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

รายงานการวิจัย

เรื่อง

ศึกษาชนิดของเอนไซม์ในกระเพาะอาหารกุ้งกุลาดำ

โดย

อัมพร ทองกู้เกียรติกูล

26 มี.ค. 2552 QK911167
249179
ริมบริการ
26 มี.ค. 2552

ภาควิชาชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

พ.ศ. 2540

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ I

Abstract II

บทนำ 1

วิธีการศึกษา 6

ผลการทดลอง 14

วิจารณ์ผลการทดลอง 18

สรุปผลการทดลอง 21

ข้อเสนอแนะ 22

เอกสารอ้างอิง 23

บทคัดย่อ

ผลจากการทดลองในกุ้งกุลาดำพบว่า กุ้งกุลาดำพี 5 มีการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส และอะมัยเลสต่ำที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วการทำงานเพิ่มขึ้นตามอายุและสูงสุดเมื่อมีอายุประมาณสองเดือน. ส่วนเอนไซม์โปรติเอสทำงานได้ดีในกุ้งวัยอ่อนเมื่อโตขึ้นการทำงานลดลง การทำงานทั้งเอนไซม์เซลลูเลส, อะมัยเลส และโปรติเอส ในภาวะความเป็นกรด-ด่างต่างกันพบว่า ค่าพีเอชในช่วงประมาณ 6 เหมาะสมที่สุดภายใต้สภาวะที่ทดลอง.

Abstract

Results on enzymic activity of post - lavae (P_5) of *Penaeus monodon* showed that cellulase and amylase activity were low at 37 °c. The activity revealed the peak when the shrimp was about two months. The activity of protease was high in juvenile shrimp and was low in matured organism. The activity of cellulase, amylase and protease at different pH levels was investigated and the result showed that pH 6 was optimal.

บทนำ

กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* Fabricius) เป็นสัตว์น้ำที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย นิยมเลี้ยงกันมากในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้แพร่พันธ์ทั่วไปตามธรรมชาติโดยที่ในอ่าวไทยแหล่งวางไข่บริเวณชายฝั่งตะวันออกของอ่าวไทยตั้งแต่ระยองถึงตราดรวมทั้งนอกฝั่งชุมพรและประจวบคีรีขันธ์ (บรรจง, 2529) กุ้งชนิดนี้ตัวเมียจะวางไข่ในทะเลที่มีน้ำลึกตั้งแต่ 10 เมตรขึ้นไปตั้งแต่ฟักออกเป็นตัวจนกระทั้งโตเป็นกุ้งวัยรุ่นประมาณ 2 สัปดาห์ ใช้ชีวิตในสภาพแพลงค์ตอนจนกระทั้งเข้าใกล้ฝั่ง เมื่อเป็นวัยอ่อนขั้นสุดท้ายจะปรับตัวเปลี่ยนการอยู่อาศัยบริเวณปากแม่น้ำ ป่าชายเลนและบริเวณใกล้ฝั่ง

กุ้งกุลาดำตามอนุกรมวิชานจัดเป็น

Phylum Arthropoda
Class Crustacea
Subclass Malacostraca
Series Eumalacostraca
Superorder Eucarida
Order Decapoda
Suborder Natantia
Section Penaeica
Family Penaeidae
Genus Penaeus
Species Penaeus monodon Fabricius

กุ้งกุลาดำเป็นกุ้งที่สามารถอาศัยอยู่ได้ในระดับความเค็มที่กว้าง (Uryhaline) คืออยู่ในน้ำที่มีความเค็มตั้งแต่ 3-45 ppt. ได้ แต่ในช่วงความเค็มที่เหมาะสมคือ 23-30 ppt. ถ้าสูงเกินกว่า 45 หรือต่ำกว่า 10 ppt. ลูกกุ้งจะตาย (**นพดล, 2531**)

ชีวะประวัติของกุ้งกุลาดำแบ่งออกได้เป็น 6 ช่วง คือ

เอมบริโอ (Embryo)
ลูกกุ้งวัยอ่อน (Larvae)
ลูกกุ้งวัยเล็ก (Juvenile)

กุ้งเล็ก (Adolesence)
กุ้งวัยรุ่น (Subadult)
กุ้งตัวเต็มวัย (Adult)

กุ้งตัวเต็มวัยจะอาศัยในเขตบริเวณน้ำที่ค่อนข้างลึก และเมื่อผสมพันธุ์และวางไข่แล้ว กุ้งวัยอ่อนจะอพยพเข้าสู่ชายฝั่ง ซึ่งจะโตเป็นกุ้งวัยเล็กและกุ้งวัยรุ่น จะอาศัยอยู่ในบริเวณน้ำกร่อย หรือเขตป่าชายเลนต่อไป และหลังจากเจริญเติบโตขึ้นบ้างแล้วจึงจะย้ายกลับลงสู่ทะเลลึกเมื่อ กุ้งกุลาดำที่มีอายุประมาณ 1 ปี จะออกไปวางไข่ในทะเลลึก (ประมาณ 15-40 เมตร) ซึ่งมีความเค็มค่อนข้างสูง หลังจากไข่ได้รับการผสมพันธุ์แล้วก็จะเริ่มแบ่งตัวและวิวัฒนาการไปเรื่อยๆจนฟักออกเป็นตัว ใช้เวลา 12-20 ชั่วโมง จึงจะเข้าเป็นตัวอ่อนระยะที่ 1 และเจริญต่อไปเป็นกุ้งระยะต่างๆจนเป็นกุ้งตัวเต็มวัย **(นพดล, 2531)**

กุ้งกุลาดำมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นระยะ รวม 4 ระยะ คือ **นอเพลียส** (Nauplius), **ซูเอีย** (Zuea), **ไมซีส** (Mysis), และ**กุ้งพี** (Post Larvae) (**ประจวบ, 2527**) การเจริญเติบโตหรือการเปลี่ยนแปลงเข้าสู่ระยะใหม่ของกุ้งแต่ละครั้ง จะเป็นในลักษณะของการลอกคราบ ในระยะนอเพลียส กุ้งจะใช้เวลาลอกคราบ 6 ครั้ง จึงจะเข้าสู่ระยะซูเอีย ระยะนี้จะมีการลอกคราบ 3 ครั้ง แล้วเข้าสู่ระยะไมซีส ลอกคราบ 3 ครั้งจึงจะเข้าสู่ระยะพี (**บรรจง, 2529**)

โดยทั่วไปจะเรียกกุ้งระยะหลังตัวอ่อนและกุ้งวัยเล็ก ซึ่งมีพฤติกรรมและรูปร่างคล้ายพ่อ - แม่พันธุ์ แต่อวัยวะสืบพันธุ์ยังไม่เจริญเต็มที่นี้ว่า **กุ้งโพสลาว่าหรือกุ้งพี** ลูกกุ้งที่เข้าสู่ระยะพีวันแรก เรียกว่า พี-1 หลังจากนั้นจะมีการลอกคราบ และพัฒนาไปสู่ระยะกุ้งวัยรุ่นโดยกุ้งพี-1 ซึ่งลอกคราบแล้วจะเรียกว่า พี-2 ไปเรื่อยๆ กุ้งระยะพี-15 จะมีอายุประมาณ 24 วัน หลังจากออกจากไข่

<u>เอนไซม์</u>

เอนไซม์ เป็นกลุ่มโปรตีนที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยในการทำงานต้องมี Cofactor ซึ่งมักเป็นโลหะถ้าเป็นสารอินทรีย์เรียก Coenzyme เอนไซม์สามารถเร่งปฏิกิริยาเคมีในสิ่งมีชีวิตได้อย่างมีประสิทธิ์ภาพ โดยทั่วไปแล้วเอนไซม์สามารถทำงานได้ภายใต้ภาวะที่ไม่รุนแรงซึ่งเกิดขึ้นภายในเซลล์เอนไซม์มีความจำเพาะ ไม่ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์อื่น รวมทั้งเอนไซม์เพิ่มอัตราเร็วปฏิกิริยาโดยเอนไซม์เป็นตัวกระตุ้นทำให้พลังงานกระตุ้นของปฏิกิริยาลดลง

เอนไซม์ เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวเคมีสามารถเร่งอัตราการเกิดปฏิกิริยา เอนไซม์ทำให้พลังงานกระตุ้นลดน้อยลง จึงทำให้เกิดปฏิกิริยาได้เร็วขึ้น พบว่าปฏิกิริยาภายในสิ่งมีชีวิตเกือบทุก

ปฏิกิริยาจำเป็นต้องมีเอนไซม์เป็นตัวเร่ง มิฉะนั้นจะไม่เกิดขบวนการเมตาบอลิซึมภายในสิ่งมีชีวิต จึงเป็นเรื่องที่มีความสำคัญยิ่ง (**พิชาญและคณะ, 2529**) **เอนไซม์ในกุ้งที่สนใจศึกษา** ได้แก่.

เอนไซม์ย่อยคาร์โบไฮเดรส

จัดเป็นเอนไซม์ที่ได้รับความสนใจศึกษาอย่างแพร่หลาย เนื่องจากกุ้งแต่ละชนิดมีความสามารถในการย่อยคาร์โบไฮเดรสต่างกันมาก α-amylase เป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการย่อยคาร์โบไฮเดรสให้เป็นกลูโคสและมัลโตส

เอนไซม์ย่อยคาร์โบไฮเดรสที่พบในกระเพาะอาหาร และลำไส้ นอกเหนือจาก α-amylase ก็ยังมี กลูโคซิเดส มัลเดสซูเครส แลคเตส และเซลลูเลส ซึ่งก็มีหน้าที่ย่อยที่มีความสลับซับซ้อนแตกต่างกันไปเช่น

Hydrolase (ไฮโดรเลส) (วิบูลย์, 2526) เป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการตัดพันธะ ระหว่างคาร์บอนกับอะตอมของสารอื่น โดยใช้น้ำชื่อทั่วๆไปของเอนไซม์ในกลุ่มนี้ได้แก่ esteras, peptidase, amylase, phosphatase, urease, pepsin, trypsin และ chymotrypsin

Amylase (อะมัยเลส) แบ่งออกเป็นชนิดต่างๆ 5 ชนิด ซึ่งสามารถไฮดดรไลซ์พันธะต่างๆของแป้งได้ ดังนี้

1. **α-amylase**
2. **β-amylase**
3. **glucoamylases (gramma-amylase)**
4. **pullulanases**
5. **isoamylases**

อะมัยเลสเป็นไฮโดรไลติคเอนไซม์เร่งปฏิกิริยาการสลายพันธะ α-1, 4 -glycoside ของโมเลกุลแป้ง และไกลโคเจนให้เป็นน้ำตาลมอลโตส พบได้ในน้ำย่อยจาก ตับอ่อนน้ำลาย และตับ

อะมัยเลสเป็นกลุ่มของไฮโดรเลส (hydrplase) ที่ย่อยพวกคาร์โบไฮเดรส เช่น แป้งและไกลโคเจน (**พิชาญ และคณะ, 2529**)

เป็นที่ทราบกันว่า **amylase activity** มีแพร่กระจายทั่วไปในทุกๆเนื้อเยื่อ และพบได้ในอวัยวะที่ไม่เกี่ยวข้องกับระบบย่อยอาหารด้วย เช่น อวัยวะสืบพันธุ์ และกล้ามเนื้อ เป็นต้น

นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า pH มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ด้วย เอนไซม์อะมัยเลสในกุ้งมังกร ทำงานได้ดีที่ระดับ pH = 3 - 8 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

เอนไซม์ อะมัยเลสจะมีความหลากหลายมากในการพัฒนาของตัวอ่อนของกุ้ง Penaeus japonicus เป็นเอนไซม์ย่อยเซลลูโลส

เอนไซม์เซลลูเลสที่พบโดยทั่วไปเป็นเอนไซม์ผสมประกอบด้วยเอนไซม์หลายชนิด โดยเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับระบบย่อยอาหารของกุ้งกุลาดำ จะหลั่งออกมาจากแหล่งใหญ่ๆได้แก่ กระเพาะอาหาร ตับอ่อน น้ำลาย เป็นต้น เอนไซม์ที่หลั่งออกมาเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยภายนอกเซลล์ ซึ่งมีหลายชนิดได้แก่ **amylase, cellulase, lipase, alginase, chtobiase** โดยอะมัยเลสในสัตว์ส่วนใหญ่เป็น **α-amylase (พิชาญ และคณะ, 2529)**

yokoe and yasumasu, (1964) รายงานว่า ระดับ pH ที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส ในกุ้งตระกูล Penaeus ประมาณ 6.4 และมักพบบริเวณเนื้อเยื่อทั่วไปและที่ hepatopancreas

เอนไซม์โปรติเอส (Protease) หรือ Proteolytic enzyme เป็นอนุพันธ์โปรตีนที่เกิดขึ้นเมื่อโปรตีนถูกไฮโดรไลซ์ โปรตีนชนิดนี้ละลายได้ในน้ำไม่ตกตะกอนเมื่อได้รับความร้อน แต่จะตกตะกอนในสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว โปรติเอสเป็นกลุ่มเอนไซม์ที่ช่วยเร่งปฏิกิริยาการตัด peptide bond ของโปรตีนและเปปไทด์ต่างๆ ซึ่งเราจำเป็นต้องทราบความแตกต่างระหว่างเอนไซม์ proteinase (endopeptidase) กับ peptidase (exopeptidase) ให้ดี เพราะต่างก็เป็นเอนไซม์ที่อยู่ในกลุ่มโปรติเอสด้วยกันแต่ทำหน้าที่ต่างกันเท่านั้น

peptidase (exopeptidase) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาที่เกี่ยวกับการตัดพันธะเปปไทด์ซึ่งอยู่ติดกับ free amino group หรือ free carboxyl group เอนไซม์ที่สำคัญในพวก peptidase ได้แก่

- **Carboxypeptidases** เป็นเอนไซม์ที่ทำปฏิกิริยากับ substate ทางส่วนที่มี free carboxyl group โดยมันช่วยตัดบอนด์ที่อยู่ติดกับกรุ๊ปดังกล่าวให้กรดอะมิโนออกมาเป็นอิสระ เช่น

carboxypeptidase ที่ได้จากตับอ่อน ไต และม้ามของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

- **Aminopeptidases** เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่เกิดกับเปปไทด์บอนด์ที่อยู่ใกล้กับ essential free amino group ของ simple peptidase เช่น aminotripeptidase ที่พบในเยื่อของสัตว์ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการตัด tripeptide เช่น L - alanyl glycyl glycine ให้กลายเป็น L - alanine กับ glycyl glycine

- **Dipeptidases** เป็นเอนไซม์ที่ช่วยเร่งในปฏิกิริยาการตัด dipeptide เช่น glycylycine dipeptidase สำหรับเอนไซม์ชนิดนี้จะเกิดปฏิกิริยาดี ต้องมี Co กับ Mn ร่วมอยู่ด้วย

- **Proteinase (endopeptidase)** ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการตัด peptide bond ที่อยู่ตรงกลางๆโมเลกุลโปรตีน เอนไซม์พวกนี้สามารถประกอบกิจกรรมการตัด peptide bond ให้กลายเป็น simple peptide และ dervative ต่างๆ ได้เช่น เอนไซม์ pepsin, trypsin, และchymotrypsin ในสัตว์เป็นต้น

ในกุ้งกุลาดำ เอนไซม์ protease จะถูกหลั่งสู่กระเพาะอาหารเพื่อสลายโมเลกุลของโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ให้เป็นกรดอะมิโนที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก เช่น phenylalanine, tyrosine หรือ tryptophan เพื่อที่กุ้งสามารถดูดซึมกรดอะมิโนเหล่านี้ไปใช้ประโยชน์ภายในร่างกายได้ดังนั้น เอนไซม์ protease จึงเป็นเอนไซม์ที่ช่วยให้ระบบการย่อยโปรตีนมีประสิทธิภาพที่ดี ร่างกายสามารถดูดซึมผลผลิตที่ได้จากการย่อยไปใช้ได้เลย.

วิธีการศึกษา

เอนไซม์เซลลูเลส และอะมัยเลส

อุปกรณ์

1. เครื่อง Spectrophotometer
2. ปิเปต ขนาดต่างๆ
3. เครื่อง Centrifuge
4. บีกเกอร์ ขนาดต่างๆ
5. กุ้งกุลาดำระยะต่างๆ
6. เครื่องวัดค่า pH
7. เครื่องชั่ง
8. อ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิได้ (Water bath)
9. เทอร์โมมิเตอร์
10. ตู้เย็น
11. ครก บดยา
12. หลอดทดลองขนาดต่างๆ

สารเคมี

1. 1% Sodium carboxymethyl cellulose
2. 0.2% น้ำแป้งข้าวโพด
3. 0.1 M. acetate buffer pH 3.5 4.0 4.5 5.0 5.5 6.0 6.5 7.0 7.5
4. 10% Copper sulphate. $5H_2O$
5. Anhydrous sodium carbonate
6. Sodiumbicarbonate
7. Rochelle salt
8. Anhydrous sodium sulphate

9. Ammonium molybdate

10. 96% of sulfuric acid

11. $Na_2 HASO_4 . 7 H_2 O$

12. น้ำกลั่นที่ต้มไล่ CO ออกแล้วทิ้งไว้ให้เย็น

13. Enzyme solution ของกุ้งขนาดต่างๆ

การเตรียมสาร reagent

1. Copper reagent หรือ Somogyi 's reagent แบ่งการเตรียมออกเป็น 2 ขั้น ดังต่อไปนี้

Solution 1 : - ละลาย $Na_2 Co_3$ จำนวน 24 กรัมและ Rochelle salt จำนวน 12 กรัมเข้าด้วยกันในน้ำกลั่น 250 ml.

- เติมสารละลาย 10% $Cuso_4$ จำนวน 40 ml.
- คนให้ทั่วแล้วเติม $NaHCO_3$ จำนวน 16 กรัม

Solution 2 : - ละลาย $Na_2 SO_4$ จำนวน 18 กรัมในน้ำร้อน 500 cc.

- เมื่อเย็นลงเอาไปรวมกับ Solution 1 แล้วทำให้เป็น 1000 ml. โดยน้ำกลั่น เก็บในขวดทึบแสง ถ้าตก่ตะกอนให้กรองออกได้ เก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ 1 อาทิตย์จึงจะนำมาใช้งานได้

2. Arsenomolybdate reagent หรือ Nelson's reagent

- ละลาย Ammonium molybdate จำนวน 25 กรัม และ 96 % H SO จำนวน 21 ml. ในน้ำกลั่น 450 ml.
- ละลาย $Na_2HASO_4 .7H_2O$ จำนวน 3 กรัมในน้ำกลั่น 25 ml.
- แล้วเติมสารละลายทั้งสองเข้าด้วยกัน
- เก็บไว้ในขวดสีชา ที่ 37 องศาเซลเซียส

3. Cellulase reaction mixture : ประกอบด้วย

- 1.0 ml. of 1% sodium CMC

- 2.0 ml. of 0.1 M. acetate buffer pH 4.5
- 1.0 ml. of enzyme solution

4. Amylase reaction mixture : ประกอบด้วย

- 1.0 ml. of 0.2% น้ำแป้งข้าวโพด
- 2.0 ml. of 0.1 M. acetate buffer pH 6.0 (พิชาญ และคณะ
- 1.0 ml. of enzyme solution

การเตรียม Enzyme solution

1. กุ้งขนาดเล็ก
   1.1 นำกุ้งที่ยังมีชีวิตหรือยังมีความสดอยู่ มาพอประมาณ 1 กำมือ ใส่ในครก บดยา
   1.2 บดในครก บดยาที่อยู่ในถาดน้ำแข็งแล้วใช้น้ำกลั่นฉีดทำให้เจือจาง จากนั้นนำมาเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 7,000 - 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที
   1.3 ดูดเอา enzyme solution ที่อยู่ด้านบนมาใช้ หรือแช่เก็บไว้ในตู้เย็นไม่เกิน 24 ชั่วโมง
2. กุ้งขนาดใหญ่
   2.1 นำกุ้งมาวัดขนาด ชั่งน้ำหนักและจดบันทึกอย่างละเอียด
   2.2 ผ่าเอาส่วนของ ทางเดินอาหาร, และเครื่องใน ที่อยู่ใต้ carapace ซึ่งได้แก่ กระเพาะอาหาร ตับอ่อน ถุงน้ำดี เป็นต้น
   2.3 ทำเช่นเดียวกับข้อ 1.2 และ 1.3

กุ้งกุลาดำที่ใช้ในการทดลอง

1. กุ้งขนาด พี 5
2. กุ้งขนาด พี 10
3. กุ้งขนาด พี 15
4. กุ้งขนาด พี 20
5. กุ้งลงบ่อดินอายุ 2 เดือน

6. กุ้งลงบ่อดินอายุ 2 เดือนครึ่ง

กุ้งทั้งหมดนำมาพักเพื่อปรับตัวอย่างน้อย 15 ชั่วโมง ก่อนนำมาทำการทดลอง โดยเลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียสำหรับกุ้งขนาดเล็ก และอาหารเม็ดเล็กสำหรับกุ้งขนาดใหญ่ที่ใช้กันตามบ่อเลี้ยงกุ้งโดยทั่วไป

วิธีการทดลอง

1. การหาปริมาณเอนไซม์เซลลูเลส และอะมัยเลสในกุ้งกุลาดำ พี 5 10 15 และอายุ 2 เดือน

1.1 เติม Reactionmixture ของกุ้งกุลาดำ พี 5 ปริมาตร 4 ml. ลงในหลอดทดลองแล้วเติม Copper reagent ปริมาตร 2 ml.

1.2 Incubate เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง ที่ 37 °C

1.3 จากนั้นนำมาต้มให้เดือด 10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น จะได้ตะกอนสีส้มของ Copper oxide

1.4 เติม Arsenomolybdate reagent 2 ml. ผสมให้เข้ากันตะกอนสีส้มของ Copper oxide จะละลายหมดทิ้งไว้ให้เย็นสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินเข้มถ้าเข้มมากก็สามารถทำการเจือจางได้ ในการทดลองนี้ทำการเจือจาง โดยใช้สารละลาย 1 ml. ละลายในน้ำกลั่น 10 ml. เพื่อความสะดวกรวดเร็ว

1.5 ตั้งทิ้งไว้ 15 - 40 นาที

1.6 วัดค่า O.D. ที่ 500 nm. โดยเครื่อง Spectrophtometer บันทึกผลการทดลอง

1.7 ทำการทดลองซ้ำตั้งแต่ข้อ 1.1 - 1.6 โดยเปลี่ยน Reaction mixture ของกุ้งกุลาดำเป็น พี 10 15 และอายุ 2 เดือน ตามลำดับ

2. เปรียบเทียบการทำงานของเอนไซม์ทั้งสองชนิดในกุ้งกุลาดำที่มีขนาดแตกต่างกันในรุ่นอายุ 2 เดือนครึ่ง

2.1 นำกุ้งกุลาดำอายุ 2 เดือนครึ่ง ที่มีขนาดแตกต่างกันมาวัดขนาด และชั่งน้ำหนักทำการจดบันทึก

2.2 คัดขนาดกุ้งโดยแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ให้ขนาดที่ใกล้เคียงกันอยู่กลุ่มเดียวกัน

2.3 นำกุ้งแต่ละกลุ่มไปสกัดได้ Enzyme solution 3 ชุด

2.4 ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1.1 - 1.6 แต่เปลี่ยนเป็น Reaction mixture ของกุ้งกุลาดำอายุ 2 เดือนครึ่ง ทั้ง 3 ชุดที่เตรียมไว้

3. การหาระดับ pH ที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส และอะมัยเลส ในกุ้งกุลาดำขนาด พี 15

3.1 ผสม enztmeso lution และ 1% sodium CMC อย่างละ 1.0 ml. เข้าด้วยกัน ในหลอดทดลอง 9 หลอด

3.2 เติม acetate buffer pH 3.5 4.0 4.5 5.0 5.5 6.0 6.5 7.0 7.5 ลงในแต่ละหลอดตามลำดับ

3.3 เติม Copper reagent 2.0 ml. ทุกๆหลอด

3.4 ทำเช่นเดียวกับข้อ 1.3 - 1.6 แต่ทำทั้งหมด 3 ซ้ำ

3.5 ทำเช่นเดียวกับข้อ 2.1 - 2.4 แต่เปลี่ยนจาก 1% Sodium CMC เป็น 0.2% น้ำแป้งข้าวโพด

การคำนวณผลการทดลอง

การทำงานของเอนไซม์ (enzyme activity) สามารถคำนวณได้จากสูตร

$$\textbf{Enzyme activity} = \frac{\text{O.D. Sample}}{\text{P}}$$

มีหน่วยเป็น Absorbance/mg. Protein

เมื่อ O.D. = Optical density ของตัวอย่าง

P = ปริมาณของโปรตีน (มีหน่วยเป็นมิลลิกรัม) ได้จากการทดลองร่วมของศิวพล (2536)

เอนไซม์โปรติเอส

อุปกรณ์

1. กุ้งกุลาดำขนาด พี 5, 10, 15, 20, อายุ 2 เดือน, อายุ 2 เดือนครึ่ง
2. เครื่องแก้วที่ใช้ในการทดลอง เช่น หลอดทดลอง ปิเปต ขวดลูกชมพู่
3. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง

วิธีการเตรียมรีเอเจนต์

การหาปริมาณโปรตีน

1. Alkaline Na_2Co_3 ละลาย Na_2Co_3 2 กรัม ใน 0.1 โมล NaOH จำนวน 100 มิลลิลิตร
2. NaOH 0.1 N ละลาย Na OH 4 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร
3. 1% $NaKC_4H_4O_6$ 1 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร
4. Copper sulfate - sodium potassium tartrte ละลาย $CuSo_4$ 500 มิลลิกรัมใน 1% $NaKC_4H_4O_6$ 100 มิลลิลิตร
5. Alkaline solution นำสารละลายจากข้อ 1 จำนวน 50 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายข้อ 4 จำนวน 1 มิลลิลิตร
6. 1:1 Folin - Ciocatea reagent ผสม Folin - Ciocatea reagent 10 มิลลิลิตร กับน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร

การหาการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส

1. Sodium acetate buffer ชั่ง Sodium acetate จำนวน 6.8 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร แล้วปรับ pH ให้ได้ตามต้องการด้วย acetic acid

2. 1% Casein ละลาย Casein จำนวน 3 กรัม ในสารละลาย 0.5 N NaOH จำนวน 200 มิลลิลิตร

3. 0.6 N TCA ชั่ง TCA 49 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร

4. 0.5 N NaOH ชั่ง NaOH 20 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

5. 1:3 Folin reagent ผสม Folin reagent 10 มิลลิลิตร กับน้ำกลั่น 30 มิลลิลิตร

วิธีการทดลอง

- กุ้งขนาด พี 5 10 15 นำตัวกุ้งมาบดให้ละเอียดในสารละลาย buffer pH 6 ของ Sodium acetate จำนวน 10 มิลลิลิตร

- กุ้งขนาด 2 เดือน และ 2 เดือนครึ่ง จะนำส่วนกระเพาะอาหารของกุ้งมาบดให้ละเอียดในสารละลาย buffer pH 6 ของ Sodium acetate จำนวน 10 มิลลิลิตร

การหาปริมาณโปรตีน

1. นำ enzyme solution ใสในหลอดทดลอง 0.5 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นอีก 0.5 มิลลิลิตร

2. เติม aikaline solution ลงไป 5 มิลลิลิตร

3. 1:1 Folin - ciocaltea reagent ลงไป 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร

การหาปริมาณเอนไซม์โปรติเอส

1. นำ enzyme solution ใส่ในหลอดทดลองขนาด 1 มิลลิลิตร แล้วเติม 1 เปอร์เซ็นต์ casein อีก 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 36 - 39 องศาเซลเซียส

2. นำสารละลายที่อุ่นแล้วมาเติม 0.6 N TCA ลงไป 2 มิลลิลิตร แล้วนำไป centrifuge muj 7,000 รอบเป็นเวลา 5 นาที

3. ดูดสารละลายใสที่ได้จากข้อ 2 มา 1 มิลลิลิตร ลงในขวดลูกชมพู่แล้วเติมน้ำกลั่น 4 มิลลิลิตร เติม 0.5 N NaOH 10 มิลลิลิตร และ 1:3 Folin ciocaltea reagent 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันนำสารละลายที่ใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร

<u>การเตรียมกราฟมาตรฐาน</u>

1. นำ 1 เปอร์เซ็นต์ casein จำนวน 0 0.05 0.15 0.3 0.4 0.6 และ 1.0 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง

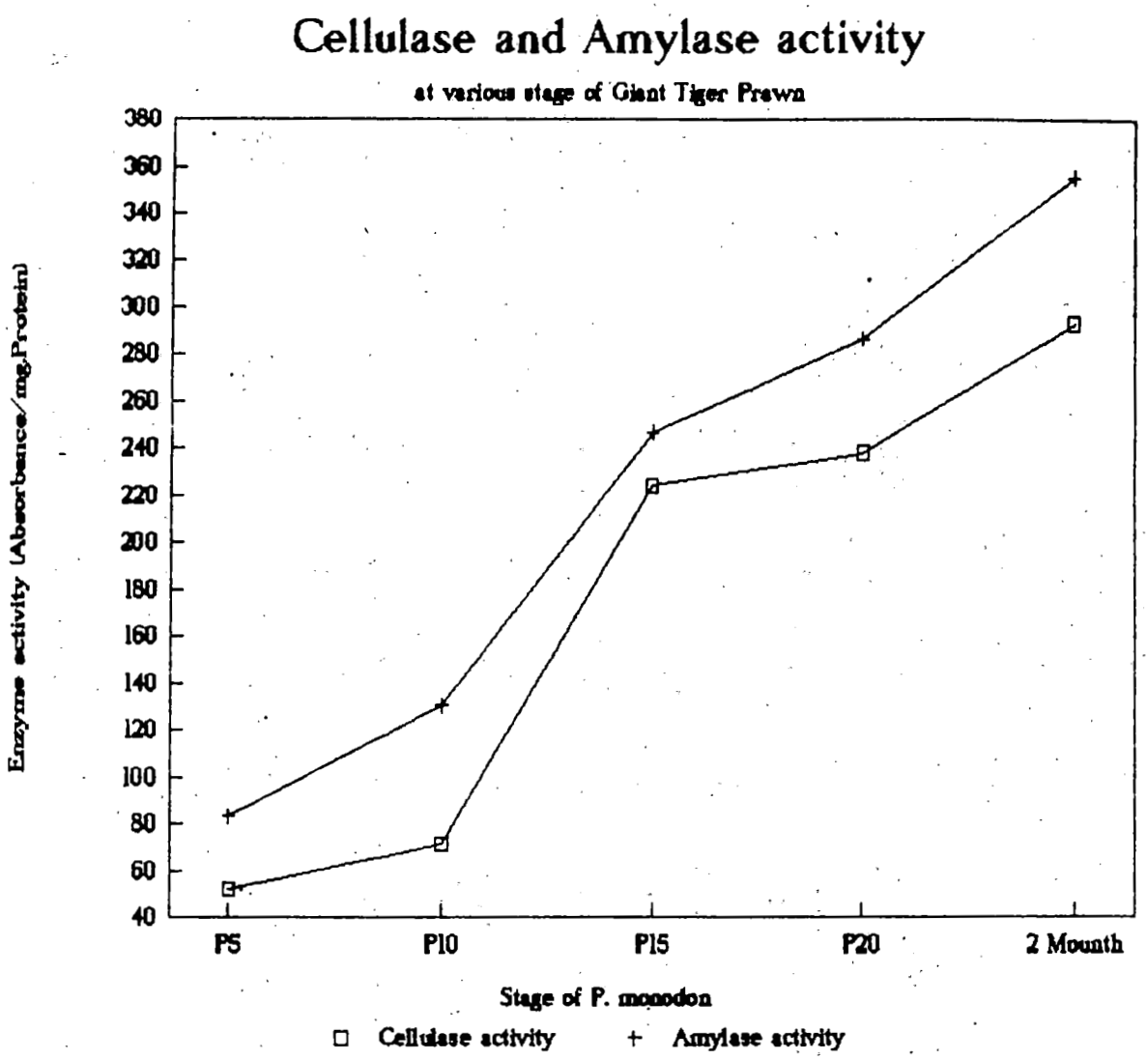
2. เติมน้ำกลั่นลงในหลอดทดลอง เพื่อปรับปริมาตรสารละลายให้เป็น 1 มิลลิลิตรทุกหลอด

3. เติม Alkaline solution ลงไปหลอดละ 5 มิลลิลิตรแล้วเติม 1:1 Folin ciocaltea ลงไปหลอดละ 0.5 มิลลิลิตร

4. นำสารละลายนี้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร

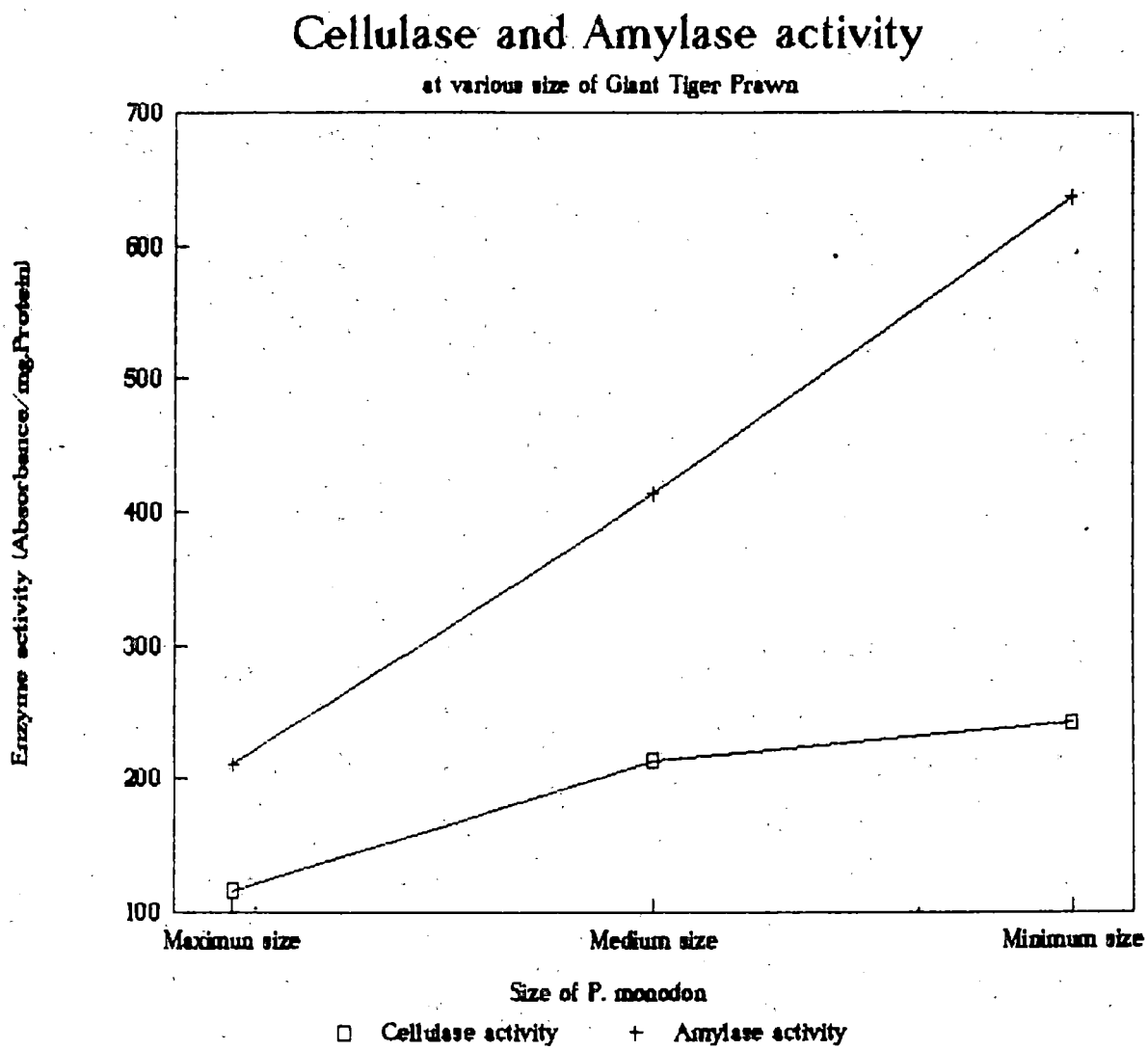
ผลการทดลอง

จากการศึกษาการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส และอะมัยเลส ในกุ้งกุลาดำพบว่ามีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามอายุของกุ้งจาก พี 5 ถึงอายุประมาณ 2 เดือน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติดังแสดงในรูปที่ 1



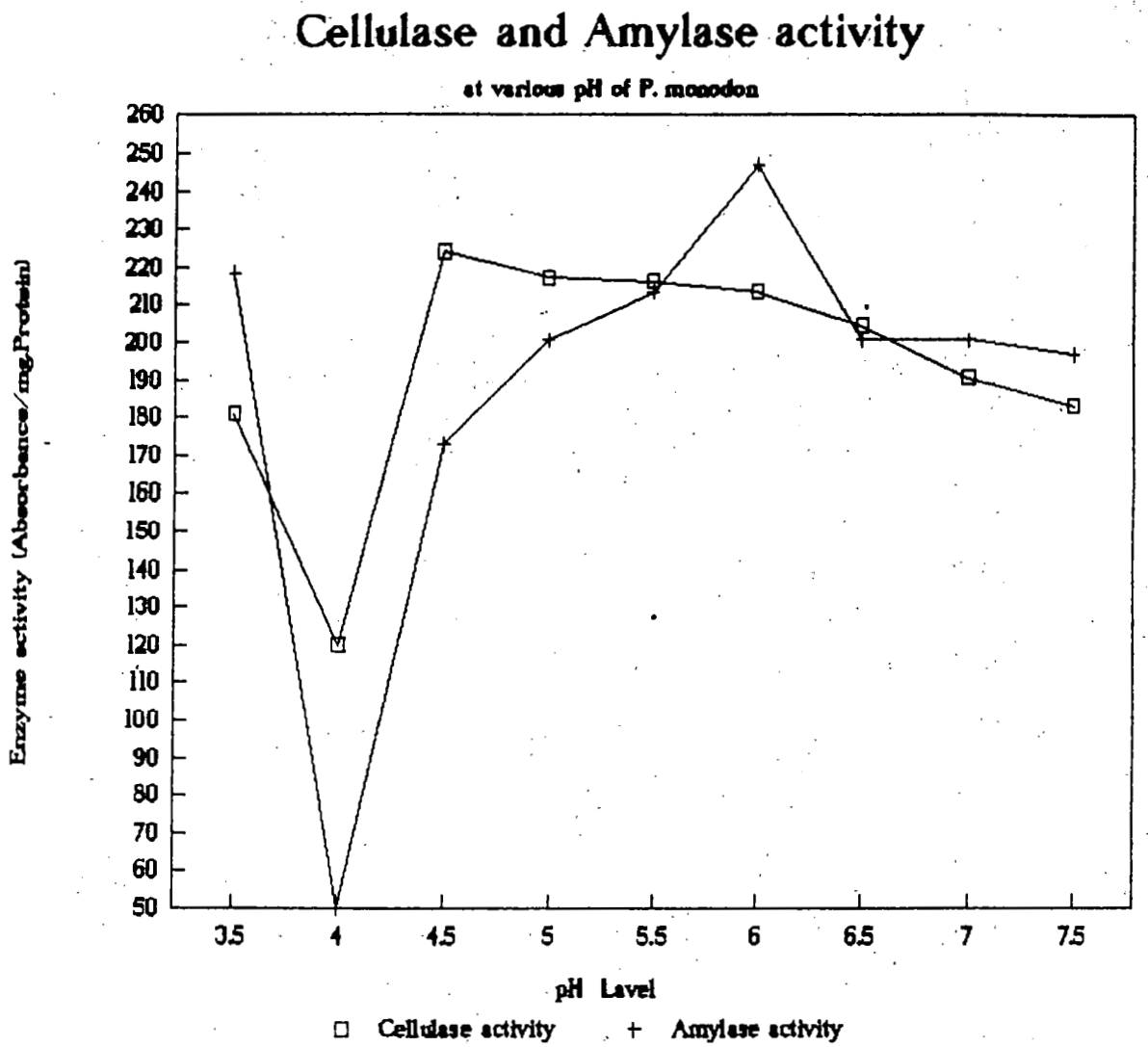
รูปที่ 1: แสดงการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส และอะมัยเลส ในกุ้งกุลาดำในระยะต่างๆ

แต่เมื่อมีการศึกษาดูการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส และอะมัยเลส พบว่าลดลงตามขนาดที่เพิ่มขึ้นของกุ้งกุลาดำที่มีอายุ 2 เดือนครึ่ง จากขนาดเล็กไปใหญ่อย่างมีนัยสำคัญดังแสดงในรูปที่ 2



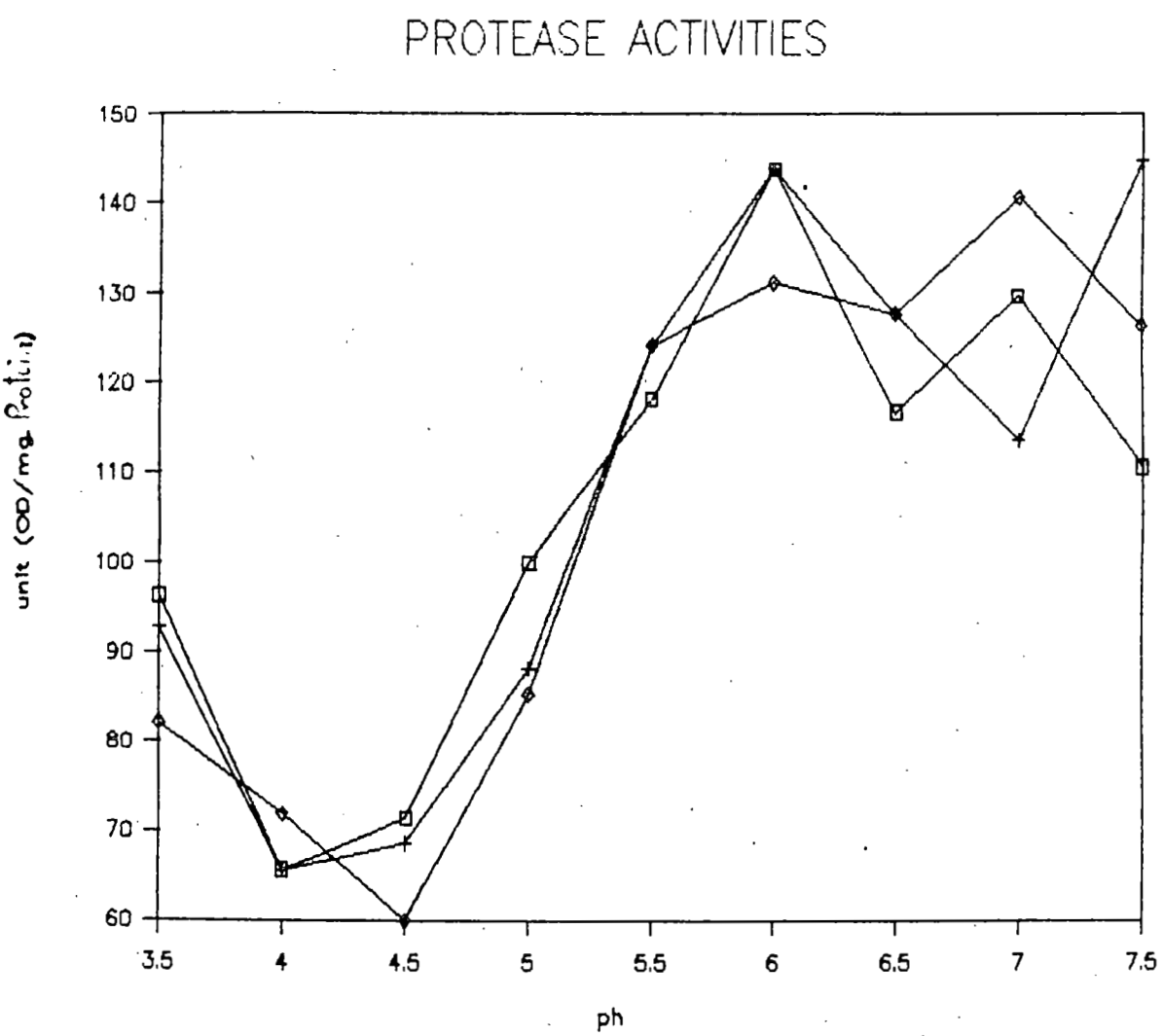
รูปที่ 2 : การทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส และอะมัยเลส ที่เพิ่มขึ้นในกุ้งกุลาดำอายุ 2 เดือน

ส่วนผลการศึกษาด้านการทำงานเมื่อดูการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส ในช่วง pH 4.5 - 6.5 พบว่าประมาณ pH 4.5 มีการทำงานค่อนข้างดี ส่วนระดับการทำงานที่เหมาะสมของเอนไซม์อะมัยเลสในช่วง pH 5.0 - 7.0 ได้ว่า pH ที่เหมาะสมที่สุดคือประมาณ 6.0 ดังแสดงในรูปที่ 3



รูปที่ 3 : แสดงการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส และอะมัยเลส ในกุ้งกุลาดำ พี 15 ที่ระดับ pH ต่างๆ

การทำงานของเอนไซม์โปรติเอส ในกุ้งกุลาดำในระยะต่างๆ ตามค่า pH ต่างๆ ของกุ้งขนาด พี 15 เพื่อดูการทำงานของเอนไซม์ ตามรูปที่ 4



รูปที่ 4 : แสดงการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสในกุ้งกุลาดำขนาด พี 15 ที่ระดับ pH ต่างๆ

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากผลการทดลองการศึกษาการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส และอะมัยเลส ในกุ้งกุลาดำอายุต่างๆ กัน ซึ่งดูได้จากการทำงานของเอนไซม์ในหน่วย Absorbance/โปรตีน 1 กรัม ผลการทำงานของเอนไซม์มีแนวโน้มว่าจะเพิ่มขึ้นตามอายุที่เพิ่มขึ้น แสดงว่า กุ้งกุลาดำในระยะ พี 5 และพี 10 น่าจะยังไม่มีการสร้างอวัยวะที่ใช้ในการย่อยอาหารหรือสร้างเอนไซม์ทั้ง 2 ประเภทนี้ อย่างมีประสิทธิภาพพอ จึงทำให้ค่าการทำงานของเอนไซม์อยู่ในระดับที่ต่ำ เมื่อมีขนาดโตขึ้นตามอายุ อวัยะที่ใช้ในการย่อยและสร้างเอนไซม์เริ่มสร้างหรือถูกสร้างให้ทำงานอย่างมีประสิทธิภาพขึ้น ดังนั้น การทำงานของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดจึงมีระดับเพิ่มขึ้นตามลำดับ

กุ้งกุลาดำอายุ 2 เดือนครึ่ง ที่แบ่งเป็น 3 ชุดตามขนาด โดยชุดที่ 1 มีขนาดใหญ่ชุดที่ 2 ขนาดกลาง และชุดที่ 3 ขนาดเล็ก การทำงานของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดมีแนวโน้มที่จะเพิ่มขึ้นจากชุดที่ 1 ไปชุดที่ 3 ตามลำดับ แสดงว่าในชุดที่มีขนาดเล็กกุ้งกุลาดำมีความต้องการอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรตเพื่อนำไปใช้ในการเจริญเติบโตมากกว่าชุดที่มีขนาดใหญ่ หรือกุ้งขนาดเล็กกินอาหารไปในปริมาณที่สูงจึงขับเอนไซม์ออกมาย่อยมากนั่นเอง และเนื่องจากขนาดของกุ้งมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ โดยที่กุ้งขนาดใหญ่จะมีกระเพาะอาหารที่มีขนาดใหญ่กว่ากุ้งขนาดเล็กทำให้เอนไซม์ย่อยได้นานขึ้น การทำงานของเอนไซม์จึงต่ำกว่าในกุ้งขนาดเล็ก

ระดับ pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ ของเอนไซม์เซลลูเลส คิดเป็นหน่วย Absorbance / ปริมาณโปรตีน 1 กรัม พบว่าที่ช่วง pH 4.5 - 6.5 การทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสอยู่ในระดับสูง และระดับ pH ที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้คือ 4.5

Yokoe and Tasumasu (1964) รายงานว่า ระดับ pH ที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส ในกุ้งตระกูล **Penaeus** ประมาณ 6.4

ระดับ pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์อะมัยเลส ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คิดเป็นหน่วย Absorbance / ปริมาณโปรตีน 1 กรัม พบว่าที่ช่วง pH 5.0 -

7.0 การทำงานของเอนไซม์อะมัยเลสอยู่ในระดับสูงและระดับ pH ที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้คือ 6.0

ทั้งนี้ Brockerhoff และคณะพบว่า เอนไซม์อะมัยเลส ในกุ้งมังกร (**american lobster**) ทำงานได้ดีที่ระดับ pH = 3 - 8 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ผลการทดลองในกุ้งกุลาดำครั้งนี้มีค่าที่อยู่ในช่วงใกล้เคียงกัน

การที่ระดับการทำงานของเอนไซม์อะมัยเลสและเอนไซม์เซลลูเลสแตกต่างกันน่าจะเนื่องมาจากสูตรอาหารที่เป็นเหมือน substrate มีความแตกต่างกันโดยทั่วไปมีปริมาณแป้งมากกว่าเส้นใยที่ประกอบลงไปโดยมุ่งให้อาหารเป็นตัวเสริมสร้างให้เกิดประโยชน์ในการเจริญเติบโต แป้งหรือคาร์โบไฮเดรตในอาหาร จะช่วยลดโปรตีนในการสร้าง **ไคติน** (Conway and Forster, 1971) ทำให้กุ้งสามารถใช้โปรตีนไปในการเจริญเติบโตได้อย่างเต็มที่การสังเคราะห์ไคตินมีความสำคัญในการสร้างหรือการแข็งตัวของเปลือกซึ่งเป็นส่วนห่อหุ้มร่างกายของกุ้ง ลักษณะเช่นนี้จะมีผลสะท้อนถึงการเจริญเติบโตในภาพรวมซึ่งมีการลอกคราบเป็นระยะ **(มะลิ, 2531)**

จากการตรวจหาการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสในกุ้งกุลาดำระยะต่างๆ (กราฟรูปที่ 1) พบว่าในกุ้งอายุ 2 เดือนจะมีการทำงานของเอนไซม์ดีที่สุดและมีการทำงานมากเป็น 2 เท่าของกุ้งขนาด พี 5 ซึ่งมีการทำงานของเอนไซม์ดีเป็นอันดับ 2 ส่วนในกุ้ง พี 15 จะมีการทำงานของเอนไซม์ต่ำที่สุด จากการวิเคราะห์ผลในกุ้งขนาด 2 เดือนเป็นตัวอย่างกุ้งที่มีอายุมากและขนาดลำตัวใหญ่จึงจำเป็นต้องมีการใช้และสลายโปรตีน เพื่อใช้ในขบวนการ metabolism ต่างๆในร่างกายเนื่องจากกุ้งที่มีอายุมากอวัยวะและต่อมต่างๆภายในร่างกายโดยโปรตีนเหล่านี้จะเป็นโครงร่างค้ำจุนร่างกายเป็นโปรตีนที่ช่วยขนส่งสาร (ในเลือด) หรือเป็นโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของฮอร์โมน เป็นต้นส่วนในกุ้งที่มีอายุน้อยคือกุ้ง พี5 10 15 20 การทำงานของเอนไซม์โปรติเอสจะใกล้เคียงกันในกุ้ง พี5 และ พี10 การทำงานของเอนไซม์ใกล้เคียงกันมากและการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสจะดีกว่าในกุ้งที่มีอายุมากกว่า คือในกุ้ง พี 15 และ พี20 ทั้งนี้เนื่องมาจากในกุ้งที่มีอายุน้อย การทำงานของเอนไซม์ตัวอื่นที่ช่วยย่อยโปรตีนมีการทำงานได้ดีขึ้น การทำงานของเอนไซม์โปรติเอสจึงลดลงน้อยลง

แนวโน้มการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสในกุ้งที่มีอายุมากกว่าจึงมีแนวโน้มที่ลดลง ส่วนในกุ้งอายุ 2 เดือนการทำงานของระบบทุกระบบดีขึ้น เอนไซม์ทุกตัวจึงจำเป็นต้องมีการทำงานมากขึ้น

ส่วนในการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสเปรียบเทียบตามขนาดของกุ้งกุลาดำที่อายุเท่าๆ กัน ผลดังรูปที่ 2 พบว่าในกุ้งขนาดกลางมีการทำงานของเอนไซม์ดีที่สุด รองลงมาคือกุ้งขนาดเล็ก ส่วนในกุ้งขนาดใหญ่จะมีการทำงานของเอนไซม์น้อยที่สุด ทั้งนี้เนื่องจากในกุ้งขนาดใหญ่มีการพัฒนาการของเนื้อเยื่อได้อย่างเต็มที่แล้ว จึงไม่จำเป็นต้องใช้โปรตีนเพื่อเสริมสร้างเนื้อเยื่อและอวัยวะต่างๆของร่างกาย และกุ้งขนาดใหญ่จะมีการเคลื่อนที่ได้เชื่องช้ากว่าในกุ้งขนาดเล็ก ดังนั้นอัตราการเผาผลาญอาหารจึงน้อยทำให้การทำงานของเอนไซม์ลดลงด้วยส่วนในกุ้งขนาดกลางเป็นกุ้งที่มีอวัยวะสมบูรณ์และมี metabolism สูง มีการเผาผลาญและใช้พลังงานสูงการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสต่ำกว่าในกุ้งขนาดกลางและสูงกว่าในกุ้งขนาดใหญ่ เนื่องจากในกุ้งเล็กอวัยวะบางส่วนในตัวกุ้งทำงานได้ไม่ดีนัก ระบบการย่อยอาหารทำงานไม่เต็มที่อัตราการแลกเนื้อจึงต่ำ

การเปรียบเทียบการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสได้ผลดังกราฟที่ 3 และกราฟที่ 4 โดยเอนไซม์โปรติเอสจะทำงานได้ในช่วงที่เป็นกรดและจะทำงานได้ดีในช่วงที่เป็นกลาง และทำงานได้ดีที่สุดที่ pH 6 ซึ่งเป็นไปตามทฤษฎี ในกระเพาะอาหารน้ำย่อยส่วนมากมีฤทธิ์เป็นกรดจนถึงลำไส้เล็กส่วนต้นน้ำย่อยมีฤทธิ์เป็นกรดจนถึงกลาง เอนไซม์โปรติเอสจะถูกหลั่งบริเวณกระเพาะอาหารจนถึงลำไส้เล็กส่วนต้น.

สรุปผลการทดลอง

1. จากผลการทดลองพบว่า การทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส และอะมัยเลส ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียล ในกุ้งกุลาดำขนาดพี 5 อยู่ในระดับต่ำที่สุดคือ 51.875 และ83.2125 หน่วย Absorbance/ปริมาณโปรตีน 1 กรัม ตามลำดับ และการทำงานของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้จะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ตามอายุที่เพิ่มขึ้น จนในที่สุดจะมีระดับสูงที่สุดที่อายุ 2 เดือน คือ 293.08943 และ 355.2845 หน่วย O.D./ ปริมาณโปรตีน 1 กรัม ตามลำดับ

2. การทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส และอะมัยเลส ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในกุ้งกุลาดำอายุ 2 เดือนครึ่ง จะมีปริมาณสูงที่สุดในกุ้งกุลาดำขนาดเล็กคือ 241.4285 และ 636 หน่วย Absorbance/ปริมาณโปรตีน 1 กรัม ตามลำดับ ปริมาณจะต่ำที่สุดในกุ้งกุลาดำขนาดใหญ่คือ 116.5605 และ 210.7006 หน่วย Absorbance/ปริมาณโปรตีน 1 กรัม ตามลำดับ ส่วนขนาดกลางจะมีระดับการทำงานอยู่ที่ 213.4831 และ 413.4831 หน่วย Absorbance/ปริมาณโปรตีน 1 กรัม

3. เอนไซม์โปรติเอสทำงานได้ดีในกุ้งวัยอ่อนเมื่อโตขึ้นลดลงรวมทั้งกุ้งขนาดกลางที่ทำการศึกษาการทำงานเอนไซม์ก็เกิดขึ้นได้ดี

4. ระดับ pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสในกุ้งกุลาดำ พี 15 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อยู่ในช่วง 4.5 - 6.5 ระดับ pH ที่การทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสสูงที่สุด (246.9394 หน่วย Absorbance/ปริมาณโปรตีน 1 กรัม) คือ 6.0

ข้อเสนอแนะ

1. กุ้งที่นำมาใช้ในการทดลองทุกครั้งควรนำมาจากแหล่งเดียวกัน เพื่อลดค่าความผิดพลาดที่อาจเกิดขึ้นจากปริมาณการให้อาหารแต่ละครั้ง

2. การทดลองแต่ละครั้งต้องควบคุมปัจจัยคงที่ให้เหมือนกัน เพื่อป้องกันความผิดพลาดอันอาจจะเกิดขึ้นจากปัจจัยเหล่านี้

3. ในการทดลองศึกษาระดับ pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด ควรเตรียมบัฟเฟอร์ที่มี pH แตกต่างกันตั้งแต่ 0.1 - 0.25 (หรือทศนิยม 2 ตำแหน่ง) เพื่อข้อมูลที่ละเอียดยิ่งขึ้น

4. ควรปรับอัตราส่วนระหว่างสับสเตรทเอนไซม์และรีเอเจนต์ต่างๆ ให้เหมาะสมเพื่อให้ได้ค่าระดับการทำงานของเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุด

5. การทดลองเกี่ยวกับเอนไซม์ ควรใช้เครื่องมือและเทคโนโลยีอันทันสมัย อุปกรณ์ที่ใช้ควรมีประสิทธิภาพ เช่น การใช้ Viscosity หรือ Viscosimeter แทนที่จะใช้การดูดกลืนแสงของเครื่อง Spectrophotometer หรือการใช้เครื่องเหวี่ยงที่ควบคุมอุณหภูมิได้ แทนเครื่องเหวี่ยงธรรมดา

6. ควรมีการทำเอนไซม์ที่บริสุทธิ์เพื่อนำมาวิเคราะห์หาค่าต่างๆได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ

7. ควรมีการทดลองหาการทำงานของเอนไซม์ในสภาวะของกุ้งกินอาหารและหลังกินอาหาร เพื่อเปรียบเทียบว่าอาหารเป็นสิ่งเร้าที่ทำให้กุ้งมีการหลั่งเอนไซม์ออกมาหรือไม่

8. ควรมีการศึกษาการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส ในปัจจัยอื่นๆ ที่แตกต่างกันบ้างนอกจาก pH เช่นอุณหภูมิ, สูตรอาหาร เป็นต้น

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

เอกสารอ้างอิง

นพดล ค้าขาย 2531, **การเพาะพันธุ์กุ้งกุลาดำ**, ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง, จังหวัดระยอง. 11 หน้า

บรรจง เทียนส่งรัศมี 2529, **การเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล**, อักษรเจริญทัศน์, 101 หน้า

ประจวบ หลำอุบล 2527, **การเลี้ยงกุ้ง**, ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล, คณะประมง, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 237 หน้า

พิชาญ สว่างวงศ์, วรวิทย์ ชีวาพร และสมถวิล เดชะพรหมพันธุ์, 2529, **ผลการเปลี่ยนแปลงประจำวันของความเค็มและสภาวะแห้งช่วงน้ำลดต่อการทำงานของเอนไซม์อัลฟา - อะมัยเลส และโปรติเอส ในกระเพาะอาหารของหอยนางรมที่เลี้ยงบริเวณอ่างศิลา**, ภาควิชาวาริชศาสตร์, มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ, บางแสน 32 หน้า

มะลิ บุณยวัฒผลิน, 2531, **อาหารและการให้อาหารกุ้งกุลาดำ**, กทม: 65 หน้า

วิบูลย์ รัตนาปนนท์, 2526, **เอนไซม์และโคเอนไซม์**, ภาคชีวเคมี, คณะแพทย์ศาสตร์, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 107 หน้า

Conway, C. B. and I . Forster, 1971, Finish nutrition in Asia. Methodological approaches to research and development : IDRC - 233 : 154 p.

Yokoe , Y and I. Yasumasu , 1964, The distribution of cellulase in invertebrates. Pergamon Press, Ltd., Comp. Brochem. Plyoiol. U.K.

249179

๖๗๒.๗๕๑๑
๐๕๕๔
ก.๒