ DDW 80 มิลลิลิตร ปรับ pH เท่ากับ 8.0 แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร
2. ซับสเตรต: บัฟเฟอร์+1 เปอร์เซ็นต์ Triton x-100 + 0.1 เปอร์เซ็นต์ (W/V) Gum Arabic
เตรียมโดย
สารละลาย A : ชั่ง p-NPP 0.03 กรัม ละลายด้วย 2-Propanol 10 มิลลิลิตร
สารละลาย B : ชั่ง Gum arabic 0.1 กรัม ละลายในบัฟเฟอร์ 100 มิลลิลิตร ค่อยๆ คนให้ละลายจนหมด แล้วเติมสารละลาย A เขย่าเบาๆ ให้ละลายจนได้สารละลายใส ไม่มีสี
3. สารละลายมาตรฐาน Para-nitrophenol 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
เตรียมโดย ชั่ง Para-nitrophenol 0.01 กรัม ละลายและปรับปริมาตรในน้ำ DDW 10 มิลลิลิตร

1.6.3 วิธีการ

1. คุดเอนไซม์สกัดปริมาตร 10 ไมโครลิตร ใส่ถาดหลุมก้นแบน 96 ช่อง

2. เติมซับสเตรต 190 ไมโครลิตร
3. วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร ทุกๆ 15 วินาที เป็นเวลา 3 นาที
4. นำข้อมูลไปสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความยาวคลื่นและเวลา เพื่อหาค่า Initial velocity แล้วนำมาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน Para-nitrophenol

การคำนวณ

$$\text{Unit of Enzyme activity}(\mu\text{mol/ml}) = \frac{(\text{Abs at } 410 \text{ nm/min}) \times V \text{ total (ml)} \times \text{Dilution factor of enzyme}}{\text{ค่าคงที่ของสมการ (m)} \times V \text{ of enzyme}}$$

ภาคผนวก ง

การเก็บตัวอย่างลูกปลากระพงขาวอายุแรกฟัก-30 วัน หลังฟักออกเป็นตัว สำหรับการทดลองที่ 1

ตารางที่ ง.1 ความยาวลำตัวเฉลี่ย และน้ำหนักตัวเฉลี่ยของลูกปลา การให้อาหาร และคุณภาพน้ำในระบบเลี้ยงลูกปลากระพงขาวอายุแรกฟัก-30 วัน หลังฟักออกเป็นตัว (DPH¹)

อายุของลูกปลา ² (DPH)	วันที่เก็บตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง (ตัวต่อครั้ง)		
		วัดความยาว	ชั่งน้ำหนัก	ศึกษาเนื้อเยื่อวิทยา
0	3 ธ.ค. 53	30	-	40
1	5 ธ.ค. 53	30	-	40
2	6 ธ.ค. 53	30	-	40
3	7 ธ.ค. 53	30	250	40
4	8 ธ.ค. 53	30	-	40
5	9 ธ.ค. 53	30	-	40
6	10 ธ.ค. 53	30	250	40
7	11 ธ.ค. 53	30	-	40
9	13 ธ.ค. 53	30	200	40
11	15 ธ.ค. 53	30	-	40
13	17 ธ.ค. 53	30	100	40
15	19 ธ.ค. 53	30	100	40
17	21 ธ.ค. 53	30	10	40
19	23 ธ.ค. 53	30	-	40
21	25 ธ.ค. 53	30	10	40
24	28 ธ.ค. 53	30	10	40
27	31 ธ.ค. 53	30	10	40
30	1 ม.ค. 54	30	10	40

¹DPH = Days post hatch

²ความถี่ในการเก็บตัวอย่าง; ลูกปลาอายุ 0-7 วัน เก็บทุกวัน, 8-21 วัน เก็บทุก 2 วัน และ 22-30 วัน เก็บทุก 3 วัน

ภาคผนวก จ

ราคาวัตถุดิบอาหารปลากะพงขาว

ตารางที่ จ.1 ราคาวัตถุดิบอาหารที่ใช้ในการทดลองที่ 2

ลำดับ	วัตถุดิบ	ราคา	รายละเอียด	ที่มา
1	ปลาป่น	47.99 บาท/กก.	ราคาปลาป่นนำเข้า อ้างอิงเดือนมีนาคม พ.ศ. 2555	สมาคมผู้ผลิต อาหารสัตว์ไทย
2	หมักป่น	-	เตรียมเองจากหมักสด	หมักสด ราคา 70 บาท/กก.
3	โปรตีนไฮโดรไล เสต	-	เตรียมเองจากปลาทุแวกสด ย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส	ปลาทุแวก ราคา 50 บาท/กก., เอนไซม์อัลคาเลส (Sigma) ขนาด 50 ml ราคา 3,808.72 บาท
4	เจลาติน	380 บาท/ กก.	เกรดสำหรับทำอาหาร	บริษัท หาดใหญ่ เบเกอร์รี่ เซ็นเตอร์ จำกัด
5	คาราจีแนน	1,700 บาท/กก.	เกรดสำหรับทำอาหาร	ห้างหุ้นส่วนจำกัด ไฮ ซายน์
6	เด็กซ์ตริน	-	Dextrin white, Technical, Himedia	ภาควิชาวาริชศาสตร์
7	น้ำมันปลา	-	ได้รับความอนุเคราะห์ จากบริษัท เจริญโภคภัณฑ์อาหาร จำกัด	-
8	เลซิดิน	-	ได้รับความอนุเคราะห์ จากบริษัท ไทยยูเนียน ฟีดมิลล์ จำกัด	-
9	วิตามินซี	-	-	-
10	วิตามินรวม	-	ได้รับความอนุเคราะห์จาก บริษัท ไทยยูเนียน ฟีดมิลล์ จำกัด	-
11	แร่ธาตุรวม 40 กรัม/ อาหาร 1 กก.	25.78	ราคารวมสารเคมี	ภาควิชาวาริชศาสตร์
12	NaCl 2 กรัม/ อาหาร 1 กิโลกรัม	0.32	-	ภาควิชาวาริชศาสตร์
13	บีเอชที	-	-	ภาควิชาวาริชศาสตร์

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล	นางสาวจุฑารัตน์ คชเวช		
รหัสประจำตัวนักศึกษา	5110620006		
วุฒิการศึกษา			
วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา	
วิทยาศาสตรบัณฑิต (วาริชศาสตร์)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2550	

ทุนการศึกษา

1. ทุนอุดหนุนการวิจัยของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
2. ได้รับการสนับสนุนส่วนหนึ่งจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพ เกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

จุฑารัตน์ คชเวช, ชุติมา ตันติกิตติ และฤดีกร วิวัฒน์ปฐพี. 2556. ผลของรูปแบบอาหารสำเร็จรูปต่อการยอมรับอาหาร อัตรารอดตาย และการเจริญเติบโตในปลาเกะพงขาววัยรุ่นตอนต้น (*Lates calcarifer* Bloch, 1790). วารสารการประมง 66(1): (กำลังอยู่ระหว่างการตีพิมพ์).

Khochchawech, J. and Tantikitti, C. 2010. Effects of forms of weaning diets on acceptability, survival rate and growth in early juvenile Asian seabass (*Lates calcarifer*, Bloch). The 7th IMT-GT UNINET and The 3rd Joint International PSU-UNS Conferences, 7-8 October 2010, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, Thailand.

Srichanun, M., Tantikitti, C., Chotikachinda, R., Iang-ubon, S. and Khochchawech, J. 2012. Different protein hydrolysate products and levels on survival rate, growth and activity of proteolytic and brush border enzymes in Asian sea bass larvae. XV International Symposium on Fish Nutrition and Feeding, 4-7 June 2012, Molde, Norway.