ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ)

ปริญญา

เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ
สาขา	**ภาควิชา**

เรื่อง ผลการใช้อาหารโปรตีนต่ำต่อการเจริญเติบโต และระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาว

Effect of Low Protein Diet on Growth and Immunity of *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931)

นามผู้วิจัย นางสาวณัฐกุล แหยมสุขสวัสดิ์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

(รองศาสตราจารย์อรพินท์ จินตสถาพร, วท.ด.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

(รองศาสตราจารย์นนทวิทย์ อารีย์ชน, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา .....

(ศาสตราจารย์อุทัยรัตน์ ณ นคร, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ..... **เดือน** ..... **พ.ศ.** .....

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ผลการใช้อาหารโปรตีนต่ำต่อการเจริญเติบโต และระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาว

Effect of Low Protein Diet on Growth and Immunity of *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931)

โดย

นางสาวณัฐกุล แหยมสุขสวัสดิ์

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ)
พ.ศ. 2552

ณัฐกุล แหยมสุขสวัสดิ์ 2552: ผลการใช้อาหารโปรตีนต่ำต่อการเจริญเติบโต และระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาว ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ) สาขาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์อรพินท์ จินตสถาพร, วท.ด. 87 หน้า

การศึกษาการใช้อาหารโปรตีนต่ำต่อการเจริญเติบโต และระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาว ซึ่งเลี้ยงด้วยอาหารที่มีระดับโปรตีน (36, 32, 28 และ 24%) ในระยะวันที่ 51-100 ของการเลี้ยง โดยทำการศึกษาในบ่อกลางแจ้งขนาด 50 ตารางเมตรที่ปูด้วยพลาสติกโพลิเอธิลีน (PE) สีดำทั่วทั้งบ่อ เริ่มเลี้ยงลูกกุ้งขาวน้ำหนักเฉลี่ย 2.3 มิลลิกรัม ที่ความหนาแน่น 100 ตัว/ตารางเมตร ทำการทดลองเป็นระยะเวลา 100 วัน แบ่งชุดการทดลองเป็น 4 ชุด ชุดการทดลองที่หนึ่งให้อาหารที่มีระดับโปรตีน 36% ตลอดการเลี้ยง แต่สำหรับชุดการทดลองที่สอง สาม และสี่ทำการให้อาหารระดับโปรตีน 36% ในระหว่างวันที่ 1-50 ของการเลี้ยง หลังจากนั้นเปลี่ยนเป็นอาหารระดับโปรตีน 32, 28 และ 24% ตามลำดับ เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่าน้ำหนักที่เพิ่ม (WG), อัตราการเจริญเติบโตต่อวัน (ADG), อัตรารอด (SR), อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (SGR) ของทุกชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) โดยที่ผลผลิตรวมสุดท้ายของชุดการทดลองที่สอง (32% โปรตีน) มีค่าสูงสุด และมีค่าใกล้เคียงกับชุดการทดลองที่สาม (28%โปรตีน) แต่มีค่าสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญกันทางสถิติ ($p\leq0.05$) กับชุดการทดลองที่หนึ่ง (36% โปรตีน) และที่สี่ (24%โปรตีน) การใช้ประโยชน์จากอาหารโดยพิจารณาค่าประสิทธิภาพการใช้โปรตีน (PER) และโปรตีนที่สะสมในตัวกุ้ง (PR) พบว่าในชุดการทดลองที่หนึ่ง (36%โปรตีน) มีค่าต่ำกว่าชุดการทดลองที่สาม (28%โปรตีน) และที่สี่ (24%โปรตีน) อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) การตรวจสอบระบบภูมิคุ้มกันพบว่าปริมาณเม็ดเลือดรวม และผลผลิตซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออนจากปฏิกิริยา respiratory burst ของกุ้งขาวที่อายุ 60 และ 100 วัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) จากผลการทดลองในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสามารถให้อาหารที่มีระดับโปรตีน 28% ในการเลี้ยงกุ้งขาวที่มีอายุตั้งแต่ 50 วันหรือน้ำหนักมากกว่า 7.5 กรัมขึ้นไปได้ โดยไม่มีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตและระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง

_____ _____ ___ / ___ / ___

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

Nattakul Yaemsooksawat 2009: Effect of Low Protein Diet on Growth and Immunity of *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). Master of Science (Aquaculture), Major Field: Aquaculture, Department of Aquaculture. Thesis Advisor: Associate Professor Orapint Jintasataporn, Ph.D. 87 pages.

This experiment was conducted to determine the effects of low protein diets on growth performance and immune response of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). The diets of 36, 32, 28 and 24% crude protein (CP) was fed to shrimp on 51-100 day of culture periods. In an outdoor pond trial, *L. vannamei* postlarvae with average weight of 2.3 mg were stocked into 50 m^2 earthen pond lining with black polyethylene plastic (PE) at density of 100 shrimp $pond^{-1}$ later on reared for 100 days. The experiment was set up for four treatments, treatment 1: shrimp were fed diet of 36%CP throughout the culture period and the others, shrimp were fed diet of 36%CP only first 50 days, after that switched to diet of 32, 28 and 24%CP until harvest for treatment 2, 3 and 4 respectively. At the end of trial, weight gain, average daily gain, survival rate and specific growth rate of shrimps were not affect by treatment ($p>0.05$). However, the production of shrimp from treatment 2 (32%CP) was highest and closed to production of treatment 3 (28%CP) but production of treatment 1 and 4 were significantly lower ($p\leq0.05$) with treatment 2 (32%CP). Based on feed utilization, protein efficiency ratio and protein retention of treatment 1 was significant lower than treatment 3 and 4. The immune response in term of total hemocyte count (THC) and the production of superoxide anion (SO), also known as respiratory burst activity, on day 60 and 100 of culture were not significant differences ($p>0.05$). Therefore low protein diets of 28% can be fed for *L. vannamei*, after 50 cultured days or over 7.5 g, without any adverse affected on growth performance and immune response.

_____ _____ ___ / ___ / ___

Student's signature Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.อรพินท์ จินตสถาพร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก รองศาสตราจารย์ ดร.นนทวิทย์ อารีย์ชน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมที่กรุณาให้คำปรึกษาและความรู้เกี่ยวกับการทำงานวิจัยในครั้งนี้เป็นอย่างดี ตลอดจนการให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ให้วิทยานิพนธ์สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี และขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านที่กรุณาประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ให้แก่ข้าพเจ้าตลอดการศึกษาที่ผ่านมา

ขอกราบขอบพระคุณ น.สพ.ดร.สุจินต์ ธรรมศาสตร์ ดร.เฉิน หมิง เดี่ยน และคุณสุพล พันธุมะโอภาส ที่ให้โอกาสสนับสนุนทุนในการศึกษาระดับปริญญาโท รวมถึงผู้บังคับบัญชาทุกท่านที่ข้าพเจ้าเคยร่วมงาน ขอขอบคุณพนักงานฟาร์มยี่สาร 3 ทุกท่านที่เอื้อเฟื้อสถานที่ และความช่วยเหลือต่าง ๆ ในระหว่างการดำเนินงานทดลอง ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์เคมี หน่วยงานเทคโนโลยีชีวภาพ และหน่วยงานสถิติวิชาการ ณ โรงงานอาหารสัตว์น้ำมหาชัย ที่ให้คำปรึกษาแนะนำ และความช่วยเหลือต่างๆ ในการปฏิบัติการวิเคราะห์อาหาร และตรวจสอบระบบภูมิคุ้มกัน ขอขอบคุณเพื่อนนิสิตปริญญาโท เพื่อนร่วมงานที่ศูนย์วิจัยอาหารสัตว์น้ำเค็มทุกท่านที่มีน้ำใจและให้กำลังใจมาโดยตลอด

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อสำรวย คุณแม่บุญพิศ ที่อบรมสั่งสอน ส่งเสริมและสนับสนุนสิ่งดีๆ ตลอดมา สุดท้ายนี้ขอขอบคุณ คุณสมจิตต์ ไชยพูล ที่คอยให้กำลังใจ และความปรารถนาดีจนการศึกษาครั้งนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

ณัฐกุล แหยมสุขสวัสดิ์

มกราคม 2552

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	27
อุปกรณ์	27
วิธีการ	28
ผลและวิจารณ์	38
สรุปและข้อเสนอแนะ	56
สรุป	56
ข้อเสนอแนะ	58
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	59
ภาคผนวก	73

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ระดับโปรตีน (เปอร์เซ็นต์) ในอาหารที่เหมาะสมสำหรับครัสเตเชียนบางชนิด	10
2	ความต้องการโปรตีน (เปอร์เซ็นต์) ของกุ้งตระกูลพีเนียสต่าง ๆ	11
3	กรดอะมิโนจำเป็นที่เป็นองค์ประกอบในกล้ามเนื้อ (ก/100 ก โปรตีน) และปริมาณที่แนะนำสำหรับอาหารกุ้ง (ก/100 ก โปรตีน)	14
4	เอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อ R1 และ R2	18
5	การให้อาหารระดับโปรตีน (%) ที่ต่างกันในแต่ละชุดการทดลอง	28
6	ส่วนประกอบ (เปอร์เซ็นต์) ของอาหารทดลองที่ระดับโปรตีนต่างกัน 4 ระดับ	31
7	องค์ประกอบทางเคมี (เปอร์เซ็นต์) ของอาหารทดลองทีมีระดับโปรตีนต่างกัน 4 ระดับ	32
8	วิธีการวิเคราะห์คุณภาพน้ำ	33
9	น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้ง (กรัม) ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 ถึง สัปดาห์ที่ 14	38
10	การเจริญเติบโต และผลผลิตของกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีระดับโปรตีนต่างกัน	40
11	ประสิทธิภาพอาหาร และการใช้ประโยชน์จากอาหาร	42
12	กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสที่ระดับ pH 6, 7, 8 ของกุ้งขาวอายุ 30, 60, 90 และ 100 วัน เมื่อได้รับอาหารที่มีระดับโปรตีนต่างกัน	44
13	ประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนในห้องปฏิบัติการ (เปอร์เซ็นต์) โดยใช้เอนไซม์ที่สกัดจาก hepatopancreas ของกุ้งที่อายุ 30, 60, 90 และ 100 วัน	46
14	อัตราส่วนการสังเคราะห์ RNA ต่อโปรตีนในตับ และกล้ามเนื้อของกุ้งขาวเมื่อได้รับอาหารที่มีระดับโปรตีนต่างกัน	49
15	กรดอะมิโนจำเป็นอาหารทดลอง และกล้ามเนื้อกุ้ง (ก/100 ก โปรตีน)	51
16	ปริมาณเม็ดเลือดรวม (10^7 cell/ml) และซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (unit/ml) ของกุ้งขาวที่อายุ 60 และ 100 วัน	52
17	คุณภาพน้ำต่าง ๆ ตลอดระยะเวลาการทดลอง (ค่าเฉลี่ย ±SD)	54

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ระบบทางเดินอาหาร (digestive system) ของกุ้ง	15
2	ช่องท้องบริเวณทางเดินอาหาร (proventricular) ของกุ้งตระกูลพีเนียส	16
3	บ่อทดลองขนาด 50 ตารางเมตร ปูด้วยพลาสติกดำ (PE) ทั่วทั้งบ่อ	29
4	แผนผังบ่อทดลอง	30
5	อาหารทดลอง 4 สูตรที่มีระดับโปรตีนต่างกัน	32
6	น้ำหนักเฉลี่ย (กรัม) ของกุ้งขาวตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 ถึง สัปดาห์ที่ 14	39
7	กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสที่ระดับ pH 6, 7, 8 ของกุ้งขาวที่อายุ 30, 60, 90 และ 100 วัน เมื่อได้รับอาหารที่มีระดับโปรตีนต่างกัน	45
8	ประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนในห้องปฏิบัติการ (เปอร์เซ็นต์) โดยเอนไซม์ที่สกัดจากกุ้งขาวที่อายุ 30, 60, 90 และ 100 วัน เมื่อได้รบอาหารที่มีระดับโปรตีนต่างกัน	48

ผลการใช้อาหารโปรตีนต่ำต่อการเจริญเติบโต และระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาว

Effect of Low Protein Diet on Growth and Immunity of *Litopeaeus vannamei* (Boone, 1931)

คำนำ

จากสถิติการเลี้ยงและการส่งออกกุ้งกุลาดำ *(Penaeus monodon)* ของไทย พบว่าปัจจุบันมีการเลี้ยงกุ้งกุลาดำในประเทศเพียง 4% เท่านั้น เหตุผลที่ทำให้การเลี้ยงกุ้งกุลาดำลดลงคือปัญหาเรื่องการเจริญเติบโตและการจัดการภายในฟาร์ม ผู้เลี้ยงส่วนใหญ่จึงเปลี่ยนมาเลี้ยงกุ้งขาว *(Litopenaeus vannamei)* กันมากขึ้น เนื่องจากกุ้งขาวทนต่อสภาพแวดล้อมได้ดี เลี้ยงง่ายกว่า ถึงแม้ราคาขายจะต่ำกว่าเพียงเล็กน้อย ซึ่งราคากุ้งขาวกับกุ้งกุลาดำไม่ได้มีความแตกต่างกันมากนัก กุ้งขาวเป็นกุ้งขนาดเล็กแต่ผลผลิตต่อไร่สูงกว่าอีกทั้งต้นทุนก็ต่ำกว่า (เกวลิน, 2549) กุ้งขาวเป็นกุ้งที่ได้รับการพัฒนาสายพันธุ์มากกว่า 10 รุ่น (F_{10}) ตลอดระยะการเลี้ยงเป็นแบบวงจรชีวิตปิด (close life cycle) พ่อแม่พันธุ์กุ้งขาวที่ได้พัฒนามาจากบ่อดิน (Domesticated broodstock) ในระยะเวลากว่า 12 ปี เป็นพ่อแม่พันธุ์ที่ปลอดโรค (Specific pathogen free; SPF) หรือมีความต้านทานโรค (Specific pathogen resistant; SPR) จึงทำให้กุ้งขาวเลี้ยงง่าย (ภิญโญ, 2545)

ผลผลิตกุ้งขาวส่วนใหญ่จะส่งออกต่างประเทศเช่นเดียวกับกุ้งกุลาดำ แต่เนื่องจากกุ้งขาวมีราคาถูก และส่วนใหญ่ที่ผลิตออกมานั้นมีตั้งแต่ขนาดเล็กประมาณ 60 จนถึง 120 ตัว/กิโลกรัม ทำให้มีการบริโภคภายในประเทศเป็นจำนวนมาก ซึ่งอนาคตการบริโภคกุ้งขาวภายในประเทศจะเพิ่มขึ้นและกระจายไปตามพื้นที่ต่าง ๆ ทั่วประเทศมากกว่ากุ้งชนิดอื่น ๆ เนื่องจากสามารถผลิตได้ในปริมาณมากและในส่วนต้นทุนการเลี้ยงกุ้งขาวก็ต่ำกว่าการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ เพราะกุ้งขาวสามารถให้อาหารโปรตีนต่ำ และมีการใช้เคมีภัณฑ์ต่าง ๆ น้อย อีกทั้งการเลี้ยงยังใช้ระยะเวลาสั้นกว่ากุ้งกุลาดำ แต่อย่างไรก็ตามระบบการเลี้ยงกุ้งขาวเป็นแบบพัฒนามีการปล่อยในอัตราหนาแน่นสูง มีการให้อาหารปริมาณมาก ดังนั้นอาหารที่เหลือและของเสียที่เกิดจากการขับถ่ายของกุ้งจึงสะสมในบ่อเลี้ยงมาก มีผลให้สภาพแวดล้อมในบ่อเสื่อมโทรมก่อให้กุ้งเกิดความเครียดและอ่อนแอมีผลทำให้การทำงานระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งลดลง เป็นเหตุให้กุ้งเกิดการติดเชื้อได้ง่าย ซึ่งที่ผ่านมามีโรคหลายชนิดที่สร้างความเสียหายในการเลี้ยงกุ้งขาวโดยเฉพาะโรคทอร่าซึ่งเกิดจากเชื้อ Taura syndrome virus (TSV) มีผลให้กุ้งตายเป็นจำนวนมาก (ชลอ และพรเลิศ, 2547)

อาหารที่นำมาเลี้ยงกุ้งนั้นต้องมีโภชนะต่าง ๆ ที่เหมาะสมครบถ้วน และเพียงพอต่อความต้องการของกุ้ง โดยเฉพาะโปรตีนนับเป็นโภชนะที่สำคัญอย่างยิ่งที่สัตว์น้ำต้องการเพื่อใช้เป็นสารอาหารสำหรับร่างกายในการสร้าง เนื้อ หนัง อวัยวะต่าง ๆ รวมถึงเอนไซม์ ฮอร์โมน สารภูมิคุ้มกัน และสารพันธุกรรม (อมรรัตน์ และคณะ, 2548) ความต้องการโปรตีนของกุ้งก็จะต่างกันไปตามแต่ละชนิด อายุ และปัจจัยต่าง ๆ (Akiyama *et al*., 1991) สำหรับกุ้งขาวต้องการโปรตีนประมาณ 25-35% ซึ่งต่ำกว่า *P . chinensis* และ *P. mono*don (Wyban, 1992) เกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งทราบดีว่าต้นทุนส่วนใหญ่ของการเลี้ยงกุ้งอยู่ที่อาหาร และโภชนะที่มีผลต่อราคาอาหารกุ้งมากที่สุดนั้นคือโปรตีน

ดังนั้น ถ้าสามารถให้อาหารกุ้งที่มีระดับโปรตีนต่ำกว่าที่ใช้กันทั่วไปในขณะนี้ ในการเลี้ยงกุ้งขาวแล้วพบว่ามีอัตรารอดและอัตราการเจริญเติบโตไม่ต่างกัน รวมถึงไม่มีผลกระทบต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งมากนัก ก็น่าจะเป็นประโยชน์ทั้งในเรื่องต้นทุนการเลี้ยงกุ้ง อีกทั้งลดการเหลือค้างของอาหารกุ้งและของเสียที่เกิดจากการขับถ่ายของลงสู่บ่อเลี้ยง และแหล่งน้ำธรรมชาติเพื่อให้การเลี้ยงกุ้งของประเทศไทยเป็นอุตสาหกรรมที่ยั่งยืนตลอดไป สร้างรายได้ให้แก่เกษตรกร และประเทศชาติอย่างมหาศาลเช่นเดิม

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาอัตราการเจริญเติบโต อัตรารอดตาย น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีระดับโปรตีนต่างกัน

2. เพื่อศึกษาอัตราการแลกเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ ประสิทธิภาพการใช้โปรตีนในอาหาร และการเก็บสะสมโปรตีนจากอาหารที่ใช้ในการทดลองเลี้ยงกุ้งขาว

3. เพื่อศึกษาระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีระดับโปรตีนต่างกัน

4. เพื่อศึกษาการทำงานของเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีน และประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนในห้องปฏิบัติการของกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีระดับโปรตีนต่างกัน

5. เพื่อศึกษาผลของระดับโปรตีนในอาหารต่ออัตราการสังเคราะห์ RNA ต่อโปรตีนของกุ้งขาว

การตรวจเอกสาร

กุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*)

ชื่อภาษาอังกฤษของกุ้งชนิดนี้เมื่อก่อนไม่มีคำว่า “Lito” คือใช้เพียงคำว่า “*Penaeus*” แต่ต่อมาในปี 1997 Dr. Isabel Perea Farfante และ Dr. Brian Kenley ได้พยายามยกระดับกุ้งชนิดนี้ขึ้นเป็นระดับสกุลพีเนียส (Genus *Penaeus*) แทนที่จะเป็นสกุลรอง (Subgenus) โดยให้เรียกเป็น *Litopenaeus vannamei* หรือ *L. vannamei* แต่บางส่วนก็ยังคงใช้ *P. vannamei* อยู่เช่นเดิม ดังนั้นกุ้ง *P. vannamei* และ *L . vannamei* เป็นกุ้งชนิดเดียวกัน (ภิญโญ, 2545)

อนุกรมวิธานกุ้งขาว (*Litopenaeus vannam*ei), Boone (1931) ดังนี้

Kingdom Animalia
Phylum Arthopoda
Class Crustacea
Subclass Malacostraca
Order Decapoda
Family Penaeidae
Genus *Penaeus*
Subgenus *Litopenaeus*
Species *vannamei*
Common name White shrimp, White leg shrimp, West white shrimp, Pacific white shrimp

ลักษณะทั่วไปของกุ้งขาว

กุ้งขาวมีลำตัวขาวใส ขาสีขาว หางมีสีแดง โดยเฉพาะบริเวณปลายหาง จะมีสีแดงเข้ม กรีจะมีแนวตรงปลายงุ้มเล็กน้อย เมื่อโตขึ้นฟันกรีด้านบนจะมี 8 ซี่ และด้านล่าง 2 ซี่ ความยาวของกรีจะยาวกว่าลูกตาไม่มาก (หากเปรียบเทียบกับกุ้งพันธุ์อื่น เช่น กุ้งแชบ๊วยจะเห็นความยาวของกรียาวกว่าลูกตามาก) มีเมือกมาก ซึ่งไม่เหมือนกับกุ้งขาวบางชนิดที่สามารถสังเกตเห็นได้ว่ามีเมือกน้อย ลำตัวค่อนข้างแห้งเร็วเมื่อนำขึ้นจากน้ำ และที่สังเกตเห็นเด่นชัดที่สุดคือลำไส้ของกุ้งชนิดนี้จะโต

เห็นได้ชัดเจนกว่ากุ้งขาวชนิดอื่น ๆ (ภิญโญ, 2545) กุ้งชนิดนี้มีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพของน้ำ ตื่นตกใจง่าย แต่มีลักษณะที่พิเศษคือสามารถปรับตัวเข้ากับสภาวะแวดล้อมภายใต้ระบบการเลี้ยงได้ โดยสามารถเลี้ยงได้ทั้งในน้ำที่มีระดับความเค็ม 0-35 พีพีที แต่ระดับความเค็มที่เจริญเติบโตได้ดีคือ 10-22 พีพีที อุณหภูมิของน้ำในระดับที่เหมาะสมคือ 26-29 องศาเซลเซียส ซึ่งสามารถทำการเพาะเลี้ยงได้ทั้งในบริเวณพื้นที่ชายฝั่ง หรือบริเวณพื้นที่ในแผ่นดินเขตความเค็มต่ำ (ปิยะบุตร, 2546ก)

การแพร่กระจาย และวงจรชีวิตของกุ้งขาว

กุ้งขาวเป็นกุ้งพื้นเมืองในทวีปอเมริกาใต้ พบทั่วไปบริเวณชายฝั่งมหาสมุทรแปซิฟิกตะวันออก ตั้งแต่ตอนเหนือของประเทศเม็กซิโกจนถึงตอนเหนือของประเทศเปรู ซึ่งเป็นเขตที่มีอุณหภูมิของน้ำประมาณ 26-28 องศาเซลเซียส และมีความเค็มประมาณ 35 พีพีที ชอบอยู่ตามพื้นโคลน มีการเลี้ยงกันมากในประเทศเอกวาดอร์ เม็กซิโก เปรู ปานามา ฮอนดูรัส โคลัมเบีย กุ้งชนิดนี้มีการนำเข้ามาเลี้ยงในทวีปเอเชียครั้งแรกในประเทศไต้หวันปี พ.ศ. 2539 ต่อมาได้นำเข้ามาในประเทศจีนในปี พ.ศ. 2541 สำหรับประเทศไทยได้นำกุ้งขาวเข้ามาทดลองเลี้ยงในปี พ.ศ. 2541 แต่การทดลองในครั้งนั้นไม่ประสบความสำเร็จมากนัก จนกระทั่งเดือนมีนาคม พ.ศ. 2545 กรมประมงได้อนุญาตให้นำพ่อแม่พันธุ์ที่ปลอดเชื้อ (SPF) จากต่างประเทศเข้ามาทดลองเลี้ยง ระยะเวลาการนำเข้าพ่อแม่พันธุ์ที่ปลอดเชื้อตั้งแต่เดือนมีนาคม 2545 – กุมภาพันธ์ 2546 (ชลอ และพรเลิศ, 2547)

กุ้งขาวเป็นสัตว์ 2 ระดับน้ำ คือ ระยะโตเต็มวัยอยู่ในทะเล ส่วนช่วงไม่สมบูรณ์เพศ อาศัยอยู่บริเวณชายฝั่ง ส่วนพ่อแม่พันธุ์จะอยู่ในทะเลลึกประมาณ 70 เมตร ห่างจากชายฝั่งทวีปอเมริกา ไข่กุ้งจะฟักเป็นตัว และพัฒนาระยะตัวอ่อนในทะเล ในระยะนี้ลูกกุ้งจะอยู่ในลักษณะของแพลงก์ตอนสัตว์ เมื่อเข้าสู่ระยะโพสต์ลาวาจะอพยพเข้ามาอาศัยอยู่บริเวณน้ำตื้นชายฝั่งใกล้ปากแม่น้ำ หรือป่าชายเลน หลังจากเจริญเติบโตอยู่บริเวณชายฝั่งประมาณ 2-3 เดือน กุ้งที่โตเต็มวัยจะอพยพกลับสู่ทะเลเพื่อพัฒนาความสมบูรณ์เพศไปเป็นพ่อแม่พันธุ์ต่อไป (Wyban, 1991)

การลอกคราบ และการเจริญเติบโต

การลอกคราบของกุ้งเป็นพฤติกรรมเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงทางด้านสรีรวิทยาของกุ้ง เพื่อการเจริญเติบโตขยายขนาดของเซลล์ซึ่งเกิดขึ้นติดต่อกันตลอดเวลา โดยเริ่มจากมีการสะสมอาหารที่จำเป็นสำหรับการลอกคราบไว้ในเฮปาโตแพนเครียส มีการสำรองแคลเซียมในเลือดให้สูงกว่าปกติเพราะแคลเซียมจะถูกดึงกลับไปใช้ในการสร้างเปลือกใหม่ทันทีที่มีการสลัดเปลือกเก่าทิ้ง มี

การดูดกลับของสารพวกแคลเซียมจากคราบเก่าเข้าไปไว้ในลำตัว (Brown *et al*., 1991) และมีการสะสมน้ำเข้าไว้ในตัวเพื่อสลัดเปลือกเก่าทิ้ง และขยายตัวออกพร้อมกับขับน้ำบางส่วนออกเพื่อปรับปริมาตรความเข้มข้นของสารประกอบเกลือแร่ภายในร่างกายให้เข้าสู่ระดับเดิม มีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์อีปิเดอร์มิสเพื่อการสร้างคราบใหม่ต่อไป ขบวนการลอกคราบนี้จะเกี่ยวข้องกับระบบต่าง ๆ คือ ระบบประสาท ระบบเลือด ระบบสืบพันธุ์ ระบบขับถ่าย การปรับระดับภายในเซลล์ และการแลก เปลี่ยนไอออน (ประจวบ, 2537)

อัตราการเจริญเติบโตของกุ้งขึ้นอยู่กับปัจจัยสำคัญ 2 ปัจจัย คือ ความถี่ในการลอกคราบ (ระยะเวลาระหว่างการลอกคราบแต่ละครั้ง) และขนาดที่เพิ่มขึ้น (น้ำหนักและความยาวที่เพิ่มขึ้นในการลอกคราบแต่ละครั้ง) เพราะตัวกุ้งจะถูกหุ้มด้วยเปลือกซึ่งเป็นโครงร่างแข็งดังนั้นจึงต้องลอกคราบเก่าออกแล้วสร้างคราบใหม่ที่ใหญ่ขึ้นเพื่อรับกับการขยายขนาดที่เพิ่มขึ้น (Wyban, 1991)

พ่อแม่พันธุ์ และการพัฒนาสายพันธุ์ในต่างประเทศ

เนื่องจากพ่อแม่พันธุ์กุ้งขาวทั้งหมดนำเข้ามาจากต่างประเทศ ซึ่งส่วนใหญ่มาจากประเทศไต้หวัน จีน และสหรัฐอเมริกา พ่อแม่พันธุ์ที่มีอยู่ในประเทศไทยขณะนี้มีลักษณะแตกต่างกันบ้างพอจะสังเกตได้ คือ ถ้านำเข้ามาจากประเทศไต้หวัน ลักษณะสำคัญคือส่วนหัวจะโตกว่าพ่อแม่พันธุ์จากแหล่งอื่น ๆ โดยสันนิษฐานว่าสายพันธุ์ที่นำเข้าไปในประเทศไต้หวันในระยะแรกน่าจะเป็นสายพันธุ์ที่นำเข้ามาจากมลรัฐฮาวายประเทศสหรัฐอเมริกา ต่อมามีการผสมพันธุ์กับสายพันธุ์อื่นบ้างจนมีลักษณะที่เห็นในปัจจุบันนั้นคือส่วนหัวโตและสีจะแดงเข้ม ส่วนพ่อแม่พันธุ์ที่นำเข้าจากมลรัฐฮาวายประเทศสหรัฐอเมริกา ลักษณะลำตัวเหมือนกับพ่อแม่พันธุ์ที่มาจากมลรัฐฟลอริดา แต่จะมีสีแดงเข้มกว่า (ชลอ และพรเลิศ, 2547)

มีการพัฒนา และปรับปรุงสายพันธุ์กุ้งขาวในต่างประเทศมาเป็นเวลานานไม่ต่ำกว่า 20 ปี โดยเฉพาะที่สถาบัน Oceanic Institute มลรัฐฮาวาย ประเทศสหรัฐอเมริกาจนได้สายพันธุ์กุ้งขาวจำนวนมากที่มีการเจริญเติบโตเร็วมีขนาดใกล้เคียงกัน และสามารถเลี้ยงได้ในอัตราความหนาแน่นสูงมาก ให้ผลผลิตสูงในระยะเวลาสั้น การพัฒนาสายพันธุ์ (genetic improvement) ไม่ใช่เพียงแต่เป็นการนำเอากุ้งในธรรมชาติมาเลี้ยงในสภาพแวดล้อมที่เตรียมไว้ให้อาจจะเป็นบ่อดินหรือบ่อในโรงเพาะฟักแล้ว กุ้งเหล่านั้นสามารถผสมพันธุ์และสืบพันธุ์จนผลิตลูกออกมาได้ลักษณะเช่นนี้เรียกว่า domestication การพัฒนาสายพันธุ์กุ้งต้องใช้เวลานานโดยมีนักวิจัย หรือนักวิทยาศาสตร์จากหลายสาขาวิชาที่เกี่ยวข้อง ทั้งด้านพันธุศาสตร์ชีวเคมี ด้านโรค อาหาร และการเพาะเลี้ยงร่วมกัน

ทำงานในสถานที่ซึ่งมีการเตรียมไว้สำหรับการผลิต หรือพัฒนาสายพันธุ์กุ้งโดยเฉพาะที่จำเป็นต้องมีระบบ biosecure ที่สามารถป้องกันเชื้อโรคต่าง ๆ ได้ (ชลอ และพรเลิศ, 2547)

ความต้องการอาหาร และโภชนะโปรตีนของกุ้ง

อาหารเป็นสิ่งที่สัตว์น้ำกินและเกิดประโยชน์ต่อร่างกาย เพื่อซ่อมแซมส่วนที่สึกหรอ สร้างความเจริญเติบโตให้แก่ร่างกาย และช่วยทำให้กระบวนการต่าง ๆ ในการดำรงชีวิตดำเนินไปอย่างปกติ (เวียง, 2542) ในอาหารกุ้งจะมีส่วนประกอบที่แตกต่างกันในทางเคมีที่เรียกว่าสารอาหาร ได้แก่ โปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน วิตามิน และเกลือแร่ อาหารแต่ละชนิดก็มีสารอาหารที่แตกต่างกันไป (อิทธิพร, 2532) ความต้องการอาหารของกุ้งโดยทั่วไปก็เช่นเดียวกับสัตว์น้ำชนิดอื่น ๆ คือ ต้องการโปรตีนเพื่อใช้ในการบำรุงร่างกายให้อยู่ในสภาพปกติ และการสร้างความเจริญเติบโตให้แก่ร่างกาย ต้องการคาร์โบไฮเดรตและไขมันเพื่อเป็นแหล่งพลังงาน (Hickling, 1971) พลังงานในอาหารนั้นได้จากโปรตีน แป้ง และไขมัน เดิมไม่ค่อยได้กล่าวถึงพลังงานมากนัก แต่ปัจจุบันในการคำนวณสูตรอาหารคำนึงถึงพลังงานด้วย เนื่องจากมีความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนกับพลังงาน ซึ่งจะเป็นจุดที่สามารถลดต้นทุนหรือลดการใช้โปรตีนได้บางส่วน เนื่องจากพลังงานเป็นสารอาหารที่ใช้เพื่อการดำรงชีวิตเช่นการหายใจ การว่ายน้ำ และเพื่อการเจริญเติบโต โดยที่สัตว์น้ำจำเป็นต้องได้รับพลังงานเพื่อการดำรงชีวิตเพียงพอเสียก่อนจึงจะเหลือใช้เพื่อการเจริญเติบโต ระดับพลังงานในอาหารที่เหมาะสมเพื่อให้สัตว์น้ำมีการเจริญเติบโตดีควรมีค่าระหว่าง 8-10 กิโลแคลอรี่/น้ำหนักโปรตีน 1 กรัม (อมรรัตน์ และคณะ, 2548)

ในสัตว์ทุกชนิดมีโปรตีนเป็นองค์ประกอบอยู่ประมาณ 20% และธาตุที่เป็นองค์ประกอบของโปรตีน คือ คาร์บอน (50-55%), ไฮโดรเจน (6.57.5%), ไนโตรเจน (15.5-18% โดยเฉลี่ย 16%), ออกซิเจน (21.5-23.5%) และซัลเฟอร์ (0.5-2.0%) สัตว์น้ำต้องการโปรตีนมากถึง 30-50% ของน้ำหนักอาหาร เพราะเป็นสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของร่างกาย (Lovell, 1989) ในการสร้าง เนื้อ หนัง อวัยวะต่าง ๆ เอนไซม์ ฮอร์โมน สารภูมิคุ้มกัน และสารพันธุกรรม โดยโปรตีนประกอบด้วยส่วนย่อยที่เรียกว่า กรดอะมิโน (amino acid) แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ กรดอะมิโนที่จำเป็น (essential amino acid) ซึ่งร่างกายสัตว์น้ำไม่สามารถสังเคราะห์ได้เอง และกรดอะมิโนที่ไม่จำเป็น (non-essential amino acid) ที่ร่างกายสังเคราะห์ขึ้นเองได้ จึงไม่จำเป็นต้องมีในอาหารสัตว์น้ำต้องได้รับกรดอะมิโนที่จำเป็นครบทุกตัวในปริมาณที่พอเหมาะ จึงจะทำให้ร่างกายสร้างโปรตีนได้โปรตีนที่ดีจะทำให้สัตว์น้ำมีการเจริญเติบโตดี และควรมีส่วนประกอบของกรดอะมิโนที่จำเป็นทั้ง 10 ชนิดในปริมาณที่สมดุล (มะลิ, 2531; อมรรัตน์ และคณะ, 2548)

การใช้ประโยชน์ของโปรตีนในสัตว์น้ำขึ้นกับชนิด ขนาดของสัตว์น้ำ ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม คุณภาพและระดับของโปรตีนรวมถึงพลังงานที่มีในอาหาร ชนิดของแหล่งพลังงานและปริมาณอาหารที่ให้กิน (Steffens, 1981) การประหยัดโปรตีนในการเลี้ยงสัตว์น้ำสามารถทำได้โดยให้อาหารที่มีพลังงานอย่างเพียงพอ อาหารที่มีพลังงานต่ำจะทำให้โปรตีนถูกนำไปใช้เป็นแหล่งพลัง งาน มีผลโปรตีนถูกใช้อย่างสิ้นเปลืองไม่เกิดประโยชน์ต่อการเจริญเติบโต อีกทั้งโปรตีนก็มีราคาแพงทำให้ต้นทุนค่าอาหารสูงขึ้น (Pitcher และ Paul, 1982) โปรตีนในอาหารกุ้งได้จากวัตถุดิบที่เป็นแหล่งโปรตีนจากสัตว์ ได้แก่ ปลาป่น หมึกป่น เลือดป่น และแหล่งโปรตีนจากพืช ได้แก่ กากถั่วเหลือง กากงา กากเมล็ดทานตะวัน เป็นต้น แต่โปรตีนจากพืชมีข้อจำกัดคือมีปริมาณกรดอะมิโนจำเป็นที่สัตว์น้ำต้องการในปริมาณน้อย หรือขาดกรดอะมิโนจำเป็นบางตัว เมื่อนำมาเป็นส่วนผสมในอาหารปริมาณมาก แม้จะให้ค่าโปรตีนในอาหารกุ้งสูง แต่จะมีผลทำให้ขาดสมดุลของกรดอะมิโนตามที่สัตว์น้ำต้องการจึงส่งผลให้สัตว์น้ำเจริญเติบโตช้า นอกจากนี้โปรตีนจากพืชยังมีข้อจำกัดอื่นคือมีสารต้านโภชนาการ (anti-nutrition factor) เป็นปัจจัยร่วมที่ทำให้สัตว์น้ำมีขบวนการต่าง ๆ ในร่างกายผิดปกติ และโตช้า (อมรรัตน์ และคณะ, 2548) ปลาป่นนับเป็นแหล่งโปรตีนที่ดีสำหรับสัตว์น้ำเนื่องจากมีกรดอะมิโนไลซีน เมไธโอนีน และทริปโตเฟนสูง อีกทั้งเป็นแหล่งของแคลเซียม ฟอสฟอรัส และแร่ธาตุรองที่สำคัญได้แก่ แมงกานีส เหล็ก และไอโอดีน นอกจากนี้ยังเป็นแหล่งที่อุดมไปด้วยวิตามิน เช่น บี 1, บี 2, ไนอาซีน และโคลีน จึงนิยมใช้ในอาหารสัตว์น้ำ (จารุรัตน์ 2528; Sick *et al*., 1973)

มีการกำหนดมาตรฐานปลาป่นตามกระทรวงพาณิชย์ลงวันที่ 20 ธันวาคม 2538 (จูอะดี และคณะ, 2539)

ปลาป่นเกรดที่ 1	ต้องมีโปรตีนไม่น้อยกว่า 60% ความชื้นไม่เกิน 10% และเถ้าไม่เกิน 26%
ปลาป่นเกรดที่ 2	ต้องมีโปรตีนไม่น้อยกว่า 55% ความชื้นไม่เกิน 10% และเถ้าไม่เกิน 28%
ปลาป่นเกรดที่ 3	ต้องมีโปรตีนไม่น้อยกว่า 50% ความชื้นไม่เกิน 10% และเถ้าไม่เกิน 30%
ปลาป่นคุณภาพต่ำ	จัดเป็นปลาป่นที่มีเปอร์เซ็นโปรตีนต่ำกว่า 50%

Sick และ Andrews (1973) ทดลองใช้กากถั่วเหลือง และแหล่งโปรตีนอื่น ๆ แทนปลาป่นในอาหารกุ้งสกุลพีเนียสพบว่าสามารถใช้กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งโปรตีนที่ดีสำหรับกุ้ง เช่นเดียวกับ Kanazawa *et al.* (1970) ได้นำกากถั่วเหลืองซึ่งเป็นวัตถุดิบแหล่งโปรตีนจากพืชที่ดีมาใช้เป็นส่วนผสมในอาหารกุ้งได้ จากการศึกษาของ Colvin และ Brand (1977) พบว่าการเจริญเติบโตของ *L. vannamei* และ *P. stylirostris* เพิ่มสูงขึ้นถ้าในอาหารกุ้งมีแหล่งโปรตีนที่มาจากสัตว์ และกากถั่วเหลืองในอัตรา 1:1

Lim and Doming (1990) รายงานว่าสามารถใช้กากถั่วเหลืองในอาหารกุ้งมากถึง 43% แต่ถ้ามากกว่านี้อัตราการเจริญเติบโตจะลดลง Davis *et al*. (2002) ทดลองให้อาหารกุ้งขาวที่มีถั่วผ่านการเอ็กทรูดหรือไมโครไนซ์ นำมาเป็นส่วนประกอบของอาหารในปริมาณ 5%, 10% และ 20% พบว่าสามารถนำมาเป็นอาหารกุ้งที่มีคุณค่าทางโปรตีนและพลังงานสูง โดยไม่มีผลกระทบต่ออัตราการเจริญเติบโต และอัตรารอดของกุ้ง Lawrence *et al*. (1995) พบว่าเมื่อเลี้ยงกุ้งขาวในระยะ juvenile ด้วยอาหารที่มีระดับโปรตีน25% และมีกากถั่วเหลืองเป็นส่วนผสมอยู่ในสูตรปริมาณ 45% จะทำให้กุ้งมีน้ำหนักดี

Smith *et al*. (1985) ศึกษาการเจริญเติบโตของกุ้งขาว 3 ขนาด ได้แก่ 4, 9.8 และ 20.8 กรัม ที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีโปรตีน 22, 29 และ 36% โดยมีอัตราส่วนระหว่างแหล่งโปรตีนจากสัตว์กับพืช เป็น 2:1 หรือ 1:1 พบว่าอัตราการเจริญเติบโตของกุ้งมีความสัมพันธ์กับระดับโปรตีนในอาหาร และมีความแตกต่างกันทางสถิติในกุ้งขนาดเล็กที่สุดเท่านั้น

Velasco *et al.* (2002) ทดลองเลี้ยงกุ้งด้วยอาหารที่มีระดับโปรตีนเท่ากับ 10, 15, 25 และ 35 พบว่าทุกชุดการทดลองมีอัตรารอดเท่ากับ 80% อัตราการเจริญเติบโตไม่แตกต่างกันยกเว้นที่ระดับโปรตีน 10% จะมีอัตราการเจริญเติบโตแตกต่างจากกลุ่มอื่น Kureshy และ Davis (2002) รายงานว่ากุ้งขาวในระยะ juvenile ต้องการ maintenance protein เท่ากับ 1.8-3.8 mg DP kg BW day^{-1} และในระยะ subadult เท่ากับ 1.5-2.1 mg DP kg BW day^{-1} แต่ถ้าต้องการให้มีอัตราการเจริญเติบโตดีที่สุดในระยะ juvenile และ subadult ควรอยู่ที่ระดับ 4.6 และ 2.4 mg DP kg BW day^{-1} ตามลำดับ

Matinez *et al*. (2003) ทดลองเลี้ยงกุ้ง *L . stylirostris* และ *L. vannamei* ด้วยอาหารระดับโปรตีนต่ำ (โปรตีน 250 ก/กก อาหาร) และระดับโปรตีนสูง (มีโปรตีน 400 ก/กก อาหาร) พบว่ากุ้ง *L. vannamei* มีการเจริญเติบโต น้ำหนักสุดท้าย และอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (FCR) ดีที่สุดในชุดทดลองที่ให้อาหารระดับโปรตีนต่ำ กุ้ง *L. vannamei* ต้องการโปรตีนต่ำกว่า *L. stylirostris* นอกจากนี้ยังพบว่าคุณภาพน้ำของชุดที่ให้อาหารระดับโปรตีนต่ำดีกว่าระดับโปรตีนสูง โดยดูจากค่าไนเตรท แอมโมเนีย และสารอินทรีย์ มีรายงานว่ากุ้งขาวต้องการระดับโปรตีนประมาณ 25-35% (Wyban, 1991) และในระยะ juvenile ต้องการโปรตีนต่ำกว่า 30% (Colvin และ Bran, 1977) ในขณะที่ Kureshy *et al*. (2000) พบว่าความต้องการโปรตีนสูงสุดของกุ้งขาวในระยะ juvenile และ sub adult คือ 32% ส่วนในระยะโพสต์ลาวาต้องการ 30-35% (ตารางที่ 1 และ 2)

Rosas *et al*. (2001a,b) พบว่าโปรตีนและกลูโคสในเลือดกุ้ง *L. setiferus* และ *L. vannamei* ระยะ juvenile จะมีความสัมพันธ์กับระดับโปรตีน และคาร์โบไฮเดรตที่มีในอาหารอย่างมาก โดยที่โปรตีนในเลือดจะสัมพันธ์กับระดับแอมโมเนียในน้ำเลือด แสดงว่าถ้าในอาหารมีโปรตีนมากก็จะเกิดแอมโมเนียแล้วมีผลเกิด glutamate dehydrogenase ที่เหงือก มีหลักฐานว่ากุ้ง *L. setiferus* และ *L. vannamei* สามารถเปลี่ยนโปรตีนไปเป็นไกลโคเจนโดยขบวนการ gluconeo genic เพื่อรักษาระดับกลูโคสในระบบเลือดที่ไม่ได้เกิดจากคาร์โบไฮเดรต นอกจากนั้นยังมีรายงานว่าเมแทบอลิซึม ของโปรตีนในกุ้งจะเป็นตัวกำหนดระบบเมแทบอลิซึมต่าง ๆ ในร่างกาย ตั้งแต่เมแทบอลิซึมโปรตีน การสังเคราะห์คาร์โบไฮเดรต การสังเคราะห์ไกลโคเจน ควบคุมระบบสมดุลย์ รวมถึงการเก็บโปรตีนในรูปฮีโมไซยานิน (hemocyanin)

ตารางที่ 1 ระดับโปรตีน (เปอร์เซ็นต์) ในอาหารที่เหมาะสมสำหรับครัสเตเชียนบางชนิด

ชื่อวิทยาศาสตร์	แหล่งโปรตีนในอาหาร	ระดับโปรตีน (%)
Homarus americanus	casein, gluten , and shrimp meal	31
Homarus gammarus	fish and crustacean meal	35
Macrobrachium rosenbergii	soybean, tuna and shrimp meal	> 35
Metapenaeus monoceros	casein, gluten and shrimp meal	55
Palaemon serratus	fish meal and shrimp meal	40
Penaeus duorarum	soybean meal	28-30
Penaeus indicus	prawn meal	42.8
Penaeus japonicus	shrimp meal	40
	casein and egg albumin	54
	squid meal	60
Penaeus merguiensis	Mytilus edulis meal	34-42
Penaeus monodon	casein and fish meal	46
Penaeus setiferus	fish meal	28-32
Penaeus vannamei	soybean meal, fish meal and prawn meal	30

ที่มา: Colvin and Brand (1977)

ตารางที่ 2 ความต้องการโปรตีน (เปอร์เซ็นต์) ของกุ้งตระกูลพีเนียสต่าง ๆ

ชนิดกุ้งตระกูลพีเนียส ขนาด (กรัม)	เปอร์เซ็นต์โปรตีน จากการตรวจสอบ	เปอร์เซ็นต์โปรตีน ที่แนะนำ
P. aztecus		
0.02, 0.14	40-80	40
6.0	24-63	51
4.0, 10.0, 15.0	22-36	30-36
P. indicus		
1.0	21-53	43
P. japonicus		
5.3	63-76	>60
4.2	2-66	52-57
P. merguiensis		
0.01	17-51	34-42
P. monodon		
0.5-1.8	2-66	45-50
1.3	25-60	40
P. setiferus		
4.0	14-52	28-32
3.7, 9.8, 14.7	22-36	30
P. styliostris		
0.05	25-40	35
P. vannamei		
0.03	25-40	30
4.0, 9.8, 20.8	22-36	30

ที่มา: Akiyama *et al.* (1991)

กรดอะมิโน

กรดอะมิโนเป็นตัวกำหนดคุณภาพของโปรตีนถ้าโปรตีนมีกรดอะมิโนที่จำเป็นทั้ง 10 ชนิด ครบถ้วนในปริมาณมากพอเรียกว่าโปรตีนชนิดสมบูรณ์ (Complete protein)หรือโปรตีนที่มีคุณภาพดีสำหรับสัตว์น้ำ ส่วนโปรตีนที่มีกรดอะมิโนที่จำเป็นไม่ครบทุกชนิด หรือมีครบแต่มีในปริมาณจำกัดจัดเป็นโปรตีนที่มีคุณภาพไม่ดีหรือเรียกว่าโปรตีนชนิดไม่สมบูรณ์ (Incomplete protein) โปรตีนชนิดสมบูรณ์พบในเนื้อสัตว์ ผลิตภัณฑ์จากสัตว์และถั่วเหลือง สำหรับโปรตีนที่พบในพืชอื่น ๆ เป็นโปรตีนชนิดไม่สมบูรณ์ (เวียง, 2542)โปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนในสัดส่วน ที่ไม่ตรงกับความต้องการของสัตว์จะทำให้สัตว์นำไปสังเคราะห์เป็นโปรตีนให้กับร่างกายได้อย่างไม่มีประสิทธิภาพ แม้ว่าโปรตีนนั้นจะถูกย่อยได้ง่ายในร่างกาย หากขาดกรดอะมิโนที่จำเป็นไปหนึ่งชนิดหรือมีปริมาณกรดอะมิโนไม่สมดุลกับความต้องการของสัตว์ (มี amino acid pattern แตกต่างกันระหว่างความต้องการกรดอะมิโนของสัตว์ และปริมาณกรดอะมิโนที่มีอยู่ในอาหาร) ถือว่าอาหารนั้นมีคุณค่าทางโภชนะต่ำ เมื่อสัตว์ได้รับแล้วจะแสดงอาการบางอย่างของการขาดกรดอะมิโนบางตัว เช่น มีการเจริญเติบโตช้า แคระแกร็น (พันธิพา, 2543)

กรดอะมิโนที่มีค่าสัดส่วนการเปรียบเทียบต่ำที่สุดในจำนวนกรดอะมิโนชนิดจำเป็น10ชนิด เมื่อเทียบกับกรดอะมิโนชนิดเดียวกันในอาหารมาตรฐานต่อน้ำหนักโปรตีนเท่ากันเรียกว่ากรดอะมิโนจำเป็นที่มีปริมาณน้อยหรือจำกัด (limiting amino acid) ซึ่งหมายความว่าเป็นกรดอะมิโนชนิดจำเป็นที่มีอยู่น้อยที่สุดในอาหาร ดังเช่นพบว่าไลซีนมีน้อยที่สุดในข้าว ทริปโตเฟนมีน้อยที่สุดในข้าวโพด ส่วนเมไธโอนีนมีน้อยที่สุดในถั่วต่าง ๆ ยกเว้นถั่วเหลือง (เวียง, 2542) ความต้องการกรดอะมิโนของกุ้งจะแตกต่างกัน ขึ้นกับการลอกคราบ อายุ และความเค็ม (Mc Coid *et al.*, 1984)

กรดอะมิโนที่ได้จากการย่อยโปรตีนจะซึมผ่านลำไส้โดยอาศัยพลังงาน (active transport) การดูดซึมกรดอะมิโนเกิดขึ้นควบคู่กับการดูดซึมโซเดียมไอออน ซึ่งมีวิตามินบี 2 แมงกานีส และเหล็กช่วยให้ซึมผ่านผนังลำไส้ได้ดีขึ้น นอกจากนี้การดูดซึมกรดอะมิโนบางชนิดต้องอาศัยไลโปโปรตีนเป็นตัวพา (carrier or passive diffusion) ทำให้ความสามารถในการซึมผ่านผนังลำไส้ของกรดอะมิโนแต่ละชนิดใช้เวลาไม่เท่ากัน เมไธโอนีน ลิวซีน ไอโซลิวซีน วาลีน ซึมผ่านได้เร็วมาก ส่วนทรีโอนีนซึมผ่านได้ช้ากว่าชนิดอื่น และอาหารที่มีอัตราส่วนกรดอะมิโนเหมาะสมจะซึมผ่านได้ดีกว่าอาหารที่มีสัดส่วนของกรดอะมิโนไม่เหมาะสม กรดอะมิโนที่ถูกดูดซึมแล้วจะเข้าสู่เส้นเลือดฝอยภายในวิลไล จากนั้นจึงเข้าสู่กระแสโลหิตหมุนเวียนไปยังเซลล์ตามส่วนต่างๆของร่างกาย (เวียง, 2542) ผนังของลำไส้ (epithelium) เป็นตัวจำกัดการดูดซึมสารต่าง ๆ ที่จะผ่านเข้าสู่ภายใน

ร่างกาย กรดอะมิโนบางชนิดจะมีการแก่งแย่งกันในเรื่องของการดูดซึม (antagonism) เช่น อาร์จีนีน ซิสตีน ส่วนออนิทีนจะยับยั้งการดูดซึมไลซีน (พันธิพา, 2543) นอกจากนี้พบว่ากรดอะมิโนไลซีน และอาร์จินีนมีความสัมพันธ์กันในลักษณะที่เรียกว่า lysine-arginine antagonism นั่นคือ หากมีระดับของกรดอะมิโนชนิดใดชนิดหนึ่งในจำนวนสองตัวนี้มากเกินไป มีผลทำให้การเจริญเติบโตลดลง แม้ว่ารายงานดังกล่าวไม่พบในกุ้งแต่เชื่อว่าสัดส่วนของไลซีนต่ออาร์จินีน ควรรักษาให้อยู่ที่ระดับ 1:1 ถึง 1:1.1 (วุฒิพร, 2541)

หลังจากกรดอะมิโนถูกดูดซึม และนำเข้าสู่กระแสโลหิตเพื่อส่งมายังตับ แล้วกรดอะมิโนก็ถูกส่งออกจากตับเข้าระบบหมุนเวียนของโลหิตไปยังเซลล์ต่าง ๆ ซึ่งเซลล์เหล่านี้จะรับกรดอะมิโนเพื่อนำมาสังเคราะห์โปรตีนชนิดต่าง ๆ สำหรับทดแทนส่วนที่เสื่อมไปเพื่อการเจริญเติบโต และเพื่อการทำงานภายในร่างกาย การสังเคราะห์โปรตีนจะเกิดขึ้นก็ต่อเมื่อเซลล์ได้รับกรดอะมิโนที่จำเป็นครบทุกชนิดในปริมาณมากพอ (ตารางที่ 3) ถ้าขาดกรดอะมิโนที่จำเป็นชนิดหนึ่งชนิดใดแล้วการสังเคราะห์โปรตีนจะไม่เกิดขึ้น แล้วกรดอะมิโนจะถูกส่งกลับมาสลายตัวที่ตับโดยกระบวนการดีแอมมิเนชั่น (deamination) และถูกขับออกจากร่างกาย ด้วยเหตุที่ร่างกายสัตว์น้ำไม่มีเซลล์พิเศษสำหรับเก็บกรดอะมิโน กรดอะมิโนส่วนที่เกินความต้องการจึงถูกนำไปใช้เป็นพลังงานโดยจะถูกส่งไปยังตับ ตับจะแยกส่วนที่เป็นหมู่อะมิโนออกจากโมเลกุลแล้วผ่านกระบวนการเปลี่ยนแปลงต่าง ๆ จนกลายเป็นกรดคีโตและแอมโมเนีย จากนั้นจะถูกขับออกจากร่างกาย ส่วนกรดคีโตจะถูกนำไปสลายตัวเพื่อให้ได้พลังงานในวัฏจักรเครบส์ บางส่วนถูกนำไปแปรสภาพเป็นไกลโคเจน หรือไขมันแล้วเก็บสะสมไว้ในร่างกาย หรือนำไปสังเคราะห์เป็นกรดอะมิโนชนิดใหม่ในกระบวนการที่เรียกว่าทรานส์แอมมิเนชั่น (transamination) (เวียง, 2542)

Hird (1986) รายงานว่าอาร์จีนีนเป็นกรดอะมิโนที่จำเป็นในกลุ่มครัสเตเซียน ซึ่งทำหน้าที่เป็น phosphogen สำหรับการยืดหดกล้ามเนื้อ ถ้าขาดอาร์จีนีนจะทำให้กุ้งตระกูลพีเนียสเจริญเติบโตช้า (Lim and Akiyama, 1995) การเสริมอาร์จีนีน ฟีนิลอะลานีน ลิวซีน หรือไอโซลิวซีน 1% ในอาหารกุ้งก้ามกรามจะทำให้มีอัตราการเจริญเติบโตดี (Leuteio, 1979) ถ้ามีการเสริม crystalline amino acid ในอาหารกุ้งขาวจะทำให้ผลผลิตเพิ่มขึ้น (Lim, 1993) เมื่อทำการศึกษาโดยติดตามการฉายรังสีทำให้ทราบว่าซิสตีนสามารถถูกสังเคราะห์จากเซอรีนและเมทไธโอนีน ส่วนไทโรซีนสามารถถูกสังเคราะห์มาจากฟีนิลอะลานีนโดยปฏิกิริยา hydroxylation (Zan, 1966)

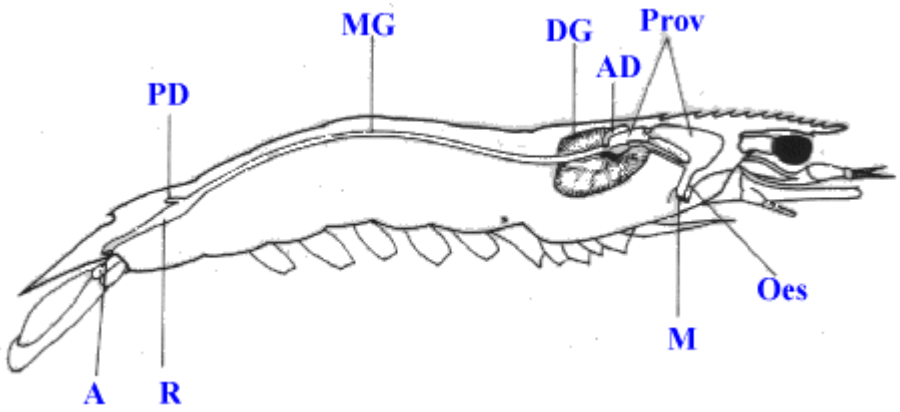
ตารางที่ 3 กรดอะมิโนจำเป็น (กรัม/100กรัม โปรตีน) ที่เป็นองค์ประกอบในกล้ามเนื้อกุ้ง และปริมาณที่แนะนำสำหรับอาหารกุ้ง (กรัม/100กรัม โปรตีน)

ชนิดกรดอะมิโน	กล้ามเนื้อกุ้ง* (ก/100 ก โปรตีน)	ปริมาณแนะนำ** (ก/100 ก โปรตีน)
Arginine	7.5	5.8
Histidine	1.9	2.1
Isoleucine	3.6	3.5
Leucine	6.5	5.4
Lysine	6.4	5.3
Methionine	2.6	2.4
Phenylalanine	3.6	4
Threonine	3.4	3.6
Tryptophan	1.1	ND
Valine	3.8	4

ที่มา: * Lim (1993)

** Akiyama *et al*. (1992)

อวัยวะในการย่อยอาหาร (Digestive organs) ของกุ้ง



ภาพที่ 1 ระบบทางเดินอาหาร (digestive system) ของกุ้ง

A = anus **AD** = anterior diverticulum of midgut **DG** = digestive gland

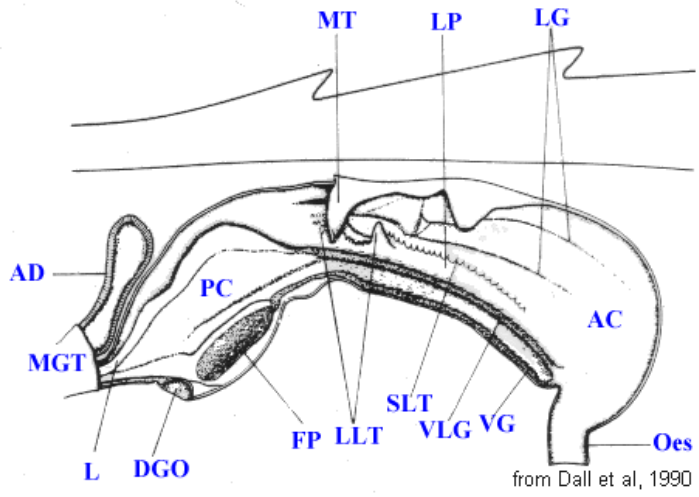
M = mouth **MG** = midgut **Oes** = oesophagus

PD = posterior diverticulum of midgut **Prov** = proventriculus **R** = rectum

ที่มา: Dall *et al*. (1990)

Foregut จะมีต่อมน้ำย่อยขับสารเข้าไปในโพรเวนทิเคิลส่วนหน้า ส่วนร่องกลางทำหน้าที่ในการส่งผ่านน้ำย่อยให้ผ่านไปทางด้านหลังโดยผ่านแกสทริกมิล อาหารจะถูกดักโดยตะแกรงที่ทำหน้าที่ในการกรองเอาเฉพาะของเหลว และชิ้นส่วนที่ละเอียดผ่านเข้าไปที่ต่อมน้ำย่อย เพื่อการย่อยครั้งสุดท้ายแล้วจึงมีการดูดซึม

อาหารเหลวจะถูกนำมาที่ ventral setose groove ของช่องลำไส้ส่วนหน้า ซึ่งจะมีขนแข็ง ๆ ดักอาหารชิ้นใหญ่แยกออกจากของเหลว และส่งต่อไปด้านหลังที่ filter press ทำหน้าที่แยกอาหารขนาดใหญ่กว่า 1ไมครอน ผ่านไปทางช่องเปิดของต่อมน้ำย่อย จากนั้นน้ำย่อยจะถูกปั๊มแล้วฉีดจากด้านหลังให้เข้าไปที่ร่องด้านข้าง เชื่อมกับของเหลวที่แยกจากอาหารทางส่วนท้ายของลำไส้



ภาพที่ 2 ช่องท้องบริเวณทางเดินอาหาร (proventricular) ของกุ้งตระกูลพีเนียส

AC = anterior chamber **AD** = anterior diverticulum

DGO = digestive gland opening **FP** = filter press (pyloric press)

L = lappets **LG** = lateral grooves

LLT = large lateral teeth **LP** = lateral plate (cardiac plate)

MG = tubular part of midgut **MT** = medial tooth (prephloric ossicle)

Oes = oesophagus **PC** = posterior chamber

SLT = minor lateral teeth (cardiac teeth) **VG** = ventral setose groove

VLG = ventro-lateral setose groove

ที่มา: Dall *et al*. (1990)

ในส่วน midgut ของเหลวที่รวมกันแล้ว จะผ่านไปที่ช่องลำไส้ส่วนหน้าผ่าน filter press ร่องด้านข้างของช่องลำไส้ส่วนหน้า ทำหน้าที่ในการไหลเวียนของของเหลว ภายหลังจากที่อาหารเหลวเข้าไปที่ digestive gland สารอาหารที่ละลายแล้วจะถูกดูดซึม ส่วนอาหารเหลวจะรวมกับเอนไซม์เพิ่มขึ้น แล้วกลับออกไปที่ proventriculus อีกครั้ง และไหลเวียนหลาย ๆ รอบก่อนที่จะเข้าไปในท่อเล็ก ๆ ภายในต่อมน้ำย่อย การดูดซึมและขับออกจะเกิดขึ้นสลับกัน บริเวณ midgut ของครัสเตเซียชั้นสูงการย่อยเกิดขึ้นรวดเร็วและมีประสิทธิภาพ เพราะที่เยื่อบุผนังของ midgut จะมีต่อมสร้างน้ำย่อยที่จำเป็นพวกโพรพิโอไลทิก

Midgut มีหน้าที่หลัก 2 ประการ คือ การหลั่งเอนไซม์ และการดูดซึมอาหารที่ย่อยแล้ว ซึ่งคาดว่าเยื่อบุผิวจะแตกต่างกัน ประกอบด้วยเซลล์ 2 ชนิด ชนิดแรก microvilli ทำหน้าที่ในการดูดซึมอาหาร และ vesicular cell หรือเรียกว่า digestive gland ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์ และหลั่เอนไซม์ ที่ใช้ในการย่อยอาหาร (digestive enzyme) และรวมถึงหน้าที่ในการดูดกลับสารอาหาร เป็นบริเวณที่เก็บพลังงานด้วย เมื่อร่างกายทำการย่อยอาหารแล้วส่วนที่ไม่สามารถย่อยได้จะถูกรวบรวมเป็นอุจจาระใน midgut และส่งต่อไปยังส่วนของ hindgut กล้ามเนื้อส่วนนี้จะปั้มน้ำเข้าในลำไส้เพื่อช่วยในการถ่ายอุจจาระ

Hepatopancreas คือต่อมสร้างน้ำย่อยที่พบในพวกสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง ทำหน้าที่คล้ายคลึงกับตับ (liver) และตับอ่อน (pancreas) ในสัตว์ชั้นสูง จึงทำหน้าที่เป็ทั้งตับและตับอ่อนรวมกัน ในสัตว์พวกกุ้งนั้น hepatopancreas ประกอบด้วยท่อตันหรือถุงตัน (diverticula) เปิดออกสู่ท่อที่จะทำหน้าที่หลั่งน้ำย่อย แล้วไปเปิดออกที่ท่ออันแรก หรือ collecting ducts น้ำย่อยที่หลั่งออกมาจะไหลลงสู่ midgut ใกล้ ๆ กับกระเพาะส่วนหลัง (ประจวบ, 2537) Hepatopancreas เป็น อวัยวะที่มีการหลั่งกรดน้ำดี เป็นแหล่งที่มีการสะสมไกลโคเจน ไขมัน และแคลเซียม รวมทั้งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเผาผลาญโปรตีน (Vonk, 1960)

เอนไซม์ในทางเดินอาหาร (Digestive Enzyme)

เอนไซม์คือโปรตีนกลุ่มหนึ่งที่มีหน้าที่พิเศษแตกต่างจากโปรตีน และมหชีวโมเลกุลทั่วไป กล่าวคือ มีความสามารถเร่งปฏิกิริยาในสิ่งมีชีวิตได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงกว่าตัวเร่งสังเคราะห์เป็นหลายล้านเท่าด้วยปริมาณเอนไซม์เพียงระดับไมโครโมลาร์ (μM) นอกจากนี้เอนไซม์สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ภายใต้ภาวะไม่รุนแรงซึ่งเหมาะสมอย่างยิ่งกับภาวะภายในเซลล์ และเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิตทั่วไป เอนไซม์มีความจำเพาะต่อสารที่ทำปฏิกิริยาซึ่งเรียกว่าซับสเตรตและสามารถเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ไม่เปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์อื่น ตลอดทั้งเอนไซม์จะเพิ่มอัตราเร็วของปฏิกิริยาโดยลดพลังงานกระตุ้นของปฏิกิริยาได้ (ปราณี, 2547)

เอนไซม์เป็นสารประกอบโปรตีน เนื่องจาก

1. เมื่อนำเอนไซม์มาย่อยสลายด้วยกรดไฮโดรคลอริก โซดาไฟ หรือด้วยเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีน พบว่าผลผลิตที่ได้เป็นกรดอะมิโน บางครั้งอาจพบกลุ่มสารประกอบอื่นๆได้แก่ ฟอสเฟต คาร์โบไฮเดรต กรดนิวคลิอิกด้วย

2. เอนไซม์ถูกทำให้เสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนได้ด้วยความร้อน สารละลายอินทรีย์ กรดแก่ หรือด่างแก่เหมือนโปรตีนทั่วไป

3. เอนไซม์มีลักษณะของโปรตีนเมื่อนำมาศึกษาผลึกศาสตร์รังสีเอกซ์ และเมื่อนำมาทดสอบด้วยวิธีทดสอบโปรตีนตามวิธีต่างๆ เช่น การตรวจพันธะเปปไทด์ด้วยวิธี Biuret test การตรวจอนุมูลไทโรซีนโดยวิธี Millon's test การตรวจอนุมูลทริปโทแฟนโดยวิธี Hopkins Cole test และการตรวจอนุมูลอาร์จินีนโดยวิธี Sakaguchi test

เอนไซม์สำคัญที่เกี่ยวข้องกับการย่อยโปรตีน (Protein Digestive Enzyme)

โปรติเอส (protease) มีชื่อสามัญหลายชื่อ ได้แก่ เปปติเดส โปรติเนส เปปไทด์โดรเลส และเอนไซม์โปรติโอไลติก มีลักษณะปฏิกิริยาดังนี้คือ สลายพันธะเปปไทด์ -CO-NH- ด้วยน้ำ โปรติเอสผลิตมาจากหลายแหล่ง เช่น ในกระเพาะอาหารมีกรดเกลือไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์เปปซิโนเจนเปลี่ยนเป็นเปปซินให้สามารถย่อยโปรตีน ในลำไส้มีเอนไซม์สร้างจากตับอ่อนคือ เอนไซม์ทริปซิโนเจนและไคโมทริปซิโนเจน แล้วถูกกระตุ้นโดยเอนไซม์เอนเทอโรไคเนสเปลี่ยนเป็นทริปซิน และไคโมทริปซิน

ตารางที่ 4 เอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อ R_1 และ R_2

เอนไซม์	ความจำเพาะต่ออนุมูลกรดอะมิโน
แอลฟา-ไคโมทริปซิน	Tyrosine, Phenylalanine, Tryptophane (R_1)
ทริปซิน	Lysine, Arginine (R_1)
เปปซิน	Phenylalanine (R_2)

ลักษณะธรรมชาติของ R_1 และ R_2 เป็นอนุมูลของกรดอะมิโน 2 ชนิด ที่มาทำให้เกิดพันธะเปปไทด์ 1 พันธะ หรือ R_1 และ R_2 คือ side chain ของโปรตีน ดังนั้นถ้าโปรติเอสตัวใดมีความจำเพาะต่อ R_1 แสดงว่าเอนไซม์นั้นเข้าตัดพันธะเปปไทด์โดยเข้าทางปลายอะมิโน (N-terminal splitting) โดยที่ R_2 นั้นจะเป็นอะไรก็ได้ และในกรณีที่โปรติเอสมีความจำเพาะต่อ R_2 ก็แสดงว่าเอนไซม์นั้นเข้าตัดพันธะเปปไทด์โดยเข้าทางปลายคาร์บอกซี (C- terminal splitting)

โปรติเอส แบ่งได้เป็น 4 กลุ่ม ตามกลไกการทำงาน

1. โปรติเอสเซอรีน (serine proteases) ได้แก่ ตระกูลไคโมทริปซิน, ไคโมทริปซินบี และซี, ทริปซินเป็นต้น จัดเป็นพวกเอนโดเปปติเดส ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาคือ pH > 7 (pH7-11) จึงเป็นพวก alkali proteases โดยทั่วไปจะมีความจำเพาะต่อซับเสตรตที่อนุมูลกรดอะมิโนเป็น R_1

2. โปรติเอสซัลไฟดริล (sulfhydryl proteases) ได้แก่ ปาเปนจากมะละกอ และโบรมิเลนจากสับปะรด จัดเป็นเอนโดเปปติเดส มีระดับ pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ที่ pH 6-7.5

3. โปรติเอสมีโลหะ (metal-containing proteases) หมายถึง โปรติเอสที่มีไอออน และโลหะร่วมในปฏิกิริยาการย่อยสลาย คืออยู่ในลักษณะโคแฟกเตอร์ ทำงานได้ดีในช่วง pH กลาง (pH 6.5-7.5) เรียก neutral protease ได้แก่ carboxypeptidases ซึ่งเป็น exopeptidase ตัดสายด้านปลายหมู่คาร์บอกซิล ต้องการไอออนของโลหะคือ Zn^{2+} เป็นต้น

4. โปรติเอสกรด (acid protease) หมายถึง โปรติเอสที่มีช่วง pH ของการทำปฏิกิริยาการย่อยสลายอยู่ในช่วง pH ของกรด (pH<7) โดยทั่วไปจะอยู่ระหว่าง pH 2-4 เช่นเรนนินและเปปซิน

เอนไซม์โปรติเอสที่พบใน hepatopancreas ของกุ้ง ได้แก่ คาร์บอกซีเปปติเดส (carboxy peptidase) เอนไซม์คล้ายทริพซิน (trypsin-like) และคาเทพซินซี (cathepsin-c) ซึ่งนำมาใช้ประโยชน์เป็นตัวช่วยในกระบวนการวินิจฉัยทางการแพทย์ และการผลิตอาหารสัตว์เลี้ยง อย่างไรก็ตามพบว่าเอนไซม์ทำให้เนื้อกุ้งและผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกุ้งมีลักษณะนิ่มเละ มีผลให้ผลิตภัณฑ์มีคุณภาพด้อยลง ได้แก่ เอนไซม์คล้ายทริปซินและคลอลาจีเนสซึ่งถูกหลั่งออกมาจาก hepatopancreas จากตัวกุ้งเอง (Haard, 1994)

มีหลักฐานว่าระบบการย่อย และการดูดซึมอาหารของกุ้งจะแตกต่างจากสัตว์มีกระดูกสันหลัง (Ceccaldi, 1990) ซึ่งเอนไซม์ในระบบย่อยอาหารของกุ้งโดยเฉพาะที่ย่อยโปรตีนค่อนข้างคล้ายปลากลุ่มที่ไม่มีกระเพาะอาหารคือไม่มีเปปซิน แต่มีทริปซินหรือ tyrpsin-like serine protease นับว่ามีปริมาณและบทบาทมาก ทริปซินของกุ้งจะย่อย under maturate protein ขณะที่ทริปซินในสัตว์มีกระดูกสันหลังไม่สามารถย่อยได้ (Dal and Moriarty, 1983) เมื่อไม่นานมานี้ยังพบเอนไซม์ไคโมทริบปซินในกุ้งหลายชนิดซึ่งมีประสิทธิภาพมากและมีความจำเพาะสูง นอกจากนี้ยังพบ

astacine ในกุ้งหลายชนิดแต่ไม่พบในสัตว์มีกระดูกสันหลัง astacine เป็นโปรติเอสที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำจัดเป็น metalloprotease

อาหารที่มีพืชเป็นส่วนประกอบอาจมี antinutrition ที่จะลดประสิทธิภาพในการย่อย เนื่องจากมีสารยับยั้งเอนไซม์ซึ่งจะลดความสามารถของเอนไซม์ที่ใช้ย่อยโปรตีน (Olli *et al.,* 1994) เมื่อประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนลดลงก็จะได้รับกรดอะมิโนน้อยลง ซึ่งกรดอะมิโนมีผลต่อการสังเคราะห์โปรตีน และการเจริญเติบโต ในแหล่งโปรตีนที่มาจากเมล็ดพืชบางชนิดจะมีสารยับยั้งเอนไซม์ย่อยโปรตีน โดยมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ทำให้กุ้งมีอัตราการเจริญเติบโตลดลง (Garcia-Correno, 1990) ในกุ้งตระกูลพีเนียสจะมีการเปลี่ยนแปลงสัณฐาน และพฤติกรรมจากสัตว์กินพืช (herbivore) เป็นสัตว์กินทั้งพืชและสัตว์ (omnivore) การเปลี่ยนแปลงนี้ก็จะเปลี่ยนอัตราการเผาผลาญและกิจกรรมต่างๆ ของเอนไซม์ (Lemos *et al*., 1990) กุ้งในแต่ละระยะก็มีเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่มีลักษณะและปริมาณที่แตกต่างกัน โดย digestive gland ของกุ้งตระกูลพีเนียสจะเป็นบริเวณที่มีการทำงานของเอนไซม์ย่อยโปรตีนสูง (Van Wormhoudt *et al*., 1992) พบว่าเอนไซม์ภายในตัวกุ้งนั้นมาจาก 2 แหล่ง คือ ภายในตัวกุ้ง (endogenous) และ ภายนอกตัวกุ้ง (exogenous) ได้แก่ เอนไซม์ของพวกแบคทีเรียในลำไส้ (normal flora) และเอนไซม์จากลำไส้ของอาหารมีชีวิตที่กุ้งกินเข้าไป (Harris, 1993)

Ezquerra *et al*. (1997) ได้ศึกษาการนำเอนไซม์ที่สกัดจาก hepatopancreas ของกุ้ง เพื่อมาประเมินประสิทธิภาพการย่อยได้ของอาหารกุ้งขาว 7 ตัวอย่างในห้องปฏิบัติการ (in vitro digestibility) พบว่ามีความสัมพันธ์กับการประเมินประสิทธิภาพการย่อยได้ในตัวสัตว์น้ำ (in vivo protein digestibility) เช่นเดียวกับ Lan and Pan (1993) ได้ศึกษาในกุ้งกุลาดำพบว่าระดับความเข้มข้นของไลซีน และอาร์จินีนมีความสัมพันธ์กับการทำ in vitro protein digestion ซึ่งมีทริปซินเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการย่อย แต่การศึกษา in vitro digestibility นั้นมีข้อจำกัดคือควรใช้เอนไซม์ ที่สกัดมาจาก midgut gland ของกุ้งที่ได้รับอาหารเหมือนกัน เพื่อเป็นการยืนยันผลที่ดี (Divakaran *et al .,* 2004)

Lee *et al*. (1984) พบว่าการทำงานของเอนไซม์ย่อยโปรตีนในกุ้ง *P. vannamei* จะเพิ่มมากขึ้น ถ้าคุณภาพและระดับโปรตีนสูงขึ้น แต่ความสัมพันธ์ระหว่างระดับโปรตีน และการทำงานของ เอนไซม์ในกุ้ง *P. setiferus* จะตรงข้ามกับในกุ้ง *P. vannamei* เช่นเดียวกับ Le Moullau *et al*. (1994) พบว่าการทำงานของเอนไซม์ทริปซินในกุ้ง *P. vannamei* ระยะวัยอ่อนจะสูงขึ้นเมื่อระดับโปรตีนในอาหารสูง แต่การทำงานของ เอนไซม์ไคโมทริปซินลดลง สำหรับกุ้งตระกูลพีเนียสนั้นพบว่าเอนไซม์ชนิดแรกที่มีความเข้มข้นสูงและทำงานก่อนคือเอนไซม์อะไมเลส ต่อมาเอนไซม์

โปรติเอสจะค่อย ๆ ทำงานแทนเอนไซม์อะไมเลสในช่วงกลางของระยะวัยอ่อน ซึ่งการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นพร้อมกับการเปลี่ยนแปลงการกินอาหารด้วย

Lemos *et al.* (2000) ศึกษาการทำงานของเอนไซม์ทริปซินในกุ้ง *L . chmitti* พบว่าในระยะไข่ และนอเพลียสจะมีระดับต่ำมาก แต่เพิ่มมากขึ้นในระยะซูเอี้ย 1 แล้วมีปริมาณสูงสุดในระยะซูเอี้ย 3 จากนั้นปริมาณเริ่มลดลงตั้งแต่ไมซิส 1 จนถึงระยะโพสต์ลาวาต้น ลักษณะเช่นนี้ยังพบในกุ้งชนิดอื่นอีกได้แก่ *L. setiferus, P. monodon* รวมถึง *L. vannamei* Lee *et al*. (1984) พบว่าเอนไซม์ของกุ้งมีหลายชนิดที่สามารถย่อยซับสเตรทที่แตกต่างกันได้หลายประเภท ปัจจัยที่มีผลต่อกาทำงานของเอนไซม์ ได้แก่ อาหารที่กุ้งกิน การเปลี่ยนแปลงรูปร่างลักษณะ ขนาดกุ้ง และการเปลี่ยนแปลงในรอบวัน การทำงานของเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีนในกุ้ง *L. vannamei* ลดลงเมื่อมีการเจริญเติบโตมากขึ้น จากการศึกษาพบว่ากุ้งขนาดเล็ก (4 กรัม) จะมีความสามารถใช้โปรตีนได้ดีกว่ากุ้งขนาดใหญ่ (10-20 กรัม) โดยที่คุณภาพของโปรตีนจะมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์

ระบบภูมิคุ้มกันโรคของกุ้ง

กลุ่มครัสเตเชียไม่มีระบบภูมิคุ้มกันโรคแบบเฉพาะเจาะจง (specific immune response) ซึ่งทำหน้าที่โดยแอนติบอดี้ (antibody) แต่การป้องกันตัวของสัตว์น้ำกลุ่มนี้เป็นแบบไม่จำเพาะเจาะจง (non-specific immune response) ซึ่งส่วนใหญ่เกิดจากกิจกรรมของเม็ดเลือด น้ำเลือด และเนื้อเยื่อต่าง ๆ ในร่างกาย (Soderhall และ Cerenius, 1992) ระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งสามารถแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ

1. ระบบภูมิคุ้มกันที่อาศัยเซลล์ (cellular immunity) เซลล์ที่มีบทบาทสำคัญ คือ เซลล์เม็ดเลือด 3 ชนิด คือ ไฮยาลีนเซลล์ (hyaline cell) เซมิกรานูลาร์ (semi granular) และลาร์จกรานูลาร์ (large granular) ที่เป็นอิสระ นอกจากนี้ยังมีเซลล์จับกินที่อยู่กับที่ (fix phagocyte) กระจายอยู่ตามเนื้อเยื่อ เหงือก ต่อมน้ำเหลือง หัวใจ และเนื้อเยื่อเกี่ยวพันต่าง ๆ ซึ่งมีหน้าที่ในการจับกินเชื้อโรค (phagocytic activity) การห้อมล้อม และการกำจัดสิ่งแปลกปลอม (nodule formation and encapsulation) (Sindermann, 1971; Rabin, 1970)

2. ระบบภูมิคุ้มกันน้ำเลือด (humoral immunity) ระบบนี้เกิดจากการทำงานของหลายปฏิกิริยา เช่น การเกิดการแข็งตัวของเลือด (blood clotting) การเกิดเมลานิน (melanin formation) และ opsonization ระบบที่สำคัญ คือ prophenoloxidase activating system และ lectin ซึ่งคอยดักจับสิ่งแปลกปลอม (Sindermann, 1971; Rabin, 1970)

ชนิด และหน้าที่ของเม็ดเลือดในกุ้งทะเล

เซลล์ที่มีบทบาทในระบบภูมิคุ้มกัน คือ เซลล์เม็ดเลือด (hemocyte) ซึ่งมีรายงานครั้งแรกโดย Haeckel ในปี ค.ศ. 1857 และได้จำแนกเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งทะเลออกเป็น 3 ชนิด (Martin and Graves, 1985; Hose *et al*., 1990; Vargas-Albores, 1995) โดยการมีหรือไม่มี จำนวน ขนาด การย้อมสี และโครงสร้างของแกรนูลภายในไซโตพลาสซึมเป็นหลัก ได้แก่

1. Hyaline cells (non-granular cells, hyalinocyte หรือ hyalocytes) เป็นเซลล์เม็ดเลือดที่มีขนาดเล็กที่สุด รูปร่างกลมแบน ผิวเรียบ ไม่มีแกรนูล นิวเคลียสขนาดใหญ่อยู่กลางเซลล์ มีขอบเขตของไซโตพลาสซึมน้อย มีหน้าที่ phagocytosis สิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาในร่างกาย (Soderhall and Smith, 1992)

2. Semi-granular cells (semigranulocyte) มีลักษณะกึ่งกลางระหว่าง hyaline cell และ granualocyte มีรูปร่างเป็นรูปไข่หรือรูปกระสวย ขนาดของเซลล์มีความกว้าง 4.2-6.8 ไมครอน ยาว 9.0-14.2 ไมครอน (กิจการ และคณะ 2543ข) นิวเคลียสมีขนาดเล็กตรงกลางเซลล์ หรือขอบเซลล์ ภายในไซโตพลาสซึมมีแกรนูลขนาดเล็ก ลักษณะเซลล์ไม่แน่นอนมักแตกสลายตัวได้ง่ายเป็นเม็ดเลือดที่ทำหน้ารับรู้ และมีปฏิกิริยาตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมในการสร้าง nodule formation และ encapsulation รวมทั้ง phenoloxidase activating system (Soderhall and Smith, 1992)

3. Granular cell (granulocyte) เซลล์ชนิดนี้มีขนาดใหญ่ที่สุด รูปร่างเป็นรูปไข่ นิวเคลียสมีขนาดเล็กรูปร่างโค้งคล้ายไต เส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์ 8-10 ไมครอน กว้าง 7.2-7.8 ไมครอน ยาว 12.2-14.6 ไมครอน (กิจการ และคณะ 2543ข) ภายในไซโตพลาสซึมมีแกรนูลขนาดใหญ่ เมื่อเทียบกับ semigranulocyte มีหน้าที่หลักในการทำงานในระบบ phenoloxidase activating system (Soderhall and Smith, 1986)

เม็ดเลือดทั้ง 3 ชนิดจะไหลไปกับน้ำเลือดทั่วร่างกาย และทำหน้าที่เกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันเท่านั้น (Fatchiffe *et al*., 1985) เม็ดเลือดจะเพิ่มจำนวนมาทดแทนส่วนที่แก่ และตายไปจากเนื้อเยื่อที่สร้างเม็ดเลือด (hemopoietic tissue) ในกุ้งพบตรงตำแหน่งด้านบนของกระเพาะอาหาร และโคนขาเดินโดยอยู่เป็นกลุ่มในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน และอยู่ใกล้แอ่งเลือด ในน้ำเลือดจะมีรงควัตถุที่เรียกว่า hemocyanin ทำหน้าที่ในการแลกเปลี่ยนก๊าซ

1. ระบบภูมิคุ้มกันที่อาศัยเซลล์ (cellular immunity)

1.1 กระบวนการกลืนกินทำลาย (Phagocytosis)

Phagocytosis เป็นกระบวนการที่สำคัญของเม็ดเลือดในการทำลาย หรือลบล้างสิ่งแปลกปลอมทั้งที่มีชีวิต และไม่มีชีวิตที่บุกรุกเข้าไปในร่างกายซึ่งเป็นแบบไม่จำเพาะเจาะจง (McKay and Jendin, 1970) ขั้นตอนในการกลืนกินจะมีลักษณะเช่นเดียวกับสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง (Fatchiffe *et al*., 1985) เริ่มจากการยึดกันระหว่างสิ่งแปลกปลอมกับผิวของเซลล์ หลังจากนั้นผิวของเซลล์จะเว้าเข้าไปเกิดเป็น phagosome และจะสัมผัสกับ lysosome ที่อยู่ภายในเซลล์เกิดเป็น phagolysosome ซึ่งภายในไลโซโซมจะบรรจุเอนไซม์หลายชนิดย่อยสลายเรียกว่า acid hydrolases ซึ่งรวมถึงเอนไซม์ DNase, RNases, proteases, phophatases และ lipase ที่สามารถไปลดขนาดของโมเลกุลสิ่งแปลกปลอมทั้งหลายให้เหลือเป็นหน่วยย่อย ๆ และมีการแตกตัวของออกซิเจน (oxygen burst) ออกซิเจนเหล่านี้จะถูกรีดิวซ์เป็น superoxide anion (O_2^-) ด้วย NADPH ต่อจากนั้นจะถูกเปลี่ยนเป็น hydrogen

peroxide (H_2O_2) ซึ่งการแตกตัวของออกซิเจนสามารถผลิตออกซิเจนในรูปแบบที่เป็นพิษ จำนวนโมเลกุลทั้งหมดมีความสามารถในการเกิดปฏิกิริยา และมีการทำลายอนุภาคภายใน Phagolysosome โดยกลไกทางเคมีอย่างไม่จำเพาะเจาะจง หลังจากย่อยสลายแล้วก็จะปล่อยส่วนที่ถูกทำลายแล้วออกมาจากเซลล์ (Klein, 1982)

การเพิ่มจำนวนอิเล็กตรอนโดยมี NADPH เป็นตัวให้อิเล็กตรอนทำให้เกิดอนุภาคต่าง ๆ

Superoxide : $O_2 + e^- \longrightarrow O_2^-$

Hydrogen peroxide : $O_2^- + e^- + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2$

Hydroxyl radicle : $H_2O_2 + e^- + H^+ \longrightarrow OH^- + H_2O$

1.2 Nodule formation และ Encapsulation

ในกรณีที่สิ่งแปลกปลอมมีจำนวนเพิ่มขึ้นมาก หรือมีขนาดใหญ่เกินกว่าเม็ดเลือดที่ไม่สามารถใช้กระบวนการ phagocytosis จะเกิดการรวมกลุ่มกันของเม็ดเลือด จนทำให้เกิดเป็น nodule ล้อมรอบสิ่งแปลกปลอมเพื่อไม่ให้กระจายไปทั่วร่างกาย ซึ่งมีประสิทธิภาพในการจำกัดขอบเขตของการแพร่กระจายของเชื้อโรคได้มาก โดย nodule formation จะเกิดเมื่อสิ่งแปลกปลอมนั้นเข้ามาเป็นจำนวนมาก ส่วน encapsulation จะเกิดขึ้นเมื่อสิ่งแปลกปลอมนั้นมีขนาดใหญ่ Persson และ Soderhall (1987) รายงานว่า semigranulocyte เป็นกลุ่มแรกที่เข้าเรียงตัวล้อมรอบสิ่งแปลก ปลอมที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางใหญ่กว่า 10 ไมครอน ทำให้เกิดเป็นรูปร่างคล้ายแคปซูล

2. ระบบภูมิคุ้มกันในน้ำเลือด (Humoral immunity)

2.1 การแข็งตัวของเลือด (hemolymph clotting)

การแข็งตัวของเลือดเป็นปฏิกิริยาที่สำคัญทั้งในสัตว์มีกระดูกสันหลัง และไม่มีกระดูกสันหลังเพื่อที่ป้องกันการสูญเสียเลือดจากบาดแผล และป้องกันการติดเชื้อโรคผ่านบาดแผล เกิดขึ้นโดยเม็ดเลือดชนิด hyaline cell จะปลดปล่อยสารเคมีออกมา แล้วไปกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของ coagulogen ซึ่งเป็นสารที่ทำให้เกิดการจับตัวเป็นก้อน โดยเป็นโปรตีนหลักเกี่ยวกับการแข็งตัวของเลือดซึ่งอยู่ในน้ำเลือดของครัสเตเซียนหลายชนิด Martin *et al*. (1985) รายงานว่าการที่เลือดไม่สามารถแข็งตัวได้ อาจเกิดมาจากการที่เม็ดเลือดชนิด hyaline cell มีปริมาณลดลงจากการติดเชื้อแบคทีเรีย

2.2 Phenoloxidase activation system

เป็นระบบที่สำคัญมากในการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง เป็นการทำลายเชื้อโรคและควบคุมการกระจายของเชื้อโรคภายในตัวกุ้ง ซึ่งเป็นระบบภูมิคุ้มกันที่สำคัญ โดยมีเอนไซม์ phenoloxidase (PO) ที่อยู่ในรูป pro-enzyme ที่เรียกว่า prophenoloxidase (proPO) และเอนไซม์ในกลุ่มเซอรีนโปรติเอส โดยจะทำงานร่วมกันอย่างมีระบบ (Leonard *et al*., 1985; Soderhall *et al*., 1994) กระบวนการที่สำคัญของระบบนี้เริ่มจาก prophenoloxidase เปลี่ยนเป็น phenoloxidase จะไปออกซิไดซ์สารกลุ่มฟีนอล (phenol) ให้เป็นสารประกอบควิโนน (quinone) แล้วเปลี่ยนไปเป็นเมลานินได้ในที่สุด หน้าที่ของเมลานินจะช่วยในการยับยั้งหรือป้องกันการเจริญ เติบโตของเชื้อแบคทีเรีย สารต่อต้านแบคทีเรีย (antibacterial substance) เป็นสารประกอบขั้นสุด ท้ายที่ได้จากกระบวนการนี้ (Hose *et al*., 1987)

2.3 สารออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (Bactericidin)

Bactericidin พบได้ในส่วนของพลาสมา ซีรั่ม และในสารละลาย HLS (hemocyte lysate supernatant) สามารถถูกชักนำให้สูงขึ้นเมื่อได้รับสารกระตุ้น ไม่ทนความร้อน และมีความจำเพาะต่อเชื้อบางชนิด (ชัยชาญ, 2545)

2.4 Agglutinin

พบโดยธรรมชาติในน้ำเลือดของครัสเตเซียน นอกจากจะเป็นสารก่อให้เกิดการจับตัวของสิ่งแปลกปลอมแล้วยังมีหน้าที่เป็น opsonin กระตุ้นกระบวนการ phagocytosis ในการป้องกันสิ่งแปลกปลอมของเซลล์ด้วย (Vargas-Albores, 1995)

2.5 Cytokine-like factors

Cytokine-like factors มีหน้าที่ช่วยรักษาความสมดุลย์ของเลือดในระบบภูมิคุ้มกัน และช่วยในการประสานงานระหว่างระบบภูมิคุ้มกันกับระบบอื่น ๆ ในร่างกาย cytokine-like factors ในกุ้งได้แก่ โปรตีนขนาด 76 kDa ซึ่งมีหน้าที่ช่วยกระตุ้นกระบวนการ phagocytosis ช่วยในการยึดติดระหว่างเซลล์เม็ดเลือดกับสิ่งแปลกปลอมขณะเกิดการห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอม (Smith and Chisholm, 1992) นอกจากนี้ยังส่งเสริมการทำงานของ prophenoloxidase โดยช่วยเซลล์เม็ดเลือดชนิด semi granular และ large granular เกิด degranulation มากขึ้น ทำให้เอนไซม์ในระบบ prophenoloxidase ถูกปล่อยออกมามากขึ้น (Johansson และ Soderhall, 1989)

Sung *et al*. (1996) พบว่า prophenoloxidase ของกุ้งกุลาดำ กุ้งก้ามกราม และกุ้งขาว ส่วนใหญ่จะอยู่ในไซโตพลาซึมของเม็ดเลือดทั้ง semigranulocyte และ granylocyte นอกจากนี้แล้ว ยังพบเอนไซม์ชนิดนี้แพร่กระจายอยู่ในเนื้อเยื่อหลายส่วนของตัวกุ้ง และจากการศึกษาของกิจการ และคณะ (2543ก) พบว่าความว่องไวของเอนไซม์ phenoloxidase จากเม็ดเลือด และน้ำเลือดกุ้งกุลาดำมีค่าแตกต่างกัน โดยในเม็ดเลือดจะมีปริมาณค่อนข้างสูง และในน้ำเลือดจะมีปริมาณต่ำ

ในกุ้งมีโปรตีนที่จะจดจำ และเข้าจับสิ่งแปลกปลอมได้แก่ lipopolysaccharide binding protein (LPBP) และ B-glucan binding protein (BGBP) (Vargas-Albores และ Vepiz-Plascencia, 2000) ส่วน clotting protein จะทำหน้าที่ในการโอบล้อมสิ่งแปลกปลอมที่บุกรุก และป้องกันการสูญเสียเลือดจากบาดแผล (Hall *et al*., 1999) กระบวนการป้องกันตัวของกุ้งที่เรียกว่า melanization ซึ่งเกิดจากการทำหน้าที่ของ proPO จนได้สาร melanin (Soderhall, 2000) และการทำงานร่วมกับโปรตีนอื่น ๆ antimicrobial peptides ถูกสร้างขึ้นเพื่อต่อต้านการบุกรุกของแบคทีเรียแกรมลบ นอกจากนี้ยังมี hemocyte (Hc) เป็นส่วนของโปรตีนที่มีหน้าที่มากมายทั้งทางด้านสารอาหาร และระบบภูมิคุ้มกัน (Chen และ Cheng, 1995) แล้วยังเป็นสารตั้งต้นของ proPO-like enzyme (Adachi *et al*., 2003)

Adachi *et al*. (2003) รายงานว่าออกซีฮีโมไซท์ (OxyHc) มีความสัมพันธ์กับระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง โดยมีผลมาจากโภชนะและแหล่งโปรตีนในอาหาร ถ้ากุ้งได้รับอาหารที่มีระดับโปรตีนไม่เหมาะสม (nutritional stress) จะทำให้ปริมาณเม็ดเลือดน้อยลง ส่งผลให้ระบบภูมิคุ้มกันมีประสิทธิภาพลดลง Cristina *et al*. (2004b) ศึกษาผลของการใช้อาหารที่ระดับโปรตีนต่างกัน (40, 15 และ 5%) ต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง *P. vannamei* พบว่า กุ้งที่ให้อาหารระดับโปรตีน 40 DP/kg. มีปริมาณเม็ดเลือกมาก แต่กุ้งที่ได้รับอาหารระดับโปรตีน 15 DP/kg. มี proPO มากกว่า แสดงว่ากุ้งสามารถเพิ่มระดับภูมิคุ้มกันเพื่อตอบสนองต่อการมีปริมาณเม็ดเลือดน้อย เมตาบอไลท์ต่าง ๆ ในเลือด และระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวระยะรุ่น ที่ให้อาหารระดับคาร์โบไฮเดรตต่างกัน คือ 3% และ 44% (โปรตีน 65% และ 34% ตามลำดับ) พบว่ากุ้งที่ให้อาหารที่มีระดับคาร์โบไฮเดรต 3% จะมีค่าต่าง ๆ ในระบบภูมิคุ้มกัน (proPO, Hemocyte cell, ProPO/granular cell) สูงกว่ากุ้งที่ให้อาหารที่มีระดับคาร์โบไฮเดรต 44% ($p< 0.05$) (Cristina *et al*., 2004a)

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ลูกกุ้งขาวระยะโพสต์ลาวา 15
2. บ่อทดลองขนาด 50 ตารางเมตร จำนวน 16 บ่อ
3. ระบบลม และเครื่องให้อากาศ
4. น้ำเค็ม และสารต่างๆ ที่ใช้ในการเตรียมน้ำ
5. อุปกรณ์ต่างๆ ที่ใช้สำหรับการเลี้ยงกุ้ง
6. อาหารทดลอง ที่มีระดับโปรตีน 5 ระดับ คือ 24, 28, 32, 36 เปอร์เซนต์
7. อุปกรณ์ และสารสำหรับวิเคราะห์คุณภาพน้ำ
8. ชุดเครื่องมือ และสารสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน
9. ชุดเครื่องมือ และสารสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณไขมัน
10. ชุดเครื่องมือ และสารสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณใยอาหาร
11. ชุดเครื่องมือ และสารสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณเถ้า
12. ชุดเครื่องมือ และสารสำหรับวิเคราะห์ปริมาณ RNA/โปรตีน
13. ชุดเครื่องมือ และสารสำหรับวิเคราะห์เอนไซม์โปรติเอส
14. ชุดเครื่องมือ และสารสำหรับวิเคราะห์ประสิทธิภาพการย่อยในห้องปฏิบัติการ
15. ชุดเครื่องมือ และสารเคมีสำหรับตรวจสอบระบบภูมิคุ้มกันกุ้งขาว

วิธีการ

1. แผนการทดลอง

การทดลองเป็นแบบสุ่มตลอด (completely randomized design : CRD) เพื่อศึกษาระดับโปรตีนที่ต่างกันในอาหารกุ้งที่มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโต การใช้ประโยชน์จากอาหาร ระดับกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสในทางเดินอาหาร ประสิทธิภาพการย่อยอาหารในห้องปฏิบัติการ (in vitro protein digestibility) อัตราส่วนการสังเคราะห์ RNA ต่อโปรตีนในกล้ามเนื้อ ระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง รวมถึงกรดอะมิโนในกุ้งขาว แบ่งการทดลองเป็น 4 ชุด (treatment) ในแต่ละชุดการทดลองมี 4 ซ้ำ (replicate) เริ่มทดลองจากกุ้งวัยอ่อนระยะโพสต์ลาวา 15 เป็นเวลา 100 วัน (ความหนาแน่นในการปล่อยลูกกุ้ง คือ 100 ตัว/ตารางเมตร) ทำการทดลองในบ่อขนาด 50 ตารางเมตรที่ปูด้วยพลาสติกดำ (PE) ทั่วทั้งบ่อ จำนวน 16 บ่อ

ระดับโปรตีนในอาหารมี 4 ระดับคือ 24, 28, 32 และ 36% โดยมีอัตราส่วนระหว่างโปรตีนจากสัตว์ และโปรตีนจากพืชในอัตราส่วน 60 : 40 แบ่งชุดการทดลองดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 วันที่ 1-100 ให้อาหารที่มีระดับโปรตีน 36%

ชุดการทดลองที่ 2 วันที่ 1-50 ให้อาหารที่มีระดับโปรตีน 36% วันที่ 51-100 ให้ระดับโปรตีน 32%

ชุดการทดลองที่ 3 วันที่ 1-50 ให้อาหารที่มีระดับโปรตีน 36% วันที่ 51-100 ให้ระดับโปรตีน 28%

ชุดการทดลองที่ 4 วันที่ 1-50 ให้อาหารที่มีระดับโปรตีน 36% วันที่ 51-100 ให้ระดับโปรตีน 24%

ตารางที่ 5 การให้อาหารระดับโปรตีน (%) ที่ต่างกันในแต่ละชุดการทดลอง

ชุดการทดลอง	ให้อาหารระดับโปรตีน (%)	
	อายุกุ้ง 1 - 50 วัน	อายุกุ้ง 51 - 100 วัน
1	36	36
2	36	32
3	36	28
4	36	24

2. การเตรียมบ่อ และน้ำสำหรับการเลี้ยง

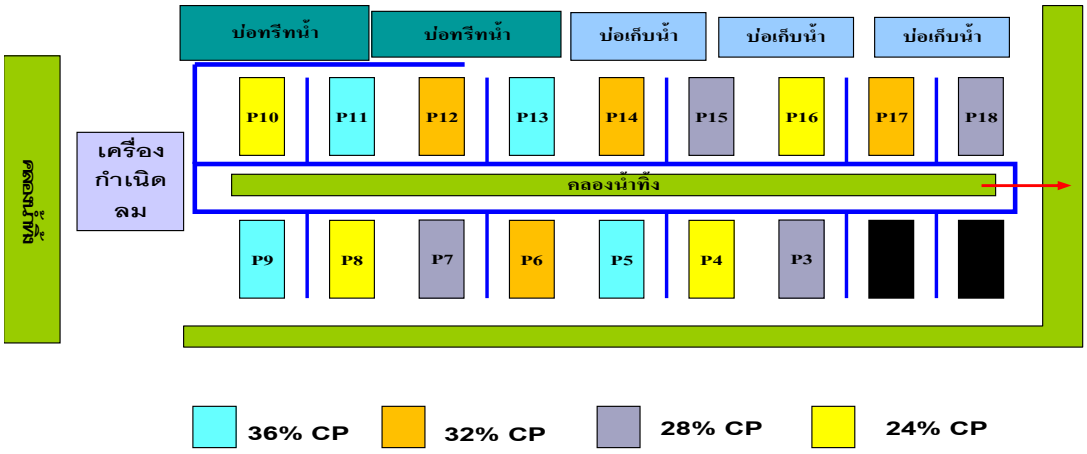
2.1 การเตรียมบ่อเลี้ยง

1. ทำความสะอาด ตากบ่อให้แห้ง
2. กำจัดพาหะภายในและบริเวณบ่อเลี้ยง
3. กำจัดปูโดยการจับออก ใช้เหยื่อล่อหรือวางเหยื่อผสมยาเบื่อ (ซันเทอเร็กซ์)
4. กำจัดหอยเจดีย์โดยการเก็บออกให้ได้มากที่สุด
5. กำจัดพาหะก่อโรคภายในฟาร์ม เช่น ปู นก หนู
6. ตรวจเช็คความพร้อมของบ่อ
7. ติดตั้งระบบให้อากาศ

2.2 การเตรียมน้ำและทำสีน้ำ

1. สูบน้ำเข้าบ่อจนได้ระดับ 100 เซนติเมตร โดยผ่านถุงกรองน้ำไนล่อนสีฟ้า เบอร์ 26
2. เปิดเครื่องตีน้ำทิ้งไว้ 2 วัน เพื่อให้ไข่ปลาและพาหะต่าง ๆ ฟักเป็นตัว
3. กำจัดพาหะในน้ำด้วยซันเทอร์เร็กซ์ ความเข้มข้น 2 พีพีเอ็ม หลังลงซันเทอร์เร็กซ์เปิดเครื่องตีน้ำ 4-6 ชั่วโมง ให้ซันเทอร์เร็กซ์กระจายทั่วบ่อ
4. การทำสีน้ำในบ่อเลี้ยง ใช้วัสดุปูน 25 – 50 กิโลกรัม/ไร่ ทุกวัน วัดค่าอัลคาไลน์ประกอบโดยต้องมีค่าไม่ต่ำกว่า 100 พีพีเอ็ม และสร้างอาหารธรรมชาติ

ภาพที่ 3 บ่อทดลองขนาด 50 ตารางเมตร ปูด้วยพลาสติกดำ (PE) ทั่วทั้งบ่อ



ภาพที่ 4 แผนผังบ่อทดลอง (P = บ่อที่)

3. การเตรียมอาหารทดลอง

อาหารเม็ดที่ใช้ทดลองทั้ง 4 สูตร มีระดับโปรตีนที่กำหนด คือ 36, 32, 28 และ 24% โดยมีอัตรา ส่วนระหว่างโปรตีนจากสัตว์ และโปรตีนจากพืชในอัตราส่วน 60 : 40 สำหรับอาหารทั้ง 4 สูตร หลังจากผลิตอาหารทดลองที่มีระดับโปรตีนดังกล่าวแล้ว จึงนำอาหารทดลองแต่ละสูตรไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีเพื่อทราบถึงปริมาณโปรตีน และพลังงานที่ได้จากการวิเคราะห์ให้ใกล้เคียงกับค่าที่คำนวณโดยมีขั้นตอน และการวิเคราะห์ตามวิธีการของ AOAC (2000) ดังนี้

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน	ด้วยวิธี Kjeldahl
การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน	ด้วยวิธี ether extraction
การวิเคราะห์ปริมาณไฟเบอร์	ด้วยวิธี acid – alkali digestion
การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า	ด้วยวิธี muffle furnace combustion
การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น	ด้วยวิธี oven – drying

ปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ย่อยได้ Nitrogen free extract (NFE) คำนวณจากสูตร

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

ค่าพลังงานรวมของอาหาร คำนวณจากสูตร (NRC, 1993)

GE (kcal/kg) = (%โปรตีนx5.7) + (%ไขมันx9.3) + (%คาร์โบไฮเดรตx4.2)

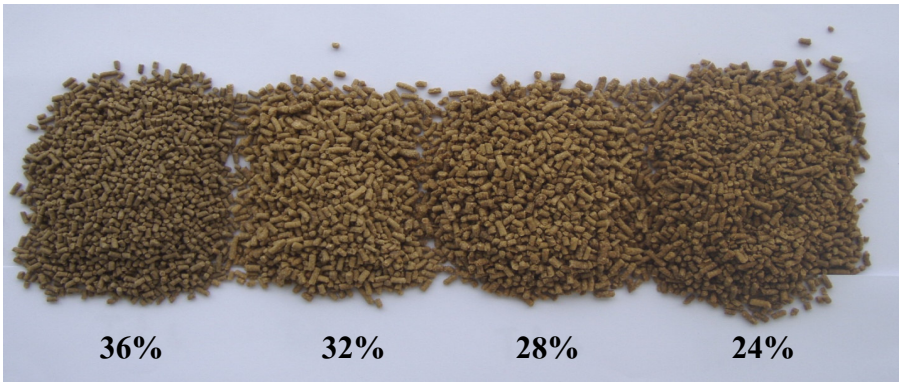
หรือ DE (kcal/kg) = (%โปรตีนx3.5) + (%ไขมันx8) + (%NFEx1.5)

ตารางที่ 6 ส่วนประกอบ (เปอร์เซ็นต์) ของอาหารทดลองที่มีระดับโปรตีนต่างกัน 4 ระดับ

องค์ประกอบวัตถุดิบ	สูตรอาหารทดลอง (กรัม / อาหาร 100 กรัม)			
	36%	32%	28%	24%
ปลาป่น	24.20	19.00	16.00	11.60
หัวกุ้งป่น	10.00	10.00	10.00	10.00
กากถั่วเหลือง	20.00	16.00	10.00	6.50
แป้งสาลี	38.50	37.50	42.50	53.00
รำละเอียด	0	10.00	13.00	10.00
น้ำมัน*	4.10	4.30	4.30	4.70
คลอรีนคลอไรด์ 60%	0.60	0.60	0.60	0.60
วิตามิน และแร่ธาตุรวม**	2.00	2.00	2.00	2.00
โมโนโซเดียมฟอสเฟต	0.60	0.60	0.60	0.60
หินฝุ่น	0	0	1.00	1.00

หมายเหตุ * น้ำมันประกอบด้วยน้ำมันปลาและเลซิติน อัตราส่วน 1:1

** วิตามิน และแร่ธาตุรวม 1 กิโลกรัม ประกอบด้วย วิตามินเอ 12 กรัม/กิโลกรัม วิตามินอี 300 กรัม/กิโลกรัม วิตามินเค 80 กรัม/กิโลกรัม วิตามินบี 1 100 กรัม/กิโลกรัม วิตามินบี 2 80 กรัม/กิโลกรัม วิตามินบี 6 100 กรัม/กิโลกรัม วิตามินบี 12 0.05 กรัม/กิโลกรัม กรดโฟลิค 20 กรัม/กิโลกรัม นิโคตินิค 100 กรัม/กิโลกรัม ไบโอติน 1.5 กรัม/กิโลกรัม กรดเพนโทเธนิค 100 กรัม/กิโลกรัม อินโนซิทอล 15 กรัม/กิโลกรัม วิตามินซี 500 กรัม/กิโลกรัม แมงกานีสซัลเฟต 0.02 กรัม/กิโลกรัม คอปเปอร์ซัลเฟต 0.035 กรัม/กิโลกรัม ซีลีเนียม 0.0002 กรัม/กิโลกรัม



ภาพที่ 5 อาหารทดลอง 4 สูตรที่ระดับโปรตีนต่างกัน

ตารางที่ 7 องค์ประกอบทางเคมี (ปอร์เซ็นต์) ของอาหารทดลองที่มีระดับโปรตีนต่างกัน 4 ระดับ

องค์ประกอบทางเคมี	อาหารระดับโปรตีน (%)			
	36	32	28	24
โปรตีน	36.00	32.90	28.20	25.40
ไขมัน	5.43	6.35	6.28	6.30
ความชื้น	9.32	9.37	8.69	8.64
ไฟเบอร์	2.11	3.50	3.62	3.40
เถ้า	10.33	10.40	9.66	8.44
NFE	36.81	37.48	43.55	47.82
พลังงานรวม (kcal/g)	5.02	5.12	5.12	4.98

4. สภาวะการทดลอง

4.1 การให้อาหาร

เริ่มให้ในอัตรา 1 กิโลกรัม/กุ้ง 10^5 ตัว จากนั้นจะเพิ่มอีก 100 กรัมในสัปดาห์ต่อๆไป เมื่ออายุครบ 1 เดือน จะปรับอาหารที่ให้โดยการเช็คยอแต่ละบ่อทดลอง ให้อาหารวันละ 5 มื้อ

4.2 การจัดการคุณภาพน้ำ

4.2.1 มีการให้ออกซิเจนตลอดเวลาโดยการติดตั้ง air lift และหัวทรายในแต่ละบ่อ โดยมีซูเปอร์ชาร์จเป็นเครื่องกำเนิดลม

4.2.2 ระหว่างการเลี้ยงตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำดังนี้ ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ, ความเป็นกรด-ด่าง และอุณหภูมิจะทำการวัดทุกวัน วันละ 2 ครั้ง ที่เวลา 6:00 และ 14:00 ส่วนค่าความเป็นด่าง, ความกระด้าง และสารประกอบไนโตรเจนต่าง ๆ จะทำการตรวจสอบอาทิตย์ละ 1 ครั้ง

ตารางที่ 8 วิธีการวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

พารามิเตอร์	หน่วย	วิธีวิเคราะห์
ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ (DO)	mg/l	เครื่องวัดออกซิเจน
ความเป็นกรดเป็นด่าง (pH)		pH meter
อุณหภูมิ (temperature)	^{O}C	Thermometer
ความเป็นด่าง (alkalinity)	mg/l	Tritation method
ความกระด้าง (hardness)	mg/l	EDTA Tritation method
แอมโมเนีย (total ammonia)	mg/l	Koroleff's indophenol blue
ไนไตรท์ (nitrite)3	mg NO_2-N/l	diazotization

5. ศึกษาการเจริญเติบโต และการใช้ประโยชน์อาหาร

5.1 ทำการบันทึกน้ำหนักกุ้งขาวทุก ๆ สัปดาห์ เริ่มต้นสัปดาห์ที่ 2 -14 โดยการสุ่มกุ้งในแต่ละบ่อ (จำนวนไม่ต่ำกว่า 100 ตัว/บ่อ)

5.2 จำนวนกุ้งเริ่มต้น และสิ้นสุดการทดลอง พร้อมทั้งบันทึกปริมาณอาหารที่ให้แล้วนำข้อมูลคำนวณหาค่าต่าง ๆ ดังนี้

น้ำหนักเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (weight gain, WG)

$$WG\ (g) = W_2 - W_1$$

W_1 = น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งเมื่อเริ่มการทดลอง (กรัม)

W_2 = น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (กรัม)

น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นเฉลี่ยต่อวัน (average daily weight gain, ADG)

$$ADG\ (g/day) = \frac{W_2 - W_1}{\text{ระยะเวลาการทดลอง}}$$

อัตราการรอดตาย (%SR)

$$SR = \frac{\text{จำนวนกุ้งเมื่อสิ้นสุดการทดลอง}}{\text{จำนวนกุ้งเมื่อเริ่มทดลอง}} X\ 100$$

5.3 ก่อนและสิ้นสุดการทดลองนำกุ้งขาวมาวิเคราะห์โภชนะดังนี้ โปรตีน ไขมัน ความชื้น กาก และเถ้า (AOAC, 2000) นำมาคำนวณค่าต่าง ๆ ดังนี้

อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (feed conversion ratio, FCR)

$$FCR = \frac{\text{น้ำหนักอาหารที่กิน}}{\text{น้ำหนักกุ้งที่เพิ่มขึ้น}}$$

ประสิทธิภาพของโปรตีนในอาหาร (protein efficiency ratio, PER)

$$PER = \frac{\text{น้ำหนักกุ้งที่เพิ่มขึ้น}}{\text{น้ำหนักของโปรตีนที่กิน}}$$

โปรตีนในอาหารที่เก็บอยู่ในตัวกุ้ง (protein retention, PR)

$$PR\ (\%) = \frac{[\ W_2 X P_2\ ] - [\ W_1 X P_1\ ]\ X\ 100}{P}$$

W_1 = น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งเมื่อเริ่มการทดลอง (กรัม)

W_2 = น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (กรัม)

P = น้ำหนักโปรตีนในอาหารที่กุ้งกิน

P_1 = ร้อยละโปรตีนในกุ้งขาวเมื่อเริ่มการทดลอง

P_2 = ร้อยละโปรตีนในกุ้งขาวเมื่อสิ้นสุดการทดลอง

พลังงานในอาหารที่เก็บอยู่ในตัวกุ้งขาว (energy retention, ER)

$$ER\ (\%) = \frac{[\ W_2 \times E_2\ ] - [\ W_1 \times E_1\ ] \times 100}{E}$$

W_1 = น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งเมื่อเริ่มการทดลอง (กรัม)

W_2 = น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (กรัม)

E = พลังงานรวมในอาหารที่กุ้งกิน

E_1 = ร้อยละพลังงานในตัวกุ้งเมื่อเริ่มการทดลอง

E_2 = ร้อยละพลังงานในตัวกุ้งเมื่อสิ้นสุดการทดลอง

6. ศึกษากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสในทางเดินอาหาร

6.1 นำกุ้งขาวมาสกัดเอนไซม์ (crude enzyme extract) ตามวิธี Villasante *et al.* (1999) เพื่อมาวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส (protease) ทางเดินอาหารโดยการเก็บ hepatopancreasมาบดให้ละเอียดโดยใช้ homogenizer ใน Tris-HCl buffer ความเข้มข้น 50 Mm พีเอช 7.5 จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้มาเข้าเครื่อง centrifuge ที่ความเร็วรอบ 15,000 g ที่ 4 องศาเซลเซียส เก็บเฉพาะส่วนที่เป็นของเหลวด้านบน (supernatant) ไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

6.2 ศึกษากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส ในสภาพการเปลี่ยนแปลงพีเอช ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Villasante *et al.*(1999) ดังนี้ เตรียมซับสเตรต คือ azocasein ความเข้มข้น 2% ในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 6,7 และ 8 เริ่มต้นด้วยการเติมเอนไซม์ที่สกัดได้ปริมาตร 20 ไมโครลิตรใน azocasein ความเข้มข้น 2% ที่เตรียมไว้แต่ละพีเอชปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมในหลอดทดลอง บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม TCA (trichloroacetic acid) ความเข้มข้น 10 % ปริมาตร 1.2 มิลลิลิตร แล้วนำเข้าเครื่อง centrifuge ที่ความเร็วรอบ 15000 g เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นวัดกิจกรรมเอนไซม์ด้วยเครื่อง
สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่นแสง 440 นาโนเมตร

7. ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยอาหารในห้องปฏิบัติการ

เติมเอนไซม์ที่สกัดจาก hepatopancreas 0.5 มิลลิลิตร ในอาหารที่ preincubate ไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำส่วนที่ถูกย่อยปริมาตร 1 มิลลิลิตร หยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ด้วยอุณหภูมิ

100 องศาเซลเซียส ส่วนชุดควบคุมทำเช่นเดียวกันแต่ไม่มีการเติมเอนไซม์สกัด จากนั้นนำ digested mixture และ undigested control เติม 50 mM phosphate buffer, pH 8.2 ปริมาตร 40 มิลลิลิตร กับ 0.1% TNBS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าและบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง (ที่มืด) เติม 1 N HCl ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา จากนั้นนำไปวัดที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร

8. ศึกษาการสังเคราะห์ RNA ต่อโปรตีนในกล้ามเนื้อ

เมื่อสิ้นสุดการทดลอง วิเคราะห์หาอัตราส่วนการสังเคราะห์ RNA ต่อโปรตีน เพื่อนำข้อมูลมาประเมินการเจริญเติบโตของกล้ามเนื้อกุ้ง ตามวิธีการของ Sunde *et al.* (2001) บดตัวอย่างกุ้งขาว ชั่ง 50-100 มิลลิกรัม เติม TRIzol reagent แล้วย่อยตัวอย่างด้วย sonicator จนสารละลายผสมเข้ากันดี บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที เติมคลอโรฟอร์มนำไป centrifuge จากนั้นจะได้สารละลายแยกออกเป็น 3 ส่วน ส่วนบนสุดเป็นชั้นของ RNA ส่วนล่างสุดเป็นโปรตีน ปิเปตส่วน RNA และโปรตีนแยกเป็นสองส่วน ตกตะกอนด้วยไอโซโพรพานอล นำไป Centifuge จะได้ Pellet ออกมา เติม 90% ethanol ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง

ส่วนที่ 1 RNA เก็บ Pellet แล้วนำไปอบแห้ง 10 นาที เติม NaAc อบต่ออีก 10 นาที จากนั้นเติม NaAc 1:10 (RNA : NaAc) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร

ส่วนที่ 2 โปรตีน นำไป centrifuge แล้วล้างออกด้วย ethanol ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนำไป centrifuge อีก 10 นาที เก็บ Pellet แล้วอบที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 20 นาทีเติม 1% SDS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปอบแห้ง 100 นาที เติม SDS 1:3 (protein : SDS) วัดที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

9. ระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง

ทำการศึกษาระดับภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่มีระดับโปรตีนต่าง ๆ กัน ที่อายุกุ้ง 60 และ 100 วัน เจาะเลือดจาก ventral sinus ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตรด้วยเข็มฉีดยา ซึ่งภายในบรรจุสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (anticoagulant) ในอัตราส่วน 1:2 นำเลือดที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณเม็ดเลือดรวม (total hemocyte count) และการหา Superoxide anion production

1. การตรวจนับปริมาณเม็ดเลือดกุ้งขาว (total hemocytes count)

นำเลือดที่เจาะได้มาตรวจนับเม็ดเลือดโดยใช้ hemacytometer และคำนวณปริมาณเม็ดเลือดเป็นจำนวนเซลล์/ลูกบาศก์มิลลิตร

2. การหา Superoxide anion production

เก็บตัวอย่างเลือดกุ้งใส่ลงใน microplate ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เติม MHBSS 50 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง จากนั้นดูดส่วนใสทิ้ง แล้วหยด 0.3% NBT working solution 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 อุณหภูมินาน 1 ชั่วโมง แล้วดูด 0.3% NBT working solution ทิ้ง เติม absolute methanol 200 ไมโครลิตรแล้วดูดทิ้ง จากนั้นหยอด 70% เมธานอลแล้วดูดทิ้ง 2 ครั้ง หลังจากดูดทิ้งครั้งสุดท้ายแล้วปล่อยให้หลุมที่มีตัวอย่างแห้ง เติม 2M KOH 120 ไมโครลิตร และ DMSO 140 ไมโครลิตร นำไปเขย่าด้วยเครื่อง microplate shaker ให้สารละลายเข้ากัน นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 620 nm. ด้วยเครื่อง ELISA reader ใช้โปรแกรมการวัดแบบ absorbance เครื่องจะรายงานผลอัตโนมัติหลังวัดการดูดกลืนแสงแล้ว

10. การศึกษาปริมาณกรดอะมิโนในตัวกุ้ง

เมื่อสิ้นสุดการทดลองนำกุ้งที่ได้จากการทดลองไปทำการหาปริมาณกรดอะมิโนในตัว โดยใช้เครื่อง HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

11 . การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ข้อมูลที่ได้จากการทดลองต่าง ๆ ได้แก่ การเจริญเติบโต การใช้ประโยชน์จากอาหาร กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสในทางเดินอาหาร ประสิทธิภาพการย่อยอาหารในห้องปฏิบัติการอัตรา ส่วนการสังเคราะห์ RNA ต่อการสังเคราะห์โปรตีนในกล้ามเนื้อ และปริมาณกรดอะมิโนตัวกุ้ง ใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance: ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (อนันต์ชัย, 2543)

12. สถานที่ และระยะเวลาในการทดลอง

บริษัท เจริญโภคภัณฑ์อาหาร จำกัด (ฟาร์มยี่สาร 3 อ.เมือง จ.สมุทรสงคราม) และห้องปฏิบัติการโภชนศาสตร์อาหารสัตว์น้ำ ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ดำเนินการทดลองตั้งแต่เดือนเมษายน 2550 – เดือนกันยายน 2550

ผลและวิจารณ์

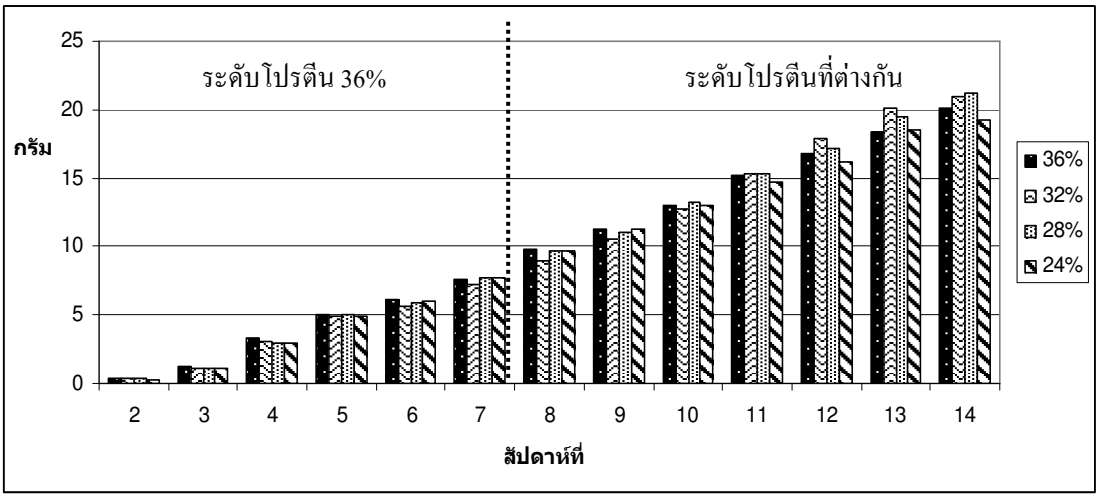
1. ผลของระดับโปรตีนในอาหารต่อการเจริญเติบโต และผลผลิตที่ได้

ตารางที่ 9 น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งขาว (กรัม) ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 ถึงสัปดาห์ที่ 14

อายุกุ้ง	ชุดการทดลอง				P-value	PSE
	1	2	3	4		
สัปดาห์ที่ 2	0.32[a]	0.34[a]	0.32[a]	0.29[a]	0.771	0.055
สัปดาห์ที่ 3	1.29[a]	1.16[a]	1.06[a]	1.05[a]	0.170	0.155
สัปดาห์ที่ 4	3.28[a]	3.05[a]	2.93[a]	2.97[a]	0.296	0.271
สัปดาห์ที่ 5	4.97[a]	4.93[a]	5.01[a]	4.95[a]	0.956	0.439
สัปดาห์ที่ 6	6.13[a]	5.63[a]	5.90[a]	6.02[a]	0.660	0.575
สัปดาห์ที่ 7	7.60[a]	7.26[a]	7.74[a]	7.76[a]	0.875	0.966
สัปดาห์ที่ 8	9.80[a]	8.94[a]	9.71[a]	9.72[a]	0.281	0.636
สัปดาห์ที่ 9	11.31[a]	10.57[a]	11.01[a]	11.31[a]	0.419	0.487
สัปดาห์ที่ 10	12.95[a]	12.81[a]	13.18[a]	13.02[a]	0.909	0.739
สัปดาห์ที่ 11	15.21[a]	15.9[a]	15.35[a]	14.76[a]	0.783	0.284
สัปดาห์ที่ 12	16.83[a]	17.81[a]	17.18[a]	16.22[a]	0.239	1.077
สัปดาห์ที่ 13	18.38[a]	20.12[a]	19.49[a]	18.53[a]	0.172	1.172
สัปดาห์ที่ 14	20.05[a]	21.01[a]	21.24[a]	19.21[a]	0.164	1.320

หมายเหตุ ค่าในแนวนอนเดียวกันยกกำลังตัวอักษรต่างกัน แสดงว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ $p<0.05$

น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งขาวที่เริ่มต้นเปลี่ยนการให้อาหาร จากการให้อาหารที่มีระดับโปรตีน36% ตั้งแต่อายุ 1-50 วัน มาเป็นอาหารที่มีระดับโปรตีนที่ต่ำกว่าคือ 32% 28% และ 24% ซึ่งเริ่มต้นที่อายุ 51 วันนั้นไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ภาพที่ 6 และ ตารางที่ 9) ดังนั้นน้ำหนักเริ่มต้นของกุ้งขาวก่อนการเปลี่ยนการให้อาหารจึงไม่มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของกุ้งอายุที่มีอายุตั้งแต่ 51 จนถึง 100 วัน



ภาพที่ 6 น้ำหนักเฉลี่ย (กรัม) ของกุ้งขาวตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 ถึงสัปดาห์ที่ 14

กุ้งขาวที่ทำการทดลองด้วยการให้อาหารที่ระดับโปรตีนเท่ากัน (36%) เป็นระยะเวลา 50 วัน แรก จากนั้นเปลี่ยนเป็นอาหารที่มีระดับโปรตีนต่างกัน 4 ระดับ (36, 32, 28 และ 24%) ตั้งแต่อายุ 51-100 วัน เป็นชุดการทดลองที่ 1 2 3 และ 4 พบว่าการเจริญเติบโต และอัตรารอดมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างไม่มีนัยสำคัญ (p>0.05) ดังตารางที่ 10 อัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน (ADG) เท่ากับ 0.20 0.21 0.21 และ 0.19 กรัม/ตัว/วัน อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (SGR) เท่ากับ 9.07, 9.12, 9.13 และ 9.03 เปอร์เซ็นต์/วัน และน้ำหนักที่เพิ่ม (WG) เท่ากับ 20.05, 21.01, 21.24 และ 19.21 กรัม/ตัว และอัตรารอด (SR) เท่ากับ 74.50 89.59 84.27 และ 77.70 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ โดยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (p>0.05) กุ้งขาวเป็นกุ้งขนาดเล็กกว่ากุ้งกุลาดำ แต่มีการเจริญเติบโตเร็วมากจนถึงประมาณ 90 วัน ดังนั้นการเลี้ยงชนิดนี้ส่วนใหญ่จะเลี้ยงนาน 90-100 วัน ถ้าได้ลูกพันธุ์ที่ดีควรจะได้กุ้งที่มีน้ำหนักประมาณ 15-20 กรัม (ชลอ และพรเลิศ, 2547)

จากการทดลองครั้งนี้พบว่าการเจริญเติบโตของกุ้งที่ให้อาหารระดับโปรตีน 36% มีค่าต่ำกว่ากุ้งที่ให้อาหารระดับโปรตีน 32 และ 28% เนื่องจากเมื่อสัตว์น้ำได้รับโปรตีนที่มากเกินความต้องการจะมีอัตราการเจริญเติบโตเท่าเดิม หรือลดลงเล็กน้อย (วีรพงศ์, 2536) ทั้งนี้เป็นเพราะโปรตีน (ไนโตรเจน) ส่วนที่เกินความต้องการใช้ประโยชน์เกิดกระบวนการ deamination ภายในร่างกาย และมีสารประกอบไนโตรเจนที่ถูกขับถ่ายลงสู่น้ำมีผลให้คุณภาพน้ำในบ่อเสื่อมลง สัตว์น้ำเกิดการเบื่ออาหารและใช้ประโยชน์จากอาหารได้น้อยทำให้การเจริญเติบโตมีค่าลดลง ดังนั้นปริมาณโปรตีนที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงสัตว์น้ำคือปริมาณโปรตีนที่น้อยที่สุดที่ทำให้สัตว์น้ำมีการเจริญเติบโตดีที่สุด (เวียง, 2542)

ตารางที่ 10 การเจริญเติบโต และผลผลิตของกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีระดับโปรตีนต่างกัน

ตัวชี้วัด	ชุดการทดลอง				P-value	PSE
	1	2	3	4		
อัตรการเจริญเติบโตต่อวัน (ก/วัน)	0.20[a]	0.21[a]	0.21[a]	0.19[a]	0.255	0.013
อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (%/วัน)	9.07[a]	9.12[a]	9.13[a]	9.03[a]	0.161	0.068
น้ำหนักกุ้งที่ได้ (กรัม)	20.05[a]	21.01[a]	21.24[a]	19.21[a]	0.164	1.315
อัตรารอด (%)	74.50[a]	89.59[a]	84.27[a]	77.76[a]	0.119	8.691
น้ำหนักรวม (กก/บ่อ)	74.94[b]	94.05[a]	89.51[ab]	74.70[b]	0.051	0.717
ต้นทุนอาหารต่อกุ้ง 1 กก (บาท)[1]	28.21[a]	26.61[ab]	25.86[bc]	24.60[c]	0.005	1.288

หมายเหตุ ค่าในแนวนอนเดียวกันยกกำลังตัวอักษรต่างกัน แสดงว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ $p<0.05$

[1] ต้นทุนค่าอาหารคำนวณเฉพาะต้นทุนค่าวัตถุดิบ ณ ราคาโรงงานผลิตอาหาร

เมื่อพิจารณาสัดส่วนระหว่างพลังงานต่อโปรตีนของอาหารระดับโปรตีน36% มีค่าเท่ากับ 8.6 กิโลแคลอรี่/กรัมโปรตีน ซึ่งน้อยกว่าในอาหารระดับโปรตีน 32, 28 และ 24% ที่เท่ากับ 9.2 , 10.09 และ 10.83 กิโลแคลอรี่/กรัมโปรตีน ตามลำดับ ดังนั้นอาหารทดลองทั้งสี่ระดับโปรตีนจึงมีความสอดคล้องกับพลังงานต่อโปรตีนของอาหารสัตว์น้ำซึ่งโดยทั่วไปควรมีค่า 8 – 10 กิโลแคลอรี่/กรัมโปรตีน (อมรรัตน์ และคณะ, 2548) แต่อย่างไรก็ตามพลังงานของอาหารระดับโปรตีน 36% (8.6 กิโลแคลอรี่/กรัมโปรตีน) อาจยังไม่เพียงพอต่อการดำรงชีวิตของกุ้งขาว ดังนั้นโปรตีนบางส่วนต้องถูกเปลี่ยนเป็นพลังงานโดยไม่สามารถใช้เพื่อการเจริญเติบโตได้ทั้งหมด และที่ระดับโปรตีนต่ำกว่านี้พลังงานที่ไม่ได้มาจากโปรตีนมีค่าสูงขึ้น โปรตีนในอาหารจึงถูกใช้ไปเพื่อการเจริญเติบโตทั้งหมด (ชลธิศักดิ์, 2540)

น้ำหนักรวมต่อบ่อของกุ้งที่ได้รับอาหาร 36% และ 24%โปรตีนมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) กับกุ้งที่ได้รับอาหาร 32%โปรตีน ส่วนน้ำหนักรวมต่อบ่อของกุ้งที่ได้รับอาหาร 28% โปรตีนไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองอื่น โดยมีค่าเท่ากับ 74.94 94.05 89.51 และ 74.70 กิโลกรัม/บ่อ ตามลำดับ (ตารางที่ 10) ถึงแม้น้ำหนักกุ้งต่อตัวที่ได้ในแต่ละชุดการทดลองจะไม่แตกต่างกัน แต่อัตรารอดของกุ้งที่ได้รับอาหาร 36% และ 24%โปรตีนต่ำกว่ากุ้งที่ได้รับอาหาร 32%โปรตีน แสดงว่าในระหว่างการทดลองมีกุ้งบางส่วนตายจึงทำให้จำนวน

กุ้งหายไปเป็นผลทำให้การคำนวณหาน้ำหนักรวมทั้งบ่อของกุ้งที่ได้รับอาหารระดับโปรตีน 36 และ 24% เกิดความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับกุ้งที่ได้รับอาหาร 32%โปรตีน

ดังนั้นกุ้งที่ได้รับอาหาร 32% และ 28%โปรตีน มีอัตราการเจริญเติบโต อัตรารอด และผลผลิตรวมต่อบ่อสูงกว่ากุ้งที่ได้รับอาหาร 36% และ 24%โปรตีน

2. ผลของระดับโปรตีนในอาหารต่อการใช้ประโยชน์จากอาหาร

ปริมาณอาหารที่กุ้งกินต่อตัวในระยะเวลาการทดลอง 100 วัน พบว่ากุ้งที่ได้รับอาหาร 24% โปรตีน กินอาหารต่ำกว่าชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดยมีค่าเท่ากับ 30.08, 29.11, 30.58 และ 27.04 กรัม ในกลุ่มที่ได้รับอาหาร 36, 32, 28 และ 24%โปรตีน ตามลำดับ (ตารางที่ 11) ทั้งนี้อาจเนื่องจากในชุดการทดลองที่ 4 ได้เปลี่ยนการให้จากระดับโปรตีน 36% มาเป็น 24% ซึ่งมีปลาป่นเป็นองค์ประกอบในสูตรอาหารเพียง 11.6% จึงอาจมีผลต่อการดึงดูดของกุ้งในการเข้ามาจับกินอาหารทำให้ปริมาณอาหารที่กุ้งกินมีค่าลดลง โดยปลาป่นที่ดีจะช่วยกระตุ้นให้ปลาและสัตว์น้ำกินอาหารได้มากขึ้น ปลาป่นที่จะนำมาใช้ในการผลิตอาหารปลาควรมีกลิ่นหอม ไม่มีกลิ่นเหม็นไหม้ (วีรพงศ์, 2536) ส่วนอัตราการกินอาหารของกุ้งมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างไม่มีนัยสำคัญ (p>0.05) มีค่าเท่ากับ 1.40, 1.33, 1.31 และ 1.47 กรัม/นน กุ้ง 100 กรัม/วัน อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อในแต่ละชุดการทดลองมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างไม่มีนัยสำคัญ (p >0.05) มีค่าเท่ากับ 1.50, 1.39, 1.44 และ 1.41 ซึ่งอยู่ในช่วงเดียวกับการสำรวจการเลี้ยงกุ้งทางใต้ของประเทศไทยพบว่าอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้ออยู่ในช่วง 1.4 – 2.0 ซึ่งมีเพียงไม่กี่ฟาร์มที่ทำได้เพียง 1.2 แต่ส่วนใหญ่ยังมากกว่า 2.0 (Lin, 1992)

เมื่อพิจารณาค่าประสิทธิภาพของอาหาร (FCE) มีค่าเท่ากับ 66.60, 72.18, 69.65 และ 70.91 โดยค่านี้จะผกผันกับอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ สำหรับอาหารสัตว์น้ำที่ดีควรมีค่าประสิทธิภาพของอาหารโดยเฉลี่ยเท่ากับ 62.5 (Parker, 1987) ดังนั้นอาหารสัตว์น้ำที่มีค่าประสิทธิภาพของอาหารต่ำกว่า 50 จัดเป็นอาหารที่มีคุณภาพต่ำ (เวียง, 2543) จากการประเมินประสิทธิภาพของอาหารทดลองทั้ง 4 ระดับโปรตีน โดยดูจากค่าอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อและค่าประสิทธิภาพของอาหาร แสดงว่าอาหารทดลองทั้ง 4 ระดับโปรตีนนับเป็นอาหารที่มีคุณภาพดีเหมาะแก่การเลี้ยงกุ้งเพราะค่าที่ได้จากการคำนวณอยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน รวมถึงผลการทดลองพบว่าระดับโปรตีนในอาหารครั้งนี้เพียงพอต่อความต้องการของกุ้งเนื่องจากกุ้งมีอัตราการเจริญเติบโตดี ผลผลิตที่ได้ต่อบ่อสูง และอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้ออยู่ในเกณฑ์ปกติ

ตารางที่ 11 ประสิทธิภาพอาหาร และการใช้ประโยชน์จากอาหาร

ตัวชี้วัด	ชุดการทดลอง				P-value	PSE
	1	2	3	4		
ปริมาณอาหารต่อตัว (ก/100วัน)	30.08[a]	29.11[ab]	30.58[a]	27.04[b]	0.029	1.521
อัตราการกินอาหาร (ก/นน กุ้ง 100 ก/วัน)	1.40[a]	1.33[a]	1.31[a]	1.47[a]	0.152	0.098
อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ	1.50[a]	1.39[a]	1.44[a]	1.41[a]	0.110	0.064
ประสิทธิภาพของอาหาร	66.60[a]	72.18[a]	69.65[a]	70.91[a]	0.108	3.056
ประสิทธิภาพโปรตีนในอาหาร	1.91[b]	2.13[ab]	2.29[a]	2.38[a]	0.013	0.138
โปรตีนในอาหารที่สะสมในตัวกุ้ง (%)	36.06[b]	40.11[ab]	45.30[a]	45.00[a]	0.009	2.740
พลังงานในอาหารที่สะสมในตัวกุ้ง (%)	79.95[a]	76.88[a]	71.72[a]	70.94[a]	0.139	4.757

หมายเหตุ ค่าในแนวนอนเดียวกันยกกำลังตัวอักษรต่างกัน แสดงว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ $p<0.05$

ผลการประเมินคุณค่าของโปรตีนในอาหารทดลองที่มีระดับโปรตีนแตกต่างกัน โดยดูจากค่าประสิทธิภาพของโปรตีน (protein efficiency ratio : PER) เท่ากับ 1.91, 2.13, 2.29 และ 2.38 ตามลำดับ จากการคำนวณหาค่าประสิทธิภาพของโปรตีนในอาหารกุ้งที่มีระดับโปรตีน 30% นั้นเท่ากับ 1.88±0.08 (Cruz-Suarez *et al*., 2007) และ ค่าประสิทธิภาพของโปรตีนในอาหารกุ้งที่มีระดับโปรตีน 35.6% มีค่าเท่ากับ 1.97 (Crisantema, 2008) ถ้านำค่าประสิทธิภาพของโปรตีนมาเปรียบเทียบอาหารที่มีระดับโปรตีนต่างกัน พบว่าค่าประสิทธิภาพของโปรตีนในอาหารที่มีโปรตีนสูงจะต่ำกว่าอาหารที่มีโปรตีนต่ำ (บัญญัติ, 2532 และ Hepher, 1988) ประสิทธิภาพของโปรตีนในอาหารจะขึ้นอยู่กับระดับโปรตีนและระดับพลังงานในอาหาร (Lovell, 1993) นอกจากนี้เมื่อพิจารณาค่าโปรตีนในอาหารที่สะสมในตัวกุ้ง (protein retention : PR) เท่ากับ 36.06, 40.11, 45.30 และ 45% ตามลำดับ ดังนั้นเมื่อกุ้งกินโปรตีนเข้าสู่ร่างกายแล้วมีการสะสมในตัวมาก โอกาสที่จะปลดปล่อยสารประกอบไนโตรเจนลงสู่สิ่งแวดล้อมก็น้อยลง การให้อาหารที่มีระดับโปรตีนสูงนั้นสัตว์จะใช้ประโยชน์จากโปรตีนได้ไม่ดีเท่าที่ควร ทำให้เกิดการสูญเสียค่าใช้จ่ายเกินความจำเป็นและอาจก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมจากโปรตีนส่วนเกินความต้องการของสัตว์ที่จะนำไปใช้ประโยชน์ เนื่องจากสัตว์ไม่สามารถสะสมไนโตรเจนจากโปรตีนไว้ในร่างกายได้มากกว่าความต้องการใช้ประโยชน์ จึงต้องขับไนโตรเจนออกจากร่างกายในรูปของเสีย เช่น แอมโมเนียในสัตว์น้ำ ยูเรียและยูริคในสัตว์บก (Murray *et al*., 1993 ; Walsh and Wright, 1995)

จากการทดลองพบว่าค่าประสิทธิภาพของโปรตีน และโปรตีนในอาหารที่สะสมในตัวกุ้งจะมีค่าสูงขึ้นถ้าระดับโปรตีนในอาหารลดลง และพบว่าทั้งสองค่าของอาหารระดับโปรตีน 36% มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) กับอาหารทดลองที่มีระดับโปรตีน 28 และ 24% แต่เมื่อดูค่าพลังงานในอาหารที่สะสมในสัตว์พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (p>0.05) ที่ระดับโปรตีน 36% พบว่ามีค่าการสะสมพลังงานสูงสุด แล้วมีแนวโน้มลดลงเมื่อระดับโปรตีนลดลง ซึ่งมีค่าเท่ากับ 79.95 76.88 71.72 และ 70.94% ตามลำดับ

อาหารระดับโปรตีน 32%โปรตีน มีอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อน้อยที่สุด อาหารระดับโปรตีน 24%โปรตีน มีค่าประสิทธิภาพโปรตีนในอาหารมากที่สุด และอาหารระดับโปรตีน 28% โปรตีน มีค่าการสะสมโปรตีนในตัวกุ้งมากที่สุด

3. กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสในทางเดินอาหาร

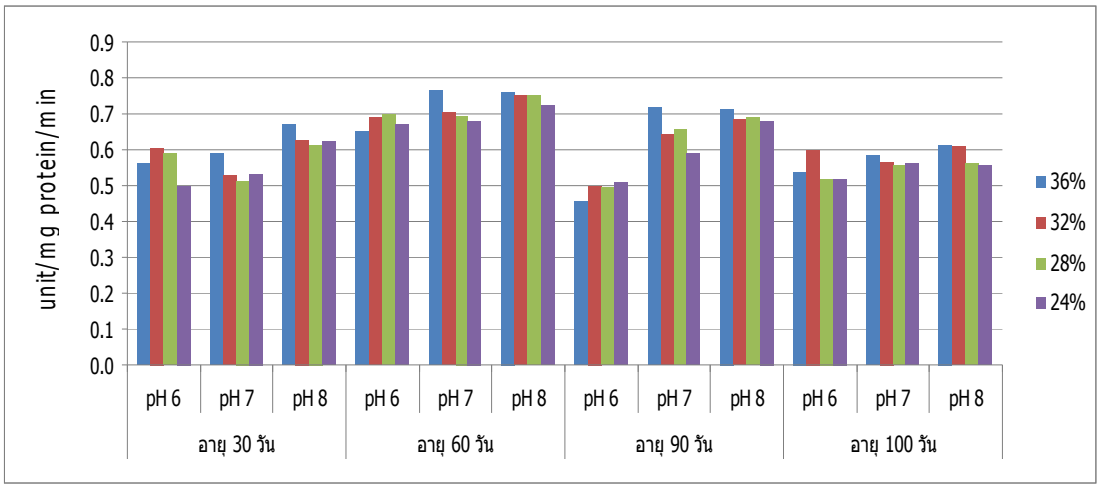
กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่มีระดับโปรตีนต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติอย่างไม่มีนัยสำคัญ (p>0.05) ดังตารางที่ 12 พบว่ากุ้งที่ได้รับอาหารที่มีระดับโปรตีน 36% มีค่า 0.458 – 0.767 ยูนิต/ มิลลิกรัมโปรตีน/นาที ที่ระดับโปรตีน 32% มีค่า 0.500 – 0.75 ยูนิต/ มิลลิกรัมโปรตีน/นาที ที่ระดับโปรตีน 28% มีค่า 0.497 – 0.751 ยูนิต/ มิลลิกรัมโปรตีน/นาที และที่ระดับโปรตีน 24% มีค่า 0.507 – 0.722 ยูนิต/ มิลลิกรัมโปรตีน/นาที แต่อย่างไรก็ตามที่ระดับ pH 8 มีแนวโน้มสูงกว่าที่ระดับ pH 6 และ 7 (ภาพที่ 7) ดังนั้นจึงเป็นเอนไซม์กลุ่มโปรติเอสเซอรีน (serine proteases) พวก alkali proteases ซึ่งโดยทั่วไปจะมีความจำเพาะต่อซับเสตรต เช่น Chymotrypsin B มีความจำเพาะต่อไทโรซิน ฟีนิลอะลานิล และทริปโทเฟน ส่วนทริปซินมีความจำเพาะต่อไลซีนและอาร์จินีน (ปราณี, 2547) โดยเอนไซม์กลุ่ม serine protease (trypsin-like enzyme) นับเป็นเอนไซม์ที่ใช้ย่อยโปรตีนในกุ้งตระกูลพีเนียส (Galgani *et al*., 1984)

ตารางที่ 12 กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสที่ระดับ pH 6, 7 และ 8 ของกุ้งขาวอายุ 30, 60, 90 และ 100 วัน เมื่อได้รับอาหารที่มีระดับโปรตีนต่างกัน

อายุกุ้ง (วัน)	ระดับ pH	ชุดการทดลอง				P-value	PSE
		1	2	3	4		
30	6	0.562[a]	0.605[a]	0.589[a]	0.507[a]	0.2417	0.072
	7	0.593[a]	0.532[a]	0.531[a]	0.515[a]	0.0811	0.081
	8	0.672[a]	0.630[a]	0.614[a]	0.623[a]	0.6847	0.685
60	6	0.651[a]	0.692[a]	0.699[a]	0.671[a]	0.7557	0.685
	7	0.767[a]	0.706[a]	0.693[a]	0.682[a]	0.0918	0.047
	8	0.761[a]	0.751[a]	0.751[a]	0.722[a]	0.8604	0.067
90	6	0.458[a]	0.500[a]	0.497[a]	0.511[a]	0.4357	0.047
	7	0.718[a]	0.642[a]	0.655[a]	0.592[a]	0.3680	0.097
	8	0.716[a]	0.688[a]	0.689[a]	0.681[a]	0.8745	0.665
100	6	0.539[a]	0.599[a]	0.519[a]	0.519[a]	0.7357	0.116
	7	0.587[a]	0.565[a]	0.559[a]	0.563[a]	0.9622	0.08
	8	0.615[a]	0.611[a]	0.563[a]	0.557[a]	0.8623	0.124

หมายเหตุ ค่าในแนวนอนเดียวกันยกกำลังตัวอักษรต่างกัน แสดงว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ $p<0.05$

จากภาพที่ 7 พบว่าเมื่อกุ้งมีอายุมากขึ้น กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสจะมีแนวโน้มลดลง สำหรับกุ้ง *L. vannamei* มีการทำงานของเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีนลดลงเมื่อมีการเจริญเติบโตมากขึ้น (Lee *et al*., 1984) เช่นเดียวกับการทดลองของ Julian *et al*. (2003) พบว่าการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสของกุ้งขาวจะสูงเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ตั้งแต่น้ำหนัก 2 กรัม และมากสุดที่น้ำหนัก 6 กรัม แล้วจะค่อย ๆ ลดต่ำลงเมื่อกุ้งมีน้ำหนักมากขึ้น โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) นอกจากอายุกุ้งแล้วยังมีปัจจัยอื่น ๆ อีกที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ได้แก่ การเปลี่ยนแปลงรูปร่างลักษณะของกุ้ง การเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมในรอบวัน และอาหารที่กุ้งกิน



ภาพที่ 7 กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสที่ระดับ pH 6, 7 และ 8 ของกุ้งขาวอายุ 30, 60, 90 และ 100 วัน เมื่อได้รับอาหารที่มีระดับโปรตีนต่างกัน

จากผลการทดลองการทำงานของเอนไซม์ของกุ้งขาวที่กินอาหารระดับโปรตีนต่างกันพบว่ามีความแตกต่างทางสถิติอย่างไม่มีนัยสำคัญ (p>0.05) ดังนั้นอาหารในการทดลองครั้งนี้ไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสที่จะย่อยโปรตีนในอาหาร ทำให้กุ้งสามารถนำกรดอะมิโนที่ถูกย่อยแล้วไปสังเคราะห์โปรตีนในร่างกายเพื่อใช้ในการเจริญเติบโต มีผลให้กุ้งมีน้ำหนักสุดท้ายไม่แตกต่างกัน แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษาของ Lee *et al.* (1994) พบว่าโปรตีนในอาหารจะมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ในกุ้งขาวที่มีน้ำหนักระหว่าง 17 – 30 กรัม มากกว่ากุ้งที่น้ำหนักน้อยกว่า 10 กรัม โดยที่การทำงานของเอนไซม์จะสูงกว่าในกุ้งขนาดเล็กเมื่อให้อาหารที่มีอัตราส่วนระหว่างโปรตีนจากสัตว์และพืชเท่ากับ 2:1 หรือ 1:1

4. ประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนในห้องปฏิบัติการโดยเอนไซม์ที่สกัดจากกุ้ง

เมื่อทำการทดลองประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนในห้องปฏิบัติการ (in vitro digestibility) โดยใช้เอนไซม์ที่สกัดจากเฮปาโตแพนเครียสของกุ้งที่กินอาหารระดับโปรตีนต่างกันมาย่อยอาหารทดลองทั้ง 4 ระดับโปรตีน ที่อายุกุ้ง 30 วันพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ (p>0.05) เนื่องจากกุ้งทดลองกินอาหารระดับโปรตีนเท่ากันคือ 36% (ตารางที่ 13) แต่จะพบว่ามีค่าต่ำกว่าที่อายุกุ้ง 60 วัน ทั้งนี้อาจเนื่องจากระบบทางเดินอาหารของกุ้งยังพัฒนาไม่สมบูรณ์ และการทำงานของเอนไซม์มีค่าต่ำกว่า (ภาพที่ 7)

ตารางที่ 13 ประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนในห้องปฏิบัติการ (เปอร์เซ็นต์) โดยเอนไซม์ที่สกัดจาก hepatopancreas ของกุ้งที่อายุ 30, 60, 90 และ 100 วัน

อายุกุ้ง	ซับสเตรตคืออาหาร	เอนไซม์จากกุ้งในชุดการทดลอง				P-value	PSE
(วัน)	ระดับโปรตีน(%)	1	2	3	4		
30	36	21.18^{a}	22.81^{a}	20.24^{a}	20.87^{a}	0.143	1.483
60	36	21.75^{a}	21.93^{a}	21.16^{ab}	19.03^{b}	0.059	1.471
	32	21.53^{a}	21.20^{a}	20.62^{ab}	18.31^{b}	0.051	1.567
	28	22.96^{a}	19.93^{ab}	19.08^{bc}	16.09^{c}	0.008	2.245
	24	21.25^{a}	19.41^{a}	19.51^{a}	16.07^{b}	0.009	1.747
90	36	25.33^{a}	26.30^{a}	25.19^{a}	24.35^{a}	0.429	1.598
	32	25.63^{a}	28.00^{a}	25.05^{a}	24.08^{a}	0.242	2.649
	28	22.83^{a}	22.70^{a}	21.64^{ab}	21.14^{b}	0.043	0.852
	24	22.83^{a}	23.19^{a}	22.44^{a}	23.27^{a}	0.87	1.67
100	36	32.89^{a}	34.81^{a}	33.91^{a}	33.74^{a}	0.856	3.115
	32	33.64^{a}	34.46^{a}	33.52^{a}	33.77^{a}	0.973	3.086
	28	32.87^{a}	33.97^{a}	32.12^{a}	31.85^{a}	0.723	2.844
	24	30.78^{a}	34.14^{a}	34.43^{a}	32.26^{a}	0.238	2.694

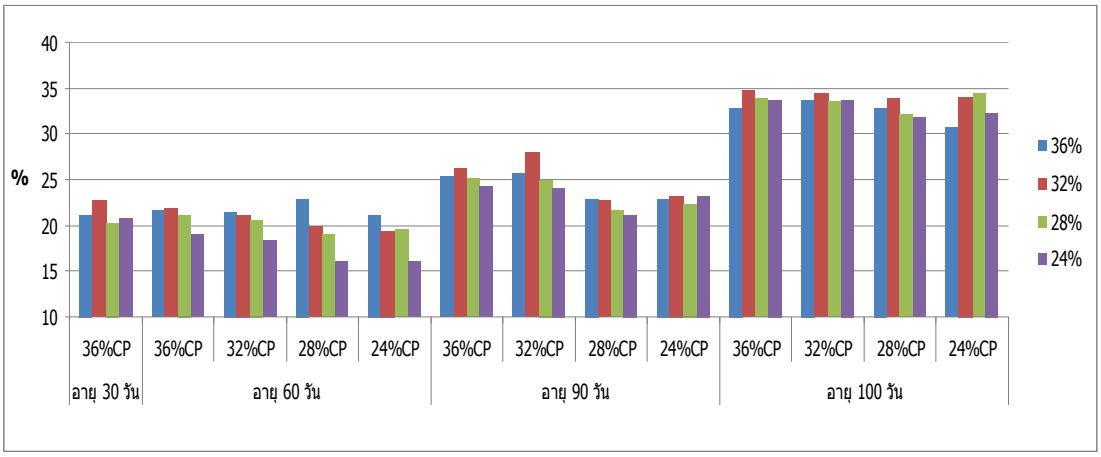
หมายเหตุ ค่าในแนวนอนเดียวกันยกกำลังตัวอักษรต่างกัน แสดงว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ $p<0.05$

ที่อายุกุ้ง 60 วันพบว่าประสิทธิภาพการย่อยอาหารของกุ้งที่กินอาหารโปรตีน 24% มีควาแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) กับกุ้งที่กินอาหารโปรตีนที่สูงกว่า ทั้งนี้อาจเนื่องจากเมื่อพิจารณาการทำงานของเอนไซม์ย่อยโปรตีนแล้วพบว่ากุ้งที่กินอาหารระดับโปรตีน24%มีค่าน้อยกว่ากุ้งที่กินอาหารระดับโปรตีน 28% ขึ้นไป (ตารางที่ 12) จึงมีผลทำให้ประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนในห้องปฏิบัติการมีค่าต่ำที่สุด โดยเฉพาะการย่อยอาหารระดับโปรตีน 24% นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบการย่อยอาหารที่มีโปรตีนต่างกันจากกุ้งที่กินอาหารที่มีระดับโปรตีนเดียวกันพบว่าอาหารที่มีระดับโปรตีนสูงนั้นมีแนวโน้มการถูกย่อยสูงกว่าอาหารที่มีระดับโปรตีนต่ำ เพราะในอาหารที่มีระดับโปรตีนสูงมีวัตถุดิบแหล่งโปรตีนในปริมาณสูงโดยเฉพาะปลาป่น ซึ่งนับเป็นแหล่งโปรตีนจากสัตว์คุณภาพดีเนื่องจากเป็นวัตถุ

ดิบที่มีการย่อยได้สูงและมีสมดุลย์ของกรดอะมิโนที่จำเป็น อีกทั้งไม่มีสารขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ทริปซิน (trypsin inhibitor) เช่นเดียวกับวัตถุดิบแหล่งโปรตีนจากพืช ได้แก่ กากถั่วลิสง และกากเมล็ดทานตะวัน นอกจากนี้ปลาป่นไม่มีสารขัดขวางโภชนะที่มักพบในวัตถุดิบโปรตีนจากแหล่งอื่น ปลาป่นส่วนใหญ่ที่ผลิตในประเทศไทยมีโปรตีนอยู่ระหว่าง 52 – 60 เปอร์เซ็นต์ (อรพินท์, 2550) แล้วปลาป่นที่นำมาเป็นองค์ประกอบในอาหารทดลองนั้นมีปริมาณโปรตีนประมาณ 62% จึงนับเป็นปลาป่นเกรด 1 (จูอะดี และมะลิ, 2539)

ที่อายุกุ้ง 90 วัน พบว่าประสิทธิภาพการย่อยอาหารระดับโปรตีน 36, 32 และ 24% ของกุ้งทุกชุดการทดลองมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างไม่มีนัยสำคัญ (p>0.05) อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพการย่อยของกุ้งชุดที่กินอาหารระดับโปรตีน 24% มีแนวโน้มต่ำกว่าชุดการทดลองอื่น ๆ นอกจากนี้พบว่าประสิทธิภาพการย่อยอาหารระดับโปรตีน 28% ของกุ้งชุดที่กินอาหารระดับโปรตีน 36 และ 32% มีค่าสูงกว่ากุ้งที่กินอาหารระดับโปรตีน 24% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p <0.05)

ที่อายุกุ้ง 100 วัน พบว่าประสิทธิภาพการย่อยของกุ้งมีค่าสูงที่สุด และทุกชุดการทดลองมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างไม่มีนัยสำคัญ (p>0.05) อย่างไรก็ตามพบว่าประสิทธิภาพการย่อยของกุ้งชุดที่กินอาหารระดับโปรตีน 32% มีแนวโน้มสูงกว่าชุดอื่นๆ (ภาพที่ 8) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะการทำงานของเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีนของกุ้งที่กินอาหารระดับโปรตีน 32% มีค่าสูง (ภาพที่ 7) ดังนั้นการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนในห้องปฏิบัติการสามารถนำมาตรวจสอบการย่อยได้ของวัตถุดิบชนิดต่างๆ รวมถึงอาหารเนื่องจากใช้ระยะเวลาไม่นาน มีความสะดวกมากกว่าการทดลองในตัวสัตว์น้ำ แต่อย่างไรก็ตามควรใช้เอนไซม์ที่สกัดจากเฮพาโตแพนเครียสของกุ้งที่อายุไม่เกิน 60 วัน และต้องมาจากกุ้งที่กินอาหารชนิดเดียวกันเพื่อนำมาทดลอง (Divakanan *et al*., 2004)



ภาพที่ 8 ประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนในห้องปฏิบัติการ (เปอร์เซนต์) โดยเอนไซม์ที่สกัดจาก hepatopancreas ของกุ้งที่อายุ 30,60, 90 และ 100 วัน

ที่อายุกุ้ง 30 วันพบว่าค่าประสิทธิภาพการย่อยได้ไม่แตกต่างกันทุกชุดการทดลอง เนื่องจากกุ้งกินอาหารระดับโปรตีนเท่ากันคือ 36% แต่จะพบว่ามีค่าต่ำกว่าที่อายุกุ้ง 60 วัน ทั้งนี้อาจเนื่องจากระบบทางเดินอาหารของกุ้งยังพัฒนาไม่สมบูรณ์ และการทำงานของเอนไซม์มีค่าต่ำกว่า ที่อายุกุ้ง 60 วัน กุ้งที่กินอาหารโปรตีนต่ำมีค่าการย่อยได้ต่ำกว่ากุ้งที่กินอาหารโปรตีนสูง และหากอาหารที่ถูกย่อยมีระดับโปรตีนต่ำจะยิ่งลดประสิทธิภาพการย่อยลงอีก ที่อายุกุ้ง 90 วันประสิทธิภาพการย่อยของกุ้งดีขึ้นในอาหารโปรตีน 36 และ 32% อาจเนื่องจากแหล่งโปรตีนมีคุณภาพดีมากพอที่จะทำให้ค่าการย่อยได้ของกุ้งไม่ต่างกัน แต่ถ้าอาหารมีระดับโปรตีนต่ำลงประสิทธิภาพการย่อยของกุ้งจะลดลง และที่อายุกุ้ง 100 วัน ประสิทธิภาพการย่อยได้ของกุ้งทุกชุดการทดลองไม่แตกต่างกันเนื่องจากระบบทางเดินอาหารแข็งแรงขึ้น

5. อัตราส่วนการสังเคราะห์ RNA ต่อโปรตีนในตับ และกล้ามเนื้อของกุ้งขาว

จากตารางที่ 14 เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่ากุ้งที่ได้รับอาหารระดับโปรตีนต่างกันมีอัตราการสังเคราะห์โปรตีนในตับ และกล้ามเนื้อแตกต่างกันทางสถิติอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($p>0.05$) เมื่อพิจารณาจากอัตราส่วนการสังเคราะห์ RNA ต่อโปรตีนในตับมีค่า 0.125–0.159 แต่เมื่อพิจารณาปริมาณ RNA และโปรตีนในตับของกุ้งที่ได้รับอาหารระดับโปรตีนต่างกัน พบว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ซึ่งมีปริมาณ RNA เท่ากับ 0.337–0.586 ไมโครกรัม/มิลลิกรัม และปริมาณโปรตีนเท่ากับ 0.0023-0.0043 มิลลิกรัม/มิลลิกรัม ทั้งยังพบว่ากุ้งที่กินอาหารระดับโปรตีน 32% มีค่าสูงที่สุดส่วนปริมาณ RNA และโปรตีนในกล้ามเนื้อแตกต่างกันทางสถิติอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($p>0.05$)

ซึ่งมีปริมาณ RNA เท่ากับ 0.2113 – 0.2855 ไมโครกรัม/มิลลิกรัม และปริมาณโปรตีนเท่ากับ 0.0015 -0.003 มิลลิกรัม/มิลลิกรัม อัตราส่วนการสังเคราะห์ RNA ต่อโปรตีนในกล้ามเนื้อมีค่า 0.0753–0.1263

ตารางที่ 14 อัตราส่วนการสังเคราะห์ RNA ต่อโปรตีนในตับ และกล้ามเนื้อกุ้งขาวเมื่อได้รับอาหารที่ระดับโปรตีนต่างกัน

แหล่ง	การสังเคราะห์	ชุดการทดลอง				P-value	PSE
		1	2	3	4		
ตับ	RNA [1]	0.4775^{ab}	0.5860^{a}	0.3378^{b}	0.3545^{b}	0.021	0.107
	โปรตีน [2]	0.0033^{ab}	0.0043^{a}	0.0025^{b}	0.0023^{ab}	0.030	0.001
	RNA/โปรตีน [3]	0.1568^{a}	0.1548^{a}	0.1258^{a}	0.1593^{a}	0.675	0.043
กล้ามเนื้อ	RNA [1]	0.2855^{a}	0.2565^{a}	0.2258^{a}	0.2113^{a}	0.707	0.016
	โปรตีน [2]	0.0023^{a}	0.0028^{a}	0.0030^{a}	0.0015^{a}	0.112	0.008
	RNA/โปรตีน [3]	0.1263^{a}	0.1053^{a}	0.0753^{a}	0.1185^{a}	0.373	0.042

หมายเหตุ ค่าในแนวนอนเดียวกันยกกำลังตัวอักษรต่างกัน แสดงว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ $p<0.05$

[1] หน่วย ไมโครกรัม/มิลลิกรัม

[2] หน่วย มิลลิกรัม/มิลลิกรัม

[3] อัตราส่วนการสังเคราะห์ RNA/โปรตีน

ปริมาณการสังเคราะห์ RNA ที่วิเคราะห์ได้นั้นเป็น total RNA ซึ่งประกอบด้วย mRNA tRNA และ rRNA โดยปริมาณ RNA จะบ่งบอกถึงแนวโน้มความสามารถการสังเคราะห์โปรตีนได้ เพราะ RNA แต่ละตัวเป็นสารตั้งต้นที่สำคัญในการสังเคราะห์โปรตีน เช่น mRNA เป็นตัวรับข้อมูลพันธุกรรมจาก DNA ส่วน tRNA เป็นตัวขนย้ายกรดอะมิโนเพื่อมาสร้างโปรตีนและ rRNA เป็นแหล่งไรโบโซมเพื่อสังเคราะห์โปรตีน ดังนั้นถ้ามีปริมาณ RNA มากโอกาสที่จะมีการสังเคราะห์โปรตีนได้ก็มาก ขึ้นอยู่กับปริมาณและชนิดของกรดอะมิโนที่จะนำมาต่อเป็นสายพันธะเปปไทด์ของกรดอะมิโนแต่ละชนิดให้สร้างเป็นโปรตีนแต่ละชนิดด้วย ทั้งนี้ยังต้องขึ้นกับโภชนะอาหารที่กุ้งได้รับโดยเฉพาะโปรตีน จากการทดลองพบว่าแม้กุ้งจะได้รับอาหารที่มีระดับโปรตีนต่างกัน แต่ก็ไม่มีผลต่ออัตราการสังเคราะห์โปรตีนจึงทำให้น้ำหนักกุ้งหลังปิดการทดลองไม่มีความแตกต่างกัน

จากการทดลองครั้งนี้พบว่าอาหารที่มีระดับโปรตีน 24–36% ไม่มีผลต่ออัตรากาสังเคราะห์ RNA ต่อโปรตีนทั้งในตับและกล้ามเนื้อของกุ้งขาว จึงทำให้กุ้งนำกรดอะมิโนที่ได้จากการย่อย และดูดซึมแล้วมาสังเคราะห์โปรตีนเพื่อสร้างกล้ามเนื้อ จากการศึกษาของ Jose (2006) พบว่าอัตราส่วนการสังเคราะห์ RNA ต่อโปรตีนในกล้ามเนื้อกุ้งขาวอายุ 3 เดือน มีค่าสูงสุดในระยะก่อนลอกคราบสุดท้าย (late premolt : stage D3) เท่ากับ 0.46 และมีค่าต่ำสุดในระยะระหว่างการลอกคราบ (intermolt) เท่ากับ 0.22 ดังนั้นระยะการลอกคราบจึงมีผลต่ออัตราส่วนการสังเคราะห์ RNA/โปรตีน ในกุ้งกุลาดำที่มีการเสริมเบตาอีน 1.5, 0.75 และ 0% พบว่าอัตราส่วนการสังเคราะห์ RNA/โปรตีน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) มีค่าเท่ากับ 0.36 0.33 และ 0.34 ตามลำดับ (จริยา, 2549)

6. กรดอะมิโนจำเป็นในอาหารทดลอง และกล้ามเนื้อกุ้ง

ปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็นบางชนิดในอาหารทดลอง (ตารางที่ 15) จะมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) แต่หลังสิ้นสุดงานทดลองพบว่ากรดอะมิโนในตัวกุ้งมีความแตกต่างทางสถิติอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($p>0.05$) และมีปริมาณมากกว่าในอาหารทดลองยกเว้นฟีนิลอะลานีนที่มีปริมาณน้อยกว่า (ตารางที่ 15) โดยที่ปริมาณกรดอะมิโนในตัวกุ้งทดลองนั้นมีค่าใกล้เคียงกับของ Lim (1993) ส่วนปริมาณกรดอะมิโนในอาหารทดลองก็มีค่าใกล้เคียงกับการแนะนำของ Akiyama (1992) ยกเว้นไลซีนที่มีค่าน้อยกว่า (ตารางที่ 3) ความต้องการไลซีนของกุ้งขาวมีน้อยกว่ากุ้งกุลาดำโดยกุ้งขาวมีความต้องการไลซีนในปริมาณ 3.1% ของโปรตีน (Akiyama, 1986) ส่วนในกุ้งกุลาดำมีความต้องการในปริมาณ 5.2% ของโปรตีน (Millamena, 1998) อย่างไรก็ตาม Fox *et al* .(1992) รายงานว่าในอาหารกุ้งควรเติม covalent lysine และ crystalline lysine ให้ได้อัตราส่วน 4.67% และ 5.19% ตามลำดับ เพื่อให้ใกล้เคียงกับความตามความต้องการของกุ้งขาว ดังนั้นอาหารทดลองที่มีระดับไลซีนน้อยกว่า 2.8% อาจไม่เพียงพอต่อการสังเคราะห์กล้ามเนื้อจึงพบปริมาณโปรตีน และ RNA ในตับกุ้งชุดที่ได้รับอาหาร 28 และ 24% มีค่าลดลง ($p<0.05$) (ตารางที่ 14)

นอกจากนี้พบว่าอัตราส่วนระหว่างไลซีน และอาร์จีนีนในอาหารทดลองแต่ละระดับโปรตีนมีค่ามากกว่า 1 : 1.1 ซึ่งอาจเกิด lysine-arginine antagonism เช่นเดียวกับสัตว์อื่น แต่จากผลการทดลองพบว่าอัตราการเจริญเติบโตของกุ้งมีแนวโน้มที่ดี และองค์ประกอบของกรดอะมิโนทั้งสองชนิดในกล้ามเนื้อกุ้งอยู่ในเกณฑ์ปกติ แสดงว่าปริมาณไลซีนและอาร์จีนีนในอาหารทดลองยังไม่สูงจนทำให้เกิด lysine-arginine antagonism ในกุ้งขาว

ตารางที่ 15 กรดอะมิโนจำเป็น(กรัม/100 กรัม โปรตีน) ในอาหารทดลอง และกล้ามเนื้อกุ้ง (กรัม/100 กรัม โปรตีน)

กรดอะมิโน	อาหารระดับโปรตีน (%)					กล้ามเนื้อกุ้งชุดการทดลอง				
	36	32	28	24	P-value	1	2	3	4	P-value
Arginine	5.57[b]	6.18[a]	5.67[b]	5.63[b]	0.029	9.11[a]	9.32[a]	9.16[a]	8.99[a]	0.381
Isoleucine	3.66[a]	3.83[a]	3.76[a]	3.50[a]	0.262	3.72[a]	3.63[a]	3.76[a]	3.80[a]	0.276
Leucine	5.92[a]	6.78[a]	6.01[a]	6.14[a]	0.058	7.09[a]	7.05[a]	7.19[a]	7.46[a]	0.293
Lysine	2.88[b]	3.20[a]	2.52[b]	2.24[b]	0.007	6.67[a]	6.50[a]	6.81[a]	6.50[a]	0.525
Methionine	1.77[a]	1.60[a]	1.67[a]	1.80[a]	0.1009	2.49[a]	2.44[a]	2.55[a]	2.44[a]	0.1631
Phenylalanine	4.29[a]	4.01[a]	4.10[a]	4.31[a]	0.297	3.47[a]	3.53[a]	3.74[a]	3.59[a]	0.548
Threonine	3.47[a]	3.45[a]	3.27[a]	3.35[a]	0.308	3.28[a]	3.33[a]	3.42[a]	3.28[a]	0.790
Tryptophane	1.13[c]	1.19[bc]	1.20[b]	1.34[a]	0.004	1.34[a]	1.29[a]	1.27[a]	1.27[a]	0.651
Valine	3.75[a]	3.98[a]	3.85[a]	3.75[a]	0.549	3.92[a]	3.91[a]	3.91[a]	3.28[a]	0.790

หมายเหตุ ค่าในแนวนอนเดียวกันยกกำลังตัวอักษรต่างกัน แสดงว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ $p<0.05$

อย่างไรก็ตามพบว่าปริมาณอาร์จีนีนในอาหารทดลองทั้ง 4 ระดับโปรตีนอยู่ในเกณฑ์ที่เหมาะสม ซึ่งอาร์จีนีนนั้นทำหน้าที่เป็น phosphagen ในการยืดหดกล้ามเนื้อของกุ้ง (Hird, 1986) ถ้าในอาหารมีปริมาณอาร์จีนีนสูงจะทำให้กุ้งมีอัตราการเจริญเติบโตดี ปริมาณที่ต้องการเพื่อให้อัตราการเจริญเติบโตเป็นไปอย่างปกติเท่ากับ 54.8 กรัม/กิโลกรัมโปรตีน (Chen *et al*.,1992)

7. ระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง

จากตารางที่ 16 แสดงปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งที่กินอาหารระดับโปรตีนต่างกัน พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (>0.05) ซึ่งปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งที่อายุ 60 วันอยู่ในช่วง 2.12 – 2.97 x10^7เซลล์/มิลลิลิตร โดยมีแนวโน้มสูงขึ้นตามระดับโปรตีน เช่นเดียวกับการ ศึกษาของ Cristina *et al*., (2004) ที่พบว่าปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งขาวที่มาจากการเพาะเลี้ยงน้ำหนักกุ้งขาวประมาณ 0.8±0.1 กรัม ถ้าได้รับอาหารที่มีระดับโปรตีนสูง (44%) นานประมาณ 55 วัน จะมี

ปริมาณเม็ดเลือดรวมมากกว่าที่ได้รับอาหารระดับโปรตีนต่ำ (14%) อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งผกผันกับการตรวจสอบในกุ้งขาวที่จับจากธรรมชาติ ถ้าได้รับอาหารที่มีระดับโปรตีนสูงจะมีปริมาณน้อยกว่าที่ได้รับอาหารระดับโปรตีนต่ำอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากอาหารที่กุ้งกินจะมีผลต่อปริมาณเม็ดเลือดรวมแล้วยังมีปัจจัยอื่น ๆ อีกได้แก่ ระยะในการลอกคราบ และการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันเป็นต้น จากการศึกษาของ Liu (2004) ที่พบว่ากุ้งในระยะ intermolt นั้นมีปริมาณเม็ดเลือดรวมสูงสุดและต่ำสุดในระยะ premolt มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 315, 226 x 10^5เซลล์/มิลลิลิตร ตามลำดับ จากการศึกษาของฉัทช-นัน (2549) พบว่าปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งขาวจะมีปริมาณสูงสุด เมื่อกุ้งได้รับอาหารที่ผสมเบต้ากลูแคน 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัมเป็นเวลานาน 4 สัปดาห์ คือมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 21.55 ± 2.54 x10^6เซลล์/มิลลิลตร ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) จากกลุ่มที่ได้รับเบต้ากลูแคนในระยะเวลาที่น้อยกว่าคือเป็นเวลา 2 และ 3 สัปดาห์ และกลุ่มที่ไม่ได้รับเบต้ากลูแคน ซึ่งมีปริมาณเม็ดเลือดรวมเฉลี่ย 15.30 ± 3.44x10^6, 17.43 ± 2.3x10^6 และ 13.89 ± 2.33x10^6 เซลล์/มิลลิลิตร ตามลำดับ

ตารางที่ 16 ปริมาณเม็ดเลือดรวม (X10^7 เซลล์/มิลลิลิตร) และซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (ยูนิต/มิลลิลิตร) ของกุ้งขาวที่อายุ 60 และ 100 วัน

อายุกุ้ง (วัน)	ระบบภูมิคุ้มกัน	ชุดการทดลอง				P-value	PSE
		1	2	3	4		
60	THC *	2.965[a]	2.653[a]	2.378[a]	2.116[a]	0.1617	0.856
	SO **	8.148[a]	9.348[a]	9.588[a]	10.298[a]	0.5237	6.81
100	THC *	1.783[a]	2.034[a]	1.770[a]	2.032[a]	0.5694	0.568
	SO **	5.590[a]	7.278[a]	6.364[a]	7.404[a]	0.4504	2.833

หมายเหตุ ค่าในแนวนอนเดียวกันยกกำลังตัวอักษรต่างกัน แสดงว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ p<0.05

*เซลล์/มิลลิลิตร

**ยูนิต/มิลลิลิตร

ที่อายุ 100 วัน กุ้งมีปริมาณเม็ดเลือดรวมอยู่ในช่วง 1.77 – 2.03 X 10^7 เซลล์/มิลลิลตร โดยมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างไม่มีนัยสำคัญ (p>0.05) แสดงว่าระดับโปรตีนในอาหารไม่มีผลต่อการสร้างเม็ดเลือดของกุ้งโดยเฉพาะในกุ้งที่มีอายุมากขึ้น ซึ่งปริมาณเม็ดเลือดในกุ้งที่ศึกษานี้มีค่าในช่วง

เดียวกับการศึกษาของฉัทชนัน (2549) และ Liu (2004) ดังนั้นการได้รับอาหารระดับโปรตีน 24% ก็ยังไม่มีผลกระทบต่อปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้ง

ปริมาณซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออนซึ่งเป็นผลผลิตของการเกิดกระบวนการกลืนกินทำลายสิ่งแปลกปลอมทั้งที่มีชีวิต และไม่มีชีวิตที่บุกรุกเข้าไปในร่างกายโดยเม็ดเลือดชนิดไฮยาลีนเซลล์ จากผลการทดลองพบว่ามีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) ทั้งที่อายุ 60 และ 100 วัน มีค่าเท่ากับ 8.148 – 10.298 และ 5.590 – 7.404 ยูนิต/มิลลิลตร ตามลำดับ ที่อายุ 60 วัน พบว่าเมื่อกุ้งกินอาหารที่ระดับโปรตีนต่ำลง ค่าปริมาณซูเปอร์ออกไซด์สูงขึ้นแต่ปริมาณเม็ดเลือดรวมมีค่าลดลง แสดงว่าเม็ดเลือดส่วนใหญ่จะเป็นชนิดไฮยาลินเซลล์เพราะเม็ดเลือดชนิดนี้มีหน้าที่หลักในการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม (Soderhall and Cereius, 1992) จึงทำให้เกิดซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออนในปริมาณที่มากกว่าเมื่อมีการบุกรุกของสิ่งแปลกปลอม จากผลการทดลองแม้กุ้งที่ได้รับอาหารระดับโปรตีนต่ำกว่าจะมีการสร้างเม็ดเลือดน้อยกว่ากุ้งที่ได้รับอาหารระดับโปรตีนสูงก็ตาม แต่เมื่อพิจารณากระบวนการกลืนกินทำลายสิ่งแปลกปลอมซึ่งเป็นการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่เจาะจง และเกิดขึ้นในด่านแรกของร่างกายที่จะทำงานทันทีเมื่อพบกับสิ่งแปลกปลอม หรือแอนติเจนที่เข้าสู่ร่างกาย (สันนิภา, 2549) นั้นมีประสิทธิภาพสูงกว่า ในกุ้งกุลาดำอายุ 2 เดือนที่มีน้ำหนักในช่วง 10-15 กรัม มีปริมาณซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออนเท่ากับ 8.5±2.646 ยูนิต ถ้าได้รับอาหารผสมเปปติโดกลัยแคนที่ความเข้มข้น 2, 4 และ 6 กรัม/กิโลกรัม นานเป็นระยะเวลา 7 วัน จะมีปริมาณเพิ่มขึ้นเป็น 9.75, 12.75 และ 17.5 ยูนิต ตามลำดับ พบว่าที่ความเข้มข้น 6 กรัม/กิโลกรัม มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับชุดปกติ (นนทวิทย์, 2547)

ดังนั้นจากการทดลองครั้งนี้พบว่าอาหารที่มีระดับโปรตีน 36 -24% ไม่มีผลกระทบต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งเนื่องจากปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งทุกชุดการทดลองอยู่ในเกณฑ์ปกติ เม็ดเลือดนับเป็นเซลล์ที่มีบทบาทในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง เม็ดเลือดแต่ละชนิดก็จะมีหน้าที่ที่ต่างกัน(Soderhall, 1999) แต่อย่างไรก็ตามพบว่าทั้งปริมาณเม็ดเลือดรวม และซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออนของกุ้งที่อายุ 100 วัน มีค่าน้อยกว่าที่อายุ 60 วัน อาจเนื่องจากเก็บเลือดกุ้งเพื่อนำมาวิเคราะห์หลังจากจับกุ้งขึ้นจากบ่อจึงอาจทำให้กุ้งเกิดความเครียด มีผลให้ระดับภูมิคุ้มกันของกุ้งลดลง

8. คุณภาพน้ำ

จากการตรวจสอบคุณภาพน้ำตลอดระยะเวลาการทดลองดังตารางที่ 17 พบว่าอุณหภูมิในช่วงเช้า และบ่ายแตกต่างกันประมาณ 3 องศาเซลเซียส เนื่องจากช่วงที่ทำการทดลองเป็นฤดูร้อน ทำให้

อุณหภูมิในช่วงบ่ายสูง (ประมาณ 33 องศาเซลเซียส) แล้วบางวันฝนตกในช่วงเย็นถึงกลางคืนจึงทำให้อุณหภูมิในช่วงเช้าต่ำแต่ก็สูงกว่า 27 องศาเซลเซียส การเลี้ยงกุ้งขาวในรัฐเท็กซัส ถ้าอุณหภูมิในช่วงเช้าไม่ต่ำกว่า 27 องศาเซลเซียส จะมีผลให้อัตราการเจริญเติบโตมากกว่า 1.8 กรัม/สัปดาห์ (Bray *et al*., 1994)

ตารางที่ 17 คุณภาพน้ำต่าง ๆ ตลอดระยะเวลาการทดลอง (ค่าเฉลี่ย ± SE)

คุณภาพน้ำ	ชุดการทดลอง			
	1	2	3	4
อุณหภูมิ (OC)				
6:00	29.0 ±1.01	29.9±1.02	29.8±1.01	29.8±1.01
14:00	32.8±1.74	32.9±1.84	32.9±1.78	32.8±1.73
pH				
6:00	8.0±0.18	8.0±0.19	8.0±0.18	8.0±0.19
14:00	8.4±0.16	8.4±0.17	8.4±0.17	8.4±0.18
DO (ppm)				
6:00	4.9±0.61	4.8±0.63	4.8±0.61	4.9±0.58
14:00	8.4±1.13	8.4±1.05	8.6±1.23	8.6±1.09
ความเค็ม (ppt)	19±3.80	19±4.15	20±3.72	19±4.01
ค่าความเป็นด่าง (ppm)	149±21.72	140±20.57	145±23.24	138±20.82
แอมโมเนียรวม (ppm)	0.7±0.55	0.76±0.80	0.69±1.03	0.37±0.51
ไนไตรท์-ไนโตรเจน (ppm)	0.31±0.44	0.4±0.51	0.18±0.33	0.1±0.54
ไนเตรท (ppm)	0.22±0.55	0.27±0.54	0.12±0.54	0.12±0.54
การถ่ายน้ำเฉลี่ย (%)	21.46	19.79	19.89	17.08

ค่าความเป็นกรด-ด่างในบ่อเลี้ยงกุ้งทุกชุดการทดลองพบว่าในตอนเช้า และบ่ายมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 8 และ 8.4 ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในช่วงที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงสัตว์น้ำเค็ม ในการเลี้ยงกุ้งทะเลควรให้ค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วง 7.5 – 8.5 (Law, 1988) ถ้าความเป็นกรด-ด่างมีค่าต่ำมากมีผลให้กุ้งเกิด

ความเครียด และเป็นสาเหตุทำให้เปลือกกุ้งนิ่มรวมถึงอัตรารอดต่ำ แต่ถ้าต่ำเพียงเล็กน้อยจะไม่มีต่ออัตรารอดแต่อาจจะมีทำให้อัตราการเจริญเติบโตลดลง (Wicking, 1976)

ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำทุกชุดการทดลองพบว่าในตอนเช้า และบ่ายมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 4.8 และ 8.5 ตามลำดับ ถ้าปริมาณออกซิเจนละลายน้ำลดลงถึง 1.5 – 2.1 มก/ลิตร มีผลให้กุ้งกุลาดำลอยหัว และถ้าลดลงถึง 0.4 – 0.7 มก/ลิตร จะเห็นกุ้งเริ่มตาย (Liao และ Murai, 1986)

ปริมาณแอมโมเนียรวมในน้ำอยู่ในช่วง 0.37 – 0.76 มก/ลิตร และปริมาณไนไตรท์-ไนโตรเจนอยู่ในช่วง 0.1 – 0.4 มก/ลิตร ทั้งสองค่าไม่มีความเป็นพิษต่อกุ้ง ที่ความเค็ม 15 พีพีทีความเป็นพิษต่อกุ้งขาวของแอมโมเนียรวมจะมีค่าอยู่ในช่วง 2.6 – 3.95 มก/ลิตร (Jiang *et al.,* 1999) และของไนไตรท์มีค่า 6.1 มก/ลิตร (Lin และ Chen, 2003) แต่อย่างไรก็ตามพบว่าปริมาณของแอมโมเนียรวม และไนไตรท์ในน้ำของชุดการทดลองที่กินอาหารระดับโปรตีน 24% มีค่าต่ำกว่าชุดที่กินอาหารระดับโปรตีนที่สูงกว่า พร้อมทั้งเมื่อพิจารณาการถ่ายน้ำก็พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การถ่ายน้ำน้อยกว่าชุดทดลองอื่น ๆ ด้วย เมื่อสัตว์น้ำได้รับอาหารที่โปรตีนสูงและปริมาณกรดอะมิโนที่ได้รับมาก หรือได้รับอาหารที่มีส่วนเกินกว่าความต้องการของโปรตีนและกรดอะมิโนมาก เมื่อสัตว์น้ำนำกรดอะมิโนที่ได้รับไปใช้ในเมตาบอลิซึมของร่างกายแล้วยังมีกรดอะมิโนเหลือ กรดอะมิโนส่วนที่มากเกินพอจะอยู่ในร่างกายได้ในระยะเวลาสั้น ๆ หากไม่มีการนำไปใช้ประโยชน์จะถูกสลายเป็นสารอื่น และบางส่วนเปลี่ยนไปเก็บสะสมในรูปพลังงานแล้วขับไนโตรเจนซึ่งเป็นของเสียออกจากร่างกาย (Urich, 1994) โปรตีนที่สัตว์น้ำใช้ไม่หมดมีการขับออกทางสิ่งขับถ่าย และโปรตีนจากอาหารที่ตกค้างในระหว่างการเลี้ยง ซึ่งโปรตีนเป็นโภชนะที่มีราคาแพงและมีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมมากโดยเฉพาะการเกิดน้ำเสีย การผลิตอาหารที่มีระดับโปรตีนเหมาะสมจะทำให้ประหยัดค่าใช้จ่าย และลดปัญหาด้านมลภาวะทางน้ำ (อรพินท์, 2544)

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

ผลการใช้อาหารที่มีระดับโปรตีนที่ต่างกัน 4 ระดับ คือ 36, 32, 28 และ 24% ต่ออัตราการเจริญเติบโต และระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาว สามารถสรุปผลการทดลองได้ดังนี้

1. การเจริญเติบโตของกุ้งขาว อัตรารอด น้ำหนักเฉลี่ย อัตราการเจริญเติบโตต่อวัน อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) แต่พบว่าน้ำหนักรวมต่อบ่อของกุ้งที่กินอาหารระดับโปรตีน 32% มีค่าสูงที่สุด ($p \leq 0.05$) และใกล้เคียงกับกุ้งที่กินอาหารโปรตีน 28% ส่วนกุ้งที่กินอาหารระดับโปรตีน 36 และ 24% มีค่าน้อยกว่ากุ้งที่กินอาหารระดับโปรตีน 32% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

2. อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ อัตราการกินอาหาร ประสิทธิภาพการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อมีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) แต่ประสิทธิภาพโปรตีนในอาหาร และโปรตีนในอาหารที่สะสมในกุ้งที่กินอาหารระดับโปรตีน 36% มีค่าต่ำกว่ากุ้งที่กินอาหารระดับโปรตีน 28 และ 24% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

3. กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสในทางเดินอาหารที่ระดับ pH 6, 7, 8 ของกุ้งที่กินอาหารระดับโปรตีน 36, 32, 28 และ 24% มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05)

4. ประสิทธิภาพการย่อยอาหารในห้องปฏิบัติการโดยเอนไซม์ที่สกัดจากเฮปาโตแพนเครียสของกุ้งที่อายุ 30 และ 100 วัน มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) แต่ที่อายุ 60 วัน พบว่ากุ้งที่กินอาหารระดับโปรตีน 24% มีประสิทธิภาพการย่อยอาหารทั้ง 4 ระดับโปรตีนในห้องปฏิบัติการต่ำกว่ากลุ่มที่กินอาหารระดับโปรตีน 36 และ 32% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) แต่ที่อายุ 90 วันพบว่ากุ้งที่กินอาหารระดับโปรตีน 24% มีประสิทธิภาพการย่อยอาหารในห้องปฏิบัติการต่ำกว่ากุ้งที่กินอาหารระดับโปรตีน 36 และ 32% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) สำหรับอาหารระดับโปรตีน 28% เท่านั้น

5. อัตราการสังเคราะห์ RNA /โปรตีนในตับ และกล้ามเนื้อของกุ้งที่กินอาหารระดับโปรตีน 36, 32, 28 และ 24% มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05)

6. ปริมาณกรดอะมิโนชนิดที่จำเป็นในตัวกุ้งที่กินอาหารระดับโปรตีน 36, 32, 28 และ 24% มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05)

7. การตรวจสอบระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งได้แก่ ปริมาณเม็ดเลือดรวม และซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออนของกุ้งที่กินอาหารระดับโปรตีน 36, 32, 28 และ 24% มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05)

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสามารถใช้อาหารที่มีระดับโปรตีน 28 % ในการเลี้ยงกุ้งขาวที่มีอายุตั้งแต่ 50 วัน หรือน้ำหนักมากกว่า 7.5 กรัมขึ้นไป เนื่องจากเมื่อทำการเปลี่ยนการให้อาหารจากที่ระดับโปรตีน 36% มาเป็น 28% หลังกุ้งมีอายุตั้งแต่ 50 วัน พบว่าการสะสมโปรตีนในตัวกุ้งมีค่าสูงสุด น้ำหนักสุดท้ายของกุ้งที่เพิ่มและอัตรารอดดีกว่าการเลี้ยงด้วยอาหารที่มีระดับโปรตีน 36% ตลอด 100 วัน อีกทั้งไม่มีผลกระทบต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง รวมถึงต้นทุนค่าอาหารต่อการผลิตกุ้ง 1 กิโลกรัมถูกกว่าการเลี้ยงด้วยอาหารที่มีระดับโปรตีน 36 และ 32% พร้อมทั้งลดปริมาณแอมโนเนียที่ปล่อยลงสู่แหล่งน้ำ จึงลดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม

ข้อเสนอแนะ

1. ควรทดลองเปลี่ยนการให้อาหารที่มีระดับโปรตีนต่ำให้กับกุ้งเร็วขึ้นจากที่อายุ 51 วัน เป็นอายุ 31 วัน

2. ควรทำการทดลองในฤดูฝนหรือหนาว เนื่องจากการทดลองครั้งนี้อยู่ในช่วงฤดูร้อน จึงทำให้อุณหภูมิเหมาะสมต่อการกินอาหารของกุ้งส่งผลให้กุ้งมีการเจริญเติบโตปกติ ถึงแม้จะลดระดับโปรตีนในอาหาร ถ้าทำการทดลองในฤดูฝนหรือฤดูหนาวที่มีอุณหภูมิต่ำกว่าฤดูร้อน การกินอาหารของกุ้งลดลงอาจมีผลต่อการเจริญเติบโตถ้ากุ้งได้รับอาหารที่มีระดับโปรตีนต่ำ

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กิจการ ศุภมาตย์, วุฒิพร พรหมขุนทอง, ชุติมา ตินติกิตติ และ R. Hoffmann. 2543ก. ระบบภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำ: เซลล์และเนื้อเยื่อที่เกี่ยวข้องในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมในกุ้งกุลาดำ. **วารสารสงขลานครินทร์** 22: 581-588.

_____, สุภาพ เกียรติทับทิว และ R. Hoffmann. 2543ข. ระบบภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำ : การศึกษาทางจุลทรรศน์อิเลคตรอนของเม็ดเลือดกุ้งกุลาดำ. **วารสารสงขลานครินทร์** 22: 589-596.

เกวลิน หนูฤทธิ์. 2549**.** สถานการณ์กุ้งกุลาดำและกุ้งขาว. **จุลสารเศรษฐกิจการประมง 10:1**. ส่วนเศรษฐกิจการประมง สำนักพัฒนาและถ่ายทอดเทคโนโลยีการประมง, กรมประมง.

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2546. เทคนิคการประเมินคุณภาพอาหาร ประสิทธิภาพการย่อย และการเจริญเติบโตของสัตว์. **เอกสารประกอบการอบรมเชิงปฏิบัติการ.** คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ม กรุงเทพฯ

จริยา สนิทชน. 2549. **ผลของเบตาอีนต่ออัตราการเจริญเติบโต กิจกรรมเอนไซม์ในทางเดินอาหารและการสังเคราะห์โปรตีนของกุ้งกุลาดำ.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

จารุรัตน์ เศรษฐภักดี. 2528. **อาหารสัตว์เศรษฐกิจ.** ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

จูอะดี พงศ์มณีรัตน์, มะลิ บุณยรัตนผลิน, ชูศักดิ์ บริสุทธิ์ และ สุจินต์ บุญช่วย. 2539. **องค์ประกอบทางเคมีของปลาป่นไทย.** เอกสารวิชาการฉบับที่ 10/2539**.** สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง กรมประมง, กรุงเทพฯ.

_____, พิชญา ชัยนาค และทวี จินดามัยกุล. 2547. ประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนจากวัตถุดิบบางชนิดสำหรับปลาทะเลและกุ้งทะเล. **วารสารการประมง** ปีที่ 57: 317-330.

เจษฎา อิสเหาะ. 2536. **ผลของระดับโปรตีนต่ออัตราการเจริญเติบโต และอัตรารอดของกุ้งกุลาดำวัยอ่อนในน้ำเกลือสินเธาว์ ความเค็มระดับต่างๆ**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ฉัทชนัน ศิริไพศาล. 2549. **การใช้เบต้ากลูแคนเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*)**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ชลธิศักดิ์ ชาวปากน้ำ. 2540. **การเจริญเติบโตและอัตรารอดตายของลูกปลาชะโอนวัยอ่อนที่เลี้ยงด้วยอาหารเม็ดที่มีระดับโปรตีนต่างกัน**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ชลอ ลิ้มสุวรรณ, พรเลิศ จันทร์รัชชกูล. 2547. **อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งในประเทศไทย.** เมจิค พับบลิเคชั่น, กรุงเทพฯ.

ชัยชาญ ไตรศรีศิลป์. 2545. **ฟีนอลออกซิเดสที่เกี่ยวข้องกับระพบบภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon*.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ธนพงศ์ แสงซื่อ, บงกช สโรชวิกสัต, อนุชิต เกตุรวม, สุรีย์รัตน์ เงินดวง, ศรีสุคล ปานเจริญ, กัญญา คงเขียว, เชิดชัย เฉวียงหงศ์, ปรีชา เอกธรรมสุทธิ์, วิชัย ลาภจตุพร. **กุ้งขาว**. แลบอินเตอร์, กรุงเทพฯ.

นนทวิทย์ อารีย์ชน. 2549**. คู่มือปฏิบัติการภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำ**. ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพ.

นิตยา ยิ้มเจริญ. 2549. **การใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติกในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*).** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

บัลลังก์ เนื่องแสง. 2542. **ระดับโปรตีนที่เหมาะสมในอาหารลูกตะพาบน้ำไต้หวัน *Trionyx sinensis* Wiegmann**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

บุญชัย กิจสัมฤทธิ์โรจน์. 2532. **หลักการใช้และให้อาหารปลา-กุ้ง.** ศูนย์ผลิตตำราเกษตรเพื่อชนบท, นนทบุรี.

ประจวบ หลำอุบล. 2537. **สรีรวิทยาของกุ้ง.** ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ประดิษฐ์ มีสุข. 2547**. ชีวิเคมีเบื้องต้น (เคมีชีวิต).** มหาวิทยาลัยทักษิณ, สงขลา.

ปราณี อ่อนเปรื่อง. 2547. **เอนไซม์ทางเดินอาหาร.** ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหารม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ปิยะบุตร วานิชพงษ์พันธุ์. 2546 ก. ศาสตร์ของกุ้งขาวลิโทพีเนียสแวนนาไม. **สัตว์น้ำ** 14 (161): 109-119.

พุทธ ส่องแสงจินดา. 2531. การลอกคราบในครัสเตเซีย. **เอกสารเผยแพร่ฉบับที่** 1/2531. สถาบันเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งจังหวัดสงขลา กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์,สงขลา.

ภิญโญ เกียรติภิญโญ. 2545**. วิธีปฏิบัติสำหรับการเลี้ยงกุ้งขาว แอล. แวนาไม.** สำนักพิมพ์เมืองเกษตรแม็กกาซีน, สมุทรปราการ.

มะลิ บุณยรัตนผลิน. 2531. **อาหารและการให้อาหารกุ้งกุลาดำ.** สำนักพิมพ์ช่อนนทรี, กรุงเทพฯ.

วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. 2535. **อาหารปลา.** ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา, ชลบุรี.

วุฒิพร พรหมขุนทอง. 2541. **โภชนาศาสตร์สัตว์น้ำ.** ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

เวียง เชื้อโพธิ์หัก. 2528. **อาหารปลา.** ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาตร์, กรุงเทพฯ.

_____. 2542. **โภชนศาสตร์ และการให้อาหารสัตว์น้ำ**. คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สันนิภา สุรทัตต์. 2549. **วิทยาภูมิคุ้มกันทางสัตวแพทย์ภาคปฏิบัติ**. โรงพิมพ์ตีรณสาร, กรุงเทพฯ.

สามารถ เปรมกิจ และ บุญชัย เจียมปรีชา. 2548. การเลี้ยงกุ้งขาวแวนาไม (*Penaeus vannamei* Boone) แบบพัฒนาในระดับความหนาแน่นต่างกัน. **เอกสารวิชาการฉบับที่ 57/2548**. ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งสมุทรสาคร กรมประมง, กรุงเทพฯ.

สิริภัทร์ พราหมณีย์. 2548. **หลักชีววิทยา.** คณะศิลปศาสตร์ และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพ.

อมรรัตน์ เสริมวัฒนากุล, พิศมัย สมสืบ, นัชนรี ทองศรี, สาวิตรี วงศ์สุวรรณ. 2548. **อาหารและการผลิตอาหารสัตว์น้ำ**. กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

อรพินท์ จินตสถาพร. 2549. **ปฏิบัติการวิชาอาหารสัตว์น้ำ**. ภาคเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพ.

_____ . 2544. **การศึกษาเปรียบเทียบทางโภชนศาสตร์ระหว่างไก่กระทง และปลาดุกอุย**. วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อิทธิพร จันทร์เพ็ญ. 2532. **อาหารและการให้อาหารปลา,กุ้ง**. สำนักพิมพ์ช่อนนทรี, กรุงเทพฯ.

อนันต์ชัย เขื่อนธรรม. 2542. **หลักการวางแผนการทดลอง**. ภาควิชาสถิติ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Adachi, K., Hirata, T., Nishioka, T., Sakaguchi, M., 2003. Haemocyte components in crustaceans convert hemocyanin into a phenolxidase-like enzymes. **Comp. Biochem. Physiol**. 134B: 135-141.

Akiyama, D.M., Dominy, W.G., Lawrence, A.L. 1992. Penaeid shrimp nutrition for the commercial feed industry. In: Fast, A.L., Lester, L.J. (Eds.), **Marine Shrimp Culture**: Principles and Practices. Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam. The Netherlands.

AOAC. 1990**. Official Methods of Analysis**. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C.

Camp Cordova, A.I., N.Y. Hernandez-saavedra and F. Ascencio. 2002. Superoxide dismutase as modulator of immune function in American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Comp. **Biochem. Physiol. Part C**. 133: 557-565.

Ceccaldi, H.J. 1990. Anatomy and physiology of digestive tract of crustaceans decapods reared in aquaculture.P 243-259 in **Advances in tropical aquaculture**. Actes de Colloques 9 France.

Chen, J.C. Cheng, S.-Y. 1995. Hemolymph oxygen content, oxyhemocyanin, protein levels and ammonia excretion in the shrimp *Penaeus monodon* exposed to ambient nitrite. **J. Comp. Physiol.** B 164 : 530-535.

Colvin, L.B. and Brand, C.W. 1977. The protein requirement of Penaeid shrimp at various life-cycle stages in controlled environment system**. Proc. World Maricult. Soc**. 8: 821-840.

Crisantema, H. and Miguel, A. 2008. Partial replacement of fish meal by porcine meat meal in practical diets forPacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Aquaculture** 277: 244-250.

Cristina Pascual, Edgar Zenteno, Gerard Cuzon, Jaime Suarez, Ariadna Sanchez, Gabriela Gaxiola, Gabriel Taboada, Teresita Maldonado and Corlaos Rosas. 2004. *Litopenaeus vannamei* juveniles energetic balance and immunological response to dietary proteins. **Aquaculture** 239: 375 -395.

_____, Leticia Arena, Gerard Cuzon, Gabriela Gaxiola, Gabriel Taboada, Manuel Balenzuela, Carlos Rosas. 2004. Effect of a size-based selection program on blood metabolites and immune response of *Litopenaeus vannamei* juvenile fed different dietary carbohydrate levels. **Aquaculture** 230: 405-416.

Cruz-Suarez, L.E., Nieto-Lopez, M., Guajardo-Barbosa, C., Tapia-Salazar, M., Scholz, U., Ricque-Marie, D. 2007. Replacement of fish meal with poultry by-product meal in practical diets for *Litopenaeus vannamei*, and digestibility of the tested ingredients and diets. **Aquaculture** 272 : 266-476.

Dall, W., B.J. Hill, P.C.Rothlisberg and D.J. Sharples. 1990. **The biology of the Penaeidae**. Advances in marine biology Vol. 27. Academic Press. New York, USA.

Dall, W. and J.W. Moriarty. 1983. Functional aspects of nutrition and digestion. Pages 215-261 in L.H. Mantel, editor. Internal anatomy and physiological regulation. **The biology of crustacean**, Vol. 5. Academic Press, New York, USA.

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

Davis, D.A., Arnold, C.R., McCallum, I. 2002. Nutritional value of feed peas (*Pisum sativum*) in practical diet formulations for *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture Nutrition** 8 (2): 87-89.

Dennis McIntosh, T.M. Samacha, E.R0 Jones, A.L.Lawrence, D.A.McKee, S.Horowitz and A Horowitz. 2000. The effect of a commercial bacterial supplement on the high-density culturing of *Litopenaeus vannamei* with a low-protein diet in an outdoor tank system and no water exchange. **Aquacultural Engineering** 21: 215-227.

Divakaran, S., Ian P. Forster and Mario Velasco. 2004. Limitations on the use of shrimp *Litopenaeus vannamei* midgut gland extract for the measurement of in vitro protein digestibility. **Aquaculture** 239: 323-329.

Donald Voet, Judith G. Voet, Charlotte W. Pratt. 1999**. Fundamentals of Bichemistry**. John Wiley & Sons, Inc. New York.

Evelyne Bachere. 2000. Introduction Shrimp immunity and disease control. **Aquaculture** 191: 3-11.

Ezquerra, J.M., F.L. Garcia-Carreno, O. Carrillo. 1998. In vitro digestibility of dietary protein sources for white shrimp (*Penaeus vannamei*). **Aquaculture** 163: 123-136.

Francisco Vargas-Albores, Gloria Yepiz-Plascencia. 2000. Beta glucan binding protein and diets role in shrimp immune response. **Aquaculture** 191: 13-21.

Galgani F.G., Benyamin Y. and Ceccaldi H.J. 1984. Identification of digestive proteinases of Penaeus kerathurus: a comparison with Penaeus japonicus Bate. **Comparative Biochemistry and Physiology 78**B: 355-361.

Garcia-Correno F.L. 1998. Prediction of protein digestibility in shrimp and use of second generation protein ingredients in aquaculture. In :Civera ,R. and Cruz-Suarez, L.E. **Advances en Nutricion Acicola** 4 Memorias del Simposium Internacional de Nutricion Acuicola. Nov 15-18, 1998, LaPaz, B.C.S., Mexico.

Gèrard Cuzon, Addison Lawrence, Gabriela Gaxiola, Carlos Fosas, J. Guillaume. 2004. Nutrition of *Litopenaeus vannamei* reared in tanks or in ponds. **Aquaculture** 235: 513-551.

Gilles Le Moullac, Philippe Haffner. 2000. Environmental factors affecting immune response in Crustacea. **Aquaculture** 191: 121-131.

Harris, J.M. 1993. Widespread occurrence of extensive epidural rod bacteria in the hindguts of marine *Thalassinidae* and *Brachyura* (Crustacea, Decapoda). **Marine Biology** 116(4): 285-346.

Hepher, B. 1988. **Nutrition of pond fishes**. Cambridge University Press, Cambridge, New York.

Hird, F.J.R. 1986. The importance of arginine in evolution. **Comparative Biochemistry and Physiology** 859: 285-288.

Hose, J.E., G.E. Martin, V.A.Nguyen, J.Lucus and T. Rusentin. 1987. Cytochemical features of shrimp hemocytes. **Biol. Bull. Mar. Biol.** 173(1): 178-187.

James P. McVey. 1993. **Mariculture**. CRC Press, Florida, USA.

Jean Guillaume. 1997. **Crustacean Nutrition**. The World Aquaculture Society, Louisiana, USA.

Jenny Rodriguez, Gilles Le Moullac. 2000. State of the art of immunological tools and health control on penaeid shrimp. **Aquaculture** 191: 109-119.

Jiang, D.H., Lawrence, A.L., Neill, W.H., Grant, W.H. and Gong, H. 1999. Lethal effect of ammonia to postlarval *Penaeus vannamei* at two temperatures **In American Aquaculture Society Annual Conference**. pp. 77. Florida.

Johanson, W. W. and K. Soderhall. 1985. Exocytosis of the prophenoloxidase activation system from crayfish hemocytes**. J. Comp. Physiol. B**, 156 : 175-181.

Julian Gamboa- Delgado, Cesar Molina-Poveda and Chantal Cahu. 2003. Digestive enzyme activity and food ingesta in juvenile shimp *Litopenaeus vannavei* (Boone, 1931) as a function of body weight. **Aquaculture Research** 34: 1403-1411.

Kallaya Sritunyalucksana, Kenneth Soderhall. 2000. The proPO and clotting system in crustaceans. **Aquaculture** 191: 53-69.

Kanazawa, A. 1990. Protein requirements of penaeid shrimp. P. 261-270 in **Advances in Tropical** Aquaculture, Actes de Colloques 9. France.

Kanazawa, A.M. Shmaya, M. Kawasaki and K.I. Kashiwada. 1970. Nutritional requirements of prawn. 1- Feeding on artificial diet. **Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisherie**s 36 : 949-954.

Klein, J. 1982. Immunology : **The Science of Self-nonself Discrimination**. USA:A Wiley intersciencepublication.

Kureshy, N., Davis, D.A. and Arnold, C.R., 2000. Partial replacement of fish meal with meat and bone meal, flash-dried poultry by-product meal and enzyme digested poultry by-product meal in practical diets for juvenile red drum. **N. Am. J. Aquacult**. 62 : 266-272.

Lan, C.C. and B.S. Pan. 1993. In vivo digestibility simulation the proteolysis of feed protein in the midgut gland of grass shrimp (*Penaeus monodon*). **Aquaculture** 109 : 59-70.

Lawrence, A.L., Fox, J.M. and Li-Chen, E. 1995. Dietary requirement for lysine by juvenile *Penaeus vannamei* using intact and free amino acid sources. **Aquaculture** 131: 279-290.

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

Le Moullac,G., A.Van Wormhoudt and AQACOP. 1994. Adaptation of digestive enzymes to dietary protein, carbohydrate and fibre levels and influence of protein and carbohydrate quality in *Penaeus vannamei* larvae. **Aquatic Living Resources** 7 : 203-210.

Lemos, D., J.M. Ezquerra and Garcia-Carreno. 2000. Protein digestion in penaeid shrimp: digestive proteinases, proteinase inhibitors and feed digestibility. **Aquaculture** 186: 89-105.

Leuterio, T. 1979. Amino acid supplementation of feed pellets of the giant shrimp (*Macrobrachium rosenbergii*). Proceeding s of the **World Mariculture Society** 10 : 674-688.

Lim, C. and Dominy, W. 1990. Evaluation of soybean meal as a replacement for marine animal protein in diets for shrimp (*Penaeus vannamei*). **Aquaculture** 87: 53-63.

Lim, C. 1993. Effect of dietary pH on amino acid utilization by shrimp (*Penaeus vannamei*). **Aquaculture** 114 : 293-303.

Lin, Y.C. and Chen, J.C. 2001. Acute toxicity of nitrite on *Litopenaeus vannamei* juveniles at different salinity levels. **Aquaculture** 87:133-143.

Louis R.D. Abramo, Couglas E. Conklin and Dean M. Akiyama. 1997**. Crustacean Nutrition** Advances in World Aquaculture Volume 6. World aquaculture society. 587 p.

Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phemol reagent**. J. Biol.Chem**. 193: 265-275.

Martin, G.G. and B.L. Graves. 1985. Fine structure and classification of shrimp hemocytes. **J.Morphol**. 185 : 339-349.

Martinez-Cordova, L.R., A. Campana Torres and M.A. Porchax-Comejo. 2003. Dietary protein level and natural food management in the culture of blue (*Litopenaeus stylirostris*) and white shrimp (*Liteopenaeus vannamei*) in microcosms**. Aquaculture Nutrition** 9 : 155-162.

McCoid, V.,Miget, R. and Finne, G. 1984. Effect of environmental salinity on the free amino acid composition and concentration in Penaeid shrimp. **J. Food Sci** 49: 327-330

McKay, D. and C.R.Jenkin. 1970. Immunity in the invertebrates. The role of serum factores inphagocytosis of erythocytes by haemocytes of the freshwater crayfish (*Parachaeraps bicarinatus*) **Aust. J. Exp.Biol.Med.Sci.** 48: 139-150.

Mats W. Johansson, Pia Keyser, Kallaya Sritunyalucksana, Denneth Soderhall. 2000. Crustacean haemocytes and haematopoiesis. **Aquaculture** 191: 45-52.

Millamena, O.M., M.N.,Bautista-Teruel, O.S.Reyes, A. Kanazawa. 1998. Requirements of juvenile marine shrimp, *Penaeus monodon* (Fabricius) for lysine and arginine. **Aquaculture** 164 : 95-104.

Moss, S.M., S. Divadaran and B.G. Kim. 2001. Stimulation effects of pond water on digestive exzyme activity in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture Research** 32: 125-131.

Murry, R.K., D.K, Granner, P.A. Mayes and V.W. Rodwell. 1993. **Harper's Biochemistry.** Prentice-Hall International Inc. New Jersey.

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

NRC. 1983. **Nutrient Requirement of Warmwater Fishes and shellfishes**. National Academy Press, Washington, D.C.

Parker, N.C. 1987. Feed conversion indices : controversy or convention? **Prog.Fish Cult**. 49(3) : 161-166.

Person, M., A. Ver and K. Soderhall. 1987. Encapsulation of foreign particles in vitro by separated blood cells from crayfish, *Astacus leptodactylus*. **Cell. Tiss. Res**. 247:409-415.

Rosas, C., Cuzon, G., Taboada, G., Pascual, C., Gaxiola, G., Van Wormhoudt, A. 2001a. Effect of dietary protein and energy levels (P/E) on growth, oxygen consumption, hemolymph and digestive gland carbohydrates, nitrogen excretion and osmotic pressure of *Litopenaeus vannamei* and *L. setiferus* juveniles. **Aquaculture Research** 32 : 1-20.

Rosas, C., Cuzon, G., Gaxiola, G., Le Priol, Y., Paxcual, C., Fossignynol, J., Contreras, F., Sanchez, A., Van Wormhoudt, A. 2001b. Metabolism and growth of juveniles of *Litopenaeus vannamei* : effect of salinity and dietary carbohydrateslevels**. J. Exp. Mar. Biol. Ecol** 259 (1) : 1-22.

Shin-Ichi Teshima, Shunsuke Koshio and Manabu Ishikawa. 2006. Protein Requirements of the Freshwater Prawn *Macrobrachium rosenbergii* Evaluated by the Factorial Method. **World Aquaculture Society** 37: 145-153.

Sick, L.V. and J.W. Andrews. 1973. The effects of selected lipids, carbohydrates and protein on the growth, survival and body composition of P. duorarun. pp. 263-276. **In Proc. Ann. Workshop World Maricul**. 4.

Smith, L.L., P.G. Lee, A.L. Lawrence and K. Strawn. 1985. Growth and digestibility by three size of *Penaeus vannamei* Boone: effect of dietary protein and protein source. **Aquaculture** 46: 85-96.

Smith, V. and K. Soderhall. 1986. **Cellular immune mechanism in the crustacean**. Symposium of the Zoological Society of London. 56: 59-79.

Soderhall, K. and L. Cerenius. 1992. Crustacean immunity. Annu. Rev. **J.Fish.Dis**. 2: 3-23.

_____. and V.J. Smith. 1986. Prophenoloxidase-activating cascade as a recognition system in arthropods, pp. 251-258. *In* A.P. Gupta (ed.). **Hemolytic and Humoral Immunity in Arthropods**. John Wiley&Sons, Inc., New York.

Sunde, J., G.L. Taranger and K. Rungruangsak-Tirrusseb. 2001. Digestive protease activities and free amino acids in white muscle as indicators for feed conversion efficiency and growth rate n Atlantic salmon. **Fish Physiology and Biochemistry** 25 : 355-345.

Sung,H., .L. Yung and Y.L.Song. 1996. Enhancement of microbicidal activity in the black tiger prawn *Penaeus monodon* via immunostimulation**. J.Crust. Biol.** 16(2) : 278-284.

Urich, K. 1994. **Comparative Animal Biochemistry**. Springer-Verlag, Berlin.

Vargas-Alvores, F. 1995. The defense system of brown shrimp (*Penaeus californiensis*): Humoral recognition and cellular response. **J.Mar. biotechnol**. 3 : 153-156.

Van Wormhoudt, A., P.Le Chevallier and D. Sellos. 1992. Purification, biochemical characterization and N-terminal sequence of a serine-protease with chymotrypsic and collaggenolytic activities in a tropical shrimp, *Penaeus vannamei*. **Comparative Biochemistry and Physiology** 103 : 675-680.

Velasco,M., A.L. Lawrence, F.L. Castille and L.G. Obaldo. **Dietary protein requirement for *Litopenaeu vannamei*.** 2000. Avances en Nutricion Acuicola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutricion Acuicola. Yucatan, Mexico.

Walsh, P.J. and P.Wright. 1995. **Nitrogen Metabolism and Excretion**. CRC Press, New York.

Wyban James. 1992. **Special Session on shrimp Farming**. The World Aquaculture Society, Florida, USA.

_____ and Sweeney, J.N. 1991. **Intensive shrimp production technology**. The Oceanic Institute Shrimp Manual. The Ocean Institute, Hoholulu, Makapuu Point, HI.

ภาคผนวก

การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส

การสกัดเอนไซม์ (crude enzyme extraction) (Villasante *et al*., 1999)

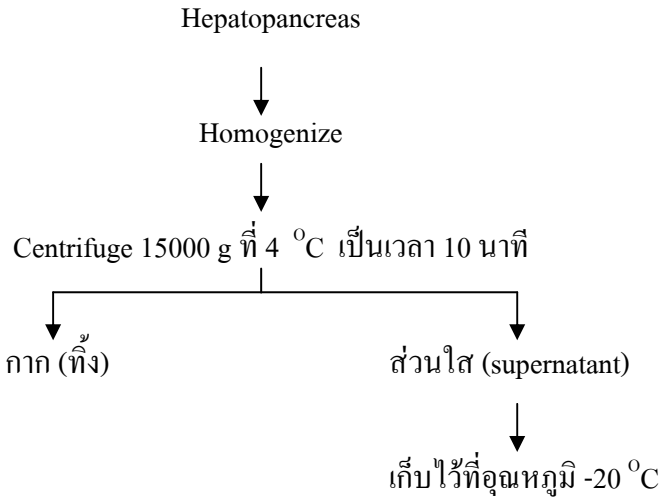
อุปกรณ์

1. เครื่อง homogenizor
2. เครื่อง centrifuge
3. ตู้แช่เย็น freezer อุณหภูมิต่ำกว่า -20 องศาเซลเซียส
4. เครื่องแก้ว
5. appendrop
6. pepettetip
7. micropipette
8. น้ำแข็ง

สารเคมี

1. สารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl buffer พีเอช 7.5

วิธีการ



การเตรียมบัฟเฟอร์ (Buffer solution) พีเอช 6, 7 และ 8

อุปกรณ์

1. เครื่องวัดพีเอช
2. เครื่องชั่งน้ำหนัก
3. เครื่องแก้วในการเตรียมสาร เช่น บีกเกอร์ ไมโครปิเปต กระบอกตวง แท่งแก้ว

สารเคมี

1. น้ำกลั่น
2. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.2 โมลาร์
3. โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.2 โมลาร์

วิธีการ

ผสมไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.2 โมลาร์ กับโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.2 โมลาร์ ตามปริมาตรดังตาราง แล้วเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ตรวจสอบด้วยเครื่องวัดพีเอช

พีเอช	ปริมาตรของไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.2 โมลาร์ (มิลลิลิตร)	ปริมาตรของโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.2 โมลาร์ (มิลลิลิตร)
6	30.75	219.25
7	152.5	97.5
8	236.75	13.25

การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส (Villasante *et al*., 1999)

อุปกรณ์

1. เครื่อง vortex mixture
2. เครื่อง centrifuge
3. เครื่อง spectrophotometer
4. เครื่องแก้ว
5. นาฬิกาจับเวลา
6. micropipette
7. appendrop
8. pipettetip

สารเคมี

1. สารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 6, 7 และ 8
2. azocasein 2%ในสารละลายบัฟเฟอร์เป็นซับสเตรท
3. trichloroacetic acid 10% (TCA)
4. NaOH 1 โมลาร์
5. น้ำแข็ง

วิธีการ

250 µl of azocasein 2% + 250 µl of crude enzyme extract

↓ บ่มที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที

หยุดปฏิกิริยาด้วย 1.2 ml of TCA

↓ Centrifuge 1500 g นาน 15 นาที

เก็บส่วนใส 1 ml เติม 1.4 ml 1 โมลาร์ NaOH

↓

วัดด้วยเครื่อง spectrophotometer ความยาวคลื่นแสงที่ 440 nm

การตรวจสอบประสิทธิภาพการย่อยในห้องปฏิบัติการ

อุปกรณ์

1. ตู้ incubator
2. เครื่อง spectrophotometer
3. เครื่องแก้ว
4. นาฬิกาจับเวลา
5. micropipette
6. appendrop
7. pipettetip

สารเคมี

1. 50 mM phosphate buffer, pH 8.2
2. เอนไซม์ที่สกัดจาก hepatopancreas
3. อาหารทดลอง
4. 0.1% TNBS (in 50 mM phosphate buffer, pH 8.2)
5. 1 N HCl

วิธีการ

1. การเตรียมอาหารทดลอง (pre-incubated feed mixtures)

อาหารทดลองที่บดละเอียด (20 mg)

↓ + 40 ml 50 mM phosphate buffer, pH 8.2

ผสมเข้าด้วยกัน

↓

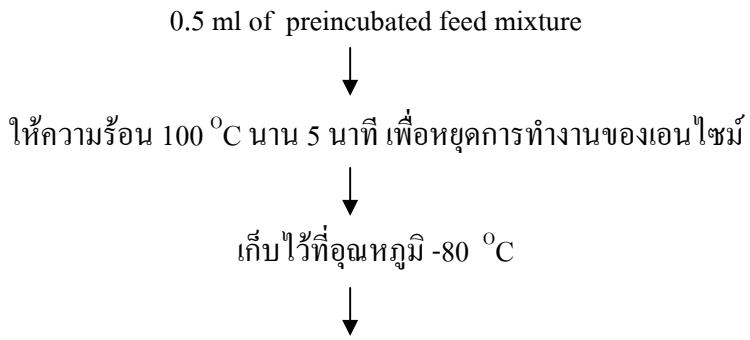
บ่มนาน 1 คืนที่อุณหภูมิห้องใน shaking incubator

↓

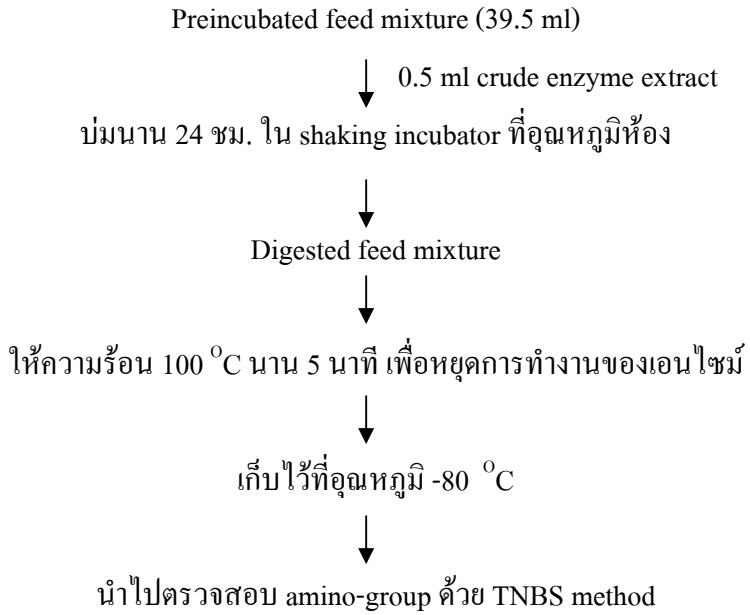
เพื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพการย่อยในห้องปฏิบัติการ

2. การย่อยอาหารทดลอง (In vitro digestion of the feed samples)

ชุดควบคุม



ชุดทดลอง



3. การตรวจสอบผลผลิตจากการย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอส โดย TNBS method

ปิเปต 2 ml of undigested control (0 h) และ digested mixture (24 h) ลงใน tube

↓ เติม 2 ml 50 mM phosphate buffer, pH 8.2 + 1 ml of 0.1% TNBS

ผสมให้เข้ากัน

↓

บ่มที่อุณหภูมิ 60 ^{O}C ในที่มืด

↓ เติม 1 ml 1 N HCl เพื่อหยุดปฏิกิริยา

ผสม และทิ้งให้เย็นที่อุณภูมิห้อง

↓

วัดที่ความยาวคลื่น 420 nm

↓

คำนวณ NH2-group โดยใช้ DL-alanine standard curve

การวิเคราะห์อัตราส่วนการสังเคราะห์ RNA ต่อโปรตีนในกล้ามเนื้อ

(Sunde *et al.*, 2001)

อุปกรณ์

1. เครื่อง sonicator
2. เครื่อง centrifuge
3. microcentifuge tube

สารเคมี

1. TRIzol reagent
2. chloroform
3. isopropanol
4. ethanol
5. sodium acetate 0.1 M ที่ pH 5
6. sodium dodecyl dulfate (SDS) 1%

วิธีการ

50-100 mg frozen white muscle sample (-80^{o} C) (….mg)

in microcentrifuge tube (1.5 ml vol)

↓ immediately add 1 ml TRIzol reagent

homogenize using sonicator

↓

incubate at room temp/ 10 min

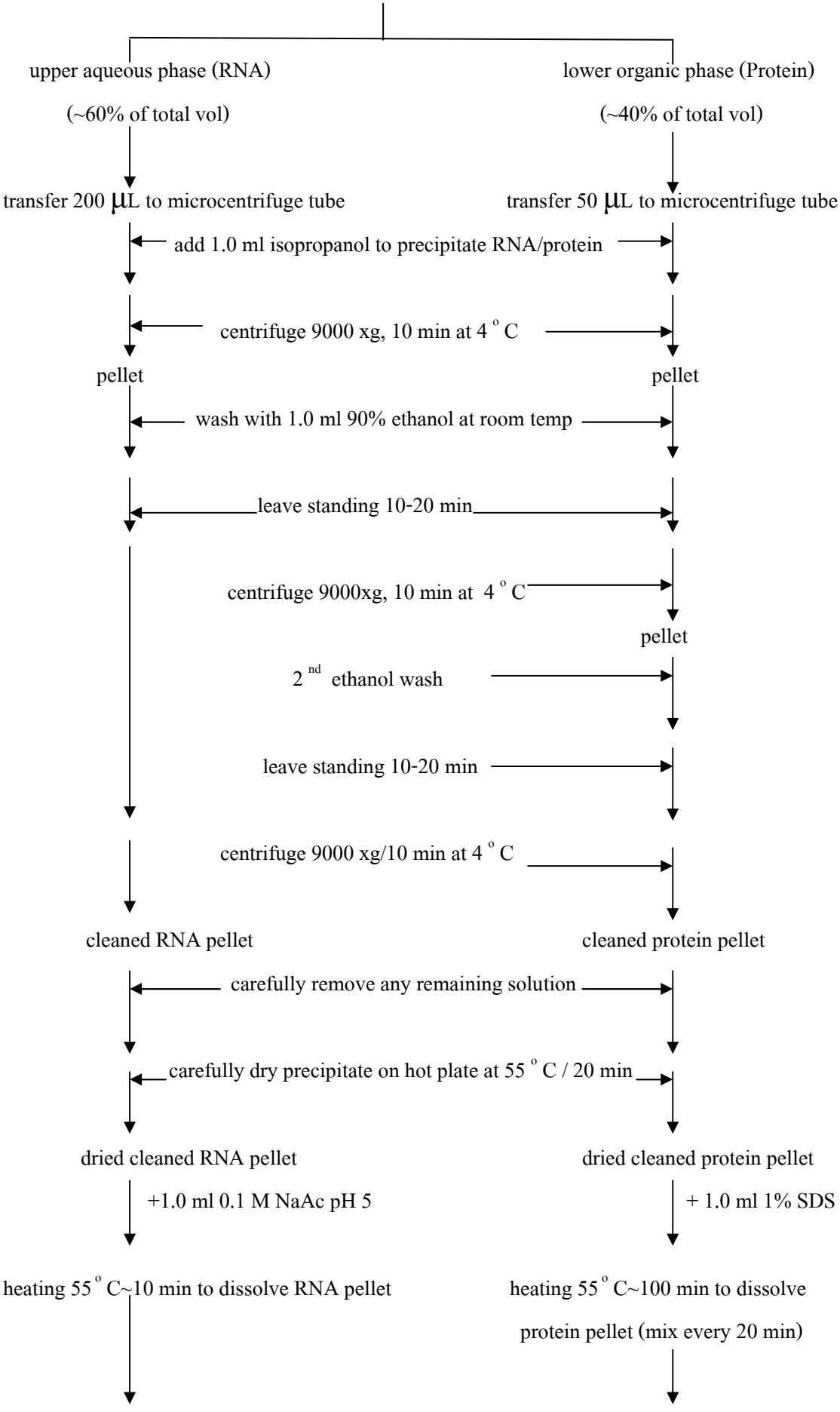
↓ add 0.2 ml chloroform

mix to extract and separate RNA and protein

↓

centrifuge 5000xg, 10 min

↓

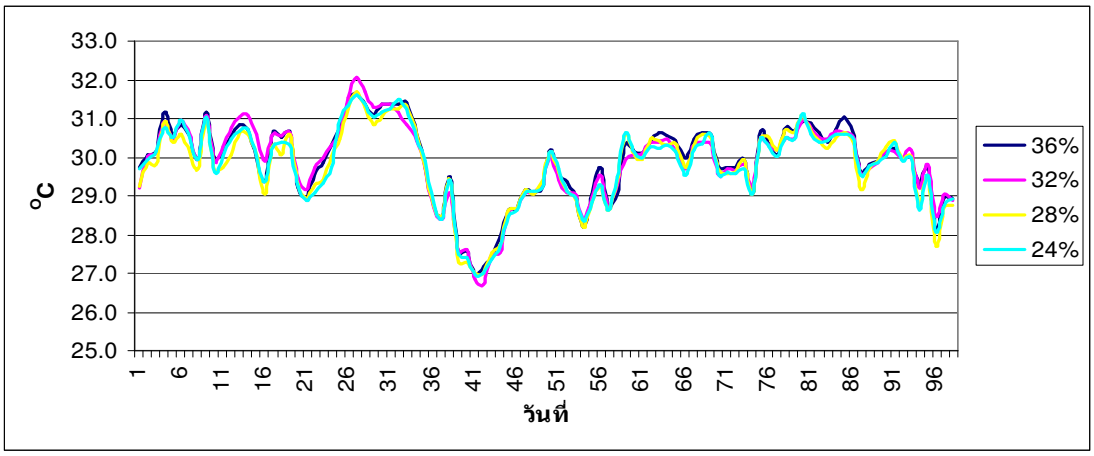

upper aqueous phase (RNA)
(~60% of total vol)
lower organic phase (Protein)
(~40% of total vol)
transfer 200 µL to microcentrifuge tube
transfer 50 µL to microcentrifuge tube
add 1.0 ml isopropanol to precipitate RNA/protein
centrifuge 9000 xg, 10 min at 4 ° C
pellet
pellet
wash with 1.0 ml 90% ethanol at room temp
leave standing 10-20 min
centrifuge 9000xg, 10 min at 4 ° C
pellet
2 nd ethanol wash
leave standing 10-20 min
centrifuge 9000 xg/10 min at 4 ° C
cleaned RNA pellet
cleaned protein pellet
carefully remove any remaining solution
carefully dry precipitate on hot plate at 55 ° C / 20 min
dried cleaned RNA pellet
dried cleaned protein pellet
+1.0 ml 0.1 M NaAc pH 5
+ 1.0 ml 1% SDS
heating 55 ° C~10 min to dissolve RNA pellet
heating 55 ° C~100 min to dissolve
protein pellet (mix every 20 min)

dil 1:10 with 0.1 M NaAc pH 5 → measure A_{260} to determine [RNA]

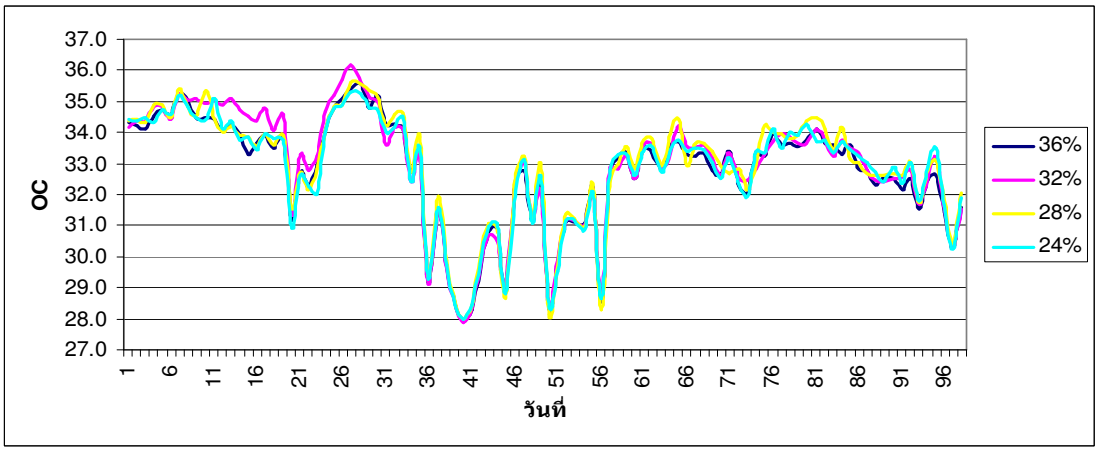
dil 1:3 with 1% SDS → measure A_{280} to determine [protein]

<u>การคำนวณ</u>

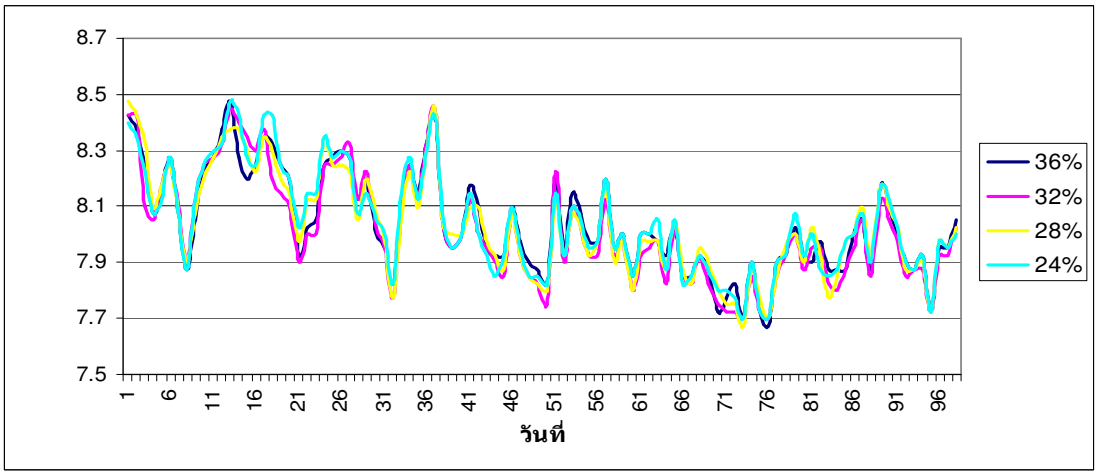
1. Calculate [RNA] using E_{260} = 40 μg RNA ml^{-1}
2. Calculate [protein] using E_{280} = 2.1 mg protein ml^{-1}
3. Calculate the protein synthesis capacity of the white muscle as the ratio of RNA /protein μg mg^{-1}



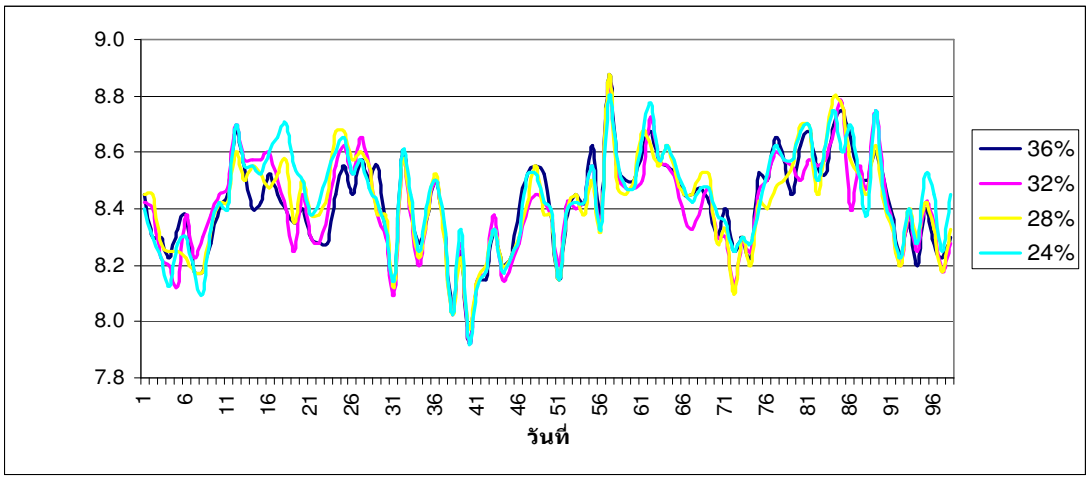
ภาพผนวกที่ 1 อุณหภูมิ ณ 6:00 น.



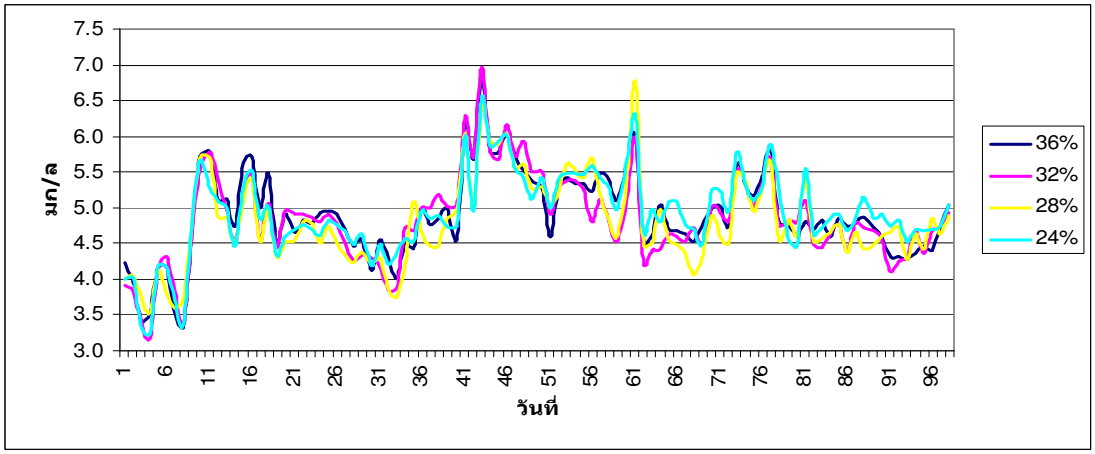
ภาพผนวกที่ 2 อุณหภูมิ ณ 14:00 น.



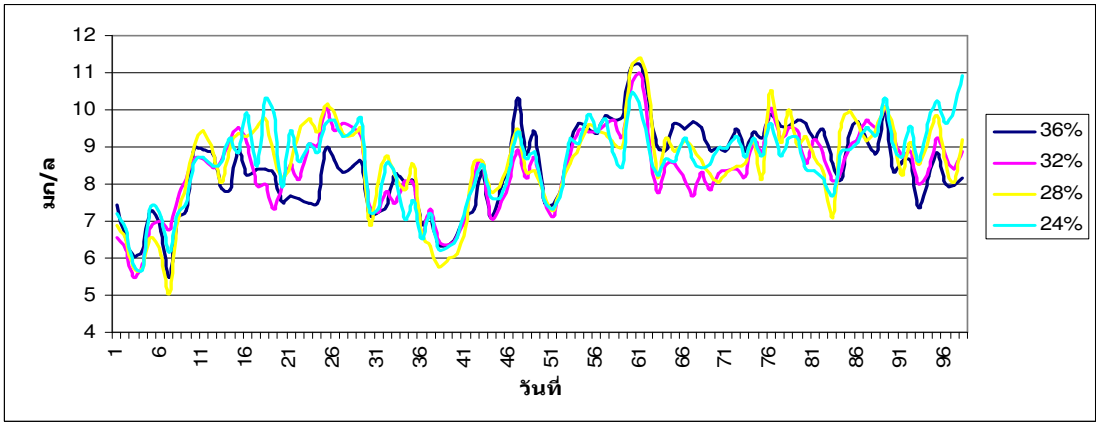
ภาพผนวกที่ 3 pH ณ 6:00 น.



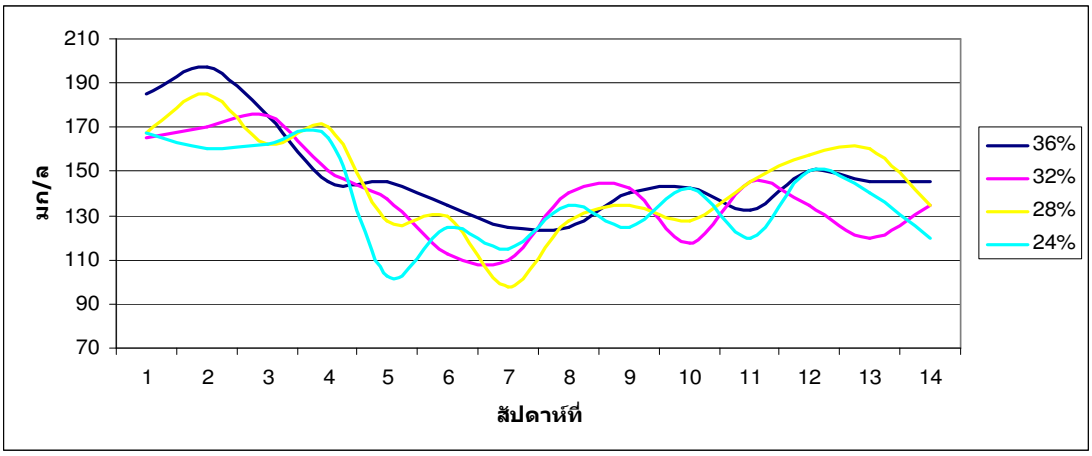
ภาพผนวกที่ 4 pH ณ 14:00 น.



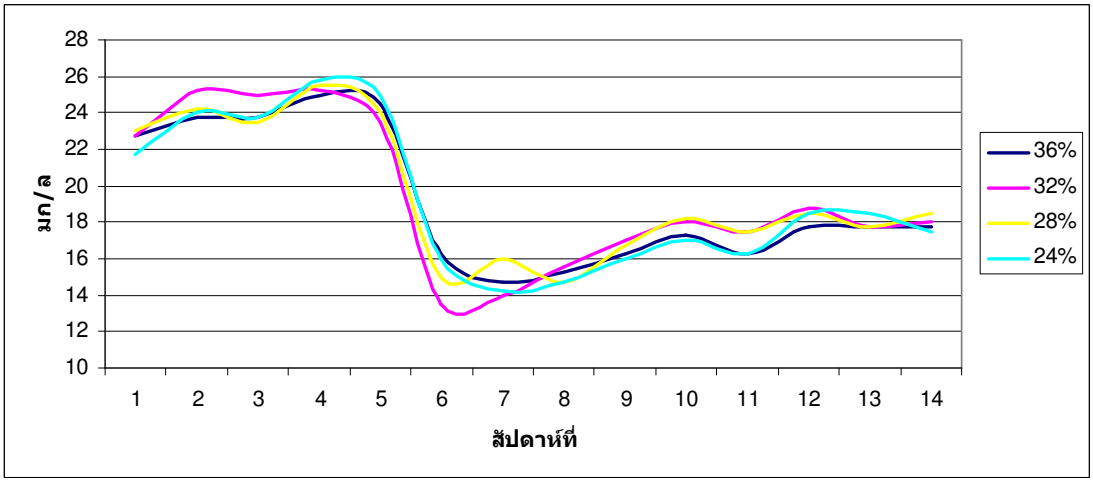
ภาพผนวกที่ 5 DO ณ 6:00 น.



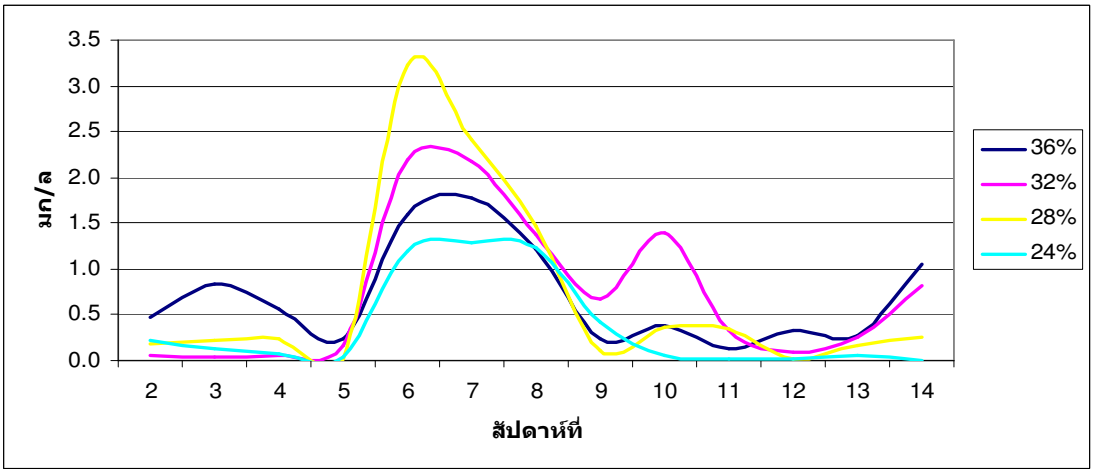
ภาพผนวกที่ 6 DO ณ 14:00 น.



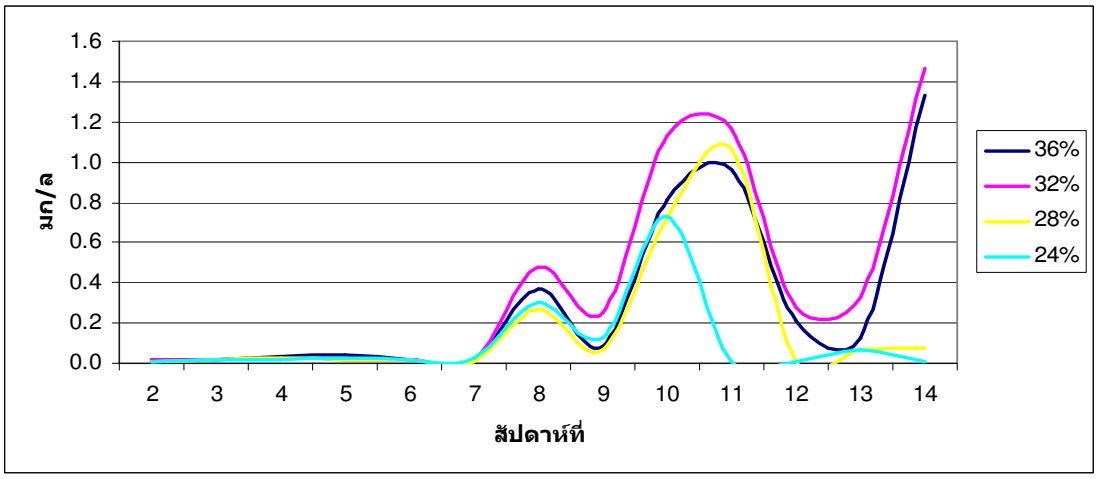
ภาพผนวกที่ 7 ค่าความเป็นด่าง



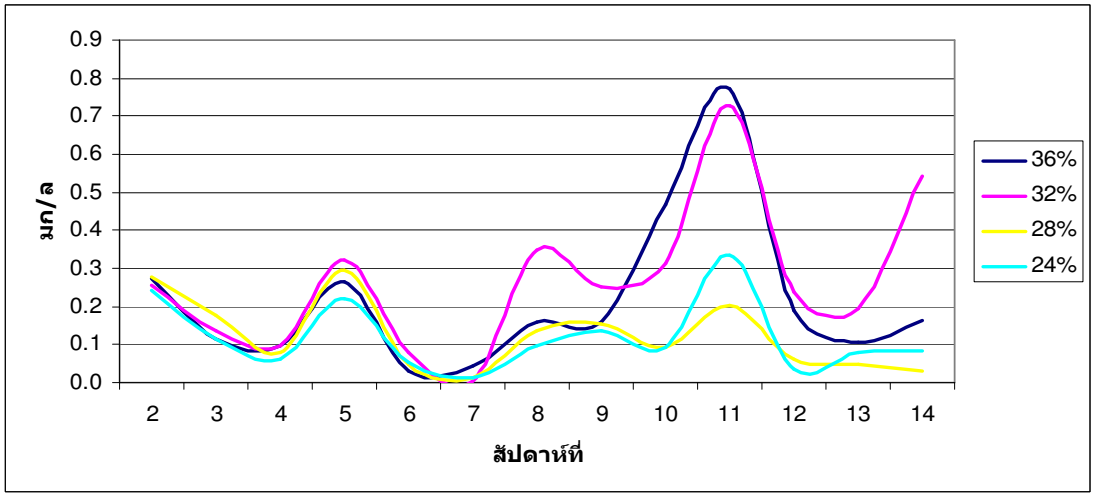
ภาพผนวกที่ 8 ค่าความเค็ม



ภาพผนวกที่ 9 ค่าแอมโมเนียรวม



ภาพผนวกที่ 10 ค่าไนไตรท์-ไนโตรเจน



ภาพผนวกที่ 11 ค่าไนเตรท

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาวณัฐกุล แหยมสุขสวัสดิ์
วัน เดือน ปี ที่เกิด	2 ตุลาคม 2520
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา	ชั้นมัธยมศึกษาตอนต้น และตอนปลายจากโรงเรียนศึกษานารี พ.ศ. 2538 วท.บ. (ประมง) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ พ.ศ. 2542
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	ผจก. แผนกพัฒนา และทดลองอาหารสัตว์น้ำเค็ม
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	บมจ.เจริญโภคภัณฑ์อาหาร