ผลของการเสริมเอนไซม์โปรติเอสในอาหารกุ้งขาวต่อการเจริญเติบโต สัมประสิทธิ์การย่อยอาหาร และความต้านทานโรค

Effect of Dietary Protease Supplementation on Growth Performance, Digestibility Coefficient and Disease Resistance in Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

พัธพงค์ แซ่ตู

Pattapong Saetoo

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวาริชศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Aquatic Science
Prince of Songkla University
2561

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ ผลของการเสริมเอนไซม์โปรติเอสในอาหารกุ้งขาวต่อการเจริญเติบโต สัมประสิทธิ์การย่อยอาหาร และความต้านทานโรค

ผู้เขียน นายพัธพงค์ แซ่ตู

สาขาวิชา วาริชศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร. วุฒิพร พรหมขุนทอง)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุภฎา คีรีรัฐนิคม)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. วุฒิพร พรหมขุนทอง)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นเรศ ซ่วนยุก)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวาริชศาสตร์

.....

(ศาสตราจารย์ ดร. ดำรงศักดิ์ ฟ้ารุ่งสาง)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ.....
(รองศาสตราจารย์ ดร. วุฒิพร พรหมขุนทอง)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ลงชื่อ.....
(นายพัธพงค์ แซ่ตู)
นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....

(นายพัธพงค์ แซ่ตู)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์ ผลของการเสริมเอนไซม์โปรติเอสในอาหารกุ้งขาวต่อการเจริญเติบโต สัมประสิทธิ์การย่อยอาหาร และความต้านทานโรค

ผู้เขียน นายพัธพงค์ แซ่ตู

สาขาวิชา วาริชศาสตร์

ปีการศึกษา 2561

บทคัดย่อ

ศึกษาผลของการเสริมเอนไซม์โปรติเอสในอาหารสำหรับกุ้งขาวที่มีการลดระดับปลาป่นในสูตรอาหารและใช้วัตถุดิบแหล่งโปรตีนจากกากถั่วเหลืองมาทดแทนเปรียบเทียบกับสูตรอาหารปกติที่มีการใช้ปลาป่นเป็นแหล่งโปรตีนหลักต่อการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหาร กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหาร สัมประสิทธิ์การย่อยอาหาร ภูมิคุ้มกัน และความต้านทานต่อเชื้อ *Vibrio harveyi* ในกุ้งขาว น้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้น 2.33 กรัมต่อตัว ทำการทดลองในถังพลาสติกทรงสี่เหลี่ยมความจุน้ำ 220 ลิตร ใช้กุ้งจำนวน 30 ตัวต่อถัง เลี้ยงในน้ำทะเลความเค็ม 15 พีพีที กุ้งได้รับอาหารวันละ 4 มื้อ วางแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียล แบบ 3 × 2 ซึ่งปัจจัยที่ศึกษามี 2 ปัจจัย คือ ระดับของปลาป่นในสูตรอาหารแตกต่างกัน 3 ระดับ คือ 180 กรัม/กิโลกรัม (ปลาป่นสูง) 100 ก./กก. (ปลาป่นต่ำ) และ 0 ก./กก. (ไม่มีปลาป่น) และแต่ละระดับของปลาป่นแบ่งออกเป็นกลุ่มที่ไม่เสริมและมีการเสริมเอนไซม์โปรติเอสที่ระดับ 175 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร และกำหนดให้อาหารทุกสูตรมีระดับโปรตีน 38 เปอร์เซ็นต์ และพลังงาน 19 กิโลจูล/กรัมอาหารเท่ากัน การทดลองแบ่งเป็น 6 ชุดการทดลอง ๆ ละ 5 ซ้ำ ระยะเวลาในการทดลอง 8 สัปดาห์ พบว่ากุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่มีปลาป่นต่ำมีการเจริญเติบโตไม่แตกต่างกับกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่มีปลาป่นสูง ($P > 0.05$) แม้ว่ากุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่มีปลาป่นต่ำจะมีกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหารได้แก่ เอนไซม์โปรติเอส อะไมเลส และเซลลูเลส รวมถึงสัมประสิทธิ์การย่อยวัตถุแห้งและโปรตีนลดต่ำลงก็ตาม ($P < 0.05$) แต่กุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่ไม่มีปลาป่นมีการเจริญเติบโต ปริมาณอาหารที่กุ้งกิน กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหารได้แก่ ไคโมทริปซิน และเซลลูเลส รวมถึงสัมประสิทธิ์การย่อยโปรตีนลดต่ำลง เมื่อเปรียบเทียบกับกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่มีปลาป่นต่ำและปลาป่นสูง ($P < 0.05$) อย่างไรก็ตามกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่มีปลาป่นสูง และมีการลดปลาป่นลงในสูตรอาหารทั้ง 2 ระดับ มีอัตราการรอด ประสิทธิภาพการใช้อาหาร รวมถึงปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันได้แก่ ปริมาณเม็ดเลือดรวม ปริมาณออกซีฮีโมไซยานินและโปรตีน และอัตราส่วนของออกซีฮีโมไซยานินต่อโปรตีนในฮีโม

ลิมฟ์ กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสและแคทาเลส และปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ และมีอัตราการตายสะสมหลังได้รับเชื้อ *V. harveyi* เป็นเวลา 14 วัน ไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$)

การเสริมเอนไซม์โปรติเอสในอาหารส่งผลให้กุ้งขาวมีประสิทธิภาพการใช้อาหารเพิ่มสูงขึ้นโดยมีอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อดีขึ้น ในขณะที่มีประสิทธิภาพการใช้โปรตีนและการใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิเพิ่มสูงขึ้น และมีกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหารได้แก่ เอนไซม์ทริปซิน ไคโมทริปซิน ไลเปส และเซลลูเลส รวมถึงสัมประสิทธิ์การย่อยวัตถุแห้ง โปรตีน และพลังงานเพิ่มสูงขึ้น ($P < 0.05$) อีกทั้งยังส่งผลให้มีปริมาณออกซีฮีโมไซยานิน รวมถึงอัตราส่วนของออกซีฮีโมไซยานินต่อโปรตีนในฮีโมลิมฟ์ลดต่ำลง ($P < 0.05$) ซึ่งอาจบ่งชี้ถึงการลดลงของความต้องการใช้พลังงานในกิจกรรมการย่อยอาหาร การตอบสนองของร่างกายต่อโปรตีนที่มีความเป็นพิษจากกากถั่วเหลือง แต่อย่างไรก็ตามการเสริมเอนไซม์โปรติเอสลงในอาหารไม่ส่งผลต่อการเจริญเติบโต อัตราการรอดตาย รวมถึงปัจจัยอื่นๆที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันและอัตราการตายสะสมหลังได้รับเชื้อ *V. harveyi* เป็นเวลา 14 วัน ($P > 0.05$) จากผลการศึกษาบ่งชี้ว่าในสูตรอาหารสำหรับกุ้งขาวสามารถลดระดับปลาป่นลง 45 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้แหล่งโปรตีนจากกากถั่วเหลืองมาทดแทน และการเสริมเอนไซม์โปรติเอสที่ระดับ 175 มก./กก. สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการใช้อาหารและสัมประสิทธิ์การย่อยอาหารของกุ้งขาวให้สูงขึ้น

Thesis Title Effect of Dietary Protease Supplementation on Growth Performance, Digestibility Coefficient and Disease Resistance in Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

Author Mr. Pattapong Saetoo

Major Program Aquatic Science

Academic Year 2018

Abstract

This study investigated the effects of exogenous protease enzyme supplementation on Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* as a result of replacing fish meal with plant protein from soybean meal in comparison with a high fish meal diet, on growth performance, feed utilization, enzyme activity, immunity and disease resistance. Shrimp with an initial average body weight of 2.33g, were randomly sampled and reared in 220-liter rectangular plastic tanks at the stocking rate of 30 shrimp per tank with 15 ppt seawater. Shrimp were fed experimental diets four times daily for 8 weeks. Feeding trial was operated by 3×2 factorial experimental design, composed of 6 treatments with 5 replications each. Two factors were examined. First of which had 3 different levels of fish meal including 180g kg^{-1} (PC), 100g kg^{-1} (NC1) and 0g kg^{-1} (NC2). Each fish meal level was divided into two groups, i.e. un-supplemented and supplemented with 175mg kg^{-1} exogenous protease enzyme. All diets were formulated to reach iso-proteic (38%) and iso-energetic (19kJ g^{-1}). In low fish meal diets (NC1 and NC2), fish meal (from PC diet) was replaced by soybean meal. The results exhibited no significant differences in growth performance between shrimp fed PC diet and NC1 diet ($P > 0.05$), whereas digestive enzyme activity, i.e. protease, amylase and cellulase as well as apparent digestibility coefficients (dry matter and crude protein) of NC1, significantly decreased ($P < 0.05$). However, growth performance, feed intake and digestive enzyme chymotrypsin and cellulase activity, as well as apparent digestibility coefficient of crude protein were significantly lower for NC2 compared to the PC and NC1 ($P < 0.05$). Moreover, there were no differences in survival rate, feed utilization and all immune parameters including total hemocyte count, hemolymph oxyhemocyanin content, the ratio of oxyhemocyanin to hemolymph

protein, phenoloxidase activity, catalase activity, malondialdehyde content and cumulative mortality after challenge with *V. harveyi* for 14 days among treatment groups (PC, NC1 and NC2) ($P > 0.05$).

Exogenous protease supplementation in low fish meal diets had a positive influence on feed utilization as the result of an improvement in feed conversion ratio and an enhancement of protein efficiency ratio, apparent net protein utilization, digestive enzyme activity including trypsin, chymotrypsin, lipase and cellulase, as well as apparent digestibility coefficients of dry matter, crude protein and gross energy ($P < 0.05$). Furthermore, there was significant attenuation of oxyhemocyanin content and the ratio of oxyhemocyanin to hemolymph protein which might be due to the decreased energy demand for digestive activity and shrimp response against antigenic proteins from soybean meal. However, supplementation of the protease showed no significant differences in growth performance, survival rate, other immune parameters and cumulative mortality during disease challenge test ($P > 0.05$). Our results indicated that the reduction of fish meal levels up to 45 % in shrimp diet when a low fish meal diet was replaced with soybean meal and supplementation of protease at 175mg kg^{-1} in the diets could improve the feed utilization and apparent digestibility coefficients of Pacific white shrimp.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.วุฒิพร พรหมขุนทอง ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ให้โอกาสข้าพเจ้าได้ทำงานวิจัยเรื่องนี้ ท่านได้มอบความรู้และถ่ายทอดประสบการณ์ที่เป็นประโยชน์ในการปฏิบัติงาน ทั้งคอยชี้แนะแนวทางการทำงาน ตักเตือนและช่วยแก้ไขให้เสมอมาจนทำให้งานนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุภฎา คีรีรัฐนิคม ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่กรุณาแก้ไขตรวจทาน ให้คำแนะนำ และชี้ให้เห็นจุดบกพร่องพร้อมแสดงความคิดเห็นอันเป็นประโยชน์ยิ่งต่องานวิจัย ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นเรศ ซ่วนยุก หัวหน้าศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ กิจการ ศุภมาตย์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่ให้ความห่วงใยและอนุเคราะห์สถานที่ในการทำงานและเขียนวิทยานิพนธ์ อีกทั้งกรุณาให้คำแนะนำและแก้ไขข้อบกพร่องอันเป็นประโยชน์ต่องานวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณพี่นัทท์ นันทพงศ์ นักศึกษาปริญญาเอกซึ่งเป็นต้นแบบในการทำงานและการใช้ชีวิตของข้าพเจ้า ทั้งยังได้ให้คำปรึกษาและแนะนำแนวทางในการปฏิบัติงานตลอดจนแนะนำแหล่งข้อมูลทางวิชาการต่างๆ ที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่ง พร้อมทั้งเสียสละเวลาตรวจทานแก้ไขการเขียนวิทยานิพนธ์เล่มนี้ให้มีความถูกต้องยิ่งขึ้น ขอขอบคุณพี่อัครวิทย์ อิสสะโร นักวิทยาศาสตร์ประจำศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ กิจการ ศุภมาตย์ ที่ได้ให้คำปรึกษา ชี้แนะแนวทางและดูแลอำนวยความสะดวกในด้านการศึกษาความต้านทานต่อเชื้อ *Vibrio harveyi* ในกุ้งขาว จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ที่อุดหนุนทุนวิจัย และงานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยส่วนหนึ่งจากสถานวิจัยความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรและทรัพยากรธรรมชาติ ระยะที่ 2 และขอขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร. สมปอง เตชะโต ผู้อำนวยการสถานวิจัยความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรและทรัพยากรธรรมชาติ ระยะที่ 2 มา ณ โอกาสนี้ด้วย

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ ภาควิชาวาริชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ทุกท่านที่ได้กรุณาสั่งสอนให้ความรู้และคำแนะนำแก่ข้าพเจ้า ตลอดช่วงเวลาที่ข้าพเจ้าศึกษา ณ ที่นี่ และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ประจำศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ กิจการ ศุภมาตย์ ที่ให้ความห่วงใย อำนวยความสะดวกในทุกๆ เรื่องที่ข้าพเจ้าต้องการความช่วยเหลือได้แก่ พี่สุนันท์ ช่วยป้อง และพี่ทนงศักดิ์ ทองชอุ่ม ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาวาริชศาสตร์ พี่ดุสิต นาคะชาต พี่นพรัตน์

แท่นมาก พี่พัชรินทร์ สุขแต้ม และพี่จบ ห่อทอง ตลอดจนเจ้าที่สำนักงานภาควิชาวาริชศาสตร์ พี่รัตนา โพชะเรือง พี่อาภรณ์ ศรีผ่อง พี่มาลี เจตวิจิตร และพี่นิศมา สุวรรโณ ที่คอยอำนวยความสะดวกในด้านต่างๆ ด้วยดี เสมอมา

ข้าพเจ้าคงไม่สามารถดำเนินงานวิจัยนี้ให้สำเร็จลุล่วงได้ หากไม่ได้รับความช่วยเหลือทั้งในด้านกำลังกายและกำลังใจ รวมถึงการให้คำปรึกษาและข้อเสนอแนะในทุกๆ เรื่องที่เป็นประโยชน์ในขณะทำการทดลองจากพี่อานูวี บากา พี่อนุสรณ์ ช่วยทอง และพี่ดุสิต จิตต์รัตน์ รวมทั้งเพื่อนๆ นักศึกษาวาริชศาสตร์อันได้แก่ คุณวิศรุต ช่อเส้ง คุณธรานันท์ คงกะพันธ์ คุณศุกร์เทียนชัย แซ่โค้ว คุณวิรุฬห์ศักดิ์ ทองสุภา พี่เนตรรังสี ประนามะ พี่ชุติมา คลิ้งขลิบ และคนอื่นที่ไม่ได้กล่าวนาม จึงขอแสดงความขอบคุณด้วยใจจริง

ขอขอบคุณบริษัท JEFO Nutrition Inc. ประเทศแคนาดา ที่สนับสนุนเอนไซม์โปรติเอสที่ใช้ในการทดลอง รวมถึงให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ด้านการใช้เอนไซม์โปรติเอสในอาหารกุ้งขาว และขอขอบคุณบริษัท โกลด์ คอยน์ สเปเชียลิตี้ส์ (ประเทศไทย) จำกัด ที่สนับสนุนวัตถุดิบอาหาร วิตามิน และแร่ธาตุที่ใช้ในการทดลอง อีกทั้งให้คำปรึกษา แนะนำในด้านต่างๆ ที่เป็นประโยชน์ต่อการทดลอง

ท้ายที่สุดนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณบิดาและมารดาของข้าพเจ้าซึ่งเป็นแรงผลักดันและกำลังใจสูงสุดของข้าพเจ้า อีกทั้งยังให้การสนับสนุนและส่งเสริมในทุกๆ เรื่องที่ข้าพเจ้าต้องการ ขอขอบคุณพี่ชาย พี่สาว รวมถึงหลานๆ ที่ข้าพเจ้ารักยิ่งที่คอยเป็นกำลังใจให้แก่กันเสมอมา และขอขอบคุณคุณวิไลวรรณ เซ่งโห้ย ที่คอยเป็นกำลังใจและให้คำปรึกษาและความช่วยเหลือในทุกๆ เรื่องอย่างจริงใจในช่วงเวลาที่ข้าพเจ้าพบกับความยากลำบาก ทำให้ข้าพเจ้าอดทนพยายาม จนประสบความสำเร็จในการศึกษาระดับวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตในครั้งนี้

พัธพงค์ แซ่ตู

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อ	(5)
Abstract	(7)
กิตติกรรมประกาศ	(9)
สารบัญ	(11)
สารบัญตาราง	(12)
สารบัญภาพ	(13)
บทที่	
1. บทนำ	1
1. บทนำต้นเรื่อง	1
2. ตรวจเอกสาร	3
3. วัตถุประสงค์	28
2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง	29
1. วัสดุ	29
2 อุปกรณ์	30
3. วิธีการทดลอง	32
3. ผลการศึกษา	50
4. วิจารณ์ผลการทดลอง	66
5. สรุปผลการศึกษา	78
เอกสารอ้างอิง	79
ภาคผนวก	91
ประวัติผู้เขียน	98

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1.	หน้าที่ของเซลล์เม็ดเลือดของสัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียน	10
2.	องค์ประกอบและปริมาณของวิตามินชนิดต่างๆในอาหารของกุ้ง	14
3.	องค์ประกอบทางเคมีและกรดอะมิโนที่จำเป็นในวัตถุดิบแหล่งโปรตีนของอาหารกุ้ง	17
4.	รายละเอียดของอาหารทดลองทั้ง 6 สูตร	34
5.	ส่วนประกอบและปริมาณของวัตถุดิบในอาหารทดลองแต่ละสูตร	36
6.	คุณค่าทางโภชนาการของอาหารทดลอง (% as fed basis)	37
7.	การเจริญเติบโต และเปอร์เซ็นต์การรอดตายของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง 6 สูตร เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์	51
8.	ปริมาณอาหารที่กุ้งกิน และประสิทธิภาพการใช้อาหารของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง 6 สูตร เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์	53
9	องค์ประกอบทางเคมีของซากกุ้งขาวที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง 6 สูตร เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์	55
10.	องค์ประกอบเลือดและภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง 6 สูตร เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์	57
11.	กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหารในตับและตับอ่อนของกุ้งที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง 6 สูตร เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์	59
12.	กิจกรรมของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระและการออกซิเดชันของกรดไขมันในตับและตับของกุ้งที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง 6 สูตร เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์	61
13.	อัตราการตายสะสมของกุ้งขาวที่ได้รับเชื้อ *Vibrio harveyi* เป็นระยะเวลา 14 วัน หลังได้รับอาหารทดลองทั้ง 6 สูตร เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์	63
14.	ค่าสัมประสิทธิ์การย่อยสารอาหารของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง 6 สูตร	65

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1.	ลักษณะทั่วไปของกุ้งขาว *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931)	4
2.	วงจรชีวิตของกุ้งในกลุ่ม penaeid	5
3.	แสดงระบบทางเดินอาหารและอวัยวะภายในของกุ้ง	6
4.	กระบวนการป้องกันตัวเองของสัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียน	9
5.	กลไกการทำงานของโปรติเอส บริเวณ active site	19

บทที่ 1

บทนำ

1. บทนำต้นเรื่อง

แนวทางการวิจัยและพัฒนาองค์ความรู้ด้านอาหารสัตว์น้ำในปัจจุบันเป็นการนำแหล่งโปรตีนจากพืชและสัตว์ รวมถึงวัตถุดิบเศษเหลือจากอุตสาหกรรมมาใช้เป็นวัตถุดิบเพื่อทดแทนปลาป่นซึ่งเป็นแหล่งโปรตีนที่สำคัญเพราะมีปริมาณและคุณภาพของสารอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสัตว์น้ำ เนื่องจากสถานการณ์ในปัจจุบันที่ปลาป่นมีราคาเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง แต่ในทางกลับกันปริมาณผลผลิตปลาป่นได้มาจากการจับจากธรรมชาติมีแนวโน้มลดลง (Tacon and Metian, 2015; Song *et al*., 2016) ดังนั้นการนำแหล่งโปรตีนจากพืชและสัตว์อื่นมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตอาหารสัตว์น้ำจึงเป็นการลดต้นทุนค่าอาหารและลดผลกระทบด้านสิ่งแวดล้อม อีกทั้งยังเป็นแนวทางพัฒนาที่นำไปสู่ความยั่งยืนของการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำด้วย โดยวัตถุดิบแหล่งโปรตีนทดแทนจากพืชที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตอาหารสัตว์น้ำ เช่น กากถั่วเหลือง กากข้าวโพด กากคาโนลา กากเมล็ดฝ้ายป่น และรำข้าวสาลี (Jiang *et al*., 2014) ส่วนแหล่งโปรตีนทดแทนจากสัตว์ ได้แก่ เนื้อและกระดูกป่น เลือดป่น ขนไก่ป่น และวัสดุเศษเหลือจากไก่ป่น (Phromkunthong *et al*., 2015; Song *et al*., 2016) แต่แหล่งโปรตีนทดแทนดังกล่าวมีข้อจำกัดหลายประการในการนำมาใช้เป็นองค์ประกอบในอาหารสัตว์น้ำ เช่น สารต้านโภชนาการ กรดอะมิโนจำเป็นที่ไม่สมดุล เป็นแหล่งโปรตีนที่ย่อยได้ต่ำ อาทิเช่น กากถั่วเหลืองมีสารยับยั้งเอนไซม์โปรติเอส และแลกติน (Ghazi *et al*., 2002; Hassaan *et al*., 2015; Song *et al*., 2016) รวมถึงขาดกรดอะมิโนที่จำเป็นได้แก่ เมทไธโอนิน ไลซีน และทรีโอนิน (Amaya *et al*., 2007) การเสริมเอนไซม์โปรติเอสลงในอาหารสัตว์น้ำเป็นแนวทางหนึ่งในการเพิ่มการใช้ประโยชน์จากวัตถุดิบแหล่งโปรตีนทดแทน (Song *et al*., 2016) ดังแสดงในรายงานวิจัยผลของการเสริมเอนไซม์โปรติเอสลงในอาหารสัตว์ที่มีการใช้แหล่งโปรตีนทดแทนจากพืช จากการทดลองในไก่พบว่า สามารถเร่งการเจริญเติบโต เพิ่มสัมประสิทธิ์การย่อยโปรตีนและการใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิให้สูงขึ้น (Ghazi *et al*., 2002; Yu *et al*., 2007) เช่นเดียวกับในสุกรพบว่า สามารถเร่งการเจริญเติบโต ส่งเสริมให้มีการพัฒนาของลำไส้ เพิ่มสัมประสิทธิ์การย่อยโปรตีนรวมถึงกรดอะมิโน และส่งเสริมให้มีสุขภาพที่ดีเพิ่มขึ้น (Guggenbuhl *et al*., 2012; Zuo *et al*., 2015) ส่วนรายงานการวิจัยผลของการเสริมเอนไซม์โปรติเอสในอาหารสัตว์น้ำ พบว่าสามารถเพิ่มสัมประสิทธิ์การย่อยสารอาหารของปลาเรนโบว์เทราต์ (Drew *et al*., 2005; Dalsgaard *et al*., 2012) และสามารถเร่งการเจริญเติบโตของปลานิล (Li *et al*., 2015)

ปลาช่อน (Thanh Huong *et al*., 2015) และปลา gibel carp (Shi *et al*., 2016) ให้สูงขึ้น อีกทั้งยังสามารถเพิ่มการใช้ประโยชน์จากโปรตีนและไขมันสุทธิในปู chinese mitten crab (Chowdhury *et al*., 2017) ส่วนในกุ้ง Song และคณะ (2016) ทดลองเสริมเอนไซม์โปรติเอสในอาหารกุ้งขาวที่มีปลาป่นต่ำ (10 %) พบว่าสามารถเร่งการเจริญเติบโต และสามารถเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหาร รวมถึงความต้านทานต่อโรคและความเครียด เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารที่มีระดับปลาป่นสูง (20 %) สอดคล้องกับ Li และคณะ (2015) ที่รายงานว่าเอนไซม์โปรติเอสสามารถเร่งการเจริญเติบโตและทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหารในกุ้งขาวเพิ่มขึ้น นอกจากนี้จากการศึกษาของ Davis และคณะ (1998) พบว่าเอนไซม์โปรติเอสสามารถเพิ่มสัมประสิทธิ์การย่อยโปรตีนของกุ้งขาวให้สูงขึ้น จากรายงานการศึกษาที่กล่าวมาข้างต้นแสดงให้เห็นถึงผลในเชิงบวกของการเสริมเอนไซม์โปรติเอสในอาหารสัตว์ โดยสามารถเพิ่มสัมประสิทธิ์การย่อยของสารอาหาร และการใช้ประโยชน์จากอาหารให้ดีขึ้น เมื่อมีการนำวัตถุดิบจากพืชมาทดแทนโปรตีนจากปลาป่น โดยเป็นการลดต้นทุนค่าอาหาร และช่วยลดของเสียที่เกิดจากการเพาะเลี้ยง

การทดลองครั้งนี้เลือกใช้กุ้งขาวเป็นสัตว์ทดลองเนื่องจากเป็นสัตว์น้ำที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ มีการเพาะเลี้ยงกันอย่างแพร่หลายโดยเฉพาะในพื้นที่ชายฝั่งทะเลของประเทศไทย กุ้งขาวมีรสชาติดี มีการเจริญเติบโตเร็วและสามารถเจริญเติบโตได้ในความเค็มช่วงกว้าง โดยประเทศไทยมีศักยภาพในการผลิตสูงและเป็นผู้นำด้านการส่งออกในตลาดโลก โดยมีตลาดหลักคือ สหรัฐอเมริกา ญี่ปุ่น และสหภาพยุโรป ในปี พ.ศ. 2560 ประเทศไทยสามารถผลิตกุ้งขาวจากการเพาะเลี้ยงแบบพัฒนา 245,784 ตัน มีปริมาณการส่งออก 175,146.12 ตัน คิดเป็นมูลค่า 58,933.34 ล้านบาท และคาดว่ามีแนวโน้มผลผลิตกุ้งขาวเพิ่มสูงขึ้นในปี พ.ศ. 2561 โดยจะผลิตได้ไม่ต่ำกว่า 300,000 ตัน เนื่องจากสถานการณ์การเลี้ยงกลับสู่สภาวะปกติ มีปัญหาด้านโรคระบาดที่ส่งผลกระทบต่อการผลิตลดลง (สุทธสินี, 2561) จากความสำคัญทางเศรษฐกิจของกุ้งขาวในปัจจุบันจึงมีการศึกษาเพื่อหาแนวทางในการเพิ่มขีดความสามารถด้านการผลิตและการพัฒนาคุณภาพของผลิตภัณฑ์ การลดต้นทุนค่าอาหารในการเลี้ยงกุ้งขาวเป็นแนวทางหนึ่งที่สำคัญ เนื่องจากต้นทุนหลักในการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวประมาณ 40-50 เปอร์เซ็นต์มาจากค่าอาหาร โดยส่วนใหญ่จะมาจากวัตถุดิบที่เป็นแหล่งของโปรตีนซึ่งมีราคาแพงเช่น ปลาป่นที่ในปัจจุบันมีการใช้อยู่ที่ 20-28 เปอร์เซ็นต์ในสูตรอาหาร (ชลอ และคณะ, 2553; Tacon and Metian, 2008; Lebel *et al*., 2010)

งานวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาผลของการเสริมเอนไซม์โปรติเอสในอาหารกุ้งขาวที่มีการลดระดับปลาป่นและใช้แหล่งโปรตีนจากพืชมาทดแทนเปรียบเทียบกับสูตรอาหารปกติที่มีการใช้ปลาป่นเป็นแหล่งโปรตีนหลักต่อการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหาร กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหาร สัมประสิทธิ์การย่อยอาหาร ภูมิคุ้มกัน รวมถึงความต้านทานต่อเชื้อ *Vibrio harveyi* ในกุ้งขาว

ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อเกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงกุ้ง และบริษัทผู้ผลิตอาหารในการพัฒนาสูตรอาหาร เพื่อลดการใช้โปรตีนจากปลาป่นและเป็นการลดต้นทุนค่าอาหารสำหรับกุ้งขาว เพื่อส่งเสริมการเลี้ยงกุ้งในประเทศไทยพัฒนาสู่ความยั่งยืนต่อไปในอนาคต

2. การตรวจเอกสาร

2.1 ชีววิทยาของกุ้งขาว

กุ้งขาวมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) หรือชื่อสามัญที่รู้จักกันโดยทั่วไปคือ Pacific white shrimp หรือ White leg shrimp เป็นกุ้งสายพันธุ์พื้นเมืองของภูมิภาคลาตินอเมริกา ในธรรมชาติพบทั่วไปบริเวณชายฝั่งมหาสมุทรแปซิฟิกตะวันออก จากตอนเหนือของประเทศเม็กซิโกจนถึงตอนใต้ของเปรู ซึ่งเป็นเขตที่มีอุณหภูมิของน้ำเฉลี่ยมากกว่า 20 องศาเซลเซียส ความเค็ม 35 พีพีที โดยกุ้งขาวเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 23-30 องศาเซลเซียส สามารถทนต่ออุณหภูมิที่ต่ำกว่า 15 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิที่สูงกว่า 33 องศาเซลเซียสได้ ในกุ้งขนาดเล็กประมาณ 1 กรัม เจริญเติบโตดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในขณะที่กุ้งขนาดกลางและขนาดใหญ่ขนาดประมาณ 12-18 กรัม เจริญเติบโตดีที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส และสามารถทนทานต่อความเค็มในช่วงกว้างตั้งแต่ 0.5-40 พีพีที ความเค็มที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 7-34 พีพีที เจริญเติบโตดีที่ความเค็ม 10-15 พีพีที (Briggs *et al*., 2004) ประเทศไทยเริ่มมีการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวตั้งแต่ปี พ.ศ. 2545 โดยกรมประมงอนุญาตให้นำพ่อแม่พันธุ์ที่ปลอดเชื้อ (specific pathogen free, SPF) จากต่างประเทศเข้ามาทดลองเลี้ยง ซึ่งเป็นช่วงเวลาเดียวกันที่การเลี้ยงกุ้งกุลาดำในประเทศไทยประสบปัญหากุ้งโตช้า (ชลอ และพรเลิศ, 2547) ปัจจุบันมีการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวกันอย่างแพร่หลายและเป็นสัตว์น้ำส่งออกที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย

2.1.1 การจัดลำดับทางอนุกรมวิธาน

กุ้งขาว *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) มีการจัดอนุกรมวิธานดังนี้ (Machado Tamayo, 2006; Karuppasamy *et al*., 2016)

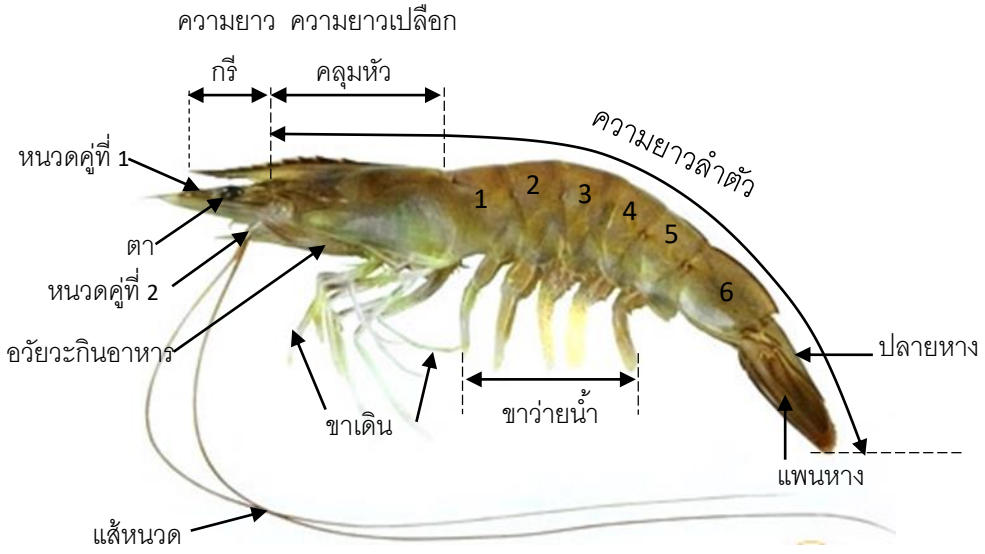
Phylum Arthropoda
Subphylum Crustacean
Class Malacostraca
Order Decapoda
Family Penaeidae

Genus *Litopenaeus*

Species *vannamei* (Boone, 1931)

2.1.2 ลักษณะทั่วไป วงจรชีวิต และถิ่นที่อยู่อาศัย

ลักษณะโดยทั่วไปของกุ้งขาวมีลักษณะคล้ายคลึงกับกุ้งในกลุ่ม penaeidae โดยทั่วไป ซึ่งมีร่างกายแบนข้าง แบ่งออกเป็นสองส่วน โดยมีส่วนหัวรวมกับส่วนอกเรียก cephalothorax มีจำนวนปล้อง 13 ปล้อง ประกอบไปด้วยส่วนหัว 5 ปล้อง ส่วนอก 8 ปล้อง และส่วนท้องมีจำนวนปล้อง 6 ปล้อง มีเปลือกเป็นโครงสร้างแข็งที่ประกอบไปด้วยไคตินและแคลเซียมหุ้มร่างกายและรยางค์ ดังนั้นการเจริญเติบโตของกุ้งจึงต้องอาศัยการลอกคราบ กุ้งขาวมีลักษณะเด่นที่สามารถสังเกตเห็นได้ชัด คือ บริเวณฟันกรีด้านบนจะหยักและถี่ แนวกรีมีลักษณะงุ้มลงเล็กน้อย ปลายกรีตรง โดยมีฟันกรีด้านบน 8 อัน ด้านล่าง 2 อัน ลำตัวและรยางค์มีสีขาวใสแต่สามารถเปลี่ยนแปลงไปตามอาหารที่กินและสภาพแวดล้อม มีเซลล์เม็ดสี (chromatophores) สังเกตเห็นเป็นจุดสีดำกระจายอยู่ทั่วตัว ปลายหางและแส้หนวดมีสีแดงเข้ม และสามารถสังเกตเห็นอวัยวะย่อยอาหาร โดยเฉพาะลำไส้ได้ชัดเจน (ภาพที่ 1) กุ้งขาวเพศเมียมีระบบเพศแบบเปิด (open thelycum) ไม่มีแผ่นปิดช่องเพศ (seminal receptacle) ตัวเต็มวัยสมบูรณ์เต็มที่มีความยาวทั้งหมด (total length) 23 เซนติเมตร มีความยาวเปลือกคลุมหัว (carapace length) 9 เซนติเมตร กุ้งเพศเมียจะมีขนาดใหญ่กว่ากุ้งเพศผู้ (ชลอ และพรเลิศ, 2547; Alday-Sanz, 2010; Karuppasamy *et al*., 2016)



ภาพที่ 1 ลักษณะทั่วไปของกุ้งขาว *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931)

ที่มา: ดัดแปลงจาก Alday-Sanz (2010)

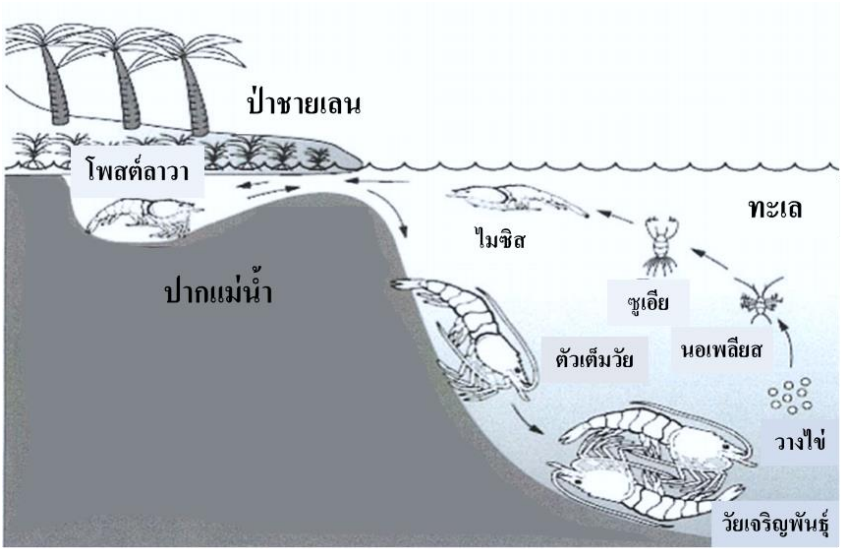
กุ้งขาวอาศัยอยู่ในทะเลเขตร้อนบริเวณชายฝั่งมหาสมุทรแปซิฟิกตะวันออกจากตอนเหนือของประเทศเม็กซิโกจนถึงตอนใต้ของเปรู กุ้งขาวตัวโตเต็มวัยอาศัยและวางไข่ในทะเล เมื่อตัวอ่อนพัฒนาเข้าสู่ระยะโพสต์ลาวาจะอพยพเข้ามาอาศัยอยู่บริเวณชายฝั่ง ปากแม่น้ำหรือป่าชายเลนซึ่งเป็นบริเวณที่มีความอุดมสมบูรณ์จนกระทั่งเจริญเติบโตพัฒนาเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ (ภาพที่ 2) โดยกุ้งขาวที่มีความสมบูรณ์เพศ เพศผู้มีน้ำหนักประมาณ 20 กรัม ส่วนเพศเมียมีน้ำหนักประมาณ 28 กรัม มีอายุ 6-7 เดือนขึ้นไป สำหรับกุ้งขาวเพศเมียที่มีขนาด 30-45 กรัม สามารถวางไข่ 100,000-250,000 ฟอง มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.22 มิลลิเมตร ไข่ที่ได้รับการผสมจะฟักเป็นตัวอ่อนภายใน 16 ชั่วโมง หลังจากวางไข่ การพัฒนาของตัวอ่อนจะเติบโตและพัฒนารูปร่างด้วยการลอกคราบแบ่งเป็นระยะต่างๆ (ภาพที่ 2) ดังกล่าวต่อไปนี้

ระยะนอเพลียส (nauplius) มีการเคลื่อนที่แบบไม่ต่อเนื่อง เข้าหาแสง ไม่กินอาหาร แต่ได้รับสารอาหารจาก yolk มี 6 ระยะ

ระยะซูเอีย (zoea) กินแพลงก์ตอนพืชเป็นอาหาร สามารถสังเกตเห็นการพัฒนาของตาและแพนหางได้ชัดเจน มี 3 ระยะ

ระยะไมซิส (mysis) สามารถกินแพลงก์ตอนสัตว์เป็นอาหาร และสังเกตเห็นการพัฒนาของขาว่ายน้ำได้ชัดเจน มี 3 ระยะ

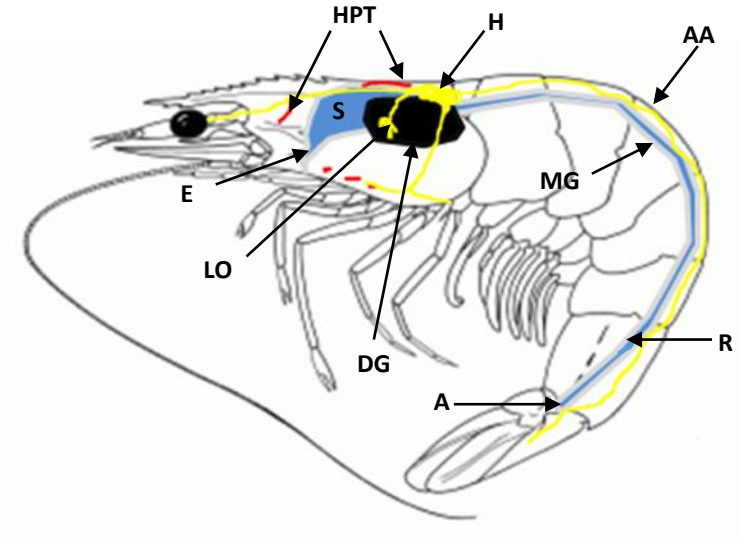
ระยะโพสต์ลาวา (postlarva) มีลักษณะเหมือนตัวเต็มวัย โดยหลังจากลอกคราบเป็นเวลา 5 วัน จะอพยพเข้าสู่ชายฝั่งและเริ่มกินอาหารพวกเศษซากพืชซากสัตว์ เพรียง หอยสองฝา และครัสเตเชียนชนิดต่างๆเป็นอาหาร (FAO, 2016; Karuppasamy *et al*., 2016)



ภาพที่ 2 วงจรชีวิตของกุ้งในกลุ่ม penaeid
ที่มา: ดัดแปลงจาก Motola (2016)

2.1.3 ระบบย่อยอาหารของกุ้งขาว

อวัยวะในระบบย่อยอาหารของกุ้งประกอบด้วยหลอดอาหาร (esophagus) กระเพาะอาหาร (stomach) ตับและตับอ่อน (hepatopancreas) สำไส้ส่วนกลาง (midgut) ลำไส้ส่วนปลาย (hindgut) และทวารหนัก (anus) (ภาพที่ 3) โดยมีตับและตับอ่อนหรือที่เรียกว่า hepatopancreas เป็นอวัยวะที่สำคัญในระบบทางเดินอาหารของกุ้งมีหน้าที่ในการสังเคราะห์และหลั่งเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยอาหาร (digestive enzyme) และมีหน้าที่ในการดูดซึมและเก็บสะสมสารอาหาร โดยการทำงานของเซลล์บุผนังท่อตับและตับอ่อน (digestive gland tubules) ประกอบด้วย F cells (fibrenzellen) และ B cells (blasenzellen) ทำหน้าในการสังเคราะห์และหลั่งเอนไซม์ ส่วน R cells (restrellen) ดูดซึมและเก็บสะสมสารอาหาร และ E cells (embryonic cell) มีลักษณะเป็นเซลล์เอ็มบริโอพบบริเวณส่วนปลายของท่อตับและตับอ่อน มักพบมีการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส และพัฒนาไปเป็น R cells และ B cells และต้องอาศัยการทำงานประสานกันกับกระเพาะอาหารและลำไส้ส่วนกลางในการย่อยและดูดกลับของสารอาหาร และอาหารในส่วนที่ร่างกายไม่สามารถย่อยได้จะถูกรวบรวมเป็นอุจจาระในส่วนของลำไส้ส่วนปลายและถูกขับออกนอกร่างกายโดยการทำงานของกล้ามเนื้อส่วนดังกล่าว (Ceccaldi, 1989; Alday-Sanz, 2010)



ภาพที่ 3 แสดงระบบทางเดินอาหารและอวัยวะภายในของกุ้งได้แก่ esophagus (E), stomach (S), digestive gland (DG), midgut (MG), (hindgut) anus (A) และ rectum (R), heart (H), abdominal artery (AA), lymphoid organ (LO) และ hematopoietic tissue (HPT)

ที่มา: ดัดแปลงจาก Alday-Sanz (2010)

ชนิด คุณสมบัติ และการควบคุมเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารเป็นเครื่องบ่งชี้ความสามารถในการย่อย และส่วนประกอบของอาหารที่กุ้งกิน โดยมีการรวบรวมรายงานการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ย่อยอาหารในระบบทางเดินอาหารของกุ้ง โดย Carrillo-Farnes และคณะ (2007) ซึ่งได้แบ่งกลุ่มของเอนไซม์ย่อยอาหารออกเป็น 3 กลุ่มหลัก มีรายละเอียดดังนี้

1. โปรติเอส และเปปทิเดส (protease and peptidase) เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยโปรตีน โดยพบเซรีนโปรติเอส (serine protease) มีปริมาณมากที่สุดในตับและตับอ่อน ถึงแม้จะมีรายงานการพบเมทัลโลโปรติเอส (metallo protease) ด้วยเช่นเดียวกัน โดยหนึ่งในเซรีนโปรติเอสที่มีความสำคัญมากที่สุดคือ ทริปซิน (trypsin)ในกุ้งลายเสือ *Marsupenaeus japonicus* และกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* พบเอนไซม์ชนิดนี้ประมาณ 40-50 เปอร์เซ็นต์ และ 50-60 เปอร์เซ็นต์ ของเอนไซม์ย่อยโปรตีนทั้งหมด ตามลำดับ และการตรวจวัดกิจกรรมของทริปซินในตับและตับอ่อนของกุ้งลายเสือโดยใช้สารตั้งต้นที่สังเคราะห์ขึ้น คือ α-p-toluenesulfonyl-L-arginine-methyl ester (TAME) พบว่ากิจกรรมของทริปซินถูกยับยั้งโดย Soy inhibitor of Kunitz (SBTI) ซึ่งเป็นตัวยับยั้งตามธรรมชาติ เช่นเดียวกับกิจกรรมของไคโมทริปซิน (chymotrypsin) ในตับและตับอ่อนของกุ้งขาว โดยระดับพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสในกุ้งอยู่ในช่วง 7.5-9

2. ไลเปส และเอสเทอเรส (lipase and esterase) เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่มีประโยชน์ต่อการแสดงออกในหลากหลายกิจกรรม เช่น ฟอสโฟไลเปส (phospholipase) คอเลสเตอรอล เอสเทอเรส (cholesterol esterase) เอสเทอเรส (esterase) และเอไมเดส (amidase) เป็นต้น โดยสารตั้งต้นในธรรมชาติคือ กรดไขมันสายยาวไตรเอซิลกลีเซอไรด์ (triacylgryceride) โดยเข้าย่อยสลายพันธะเอสเทอในตำแหน่งที่ 1 และ 3 ผลิตผลที่ได้อยู่ในรูปของโมโนเอซิลกลีเซอไรด์ (monoacylglyceride) และกรดไขมันอิสระ ในกุ้งชนิดต่างๆ สามารถพบกิจกรรมของเอนไซม์ชนิดนี้ได้ที่ตับและตับอ่อน โดยระดับพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมอยู่ในช่วง 7.5-10 ในกุ้งขาวพบมีกิจกรรมสูงสุดที่ระดับพีเอชเท่ากับ 8

3. คาร์โบไฮโดรเลส (carbohydrolase) เป็นกลุ่มเอนไซม์ย่อยคาร์โบไฮเดรต จากการสกัดเอนไซม์อะไมเลส (amylase) จากระบบทางเดินอาหารของกุ้ง *Farfantepenaeus californiensis* พบว่าเอนไซม์อะไมเลสทำงานได้ดีที่พีเอช 6.5-8.0 อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 30-40 องศาเซลเซียส

การควบคุมกิจกรรมของเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารของกุ้งเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์และเก็บในรูปไซโมเจน (zymogen) ในแกรนูลของตับและตับอ่อน โดยมีรายงานการพบทริปซิโนเจนใน B cell ของตับและตับอ่อนกุ้งขาว และการผลิตเอนไซม์ในตับและตับอ่อนของสัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียนถูกควบคุมโดยฮอร์โมนจากก้านตา โดยมีรายงานว่าแกสตริน (gastrin)

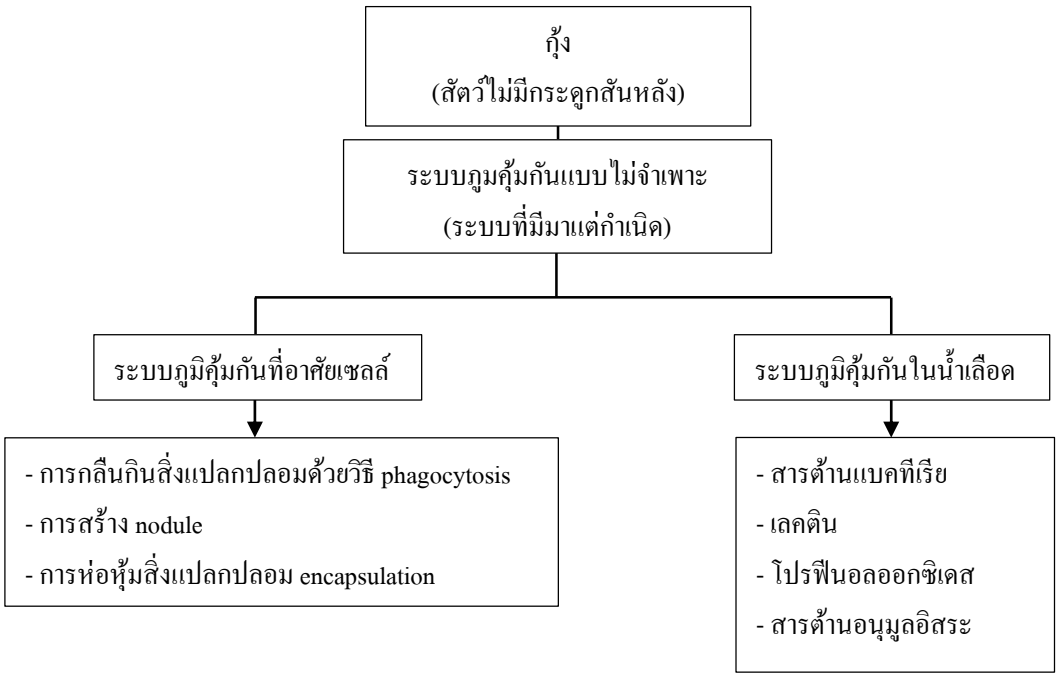
สามารถกระตุ้นการสังเคราะห์โปรตีนในตับและตับอ่อนของกุ้ง *Palaemon serratus* และนอกจากนี้การควบคุมกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหารยังขึ้นอยู่กับนาฬิกาชีวภาพ หรือ circadian rhynthm โดยมีรายงานการศึกษาความสัมพันธ์ของการให้อาหารและกิจกรรมของเอนไซม์ในกุ้งขาว พบว่ากุ้งที่ได้รับอาหารเวลา 12.00 น. และ 20.00 น. ผลิตเอนไซม์โปรติเอส, อะไมเลส และไลเปสออกมามากที่สุดที่เวลา 14.00 น. และพบกิจกรรมของเอนไซม์ต่ำสุดที่เวลา 02.00 น. และยังมีรายงานว่าระยะการลอกคราบส่งผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารของกุ้งอย่างมาก ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการตอบสนองของระบบต่างๆในร่างกายต่อความต้องการพลังงานและสารอาหาร

นอกจากนี้ยังมีรายงานการพบแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์และหลั่งออกภายนอกเซลล์ในระบบทางเดินอาหารของกุ้งขาว โดย Tzuc และคณะ (2014) รายงานว่าแบคทีเรียกลุ่มวิบริโอ (*Vibrio*) และซูโดแอลเทอโรโมเนส (*Pseudoalteromonas*) เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นที่พบในระบบทางเดินอาหารของกุ้ง แบคทีเรียเหล่านี้ผลิตสารประกอบทางเคมีได้หลายชนิดได้แก่ อะไมเลส ไลเปส และไคติเนส (chitinase) รวมถึงโปรติเอส เบต้า-กาแลคโตซิเดส (β-galactosidase) ฟอสโฟไลเปส และสารต่อต้านแบคทีเรียจากการรวบรวมรายงานการศึกษาที่มีมาก่อนหน้านี้ โดยเอนไซม์เหล่านี้มีความสามารถช่วยในการย่อยสลายองค์ประกอบของอาหารที่กุ้งกินเข้าไปได้ ทำให้กุ้งย่อยและดูดซึมสารอาหารได้เพิ่มขึ้นนำไปสู่การเจริญเติบโตของกุ้งที่เพิ่มสูงขึ้น

2.1.4 ระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง

กุ้งเป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง มีระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะหรือภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด (innate immunity) โดยประกอบด้วย 2 ระบบหลัก คือ ภูมิคุ้มกันในน้ำเลือด และภูมิคุ้มกันที่อาศัยเซลล์ ทั้ง 2 ระบบจะทำงานร่วมกันโดยอาศัยการทำงานของเซลล์เม็ดเลือด (haemocytes) เป็นหลัก (ภาพที่ 4) ซึ่งเซลล์เม็ดเลือดเป็นองค์ประกอบของเลือดที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน และสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้สุขภาพของกุ้งได้ดี โดยปริมาณเม็ดเลือดมีความแตกต่างกันในกุ้งแต่ละชนิด แต่โดยทั่วไปอยู่ในช่วง 0.2-400 $\times 10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร กุ้งผลิตและปล่อยเม็ดเลือดเข้าสู่ระบบหมุนเวียนเลือดแบบเปิดจากอวัยวะที่เรียกว่า hematopoietic tissue ซึ่งอยู่บริเวณเหนือกระเพาะอาหาร (ภาพที่ 3) โดยเม็ดเลือดกุ้งสามารถแบ่งได้เป็น 3 ชนิด ได้แก่ ไฮยาลินเซลล์ (hyaline cell) เซมิแกรนูลาร์เซลล์ (semi-granular cell) และแกรนูลาร์เซลล์ (granular cell) (Alday-Sanz, 2010) โดย Johansson และคณะ (2000) รายงานถึงปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณของเม็ดเลือดกุ้งได้แก่ การตอบสนองต่อการติดเชื้อ ความเครียดจากสภาพแวดล้อม และระดับของฮอร์โมนระหว่างการลอกคราบ แต่อย่างไรก็ตาม Martin และ Graves (1985) รายงานปริมาณของเม็ดเลือดแต่ละชนิดในกุ้งขาวพบว่ามีไฮยาลินเซลล์ประมาณ 5-20 เปอร์เซ็นต์, เซมิแกรนูลาร์เซลล์มีประมาณ 60-75 เปอร์เซ็นต์ และแกรนูลาร์เซลล์มีประมาณ 10-20 เปอร์เซ็นต์ จากจำนวนเม็ดเลือด

ทั้งหมด ส่วนหน้าที่การทำงานของเม็ดเลือดกุ้งแต่ละชนิด (ตารางที่ 1) มีความแตกต่างกันในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน กล่าวคือ ไฮยาลินเซลล์มีขนาดเล็กและมีแกรนูลเล็กน้อยหรือไม่มีเลย มีบทบาทสำคัญในกระบวนการจับกินเซลล์ของสิ่งแปลกปลอม ส่วนเซมิแกรนูลาร์เซลล์และแกรนูลาร์เซลล์ เป็นเซลล์ที่มีแกรนูลมีบทบาทในการกำจัดเซลล์สิ่งแปลกปลอมโดยการห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอม (encapsulation) และภายในแกรนูลมีเอนไซม์ซึ่งใช้ในการทำลายสิ่งแปลกปลอมที่สำคัญในกุ้งได้แก่ เอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase) ที่ทำให้เกิดกระบวนการ melanisation ใช้ในการห้อมล้อมสิ่งแปลกปลอมไม่ให้กระจายไปยังส่วนต่างๆของร่างกาย และการผลิตซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (superoxide anion) ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่ผลิตจากเซลล์เม็ดเลือดขณะที่เกิดกระบวนการจับกินสิ่งแปลกปลอมที่สามารถทำลายเชื้อโรคได้ (Sritunyalucksana and Söderhäll, 2000)



ภาพที่ 4 กระบวนการป้องกันตัวเองของสัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียน
ที่มา: ดัดแปลงจาก Alday-Sanz (2010)

ระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งยังมีการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระขึ้นเพื่อป้องกันผลกระทบจากสารอนุมูลอิสระที่มีพิษต่อเซลล์ สารอนุมูลอิสระได้แก่ superoxide anion radical, hydroxyl radical และ hydrogen peroxide เป็นต้น ซึ่งถูกสร้างขึ้นในกระบวนการเมแทบอลิซึม และพบมาก

ในสภาวะเครียดจากสภาพแวดล้อมที่เป็นพิษและจากการถูกบุกรุกจากเซลล์แปลกปลอมหรือภาวะติดเชื้อ อนุมูลอิสระช่วยในการฆ่าเซลล์บุกรุกแต่หากมีการสร้างมากเกินก็อาจทำลายเซลล์เจ้าบ้านให้เสียหาย ดังนั้นเพื่อควบคุมและป้องกันความเสียหายจากอนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระจึงถูกสร้างขึ้นได้แก่ catalase, glutathione peroxidase (GPX) และ superoxide dismutase (SOD) เป็นต้น เอนไซม์เหล่านี้มีความสำคัญในการรักษาสมดุลภายในเซลล์ ช่วยควบคุมอัตราการเกิดเมแทบอลิซึมโดยการลดปริมาณของพลังงานกระตุ้นที่จำเป็นต่อการเริ่มปฏิกิริยา ช่วยปกป้องเซลล์จากการเกิดออกซิเดชัน นอกจากนี้สารต้านอนุมูลอิสระถูกนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้ภาวะที่เซลล์ถูกทำลายด้วยอนุมูลอิสระ (oxidative stress) รวมถึงการวัดค่า malondialdehyde (MDA) ซึ่งเกิดจากการออกซิเดชันของกรดไขมัน ปริมาณของ MDA บ่งชี้ถึงความเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์จากการเกิดออกซิเดชันของไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์ (Aguirre-Guzman *et al*., 2009; Patlolla *et al*., 2009)

ตารางที่ 1 หน้าที่ของเซลล์เม็ดเลือดของสัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียน

ชนิดของเซลล์เม็ดเลือด	หน้าที่ในระบบภูมิคุ้มกัน
Hyaline cells	Phagocytosis
Semi-granular cell	Encapsulation
	phagocytosis (limited)
	storage and release of the proPO symtem
	cytotoxicity
Granular cell	storage and release of the proPO symtem
	cytotoxicity

ที่มา: Johansson และคณะ (2000)

2.2 ความต้องการสารอาหารของกุ้งขาว

กุ้งมีความต้องการสารอาหารเพื่อใช้ในกิจกรรมต่างๆในการดำรงชีพเช่นเดียวกับสัตว์ชนิดอื่นๆโดยทั่วไป ซึ่งประกอบด้วยโปรตีน (กรดอะมิโน) ไขมัน (กรดไขมัน) คาร์โบไฮเดรต (พลังงาน) วิตามิน และแร่ธาตุ เป็นสารอาหารที่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของกุ้ง และยังมีบทบาทสำคัญต่อการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในกุ้ง หากกุ้งได้รับอาหารหรือสารอาหารที่ไม่เพียงพอการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันและความสามารถในการต่อต้านเชื้อโรคก็จะลดลง (Alday-Sanz, 2010) ดังนั้นปริมาณและคุณภาพของสารอาหารที่เหมาะสมมีบทบาทสำคัญต่อ

สุขภาพและการเจริญเติบโตที่ดีของกุ้ง โดยระดับความต้องการสารอาหารที่เหมาะสมสำหรับกุ้งขาว มีรายละเอียดดังกล่าวต่อไปนี้

2.2.1 โปรตีนและกรดอะมิโน

ระดับความต้องการโปรตีนของกุ้งขาวขึ้นอยู่กับคุณภาพของโปรตีน (ปริมาณและความสมดุลของกรดอะมิโน สัมประสิทธิ์การย่อย) อายุ และลักษณะทางกายภาพรวมถึงสภาพแวดล้อม (Shiau, 1998; Alday-Sanz, 2010) อย่างไรก็ตามระดับความต้องการโปรตีนของกุ้งขาวสามารถสรุปได้ดังนี้

ในกุ้งขาวระยะวัยรุ่นและวัยเจริญพันธุ์ระดับความต้องการโปรตีนจากการรวบรวมรายงานการศึกษาที่ผ่านมามีการรายงานระดับความต้องการโปรตีนที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตในระดับที่แตกต่างกัน (Kureshy and Davis, 2002; Cuzon *et al*., 2004; Yun *et al*., 2015) อย่างไรก็ตามพอที่จะสรุประดับความต้องการโปรตีนที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของกุ้งขาวอยู่ที่ระดับมากกว่า 32 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร (Kureshy and Davis, 2002) แต่ไม่เกิน 44 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร (Yun *et al*., 2015) และนอกจากนี้ความต้องการโปรตีนของกุ้งขาวขึ้นอยู่กับช่วงอายุ และระดับของโปรตีนในอาหาร ซึ่งจากรายงานการศึกษาของ Kureshy และ Davis (2002) พบว่าความต้องการโปรตีนของกุ้งขาวระยะวัยรุ่นที่ให้ผลการเจริญเติบโตสูงสุด มีความต้องการโปรตีน 46.4 กรัมโปรตีนต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน เมื่อได้รับอาหารที่มีระดับโปรตีน 32 เปอร์เซ็นต์ และ 43.4 กรัมโปรตีนต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน เมื่อได้รับอาหารที่มีระดับโปรตีน 48 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในวัยเจริญพันธุ์มีความต้องการโปรตีน 23.5 กรัมโปรตีนต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน เมื่อได้รับอาหารที่มีระดับโปรตีน 32 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร และ 20.5 กรัมโปรตีนต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน เมื่อได้รับอาหารที่มีระดับโปรตีน 48 เปอร์เซ็นต์

สำหรับความต้องการโปรตีนและพลังงานในอาหารของกุ้งขาวจากการรวบรวมรายงานการวิจัยของ Alday-Sanz (2010) แสดงอัตราส่วนของโปรตีนต่อพลังงานที่เหมาะสมต่อกุ้งขาวระยะวัยรุ่นอยู่ที่ระดับ 18 มิลลิกรัมโปรตีนต่อกิโลจูล ในอาหารที่มีระดับโปรตีน 25-35 เปอร์เซ็นต์

กุ้งขาวมีความต้องการกรดอะมิโนที่จำเป็น 10 ชนิด เช่นเดียวกับในสัตว์น้ำชนิดอื่นๆ ประกอบด้วยอาร์จินีน (Arginine) ฮีสทิดีน (Histidine) ไอโซลิวซีน (Isoleucine) ลิวซีน (Leucine) ไลซีน (Lysine) เมทไธโอนีน (Methionine) ฟีนิวอาลานีน (Phenylalanine) ทรีโอนีน (Threonine) วาลีน (Valine) และทริปโตเฟน (Tryptophan) (Cuzon *et al*., 2004) โดย Alday-Sanz (2010) กล่าวว่า ไลซีน เมทไธโอนีน และอาร์จินีนเป็นกรดอะมิโนที่ขาดไม่ได้สำหรับการกำหนด

สูตรอาหารในกุ้ง เนื่องจากเป็นกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตและการรอดตายของกุ้ง จากรายงานการวิจัยของ Zhengfu และคณะ (2013) แสดงปริมาณความต้องการอาร์จินีนและไลซีนในกุ้งขาวที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 1.80-2.21 และ 2.11-2.51 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร ตามลำดับ ในขณะที่ปริมาณความต้องการเมทไธโอนีนที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 0.66-0.91 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร (Lin *et al*., 2015)

2.2.2 ไขมันและกรดไขมัน

ไขมันจัดเป็นแหล่งของพลังงานที่สำคัญและเป็นแหล่งของกรดไขมันที่จำเป็นสำหรับกุ้งขาว ซึ่งกุ้งไม่สามารถสังเคราะห์ขึ้นมาเองได้ โดยในอาหารกุ้งควรมีองค์ประกอบของไขมันที่ระดับ 6-8 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่ควรเกิน 10 เปอร์เซ็นต์ สำหรับกรดไขมันที่จำเป็นในอาหารกุ้งมี 4 ชนิด ประกอบด้วย linoleic (18:2n-6) linolenic (18:3n-3) eicosapentaenoic acid (20:5n-3, EPA) และ decosahexaenoic acid (22:6n-3, DHA) โดยเฉพาะ EPA และ DHA เป็นกรดไขมันที่ขาดไม่ได้ในอาหารกุ้ง ส่วนความต้องการของกรดไขมันชนิด EPA และ DHA ในกุ้งกลุ่ม penaeid อยู่ที่ประมาณ 0.5-1 เปอร์เซ็นต์ ของอาหาร (Shiau, 1998; Alday-Sanz, 2010)

2.2.3 ฟอสโฟลิพิด และคอเลสเตอรอล (phospholipid and cholesterol)

ฟอสโฟลิพิดและคอเลสเตอรอลเป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ มีความสำคัญในการรักษาโครงสร้างและหน้าที่ของเซลล์ นอกจากนี้คอเลสเตอรอลยังเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์สเตอรอยด์ฮอร์โมนในกุ้ง ส่วนฟอสโฟลิพิดเป็นตัวรับส่งสัญญาณเข้าสู่เซลล์และเป็นตัวกลางที่สำคัญในกระบวนการเมแทบอลิซึมของไขมันและเพิ่มการนำคอเลสเตอรอลจากอาหารไปใช้ประโยชน์ โดยในกุ้งหรือสัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียนไม่สามารถสังเคราะห์ฟอสโฟลิพิดและคอเลสเตอรอลขึ้นมาใช้เองได้ ดังนั้นฟอสโฟลิพิดและคอเลสเตอรอลจึงเป็นสารอาหารที่จำเป็นสำหรับกุ้ง (Gong *et al*., 2000a) เพราะฉะนั้นในอาหารของกุ้งขาวจำเป็นต้องมีการเสริมฟอสโฟลิพิดและคอเลสเตอรอลลงไป ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

จากการศึกษาของ Gong และคณะ (2000b) พบว่าการเสริม phospholipid ชนิด phosphatidylchloline บริสุทธิ์ ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตและอัตรารอดของกุ้งขาว แต่การเสริม phospholipid ชนิด phosphatidylethanolamine (PE) 25 เปอร์เซ็นต์ และ phosphatedyl-inositol (PI) 21.8 เปอร์เซ็นต์ ที่ได้จาก soybean lecithin ร่วมกัน ส่งเสริมการเจริญเติบโตของกุ้งขาวให้เพิ่มสูงขึ้น ส่วนระดับความต้องการ phospholipid ของกุ้งขาว จากการศึกษาของ Gong และคณะ (2001) พบว่าระดับที่เหมาะสมของ phospholipid ในอาหารอยู่ที่ระดับ 3-5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้แหล่ง phospholipid ที่ได้จาก soybean lecithin ในรูปของ de-oiled lecithin และ crude lecithin ที่มีองค์ประกอบของ phospholipid ที่ระดับ 97.6 และ 71.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

อย่างไรก็ตามจากการศึกษาของ Gong และคณะ (2000a) พบว่าระดับความต้องการ cholesterol และ phospholipid ในอาหารของกุ้งขาวมีความสัมพันธ์กัน โดยกุ้งขาวมีระดับความต้องการ cholesterol ที่ระดับ 0.35 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารที่ไม่มีการเสริม phospholipid แต่ในอาหารที่มีปริมาณของ phospholipid ที่ระดับ 1.5, 3.0 และ 5.0 เปอร์เซ็นต์ กุ้งขาวมีระดับความต้องการ cholesterol ลดลงที่ระดับ 0.14, 0.13 และ 0.05 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แสดงให้เห็นถึงระดับความต้องการ cholesterol ของกุ้งขาวที่ลดลง เมื่อมีระดับของ phospholipid ในอาหารเพิ่มขึ้น

2.2.4 คาร์โบไฮเดรต

คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งของพลังงานในอาหารที่มีราคาถูก และมีบทบาทสำคัญต่อคุณสมบัติทางกายภาพของอาหาร เช่น การจับตัวกันและความคงสภาพของเม็ดอาหารในน้ำ โดยระดับและแหล่งของคาร์โบไฮเดรตในอาหารที่เหมาะสม ส่งผลให้กุ้งนำโปรตีนไปใช้ในการเจริญเติบโตได้อย่างเต็มที่ และคาร์โบไฮเดรตมีความสำคัญต่อการสังเคราะห์ไคตินในการสร้างโครงร่างแข็งของกุ้ง โดยกุ้งสามารถย่อยและใช้ประโยชน์จากแป้งได้สูงกว่าน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว พวกกลูโคส และสามารถใช้ประโยชน์จากแป้งที่มีเม็ดแป้งขนาดเล็ก และมีองค์ประกอบของอะไมโลเพกตินที่สูงเช่นในแป้งสาลีได้ดีกว่าแป้งมันสำปะหลัง (Shiau, 1998; Alday-Sanz, 2010) ในอาหารกุ้งขาวระดับของคาร์โบไฮเดรตที่เหมาะสมอยู่ที่ 10-20 เปอร์เซ็นต์ และกำหนดให้มีเยื่อใย เช่นเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสซึ่งกุ้งไม่สามารถย่อยได้ จำกัดไม่ควรเกิน 4 เปอร์เซ็นต์ (Alday-Sanz, 2010)

2.2.5 วิตามิน และแร่ธาตุ

วิตามินมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึม หรือการเจริญเติบโตของร่างกาย ซึ่งเป็นองค์ประกอบของโคเอนไซม์ (coenzyme) และมีความเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาชีวเคมีของร่างกาย โดยกุ้งมีความต้องการในปริมาณน้อย แต่หากได้รับในปริมาณที่ไม่เพียงพอก็อาจทำให้กุ้งผิดปกติได้ เช่น กินอาหารลดลง การเจริญเติบโตช้า อัตราการตายสูง และมีอัตราการแลกเนื้อสูงขึ้น ดังนั้นในอาหารกุ้งขาวจึงมีการเสริมวิตามินในรูปของวิตามินพรีมิกซ์เพื่อป้องกันการสูญเสียของวิตามินในระหว่างการผลิต การเก็บรักษา และการละลายน้ำของอาหารสำเร็จรูป โดยทั่วไปประกอบด้วยวิตามินที่ละลายในน้ำ 11 ชนิด และวิตามินที่ละลายในไขมันอีก 4 ชนิด โดยมีปริมาณวิตามินชนิดต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 2 ตามรายงานของ (Alday-Sanz, 2010)

แร่ธาตุเป็นสารอนินทรีย์ที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตและการเจริญเติบโตของร่างกาย เช่น การสร้างโครงร่างแข็ง รักษาสมดุลของของเหลวในร่างกาย ควบคุมความสมดุลกรด-ด่าง เป็นองค์ประกอบที่สำคัญของฮอร์โมน เอนไซม์ และเป็นโคแฟกเตอร์ช่วยกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ อีกทั้งยังมีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการหดตัวของกล้ามเนื้อและการถ่ายทอดกระแส

ประสาท (โชคชัย, 2548; Alday-Sanz, 2010) แม้ว่ากุ้งจะได้รับแร่ธาตุต่างๆจากน้ำ และอาหารธรรมชาติในระบบการเลี้ยง แต่ก็มีแร่ธาตุบางชนิดยังไม่เพียงพอต่อความต้องการของกุ้ง โดยเฉพาะระบบการเลี้ยงแบบพัฒนาที่มีการปล่อยกุ้งหนาแน่นและมีระดับความเค็มที่ต่ำ กุ้งมีความต้องการแร่ธาตุเหมือนกับในสัตว์บกและปลา สามารถแบ่งเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ แร่ธาตุหลัก (macro mineral) แร่ธาตุที่มีความต้องการในปริมาณมาก เช่น แคลเซียม คลอไรด์ แมกนีเซียม ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม โซเดียม และกำมะถัน ส่วนแร่ธาตุรอง (trace mineral) แร่ธาตุที่มีความต้องการในปริมาณน้อย เช่น ทองแดง เหล็ก แมงกานีส ซีลิเนียม สังกะสี และโคบอลต์ โดยจากการรวบรวมรายงานการศึกษาของ Alday-Sanz (2010) ถึงระดับความต้องการแร่ธาตุบางชนิดของกุ้งในอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต ได้แก่ แคลเซียม แมกนีเซียม โพแทสเซียม และฟอสฟอรัสที่ระดับ 0-1, 0.2-0.3, 1.2 และ 1.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนสังกะสี แมงกานีส ทองแดง และซีลิเนียมที่ระดับ 35-48, 2.5-10, 10-30 และไม่เกิน 0.3 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร (มก./กก.) ตามลำดับ

ตารางที่ 2 องค์ประกอบและปริมาณของวิตามินชนิดต่างๆในอาหารของกุ้ง

วิตามินที่ละลายในน้ำ	ความต้องการ (mg/kg diet)
วิตามินบี 1, ไธอามีน (Thiamine)	60
วิตามินบี 2, ไรโบเฟลวิน (Riboflavin)	25
วิตามินบี 6, ไพริดอกซิน (Pyridoxine)	70
วิตามินบี 12, ไซยาโนโคบาลามิน (Cyanocobalamin)	0.2
วิตามินซี, กรดแอสคอบิก (ascorbic acid)	100-200
ไบโอติน (Biotin)	1
โคลีน (Choline)	600
กรดโฟลิก (Folic acid)	2
อิโนซิทอล (Inositol)	3000
ไนอาซิน (Niacin)	40
กรดแพนโทเธนิค (Pantothenic acid)	75
วิตามินที่ละลายในไขมัน	
วิตามิน เอ (Vitamin A)	5000 (IU)
วิตามิน ดี (Vitamin D)	0.1
วิตามิน อี (Vitamin E)	100
วิตามิน เค (Vitamin K)	5

IU: international unit

ที่มา: ดัดแปลงจาก Alday-Sanz (2010)

2.3 แหล่งของวัตถุดิบโปรตีนในอาหารกุ้ง

การพิจารณาคุณภาพของโปรตีนมักพิจารณาจากความสามารถของสัตว์น้ำในการย่อยโปรตีน ปริมาณโปรตีน และความสมดุลของกรดอะมิโนในวัตถุดิบเป็นสำคัญ (ตารางที่ 3) โดยวัตถุดิบแหล่งโปรตีนหลักที่นิยมนำมาใช้เป็นองค์ประกอบที่สำคัญในสูตรอาหารกุ้งและอาหารปลากินเนื้อโดยทั่วไป ได้แก่

ปลาป่น เนื่องจากมีปริมาณโปรตีนสูง 50-65 เปอร์เซ็นต์ หรือมากกว่า ไขมัน 4-20 เปอร์เซ็นต์ และมีเถ้า 11-12 เปอร์เซ็นต์ ในปลากะตักป่น และมากกว่า 23 เปอร์เซ็นต์ ในเศษเหลือจากปลาแล่เนื้อป่น โดยปลาป่นมีความสมดุลของกรดอะมิโนที่จำเป็นในปริมาณที่สูง อีกทั้งยังมีองค์ประกอบของฟอสโฟลิพิด และกรดไขมันที่จำเป็น ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อการเจริญเติบโตของกุ้ง สามารถเพิ่มความน่ากินของอาหารและเป็นแหล่งโปรตีนที่ย่อยได้สูง ในประเทศไทย ปลาป่นสามารถแบ่งตามองค์ประกอบของโปรตีน ไขมัน และเถ้า ได้แก่ ปลาป่นเกรดคุณภาพมีโปรตีนไม่น้อยกว่า 65 เปอร์เซ็นต์ ส่วนปลาป่นเกรดที่ 1 และ 2 มีโปรตีนไม่น้อยกว่า 60 และ 55 เปอร์เซ็นต์ โดยกุ้งขาวมีสัมประสิทธิ์การย่อยได้ของโปรตีนจากปลาป่นในเกรดต่างๆ อยู่ที่ระดับ 90-92, 88 และ 85 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Tantikitti *et al*., 2016)

อย่างไรก็ตามปลาป่นเป็นวัตถุดิบที่มีราคาสูง ปลาป่นเกรดกุ้งหรือเกรดคุณภาพมีราคา 40-42 บาทต่อกิโลกรัม (สมาคมผู้ผลิตปลาป่นไทย, 2561) และมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง ในทางกลับกันผลผลิตปลาป่นมีปริมาณไม่แน่นอนและมีแนวโน้มลดลง เนื่องจากแหล่งวัตถุดิบในการผลิตปลาป่นในประเทศไทยมาจาก 2 แหล่ง ได้แก่ ปลาเป็ดร้อยละ 55 เปอร์เซ็นต์ และเศษเหลือจากโรงงานแปรรูปสัตว์น้ำทะเลร้อยละ 45 เปอร์เซ็นต์ (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2555) ซึ่งล้วนแล้วแต่ต้องอาศัยพึ่งพาการทำประมงจับจากธรรมชาติ โดยปลาสด 100 กรัม สามารถผลิตปลาป่นได้ 22.5 กรัม และน้ำมันปลา 5 กรัม ส่วนปริมาณปลาป่นในสูตรอาหารกุ้งสำเร็จรูปมีปริมาณเฉลี่ยลดลงอย่างต่อเนื่อง โดยในปี 1995 อยู่ที่ 28 เปอร์เซ็นต์ ลดลงเหลือ 20 เปอร์เซ็นต์ ในปี 2006 และคาดการณ์ว่าในปี 2020 ลดลงเหลือเพียง 5 เปอร์เซ็นต์ ในสูตรอาหารกุ้งสำเร็จรูป (Tacon and Metian, 2008) ดังนั้น การนำแหล่งวัตถุดิบโปรตีนจากพืชและสัตว์มาใช้ทดแทนแหล่งโปรตีนจากปลาป่นในสูตรอาหารกุ้ง จึงเป็นแนวทางที่สำคัญในการลดต้นทุนค่าอาหารในอุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งของประเทศไทยที่มีสูงถึง 40-50 เปอร์เซ็นต์ ของต้นทุนทั้งหมด (ชลอ และคณะ, 2553; Shang *et al*., 1998; Lebel *et al*., 2010) อีกทั้งยังเป็นการเพิ่มขีดความสามารถในการแข่งขันทางการตลาด ซึ่งนำไปสู่ความสำเร็จ และส่งเสริมให้เกิดความยั่งยืนของอุตสาหกรรมกุ้งไทย

แหล่งวัตถุดิบโปรตีนทดแทนจากพืชและสัตว์ก็มีข้อจำกัดในการนำมาใช้ทดแทนโปรตีนจากปลาป่นในระดับที่สูงได้ เนื่องจากมีกรดอะมิโนที่ไม่สมดุล กุ้งสามารถย่อยได้ต่ำ และมี

สารต้านโภชนาการหรือโปรตีนที่มีความเป็นพิษเป็นองค์ประกอบ เป็นต้น ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

กากถั่วเหลือง ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากการสกัดน้ำมัน ราคา 13-17 บาทต่อกิโลกรัม (สมาคมผู้ผลิตอาหารไทย, 2560) จัดเป็นวัตถุดิบโปรตีนจากพืชที่มีคุณภาพดี มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบประมาณ 42-50 เปอร์เซ็นต์ (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2554) แต่อย่างไรก็ตาม กากถั่วเหลืองมีองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่จำเป็น 3 ชนิด ได้แก่ เมทไธโอนิน ไลซีน และทรีโอนินที่จำกัด (Amaya *et al*., 2007) มีแลกติน และโปรตีนที่มีความเป็นพิษ (antigenic protein) ได้แก่ glycinin และ β-conglycinin (Dersjant-Li, 2002; Xu *et al*., 2010; Song *et al*., 2016) และมีสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซิน (Hassaan *et al*., 2015) ในกุ้งขาวสามารถใช้เป็นองค์ประกอบในสูตรอาหารที่ระดับ 40-45 เปอร์เซ็นต์ (Cuzon *et al*., 2004; Amaya *et al*., 2007)

กากถั่วลิสง เป็นผลพลอยได้จากการสกัดน้ำมันถั่วลิสง จัดเป็นวัตถุดิบโปรตีนที่มีคุณภาพด้อยกว่ากากถั่วเหลือง มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบประมาณ 45-50 เปอร์เซ็นต์ มีระดับกรดอะมิโนอาร์จินีนสูง แต่มีระดับของกรดอะมิโนไลซีนและเมทไธโอนีนต่ำ และมีสารอะฟลาทอกซิน (Aflatoxin) ที่ผลิตจากเชื้อรา *Aspergillus flavus* โดยเฉพาะในกากถั่วลิสงที่มีความชื้นสูง (สมนึก และนพแสน, 2550; Liu *et al*., 2012) ในกุ้งขาวสามารถใช้เป็นองค์ประกอบในสูตรอาหารที่ระดับ 14 เปอร์เซ็นต์ (Liu *et al*., 2012)

กากคาโนลา เป็นพืชตระกูล Brassicaceae เช่นเดียวกับพวกผักกาด เป็นเมล็ดพืชน้ำมันเมืองหนาวที่สามารถนำมาแยกน้ำมันออกได้ กากที่เหลือนำมาใช้เป็นวัตถุดิบอาหารสัตว์ มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบประมาณ 35-48 เปอร์เซ็นต์ มีรสชาติขม มีระดับของกรดอะมิโนไลซีนและเมทไธโอนีนต่ำ และมีสารต้านโภชนาการพวกกลูโคซิโนเลต (glucosinolates) และกรดอีรูซิค (erucic acid) (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2554; Song *et al*., 2016) ในกุ้งขาวสามารถใช้เป็นองค์ประกอบในสูตรอาหารที่ระดับ 20 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับกากถั่วเหลือง (Suarez *et al*., 2009)

เนื้อและกระดูกป่น (meat and bone meal) ได้จากเศษเนื้อ ขน เอ็น พังผืด เลือดและเครื่องในสัตว์ มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบประมาณ 45-60 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งที่ดีของกรดอะมิโนที่จำเป็น มีแคลเซียมและฟอสฟอรัสสูง (สมนึก และนพแสน, 2550; Tan *et al*., 2005) ในกุ้งขาวสามารถใช้เป็นองค์ประกอบในสูตรอาหารที่ระดับ 29 เปอร์เซ็นต์ หรือทดแทนโปรตีนจากปลาป่นที่ระดับ 60 เปอร์เซ็นต์ (Tan *et al*., 2005)

เศษไก่ป่น (poultry by - product meal) เป็นวัตถุดิบแหล่งโปรตีนที่มีคุณภาพ มีองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่จำเป็นครบถ้วน และเป็นแหล่งของกรดไขมันที่จำเป็น ในกุ้งขาวมีสัมประสิทธิ์การย่อยโปรตีนจากเศษไก่ป่นสูงที่ระดับ 90 เปอร์เซ็นต์ และสามารถใช้เป็นองค์ประกอบในสูตรอาหารที่ระดับ 31.4 เปอร์เซ็นต์ หรือทดแทนโปรตีนจากปลาป่นที่ระดับ 80

เปอร์เซ็นต์ (Cruz-Suarez *et al*., 2007) และเมื่อใช้ร่วมกับกากถั่วเหลืองผสมกันด้วยไข่สามารถใช้ทดแทนปลาป่นได้ที่ระดับ 100 เปอร์เซ็นต์ (ปลาป่น 30 ลดลงเหลือ 0 เปอร์เซ็นต์ ในสูตรอาหาร) (Samocha *et al*., 2004)

ตารางที่ 3 องค์ประกอบทางเคมีและกรดอะมิโนที่จำเป็นในวัตถุดิบแหล่งโปรตีนของอาหารกุ้ง (เปอร์เซ็นต์ของวัตถุแห้ง)

องค์ประกอบ	**วัตถุดิบ**					
	ปลาป่น [1]	กากถั่วเหลือง [2]	กากถั่วลิสง [3]	กากคาโนลา [4]	เนื้อและกระดูกป่น [5]	เศษไก่ป่น [6]
ความชื้น	4.58	8.26	6	9.12	-	4.41
โปรตีน	65.0	46.9	46.1	38.9	51. 11	66.3
ไขมัน	8.95	3.45	7.8	5.92	11.62	12.6
เถ้า	17.3	6.68	12.9	8.16	32.35	12.0
เยื่อใย	0	3.35	-	8.31	-	0.97
NFE	0	-	-	-	-	3.73
แคลเซียม	5.29	0.35	-	-	9.13	3.4
ฟอสฟอรัส	3.17	0.62	-	-	4.54	2.1
อาร์จินีน	3.89	3.57	5.3	2.11	3.35	4.41
ฮิสทิดีน	1.61	1.26	0.9	1.09	0.96	1.48
ไอโซลิวซีน	2.81	2.3	1.4	1.48	1.46	2.44
ลิวซีน	4.86	3.7	2.4	2.5	3.11	4.48
ไลซีน	5.30	2.71	1.5	2.26	2.69	3.97
เมทไธโอนีน	1.72	0.68	1 (+ซีสตีน)	0.79	0.65	1.24
ฟีนิลอะลานีน	2.64	2.38	3.2 (+ไทโรซีน)	1.53	1.76	2.47
ทรีโอนีน	2.70	1.86	1.4	1.63	1.70	2.48
ทริปโตเฟน	0.55	0.66	-	0.48	0.32	0.63
วาลีน	3.3	2.49	1.4	1.81	2.42	3.01
คอเลสเตอรอล	0.86	-	-	-	-	0.6
ฟอสโพลิพิด	2.98	-	-	-	-	3.7

ที่มา: [1] (Tan *et al*., 2005; Cruz-Suarez *et al*., 2007), [2] (Tan *et al*., 2005; Suarez *et al*., 2009), [3] (Liu *et al*., 2012), [4] (Suarez *et al*., 2009), [5] (Tan *et al*., 2005), [6] (Davis and Arnold, 2000; Cruz-Suarez *et al*., 2007)

2.4 เอนไซม์โปรติเอสและการเจริญเติบโตของกุ้ง

2.4.1 เอนไซม์โปรติเอส

โปรติเอส คือกลุ่มของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยโปรตีน (proteolytic enzyme) โดยจะเข้าไปสลายพันธะเปปไทด์ให้แตกตัวลงจนมาเป็นหน่วยที่เล็กที่สุดคือ กรดอะมิโน โปรติเอสพบได้ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิดทั้งในแบคทีเรีย เชื้อรา ไวรัส รวมถึงในพืช แต่พบมากที่สุดในสัตว์ และที่รู้จักกันมากคือ เอนไซม์ที่ผลิตได้ในระบบย่อยอาหารของสัตว์ อาทิเช่น ทริปซิน ไคโมทริปซิน และเปปทิเดส เป็นต้น โดยเอนไซม์โปรติเอสสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มหลัก ตามตำแหน่งในการเกิดปฏิกิริยา และกลไกการทำงาน ตามรายงานของธันยพร (2550); Rao และคณะ (1998) และ Sriket (2014) มีรายละเอียดดังนี้

1. แบ่งตามตำแหน่งในการเกิดปฏิกิริยาย่อยสลายโปรตีนได้เป็น 2 แบบ คือ

1.1. เอกซ์โซเปปติเดส (exopeptidases) เป็นเอนไซมท์ที่ย่อยสลายพันธะเปปไทด์ด้านปลายโซ่โมเลกุลของโปรตีน โดยการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ทางด้านปลายหมู่อะมิโน เรียกว่า อะมิโนเปปติเดส (aminopeptidase) และในขณะที่การย่อยพันธะเปปไทด์ทางด้านปลายหมู่คาร์บอกซิล เรียกว่า คาร์บอกซีเปปติเดส (carboxypeptidase)

1.2. เอนโดเปปติเดส (endopeptidase) เป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายพันธะเปปไทด์จากภายในโซ่โมเลกุลของโปรตีนให้แตกตัวลงได้เป็นเปปไทด์สายสั้นๆ ซึ่งเอนโดเปปติเดสมีประสิทธิภาพสูงในการย่อยโปรตีน โดยมีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นที่เป็นเปปไทด์โมเลกุลใหญ่หลายชนิด ส่งผลให้สามารถย่อยสลายโมเลกุลของโปรตีนได้อย่างรวดเร็ว

2. แบ่งตามกลไกการทำงานได้เป็น 4 ประเภท (ภาพที่ 5) มีรายละเอียดดังได้อธิบายต่อไปนี้

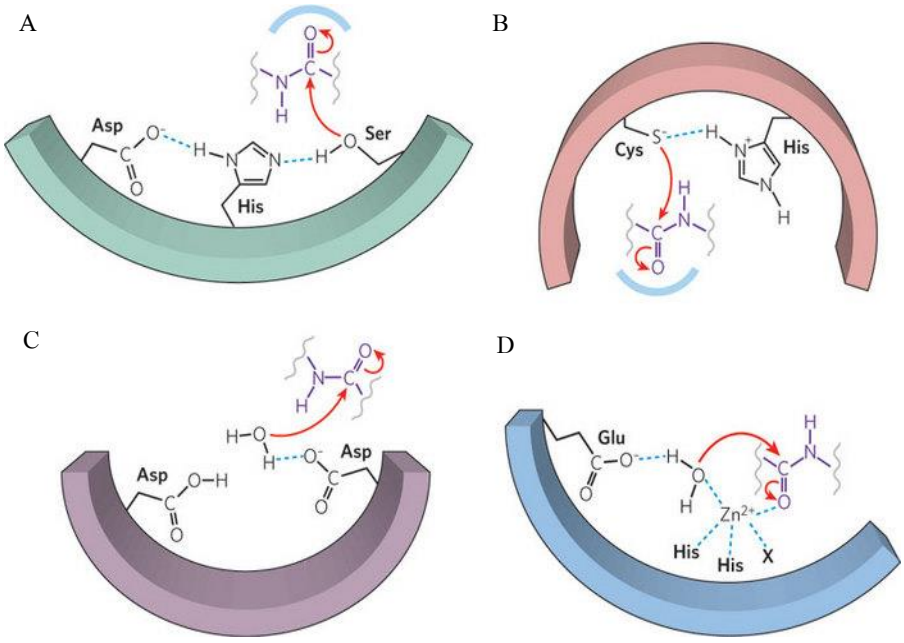
2.1. เซรีนโปรติเอส (serine protease) เอนไซม์กลุ่มนี้จัดอยู่ในกลุ่มอัลคาไลน์โปรติเอส (alkaline protease) มีพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ในช่วงพีเอช 7-11 และอุณหภูมิในช่วง 35-65 องศาเซลเซียส เป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายโปรตีนแบบเอนโดเปปติเดสมีอนุมูลเซริลเรสซิดิวส์ (seryl residue) และหมู่อิมิดาโซล (imidazole) อยู่ที่บริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ และสามารถยับยั้งการทำงานได้โดย DEP (di-isopropyl-phosphofluoride) ซึ่งเข้าทำปฏิกิริยากับหมู่ไฮดรอกซิลของอนุมูลเซริลในบริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ ตัวอย่างของเอนไซม์ในกลุ่มนี้ได้แก่ อีลาสเตส (elastase) ทรอมบิน (thrombin) ทริปซิน และไคโมทริปซิน เป็นต้น

2.2. ซิสเตอีนโปรติเอส (cysteine protease) เอนไซม์กลุ่มนี้จัดอยู่ในกลุ่มนิวทรัลโปรติเอส (neutral protease) มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ในช่วง 5-7.5 เป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายโปรตีนแบบเอนโดเปปติเดสมีกรดอะมิโนซิสเตอีนอยู่ที่บริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ และ

สามารถยับยั้งการทำงานได้ด้วยสารที่มีหมู่ซัลไฮดริล (sulfhydryl) ได้แก่ PCMB (p-chloromercury benzoate) โดยเอนไซม์ในกลุ่มนี้สามารถสกัดได้จากพืชชั้นสูงรวมถึงจุลินทรีย์บางชนิด ตัวอย่างได้แก่ ปาเปน (papain) และโบรมีเลน (bromelain) เป็นต้น

2.3. แอสพาติกโปรติเอส (aspartic protease) เอนไซม์กลุ่มนี้จัดอยู่ในกลุ่มคาร์บอกซิลโปรติเอส (carboxyl protease) และแอซิดโปรติเอส (acid protease) มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ในช่วง 2-4 มีหมู่คาร์บอกซิลจากอนุมูลกรดแอสปาติก 2 อนุมูล อยู่ที่บริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ และสามารถยับยั้งการทำงานได้ด้วย pepstatin โดยเอนไซม์ในกลุ่มนี้พบมากในจุลินทรีย์ ตัวอย่างได้แก่ เปปซิน (pepsin) และเรนนิน (rennin) เป็นต้น

2.4. เมทัลโลโปรติเอส (metallo protease) เอนไซม์กลุ่มนี้จัดอยู่ในกลุ่มนิวทรัลโปรติเอส มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ในช่วง 6-8 เป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายโปรตีนแบบเอกซ์โซเปปติเดส โดยมีอิออนของโลหะรวมอยู่ในโมเลกุลของเอนไซม์หรือร่วมในปฏิกิริยาการย่อยสลายโปรตีนในรูปแบบของโคแฟกเตอร์ และสามารถยับยั้งการทำงานได้โดยสารจับอิออนของโลหะ (metal chelating agent) ได้แก่ 1,10-phenanthroline และ EDTA เป็นต้น ตัวอย่างเอนไซม์ในกลุ่มนี้ได้แก่ คาร์บอกซีเปปทิเดส (carboxypeptidase) และโปรลิเดส (prolidase) เป็นต้น



ภาพที่ 5 กลไกการทำงานของโปรติเอส บริเวณ active site สามารถแบ่งออกได้เป็น 4 กลุ่ม คือ (A) serine protease, (B) cysteine protease, (C) aspartic protease และ (D) metallo protease
ที่มา: Erez และคณะ (2009)

2.4.2 กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสในกุ้ง

เอนไซม์โปรติเอสมีความสำคัญอย่างมากในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียน โดยระดับค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสในสัตว์กลุ่มครัสเตเชียนมีค่าแตกต่างกันในแต่ละชนิด แต่โดยทั่วไปเอนไซม์โปรติเอสของสัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียนมีกิจกรรมสูงสุดอยู่ในช่วงค่าความเป็นกรดด่าง 5.5-9.0 ตัวอย่างเช่น ในกุ้ง *Pleoticus muelleri* พบว่าเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจากตับและตับอ่อนมีกิจกรรมสูงในช่วงค่าความเป็นกรดด่าง 7.5-8.0 (Fernandez Gimenez *et al*., 2001) และในกุ้ง *Trachypenaeus curvirostris* มีกิจกรรมสูงสุดที่ค่าความเป็นกรดด่าง 8.4 (Asahara, 1973) และจากการศึกษาของ Tsai และคณะ (1986) พบกิจกรรมของเอนไซม์ในกลุ่มเซรีนโปรติเอสในกุ้ง *Penaeus monodon*, *Marsopenaeus japonicas*, *Fenneropenaeus penicillatus*, *Litopenaeus vannamei*, *Metapenaeus monoceros* และ *Macrobracium rosenbergii* โดยมีตับและตับอ่อนทำหน้าที่ในการผลิต และนอกจากนี้กิจกรรมของเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารของกุ้งมีความสัมพันธ์กับระยะของการลอกคราบ และการพัฒนาการเจริญเติบโตของกุ้ง (Ceccaldi, 1989)

ส่วนการควบคุมกิจกรรมและการสังเคราะห์เอนไซม์โปรติเอสในระบบทางเดินอาหารของกุ้งมีความจำเพาะต่อชนิดของกุ้ง โดย Fernandez Gimenez และคณะ (2001) รายงานว่าในกุ้งที่กินอาหารได้ทั้งพืชและสัตว์ (omnivorous) ได้แก่ กุ้งกุลาดำ *P. monodon* และกุ้งขาว *L. vannamei* มีความต้องการโปรตีนและมีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสในตับและตับอ่อนสูงกว่าในกุ้งที่กินเนื้อ (carnivorous) เพียงอย่างเดียว เช่น กุ้ง *Farfantepenaeus californiensis* และ *P. muelleri* นอกจากนี้ยังพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีนทริปซินและไคโมทริปซินในตับและตับอ่อนของกุ้ง *P. muelleri* มีกิจกรรมสูงสุดในช่วงหลังลอกคราบ (postmolt) และต่ำสุดในช่วงลอกคราบ (intermolt) เช่นเดียวกับในกุ้งขาว *L. vannamei* มีกิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินเพิ่มสูงขึ้นในช่วงหลังลอกคราบ (postmolt) และสูงสุดในช่วงก่อนลอกคราบ (premolt) และต่ำสุดในช่วงลอกคราบ (intermolt) ในขณะที่เอนไซม์ไคโมทริปซินไม่แสดงความแตกต่างในระยะต่างๆ ของการลอกคราบ และนอกจากนี้ในกุ้งขาว Moss และคณะ (2001) แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารและอาหารธรรมชาติในบ่อเลี้ยงกุ้ง กล่าวคือในกุ้งที่เลี้ยงในน้ำที่มีอาหารธรรมชาติพบกิจกรรมของเอนไซม์ในกลุ่มเซรีนโปรติเอสเพิ่มสูงขึ้นมากกว่าสองเท่า เมื่อเทียบกับกุ้งที่เลี้ยงในน้ำที่ผ่านการกรอง อาจเป็นเพราะความอุดมสมบูรณ์ของแหล่งอาหารธรรมชาติ เช่น ไดอะตอม และสาหร่าย เป็นแหล่งโปรตีนสำหรับกุ้ง และอาจส่งเสริมให้กุ้งมีการเติบโตที่เพิ่มสูงขึ้น และจากการศึกษาของ Lee และคณะ (1984) ถึงกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีน ได้แก่ trypsin, carboxypeptidase A และ B, acid protease และ general protease พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์

ย่อยโปรตีนในระบบทางเดินอาหารขึ้นอยู่กับการกำหนดสูตรอาหารของกุ้ง กล่าวคือ แหล่งของโปรตีนในอาหารมีผลอย่างมากต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสในกุ้งขนาดเล็ก (9-11 กรัม) ในขณะที่ระดับของโปรตีนในอาหารส่งผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสในกุ้งทุกขนาด โดยกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีนมีค่าสูงในกุ้งขนาดเล็ก โดยเฉพาะเมื่อได้รับอาหารที่มีแหล่งโปรตีนจากสัตว์ในอัตราส่วนที่สูงกว่าพืช และลดต่ำลงในกุ้งที่มีขนาดใหญ่ (15-30 กรัม) นั่นอาจหมายถึงกุ้งโต (มากกว่า 15 กรัม) มีความสามารถในการย่อยแหล่งโปรตีนคุณภาพสูงในอาหารได้น้อยกว่าในกุ้งขนาดเล็ก และการเปลี่ยนแปลงระดับของเอนไซม์ไม่ได้มีความเกี่ยวข้องโดยตรงกับอัตราการเติบโต แต่เป็นผลมาจากความแตกต่างของสารอาหารที่กุ้งได้รับ ดังนั้นสามารถกล่าวโดยสรุปได้ว่ากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีนในกุ้งขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ได้แก่ ระยะการลอกคราบของกุ้ง ลักษณะนิสัยการกินอาหาร และชนิดของแหล่งโปรตีนรวมถึงปริมาณของโปรตีนในอาหารกุ้ง

2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสในอาหารสัตว์น้ำ

เอนไซม์คือกลุ่มของโปรตีนที่ทำหน้าที่แตกต่างจากโปรตีน โดยทั่วไปมีหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาชีวเคมี ทำงานได้เมื่ออยู่ในสภาวะที่เหมาะสม ขึ้นอยู่กับความชื้น ค่าความเป็นกรดด่าง และอุณหภูมิ (ธงชาติ, 2556) โดยการประยุกต์ใช้เอนไซม์โปรติเอสในอาหารสัตว์น้ำ มีปัจจัยด้านอื่นๆที่เกี่ยวข้องกับกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสในอาหารสัตว์น้ำ สามารถสรุปเป็นประเด็นสำคัญของความสัมพันธ์กันได้ดังนี้ ชนิดของสัตว์น้ำ ระดับของเอนโซม์โปรติเอสในอาหาร ชนิดและปริมาณของวัตถุดิบพืชที่ใช้เป็นแหล่งโปรตีนในอาหาร โดยความรู้ความเข้าใจพื้นฐานดังกล่าวนำไปสู้ความสำเร็จของการประยุกต์ใช้เอนไซม์โปรติเอสในอาหารสัตว์น้ำตามวัตถุประสงค์ที่กำหนด ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

2.5.1 ชนิดของสัตว์น้ำ และสภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส

หลักการสำคัญของเอนไซม์โปรติเอสที่นำมาประยุกต์ใช้ในอาหารสัตว์น้ำ คือ สามารถมีกิจกรรมหรือไม่เสียสภาพเมื่อผ่านกระบวนการผลิตและอัดเม็ดอาหารที่อุณหภูมิสูง และสามารถมีกิจกรรมในช่วงอุณหภูมิที่สัตว์น้ำอยู่อาศัยและระดับค่าความเป็นกรดด่างหรือสภาวะในทางเดินอาหารของสัตว์น้ำแต่ละชนิด แสดงให้เห็นได้จากการศึกษาของ Divakaran และ Velasco (1999) จากการเสริมเอนไซม์โปรติเอสทางการค้า 4 ชนิด ได้แก่ Fungal protease, Multizyme AK, Enzeco protease และ Cenzyme ในอาหารกุ้งขาวที่ระดับ 1 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิด ไม่ส่งผลให้มีการเจริญเติบโตที่เพิ่มสูงขึ้น แม้ว่าจากการศึกษาในหลอดทดลองจะมีกิจกรรมของ

เอนไซม์ในอาหาร ชี้ให้เห็นถึงความสำคัญของกิจกรรมของเอนไซม์ในสภาวะที่สัตว์น้ำอยู่อาศัย หรือสภาวะของระบบย่อยอาหารของสัตว์น้ำแต่ละชนิด

ปัจจุบันจากการรวบรวมรายงานการศึกษาผลของการประยุกต์ใช้เอนไซม์โปรติเอสในอาหารสัตว์น้ำที่ผลิตได้จากยีสต์ เชื้อรา และแบคทีเรียชนิดต่างๆ และพัฒนามาเป็นผลิตภัณฑ์ทางการค้าที่น่าสนใจ ซึ่งสามารถตอบโจทย์ของการนำมาประยุกต์ในอาหารสัตว์น้ำ โดยเฉพาะแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ซึ่งเป็นภูมิภาคเขตร้อน คือ เอนไซม์โปรติเอสชนิดเซรีน (serine protease) สามารถทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นด่าง จัดอยู่ในกลุ่มเอนโดเปปทิเดส (endopeptidase) ที่เป็นผลิตผลจากการหมักของแบคทีเรีย (*Streptomyces* sp.) จาก JEFO Nutrition Inc., Saint-Hyacinthe, QC, Canada จากการศึกษาของ Li และคณะ (2015) พบว่าสามารถทนต่ออุณหภูมิที่สูงในระหว่างการอัดเม็ดอาหารสำหรับกุ้งขาวที่อุณหภูมิ 80 ± 5 องศาเซลเซียส และหลังจากการอบที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 25 นาที มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสอยู่ที่ระดับ 79.3 และ 67.5 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และมีกิจกรรมในช่วงอุณหภูมิ 15-40 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกับสภาพแวดล้อมที่สัตว์น้ำอยู่อาศัย และมีกิจกรรมสูงที่อุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียส และมีค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อกิจกรรมอยู่ที่ 8.5 และจากการทดสอบในปลาและกุ้งชนิดต่างๆ พบว่าสามารถส่งเสริมให้มีการเจริญเติบโตที่เพิ่มสูงขึ้น เมื่อมีการนำวัตถุดิบพืชมาทดแทนปลาป่นในสูตรอาหารและเสริมด้วยเอนไซม์โปรติเอส ได้แก่ ปลาช่อน (*Channa striatus*) (Thanh Huong *et al*., 2015) ปลานิลลูกผสม (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*) (Li *et al*., 2015) ปลา gibel carp (*Carassius auratus gibelio*) (Shi *et al*., 2016) และกุ้งขาว (*L. vannamei*) (Li *et al*., 2015; Song *et al*., 2016) และยังมีรายงานเพิ่มเติมจากการศึกษาของ Shi และคณะ (2016) ว่าสามารถทนต่ออุณหภูมิและความดันที่สูงในระหว่างการอัดเม็ดอาหารชนิดเม็ดลอย (extruding) ที่อุณหภูมิ 110 ± 5 องศาเซลเซียส และมีความดันที่สูง (มากกว่า 10 เท่าของความดันบรรยากาศ) มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสลดลงอยู่ที่ระดับ 37.65 เปอร์เซ็นต์ และจากการทดสอบในปลา gibel carp (Shi *et al*., 2016) และปลานิลลูกผสม (Li *et al*., 2015) พบว่าไม่สามารถส่งเสริมให้ปลาทั้งสองชนิดมีการเจริญเติบโตที่เพิ่มสูงขึ้น

2.5.2 ระดับของเอนไซม์โปรติเอส ชนิดและปริมาณของวัตถุดิบที่ใช้เป็นแหล่งโปรตีนในอาหาร

เป็นปัจจัยที่สำคัญต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสในอาหารสัตว์น้ำ ซึ่งจากการศึกษาของ Dalsgaard และคณะ (2012) ถึงผลของการเสริมเอนไซม์โปรติเอสทางการค้า (DSM Nutritional Product, Saint-Louis Cedex, France) ที่ระดับ 228 มก./กก. ต่อสัมประสิทธิ์การย่อยสารอาหารในวัตถุดิบพืชที่ใช้เป็นแหล่งโปรตีนหลัก 3 ชนิด คือ กากถั่วเหลือง (344 กรัมต่อกิโลกรัม (ก./กก.)) กากเมล็ดทานตะวัน (246 ก./กก.) และกากคาโนลา (264 ก./กก.) ในอาหารของปลาเรน

โบว์เทราต์ (*Oncorhynchus mykiss*) พบว่าสามารถเพิ่มสัมประสิทธิ์การย่อยวัตถุแห้ง โปรตีน ไขมัน เถ้า และฟอสฟอรัสในอาหารที่ใช้กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งโปรตีนหลักให้สูงขึ้น แต่ในอาหารที่ใช้กากเมล็ดทานตะวันและกากคาโนลาเป็นแหล่งโปรตีนหลักมีสัมประสิทธิ์การย่อยสารอาหารไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ซึ่งกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสต่อสัมประสิทธิ์การย่อยได้ของสารอาหารในกากถั่วเหลืองอาจมีความสัมพันธ์กับการย่อยหรือการลดลงของสารต้านโภชนาการที่เป็นโปรตีน (proteinaceous anti-nutrients) โปรตีนที่มีความเป็นพิษต่อร่างกาย (antigenic proteins) และหรือการเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนที่เสียสภาพระหว่างกระบวนการผลิตอาหาร แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างเอนไซม์โปรติเอส แหล่งและปริมาณของสารตั้งต้นหรือวัตถุดิบโปรตีนจากพืชในอาหารสัตว์น้ำ

นอกจากนี้กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสต่อสัมประสิทธิ์การย่อยได้ของสารอาหารและการเจริญเติบโตยังขึ้นอยู่กับระดับที่เหมาะสมของเอนไซม์โปรติเอส และวัตถุดิบพืชที่ใช้เป็นแหล่งโปรตีนในอาหารสัตว์น้ำอีกด้วย โดยหากมีระดับของเอนไซม์โปรติเอสที่สูงมากเกินกว่าระดับของสารตั้งต้นหรือโปรตีนในอาหารสัตว์น้ำ เอนไซม์โปรตีเอสในส่วนที่เหลือจะย่อยโปรตีนของชั้นเยื่อเมือกทางเดินอาหาร (mucosal proteins) ส่งผลให้สัตว์น้ำมีการเจริญเติบโตที่ลดลง (Song *et al*., 2016) โดยในกุ้งและปลามีรายงานการศึกษาพบว่าระดับของเอนไซม์โปรติเอสที่เหมาะสมสามารถส่งเสริมให้มีการเจริญเติบโตเพิ่มสูงขึ้น ในกุ้งขาวอยู่ที่ระดับ 175 มก./กก. เมื่อใช้กากถั่วเหลืองและกากถั่วลิสงทดแทนโปรตีนจากปลาป่นที่ระดับ 50 เปอร์เซ็นต์ในสูตรอาหาร (Song *et al*., 2016) และในปลา Gibel carp อยู่ที่ระดับ 150-175 มก./กก. เมื่อใช้กากถั่วเหลืองทดแทนโปรตีนจากปลาป่นที่ระดับ 67 เปอร์เซ็นต์ ในสูตรอาหาร (Shi *et al*., 2016)

2.6 ผลของการเสริมเอนไซม์โปรติเอสในอาหารสัตว์น้ำ

จากรายงานการศึกษาของ Davis และคณะ (1998) พบว่าการเสริมเอนไซม์โปรติเอสทางการค้า Enzeco ® Bromelain FG ในอาหารกุ้งขาว ที่ระดับ 4 ก./กก. มีสัมประสิทธิ์การย่อยโปรตีนเพิ่มขึ้น 9 เปอร์เซ็นต์ จาก 65.3 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารสูตรควบคุม เป็น 74.3 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารที่มีการเสริมเอนไซม์โปรติเอส อย่างไรก็ตามการเสริมเอนไซม์โปรติเอสที่ระดับ 4 ก./กก มีผลต่อการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหารที่ลดลงเมื่อเทียบกับอาหารชุดควบคุม คณะผู้วิจัยให้เหตุผลว่าอาจเกิดจากเอนไซม์โปรติเอสไปลดความน่ากินของอาหารและการรวมกลุ่มกันของสารอาหารจากการย่อยที่เกิดขึ้นก่อน (pre-digest) เช่นเดียวกับในอาหารปลาเรนโบว์เทราต์ (*O. mykiss*) จากการเสริมเอนไซม์โปรติเอสทางการค้า (Poultrygrow -250 TM; JEFO Nutrition Inc., St. Hyacinthe QC) ที่ระดับ 250 มก./กก. มีสัมประสิทธิ์การย่อยวัตถุแห้ง โปรตีน ไขมัน และพลังงานเพิ่มสูงขึ้น ในอาหารที่มีองค์ประกอบของกากถั่วลันเตาและกากคาโนลาในอัตราส่วน 1:1

ที่ระดับ 240 ก./กก. แต่มีการเจริญเติบโตไม่แตกต่างกับอาหารในสูตรเดียวกันที่ไม่มีการเสริมเอนไซม์โปรติเอส (มีแนวโน้มการเจริญเติบโตและปริมาณอาหารที่กินลดต่ำลง) แม้ว่าจะมีอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อที่ลดต่ำลงก็ตาม (Drew *et al*., 2005) และจากการเสริมเอนไซม์โปรติเอสทางการค้า (DSM Nutritional Product, Saint-Louis Cedex, France) ที่ระดับ 228 มก./กก. มีสัมประสิทธิ์การย่อยวัตถุแห้ง โปรตีน ไขมัน เถ้า และฟอสฟอรัสเพิ่มสูงขึ้น ในอาหารที่มีกากถั่วเหลือง 340 ก./กก. เป็นแหล่งโปรตีนหลัก แต่มีการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหารไม่แตกต่างกับอาหารในชุดควบคุม อาจเนื่องมาจากระยะเวลาการทดลองที่สั้นเพียง 17-19 วัน (Dalsgaasd *et al*., 2012)

จากการศึกษาหาระดับที่เหมาะสมของการเสริมเอนไซม์โปรติเอสทางการค้า (JEFO Nutrition Inc., St. Hyacinthe QC) ที่ระดับ 125, 150 และ 175 มก./กก. ในอาหาร (อาหารเม็ดจม อุณหภูมิในการอัดเม็ด 80 ± 5 องศาเซลเซียส) พบว่า ในปลา gibel carp ระดับที่เหมาะสมอยู่ที่ 150-175 มก./กก. เมื่อใช้กากถั่วเหลืองทดแทนโปรตีนจากปลาป่นที่ระดับ 67 เปอร์เซ็นต์ ในสูตรอาหาร โดยมีการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหาร และสัมประสิทธิ์การย่อยโปรตีนเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเทียบกับอาหารในสูตรเดียวกัน และไม่แตกต่างกับอาหารที่มีระดับปลาป่นสูง (Shi *et al*., 2016) และในกุ้งขาวระดับที่เหมาะสมอยู่ที่ 175 มก./กก. เมื่อใช้กากถั่วเหลืองและกากถั่วลิสงทดแทนโปรตีนจากปลาป่นที่ระดับ 50 เปอร์เซ็นต์ ในสูตรอาหาร โดยมีการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหารไม่แตกต่างกับอาหารที่มีระดับปลาป่นสูง และมีกิจกรรมของเอนไซม์ทริปซิน ไลเปส และอะไมเลสในตับและตับอ่อนเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเทียบกับอาหารในสูตรเดียวกันที่ไม่เสริมเอนไซม์โปรติเอส แต่มีระดับต่ำกว่าอาหารที่มีระดับปลาป่นสูง และมีระดับของเอนไซม์ที่เกี่ยวของกับระบบภูมิคุ้มกันในตับและตับอ่อน และในซีรัมที่ดีเพิ่มขึ้น โดยมีระดับของ superoxide dismutase (SOD) และ phenoloxidase (PO) ในตับและตับอ่อน และในซีรัมที่เพิ่มสูงขึ้น ส่วนระดับของ malondialdehyde (MDA) ในซีรัมและปริมาณการตายสะสมที่ 96 ชั่วโมง หลังการฉีดเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ที่ระดับ 2.4×10^{7} CFU/ml มีค่าลดลง เมื่อเทียบกับอาหารในสูตรเดียวกันที่ไม่เสริมเอนไซม์โปรติเอส แต่ไม่แตกต่างกับอาหารที่มีระดับปลาป่นสูง (Song *et al*., 2016)

จากการรวบรวมรายงานการศึกษาผลของการเสริมเอนไซม์โปรติเอสที่ระดับ 175 มก./กก. (ระดับที่เหมาะสม) ในอาหารสัตว์น้ำชนิดอื่นๆ ได้แก่ ปลาช่อน (*C. striatus*) พบว่าปลามีการเจริญเติบโต (มีขนาดที่สม่ำเสมอ) และประสิทธิภาพการใช้อาหารที่เพิ่มสูงขึ้นในอาหารที่มีปลาป่นและองค์ประกอบอื่นๆ ที่เหมือนกัน และในอาหารที่ใช้กากถั่วเหลือง กากคาโนลา และรำข้าวทดแทนโปรตีนจากปลาป่นที่ระดับ 65 เปอร์เซ็นต์ มีการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหารไม่แตกต่างกับอาหารชุดควบคุมที่มีปลาป่นสูง (Thanh Huong *et al*., 2015) เช่นเดียวกับผลการศึกษา

ของ Li และคณะ (2015) ในกุ้งขาว (*L. vannamei*) พบว่ามีการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหาร และกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสในตับและตับอ่อนที่เพิ่มสูงขึ้นในอาหารที่มีการลดระดับปลาป่นลง 10 เปอร์เซ็นต์ และโปรตีน 5 เปอร์เซ็นต์ ในสูตรอาหาร และไม่แตกต่างกับอาหารที่มีปลาป่นและโปรตีนสูง ส่วนในปลานิลลูกผสม (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*) พบว่ามีการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหาร และสัมประสิทธิ์การย่อยโปรตีนเพิ่มสูงขึ้นในอาหารที่มีระดับปลาป่น 30 ก./กก. แต่ในอาหารที่มีระดับปลาป่น 90 ก./กก. มีการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหาร และสัมประสิทธิ์การย่อยโปรตีนไม่แตกต่างกัน และในปู Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) จากการศึกษาของ Chowdhury และคณะ (2017) พบว่าสามารถเพิ่มการใช้ประโยชน์จากโปรตีนและไขมันสุทธิให้สูงขึ้นในอาหารที่มีระดับปลาป่นต่ำ และมีค่าสูงกว่าปูที่ได้รับอาหารที่มีระดับปลาป่นสูง ซึ่งจากผลรายงานการศึกษาที่กล่าวมาข้างต้นสามารถสรุปได้ถึงวัตถุประสงค์ของการประยุกต์ใช้เอนไซม์โปรติเอสในอาหารสัตว์น้ำ เพื่อเป็นการใช้ประโยชน์จากแหล่งโปรตีนทนแทนจากพืชได้เพิ่มสูงขึ้นในสูตรอาหาร ซึ่งการเสริมเอนไซม์โปรติเอสสามารถเร่งการเจริญเติบโต เพิ่มประสิทธิภาพการใช้อาหาร ประสิทธิภาพการย่อยสารอาหาร รวมถึงภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำให้เพิ่มสูงขึ้น เมื่อมีการทดแทนแหล่งโปรตีนจากปลาป่นด้วยวัตถุดิบแหล่งโปรตีนจากพืชในสูตรอาหารที่ระดับ 50-67 เปอร์เซ็นต์ โดยไม่มีผลเชิงลบเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารที่มีปลาป่นในระดับสูงหรืออาหารสูตรควบคุมเชิงบวก

โดยระดับและชนิดที่เหมาะสมของการประยุกต์ใช้เอนไซม์โปรติเอสในอาหารสัตว์น้ำอยู่ที่ระดับ 175 มก./กก. เมื่อใช้เอนไซม์โปรติเอสชนิดเซรีนที่สามารถทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นด่าง จัดอยู่ในกลุ่มเอนโดเปปทิเดสที่เป็นผลิตผลจากการหมักของแบคทีเรีย (*Streptomyces* sp.) จาก JEFO Nutrition Inc., Saint-Hyacinthe, QC, Canada เสริมลงในอาหารเม็ดจม (อุณหภูมิในการอัดเม็ด 80 ± 5 องศาเซลเซียส)

2.7 เชื้อวิบริโอและการก่อโรคในกุ้ง

เชื้อวิบริโอจัดเป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างเป็นท่อนตรงหรือท่อนโค้ง เคลื่อนที่โดยใช้แฟลกเจลลาที่ขั้ว เซลล์มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.3-1.3 ไมโครเมตร บางพวกต้องการเกลือหรือเกลือมีส่วนช่วยในการกระตุ้นการเจริญเติบโต สามารถพบในน้ำที่มีความเค็มในช่วงกว้าง เชื้อวิบริโอเป็นสาเหตุให้เกิดการตายในกุ้งตั้งแต่ค่อนข้างมากถึงระดับตาย 100 เปอร์เซ็นต์ อาการโดยทั่วๆ ไปของกุ้งที่ติดเชื้อวิบริโอจะเกิดการตายของเนื้อเยื่อบริเวณเซลล์ของท่อตับและพบเชื้อวิบริโออยู่ในบริเวณท่อตับ ต่อจากนั้นจะเกิดแกรนูลโลมาตัส (granulomatous) ล้อมรอบบริเวณท่อตับที่ถูก

เชื้อวิบริโอเข้าทำลาย (สาวิตรี, 2541) โดยเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มวิบริโอที่แยกได้จากกุ้งขาว และกุ้งกุลาดำในโรงเพาะฟักและในบ่อดินที่เป็นโรคส่วนใหญ่พบเชื้อ *Vibrio alginolyticus*, *V. damsela*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. penaeicida* และ *V. harveyi* (Saulnier *et al*., 2000)

2.7.1 โรคเรืองแสงในกุ้ง

มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อแบคทีเรีย วิบริโอ ฮาวีอาย (*Vibrio harveyi*) นำมาซึ่งการตายของลูกกุ้งจำนวนมากในโรงเพาะฟัก โดยมักสังเกตเห็นมีการเรืองแสงบริเวณตัวกุ้งที่มีชีวิตหรือซากของกุ้งโดยเฉพาะส่วนหัวในเวลากลางคืน หลังจากทำการแยกเชื้อจากลูกกุ้งที่ตายพบว่ามีเชื้อ *V. harveyi* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีลักษณะรูปร่างเป็นท่อนสั้นๆ เจริญเติบโตได้ทั้งในภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน เชื้อนี้สามารถให้แสงสีเขียวแกมเหลืองออกมา โดยปฏิกิริยาทางเคมีที่เกิดจากเอนไซม์ลูซิเฟอเรส (luciferase) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ซึ่งทำให้เรืองแสงได้ในที่มืด เชื้อ *V. harveyi* จะเพิ่มจำนวนเซลล์อย่างรวดเร็วในน้ำที่มีความเค็ม 10-40 พีพีที ที่อุณหภูมิ 25-35 องศาเซลเซียส ในช่วงค่าความเป็นกรดด่าง 7-9 โดยความรุนแรงของโรคมีความสัมพันธ์กับความเค็มของน้ำ ฤดูกาล และปริมาณสารอินทรีย์ในน้ำ กล่าวคือ การลดระดับความเค็มของน้ำเหลือ 5-7 พีพีที สามารถลดความรุนแรงของโรคได้ และในน้ำที่มีปริมาณสารอินทรีย์สูง เชื้อ *V. harveyi* จะเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว มักพบการแพร่ระบาดของโรคเป็นบริเวณกว้างในช่างฤดูร้อน และปัญหาการเกิดโรคเรืองแสงของกุ้งในบ่อเลี้ยงพบได้ตั้งแต่เริ่มปล่อยกุ้งลงเลี้ยง 2 สัปดาห์ จนถึงกุ้งใหญ่ โดยพบมากในกุ้งที่มีอายุ 1-2 เดือน (ชลอ, 2543) โดย มณเฑียร และคณะ (2533) พบว่าอาการที่เกิดจากการติดเชื้อ *V. harveyi* ในระยะแรกลูกกุ้งจะมีการเคลื่อนไหวช้าลง ลำตัวสีขาวขุ่น และเมื่อนำลูกกุ้งที่มีอาการใกล้ตายมาตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์จากการศึกษาของ Karunasagar และคณะ (1994) พบว่ามีเชื้อ *V. harveyi* จำนวนมากอยู่ในแอ่งเลือดของลูกกุ้ง และนอกจากนี้ Lavilla-Pitogo และคณะ (1990) รายงานเพิ่มเติมว่ามีเชื้อ *V. harveyi* อยู่ในแอ่งเลือดประมาณ 8.6×10^4 CFU/ml และพบเชื้อ *V. harveyi* อยู่กันอย่างหนาแน่นที่บริเวณทางเดินอาหารและจากการตรวจสอบลักษณะของลูกกุ้งที่ติดเชื้อโดยใช้ scaning electron micrograph จะพบเชื้อ *V. harveyi* อยู่รวมตัวกันที่บริเวณปากและอวัยวะช่วยกินอาหาร และจากการตัดตามขวางของบริเวณทางเดินอาหารพบว่ามีเชื้อ *V. harveyi* อยู่รวมกับอนุภาคของอาหาร เมื่อตรวจดูเนื้อเยื่อบริเวณเหงือกพบมีเชื้อ *V. harveyi* จำนวนมากเช่นเดียวกัน จึงคาดว่าการติดเชื้อ *V. harveyi* อาจสามารถผ่านทางระบบหายใจได้

ส่วนการศึกษาทางด้านพยาธิสภาพของกุ้งที่ติดเชื้อ *V. harveyi* พบเชื้อเข้าทำลายที่บริเวณท่อตับ และเซลล์ด้านในของท่อตับจะแยกตัวออกจากชั้นของ basal lamina และเกิดการตาย

ของเนื้อเยื่อบริเวณดังกล่าว และบริเวณ basal lamina ที่ติดเชื้อจะมีการสร้างสารประกอบพวก PAS-positive โดยจะมีลักษณะหนาเนื่องจากมี collagenous fibers ที่ถูกสร้างขึ้นมาใหม่และมีเซลล์ที่ภายในนิวเคลียสเป็นรูปเกลียวและถูกตรึงอยู่ใน collagenous fibers ท่อตับที่มีการติดเชื้อจะถูกเซลล์เม็ดเลือดล้อมรอบ basal lamina ที่มีลักษณะหนา เนื้อเยื่อที่อยู่ในบริเวณท่อตับที่มีการติดเชื้อจะมีลักษณะบวม แอ่งเลือดขยายขนาดใหญ่ขึ้น มีการรวมตัวกันของ eosinophilic granules, amorphous matter และมีการแทรกซึมของเซลล์เม็ดเลือด สุดท้ายกลายเป็น granulomatous capsule บริเวณชั้นเนื้อเยื่อที่มีการติดเชื้อจะเกิดลักษณะเซลล์ตายเป็นจำนวนมาก โดยกุ้งที่ติดเชื้อเป็นระยะเวลานาน 14 วัน จะเกิดการตายของเซลล์ตับและตับอ่อนรวมถึงต่อมน้ำเหลืองเกือบทั้งหมด สุดท้ายกุ้งไม่กินอาหารส่งผลให้ร่างกายอ่อนแอและตายในที่สุด (Jiravanichpaisal *et al*.,1994)

3. วัตถุประสงค์

3.1 เพื่อศึกษาผลของการเสริมเอนไซม์โปรติเอสในอาหารที่มีระดับปลาป่นแตกต่างกัน 3 ระดับคือ 18, 10 และ 0 เปอร์เซ็นต์ในสูตรอาหาร โดยใช้แหล่งโปรตีนจากกากถั่วเหลืองมาทดแทนต่อการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหาร กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหาร สัมประสิทธิ์การย่อยอาหาร ภูมิคุ้มกัน รวมถึงความต้านทานต่อเชื้อ *Vibrio harveyi* ในกุ้งขาว

3.2 เพื่อลดปริมาณการใช้แหล่งโปรตีนจากปลาป่นและใช้แหล่งโปรตีนจากกากถั่วเหลืองมาทดแทนในสูตรอาหาร โดยไม่ส่งผลเชิงลบต่อการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหารของกุ้งขาว

3.3 เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการใช้อาหารและสัมประสิทธิ์การย่อยอาหารของกุ้งขาวให้สูงขึ้น เมื่อมีการเสริมเอนไซม์โปรติเอส

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

1. วัสดุ

1.1 กุ้งขาวที่ใช้ในการทดลอง

ลูกพันธุ์กุ้งขาวระยะโพสต์ลาร์วา 13 จากฟาร์มกุ้งอินเตอร์ อ.สทิงพระ จ.สงขลา จำนวน 10,000 ตัว นำมาอนุบาลจนกระทั่งกุ้งมีน้ำหนักเฉลี่ย 2.33 กรัมต่อตัว

1.2 สารเคมี

1.2.1 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของตัวกุ้งทดลอง, มูลกุ้ง และองค์ประกอบทางโภชนาการของอาหารทดลอง (แสดงในภาคผนวก)

1.2.2 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์โครมิคออกไซด์ในมูลกุ้ง และอาหารทดลอง (แสดงในภาคผนวก)

1.2.3 สารเคมีสำหรับการศึกษาองค์ประกอบเลือดและระดับภูมิคุ้มกันของกุ้งขาว (แสดงในวิธีการทดลองที่ 3.6.4)

1.2.4 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์เอนไซม์ย่อยอาหาร, เอนไซม์ต่อต้านอนุมูลอิสระ และการออกซิเดชันของกรดไขมัน (แสดงในวิธีการทดลองที่ 3.6.5 และ 3.6.6)

1.2.5 สารเคมีสำหรับเตรียมน้ำเลี้ยงกุ้ง ได้แก่ โซเดียมไบคาร์บอเนต แคลเซียมคลอไรด์ แมกนีเซียมคลอไรด์ คลอรีนผง (65 เปอร์เซ็นต์) และโซเดียมไธโอซัลเฟต

1.2.6 สารเคมีสำหรับเตรียมเชื้อ *Vibrio harveyi* (แสดงในวิธีการทดลองที่ 3.6.7)

1.3 อาหารสำหรับอนุบาลลูกกุ้งก่อนเริ่มต้นการทดลอง

ใช้อาหารสำเร็จรูปทางการค้าสำหรับอนุบาลลูกกุ้งขาวขนาดเบอร์ 1 ตั้งแต่ลูกกุ้งระยะโพสลาวา 13 ถึงน้ำหนักตัว 0.5 กรัม และเบอร์ 2 ตั้งแต่ลูกกุ้งมีน้ำหนักตัว 0.5-2.3 กรัม ยี่ห้อ โกลด์ โฟร์เต้ ซึ่งได้รับการสนับสนุนจากบริษัท โกลด์ คอยน์ สเปเชียลิตี้ส์ (ประเทศไทย) จำกัด ให้อาหารวันละ 4 ครั้ง ได้แก่ เวลา 8.00 น. 12.00 น. 16.00 น. และ 20.00 น. โดยในช่วง 10 วันแรกของการอนุบาลใช้อาทีเมียแรกฟักเป็นอาหารเสริมสลับกับการใช้อาหารสำเร็จรูปทางการค้า

2. อุปกรณ์

2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเลี้ยงกุ้ง

2.1.1 บ่อคอนกรีตขนาด 3 ลูกบาศก์เมตร จำนวน 2 บ่อ สำหรับการอนุบาลลูกกุ้ง

2.1.2 ถังพลาสติกทรงสี่เหลี่ยมขนาด 58 x 79 x 48 เซนติเมตร ความจุน้ำ 220 ลิตร จำนวน 30 ถัง ปิดถังทดลองด้วยตาข่ายพลาสติก เพื่อป้องกันการกระโดดของกุ้งทดลอง สำหรับการเลี้ยงกุ้งในระหว่างการทดลอง

2.1.3 อุปกรณ์ระบบให้อากาศ ได้แก่ เครื่องให้อากาศ หัวทราย สายออกซิเจน และหัวปรับปริมาณออกซิเจน

2.1.4 อุปกรณ์เปลี่ยนถ่ายน้ำ ได้แก่ เครื่องปั๊มน้ำชนิดจุ่ม สายยางดูดตะกอน ฝอยทำความสะอาดถัง

2.1.5 อุปกรณ์ขนย้ายกุ้ง ได้แก่ สวิงช้อนกุ้ง และถังพลาสติก

2.2 อุปกรณ์สำหรับเตรียมอาหารทดลอง

2.2.1 เครื่องมือเตรียมอาหาร ได้แก่ เครื่องบดวัตถุดิบอาหาร เครื่องผสมและอัดเม็ดอาหาร ตู้อบอาหาร และตู้เย็นเก็บอาหารอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.2.2 อุปกรณ์ชั่งตวงวัสดุอาหาร ได้แก่ เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง และเครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง กระบอกตวง บีกเกอร์ ถาดเตรียมอาหาร

2.3 อุปกรณ์วิเคราะห์คุณภาพน้ำ

2.3.1 อุปกรณ์สำหรับเก็บตัวอย่างน้ำ และตวงปริมาตรน้ำสำหรับวิเคราะห์คุณภาพน้ำ ได้แก่ ขวดเก็บตัวอย่างน้ำ และกระบอกฉีดยาขนาด 1 และ 10 มิลลิลิตร

2.3.2 อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์คุณภาพน้ำ ได้แก่ เทอร์โมมิเตอร์ (thermometer) เครื่องวัดความเค็ม (refractometor) เครื่องตรวจวัดปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (DO meter) เครื่องตรวจวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) และชุดทดสอบคุณภาพน้ำ (test kit) ตรวจวัดค่าความเป็นด่าง และปริมาณแอมโมเนีย

2.4 อุปกรณ์สำหรับตรวจสอบการเจริญเติบโตของกุ้ง

ประกอบด้วย เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง สวิงตักกุ้ง ถังสำหรับขนย้ายกุ้ง ผ้าซับน้ำ และอุปกรณ์จดบันทึกข้อมูล

2.5 อุปกรณ์เก็บมูลกุ้งเพื่อศึกษาสัมประสิทธิ์การย่อยอาหาร

2.5.1 อุปกรณ์ดูดตะกอนและทำความสะอาดถังทดลอง ได้แก่ สายยาง และฝอยทำความสะอาดถังพลาสติก

2.5.2 อุปกรณ์เก็บมูลกุ้ง ได้แก่ สวิงตาถี่ ผ้าซับน้ำ กระปุกพลาสติก และตู้แช่แข็ง

2.5.3 อุปกรณ์เตรียมตัวอย่างมูลกุ้งสำหรับการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ ชุดเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dry) และตู้แช่แข็ง

2.6 อุปกรณ์วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบอาหาร อาหารทดลอง มูลกุ้ง และตัวกุ้งทดลอง

2.6.1 อุปกรณ์วิเคราะห์ความชื้น ได้แก่ ถ้วยกระเบื้องเคลือบ ตู้อบ โถดูดความชื้น และเครื่องชั่งทศนิยม 3 ตำแหน่ง

2.6.2 อุปกรณ์วิเคราะห์โปรตีน ได้แก่ ชุดเครื่องย่อยโปรตีน ชุดเครื่องกลั่นโปรตีน หลอดย่อยโปรตีน บีกเกอร์ กระบอกตวง ขวดรูปชมพู่ และบิวเรต 50 มิลลิลิตร พร้อมขาตั้ง เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 3 ตำแหน่ง กระดาษชั่งตัวอย่างที่ปราศจากไนโตรเจน

2.6.3 อุปกรณ์วิเคราะห์ไขมัน ได้แก่ ชุดเครื่องมือวิเคราะห์ไขมัน ถ้วยสกัดไขมัน ไส้กรองสาร ตู้อบ โถดูดความชื้น และเครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 3 ตำแหน่ง

2.6.4 อุปกรณ์วิเคราะห์เถ้า ได้แก่ ถ้วยกระเบื้องเคลือบ เตาเผา เครื่องชั่งทศนิยม 3 ตำแหน่ง และโถดูดความชื้น

2.6.5 อุปกรณ์วิเคราะห์พลังงาน ได้แก่ ชุดอัดเม็ดอาหาร ชุดเครื่องวิเคราะห์พลังงาน ลวดยาว 60 มิลลิเมตร และด้ายยาว 120 มิลลิเมตร (ต่อ 1 ตัวอย่าง) แว่นขยาย และเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง

2.6.6 อุปกรณ์การวิเคราะห์โครมิกออกไซด์ ได้แก่ เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 3 ตำแหน่ง แผ่นให้ความร้อน (0-300 องศาเซลเซียส) บีกเกอร์ กระบอกตวง ขวดน้ำกลั่น ดรอปเปอร์ กรวยกรองแก้ว ขวดรูปชมพู่ 50 มิลลิลิตร ขวดปรับปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ขวดพลาสติก เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง และหลอดแก้ว (cuvette)

2.7 อุปกรณ์สำหรับการศึกษาระดับภูมิคุ้มกันและองค์ประกอบเลือดของกุ้งขาว

2.7.1 อุปกรณ์เจาะเลือดกุ้ง ได้แก่ เข็มฉีดยา ขนาด 25 G และหลอดฉีดยา ขนาด 1 มิลลิลิตร และหลอดไมโครเซนตริฟิวก์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

2.7.2 อุปกรณ์นับเม็ดเลือดกุ้ง ได้แก่ ไมโครปิเปต หลอดไมโครเซนตริฟิวก์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร สไลด์นับเม็ดเลือด (Hemacytometer) กล้องจุลทรรศน์ และเครื่องนับจำนวนแบบกด

2.7.3 อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์องค์ประกอบเลือด และเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ได้แก่ ไมโครปิเปต หลอดไมโครเซนตริฟิวก์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แท่งบดตัวอย่าง เครื่องหมุนเหวี่ยงไมโครเพลท (microplate) และเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (microplate reader)

2.8 อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหาร รวมถึงกิจกรรมของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ และการออกซิเดชันของกรดไขมันในตับและตับอ่อน

2.8.1 อุปกรณ์เก็บเนื้อเยื่อตัวอย่าง ได้แก่ ชุดอุปกรณ์ผ่าตัด หลอดทดลองฝาเกลียว ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ถังไนโตรเจนเหลว

2.8.2. อุปกรณ์สกัดและวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ และการเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์การออกซิเดชันของกรดไขมันจากเนื้อเยื่อ ได้แก่ ชุดอุปกรณ์ผ่าตัด เครื่องชั่งทศนิยม 3 ตำแหน่ง ไมโครปิเปต แท่งบดตัวอย่าง เครื่องหมุนเหวี่ยง หลอดไมโครเซนตริฟิวก์ขนาด 0.7 และ 1.5 มิลลิลิตร หลอดแก้วทดลองขนาด 20 มิลลิลิตร ตู้บ่ม (incubator) ไมโครเพลท และเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (microplate reader)

3. วิธีการทดลอง

3.1 การเตรียมอุปกรณ์ทดลอง

ใช้ถังพลาสติกทรงสี่เหลี่ยมขนาด 58 × 79 × 48 เซนติเมตร ความจุน้ำ 220 ลิตร ทำความสะอาดและติดตั้งอุปกรณ์ให้อากาศ จากนั้นเติมน้ำทะเลความเค็ม 15 พีพีที ที่ปราศจากคลอรีนให้ได้ปริมาตร 170 ลิตร ปิดถังทดลองด้วยตาข่ายพลาสติก เพื่อป้องกันการกระโดดของกุ้งทดลอง ในระหว่างการทดลองจะมีการทำความสะอาดถังทดลอง และทำการเปลี่ยนถ่ายน้ำทุกวัน ในช่วงเวลา 9.00 น.-11.30 น. โดยใช้น้ำทะเลความเค็ม 15 พีพีที ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยคลอรีนเป็นเวลาอย่างน้อย 24 ชั่วโมง และปรับปริมาณความเป็นด่างด้วยการเติมโซเดียมไบคาร์บอเนตให้ได้ประมาณ 120 มิลลิกรัมต่อลิตร

3.2 การเตรียมกุ้งทดลอง

นำลูกพันธุ์กุ้งขาวระยะโพสต์ลาร์วา 13 จำนวน 10,000 ตัว มาอนุบาลในบ่อคอนกรีตขนาด 3 ลูกบาศก์เมตร จำนวน 2 บ่อ โดยเติมน้ำทะเลความเค็ม 15 พีพีที ที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยคลอรีนเป็นเวลาอย่างน้อย 24 ชั่วโมง ในบ่อให้ได้ปริมาตร 1.5 ลูกบาศก์เมตร อนุบาลลูกกุ้งโดยใช้อาหารเม็ดสำเร็จรูปยี่ห้อโกลด์ โฟร์เต้ สำหรับลูกกุ้งขาวขนาดเบอร์ 1 ตั้งแต่ลูกกุ้งระยะโพสลาวา 13 ถึงน้ำหนักตัว 0.5 กรัม และเบอร์ 2 ตั้งแต่ลูกกุ้งมีน้ำหนักตัว 0.5-2.3 กรัม โดยให้อาหารวันละ 4 ครั้ง ได้แก่ เวลา 8.00 น. 12.00 น. 16.00 น. และ 20.00 น. ซึ่งในช่วง 10 วันแรกของการอนุบาลให้อาทีเมียเป็นอาหารเสริมสลับกับการให้อาหารสำเร็จรูป และทำการเปลี่ยนถ่ายน้ำทุกๆ 3 วัน และเมื่ออนุบาลลูกกุ้งขาวเป็นระยะเวลา 40 วัน เริ่มให้อาหารทดลองสูตรที่มีปลาป่น 18 เปอร์เซ็นต์ (สูตรที่ 1) เพื่อฝึกให้กุ้งคุ้นเคยกับอาหารทดลอง เมื่อกุ้งที่อนุบาลมีน้ำหนักเฉลี่ย 2.33 กรัมต่อตัว จึง

คัดกุ้งที่มีขนาดและน้ำหนักใกล้เคียงกันลงในถังทดลอง จำนวนถังทดลองละ 30 ตัว ปรับสภาพกุ้งให้มีความคุ้นเคยกับถังทดลองและให้กินอาหารทดลองสูตรที่ 1 เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นจึงนำมาชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง บันทึกข้อมูลน้ำหนักกุ้งเริ่มต้นเพื่อนำไปคำนวณการเจริญเติบโต

3.3 เอนไซม์โปรติเอส

เอนไซม์โปรติเอส (EC 3.4.21) ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ เป็นผลิตภัณฑ์ทางการค้าของบริษัท JEFO Nutrition Inc. ประเทศแคนาดา ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ย่อยพันธะเปปไทด์ หรือพันธะเอไมด์จากภายในโซ่โมเลกุลของโปรตีน จัดอยู่ในกลุ่มเอนโดเปปทิเดส (endopeptidase) ชนิดเซรีนโปรติเอส (serine protease) สามารถทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นด่าง ซึ่งเป็นผลิตผลจากการหมักของแบคทีเรีย (*Streptomyces* sp.) จากการศึกษาของ Li และคณะ (2015) พบว่าสามารถทนต่ออุณหภูมิที่สูงในระหว่างการอัดเม็ดอาหารชนิดเม็ดจม (pelleting) สำหรับกุ้งขาว ที่อุณหภูมิ 80±5 องศาเซลเซียส และหลังจากการอบที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 25 นาที โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสเหลืออยู่ที่ระดับ 79.3 และ 67.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกิจกรรมของเอนไซม์ตั้งต้น และสามารถมีกิจกรรมในช่วงอุณหภูมิที่กว้าง โดยมีกิจกรรมสูงในช่วงอุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียส และมีค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์อยู่ที่ 8.5 และจากศึกษาหาระดับที่เหมาะสมของการเสริมเอนไซม์โปรติเอสในอาหาร สำหรับกุ้งขาว โดย Song และคณะ (2016) พบว่าระดับที่เหมาะสมซึ่งสามารถส่งเสริมให้กุ้งขาวมีการเจริญเติบโตเพิ่มสูงขึ้นอยู่ที่ระดับ 175 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร และจากการศึกษาของ Shi และคณะ (2016) พบว่าสามารถทนต่ออุณหภูมิและความดันที่สูงในระหว่างการอัดเม็ดอาหารชนิดเม็ดลอย (extruding) สำหรับปลา gibel carp ที่อุณหภูมิ 110 ± 5 องศาเซลเซียส และความดันที่สูง (มากกว่า 10 เท่าของความดันบรรยากาศ) มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสอยู่ที่ระดับ 37.65 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับกิจกรรมของเอนไซม์ตั้งต้น แต่เมื่อนำมาทดลองพบว่าไม่สามารถส่งเสริมให้ปลา gibel carp มีการเจริญเติบโตที่เพิ่มสูงขึ้น แม้ว่าจะมีการเสริมเอนไซม์โปรติเอสที่ระดับ 175 มก./กก.

3.4 การเตรียมอาหารทดลอง

อาหารที่ใช้ในการทดลองมีทั้งหมด 6 สูตร เป็นอาหารเม็ดจมที่เตรียมขึ้นเอง ประกอบด้วยอาหารทดลองสูตรที่มีระดับปลาป่นแตกต่างกัน 3 ระดับ คือ 18, 10 และ 0 เปอร์เซ็นต์ และแต่ละระดับของปลาป่นแบ่งออกเป็นกลุ่มที่ไม่เสริมและมีการเสริมเอนไซม์โปรติเอสที่ระดับ 175 มก./กก. (ตารางที่ 4) กำหนดให้อาหารทดลองทุกสูตรมีระดับโปรตีน 38 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 7 เปอร์เซ็นต์ และพลังงาน 19 เมกะจูลต่ออาหาร 1 กิโลกรัม โดยในอาหารทดลองสูตรที่มีการลดระดับปลาป่นลงที่ระดับ 45 และ 100 เปอร์เซ็นต์ (ระดับปลาป่น 10 และ 0 เปอร์เซ็นต์ ในสูตร

อาหาร) ใช้วัตถุดิบแหล่งโปรตีนจากกากถั่วเหลืองมาทดแทนโปรตีนจากปลาป่นและเสริมด้วยกรดอะมิโนเมทไธโอนีนเพื่อให้มีปริมาณเทียบเท่ากับสูตรอาหารที่มีระดับปลาป่นปกติ (ระดับปลาป่น 18 เปอร์เซ็นต์ ในสูตรอาหาร) (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 4 รายละเอียดของอาหารทดลองทั้ง 6 สูตร

สูตรที่	สูตรอาหารทดลอง	เสริมเอนไซม์โปรติเอส 175 มิลลิกรัม/ กิโลกรัมอาหาร
1	อาหารทดลองสูตรที่มีปลาป่น 18 เปอร์เซ็นต์	-
2	อาหารทดลองสูตรที่มีปลาป่น 18 เปอร์เซ็นต์	เสริม
3	อาหารทดลองสูตรที่มีปลาป่น 10 เปอร์เซ็นต์	-
4	อาหารทดลองสูตรที่มีปลาป่น 10 เปอร์เซ็นต์	เสริม
5	อาหารทดลองสูตรที่มีปลาป่น 0 เปอร์เซ็นต์	-
6	อาหารทดลองสูตรที่มีปลาป่น 0 เปอร์เซ็นต์	เสริม

3.4.1 ขั้นตอนการเตรียมอาหารทดลอง

3.4.1.1 นำวัตถุดิบอาหารที่ทราบคุณค่าทางโภชนาการมาสร้างสูตรอาหาร โดยคำนวณให้อาหารทดลองในแต่ละสูตรมีระดับโปรตีน 38 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 7 เปอร์เซ็นต์ และพลังงาน 19 เมกะจูลต่ออาหาร 1 กิโลกรัม รายละเอียดของอาหารทดลองในแต่ละสูตรดังกำหนดในตารางที่ 4 และใช้วัตถุดิบแหล่งโปรตีนจากกากถั่วเหลืองมาทดแทนโปรตีนจากปลาป่น

3.4.1.2 ชั่งวัตถุดิบอาหารที่ผ่านการร่อนจากตะแกรงขนาด 30 เมช (mesh) รวมถึงน้ำมัน วิตามิน และแร่ธาตุ แยกใส่ถุงไว้ตามสูตรอาหารทดลองแต่ละสูตร (ตารางที่ 5) ส่วนอาหารสำหรับการศึกษาสัมประสิทธิ์การย่อยสารอาหารจะทำโดยใช้อาหารที่มีส่วนผสมของโครมิกออกไซด์ (Cr_2O_3) 1 กรัมต่ออาหาร 100 กรัม และปรับลดแป้งสาลีในสูตรอาหารแต่ละสูตร

3.4.1.3 นำวัตถุดิบอาหารทั้งหมดยกเว้นน้ำมัน มาผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมอาหารประมาณ 30 นาที จึงเติมน้ำมันปลาและน้ำมันพืชลงไป ผสมต่ออีกประมาณ 20 นาที จึงเติมน้ำกลั่นประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักอาหาร ผสมต่ออีก 10 นาที ส่วนในสูตรอาหารที่มีการเสริมเอนไซม์โปรติเอสที่ระดับ 175 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร นำเอนไซม์โปรติเอส (รูปแบบผง) ที่ชั่งน้ำหนักแล้วตามสูตรอาหารมาผสมกับแป้งและเขย่าให้เข้ากันในถุงพลาสติกก่อนนำไปผสมรวมกับวัตถุดิบอาหารอื่นด้วยเครื่องผสมอาหารตามกระบวนการเช่นเดียวกับอาหารสูตรปกติ

3.4.1.4 นำวัตถุดิบอาหารที่ผสมเข้ากันดีแล้วเข้าเครื่องอัดเม็ดอาหาร ผ่านหน้าแว่นเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร โดยทำการอัดเม็ดอาหารสองรอบ รอบแรกให้อาหารอัดออกมาโดยไม่ตัดเม็ด และในรอบที่สองจึงตัดเม็ดอาหารให้มีขนาดใกล้เคียงกัน

3.4.1.5 นำอาหารที่ผ่านการอัดและตัดเม็ดแล้วไปนึ่งเป็นเวลา 7 นาที ที่อุณหภูมิประมาณ 95 องศาเซลเซียส (เพื่อความคงทนในน้ำทางกายภาพของเม็ดอาหาร) และอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

3.4.1.6 นำอาหารที่เตรียมเสร็จแล้วใส่ในถุงพลาสติก เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้ในการทดลอง

3.4.1.7 นำอาหารทดลองที่เตรียมเสร็จแล้วไปวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการได้แก่ ความชื้น โปรตีน ไขมัน เถ้า และพลังงาน ตามวิธีมาตรฐานของ AOAC (1990) (รายละเอียดแสดงไว้ในตารางที่ 6) และวิเคราะห์ปริมาณโครมิกออกไซด์ ตามวิธีการของ Furukawa และ Tsukahara (1966)

ตารางที่ 5 ส่วนประกอบและปริมาณของวัตถุดิบในอาหารทดลองแต่ละสูตร

วัตถุดิบ (กรัมต่ออาหาร 100 กรัม)	**สูตรอาหาร**					
	T1	T2	T3	T4	T5	T6
	PC	PC+175	NC 1	NC 1+175	NC2	NC2 + 175
ปลาป่น (60% โปรตีน)	18	18	10	10	0	0
กากถั่วเหลือง (45% โปรตีน)	23	23	33	33	45	45
โปรตีนข้าวโพดเข้มข้น	8	8	8	8	8	8
แป้งสาลี	32	32	29	29	26	26
วีทกลูเทน	5	5	5	5	5	5
วีทพอลลาร์ด	2.19	2.17	2.83	2.812	3.3	3.282
ทูน่าไฮโดรไลเสต	1	1	1	1	1	1
ตับทูน่าป่น	3	3	3	3	3	3
ตับหมึกป่น	3	3	3	3	3	3
น้ำมันปลา	1.81	1.81	1.77	1.77	1.72	1.72
เลซิติน	1	1	1	1	1	1
วิตามินรวม	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
แร่ธาตุรวม	1.7	1.7	2	2	2.48	2.48
เมทไธโอนีน	0	0	0.1	0.1	0.2	0.2
เอนไซม์โปรติเอส	0	0.0175	0	0.0175	0	0.0175
รวม	100	100	100	100	100	100

ตารางที่ 6 คุณค่าทางโภชนาการของอาหารทดลอง (% as fed basis)[1]

สูตรอาหาร	ระดับของปลาป่น (เปอร์เซ็นต์)	เอนไซม์โปรติเอส [2] 175 มก./กก.	ความชื้น	โปรตีน	ไขมัน	เถ้า	พลังงาน (เมกะจูล/อาหาร 1 กิโลกรัม)
1	18	-	7.44 ± 0.40	38.36 ± 0.17	6.74 ± 0.31	7.36 ± 0.19	19.51 ± 0.14
2		+	8.26 ± 0.75	38.42 ± 0.10	6.57 ± 0.08	7.34 ± 0.09	19.99 ± 0.13
3	10	-	7.99 ± 0.61	38.29 ± 0.13	6.11 ± 0.27	7.04 ± 0.14	19.81 ± 0.35
4		+	7.52 ± 0.66	38.32 ± 0.18	6.47 ± 0.48	7.13 ± 0.27	19.71 ± 0.12
5	0	-	7.99 ± 0.80	38.18 ± 0.17	6.03 ± 0.31	7.04 ± 0.20	19.65 ± 0.14
6		+	7.37 ± 0.46	38.13 ± 0.22	6.14 ± 0.29	6.99 ± 0.18	19.79 ± 0.29

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จากการวิเคราะห์ข้อมูล 3 ซ้ำ)

[2] สัญลักษณ์ (-) แทนการไม่เสริมเอนไซม์โปรติเอสลงในอาหาร และ (+) แทนการเสริมเอนไซม์โปรติเอสที่ระดับ 175 มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหาร

3.5 แผนการทดลองและการเก็บรวบรวมข้อมูล

ศึกษาผลของการเสริมเอนไซม์โปรติเอสซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ทางการค้าของบริษัท JEFO Nutrition Inc. ประเทศแคนาดา ในอาหารสำหรับกุ้งขาวที่มีระดับปลาป่นปกติ (ปลาป่น 18 เปอร์เซ็นต์) และมีการลดระดับปลาป่นลงในสูตรอาหารที่ระดับ 45 และ 100 เปอร์เซ็นต์ (ปลาป่น 10 และ 0 เปอร์เซ็นต์) โดยใช้วัตถุดิบแหล่งโปรตีนจากกากถั่วเหลืองมาทดแทนโปรตีนจากปลาป่น และเสริมด้วยกรดอะมิโนเมทไธโอนีนเพื่อให้มีปริมาณเทียบเท่ากับสูตรอาหารที่มีระดับปลาป่นปกติ ต่อการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหาร กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหาร สัมประสิทธิ์การย่อยสารอาหาร ภูมิคุ้มกัน และความต้านทานต่อเชื้อ *Vibrio harveyi* วางแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียล (factorial design) แบบ 3×2 โดยปัจจัยที่ศึกษามี 2 ปัจจัย ได้แก่ ระดับของปลาป่นในสูตรอาหารแตกต่างกัน 3 ระดับ คือ 18, 10 และ 0 เปอร์เซ็นต์ และแต่ละระดับของปลาป่นแบ่งออกเป็นกลุ่มที่ไม่เสริมและมีการเสริมเอนไซม์โปรติเอสที่ระดับ 175 มก./กก. ดังนั้นสามารถแบ่งชุดการทดลองเป็น 6 ชุดการทดลอง โดยทำการทดลองชุดการทดลองๆ ละ 5 ซ้ำ ซึ่งอาหารทดลองที่ใช้เป็นอาหารเม็ดจมที่เตรียมขึ้นเอง ดำเนินการทดลองโดยการเตรียมถังทดลองพลาสติกทรงสี่เหลี่ยมจำนวน 30 ถัง เติมน้ำให้ได้ปริมาตร 170 ลิตรต่อถัง สุ่มจับฉลากหาตำแหน่งที่วางถังทดลองเพื่อไม่ให้สภาพแวดล้อมภายนอกมีผลต่อการทดลอง เมื่อเริ่มการทดลองคัดเลือกลูกกุ้งขาวที่มีขนาดใกล้เคียงกันและมีสุขภาพดีจากบ่ออนุบาล จำนวน 30 ตัว ลงในถังทดลองแต่ละถัง ชั่งน้ำหนักและบันทึกข้อมูล ระหว่างการทดลองให้อาหารทดลองแต่ละสูตรวันละ 4 ครั้ง ได้แก่ เวลา 8.00 น. 12.00 น. 16.00 น. และ 20.00 น. โดยให้กินอาหารจนอิ่ม จดบันทึกน้ำหนักอาหารที่กุ้งได้รับในแต่ละวันต่อถังทดลอง เปลี่ยนถ่ายน้ำและดูดตะกอนของเสียออกทุกวัน แล้วเติมน้ำให้ถึงระดับเดิม บันทึกน้ำหนักและจำนวนกุ้งทดลองในแต่ละถังเมื่อสิ้นสุดการทดลอง โดยใช้น้ำแข็งลดอุณหภูมิของน้ำลงที่ 20 องศาเซลเซียส เพื่อลดกิจกรรมของร่างกายในระหว่างการชั่งน้ำหนัก และตรวจวัดคุณภาพน้ำทุกๆ สัปดาห์ โดยตรวจวัดคุณภาพน้ำจากแต่ละชุดการทดลองๆ ละ 3 ถัง เพื่อควบคุมคุณภาพน้ำให้เหมาะสม ระยะเวลาการทดลอง 8 สัปดาห์ ซึ่งระหว่างการทดลองมีคุณภาพน้ำ ได้แก่ อุณหภูมิ 26-28 องศาเซลเซียส ความเค็ม 15 พีพีที ความเป็นกรด-ด่าง 7-8 ออกซิเจนที่ละลายในน้ำ 6.5-7.8 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเป็นด่าง 120 มิลลิกรัมต่อลิตร และแอมโมเนีย 0.1-0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร

3.6 การเก็บรวบรวมข้อมูล

3.6.1 การตรวจสอบพฤติกรรมและลักษณะที่แสดงออกของกุ้ง

บันทึกข้อมูลในระหว่างการทดลอง โดยสังเกตพฤติกรรมของกุ้ง ได้แก่ สีตัว เหงือก การว่ายน้ำ การกินอาหาร การลอกคราบ การเกิดบาดแผล และพฤติกรรมที่ผิดปกติ

3.6.2 การเจริญเติบโตและอัตรารอด

เมื่อสิ้นสุดการทดลองในสัปดาห์ที่ 8 ชั่งน้ำหนักของกุ้งด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง เพื่อนำข้อมูลน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นไปคำนวณค่าการเจริญเติบโต บันทึกจำนวนกุ้งที่เหลืออยู่ และน้ำหนักอาหารที่กุ้งกินของทุกชุดการทดลอง นำข้อมูลที่ได้มาคำนวณ

เปอร์เซ็นต์การรอดตาย (survival, %)

$$\text{เปอร์เซ็นต์การรอดตาย} = \frac{\text{จำนวนกุ้งเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (ตัว)}}{\text{จำนวนกุ้งเริ่มต้นการทดลอง (ตัว)}} \times 100$$

การเจริญเติบโตคำนวณตามวิธีการของ Jiang และคณะ (2014) ได้แก่

น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (weight gain, WG) (เปอร์เซ็นต์)

$$WG = \frac{\text{น้ำหนักกุ้งเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (กรัม)} - \text{น้ำหนักกุ้งเริ่มต้น (กรัม)}}{\text{น้ำหนักกุ้งเริ่มต้น (กรัม)}} \times 100$$

อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate, SGR) (เปอร์เซ็นต์ต่อวัน)

$$SGR = \frac{\ln \text{น้ำหนักกุ้งเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (กรัม)} - \ln \text{น้ำหนักกุ้งเริ่มต้น (กรัม)}}{\text{ระยะเวลา (วัน)}} \times 100$$

อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (feed conversion rate, FCR) คำนวณตามวิธีการของ Huo และคณะ (2014)

$$FCR = \frac{\text{น้ำหนักอาหารที่กุ้งกินทั้งหมด (กรัม)}}{\text{น้ำหนักกุ้งที่เพิ่มขึ้นตลอดการทดลอง (กรัม)}}$$

ปริมาณอาหารที่กุ้งกิน (feed intake, FI) (กรัมต่อตัว)

$$FI = \frac{\text{น้ำหนักอาหารที่กุ้งกินทั้งหมด (กรัม)}}{\text{จำนวนกุ้งเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (ตัว)}}$$

ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน (protein efficiency ratio, PER) คำนวณตามวิธีการของ Jiang และคณะ (2014)

$$PER = \frac{\text{น้ำหนักกุ้งที่เพิ่มขึ้น (กรัม)}}{\text{น้ำหนักโปรตีนที่กุ้งกิน (กรัม)}}$$

3.6.3. การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของซากกุ้ง

สุ่มเก็บตัวอย่างกุ้งก่อนการทดลองจำนวน 20 ตัว นำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของตัวกุ้ง ได้แก่ ความชื้น โปรตีน ตามวิธีการของ AOAC (1990) และเมื่อสิ้นสุดการทดลองในสัปดาห์ที่ 8 สุ่มตัวอย่างกุ้งจากแต่ละชุดการทดลองๆ ละ 10 ตัว (ถังทดลองละ 2 ตัว) ไปวิเคราะห์หาความชื้น โปรตีน ไขมัน และเถ้า นำค่าโปรตีนไปคำนวณการใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ ตามวิธีการของ Maghsoudloo และคณะ (2012) จากสมการ

การใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ (apparent net protein utilization, ANPU) (เปอร์เซ็นต์)

$$ANPU = 100 \times \frac{\text{น้ำหนักโปรตีนในตัวกุ้งเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (กรัม)} - \text{น้ำหนักโปรตีนในตัวกุ้งเริ่มต้น (กรัม)}}{\text{น้ำหนักโปรตีนจากอาหารที่กุ้งกิน (กรัม)}}$$

3.6.4 การศึกษาองค์ประกอบเลือดและภูมิคุ้มกันของกุ้งขาว

การศึกษาองค์ประกอบเลือดและภูมิคุ้มกันของกุ้ง เมื่อสิ้นสุดการทดลองในสัปดาห์ที่ 8 สุ่มตัวอย่างกุ้งชุดการทดลองละ 10 ตัว (ถังทดลองละ 2 ตัว) มาเก็บตัวอย่างเลือดจากแอ่งเลือดบริเวณขาเดินคู่ที่ 3 ทำการเจาะเลือดกุ้งโดยใช้กระบอกฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร หัวเข็ม 25 G นำเลือดที่เจาะได้จากกุ้งแต่ละตัวในแต่ละชุดการทดลองแบ่งใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวก์ที่จัดเตรียมไว้สำหรับการตรวจนับปริมาณของเม็ดเลือดรวม และการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน, oxyhemocyanin และอัตราส่วนระหว่าง oxyhemocyanin / protein ใน hemolymph และกิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase ซึ่งมีรายละเอียดตามวิธีการดังต่อไปนี้

3.6.4.1 การตรวจนับปริมาณเม็ดเลือดรวม (total hemocyte count,THC)

ตรวจนับปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้ง ตามวิธีการของ กิจการ และคณะ (2543) โดยนำเลือดที่เจาะได้จากกุ้งแต่ละตัวปริมาตร 50 ไมโครลิตร (ชุดการทดลองละ 10 ตัว จากถังทดลองละ 2 ตัว) มาเจือจางด้วยสารละลายไตรแพนบลู (trypan blue 0.15 เปอร์เซ็นต์ ใน NaCl 2.6 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 450 ไมโครลิตร (อัตราส่วน 1:10) ผสมให้เข้ากัน นำมานับจำนวนเม็ดเลือด

ทั้งหมด โดยใช้สไลด์นับเม็ดเลือด (hemacytometer) และคำนวณปริมาณเม็ดเลือดที่นับได้โดยรายงานเป็นจำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตร ดังนี้

ปริมาตรของ hemacytometer = กว้าง × ยาว × สูง

= 1 มิลลิเมตร × 1 มิลลิเมตร × 0.1 มิลลิเมตร

= 0.1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร

จำนวนเซลล์เม็ดเลือดที่นับได้ = จำนวนเซลล์เม็ดเลือดต่อ 0.1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร

ดังนั้น จำนวนเซลล์เม็ดเลือดต่อมิลลิลิตร = เซลล์เม็ดเลือดที่นับได้ × 10^4 × ค่า dilution

หมายเหตุ 10^4 มาจาก จำนวนเซลล์เม็ดเลือดต่อ 0.1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร เทียบให้เป็นต่อ 1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร หรือเท่ากับจำนวนเซลล์เม็ดเลือด × 10^1, โดย 10^3 ลูกบาศก์มิลลิเมตร = 1 มิลลิลิตร ดังนั้น จำนวนเซลล์เม็ดเลือดต่อมิลลิลิตร = จำนวนเซลล์เม็ดเลือด × 10^1 × 10^3 หรือ × 10^4

3.6.4.2 ปริมาณโปรตีนใน hemolymph (hemolymph protein)

โดยนำเลือดที่เจาะได้จากกุ้งแต่ละตัวปริมาตร 10 ไมโครลิตร (ชุดการทดลองละ 10 ตัว จากถังทดลองละ 2 ตัว) มาใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวก์ที่มีน้ำกลั่น 990 ไมโครลิตร (อัตราส่วน 1:100) ผสมให้เข้ากัน นำไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ด้วยวิธีของ Bradford (1976) ปริมาตร 12.5 ไมโครลิตร ใส่ลงใน microplate ที่มีน้ำกลั่น 12.5 ไมโครลิตร แล้วเติม Bradford's reagent 325 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader ตัวเทียบวัด (blank) ใช้น้ำกลั่น 25 ไมโครลิตร แทนตัวอย่าง แล้วคำนวณปริมาณโปรตีนเป็นมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานอัลบูมิน (Bovine serum albumin; BSA) 0-0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยสมการ $Y = 1.5048X + 0.0182$ ($R^2 = 0.9876$)

3.6.4.3 ปริมาณ oxyhemocyanin และอัตราส่วนของ oxyhemocyanin / protein ใน hemolymph

วิเคราะห์และคำนวณปริมาณ oxyhemocyanin และอัตราส่วนของ oxyhemocyanin / protein ตามวิธีการของ Li และคณะ (2008) โดยดูดตัวอย่างเลือดของกุ้งแต่ละตัวที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:100 ที่เหลือจากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนใน hemolymph (จากข้อ 3.6.4.2) ปริมาตร 350 ไมโครลิตร (ชุดการทดลองละ 10 ตัว จากถังทดลองละ 2 ตัว) ใส่ลงใน microplate นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 335 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader และคำนวณปริมาณ oxyhemocyanin (มิลลิโมลต่อลิตร) โดยนำค่า $OD_{335\,nm}$ มาหารด้วยค่า extinction coefficient, E^{mM}_{1cm} เท่ากับ 17.26 และคำนวณอัตราส่วนของ oxyhemocyanin / protein โดยนำปริมาณ oxyhemocyanin (มิลลิโมลต่อลิตร) มาหารด้วย hemolymph protein (มิลลิโมลต่อลิตร) ที่ได้จากการนำปริมาณ hemolymph protein (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ที่หาได้จากข้อ 3.6.4.2 มาเปลี่ยนหน่วยเป็น

มิลลิโมลต่อลิตร โดยนำค่าปริมาณ hemolymph protein (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) หารด้วยค่าคงที่เท่ากับ 66

3.6.4.4 กิจกรรมของเอนไซม์ Phenoloxidase (PO activity)

เตรียมตัวอย่าง hemocyte lysate (HLS) โดยนำเลือดที่เจาะได้จากกุ้งแต่ละตัว ปริมาตร 200 ไมโครลิตร (ชุดการทดลองละ 10 ตัว จากถังทดลองละ 2 ตัว) มาผสมกับสารละลาย cacodylate (CAC) buffer พีเอช 7.4 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ในหลอดไมโครเซนตริฟิวก์ เก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวรอการวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

นำเซลล์เม็ดเลือดที่ได้มาบดด้วยแท่งบดให้เซลล์แตก แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นดูดส่วนใสด้านบนซึ่งเป็น hemocyte lysate (HLS) ที่ได้ 5 ไมโครลิตร ไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน โดยวิธีของ Bradford (1976) โดยนำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่น 995 ไมโครลิตร (อัตราส่วน 1:200) ผสมให้เข้ากันในหลอดไมโครเซนตริฟิวก์ แล้วดูดมา 5 ไมโครลิตร ใส่ลงใน microplate ที่มีน้ำกลั่น 20 ไมโครลิตร แล้วเติม Bradford's reagent 325 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader คำนวณปริมาณโปรตีนเป็นมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานอัลบูมิน (Bovine serum albumin; BSA) 0-0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยสมการ $Y = 2.4527X - 0.0308$ ($R^2 = 0.9965$)

และนำสารละลาย HLS ในส่วนที่เหลือไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase ซึ่งดัดแปลงจากวิธีการของ Smith และ Söderhäll (1991) โดยดูดสารละลาย HLS มา 25 ไมโครลิตร เติมสารละลาย trypsin (trypsin 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของ CAC buffer) 25 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมสารละลาย CAC buffer 150 ไมโครลิตร และเติม L-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของ CAC buffer) 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันใน microplate นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader ทันที บันทึกค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนแปลงทุกๆ 1 นาที จนกระทั่งค่าการดูดกลืนแสงลดลง และสำหรับตัวเทียบวัด (blank) จะใช้สารละลาย CAC buffer จำนวน 25 ไมโครลิตร แทนตัวอย่าง

ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน) คำนวณได้จากสูตร

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน)} = \frac{\Delta OD_{490\ nm} / \text{นาที}\ (0.001)}{\text{โปรตีนใน HLS 0.025 ml}}$$

หมายเหตุ: $\Delta OD_{490\ nm}$ คือ ผลต่างของค่าการดูดกลืนแสงสุดท้ายกับค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นในช่วงเวลาที่มีกิจกรรมสูงสุด และ 0.001 เป็นค่าที่กำหนดเอง

กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส 1 ยูนิต หมายถึง ความสามารถของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสที่สามารถเปลี่ยน L-DOPA ไปเป็นโดปามีน (Dopamine) ด้วยการดูดกลืนแสง 0.001 ($OD_{490\ nm}$)/นาที/มิลลิกรัมโปรตีน (Söderhäll and Unestam, 1979)

3.6.5 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหาร

การเก็บตัวอย่างและการสกัดเอนไซม์ย่อยอาหาร เมื่อสิ้นสุดการทดลองในสัปดาห์ที่ 8 สุ่มตัวอย่างกุ้ง 10 ตัว จากแต่ละชุดการทดลอง (ถังทดลองละ 2 ตัว) เก็บตัวอย่างตับและตับอ่อนของกุ้งแต่ละตัวมาบดด้วยแท่งบดตัวอย่างให้ละเอียด ใน Tris-HCl buffer พีเอช 7.5 ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนที่เป็นของเหลวด้านบนโดยระวังไม่ให้ดูดส่วนที่เป็นไขมันออกมาด้วยจากนั้นนำของเหลวที่ได้เก็บไว้ที่ - 20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้ในการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ (Vega-Villasante *et al*., 1999)

3.6.5.1 ปริมาณโปรตีนในสารสกัดเอนไซม์

วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในสารสกัดเอนไซม์ โดยวิธีของ Bradford (1976) โดยดูดตัวอย่างสารสกัดเอนไซม์ของกุ้งแต่ละตัว (ชุดการทดลองละ 10 ตัว จากถังทดลองละ 2 ตัว) มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:100 ผสมให้เข้ากัน ดูดมา 25 ไมโครลิตร จำนวน 10 ชุดการทดลองๆ ละ 10 ตัว (ถังทดลองละ 2 ตัว) ใส่ลงใน microplate แล้วเติม Bradford's reagent 325 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader คำนวณปริมาณโปรตีนเป็นมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานอัลบูมิน (Bovine serum albumin; BSA) 0-0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยสมการ $Y = 2.1766X - 0.0361$ ($R^2 = 0.9958$)

3.6.5.2 กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส (Protease activity)

วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส ซึ่งดัดแปลงจากวิธีการของ Marina Ezguerra และ Garcia-Carreno (1997); Vega-Villasante และคณะ (1999) และ Bezerra และคณะ (2005) โดยดูดตัวอย่างสารสกัดเอนไซม์ของกุ้งแต่ละตัวที่เจือจางในอัตราส่วน 1:10 ปริมาตร 20 ไมโครลิตร (ชุดการทดลองละ 10 ตัว จากถังทดลองละ 2 ตัว) มาผสมกับ Tris-HCl buffer พีเอช 7.5 ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และเติม azocasein 2 เปอร์เซ็นต์ ใน Tris-HCl พีเอช 7.5 ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นนำตัวอย่างเข้าเครื่องบ่ม (incubator) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที และหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม trichloroacetic

acid (TCA) 20 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ดูดตัวอย่างส่วนใสด้านบนปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงใน microplate ที่เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 440 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader และสำหรับหลอดควบคุม (blank) เตรียมโดยวิธีการดังกล่าวข้างต้น แต่เติมตัวอย่างสารสกัดเอนไซม์หลังจากเติม TCA แล้ว และรายงานค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส (ยูนิตต่อมิลลิกรัมของโปรตีน)

กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส 1 ยูนิต หมายถึง การเพิ่มขึ้นของค่าการดูดกลืนแสง 0.01 ($OD_{440\ nm}$) ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด (Vega-Villasante *et al*., 1999)

3.6.5.3 กิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินและเอนไซม์ไคโมทริปซิน (Trypsin and Chymotrypsin activity)

วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ทริปซิน ตามวิธีการศึกษาของ Marina Ezguerra และ Garcia-Carreno (1997) และ Xu และคณะ (2012) และเอนไซม์ไคโมทริปซิน ตามวิธีการศึกษาของ Cordova-Murueta และ Garcia-Carreno (2002) และ Rathore และคณะ (2005) โดยใช้ N_{α}-Benzoyl-L-arginine 4-nitroanilide hydrochloride, BAPNA (Sigma, Japan) ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ และใช้ N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe p-nitroanilide, SAPNA (Sigma, USA) ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ เป็นสารตั้งต้นสำหรับเอนไซม์ทริปซินและไคโมทริปซินตามลำดับ ซึ่งสารตั้งต้นของเอนไซม์แต่ละตัวละลายอยู่ใน dimethylsulfoxide (DMSO) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ก่อนปรับปริมาตรด้วย Tris-HCl buffer พีเอช 7.5 ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่มีองค์ประกอบของ $CaCl_2$ ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ซึ่งการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด ใช้ตัวอย่างสารสกัดเอนไซม์ของกุ้งแต่ละตัวที่เจือจางในอัตราส่วน 1:10 ปริมาตร 20 ไมโครลิตร (ชุดการทดลองละ 10 ตัว จากถังทดลองละ 2 ตัว) มาผสมกับสารตั้งต้นของเอนไซม์แต่ละชนิด ปริมาตร 480 ไมโครลิตร จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้เข้าเครื่องบ่ม (incubator) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที หลังจากนั้นเติม trichloroacetic acid (TCA) 20 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader

ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินและไคโมทริปซิน (ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน) คำนวณได้จากสูตร

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน)} = \frac{OD_{410\ nm} \times 1000 \times \text{ปริมาตรรวมของปฏิกิริยา (มิลลิลิตร)}}{8800 \times \text{ระยะเวลาที่บ่ม (นาที)} \times \text{ปริมาณโปรตีนในสารสกัดเอนไซม์ (มิลลิกรัม)}}$$

หมายเหตุ 8800 (M^{-1} cm^{-1}) คือ extinction coefficient ของ p-nitroanilide

กิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินและไคโมทริปซิน 1 ยูนิต หมายถึง ความสามารถของเอนไซม์ในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสารตั้งต้นได้ p-nitroanilide 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

3.6.5.4 กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (Lipase activity)

วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส ตามวิธีการศึกษาของ Klahan และคณะ (2009) โดยดูดตัวอย่างสารสกัดเอนไซม์ของกุ้งแต่ละตัวที่เจือจางในอัตราส่วน 1:5 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร (ชุดการทดลองละ 10 ตัว จากถังทดลองละ 2 ตัว) ผสมกับสารตั้งต้น *p*-Nitrophenyl palmitate, *p*NNP (Sigma, USA) ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ที่ละลายใน 2-propanyl และเติม Tris-HCl buffer พีเอช 7.5 ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 800 ไมโครลิตร จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้เข้าเครื่องบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที หลังจากนั้นเติมโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 250 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา นำตัวอย่างที่ได้ไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ดูดส่วนใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader และคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน) โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน p-nitrophenol 0-100 ไมโครโมล ด้วยสมการ $Y = 0.0114X + 0.0056$ ($R^2 = 0.9994$)

กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส 1 ยูนิต หมายถึง ความสามารถของเอนไซม์ในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสารตั้งต้นได้ p-nitrophenol 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

3.6.5.5 กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส (Amylase activity)

วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส ตามวิธีการศึกษาของ Vega-Villasante และคณะ (1999) และ Shyne Anand และคณะ (2014) โดยดูดตัวอย่างสารสกัดเอนไซม์ของกุ้งแต่ละตัวที่เจือจางในอัตราส่วน 1:5 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร (ชุดการทดลองละ 10 ตัว จากถังทดลองละ 2 ตัว) ผสมกับ Tris-HCl buffer พีเอช 7.5 ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 250 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลายน้ำแป้งความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (ที่ละลายอยู่ใน Tris-HCl buffer พีเอช 7.5 ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที และหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) 500 ไมโครลิตร และต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader และคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส (ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน) โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานมอลโทส (maltose) 0-10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยสมการ $Y = 0.1176X + 0.0072$ ($R^2 = 0.995$)

กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส 1 ยูนิต หมายถึง ความสามารถของเอนไซม์ในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสารตั้งต้นได้ maltose 1 โมล ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

3.6.5.6 กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส (Cellulase activity)

วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส โดยดัดแปลงจากวิธีของ Miller (1959) และ Shyne Anand และคณะ (2014) โดยดูดตัวอย่างสารสกัดเอนไซม์ของกุ้งแต่ละตัวที่เจือจางในอัตราส่วน 1:5 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร (ชุดการทดลองละ 10 ตัว จากถังทดลองละ 2 ตัว) ผสมกับสารละลาย Phosphate buffer พีเอช 6.8 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และเติมสารตั้งต้น carboxymethyl cellulose (CMC) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม DNS ปริมาตร 600 ไมโครลิตร และต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 574 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader และคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส (ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน) โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานกลูโคส (glucose) 0-1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยสมการ $Y = 0.0289X + 0.0012$ ($R^2 = 0.9934$)

กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส 1 ยูนิต หมายถึง ความสามารถของเอนไซม์ในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสารตั้งต้นได้ glucose 1 โมล ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

3.6.6 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระและการออกซิเดชันของกรดไขมัน

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ กิจกรรมของเอนไซม์แคทาเลส (catalase) และการวิเคราะห์การออกซิเดชันของกรดไขมัน ได้แก่ ปริมาณ malondialdehyde (MDA) โดยเมื่อสิ้นสุดการทดลองในสัปดาห์ที่ 8 สุ่มตัวอย่างกุ้ง 10 ตัว จากแต่ละชุดการทดลอง (ถังทดลองละ 2 ตัว) เก็บตัวอย่างตับและตับอ่อนของกุ้งแต่ละตัวใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร และแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวทันทีจนกว่าจะนำมาใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

3.6.6.1 กิจกรรมของเอนไซม์แคทาเลส (Catalase activity)

โดยนำสารสกัดเอนไซม์ที่สกัดได้จากตัวอย่างตับและตับอ่อนของกุ้งแต่ละตัว (ชุดการทดลองละ 10 ตัว จากถังทดลองละ 2 ตัว) ตามวิธีการของ Vega-Villasante และคณะ (1999) มาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์แคทาเลส ตามวิธีของ Johansson และ Borg (1988) และ Trasviña-Arenas และคณะ (2013) โดยวัดจากปริมาณของ formaldehyde ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์ catalase กับ H_2O_2 เมื่อ formaldehyde จับกับ chromogen Purpald (4-amino-3-hydrazino-5-mercapto-1,2,4-triazole) จะเกิดเป็นสีชมพู วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นา

โนเมตร และคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์แคทาเลส (ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน) โดยการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ formaldehyde 0-100 ไมโครโมล ด้วยสมการ $Y = 0.0057X + 0.0098$ ($R^2 = 0.9955$)

กิจกรรมของเอนไซม์แคทาเลส 1 ยูนิต หมายถึง ความสามารถของเอนไซม์ในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสารตั้งต้นได้ formaldehyde 1 นาโนโมล ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

3.6.6.2 ปริมาณ malondialdehyde (MDA)

วิเคราะห์ปริมาณ MDA จากการทำปฏิกิริยากับ thiobarbituric acid (TBA) ในรูปของ thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) ตามวิธีการของ Nirmal และ Benjakul (2010) โดยชั่งน้ำหนักตัวอย่างตับและตับอ่อนของกุ้งแต่ละตัวให้ได้ประมาณ 0.1 กรัม (ชุดการทดลองละ 10 ตัว จากถังทดลองละ 2 ตัว) จดบันทึกน้ำหนักที่ได้ นำมาบดในสารละลาย trichloroacetic acid (TCA) 3 เปอร์เซ็นต์ ที่ละลายอยู่ใน HCl 0.25 นอร์มอล ปริมาตร 800 ไมโครลิตร ดูดมา 200 ไมโครลิตร เติมสารละลาย TBA (thiobarbituric acid 0.375 เปอร์เซ็นต์ และ trichloroacetic acid (TCA) 15 เปอร์เซ็นต์ ที่ละลายอยู่ใน HCl 0.25 นอร์มอล) 200 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือด นาน 10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น ก่อนนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร ส่วนตัวเทียบวัด (blank) ของตัวอย่าง 200 ไมโครลิตร เตรียมโดยวิธีการดังกล่าวข้างต้น แต่เติม trichloroacetic acid (TCA) 15 เปอร์เซ็นต์ ที่ละลายอยู่ใน HCl 0.25 นอร์มอล (ไม่มี thiobarbituric acid 0.375 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และคำนวณปริมาณ TBARS โดยการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ MDA 0-40 ไมโครโมล ($Y = 0.0462X + 0.0619$, $R^2 = 0.9999$) ที่ได้จากการเตรียมสารละลาย 1,1,3,3-tetramethoxypropane (TEP) (Sigma-Aldrich, Germany) เพื่อให้ได้ปริมาณ MDA ตามที่กำหนด รายงานผลในหน่วยไมโครโมลของ MDA ต่อกรัมตัวอย่าง

3.6.7 การศึกษาความสามารถในการต้านทานเชื้อแบคทีเรีย

การศึกษาความสามารถในการต้านทานเชื้อแบคทีเรีย ใช้เชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำกิจการ ศุภมาตย์ ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ โดยเลี้ยงแบคทีเรีย *V. harveyi* บนอาหาร tryptic soy agar ที่มีเกลือแกง (NaCl) 1.5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง จากนั้นนำแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารไปเลี้ยงในอาหาร tryptic soy broth ที่มีเกลือแกง 1.5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงเก็บเซลล์แบคทีเรียที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ล้างตะกอนเซลล์แบคทีเรียจำนวน 2 ครั้ง ด้วยน้ำเกลือความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว โดยการ

หมุนเหวี่ยง จากนั้นละลายตะกอนเซลล์แบคทีเรียด้วยน้ำเกลือความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้ได้ค่าอยู่ในช่วง 0.03-0.05 ซึ่งมีค่าปริมาณเชื้อแบคทีเรียประมาณ 2.3×10^{7} CFU/ml นำเชื้อที่ได้ฉีดเข้ากล้ามเนื้อปล้องที่ 6 ของกุ้งทดลองที่ได้รับอาหารทดลองเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ ในปริมาตรตัวละ 0.1 มิลลิลิตร ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ตัว ในส่วนของชุดควบคุมใช้กุ้งทดลองที่ได้รับอาหารทดลองสูตรที่ 1 ฉีดน้ำเกลือความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เข้ากล้ามเนื้อปล้องที่ 6 ของกุ้ง ในปริมาตรตัวละ 0.1 มิลลิลิตร สังเกตอาการและบันทึกผลอัตราการตายสะสมของกุ้งในแต่ละชุดการทดลอง เป็นระยะเวลา 14 วัน

3.6.8 การศึกษาสัมประสิทธิ์การย่อยอาหารของกุ้ง

ทำการเก็บมูลกุ้งเพื่อศึกษาสัมประสิทธิ์การย่อยอาหาร โดยเริ่มเก็บมูลกุ้งหลังจากให้อาหารที่มีส่วนผสมโครมิคออกไซด์เป็นเวลา 1 สัปดาห์ เพื่อให้กุ้งคุ้นเคยกับอาหาร ทำการเก็บมูลกุ้ง โดยหลังจากให้อาหารกุ้งจนอิ่มเป็นเวลา 30 นาที ทำความสะอาดถังทดลองด้วยวิธีกาลักน้ำดูดเอาเศษอาหารและมูลกุ้งที่ตกค้างออกจนหมด หลังจากนั้นเติมน้ำทิ้งไว้ 30 นาที จึงเริ่มเก็บมูลกุ้ง โดยใช้สวิงตาถี่ตักควรระวังไม่ให้มูลกุ้งแตกกระจายละลายน้ำ และดำเนินการเก็บมูลกุ้งในแต่ละถังอย่างต่อเนื่องเมื่อสังเกตเห็นมูลกุ้งในถังทดลอง นำมูลกุ้งที่เก็บได้ในแต่ละถังมาแยกใส่กระปุกตามหน่วยการทดลอง และนำมูลกุ้งไปทำให้แห้งด้วยวิธีการการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dry) เป็นเวลา 48 ชั่วโมงหรือจนมูลกุ้งแห้ง เพื่อนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ โปรตีน พลังงาน ตามวิธีมาตรฐานของ AOAC (1990) และโครมิคออกไซด์ ตามวิธีการของ Furukawa และ Tsukahara (1966) และนำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณค่าสัมประสิทธิ์การย่อยอาหารโดยการเปรียบเทียบปริมาณโครมิคออกไซด์ และสารอาหารที่ต้องการศึกษาที่มีในอาหารกับที่มีอยู่ในมูลกุ้ง ตามวิธีการของ Cruz-Suarez และคณะ (2007) คำนวณได้จากสมาการ

ประสิทธิภาพการย่อยวัสดุแห้ง (dry matter digestibility, % DM)

$$\% \text{ DM} = 1\text{-} \left(\frac{\% \text{ โครมิกออกไซด์ในอาหาร}}{\% \text{ โครมิกออกไซด์ในมูล}} \right) \times 100$$

สัมประสิทธิ์การย่อยสารอาหาร (apparent digestibility coefficients, % ADC)

$$\% \text{ ADC} = 1 - \left(\frac{\% \text{ โครมิกออกไซด์ในอาหาร}}{\% \text{ โครมิกออกไซด์ในมูล}} \right) \times \left(\frac{\% \text{ สารอาหารในมูล}}{\% \text{ สารอาหารในอาหาร}} \right) \times 100$$

3.7 วิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบสองทาง (two way Analysis of variance, ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของกลุ่มการทดลองด้วย Duncan's Multiple Range Test ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS (version 16.0)

บทที่ 3

ผลการศึกษา

3.1 การเจริญเติบโต

3.1.1 น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัว น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ

น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัว น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของกุ้งขาวภายหลังได้รับอาหารทดลองทั้ง 6 สูตร เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ แสดงไว้ในตารางที่ 7 พบว่าระดับปลาป่นในสูตรอาหารส่งผลต่อการเจริญเติบโตของกุ้งขาวโดยพบว่า กุ้งขาวที่ได้รับอาหารสูตรที่มีปลาป่น 18 เปอร์เซ็นต์ และ 10 เปอร์เซ็นต์ มีน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัว น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงกว่ากุ้งขาวที่ได้รับอาหารสูตรที่ไม่มีปลาป่น ($P < 0.05$) ทั้งนี้การเสริมเอนไซม์โปรติเอสที่ระดับ 175 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร ไม่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของกุ้งขาว ($P > 0.05$) และไม่มีปฏิสัมพันธ์ร่วมระหว่างระดับปลาป่นและการเสริมเอนไซม์โปรติเอส ($P > 0.05$)

3.1.2 อัตราการรอดตาย

อัตรารอดตายของกุ้งขาวเมื่อสิ้นสุดการทดลองแสดงไว้ในตารางที่ 7 โดยพบว่าระดับปลาป่นและการเสริมเอนไซม์โปรติเอสในสูตรอาหารไม่มีผลต่ออัตรารอดตายของกุ้งขาว ($P > 0.05$) และไม่พบปฏิสัมพันธ์ร่วมระหว่างระดับปลาป่นและการเสริมเอนไซม์โปรติเอส ($P > 0.05$) โดยอัตรารอดตายมีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 73.33 ± 2.72 ถึง 83.34 ± 6.09 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสาเหตุการตายของกุ้งในทุกชุดการทดลองเกิดจากพฤติกรรมของกุ้งที่กินกันเอง (cannibalism) ในระหว่างการลอกคราบ โดยเฉพาะเมื่อเข้าสู่ช่วงเดือนที่สองของการทดลอง

ตารางที่ 7 การเจริญเติบโต และเปอร์เซ็นต์การรอดตายของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง 6 สูตร เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

Individual treatment means		น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัว (กรัม)	น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัว (กรัม)	น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ	การรอดตาย
ระดับของปลาป่น (เปอร์เซ็นต์)	เอนไซม์โปรติเอส	เริ่มต้นการทดลอง	สิ้นสุดการทดลอง	(เปอร์เซ็นต์)	(เปอร์เซ็นต์ต่อวัน)	(เปอร์เซ็นต์)
18	-	2.33 ± 0.00	11.99 ± 0.79	415.18 ± 34.71	3.03 ± 0.13	73.33 ± 2.72
	+	2.32 ± 0.01	12.14 ± 0.71	422.34 ± 30.35	3.06 ± 0.11	80.00 ± 9.81
10	-	2.33 ± 0.01	11.49 ± 0.26	393.37 ± 12.73	2.96 ± 0.05	77.50 ± 3.19
	+	2.32 ± 0.01	11.82 ± 0.63	409.01 ± 27.39	3.01 ± 0.10	83.34 ± 6.09
0	-	2.33 ± 0.00	10.23 ± 0.32	339.88 ± 12.80	2.74 ± 0.06	82.50 ± 1.67
	+	2.33 ± 0.01	10.45 ± 0.54	348.30 ± 23.32	2.78 ± 0.10	83.33 ± 4.71
Means of main effects						
18			12.06 ± 0.70^{b}	418.76 ± 30.42^{b}	3.05 ± 0.11^{b}	76.67 ± 7.56^{a}
10			11.65 ± 0.48^{b}	401.19 ± 21.47^{b}	2.98 ± 0.08^{b}	80.42 ± 5.47^{a}
0			10.34 ± 0.42^{a}	344.09 ± 17.99^{a}	2.76 ± 0.08^{a}	82.92 ± 3.30^{a}
	-		11.24 ± 0.90^{x}	382.81 ± 38.85^{x}	2.91 ± 0.15^{x}	77.78 ± 4.57^{x}
	+		11.47 ± 0.95^{x}	393.22 ± 41.68^{x}	2.95 ± 0.16^{x}	82.22 ± 6.72^{x}
ANOVA : P value						
ปลาป่น			0.000	0.000	0.000	0.094
โปรติเอส			0.341	0.321	0.321	0.060
ปลาป่น × โปรติเอส			0.954	0.935	0.970	0.520

ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จากการวิเคราะห์ข้อมูล 5 ซ้ำ)

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีตัวอักษรแตกต่างกันกำกับ มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P < 0.05$)

โดยที่อักษร a, b, c แทนความแตกต่างทางสถิติของระดับปลาป่น และอักษร x, y แทนความแตกต่างทางสถิติของการเสริมเอนไซม์โปรติเอส

3.1.3 ปริมาณอาหารที่กุ้งกิน และประสิทธิภาพการใช้อาหาร

ปริมาณอาหารที่กุ้งกิน และประสิทธิภาพการใช้อาหารของกุ้งขาวภายหลังได้รับอาหารทดลองเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ แสดงไว้ในตารางที่ 8 พบว่าระดับปลาป่นในสูตรอาหารส่งผลต่อปริมาณอาหารที่กุ้งกิน โดยกุ้งขาวที่ได้รับอาหารสูตรที่มีปลาป่น 18 เปอร์เซ็นต์ และ 10 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณอาหารที่กินสูงกว่ากุ้งขาวที่ได้รับอาหารสูตรที่ไม่มีปลาป่น ($P < 0.05$) จากการสังเกตพฤติกรรมพบว่าในช่วงสองสัปดาห์แรกของการทดลองกุ้งขาวที่ได้รับอาหารสูตรที่ไม่มีปลาป่นไม่ค่อยกินอาหารและใช้เวลาปรับตัวในการยอมรับอาหารนานกว่าสูตรอาหารที่มีปลาป่น 18 เปอร์เซ็นต์ และ 10 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้การเสริมเอนไซม์โปรติเอสในสูตรอาหารไม่ส่งผลต่อปริมาณอาหารที่กิน ($P > 0.05$) และไม่พบปฏิสัมพันธ์ร่วมระหว่างระดับปลาป่นและการเสริมเอนไซม์โปรติเอส ($P > 0.05$)

การศึกษาค่าที่เกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพการใช้อาหาร ได้แก่ อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน และการใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ พบว่าระดับปลาป่นในสูตรอาหารไม่ส่งผลต่ออัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน และการใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิของกุ้งขาว ($P > 0.05$) และไม่มีปฏิสัมพันธ์ร่วมระหว่างระดับปลาป่นและการเสริมเอนไซม์โปรติเอส ($P > 0.05$) แต่การเสริมเอนไซม์โปรติเอสส่งผลให้อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อดีขึ้น ในขณะที่ประสิทธิภาพการใช้โปรตีนและการใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิของกุ้งขาวเพิ่มสูงขึ้น ($P < 0.05$)

ตารางที่ 8 ปริมาณอาหารที่กุ้งกิน และประสิทธิภาพการใช้อาหารของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง 6 สูตร เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

Individual treatment means		ปริมาณอาหารที่กุ้งกิน (กรัมต่อตัว)	อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ	ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน	การใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ (เปอร์เซ็นต์)
ระดับของปลาป่น (เปอร์เซ็นต์)	เอนไซม์โปรติเอส				
18	-	14.68 ± 0.71	1.53 ± 0.10	1.72 ± 0.12	28.02 ± 1.84
	+	14.39 ± 1.37	1.47 ± 0.10	1.78 ± 0.12	28.82 ± 1.94
10	-	14.47 ± 0.86	1.58 ± 0.07	1.66 ± 0.07	26.82 ± 1.15
	+	13.96 ± 0.63	1.48 ± 0.12	1.78 ± 0.14	28.83 ± 2.14
0	-	12.72 ± 0.25	1.61 ± 0.04	1.63 ± 0.04	26.08 ± 0.65
	+	12.32 ± 0.45	1.52 ± 0.10	1.73 ± 0.10	28.76 ± 1.71
Means of main effects					
18		14.53 ± 1.02^{b}	1.50 ± 0.10^{a}	1.75 ± 0.11^{a}	28.42 ± 1.80^{a}
10		14.22 ± 0.75^{b}	1.53 ± 0.10^{a}	1.72 ± 0.12^{a}	27.82 ± 1.92^{a}
0		12.52 ± 0.40^{a}	1.57 ± 0.08^{a}	1.68 ± 0.09^{a}	27.42 ± 1.87^{a}
	-	13.96 ± 1.10^{x}	1.57 ± 0.08^{y}	1.67 ± 0.08^{x}	26.97 ± 1.45^{x}
	+	13.55 ± 1.24^{x}	1.49 ± 0.10^{x}	1.76 ± 0.11^{y}	28.80 ± 1.75^{y}
ANOVA : P value					
ปลาป่น		0.000	0.329	0.427	0.491
โปรติเอส		0.231	0.035	0.037	0.014
ปลาป่น × โปรติเอส		0.961	0.896	0.843	0.529

ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จากการวิเคราะห์ข้อมูล 5 ซ้ำ)

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีตัวอักษรแตกต่างกันกำกับ มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P < 0.05$)

โดยที่อักษร a, b, c แทนความแตกต่างทางสถิติของระดับปลาป่น และอักษร x, y แทนความแตกต่างทางสถิติของการเสริมเอนไซม์โปรติเอส

3.1.4 องค์ประกอบทางเคมีของซากกุ้ง

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของซากกุ้งขาวภายหลังได้รับอาหารทดลองเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ แสดงไว้ในตารางที่ 9 พบว่าระดับปลาป่นและการเสริมเอนไซม์โปรติเอสในสูตรอาหารไม่ส่งผลต่อน้ำหนักแห้ง โปรตีน ไขมัน และเถ้าในซากกุ้งขาว ($P > 0.05$) และไม่มีปฏิสัมพันธ์ร่วมระหว่างระดับปลาป่นและการเสริมเอนไซม์โปรติเอส ($P > 0.05$)

ตารางที่ 9 องค์ประกอบทางเคมีของซากกุ้งขาวที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง 6 สูตร เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ (เปอร์เซ็นต์, บนฐานน้ำหนักแห้ง)

Individual treatment means		น้ำหนักแห้ง	โปรตีน	ไขมัน	เถ้า
ระดับของปลาป่น (เปอร์เซ็นต์)	เอนไซม์โปรติเอส				
18	-	23.65 ± 1.30	68.22 ± 1.63	5.24 ± 0.29	11.50 ± 1.01
	+	23.34 ± 0.82	68.65 ± 0.58	5.27 ± 0.27	11.66 ± 0.49
10	-	23.74 ± 0.84	67.50 ± 1.22	5.25 ± 0.23	11.87 ± 0.31
	+	23.41 ± 0.73	68.54 ± 2.55	5.28 ± 0.33	12.63 ± 0.27
0	-	23.57 ± 0.29	67.32 ± 0.54	5.10 ± 0.29	12.00 ± 0.94
	+	23.97 ± 0.50	68.17 ± 0.71	5.18 ± 0.29	12.37 ± 0.78
Means of main effects					
18		23.50 ± 1.04^{a}	68.44 ± 1.18^{a}	5.26 ± 0.27^{a}	11.58 ± 0.74^{a}
10		23.58 ± 0.76^{a}	68.02 ± 1.96^{a}	5.27 ± 0.27^{a}	12.25 ± 0.49^{a}
0		23.77 ± 0.44^{a}	67.75 ± 0.75^{a}	5.14 ± 0.28^{a}	12.18 ± 0.82^{a}
	-	23.65 ± 0.85^{x}	67.68 ± 1.20^{x}	5.20 ± 0.26^{x}	11.79 ± 0.77^{x}
	+	23.58 ± 0.71^{x}	68.46 ± 1.46^{x}	5.24 ± 0.28^{x}	12.22 ± 0.66^{x}
ANOVA : P value					
ปลาป่น		0.739	0.547	0.561	0.134
โปรติเอส		0.793	0.142	0.666	0.146
ปลาป่น × โปรติเอส		0.524	0.882	0.971	0.686

ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จากการวิเคราะห์ข้อมูล 5 ซ้ำ)

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีตัวอักษรแตกต่างกันกำกับ มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P < 0.05$)

โดยที่อักษร a, b, c แทนความแตกต่างทางสถิติของระดับปลาป่น และอักษร x, y แทนความแตกต่างทางสถิติของการเสริมเอนไซม์โปรติเอส

3.2 องค์ประกอบเลือดและภูมิคุ้มกันของกุ้งขาว

ผลการศึกษาองค์ประกอบเลือดและภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวภายหลังได้รับอาหารทดลองเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ แสดงไว้ในตารางที่ 10 ซึ่งมีรายละเอียดดังกล่าวต่อไปนี้

ปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งขาว พบว่าระดับปลาป่นและการเสริมเอนไซม์โปรติเอสในสูตรอาหารไม่ส่งผลต่อปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งขาว ($P > 0.05$) และไม่มีปฏิสัมพันธ์ร่วมระหว่างระดับปลาป่นและการเสริมเอนไซม์โปรติเอส ($P > 0.05$)

ปริมาณ oxyhemocyanin, protien และอัตราส่วนของ oxyhemocyanin / protein ใน hemolymph ของกุ้งขาว พบว่าระดับปลาป่นในสูตรอาหารไม่ส่งผลต่อปริมาณ oxyhemocyanin, protien และอัตราส่วนของ oxyhemocyanin / protein ของกุ้งขาว ($P > 0.05$) และไม่มีปฏิสัมพันธ์ร่วมระหว่างระดับปลาป่นและการเสริมเอนไซม์โปรติเอส ($P > 0.05$) ทั้งนี้การเสริมเอนไซม์โปรติเอสในสูตรอาหารส่งผลให้มีปริมาณ oxyhemocyanin และอัตราส่วนของ oxyhemocyanin / protein ลดต่ำลง ($P < 0.05$) แต่ไม่ส่งผลต่อปริมาณ protein ของกุ้งขาว ($P > 0.05$)

กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase (PO activity) ของกุ้งขาว พบว่าระดับปลาป่นและการเสริมเอนไซม์โปรติเอสในสูตรอาหารไม่ส่งผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase ของกุ้งขาว ($P > 0.05$) และไม่พบปฏิสัมพันธ์ร่วมระหว่างระดับปลาป่นและการเสริมเอนไซม์โปรติเอส ($P > 0.05$)

ตารางที่ 10 องค์ประกอบเลือดและภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง 6 สูตร เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

Individual treatment means		ปริมาณเม็ดเลือดรวม ($\times 10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	Oxyhemocyanin (มิลลิโมลต่อลิตร)	Protein (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	อัตราส่วนของ Oxyhemocyanin / protein (เปอร์เซ็นต์)	Phenoloxidase (PO) activity (ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน)
ระดับของปลาป่น (เปอร์เซ็นต์)	เอนไซม์โปรติเอส					
18	-	2.11 ± 0.43	1.29 ± 0.25	121.20 ± 5.17	72.36 ± 9.96	68.27 ± 38.24
	+	2.01 ± 0.50	1.21 ± 0.27	120.28 ± 11.72	67.69 ± 8.94	78.49 ± 23.77
10	-	1.94 ± 0.46	1.30 ± 0.26	119.13 ± 5.01	68.69 ± 9.29	78.73 ± 32.96
	+	2.15 ± 0.31	1.12 ± 0.28	117.79 ± 5.93	65.67 ± 12.66	85.03 ± 21.15
0	-	1.95 ± 0.45	1.20 ± 0.32	117.36 ± 5.92	68.55 ± 11.70	81.36 ± 23.07
	+	2.30 ± 0.66	0.92 ± 0.25	116.23 ± 6.96	56.02 ± 9.29	85.48 ± 18.88
Means of main effects						
18		2.06 ± 0.45^a	1.25 ± 0.26^a	120.74 ± 8.83^a	70.03 ± 9.49^a	73.08 ± 31.71^a
10		2.05 ± 0.39^a	1.21 ± 0.28^a	118.46 ± 5.39^a	67.18 ± 10.88^a	81.53 ± 27.74^a
0		2.11 ± 0.57^a	1.06 ± 0.31^a	116.80 ± 6.30^a	62.29 ± 12.10^a	83.06 ± 20.92^a
	-	2.00 ± 0.44^x	1.26 ± 0.27^y	119.29 ± 5.40^x	69.87 ± 10.12^y	76.39 ± 31.14^x
	+	2.15 ± 0.49^x	1.08 ± 0.29^x	118.16 ± 8.49^x	63.13 ± 11.29^x	82.89 ± 20.74^x
ANOVA : P value						
ปลาป่น		0.893	0.078	0.245	0.088	0.532
โปรติเอส		0.275	0.013	0.553	0.021	0.381
ปลาป่น × โปรติเอส		0.405	0.481	0.996	0.349	0.949

ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จากการวิเคราะห์ข้อมูล 10 ซ้ำ)

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีตัวอักษรแตกต่างกันกำกับ มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P < 0.05$)

โดยที่อักษร a, b, c แทนความแตกต่างทางสถิติของระดับปลาป่น และอักษร x, y แทนความแตกต่างทางสถิติของการเสริมเอนไซม์โปรติเอส

3.3 กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหารในตับและตับอ่อนของกุ้งขาว

ผลการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหารในตับและตับอ่อนของกุ้งขาว ภายหลังได้รับอาหารทดลองเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ แสดงไว้ในตารางที่ 11 ซึ่งมีรายละเอียดดังกล่าวต่อไปนี้

กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสในตับและตับอ่อนของกุ้งขาว พบว่าระดับปลาป่นในสูตรอาหารส่งผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส โดยกุ้งขาวที่ได้รับอาหารสูตรที่มีปลาป่น 18 เปอร์เซ็นต์ มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงกว่ากุ้งขาวที่ได้รับอาหารสูตรที่มีปลาป่น 10 เปอร์เซ็นต์ และอาหารสูตรที่ไม่มีปลาป่น ($P < 0.05$) ทั้งนี้การเสริมเอนไซม์โปรติเอสในสูตรอาหารไม่ส่งผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส ($P > 0.05$) และไม่มีปฏิสัมพันธ์ร่วมระหว่างระดับปลาป่นและการเสริมเอนไซม์โปรติเอส ($P > 0.05$)

กิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินและไคโมทริปซินในตับและตับอ่อนของกุ้งขาว พบว่าระดับปลาป่นในสูตรอาหารไม่ส่งผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ทริปซิน ($P > 0.05$) แต่ส่งผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไคโมทริปซิน โดยกุ้งขาวที่ได้รับอาหารสูตรที่มีปลาป่น 18 และ 10 เปอร์เซ็นต์ มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคโมทริปซินสูงกว่ากุ้งขาวที่ได้รับอาหารสูตรที่ไม่มีปลาป่น ($P < 0.05$) ทั้งนี้การเสริมเอนไซม์โปรติเอสในสูตรอาหารส่งผลให้กุ้งขาวมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินและไคโมทริปซินเพิ่มสูงขึ้น ($P < 0.05$) แต่ไม่มีปฏิสัมพันธ์ร่วมระหว่างระดับปลาป่นและการเสริมเอนไซม์โปรติเอส ($P > 0.05$)

กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสในตับและตับอ่อนของกุ้งขาว พบว่าระดับปลาป่นในสูตรอาหารไม่ส่งผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส ($P > 0.05$) และไม่มีปฏิสัมพันธ์ร่วมระหว่างระดับปลาป่นและการเสริมเอนไซม์โปรติเอส ($P > 0.05$) แต่การเสริมเอนไซม์โปรติเอสในสูตรอาหารส่งผลให้กุ้งขาวมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสเพิ่มสูงขึ้น ($P < 0.05$)

กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสและเซลลูเลสในตับและตับอ่อนของกุ้งขาว พบว่าระดับปลาป่นในสูตรอาหารส่งผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสและเซลลูเลส โดยกุ้งขาวที่ได้รับอาหารสูตรที่มีปลาป่น 18 เปอร์เซ็นต์ มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสสูงกว่ากุ้งขาวที่ได้รับอาหารสูตรที่มีปลาป่น 10 เปอร์เซ็นต์ และอาหารสูตรที่ไม่มีปลาป่น และมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสลดต่ำลงตามระดับปลาป่นในสูตรอาหารที่ลดลง ($P < 0.05$) ทั้งนี้การเสริมเอนไซม์โปรติเอสในสูตรอาหารไม่ส่งผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส ($P > 0.05$) แต่ส่งผลให้กุ้งขาวมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสเพิ่มสูงขึ้น ($P < 0.05$) และไม่พบปฏิสัมพันธ์ร่วมระหว่างระดับปลาป่นและการเสริมเอนไซม์โปรติเอส ($P > 0.05$)

ตารางที่ 11 กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหารในตับและตับอ่อนของกุ้งที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง 6 สูตร เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ (ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน)

Individual treatment means		โปรติเอส	ทริปซิน	ไคโมทริปซิน	ไลเปส	อะไมเลส	เซลลูเลส
ระดับของปลาป่น (เปอร์เซ็นต์)	เอนไซม์โปรติเอส						
18	-	23.80 ± 3.62	2.62 ± 0.83	1.35 ± 0.24	51.39 ± 10.56	0.310 ± 0.051	0.052 ± 0.008
	+	24.52 ± 3.86	3.25 ± 0.84	1.40 ± 0.29	59.23 ± 16.06	0.321 ± 0.070	0.057 ± 0.012
10	-	20.37 ± 2.42	2.57 ± 0.44	1.20 ± 0.11	49.43 ± 6.00	0.260 ± 0.027	0.045 ± 0.008
	+	22.38 ± 4.93	3.15 ± 0.77	1.33 ± 0.14	57.01 ± 8.51	0.263 ± 0.058	0.049 ± 0.010
0	-	19.45 ± 3.63	2.60 ± 0.25	1.04 ± 0.08	49.82 ± 9.72	0.252 ± 0.032	0.038 ± 0.005
	+	20.42 ± 2.62	3.08 ± 0.44	1.22 ± 0.18	58.18 ± 11.07	0.269 ± 0.031	0.044 ± 0.004
Means of main effects							
18		24.16 ± 3.65^{b}	2.93 ± 0.87^{a}	1.37 ± 0.26^{b}	55.31 ± 13.79^{a}	0.316 ± 0.059^{b}	0.055 ± 0.010^{c}
10		21.37 ± 3.91^{a}	2.84 ± 0.66^{a}	1.27 ± 0.14^{b}	53.22 ± 8.12^{a}	0.262 ± 0.043^{a}	0.047 ± 0.009^{b}
0		19.91 ± 3.14^{a}	2.83 ± 0.42^{a}	1.14 ± 0.17^{a}	54.00 ± 10.95^{a}	0.260 ± 0.032^{a}	0.041 ± 0.005^{a}
	-	21.21 ± 3.68^{x}	2.60 ± 0.54^{x}	1.20 ± 0.20^{x}	50.26 ± 8.72^{x}	0.274 ± 0.045^{x}	0.045 ± 0.009^{x}
	+	22.52 ± 4.16^{x}	3.16 ± 0.68^{y}	1.32 ± 0.22^{y}	58.18 ± 11.99^{y}	0.286 ± 0.060^{x}	0.050 ± 0.011^{y}
ANOVA : P value							
ปลาป่น		0.004	0.901	0.002	0.852	0.001	0.000
โปรติเอส		0.222	0.003	0.034	0.014	0.430	0.048
ปลาป่น ×โปรติเอส		0.853	0.941	0.590	0.995	0.906	0.987

ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จากการวิเคราะห์ข้อมูล 10 ซ้ำ)

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีตัวอักษรแตกต่างกันกำกับ มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P < 0.05$)

โดยที่อักษร a, b, c แทนความแตกต่างทางสถิติของระดับปลาป่น และอักษร x, y แทนความแตกต่างทางสถิติของการเสริมเอนไซม์โปรติเอส

3.4 กิจกรรมของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระและการออกซิเดชันของกรดไขมันในตับและตับอ่อนของกุ้งขาว

ผลการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระได้แก่ กิจกรรมของเอนไซม์แคทาเลส (catalase) และการวิเคราะห์การออกซิเดชันของกรดไขมันคือ ปริมาณ malondialdehyde (MDA) ในตับและตับอ่อนของกุ้งขาวภายหลังได้รับอาหารทดลองเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ ดังแสดงไว้ในตารางที่ 12 พบว่า ระดับปลาป่นและการเสริมเอนไซม์โปรติเอสในสูตรอาหารไม่ส่งผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์แคทาเลส และปริมาณ malondialdehyde ($P > 0.05$) และไม่พบปฏิสัมพันธ์ร่วมระหว่างระดับปลาป่นและการเสริมเอนไซม์โปรติเอส ($P > 0.05$)

ตารางที่ 12 กิจกรรมของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระและการออกซิเดชันของกรดไขมันในตับและตับของกุ้งที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง 6 สูตร เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

Individual treatment means		Catalase (CAT) activity (ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน)	Malondialdehyde (MDA) (ไมโครโมลต่อกรัมตัวอย่าง)
ระดับของปลาป่น (เปอร์เซ็นต์)	เอนไซม์โปรติเอส		
18	-	569.61 ± 222.82	117.94 ± 16.87
	+	695.75 ± 158.40	114.79 ± 32.10
10	-	593.07 ± 184.93	120.57 ± 6.92
	+	669.40 ± 225.52	116.76 ± 18.56
0	-	554.59 ± 178.97	119.49 ± 24.73
	+	654.17 ± 284.10	112.53 ± 21.84
Means of main effects			
18		632.68 ± 198.97^{a}	116.37 ± 24.69^{a}
10		633.48 ± 204.78^{a}	118.67 ± 13.73^{a}
0		609.92 ± 241.89^{a}	115.80 ± 22.78^{a}
	-	572.21 ± 191.46^{x}	119.44 ± 16.68^{x}
	+	673.24 ± 221.03^{x}	114.69 ± 23.12^{x}
ANOVA : P value			
ปลาป่น		0.906	0.922
โปรติเอส		0.091	0.448
ปลาป่น ×โปรติเอส		0.940	0.963

ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จากการวิเคราะห์ข้อมูล 10 ซ้ำ)

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีตัวอักษรแตกต่างกันกำกับ มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P < 0.05$)

โดยที่อักษร a, b, c แทนความแตกต่างทางสถิติของระดับปลาป่น และอักษร x, y แทนความแตกต่างทางสถิติของการเสริมเอนไซม์โปรติเอส

3.5 ความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรียของกุ้งขาว

ผลการศึกษาความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรียของกุ้งขาวภายหลังได้รับอาหารทดลองเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ โดยบันทึกผลอัตราการตายสะสมของกุ้งขาวหลังได้รับเชื้อ *V. harveyi* ที่ระดับความเข้มข้น 2.3×10^{7} CFU/ml เป็นระยะเวลา 14 วัน ดังแสดงไว้ในตารางที่ 13 พบว่า ระดับปลาป่นและการเสริมเอนไซม์โปรติเอสในสูตรอาหารไม่ส่งผลต่ออัตราการตายสะสมของกุ้งขาว ($P > 0.05$) และไม่พบปฏิสัมพันธ์ร่วมระหว่างระดับปลาป่นและการเสริมเอนไซม์โปรติเอส ($P > 0.05$)

ตารางที่ 13 อัตราการตายสะสมของกุ้งขาวที่ได้รับเชื้อ *Vibrio harveyi* เป็นระยะเวลา 14 วัน หลังได้รับอาหารทดลองทั้ง 6 สูตร เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

Individual treatment means		อัตราการตายสะสม (เปอร์เซ็นต์)
ระดับของปลาป่น (เปอร์เซ็นต์)	เอนไซม์โปรติเอส	
18	-	53.33 ± 5.77
	+	43.33 ± 23.09
10	-	56.67 ± 15.28
	+	46.67 ± 11.55
0	-	56.67 ± 5.77
	+	53.33 ± 11.55
Means of main effects		
18		48.33 ± 16.02^{a}
10		51.67 ± 13.29^{a}
0		55.00 ± 8.37^{a}
	-	55.56 ± 8.82^{x}
	+	47.78 ± 14.81^{x}
ANOVA : P value		
ปลาป่น		0.703
โปรติเอส		0.246
ปลาป่น ×โปรติเอส		0.887

ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จากการวิเคราะห์ข้อมูล 3 ซ้ำ)
ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีตัวอักษรแตกต่างกันกำกับ มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P < 0.05$) โดยที่อักษร a, b, c แทนความแตกต่างทางสถิติของระดับปลาป่น และอักษร x, y แทนความแตกต่างทางสถิติของการเสริมเอนไซม์โปรติเอส

3.6 ค่าสัมประสิทธิ์การย่อยสารอาหารของกุ้งขาว

ผลการศึกษาสัมประสิทธิ์การย่อยสารอาหารของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง 6 สูตร แสดงไว้ในตารางที่ 14 พบว่า ระดับปลาป่นในสูตรอาหารส่งผลต่อสัมประสิทธิ์การย่อยวัตถุแห้งและโปรตีนของกุ้งขาว โดยกุ้งขาวที่ได้รับอาหารสูตรที่มีปลาป่น 18 เปอร์เซ็นต์ มีค่าสัมประสิทธิ์การย่อยวัตถุแห้งสูงกว่ากุ้งขาวที่ได้รับอาหารสูตรที่มีปลาป่น 10 เปอร์เซ็นต์ และอาหารสูตรที่ไม่มีปลาป่น และมีค่าสัมประสิทธิ์การย่อยโปรตีนลดต่ำลงตามระดับปลาป่นในสูตรอาหารที่ลดลง ($P < 0.05$) แต่ระดับปลาป่นในสูตรอาหารไม่ส่งผลต่อสัมประสิทธิ์การย่อยพลังงานของกุ้งขาว ($P > 0.05$) ทั้งนี้การเสริมเอนไซม์โปรติเอสในสูตรอาหารส่งผลให้กุ้งขาวมีค่าสัมประสิทธิ์การย่อยวัตถุแห้ง โปรตีน และพลังงานเพิ่มสูงขึ้น ($P < 0.05$) แต่ไม่พบปฏิสัมพันธ์ร่วมระหว่างระดับปลาป่นและการเสริมเอนไซม์โปรติเอส ($P > 0.05$)

ตารางที่ 14 ค่าสัมประสิทธิ์การย่อยสารอาหารของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง 6 สูตร (เปอร์เซ็นต์)

Individual treatment means		วัตถุแห้ง	โปรตีน	พลังงาน
ระดับของปลาป่น (เปอร์เซ็นต์)	เอนไซม์โปรติเอส			
18	-	67.93 ± 0.58	83.94 ± 1.14	76.72 ± 2.34
	+	70.20 ± 2.03	85.21 ± 1.20	78.43 ± 0.88
10	-	65.25 ± 0.62	80.60 ± 1.20	74.91 ± 1.97
	+	67.94 ± 0.34	82.54 ± 0.90	78.23 ± 0.92
0	-	65.62 ± 1.51	79.81 ± 1.28	74.60 ± 3.02
	+	67.50 ± 0.25	81.14 ± 1.23	76.54 ± 0.75
Means of main effects				
18		69.07 ± 1.85^{b}	84.57 ± 1.29^{c}	77.57 ± 1.89^{a}
10		66.59 ± 1.49^{a}	81.57 ± 1.43^{b}	76.57 ± 2.27^{a}
0		66.56 ± 1.42^{a}	80.47 ± 1.37^{a}	75.57 ± 2.31^{a}
	-	66.27 ± 1.54^{x}	81.45 ± 2.16^{x}	75.41 ± 2.49^{x}
	+	68.55 ± 1.65^{y}	82.96 ± 2.03^{y}	77.73 ± 1.18^{y}
ANOVA : P value				
ปลาป่น		0.000	0.000	0.074
โปรติเอส		0.000	0.002	0.002
ปลาป่น ×โปรติเอส		0.721	0.780	0.582

ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จากการวิเคราะห์ข้อมูล 5 ซ้ำ)

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีตัวอักษรแตกต่างกันกำกับ มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P < 0.05$)

โดยที่อักษร a, b, c แทนความแตกต่างทางสถิติของระดับปลาป่น และอักษร x, y แทนความแตกต่างทางสถิติของการเสริมเอนไซม์โปรติเอส

บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลอง

ผลของการเสริมเอนไซม์โปรติเอสในอาหารสำหรับกุ้งขาวที่มีระดับปลาป่นปกติและมีการลดระดับปลาป่นลงในสูตรอาหาร โดยใช้วัตถุดิบแหล่งโปรตีนจากกากถั่วเหลืองมาทดแทนโปรตีนจากปลาป่น ซึ่งปัจจัยที่ศึกษามี 2 ปัจจัย ได้แก่ ระดับของปลาป่นในสูตรอาหารแตกต่างกัน 3 ระดับ คือ 18, 10 และ 0 เปอร์เซ็นต์ และแต่ละระดับของปลาป่นแบ่งออกเป็นกลุ่มที่ไม่เสริมและมีการเสริมเอนไซม์โปรติเอสที่ระดับ 175 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร (มก./กก.) โดยภายหลังกุ้งขาวได้รับอาหารทดลองทั้ง 6 สูตร เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ มีผลต่อปัจจัยที่ศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหาร กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหาร สัมประสิทธิ์การย่อยสารอาหาร ภูมิคุ้มกัน และความต้านทานต่อเชื้อ *Vibrio harveyi* ดังได้กล่าวต่อไปนี้

การศึกษาการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหารของกุ้งขาวในกรณีการศึกษาครั้งนี้พบว่ากุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่มีระดับปลาป่น 18 เปอร์เซ็นต์ มีการเจริญเติบโต (น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัว น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (WG) และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (SGR)) ไม่แตกต่างกับกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่มีระดับปลาป่น 10 เปอร์เซ็นต์ ($P > 0.05$) โดยกุ้งขาวที่ได้รับอาหารทั้งสองกลุ่มมีการเจริญเติบโตที่สูงกว่ากุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่ไม่มีปลาป่น ($P < 0.05$) และการลดระดับปลาป่นลงในสูตรอาหารไม่ส่งผลให้กุ้งขาวมีอัตราการรอดตายลดลง ($P > 0.05$) อีกทั้งยังพบว่าระดับปลาป่นที่สูงในสูตรอาหารไม่สามารถส่งเสริมให้กุ้งขาวมีประสิทธิภาพการใช้อาหาร (อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (FCR) ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน (PER) และการใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ (ANPU)) แตกต่างกับกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่มีการลดระดับปลาป่นลงในสูตรอาหาร ($P > 0.05$) หรือกล่าวได้อีกนัยหนึ่งว่าการลดระดับปลาป่นในสูตรอาหารลงจาก 18 เปอร์เซ็นต์ เหลือ 10 เปอร์เซ็นต์ (คิดเป็นปริมาณโปรตีนที่ได้จากปลาป่นลดลง 45 เปอร์เซ็นต์) โดยใช้แหล่งโปรตีนจากกากถั่วเหลืองทดแทนไม่ส่งผลเชิงลบต่อการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหารของกุ้งขาว แต่การไม่ใช้ปลาป่นในสูตรอาหาร และใช้แหล่งโปรตีนจากกากถั่วเหลืองทดแทนโปรตีนทั้งหมดจากปลาป่น ส่งผลเชิงลบต่อการเจริญเติบโต และมีประสิทธิภาพการใช้อาหารต่ำที่สุด ซึ่งการเจริญเติบโตของกุ้งขาวที่ลดต่ำลง ส่วนหนึ่งอาจเป็นผลเนื่องมาจากปริมาณอาหารที่กุ้งกิน (FI) มีปริมาณลดต่ำลง ($P < 0.05$) โดยเฉพาะในช่วงสองสัปดาห์แรกของการทดลองพบว่า กุ้งในกลุ่มการทดลองที่ได้รับอาหารที่ไม่มีปลาป่นไม่ค่อยกินอาหารและใช้เวลาปรับตัวในการยอมรับอาหารนาน

ซึ่งจากผลการศึกษาดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Suárez และคณะ (2009) ที่พบว่ากุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่ไม่มีปลาป่น และใช้กากถั่วเหลืองร่วมกับกากคาโนลาเป็นแหล่งโปรตีนหลักทดแทนโปรตีนจากปลาป่นในสูตรอาหาร มีการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้โปรตีนลดต่ำลง แต่มีอัตราการรอด และอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อไม่แตกต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบกับกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่มีระดับปลาป่น 6, 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์ ในสูตรอาหาร แต่อย่างไรก็ตามจากรายงานการศึกษานี้กลับพบว่ามีปริมาณอาหารที่กุ้งกินไม่แตกต่างกัน โดยระบุว่าระดับหมึกป่น 2 เปอร์เซ็นต์ ในสูตรอาหารเพียงพอที่จะส่งเสริมให้กุ้งขาวมีการกินอาหารที่เป็นปกติ ซึ่งแตกต่างจากผลการทดลองในกรณีการศึกษาครั้งนี้ที่พบว่ากุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่ไม่มีปลาป่นมีปริมาณอาหารที่กุ้งกินลดต่ำลง โดยผลการทดลองดังกล่าวมีความสอดคล้องกับรายงานการศึกษาของ Soares และคณะ (2015) ที่รายงานว่าปริมาณอาหารที่กุ้งกินมีแนวโน้มลดลงตามระดับปลาป่นในสูตรอาหารที่ลดลง โดยการที่ไม่ใช้ปลาป่นในสูตรอาหาร ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของกุ้งขาวที่ลดต่ำลง แต่สามารถลดระดับปลาป่นลงในสูตรอาหารของกุ้งขาวที่ระดับ 75 เปอร์เซ็นต์ โดยไม่ส่งผลเชิงลบต่อการเจริญเติบโต เมื่อใช้โปรตีนถั่วเหลืองเข้มข้น (soybean protein concentrate) ทดแทนโปรตีนจากปลาป่น โดยการลดลงของปริมาณอาหารที่กุ้งกินในกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่ไม่มีปลาป่นของกรณีการศึกษาครั้งนี้คาดว่า น่าจะเกิดจากกลิ่นที่สามารถดึงดูดการกินอาหารของกุ้งขาวได้น้อย ถึงแม้จะมีองค์ประกอบของวัตถุดิบที่สามารถดึงดูดการกินอาหารของกุ้งในสูตรอาหารไม่แตกต่างกับอาหารที่มีระดับปลาป่น 18 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งประกอบด้วย ตับหมึกป่น ตับทูน่าป่น และทูน่าไฮโดรไลเสต และนอกจากนี้อาจเกิดจากรสขมของสาร saponin ซึ่งเป็นหนึ่งในสารต้านโภชนาการที่เป็นองค์ประกอบในกากถั่วเหลือง (Peisker, 2001; Dersjant-Li, 2002) Dersjant-Li (2002) รายงานว่าในกากถั่วเหลืองจะมีปริมาณ saponin อยู่ในช่วง 0.43 ถึง 0.67 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นอยู่กับกระบวนการผลิต และจากรายงานการศึกษาของ Yang และคณะ (2015) พบว่ากุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่มีระดับปลาป่น 12 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการรอด การเจริญเติบโต และประสิทธิภาพการใช้อาหารไม่แตกต่างกับกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่มีระดับปลาป่น 18 เปอร์เซ็นต์ แต่มีความแตกต่างกับกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่มีระดับปลาป่น 21 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นไป เมื่อใช้กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งโปรตีนทดแทนโปรตีนจากปลาป่นในสูตรอาหาร อย่างไรก็ตามจากรายงานการศึกษาของ Amaya และคณะ (2007) แสดงให้เห็นว่ากุ้งขาวที่เลี้ยงในบ่อดิน แม้ว่าจะได้รับอาหารที่ไม่มีปลาป่นก็มีอัตรารอด น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัว ผลผลิตมวลรวม น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น และอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อไม่แตกต่างกับกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่มีระดับปลาป่น 3, 6 และ 9 เปอร์เซ็นต์ ในสูตรอาหาร โดยใช้กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งโปรตีนหลักร่วมกับคอร์นกลูเทนทดแทนโปรตีนจากปลาป่นในสูตรอาหาร

สำหรับผลของการเสริมเอนไซม์โปรติเอสซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้บ่งชี้ให้เห็นว่าการเสริมเอนไซม์โปรติเอสลงในอาหารกุ้งขาวสามารถส่งเสริมให้มีประสิทธิภาพการใช้อาหารเพิ่มสูงขึ้น โดยมีอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อดีขึ้น มีประสิทธิภาพการใช้โปรตีนและการใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิเพิ่มสูงขึ้น ($P < 0.05$) สอดคล้องกับรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ที่พบว่าการเสริมเอนไซม์โปรติเอสซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ทางการค้าชนิดเดียวกับที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ที่ระดับ 175 มก./กก. ในอาหารที่มีการใช้กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งโปรตีนหลักทดแทนโปรตีนจากปลาป่นสามารถส่งเสริมให้สัตว์น้ำชนิดต่างๆ มีการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหารเพิ่มสูงขึ้น ดังแสดงให้เห็นได้จากผลการทดลองในปลาช่อน (Thanh Huong *et al*., 2015) ปลา gibel carp (Shi *et al*., 2016) ปลานิลลูกผสม (Li *et al*., 2015) และในกุ้งขาว (Li *et al*., 2015; Song *et al*., 2016) อย่างไรก็ตามจากรายงานการศึกษาล่าสุดในปู chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) พบว่าการเสริมเอนไซม์โปรติเอสลงในอาหารไม่ส่งเสริมให้ปูมีการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหาร (อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อและประสิทธิภาพการใช้โปรตีน) แตกต่างจากกลุ่มควบคุม แต่การเสริมเอนไซม์โปรติเอสส่งผลให้มีการใช้ประโยชน์จากโปรตีนและไขมันสุทธิเพิ่มสูงขึ้น (Chowdhury *et al.,* 2017) โดยการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหารที่เพิ่มสูงขึ้นจากการเสริมเอนไซม์โปรติเอสลงในอาหารที่ใช้กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งโปรตีนหลักทดแทนโปรตีนจากปลาป่น อาจเป็นผลเนื่องมาจากการปรับปรุงปริมาณและคุณภาพของสารอาหารให้สูงขึ้น และจากการย่อยหรือการลดลงของสารต้านโภชนาการที่เป็นโปรตีน (proteinaceous anti-nutrients) เช่น protease inhibitor และ lectin และโปรตีนที่มีความเป็นพิษ (antigenic protein) ได้แก่ glycinin และ β-conglycinin หรือการเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนที่เสียสภาพระหว่างกระบวนการผลิตอาหาร (Peisker, 2001; Dalsgaasd *et al*., 2012; Chowdhury *et al*., 2017) โดยจากรายงานของ Peisker (2001) และ Maytorena-Verdugo และคณะ (2017) กล่าวว่า protease inhibitor เป็นสารต้านโภชนาการที่พบในถั่วเหลืองที่ส่งผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินและไคโมทริปซินของกุ้งขาว เมื่อกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยโปรตีนลดลง ส่งผลให้ประสิทธิภาพการย่อยและการนำโปรตีนไปใช้ประโยชน์ลดลงตามไปด้วย ดังแสดงให้เห็นได้จากกิจกรรมของเอนไซม์ในกลุ่มย่อยโปรตีนในการศึกษาครั้งนี้ได้แก่ กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสในกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่มีระดับปลาป่น 10 เปอร์เซ็นต์ และไม่มีปลาป่น มีค่าต่ำกว่ากุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่มีระดับปลาป่น 18 เปอร์เซ็นต์ และกิจกรรมของเอนไซม์ไคโมทริปซินในกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่ไม่มีปลาป่น มีค่าต่ำกว่ากุ้งขาวที่ได้รับอาหารสูตรที่มีระดับปลาป่น 18 และ 10 เปอร์เซ็นต์ การเสริมเอนไซม์โปรติเอสเป็นการเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารเพื่อชดเชยบางส่วนที่ถูกยับยั้งโดยสารต้านโภชนาการ และจากการรวบรวมรายงานการศึกษาของ Dersjant-Li (2002) รายงานว่า lectin

เป็นสาเหตุให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของผนังลำไส้และส่งผลต่อความสามารถในการดูดซึมสารอาหารที่ลดลง จากการศึกษาในปลา Atlantic salmon พบว่าลำไส้เล็กส่วนปลายมีความไวต่อ lectin สูง จากการตรวจพบการเกาะกลุ่มของ lectin กับผนังหนังลำไส้ในระดับที่สูง นอกจากนี้ glycinin และ β-conglycinin เป็นสาเหตุให้เกิดการตอบสนองของร่างกายต่อสารก่อภูมิแพ้และสามารถทำลายผนังลำไส้ของสัตว์น้ำ โดยสารต้านโภชนาการเหล่านี้ส่งผลเชิงลบต่อการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหารของสัตว์น้ำ ดังนั้นการลดลงของสารต้านโภชนาการดังกล่าวในกากถั่วเหลืองที่ใช้เป็นแหล่งโปรตีนทดแทนปลาป่นสามารถส่งเสริมให้มีผลเชิงบวกต่อการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหารของสัตว์น้ำดังปรากฏในรายงานการศึกษาที่ผ่านมาและในกรณีการศึกษาครั้งนี้ และจากการศึกษาของ Chowdhury และ Villarroal (2014) ยังรายงานเพิ่มเติมอีกว่าการเสริมเอนไซม์โปรติเอสลงในอาหารสามารถส่งเสริมให้ปลาเรนโบว์เทราต์ (*O. mykiss*) มีการพัฒนาของเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ (villi) ให้มีความหนาแน่นและขนาดที่เพิ่มสูงขึ้น ซึ่งหมายถึงการมีพื้นที่ในการดูดซึมสารอาหารได้เพิ่มสูงขึ้น และประกอบกับการเสริมเอนไซม์โปรติเอสลงในอาหารยังสามารถส่งเสริมให้มีกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหารเพิ่มสูงขึ้น (Li *et al*., 2015; Song *et al*., 2016; Chowdhury *et al*., 2017) ในทางกลับกันการลดระดับปลาป่นลงในสูตรอาหารและใช้แหล่งโปรตีนจากกากถั่วเหลืองมาทดแทนก็ส่งผลให้มีสารต้านโภชนาการในอาหารเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งนอกจากสารต้านโภชนาการที่เป็นโปรตีนและโปรตีนที่มีความเป็นพิษดังได้กล่าวมาแล้วข้างต้น จากรายงานของ Peisker (2001) และ Dersjant-Li (2002) ยังรายงานเพิ่มเติมอีกว่าในกากถั่วเหลืองยังมีองค์ประกอบของสาร saponin ซึ่งอาจเป็นสาเหตุให้เกิดการเปลี่ยนแปลงหน้าที่การทำงานของลำไส้อีกด้วย และนอกจากนี้กากถั่วเหลืองยังมีองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่จำเป็น 3 ชนิด ได้แก่ เมทไธโอนิน ไลซีน และทรีโอนินที่จำกัด (Amaya *et al*., 2007) ดังนั้นการลดระดับปลาป่นลงในสูตรอาหาร และใช้แหล่งโปรตีนจากกากถั่วเหลืองมาทดแทนในสูตรอาหารสำหรับกุ้งขาวจึงมีแนวโน้มการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหารที่ลดลง

เมื่อทำการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของซากกุ้งภายหลังได้รับอาหารทดลองสูตรต่างๆ เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าระดับปลาป่นที่สูงในสูตรอาหารไม่สามารถส่งเสริมให้กุ้งขาวมีปริมาณโปรตีน ไขมัน และเถ้าในซากกุ้งแตกต่างกับอาหารที่มีการลดระดับปลาป่นลง ($P > 0.05$) เช่นเดียวกับการเสริมเอนไซม์โปรติเอสลงในอาหารที่ไม่สามารถส่งเสริมให้กุ้งขาวมีปริมาณโปรตีน ไขมัน และเถ้าในซากแตกต่างกัน ($P > 0.05$) ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานการศึกษาของ Shi และคณะ (2016) ที่พบว่าระดับปลาป่นและการเสริมเอนไซม์โปรติเอสลงในอาหารไม่สามารถส่งเสริมให้ปลา gibel carp มีปริมาณโปรตีน ไขมัน และเถ้าในซากแตกต่างกัน ส่วนในปู chinese mitten crab จากการศึกษาของ Chowdhury และคณะ (2017) พบว่ามีเพียงปริมาณ

ไขมันในซากที่เพิ่มสูงขึ้น แต่มีปริมาณโปรตีนและเถ้าในซากไม่แตกต่างกัน ถึงแม้ว่าจากรายงานทั้งสองจะมีผลของการใช้ประโยชน์จากโปรตีนและไขมันสุทธิเพิ่มสูงขึ้นตามระดับปลาป่นและการเสริมเอนไซม์โปรติเอสลงในอาหาร เช่นเดียวกับกรณีการศึกษาครั้งนี้ที่พบว่ามีการใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิเพิ่มสูงขึ้นในกุ้งขาวที่ได้รับอาหารเสริมเอนไซม์โปรติเอส และจากการศึกษาของ Song และคณะ (2017) ในกุ้งขาวพบว่ามีปริมาณโปรตีนในซากเพิ่มสูงขึ้นเมื่อได้รับอาหารที่มีการเสริมเอนไซม์โปรติเอส แต่มีปริมาณไขมันและเถ้าในซากไม่แตกต่างกัน

ส่วนผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหารในกรณีการศึกษาครั้งนี้พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหารในตับและตับอ่อนของกุ้งขาวมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นตามระดับปลาป่นในสูตรอาหารที่เพิ่มสูงขึ้น โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยโปรตีน ได้แก่ เอนไซม์โปรติเอส และเอนไซม์ในกลุ่มเซรีนโปรติเอสประกอบด้วยเอนไซม์ทริปซินและไคโมทริปซิน ซึ่งกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่มีระดับปลาป่น 18 เปอร์เซ็นต์ มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงกว่ากุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่มีระดับปลาป่น 10 เปอร์เซ็นต์ และอาหารที่ไม่มีปลาป่น ($P < 0.05$) และกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่มีระดับปลาป่น 18 และ 10 เปอร์เซ็นต์ มีกิจกรรมของเอนไซม์ไคโมทริปซินสูงกว่ากุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่ไม่มีปลาป่น ($P < 0.05$) แต่มีกิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$) เช่นเดียวกับกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ทำหน้าที่ย่อยไขมันที่มีกิจกรรมไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$) ส่วนกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสและเซลลูเลสที่ทำหน้าที่ย่อยคาร์โบไฮเดรตมีกิจกรรมเพิ่มสูงขึ้นตามระดับปลาป่นที่สูงขึ้นในสูตรอาหาร ($P < 0.05$) แต่กุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่มีระดับปลาป่น 10 เปอร์เซ็นต์ และไม่มีปลาป่นมีกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$) ทั้งนี้การเสริมเอนไซม์โปรติเอสลงในอาหารสามารถส่งเสริมให้กุ้งขาวมีกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหารประกอบด้วยกิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินและไคโมทริปซิน ไลเปส และเซลลูเลสในตับและตับอ่อนเพิ่มสูงขึ้น ($P < 0.05$) แต่มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสและอะไมเลสในตับและตับอ่อนไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$) โดยผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานการศึกษาของ Song และคณะ (2016) ที่รายงานว่าการเสริมเอนไซม์โปรติเอสลงในอาหารที่ใช้กากถั่วเหลืองและกากถั่วลิสงทดแทนโปรตีนจากปลาป่นที่ระดับ 50 เปอร์เซ็นต์ มีกิจกรรมของเอนไซม์ทริปซิน ไลเปส และอะไมเลสในตับและตับอ่อนของกุ้งขาวเพิ่มสูงขึ้น เมื่อเทียบกับอาหารในสูตรเดียวกันที่ไม่เสริมเอนไซม์โปรติเอส แต่มีระดับต่ำกว่าอาหารที่มีระดับปลาป่นสูง และจากรายงานการศึกษาของ Li และคณะ (2015) ยังรายงานเพิ่มเติมอีกว่าการเสริมเอนไซม์โปรติเอสลงในอาหารที่มีการลดระดับปลาป่นลง 10 เปอร์เซ็นต์ และโปรตีน 5 เปอร์เซ็นต์ สามารถส่งเสริมให้กุ้งขาวมีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสในตับและตับอ่อนเพิ่มสูงขึ้น และไม่แตกต่างกับอาหารที่มีระดับปลาป่นและโปรตีนสูง เช่นเดียวกับในปู chinese mitten crab จากการศึกษาของ Chowdhury และคณะ (2017) ที่

พบว่าการเสริมเอนไซม์โปรติเอสลงในอาหารที่ใช้กากถั่วเหลืองและกากเมล็ดฝ้ายทดแทนโปรตีนจากปลาป่นที่ระดับ 27 เปอร์เซ็นต์ สามารถส่งเสริมให้มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสในตับและตับอ่อนเพิ่มสูงขึ้น โดยการเพิ่มขึ้นของกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหารในตับและตับอ่อนของกุ้งขาวซึ่งจากการรวบรวมรายงานการศึกษาเบื้องต้นสามารถสรุปได้ว่ากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหารในตับและตับอ่อนของกุ้งขึ้นอยู่กับอาหารที่ได้รับ และปัจจัยจากตัวกุ้ง อันได้แก่ พันธุกรรม ช่วงอายุ การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ สุขภาพและรวมถึงสภาพแวดล้อมที่กุ้งอยู่อาศัย (Lee *et al*., 1984; Brito *et al*., 2000; Fernandez Gimenez *et al*., 2001; Moss *et al*., 2001; Cordova-Murueta and Garcia-Carreno, 2002) แต่หากจะชี้ชัดถึงสาเหตุการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ย่อยอาหารตามระดับของปลาป่นในสูตรอาหารที่เพิ่มสูงขึ้น และเมื่อมีการเสริมเอนไซม์โปรติเอสลงในอาหารของกุ้งขาวอาจมีผลเนื่องมาจากปริมาณและคุณภาพของสารอาหารในปลาป่นที่สูงกว่าในวัตถุดิบแหล่งโปรตีนทดแทนจากพืช หรือจากการปรับปรุงปริมาณและคุณภาพของสารอาหารให้สูงขึ้นจากกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่เสริมลงไปในอาหาร (Chowdhury *et al*., 2017) และประกอบกับการลดลงของสารต้านโภชนาการที่เป็นโปรตีน และโปรตีนที่มีความเป็นพิษในวัตถุดิบแหล่งโปรตีนทดแทนจากกากถั่วเหลือง (Dalsgaasd *et al*., 2012; Chowdhury *et al*., 2017) ซึ่งที่กล่าวมาข้างต้นสามารถแสดงให้เห็นได้จากรายงานการศึกษาของ Moss และคณะ (2001) ที่พบว่ากุ้งขาวที่เลี้ยงในน้ำที่มีอาหารธรรมชาติมีกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหาร ได้แก่ เอนไซม์ในกลุ่มเซรีนโปรติเอส ไลเปส อะไมเลส และเซลลูเลสเพิ่มสูงขึ้น เมื่อเทียบกับกุ้งขาวที่เลี้ยงในน้ำที่ผ่านการกรอง ซึ่งเป็นผลมาจากความอุดมสมบูรณ์ของแหล่งอาหารธรรมชาติ อาทิเช่น ไดอะตอม และสาหร่าย เป็นแหล่งสารอาหารหรือสารตั้งต้นสำหรับกุ้งขาวจึงส่งผลให้มีกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหารเพิ่มสูงขึ้น และยังมีรายงานเพิ่มเติมอีกว่าเป็นผลมาจากความแตกต่างของสารอาหารที่กุ้งได้รับ โดยกุ้งขาวมีกิจกรรมของเอนไซม์ในกลุ่มย่อยโปรตีนเพิ่มสูงขึ้น เมื่อได้รับอาหารที่มีระดับโปรตีนที่สูงและได้รับอาหารที่มีแหล่งโปรตีนจากสัตว์ในอัตราส่วนที่สูงกว่าพืช (Lee *et al*., 1984) และจากรายงานการศึกษาของ Fernandez Gimenez และคณะ (2001) รายงานว่ากิจกรรมของเอนไซม์เซรีนโปรติเอสในกุ้ง *Pleoticus muelleri* และกุ้งขาวเพิ่มสูงขึ้นในระยะหลังการลอกคราบ และลดต่ำลงในช่วงระยะก่อนการลอกคราบและระยะระหว่างการลอกคราบ ซึ่งอาจเกิดจากความต้องการสารอาหารของกุ้งหลังการลอกคราบเพื่อการเจริญเติบโต อย่างไรก็ตามโดยปกติกุ้งมีปริมาณการกินอาหารลดลงในช่วงการลอกคราบ นั้นอาจหมายถึงการมีแหล่งของสารอาหารหรือสารตั้งต้นที่ลดลง จึงเป็นสาเหตุให้มีกิจกรรมของเอนไซม์เซรีนโปรติเอสลดต่ำลง และนอกจากนี้จากรายงานของ Shiau (1998) และ Alday-Sanz (2010) รายงานว่าคาร์โบไฮเดรตในอาหารมีความสำคัญในการสังเคราะห์ไคตินในการสร้างโครงร่างแข็งของกุ้ง และกุ้งสามารถใช้แป้งที่มีเม็ดแป้งขนาดเล็กและมี

องค์ประกอบของอะไมโลเพกตินที่สูงเช่นในแป้งสาลีได้ดี ซึ่งอาจมีความสัมพันธ์กับปริมาณของเอนไซม์ในกลุ่มย่อยคาร์โบไฮเดรตที่เพิ่มสูงขึ้นในกรณีการศึกษาครั้งนี้ โดยในสูตรอาหารที่มีระดับปลาป่น 18 เปอร์เซ็นต์ มีองค์ประกอบของแป้งสาลีในสูตรอาหารสูงที่สุดและลดลงตามระดับปลาป่นที่ลดลงในสูตรอาหารแต่ละสูตร หรืออาจเป็นผลมาจากการตอบสนองความต้องสารอาหารจากคาร์โบไฮเดรตของร่างกายในการสังเคราะห์ไคตินในการสร้างโครงร่างแข็งเพื่อการเจริญเติบโตที่เพิ่มสูงขึ้นตามระดับปลาป่นในสูตรอาหารที่เพิ่มสูงขึ้น

จากผลการศึกษาสัมประสิทธิ์การย่อยสารอาหารของกุ้งขาวในกรณีการศึกษาครั้งนี้ พบว่ากุ้งขาวที่ได้รับอาหารสูตรที่มีระดับปลาป่น 18 เปอร์เซ็นต์ มีค่าสัมประสิทธิ์การย่อยวัตถุแห้งสูงกว่ากุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่มีระดับปลาป่น 10 เปอร์เซ็นต์ และไม่มีปลาป่น ($P < 0.05$) และมีค่าสัมประสิทธิ์การย่อยโปรตีนลดต่ำลงตามระดับปลาป่นในสูตรอาหารที่ลดลง ($P < 0.05$) แต่มีค่าสัมประสิทธิ์การย่อยพลังงานไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$) ซึ่งจากผลการทดลองดังกล่าวอาจบ่งชี้ได้ว่าปลาป่นเป็นแหล่งของโปรตีนที่สำคัญในสูตรอาหารสำหรับกุ้งขาว โดยการลดระดับปลาป่นในสูตรอาหารและใช้แหล่งโปรตีนจากกากถั่วเหลืองมาทดแทนโปรตีนจากปลาป่นส่งผลต่อสัมประสิทธิ์การย่อยโปรตีนของกุ้งขาวให้ลดลงอย่างเห็นได้ชัด ทั้งนี้การเสริมเอนไซม์โปรติเอสในสูตรอาหารสามารถส่งเสริมให้กุ้งขาวมีค่าสัมประสิทธิ์การย่อยวัตถุแห้ง โปรตีน และพลังงานเพิ่มสูงขึ้น ($P < 0.05$) สอดคล้องกับรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Dalsgaard และคณะ (2012) จากผลการทดลองเสริมเอนไซม์โปรติเอสลงในอาหารที่ใช้แหล่งโปรตีนหลักจากวัตถุดิบพืชต่างกัน 3 ชนิด ได้แก่ กากถั่วเหลือง กากเมล็ดทานตะวัน และกากคาโนลา ต่อสัมประสิทธิ์การย่อยสารอาหารของปลาเรนโบว์เทราต์ พบว่าสามารถเพิ่มสัมประสิทธิ์การย่อยวัตถุแห้ง โปรตีน ไขมัน เถ้า และฟอสฟอรัสในอาหารที่ใช้กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งโปรตีนหลัก แต่ในอาหารที่ใช้แหล่งโปรตีนหลักจากกากเมล็ดทานตะวัน และกากคาโนลามีสัมประสิทธิ์การย่อยสารอาหารไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุม ซึ่งจากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างเอนไซม์โปรติเอสกับชนิดและปริมาณของสารตั้งต้นหรือวัตถุดิบแหล่งโปรตีนจากพืชในอาหารสัตว์น้ำ เช่นเดียวกับในกรณีการศึกษาครั้งนี้ที่ใช้แหล่งโปรตีนจากกากถั่วเหลืองเป็นแหล่งโปรตีนในสูตรอาหารที่มีระดับปลาป่น 18 เปอร์เซ็นต์ และทดแทนโปรตีนจากปลาป่นในสูตรอาหารที่มีการลดระดับปลาป่นลง และสอดคล้องกับรายงานการศึกษาของ Li และคณะ (2015) ที่พบว่าการเสริมเอนไซม์โปรติเอสลงในอาหารปลานิลลูกผสมที่มีระดับปลาป่นต่ำ 3 เปอร์เซ็นต์ และใช้กากถั่วเหลืองทดแทนโปรตีนจากปลาป่น มีสัมประสิทธิ์การย่อยวัตถุแห้งและโปรตีนเพิ่มสูงขึ้น เมื่อเทียบกับอาหารในสูตรเดียวกันและไม่แตกต่างกับอาหารที่มีระดับปลาป่นสูง 9 เปอร์เซ็นต์ แต่การเสริมเอนไซม์โปรติเอสในอาหารที่มีระดับปลาป่นสูงไม่สามารถส่งเสริมให้มีสัมประสิทธิ์การย่อยวัตถุแห้งและโปรตีนเพิ่ม

สูงขึ้น เช่นเดียวกับผลการศึกษาของ Shi และคณะ (2016) ที่รายงานว่าการเสริมเอนไซม์โปรติเอสในอาหารปลา gibel carp ที่มีระดับปลาป่นต่ำ 3 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้กากถั่วเหลืองทดแทนโปรตีนจากปลาป่นในสูตรอาหาร มีสัมประสิทธิ์การย่อยวัตถุแห้งและโปรตีนเพิ่มสูงขึ้น เมื่อเทียบกับอาหารในสูตรเดียวกัน และไม่แตกต่างกับอาหารที่มีระดับปลาป่นสูง 9 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจากผลของสัมประสิทธิ์การย่อยสารอาหารที่เพิ่มสูงขึ้นในสัตว์น้ำชนิดต่างๆ จากรายงานการศึกษาที่กล่าวมาแล้วข้างต้นอาจเป็นผลโดยตรงจากปริมาณและคุณภาพของสารอาหารในปลาป่นที่สูงกว่าในกากถั่วเหลือง และการเสริมเอนไซม์โปรติเอสลงในอาหารที่สามารถปรับปรุงคุณภาพและปริมาณของสารอาหารให้เพิ่มสูงขึ้น รวมถึงมีปริมาณสารต้านโภชนาการที่เป็นโปรตีนและโปรตีนที่มีความเป็นพิษต่อร่างกายในกากถั่วเหลืองให้ลดต่ำลง (Dalsgaard *et al*., 2012; Chowdhury *et al*., 2017) และยังอาจเป็นผลมาจากการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ย่อยอาหารในระบบย่อยอาหารของสัตว์น้ำเมื่อมีปริมาณและคุณภาพของสารอาหารเพิ่มสูงขึ้น (Chowdhury *et al*., 2017) ดังแสดงให้เห็นได้จากการเสริมเอนไซม์โปรติเอสลงในอาหารกุ้งขาวจากการศึกษาของ Li และคณะ (2015) พบว่าสามารถส่งเสริมให้มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสในตับและตับอ่อนเพิ่มสูงขึ้นเช่นเดียวกับการศึกษาของ Song และคณะ (2016) ที่รายงานเพิ่มเติมอีกว่าสามารถส่งเสริมให้กุ้งขาวมีกิจกรรมของเอนไซม์ทริปซิน ไลเปส และอะไมเลสในตับและตับอ่อนเพิ่มสูงขึ้น และจากกรณีการศึกษาในครั้งนี้ที่พบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหารในกลุ่มย่อยโปรตีน ไขมัน และคาร์โบไฮเดรตเพิ่มสูงขึ้น รายละเอียดดังได้กล่าวมาแล้วข้างต้น ซึ่งเหล่านี้อาจส่งผลให้การเสริมเอนไซม์โปรติเอสในสูตรอาหารสามารถส่งเสริมให้กุ้งขาวมีสัมประสิทธิ์การย่อยวัตถุแห้ง โปรตีน และพลังงานเพิ่มสูงขึ้นในกรณีการศึกษาครั้งนี้

ส่วนปริมาณเม็ดเลือดรวม และกิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase (PO) ซึ่งสามารถใช้เป็นตัวชี้วัดที่บ่งชี้ถึงภูมิคุ้มกันของกุ้งหรือสัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียนได้ดี (Li *et al*., 2008a; Li and Chen, 2008) กล่าวคือกุ้งหรือสัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียนมีระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ โดยประกอบด้วยภูมิคุ้มกันในน้ำเลือด และภูมิคุ้มกันที่อาศัยเซลล์ ทั้ง 2 ระบบจะทำงานร่วมกันโดยอาศัยการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดเป็นหลัก (Alday-Sanz, 2010; Song *et al*., 2016a) ซึ่งกิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase เป็นผลิตผลสุดท้ายของระบบ prophenoloxidase (proPO) ภายหลังการทำงานของเซรีนโปรติเอส เมื่อถูกกระตุ้นด้วยองค์ประกอบของเซลล์จุลชีพ เช่น β-1,3-glucan และ lipopolysaccharide (LPS) เป็นต้น โดย prophenoloxidase สังเคราะห์ขึ้นจากเซลล์เม็ดเลือดชนิดเซมิแกรนูลาร์และแกรนูลาร์เซลล์ ซึ่งกิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase เป็นการทำลายสิ่งแปลกปลอมโดยกระบวนการ melanisation ห้อมล้อมสิ่งแปลกปลอมไม่ให้กระจายไปยังส่วนต่างๆ ของร่างกาย (Chiu *et al*., 2007; Li *et al*., 2008a; Li and Chen 2008) และนอกจากนี้ระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งยังมีการสร้างเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ ตัวอย่างเช่น catalase (CAT), glutathione peroxidase

(GPX) และ superoxide dismutase (SOD) เป็นต้น เพื่อควบคุมและป้องกันผลกระทบจากสารอนุมูลอิสระ อาทิเช่น superoxide anion radical ($O_2^{\bullet-}$) hydroxyl radical ($^{\bullet}OH$) และ hydrogen peroxide (H_2O_2) เป็นต้น ซึ่งเหล่านี้มีพิษต่อเซลล์ โดยสารอนุมูลอิสระดังกล่าวถูกผลิตขึ้นในกระบวนการเมแทบอลิซึม ซึ่งพบมากในสภาวะเครียดจากสภาพแวดล้อมที่เป็นพิษและภาวะติดเชื้อเพื่อช่วยในการฆ่าเซลล์บุกรุก ดังนั้นสารต้านอนุมูลอิสระถูกนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้ภาวะที่เซลล์ถูกทำลายด้วยอนุมูลอิสระ (oxidative stress) รวมถึงการวัดค่า malondialdehyde (MDA) ซึ่งสามารถบ่งชี้ถึงความเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์จากการออกซิเดชันของกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวได้ (Aguirre-Guzman *et al*., 2009; Patlolla *et al*., 2009)

โดยจากการศึกษาครั้งนี้พบว่ากุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่มีระดับปลาป่น 18 เปอร์เซ็นต์ และมีการลดระดับปลาป่นลงเหลือ 10 และ 0 เปอร์เซ็นต์ ในสูตรอาหาร โดยใช้กากถั่วเหลืองทดแทนแหล่งโปรตีนจากปลาป่น และการเสริมเอนไซม์โปรติเอสในสูตรอาหารไม่ส่งผลให้มีปริมาณเม็ดเลือดรวม กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase และ catalase และปริมาณของ malondialdehyde แตกต่างกัน ($P > 0.05$) โดยจากการรวบรวมรายงานการศึกษาที่มีความเกี่ยวข้องกับกรณีการศึกษาในครั้งนี้ต่อภูมิคุ้มกันของกุ้งพบมีรายงานว่าสาร saponin ส่งผลต่อปริมาณเม็ดเลือดรวมให้เพิ่มสูงขึ้น แต่มีกิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase ลดต่ำลงตามระดับความเข้มข้นของสาร saponin ที่เพิ่มสูงขึ้น ในกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) (Yeh *et al*., 2006) และกุ้งขาว (Su and Chen, 2008) และนอกจากนี้จากรายงานการศึกษาของ Su และ Chen (2008) ยังพบอีกว่าสาร saponin ส่งผลให้กุ้งขาวมีกิจกรรมของเอนไซม์ superoxide dismutase และ glutathione peroxidase เพิ่มสูงขึ้น อีกทั้งยังส่งผลให้มีกิจกรรมการจับกินสิ่งแปลกปลอม (phagocytic activity) เพิ่มสูงขึ้นอีกด้วย และจากการศึกษาของ Liu และคณะ (2011) รายงานว่าการเสริม polysaccharide ที่สกัดจากส่วนรากของโสม (*Panax ginseng*) สามารถส่งเสริมให้กุ้งขาวมีภูมิคุ้มกันที่ดีเพิ่มขึ้น โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์ catalase และ superoxide dismutase เพิ่มสูงขึ้นและมีปริมาณของ malondialdehyde ลดต่ำลง โดย polysaccharide เป็นองค์ประกอบพื้นฐานของผนังเซลล์ของเนื้อเยื่อภายในเมล็ดถั่วเหลืองประกอบด้วย cellulose, arabinogalactan, arabinan และ acidic polysaccharide complex (Sievert, 1990) ซึ่งปริมาณสาร saponin และ polysaccharide ในกากถั่วเหลืองที่ใช้เป็นแหล่งโปรตีนทดแทนโปรตีนจากปลาป่นในกรณีการศึกษาครั้งนี้อาจเป็นสาเหตุของผลการทดลองที่พบว่ามีปัจจัยที่ศึกษาเกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันไม่แตกต่างกัน แม้ว่าจะมีการลดระดับปลาป่นลงในสูตรอาหารก็ตาม ส่วนการศึกษาผลของการเสริมเอนไซม์โปรติเอสลงในอาหารที่มีการลดระดับปลาป่นลงและใช้แหล่งโปรตีนจากพืชมาทดแทนจากรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ โดย Song และคณะ (2016) พบว่าการเสริมเอนไซม์โปรติเอสลงในอาหารกุ้งขาวที่ใช้แหล่งโปรตีน

จากกากถั่วเหลืองร่วมกับกากถั่วลิสงทดแทนโปรตีนจากปลาป่นที่ระดับ 50 เปอร์เซ็นต์ สามารถส่งเสริมให้กุ้งขาวมีภูมิคุ้มกันที่ดีเพิ่มขึ้น โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase และ superoxide dismutase เพิ่มสูงขึ้น และมีปริมาณของ malondialdehyde ลดต่ำลงแตกต่างกับกลุ่มที่ไม่เสริมเอนไซม์โปรติเอส และไม่แตกต่างกับกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่มีระดับปลาป่นสูง และนอกจากนี้ยังมีรายงานเพิ่มเติมจากการศึกษาของ Xie และคณะ (2016) อีกว่าการลดระดับปลาป่นในสูตรอาหารของกุ้งขาวลงเหลือ 15, 10 และ 5 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้แหล่งโปรตีนทดแทนจากกากถั่วเหลืองและโปรตีนถั่วเหลืองเข้มข้น และเสริมด้วยกรดอะมิโนในสูตรอาหารที่มีการลดระดับปลาป่นลงให้มีปริมาณเทียบเท่ากับอาหารในสูตรที่มีระดับปลาป่นสูง มีกิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase, catalase และ superoxide dismutase ไม่แตกต่างกับอาหารสูตรที่มีระดับปลาป่นสูง 20 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวส่วนหนึ่งอาจเป็นผลมาจากคุณภาพของโปรตีนในอาหารที่ใกล้เคียงกันจากการเสริมกรดอะมิโนลงในสูตรอาหารที่มีการลดการใช้โปรตีนจากปลาป่น เช่นเดียวกับในกรณีการศึกษาครั้งนี้ที่พบว่าการลดระดับปลาป่นในสูตรอาหารโดยใช้แหล่งโปรตีนจากกากถั่วเหลืองมาทดแทน และเสริมด้วยกรดอะมิโนเมทไธโอนีนมีกิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase และ catalase และปริมาณของ malondialdehyde ไม่แตกต่างกับกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่มีระดับปลาป่น 18 เปอร์เซ็นต์ ($P > 0.05$) อย่างไรก็ตามจากการศึกษาของ Xie และคณะ (2016) พบว่าการลดระดับปลาป่นในสูตรอาหารของกุ้งขาวลงต่ำกว่า 15 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลให้มีกิจกรรมของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระลดต่ำลง เมื่อเปรียบเทียบกับกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่มีระดับปลาป่นสูง 25 เปอร์เซ็นต์ ถึงแม้ว่าจะมีการเสริมกรดอะมิโนลงในอาหารที่มีการลดระดับปลาป่นลงก็ตาม

สำหรับปริมาณ oxyhemocyanin, protein และอัตราส่วนของ oxyhemocyanin / protein ใน hemolymph ของกุ้ง กล่าวคือ oxyhemocyanin คือ hemocyanin ซึ่งทำหน้าที่ในการจับและขนส่งออกซิเจนของเลือด โดยการเพิ่มขึ้นของ hemocyanin หมายถึงการเพิ่มความสามารถของเม็ดเลือดในการจับและขนส่งออกซิเจนหรือการนำออกซิเจนเข้าสู่เซลล์ของเนื้อเยื่อ เพื่อตอบสนองกระบวนการเมแทบอลิซึมในกิจกรรมต่างๆของร่างกาย (Taylor and Anstiss, 1999; Cheng *et al*., 2003; Li *et al*., 2008b) ซึ่งปริมาณของ oxyhemocyanin ใน hemolymph สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ที่ดีสำหรับสุขภาพของสัตว์น้ำในกลุ่มครัสเตเชียน (Cheng *et al*., 2003; Li *et al*., 2008b) โดยปริมาณ oxyhemocyanin, protein และอัตราส่วนของ oxyhemocyanin / protein ใน hemolymph จะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อกุ้งได้รับความเครียดจากสภาพแวดล้อม เช่นจากการศึกษาของ Li และคณะ (2008b) ในกุ้งขาวเมื่ออยู่ในสภาพแวดล้อมที่มีความเค็มต่ำ และจากการศึกษาของ Cheng และคณะ (2003) ในกุ้งก้ามกราม เมื่ออยู่ในสภาพแวดล้อมที่มีออกซิเจนต่ำ และสำหรับในการศึกษาครั้งนี้พบว่ากุ้งขาวที่ได้รับอาหารเสริมเอนไซม์โปรติเอสมีปริมาณ oxyhemocyanin และอัตราส่วนของ oxyhemocyanin

/ protein ใน hemolymph ลดต่ำลง เมื่อเปรียบเทียบกับกุ้งขาวที่ได้รับอาหารไม่เสริมเอนไซม์โปรติเอส ($P < 0.05$) ซึ่งปริมาณ oxyhemocyanin และอัตราส่วนของ oxyhemocyanin / protein ที่ลดลงในกรณีการศึกษาครั้งนี้ อาจหมายถึงความต้องการใช้พลังงานในกิจกรรมการย่อยอาหาร การตอบสนองของร่างกายต่อโปรตีนที่มีความเป็นพิษที่ลดลง เนื่องจากการเสริมเอนไซม์โปรติเอสสามารถปรับปรุงคุณภาพของสารอาหารในอาหารให้สูงขึ้น โดยการย่อยหรือการทำให้ลดลงของสารต้านโภชนาการที่เป็นโปรตีนและโปรตีนที่มีความเป็นพิษ และจากการเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนที่เสียสภาพระหว่างกระบวนการผลิตอาหาร (Dalsgaard *et al*., 2012) ซึ่งเหล่านี้อาจส่งผลให้กุ้งขาวมีความต้องการใช้พลังงานของร่างกายที่ลดลง และการเพิ่มขึ้นของปริมาณ oxyhemocyanin และ protein ใน hemolymph ของกุ้งขาว จากรายงานการศึกษาของ Cheng และคณะ (2002) พบว่ามีความสัมพันธ์กับระยะการลอกคราบของกุ้ง โดยปริมาณ oxyhemocyanin และ protein ใน hemolymph จะมีปริมาณที่ต่ำในช่วงระยะหลังการลอกคราบ แต่จะมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นในระยะก่อนการลอกคราบและระยะระหว่างการลอกคราบ ซึ่งบ่งชี้ถึงความต้องการใช้พลังงานของร่างกายในกิจกรรมการลอกคราบของกุ้งที่เพิ่มสูงขึ้น และจากการศึกษาของ Yeh และคณะ (2006) ยังรายงานเพิ่มเติมอีกว่าสาร saponin ส่งผลต่อปริมาณ oxyhemocyanin ใน hemolymph ของกุ้งก้ามกรามให้มีปริมาณลดต่ำลงตามระดับความเข้มข้นของ saponin ที่เพิ่มสูงขึ้น โดยในการศึกษาครั้งนี้พบว่าปริมาณของ oxyhemocyanin และอัตราส่วนของ oxyhemocyanin / protein มีแนวโน้มลดต่ำลง ($P > 0.05$) ตามระดับการใช้แหล่งโปรตีนทดแทนจากกากถั่วเหลืองที่เพิ่มสูงขึ้น

อย่างไรก็ตามรายงานการศึกษาเกี่ยวกับผลของการเสริมเอนไซม์โปรติเอสในอาหารสัตว์น้ำต่อปัจจัยที่ศึกษาที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันยังมีข้อมูลที่ศึกษาน้อยมาก ดังนั้นจึงยังไม่สามารถสรุปปัจจัยหรือสาเหตุที่ชัดเจนที่ส่งผลต่อภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวในการศึกษาครั้งนี้ได้ อย่างไรก็ตามอย่างน้อยที่สุดการศึกษาครั้งนี้ก็เป็นส่วนหนึ่งในการแสดงข้อมูลพื้นฐานได้ว่า การลดระดับปลาป่นในสูตรอาหารโดยใช้แหล่งโปรตีนจากกากถั่วเหลืองทดแทน และการเสริมเอนไซม์โปรติเอสในอาหารกุ้งขาวไม่ส่งผลเชิงลบต่อภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวซึ่งหมายรวมถึงความสามารถในการป้องกันเซลล์จากการถูกทำลายด้วยอนุมูลอิสระและจากการออกซิเดชันของกรดไขมัน และหรือความทนทานต่อสภาพแวดล้อม โดยการเสริมเอนไซม์โปรติเอสลงในอาหารสามารถส่งเสริมให้กุ้งขาวมีความต้องการออกซิเจนในกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์ที่ลดลง แสดงให้เห็นได้จากปริมาณ oxyhemocyanin และอัตราส่วนของ oxyhemocyanin / protein ที่ลดต่ำลง ($P < 0.05$)

จากผลการศึกษาอัตราการตายสะสมของกุ้งขาวหลังได้รับเชื้อ *V. harveyi* ที่ระดับความเข้มข้น 2.3×10^7 CFU/ml เป็นระยะเวลา 14 วัน หลังได้รับอาหารทดลองเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าการเสริมเอนไซม์โปรติเอสและระดับปลาป่นในสูตรอาหารไม่ส่งผลให้กุ้งขาวมีอัตราการตาย

สะสมแตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) อย่างไรก็ตามจากรายงานการศึกษาของ Song และคณะ (2016) พบว่าการเสริมเอนไซม์โปรติเอสลงในอาหารที่มีการลดระดับปลาป่นลงที่ระดับ 50 เปอร์เซ็นต์ และใช้แหล่งโปรตีนจากกากถั่วเหลืองร่วมกับกากถั่วลิสงทดแทนโปรตีนจากปลาป่น สามารถส่งเสริมให้กุ้งขาวมีอัตราการตายสะสมที่ 96 ชั่วโมง หลังได้รับเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่ระดับความเข้มข้น 2.4×10^7 CFU/ml มีค่าลดลง เมื่อเทียบกับอาหารในสูตรเดียวกันที่ไม่มีการเสริมเอนไซม์โปรติเอส และไม่แตกต่างกับอาหารที่มีระดับปลาป่นสูง

บทที่ 5

สรุปผลการศึกษา

จากผลการทดลองเสริมเอนไซม์โปรติเอสในอาหารสำหรับกุ้งขาวที่มีระดับปลาป่นปกติและมีการลดระดับปลาป่นลงในสูตรอาหาร โดยใช้แหล่งโปรตีนจากกากถั่วเหลืองทดแทนโปรตีนจากปลาป่น ซึ่งปัจจัยที่ศึกษาประกอบด้วย 2 ปัจจัย คือ ระดับของปลาป่นในสูตรอาหารแตกต่างกัน 3 ระดับ คือ 18, 10 และ 0 เปอร์เซ็นต์ และแต่ละระดับปลาป่นแบ่งออกเป็นกลุ่มที่ไม่เสริมและมีการเสริมเอนไซม์โปรติเอสที่ระดับ 175 มก./กก. ซึ่งสรุปผลได้ดังนี้

สามารถลดระดับปลาป่นในสูตรอาหารสำหรับกุ้งขาวลง 45 เปอร์เซ็นต์ จากระดับปลาป่น 18 เปอร์เซ็นต์ ลดลงเหลือ 10 เปอร์เซ็นต์ ในสูตรอาหาร เมื่อใช้แหล่งโปรตีนจากกากถั่วเหลืองทดแทนโปรตีนจากปลาป่น โดยไม่ส่งผลเชิงลบต่อการเจริญเติบโต (น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัว น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ) อัตราการรอด ประสิทธิภาพการใช้อาหาร (อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน และการใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ) องค์ประกอบทางเคมีของซากกุ้ง รวมถึงภูมิคุ้มกันและการต้านทานต่อเชื้อ *V. harveyi* ถึงแม้ว่าจะมีกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหารได้แก่ โปรติเอส อะไมเลส และเซลลูเลส และมีสัมประสิทธิ์การย่อยวัตถุแห้งและโปรตีนลดต่ำลงก็ตาม

การลดระดับปลาป่นลงเหลือ 0 เปอร์เซ็นต์ ในสูตรอาหาร ส่งผลเชิงลบต่อการเจริญเติบโตและการกินอาหารของกุ้งขาว โดยกุ้งขาวมีปริมาณอาหารที่กินลดต่ำลงถึงแม้จะมีองค์ประกอบของวัตถุดิบที่สามารถดึงดูดการกินอาหารในสูตรอาหารก็ตาม อีกทั้งยังมีกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหารโดยเฉพาะกิจกรรมของเอนไซม์ไคโมทริปซินและเซลลูเลส รวมถึงสัมประสิทธิ์การย่อยโปรตีนที่ลดต่ำลง

การเสริมเอนไซม์โปรติเอสลงในอาหารสามารถส่งเสริมให้กุ้งขาวมีประสิทธิภาพการใช้อาหารรวมถึงกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหารโดยเฉพาะกิจกรรมของเอนไซม์ทริปซิน ไคโมทริปซิน ไลเปส และเซลลูเลส อีกทั้งยังส่งเสริมให้มีสัมประสิทธิ์การย่อยวัตถุแห้ง โปรตีน และพลังงานเพิ่มสูงขึ้น และมีแนวโน้มส่งผลเชิงบวกต่อการเจริญเติบโตและอัตราการรอด รวมถึงภูมิคุ้มกันและการต้านทานต่อเชื้อ *V. harveyi*

ดังนั้นในสูตรอาหารสำหรับกุ้งขาวสามารถลดระดับปลาป่นลง 45 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้แหล่งโปรตีนจากกากถั่วเหลืองมาทดแทน และการเสริมเอนไซม์โปรติเอสที่ระดับ 175 มก./กก. สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการใช้อาหารและสัมประสิทธิ์การย่อยอาหารของกุ้งขาวให้สูงขึ้น

เอกสารอ้างอิง

กิจการ ศุภมาตย์, จรีพร เรืองศรี, สุภฎา คีรีรัฐนิคม และนรินทร์ สงสีจันทร์. 2543. ระบบภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำ: IV. การศึกษาค่าปกติของระบบภูมิคุ้มกันและองค์ประกอบเลือดในกุ้งกุลาดำ. วารสารสงขลานครินทร์ ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22: 579-603.

ชลอ ลิ้มสุวรรณ. 2543. กุ้งไทย 2000. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์ เจริญรัฐการพิมพ์.

ชลอ ลิ้มสุวรรณ และพรเลิศ จันทร์รัชชกูล. 2547. อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งในประเทศไทย. กรุงเทพฯ: บริษัท เมจิค พับบลิเคชั่น จำกัด.

ชลอ ลิ้มสุวรรณ, สุธี วงศ์มณีประทีป, สาธิต ประเสริฐศรี, แก้วตา ลิ้มเฮง, ปัทมา วิริยพัฒนทรัพย์, เกศินี หลายสุทธิสาร และอริสา ศรีหมากสุก. 2553. ผลของอุณหภูมิต่อปริมาณการกินอาหาร การเจริญเติบโต อัตราการรอดตายและคุณภาพน้ำในการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*). การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 48 กรุงเทพฯ 3-5 กุมพาพันธ์ 2553 หน้า 313-321.

โชคชัย เหลืองธุวปราณีต. 2548. หลักการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ. กรุงเทพฯ: โฟร์เพซ.

มณเฑียร ส่งเสริม, บัญญัติ สุขศรีงาม และประภาศิริ ศรีโสภาภรณ์. 2533. การศึกษาแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคเรืองแสงกุ้งกุลาดำ. วารสารศรีนครินทร์วิโรฒวิจัยและพัฒนา 4: 15-24.

ธงชาติ สุริยวงค์. 2556. ผลของกากมันสำปะหลังเสริมด้วยเอนไซม์ไซลาเนสต่อการย่อยได้ของโภชนะสมรรถนะการเจริญเติบโต และคุณภาพซากของไก่เนื้อ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

ธันยพร จันท์แสนโรจน์. 2550. การผลิตและสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากหอยเป๋าฮื้อ *Haliotis asinina*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สมนึก สอนนอก และนพแสน พรหมอินทร์. 2550. การศึกษาคุณค่าทางโภชนะของวัตถุดิบอาหารสัตว์ในท้องถิ่นเขตจังหวัดปัตตานี. รายงานการวิจัย. ภาควิชาเทคโนโลยีและการอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สมาคมผู้ผลิตปลาป่นไทย. 2561. ประกาศราคาปลาป่นประจำวัน. เข้าถึงได้จาก http://www.thaifishmeal.com/images/Report%20%20Fishmeal%20Price%20April%2011%202018.pdf [17 เมษายน 2561].

สมาคมผู้ผลิตอาหารไทย. 2561. ราคาวัตถุดิบอาหารสัตว์. เข้าถึงได้จาก http://www.thaifeedmill.com/tabid/78/Default.aspx [17 เมษายน 2561].

สาวิตรี ศิลาเกษ. 2541. การผลิตวัคซีนจากเชื้อ *Vibrio harveyi* และการประยุกต์ใช้ในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* Fabricius). วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2554. การศึกษาความต้องการใช้วัตถุดิบอาหารสัตว์. กรุงเทพฯ: สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2555. การศึกษาเศรษฐกิจการผลิตการตลาดปลาป่น ระบบประกันคุณภาพ. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. เอกสารวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร เลขที่ 113 มีนาคม 2555.

สุทธสินี สนธิรัตน. 2561. สถานการณ์สินค้ากุ้งทะเลและผลิตภัณฑ์ ปี 2560 และแนวโน้มปี 2561. เข้าถึงได้จาก http://www.fisheries.go.th/strategy/UserFiles/files/shimp.pdf [17 เมษายน 2561].

Aguirre-Guzman, G., Sanchez-Martinez, J.G., Campa-Cordova, A.I., Luna-Gonzalez, A. and Ascencio, F. 2009. Penaeid shrimp immune system. Thai Journal of Veterinary Medicine 39: 205-215.

Alday-Sanz, V. 2010. The shrimp book. India: Replika Press.

Amaya, E.A., Davis, A.D. and Rouse, D.B. 2007. Replacement of fish meal in practical diets for the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) reared under pond conditions. Aquaculture 262: 393-401.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 1990. Official Methods of Analysis 15th Edition. Washington DC: Association of Official Analytical Chemists.

Asahara, M. 1973. Studies on proteolytic enzyme in the liver of the shrimp, *Trachypenaeus curvirostris*. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries 39: 987-991.

Dersjant-Li, Y. 2002. The use of soy protein in aquafeeds. In: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortés, M.G., Simoes, N. (Eds.). Avances en

Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 3 al 6 de Septiembre del 2002. Cancún, Quintana Roo, México.

Bezerra, R.S., Lins, E.J.F., Alencar, R.B., Paiva, P.M.G., Chaves, M.E.C., Luana, C.B.B. and Carvalho, L.B. 2005. Alkaline proteinase from intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Process Biochemistry 40: 1829-1834.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.

Briggs, M., Funge-Smith, S., Subasinghe, R. and Phillips, M. 2004. Introductions and movement of *Penaeus vannamei* and *Penaeus stylirostris* in Asia and the Pacific. Bangkok. Food and Agriculture Organization of the United Nations Regional Office for Asia and the Pacific.

Brito, R., Chimal, M.E., Gaxiola, G. and Rosas, C. 2000. Growth, metabolic rate, and digestive enzyme activity in the white shrimp *Litopenaeus setiferus* early postlarvae fed different diets. Experimental Marine Biology Ecology 255: 21-36.

Carrillo-Farnes, O., Forrellat-Barrios, A., Guerrero-Galvan, S. and Vega-Villasante, F. 2007. A review of digestive enzyme activity in penaeid shrimp. Crustaceana 80: 257-275.

Ceccaldi, H.J. 1989. Anatomy and physiology of digestive tract of crustacean decapods reared in aquaculture. Advances in Tropical Aquaculture 9: 243-259.

Cheng, W., Liu, C.H. and Kuo, C.M. 2003. Effects of dissolved oxygen on hemolymph parameters of freshwater giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). Aquaculture 220: 843-856.

Cheng, W., Liu, C.H., Yan, D.F. and Chen, J.C. 2002. Hemolymph oxyhemocyanin, protein, osmolality and electrolyte levels of whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* in relation to size and molt stage. Aquaculture 211: 325-339.

Chowdhury, M.A.K. and Villarroal, P.C. 2014. Use of a heat-stable protease in salmonid feeds: experiences from Canada and Chile. International Aquafeed 2014: 30-32.

Chowdhury, M.A.K., Zhu, J., Cai, C., Ye, Y. and He, J. 2017. Dietary protease modulates nutrient retention efficiency and hepatopancreatic protease activity in juvenile Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*. Aquaculture Nutrition 2017: 1-7.

Chiu, C.H., Guu, Y.K., Liu, C.H., Pan, T.M. and Cheng, W. 2007. Immune responses and gene expression in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, induced by *Lactobacillus plantarum*. Fish and Shellfish Immunology 23: 364-377.

Cordova-Murueta, J.H. and Garcia-Carreno, F.L. 2002. Nutritive value of squid and hydrolyzed protein supplement in shrimp feed. Aquaculture 210: 371-384.

Cruz-Suarez, L.E., Nieto-Lopez, M., Guajardo-Barbosa, C., Tapia-Salazar, M., Scholz, U. and Ricque-Marie, D. 2007. Replacement of fish meal with poultry by-product meal in practical diets for *Litopenaeus vannamei*, and digestibility of the tested ingredients and diets. Aquaculture 272: 466-476.

Cuzon, G. Lawrence, A., Gaxiola, G., Rosas, C. and Guillaume, J. 2004. Nutrition of *Litopenaeus vannamei* reared in tanks or in ponds. Aquaculture 235: 513-551.

Dalsgaard, J., Verlhac, V., Hjermitslev, N.H., Ekmann, K.S., Fischer, M., Klausen, M. and Pedersen, P.B. 2012. Effects of exogenous enzymes on apparent nutrient digestibility in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets with high inclusion of plant-based protein. Animal Feed Science and Technology 171: 181-191.

Davis, D.A. and Arnold, C.R. 2000. Replacement of fish meal in practical diets for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture 185: 291-298.

Davis, D.A., Johnston, W.L. and Arnold, C.R. 1998. The use of enzyme supplements in shrimp diets. Symposium publication IV International Symposium on Aquatic Nutrition, La Paz, B.C.S., Mexico, 15-18 November 1998, pp. 452-462.

Divakaran, S. and Velasco, M. 1999. Effect of proteolytic enzyme addition to a practical feed on growth of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone). Aquaculture Research 30: 335-339.

Drew, M.D., Racz, V.J., Gauthier, R. and Thiessen, D.L. 2005. Effect of adding protease to coextruded flax:pea or canola:pea products on nutrient digestibility and growth performance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Animal Feed Science and Technology 119: 117-128.

Erez, E., Fass, D. and Bibi, E. 2009. How intramembrane proteases bury hydrolytic reactions in the membrane. Nature 459: 371-378.

FAO (Food and Agriculture Organization). 2016. Cultured aquatic species information programme *Penaeus vannamei* (Boone, 1931). Available: http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Penaeus_vannamei/en [20 July 2016].

Fernandez Gimenez, A.V., Garcia-Carreno, F.L., Navarrete del Toro, M.A. and Fenucci, J.L. 2001. Digestive proteinases of red shrimp *Pleoticus muelleri* (Decapoda, Penaeoidea) : partial characterization and relationship with molting. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology 130: 331-338.

Furukawa, A. and Tsukahara, H. 1996. On the acid digestion for the determination of chromic oxide as an index substance in the study of digestibility of fish feed. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries 32: 502-506.

Ghazi, S., Rooke, J.A., Galbraith, H. and Bedford, M.R. 2002. The potential for the improvement of the nutritive value of soya-bean meal by different proteases in broiler chicks and broiler cockerels. British Poultry Science 43: 70-77.

Gong, H., Lawrence, A.L., Gatlin, D.M., Jiang, D.H. and Zhang, F. 2001. Comparison of different types and levels of commercial soybean lecithin supplemented semipurified diets for juvenile *Litopenaeus vannamei* Boone. Aquaculture Nutrition 7: 11-17.

Gong, H., Lawrence A.L., Jiang, D.H., Castille, F.L. and Gatlin, D.M. 2000a. Lipid nutrition of juvenile *Litopenaeus vannamei* I. Dietary cholesterol and de-oiled soy lecithin requirements and their interaction. Aquaculture 190: 305-324.

Gong, H., Lawrence, A.L., Jiang, D.H. and Gatlin, D.M. 2000b. Lipid nutrition of juvenile *Litopenaeus* v*annamei* II. Active components of soybean lecithin. Aquaculture 190: 325-342.

Guggenbuhl, P., Wache, Y. and Wilson, J.W. 2012. Effects of dietary supplementation with a protease on the apparent ileal digestibility of the weaned piglet. Journal of Animal Science 90: 152-154.

Hassaan, M.S., Soltan, M.A. and Abdel-Moez, A.M. 2015. Nutritive value of soybean meal after solid state fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Animal Feed Science and Technology 201: 89-98.

Huo, Y.W., Jina, M., Zhou, P.P., Li, M., Mai, K.S. and Zhou, Q.C. 2014. Effects of dietary protein and lipid levels on growth, feed utilization and body composition of juvenile swimming crab, *Portunus trituberculatus.* Aquaculture 434: 151-158.

Jiang, T.T., Feng, L., Liu, Y., Jiang, W.D., Jiang, J., Li, S.H., Tang, L., Kuang, S.Y. and Zhou, X.Q. 2014. Effects of exogenous xylanase supplementation in plant protein-enriched diets on growth performance, intestinal enzyme activities and microflora of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). Aquaculture Nutrition 20: 632-645.

Jiravanichpaisal, P., Miyazaki, T. and Limsuwan, C. 1994. Histopathology, biochemistry and pathogenicity of *Vibrio harveyi* infecting black tiger prawn *Penaeus monodon*. Journal of Aquatic Animal Health 6: 27-35.

Johansson, L.H. and Borg, L.A. 1988. A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissue samples. Analytical Biochemistry 174: 331-336.

Johansson, M.W., Keyser, P., Sritunyalucksana, K. and Soderhall, K. 2000. Crustacean haemocytes and haematopoiesis. Aquaculture 191: 45-52.

Karunasagar, I., Pai, R., Malathi, G.R. and Karunasagar, I. 1994. Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic-resistant *Vibrio harveyi* infection. Aquaculture 128: 203-209.

Karuppasamy, A., Mathivanan, V. and Karuppasamy, R. 2016. Effects on growth and survival of *Litopenaeus vannamei* culture special reference with temperature. Archives of Applied Science Research 8: 14-17.

Klahan, R., Areechon, N., Yoonpundh, R. and Engkagul, A. 2009. Characterization and activity of digestive enzymes in different sizes of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). Kasetsart Journal (Natural Science) 43: 143-153.

Kureshy, N. and Davis, D.A. 2002. Protein requirement for maintenance and maximum weight gain for the pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture 204: 125-143.

Lavilla-Pitogo, C.R., Baticados, M.C.L., Lruz-Lalierda, E.R. and De la Pena, L.D. 1990. Occurrence of luminous bacterial disease of *Penaeus monodon* larvae in the Philippines. Aquaculture 91: 1-13.

Lee, P.G., Smith, L.L. and Lawrence, A.L. 1984. Digestive proteases of *Penaeus vannamei* Boone: relationship between enzyme activity, size and diet. Aquaculture 42: 225-239.

Lebel, L., Mungkung, R., Gheewala, S.H. and Lebel, P. 2010. Innovation cycles, niches and sustainability in the shrimp aquaculture industry in Thailand. Environmental Science and Policy 13: 291-202.

Lin, H., Chen, Y., Niu, J., Zhou, C., Zhong, H., Du, Q. and Zhang, J. 2015. Dietary methionine requirements of pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei,* of three different sizes. The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh 67: 1163-1173.

Liu, X.L., Xi, Q.Y., Yang, L., Li, H.Y., Jiang, Q.Y., Shu, G., Wang, S.B., Gao, P., Zhu, X.T. and Zhang, Y.L. 2011. The effect of dietary *Panax ginseng* polysaccharide extract on the immune responses in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Fish and Shellfish Immunology 30: 495-500.

Liu, X.H., Ye, J.D., Wang, K., Kong, J.H., Yang, W. and Zhou, L. 2012. Partial replacement of fish meal with peanut meal in practical diets for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture Research 43: 745-755.

Li, C.C. and Chen, J.C. 2008. Effect of saponin immersion on enhancement of the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. Fish and Shellfish Immunology 24: 74-81.

Li, C.C., Yeh, S.T. and Chen, J.C. 2008a. The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* following *Vibrio alginolyticus* injection. Fish and Shellfish Immunology 25: 853-860.

Li, E., Chen, L., Zeng, C., Yu, N., Xiong, Z., Chen, X. and Qin, J.G. 2008b. Comparison of digestive and antioxidant enzymes activities, haemolymph oxyhemocyanin contents and hepatopancreas histology of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, at various salinities. Aquaculture 274: 80-86

Li, X.Q., Chai, X.Q., Liu, D.Y., Chowdhury, M.A.K. and Leng, X.J. 2015. Effects of temperature and feed processing on protease activity and dietary protease on growths of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*. Aquaculture Nutrition. 1-10.

Machado Tamayo, R.J. 2006. Assessment of genetic variability in two lots of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) introduced to Cuba. Master thesis. University of Tromsø.

Maghsoudloo, T., Marammazi, J.G., Matinfar, A., Kazemian, M. and Paghe, E. 2012. Effects of different levels of energy and protein sources on the growth performance, feeding, survival rate and the chemical body composition of juvenile pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Iranian Journal of Fisheries Sciences 11(3): 531-547.

Martin, G.G. and Graves, B.L. 1985. Fine structure and classification of shrimp hemocytes. Journal of Morphology 185: 339-348.

Marina Ezguerra, J. and Garcia-Carreno F.L. 1997. Effects of feed diets on digestive proteases from the hepatopancreas of white shrimp (*Penaeus vannamei*). Journal of Food Biochemistry 21: 401-419.

Maytorena-Verdugo, C.I., Córdova-Murueta, J.H. and García-Carreño, F.L. 2017. *Litopenaeus vannamei* digestive metallo peptidases compensate for anti-nutritional SBTI in feed. Aquaculture 473: 508-512.

Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry 31: 426-428.

Moss, S.M., Divakaran, S. and Kim, B.G. 2001. Stimulating effects of pond water on digestive enzyme activity in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone). Aquaculture Research 32: 125-131.

Motola, H.D. 2016. Population dynamics and standing biomass of indian white prawn (*Penaeus indicus*) and brown shrimp (*Metapenaeus monoceros*) along the coast of Tanzania. United Nations University Fisheries Training Programme.

Nirmal, N.P. and Benjakul, S. 2010. Effect of catechin and ferulic acid on melanosis and quality of Pacific white shrimp subjected to prior freeze-thawing during refrigerated storage. Food Control 21: 1263-1271.

Patlolla, A.K., Barnes, C., Yedjou, C., Velma, V.R. and Tchounwou. P.B. 2009. Oxidative stress, DNA damage, and antioxidant enzyme activity induced by hexavalent chromium in sprague-dawley rats. Environmental Toxicology 24: 66-73.

Peisker, M. 2001. Manufacturing of soy protein concentrate for animal nutrition. In: Brufau J. (ed.). Feed manufacturing in the Mediterranean region. Improving safety: From feed to food. Zaragoza: CIHEAM, 2001. p. 103-107 (Cahiers Options Méditerranéennes; n. 54).

Phromkunthong, W., Guedon, M. and Roques, C. 2015. Fish meal substitution with land animal proteins in Nile tilapia. Aquaculture Asia Pacific 11: 36-37.

Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S. and Deshpande, V.V. 1998. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. Microbiology and Molecular Biology Review 62: 597-635.

Rathore, R.M., Kumar, S. and Chakrabarti, R. 2005. Digestive enzyme patterns and evaluation of protease classes in *Catla catla* (Family: Cyprinidae) during early developmental stages. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B 142: 98-106.

Samocha, T.M., Davis, D.A., Saoud, I.P. and DeBault, K. 2004. Substitution of fish meal by co-extruded soybean poultry by-product meal in practical diets for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture 231: 197-203.

Saulnier, D., Haffner, P., Goarant, C., Levy, P. and Ansquer, D. 2000. Experimental infection models for shrimp vibriosis studies: a review. Aquaculture 191: 133-144.

Shang, Y.C., Leung, P. and Ling, B.H. 1998. Comparative economics of shrimp farming in Asia. Aquaculture 164: 183-200.

Shiau, S.Y. 1998. Nutrient requirements of penaeid shrimps. Aquaculture 164: 77-93.

Shi, Z., Li, X.Q., Chowdhury, M.A.K., Chen, J.N. and Leng, X.J. 2016. Effects of protease supplementation in low fish meal pelleted and extruded diets on growth, nutrient retention and digestibility of gibel carp, *Carassius auratus gibelio*. Aquaculture 460: 37-44.

Shyne Anand, P.S., Kohli, M.P.S., Kumar, S., Sundaray, J.K., Dam Roy, S., Venkateshwarlu, G., Sinha, A. and Pailan, G.H. 2014. Effect of dietary supplementation of biofloc on growth performance and digestive enzyme activities in *Penaeus monodon*. Aquaculture 418-419: 108-115.

Sievert, D., Pomeranz, Y. and Abdelrahman, A. 1990. Functional properties of soy polysaccharides and wheat bran in soft wheat products. Cereal Chemistry 67(l): 10-13.

Smith, V.J., and Söderhäll, K. 1991. A comparison of phenoloxidase activity in the blood of marine invertebrates. Development and Comparative Immunology 15: 251-262.

Söderhäll, K. and Unestam, T. 1979. Activation of serum prophenoloxidase in arthropod immunity. The specificity of cell wall glucan activation and activation by purified fungal glycoproteins of crayfish phenoloxidase. Canadian Journal of Microbiology 25: 406-414.

Soares, M., Fracalossi, D.M., Lima de Freitas, L.E., Rodrigues, M.S., Redig, J.C., Mouriño, J.L.P., Seiffert, W.Q. and Vieira, F.N. 2015. Replacement of fish meal by protein soybean concentrate in practical diets for Pacific white shrimp. Revista Brasileira de Zootecnia 44(10): 343-349.

Song, H.L., Tan, B.P., Chi1, S.Y., Liu, Y., Chowdhury, M.A.K. and Dong, X.H. 2016. The effects of a dietary protease-complex on performance, digestive and immune enzyme activity, and disease resistance of *Litopenaeus vannamei* fed high plant protein diets. Aquaculture Research. 1-11.

Sriket, C. 2014. Mini review: Proteases in fish and shellfish: Role on muscle softening and prevention. International Food Research Journal 21: 433-445.

Sritunyalucksana, K. and Söderhäll, K. 2000. The proPO and clotting system in crustaceans. Aquaculture 191: 53-69.

Suárez, J.A., Gaxiola, G., Mendoza, R., Cadavid, S., Garcia, G., Alanis, G., Suarez, A., Faillace, j. and Cuzon, G. 2009. Substitution of fish meal with plant protein sources and energy budget for white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). Aquaculture 289: 118-123.

Su, B.K. and Chen, J.C. 2008. Effect of saponin immersion on enhancement of the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. Fish and Shellfish Immunology 24: 74-81.

Tacon, A.G.J. and Metian, M. 2008. Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects. Aquaculture 285: 146-158.

Tacon, A.G.J. and Metian, M. 2015. Feed matters: satisfying the feed demand of aquaculture. Reviews in Fisheries Science and Aquaculture 23: 1-10.

Tan, B., Mai, K., Zheng, S., Zhou, Q., Liu, L. and Yu, Y. 2005. Replacement of fish meal by meat and bone meal in practical diets for the white shrimp *Litopenaeus vannamai* (Boone). Aquaculture Research 36: 439-444.

Tantikitti, C., Chookird, D. and Phongdara, A. 2016. Effects of fishmeal quality on growth performance, protein digestibility and trypsin gene expression in pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Songklanakarin Journal of Science and Technology 38: 73-82.

Taylor, H.H. and Anstiss J.M. 1999. Copper and haemocyanin dynamics in aquatic invertebrates. Marine and Freshwater Research 50: 907-931.

Thanh Huong, D.T., Isidori, N., Lucien-Brun, H. and Chowdhury, M.A.K. 2015. Dietary protease improves growth performance and size distribution of snakehead fed a low fish meal diet. Aquaculture Asia Pacific 11: 44-46.

Trasviña-Arenas, C.H., Garcia-Triana, A., Peregrino-Uriarte A.B. and Yepiz-Plascencia, G. 2013. White shrimp *Litopenaeus vannamei* catalase: Gene structure, expression and activity under hypoxia and reoxygenation. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology 164: 44-52.

Tsai, I.H., Chuang, K.L. and Chuang, J.L. 1986. Chymotrypsins in digestive tracts of crustacean decapods (shrimps). Comparative Biochemistry and Physiology 85: 235-240.

Tzuc, J.T., Escalante, D.R., Herrera, R.R., Cortes, G.G. and Arena Ortiz, M.L. 2014. Microbiota from *Litopenaeus vannamei*: digestive tract microbial community of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). SpringerPlus 3: 280-290.

Vega-Villasante, F., Fernandez, I., Preciado, R.M., Oliva, M., Tovar, D. and Nolasco, H. 1999. The activity of digestive enzymes during the molting stages of the arched swimming *Callinectes arcuatus* Ordway, 1863 (Crustacea: Decapoda: Portunidae). Bulletin of Marine Science 65: 1-9.

Xie, S.W., Liu, Y.J., Zeng, S., Niu, J. and Tian, L.X. 2016. Partial replacement of fish-meal by soy protein concentrate and soybean meal based protein blend for juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture 464: 296-302.

Xu, J., Zhou, A., Wang, Z. and Ai, D. 2010. Effects of glycinin and β-conglycinin on integrity and immune responses of mouse intestinal epithelial cells. The Journal of Animal and Plant Sciences 20: 170-174.

Xu, W.J., Pan, L.Q., Zhao, D.H. and Huang, J. 2012. Preliminary investigation into the contribution of bioflocs on protein nutrition of *Litopenaeus vannamei* fed with different dietary protein levels in zero-water exchange culture tanks. Aquaculture 350-353: 147-153.

Yang, Q., Tan, B., Dong, X., Chi, S. and Liu, H. 2015. Effect of replacing fish meal with extruded soybean meal on growth, feed utilization and apparent nutrient digestibility of Juvenile white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Journal of Ocean University of China 14: 865-872.

Yeh, S.P., Liu, C.H., Sung, T.G., Lee, P.P. and Cheng, W. 2006. Effect of saponin on hematological and immunological parameters of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. Aquaculture 261: 1432-1439.

Yu, B., Wu, S.T., Liu, C.C., Gauthier, R. and Chiou, P.W.S. 2007. Effects of enzyme inclusion in a maize-soybean diet on broiler performance. Animal Feed Science and Technology 134: 283-294.

Yun, H., Lee, J., Park, G., Jang, I.K., Katya, K., Shahkar, E. and Bai, S.C. 2015. Reevaluation of optimum dietary protein level in juvenile whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). Animal Nutrition and Feed Technology 15: 385-394.

Zhengfu, F., Chaohua, D. and Linlin, W. 2013. Optimal content and ratio of lysine to arginine in the diet of pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Chinese Journal of Oceanology and Limnology 31: 789-795.

Zuo, J., Ling, B., Long, L., Li, T., Lahaye, L., Yang, C. and Feng, D. 2015. Effect of dietary supplementation with protease on growth performance, nutrient digestibility, intestinal morphology, digestive enzymes and gene expression of weaned piglets. Animal Nutrition 1: 276-282.

ภาคผนวก

1. วิธีการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในวัตถุดิบอาหาร อาหารทดลอง มูลกุ้ง และซากกุ้งทดลอง

1.1 การวิเคราะห์ความชื้น (ตามวิธีการของ AOAC, 1990)

1.1.1 นำถ้วย (crucible) ไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที และทำให้เย็นในโถดูดความชื้น

1.1.2 ชั่งและบันทึกน้ำหนักของถ้วยโดยละเอียด

1.1.3 ชั่งตัวอย่างใส่ถ้วยประมาณ 1 กรัม โดยบันทึกน้ำหนักอย่างละเอียด

1.1.4 นำตัวอย่างเข้าตู้อบ โดยใช้อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง

1.1.5 นำตัวอย่างที่อบแล้วใส่โถดูดความชื้นทิ้งไว้ให้เย็น บันทึกน้ำหนักของตัวอย่าง

1.1.6 ทำซ้ำตามข้อ 1 ถึง 5 จนกระทั่งน้ำหนักที่ได้คงที่ โดยน้ำหนักที่หายไปคือน้ำหนักของความชื้น

คำนวณเปอร์เซ็นต์ความชื้นด้วยสมการ

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความชื้น} = \frac{(a - b)}{w} \times 100$$

เมื่อ a = น้ำหนักตัวอย่างและถ้วยก่อนอบแห้ง (กรัม)

b = น้ำหนักตัวอย่างและถ้วยหลังอบแห้ง (กรัม)

w = น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ (กรัม)

1.2 การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า (ตามวิธีการของ AOAC, 1990)

1.2.1 ชั่งตัวอย่าง 1 กรัม ใส่ในถ้วยกระเบื้องเคลือบที่บันทึกน้ำหนักที่แน่นอนแล้ว

1.2.2 นำไปเผาในเตาเผาที่อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จนเถ้าเป็นสีขาว

1.2.3 นำเข้าโถดูดความชื้น และเมื่อตัวอย่างเย็นแล้ว นำออกมาชั่งน้ำหนักโดยละเอียด

คำนวณเปอร์เซ็นต์เถ้าด้วยสมการ

$$\text{เปอร์เซ็นต์เถ้า} = \frac{(b - a)}{w} \times 100$$

เมื่อ a = น้ำหนักของถ้วยกระเบื้องเคลือบ

b = น้ำหนักของถ้วยกระเบื้องเคลือบกับน้ำหนักของเถ้าภายหลังการเผา

w = น้ำหนักตัวอย่างก่อนเผา

1.3 การวิเคราะห์หาโปรตีน (ตามวิธีการของ AOAC, 1990)

1.3.1 สารเคมี

1.3.1.1 กรดซัลฟูริก (sulfuric acid, H_2SO_4) เข้มข้น 93-98 เปอร์เซ็นต์

1.3.1.2 สารเร่งร่วม (catalyst mixture): เตรียมโดย ชั่งคอปเปอร์ซัลเฟต (cupper sulfate, $CuSO_4$) 7 กรัม กับโพแตสเซียมซัลเฟต (potassium sulfate, K_2SO_4) 100 กรัม ผสมให้เข้ากัน

1.3.1.3 โซเดียมไฮดรอกไซด์ 45 เปอร์เซ็นต์ (sodium hydroxide, NaOH): เตรียมโดยละลาย 450 กรัมของโซเดียมไฮดรอกไซด์ชนิดเกล็ดลงในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร

1.3.1.4 สารละลายกรดเกลือ (hydrochloric acid, HCl) 0.1 นอร์มอล: เตรียมโดยละลายกรดเกลือ 9 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร

1.3.1.5 กรดบอริค (boric acid, H_3BO_3) 4 เปอร์เซ็นต์: เตรียมโดย ต้มน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตรให้ร้อน แล้วใส่ผงกรดบอริคลงไป 40 กรัม ต้มจนละลายหมด ทิ้งไว้จนสารละลายเย็นลง แล้วจึงเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร

1.3.1.6 อินดิเคเตอร์รวม (mixed indicator): เตรียมโดยละลายเมทธิลเรด (metyl red) 0.2 กรัม ในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร และละลายเมทธิลีนบลู (methylene blue) 0.2 กรัมในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายเมทธิลเรด 2 ส่วน ผสมกับสารละลายเมทธิลีนบลู 1 ส่วน เขย่าให้เข้ากัน

1.3.1.7 เมทิลออเรจน์ อินดิเคเตอร์ (metyl orange indicator): เตรียมโดยละลายเมทิลออเรนจ์ 0.1 กรัม ในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

1.3.1.8.สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (sodium carbonate, Na_2CO_3) 0.1 นอร์มอล: เตรียมโดย อบโซเดียมคาร์บอเนตที่อุณหภูมิ 260-270 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ชั่งสารมา 1.325 กรัม เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 250 มิลลิลิตร

1.3.2 ขั้นตอนการย่อย (digestion)

1.3.2.1 ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักประมาณ 0.5 กรัม โดยชั่งตัวอย่างลงบนกระดาษกรองที่ปราศจากสารไนโตรเจนแล้วห่อตัวอย่างใส่ในขวดแก้ววิเคราะห์โปรตีน

1.3.2.2 เติมสารเร่งร่วม 3 กรัม เพื่อเป็นตัวช่วยเร่งปฏิกิริยาการย่อย

1.3.2.3 เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 10 มิลลิลิตร

1.3.2.4 นำไปย่อยด้วยชุดเครื่องย่อยโปรตีน ที่อุณหภูมิ 420 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จนกระทั่ง สารละลายในขวดแก้ววิเคราะห์โปรตีนเป็นสีเขียวมรกตและใส ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น

1.3.3 ขั้นตอนการกลั่น (distillation)

1.3.3.1 เมื่อสารละลายเย็นดีแล้วต่อขวดแก้ววิเคราะห์โปรตีนเข้ากับเครื่องกลั่นที่มีขวดรูปชมพู่ซึ่งบรรจุกรดบอริค 30 มิลลิลิตร (ใส่อินดิเคเตอร์รวม 2-3 หยด) โดยให้ปลายของหลอดแก้วที่ต่อจากกระบอกแก้วควบแน่นจุ่มอยู่ในกรดบอริค

1.3.3.2 ทำการเลือกโปรแกรม 1 เพื่อกลั่น โดยเครื่องกลั่นจะทำงานอัตโนมัติ ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้ เติมน้ำกลั่นลงไปในขวดแก้ววิเคราะห์ปริมาตร 20 มิลลิลิตร และเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ลงในขวดแก้ววิเคราะห์ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จะสังเกตเห็นสารละลายมีสีดำ แล้วทำการกลั่นเป็นเวลา 5 นาที จนกระทั่งไม่มีแก๊สแอมโมเนียออกมา นำขวดรูปชมพู่ออกจากเครื่องกลั่น (ก่อนใช้และหลังใช้เครื่องกลั่นควรทำการล้าง โดยเลือกโปรแกรม 2 เพื่อล้างระบบ โดยเครื่องจะทำงานอัตโนมัติ โดยใช้น้ำกลั่น และควรตรวจสอบปริมาตรของน้ำกลั่น และโซเดียมไฮดรอกไซด์ไม่ให้มีปริมาตรต่ำกว่าที่กำหนด)

1.3.4 ขั้นตอนการไตเตรท (titration)

1.3.4.1 นำไปไตเตรทด้วยกรดเกลือมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน จนถึงจุดยุติ (end point) สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินอ่อน

1.3.4.2 บันทึกปริมาตรของกรดเกลือมาตรฐานที่ใช้ เพื่อคำนวณเปอร์เซ็นต์โปรตีนต่อไป

การคำนวณ

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

เมื่อ V_1 = ปริมาตรของกรดมาตรฐานที่ใช้ไตเตรทตัวอย่าง

V_2 = ปริมาตรของกรดมาตรฐานที่ใช้ไตเตรทตัวอย่างที่ใช้ตรวจสอบ

N = เป็นความเข้มข้นของกรดเกลือเป็นนอร์มอล

W = น้ำหนักตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์

1.3.5 การตรวจหาความเข้มข้นของสารละลายกรดเกลือมาตรฐาน

ดูดสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 40 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร เติมเมทิลออเรนจ์ อินดิเคเตอร์ 2-3 หยด ทำการไตเตรทด้วยสารละลายกรดเกลือ 0.1 นอร์มอล (จากสารละลายสีเหลืองเปลี่ยนเป็นสีส้มแดง) คำนวณความเข้มข้นของสารละลายกรดเกลือโดยใช้สูตร

$$N_1V_1 = N_2V_2$$

หรือ

$$\text{นอร์มอลลิตี้ของกรดเกลือ} = \frac{\text{น้ำหนัก (กรัม) ของโซเดียมคาร์โบเนต} \times 1000}{\text{สารละลายกรดเกลือ (มิลลิลิตร)} \times 52.994}$$

N_1 = ความเข้มข้นของสารละลายที่จะปรับค่า N_2 = ความเข้มข้นของสารละลายที่ต้องการ

V_1 = ปริมาตรของสารละลายที่จะปรับค่า V_2 = ปริมาตรของสารละลายที่ต้องการ

1.4 การวิเคราะห์หาไขมัน (ใช้เครื่อง Soxtec™ CU 8000)

1.4.1 สารเคมี

1.4.1.1 ปิโตรเลียมอีเทอร์ (Petroleum ether)

1.4.2 วิธีการ

1.4.2.1 อบถ้วยสกัดไขมัน (extraction cups) ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้นเป็นเวลา 40 นาที

1.4.2.2 อบตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน แล้วทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น

1.4.2.3 ชั่งและบันทึกน้ำหนักตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ใส่ในกระดาษกรองประมาณ 1 กรัม (w) ห่อให้มิดชิด ใส่ลงในไส้กรอง (thimbles) ที่เตรียมไว้ นำไปใส่ประกอบเข้าเครื่องสกัดไขมัน Soxtec™ CU 8000

1.4.2.4 ชั่งและบันทึกน้ำหนักถ้วยสกัดไขมัน (b) นำไปใส่ประกอบเข้าเครื่องสกัดไขมัน

1.4.2.5 เติมปิโตรเลียมอีเทอร์ปริมาตร 80 มิลลิลิตรต่อตัวอย่าง

1.4.2.6 ขั้นตอนการสกัดไขมัน (extraction) ของเครื่อง Soxtec™ CU 8000 เป็นระบบอัตโนมัติใช้เวลารวมทั้งหมด 1 ชั่วโมง 10 นาที โดยประกอบด้วยขั้นตอนการ boiling หรือต้ม

ให้เดือด 20 นาที, rinsing เพื่อล้างตัวอย่าง 40 นาที และ solvent recovery เพื่อระเหยปิโตรเลียมอีเทอร์ไปเก็บใน recovery flask 10 นาที

หมายเหตุ ปิโตรเลียมอีเทอร์ที่ผ่านการสกัดไขมันแล้ว 1 ครั้ง นำมาผสมกับปิโตรเลียมอีเทอร์ใหม่ในอัตราส่วน 40 ต่อ 60 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สามารถนำมาใช้ซ้ำสำหรับการสกัดไขมันได้

1.4.2.7 นำถ้วยสกัดไขมันออกจากเครื่องสกัดไขมัน แล้วนำไปอบที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้นเป็นเวลา 40 นาที

1.4.2.8 นำถ้วยสกัดไขมันและไขมันหลังอบแห้งมาชั่งและบันทึกน้ำหนัก (a)

การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ไขมัน

$$\text{เปอร์เซ็นต์ไขมัน} = \frac{(a - b)}{w} \times 100$$

เมื่อ a = น้ำหนักถ้วยสกัดไขมันและน้ำหนักไขมันหลังอบแห้ง

b = น้ำหนักที่แน่นอนของถ้วยสกัดไขมัน

w = น้ำหนักตัวอย่าง

1.5 การวิเคราะห์โครมิกออกไซด์ (ตามวิธีการของ Furukawa และ Tsukahara, 1966)

1.5.1 สารเคมี

1.5.1.1 กรดไนตริกเข้มข้น (nitric acid, HNO_3)

1.5.1.2 กรดเปอร์คลอริคเข้มข้น (perchloric, $HClO_4$)

1.5.2 ขั้นตอนการย่อย (digestion)

1.5.2.1 ชั่งตัวอย่างปริมาณ 50-100 มิลลิกรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 50 มิลลิลิตร

1.5.2.2 เติมกรดไนตริกเข้มข้นประมาณ 5-10 มิลลิลิตร นำไปย่อยบนแผ่นให้ความร้อน (hot plate) ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส และค่อยๆปรับเพิ่มอุณหภูมิเป็น 190 องศาเซลเซียส จะเห็นควันสีน้ำตาล ซึ่งเกิดจากการทำปฏิกิริยาของกรดไนตริกกับอินทรีย์คาร์บอน ทำการย่อยจนหมดควันสีน้ำตาล หรือสารละลายใสและมีตะกอนสีเขียว ในกรณีที่หากสารละลายยังไม่ใสหรือมีสีเขียวให้เติมกรดไนตริกเพิ่มแล้วย่อยต่อ

1.5.2.3 เติมกรดเปอร์คลอริคเข้มข้นประมาณ 3-5 มิลลิลิตร จะสังเกตเห็นควันสีขาวของกรดเปอร์คลอริค การย่อยจะสิ้นสุดเมื่อสารละลายในขวดรูปชมพู่เป็นสีส้มแดง และเมื่อตั้งทิ้งไว้ให้เย็นจะมีตะกอนสีแดงอิฐและมีคราบเป็นสีแดงอิฐเกาะที่ข้างขวด

1.5.2.4 ปรับปริมาตรของสารละลายในขวดรูปชมพู่ด้วยน้ำที่ปราศจากไอออนให้ได้ปริมาตร 25 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันในขวดปรับปริมาตร และเก็บสารละลายที่ปรับปริมาตรแล้วไว้ในขวดพลาสติกขนาด 100 มิลลิลิตร

1.5.2.5 นำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 350 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับน้ำที่ปราศจากไอออน

ก. คำนวณปริมาณโครมิกออกไซด์โดยใช้สมการ

$$X = \left(\frac{1}{4}\right) \times \left(\frac{(Y - 0.0032)}{0.2089}\right)$$

เมื่อ X = ปริมาณโครมิกออกไซด์ (มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร)

Y = ค่าการดูดกลืนแสง

โดยค่า 0.0032 และ 0.2089 เป็นค่าคงที่

ข. คำนวณปริมาณโครมิกออกไซด์ในตัวอย่าง

$$\text{ปริมาณโครมิกออกไซด์ในตัวอย่าง} = \frac{\text{ปริมาณโครมิกออกไซด์จากสมาการในข้อ ก.}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์ (มิลลิกรัม)}} \times 100$$

1.6 การวิเคราะห์พลังงาน (บอมบ์คาลอรีมิเตอร์; Bomb Calorimeter)

1.6.1 ชั่งตัวอย่างที่อัดเม็ดเตรียมไว้ โดยใส่ตัวอย่างในถ้วยโลหะ หักน้ำหนักของถ้วยออกก่อน

1.6.2 นำถ้วยใส่ตัวอย่างวางในช่องใส่ถ้วย จากนั้นจึงต่อลวด Firing-wire ความยาว 6 ซม. เข้ากับขั้วไฟฟ้า แล้วจึงต่อด้ายความยาว 12 ซม. เข้ากับลวดโดยนำปลายด้ายด้านหนึ่งวางในถ้วยใส่ตัวอย่าง หลังจากนั้นจึงนำเม็ดตัวอย่างมาวางทับ

1.6.3 เติมน้ำใส่ใน bomb 1 มิลลิลิตร แล้วปิดฝาโดยวิธีขันเกลียว (ห้ามใช้ประแจเพราะประเกนกันรั่วจะฉีกขาด)

1.6.4 เติมออกซิเจนเข้า bomb ช้าๆ จนกระทั่งความดันถึง 20 บาร์

1.6.5 เติมน้ำในถังประมาณ 2 ลิตร ยกตั้งในเครื่อง แล้วยกลูก bomb ใส่ในถังน้ำ ให้สังเกตดูว่ามีฟองอากาศผุดออกมาหรือไม่ (ถ้ามีแสดงว่าออกซิเจนรั่วต้องแก้ไข) ถ้าปกติก็ปิดฝาชุดทดลอง

1.6.6 ตรวจสอบวงจรไฟฟ้าโดยกดปุ่ม test switch ถ้าปกติ หลอดไฟจะสว่าง

1.6.7 ปรับตั้ง Thermometer bridge เพื่อปรับอุณหภูมิของน้ำรอบ bomb กับน้ำหล่อเย็นให้มีค่าเท่ากันโดยหมุนปุ่ม balance ไปตามเข็มจะอุ่นเร็ว หมุนทวนเข็มจะอุ่นช้า

1.6.8 บันทึกอุณหภูมิที่อ่านจาก Thermometer reader/vibrator ให้ละเอียด 0.001 องศาเซลเซียส

1.6.9 เมื่ออุณหภูมิของน้ำหล่อเย็นกับถังแช่ bomb เท่ากันแล้ว เครื่องพร้อมจะทำงานให้กด fire switch เพื่อสันดาปอยู่นานประมาณ 3 วินาที พร้อมทั้งอ่านอุณหภูมิขณะนั้นด้วย

1.6.10 กดปุ่ม test switch เพื่อทดสอบความปกติของการหลอมละลายของลวดจุดสันดาป โดยถ้าปกติหลอดไฟจะดับ และระบบควบคุมอัตโนมัติจะทำการปรับอุณหภูมิของน้ำหล่อเย็นให้สมดุลกับน้ำรอบ bomb เพื่อให้เป็น adiabatic process

1.6.11 หลังจากจุดระเบิดแล้ว 5 นาที อ่านอุณหภูมิให้ละเอียด 0.001 $^{\circ}$C พร้อมทั้งบันทึกค่า ยกฝาเครื่องขึ้น นำ bomb ขึ้นมาตรวจภายในห้องไหม้ และวัดความยาวของลวดที่เหลือสังเกตผลการสันดาป ซึ่งอาจเกิดได้ 2 กรณี คือ

ก. ภายใน bomb มีแต่หยดน้ำเหลืออยู่แสดงว่าการทดลองเป็นการสันดาปอย่างสมบูรณ์ การทดลองสำเร็จผล

ข. ภายใน bomb มีเขม่าดำ หรือเห็นเศษตัวอย่างค้างอยู่ แสดงว่าการสันดาปไม่สมบูรณ์ การทดลองล้มเหลว ต้องทำซ้ำอีกรอบตามวิธีการเดิม

การคำนวณผลการทดลอง

$$\text{ค่าพลังงานความร้อน} = \frac{(\text{Heat capacity} \times \text{อุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นของตัวอย่าง})\text{-พลังงานด้าย-พลังงานลวด}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}}$$

$$\text{Heat capacity} = \frac{(26441.6 \times \text{น้ำหนัก Benzoic}) + 58.58 + 12.55 \text{ หน่วย Joules/ } ^{\circ}\text{C}}{\text{อุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น}}$$

ค่าพลังงานด้ายต่อความยาว 12 ซม. = 58.58 Joules/$^{\circ}$C

ค่าพลังงานลวดต่อความยาว 6 ซม. = 12.55 Joules/$^{\circ}$C

หมายเหตุ 1 Cal = 4.184 Joules

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นายพัธพงค์ แซ่ตู

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5710620014

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีการประมง)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2555

ทุนการศึกษา

1. ทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ ปีงบประมาณ 2560 มหาวิทยาลัยสงขลา-นครินทร์

2. ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยส่วนหนึ่งจากสถานวิจัยความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรและทรัพยากรธรรมชาติ ระยะที่ 2