ผลของการเสริมเมไธโอนีนในอาหารปลากะพงขาวที่มีแหล่งโปรตีนทดแทนปลาป่นต่อการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหารและกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหาร

Effects of Methionine Supplementation in Diets Containing Alternative Protein Sources on Growth Performance, Feed Efficiency and Digestive Enzyme Activity in Asian Seabass (*Lates calcarifer*)

เนตรรังสี ประนามะ

Nedrangsee Pranama

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวาริชศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Sumitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Aquatic Science
Prince of Songkla University
2559

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ ผลของการเสริมเมไธโอนีนในอาหารปลากะพงขาวที่มีแหล่งโปรตีนทดแทนปลาป่นต่อการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหารและกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหาร

ผู้เขียน นางสาวเนตรรังสี ประนามะ

สาขาวิชา วาริชศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

……

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชุติมา ตันติกิตติ)

คณะกรรมการสอบ

……ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุภฎา คีรีรัฐนิคม)

……กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชุติมา ตันติกิตติ)

……กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.การุณ ทองประจุแก้ว)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวาริชศาสตร์

……

(รองศาสตราจารย์ ดร. ธีระพล ศรีชนะ)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชุติมา ตันติกิตติ)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ลงชื่อ.....
(นางสาวเนตรรังสี ประนามะ)
นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....

(นางสาวเนตรวังสี ประนามะ)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์ ผลของการเสริมเมไธโอนีนในอาหารปลากะพงขาวที่มีแหล่งโปรตีนทดแทนปลาป่นต่อการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหารและกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหาร

ผู้เขียน นางสาวเนตรรังสี ประนามะ

สาขาวิชา วาริชศาสตร์

ปีการศึกษา 2559

บทคัดย่อ

การศึกษาผลของการเสริมเมไธโอนีนในอาหารต่อการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหาร ชีวภาพพร้อมใช้ของเมไธโอนีน กิจกรรมของบรัชบอร์เดอร์เอนไซม์ และลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของลำไส้และไส้ติ่งของปลากะพงขาวระยะวัยรุ่น น้ำหนักเริ่มต้น 8.12-8.14 กรัม ในระบบน้ำจืด วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design : CRD) 12 ชุดการทดลองๆ ละ 3 ซ้ำ โดยอาหารทดลอง 12 สูตร มีกากถั่วเหลืองสกัดน้ำมันป่นและเนื้อป่นเป็นแหล่งโปรตีนหลักและเสริมด้วยเมไธโอนีน 2 รูปแบบคือ *DL*-Met และ MetMet ที่ระดับคือ 0 (สูตรควบคุม), 0.2, 0.4, 0.8, 1.2 และ 1.6 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีน สำหรับอาหารสูตรอ้างอิงมีปลาป่นร่วมกับกากถั่วเหลืองสกัดน้ำมันป่นเป็นแหล่งโปรตีนหลัก ทดลองในตู้ทดลองขนาด 120 ลิตร ความหนาแน่น 10 ตัว/ตู้ โดยให้อาหารทดลองจนปลาอิ่มวันละ 2 มื้อ เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่า อัตราการรอดตายของปลาที่ได้รับอาหารแต่ละสูตรไม่มีความแตกต่างกันอยู่ในช่วง 96.67-100 เปอร์เซ็นต์ ปลาที่ได้รับอาหารสูตรควบคุมมีน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะและประสิทธิภาพการใช้อาหารต่ำที่สุด ปลาที่ได้รับอาหารที่เสริมด้วย *DL*-met มีผลการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้โปรตีนและโปรตีนที่นำไปใช้ประโยชน์สูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารที่เสริมด้วย MetMet ในระดับเดียวกัน ในชั้นมิวโคซาของปลาที่ได้รับอาหารที่เสริมด้วย *DL*-met และ MetMet ในระดับต่ำพบว่า ความยาวของรอยย่นมีการลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับปลาที่ได้รับอาหารที่เสริมด้วย *DL*-met และ MetMet ในระดับสูงกว่า เมื่อพิจารณาผลการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหารพบว่า อาหารสำหรับปลากะพงขาวระยะวัยรุ่นที่มีการใช้กากถั่วเหลืองสกัดน้ำมันป่นและเนื้อป่นเป็นวัตถุดิบโปรตีนหลักควรมีเมไธโอนีนในอาหารเท่ากับ 1.17 เปอร์เซ็นต์ของอาหารหรือ 2.54 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีน สำหรับอาหารที่เสริมด้วย *DL*-met และ 1.23 เปอร์เซ็นต์ของอาหารหรือ 2.67 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีน สำหรับอาหารที่เสริมด้วย MetMet เมื่ออาหารมีซีสตีนที่ระดับ 0.53 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า ปลากะพงขาว

ที่ได้รับเมไธโอนีนทั้ง 2 รูปแบบ มีการเจริญเติบโตและชีวภาพพร้อมใช้ของเมไธโอนีนไม่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงสามารถนำเมไธโอนีนทั้ง 2 รูปแบบมาเสริมในอาหารปลากะพงขาวได้

Thesis Title	Effects of Methionine Supplementation in Diets Containing Alternative Protein Sources on Growth Performance, Feed Efficiency and Digestive Enzyme Activity in Asian Seabass (*Lates calcarifer*)
Author	Miss Nedrangsee Pranama
Major Program	Aquatic Science
Academic Year	2016

ABSTRACT

This study investigated the effects of methionine forms on growth performance, feed efficiency, bioavailability of methionine, brush border enzyme activity, intestine and pyloric caeca histology of Asian seabass (*Lates calcarifer*) with an average initial weight of 8.12±8.14 g in freshwater condition. The experiment was in a completely randomized design having twelve treatments with three replications. The experimental diets were formulated to contain dehulled soybean meal and meat meal as principle protein sources and supplemented with graded levels of *DL*-met and MetMet at 0 (control diet), 0.2, 0.4, 0.8, 1.2 and 1.6% of protein, respectively. The reference diet containing fish meal and dehulled soybean meal as the protein sources was also included. The fish were in 120 L aquaria at the density of ten fish per replication and fed with experimental diets twice daily to apparent satiation for 6 weeks. At the end of feeding trial, survival rate was not affected by dietary treatments which were in the range of 96.67-100%. Weight gain, specific growth rate and feed efficiency of fish fed the control diet were the lowest. Fish fed *DL*-met supplemented diets showed higher growth performance, protein efficiency ratio and productive protein value than those fed MetMet supplemented diets. Decreases in the intestine mucosa folds in the groups fed diets with low *DL*-met and MetMet supplemented levels were observed as compared with those fed higher *DL*-met and MetMet supplemented diets. Based on the growth performance and feed utilization efficiency, the optimal methionine supplementation

using *DL*-met in the diets having dehulled soybean and meat meal as protein sources for juvenile Asian seabass was 1.17% of diet or 2.54% of protein and 1.23% of diet or 2.67% of protein for MetMet supplementation when cysteine was at 0.53% of diet. The results on indifferent growth responses and bioavailability of methionine implied that Asian seabass could use both *DL*-met and MetMet for growth.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จไปได้ด้วยความอนุเคราะห์และความช่วยเหลือจากผู้เกี่ยวข้องทุกท่าน ซึ่งไม่อาจเขียนคำขอบคุณได้ครบทุกท่าน จึงขอขอบคุณทุกท่านด้วยใจใน ณ ที่นี้

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชุติมา ตันติกิตติ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์เป็นอย่างสูง ที่เสียสละเวลามอบความรู้ ให้คำปรึกษา ชี้แนะแนวทางในการศึกษาค้นคว้า การทำงาน กรุณาแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ จนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุภฎา คีรีรัฐนิคม และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.การุณ ทองประจุแก้ว กรรมการสอบวิทยานิพนธ์และแก้ไขวิทยานิพนธ์ทำให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งสงขลา ที่ให้ความอนุเคราะห์พันธุ์ปลากะพงขาวสำหรับใช้ในการทดลอง บริษัทเจริญโภคภัณฑ์อาหาร จำกัด (มหาชน) โรงงานผลิตอาหารสัตว์น้ำบ้านพรุ ที่ให้ความอนุเคราะห์ปลาป่น กากถั่วเหลือง แป้งสาลี น้ำมันปลาและโคลีนคลอไรด์ บริษัทไทยยูเนี่ยน ฟีดมิลล์ จำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์วิตามินผสม บริษัทไทยลักซ์ เอ็นเตอร์ไพรส์ จำกัด (มหาชน) ที่ให้ความอนุเคราะห์เนื้อป่น และบริษัท EVONIK ประเทศเยอรมนี ที่ให้ความอนุเคราะห์เมไธโอนีน

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำกิจการ ศุภมาตย์ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ เจ้าหน้าที่สำนักงานภาควิชาทุกคน และนักศึกษาปริญญาเอก ปริญญาโท ที่ให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ ทั้งความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำและกำลังใจจนกระทั่งวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบคุณบริษัท EVONIK ประเทศเยอรมนีและประเทศสิงคโปร์ ที่เป็นส่วนหนึ่งในการให้ทุนสนับสนุนการวิจัยและให้ความอนุเคราะห์วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของตัวอย่างทดลองของวิทยานิพนธ์นี้

สุดท้ายนี้ ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดาและครอบครัวของข้าพเจ้า ที่ให้การสนับสนุนการศึกษาและกำลังใจที่มอบให้ข้าพเจ้าตลอดมา นอกจากนี้ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ของข้าพเจ้าทุกคนที่คอยเป็นกำลังใจให้ข้าพเจ้าเสมอมา ทำให้ข้าพเจ้าได้ประสบความสำเร็จในการศึกษาครั้งนี้

เนตรรังสี ประนามะ

สารบัญ

สารบัญ 10

สารบัญตาราง 13

สารบัญภาพ 14

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 บทนำต้นเรื่อง 1

บทที่ 2 การตรวจเอกสาร 5

2.1 ชีววิทยาของปลากะพง 5

2.1.1 การจัดลำดับทางอนุกรมวิธาน 5

2.1.2 ลักษณะทั่วไป 6

2.1.3 การแพร่กระจายและถิ่นที่อยู่อาศัย 7

2.1.4 การเพาะเลี้ยงปลากะพงขาวในประเทศไทย 8

2.2 ความต้องการสารอาหารของปลากะพงขาว 8

2.2.1 ความต้องการโปรตีนและกรดอะมิโน 8

2.2.2 ความต้องการไขมันและกรดไขมันที่จำเป็น 9

2.2.3 ความต้องการคาร์โบไฮเดรต 10

2.2.4 ความต้องการวิตามิน 10

2.2.5 ความต้องการเกลือแร่ 11

2.3 แหล่งวัตถุดิบในอาหารปลา 11

2.3.1 การใช้วัตถุดิบโปรตีนทดแทนที่มาจากสัตว์ 17

2.3.2 การใช้วัตถุดิบโปรตีนทดแทนที่มาจากพืช 20

2.4 กระบวนการย่อยอาหารและการใช้ประโยชน์จากโปรตีนในปลา 24

2.4.1 ระบบย่อยอาหารของปลา 24

2.4.2 เอนไซม์ย่อยโปรตีน 33

2.5 กรดอะมิโนเมไธโอนีนและความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของปลา 36

2.5.1 กรดอะมิโนเมไธโอนีน 38
2.5.2 การศึกษารูปแบบและระดับความต้องการกรดอะมิโนเมไธโอนีน
ในอาหารสัตว์น้ำ 40
2.6 วัตถุประสงค์ของการทดลอง 47
บทที่ 3 วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการทดลอง 48
3.1 แผนการทดลอง 48
3.2 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการทดลอง 49
3.2.1 ลูกพันธุ์ปลากะพงขาว 49
3.2.2 การเตรียมอาหารทดลอง 49
3.2.3 ระบบการเลี้ยงและการให้อาหาร 50
3.2.4 การตรวจสอบการเจริญเติบโตและการเก็บตัวอย่าง 50
3.2.5 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ 55
บทที่ 4 ผลการทดลอง 57
4.1 องค์ประกอบกรดอะมิโนของอาหารทดลอง 57
4.2 การเจริญเติบโต 59
4.3 ประสิทธิภาพการใช้อาหาร 62
4.4 องค์ประกอบทางเคมี และกรดอะมิโนของปลา 65
4.5 กิจกรรมของเอนไซม์ลิวซีนอะมิโนเปปทิเดสและอัลคาไลน์ฟอสฟาเตส 67
4.6 การเปลี่ยนแปลงจุลกายวิภาคศาสตร์ของลำไส้และไส้ติ่ง 68
4.7 คุณภาพน้ำในตู้ทดลอง 73
บทที่ 5 บทวิจารณ์ 74
พฤติกรรมการกินอาหารของปลากะพงขาวในระหว่างการทดลอง 74
ระดับของเมไธโอนีนที่เหมาะสมในอาหารที่มีการทดแทนปลาป่นด้วยกากถั่วเหลือง
สกัดน้ำมันป่น 74
รูปแบบของเมไธโอนีนที่เหมาะสมที่ใช้ในอาหารสำหรับปลากะพงขาว 80
บทที่ 6 บทสรุปและข้อเสนอแนะ 85

เอกสารอ้างอิง 87

ภาคผนวก 104

ภาคผนวก ก. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของอาหารทดลองและปลาทดลอง 104

ภาคผนวก ข. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและลิวซีนอะมิโนเปปทิเดส 110

ภาคผนวก ค. การเตรียมตัวอย่างและการศึกษาพยาธิสภาพเนื้อเยื่อด้วยเทคนิคทางเนื้อเยื่อวิทยา 117

ประวัติผู้เขียน 120

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 ระดับโปรตีนที่เหมาะสมในอาหารสำหรับปลากะพงขาว 9
ตารางที่ 2 ปริมาณโปรตีนและองค์ประกอบของกรดอะมิโนในวัตถุดิบชนิดต่างๆ 14
ตารางที่ 3 วัตถุดิบที่ใช้เป็นแหล่งโปรตีนในอาหารสัตว์น้ำ 16
ตารางที่ 4 ระดับความต้องการเมไธโอนีนในอาหารของปลาชนิดต่างๆ 46
ตารางที่ 5 องค์ประกอบของอาหารทดลองที่มีการเสริมเมไธโอนีน 2 รูปแบบที่ 5 ระดับ 52
ตารางที่ 6 องค์ประกอบของกรดอะมิโนในอาหารทดลอง 58
ตารางที่ 7 สมการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นกับอัตราการเจริญเติบโต จำเพาะและอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อของปลากะพงขาวได้รับอาหาร ทดลองเป็นเวลา 6 สัปดาห์ 62
ตารางที่ 8 ปริมาณอาหารที่ปลากิน อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ ประสิทธิภาพการใช้ โปรตีนและโปรตีนที่นำไปใช้ประโยชน์ของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารทดลอง เป็นเวลา 6 สัปดาห์ 63
ตารางที่ 9 องค์ประกอบทางเคมีของปลาที่ได้รับอาหารทดลองเป็นเวลา 6 สัปดาห์ 65
ตารางที่ 10 องค์ประกอบของกรดอะมิโนของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารทดลองเป็น เวลา 6 สัปดาห์ 66
ตารางที่ 11 กิจกรรมของเอนไซม์ลิวซีนอะมิโนเปปทิเดสและเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ในไส้ติ่งและลำไส้ของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารทดลองเป็นเวลา 6 สัปดาห์ 68

สารบัญภาพ

ภาพที่ 1 ลักษณะทั่วไปของปลากะพงขาวเพศผู้และเพศเมีย 6
ภาพที่ 2 การแพร่กระจายของปลากะพงขาวในประเทศเขตร้อนและภูมิภาคใกล้เคียง
ในเอเชีย-แปซิฟิก 7
ภาพที่ 3 อวัยวะในระบบย่อยอาหารของปลา 25
ภาพที่ 4 ท่อทางเดินอาหารของปลาชนิดต่างๆ 26
ภาพที่ 5 อวัยวะในระบบย่อยอาหารของปลา Shi drum 28
ภาพที่ 6 โครงสร้างผนังเนื้อเยื่อลำไส้เล็กของสัตว์มีกระดูกสันหลัง 29
ภาพที่ 7 ลักษณะเนื้อเยื่อของลำไส้และไส้ติ่ง 30
ภาพที่ 8 ลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาในชั้นมิวโคซาของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่มี
ปลาป่นเป็นวัตถุดิบโปรตีนหลักและปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่มีกากถั่วเหลืองดิบ
เป็นวัตถุดิบโปรตีน 32
ภาพที่ 9 ลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาในชั้นมิวโคซาของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่มี
กากถั่วเหลืองดิบเป็นวัตถุดิบโปรตีน 33
ภาพที่ 10 กระบวนการกระตุ้นเอนไซม์ย่อยโปรตีนและเปปไทด์ในสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง 35
ภาพที่ 11 หน้าที่ของกรดอะมิโนในการเจริญเติบโต พัฒนาการต่างๆ และสุขภาพของปลา 38
ภาพที่ 12 โครงสร้างของเมไธโอนีน 39
ภาพที่ 13 กระบวนการเมแทบอลิซึมของเมไธโอนีน 40
ภาพที่ 14 โครงสร้างทางเคมีของแอล-เมไธโอนีน 41
ภาพที่ 15 โครงสร้างทางเคมีของแอล-เมไธโอนิล-แอล-เมไธโอนีน 41
ภาพที่ 16 โครงสร้างทางเคมีของดี-เมไธโอนิล-ดี-เมไธโอนีน 42
ภาพที่ 17 โครงสร้างทางเคมีของดี-เมไธโอนิล-แอล-เมไธโอนีน 42
ภาพที่ 18 โครงสร้างทางเคมีของแอล-เมไธโอนิล-ดี-เมไธโอนีน 42
ภาพที่ 19 โครงสร้างทางเคมีของดีแอล-เมไธโอนิล-ดีแอล-เมไธโอนีน 42
ภาพที่ 20 โครงสร้างทางเคมีของดีแอล-เมไธโอนีนไฮดรอกซีแอนาลอกฟรีแอซิดหรือ
ดีแอล-ไดไฮดรอกซีเตตระเมทิลไธโอบิวทาโนอิกแอซิด 43
ภาพที่ 21 โครงสร้างทางเคมีของดีแอล-เมไธโอนีนไฮดรอกซีแอนาลอกแคลเซียม 43

ภาพที่ 22 ความสัมพันธ์ระหว่างระดับของเมไธโอนีนในอาหารกับอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่เสริมด้วยเมไธโอนีนแบบ *DL*-met และ MetMet เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ 61
ภาพที่ 23 ความสัมพันธ์ระหว่างระดับของเมไธโอนีนในอาหารกับอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่เสริมด้วยเมไธโอนีนแบบ *DL*-met และ MetMet เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ 64
ภาพที่ 24 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางส่วนของเดินอาหารปลากะพงขาว 69
ภาพที่ 25 ภาพตัดขวางของเนื้อเยื่อลำไส้และไส้ติ่ง 69
ภาพที่ 26 ภาพตัดขวางของเนื้อเยื่อไส้ติ่งของปลากะพงขาวชุดการทดลองที่ 1, 2, 6 และ 12 ที่ได้รับอาหารสูตรอ้างอิง อาหารสูตรควบคุม อาหารสูตรพื้นฐานมีการเสริมเมไธโอนีนในรูปแบบ *DL*-met ที่ระดับ 0.54 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร และอาหารสูตรพื้นฐานมีการเสริมเมไธโอนีนในรูปแบบ MetMet ที่ระดับ 0.72 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร ตามลำดับ เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ 70
ภาพที่ 27 ภาพตัดขวางของเนื้อเยื่อลำไส้ชั้นมิวโคซาของปลากะพงขาวชุดการทดลองที่ 1-6 ที่ได้รับอาหารสูตรอ้างอิง อาหารสูตรควบคุมและอาหารสูตรพื้นฐานมีการเสริมเมไธโอนีนในรูปแบบ *DL*-met ที่ระดับ 0.09, 0.18, 0.36 และ 0.54 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร ตามลำดับ เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ 71
ภาพที่ 28 ภาพตัดขวางของเนื้อเยื่อลำไส้ชั้นมิวโคซาของปลากะพงขาวชุดการทดลองที่ 7-12 ที่ได้รับอาหารสูตรพื้นฐานมีการเสริมเมไธโอนีนในรูปแบบ *DL*-met ที่ระดับ 0.72 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร และอาหารสูตรพื้นฐานมีการเสริมเมไธโอนีนในรูปแบบ MetMet 0.09, 0.18, 0.36, 0.54 และ 0.72 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร ตามลำดับ เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ 72

บทที่ 1
บทนำ

1.1 บทนำต้นเรื่อง

ปลากะพงขาวเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่มีความสำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทย เนื่องจากเป็นปลาที่เลี้ยงง่าย สามารถเจริญเติบโตได้ในน้ำที่มีความขุ่นสูงและมีความเค็มที่แตกต่างกัน มีปริมาณความต้องการเพื่อการบริโภคสูง เนื่องจากเนื้อมีรสชาติดี และมีราคาขายสูง (Boonyaratpalin *et al*., 1998) จึงมีการเพาะเลี้ยงกันอย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะในบริเวณพื้นที่ติดชายทะเล

ผลผลิตปลากะพงขาวมาจากการเพาะเลี้ยงเป็นหลัก ตั้งแต่ปี 2543 มีปริมาณผลผลิตปลาเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยในปี 2549 มีปริมาณผลผลิตสูงกว่า 15,000 ตัน แต่ประสบปัญหามลภาวะทางน้ำต่างๆ ในปี 2550 เนื่องจากมีปริมาณน้ำจืดหลากเข้าสู่บริเวณพื้นที่เพาะเลี้ยงทำให้ปลาไม่สามารถปรับตัวได้ทันตามสภาพการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว จึงเกิดการตายเป็นจำนวนมาก ส่งผลให้มีผลผลิตปลากะพงขาวในปีดังกล่าวออกสู่ตลาดลดลง โดยมีปริมาณผลผลิตเพียง 12,366 ตัน อย่างไรก็ตามหลังจากประสบปัญหาดังกล่าว ต่อมาในปี 2551 ผลผลิตปลากะพงมีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องและมีแนวโน้มเพิ่มปริมาณผลผลิตขึ้นอย่างรวดเร็ว ซึ่งในปี 2553 ผลผลิตปลากะพงมีปริมาณมากกว่า 15,000 ตัน (กลุ่มวิจัยและวิเคราะห์สถิติการประมง, 2553) จนในปี 2558 ผลผลิตปลากะพงมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นถึง 16,690 ตัน (นเรศ, 2559)

ต้นทุนหลักในการเพาะเลี้ยงปลากะพงขาวคือค่าอาหาร โดยมีต้นทุนประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ของต้นทุนทั้งหมด เกษตรกรจึงต้องเลือกใช้อาหารที่มีคุณภาพดี มีคุณค่าทางโภชนาการที่ครบถ้วนและเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของปลากะพงขาว เพื่อให้เกิดประสิทธิภาพในการใช้ประโยชน์จากอาหารอย่างสูงสุดและส่งผลให้ปลากะพงขาวมีการเจริญเติบโตสูงสุด โดยในช่วงแรกของการพัฒนาอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ วัตถุดิบโปรตีนหลักที่นิยมใช้ในการผลิตอาหารสัตว์น้ำคือปลาป่น เนื่องจากมีโปรตีนสูงประมาณ 50-60 เปอร์เซ็นต์ มีกรดอะมิโนที่สมดุล มีไลซีนและเมไธโอนีนสูง มีปริมาณแคลเซียม ฟอสฟอรัสและกรดไขมันที่จำเป็น (โอเมก้า 3) สูง (นิฮารีฟัร, 2554) มีวิตามินบี 12 ไรโบฟลาวิน โคลีนและไนอาซีนสูง (นฤมล, 2550) และมีกลิ่นที่หอมชวนกิน (Jirsa *et al*., 2013) แต่ในปัจจุบันปลาป่นมีคุณภาพผันแปรไปตามฤดูกาลและ

ปริมาณวัตถุดิบปลาป่นเข้าสู่ภาวะวิกฤต เนื่องจากปริมาณที่ผลิตได้ไม่เพียงพอต่อความต้องการในการนำมาใช้ผลิตอาหารปลา ซึ่งในช่วงปี 2547-2551 ผลผลิตปลาป่นของไทยมีแนวโน้มลดลงเฉลี่ยร้อยละ 3.67 ต่อปี (สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร, 2555) ส่งผลให้ปลาป่นมีราคาสูงขึ้น ซึ่งในปัจจุบันมีราคาสูงถึงกิโลกรัมละ 33 บาท (ราคาปลาป่นประจำเดือนพฤษภาคม 2559; สมาคมผู้ผลิตอาหารสัตว์ไทย, 2559) สวนทางกับคุณภาพที่ลดลงเนื่องจากบางครั้งอาจมีการปลอมปนด้วยวัตถุดิบโปรตีนชนิดอื่น ดังนั้นจึงมีความสำคัญอย่างยิ่งในการศึกษาแหล่งวัตถุดิบโปรตีนทางเลือกเพื่อนำมาใช้ในอาหารปลา

ในการเลือกใช้วัตถุดิบโปรตีนเพื่อการผลิตอาหารปลากะพงขาวนั้น ต้องพิจารณาระดับกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในวัตถุดิบนั้นๆ รวมทั้งความสามารถของปลาในการย่อยวัตถุดิบแต่ละชนิด การดูดซึมสารอาหารและการนำสารอาหารไปใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึม โดยวัตถุดิบโปรตีนคุณภาพดีต้องมีกรดอะมิโนจำเป็น (essential amino acids: EAAs) ได้แก่ อาร์จินีน (arginine) ฮิสทิดีน (histidine) ไอโซลิวซีน (isoleucine) ลิวซีน (leucine) ไลซีน (lysine) เมไธโอนีน (methionine) ฟีนิลอะลานีน (phenylalanine) ทรีโอนีน (threonine) ทริปโตเฟน (tryptophan) และวาลีน (valine) อย่างครบถ้วนและมีสัดส่วนที่เหมาะสม เนื่องจากเป็นกรดอะมิโนที่ปลาไม่สามารถสังเคราะห์ในร่างกายได้หรือสังเคราะห์ได้ในปริมาณจำกัด ดังนั้นชนิดและคุณสมบัติของวัตถุดิบโปรตีนจึงขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของแหล่งโปรตีนนั้น (นัยนา, 2545) นอกจากนี้ปลายังต้องได้รับปริมาณกรดอะมิโนจำเป็นในอาหารอย่างเพียงพอ จึงจะสามารถสังเคราะห์โปรตีนและดำเนินกระบวนการเมแทบอลิซึมต่างๆ ซึ่งจะทำให้ปลามีการเจริญเติบโตที่ดีและเป็นปกติ (เวียง, 2543)

คุณภาพของวัตถุดิบอาหารมีความสัมพันธ์โดยตรงกับคุณภาพของอาหาร การเจริญเติบโตของสัตว์น้ำและผลผลิตสัตว์น้ำที่เลี้ยง (ชุติมา, 2549) วัตถุดิบอาหารที่นำมาใช้เป็นแหล่งโปรตีนทดแทนปลาป่นมาจาก 2 แหล่งหลัก ได้แก่ แหล่งโปรตีนที่มาจากสัตว์ซึ่งจะมีคุณภาพของโปรตีนที่ดีกว่าวัตถุดิบโปรตีนที่มาจากพืช เนื่องจากมีองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่จำเป็นใกล้เคียงกับความต้องการของสัตว์ มีกลิ่นและรสที่ดี เช่น เนื้อป่น ไก่ป่น ขนไก่ป่น เลือดป่น กุ้งป่น เศษเหลือจากการแปรรูปสัตว์และไฮโดรไลเสต โดยแหล่งโปรตีนจากสัตว์มีปริมาณโปรตีนผันแปรระหว่าง 25-85 เปอร์เซ็นต์ และแหล่งโปรตีนที่มาจากพืช ส่วนใหญ่จะเป็นวัตถุดิบที่มาจากเมล็ดพืชน้ำมันและใบพืชต่างๆ เช่น ถั่วเหลือง ถั่วลิสง เมล็ดฝ้าย เมล็ดทานตะวัน กากมะพร้าว กากปาล์ม ข้าวโพดป่น ใบกระถิน ใบไมยราพ เป็นต้น ซึ่งจะมีปริมาณโปรตีนประมาณ 20-60 เปอร์เซ็นต์ สำหรับแหล่งวัตถุดิบทดแทนที่นิยมนำมาใช้ ส่วนใหญ่เป็นวัตถุดิบที่ได้จากเศษเหลือจากการ

เกษตร การประมงและจากโรงงานฆ่าสัตว์ เช่น กากถั่วเหลืองป่น เนื้อและกระดูกป่น ขนไก่ป่น เลือดป่นและผลพลอยได้จากการประมง เป็นต้น วัตถุดิบเหล่านี้มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบ 40-75 เปอร์เซ็นต์ของวัตถุแห้ง ซึ่งส่วนใหญ่ที่นำมาใช้ในการผลิตอาหารปลามักมีกรดอะมิโนจำเป็นไม่สมดุลและไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตของปลา โดยเฉพาะในวัตถุดิบจากพืชและเศษเหลือสัตว์ โดยกรดอะมิโนจำเป็นที่มักพบปริมาณน้อยคือ เมไธโอนีนและไลซีน (Nunes *et al*., 2014) นอกจากนี้ยังมีสารต้านการใช้ประโยชน์ของสารอาหาร เช่น สารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน (trypsin inhibitors) และหากใช้วัตถุดิบทดแทนโดยเฉพาะวัตถุดิบจากพืชในปริมาณสูง จะทำให้อาหารขาดกลิ่นและรสที่ชวนกินได้ (Jirsa *et al*., 2013) อย่างไรก็ตามจากการศึกษาพบว่า ปลาบางชนิด เช่น ปลา Atlantic cod (*Gadus morhua*) ปลา Florida pompano (*Trachinotus carolinus*) ปลาช่อนทะเล (*Rachycentron canadum*) และปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*) สามารถนำวัตถุดิบทดแทนมาใช้เป็นแหล่งโปรตีนในอาหารได้ 100 เปอร์เซ็นต์ โดยมีการเสริมกรดอะมิโนจำเป็นบางชนิด เช่น ไลซีน อาร์จินีนและเมไธโอนีน ลงในอาหารเพื่อให้มีปริมาณสารอาหารเพียงพอต่อความต้องการของปลา (Chotikachinda *et al*., 2013; Hansen *et al*., 2007; Rossi and Davis, 2012; Salze *et al*., 2010) แต่สำหรับปลาบางชนิด เช่น ปลา gilthead sea bream (*Sparus aurata*) ปลา rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) และปลา Atlantic salmon (*Salmo salar*) จำเป็นต้องเสริมกรดอะมิโนในอาหารเพิ่มเติมเพื่อให้เพียงพอสำหรับความต้องการของร่างกาย ดังนั้นในการนำวัตถุดิบโปรตีนทดแทนมาใช้ในการผลิตอาหารปลาจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งในการเสริมกรดอะมิโนชนิดที่ขาดให้มีปริมาณและสัดส่วนของกรดอะมิโนจำเป็นเหมาะสมกับความต้องการ

กากถั่วเหลืองเป็นผลพลอยได้จากการผลิตน้ำมันพืช จัดเป็นวัตถุดิบโปรตีนจากพืชที่มีคุณภาพ มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบประมาณ 40-50 เปอร์เซ็นต์ มีกรดไขมันที่จำเป็นคือกรดไลโนเลอิกในปริมาณค่อนข้างสูง และยังมีไรโบฟลาวินและไนอาซีนสูงอีกด้วย (นฤมล, 2550) จึงมีการนำมาใช้ในอาหารปลาเพื่อทดแทนวัตถุดิบโปรตีนจากปลาป่น โดยสามารถใช้กากถั่วเหลืองสกัดน้ำมัน (defatted soybean meal) ในอาหารปลากะพงระยะวัยรุ่นได้ที่ระดับ 10 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนจากปลาป่น ซึ่งเป็นระดับที่เหมาะสมส่งผลให้ปลาที่ได้รับมีการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหารที่ดี (Tantikitti *et al*., 2005) ต่างจากการศึกษาในปี 1998 ของ Boonyaratpalin และคณะ ที่ศึกษาการใช้กากถั่วเหลืองสกัดน้ำมันทดแทนแหล่งโปรตีนจากปลาป่นในอาหารสำหรับปลากะพงขาวระยะวัยรุ่นที่มีน้ำหนักประมาณ 1.3 กรัม/ตัว ซึ่งพบว่า สามารถใช้กากถั่วเหลืองสกัดน้ำมันทดแทนแหล่งโปรตีนจากปลาป่นได้สูงถึง 37.5 เปอร์เซ็นต์ โดยให้ผล

การเจริญเติบโตไม่แตกต่างจากปลาที่ได้รับอาหารสูตรควบคุม แต่การใช้กากถั่วเหลืองในปริมาณสูงจะทำให้ปลาได้รับกรดอะมิโนที่จำเป็นในปริมาณที่ไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโต เนื่องจากกากถั่วเหลืองมีเมไธโอนีนและซีสตีนค่อนข้างต่ำ ดังนั้นในการนำกากถั่วเหลืองมาใช้เป็นวัตถุดิบโปรตีนหลักในอาหารสัตว์น้ำ จึงจำเป็นต้องมีการเสริมกรดอะมิโนที่จำเป็นลงไป เช่น เมไธโอนีน เพื่อให้ได้ปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็นเพียงพอต่อความต้องการของปลา เช่น การศึกษาของ Alam และคณะ (2012) ซึ่งนำกากถั่วเหลือง (soybean meal) มาใช้ในอาหารปลากะพงดำ (black seabass, *Centropritis striata*) ได้ 60 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนในอาหาร และเมื่อมีการเสริมด้วยกรดอะมิโน 2 ชนิดคือ เมไธโอนีนและไลซีน สามารถใช้กากถั่วเหลืองได้สูงถึง 70 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนในอาหาร โดยมีการเจริญเติบโตใกล้เคียงกับปลาที่ได้รับอาหารสูตรอ้างอิง

ในปัจจุบัน อุตสาหกรรมการผลิตอาหารสัตว์น้ำได้มีการพัฒนาอย่างรวดเร็ว มีการศึกษาค้นคว้าเพื่อหาแหล่งของวัตถุดิบและสารเติมแต่งเพื่อช่วยให้สัตว์น้ำสามารถนำสารอาหารในอาหารไปใช้ประโยชน์เพื่อการเจริญเติบโตได้สูงสุด กรดอะมิโนชนิดจำเป็น เช่น เมไธโอนีนที่ถูกผลิตออกมาจำหน่ายก็มีหลากหลายรูปแบบ โดย *DL*-met (*DL*-methionine) เป็นเมไธโอนีนที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์น้ำ เนื่องจากปลามีประสิทธิภาพในการใช้ *DL*-met ได้เทียบเท่ากับ *L*-met (*L*-methionine) ซึ่งเป็นรูปแบบที่พบโดยทั่วไปในเนื้อเยื่อสิ่งมีชีวิตและเป็นรูปแบบที่สิ่งมีชีวิตสามารถดูดซึมได้ทันที ส่วน MetMet (*DL*-methionine dimer) เป็นเมไธโอนีนรูปแบบใหม่ ผลิตโดยบริษัท EVONIK ประเทศเยอรมณี MetMet เป็นเมไธโอนีนที่เกิดจาก *DL*-met 2 โมเลกุล ซึ่งมีความคงตัวในน้ำสูง โดยยังไม่พบรายงานการวิจัยที่ศึกษาผลของเมไธโอนีนทั้งสองรูปแบบนี้ต่อการเจริญเติบโตของปลากะพงขาว งานวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาระดับและรูปแบบของเมไธโอนีนคือ *DL*-met และ MetMet ที่ต่ำที่สุดที่ให้ผลการเจริญเติบโตของปลากะพงขาวดีที่สุด เมื่อมีการนำกากถั่วเหลืองและวัตถุดิบอื่นมาทดแทนโปรตีนจากปลาป่นในอาหารในปริมาณสูง ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อเกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงและบริษัทผู้ผลิตอาหารสัตว์น้ำในการพัฒนาสูตรอาหาร เพื่อลดการใช้โปรตีนจากปลาป่นและลดต้นทุนในการผลิตอาหารสำหรับปลากะพง และเพื่อให้เกิดการส่งเสริมการเพาะเลี้ยงปลากะพงขาวที่ยั่งยืน

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

2.1 ชีววิทยาของปลากะพง

ปลากะพงขาวมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Lates calcarifer* (Bloch) หรือชื่อสามัญที่รู้จักกันโดยทั่วไปคือ giant sea perch หรือ Asian seabass เป็นปลาน้ำกร่อยที่มีขนาดใหญ่และมีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศเขตร้อนและภูมิภาคใกล้เคียงในเอเชีย-แปซิฟิก (Ganzon-Naret, 2013a; Ganzon-Naret, 2013b; Mathew, 2009; Nandakumar *et al*., 2013; Plaipetch and Yakupitiyage, 2012; Tantikitti *et al*., 2005)

2.1.1 การจัดลำดับทางอนุกรมวิธาน

มีการจัดปลากะพงขาวตามหลักอนุกรมวิธานได้ดังนี้

Phylum Chordata
Sub-phylum Vertebrata
Class Pisces
Sub-class Teleostomi
Order Percomorphi
Family Centropomidae
Genus *Lates*
Species *L. calcarifer*

ภาพที่ 1 ลักษณะทั่วไปของปลากะพงขาวเพศผู้ (ด้านบน) และเพศเมีย (ด้านล่าง) (Mathew, 2009)

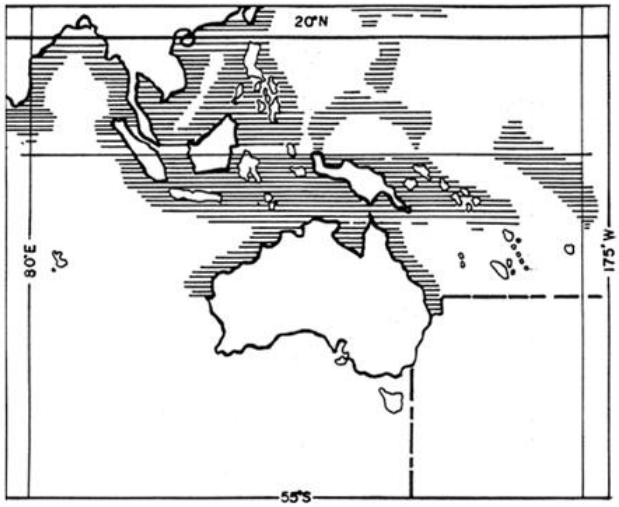
2.1.2 ลักษณะทั่วไป

ปลากะพงขาวเป็นปลาที่มีลำตัวค่อนข้างยาว หนาและแบนข้างเล็กน้อย บริเวณไหล่จะโค้งมน ส่วนลำตัวจะลาดชันและเว้า ส่วนของขากรรไกรล่างยื่นยาวกว่าขากรรไกรบนเล็กน้อย ปากกว้าง ขอบปากบนเป็นแผ่นใหญ่ แยกเป็นแนวตอนต้นและตอนท้ายอย่างชัดเจน (ภาพที่ 1) บริเวณส่วนปากจะยืดหดได้บ้าง ช่องปากเฉียงลงด้านล่างเล็กน้อย มีฟันเล็กละเอียดบนขากรรไกรบนและล่าง และที่เพดานปาก ตาของปลาชนิดนี้มีขนาดกลาง ไม่มีเยื่อที่เป็นไขมันหุ้ม แก้มมีขนาดใหญ่ มีขอบหลังเป็นหนามแหลม 4 ซี่ และเรียงต่อด้วยซี่เล็กๆ จัดตามแนวหลังด้านบนส่วนหัวและบนแผ่นเหงือกมีเกล็ดขนาดต่างๆ กัน เกล็ดบริเวณลำตัวค่อนข้างใหญ่และมีลักษณะเป็นหนามเล็กๆ (ctenoid scale) ด้านหลังมีสีเทาเงินหรือเขียวปนเทา ส่วนท้องจะมีสีเงินแกมเหลือง บริเวณด้านข้างลำตัวมีสีเงิน ครีบหลัง ครีบก้นและครีบหางจะมีสีเทาปนดำบางๆ มีครีบหลังสองตอน ตอนแรกอยู่ตรงตำแหน่งของครีบท้อง มีก้านครีบแข็งที่แหลมคมขนาดใหญ่ 7-8 ก้าน เชื่อมต่อกันด้วยเยื่อบางๆ ครีบหลังตอนที่สองแยกจากตอนแรกอย่างเห็นได้ชัด มีก้านครีบแข็ง (fin spine) 1 ก้าน ก้านครีบอ่อน (fin soft ray) 10-11 ก้าน มีปลายแตกแขนง ครีบก้นมีตำแหน่งใกล้เคียงกับครีบหลังตอนที่สอง ซึ่งประกอบด้วยก้านครีบแข็ง 3 ก้านและก้านครีบอ่อน 7-8 ก้าน ข้อหางสั้น ครีบหางค่อนข้างกลม เส้นข้างตัวโค้งไปตามแนวสันหลัง มีเกล็ดบนเส้นข้างตัว 52-61 เกล็ด (ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งระยอง, 2557; ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง

เพชรบุรี, 2557; ศูนย์พัฒนาประมงพื้นที่ลุ่มน้ำปากพนังอันเนื่องมาจากพระราชดำริ, 2557; Mathew, 2009) มีขนาดความยาวประมาณ 20-40 เซนติเมตร พบขนาดใหญ่ถึง 2 เมตร และมีน้ำหนักถึง 60 กิโลกรัม (ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งภูเก็ต, 2557)

2.1.3 การแพร่กระจายและถิ่นที่อยู่อาศัย

ปลากะพงขาวสามารถอาศัยอยู่ได้ทั้งในน้ำจืด น้ำกร่อยและน้ำเค็ม มีการแพร่กระจายอย่างกว้างขวางในประเทศเขตร้อนและประเทศแถบมหาสมุทรแปซิฟิกและมหาสมุทรอินเดีย ระหว่างลองติจูดที่ 50 องศาตะวันออกถึง 160 องศาตะวันตก และละติจูดที่ 24 องศาเหนือถึง 25 องศาใต้ (ภาพที่ 2) ในบริเวณที่มีความลึก 10-50 เมตร โดยมีการอพยพย้ายถิ่นระหว่างน้ำจืดและน้ำเค็มอยู่เสมอ โดยเฉพาะเมื่อมีความสมบูรณ์ทางเพศต้องอพยพไปสู่ปากแม่น้ำหรือทะเลที่มีความเค็ม 30-32 พีพีทีและลึก 10-15 เมตร เพื่อสืบพันธุ์วางไข่ โดยธรรมชาติปลากะพงขาวเป็นปลาที่ปราดเปรียว ว่องไว ว่ายน้ำรวดเร็ว สามารถกระโดดพ้นน้ำได้สูงขณะตกใจหรือไล่เหยื่อ และออกหากินในบริเวณที่มีกระแสน้ำอ่อน ปลาขนาดใหญ่มักไม่รวมฝูง นอกจากฤดูผสมพันธุ์จะรวมเป็นกลุ่มเล็กๆ สำหรับในประเทศไทยพบปลากะพงขาวแพร่กระจายอยู่ทุกจังหวัดชายทะเลทั้งในอ่าวไทยและฝั่งทะเลอันดามันในบริเวณที่ไม่ห่างไกลออกไปจากชายฝั่งมากนัก โดยอาศัยอยู่ชุกชุมตามปากแม่น้ำ ลำคลองและทะเลสาบ (Mathew, 2009; Plaipetch and Yakupitiyage, 2012)



ภาพที่ 2 การแพร่กระจายของปลากะพงขาวในประเทศเขตร้อนและภูมิภาคใกล้เคียงในเอเชีย-แปซิฟิก (Mathew, 2009)

2.1.4 การเพาะเลี้ยงปลากะพงขาวในประเทศไทย

ปลากะพงขาวเป็นปลาที่สามารถหาพันธุ์ได้ง่าย เลี้ยงง่าย โตเร็ว เนื้อมีรสชาติดี (Boonyaratpalin *et al*., 1998) และราคาค่อนข้างสูง จึงเป็นที่ต้องการของตลาดมาก ปลาชนิดนี้นิยมเลี้ยงกันอย่างแพร่หลายในเขตจังหวัดชายทะเล (Mathew, 2009) สำหรับการเพาะเลี้ยงปลากะพงขาวในประเทศไทย เริ่มเพาะเลี้ยงโดยสถานีประมงจังหวัดสงขลาด้วยวิธีการผสมเทียมเมื่อปี พ.ศ. 2514 และประสบผลสำเร็จในปี พ.ศ. 2516 จากนั้นจึงมีการศึกษาเกี่ยวกับปลากะพงขาวเรื่อยมา จึงส่งผลให้การเพาะพันธุ์ปลากะพงขาวในประเทศไทยพัฒนาก้าวหน้าไปอย่างรวดเร็ว (กรมประมง, มปป.)

2.2 ความต้องการสารอาหารของปลากะพงขาว

ปลาที่ได้รับสารอาหารและพลังงานจากอาหารในระดับที่เหมาะสมกับความต้องการจะมีการเจริญเติบโตดีที่สุด หากได้รับสารอาหารและพลังงานต่ำกว่าระดับที่ต้องการจะทำให้ปลามีการเจริญเติบโตลดลง แต่ถ้าได้รับในระดับที่สูงเกินความต้องการจะทำให้มีการสะสมในรูปของไขมันหรือไกลโคเจนซึ่งทำให้คุณภาพซาก (carcass quality) เปลี่ยนไปและอาจทำให้ปลามีการเจริญเติบโตลดลงด้วย (วีรพงศ์, 2536) ดังนั้นอาหารที่ใช้เลี้ยงปลากะพงขาวซึ่งเป็นปลากินเนื้อ (carnivore) จึงต้องมีคุณค่าทางโภชนาการที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตและเหมาะสมกับอุปนิสัยในการกินอาหาร ดังนี้

2.2.1 ความต้องการโปรตีนและกรดอะมิโน

โปรตีนและกรดอะมิโนเป็นสารอาหารที่มีความสำคัญต่อการสังเคราะห์โปรตีนและเป็นสารตั้งต้นต่างๆ เพื่อใช้ในการเจริญเติบโตของสัตว์ทุกชนิด โดยเป็นส่วนประกอบของเอนไซม์ ฮอร์โมน สารภูมิคุ้มกันและสารประกอบในเลือด ในปลากะพงขาววัยอ่อนมีความต้องการโปรตีนในปริมาณสูงและลดลงเมื่อปลามีการเจริญเติบโตมากขึ้น (ธนาภรณ์, 2557) เนื่องจากปลาขนาดใหญ่มีอัตราการสังเคราะห์โปรตีนในร่างกายต่ำกว่าปลาขนาดเล็ก (Glencross, 2006) ส่วนใหญ่จะนำไปใช้ในการซ่อมแซมและทดแทนส่วนที่สึกหรอ ซึ่งต่างจากปลาขนาดเล็กที่นำไปใช้สร้างกล้ามเนื้อเพื่อการเจริญเติบโต โดยปลาที่มีการเจริญเติบโตที่ดีมักเป็นปลาที่ได้รับอาหารที่ประกอบด้วยโปรตีนคุณภาพดี คือ มีกรดอะมิโนที่จำเป็นครบถ้วนใน

ปริมาณเพียงพอต่อความต้องการของร่างกาย ในปลาที่ได้รับอาหารที่มีโปรตีนหรือกรดอะมิโนในปริมาณที่มากเกินไปจะทำให้ปลาเจริญเติบโตช้า เนื่องจากต้องมีการนำพลังงานส่วนหนึ่งไปใช้ในการกำจัดโปรตีนและกรดอะมิโนส่วนเกิน ส่วนอาหารที่มีระดับพลังงานมากเกินไปก็จะทำให้ปลากินอาหารลดลงและโตช้า เพราะได้รับสารอาหารไม่เพียงพอต่อการนำไปใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึมของกิจกรรมต่างๆ ในร่างกาย ความต้องการโปรตีนแต่ละช่วงอายุ ดังตารางที่ 1 (Ambasankar *et al*., 2009; Boonyaratpalin, 1997; Catacutan and Coloso, 1995; Sakaras *et al*., 1988; Sakaras *et al*., 1989)

ตารางที่ 1 ระดับโปรตีนที่เหมาะสมในอาหารสำหรับปลากะพงขาว

ระดับโปรตีนที่เหมาะสม (เปอร์เซ็นต์)	ระดับพลังงานที่เหมาะสม (เมกกะจูล/กิโลกรัม)	ขนาดปลาเริ่มต้น (กรัม)	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	อ้างอิง
45-55	13.4-16.4	-	-	Cuzon (1988)
50	-	7.5	-	Sakaras และคณะ (1988)
45	-	-	-	Sakaras และคณะ (1989)
40-45	-	-	-	Wong และ Chou (1989)
50	50	1.3	29	Catacutan และ Coloso (1995)
46-55	18.4-18.7	76	28	Williams และ Barlow (1999)
52	17.8-21.0	230	28	Williams และคณะ (2003)
60	20.9-22.8	80	28	Williams และคณะ (2003)

ที่มา : ดัดแปลงจาก Glencross (2006)

2.2.2 ความต้องการไขมันและกรดไขมันที่จำเป็น

ไขมันเป็นแหล่งของพลังงานที่สำคัญและเป็นแหล่งของกรดไขมันที่จำเป็นสำหรับปลากะพงขาวและมีบทบาทสำคัญในการสำรองโปรตีน เพื่อช่วยให้ปลาสามารถใช้โปรตีนในการเจริญเติบโตอย่างเต็มที่

ในการผลิตอาหารสำหรับปลากะพงขาวที่มีโปรตีน 43-50 เปอร์เซ็นต์ของอาหารพบว่า ระดับของไขมันที่เหมาะสมคือ 10-18 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร เป็นระดับที่ปลาสามารถนำสารอาหารทั้งโปรตีนและไขมันไปใช้ประโยชน์เพื่อการเจริญเติบโตได้ดี (Ambasankar *et al*., 2009; Glencross, 2006; Millamena, 1996) โดยระดับของไขมันที่เหมาะสมจะขึ้นอยู่กับระดับ

ของโปรตีนในอาหารและขนาดของปลา เช่น ในปลาที่มีขนาด 80 กรัม จะมีความต้องการไขมันและโปรตีนเท่ากับ 18 และ 60 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร ตามลำดับ (Williams *et al*., 2003) ในขณะที่ปลาขนาด 230 กรัม ต้องการไขมันและโปรตีนในอาหารเท่ากับ 19 และ 53 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดย ปลาที่มีขนาดใหญ่จะมีความต้องการโปรตีนลดต่ำลง แต่อย่างไรก็ตาม ในการดำเนินกิจกรรมต่างๆ ของปลายังคงใช้พลังงานจากอาหารอยู่ ดังนั้นปริมาณไขมันในอาหารจึงไม่ได้ลดต่ำลงตามปริมาณโปรตีนที่ลดลง

สำหรับความต้องการกรดไขมันที่จำเป็นของปลากะพงขาวยังไม่มีข้อมูลงานวิจัยที่แน่ชัด โดย Boonyaratpalin (1997) รายงานว่า ปลากะพงขาวมีความต้องการไขมันชนิด *n*-3 ในช่วง 1.00-1.70 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร ใกล้เคียงกับการศึกษาของ Williams และ Barlow (1999) ซึ่งรายงานว่า ระดับความต้องการ *n*-3 ในช่วง 0.45-1.15 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร

2.2.3 **ความต้องการคาร์โบไฮเดรต**

ปลากะพงขาวใช้คาร์โบไฮเดรตในอาหารเป็นแหล่งของพลังงานในกระบวนการเมแทบอลิซึมต่างๆ ซึ่งส่งผลให้ปลาสามารถนำโปรตีนไปใช้ประโยชน์ในการสร้างกล้ามเนื้อได้อย่างเต็มที่ ในปลากะพงขาววัยรุ่น (น้ำหนักประมาณ 0.9 กรัม/ตัว) มีความต้องการคาร์โบไฮเดรตที่ระดับ 20-25 เปอร์เซ็นต์ (Catacutan and Coloso, 1997; Millamena, 1996) และในปลาวัยอ่อนที่ระดับไม่เกิน 20 เปอร์เซ็นต์ (Boonyaratpalin, 1991)

2.2.4 **ความต้องการวิตามิน**

วิตามินทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้นของปฏิกิริยาต่างๆ ในกระบวนการเม-แทบอลิซึม ซึ่งปลามีความต้องการในปริมาณน้อย แต่หากได้รับในปริมาณที่ไม่เพียงพอ จะทำให้เกิดโรคได้ เช่น ปลากะพงขาวสามารถเจริญเติบโตได้อย่างปกติโดยที่ไม่ต้องเสริมวิตามินซีในอาหารเป็นเวลา 2 สัปดาห์ แต่เมื่อหลังจาก 2 สัปดาห์ พบว่า ปลาที่ไม่ได้รับวิตามินซีจะมีอาการผิดปกติของกระดูกและอาการผิดปกติของพัฒนาการของเหงือก ดังนั้นจึงต้องมีการเสริมวิตามินซีโดยระดับที่เหมาะสมคือ 700 มิลลิกรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม (Boonyaratpalin *et al*., 1994 อ้างโดย Glencross, 2006) นอกจากวิตามินซีแล้ว ยังมีความจำเป็นต้องเสริมวิตามินชนิดอื่นๆ อีก เช่น ไพ-ริดอกซินและกรดแพนโททินิก โดยระดับที่เหมาะสมคือ 5-10 และ 15 มิลลิกรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ตามลำดับ (Boonyaratpalin *et al*., 1994 อ้างโดย Glencross, 2006) เพื่อช่วยลดอัตราการตาย

ของปลา นอกจากนี้ยังมีวิตามินอื่นที่สำคัญ เช่น ไทอามีน ไรโบฟลาวิน กรดนิโคตินิก ไบโอติน อิน-โนซิทอลและวิตามินอี เป็นต้น ที่ช่วยให้ปลามีการเจริญเติบโตตามปกติ (Boonyaratpalin and Wanokowat, 1993 อ้างโดย Glencross, 2006)

2.2.5 **ความต้องการเกลือแร่**

เกลือแร่เป็นสารอนินทรีย์ที่ร่างกายต้องการเพื่อนำมาใช้ในการเจริญเติบโตและการดำรงชีวิตประจำวัน ช่วยให้การทำงานของกระบวนการเมแทบอลิซึมของร่างกายเป็นไปตามปกติ (วีรพงศ์, 2536) เกลือแร่แบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มคือ เกลือแร่ที่ปลาต้องการในปริมาณมาก (macro/major mineral) เช่น แคลเซียม ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม โซเดียม โพแทส-เซียม คลอไรด์และกำมะถัน เกลือแร่เหล่านี้เป็นกลุ่มที่พบและต้องการในปริมาณมากในระดับกรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม และเกลือแร่ที่ปลาต้องการในปริมาณน้อย (trace/micro mineral) เช่น เหล็ก แมงกานีส ไอโอดีน ทองแดง สังกะสี โคบอลท์ โมลิบดินัม ซิลีเนียม ดีบุก โครเมียม นิกเกิล วาเนเดียม ซิลิคอนและอะลูมิเนียม เกลือแร่เหล่านี้เป็นกลุ่มที่ต้องการในปริมาณน้อย ระดับมิลลิ-กรัมหรือไมโครกรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม บทบาทหน้าที่สำคัญของเกลือแร่ต่อการเจริญเติบโตของปลาคือ ช่วยในการสร้างกระดูก รักษาสมดุลของสารและน้ำในร่างกาย ควบคุมความสมดุลของกรด-ด่าง เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของฮอร์โมนเอนไซม์ ช่วยกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์และเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของชีวโมเลกุล โดยปลาสามารถดูดซึมหรือได้รับเกลือแร่จากน้ำได้โดยตรง เนื่องจากปลามีการแลกเปลี่ยนและดูดซึมเกลือแร่จากน้ำที่บริเวณเหงือกและผิวอยู่ตลอดเวลา (ชุติมา, 2549) สำหรับการศึกษาความต้องการเกลือแร่ของปลากะพงขาว มีการศึกษาวิจัยน้อยมาก เนื่องจากมีอุปสรรคในการควบคุมความเข้มข้นของเกลือแร่ในอาหาร (สร้อยแก้ว, 2555) อย่างไรก็ตาม ยังมีการศึกษาความต้องการเกลือแร่ที่มีความสำคัญบางชนิด โดย Chaimongkol และ Boonyaratpalin (2001 อ้างโดย Glencross, 2006) พบว่า ปลากะพงขาวมีความต้องการโมโนโซเดียมฟอสเฟตและฟอสฟอรัสที่ระดับ 5-10 และ 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ตามลำดับ

2.3 **แหล่งวัตถุดิบในอาหารปลา**

การพิจารณาคุณภาพของโปรตีนมักพิจารณาจากความสามารถของปลาในการย่อยโปรตีน ปริมาณโปรตีนและองค์ประกอบของกรดอะมิโนในวัตถุดิบ (ตารางที่ 2) เพราะเมื่อ

โปรตีนดังกล่าวถูกย่อยและดูดซึมเข้าไปในร่างกาย ปลาจะสามารถนำกรดอะมิโนไปใช้เพื่อการสร้างโปรตีนในร่างกายได้ แต่ถ้าโปรตีนนั้นย่อยยาก อีกทั้งมีปริมาณและสัดส่วนของกรดอะมิโนที่จำเป็นไม่เหมาะสมกับความต้องการของปลา ปลาจะไม่สามารถนำกรดอะมิโนชนิดอื่นๆ ไปใช้สร้างโปรตีนได้ เพราะในการสร้างโปรตีนต้องมีกรดอะมิโนชนิดที่ต้องการอยู่อย่างครบถ้วน โดยวัตถุดิบที่เป็นแหล่งโปรตีนทั่วไปมักเป็นวัตถุดิบที่มีโปรตีนมากกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ของวัตถุแห้ง (เวียง, 2543; นฤมล, 2550)

กรดอะมิโนเป็นตัวกำหนดคุณภาพของวัตถุดิบโปรตีน โดยชนิดและคุณสมบัติของวัตถุดิบโปรตีนที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของแหล่งโปรตีนนั้น (นัยนา, 2545) โปรตีนที่มีกรดอะมิโนชนิดจำเป็นทั้ง 10 ชนิดครบถ้วนในปริมาณมากพอ เรียกว่าโปรตีนชนิดสมบูรณ์ (complete protein) หรือแหล่งโปรตีนที่มีคุณภาพดีสำหรับสัตว์น้ำ พบทั่วไปในเนื้อสัตว์ ส่วนแหล่งโปรตีนที่มีกรดอะมิโนชนิดจำเป็นไม่ครบทุกชนิดหรือมีครบแต่ในปริมาณจำกัด จัดเป็นแหล่งโปรตีนที่มีคุณภาพไม่ดีหรือเรียกว่าวัตถุดิบโปรตีนชนิดไม่สมบูรณ์ (incomplete protein) โดยปริมาณกรดอะมิโนชนิดจำเป็นในอาหารจะต้องมีมากพอ สัตว์น้ำจึงจะสามารถสังเคราะห์โปรตีนในร่างกายได้ตามต้องการ ซึ่งจะทำให้สัตว์น้ำมีการเจริญเติบโตดีเป็นปกติ (เวียง, 2543)

ปลาป่นเป็นวัตถุดิบหลักที่นิยมนำมาใช้ในสูตรอาหาร ผลิตมาจากเศษปลาเล็กปลาน้อย (สมาคมผู้ผลิตอาหารสัตว์ไทย, 2553) หรือเศษปลาที่เหลือจากโรงงานทำปลากระป๋อง (สถาบันวิจัยอาหารสัตว์น้ำจืด, มปป.) จัดเป็นโปรตีนที่มีคุณภาพดี เนื่องจากมีโปรตีนสูงประมาณ 50-60 เปอร์เซ็นต์ มีกรดอะมิโนที่สมดุล มีไลซีนและเมไธโอนีนสูง (ตารางที่ 2) มีปริมาณแคลเซียม ฟอสฟอรัสและกรดไขมันที่จำเป็น (โอเมก้า 3) สูง (นิฮารีฟัร, 2554) และมีวิตามินบี 12 ไรโบฟลาวิน โคลีนและไนอาซีนสูงอีกด้วย (นฤมล, 2550) คุณภาพของปลาป่นสามารถแบ่งได้ตามเปอร์เซ็นต์ของโปรตีนในปลา โดยปลาป่นชั้นคุณภาพที่ 1 จะมีโปรตีนไม่น้อยกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ ปลาป่นชั้นคุณภาพที่ 2 และ 3 มีโปรตีนไม่น้อยกว่า 55 และ 50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร, 2555)

อุตสาหกรรมการผลิตอาหารปลามีการนำปลาป่นมาใช้เป็นวัตถุดิบโปรตีนหลักเพื่อให้ปลาได้รับอาหารอย่างเต็มที่ มีการเจริญเติบโตสูงสุดและได้ผลผลิตปลาในปริมาณมาก เป็นเหตุให้อุตสาหกรรมการผลิตอาหารปลามีความต้องการใช้ปลาป่นมากขึ้น ประเทศไทยผลิตปลาป่นจากปลาต่างๆ ที่คนไม่นิยมบริโภค ซึ่งรวมเรียกว่าปลาเป็ด ทั้งเศษที่เหลือจากการแปรรูปของโรงงานอาหารกระป๋องและโรงงานทำปลาบด ซึ่งในช่วงปี 2547-2551 ผลผลิตปลาป่นของไทยมี

แนวโน้มลดลงเฉลี่ยร้อยละ 3.67 ต่อปี ในขณะที่ความต้องการใช้ปลาป่นในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ยังมีต่อเนื่องตามประชากรสัตว์ที่เพิ่มมากขึ้น โดยความต้องการใช้วัตถุดิบปลาป่นอาหารสัตว์ช่วงปี 2547-2551 มีอัตราเพิ่มเฉลี่ยร้อยละ 5.33 ต่อปี (สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร, 2555) แต่อย่างไรก็ตาม เมื่อมีการจับปลาจนเกินกำลังการผลิตของปลาในธรรมชาติก็จะทำให้ปริมาณปลาที่จับได้ลดน้อยลงจนไม่เพียงพอต่อความต้องการในการนำมาใช้ ส่งผลให้ราคาของปลาป่นสูงขึ้น ดังนั้นผู้ผลิตอาหารปลาในปัจจุบันจึงให้ความสนใจในการศึกษาค้นคว้าแหล่งวัตถุดิบโปรตีนทดแทนมาใช้ในอาหารปลาเพื่อทดแทนโปรตีนจากปลาป่น

ตารางที่ 2 ปริมาณโปรตีนและองค์ประกอบของกรดอะมิโนในวัตถุดิบชนิดต่างๆ

วัตถุดิบ	ปริมาณโปรตีน (เปอร์เซ็นต์ของวัตถุแห้ง)	ปริมาณกรดอะมิโน (กรัม/16 กรัมของไนโตรเจน)									
		อาร์จินีน	ฮิสทิดีน	ไอโซลิวซีน	ลิวซีน	ไลซีน	เมไธโอนีน	ฟีนิลอะลานีน	ทรีโอนีน	ทริปโตเฟน	วาลีน
ปลาป่น (brown fish meal)	69.0	4.6	2.0	3.0	5.5	6.2	1.6	3.2	3.1	2.3	3.2
ไก่ป่น (poultry by-product meal)	56.4-84.2	4.21	1.17	3.43	4.68	3.04	1.16	2.46	2.23	0.55	2.81
เนื้อป่น (meat meal)	49.5-64.5	4.40	1.50	2.06	4.24	3.58	0.88	2.37	2.17	0.52	3.08
เนื้อและกระดูกป่น (meat and bone meal)	45.5-62.4	3.38	1.03	1.42	2.86	3.75	1.01	1.63	2.50	0.24	2.18
เลือดป่น (blood meal)	92.5	4.01	5.49	1.08	11.82	8.53	1.19	6.44	4.50	1.21	8.10
โปรตีนปลาไฮโดรไลเสตเข้มข้น (fish protein hydrolysate)	80.0	6.4-7.1	1.8-2.1	3.7-4.3	6.0-7.1	6.9-7.5	2.6-2.9	2.7-3.7	3.5-3.9	0.8-1.0	4.2-4.9
หมึกป่น (squid meal)	80.5	6.08	2.16	4.19	7.28	6.30	2.83	3.43	3.60	0.90	4.16
หัวกุ้งป่น (shrimp head meal)	70.9-74.2	56.1	1.9	6.3	5.9	4.8	1.3	4.1	3.6	3.6	5.4
ขนไก่ป่น (feather meal)	71.7-92.7	5.61	0.42	4.28	8.65	1.03	0.30	5.22	4.68	1.25	8.37
กากถั่วเหลืองสกัดน้ำมัน (defatted soybean meal)	52.0-54.0	-	-	7.0	4.4	6.3	1.3	5.1	4.0	1.4	4.8
กากถั่วเหลืองโปรตีนเข้มข้น (soy protein concentrate)	67.0-72.0	-	-	7.9	4.6	6.3	1.3	5.1	4.3	1.5	4.8

ที่มา : Hertrampf และ Piedad-Pascual (2000)

วัตถุดิบอาหารที่นำมาใช้เป็นแหล่งโปรตีนทดแทนปลาป่นในปัจจุบันมาจาก 2 แหล่งหลัก ได้แก่ วัตถุดิบที่มาจากสัตว์และวัตถุดิบที่มาจากพืช โดยวัตถุดิบโปรตีนที่มาจากสัตว์จะมีคุณภาพของโปรตีนดีกว่าวัตถุดิบโปรตีนที่มาจากพืช เนื่องจากมีองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่จำเป็นในปริมาณที่ใกล้เคียงกับความต้องการของสัตว์ อย่างไรก็ตาม ปริมาณและคุณภาพของโปรตีนที่มาจากสัตว์จะผันแปร โดยมีปริมาณโปรตีน 25-85 เปอร์เซ็นต์ของวัตถุแห้ง ขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาและกระบวนการผลิต เช่น เนื้อและกระดูกป่น เลือดป่น ขนไก่ป่น นมผงและหางนมผง เป็นต้น วัตถุดิบโปรตีนจากพืช ส่วนใหญ่จะเป็นวัตถุดิบที่ได้จากเมล็ดพืชน้ำมันชนิดต่างๆ และเป็นผลพลอยได้จากใบพืชต่างๆ รวมทั้งใบพืชตระกูลถั่วด้วย วัตถุดิบที่ได้จากเมล็ดพืชน้ำมันเป็นแหล่งโปรตีนที่นิยมนำมาใช้ในการผลิตอาหารสัตว์ ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากการสกัดน้ำมันพืช จะมีโปรตีนสูงกว่า 40 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นอยู่กับกระบวนการในการผลิต ส่วนใหญ่จะมีสารต่อต้านการใช้ประโยชน์ของโภชนะหรือมีสารพิษ หากได้รับความร้อนในกระบวนการผลิตไม่เพียงพอ และนำไปใช้ในการผลิตอาหารสัตว์ก็จะทำให้เกิดสารพิษได้ เช่น ถั่วเหลือง ถั่วลิสง เมล็ดฝ้าย เมล็ดทานตะวัน เป็นต้น ส่วนผลพลอยได้จากพืชและใบพืช เป็นวัตถุดิบที่มีโปรตีน 20-30 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นอยู่กับกระบวนการผลิตและอายุของพืช ได้แก่ กากมะพร้าว กากเบียร์ กากส่าเหล้า กากเนื้อในเมล็ดปาล์ม ใบกระถิน ใบถั่ว ใบไมยราพ เป็นต้น โดยส่วนใหญ่แล้ววัตถุดิบโปรตีนที่มาจากพืชจะมีกรดอะมิโนไลซีนและเมไธโอนีนต่ำ อีกทั้งยังมีเยื่อใยสูง จึงเป็นข้อจำกัดในการนำมาใช้ในการผลิตอาหารสัตว์น้ำ(นฤมล, 2550) (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 วัตถุดิบที่ใช้เป็นแหล่งโปรตีนในอาหารสัตว์น้ำ

วัตถุดิบ	ปริมาณโปรตีน (เปอร์เซ็นต์ของวัตถุแห้ง)	โปรตีน	ไขมัน	เยื่อใย	เถ้า
ปลาป่น (fish meal)	90-93	59.0-72.0	7.6-10.1	0.6-1.0	10.4-21.5
เนื้อและกระดูกป่น (meat and bone meal)	94	50.9	9.7	2.4	29.2
เนื้อและกระดูกป่น (meat and bone meal, porcine)	97	59.0	11.0	-	20.0
เนื้อป่น (meat meal)	93	55.6	5.6	2.3	27.0
เลือดป่น (blood meal, spray dried)	93	88.6	1.4	1.0	5.8
ไก่ป่น (poultry byproduct meal, feed grade)	89	55.9	13.6	2.1	14.5
ขนไก่ป่น (poultry feather meal, hydrolyzed, dried)	93	83.3	5.4	1.2	2.9
เปลือกกุ้งป่น (shrimp meal, dried)	88	39.5	3.2	12.8	27.2
เศษปลาหมึกป่น (squid meal)	95	76.5	3.8	-	6.1
ตับปลาหมึกป่น (squid liver meal)	89	45.2	15.3	-	6.8
น้ำต้มปลาเข้มข้น (fish solubles, condensed)	50	31.5	6.1	0.5	9.6
น้ำต้มปลาเข้มข้น (fish solubles, dried)	93	64.1	8.2	1.3	2.5
กากถั่วเหลือง (soybean meal, toasted, solvent extracted without hulls)	90	48.5	0.9	3.4	5.8
กากถั่วเหลือง (soybean meal, solvent extracted)	89	44.0	1.5	7.3	6.3
กากถั่วเหลือง (soybean seed, extruded, full fat)	90	35.2	18.0	5.0	4.5
กากถั่วเหลืองเข้มข้น (soybean concentrate)	92	63.6	0.5	4.5	-
วีทกลูเตน (wheat gluten meal)	89	80.7	1.5	0.5	0.7

ที่มา: NRC (2011)

2.3.1 การใช้วัตถุดิบโปรตีนทดแทนที่มาจากสัตว์

1.) **เนื้อป่น** (meat meal)

เนื้อป่นเป็นวัตถุดิบที่ได้จากการป่นเศษเนื้อที่เหลือทิ้งจากโรงงานฆ่าสัตว์ เนื้อป่นที่ดีต้องไม่มีการปนของขน กีบ เท้า เขาและเศษอาหารต่างๆ นอกจากนี้ต้องมีฟอสฟอรัสต่ำกว่า 4.4 เปอร์เซ็นต์ ถ้ามีฟอสฟอรัสเกินจากนี้จะเรียกว่า เนื้อและกระดูกป่น โดยทั่วไปเนื้อป่นจะมีโปรตีน ไขมัน แคลเซียม และฟอสฟอรัส 45-50, 10, 7-10 และ 4-5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในการใช้เนื้อและกระดูกป่นผสมในอาหารสัตว์ควรเสริมในปริมาณ 7-10 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากมีเมไธ-โอนีน ซีสตีนและทริปโตเฟนต่ำ มีฟอสฟอรัสสูงและบางครั้งอาจมีเจลาตินสูงด้วย (นฤมล, 2550) เนื้อป่นจัดเป็นวัตถุดิบอีกชนิดหนึ่งที่นำมาใช้ในอาหารปลากะพงขาวกันอย่างแพร่หลาย จากการทดลองของ Williams และคณะ (2003) พบว่า เนื้อป่นที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบ 52 เปอร์เซ็นต์ สามารถนำมาทดแทนปลาป่นได้ 100 เปอร์เซ็นต์ โดยไม่ทำให้การเจริญเติบโตต่างจากปลาที่ได้รับอาหารชุดควบคุม ทั้งการเลี้ยงในระดับห้องปฏิบัติการและการเลี้ยงในกระชัง เป็นต้น

2.) **เลือดป่น** (blood meal)

เลือดป่นได้จากการเอาเลือดจากโรงงานชำแหละสัตว์มาทำให้แห้งแล้วป่นละเอียด เลือดป่นมีโปรตีนสูงถึง 90 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งของไลซีนและทริปโตเฟนที่ดี แต่เลือดป่นเป็นโปรตีนที่ย่อยได้ยาก มีเมไธโอนีน ไอโซลิวซีน แคลเซียม และฟอสฟอรัสต่ำ หากเก็บในสภาพที่มีความชื้นสูงเกิน 12 เปอร์เซ็นต์ ทำให้เสื่อมสภาพได้ เนื่องจากเลือดป่นสามารถดูดความชื้นในอากาศได้อย่างรวดเร็ว (นฤมล, 2550) และไม่ควรนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตอาหารสัตว์น้ำมากเกินกว่า 5 เปอร์เซ็นต์ (วีรพงศ์, 2536) เพราะจะทำให้เม็ดอาหารละลายน้ำได้เร็ว อีกทั้งยังทำให้รสชาติและกลิ่นของเนื้อสัตว์ที่ได้รับอาหารนั้นเปลี่ยนไป (นฤมล, 2550) ในปลากะรังดอกแดง (*Epinephelus coioides*) ระดับของเลือดป่นในอาหารที่เหมาะสมคือ 2 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร (Millamena, 2002) แตกต่างจากปลานิลซึ่งสามารถใช้เลือดป่นผสมในอาหารได้ถึง 60 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร (Ufodike and Ugwuzor, 1986) ใกล้เคียงกับการศึกษาของ Aladetohun และ Sogbesan (2013) ที่พบว่า สามารถใช้เลือดป่นในอาหารปลานิลได้ที่ระดับ 54.6 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร

3.) **ไก่ป่นและเศษไก่ป่น** (poultry by-product meal)

ไก่ป่นจากโรงงานฆ่าสัตว์ เป็นวัตถุดิบที่มีโปรตีนและไขมันสูง จากการศึกษาของ Nandakumar และคณะ (2013) พบว่า เศษเหลือไก่มีโปรตีนและไขมัน 53 และ 32 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สามารถนำมาใช้ทดแทนปลาป่นในอาหารปลากะพงขาวระยะวัยรุ่นที่มีน้ำหนัก 3 กรัมได้ที่ระดับ 5-10 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร และจากการศึกษาของ Chotikachinda และคณะ (2013) พบว่า ไก่ป่นสามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบโปรตีนหลักทดแทนปลาป่นในอาหารสำหรับปลากะพงที่ระดับ 100 เปอร์เซ็นต์ของปลาป่นได้ โดยเสริมโปรตีนไฮโดรไลเสตจากเครื่องในปลาทูน่าในอาหารที่ระดับ 3 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร ซึ่งจะไม่ทำให้ปลามีการเจริญเติบโตแตกต่างจากปลาที่ได้รับอาหารสูตรอ้างอิงที่มีปลาป่นเป็นวัตถุดิบโปรตีนหลัก

4.) **ขนไก่ป่น** (feather meal)

ขนไก่ป่นเป็นวัตถุดิบที่มีโปรตีนสูง 85-89 เปอร์เซ็นต์ จัดเป็นแหล่งโปรตีนที่มีคุณภาพไม่ดีนัก เนื่องจากเป็นโปรตีนที่ย่อยได้ยาก เพราะมีเคอราติน (keratin) สูง (90 เปอร์เซ็นต์) และปริมาณกรดอะมิโนไม่สมดุล (นฤมล, 2550; Grazziotin *et al*., 2008) ในปลา rainbow trout พบว่า มีประสิทธิภาพในการย่อยขนไก่ป่น 58-62 เปอร์เซ็นต์ (Cho and Slinger, 1979 อ้างโดย Bureau, 2006) ต่างจากการศึกษาของ Sugiura และคณะ (1998) พบว่า ปลา coho salmon และปลา rainbow trout มีประสิทธิภาพในการย่อยขนไก่ป่นเท่ากับ 81.3 และ 83.7 เปอร์เซ็นต์ และปลา rockfish ที่พบว่า มีประสิทธิภาพในการย่อยเท่ากับ 87 เปอร์เซ็นต์ (Lee, 2002) อย่างไรก็ตาม ก่อนการนำขนไก่ป่นไปใช้ควรมีการปรับปรุงคุณภาพโดยวิธีการต่างๆ เช่น การใช้ความร้อน การใช้สารเคมี (Hertrampf and Piedad-Pascual, 2000) และการหมักโดยใช้จุลินทรีย์ *Bacillus licheniformis* (Grazziotin *et al*., 2008) เพื่อให้ได้โปรตีนที่มีโครงสร้างไม่ซับซ้อนและมีสายสั้นลงซึ่งทำให้ปลาสามารถย่อยได้ดีขึ้น สำหรับการนำขนไก่ป่นไปใช้ในอาหารปลาพบว่า ในปลาดุกยักษ์หรือปลาดุกแอฟริกา (*Clarias gariepinus*) และปลาดุกยักษ์ลูกผสม (*Heterobranchus bidorsalis* x *C. gariepinus*) สามารถนำขนไก่ป่นมาใช้เป็นวัตถุดิบในอาหารได้ที่ระดับ 5.81 เปอร์เซ็นต์ (Ejere *et al*., 2014) ในปลานิล (*Oreochromis niloticus*) และปลาดุกลูกผสม (*C. macrocephalus x C. gariepinus*) สามารถใช้ขนไก่ป่นหมักทดแทนปลาป่นในอาหารได้ที่ระดับ 25 เปอร์เซ็นต์ของปลาป่นในอาหาร (Rakyuttihamkul, 2005) เป็นต้น

5.) **เศษเหลือกุ้งป่น** (shrimp by-product)

เศษเหลือกุ้งป่นเป็นผลผลิตที่ได้จากโรงงานกุ้งแช่แข็งหรือกุ้งแห้ง ประกอบด้วยหัวและเปลือก มีโปรตีนประมาณ 45 เปอร์เซ็นต์ แต่เป็นโปรตีนที่ย่อยได้ยาก มีโปรตีนที่ย่อยได้เพียง 25-50 เปอร์เซ็นต์ (ศูนย์พัฒนาเทคโนโลยีอาหารสัตว์น้ำ, 2554) มีแคลเซียมสูง 5-27 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้แกลบกุ้งยังมีกลิ่นหอม ช่วยให้สัตว์น้ำกินอาหารดีขึ้น อย่างไรก็ตาม การใช้แกลบกุ้งป่นในอาหารสัตว์น้ำควรมีการใช้ร่วมกับวัตถุดิบโปรตีนชนิดอื่นและไม่ควรใช้มากกว่า 5-10 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร (นฤมล, 2550; วีรพงศ์, 2536) สำหรับวัตถุดิบหัวกุ้งหมักป่น (fermented shrimp head waste meal) สามารถใช้เป็นวัตถุดิบโปรตีนในอาหารในปลาดุกแอฟริกา (*C. gariepinus*) ได้ที่ระดับ 13 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร (Nwanna, 2003) ในอาหารปลานิล (*O. niloticus*) ที่ระดับ 30 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร (Cavalheiro *et al*., 2007) ส่วนเปลือกกุ้งป่น (shrimp shell meal) สามารถนำมาใช้ในอาหารปลานิลลูกผสม (*O. niloticus x O. aureus*) ได้ที่ระดับ 25 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร (Fall *et al*., 2012) ใกล้เคียงกับการรายงานของศูนย์พัฒนาเทคโนโลยีอาหารสัตว์น้ำ (2554) ที่พบว่า ในอาหารปลาสามารถใช้เปลือกกุ้งป่นได้สูงถึง 20 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร

6.) **เนื้อหอยเชอรี่** (snail meal)

เนื้อหอยเชอรี่เป็นวัตถุดิบที่มีโปรตีนสูง 57 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง มีไขมันและเยื่อใยต่ำ (ศูนย์พัฒนาเทคโนโลยีอาหารสัตว์น้ำ, 2554) สามารถใช้ทดแทนปลาป่นในอาหารปลานิล (*O. niloticus*) (จุฑามาศ, 2545) และปลาดุกบิ๊กอุย (*C. macrocepphalus x C. gariepinus*) (บัญชา และคณะ, 2544) ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ โดยไม่ส่งผลกระทบต่อน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นและอัตราการรอดตายของปลา

7.) **น้ำนึ่งปลา** (fishes condensate)

น้ำนึ่งปลาเป็นวัสดุเศษเหลือจากการล้างและนึ่งปลาในขบวนการผลิตปลากระป๋อง จากการศึกษาโดย วัฒนา และอุไรวรรณ (2554) พบว่า น้ำนึ่งปลามีโปรตีน 43.36 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง สามารถนำมาใช้ในการทดแทนโปรตีนจากปลาป่นสำหรับปลาหมอ

ไทยได้ 25 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนจากปลาป่น และจากการศึกษาระดับที่เหมาะสมของตะกอนน้ำนึ่งปลาในการนำมาทดแทนปลาป่นในปลาดุกบิ๊กอุย (*C. macrocepphalus x C. gariepinus*) พบว่า ระดับของตะกอนน้ำนึ่งปลาที่ผสมในอาหารต้องไม่เกิน 10 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร เนื่องจากตะกอนน้ำนึ่งปลามีปริมาณเกลือสูง เมื่อนำไปผสมในอาหารในปริมาณมากจะทำให้อาหารปลามีรสเค็มเพิ่มขึ้น ส่งผลให้ปลากินอาหารได้น้อยลง (สุทิน และวิชิต, 2547)

2.3.2 การใช้วัตถุดิบโปรตีนทดแทนที่มาจากพืช

1.) กากถั่วเหลือง

กากถั่วเหลืองเป็นผลพลอยได้จากการผลิตน้ำมันพืช จัดเป็นวัตถุดิบโปรตีนจากพืชที่มีคุณภาพดีและมีคุณภาพ (Tacon and Forster, 2001) มีโปรตีนเป็นองค์-ประกอบประมาณ 40-50 เปอร์เซ็นต์ (นฤมล, 2550) มีกรดไขมันที่จำเป็นคือ กรดไลโนเลอิกในปริมาณค่อนข้างสูง (6.48-11.6 เปอร์เซ็นต์ของวัตถุแห้ง) อีกทั้งยังมีไรโบฟลาวินและไนอาซีนสูง (2.6-4.4 และ 22.0-59.8 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ตามลำดับ) อีกด้วย (Banaszkiewicz, 2011) การนำกากถั่วเหลืองมาใช้ในอาหารปลาในระดับที่เหมาะสมจึงสามารถทำให้ปลามีการเจริญเติบโตและอัตราการรอดตายที่ดี

กากถั่วเหลืองที่นิยมนำมาใช้เป็นอาหารปลามีหลายชนิดด้วยกัน ซึ่งมีคุณภาพแตกต่างกันตามกระบวนการในการผลิต เช่น กากถั่วเหลืองบด กากถั่วเหลืองสกัดน้ำมัน (defatted soybean meal) ซึ่งผ่านการสกัดน้ำมัน 2 วิธีคือ การสกัดน้ำมันด้วยการบีบหรืออัดและการสกัดด้วยสารละลายอินทรีย์ และกากถั่วเหลืองกะเทาะเปลือก (dehulled soybean meal) เป็นต้น (นิฮารีฟัร, 2554; นฤมล, 2550) การนำกากถั่วเหลืองมาใช้ในอาหารปลาเพื่อทดแทนวัตถุดิบโปรตีนจากปลาป่นสามารถช่วยลดต้นทุนในการผลิตอาหารได้ เนื่องจากปลาป่นคุณภาพดีจะมีราคา 34-37 บาท/กิโลกรัม ส่วนกากถั่วเหลืองมีราคา 19-20 บาท/กิโลกรัม (สมาคมผู้ผลิตอาหารสัตว์ไทย, 2557)

การใช้กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งวัตถุดิบในอาหารมีปัจจัยจำกัดที่สำคัญคือหากใช้กากถั่วเหลืองในปริมาณสูงจะทำให้ปลาได้รับกรดอะมิโนที่จำเป็นในปริมาณที่ไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโต เนื่องจากมีเมไธโอนีนและซีสตีนต่ำ (ยุพร, 2550) ดังนั้นในการนำกากถั่วเหลืองมาใช้เป็นวัตถุดิบโปรตีนหลักในอาหารสัตว์น้ำ จึงจำเป็นต้องมีการเสริมกรดอะมิโนที่จำเป็น เช่น เมไธโอนีน เพื่อให้ได้ปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็นเพียงพอต่อความต้องการของปลา นอกจาก

กากถั่วเหลืองจะมีกรดอะมิโนที่ไม่สมดุลแล้ว ยังมีสารต่อต้านการใช้ประโยชน์คือ สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซิน (trypsin inhibitor) และ hemagglutinins ซึ่งเป็นต้นเหตุของการตกตะกอนของเม็ดเลือดแดงทำให้ตับอ่อนและลำไส้ส่วนต้นมีความผิดปกติคือ ไมโครวิลไลของเซลล์บุผิวของลำไส้หดหายไป (Boonyaratpalin *et al*., 1998) จึงไม่สามารถนำกากถั่วเหลืองมาใช้เป็นวัตถุดิบโปรตีนทดแทนได้ในระดับสูง ดังนั้นก่อนการนำกากถั่วเหลืองมาใช้ในการผลิตอาหารสัตว์น้ำจึงควรทำให้สุกก่อน โดยความร้อนที่เหมาะสมจะช่วยเพิ่มคุณค่าของโปรตีนที่มีประโยชน์ได้ (นิฮารีฟัร, 2554)

สำหรับการนำกากถั่วเหลืองไปใช้เป็นวัตถุดิบโปรตีนในอาหารปลาพบว่าระดับที่เหมาะสมมีความแตกต่างกัน โดยขึ้นอยู่กับชนิดของปลาและชนิดของกากถั่วเหลืองที่ใช้ เช่น ในปลานิล (*O. niloticus*) พบว่า ปลาสามารถเจริญเติบโตได้ดีเมื่อได้รับอาหารที่มีกากถั่วเหลืองเป็นส่วนผสมที่ระดับ 25 เปอร์เซ็นต์ของปลาป่นในอาหาร โดยในอาหารนั้นมีการเสริมด้วยกรดอะมิโน 2 ชนิดคือ เมไธโอนีนและไลซีน (El-Saidy and Gaber, 2003) สำหรับปลาไน (*Cyprinus carpio*) สามารถเจริญเติบโตได้ดีเมื่อได้รับอาหารที่มีกากถั่วเหลืองเป็นแหล่งโปรตีนที่ระดับ 40 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร (Dabrowski and Kozak, 1979) ปลากะรังดอกแดง (*Epinephelus coioides*) และปลาปอมปาดัวร์ (*Symphysodon aequifasciata*) สามารถเจริญเติบโตได้ดีเมื่อใช้กากถั่วเหลืองสกัดน้ำมันในอาหาร 30 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนจากปลาป่น (อัตรา และคณะ, 2546; Chong *et al*., 2003) เป็นต้น

ในปลากะพงขาวพบว่า กากถั่วเหลืองสกัดน้ำมันสามารถนำมาใช้ในอาหารปลากะพงขาวระยะวัยรุ่น (น้ำหนักเริ่มต้น 0.95-0.99 กรัม/ตัว) ได้ที่ระดับ 10 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนในอาหาร ซึ่งมีปลาป่นเป็นวัตถุดิบโปรตีนหลักร่วมกับการใช้หัวกุ้งป่น โดยไม่มีการเสริมกรดอะมิโนที่จำเป็น ซึ่งเป็นระดับที่ส่งผลให้ปลามีการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหารที่ดี (Tantikitti *et al*., 2005) ในการศึกษาของ Boonyaratpalin และคณะ (1998) ที่ศึกษาการใช้กากถั่วเหลืองสกัดน้ำมันทดแทนแหล่งโปรตีนจากปลาป่นในอาหารสำหรับปลากะพงขาวระยะวัยรุ่น พบว่า สามารถใช้กากถั่วเหลืองสกัดน้ำมันทดแทนแหล่งโปรตีนจากปลาป่นได้สูงถึง 37.5 เปอร์เซ็นต์ (15 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนในอาหาร) โดยให้ผลการเจริญเติบโตไม่แตกต่างจากปลาที่ได้รับอาหารสูตรควบคุม ทั้งนี้ปริมาณการใช้กากถั่วเหลืองจะขึ้นอยู่กับวัตถุดิบอื่นที่เป็นองค์ประกอบในอาหารด้วย โดยหากมีการเสริมกรดอะมิโนชนิดที่ขาดลงในอาหารก็จะทำให้สามารถนำกากถั่วเหลืองมาใช้เป็นแหล่งโปรตีนได้สูงขึ้น เช่น Alam และคณะ (2012) ศึกษาการนำกากถั่วเหลืองมาใช้ในอาหารปลากะพงดำ (black seabass, *Centropritis striata*) พบว่า

สามารถนำกากถั่วเหลืองมาใช้ได้สูงถึง 60 เปอร์เซ็นต์ของปลาป่นในอาหาร และเมื่อมีการเสริมด้วยกรดอะมิโน 2 ชนิดคือ เมไธโอนีนและไลซีน สามารถใช้กากถั่วเหลืองได้สูงถึง 70 เปอร์เซ็นต์ของปลาป่นในอาหาร โดยไม่ทำให้ปลามีผลการเจริญเติบโตแตกต่างจากปลาที่ได้รับอาหารสูตรอ้างอิง

2.) **กากถั่วลิสง**

กากถั่วลิสงเป็นผลพลอยได้จากการสกัดน้ำมันเมล็ดถั่วลิสง ซึ่งรูปแบบที่นำมาใช้มีทั้งแบบกากถั่วลิสงกะเทาะเปลือกบางส่วนและกากถั่วลิสงที่กะเทาะเปลือกจนหมด โดยมีโปรตีนตั้งแต่ 25-45 เปอร์เซ็นต์ กากถั่วลิสงมีโปรตีนใกล้เคียงกับกากถั่วเหลือง แต่มีคุณภาพต่ำกว่าคือ มีกรดอะมิโนชนิดไลซีนและเมไธโอนีนต่ำ มีแคลเซียม แคโรทีน วิตามินดีและไรโบฟลาวินต่ำ แต่มีไนอาซีนและกรดแพนโทเธนิกสูง การใช้กากถั่วลิสงเป็นส่วนผสมในอาหารจึงควรใช้ร่วมกับวัตถุดิบโปรตีนอื่นที่มีคุณภาพดี เช่น วัตถุดิบโปรตีนที่มาจากสัตว์ นอกจากนี้ในการเลือกใช้กากถั่วลิสงยังต้องระมัดระวังเรื่องการเหม็นหืนและสารพิษอะฟลาทอกซินอีกด้วย (นฤมล, 2550; วีรพงศ์, 2536)

3.) **พืชตระกูลถั่วชนิดอื่น**

นอกจากการนำกากถั่วเหลืองและกากถั่วลิสงมาใช้เป็นแหล่งวัตถุดิบโปรตีนในอาหารแล้ว ยังมีการนำพืชตระกูลถั่วชนิดอื่นมาใช้เป็นวัตถุดิบโปรตีนในอาหารปลากะพงขาว เช่น ถั่วเขียว (green pea, *Pisum sativum*) สามารถนำมาใช้ในอาหารปลากะพงขาววัยอ่อน (0.5 กรัม) ได้ที่ระดับ 10 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนในอาหาร (Ganzon-Naret, 2013b) เนื่องจากถั่วเขียวมีสารต่อต้านการใช้ประโยชน์เช่นเดียวกับถั่วเหลือง Ganzon-Naret (2013a) ศึกษาการนำเมล็ดพืชตระกูลถั่ว 3 ชนิด คือ ถั่วแระ (pigeon pea, *Cajanus cajan*) ถั่วแปบ (yellow mung beans, *Phaseolus aureus*) และถั่วเขียว (green mung beans, *Vigna radiate*) มาใช้ในอาหารปลากะพงขาว โดยผสมเอนไซม์ microbial phytase ลงไปในอาหารที่ระดับ 300 ยูนิต/อาหาร 1 กิโลกรัม ทำให้สามารถใช้วัตถุดิบเมล็ดพืชตระกูลถั่วนี้ได้ถึง 18-20 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนในอาหาร

4.) Canola meal

yeast-fermented canola meal สามารถนำมาใช้ทดแทนโปรตีนจากปลาป่นในอาหารปลากะพงขาวที่มีน้ำหนัก 5 กรัม/ตัว ที่ระดับ 50 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร โดยไม่ส่งผลกระทบทางลบต่อการเจริญเติบโตของปลาเมื่อเปรียบเทียบกับปลาที่ได้รับอาหารชุดควบคุม แต่ปลาที่ได้รับอาหารทดลองที่ใช้ yeast-fermented canola meal ผสมในอาหารที่ระดับ 100 เปอร์-เซ็นต์ มีอัตราการรอดตายเป็น 0 เปอร์เซ็นต์ หลังจากการทดลองผ่านไป 2 สัปดาห์ (Plaipetch and Yakupitiyage, 2012)

5.) แหนแดง

แหนแดง (*Azolla microphylla*) เป็นพืชที่พบทั่วไปตามแหล่งน้ำ สามารถตรึงไนโตรเจนในอากาศมาใช้สำหรับการเจริญเติบโตและขยายพันธุ์ได้ มีองค์ประกอบที่สำคัญ เช่น โปรตีน ไขมันและเซลลูโลส จากงานวิจัยของ Fiogbe และคณะ (2004; อ้างโดย อนุรักษ์ และคณะ, 2555) พบว่า แหนแดงสามารถใช้เสริมในอาหารปลาที่ระดับ 40 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้งจะทำให้ปลามีการเจริญเติบโตสูงที่สุด และจากการศึกษาของอนุรักษ์ และคณะ (2555) พบว่าสามารถนำแหนแดงมาใช้เป็นวัตถุดิบโปรตีนในอาหารปลานิลแดงแปลงเพศ (*O. niloticus*) ได้ถึง 26 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อคำนวณต้นทุนค่าอาหารต่อ 1 กิโลกรัมแล้วพบว่า อาหารที่มีแหนแดงเป็นส่วนผสมมีต้นทุนต่ำกว่าสูตรควบคุมที่มีปลาป่นเป็นวัตถุดิบโปรตีนหลัก แหนแดงจึงสามารถเป็นวัตถุดิบอาหารที่มีต้นทุนต่ำและมีคุณค่าทางโภชนาการสูงพอสำหรับการนำไปเป็นวัตถุดิบโปรตีนในอาหารปลา

จากการศึกษาค้นคว้าวัตถุดิบทดแทนปลาป่นในปัจจุบันพบว่า สามารถใช้ผลิตภัณฑ์จากสัตว์เป็นวัตถุดิบทดแทนปลาป่นในอาหารปลาบางชนิดได้ 100 เปอร์เซ็นต์ เช่น การใช้หอยเชอรี่ป่นในอาหารปลานิลและปลาดุกบิ๊กอุย (จุฑามาศ, 2545; บัญชา และคณะ, 2544) การใช้ไก่ป่นในอาหารปลากะพงขาว โดยเสริมด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากเครื่องในปลาทูน่า 3 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร ซึ่งไม่ทำให้ปลามีการเจริญเติบโตแตกต่างจากปลาที่ได้รับอาหารสูตรอ้างอิงที่มีปลาป่นเป็นวัตถุดิบโปรตีนหลัก เป็นต้น ดังนั้นการใช้วัตถุดิบทดแทนจึงเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการพัฒนาสูตรอาหารปลาเพื่อลดการใช้โปรตีนจากปลาป่นที่ผลิตจากปลาในธรรมชาติ ส่งผลให้การจับปลาจากธรรมชาติเพื่อการผลิตเป็นปลาป่นลดน้อยลง ช่วยให้ปลามีปริมาณประชากร

เพิ่มขึ้น มีโอกาสเจริญเติบโตและขยายพันธุ์มากขึ้น นอกจากนี้ยังช่วยลดปริมาณเศษเหลือจากอุตสาหกรรมต่างๆ ที่จะปล่อยทิ้งสู่ธรรมชาติและช่วยให้เกิดการเพาะเลี้ยงปลาอย่างยั่งยืน

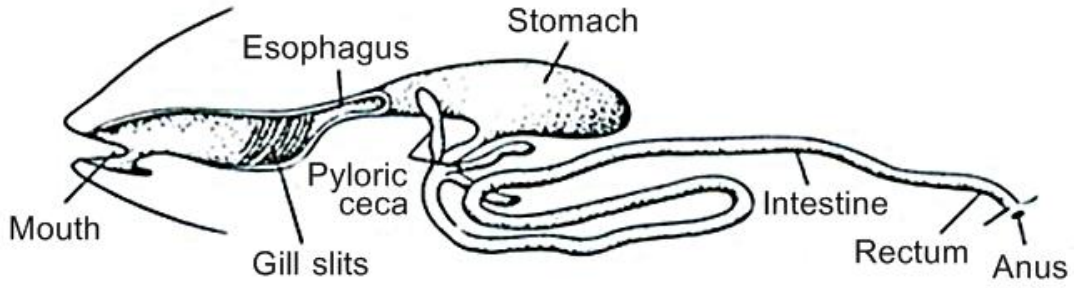
2.4 กระบวนการย่อยอาหารและการใช้ประโยชน์จากโปรตีนในปลา

อาหารปลาจะมีประโยชน์หรือไม่นั้นขึ้นอยู่กับความสามารถในการย่อยและดูดซึมนำไปใช้ประโยชน์ของปลา โดยปัจจัยที่ส่งผลต่ออัตราการย่อยอาหารของปลาคือ ชนิดและอายุของปลา ความเครียด อุณหภูมิของน้ำ ออกซิเจนในน้ำ ความเป็นกรด-ด่างของน้ำ ความสามารถในการย่อยอาหารของปลาและองค์ประกอบของอาหาร ซึ่งประกอบด้วยชนิดวัตถุดิบ สัดส่วนของวัตถุดิบ ขนาดวัตถุดิบ ความสุกของวัตถุดิบ ปริมาณแป้งในอาหาร ความแข็งของเม็ดอาหารและพลังงานที่อยู่ในอาหาร (ชุติมา, 2549; ธนาภรณ์, 2557; Viadero, 2005)

การย่อยอาหารคือ การทำให้อาหารมีขนาดเล็กลงจนเป็นสารละลายก่อนถูกดูดซึมจากทางเดินอาหาร ระบบย่อยอาหารในสัตว์น้ำคล้ายคลึงกับในสัตว์เลือดอุ่น ประกอบด้วยกระบวนการย่อย 3 กระบวนการคือ กระบวนการย่อยขนาดของอาหารให้เล็กลงด้วยวิธีกล (mechanical degradation) กระบวนการละลายอาหารด้วยน้ำย่อย (enzyme solubilization) และกระบวนการทำให้อาหารเป็นของเหลวและไขมันแตกตัว (emulsification) (เวียง, 2543)

2.4.1 ระบบย่อยอาหารของปลา

ระบบย่อยอาหารของปลาเป็นระบบที่มีความสัมพันธ์โดยตรงกับการเจริญเติบโตของปลา ถ้าปลาได้รับอาหารที่มีสารอาหารในปริมาณที่ครบถ้วนและมีคุณภาพดี สามารถย่อยและดูดซึมได้ง่ายก็จะช่วยให้ปลามีการเจริญเติบโตที่ดี โดยระบบย่อยอาหารของปลาแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของปลาและอาหารที่ปลากิน (Khojasteh, 2012) อย่างไรก็ตามระบบย่อยอาหารประกอบด้วยส่วนสำคัญเหมือนกัน คือ ทางเดินอาหาร (digestive tract) อวัยวะช่วยย่อยอาหาร (accessory gland) ได้แก่ ตับ ตับอ่อนและถุงน้ำดี และเอนไซม์ย่อยอาหาร (digestive enzyme) แสดงดังภาพที่ 3 (วีรพงศ์, 2536)



ภาพที่ 3 อวัยวะในระบบย่อยอาหารของปลา (Juni, 2013)

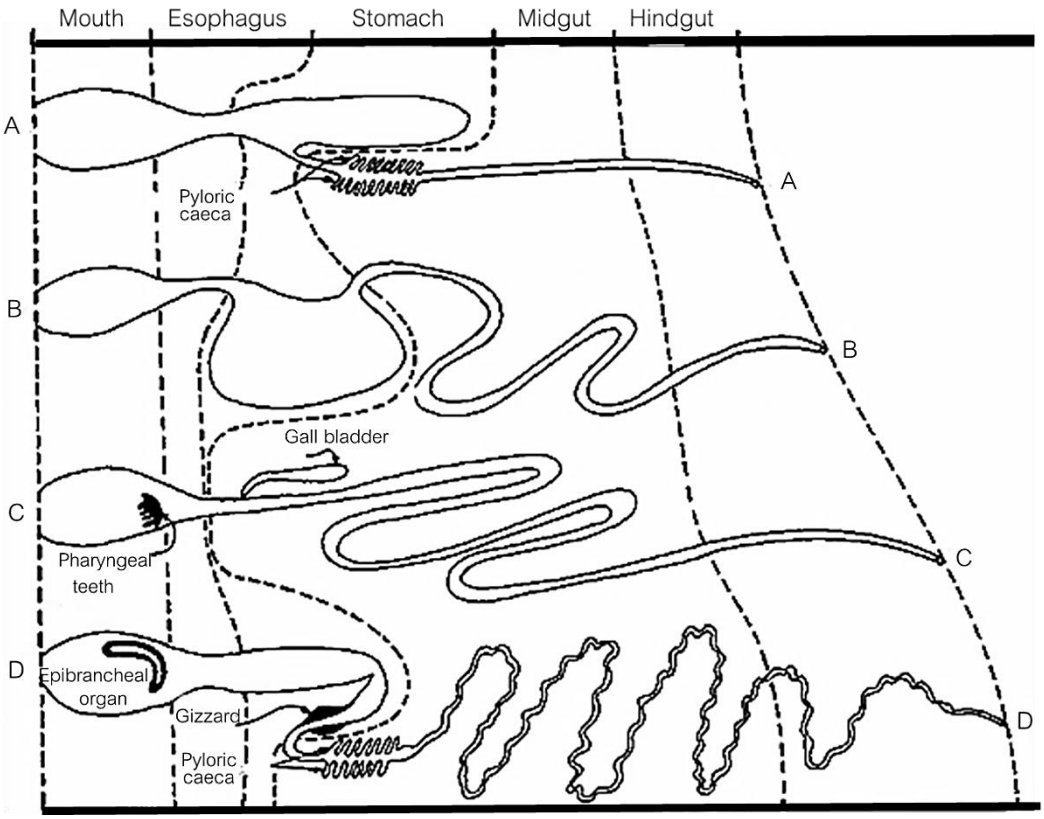
สัตว์มีกระดูกสันหลังส่วนใหญ่มีท่อทางเดินอาหาร ประกอบด้วย ปาก (mouth) หลอดอาหาร (esophagus) กระเพาะอาหาร (stomach) ลำไส้ (intestine) และลำไส้ตรง (rectum) ปลาวัยอ่อนที่เพิ่งฟักออกจากไข่จะมีระบบท่อทางเดินอาหารที่ยังไม่สมบูรณ์ เมื่อปลาโตขึ้นจะมีการพัฒนาท่อทางเดินอาหารและเอนไซม์ย่อยอาหารเพื่อทำหน้าที่ให้เป็นปกติ

1.) ปาก (mouth)

ปากเป็นอวัยวะที่ใช้ในการกินอาหาร ก่อนส่งต่อไปยังหลอดอาหารและกระเพาะอาหาร ปากจะอยู่บริเวณปลายจงอยปาก โดยตำแหน่งและขนาดปากของปลาแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน ภายในช่องปาก (buccal cavity) ของปลาประกอบด้วยอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับการย่อยอาหาร ได้แก่ ฟัน (teeth) ทำหน้าที่กัดหรือบดอาหารขนาดใหญ่ให้มีขนาดเล็กลงก่อนถูกนำไปย่อยในกระเพาะอาหาร ซี่เหงือก (gill raker) ทำหน้าที่ป้องกันไม่ให้อาหารหรืออินทรียสารผ่านเข้ามาบริเวณเหงือก และเซลล์ผลิตเมือก (mucous cell) ทำหน้าที่ผลิตเมือกหล่อลื่นอาหารทำให้อาหารอ่อนนุ่มขณะเคี้ยวหรือบด ซึ่งจะช่วยให้ปลากินหรือกลืนอาหารได้ง่าย (วีรพงศ์, 2536) ปลากะพงขาวจัดเป็นปลานักล่า เป็นปลาที่กินสัตว์เป็นอาหาร จึงมีการพัฒนาของฟันสำหรับใช้ในการจับเหยื่อให้แน่น (วิมล, 2528)

ในการกินอาหารของปลาทั่วไป จะใช้การสัมผัสทางเคมี (chemoreception) โดยมีตุ่มรับรสอาหาร (taste bud) แล้วไปกระตุ้นระบบสมองให้สั่งงานมาควบคุมการกินอาหาร ปลาแต่ละชนิดจะมีจำนวนตุ่มรับรสอาหารในแต่ละบริเวณแตกต่างกันไป ตุ่มรับรสของปลากระดูกแข็งมักพบทั่วไปบริเวณลำตัวหรือครีบ แต่บริเวณที่พบมากที่สุดจะเป็นบริเวณที่สัมผัสกับอาหารโดยตรง เช่น ปาก ริมฝีปาก ฟัน คอหอย ซี่เหงือก แกนเหงือกและหนวด เมื่อปลาได้รับอาหาร อาหารที่ปลากินจะถูกเคี้ยวในปากและส่งต่อไปสู่ทางเดินอาหาร (วิมล, 2528)

ปลาบางชนิดมีท่อทางเดินอาหารเป็นท่อยาวจากปากถึงทวารหนักและแยกกันไม่ชัดเจน บางชนิดสามารถแยกส่วนของคอหอย กระเพาะอาหารและลำไส้ได้ชัดเจน โดยมีลักษณะของเซลล์เยื่อบุผิวหนังคล้ายกัน ทั้งนี้เนื่องจากความแตกต่างของพฤติกรรมการกินอาหาร (feeding habit) ทำให้ปลาต้องมีวิวัฒนาการของระบบย่อยอาหารเพื่อให้มีประสิทธิภาพในการย่อยและการดูดซึมอาหารได้มากที่สุด (Khojasteh, 2012; วิมล, 2528) (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 ท่อทางเดินอาหารของปลาชนิดต่างๆ A: ปลาเรนโบว์เทร้า (ปลากินเนื้อ); B: ปลาดุก (ปลากินพืชและเนื้อ มีกระเพาะอาหาร); C: ปลาไน (ปลากินพืชและเนื้อ ไม่มีกระเพาะอาหาร); D: ปลานวลจันทร์ (ปลากินแพลงค์ตอนพืช) ดัดแปลงจาก (Smith, 1980)

ในปลา common dentex (*Dentex dentex*) พบว่า ผนังทางเดินอาหารประกอบด้วยเนื้อเยื่อชั้นต่างๆ คือ ชั้นมิวโคซา (mucosa) ชั้นซับมิวโคซา (submucosa) ชั้นมัสคิว-ลาริสและชั้นเซอโรซา (serosa) โดยไม่พบชั้นมัสคิวลาริสเซอโรซา (muscularis mucosa) ระหว่างชั้นมิวโคซาและชั้นซับมิวโคซา (Carrassón *et al*., 2006)

2.) **หลอดอาหาร** (esophagus)

หลอดอาหารเป็นส่วนที่อยู่ระหว่างปากและกระเพาะอาหาร ทำหน้าที่เป็นทางผ่านของอาหาร ภายในหลอดอาหารของปลาบางชนิดอาจมีตุ่มรับรสอาหารอยู่บริเวณด้านหน้าหลอดอาหารและพบเซลล์ผลิตเมือกตลอดความยาวหลอดอาหาร (วีรพงศ์, 2536) เนื้อเยื่อบุผิวหลอดอาหารประกอบด้วยเนื้อเยื่อขนาดต่างๆ ที่พับซ้อนกันไปมาจำนวนมาก โดยมีลักษณะยื่นออกมาคล้ายนิ้วมือในส่วนต้นและส่วนท้ายของหลอดอาหาร บริเวณส่วนปลายของเนื้อเยื่อที่ยื่นออกมาคล้ายนิ้วมือนั้น ประกอบด้วยเนื้อเยื่อชนิด simple columnar epithelium คือ เนื้อเยื่อที่ประกอบด้วยเซลล์สี่เหลี่ยมทรงสูง เรียงตัวเป็นชั้นเดียวและมีไมโครวิลไลที่เนื้อผิว และเนื้อเยื่อชนิด stratified squamous epithelium คือเนื้อเยื่อที่ประกอบด้วยเซลล์เรียงตัวกัน 2-3 ชั้น และมี fingerprint-like microridges ที่เนื้อเยื่อบุผิว ซึ่งเนื้อเยื่อชนิด stratified squamous epithelium นี้พบจำนวนมากที่บริเวณส่วนฐานของเนื้อเยื่อที่พับซ้อนกัน (Carrassón *et al*., 2006)

ในชั้นมิวโคซาภายในหลอดอาหารพบเซลล์หลั่งสารชนิด globlet cells กระจายอยู่ตามผิวเนื้อเยื่อชนิด stratified epithelium และ rodlet cells พบกระจายอยู่ตามผิวเนื้อเยื่อชนิด columnar และ stratified epithelium โดยเซลล์หลั่งสารทั้ง 2 ชนิดนี้พบกระจายอยู่เป็นจำนวนมากตลอดความยาวของหลอดอาหาร ส่วนใต้ชั้นมิวโคซาประกอบด้วยเนื้อเยื่อไขมัน หลอดเลือดฝอยและเส้นประสาท และชั้นเซอโรซาประกอบด้วยเนื้อเยื่อที่มีเซลล์ชั้นเดียวคือ simple squamous epithelium เป็นชั้นนอกสุด ลักษณะเป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันบางๆ บุภายนอกที่เรียกว่า เมโซทีเลียลเซลล์ (mesothelial cells) (Carrassón *et al*., 2006)

3.) **กระเพาะอาหาร** (stomach)

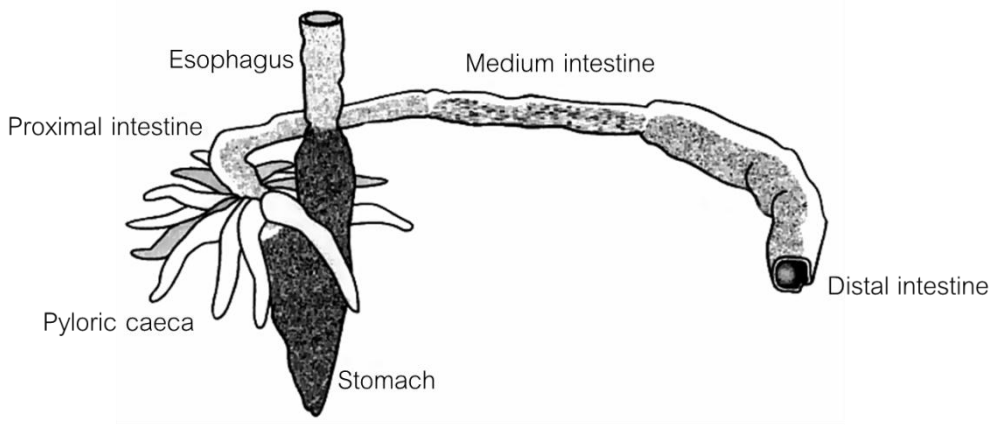
กระเพาะอาหารมีหน้าที่ในการย่อย ปลาแต่ละชนิดมีขนาดหรือรูปร่างของกระเพาะอาหารแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับพฤติกรรมการกินอาหาร บริเวณกระเพาะอาหารของปลาบางชนิดอาจพบกึ๋น (gizzard) ทำหน้าที่ช่วยในการบดอาหาร (วีรพงศ์, 2536)

จากการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่า บริเวณชั้นมิวโคซาปกคลุมด้วยเนื้อเยื่อชนิด simple columnar epithelium มีลักษณะเป็นรอยย่นตามแนวยาวจำนวนมาก เพื่อการขยายตัวเมื่ออาหารเต็มกระเพาะ และมีไมโครวิลไลกระจายอยู่ทั่วไปบนเนื้อเยื่อบุผิว มีกระเปาะสารคัดหลั่งซึ่งบรรจุสารประกอบเนื้อเดียว (homogeneous material) กระจายอยู่ทั่วไปที่

ผิวเซลล์ แต่ไม่พบเซลล์หลั่งสารชนิด goblet cells พบเพียงแต่ rodlet cells กระจายที่เนื้อผิวเล็กน้อย (Carrassón *et al*., 2006)

4.) **ลำไส้และไส้ติ่ง** (intestine and pyloric caeca)

ลำไส้ของปลาแบ่งออกได้เป็น 3 ส่วน ได้แก่ ลำไส้ส่วนต้น (proximal intestine) ลำไส้ส่วนกลาง (medium intestine) และลำไส้ส่วนท้าย (distal intestine) (ภาพที่ 5) ลำไส้แต่ละส่วนมีลักษณะทางกายวิภาคคล้ายคลึงกัน โดยเป็นท่อยาวไปตลอดความยาวช่องท้อง ไปเปิดออกบริเวณช่องทวาร เซลล์บุผนังลำไส้ประกอบด้วยเซลล์หลั่งเอนไซม์ ทำหน้าที่หลั่งเอนไซม์ออกมาย่อยโปรตีน คาร์โบไฮเดรตและไขมัน และเซลล์ผลิตเมือก ทำหน้าที่ผลิตสารจำพวกมิวโค-โพลีแซ็กคาไรด์ (mucopoly-saccharide) ออกมาเคลือบลำไส้เพื่อป้องกันการย่อยโดยเอนไซม์ (Carrassón *et al*., 2006; Khojasteh, 2012; วีรพงศ์, 2536)



ภาพที่ 5 อวัยวะในระบบย่อยอาหารของปลา Shi drum (Pedini *et al*., 2002)

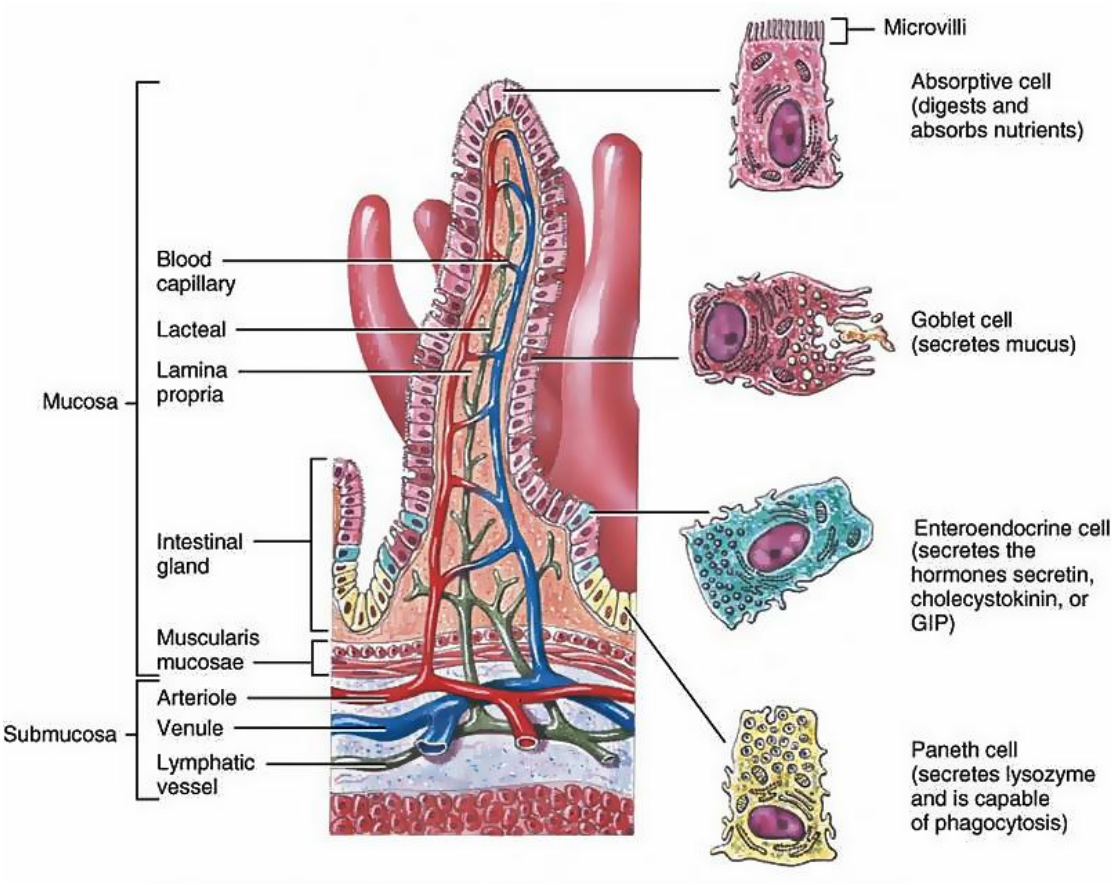
โดยทั่วไปลักษณะรูปร่างของลำไส้มีความสัมพันธ์กับพฤติกรรมการกินอาหาร ปลากินพืชมีลำไส้ยาวหลายเท่าของความยาวลำตัว เป็นท่อขดไปมาในช่องท้อง เนื่องจากปลากินพืชส่วนใหญ่มีการย่อยอาหารในลำไส้ นอกจากนี้อาหารจำพวกพืชจะมีผนังเซลล์ที่ย่อยยาก ทำให้ปลาปรับตัวให้มีลำไส้ยาวเพื่อเพิ่มพื้นที่ในการย่อยและดูดซึมอาหาร ส่วนปลากินเนื้อมีลักษณะลำไส้เป็นท่อตรงและมีความยาวสั้นกว่าความยาวลำตัว และมีลำไส้สั้นกว่าปลากินพืช (วีรพงศ์, 2536) โดยผนังลำไส้ (ภาพที่ 6) มีโครงสร้างที่สำคัญ (วิมล, 2528) ได้แก่

(1) มีวิลไล (villi) ซึ่งเป็น mucous membrane ที่ยื่นขึ้นทำให้มีลักษณะคล้ายนิ้วมือหรือใบไม้

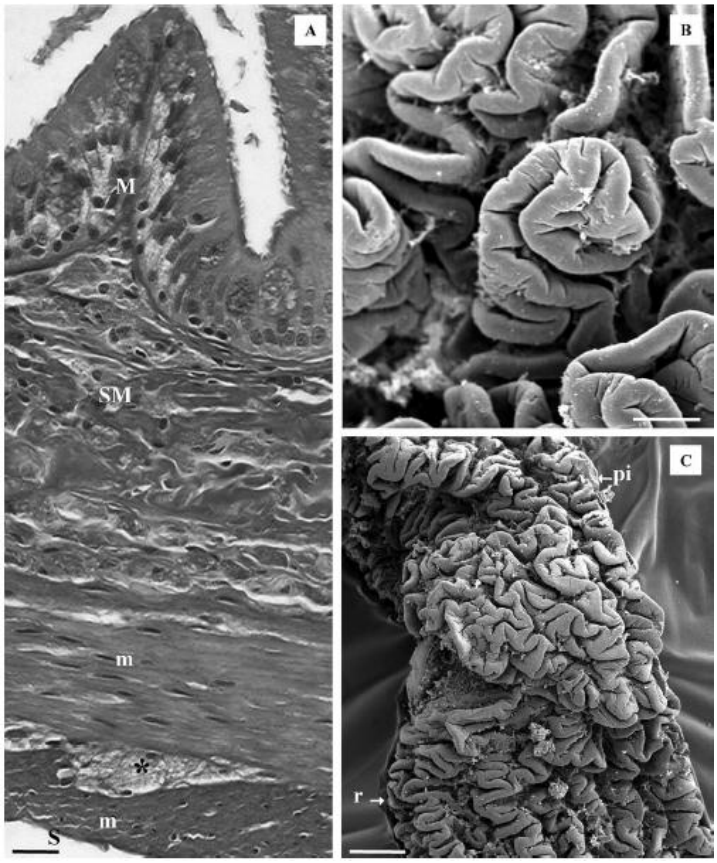
(2) มี plicae circulares (valve of Kerchring) เป็น circular หรือ spiral folds ที่ถาวรของผนังชั้นมิวโคซาและชั้นซับมิวโคซา

(3) ด้านบนของเซลล์เยื่อบุผิวของวิลไลมี striated border

(4) มี crypt of Lieberkuhn เป็นต่อมที่อยู่ระหว่างฐานของวิลไล



ภาพที่ 6 โครงสร้างผนังเนื้อเยื่อลำไส้เล็กของสัตว์มีกระดูกสันหลัง (Sofroniou, 2012)



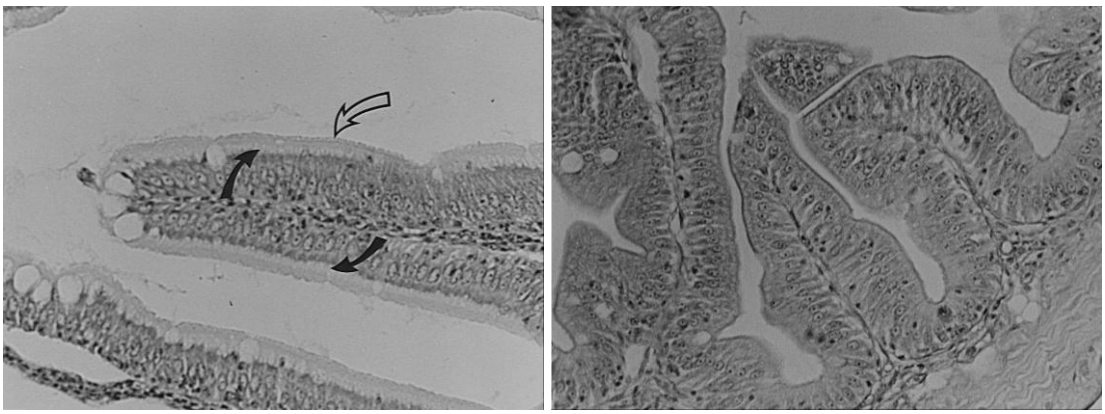
ภาพที่ 7 ลักษณะเนื้อเยื่อของลำไส้และไส้ติ่ง; A. ผนังลำไส้ (15 ไมโครเมตร); M: ชั้นมิวโคซา; SM: ชั้นใต้ซับมิวโคซา; M: ชั้นมัสคิวลาริสและ S: ชั้นเซอโรซา, B. รอยย่นขั้นต้นและรอยย่นขั้นพัฒนาของชั้นมิวโคซา (0.15 ไมโครเมตร), C. funnel-like valve ที่แบ่งระหว่างลำไส้ตรงและลำไส้ส่วนท้าย (pi) (0.43 ไมโครเมตร) (Carrassón *et al*. 2006)

จากการศึกษาลักษณะเนื้อเยื่อวิทยาของ Carrassón และคณะ (2006) ในปลา common dentex (*Dentex dentex*) พบว่า ลักษณะเนื้อเยื่อของไส้ติ่งไม่มีความแตกต่างจากลำไส้มากนัก (ภาพที่ 7) โดยทั้งไส้ติ่งและลำไส้ประกอบด้วยเนื้อเยื่อชั้นเซอโรซาที่มีชั้นกล้ามเนื้อวงและกล้ามเนื้อตามยาว มีชั้นซับมิวโคซาและชั้นมิวโคซา ตามลำดับ บริเวณชั้นซับมิวโคซามีกล้ามเนื้อแบบบาง 2 ชั้น ประกอบด้วยชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective muscle) ซึ่งพบระหว่างชั้นเซอโรซาและชั้นซับมิวโคซา ในชั้นมิวโคซาของลำไส้และไส้ติ่งมีลักษณะของเนื้อเยื่อแบบเดียวกัน คือพบรอยย่นที่ขยายและแตกเป็นสาขาไปตลอดความยาวทั้งหมด ยกเว้นส่วนบริเวณลำไส้ตรงที่พบว่า การวางตัวของรอยย่นจะกลายเป็นรอยย่นตามยาว โดยมี funnel-like valve เป็นตัวกั้นระหว่างลำไส้ส่วนท้ายกับลำไส้ตรง

บริเวณเนื้อเยื่อบุผิวของลำไส้และไส้ติ่งประกอบด้วยเนื้อเยื่อชนิด simple columnar epithelium ที่มีเซลล์หลั่งสารชนิด goblet cells และ rodlet cells กระจายอยู่ทั่วไป นอกจากนี้พบเซลล์เม็ดเลือดขาวที่เคลื่อนที่ไปมาอีกด้วย สำหรับเซลล์ที่มีหน้าที่ในการดูดซึมสารอาหารและสารต่างๆ (absorptive columnar cells) พบอยู่ทั่วไปตลอดบริเวณที่เป็นไมโครวิล-ไล

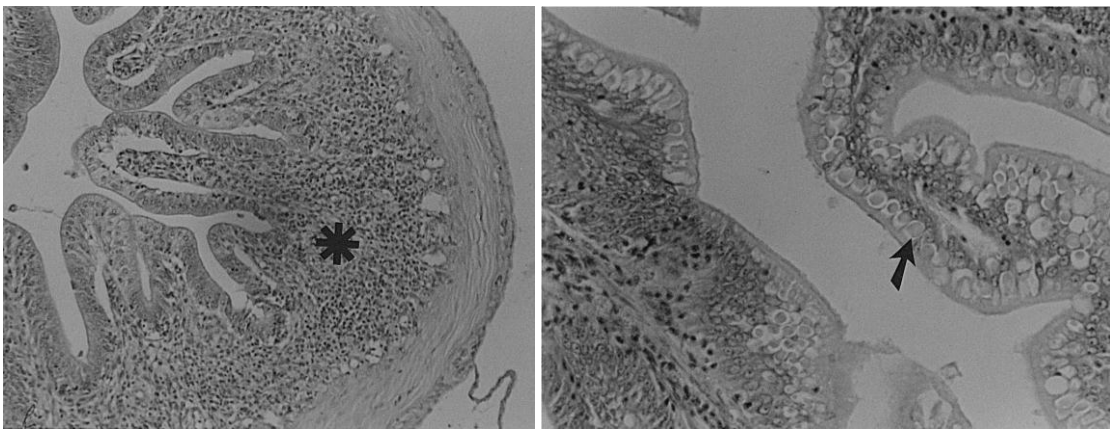
จากการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนศึกษาผนังลำไส้พบว่า brush border membrane มีพื้นที่ในลำไส้ถึง 90 เปอร์เซ็นต์ของพื้นผิวทั้งหมด ผนังด้านในจะม้วนตัวเป็นไมโครวิลไล (microvilli) ซึ่งทำให้มีพื้นที่ผิวจำนวนมากในการย่อยและดูดซึมอาหาร จึงทำให้เป็นบริเวณที่มีการย่อยอาหารเกิดขึ้นมากที่สุด มีการดูดซึมสารอาหารเข้าสู่ผนังลำไส้และขนส่งไปสู่เซลล์ที่อวัยวะต่างๆ โดยในปลาต่างชนิดกันพบว่า มีขนาดของไมโครวิลไลแตกต่างกัน ซึ่งสัมพันธ์โดยตรงกับแหล่งที่อยู่อาศัยและพฤติกรรมการกินอาหาร (Khojasteh, 2012; วิมล, 2528; วีรพงศ์, 2536)

Boonyaratpalin และคณะ (1998) ได้ทำการศึกษาลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่ใช้ถั่วเหลืองชนิดต่างๆ เป็นวัตถุดิบในอาหารทดแทนโปรตีนจากปลาป่น 15 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ กากถั่วเหลืองสกัดน้ำมันด้วยสารละลายอินทรีย์ (solvent extracted soybean meal) กากถั่วเหลืองไขมันเต็ม (extruded full-fat soybean meal) กากถั่วเหลืองไขมันเต็มนึ่งไอน้ำ (steamed full-fat soybean meal) และกากถั่วเหลืองดิบไขมันเต็มแช่น้ำ (soaked raw full-fat soybean meal) ที่ระดับ 21.0, 27.0, 28.5 และ 27.5 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร เปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่มีปลาป่นเป็นวัตถุดิบหลัก โดยให้อาหารทดลองเป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์ พบว่า ปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่มีปลาป่นเป็นวัตถุดิบหลัก มีการพัฒนาของเนื้อเยื่อเป็นไปตามปกติ ชั้นมิวโคซามีการพัฒนาที่ดี มีไมโครวิลไลที่พัฒนาและแสดงให้เห็นอย่างชัดเจน มีเซลล์ดูดซึมจำนวนมากในไซโตพลาสซึม (cytoplasm) และพบเซลล์หลั่งสารชนิด goblet cells กระจายอยู่ทั่วไปในชั้นมิวโคซา (ภาพที่ 8 ซ้าย) ส่วนปลาที่ได้รับอาหารที่มีกากถั่วเหลืองดิบไขมันเต็มแช่น้ำเป็นวัตถุดิบอาหาร แสดงให้เห็นความผิดปกติในการพัฒนาของเนื้อเยื่อบุผิว โดยไมโครวิลไลหดสั้นและเซลล์ดูดซึมมีจำนวนน้อย (ภาพที่ 8 ขวา) เนื้อเยื่อเกี่ยวพันเพิ่มจำนวนมากขึ้นกว่าปกติ (ภาพที่ 9 ซ้าย)



ภาพที่ 8 ลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาในชั้นมิวโคซาของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่มีปลาป่นเป็นวัตถุดิบโปรตีนหลัก (ซ้าย) ปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่มีกากถั่วเหลืองดิบเป็นวัตถุดิบโปรตีน (ขวา); ลูกศรทึบแสดงบริเวณของเซลล์ดูดซึมที่พบจำนวนมากและลูกศรโปร่งแสดงไมโครวิลไลที่พัฒนาอย่างเด่นชัด (Boonyaratpalin *et al*., 1998)

สำหรับปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่มีกากถั่วเหลืองไขมันเต็มพบว่า มีเม็ดเลือดขาวชนิดที่มีแกรนูล (eosinophilic) กระจายอยู่ทั่วไปตามเนื้อผิวมากกว่าปลาชุดการทดลองอื่น และมีไมโครวิลไลหดสั้น (ภาพที่ 9 ขวา) ส่วนปลาที่ได้รับอาหารที่มีกากถั่วเหลืองสกัดน้ำมันด้วยสารละลายอินทรีย์และกากถั่วเหลืองไขมันเต็มนึ่งไอน้ำมีการพัฒนาของเนื้อเยื่อลำไส้ที่เป็นไปตามปกติ แต่มีไมโครวิลไลสั้นลงเล็กน้อยและมีบริเวณดูดซึมสารอาหารน้อยกว่าปลาที่ได้รับอาหารที่มีปลาป่นเป็นวัตถุดิบโปรตีนหลัก ลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของปลาทดลองทั้ง 5 ชุดการทดลองนี้มีความสอดคล้องกับผลการเจริญเติบโต โดยพบว่าปลาที่ได้รับอาหารที่มีปลาป่นเป็นวัตถุดิบโปรตีนหลักมีการเจริญเติบโตดีที่สุด รองลงมาคือปลาที่ได้รับอาหารที่มีกากถั่วเหลืองสกัดน้ำมันด้วยสารละลายอินทรีย์ กากถั่วเหลืองไขมันเต็มและกากถั่วเหลืองไขมันเต็มนึ่งไอน้ำเป็นวัตถุดิบในอาหาร ตามลำดับ ส่วนปลาที่ได้รับอาหารที่มีกากถั่วเหลืองดิบไขมันเต็มแช่น้ำมีการเจริญเติบโตน้อยที่สุด ทั้งนี้เนื่องจากถั่วเหลืองดิบมีสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซินและอาจมีสารต้านโภชนะอื่น ทำให้ปลานำกากถั่วเหลืองดิบไปใช้ประโยชน์ได้น้อยกว่ากากถั่วเหลืองที่ทำให้สุกหรือกากถั่วเหลืองที่ผ่านกรรมวิธีปรับปรุงคุณภาพ (Boonyaratpalin *et al*., 1998; นฤมล, 2550)



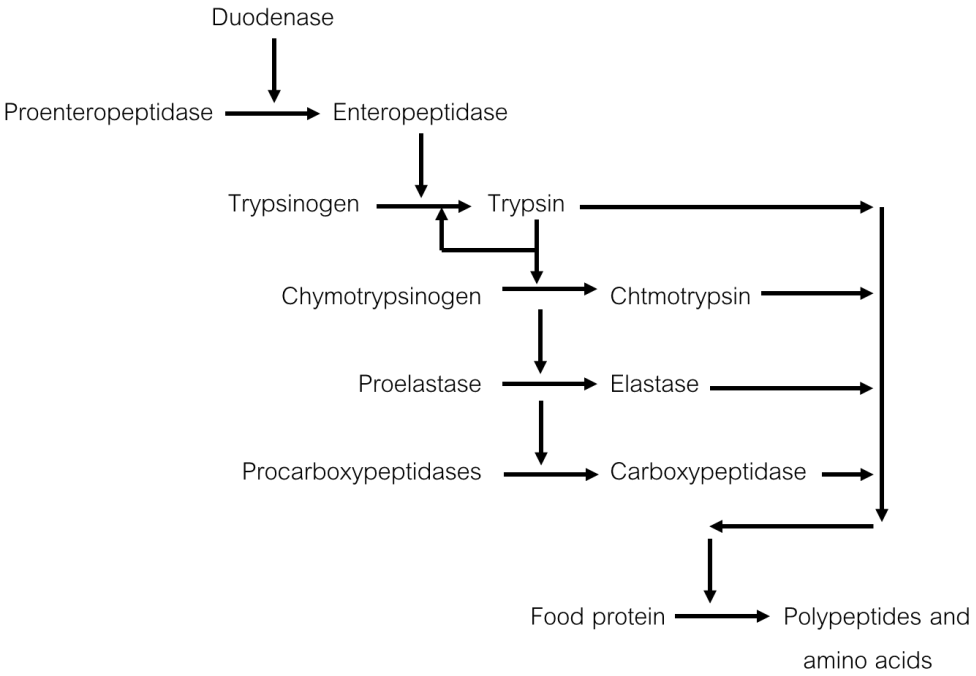
ภาพที่ 9 ลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาในชั้นมิวโคซาของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่มีกากถั่วเหลืองดิบเป็นวัตถุดิบโปรตีน (ซ้าย: แสดงการพัฒนาของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่มากกว่าปกติ; ขวา: แสดงเม็ดเลือดขาวชนิดที่มีแกรนูล) (Boonyaratpalin *et al*., 1998)

2.4.2 เอนไซม์ย่อยโปรตีน

เอนไซม์มีบทบาทและความสำคัญต่อการย่อยอาหารของปลา โดยเอนไซม์กลุ่มที่ย่อยโปรตีน (proteolytic enzyme) ในปลามีการสังเคราะห์มาจากบริเวณผนังกระเพาะอาหาร เช่น เปปซิน (pepsin) และอะมิโนเปปทิเดส (aminopeptidase) สังเคราะห์จากตับอ่อน เช่น ทริปซิน (trypsin) ไคโมทริปซิน (chymotrypsin) อีลาสติน (elastin) คอลลาจีเนส (collagenase) คาร์บอกซีเปปติเดส (carboxypeptidase) และอะมิโนเปปติเดส (aminopeptidase) (ชุติมา, 2549) โดยสามารถแบ่งการทำงานของเอนไซม์ตามการย่อยสลายได้เป็น 2 ประเภทคือ endopeptidase ได้แก่ เอนไซม์เปปซิน ทริปซิน ไคโมทริปซินและอีลาสติน ซึ่งเป็นเอนไซม์ย่อยสลายสายเปปไทด์ที่ตำแหน่งภายในสายเปปไทด์ ส่วนอีกประเภทหนึ่งคือ exopeptidase ได้แก่ เอนไซม์คาร์บอกซีเปปติเดสและอะมิโนเปปติเดส เป็นเอนไซม์ย่อยสลายสายเปปไทด์ที่ตำแหน่งปลายสาย (นัยนา, 2553) ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้จะไปทำหน้าที่ย่อยโปรตีนที่กระเพาะอาหารและลำไส้เล็ก ปลาที่มีกระเพาะอาหารจะเริ่มต้นการย่อยที่กระเพาะอาหารโดยเอนไซม์เปปซิน หลังจากนั้นจะเกิดการย่อยต่อที่ลำไส้เล็ก โดยเอนไซม์ทริปซิน ไคโมทริปซิน อีลาสตินและคอลลาจีเนส (ชุติมา, 2549)

เปปซินจัดเป็นเอนไซม์ย่อยโปรตีนประเภทอะซิดิกโปรติเอส สร้างจากกระเพาะอาหารและทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นกรดสูง ซึ่งกรดนี้เกิดจากปฏิกิริยาของกรดคาร์บอนิคและโซเดียมคลอไรด์ที่ถูกลำเลียงมายังผนังกระเพาะอาหารได้เป็นกรดเกลือและโมโนโซเดียม-

คาร์บอเนต ในขณะที่ปลายังไม่กินอาหารก็จะยังไม่หลั่งกรดเกลือออกมาทำให้กระเพาะอาหารมีสภาพเป็นกลาง เมื่อปลากินอาหารจะมีการหลั่งกรดเกลือออกมา ทำให้กระเพาะอาหารมีสภาพเป็นกรดอย่างรวดเร็วและเมื่อเสร็จสิ้นการย่อยอาหารก็จะมีสภาพเป็นกลางดังเดิม โดยปลากินเนื้อจะมีประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์เปปซินมากกว่าปลากินพืช (วีรพงศ์, 2536) ในปลากะพงขาวพบว่า กิจกรรมของเอนไซม์เปปซินมีการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วหลังจากปลาฟักเป็นตัว 18 วัน (Srichanun *et al*., 2013) ในขณะที่อัลคาไลน์โปรติเอส เช่น ทริปซินและไคโมทริปซินพบว่าสร้างมาจากตับอ่อนซึ่งทำงานในลำไส้เล็กซึ่งมีสภาวะเป็นเบส (การุณ และอุทัยวรรณ, 2555) โดยทริป-ซินเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทหลักในการควบคุมการย่อยโปรตีน ถูกผลิตโดยตับอ่อน ทำหน้าที่กระตุ้นโปรเอนไซม์ (proenzyme) หรือไซโมเจน (zymogen) ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยโปรตีนหลายชนิด ได้แก่ ทริปซิโนเจน (trypsinogen) ไคโมทริปซิโนเจน (chymotrypsinogen) โปรคาร์บอกซีเปปติ-เดส (procarboxypeptidase) และโปรอีลาสเตส (proelastase) ให้อยู่ในรูปที่สามารถทำปฏิกิริยาได้ (active enzyme) ได้แก่ ทริปซิน ไคโมทริปซิน คาร์บอกซีเปปติเดสและอีลาสเตส (elastase) ตามลำดับ (ภาพที่ 10) นอกจากนี้ทริปซินยังมีความสำคัญต่อพัฒนาการของสัตว์น้ำแต่ละช่วงวัย คือ พัฒนาการก่อนระยะฟักตัว หลังระยะฟักตัว (Srichanun *et al*., 2013) และสัตว์น้ำวัยเจริญพันธุ์ ดังนั้นการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินจึงมีบทบาทสำคัญต่อการประเมินประสิทธิภาพการย่อยโปรตีน (การุณ และอุทัยวรรณ, 2555) สำหรับในปลากะพงขาวพบว่า ในช่วงสัปดาห์แรกหลังการฟักเป็นตัวจะพบทริปซินในระดับต่ำ และมีการเพิ่มระดับขึ้นอย่างชัดเจนหลังจากฟักเป็นตัว 3-12 วัน และจะมีระดับคงที่หลังจากฟักเป็นตัว 18 วัน ซึ่งมีลักษณะคล้ายคลึงกับปลาชนิดอื่นๆ เช่น Japanese flounder, winter flounder และ European seabass เป็นต้น (Srichanun *et al*., 2013)



ภาพที่ 10 กระบวนการกระตุ้นเอนไซม์ย่อยโปรตีนและเปปไทด์ในสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง (การุณ และอุทัยวรรณ, 2555)

การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินจะส่งผลต่อประสิทธิภาพการย่อยโปรตีน ปริมาณกรดอะมิโนอิสระในพลาสมาและกล้ามเนื้อ สมดุลของการสร้างและการสลายโปรตีนและอัตราการเจริญเติบโต เนื่องจากอัตราการหลั่งของทริปซินมีความสัมพันธ์กับความอยากอาหาร อัตราการดูดซึม การสังเคราะห์กรดอะมิโนที่จำเป็นสำหรับการสร้างโปรตีนและระดับการหลั่งของพลาสมาอินซูลิน (การุณ และอุทัยวรรณ, 2555)

อะมิโนเปปทิเดส (aminopeptidase) และอัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (alkaline phosphatase) เป็นเอนไซม์ที่พบบริเวณ brush border membrane ของลำไส้ปลา อะมิโนเปปทิเดสมีบทบาทสำคัญในการควบคุมการทำงานของเซลล์ การรักษาสมดุลของเซลล์ การเจริญเติบโตและการพัฒนาของเซลล์ อะมิโนเปปทิเดสมีอยู่ด้วยกันหลายชนิดขึ้นอยู่กับหน้าที่ในการทำงาน สำหรับลิวซีนอะมิโนเปปทิเดส (leucine aminopeptidase) เป็น exopeptidases ที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายลิวซีนที่อยู่บริเวณปลายสายของโปรตีนหรือเปปไทด์ การทำงานของลิวซีนอะมิโนเปปทิเดสจะมีความจำเพาะเจาะจงกับเปปไทด์ที่เป็นกรดอะมิโนชนิดลิวซีน พบบริเวณ epithelial cells ในส่วนของ brush border membrane (Matsui *et al*., 2006; วิชญะ, 2550) ปัจจัยที่เกี่ยวข้องที่สำคัญในการทำงานของลิวซีนอะมิโนเปปทิเดสคือ อุณหภูมิและพีเอช

ส่วนอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสเป็นเอนไซม์ไฮโดรเลสที่ทำหน้าที่ย้ายหมู่ฟอสเฟตจากโมเลกุลหลายชนิด เช่น นิวคลีโอไทด์ โปรตีนและอัลคาลอยด์ (จรัญ, 2554; Kaslow, 2013) อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสทำงานได้ดีในสภาพแวดล้อมที่เป็นเป็นเบส (alkaline) (Puttige and Nooralabettu, 2011) บริเวณลำไส้ของปลากะพงพบว่ามี microvilli เกิดขึ้นที่บริเวณผนังลำไส้จำนวนมากหลังจากฟักเป็นตัวแล้ว 14 วัน และเริ่มมีกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและลิวซีนอะมิโนเปปทิเดสในวันที่ 18 หลังจากฟักเป็นตัว โดยหากพบกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและลิวซีน-อะมิโนเปปทิเดสนี้จะแสดงให้เห็นถึงความสมบูรณ์ของลำไส้ปลา ปลามีความพร้อมและความสามารถในการย่อยโปรตีนสูงสุด (Srichanun *et al*., 2013)

ปัจจัยที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ในสัตว์น้ำมีอยู่หลายปัจจัยด้วยกัน ทั้งปัจจัยภายนอกและภายในได้แก่ พีเอช อุณหภูมิของสภาพแวดล้อมที่อยู่อาศัย ความถี่ในการให้อาหาร แหล่งและคุณภาพของวัตถุดิบโปรตีนในอาหาร พันธุกรรมและความเครียด เป็นต้น (การุณ และอุทัยวรรณ, 2555; Hethey *et al*., 2002) จากรายงานการวิจัยต่างๆ พบว่า เอนไซม์เหล่านี้สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดีในช่วงพีเอช 6-11 และที่อุณหภูมิ 40-70 องศาเซลเซียส (Buarque *et al*., 2009; Buarque *et al*., 2010; Hernandez *et al*., 2004; Oh *et al*., 2000; Omondi, 2005)

การประยุกต์ใช้ความรู้ด้านเอนไซม์ย่อยอาหารและความสามารถในการย่อยโปรตีนของสัตว์น้ำ จึงเป็นสิ่งสำคัญในการคัดเลือกวัตถุดิบที่จะนำมาใช้ในการผลิตอาหารอย่างมีประสิทธิภาพและการพัฒนาอาหารให้เหมาะสมกับความต้องการของสัตว์น้ำ (Buarque *et al*., 2009; Buarque *et al*., 2010; Vega-Villasante *et al*., 1995) เพื่อให้เกิดความคุ้มทุน เพิ่มประสิทธิภาพการย่อยอาหารได้อย่างเต็มที่และช่วยลดปริมาณของเสียที่เกิดขึ้น

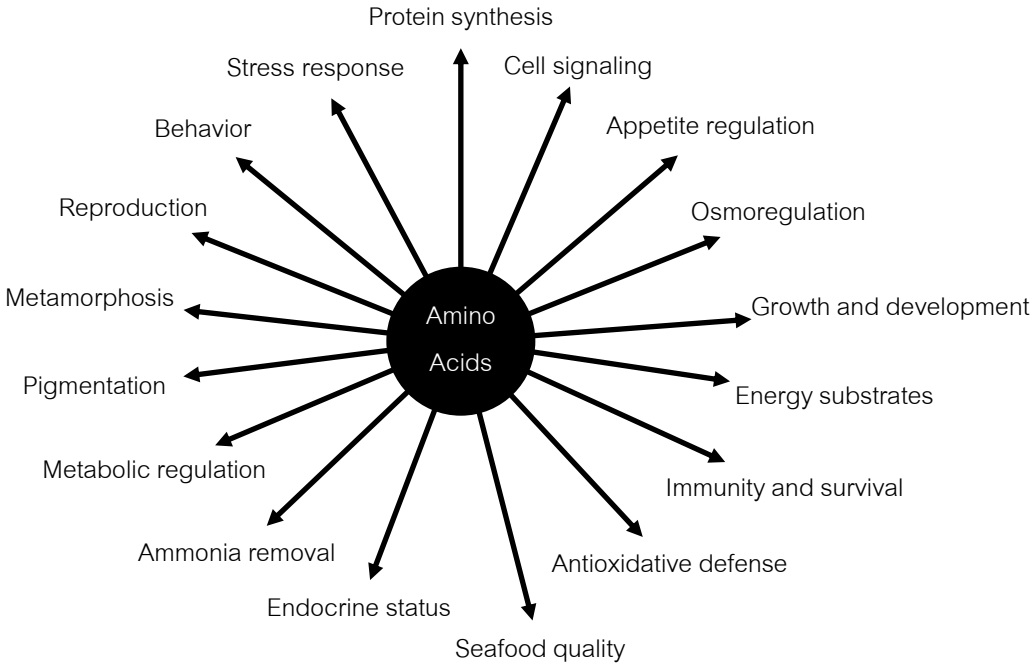
2.5 กรดอะมิโนเมไธโอนีนและความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของปลา

กรดอะมิโนที่อยู่ในร่างกายของสัตว์น้ำส่วนใหญ่เป็นส่วนประกอบของโปรตีน สำหรับกรดอะมิโนอิสระที่ไม่เป็นส่วนประกอบของโปรตีน (body pool) จะมีปริมาณน้อยมากและมาจาก 2 แหล่งคือ อาหารและการสลายโปรตีนในร่างกายสัตว์น้ำ เมื่อปลาได้รับอาหาร กรดอะมิโนในกระแสเลือดจะเพิ่มสูงขึ้น โดยปลาในเขตอบอุ่นจะมีระดับสูงสุดในช่วงเวลา 6 ชั่วโมง ปริมาณกรดอะมิโนที่มีอยู่ในเนื้อเยื่อต่างๆ จะเพิ่มสูงขึ้นเกินความสามารถที่จะนำไปสังเคราะห์โปรตีนได้หมด กรดอะมิโนส่วนเกินจะถูกสลายที่ตับโดยการกำจัดหมู่อะมิโน (amino group) และมีการสร้าง

กรดแอลฟา-คีโต ซึ่งเข้าสู่กระบวนการออกซิเดชันในวัฏจักรเคร็บซ์ (Kreb's cycle หรือ Tricarboxylic acid cycle : TCA cycle) ได้พลังงาน คาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ (ชุติมา, 2549)

ปลามีความต้องการกรดอะมิโนจากอาหาร 10 ชนิดได้แก่ อาร์จินีน (arginine) ฮิสทิดีน (histidine) ไอโซลิวซีน (isoleucine) ลิวซีน (leucine) ไลซีน (lysine) เมไธโอนีน (methionine) ฟีนิลอะลานีน (phenylalanine) ทรีโอนีน (treonine) ทริปโตเฟน (tryptophan) และวาลีน (valine) เนื่องจากกรดอะมิโนเหล่านี้เป็นกรดอะมิโนที่ปลาไม่สามารถสังเคราะห์ในร่างกายได้หรือสังเคราะห์ได้ในปริมาณจำกัด จึงจำเป็นต้องเติมในอาหารให้เพียงพอกับความต้องการ ส่วนกรดอะมิโนชนิดอื่น 10 ชนิดได้แก่ อะลานีน (alanine) กรดแอสปาติก (aspartic acid) แอสปาราจีน (asparagine) กรดกลูตามิก (glutamic acid) กลูตามีน (glutamine) ซีสตีน (cysteine) ไกลซีน (glycine) โปรลีน (proline) เซอรีน (serine) และไทโรซีน (tyrosine) จัดเป็นกรดอะมิโนไม่จำเป็น เนื่องจากปลาสามารถผลิตได้เองในปริมาณที่เพียงพอ

กรดอะมิโนทั้งชนิดที่จำเป็นและไม่จำเป็นนี้ มีบทบาทและความสำคัญในกระบวนการเมแทบอลิซึมของปลา โดยทำหน้าที่เป็นโครงสร้างสำคัญในการสร้างสายโปรตีน ช่วยในการปรับสมดุลของสารต่างๆ และเป็นตัวกลางในกระบวนการเมแทบอลิซึมในร่างกายของปลา ดังภาพที่ 11 เพื่อให้ปลาสามารถทำกิจกรรมต่างๆ ได้อย่างปกติและมีสุขภาพดี นอกจากนี้ยังมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการซ่อมแซมกล้ามเนื้อส่วนต่างๆ ในร่างกายที่เสื่อมสลายไป (Cowey, 1994; Li *et al*., 2008; Murillo-Gurrea *et al*., 2001; Usydus *et al*., 2009)



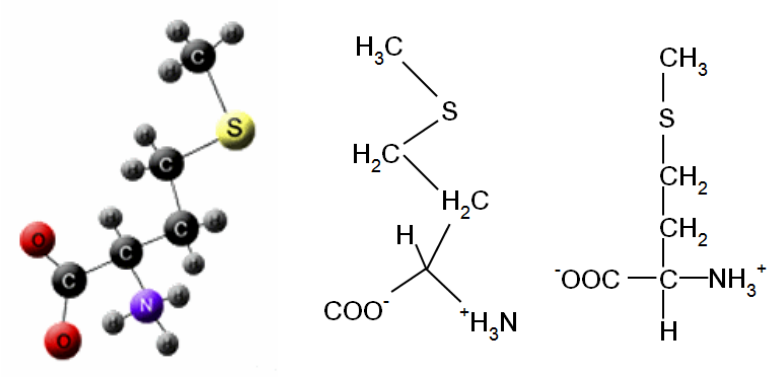
ภาพที่ 11 หน้าที่ของกรดอะมิโนในการเจริญเติบโต พัฒนาการต่างๆ และสุขภาพของปลา (Li *et al*., 2008)

การขาดกรดอะมิโนจำเป็นบางชนิดอาจทำให้เกิดความผิดปกติหรืออาการเฉพาะได้ เช่น ในปลาที่ขาดไลซีนทำให้ครีบและหางกร่อน (fin erosion) ขาดเมไธโอนีนทำให้ตาเป็นต้อหรือตาขุ่นมัว (cataract) และขาดทริปโตเฟนทำให้ตัวคดงอ (scoliosis) เป็นต้น ซึ่งอาการขาดกรดอะมิโนเหล่านี้อาจมีสาเหตุที่สำคัญ 4 ประการ ได้แก่ 1) ใช้วัตถุดิบโปรตีนที่ขาดกรดอะมิโนที่จำเป็นหรือมีสัดส่วนของกรดอะมิโนที่ไม่เหมาะสม 2) ใช้ความร้อนสูงในกระบวนการผลิต 3) ใช้สารเคมีในการผลิตวัตถุดิบโปรตีน และ 4) การละลายของกรดอะมิโนในน้ำ (ชุติมา, 2549)

2.5.1 กรดอะมิโนเมไธโอนีน

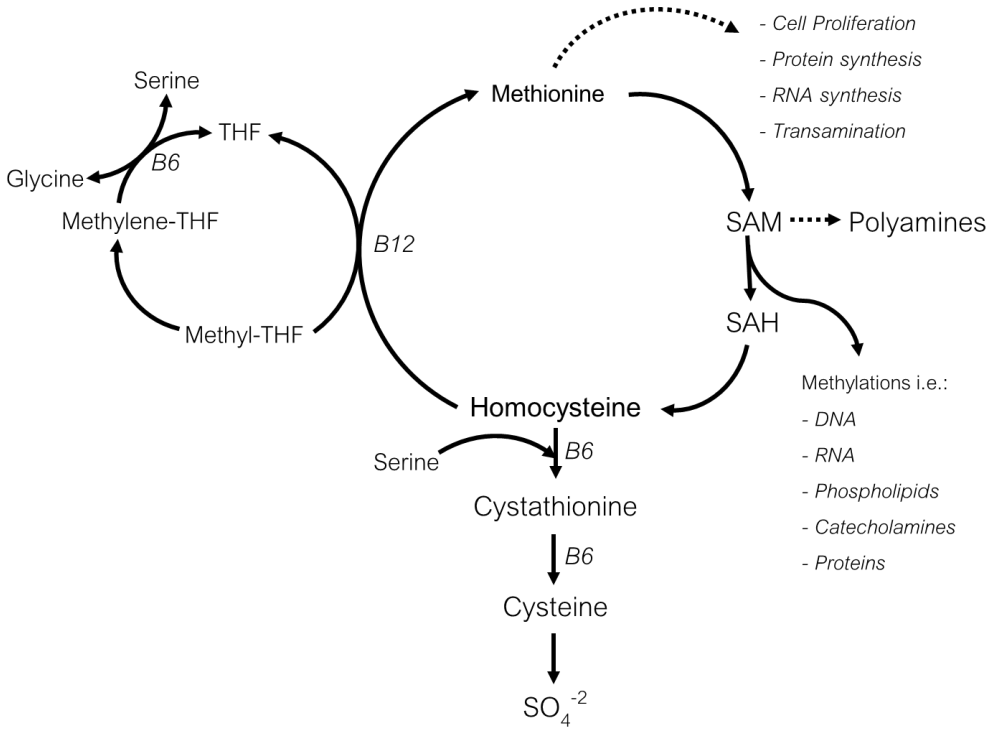
เมไธโอนีน เป็นกรดอะมิโนที่มีอยู่จำกัด (limiting amino acid) ในวัตถุดิบพืชที่นำมาใช้เป็นวัตถุดิบโปรตีนทดแทนปลาป่น (Binder, 2004; Murthy, 2006) จัดเป็นกรดอะมิโนจำเป็น (essential amino acid: EAA) ที่ร่างกายสัตว์สร้างไม่ได้หรือสร้างได้แต่ไม่เพียงพอกับความต้องการ จำเป็นต้องได้รับจากอาหาร เมไธโอนีนจัดอยู่ในกลุ่มกรดอะมิโนที่มีกำมะถันเป็นองค์ประกอบ (sulphur amino acids) ซึ่งมีซีสตีน (cysteine) และซีสไตน์ (cystine) รวมอยู่ด้วยและโครงสร้างประกอบด้วยหมู่คาร์บอกซิล (carboxyl group, -COOH) หมู่อะมิโน

(amino group, -NH_2) อะตอมไฮโดรเจน (hydrogen atom, -H) และหมู่ R (side chain) โดยหมู่อะมิโนเกาะติดกับคาร์บอนที่ตำแหน่งแอลฟ่า เมไธโอนีนจึงถูกจัดเป็น non polar methyl thioester group ดังแสดงในภาพที่ 12



ภาพที่ 12 โครงสร้างของเมไธโอนีน (สมปอง, 2550)

เมไธโอนีนมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโต ระบบภูมิคุ้มกัน ระบบสืบพันธุ์ เป็นกรดอะมิโนตัวแรกที่ใช้ในกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนบนสายอาร์เอ็นเอ (RNA) และทำหน้าที่ให้หมู่เมทิลที่สำคัญที่สุดในร่างกาย โดย transmethylation เป็นกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการใช้พลังงานในการกระตุ้นการเปลี่ยนเมไธโอนีนไปเป็น S-adenosylmethionine (SAM) โดยใช้เอนไซม์ methionine adenosyltransferase (MAT) จากนั้นหมู่เมทิลที่อยู่บน SAM จะถูกขนส่งไปให้ตัวรับตัวอื่นโดยเอนไซม์ methyl transferase ขบวนการ transmethylation จะสิ้นสุดเมื่อ SAM ถูกเปลี่ยนไปเป็น adenosine และ homocysteine ซึ่งหมู่เมทิล (CH_3) ดังกล่าวจะถูกนำไปใช้ในกระบวนการสังเคราะห์ซีสตีนและซีสไตน์ และสังเคราะห์สารประกอบชนิดต่างๆ เช่น พิวรีน (purine) และไพริมิดีน (pyrimidine) หรือสารตัวกลางในกระบวนการเมแทบอลิซึมของไขมัน เช่น ครีเอทีน (creatine) โคลีน (choline) ฟอสฟอลิปิด (phospholipid) เป็นต้น ดังแสดงในภาพที่ 13 ดังนั้นหากเมไธโอนีนในอาหารมีสัดส่วนไม่สมดุลกับความต้องการของร่างกาย ส่งผลให้สมองที่ควบคุมความอยากอาหารทำงานผิดปกติ สัตว์ลดการกินอาหารและส่งผลให้กระบวนการเติบโตลดต่ำลง (John and Margaret, 2006; Murthy, 2006; Shapira, 2014; Suarez and Van der Aa, 2012)



ภาพที่ 13 กระบวนการเมแทบอลิซึมของเมไธโอนีน (ดัดแปลงจาก Shapira, 2014)

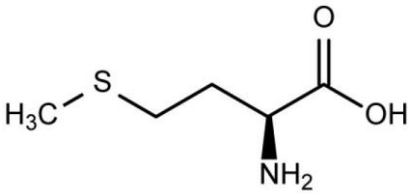
2.5.2 การศึกษารูปแบบและระดับความต้องการกรดอะมิโนเมไธโอนีนในอาหารสัตว์น้ำ

ในปัจจุบัน อุตสาหกรรมการผลิตอาหารสัตว์น้ำได้มีการพัฒนาอย่างรวดเร็ว มีการศึกษาค้นคว้าเพื่อหาแหล่งของวัตถุดิบและสารเติมแต่งเพื่อช่วยให้สัตว์น้ำสามารถนำสารอาหารในอาหารไปใช้ประโยชน์ เพื่อการเจริญเติบโตสูงสุด กรดอะมิโนเมไธโอนีนที่ถูกผลิตออกมาจำหน่ายก็เช่นเดียวกัน มีหลากหลายรูปแบบ เช่น แอล-เมไธโอนีน (*L*-Met), ดี-เมไธโอนีน (*D*-methionine: *D*-Met), ดีแอล-เมไธโอนีน (*DL*-Met) ประกอบด้วยเมไธโอนีนบริสุทธิ์ 99 เปอร์เซ็นต์ และน้ำ 1 เปอร์เซ็นต์, ดีแอล-เมไธโอนีนไฮดรอกซีแอนาลอกฟรีแอซิด (*DL*-methionine hydroxy analog-free acid: MHA-FA) เป็นเมไธโอนีนที่อยู่ในรูปของเหลวประกอบ ด้วยเมไธโอนีนบริสุทธิ์ 88 เปอร์เซ็นต์ (Kalbande, 2009; Kies *et al*., 1975) ส่วนดีแอล-เมไธโอนีนไฮดรอกซีแอนาลอกแคลเซียม (*DL*-methionine hydroxy analog-calcium: MHA-Ca) เป็นเมไธโอนีนที่อยู่ในรูปของเหลวประกอบด้วยเมไธโอนีนบริสุทธิ์ 84 เปอร์เซ็นต์ (Yang *et al*., 2010) แต่อาจจะมีปริมาณที่แตกต่างกันตามแหล่งผลิต เช่น Hu และคณะ (2008) รายงานว่า MHA-Ca บริสุทธิ์ 78 เปอร์-เซ็นต์

1.) การศึกษารูปแบบของกรดอะมิโนเมไธโอนีนในอาหารสัตว์น้ำ

เมไธโอนีนแต่ละรูปแบบจะมีคุณสมบัติแตกต่างกัน ทั้งในส่วนของที่มา โครงสร้างทางเคมี ความสามารถของสัตว์ในการดูดซึมหรือขนส่งเข้าสู่ร่างกาย รวมทั้งบริเวณที่เกิดการดูดซึมและการเปลี่ยนรูปไปเป็นแอล-เมไธโอนีน (Nunes *et al*., 2014) จึงทำให้ปลาแต่ละชนิดมีความสามารถในการนำเมไธโอนีนแต่ละรูปแบบไปใช้ได้แตกต่างกัน โดยรูปแบบของเมไธโอนีนที่มีการนำมาเสริมในอาหาร เช่น

(1) แอล-เมไธโอนีน (*L*-Met)

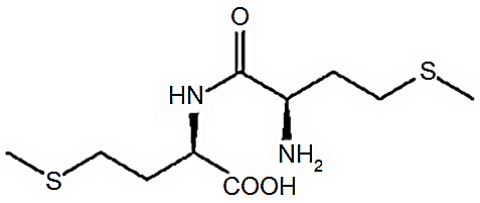


ภาพที่ 14 โครงสร้างทางเคมีของแอล-เมไธโอนีน (Willke, 2014)

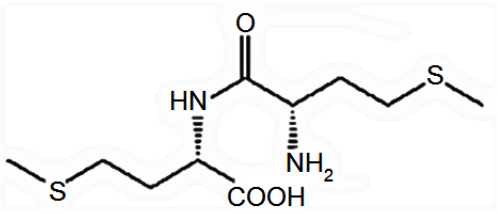
(2) ดี-เมไธโอนีน (*D*-Met)

(3) ดีแอล-เมไธโอนีน (*DL*-Met) ประกอบด้วยเมไธโอนีนที่มีความบริสุทธิ์ 99 เปอร์เซ็นต์ และน้ำ 1 เปอร์เซ็นต์ มีลักษณะเป็นเมไธโอนีนรูปผลึก นิยมนำมาใช้เสริมในอาหารสัตว์

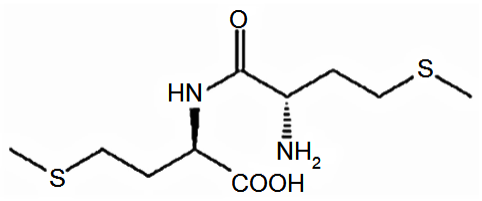
(4) เมไธโอนีนไดเมอร์ (methionine dimer) ได้แก่ แอล-เมไธโอนิล-แอล-เมไธโอนีน ดี-เมไธโอนิล-ดี-เมไธโอนีน ดี-เมไธโอนิล-แอล-เมไธโอนีน แอล-เมไธโอนิล-ดี-เมไธโอนีน ดีแอล-เมไธโอนิล-ดีแอล-เมไธโอนีน



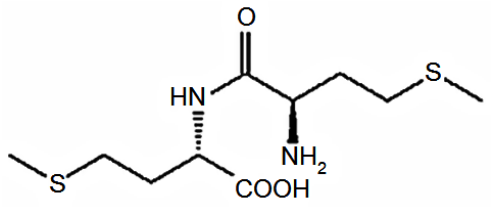
ภาพที่ 15 โครงสร้างทางเคมีของแอล-เมไธโอนิล-แอล-เมไธโอนีน (Kobler *et al*., 2013)



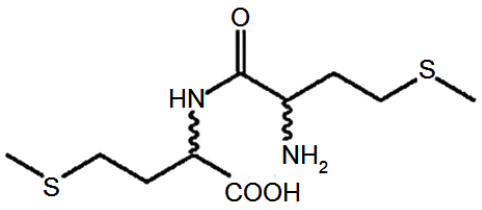
ภาพที่ 16 โครงสร้างทางเคมีของดี-เมไธโอนิล-ดี-เมไธโอนีน (Kobler *et al*., 2013)



ภาพที่ 17 โครงสร้างทางเคมีของดี-เมไธโอนิล-แอล-เมไธโอนีน (Kobler *et al*., 2013)



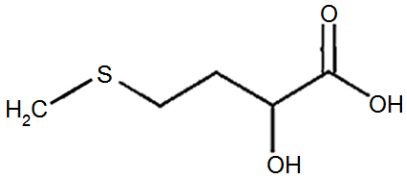
ภาพที่ 18 โครงสร้างทางเคมีของแอล-เมไธโอนิล-ดี-เมไธโอนีน (Kobler *et al*., 2013)



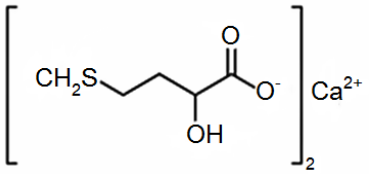
ภาพที่ 19 โครงสร้างทางเคมีของดีแอล-เมไธโอนิล-ดีแอล-เมไธโอนีน (Kobler *et al*., 2013)

นอกจากเมไธโอนีนรูปแบบต่างๆ ในข้างต้นแล้ว บริษัทสารเคมียังได้ผลิตกรดอะมิโนที่มีลักษณะโครงสร้างคล้ายคลึงกับเมไธโอนีน ซึ่งนิยมนำมาใช้ในอาหารสำหรับสัตว์บก

และสัตว์เคี้ยวเอื้อง เช่น ดีแอล-เมไธโอนีนไฮดรอกซีแอนาลอกฟรีแอซิด (MHA-FA) หรือดีแอล-ไดไฮดรอกซีเตตระเมทิลไธโอบิวทาโนอิกแอซิด (*DL*-2-hydroxy-4-methylthio-butanoic acid: HMTBa) (Nunes *et al*., 2014) เป็นเมไธโอนีนที่อยู่ในรูปของเหลวประกอบด้วยเมไธโอนีนบริสุทธิ์ 88 เปอร์เซ็นต์ (Kalbande, 2009; Kies *et al*., 1975) เป็นกรดอินทรีย์ที่มีหมู่ไฮดรอกซิลอยู่ที่คาร์บอนตำแหน่งแอลฟาแทนหมู่อะมิโนในดีแอล-เมไธโอนีน (Ma *et al*., 2013) และดีแอล-เมไธโอนีนไฮดรอกซีแอนาลอกแคลเซียม (MHA-Ca) เป็นเมไธโอนีนที่อยู่ในรูปของเหลวประกอบด้วยเมไธโอนีนบริสุทธิ์ 84 เปอร์เซ็นต์ (Yang *et al*., 2010) หรือ 78 เปอร์เซ็นต์ (Hu *et al*., 2008) ขึ้นอยู่กับการผลิตของแต่ละบริษัท



ภาพที่ 20 โครงสร้างทางเคมีของดีแอล-เมไธโอนีนไฮดรอกซีแอนาลอกฟรีแอซิดหรือดีแอล-ไดไฮดรอกซีเตตระเมทิลไธโอบิวทาโนอิกแอซิด (ChemNet, 2015)



ภาพที่ 21 โครงสร้างทางเคมีของดีแอล-เมไธโอนีนไฮดรอกซีแอนาลอกแคลเซียม (Sigma-Aldrich, 2015)

รูปแบบของเมไธโอนีนที่พบโดยทั่วไปในเนื้อเยื่อสิ่งมีชีวิตคือ *L*-met ทำให้สิ่งมีชีวิต เช่น ไก่เนื้อ สามารถนำเมไธโอนีนแบบ *L*-met ไปใช้ประโยชน์ในกระบวนการเมแทบอลิซึมต่างๆ ได้ดีเมื่อเทียบกับ *D*-met ที่อยู่ในรูป inactive เหมือนในมนุษย์ที่พบว่า สามารถนำเมไธโอนีนรูปแบบ *L*-met และ *DL*-met ไปใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึมต่างๆ ได้ดีกว่าเมไธโอนีนแบบ *D*-met (Kies *et al*., 1975) อย่างไรก็ตาม ยังมีสัตว์จำพวกนกที่สามารถนำเมไธโอนีนทั้ง 2 รูปแบบไปใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึมต่างๆ ได้ (Kalbande, 2009) ส่วนในปลาพบว่า สามารถใช้เมไธโอนีนได้ทั้งแบบ *L*-met และ *DL*-met โดยปลาจะเปลี่ยนรูปของเมไธโอนีนแบบ *DL*-met โดยกระบวนการออกซิเดชันเป็น keto analogue แล้วผ่านกระบวนการ transamination ได้เป็น *L*-met

และจะถูกดูดซึมไปใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึมต่างๆ สำหรับเมไธโอนีนแบบ MHA พบว่า ปลา hybrid striped bass และปลา red drum (*Sciaenops ocellatus*) มีประสิทธิภาพในการนำ MHA ไปใช้ในการเจริญเติบโตได้ถึง 75-100 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ปลาดุก (channel catfish) สามารถนำ MHA ไปใช้ได้เพียง 26 เปอร์เซ็นต์ (Murthy, 2006) แสดงให้เห็นว่าปลาแต่ละชนิดมีความสามารถในการนำเมไธโอนีนไปใช้ได้ต่างกัน ดังนั้นการศึกษารูปแบบของเมไธโอนีนจึงมีความจำเป็นสำหรับปลาแต่ละชนิด การศึกษาผลของรูปแบบเมไธโอนีนในอาหารสัตว์น้ำ เช่น Gu และคณะ (2013) ศึกษาการนำเมไธโอนีน 2 รูปแบบคือ crystalline methionine (Cmet: *L*-methionine) และ oligo-methionine (Omet: dipeptide to octapeptide) มาใช้ในอาหารกุ้งขาวแวนนาไมที่มีการใช้โปรตีนถั่วเหลืองเข้มข้นทดแทนปลาป่นในอาหารพบว่า กุ้งที่ได้รับอาหารที่มีเมไธโอนีนแบบ Omet มีประสิทธิภาพการใช้อาหารที่สูงกว่ากุ้งที่ได้รับอาหารที่มีเมไธโอนีนแบบ Cmet จึงทำให้กุ้งที่ได้รับเมไธโอนีนแบบ Omet มีการเจริญเติบโตที่ดีกว่า

ในปลานิล Mohamed และ Liebert (2014) ศึกษาผลของเมไธโอนีนรูปแบบต่างๆ ในอาหารต่อการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้โปรตีน โดยผลิตอาหารที่มีโปรตีน 28 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 7 สูตร มีรูปแบบของเมไธโอนีนที่แตกต่างกัน 3 รูปแบบคือ *DL*-met, methionine dimer, *DL*-*LD*-met แต่ละรูปแบบมี 2 ระดับคือ 0.15 และ 0.30 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร โดยมีซิสตีนเป็นองค์ประกอบในอาหาร 0.39 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร นำมาเลี้ยงปลานิลน้ำหนัก 13 กรัม/ตัว เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า ปลาที่ได้รับอาหารที่มีเมไธโอนีนในอาหารที่ระดับ 0.30 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร มีการเจริญเติบโตที่สูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารที่มีเมไธโอนีนในอาหารที่ระดับ 0.15 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร โดยรูปแบบที่ให้ผลการเจริญเติบโตสูงที่สุดคือ methionine dimer

2.) การศึกษาระดับความต้องการกรดอะมิโนเมไธโอนีนในอาหารสัตว์น้ำ

การศึกษาความต้องการเมไธโอนีนของสัตว์น้ำ ทำได้โดยการให้อาหารที่มีระดับของเมไธโอนีนที่ต้องการศึกษาตั้งแต่ระดับต่ำและค่อยๆ เพิ่มปริมาณมากขึ้น จากนั้นจึงนำไปเลี้ยงสัตว์น้ำแล้วบันทึกการเจริญเติบโต นำผลที่ได้มาสร้างกราฟ เรียกว่า dose response curve วิเคราะห์ด้วยสมการถดถอยแบบไม่เป็นเส้นตรง (non-linear regression analysis) เพื่อกำหนดระดับความต้องการเมไธโอนีนที่เหมาะสม (ชุติมา, 2549) เพื่อให้การสร้างสูตรอาหารมีประสิทธิภาพสูงสุด ส่งผลให้สัตว์น้ำเกิดการเจริญเติบโตและมีสุขภาพที่ดี โดยรูปแบบและระดับของเมไธโอนีนที่เหมาะสมจะช่วยให้สัตว์สามารถเจริญเติบโตได้อย่างเต็มที่ มีประสิทธิภาพในการ

นำสารอาหารไปใช้ประโยชน์และมีอัตราการรอดตายที่ดี โดยระดับความต้องการของเมไธโอนีนในปลาชนิดต่างๆ แสดงดังตารางที่ 4

ส่วนประกอบของอาหารทดลองส่วนใหญ่ใช้ส่วนผสมของอาหารที่มีความบริสุทธิ์ เช่น ใช้เคซีน (casein) เจลาติน (gelatin) และโปรตีนสกัดจากปลา (isolate fish protein) เป็นแหล่งโปรตีน ใช้กลูโคส (glucose) ซูโครส (sucrose) เด็กซ์ตริน (dextrin) และแป้งสุก (starch) เป็นแหล่งของคาร์โบไฮเดรต ใช้น้ำมันปลา (fish oil) เป็นแหล่งของน้ำมัน และใช้กรดอะมิโนสังเคราะห์เป็นแหล่งของกรดอะมิโน (ชุติมา, 2549) เช่น Murthy และคณะ (1998) ศึกษาความต้องการกรดอะมิโนกลุ่มที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบ (sulphur amino acid) คือเมไธโอนีนและซีสตีนในปลาคาร์ฟอินเดีย (Indian major carp) โดยใช้เคซีน เจลาติน น้ำมันปลา น้ำมันดอกทานตะวัน (sunflower) วิตามินรวม แร่ธาตุรวมและกรดอะมิโนสังเคราะห์เป็นส่วนประกอบของอาหาร อย่างไรก็ตามอาหารที่มีความบริสุทธิ์สูงมักจะไม่มีความน่ากิน จึงมีการปรับส่วนประกอบของอาหารให้เป็นแบบกึ่งบริสุทธิ์โดยใช้วัตถุดิบธรรมชาติ เช่น Murillo-Gurrea และคณะ (2001) ศึกษาความต้องการกรดอะมิโนไลซีนและอาร์จินีน (arginine) ในปลากะพงขาวระยะวัยรุ่นโดยใช้ปลาป่นและหมึกป่นเป็นวัตถุดิบโปรตีนและเสริมกรดอะมิโนสังเคราะห์

ตารางที่ 4 ระดับความต้องการเมไธโอนีนในอาหารของปลาชนิดต่างๆ

ชนิด		ระดับความต้องการเมไธโอนีน[1]	อ้างอิง
ปลา gilthead sea bream	(*Sparatus aurotus*)	1.4 (4.0)	Luquet และ Sabaut (1974)
ปลา milkfish	(*Chanos chanos*)	1.0 (2.5)	Borlogan และ Coloso (1993)
ปลา yellow tail	(*Seriola quinqueradiata*)	1.1 (2.6)	Ruchimat และคณะ (1977)
ปลา channel catfish	(*Ictalarus punctatus*)	0.6 (2.3)	Harding และคณะ (1977)
		0.9 (3.4)	Cai และ Burtle (1996)
ปลาไน	(*C. carpio*)	1.2 (3.1)	Nose (1979)
ปลา Japanese eel	(*Anguilla japonica*)	1.2 (3.2)	Nose (1979)
ปลานิล	(*T. mossambica*)	1.3 (3.2)	Jackson และ Capper (1982)
	(*T. nilotica*)	0.8 (2.7)	Santiago และ Lovell (1988)
		0.5 (1.8)	Nguyen และ Davis (2009)
ปลา rainbow trout	(*O. mykiss*)	0.7 (1.8)	Ogino (1980)
		1.0 (2.2)	Walton และคณะ (1982)
		1.1 (3.0)	Rumsey และคณะ (1983)
		1.0 (2.9)	Kim และคณะ (1984)
		0.6 (1.5)	Cowey และคณะ (1983)
		0.5 (1.4)	Kim และคณะ (1992)
ปลา Chinook salmon	(*O. tshawytscha*)	1.6 (4.0)	Halver และคณะ (1959)
ปลา Atlantic salmon	(*Salmo salar*)	1.1 (2.4)	Rollin และคณะ (1994)
		1.1 (2.8)	Scott (1998)
ปลากะพงยุโรป	(*Dicentrarchus labrax*)	- (2.9)	Tibaldi และ Kaushik (2005)
ปลากะพงขาว	(*L. calcarifer*)	- (2.2)	Millamena (1996)

[1] เปอร์เซ็นต์ของอาหาร (เปอร์เซ็นต์ของโปรตีน)

ที่มา: ดัดแปลงจาก Scott (1998)

สำหรับตัวอย่างงานวิจัยที่ทำการศึกษาความต้องการเมไธโอนีนในอาหารสัตว์น้ำ เช่น Scott (1998) ศึกษาระดับความต้องการเมไธโอนีนในอาหารปลา Atlantic salmon (*S. salar*) ที่มีน้ำหนัก 65.7 กรัม/ตัว โดยมีระดับของเมไธโอนีนในอาหาร 0.4-1.4 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร มีซีสตีนเป็นองค์ประกอบ 0.5 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร เมื่อสิ้นสุดการทดลองนำผลการเจริญเติบโตไปวิเคราะห์เพื่อหาระดับความต้องการเมไธโอนีนในอาหาร โดยใช้ broken-line regression พบว่า ปลา Atlantic salmon มีความต้องการเมไธโอนีนในอาหารเท่ากับ 1.14 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร (2.85 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนในอาหาร)

Luo และคณะ (2005) ศึกษาระดับความต้องการเมไธโอนีนในอาหารปลากะรังดอกแดงขนาด 13 กรัม/ตัว โดยผลิตอาหารที่มีโปรตีน 48 เปอร์เซ็นต์ มีระดับของเมไธโอนีนในอาหาร 0.55-1.81 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร นำมาเลี้ยงปลาเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ เมื่อสิ้นสุดการทดลองชั่งน้ำหนักปลาแล้วนำข้อมูลไปวิเคราะห์ความต้องการเมไธโอนีนในอาหารปลาโดยการใช้ broken-line regression พบว่า ปลากะรังดอกแดงมีความต้องการเมไธโอนีนในอาหารเท่ากับ 1.31 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร (2.73 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีน)

Nguyen และ Davis (2009) ศึกษาความต้องการระดับของเมไธโอนีนในปลานิลที่มีโปรตีนในอาหาร 28 เปอร์เซ็นต์ มีระดับของเมไธโอนีนในอาหาร 0.33-0.57 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร นำอาหารทดลองมาเลี้ยงปลานิลระยะวัยรุ่นที่มีน้ำหนัก 5.6 กรัม เป็นเวลา 8 สัปดาห์ เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ชั่งน้ำหนักปลาแล้วนำข้อมูลไปวิเคราะห์ความต้องการเมไธโอนีนในอาหารปลาโดยการใช้ broken-line regression ซึ่งจากการทดลองและวิเคราะห์ผลพบว่า ปลานิลมีความต้องการเมไธโอนีนในอาหารเท่ากับ 0.49 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร (1.75 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีน, มีซิสตีนในอาหาร 0.45 เปอร์เซ็นต์) เป็นต้น

2.6 วัตถุประสงค์ของการทดลอง

2.6.1 เพื่อศึกษารูปแบบและระดับของเมไธโอนีนในอาหารที่มีแหล่งโปรตีนทดแทนปลาป่นที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของปลากะพงขาว

2.6.2 เพื่อศึกษาผลของเมไธโอนีนในอาหารที่มีแหล่งโปรตีนทดแทนปลาป่นต่อการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหารและกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหารที่สำคัญของปลากะพงขาว

2.6.3 เพื่อศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของลำไส้และไส้ติ่งของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่เสริมด้วยเมไธโอนีน 2 รูปแบบที่ระดับต่างๆ กัน

บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design : CRD) มี 12 ชุดการทดลอง แต่ละชุดการทดลองมี 3 ซ้ำ ประกอบด้วย

ชุดการทดลองที่ 1 อาหารสูตรอ้างอิง มีปลาป่นเป็นวัตถุดิบโปรตีนหลัก

ชุดการทดลองที่ 2 อาหารสูตรควบคุมที่ไม่มีการเสริมเมไธโอนีนในอาหาร

ชุดการทดลองที่ 3 อาหารสูตรพื้นฐานที่มีการเสริมเมไธโอนีนในรูปแบบ *DL*-methionine (*DL*-met) ที่ระดับ 0.09 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร

ชุดการทดลองที่ 4 อาหารสูตรพื้นฐานที่มีการเสริมเมไธโอนีนในรูปแบบ *DL*-methionine (*DL*-met) ที่ระดับ 0.18 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร

ชุดการทดลองที่ 5 อาหารสูตรพื้นฐานที่มีการเสริมเมไธโอนีนในรูปแบบ *DL*-methionine (*DL*-met) ที่ระดับ 0.36 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร

ชุดการทดลองที่ 6 อาหารสูตรพื้นฐานที่มีการเสริมเมไธโอนีนในรูปแบบ *DL*-methionine (*DL*-met) ที่ระดับ 0.54 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร

ชุดการทดลองที่ 7 อาหารสูตรพื้นฐานที่มีการเสริมเมไธโอนีนในรูปแบบ *DL*-methionine (*DL*-met) ที่ระดับ 0.72 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร

ชุดการทดลองที่ 8 อาหารสูตรพื้นฐานที่มีการเสริมเมไธโอนีนในรูปแบบ *DL*-methionine dimer (MetMet) ที่ระดับ 0.09 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร

ชุดการทดลองที่ 9 อาหารสูตรพื้นฐานที่มีการเสริมเมไธโอนีนในรูปแบบ *DL*-methionine dimer (MetMet) ที่ระดับ 0.18 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร

ชุดการทดลองที่ 10 อาหารสูตรพื้นฐานที่มีการเสริมเมไธโอนีนในรูปแบบ *DL*-methionine dimer (MetMet) ที่ระดับ 0.36 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร

ชุดการทดลองที่ 11 อาหารสูตรพื้นฐานที่มีการเสริมเมไธโอนีนในรูปแบบ *DL*-methionine dimer (MetMet) ที่ระดับ 0.54 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร

ชุดการทดลองที่ 12 อาหารสูตรพื้นฐานที่มีการเสริมเมไธโอนีนในรูปแบบ *DL*-methionine dimer (MetMet) ที่ระดับ 0.72 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร

3.2 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการทดลอง

3.2.1 ลูกพันธุ์ปลากะพงขาว

นำปลากะพงขาวขนาด 0.2 กรัม จำนวน 1,500 ตัว มาเลี้ยงในถังไฟเบอร์ขนาด 1,000 ลิตร จำนวน 3 ถัง ความหนาแน่น 1.20 ตัว/ลิตร ใช้อาหารอนุบาลที่มีโปรตีนเท่ากับ 45 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ปลาป่นเป็นแหล่งโปรตีนหลัก อนุบาลปลาจนมีขนาดน้ำหนักตัวประมาณ 7 กรัม

3.2.2 การเตรียมอาหารทดลอง

อาหารที่ใช้ในการทดลองเป็นอาหารเม็ดแห้ง จำนวน 12 สูตร ดังตารางที่ 5 ประกอบด้วยอาหารสูตรอ้างอิง (สูตรที่ 1) ซึ่งมีปลาป่นเป็นวัตถุดิบโปรตีนหลัก อาหารสูตรควบคุม (สูตรที่ 2) ที่ไม่มีการเสริมเมไธโอนีนในอาหารและอาหารทดลอง 10 สูตร (สูตรที่ 3-12) มีกากถั่วเหลืองสกัดน้ำมันป่นและเนื้อป่นเป็นวัตถุดิบโปรตีนหลักและมีการเสริมโปรตีนไฮโดรไลเสตจากเครื่องในปลาทูน่าที่ระดับ 5 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร เพื่อเพิ่มความน่ากินให้กับอาหารทดลอง (Chotikachinda *et al*., 2013) อาหารสูตรที่ 3-7 เป็นอาหารสูตรทดลองที่มีการเสริมด้วยเมไธโอนีนแบบ *DL*-Met (ประกอบด้วยเมไธโอนีนบริสุทธิ์ 99 เปอร์เซ็นต์) ที่ระดับ 0.09, 0.18, 0.36, 0.54 และ 0.72 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร (0.2, 0.4, 0.8, 1.2 และ 1.6 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนในอาหาร) ตามลำดับ อาหารสูตรที่ 8-12 เป็นอาหารสูตรทดลองที่มีการเสริมด้วยเมไธโอนีนแบบ MetMet (ประกอบด้วยเมไธโอนีนบริสุทธิ์ 96 เปอร์เซ็นต์) ที่ระดับ 0.09, 0.18, 0.36, 0.54 และ 0.72 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร (0.2, 0.4, 0.8, 1.2 และ 1.6 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนในอาหาร) ตามลำดับ

ชั่งส่วนประกอบของอาหารแต่ละชนิดในแต่ละสูตรอาหาร ผสมส่วนประกอบต่างๆ ของอาหารให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมอาหาร (Hobart, Legacy HL200, USA)

เป็นระยะเวลา 30 นาที จากนั้นเติมน้ำปริมาณ 35 เปอร์เซ็นต์ แล้วผสมต่อเป็นระยะเวลา 10 นาที นำเข้าเครื่องอัดเม็ดอาหาร ผ่านหน้าแว่นขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 3 มิลลิเมตร นำอาหารที่อัดเม็ดแล้วอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แล้วนำไปบรรจุใส่ในถุงโพลีเอทิลีนและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการใช้งาน

เก็บตัวอย่างอาหารที่ผลิตแล้วทุกสูตร เพื่อทำการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ โปรตีน ไขมัน เถ้าและความชื้น ตามวิธีการของ AOAC (1995) และวิเคราะห์กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบ โดยได้รับการอนุเคราะห์จากบริษัท EVONIK ประเทศสิงคโปร์

3.2.3 ระบบการเลี้ยงและการให้อาหาร

ใช้ตู้ทดลองจำนวน 36 ตู้ ขนาด 120 ลิตร (40 x 50 x 60 เซนติเมตร) คัดปลากะพงขาวที่มีขนาดใกล้เคียงกัน (น้ำหนักประมาณ 7 กรัม) จำนวน 12 ตัว/ตู้ เลี้ยงในตู้ทดลองก่อนเริ่มการทดลองเป็นเวลา 1 สัปดาห์ เพื่อปรับสภาพปลากับสภาพแวดล้อมของการทดลอง เมื่อครบกำหนด 1 สัปดาห์ คัดขนาดปลาในแต่ละตู้ให้มีน้ำหนักใกล้เคียงกันจำนวน 10 ตัว/ตู้ และเริ่มปรับเป็นอาหารทดลองเป็นเวลา 3 วัน ให้อาหารแบบปลากินจนอิ่มวันละ 2 มื้อ เวลา 9.00 น. และ 16.00 น. เป็นเวลา 6 สัปดาห์ จดบันทึกน้ำหนักอาหารที่ปลากินในแต่ละวัน ในระหว่างการทดลองมีการดูดตะกอน เปลี่ยนถ่ายน้ำและทำความสะอาดตู้ทดลองทุกวัน โดยเปลี่ยนถ่ายน้ำครั้งละ 80 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรน้ำทั้งหมด วัดอุณหภูมิโดยใช้เทอร์โมมิเตอร์ วัดปริมาณออกซิเจนในน้ำโดยใช้เครื่องมือวัดออกซิเจน Hanna oxy-check วัดปริมาณไนไตรท์และแอมโมเนียในน้ำโดยใช้ชุดทดลอง test kits (Vunique, Better Syndicate Co., Ltd) เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์/ครั้ง เพื่อควบคุมคุณภาพน้ำให้เหมาะสมตลอดการทดลอง

3.2.4 การตรวจสอบการเจริญเติบโตและการเก็บตัวอย่าง

ในระหว่างการทดลอง สังเกตพฤติกรรมการกินอาหารของปลาและลักษณะภายนอกทั่วไป ได้แก่ สีของลำตัว การว่ายน้ำ การตกเลือดและการเกิดบาดแผล รวมทั้งพฤติกรรมที่ผิดปกติและใช้ยาหรือสารเคมีเพื่อป้องกันโรคตามสภาพของปลา

ระหว่างการเลี้ยงในสัปดาห์ที่ 3 ชั่งน้ำหนักปลาทดลองเพื่อวัดการเจริญเติบโตด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง โดยไม่มีการให้อาหารก่อนการชั่งน้ำหนัก 24 ชั่วโมง สลบปลาก่อนชั่งโดยใช้น้ำมันกานพลูที่มีความเข้มข้น 500 ไมโครลิตร/น้ำ 1 ลิตร บันทึกปริมาณ

อาหารที่ปลากินเป็นประจำทุกวันเพื่อให้ทราบปริมาณอาหารที่ปลากินในแต่ละวัน บันทึกอัตรารอดตายโดยนับจำนวนปลากะพงขาวเป็นประจำทุกวัน

เมื่อสิ้นสุดการทดลองในสัปดาห์ที่ 6 ชั่งน้ำหนักปลาทุกตัวในแต่ละซ้ำของแต่ละชุดการทดลอง นับจำนวนปลาที่เหลือ นำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณเพื่อวิเคราะห์ผลการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหารของปลากะพงขาว และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโตและระดับของเมไธโอนีน ด้วยการวิเคราะห์แบบ Nonlinear regression เพื่อหาระดับเมไธโอนีนต่ำสุดที่ทำให้ปลามีการเจริญเติบโตดีที่สุด ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ตามวิธีการของ Littell และคณะ (1997) นอกจากนี้เก็บตัวอย่างปลาจำนวน 3 ตัว/ตู้ เพื่อนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ โปรตีน ไขมัน เถ้าและความชื้น ตามวิธีการของ AOAC (1995) และเก็บตัวอย่างทางเดินอาหารของปลา โดยเก็บตัวอย่างไส้ติ่งและลำไส้ปลาจำนวน 1 ตัว/ตู้ ใส่ในหลอดพลาสติกฝาเกลียวและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหารและเก็บตัวอย่างไส้ติ่งและลำไส้ปลาเพื่อศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์

ตารางที่ 5 องค์ประกอบของอาหารทดลองที่มีการเสริมเมไธโอนีน 2 รูปแบบที่ 5 ระดับ (กรัม/กิโลกรัม, บนฐานน้ำหนักสด)

วัตถุดิบ	1 สูตรอ้างอิง	2 สูตรควบคุม	3 *DL*-met 0.09%	4 *DL*-met 0.18%	5 *DL*-met 0.36%	6 *DL*-met 0.54%	7 *DL*-met 0.72%	8 MetMet 0.09%	9 MetMet 0.18%	10 MetMet 0.36%	11 MetMet 0.54%	12 MetMet 0.72%
ปลาป่น	582.00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
เนื้อป่น	-	360.00	360.00	360.00	360.00	360.00	360.00	360.00	360.00	360.00	360.00	360.00
กากถั่วเหลืองสกัดน้ำมันป่น	180.00	410.00	410.00	410.00	410.00	410.00	410.00	410.00	410.00	410.00	410.00	410.00
เครื่องในปลาทูน่าไฮโดรไลเสต	-	25.00	25.00	25.00	25.00	25.00	25.00	25.00	25.00	25.00	25.00	25.00
น้ำมันปลา	15.00	27.00	27.00	27.00	27.00	27.00	27.00	27.00	27.00	27.00	27.00	27.00
น้ำมันพืช	15.00	27.00	27.00	27.00	27.00	27.00	27.00	27.00	27.00	27.00	27.00	27.00
วิตามินรวม[1]	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00
แร่ธาตุรวม[2]	40.00	40.00	40.00	40.00	40.00	40.00	40.00	40.00	40.00	40.00	40.00	40.00
แป้งสาลี	75.50	75.50	75.30	75.30	75.30	75.30	75.30	75.30	75.30	75.30	75.30	75.30
Carboxymethyl cellulose	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00
DL-met (99% Met)[3]	-	-	0.91	1.82	3.64	5.45	7.27	-	-	-	-	-
MetMet (96% Met)[4]	-	-	-	-	-	-	-	0.94	1.88	3.75	5.63	7.50
NaCl	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
BHT	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
แกลบบด	64.30	7.30	6.59	5.68	3.86	2.05	0.23	6.56	5.62	3.75	1.87	0.00
องค์ประกอบทางเคมี (เปอร์เซ็นต์, as fed basis)												
โปรตีน	48.66	45.91	45.50	45.81	46.20	46.35	46.29	45.87	46.05	46.15	46.36	45.95
ไขมัน	11.21	11.11	11.47	11.87	11.63	11.50	10.89	10.67	10.57	12.14	11.96	12.28
เถ้า	17.47	14.95	14.72	14.14	14.61	14.67	14.57	14.77	14.90	14.38	14.61	14.38
พลังงานรวม (กิโลแคลอรี/ 100 กรัม)	453.15	454.68	459.58	453.44	458.58	457.14	449.49	443.71	451.72	435.41	442.14	450.56

[1]วิตามินรวม: ได้รับการอนุเคราะห์จากบริษัทไทยยูเนี่ยนฟีดมิลล์ จำกัด

[2] แร่ธาตุรวม (กรัม/ 1 กิโลกรัมของอาหาร): $NaH_2PO_2.2H_2O$ 15; $CaHPO_4$ 8; KCl 5; KH_2PO_4 10 แป้งข้าวเจ้า 2

[3,4]*DL*-met และ MetMet ได้รับการอนุเคราะห์จากบริษัท EVONIK ประเทศเยอรมนี

อาหารสูตรที่ 3-7 มีการเสริมด้วยเมไธโอนีนแบบ *DL*-met ที่ระดับ 0.09, 0.18, 0.36, 0.54 และ 0.72 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร

อาหารสูตรที่ 8-12 มีการเสริมด้วยเมไธโอนีนแบบ MetMet ที่ระดับ 0.09, 0.18, 0.36, 0.54 และ 0.72 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร

1.) **พารามิเตอร์การเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหาร**

พารามิเตอร์ในการวิเคราะห์ผลการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหารของปลากะพงขาว ได้แก่ อัตรารอดตาย น้ำหนักปลาที่เพิ่ม อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ ประสิทธิภาพการใช้โปรตีนและโปรตีนที่นำไปใช้ประโยชน์ คำนวณด้วยสมการดังต่อไปนี้

(1) อัตรารอดตาย (เปอร์เซ็นต์)

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

(2) น้ำหนักปลาที่เพิ่ม (กรัม/ตัว)

= น้ำหนักปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (กรัม) - น้ำหนักปลาเมื่อเริ่มต้นการทดลอง (กรัม)

(3) อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (เปอร์เซ็นต์/วัน)

$$= \frac{(\ln \text{น้ำหนักปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง} - \ln \text{น้ำหนักปลาเมื่อเริ่มต้นการทดลอง})}{\text{จำนวนวันที่ทำการทดลอง (วัน)}} \times 100$$

(4) อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ

$$= \frac{\text{น้ำหนักอาหารที่ปลากินทั้งหมด (กรัม)}}{\text{น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น (กรัม)}}$$

(5) ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน

$$= \frac{\text{น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น (กรัม)}}{\text{น้ำหนักโปรตีนที่ปลากิน (กรัม)}}$$

(6) โปรตีนที่นำไปใช้ประโยชน์ (เปอร์เซ็นต์)

$$= \frac{\text{โปรตีนที่เพิ่มขึ้นในตัวปลา (กรัม)}}{\text{น้ำหนักโปรตีนที่ปลากิน (กรัม)}} \times 100$$

2.) การสกัดเอนไซม์จากบรัชบอร์เดอร์เมมเบรน

อดอาหารปลาทดลองเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้ทางเดินอาหารปราศจากอาหาร สลบปลาด้วยน้ำมันกานพลู ผ่าตัดและเก็บตัวอย่างลำไส้และไส้ติ่งในหลอดพลาสติกฝาเกลียว แล้วเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวทันที เพื่อรอสกัดบรัชบอร์เดอร์เอนไซม์ โดยใช้วิธีการสกัดที่ดัดแปลงจาก Kvåle และคณะ (2007) โดยใช้ Tris (2 มิลลิโมลาร์)-mannitol (50 มิลลิโมลาร์) พีเอช 7.0 ในสัดส่วน 30 เท่าของปริมาตรต่อน้ำหนัก แล้วบดตัวอย่างให้ละเอียด หลังจากนั้นเติม $CaCl_2$ (100 มิลลิโมลาร์) นำไปปั่นแยกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,000x*g* เป็นเวลา 10 นาที เก็บสารละลายส่วนใสและนำไปปั่นแยกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 34,000x*g* เป็นเวลา 20 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้ง และละลายตะกอนขาวขุ่นที่ได้ด้วย Tris (5 มิลลิโมลาร์)-HEPES (5 มิลลิโมลาร์)-KCl (10 มิลลิโมลาร์)-DTT (1 มิลลิโมลาร์) พีเอช 7.5 เก็บตัวอย่างบรัชบอร์เดอร์เอนไซม์ที่ได้ในตู้แช่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อรอวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของ crude enzyme และวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ลิวซีนอะมิโนเปปทิเดสและอัล-คาไลน์ฟอสฟาเตส

3.) การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของ crude enzyme ด้วยวิธี Lowry

ปิเปตน้ำกลั่น (distilled water, DDW) 48 ไมโครลิตร ผสมกับตัวอย่างเอนไซม์ 2 ไมโครลิตร ลงใน microplate (ขนาด 300 ไมโครลิตร) แล้วผสมให้เข้ากัน เติม alkaline copper solution 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันดี รอทำปฏิกิริยา 10 นาที หลังจากนั้นเติม Follin phenol reagent 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันดีและรอทำปฏิกิริยา 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณปริมาณโปรตีนในตัวอย่างเอนไซม์เทียบกับกราฟมาตรฐาน Bovine Serum Albumin (BSA)

4.) การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ลิวซีนอะมิโนเปปทิเดส

วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ลิวซีนอะมิโนเปปทิเดส (EC 3.4.11.1) ตามวิธีการของ (Srichanun, 2013) โดยนำ sodium phosphate buffer (80 มิลลิโมลาร์) พีเอช 7.5 ผสมกับ *L*-leucine *p*-nitroanilide (2 มิลลิโมลาร์) (Sigma L9125, ละลายใน DMSO (0.1 มิลลิ-โมลาร์)) และเติมเอนไซม์ที่ได้จากการสกัด ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาว

คลื่น 410 นาโนเมตร ทุกๆ 20 วินาที เป็นเวลา 5 นาที (1 หน่วยกิจกรรมของเอนไซม์ (1 Unit) แสดงเป็นไมโครโมลของ *p*-nitroanilide ที่ถูกปล่อยออกมาในเวลา 1 นาที)

5.) การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส

วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (EC 3.1.3.1) ตามวิธีการของ (Srichanun, 2013) โดยนำ *p*-nitrophenyl-phosphate (7 มิลลิโมลาร์) (Sigma P0757) ผสมกับ $NaCO_3$/$NaHCO_3$ (30 มิลลิโมลาร์) พีเอช 10.75 และเติมเอนไซม์ที่ได้จากการสกัด ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 407 นาโนเมตร ทุกๆ 20 วินาที เป็นเวลา 2 นาที (1 หน่วยกิจกรรมของเอนไซม์ (1 Unit) แสดงเป็นไมโครโมลของ *p*-nitrophenol ที่ถูกปล่อยออกมาในเวลา 1 นาที)

6.) การศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของลำไส้และไส้ติ่งปลา

อดอาหารปลาทดลองเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผ่าตัดและเก็บตัวอย่างลำไส้และไส้ติ่ง ฉีดน้ำยาดอง Bouin's fluid (Bio-Optica, Milano Italy) เข้าสู่เนื้อเยื่อลำไส้และไส้ติ่งปลา เพื่อให้น้ำยาเข้าสู่เนื้อเยื่อดีขึ้น นำไปใส่ในขวดที่มีน้ำยาดอง Bouin's fluid เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบตามกำหนดเวลาจึงเปลี่ยนน้ำยาดองเป็นแอลกอฮอล์ 50 และ 70 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ จากนั้นจึงดึงน้ำออกจากเซลล์ด้วยเครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติ (LEICA TP1020, Germany) โดยนำตัวอย่างผ่านไอโซโพรพิลแอลกอลฮอล์และไซลีน แล้วฝังตัวอย่างด้วยพาราฟินด้วยเครื่องเอมเบดดิ้ง (LEICA EG1150H, China) นำเนื้อเยื่อไปตัดตามความยาวด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อไมโครโตม (sliding microtome บริษัท Jung AG Heidelberg) ให้มีความหนา 3-5 ไมโครเมตร ติดลงบนสไลด์ นำไปย้อมสีฮีมาทอกไซลินและอีโอซิน (Bancroft, 1979) หลังจากนั้นนำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศ์และบันทึกภาพ

3.2.5 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลพารามิเตอร์ต่างๆ ของการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหารมาหาค่าเฉลี่ยและวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลโดย One way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey's HSD Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95

เปอร์เซ็นต์ เพื่อตรวจสอบความแตกต่างในแต่ละชุดการทดลอง โดยใช้โปรแกรม SPSS 17.0 และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะและโปรตีนที่นำไปใช้ประโยชน์ด้วยการวิเคราะห์ความสัมพันธ์แบบ Nonlinear regression เพื่อหาระดับของเมไธโอนีนต่ำสุดที่ทำให้ปลาเจริญเติบโตดีที่สุด ตามวิธีการของ Littell และคณะ (1997) ด้วยโปรแกรม SAS โดยได้รับการอนุเคราะห์ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์แบบ Nonlinear regression จากบริษัท EVONIK ประเทศเยอรมนี

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 องค์ประกอบกรดอะมิโนของอาหารทดลอง

องค์ประกอบของกรดอะมิโนในอาหารพบว่า เมไธโอนีนมีค่าอยู่ในช่วง 6.40-14.11 กรัม/กิโลกรัมของอาหาร ซึ่งมีค่าเพิ่มขึ้นตามการเสริมเมไธโอนีนในอาหาร ส่วนกรดอะมิโนอื่นๆ ทั้งกรดอะมิโนจำเป็นและไม่จำเป็นพบว่า อาหารแต่ละสูตรมีค่ากรดอะมิโนแต่ละชนิดใกล้เคียงกัน ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 องค์ประกอบของกรดอะมิโน (กรัม/กิโลกรัม, บนฐานน้ำหนักสด) ในอาหารทดลอง

กรดอะมิโน	1 สูตรอ้างอิง	2 สูตรควบคุม	3 *DL*-met 0.09%	4 *DL*-met 0.18%	5 *DL*-met 0.36%	6 *DL*-met 0.54%	7 *DL*-met 0.72%	8 MetMet 0.09%	9 MetMet 0.18%	10 MetMet 0.36%	11 MetMet 0.54%	12 MetMet 0.72%
กรดอะมิโนจำเป็น												
Arginine	28.74	32.41	32.61	32.08	32.26	32.02	32.02	32.31	31.84	32.59	32.41	32.37
Histidine	11.50	11.54	11.49	11.35	11.48	11.36	11.36	11.67	11.30	11.74	11.61	11.62
Isoleucine	19.81	16.79	16.89	16.75	16.87	16.64	16.64	16.89	16.33	16.98	16.93	16.77
Leucine	35.76	32.56	32.73	32.39	32.58	32.39	32.39	32.79	31.96	32.85	32.90	32.79
Lysine	34.75	28.87	28.99	28.81	28.90	28.69	28.69	28.98	28.33	29.12	29.08	28.96
Methionine	11.40	6.40	7.68	8.42	10.22	11.67	13.28	7.76	8.14	10.49	12.31	14.11
Phenylalanine	19.78	19.79	19.92	19.69	19.75	19.60	19.60	19.77	19.28	19.85	19.78	19.86
Threonine	19.24	16.42	16.52	16.42	16.49	16.39	16.39	16.55	16.14	16.61	16.56	16.57
Tryptophan	5.32	4.90	4.81	4.79	4.86	4.88	4.88	4.94	4.91	4.89	4.95	4.87
Valine	23.19	20.90	20.93	20.79	21.02	20.69	20.69	21.11	20.49	21.13	21.15	20.98
กรดอะมิโนไม่จำเป็น												
Alanine	28.88	26.41	26.52	26.18	26.34	26.15	26.15	26.20	25.94	26.52	26.39	26.26
Aspartic acid	45.62	43.95	44.20	43.70	44.01	43.87	43.87	44.23	43.45	44.57	44.54	44.35
Cysteine	5.08	5.11	5.43	5.40	5.40	5.38	5.38	5.44	5.25	5.48	5.45	5.42
Glutamic acid	71.45	72.15	72.68	72.06	72.42	72.04	72.04	72.65	70.55	72.90	72.76	72.31
Glycine	29.39	36.63	36.67	36.23	36.62	36.18	36.18	36.19	36.00	36.64	36.52	36.30
Proline	22.77	30.14	29.24	29.68	29.65	29.51	29.51	29.48	29.18	30.47	29.35	29.20
Serine	19.11	19.87	19.97	19.72	19.72	19.89	19.89	19.87	19.59	20.04	19.87	19.86

4.2 การเจริญเติบโต

ปลากะพงขาวน้ำหนักเริ่มต้นเฉลี่ย 8.12-8.14 กรัม/ตัว ได้รับอาหารสูตรอ้างอิง (สูตรที่ 1) ที่มีปลาป่นเป็นวัตถุดิบโปรตีนหลัก อาหารสูตรควบคุม (สูตรที่ 2) ที่ไม่มีการเสริมเมไธโอนีน และอาหารที่เสริมเมไธโอนีน 2 รูปแบบคือ *DL*-met (สูตรที่ 3-7) และ MetMet (สูตรที่ 8-12) ที่ระดับต่าง ๆ กัน 5 ระดับ เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า ปลาที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง 12 สูตรมีอัตราการรอดตายไม่แตกต่างกันทางสถิติ (96.67-100 เปอร์เซ็นต์) โดยปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 11 มีอัตราการรอดตาย 96.67 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 7) เนื่องจากปลาไม่กินอาหารและถูกปลาตัวใหญ่กว่ากัด

น้ำหนักเริ่มต้น น้ำหนักสุดท้าย น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารทดลองเป็นเวลา 6 สัปดาห์ ดังตารางที่ 7 พบว่ารูปแบบและระดับของเมไธโอนีนมีผลต่อน้ำหนักปลาสุดท้าย น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้นและอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ โดยปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 1 มีน้ำหนักสุดท้ายเฉลี่ยสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญคือ 36.62±0.96 กรัม/ตัว ($P<0.05$) แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 6 และ 7 ($P>0.05$) ส่วนปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 2 มีน้ำหนักปลาสุดท้ายเฉลี่ยต่ำสุดคือ 23.95±1.20 กรัม/ตัว ($P<0.05$) ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติกับปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 3-5 และสูตรที่ 8-12 สอดคล้องกับอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของปลาที่พบว่า ปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 1 มีค่าสูงสุด รองลงมาคือปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 7, 6 และ 12 ตามลำดับ โดยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

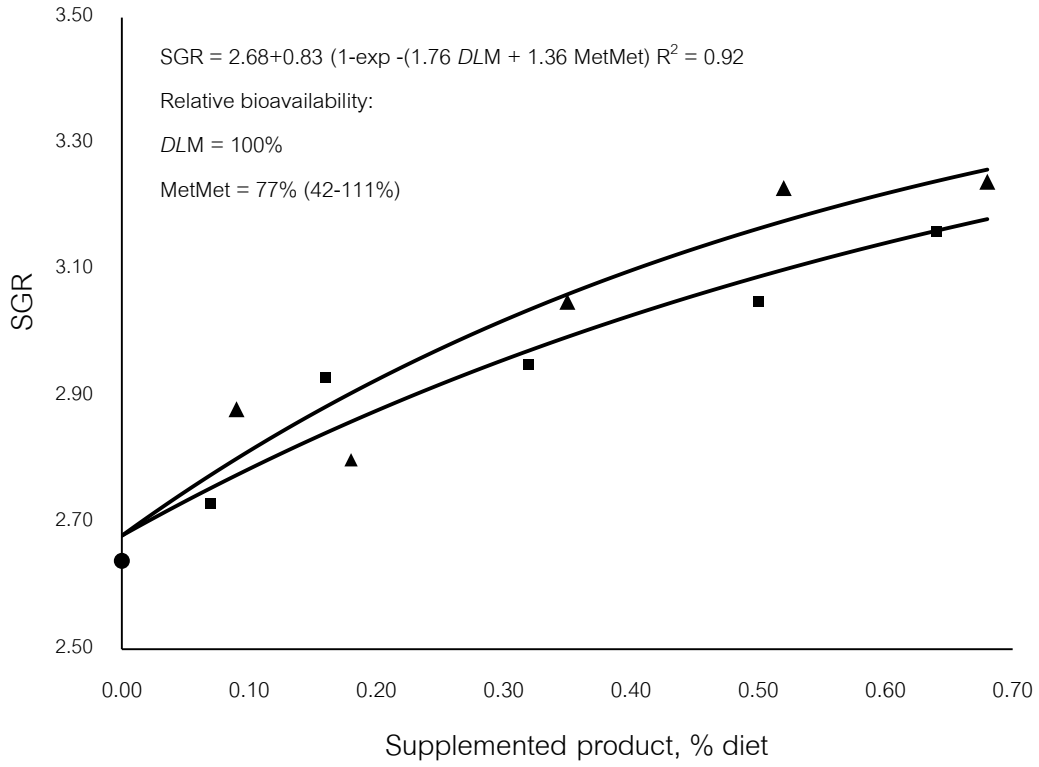
ตารางที่ 7 น้ำหนักเริ่มต้น น้ำหนักสุดท้าย น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะและอัตราการรอดตายของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารทดลองเป็นเวลา 6 สัปดาห์[1]

ชุดการทดลอง	น้ำหนักเริ่มต้น (กรัม/ตัว)	น้ำหนักสุดท้าย (กรัม/ตัว)	น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (กรัม/ตัว)[2]	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (เปอร์เซ็นต์/วัน)[3]	อัตราการรอดตาย (เปอร์เซ็นต์)
1 (สูตรอ้างอิง)	8.14 ± 0.03^{ns}	36.62 ± 0.96^{a}	28.48 ± 0.94^{a}	3.67 ± 0.06^{a}	100.00 ± 0.00^{ns}
2 (สูตรควบคุม)	8.12 ± 0.05^{ns}	23.95 ± 1.20^{c}	15.84 ± 1.25^{c}	2.63 ± 0.14^{c}	100.00 ± 0.00^{ns}
3 (*DL*-met 0.09%)	8.13 ± 0.11^{ns}	26.54 ± 2.93^{bc}	18.41 ± 2.83^{bc}	2.88 ± 0.23^{bc}	100.00 ± 0.00^{ns}
4 (*DL*-met 0.18%)	8.14 ± 0.08^{ns}	25.68 ± 1.11^{bc}	17.54 ± 1.12^{bc}	2.80 ± 0.11^{bc}	100.00 ± 0.00^{ns}
5 (*DL*-met 0.36%)	8.14 ± 0.16^{ns}	28.42 ± 1.23^{bc}	20.28 ± 1.11^{bc}	3.05 ± 0.07^{bc}	100.00 ± 0.00^{ns}
6 (*DL*-met 0.54%)	8.12 ± 0.11^{ns}	30.57 ± 2.54^{ab}	22.45 ± 2.65^{ab}	3.22 ± 0.23^{ab}	100.00 ± 0.00^{ns}
7 (*DL*-met 0.72%)	8.13 ± 0.12^{ns}	30.73 ± 1.96^{ab}	22.60 ± 2.02^{ab}	3.24 ± 0.18^{ab}	100.00 ± 0.00^{ns}
8 (MetMet 0.09%)	8.14 ± 0.07^{ns}	25.02 ± 2.38^{bc}	16.88 ± 2.38^{bc}	2.73 ± 0.23^{bc}	100.00 ± 0.00^{ns}
9 (MetMet 0.18%)	8.14 ± 0.08^{ns}	27.11 ± 1.64^{bc}	18.97 ± 1.69^{bc}	2.93 ± 0.17^{bc}	100.00 ± 0.00^{ns}
10 (MetMet 0.36%)	8.12 ± 0.04^{ns}	27.36 ± 3.34^{bc}	19.24 ± 3.30^{bc}	2.95 ± 0.28^{bc}	100.00 ± 0.00^{ns}
11 (MetMet 0.54%)	8.14 ± 0.06^{ns}	28.45 ± 2.53^{bc}	20.31 ± 2.59^{bc}	3.05 ± 0.24^{bc}	96.67 ± 5.77^{ns}
12 (MetMet 0.72%)	8.13 ± 0.06^{ns}	29.69 ± 1.60^{bc}	21.56 ± 1.55^{bc}	3.16 ± 0.12^{abc}	100.00 ± 0.00^{ns}

[1]ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± SD (n=3) ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P>0.05)

[2]น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น = (น้ำหนักสุดท้ายเฉลี่ย (กรัม/ตัว) - น้ำหนักเริ่มต้นเฉลี่ย (กรัม/ตัว))

[3]อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ = {[(ln น้ำหนักสุดท้าย (กรัม/ตัว) - ln น้ำหนักเริ่มต้น (กรัม/ตัว))] / จำนวนวันที่ทดลอง} x 100



ภาพที่ 22 ความสัมพันธ์ระหว่างระดับของเมไธโอนีนในอาหารกับอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่เสริมด้วยเมไธโอนีนแบบ *DL*-met และ MetMet เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ (สัญลักษณ์วงกลม สามเหลี่ยมและสี่เหลี่ยมแสดงอัตราการเจริญเติบโตของปลากะพงที่ได้รับอาหารสูตรควบคุม และอัตราการเจริญเติบโตของปลากะพงที่ได้รับอาหารที่เสริมด้วย *DL*-met และ MetMet ตามลำดับ)

จากผลการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหารของปลากะพงที่ได้รับอาหารทดลองเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ ได้นำมาสร้างสมการเพื่อหาค่าชีวภาพพร้อมใช้ในพารามิเตอร์ต่างๆ ด้วยโปรแกรม SAS ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์วิเคราะห์ข้อมูลจากบริษัท EVONIK ประเทศเยอรมนี พบว่า ได้สมการสำหรับทำนายชีวภาพพร้อมใช้ของอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะคือ $SGR = 2.68+0.83(1-e^{-(1.76DLM+1.36MetMet)})$ โดยกำหนดให้ *DL*M หรือ MetMet ในสมการคือระดับความเข้มข้นของ *DL*-met และ MetMet ที่ต้องการเสริมในอาหารตามลำดับ มีค่า R^2 เท่ากับ 0.92 จากกราฟแสดงความสัมพันธ์ดังกล่าว แสดงให้เห็นว่า ปลาที่ได้รับเมไธโอนีนทั้งสองรูปแบบในระดับเดียวกันมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะไม่แตกต่างกัน เนื่องจากค่าชีวภาพพร้อมใช้ของ MetMet เมื่อเปรียบเทียบกับ *DL*-met เท่ากับ 77 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งอยู่ในช่วงของค่า confidence limits (confidence interval) คือ 42-111 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 7 สมการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นกับอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะและอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อของปลากะพงขาวได้รับอาหารทดลองเป็นเวลา 6 สัปดาห์

พารามิเตอร์	น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ	อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ
ชีวภาพพร้อมใช้ (เปอร์เซ็นต์)	76	77	117
Confidence limits (95เปอร์เซ็นต์)	43-109	42-111	50-184
R^2	0.93	0.92	0.95
สมการ	Weight gain = $16.28+10.32(1-e^{-(1.46DLM+1.114MetMet)})$		
	SGR = $2.68+0.83(1-e^{-(1.76DLM+1.36MetMet)})$		
	FCR = $1.28+0.29(1-e^{-(7.82DLM+9.14MetMet)})$		

4.3 ประสิทธิภาพการใช้อาหาร

ตลอดระยะเวลาการทดลอง 6 สัปดาห์ ปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 1 มีพฤติกรรมการกินอาหารดีที่สุด จึงมีปริมาณอาหารที่กินสูงสุดคือ 26.28±1.13 กรัม/ตัว ($P<0.05$) แต่ไม่แตกต่างทางสถิติกับปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 3, 6, 7 และ 12 ($P>0.05$) ส่วนปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 2 มีน้ำหนักอาหารที่กินต่ำสุดคือ 20.14 ± 0.89 กรัม ($P<0.05$) สำหรับอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อพบว่า ปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 1 มีอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อต่ำสุดคือ 0.90±0.02 แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 5-7 และสูตรที่ 9-12 ($P>0.05$) ส่วนประสิทธิภาพการใช้โปรตีนพบว่า ปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 6 มีค่าสูงสุด ($P<0.05$) แต่ไม่แตกต่างทางสถิติกับปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 1, 4, 5, 7 และสูตรที่ 9-12 ($P>0.05$) สอดคล้องกับการนำโปรตีนไปใช้ประโยชน์ในปลากะพงขาว (ตารางที่ 8) แสดงให้เห็นว่าปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 6 มีประสิทธิภาพการใช้อาหารสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารทดลองสูตรอื่นๆ

ตารางที่ 8 ปริมาณอาหารที่ปลากิน อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน และโปรตีนที่นำไปใช้ประโยชน์ของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารทดลองเป็นเวลา 6 สัปดาห์[1]

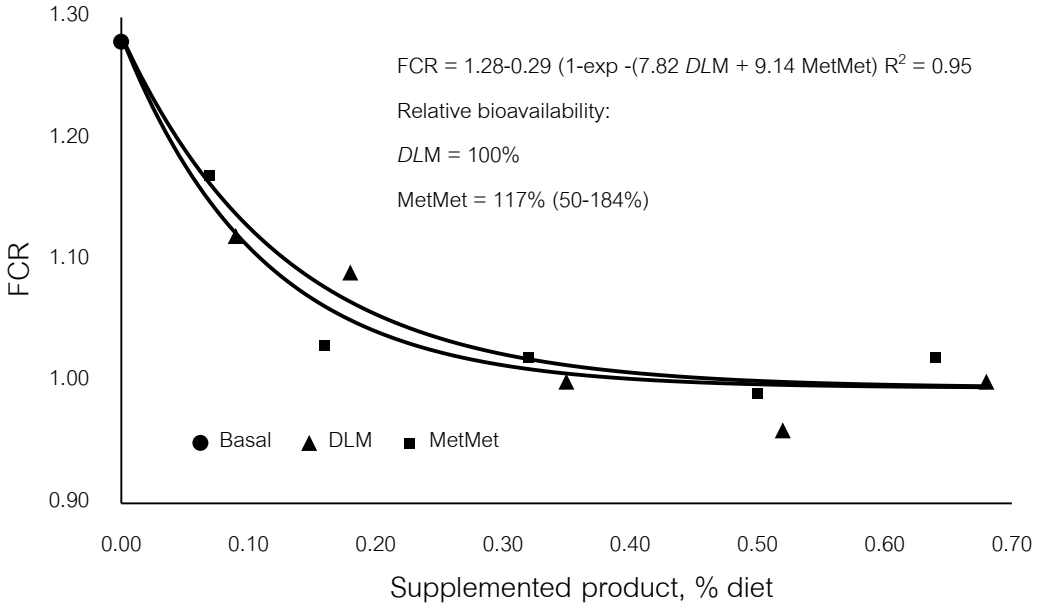
ชุดการทดลอง	ปริมาณอาหารที่กิน (กรัม/ตัว)	อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ[2]	ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน[3]	โปรตีนที่นำไปใช้ประโยชน์ (เปอร์เซ็นต์)[4]
1 (สูตรอ้างอิง)	26.28 ± 1.13^{a}	0.92 ± 0.07^{e}	2.23 ± 0.16^{ab}	38.15 ± 2.61^{a}
2 (สูตรควบคุม)	20.14 ± 0.89^{b}	1.28 ± 0.12^{a}	1.72 ± 0.15^{d}	28.19 ± 2.60^{d}
3 (*DL*-met 0.09%)	20.62 ± 2.26^{ab}	1.12 ± 0.06^{abc}	1.96 ± 0.10^{bcd}	33.24 ± 1.14^{bc}
4 (*DL*-met 0.18%)	19.13 ± 1.34^{b}	1.09 ± 0.02^{bcd}	2.00 ± 0.04^{abcd}	34.25 ± 0.55^{abc}
5 (*DL*-met 0.36%)	20.32 ± 0.48^{b}	1.00 ± 0.03^{cde}	2.16 ± 0.07^{ab}	36.73 ± 0.75^{ab}
6 (*DL*-met 0.54%)	21.57 ± 2.68^{ab}	0.96 ± 0.02^{de}	2.25 ± 0.05^{a}	38.44 ± 0.27^{a}
7 (*DL*-met 0.72%)	22.67 ± 1.43^{ab}	1.01 ± 0.05^{cde}	2.15 ± 0.10^{ab}	37.24 ± 1.86^{ab}
8 (MetMet 0.09%)	19.75 ± 2.08^{b}	1.18 ± 0.06^{ab}	1.86 ± 0.09^{cd}	30.14 ± 1.80^{cd}
9 (MetMet 0.18%)	19.68 ± 2.50^{b}	1.03 ± 0.05^{bcde}	2.10 ± 0.10^{abc}	34.79 ± 2.19^{abc}
10 (MetMet 0.36%)	19.68 ± 3.17^{b}	1.03 ± 0.04^{bcde}	2.12 ± 0.08^{abc}	35.72 ± 1.13^{ab}
11 (MetMet 0.54%)	20.08 ±2.47^{b}	0.99 ± 0.05^{cde}	2.18 ± 0.10^{ab}	36.96 ± 1.38^{ab}
12 (MetMet 0.72%)	21.95 ± 1.67^{ab}	1.02 ± 0.04^{cde}	2.14 ± 0.08^{abc}	36.72 ± 1.62^{ab}

[1]ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± SD (n=3) ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P>0.05)

[2]อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ = น้ำหนักอาหารที่ปลากิน (กรัม/ตัว) / น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น (กรัม/ตัว)

[3]ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน = น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น (กรัม/ตัว) / น้ำหนักโปรตีนที่ปลากิน (กรัม/ตัว)

[4]โปรตีนที่นำไปใช้ประโยชน์ = (โปรตีนที่เพิ่มขึ้นในตัวปลา (กรัม) / โปรตีนที่ปลากิน (กรัม)) x 100



ภาพที่ 23 ความสัมพันธ์ระหว่างระดับของเมไธโอนีนในอาหารกับอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่เสริมด้วยเมไธโอนีนแบบ *DL*-met และ MetMet เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ (สัญลักษณ์วงกลม สามเหลี่ยมและสี่เหลี่ยมแสดงอัตราการเจริญเติบโตของปลากะพงที่ได้รับอาหารสูตรควบคุม และอัตราการเจริญเติบโตของปลากะพงที่ได้รับอาหารที่เสริมด้วย *DL*-met และ MetMet ตามลำดับ)

จากผลการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหารของปลากะพงที่ได้รับอาหารทดลองเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ ได้นำมาสร้างสมการเพื่อหาค่าชีวภาพพร้อมใช้ในพารามิเตอร์ต่างๆ ด้วยโปรแกรม SAS ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์วิเคราะห์ข้อมูลจากบริษัท EVONIK ประเทศเยอรมนี พบว่า ได้สมการสำหรับทำนายชีวภาพพร้อมใช้ของอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อคือ $SGR = 2.68+0.83(1-e^{-(1.76DLM+1.36MetMet)})$ โดยกำหนดให้ *DL*M หรือ MetMet ในสมการคือระดับความเข้มข้นของ *DL*-met และ MetMet ที่ต้องการเสริมในอาหาร ตามลำดับ มีค่า R^2 เท่ากับ 0.95 จากกราฟแสดงความสัมพันธ์ดังกล่าว แสดงให้เห็นว่า ปลาที่ได้รับเมไธโอนีนทั้งสองรูปแบบในระดับเดียวกันมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะไม่แตกต่างกัน เนื่องจากค่าชีวภาพพร้อมใช้ของ MetMet เมื่อเปรียบเทียบกับ *DL*-met เท่ากับ 117 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 7) ซึ่งอยู่ในช่วงของค่า confidence limits คือ 50-184 เปอร์เซ็นต์

4.4 องค์ประกอบทางเคมี และกรดอะมิโนของปลา

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของปลาหลังการทดลองพบว่า ระดับของเมไธโอนีนที่เสริมลงในอาหารมีผลต่อระดับโปรตีนในซากปลา (ตารางที่ 9) โดยปริมาณโปรตีนมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามระดับของเมไธโอนีนในอาหารที่เพิ่มขึ้น สอดคล้องกับปริมาณกรดอะมิโนในซากปลา (ตารางที่ 10) ซึ่งพบว่า กรดอะมิโนที่จำเป็นมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามปริมาณของเมไธโอนีนในอาหารที่เพิ่มขึ้น สำหรับปริมาณไขมันพบว่า ปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 5, 6, 9, 10 และ 11 มีปริมาณไขมันในซากน้อยที่สุด แต่ไม่แตกต่างจากปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 2, 3, 4, 7, 8 และ 12 ส่วนปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 1 มีปริมาณไขมันในซากสูงที่สุด สำหรับปริมาณเถ้าพบว่า ปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 2 มีปริมาณสูงที่สุด แต่ไม่แตกต่างจากปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 3, 4, 7, 8 และ 9 ส่วนปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 10 และ 12 มีปริมาณเถ้าในซากต่ำที่สุด ($P<0.05$)

ตารางที่ 9 องค์ประกอบทางเคมี (บนฐานน้ำหนักเปียก) ของปลาที่ได้รับอาหารทดลองเป็นเวลา 6 สัปดาห์[1]

ชุดการทดลอง	องค์ประกอบทางเคมี (เปอร์เซ็นต์)			
	ความชื้น	โปรตีน	ไขมัน	เถ้า
ปลาเริ่มต้น	75.42 ± 0.13	14.63 ± 0.25	3.85 ± 0.08	3.76 ± 0.11
1 (สูตรอ้างอิง)	72.93 ± 0.34^{b}	16.52 ± 0.02^{a}	4.35 ± 0.33^{a}	4.90 ± 0.08^{bc}
2 (สูตรควบคุม)	73.51 ± 0.38^{ab}	15.78 ± 0.29^{cd}	3.98 ± 0.28^{ab}	5.43 ± 0.15^{a}
3 (*DL*-met 0.09%)	73.46 ± 0.40^{ab}	16.21 ± 0.14^{abc}	3.90 ± 0.51^{ab}	5.11 ± 0.18^{abc}
4 (*DL*-met 0.18%)	73.37 ± 0.10^{ab}	16.28 ± 0.13^{ab}	4.06 ± 0.21^{ab}	5.27 ± 0.07^{ab}
5 (*DL*-met 0.36%)	73.86 ± 0.49^{ab}	16.29 ± 0.12^{ab}	3.37 ± 0.24^{b}	4.92 ± 0.08^{bc}
6 (*DL*-met 0.54%)	73.95 ± 0.35^{ab}	16.41 ± 0.20^{a}	3.43 ± 0.18^{b}	4.88 ± 0.05^{bc}
7 (*DL*-met 0.72%)	73.60 ± 0.50^{ab}	16.55 ± 0.14^{a}	3.55 ± 0.17^{ab}	5.08 ± 0.36^{abc}
8 (MetMet 0.09%)	73.87 ± 0.26^{ab}	15.64 ± 0.21^{d}	3.86 ± 0.33^{ab}	5.23 ± 0.30^{abc}
9 (MetMet 0.18%)	74.27 ± 0.27^{a}	15.92 ± 0.18^{bcd}	3.32 ± 0.21^{b}	5.06 ± 0.06^{abc}
10 (MetMet 0.36%)	74.10 ± 0.24^{a}	16.16 ± 0.05^{abc}	3.40 ± 0.17^{b}	4.74 ± 0.11^{c}
11 (MetMet 0.54%)	73.82 ± 0.25^{ab}	16.23 ± 0.15^{abc}	3.26 ± 0.09^{b}	4.92 ± 0.07^{bc}
12 (MetMet 0.72%)	73.52 ± 0.49^{ab}	16.43 ± 0.16^{a}	3.75 ± 0.32^{ab}	4.75 ± 0.17^{c}

[1]ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± SD (n=3) ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P>0.05$)

ตารางที่ 10 องค์ประกอบของกรดอะมิโน (กรัม/กิโลกรัม, บนฐานน้ำหนักสด) ของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารทดลองเป็นเวลา 6 สัปดาห์

กรดอะมิโน	1 สูตรอ้างอิง	2 สูตรควบคุม	3 *DL*-met 0.09%	4 *DL*-met 0.18%	5 *DL*-met 0.36%	6 *DL*-met 0.54%	7 *DL*-met 0.72%	8 MetMet 0.09%	9 MetMet 0.18%	10 MetMet 0.36%	11 MetMet 0.54%	12 MetMet 0.72%
กรดอะมิโนจำเป็น												
Arginine	36.23	37.03	36.03	37.37	38.20	37.80	37.80	36.47	37.37	37.30	37.63	37.30
Histidine	12.17	11.40	11.37	11.70	12.33	12.30	12.30	11.73	11.90	12.33	12.43	12.37
Isoleucine	24.60	23.43	23.33	24.13	24.80	24.67	24.67	23.83	24.20	24.80	24.57	24.57
Leucine	42.47	40.23	40.10	41.37	42.70	42.73	42.73	41.33	42.03	43.20	42.73	42.67
Lysine	47.90	44.27	44.20	45.50	47.73	48.47	48.47	46.17	46.43	48.67	48.33	48.20
Methionine	17.27	16.20	16.10	16.50	17.17	17.27	17.27	16.43	16.57	17.10	17.07	17.00
Phenylalanine	24.37	23.37	23.43	24.00	24.80	24.80	24.80	24.07	24.30	25.07	24.77	24.70
Threonine	25.30	24.80	24.77	25.37	25.73	25.80	25.80	25.00	25.23	25.77	25.50	25.50
Tryptophan	5.40^{ab}	4.97^{b}	5.00^{ab}	5.10^{ab}	5.33^{ab}	5.43^{ab}	5.43^{ab}	5.20^{ab}	5.27^{ab}	5.50^{a}	5.37^{ab}	5.33^{ab}
Valine	28.43	27.57	27.50	28.27	28.70	28.70	28.70	27.87	28.20	28.60	28.47	28.53
กรดอะมิโนไม่จำเป็น												
Alanine	44.70	45.20	45.37	45.80	46.00	46.13	46.13	45.53	45.77	45.23	45.43	45.57
Aspartic acid	56.93	55.90	54.83	56.77	58.43	58.00	58.00	55.00	56.60	57.47	57.40	57.50
Cysteine	5.43^{ab}	5.13^{b}	5.10^{b}	5.30^{ab}	5.57^{ab}	5.47^{ab}	5.47^{ab}	5.17^{ab}	5.27^{ab}	5.50^{ab}	5.43^{ab}	5.50^{ab}
Glutamic acid	84.33	82.53	82.37	84.43	85.97	86.23	86.23	84.20	84.67	85.90	85.07	85.33
Glycine	55.90^{c}	59.80^{ab}	60.30^{ab}	61.07^{ab}	61.50^{ab}	61.57^{ab}	61.57^{ab}	60.30^{ab}	59.83^{ab}	58.70^{bc}	59.87^{ab}	59.37^{abc}
Proline	31.57^{c}	32.43^{ab}	33.13^{ab}	33.90^{a}	33.53^{ab}	34.00^{a}	34.00^{a}	33.90^{a}	33.50^{ab}	32.37^{ab}	33.07^{ab}	33.70^{ab}
Serine	22.73	23.17	22.87	23.67	23.83	23.33	23.33	22.77	23.53	23.53	23.20	23.20

[1]ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± SD (n=3) ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P>0.05)

4.5 กิจกรรมของเอนไซม์ลิวซีนอะมิโนเปปทิเดสและอัลคาไลน์ฟอสฟาเตส

กิจกรรมของเอนไซม์ลิวซีนอะมิโนเปปทิเดสและอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสทั้งในไส้ติ่งและลำไส้แสดงดังตารางที่ 11 พบว่า ปลาที่ได้รับอาหารที่เสริมด้วย *DL*-met มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ลิวซีนอะมิโนเปปทิเดสที่มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นตามระดับของเมไธโอนีนที่เสริมในอาหารและลดต่ำลงที่ระดับสูงสุดคือ 0.72 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร สอดคล้องกับผลของการเจริญเติบโตของปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 6 ซึ่งมีค่าประสิทธิภาพการใช้โปรตีนและการนำโปรตีนไปใช้ประโยชน์สูงสุด ส่วนปลาที่ได้รับอาหารที่เสริมด้วย MetMet มีแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของกิจกรรมของเอนไซม์ลิวซีนอะมิโนเปปทิเดสตามระดับของเมไธโอนีนที่เสริมในอาหารเช่นเดียวกัน แต่จะมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่สูงในปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 9 และสูตรที่ 12 ส่วนกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส พบว่า ปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 1 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ทั้งในลำไส้และไส้ติ่งสูงสุด โดยในไส้ติ่งไม่มีแนวโน้มของการเพิ่มขึ้นหรือลดลงตามระดับของเมไธโอนีนที่เสริมในอาหาร แต่มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นหรือลดลงตามปริมาณอาหารที่ปลากิน ส่วนในลำไส้จะเห็นว่า ค่ากิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส มีแนวโน้มลดลงตามระดับของ *DL*-met ที่เพิ่มขึ้น ส่วนปลาที่ได้รับอาหารที่เสริมด้วย MetMet ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและระดับของเมไธโอนีน โดยจากการศึกษาพบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดพบในไส้ติ่งมากกว่าในลำไส้

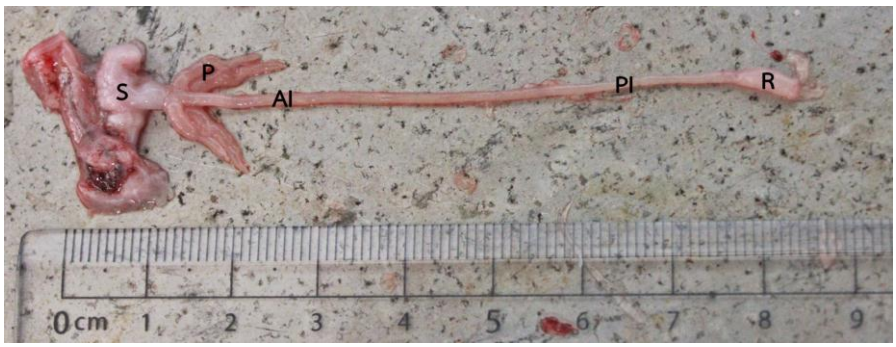
ตารางที่ 11 กิจกรรมของเอนไซม์ลิวซีนอะมิโนเปปทิเดสและเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในไส้ติ่งและลำไส้ของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารทดลองเป็นเวลา 6 สัปดาห์

ชุดการทดลอง	กิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิต/มิลลิกรัมของโปรตีน)			
	ลิวซีนอะมิโนเปปทิเดส		อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส	
	ไส้ติ่ง	ลำไส้	ไส้ติ่ง	ลำไส้
1 (สูตรอ้างอิง)	1.88 ± 0.07^{b}	1.87 ± 0.23^{b}	222.04 ± 23.04^{a}	119.95 ± 14.61^{a}
2 (สูตรควบคุม)	2.81 ± 0.36^{ab}	1.85 ± 0.30^{b}	91.20 ± 6.89^{bcd}	55.40 ± 3.58^{ab}
3 (*DL*-met 0.09%)	2.21 ± 0.28^{ab}	2.05 ± 0.51^{b}	84.59 ± 18.92^{bcd}	72.80 ± 8.85^{ab}
4 (*DL*-met 0.18%)	2.60 ± 0.59^{ab}	2.15 ± 0.39^{b}	61.72 ± 13.71^{bcd}	51.01 ± 29.16^{ab}
5 (*DL*-met 0.36%)	3.14 ± 0.81^{ab}	2.33 ± 0.54^{ab}	58.14 ± 7.58^{cde}	54.39 ± 7.50^{ab}
6 (*DL*-met 0.54%)	3.46 ± 1.17^{ab}	2.57 ± 0.03^{ab}	85.66 ± 3.28^{bcd}	45.74 ± 12.64^{ab}
7 (*DL*-met 0.72%)	3.04 ± 0.43^{ab}	1.70 ± 0.03^{b}	108.44 ± 9.71^{b}	36.94 ± 13.21^{ab}
8 (MetMet 0.09%)	3.40 ± 0.91^{ab}	1.76 ± 0.18^{b}	68.68 ± 12.43^{bcde}	40.83 ± 10.67^{ab}
9 (MetMet 0.18%)	3.85 ± 1.05^{ab}	3.79 ± 1.26^{a}	88.58 ± 14.12^{bcd}	55.39 ± 15.54^{ab}
10 (MetMet 0.36%)	3.38 ± 0.89^{ab}	2.73 ± 0.29^{ab}	46.87 ± 8.53^{e}	26.47 ± 16.89^{b}
11 (MetMet 0.54%)	3.66 ± 0.65^{ab}	3.23 ± 0.05^{ab}	56.71 ± 16.30^{de}	62.14 ± 15.84^{ab}
12 (MetMet 0.72%)	4.04 ± 0.59^{a}	3.05 ± 0.59^{ab}	93.12 ± 6.08^{bc}	39.49 ± 13.16^{ab}

[1]ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± SD (n=3) ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P>0.05)

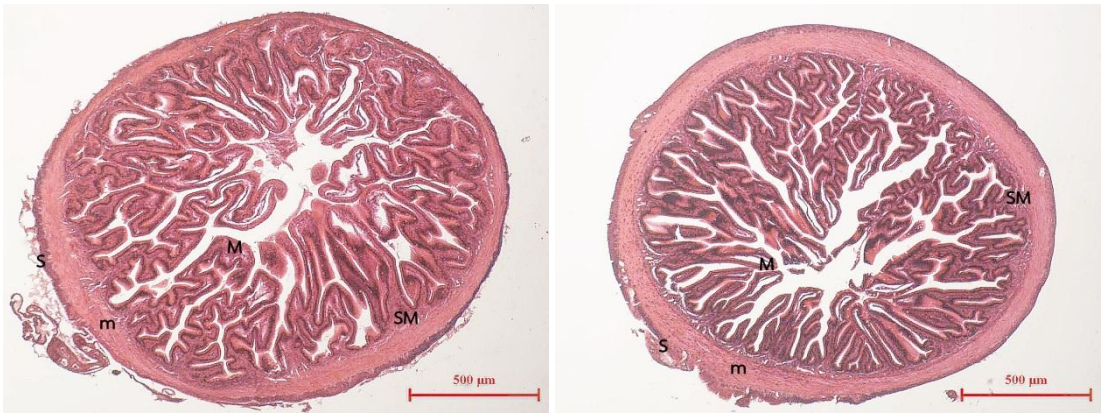
4.6 การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของลำไส้และไส้ติ่ง

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของลำไส้และไส้ติ่งปลากะพงขาวพบว่าไส้ติ่งของปลากะพงขาวอยู่ในบริเวณส่วนท้ายของกระเพาะอาหารหรือส่วนต้นของลำไส้ปลา โดยมีลักษณะเป็นท่อปลายตันคล้ายนิ้วมือ ไส้ติ่งของปลากะพงในการทดลองนี้พบส่วนใหญ่มีจำนวน 5 อัน (ภาพที่ 24) เมื่อวัดความยาวลำไส้ปลาพบว่า มีความยาว 5.50-9.00 เซนติเมตร ขึ้นอยู่กับขนาดของปลา



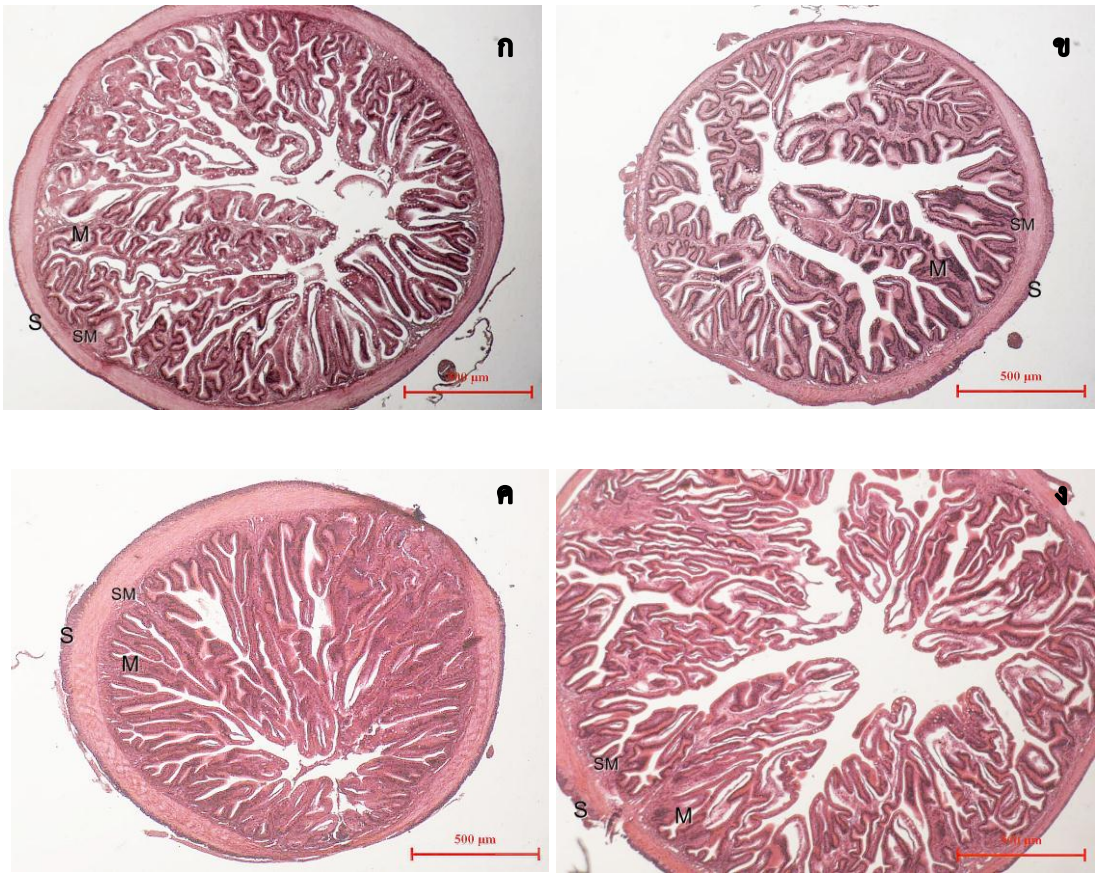
ภาพที่ 24 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางส่วนของเดินอาหารปลากะพงขาว (S: กระเพาะอาหาร, P: ไส้ติ่ง, AI: ลำไส้ส่วนต้น, PI: ลำไส้ส่วนท้าย และ R ไส้ตรง)

ลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของไส้ติ่งไม่มีความแตกต่างจากลำไส้มากนัก (ภาพที่ 25) โดยทั้งไส้ติ่งและลำไส้ประกอบด้วยเนื้อเยื่อชั้นเซอโรซาที่มีชั้นกล้ามเนื้อวงและกล้ามเนื้อตามยาว มีชั้นใต้มิวโคซาและชั้นมิวโคซา ตามลำดับ บริเวณชั้นระหว่างชั้นเซอโรซาและชั้นซับมิวโคซาประกอบด้วยชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ในชั้นมิวโคซาของลำไส้และไส้ติ่งมีลักษณะของเนื้อเยื่อแบบเดียวกันและพบรอยย่นที่ขยายและแตกเป็นสาขา ผนังด้านในของชั้นมิวโคซาจะม้วนตัวเป็นวิลไล ทำให้มีพื้นที่ผิวจำนวนมากในการย่อยและดูดซึมอาหาร จากการสังเกตลักษณะเนื้อเยื่อบนแผ่นสไลด์ด้วยตาเปล่าพบว่า ปลาที่ได้รับอาหารต่างกันมีความยาวของวิลไลและรอยย่นของชั้นมิวโคซาแตกต่างกัน

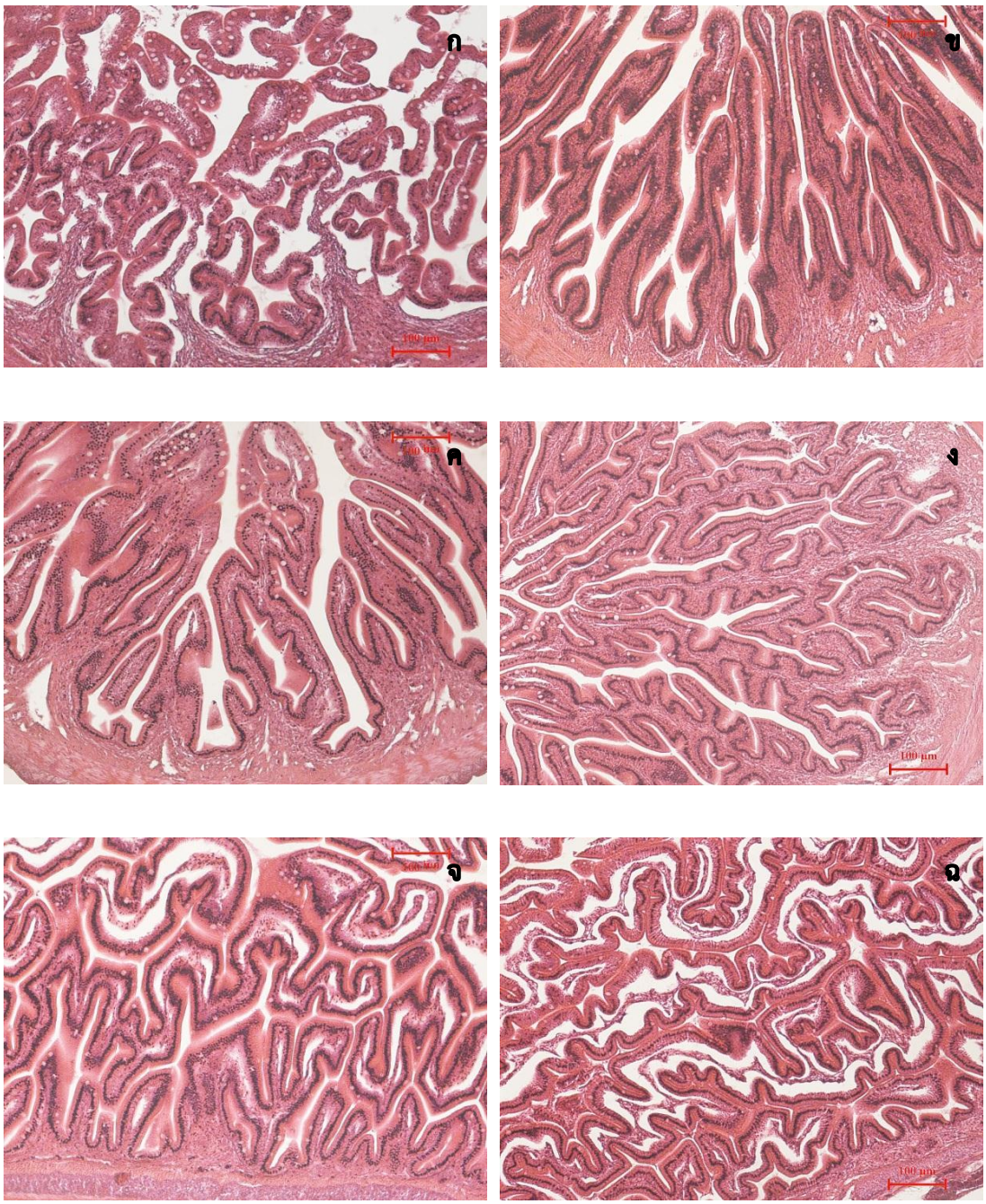


ภาพที่ 25 ภาพตัดขวางของเนื้อเยื่อลำไส้ (ซ้าย) และไส้ติ่ง (ขวา); M: ชั้นมิวโคซา, SM: ชั้นซับมิวโคซา, S: ชั้นเซอโรซา, m: ชั้นกล้ามเนื้อเรียบ (H&E, 4X)

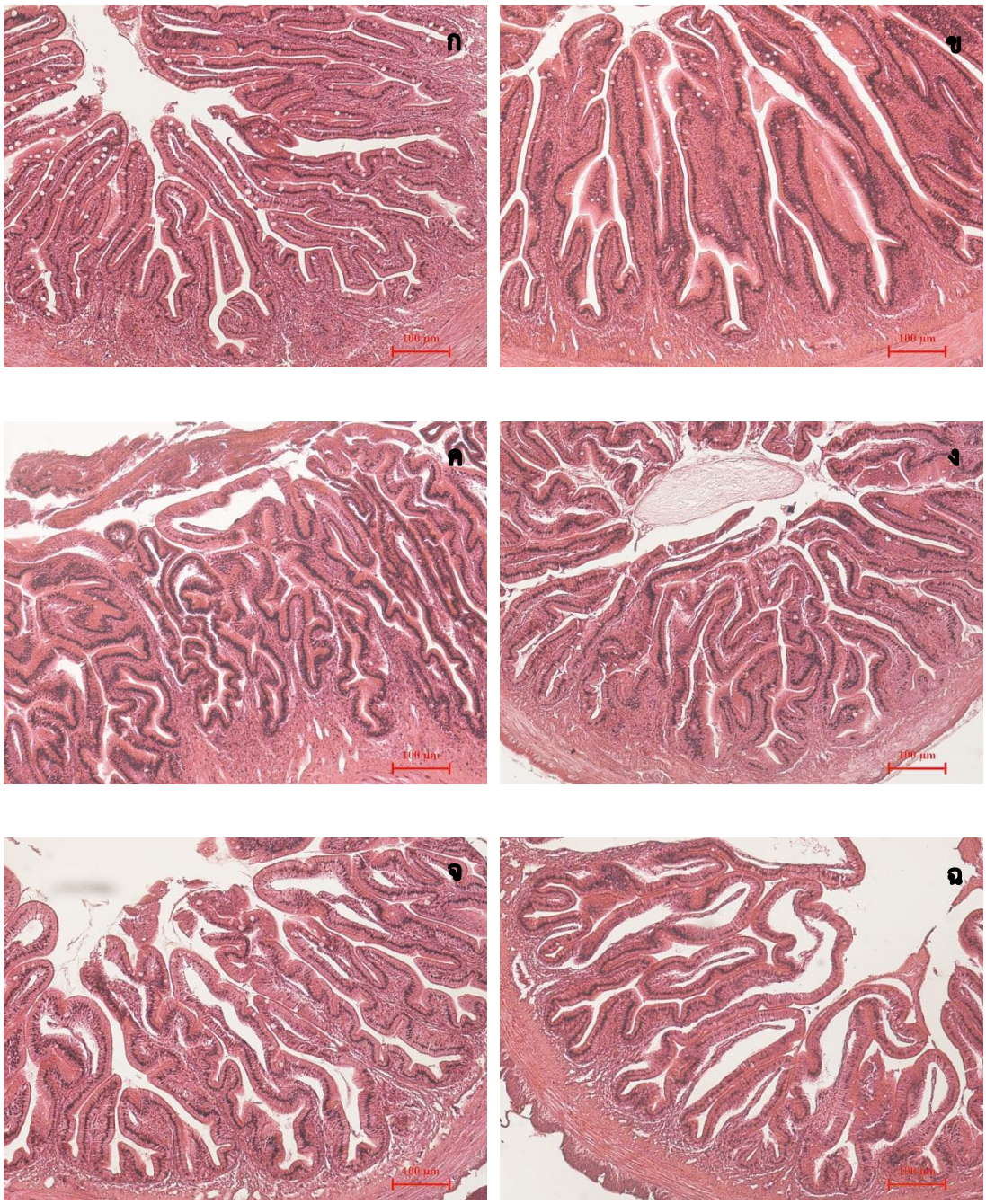
จากการศึกษาความแตกต่างของลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของลำไส้และไส้ติ่งของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารทดลองแตกต่างกัน 12 สูตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า ปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 1 ลำไส้ตอนต้นมีลักษณะปกติ ชั้นซับมิวโคซา ประกอบไปด้วย enterocyte ที่มีวิลไลยาวและจำนวนมากที่พับซ้อนกันไปมา และพบลักษณะเช่นนี้ในปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 4-7 และ 9-11 ในขณะที่ปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 2, 3, 8 และ 12 ในชั้นมิวโคซา มีวิลไลมีจำนวนน้อยและขนาดลดลง (ภาพที่ 27 และ 28) ซึ่งความแตกต่างนี้มีความสัมพันธ์โดยตรงกับการเจริญเติบโต ส่วนลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของไส้ติ่งของปลาที่ได้รับอาหารแต่ละสูตร พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันมากนัก (ภาพที่ 26)



ภาพที่ 26 ภาพตัดขวางของเนื้อเยื่อไส้ติ่งของปลากะพงขาวชุดการทดลองที่ 1, 2, 6 และ 12 (ก-ง ตามลำดับ) ที่ได้รับอาหารสูตรอ้างอิง อาหารสูตรควบคุม อาหารสูตรพื้นฐานมีการเสริมเมไธโอนีนในรูปแบบ *DL*-met ที่ระดับ 0.54 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร และอาหารสูตรพื้นฐานมีการเสริมเมไธโอนีนในรูปแบบ MetMet ที่ระดับ 0.72 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร ตามลำดับ เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์; M: ชั้นมิวโคซา, SM: ชั้นซับมิวโคซา, S: ชั้นเซอโรซา (H&E, 4X)



ภาพที่ 27 ภาพตัดขวางของเนื้อเยื่อลำไส้ชั้นมิวโคซาของปลากะพงขาวชุดการทดลองที่ 1-6 (ก-ฉ ตามลำดับ) ที่ได้รับอาหารสูตรอ้างอิง อาหารสูตรควบคุมและอาหารสูตรพื้นฐานมีการเสริมเมไธโอนีนในรูปแบบ *DL*-met ที่ระดับ 0.09, 0.18, 0.36 และ 0.54 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร ตามลำดับ เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ (H&E, 10X)



ภาพที่ 28 ภาพตัดขวางของเนื้อเยื่อลำไส้ชั้นมิวโคซาของปลากะพงขาวชุดการทดลองที่ 7-12 (ก-ฉ ตามลำดับ) ที่ได้รับอาหารสูตรพื้นฐานมีการเสริมเมไธโอนีนในรูปแบบ *DL*-met ที่ระดับ 0.72 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร และอาหารสูตรพื้นฐานมีการเสริมเมไธโอนีนในรูปแบบ MetMet 0.09, 0.18, 0.36, 0.54 และ 0.72 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร ตามลำดับ เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ (H&E, 10X)

4.7 **คุณภาพน้ำในตู้ทดลอง**

ผลการวิเคราะห์คุณภาพน้ำตลอดการทดลองพบว่า มีอุณหภูมิอยู่ในช่วง 27-29 องศาเซลเซียส ปริมาณแอมโมเนีย 0.07-0.12 มิลลิกรัม/ลิตร และปริมาณไนไตรท์ (NO_2) 0.83-1.00 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งแต่ละพารามิเตอร์อยู่ในช่วงที่เหมาะสม เนื่องจากมีการเปลี่ยนถ่ายน้ำเป็นประจำทุกวัน

บทที่ 5

บทวิจารณ์

พฤติกรรมการกินอาหารของปลากะพงขาวในระหว่างการทดลอง

จากการสังเกตพฤติกรรมการกินอาหารของปลาในระหว่างการทดลองพบว่า วันแรกของการให้อาหารทดลองทั้ง 12 สูตร ปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 2-12 ไม่กินอาหาร โดยเมื่อกินแล้วจะคายออกมา แต่หลังจากนั้นในวันที่ 2-4 ปลามีการยอมรับอาหารมากขึ้น เมื่อเข้าสู่วันที่ 5 ปลามีการยอมรับอาหาร 100 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาณอาหารที่ปลากินมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามระดับของเมไธโอนีนที่เสริมในอาหาร อย่างไรก็ตามมีปลาบางตัวที่ยังไม่ยอมรับอาหารจึงทำให้ปลามีลักษณะผอมแห้ง แตกต่างจากปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 1 ที่ยอมรับอาหาร 100 เปอร์เซ็นต์ ตั้งแต่วันแรกของการให้อาหารทดลอง ทั้งนี้เนื่องจากอาหารสูตรที่ 1 มีปลาป่นเป็นวัตถุดิบโปรตีนหลักจึงทำให้มีกลิ่นและรสที่ตรงกับความต้องการของปลา (Nguyen and Davis, 2009) มากกว่าอาหารสูตรทดลองอื่นๆ ที่มีกากถั่วเหลืองและเนื้อป่นเป็นวัตถุดิบโปรตีนหลัก ทั้งนี้เนื่องจากถั่วเหลืองมีสารที่ทำให้อาหารมีกลิ่นหรือรสเหม็นเขียว (green beany flavour) ทำให้อาหารทดลองที่มีกากถั่วเหลืองเป็นองค์ประกอบในปริมาณมากมีรสชาติไม่ชวนกิน (มะลิ และคณะ, 2539) นอกจากนี้ปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 2-12 ยังมีพฤติกรรมก้าวร้าว มักว่ายน้ำไล่กัดกันเป็นประจำ จากพฤติกรรมการกินอาหารของปลาข้างต้นแสดงให้เห็นว่าวัตถุดิบที่เป็นส่วนประกอบในอาหารโดยเฉพาะอย่างยิ่งวัตถุดิบโปรตีนหลักมีผลต่อน้ำหนักอาหารที่ปลากิน

ระดับของเมไธโอนีนที่เหมาะสมในอาหารที่มีการทดแทนปลาป่นด้วยกากถั่วเหลืองสกัดน้ำมันป่น

เมไธโอนีนคือหนึ่งในกรดอะมิโนที่มีอยู่อย่างจำกัดในอาหารปลาและสัตว์น้ำชนิดต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งอาหารที่มีวัตถุดิบพืช เช่น กากถั่วเหลือง เป็นองค์ประกอบในปริมาณมาก (Coloso *et al*., 1999) โดยรูปแบบของเมไธโอนีนที่ใช้แพร่หลายในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์น้ำ ประกอบด้วยเมไธโอนีนบริสุทธิ์ 99 เปอร์เซ็นต์ (Kalbande, 2009; Kies *et al*., 1975) ซึ่ง

MetMet เป็นเมไธโอนีนรูปแบบใหม่ที่ผลิตโดยบริษัท EVONIK ประเทศเยอรมนี ประกอบด้วยเมไธโอนีนบริสุทธิ์ 96 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำเมไธโอนีนทั้ง 2 รูปแบบมาเสริมในอาหารทดลองที่ระดับแตกต่างกัน 5 ระดับ ทำให้มีเมไธโอนีนรวมในอาหารเท่ากับ 7.68-14.11 กรัม/กิโลกรัม ส่วนอาหารสูตรที่ 1 เป็นอาหารสูตรอ้างอิงที่ใช้ปลาป่นเป็นวัตถุดิบโปรตีนหลัก มีปริมาณเมไธโอนีนที่เป็นองค์ประกอบในอาหารอย่างเพียงพอคือ 11.40 กรัม/กิโลกรัมของอาหาร โดยอาหารสูตรที่ 2 ซึ่งเป็นสูตรควบคุมที่มีกากถั่วเหลืองและเนื้อป่นเป็นแหล่งโปรตีนหลัก มีปริมาณเมไธโอนีนที่เป็นองค์ประกอบในอาหารเพียง 6.40 กรัม/กิโลกรัมของอาหาร มีระดับต่ำกว่าระดับความต้องการของปลากะพงขาวระยะวัยรุ่นที่ต้องการเมไธโอนีนในอาหารเท่ากับ 10.30 กรัม/กิโลกรัมของอาหาร (บนฐานน้ำหนักแห้ง) (Coloso *et al*., 1999)

การเสริมเมไธโอนีนในอาหารในระดับที่ทำให้อาหารมีปริมาณเมไธโอนีนรวมเพียงพอต่อความต้องการจะทำให้ปลามีการเจริญเติบโตสูงสุด เช่น Ma และคณะ (2013) ได้ศึกษาระดับความต้องการเมไธโอนีนในอาหารสำหรับปลาลิ้นหมาระยะวัยรุ่น ซึ่งพบว่า หากในอาหารมีระดับเมไธโอนีนไม่เพียงพอจะทำให้อัตราการเจริญเติบโตของปลาต่ำกว่าปลาที่ได้รับเมไธโอนีนในอาหารอย่างเพียงพอ โดยระดับการเสริมที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับความต้องการเมไธโอนีนของปลาหรือสัตว์น้ำแต่ละชนิดและปริมาณเมไธโอนีนรวมที่มีอยู่ในวัตถุดิบโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของอาหาร จากการทดลองครั้งนี้พบว่า ปลากะพงขาวระยะวัยรุ่นที่ได้รับอาหารสูตรที่ 2 ซึ่งมีระดับของเมไธโอนีนในอาหารต่ำที่สุดเท่ากับ 6.40 กรัม/กิโลกรัมของอาหาร มีการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหารต่ำกว่าปลาที่ได้รับอาหารสูตรอื่นที่มีระดับของเมไธโอนีนสูงกว่า สอดคล้องกับการศึกษาการเสริมเมไธโอนีนในอาหารปลาชนิดอื่นๆ เช่น ปลา catfish *Silurus meridionalis* (Ai and Xie, 2005) ปลาดุกแอฟริกา *C. gariepinus* (Davies and Ezenwa, 2010) ปลา bream *Abramis brama orientalis* (Ghomi and Alizadehnajd, 2012) และปลาน้ำจืดอื่นๆ (Khalil *et al*., 2010)

เมื่อวิเคราะห์ประสิทธิภาพการใช้อาหารพบว่า ปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 6 มีประสิทธิภาพการใช้อาหารสูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารทดลองอื่นๆ โดยสังเกตได้จากค่าการนำโปรตีนไปใช้ประโยชน์และประสิทธิภาพการใช้โปรตีน ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ปลาสามารถนำอาหารไปใช้ในการสร้างเนื้อเยื่อได้ดีที่สุด แม้ว่าปลาที่ได้รับอาหารสูตรอ้างอิงจะมีอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อต่ำที่สุด แต่อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อก็ไม่ได้เป็นผลของโปรตีนหรือกรดอะมิโนเพียงอย่างเดียว แต่อาจเกิดจากสารอาหารอื่นๆ เช่น ไขมัน คาร์โบไฮเดรต วิตามินและแร่ธาตุ (นัยนา, 2553)

อย่างไรก็ตาม เมื่อปลาได้รับอาหารที่เสริมเมไธโอนีนในระดับ 0.72 เปอร์เซ็นต์ ทั้ง 2 รูปแบบ (สูตรที่ 7 และ 12) พบว่า ปลามีประสิทธิภาพการใช้โปรตีนและการนำโปรตีนไปใช้ประโยชน์ลดลง ทั้งนี้อาจมีสาเหตุจากการได้รับเมไธโอนีนมากเกินความต้องการ ทำให้กรดอะมิโนที่ปลาได้รับไม่สมดุล จึงเกิดการเปลี่ยนกรดอะมิโนอิสระโดยกระบวนการเมแทบอลิซึมเป็นไขมันหรือไกลโคเจน ซึ่งสังเกตได้จากปริมาณไขมันในซากปลาหลังทดลองพบว่า ปลาที่ได้รับอาหารที่เสริมเมไธโอนีนทั้ง 2 รูปแบบในระดับ 0.54 เปอร์เซ็นต์ (สูตรที่ 6 และ 11) ซึ่งเป็นระดับที่มีปริมาณเมไธโอนีนใกล้เคียงกับความต้องการของปลามีปริมาณไขมันในซากปลาต่ำกว่าปลาที่ได้รับอาหารที่เสริมเมไธโอนีนทั้ง 2 รูปแบบในระดับ 0.72 เปอร์เซ็นต์

สำหรับปริมาณกรดอะมิโนที่มีในซากปลาหลังทดลองพบว่า มีความสอดคล้องกับปริมาณเมไธโอนีนในอาหารที่เพิ่มขึ้น โดยปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 6 ซึ่งระดับการนำโปรตีนไปใช้ประโยชน์ในการสร้างเนื้อเยื่อได้ดีที่สุด มีปริมาณกรดอะมิโนทั้งชนิดที่จำเป็นและไม่จำเป็นเกือบทุกชนิด (ยกเว้นทริปโตเฟนและเซอรีน) สูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารสูตรอื่นๆ

อย่างไรก็ตามปลาที่ได้รับอาหารที่มีกากถั่วเหลืองเป็นวัตถุดิบโปรตีนหลักในปริมาณสูงในอาหาร ทำให้ปลาได้รับสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตไม่ครบถ้วนและเพียงพอ ปลาจะทดแทนสารอาหารที่จำเป็นเหล่านั้นโดยการเพิ่มปริมาณอาหารที่กินเพื่อให้ได้รับสารอาหารครบถ้วนและเพียงพอต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมของร่างกาย (Heikkinen *et al*., 2006) ด้วยเหตุนี้จึงทำให้ปลาที่ได้รับอาหารทดลองที่มีสารอาหารจำเป็นในระดับต่ำ เช่น ปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 2 มีปริมาณอาหารที่กินอาจไม่แตกต่างจากปลาที่ได้รับอาหารทดลองอื่นมาก แต่จะทำให้อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อของปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 2 มีค่าสูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารสูตรอ้างอิง (Cao *et al*., 2011) ในปลากินเนื้อ เช่น ปลาแซลมอน พบว่า การใช้วัตถุดิบกากถั่วเหลืองในอาหารมีปริมาณสูงสุดที่แนะนำคือ 20-30 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร ซึ่งหากใช้กากถั่วเหลืองในปริมาณสูงกว่าระดับที่แนะนำนี้จะมีผลทำให้ประสิทธิภาพการใช้อาหารและการเจริญเติบโตของปลาลดลงเนื่องจากสารต้านโภชนะบางชนิด แต่อย่างไรก็ตามสารต้านโภชนะในกากถั่วเหลืองสามารถใช้วิธีการทางชีวภาพและกายภาพในการลดปริมาณลงได้ เช่น การใช้ความร้อนเพื่อทำลายสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน เป็นต้น (Heikkinen *et al*., 2006)

สำหรับกิจกรรมของเอนไซม์ลิวซีนอะมิโนเปปทิเดส พบว่ามีความสัมพันธ์กับระดับการเสริมเมไธโอนีนในอาหาร โดยระดับกิจกรรมของเอนไซม์มีการเพิ่มขึ้นตามระดับการเสริมเมไธโอนีนในอาหารที่เพิ่มขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากเอนไซม์ลิวซีนอะมิโนเปปทิเดส เป็นเอนไซม์ที่มีหน้าที่สำคัญในการปล่อยกรดอะมิโนชนิดลิวซีน อาร์จินีนและเมไธโอนีนที่ตำแหน่งปลายสายของเปป-

ไทด์ ซึ่งเป็นการย่อยขั้นสุดท้ายก่อนการดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือด โดยเป็นเอนไซม์ชนิดหลักที่พบบริเวณไมโครวิลไลของลำไส้ (Silva *et al*., 2010) ดังนั้นเมื่อปลาได้รับเมไธโอนีนจากอาหารในปริมาณสูงขึ้น นั่นคือมีซับสเตรทหรือเมไธโอนีนที่ถูกปล่อยเพิ่มมากขึ้นจึงทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ลิวซีนอะมิโนเปปทิเดสสูงขึ้นด้วย

ส่วนกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสพบว่า ปลาที่ได้รับอาหารสูตรอ้างอิงมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด ในลำไส้ปลาที่ได้รับอาหารที่เสริมเมไธโอนีนแบบ *DL*-met มีแนวโน้มกิจกรรมของเอนไซม์ลดลงตามระดับของเมไธโอนีนในอาหารที่เพิ่มสูงขึ้น แต่ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและระดับของเมไธโอนีนแบบ MetMet ส่วนในไส้ติ่งของปลาที่ได้รับอาหารที่เสริมด้วยเมไธโอนีนทั้งสองรูปแบบพบว่า กิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นหรือลดลงตามปริมาณอาหารที่ปลากิน เนื่องจากเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสเป็นเอนไซม์ที่มีหน้าที่สำคัญในการแยกหมู่ฟอสเฟตออกจากสารประกอบ เช่น ดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอและนิวคลีโอไทด์ และทำหน้าที่ในการดูดซึมสารอาหารและขนส่งสารอาหารผ่านเนื้อเยื่อลำไส้บริเวณขั้นมิวโคซาเข้าสู่เส้นเลือด (Ribeiro *et al*., 2015) ดังนั้นกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส จึงอาจไม่ขึ้นอยู่กับระดับของเมไธโอนีนในอาหารเพียงอย่างเดียว แต่อาจขึ้นอยู่กับระดับกรดอะมิโนทั้งหมดที่ปลาได้รับจากอาหาร

เมื่อพิจารณาจากผลการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหารและกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหารแล้วพบว่า ระดับที่เหมาะสมในการเสริมกรดอะมิโนเมไธโอนีนในรูปแบบ *DL*-met และ MetMet คือระดับ 0.54 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร (บนฐานน้ำหนักสด) โดยในอาหารมีเมไธโอนีนเป็นองค์ประกอบ 0.64 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร (บนฐานน้ำหนักสด) ซึ่งทำให้ในอาหารนั้นมีเมไธโอนีนรวมเท่ากับ 1.17 และ 1.23 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร (บนฐานน้ำหนักสด) ตามลำดับ โดยมีซีสตีนเป็นองค์ประกอบในอาหารเท่ากับ 0.53-0.55 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร (บนฐานน้ำหนักสด) ใกล้เคียงกับการศึกษาระดับความต้องการเมไธโอนีนของปลากะพงขาวในอาหารโดย Coloso และคณะ (1999) พบว่า ปลากะพงขาวมีความต้องการเมไธโอนีนในอาหารเท่ากับ 1.03 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักอาหาร (บนฐานน้ำหนักแห้ง) หรือ 2.24 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนในอาหาร

อย่างไรก็ตาม Wilson และ Halver (1986; อ้างโดย Coloso *et al*., 1999) แนะนำว่า การศึกษาความต้องการกรดอะมิโนที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบดีกว่าการศึกษาระดับความต้องการเมไธโอนีนเพียงอย่างเดียว เนื่องจากเมไธโอนีนบางส่วนจะเปลี่ยนเป็นซีสตีน ดังนั้นหากในอาหารมีซีสตีนต่ำจะทำให้ดึงเมไธโอนีนมาใช้สูงขึ้น ซึ่งทำให้ความต้องการเมไธโอนีนในอาหารมากเกินความเป็นจริงที่ปลาต้องการ โดยปลาแต่ละชนิดมีความต้องการกรดอะมิโนที่มี

ซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบในอาหารที่ระดับแตกต่างกันดังตารางที่ 4 ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของปลาและส่วนประกอบของอาหาร (ชนิดของวัตถุดิบ ระดับโปรตีนในอาหาร ปริมาณซีสตีนและกรดอะมิโนชนิดอื่นๆ ในอาหาร) ที่ทำการศึกษาวิจัยนั้น รวมทั้งสภาพแวดล้อมในการทดลอง สำหรับการทดลองของ Coloso และคณะ (1999) เพื่อศึกษาปริมาณความต้องการกรดอะมิโนที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบในอาหารของปลากะพงขาวระยะวัยรุ่นที่มีน้ำหนักเริ่มต้น 2.59 ± 0.08 กรัม/ตัว โดยสร้างสูตรอาหารทดลองที่มีโปรตีนในอาหาร 46 เปอร์เซ็นต์ และมีซีสตีน 0.31 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร ศึกษาโดยใช้น้ำทะเล (seawater) ที่มีความเค็ม 31 พีพีที เป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ ซึ่งมีสภาพแวดล้อมในการเลี้ยงแตกต่างจากงานวิจัยนี้ ทำให้ค่าความต้องการเมไธโอนีนที่ได้จากการทดลองมีความแตกต่างกันเล็กน้อย โดย Coloso และคณะ (1999) พบว่า ปลากะพงขาวมีความต้องการกรดอะมิโนที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบในอาหารเท่ากับ 1.34 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักอาหาร (บนฐานน้ำหนักแห้ง) หรือ 2.90 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนในอาหาร ซึ่งเมื่อพิจารณาเป็นปริมาณเมไธโอนีนที่ความต้องการในอาหารแล้วพบว่า ปลากะพงขาวระยะวัยรุ่นมีความต้องการเท่ากับ 1.03 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักอาหาร (บนฐานน้ำหนักแห้ง) หรือ 2.24 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนในอาหาร

ในปลาที่มีพฤติกรรมการกินอาหารต่างชนิดกันพบว่า ระดับความต้องการเมไธโอนีนของปลากินเนื้อ (carnivorous) ปลากินเนื้อและพืช (omnivorous) และปลากินพืช (herbivorous) มีความต้องการที่ระดับแตกต่างกันไม่สามารถระบุปริมาณความต้องการสูง-ต่ำตามพฤติกรรมการกินอาหารได้ ในปลากินเนื้อ เช่น ปลา Atlantic salmon มีความต้องการเมไธโอนีนเท่ากับ 2.4 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนในอาหาร ปลากินพืช เช่น ปลานิลมีความต้องการเมไธโอนีนในช่วง 1.8-3.2 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนในอาหาร ทั้งนี้เนื่องจากในอาหารมีวัตถุดิบที่เป็นส่วนประกอบแตกต่างกัน รวมทั้งอาจมีสภาพแวดล้อมในการเลี้ยงแตกต่างกันด้วย เช่น Scott (1998) ศึกษาระดับความต้องการ *L*-met ในอาหารปลา Atlantic salmon (*S. salar*) ที่มีน้ำหนักเฉลี่ย 65.7 กรัม/ตัว โดยมีกากถั่วเหลืองป่นและปลาป่นเป็นแหล่งโปรตีนหลัก มีซีสตีนเป็นองค์ประกอบ 0.36 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร พบว่า ปลา Atlantic salmon มีความต้องการ *L*-met ในอาหารเท่ากับ 1.14 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร (2.85 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนในอาหาร) ในปลา yellow perch ระยะวัยรุ่นน้ำหนักเฉลี่ย 4.70 กรัม/ตัว พบว่า ในอาหารที่มีเคซีนและเจลาตินเป็นแหล่งวัตถุดิบโปรตีนหลัก มีซีสตีนเป็นองค์ประกอบเท่ากับ 0.03 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร ปลามีความต้องการ *L*-met ในอาหารเท่ากับ 1.0-1.1 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร นอกจากนี้ยังพบว่า ปริมาณของเมไธโอนีนต่ำกว่าระดับที่ปลาต้องการ จะทำให้ปลามีอัตรารอดต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับปลาที่ได้รับ

อาหารที่มีปลาป่นเป็นวัตถุดิบโปรตีนหลัก (Twibell *et al*., 2000) ในปลากะรังที่มีน้ำหนักเฉลี่ย 13 กรัม/ตัว ได้รับอาหารที่มีปลาป่นและกากถั่วเหลืองโปรตีนเข้มข้น (soy protein concentrate) เป็นวัตถุดิบโปรตีนหลักและเสริมด้วยกรดอะมิโนรูปผลึกเพื่อให้มีกรดอะมิโนเพียงพอต่อความต้องการ มีระดับของซีสตีนในอาหารเท่ากับ 0.26 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร พบว่า ปลามีความต้องการ *L*-met ในอาหารเท่ากับ 1.31 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร (2.73 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีน) (Luo *et al*., 2005) สำหรับปลานิลที่ได้รับอาหารที่มีกากถั่วเหลืองกะเทาะเปลือกและกากเมล็ดฝ้ายป่นเป็นวัตถุดิบโปรตีนหลัก โดยมีระดับของซีสตีนในอาหาร 0.45 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร พบว่า ปลามีความต้องการ *L*-met ในอาหารเท่ากับ 0.49 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร (1.75 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีน) (Nguyen and Davis, 2009)

นอกจากนี้ในปลาชนิดอื่นเช่น ปลาดุกแอฟริกา (*C. gariepinus*) ที่มีน้ำหนักเฉลี่ย 2.97 กรัม/ตัว มีต้องการเมไธโอนีนในอาหารที่ระดับ 2.97 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนในอาหาร (Ovie and Eze, 2009) ปลา rainbow trout (*O. mykiss*) ที่มีน้ำหนักเฉลี่ย 505 กรัม/ตัว มีความต้องการเมไธโอนีนในอาหาร 0.59-0.67 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร (Bae *et al*., 2011)

สำหรับปลาน้ำจืด เช่น ปลากดอเมริกัน (*Ictalurus punctatus*) และปลานิล (*O. niloticus*) มีความต้องการเมไธโอนีนในอาหารเท่ากับ 0.56 และ 0.75 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร ตามลำดับ (Harding *et al*., 1977; Schwarz *et al*., 1998) ต่างจากปลาทะเลที่พบว่า มีระดับความต้องการเมไธโอนีนในอาหารสูงกว่า เช่น ปลา hybrid striped bass (*Morone chrysops x M. saxatili*) ปลา red drum ปลา yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) ปลากะรังดอกแดง ปลาช่อนทะเลและปลา yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) มีความต้องการเมไธโอนีนเท่ากับ 1.00, 1.06, 1.11, 1.31, 1.19 และ 1.44 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีน ตามลำดับ (Keembiyehetty and Gatlin, 1993; Mai *et al*., 2006; Moon and Gatlin, 1991; Ruchimat *et al*., 1997; Zhou *et al*., 2006)

จากผลการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหารข้างต้นพบว่า ปลาที่ได้รับอาหารที่มีเมไธโอนีนต่ำกว่าระดับความต้องการของร่างกาย ทำให้ปลาที่ได้รับอาหารนั้นมีการเจริญเติบโตช้า ไม่อยากกินอาหาร มีประสิทธิภาพการใช้อาหารต่ำ และอาจทำให้เกิดอาการเฉพาะได้ เช่น ทำให้ปลามีอาการตาเป็นต้อ (ชุติมา, 2549; Ersdal *et al*., 2001) นอกจากนี้หากขาดเมไธโอนีนจะทำให้ปลาไม่สามารถสังเคราะห์โปรตีนได้ เนื่องจากเมไธโอนีนเป็นกรดอะมิโนตัวแรกในการสังเคราะห์โปรตีน อย่างไรก็ตามในอาหารที่มีปลาป่นเป็นองค์ประกอบระดับต่ำหรือไม่มีปลาป่นเป็นองค์ประกอบในอาหารซึ่งทำให้อาหารนั้นขาดเมไธโอนีน แต่หากมีการเสริมเมไธโอนีน

และกรดอะมิโนจำเป็นชนิดอื่นในอาหารจนมีปริมาณที่เพียงพอตามความต้องการของปลาจะทำให้ปลาที่ได้รับอาหารนี้มีการเจริญเติบโตเช่นเดียวกันกับปลาที่ได้รับอาหารที่มีปลาป่นเป็นวัตถุดิบโปรตีนหลัก (Boonyoung *et al*., 2012; Browdy *et al*., 2012; Cheng *et al*., 2003; Hu *et al*., 2008; Huai *et al*., 2010; Ma *et al*., 2013; Shen *et al*., 2007) ส่วนปลาที่ได้รับอาหารที่เสริมด้วยเมไธโอนีนที่สูงขึ้นเกินระดับความต้องการทำให้มีการเจริญเติบโตลดลง อาจเกิดได้จากเมไธ-โอนีนที่สูงจนก่อให้เกิดความเป็นพิษในตัวปลา จากการวิจัยในปลาบางชนิด เช่น ปลา milkfish และปลา catla fry ที่ระดับสูงกว่า 3.25 และ 3.75 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีน ตามลำดับ เช่นเดียวกับการศึกษาในปลาชนิดอื่นๆ เช่น ปลา mossambique tilapia fry และปลา European seabass (Coloso *et al*., 1999) ภาวะความเป็นพิษที่อาจเกิดขึ้นนี้เกิดจากการได้รับกรดอะมิโนมากเกินความต้องการทำให้กรดอะมิโนมีปริมาณไม่สมดุลกันและส่งผลต่อการใช้ประโยชน์ของกรดอะมิโนตัวอื่นได้

รูปแบบของเมไธโอนีนที่เหมาะสมที่ใช้ในอาหารสำหรับปลากะพงขาว

ในธรรมชาติเมไธโอนีนมีอยู่หลายรูปแบบ แต่มีเพียงรูปแบบเดียวที่สามารถใช้ในกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนและเมแทบอลิซึมต่างๆ คือ *L*-met (Goff and Gatlin, 2004) ดังนั้นเมื่อสิ่งมีชีวิต เช่น ปลา ได้รับอาหารที่มีเมไธโอนีนรูปแบบอื่น เช่น *D*-met, *DL*-met หรือ *DL*-MHA ปลาต้องใช้พลังงานส่วนหนึ่งในการเปลี่ยนเมไธโอนีนรูปแบบต่างๆ ให้อยู่ในรูปของ *L*-met เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

ในการทดลองครั้งนี้ พบว่าปลาที่ได้รับอาหารที่เสริมด้วย *DL*-met มีผลการเจริญเติบโตที่สูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารที่เสริมด้วย MetMet เมื่อเปรียบเทียบกับปลาที่ได้รับเมไธ-โอนีนที่ระดับเดียวกัน ทั้งนี้เนื่องจาก *DL*-met เป็นเมไธโอนีนที่เกิดจาก *D*-met กับ *L*-met ดังนั้นในการเปลี่ยนรูปแบบจาก *D*-met ไปเป็น *L*-met จึงใช้พลังงานต่ำกว่า MetMet ซึ่งเกิดจากการเชื่อมกันระหว่าง *DL*-met และ *DL*-met เพราะปลาต้องใช้พลังงานส่วนหนึ่งในการสลายพันธะที่เชื่อมระหว่าง *DL*-met 2 โมเลกุล และใช้พลังงานเพื่อการเปลี่ยนรูปแบบ จาก *D*-met ไปเป็น *L*-met อีกครั้ง เช่นเดียวกับการศึกษาของ Hoehler และคณะ (2005) ที่พบว่า การเปลี่ยน *DL*-met ไปเป็น *L*-met ใช้พลังงานเพียง 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับ *DL*-MHA-FA (ประกอบด้วยเมไธโอนีนบริสุทธิ์ 88 เปอร์เซ็นต์) จึงทำให้ปลาที่ได้รับอาหารที่เสริมด้วย *DL*-met มีการเจริญเติบโตที่ดีกว่าปลาที่ได้รับอาหารที่เสริมด้วย MetMet และสอดคล้องกับประสิทธิภาพการใช้อาหารของปลาเป็นอย่างยิ่ง

เนื่องจากปลาแต่ละชนิดมีพฤติกรรมการกินอาหารและสภาพแวดล้อมที่อาศัยแตกต่างกัน ดังนั้นปลาจึงมีความต้องการสารอาหารเพื่อการเจริญเติบโตในปริมาณและรูปแบบที่แตกต่างกัน นอกจากการศึกษารูปแบบที่เหมาะสมของเมไธโอนีนในอาหารของปลากะพงขาว 2 รูปแบบนี้แล้ว ยังมีงานวิจัยอื่นๆ ที่ศึกษารูปแบบที่เหมาะสมของเมไธโอนีนต่อการเจริญเติบโตของปลาชนิดต่างๆ เช่น ปลา red drum ปลา Jian carp (*C. carpio* var. Jian) ปลา grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) และกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) พบว่า สัตว์น้ำเหล่านี้สามารถนำดีแอล-ไดไฮดรอกซีเตตระเมทิลไธโอบิวทาโนอิกแอซิด (*DL*-2-hydroxy-4-methyl thiobutanoic acid: HMTBa) ไปใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึมเพื่อการเจริญเติบโตได้ดี โดยมีประสิทธิภาพมากกว่า 98 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับ *L*-met (Forster and Dominy, 2006; Goff and Gatlin, 2004; Xiao *et al*., 2011; Yang *et al*., 2010)

ในปลาชนิดอื่นๆ เช่น ปลาลิ้นหมา (*Psetta maxima*) ที่มีน้ำหนักเฉลี่ย 5.60 กรัม/ตัว มีความต้องการ HMTBa 1.49-1.56 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร (3.19-3.25 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนในอาหาร) หรือ *L*-met 1.58-1.59 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร (3.27-3.31 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนในอาหาร) เพื่อนำไปใช้ในกระบวนการเจริญเติบโต โดยปลาลิ้นหมาสามารถดูดซึม HMTBa เข้าไปในร่างกายได้เร็วกว่าเมไธโอนีนแบบ *L*-met นอกจากนี้ยังพบว่า HMTBa มีความสามารถในการต่อต้านหรือลดการเกิดปฏิกิริยาการออกซิเดชันของไขมันและโปรตีนในตัวปลาได้สูงกว่า *L*-met ดังนั้นจึงสามารถเลือกใช้เมไธโอนีนสำหรับปลาลิ้นหมาได้ทั้งสองรูปแบบโดยขึ้นอยู่กับต้นทุนที่ใช้ในการผลิต (Ma *et al*., 2013)

สำหรับปลา red drum ที่มีน้ำหนักเฉลี่ย 175 กรัม/ตัว พบว่า สามารถนำ *L*-met, *DL*-met, MHA เอ็นอะซิติล-ดีแอล-เมไธโอนีน (*N*-acetyl-*DL*-methionine) และอะลิเมท (Alimet^{TM}, เมไธโอนีนไฮดรอกซีแอนาลอกในรูปของเหลว) มาใช้เสริมในอาหารได้ทุกรูปแบบ (Goff and Gatlin, 2004) ในอาหารสำหรับปลานิลพบว่า ปลาที่ได้รับอาหารที่เสริม *DL*,*LD*-met ในอาหารที่ระดับ 0.30 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร ส่งผลให้ปลามีการเจริญเติบโตสูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับปลาที่ได้รับเมไธโอนีนแบบ *DL*-met และ *DL*,*LD*-met (Mohamed and Liebert, 2014) ส่วนในกุ้งขาวแวนนาไมพบว่า กุ้งที่ได้รับอาหารที่มีโอลิโกเมไธโอนีน (dipeptide to octapeptide: Omet) มีประสิทธิภาพการใช้อาหารที่สูงกว่ากุ้งที่ได้รับอาหารที่มี *L*-met จึงทำให้กุ้งมีการเจริญเติบโตที่ดีกว่า เนื่องจาก Omet มีความคงตัวในน้ำสูงกว่า *L*-met จึงทำให้ลดการสูญเสียสารอาหารในน้ำ (Gu *et al*., 2013) เนื่องจากเป็นรูปแบบที่มีความเหมาะสมกับพฤติกรรมการกินอาหารของกุ้งขาว ซึ่งเป็นสัตว์ที่กินอาหารแบบกัดแทะทำให้เม็ดอาหารแตกและสารอาหารละลายได้ง่าย (NRC,

2011) โดย Omet (เกิดจาก *DL*-met จำนวน 2-8 โมเลกุลเชื่อมต่อกัน) อาจมีโครงสร้างทางเคมีใกล้เคียงกับ MetMet ในงานวิจัยนี้ที่เกิดจาก *DL*-met จำนวน 2 โมเลกุลเชื่อมต่อกัน เพื่อประสิทธิภาพในการคงตัวในน้ำ แต่อย่างไรก็ตาม เนื่องจากปลากะพงขาวเป็นสัตว์ที่กินอาหารแบบฮุบทั้งเม็ดเช่นเดียวกับปลาชนิดอื่นๆ จึงอาจไม่จำเป็นต้องได้รับอาหารที่เสริมด้วยเมไธโอนีนที่มีความคงตัวในน้ำสูงเช่นเดียวกับสัตว์น้ำประเภทกัดแทะ เช่น กุ้ง ที่ต้องใช้อาหารที่มีความคงตัวในน้ำสูง ด้วยเหตุดังกล่าวรูปแบบของเมไธโอนีนที่เหมาะสมจึงเป็นสิ่งสำคัญที่ต้องคำนึงถึงเมื่อต้องการผลิตอาหารสำหรับสัตว์น้ำ

เนื่องจากเมไธโอนีนเป็นหนึ่งในกรดอะมิโนที่เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้จากวัตถุดิบประเภทโปรตีน เมื่อสัตว์น้ำได้รับแล้วจะนำไปใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึมต่างๆ ได้ทันที จึงทำให้มีขนาดโมเลกุลเล็กมากและสามารถละลายน้ำได้อย่างรวดเร็ว ดังนั้นนอกจากการศึกษารูปแบบของเมไธโอนีนที่เหมาะสมในอาหารปลาและสัตว์น้ำชนิดอื่นแล้ว ยังมีการศึกษาประสิทธิภาพการใช้สารเคลือบเมไธโอนีนที่เสริมในอาหารปลา เช่น ในอาหารสำหรับปลาช่อนทะเล (*Rachycentron canadum*) ระยะวัยรุ่นที่มีน้ำหนัก 5.7 กรัม/ตัว พบว่า การเสริม *L*-met รูปผลึก (crystalline *L*-Met) มีความเหมาะสมในการนำมาใช้เป็นแหล่งเมไธโอนีนในอาหารปลาช่อนทะเลมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับ *L*-met ที่เคลือบด้วยอะคริลิคเรซิน (acrylic-resin coated *L*-Met) *L*-met ที่เคลือบด้วยเซลลูโลสอะซิเตสพาเลส (cellulose-acetate-phthalate coated *L*-Met) และ *L*-met ที่เคลือบด้วยไตรออลมิทินโพลีไวนิลแอลกอฮอล์ (tripalmitinpolyvinyl alcohol coated *L*-Met) เนื่องจากเป็นรูปแบบของเมไธโอนีนที่ปลาสามารถดูดซึมนำไปใช้ได้ดีที่สุด ส่วน *L*-met ที่เคลือบด้วยสารต่างๆ นั้นจำเป็นต้องผ่านการย่อยสลายสารที่เคลือบก่อน เพื่อให้ได้ *L*-met บริสุทธิ์ (Chi *et al*., 2014) ด้วยเหตุนี้จึงอาจทำให้ปลาดูดซึมเมไธโอนีนแบบเคลือบได้ช้ากว่า ดังนั้นแม้ว่าการเคลือบผิวกรดอะมิโนนั้นจะช่วยให้เม็ดอาหารลดการสูญเสียเมไธโอนีนในน้ำ แต่ควรใช้สารเคลือบที่ย่อยได้ง่ายเพื่อให้ปลาสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในกระบวนการเมแทบอลิซึมได้อย่างเต็มที่และมีประสิทธิภาพ

การนำผลการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหารของปลากะพงขาวมาสร้างสมการเพื่อหาค่าชีวภาพพร้อมใช้ในพารามิเตอร์ต่างๆ ด้วยโปรแกรม SAS เพื่อเปรียบเทียบชีวภาพพร้อมใช้ของเมไธโอนีน 2 รูปแบบคือ *DL*-met และ MetMet พบว่า พารามิเตอร์ต่างๆ คือ น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะและอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อพบว่า MetMet มีชีวภาพพร้อมใช้คิดเป็น 76, 77 และ 117 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ *DL*-met แสดงว่าปลาสามารถนำ *DL*-met มาใช้ในการเจริญเติบโตได้ดีกว่าซึ่งสอดคล้องกับผลการ

เจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหารที่กล่าวมาข้างต้นแล้ว อย่างไรก็ตาม แม้ว่าปลากะพงขาวสามารถใช้ *DL*-met สำหรับการเจริญเติบโตได้ดีกว่า แต่ชีวภาพพร้อมใช้ของเมไธโอนีนทั้ง 2 รูปแบบในพารามิเตอร์ต่างๆ ทั้งน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะและอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อก็ไม่แตกต่างกันทางสถิติ เนื่องจากมีค่าอยู่ในช่วงของค่า Confidence limit คือ 43-109, 42-111 และ 50-184 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า ถึงแม้ว่าปลากะพงขาวจะใช้ *DL*-met ในการเจริญเติบโตได้ดีกว่า แต่ก็สามารถใช้เมไธโอนีนรูปแบบ MetMet ได้เช่นกัน ทั้งนี้การเลือกใช้อาจขึ้นอยู่กับกระบวนการและต้นทุนในการผลิตอาหาร

การศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของลำไส้และไส้ติ่งเป็นอีกพารามิเตอร์ที่นำมาใช้เป็นตัวชี้วัดการเจริญเติบโตของปลาที่ได้รับเมไธโอนีนระดับต่างๆ ได้ เนื่องจากไส้ติ่งและลำไส้เป็นอวัยวะที่สำคัญในการย่อยและดูดซึมอาหาร รวมทั้งการขนส่งสารอาหารสู่อวัยวะส่วนต่างๆ ในร่างกาย (Sweetman *et al*., 2008) โดยลำไส้ในปลาแต่ละชนิดมีความยาวที่แตกต่างกันและสัมพันธ์โดยตรงกับพฤติกรรมการกิน เช่น ปลากินเนื้อมักมีลำไส้สั้นกว่าปลากินพืช ปลากระดูกแข็งบางชนิดมีพื้นที่ผิวผนังลำไส้แบบเรียบ บางชนิดมีรอยพับหรือแบบโครงข่ายและบางชนิดมีส่วนที่ยื่นออกมาที่เรียกว่าวิลไล (Genten *et al*., 2009) ปลาบางชนิดมีไส้-ติ่งซึ่งทำหน้าที่ในการย่อยอาหารและทำให้อาหารอยู่ในลำไส้ได้นานขึ้นซึ่งปลาสามารถใช้ประโยชน์จากอาหารได้เต็มที่ สำหรับปลากะพงขาวพบว่า ผนังลำไส้มีรอยพับหรือรอยย่นและวิลไลกระจายทั่วไปตลอดความยาวลำไส้ เช่นเดียวกับการศึกษาของ Carrassón และคณะ (2006) ที่พบว่า ลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาทางเดินอาหารของปลา common dentex บริเวณชั้นมิวโคซามีลักษณะเป็นรอยย่นตามแนวยาวจำนวนมากและมีไมโครวิลไลกระจายอยู่ทั่วไปบนเนื้อผิว สำหรับไส้ติ่งในปลากะพงขาวพบที่บริเวณส่วนปลายของกระเพาะอาหารหรือส่วนต้นของลำไส้ปลา มีลักษณะเป็นท่อปลายตันคล้ายนิ้วมือพบส่วนใหญ่มีจำนวน 5 อัน เมื่อศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์พบว่า ไส้ติ่งประกอบด้วยเนื้อเยื่อชั้นเซอโรซาที่มีชั้นกล้ามเนื้อวงและกล้ามเนื้อตามยาว มีชั้นซับมิวโคซาและชั้นมิวโคซา รวมทั้งพบวิลไลอยู่ทั่วไปตลอดความยาวไส้ติ่งเช่นเดียวกับลำไส้ปลา ทั้งนี้เนื่องจากไส้ติ่งมีหน้าที่ในการย่อยและดูดซึมเช่นเดียวกับลำไส้ (Cao *et al*., 2011; Mumford *et al*., 2007) จึงทำให้มีลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาที่คล้ายคลึงกัน

ในการศึกษาครั้งนี้ ปลาที่ได้รับอาหารที่มีกากถั่วเหลืองเป็นส่วนประกอบในปริมาณสูง (41 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร) และมีปริมาณกรดอะมิโนเมไธโอนีนต่ำกว่าระดับความต้องการของปลาส่งผลทำให้มีพัฒนาการทางจุลกายวิภาคศาสตร์น้อยกว่าปลาที่ได้รับอาหารที่มีปลาป่นเป็นโปรตีนหลักและทำให้วิลไลมีลักษณะหดสั้นลงเมื่อเทียบกับปลาที่ได้รับอาหารทดลอง

สูตรอื่น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของมะลิ และคณะ (2539) ที่พบว่า วัตถุดิบถั่วเหลืองดิบที่ผ่านการแช่น้ำมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่ลำไส้ส่วนต้นอย่างเห็นได้ชัดคือ enterocyte ในชั้นมิวโคซามี digestive vacuole เล็กลงและน้อยลง ไมโครวิลไลสั้นลง และยังพบว่าบริเวณเซลล์ชั้นมิวโคซามี lamina propia เพิ่มจำนวนมากขึ้นกว่าปลาที่ได้รับอาหารที่มีปลาป่นเป็นวัตถุดิบหลัก นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับการทดลองในปลาแซลมอนที่พบว่า ลำไส้ตอนท้ายมีพื้นที่ผิวสัมผัสลดน้อยลงเช่นกันในปลาที่ได้รับอาหารที่มีกากถั่วเหลืองในปริมาณสูง (Van den Ingh *et al*., 1991) ทั้งนี้อาจเกิดจากสารต้านโภชนะที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ลำไส้และอาจเกิดจากสารพิษอื่นที่มีในถั่วเหลือง เช่น soybean agglutinin หรือ lectin อีกด้วย โดยระดับของสารต้านโภชนะที่สูงมีผลต่อการเจริญเติบโตของปลา ทำให้การเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนลดลง (มะลิ และคณะ, 2539) จากการทดลองเห็นได้ชัดว่า ลักษณะของวิลไลภายในลำไส้ปลาที่ได้รับอาหารแต่ละสูตรมีความยาวและลักษณะรอยย่นแตกต่างกัน โดยมีลักษณะของรอยย่นที่เพิ่มมากขึ้นตามระดับของเมไธโอนีนที่เสริมลงไปในอาหาร สอดคล้องโดยตรงกับผลการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหาร เนื่องจากลำไส้ส่วนต้นของปลามีหน้าที่หลัก 4 ประการคือ 1.) การขนส่งสารอาหารจากกระเพาะอาหารสู่ลำไส้ส่วนท้าย 2.) การย่อยอาหารให้มีขนาดโมเลกุลเล็กด้วยเอนไซม์ที่ผลิตจากผนังลำไส้เองและจากต่อมต่างๆ 3.) การดูดซึมผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้จากการย่อยเข้าสู่เส้นเลือดโดยผ่านผนังลำไส้ และ 4.) กระตุ้นการผลิตและหลั่งฮอร์โมนบางชนิด เช่น secretin (Mumford *et al*., 2007) เมื่อพื้นที่ผิวสัมผัสในการดูดซึมสารอาหารลดน้อยลง จึงทำให้การย่อยและการนำผลิตภัณฑ์สุดท้ายหรือสารอาหารที่ได้จากการย่อยไปใช้ประโยชน์ในการเจริญเติบโตลดน้อยลงด้วย สังเกตได้จากกิจกรรมของเอนไซม์ลิวซีนอะ-มิโนเปปทิเดสซึ่งทำหน้าที่ย่อยสลายเปปไทด์ที่ตำแหน่งกรดอะมิโนชนิดเมไธโอนีนพบว่า มีแนวโน้มมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มสูงขึ้นตามระดับของเมไธโอนีนที่ได้รับจากอาหาร ทั้งนี้เนื่องจากลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของลำไส้ปลามีความสอดคล้องโดยตรงกับการย่อยอาหารและอุปนิสัยในการกินอาหารของปลา ดังนั้นเมื่อปลาได้รับสารอาหารที่จำเป็นอย่างครบถ้วนในปริมาณที่เหมาะสมเช่นเดียวกับปลาที่ได้รับอาหารที่มีปลาป่นเป็นวัตถุดิบหลัก (สูตรอ้างอิง) จะทำให้ปลามีการพัฒนาของลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของลำไส้ที่ดีและมีประสิทธิภาพในการย่อยและดูดซึมอาหารได้อย่างเต็มที่ ส่งผลให้มีการเจริญเติบโตที่ดีตามลำดับ อย่างไรก็ตามนอกจากปัจจัยทางด้านอาหารแล้ว ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและจุลกายวิภาคศาสตร์ของปลาจะมีความแตกต่างกันตามปัจจัยของสิ่งแวดล้อมและปัจจัยทางชีวภาพ เช่น อุปนิสัยการกินอาหาร อายุของปลาและรูปร่าง เป็นต้น (Cao *et al*., 2011)

บทที่ 6

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาผลของเมไธโอนีนในอาหารที่มีแหล่งโปรตีนทดแทนปลาป่นต่อการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหาร กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหารและลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของปลากะพงขาวสามารถสรุปผลได้ดังนี้

1. รูปแบบของเมไธโอนีนที่มีความเหมาะสมต่อการใช้ประโยชน์ในอาหารเพื่อการเจริญเติบโตของปลากะพงขาว คือ *DL*-met เนื่องจากปลาที่ได้รับอาหารที่เสริมด้วยเมไธโอนีนแบบ *DL*-met มีการเจริญเติบโตดีและมีประสิทธิภาพการใช้อาหารสูงกว่าปลาที่ได้รับเมไธโอนีนแบบ MetMet แต่อย่างไรก็ตามเมไธโอนีนทั้ง 2 รูปแบบให้ผลการเจริญเติบโตไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีระดับที่เหมาะสมในอาหารแตกต่างกันคือ *DL*-met ที่ระดับ 1.17 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร (บนพื้นฐานน้ำหนักสด) และ MetMet ที่ระดับ 1.23 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร (บนพื้นฐานน้ำหนักสด) เนื่องจากเมไธโอนีนทั้ง 2 รูปแบบมีโครงสร้างทางเคมีแตกต่างกัน โดย *DL*-met เกิดจากการเชื่อมพันธะต่อกันระหว่าง *D*-met และ *L*-met ส่วน MetMet เกิดจาก *DL*-met จำนวน 2 โมเลกุลมาเชื่อมพันธะต่อกัน

2. ปลากะพงขาวมีประสิทธิภาพการใช้อาหารที่ดี เมื่อได้รับอาหารที่มีปริมาณเมไธโอนีนเพียงพอต่อความต้องการของร่างกายเพื่อนำไปใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึม ส่งผลโดยตรงต่อบรัชบอร์เดอร์เอนไซม์ เช่น ลิวซีนอะมิโนเปปทิเดส ที่มีกิจกรรมการทำงานสูงเมื่อได้รับอาหารที่มีเมไธโอนีนในระดับที่เพียงพอต่อการเจริญเติบโต จึงส่งผลให้ปลามีประสิทธิภาพการใช้อาหารเต็มที่และทำให้มีการเจริญเติบโตที่ดี

3. ลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของปลามีความสอดคล้องกับการเจริญเติบโตอย่างเด่นชัด โดยปลาที่มีการเจริญเติบโตดีมีลักษณะรอยย่นที่ผนังลำไส้จำนวนมากเมื่อเปรียบเทียบกับปลาที่เจริญเติบโตน้อยกว่า แสดงให้เห็นว่าอาหารมีผลโดยตรงต่อการพัฒนาลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของลำไส้ปลา

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในส่วนของแอมโมเนียในพลาสมา เพื่อทราบปริมาณกรดอะมิโนที่นำไปใช้ประโยชน์จริงและกรดอะมิโนที่ขับทิ้งไปเนื่องจากปริมาณสูงกว่าระดับความต้องการ

2. เนื่องจากปลากะพงขาวที่อาศัยในน้ำจืดและน้ำเค็มมีความต้องการสารอาหารในระดับที่แตกต่างกัน จึงควรมีการศึกษาผลของเมไธโอนีน ระดับและรูปแบบของเมไธโอนีนที่เหมาะสมเมื่อเลี้ยงปลากะพงขาวในระบบน้ำเค็มด้วย

3. ปลากะพงขาวมีความสามารถใช้เมไธโอนีนแต่ละรูปแบบแตกต่างกัน ประกอบกับเมไธโอนีนสังเคราะห์ที่ผลิตเพื่อเสริมในอาหารสัตว์มีหลายรูปแบบ จึงควรศึกษาผลของเมไธ-โอนีนรูปแบบอื่นเพิ่มเติม เพื่อการเลือกใช้รูปแบบของเมไธโอนีนที่เหมาะสมต่อการเจริญของปลากะพงขาวมากที่สุด

เอกสารอ้างอิง

กรมประมง. มปป. การเพาะเลี้ยงปลากะพงขาว. กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ.

กลุ่มวิจัยและวิเคราะห์สถิติการประมง. 2553. แผนแม่บทการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของประเทศไทย (ฉบับร่าง) ปี พ.ศ. 2545-2549. กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ.

การุณ ทองประจุแก้ว และอุทัยวรรณ โกวิทวที. 2555. เอนไซม์ย่อยอาหารกับการพัฒนาอาหารเพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ. วารสารวิชาการพระจอมเกล้าพระนครเหนือ 22: 710-720.

จรัญ ปัตตาโน. 2554. Alkaline phosphatase. เข้าถึงได้จาก http://www.medtechzone.com/data/chem/ALP.php (เข้าถึงเมื่อ 15 ตุลาคม 2557)

จุฑามาศ นรชาญ, ประทักษ์ ตาบทิพย์วรรณ, อรพิน จินตสถาพร และส่งศรี มหาสวัสดิ์. 2545. การใช้เนื้อหอยเชอรี่บดแห้งทดแทนปลาป่นในอาหารปลานิล. การประชุมทางวิชาการครั้งที่ 40 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สาขาสัตว์ สาขาสัตวแพทย์ สาขาประมง 4-7 กุมภาพันธ์ 2545.

ชุติมา ตันติกิตติ. 2549. อาหารสัตว์น้ำขั้นสูง. ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. สงขลา.

ธนาภรณ์ จิตตปาลพงศ์. 2557. การสร้างสูตรอาหารสัตว์น้ำและสูตรอาหารสัตว์น้ำเศรษฐกิจ. กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ.

นเรศ กิจจาพัฒนพันธ์. 2559. สินค้าปลากะพงขาวและผลิตภัณฑ์ ประจำเดือนมิถุนายน 2559. ส่วนเศรษฐกิจการประมง, กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ.

นฤมล อัศวเกศมณี. 2550. อาหารและการให้อาหารปลา. คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา. สงขลา.

นัยนา บุญทวียุวัฒน์. 2553. ชีวเคมีทางโภชนาการ. ภาควิชาอนามัยชุมชน คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. กรุงเทพฯ.

นิฮารีฟัร เจษฎาภา. 2554. การทดแทนโปรตีนจากปลาป่นด้วยกากถั่วเหลืองต่อการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหารองค์ประกอบทางเคมีและเนื้อเยื่อของระบบทางเดินอาหารในปลาดุกรำพัน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวาริชศาสตร์. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. สงขลา.

บัญชา ทองที, เทพรัตน์ อึ้งเศรษฐพันธ์, กระสินธุ์ หังสพฤกษ์ และสุฤทธิ์ สมบูรณ์ชัย. 2544. การใช้หอยเชอรี่อบแห้งบดทดแทนปลาป่นในสูตรอาหารปลาดุกบิ๊กอุย. วารสารการประมง 6: 497-502.

มะลิ บุณยรัตผลิน, ประวิทย์ สุรนีนาถ และธำมรงค์ ตันภิบาล. 2539. การแทนที่ปลาป่นด้วยผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองชนิดต่างๆ ในอาหารปลากะพงขาว. สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง. สงขลา.

ยุพร พืชกมุทร. 2550. การใช้ประโยชน์จากกากถั่วเหลือง. วารสารพระจอมเกล้าลาดกระบัง 2: 34-41.

วัฒนา วัฒนกุล และอุไรวรรณ วัฒนกุล. 2554. ผลของการใช้น้ำนึ่งปลาเป็นส่วนผสมในอาหารเลี้ยงปลาหมอไทย. วารสารวิชาการและวิจัย มทร.พระนคร ฉบับพิเศษ. การประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล ครั้งที่ 5.

วิชญะ ทองตะโก. 2550. การควบคุมการแสดงออกของยีน. เข้าถึงได้จาก http://www.vcharkarn.com/vblog /33469/3 (เข้าถึงเมื่อ 15 ตุลาคม 2557).

วิมล เหมะจันทร. 2528. ชีววิทยาของปลา. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ.

วีรพงศ์ วุฒิพันธ์ชัย. 2536. อาหารปลา. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์. กรุงเทพฯ.

เวียง เชื้อโพธิ์หัก. 2543. โภชนศาสตร์ปลาและการให้อาหารปลา. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

ศูนย์พัฒนาเทคโนโลยีอาหารสัตว์น้ำ. 2554. การผลิตอาหารสัตว์น้ำระดับฟาร์ม. ฝ่ายสนับสนุนวิชาการ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. เอกสารวิชาการ 1/2554.

ศูนย์พัฒนาประมงพื้นที่ลุ่มน้ำปากพนังอันเนื่องมาจากพระราชดำริ. 2557. ความรู้เกี่ยวกับการเลี้ยงสัตว์น้ำ. เข้าถึงได้จาก http://www. fisheries.go.th/cf-pak_panang (เข้าถึงเมื่อ 15 ตุลาคม 2557).

ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งเพชรบุรี. 2557. การเพาะเลี้ยงปลากะพงขาว. เข้าถึงได้จาก http://www.fisheries.go.th/cf-phetchaburi (เข้าถึงเมื่อ 15 พฤศจิกายน 2557).

ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งภูเก็ต. 2557. การเลี้ยงปลากะพงขาว *Lates calcarifer* (Bloch) ในกระชังขนาดใหญ่. สำนักวิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง, กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งระยอง. 2557. การเพาะเลี้ยงปลากะพงขาว. เข้าถึงได้จาก http://www.fisheries.go.th/cf-rayong (เข้าถึงเมื่อ 15 พฤศจิกายน 2557).

สถาบันวิจัยอาหารสัตว์น้ำจืด. มปป. แนวทางการลดต้นทุนอาหารสัตว์น้ำ. สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด, กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

สมาคมผู้ผลิตอาหารสัตว์ไทย. 2553. ปลาป่น. ธุรกิจอาหารสัตว์ 134: 25-68.

สมาคมผู้ผลิตอาหารสัตว์ไทย. 2557. ราคาวัตถุดิบอาหารสัตว์. เข้าถึงได้จาก http://www.thai-feedmill.com (เข้าถึงเมื่อ 28 พฤศจิกายน 2557).

สมาคมผู้ผลิตอาหารสัตว์ไทย. 2559. ราคาวัตถุดิบอาหารสัตว์. เข้าถึงได้จาก http://www.thai-feedmill.com (เข้าถึงเมื่อ 5 กรกฎาคม 2559).

สุทิน สมบูรณ์ และวิชิต เสมาชัย. 2547. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 42: สาขาประมง สาขาอุตสาหกรรมเกษตร. กรุงเทพฯ. หน้า 93-100.

สมปอง ธรรมศิริริกษ์. 2550. โครงสร้างและหน้าที่ของโปรตีน. ภาควิชาชีวเคมี มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น.

สร้อยแก้ว เอียงอุบล. 2555. ผลของชนิดและระดับของคาร์โบไฮเดรตต่อการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการย่อยอาหาร ประสิทธิภาพการใช้อาหารและกิจกรรมเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการใช้คาร์โบไฮเดรตในปลากะพงขาว (*Lates calcarifer* Bloch). วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวาริชศาสตร์. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. สงขลา.

สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร. 2555. การศึกษาเศรษฐกิจการผลิตการตลาดปลาป่น ระบบประกันคุณภาพ. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ.

อนุรักษ์ เขียวขจรเขต, อมรรัตน์ วันอังคาร, กุลยาภัสร์ วุฒิจารี, ณัฐมนตรี คงกระพันธ์ และณัฐพงศ์ วงศ์ใหญ่. 2555. การใช้ประโยชน์จากแหนแดงอบแห้งในอาหารปลานิลแดงแปลงเพศ (*Oreochromis niloticus* Linn.). แก่นเกษตร 40 ฉบับพิเศษ 2: 518-521.

อัตรา ไชยมงคล, มะลิ บุณยรัตผลิน, ชูศักดิ์ บริสุทธิ์ และสุจินต์ บุญช่วย. 2546. การใช้กากถั่วเหลืองสกัดน้ำมันแทนที่ปลาป่นในอาหารปลากะรังดอกแดง. บทคัดย่อ การสัมมนาวิชาการประมง ประจำปี 2546 วันที่ 7-9 กรกฎาคม 2546. กรมประมง หน้า 92.

Ai, Q. and Xie, X. 2005. Effects of replacement of fish meal by soybean meal and supplementation of methionine in fish meal/soybean meal-based diets on growth performance of the Southern catfish *Silurus meridionalis*. Journal of the World Aquaculture Society 36: 498-507.

Aladetohun, N.F. and Sogbesan, O.A. 2013. Utilization of blood meal as a protein ingredient from animal waste product in the diet of *Oreochromis niloticus*. International Journal of Fisheries and Aquaculture 5: 234-237.

Alam, M.S., Watanabe, W.O., Sullivan, K.B. and Rezek, T.C. 2012. Replacement of menhaden fish meal protein by solvent-extracted soybean meal protein in the diet of juvenile back seabass supplemented with or without squid meal, krill meal, methionine, and lysine. North American Journal of Aquaculture 74: 251–265.

Ambasankar, K., Ahamad Ali, S. and Syamadayal, J. 2009. Nutritional requirement of Asian seabass, *Lates calcarifer*. National Training on Cage Culture of Seabass held at CMFRI, Kochi 14-23 December 2009.

Anderson, A.J. 2003. Metabolic studies on carbohydrate utilization by barramundi and tilapia. In: Aquaculture Diet Development Subprogram: Ingredient Evaluation, pp. 120-134. Project 1996-391, Final Report to the Fisheries R&D Corporation, Canberra, Australia.

Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 1995. Official Methods of Analysis of Official Analytical Chemists International, 16th Edition. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.

Bae, J.Y., Ok, I.H., Lee, S., Hung, S.S.O., Min, T.S. and Bai, S.C. 2011. Re-evaluation of dietary methionine requirement by plasma methionine and ammonia concentrations in surgically modified rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. The Asian-Australasian Association of Animal Production Societies 24: 974-981.

Banaszkiewicz, T. 2011. Chapter 1: Nutritional Value of Soybean Meal. In El-Shemy, H.A. (ed.). Soybean and Nutrition. ISBN 978-953-307-536-5. Published: September 12, 2011 under CC BY-NC-SA 3.0 license.

Bancroft, J.D. 1975. Histochemical Techniques. 2nd Edition. Butterworths, London.

Binder, M. 2004. Synthesis methionine saves resources. Feed Mix 12: 32-34.

Boonyaratpalin, M. 1991. Nutritional studies on seabass (*Lates calcarifer*). In De Silva, S.S. (ed.) Fish Nutrition Research in Asia. Proceedings of the Fourth Asian Fish Nutrition Workshop. Asian Fisheries Society, Philippines. 33-41.

Boonyaratpalin, M. 1997. Nutrient requirements of marine food fish cultured in Southeast Asia. Aquaculture 151: 283-313.

Boonyaratpalin, M., Suraneiranat, P. and Tunpibal, T. 1998. Replacement of fish meal with various types of soybean products in diets for the Asian seabass, *Lates calcarifer*. Aquaculture 161: 67–78.

Boonyoung, S., Haga, Y. and Satoh, S. 2012. Preliminary study on effects of hydroxyl analog and taurine supplementation in a soy protein concentrate-based diet on the biological performance and amino acid composition of rainbow trout [*Oncorhynchus mykiss* (Walbaum)]. Aquaculture Research 44: 1339-1347.

Browdy, C.L., Bharadwaj, A.S., Venero, J.A. and Nunes, A.J.P. 2012. Supplementation with 2-hydroxy-4-(methylthio) butanoic acid (HMTBa) in low fish meal diets for the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture Nutrition 18: 432-440.

Buarque, D.S., Castro, P.F., Santos, F.M.S., Amaral, I.P.G., Oliveira, S.M., Alves, K.B., Carvalho, L.B. and Bezerra, R.S. 2010. Digestive proteinases and peptidases in the hepatopancreas of the southern brown shrimp (*Farfantepenaeus paulensis*) in two sub-adult stages. Aquaculture Nutrition 40: 861-870.

Buarque, D.S., Castro, P.F., Santos, F.M.S., Lemos, D., Carvalho, L.B. and Bezerra, R.S. 2009. Digestive peptidases and proteinases in the midgut gland of the pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). Aquaculture Research 40: 861-870.

Bureau, D.P. 2006. Rendered products in fish aquaculture feeds. In Meeker, D.L. (ed.). Essential Rendering. National Renderers Association, United States. 179-194.

Cao, X.J., Wang, W.M. and Song, F. 2011. Anatomical and histological characteristics of the intestine of the topmouth culture (*Culter alburnus*). Anatomia Histologia Embryologia Journal of Veterinary Medicine 40: 292-298.

Carrassón, M., Grau, A., Dopazo, L.R. and Crespo, S. 2006. A histological, histochemical and ultrastructural study of the digestive tract of *Dentex dentex* (Pisces, Sparidae). Histology and Histopathology 21: 579-593.

Catacutan, M.R. and Coloso, R.M. 1995. Effect of dietary protein to energy ratios on growth, survival and body composition of juvenile Asia 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.

Cavalheiro, J.M.O., De Souza, E.O. and Bora, P.S. 2007. Utilization of shrimp industry waste in the formulation of tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus) feed. Bioresource Technology 98: 602–606.

ChemNet. 2015. About 2-hydroxy-4-(methylthio)butyric acid. [online] http://www.chemnet.com/India/Products/2hydroxy4(methylthio)butyricacid/Suppliers-0-0.html. (เข้าถึงเมื่อ 25 เมษายน 2558).

Cheng, Z.J., Hardy, R.W. and Blair, M. 2003. Effects of supplementing methionine hydroxyl analogue in soybean meal and distiller's dried gain-based diets on the performance and nutrient retention of rainbow trout [*Oncorhynchus mykiss* (Walbaum)]. Aquaculture Research 34: 1303-1310.

Chi, S., Tan, B., Dong, X., Yang, Q. and Liu, H. 2014. Effects of supplemental coated of crystalling methionine in low-fishmeal diet on the growth performance and body composition of juvenile cobia *Rachycentron canadum* (Linnaeus). Chinese Journal of Oceanology and Limnology 32: 1297-1306.

Chong, A., Hashim, R. and Ali, A.B. 2003. Assessment of soybean meal in diets for discus (*Symphysodon aequifasciata*) farming through a fishmeal replacement study. Aquaculture Research 34: 913-922.

Chotikachinda, R., Tantikitti, C., Benjakul, S., Rustad, T. and Kumarnsit, E. 2013. Production of protein hydrolysates from skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) viscera as feeding attractants for Asian seabass (*Lates calcarifer*). Aquaculture Nutrition 19: 773-784.

Coloso, R.M., Murillo-Gurrea, D.P., Borlongan, I.G. and Catacutan, M.K. 1999. Sulphur amino acid requirement of juvenile Asian sea bass *Lates calcarifer*. Journal of Applied of Ichthyology 15: 54-58.

Cowey, C.B. 1994. Amino acid requirements of fish: a critical appraisal of present values. Aquaculture 124: 1-11.

Dabrowski, K. and Kozak, B. 1979. The use of fish meal and soya bean meal as a protein source in the diet of grass carp fry. Aquaculture 18: 107–114.

Davies, O.A. and Ezenwa, N.C. 2010. Groundnut cake as alternative protein source in the diet of *Clarias gariepinus* fry. International Journal of Science and Nature 1: 73-76.

Ejere, V.C., Adeniji, A.O., Levi, C.A., Asogwa, C.N. and Chukwuka, C.O. 2014. Evaluation of poultry feather meal as a dietary protein source for *Clarias gariepinus* and *Heterobranchus bidorsalis* hybrid. International Journal of Science and Technology 3: 203-208.

El-Saidy, D.M.S.D. and Gaber, M.M.A. 2003. Replacement of fish meal with a mixture of different plant protein sources in juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) diets. Aquaculture Research 34: 1119-1127.

Ersdal, C., Midtlyng, P.J. and Jarp, J. 2001. An epidemiological study of cataracts in seawater farmed Atlantic salmon *Salmo salar*. Diseases of Aquatic Organisms 45: 229-236.

Fall, J., Tseng, Y.T., Ndong, D. and Sheen, S.S. 2012. The effects of replacement of soybean meal by shrimp shell meal on the growth of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus x Oreochromis aureus*) reared under brackish water. International Journal of Fisheries and Aquaculture 4: 85-91.

Forster, I.P. and Dominy, W.G. 2006. Efficacy of three methionine sources in diets for Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Journal of the World Aquaculture Society 37: 474-480.

Ganzon-Naret, E.S. 2013a. The potential use of legume-based diets supplemented with microbial phytase on the growth performance and feed efficiency of Asian seabass, *Lates calcarifer*. Aquaculture, Aquarium, Conservation and Legislation 6: 453-463.

Ganzon-Naret, E.S. 2013b. The use of green pea (*Pisum sativum*) as alternative protein source for fish meal in diets for Asian seabass, *Lates calcarifer*. Aquaculture, Aquarium, Conservation and Legislation 6: 399-406.

Genten, F., Trewinghe, E. and Danguy, A. 2009. Digestive System. In: Atlas of Fish Histology. Science Publishers, 75-91.

Ghomi, M.R. and Alizadehnajd, A. 2012. Dietary lysine and methionine requirement of bream *Abramis brama orientalis* juvenile. Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology 16: 79-82.

Glencross, B. 2006. The nutritional management of barramundi, *Lates calcarifer* a review. Aquaculture Nutrition 12: 291-309.

Grazziotin, A., Pimentel, F.A., De Jong, E.V. and Brandelli, A. 2008. Poultry feather hydrolysate as a protein source for growing rats. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science 45: 61-67.

Goff, J.B. and Gatlin III, D.M., 2004. Evaluation of different sulfur amino acid compounds in the diet of red drum, *Sciaenops ocellatus*, and sparing value of cystine for methionine. Aquaculture 241: 465-477.

Gu, M., Zhang, W.B., Bai, N., Mai, K.S. and Xu, W. 2013. Effects of dietaty crystalline methionine of oligo-methionine on growth performance and feed utilization of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed plant protein enriched diets. Aquaculture Nutrition 19: 39-46.

Hansen, A.C., Rosenlund, G., Karlsen, Ø., Koppe, W. and Hemre, G.I. 2007. Total replacement of fish meal with plant proteins in diets for Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). I. Effects on growth and protein retention. Aquaculture 272: 599-611.

Harding, D.E., Allen Jr., O.W. and Wilson, R.P. 1977. Sulfur amino acid requirement of channel catfish: *L*-methionine and *L*-cystine. Journal of Nutrition 107: 2031-2035.

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

Hernandez, J.C.S, Garcia-Carreno, F.L. and Hernandez-Cortes, P. 2004. *Penaeus vannamei* isotrypsins: purification and characterization. Comparative Biochemistry and Physiology 138B: 155-162.

Hertrampf, J.W. and Piedad-Pascual, F. 2000. Handbook on Ingredients for Aquaculture Feeds. Kluwer Academic Publishers, Netherlands. 573 p.

Hethey, J., Lai, J., Loutet, S., Martin, M. and Tang, V. 2002. Effect of tricine, glycine and tris buffer on alkaline phosphatase activity. Journal of Experimental Microbiology and Immunology 2: 33-38.

Hoehler, D., Lemme, A., Jensen, S.K. and Vieira, S.L. 2005. Relative effectiveness of methionine sources in diets for broiler chickens. The Journal of Applied Poultry Research 14: 679-693.

Hu, M., Wang, Y., Wang, Q., Zhao, M., Xiong, B., Qian, X., Zhao, Y. and Luo, Z. 2008. Replacement of fish meal by rendered animal protein ingredients with lysine and methionine supplementation to practical diets for gibel carp, *Carassius auratus gibelio*. Aquaculture 275: 260-265.

Huai, M.Y., Liu, Y.J., Tian, L.X., Deng, S.X., Xu, A.L., Gao, W. and Yang, H.J. 2010. Effect of dietary protein reduction with synthetic amino acids supplementation on growth performance, digestibility and body composition of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture International 18: 255-269.

Jirsa, D., Salze, G.P., Barrows, F.T., Davis, D.A. and Drawbridge, M. 2013. First-limiting amino acids in soybean-based diets for white seabass *Atractoscion nobilis*. Aquaculture 414-415: 167-172.

John, T.B. and Margaret, E.B. 2006. The sulfur-containing amino acids: an overview. Journal of Nutrition 136: 1636-1640.

Juni. 2013. Anatomy of Pisces Digestive System. [online] https://faystory.wordpress.com /2013/06/16/anatomy-of-pisces-digestive-system/ (เข้าถึงเมื่อ 15 พฤศจิกายน 2557)

Kalbande, V.H., Ravikanth, K., Maini, S. and Rekhe, D.S. 2009. Methionine supplementation options in poultry. International Journal of Poultry Science 8: 588-591.

Kaslow, J.E. 2557. Alkaline phosphatase. [online] www.drkaslow.com/html/alkaline_ phosphatase.html (เข้าถึงเมื่อ 14 มกราคม 2557).

Keembiyehetty, C.N. and Gatlin III, D.M. 1993. Total sulphur amino acid requirement of juvenile hybrid striped bass, *Morone chrysops x M. saxatilis*. Aquaculture 110: 331-339.

Khalil, R.H., Saad, T.T. and Derballa, A.E. 2010. Effect of lysine and methionine deficiency on immunity in fresh water fish. Journal of the Arabian Aquaculture Society 5: 65-77.

Khojasteh, S.M.B. 2012. The morphology of the post-gastric alimentary canal in teleost fishes: a brief review. International Journal of Aquatic Science 3: 71-88.

Kies, C., Fox, H. and Aprahamian, S. 1975. Comparative value of *L*-, *DL*-, and *D*-methionine supplementation of an oat-based diet for humans. The Journal of Nutrition 109: 809-814.

Kobler, C., Haeussner, T. and Weckbecker, C. 2013. Preparation and use of methionylmethione as feed additive for fish and crustaceans. Patent Application Publication, United States.

Kvåle, A., Mangor-Jensen, A., Moren, M., Espe, M. and Hamre, K. 2007. Development and characterisation of some intestinal enzymes in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) and Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) larvae. Aquaculture 264: 457-468.

Lee, S.M. 2002. Apparent digestibility coefficients of various feed ingredients for juvenile and grower rockfish (*Sebastes schlegeli*). Aquaculture 207: 79-95.

Li, P., Mai, K., Trushenski, J. and Wu, G. 2008. New developments in fish amino acid nutrition: towards functional and environmentally oriented aquafeeds. Amino Acids 37: 43-53.

Littell, R.C., Henry, P.R., Lewis, A.J. and Ammerman, C.B. 1997. Estimation of relative bioavailability of nutrients using SAS procedures. Journal of Animal Science 75: 2672-2683.

Luo, Z., Liu, Y.J., Mai, K.S., Tian, L.X., Yang, H.J., Tan, X.Y. and Liu, D.H. 2005. Dietary *L*-methionine requirement of juvenile grouper *Epinephelus coioides* at a constant dietary cystine level. Aquaculture 249: 409-418.

Ma, R., Hou, H., Zhang, W., Bharadwaj, A., Browdy, C. and Mai., K. 2013. An effective source of dietary methionine for the turbot *Psetta maxima*. International Aqua-feed Magazine 16: 38-40.

Mai, K., Wan, J., Ai, Q., Xu, W., Liufu, Z., Zhang, L., Zhang C. and Li, H. 2006. Dietary methionine requirement of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*. Aqua-culture 253: 564-572.

Mathew, G. 2009. Taxonomy, identification and biology of seabass (*Lates calcarifer*). National Training on Cage Culture of Seabass held at CMFRI, Kochi, 14-23 December 2009.

Matsui, M., Fowler, J.H. and Walling, L.L. 2006. Leucine aminopeptidase: diversity in structure and function. Biological Chemistry 387: 1535-1544.

Millamena, O.M. 1996. Review of SEAFEDC/AQD fish nutrition and feed development research. In: Feeds for Small-Scale Aquaculture, Proceedings of the National Seminar-Workshop on Fish Nutrition and Feeds. SEAFDEC Aquaculture Depart-ment, Iloilo, Philippines, pp. 52-63.

Millamena, O.M. 2002. Replacement of fish meal by animal by-product meals in a prac-tical diet for grow-out culture of grouper *Epinephelus coioides*. Aquaculture 204: 75-84.

Mohamed, K. and Liebert, F. 2014. Efficiency of using different methionine sources in low methionine diets of *Oreochromis niloticus* fingerlings. Egyptian Journal of Animal Production 51: 216-224.

Moon, H.Y. and Gatlin III, D.M. 1991. Total sulfur amino acid requirement of juvenile red drum, *Sciaenops ocellatus*. Aquaculture 95: 97-106.

Mumford, S., Heidel, J., Smith, C., Morrison, J., MacConnell, B. and Blazer, V. 2007. Fish histology and histophatology. U.S. Fish and Wildlife Service, National Conservation Training Center. United States.

Murillo-Gurrea, D.P., Coloso, R.M., Borlongan, I.G. and Serrano, A.E. 2001. Lysine and arginine requirements of juvenile Asian seabass (*Lates calcalrifer*). Journal of Applied Ichthyology 17: 49-53.

Murthy, H.S. 2006. Sulfur amino acid utilization: Important element of fish nutrition varies by species. Global Aquaculture Advocate 9: 68-69.

Nandakumar, S., Ambasankar, K., Syamadayal, J., Raman, C. and Ali, S.R. 2013. Fish meal replacement with chicken waste meal in Asian seabass (*Lates calcarifer*) feeds. Indian Journal of Fisheries 60: 109-114.

National Research Council (NRC). 2011. Nutrient Requirements of Fish and Shrimp. Animal Nutrition Series, National Research Council of the National Academies. The National Academies Press, Washington, D.C., USA.

Nguyen, T.N. and Davis, D.A. 2009. Methionine requirement in practical diets of juvenile nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Journal of the World Aquaculture Society 40: 410-416.

Nunes, A.J.P., Sá, M.V.C., Browdy, C.L. and Vazquez-Anon, M. 2014. Practical supplementation of shrimp and fish feeds with crystalline amino acid. Aquaculture 431: 20-27.

Nwanna, L.C. 2003. Nutritional value and digestibility of fermented shrimp head waste meal by African catfish *Clarias gariepinus*. Pakistan Journal of Nutrition 2: 339-345.

Oh, E.S., Kim, D.S., Kim, J.H. and Kim, H.R. 2000. Enzymatic properties of a protease from the hepatopancreas of shrimp, *Penaelis orientalis*. Journal of Food Biochemistry 24: 251-264.

Omondi, J.G. 2005. Digestive endo-proteases from the midgut glands of the Indian white shrimp, *Penaeus Indicus* (Decapoda: Penaeidae) from Kenya. Western Indian Ocean Journal of Marine Science 4: 109-121.

Ovie, S.O. and Eze, S. 2009. Dietary methionine requirement of *C. gariepinus* fingerlings and its effect of the growth and body composition. National Institute for Freshwater Fisheries Research. Nuw Bussa, Nigeria.

Pedini, V., Scocco, P., Gargiulo, A.M., Ceccarelli, P. and Lorvik, S. 2002. Glycoconjugate characterization in the intestine of *Umbrina cirrosa* by means of lectin histochemistry. Journal of Fish Biology 61: 1363-1372.

Plaipeth, P. and Yakupitiyage, A. 2012. Use of yeast-fermented canola meal to replace fishmeal in the diet of Asian seabass *Lates calcarifer* (Bloch, 1790). Journal of Aquaculture Research and Development 3: 1-5.

Puttige, K. and Nooralabettu, K.P. 2011. Alkaline phosphatase activity during homogenization of hepatopancreatic tissue of shrimps using sodium acetate, KCl solution, tris-HCl and glycine-NaOH buffer. International Journal of Scientific and Engineering Research 2: 1-7.

Rakyuttihamkul, E. 2005. Utilization of fermented feather meal replacement of fish meal in fish feed. Master Dissertation, Mahidol University, Nathon pathom, Thailand.

Ribeiro, L., Moura, J., Santos, M., Colen, R., Rodrogues, V., Bandarra, N., Soares, F., Ramalho, P., Barata, M., Moura, P., Pousão-Ferreira, P. and Dias, J. 2015. Effect of vegetable based diets on growth, intestinal morphology, activity of intestinal enzymes and haematological stress indicators in meager (*Argyrosomus regius*). Aquaculture 447: 116-128.

Rossi, Jr. and Davis, D.A. 2012. Replacement of fishmeal with poultry by-product meal in the diet of Florida pompano, *Trachinotus carolinus* L. Aquaculture 338-341: 160-166.

Ruchimat, T., Masumoto, T., Hosokawa, H. and Shimeno, S. 1997. Quantitative methionine requirement of yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. Aquaculture 150: 113-122.

Sakaras, W., Boonyaratpalin, M., Unpraser, N. and Kumpang, P. 1988. Optimum dietary protein energy ratio in seabass feed I, Technical Paper No. 7, Rayong Brackishwater Fisheries Station, Thailand. 20 p.

Sakaras, W., Boonyaratpalin, M., Unpraser, N. and Kumpang, P. 1989. Optimum dietary protein energy ratio in seabass feed. II. Technical Paper No. 8, Rayong Brackishwater Fisheries Station, Thailand. 22 p.

Salze, G., McLean, E., Battle, P.R., Schwarz, M.H. and Craig, S.R. 2010. Use of soy protein concentrate and novel ingredients in the total elimination of fish meal and fish oil in diets for juvenile cobia, *Rachycentron canadum*. Aquaculture 298: 294-299.

Schwarz, E.J., Kirchgessner, M. and Deuringer, U. 1998. Studies on the methionine requirement of carp, *Cyprinus carpio*. Aquaculture 161:121-129.

Scott, L.A. 1998. Essential amino acid requirements of Atlantic salmon (*Salmo salar*) reared in sea water, with emphasis on histidine and methionine. Master Dissertation, Dalhousie University, Halifax, Nova Scotia.

Shapira, N. 2014. Cheese 'refinement' with whey B-vitamin removal during precipitation potentially induces temporal 'functional' dietary shortage: homocysteine as a biomarker. Food and Function 5: 1587-1593.

Shen, X., Zhou, H., Huai, M. and Yi, G. 2007. Effect of calcium salt of 2-hydroxy-4-(methylthio) butanoic acid (MHA-Ca) on growth performance and white muscle composition of common carp (*Cyprinus carpio*). Journal of Shanghai Fisheries University 16: 118-123.

Sigma-Aldrich. 2015. 2-Hydroxy-4-(methylthio)butyric acid calcium salt. [online] http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/55875?lang=en&region=TH. (เข้าถึงเมื่อ 25 เมษายน 2558).

Silva, F.C.P., Nicoli, J.R., Zambonino-Infante, J.L., Le Gall, M.M., Kaushik, S. and Gatesoupe, F.J. 2010. Influence of partial substitution of dietary fish meal on the activity of digestive enzymes in the intestinal brush border membrane of gilthead sea bream, *Sparus aurata* and goldfish, *Carassius auratus*. Aquaculture 306: 233-237

Smith, L.S. 1980. Digestion in Teleost Fishes. In: Fish Feed Technology, ADCP/ REP/80/11, FAO Rome: 4–18.

Sofroniou, T. 2012. Digestive system. [online] http://tsbiomed.blogspot.com/2012/12/digestive -system.html (เข้าถึงเมื่อ 29 พฤศจิกายน 2559).

Srichanun, M., Tantikitti, C., Utarabhand, P. and Kortner, T.M. 2013. Gene expression and activity of digestive enzymes during the larval development of Asian sea-bass (*Lates calcarifer*). Comparative Biochemistry and Physiology 165B: 1-9.

Suarez, B.J. and Van der Aa, A. 2012. Reconsidering betaine in poultry feed from a cost perspective. Feed International 20-22.

Sugiura, S.H., Dong, F.M., Rathbone, C.K. and Hardy, R.W. 1998. Apparent protein digestibility and mineral availabilities in various feed ingredients for salmonid feeds. Aquaculture 159: 177-202.

Sweetman, J., Dimitroglou, A., Davies, S and Torrecillas, S. 2008. Gut morphology: a key to efficiency nutrition. International Aquafeed 8: 26-30.

Tacon, A.G.J. and Forster, I.P. 2001. Global trends and challenges to aquaculture and aquafeed development in the new millennium. In: International Aquafeed-Directory and Buyers' guide 2001. Middiesex, UK, Turret Rai Uxbridge. 4-25.

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

Twibell, R.G., Wilson, K.A. and Brown, P.B. 2000. Dietary sulfur amino acid requirement of juvenile yellow perch fed the maximum cystine replacement value for methionine. Journal of Nutrition 130: 612-616.

Ufodike, E.B.C. and Ugwuzor, G.N. 1986. Effects of fish-meal, cow blood-meal, and sorghum diets on food utilization and growth of cage cultured *Sarotherodon niloticus*. In: 3rd Annual Conference of the Fisheries Society of Nigeria (FISON), Maiduguri, Nigeria, 22-25 February 1983, 84-88.

Usydus, Z., Szlinder-Richert, J. and Adamczyk, M. 2009. Protein quality and amino acid profiles of fish products available in Poland. Food Chemistry 112: 139-145.

Van den Ingh, T.S.G.A.M., Krogdahl, A., Olli, J.J., Hendriks, H.G.C.J.M. and Koninkx, J.G.J.F. 1991. Effects of soybean-containing diets on the proximal and distal intestine in Atlantic salmon *Salmo salar*: a morphological study. Aquaculture 94: 297-305.

Vega-Villasante, F., Nolasco, H. and Civera, R. 1995. The digestive enzymes of the Pacific brown shrimp *Penaeus californiensis* II. Properties of protease activity in the whole digestive tract. Comparative Biochemistry and Physiology 112B: 123-129.

Viadero, R.C. 2005. Factors affecting fish growth and production. In: Water Encyclopedia. Published Online: 15 April 2005.

Williams, K.C. and Barlow, C.G. 1999. Dietary requirement and optimal feeding practices for barramundi (*Lates calcarifer*), 95 p. Project 93/120, Final Report to Fisheries R&D Corporation, Canberra, Australia.

Williams, K.C., Barlow, C.G., Rodgers, L., Hockings, I., Agcopra, C. and Ruscoe, I. 2003. Asian seabass *Lates calcarifer* perform well when fed pellet diets high in protein and lipid. Aquaculture 225: 191-206.

Williams, K.C., Barlow, C.G., Rodgers, L. and Ruscoe, I. 2003. Potential of meat meal to replace fish meal in extruded dry diets for barramundi, *Lates calcarifer* (Bloch). I. Growth performance. Aquaculture Research 34: 23-32.

Willke, T. 2014. Methionine production – a critical review. Applied Microbiology and Biotechnology 98: 9893-9914.

Xiao, W.W., Feng, L., Liu, Y., Jiang, J., Hu, K., Jiang, W.D., Li, S.H. and Zhou, X.Q. 2011. Effects of dietary methionine hydroxyl analogue supplement on growth, protein deposition and intestinal enzymes activities of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). Aquaculture Nutrition 17: 408-417.

Yang, H.J., Liu, Y.J., Tian, L.X., Liang, G.Y. and Lin, H.R. 2010. Effects of supplemental lysine and methionine on growth performance and body composition for grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). American Journal of Agricultural and Biological Sciences 5: 222-227.

Zhou, Q.C., Wu, Z.E., Tan, B.P., Chi, S.Y. and Yang, Q.H. 2006. Optimal dietary methionine requirement for juvenile cobia, *Rachycentron canadum*. Aquaculture 258: 551-557.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก.

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของอาหารทดลองและปลาทดลอง

1. การวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์โปรตีนรวม

สมการย่อย : โดยใช้กรดกำมะถันเข้มข้นย่อย มีปฏิกิริยาเกิดขึ้นดังสมการ

โปรตีนแท้ + H_2SO_4 Conc. $\longrightarrow$ $(NH_4)_2SO_4$

และสารประกอบไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีน + H_2SO_4 Conc. $\longrightarrow$ $(NH_4)_2SO_4$

สมการการกลั่น : โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ไล่แก๊สแอมโมเนียออกจากแอมโม-เนียมซัลเฟตแล้วใช้กรดบอริคจับก๊าซแอมโมเนียไว้

$$(NH_4)_2SO_4 + 2\ NaOH \longrightarrow Na_2SO_4 + 2NH_3 + 2H_2O$$

$$(NH_4)_2B_4O_7 + 2\ N^+ + 5\ H_2O \longrightarrow 2NH_4^+ + 4H_3BO_3$$

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), บิวเรต ขนาด 50 มล. พร้อมขาตั้ง

1.2 สารเคมี

1.) กรดซัลฟิวริกเข้มข้น (H_2SO_4) 93-98 เปอร์เซ็นต์

2.) สารเร่งรวม (catalyst mixture)

ชั่ง $CuSO_4$ 7 กรัม กับ K_2SO_4 100 กรัม ผสมให้เข้ากัน

3.) สารละลาย NaOH 45 เปอร์เซ็นต์

ละลาย NaOH 450 กรัมในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร

4.) สารละลาย HCl 0.1 นอร์มอล

ละลาย HCl 9 มิลลิลิตรในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรจนครบ 1 ลิตร

5.) สารละลาย H_3BO_3 4 เปอร์เซ็นต์

ละลายกรดบอริค 4 กรัมในน้ำกลั่น ต้มจนกระทั่งละลายหมดปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

6.) อินดิเคเตอร์รวม (mixed indicator)

ละลายเมทิลเรด 0.2 กรัมในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ปรับปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตร และละลายเมทิลินบลู (methylene blue) 0.2 กรัมในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ปรับปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายเมทิลเรด 2 ส่วน ผสมกับสารละลายเมทิลินบลู 1 ส่วน เขย่าให้เข้ากัน

7.) สารละลาย Na_2CO_3 0.1 นอร์มอล

อบโซเดียมคาร์บอเนตที่อุณหภูมิ 260-270 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ชั่งสารดังกล่าวมา 1.325 กรัม ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 250 มิลลิลิตร

8.) เมทิลออเรนจ์อินดิเคเตอร์ (methyl orange indicator)

ละลายเมทิลออเรนจ์ 0.1 กรัมในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตร

1.3 การตรวจหาความเข้มข้นของสารละลายกรดเกลือมาตรฐาน

ดูดสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 40 มิลลิลิตร ลงในขวดชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร เติมเมทิลออเรนจ์ อินดิเคเตอร์ 2-3 หยด ทำการไตเตรทด้วยสารละลายกรดเกลือ 0.1 นอร์มอล (จากสารละลายสีเหลืองเปลี่ยนเป็นสีส้มแดงหรือจนสีไม่เปลี่ยน) คำนวณความเข้มข้นของสารละลายกรดเกลือโดยใช้สูตร $N_1V_1 = N_2V_2$

หรือนอร์มอลลิตี้ของกรดเกลือ

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

** หมายเหตุ ควรทำ 3 ซ้ำเพื่อให้ได้ค่าที่แน่นอน

1.4 วิธีการวิเคราะห์

1.) ขั้นตอนการย่อย

ชั่งตัวอย่างด้วยกระดาษชั่งสารที่ปราศจากไนโตรเจน ให้ได้น้ำหนัก 0.5 กรัม บันทึกน้ำหนักโดยละเอียด (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) ใส่ตัวอย่างลงในขวดวิเคราะห์โปรตีน เติมสารเร่งรวม 3 กรัม เติมกรดกำมะถันเข้มข้น 10 มิลลิลิตร และนำไปให้ความร้อนด้วยชุดเครื่องย่อยโปรตีนที่อุณหภูมิ 375 องศาเซลเซียส จนกระทั่งสารละลายในขวดวิเคราะห์ใส (สีเขียวมรกต) ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น

2.) ขั้นตอนการกลั่น

นำหลอดโปรตีนที่เย็นและมีสารละลายตัวอย่าง เติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร ต่อขวดแก้ววิเคราะห์โปรตีนเข้ากับชุดเครื่องกลั่นที่มีขวดรูปชมพู่บรรจุกรดบอริค 40 มิลลิลิตร (ใส่อินดิเคเตอร์รวม 2-3 หยด) โดยให้ปลายของท่อยางที่ต่อจากกระบอกแก้วควบแน่นจุ่มอยู่ในกรดบอริค เติม 45 เปอร์เซ็นต์ NaOH ลงในขวดวิเคราะห์อย่างช้าๆ จนมีปริมาตร 50 มิลลิลิตร จะเห็นสารละลายมีสีดำ ทำการกลั่นจนกระทั่งไม่มีก๊าซแอมโมเนียออกมา เมื่อกรดบอริคเปลี่ยนเป็นสีเขียวแล้วจึงทำการกลั่นต่อไปอีก 10 นาทีจากนั้นนำขวดรูปชมพู่ออกจากเครื่องกลั่น

ค. ขั้นตอนการไตเตรท (titration)

นำไปไตเตรทด้วยสารละลายกรดเกลือมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน จนกระทั่งกรดบอริคเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินอ่อน บันทึกปริมาตรของกรดเกลือมาตรฐานที่ใช้เพื่อการคำนวณต่อไป

** <u>หมายเหตุ</u> ทำ blank โดยใช้กระดาษชั่งสารอย่างเดียวและทำการย่อยและกลั่นเหมือนตัวอย่างทุกขั้นตอน

การคำนวณ

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

โดย V_1 คือ ปริมาตรของกรดเกลือที่ใช้ในการไตเตรทกับตัวอย่าง

V_2 คือ ปริมาตรของกรดเกลือที่ใช้ในการไตเตรทกับ blank

N คือ ความเข้มข้นของกรดเกลือ (นอร์มอล)

W คือ น้ำหนักตัวอย่าง

2. การวิเคราะห์ปริมาณไขมันรวม

2.1 อุปกรณ์

1.) ชุดวิเคราะห์ไขมัน (Soxtec System HT6)

2.) ถ้วยสกัดไขมัน (cup) และลูกแก้ว

3.) ไส้กรองสาร (thimble)

4.) โถดูดความชื้น

5.) ตู้อบ

2.2 สารเคมี

สารละลายไดคลอโรมีเทน

2.3 วิธีการวิเคราะห์

อบถ้วยสกัดไขมัน (cup) ที่มีลูกแก้ว 2 – 3 เม็ด และตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ในตู้อบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส อบจนแห้งแล้วตั้งทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักถ้วยสกัดไขมันพร้อมลูกแก้วให้ได้น้ำหนักคงที่ (W_1) ชั่งตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ใส่กระดาษกรอง ประมาณ 1 – 2 กรัม (W_2) ห่อให้มิดชิดใส่ลงในไส้กรองสารที่เตรียมไว้นำไปใส่เข้าเครื่องสกัดไขมัน นำถ้วยสกัดไขมันพร้อมลูกแก้วที่ชั่งไว้แล้วเติมสารละลายไตรคลอโรเอทิลลีน 25 มิลลิลิตร แล้วใส่เข้าเครื่องสกัดไขมันให้เรียบร้อย เปิดเครื่องสกัดไขมัน ปรับอุณหภูมิไปที่ 180 องศาเซลเซียส เปิดน้ำเข้าเครื่อง เปิดวาล์ว เลื่อนปุ่มไปที่ boiling ต้มให้เดือด 40 นาที เลื่อนปุ่มไปที่ rinsing เพื่อล้างตัวอย่าง 30 นาที ปิดวาล์ว เปิดสวิทซ์อากาศ เลื่อนปุ่มไปที่ evaporation เพื่อให้สารระเหยออกไป 10 นาที ปิดเครื่อง ปิดอากาศและน้ำ แล้วเลื่อนปุ่ม evaporation กลับที่เดิม นำถ้วยสกัดไขมันออกจากเครื่องวางทิ้งไว้ให้เย็นแล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส จนแห้ง นำถ้วยสกัดไขมันออกมาใส่ในโถดูดความชื้นทิ้งไว้ให้เย็นแล้วนำมา ชั่งน้ำหนัก (W_3)

การคำนวณ

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

โดย W_1 คือ น้ำหนักถ้วยสกัดไขมันพร้อมลูกแก้ว

W_2 คือ น้ำหนักตัวอย่าง

W_3 คือ น้ำหนักถ้วยสกัดไขมันพร้อมลูกแก้วและตัวอย่างหลังการอบ

3. การวิเคราะห์ความชื้น

3.1 อุปกรณ์

1.) ถ้วย crucible

2.) เตาอบ

3.) ตาชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง

4.) โถดูดความชื้น

3.2 วิธีการวิเคราะห์

นำถ้วย crucible เข้าตู้อบอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที และทำให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งและบันทึกน้ำหนักของ crucible โดยละเอียด (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) ชั่งตัวอย่างใส่ ถ้วย crucible ประมาณ 5 กรัม โดยบันทึกน้ำหนักอย่างละเอียด นำตัวอย่างเข้าตู้อบ โดยใช้อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่อบแล้วใส่ในโถดูดความชื้น ทิ้งไว้ให้เย็น บันทึกน้ำหนักของตัวอย่างทำซ้ำข้อ 1.1.4 – 1.1.5 จนกระทั่งน้ำหนักที่ได้คงที่โดยน้ำหนักที่หายไป คือน้ำหนักของความชื้น

การคำนวณ

$$\text{ความชื้น (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{(a-b) \times 100}{a}$$

โดย a คือ น้ำหนักของตัวอย่างก่อนอบแห้ง

b คือ น้ำหนักของตัวอย่างหลังอบแห้ง

4. การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า

4.1 อุปกรณ์

1.) ถ้วย crucible

2.) เตาเผา

3.) เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง

4.) โถดูดความชื้น

4.2 วิธีการวิเคราะห์

ชั่งตัวอย่างน้ำหนัก 2 กรัม ใส่ถ้วยกระเบื้องเคลือบ บันทึกน้ำหนักโดยละเอียด นำไปเผาในเตาเผาที่อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมงจนเถ้าเป็นสีขาว นำเข้าโถดูดความชื้น ทิ้งไว้ให้เย็น นำออกมาชั่งน้ำหนักโดยละเอียด

การคำนวณ

$$\text{เถ้า (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{(b-a) \times 100}{W}$$

โดย a คือ น้ำหนักของถ้วยกระเบื้องเคลือบ

b คือ น้ำหนักของถ้วยกระเบื้องเคลือบกับน้ำหนักของเถ้าหลังการเผา

w คือ น้ำหนักตัวอย่างก่อนเผา

ภาคผนวก ข.

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและลิวซีนอะมิโนเปปทิเดส

1. สารเคมีที่ใช้และการเตรียมสารเคมี

1.1 Tris (2 มิลลิโมลาร์) – mannitol (50 มิลลิโมลาร์), พีเอช 7.0

ชั่ง Tris (MW. 121.14 กรัม/โมล) 0.1211 กรัม และ mannitol 4.5543 กรัม ละลายด้วยน้ำ DDW ประมาณ 400 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ปรับ พีเอช ด้วยให้ได้ 7.0 และปรับปริมาตรให้ได้ 500 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.2 $CaCl_2$ (100 มิลลิโมลาร์)

ชั่ง $CaCl_2.2H_2O$ (MW. 147.02 กรัม/โมล) 1.4702 กรัม ละลายด้วยน้ำ DDW และปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.3 Tris (5 มิลลิโมลาร์) – HEPES (5 มิลลิโมลาร์) – KCl (10 มิลลิโมลาร์) – DTT (1 มิลลิโมลาร์), พีเอช 7.5

ชั่ง Tris (MW. 121.14 กรัม/โมล) 0.030 กรัม ชั่ง HEPES (MW. 238.30 กรัม/โมล) 1.1915 กรัม ชั่ง KCl (MW. 121.14 กรัม/โมล) 0.037 กรัม และชั่ง DTT (MW. 154.25 กรัม/โมล) 0.1543 กรัม ละลายด้วยน้ำ DDW ประมาณ 400 มิลลิลิตร ปรับ พีเอช ด้วยให้ได้ 7.5 และปรับปริมาตรให้ได้ 500 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.4 Na_2CO_3/$NaHCO_3$ buffer (30 มิลลิโมลาร์), พีเอช 10.75

ชั่ง Na_2CO_3 (MW. 105.99 กรัม/โมล) 1.5899 กรัม และชั่ง $NaHCO_3$ (MW. 84.01 กรัม/โมล) 1.2602 กรัม ประมาณ 400 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ปรับ พีเอช ด้วยให้ได้ 10.75 และปรับปริมาตรให้ได้ 500 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.5 Sodium phosphate buffer (100 มิลลิโมลาร์), พีเอช 7.5

ชั่ง $Na_2HPO_4.7H_2O$ (MW. 268.06 กรัม/โมล) 10.7224 กรัม และชั่ง $NaH_2PO_4.2H_2O$ (MW. 156.01 กรัม/โมล) 6.2404 กรัม ประมาณ 400 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ปรับ พีเอช ด้วยให้ได้ 7.5 และปรับปริมาตรให้ได้ 500 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.6 Substrate for alkaline phosphatase: 7 มิลลิโมลาร์ *p*-Nitrophenyl phosphate solution (*p*NPP)

ชั่ง *p*NPP (MW. 371.14 กรัม/โมล) 0.130 กรัม ละลายด้วย $MgCl_2$ (1 มิลลิโมลาร์) 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Na_2CO_3/$NaHCO_3$ buffer (30 มิลลิโมลาร์), พีเอช 10.75 จนได้ปริมาตรครบ 50 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.7 Substrate for leucine aminopeptidase: 2 มิลลิโมลาร์ *L*-Leucine *p*-nitroanilide solution (Leu-*p*-Nan)

ชั่ง Leu-*p*-Nan (MW. 251.28 กรัม/โมล) 0.025 กรัม ละลายด้วย DMSO 200 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วย Sodium phosphate buffer (100 มิลลิโมลาร์), พีเอช 7.5 จนได้ปริมาตรครบ 50 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.8 $MgCl_2$ (1 มิลลิโมลาร์)

ชั่ง $MgCl_2.6H_2O$ (MW. 203.30 กรัม/โมล) 0.0051 กรัม ละลายด้วยน้ำ DDW และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 25 มิลลิลิตร

1.9 alkaline copper solution

ชั่ง $CuSO_4.5H_2O$ 0.05 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ชั่ง Sodium tartrate 0.1 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ชั่ง NaOH 10 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร เติม Na_2CO_3 ลงไป 5 กรัม

นำสารละลายในข้างต้นมาผสมให้เข้ากันและปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ใช้น้ำกลั่นที่ต้มแล้วในการเตรียม)

1.10 follin phenol reagent

ปิเปต follin phenol reagent 1 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำ DDW 10 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.11 Bovine serum albumin, BSA (1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

ชั่ง BSA 10 มิลลิกรัม ละลายด้วยน้ำ DDW และปรับปริมาตรให้ได้ 10 มิลลิลิตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

1.12 Dimethyl sulfoxide

2. การเก็บตัวอย่างปลาทดลอง

อดอาหารปลาทดลองเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้ทางเดินอาหารปราศจากอาหาร สลบปลาด้วยน้ำมันกานพลู ผ่าตัดและเก็บตัวอย่างลำไส้และไส้ติ่งในหลอดพลาสติกฝาเกลียว แล้วเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวทันที เพื่อรอสกัดบรัชบอร์เดอร์เอนไซม์

3. การสกัดเอนไซม์จากไส้ติ่งและลำไส้

สกัดบรัชบอร์เดอร์เอนไซม์ โดยใช้วิธีการสกัดที่ดัดแปลงจาก Kvåle และคณะ (2007) โดยใช้ Tris (2 มิลลิโมลาร์)-mannitol (50 มิลลิโมลาร์) พีเอช 7.0 ในสัดส่วน 30 เท่าของปริมาตรต่อน้ำหนัก แล้วบดตัวอย่างให้ละเอียด หลังจากนั้นเติม $CaCl_2$ (100 มิลลิโมลาร์) นำไปปั่นแยกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,000x*g* เป็นเวลา 10 นาที เก็บสารละลายส่วนใสและนำไปปั่นแยกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 34,000x*g* เป็นเวลา 20 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้ง และละลายตะกอนขาวขุ่นที่ได้ด้วย Tris (5 มิลลิโมลาร์)-HEPES (5 มิลลิโมลาร์)-KCl (10 มิลลิโมลาร์)-DTT (1 มิลลิโมลาร์) พีเอช 7.5 เก็บตัวอย่างบรัชบอร์เดอร์เอนไซม์ที่ได้ในตู้แช่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อรอวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของ crude enzyme และวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ลิวซีนอะมิโนเปปทิเดสและอัลคาไลน์ฟอสฟาเตส

4. การวัดปริมาณโปรตีนของ crude enzyme ด้วยวิธี Lowry

ปิเปตน้ำ DDW 48 ไมโครลิตร ผสมกับตัวอย่างเอนไซม์ 2 ไมโครลิตร ใน microplate (ขนาด 300 ไมโครลิตร) ผสมให้เข้ากัน เติม alkaline copper solution 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันดี รอทำปฏิกิริยา 10 นาที หลังจากนั้นเติม Follin phenol reagent 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันดีและรอทำปฏิกิริยา 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณปริมาณโปรตีนในตัวอย่างเอนไซม์เทียบกับกราฟมาตรฐาน Bovine Serum Albumin (BSA)

วิธีการทำกราฟมาตรฐาน BSA

เจือจาง BSA ให้ได้ความเข้มข้นตามที่ต้องการด้วยน้ำ DDW ดังนี้

สารละลาย BSA 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (ไมโครลิตร)	น้ำ DDW (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นของ BSA (ไมโครโมล/มิลลิลิตร)
0	1000	0.00
40	960	0.04
100	900	0.10
200	800	0.20
300	700	0.30
400	600	0.40
600	400	0.60
800	200	0.80
1000	0	1.00

ผสมสารละลายแต่ละความเข้มข้นให้เข้ากัน ปิเปตลงใน microplate (ขนาด 300 ไมโครลิตร) 50 ไมโครลิตร แล้วเติม alkaline copper solution 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันดี รอทำปฏิกิริยา 10 นาที หลังจากนั้นเติม follin phenol reagent 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันดีและรอทำปฏิกิริยา 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 640 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างกราฟเส้นตรงเทียบกับค่าความเข้มข้นของ BSA และหาสมการของกราฟเส้นตรงนั้น

5. การวัดกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส

วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (EC 3.1.3.1) ตามวิธีการของ (Srichanun, 2013) โดยนำ *p*-nitrophenyl-phosphate (7 มิลลิโมลาร์) (Sigma P0757) ผสมกับ $NaCO_3$/$NaHCO_3$ (30 มิลลิโมลาร์) พีเอช 10.75 และเติมเอนไซม์ที่ได้จากการสกัด ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 407 นาโนเมตร ทุกๆ 20 วินาที เป็นเวลา 5 นาที

วิธีการทำกราฟมาตรฐาน para-nitrophenol

ชั่ง para-nitrophenol 0.005 กรัม ละลายด้วย 2-propanol 500 ไมโครลิตร (71.8856 ไมโครโมล/มิลลิลิตร) จากนั้นเจือจางสารละลาย para-nitrophenol 20 เท่า โดยปิเปตสารละลาย para-nitrophenol มา 25 ไมโครลิตร ผสมกับ 2-propanol 475 ไมโครลิตร จะได้สารละลายใสมีสีเหลืองอ่อนๆ นำไปเจือจางต่ออีก 10 เท่า โดยปิเปตสารละลาย para-nitrophenol มา 50 ไมโครลิตร ผสมกับ 2-propanol 450 ไมโครลิตร (0.3594 ไมโครโมล/มิลลิลิตร) จะได้สารละลายใสไม่มีสี หลังจากนั้นนำไปเจือจางให้ได้ความเข้มข้นตามที่ต้องการด้วย $NaCO_3$/$NaHCO_3$ (30 มิลลิโมลาร์) พีเอช 10.75 ดังนี้

สารละลาย para-nitrophenol 0.3594 ไมโครโมล/มิลลิลิตร (ไมโครลิตร)	$NaCO_3$/$NaHCO_3$ (30 มิลลิโมลาร์) พีเอช 10.75 (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นของสารละลาย para-nitrophenol (ไมโครโมล/มิลลิลิตร)
0	300	0.0000
2	298	0.0024
4	296	0.0048
6	294	0.0072
8	292	0.0096
10	290	0.0120
15	285	0.0180
20	280	0.0240
25	275	0.0300
30	270	0.0359
40	260	0.0479
50	250	0.0599
75	225	0.0899
100	200	0.1198

ผสมสารละลายแต่ละความเข้มข้นให้เข้ากันใน microplate (ขนาด 300 ไมโครลิตร) แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 407 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างกราฟเส้นตรงเทียบกับค่าความเข้มข้นของ para-nitrophenol และหาสมการของกราฟเส้นตรงนั้น

6. การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ลิวซีนอะมิโนเปปทิเดส

วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ลิวซีนอะมิโนเปปทิเดส (EC 3.4.11.1) ตามวิธีการของ (Srichanun, 2013) โดยนำ sodium phosphate buffer (80 มิลลิโมลาร์) พีเอช 7.5 ผสมกับ *L*-leucine *p*-nitroanilide (2 มิลลิโมลาร์) (Sigma L9125, ละลายใน DMSO (0.1 มิลลิโมลาร์)) และเติมเอนไซม์ที่ได้จากการสกัด ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร ทุกๆ 20 วินาที เป็นเวลา 5 นาที

วิธีการทำกราฟมาตรฐาน para-nitroanilide

ชั่ง para-nitroanilide 0.001 กรัม ละลายด้วย 1 เปอร์เซ็นต์ DMSO 10 ไมโครลิตร เติม 0.1 M Tris buffer, พีเอช 7.5 990 ไมโครลิตร จะได้สารละลายสีเหลืองขุ่น นำไปเจือจางต่อโดยเติม 0.1 M Tris buffer, พีเอช 7.5 ให้ได้ปริมาตร 5000 ไมโครลิตร จะได้สารละลายสีเหลืองใส หลังจากนั้นนำไปเจือจางให้ได้ความเข้มข้นตามที่ต้องการด้วย sodium phosphate buffer (80 มิลลิโมลาร์) พีเอช 7.5 ดังนี้

สารละลาย para-nitroanilide 1.448 ไมโครโมล/มิลลิลิตร (ไมโครลิตร)	sodium phosphate buffer (80 มิลลิโมลาร์) พีเอช 7.5 (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นของสารละลาย para-nitroanilide (ไมโครโมล/มิลลิลิตร)
0	300	0.0000
2	298	0.0097
4	296	0.0193
6	294	0.0290
8	292	0.0386
10	290	0.0483
15	285	0.0724
20	280	0.0965
25	275	0.1207
30	270	0.1448
40	260	0.1931
50	250	0.2413

ผสมสารละลายแต่ละความเข้มข้นให้เข้ากันใน microplate (ขนาด 300 ไมโครลิตร) แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างกราฟเส้นตรงเทียบกับค่าความเข้มข้นของ para-nitroanilide และหาสมการของกราฟเส้นตรงนั้น

ภาคผนวก ค.

การเตรียมตัวอย่างและการศึกษาพยาธิสภาพเนื้อเยื่อด้วยเทคนิคทางเนื้อเยื่อวิทยา (Bancroft, 1975)

1. สารเคมีที่ใช้และการเตรียมสารเคมี

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

1.2 สีย้อมฮีมาทอกซิลิน (Hematoxylin) (Humason, 1979)

ละลายอลัม (potassium aluminium sulfate, Alum) 100 กรัม ในน้ำ DDW เติมฮีมาทอกซิลิน (hematoxylin crystal) 4 กรัม คนให้สารทั้งสองละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เติมโซเดียมไอโอเดท (sodium hydrate) 0.8 กรัม ละลายให้เข้ากัน จากนั้นเติมกรดซิตริก (citric acid) 4 กรัม และคลอรัลไฮเดรท (chloral hydrate) 200 กรัม ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน ตั้งไว้ประมาณ 1 สัปดาห์ ก่อนนำมาใช้งาน

1.3 สีย้อมอีโอซิน (Eosin) (Humason, 1979)

ละลายอีโอซิน (Eosin Y. (CI 45380)) 1 กรัม ด้วยเอทธิลแอลกอฮอล์ (เข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์) 100 มิลลิลิตร จนเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วเติมเอทธิลแอลกอฮอล์อีก 900 มิลลิลิตร และกรดอะซิติก 5 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน

2. การเก็บตัวอย่างปลาทดลอง

อดอาหารปลาทดลองเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผ่าตัดและเก็บตัวอย่างลำไส้และไส้ติ่ง ฉีดน้ำยาดองเข้าสู่เนื้อเยื่อลำไส้และไส้ติ่งปลาปลา เพื่อให้น้ำยาเข้าสู่เนื้อเยื่อดีขึ้น นำไปใส่ในขวดที่มีน้ำยาดอง Bouin's fluid (Bio-Optica, Milano Italy) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบตามกำหนดเวลาจึงเปลี่ยนน้ำยาดองเป็นแอลกอฮอล์ 50 และ 70 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยต้องเปลี่ยนน้ำยาใหม่ทุกๆ 24 ชั่วโมง จนกระทั่งไม่มีสีของ Bouin's fluid เพราะจะทำให้การย้อมสีไม่คงทน จากนั้นนำไปเข้าสู่ขั้นตอนการดึงน้ำออกจากเซลล์และการฝังตัวอย่างต่อไป

3. การดึงน้ำออกจากเซลล์ (Dehydration) และการฝังตัวอย่างลงในพาราฟิน (Embeding)

นำตัวอย่างไปเข้าสู่ขั้นตอนการดึงน้ำออกจากเซลล์ด้วยเครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติ (LEICA TP1020, Germany) มีขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่	สารละลาย	เวลา (ชั่วโมง)
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	แอลกอฮอล์ 100 เปอร์เซ็นต์ (absolute alcohol)	2
7	ไอโซโพรพิล แอลกอฮอล์ (isopropyl alcohol)	1
8	ไอโซโพรพิล แอลกอฮอล์	1
9	ไซลีน (xylene)	1
10	ไซลีน	1
11	พาราพลาสท์ (paraplast)	1
12	พาราพลาสท์	1

นำตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ผ่านการดึงน้ำออกจากเซลล์แล้ว ไปฝังลงในพาราฟิน (paraffin) ด้วยเครื่องเอมเบดดิ้ง (LEICA EG1150H, China) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อให้ง่ายต่อการนำไปตกแต่ง จากนั้นนำเนื้อเยื่อไปตัดตามความยาวด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อไมโครโตม (sliding microtome บริษัท Jung AG Heidelberg) ให้มีความหนา 3-5 ไมโครเมตร นำชิ้นตัวอย่างที่ตัดแล้วไปลอยในน้ำอุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส เพื่อให้เนื้อเยื่อขยายตัว จากนั้นใช้สไลด์ช้อนตัวอย่างขึ้นและนำไปอบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน เพื่อให้เนื้อเยื่อติดกับสไลด์ดีขึ้น หลังจากนั้นนำตัวอย่างไปเข้าสู่ขั้นตอนการย้อมสี

4. การย้อมสี

ขั้นตอนที่	สารละลาย	เวลา (นาที)
1	ไซลีน	2
2	ไซลีน	2
3	ไซลีน	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	สีย้อมฮีมาทอกซิลิน	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 95 เปอร์เซ็นต์	2
18	แอลกอฮอล์ 100 เปอร์เซ็นต์	2
19	ไอโซโพรพิล แอลกอฮอล์	2
20	ไอโซโพรพิล แอลกอฮอล์	2
21	ไซลีน	2
22	ไซลีน	2
23	ไซลีน	2

นำสไลด์ที่ย้อมสีตัวอย่างเรียบร้อยแล้ว มาหยดน้ำยาเปอร์เมาท์และปิดด้วย cover glass หลังจากนั้นนำไปศึกษาพยาธิสภาพด้วยกล้องจุลทรรศ์และบันทึกภาพ

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวเนตรรังสี ประนามะ

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5610620042

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (วาริชศาสตร์)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2554

ทุนการศึกษา

1. ทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ ปีงบประมาณ 2558 มหาวิทยาลัยสงขลา-นครินทร์

2. ได้รับการสนับสนุนส่วนหนึ่งจากโครงการ Evonik's University Program จัดขึ้นโดยบริษัท EVONIK ประเทศเยอรมนีและประเทศสิงคโปร์