

ผลของการเสริมโคโคซานในอาหารกุ้งต่อการเจริญเติบโต อัตราการรอดตาย การลอกคราบ  
และการสนองตอบต่อภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*)  
ที่ความเค็มน้ำ 3 ระดับ

กมลรัตน์ ยงเจริญ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวาริชศาสตร์


คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

กันยายน 2561

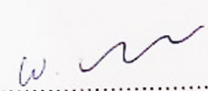
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

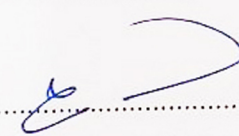
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณา  
วิทยานิพนธ์ของกมลรัตน์ ยงเจริญ ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม  
หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวาริชศาสตร์ ของมหาวิทยาลัยบูรพาได้


คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

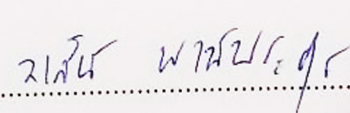
  
..... อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บุญรัตน์ ประทุมชาติ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

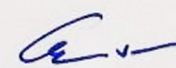
  
..... ประธาน  
(ดร.พิเชต พลายเพชร)

  
..... กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บุญรัตน์ ประทุมชาติ)

  
..... กรรมการ  
(นายสกันธ์ แสงประดับ)

  
..... กรรมการ  
(ดร.วาสิณี พงษ์ประยูร)

คณะวิทยาศาสตร์อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม  
หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวาริชศาสตร์ของมหาวิทยาลัยบูรพา

  
..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอกรัฐ ศรีสุข)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ. 2561

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยความรู้ความกรุณาจากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บุญรัตน์ ประทุมชาติ อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก คุณสภกนธ์ แสงประดับ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้ความรู้ ให้คำปรึกษาแนะนำแนวทางที่ถูกต้อง ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ด้วยความละเอียดถี่ถ้วน และเอาใจใส่ด้วยดีเสมอมา ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งเป็นอย่างยิ่ง จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ ดร.พิเชต พลายเพชร และดร.วิลาสินี พงษ์ประยูร ที่กรุณาให้ความรู้ ตรวจสอบแก้ไขและวิจารณ์ผลงานทำให้งานวิจัยมีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณภาควิชาวาริชศาสตร์ รวมทั้งบุคลากรของภาควิชาวาริชศาสตร์ทุกท่าน และขอบคุณเพื่อน ๆ รวมทั้งท่านอื่น ๆ ที่มีได้กล่าวถึงในที่นี้ ที่ให้ความช่วยเหลือ ทำให้การทำ วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณศูนย์วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีอาหารสัตว์น้ำชลบุรี ที่ความอนุเคราะห์ ในส่วนการวิเคราะห์แร่ธาตุด้วยเครื่อง ICP-OES (Inductively Coupled Plasma Optical Emission spectrometry)

ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัว ที่มีส่วนช่วยให้กำลังใจและให้ความช่วยเหลือ ทำให้การทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดี

กมลรัตน์ ยงเจริญ

56910025: สาขาวิชา: วาริชศาสตร์; วท.ม. (วาริชศาสตร์)

คำสำคัญ: กุ้งขาวแวนนาไม/ ไคโตซาน/ การเจริญเติบโต/ ความเค็ม

กมลรัตน์ ยงเจริญ: ผลของการเสริมไคโตซานในอาหารกุ้งต่อการเจริญเติบโต

อัตราการรอดตาย การลอกคราบ และการสนองตอบต่อภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) ที่ความเค็มน้ำ 3 ระดับ (EFFECT OF DIETARY CHITOSAN SUPPLEMENTATION IN PELLET FEED ON GROWTH PERFORMANCE, SURVIVAL RATE, MOLTING AND IMMUNE RESPONSE OF PACIFIC WHITE SHRIMP (*Litopenaeus vannamei*) AT 3 SALINITY LEVELS) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: บุญรัตน์ ประทุมชาติ, Ph.D., สกนธ์ แสงประดับ, M.Sc. 74 หน้า. ปี พ.ศ. 2561.

ผลของการเสริมไคโตซานในอาหารร่วมกับความเค็มต่อการเจริญเติบโต อัตรารอด ความถี่ของการลอกคราบ การเปลี่ยนแปลงทางสรีระเคมีและการสนองตอบต่อภูมิคุ้มกันของกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) ซึ่งได้วางแผนการทดลอง two-way ANOVA ตามอาหารที่มีการเสริม ไคโตซาน 0.2 % และไม่เสริมไคโตซาน (ชุดควบคุม) ร่วมกับความเค็ม 3 ระดับ (10, 23 และ 36 ppt) ทำ 4 ซ้ำ โดยเลี้ยงกุ้งขาวขนาด 3.18±0.08 กรัม ความยาว 7.61±0.34 เซนติเมตร ให้อาหารทดลองที่มีโปรตีน 36% ให้อาหารอัตรา 5% ของน้ำหนักตัวต่อวัน แบ่งให้วันละ 4 ครั้ง เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ตรวจสอบพารามิเตอร์การเจริญเติบโต อัตรารอด อัตราแลกเนื้อ (FCR) ความถี่ในการลอกคราบ ระยะเวลาที่ต้านการสลายจากการทดสอบความเครียด (ARP) ปริมาณเม็ดเลือดรวม (THC) ระยะเวลาที่เลือดแข็งตัว (CP) ความเข้มข้นของอิออน (ion) โซเดียม (Na) โพแทสเซียม (K) แคลเซียม (Ca) แมกนีเซียม (Mg) ฟอสฟอรัส (P) แมงกานีส (Mn) ทองแดง (Cu) ซัลเฟอร์ (S) คลอไรด์ (Cl) ของพลาสมาและเปลือกกุ้ง ความเข้มข้นโปรตีนรวมในพลาสมา ปริมาณไคติน (Chitin) และไคโตซาน (Chitosan) ในเปลือก

ผลการทดลองพบว่า กุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารที่เสริมไคโตซาน 0.2% มี % น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (%WG) อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะด้านน้ำหนัก (%SGRW) % ความยาวที่เพิ่มขึ้น (%LG), ARP และโปรตีนในพลาสมาสูงกว่า และ FCR ต่ำกว่ากุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารชุดควบคุม ( $p < 0.05$ ) เมื่อพิจารณาผลของความเค็มปัจจัยเดียวพบว่า กุ้งที่เลี้ยงในน้ำความเค็ม 36 ppt มีน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นต่อวัน (ADG) %WG % SGRW และ %LG สูงกว่าที่กุ้งเลี้ยงใน 10 ppt และ 23 ppt ( $p < 0.05$ ) ขณะที่ กุ้งที่เลี้ยงในน้ำความเค็ม 10 ppt มีอัตรารอด (%SR) ต่ำ ( $p < 0.05$ ) และ FCR สูงกว่า ( $p < 0.05$ ) อีก 2 ระดับความเค็ม ARP นานขึ้นเมื่อเลี้ยงกุ้งในน้ำความเค็มต่ำลง ( $p < 0.05$ ) ความเค็มที่สูงขึ้นส่งผลให้ ความเข้มข้นของโปรตีน กับ Mg ในพลาสมา และ Mn ในเปลือกสูงสุด แต่ Ca ในเปลือกต่ำลง ในกุ้งที่เลี้ยงในน้ำความเค็ม 36 ppt ค่า Mg ในเปลือกและ THC ในเลือดสูงขึ้น ( $p < 0.05$ ) เมื่อเลี้ยงกุ้งในน้ำความเค็ม 23 ppt ( $p < 0.05$ )

เมื่อพิจารณาผลร่วมของการเสริมไคโตซานและความเค็มในการเลี้ยงกุ้ง พบว่าอัตรารอดของ กุ้งกลุ่มที่เลี้ยงในน้ำความเค็ม 23 ppt และ 36 ppt และให้อาหารที่ผสมไคโตซานมีค่าสูงกว่า ( $p < 0.05$ ) กุ้งชุดที่เลี้ยงใน 10 ppt ทั้ง 2 กลุ่ม ARP ของกุ้งกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมไคโตซานมีค่าสูงกว่าชุดที่ ให้อาหารชุดควบคุม ( $p < 0.05$ ) ในน้ำความเค็ม 10 ppt FCR กุ้งทุกกลุ่มที่เลี้ยงในน้ำความเค็ม 23 ppt และ 36 ppt มีค่า FCR ต่ำกว่า ( $p < 0.05$ ) กุ้งทั้ง 2 กลุ่มที่เลี้ยงในน้ำความเค็ม 10 ppt ค่าโปรตีนในพลาสมา ของกุ้งกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมไคโตซานมีค่าสูงกว่า ( $p < 0.05$ ) ชุดที่ให้อาหารควบคุม ทั้งในน้ำความเค็ม 10 ppt และ 36 ppt และ ค่า THC ของกุ้งกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมไคโตซานมีค่าสูงกว่า ( $p < 0.05$ ) ชุดที่ให้อาหารควบคุมที่ความเค็ม 36 ppt

56910025: MAJOR: AQUATIC SCIENCE; M.Sc. (AQUATIC SCIENCE)

KEYWORDS: WHITE SHRIMP/ CHITOSAN/ GROWTH/ SALINITY

KAMONRAT YOUNGJAREAN: EFFECT OF DIETARY CHITOSAN

SUPPLEMENTATION IN PELLET FEED ON GROWTH PERFORMANCE, SURVIVAL RATE, MOLTING AND IMMUNE RESPONSE OF PACIFIC WHITE SHRIMP

(*Litopenaeus vannamei*) AT 3 SALINITY LEVELS. ADVISORY COMMITTEE:

BOONYARATH PRATOOMCHAT, Ph.D., SAKON SANGPRADUB, M.Sc. 74 P. 2018.

Effect of dietary chitosan supplementation on growth, survival, molt frequency, physicochemical change and immune response of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) was studied. Factorial design was used for the experiment as followed two types of diets (chitosan supplementary diet at 0.2% and without chitosan supplement as control) coordinated with the three levels of salinity (10, 23 and 36 ppt). Four replications were operated. Shrimps with size of  $3.18 \pm 0.08$  g in wet weight and  $7.61 \pm 0.3$  cm in total length were used and fed four times daily with test diet containing 36% protein at 5% body weight for 8 weeks. Growth parameters, survival rate, feed conversion ratio (FCR) molting frequency (MF), anaesthetized resistant period (ARP), total hemocyte count (THC) hemolymph clotting period, concentrations of Na, K, Ca, Mg, P, Mn, Cu, S, and Cl ions in plasma and cuticle, total protein in plasma, chitin and chitosan contents in the cuticle were investigated.

The results showed that %weight gain (%WG), %specific growth rate in weight (%SGRW), %length gain (%LG), ARP, and plasma protein of shrimp fed with 0.2% chitosan supplemented diet were higher than those of control diet ( $p < 0.05$ ) while FCR showed lower than that of control ( $p < 0.05$ ). Consideration of salinity effect, the results found that average daily growth (ADG), %WG, %SGRW and %LG of shrimp that raising at 36 ppt showed higher ( $p < 0.05$ ) than those of at 10 ppt and 23 ppt. Shrimp raising in 10 ppt showed lower %SR ( $p < 0.05$ ) and higher FCR ( $p < 0.05$ ) when compared to the other salinities. ARP value increased ( $p < 0.05$ ) when raising at lower salinity. The highest concentrations of plasma protein and Mn in cuticle ( $p < 0.05$ ) were found in shrimp that raising in 36 ppt. Mg in cuticle and THC values were higher ( $p < 0.05$ ) when cultured at 23 ppt ( $p < 0.05$ ).

Consideration of chitosan supplementation and salinity for raising shrimp, %SR of shrimp reared in 23 ppt and 36 ppt and fed on chitosan supplementary diet showed higher ( $p < 0.05$ ) than that of the others. ARP of shrimp fed on chitosan supplementary diet showed higher ( $p < 0.05$ ) than that of control diet in 10 ppt. FCR values of groups in 23 ppt and 36 ppt showed lower ( $p < 0.05$ ) than those of 10 ppt. Plasma protein of shrimp fed on chitosan supplementary diet was higher than that of control diet both 10 ppt and 36 ppt. THC of shrimp fed with chitosan supplementary diet showed higher ( $p < 0.05$ ) than that of control diet at 36 ppt.

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญภาพ.....	ฌ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
สมมติฐานของการวิจัย.....	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย.....	3
ขอบเขตของการวิจัย.....	3
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
ชีววิทยา.....	4
โครงสร้างเปลือกของครัสเตเชียน.....	5
วงจรการลอกคราบของกุ้งทะเล.....	6
องค์ประกอบของสารอินทรีย์และสารอินทรีย์ในเลือดกุ้ง.....	7
สารไคติน.....	12
สารไคโตซาน.....	14
การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำกับการประยุกต์ใช้ไคโตซาน.....	18
ผลของไคโตซานต่อการเจริญเติบโต(Growth)และอัตราแลกเนื้อ(FCR).....	18
ผลของไคโตซานต่ออัตราการรอด (%Survival Rate).....	20
ผลของไคโตซานต่อปริมาณไคตินและไคโตซานในเปลือก.....	23
ผลของไคโตซานต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง.....	23

## สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า	
3	วิธีการดำเนินงานวิจัย	31
	สถานที่ทำการวิจัย.....	31
	ระยะเวลาดำเนินการวิจัย.....	31
	อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย.....	31
	วิธีดำเนินการวิจัย.....	33
4	ผลการวิจัย.....	42
	ผลของการเสริมโคโตซานในอาหารและระดับความเค็มในการเลี้ยงต่อการเจริญเติบโต อัตรารอด อัตราแลกเนื้อ ความถี่ในการลอกคราบ และระยะเวลาต่อการสลบของกุ้งขาวแวนนาไม.....	42
	ผลของการเสริมโคโตซานในอาหารและระดับความเค็มในการเลี้ยงต่อปริมาณแร่ธาตุในพลาสมา โปรตีนในพลาสมา ระยะเวลาที่เลือดแข็งตัว และปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งขาวแวนนาไม.....	47
	ผลของการเสริมโคโตซานในอาหารและระดับความเค็มในการเลี้ยงต่อปริมาณแร่ธาตุ โคตินและโคโตซานในเปลือกกุ้งขาวแวนนาไม.....	51
5	อภิปรายและสรุปผล.....	55
	สรุปผลการวิจัย.....	62
	ข้อเสนอแนะ.....	63
	รายการอ้างอิง.....	64
	ประวัติย่อของผู้วิจัย.....	74

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	คุณสมบัติทางเคมีของโคโตซานตามน้ำหนักโมเลกุล.....	17
2	ผลของโคโตซานต่อการเจริญเติบโต (Growth) และอัตราแลกเนื้อ (FCR).....	21
3	ผลของโคโตซานต่ออัตราการรอด (%Survival Rate).....	25
4	ผลของโคโตซานต่อปริมาณโคตินและโคโตซานในเป็ลือก.....	26
5	ผลของโคโตซานต่อภูมิคุ้มกัน (Immune) และการทนต่อความเครียด (Tolerance for Stress).....	29
6	สูตรอาหารทดลองกุ้งขาวและองค์ประกอบทางเคมีอย่างหยาบของอาหาร.....	36
7	ระดับพฤติกรรมกุ้งขาวที่กำหนดระดับการสลับ.....	41



## สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	โครงสร้างทางเคมีของ เซลลูโลส ไคติน ไคโตซาน.....	12
2	แอลฟา-ไคติน ( $\alpha$ -Chitin).....	12
3	เบต้า-ไคติน ( $\beta$ -Chitin).....	13
4	แกมมา-ไคติน ( $\gamma$ -Chitin).....	13
5	ระบบเลี้ยงกุ้งที่ความเค็ม 3 ระดับ.....	34
6	กราฟมาตรฐานโปรตีนโบวีซีรั่มอัลบูมิน ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ในพลาสมากุ้ง.....	38
7	ผลของความเค็ม 3 ระดับ ไคโตซานที่ 0 (C) และ 0.2% (Chi) และผลของ ความเค็มร่วมกับไคโตซาน ต่อ $ADG_w$ , %WG, $SGR_w$ และ %LG.....	44
8	ผลของความเค็ม 3 ระดับ ไคโตซานที่ 0 (C) และ 0.2% (Chi) และผลของ ความเค็มร่วมกับไคโตซาน ต่อ $SGR_L$ , SVW, SRL และ MF.....	45
9	ผลของความเค็ม 3 ระดับ ไคโตซานที่ 0 (C) และ 0.2% (Chi) และผลของ ความเค็มร่วมกับไคโตซาน ต่อ %SR, FCR และ Stress test.....	46
10	ผลของความเค็ม 3 ระดับ ไคโตซานที่ 0 (C) และ 0.2% (Chi) และผลของ ความเค็มร่วมกับไคโตซาน ต่อ Na, K และ Ca.....	48
11	ผลของความเค็ม 3 ระดับ ไคโตซานที่ 0 (C) และ 0.2% (Chi) และผลของ ความเค็มร่วมกับไคโตซาน ต่อ Mg, P และ Cu.....	49
12	ผลของความเค็ม 3 ระดับ ไคโตซานที่ 0 (C) และ 0.2% (Chi) และผลของ ความเค็มร่วมกับไคโตซาน ต่อ Clotting, Protein plasma และ THC.....	50
13	ผลของความเค็ม 3 ระดับ ไคโตซานที่ 0 (C) และ 0.2% (Chi) และผลของ ความเค็มร่วมกับไคโตซานต่อ Na, K และ Ca.....	52
14	ผลของความเค็ม 3 ระดับ ไคโตซานที่ 0 (C) และ 0.2% (Chi) และผลของ ความเค็มร่วมกับไคโตซาน ต่อ Mg, P และ Cu.....	53
15	ผลของความเค็ม 3 ระดับ ไคโตซานที่ 0 (C) และ 0.2% (Chi) และผลของ ความเค็มร่วมกับไคโตซาน ต่อ P, Chitin และ Chitosan.....	54

# บทที่ 1

## บทนำ

### ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในรอบ 10 ปีที่ผ่านมาผลผลิตกุ้งในประเทศไทยมากกว่า 90% คือกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) (Fast & Menasveta, 2000 cited in Boyd, Thunjai, & Boonyaratpalin, 2002) ด้วยลักษณะเด่นของสายพันธุ์เจริญเติบโตเร็ว เลี้ยงง่าย อัตรารอดสูง ใช้ระยะเวลาในการเลี้ยงเร็วกว่ากุ้งชนิดอื่น ๆ อีกทั้งมีความทนทานสูงในสภาวะแวดล้อมและความเค็มน้ำที่เปลี่ยนแปลง สามารถปรับตัวต่อความเค็มได้ตั้งแต่ช่วง 1-40 ppt (Davis, Samocha, & Boyd, 2004) จากลักษณะดังกล่าวข้างต้นสามารถช่วยลดต้นทุนค่าใช้จ่ายในการชื้อน้ำเค็มและการแพร่ระบาดของโรคกุ้งได้ทางหนึ่ง เกษตรกรในหลายพื้นที่จึงหันมาเลี้ยงกุ้งขาวที่ความเค็มน้ำที่ต่ำมาก ๆ ทำให้ประสบปัญหาการลอกคราบแล้วตาย ลอกคราบไม่ออก ทำให้อัตราแลกเนื้อสูง และเติบโตช้า เนื่องจากกุ้งขาวต้องสูญเสียพลังงานเพื่อรักษาสมดุลเกลือแร่ในร่างกายให้เหมาะสมกับสภาพแวดล้อม จนไม่เพียงพอสำหรับใช้ในการลอกคราบเพื่อการเจริญเติบโตได้เต็มที่ ซึ่งความเค็มที่เหมาะสมที่กุ้งขาวในแง่ของสมดุลเกลือแร่ คือ ความเค็มประมาณ 23 ppt ในการเลี้ยงกุ้งขาวที่ความเค็มน้ำ 10 ppt พบว่ากุ้งต้องใช้พลังงานจากแหล่งโปรตีน เพื่อปรับสมดุลในร่างกายเป็นอันดับแรกก่อนใช้เพื่อการลอกคราบและการเจริญเติบโต จากความเค็มของน้ำที่ไม่เหมาะสมนี้ส่งผลต่อให้เกิดความเครียดและความต้านทานโรค (บุญรัตน์ ประทุมชาติ และกระสินธุ์ หังสพฤกษ์, 2554) และเมื่ออาศัยอยู่ในน้ำที่มีความเค็มสูงกว่า 23 ppt พบว่าจะต้องใช้พลังงานในการขับเกลือแร่บางชนิดที่มากเกินไปเกินความต้องการออกจากร่างกายก่อนเช่นกัน ด้วยสายพันธุ์ที่เจริญเติบโตเร็ว กระบวนการสะสมสารอาหารและแร่ธาตุทั้ง 9 ชนิด ต้องเตรียมพร้อมเสมอและตลอดเวลาในการสร้างเปลือกและลอกคราบให้สมดุลกัน ซึ่งความเค็มมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารอินทรีย์และอนินทรีย์ในร่างกายครัสเตเชียน (บุญรัตน์ ประทุมชาติ, พิชายู สว่างวงศ์ และจอร์จ มาซาโด, 2546) สารอินทรีย์ 45% ในโครงสร้างเปลือกกุ้งประกอบด้วยไคติน (Chitin) และโปรตีน (Pratoomchat, Sawangwong, Guedes, Reis, & Machado, 2002a) ไคโตซานสะสมมากที่สุด ลำตัว จึงสามารถนำไคโตซานที่เป็นอนุพันธ์ของไคตินเป็นสารตั้งต้นที่กุ้งขาวนำไปใช้ในการสร้างเนื้อเยื่อและเปลือก เมื่อกุ้งขาวได้รับไคโตซานในปริมาณที่เหมาะสม นอกจากจะมีบทบาทต่อการลอกคราบ ที่สมบูรณ์แล้วยังช่วยเสริมสร้างระบบภูมิคุ้มกัน (Immune enhancement) ในร่างกายจากการกระตุ้นการสร้างเม็ดเลือดทั้งหมด (Total haemocyte) ทำให้มี Oxyhaemocyanin เพิ่มขึ้น

สามารถจับตัวกับออกซิเจนส่งผลต่อระบบไหลเวียนของเลือดได้ดี มีการผลิต Superoxide anion และกิจกรรมของเอนไซม์ Superoxide dismutase (SOD) ภายในเซลล์ให้สูงขึ้น (Lee & Shiau, 2002) สุขภาพของกุ้งขาวดี ทำให้เพิ่มอัตราการรอดเพิ่มขึ้น ดังรายงานพบว่าเสริมโคโตซานในอาหารกุ้งขาว 0.2% ช่วยเพิ่มการเจริญเติบโต (Niu et al., 2011) นอกจากนี้ยังมีผลต่อภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำเมื่อได้รับอาหารที่เสริมโคโตซาน 0.1- 0.2% ช่วยสร้างสารต้านอนุมูลอิสระและภูมิคุ้มกัน (Niu et al., 2013b)

ผลการวิจัยนี้ส่งผลให้เกิดความรู้ความเข้าใจในเรื่องการเสริมโคโตซาน 0.2% แปรผันตามความเค็มของน้ำต่อการเปลี่ยนแปลงทางสรีรเคมีของกุ้ง ความสำคัญหรือความจำเป็นของโคโตซานเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในกระบวนการลอกคราบ การสร้างเปลือกใหม่ และการเจริญเติบโต ความจำเป็นของการใช้โคโตซานเพื่อเสริมในอาหารสำเร็จรูป หรือระบบของการเลี้ยงกุ้งแบบพัฒนาซึ่งจะทำให้เกิดความชัดเจนมากขึ้นในวิธีการเลี้ยงและมีประโยชน์ในการพัฒนาด้านสภาพของอาหารที่ควรพิจารณานำเอาโคโตซานเสริมลงไปในช่วงตอนการผลิตอาหาร ทำให้ทราบถึงการขาดแคลนของแร่ธาตุและสารอินทรีย์ของกุ้งขาวต่อการลอกคราบแล้วตาย ลอกคราบไม่ออกหรือเปลือกกุ้งนึ่ม เนื่องจากไม่มีรายงานการวิจัยด้านการเสริมโคโตซานในอาหารเลี้ยงกุ้งขาวกับความเค็มของน้ำ จึงมีความจำเป็นที่จะต้องทำการวิจัยเพื่อช่วยเสริมการเพิ่มผลผลิตและตอบสนองของความต้องการด้านการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวที่ทำรายได้สูงให้กับประเทศไทย

### วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อทราบผลของการเสริมโคโตซานในอาหารต่อการเจริญเติบโต ความถี่ของการลอกคราบ อัตราแลกเปลี่ยน อัตราการรอดตาย ระยะเวลาสลบระยะที่ 3 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นแร่ธาตุ 9 ชนิด ในพลาสมาและเปลือก โคโตซานในเปลือกกุ้ง รวมถึงระยะเวลาเลือดแข็งตัวของเลือด โปรตีนในพลาสมา ปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งขาว (*L.vannamei*) วัฏรุ่นที่เลี้ยงในน้ำความเค็ม 3 ระดับ

### สมมติฐานของการวิจัย

การเสริมโคโตซานในอาหารที่เลี้ยงกุ้งขาวทุกระดับความเค็มน้ำ น่าจะส่งผลเชิงบวกต่อการเจริญเติบโต อัตราการรอดตาย ระยะเวลาสลบระยะที่ 3 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นแร่ธาตุ 9 ชนิด ในพลาสมาและเปลือก โคโตซานในเปลือกของกุ้งและการเปลี่ยนแปลงทางสรีระเคมีของกุ้ง รวมถึงระยะเวลาเลือดแข็งตัวของเลือด โปรตีนในพลาสมา ปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งขาว (*L. vannamei*) วัฏรุ่นที่เลี้ยงในน้ำความเค็ม 3 ระดับ ต่อผลการสนองตอบต่อภูมิคุ้มกัน

## ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย

ทราบว่าสารเสริมโคโคซานในอาหารที่เลี้ยงกุ้งขาว (*L. vannamei*) ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 23 ppt มีส่วนช่วยในการแก้ปัญหากุ้งเจริญเติบโตช้า กุ้งลอกคราบไม่ออก และมีอัตราการรอดต่ำ เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการพัฒนาการเลี้ยงและเพิ่มผลผลิตอุตสาหกรรมกุ้งขาว

## ขอบเขตการวิจัย

วางแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียล (factorial design) 2x3 ตามความเข้มข้นของ โคโคซานในอาหาร 2 ระดับ (0 และ 0.2%) และการเลี้ยงกุ้งขาวในความเข้มข้น 3 ระดับ (10 ppt 23 ppt และ 36 ppt) แบ่งออกเป็น 6 ชุดทดลอง ๆ ละ 4 ซ้ำ ใช้เลี้ยงกุ้งขาวจากบ่อเลี้ยงแบบพัฒนา ขนาดเฉลี่ย 3 กรัม เลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน ทำการตรวจสอบการเจริญเติบโตจากเปอร์เซ็นต์การเพิ่ม น้ำหนัก (%WG) การเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน (ADG) อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (SRG) ความถี่ ในการลอกคราบต่อวัน อัตราแลกเนื้อ (FCR) อัตรารอด (SR) และระยะเวลาสลบระยะที่ 3 ของ กุ้งขาวจากการทดสอบความเครียด

เมื่อสิ้นสุดการทดลอง นำตัวอย่างกุ้งขาวมาทำการเก็บเลือดและเปลือก เพื่อใช้ ตรวจสอบ โซเดียม ( $\text{Na}^+$ ) โพแทสเซียม ( $\text{K}^+$ ) แคลเซียม ( $\text{Ca}^{2+}$ ) แมกนีเซียม ( $\text{Mg}^{2+}$ ) ฟอสฟอรัส ( $\text{P}^{4+}$ ) ซัลเฟอร์ ( $\text{S}^{2-}$ ) คลอไรด์ ( $\text{Cl}^-$ ) แมงกานีส ( $\text{Mn}^{7+}$ ) และทองแดง ( $\text{Cu}^{2+}$ ) ทั้งในเลือดและในเปลือก โปรตีนในพลาสมา ไคตินและโคโคซานในเปลือกกุ้ง จำนวนเม็ดเลือดและระยะเวลาเลือดแข็งตัว (Clotting) เพื่อใช้เป็นดัชนีชี้วัดการสนองตอบต่อภูมิคุ้มกัน

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 1. ชีววิทยา

กุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) หรือกุ้งขาวแปซิฟิก Pacific White Shrimp หรือที่เรียกกันทั่วไปว่า White Leg Shrimp ลักษณะรูปร่างทรงกระบอก เรียวยาว กรีเป็นแนวตรง แต่ปลายข้อมลงและความยาวกกรีน้อยกว่าก้านตาเล็กน้อย ฟันกรีด้านบนเป็นรอยหยักถี่ เห็นร่องบน กกรีดเด่น มีขนาด 1 คู่ ตามีสีแดงเข้ม สีลำตัวสีขาวใส เปลือกสีเทา ขาเดินสีขาว หางสีแดงเรื่อ และปลายหางสีแดงเข้มเปลือกหุ้มตัว ขนาดลำตัวยาวสูงสุด 9 นิ้ว (ประมาณ 23 cm) ขนาดเล็กกว่า กุ้งกุลาดำและกุ้งแชบ๊วย อาศัยตามแนวชายฝั่งมหาสมุทรแปซิฟิก บริเวณป่าชายเลนลักษณะพื้นโคลนจนถึงระดับความลึกประมาณ 70 m (ปิยะบุตร วานิชพงษ์พันธุ์, 2544 อ้างถึงใน บุญรัตน์ ประทุมชาติ, อรสา สุริยาพันธุ์, กิตติยา อุปถัมภ์ และสว่างพงศ์ สมมาตร, 2550)

กุ้งขาวกินอาหารได้ทั้งพืช สัตว์หน้าดินและซากสิ่งมีชีวิต จะว่ายน้ำเข้าจับอาหารที่จม กิ่งลอย ทั้งพืชและสัตว์บริเวณกลางน้ำ บริเวณน้ำตื้นจะเคลื่อนที่ว่ายน้ำกิ่งคลาน การเคลื่อนที่ตลอดเวลาและเร็วจึงต้องการออกซิเจนมาก จึงเน้นระบบการให้อากาศต้องเพียงพอต่อความต้องการในการเลี้ยง (Córdova & Messina, 2005) กุ้งชนิดนี้กินอาหารมากโตเร็ว การเลี้ยงแบบให้อาหารสำเร็จรูป จะพิจารณาตามอัตราการเจริญเติบโตและน้ำหนักตัวของกุ้งที่เพิ่มขึ้น พบการเลี้ยงกุ้งชนิดนี้มากในประเทศเอกวาดอร์ เม็กซิโก เปรู ปานามา ฮอนดูรัส โคลัมเบีย บราซิล และประเทศไทย นิยมเรียกกุ้งขาวแวนนาไม ว่า “กุ้งขาว” เป็นกุ้งที่เลี้ยงง่ายโตเร็ว พื้นที่เลี้ยงกุ้งขาวของประเทศไทยกระจายอยู่ทั้งเขตชายฝั่งทะเลและเขตความเค็มต่ำ เพราะสามารถปรับตัวให้เข้ากับความเค็มได้ในช่วงกว้าง การปรับตัวให้เข้ากับความเค็มหมายถึง การที่กุ้งขาวพยายามรักษาสมดุลเกลือแร่ในร่างกายให้เหมาะสมกับสภาพแวดล้อม เพื่อใช้ในการควบคุมระบบประสาท การเคลื่อนไหวของกล้ามเนื้อ และการสร้างความแข็งแรงของเปลือกซึ่งกระบวนการรักษาสมดุลเกลือแร่จะต้องใช้พลังงาน ความเค็มที่เหมาะสมกับการเลี้ยงกุ้งขาว คือ 20-25 ppt อย่างไรก็ตามมีผลจากการวิจัยชี้ให้เห็นว่าความเค็มเหมาะสม เมื่อพิจารณาจาก Iso osmotic point คือ ความเค็มประมาณ 23 ppt (บุญรัตน์ ประทุมชาติ และกระสินธุ์ หังสพฤกษ์, 2554) ดังนั้น เมื่อเลี้ยงกุ้งขาวอยู่ในความเค็มที่ต่ำกว่า 23 ppt กุ้งขาวต้องใช้พลังงานเพิ่มขึ้นในการรักษาระดับเกลือในร่างกายรวมทั้งการลดขับออกและเพิ่มการนำเข้า เพื่อให้มีระดับที่เหมาะสมสำหรับร่างกาย

ในทางตรงกันข้ามถ้าเลี้ยงกุ้งในความเค็มสูงกว่า 23 ppt กุ้งขาวจะต้องเสียพลังงานในการปรับลดเกลือแร่บางชนิดออกจากร่างกาย เพื่อรักษาสภาวะสมดุลเกลือแร่เช่นเดียวกัน

## 2. โครงสร้างเปลือกของครัสเตเชีย

โครงสร้างเปลือกประกอบด้วยสารอินทรีย์ 55% จากแคลเซียมคาร์บอเนต รองลงมาคือแมกนีเซียม ฟอสฟอรัส โซเดียม โพแทสเซียม และสารอินทรีย์ 45% จากไคติน (Chitin) และโปรตีน (Pratoomchat et al., 2002a) องค์ประกอบของเปลือก ประกอบด้วยเส้นใยที่มี Chitin - Protein เป็นโครงสร้างหลัก ถัดมาคือชั้น Epicuticle ส่วนมากประกอบด้วยโปรตีน รวมถึงในชั้น Exocuticle และ Endocuticle ส่วนมากพบไคติน (Travis, 1965; cited in Pratoomchat, Sawangwong, Pakkong & Machado, 2002b) สารตั้งต้นของไคตินก็คือคาร์โบไฮเดรต ไคตินเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่สำคัญของโครงสร้างเปลือกการลอกคราบ ซึ่งตามองค์ประกอบกลุ่มโปรตีน จะเพิ่มสูงช่วงหลังลอกคราบ ซึ่งเป็นการเพิ่มความแข็งแรง ในการสร้างชั้น Epicuticle และ Exocuticle หลังจากมีการลอกคราบใหม่ ๆ ซึ่ง NaOH-Protein มีความสำคัญต่อ Sclerotization และ HCl-Protein ในการสร้างเปลือก (Pratoomchat et al., 2002a) ครัสเตเชียเจริญเติบโตด้วยการลอกคราบเปลือกเก่าทิ้งพร้อมกับสร้างเปลือกใหม่ขึ้นมาภายใต้เปลือกเก่า ซึ่งสามารถจำแนกลักษณะโครงสร้างเปลือกที่หุ้มร่างกาย ครัสเตเชียออกเป็นชั้น ๆ ดังนี้ (Camaron, 1985; Pratoomchat et al., 2002b)

2.1 เอพิคิวติเคิล (Epicuticle) เป็นชั้นที่อยู่บนสุด ประกอบด้วยสารพวกไลโปโปรตีน (Lipoprotein) ซึ่งสร้างมาจากต่อมเทกิวเมนทัล (Tegumental Gland) ที่อยู่ในชั้นเอพิเดอร์มิส (Epidermis) ในชั้นนี้จะไม่พบไคตินเป็นองค์ประกอบ มีหน้าที่ป้องกันการซึมผ่านเข้าออกของน้ำ

2.2 โปรคิวติเคิล (Procuticle) เป็นเปลือกที่อยู่ถัดมาจากชั้นเอพิเดอร์มิส ประกอบด้วย 2 ชั้น คือ

2.2.1 เอกโซคิวติเคิล (Exocuticle) เป็นชั้นที่มีการสะสมของเม็ดสี (Melamin Pigment) ทำให้เรียกชั้นนี้ว่า ชั้นเม็ดสี (Pigmented Layer) ซึ่งเป็นจุดกำเนิดสีต่าง ๆ ชั้นนี้มีไคตินเป็นองค์ประกอบอยู่ประมาณ 40-45% และมีการสะสมเกลือแคลเซียมด้วย

2.2.2 เอนโดคิวติเคิล (Endocuticle) มีไคตินเป็นองค์ประกอบแบ่งออกเป็น 2 ชั้นย่อย คือ

ก ชั้นที่มีการสะสมเกลือแคลเซียม (Calcified Layer) เป็นชั้นที่มีการสะสมเกลือแคลเซียม มีพื้นที่กว้างกว่าชั้นอื่น ๆ

ข เอพิดERMิส (Epidermis) เป็นชั้นเซลล์มีขนาดใหญ่ประกอบด้วยเซลล์ที่มีลักษณะสี่เหลี่ยมทรงสูงอัดแน่น มีเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (Connective Tissue) เซลล์ต่อม (Grand Cell) เม็ดสี (Pigment) และปลายประสาท ทำหน้าที่ขับสารออกไปทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเปลือก

### 3. วงจรการลอกคราบของกิ้งทะเล

กิ้งเจริญเติบโตโดยอาศัยกระบวนการลอกคราบ หากเกิดปัญหาในการลอกคราบขึ้น กิ้งจะหยุดการเจริญเติบโตและตาย ระยะเวลาลอกคราบของกิ้งจะควบคุมด้วยระบบประสาทส่วนกลาง และฮอร์โมน Ecdysone สร้างจาก Y-organ การที่กิ้งจะลอกคราบเร็วหรือช้าขึ้นกับปัจจัยหลายอย่าง เช่น อายุของกิ้ง อาหาร แสง และ อุณหภูมิ โดยทั่วไปกิ้งใช้ระยะเวลาในการลอกคราบนานขึ้นเมื่ออายุมากขึ้น การศึกษาวงจรการลอกคราบของคริสต์เตเซียน สังเกตได้จากการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพวิภาคของรยางค์ (Setae) ได้มีการศึกษาและแบ่งระยะต่าง ๆ ของการลอกคราบ (Smith & Dall, 1986; บุญรัตน์ ประทุมชาติ, 2545 อ้างถึงใน สว่างพงษ์ สมมาตร, 2552) ออกเป็น 3 ระยะ ได้แก่ ระยะก่อนการลอกคราบ (Proecdysis หรือ Premolt stage) ระยะการลอกคราบ (Ecdysis หรือ Molting Stage) ระยะหลังการลอกคราบ (Metaecdysis หรือ Postmolt Stage) โดยสามารถแบ่งออกเป็นระยะย่อย ๆ ดังนี้

**ระยะ A** แบ่งออกเป็น 2 ระยะย่อย คือ

ระยะ A1 เริ่มขึ้นหลังจากลอกคราบเสร็จใหม่ ๆ ลักษณะภายในและบริเวณฐานของรยางค์มีของเหลว (Cellular Matrix) ระยะนี้ใช้เวลา 1 ชั่วโมง

ระยะ A2 ภายในขนของรยางค์มีการหดตัวของของเหลว ระยะนี้ใช้เวลา 5-8 ชั่วโมง

**ระยะ B** บริเวณโคนของรยางค์มีการสร้าง Setal Cone ระยะนี้เริ่มต้นหลังจากสัตว์ลอกคราบได้ประมาณ 6-9 ชั่วโมง ไปจนถึงสิ้นสุดระยะนี้ใช้เวลาประมาณ 2 วัน

**ระยะ C** คราบของสัตว์จะแข็งเต็มที่ โคนขนของรยางค์ทุกเส้นมี Setal Cone โดยมี Epidermal Cell แทรกอยู่ ระยะนี้เวลาประมาณ 1-2 วัน และจะสิ้นสุดระยะนี้เมื่อ Epidermal Cell เริ่มแยกออกจากบริเวณฐานขนของรยางค์

**ระยะ D** สามารถแบ่งออกได้ 5 ระยะคือ

ระยะ D<sub>0</sub> เริ่มเมื่อ Epidermal Cell แยกตัวออกจากฐานขนของรยางค์ โดยเรียงเป็นแนวนานกับ Setal Node ซึ่งเรียกว่า Epidermal Line ระยะนี้ใช้เวลา 3-4 วัน

ระยะ D<sub>2</sub> มีการสร้างคราบใหม่ขึ้นนอกเห็นส่วนปลายขนของรยางค์สีแดงส้มโผล่ออกจาก Epidermal Line ระยะนี้ใช้เวลา 2.5 วัน

ระยะ D<sub>1</sub> ระยะนี้เป็นระยะการพัฒนาขนของรยางค์ชุดใหม่ ใช้เวลา 9-10 วัน เห็นแนว Epidermal Line ลักษณะคล้ายลูกคลื่น และเว้ามากขึ้นจนเป็นรอยหยักคล้ายขอบของเปลือกหอย เห็นได้ชัดเจนและสามารถมองเห็นปลายขนของรยางค์ชุดใหม่ได้วาง ๆ

ระยะ D<sub>2</sub> มีการสร้างคราบใหม่ขึ้นนอกเห็นส่วนปลายขนของรยางค์สีแดงส้มโผล่ ออกจาก Epidermal Line ระยะนี้ใช้เวลา 2.5 วัน

ระยะ D<sub>3</sub> มี Setal Node เกิดขึ้นที่ฐานของขนในรยางค์ชุดใหม่ ระยะนี้เริ่มก่อนลอกคราบ 9 ชั่วโมง

ระยะ D<sub>4</sub> ระยะนี้คราบเก่าจะแยกออกจากตัวสัตว์น้ำแล้ว บริเวณรอยต่อระหว่างคราบ ส่วนหัวและลำตัวเริ่มแยกออกจากกัน ใช้เวลา 1 ชั่วโมง ก่อนลอกคราบ

ระยะ E เป็นระยะที่สัตว์ลอกคราบและปรากฏขนของรยางค์แผ่ออกมาอย่างชัดเจน (บุญรัตน์ ประทุมชาติ และคณะ, 2550)

#### 4. องค์ประกอบของสารอินทรีย์และสารอินทรีย์ในเลือดกุ้ง

ระบบหมุนเวียนเลือดของพวกเดคาพอด (Decapod) จัดเป็นแบบกึ่งปิดกึ่งเปิด มีระบบหมุนเวียนเลือดภายในช่องว่างของลำตัว เนื่องจากระบบหมุนเวียนเลือดดังกล่าวประกอบด้วย หัวใจ เส้นเลือด และแ่งเลือดดำ มีแ่งเลือดกระจายอยู่ทั่วไป พบอยู่ระหว่างเนื้อเยื่อและอวัยวะต่าง ๆ ตามช่องว่างภายในลำตัว เลือดจะมีการหมุนเวียนอยู่ภายในช่องว่าง โดยอาศัยการเคลื่อนไหวของร่างกายและกล้ามเนื้อต่าง ๆ การบีบและหดตัวของหัวใจ มีฮีโมไซยานิน (Hemocyanin) ซึ่งมีองค์ประกอบของทองแดง 0.17% ลิพิด (Lipid) โปรตีน (Protein) คาร์โบไฮเดรต (Carbohydrate) มีน้อยกว่า 4 % เนื่องจากมีองค์ประกอบของทองแดง ทำให้เลือดสัตว์เหล่านี้มีสีน้ำเงินหรือฟ้า เมื่อถูกสัมผัสกับอากาศ นอกจากนี้ยังประกอบด้วยแร่ธาตุต่าง ๆ ที่เป็นองค์ประกอบที่มีความสำคัญต่อกระบวนการควบคุมสมดุลของน้ำและอิออน (นางนุช ตั้งเกริกโอฟาร์, 2550) ประกอบด้วย กุ้งทะเลมีโครงสร้างแข็งห่อหุ้มอยู่ภายนอกร่างกาย และมีเจริญเติบโตโดยการลอกคราบ ซึ่งของเสียและไนโตรเจนที่ขับถ่ายออกมามักจะอยู่ในรูปแอมโมเนีย และยังมีความสำคัญกับคุณสมบัติของเลือด โดยองค์ประกอบของเลือดมีทั้งส่วนที่เป็นสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ คือ คาร์โบไฮเดรต ไขมัน และโปรตีน (บุญรัตน์ ประทุมชาติ, บัลลังก์ เนื่องแสง และถนอมศักดิ์ บุญภักดี, 2546)



4.1 สารอินทรีย์ ได้แก่  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  และ  $\text{Cl}^-$  เมื่อพิจารณาที่ปริมาณความเข้มข้นพบว่า  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  และ  $\text{Mg}^{2+}$  ของสัตว์ที่อาศัยอยู่ในทะเลมีปริมาณมากกว่าสัตว์ที่อาศัยอยู่ในน้ำจืด ขณะที่  $\text{Ca}^{2+}$  ในเลือดของพวกที่อยู่ในน้ำจืดจะมากกว่าสัตว์ที่อยู่ในทะเล

#### 4.1.1 $\text{Na}^+$ (โซเดียม)

เป็นธาตุที่มีความเข้มข้นสูงมากชนิดหนึ่งในเลือดของครัสเตเชียน มีค่าต่ำกว่าน้ำภายนอกเล็กน้อย ทำหน้าที่รักษาสมดุลออสโมติก (Osmotic Balance) ร่วมกับ  $\text{Cl}^-$  ซึ่งมี  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  และ  $\text{Ca}^{2+}$  เป็นตัวช่วยปรับ เพื่อรักษาสภาพความเป็นกรด-ด่างให้สมดุลภายในตัว การทำงานของกล้ามเนื้อและระบบประสาท การควบคุมสมดุลของ  $\text{Na}^+$  ระหว่างภายในและภายนอกเซลล์จะมีความสัมพันธ์กับการทำงานของเอนไซม์  $\text{Na}^+ / \text{K}^+ \text{ATPase}$  และ  $\text{V-ATPase}$  ภายในห้อง

#### 4.1.2 $\text{Cl}^-$ (คลอไรด์)

เป็นธาตุที่พบในของเหลวภายในและภายนอกเซลล์สัตว์ เคลื่อนย้ายเร็วเมื่อน้ำภายนอกมีการเปลี่ยนแปลง ช่วยรักษาความดันออสโมติก และยังคงควบคุมการเข้าออกของสารและน้ำภายนอกเซลล์ กุ้งสามารถสะสม  $\text{Cl}^-$  ได้มากกว่า  $\text{Na}^+$  และ  $\text{K}^+$  มีความเข้มข้นใกล้เคียงกับ  $\text{Na}^+$  ซึ่ง  $\text{Cl}^-$  เกี่ยวข้องกับการเกิดสมดุลของแคทไอออน (Cation) และแอนไอออน (Anion) เมื่ออยู่ร่วมกับ  $\text{Na}^+$  ถ้าอยู่ในสภาพสมดุลการแลกเปลี่ยนของ  $\text{Mg}^{2+}$  และ  $\text{S}^{2-}$  จะเกิดได้ดี ปริมาณของ  $\text{Cl}^-$  ในเลือดของครัสเตเชียนจะเท่ากับน้ำทะเลหรือใกล้เคียงกัน จึงไม่มีปัญหาการปรับสมดุลเหมือนอิกอนตัวอื่น ๆ  $\text{Cl}^-$  ยังมีส่วนกระตุ้นน้ำย่อยอะไมเลส (Amylase) ให้ทำงานดีขึ้น รักษาความเป็นกรด-ด่างของน้ำย่อยและเป็นส่วนประกอบในน้ำย่อยด้วย (บุญรัตน์ ประทุมชาติ และกระสินธุ์ หังสพฤกษ์, 2556)

#### 4.1.3 $\text{Ca}^{2+}$ (แคลเซียม)

กลุ่มครัสเตเชียนมี  $\text{Ca}^{2+}$  เป็นส่วนประกอบสำคัญของโครงสร้างภายนอก อยู่ในรูปของแคลเซียมคาร์บอเนต ( $\text{CaCO}_3$ ) สะสมในตับพบในรูปของเกลือแคลเซียมฟอสเฟต ( $\text{CaPO}_4$ ) มีโปรตีนเชื่อมต่อการสะสม  $\text{Ca}^{2+}$  ในเลือดและที่ส่วนอื่นของร่างกาย ต้องควบคุมไม่ให้ระดับของ  $\text{Ca}^{2+}$  ในเลือดสูงเกินไป จึงต้องทำการขับออกนอกร่างกาย และนำไปสร้างเปลือก หรือเก็บสะสมไว้ในอวัยวะต่าง ๆ (บุญรัตน์ ประทุมชาติ และคณะ, 2546ข)  $\text{Ca}^{2+}$  จะมีการกลับเข้าสู่ร่างกายในระยะหลังการลอกคราบ และไม่มี การเปลี่ยนแปลงในระยะคราบแข็ง พบว่ามีการเคลื่อนที่ออกไปสู่น้ำภายนอกในระยะก่อนการลอกคราบ (Zanotto & Wheatly, 2003) เช่นเดียวกับในกุ้ง (*P. indicus*) ความเข้มข้น  $\text{Ca}^{2+}$  ในเนื้อเยื่อเปลือกมีการสะสมสูงที่ระยะก่อนการลอกคราบและระยะคราบแข็ง และจะลดการสะสมที่ระยะหลังการลอกคราบ (Vijayan & Diwan, 1996)

#### 4.1.4 $K^+$ (โพแทสเซียม)

ธาตุที่พบอยู่ในเซลล์ของร่างกายและเลือด โดยความเข้มข้นของ  $K^+$  ในเลือดอาจสูงหรือต่ำกว่าน้ำทะเลภายนอก (Burton, 1967, 1973, 1975 cited in Burton, 1995) ซึ่งถ้ามี  $K^+$  มากเกินไปในร่างกายต้องขับออกทางต่อมแอนเทนนัล (Antennal Gland) (บุญรัตน์ ประทุมชาติ และคณะ, 2556)

#### 4.1.5 $Mg^{2+}$ (แมกนีเซียม)

ครัสเตเซียนที่อยู่ในน้ำทะเลจะมีความเข้มข้นของ  $Mg^{2+}$  ภายในร่างกายต่ำกว่าในน้ำทะเลภายนอก พบ  $Mg^{2+}$  อยู่ในโครงสร้างของร่างกายประมาณ 70 % ส่วนอีก 30 % พบในเนื้อเยื่อและเลือด (Burton, 1995) ในกุ้งแชบ๊วย (*P. indicus*) ความเข้มข้นที่เปลี่ยนแปลงของ  $Mg^{2+}$  ในเนื้อเยื่อมีลักษณะคล้ายกับ  $Ca^{2+}$  คาดว่าสามารถใช้  $Mg^{2+}$  แทนที่  $Ca^{2+}$  ซึ่งเป็นแร่ธาตุที่สำคัญในกระบวนการสร้างเปลือกของครัสเตเซียน ในขณะที่กุ้ง (*P. californiensis*) มีระดับ  $Mg^{2+}$  ในเปลือกประมาณ 1.25 % (Vijayan & Diwan, 1996)

#### 4.1.6 $P^{4+}$ (ฟอสฟอรัส)

เป็นธาตุที่มีความสำคัญต่อการสร้างเปลือกร่วมกับ  $Ca^{2+}$  โดยเฉพาะอย่างยิ่งช่วงที่กุ้งมีการสร้างเปลือกใหม่  $P^{4+}$  ยังเป็นส่วนประกอบของกรดนิวคลีอิก และสารประกอบฟอสโฟไลปิดที่สำคัญในร่างกาย เช่น Co-enzyme, NADP และ ATP เป็นต้น ซึ่งอยู่ในบริเวณสมองและระบบประสาท (บุญรัตน์ ประทุมชาติ, พิชาญ สว่างวงศ์ และจอร์ มาซาโด, 2547)

**4.2 สารอินทรีย์** ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต ไขมัน และโปรตีน เป็นปัจจัยที่ทำให้ความเข้มข้นในเลือดของสัตว์มีความแตกต่างกัน

#### 4.2.1 คาร์โบไฮเดรต

เป็นสารอินทรีย์ในกลุ่มกลูโคสทำหน้าที่ให้พลังงาน สร้างเนื้อเยื่อและสร้างเป็นไคติน เพื่อให้เป็นโครงสร้างเปลือกระดับของกลูโคสมีการเปลี่ยนแปลงในรอบวงจรลอกคราบและตามการเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อมภายนอก ระหว่างกระบวนการลอกคราบของครัสเตเซียนส่งผลให้ระดับของกลูโคสในเลือดลดลงอย่างมาก จากการสังเคราะห์ไคตินในระยะที่คราบเริ่มแข็งเพราะน้ำตาลในเลือดเป็นองค์ประกอบหลักในการสร้างไคติน ซึ่งระยะการลอกคราบจึงต้องใช้พลังงานค่อนข้างมาก ดังนั้น ขบวนการเมตาบอลิซึมในเลือดจึงมีความสัมพันธ์กับการลอกคราบเป็นอย่างมาก ถึงแม้ว่ากลูโคสในเลือดจะมาจากการขนส่งระหว่างตับอ่อน แต่ในกระบวนการเมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรตในเลือดมีความสำคัญมากกว่าในตับ พบว่าการเปลี่ยนแปลงของระดับกลูโคสในตับจะทำให้ความเข้มข้นของกลูโคสในเลือดเปลี่ยนแปลง (Pratoomchat et al., 2002b) ปัจจัยอื่น ๆ นอกจากการเปลี่ยนแปลงในระยะลอกคราบที่สามารถทำให้ระดับกลูโคสในเลือดหรือใน

ต่ำลดลงได้ เช่น ความเครียด การอดอาหาร ฤดูหนาว ความเค็ม น้ำ อุณหภูมิ วงจรการสืบพันธุ์ และในปูม้า (*P. pelagicus*) ความเข้มข้นของคาร์โบไฮเดรตมีค่าสูงที่สุดที่ความเค็ม 15 และ 20 ppt และมีค่าลดลงความเค็ม 7-10 ppt และความเค็ม 25-40 ppt (บุญรัตน์ ประทุมชาติ และคณะ, 2546ข)

#### 4.2.2 ไขมัน

ไขมันพบน้อยมาก ส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปของฟอสโฟไลปิด (Phospholipids) และไตรกลีเซอไรด์ (Triglycerides) มีความสำคัญต่อการประหยัดการใช้พลังงาน ปริมาณของไขมันมีความสัมพันธ์กับขบวนการสลายของคาร์โบไฮเดรต ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงในรอบวงจรลอกคราบและตามการเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อมภายนอก ปกติ จะมีการเก็บสะสมไขมันไว้ใน Midgut Gland ในช่วงก่อนการลอกคราบ และจะขับออกมาหลังจากกึ่งมีการลอกคราบเพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานและโครงสร้างเปลือก (บุญรัตน์ ประทุมชาติ และคณะ, 2546ก)

#### 4.2.3 โปรตีน

ปริมาณของโปรตีนในน้ำเลือด (Plasma) ของคริสต์เตียนมีปริมาณ 4% ซึ่งนับว่าเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีปริมาณสูงที่สุด เลือดประกอบด้วย ฮีโมไซยานิน (Hemocyanin) ซึ่งพบมากที่สุดประมาณ 80-95% ของโปรตีนทั้งหมดและไฟบริโนเจน (Fibrinogen) โปรตีนมีความสำคัญต่อการจัดระเบียบโครงสร้างร่างกายเพื่อการเจริญเติบโต การพัฒนาการ ชีวพลังงาน และสรีระวิทยา เป็นองค์ประกอบของกรดนิวคลีอิก เอนไซม์ โคเอนไซม์ โครงสร้างพันธุกรรม รวมถึงการควบคุมเมตาบอลิซึม และการถ่ายทอดพลังงาน

การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของโปรตีนในพลาสมาจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วในระยะก่อนการลอกคราบ ในปูทะเล (*Scylla* sp.) พบว่า ความเข้มข้นของโปรตีนในพลาสมามีค่าเพิ่มขึ้นสูงสุดในระยะการลอกคราบตอนปลาย (Late Premolt) ซึ่งเท่ากับ 97 mg/ml และมีค่าต่ำสุดอยู่ที่ 23 mg/ml ในระยะหลังลอกคราบ (Post molt) ที่เป็นเช่นนี้ เนื่องจากในระยะก่อนการลอกคราบปูมีการดูดกลับสารอินทรีย์ต่าง ๆ จากโครงสร้างเก่าทำให้เลือดมีความเข้มข้นของโปรตีนสูงขึ้นและในระยะลอกคราบปูมีการดูดน้ำเข้าสู่ร่างกายทำให้ระดับความเข้มข้นของโปรตีนในเลือดลดลง นอกจากนี้ ยังเนื่องมาจากการนำโปรตีนไปใช้ในการสร้างโครงสร้างใหม่ด้วย (Pratoomchat et al., 2002b) ระดับความเข้มข้นของโปรตีนในเลือดจะมีการเปลี่ยนแปลงตามสภาพความเค็มในธรรมชาติ การศึกษา ในปูทะเลที่ความเค็มที่ต่างกัน พบว่าความเข้มข้นของโปรตีนในพลาสมาจะมีระดับต่ำสุดที่ความเค็ม 5 ppt และค่อย ๆ เพิ่มขึ้นที่ความเค็ม 10 และ 15 ppt

ตามลำดับ จากนั้น มีค่าสูงสุดที่ความเค็ม 20ppt (บุญรัตน์ ประทุมชาติ และคณะ, 2546ข) และเช่นเดียวกันกับในปูม้า ความเข้มข้นของโปรตีนในพลาสมา มีค่าต่ำที่ความเค็ม 7 ppt ก่อนที่มีค่าเพิ่มขึ้นสูงสุดที่ความเค็ม 10-15 ppt แล้วมีค่าลดลง และคงที่ในช่วงที่ความเค็ม 20-40ppt (บุญรัตน์ ประทุมชาติ และคณะ, 2546ข)

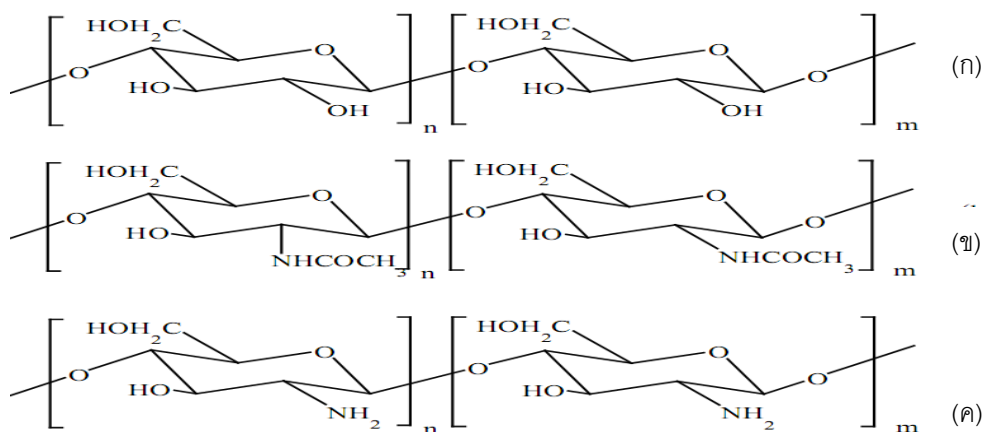
กุ้งมีความต้องการอาหารเพื่อการเจริญเติบโตและซ่อมแซมส่วนที่สึกหรอของร่างกาย Lall (2002) กล่าวว่า กุ้งที่เลี้ยงในความเค็มต่ำนั้นจะใช้โปรตีนเป็นแหล่งพลังงานมากกว่าไขมัน นอกจากนี้ปริมาณโปรตีนที่มากเกินไปก็ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของกุ้งขาว ปัจจุบันการเลี้ยงกุ้งใช้อาหารเม็ดสำเร็จรูปที่มีคุณค่าทางโภชนาการตามความต้องการของกุ้ง โดยให้มีปริมาณโปรตีนไม่ต่ำกว่าร้อยละ 30-35 คาร์โบไฮเดรตร้อยละไม่ต่ำกว่าร้อยละ 16-17 กากไม่ต่ำกว่าร้อยละ 3-4 ไขมันไม่ต่ำกว่าร้อยละ 3.5-4 ความชื้นไม่มากกว่าร้อยละ 10-12 (ศูนย์พัฒนาเทคโนโลยีอาหารสัตว์น้ำ, 2554) ซึ่งมีส่วนประกอบของ ปลาป่น เปลือกกุ้งป่น เปลือกหอยป่น กากถั่วลิสง กากถั่วเหลือง ไขมันพืช ไขมันสัตว์ วิตามิน แร่ธาตุ และสารอนุมคุณภาพอาหารสัตว์ สำหรับความต้องการแร่ธาตุสำหรับน้ำที่ความเค็มต่ำลง ปริมาณของเกลือแร่จะลดลงตามความเค็มที่ลดลง ซึ่งเกลือแร่ที่มีความสำคัญในการเลี้ยงกุ้งขาว เช่น  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  และ  $\text{Mg}^{2+}$  ก็ลดลงตามไปด้วย

#### 4.3 ระบบการแข็งตัวของเลือด (Clotting System)

ระบบการแข็งตัวของเลือดเกี่ยวเนื่องไปถึงภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดของ crustacean คือกระบวนการซึ่งทำให้เลือดกลายเป็นลิ่มเลือด กระบวนการนี้เกิดจากส่วนของเซลล์และโปรตีน มีการกระตุ้นปฏิกิริยาอย่างเป็นลำดับ จนทำให้เกิดเส้นใยไฟบริน มาเสริมสร้างความแข็งแรง เกิดลิ่มเลือดที่จับกันอยู่ กลไกนี้จะเกิดภายในระยะเวลา 1 นาที โดยเชื่อมโยงกับการปล่อยสาร antimicrobial ที่อยู่ในเซลล์เม็ดเลือดและน้ำเลือด ลักษณะการเกิดจะป้องกันการสูญเสียเลือด พร้อมทั้งกำจัดสิ่งแปลกปลอม และเซลล์เม็ดเลือด (Kawabata, Muta, & Iwanaga, 1996) รูปแบบการแข็งตัวของเลือด crustacean โดยกระบวนการขึ้นกับเอนไซม์ Transglutaminase (TGase) ปล่อยจาก Hemocytes ภายใต้การกระตุ้นการกำจัดสิ่งแปลกปลอมหรือเนื้อเยื่อที่ถูกทำลาย (Maningas, Kondo, Hirono, Taki, & Aoki, 2008) TGase ของขบวนการนี้จะอยู่ในรูป  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamyl)-lysine เชื่อมโยงระหว่าง Glutamine และ Lysine ของ Clottable Protein (CP) ขั้นตอนการเปลี่ยนแปลงเป็นสารโพลีเมอร์ ทำให้มีการพัฒนาโดยกลไกเหล่านี้ จะเกิดขึ้นกับ crustacean ได้โดยไม่จำเป็นต้องมีการกระตุ้นจากเชื้อโรค

## 5. สารไคติน

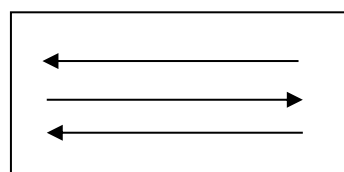
ในปี ค.ศ. 1811 Henri Bracannot ค้นพบสารไคตินครั้งแรกในหีด ต่อมาปี ค.ศ. 1823 Odier เรียกโพลิเมอร์ชีวภาพ (Biopolymers) ชนิดนี้ว่า “ไคติน” คำว่าไคตินมาจากคำว่า “Chiton” ในภาษากรีกมีความหมายว่า เกราะหุ้ม ไคตินเป็นพวกโพลีแซคคาไรด์ (Polysaccharide) มีมากในโลกเป็นอันดับสองรองจากเซลลูโลส (Cellulose) มีโครงสร้างทางเคมีคล้ายเซลลูโลส (ภาพที่ 1ก) แตกต่างกันที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 ของสารไคตินจะมีหมู่ Acetamide Group ( $\text{NH-CO-CH}_3$ ) เกาะอยู่ แต่เซลลูโลสจะเป็นหมู่ Hydroxyl Group ( $-\text{OH}$ ) ชื่อทางเคมีของสารไคติน คือ Poly  $\beta$ -(1-4) acetamido2-deoxy-D-glucose (ภาพที่ 1 ก, ข, ค) โดยมีรูปแบบซึ่งพิจารณาจากลักษณะการเรียงตัวของสายโมเลกุล 3 แบบ



ภาพที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของ (ก) เซลลูโลส (ข) ไคติน (ค) ไคโตซาน (Chitosan)

(ที่มา : Win et al., 2007 อ้างถึงใน สุวบุญ จิราญชัย, รักรอง ยกถ่าน และโกสุ่ม สมัครรัตน์, 2544)

แบบที่ 1 แอลฟา-ไคติน ( $\alpha$ -Chitin) เกิดจากการเรียงตัวของสายโซ่โมเลกุลในลักษณะสวนทางกัน (Anti-Parallel Chain Alignment) ทำให้มีความแข็งแรง ส่วนใหญ่พบในเปลือก (Cuticle) กุ้ง ปู และแมลง (ภาพที่ 2)



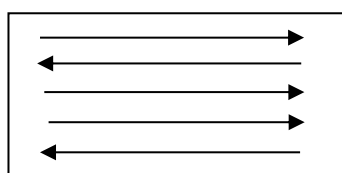
ภาพที่ 2 แอลฟา-ไคติน ( $\alpha$ -Chitin)

แบบที่ 2 เบต้า-ไคติน ( $\beta$ -Chitin) เกิดจากการเรียงตัวของสายโซ่โมเลกุลในลักษณะไปในทิศทางเดียวกัน(Parallel Chain Alignment) ทำให้มีความแข็งแรงน้อยจึงจับกันได้ไม่ค่อยแข็งแรง และไวต่อปฏิกิริยาเคมีมากกว่าแบบ อัลฟา ส่วนใหญ่พบใน หอยและแกนปลาหมึก (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 เบต้า-ไคติน ( $\beta$ -Chitin)

แบบที่ 3 แบบแกมมา-ไคติน ( $\gamma$ -Chitin) เกิดจากการเรียงตัวของสายโซ่โมเลกุลในลักษณะที่ไม่แน่นอน (Non-Parallel Chain Alignment) ทำให้มีความแข็งแรงรองจากแบบอัลฟา ส่วนใหญ่พบใน เห็ด รา และพืชชั้นต่ำ (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 แกมมา-ไคติน ( $\gamma$ -Chitin)

ด้วยรูปแบบที่แตกต่างกันทำให้ ไคติน ไคโตซานที่มาจากเปลือกกุ้ง กระดองปู มีคุณสมบัติต่างจากไคติน ไคโตซานจากแกนปลาหมึกซึ่งไวต่อปฏิกิริยาเคมีมากกว่า ทำให้การผลิตไคโตซานและอนุพันธ์อื่น ๆ ยากขึ้น ซึ่งสามารถเสื่อมสลายของสายโซ่โมเลกุล (Chain Degradation) ก็สามารถเกิดขึ้นง่าย ไคโตซานจากแกนหมึกมีสมบัติในการดูดความชื้นและน้ำดีกว่า โมเลกุลของน้ำสามารถแทรกซึมผ่านเข้าไปในผลึกได้ง่ายกว่า และยังมีความเหนียวมากกว่าไคโตซานจากเปลือกกุ้ง และกระดองปู ที่ความเข้มข้นเดียวกัน นิยมนำมาใช้เป็นสารเพิ่มความข้น (Thickener) ในผลิตภัณฑ์ทางอาหาร เครื่องสำอาง และทางการแพทย์ (เขาวภา ไหวพริบ, 2547)

## 6. สารไคโตซาน

ค้นพบสารไคโตซานในปี ค.ศ. 1859 โดย Rouget จากการต้มสารไคตินกับ สารละลายไฮเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น (Shahidi, Arachchi, & Jeon, 1999) ไคโตซาน (Chitosan) เป็นอนุพันธ์ (Derivative) ชนิดหนึ่งของสารไคตินในรูปที่มีปริมาณหมู่อะซิทิลต่ำ ที่เกิดจากปฏิกิริยากำจัดหมู่อะซิทิล (Degree of Deacetylation, DD%) ของสารไคตินด้วย ด่างเข้มข้น เมื่อมีการกำจัดหมู่อะซิทิลประมาณ 60% จะสามารถละลายในกรดอ่อนได้ การกำจัด หมู่อะซิทิลจะใช้วิธีทางเคมีทำให้โครงสร้างทางเคมีของสารไคตินเปลี่ยนไป โดยหมู่อะเซทาไมด์ ( $\text{NH-CO-CH}_3$ ) เปลี่ยนเป็นหมู่อะมิโน ( $-\text{NH}_2$ ) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 ดังนั้นสารไคโตซานคือ โพลีเมอร์ของ D-Glucosamine (2-Amino-Deoxy-D-Glucose) (ภาพที่ 1) (Win et al., 2007) อ้างถึงใน สุวนัญ จิราญชัย, รักรอง ยกถ่าน และโกสุม สมัครรัตน์, 2544 ) ประกอบด้วยสาร น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (Glucosamine) ลักษณะเรียงตัวกันเป็นสายยาว มีน้ำหนักโมเลกุลตาม ความยาวของสายไคโตซาน (ชินจิต สีพญา และอุดมลักษณ์ เวียงงาม, 2557) มีคุณสมบัติแตก สลายได้ทางชีวภาพ (Biodegradable) ย่อยสลายได้โดยจุลินทรีย์หรือแบคทีเรียในธรรมชาติ ไม่ก่อให้เกิดพิษ (Non-Phytotoxic) และอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม (สาวิกา กัลปพฤกษ์ และคณะ, 2556)

## 7. การผลิตสารไคโตซานสามารถผลิตได้ 2 วิธี ดังต่อไปนี้

วิธีทางชีวภาพ โดยการใช้จุลินทรีย์หรือเอนไซม์ในการผลิต (McGahren et al., 1984; Hang, 1990 อ้างถึงใน มนต์สรวง ยางทอง, 2549) และวิธีทางเคมี โดยการล้างทำความสะอาด วัตถุดิบ จากนั้นเข้าสู่ขั้นตอนที่สำคัญ 3 ขั้นตอน

ขั้นตอนที่ 1 กำจัดโปรตีน (Deproteinization) นำมาทำปฏิกิริยากับด่าง ด้วยไฮเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) หรือโซดาไฟ ความเข้มข้น 3-5% ที่อุณหภูมิประมาณ 80-90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง มีผลให้โปรตีนส่วนใหญ่จะถูกกำจัดออกจากวัตถุดิบ พร้อมด้วยไขมันและ รงควัตถุบางชนิดจะถูกกำจัดออก

ขั้นตอนที่ 2 กำจัดแร่ธาตุ (Deminerallization) นำมาทำปฏิกิริยากับกรดด้วยไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 3-5 % ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 คืน มีผลให้แร่ธาตุโดยเฉพาะแคลเซียมคาร์บอเนต และโปรตีนหรือรงควัตถุที่ละลายในกรด ถูกกำจัดออกไป (อาจจะมีฟอกสีในขั้นตอนนี้หรือไม่ก็ได้) ผลิตภัณฑ์ไคตินจะได้ในขั้นตอนนี้ การกำจัดด้วยสภาวะไม่รุนแรง ก็จะได้ไคตินและไคโตซานที่มี น้ำหนักโมเลกุลสูง แต่หากใช้ในสภาวะอ่อนเกินไป จะมีผลให้กำจัดแร่ธาตุและโปรตีนในวัตถุดิบไม่ สมบูรณ์

ขั้นตอนที่ 3 กำจัดหมู่อะซิติกออกจากโคติน โดยผลปฏิกิริยาทางเคมีขึ้นอยู่กับปัจจัยดังต่อไปนี้

#### ก. ชนิดของสารละลาย

สารละลายต่างที่นิยมใช้กำจัดหมู่อะซิติกในโคติน คือ NaOH, KOH, LiOH,  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  และ  $\text{Na}_2\text{PO}_4$  ในการกำจัดหมู่อะซิติกในกระดองปูจะใช้ KOH 2 M ดีกว่า NaOH 1 M เพราะได้สารละลายโคโตซานที่มีความหนืดสูงกว่าการใช้สารละลาย NaOH (Roberts, 1992 อ้างถึงใน เยาวภา ไหวพริบ, 2547)

#### ข. ความหนืดของสารละลายต่าง

ใช้ต่างในรูปสารละลาย ความเข้มข้น 30-50 % โดยน้ำหนักหากใช้ในความเข้มข้นสูงเกินไปทำให้ได้โคโตซานสูญเสียสภาพธรรมชาติ เนื่องจากใช้สภาวะที่รุนแรง อุณหภูมิที่สูงและเวลาที่นานในการกำจัด หากใช้สารละลายความเข้มข้นต่ำเกินไป จะทำให้การละลายโคโตซานในกรดอ่อนละลายได้ยากขึ้นหรือไม่สามารถละลายได้ (อัมภาวุฒ แสงนภาเพ็ญ, 2542 อ้างถึงใน เยาวภา ไหวพริบ, 2547)

#### ค. อุณหภูมิ

โดยมากใช้อุณหภูมิที่สูง ตั้งแต่ 90-140 องศาเซลเซียส (Roberts, 1992 อ้างถึงใน เยาวภา ไหวพริบ, 2547) พบว่าที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส โคโตซานที่ได้จะมีโมเลกุลลดลงเกิดจากปฏิกิริยา Degradation ถ้าใช้ความเข้มข้นสารละลายต่างสูงขึ้น อุณหภูมิที่ใช้ควรลดลงเพื่อไม่ให้เกิดสภาวะที่กำจัดรุนแรงเกินไป

#### ง. เวลา

การกำจัดหมู่อะซิติกด้วยเวลาที่นาน จะได้โคโตซานที่มีปริมาณหมู่อะซิติก และขนาดโมเลกุลลดลง แต่จะมี Charge Density สูงขึ้น (เยาวภา ไหวพริบ, 2547) สุดท้ายขั้นตอนการผลิตโคตินในการกำจัดหมู่อะซิติกโดยสารละลายต่าง ไม่สามารถกำหนดสภาวะที่เหมาะสมเป็นมาตรฐาน เพราะขั้นตอนเหล่านี้จะขึ้นกับความเข้มข้นของต่าง อุณหภูมิ และเวลาที่ใช้ แต่การเพิ่มเวลามีผลต่อความหนืดเนื่องจากเกิดการขาดของสายไซโพลีเมอร์ได้

## 8. สมบัติทางเคมีกายภาพโคโตซาน

8.1 การละลาย (Solubility) โคโตซานพบว่าสามารถละลายได้ในสารละลายกรดอ่อน กรดอินทรีย์บางชนิด ได้แก่ กรดไนตริก กรดไฮโดรคลอริก กรดเปอร์คลอริก และกรดฟอสฟอริก โดยใช้อุณหภูมิสูงปานกลาง ในบางครั้งอาจมีตะกอนเจลสีขาว มีความเหนียว สีใส เป็นการแตกตัว



ของหมู่อะมิโน มีค่าสัมประสิทธิ์การแตกตัว ( $pK_a$ ) ขึ้นกับความหนาแน่นของประจุโพลีเมอร์ มีค่าอยู่ในช่วง 6.2-6.8 เรียกว่า non-newtonia ในสารละลาย

8.2 น้ำหนักโมเลกุล (Molecular Weight) ไคโตซานมีน้ำหนักโมเลกุลช่วง  $1 \times 10^5$  ถึง  $1.2 \times 10^6$  ดาลตัน ขึ้นกับกระบวนการผลิต

8.3 การกำจัดหรือลดหมู่อะซีติล (Deacetylation) เป็นการเปลี่ยนแปลงทางเคมีที่ใช้ในการกำจัดหรือลดหมู่อะซีติล ( $CH_3CO^-$ ) ที่มีอยู่บนโมเลกุลของไคติน เพื่อให้เกิดเป็นไคโตซาน (Chitosan) ซึ่งเป็นการเพิ่มขึ้นของหมู่อะมิโน ( $NH_2^-$ ) บนโมเลกุลของไคตินและหมู่อะมิโนนี้มีความสามารถในการรับโปรตอนจากสารละลายซึ่งช่วยให้การละลายดีขึ้น เพราะมีสมบัติเป็นประจุบวก (Cation) ส่วนใหญ่เมื่อปริมาณของหมู่อะซีติล ถูกกำจัดไปมากกว่า 60% ขึ้นไป สารไคโตซานที่ได้สามารถละลายได้ในกรดอินทรีย์หลายชนิด การลดหมู่อะซีติลกระทำได้โดยใช้ด่างที่เข้มข้นสูงตั้งแต่ 40% ขึ้นไป ดังนั้นพารามิเตอร์ที่สำคัญในการพิจารณาสารไคโตซานก็คือ ค่าระดับการกำจัดหมู่อะซีติล (Degree of Deacetylation, %DD) ทำให้ทราบถึงความเป็นไคโตซาน เนื่องจากไคติน และไคโตซาน เป็น Co-Polymer ระหว่าง 2 Monomer ของ N-acetyl-D-Glucosamine และ D-Glucosamine ซึ่งลักษณะเด่นของไคติน คือ ค่าสัดส่วน monomer แรกมากกว่ามีค่า Degree of Deacetylation จะต่ำ ส่วนไคโตซาน คือค่าสัดส่วน monomer สองมากกว่ามีค่า Degree of Deacetylation จะสูงระดับการกำจัดหมู่อะซีติลเป็นปัจจัยโครงสร้างสำคัญของไคโตซาน ได้แก่ การละลาย ความหนืด การจับความชื้น การจับไขมัน และความสามารถในการถูกย่อยด้วยเอนไซม์ ต่อการนำไปประยุกต์ใช้ (เขาวภา ไหวพริบ, 2547)

8.4 ความหนืด (Viscosity) เกิดจากหลายปัจจัย ได้แก่ ระดับการกำจัดหมู่อะซีติล น้ำหนักโมเลกุล ความเข้มข้น Ionic Strength ความเป็นกรด-ด่าง และอุณหภูมิ เมื่ออุณหภูมิสูง ความหนืดของสารละลาย Polymer จะลดลง แต่ชนิดกรดที่ใช้และการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่าง จะให้ผลความหนืดที่แตกต่างกัน เนื่องจากโมเลกุลไม่สามารถเข้าใกล้กันจับตัวเป็นเจลได้ ทั้งยังขึ้นกับขนาดโมเลกุล รูปร่างและประจุสาร Polysaccharide ที่มีขนาดใหญ่จะให้โซลที่มีความหนืดสูงกว่าสาร Polysaccharide ที่มีขนาดเล็กกว่า (ถ้าเป็นสารชนิดเดียวกัน) สาร Polymer ที่มีกึ่งก้านโดยเฉพาะกึ่งก้านที่มีหลายลักษณะจะให้โซล (Sols) ที่ขึ้นหนืดและอยู่ตัว สาร Polysaccharide ที่มีโมเลกุลเป็นเส้นยาวจะให้ความหนืดสูงกว่าสารที่มีโมเลกุลกึ่งก้าน เมื่อความเข้มข้นเท่ากันหรือมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากัน โมเลกุลที่มีกึ่งก้านมาจะพองตัวได้น้อยกว่าโมเลกุลที่ไม่มีกึ่งก้านจากน้ำหนักโมเลกุลที่เท่ากัน

8.5 ความสามารถในการเกิดปฏิกิริยา ไคโตซานประกอบด้วย 3 หมู่ฟังก์ชัน ที่มีความไวต่อการเกิดปฏิกิริยา ได้แก่ หมู่อะมิโน ( $-NH_2$ ) ที่คาร์บอน ตำแหน่งที่ 2 (C-2) หมู่ Primary Alcohol

( $-\text{CH}_2\text{OH}$ ) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 6 (C-6) และหมู่ Secondary Alcohol ( $-\text{CHOH}$ ) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 (C-3) การปรับปรุงโครงสร้างทางเคมี (Chemical Modification) ของทั้งสามหมู่ฟังก์ชันนี้ ทำให้เกิดวัสดุต่าง ๆ ในการใช้ประโยชน์แตกต่างกัน การใช้งานจะขึ้นอยู่กับปัจจัยทางเคมีและกายภาพ ได้แก่ ระดับการกำจัดหมู่อะซิติก ความชื้น ปริมาณเถ้า ปริมาณโปรตีน ความหนืด และน้ำหนักโมเลกุล (เยวภา ไหวพริบ, 2547)

ตารางที่ 1 คุณสมบัติทางเคมีของโคโคซานตามน้ำหนักโมเลกุล

รายการ	น้ำหนักโมเลกุลของโคโคซาน		
	ต่ำ	ปานกลาง	สูง
วัตถุดิบ	เปลือกกุ้งสด	เปลือกกุ้งสด	เปลือกกุ้งสด
สี	ขาวอมเหลือง	ขาวอมเหลือง	ขาวอมเหลือง
ความชื้น	น้อยกว่า 10%	น้อยกว่า 10%	น้อยกว่า 10%
เถ้า	น้อยกว่า 1.0%	น้อยกว่า 1.0%	น้อยกว่า 1.0%
สารละลาย (ใน 1% acetic acid)	ใส	ใส	ใส
การละลาย	มากกว่า 99%	มากกว่า 99%	มากกว่า 99%
ไม่ละลาย (%)	น้อยกว่า 1.0%	น้อยกว่า 1.0%	น้อยกว่า 1.0%
ความขุ่น	น้อยกว่า 50 NTUs	น้อยกว่า 50 NTUs	น้อยกว่า 50 NTUs
ความหนืด	น้อยกว่า 500 (mpa.S (cps))	น้อยกว่า 500 -1,000 (mpa.S (cps))	มากกว่า 1,000 (mpa.S (cps))
น้ำหนักโมเลกุล	น้อยกว่า 500,000	500,000-1,000,000	มากกว่า 1,000,000
กำจัดหมู่อะซิติก	ไม่ต่ำกว่า 95%	ไม่ต่ำกว่า 95%	ไม่ต่ำกว่า 95%
อนุภาคเม็ด	30 Mesh	30 Mesh	30 Mesh
โลหะหนัก	น้อยกว่า 10 ppm	น้อยกว่า 10 ppm	น้อยกว่า 10 ppm
ส่วนประกอบชีวภาพ			
Yeast & Mold	น้อยกว่า 100 Cfug	น้อยกว่า 100 Cfug	น้อยกว่า 100 Cfug
E. coil	น้อยกว่า 50 Cfug	น้อยกว่า 50 Cfug	น้อยกว่า 50 Cfug
Salmonella/ Coliform	-	-	-

(ที่มา: บริษัท bonafidesmarketing <http://bonafidesmarketing.com>)

## 9. ชนิดของไคโตซาน

ชนิดของไคโตซานที่ผลิตขึ้นมาจำหน่ายมี 4 ชนิด ดังนี้

1. ชนิดที่เป็นเกล็ดหรือแผ่นบางขนาดเล็ก (Flake)
2. ชนิดที่เป็นผงละเอียดคล้ายแป้ง (Micromilled Powder)
3. ชนิดสารละลายเป็นของเหลวหนืด (Solution) ความเข้มข้นขึ้นอยู่กับนำไปใช้งาน
4. ชนิดเม็ดจิ๋วขนาดประมาณ 300-500 ไมโครเมตร (Bead)

ผลิตภัณฑ์ไคโตซานที่อยู่ในรูป Flake , Powder , Bead นั้น หากเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพสูง จะต้องมีความชื้นต่ำมากคือไม่เกิน 5-10 % หากความชื้นสูงกว่านี้ก็จะทำให้เกิดเชื้อราหรือมีสิ่งปนเปื้อนอื่น ๆ เข้าไปปะปนอยู่ทำให้คุณภาพด้อยลง หรืออาจจะเกิดความเป็นพิษ เนื่องจากเชื้อราเชื้อแบคทีเรียหรือสิ่งปนเปื้อนนั่น ๆ ผลิตภัณฑ์พิษออกมา ความเป็นไปได้ที่จะเกิดการปนเปื้อนของสิ่งไม่พึงประสงค์ในไคโตซานนั้นมีผลมาจากวัตถุดิบที่นำมาสกัดเป็นสำคัญ

## 10. การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำกับการประยุกต์ใช้ไคโตซาน

ด้วยวัตถุดิบ (เศษเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรม เปลือกกุ้ง ปู) ที่มีมากเพียงพอไม่มีปัญหาเรื่องการขาดแคลนวัตถุดิบ อีกทั้งเทคโนโลยีที่ผลิตมีไม่ยุ่งยาก ความสะดวก ทำให้ราคาไม่สูงมาก สามารถใช้ได้ทุกระดับภาคส่วน ตั้งแต่ภาคครัวเรือน ภาคเกษตรกรรม ภาคเอกชน และภาคอุตสาหกรรมแล้วแต่ความต้องการที่จะนำไปใช้ในด้านใด การนำมาประยุกต์และพัฒนาการใช้แก่สัตว์น้ำ ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำก็มีอย่างแพร่หลาย เช่น เป็นวัตถุดิบผสมในอาหาร เพิ่มภูมิคุ้มกันของร่างกาย และการเจริญเติบโต เป็นต้น

### 10.1 ผลของไคโตซานต่อการเจริญเติบโต (Growth) และอัตราแลกเนื้อ (FCR)

วัชรอำพล สีระคาม, ศิริลักษณ์ วงศ์พิเชษฐ และปรกรณ์ อุ่นประเสริฐ (2546) เลี้ยงกุ้งขาว (*P. vannamei*) ระยะ P12 น้ำหนัก 0.001 กรัม ในบ่อดินที่ความเค็มน้ำ 19±1.15 ppt เป็นเวลา 100 วัน ด้วยอาหารกึ่งที่ผสมสารละลายไคโตซาน ที่ 0, 0.02 และ 0.04% พบว่า กุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสมไคโตซาน 0.04% มีน้ำหนักเฉลี่ยต่อวันที่เพิ่มขึ้นสูงสุด (0.17 กรัม/ตัว/วัน) และอัตราการแลกเนื้อต่ำที่สุด (1.24) แต่ไม่แตกต่างจากกลุ่มอื่น ( $p > 0.05$ ) ต่อมา Niu et al. (2011) เลี้ยงกุ้งขาว (*P. vannamei*) น้ำหนัก 0.0012 กรัม ที่ความเค็มน้ำ 30-32 ppt เป็นเวลา 60 วัน ด้วยอาหารกึ่งที่ผสมสารละลายไคโตซาน (C3646,  $\geq 75\%$  Deacetylation Degree) ได้มาจาก Sigma ที่ 0, 0.5, 1, 2 และ 4g/kg พบว่ากุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสมไคโตซาน 2g/kg มีน้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นสูงสุด (13,633%) และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด (21.40%) ซึ่งสูงกว่ากลุ่มอื่น ( $p < 0.05$ )

ส่วนการศึกษาในกุ้งกุลาดำ Shiau and Yu (1998) เลี้ยงกุ้งกุลาดำ (*P. monodon*) น้ำหนักเริ่มต้น 0.45 กรัม เลี้ยงที่ความเค็มน้ำ 19-21 ppt เป็นเวลา 60 วัน ด้วยอาหารกุ้งที่ผสมสารละลายไคโตซาน (Chitosan Polymer of Glucosamine) ที่ 0, 20, 50 และ 100 g/kg พบว่า กุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารผสมไคโตซาน 20 g/kg มีน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นสูงสุด (23.40 กรัม) แต่ไม่แตกต่างจากกลุ่มอื่น ( $p>0.05$ ) เช่นเดียวกับ ปิยะบุตร วานิชพงษ์พันธ์ และคณะ (2544) เลี้ยงกุ้งกุลาดำ (*P. monodon*) อายุ 30 วัน ในบ่อดินที่ความเค็มน้ำ  $5\pm 2$  ppt เป็นเวลา 110 วัน ด้วยอาหารที่ผสมสารละลายไคโตซานสกัดจากเปลือกกุ้งกุลาดำ (*P. monodon*) มีค่า Degree of Deacetylation  $80.0\pm 2\%$  ที่ 0 ppm, 200 ppm และ 400 ppm พบว่าอาหารที่เคลือบไคโตซาน 400 ppm ทำให้กุ้งกุลาดำน้ำหนักเฉลี่ยต่อวันเพิ่มขึ้นสูงสุด (0.19 กรัม/ตัว/วัน) และอัตราแลกเนื้อต่ำที่สุด (1.15) แต่ไม่แตกต่างจากกลุ่มอื่น ( $p>0.05$ ) สอดคล้องกับ นิวัฒน์ วงษ์พยัคฆ์ (2545) ผสมสารละลายไคโตซานในอาหารเพื่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (*P. monodon*) ที่ 0%, 1% และ 2% ที่น้ำหนักเริ่มต้น 8.81 กรัม อายุ 2 เดือน ที่ความเค็ม 3 ระดับ 5, 15 และ 30 ppt เป็นเวลา 42 วัน พบว่าในแต่ละความเค็มมีเปอร์เซ็นต์น้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น น้ำหนักเฉลี่ยต่อวันเพิ่มขึ้น และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมไคโตซาน 0 %, 1% และ 2% ไม่มีความแตกต่างกัน ( $p>0.05$ )

และในการศึกษาต่อมา Niu et al. (2013a) เลี้ยงกุ้งกุลาดำ (*P. monodon*) น้ำหนัก 1.16 กรัม ที่ความเค็มน้ำ 29-30 ppt เป็นเวลา 60 วัน ด้วยอาหารที่ผสมสารละลายไคโตซาน (C3646,  $\geq 75\%$  deacetylation degree ได้มาจาก Sigma ที่ 0%, 0.05%, 0.1%, 0.2%, 0.3% และ 0.4% พบว่าอาหารที่ผสมไคโตซาน 0.1% มีน้ำหนักเฉลี่ยเพิ่มขึ้นสูงสุด (463%) ซึ่งสูงกว่ากลุ่มอื่น ( $p<0.05$ ) แต่ไม่แตกต่างกับการใช้อาหารที่ผสมไคโตซาน 0.2% จากนั้นในปีเดียวกัน Niu et al. (2013b) ได้ทดสอบเกี่ยวกับอนุพันธ์ไคโตซานเปรียบเทียบกับไคตินในอาหารกุ้งกุลาดำ โดยเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (*P. monodon*) วัยรุ่น น้ำหนัก 1.49 กรัม ที่ความเค็มน้ำ 30 ppt เป็นเวลา 70 วัน ใช้สารละลายไคติน chitin (C7170) และไคโตซาน 3 อนุพันธ์ Chitosan (C3646), Chitosan Oligosac (523682) และ N-Acetyl-D-Glucosamine (A4106) ที่ 0.4% พบว่าอาหารกุ้งกุลาดำผสมไคโตซาน (C3646) มีน้ำหนักเฉลี่ยเพิ่มขึ้นสูงสุด (318%) และมีอัตราแลกเนื้อต่ำสุด (1.09) สอดคล้องกับ Niu et al. (2013a) ที่มีอัตราแลกเนื้อต่ำที่สุด (1.33) เมื่อใช้อาหารผสมไคโตซาน 0.1-0.3% ซึ่งต่ำกว่าการใช้ไคโตซาน 0, 0.05 และ 0.4% ( $p<0.05$ ) เช่นเดียวกับ นิวัฒน์ วงษ์พยัคฆ์ (2545) เลี้ยงกุ้งกุลาดำ (*P. monodon*) วัยรุ่น น้ำหนัก 8.81 กรัม ที่ความเค็มน้ำ 5, 15 และ 30 ppt เป็นเวลา 42 วัน เคลือบสารละลาย

โคโตซาน 1 และ 2% ในอาหารเลี้ยงกุ้ง พบว่ากุ้งที่เลี้ยงความเค็มน้ำ 5 ppt มีอัตราการแลกเนื้อ 3.82 และ 3.00 ตามลำดับ ซึ่งต่ำกว่าอาหารที่ไม่เคลือบโคโตซาน (7.53) ( $p < 0.05$ ) ขณะที่กุ้งที่เลี้ยงความเค็มน้ำ 15 ppt มีอัตราการแลกเนื้อ 2.19 และ 2.03 ซึ่งไม่แตกต่างกับการใช้อาหารที่ไม่เคลือบโคโตซาน (3.39) ( $p > 0.05$ ) ส่วนกุ้งที่เลี้ยงความเค็มน้ำ 30 ppt ที่เคลือบสารละลายโคโตซาน 2% มีอัตราการแลกเนื้อ 1.85 ซึ่งต่ำกว่าอาหารที่ไม่เคลือบสารละลายโคโตซาน (4.89) และเคลือบสารละลายโคโตซาน 1% (2.44) ซึ่งให้เห็นว่าการใช้โคโตซานในรูปแบบและระดับเปอร์เซ็นต์ที่แตกต่างกันมีผลต่อการเจริญเติบโตทั้งในกุ้งขาวและกุ้งกุลาดำ (ตารางที่ 2)

#### 10.2 ผลของโคโตซานต่ออัตราการรอด (%Survival Rate)

วัชรอำพล สีระคาม, ศิริลักษณ์ วงศ์พิเชษฐ และปกรณ อุ้นประเสริฐ (2546) เลี้ยงกุ้งขาว (*P. vannamei*) ระยะ P12 น้ำหนัก 0.001 กรัม ในบ่อดินที่ความเค็มน้ำ  $19 \pm 1.15$  ppt เป็นเวลา 100 วัน ด้วยอาหารกุ้งผสมสารละลายโคโตซานที่ 0, 0.02 และ 0.04% พบว่ากุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสมโคโตซาน 0.04% มีอัตราการรอดสูง (89%) แต่ไม่แตกต่างจากกลุ่มอื่น ( $p > 0.05$ ) ต่อมา Niu et al. (2011) เลี้ยงกุ้งขาว (*P. vannamei*) น้ำหนัก 0.0012 กรัม ที่ความเค็มน้ำ 30-32 ppt เป็นเวลา 60 วัน ด้วยอาหารกุ้งที่ผสมสารละลายโคโตซาน (C3646,  $\geq 75\%$  Deacetylation of Degree) ได้มาจาก Sigma ที่ 0, 0.5, 1, 2 และ 4 g/kg พบว่ากุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสมโคโตซาน 1 g/kg มีอัตราการรอดสูงสุด (51%) ซึ่งสูงกว่ากลุ่มอื่น ( $p < 0.05$ )

ส่วนการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ Shiao and Yu (1998) ทดสอบเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (*P. monodon*) น้ำหนักเริ่มต้น 0.45 กรัม เลี้ยงที่ความเค็มน้ำ 19-21 ppt เป็นเวลา 60 วัน ด้วยอาหารกุ้งที่ผสมสารละลายโคโตซาน (Chitosan Polymer of Glucosamine) ที่ 0, 20, 50 และ 100 g/kg พบว่ากุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารผสมโคโตซานให้อัตรารอดไม่แตกต่างจากกลุ่มอื่น ( $p > 0.05$ ) ทำนองเดียวกับปิยะบุตร วานิชพงษ์พันธุ์ และคณะ (2544) เลี้ยงกุ้งกุลาดำ (*P. monodon*) อายุ 30 วัน ในบ่อดินที่ความเค็มน้ำ  $5 \pm 2$  ppt เป็นเวลา 110 วัน ด้วยอาหารที่ผสมสารละลายโคโตซานสกัดจากเปลือกกุ้งกุลาดำ (*P. monodon*) มีค่า Degree of Deacetylation  $80.0 \pm 2\%$  ที่ 0 ppm, 200 ppm และ 400 ppm และ นิวัฒน์ วงษ์พยัคฆ์ (2545) ผสมสารละลายโคโตซานในอาหารเพื่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (*P. monodon*) ที่ 0%, 1% และ 2% กุ้งที่น้ำหนักเริ่มต้น 8.81 กรัม อายุ 2 เดือน ที่ความเค็ม 3 ระดับ 5, 15 และ 30 ppt เป็นเวลา 180 วัน พบว่ากุ้งที่กินอาหารผสมโคโตซานมีอัตราการรอดไม่แตกต่างกัน ( $p > 0.05$ ) ถึงแม้ว่าจะมีอัตราการรอดสูง แต่จากการศึกษาของ Niu et al. (2013a) เลี้ยงกุ้งกุลาดำ (*P. monodon*) น้ำหนัก 1.16 กรัม ที่ความเค็มน้ำ 29-30 ppt เป็นเวลา 60 วัน ด้วยอาหารที่ผสมสารละลายโคโตซาน (C3646,  $\geq 75\%$  deacetylation degree) ได้มาจาก Sigma ที่ 0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.4% พบว่าอาหารที่ผสมโคโตซาน 0.1% มีอัตราการรอดสูงสุด (83.33%) ซึ่งสูงกว่ากลุ่มอื่น ( $p < 0.05$ ) สอดคล้องกับ

ตารางที่ 2 ผลของไคโตซานต่อการเจริญเติบโต (Growth) และอัตราแลกเนื้อ (FCR)

กุ้ง	ลำดับที่	เอกสารอ้างอิง	อายุ	ขนาด (กรัม)	ความเค็ม (ppt)	การเสริมไคโตซานต่ออาหาร 1 กิโลกรัม	เวลาเลี้ยง (วัน)	น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (%WG)	น้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น (ADG กรัม/ตัว/วัน)	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ(%SGR)	อัตราแลกเนื้อ (FCR)
กุ้งกุลาดำ ( <i>P.monodon</i> )	1	Shiau and Yu (1998)	-	0.45	19-21	chitosan 0, 20, 50, 100 g	60		-	-	-
กุ้งกุลาดำ ( <i>P.monodon</i> )	2	ปิยะบุตร (2544) แบ่งเป็น 2 การทดลอง	30 วัน		5±2	การทดลองที่ 1 chitosan 0 , 200, 400, 600, 800, 1000 ppm	113	-	-	-	1.53, 1.34,1.27, 1.35,1.38, 1.36
					5±2	การทดลองที่ 2 chitosan 0, 200, 400 ppm	110	-	0.17 g, 0.18 g, 0.19 g	-	1.50, 1.29, 1.15
กุ้งกุลาดำ ( <i>P.monodon</i> )	3	นิวัฒน์ (2545)	2เดือน	8.81	5, 15, 30	chitosan 0, 1, 2%	42	5ppt chitosan 0% (15.30%), 1%(18.66%), 2%(16.03%) 15ppt chitosan 0% (19.74%),1%(24.21%), 2% (36.71%) 30ppt chitosan 0% (25.88%),1%(31.47%), 2% (30.02%)	5ppt chitosan 0% (0.04g),1-2% (0.07g) 15ppt chitosan 0% (0.08g), 1% (0.10g) 2%(0.13g) 30ppt chitosan 0% (0.09g),1-2% (0.11g)	5ppt chitosan 0% (0.75%), 2%(1.48%), 2% (1.30%) 15ppt chitosan 0% (1.56%), 1-2% (2.31%) 30ppt chitosan 0% (1.68%), 1-2% (2.19%)	5ppt chitosan 0% (7.53), 1% (3.82)*, 2%(3.00)* 15ppt chitosan 0% (3.39), 1% (2.19), 2% (2.03) 30ppt chitosan 0% (4.89), 1%(2.44) , 2% (1.85)

หมายเหตุ เครื่องหมาย\* ค่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

ตารางที่ 2 (ต่อ)

กุ้ง	ลำดับที่	เอกสารอ้างอิง	ขนาด (กรัม)	ความเค็ม (ppt)	การเสริมไคโตซานต่ออาหาร 1 กิโลกรัม	เวลาเลี้ยง (วัน)	น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (%WG)	น้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น (ADG กรัม/ตัว/วัน)	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (%SGR)	อัตราแลกเนื้อ (FCR)
กุ้งกุลาดำ ( <i>P.monodon</i> )	4	Niu et al. (2013a)	1.16	29-30	chitosan 0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4%	60	370%, 413%, 463%*, 432%, 410%, 381%	-	-	1.43, 1.43 1.33*, 1.33*, 1.33*, 1.39
กุ้งกุลาดำ ( <i>P.monodon</i> )	5	Niu et al. (2013b)	1.49	30	control, chitin (C7170), chitosan (C3646), chitosan oligosac (523682), N-acetyl-D-glucosamine (A4106) เสริมที่ความเข้มข้น 0.4% ทุกอนุพันธ์	70	249%, 271%, 318%*, 259% 230%	-	-	1.28, 1.18, 1.09*, 1.23, 1.35
กุ้งขาว ( <i>P.vannamei</i> )	6	วัชรอำพล (2546)	0.001	19±1	chitosan 0, 0.02, 0.04%	100	-	0.14g, 0.16g, 0.17g	-	1.33, 1.31, 1.24
กุ้งขาว ( <i>P.vannamei</i> )	7	Niu et al. (2011)	0.012	30-32	chitosan 0, 0.5, 1, 2, 4 g	60	9,797%, 9,797%, 10,337%, 13,633%*, 11,611%	-	19.90%, 20.00%, 20.20%, 21.40%*, 20.70%	-

หมายเหตุ เครื่องหมาย\* ค่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

Niu et al. (2013b) เลี้ยงกุ้งกุลาดำ (*P.monodon*) ใช้น้ำหนัก 1.49 กรัม ที่ความเค็มน้ำ 30 ppt เป็นเวลา 70 วัน ใช้สารละลายไคติน Chitin (C7170) และไคโตซาน 3 อนุพันธ์ Chitosan (C3646), Chitosan Oligosac (523682) และ N-acetyl-D-glucosamine (A4106) พบว่าอาหารที่ผสมไคโตซาน(C3646) ที่ 0.4% มีอัตราการรอดสูงสุด (67.80%) ซึ่งสูงกว่ากลุ่มอื่น ( $p<0.05$ ) แต่ไม่แตกต่างจากสารละลายไคโตซานกลุ่มอื่น ( $p>0.05$ ) ซึ่งให้เห็นว่าการใช้ไคโตซานในรูปแบบและระดับเปอร์เซ็นต์ที่แตกต่างกันมีผลต่อการอัตราการรอดทั้งในกุ้งขาวและกุ้งกุลาดำ (ตารางที่ 3)

#### 10.3 ผลของไคโตซานต่อปริมาณไคตินและไคโตซานในเปลือก

นิวัฒน์ วงษ์พยัคฆ์ (2545) ผสมสารละลายไคโตซานในอาหารเพื่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (*P. monodon*) ที่ 0 , 1 และ 2% ที่น้ำหนักเริ่มต้น 8.81 กรัม อายุ 2 เดือน ที่ความเค็ม 3 ระดับ 5, 15 และ 30 ppt เป็นเวลา 42 วัน พบว่าปริมาณไคตินและไคโตซานในเปลือก ระยะก่อนการลอกคราบที่ทุกความเค็มน้ำไม่มีความแตกต่างกัน ( $p>0.05$ ) แต่ระยะหลังการลอกคราบในแต่ละความเค็มน้ำมีปริมาณไคตินและไคโตซานแตกต่างกัน ( $p<0.05$ ) ส่วนในการศึกษาของวีราภรณ์ แข็งขัน (2547) ผสมสารละลายไคโตซานในอาหารเพื่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (*P. monodon*) ที่ 0 , 200 และ 400 ppm ที่น้ำหนักเริ่มต้น 15 กรัม อายุ 4 เดือน ที่ความเค็ม 10 ppt เป็นเวลา 9 วัน พบว่าอาหารกุ้งที่เคลือบไคโตซาน 400 ppm มีปริมาณกลูโคซามีนในเปลือกสูงสุด (3.53  $\mu\text{g/L}$ ) ซึ่งสูงกว่ากลุ่มอื่น ( $p<0.05$ ) (ตารางที่ 4)

#### 10.4 ผลของไคโตซานต่อระบบภูมิคุ้มกันกุ้งขาว

การที่ร่างกายสามารถจดจำสิ่งแปลกปลอมและพยายามกำจัดทิ้งไป เป็นการตอบสนองทางกลไกธรรมชาติที่จำเพาะต่อแอนติเจนของสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย (สุทธิพันธ์ สารสมบัติ และคณะ, 2537) กุ้งขาวมีระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (Non-Specific Immune Response) ที่มีมาแต่กำเนิด (Innate Immune) (Bachère, Destoumieux, & Bulet, 2000) ซึ่งจะไม่มี การตอบสนองและสร้างแอนติบอดี (Antibody) (กิจการ สุภมาตย์, จีรพร เรืองศรี, สุภาวดี ศิริรัฐนิคม และเนเรศ ช้วนยุค, 2543) เนื่องจากเลือดกุ้งเป็นระบบหมุนเวียนแบบปิด ประกอบด้วย หัวใจ แอ่งเลือด และน้ำเหลือง เลี้ยงส่วนต่างๆ ของร่างกายผ่านทางเลือดจากหัวใจไหลเข้าไปในแอ่งเลือด ในน้ำเลือดกุ้งมีรงควัตถุที่ทำหน้าที่ในการแลกเปลี่ยนก๊าซ คือ Hemocyanin (Ratcliffe, Rowley, Fitzgerald, & Rhodes, 1985) โดยมีประมาณ 60-95 % ในน้ำเลือดทั้งหมด มีการเปลี่ยนแปลงตามเพศ ขนาดขงตัวกุ้ง และวงจรการลอกคราบของตัวกุ้ง (Chen & Cheng, 1993)โดยอาศัยการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดเป็นหลัก (Haemocytes) แบ่งเป็น 2 ระบบหลักคือ Cellular Immunity และ Humoral Immunity (Smith, Brown, & Houton, 2003)



10.4.1 ระบบภูมิคุ้มกันที่อาศัยเซลล์ (Cellular Immunity) เป็นการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดด้วยกระบวนการ 3 แบบ แต่ละแบบจะทำหน้าที่โดยเซลล์เม็ดเลือดที่แตกต่างกัน

10.4.1.1 การกลืนกินสิ่งแปลกปลอม (Phagocytosis) ทำงานโดยเซลล์ไฮยาไลน์ (Hyaline Cells) เป็นขั้นแรกของการกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่มีขนาดเล็ก มีจำนวนน้อย เช่น โปรโตซัว แบคทีเรีย เชื้อรา และไวรัส ที่ผ่านเข้ามาจากชั้นผิวปกคลุมเข้าสู่ตัวกุ้ง โดยเซลล์ไฮยาไลน์จะใช้ไซโตพลาสซึม (Cytoplasm) ล้อมรอบสิ่งแปลกปลอมแล้ว ไลโซโซม (Lysosome) จะหลั่งสารช่วยย่อยมาสลาย และทำลายก่อนเซลล์เม็ดเลือดจะปล่อยออกสู่นอกเซลล์

10.4.1.2 การสร้าง (Nodule Formation) จะเป็นเกิดเมื่อมีสิ่งแปลกปลอมมีจำนวนมาก กำจัดโดยการนำสิ่งแปลกปลอมเข้ามากลางเซลล์เม็ดเลือดหลาย ๆ เซลล์ เหมือนเป็นกำแพงล้อมรอบและกันออกไปไม่ให้อันตรายตัวกุ้ง

10.4.1.3 การห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอม (Encapsulation) เป็นการห่อหุ้มโดยหน้าที่ของเซลล์เซมิแกรนูลา (Semigranular Cells) ทำงานเมื่อสิ่งแปลกปลอมมีขนาดใหญ่

10.4.2 ระบบภูมิคุ้มกันนำเลือด (Humoral Immunity) เป็นการทำงานประสานกับระบบเซลล์ใน Hemolymph โดยตัวหลักที่ใช้กำจัดสิ่งแปลกปลอมคือ สารต้านแบคทีเรีย (Antimicrobial Peptides, AMPs) เช่น ไลโซไซม์ (Lysozyme) และเลคติน (Lectins) สารทั้งสองชนิดนี้ถูกสร้างโดยเซลล์เม็ดเลือดชนิดแกรนูลา ซึ่งจะหลั่งสารออกมาข้างนอกเซลล์ หรือเก็บไว้ที่เซลล์ เลคตินจะทำหน้าที่ป้องกันการติดเชื้อ ส่วนไลโซไซม์เป็นเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ของแบคทีเรีย และในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียจากเอนไซม์ฟีโนลออกซิเดส (Phenoloxidase) ที่สร้างจากการกระตุ้นโปรฟีโนลออกซิเดส (Prophenoloxidase) ทำงานร่วมกับเมลานิน (Melanin)

สภาพแวดล้อมในการเลี้ยงเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลทางด้านภูมิคุ้มกันในกุ้ง โดยเฉพาะคุณภาพน้ำได้แก่

#### ก. ความเค็มของน้ำ

ความเค็มน้ำที่มีการเปลี่ยนแปลงของระดับความเค็มส่งผลต่อความเข้มข้นของแร่ธาตุในน้ำ โดยที่มีความเค็ม 25 ppt มีค่า Osmolality ใกล้เคียงกับในตัวกุ้ง เนื่องจากกุ้งขามีค่า Iso osmotic Point (IOP) เท่ากับน้ำความเค็ม 23 ppt (บุญรัตน์ ประทุมชาติ และคณะ, 2556) จึงทำให้กุ้งขามีความเค็มในน้ำที่มีความเค็ม 23 ppt ไม่ต้องการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อม ส่งผลให้พลังงานและสารอาหารที่ได้รับมาจากอาหาร สามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโตได้อย่างเต็มที่ ซึ่งแตกต่างจากกุ้งที่เลี้ยงในน้ำความเค็มต่ำหรือสูงเกินไป กุ้งจึงต้องนำพลังงานที่ได้มาใช้ในการปรับตัวเป็นส่วนใหญ่ ส่งผลให้เหลือพลังงานที่ใช้ในการเจริญเติบโตมีไม่เพียงพอ

ตารางที่ 3 ผลของไคโตซานต่ออัตราการรอด (%Survival Rate)

กุ้ง	ลำดับ ที่	เอกสารอ้างอิง	อายุ	ขนาด (กรัม)	ความเค็ม (ppt)	การเสริมไคโตซาน ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม	เวลาเลี้ยง (วัน)	อัตราการรอด (%SR)
กุ้งกุลาดำ ( <i>P.monodon</i> )	1	Shiau and Yu (1998)	-	0.45	19-21	chitosan 0, 20, 50, 100 g	60	76.62%, 67.83%, 63.48%, 65.45%
กุ้งกุลาดำ ( <i>P.monodon</i> )	2	ปิยะบุตร (2544)	30 วัน		5±2	การทดลองที่ 1 chitosan 0, 200, 400, 600, 800, 1000 ppm	113	-
					5±2	การทดลองที่ 2 chitosan 0, 200, 400 pm	110	55.68%, 64.92%, 78.97%
กุ้งกุลาดำ ( <i>P.monodon</i> )	3	นิวัฒน์ (2545)	2 เดือน	8.81	5, 15, 30	chitosan 0, 1, 2%	42	5 ppt chitosan 0% (32.05%), 1% (30.77%), 2% (26.92% ) 15 ppt chitosan 0% (41.03%), 1% (47.44%), 2% (46.15% ) 30 ppt chitosan 0% (43.59%), 1% (41.03%), 2% (47.44% )
กุ้งกุลาดำ ( <i>P.monodon</i> )	4	Niu et al., (2013a)		1.16	29-30	chitosan 0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4%	60	52.22%, 64.44%, 83.33%*, 77.78%, 74.44%, 63.33%
กุ้งกุลาดำ ( <i>P.monodon</i> )	5	Niu et al., (2013b)		1.49	30	control, chitin (C7170), chitosan (C3646) chitosan oligosac (523682), N-acetyl-D- glucosamine (A4106) เสริมที่ความเข้มข้น 0.4% ทุกอนุพันธ์	70	56.93%, 60.54%, 67.80%*, 57.59%, 45.64%
กุ้งขาว ( <i>P. vannamei</i> )	6	วัชรอำพล, (2546)		0.001	19±1.15	chitosan 0, 0.02, 0.04%	100	82%, 79%, 89%
กุ้งขาว ( <i>P. vannamei</i> )	7	Niu et al., (2011)		0.001 2	30-32	chitosan 0, 0.5, 1, 2, 4 g	60	36%, 36%, 51%*, 45%, 39%

หมายเหตุ เครื่องหมาย\* ค่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

ตารางที่ 4 ผลของไคโตซานต่อปริมาณไคตินและไคโตซานในเปลือก

กุ้ง	ลำดับ ที่	เอกสารอ้างอิง	อายุ	ขนาด (กรัม)	ความเค็ม (ppt)	การเสริมไคโตซาน ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม	เวลาเลี้ยง (วัน)	ก่อนเสริมไคโตซาน	หลังเสริมไคโตซาน
กุ้งกุลาดำ ( <i>P.monodon</i> )	1	นิวัฒน์ (2545)	2 เดือน	8.81	5, 15, 30	chitosan 0, 1, 2%	42	(Pre-Post) 15ppt 25% chitin และ chitosan cuticle >5,30 ppt 23-24%	<u>ก่อนลอกคราบ</u> 5 ppt chitin 0-1% (23.00%), 2% (24.68%) 15 ppt chitin 0,2% (23.65%), 1% (24.83%) 30 ppt chitin 0,2% (22.06%), 1% (24.83%) <u>หลังลอกคราบ</u> 5 ppt chitin 0-2% (~23.76%) 15 ppt chitin 0-1% (~21.48%), 2% (22.32%) 30 ppt chitin 0-2% (~22.91%) <u>ก่อนลอกคราบ</u> 5 ppt chitosan 2% (23.40%) ( $p > 0.05$ ) 15 ppt chitosan 1% (23.40%) ( $p > 0.05$ ) 30 ppt chitosan 1% (22.86%) ( $p > 0.05$ ) <u>หลังลอกคราบ</u> 5 ppt chitosan 0-1% (~22.88%), 2% (23.08%) 15 ppt chitosan 0,2% (~21.17%), 1% (20.28%) 30 ppt chitosan 0-1% (~22.36%), 2% (21.91%)
กุ้งกุลาดำ ( <i>P.monodon</i> )	2	วีระภรณ์ (2547)	4 เดือน	15	10	chitosan 0, 200, 400 ppm	9	–	มีปริมาณ glucosamine (2.35 µg/L), glucosamine (2.67 µg/L), glucosamine (3.53 µg/L)*

หมายเหตุ เครื่องหมาย\* ค่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

### ข. ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ

สภาวะปกติปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำต้องมีค่ามากกว่า 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อให้เพียงพอต่อความต้องการของสัตว์น้ำ ซึ่งในสภาวะที่ออกซิเจนละลายในน้ำต่ำ จะส่งผลกระทบต่อการดำรงชีวิตของกุ้งและระบบภูมิคุ้มกัน กุ้งที่ลดกิจกรรมการใช้ออกซิเจนในร่างกายและว่ายน้ำวนที่ผิวน้ำบ่อยขึ้น เพื่อดึงออกซิเจนจากอากาศ ปริมาณออกซิเจนที่ละลายต่ำลง ส่งผลให้มีปริมาณเม็ดเลือดรวม (Total Hemocyte Count) ลดลง สอดคล้องกับ กิจการ ศุภมาตย์ และคณะ (2543) พบว่ากุ้งกุลาดำ (*P. monodon*) ขนาด 12-15 กรัม ที่เลี้ยงในน้ำที่มีปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำต่ำ (0.9-1.2 มก./ลิตร) ส่งผลให้ปริมาณเม็ดเลือดรวมลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณออกซิเจนที่ละลายในปกติ (5.0-5.8 มก./ลิตร)

### ค. ความเป็นกรดเป็นด่าง

หากในรอบวันเกิดการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดเป็นด่างสูงหรือต่ำเกินไป จากรายงานของกิจการ ศุภมาตย์ และคณะ (2543) พบว่า ไม่ส่งผลกระทบต่อเปลี่ยนแปลงปริมาณเม็ดเลือดรวมในกุ้งกุลาดำ (*P. monodon*) จากค่าพีเอชในชุดควบคุมปกติ 7.8 และชุดทดลองมีค่าพีเอช 6.0-6.1

### ง. อุณหภูมิ

อุณหภูมิที่เหมาะสมมีความสำคัญต่อการเลี้ยงกุ้ง เพราะเป็นสัตว์เลือดเย็น ถ้าอุณหภูมิของน้ำต่ำกว่า 25 องศาเซลเซียส จะส่งผลกระทบต่อปริมาณเม็ดเลือดรวม สอดคล้องกับรายงานของ Yu (1993) พบว่าเมื่ออุณหภูมิต่ำลงและมีการเลี้ยงกุ้ง (*P. japonicas*) ในอัตราความหนาแน่นสูง ส่งผลต่อการลดลงของค่าเฉลี่ยเม็ดเลือดรวม และกิจการ ศุภมาตย์ และคณะ (2543) พบว่าที่อุณหภูมิต่ำ (25°C) มีผลต่อปริมาณเม็ดเลือดรวมต่ำกว่าที่อุณหภูมิสูง (30°C)

จากรายงาน Niu et al. (2013a) เลี้ยงกุ้งกุลาดำ (*P. monodon*) น้ำหนัก 1.16 กรัม ที่ความเค็มน้ำ 29-30 ppt เป็นเวลา 60 วัน ด้วยอาหารกุ้งที่ผสมสารละลายไคโตซาน (C3646,  $\geq 75\%$  Deacetylation of Degree) ได้มาจาก Sigma ที่ 0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.4% พบว่าการเสริมไคโตซานในอาหารกุ้งกุลาดำทุกระดับมีปริมาณเม็ดเลือดรวมสูงกว่าชุดควบคุม ( $p < 0.05$ ) ในขณะที่ผลของการแข็งตัวของเลือด อาหารกุ้งที่ผสมไคโตซานที่ 0.1- 0.4% มีการแข็งตัวของเลือดเร็วกว่าอาหารกุ้งที่ผสมไคโตซาน 0 และ 0.05% ( $p < 0.05$ ) และผลของสารก่ออนุมูลอิสระอาหารกุ้งกุลาดำที่ผสมไคโตซาน 0.05 - 0.4% ช่วยลดการเกิดอนุมูลอิสระกลุ่ม Malondialdehyde and Carbonyl protein contents ได้มากกว่าชุดควบคุม ( $p < 0.05$ )

ในขณะที่ Niu et al. (2013b) เลี้ยงกุ้งกุลาดำ (*P. monodon*) วั้ยรุ่น น้ำหนัก 1.49 กรัม ที่ความเค็มน้ำ 30 ppt เป็นเวลา 70 วัน ด้วยอาหารกุ้งที่ผสมสารละลายไคติน chitin (C7170) และ

ไคโตซาน 3 อนุพันธ์ Chitosan (C3646), Chitosan Oligosaccharide (523682) และ N-Acetyl-D-Glucosamine (A4106) ที่ 0.4% พบว่าปริมาณ Chitin และ 3 อนุพันธ์ มีค่า Glutathione (GSH) และ Phenoloxidase (PO) ไม่แตกต่างกัน ( $p>0.05$ ) และอาหารที่ผสมไคโตซาน Chitosan (C3646) ทำให้มีค่า TAS สูงกว่า Chitin, Chitosan Oligosaccharide และ N-Acetyl-D-Glucosamine ( $p<0.05$ ) ส่วนค่า Superoxidate Dismutase (SOD) Activity พบว่าอาหารกึ่งกลาดำที่ผสมไคโตซาน Chitosan (C3646) ทำให้ค่า SOD ต่ำกว่า Chitin, Chitosan Oligosaccharide และ N-Acetyl-D-Glucosamine ( $p<0.05$ ) และ Glutathione Peroxidase (GSH-Px) พบว่า Chitin, Chitosan (C3646) และ Chitosan Oligosaccharide ทำให้ค่า GSH-Px สูงสุด สูงกว่าชุดควบคุมและ N-Acetyl-D-Glucosamine (A4106) ( $p<0.05$ ) และเมื่อทดสอบความเครียดจากการลดปริมาณออกซิเจนในน้ำเป็นเวลา 7 วัน พบว่าอาหารกึ่งกลาดำผสม Chitin และ Chitosan ทำให้มีอัตราการรอดสูงสุด (73%) สูงกว่าชุดควบคุม, Chitosan Oligosaccharide และ N-Acetyl-D-Glucosamine ( $p<0.05$ ) แต่ช่วง 3 วันสุดท้ายของการทดสอบพบว่า Chitin Chitosan และ Chitosan Oligosaccharide ไม่แตกต่างกัน ( $p>0.05$ ) ส่งผลต่อปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในตัวกึ่งกลาดำพบว่าอาหารกึ่งผสม Chitin, Chitosan (C3646) และ Chitosan Oligosaccharide 0.4% ทำให้ค่า Glutathione (GSH) และ Total Antioxidant Status (TAS) สูงกว่าชุดควบคุม และ N-acetyl-D-glucosamine ( $p<0.05$ ) ในขณะที่ค่า SOD พบว่าอาหารกึ่งผสม Chitin และ Chitosan (C3646) ทำให้ค่า Superoxidate Dismutase (SOD) Activity ต่ำกว่าชุดควบคุม, Chitosan Oligosaccharide และ N-Acetyl-D-Glucosamine ส่วน (GSH-Px) พบว่าอาหารกึ่งผสม Chitosan (C3646) ทำให้ค่า Phenoloxidase (PO) และ Glutathione Peroxidase (GSH-Px) สูงที่สุด แต่ไม่แตกต่างจากกลุ่มอื่น ( $p>0.05$ ) สอดคล้องกับ Niu et al. (2011) เลี้ยงกุ้งขาว น้ำหนัก 0.0012 กรัม ที่ความเค็มน้ำ 30-32 ppt เป็นเวลา 60 วัน ด้วยอาหารกึ่งที่ผสมสารละลายไคโตซาน (C3646,  $\geq 75\%$  Deacetylation of Degree) ได้มาจาก Sigma ที่ 0, 0.5, 1, 2 และ 4 g/kg ทดสอบความเครียดจากการลดปริมาณออกซิเจนในน้ำเป็นเวลา 9 วัน พบว่าอาหารกึ่งขาวผสม Chitosan 2g ทำให้มีอัตราการรอดสูงสุด (37%) ซึ่งสูงกว่ากลุ่มอื่น ( $p<0.05$ ) (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 ผลของไคโตซานต่อภูมิคุ้มกัน (Immune) และการทนต่อความเครียด (Tolerance for Stress)

กุ้ง	ลำดับ ที่	เอกสารอ้างอิง	อายุ	ขนาด (กรัม)	ความ เค็ม (ppt)	การเสริมไคโตซาน ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม	เวลาเลี้ยง (วัน)	จำนวนเม็ดเลือดและการ แข็งตัวของเลือด	อนุมูลอิสระ	สารต้านอนุมูลอิสระ
กุ้งกุลาดำ ( <i>P.monodon</i> )	1	Niu et al., (2013a)		1.16	29-30	0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4%	60	1. THC chitosan 0% (0.8) 0.05%-0.4% (~1.43)* 2. clotting chitosan 0% (752) 0.1-0.4 (506)* และ 0.05% (553)	1. MDA chitosan 0% (49 nmol g <sup>-1</sup> ) 0.05% - 0.4% (34 nmol mg <sup>-1</sup> )* 2. CP chitosan 0% (1.64) 0.05%-0.4% (1.27 nmol mg <sup>-1</sup> )*	-
กุ้งกุลาดำ ( <i>P.monodon</i> )	2	Niu et al., (2013b)		1.49	30	control, chitin (C7170), chitosan (C3646), chitosan oligosac (523682) N-acetyl-D- glucosamine (A4106) เสริมที่ ความเข้มข้น 0.4% ทุกอนุพันธ์	70	-	-	<u>การทดลองที่</u> 1. control, chitin or 3 derivatives glutathione (GSH) (~2.61 nmol mg <sup>-1</sup> ) 2. TAS control (3.27 μmol g <sup>-1</sup> ), chitin (4.59 μmol g <sup>-1</sup> ) chitosan ( 6.27 μmol g <sup>-1</sup> )* chitosan oligosac (4.83 μmol g <sup>-1</sup> ), N-acetyl (3.25 μmol g <sup>-1</sup> ) 3. SOD control (1.91 U mg <sup>-1</sup> ), chitin (1.46 U mg <sup>-1</sup> ), chitosan (1.44 U mg <sup>-1</sup> )* chitosan oligosac (1.46 U mg <sup>-1</sup> ), N-acetyl (1.48 U mg <sup>-1</sup> ) 4. PO control chitin และ chitosan 3 อนุพันธ์ (~15.35 U mg <sup>-1</sup> ) 5. GSH-Px contro (1.57 U mg <sup>-1</sup> ) chitin chitosan chitosan oligi (~2.58 U mg <sup>-1</sup> )* และ N-acetyl (1.66 U mg <sup>-1</sup> )

หมายเหตุ เครื่องหมาย\* ค่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

ตารางที่ 5 (ต่อ)

กุ้ง	ลำดับ ที่	อ้างอิง	อายุ	ขนาด (กรัม)	ความเค็ม (ppt)	การเสริมโคไคซาน ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม	เวลา เลี้ยง (วัน)	สารต้านอนุมูลอิสระ	การทดสอบความเครียด
กุ้งกุลาดำ ( <i>P.monodon</i> )	2	Niu et al., (2013b)		1.49	30	control, chitin (C7170), chitosan (C3646), chitosan oligosac (523682), N-acetyl-D-glucosamine (A4106) เสริมที่ความเข้มข้น 0.4% ทุกอนุพันธ์	70	การทดลองที่ 2 1. GSH chitin, chitosan, chitosan oligi (~4.31 nmol mg <sup>-1</sup> protein)* control และ N-acetyl (3.20) 2.TAS control(1.35 μmol g <sup>-1</sup> ), chitin (2.57), Chitosan (3.28)*, Chitosan oligi(2.56) และ N-acetyl (1.33) 3. SOD control (3.50 U mg <sup>-1</sup> ), chitin (3.34), chitosan (3.25)*,chitosan oligi(3.53) และ N-acetyl (3.71) 4.PO control (30.08Umg <sup>1</sup> ), chitin(34.70), chitosan(50.66)* chitosan oligi(27.65) และ N-acetyl (25.15) 5.GSH-Px control (3.89Umg <sup>1</sup> ), chitin(5.32), chitosan (7.21)*,chitosan oligi (4.62) และ N-acetyl (3.59)	การทดลองที่ 2 ให้ DO ต่ำ (%) เป็นเวลา 7 วัน อัตรารอด control (34%) chitin and chitosan(73%) Chitosan oligi (49%) และ N-acetyl (16%)
กุ้งขาว ( <i>P.vannamei</i> )	3	Niu et al., (2011)		0.0012	30-32	chitosan 0, 0.5, 1, 2, 4 g	60	-	ให้ DO ต่ำ นาน 9 วัน เพื่อศึกษาอัตรารอด (%) 5%, 11%, 32%, 37%*, 27%

หมายเหตุ เครื่องหมาย\* ค่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### 1. สถานที่ทำการวิจัย

ในการศึกษาผลของการเสริมโคโคซานในอาหารกึ่งต่อการเจริญเติบโต อัตรารอด การลอกคราบ และการสนองตอบต่อภูมิคุ้มกันกึ่งของชาวแวนนาไม (*L. vannamei*) ที่ความเค็มน้ำ 3 ระดับ และการวิเคราะห์แร่ธาตุด้วยเครื่อง ICP-OES (Inductively Coupled Plasma Optical Emission spectrometry) ศูนย์วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีอาหารสัตว์น้ำชลบุรี ตำบลบางพระ อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี

#### 2. ระยะเวลาดำเนินการวิจัย

ระหว่างเดือนสิงหาคม 2558 ถึง เดือนมีนาคม 2559

#### 3. วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

##### 3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเลี้ยงกึ่งทดลอง

- 3.1.1 ถังไฟเบอร์กลาส ขนาด 2,000 ลิตร จำนวน 3 ถัง
- 3.1.2 ถังไฟเบอร์กลาส ขนาด 300 ลิตร จำนวน 24 ถัง
- 3.1.3 ถังไฟเบอร์กลาส ขนาด 250 ลิตร จำนวน 9 ถัง
- 3.1.4 ชุดระบบให้อากาศ
- 3.1.5 ชุดเปลี่ยนถ่ายน้ำ
- 3.1.6 อุปกรณ์เคลื่อนย้ายกึ่ง

##### 3.2 อุปกรณ์ผลิตและเก็บอาหาร

- 3.2.1 เครื่องผลิตอาหารยี่ห้อ Hobart mixer รุ่น A 200 T
- 3.2.2 เครื่องชั่งไฟฟ้า Satorius รุ่น Basic
- 3.2.3 ตู้แช่เพื่อเก็บรักษาอาหารทดลอง (อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส)

##### 3.3 เครื่องมือวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของอาหาร

- 3.3.1 ความชื้นด้วยวิธี oven-drying
- 3.3.2 โปรตีนด้วยเครื่องวิเคราะห์ไนโตรเจน (Leco, TruSpec CN Carbon/Nitrogen Determination)



3.3.3 ถ้าวินวิเคราะห์ด้วยเครื่อง muffle furnace

3.3.4 ไขมันวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค Supercritical Fluid Extraction (SFE)

3.3.5 เยื่อใยวิเคราะห์ด้วยเครื่องรุ่น Fibertec System

### 3.4 อุปกรณ์สำหรับเตรียมเลือด

3.4.1 อุปกรณ์เจาะเลือดกึ่งทดลอง ได้แก่ เข็มขนาด 27Gx1 และหลอดฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร

3.4.2 อุปกรณ์แยกพลาสมา ได้แก่ ไมโครปีเปต เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ของบริษัท Beckman รุ่น Avanti™

3.4.3 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) ของบริษัท Shimada รุ่น UV 1201 V

3.4.4 ตรวจนับจำนวนเม็ดเลือด hemocytometer

### 3.5 อุปกรณ์สำหรับเตรียมเปลือก

3.5.1 ตู้อบ

3.5.2 เครื่องซังน้ำหนัก

3.5.3 โกร่งบด

3.5.4 ตะแกรงตาถี่ขนาด 150 ไมโครเมตร

3.5.5 โถดูดความชื้น

### 3.6 สารเคมี

3.6.1 ไคโตซาน 85-90% deacetylation degree

3.6.2 แคลเซียมไฮโปคลอไรท์  $\text{Ca}(\text{OCl})_2$

3.6.3 วิเคราะห์หึ่งค์ประกอบทางโภชนาการอาหาร

ก. ซีดีทีเอ

ข. ก๊าซออกซิเจน 99.70%

ค. ก๊าซฮีเลียม 99.99%

ง. leco dry

จ. เอทานอล 80%

ฉ. กรดซัลฟูริก 95-97% ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ )

ช. โซเดียมไฮดรอกไซด์ ( $\text{NaOH}$ )

ซ. octhanol

ณ. cillite no.545

### 3.6.4 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของพลาสติกและเปลือกกุ้งทดลอง

ก. tri- sodium citrate ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )

ข. dry reagent

ค. กรดไฮโดรคลอริก (HCl)

ง. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

จ. กรดอะซิติก (acetic acid)

ฉ. น้ำบริสุทธิ์ที่ยังยวด (Deionized water)

## 4. วิธีดำเนินการวิจัย การเก็บข้อมูลและวิเคราะห์ตัวอย่าง

### 4.1 การวางแผนการทดลอง

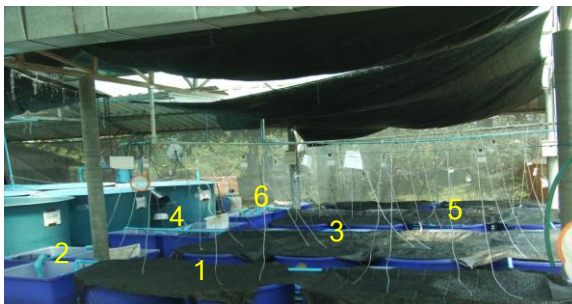
วางแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียล (factorial) แบ่งออกเป็น 6 ชุดการทดลอง ตามความเค็มน้ำ 10, 23 และ 36 ppt และการเสริมโคโตซาน 0.2 % และไม่เสริมโคโตซานในอาหาร ทำ 4 ซ้ำต่อการทดลอง

### 4.2 การเตรียมถังที่ใช้เลี้ยง

ล้างและแช่ถังไฟเบอร์กลาสขนาด 300 ลิตร ด้วยแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ ( $\text{CaOCl}_2$ ) ระดับความเข้มข้น 50-100 ppm ทิ้งไว้ 1 คืน แล้วล้างด้วยน้ำสะอาดอีกครั้ง

### 4.3 การเตรียมน้ำและการปรับสภาพกุ้งทดลอง

เตรียมน้ำทะเลลงบ่อพักน้ำที่เตรียมไว้ วัดความเค็มแล้วปรับความเค็มด้วยน้ำจืดให้ได้ระดับความเค็มน้ำ 23 ppt เติมน้ำลงในถังไฟเบอร์กลาสขนาด 300 ลิตร ปริมาตร 200 ลิตร นำกุ้งทดลองมาทำการปรับความเค็มน้ำที่ระดับ 10, 23 และ 36 ppt วิธีการปรับความเค็มน้ำที่ใช้ในการเลี้ยงจะค่อย ๆ ปรับความเค็มน้ำจากความเค็ม 23 ppt ขึ้นและลงให้ได้ความเค็มที่ต้องการ 2 ppt ต่อชั่วโมง และเมื่อได้ความเค็มที่ต้องการแล้วเลี้ยงกุ้งทดลองต่อไปอีก 5 วันก่อนเริ่มการทดลองใช้ระบบน้ำหมุนเวียนกึ่งปิด (semi-close recirculation system) แต่ละชุดแยกกัน ประกอบด้วย ถังตกตะกอน ถังบำบัดชีวภาพ โดยแต่ละถังมีน้ำไหลผ่านตลอดเวลาและมีอัตราการไหลของน้ำ 1 ลิตรต่อนาที (ภาพที่ 5) ซึ่งจะเติมน้ำเพิ่มหากน้ำหายไปจากระบบ อุณหภูมิระหว่างเลี้ยงอยู่ระหว่าง 28-31 องศาเซลเซียส ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำมากกว่า 6.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และแอมโมเนียน้อยกว่า 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร



ภาพที่ 5 ระบบเลี้ยงกุ้งที่ความเค็ม 3 ระดับ บ่อเลี้ยง (1, 3 และ 5) บ่อบำบัด (2, 4 และ 6)

#### 4.4 การรวบรวมและการเตรียมกุ้งทดลองที่ใช้ในการทดลอง

รวบรวมกุ้งทดลองระยะโพสลาวา 15 จากสุชาติฟาร์ม ต.บางพระ อ.ศรีราชา จังหวัดชลบุรี ที่มีลักษณะแข็งแรงสมบูรณ์ ประมาณ 5,000 ตัว มาปรับสภาพแวดล้อมในบ่อพักและอนุบาลด้วยอาหารสำเร็จรูปสูตรควบคุม (ไม่เสริมโคโคซาน) ขนาดเม็ดอาหาร 350 ไมโครเมตร ใช้กับกุ้งระยะโพสลาวา 15-30 วัน ขนาดเม็ดอาหาร 500 ไมโครเมตร ใช้กับกุ้งอายุ 1-15 วัน ขนาดเม็ดอาหาร 1.2 มิลลิเมตร ใช้กับกุ้งอายุ 16-30 วัน ตามลำดับจนมีน้ำหนักเริ่มต้นประมาณ  $3.18 \pm 0.08$  กรัม ความยาว  $7.61 \pm 0.34$  เซนติเมตรแล้วจึงคัดกุ้งทดลองที่แข็งแรง มีขนาดใกล้เคียงกันลงเลี้ยงในถังไฟเบอร์กลาส ขนาด 300 ลิตร จำนวน 30 ตัวต่อถัง (0.8 ตัวต่อลูกบาศก์เมตร) จำนวนทั้งสิ้น 24 ถัง ถึงคลุมด้วยสแลนสีดำเพื่อลดแสงลดสิ่งรบกวนจากภายนอก และป้องกันกุ้งกระโดดออกนอกถัง

#### 4.5 การให้อาหารและการผลิตอาหารทดลอง

อาหารกุ้งที่มีปลาป่นและกากถั่วเหลืองสกัดน้ำมันเป็นแหล่งโปรตีนหลักโดยอาหารทั้ง 2 สูตรมีส่วนประกอบของวัตถุดิบเหมือนกัน (ตารางที่ 6) ยกเว้นระดับของโคโคซานที่ 0.2 % กำหนดให้มีสารอาหารในระดับที่ใกล้เคียงกันคือ โปรตีนไม่ต่ำกว่า 35 % ไขมันไม่ต่ำกว่า 5 % ความชื้นไม่มากกว่า 11 % กากไม่มากกว่า 3 % โดยให้อาหาร 6% ของน้ำหนักกุ้ง วันละ 5 ครั้ง ในเวลา 06.00 น. 10.00 น. 14.00 น. 18.00 น. และ 22.00 น.

ขั้นตอนการผลิตอาหารทดลองมีดังต่อไปนี้

4.5.1 วิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของวัตถุดิบ ได้แก่ ปริมาณโปรตีน ไขมัน ความชื้น เถ้า เยื่อใย ฟอสฟอรัส และโคโคซานและสร้างสูตรอาหารโดยคำนวณอาหารทดลองทุกสูตรให้มีระดับของโปรตีน ไขมัน และพลังงานเท่ากัน

4.5.2 ชั่งวัตถุดิบอาหารที่ผ่านการร่อนจากตะแกรง ตามอัตราส่วนที่ต้องการ แยกถุงไว้ใช้ในแต่ละชุดการทดลอง

4.5.3 ละลายผงโคโตซาน ตามปริมาณที่กำหนดไว้ในแต่ละชุดการทดลอง ด้วย 1% acetic acid โดยใช้กรด 200 มิลลิลิตร ต่ออาหาร 1,000 กรัม นำสารละลายโคโตซานมาคลุกกับวัตถุดิบอาหารแต่ละชุดการทดลอง (ชุดควบคุมให้เติม 1% acetic acid อย่างเดียว)

4.5.4 นำวัตถุดิบจาก (ข้อ 2) ยกเว้นน้ำมัน มาผสมคลุกเคล้าให้เข้ากัน ตามด้วยน้ำสะอาด หลังจากนั้นจึงนำส่วนผสมทั้งหมดอัดให้เป็นเม็ดอาหารด้วยเครื่องบดเนื้อและตัดให้ได้ขนาดตามความเหมาะสมกับขนาดกึ่งขาว

4.5.5 อบอาหารที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เมื่ออาหารแห้งดีแล้วเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะเริ่มทดลอง

4.5.6 นำอาหารเม็ดวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการ (ตารางที่ 6) ได้แก่ ความชื้น โปรตีน ไขมัน เถ้า และเยื่อใย ตามวิธีของ AOAC (2005) ส่วนปริมาณคาร์โบไฮเดรต (ไนโตรเจนฟรีเอ็กซ์แทรกซ์, nitrogen free extract, NFE) คำนวณได้จากสูตร

$$\text{NFE} = 100 - (\% \text{ความชื้น} + \% \text{โปรตีน} + \% \text{ไขมัน} + \% \text{เถ้า} + \% \text{เยื่อใย})$$

ตารางที่ 6 สูตรอาหารทดลองสำหรับกึ่งขาวและองค์ประกอบทางเคมีอย่างหยาบของอาหาร

วัตถุดิบ	โคโตซาน 0.2%	โคโตซาน 0%
ปลาป่น (60% โปรตีน)	37.00	37.00
กากถั่วเหลือง (41% โปรตีน)	12.00	12.00
หมักป่น	3.00	3.00
หวิดกลูเตน	4.00	4.00
แป้งสาลี	16.00	16.00
แอลฟาสตาร์ท	17.80	18.00
น้ำมันปลา	5.61	5.61
โคลีนคลอไรด์ (50%)	0.60	0.60
วิตามินรวม <sup>1</sup>	1.00	1.00
แร่ธาตุรวม <sup>2</sup>	1.00	1.00
โมโนแคลเซียม ฟอสเฟต	0.20	0.20
สารกันเหิน (B.H.T)	0.02	0.02
เลซิทิน (60% โปรตีน)	1.00	1.00
วิตามินอี (E 50)	0.02	0.02
วิตามินซี (C 35%) <sup>3</sup>	0.10	0.10
โคเลสเตอรอล	0.20	0.20
กรดอะซิติก	0.20	0.20
สารกันรา (Propionic acid)	0.20	0.20
โพลีเมทิลคาร์โบมาย (P.M.C)	0.05	0.05
รวม	100.00	100.00
องค์ประกอบทางเคมี (เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง)		
ความชื้น	8.95	8.97
โปรตีน	36.93	36.95
ไขมัน	7.70	7.70
เถ้า	10.54	10.54
ใยอาหาร	0.97	0.78
NFE	35.88	35.84

<sup>1</sup>Vitamin premix g kg<sup>-1</sup>: Thiamine – HCl 60, Riboflavin 25, Pyridoxin – HCl 50, Nicotinic acid 40, Ca – d – Pantothenate 75, Biotin 2 % 1, Folic HF 85 % 10, Inositol 400, Vitamin B<sub>12</sub> 0.05, Vitamin E<sub>50</sub> 100, Vitamin K<sub>3</sub> 50 % 35, Vitamin A 5, Vitamin D<sub>3</sub> 1.00 <sup>2</sup>Mineral premix g kg<sup>-1</sup>: Ca (H<sub>2</sub> PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> H<sub>2</sub>O 2.5, NaH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O 3.75, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.5, KCl 1.25

<sup>3</sup>Vitamin C : Ca – PO<sub>4</sub>

#### 4.6 การตรวจสอบคุณภาพน้ำ

ตรวจสอบคุณภาพน้ำในถังเลี้ยงก่อนเริ่มและระหว่างทดลองเก็บน้ำจากถังทดลองเพื่อวิเคราะห์คุณภาพน้ำทุกสัปดาห์ โดยวิเคราะห์

- 4.6.1 ค่าพีเอช วัดโดย electronic pH (Meter Toledo 320 model)
- 4.6.2 ค่าออกซิเจนที่ละลายน้ำและอุณหภูมิของน้ำ วัดโดย (YSI model 52)
- 4.6.3 ค่าความเค็ม วัดโดย (hand refractometer)
- 4.6.4 ปริมาณแอมโมเนียรวม วัดโดยชุด Test Kit ยี่ห้อ PARA
- 4.6.5 ปริมาณไนไตรท์ วัดโดยชุด Test Kit ยี่ห้อ SONA
- 4.6.6 ค่าอัลคาไลน์ วัดโดยชุด Test Kit ยี่ห้อ IMPACT

#### 4.7 การเก็บข้อมูล

4.7.1 การเก็บข้อมูลของการเจริญเติบโต การลอกคราบ และอัตราการรอด

ก. การเจริญเติบโต ทุก ๆ 15 วัน สุ่มกุ้ง 25% ของจำนวนทั้งหมดในแต่ละซ้ำ มาชั่งน้ำหนัก (กรัม) และวัดขนาดความยาว (เซนติเมตร) เพื่อมาคำนวณหาการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ เปอร์เซ็นต์การเพิ่มน้ำหนักและความยาว

ข. การลอกคราบและอัตราการรอด ระหว่างการทำการทดลองทุก ๆ วัน ทำการบันทึกผลการลอกคราบของกุ้ง จำนวนกุ้งที่ตายและลักษณะที่ตาย

#### 4.8 การวิเคราะห์ทางชีวเคมี

4.8.1 การเก็บตัวอย่างเลือดกุ้งทดลอง

ก. หลังจากเลี้ยงกุ้งจนครบ 60 วัน จึงทำการสุ่มตัวอย่างกุ้งแต่ละการทดลองมาเก็บตัวอย่างเลือด

ข. ก่อนเก็บเลือดให้งดอาหารเป็นเวลา 24 ชั่วโมง สุ่มตัวอย่างกุ้งระยะก่อนลอกคราบตอนต้น (early premolt stage, D0) ที่มีสภาพแข็งแรง มาจำนวนเท่า ๆ กัน (5 ตัวอย่าง/ซ้ำ) ในแต่ละการทดลอง

ค. ดูดเลือดกุ้งโดยใช้เข็ม เบอร์ 27 Tuberculin ขนาด 1.0 มิลลิลิตร แกลงบริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 5

ง. เก็บตัวอย่างเลือดไว้ใน Eppendorf โดยผสม 30% tri-sodium citrate เพื่อกันเลือดแข็งตัว (anticoagulant) อัตราส่วน 1:1 (ใช้เลือด 0.7 มิลลิลิตร: 30% tri-sodium citrate 0.7 มิลลิลิตร) เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปเก็บในตู้แช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

#### 4.8.2 การเตรียมพลาสมา

ก. นำเลือดกึ่งที่ผสม 30% tri-sodium citrate (ข้อ 4.8.1 ง) นำไปปั่นเพื่อให้ตกตะกอน(ควรทิ้งให้เลือดใน eppendorf เป็นของเหลวก่อน) ด้วยเครื่อง microcentrifuge ด้วยแรงเหวี่ยง 10,000 g ที่ อุณหภูมิ 4°C นาน 15-20 นาที

ข. ดูดของเหลวส่วนบน (supernatant) ซึ่งก็คือพลาสมาปริมาตร 1 มิลลิลิตรเก็บไว้ใน Eppendorf ใหม่ เพื่อใช้เป็นตัวอย่างวิเคราะห์หาปริมาณแร่ธาตุต่าง ๆ และโปรตีนรวมในน้ำเลือดต่อไป

#### 4.8.3 การเตรียมตัวอย่างเปลือก

ก. นำตัวอย่างกึ่งที่เก็บเลือดแล้ว มาแกะเปลือกกึ่ง (6 ตัวอย่าง/ซ้ำ) นำมาล้างให้สะอาดด้วยน้ำบริสุทธิ์ยิ่งยวด (deionized water) 2 รอบ

ข. นำเปลือกที่ล้างแล้วไปอบ ในตู้อบด้วยอุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเปลือกที่อบและชั่งน้ำหนักครบแล้ว นำกลับไปอบต่ออีก 2 ชั่วโมง จากนั้นนำกลับมาชั่งน้ำหนักอีกครั้ง จนได้น้ำหนักแห้งที่คงที่

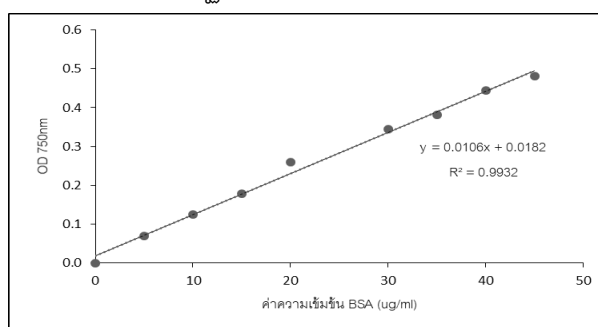
ค. นำเปลือกกึ่งแต่ละตัวที่อบแห้งแล้ว มาบดในโกร่งบด (ceramic mortar) ให้ละเอียด แล้วนำไปร่อนด้วยตะแกรงตาถี่ขนาด 150  $\mu\text{m}$  ให้ได้ปริมาณ 1g สำหรับการวิเคราะห์แร่ธาตุต่าง ๆ ต่อไป โดยเก็บไว้ในโถดูดความชื้น (desiccator)

#### 4.8.4 การวัดปริมาณแร่ธาตุในพลาสมาและเปลือก

นำพลาสมาและเปลือกกึ่งไปวัดปริมาณของแร่ธาตุ โซเดียม ( $\text{Na}^+$ ) โพแทสเซียม ( $\text{K}^+$ ) แมกนีเซียม ( $\text{Mg}^{2+}$ ) แคลเซียม ( $\text{Ca}^{2+}$ ) ฟอสฟอรัส ( $\text{P}^{4+}$ ) ซัลเฟอร์ ( $\text{S}^{2-}$ ) คลอไรด์ ( $\text{Cl}^-$ ) แมงกานีส ( $\text{Mn}^{7+}$ ) และทองแดง ( $\text{Cu}^{2+}$ ) ด้วยเครื่อง ICP-OES (Inductively Coupled Plasma Optical Emission spectrometry) ดัดแปลงจากวิธีการของ AOAC (2005) จะได้ปริมาณแร่ธาตุต่าง ๆ

#### 4.8.5 การตรวจปริมาณโปรตีนในน้ำเลือด

การวิเคราะห์หาโปรตีนโดยวิธี Lowry (Lowry et al., 1951) จากค่าความเข้มข้นของโปรตีนในพลาสมา กึ่ง โดยใช้กราฟมาตรฐาน (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 6 กราฟมาตรฐานโปรตีนโบวีซีรัมอัลบูมิน ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ในพลาสมา กึ่ง

#### 4.8.6 การวัดปริมาณของโคติน -โคโตซานใน เปลือกกุ้งทดลอง

ก. นำเปลือกกุ้งแกะเปลือก ล้างให้สะอาด พักให้แห้งบนตะแกรง แยกเปลือกกุ้งเพื่อใช้วิเคราะห์ 2 ซ้ำ บันทึกน้ำหนักก่อนอบ นำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกน้ำหนักหลังอบ บดในโถรงบด (ceramic mortar) ให้ละเอียด ให้ได้ขนาดประมาณ 0.5 มิลลิเมตร (ดวงกมล มั่นประเสริฐ, 2541)

ข. สกัดโคติน นำเปลือกที่ผ่านการบดมากำจัดแร่ธาตุ ด้วยสารละลาย 2N HCl ในอัตราส่วนเปลือกกุ้งต่อปริมาณกรด 1:20 (w/v) ที่อุณหภูมิห้อง กวนตลอดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบ 1 ชั่วโมง นำมากรองและล้างจนเป็นมีค่าเป็นกลาง ต่อด้วยการกำจัดโปรตีนด้วยสารละลาย 2N NaOH ในอัตราส่วนเปลือกกุ้งต่อปริมาณด่าง 1:20 (w/v) ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ใช้ shaking bath กวนตลอด 2 ชั่วโมง เมื่อครบ 2 ชั่วโมง นำมากรองและล้างจนเป็นมีค่าเป็นกลาง นำโคตินที่ได้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำมาซึ่งพร้อมบันทึกน้ำหนักโคตินที่ได้

ค. สกัดโคโตซาน นำโคตินที่มากำจัดหมู่อะซิติก (acetylation) ด้วยสารละลาย 50% (w/v) NaOH ในอัตราส่วนโคตินต่อปริมาณด่าง 1:20 (w/v) ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ใช้ shaking bath กวนตลอด 3 ชั่วโมง เมื่อครบ 3 ชั่วโมง นำมากรองและล้างจนเป็นมีค่าเป็นกลาง นำโคโตซานที่ได้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำมาซึ่งพร้อมบันทึกน้ำหนักโคโตซานที่ได้

ง. เปรียบเทียบปริมาณโคติน-โคโตซานที่ได้จากการสกัดเพื่อคำนวณ ปริมาณโคติน-โคโตซานต่อน้ำหนักแห้งของเปลือกกุ้ง และเปอร์เซ็นต์ปริมาณโคติน-โคโตซานต่อน้ำหนักแห้งของเปลือกกุ้ง

#### 4.8.7 ภูมิภาคัมกันของกุ้งทดลอง

เมื่อสิ้นสุดการทดลองสุ่มกุ้งตัวอย่าง (5 ตัว/ซ้ำ) เพื่อเก็บตัวอย่างเลือดกุ้งโดยวิเคราะห์ทันทีที่เก็บตัวอย่าง

ก. การตรวจนับปริมาณเม็ดเลือดรวม นำเลือดกุ้งที่เจือจางด้วยสารละลายป้องกัน การแข็งตัวของเลือด ใช้ micropipette ดึงสารละลายเลือดกุ้งจำนวน 20 ไมโครลิตร มาตรวจนับจำนวนเม็ดเลือดด้วย hemacytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ คำนวณปริมาณเม็ดเลือดที่นับได้เป็นจำนวนเซลล์ต่อลูกบาศก์มิลลิเมตรจากสมการด้านล่าง



$$\begin{aligned}
 \text{ปริมาตรของ Hemacytometer} &= \text{กว้าง} \times \text{ยาว} \times \text{ลึก} \\
 &= 0.2 \text{ มม.} \times 0.2 \text{ มม.} \times 0.1 \text{ มม.} \\
 &= 0.02 \text{ ซม.} \times 0.02 \text{ ซม.} \times 0.01 \text{ ซม.} \\
 &= 0.000004 \text{ มล.} (4 \times 10^{-6})
 \end{aligned}$$

ความหนาแน่นของเม็ดเลือด = ค่าเฉลี่ยปริมาณเม็ดเลือดรวม 5 ช่อง  $\times \frac{1}{4} \times 10^6$  เซลล์/มล.

ข. การวัดระยะเวลาแข็งตัวของเลือด (Clotting) หยดเลือดกึ่งลงสไลด์หลุมจากนั้นเขย่าสไลด์หลุมพร้อมจับเวลาที่เลือดกึ่งเป็นลิ่มและเริ่มจะแข็งตัวพร้อมบันทึกการแข็งตัวของเลือดกึ่ง (นาที) ทุกตัวในแต่ละซ้ำ ทุกชุดการทดลอง

#### 4.8.8 การทดสอบความเครียด

ก. นำกึ่งที่มีระยะลอกคราบ D0 ของแต่ละชุดการทดลอง (5 ตัว/ซ้ำ) มาทำการทดสอบความเครียดในขวดโหลขนาด 20 ลิตร ที่บรรจุน้ำจืดที่อุณหภูมิห้อง

ข. ตรวจสอบระยะเวลาที่กึ่งแต่ละตัวไม่สามารถทรงตัวได้ (ระยะสลบที่ 3) จนครบทุกตัวในแต่ละซ้ำ ทุกชุดการทดลอง

ค. บันทึกระยะเวลาที่ทำให้กึ่งทดลองสลบทั้งหมด (ชั่วโมง/นาที)

ง. หลักเกณฑ์ตรวจสอบในการสลบของกึ่งทดลอง ได้ดัดแปลงจาก วิธนา ตุงซีพ (2549) ตามตารางที่ 7 จะแสดงออกของพฤติกรรม 5 ระยะดังนี้

ระยะที่ 1 สูญเสียการตอบสนองจากสิ่งเร้าภายนอก

ระยะที่ 2 สามารถทนต่อการสัมผัส

ระยะที่ 3 สูญเสียการสะบัดของหางตามปกติ หางส่วนที่เคยกိုင်งอสะบัดได้

ลดการเคลื่อนไหวลงมาวางในแนวตรงกับลำตัว

ระยะที่ 4 สูญเสียการควบคุมการทำงานของกล้ามเนื้อส่วนหาง

ระยะที่ 5 สูญเสียการควบคุมการทำงานของ maxilla activity

ตารางที่ 7 ระดับพฤติกรรมกึ่งขาวที่กำหนดระดับการสลับ

ระดับ	พฤติกรรม			
	การขยับขาเดิน และขาว่ายน้ำ	การขยับเหงือก	การเดินของหัวใจ	การตอบสนองต่อ การกระตุ้น
5	เร็วมาก	เร็วมาก	เร็วมาก	ดีมาก
4	เร็ว	เร็ว	เร็ว	ดี
3	ปานกลาง	ปานกลาง	ปานกลาง	ปานกลาง
2	ช้า	ช้า	ช้า	น้อย
1	ช้ามาก	ช้ามาก	ช้ามาก	น้อยมาก
0	ไม่ขยับ	ไม่ขยับ	หยุดเดิน	ไม่ตอบสนอง

#### 4.9 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลแต่ละการทดลอง ตรวจสอบค่าพารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต ได้แก่ การเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน (ADG) เปอร์เซ็นต์การเพิ่มน้ำหนัก (%WG) เปอร์เซ็นต์ความยาวที่เพิ่มขึ้น (%LG) อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (%SRG) อัตรารอด (%SR) อัตราการแลกเนื้อ (FCR) เปอร์เซ็นต์ความถี่ในการลอกคราบต่อวัน ค่าพารามิเตอร์เกี่ยวข้องกับองค์ประกอบทางเคมีในพลาสมา ได้แก่ โซเดียม ( $\text{Na}^+$ ) โพแทสเซียม ( $\text{K}^+$ ) แคลเซียม ( $\text{Ca}^{2+}$ ) แมกนีเซียม ( $\text{Mg}^{2+}$ ) ฟอสฟอรัส ( $\text{P}^{4+}$ ) ซัลเฟอร์ ( $\text{S}^{2-}$ ) คลอไรด์ ( $\text{Cl}^-$ ) แมงกานีส ( $\text{Mn}^{7+}$ ) และทองแดง ( $\text{Cu}^{2+}$ ) โปรตีนรวมในน้ำเลือด (Total Plasma protein) องค์ประกอบทางเคมีของเปลือก ได้แก่ แร่ธาตุ โซเดียม ( $\text{Na}^+$ ) โพแทสเซียม ( $\text{K}^+$ ) แคลเซียม ( $\text{Ca}^{2+}$ ) แมกนีเซียม ( $\text{Mg}^{2+}$ ) ฟอสฟอรัส ( $\text{P}^{4+}$ ) ซัลเฟอร์ ( $\text{S}^{2-}$ ) คลอไรด์ ( $\text{Cl}^-$ ) แมงกานีส ( $\text{Mn}^{7+}$ ) และทองแดง ( $\text{Cu}^{2+}$ ) รวมถึงปริมาณไคติน และไคโตซาน

ค่าพารามิเตอร์เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกัน ได้แก่ ปริมาณเม็ดเลือดรวม (THC) ระยะเวลาเลือดแข็งตัว (Clotting) และระยะเวลาที่ทำให้กุ้งสลบจากการทดสอบความเครียด มาหาความแตกต่างทางสถิติด้วยการวิเคราะห์ TWO-way ANOVA และทดสอบความแตกต่างระหว่างกลุ่มด้วยวิธี Tukey test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

## บทที่ 4

### ผลการวิจัย

จากการทดลองเลี้ยงกุ้งขาว น้ำหนักเริ่มต้นเฉลี่ยที่  $3.18 \pm 0.08$  กรัม ความยาวเริ่มต้นเฉลี่ย  $7.61 \pm 0.34$  เซนติเมตร ในถังไฟเบอร์กลาส ขนาด 300 ลิตร ด้วยอาหารสำเร็จรูปที่เสริมโคโตซาน (0.2%) และไม่เสริมโคโตซาน (0%) ในน้ำที่มีความเค็ม 3 ระดับ ได้แก่ 10, 23 และ 36 ppt เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ มีผลการทดลอง ดังนี้

#### 4.1 ผลของการเสริมโคโตซานในอาหารและระดับความเค็มในการเลี้ยงต่อการเจริญเติบโต อัตรารอด อัตราแลกเนื้อ ความถี่ในการลอกคราบ และระยะเวลาต่อการสลบของกุ้งขาวแวนนาไม

##### ผลของการเสริมโคโตซานในอาหาร

ผลการศึกษาพบว่ากุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ไม่เสริมโคโตซาน (0%) และเสริมโคโตซาน (0.2%) มีค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะด้านน้ำหนัก (SGRW) (ภาพที่ 7C) น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นต่อวัน (ADG) (ภาพที่ 7A) อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะด้านความยาว SGRL (ภาพที่ 8A) อัตรารอด (%SR) (ภาพที่ 9A) ความแปรปรวนของน้ำหนัก (%SWW) (ภาพที่ 8B) ความแปรปรวนของความยาว (%SVL) (ภาพที่ 8C) และความถี่ในการลอกคราบ (MF) (ภาพที่ 8D) ไม่แตกต่างกัน ( $p > 0.05$ ) ยกเว้นค่า %น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (%WG) (ภาพที่ 7B) และ %ความยาวที่เพิ่มขึ้น (%LG) (ภาพที่ 7D) ของกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมโคโตซาน 0.2% มีค่าสูงกว่ากุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารไม่เสริมโคโตซาน (0%) ( $p < 0.05$ ) และกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมโคโตซาน 0.2% มีระยะเวลาที่ต่อการสลบ (ARP) (ภาพที่ 9C) นานกว่ากุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารไม่เสริมโคโตซาน (0%) ( $p < 0.05$ ) ส่วนค่าอัตราแลกเนื้อ (FCR) (ภาพที่ 9B) พบว่ากุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมโคโตซาน 0.2% มีค่าต่ำกว่ากุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารไม่เสริมโคโตซาน ( $p < 0.05$ )

##### ผลของความเค็ม

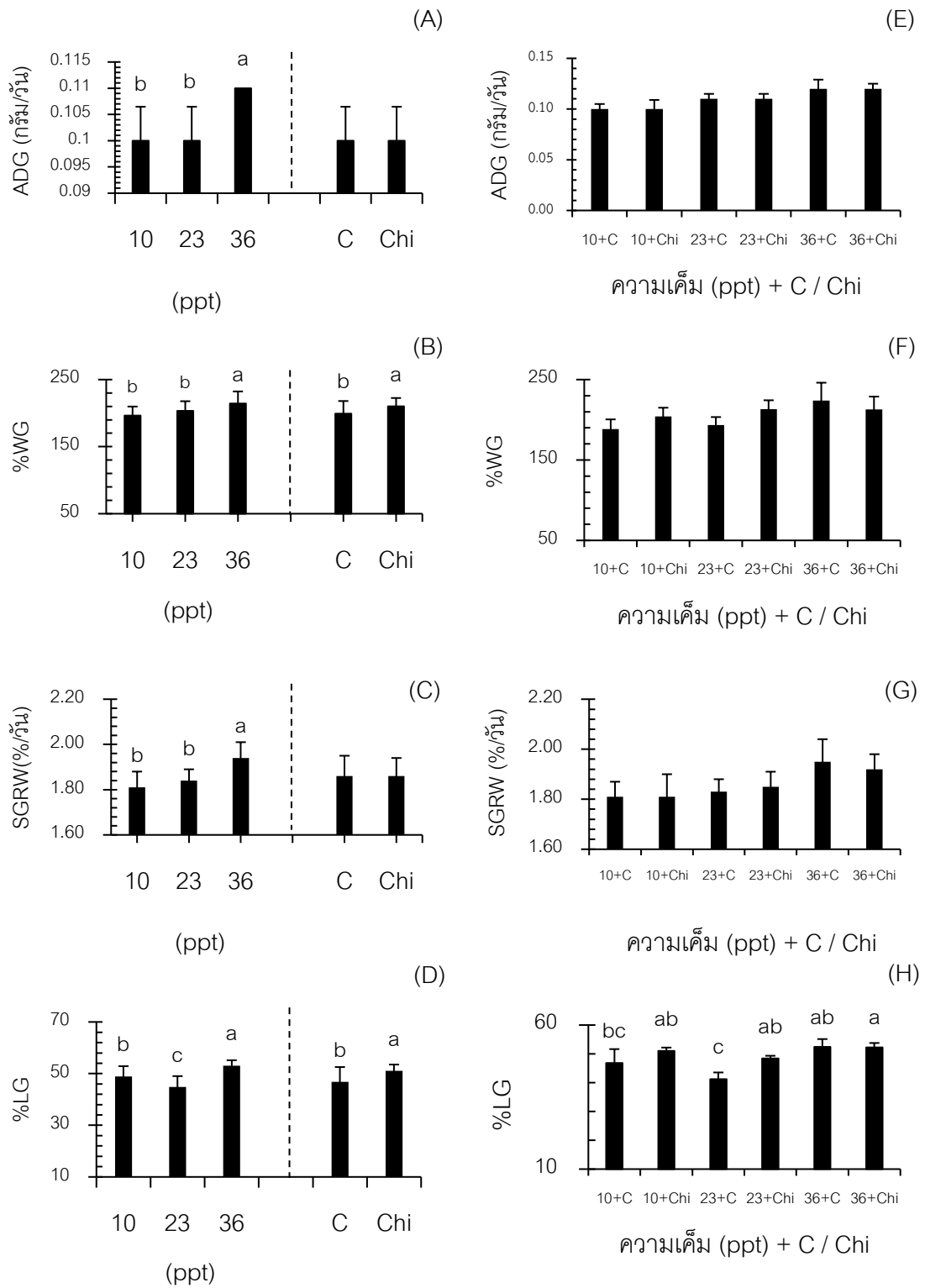
ผลการศึกษาพบว่ากุ้งที่เลี้ยงในความเค็มน้ำ 10 และ 23 ppt มี ADG (ภาพที่ 7A) %WG (ภาพที่ 7B) SGRW (ภาพที่ 7C) และ %LG (ภาพที่ 7D) ไม่แตกต่างกัน ( $p > 0.05$ ) แต่กุ้งที่เลี้ยงในน้ำทั้ง 2 ระดับความเค็มนี้ มีค่าดังกล่าวน้อยกว่ากุ้งที่เลี้ยงในความเค็มน้ำ 36 ppt ( $p < 0.05$ ) แต่กุ้งที่เลี้ยงในความเค็มน้ำทั้ง 3 ระดับ มี SGRL (ภาพที่ 8A) %SWW (ภาพที่ 8B) %SVL (ภาพที่ 8C) และ MF

(ภาพที่ 8D) ไม่แตกต่างกัน ( $p>0.05$ ) ขณะที่กึ่งที่เลี้ยงในความเค็มน้ำ 23 และ 36 ppt มี %SR (ภาพที่ 9A) ไม่แตกต่างกัน ( $p>0.05$ ) แต่มีค่าสูงกว่ากึ่งที่เลี้ยงในความเค็มน้ำ 10 ppt ( $p<0.05$ )

กึ่งที่เลี้ยงในความเค็มน้ำ 23 และ 36 ppt มี FCR (ภาพที่ 9B) ไม่แตกต่างกัน ( $p>0.05$ ) แต่ต่ำกว่ากึ่งที่เลี้ยงในความเค็มน้ำ 10 ppt ( $p<0.05$ ) ARP (ภาพที่ 9C) พบว่ากึ่งที่เลี้ยงในความเค็มน้ำ 10 ppt มีผลต่อ ARP นานกว่ากึ่งที่เลี้ยงในความเค็มน้ำ 23 และ 36 ppt ( $p<0.05$ ) และกึ่งที่เลี้ยงในความเค็มน้ำ 23 ppt มี ARP นานกว่ากึ่งที่เลี้ยงในความเค็มน้ำ 36 ppt ( $p<0.05$ )

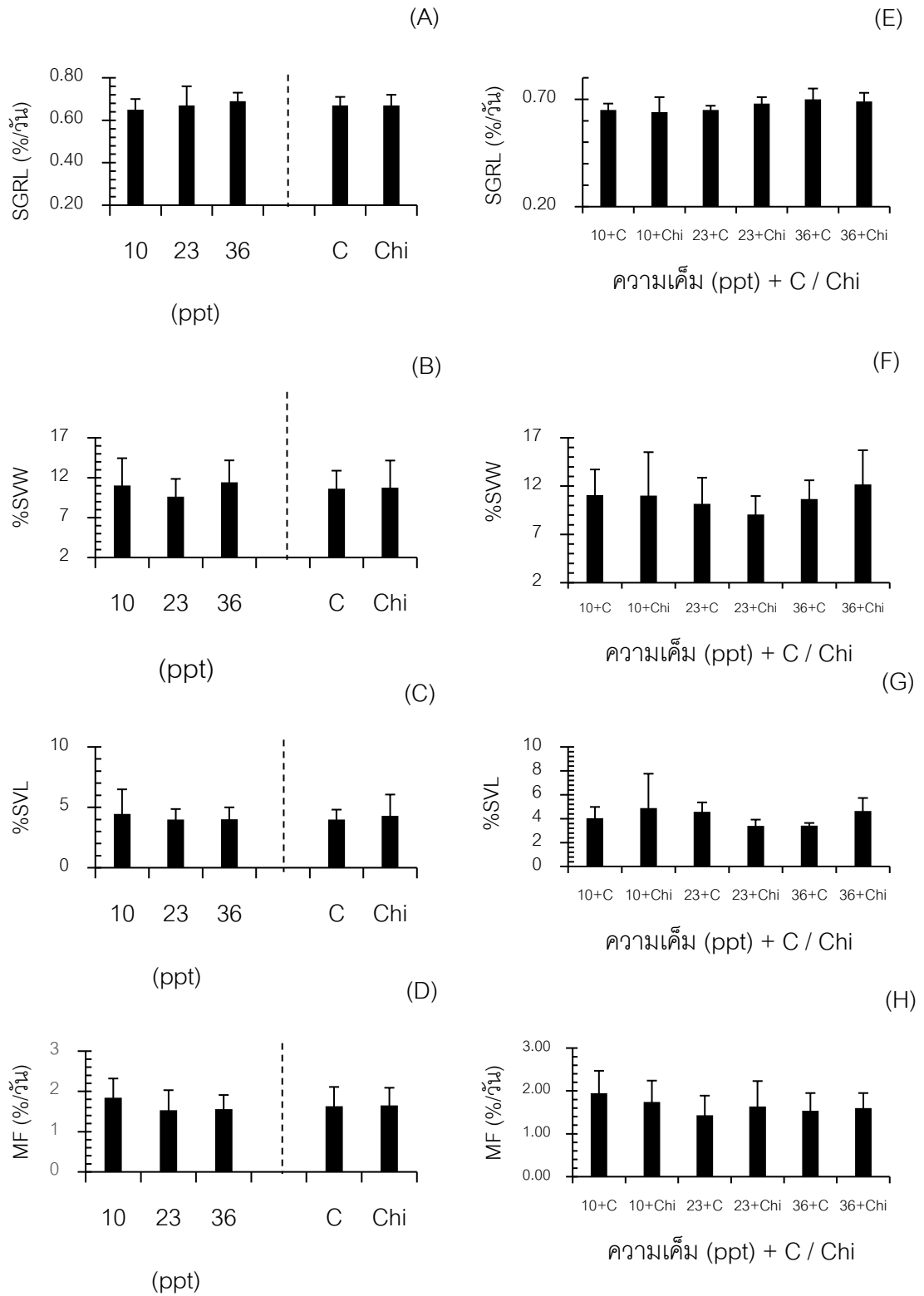
### **อิทธิพลร่วมของระดับความเค็มและการเสริมโคโตซานในอาหาร**

การศึกษานี้พบอิทธิพลร่วมของระดับความเค็มและการเสริมโคโตซานในอาหารต่อการเจริญเติบโตด้าน %LG (ภาพที่ 7H) โดยกึ่งที่เลี้ยงในความเค็มน้ำ 36 ppt ที่ให้อาหารทั้ง 2 แบบ มีค่า %LG สูงกว่ากึ่งที่เลี้ยงในความเค็มน้ำ 23 ppt ที่ไม่เสริมโคโตซาน %SR (ภาพที่ 9D) ของกึ่งที่เลี้ยงในความเค็มน้ำ 23 ppt และ 36 ppt ที่ให้อาหารทั้ง 2 แบบ มีค่าสูงกว่ากึ่งที่เลี้ยงในความเค็มน้ำ 10 ppt ที่ให้อาหารทั้ง 2 แบบ ( $p<0.05$ ) แต่จากการทดลองพบว่าที่ระดับความเค็มเดียวกันการเสริมโคโตซานไม่มีผลต่อ %SR ขณะที่ความเค็มน้ำ 23 ppt และ 36 ppt ที่ให้อาหารทั้ง 2 แบบ มีค่า FCR ต่ำกว่ากึ่งที่เลี้ยงความเค็มน้ำ 10 ppt ที่ให้อาหารทั้ง 2 แบบ ( $p<0.05$ ) ส่วนความเค็มน้ำ 10 ppt ร่วมกับเสริมโคโตซานในอาหาร 0.2% มีผลต่อ ARP (ภาพที่ 9F) สูงกว่าความเค็มน้ำ 10 ppt ที่ไม่เสริมโคโตซาน ขณะที่การเสริมโคโตซานไม่มีผลต่อ ARP ของกึ่งที่เลี้ยงในความเค็มน้ำ 23 ppt และ 36 ppt ( $p>0.05$ )



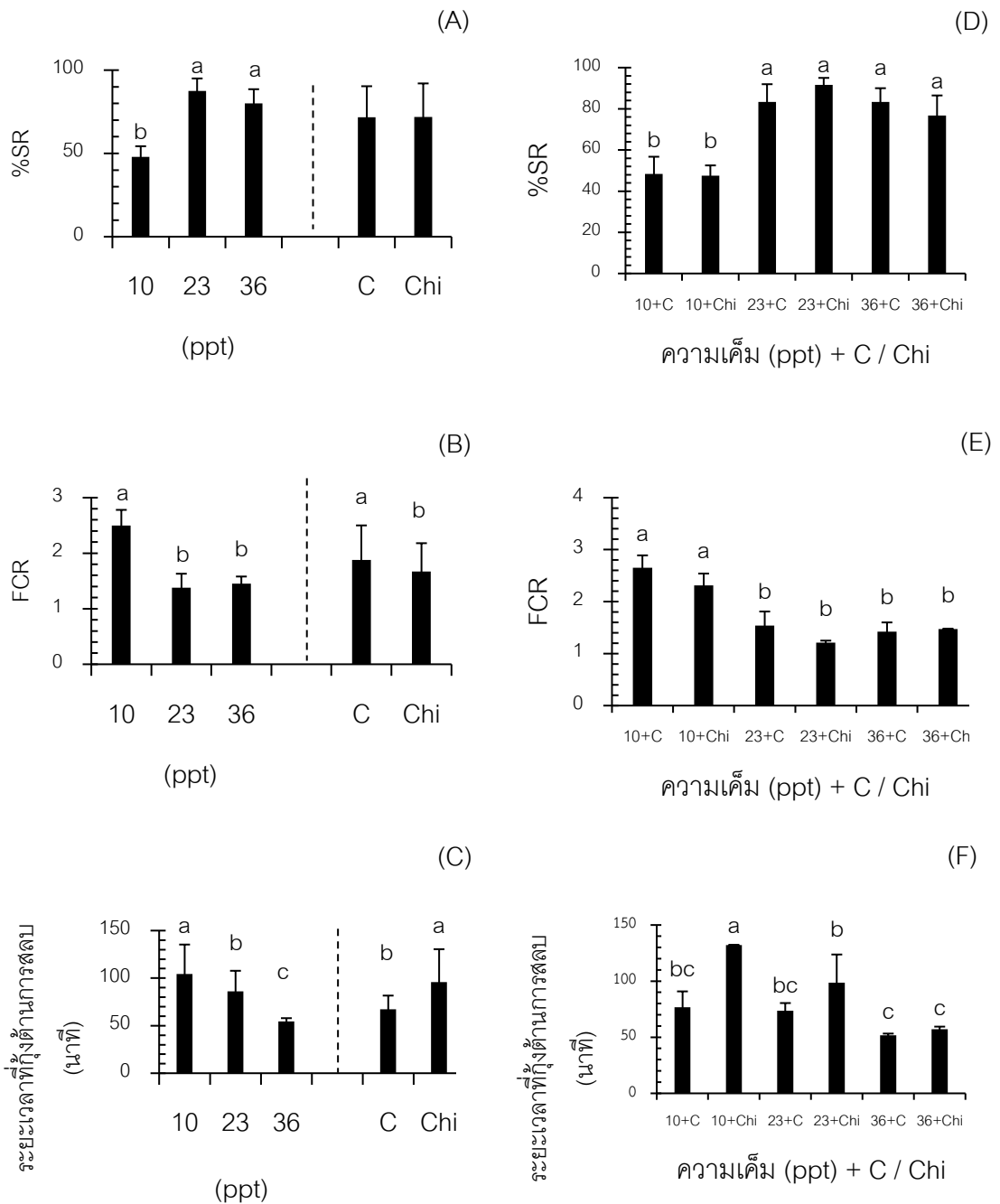
ภาพที่ 7 ผลของความเค็ม 3 ระดับ และโคโตซานที่ 0 (C) และ 0.2% (Chi) ต่อ ADG (A) %WG (B) SGRW (C) และ%LG (D) และผลของความเค็มร่วมกับโคโตซาน ต่อ ADG (E) %WG (F) SGRW (G) และ%LG (H)

อักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันหมายถึงให้ผลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )



ภาพที่ 8 ผลของความเค็ม 3 ระดับ และไคโตซานที่ 0 (C) และ 0.2% (Chi) ต่อ SGRL (A) SWW (B) SRL (C) และ MF (D) และผลของความเค็มร่วมกับไคโตซาน ต่อ SGRL (E) SWW (F) SRL (G) และ MF (H)

อักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันหมายถึงให้ผลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )



ภาพที่ 9 ผลของความเค็ม 3 ระดับ และโคโตซานที่ 0 (C) และ 0.2% (Chi) ต่อ %SR (A) FCR (B) และ Stress test (C) และผลของความเค็มร่วมกับโคโตซาน ต่อ %SR (D) FCR (E) และ Stress test (F)

อักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันหมายถึงให้ผลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

## 4.2 ผลของการเสริมโคโคซานในอาหารและระดับความเค็มในการเลี้ยงต่อ ปริมาณแร่ธาตุในพลาสมา โปรตีนในพลาสมา ระยะเวลาที่เลือดแข็งตัว และปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งขาวแวนนาไม

### ผลของการเสริมโคโคซานในอาหาร

ผลการศึกษาพบว่ากุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ไม่เสริมโคโคซาน (0%) และอาหารที่เสริมโคโคซาน (0.2%) มีปริมาณ Na (ภาพที่ 10A) K (ภาพที่ 10B) Ca (ภาพที่ 10 C) P (ภาพที่ 11B) Cu (ภาพที่ 11C) และ Mg (ภาพที่ 11A) ในพลาสมา ค่าระยะเวลาที่เลือดแข็งตัว (ภาพที่ 12A) และ ปริมาณเม็ดเลือดรวม (THC) (ภาพที่ 12C) ไม่แตกต่างกัน ( $p>0.05$ ) ยกเว้นกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมโคโคซาน 0.2% มีปริมาณโปรตีนในพลาสมา (ภาพที่ 12B) สูงกว่ากุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ไม่เสริมโคโคซาน ( $p<0.05$ )

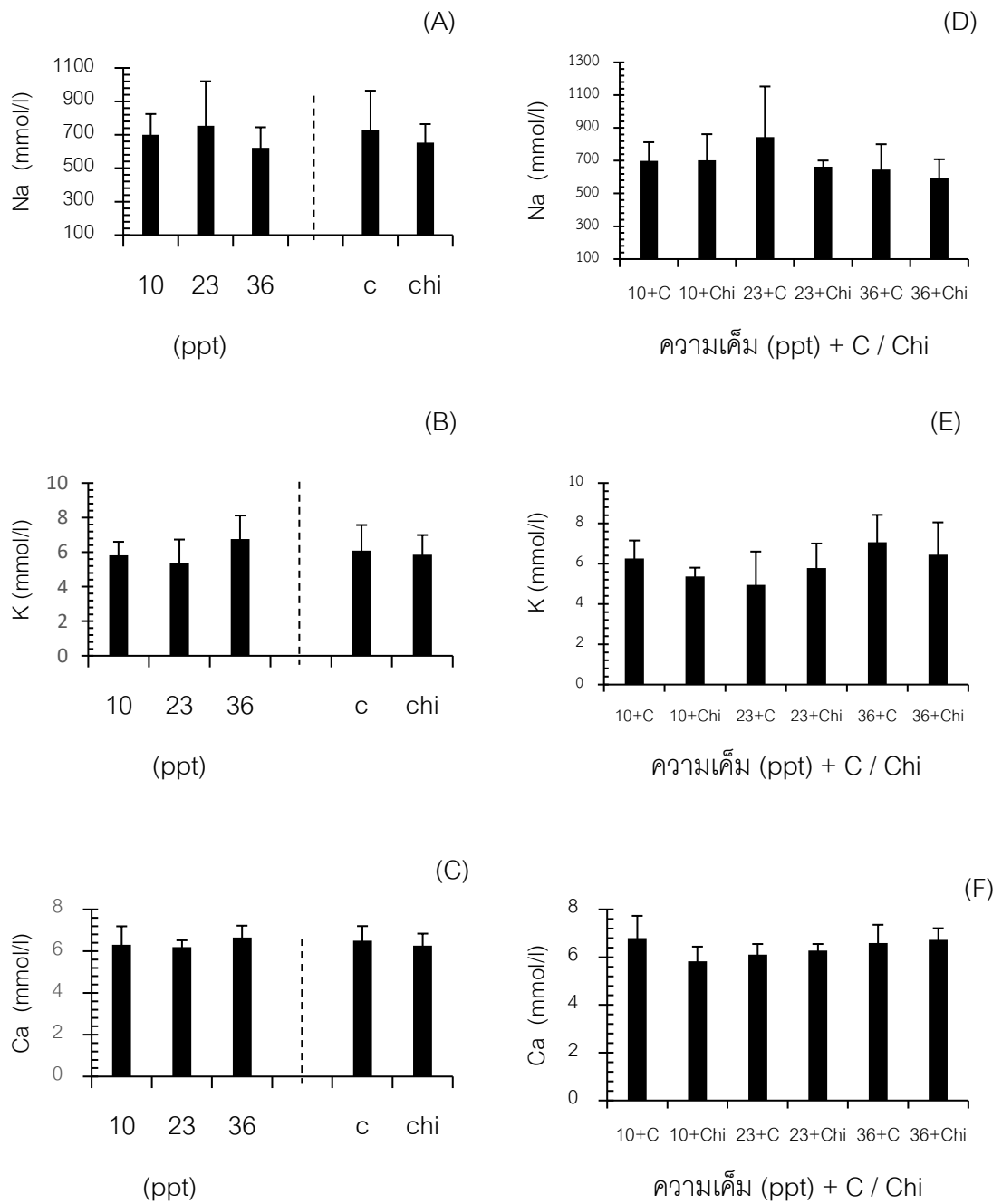
### ผลของความเค็ม

ผลการศึกษาพบว่ากุ้งที่เลี้ยงในความเค็มน้ำทั้ง 3 ระดับ มีปริมาณ Na (ภาพที่ 10A) K (ภาพที่ 10B) Ca (ภาพที่ 10C) P (ภาพที่ 11B) และ Cu (ภาพที่ 11C) ในพลาสมา และค่าระยะเวลาที่เลือดแข็งตัว (ภาพที่ 12A) ไม่แตกต่างกัน ( $p>0.05$ ) แต่กุ้งที่เลี้ยงในความเค็มน้ำ 36 ppt มีปริมาณ Mg ในพลาสมา (ภาพที่ 11A) และโปรตีนในพลาสมา (ภาพที่ 12B) สูงกว่ากุ้งที่เลี้ยงในความเค็มน้ำ 10 ppt และ 23 ppt ( $p<0.05$ ) และกุ้งที่เลี้ยงในความเค็มน้ำ 23 ppt มี THC (ภาพที่ 12C) สูงกว่ากุ้งที่เลี้ยงในความเค็มน้ำ 10 และ 36 ppt ( $p<0.05$ )

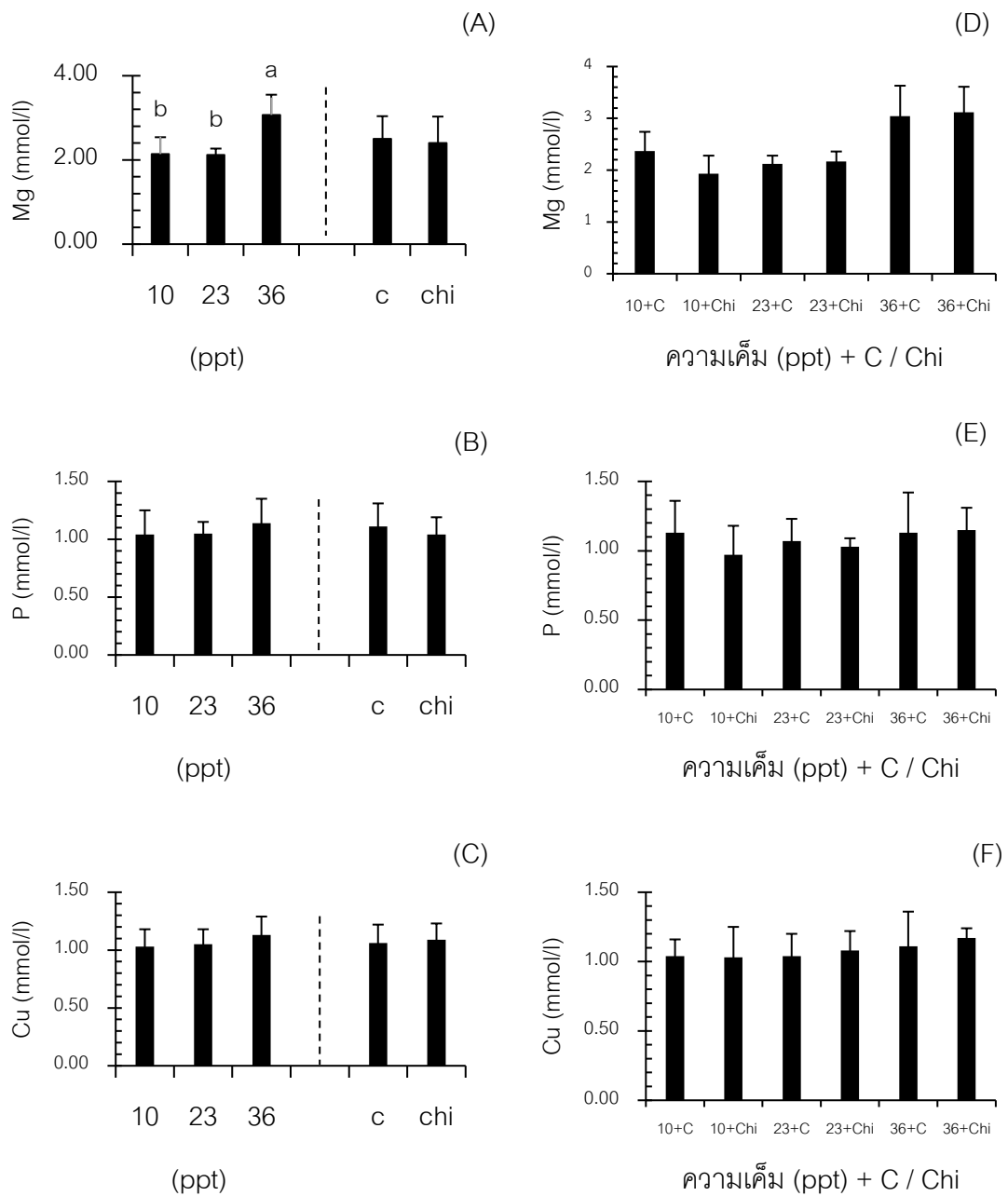
### อิทธิพลร่วมของระดับความเค็มและการเสริมโคโคซานในอาหาร

การศึกษานี้พบอิทธิพลร่วมของระดับความเค็มและการเสริมโคโคซานในอาหารต่อ โปรตีนในพลาสมา (ภาพที่ 12E) ของกุ้งที่เลี้ยงในความเค็มน้ำ 36 ppt ร่วมกับเสริมโคโคซานในอาหาร ทำให้กุ้งมีโปรตีนในพลาสมาสูงกว่าทุกความเค็มน้ำที่มีการเสริมและไม่เสริมโคโคซานในอาหาร ( $p<0.05$ ) และมีผลต่อ THC (ภาพที่ 12F) ของกุ้งที่เลี้ยงในความเค็มน้ำ 23 ppt ทั้ง 2 แบบ และความเค็มน้ำ 36 ppt ร่วมกับเสริมโคโคซานในอาหาร ทำให้กุ้งมี THC สูงกว่าความเค็มน้ำ ระดับอื่น ๆ ที่มีการเสริมและไม่เสริมโคโคซานในอาหาร ( $p<0.05$ ) แต่ไม่มีอิทธิพลร่วมต่อ ปริมาณแร่ธาตุและระยะเวลาที่เลือดแข็งตัว ( $p>0.05$ )

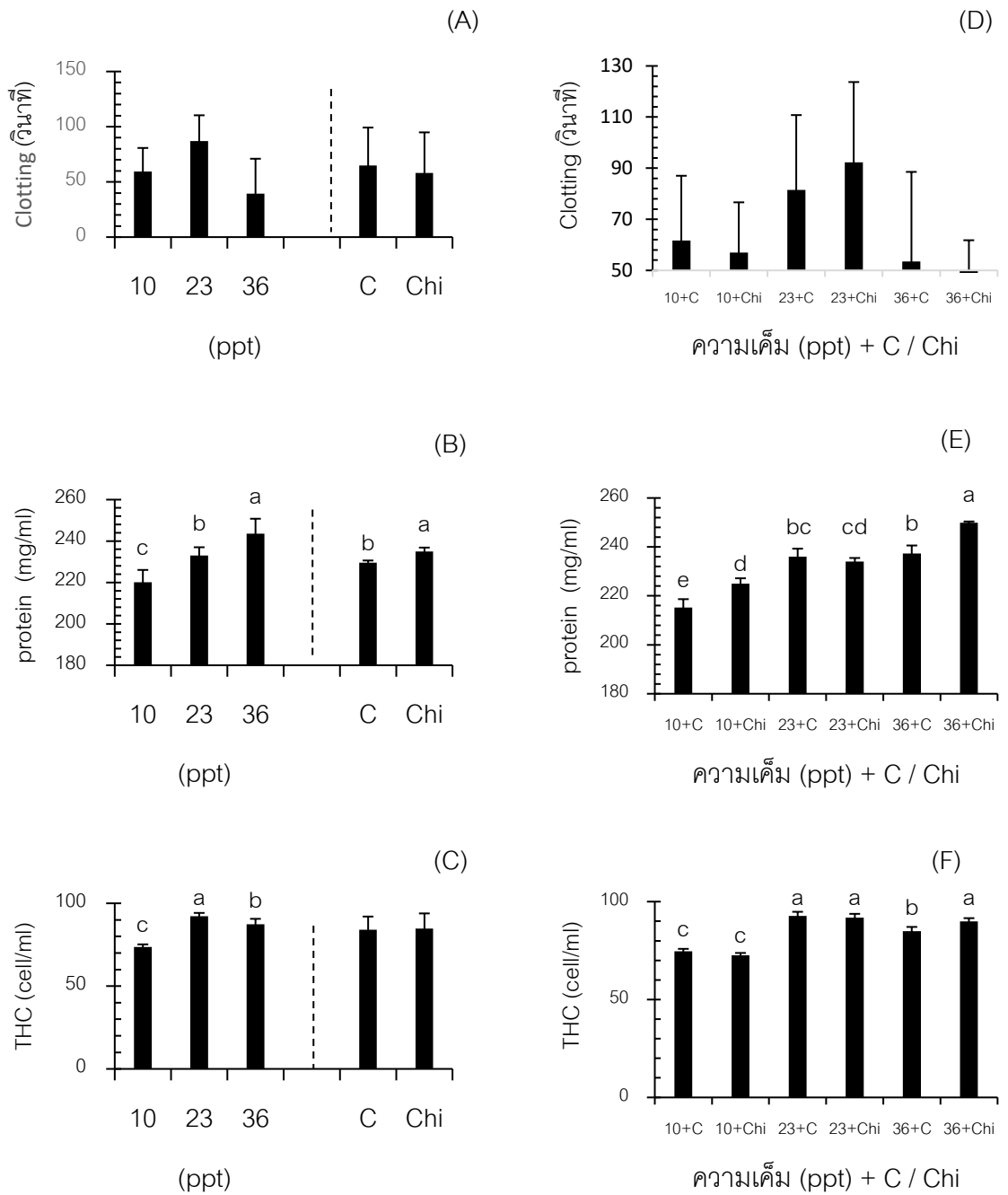




ภาพที่ 10 ผลของความเค็ม 3 ระดับ และโคโคซานที่ 0 (C) และ 0.2% (Chi) ต่อ Na (A) K (B) และ Ca (C) และผลของความเค็มร่วมกับโคโคซาน ต่อ Na (D) K (E) และ Ca (F) ในพลาสมา อักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันหมายถึงให้ผลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )



ภาพที่ 11 ผลของความเค็ม 3 ระดับ และไคโตซานที่ 0 (C) และ 0.2% (Chi) ต่อ Mg (A) P (B) และ Cu (C) และผลของความเค็มร่วมกับไคโตซาน ต่อ Mg (D) P (E) และ Cu (F) ในพลาสมา อักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันหมายถึงให้ผลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )



ภาพที่ 12 ผลของความเค็ม 3 ระดับ และโคโคซานที่ 0 (C) และ 0.2% (Chi) ต่อ Clotting (A)

Protein plasma (B) และTHC (C) และผลของความเค็มร่วมกับโคโคซานต่อ Clotting (D)

Protein plasma (E) และTHC (F)

อักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันหมายถึงให้ผลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

### 4.3 ผลของการเสริมโคโตซานในอาหารและระดับความเค็มในการเลี้ยงต่อ ปริมาณแร่ธาตุ โคตินและโคโตซานในเปลือกกุ้งขาวแวนนาไม

#### ผลของการเสริมโคโตซานในอาหาร

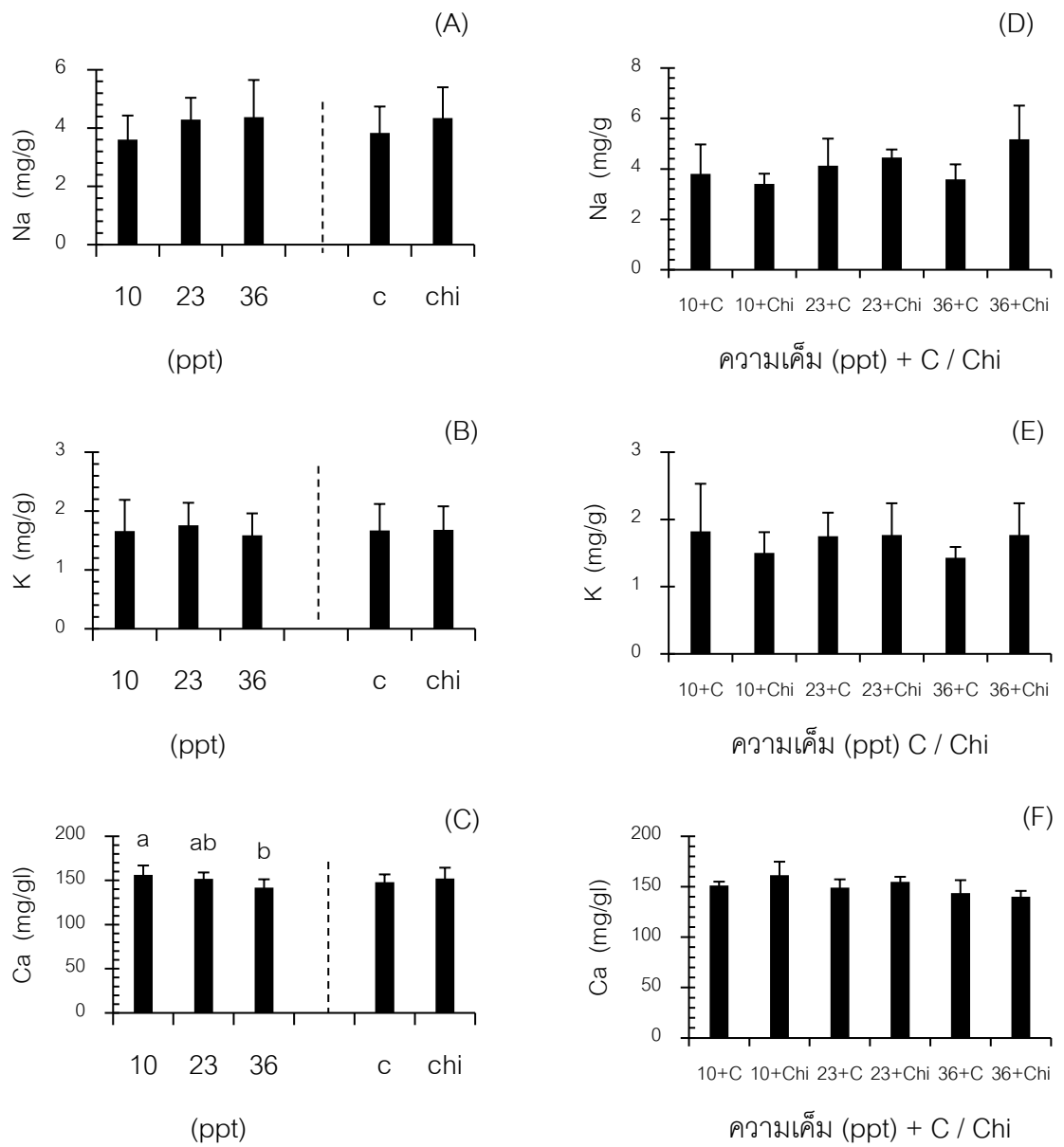
ผลการศึกษาพบว่ากุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ไม่เสริม (0%) และเสริมโคโตซาน 0.2% พบปริมาณ Na (ภาพที่ 13A) K (ภาพที่ 13 B) Ca (ภาพที่ 13C) Cu (ภาพที่ 14C) Mn (ภาพที่ 14B) P (ภาพที่ 15A) โคติน (ภาพที่ 15B) และโคโตซาน (ภาพที่ 15C) ในเปลือก ไม่แตกต่างกัน ( $p>0.05$ ) แต่กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมโคโตซาน 0.2% มีปริมาณ Mg (ภาพที่ 14A) ในเปลือกสูงกว่ากุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ไม่เสริมโคโตซาน ( $p<0.05$ )

#### ผลของความเค็ม

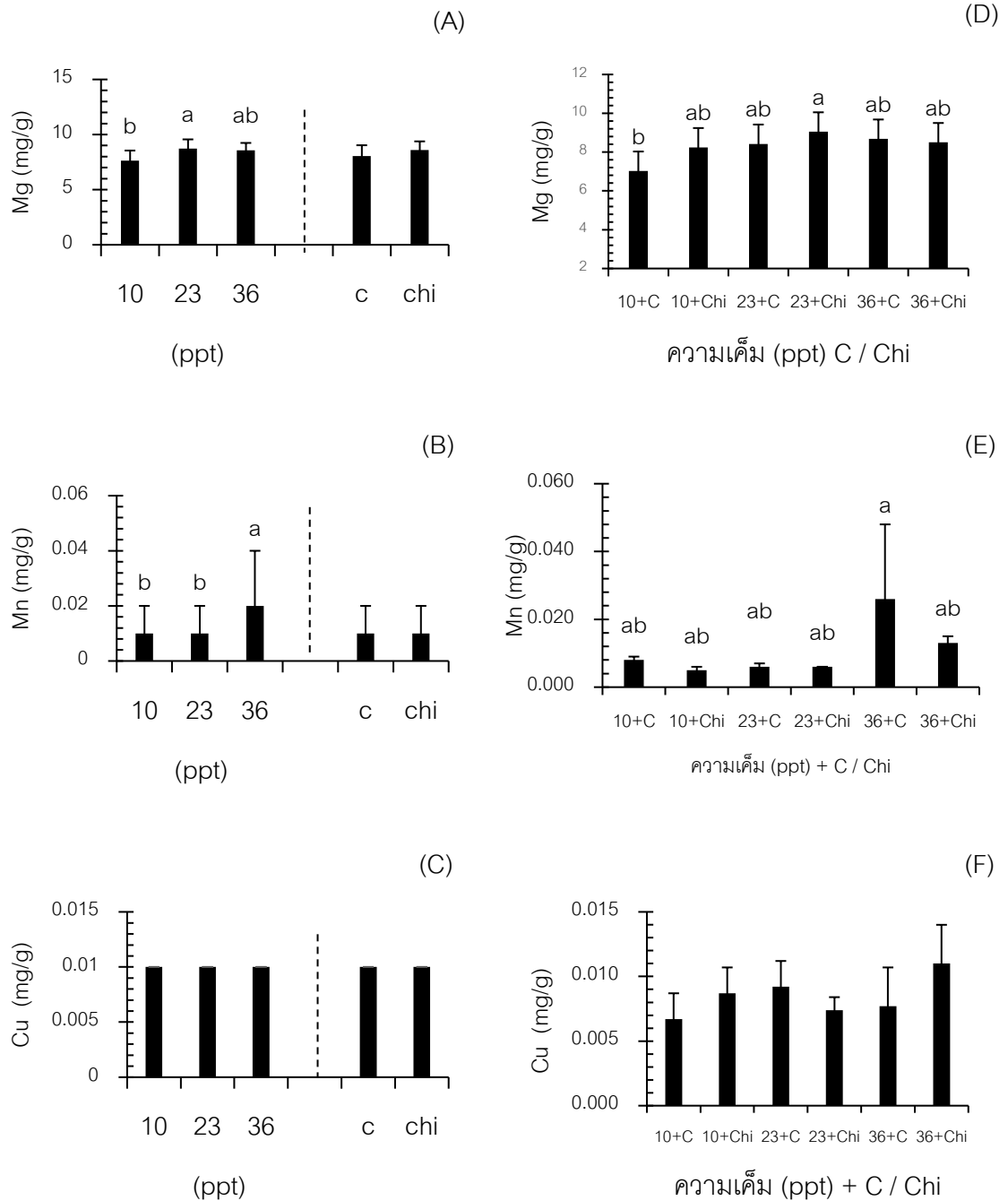
ผลการศึกษาพบว่ากุ้งที่เลี้ยงในความเค็มน้ำทั้ง 3 ระดับ มีปริมาณ Na (ภาพที่ 13 A) K (ภาพที่ 13B) P (ภาพที่ 15A) Cu (ภาพที่ 13C) โคติน (ภาพที่ 15B) และโคโตซาน (ภาพที่ 15 C) ในเปลือกไม่แตกต่างกัน ( $p>0.05$ ) แต่กุ้งที่เลี้ยงในความเค็มน้ำ 10 ppt พบปริมาณ Ca (ภาพที่ 13C) ในเปลือก สูงกว่ากุ้งที่เลี้ยงในความเค็มน้ำ 36 ppt ( $p<0.05$ ) แต่ไม่แตกต่างจากกุ้งที่เลี้ยงใน ความเค็มน้ำ 23 ppt ( $p>0.05$ ) กุ้งที่เลี้ยงในความเค็มน้ำ 23 ppt มีปริมาณ Mg (ภาพที่ 14A) ในเปลือกสูงกว่ากุ้งที่เลี้ยงในความเค็มน้ำ 10 ppt ( $p<0.05$ ) แต่ไม่แตกต่างจากกุ้งที่เลี้ยงใน ความเค็มน้ำ 36 ppt ( $p>0.05$ ) และกุ้งที่เลี้ยงในความเค็มน้ำ 36 ppt มีปริมาณ Mn (ภาพที่ 14B) ในเปลือกสูงกว่ากุ้งที่เลี้ยงในน้ำความเค็ม 10 และ 23 ppt ( $p<0.05$ )

#### อิทธิพลร่วมของระดับความเค็มและการเสริมโคโตซานในอาหาร

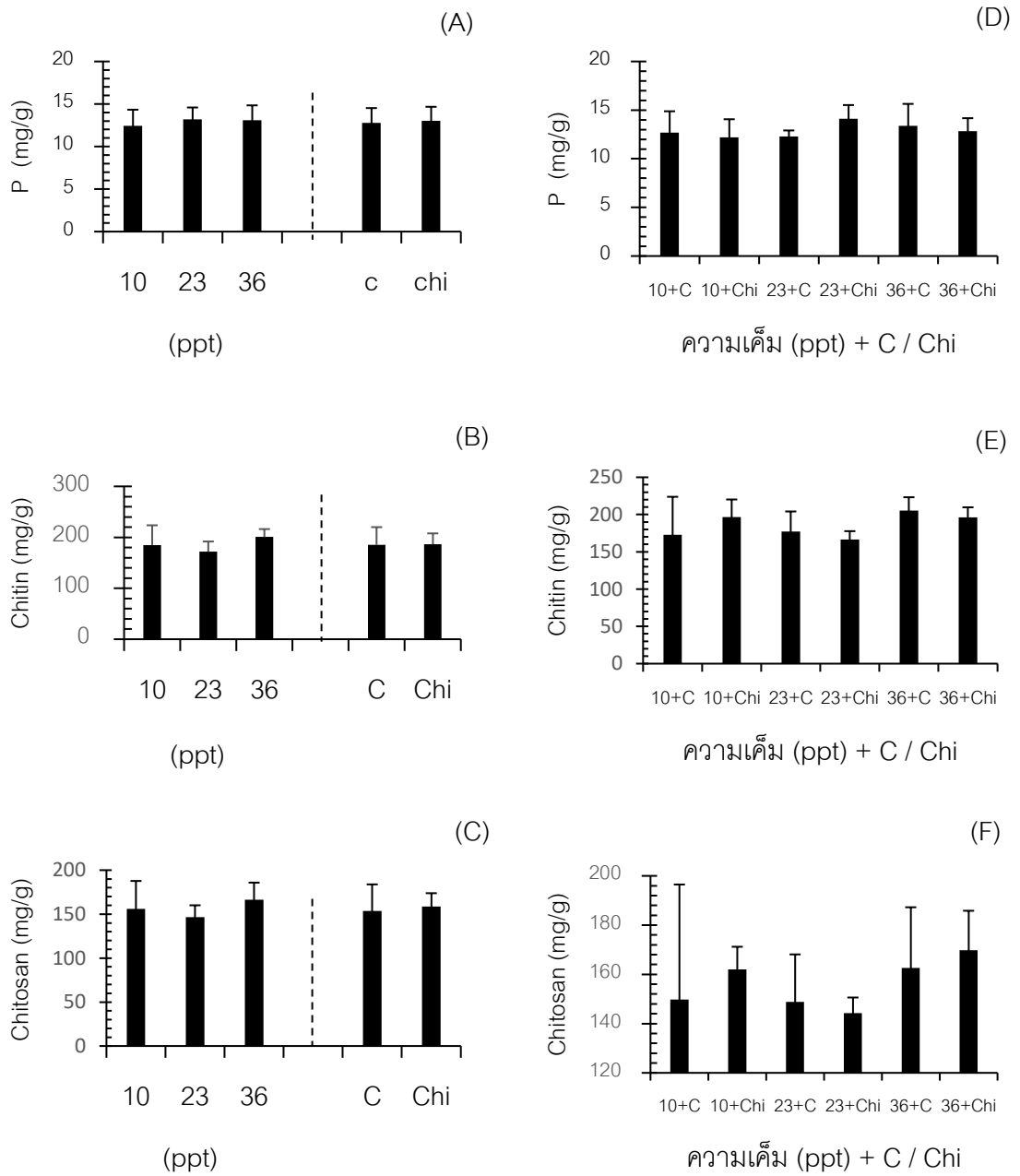
อิทธิพลร่วมของระดับความเค็มและการเสริมโคโตซานในอาหารมีผลต่อ Mg (ภาพที่ 14D) ในเปลือกของกุ้งที่เลี้ยงในความเค็มน้ำ 23 ppt ร่วมกับเสริมโคโตซานในอาหาร สูงกว่ากุ้งที่เลี้ยงใน ความเค็มน้ำ 10 ppt ( $p<0.05$ ) แต่ไม่แตกต่างจากกุ้งที่เลี้ยงในความเค็มน้ำอื่น ๆ และร่วมกับเสริม และไม่เสริมโคโตซานในอาหาร ( $p>0.05$ ) และมีผลต่อ Mn (ภาพที่ 13E) ในเปลือกของกุ้งที่เลี้ยงใน ความเค็มน้ำ 36 ppt สูงกว่ากุ้งที่เลี้ยงในความเค็มน้ำ 10 ppt ร่วมกับเสริมโคโตซานในอาหาร ( $p<0.05$ ) แต่ไม่แตกต่างจากกุ้งที่เลี้ยงในความเค็มน้ำอื่น ๆ และร่วมกับเสริมและไม่เสริมโคโตซาน ในอาหาร ( $p>0.05$ ) ขณะที่ไม่พบอิทธิพลร่วมใน Na (ภาพที่ 13D) K (ภาพที่ 13E) Ca (ภาพที่ 13F) Cu (ภาพที่ 13F) P (ภาพที่ 13D) โคติน (ภาพที่ 13E) และโคโตซาน (ภาพที่ 13F) ในเปลือกไม่ แตกต่างกัน ( $p>0.05$ )



ภาพที่ 13 ผลของความเค็ม 3 ระดับ และไคโตซานที่ 0 (C) และ 0.2% (Chi) ต่อ Na (A) K (B) และ Ca (C) และผลของความเค็มร่วมกับไคโตซาน ต่อ Na (D) K (E) และ Ca (F) ในเปลือก อักขรภาษาอังกฤษที่ต่างกันหมายถึงให้ผลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )



ภาพที่ 14 ผลของความเค็ม 3 ระดับ และไคโตซานที่ 0 (C) และ 0.2% (Chi) ต่อ Mg (A) P (B) และ Cu (C) และผลของความเค็มร่วมกับไคโตซาน ต่อ Mg (D) P (E) และ Cu (F) ในเปลือก อักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันหมายถึงให้ผลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )



ภาพที่ 15 ผลของความเค็ม 3 ระดับ และไคโตซานที่ 0 (C) และ 0.2% (Chi) ต่อ P (A) Chitin (B) และ Chitosan (C) และผลของความเค็มร่วมกับไคโตซาน ต่อ P (D) Chitin (E) และ Chitosan (F) ในเปลือก

อักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันหมายถึงให้ผลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

## บทที่ 5

### อภิปรายและสรุปผล

#### 5.1 ผลของการเสริมโคโตซานในอาหารและระดับความเค็มในการเลี้ยงต่อการเจริญเติบโต อัตราแลกเนื้อ อัตรารอด ความถี่ในการลอกคราบ และระยะเวลาต่อการสลบของกุ้งขาวแวนนาไม

##### ผลของการเสริมโคโตซานในอาหาร

ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการเสริมโคโตซานในอาหารอัตรา 0.2% ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตด้าน % น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (%WG) และ % ความยาวที่เพิ่มขึ้น (%LG) ซึ่งสอดคล้องกับวัชรอำพล สีระคาม (2556) ที่พบว่าการเลี้ยงกุ้งขาวระยะโพสลาวาในบ่อดินเป็นระยะเวลา 100 วันนั้น หากเสริมโคโตซานในอาหารอัตรา 0.02 และ 0.04% ทำให้กุ้งมีอัตราการเจริญเติบโตดีกว่าการไม่เสริมโคโตซานในอาหาร เช่นเดียวกับ การศึกษาในกุ้งกุลาดำวัยรุ่น เสริมโคโตซานในอาหาร 100 ppm สูงกว่าไม่มีการเสริมโคโตซานในอาหาร (Attasart, Ruenglerpanyakul, & Wanichpongpan, 2005) แสดงว่ากุ้งที่ได้รับการเสริมโคโตซานในอาหารทำให้มีการเจริญเติบโตได้ดีกว่ากุ้งที่ไม่มีการเสริมโคโตซานในอาหาร เนื่องจากกุ้งที่ได้รับการเสริมโคโตซานในอาหารนั้น ทำให้กุ้งสามารถนำโคโตซานไปใช้เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการสร้างเปลือกได้ทันที เมื่อกุ้งได้รับอาหารผ่านเข้าสู่ระบบทางเดินอาหารก็จะช่วยเพิ่มการย่อยและการดูดซึมสารอาหาร (Gopalakannan & Arul, 2006) จากผลการเสริมโคโตซานในอาหารอัตรา 0.2% ในการทดลองดังกล่าวนี้ชี้ให้เห็นว่าการเจริญเติบโตที่ดีของกุ้งมีผลต่ออัตราการแลกเนื้อที่ต่ำกว่ากุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ไม่เสริมโคโตซาน เป็นการยืนยันว่าการเสริมโคโตซานในอาหารนั้นมีประสิทธิภาพต่อการสร้างเสริมโครงสร้างเปลือก จึงทำให้กุ้งมีพลังงานที่มากพอสำหรับใช้ในการเจริญเติบโตมากขึ้น (วีรพงษ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2536) เช่นเดียวกับการศึกษาของปิยะบุตร วานิชพงษ์พันธุ์ และคณะ (2544) ที่มีผลการศึกษาเป็นไปในทางเดียวกันกับการศึกษาของวัชรอำพล สีระคาม (2556) และผลจากการที่กุ้งสามารถใช้ประโยชน์จากอาหารได้อย่างคุ้มค่าลดการละลายเมื่ออยู่ในน้ำ สอดคล้องกับการศึกษาของ อรพินท์ มงคลเคหา (2544) การใช้สารละลายโคโตซานผสมในอาหารเพื่อเพิ่มความคงทนในอาหารกุ้งกุลาดำ ความเข้มข้น 80 85 90 %DD ในอัตรา 0.5 1.0 1.5 และ 2% โดยอาหารกุ้งที่ใช้โคโตซาน 90 %DD มีความคงทนในน้ำสูงที่สุดและแปรผันตามอัตราโคโตซานที่เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามแม้การเสริมและไม่เสริมโคโตซานในอาหารมีอัตราการรอดและความถี่ในการลอกคราบที่ไม่แตกต่างกัน แต่การเสริมโคโตซานในอาหารอัตรา 0.2% ทำให้กุ้งมีระยะเวลาต่อการสลบดีกว่าการไม่เสริมโคโตซานในอาหาร ทั้งนี้จากกลไกการ



ทำงานของไคโตซานต่อการปรับสมดุลน้ำและแร่ธาตุของกุ้งยังไม่ทราบแน่ชัด แต่เป็นไปได้ว่าไคโตซานเกี่ยวข้องกับการสะสมกลูโคสในกระแสเลือด ดังเช่นการศึกษาในปลาเรนโบวเทราต์ พบว่าการเสริมไคโตซานในอาหารอัตรา 0.25-0.5% ทำให้ปลาที่มีปริมาณกลูโคสในเลือดสูงกว่าปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารไม่เสริมไคโตซาน และทำให้ปลาที่มีอัตราอดจากการแช่ในน้ำความเค็ม 25 และ 30 ppt สูงกว่า (Meshkini, Tafy, Tukmechi, & Farhang-Pajuh, 2012) ดังนั้นกุ้งที่ได้รับอาหารเสริมไคโตซานจึงมีโอกาสพบปริมาณกลูโคสในเลือดสูงกว่ากุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ไม่เสริมไคโตซานเช่นกัน แต่เป็นเพียงข้อสันนิษฐาน ทั้งนี้ในช่วงที่สัตว์น้ำเกิดความเครียดจะมีการสร้างพลังงานจากสารอาหารต่าง ๆ เช่น กลูโคส เพื่อปรับสมดุลของร่างกาย โดยสัตว์น้ำที่มีกลูโคสในกระแสเลือดมากกว่าย่อมสามารถสร้างพลังงานในการปรับสมดุลของร่างกายได้รวดเร็วกว่าสัตว์น้ำที่มีกลูโคสในกระแสเลือดน้อย ซึ่งต้องอาศัยกระบวนการในการเปลี่ยนไกลโคเจนในตับและกล้ามเนื้อไปเป็นกลูโคสก่อนนำมาสร้างพลังงาน

### ผลของความเค็ม

เมื่อพิจารณาผลการเลี้ยงกุ้งขาว (*L. vannamei*) ในระดับความเค็มน้ำ 36 ppt มี%น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (%WG) % ความยาวที่เพิ่มขึ้น (%LG) น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นต่อวัน (ADG) และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะด้านน้ำหนัก (%SGRW) สูงกว่าและอัตราแลกเนื้อที่ต่ำกว่ากุ้งที่เลี้ยงในระดับความเค็มน้ำ 23 และ 10 ppt ทั้งนี้อาจจะเนื่องมาจากความเค็มของน้ำมีผลทางชีวภาพของสัตว์ในกลุ่ม Crustacean ซึ่งสามารถอาศัยอยู่ในความเค็มที่ต่างกัน และความเค็มของน้ำมีผลโดยตรงต่อการเจริญเติบโต อัตรารอด (Rouse & Kartamulia, 1992) แสดงให้เห็นว่าระดับความเค็มน้ำส่งผลต่อการเจริญเติบโตของกุ้งขาว (*L. vannamei*) เช่นเดียวกัน (Davis, Samocha, & Boyd, 2004) อย่างไรก็ตามความเค็มน้ำที่เหมาะสมของกุ้งขาว (*L. vannamei*) คือ 23 ppt เนื่องจากทำให้กุ้งมีอัตราอดสูงและอัตราแลกเนื้อต่ำ สอดคล้องกับ บุญรัตน์ ประทุมชาติ และกระสินธุ์ หังสพฤกษ์ (2554) รายงานว่าความเค็มเหมาะสมในการเลี้ยงกุ้งชนิดนี้คือ 23 ppt เนื่องจากร่างกายกุ้งมีความสมดุลของน้ำและแร่ธาตุที่จำเป็นระหว่างร่างกายกับสิ่งแวดล้อมหรือเรียกว่า Iso-osmotic point (IOP) ทำให้มีการสูญเสียพลังงานในการปรับสมดุลของร่างกายน้อยที่สุด การศึกษานี้พบว่ากุ้งที่เลี้ยงความเค็มน้ำ 10 ppt มีอัตราการเจริญเติบโตและอัตราอดต่ำกว่ากุ้งที่เลี้ยงในความเค็มน้ำ 23 และ 36 ppt และมีอัตราแลกเนื้อสูงกว่า ทั้งนี้อาจเกิดจากกุ้งต้องสูญเสียพลังงานในการปรับสมดุลน้ำและแร่ธาตุ (Osmoregulation) และนำสารอาหารมาสร้างเป็นพลังงาน ทำให้มีสารอาหารเพื่อการเจริญเติบโตน้อยลงและทำให้อัตราแลกเนื้อสูงขึ้น สอดคล้องกับการศึกษาของ Maicá, Borba, Martins, and Junior (2014) พบว่ากุ้งขาว (*L. vannamei*) ระยะเวลาเลี้ยงในน้ำความเค็ม 16 และ

4 ppt มีการเจริญเติบโตและอัตราการรอดต่ำกว่าและมีอัตราแลกเปลี่ยนสูงกว่ากุ้งที่เลี้ยงในความเค็มน้ำ 32 ppt เช่นเดียวกับการทดลองของ Decamp, Cody, Conquest, Delanoy, and Tacon (2003) ที่เลี้ยงกุ้งขาว (*L. vannamei*) ระยะวัยรุ่นในความเค็มน้ำ 9, 18 และ 36 ppt

ขณะที่อัตราการรอดของกุ้งที่เลี้ยงในความเค็มน้ำ 10 ppt มีค่าต่ำกว่ากุ้งที่เลี้ยงในน้ำความเค็มอื่น ๆ นั้น อาจเกิดจากภาวะความเค็มต่ำไปกระตุ้นการสร้างฮอร์โมนลอกคราบทำให้เกิดการลอกคราบเร็วขึ้น โดยการทดลองนี้พบว่ากุ้งขาวที่เลี้ยงในน้ำความเค็มน้ำ 10 ppt มีความถี่ในการลอกคราบสูงกว่ากุ้งที่เลี้ยงในความเค็มน้ำ 23 และ 36 ppt และสอดคล้องกับการศึกษาในกุ้งกุลาดำ (*P. monodon*) (ไพโรจน์ พวงลดดา, 2538) ปัจจัยของความพร้อมในระบบต่อมไร้ท่อที่ผลิตฮอร์โมนเกี่ยวข้องกับ

การลอกคราบ หรือความสมบูรณ์ของระบบสรีระภายในตัวกุ้งมีผลกระทบต่ออัตราการลอกคราบมากกว่าระดับความเค็มที่ใช้เลี้ยง เช่นเดียวกับการทดลองกุ้งขาว (*L. vannamei*) ขนาด 2.07 กรัมที่เลี้ยงระดับความเค็มต่างกัน พบว่าระดับความเค็มไม่มีผลต่อระยะเวลาการลอกคราบของกุ้ง เมื่อเปรียบเทียบระยะเวลาการลอกคราบของกุ้งที่ความเค็ม 0.2, 0.35, 0.5 และ 1 ppt. กับ 15 ppt (วิทยา รัตนะ, 2549) นอกจากนี้กุ้งที่เลี้ยงในความเค็มต่ำน้ำมีความเสี่ยงในการถูกกินหลังการลอกคราบโดยกุ้งที่ไม่มีการลอกคราบมากขึ้น เนื่องจากความเค็มที่ลดลงทำให้ปริมาณ Mg ในน้ำลดลง ทั้งนี้ Mg ที่เป็นส่วนแร่ธาตุที่มีความสำคัญต่อกระบวนการสร้างเปลือกและการขาดแคลนแร่ธาตุชนิดนี้ทำให้กระบวนการสร้างเปลือกและการแข็งตัวของเปลือกผิดปกติไป นอกจากนี้ บุญรัตน์ ประทุมชาติ และกระสินธุ์ หังสพฤกษ์ (2556) พบว่ากุ้งขาว (*L. vannamei*) ระยะวัยรุ่นที่เลี้ยงในความเค็มน้ำ 10 และ 20 ppt มีความถี่ในการลอกคราบมากขึ้นหากน้ำมีอัตราส่วนของ Mg : Ca ลดลง แม้ว่าการทดลองนี้ไม่ได้มีการวัดปริมาณ Mg ในน้ำ แต่การขาดแคลน Mg อาจสังเกตได้จากกุ้งที่เลี้ยงในความเค็มน้ำ 10 ppt มีปริมาณ Mg ในเปลือกน้อยกว่ากุ้งที่เลี้ยงในความเค็มน้ำ 23 และ 36 ppt ดังนั้นจากงานวิจัยที่ผ่านมาและการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า Mg มีความสัมพันธ์กับการลอกคราบของกุ้งอย่างชัดเจนและส่งผลกระทบต่ออัตราการรอดเนื่องจากความผิดปกติของการสร้างเปลือก จากผลกระทบต่ออัตราการรอดของกุ้งขาวในน้ำความเค็มต่ำดังที่กล่าวมาข้างต้น การเพิ่มปริมาณ Mg ในน้ำ เช่น การเติมปูนที่เป็นแหล่ง Mg อาจทางเลื้อกหนึ่งในการเพิ่มอัตราการรอดของกุ้งเลี้ยงกุ้งด้วยความเค็มต่ำ ทั้งนี้การศึกษาของ Roy, Davis, Saoud, and Henry (2007) พบว่าอัตราการรอดของกุ้งเพิ่มขึ้นหากน้ำมีปริมาณ Mg มากกว่า 10 มิลลิกรัม/ลิตร

ขณะที่การทดสอบระยะเวลาต้านการสลบ พบว่ากุ้งที่เลี้ยงในความเค็มน้ำ 10 ppt มีระยะเวลาต้านการสลบนานกว่ากุ้งที่เลี้ยงในความเค็มน้ำ 23 และ 36 ppt ทั้งนี้เนื่องจากเป็นการทดสอบในน้ำจืด (0 ppt) ซึ่งน้ำมีปริมาณแร่ธาตุในน้ำแตกต่างจากความเค็มน้ำ 10 ppt น้อยที่สุด

ทำให้กุ้งเสียพลังงานในการปรับสมดุลของน้ำและแร่ธาตุในร่างกายน้อยที่สุด และทำให้สามารถทนทานต่อการเสียสมดุลของร่างกายได้นานที่สุด ทั้งนี้ความแตกต่างของความเค็มของน้ำในช่วงกว้างทำให้เกิดภาวะ osmotic pressure shock กับกุ้งที่เลี้ยงในความเค็มน้ำ 23 และ 36 ppt เนื่องจากระบบ Osmoregulation ของกุ้งที่เลี้ยงในความเค็มน้ำ 23 ppt และ 36 ppt ซึ่งปกติมีสภาพเป็น isotonic และ hypotonic pressure ได้กลายเป็นสภาพ hypertonic pressure อย่างรวดเร็วเมื่อแช่ในน้ำจืด ทำให้กุ้งต้องใช้พลังงานในอัตราสูงเพื่อปรับสมดุลของน้ำและแร่ธาตุ และเมื่อร่างกายมีพลังงานลดน้อยลงและน้ำมีปริมาณออกซิเจนน้อยซึ่งไม่เพียงพอต่อการสร้างพลังงานเพิ่มเติม เนื่องจากไม่มีการให้ออกซิเจนขณะทดลอง ทำให้กุ้งเสียการทรงตัวภายในระยะเวลาที่สั้นกว่ากุ้งที่เลี้ยงในความเค็มน้ำ 10 ppt ที่มีสภาพเป็น hypertonic pressure อยู่แล้ว ซึ่งใช้พลังงานในอัตราที่น้อยกว่าในการปรับสมดุล ทำให้กุ้งที่เลี้ยงในความเค็มน้ำ 10 ppt ทนต่อความเครียดในการแช่ในน้ำจืดได้ดีกว่า ขณะที่การทดลองของ Su, Ma, and Feng (2010) พบว่าการลดความเค็มในช่วงกว้างภายในระยะเวลาสั้นทำให้กุ้งใช้พลังงานในการหายใจและการลอกคราบมากขึ้น รวมทั้งมีอัตราการลดลง

#### **อิทธิพลร่วมของการเสริมโคโคซานในอาหาร และระดับความเค็ม**

การศึกษานี้พบว่าความเค็มมีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโต ซึ่งส่งผลต่อ %ความยาวที่เพิ่มขึ้น (%LG) อัตรารอด (%) และอัตราแลกเนื้อ เมื่อเทียบกับกุ้งเลี้ยงด้วยอาหารไม่เสริมโคโคซาน เพราะความเค็มของน้ำมีผลต่อการกินอาหารและประสิทธิภาพการใช้อาหารซึ่งส่งผลโดยตรงต่อการเจริญเติบโต อัตราแลกเนื้อ และอัตรารอด (Rouse & Kartamulia, 1992) ทำให้กุ้งมีความถี่ในการลอกคราบเป็นปกติ โดยกุ้งที่เลี้ยงในน้ำที่มีความเค็มสูงกว่าก็จะต้องสูญเสียพลังงานในการรักษาสมดุลเกลือแร่ในร่างกายให้อยู่ในสภาวะที่เหมาะสม อย่างเช่นกุ้งที่เลี้ยงในน้ำความเค็มต่ำจึงทำให้กุ้งมีการเจริญเติบโตดี ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Maicá, Borba, Martins, and Junior (2014) พบว่ากุ้งขาว (*L. vannamei*) ระยะวัยรุ่นที่เลี้ยงในความเค็มน้ำ 16 และ 4 ppt มีการเจริญเติบโตและอัตรารอดต่ำกว่าและมีอัตราแลกเนื้อสูงกว่ากุ้งที่เลี้ยงในความเค็มน้ำ 32 ppt เช่นเดียวกับ ศึกษาผลของความเค็มต่ออัตรารอดและการเจริญเติบโตของปูทะเล (*Scylla serrata*) พบว่าการเพิ่มความเค็มจาก 5 ถึง 25 ppt มีผลต่ออัตรารอดและการเจริญเติบโตของปูทะเล ขณะที่ระยะเวลาต้านการสลบของกุ้งมีอิทธิพลหลักมาจากความเค็มน้ำ และเห็นผลชัดเจนในอาหารที่เสริมโคโคซานของการเลี้ยงในความเค็มน้ำ 10 ppt น่าจะมีสาเหตุมาจากกุ้งสามารถปรับระบบการควบคุมปริมาณน้ำภายในร่างกาย (water regulatory system) ซึ่งเกิดจากความแตกต่างของแรงดัน osmotic ระหว่างภายในตัวกุ้งและน้ำภายนอก และสามารถปรับสมดุลน้ำและแร่ธาตุของร่างกายได้ (บุญรัตน์ ประทุมชาติ และคณะ, 2546ก) ทั้งนี้ผลจากประจุไฟฟ้าที่เป็นประจุแคทไอออนของ

โคโตซานทำให้สามารถไปจับตัวอื่น ๆ ในน้ำทะเลซึ่งเป็นสารประกอบที่ละลายและแตกตัวเป็นไอออนอยู่ในน้ำเข้ามาในตัวกุ้ง ทำให้ความเข้มข้นไอออนภายในเลือดหรือในร่างกายเพิ่มขึ้น

## 5.2 ผลของการเสริมโคโตซานในอาหารและระดับความเค็มในการเลี้ยงต่อปริมาณแร่ธาตุในพลาสมา โปรตีนในพลาสมา ระยะเวลาที่เลือดแข็งตัว และปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งขาวแวนนาไม

### ผลของการเสริมโคโตซานในอาหาร

ผลการศึกษาพบว่ากุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ไม่เสริมโคโตซาน (0%) และเสริมโคโตซาน (0.2%) มีค่า Na, Ca, K, P, Cu และ Mg ในพลาสมา ระยะเวลาที่เลือดแข็งตัว และปริมาณเม็ดเลือดรวมไม่ต่างกัน ยกเว้นค่าโปรตีนในพลาสมาที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมโคโตซานสูงกว่ากุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารไม่เสริมโคโตซาน และมีผลให้กุ้งมีระยะเวลาที่เลือดแข็งตัวน้อยกว่า ทั้งนี้เป็นไปได้ว่าการเสริมโคโตซานทำให้ปริมาณไฟบริโนเจนสูงขึ้น ซึ่งโปรตีนชนิดนี้เป็นโปรตีนที่ถูกสังเคราะห์ที่ตับชนิดเป็นโปรตีนไกลโคโปรตีน (Glycoprotein) ซึ่งจากการศึกษาเปปไทด์ของไฟบริโนเจน พบว่ามีองค์ประกอบของกลูโคซามีนด้วย (Mester et al., 1965) ดังนั้นการเสริมโคโตซานในอาหารทำให้กุ้งได้รับกลูโคซามีนเพิ่มขึ้นและอาจถูกนำไปสร้างไฟบริโนเจนได้ปริมาณมากและส่งผลให้ระยะเวลาในการแข็งตัวของเลือดน้อยลง ขณะที่การศึกษาของ Niu et al. (2013a) พบว่าการเสริมโคโตซานในอาหาร 0.05-0.4% มีผลให้ระยะเวลาที่เลือดแข็งตัวจะลดลงตามอัตราการเสริมในการศึกษานี้ยังพบว่าการเสริมโคโตซานในอาหารทำให้กุ้งมีปริมาณเม็ดเลือดรวมสูงกว่าการไม่เสริมทั้งนี้เป็นไปได้ว่าการที่กุ้งมีปริมาณโปรตีนในพลาสมาสูงขึ้น จากการทดลองนี้ทำให้มีโปรตีนสำหรับการสร้างเม็ดเลือดมากขึ้น ซึ่งเม็ดเลือดมีบทบาทสำคัญในการแข็งตัวของเลือดเช่นกัน โดยเม็ดเลือดเป็นตัวกระตุ้นให้ไฟบริโนเจนกลายเป็นไฟบรินที่ช่วยในการแข็งตัวของเลือด (Maningas, Kondo, Hirono, Taki, & Aoki, 2008)

### ผลของความเค็ม

การศึกษานี้พบว่ากุ้งที่เลี้ยงในความเค็มน้ำทั้ง 3 ระดับ มีปริมาณแร่ธาตุ K, Ca, Mg, P และ Cu ในพลาสมามีค่าใกล้เคียงกัน และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามความเค็มที่เพิ่มขึ้น สอดคล้องกับการทดลองในกุ้งขาวของ สว่างพงษ์ สมมาตร และบุญรัตน์ ประทุมชาติ (2551) พบว่าการเปลี่ยนแปลงความเค็มน้ำจาก 20 ppt เป็น 35 ppt มีผลให้ปริมาณ K, Ca, Mg และ P ในเลือดมีค่าเพิ่มขึ้น ขณะที่ปริมาณโปรตีนในพลาสมามีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามความเค็มที่เพิ่มขึ้น สอดคล้องกับการทดลองของ Rosas et al. (2001) พบว่ากุ้งขาว (*L. vannamei*) ที่เลี้ยงในความเค็มน้ำ 15 ppt มีปริมาณโปรตีนในฮีโมลิมน้อยกว่ากุ้งที่เลี้ยงในความเค็มน้ำ 40 ppt แต่ผลการศึกษานี้ขัดแย้งกับ

การทดลองของ Saeed, Sima, and Babak (2015) พบว่าโปรตีนในพลาสมาของกุ้งขาว (*L. vannamei*) ้วยรุ่นมีปริมาณเพิ่มขึ้น เมื่อลดความเค็มจาก 30 ppt เป็น 15 ppt และมีปริมาณลดลงหากเพิ่มความเค็มจาก 30 ppt ไปเป็น 45 ppt ซึ่งความแตกต่างนี้อาจเกิดจากกุ้งมีความเครียดเนื่องจากถูกรบกวนจากการเก็บเลือดกุ้งที่ระยะเวลา 1, 8, 21 และ 30 วัน ทำให้ส่งผลกระทบต่อการเปลี่ยนแปลงสรีระวิทยาของกุ้ง เช่นเดียวกับการทดลองในกุ้งแซบวีย (*Fenneropenaeus indicus*) ที่ลดความเค็มจาก 35 ppt ไปเป็นความเค็มที่ต่ำกว่า 25 ppt ทำให้ปริมาณโปรตีนในเลือดเพิ่มขึ้นและมีค่ามากที่สุดที่ระดับความเค็ม 5 ppt (Subramanian & Philip, 2012) ซึ่งการทดลองดังกล่าวนี้ทำการเก็บตัวอย่างเลือดหลังการเลี้ยงเพียง 7 วัน

อีกทั้งปัจจัยของระดับความเค็มน้ำต่ำอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้กุ้งต้องใช้กรดอะมิโนอิสระในปริมาณมากขึ้นเพื่อรักษาสมดุลความเป็นกรดต่างในเลือดและเซลล์ เนื่องจากกรดอะมิโนอิสระบางชนิดมีคุณสมบัติเป็นกรดหรือเป็นด่างที่ช่วยควบคุมความเป็นกรดต่างของเลือดและภายในเซลล์ (เวียง เชื้อโพธิ์หัท, 2542) ซึ่งความเป็นกรดต่างมีผลต่อการควบคุมปริมาณแร่ธาตุต่างๆ ของเลือดและภายในเซลล์ จากการศึกษาในกุ้งแซบวีย (*F. indicus*) พบว่าการลดความเค็มจาก 35 ppt ไปเป็นความเค็มที่ต่ำกว่า 25 ppt ทำให้ปริมาณกรดอะมิโนอิสระในเลือดเพิ่มขึ้นและมีค่าสูงที่สุดที่ความเค็ม 0 ppt (Subramanian & Philip, 2012) แสดงให้เห็นว่ากุ้งต้องใช้กรดอะมิโนอิสระมากขึ้นเพื่อควบคุมปริมาณแร่ธาตุต่างๆ ผลกระทบดังกล่าวอาจส่งผลให้มีการสร้างโปรตีนเพื่อการเจริญเติบโตในปริมาณที่ลดลง รวมทั้งหากเกิดภาวะขาดแคลนกรดอะมิโนอิสระร่างกายจำเป็นต้องสลายโปรตีนเพื่อเป็นแหล่งของกรดอะมิโนอิสระมากขึ้น ทำให้มีโปรตีนสำหรับการเจริญเติบโตน้อยลง ซึ่งในการทดลองนี้พบว่ากุ้งที่เลี้ยงในความเค็มน้ำ 10 ppt มีอัตราการเจริญเติบโตต่ำกว่ากุ้งที่เลี้ยงในความเค็มน้ำ 23 และ 36 ppt

ขณะที่กระบวนการแข็งตัวของเลือด (Clotting) เป็นการทำงานร่วมกันของโปรตีนในเลือด (Clotting protein) และปริมาณ Ca จากการศึกษาพบว่ากุ้งที่เลี้ยงในน้ำความเค็ม 36 ppt มีระยะเวลาที่เลือดแข็งตัวน้อยที่สุด ซึ่งสัมพันธ์กับการมีปริมาณโปรตีนและแคลเซียมในพลาสมามากที่สุด ขณะที่กุ้งที่เลี้ยงในน้ำความเค็ม 10 ppt มีระยะเวลาที่เลือดแข็งตัวน้อยกว่ากุ้งที่เลี้ยงในน้ำความเค็ม 23 ppt โดยกุ้งที่เลี้ยงในน้ำความเค็ม 10 ppt มีแคลเซียมในพลาสมาสูงกว่ากุ้งที่เลี้ยงในน้ำความเค็ม 23 ppt เล็กน้อย แต่ปริมาณโปรตีนในเลือดน้อยกว่า ดังนั้นการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าปริมาณ Ca ในพลาสมามีอิทธิพลต่อระยะเวลาที่เลือดแข็งตัวมากกว่าปริมาณโปรตีนในพลาสมา ขณะที่การศึกษาปริมาณเม็ดเลือดรวม พบว่ากุ้งที่เลี้ยงในน้ำความเค็ม 23 ppt มีปริมาณเม็ดเลือดรวมสูงกว่ากุ้งที่เลี้ยงในน้ำความเค็ม 10 และ 36 ppt โดยแนวโน้มใกล้เคียงกับการ

ทดลองในกึ่งขาวของ Saeed et al. (2015) พบว่าปริมาณเม็ดเลือดของกึ่งลดลงเมื่อความเค็มเพิ่มจาก 30 ppt เป็น 45 ppt และเมื่อความเค็มลดจาก 30 เหลือ 15 ppt ใกล้เคียงกับการศึกษาในกึ่งกุลาดำของ Joseph and Philip (2007) พบว่าเมื่อความเค็มเพิ่มจาก 15 ppt เป็น 35 ppt และความเค็มลดจาก 15 ppt เหลือ 0 ppt ทำให้ปริมาณเม็ดเลือดลดลงเช่นกัน ทั้งนี้เป็นไปได้ว่าการเลี้ยงกึ่งขาวในความเค็มน้ำที่สูงหรือต่ำกว่า 23 ppt ซึ่งเป็นจุด IOP ของกึ่งขาวทำให้กึ่งต้องสลายโปรตีนเพื่อสร้างพลังงานมากขึ้นส่งผลให้มีการสร้างเม็ดเลือดน้อยลง

#### **อิทธิพลร่วมของระดับความเค็มและการเสริมโคโตซานในอาหาร**

การศึกษานี้ไม่พบอิทธิพลร่วมของระดับความเค็มและการเสริมโคโตซานในอาหารต่อปริมาณแร่ธาตุและระยะเวลาที่เลือดแข็งตัว แต่มีอิทธิพลร่วมต่อโปรตีนในพลาสมาและปริมาณเม็ดเลือดรวม โดยการเสริมโคโตซานในอาหารทำให้กึ่งที่เลี้ยงในความเค็มน้ำ 36 ppt มีปริมาณเม็ดเลือดรวมเพิ่มขึ้น แต่กึ่งที่เลี้ยงในความเค็มน้ำ 10 และ 23 ppt มีปริมาณเม็ดเลือดรวมลดลง เมื่อเทียบกับกึ่งที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ไม่เสริมโคโตซาน เมื่อพิจารณาแต่ละปัจจัยพบว่าระดับความเค็มมีอิทธิพลต่อโปรตีนในพลาสมาและปริมาณเม็ดเลือดรวมอย่างชัดเจน ส่วนอิทธิพลของการเสริมโคโตซานในอาหารไม่ชัดเจน แต่ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า การเสริมโคโตซานในอาหารให้แก่กึ่งที่เลี้ยงในความเค็มน้ำไม่เกิน 23 ppt ไม่มีประโยชน์ในการเพิ่มปริมาณเม็ดเลือดรวมซึ่งเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของกึ่ง

### **5.3 ผลของการเสริมโคโตซานในอาหารและระดับความเค็มต่อปริมาณแร่ธาตุโคตินและโคโตซานในเปลือกกึ่งขาวแวนนาไม**

#### **ผลของการเสริมโคโตซานในอาหาร**

ผลการศึกษาพบว่ากึ่งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารที่เสริมโคโตซาน 0.2% มีปริมาณแร่ธาตุส่วนใหญ่ ปริมาณโคตินและโคโตซานในเปลือกไม่แตกต่างกัน ( $p>0.05$ ) เมื่อเทียบกับการเลี้ยงด้วยอาหารที่ไม่เสริมโคโตซาน

#### **ผลของความเค็ม**

ผลการศึกษาพบว่ากึ่งที่เลี้ยงในความเค็มน้ำ 10 ppt มีการสะสมปริมาณ Ca สูงกว่าความเค็มอื่น ๆ ซึ่งกึ่งขาวพยายามควบคุม Ca ในพลาสมาและเปลือกคงที่ช่วงความเค็ม 2.8-40 ppt (สว่างพงษ์ สมมาตร, 2552) สอดคล้องกับผลการศึกษาในพลาสมาที่ความเค็มน้ำ 10 23 และ 36 ppt Ca ในพลาสมา เท่ากับ 6.31 6.19 และ 6.65 mmole/l หากแต่การเพิ่มขึ้นของระดับความเค็มทำให้การสะสม Ca ในเปลือกลดลง ที่เป็นเช่นนี้น่าจะมีเหตุผลมาจากระดับแคลเซียมในน้ำยังมีค่าต่ำกว่าความต้องการของกึ่งชนิดนี้ก็ได้ ทั้งนี้จากการศึกษาโครงสร้างเปลือกของกึ่งแซบวีย (*F. indicus*) พบว่ามี Ca เป็นองค์ประกอบหลัก รองลงมาคือ Na, K และ Mg ตามลำดับ (Ravichandran,

Rameshkumar, & Prince, 2009) ในทางกลับกันกึ่งที่เลี้ยงในความเค็มน้ำ 23 ppt มีการสะสมปริมาณ Mg สูงกว่ากึ่งที่เลี้ยงในความเค็มน้ำ 10 ppt แต่มีค่าใกล้เคียงกับกึ่งที่เลี้ยงในความเค็มน้ำ 36 ppt ในกระบวนการสร้างเปลือกปกติ สัดส่วนของแร่ธาตุเหล่านี้ในเปลือกต้องมีค่าคงที่ อย่างไรก็ตาม เมื่อสัดส่วนของแร่ธาตุชนิดใดเปลี่ยนแปลงไปทำให้สัดส่วนของแร่ธาตุชนิดอื่น ๆ เปลี่ยนแปลงด้วย ดังนั้นการศึกษานี้บ่งชี้ว่า Mg น่าจะเป็นปัจจัยจำกัดต่อการสร้างเปลือก ในแง่เป็นตัวปรับสมดุลเกลือแร่ในร่างกาย ซึ่งผลการขาดแคลน Mg ที่ความเค็มน้ำ 10 ppt ทำให้กระบวนการสร้างเปลือกผิดปกติ เช่น กุ้งมีความถี่ในการลอกคราบที่มากขึ้น แม้ว่าการทดลองนี้ใช้วัตถุดิบและแร่ธาตุที่เป็นแหล่ง Mg แต่กลับพบว่าไม่มีอิทธิพลต่อการสะสม Mg ในพลาสมาและเปลือก เช่นเดียวกับการทดลองของ Roy, Davis, and Nguyen (2015) พบว่ากุ้งขาวที่เลี้ยงในน้ำความเค็ม 5 ppt และให้อาหารที่เสริม Mg chelate อัตรา 0.15, 0.3 และ 0.6% ทำให้ปริมาณ Mg ในพลาสมาลดลงตามระดับการเสริม และปริมาณ Mg ในตัวกุ้งไม่แตกต่างกัน เมื่อพิจารณาในส่วนของ Mn ไม่น่าจะเป็นปัจจัยสำคัญมากนักเนื่องจากปริมาณ Mn ในเปลือก เท่ากับ 0.01-0.02 mg/g ซึ่งคาดว่ากุ้งน่าจะได้รับปริมาณ Mn เพียงพอจากในอาหาร

#### **อิทธิพลร่วมของการเสริมโคโคซานในอาหารและระดับความเค็ม**

จากการศึกษาของอิทธิพลร่วมของการเสริมโคโคซานในอาหารและระดับความเค็มไม่มีผลต่อปริมาณ Na, K, P, Cu, Mn , โคโคติน และโคโคซานในเปลือก เมื่อเทียบกับการไม่เสริมโคโคซานในอาหาร อย่างไรก็ตาม ผลการศึกษาพบว่ากึ่งที่เลี้ยงในความเค็มน้ำ 10 และ 23 ppt ที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมโคโคซาน 0.2% มีปริมาณ Mg ในเปลือกเพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับการไม่เสริมโคโคซานในอาหาร อาจเป็นการชี้ให้เห็นว่า ถึงแม้ในความเค็มน้ำที่ 10 และ 23 ppt น่าจะมีปริมาณ Mg น้อยกว่าความเค็มน้ำที่ 36 ppt แต่กลับพบว่าการเสริมโคโคซานมีส่วนช่วยให้กุ้งมีการสะสม Mg ได้มากขึ้น ทั้งนี้ Mg เป็นส่วนสำคัญต่อกุ้งในการปรับสมดุลเกลือแร่ในร่างกายและการสร้างเปลือก (สว่างพงษ์ สมมาตร และบุญรัตน์ ประทุมชาติ, 2551)

#### **สรุปผลการวิจัย**

1. การเสริมโคโคซาน 0.2% มีผลทำให้ % น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (%WG) อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะด้านน้ำหนัก (%SGRW) % ความยาวที่เพิ่มขึ้น (%LG), ระยะเวลาด้านการสลบและโปรตีนในพลาสมาสูงกว่า และFCR ต่ำกว่ากึ่งที่เลี้ยงด้วยอาหารชุดควบคุม

2. น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นต่อวัน (ADG) %WG % SGRW และ %LG ของกึ่งที่เลี้ยงในน้ำ 36 ppt สูงกว่าที่กึ่งเลี้ยงในน้ำ 10 ppt และ 23 ppt ( $p < 0.05$ ) ขณะที่กึ่งที่เลี้ยงในน้ำความเค็ม 10 ppt มีอัตราการรอด (%SR) ต่ำ ( $p < 0.05$ ) และ FCR สูงกว่า ( $p < 0.05$ ) อีก 2 ระดับความเค็ม ระยะเวลาด้านการสลบนานขึ้นเมื่อเลี้ยงกึ่งในน้ำความเค็มต่ำลง ( $p < 0.05$ )
3. อัตรารอดของกึ่งกลุ่มที่เลี้ยงในความเค็ม 23 ppt และ 36 ppt และให้อาหารที่ผสมโคโตซานมีค่าสูงกว่า ( $p < 0.05$ ) กึ่งชุดที่เลี้ยงใน 10 ppt ทั้ง 2 กลุ่ม
4. ระยะเวลาด้านการสลบของกึ่งกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโคโตซานมีค่าสูงกว่าชุดที่ให้อาหารชุดควบคุม ( $p < 0.05$ ) ในความเค็ม 10 ppt
5. ค่าโปรตีนในพลาสมาของกึ่งกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโคโตซานมีค่าสูงกว่า ( $p < 0.05$ ) ชุดที่ให้อาหารควบคุม ทั้งในความเค็ม 10 ppt และ 36 ppt และ ค่า THC ของกึ่งกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโคโตซานมีค่าสูงกว่า ( $p < 0.05$ ) ชุดที่ให้อาหารควบคุมที่ความเค็ม 36 ppt

### ข้อเสนอแนะ

1. สูตรอาหารกึ่งที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้มีการผสมสารเหนียวเพื่อเพิ่มความคงทนให้กับอาหาร ควรเตรียมสูตรอาหารโดยใช้สารโคโตซานแทนการใช้สารเหนียวในขั้นตอนการผลิต เพื่อได้ทราบข้อมูลเรื่องการความคงทนในอาหารได้จริงในทางปฏิบัติ
2. การศึกษาในงานวิจัยนี้เป็นการเสริมโคโตซานในอาหารเลี้ยงกุ้งขาว จึงควรทำการศึกษาการเสริมโคโตซานในอาหารที่ใช้เลี้ยงกุ้งชนิดอื่น ๆ และขนาดกึ่งที่มีความแตกต่างกัน
3. ควรศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับคุณสมบัติของโคโตซานต่อการต้านเชื้อจุลินทรีย์
4. การเลี้ยงกึ่งมีการให้อากาศและหมุนเวียนน้ำภายในระบบ ควรทดสอบความคงทนของอาหารในน้ำ และคุณสมบัติของน้ำภายในบ่อเลี้ยงของการเสริมโคโตซานในอาหารที่เกิดจากการย่อยสลายของอินทรีย์สารในบ่อเลี้ยง



## รายการอ้างอิง

- กิจการ ศุภมาตย์, จรีพร เรืองศรี, สุภภา ศิริรัฐนิคม และนเรศ ช้วนยุค. (2543). ระบบภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำ: V. ผลของอุณหภูมิปริมาณออกซิเจนละลายน้ำและความเป็นกรด-ด่างของน้ำต่อระบบภูมิคุ้มกันโรคและองค์ประกอบเลือดในกุ้งกุลาดำ. *วารสารสงขลานครินทร์, ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*, 22 (ฉบับพิเศษ), 605-613.
- ชินจิต สัพพญา และอุดมลักษณ์ เวียงงาม. (2557). ยืดอายุอาหารได้ด้วยไคโตซาน. *กรมวิทยาศาสตร์บริการ*, 62(196), 33-35.
- ดวงกมล มั่นประเสริฐ. (2541). การเปรียบเทียบปริมาณไคโตแซนจากส่วนต่าง ๆ ของกุ้ง 7 ชนิด. *ปัญหาพิเศษวิทยาศาสตร์บัณฑิต, สาขาชีววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท*. (2554). การประเมินประสิทธิภาพของสารไอโซยูจินอลเพื่อใช้เป็นยาสลับสำหรับกุ้งขาวแวนนาไม *Litopenaeus vannamei*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาชีววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์การประมง, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- นนุช ตั้งเกริกไอฟาร์. (2550). *ชีววิทยาของครัสเตเชีย* (พิมพ์ครั้งที่ 2). กรุงเทพฯ: โอ.เอส.พรีนติ้ง เฮาส์.
- นนุช ตั้งเกริกไอฟาร์ และกฤษดา ทองเทียม. (2553). ผลของความเค็มและไนโตรเจนต่อค่าออกซิโมลาไลตีของเลือด และการดูดซึมไนโตรเจนเข้าสู่กระแสเลือดของกุ้งขาวแวนนาไม. *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา*, 15(2), 20-28.
- บุญรัตน์ ประทุมชาติ. (2545). *เอกสารประกอบการสอนวิชาการเพาะเลี้ยงชายฝั่ง*. ชลบุรี : ภาควิชาชีววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.
- บุญรัตน์ ประทุมชาติ, บัลลังก์ เนื่องแสง และถนอมศักดิ์ บุญศักดิ์. (2546ก). *ผลของการเสริมเกลือแร่ในอาหารและการเปลี่ยนแปลงทางสรีระเคมีของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงระบบพัฒนา*. ชลบุรี : สาขาชีววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.
- บุญรัตน์ ประทุมชาติ, พิชาญ สว่างวงศ์ และจอร์จ มาซาโด. (2546ข). *ผลของความเค็มน้ำต่อชบวนการลอกคราบและการเปลี่ยนแปลงทางสรีระเคมีของปูทะเล (Scylla serrata)*. ชลบุรี : ภาควิชาชีววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.
- บุญรัตน์ ประทุมชาติ, อรสา สุริยาพันธุ์, กิตติยา อูปลัสม์ และสว่างวงศ์ สมมาต. (2550). *กระบวนการสะสมแร่ธาตุของกุ้งขาว (Litopenaeus vannamei) และการประยุกต์การเสริมแร่ธาตุในระบบอนุบาลและการเลี้ยงในเชิงพาณิชย์*. ชลบุรี : สาขาชีววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.

- บุญรัตน์ ประทุมชาติ และกระสินธุ์ หังสพฤกษ์. (2554). ผลของการเสริมธาตุทองแดงในรูปคีเลตในอาหาร ต่อการเจริญเติบโต การรอดตาย อัตราการแลกเนื้อ และการเปลี่ยนแปลงสีระยะเคมีของกุ้งขาววิญรูน (*Litopenaeus vannamei*). ชลบุรี : สาขาวิชาวาริชศาสตร์, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.
- บุญรัตน์ ประทุมชาติ และกระสินธุ์ หังสพฤกษ์. (2556). การบริโภคแมกนีเซียมและแคลเซียมในน้ำ และผลของสัดส่วนแมกนีเซียมและแคลเซียมต่อการเจริญเติบโต อัตราการรอด และระยะเวลาลอกคราบของกุ้งขาววิญรูน (*Litopenaeus vannamei*) ที่ความเค็ม 3 ระดับ. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์. ชลบุรี : สาขาวิชาวาริชศาสตร์, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.
- บุญรัตน์ ประทุมชาติ และกระสินธุ์ หังสพฤกษ์. (2556). ผลของการเปลี่ยนแปลงความเค็มอย่างเฉียบพลันต่อการรอดตาย พฤติกรรมการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ และสีระยะเคมีของกุ้งขาววิญรูน (*Litopenaeus vannamei*). ชลบุรี : สาขาวิชาวาริชศาสตร์, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.
- บริษัทโบนาไฟเดส มาร์เก็ตติ้ง จำกัด. (2013). ข้อมูลโคโคซานกับสัตว์น้ำ. เข้าถึงได้จาก [http://bonafidesmarketing.com/wizContent.asp?wizConID=71&txtmMenu\\_ID=7](http://bonafidesmarketing.com/wizContent.asp?wizConID=71&txtmMenu_ID=7)
- ปิยะบุตร วานิชพงษ์พันธุ์, นบชนก ธนพงศธร และสุวลี จันทรกระจ่าง. (2544). การใช้โคโคซานโคโคซานเป็นสารเร่งการเจริญเติบโตในกุ้งกุลาดำ. ใน การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ “ครั้งที่ 39” (หน้า 30-37). กรุงเทพฯ: อุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ไพโรจน์ พวงลดดา. (2538). ระยะเวลาการลอกคราบของกุ้งกุลาดำในบ่อเลี้ยง. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต, สาขาวิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ, คณะประมง, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- มนต์สรวง ยางทอง. (2549). ผลของโคโคซานระดับต่าง ๆ ต่อการเคลือบเม็ดอาหารปลานิล แปลงเพศที่เสริมด้วยเอนไซม์ไฟเตส. วารสารพระจอมเกล้าลาดกระบัง, 14(1), 34-43.
- เยาวภา ไหวพริบ. (2547). สหสัมพันธ์ระหว่างสมบัติทางเคมีกายภาพและสมบัติการใช้งานของโคโคซานที่ผลิตได้จากเปลือกกุ้ง. รายงานฉบับสมบูรณ์ทุนอุดหนุนการวิจัย. ชลบุรี : มหาวิทยาลัยบูรพา.
- ลิลิา เรืองแป้น. (2547). ความรู้เรื่องการเพาะเลี้ยงและธรรมชาติของกุ้งทะเล. วารสารสัตว์น้ำ, 14(162), 31-34.

- วัชรอำพล สีระคาม. (2556). ผลของการเสริมโคโคซานในอาหารเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในบ่อดิน. วิทยานิพนธ์เกษตรศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาเกษตรศาสตร์และสหกรณ์, มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช.
- วัชรียา ภูริวิโรจน์กุล. (2547). ระบบภูมิคุ้มกันของโรคกุ้ง. ใน การฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการ เรื่อง การวินิจฉัยและการป้องกันโรคสัตว์น้ำ (หน้า 46-64). กรุงเทพฯ: ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- วิทยา รัตนะ. (2549). ผลระดับความเค็มต่ำและองค์ประกอบของแร่ธาตุในน้ำที่มีต่อการเจริญเติบโตและอัตราการรอดตายของกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*). วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์ มหาบัณฑิต, สาขาวิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ, คณะประมง, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- วีณา ตุงซีฟ. (2549). ระยะเวลาการลดอุณหภูมิน้ำที่เหมาะสมในการสลบกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) ขนาดตลาดเพื่อการลำเลียงให้มีชีวิตที่อุณหภูมิต่ำ. ปัญหาพิเศษวิทยาศาสตร์บัณฑิต, สาขาวิชาวาริชศาสตร์, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.
- วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. (2536). อาหารปลา. กรุงเทพฯ: โอ.เอส.พรีนติ้ง เฮาส์.
- เวียง เชื้อโพธิ์หัก. (2542). โภชนศาสตร์สัตว์น้ำและการให้อาหารสัตว์น้ำ. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ศุภย์พัฒนาเทคโนโลยีอาหารสัตว์น้ำฝ่ายสนับสนุนวิชาการ คณะประมง. (2554). คู่มือการสร้างสูตรอาหารสัตว์น้ำ. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สว่างพงษ์ สมมาตร. (2552). ผลของความเค็มน้ำต่อสรีรเคมีและการเสริมแร่ธาตุบางชนิดในระบบการเลี้ยงกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) เชียงพาณิชย์. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์ มหาบัณฑิต, สาขาวิชาวาริชศาสตร์, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.
- สว่างพงษ์ สมมาตร และบุญรัตน์ ประทุมชาติ. (2551). ผลของความเค็มน้ำต่อการเปลี่ยนแปลงออสโมลาลิตีในเลือด และความเข้มข้นของแร่ธาตุ 9 ชนิดในพลาสมาของกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*). ใน การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ “ครั้งที่ 46” (หน้า 250-259). กรุงเทพฯ: หน่วยงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัย.
- สาวิกา กัลปพฤกษ์, ผกายวรรณ กีกักอง และสิทธิ กุหลาบทอง. (2556). โคโคซานในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ. วารสารวิชาการ *Veridian E-Journal*, Silpakorn University, 6(2), 984-993.

- สิริรัตน์ จงฤทธิพร, พรรณทิพย์ สุวรรณสาครกุล, ปวเรศวร์ อินทุเศรษฐ และรัตดาวัลย์ บุญแต่ง. (2552). คุณสมบัติของไคโตซานที่สกัดได้จากเปลือกกุ้งขาว. *วารสารการประมง*, 62(6), 519-524.
- สุทธิพันธ์ สารสมบัติ, วิบูลย์ศรี พิมลพันธุ์, นภาพร บานชื่น, ทศนีย์ สุโกศล, ธารารัชต์ ธารากุล, ศันสนีย์ เสนะวงษ์ และสิริฤกษ์ ทรงศิริวิไล. (2537). *อิมมูโนวิทยา* (พิมพ์ครั้งที่ 4). กรุงเทพฯ: เค.พี.พรินติ้ง.
- สุธีวัฒน์ สมสืบ, พิสมัย สมสืบ, มะลิ บุญยรัตนผลิน และอมรรัตน์ เสริมวัฒนากุล. (ม.ป.ป.). การทดสอบปัจจัยสภาพแวดล้อมที่มีผลต่อกุ้งกุลาดำ. *โครงการคลังความรู้ดิจิทัล*, 2(1), 19-25.
- สุมาลัย ศรีกำไลทอง, ปาริชาติ หลายชูไทย, เหวดี นาคดี, พรศ วิจารย์รัฐพันธ์ และณรงค์เดช อาษา. (2540). *การใช้ประโยชน์โพลีแซคคาไรด์จากของเหลือทิ้งผลิตภัณฑ์ทะเล ในรายงานฉบับที่ 1 ปัจจัยของการผลิตที่มีผลต่อคุณสมบัติของไคโตซาน*. กรุงเทพฯ : สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย.
- สุวบุญ จิระกาญจชัย, รัจรอง ยกถ่าน และโกสุม สมัครรัตน์. (2544). ไคตินและไคโตซานจากวัตถุดิบธรรมชาติสู่การประยุกต์ใช้. ใน *การประชุมเชิงปฏิบัติการ* (หน้า 1-13). กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- อัษฎารุณ แสงนาเพ็ญ. (2542). *การสกัดไคโตซานจากกากเซลล์จุลินทรีย์ในอุตสาหกรรม (กรดซิตริก)*. คุษฎีนิพนธ์ปรัชญาคุษฎีบัณฑิต, สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยพระจอมเกล้าลาดกระบัง.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). (2005). *Official methods of analysis* (18<sup>th</sup>ed.). Washington, DC: American Public Association.
- Attasart, S., Ruenglertpanyakul, W., & Wanichpongpan, P. (2005). Utilization of chitosan for organic shrimp production. *Journal of the Minerals, Metals and Materials Society*, 15, 37-43.
- Bachère, E., Destoumieux, D., & Bulet, P. (2000). Penaeidins antimicrobial peptide of shrimp: A comparison with other effect of innate immunity. *Aquaculture*, 191, 71-88.
- Boyd, C. E., Thunjai, T., & Boonyaratpalin, M. (2002). Dissolved Salts in Water for Inland Low-Salinity Shrimp Culture. *Global Aquaculture Advocate*, 5, 40-45.

- Brown, J. H., Wickins, J. F., & Maclean, M. H. (1991). The effect of water hardness on growth and carapace mineralization of juvenile freshwater prawns *Macrobrachium rosenbergii* Deman. *Aquaculture*, 95, 329-345.
- Burton, R. F. (1995). Cation balance in crustacean haemolymph: Relationship to cell membrane potentials and membrane surface charge. *Comparative Biochemistry and Physiology part A*, 111, 125-131.
- Cameron, J. N. (1985). Post-moult calcification in the blue crab (*Callinectes sapidus*): Relationships between apparent net  $H^+$  excretion, calcium and bicarbonate. *Journal of Experimental Biology* 119, 275-285.
- Chandrkrachang, S. (2002). The applications of chitin and chitosan in agriculture in Thailand. *Advances in Chitin Science*, 5, 458-462.
- Chen, J. C., & Cheng, S. Y. (1993). Studies on hemocyanin and haemolymph protein levels of *Penaeus japonicus* based on sex, size and molting cycle. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 106, 293-296.
- Cheng, S. Y., & Chen, J. C. (2001). Joint action of elevated ambient ammonia and nitrite on hemolymph nitrogenous compounds and nitrogen excretion of tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 131, 303-314.
- Chien, Y. H., Pan, C. H., & Hunter, B. (2003). The resistance to physical stresses by *Penaeus monodon* juveniles fed diets supplemented with astaxanthin. *Aquaculture*, 216, 117-191.
- Córdov, L. R., & Messina, E. (2005). Biotic communities and feeding habits of *Litopenaeus vannamei* (Boone 1931) and *Litopenaeus stylirostris* (Stimpson 1974) in monoculture and polyculture semi-intensive ponds. *Aquaculture Research*, 36(11), 1075.
- Davis, D. A., Samocha, T. M., & Boyd, C. E. (2004). *Acclimating pacific white shrimp Litopenaeus vannamei to inland low salinity water*. United States: Southern Regional Aquaculture Center.

- Dall, W. (1965). Studies on Physiology of shrimp, *Metapenaeus* (Crustacea: Decapod: Penaeidae), III. Composition and structure of integument. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research*, 16, 13-23.
- Decamp, O., Cody, J., Conquest, L., Delanoy, G., & Tacon, A. G. J. (2003). Effect of salinity on natural community and production of *Litopenaeus vannamei* (Boone) within experimental zero-water exchange culture systems. *Aquaculture Research*, 34, 345-355.
- Flach, J., Pilet, P. E., & Jolles, P. (1992). What's new in chitinase research. *Experientia*, 48(8), 701-716.
- Gavhane, Y. N., Gurav, A. S., & Yadav, A. V. (2013). Chitosan and Its Applications. *A Review of Literature*, 4(1), 312-331.
- Gopalakannan, A., & Arul, V. (2006). Immunomodulatory effect of dietary intake of chitin, chitosan and levamisole on the immune system of *Cyprinus carpio* and control of *Aeromonas hydrophilia* infection in ponds. *Aquaculture*, 255, 179-187.
- Joseph, A., & Philip, R. (2007). Acute salinity stress alters the haemolymph metabolic profile of *Penaeus monodon* and reduces immunocompetence to white spot syndrome virus infection. *Aquaculture*, 272, 87-97.
- Kawabata, S. I., Muta, T., & Iwanaga, S. (1996). The clotting cascade and defense molecules found in the hemolymph of the horseshoe crab *Carcinoscorpius rotundicauda*. In K. Soderhall, S. Iwanaga, & G.R. Vasta (Eds.), *Invertebrate Immunology* (pp. 255-283). Cambridge, UK: Fair Haven, Sound on Sound Publications.
- Kumar, P., Sahu, N. P., Saharan, N., Reddy, K. A., & Kumar, S. (2011). Effects of dietary source and chitin on growth and survival of post-larvae *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish Nutrition and Biochemistry*, 363-368.
- Lall, S. P. (2002). The Minerals. In J. E. Halver, & R. W. Hard. (Eds.), *Fish Nutrition* (3<sup>rd</sup> ed.). (p. 231). New York: Academic Press.

- Lee, M. S., & Shiau, S. Y. (2002). Dietary copper requirement of juvenile grass shrimp *Penaeus monodon* and effects on non-specific immune responses. *Fish & Shellfish Immunology*, 13(4), 259-270.
- Lin, j., Hu, B., Chen, A., Huang, F., Tang, Y., & Li, Y. Z. (2008). Effects of rare earth-chitosan chelate on performance of aquatic pellets. *Journal of Hydroecology*.
- Maicá, P. F., Borba, M. R. D., Martins, T. G., & Junior, W. W. (2014). Effect of salinity on performance and body composition of Pacific white shrimp juveniles reared in a super-intensive system. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 43(7), 343-350.
- Maningas, M. B. B., Kondo, H., Hirono, I., Taki, T. S., & Aoki, T. (2008). Essential function of transglutaminase and clotting protein in shrimp immunity. *Science direct in Molecular Immunology*, 45, 1269-1275.
- Mast, W. J., Keyser, P., Sritunyalucksana, K., & Soderhall, K. (2000). Crustacean haemocytes and haematopoiesis. *Aquaculture*, 191, 45-52.
- Mester, L., Moczar, E., Vass, G., & Szabados, L. (1965). Structure and role of the glucide fractions of brinogen. *Pathologie Biologie*, 13, 540.
- Meshkini, S., Taky, A. A., Tukmechi, A., & Farhang-Pajuh, F. (2012). Effects of chitosan on hematological parameters and stress resistance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Veterinary Research Forum*, 3(1), 49-54.
- Mia, M. Y., & Shah, M. M. R. (2010). Effect of salinity on the survival and growth of mud crabling, *Scylla serrata*. *Rajshahi University Zoological Society*, 29, 29-32.
- Niu, J., Li, C. H., Tian, L. X., Liu, Y. J., Chen, X., Wu, K. C., Jun, W., Huang, Z., Wang, J., Huang, Z., Wang, Y., & Lin, H. Z. (2013a). Suitable dietary chitosan improves the growth performance, survival and immune function of tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Aquaculture Research*, 1-11.
- Niu, J., Lin, H. Z., Jiang, S. G., Chen, X., Wu, K. C., Liu, Y. J., Wang, S., & Tian, L. X. (2013b). Comparison of effects of chitin, chitosan, chitosan oligosaccharide and N-acetyl-D-glucosamine on growth performance, anti-oxidant defenses and oxidative stress status of *Penaeus monodon*. *Aquaculture*, 372-375.

- Niu, J., Liu, Y. J., Lin, H. Z., Mai, K. S., Yang, H. J., Liang, Y. G., & Tian, L. X. (2011). Effects of dietary chitosan on growth, survival and stress tolerance of postlarval shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Nutrition*, 17, 406-412.
- Pratoomchat, B., Sawangwong, P., Guedes, R., Reis, M. D. L., & Machado, J. (2002a). Cuticle Ultrastructure changes in the crab *Scylla serrata* over the molt cycle. *Journal of Experimental Zoology*, 293(4), 414-426.
- Pratoomchat, B., Sawangwong, P., Pakkong, P., & Machado, J. (2002b). Organic and inorganic variations in haemolymph, epidermal tissue and cuticle over the molt cycle in *Scylla serrata* (Decapoda). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 131(A), 243-255.
- Ratcliffe, N. A., Rowley, A. F., Fitzgerald, S. W., & Rhode, C. P. (1985). Invertebrate immunity, basic concepts and recent advances. *International Review Cytology*, 97, 183-350.
- Ravichandran, S., Rameshkumar, G., & Rosario Prince, A. (2009). Biochemical composition of shell and flesh of the Indian white shrimp *Penaeus indicus* (H. milne Edwards 1837). *Journal of Scientific Research*, 4(3), 191-194.
- Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in polymer Science*, 31, 603-632.
- Rosas, C., Cuzon, G., Gaxiola, G., Priol, Y. L., Pascual, C., Rossignol, J., Contreras, F., Sanchez, A., & Wormhoudt, A. V. (2001). Metabolism and growth of juveniles of *Litopenaeus vannamei*: Effect of salinity and dietary carbohydrate levels. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 259, 1-22.
- Rouse, D. B., & Kartamulia, I. (1992). Influence of salinity and temperature on molting and survival of the Australia freshwater crayfish (*Cherax tenuimanus*). *Aquaculture*, 105(1), 47-52.
- Roy, L. A., Davis, D. A., & Nguyen, T.N. (2015). Waters of west alabama. *Journal of the world Aquaculture society*, 40(2), 248-254.



- Roy, L. A., Davis, D. A., Saoud, I. P., & Raymond, P. H. (2007). Effects of varying levels of aqueous potassium and magnesium on survival, growth, and respiration of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, reared in low salinity waters. *Aquaculture*, 262(2-4), 461-469.
- Saeed, K., Sima, A. S., & Babak, G. (2015). The survey effect of salinity stress on blood parameters of young *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 3(5), 358-363.
- Shahidi, F., Arachchi, K. V., & Jeon, Y. J. (1999). Food applications of chitin and chitosans trends in food. *Sciences & Technology*, 10, 37-51.
- Shiau, S.Y., & Yu, Y. P. (1998). Chitin but not Chitosan supplementation enhances growth of grass shrimp *Penaeus monodon*. *Nutritional Sciences*, 908-912.
- Smith, D. M., & Dall, W. (1986). Moulting staging the tiger prawn *Penaeus esculentus*. In P. C. Rotblisberg, B. J. Hill & D. J. Staples (Eds.), *Second Austria National Brown Seminar* (pp. 85-90). Cleveland: NSP2.
- Smith, V. J., Brown, J. H., & Houton, C. (2003). Immunostimulation in crustacean: Does it really protect against infection. *Fish and Shellfish Immunology*, 15, 71-90.
- Subramanian, S., & Philip, R. (2012). Salinity induced haematological inflection in indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus* (H. Milne-Edwards, 1837). *Asian Fisheries Science*, 25,170-179.
- Su, Y., Ma, S., & Feng, C. (2010). Effects of salinity fluctuation on the growth and energy budget of juvenile *Litopenaeus vannamei* at different temperatures. *Journal of Crustacean Biology*, 30(3), 430-434.
- Toan, N. V. (2001). *Effect of Improper storage of shrimp shell material on the quality of chitin and chitosan*. Master's thesis, School of Environment, Resources and Development, Asian Institute of Technology.
- Travis, D. F. (1996). The molting cycle of spiny lobster, *Panulirus argus* Latereille III: Physiological change in blood and urine. *Biological Bulletin*, 109, 485-503.

- Travis, D.F. (1965). The molting cycle of the spiny lobster, *Panulirus argus* Latreille.II. Pre-ecdysial histological and histochemical changes in the hepatopancreas and integumental tissues. *Biological Bulletin*, 108, 88-112.
- Vargas, A. F., Hinojosa, B. P., Porlillo, C. G., & Magallon, B. F. (1998). Influence of temperature and salinity on the yellowleg shrimp *Penaeus californiensis* Holmes. prophenoloxidase system. *Aquaculture*, 29(8), 549-553.
- Vijayan, K. K., & Diwan, A. D. (1996). Fluctuations in Ca, Mg and P levels in the hemolymph, muscle, midgut gland and exoskeleton during the molt cycle of the Indian White Prawn *Penaeus indicus* (Decapods; Penaeidae). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 14(A), 91-97.
- Wang, S. H., & Chen, J. C. (2005). The protective effect of chitin and chitosan against vibrio Alginolyticus in white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology*, 19, 191–204.
- Warner, G. F. (1977). *The biology of crabs*. Paul Elek (Scientific Books). London: Great Britain.
- Win, K. K. N., Jitareerat, P., Kanlayanarat, S., & Sangchote, S. (2007). Effect of cinnamon extract, chitosan coating, hot water treatment and their combinations on crown rot disease and quality of banana fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 45, 333-340.
- Yew, H. C., Chih, H. P., & Hunter, B. (2003). The resistance to physical stress by *Penaeus monodon* juveniles fed diets supplemented with astaxanthin. *Aquaculture*, 216, 177-191.
- Yu, J. (1993). Hemocyte classification, density and percentage of the prawn *Penaeus japonicas*. *Journal of Ocean-University Qingdao-Haiyang-Dao-xeu-Xueda*, 23(1), 107-114.
- Zanotto, F. P., & Wheatly, M.G. (2003). Calcium balance in crustaceans: Nutritional aspects of physiological regulation. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 133(A), 645-660.