รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย การพัฒนาสูตรอาหารเม็ดสำหรับการเลี้ยงปลานิลด้วยแนวทางการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยอาหาร

Development of tilapia (*Oreochromis niloticus*) diet based on digestibility approach

วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย
สุบัณฑิต นิ่มรัตน์

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561 มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 256101A1080028
สัญญาเลขที่ 36/2561

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย การพัฒนาสูตรอาหารเม็ดสำหรับการเลี้ยงปลานิลด้วยแนวทางการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยอาหาร
Development of tilapia (*Oreochromis niloticus*) diet based on digestibility approach

วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย[1]
สุบัณฑิต นิ่มรัตน์[2]

[1]ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
[2]ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

กุมภาพันธ์ 2562

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่อง การพัฒนาสูตรอาหารเม็ดสำหรับการเลี้ยงปลานิลด้วยแนวทางการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยอาหาร สำเร็จเรียบร้อยลงได้ โดยได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 36/2561

บทคัดย่อ

งานวิจัยเรื่อง การพัฒนาสูตรอาหารเม็ดสำหรับการเลี้ยงปลานิลด้วยแนวทางการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยอาหาร ได้ศึกษาศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินและเอนไซม์ไคโมทริปซินในปลานิลเพื่อหาอุณหภูมิและอายุที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ทริปซินและเอนไซม์ไคโมทริปซินของปลานิล โดยทำการสกัดเอนไซม์ทริปซินและเอนไซม์ไคโมทริปซินจากลำไส้ของปลานิลที่มีอายุระหว่าง 45 ถึง 150 วัน และประเมินการทำงานของเอนไซม์ทริปซิน และเอนไซม์ไคโมทริปซินทุกๆ 15 วัน โดยใช้สับสเตรต benzoyl-L-arginine-p-nitroanilide และ N-succinyl-Ala-Ala-Pro-phe-p-nitroanilide ตามลำดับ และศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ทริปซิน และเอนไซม์ไคโมทริปซินที่อุณหภูมิระหว่าง 30-70 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ 20-60 องศาเซลเซียสตามลำดับก่อนการประเมินแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ทริปซิน และเอนไซม์ไคโมทริปซิน ผลจากการศึกษาในปีแรกของโครงการ พบว่า การทำงานของเอนไซม์ทริปซินและเอนไซม์ไคโมทริปซินของปลานิล มีค่าเพิ่มขึ้นตามอุณหภูมิที่ทำการทดสอบ และอายุของปลานิล โดยกิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินมีค่าสูงสุดที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส และเมื่อปลามีอายุ 105 วัน ในขณะที่กิจกรรมของเอนไซม์ไคโมทริปซินมีค่าสูงสุดเมื่อปลามีอายุ 120 วัน โดยที่กิจกรรมของเอนไซม์ไคโมทริปซินไม่ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิที่ทดสอบ

คำสำคัญ: ปลานิล, เอนไซม์ทริปซิน, เอนไซม์ไคโมทริปซิน, กิจกรรมเอนไซม์

ABSTRACT

The research project entitled “Development of tilapia (*Oreochromis niloticus*) diet based on digestibility approach” was aimed to determine enzyme activities of trypsin and chymotrypsin of tilapia based on evaluation the effects of fish age and temperatures on enzyme activities of trypsin and chymotrypsin. Crude enzymes were extracted from the intestine of tilapia every 15 days during a fish culture period between 45-150 days. Assessments of trypsin activity and chymotrypsin activity were determined with the substrates mamely, benzoyl-L-arginine-p-nitroanilide and N-succinyl-Ala-Ala-Pro-phe-p-nitroanilide, respectively, under a wide range of tested temperatures from 30-70˚C and 20-60˚C, respectively prior to calculation of specific enzymes activities of trypsin and chymotrypsin. Results in the first year of study showed that trypsin and chymotrypsin activities were increased with the tested temperatures and fish age. Highest trypsin activities were observed at 70˚C when fish age was 105 days. Highest chymotrypsin activities were detected when fish age was 120 days despite non-significant differences in chymotrypsin activities within tested temperatures.

Keywords: Tilapia, Trypsin, Chymotrypsin, Enzyme Activity

สารบัญ

		หน้า
กิตติกรรมประกาศ		i
บทคัดย่อ		ii
Abstract		iii
สารบัญ		iv
สารบัญตาราง		v
บทที่		
1	บทนำ	1
2	เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	6
3	วิธีดำเนินงานวิจัย	12
4	ผลการทดลอง	17
5	อภิปรายและสรุปผลการทดลอง	27
เอกสารอ้างอิง		30
ผลผลิต (Output)		34
ประวัติคณะผู้วิจัย		35

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ความยาวเฉลี่ย (เซนติเมตร) และน้ำหนักเฉลี่ย (กรัม) ของปลานิลที่อายุต่างๆกัน.....	17
2	แอคติวิตีของเอนไซม์ทริปซิน (μmol p-nitroaniline h^{-1} ml^{-1}) ของปลานิลอายุต่าง ๆ ที่อุณหภูมิต่างกัน.....	19
3	ปริมาณโปรตีนในเอนไซม์ที่สกัดออกมาจากปลานิลที่อายุต่างๆ.....	20
4	แอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ทริปซิน (μmol p-nitroaniline h^{-1} mg $protein^{-1}$) ของปลานิลอายุต่าง ๆ ที่อุณหภูมิต่างกัน.....	21
5	แอคติวิตีของเอนไซม์ไคโมทริปซิน (μmol p-nitroaniline h^{-1} ml^{-1}) ของปลานิลอายุต่างๆ ที่อุณหภูมิต่างกัน.....	23
6	แอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ไคโมทริปซิน (μmol p-nitroaniline h^{-1} mg $protein^{-1}$) ของปลานิลอายุต่าง ๆ ที่อุณหภูมิต่างกัน.....	26

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำวิจัย

ปลานิลเป็นสัตว์น้ำที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่งของประเทศไทย มีราคาดี มีการเลี้ยงอย่างแพร่หลายในทุกภูมิภาคของประเทศไทย และจัดเป็นปลาน้ำจืดที่มีผลผลิตจากการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมากเป็นอันดับที่ 1 ของประเทศไทย โดยผลผลิตของปลานิลของฟาร์มเลี้ยงสัตว์น้ำจืดทั้งประเทศไทยในปี พ.ศ. 2552 มีปริมาณรวม 221,042.65 ตัน หรือร้อยละ 43.26 ของปริมาณการผลิตสัตว์น้ำจืดทั้งหมดของประเทศ คิดเป็นมูลค่า 8,391.1 ล้านบาท (กลุ่มวิจัยและวิเคราะห์สถิติการประมง, 2554) ปลานิลเป็นปลาที่ตลาดผู้บริโภคยังมีความต้องการสูงขึ้นเรื่อยๆ และมีศักยภาพการเพาะเลี้ยงที่ดีมาก เนื่องจากปลานิลมีอัตราการเจริญเติบโตที่สูง เลี้ยงง่าย ปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ง่าย มีปริมาณไขมันและคลอเรสเตอรอลต่ำ มีการพัฒนาสายพันธุ์ปลาอย่างต่อเนื่อง สามารถนำไปแปรรูปเป็นอาหารชนิดต่างๆได้อีกมากมาย เช่น ปลาทอด ปลาเผา ปลานึ่ง มีการจัดทำมาตรฐานการปฏิบัติทางการเพาะเลี้ยงที่ดี (GAP) จึงส่งผลต่อแนวโน้มการเลี้ยงปลาชนิดนี้ให้มีลู่ทางแจ่มใสต่อไปโดยไม่ต้องกังวลปัญหาทางด้านการตลาด และยังมีเครือข่ายภาครัฐในการควบคุม กำกับและดูแลด้านมาตรฐานการผลิตและการแปรรูปครอบคลุมทุกพื้นที่ที่มีการผลิตและแปรรูป นอกจากนี้ปลานิลก็สามารถส่งเป็นสินค้าส่งออกไปยังต่างประเทศในลักษณะของปลาแล่เนื้อ ตลาดที่สำคัญๆ อาทิ ญี่ปุ่น อเมริกา อิตาลี เป็นต้น เนื่องจากปลานิลจัดเป็นปลาเนื้อขาวที่มีศักยภาพในการเป็นสินค้าส่งออก การส่งออกปลานิลของประเทศไทยไปต่างประเทศมีปริมาณการส่งออกเพิ่มมากขึ้นตั้งแต่ปีพ.ศ. 2545 โดยปริมาณการส่งออกปลานิลปี 2551 มีรวมทั้งสิ้น 19,745,188 กิโลกรัม คิดเป็นมูลค่า 1,298,986,629 บาท ซึ่งเพิ่มขึ้นจากปี 2550 ร้อยละ 55 ซึ่งมีปริมาณการส่งออกปลานิลรวมทั้งสิ้น 12,733,959 กิโลกรัม มูลค่า 668,803,306 บาท โดยการส่งออกส่วนใหญ่จะอยู่ในหลายรูปแบบ ได้แก่ ปลานิลแช่เย็นจนแข็ง ไม่รวมเนื้อปลาแบบฟิลเล่ ตับและไข่, เนื้อปลานิลแบบฟิลเล่ สด หรือแช่เย็น, เนื้อปลานิลแบบฟิลเล่ แช่เย็นจนแข็ง, ปลานิลสดแช่เย็น ไม่รวมตับและไข่ และปลานิลแห้ง ไม่รมควัน เป็นต้น

การเลี้ยงปลานิลในประเทศไทยมีอัตราการขยายตัวเพิ่มมากขึ้น ซึ่งส่วนใหญ่แล้วยังคงเป็นการเลี้ยงเพื่อการบริโภคภายในประเทศ โดยสถานการณ์และแนวโน้มของผลผลิตปลานิลในประเทศไทยนั้นมีการขยายตัวเพิ่มขึ้นอย่างค่อยเป็นค่อยไปจากปี 2540-2545 และมีการขยายตัวอย่างรวดเร็วในปี 2546 โดยในปี 2551 มีผลผลิตปลานิลที่ได้จากการเพาะเลี้ยงมากถึง 195,900 ตัน เพิ่มขึ้นจากปี 2546 ร้อยละ 99 ซึ่งมีมูลค่าผลผลิตปลานิลที่ได้จากการเพาะเลี้ยงมากถึง 5,770 ล้านบาท เพิ่มขึ้นจากปี 2546 ร้อยละ 110 (สถิติการประมงแห่งประเทศไทย 2549) อย่างไรก็ตามการเลี้ยงปลานิลของประเทศไทยมีต้นทุนแตกต่างกันตามรูปแบบการเลี้ยง ได้แก่ การเลี้ยงปลานิลในบ่อดินด้วยการใช้วัตถุดิบในท้องถิ่นมีต้นทุนประมาณ 23-33 บาท/กิโลกรัม การเลี้ยงปลานิลในบ่อดินด้วยอาหารเม็ดสำเร็จรูปมีต้นทุนประมาณ 37-42 บาท/กิโลกรัม ส่วนการเลี้ยงปลานิลในกระชังมีต้นทุนประมาณ 33-44 บาท/ กิโลกรัม (กรมประมง, 2552) ทั้งนี้กว่าร้อยละ 70-80 ของต้นทุนเป็นค่าอาหาร โดยทั่วไปแล้วต้นทุนปลานิล ขึ้นอยู่กับการเลี้ยงของเกษตรกร เช่น อัตราการปล่อย ขนาดของลูกปลาที่ปล่อย อัตรารอดของปลา ประเภทอาหารที่ใช้เลี้ยงปลา ราคาขายที่ปากบ่อของแต่ละพื้นที่ และขนาดผลผลิตที่ขาย

ปลานิลเป็นสัตว์น้ำที่เลี้ยงได้ง่าย และลงทุนไม่มากเหมือนสัตว์น้ำเศรษฐกิจชนิดอื่นๆเช่นกุ้งขาว เป็นต้น โดยในปัจจุบันได้มีความพยายามปรับปรุงสายพันธุ์และพัฒนาเทคนิคการเลี้ยงปลานิลเพื่อให้ได้ผลผลิตที่มีลักษณะและคุณภาพตรงกับความต้องการของตลาดต่างประเทศ เช่น ปลานิลแปลงเพศ ปลานิลแดง ปลานิลทริพลอยด์ รวมทั้งการเลี้ยงปลานิลในน้ำที่มีความเค็มต่ำ เพื่อแก้ไขปัญหากลิ่นสาบโคลน เป็นต้น อย่างไรก็ตามรูปแบบการเลี้ยงปลานิลส่วนใหญ่ในหลายพื้นที่ของประเทศไทยเป็นการเลี้ยงแบบพัฒนา (intensive culture) ที่มีการปล่อยลูกปลานิลจำนวนมากต่อหน่วยพื้นที่ลงในบ่อเลี้ยง ทำให้มีการใช้อาหารสำเร็จรูปเป็นหลักเพื่อเร่งผลผลิตปลา ซึ่งในการเลี้ยงส่วนมากมักประสบกับปัญหาเกี่ยวกับประสิทธิภาพของอาหารที่ใช้เลี้ยงปลา ทำให้มีค่าอัตราแลกเนื้อสูง ส่งผลให้ต้นทุนค่าอาหารสูงด้วย ทั้งนี้ต้นทุนส่วนใหญ่ในการเลี้ยงปลานิลจะอยู่ที่ต้นทุนค่าอาหารประมาณ 50-60 เปอร์เซ็นต์ โดยที่ต้นทุนส่วนใหญ่ในการผลิตอาหารสัตว์ก็คือ ปลาป่น (fishmeal) ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญของอาหารสัตว์ เนื่องจากปลาป่นมีกรดอะมิโนที่จำเป็นทุกชนิด ซึ่งสามารถเร่งการเจริญเติบโตของสัตว์ได้ แต่ปลาป่นก็ยังมีคุณภาพไม่สม่ำเสมอ มีโปรตีนแตกต่างกันมาก และยังต้องระวังในการเลือกซื้อปลาป่นให้ได้คุณภาพตามต้องการ อีกทั้งปลาป่นก็มีราคาค่อนข้างสูงเนื่องจากวัตถุดิบที่ใช้ผลิตปลาป่นคือปลาเป็ดที่มีปริมาณลดลงอย่างรวดเร็วในท้องทะเลไทย ทำให้ผู้ประกอบการธุรกิจประมงจำเป็นต้องสั่งซื้อปลาป่นจากต่างประเทศมากขึ้นเพื่อนำมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตอาหาร ส่งผลต่อต้นทุนการเลี้ยงสัตว์น้ำหลายๆชนิดเพิ่มสูงขึ้น อีกทั้งขณะนี้ได้มีพระราชบัญญัติการประมงที่ประกาศใช้ปี พ.ศ. ๒๕๕๘ ซึ่งได้กำหนดรูปแบบและแนวทางการบริหารจัดการทรัพยากรประมงให้มีความยั่งยืนแก้ไขปัญหาการประมงที่ผิดกฎหมาย (IUU fishing) ทำให้ปลาขนาดเล็กหรือปลาเป็ดที่นำมาทำปลาป่นเริ่มหาได้ยากขึ้น อีกทั้งราคาของปลาป่นก็ค่อนข้างแพงเมื่อเมื่อเปรียบเทียบกับวัตถุดิบอาหารอาหารสัตว์ชนิดอื่นๆ จึงทำให้มีแนวคิดในการหาวัตถุดิบอาหารสัตว์ชนิดอื่นมาแทนปลาป่นเพื่อผลิตอาหารที่มีคุณค่าทางอาหารเหมือนเดิม แต่ราคาต้นทุนอาหารต้องถูกลงด้วยการใช้แหล่งโปรตีนจากพืชหรือแหล่งอื่นๆซึ่งมีราคาถูกกว่าแต่ปลานิลสามารถย่อยได้มาแทนที่ปลาป่นบางส่วน แนวคิดดังกล่าวนี้ได้มีการศึกษาทั้งในประเทศและต่างประเทศเพื่อหาวัตถุดิบอาหารสัตว์ (feedstuffs) ที่เหมาะสมมาทดแทนปลาป่นบางส่วน เช่น การทดแทนปลาป่นในอาหารในปลา silver perch (*Bidyanus bidyanus*; Allan, 2000) ปลา seabream (*Sparus aurata*; Silva et al., 2010) เป็นต้น อย่างไรก็ตามข้อจำกัดของการพัฒนาสูตรอาหารแนวทางดังกล่าวต้องใช้เวลาทดลองเลี้ยงนาน 3-4 เดือนเพื่อให้ปลาเจริญเติบโตมากพอในการพิจารณาว่าอาหารสูตรไหนดีหรือเหมาะสมที่สุดจากการประเมินการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหาร (Vuthiphandchai, 1986) อีกทั้งอัตราส่วนของชนิดวัตถุดิบอาหารสัตว์ที่เป็นแหล่งโปรตีนจากพืชที่นิยมใส่ลงไปทดแทนปลาป่นส่วนมากก็มักใส่ลงไปในสูตรอาหารแบบก้าวกระโดดเช่น 10%, 20%, 30% หรือ 15%, 30%, 45% เป็นต้น ซึ่งถ้าพิจารณาในด้านของประสิทธิภาพการย่อยโปรตีน (protein digestibility) ที่มาจากพืชของปลาชนิดใดชนิดหนึ่ง มีความเป็นไปได้ว่าการใส่แหล่งโปรตีนจากพืชโดยไม่ทราบข้อมูลแท้จริงว่าปลาชนิดนั้นมีความสามารถในการย่อยโปรตีนจากพืชชนิดนั้นได้มากน้อยเพียงไร ก็จะมีผลทำให้เสียเวลาในการทดลองโดยที่ปลาจะเจริญเติบโตไม่ดีเท่าที่ควร เช่น ความสามารถแท้จริงของปลาชนิดหนึ่งในการย่อยกากถั่วเหลืองมีค่า 30% แต่ถ้าผลิตสูตรอาหารเม็ดเลี้ยงปลาชนิดนั้นโดยกำหนดให้ใช้กากถั่วเหลือง 45% ซึ่งมากกว่าความสามารถแท้จริงที่ปลาชนิดนั้นๆจะย่อยได้ ทำให้ประสิทธิภาพการย่อยอาหารต่ำ และปลาโตช้าตามมาในภายหลัง ดังนั้นการพัฒนาสูตรอาหารที่เหมาะสมแนวทางใหม่ จึงจำเป็นที่ต้องทราบว่าชนิดปลาที่ศึกษานั้นมี

ความสามารถในการย่อยวัตถุดิบอาหารสัตว์ที่จะมาทดแทนปลาป่นได้แท้จริงมากน้อยเพียงใดก่อนการผลิตหรือคำนวณสูตรอาหารเม็ด เพื่อให้ปลาย่อยอาหารได้ดี และเจริญเติบโตเร็ว

แนวทางหนึ่งของการแก้ปัญหาความไม่แน่นอนของราคาและผลผลิตปลาป่นที่สามารถทำได้ง่ายและสะดวกในทางปฏิบัติ สามารถทำได้โดยลดการใช้ปริมาณปลาป่นบางส่วนในสูตรอาหาร แล้วทดแทนด้วยโปรตีนจากวัตถุดิบอาหารสัตว์ที่เป็นพืชที่มีโปรตีนสูงบางชนิดที่หาได้ง่ายในท้องถิ่น เช่น กากถั่วเหลือง กากถั่วลิสง เป็นต้น ซึ่งมีราคาถูกกว่าปลาป่น แล้วนำมาผลิตสูตรอาหารที่มีระดับโปรตีน หรือพลังงานเท่าเดิม แต่ปรับสัดส่วนของปลาป่น และวัตถุดิบอาหารสัตว์ที่เป็นพืชที่มีโปรตีนสูงในสูตรอาหาร แล้วนำไปทดสอบด้วยการย่อยด้วยเอนไซม์สกัดจากลำไส้ปลาภายในหลอดทดลอง (*In vitro* digestibility) เพื่อทราบความสามารถที่แท้จริงของเอนไซม์สกัดของปลาชนิดนั้นว่าย่อยวัตถุดิบอาหารสัตว์แต่ละชนิดได้มากน้อยแค่ไหน ก็จะทำให้มีฐานข้อมูล (database) ของความสามารถในการย่อยวัตถุดิบอาหารสัตว์แต่ละชนิดของน้ำย่อยปลาชนิดนั้นในหลอดทดลอง ซึ่งสามารถนำมาใช้ประกอบการสร้างสูตรอาหารเลี้ยงที่เหมาะสมที่ปลาย่อยได้ดี โดยเลือกใช้ชนิดและระดับของวัตถุดิบอาหารสัตว์ที่เหมาะสมจากฐานข้อมูลที่มี เพื่อทำให้ต้นทุนการผลิตสูตรอาหารลดต่ำลง ซึ่งเมื่อนำสูตรอาหารดังกล่าวไปเลี้ยงปลาแล้วปลายังคงมีการเจริญเติบโตที่ดี และได้ผลตอบแทนมากขึ้น (Soltan et al., 2008)

โดยทั่วไปอาหารเม็ดของปลาประกอบด้วยวัตถุดิบอาหารสัตว์ (feedstuffs) หลายอย่างเป็นองค์ประกอบ เช่น ปลาป่น กากถั่วเหลือง ปลายข้าว รำข้าว แป้งสาลี ฯลฯ ซึ่งจะมีระดับโปรตีน ไขมัน และธาตุอาหารอื่นๆตามความต้องการของปลาแต่ละชนิดเพื่อทำให้ปลาเจริญเติบโต ด้วยเหตุที่ปลานิลมีการเลี้ยงแพร่หลายทั่วประเทศ และมีผลผลิตจากการเลี้ยงสูงสุดเป็นอันดับ 1 ของประเทศของสัตว์น้ำจืดทั้งหมดตามที่กล่าวมาแล้ว และมีรูปแบบการเลี้ยงแบบพัฒนาเป็นส่วนใหญ่ที่ต้องพึงพาอาหารเม็ด หรืออาหารสำเร็จรูปเป็นหลัก ทำให้ผู้เลี้ยงซื้ออาหารเม็ดสำเร็จรูปมาใช้อย่างแพร่หลาย ซึ่งในปัจจุบันอาหารเม็ดสำเร็จรูปได้มีราคาสูงขึ้น ทำให้ต้นทุนการผลิตเพิ่มขึ้น จึงควรพัฒนาสูตรอาหารเม็ดเพื่อใช้เองในฟาร์ม โดยทำให้อาหารเม็ดราคาถูกลง และปลานิลย่อยและเจริญเติบโตได้ดี ด้วยการศึกษาแนวทางพัฒนาสูตรอาหารปลานิลจากแนวทางประสิทธิภาพการย่อยอาหาร ซึ่งแม้จะเป็นการศึกษาในหลอดทดลอง (in vitro) แต่สามารถนำสูตรมาใช้ในตัวปลานิลได้โดยตรง (in vivo) เพื่อให้ปลานิลเจริญเติบโตเหมือนเดิมด้วยการทดแทนปลาป่นด้วยวัตถุดิบอาหารสัตว์ที่เป็นแหล่งโปรตีนจากพืช อย่างไรก็ตามงานวิจัยด้านอาหารสัตว์น้ำในประเทศไทยแม้จะมีผู้ศึกษาในสัตว์น้ำหลายชนิดเป็นจำนวนมากเพื่อทำให้สัตว์น้ำเจริญเติบโต แต่การศึกษาวิจัยเกี่ยวกับประสิทธิภาพการย่อยอาหารในหลอดทดลองเพื่อให้ได้ฐานข้อมูลสำหรับน้ำย่อยของปลาแต่ละชนิดในการย่อยวัตถุดิบอาหารสัตว์ประเภทต่างๆ ยังมีค่อนข้างจำกัด เพราะต้องบูรณาการความรู้ด้านเคมี ชีวเคมี เทคโนโลยีชีวภาพและการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเข้าด้วยกันในการสร้างสูตรอาหารที่เหมาะสม ที่มีปลาป่นน้อยลง แต่มีแหล่งโปรตีนจากพืชมากขึ้น เพื่อทำให้ปลาย่อยอาหารสูตรนั้นๆได้ดี และเจริญเติบโตเร็วตามปกติ รวมทั้งยังต้องมีต้นทุนอาหารเม็ดที่ลดต่ำลง อย่างไรก็ตามข้อจำกัดของการพัฒนาสูตรอาหารปลาแนวทางดังกล่าวยังจะต้องทราบว่าสัตว์น้ำชนิดนั้นๆมีความสามารถย่อยวัตถุดิบอาหารสัตว์แต่ละชนิดที่จะนำไปแทนที่ปลาป่นได้มากน้อยเพียงไร เพราะปลาแต่ละชนิดมีความแตกต่างในเรื่องของความสามารถ หรือประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ในการย่อยอาหารที่แตกต่างกัน จึงจำเป็นที่จะต้องสกัดเอนไซม์จากลำไส้ของปลาออกมาก่อน แล้วนำเอนไซม์เหล่านั้นไปทดสอบย่อยวัตถุดิบอาหารสัตว์ในหลอดทดลอง เพื่อทราบความสามารถที่ปลาชนิดนั้นๆจะย่อยวัตถุดิบแต่ละชนิดได้มาก

น้อยเท่าไร เพื่อทำให้สามารถผลิตสูตรอาหารเลี้ยงปลาได้อย่างเหมาะสม และมั่นใจได้ว่าปลาจะโตเร็ว เพราะสูตรอาหารที่ได้จะกำหนดตามเปอร์เซ็นต์วัตถุดิบอาหารสัตว์แต่ละชนิดที่สัตว์น้ำย่อยได้จริงในสูตรอาหาร และยังสามารถสร้างสูตรอาหารที่เหมาะสมที่มีราคาลดลง (Rungruangsak-Torrissen et al., 2002)

จากหลักการและเหตุผลที่กล่าวมาทั้งหมดข้างต้นนั้นทำให้การศึกษาประสิทธิภาพการย่อยวัตถุดิบอาหารสัตว์ที่จะใช้นำมาทดแทนปลาป่นสำหรับสูตรอาหารเลี้ยงปลานิล จึงจำเป็นต้องเริ่มจากศึกษาหาชนิดของเอนไซม์ย่อยอาหารของปลานิล ที่พบในช่วงอายุต่างๆของปลาเพื่อที่จะได้ทราบถึงชนิด หรือกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหารที่มีในท่อทางเดินอาหาร หลังจากนั้นจึงสกัดเอนไซม์ย่อยอาหารออกมาเพื่อนำมาเป็นน้ำย่อยในการทดลองย่อยวัตถุดิบอาหารสัตว์ที่ต้องการศึกษาในหลอดทดลอง (*in vitro* digestibility) เพื่อจะได้ทราบถึงชนิดและปริมาณของวัตถุดิบอาหารสัตว์ที่เหมาะสมในการเลี้ยงปลานิล หลังจากนั้นจึงนำเอาวัตถุดิบอาหารสัตว์ที่คัดเลือกว่าดีที่สุดมาผสมแทนที่ปลาป่นในสูตรอาหารเลี้ยงปลานิลในรูปแบบต่างๆ (experimental diets) เพื่อที่จะประเมินการเจริญเติบโตของปลานิล เปรียบเทียบกับสูตรอาหารมาตราฐานที่ใช้ปลาป่นเป็นวัตถุดิบ (standard diet) ด้วยเหตุที่การเลี้ยงปลานิลมีการเลี้ยงอย่างกว้างขวางทั่วประเทศ และเกษตรกรจำนวนมากยังใช้อาหารเม็ดที่มีต้นทุนสูงในการเลี้ยงปลานิลทั้งในบริเวณน้ำจืดและชายฝั่งทะเล จึงสมควรพัฒนาวิจัยศึกษาการลดต้นทุนสูตรอาหารเม็ดในการเลี้ยงปลานิลด้วยการทดแทนปลาป่นบางส่วนด้วยแหล่งโปรตีนจากพืชที่มีคุณภาพสูง แต่ราคาถูก และปลานิลย่อยได้ดี เพื่อทำให้ปลานิลมีการเจริญเติบโตที่ดีด้วยการใช้อาหารเม็ดที่มีต้นทุนถูกลง ซึ่งจะทำให้การเลี้ยงปลานิลให้ผลตอบแทนที่คุ้มค่ามากที่สุด ลดการพึ่งพาอาหารสำเร็จรูปที่นับวันราคาจะสูงขึ้น และช่วยลดการใช้ปลาป่นในการเลี้ยงสัตว์น้ำของประเทศต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหาร (enzyme activity) ของปลานิล ในช่วงที่มีอายุต่างๆ กัน
2. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการย่อยอาหารในหลอดทดลอง (*in vitro* digestibility) ของปลานิล โดยใช้วัตถุดิบอาหารสัตว์ที่แตกต่างกัน
3. เพื่อทดแทนการใช้ปลาป่นบางส่วนด้วยการใช้แหล่งโปรตีนจากพืชทดแทนในสูตรอาหารเพื่อเลี้ยงปลานิลให้มีการเจริญเติบโตที่ดี โดยที่ต้นทุนการผลิตอาหารลดลง

ขอบเขตของการวิจัย

นำปลานิลที่มีอายุต่างๆกันมาเลี้ยงในสภาพที่เหมาะสมในโรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ และสกัดเอาเอนไซม์ย่อยอาหารออกมาจากระบบทางเดินอาหารแล้วนำมาหาแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยอาหาร หลังจากนั้นก็จะทำการศึกษาหาประสิทธิภาพของเอนไซม์ย่อยอาหารของปลานิลด้วยการย่อยอาหารในหลอดทดลองโดยใช้วัตถุดิบอาหารสัตว์ต่างชนิดกัน และเมื่อทราบชนิดและระดับของวัตถุดิบที่เหมาะสมที่จะนำมาทดแทนปลาป่นในปีถัดไปแล้วก็นำไปผสมลงในสูตรอาหารปลานิลในปริมาณแตกต่างกันเพื่อเลี้ยงปลานิลเพื่อประเมินอัตราการเจริญเติบโต อัตราการรอดตาย และประสิทธิภาพการใช้อาหารโดยมีการศึกษาเปรียบเทียบการประเมินประสิทธิภาพการย่อยอาหารด้วยวิธี *in vitro*

digestibility และ วิธีการใช้ internal marker โดยการเก็บขี้ปลา (feces) มาวิเคราะห์ปริมาณ Cr_2O_3

วิธีดำเนินการวิจัยโดยสรุป ทฤษฎีและ/หรือแนวทางความคิดที่นำมาใช้ในงานวิจัย

ในปัจจุบันเป็นที่ทราบกันโดยทั่วไปว่าการผลิตอาหารเม็ดเพื่อการเลี้ยงปลาจำเป็นต้องมีสูตรอาหารที่เหมาะสมเพื่อให้ปลามีการเจริญเติบโตที่ดี โดยคัดเลือกชนิดของวัตถุดิบอาหารสัตว์ที่เหมาะสมมาใช้เป็นองค์ประกอบในการผลิตอาหาร อย่างไรก็ตามสูตรอาหารปลาที่พัฒนาใช้ในประเทศไทยส่วนมากยังเป็นการนำวัตถุดิบอาหารสัตว์มาใช้ในอัตราส่วนต่างๆกันโดยพยายามลดต้นทุนอาหารโดยการใช้แหล่งโปรตีนจากพืชมาทดแทนปลาป่นและยังต้องทดลองนำอาหารมาเลี้ยงปลาในระยะเวลานานกว่าจะทราบสูตรอาหารที่เหมาะสมในการนำมาเลี้ยงปลา การสร้างสูตรอาหารปลาที่เหมาะสมแนวทางการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำย่อยหรือเอนไซม์ (enzyme) ของปลาในการย่อยวัตถุดิบอาหารสัตว์ในหลอดทดลอง (*in vitro* digestibility) ซึ่งเป็นแนวทางใหม่ในการบูรณาการองค์ความรู้แขนงต่างๆสามารถทำให้มั่นใจได้ว่าปลนิลาจะเจริญเติบโตได้ดีแม้ว่าจะยังไม่นำสูตรอาหารนั้นมาเลี้ยงปลาก็ตาม เนื่องจากน้ำย่อยหรือเอนไซม์จะถูกสกัดจากลำไส้ของปลานิล แล้วนำไปย่อยวัตถุดิบอาหารสัตว์ที่ต้องการทดสอบในหลอดทดลองโดยตรง ทำให้ทราบ database ว่าน้ำย่อยหรือเอนไซม์สกัดของปลานิลสามารถย่อยวัตถุดิบอาหารสัตว์แต่ละชนิดได้มากน้อยเพียงไร รวมทั้งยังสามารถเลือกชนิดและปริมาณวัตถุดิบอาหารสัตว์ที่จะมาผลิตสูตรอาหารได้หลากหลายตามความต้องการของท้องถิ่น เช่นในบริเวณที่มีผู้เลี้ยงปลานิล มีวัตถุดิบอาหารสัตว์หรือแหล่งโปรตีนจากพืชชนิดใดมาก และหาได้ง่าย ก็สามารถนำมาใช้เป็นองค์ประกอบหนึ่งในสูตรอาหารปลานิลได้ทันที เพราะใน database ของเอนไซม์ในการย่อยวัตถุดิบอาหารสัตว์แต่ละชนิดจะทราบว่าปลานิลย่อยแหล่งโปรตีนจากพืชแต่ละชนิดได้มากน้อยเพียงใด ซึ่งเมื่อนำชนิดและระดับของวัตถุดิบอาหารสัตว์ที่เหมาะสมไปใช้ในการสร้างสูตรอาหารเลี้ยงปลานิล โดยไม่เกินความสามารถที่น้ำย่อยของปลานิลสามารถย่อยได้ดี จะทำให้ปลานิลสามารถนำวัตถุดิบอาหารสัตว์ที่เหมาะสมไปใช้ประโยชน์ได้ดี และมั่นใจได้ว่าปลาจะโตดีแม้ว่าขณะนั้นยังไม่เอาอาหารไปเลี้ยงปลาก็ตาม แต่การนำสูตรอาหารเหล่านั้นมาเลี้ยงปลานิลโดยตรงในภายหลังจะสามารถทำให้ทราบการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการย่อยอาหารของปลานิลจากการศึกษาด้วยแนวทางการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยอาหารในหลอดทดลอง

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบความสามารถหรือกิจกรรม (activity) ของเอนไซม์ย่อยอาหารของปลานิลที่มีอายุแตกต่างกัน

2. ทราบถึงชนิดของวัตถุดิบอาหารสัตว์และปริมาณที่เหมาะสมที่นำมาใช้ในการทดแทนปลาป่นในการผลิตอาหารเลี้ยงปลานิล

3. ได้พัฒนาเทคโนโลยีการศึกษากิจกรรม หรือความสามารถของเอนไซม์ในการย่อยวัตถุดิบอาหารสัตว์ในหลอดทดลอง เพื่อผลิตสูตรอาหารในการเลี้ยงปลานิลด้วยการใช้แหล่งโปรตีนจากพืชทดแทนปลาป่น ซึ่งสามารถนำความรู้ที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในการผลิตสูตรอาหารเลี้ยงสัตว์น้ำชนิดอื่นๆของประเทศไทยต่อไปเพื่อลดต้นทุนการผลิตอาหารสัตว์น้ำ

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ปลานิล

ปลานิล จัดเป็นปลาน้ำจืดเศรษฐกิจของไทย ที่มีการเจริญเติบโตที่รวดเร็ว มีปริมาณกล้ามเนื้อบริโภคต่อน้ำหนักสูงถึง 40% สามารถเจริญเติบโตได้ในน้ำที่มีความเค็มถึง 25 ppt ทำให้สามารถเลี้ยงในกระชังความหนาแน่นสูงโดยไม่มีผลเสียต่อปลา ให้ผลผลิตเฉลี่ย 40 กิโลกรัมต่อลูกบาศก์เมตร อีกทั้งยัง ปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดีและมีความทนทานต่อโรคสัตว์น้ำต่างๆ ได้ดี ผิวมีสีแดงส้มอมชมพู เนื้อทุกส่วนมีสีขาว ทำให้น่ารับประทาน (ชิงชัย โลหะวัฒนกุล, 2542)

ปลานิลแดงเกิดจากการผสมข้ามพันธุ์ระหว่างปลานิลกับปลาหมอเทศ โดยลูกปลาที่เกิดจากการผสมข้ามพันธุ์ 25% จะมีสีส้ม-แดง ปลานิลแดงมีลักษณะภายนอกโดยทั่วไปคล้ายคลึงกับปลานิลต่างกันเฉพาะสีของลำตัว และสีของผนังช่องท้องซึ่งผนังช่องท้องของปลานิลแดงมีสีขาวส่วนผนังช่องท้องของปลานิลมีสีดำและได้มีการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างปลานิลและปลานิลแดงพบว่าเนื้อของปลานิลแดงมีปริมาณไขมันและส่วนของคาร์โบไฮเดรตที่ย่อยได้ (NFE) มากกว่าปลานิลจึงทำให้เนื้อมีรสชาติหวานและมีความนุ่มกว่าปลานิล (สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ, 2526)

ราคาปลานิลที่เกษตรกรขายได้ที่ฟาร์มเฉลี่ยตั้งแต่เดือน มกราคม-มิถุนายน 2552 ราคาจำหน่ายที่ฟาร์มขึ้นกับขนาดของปลาโดยปลาขนาดใหญ่ราคาเฉลี่ย 46.30 บาท/กิโลกรัม ปลาขนาดกลางราคาเฉลี่ย 32.11 บาท/กิโลกรัม ปลาขนาดเล็กราคาเฉลี่ย 22.50 บาท/กิโลกรัม (ที่มา: สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร)

ราคาขายส่งเฉลี่ยตั้งแต่เดือน มกราคม-มิถุนายน 2552 ณ ตลาดไทราคาจำหน่ายปลาขนาดใหญ่ราคาเฉลี่ย 53.27 บาท/กิโลกรัม ปลาขนาดกลางราคาเฉลี่ย 42.82 บาท/กิโลกรัม ปลาขนาดเล็กราคาเฉลี่ย 32.06 บาท/กิโลกรัม (ที่มา: ตลาดไท)

ราคาขายปลีกเฉลี่ยตั้งแต่ตั้งแต่เดือน มกราคม-มิถุนายน 2552 ราคาจำหน่ายขึ้นกับขนาดของปลาโดยปลาขนาดใหญ่ราคาเฉลี่ย 55.27 บาท/กิโลกรัม ปลาขนาดกลางราคาเฉลี่ย 43.10 บาท/กิโลกรัม (ที่มา : กระทรวงพาณิชย์)

สำหรับการเพาะเลี้ยงปลานิลจะมีการให้ไรแดงในระยะวัยอ่อน แล้วเปลี่ยนมาให้ปลาป่นผสมรำ หรือกากถั่วเหลือง ฯลฯ แต่เมื่อลูกปลาโตขึ้นเป็นปลานิ้ว เกษตรกรก็จะให้อาหารแตกต่างกันในระหว่างการเลี้ยงเลี้ยงปลานิลเพื่อเป็นปลาเนื้อ เช่น อาหารเม็ด ซี่โครงไก่บด ไส้ไก่ เป็นต้น และก็มีความหลากหลายในการให้อาหารเพื่อลดต้นทุนค่าอาหารในบางพื้นที่ เช่น เลี้ยงด้วยซี่โครงไก่บดผสมรำ เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามการเลี้ยงปลานิลให้เป็นปลาเนื้อส่วนใหญ่ให้อาหารเม็ดเพื่อเร่งการเจริญเติบโต

2.2 ระบบย่อยอาหารของปลา และเอนไซม์

ระบบการย่อยอาหารของปลา จัดเป็นระบบหนึ่งที่มีความสำคัญโดยตรงต่อการเจริญเติบโตของปลา เนื่องจากอาหารจะถูกย่อยจากสารอาหารที่มีโมเลกุลใหญ่และซับซ้อนให้เป็นสารอาหารที่มีโมเลกุลเล็กลงเพื่อที่จะดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดแล้วถูกเผาผลาญในระดับเซลล์ได้เป็นพลังงานออกมาเพื่อใช้ในชีวิตประจำวัน ถ้าปลาที่เลี้ยงได้สารอาหาร (nutrients) ซึ่งประกอบด้วยโปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต วิตามิน และแร่ธาตุครบทั้งคุณภาพและปริมาณ มีการย่อยและการดูดซึมอาหารที่มี

ประสิทธิภาพก็จะมีการเจริญเติบโตที่ดี และเกิดมลภาวะในบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำน้อยลง หรือเกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม (environmental impact of aquaculture) น้อยลง เพราะสารอาหารประเภทต่างๆ ถูกเอนไซม์หรือน้ำย่อยย่อยจนได้สารอาหารโมเลกุลเล็กลงถูกดูดซึมไปใช้ประโยชน์ได้อย่างต็มที่ (Phillips, 2005) แต่ในทางตรงกันข้ามถ้าได้สารอาหารที่ไม่เหมาะสม หรือมีการย่อยและการดูดซึมไม่ดีก็จะเจริญเติบโตช้า และทำให้เกิดมลภาวะในบ่อมากขึ้น (Semmens and Miller, 2002)

ระบบการย่อยอาหารปลาแต่ละชนิด มีความแตกต่างกันทางด้านกายวิภาคหรือสรีรวิทยา ขึ้นอยู่กับพฤติกรรมการกินอาหารเช่น ปลากินพืช ปลากินพืชและเนื้อ และปลากินเนื้อ โดยทั่วไป ระบบการย่อยอาหารของสัตว์น้ำจะประกอบด้วยส่วนประกอบที่สำคัญเหมือนกันได้แก่ ท่อทางเดินอาหาร (digestive tract) อวัยวะช่วยย่อยอาหาร (accessory gland) ซึ่งได้แก่ ตับ ตับอ่อน และถุงน้ำดี และเอนไซม์ย่อยอาหาร (digestive enzyme) อาหารที่ปลากินเข้าไปในปากเมื่อถูกบด หรือกลืนผ่านหลอดอาหารลงไปยังกระเพาะอาหารและลำไส้ จะถูกย่อยให้มีขนาดเล็กลงโดยอาศัยเอนไซม์สำหรับย่อยอาหารที่หลั่งมาจากท่อทางเดินอาหาร ตับ ตับอ่อน และถุงน้ำดี ในการทำหน้าที่ร่วมกันเพื่อย่อยโปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไขมัน จากนั้นสารอาหารที่มีขนาดเล็กลงจะถูกดูดซึมผ่านผนังของท่อทางเดินอาหารเข้าสู่กระแสเลือดร่วมกับวิตามินและแร่ธาตุเพื่อนำมาใช้ในการดำรงชีพและการเจริญเติบโต โดยโปรตีนจะถูกย่อยเป็นกรดอะมิโน ส่วนไขมันจะถูกย่อยเป็นกรดไขมัน และกลีเซอรีน และคาร์โบไฮเดรตถูกย่อยเป็นน้ำตาล ขบวนการเหล่านี้จำเป็นต้องมีเอนไซม์ย่อยอาหารหรือน้ำย่อยมาทำหน้าที่ย่อยอาหารให้อาหารมีขนาดเล็กลงเพื่อนำไปเผาผลาญให้ได้พลังงานต่อไป การย่อยอาหารของปลาจะเกิดขึ้นที่กระเพาะอาหาร หรือลำไส้เท่านั้น เนื่องจากมีเอนไซม์ย่อยอาหารอยู่หลายชนิด การศึกษาด้านระบบย่อยอาหารของปลาทำให้ทราบถึงพฤติกรรมการกินอาหารของปลา ระยะเวลาที่อาหารหมดจากกระเพาะอาหาร และประสิทธิภาพการย่อยอาหาร ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการผลิตอาหารปลา และการให้อาหารปลา (วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2535)

เอนไซม์ย่อยอาหารหรือน้ำย่อยที่พบทั่วไป ได้แก่ เอนไซม์ย่อยโปรตีน (proteinases) เอนไซม์ย่อยไขมัน (lipases) และเอนไซม์ย่อยคาร์โบไฮเดรต (carbohydrases) ซึ่งการทำงานหรือกิจกรรมของเอนไซม์ (digestive enzyme activity) เหล่านี้จะมีประสิทธิภาพแตกต่างกันในปลาแต่ละชนิด การย่อยอาหารโปรตีนเริ่มต้นที่กระเพาะอาหาร โดยใช้น้ำย่อยที่ชื่อ เปปซิน (pepsin) ซึ่งเปลี่ยนแปลงมาจากเปปซิโนเจน (pepsinogen) ด้วยกรดเกลือ เปปซินจะย่อยโปรตีนให้เปลี่ยนไปโดยพันธะเปปไทด์จะแตกออกสั้นบ้างยาวบ้าง เรียกสายต่างๆ นั้นว่า โปรติโอส (proteose) ซึ่งจะเคลื่อนที่ลงต่อไปในลำไส้ ในลำไส้จะมีเอนไซม์ที่ชื่อว่า ทริปซิน (trypsin) ซึ่งเปลี่ยนมาจาก ทริปซิโนเจน (trypsinogen) ซึ่งสร้างโดยตับอ่อน ททริปซินจะย่อยโปรติโอสให้มีขนาดสั้นลง จนเป็นเปปโตน (peptone) หรือ โพลีเปปไทด์ (polypeptide) จากนั้นก็จะมีน้ำย่อยจากผนังลำไส้เล็กในกลุ่มอะมิโนเปปติเดส (aminopeptidase) ย่อยเปปโตนและโพลีเปปไทด์ให้เป็นไตรเปปไทด์ (tripeptide) ไดเปปไทด์ (dipeptide) จนในที่สุดเป็นกรดอะมิโน ซึ่งเป็นอนุภาคที่เล็กที่สุดที่ร่างกายสามารถดูดซึมไปใช้ได้ นำไปใช้ในการซ่อมแซมส่วนที่สึกหรอของร่างกาย ช่วยในการเจริญเติบโตและใช้ในระบบสืบพันธุ์ ซึ่งต่อมากรดอะมิโนที่เหลือจากการนำไปสร้างสารต่างๆในร่างกาย จะถูกกำจัดออกนอกร่างกายโดยถูกขับออกมากับปัสสาวะ (Halver and Hardy, 2003) นอกจากนี้ยังมีสารที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบที่ถูกขับออกมากับปัสสาวะ เช่นกรดยูริก (uric acid) ครีเอตินีน (creatinine) ส่วนโครงคาร์บอนของกรดอะมิโนจะถูกออกซิไดซ์เป็นพลังงาน (กล่าวขวัญ แสงสมบัติ, 2544)

เอนไซม์ย่อยโปรตีนพบได้ทั้งในกระเพาะอาหารและลำไส้ เช่นเปปซิน (pepsin) ซึ่งเป็นเอนไซม์ย่อยโปรตีนในกระเพาะอาหารของปลามีประสิทธิภาพในการย่อยโปรตีนได้ดีในสภาพที่เป็นกรดดังเช่นในสัตว์มีกระดูกสันหลังทั่วไป กระเพาะอาหารจะหลั่งกรดเกลือออกมาโดยเกิดจากปฏิกิริยาของกรดคาร์บอนิค และโซเดียมคลอไรด์ที่ถูกลำเลียงมายังผนังกระเพาะอาหารได้เป็นกรดเกลือ และโมโนโซเดียมคาร์บอเนต ในขณะที่ปลายังไม่กินอาหารก็จะยังไม่หลั่งกรดเกลือออกมาทำให้กระเพาะอาหารมีสภาพเป็นกลาง แต่เมื่อปลากินอาหารก็จะมีการหลั่งกรดเกลือออกมาทำให้กระเพาะอาหารมีสภาพเป็นกรดอย่างรวดเร็ว เช่น ปลาหมอเทศ และปลานิลจะมีพีเอช (pH) ลดลงเป็น 1.25-1.5 และ 1.4-1.6 ตามลำดับ และเมื่อเสร็จสิ้นการย่อยอาหารก็จะมีสภาพเป็นกลางดังเดิม ปลากินเนื้อจะมีประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์เปปซินมากกว่าปลากินพืช ดังเช่น การเปรียบเทียบปลาหมอเทศซึ่งกินแพลงก์ตอนกับปลากินเนื้อ 3 ชนิด พบว่า การทำงานของเปปซินปลาหมอเทศ : ปลาช่อนฟอร์โมซาน : ปลาไหลญี่ปุ่น : ปลาดุกฟอร์โมซาน มีค่าเป็น 1.0 : 27.1 : 10.5 : 8.5 ตามลำดับ ปลานิลสามารถย่อยผนังเซลล์ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ซึ่งมีเพคติน (pectin) เป็นองค์ประกอบให้แตกออกโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์เพคติเนสเตอเรส (pectinesterase) และโพลีกาแลคตูโรเนส (polygalacturonases) ที่หลั่งออกมาในกระเพาะอาหาร

เอนไซม์ย่อยโปรตีนที่พบในลำไส้จะมีอยู่หลายชนิด แต่ส่วนใหญ่แล้วได้มาจากการหลั่งของผนังลำไส้และตับอ่อน และส่วนน้อยได้มาจากการหลั่งของตับ ม้าม ถุงน้ำดี และเนื้อเยื่อเกี่ยวพันบริเวณลำไส้ น้ำย่อยดังกล่าวที่พบมีหลายชนิด ได้แก่ ทริปซิน (trypsin) ไคโมทริปซิน (chymotrypsin) คาร์บอกซีเปปติเดส (carboxygpeptidase) และอิลาสเตส (elastase) โดยทั่วไปลำไส้ปลาส่วนมากจะมีพีเอชอยู่ในช่วง 7-9 และเมื่อมีการย่อยอาหารจะมีพีเอชเพิ่มขึ้นเล็กน้อยและพบว่าการเปลี่ยนแปลงพีเอชบริเวณมิดกัท (midgut) จะมีมากกว่าฮายกัท (hindgut) เนื่องจากมิดกัทเป็นบริเวณที่มีการผสมรวมกันระหว่างอาหารจากกระเพาะอาหารที่มีฤทธิ์เป็นกรดกับเอนไซม์ในลำไส้ที่มีฤทธิ์เป็นด่าง สำหรับปลาที่ไม่มีกระเพาะอาหารจะไม่มีการหลั่งกรดเกลือออกมาแต่จะมีการย่อยโปรตีนเกิดขึ้นในลำไส้เท่านั้น (วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2535)

2.3 การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ในปลา

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับความต้องการอาหารของสัตว์น้ำ และการศึกษาด้าน enzyme activity, *in vitro* digestibility ในอาหารสัตว์น้ำได้มีการศึกษาในประเทศและต่างประเทศมีพอสรุปได้ดังนี้

Walford and Lam (1993) ศึกษาพัฒนาการของทางเดินอาหารและแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยโปรตีนของปลากะพงขาวระยะ larvae และระยะ juvenile พบว่ากระเพาะอาหารและกล้ามเนื้อหูรูด (pyrolic sphincter) ยังไม่ก่อตัวจนกระทั่งอายุ 13 วันหลังจากฟักออกจากไข่ และจะสมบูรณ์เมื่ออายุได้ 17 วัน เช่นเดียวกันกับดุสิต ตันวิไลยและคณะ (2528) ได้ทำการศึกษาการพัฒนาการของลูกปลากะพงขาววัยอ่อนพบว่าเมื่อลูกปลากะพงขาวเข้าสู่ระยะ flexure ทางเดินอาหารจะพัฒนาควบคู่ไปกับอวัยวะอื่นๆ การพัฒนาของทางเดินอาหารจะเป็นไปอย่างสม่ำเสมอ

ในการศึกษาขั้นต่อมาคือการศึกษาด้านการทำงานและคุณสมบัติของเอนไซม์ย่อยโปรตีน โดย Bassompierre et al. (1998) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการย่อยโปรตีนในหลอดทดลองและการเจริญเติบโตของปลา Atlantic salmon ที่มีความแตกต่างกันของ trypsin isozyme พบว่ามีรูปแบบของ iso-trypsin 3 รูปแบบคือ รูปแบบ 1, รูปแบบ 2 และ รูปแบบ 2’ ซึ่งปลา salmon ที่มีรูปแบบ

เป็น 2’ จะมีอัตราการเติบโตจำเพาะน้อยกว่าแบบที่ 1 และ 2 ส่วนการย่อยโปรตีนในหลอดทดลองโดยใช้เนื้อปลาป่น 3 คุณภาพ คือ คุณภาพสูง กลาง และต่ำตามลำดับพบว่าในรูปแบบที่ 1 สามารถย่อยเนื้อปลาป่นที่มีคุณภาพสูงมากที่สุด รองลงมาก็เป็นเนื้อปลาป่นคุณภาพกลางและเล็กตามลำดับ ส่วนในรูปแบบ 2 และ 2’ ไม่สามารถแบ่งได้อย่างชัดเจน

ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์น้ำพบว่าที่อวัยวะต่างกันจะมีสัดส่วนของเอนไซม์ย่อยอาหารคล้ายๆกัน โดย Torrissen (1984) ได้ทำการศึกษาการทำงานและคุณสมบัติของโปรติเอสในทางเดินอาหารของปลา Atlantic salmon และปลา rainbow trout พบว่าคุณสมบัติของเอนไซม์ที่แยกได้จากกระเพาะอาหารของปลา 2 ชนิดจะมีลักษณะคล้ายคลึงกัน และจากลำไส้เล็กก็จะคล้ายคลึงกัน ด้วยแต่คุณสมบัติของเอนไซม์ในปลาชนิดเดียวกันที่สกัดได้จากกระเพาะอาหารจะแตกต่างกันไปจากที่สกัดได้จากลำไส้เล็ก สอดคล้องกับการศึกษาของอัญชลี คงสมบูรณ์ (2530) ซึ่งได้ศึกษารูปแบบเอนไซม์ในทางเดินอาหารของลูกปลากะพงขาวซึ่งเลี้ยงด้วยอาหารต่างชนิดกันโดยศึกษารูปแบบการพัฒนาการผลิตเอนไซม์ย่อยอาหาร(ไคติเนส ทริปซิน เปปซิน และอะไมเลส) ในทางเดินอาหาร 3 ส่วน คือ กระเพาะอาหาร(หลอดอาหาร-กระเพาะอาหาร) ลำไส้(ไส้ติ่ง-ทวารหนัก) และส่วนของทางเดินอาหารทั้งหมด(หลอดอาหาร-ทวารหนัก) พบว่า เอนไซม์ไคติเนสทำงานได้ดีที่สุดที่ pH 4.5-5.5 และมีรูปแบบการสังเคราะห์เอนไซม์คล้ายคลึงกันในทุกส่วนของทางเดินอาหารและไม่สัมพันธ์กับอายุของลูกปลา ส่วนทริปซินจะตรวจพบแอคติวิตีได้ในส่วนของลำไส้เท่านั้นและทำงานได้ดีที่ pH 8-9 โดยมีรูปแบบการพัฒนาของเอนไซม์สัมพันธ์กับการเจริญเติบโตและความเข้มข้นของโปรตีนในทางเดินอาหาร จะพบเปปซินแอคติวิตีได้ทั้ง 2 ส่วนของทางเดินอาหาร แต่จะมีค่าสูงที่บริเวณกระเพาะอาหาร ส่วนเอนไซม์อะไมเลสไม่สามารถตรวจพบแอคติวิตีได้เลยในทุกส่วนของทางเดินอาหารตลอดระยะเวลาทำการทดลอง ปัจจัยต่างๆทั้งจากอายุ อิทธิพลจากสิ่งแวดล้อมและพฤติกรรมการกินอาหาร จะมีผลต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยอาหารของสัตว์น้ำดังเช่น Kuz’mina (1996) ทำการศึกษาอิทธิพลของอายุต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยอาหารของปลาน้ำจืด พบว่าคาร์โบไฮเดรสแอคติวิตีจะมีความผันแปรมากกว่าแอคติวิตีของโปรติเอส และอัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ตามอายุที่เปลี่ยนไป การเปลี่ยนแปลงนี้จะเกี่ยวข้องกับพฤติกรรม การกินอาหารของปลา โดยปลาที่ล่าเหยื่อจะมีแอคติวิตีของ amylase และ sucrase ลดลงแต่จะมีแอคติวิตีของ protease เพิ่มขึ้น และมีการศึกษาเกี่ยวกับเอนไซม์ย่อยอาหารในลูกปลาระยะ larvae และระยะ juvenile การเปลี่ยนระดับของโปรตีนในอาหารก็มีผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยอาหารในสัตว์น้ำเช่นในกุ้ง *Penaeus vannamei* ซึ่ง Moullac et al. (1997) ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ย่อยอาหารจำพวกโปรตีน โดยดูจากระดับของแอคติวิตีของเอนไซม์ โดยการเพิ่มระดับเคซีนจาก 25 เปอร์เซ็นต์ ไปเป็น 48 เปอร์เซ็นต์ ส่วนแป้งและส่วนประกอบอื่นๆจะไม่เพิ่มขึ้นพบว่าแอคติวิตีของไคโมทริปซินจะมีการเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้น แอคติวิตีของอะไมเลสจะลดลงเมื่อปริมาณเคซีนเพิ่มขึ้น ในการทดลองชุดเดียวกันนี้ยังมีการเปรียบเทียบแอคติวิตีของไคโมทริปซินโดยใช้โปรตีนจากเจลาติน เนื้อปลาหมึกและเนื้อปลาพบว่าแอคติวิตีสูงสุดของไคโมทริปซินจะอยู่ที่ปลาหมึกและน้อยสุดในเจลาติน วิชัย วัฒนกุลและคณะ (2540) ได้ทำการศึกษาการพัฒนาน้ำย่อยในลูกปลากะรังวัยอ่อน *Epinephelus coioides* ที่มีอายุ 2- 60 วันโดยใช้อาร์ทีเมีย โรติเฟอร์และเนื้อปลาสดเป็นอาหารพบว่าน้ำย่อย trypsin, chymotrypsin, carboxypeptidase A และ alpha amylase สามารถตรวจวัดได้เมื่อลูกปลามีอายุได้ 2 วัน ส่วน pepsin เริ่มตรวจวัดได้เมื่อลูกปลาอายุ 8 วัน ส่วนความว่องไวจำเพาะ (specific activity) ของน้ำย่อยในลูกปลาที่มีอายุ 2-22 วันไม่ได้มีการเปลี่ยนแปลงตามการเจริญเติบโต เมื่อลูก

ปลามีอายุมากกว่า 30 วันจะมีความไวจำเพาะของน้ำย่อยเพิ่มขึ้นตามการเจริญเติบโต เมื่อลูกปลามีอายุได้ 38 วันความว่องไวจำเพาะของน้ำย่อยทั้ง 5 ชนิดมีค่าเพิ่มขึ้น 2.4-132.5 เท่าของความว่องไวจำเพาะที่วัดเมื่อลูกปลาอายุ 2 วัน นอกจากที่กล่าวมาแล้วยังมีการประยุกต์การศึกษาทางด้านเอนไซม์ย่อยอาหาร เช่น การศึกษาเกี่ยวกับวิธีการพื้นฐานในการวัดประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนในหลอดหลอดทดลองโดยศึกษาในเอนไซม์ย่อยอาหารที่สกัดออกมาจากระบบทางเดินอาหารของปลาคาร์พมาเปรียบเทียบกับประสิทธิภาพการย่อยอาหารจากวิธีใช้อินดิเคเตอร์พบว่าประสิทธิภาพการย่อยอาหารทั้งแบบย่อยในหลอดแก้วและแบบในตัวปลาจะมีค่าและแนวโน้มที่ใกล้เคียงกัน (Eid and Matty, 1989)

ธัชนนท์ พุ่มโภคัย และ สมเกียรติ ปิยะธีรธิติวรกุล (2552) ทดลองเลี้ยงปลากะพงขาวด้วยอาหารเม็ดที่มีระดับของบริวเวอร์ยีสต์ 1% และ 2% และนิวคลีโอไทด์ 1% และ 2% เปรียบเทียบกับอาหารควบคุมโดยใช้ปลากะพงขาวน้ำหนักเฉลี่ย 0.43 กรัม ความยาวเฉลี่ย 2.95 เซนติเมตร เลี้ยงในกระชังขนาด 35x60x70 เซนติเมตร กระชังละ 30 ตัว จำนวนทั้งหมด 20 กระชัง แบ่งเป็น 5 ชุดการทดลองที่มี4 ซ้ำการทดลอง อาหารที่ศึกษามีโปรตีน 39% ไขมัน 9% และมีค่าพลังงาน 3.9 กิโลแคลอรีต่อกรัม เมื่อทดลองเลี้ยงปลากะพงขาวเป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์ พบว่า น้ำหนักเฉลี่ยและอัตราการแลกเนื้อของปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร 2% บริวเวอร์ยีสต์สูงกว่าการเลี้ยงด้วยนิวคลีโอไทด์และอาหารสูตรควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ *(P<0.05)* ผลของน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นในปลาที่เลี้ยงด้วยบริวเวอร์ยีสต์ทั้ง 1% และ 2% สูงกว่าการเลี้ยงด้วยนิวคลีโอไทด์และอาหารสูตรควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ *(P<0.05)* ในขณะที่อัตรารอดของปลาที่เลี้ยงด้วย 1% บริวเวอร์ยีสต์มีค่าสูงที่สุดเมื่อเทียบกับการทดลองอื่น

สุพัตร์ ศรีพัฒน์ และคณะ (2551) ศึกษาการใช้ยีสต์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของอาหารกุ้งก้ามกรามใช้อาหารเสริมยีสต์ 0, 2, 4 และ 6% อาหารทดลองมีโปรตีนในอาหาร 35% และพลังงานรวม (gross energy, GE) ประมาณ 450 กิโลแคลอรีต่ออาหาร 100 กรัม เท่ากัน ผลการทดลองพบว่ากุ้งก้ามกรามที่เลี้ยงด้วยอาหารที่เสริมยีสต์ 4% มีค่าดีที่สุดในด้านน้ำหนักสุดท้าย (9.51 กรัม) น้ำหนักเพิ่มต่อวัน (84.05 มิลลิกรัมต่อตัวต่อวัน) เปอร์เซ็นต์น้ำหนักเพิ่ม (648.56%) อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (2.05%ต่อวัน) ประสิทธิภาพของโปรตีน(1.80) ประสิทธิภาพของอาหาร (0.63) ปริมาณอาหารที่กิน (12.85 กรัมต่อตัว) และปริมาณโปรตีนที่กิน (4.88 กรัมต่อตัว) และมีค่าดีกว่ากุ้งก้ามกรามที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมยีสต์ 0, 2 และ 6% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ส่วนโปรตีนที่เพิ่มขึ้น (50.62%) และอัตราแลกเนื้อ (1.60) ของกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารที่เสริมยีสต์ 4% มีค่าดีกว่าชุดการทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารที่เสริมยีสต์ 0 และ 2% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ด้านอัตรารอดพบว่ากุ้งทุกชุดการทดลองมีค่าแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) จากการทดลองสามารถสรุปได้ว่าการเสริมยีสต์ 4% ในอาหารเป็นระดับเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของกุ้งก้ามกราม

Bishop *et al*. (1995) ศึกษาการใช้ขนไก่ป่นแทนปลาป่นในสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงลูกปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ในปริมาณ 0 33 66 และ100 เปอร์เซ็นต์ ลูกปลาเริ่มการทดลองน้ำหนัก 12.3 กรัม ทำการทดลอง 42 วัน พบว่าอัตราการรอดของลูกปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารทั้ง 4 สูตรไม่แตกต่างกัน แต่การใช้ปริมาณขนไก่ป่นแทนปลาป่นสูงถึง 66 เปอร์เซ็นต์ ทำให้การเจริญเติบโตของลูกปลานิลเป็นไปได้ไม่ดี และการใช้ขนไก่ป่น 100 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ปลามีน้ำหนักน้อยซึ่งส่งผลถึงการเจริญเติบโต

Boonyaratpalin et al. (1998) ศึกษาการใช้ผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลืองในแบบต่างๆ มาใช้แทนที่ปลาป่นในสูตรอาหารของปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*) เป็นเวลา 10 สัปดาห์ พบว่าในอาหารของปลากะพงขาวสามารถใช้กากถั่วหลืองสกัดน้ำมัน (solvent extracted SBM) ถั่วเหลืองเอ็กซ์ทรูด (extruded full-fat SBM) และถั่วเหลืองสตรีม (steamed full-fat SBM) แทนโปรตีนจากปลาป่นได้ 37.5 เปอร์เซ็นต์

Olvera-Novoa et al. (1997) ศึกษาการใช้โปรตีนจากถั่วพุ่ม (Cowpea protein concentrate) เป็นส่วนประกอบของโปรตีนแทนปลาป่นในอาหารของปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ระยะ fry ทำการทดลอง 9 สัปดาห์ เพื่อดูการเจริญเติบโต อัตราการรอด และประสิทธิภาพการใช้อาหาร พบว่าชุดที่มีการแทนที่ปลาป่นด้วยถั่วพุ่ม 20-30 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุด ขณะที่ประสิทธิภาพการใช้อาหารดีที่สุดในการแทนปลาป่น 40 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณถั่วพุ่มในอาหารไม่มีความสัมพันธ์กับอัตราการรอด

Deng et al. (2006) ศึกษาการเจริญเติบโตและการกินอาหารของปลา Japanese flounder (*Paralichthys oliaceus*) ระยะ juvenile โดยใช้โปรตีนถั่วเหลือง (soy protein concentrate) แทนที่ปลาป่นในสูตรอาหาร 6 สูตรที่ 0 25 50 75 87.5 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ทำการเลี้ยงเป็นเวลา 9 สัปดาห์ พบว่ากลุ่มปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรที่มีการแทนที่ปลาป่น 0 และ 25 เปอร์เซ็นต์ มีการกินอาหารสูงกว่าปลากลุ่มอื่น และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะลดลงเมื่อในสูตรอาหารมีโปรตีนถั่วเหลืองเพิ่มขึ้น แต่โปรตีนถั่วเหลืองก็ยังไม่สามารถนำมาทดแทนปลาป่นได้ เนื่องจากทำให้ปลากินอาหารได้น้อยลง และมีความไม่สมดุลของกรดอะมิโน

Gomes et al. (1994) ศึกษาการใช้วัตถุดิบประเภทโปรตีนจากพืชที่ให้พลังงานและโปรตีนใกล้เคียงกัน คือ ถั่วเหลืองอบ คอร์น กลูเตน มีล และกากถั่วเหลือง มาผสมกันแล้วให้แทนที่ปลาป่นลงในสูตรอาหารปลา rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) 4 สูตร ในปริมาณ 0 33 66 และ 100 เปอร์เซ็นต์ พบว่าสามารถใช้โปรตีนจากพืชแทนปลาป่นได้ถึง 66 เปอร์เซ็นต์ โดยไม่ส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของปลา rainbow trout

Kaushik et. al. (2003) ศึกษาการใช้แหล่งโปรตีนจากพืชแทนปลาป่นในสูตรอาหารปลากะพงยุโรป (*Dicentrarchus labrax*) โดยลดปริมาณปลาป่นลงตั้งแต่ 100 เปอร์เซ็นต์ จนถึง 2 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ปลาเริ่มทดลองหนัก 190 กรัม ทำการเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่าการใช้โปรตีนจากพืชเป็นส่วนประกอบแทนปลาป่นในสูตรอาหารปริมาณสูงนั้น ไม่ส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโต หรือการใช้ประโยชน์จากไนโตรเจนของปลากะพงยุโรป

บทที่ 3
วิธีดำเนินงานวิจัย

วัสดุอุปกรณ์ และสารเคมี

1. วัสดุอุปกรณ์การเก็บตัวอย่าง
   - ปากคีบ
   - กรรไกร
   - ถาด
   - Eppendorf tube
   - ตู้แช่ -80 องศาเซลเซียส (Refrigerator)
   - น้ำแข็ง
   - กล่องโฟม (Styrofoam box)
2. วัสดุอุปกรณ์สำหรับการสกัดเอนไซม์
   - เครื่องแมกเนติกสเปกโตรโฟโตรมิเตอร์ (Magnetic Spectrophotometer)
   - เครื่องเหวี่ยงตกตะกอนควบคุมอุณหภูมิ (Centrifuge)
   - ตู้แช่ -80 องศาเซลเซียส (Refrigerator)
   - เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH Meter)
   - ไมโครปิเปต (Micropipette) และ pipette tip
   - เครื่องบดเนื้อ (Glass Homogenizer)
   - ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (Incubator)
   - บีกเกอร์ขนาดต่างๆ และกระดาษกรอง
   - ขวดรูปชมพู่ขนาดต่างๆ
   - dialysis tubing (Sigma-Aldrich)
   - เครื่องชั่งแบบทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง
   - เครื่องปั่นผสม (Vortex mixer)
   - Thermometer
   - Water bath
   - Racks
   - Eppendorf tubes
3. <u>สารเคมีที่ใช้ในการศึกษา</u>
   - Tris – HCl
   - NaOH
   - NaCl
   - Benzoyl-L-arginine-p-nitroanilide
   - Dimethylformamide
   - N-succinyl-Ala-Ala-Pro-phe-p-nitroanilide
   - p-nitroaniline
4. ปลานิล และวัสดุอุปกรณ์เลี้ยงปลา เช่น บ่อซิเมนต์ สายอากาศ สวิง อาหารเม็ด

วิธีดำเนินการวิจัย

1. <u>การวางแผนการทดลอง</u> (Experimental design)

ในการที่จะหาวัตถุดิบอาหารสัตว์ที่เหมาะสมที่จะนำมาทดแทนปลาป่นในสูตรอาหารเลี้ยงปลานิล ต้องมีการศึกษาอย่างครบวงจร โดยในเบื้องต้นต้องมีการเตรียมตัวอย่างปลานิล โดยการเลี้ยงปลานิลไว้ในบ่อทดลอง ต่อจากนั้นก็นำตัวอย่างปลานิลมาผ่าตัดเพื่อเอาลำไส้ออกมาเพื่อที่จะนำไปสกัดเอนไซม์ย่อยอาหาร (crude digestive enzyme) เมื่อได้เอนไซม์ย่อยอาหารเสร็จแล้ว นำเอนไซม์ย่อยอาหารไปวัดหาค่ากิจกรรมหรือแอคติวิตี (activity) ของเอนไซม์ทริปซิน (trypsin activity) และไคโมทริปซิน (chymotrypsin activity) สำหรับการวัดประสิทธิภาพการย่อยอาหารในหลอดทดลอง (in vitro) ใช้วัตถุดิบที่เป็นแหล่งโปรตีนจากพืชชนิดต่างๆกัน ที่หาได้ง่ายในท้องถิ่นหรือมีราคาถูก โดยจะมีการสำรวจในพื้นที่ และเมื่อได้แหล่งโปรตีนจากพืชที่เหมาะสมในการย่อยอาหารในหลอดทดลองแล้วจะนำวัตถุดิบอาหารสัตว์เหล่านั้นนั้นไปผสมลงในสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงปลานิล เปรียบเทียบกับสูตรอาหารมาตรฐานที่ใช้เลี้ยงปลานิล โดยทำการประเมินอัตราเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหาร

2. <u>การเลี้ยงปลานิลและการเก็บตัวอย่างลำไส้</u>

นำปลานิลจากฟาร์มเพาะเลี้ยงที่มีอายุประมาณ 30 วัน ประมาณ 500 ตัวได้ถูกรวบรวมใส่ในถุงพลาสติกบรรจุน้ำ และให้ออกซิเจนเต็มที่ ทำการลำเลียงมาใส่ในรถยนต์ที่มีอากาศถ่ายเทและไม่ร้อนเพื่อนำมาพักในบ่อซีเมนต์ขนาด 1x2x1 เมตร ของโรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ภาควิชาวาริชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา แล้วให้ปลากินอาหารเม็ดที่มีโปรตีน 35% ซึ่งเป็นอาหารเม็ดชนิดลอยน้ำ ทุกๆวัน วันละ 2 เวลา เช้าและเย็น ให้อาหารปลาในอัตราประมาณ 5% น้ำหนักตัว/วัน โดยหลังจากให้อาหารแล้วประมาณ 120 นาที ใช้สวิงตักเศษอาหารที่เหลือออก โดยทำการดูดตะกอนที่พื้นบ่อออกในช่วงเย็นเพื่อป้องกันการเน่าเสียของน้ำ ทำการเปลี่ยนน้ำทุกๆ 1-2 วันโดยอุปกรณ์ที่ใช้ในการจับปลาทำการฆ่าเชื้อด้วยคลอรอกซ์ก่อนนำมาใช้จับปลา การเลี้ยงปลานิลได้ถูกเลี้ยงในบ่อซีเมนต์ด้วยอาหารชนิดเดียวกันจนปลาอายุได้ 150 วัน และทำการสุ่มปลานิลออกจากบ่อซีเมนต์ทุกๆ 15 วันเพื่อรวบรวมเอาลำไส้ไปใช้ในการทดลองต่อไป

การเก็บตัวอย่างลำไส้ของปลานิลทุกๆ 15 วัน ดำเนินการหลังจากการให้อาหารปลาเสร็จสิ้นประมาณ 90 นาที ใช้สวิงสุ่มจับปลาแต่ละช่วงอายุออกมาจากบ่อซีเมนต์แล้วนำไปใส่ในถังน้ำพลาสติกที่มีน้ำมันกานพลูเป็นยาสลบพร้อมกับให้อากาศผ่านหัวทรายลงไปในน้ำ ปล่อยทิ้งไว้ 10-15 นาที จนกระทั่งปลาหลับสนิทไม่เคลื่อนไหว โดยปลาจะหงายท้องและ operculum เคลื่อนที่ช้าลงแล้วนำปลามาแช่ในน้ำแข็งทำการสุ่มเก็บตัวอย่างปลาทดลองด้วยการผ่าท้องปลาเอาลำไส้จากปลาหลายตัว (pooled samples) เพื่อนำไปศึกษากิจกรรมด้านเอนไซม์ต่อไป โดยเมื่อปลามีขนาดใหญ่ขึ้นจะใช้ปลาในจำนวนที่น้อยลงเพื่อรวบรวมตัวอย่างลำไส้ให้ได้ในปริมาณที่ต้องการ ลำไส้ของปลาแต่ละชุดการทดลองถูกนำมาใส่ไว้ใน eppendorf tube แล้วนำไปเก็บรักษาในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3. <u>การเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษากิจกรรมเอนไซม์ย่อยอาหารของปลานิล</u>

นำเอาลำไส้ของปลานิลที่มีอายุ 45, 60, 75, 90, 105, 120, 135 และ 150 วัน โดยปลาตัวเล็กถูกรวบรวมมาครั้งละ 20 ตัวแต่ปลาตัวใหญ่ขึ้นถูกรวบรวมครั้งละ 5 ตัว เพื่อนำมาสกัดเอาเอนไซม์

ย่อยอาหารที่อยู่ภายในลำไส้มาประเมินกิจกรรมเอนไซม์ (enzyme activity) ตามวิธีการของ Rungruangsak-Torrisen *et al*. (2002) การนำตัวอย่างปลาไปรวบรวมลำไส้ในแต่ละครั้ง ได้ดำเนินการชั่งน้ำหนักและวัดความยาวของปลาก่อนการรวบรวมลำไส้ การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ทริปซินวัดจากการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง 1.25 mM benzoyl-L-arginine-p-nitroanilide และเอนไซม์ที่สกัดไว้แล้ว การประเมินทริปซินแอคติวิตี (trypsin activity) ทราบจากอัตราของการผลิตของ p-nitroaniline ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตรต่อความเข้มข้นของโปรตีนในเอนไซม์ย่อยอาหาร โดยความเข้มข้นของโปรตีนในเอนไซม์ย่อยอาหารที่สกัดจากทางเดินอาหารของปลานิลทราบโดยใช้วิธี Bio-Rad DC protein assay การวัดแอคติวิตีของทริปซินทดสอบที่อุณภูมิ 30-70 องศาเซลเซียส เพื่อทราบอุณหภูมิที่เหมาะสมในการศึกษาแอคติวิตีของทริปซิน แอคติวิตีของไคโมทริปซิน (chymotrypsin activity) ทราบจากการประเมินปฏิกิริยาระหว่าง 0.1 mM N-succinyl-Ala-Ala-Pro-phe-p-nitroanilide และเอนไซม์ที่สกัดไว้แล้ว การวัดแอคติวิตีของไคโมทริปซินทดสอบที่อุณหภูมิ 20-60 องศาเซลเซียส เพื่อทราบอุณหภูมิที่เหมาะสมในการศึกษาแอคติวิตีของไคโมทริปซิน

การสกัดเอาเอนไซม์ย่อยอาหารออกมาจากปลานิลขนาดเล็กและปลานิลที่โตขึ้นมา ทำการผ่าตัดเอาลำไส้ออกมาโดยทำการผ่าหลังจากการให้อาหารปลาไปได้ประมาณ 90 นาทีแล้วนำมาสกัดเอาเอนไซม์ย่อยอาหารออกมาทันที ในกรณีที่ยังไม่สกัดเอาเอนไซม์ออกมาได้นำลำไส้ไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสเพื่อรักษาสภาพของเอนไซม์ย่อยอาหารก่อนที่จะนำไปสกัดหาเอนไซม์อีกต่อไป (Rungruangsak-Torrisen et al., 2002)

การสกัดเอนไซม์ทำโดยนำเอาลำไส้ของปลานิลหลายตัว (pooled samples) ที่ทำการผ่าแล้วมาบดใน glass homogenizer ด้วย 50 mM Tris-buffer pH 8.0 ที่มี 200 mM NaCl ในอัตราส่วน 1:3 (น้ำหนัก/ปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อทำการบดละเอียดแล้วให้นำไปเข้าเครื่องเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 60 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นดูดเอาส่วนที่เป็นของเหลวด้านบนออกมาโดยระวังไม่ให้ดูดเอาส่วนที่เป็นไขมันที่ลอยอยู่ข้างบนออกมาด้วย โดยนำเอนไซม์สกัดที่ได้ไปทำการไดอะไลซิส (dialysis) ใน phosphate buffer pH 7.0 ด้วยการใช้ถุงไดอะไลซิสขนาด 10 KDal เมื่อได้เอนไซม์สกัดออกมาแล้วจึงนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำไปใช้ในการหาแอคติวิตีของทริปซินและไคโมทริปซิน และ/หรือศึกษาประสิทธิภาพการย่อยวัตถุดิบในหลอดทดลองต่อไป (Rungruangsak-Torrisen และคณะ, 2002)

การทำไดอะไลซิส (dialysis) เริ่มจากการเตรียม dialysis tubing ที่ใช้ทำจาก cellulose membrane ด้วยการตัดท่อ dialysis tubing ออกเป็นชิ้นให้ยาวเพียงพอในการบรรจุเอนไซม์สกัดที่จะนำมาแยกโมเลกุลและให้เหลือพื้นที่ที่เพียงพอสำหรับปิดผนึก นำท่อที่เตรียมขึ้นมามาใส่ลงในบีกเกอร์ที่บรรจุไปด้วย 100 mM $NaHCO_3$ และ 10 mM EDTA pH 7.0 จึงนำบีกเกอร์ไปตั้งบน hot plate และต้มจนสารละลายเดือดประมาณ 5 นาที รินสารละลายออกและล้าง dialysis tube โดยการแช่ในน้ำกลั่น ประมาณ 10 นาที ทำซ้ำอย่างน้อย 4 ครั้ง

การนำเอา dialysis tube ที่เตรียมเสร็จไปใช้ ทำโดยปิดปลายด้านหนึ่งของท่อ dialysis tube ให้แน่น เติมเอนไซม์สกัดที่ใช้ในการทดลองที่ได้จากปลาอายุต่างๆกันลงไป และปิดปลายด้านที่เปิดของท่อ โดยพยายามปิดปลายท่อให้ใกล้กับสารละลายโปรตีน แต่ควรให้มีช่องว่างเล็กน้อยสำหรับการขยายตัวของสารละลาย จากนั้นนำถุง dialysis ใส่ในบีกเกอร์ที่มีสารละลาย phosphate buffer

pH 7.8 นำบีกเกอร์ไปตั้งไว้ในตู้ที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส และคนสารละลายอย่างช้าๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเปลี่ยนสารละลายในบีกเกอร์ทุกๆ 6 ชั่วโมง

4. <u>การวัดแอคติวิตีของทริปซิน</u> (trypsin activity)

ในการวัดแอคติวิตีของทริปซิน วัดจากการเกิดปฏิกิริยาระหว่างทริปซินสับสเตรต 1,000 ไมโครลิตร (1.25 mM benzoyl-L-arginine-p-nitroanilide ละลายใน 0.2 M Tris-HCl buffer pH 8.4 โดยมี 5% dimethylformamide) และเอนไซม์ที่สกัดไว้แล้ว (crude enzyme) จากปลานิลอายุ 45 วัน โดยนำเอนไซม์สกัด 10 ไมโครลิตรมาใส่ในคิวเวตต์ก่อนแล้วเททริปซินสับสเตรตผสมลงไปในคิวเวตต์ที่ควบคุมอุณหภูมิตามที่กำหนดต่างๆกัน (30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 และ 70 องศาเซลเซียส) หลังจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่นแสง 410 nm โดยอ่านค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ทุก 5 วินาที นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาพล็อตกราฟเพื่อหาความชัน (slope) นำค่าความชันที่ได้มาเทียบกราฟมาตรฐานของ p-nitroaniline เพื่อหาค่า p-nitroaniline แล้วนำค่าที่ได้ไปคำนวนหาค่า trypsin activity (p-nitroaniline/h/ml) ต่อไป (μmol p-nitroaniline produced h^{-1} mg $protein^{-1}$) การประเมินแอคติวิตีของทริปซินของปลานิลได้ทำทุกๆ 15 วันโดยการสุ่มปลาเพื่อรวบรวมลำไส้ โดยนำเอนไซม์สกัดมาประเมินแอคติวิตีของทริปซินเมื่อปลาอายุ 60, 75, 90, 105, 120, 135 และ 150 วัน โดยทดสอบที่อุณหภูมิต่างๆกันตามที่กล่าวมาแล้ว

ทริปซินแอคติวิตี (แสดงผลเป็น μmol p-nitroanilide h^{-1} mg protein $^{-1}$) โดยพิจารณาจากอัตราของการผลิตของ p-nitroaniline ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตรต่อความเข้มข้นของโปรตีนในเอนไซม์ย่อยอาหาร โดยความเข้มข้นของโปรตีนในเอนไซม์ย่อยอาหารที่สกัดจากทางเดินอาหารของปลานิลใช้วิธี Bio-Rad DC(detergent-compatible) protein assay (Rungruangsak-Torrisen และคณะ, 2002) ในการวัดแอคติวิตีของทริปซินทำการวัดแอคติวิตีของคิวเวตต์ที่อุณหภูมิ 30-70 องศาเซลเซียส เพื่อประเมินอุณหภูมิที่เหมาะสมในการประเมินแอคติวิตีของทริปซิน โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

5. <u>การวัดแอคติวิตีของไคโมทริปซิน</u> (chymotrypsin activity)

แอคติวิตีของไคโมทริปซินใช้หลักการเดียวกับการศึกษาแอคติวิตีของทริปซิน เพียงแต่เปลี่ยน substrate โดยการวัดแอคติวิตีของไคโมทริปซิน ทำการศึกษาปฏิกิริยาระหว่างสับสเตรต (substrate) 0.1 mM N-succinyl-Ala-Ala-Pro-phe-p-nitroanilide ใน 0.2 M Tris-buffer pH 8.4 โดยมี 5% dimethylformamide และเอนไซม์ที่สกัดไว้แล้ว 10 ไมโครลิตร โดยเริ่มจากนำเอนไซม์สกัด (crude enzyme) จากปลานิลอายุ 45 วันในปริมาตร 10 ไมโครลิตร มาใส่ในคิวเวตต์แล้วใส่ substrate ที่มีอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในปริมาตร 1000 ไมโครลิตร ใส่ในคิวเวตต์ที่มีเอนไซม์สกัด ไคโมทริปซินแอคติวิตี (แสดงผลเป็น μmol p-nitroaniline h^{-1} mg protein ^{1}) โดยพิจารณาจากอัตราของการผลิตของ p-nitroaniline ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตรต่อความเข้มข้นของโปรตีนในเอนไซม์ย่อยอาหาร ส่วนความเข้มข้นของโปรตีนในเอนไซม์ย่อยอาหารทำโดยวิธีเดียวกับทริปซิน (Rungruangsak-Torrisen et al., 2002) ในการวัดแอคติวิตีของไคโมทริปซินทำการวัดแอคติวิตีของปลาระหว่างการเลี้ยงปลาทุกๆ 15 วันจนปลาอายุ 150 วัน โดยประเมินแอคติวิตี

ของไคโมทริปซินที่อุณหภูมิ 20-60 องศาเซลเซียส โดยมีระยะห่างช่วงละ 5 องศาตามที่กล่าวมาแล้ว เพื่อทราบอุณหภูมิที่เหมาะสมในการประเมินแอคติวิตีของไคโมทริปซิน โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

6. การวัดปริมาณโปรตีนในเอนไซม์ย่อยอาหารโดยวิธี Bio-Rad DC assay

การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในเอนไซม์สกัด (crude enzyme) ทำโดยปิเปตเอนไซม์ที่สกัด (crude emzyme) จากกระเพาะและลำไส้ของชุดการทดลองต่างๆมาเจือจางในอัตราส่วน 1 ต่อ 50 ภายในสารละลาย 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0 ที่มี 200 mM NaCl ละลายอยู่ จากนั้นทำการปิเปตสารละลายเอนไซม์สกัดที่ถูกเจือจาง 50 ไมโครลิตรออกมาผสมลงใน 250 ไมโครลิตรของสาร reagent A เขย่าให้เข้ากัน แล้วเติมสารละลาย reagent B ลงไปในปริมาณ 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที นำสารละลายไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของโปรตีนโดยใช้ BSA เป็นกราฟมาตรฐานเพื่อได้ค่า protein content (หน่วยเป็น mg/ml) โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

7. วิเคราะห์ผลทางสถิติ

นำข้อมูลของการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ หรือแอคติวิตีของทริปซินและไคโมทริปซินของปลานิล และน้ำหนักและความยาวปลา แสดงออกมาในรูปค่าเฉลี่ย ± ความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean ± SD) มาทำการทดสอบความแตกต่างระหว่างการทดลองด้วย Analysis of Variance (ANOVA) เมื่อมีความแตกต่างระหว่างกลุ่มจึงนำไปวิเคราะห์หาความแตกต่างระหว่างการทดลองด้วย Duncan’s Multiple Range Test โดยใช้โปรแกรม SPSS ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

บทที่ 4
ผลการทดลอง

การทดลองสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ตอนดังนี้

1. การเจริญเติบโตของปลานิล
2. การวัดแอคติวิตีของทริปซิน (trypsin activity) ในปลานิล
3. การวัดแอคติวิตีของไคโมทริปซิน (chymotrypsin activity) ในปลานิล

1. <u>การเจริญเติบโตของปลานิล</u>

การนำปลานิลอายุประมาณ 30 วันมาเลี้ยงในโรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของภาควิชาวาริชศาสตร์ จนมีอายุประมาณ 150 วันด้วยอาหารปลาในบ่อขนาด 1×2×1 เมตร ผลการเจริญเติบโตของปลานิลแสดงในตารางที่ 1 โดยปลาขณะเริ่มการทดลอง (อายุ 30 วัน) มีความยาวเฉลี่ย 4.42 เซนติเมตร และมีน้ำหนักเฉลี่ย 5.85 กรัม แต่เมื่อเริ่มทำการรวบรวมกระเพาะอาหารและลำไส้ในวันที่ 45 ปลามีความยาวเฉลี่ย 5.19 เซนติเมตร และมีน้ำหนักเฉลี่ย 6.55 กรัม และระหว่างการเลี้ยงปลาด้วยอาหารเม็ดจนปลามีอายุครบ 150 วัน ปลามีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยในวันสุดท้ายของการทดลอง (วันที่ 150) ปลามีความยาวเฉลี่ย 16.47 เซนติเมตร และมีน้ำหนักเฉลี่ย 83.33 กรัม

ตารางที่ 1 ความยาวเฉลี่ย (เซนติเมตร) และน้ำหนักเฉลี่ย (กรัม) ของปลานิลที่อายุต่างๆกัน

อายุปลา (วัน)	การเจริญเติบโตของปลาทับทิม	
	ความยาวเฉลี่ย (เซนติเมตร)	น้ำหนักเฉลี่ย (กรัม)
30	4.42 ± 0.43^{a}	5.85 ± 0.51^{a}
45	5.19 ± 0.51^{a}	6.55 ± 0.45^{ab}
60	6.23 ± 0.54^{ab}	8.03 ± 0.72^{c}
75	6.95 ± 0.75^{bc}	8.50 ± 0.95^{c}
90	7.92 ± 0.76^{c}	10.53 ± 1.11^{cd}
105	10.63 ± 1.09^{d}	22.58 ± 1.46^{e}
120	14.29 ± 0.40^{e}	55.20 ± 1.58^{f}
135	15.67 ± 0.95^{ef}	73.66 ± 2.11^{g}
150	16.47 ± 1.23^{fg}	83.33 ± 3.26^{h}

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

2. <u>การวัดแอคติวิตีของทริปซิน (trypsin activity) ในปลานิล</u>

การศึกษาแอคติวิตีของเอนไซม์ทริปซินในปลานิลที่มีอายุ 45, 60, 75, 90, 105, 120, 135 และ 150 วัน โดยศึกษาจากการเกิดปฏิกิริยาระหว่างทริปซินสับสเตรต (1.25 mM Benzoyl-L-Arginine-p-nitroanilide ละลายใน 0.2 Tris-HCl Buffer pH 8.4) และเอนไซม์ที่สกัดจากลำไส้ของปลาทับทิม ที่อุณหภูมิระหว่าง 30 ถึง 70 องศาเซลเซียส โดยพิจารณาจากอัตราการผลิตของ p-nitroaniline ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตรต่อชั่วโมง ซึ่งค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ทริปซินที่วิเคราะห์ได้ถูกแสดงผลไว้ในตารางที่ 2 เพื่อนำมาใช้ในการหาค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ทริปซินต่อไป

แอคติวิตีของเอนไซม์ทริปซินในปลานิลในแต่ละช่วงอายุเมื่อนำเอนไซม์สกัดมาประเมินกิจกรรมของเอนไซม์พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่ออุณหภูมิที่ใช้ทดสอบเพิ่มขึ้นจาก 30 องศาเซลเซียส มาเป็น 70 องศาเซลเซียส เช่น ปลานิลอายุ 45 วันมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินเฉลี่ยเท่ากับ 36.56 μmol p-nitroaniline h^{-1} ml^{-1} เมื่อทดสอบที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และมีค่าเฉลี่ยเพิ่มขึ้นเป็น 104.47 μmol p-nitroaniline h^{-1} ml^{-1} เมื่อทดสอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 2) ในทำนองเดียวกันปลานิลที่มีอายุ 150 วันมีกิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินเท่ากับ 118.40 μmol p-nitroaniline h^{-1} ml^{-1} ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสและมีค่าเฉลี่ยสูงสุด 305.57 μmol p-nitroaniline h^{-1} ml^{-1} เมื่อทดสอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส การประเมินผลของอายุปลาที่มีต่อกิจกรรมเอนไซม์ทริปซินก็พบว่าปลานิลมีกิจกรรมเอนไซม์ทริปซินเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อปลามีอายุมากขึ้นจาก 45 วันเป็น 150 วัน โดยมีค่าสูงสุดเมื่อปลามีอายุ 105 วันเช่น กิจกรรมเอนไซม์ทริปซินที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ของปลาอายุ 45 วันมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 49.62 μmol p-nitroaniline h^{-1} ml^{-1} แต่เมื่อปลามีอายุ 105 วันที่อุณหภูมิทดสอบเดียวกันได้ค่าเฉลี่ยเพิ่มสูงสุดเป็น 206.32 μmol p-nitroaniline h^{-1} ml^{-1} สอดคล้องกับการประเมินกิจกรรมเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ของปลาอายุ 45 วันมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 104.47 μmol p-nitroaniline h^{-1} ml^{-1} แต่เมื่อปลามีอายุ 105 วันที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสได้ค่าเฉลี่ยเพิ่มสูงสุดเป็น 357.80 μmol p-nitroaniline h^{-1} ml^{-1} (ตารางที่ 2)

2.1 <u>การประเมินปริมาณโปรตีนในเอนไซม์ย่อยอาหาร</u>

การประเมินปริมาณโปรตีนในเอนไซม์ย่อยอาหารโดยวิธี Bio-Rad assay ของปลานิลที่มีอายุ 45-150 วัน พบค่าเฉลี่ยของปริมาณโปรตีนในเอนไซม์มีค่าตั้งแต่ 13.24±1.83 mg/ml ถึง 18.81±2.46 mg/ml (ตารางที่ 3) ซึ่งต่อมาได้ทำการคำนวณค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ทริปซิน (μmol p-nitroaniline h^{-1} mg protein^{-1}) โดยนำค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ทริปซิน (μmol p-nitroaniline h^{-1} ml^{-1}) มาหารด้วยปริมาณโปรตีนในเอนไซม์ย่อยอาหาร (mg ml^{-1}) ก็จะได้ค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ทริปซิน

ตารางที่ 2 แอคติวิตีของเอนไซม์ทริปซิน (μmol p-nitroaniline h^{-1} ml^{-1}) ของปลานิลอายุต่าง ๆ ที่อุณหภูมิต่างกัน

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	45 วัน	60 วัน	75 วัน	90 วัน	105 วัน	120 วัน	135 วัน	150 วัน
30	36.56 ± 0^{a1}	133.20 ± 11.08^{b5}	87.06 ± 3.02^{a3}	73.13 ± 10.45^{a23}	126.52 ± 11.76^{a4}	40.05 ± 3.02^{a1}	67.90 ± 9.05^{a2}	118.40 ± 7.98^{a4}
35	41.79 ± 0^{ab1}	99.24 ± 7.39^{a2}	92.28 ± 10.87^{a2}	85.32 ± 6.03^{a2}	163.67 ± 8.31^{b3}	43.53 ± 3.02^{a1}	83.57 ± 15.67^{ab2}	155.83 ± 15.74^{b3}
40	49.62 ± 0.22^{bc1}	193.27 ± 0^{c5}	121.88 ± 10.87^{b3}	83.57 ± 13.82^{a2}	206.32 ± 11.97^{cd5}	45.27 ± 7.98^{a1}	83.57 ± 10.45^{ab2}	163.67 ± 7.98^{b4}
45	54.85 ± 3.69^{c1}	198.49 ± 7.39^{c5}	123.62 ± 7.98^{b3}	120.14 ± 5.22^{b3}	192.10 ± 13.97^{c5}	60.94 ± 6.03^{b1}	92.28 ± 3.02^{b2}	150.61 ± 14.85^{b4}
50	70.52 ± 3.69^{d1}	221.99 ± 3.69^{d4}	141.03 ± 0^{bc3}	125.36 ± 13.82^{b3}	226.06 ± 15.87^{d4}	67.90 ± 5.22^{b1}	94.02 ± 5.22^{b2}	234.76 ± 21.75^{c4}
55	90.54 ± 3.02^{e1}	339.95 ± 8.00^{f6}	160.18 ± 6.03^{c3}	127.10 ± 12.06^{b2}	291.35 ± 19.18^{e5}	80.09 ± 6.03^{c1}	120.14 ± 0^{c2}	240.28 ± 14.77^{c4}
60	91.41 ± 0.22^{e1}	336.04 ± 15.96^{ef5}	182.82 ± 18.83^{d3}	126.52 ± 10.64^{b2}	292.51 ± 9.05^{e4}	85.32 ± 3.02^{c1}	147.99 ± 16.79^{d2}	292.80 ± 13.50^{d4}
65	107.95 ± 13.15^{f1}	324.28 ± 6.77^{e5}	193.27 ± 18.83^{d3}	154.38 ± 11.59^{c2}	304.69 ± 16.61^{e45}	107.95 ± 15.08^{d1}	181.08 ± 21.11^{e3}	298.17 ± 4.31^{d4}
70	104.47 ± 5.22^{f1}	334.30 ± 14.77^{ef5}	232.73 ± 11.59^{e3}	166.28 ± 5.44^{c2}	357.80 ± 3.69^{f6}	104.47 ± 5.22^{d1}	175.85 ± 15.96^{e2}	305.57 ± 18.47^{d4}

ตัวเลขที่เหมือนกันในแนวนอนไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

ตารางที่ 3 ปริมาณโปรตีนในเอนไซม์ที่สกัดออกมาจากปลานิลที่อายุต่างๆ

อายุ (วัน)	ปริมาณโปรตีนในเอนไซม์ย่อยอาหาร (mg/ml)
45	16.76±2.01^{ab}
60	16.7±3.57^{ab}
75	18.59±0.85^{b}
90	13.24±1.83^{a}
105	13.4±0.48^{a}
120	13.56±2.7^{a}
135	18.81±2.46^{b}
150	13.99±3.16^{a}

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P< 0.05)

2.2 <u>แอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ทริปซิน</u>

การประเมินค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ทริปซิน ที่ได้แสดงผลในตารางที่ 4 พบว่าค่าเฉลี่ยของแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ทริปซินของปลานิลมีค่าเพิ่มขึ้นตามอุณหภูมิที่ใช้ทดสอบและอายุของปลาที่เพิ่มขึ้น โดยเมื่อพิจารณาผลของอายุปลาที่มีต่อแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ทริปซิน พบว่ามีค่าเฉลี่ยสูงสุดระหว่าง 9.45-26.71 μmol p-nitroaniline h^{-1} mg $protein^{-1}$ เมื่อปลามีอายุ 105 วัน ซึ่งมีความแตกต่างจากช่วงอายุอื่นๆของปลาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) รองลงมาคือเมื่อปลามีอายุ 150 วัน และ 60 วัน ตามลำดับ แต่ปลานิลที่อายุ 150 วัน และ 60 วัน มีค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ทริปซินไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P> 0.05) (ตารางที่ 4)

การศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ทริปซินของปลานิล พบว่ามีค่าสูงที่สุดที่อุณหภูมิทดสอบ 70 องศาเซลเซียส โดยปลาที่มีอายุ 45-150 วันเมื่อประเมินแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ทริปซินที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสได้ค่าเฉลี่ยระหว่าง 6.24-26.71 μmol p-nitroaniline h^{-1} mg $protein^{-1}$ รองลงมา คือที่อุณหภูมิทดสอบ 65 และ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ซึ่งทั้งสามอุณหภูมิที่ทดสอบนี้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) แต่ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสมีค่าแอคติวิตีจำเพาะสูงกว่าอุณหภูมิอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 แอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ทริปซิน (μmol p-nitroaniline h^{-1} mg $protein^{-1}$) ของปลานิลอายุต่าง ๆ ที่อุณหภูมิต่างกัน

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	45 วัน	60 วัน	75 วัน	90 วัน	105 วัน	120 วัน	135 วัน	150 วัน
30	2.18 ± 0^{a1}	7.98 ± 0.66^{b4}	4.68 ± 0.16^{a3}	5.53 ± 0.79^{a3}	9.45 ± 0.88^{a5}	3.19 ± 0.24^{a2}	3.61 ± 0.48^{a2}	8.46 ± 0.57^{a4}
35	2.49 ± 0^{ab1}	5.94 ± 0.44^{a45}	4.96 ± 0.59^{a34}	6.45 ± 0.46^{a6}	12.22 ± 0.62^{b7}	3.47 ± 0.24^{a12}	4.44 ± 0.83^{ab23}	11.14 ± 1.13^{b6}
40	2.96 ± 0.22^{bc1}	11.57 ± 0^{c4}	6.56 ± 0.59^{b3}	6.32 ± 1.04^{a3}	15.4 ± 0.89^{cd5}	3.61 ± 0.64^{a12}	4.44 ± 0.56^{ab2}	11.7 ± 0.57^{b4}
45	3.27 ± 0.22^{c1}	11.89 ± 0.44^{c6}	6.65 ± 0.43^{b3}	9.08 ± 0.40^{b4}	14.34 ± 1.04^{c7}	4.85 ± 0.48^{b2}	4.91 ± 0.16^{b2}	10.77 ± 1.06^{b5}
50	4.21 ± 0.22^{d1}	13.29 ± 0.22^{d4}	7.59 ± 0^{bc2}	9.47 ± 1.04^{b3}	16.88 ± 1.19^{d5}	5.41 ± 0.42^{b1}	5 ± 0.28^{b1}	16.78 ± 1.56^{c5}
55	5.4 ± 0.18^{e1}	20.36 ± 0.48^{f4}	8.62 ± 0.33^{c2}	9.6 ± 0.91^{b2}	21.75 ± 1.43^{e5}	6.38 ± 0.48^{c1}	6.39 ± 0^{c1}	17.18 ± 1.06^{c3}
60	5.46 ± 0.22^{e1}	20.12 ± 0.96^{ef4}	9.83 ± 1.01^{d3}	9.56 ± 0.80^{b3}	21.84 ± 0.68^{e5}	6.8 ± 0.24^{c12}	7.87 ± 0.89^{d2}	20.93 ± 0.97^{d45}
65	6.44 ± 0.79^{f1}	19.42 ± 0.41^{e5}	10.4 ± 1.01^{d34}	11.67 ± 0.88^{c4}	22.75 ± 1.24^{e6}	8.6 ± 1.2^{d2}	9.63 ± 1.12^{e23}	21.31 ± 0.31^{d6}
70	6.24 ± 0.31^{f1}	20.02 ± 0.89^{ef4}	12.52 ± 0.62^{e3}	12.56 ± 0.41^{c3}	26.71 ± 0.28^{f6}	8.32 ± 0.42^{d2}	9.35 ± 0.85^{e2}	21.84 ± 1.32^{d5}

ตัวเลขที่เหมือนกันในแนวนอนไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

3. <u>การวัดแอคติวิตีของไคโมทริปซิน (chymotrypsin activity) ในปลานิล</u>

การศึกษาแอคติวิตีของเอนไซม์ไคโมทริปซินในปลานิลที่มีอายุ 45, 60, 75, 90, 105, 120, 135 และ 150 วัน โดยศึกษาจากการเกิดปฏิกิริยาระหว่างทริปซินสับสเตรต (0.1 mM N-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-nitroanilide ละลายใน 0.2 Tris-HCl Buffer pH 8.4) และเอนไซม์ที่สกัดจากลำไส้ของปลานิล ที่อุณหภูมิระหว่าง 20 ถึง 60 องศาเซลเซียส โดยพิจารณาจากอัตราการผลิตของ p-nitroaniline ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตรต่อชั่วโมง ซึ่งค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไคโมทริปซิน วิเคราะห์ได้ถูกแสดงผลไว้ในตารางที่ 5 เพื่อนำมาใช้ในการประเมินค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ไคโมทริปซินต่อไป

แอคติวิตีของเอนไซม์ไคโมทริปซินในปลานิลในแต่ละช่วงอายุเมื่อนำเอนไซม์สกัดมาประเมินกิจกรรมของเอนไซม์พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ไคโมทริปซินมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อปลาที่ทดลองมีอายุมากขึ้นจาก 45 วันเป็น 150 วัน โดยมีค่าสูงสุดเมื่อปลามีอายุ 120 วันเช่น การประเมินกิจกรรมเอนไซม์ไคโมทริปซินของปลาที่มีอายุ 45 วันและ 120 วันเมื่อทดสอบที่อุณหภูมิต่างกันมีค่าระหว่าง 96.63-235.05 μmol p-nitroaniline h^{-1} ml^{-1} และ 163.67-263.78 μmol p-nitroaniline h^{-1} ml^{-1} ตามลำดับในขณะที่ปลาอายุ 150 วันมีค่าเฉลี่ยกิจกรรมเอนไซม์ไคโมทริปซินอยู่ในช่วง 62.68-250.72 μmol p-nitroaniline h^{-1} ml^{-1} (ตารางที่ 5)

การประเมินผลของอุณหภูมิที่ใช้ที่มีต่อกิจกรรมเอนไซม์ไคโมทริปซิน พบว่าปลานิลมีกิจกรรมเอนไซม์ไคโมทริปซินเพิ่มขึ้น เมื่อใช้อุณหภูมิทดสอบที่สูงขึ้นแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) เช่น ปลานิลอายุ 45 วันเมื่อทดสอบกิจกรรมเอนไซม์ไคโมทริปซินที่อุณหภูมิ 20-45 องศาเซลเซียสให้ค่าเฉลี่ย 96.63-198.49 μmol p-nitroaniline h^{-1} ml^{-1} แต่ที่อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียสให้ค่าเฉลี่ย 201.97-235.05 μmol p-nitroaniline h^{-1} ml^{-1} (ตารางที่ 5) ปลานิลอายุ 105 วันเมื่อทดสอบกิจกรรมเอนไซม์ไคโมทริปซินที่อุณหภูมิ 20-35 องศาเซลเซียสให้ค่าเฉลี่ย 163.67-201.97 μmol p-nitroaniline h^{-1} ml^{-1} แต่ที่อุณหภูมิ 40-60 องศาเซลเซียสให้ค่าเฉลี่ย 227.22-263.78 μmol p-nitroaniline h^{-1} ml^{-1} อย่างไรก็ตามปลานิลที่มีอายุ 150 วันเมื่อทดสอบกิจกรรมเอนไซม์ไคโมทริปซินที่อุณหภูมิ 20-40 องศาเซลเซียสให้ค่าเฉลี่ยระหว่าง 208.94-250.72 μmol p-nitroaniline h^{-1} ml^{-1} แต่ที่อุณหภูมิทดสอบ 45-60 องศาเซลเซียสให้ค่าเฉลี่ยลดลงอยู่ในช่วง 91.41-143.64 μmol p-nitroaniline h^{-1} ml^{-1} (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 แอคติวิตีของเอนไซม์ไคโมทริปซิน (μmol p-nitroaniline h^{-1} ml^{-1}) ของปลานิลอายุต่างๆ ที่อุณหภูมิต่างกัน

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	45 วัน	60 วัน	75 วัน	90 วัน	105 วัน	120 วัน	135 วัน	150 วัน
20	96.63±3.69^{a1}	250.72±0^{e4}	208.94±9.05^{b3}	161.93±14.77^{a2}	254.20±7.98^{e4}	163.67±10.87^{a2}	208.94±7.39^{c3}	208.94±0^{d3}
25	130.58±0^{b1}	231.57±10.87^{d3}	231.57±13.15^{c3}	195.01±10.87^{b2}	261.17±0^{e4}	185.43±18.47^{b2}	245.50±0^{e34}	235.05±13.82^{e3}
30	137.55±10.87^{b1}	228.01±6.03^{d2}	211.55±25.85^{b2}	208.94±14.77^{c2}	224.61±14.77^{d2}	214.16±7.39^{c2}	216.77±25.85^{cd2}	250.72±0.53^{e3}
35	167.15±5.22^{c1}	222.86±6.03^{d3}	248.98±3.02^{d4}	203.71±7.39^{bc2}	235.05±22.16^{d34}	201.97±10.87^{c2}	224.61±15.67^{cd3}	205.4±7.98^{d2}
40	198.49±0^{e23}	167.15±7.39^{b1}	232.44±11.08^{c4}	232.44±3.69^{d4}	188.04±18.47^{c2}	227.22±3.69^{d4}	229.83±0^{de4}	208.94±36.94^{d3}
45	185.43±11.08^{d3}	203.71±14.77^{c4}	215.90±6.03^{bc4}	238.53±10.87^{de5}	122.75±18.47^{b1}	245.50±0 ^{ef5}	215.90±10.87^{cd4}	143.64±11.08^{c2}
50	201.97±7.97^{e3}	146.25±0^{a2}	219.38±0^{bc4}	255.95±5.22^{f6}	252.46±3.02^{e6}	240.28±0^{e5}	232.44±11.08^{de5}	91.41±3.69^{b1}
55	227.22±3.69^{f6}	135.81±10.45^{a3}	208.94±7.39^{b5}	257.69±3.02^{f7}	104.47±7.39^{a2}	254.20± 6.03^{fg7}	146.25±5.22^{b4}	62.68±7.39^{a1}
60	235.05±0 ^{f5}	134.07±3.02^{a3}	190.65±11.08^{a4}	247.24±3.02^{ef56}	92.28±3.02^{a2}	263.78±3.69^{g6}	60.94±15.08^{a1}	138.42±40.63^{c3}

ตัวเลขที่เหมือนกันในแนวนอนไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)

ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)

3.1 <u>แอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ไคโมทริปซิน</u>

การประเมินค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ไคโมทริปซิน ทำโดยการนำค่าแอคติวิตีของไคโมทริปซินที่ได้จากปลาอายุต่างๆกันที่ทดสอบกิจกรรมเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆกัน (μmol p-nitroaniline h^{-1} ml^{-1}) จากตารางที่ 5 มาหารด้วยปริมาณโปรตีนในเอนไซม์ย่อยอาหาร (mg ml^{-1}) ที่ได้จากตารางที่ 3 เพื่อทราบค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ไคโมทริปซินของปลาทับทิม ได้ถูกแสดงไว้ในตารางที่ 6 พบว่า ค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ไคโมทริปซินของปลานิลมีค่าสูงสุดเมื่อปลามีอายุ 120 วัน (มีค่าเฉลี่ยระหว่าง 13.04-21.01 μmol p-nitroaniline h^{-1} mg $protein^{-1}$) รองลงมาคืออายุ 90 วัน (มีค่าเฉลี่ยระหว่าง 12.24-19.47 μmol p-nitroaniline h^{-1} mg $protein^{-1}$) และ 105 วัน (มีค่าเฉลี่ยระหว่าง 6.89-19.5 μmol p-nitroaniline h^{-1} mg $protein^{-1}$) ตามลำดับ (ตารางที่ 5) ซึ่งปลานิลในทั้งสามช่วงอายุ มีค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ไคโมทริปซินไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) แต่ปลาที่มีอายุ 120 วัน และ 90 วัน มีค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ไคโมทริปซินสูงกว่าปลาช่วงอายุอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

การศึกษาผลของอุณหภูมิที่ใช้ต่อค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ไคโมทริปซิน พบว่าการใช้อุณหภูมิทดสอบที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ทำให้มีค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ไคโมทริปซินสูงที่สุด (มีค่าเฉลี่ยระหว่าง 7.79-19.5 μmol p-nitroaniline h^{-1} mg $protein^{-1}$ ในปลาที่มีอายุ 45-150 วัน) รองลงมา คือ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส (มีค่าเฉลี่ยระหว่าง 9.98-17.55 μmol p-nitroaniline h^{-1} mg $protein^{-1}$ ในปลาที่มีอายุ 45-150 วัน) และ 30 องศาเซลเซียส (มีค่าเฉลี่ยระหว่าง 8.21-17.92 μmol p-nitroaniline h^{-1} mg $protein^{-1}$ ในปลาที่มีอายุ 45-150 วัน) อุณหภูมิทดสอบที่มีผลทำให้แอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ไคโมทริปซินมีค่าต่ำที่สุด คือ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเนื่องจากปลานิลในช่วงอายุ 135 วันมีค่าเหลือเพียง 3.24 μmol p-nitroaniline h^{-1} mg $protein^{-1}$ อย่างไรก็ตามการตรวจสอบทางสถิติ พบว่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ไคโมทริปซินที่ได้จากทุกอุณหภูมิที่ทดสอบ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) แต่เมื่อนำข้อมูลมาเปรียบเทียบกับปลาในช่วงอายุเดียวกันแต่ใช้อุณหภูมิทดสอบกิจกรรมเอนไซม์ต่างกันตั้งแต่ 20-60 องศาเซลเซียสได้ผลการศึกษาดังนี้

ปลาที่มีช่วงอายุ 45 วันมีค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ไคโมทริปซินสูงที่สุดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส (14.03 μmol p-nitroaniline h^{-1} mg $protein^{-1}$) รองลงมา คือ 55 และ 50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ แต่อุณหภูมิที่ 60 และ 55 องศาเซลเซียส มีค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ไคโมทริปซินสูงกว่าที่อุณหภูมิอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ปลาที่มีช่วงอายุ 60 วันมีค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ไคโมทริปซินสูงที่สุดที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส (15.01 μmol p-nitroaniline h^{-1} mg $protein^{-1}$) ซึ่งแตกต่างจากอุณหภูมิอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) รองลงมา คือ 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียสตามลำดับ ซึ่งทั้งสามอุณหภูมิมีค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ไคโมทริปซินไม่แตกต่างกันกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

ปลาที่มีช่วงอายุ 75 วันมีค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ไคโมทริปซินสูงที่สุดที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส (13.39 μmol p-nitroaniline h^{-1} mg $protein^{-1}$) ซึ่งแตกต่างจากอุณหภูมิอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) รองลงมา คือ 40, 25, 50 และ 45 องศาเซลเซียสตามลำดับ แต่

ทั้งสี่อุณหภูมิทดสอบนี้มีค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ไคโมทริปซินไม่แตกต่างกันกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)

ปลาที่มีช่วงอายุ 90 วันมีค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ไคโมทริปซินสูงที่สุดที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส (19.47 μmol p-nitroaniline h^{-1} mg $protein^{-1}$) รองลงมา คือ 50 องศาเซลเซียส และ 60 องศาเซลเซียสตามลำดับ ซึ่งทั้งสามอุณหภูมิมีค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ไคโมทริปซินไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) แต่ที่อุณหภูมิ 55 และ 50 องศาเซลเซียสมีค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ไคโมทริปซินสูงกว่าที่อุณหภูมิอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

ปลาที่มีช่วงอายุ 105 วันมีค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ไคโมทริปซินสูงที่สุดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (19.5 μmol p-nitroaniline h^{-1} mg $protein^{-1}$) รองลงมา คือ 20 และ 50 องศาเซลเซียสตามลำดับ ซึ่งทั้งสามอุณหภูมิทดสอบนี้มีค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ไคโมทริปซินไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) แต่มีค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ไคโมทริปซินสูงกว่าอุณหภูมิทดสอบอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

ปลาที่มีช่วงอายุ 120 วันมีค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ไคโมทริปซินสูงที่สุดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส (21.01 μmol p-nitroaniline h^{-1} mg $protein^{-1}$) รองลงมา คือ 55 องศาเซลเซียส ซึ่งทั้งสองอุณหภูมิมีค่าแอคติวิตีจำเพาะไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) แต่ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส มีค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ไคโมทริปซินสูงกว่าอุณหภูมิอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

ปลาที่มีช่วงอายุ 135 วันมีมีค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ไคโมทริปซินสูงที่สุดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (13.06 μmol p-nitroaniline h^{-1} mg $protein^{-1}$) รองลงมา คือ 50 และ 40 องศาเซลเซียสตามลำดับ ซึ่งทั้งสามอุณหภูมิมีค่าแอคติวิตีจำเพาะไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) และที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสมีค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ไคโมทริปซินสูงกว่าที่อุณหภูมิอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

ปลาที่มีช่วงอายุ 150 วันมีค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ไคโมทริปซินสูงที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (17.92 μmol p-nitroaniline h^{-1} mg $protein^{-1}$) รองลงมา คือ 25 และ 20 องศาเซลเซียสตามลำดับ ซึ่งที่อุณหภูมิทดสอบ 30 และ 25 องศาเซลเซียส มีค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ไคโมทริปซินสูงกว่าที่อุณหภูมิอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

ตารางที่ 6 แอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ไคโมทริปซิน (μmol p-nitroaniline h^{-1} mg $protein^{-1}$) ของปลานิลอายุต่าง ๆ ที่อุณหภูมิต่างกัน

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	45 วัน	60 วัน	75 วัน	90 วัน	105 วัน	120 วัน	135 วัน	150 วัน
20	5.77 ± 0.22^{a1}	15.01 ± 0^{e4}	11.24 ± 0.49^{b2}	12.24 ± 1.12^{a3}	18.98 ± 0.60^{e5}	13.04 ± 0.87^{a3}	11.11 ± 0.39^{c2}	14.94 ± 0^{d4}
25	7.79 ± 0^{b1}	13.87 ± 0.65^{d34}	12.46 ± 0.71^{c2}	14.73 ± 0.82^{b4}	19.50 ± 0^{e6}	14.77 ± 1.47^{b4}	13.06 ± 0^{e23}	16.80 ± 0.99^{e5}
30	8.21 ± 0.65^{b1}	13.66 ± 0.36^{d3}	11.38 ± 1.39^{b2}	15.79 ± 1.12^{c4}	16.77 ± 1.10^{d45}	17.06 ± 0.59^{c45}	11.53 ± 1.38^{cd2}	17.92 ± 0.53^{e5}
35	9.98 ± 0.3^{c1}	13.35 ± 0.36^{d3}	13.39 ± 0.16^{d3}	15.39 ± 0.56^{bc45}	17.55 ± 1.65^{d6}	16.09 ± 0.87^{c5}	11.94 ± 0.83^{cd2}	14.69 ± 0.57^{d4}
40	11.85 ± 0^{e2}	10.01 ± 0.44^{b1}	12.50 ± 0.60^{c2}	17.56 ± 0.28^{d4}	14.04 ± 0.55^{c3}	18.10 ± 0.29^{d4}	12.22 ± 0^{de2}	14.94 ± 2.64^{d3}
45	11.07 ± 0.66^{d23}	12.20 ± 0.89^{c3}	11.61 ± 0.32^{bc3}	18.02 ± 0.82^{de4}	9.16 ± 1.38^{b1}	19.55 ± 0^{ef5}	11.48 ± 0.58^{cd3}	10.27 ± 0.79^{c2}
50	12.05 ± 0.48^{e34}	8.76 ± 0^{a2}	11.80 ± 0^{bc3}	19.34 ± 0.40^{f5}	18.85 ± 0.23^{e5}	19.14 ± 0^{e5}	12.36 ± 0.59^{de4}	6.53 ± 0.26^{b1}
55	13.56 ± 0.22^{f4}	8.13 ± 0.63^{a2}	11.24 ± 0.40^{b3}	19.47 ± 0.23^{f5}	7.80 ± 0.55^{a2}	20.25 ± 0.48^{fg6}	7.78 ± 0.28^{b2}	4.48 ± 0.53^{a1}
60	14.03 ± 0^{f4}	8.03 ± 0.18^{a2}	10.26 ± 0.60^{a3}	18.68 ± 0.23^{ef5}	6.89 ± 0.23^{a2}	21.01 ± 0.29^{g6}	3.24 ± 0.80^{a1}	9.89 ± 2.90^{c3}

ตัวเลขที่เหมือนกันในแนวนอนไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)

ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)

บทที่ 5
อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

ผลการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า กิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินและไคโมทริบซินในลำไส้อาหารของปลานิล มีการแสดงออกของกิจกรรมเอนไซม์ที่แตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับอายุของปลานิล โดยพบว่าค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ทริปซินของปลานิลที่อายุ 105 วัน มีค่าสูงกว่าช่วงอายุอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ รองลงมาคือ ปลานิลอายุ 150 วัน และ 60 วันตามลำดับ แต่แอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ทริปซินของปลานิลที่อายุ 150 วัน และ 60 วัน ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ไคโมทริปซินของปลานิลมีค่าสูงสุดเมื่อปลามีอายุ 120 วัน รองลงมาคือ อายุ 90 วัน และ 105 วัน ตามลำดับ โดยปลาทั้งสามช่วงอายุมีค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ไคโมทริปซินไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ปลานิลที่อายุ 120 วัน และ 90 วัน มีค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ไคโมทริปซินสูงกว่าช่วงอายุอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ฉะนั้นอายุปลานิลที่เหมาะสมสำหรับการศึกษาแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ทริปซินและเอนไซม์ไคโมทริปซินจะอยู่ที่ช่วงอายุ 105 วัน และ 120 วัน ตามลำดับ

ค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ทริปซินและเอนไซม์ไคโมทริปซินที่ได้ มีความสัมพันธ์กับอัตราการเจริญเติบโตของปลานิลหรืออายุปลาที่เพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ วิชัย วัฒนกุล และคณะ (2540) ที่ทำการศึกษาการพัฒนาน้ำย่อยในลูกปลากะรัง (*Epinehelus coioides*) อายุตั้งแต่ 2-60 วัน พบว่าเมื่อปลากะรังมีอายุมากขึ้นจะมีแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ทริปซินและเอนไซม์ไคโมทริปซินเพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นไปในทางเดียวกันกับการทดลองของอัญชลี คงสมบูรณ์ (2530) ที่ทำการศึกษารูปแบบเอนไซม์ในทางเดินอาหารของลูกปลากะพงขาว พบว่า ปลากะพงขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารต่างชนิดกันมีค่าของแอคติวิตีของเอนไซม์มีความสัมพันธ์กับการเจริญเติบโตของปลากะพงขาว แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ทริปซินและเอนไซม์ไคโมทริปซิน มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายโปรตีนระหว่างการย่อยอาหารของสัตว์น้ำ ซึ่งสัตว์น้ำแต่ละชนิดอาจมีช่วงอายุที่มีกิจกรรมเอนไซม์มีค่าสูงสุดแตกต่างกันไป Cahu and Infante (2001) รายงานว่ารูปแบบของแอคติวิตีของเอนไซม์จากตับอ่อนมีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของโปรตีนภายในร่างกายของสัตว์น้ำวัยอ่อน ซึ่งแอคติวิตีของสัตว์น้ำวัยอ่อนจะเพิ่มขึ้นหลังจากเพาะฟักไปจนกระทั่งมีอายุ 20 วัน หลังจากนั้นจะค่อยๆลดลงไปจนถึงอายุ 25 วันซึ่งจะมีระดับคงที่หรือไม่เปลี่ยนแปลงมากนักเมื่อปลามีอายุมากขึ้น แสดงให้เห็นว่ากระบวนการสังเคราะห์น้ำย่อยนี้มีความเกี่ยวเนื่องกับอายุของสัตว์น้ำ

การศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินของปลานิล พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินมีค่าสูงที่สุดที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ซึ่งอุณหภูมิดังกล่าวทำให้มีค่าแอคติวิตีจำเพาะสูงกว่าการทดสอบที่อุณหภูมิอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในปลาทุกช่วงอายุที่ศึกษาตั้งแต่ 45-150 วัน แสดงว่าการศึกษากิจกรรมเอนไซม์ทริปซินของปลานิลทุกช่วงอายุ ควรใช้อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เพราะให้ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ทริปซินที่มีค่าสูงที่สุด อย่างไรก็ตามการศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไคโมทริปซินของปลานิลในปลาที่มีอายุระหว่าง 45-150 วัน ที่ใช้อุณหภูมิทดสอบระหว่าง 20-60 องศาเซลเซียส พบว่า ภาพรวมของค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ไคโมทริปซินที่ทุกอุณหภูมิทดสอบ มีค่าแอคติวิตีจำเพาะไม่แตกต่างกันทางสถิติ

ทำให้ไม่ทราบอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ไคโมทริปซิน อาจเนื่องมาจากปริมาณของเอนไซม์ไคโมทริปซินที่สกัดได้มีปริมาณน้อย เมื่อทำปฏิกิริยากับสับสเตรตแล้วมีผลทำให้ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นมีค่าน้อยลงตามปริมาณของเอนไซม์ อีกทั้งคุณภาพของเอนไซม์สกัดก็อาจมีผลต่อแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ไคโมทริปซิน เนื่องจากในการทดลองมีการนำเอนไซม์ที่สกัดได้เข้าและออกจากตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียสบ่อยครั้ง จึงอาจมีผลทำให้เอนไซม์เสียสภาพได้ ซึ่งแตกต่างจากรายงานของ Rungruangsak-Torrissen et. al. (1998) และ Rungruangsak-Torrissen and Male (2000) ที่ทำการศึกษาเกี่ยวกับแอคติวิตีของเอนไซม์ปลาแอตแลนติกแซลมอน (*Salmo salar L.*) พบว่าอุณหภูมิมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ทริปซินเช่นกัน แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ทริปซินของปลาแอตแลนติกแซลมอน อยู่ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส อีกทั้ง ธนัย สุรศิลป์ (2548) ได้ทำการศึกษาแอคติวิตีของปลากะพงขาว (*Lates calcalifer*) อายุ 20, 40, 60 และ 90 วัน พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับแอคติวิตีของเอนไซม์ทริปซินอยู่ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสจากอุณหภูมิที่ใช้ทดสอบตั้งแต่ 30-70 องศาเซลเซียส ซึ่งมีความแตกต่างกับการศึกษาในครั้งนี้ที่ได้อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการศึกษากิจกรรมเอนไซม์ทริปซินในปลานิลที่ 70 องศาเซลเซียส สาเหตุส่วนหนึ่งอาจเนื่องมาจากชนิดของปลาที่ใช้ในการทดลองแตกต่างกัน นอกจากนี้ จีรภา หินซุย และคณะ (2549) ที่ศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์ทริปซินจากอวัยวะภายในปลานิลสายพันธุ์จิตรลดา พบว่าสภาวะที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ทริปซิน คือ อุณหภูมิที่ 80 องศาเซลเซียส สอดคล้องกับผลการศึกษาของ สมัชชา สุวรรณกาญจน์ และคณะ (2562) ซึ่งศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ทริปซิน และไคโมทริปซินในปลาเวียน พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์แต่ละชนิดมีค่าสูงสุดเมื่อปลาแต่ละขนาดใช้อุณหภูมิทดสอบต่างกัน โดยกิจกรรมของเอนไซม์ทริปซิน และไคโมทริปซินในปลาเวียนที่มีอายุ 7 วัน ทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 50 และ 60 องศาเซลเซียสตามลำดับ สำหรับปลาเวียนอายุ 90 วัน กิจกรรมของเอนไซม์ทริปซิน และไคโมทริปซินทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 50 และ 15 องศาเซลเซียส ตามลำดับ อย่างไรก็ตามการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินและเอนไซม์ไคโมทริปซินเพิ่มเติมควรมีการศึกษาปัจจัยอื่นๆที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ทริปซินและเอนไซม์ไคโมทริปซินของปลานิล เช่น สภาพกรด-เบส (pH) หรือสภาพความหิวของปลา (starvation) เพื่อให้ได้ข้อมูลพื้นฐานที่จำเป็นสำหรับการนำเอาองค์ความรู้กิจกรรมของเอนไซม์ไปประยุกต์ใช้ในการย่อยวัตถุดิบอาหารสัตว์บางชนิดที่หาได้ง่ายในท้องถิ่น เพื่อให้ได้ฐานข้อมูลของประสิทธิภาพการย่อยวัตถุดิบอาหารสัตว์ชนิดต่างๆ เพื่อใช้ทำนายสูตรอาหารเลี้ยงปลาที่เหมาะสมที่จะทำให้ปลาย่อยได้ดีขึ้นและมีการเจริญเติบโตที่ดี โดยนำสูตรอาหารที่ได้จากการพัฒนาด้วยการศึกษา in vitro digestibility มาประยุกต์ใช้เลี้ยงปลาต่อไป

อย่างไรก็ตามแม้ว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ไคโมทริปซินของปลานิลในการศึกษาครั้งนี้ไม่พบความแตกต่างของอุณหภูมิที่ใช้ศึกษา แต่ Rungruangsak-Torrissen et. al. (2002) ได้ทำการศึกษาแอคติวิตีของปลาแอตแลนติกแซลมอน (*Salmo salar* L.) พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมของแอคติวิตีของเอนไซม์ไคโมทริปซินอยู่ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ในขณะที่ธนัย สุรศิลป์ (2548) รายงานว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับแอคติวิตีของเอนไซม์ไคโมทริปซินของปลากะพงขาวอยู่ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกับ Applebaum et. al. (2002) ที่ทำการศึกษาแอคติวิตีของเอนไซม์ไคโมทริปซินในตัวอ่อนระยะแรกของปลา red drum (*Sciaenops ocellatus*)

พบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไคโมทริปซินมีค่ามากที่สุดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเช่นกัน นอกจากนี้มีรายงานการศึกษาในสัตว์น้ำบางชนิดที่แอคติวิตีของไคโมทริปซินมีค่าต่ำกว่าหรือไม่พบเลย เมื่อเปรียบเทียบกับแอคติวิตีของทริปซิน เช่น Elert et. al. (2004) รายงานว่า เอนไซม์ทริปซินที่สกัดจากทางเดินอาหารของไรแดง (*Daphnia magna*) มีค่าแอคติวิตีจำเพาะ (specific trypsin activity) เท่ากับ 140.8±4.3 nmol *p*-nitroaniline /min/mg protein ส่วนเอนไซม์ไคโมทริปซินไม่พบแอคติวิตีจำเพาะ (specific chymotrypsin activity)

การศึกษาในครั้งนี้ได้กำหนดช่วงเวลาเก็บรวบรวมลำไส้หลังปลากินอาหาร 90 นาทีเพื่อนำเอนไซม์สกัดมาศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ ซึ่งอาจมีตัวแปรหลายตัวที่เกี่ยวข้องกับค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ทริปซินและเอนไซม์ไคโมทริปซิน เช่น ชนิดหรือคุณภาพของอาหารที่ใช้ ปริมาณอาหารที่ให้ สภาพความหิวของปลา อุณหภูมิที่เลี้ยงปลา รวมทั้งช่วงระยะเวลาที่ใช้เก็บตัวอย่างลำไส้ เป็นต้น ซึ่งตัวแปรเหล่านี้น่าจะมีผลต่อปริมาณหรือแอคติวิตีของเอนไซม์ทั้งสิ้น (สมัชชา สุวรรณกาญจน์ และคณะ 2562) ทำให้ผลการศึกษาแตกต่างกันไปนอกเหนือไปจากชนิดของปลาที่ทำการศึกษา เพราะว่าในการทดลองครั้งนี้ใช้ช่วงระยะเวลาในการเก็บตัวอย่างลำไส้ของปลานิลทุกช่วงอายุที่ 90 นาที ซึ่งอาจจะไม่เหมาะสมกับปลาบางขนาด เนื่องปลาแต่ละขนาดน่าจะมีระยะเวลาย่อยอาหารที่เหมาะสมในการย่อยอาหารให้มีประสิทธิภาพสูงสุดแตกต่างกัน เช่น ปลาขนาดเล็กทางเดินอาหารยังพัฒนาไม่เต็มที่และกระเพาะอาหารหรือลำไส้มีขนาดเล็ก ในขณะที่ปลาขนาดใหญ่ทางเดินอาหารพัฒนาเต็มที่แล้วและกระเพาะอาหารหรือลำไส้มีขนาดใหญ่ ซึ่งจุอาหารได้มากขึ้น ปลาขนาดเล็กจึงใช้ระยะเวลาในการย่อยอาหารที่เหมาะสมเร็วกว่าปลาขนาดใหญ่ ซึ่งตัวแปรเหล่านี้ควรได้มีการศึกษาเพิ่มเติมในรายละเอียดต่อไปเพื่อให้เอนไซม์ทริปซินและไคโมทริปซินของปลานิลทำงานได้อย่างเต็มประสิทธิภาพในการวิจัยเพื่อสามารถย่อยวัตถุดิบอาหารสัตว์ชนิดต่างๆได้ต่อไป (Rungruangsak-Torrissen et al., 2002)

สรุปผลการทดลอง

1.ปลานิลเมื่อมีอายุมากขึ้น ค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ทริปซิน และค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ไคโมทริปซิน จะมีค่าสูงขึ้น โดยค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ทริปซิน และค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ไคโมทริปซินในลำไส้ปลานิล มีค่าสูงสุดเมื่อปลานิลมีอายุ 105 วันและ 120 วัน ตามลำดับ

2. แอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ทริปซินของปลานิล มีค่าสูงที่สุดที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส

เอกสารอ้างอิง

กรมประมง. 2549. สถิติกรมประมงปี 2549. กองเศรษฐกิจการประมง. กรมประมง.

กล่าวขวัญ แสงสมบัติ. 2544. เอกสารประกอบการสอนวิชาชีวเคมีเบื้องต้น 316202 (Genera Biochemistry). ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.

กลุ่มวิจัยและวิเคราะห์สถิติการประมง. 2554. สถิติผลผลิตการเลี้ยงสัตว์น้ำจืดประจำปี 2552. ศูนย์สารสนเทศ กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เอกสารฉบับที่ 5/2554 จำนวน 65 หน้า

จีรภา หินซุย วันชัย วรวัฒนเมธีกุล นงนุช รักสกุลไทย และจิราพร รุ่งเลิศเกรียงไกร. 2549. คุณลักษณะของเอนไซม์ทริปซิน และไคโมทริปซินจากอวัยวะภายในปลานิล สายพันธุ์จิตรลดา (*Oreochromis niloticus* Linneaus) ที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วน. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 44 ภาควิชาผลิตภัณฑ์ประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ, หน้า 117-124.

ชิงชัย โลหะวัฒนกุล. 2543. วารสารสัตว์น้ำ. ปีที่ 11 ฉบับที่ 125 (มกราคม) หน้า 185-188.

ดุสิต ตันวิไลย, พุทธ แซ่ลิ่ม และยงยุทธ ปรีดาลัมพะบุตร. 2528. การศึกษาการพัฒนาการของลูกปลากะพงขาววัยอ่อน *Lates calcarifer* (*Bloch*). สงขลา: เอกสารวิชาการฉบับที่ 6/2528 สถาบันเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง จังหวัดสงขลา กรมประมง.

วิชัย วัฒนกุล สุนิตย์ โรจนพิทยากุล และพูนสิน พานิชสุข. 2540. การพัฒนาน้ำย่อยในลูกปลากะรัง *Epinepphelus coioides* วัยอ่อน. เอกสารวิชาการฉบับที่ 22/2540 สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง กรมประมง. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. 2535. อาหารปลา. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์. กรุงเทพ 216 หน้า

วิศิษฐิพร สุขสมบัติ. 2532. ยีสต์มีชีวิตในอาหารโคนม. วารสารโคนม : 22-24.

สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ. 2526. ปลานิลสีแดง. เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 17. กรมประมง

สัตว์น้ำเศรษฐกิจ. 2549. การใช้เซลล์ยีสต์ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์. ฉบับที่ 251 : 38-40

สมัชชา สุวรรณกาญจน์, ณรงค์ชัย โมใหญ่, ฐ์งกานต์ กล้าหาญ, สุริยัญ แสงหงษ์ และ สุนทรี ชาญกิจ. 2562. กิจกรรมของเอนไซม์ทริปซิน และไคโมทริปซิน และอัตราส่วนของเอนไซม์ทริปซิน ไคโมทริปซิน (T/C ratio) ในทางเดินอาหารของปลาเวียนที่อุณหภูมิต่างกัน. แก่นเกษตร 47 (ฉบับพิเศษ 1) : 1217-1224.

สุพัตร์ ศรีพัฒน์ อนุวัติ อุปนันไชย เอกพจน์ เจริญศิริวงศ์ธนา สุจิตรา สรสิทธิ์ พิศมัย สมสืบ. 2551. การใช้ยีสต์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของอาหารกุ้งก้ามกราม. สถานีประมงน้ำจืดจังหวัดเพชรบูรณ์ สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด. กรมประมง. เอกสารวิชาการที่ 10/2551. จำนวน 20 หน้า

ธัชนนท์ พุ่มโภคัย และ สมเกียรติ ปิยะธีรธิติวรกุล. 2552. ผลของบริวเวอร์ยีสต์และนิวคลีโอไทด์ในอาหารต่อการเติบโตและการรอดของปลากะพงขาว. เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 47: สาขาประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ หน้า 444-452.

ธนัย สุรศิลป์. 2548. ประสิทธิภาพการย่อยอาหารในหลอดทดลองของปลากะพงขาว (*Lates calcalifer*) ที่เลี้ยงด้วยอาหารเม็ดที่มีการทดแทนปลาป่น. ปริญญานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.

อัญชลี คงสมบูรณ์. 2530. รูปแบบเอ็นไซม์ในทางเดินอาหารของลูกปลากะพงขาว *Lates calcarifer* (Bloch) ซึ่งเลี้ยงด้วยอาหารต่างชนิด. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์ทางทะเล, บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

Applebaum, S.L., Perez, R., Lazo, J.P. and Holt, G.J. 2002. Characterization of chymotrypsin activity during early ontogeny of larval red drum (*Sciaenops ocellatus*). Fish Physiology and Biochemistry. 25: 291-300.

Bassompierre, T.H. Oatenfeld, E. McLean and K. Rungruangsak Torrisen. 1998. In vitro protein digestion, and growth of Atlantic salmon with different trypsin isozymes. Aquaculture International 6: 47-56.

Bishop, C.D., Angus, R.A. and Watts, S.A. 1995. The use of feather meal as a replacement for fish meal in the diet of *Oreochromis niloticus* fry. Bioresource Technology 54: 291-295.

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

Cahu, C. and Infate, J. Z. 2001. Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae. Aquaculture 200: 161-180.

Deng, J., Mai, K., Ai, Q., Zhang, W., Wang, X., Xu, W. and Liufu, Z. 2006. Effects of replacing fish meal with soy protein concentrate on feed intake and growth of juvenile Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. Aquaculture 258: 503-513.

Eid A.E. and A.J. Matty. (1989). A Simple In Vitro Method for Measuring Protein Digestibility. Aquaculture 79: 111-119.

Elert, E.V., Agrawal, M.K., Gebauer, C., Jaensch, H., Bauer, U. and Zitt, A. 2004. Protease activity in gut *Daphnia magna*: evidence for trypsin and chymotrypsin enzymes. Comparative Biochemistry and Physiology. 137: 287-296.

Gomes, E.F., Rema, P. and Kaushik S.J. 1994. Replacement of fish meal by plant proteins in the diet of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): digestibility and growth performance. Aquaculture 130: 177-186.

Halver, J.E. and Hardy, R.W. 2003. Fish Nutrition, Third Edition. Academic Press. 500 pp.

Kaushik, S.J., Covès, D., Dutto, G. and Blanc, D. 2003. Almost total replacement of fish meal by plant protein sources in the diet of a marine teleost, the European seabass, *Dicentrarchus labrax*. Aquaculture.230: 391-404.

Kuz'mina V.V. 1996) Influence of age on digestive enzymes activity in some freshwater teleosts. Aquaculture 148: 25-37.

Malik, K.A. and Hoffmann, P. 1993) Long-term preservation of yeast cultures by liquid-drying. World Journal of Microbiology and Biotechnology 9: 372-376.

Moullac, Gilles le, Birgit Klein, Daniel Sellos and Alain Van Wormhoudt. 1997. Adaptation of trypsin, chymotrypsin and –amylase to casein level and protein source in *Penaeus vannamei* (Crustacea Decapod). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 208 (1-2): 107-125.

Olvera-Novoa, M.A., Pereira-Pacheco, F., Olivera-Castillo, L., Pérez-Flores, V., Navarro, L. and Sámano, J.C. 1997. Cowpea (*Vigna unguiculata*) protein concentrate as replacement for fish meal in diets for tilapia (*Oreochromis niloticus*) fry. Aquaculture 158: 107-116.

Phillips, S. 2005. Environmental impacts of marine aquaculture: issue papers. Pacific States Marine Fisheries Commission, USA. 18 pp.

Rhisshipal, R. and Philip, R. 1998. Selection of marine yeasts for the generation of single cell protein from prawn-shell waste. Bioresource Technology 65: 255-256.

Rungruangsak-Torrissen, K and Male, R. 2000. Trypsin isozymes: development, digestion and structure. In: Seafood Enzymes, Utilization and Influence on Postharvest Seafood Quality. Edited by N.F. Haard and B.K. Simpson. Marcel Dekker, Inc., New York. pp 215-269.

Rungruangsak-Torrissen, K., Pringle, G.M., Moss.R. and Houlihan, D.F. 1998. Effects of varying rearing temperatures on expression of different trypsin isozymes, feed conversion efficiency and growth in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) Fish Physiology and Biochemistry 19: 247-255.

Rungruangsak-Torrissen, K., Rustad, A., Sunde, J., Eiane, S.A., Jensen, H. B., Opstvedt, J., Nygard, E., Samuelsen, T.A., Mundheim, H., Luzzana, U. and Venturini, G. 2002. In vitro digestibility base on fish crude enzyme extract for prediction of feed quality in growth trials. Journal of the Science of Food and Agriculture 82: 644-654.

Semmens, K. and Miller, D. 2002. Waste management in aquaculture. Aquaculture information series publication #AQ02-1, Agricultural and Resource Economics Program, West Virginia University, USA.10 pp.

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

Soltan, M.A., Hanafy, M.A. and Wafa, M.I.A. 2008. Effect of replacing fish meal by a mixture of different plant protein sources in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) diets. Global Veterinaria 2: 157-164.

Torrisen, K.R. 1984. Charactterization of proteases in the digestive tract of Atlantic salmon (*Salmo solar*) in comparison with Rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Comparative Biochemistry and Physiology 77B: 669-674.

Von der Haar, T. 2007. Optimized Protein Extraction for Quantitative Proteomics of Yeasts. PLoS ONE 2, e1078.

Vuthiphandchai, V. 1986. Effect of dietary carbohydrate levels on growth, feed conversion efficiencies and body composition of Nile tilapia. M.Sc. thesis. Asian Institute of Technology. Thailand. 86 pp.

Walford, J and T.J. Lam. 1993. Development of digestive tract and proteolytic enzyme activity in seabass (*Lates calcarifer*) larvae and juveniles. Aquaculture 109: 187-205.

.

ผลผลิต (Output)

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการทั้งในระดับชาติและนานาชาติ (ระบุชื่อผู้แต่ง ชื่อเรื่อง ชื่อวารสาร ปี เล่ม เลขที่และหน้า)

1. วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย และสุบัณฑิต นิ่มรัตน์. 2561. กิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินและไคโมทริปซินของปลานิล. การประชุมวิชาการระดับชาติ “วิทยาศาสตร์วิจัยครั้งที่ 10” คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.

2. การจดสิทธิบัตร

-

3. ผลงานเชิงพาณิชย์ (มีการนำเสนอไปผลิต/ขาย/ก่อให้เกิดรายได้ หรือมีการนำไปประยุกต์ใช้โดยภาคธุรกิจ หรือบุคคลทั่วไป)

-

4. ผลงานเชิงสาธารณะ (เน้นประโยชน์ต่อสังคม ชุมชน ท้องถิ่น)

-