ผลของเบทาอีนต่ออัตราการเจริญเติบโต กิจกรรมเอนไซม์ในทางเดินอาหาร และการสังเคราะห์โปรตีนของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*, Fabricius) ระยะวัยรุ่น

Effect of Betaine on Growth Performance, Digestive Enzymes Activity and Protein Synthesis in Juvenile Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*, Fabricius)

คำนำ

กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*, Fabricius) เป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจชนิดหนึ่งที่สำคัญของประเทศไทย ในปีหนึ่งๆ มีปริมาณการเพาะเลี้ยงเป็นจำนวนมากในแถบพื้นที่ชายฝั่งทะเลและได้มีการขยายพื้นที่การเลี้ยงมาเขตน้ำจืดหรือการเลี้ยงที่ระดับความเค็มต่ำ เพื่อลดปัญหาการระบาดของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวซึ่งมักจะพบในเขตการเลี้ยงที่น้ำมีความเค็มสูง จากการระบาดของโรคไม่ว่าจะเป็นเชื้อไวรัสหรือแบคทีเรีย นับว่าเป็นปัญหาหลักของการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ดังนั้นในช่วงที่ผ่านมาเกษตรกรจึงพยายามที่จะแก้ปัญหาด้วยวิธีการใช้ยาปฏิชีวนะมาป้องกันและรักษาโรค ยาที่นำมาใช้นั้นมีความหลากหลาย บางชนิดเป็นยาต้องห้าม เช่น คลอแรมฟีนิคอล เมื่อใช้แล้วทำให้เกิดการตกค้างในเนื้อกุ้งแล้วยังมีผลข้างเคียงต่อสุขภาพมนุษย์อีกด้วย จึงเป็นเหตุผลหนึ่งที่ตลาดส่งออกโดยเฉพาะสหภาพยุโรปเข้มงวดกับปริมาณของยาปฏิชีวนะที่ตกค้างในเนื้อกุ้งเป็นอย่างมาก ดังนั้นเพื่อให้มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคภาครัฐจึงได้กำหนดมาตรการการใช้ยาและสารเคมีในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ รวมทั้งยังส่งเสริมให้มีการใช้สมุนไพรเพื่อป้องกันและรักษาโรคอีกด้วย ส่วนอาหารก็เป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญขั้นพื้นฐานที่ส่งผลให้กุ้งมีสุขภาพแข็งแรงและสามารถต้านทานโรคได้ดีเช่นกัน ดังนั้นจึงควรเลือกอาหารที่ประกอบด้วยวัตถุดิบคุณภาพดี มีคุณสมบัติช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตและมีคุณค่าทางโภชนะครบถ้วนตามความต้องการของกุ้งกุลาดำ นอกจากนั้นในอาหารที่มีสารเสริมโภชนะบางชนิดยังมีผลต่อการกินอาหาร การเพิ่มประสิทธิภาพการย่อย การดูดซึมและการใช้ประโยชน์จากอาหารยังทำให้กุ้งมีการเจริญเติบโตและแข็งแรงมากขึ้นอีกด้วย

เบทาอีนหรือไตรเมธิลไกลซีน (trimethylglycine) มีคุณสมบัติในการรักษาสมดุลภายในเซลล์ (osmoprotectant) เมื่อสภาวะแวดล้อมมีการเปลี่ยนแปลง (Yancey,1992) และเป็นสารที่ช่วยดึงดูดการกินอาหาร (chemoattractant) ของกุ้ง (Carr,1978) อีกทั้งมีคุณสมบัติเป็นผู้ให้หมู่เมธิล

(methyl donor) (Jacob *et al.,* 1995) ดังนั้นในอาหารสัตว์ทั่วไป รวมทั้งอาหารสัตว์น้ำจึงนิยมเสริมเบทาอีนเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตและการใช้ประโยชน์อาหารของสัตว์

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาผลของเบทาอีนต่อการจริญเติบโตและการประเมินคุณค่าอาหารของกุ้งกุลาดำระยะวัยรุ่น
2. เพื่อศึกษาผลของเบทาอีนต่อกิจกรรมเอนไซม์ในทางเดินอาหารได้แก่ อะไมเลส (amylase) โปรติเอส (protease) และไลเปส (lipase) ของกุ้งกุลาดำระยะวัยรุ่น
3. เพื่อศึกษาผลของเบทาอีนต่ออัตราการสังเคราะห์ RNA ต่อโปรตีนของกุ้งกุลาดำระยะวัยรุ่น
4. เพื่อศึกษาผลของเบทาอีนต่อการสะสมฟอสฟาติดิลโคลีนของกุ้งกุลาดำระยะวัยรุ่น

การตรวจเอกสาร

1. กุ้งกุลาดำ

กุ้งกุลาดำ มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Penaeus monodon*, Fabricius มีชื่อสามัญว่า black tiger shrimp สามารถทนอยู่ได้ตามบริเวณที่มีอุณหภูมิสูงและความเค็มแตกต่างกันมาก (euryhaline) แพร่กระจายในน่านน้ำไต้หวัน ฟิลิปปินส์ อินโดนีเซีย มาเลเซีย (Motoh, 1981) และพื้นที่พบมากได้แก่ ไทย ออสเตรเลีย และ อินเดีย (Shigueno, 1975) มีรายงานว่าเป็นกุ้งทะเลที่นิยมเลี้ยงกันอย่างแพร่หลายในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (ASEAN, 1978)

1.1. ลักษณะรูปร่างภายนอก

กุ้งกุลาดำเป็นกุ้งทะเลที่มีขนาดใหญ่ ลำตัวมีสีเทาหรือสีน้ำตาลเข้ม มีแถบสีน้ำตาลหรือม่วงเข้มพาดขวางลำตัวทำให้เห็นเป็นปล้องๆ มีเปลือกหุ้มลำตัวเป็นโครงสร้างภายนอก (exoskelaton) ประกอบด้วยไคติน (chitin) และโปรตีน ชั้นเอพิเดอมอล (epidermal) มีแคลเซียมซึ่งเป็นส่วนที่แข็งของเปลือก แต่ละข้อปล้องจะเชื่อมติดกันด้วยเยื่อบางๆ (articular membrane) ร่างกายแบ่งเป็น 3 ส่วน คือ หัว (head) อก (thorax) และลำตัว (abdomen) มีหัวและอกรวมเข้าด้วยกันเรียกว่า cephalothorax ลำตัวแยกเป็นข้อปล้องชัดเจน ตัวกุ้งมีทั้งหมด 19 ปล้องคือ รยางค์ส่วนหัวมี 5 คู่ ส่วนอก 8 คู่ และส่วนลำตัว 6 คู่

มีเปลือกคลุมหัว (carapace) มีลักษณะเกลี้ยงไม่มีขน กรี (rostrum) โค้งเล็กน้อย ฟันกรีด้านบน (upper teeth) มี 7-8 ซี่ ฟันกรีด้านล่าง (lower teeth) มี 3 ซี่ สันข้างกรี (adrostral carina) ยาวไม่เกินครึ่งหนึ่งของเปลือกคลุมหัว (carapace) ไม่มีสันแกสโตรฟอนทรอล(gastrofontrol) มีสันที่เฮพาติค (hepatic) ขาเดินคู่ที่ 5 ไม่มีรยางค์ด้านนอก

รยางค์ (appendages) แบ่งเป็น 3 ส่วน ส่วนแรกคือ รยางค์ส่วนหัว (cephalic appendages) ประกอบด้วย ก้านตา (ocular peduncle) หนวด 2 คู่ (antennules และ antennae) mandible 1 คู่ ทำหน้าที่คล้ายปาก maxillalae และ maxillae ส่วนที่ 2 คือ รยางค์ส่วนอก (thoracic appendages) ประกอบด้วย maxillipeds 3 คู่ ทำหน้าที่คล้ายขากรรไกร ช่วยในการกินอาหาร และขาเดิน (pereiopod) 5 คู่ ใช้ในการเคลื่อนที่ และส่วนที่ 3 คือ รยางค์ส่วนลำตัว (abdominal

appendages) ประกอบด้วยขาว่ายน้ำ (pleopods) 5 คู่ ใช้สำหรับว่ายน้ำและคู่ที่ 6 คือ แพนหาง (uropod) (ประจวบ, 2525, 2537) ขาว่ายน้ำแต่ละอันมีปลายเป็น 2 แฉก โคนขาว่ายน้ำมีสีเหลืองสลับสีน้ำเงิน ขาเดินคู่ที่ 5 ไม่มี expodite หางไม่มีหนาม (Hall, 1962)

1.2 การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของกุ้ง

ลูกกุ้งวัยอ่อนระยะที่ 1 คือ ระยะนอเพลียส (nauplius) เป็นลูกกุ้งที่ฟักออกจากไข่ใหม่ๆมีขนาดเล็กมาก มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างทั้งหมด 6 ครั้ง ภายใน 40-50 ชั่วโมง ระยะนี้ลูกกุ้งยังไม่กินอาหาร แต่อาหารที่ได้รับส่วนใหญ่มาจากถุงอาหารที่ติดตัวมาและมีชีวิตส่วนใหญ่อยู่ตามหน้าดิน ระยะนอเพลียสนี้มีอยู่ 6 ระยะ คือ Nauplius 1 จนถึง Nauplius 6

ลูกกุ้งวัยอ่อนระยะที่ 2 คือ ระยะโปรโตรซูเอีย (protozoea) ลูกกุ้งจะมีลำตัวยาวขึ้น มีลักษณะเด่นคือ ส่วนของ cephalothorax แยกจากส่วนลำตัว ซึ่งลูกกุ้งระยะนี้แยกเป็น 3 ระยะย่อย คือ โปรโตรซูเอียที่ 1 โปรโตรซูเอียที่ 2 และโปรโตรซูเอียที่ 3

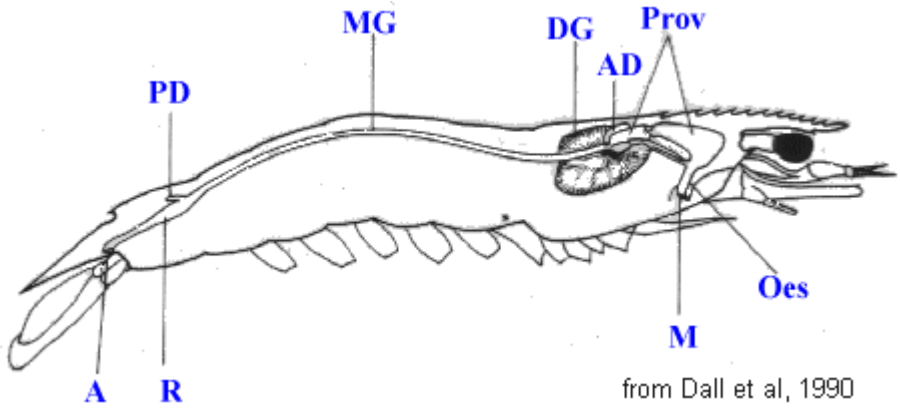
ลูกกุ้งวัยอ่อนระยะที่ 3 คือ ระยะไมซิส (mysis) ลูกกุ้งระยะนี้มีลักษณะคล้ายพ่อแม่มากขึ้น สามารถมองเห็นได้ชัด อยู่ในระยะนี้ประมาณ 7 วัน มีการเปลี่ยนแปลง 3 ระยะย่อย ระยะไมซีสที่ 1 ส่วนของขาว่ายน้ำยังไม่เกิดขึ้น แต่ที่ฐานของขาว่ายน้ำมีลักษณะเป็นปุ่มนูน (pleobases) เมื่อลูกกุ้งเข้าสู่ระยะไมซิสที่ 3 ขาว่ายน้ำจะปรากฏให้เห็นอย่างสมบูรณ์

ลูกกุ้งวัยอ่อนระยะที่ 4 คือ ระยะโพสท์ลาร์วา (postlarva) ซึ่งเป็นตัวอ่อนระยะสุดท้าย มีลักษณะเหมือนลูกกุ้งโตเต็มวัย และมีพัฒนาการของอวัยวะต่างสมบูรณ์ ลูกกุ้งระยะนี้แบ่งย่อยไปได้อีก 25 ระยะ คือ โพสท์ลาร์วาที่ 1 (P1) ไปจนถึงโพสท์ลาร์วาที่ 25 (P25) ลูกกุ้งระยะโพสท์ลาร์วานี้จะว่ายน้ำในลักษณะขนานตามแนวราบและมักเกาะตามผนังและก้นบ่อ

1.3. ลักษณะทางเดินอาหารของกุ้ง (Digestive tract)

ระบบทางเดินอาหารของกุ้งมีลักษณะเป็นท่อยาวไปตามลำตัว ดังภาพที่ 1 ใช้ปากกัดแทะ อาหารถูกส่งผ่านไปตามคอหอย (esophagus) ที่สั้น แล้วลงสู่ proventicular ดังภาพที่ 2 หรือมักเรียกว่ากระเพาะอาหาร (stomach) หลังจากนั้นอาหารจะลำเลียงไปสู่ลำไส้ซึ่งสั้นและตรง และ

ขับถ่ายมูลออกทางช่องทวาร (anus) ซึ่งมีเฮพาโตแพนเครียสเป็นแหล่งหนึ่งที่สร้างน้ำย่อยที่ใช้ในการย่อยอาหาร



A: anus

AD: anterior diverticulum of midgut

DG: digestive gland

M: mouth

MG: midgut

Oes: oesophagus

PD: posterior diverticulum of midgut

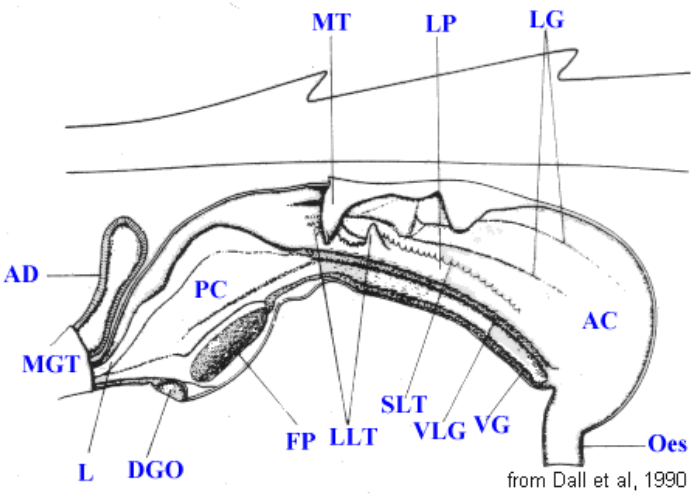
Prov: proventriculus

R: rectum

ภาพที่ 1 ระบบทางเดินอาหาร (digestive system) ของกุ้ง

ที่มา: Dall *et al*. (1990)

ประจวบ (2537) กล่าวว่าเฮพาโตแพนเครียสเป็นต่อมสร้างน้ำย่อยของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง ประกอบด้วยท่อตันหรือถุงตัน (diverticula) เปิดออกสู่ท่อ (duct) ที่จะทำหน้าที่หลั่งน้ำย่อยออกมา และ Vonk (1960) รายงานว่าเฮพาโตแพนเครียสเป็นอวัยวะที่มีการหลั่งกรดน้ำดี นอกจากนี้ยังเป็นแหล่งที่มีการสะสมไกลโคเจน ไขมันและแคลเซียม รวมทั้งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเผาผลาญโปรตีน



AC: anterior chamber

AD: anterior diverticulum

DGO: digestive gland opening

FP: filter press (pyloric press)

L: lappets

LG: lateral grooves

LLT: large lateral teeth (zygocardiac ossicle)

LP: lateral plate (cardiac plate)

MGT: tubular part of midgut

MT: medial tooth (prepyloric ossicle)

Oes: oesophagus

PC: posterior chamber

SLT: minor lateral teeth (cardiac teeth)

VG: ventral setose groove

VLG: ventro-lateral setose groove

ภาพที่ 2 ช่องท้องบริเวณทางเดินอาหาร (proventricular) ของกุ้งสกุลพีเนียส

ที่มา: Dall *et al*. (1990)

1.4. อุปนิสัยและพฤติกรรมการกินอาหาร

กุ้งกุลาดำมีกระเพาะอาหาร ลำไส้สั้นและตรง ปากเป็นแบบกัดแทะ ชอบกินอาหารที่พื้นผิวดินในเวลากลางวัน (Apud *et al*., 1980) ยืดครองพื้นที่ขณะกินอาหาร สัมผัสอาหารโดยใช้เซลล์รับความรู้สึกทางกลิ่นจากหนวดและรยางค์มากกว่าการมองเห็น เมื่อพบอาหารจะใช้ขาเดิน 3 คู่แรก คู่ใดคู่หนึ่งหรือร่วมกันจับอาหารแล้วถือแทะ อาหารจะถูกเคี้ยวให้ละเอียดต่อในปากก่อนถูกกลืนเข้าสู่กระบวนการใช้ประโยชน์ขั้นต่อไป

ในธรรมชาติกุ้งกุลาดำกินทั้งพืชและสัตว์ทั้งที่มีชีวิต ตายและเน่าเปื่อย พฤติกรรมในการกินอาหารและชนิดของอาหารที่แตกต่างกันไปตามขนาดของกุ้ง กุ้งวัยอ่อนระยะซูเอียและระยะไมซิสหากินกลางน้ำและกินแพลงก์ตอนพืชและแพลงก์ตอนสัตว์ตามลำดับ (Villaluz *et al.*, 1969) หลังจากคว่ำตัวแล้วหากินตามพื้นน้ำกุ้งวัยรุ่นระยะแรกกินทั้งพืชและสัตว์ ระยะหลังเปลี่ยนไปกินสัตว์ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังที่เคลื่อนไหวช้า (Marte, 1980) กุ้งโตเต็มวัยกินทั้งสัตว์และพืชแต่ชอบสัตว์มากกว่าพืช อาหารที่กินส่วนใหญ่ประกอบด้วย กุ้ง หอย ปู ปลาและหนอนขนาดเล็ก (Thomas, 1972; El Hag, 1984; Lim and Persyn, 1989) อาหารธรรมชาติในบ่อเลี้ยงของกุ้งกุลาดำคือ สาหร่าย แบคทีเรียและหนอนขนาดเล็กทั้งมีชีวิตและตายเน่าเปื่อยตามพื้นบ่อ จากการตรวจปริมาณของอนินทรีย์คาร์บอนในกระเพาะอาหารของกุ้งกุลาดำว่ามาจากแบคทีเรีย 10-20% (Moriarty, 1977)

1.5. ความต้องการสารอาหาร

1.5.1. ความต้องการโปรตีนและกรดอะมิโน

กุ้งกุลาดำต้องการโปรตีนในอาหารแตกต่างกันไปตามขนาด คุณภาพของโปรตีน ระดับพลังงานในอาหาร อัตราการใช้อาหารและปริมาณของอาหารธรรมชาติ ในสภาพที่ไม่มีอาหารธรรมชาติกุ้งกุลาดำควรมีโปรตีน 40-50% สำหรับกุ้งวัยอ่อน (Lee, 1971) 45-50% สำหรับกุ้งวัยรุ่นถึงกุ้งโตเต็มวัย (Alava and Lim, 1983) และ 50-55% สำหรับพ่อแม่กุ้ง (Millamena *et al.*, 1986)

กรดอะมิโนจำเป็นสำหรับปลาจำเป็นสำหรับกุ้งกุลาดำ (Coloso and Cruz, 1980) อีกทั้งยังมีกรดอะมิโนที่จำเป็นบางชนิดที่กุ้งกุลาดำต้องการในอาหารมากเป็นพิเศษ (Pascual and Kanazawa, 1986) นอกจากนั้นมีรายงานเพิ่มเติมว่าเนื้อปลาหมึก เนื้อกุ้งและเนื้อหอยทะเลมีกรดอะมิโนชนิดจำเป็นครบถ้วนเพียงพอกับความต้องการของกุ้ง (Deshimaru, 1982) ปลาป่นซึ่งเป็นแหล่งของโปรตีนที่มีคุณภาพดีสำหรับปลาให้โปรตีนที่มีคุณภาพต่ำสำหรับกุ้งกุลาดำรวมทั้งกุ้งทะเลชนิดอื่นๆ ด้วย (Forster and Berad, 1973; Sick and Andrews, 1973; Shigueno, 1975; Colvin, 1976) ทั้งนี้เพราะปลาป่นมีกรดอะมิโนฟีนิลอะลานีนและกรดอะมิโนชนิดจำเป็นพื้นฐานอื่นๆ โดยเฉพาะอาร์จินีน ฮิสติดีนและไลซีนต่ำ โปรตีนจากถั่วเหลืองป่นสามารถใช้แทนโปรตีนจากปลาป่นได้สูงถึง 45% (Pascual *et al*., 1986)

1.5.2. ความต้องการพลังงานและไขมัน

Lim and Pacual (1979) พบว่ากุ้งกุลาดำวัยรุ่นขนาดน้ำหนักประมาณ 1 กรัม เจริญเติบโตดีที่สุดเมื่อเลี้ยงด้วยอาหารที่มีโปรตีน 38% พลังงาน 3,200-3,600 กิโลแคลอรี/อาหาร 1 กิโลกรัม ซึ่งเมื่อคิดเป็นสัดส่วนโดยน้ำหนักระหว่างพลังงานกับโปรตีนจะได้เท่ากับ 8.4-9.5:1 พลังงานจำนวนนี้กุ้งควรได้รับอย่างเพียงพอจากคาร์โบไฮเดรตและไขมัน แป้งเป็นแหล่งของคาร์โบไฮเดรตที่ดีของกุ้ง (Pascual *et al.*, 1983; Alava and Pascual, 1987) ส่วนน้ำตาลโดยเฉพาะกลูโคสกุ้งใช้ประโยชน์ได้น้อยและถ้ามีในอาหารเกิน 20% เป็นอันตรายต่อกุ้ง (Abdel-Rahman *et al.*, 1979) น้ำมันถั่วเหลืองและน้ำมันปลาเป็นแหล่งของไขมันที่ดีสำหรับกุ้ง (Mangalik, 1979; Pascual, 1986) อาหารที่ใช้เลี้ยงกุ้งกุลาดำควรมีปริมาณของแป้งเป็น 1.2 เท่าของปริมาณโปรตีน (Bages and Sloanes, 1981) และมีไขมัน 5-10% (Bautista, 1986) หรือ 11.7% (Mendoza, 1982) สำหรับกุ้งวัยรุ่นและ 12% (Millamena *et al.*, 1986) สำหรับพ่อแม่พันธุ์

น้ำมันนอกจากเป็นแหล่งของพลังงานแล้วยังเป็นแหล่งของกรดไขมัน วิตามิน สเตอรอลและฟอสโฟไลปิดที่จำเป็นสำหรับกุ้งทะเล Kanazawa *et al.*, (1977) และ Jones *et al.*, (1979) รายงานว่าโอเมกา-3 (18:3n-3) และโอเมกา-6 (18:2n -6) เป็นกรดไขมันที่จำเป็นสำหรับกุ้งทะเล (*P .japonicus, P. indicus*) และกุ้งน้ำจืด (*Palaemon serratus*) นอกจากนั้นกุ้งทะเลมีความสามารถต่ำในการเปลี่ยนโอเมกา-3 เป็น EPA (20:5n-3) และ DHA (22:6n-3) อาหารกุ้งทะเลควรมี EPA หรือ DHA 0.5-1% ในกรณีใช้โอเมกา-3 และโอเมกา-6 รวมกัน สัดส่วนที่เหมาะสมระหว่างโอเมกา-3 และโอเมกา-6 คือ 1.2 :1 (Fenucci *et al*., 1981)

กุ้งไม่สามารถสังเคราะห์สเตอรอลได้เหมือนปลา และแม้กุ้งลายเสือจะสามารถเปลี่ยนสเตอรอลจากพืชและราในธรรมชาติเป็นโคเลสเตอรอลได้ แต่โคเลสเตอรอลที่เปลี่ยนได้ก็ไม่เพียงพอกับความต้องการของกุ้งเพื่อนำไปใช้ในการสร้างเซลล์ใหม่ สร้างฮอร์โมนเพศและฮอร์โมนช่วยในการลอกคราบ จึงต้องเติมโคเลสเตอรอลลงในอาหาร สำหรับกุ้งกุลาดำยังไม่มีหลักฐานยืนยันความสามารถในการเปลี่ยนโคเลสเตอรอลเหมือนกุ้งลายเสือ แต่การเติมโคเลสเตอรอลในอาหาร 0.5-1% ทำให้กุ้งกุลาดำเจริญเติบโตดี (Nalzaro, 1982) นอกจากนั้นอาหารที่เสริมด้วย เลซิธิน (lecithin) ซึ่งเป็นฟอสโฟไลปิดชนิดหนึ่ง 3% (Pascual, 1986) หรือ 4% (Nezaki, 1986) ทำให้กุ้งกุลาดำวัยอ่อนและวัยรุ่นมีอัตรารอดและการเจริญเติบโตดีขึ้น ถั่วเหลือง

และไข่จากปลาในครอบครัวปลาทูเป็นแหล่งของเลซิธินที่ดี กุ้งสังเคราะห์เลซิธินได้ช้าแต่ต้องการมากสำหรับใช้ในการขนส่งไขมันโดยเฉพาะโคเลสเตอรอลในน้ำเหลือง

1.5.3. ความต้องการวิตามิน

กุ้งลายเสือต้องการวิตามินทุกชนิดที่ปลาต้องการยกเว้นวิตามินเคและกรดแพนโทเธนิก ในอาหาร 1 กิโลกรัม ควรมีวิตามินซี 1,000-10,000 มิลลิกรัม บี1 60-120 มิลลิกรัม บี6 120 มิลลิกรัม โคลีน 600 มิลลิกรัม และอินอซิตอล 2,000-4,000 มิลลิกรัม (Kanazawa, 1985) การขาดวิตามินทำให้กุ้งมีสีซีดและเกิดสีเทาอ่อนตามขอบเปลือกบริเวณใต้ท้อง (Dashimaru and Kuroki, 1976) ผลการศึกษาความต้องการวิตามินในกุ้งกุลาดำยังไม่มีข้อสรุปชัดเจน แต่มีแนวโน้มว่าวิตามินละลายน้ำบางชนิดไม่จำเป็นต้องเติมในอาหารกุ้งกุลาดำวัยรุ่น (Catacutan and Kanazawa, 1985) การขาดวิตามินซีอาจทำให้กุ้งเปลี่ยนเป็นสีฟ้า อาการเช่นนี้แก้ไขให้เป็นปกติได้โดยการใส่สารจุดสี (astaxanthin) ในอาหารสารจุดสีดังกล่าวเป็นแหล่งของวิตามินเอ จึงทำหน้าที่ต้านการเติมออกซิเจนในไขมัน และสำรองวิตามินซีไว้ให้กุ้งได้ใช้อย่างเพียงพอ (Menasveta *et al.,* 1990)

1.5 4. ความต้องการเกลือแร่

กุ้งลายเสือต้องการฟอสฟอรัส โพแทสเซียมและแร่ธาตุรองในอาหาร (Deshimaru and Yone,1978) สำหรับแคลเซียมแม้ไม่จำเป็นแต่ควรใส่อาหารเพื่อให้กุ้งใช้ประโยชน์ฟอสฟอรัสได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งโดยทั่วไปควรใส่แคลเซียม1-2 เท่าของฟอสฟอรัส Kanazawa (1982) รายงานว่าอาหารกุ้งลายเสือควรมีแคลเซียม ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม แมกนีเซียม และทองแดง 1, 1, 0.9, 0.3 และ 0.006% ตามลำดับ

1.6. การให้อาหาร

กุ้งกุลาดำสัมผัสอาหารทางกลิ่น อาหารที่มีเนื้อกุ้ง เนื้อหอย เนื้อปลาหมึก (Pascual, 1980) กรดอะมิโนไกลซีน (Murai et al., 1983) และสารชวนกินที่สกัดจากตับปลาหมึก (Menasveta and Piyatirativouakul, 1990) จะช่วยดึงดูดให้กุ้งเข้าหาอาหารได้ง่ายและเร็วขึ้น นอกจากนั้นอาหารกุ้งที่ดีจะต้องมีขนาดพอเหมาะที่กุ้งจะสามารถจับและถือแทะได้สะดวก Lim and Persyn (1989) แนะนำให้ใช้อาหารที่มีขนาดต่างๆ ตามขนาดของกุ้ง ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แนะนำให้ใช้อาหารที่มีขนาดต่างๆ ตามขนาดของกุ้ง

ระยะเติบโต/ขนาดของกุ้ง (กรัม)	เส้นผ่าศูนย์กลางของอาหาร (มิลลิเมตร)
P_{15}-P_{30}	<0.5
P_{30}-0.5	0.5-0.8
0.5-2.0	1-2
2.0-5.0	2
5.0-10.0	2-3
>10.0	3-4

ที่มา: Lim and Persyn (1989)

ปริมาณอาหารที่ให้กุ้งกินในวันหนึ่งๆรวมทั้งจำนวนครั้งของการให้อาหารในรอบวันแตกต่างกันตามขนาดของกุ้ง Lim and Persyn (1989) อาศัยข้อมูลจากการทดลองกับกุ้งวัยรุ่น ในห้องปฏิบัติการของ Lim and Pascual (1979) แนะนำอัตราและความถี่ของการให้อาหารกุ้งในบ่อเลี้ยงตามขนาดของกุ้ง ดังตารางที่ 2

ความถี่ในการให้อาหารกุ้งขนาดหนักตั้งแต่ 10 กรัม ตามคำแนะนำของLim and Persyn (1989) ข้างต้นสอดคล้องกับแนวปฏิบัติในการเลี้ยงกุ้งแบบพัฒนาในประเทศไทย ส่วนในการเลี้ยงแบบพัฒนาซึ่งมีอัตราการปล่อยหนาแน่นขึ้น ความถี่ในการให้อาหารสูงขึ้นเป็น 4-5 ครั้งต่อวัน โดนเริ่มให้ครั้งแรกประมาณ 6.00 น. ครั้งต่อๆไปห่างกันครั้งละประมาณ 4-5 ชั่วโมง ครั้งแรกให้อาหารน้อยที่สุด แล้วค่อยเพิ่มปริมาณอาหารขึ้นเรื่อยๆ จนกระทั่งอาหารที่เหลือสำหรับกุ้งครั้งสุดท้ายคิดได้เป็น 25-30% ของปริมาณอาหารที่จะต้องให้ทั้งวัน

ตารางที่ 2 อัตราและความถี่ของการให้อาหารกุ้งใบบ่อเลี้ยงตามขนาดของกุ้ง

ระยะเติบโตขนาดครั้งของกุ้ง (กรัม)	อัตราการให้อาหารต่อวัน) (% โดยน้ำหนัก)	จำนวนครั้งในการให้อาหารต่อวัน
P_{15}-P_{30}	30-20	6
P_{30}-0.5	20-15	4
0.5-2.0	15-12	3-4
2.0-5.0	12-8	3
5.0-10.0	8-6	3
10.0-20.0	6-4	2-3
>20.0	4-3	2-3

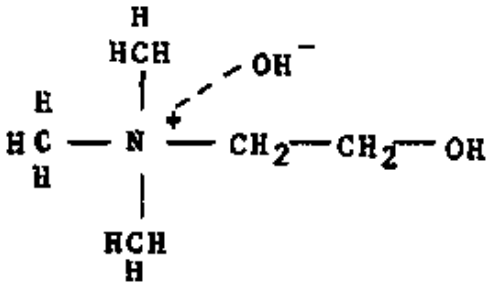
ที่มา: Lim and Persyn (1989)

แผนการให้อาหารกุ้งแต่ละครั้งห่างกัน 4-5 ชั่งโมง นับว่ามีเหตุผลเพราะอาหารที่กุ้งกินประมาณ 95% ถูกย่อยและเดินทางผ่านกระเพาะในเวลา 5 ชั่วโมง (Marte, 1980) ส่วนการเพิ่มความถี่ในการให้อาหารเป็น4-5 ครั้งต่อวันโดยมีการให้อาหารในตอนกลางคืนด้วยอาจไม่สอดคล้องกับนิสัยการอาหารของกุ้ง ซึ่งมีรายงานว่ากุ้งในบ่อเลี้ยงชอบกินอาหารในเวลากลางวัน (Apud et al., 1980) เช่นเดียวกับกั้ง (Robinson, 1989) และถ้ากุ้งชอบกินอาหารในเวลากลางวันจริง การให้อาหารน้อยที่สุดในครั้งแรกในเวลากลางวันและมากที่สุดในครั้งสุดท้ายในเวลากลางคืน ก็ยิ่งเป็นแนวปฏิบัติที่สวนทางกับนิสัยการกินอาหารของกุ้งมากยิ่งขึ้น

2. โคลีน (Choline)

โคลีนประกอบด้วยหมู่เมธิล 3 หมู่ และมีธาตุไนโตรเจน ดังภาพที่ 3 ซึ่งเป็นสารที่ให้หมู่เมธิลในการสังเคราะห์โปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของฮอร์โมนที่สำคัญเช่น อิพิเนฟรีน (epinephrine) หรือ อะดรีนาลิน (adrenalin) โคลีนทำปฏิกิริยาอะซีติลโคเอนไซม์เอ (acetyl CoA) ได้สารอะซิติลโคลีน (acetyl choline) จำเป็นในการนำความรู้สึกระบบประสาทคือส่งคำสั่งจากเซลล์ประสาทในสมองไปยังเซลล์ประสาทอื่นๆ อีกทั้งยังเป็นส่วนประกอบของไขมันประเภทฟอสโฟไลปิดชนิดฟอสฟาติดิลโคลีนซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวพาไขมันและป้องกันการสะสมไขมันที่ตับ

(Halver, 1972) และส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ผิวหนัง ทำหน้าที่ให้ความยืดหยุ่นขณะที่ร่างกายมีการเคลื่อนไหว

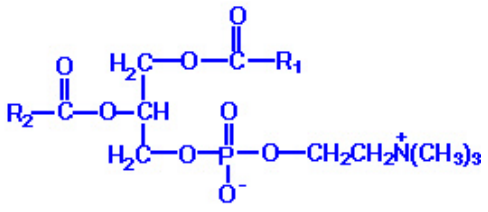


ภาพที่ 3 สูตรโครงสร้างเคมีของโคลีน

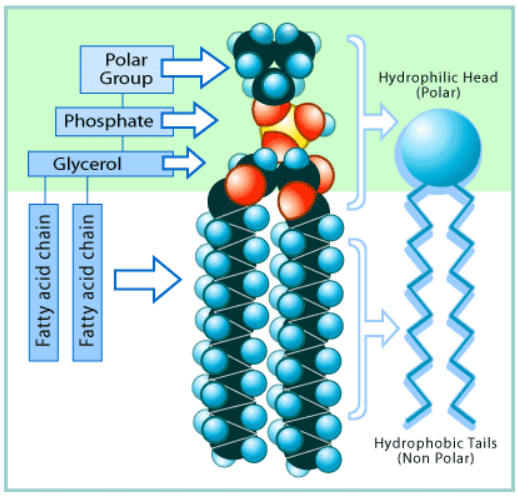
3. ฟอสฟาติดิลโคลีน (Phosphatidylcholine: PC)

3.1. โครงสร้างของฟอสฟาติดิลโคลีน

ฟอสฟาติดิลโคลีนเป็นฟอสโฟไลปิด (phospholipid) ชนิดหนึ่ง เป็นที่รู้จักกันโดยทั่วไปว่าเลซิธิน (lecithin) เป็นเอสเทอร์ของกรดฟอสฟาติดิค (phosphatidic acid) กับโคลีน (choline) ซึ่งกรดฟอสฟาติดิคประกอบด้วยกลีเซอรอล ซึ่งมีหมู่ –OH 3 หมู่ จับกับกรดไขมันจำนวน 2 โมเลกุล ส่วนตำแหน่งคาร์บอนที่ 3 ของกลีเซอรอลจับกับหมู่ฟอสเฟตและที่หมู่ฟอสเฟตจะจับกับโคลีนดังภาพที่ 4 ฟอสโฟไลปิดในส่วนที่เป็นฟอสเฟตเอสเทอร์ หรือส่วนที่เป็นกลีเซอรอลมีลักษณะโครงสร้างประกอบด้วยส่วนหัวมีขั้วสามารถรวมตัวกับน้ำได้ (hydrophilic) และหางไม่มีขั้วไม่สามารถรวมตัวกับน้ำได้ (hydrophobic) ดังภาพที่ 5



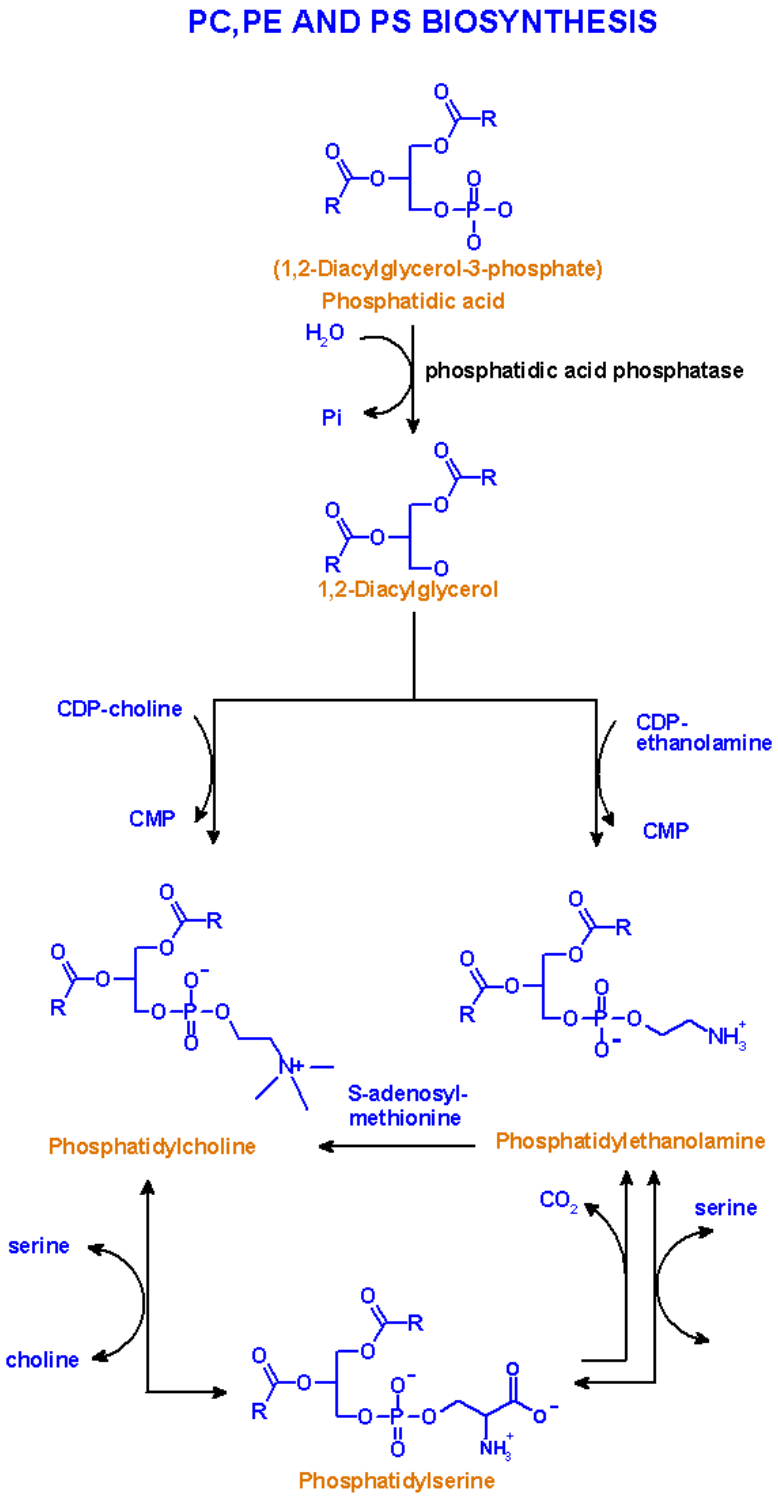
ภาพที่ 4 สูตรโครงสร้างเคมีของฟอสฟาติดิลโคลีน



ภาพที่ 5 โครงสร้างของฟอสโฟไลปิด
ที่มา: Nelson and Cox (2000)

3.2 การสังเคราะห์ฟอสฟาติดิลโคลีน

การสังเคราะห์ฟอสฟาติดิลโคลีนเกิดจากปฏิกิริยา esterification ของแอลกอฮอล์กับฟอสเฟตของ phosphatidic acid (1,2-diglycerol 3-phosphate) การสังเคราะห์ phosphatidic acid นั้นเริ่มจากกรดไขมันที่สังเคราะห์ได้ไปรวมกับโคเอนไซม์เอเป็น fatty acyl-CoA แล้วไปรวมกับกลีเซอรอล 3-phophase ได้จากการสลายกลูโคสโดยเอนไซม์ glycerol phosphate dehydrogenase ได้เป็น phosphatidic acid ส่วนใหญ่ฟอสโฟไลปิด ที่ตำแหน่งคาร์บอนที่ 1 ของกลีเซอรอลจะจับกับกรดไขมันอิ่มตัว (saturated fatty acid) และตำแหน่งคาร์บอนที่ 2 จะจับกับกรดไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) ส่วนของฟอสเฟตจะจับกับแอลกอฮอล์ เช่น choline ซึ่งจะมีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบ ส่วนฟอสเฟตที่จับกับ serine และ ethanolamine คือ phosphatidylserine (PS) และphosphatidylethanolamine (PE) ตามลำดับ ดังภาพที่ 6



ภาพที่ 6 Pathway การสังเคราะห์ฟอสโฟไลปิดชนิด phopsatidylcholine (PC) phosphatidylethanolamine (PE) และ phosphatidylserine (PS)

ที่มา: Micheal and Sergio (2003)

3.3. ความสำคัญของฟอสโฟไลปิดและฟอสฟาติดิลโคลีน

ฟอสโฟไลปิดเป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) ซึ่งมีการเรียงตัวของฟอสโฟไลปิดเป็น 2 ชั้นโดยหันส่วนที่มีขั้วไว้ด้านนอกส่วนที่ไม่มีขั้วเข้าหากัน เยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์แต่ละชนิดมีฟอสโฟไลปิดในสัดส่วนแตกต่างกันไป ฟอสฟาติดิลโคลีนเป็นส่วนประกอบที่มีมากที่สุดดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ชนิดของฟอสโฟไลปิดที่เซลล์เมมเบรนของเนื้อเยื่อไขมัน

ชนิดของฟอสโฟไลปิด	ไมโครกรัม/มิลลิกรัมของไขมัน
โคเลสเตอรอล	43
ฟอสโฟไลปิดรวมซึ่งประกอบด้วย	180
phosphatidylcholine (lecithin)	90
phosphatidylethanolamine	45
phosphatidylserine (cephalin)	16
phosphatidylinositol	10
sphingomyelin	5
ฟอสโฟไลปิดชนิดอื่นๆ	12

ที่มา: Thi-Dinh *et al.* (1990)

ฟอสโฟไลปิดที่เป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์แต่ละชนิดมีหน้าที่แตกต่างกันไป เช่น ฟอสฟาติดิลอินโนซิทอล (phosphotidylinositol) มีบทบาทในการรับสัญญาณจากฮอร์โมนบางชนิดให้เกิดกระบวนการทางชีวเคมี ฟอสฟาติดิลโคลีนเป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ของปอด ป้องกันการแฟบติดกันของปอดในขณะที่หายใจออก สฟิงโกไมอีลีน (sphingomyelin) มีมากในเซลล์ประสาท และซีรีบรอไซด์ (cerebrocide) มีมากในเซลล์สมอง

สัตว์น้ำต้องการกรดไขมันชนิดจำเป็นสำหรับใช้ในการสร้างฟอสโฟไลปิดในเยื่อหุ้มเซลล์เพื่อทำหน้าที่ให้ความยืดหยุ่นและควบคุมการซึมผ่านของสารอาหารประเภทไขมัน (Sire *et al.*, 1981) และยังจำเป็นต่อการทำงานของทุกเซลล์และอวัยวะให้เป็นปกติ ฟอสโฟไลปิดจากกรด

ไขมันที่มีความไม่อิ่มตัวสูงมีความยืดหยุ่น และควบคุมการซึมผ่านดีกว่าฟอสโฟไลปิดจากกรดไขมันที่มีความไม่อิ่มตัวต่ำ ยิ่งในกรณีของสัตว์น้ำที่อาศัยอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่มีอุณหภูมิต่ำกรดไขมันที่มีความไม่อิ่มตัวสูงยิ่งมีความจำเป็นมากขึ้น (Stickney and Lovell, 1977) ไขมันทำหน้าที่เป็นโครงสร้างของเนื้อเยื่อเซลล์ (biomembrane) ซึ่งจะทำหน้าที่ป้องกันอันตรายแก่เนื้อเยื่อหรืออวัยวะต่างๆ แล้วยังพบว่าไขมันยังเป็นตัวหล่อลื่น รวมทั้งเป็นฉนวนกันความร้อนป้องกันการสูญเสียความร้อนจากร่างกายโดยเฉพาะในสัตว์เลือดอุ่น ลักษณะของเนื้อเยื่อเซลล์ของปลาจะประกอบด้วยไขมัน 2 ชั้นที่มีโปรตีนแทรกอยู่ภายในและมีไขมันเป็นองค์ประกอบประมาณ 25% ไขมันที่พบในเยื่อเซลล์ของปลาส่วนใหญ่เป็นฟอสโฟไลปิด โดยจะพบ phosphatidylcholine มากที่สุด phosphatidylethanolamine รองลงมาซึ่งจะมี phosphatidylserine phosphatidylinositol cardiolipin และ sphingomyelin เป็นส่วนน้อย (Sargent et al. 1998) ฟอสโฟไลปิดเหล่านี้จะมีกรดไขมันเป็นองค์ประกอบแตกต่างกันไปซึ่งจะมีผลต่อการทำงานของเยื่อเซลล์ซึ่งอยู่ในเนื้อเยื่อของปลาให้ทำงานได้ปกติ

ฟอสโฟไลปิดช่วยในการดูดซึมไขมันและวิตามิน (lipophilic) การขนส่งไขมัน HUFA ไตรกลีเซอไรด์และโคเลสเตอรอลออกจากตับไปยังอวัยวะต่างๆ และเป็นแหล่งสารอาหาร เช่น essential fatty acid choline และ inositol เป็นต้น ทำให้การทำงานต่างๆ ในร่างกายทำการได้อย่างปกติ จึงส่งผลต่อการช่วยเพิ่มการเจริญเติบโตและอัตรารอดสัตว์น้ำให้ดีขึ้น

ฟอสโฟไลปิดมีความสำคัญต่อพวกครัสเตเซียนเป็นอย่างมากด้านพัฒนาการเจริญเติบโตและทางด้านสุขภาพ โดยเฉพาะ phosphatidylcholine และ phosphatidylinositol ส่วนใหญ่มีความสามารถในการสังเคราะห์ฟอสโฟไลปิดได้อย่างจำกัด ซึ่งจะมีความแตกต่างจากสัตว์บก ฉะนั้นจึงจำเป็นต้องได้รับจากอาหารด้วย เช่นเดียวกับการรายงานของ Frank and Pedley (1997) ว่าครัสเตเซียนมีความสามารถจำกัดในการสังเคราะห์ฟอสโฟไลปิด ฉะนั้นจึงจำเป็นต้องได้รับฟอสโฟไลปิดจากภายนอกผ่านทางอาหาร แต่กุ้ง lobster *(Homarus americanus*) อาจจะสามารถสังเคราะห์ฟอสโฟไลปิดเองได้โดยวิธีของสัตว์มีกระดูกสันหลัง Guillaume *et al*. (2001) กล่าวว่าฟอสโฟไลปิดมีความสำคัญต่อครัสเตเซียนไม่ใช่เพียงเป็นสารอาหารเท่านั้นแต่ยังทำหน้าที่ช่วยลำเลียง HUFAs , inositol หรือ choline เป็นตัว emulsifiers สารที่ micelles ที่ทางเดินอาหารและเป็นส่วนประกอบของ lipoprotein ซึ่งมีความสำคัญต่อการขนส่งโคเลสเตอรอลจากการดูดซึมที่เซลล์ไปยังอวัยวะเป้าหมาย ฟอสโฟไลปิดจะถูกสังเคราะห์ได้ช้า บางครั้งอาจจะถือว่าเป็น growth promoters ก็ได้ ฟอสโฟไลปิดชนิด phosphatidylcholine เป็นชนิดที่ผลต่อการทำงานของร่างกาย

มากที่สุด เมื่อได้รับอาหารที่มีโคเลสเตอรอลต่ำความต้องการฟอสโฟไลปิดสูงขึ้นเห็นได้จากความสัมพันธ์ของระบบไหล เวียนโคเลสเตอรอลและฟอสโฟไลปิดในกระแสเลือดและน้ำเหลือง (hemolymph) ที่มีการให้อาหารที่มีเลซิธินและไม่มีเลซิธิน ซึ่งเห็นได้ชัดเจนใน lobster การไหลเวียนของโคเลสเตอรอลจะดีเมื่อมีเลซิธิน ส่วนหน้าที่ของการเป็น growth promoters ยังไม่ชัดเจนใน lobster แต่จะมีความชัดเจนในกุ้งระยะต่างๆ เช่น post larva juvenile และ ระยะวางไข่ ซึ่งจะช่วยให้ได้ปริมาณไข่และอัตราการฟักดีขึ้น

Kanasawa (1982) รายงานว่าฟอสโฟไลปิดมีผลทำให้การเจริญเติบโตและอัตรารอดของครัสเตเซียนหลายชนิดดีขึ้น สอดคล้องกับการรายงานว่าอาหารที่เสริมด้วยเลซิธินซึ่งเป็นฟอสโฟไลปิดชนิดหนึ่งปริมาณ 3% และ 4% ตามลำดับ ทำให้กุ้งกุลาดำวัยอ่อนและวัยรุ่นมีอัตรารอดและการเจริญเติบโตดีขึ้น ถั่วเหลืองและไข่จากปลาในครอบครัวปลาทูน่าเป็นแหล่งของเลซิธินที่ดี กุ้งสังเคราะห์เลซิธินได้ช้าแต่ต้องการมากสำหรับใช้ในการขนส่งไขมัน โดยเฉพาะโคเลสเตอ- รอลในน้ำเหลือง (Pascual, 1986 และ Nezaki, 1986) เช่นเดียวกับ Teshima *et al.* (1986) ศึกษาปริมาณไขมันที่ตับอ่อน(hepatopancreas) กระแสเลือดและน้ำเหลือง (hemolymph) และกล้ามเนื้อกุ้งระยะวัยอ่อน ภายหลังที่มีการให้อาหารที่เสริมฟอสโฟไลปิดและไม่มีฟอสโฟไลปิด พบว่าความต้องการฟอสโฟไลปิดมีความสัมพันธ์กับการขนส่งไขมันชนิดอื่น เช่น ไตรกลีเซอไรด์และโคเลสเตอรอลไปยังน้ำเหลือง (Hemolymph) ถ้าในอาหารขาดฟอสโฟไลปิดจะทำให้การขนส่งไขมันไม่ดีพอทำให้การเจริญเติบโตและอัตรารอดของกุ้งลดลง ซึ่งการเติมเลซิธินที่ไม่มีน้ำมัน 3% ช่วยทำให้กุ้งมีการเจริญเติบโตและอัตราการแลกเนื้อสูงกว่าไม่เติมเลซิธินและพบว่าในตัวกุ้งที่ได้รับการเสริมเลซิธินจะมีปริมาณฟอสโฟไลปิดที่ระดับสูงกว่าการไม่เสริมเลซิธิน

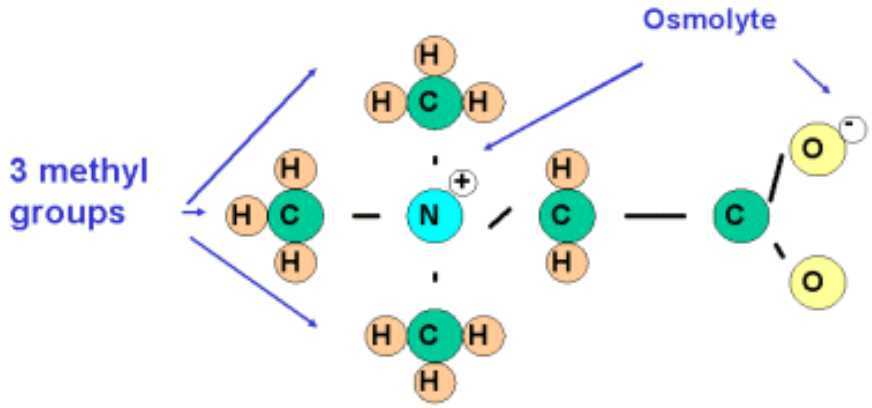
จูอะดีและมะลิ (2540) ศึกษาพบว่ากุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารที่เติมเลซิธิน 2% และ inositol 0.1% ช่วยเพิ่มความต้านทานต่อเชื้อไวรัสหัวเหลืองได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับระดับที่ต่ำกว่า ส่วนกุ้งที่ไม่ได้รับอาหารที่เติมเลซิธินและ inositol สามารถเจริญเติบโตได้เพราะได้รับฟอสโฟไล-ปิดจากวัสดุอาหารและน้ำมันปลาเพียงพอต่อการเจริญเติบโต (minimum requirement) และ Hertrampf (1992) รายงานว่าฟอสโฟไลปิดมีความสามารถในการช่วยย่อย การดูดซึมและการขนย้ายไขมันได้ง่ายในปลา baitfish เหมือนเช่นในปลาอื่นๆ การขาดฟอสโฟไลปิดในอาหารมีผลในการสะสมของหยดไขมันใน enterocyte ของลำไส้ส่วนต้นและการเพิ่มขึ้นของmucosal epithelium และการลดลงของปริมาณเฉลี่ยใน hepatocyteและจากการศึกษาที่ผ่านมาแนะนำได้ว่าฟอสโฟไลปิด

ต้องการเพื่อการดูดซึมไขมันธรรมชาติ ถึงแม้ว่าประโยชน์อื่นคือเพื่อคุณสมบัติเป็นตัวอิมัลซิไฟ-เออร์ (emulsifier)

Twibell and Brown (2000) ศึกษาพบว่า phosphatidylcholine ควรจะประเมินเช่นเดียวกับปริมาณโคลีน ความต้องการโคลีนประมาณ 600 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมและ phosphatidylcholine ก็ควรจะมีเพียงพอต่อความต้องการโคลีนด้วย เนื่องจากการศึกษานี้พิสูจน์ได้ว่าปลา perch สามารถใช้ phosphatidylcholine เป็นแหล่งโคลีนแต่เมื่อความต้องการโคลีนเพียงพอกับความต้องการโดยได้จากโคลีนคลอไรด์จะไม่มีผลต่อปริมาณ phosphatidylcholineในอาหาร

4. <u>เบทาอีน (Betaine)</u>

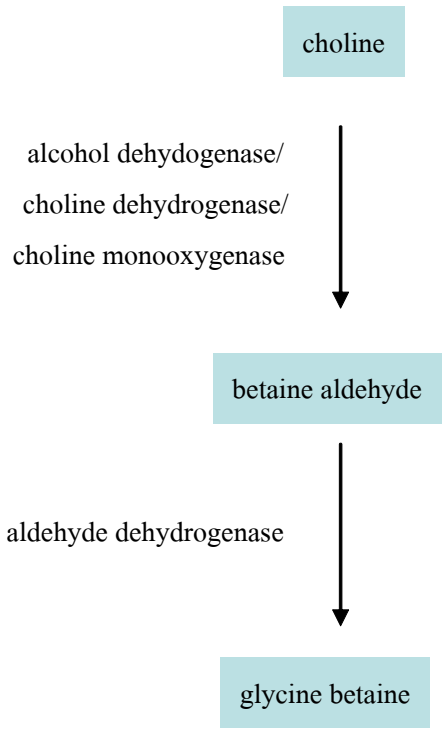
เบทาอีน (Betaine) มีชื่อทางเคมีว่าไตรเมธิลไกลซีน (trimethylglycine) เป็นสารประกอบของหมู่เมธิลรวมกับกรดอะมิโนไกลซีน (amino acid glycine) ดังภาพที่ 7 เบทาอีนเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกริยาออกซิเดชั่นของโคลีน (choline) ซึ่งเป็นตัวกลางให้หมู่เมธิล (transmethylating intermediate) ในกระบวนการเมตาบอลิซึม เนื่องจากมีคุณสมบัติเป็นผู้ให้หมู่เมธิล (CH_3) (methyl donor) จึงมีความจำเป็นในปฏิกิริยาชีวเคมีของเมไธโอนีน (methionine) และโฮโมซีสทีน (homocysteine) ทำให้ช่วยลดระดับโฮโมซีสทีนในพลาสมาและช่วยการทำงานของตับที่เกี่ยวข้องกับไขมันให้ดีขึ้น อีกทั้งยังช่วยรักษาความสมดุลภายในเซลล์ (osmoprotectant) และป้องกันโปรตีนถูกทำลาย (Schwahn *et al*., 2003)



<u>ภาพที่ 7</u> สูตรโครงสร้างเคมีของเบทาอีน (betaine)

4.1. ชีวเคมีของเบทาอีน

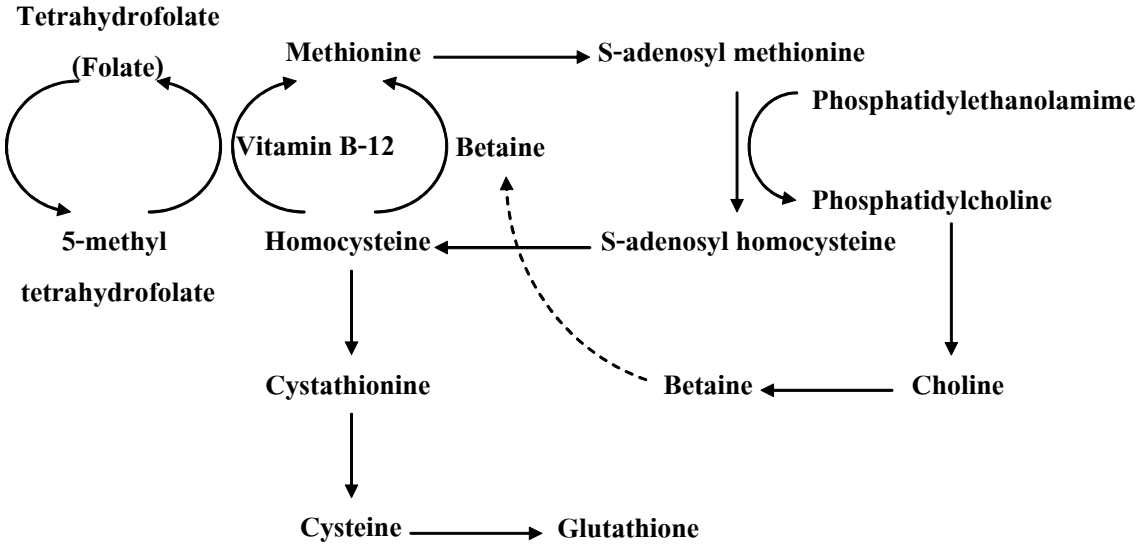
เบทาอีนถูกสร้างขึ้นในร่างกายโดยกระบวนการออกซิเดชั่นของโคลีน (oxidation of choline) ไตรเมธิลเลท (trimethylated) และสารประกอบที่ให้หมู่เมธิล ดังภาพที่ 8 กระบวนการสังเคราะห์มี 2 ขั้นตอน คือ การเปลี่ยนแปลงจากโคลีนมาเป็น betaine aldehyde ซึ่ง betaine aldehyde เป็น intermediate ของปฏิกิริยามีเอนไซม์มาเกี่ยวข้องจะเป็นชนิดใดขึ้นอยู่กับชนิดของสิ่งมีชีวิต เช่น แบคทีเรียแกรมบวก คือ alcohol dehydogenase (EC 1.1.1.1) ส่วนแบคทีเรียแกรมลบ คือ choline dehydrogenase (EC 1.1.99.1) และพืชชั้นสูงคือ choline monooxygenase (EC 1.14.15.7) ขั้นตอนที่ betaine aldehyde เปลี่ยนมาเป็น glycine betaine เอนไซม์ที่ใช้จะเหมือนกัน คือ aldehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.8.)



ภาพที่ 8 การสังเคราะห์เบทาอีนจากโคลีน (betaine biosynthesis)

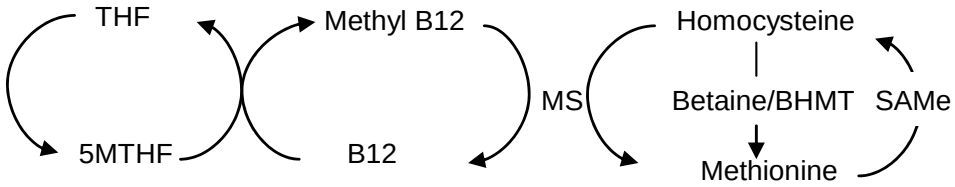
เบทาอีนจะให้หมู่เมธิลอย่างจำกัดเพียงหนึ่งปฏิกิริยาชีวเคมีเท่านั้นของการเปลี่ยนโฮโมซีสทีน (homocystein) ไปเป็นเมไธโอนีน (methionine) หลังจากที่มีการให้หมู่เมธิลแล้ว

เบทาอีนจะเปลี่ยนไปเป็นไดเมธิลไกลซีน (dimethylglycine: DMG) ในวัฏจักรเมไธโอนีนโฮโมซีสทีน (methionine-homocysteine recycling) ซัลเฟอร์ที่อยู่ในโครงสร้างโมเลกุลของเมไธโอนีนจะถูกเปลี่ยนเป็นเอส-อะดีโนซิลเมไธโอนีน (S-adenosylmethionine: SAMe) การให้หมู่เมธิลครั้งแรกสำหรับปฏิกิริยาทางชีวเคมีจะเกิดขึ้นที่ตับและถูกส่งมาที่เนื้อเยื่อ การสูญเสียหมู่เมธิลทำให้เอส-อะดีโนซิลเมไธโอนีนถูกเปลี่ยนไปเป็นเอส-อะดีโนซิลโฮโมซิสทีน และสูญเสียอะดีโนซีน (adenosine) แล้วจะถูกเปลี่ยนเป็นโฮโมซีสทีน (homocysteine) หลังจากนั้นจะถูกเมตาบอไลซ์ไปเป็นกรดอะมิโนซีสเธอีน (cysteine) ดังภาพที่ 9 และทอรีน (taurine) ซึ่งเป็น transsulfuration หรือเปลี่ยนกลับมาเป็นเมไธโอนีนจากการรับหมู่เมธิลในปฏิกิริยาเมธิลเลชัน (methylation) การเพิ่มหมู่เมธิลในโฮโมซิสทีนมีสองทาง (pathway) คือ การให้หมู่เมธิลของ methylmocabalamin หรือวิตามินบี 12 ซึ่งเป็นโคเอนไซม์ (coenzyme) ในปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่สังเคราะห์เมไธโอนีนหรืออีกทางหนึ่งคือการให้หมู่เมธิลของเบทาอีนแก่โฮโมซีสทีนโดยเอนไซม์เบทาอีน-โฮโมซิสทีนเมธิลทรานซ์เฟอเรส (betaine-homocysteine methyltransferase: BHMT) (Miller,2003) ดังภาพที่ 10



ภาพที่ 9 วัฏจักรของโฮโมซีสทีนที่มีเบทาอีนและโคลีนเกี่ยวข้อง

Involvement of Betaine in Homocysteine Recycling



TFM - tetrahydrofolate
5MTHF - 5-methyl tetrahydrofolate
MS - methionine synthase
SAMe - S-adenosylmethionine
BHMT - betaine-homocysteine methyltransferase

ภาพที่ 10 วัฏจักรของโฮโมซีสทีนที่มีเบทาอีนเกี่ยวข้อง
ที่มา: Miller (2003)

4.2. การดูซึมและการแพร่กระจาย

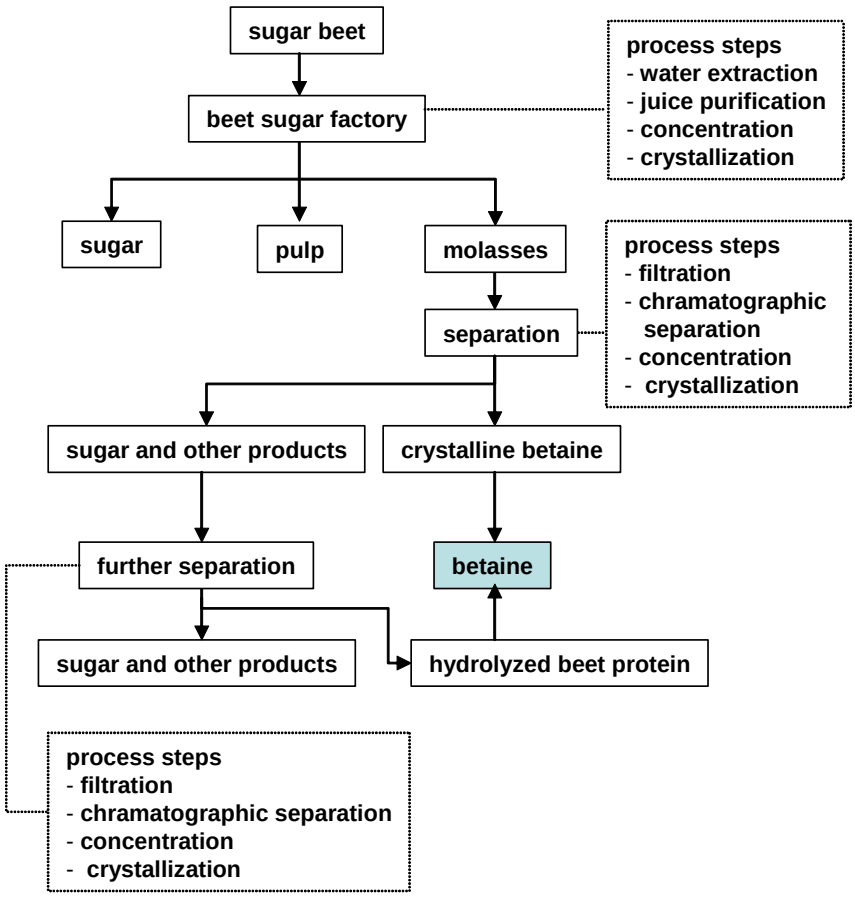
เบทาอีนสามารถถูกดูดซึมและแพร่กระจายได้ดีในร่างกาย พบความเข้มข้นที่ระดับสูงสุดในเวลาไม่เกินหนึ่งชั่วโมง การศึกษาถึงความสามารถขับเบทาอีนออกจากร่างกายของผู้ชายที่ได้ รับเบทาอีนโดยตรงจำนวน 12 คน พบว่าครึ่งหนึ่งของความเข้มข้นที่ได้รับจะถูกขับออกประมาณ 14 ชั่วโมง และจะเพิ่มขึ้นเป็น 41 ชั่วโมงหลังจากที่มีการได้รับซ้ำอีก 5 วัน ความเข้มข้นไดเมธิลไกลซีน (dimethylglycine : DMG)ในพลาสมาจะเพิ่มขึ้นด้วยหลังจากได้รับเบทาอีน มีเพียง 4 % ของเบทาอีนเท่านั้นที่จะถูกขับออกทางไต เนื่องจากจะเปลี่ยนเป็นสารประกอบอื่นในกระบวนการของเมตาบอลิซึมในร่างกาย (Schwahn *et al.* , 2003)

4.3. คุณสมบัติของเบทาอีน

เบทาอีนเป็นสารประกอบธรรมชาติ ไม่เป็นพิษ ละลายน้ำได้ดี สามารถทนความร้อนได้ถึง 200 องศาเซลเซียส

4.3. กระบวนการผลิตเบทาอีน

เบทาอีนผลิตจากหัวบีท (sugar beet) ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากการผลิตน้ำตาล มีกระบวนผลิตดังนี้ คือ นำหัวบีทมาล้างให้สะอาด แล้วหั่นเป็นแผ่นบางๆ และนำมาสกัดด้วยน้ำ ส่วนที่ได้จากการสกัดทั้งหมดที่รวมน้ำด้วยเรียกว่า crude juice หลังจากนั้นนำมาแยกให้บริสุทธิ์ โดยใส่น้ำปูนและคาร์บอนไดออกไซด์ เรียกว่า carbonation process จะได้น้ำสกัดบริสุทธิ์ (juice) ที่มีความเข้มข้นชั้นบางๆ น้ำเชื่อม (syrup) เป็นชั้นที่หนา และ เกล็ดน้ำตาลที่ตกผลึก ขั้นตอนสุดท้าย ความเข้มข้นของน้ำเชื่อมที่ไม่มากพอที่จะสามารถตกผลึกเป็นน้ำตาล ก็ยังคงรวมกับอยู่ในโมลาส (molasses) ซึ่งมีความเข้มข้นของน้ำตาลถึง 50% หลังจากนั้นจะนำไปแยกเป็นเบทาอีนต่อไปด้วยวิธี chromatographic separation process ผ่านระบบคอลัมน์ให้มีความบริสุทธิ์สูง ดังภาพที่ 11



ภาพที่ 11 กระบวนการผลิตเบทาอีน

ที่มา: The Finnstim briefing (1996)

4.5. แหล่งที่พบเบทาอีน

พบครั้งแรกในหัวบีท (sugar beet) และต่อมาพบในพืช เช่น ถั่วต่างๆ และธัญพืช เป็นต้น อีกทั้งยังพบในสัตว์ เช่น ตับ ไข่ ปลา และยังพบปริมาณสูงในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในทะเลซึ่งเป็นอาหารของปลาและสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก (microorganisms) และพืชบางชนิด

4.6. ความสำคัญของเบทาอีน (betaine)

4.6.1. ช่วยรักษาสมดุลในร่างกาย (osmoprotectant)

เบทาอีนที่พบในพืช จุลลินทรีย์ และสัตว์บางชนิดนั้นมีประโยชน์ที่จะช่วยให้เซลล์สามารถในการรักษาสมดุลได้ ในกรณีที่สิ่งแวดล้อมมีการเปลี่ยนแปลงเช่น เกิดความแห้งแล้ง มีความเค็มสูง จะทำให้เกิดการสังเคราะห์เบทาอีนในไมโตคอนเดรีย แล้วนำไปสะสมที่ในเซลล์ เบทาอีนจะช่วยรักษาความสมดุลนั้นไว้ โดยจะเก็บรักษาน้ำในเซลล์มากขึ้นและขับเกลือออกจากเซลล์ เมื่ออุณหภูมิหรือความเค็มเปลี่ยนไปช่วยทำให้เอนไซม์ภายในเซลล์ยังคงทำงานได้ปกติ (Yancey *et al.*, 1992) ซึ่งจะคล้ายกับการทำงานของเบทาอีนในไตของสัตว์ชั้นสูง

4.6.2. ช่วยดึงดูดการกิน (chemoattractant)

สารเคมีที่เป็นสารที่ช่วยดึงดูดการกินเช่น กรดอะมิโน (free amino acid) นิวคลีโอไทด์ (nucleotide), นิวคลีโอไซด์ (nucleosides) และ quaternary ammonium base (Takeda and Takii, 1992; Dy Penafloraida and Vertanen, 1996 and Papatryphon and Sorares, 2000)

เบทาอีนก็เป็นสารเคมีชนิดหนึ่งที่มีคุณสมบัติเป็น chemoattractant สามารถละลายน้ำได้ดี กลิ่นจะไปกระตุ้น olfactory bulb ของปลา จึงช่วยในการดึงดูดให้ปลาหรือสัตว์น้ำมากินอาหาร จำพวกปลากินเนื้อและพวกครัสเตเชียนมักจะชอบกินพวกสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังที่มีระดับเบทาอีนเป็นองค์ประกอบสูง ดังนั้นการเสริมเบทาอีนในสูตรอาหารอาจจะช่วยให้อาหารมีกลิ่นและรสชาติดีขึ้นที่จะดึงดูดการกินของสัตว์น้ำมากขึ้น

4.6.3. เป็นผู้ให้หมู่เมธิล (methyl donor)

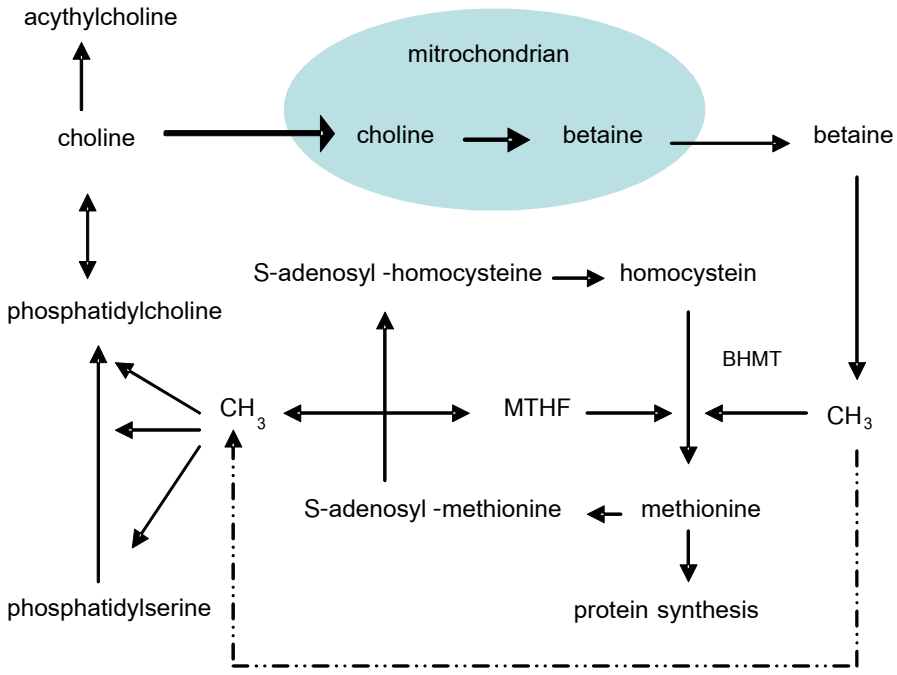
เบทาอีนเป็นผู้ให้หมู่เมธิลในปฏิกิริยาการกระตุ้นการทำงานของหลายเอนไซม์ซึ่งมีความจำเป็นในการสังเคราะห์โปรตีนและการเผาผลาญพลังงาน (energy metabolism) การสังเคราะห์เมไธโอนีนจากโฮโมซีสทีน การสังเคราะห์คาร์นิทีน (carnitine) ครีเอทีน (creatine) และ ฟอสฟาติดิลโคลีน (phosphatidylcholine) เบทาอีนทำหน้าที่ให้หมู่เมธิลทำให้โฮโมซีสทีนเปลี่ยนเป็นเมไธโอนีนแล้ว ยังได้ เอส-อะดีดนซิลเมไธโอนีน ซึ่งเป็นหมู่เมธิลที่เป็รนสารตั้งต้นในการสังเคราะห์สารประกอบอื่นๆ ที่สำคัญในร่างกาย เช่น คาร์นิทีน (carnitine) ครีเอทีน (creatine) กรดนิวคลีอิก (nucleic acids) อาร์เอ็นเอและดีเอ็นเอ (RNA/DNA) สารที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับระบบประสาท (neurotransmitters) ฮอร์โมน (hormones) และฟอสโฟลิปิด (phospholipids) ช่วยในการเปลี่ยนแปลงพลังงานและลดการสะสมไขมันในสุกร อีกทั้งพบว่าในกล้ามเนื้อของสุกรมีการสะสมคาร์นิทีน(carnitine)และสารประกอบกรดไขมันคาร์นิทีน (carnitine-fatty acid complex) มากขึ้น ช่วยให้การใช้ประโยชน์ไขมันดีขึ้น เนื่องจากคาร์นิทีนจะช่วยลำเลียงขนส่งกรดไขมันสายยาว (long chain fatty acids) ไปในไมโตรคอนเดรียทำให้ลดการสะสมไขมันในร่างกาย (Cadogan et al., 1993: Fernandez *et al*., 2002)

กลไกการเกิดปฏิกิริยาของการให้หมู่เมธิลของเบทาอีนพบเพียงการให้โฮโมซีสทีนเท่านั้นโดยเอนไซม์เบทาอีน-โฮโมซิสทีนเมธิลทรานซ์เฟอเรส(betaine-homocysteine methyltransferase : BHMT) จะไม่พบในกระบวนการให้หมู่เมธิลในปฏิกิริยาอื่น (methylation) (Baggott, 1994 and Alternative Medicine Review, 2003) แต่ S-adenosylmethionine (SAM) ที่ได้รับหมู่เมธิลจากเมไธโอนีนสามารถให้หมู่เมธิลแก่ตัวรับได้หลายชนิดและได้ผลิตภัณฑ์แตกต่างกันไปตามแต่ละตัวรับที่หมู่เมธิล

ตารางที่ 4 การปรียบเทียบเมไธโอนีนและโคลีนในปฏิกิริยา transmethylation

แหล่งของหมู่เมธิล	ถูกกระตุ้นจาก	ตัวรับหมู่เมธิล	ผลิตภัณฑ์
เมไธโอนีน	S-adenosylmethionine	หลายชนิด	หลายชนิด
โคลีน	เบทาอีน	โฮโมซีสทีน	เมไธโอนีน

ที่มา: Baggott (1994)



ภาพที่ 12 ความสัมพันธ์ของเมตาบอลิซึมระหว่างโคลีน เบทาอีนและเมไธโอนีน
ที่มา: Alternative Medicine Review (2003)

4.7. ผลของเบทาอีนต่อสัตว์น้ำ

Papatryphon and Soares (2000) พบว่าอาหารที่มีเบทาอีนทำให้ Dover sole กินอาหารน้อยกว่าอาหารสูตรควบคุม อย่างไรก็ตามเบทาอีนที่รวมกับกรดอะมิโนอื่นจะกระตุ้นการกินอาหารได้ดีกว่าอาหารที่มีกรดอะมิโนเพียงอย่างเดียว และได้มีการศึกษาผลของ เบทาอีนและกรดอะมิโนในปลากระพง (striped bass) แต่ก็ยังไม่สามารถบอกได้ชัดเจนว่าการกินอาหารที่เพิ่มขึ้นนั้นเกิดจากเบทาอีนหรือผลจากปฏิกิริยาร่วมของเบทาอีนและกรดอะมิโน

มีรายงานว่าเบทาอีนมีผลต่อการดึงดูดการกินอาหารของสัตว์น้ำ เช่น ปลากลุ่มซัลโมนิด (Salmonids) (Marui *et al*., 1983) ซีบรีม (Sea bream) (Goh and Tamura, 1980) โดเวอร์โซล (Dover sole) (Mackie *et al*., 1980, Mackie and Mitchell, 1982) ปลาไหล (Mackie and Mitchell, 1983) และกุ้ง (Carr, 1978) และสอดคล้องกับที่รายงานว่า กรดอะมิโนเบทาอีนที่ใส่ลงไปในอาหารเมื่อมีการละลายน้ำทำให้ปลาและกุ้งบางชนิดมีการตอบสนองต่อการกินในทางที่ดี เนื่องมาจาก

เบทาอีนมีกลิ่นที่ดึงดูดการกินของปลาหลายชนิด (Carr, 1976; Mackie and Mitchell, 1985; Virtanen *et al.,*1994; Takaoka *et al.,*1995; Knights, 1996; Kolkovski *et al.,* 1997 and Papatryphon and Soares, 2000) อีกทั้งยังพบว่าสริมเบทาอีนในอาหารสัตว์น้ำเพื่อเป็น chemoattractant ในกุ้งกุลาดำวัยอ่อน *Penaeus monodon* (Dy Penaflorida and Virtanen, 1996) *Penaeus indicus* (Elamparithy, 1995) มีผลทำให้น้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น ส่วนการกินอาหารของ *Penaeus japonicus* (Deshimaru and Yone, 1978) และ *Penaeus monodon* (Murai, 1983) ถูกกระตุ้นโดยการเพิ่มไกลซีน พฤติกรรมการหาอาหารของกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) จะมีประสิทธิภาพสูงขึ้นเมื่อมีสารละลายไกลซีนเบทาอีน หรือสาร chemoattractant ชนิดอื่นละลายอยู่ในน้ำ (Harpaz, 1997)

Felix and Sudharsan (2004) ทำการทดลองพบว่าไกลซีนเบทาอีนที่เสริมในอาหารระดับ 5 กรัมต่อกิโลกรัม ทำให้กุ้งก้ามกรามวัยอ่อน (*Macrobrachium rosenbergii*) มีอัตราการเจริญเติบโตของสูงที่สุดและระดับที่ 10 และ 15 กรัมต่อกิโลกรัมสูงกว่าที่ได้รับอาหารสูตรควบคุมเช่นกันซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติ อัตราการแลกเนื้อที่ได้รับอาหารที่มีไกลซีนเบทาอีนทั้ง 3 ระดับต่ำกว่าที่ได้รับอาหารสูตรควบคุม ส่วน Kasper *et a.* (2002) ได้ทำการทดลองการใช้เบทาอีนทดแทนโคลีนในอาหารสำหรับปลานิลวัยอ่อน (*Oreochromis niloticus*) พบว่าอาหารที่มีสัดส่วนของโคลีนต่อเบทาอีน 40:60 มีผลทำให้ปลามีปริมาณการกินอาหารมากที่สุดคือ 43.1 กรัมต่อน้ำหนักตัวซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติกับที่สัดส่วน 100: 0 และ 85: 15 ที่มีผลต่อปริมาณการกินอาหารที่น้อยกว่าดังนี้ 39.9 และ 40.0 กรัมต่อน้ำหนักตัวตามลำดับ แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับสัดส่วนอื่นๆ ส่วนน้ำหนักตัวของปลาที่ได้รับโคลีนต่อเบทาอีนที่สัดส่วน 10:90 มีค่าสูงสุด ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติกับที่สัดส่วน 100:0 และ 85:15 และพบว่าสัดส่วนของโคลีนและเบทาอีนในอาหารแต่ละระดับไม่มีผลทำให้ประสิทธิภาพอาหาร (feed efficeincy) และปริมาณการสะสมไขมันในตับให้มีความแตกต่างทางสถิติ

เบทาอีนมีความสำคัญต่อกรดอะมิโนซัลเฟอร์ในกระบวนการ catabolic pathway อีกทั้งยังสามารถออกซิไดซ์จากโคลีนได้ โดยมีปฏิกิริยาร่วมกันกับโคลีนหรือเมไธโอนีน รวมทั้งฟอสฟาติดิลโคลีนด้วย ในสัตว์มีกระดูกสันหลังสามารถออกซิไดซ์จากโคลีนมาเป็นเบทาอีนได้ซึ่งเป็นปฏิกิริยาทางเดียว แต่ไม่พบหลักฐานการสังเคราะห์โคลีนจากเบทาอีนในปลานิล (Kasper *et al.,* 2000) ปลาเรนโบว์เทร้า (rainbow truot) ที่ได้รับเบทาอีน 1.5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

สามารถทดแทนความต้องการโคลีนได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (Rumsey, 1991) และอาจจะถึง 100 เท่าในปลานิล

5. <u>เอนไซม์ทางในเดินอาหาร (Digestive Enzymes)</u>

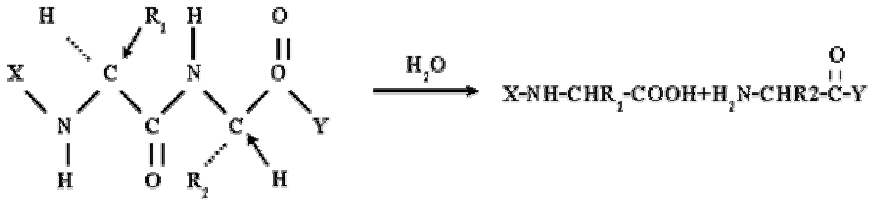
5.1. เอนไซม์เป็นกลุ่มโปรตีนกลุ่มหนึ่งที่มีความสามารถในการเร่งปฏิกริยาในสิ่งมีชีวิตได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงในระดับไมโครโมลาร์ และสามารถเร่งปฏิกริยาได้ภายใต้สภาวะไม่รุนแรง ซึ่งเหมาะสมกับภาวะภายในเซลล์และเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิต เอนไซม์มีความจำเพาะต่อสารที่ปฏิกิริยาซึ่งเรียกว่าซับสเตรต (substrate) และสามารถเร่งปฏิกิริยาโดยไม่เปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์อื่น ตัวเลขเทอร์นโอเวอร์ (turn over number) เป็นค่าที่แสดงให้เห็นประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ ซึ่งหมายถึงปริมาณโมลของซับสเตรตที่เข้าทำปฏิกิริยากับเอนไซม์หรือปริมาณโมลของผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ 1 โมล ภายในหนึ่งหน่วยเวลา (วินาทีหรือนาที) ค่านี้ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิและความเป็นกรดเป็นด่างและปัจจัยอื่นๆ ดังนั้นการเปรียบเทียบค่าตัวเลขเทอร์นโอเวอร์จะต้องควบคุมปัจจัยเหล่านี้ให้อยู่ในระดับเดียวกัน และขณะเดียวกันเอนไซม์มีความจำเพาะต่อซับสเตรตสูงมาก เช่น เอนไซม์ย่อยสลายโปรตีนจะไม่ย่อยสลายพันธะไกลโคซิลของคาร์โบไฮเดรตหรือพันธะเอสเทอร์ของไลปิด และไม่สามารถย่อยสลายพันธะเปปไทด์ของโปรตีนได้ทั้งหมด ความจำเพาะของเอนไซม์ที่มีต่อซับสเตรตนี้สามารถจะบ่งบอกได้ว่าซับสเตรตจะต้องมีโครงสร้างที่เหมาะสมสอดคล้องพอดีกับเอนไซม์และโคแฟคเตอร์ เหมือนลักษณะทางกายภาพคล้ายลูกกุญแจ (ซับสเตรต) กับแม่กุญแจ (เอนไซม์และโคแฟคเตอร์) หรือชักนำให้เกิดการรวมกันขึ้นได้และสามารถเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ไม่เปลี่ยนไปเป็นผลิตภัณฑ์อื่น ทั้งนี้เอนไซม์และโคแฟคเตอร์จะต้องจับกับซับสเตรตก่อนจึงจะเกิดการเร่งให้ได้ผลิตภัณฑ์

5.2. หน่วยเอนไซม์และแอคทิวิตีจำเพาะของเอนไซม์(Enzyme unit and specific activities) การเตรียมเอนไซม์ส่วนใหญ่จะไม่ทราบความเข้มข้นเป็นโมลาร์ที่แท้จริง ดังนั้นจึงต้องแสดงออกมาในเทอมของค่าแอคทิวิตี และรายงานค่าแอคทิวิตี้ออกมาเป็นค่ามาตรฐานเป็น Standard unit หรือ International unit (IU หรือ U) กล่าวว่า “เอนไซม์ 1 U เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาให้เกิดผลผลิต 1μmol/min ภายใต้สภาวะที่กำหนด” และความเข้มข้นของเอนไซม์แสดงในรูปของ “unit/mg protein” ความเร็วของปฏิกิริยาซึ่งแสดงแอคทิวิตีของเอนไซม์แปรตามพีเอช อุณหภูมิ และ ionic strength ดังนั้นการรายงานค่าแอคทิวิตีจำเพาะจึงรายงานผลวิเคราะห์ที่ภาวะเหมาะสมที่สุดโดยระบุอุณหภูมิ พีเอช ชนิดซับสเตรตและซับสเตรตอยู่ในภาวะที่อิ่มตัว นอกจากนี้ยังมีหน่วยใหม่ในการ

รายงานแอคทิวิตีของเอนไซม์คือ “katal” กำหนดให้ 1 katal คือ ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งการเปลี่ยนซับสเตรต 1 โมลใน 1 วินาที “ดังนั้น 1 International unit = 1/60 μ kaltal = 16.67 n katal และ 1 katal = $1x10^7$ Units ส่วนค่าแอคทิวิตีจำเพาะแสดงในเทอม “katal/kg protein หรือ μ katal/ mg protein” ค่า “molar activity” ของเอนไซม์เป็น “katal/mol protein/ sec”

5.3. เอนไซม์ที่สำคัญที่เกี่ยวข้องกับระบบการย่อยอาหาร (Digestion)

5.3.1. โปรติเอส (protease) มีชื่อสามัญหลายชื่อได้แก่ เปปไทด์ไฮโดรเลส (peptidehydrolase) โปรติเนส (proteinase) เปปติเดส (peptidase) และเอนไซม์โปรติโอไลติก (proteolytic enzyme) เป็นเอนไซม์ที่สำคัญชนิดหนึ่งในระบบการย่อยอาหารประเภทโปรตีน และยังย่อยทำลายเซลล์ที่ตาย โปรติเอสผลิตมาจากหลายแหล่ง เช่น ในกระเพาะอาหารมีกรดเกลือไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์เปปซิโนเจน (pepsinogen) เปลี่ยนเป็นเปปซิน (pepsin) ให้สามารถย่อยโปรตีน ในลำไส้มีเอนไซม์สร้างจากตับอ่อนและถูกกระตุ้นเอนไซม์ทริปซิโนเจน (trypsinogen) และไคโมทริปซิโนเจน(chymotrypsinogen)โดยเอนไซม์เอนเทอโรไคเนส (enterokinase) เปลี่ยนเป็นทริปซิน(trypsin) และไคโมทริปซิน (chymotrypsin) และเอนไซม์จากผนังลำไส้ในกลุ่มอะมิโนเปปติเดส (aminopeptidase) ลักษณะปฏิกิริยาของเอนไซม์โปรติเอสคือ สลายพันธะเปปไทด์ –CO-NH- ด้วยน้ำ ดังปฏิกริยารวมภาพที่ 13



<u>ภาพที่ 13</u> ปฏิกิริยารวมการสลายพันธะเปปไทด์ของโปรติเอส

ลักษณะธรรมชาติของ R_1 และ R_2 เป็นอนุมูลของกรดอะมิโน 2 ชนิด ที่มาทำให้เกิดพันธะเปปไทด์ 1 พันธะหรือ R_1 และ R_2 คือ side chain ของโปรตีน ดังนั้นถ้าโปรติเอสตัวใดมีความจำเพาะต่อ R_1 แสดงว่าเอนไซม์นั้นเข้าตัดพันธะเปปไทด์ โดยเข้าทางปลายอะมิโน (N-terminal) โดยที่ R_2 นั้นจะเป็นอะไรก็ได้ และในกรณีที่โปรติเอสมีความจำเพาะต่อ R_2 ก็แสดงว่าเอนไซม์นั้นเข้าตัดพันธะ เปปไทด์ในโปรตีน โดยเข้าทางปลายคาร์บอกซิล (C-terminal) เช่น

เอนไซม์แอลฟา-ไคโมทริปซิน มีความจำเพาะต่ออนุมูลกรดอะมิโน เช่น ไทโรซีน (tyrosine) ฟีนิลอะลานีน (phenylalanine) และ ทริปโตเฟน (tryptophan) (R_1) เอนไซม์ ทริปซินมีความจำเพาะต่ออนุมูลกรดอะมิโน เช่น ไลซีน (lysine) และ อาร์จินีน (arginin) (R_1) ส่วนเอนไซม์เปปซินมีความจำเพาะต่ออนุมูลกรดอะมิโนฟีนิลอะลานีน (R_2)

ลักษณะธรรมชาติของหมู่ X เป็น H^+ และหมู่ Y เป็น OH^- แต่เมื่อโปรตีนนั้นๆ มีหมู่ X และ Y เปลี่ยนไป จะมีผลให้ความจำเพาะของเอนไซม์เปลี่ยนไป ซึ่งจะบ่งชี้ลักษณะการตัดสายยาวของโพลีเปปไทด์ (polypeptide) คือ เอนโดเปปติเดส (endopeptidases) เป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายพันธะเปปไทด์อย่างอิสระภายในสายโปรตีนทั้งนี้ต้องให้จำเพาะตรงต่อ R_1 และ R_2 ด้วย จึงตัดพันธะเปปไทด์ได้ ถ้า R_1 และ R_2 ไม่สอดคล้องกับความจำเพาะของเอนไซม์นั้น การตัดพันธะเปปไทด์ไม่เกิดขึ้น และจะให้แอคทิวิตีสูงสุด ถ้า X และ Y เป็นหมู่อนุพันธ์ไม่ใช่ H^+ และ OH^- กล่าวคือ X อาจเป็น acyl group (acetyl, benzoyl, benzyloxycarbonyl เป็นต้น) และ Y เป็น amide หรือ ester group หรือ amino acid residues และมีการตัดสายยาวของโพลีเปปไทด์อีกแบบคือ เอกโซเปปติเดส (exopeptidases) เป็นโปรติเอสที่ย่อยสลายพันะเปปไทด์จากปลายสายของโปรตีนจะเป็นด้านไหนก็ต้องสอดคล้องต่อความจำเพาะของเอนไซม์ต่อ R_1 หรือ R_2 กล่าวคือ ถ้าจำเพาะต่อ R_1, X คือ H^+, Y คืออะไรก็ได้ เรียก N-terminal splitting และถ้าจำเพาะต่อ R_2, X คือ คืออะไรก็ได้ Y คือ OH^- เรียก C-terminal splitting ซึ่งแบ่งเอนไซม์ตามทิศทางการตัดปลายสายได้ 4 ประเภท คือ คาร์บอกซิเปปติดิส (carboxypeptidases,C-terminal spalitting) , อะมิโนเปปติเดส (aminopeptidases, N-terminal splitting) ไดเปปซิเดส (dipeptidases, dipepdide hydrolase) และไทรเปปซิเดส (tripeptidases)

<u>โปรติเอสแบ่งได้เป็น 4 ประเภท</u> ได้แก่ (1) โปรติเอสซีรีน (serine proteases) เป็น พวก alkali protease พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ที่ 7-11 เป็นเอนไซม์พวกเอนโดเปปติเดส(endopeptidases) ทั้งหมด เช่น ตระกูลไคโมทริปซิน (chymotrypsin family) และทริปซิน (trypsin) เป็นต้น มีความจำเพาะต่อซับสเตรตที่มีอะนุมูลกรดอะมิโนเป็น R_1 เช่นเอนไซม์แอลฟา-ไคโมทริปซิน มีความจำเพาะต่อ ไทโรซิน ฟีนิลอะลานิล และทริปซิน ส่วนทริปซินมีความจำเพาะต่อไลซีนและอาร์จินีน (2) โปรติเอสซัลไฟดริล (sulfhydryl proteases) หรือโปรติเอสไทออล (thiol proteases) หรือโปรติเอสซีสเตอีน (cysteine protease) เป็นพวก neutral protease พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ที่ 6-7.5 เป็นเอนโดเปปติเดสที่สกัดจากพืชชั้นสูงและจุลินทรีย์บางชนิดเช่น ปาเปน (จากมะละกอ) และเปปติเดสสเตรปโตคอกคัส(จาก *Streptococcus peptidase*) เป็น

ต้น (3) โปรติเอส มีโลหะ (metal- containing protease) เป็นโปรติเอสที่มีไอออนและโลหะรวมอยู่ในโมเลกุลหรือร่วมในปฏิกิริยาการย่อยสลาย อยู่ในลักษณะโคแฟคเตอร์ เป็นเอโซเปปติเดส (exopeptidases) เกือบทั้งหมด เป็นพวก neutral protease พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ที่ 6.5-7.5 เช่น คาร์บอกซีเปป ติเดสเอและบี (carboxypeptidases A, B) ซึ่งพบในตับอ่อน (4) โปรติเอสกรด (acid protetases) หรือโปรติเอสแอสพาติก (aspartic proteases) หรือโปรติเอสคาร์บอกซิล (carboxyl proteases) พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ที่ 2-4 ไม่แสดงชัดเจนถึงอนุมูลกรดอะมิโนที่มีบทบาทในบริเวณเร่ง เช่น เรนิน และเปปซิน เป็นต้น

<u>การวิเคราะห์แอคทิวิตีของโปรติเอส</u> แบ่งตามชนิดของซับสเตรตเป็น 3 ชนิดที่ดังนี้ (1) โปรตีนเป็นซับสเตรต มีวิธีการแตกต่างกัน 2 วิธี คือ วิธีที่ 1 ประเมินผลผลิตของการทำปฏิกิริยา เช่น ปริมาณเปปไทด์ที่ละลายได้ในตัวทำละลายต่างๆ เช่น กรดไตรคลอโรอะซิติก (TCA) กรดเปอร์คลอริก (perchloric acid) เป็นต้น ส่วนโปรตีนที่ใช้ได้ได้แก่ เคซีน ฮีโมโกลบินที่ผ่านการตกตะกอนด้วยกรดหรือยูเรีย วัดปริมาณสารเปปไทด์ที่ละลายใน TCA หรือส่วนสารอะโรมาติกที่ช่วงการดูดกลืนแสงที่ช่วงคลื่น 280 นาโนเมตร แล้วประเมินด้วยไทโรซีน (tyrosine) ในสารละลายปฏิกริยา ปริมาณของไทโรซีนจะผันตามแอคทิวิตีของเอนไซม์ ค่าที่วิเคราะห์นี้ไม่สามารถบอกจำนวนพันธะเปปไทด์ที่ถูกไฮโดรไลซ์ และวิธีที่ 2 ประเมินจำนวนพันธะเปปไทด์ที่ถูกไฮโดรไลซ์ คือ ปริมาณของหมู่ อะมิโนอิสระ (free amino group) ที่เป็นผลผลิตจะแปรผันตรงกับจำนวนพันธะเปปไทด์ที่ถูกไฮโดรไลซ์ โดยให้กรดอะมิโนอิสระจะทำปฏิกิริยากับ ninhydrin reagent ให้สีที่ช่วงการดูดกลืนแสงที่ช่วงคลื่น 570 นาโนเมตร เทียบกับค่าดูดกลืนแสงกับกราฟมาตรฐานของ ลูซีน (leucine) (2) ซับสเตรตสังเคราะห์ได้แก่ ซับสเตรตที่มีพันธะเอสเทอร์ อไมด์ในตำแหน่ง พันธะเปปไทด์เดิมใช้เพื่อพิจารณาความจำเพาะและกลไกทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ มี 2 ซับสเตรตคือ ใช้ซับสเตรตเป็น nitrophenyl ester ซึ่งเป็นสารให้สี (chromogenic substrate) สามารถติดตามปฏิกริยาได้โดยวัดสีที่ช่วงการดูดกลืนแสงที่ช่วงคลื่น 400 นาโนเมตร ถ้าพีเอชมากกว่า 7.0 และวัดสีที่ช่วงการดูดกลืนแสงที่ช่วงคลื่น 240 นาโนเมตร ถ้าพีเอชน้อยกว่า 7.0 และใช้ซับสเตรตพวก ester เช่น α-N-benzoyl-L-arginine ethyl ester หรือ amide ทำให้ผลผลิตเป็นหมู่คาร์บอกซิลที่สามารถติดตามปฏิกริยาได้ที่ช่วงการดูดกลืนแสงที่ช่วงคลื่น 253 นาโนเมตร (3) การควบคุมค่าดีกรีการย่อยสลายโปรตีน (degree of protein hydrolysis) โดยการย่อยสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์แล้วนำมาคำนวณตามสูตร $\%DH = 100h/h_{tot}$ (DH คือ degree of protein hydrolysis, h คือ จำนวนพันธะเปปไทด์ที่ถูกย่อยสลายต่อกรัมของโปรตีน, h_{tot} คือ จำนวนพันธะ เปปไทด์ทั้งหมดต่อกรัมของโปรตีน)

เอนไซม์โปรติเอสที่พบในเฮพาโทแพนเครียส (hepatopancreas) ของกุ้ง ได้แก่ คาร์บอกซีเปปติเดส (carboxypeptidase) เอนไซม์คล้ายทริพซิน (trysin-like)และ คาเทพซินซี (cathepsin-c) ซึ่งนำมาใช้ประโยชน์เป็นตัวช่วยในกระบวนการวินิจฉัยทางการแพทย์และการผลิตอาหารสัตว์เลี้ยง อีกทั้งยังมีบทบาททำให้ผลิตภัณฑ์เกิดการด้อยคุณภาพ คือ เอนไซม์คล้ายทริปซินและคลอลาจีเนสซึ่งถูกหลั่งออกมาจากเฮพาโทแพนเครียสจะทำให้เนื้อกุ้งและผลิตภัณฑ์จากกุ้งมีเนื้อนิ่มเละ (Haard, 1994)

5.3.2. อะไมเลส (amylase)

อะไมเลสเป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายซับสเตรตจำพวกแป้ง ไกลโคเจน เป็นเอนไซม์จากตับอ่อน ซึ่งถูกกระตุ้นจากฮอร์โมนซีครีติน (secretin) และฮอร์โมนแพนครีโอไซมิน (pancreomymin) จากผนังเยื่อเมือกในลำไส้ ผลผลิตจากการย่อยได้ โอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharide) มอลโตไตรโอส (maltotriose) มอลโตส (maltose) อะไมเลสแบ่งเป็น 3 ประเภท ได้แก่ (1) แอลฟา-อะไมเลส (α-amylase) มีชื่อตามระบบว่า α-1,4-glucan 4-glucanohydrolase เป็นเอนไซม์ที่จะเจาะจงการย่อยสลายพันธะไกลโคไลซิสของแป้งที่ α-1,4 –glucosidic bond ซึ่งจัดเป็น endoglucosidase ในลักษณะตัดภายในสายโพลิเมอร์ ได้ผลผลิตเป็นกลูแคน (glucan) และลิมิตเดกซ์ทริน (limit drextin) ที่มีหน่วยกลูโคสประมาณ 2-6 หน่วย และยังคงมีโครงรูปเดิม (α-configuration) พบทั่วไปในพืชและสัตว์ตลอดทั้งในคน จะพบในส่วนของน้ำลาย ตับอ่อน ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายแป้งเป็นโอลิโกแซ็คคาร์ไรด์ซึ่งจะถูกย่อยต่อในลำไส้เล็กก่อนที่จะซึมผ่านผนังลำไส้สู่ร่างกายเป็นเอนไซม์ที่มีมวลโมเลกุลประมาณ 50,000 ดาลตัน มี Ca^{2+} 1 ตัว ต่อเอนไซม์ 1 โมเลกุล จะถูกกระตุ้นด้วยฮาโลเจนไอออน เช่น Cl^- Br^- F^- พบว่า แอลฟา-อะไมเลส มีพีเอชเป็นปัจจัยที่มีผลต่อแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ แต่สิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดจะมีช่วงพีเอชที่เหมาะสมกับแอคทิวิตีของแอลฟา-อะไมเลสแตกต่างกันไป เช่นในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมีพีเอชที่เอนไซม์ทำงานได้สูงสุดที่พีเอช 6.0-7.0 (2) เบตา-อะไมเลส (β-amylase) มีชื่อตามระบบว่า α-1,4-glucan maltohydrolase เป็นเอนไซม์ที่จะเจาะจงต่อพันธะไกลโคไลซิสของแป้งที่ α-1,4 ในลักษณะการตัดสายโพลิเมอร์อย่างเป็นระเบียบจากปลายสาย ด้านไม่มีหมู่รีดิวซ์เข้าสู่ภายในสายไปที่ละ 1 หน่วยของมอลโทสหรือที่ละ 2 หน่วยของกลูโคส และจะหยุดปฏิกิริยาที่พันธะไกลโคไลซิสที่ α-1,6 ผลผลิตที่ได้จากการย่อยสลายแป้งหรือไกลโคเจนจะเป็นกลูแคนลิมิตเดกซ์ทริน และส่วนใหญ่เป็นมอลโทสที่มีโครงรูปร่างต่างไปจากเดิม คือ β-configuration หรือเบตา-มอลโตส พบทั่วไปในพืชชั้นสูง เช่น ข้าวบาร์เลย์ในลักษณะกำลังงอกเป็นข้าวมอลต์ ข้าวสาลี ข้าวไรย์ ถั่วเหลือง

และมันเทศ มักพบร่วมกับแอลฟา-อะไมเลสมีมวลโมเลกุล 152,000 ดาลตัน (กรณีจากมันเทศ) และ (3) แกมมา-อะไมเลส หรือกลูโคอะไมเลส หรืออะมิโลกลูโคซิเดส (γ-amylase, glucoamylase, amyloglucosidase) มีชื่อตามระบบว่า γ-1, 4 glucohydrolase สามารถย่อยสลายแป้งได้หลายพันธะ ไม่ว่าจะเป็นไกลโคซิลที่เป็น α-1,4 α-1,6 และ α-1,3 แต่จะช้ากว่า α-1,4 การตัดสายโพลิเมอร์จะเหมือนกับเบตา-อะไมเลส แต่ตัดปลายสายที่ละ 1 หน่วยของกลูโคส ผลผลิตที่ได้ส่วนใหญ่จะเป็นกลูโคสที่มีโครงรูปต่างไปจากเดิม คือได้ β-configuration หรือเบตา-ดี-กลูโคสและส่วนของกลูแคนและลิมิตเดกซ์ทริน พบทั่วไปในจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย และรา มีพีเอชที่เหมาะสมที่ 4.0-4.4

ซับสเตรตของอะไมเลสเป็นแป้งซึ่งประกอบด้วยส่วนประกอบของอะไมโลส ซึ่งมีโครงสร้างเป็นสายตรง แต่อาจไม่ตลอดทั้งสาย เป็นช่วงที่เป็นสายตรงยาวมาก จึงไม่ค่อยพบส่วนที่เป็นสาขามากนัก การเกิดสีกับไอโอดีนเป็นสีน้ำเงินเข้ม เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยน เป็นมอลโทส (เฉพาะเบตา-อะไมเลส) 70-80% และอะไมโลเพกตินซึ่งมีโครงสร้างเป็นสายสาขา การเกิดสีกับไอโอดีนเป็นสีน้ำเงินถึงน้ำตาล เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นมอลโทส (เฉพาะเบตา-อะไมเลส) 50-60%

<u>การวิเคราะห์แอคทิวิตีของอะไมเลส</u> แอลฟา-อะไมเลสทำให้เกิดโพลิเมอร์สายสั้นได้อย่างรวดเร็ว เนื่องจากการตัดสายภายในอย่างไม่เป็นระเบียบ พิจารณาจากค่าความหนืดและสีไอโอดีนจะลดลงอย่างรวดเร็ว ซึ่งต่างจากเบตา-แกมมา-อะไมเลส ที่มีลักษณารตัดสายโพลิเมอร์แบบตัดจากปลายสายสู่ในสายไปเรื่อยๆ เป็นระเบียบ ค่าการลดความหนืดและสีไอโอดีนที่หายไป ไม่ได้บ่งบอกจำนวนพันธะไกลโคซิลในแป้งที่ถูกย่อยสลาย ด้วยเหตุนี้ในการติดตามแอคทิวิตีของอะไมเลสจึงจำเป็นต้องเปรียบเทียบหมู่รีดิวซ์ที่เกิดขึ้น

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบแอคทีวิตีสัมพัทธ์ของอะไมเลสทั้ง 3 ชนิดในการย่อยสลายแป้ง

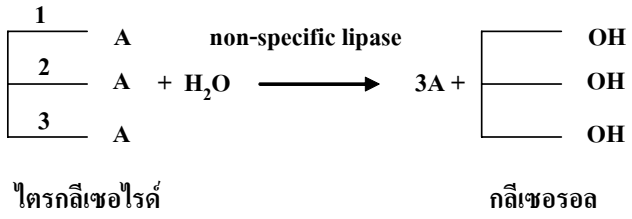
ปฏิกริยา	แอกทิวิตีสัมพัทธ์ คิดต่อหน่วยของหมู่รีดิวซ์ที่เกิดขึ้น		
	แอลฟา-อะไมเลส	เบตา-อะไมเลส	แกมมา-อะไมเลส
หมู่รีดิวซ์ที่เกิดขึ้น (ขึ้นอยู่กับปริมาณเอนไซม์)	คงที่	คงที่	คงที่
การลดความหนืด	เร็ว	ช้า	ช้า
การลดสีม่วงของไอโอดีน	เร็ว	ช้า	ช้า
การเกิดมอลโทส	ช้า	1 (เร็ว)	0 (ไม่มี)
การเกิดกลูโคส	0 (ไม่มี)	0 (ไม่มี)	1 (เร็ว)

ที่มา: ปราณี (2547)

5.3.3. ไลเปส (lipase) มีชื่อตามระบบว่า กลีเซอรอล เอสเทอร์ ไฮโดรเลส (glycerol ester hydrolase) หรือไตรเอซิลกลรเซอรอล เอซิลไฮโดรเลส (triacylglycerol acylhydrolase) เป็นเอนไซม์กลุ่มไฮโดรเลส การจัดประเภทของเอนไซม์ไลเปสอาศัยหลักใหญ่ๆ 2 ประเภท คือ เอนไซม์ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) และเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาในการสังเคราะห์สารประกอบเอซิลกลีเซอรอล (acylglycerol)

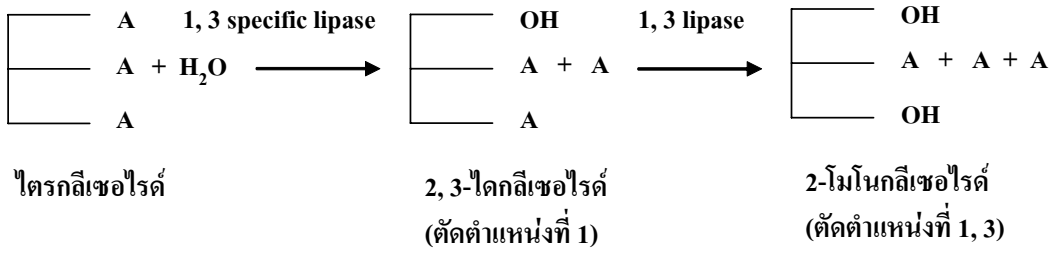
เอนไซม์ไลเปสทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ได้อย่างสมบูรณ์ เมื่อสภาพซับสเตรตคือไขมันและน้ำมันอยู่ในสภาพน้ำมันในน้ำ (oil water surface) (Macre, 1983) มี 2 ประเภท ได้แก่ (1) ทำปฏิกริยาแบบไม่จำเพาะตำแหน่งพันธะเอสเทอร์ (non-specifific lipase) บนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์นั้น ผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็นกรดไขมันอิสระ (free fatty acid) และกลีเซอรอล (glycerol) ดังภาพที่ 14 แต่ในปฏิกิริยาอาจพบไดกลีเซอไรด์ (diglycerode) และโมโนกลีเซอไรด์ (monoglyceride) เป็นตัวกลาง (intermediate) และ (2) ทำปฏิกิริยาแบบจำเพาะที่มีพันธะเอสเทอร์ตำแหน่ง 1 และ 3 (1, 3-specific lipase) บนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ ผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็นกรดไขมัน(fatty acid) 1, 2, (2, 3)–diglyceride และ 2-monoglyceride ดังภาพที่ 14 แต่ 1, 2, (2, 3) –diglyceride และ 2-monoglyceride นั้นเป็นสารไม่คงตัว ดังภาพที่ 15 ถ้ามีการบ่มไว้เป็นเวลานานพอจะเกิด acyl migration ทำให้ได้ 1,3–diglyceride และ 1,(3)-monoglyceride โดยปกติซับสเตรตของเอนไซม์ไลเปสเป็นไตรกลีเซอไรด์ที่เป็นกรดไขมันโมเลกุลยาวที่ไม่ละลาย

น้ำ ถึงแม้ว่าจะมีเอนไซม์ไลเปสบางตัวที่สามารถไฮโดรไลซ์ฟอสโฟไลปิดและโคเลสเตอรอลได้ แต่ก็ไม่จัดว่าไลเปสเป็นเอนไซม์ที่ไฮโดรไลซ์โคเลอริล เอสเทอร์ (choleryl ester) และฟอสโฟไล-ปิด (phospholipids) (Jensen, 1983)



ภาพที่ 14 ปฏิกิริยาการตัดพันธะเอสเทอร์แบบไม่จำเพาะ (ตำแหน่งพันธะเอสเทอร์ในไตรกลีเซอไรด์ คือ 1, 2, 3 และ A คือ กรดไขมัน)

ที่มา: ปราณี (2547)



ภาพที่ 15 ปฏิกิริยาการตัดพันธะเอสเทอร์แบบจำเพาะตำแหน่งของพันธะเอสเทอร์ (A คือ กรดไขมัน)

ที่มา: ปราณี (2547)

เอนไซม์ไลเปสทำหน้าที่สังเคราะห์สารประกอบเอซิลกลีเซอรอลต่างๆ (acylglycerol) เกิดปฏิกิริยาที่พันธะเอสเทอร์ของสารประกอบเอซิลกลีเซอรอล เช่น ปฏิกริยาสร้างพันธะเอสเทอร์กลับคืนมาเป็นไตรกลีเซอไรด์ (esterification) ซึ่งเป็นปฏิกริยาทวนกลับของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ปฏิกิริยาสังเคราะห์ไตรกลีเซอไรด์จากการแลกเปลี่ยนกรดไขมัน (inter-esterification) ซึ่งเป็นปฏิกริยาระหว่างไตรกลีเซอร์ไรด์กับไตรกลีเซอร์ไรด์ ปฏิกิริยาสังเคราะห์เอสเทอร์ข้ามชนิดของกรดไขมัน (acidolysis, transesterification)ซึ่งสังคราะห์เอสเทอร์จากกรดไขมันต่างชนิดในระบบปฏิกิริยา หรือมีการเคลื่อนย้ายหมู่เอซิลหรืออัลคิลของสารประกอบ

เอสเทอร์ ซึ่งเกิดขึ้นระหว่างเอสเทอร์กับกรดไขมันอิสระ เอสเทอร์กับแอลกอฮอล์ เอสเทอร์กับเอสเทอร์ หรือเอสเทอร์กับกรดอะมิโน แล้วแต่ละชนิดของสารตั้งต้น เอนไซม์ไลเปสประเภทนี้ทำให้คุณสมบัติของไขมันหรือน้ำมันเปลี่ยนแปลงไป โดยเกิดการเปลี่ยนแปลงที่ชนิดของกรดไขมันในกลีเซอรอล (เชิดศักดิ์, 2535)

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. กุ้งกุลาดำระยะโพสท์ลาร์วา 15
2. ถังไฟเบอร์ขนาดบรรจุ 1 ตัน จำนวน 18 ใบ
3. ระบบลมและเครื่องให้ออกซิเจนในน้ำขณะเลี้ยง
4. หัวทรายให้ออกซิเจนถังไฟเบอร์ละ 4 หัวทราย จำนวน 24 หัวทราย
4. บ่อซีเมนต์สำหรับเก็บน้ำเค็มก่อนนำมาเจือจางให้ได้ 20 พีพีที
5. บ่อซีเมนต์สำหรับเก็บน้ำเค็ม 20 พีพีที
6. น้ำเค็มปรับให้ได้ความเค็ม 20 พีพีที สำหรับเปลี่ยนถ่ายน้ำระหว่างการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ
7. คลอรีนผงฆ่าเชื้อน้ำเค็ม 20 พีพีที ก่อนนำมาใช้ในการเลี้ยงกุ้ง
8. อุปกรณ์การเปลี่ยนถ่ายและเติมน้ำระหว่างเลี้ยง
9. พลาสติกสีเข้มทึบแสงสำหรับคลุมถังไฟเบอร์ระหว่างเลี้ยง เพื่อป้องกันแสงส่องผ่านเข้าในถังไฟเบอร์แล้วทำให้กุ้งเครียด
10. อุปกรณ์การให้อาหาร
11 เครื่องชั่งน้ำหนัก สำหรับชั่งอาหารและน้ำหนักกุ้ง
12. อาหารกุ้งกุลาดำเบอร์ 1, 2 และ 3 ซึ่งเป็นอาหารเกล็ด ที่ผลิตจากโรงงานผลิตอาหารสัตว์ทีมีส่วนประกอบและชนิดวัตถุดิบเหมือนกันยกเว้นระดับการเสริมเบทาอีนที่ต่างกัน
13. เบทาอีน (anhydrous natural betaine) 96% ผสม calcium stearate ไม่เกิน1.5% ป้องกันการจับก้อนแข็งตัว สกัดมาจากหัวบีท (sugar beet)
14. สารเคมีและอุปกรณ์วิเคราะห์โภชนะอาหารและตัวกุ้ง
15. สารเคมีและอุปกรณ์วิเคราะห์เอนไซม์โปรติเอส อะไมเลส และไลเปส
16. สารเคมีและอุปกรณ์วิเคราะห์อัตราส่วนการสังเคราะห์ RNAต่อโปรตีน
17. สารเคมีและอุปกรณ์วิเคราะห์ฟอสฟาติดิลโคลีน

วิธีการ

1. แผนการทดลอง

การทดลองเป็นแบบสุ่มตลอด (completely randommized design: CRD) เพื่อศึกษาระดับเบทาอีนที่มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโต ระดับกิจกรรมเอนไซม์ทางเดินอาหาร อัตราส่วนการสังเคราะห์ RNA ต่อโปรตีนในกล้ามเนื้อ ปริมาณการสะสมฟอสฟาติดิลโคลีนในกุ้งกุลาดำ แบ่งการทดลองเป็น 3 ชุด (treatment) โดยมีการเสริมเบทาอีนในอาหารกุ้งต่างกัน 3 ระดับ คือ 0% 0.75% และ 1.5% และในแต่ละชุดการทดลองมี 6 ซ้ำ (replication) เริ่มทดลองจากกุ้งวัยอ่อนระยะโพสท์ลาร์วา 15 เป็นเวลา 45 วัน

2. การเตรียมอาหารทดลอง

2.1. อาหารกุ้งกุลาดำเป็นอาหารสำเร็จรูปผลิตจากโรงงานอุตสาหกรรมผลิตอาหารกุ้ง ซึ่งเป็นอาหารชนิดเม็ดขบ (crumbles) ที่มีลักษณะเป็นเกล็ดแบ่งเป็น 3 ขนาด คือ เบอร์ 1 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.4-0.8 มิลลิเมตร เบอร์ 2 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.9-1.3 มิลลิเมตร และเบอร์ 3 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.4-1.8 มิลลิเมตร มีความคงตัวในน้ำ 2-4 ชั่วโมง โดยมีส่วนประกอบวัตถุดิบเหมือนกันทุกเบอร์ แต่แตกต่างกันที่ระดับการเสริมเบทาอีนดังตารางที่ 6

2.2. อาหารที่ผลิตได้นำมาวิเคราะห์หาคุณค่าทางโภชนาการเช่น โปรตีนตามวิธี Kjeldahl method ด้วยเครื่องย่อย Foss Tecator รุ่น 2020 และเครื่องกลั่น Foss Tecator รุ่น 2200 ไขมันตามวิธี Ether extraction แบบ Soxhlet ด้วยเครื่องรุ่น Tecator 1043 ความชื้นตามวิธี Drying method ด้วย Hot air oven เยื่อใยด้วยเครื่อง Fibertec และเถ้าด้วยการเผาใน Furnace อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส (AOAC., 2000) แล้วนำมาคำนวณหาค่า Nitrogen free extract (NFE) และพลังงานรวม (Gross energy) ตามสมการ NRC (1983) ดังต่อไปนี้

NFE (%) = 100 – (%โปรตีน + %ไขมัน + %เถ้า + %เยื่อใย + %ความชื้น)

พลังงานรวม (kcal/kg) = (% โปรตีนx 5.7) + (%ไขมัน x9.3) + (%คาร์โบไฮเดรต x 4.2)

คำนวณปริมาณเมไธโอนีน (methionine) และเมไธโอนีนรวมกับซีสเธอีน (cysteine)โดยคำนวนจากปริมาณเมไธโอนีนและซีสธีนจากวัตถุดิบเป็นปริมาณเปอร์เซ็นต์ของโปรตีน

ตารางที่ 6 ส่วนประกอบอาหารกุ้งกุลาดำที่เสริมเบทาอีน 3 ระดับ

ส่วนประกอบวัตถุดิบ	ระดับการเสริมเบทาอีน (%)		
(%)	0	0.75	1.5
ปลายข้าว	3.0	3.0	3.0
กากกุ้งป่น	10.0	10.0	10.0
ปลาป่น	33.0	33.0	33.0
กากถั่วเหลือง	20.0	20.0	20.0
แป้งสาลี	30.0	30.0	30.0
โมโนแคลเซียมฟอสเฟต	0.5	0.5	0.5
เลซิธิน	1.0	1.0	1.0
สารเหนียว	0.2	0.2	0.2
สารกันหืน	0.015	0.015	0.015
สารกันเชื้อรา	0.1	0.1	0.1
วิตามินและพรีมิกซ์รวม	2.0	2.0	2.0
เบทาอีน	0	0.75	1.5

หมายเหตุ * วิตามินและแร่ธาตุรวม 1 กิโลกรัม ประกอบด้วย วิตามินเอ 12 กรัม/กิโลกรัม วิตามินบี 300 กรัม/กิโลกรัม วิตามินเค 80 กรัม/กิโลกรัม วิตามินบี1 100 กรัม/กิโลกรัม วิตามินบี 2 80 กรัม/กิโลกรัม วิตามินบี 6 100 กรัม/กิโลกรัม วิตามินบี12 0.05 กรัม/กิโลกรัม กรดโฟลิค 20 กรัม/กิโลกรัม นิโคตินิค 100 กรัม/กิโลกรัม ไบโอทิน 1.5 กรัม/กิโลกรัม กรดแพนโทเธนิค 100 กรัม/กิโลกรัม อินโนซิทอล 15 กรัม/กิโลกรัม โคลีนคลอไรด์ 30 กรัม/กิโลกรัม วิตามินซี 500 กรัม/กิโลกรัม แมงกานีสซัลเฟต 0.02 กรัม/กิโลกรัม คอปเปอร์ซัลเฟต 0.035 กรัม /กิโลกรัม ซีลีเนียม 0.0002 กรัม/กิโลกรัม

ตารางที่ 7 คุณค่าโภชนะอาหารกุ้งกุลาดำที่เสริมเบทาอีน 3 ระดับ

คุณค่าโภชนะอาหาร (น้ำหนักแห้ง)	ระดับการเสริมเบทาอีน (%)		
	0	0.75	1.5
ความชื้น (%)	10.20	9.49	10.48
โปรตีน (%)	42.88	42.55	43.45
ไขมัน (%)	6.11	6.07	6.17
เยื่อใย (%)	4.08	3.96	4.13
เถ้า (%)	19.65	20.06	19.86
nitrogen free extract (%)	17.09	17.86	15.91
พลังงานรวม (kcal/kg)	3,899	3,904	3,891
เมไธโอนีน (% โปรตีน)	2.46	2.46	2.46
เมไธโอนีน + ซีสธีน (% โปรตีน)	3.56	3.56	3.56

2.3. การทดสอบความคงทนของอาหารไปในน้ำ

นำอาหารทดลองทุกเบอร์และตะกร้าสำหรับแช่อาหารในน้ำมาอบไล่ความชื้นใน hot air oven ที่ 135 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำอาหารทุกเบอร์มาชั่งน้ำหนัก 20 กรัม และบันทึกน้ำหนักตะกร้าแต่ละอัน นำอาหารมาใส่ในตะกร้าที่ทราบน้ำหนักแช่น้ำเค็มที่ 20 พีพีที เขย่าทุก 15 นาที แช่ตามเวลาที่ต้องทดสอบคือ 15 นาที 30 นาที 1 ชั่วโมง และ 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนดนำกระชอนและอาหารขึ้นจากน้ำให้แห้งพอหมาด แล้วนำไปอบไล่ความชื้นใน hot air oven ที่ 135 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เช่นเดิม แล้วนำมาชั่งน้ำหนัก และคำนวณการสูญเสียโภชนะของอาหารโดยรวม หลังจากนั้นนำอาหารแต่ละชุดลองเบอร์ 1 2 และ 3 มาหาค่าเฉลี่ยการสูญเสียโภชนะของอาหารที่เสริมเบทาอีน 0% 0.75% และ 1.5%

ปริมาณการสูญเสียอาหารในน้ำ (%)

$$= \frac{\text{(ผลรวมน้ำหนักอาหารและตะกร้าเริ่มต้น – ผลรวมหนักอาหารและตะกร้าคงเหลือ) x 100}}{\text{(น้ำหนักอาหารและกระชอนเริ่มต้น)}}$$

3. <u>สภาวะการทดลอง</u>

3.1. การเตรียมลูกกุ้งกุลาดำ

นำกุ้งกุลาดำวัยอ่อนระยะโพสท์ลาร์วา 14 มาเลี้ยงปรับสภาพแวดล้อม เช่น ความเค็ม 1 วัน แล้วสุ่มชั่งน้ำหนักเริ่มต้นของลูกกุ้ง และสุ่มลูกกุ้งมาทดลอง ถังละ 270 ตัว คิดเป็นอัตราปล่อยประมาณ 240 ตัวต่อตารางเมตร มาเลี้ยงในถังไฟเบอร์ขนาดบรรจุ 1 ตัน เส้นผ่านศูนย์กลาง 1.2 เมตร ที่เติมน้ำเค็ม 20 พีพีที ปริมาตร 700 ลูกบาศก์เซนติเมตร เท่ากันทุกถัง พร้อมทั้งให้ออกซิเจนตลอดเวลา

3.2. การจัดการคุณภาพน้ำ

มีการให้ออกซิเจนตลอดเวลาและเปลี่ยนถ่ายน้ำอย่างน้อย 3 ครั้งต่อสัปดาห์ วิเคราะห์คุณภาพน้ำเริ่มการทดลองและระหว่างการเลี้ยง โดยเก็บตัวอย่างน้ำในถังเลี้ยงและบ่อพักน้ำเพื่อใช้ในการเติมขณะที่มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำ มีรายละเอียดดังตารางที่ 8

<u>ตารางที่ 8</u> รายละเอียดวิธีการวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

พารามิเตอร์	หน่วย	วิธีวิเคราะห์
ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ	mg/l	Oxyguard
ความเป็นกรดเป็นด่าง	-	pH Meter
อุณหภูมิ	^{O}C	Thermometer
ความเป็นด่าง	mg/l as $CaCO_3$	Titration Method
แอมโมเนีย	mg NH_3-N/l	Koroleff's Indophenol Blue Method
ไนไตรท์	mg NO^-_2-N/l	Colorimetric Method
ไนเตรท	mg NO^-_3-N/l	Colorimetric Method
TKN	mg/l	Kjeldahl method
BOD	mg/l	Titration Method

3.3. การให้อาหาร

ให้อาหารกุ้งที่ในแต่ละชุดการทดลองทุกวัน วันละ 6 มื้อ คือ เวลา 6.00 น. 9.00 น. 12.00 น. 15.00 น. 18.00 น. และ 22.00 อัตราการให้อาหาร 15-20% ของน้ำหนักตัวต่อวัน บันทึกปริมาณอาหารที่กินตลอดการทดลอง

4. <u>ศึกษาการเจริญเติบโตและการประเมินคุณค่าอาหาร</u>

4.1. ทำการบันทึกน้ำหนักกุ้งกุลาดำเริ่มต้นและสิ้นสุดการทดลอง บันทึกปริมาณอาหารที่ให้แล้วนำข้อมูลไปคำนวณหา น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (weight gain) น้ำหนักตัวเฉลี่ย (กรัม/ตัว) การเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน (average daily growt: ADG) (กรัม/ตัว/วัน) อัตราการรอดตาย (survival rate)

น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นเฉลี่ย (กรัม/ตัว) = น้ำหนักเริ่มต้น-น้ำหนักสิ้นสุดการทดลอง

น้ำหนักตัวเฉลี่ย (กรัม/ตัว) = $\frac{\text{น้ำหนักตัวทั้งหมด}}{\text{จำนวนตัว}}$

การเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน (กรัม/ตัว/วัน) = $\frac{\text{น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น}}{\text{จำนวนวัน}}$
average daily growth

อัตราการรอดตาย = $\frac{\text{จำนวนกุ้งเมื่อสิ้นสุดการทดลอง}}{\text{จำนวนกุ้งเมื่อเริ่มทดลอง}} \times 100$
survival rate

4.2. ก่อนและสิ้นสุดการทดลองนำกุ้งกุลาดำมาวิเคราะห์โภชนะดังนี้ โปรตีน ไขมัน ความชื้น กาก และเถ้า (AOAC., 2000) นำมาคำนวณอัตราการแลกเนื้อ (feed conversion ratio: FCR) ประสิทธิภาพของโปรตีน (protein efficiency ratio: PER) ค่าประโยชน์สุทธิของโปรตีน (net protein utilization: NPU) ประสิทธิภาพของพลังงาน (energy efficiency ratio: EER) และค่าการเก็บสะสมพลังงาน (net energy retention: NER)

อัตราการแลกเนื้อ = น้ำหนักอาหารทั้งหมดที่กุ้งกิน
feed conversion ratio น้ำหนักทั้งหมดของกุ้ง

ประสิทธิภาพของโปรตีน = น้ำหนักที่กุ้งเพิ่มขึ้น
protein efficiency ratio น้ำหนักของโปรตีนที่กุ้งกิน

ค่าประโยชน์สุทธิของโปรตีน = น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของโปรตีนในตัวกุ้ง
net protein utilization น้ำหนักของโปรตีนที่กุ้งกิน

ประสิทธิภาพของพลังงาน = น้ำหนักกุ้งที่เพิ่มขึ้น
energy efficiency ratio น้ำหนักของพลังงานที่กุ้งกิน

ค่าการเก็บสะสมพลังงาน = น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของพลังงานในตัวกุ้ง
net energy retention น้ำหนักของพลังงานที่สัตว์กิน

5. ศึกษากิจกรรมเอนไซม์ทางในเดินอาหาร

5.1. เมื่อสิ้นสุดการทดลอง นำกุ้งกุลาดำมาสกัดเอนไซม์ (crude enzyme extract) ตามวิธี Villasante *et al.* (1999) เพื่อมาวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ทางเดินอาหาร คือ อะไมเลส (amylase) โปรติเอส (protease) และไลเปส (lipase) โดยการเก็บตัวอย่างจากตับ (hepatopancreas) มาบดให้ละเอียดโดยใช้ homogenizer ใน Tris-HCl buffer ความเข้มข้น 50 Mm พีเอช 7.5 จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้มาเข้าเครื่อง centrifuge ที่ความเร็วรอบ 15000 g ที่ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนเฉพาะที่เป็นของเหลวด้านบน (supernatant) ไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

5.2. ศึกษากิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส ในสภาพการเปลี่ยนแปลงพีเอช 3.0-13.0 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยดัดแปลงจากวิธีของ Bernfeld (1951) ดังนี้ เตรียมซับสเตรต คือ สารละลายแป้ง (starch solution) ความเข้มข้น1% ในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 3.0-13.0 เริ่มต้นด้วยการเติมเอนไซม์ที่สกัดได้ปริมาตร 20 ไมโครลิตรในสารละลายแป้งความเข้มข้น1% ที่เตรียมไว้แต่ละพีเอช ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมในหลอดทดลอง บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที หยุดปฏิกริยาด้วย

การเติม dinitrosalicylic acid (DNS) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร แล้วนำตัวอย่างไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที หลังจากนั้นวัดกิจกรรมเอนไซม์ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่นแสง 540 นาโนเมตร

5.3. ศึกษากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส ในสภาพการเปลี่ยนแปลงพีเอช 2.0-13.0 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Vallasante *et al.*(1999) ดังนี้ เตรียมซับสเตรต คือ azocasein ความเข้มข้น 2% ในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 2.0-13.0 เริ่มต้นด้วยการเติมเอนไซม์ที่สกัดได้ปริมาตร 20 ไมโครลิตรใน azocasein ความเข้มข้น 2% ที่เตรียมไว้แต่ละพีเอชปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมในหลอดทดลอง บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม trichloroacetic acid (TCA) ความเข้มข้น 10 % ปริมาตร 1.2 มิลลิลิตร แล้วนำตัวอย่างเข้าเครื่อง centrifuge ที่ความเร็วรอบ 15000 g เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นวัดกิจกรรมเอนไซม์ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่นแสง 440 นาโนเมตร

5.4. ศึกษากิจกรรมเอนไซม์ไลเปส ในสภาพการเปลี่ยนแปลงพีเอช 4.0-13.0 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยดัดแปลงจากวิธีของ ของ Markweg *et al.* (1995) ดังนี้ นำตัวอย่างที่สกัดได้ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมกับ p-nitrophenylpalmitate (pNNP) ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ ละลายใน propanol ซึ่งเป็นซับสเตรต และเติมสารละลายบัฟเฟอร์ในแต่ละพีเอชปริมาตร 800 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย Na_2CO_3 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 250 ไมโครลิตร แล้วนำตัวอย่างเข้าเครื่อง centrifuge ที่ความเร็วรอบ 10000 g เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นวัดกิจกรรมเอนไซม์ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่นแสง 420 นาโนเมตร

6. <u>ศึกษาการสังเคราะห์ RNA ต่อโปรตีนในกล้ามเนื้อ</u>

เมื่อสิ้นสุดการทดลอง วิเคราะห์หาอัตราส่วนการสังเคราะห์ RNA ต่อโปรตีน เพื่อนำมาข้อมูลมาประเมินการเจริญเติบโตของกล้ามเนื้อกุ้ง ตามวิธีการของ Sunde *et al.* (2001) โดยการสกัด RNA และโปรตีนจากกล้ามเนื้อกุ้ง เติม TRIzol reagent แล้วย่อยตัวอย่างด้วย sonicator ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที เติมคลอโรฟอร์มเพื่อแยกชั้น RNA และโปรตีนออกจากกัน แล้วดูดส่วนบนคือ RNA และส่วนล่างคือโปรตีน นำทั้งสองส่วนมาตกตะกอนด้วย isopropanol แล้วล้าง RNA หนึ่งครั้งส่วนโปรตีนล้างสองครั้งด้วยเอธานอล นำตัวอย่างเข้าเครื่อง centrifuge ที่ความเร็วรอบ 9000 x g และทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำ RNA มาละลายด้วย sodium

acetate พีเอช 5 ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ทำการเจือจาง 1:10 จากนั้นวัดด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่นแสง 260 นาโนเมตร ส่วนโปรตีนนำมาละลายใน sodium dodecyl sulfate (SDS) จากนั้นนำมาวัดค่าด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่นแสง 280 นาโนเมตร

7. <u>ศึกษาระดับการสะสมฟอสโฟติดิลโคลีนในตัวกุ้ง</u>

เมื่อสิ้นสุดการทดลองนำกุ้งกุลาดำและอาหารทดลองมาทำการวิเคราะห์ปริมาณฟอสโฟลิปิดชนิดฟอสฟาติดิลโคลีน (phosphatidylcholine) โดยนำกุ้งมาสกัดไขมัน (total lipid) ด้วยตัวทำละลายคลอโรฟอร์ม: เมธานอล: น้ำ ในอัตราส่วน 1:2:0.8 แล้วแยกคลอโรฟอร์มออกจากไขมันด้วยเครื่อง rotary evaporation (Bligh and Dyer, 1959) นำไขมันรวมที่ได้มาแยกไขมันที่มีขั้วและไม่มีขั้วออกจากกัน ด้วย sep-pack silica cartridge ตามวิธีของ Watanabe (n.d.) หลังจากนั้นนำไขมันที่มีขั้วมาแยกฟอสฟาติดิลโคลีนด้วยวิธี thin layer chromatography (TLC) ซึ่งใช้ TLC plate (Kieselgel G60) ใช้ developing solvent ครั้งแรกด้วย คลอโรฟอร์ม : เมธานอล : น้ำกลั่น ในอัตราส่วน 65:25:4 ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วตามด้วย developing solvent ครั้งที่ 2 คลอโรฟอร์ม : เมธานอล : กรดอะซิติก ในอัตราส่วน 65:25:8 (Kornena *et al,* 2003) ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง สเปรย์ด้วย cupric sulfate solution 10 % (Schneck *et al*, 2003) หลังจากนำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส ในขั้นตอนสุดท้ายนำไปวิเคราะห์หาปริมาณฟอส-ฟาติดิลโคลีนด้วยเครื่อง Densitometer ที่ความยาวคลื่นแสง 370 นาโนเมตร โดยใช้ Hg lamp แบบ absorption

8. <u>การวิเคราะห์ผลทางสถิติ</u>

การวิเคราะห์ผลการทดสอบทางสถิติผลของกุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารที่เสริมเบทาอีน 0% 0.75% และ 1.5% ได้แก่ น้ำหนักตัวเฉลี่ย อัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน(average daily growth) อัตราการรอดตาย (survival rate) อัตราการแลกเนื้อ (food conversion ratio) ประสิทธิภาพของโปรตีน (proteine efficiency ratio) ค่าประโยชน์สุทธิของโปรตีน (net protein utilization) ประสิทธิภาพของพลังงาน (energy efficiency ratio) ค่าการเก็บสะสมพลังงาน (net energy retention) กิจกรรมเอนไซม์ทางเดินอาหาร อัตราส่วนการสังเคราะห์ RNA ต่อการสังเคราะห์โปรตีนในกล้ามเนื้อ และปริมาณการสะสมฟอสฟาติดิลโคลีน ใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน

(Analysis of variance : ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan' New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (อนันต์ชัย, 2542)

8. <u>สถานที่ทำการทดลอง</u>

ศูนย์พัฒนาเทคโนโลยีอาหารสัตว์น้ำ ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

9. <u>ระยะเวลาในการทดลอง</u>

การทดลองเริ่มตั้งแต่ เดือนเมษายน 2547 ถึงเดือนกรกฎาคม 2547

ผลและวิจารณ์

1. การเจริญเติบโตและการประเมินคุณค่าอาหาร

การศึกษาผลของเบทาอีนต่อการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำวัยรุ่นที่ได้รับอาหารทดลองที่เสริมเบทาอีน 0% 0.75% และ 1.5% พบว่ามีน้ำหนักตัวเฉลี่ยเท่ากับ 0.25 0.24 และ 0.25 กรัม/ตัว น้ำหนักตัวเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น 0.0250 0.0237 และ 0.0245 กรัม/ตัว และน้ำหนักรวมของกุ้งเฉลี่ยมีค่าเท่ากับ 64.67 56.68 และ 60.48 กรัม ตามลำดับ ดังตารางที่ 9 ซึ่งพบว่ามีความแตกต่างทางสถิติอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($p>0.05$)

ตารางที่ 9 การเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารเสริมเบทาอีน 3 ระดับ (ค่าเฉลี่ย± SE)

ระดับการเสริมเบทาอีน	น้ำหนักตัวเฉลี่ย (กรัม/ตัว)	น้ำหนักตัวเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น (กรัม/ตัว)	น้ำหนักรวม (กรัม)
0%	0.25 ± 0.002^{a}	0.0250 ± 0.002^{a}	64.67 ± 1.83^{a}
0.75%	0.24 ± 0.006^{a}	0.0237 ± 0.006^{a}	56.68 ± 3.45^{a}
1.50%	0.25 ± 0.006^{a}	0.0245 ± 0.007^{a}	60.48 ± 3.67^{a}
p-Value	0.34	0.25	0.22

ส่วนการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวันของกุ้งกุลาดำเท่ากับ 0.01 กรัม/ตัว/วัน เท่ากันทุกระดับการเสริมเบทาอีน อัตราการแลกเนื้อเท่ากับ 1.27 1.47 และ 1.38 และอัตราการรอดตายเท่ากับ 85.66 78.83 และ 82.22 % ของกุ้งที่ได้รับอาหารทดลองที่มีการเสริมเบทาอีน 0% 0.75% และ 1.5% ตามลำดับ อัตราการแลกเนื้อของกุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารที่เสริมเบทาอีนมีค่ามากที่สุด เนื่องจากมีอัตราการรอดตายน้อยที่สุด แสดงว่าในระหว่างการทดลองมีกุ้งบางส่วนตายจึงทำให้น้ำหนักกุ้งหายไปบางส่วน จึงทำให้การเปลี่ยนไปเป็นอาหารซึ่งคำนวณจากภาพรวมจึงมีประสิทธิภาพน้อยที่สุด ส่วนกุ้งที่ได้รับอาหารที่ไม่เสริมเบทาอีนมีค่าน้อยที่สุด ก็มีเหตุผลไปแนวทางเช่นเดียวกันที่อัตราการรอดตายสูงสุด จึงเหลือน้ำหนักกุ้งมากที่สุด ดังตารางที่ 10 แต่ทั้งนี้พบว่ามีความแตกต่างทางสถิติอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($p>0.05$) ทุกระดับการเสริมเบทาอีน

ตารางที่ 10 การเจริญเติบโตเฉลี่ย อัตราการแลกเนื้อ และอัตราการรอดตาย ของกุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารที่เสริมเบทาอีน 3 ระดับ (ค่าเฉลี่ย± SE)

ระดับการเสริมเบทาอีน	การเจริญเติบโตเฉลี่ย (กรัม/ตัว/วัน)	อัตราการแลกเนื้อ	อัตราการรอดตาย (%)
0%	0.01±0.0002[a]	1.27±0.04[a]	85.66 ± 2.94[a]
0.75%	0.01±0.0002[a]	1.47± 0.10[a]	78.83 ± 3.78[a]
1.50%	0.01±0.0002[a]	1.38± 0.05[a]	82.22 ± 2.63[a]
p-Value	0.82	0.83	0.60

การศึกษาผลของเบทาอีนต่ออัตราการเจริญเติบโตในกุ้งกุลาดำในครั้งนี้ เมื่อเปรียบเทียบกับกุ้งก้ามกรามวัยรุ่น (*Macrobrachium rosenbergii*) ที่ได้รับอาหารที่มีการเสริมเบทาอีนระดับ 0.5-1.5 % ซึ่งพบว่าการเสริมเบทาอีนในอาหารทำให้กุ้งมีอัตราการเจริญเติบโตขึ้น และอัตราการแลกเนื้อที่ได้รับอาหารที่เสริมเบทาอีนทั้ง 3 ระดับมีค่าต่ำกว่าที่ได้รับอาหารไม่เสริมเบทาอีน (Felix and Sudharsan, 2004) และการเสริมเบทาอีนในอาหารสำหรับกุ้ง *Penaeus indicus* ในระยะวัยรุ่นมีผลทำให้น้ำหนักตัวเพิ่มขึ้นเช่นกัน (Elamparithy, 1995) แต่ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าการเสริมเบทาอีนในระดับ 0.75-1.5% มีผลทำให้การเจริญเติบโตมีค่าใกล้เคียงกัน เนื่องจากเป็นการทดลองที่เริ่มจากกุ้งวัยอ่อน อาหารที่ให้เป็นชนิดเกล็ดขนาดเล็กตลอดการทดลองโดยเฉลี่ยมีการสูญเสียโภชนะไปกับน้ำประมาณ 23-27% ในช่วง 30 นาทีแรก ดังตารางที่ 11 ซึ่งมากกว่าอาหารชนิดเม็ดสำหรับกุ้งระยะวัยรุ่นที่มีผิวสัมผัสน้ำน้อยกว่า จึงทำให้อัตราการสูญเสียโภชนะน้อยกว่า กุ้งก้ามกรามวัยรุ่นจึงได้รับปริมาณเบทาอีนที่สูงกว่า

ตารางที่ 11 การสูญเสียโภชนะอาหารในน้ำของอาหารที่เสริมเบทาอีน 3 ระดับ

อาหารที่เสริมเบทาอีน	น้ำหนักของอาหารที่สูญเสียไปกับน้ำ (%)			
	15 นาที	30 นาที	1 ชั่วโมง	2 ชั่วโมง
0%	23.08	27.20	30.30	38.58
0.75%	22.45	25.27	27.95	34.30
1.5%	22.54	27.61	30.99	35.09

การประเมินคุณค่าอาหารของกุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารทดลองที่มีการเสริมเบทาอีนระดับ 0% 0.75% และ 1.5% ดังนี้ คือ ประสิทธิภาพของโปรตีน (protein efficiency ratio: PER) มีค่าเท่ากับ 1.82 1.61 และ 1.68 ค่าประโยชน์สุทธิของโปรตีน (net protein utilization: NPU) มีค่าเท่ากับ 0.21 0.18 และ 0.19 ประสิทธิภาพของพลังงาน (energy efficiency ratio) มีค่าเท่ากับ 1.19 1.05 และ 1.14 และค่าการเก็บสะสมพลังงาน (net energy retention) มีค่าเท่ากับ 0.19 0.16 และ 0.18 ตามลำดับ ดังตารางที่ 12 ซึ่งพบว่ามีความแตกต่างทางสถิติอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($p>0.05$)

ตารางที่ 12 การประเมินคุณค่าอาหารของกุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารที่เสริมเบทาอีน 3 ระดับ (ค่าเฉลี่ย± SD)

ระดับการเสริมเบทาอีน	ประสิทธิภาพของโปรตีน	ค่าประโยชน์สุทธิของโปรตีน	ประสิทธิภาพของพลังงาน	ค่าการเก็บสะสมพลังงาน
0%	1.82 ± 0.13^{a}	0.21 ± 0.014^{a}	1.19 ± 0.08^{a}	0.19 ± 0.01^{a}
0.75%	1.61 ± 0.24^{a}	0.18 ± 0.028^{a}	1.05 ± 0.15^{a}	0.16 ± 0.02^{a}
1.50%	1.68 ± 0.25^{a}	0.19 ± 0.029^{a}	1.14 ± 0.17^{a}	0.18 ± 0.02^{a}
p-Value	0.24	0.24	0.26	0.26

ค่าประโยชน์สุทธิของโปรตีนอาหารกุ้งทดลองที่เสริมเบทาอีนทั้ง 3 ระดับ โดยเฉลี่ยอยู่ในช่วงที่ค่อนข้างดีเมื่อเทียบกับค่าเฉลี่ยในอาหารสำหรับปลาคือ 0.163 (Parker, 1987) อาหารที่ดีควรให้ค่าประโยชน์สุทธิของโปรตีนสูงกว่าค่าเฉลี่ย และค่าประโยชน์สุทธิของโปรตีนจะนิยมใช้วัดคุณภาพคู่กับค่าการเก็บสะสมพลังงาน ซึ่งจากการผลการทดลองค่าการเก็บสะสมพลังงานาของแต่ละระดับการเสริมเบทาอีนไปในแนวทางเดียวกันกับค่าประโยชน์สุทธิของโปรตีน

จากการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนะของกุ้งกุลาดำ จะเห็นว่าระดับการสะสมโปรตีนโดยน้ำหนักแห้งมีค่า 71.04% -71.38% และพลังงานโดยน้ำหนักแห้งมีค่า 4,704-4,775 kcal/kg มีค่าใกล้เคียงกันเช่นเดียวกัน ดังตารางที่ 13 แสดงให้เห็นว่าการเสริมเบทาอีนทั้ง 3 ระดับของอาหารกุ้ง ไม่มีผลต่อการสะสมโปรตีนและพลังงานของกุ้งกุลาดำให้แตกต่างกันอย่างชัดจน

ตารางที่ 13 คุณค่าโภชนะของกุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารที่เสริมเบทาอีน 3 ระดับ

คุณค่าโภชนะของกุ้ง (น้ำหนักแห้ง)	ระดับการเสริมเบทาอีน (%)		
	0	0.75	1.5
ความชื้น (%)	12.80	10.89	13.63
โปรตีน (%)	71.12	71.04	71.38
ไขมัน (%)	3.74	4.01	4.56
เยื่อใย (%)	5.52	5.44	5.43
เถ้า (%)	18.12	17.45	17.50
nitrogen free extract (%)	1.50	2.06	1.13
พลังงานรวม (kcal/g)	4,704	4,744	4,775

เมื่อสิ้นสุดการทดลองทำการสุ่มชั่งน้ำหนักกุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารที่มีการเสริมเบทาอีน 0% 0.75% และ 1.5% โดยสุ่มชั่งน้ำหนักที่ละตัวประมาณ 490-500 ตัวต่อชุดอาหาร พบว่าอาหารที่ไม่มีการเสริมเบทาอีนน้ำหนักตัวอยู่ในช่วงประมาณไม่เกิน 0.25 กรัมต่อตัวมีจำนวนมากที่สุด 59.4% คือ ที่ไม่มีการเสริมเบทาอีน รองลงมา 52.4% คืออาหารที่เสริมเบทาอีน 1.5% และน้อยที่สุด 48.9% คืออาหารที่เสริมเบทาอีน 0.75% ส่วนช่วงน้ำหนักตัวที่ 0.25-0.50 กรัมที่ได้รับอาหารที่เสริมเบทาอีน 0% 0.75% และ 1.5% มีจำนวนไม่แตกต่างกันมากนักดังนี้ 26.6% 27.6% และ 25.5% ตามลำดับ แต่กุ้งที่ไม่ได้รับการเสริมเบทาอีนจำนวนของขนาดน้ำหนักตัวที่ 0.50-1.50 กรัม จะเริ่มมีความแตกต่างกับที่กุ้งได้รับอาหารที่เสริมเบทาอีน 0.75% และ1.5% มีค่าดังนี้ 14.0% 22.9% และ 19.8% ตามลำดับ และน้ำหนักตัวมากกว่า 1.5 กรัม กุ้งที่ไม่เสริมเบทาอีนไม่พบเลย ส่วนน้ำหนักตัวมากกว่า 1.51 กรัม พบทั้งกุ้งที่เสริมเบทาอีน 0.75% และ 1.5% มีค่า 0.6% เท่ากัน ดังตารางที่ 14

จากตารางที่ 15 จะเห็นว่ากุ้งที่ได้รับอาหารเสริมเบทาอีน 0.75% และ 1.5% มีค่าใกล้เคียงกันและแตกต่างกันมากจากกุ้งที่ได้รับอาหารที่ไม่เสริมเบทาอีน น้ำหนักกุ้งน้อยกว่า 0.5 กรัม กุ้งที่ได้รับอาหารที่ไม่เสริมเบทาอีนมีค่ามากกว่ากุ้งที่ได้รับอาหารที่เสริมเบทาอีนทั้งสองระดับ ซึ่งทั้งสองมีค่าใกล้เคียงกัน อีกทั้งพบว่ามีน้ำหนักตัวมากกว่า 1.51 กรัมมีค่าใกล้เคียงกันด้วย ซึ่งไม่พบในกุ้งที่ได้รับอาหารที่ไม่เสริมเบทาอีน

ตารางที่ 14 การกระจายน้ำหนักตัวของกุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารที่เสริมเบทาอีน 3 ระดับ (size distribution)

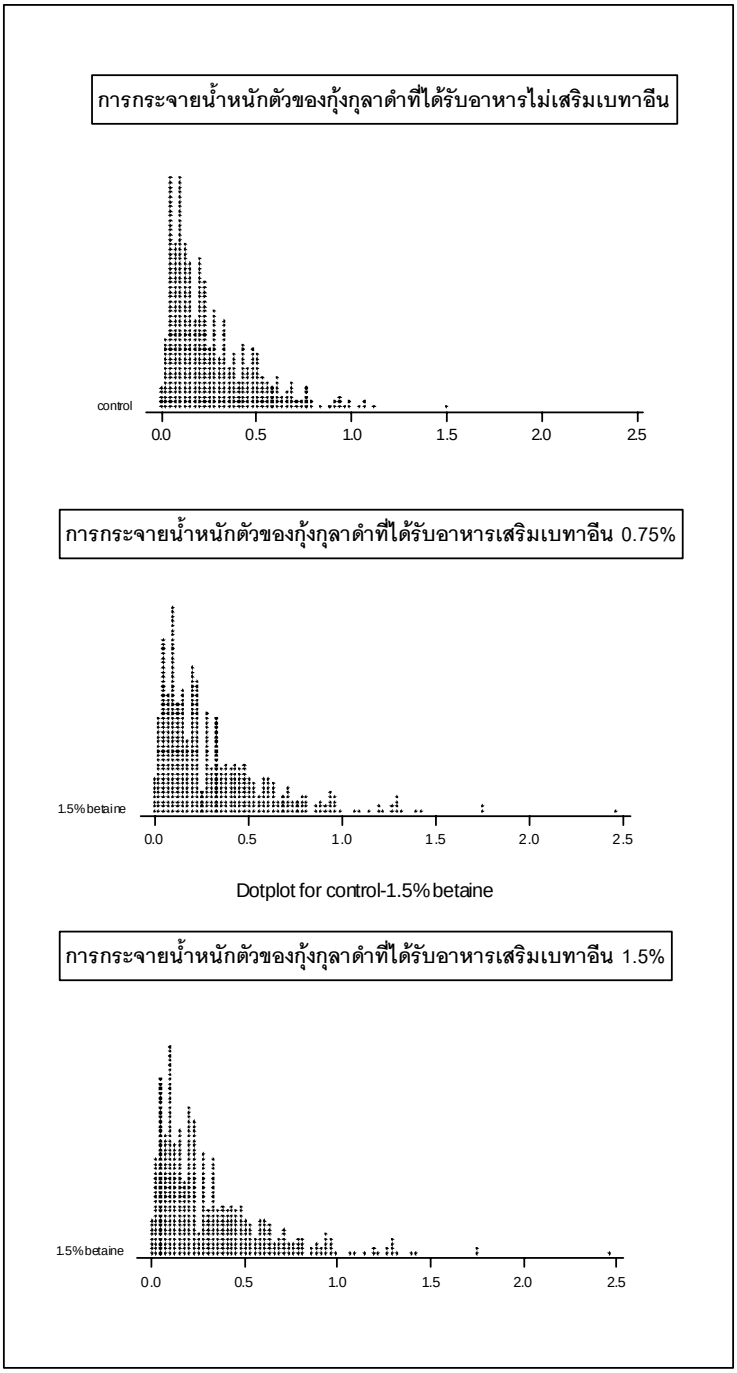
น้ำหนักตัว	จำนวนกุ้งที่ได้รับอาหารที่เสริมเบทาอีน					
	0%		0.75%		1.50%	
(กรัม)	(ตัว)	(%)	(ตัว)	(%)	(ตัว)	(%)
<0.25	297	59.4	243	48.9	266	54.2
0.25-0.50	133	26.6	137	27.6	125	25.5
0.51-1.00	65	13.0	96	19.3	82	16.7
1.00-1.50	5	1.0	18	3.6	15	3.1
1.51-2.00	0	0.0	3	0.6	2	0.4
>2.10	0	0.0	0	0.0	1	0.2
รวมทั้งหมด (ตัว)	500	100	497	100	491	100

ตารางที่ 15 เปอร์เซนต์ในแต่ละช่วงน้ำหนักของกุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารเสริมเบทาอีน 3 ระดับ

น้ำหนักตัว	จำนวนกุ้งที่ได้รับอาหารที่เสริมเบทาอีน (%)		
(กรัม)	0%	0.75%	1.50%
<0.50	86.00	76.46	79.63
0.51-1.50	14.00	22.94	19.76
>1.51	0.00	0.60	0.61

จากลักษณะการกระจายน้ำหนักตัวของกุ้งที่กล่าวมาอาจจะมีอิทธิพลจากการได้รับอาหารที่เสริมเบาทาอีน โดยเฉพาะที่ระดับ 1.5% มีการกระจายตัวมากที่สุดพบทุกช่วงน้ำหนักซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นที่มากพอที่จะดึงดูดการเข้ามาหาอาหารของกุ้งได้เร็ว จึงทำให้กุ้งเข้าไปกินได้กินอาหารได้เร็วและมาก แต่พฤติกรรมของกุ้งมีลักษณะการกินแบบยึดครองพื้นที่ เมื่อตัวที่เข้าไปกินอาหารก่อนแล้วจะไม่ยอมให้ตัวที่เข้าไปไม่ทันมาแย่งกิน จึงทำให้กุ้งที่ได้รับก่อนโตเร็วและจะเป็นจ่าฝูงยึดครองในการกินอยู่เป็นประจำ ส่วนที่ไม่ทันก็จะมีขนาดเล็กกินไม่ทันตัวโต กว่าจะได้กินอาหาร

ก็จะเป็นอาหารที่มีการสูญเสียโภชนะไปบางส่วนแล้วจึงทำให้โตไม่ทันเพื่อนจึงอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้การกระจายน้ำหนักตัวของกุ้งในแต่ละชุดการทดลองมีความแตกต่างกัน ทั้งนี้ในการให้อาหารกุ้งจึงควรพยายามให้อาหารกระจายทั่วพื้นให้มากที่สุด เพื่อลดปัญหาดังกล่าวได้



ภาพที่ 16 การกระจายน้ำหนักตัวของกุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารที่เสริมเบทาอีน 3 ระดับ

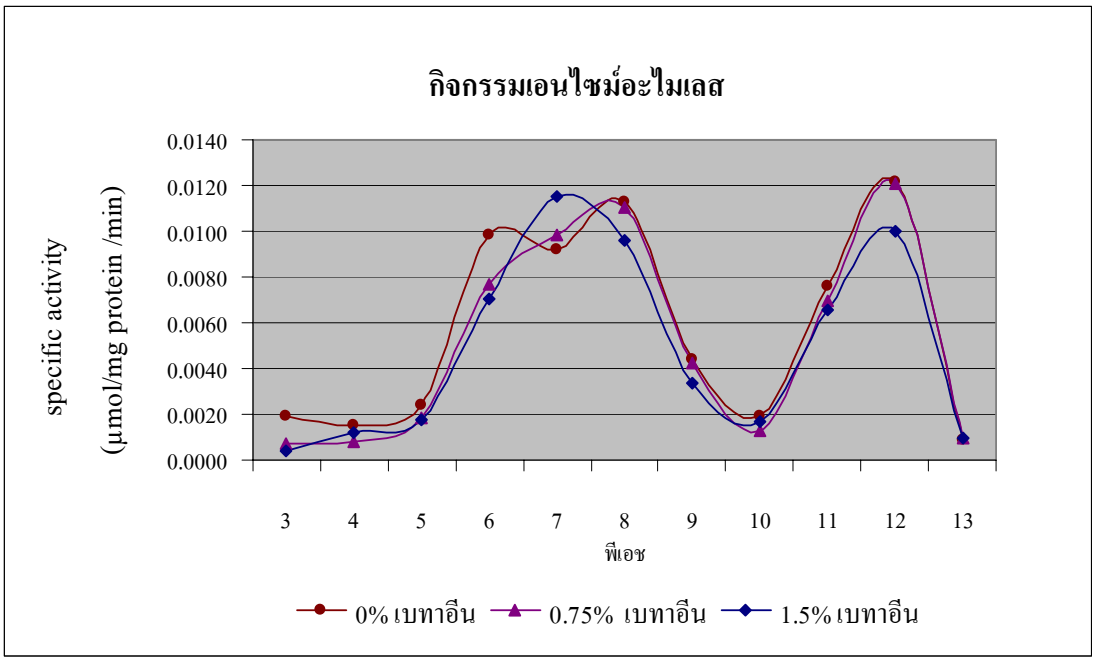
2. <u>กิจกรรมเอนไซม์ทางเดินอาหาร</u>

กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสของกุ้งกุลาดำที่พีเอช 7-8 ได้รับอาหารเสริมเบทาอีน 0% 0.75% และ 1.5% มีค่า 0.0091-0.0112 ไมโครโมล/มิลลิกรัมโปรตีน/นาที มีค่า 0.0098-0.0110 ไมโครโมล/มิลลิกรัมโปรตีน/นาที และ มีค่า 0.0115-0.0095 ไมโครโมล/มิลลิกรัมโปรตีน/นาที ตามลำดับ ดังตารางที่ 16 พบว่ามีความแตกต่างทางสถิติอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($p>0.05$)

<u>ตารางที่ 16</u> กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสของกุ้งกุลาดำเมื่อได้รับอาหารที่เสริมเบทาอีน 3 ระดับ (ค่าเฉลี่ย $\pm$ SD)

พีเอช	กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส (ไมโครโมล/มิลลิกรัมโปรตีน/นาที)			p-Value
	เบทาอีน 0%	เบทาอีน 0.75%	เบทาอีน 1.5%	
3	0.0019 ± 0.0021^{a}	0.0008 ± 0.0003^{a}	0.0004 ± 0.0003^{a}	0.34
4	0.0015 ± 0.0002^{a}	0.0008 ± 0.0004^{a}	0.0012 ± 0.0004^{a}	0.16
5	0.0024 ± 0.0015^{a}	0.0019 ± 0.0013^{a}	0.0017 ± 0.0008^{a}	0.79
6	0.0098 ± 0.0018^{a}	0.0077 ± 0.0023^{a}	0.0070 ± 0.0011^{a}	0.22
7	0.0091 ± 0.0046^{a}	0.0099 ± 0.0036^{a}	0.0115 ± 0.0021^{a}	0.73
8	0.0113 ± 0.0045^{a}	0.0110 ± 0.0030^{a}	0.0096 ± 0.0025^{a}	0.81
9	0.0044 ± 0.0022^{a}	0.0043 ± 0.0024^{a}	0.0033 ± 0.0012^{a}	0.79
10	0.0019 ± 0.0005^{a}	0.0013 ± 0.0003^{a}	0.0017 ± 0.0009^{a}	0.47
11	0.0076 ± 0.0031^{a}	0.0069 ± 0.0038^{a}	0.0065 ± 0.0016^{a}	0.91
12	0.0122 ± 0.0033^{a}	0.0121 ± 0.0057^{a}	0.0100 ± 0.0025^{a}	0.77
13	0.0009 ± 0.0003^{a}	0.0009 ± 0.0007^{a}	0.0010 ± 0.0006^{a}	0.97

จากกราฟดังภาพที่ 17 จะเห็นว่ากิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสของกุ้งกุลาดำมีค่าสูงในช่วงระดับพีเอชที่ 6-8 อาจจะเป็นเอนไซม์กลุ่มแอลฟา-อะไมเลส ซึ่งสอดคล้องกับปราณี (2547) ที่กล่าวว่าแอลฟา-อะไมเลสจะมีกิจกรรมที่เหมาะสมที่ระดับพีเอช 6.5-8.0 แต่ทั้งนี้เป็นเพียงข้อสันนิษฐานเท่านั้น ในการทดลองนี้พบว่าระดับพีเอชที่ 6-8 และ 11-12 เอนไซม์อะไมเลสมีกิจกรรมการทำงานได้สูง



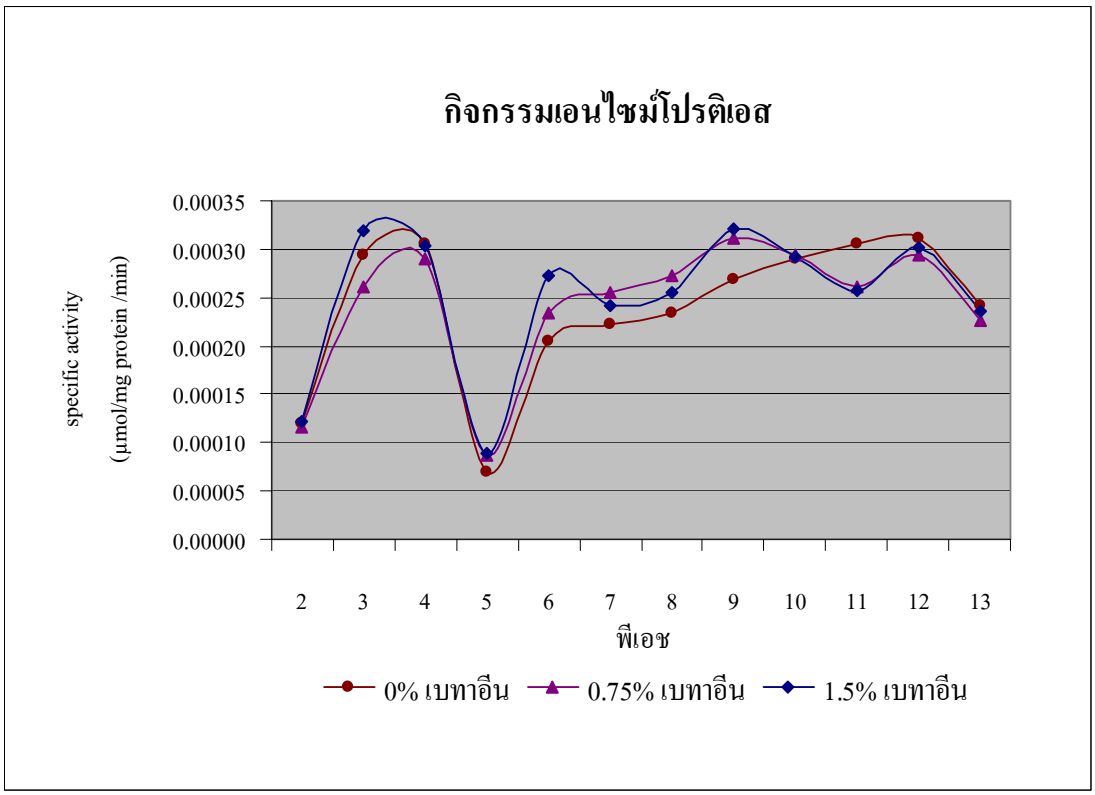
ภาพที่ 17 กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสของกุ้งกุลาดำเมื่อได้รับอาหารที่เสริมเบทาอีน 3 ระดับ

กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสของกุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารไม่มีการเสริมเบทาอีนมีค่า 0.00029-0.00030 ไมโครโมล/มิลลิกรัมโปรตีน/นาที ที่พีเอช 3-4 และ 0.00022 - 0.00029 ไมโครโมล/มิลลิกรัมโปรตีน/นาที ที่พีเอช 7-10 เสริมเบทาอีน 0.75% มีค่า 0.00008 - 0.00029 ไมโครโมล/มิลลิกรัมโปรตีน/นาที ที่พีเอช 3-4 และ 0.00025 - 0.00029 ไมโครโมล/มิลลิกรัมโปรตีน/นาที ที่พีเอช 7-10 และเสริมเบทาอีน 1.75% มีค่า 0.00030-0.00031 ไมโครโมล/มิลลิกรัมโปรตีน/นาที ที่พีเอช 3-4 และ 0.00029-0.00032 ไมโครโมล/มิลลิกรัมโปรตีน/นาที ที่พีเอช 7-10 ดังตารางที่ 17 พบว่ามีความแตกต่างทางสถิติอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($p>0.05$)

ตารางที่ 17 กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสของกุ้งกุลาดำเมื่อได้รับอาหารที่เสริมเบทาอีน 3 ระดับ (ค่าเฉลี่ย ± SD)

พีเอช	กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส (ไมโครโมล/มิลลิกรัมโปรตีน/นาที)			p-Value
	เบทาอีน 0%	เบทาอีน 0.75%	เบทาอีน 1.5%	
2	0.00012 ± 0.00004[a]	0.00011 ± 0.00002[a]	0.00012 ± 0.00002[a]	0.89
3	0.00029 ± 0.00008[a]	0.00026 ± 0.00001[a]	0.00032 ± 0.00003[a]	0.44
4	0.00031 ± 0.00004[a]	0.00029 ± 0.00005[a]	0.00030 ± 0.00006[a]	0.92
5	0.00007 ± 0.00002[a]	0.00009 ± 0.00002[a]	0.00009 ± 0.00001[a]	0.32
6	0.00020 ± 0.00003[a]	0.00023 ± 0.00006[a]	0.00027 ± 0.00009[a]	0.47
7	0.00022 ± 0.00002[a]	0.00025 ± 0.00004[a]	0.00024 ± 0.00006[a]	0.68
8	0.00023 ± 0.00003[a]	0.00027 ± 0.00003[a]	0.00025 ± 0.00005[a]	0.52
9	0.00027 ± 0.00002[a]	0.00031 ± 0.00002[a]	0.00032 ± 0.00006[a]	0.28
10	0.00029 ± 0.00003[a]	0.00029 ± 0.00006[a]	0.00029± 0.00006[a]	0.99
11	0.00030 ± 0.00006[a]	0.00026 ± 0.00002[a]	0.00026± 0.00004[a]	0.38
12	0.00031 ± 0.00007[a]	0.00029 ± 0.00001[a]	0.00030± 0.00006[a]	0.93
13	0.00024 ± 0.00008[a]	0.00023 ± 0.00005[a]	0.00024± 0.00006[a]	0.95

จากกราฟดังภาพที่ 15 จะเห็นว่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสจะมีค่าสูงที่ระดับพีเอช 3-4 ซึ่งเอนไซม์ที่ทำงานได้ดีและเหมาะสมที่ระดับพีเอชนี้คือโปรติเอสในกลุ่ม โปรติเอสกรด เช่น เปปซิน ซึ่งพบในน้ำย่อยของสัตว์มีกระดูกสันหลัง และยังพบว่ากิจกรรมเอนไซม์นี้ทำงานได้ดีที่ช่วงพีเอช 6-11 เช่นกัน ซึ่งเป็นเอนไซม์กลุ่มโปรติเอสซีรีน เช่น ไครโมทริปซินและทริปซิน

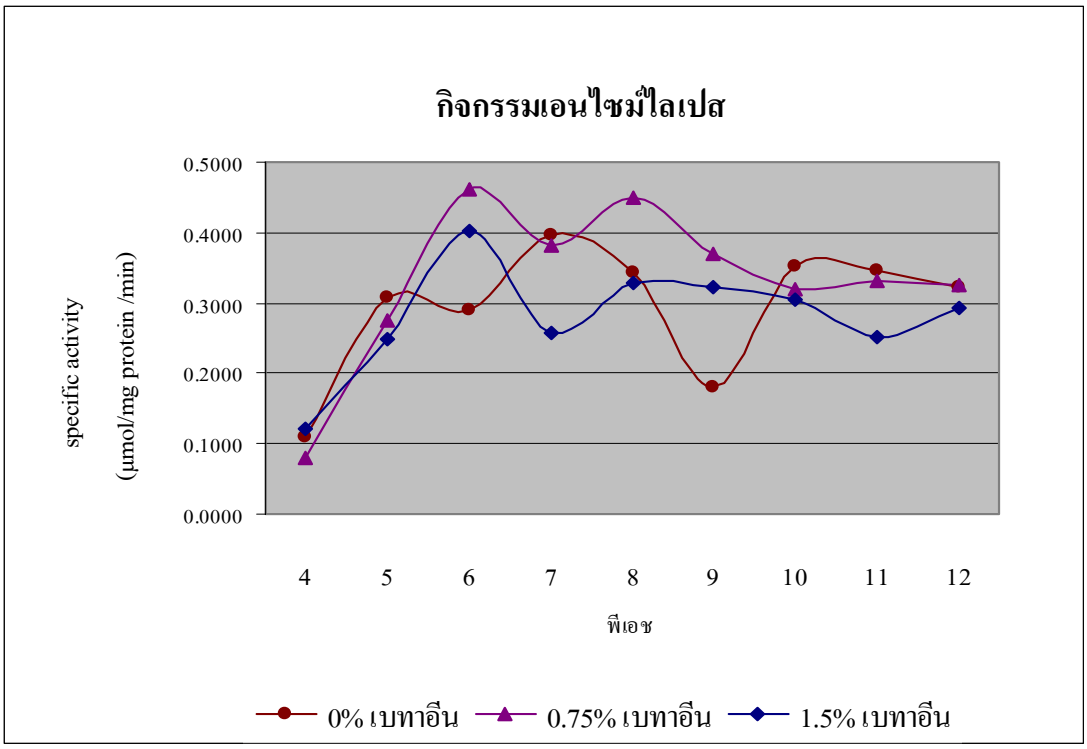


ภาพที่ 18 กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสของกุ้งกุลาดำเมื่อได้รับอาหารที่เสริมเบทาอีน 3 ระดับ

กิจกรรมเอนไซม์ไลเปสของกุ้งกุลาดำที่พีเอช 7-8 ได้รับอาหารเสริมเบทาอีน 0% 0.75% และ 1.5% มีค่า 0.3422-0.3964 ไมโครโมล/ มิลลิกรัมโปรตีน/นาที มีค่า 0.3805-0.4505 ไมโครโมล/มิลลิกรัมโปรตีน/นาที และมีค่า 0.2588-0.3274 ไมโครโมล/มิลลิกรัมโปรตีน/นาที ตามลำดับ ดังตารางที่ 18 พบว่ามีความแตกต่างทางสถิติอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($p>0.05$) จากกราฟดังภาพที่ 19 กิจกรรมเอนไซม์ไลเปสในระดับพีเอชต่างๆ จะไม่เห็นความแตกต่างกันมากนัก

ตารางที่ 18 กิจกรรมเอนไซม์ไลเปสของกุ้งกุลาดำเมื่อได้รับอาหารเสริมเบทาอีน 3 ระดับ (ค่าเฉลี่ย ± SD)

พีเอช	กิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (ไมโครโมล/มิลลิกรัมโปรตีน/นาที)			p-Value
	เบทาอีน 0%	เบทาอีน 0.75%	เบทาอีน 1.5%	
4	0.1103 ± 0.0492[a]	0.0800 ± 0.0341[a]	0.1217 ± 0.0987[a]	0.74
5	0.3082 ± 0.0947[a]	0.2757 ± 0.0915[a]	0.2495± 0.0424[a]	0.68
6	0.2911 ± 0.0919[a]	0.4604 ± 0.0551[a]	0.4036 ± 0.0513[a]	0.06
7	0.3964 ± 0.1612[a]	0.3805 ± 0.0924[a]	0.2589 ± 0.0760[a]	0.35
8	0.3423 ± 0.1313[a]	0.4505 ± 0.1180[a]	0.3274 ± 0.0519[a]	0.36
9	0.1793 ± 0.0947[a]	0.3688 ± 0.0923[a]	0.3211 ± 0.0071[a]	0.05
10	0.3527 ± 0.1293[a]	0.3186 ± 0.0922[a]	0.3054± 0.0274[a]	0.82
11	0.3469 ± 0.1372[a]	0.3315 ± 0.0325[a]	0.2519± 0.0421[a]	0.40
12	0.3225 ± 0.1315[a]	0.3246± 0.0786[a]	0.2917± 0.0130[a]	0.88



ภาพที่ 19 กิจกรรมเอนไซม์ไลเปสของกุ้งกุลาดำเมื่อได้รับอาหารที่เสริมเบทาอีน 3 ระดับ

จากคุณสมบัติของเบทาอีนที่เป็น chemoattractant ช่วยดึงดูดการกินอาหาร ทำให้ปลาหลายชนิด (Carr, 1976; Mackie and Mitchell, 1985; Virtanen *et al.,*1994; Takaoka *et al.,* 1995; Knights, 1996; Kolkovski *et al.,* 1997 and Papatryphon and Soares, 2000)) และกุ้งบางชนิดได้แก่ กุ้งกุลาดำวัยอ่อน *Penaeus monodon* (Dy Penaflorida and Virtanen, 1996) มีการตอบสนองต่อการกินในทางที่ดี น่าจะส่งผลให้กิจกรรมเอนไซม์ทางเดินอาหารมีประสิทธิภาพในย่อยอาหารที่กินเข้าไปดีด้วย แต่การในทดลองครั้งนี้พบว่ากุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารเสริมเบทาอีนทั้ง 3 ระดับ คือ 0% 0.75% และ 1.5% มีกิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอสและไลเปส มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างไม่มีนัยสำคัญ อาจเนื่องจากอาหารทดลองมีกลิ่นดึงดูดให้กุ้งเข้ามากินอาหารดีระดับหนึ่งแล้ว ถึงแม้ว่าจะเสริมเบทาอีนในอาหารก็ตามก็ไม่ส่งผลต่อการกินอาหารของกุ้งให้มีความแตกต่างกัน รวมทั้งประสิทธิภาพการย่อยอาหารและการทำงานของเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดก็ไม่แตกต่างกันด้วย อีกทั้งการทำงานของเอนไซม์ต่างๆ ในร่างกายจะมีประสิทธิภาพดีต้องขึ้นอยู่กับสภาพร่างกายที่ปกติด้วยเช่นกัน การทดลองในครั้งนี้มีการเลี้ยงกุ้งในสภาวะแวดล้อมปกติและกุ้งมีสุขภาพแข็งแรง การเสริมเบทาอีนซึ่งมีคุณสมบัติเป็น osmoprotectant (Yancey *et al.*, 1992) จึงไม่ส่งผลต่อกุ้งเช่นกันในสภาวะแวดล้อมปกติ จึงทำให้กิจกรรมเอนไซม์ทางเดินอาหารมีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญด้วย

3. <u>อัตราส่วนการสังเคราะห์ RNA ต่อโปรตีนในกล้ามเนื้อ</u>

เมื่อสิ้นสุดการทดลองกุ้งได้รับอาหารที่มีเสริมเบทาอีน 0% 0.75% และ 1.5% มีอัตราการสังเคราะห์โปรตีนแตกต่างกันทางสถิติอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($p>0.05$) เมื่อพิจารณาจากอัตราส่วนการสังเคราะห์ RNAต่อโปรตีนในกล้ามเนื้อที่มีค่า 0.33-0.36 ส่วนปริมาณ RNA ในกล้ามเนื้อ มีค่า 0.0009-0.0010 มิลลิกรัม/มิลลิกรัม และปริมาณโปรตีนในกล้ามเนื้อมีค่า 0.0026-0.0033 มิลลิกรัม/มิลลิกรัม แตกต่างกันทางสถิติอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($p>0.05$) เช่นกัน ดังตารางที่ 19

ตารางที่ 19 อัตราส่วนการสังเคราะห์ RNA ต่อโปรตีนในกล้ามเนื้อกุ้งกุลาดำเมื่อได้รับอาหารที่เสริมเบทาอีน 3 ระดับ (ค่าเฉลี่ย ±SD)

อาหารที่เสริมเบทาอีน	ปริมาณ RNA (มก./มก. กล้ามเนื้อ)	ปริมาณโปรตีน (มก./มก. กล้ามเนื้อ)	อัตราส่วนการสังเคราะห์ RNA ต่อโปรตีน
0 %	0.0010±0.0025 [a]	0.0033±0.0010 [a]	0.34±0.09 [a]
0.75%	0.0010±0.0026 [a]	0.0031±0.0013 [a]	0.33±0.07 [a]
1.50%	0.0009±0.0015 [a]	0.0026±0.0005 [a]	0.36±0.07 [a]
p-Value	0.608	0.407	0.74

ปริมาณการสังเคราะห์ RNA ที่วิเคราะห์ได้นั้นเป็น total RNA ซึ่งประกอบด้วย mRNA tRNA และ rRNA โดยปริมาณ RNA จะบ่งบอกถึงแนวโน้มความสามารถการสังเคราะห์โปรตีนได้ เพราะ RNA แต่ละตัวเป็นสารตั้งต้นที่สำคัญในการสังเคราะห์โปรตีน เช่น mRNA เป็นตัวรับข้อมูลพันธุกรรมจาก DNA ส่วน tRNA เป็นตัวขนย้ายกรดอะมิโนเพื่อมาสร้างโปรตีนและ rRNA เป็นแหล่งไรโบโซมเพื่อสังเคราะห์โปรตีนของเซลล์ ถ้ามีปริมาณ RNA มากโอกาสที่จะมีการสังเคราะห์โปรตีนได้มาก แต่ทั้งนี้ก็จะขึ้นอยู่กับปริมาณและชนิดของกรดอะมิโนที่จะนำมาต่อเป็นสายพันธะ เปปไทด์ของกรดอะมิโนแต่ละชนิดให้เกิดเป็นให้เป็นโปรตีนแต่ละชนิดด้วย ทั้งนี้ยังต้องขึ้นกับโภชนะอาหารที่กุ้งได้รับ ซึ่งการเสริมเบทาอีนในอาหารอาจจะมีบทบาทในการเป็นผู้ให้หมู่เมธิล การแก่โฮโมซีสทีนในการสังเคราะห์กรดเมไธโอนีน ซึ่งสามารถนำไปสังเคราะห์โปรตีนเพื่อการเจริญเติบโตต่อไป หรือเมไธโอนีนที่ได้ทำปฏิกิริยากับ ATP ได้ เอส-อะดีโนซิลเมไธโอนีน (SAM) แล้วให้หมู่เมธิลแก่ตัวรับชนิดอื่นแล้วตัวเองเปลี่ยนเป็นโฮโมซีสทีนแล้วรวมตัวกับซีรีนสังเคราะห์ได้กรดอะมิโนซีสธีน (cystine) เพื่อเป็นกรดอะมิโนชนิดหนึ่งในการสังเคราะห์โปรตีนเช่นกัน แต่ในการทดลองครั้งนี้พบว่าอาหารที่ให้มีการเสริมโคลีน 30 กรัมต่อกิโลกรัม คิดเป็น 600 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ซึ่งเพียงพอต่อความต้องการของกุ้ง (Kanazawa, 1985) และมีปลาป่นเป็นแหล่งของเมไธโอนีนซึ่งจากการคำนวณตามสูตรอาหารมีค่าเท่ากับ 2.46 % ของโปรตีน มีความเพียงพอต่อความต้องการของกุ้งดังการแนะนำของ Millamena *et al*. (1996) คือ 2.4% ของโปรตีน อีกทั้งการประเมินความต้องการของเมไธโอนีนจะประเมินร่วมกับซีสทีน เนื่องจากการสังเคราะห์กรดอะมิโนทั้งสองชนิดมีความเกี่ยวเนื่องกันดังที่กล่าวมาและในอาหารทดลองทั้ง 3 ชุดนี้มีค่าเมไธโอนีนรวมกับซีสทีนเท่ากับ 3.56 % ของโปรตีน สอดคล้องกับปริมาณความต้องการต่ำสุด (minimum requirement) ของกุ้งกุลาดำ คือ 3.5 % ของโปรตีน (Millamena *et*

al., 1996) เช่นกัน จึงทำให้การเสริมเบทาอีนในระดับ 0.75% และ 1.5% ไม่มีจำเป็นต้องดึงหมู่เมธิลจากเบทาอีนมาใช้ในปฏิกิริยาดังกล่าว จึงทำให้อัตราการสังเคราะห์ RNA และโปรตีนไม่มีความแตกต่างกัน ดังนั้นเพื่อการยืนยันผลดังกล่าวควรทดลองเสริมเบทาอีนในอาหารที่มีโคลีนและเมไธโอนีนไม่เพียงพอต่อความต้องการของกุ้งต่อไป ดังการทดลองของ Kasper *et al*. (2002) ที่ใช้เบทาอีนทดแทนโคลีนในอาหารปลานิลวัยรุ่น พบว่าอัตราส่วนการของโคลีนต่อเบทาอีนเท่ากับ 40:60 มีผลทำให้ปริมาณการกินอาหารและน้ำหนักปลานิลมีค่าสูงกว่าการทดแทนโคลีนด้วยเบทาอีนที่อัตราส่วน 100:0 และ 85:15 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ทั้งนี้การทดแทนโคลีนด้วยเบทาอีนไม่มีผลต่อประสิทธิภาพการใช้อาหารและการสะสมไขมันในตับของปลานิล

4. <u>การสะสมฟอสโฟติดิลโคลีนในตัวกุ้ง</u>

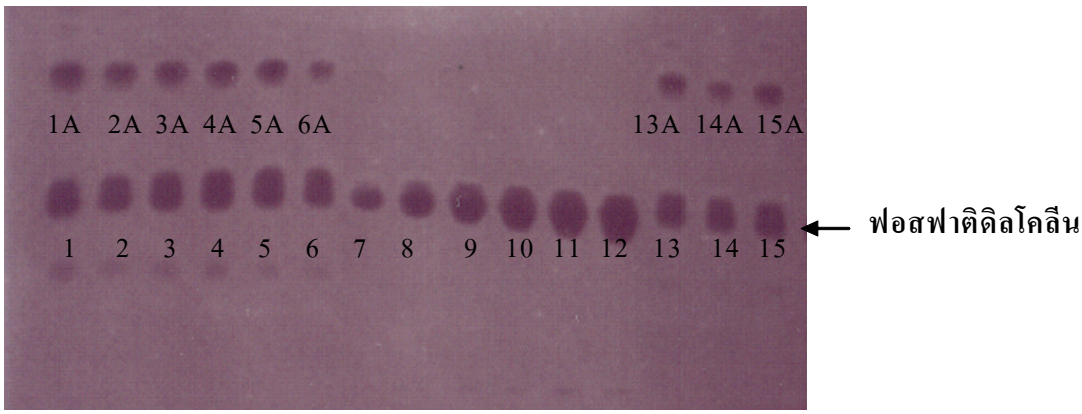
ระดับการสะสมฟอสฟาติดิลโคลีนของกุ้งกุลาดำที่ได้อาหารที่การเสริมเบทาอีน 0% 0.75% และ 1.5% มีค่าเท่ากับ 1.80 1.59 และ 2.05 มิลลิกรัม/น้ำหนักกุ้ง 1 กรัม ซึ่งมีค่าแตกต่างกันทางสถิติอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($p>0.05$) เช่นกัน ดังตารางที่ 20

<u>ตารางที่ 20</u> ปริมาณฟอสฟาติดิลโคลีนที่สะสมในตัวกุ้งเมื่อได้รับอาหารที่เสริมเบทาอีน 3 ระดับ (ค่าเฉลี่ย $\pm$ SD)

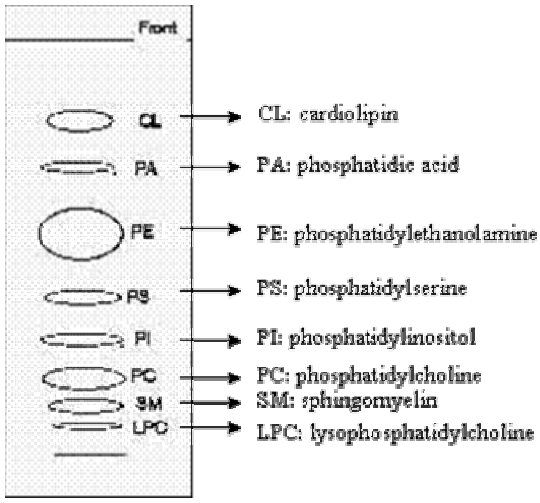
อาหารที่เสริมเบทาอีน	ปริมาณฟอสฟาติดิลโคลีน (มิลลิกรัม/น้ำหนักกุ้ง 1 กรัม)
0 %	1.80 ± 0.31^{a}
0.75%	1.59 ± 0.33^{a}
1.50%	2.05 ± 0.37^{a}
p-Value	0.33

จากการแยกฟอสฟาติดิลโคลีนจากตัวอย่างกุ้งที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง 3 ชนิดโดยวิธี thin layer chromatography พบฟอสโฟไลปิดชนิดอื่นด้วยแต่จะไม่พบในตัวอย่างที่เป็นฟอสฟาติดิลมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ดังภาพที่ 20 ซึ่งแถบที่เกิดขึ้นอาจเป็นฟอสฟาติดิลอิโนซิทอล (phosphatidylinositol) หรือฟอสฟาติลซีรีน (phosphatidylserine) หรือฟอสฟาติดิลเอธาโนลามีน (phosphatidylethanolamine) ก็เป็นได้เมื่อเปรียบเทียบกับภาพที่ 21 การแยกชนิดฟอสโฟไลปิดโดย

วิธี thin layer chromatography (Lerlay *et al*., 1987) แสดงให้เห็นว่ากุ้งกุลาดำมีการสะสมหรือสังเคราะห์ฟอสฟาติดิลโคลีนชนิดอื่นด้วย



ภาพที่ 20 การแยกฟอสฟาติดิลโคลีนโดยวิธี thin layer chromatography จากตัวกุ้งกุลาดำเมื่อได้รับอาหารที่เสริมเบทาอีน 3 ระดับ (หมายเลข 1-3 คือ เบทาอีน 0% หมายเลข 4-6 คือ เบทาอีน 1.5% หมายเลข 7-12 คือ ฟอสฟาตอดิลโคลีนมาตรฐาน 0.5 5 10 15 20 และ 25 ไมโครกรัม และหมายเลข 13-15 คือ เบทาอีน 0.75%)



ภาพที่ 21 การแยกชนิดฟอสโฟไลปิดโดยวิธี thin layer chromatography
ที่มา: Lerlay *et al*. (1987)

จาก Pathway การสังเคราะห์ฟอสโฟไลปิดชนิด ฟอสฟาติดิลโคลีน ฟอสฟาติลซีรีน และหรือฟอสฟาติดิลเอธาโนลามีน มีความสัมพันธ์กัน ฟอสฟาติลซีรีนจะสามารถเปลี่ยนกลับไปมาเป็น

ฟอสฟาติดิลโคลีนและฟอสฟาติดิลเอธาโนลามีนได้ ส่วนและฟอสฟาติดิลเอธาโนลามีนสามารถเปลี่ยนไปเป็นฟอสฟาติดิลโคลีนได้โดยมีเอส-อะดีโนซิลเมไธโอนีนเข้าร่วมทำปฏิกิริยา (Micheal and Sergio, 2003) หรือฟอสฟาติลซีรีนจะสามารถเปลี่ยนไปเป็นฟอสฟาติดิลโคลีนโดยรับหมู่เมธิลจากเบทาอีน ซึ่งเบทาอีนอาจจะมาจากการสังเคราะห์จากโคลีนหรือการเสริมในอาหาร ดังภาพที่ 12 ความสัมพันธ์ของเมตาบอลิซึมระหว่างโคลีน เบทาอีนและเมไธโอนีน (Alternative Medicine Review, 2003) แต่ในการทดลองครั้งนี้พบว่าการเสริมเบทาอีนที่ระดับ 0% 0.75% และ 1.5% มีค่าแตกต่างกันทางสถิติอย่างไม่มีนัยสำคัญ อาจจะมีเหตุผลเช่นเดียวกับการศึกษาอัตราส่วนการสังเคราะห์ RNA ต่อโปรตีน คืออาหารทดลองที่มีโคลีนและเมไธโอนีนที่เพียงพอต่อความต้องการของกุ้งแล้วเบทาอีนจึงแสดงผลต่อการสังเคราะห์และสะสมฟอสฟาติดิลโคลีนไม่ชัดเจน

ตารางที่ 21 อัตราส่วนไขมันมีขั้ว (polar lipid: PL) และไขมันไม่มีขั้ว (neutral lipid: NL) ในอาหารกุ้งที่เสริมเบทาอีน 3 ระดับและในตัวกุ้งเมื่อได้รับอาหารที่เสริมเบทาอีน 3 ระดับ (ค่าเฉลี่ย $\pm$ SD)

อาหารเสริมเบทาอีน	ไขมันในอาหาร (กรัม)			ไขมันในกุ้ง (กรัม)		
	PL (กรัม)	NL (กรัม)	PL/NL	PL (กรัม)	NL (กรัม)	PL/NL
0 %	0.22	0.84	0.27	0.17	0.11	1.57 ± 0.04
0.75%	0.20	0.74	0.27	0.19	0.14	1.32 ± 0.10
1.50%	0.21	0.84	0.26	0.21	0.11	1.86 ± 0.13

จากการวิเคราะห์หาค่าไขมันที่มีขั้วซึ่งคือกลุ่มฟอสโฟไลปิดและไขมันที่ไม่มีขั้วซึ่งคือไขมันทั่วไปพบว่าในอาหารมีอัตราส่วนของไขมันมีขั้วต่อไขมันที่ไม่มีขั้วมีค่า 0.26-0.27 แสดงให้เห็นว่าอาหารทั้ง 3 ระดับมีอัตราส่วนไขมันดังกล่าวไม่แตกต่างกัน และมีปริมาณไขมันที่เป็นกลุ่มฟอสโฟไลปิดต่ำกว่าไขมันไม่ขั้ว แต่พบว่าการวิเคราะห์ในตัวกุ้งก่อนการทดลองมีอัตราส่วนของทั้งสองชนิดมีค่าเท่ากับ 0.09 และที่ได้รับอาหารมีค่า 1.32-1.86 ดังตารางที่ 21 แสดงว่ากุ้งเมื่อได้กินอาหารเข้าไปแล้ว ร่างกายสามารถสังเคราะห์ไขมันกลุ่มฟอสโฟไลปิดได้เพราะดูจากอัตราส่วนของไขมันมีขั้วต่อไขมันไม่มีขั้วมีค่าสูงขึ้นมาก แต่จะเป็นชนิดใดหรือจากสารตั้งต้นตัวชนิดใดในการทดลองนี้ไม่สามารถบอกได้

จากการศึกษาครั้งนี้ นอกจากในอาหารกุ้งทั้ง 3 ชุด มีกรดอะมิโนเมไธโอนีนที่เพียงพอตามความต้องการจากปลาป่นซึ่งเป็นส่วนประกอบในสูตรอาหาร 33 % แล้วยังมีการเสริมโคลีนเพียงพอเช่นกัน ปริมาณ 600 มิลลิกรัมในอาหาร 1 กิโลกรัมเพียงพอต่อความต้องการของกุ้ง (Kanazawa, 1985) ยังพบว่าการทดลองมีสภาวะการเลี้ยงที่เหมาะสมมีระดับความเค็มที่สมดุล 20 พีพีที และอุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส ซึ่งไม่ทำให้กุ้งเกิดการเครียด และคุณภาพน้ำอื่นๆ ของแต่ละชุดการทดลองมีค่าใกล้เคียงกัน ดังตารางผนวกที่ 6 ไม่ส่งผลต่อการเครียดของกุ้ง จึงทำให้การเสริมเบทาอีนที่ระดับ 0% 0.75% และ 1.5% ในอาหารของการทดลองครั้งนี้มีผลให้การเจริญเติบโต กิจกรรมเอนไซม์ในทางเดินอาหาร อัตราการสังเคราะห์ RNA ต่อโปรตีนและการสะสมฟอสฟาติดิลโคลีนของกุ้งมีค่าใกล้เคียงกัน ดังนั้นหากอาหารมีโภชนะไม่ครบถ้วนตามความต้องการของกุ้ง ขาดกรดอะมิโนกลุ่มที่มีหมู่เมธิลเป็นองค์ประกอบ เช่น เมทไธโอนีนหรือโคลีนที่จำเป็นต่อการสังเคราะห์โปรตีนเพื่อการเจริญเติบโต หรือการเลี้ยงในสภาพแวดล้อมที่ความเค็มหรืออุณหภูมิไม่เหมาะสม การเสริมเบทาอีนอาจจะมีผลต่อการเจริญเติบโตและอัตรารอดเช่นเดียวกับการศึกษาของ Felix and Sudharsan (2004) ในกุ้งก้ามกรามวัยรุ่น

สรุป

การเสริมเบทาอีนในอาหารที่ระดับ 0% 0.75% และ 1.5% มีผลต่อกุ้งกุลาดำวัยรุ่น ดังรายละเอียดต่อไปนี้

1. การเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำ เช่น น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นเมื่อสิ้นสุดการทดลอง น้ำหนักตัวเฉลี่ย การเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน อัตราการแลกเนื้อ อัตราการรอดตาย ประสิทธิภาพของโปรตีน ค่าประโยชน์สุทธิของโปรตีน ประสิทธิภาพของพลังงาน และค่าการเก็บสะสมพลังงาน มีค่าแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

2. กิจกรรมเอนไซม์ในทางเดินอาหาร ได้แก่ อะไมเลส โปรติเอส และไลเปส มีค่าแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

3. อัตราการสังเคราะห์ RNA ต่อโปรตีนในกล้ามเนื้อ ตลอดจนปริมาณ RNA และโปรตีนในกล้ามเนื้อมีค่าแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

4. ระดับการสะสมฟอสฟาติดิลโคลีนในกุ้งกุลาดำมีค่าแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

ดังนั้นการเลี้ยงกุ้งที่ให้อาหารที่มีโภชนะได้แก่ กรดอะมิโนเมไธโอนีนและการเสริมโคลีนที่เพียงพอต่อความต้องการของกุ้ง และมีสภาวะการเลี้ยงที่ไม่ก่อให้เกิดความเครียด จึงไม่จำเป็นที่จะต้องเสริมเบทาอีนในอาหาร

ข้อเสนอแนะ

หากผู้ที่ต้องการศึกษาต่อไปของเบทาอีนในส่วนที่มีคุณสมบัติเป็นผู้ให้หมู่เมธิลที่มีผลต่อการเจริญเติบโต กิจกรรมเอนไซม์ในทางเดินอาหาร อัตราการสังเคราะห์RNA ต่อโปรตีนในกล้ามเนื้อ ตลอดจนการสังเคราะห์ฟอสฟาติดิลโคลีนแล้ว ควรจะศึกษาในอาหารที่มีเมไธโอนีนและหรือโคลีนที่ไม่เพียงพอต่อความต้องการของกุ้ง หรือสภาวะการทดลองที่ไม่เหมาะสม เช่น ความเค็มและอุณหภูมิ อาจจะเห็นผลที่ชัดเจนขึ้น

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

จูอะดี พงศ์มณีรัตน์ และมะลิ บุณยรัตผลิน. 2540. ผลของเลซิตินและอินโนซิทอลต่อการเจริญเติบโตประสิทธิภาพอาหารและความต้านต่อเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำ. **เอกสารวิชาการฉบับที่ 6 /2540**. 14 หน้า.

เชิดศักดิ์ เมธาธไนศวรรย์. 2535. **การใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพของปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันรำข้าว**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาตร์, กรุงเทพฯ.

ประจวบ หลำอุบล. 2525. **บทปฏิบัติการวิชากุ้ง (Natantia)**. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล, คณะประมง, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ .

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

ปราณี อ่านเปรื่อง. 2547. **เอนไซม์ทางอาหาร**. ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร, คณะวิทยาสาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ .

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

Abdel-Rahman, S.H., A. Kanazawa and S. Teshima. 1979. Effects of dietary carbohydrate on the growth and the levels of the hepatopancreatic and serum glucose of prawn. **Bull. Jap. Soc. Sci. Fish**. 45 : 1491-1494.

Alava, V.R. and C. Lim. 1983. The quantitative dietary protein requirements of *Penaeus monodon* juveniles in a controlled environment. **Aquculture** 30: 53-61.

Alava, V.R. and F.P. Pascual. 1987. Carbohydrate requirements of *Penaeus monodon* Fabricius juveniles. **Aquaculture** 61: 211-217.

Anonymous. 2003. Betaine. **Alternative Medicine Review** 8(2) : 193-196.

Anonymous. 1996. **The Finstim Briefing.** Finsugar bioproducts. 64 p.

Apud, F.D., N. Detras and R.G. Gonzales. 1980. Feeding behavior and food preference of *Penaeus monodon* Fabricius with scrap *Tilapia mossambica*. **Quarterly Research Report Southeast Asian Fisheries Development Center**, Aquaculture Department, 4(3): 19-21.

ASEAN. 1978. **Manual on Pond Culture of Penaeid Shrimp**. ASEAN national coordinating agency of the Philippines, Manila, Philippines . 132 p.

AOAC. 2000. Official **Methods of Analysis of the Association of Official Analysis Chemists. 17 th ed. Vol 1**, Association of Official Analysis Chemists , Ch4, p1-54.

Bages, M. and L. Sloanes. 1981. Effect of dietary protein and starch levels on growth and survival of *Penaeus monodon* (Febricius) postlarvae. **Aquaculture** 30: 53-61

Baggott, J. 1994. **Net Biochem**. Department of Biochemistry, MCP Hahnemann school of medicine, Philadelphai.

Bautista, M.N. 1986. The response of *Penaeus monodon* Juveniles to varying protein/energy ratio in test diet. **Aquaculture** 53: 229-242.

Bernfeld, P. 1951. Enzymes of starch degradation and synthesis. **Adv. Enzymol**. 12:379-428

Bligh, E.G. and W.J. Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and Purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology** 37 (8) : 991-917.

Cadongan, D.J., R.G. Campbell, D. Harrison and A.C. Edwards. 1993. The effects of betaine on growth performance and carcass characteristics of female pigs. *In* **Batterham, E.S. (ed.), Manipulating Pig Production IV. Australasian Pig Science Assocation**, Attwood, Victoria, Australia, 219 p

Carr, W.E.S. 1976. Chemoreception and feeding behavior in the pigfish, Orthopristis *chrysopterus*: characterization and identification of stimulatory substances in a shrimp extract. Comp. **Biochem. Physiol**. 55A: 153-157

____, W.E.S. 1978. Chemoreception in the shrimp, *Palaemonetes puio* : the role of amino acids and betaine in the elicitation of a feeding response by extracts . **Comparative Biochemistry and Physiology**. 61A: 127-132

Catacutan, M. and A. Kanazawa, 1985. Effect of some water soluble vitamins on the Growth of *Penaeus monodon* juvenile, p.182. *In* Taki, J.H. Primavera and J.A. LIobrera, eds. **Proceedings of the First International Conference on the Culture of Penaeid Prawns/shrimps,** October 1985, Iloilo, Philippines.

Coloso, R.M. and L.J. Cruz. 1980. Preliminary studies in some of aspects of amino acid biosynthesis in juveniles of *Peanaeus monodon* Fabricius. **Bull, Phill. Bioch. Soc**, 3(1&2): 12-22.

Covin, L.B. 1976. Nutritional studies on penaeid prawns: Protein requirements in compounded diets for juvenile *Penaeus indicus* (Miline Ewards). **Aquaculture** 7: 315-326.

Dall, W., Hill, J., Rothlisberg, P.C. and Staples, D.J. 1990. **The biology of Penaeidae. Advances in marine biology,** Volume 27. Blaxter J.H.S. and Southward A.J. (Eds.). Academic Press, New York, USA. 489 p.

Deshimaru, O. 1982. Protein and amino acid nutrition of the prawns, *Penaeus japonicus*, pp. 106-122. *In* **Proceeding of the second International conference in Aquaculture nutrition**, Rehboth Beach.

_____ and K. Kuroki . 1976. Studies on a purified diet for prawns. VIII. Adequate dietary levels of ascorbic acid and inositol. **Bull. Jap. Sci. Fish.** 42(5): 571-576

_____and Y. Yone. 1978. Requirements of prawns for dietary minerals. **Bull. Jap. Sci. Fish**. 44(8) : 907-910.

Dy Penaflorida, V. and E. Vertanen. 1996. Effects of FinnStim on growth and sea water adaptation of coho salmon. **Aquaculture** 168: 423-429.

Elamparithy, R. 1995. **Influence of Selected Additives on Pellet Quality and Biogrowth Parameters of Penaeid Shrimp in Juvenile**s. MFSc. thesis, Tanuvas, 75 pp.

El Hag, E.A. 1984. Food and food selection of the penaeid prawns Penaeus monodon (Fabricius). **Hydrobiologia** 110: 213-217.

Felix N. and M. Sudharsan. 2004. Effect of betaine, a feed attractant affecting growth and feed conversion of juvenile freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. **Aquaculture nutrition** 10: 193-197.

Fenucci, J.L., A.L. Lawrence and Z.P. Zien-Eldin. 1981. The effects of fatty acid and shrimp meal composition of prepared diet on growth of juvenile shrimp, *Penaeus stylirostris*. **J. World Maricult. Soc.** 12(1): 315-324.

Fernandez-Figares, I., D. Wray-Cahen, N.C. Steele, R.G. Campbell, D.D. Hall and E. Virtanen. 2002. Effect of dietary betaine on nutrient utilization and partitioning in the young growing feed-restricted pig. **J. Anim. Sci.** 80: 421-428

Forster, J.R.M. and T.W. Beard. 1973. Growth experiments with the prawn *Palaemon Serratus* Pennant fed with fresh and compounded foods. **Fish. Invest**., London, Ser. 2, 27 (7): 1-16.

Frank, D.G. and P. B. Fred. 1997. **Lipid Technologies and Applications .** Marcel Dekker, Inc.

Goh, Y. and T. Tamura. 1980. Olfactory and gustatory responses to amino acids in two marine teleosts-red sea beam and mullet. **Comp. Bichem**. **Physiol**. 66C: 217-224

Guillaume, J.C., S. Kaushik, P. Bergot and R. Metailler. 2001. **Nutrition and feeding of fish and crustaceans**. Springer-Verly Chishester, UK.

Hall, P.N. 1962. **Observation on Taxonomy and Biology of Some Indo-West Pacific Penaeid (Crustacean, Decapoda)**. Her Majesty's Stationery Office, London.

Halver, J.E. 1972. **Fish Nutrion**. Academic Press, New York. 731 p.

Harpaz, S. 1997. Enhancement of growth in juvenile freshwater prawns, *Macrobrachium rosenbergii*, through the use of chemoattractant. **Aquaculturer** 156: 225-231

Hertrampf W. Joachim. 1992. **Feeding Aquatic Animals with Phospholipids II. Fishes. Lucas Meyer. Publication No. 11.** Lucas Meyer.

Jacob D., J. Timothy and A. Timothy. 1998. An assay for betaine-homocysteine methyltransferase activity base on the microbiolohycal detection of methionine . **J. Nutr. Biochem**. 9:351-354

Jones, D.A., A. Kanazawa and K. Ono. 1979. Studies on the nutritional requirements of the larval stages of *Penaeus japonicus* using microencapsulated diets. **Mar. Biol.** 54: 261-267.

Kanazawa, A. 1982. Penaeid nutrition, pp. 87-105. *In* **Proceedings of the Second International Conference in Aquaculture nutrition**, Rehoboth Beach.

_____ . 1985. Nutrition of Penaeid prawns and shrimps, pp. 123-130. *In* **Procedings of the First International Conference on the Culture of Penaeid Prawn/Shrimp**, Iloilo, Philippines.

_____ , S. Tokiwa, M. Kayama and M. Hirata. 1977. Essential fatty acids in diet of prawns. I. Effect of linoleic and linolenic acids on growth. **Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.** 43(9): 111-1114.

Kasper, C.S. M.R. Craig, White and P.B. Brown. 2002. Betaine can replace choline in diet juvenile Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture** (205): 119-126.

_____, C.S., M.R. White, P.B. Brown. 2000. Choline is required by tilapia when methionine is not in excess. **J. Nutr**. 130: 238-242

Knights, B. 1996. Studies of feeding stimulation in young eels*, Anguilla anguilla* L., before and after first-feeding using a novel rapid-screening method. **Aquacult. Res**. 27:379-385

Kolkovski, S., A. Arieli and A. Trandler. 1997. Visual and chemical cues stimulate microdiet ingestion in sea bream larvae**. Aquacult. Int**. 5: 527-536.

Kornena, H.P., H.A. Butina, E.O. Gerasimenko, H.V. Grushenko, V.V. Nosachova, A.Y. Bundunova and B.M. Sogolovsky. 2003. Use of TLC modern methods for research of phospholipids products. **Proc. Intern. Symp. on Planar Separations Plan. Chrom**. 267-273.

Lee, D.L. 1971. Studies on the protein utilization related to growth in *Penaeus monodon* Fabricius. **Aquaculture**, 1(4): 1-3.

Leray, C. *et al.* 1987. Biomedical applications. **Journal of Chromatography,** (420): 411-416

Lim, C. and P. Pascual, 1979. Nutrition and feeding of *P. monodon* in the Philippines, pp.162-164, *In* **Proc. Techn. Consultation on Available Techn. in the Philippines**, Tigbauan,Philippines.

_____. and A. Persyn. 1989. Practical feeding of Penaeid shrimps, pp. 205-222. *In* T. Lovell. **Nutrition and fedding of fish**. Van Nostrand Reinhold, New York.

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

Mackie, A.M. and A.I. Mitchell,. 1985. Indentification of gustatory feeding stimulant for fish-applications in aquaculture. *In* Cowey, C.B., Mackie, A.M., Bell, J.G. (eds.), **Nutrion and Feeding in Fish**. Academic Press, London, pp. 177-189.

_____ and A.L.Mitchell,. 1983. Studies on the chemical nature of feeding stimulants for the juvenile European eel, *Anguilla anguilla* (L.). **J. Fish. biol.** 22:425-430

_____and A.I. Mitchell,. 1982. Further studies on the chemical control of feeding behavior in the Dover sole, *Solea solea*. **Biochem, Physiol** 73A:89-93.

Mackie, A.M. and J.W. Adron, and T.P. Grant. 1980. Chemical nature of feeding stimulants for the Dover sole, *Solea solea* L. **J. Fish Biol**. 16: 701-708

Mangalik, A. 1979. **Effects of various lipid sources on the growth and survival rates of *Penaeus monodon* Fabricius from post Larvae to juveniles in a controlled environment**. M.S. Thesis, College of Fisheries, University of Philippines.

Markweg, H.M., S. Lang and F. Wagner. 1995 . Dodecanoic acid inhibitor of a lipase form *Acinetobacter* sp. OPA 55. **Enzyme and microbial technology** 17: 512-516.

Marte, C.L. 1980. The food and feeding habit of *Penaeus monodon,* Fabricius collected from Makato River, Aklan,Philippines. **Crustaceans** 38: 225-236.

Marui, T., R.E. Evans , B. Zielinski, and T.J. Hara,. 1983. Gustatory responses of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*) palate to amino acids and derivatives. **J. Comp. Physoil.** 153:423-433

Menasveta, P. and S. Piyatiratitivorakul. 1990. Effect of Finnstim [R] on growth , food conversion and survival of giant tiger prawn (*Penaeus monodon*). **Proceedings the third Symposium on Living Aquatic Resources,** Chulalongkorn Univ. (in press).

_____, W. Worawattanamateekul, T. Latscha and J.S. Clark. 1990. Correction of giant tiger prawn (*Penaeus monodon* Febricius) coloration by astaxanthin, **Aquaculture Engineering**. (in press)

Menzoda, E.C. 1982. **Quantitative Dietary Lipid Requirement of *P. monodon* Juveniles in a Control Environment.** M.S. Thesis, College of Fisheries, university of the Philippines in the Visayas.

Micheal, W.King and Sergio Merchesin. 2003. **Lipid Metabolism-Part II**. IU School of Medicine and Brescia University. 11p.

Millamena, O.M., J.H. Primavera, R.A. Pudarera and R.V. Caballero. 1986. The effect of diet on the reproductive performance of pond-reared *Penaeus monodon* Fabricius broodstock, pp. 593-596. *In* J.L. Maclean, L.B. Dizon and L.V.Hosillos (eds.). **The first Asian fisheries forum**. Asian Fisheries Society, Manila, Philippines.

_____, M.N. Bautista-Teruel and A. Kanazawa. 1996. Methionine requirement of juvenile tiger shrimp *Penaeus monodon*, Fabricius. **Aquaculture** 143: 403-410.

Miller, A.L. 2003. The methionine – homocysteine cycle and its effects on cognitive diseases. **Altern. Meld. Rev.** 8: 7–19

Motoh, H. 1981. Studies on the fisheries biology of giant tiger prawn (*Penaeus monodon*). *In* the Philippines. **SEAFDEC Aquculture Tech. Rep**. No. 7. 128 p.

Moriarty, D.J.W. 1977. Quantification of carbon, nitrogen and bacterial biomass in the food of Some penaeid prawn, **Aust. J. Mar. Freshwater Res**. 28: 113-118.

Murai, T., A. Sumalangcay and F.P. Pascual. 1983. Supplement of Various attractants to a practical diet for juvenile *Penaeus monodon* Fabricius. **Fisheries Research Jounal of the Philippines**, 8: 2-6.

Nalzaro, G. G. 1982. **Quantitative Dietary Cholesterol Requirement of *Penaeus monodon* Juveniles**. M.S. Thesis, College of Fisheries, University of the Philippines in the Visayas.

Nelson, D.L, and M.M. Cox. 2000. **Lehninger Principles of Biochemistry, 3rd ed**. Worth Publishers, New York .

Nezaki, G. 1986. Nutritional requirement of prawn (*Penaeus monodon* Fabricius) –IV. **Effect of lecithin. Unpublished Terminal Report**. Aqua. Dept. SEAFDEC, Tigbauan, Iloilo, Philippines.

NRC (National Reserch Council). 1983. **Nutrient Requirments of Warmwater Fishes and Shellfishes**. National Academy Press, Washington, D.C. 102p.

Papatryphon, E. and J.H. Soares. 2000. Indentification of feeding stimulants for striped bass, Morone saxitilis. **Aquaculture** 185: 339-352.

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

Pascual, F.P. 1980. Attractants in purified diet. **Quarterly Research Report SEAFDEC AQD** 6 (1): 7

_____. 1986. Effect of supplemental lecithin and lipid sources on growth and survival of *P. monodon* juveniles, pp. 615-618. *In* J.L. Maclean**,** L.B. Dizon and L.V. Hosillos (eds.) **The first Asian fisheries forum**. Asian Fisheries Society, Manila, Philippines.

_____ and Kanazawa. 1986. Specific amino acid free semi-purified diet for *P. monodon* juveniles. Memoirs Kagoshima U niversity, Research Center for the South Pacific 7: 65-72.

_____. R. Coloso and C. Tamse. 1983. Survival and some histological changes in *P. monodon* Fabricius juveniles fed various carbohydrates. **Aquaculture** 31: 169-180

_____. E. M. Cruz and A. Sumalangcay, Jr. 1986. Practical diets for *P. monodon* juvenile containing various levels of defatted soybean meal. (unpublished manuscript)

Robinson, E.H. 1989. Practical feeding of crawfish, pp. 231-241. *In* T. Lovell. **Nutrition and Feeding of Fish.** Van Nostrand Reinhold, New York.

Rumsey, G.L. 1991. Choline-betaine requirements of rainbow trout. **Aquaculture** 95: 107-116.

Sargent, J., R.J. Henderson and D.R. Tocher. 1989. **The Lipids**. *In* Fish Nutrition Second Edition. Academic Press. San Diego. 153-218 p.

Schneck, J.L., B. Friend, J. Sherma. 2003. High-performance thin layer chromatographic analysis of lipids in juvenile *Helisoma trivolvis* (Colorado strain) maintained on a hen's egg yolk diet. **J. Planar Chromatogr**. 16:405-407.

Schwahn, B.C., D. Hafner and T. Hohlfeld . 2003. Pharmacokinetics of oral betaine in healthy subjects and patients with homocystinuria. **Br J Clin Pharmacol.** 55: 6-3.

Shigueno, K. 1975. **Shrimp Culture in Japan**. Association for International Technical Promotion, Tokyo, Japan. 153 p.

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

Sire, M.F., C. Lutton and J.M. Vernier. 1981. New views on intestinal absorption of lipids in teleostean fishs: an ultrastructural and biochemistry study in rainbow trout. **J. Lipid Res.** 22: 81-25

Stickney, R.R. and R.T. Lovell. 1977. Nutrion and feeding of channel catfish. **Southern Cooperative Series. Bulletin 218**. U.S. Department of Agriculture. 66 p.

Sunde, J., G. L. Taranger and K. Rungruangsak-Torrissen. 2001. Digestive protease activities and free amino acids in white muscle as indicators for feed conversion efficiency and growth rate in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) **Fish Physiology and Biochemistry** 25: 335-345.

Takaoka, O., K. Takii, M. Nakamura and M. Takeda . 1995. Indentification of feeding stimulants for tiger puffer. **Fish. Sci**. 61: 833-836.

Takeda, M. and K. Takii. 1992. Gustation and nutrition in fishes: application to aquaculture. *In* **Fish Chemoreption (ed. T.J. Hara)**. Chapman & Hall, London, 271-281p.

Teshima, S. and Kanasawa. 1986. Role of dietary phospholipid in transport of [^{14}C] tripalmitin in prawn, **Bull. Jp. Soc. Sci. Fish**. 52:519

Thi-Dinh K.L., Y .Demarne, C. Nicolas and C. Nicolas. 1990. Effect of dietary fat on phospholipids class distribution and fatty acid composition in rat cell membrane. **Lipid**. 25: 278-283.

Thomas, M.M. 1972. Food and feeding habits of *Penaeus monodon* Fabricius from Korapuzlia estuary. **Indian Journal Fisheries** 19: 202-204.

Twibell, R.G. and P.B. Brown. 2000. Dietary choline requirement of juvenile yellow perch (*Percaflavescens*). **Journal of Nutrition** 130: 95-99.

Villaluz, D.K., A. Villaluz, B. Ladrela, M. Sheik and A. Gonzaga. 1969. Reproducetive laval development and cultivation of sugpo (*Penaeus monodon* Fabricius). **Philippines Journal Science**, 98 (3-4): 205-233.

Villasante, V.F., I. Fernandez, R.M. Preciado, M. Oliva, D. Tova and H. Nolasco. 1999. The activity of digestive enzyme during the molting stage of the arched swimming *Callinectes Arcautus* orday. 1863. (Crustacea : decapoda : portunidae). **Bulletin of marine Science**. 65(1):1-9

Virtanen, E., R. Hole, R. Resink, R. Slinning and J.W. Junnila. 1994. Betanine/amino acid additive enhances seawater performance of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) fed standard fish-meal-based diets. **Aquaculture** 124: 220-231.

Vonk, H.J.. 1960. Digestion and metabolism, pp. 291-316. *In* T.H. Waterman (ed.). **The Physiology of Crustacea: I metabolism and growth**. Academic Press, New York.

Watanabe, T. n.d. **Fish nutrition and mariculture : Jica Textbook the General Aquaculture Course** . Department of Aquacultic Biosciences, Tokyo University of Fisheries. 232 p.

Yancey, P.H.. 1992. Compatible and counteracting aspects of organic osmolytes in mammalian kidney cells in vivo and vitro. pp. 33-51. *In* G.N. Somero, C.B. Osmond and Bolis, C.L., eds. **Water and Life**, Springer – Verlag, Berlin/Heidelberg.

ภาคผนวก

การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์

การเตรียมบัฟเฟอร์ (Buffer solution)

อุปกรณ์

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

สารเคมี

1. น้ำกลั่น
2. ไกลซีน 0.2 โมลาร์
3. กรดไฮโดรคลอลิค 0.2 นอร์มอล
4. กรดซิตริก 0.1 โมลาร์
5. ไดโซเดียมโดรเจนฟอสเฟต 0.2 โมลาร์
6. โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.2 โมลาร์
7. โซเดียมคาร์บอเนต 0.1 โมลาร์
8. โซเดียมไบคาร์บอเนต 0.1 โมลาร์
9. โพแทสเซียมคลอไรด์ 0.2 โมลาร์
10. โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.2 โมลาร์

วิธีการ

1. เตรียมบัฟเฟอร์ พีเอช 2

ผสมไกลซิน 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 12.5 มิลลิเมตร กับกรดไฮโดรคลอลิค 0.2 นอร์มอล ปริมาตร 11 มิลลิเมตร แล้วเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ตรวจสอบเครื่องวัดพีเอช

2. เตรียมบัฟเฟอร์ พีเอช 3, 4 และ 5

ผสมกรดซิตริก 0.1 โมลาร์ กับโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.2 โมลาร์ ตามปริมาตรดังตารางงภาคผนวกที่ 1 แล้วตรวจสอบด้วยเครื่องวัดพีเอช

ตารางผนวกที่ 1 การเตรียมบัฟเฟอร์ พีเอช 3, 4 และ 5

พีเอช	ปริมาตรของกรดซิตริก 0.1 โมลาร์	ปริมาตรของโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.2 โมลาร์
3	397.25 มิลลิลิตร	102.75 มิลลิลิตร
4	307.25 มิลลิลิตร	192.75 มิลลิลิตร
5	242.50 มิลลิลิตร	257.50 มิลลิลิตร

3. เตรียมบัฟเฟอร์พีเอช 6,7 และ 8

ผสมไดโซเดียมโดรเจนฟอสเฟต 0.2 โมลาร์กับโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.2 โมลาร์ ตามปริมาตรดังตารางงภาคผนวกที่ 2 แล้วเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ตรวจสอบด้วยเครื่องวัดพีเอช

ตารางผนวกที่ 2 การเตรียมบัฟเฟอร์ พีเอช 6, 7 และ 8

พีเอช	ปริมาตรของไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.2 โมลาร์	ปริมาตรของโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.2 โมลาร์
6	30.75 มิลลิลิตร	219.25 มิลลิลิตร
7	152.50 มิลลิลิตร	97.50 มิลลิลิตร
8	236.75 มิลลิลิตร	13.25 มิลลิลิตร

4. เตรียมบัฟเฟอร์พีเอช 9 และ 10

ผสมโซเดียมคาร์บอเนต 0.1 โมลาร์กับโซเดียมไบคาร์บอเนต 0.1 โมลาร์ตามปริมาตรดังตารางงภาคผนวกที่ 3 แล้วตรวจสอบด้วยเครื่องวัด

ตารางผนวกที่ 3 การเตรียมบัฟเฟอร์ พีเอช 9 และ 10

พีเอช	ปริมาตรของโซเดียมคาร์บอเนต 0.1 โมลาร์	ปริมาตรของโซเดียมไบคาร์บอเนต 0.1 โมลาร์
9	50 มิลลิลิตร	450 มิลลิลิตร
10	350 มิลลิลิตร	150 มิลลิลิตร

5. เตรียมบัฟเฟอร์พีเอช 11

ผสมไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 โมลาร์ปริมาตร 250 มิลลิลิตรกับโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 โมลาร์ปริมาตร 20.5 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ตรวจสอบด้วยเครื่องวัดพีเอช

6. เตรียมบัฟเฟอร์พีเอช 12 และ 13

ผสมโพแทสเซียมคลอไรด์ 0.2 โมลาร์ กับโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.2 โมลาร์ ตามปริมาตรดังตารางภาคผนวกที่ 4 แล้วเติมน้ำให้ได้ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ตรวจสอบด้วยเครื่องวัดพีเอช

ตารางผนวกที่ 4 การเตรียมบัฟเฟอร์ พีเอช 12 และ 13

พีเอช	ปริมาตรของโพแทสเซียมคลอไรด์ 0.2 โมลาร์	ปริมาตรของโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.2 โมลาร์
12	125 มิลลิลิตร	30 มิลลิลิตร
13	125 มิลลิลิตร	330 มิลลิลิตร

<u>การสกัดเอนไซม์ (crude enzyme extraction)</u> (Villasante *et,.* 1999)

อุปกรณ์

1. เครื่อง homogenizor
2. เครื่อง centrifuge
3. ตู้แช่เย็น freezer อุณหภูมิต่ำกว่า – 20 องศาเซลเซียส
4. เครื่องแก้ว เช่น บีกเกอร์ หลอดแก้ว
5. appendrop
6. pipettetip
7. ไมโครปิเปต
8. น้ำแข็ง

สารเคมี

1. สารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl buffer พีเอช 7.5

ตัวอย่าง

1. เฮพาโทแพนเครียส (hepatopancreas) ของกุ้งที่ยังมีชีวิต

วิธีการ

hepatopancreas

↓

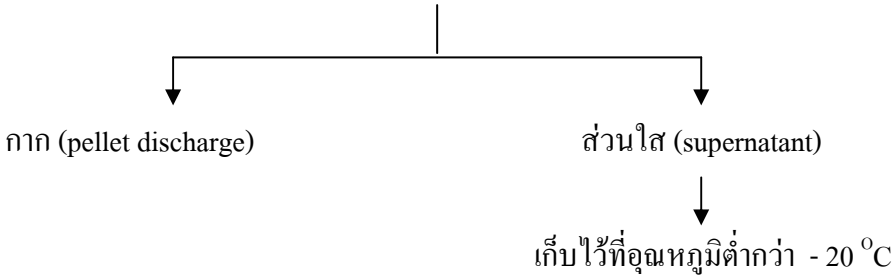
Homogenize

(ในหลอดที่แช่ในน้ำแข็งจนละเอียดเป็นเนื้อเดียวกัน)

↓

Centrifuged 15000 g ที่ 4 ^{O}C เป็นเวลา 10 นาที

↓



<u>การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส</u> (Bernfeld, 1951)

อุปกรณ์

1. เครื่อง vortex mixture
2. เครื่อง centrifuge
1. เครื่อง spectrophotometer
2. เครื่องแก้ว เช่น บีกเกอร์ หลอดทดลอง
3. เตา hot plate
4. นาฬิกาจับเวลา
5. ไมโครปิเปต
6. appendrop
7. pipettetip

สารเคมี

1. สารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 3-13
2. น้ำแป้ง (starch solution) 1% ในสารละลายบัฟเฟอร์แต่ละพีเอช (ต้มไม่ให้ใสมาเกินไป) เป็นซับสเตรต
3. 3,5-dinitrosaticytic acid (DNS) reagent (1g DNS + 2 M NaOH 20 ml + 30 g sodium potassium tatrate + น้ำกลั่นปรับให้ได้ที่ 100 ml)
4. น้ำกลั่น
5. น้ำแข็ง
6. มอลโตส (maltose)

การเตรียมกราฟมาตรฐานของน้ำตาลมอลโทส

1. เตรียมสารละลายมอลโทสเข้มข้น 10 ไมโครโมล/มิลลิลิตร
2. เจือจางให้ได้ความเข้มข้น0.2-3.0 ไมโครโมล/มิลลิลิตร ดังตารางภาคผนวกที่ 5
3. ดูดสารละลายมอลโทสที่เจือจางแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 100 ไมโครลิตรใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลาย 3.5-dinitrosalicylic acid (DNS) 250 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองผสมให้เข้ากัน
4. นำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที
5. ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วเติมน้ำกลั่น 2.5 นาโนเมตร
6. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร
7. นำค่าที่วัดได้มาเขียนกราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโทสกับค่าการดูดกลืนแสง

ตารางผนวกที่ 5 การเตรียมสารละลายเพื่อสร้างกราฟมาตรฐานมอลโตส

หลอดทดลอง	ปริมาตร มอลโตส 10 µl/ml (µl)	ปริมาตร น้ำกลั่น (µl)	ความเข้มข้น ของมอลโตส (µl/ml)
1	10	490	0.2
2	20	480	0.4
4	30	470	0.6
5	40	460	0.8
6	50	450	1.0
7	60	440	1.2
8	70	430	1.4
9	80	420	1.6
10	90	410	1.8
11	100	400	2.0
12	125	375	2.5
13	150	350	3.0

วิธีการ

250 µl of starch solution 1% + 20 µl of crude enzyme extract

↓ บ่มที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที

หยุดปฏิกิริยาด้วย 250 µl of dinitrosaticytic acid (DNS) reagent

↓ ต้ม 5 นาที

เติมน้ำกลั่น 1.5 ml

(1.5-2.5 ml ดูความเข้มข้น แต่ควรใช้ 1.5 ml)

↓

วัดด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวแสงคลื่นที่ 540 nm

<u>การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส</u> (Villasante *et al,.* 1999)

อุปกรณ์

1. เครื่อง vortex mixture
2. เครื่อง centrifuge
3. เครื่อง spectrophotometer
4. เครื่องแก้ว เช่น บีกเกอร์ หลอดทดลอง
5. นาฬิกาจับเวลา
6. ไมโครปิเปต
7. appendrop
8. pipettetip

สารเคมี

1. สารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 2-12
2. azocasein 2% ในสารละลายบัฟเฟอร์ เป็นซับสเตรท
3. trichloroacetic acid 10% (TCA)
4. NaOH 1 โมลาร์

5. น้ำแข็ง
6. มอลโตส (maltose)

วิธีการ

250 µl of azocasein 2%+ 20 µl of crude enzyme extract
↓ บ่มที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที
หยุดปฏิกิริยาด้วย 1.2 ml of TCA (trichloroacetic acid 10%)
↓ เซนตริฟิวซ์ 15000 15 นาที
เก็บส่วนใส 1 ml เติม 1.4 ml 1 โมลาร์ NaOH
↓
วัดด้วยเครื่อง spectrophotometer ความยาวแสงคลื่นที่ 400 nm

<u>การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ไลเปส</u> (Markweg *et al.*, 1995)

อุปกรณ์

1. เครื่อง vortex mixture
2. เครื่อง centrifuge
3. เครื่อง spectrophotometer
4. เครื่องแก้ว เช่น บีกเกอร์ หลอดทดลอง
5. นาฬิกาจับเวลา
6. ไมโครปิเปต
7. appendrop
8. pipettetip

สารเคมี

1. สารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 4-12
2. p-nitrophenyl plamitate (pNNP) ใน propanol

3. Na_2CO_2 0.1 โมลาร์
4. น้ำแข็ง

วิธีการ

100 µl of pNNP 0.01 M + 800 µl of buffer solution + 20 µl of crude enzyme extract

↓ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที

หยุดปฏิกิริยาด้วย 250 µl of 0.1 M Na_2CO_2

↓ เซนตริฟิวซ์ 10000 15 นาที

วัดด้วยเครื่อง spectrophotometer ความยาวแสงคลื่นที่ 420 nm

การวิเคราะห์อัตราส่วนการสังเคราะห์ RNA ต่อโปรตีนในกล้ามเนื้อ

(Sunde *et al.*, 2001)

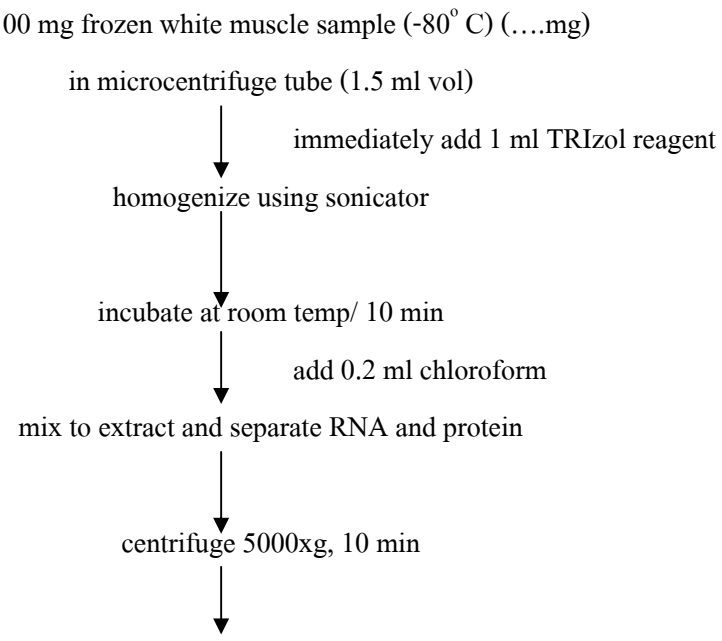
อุปกรณ์

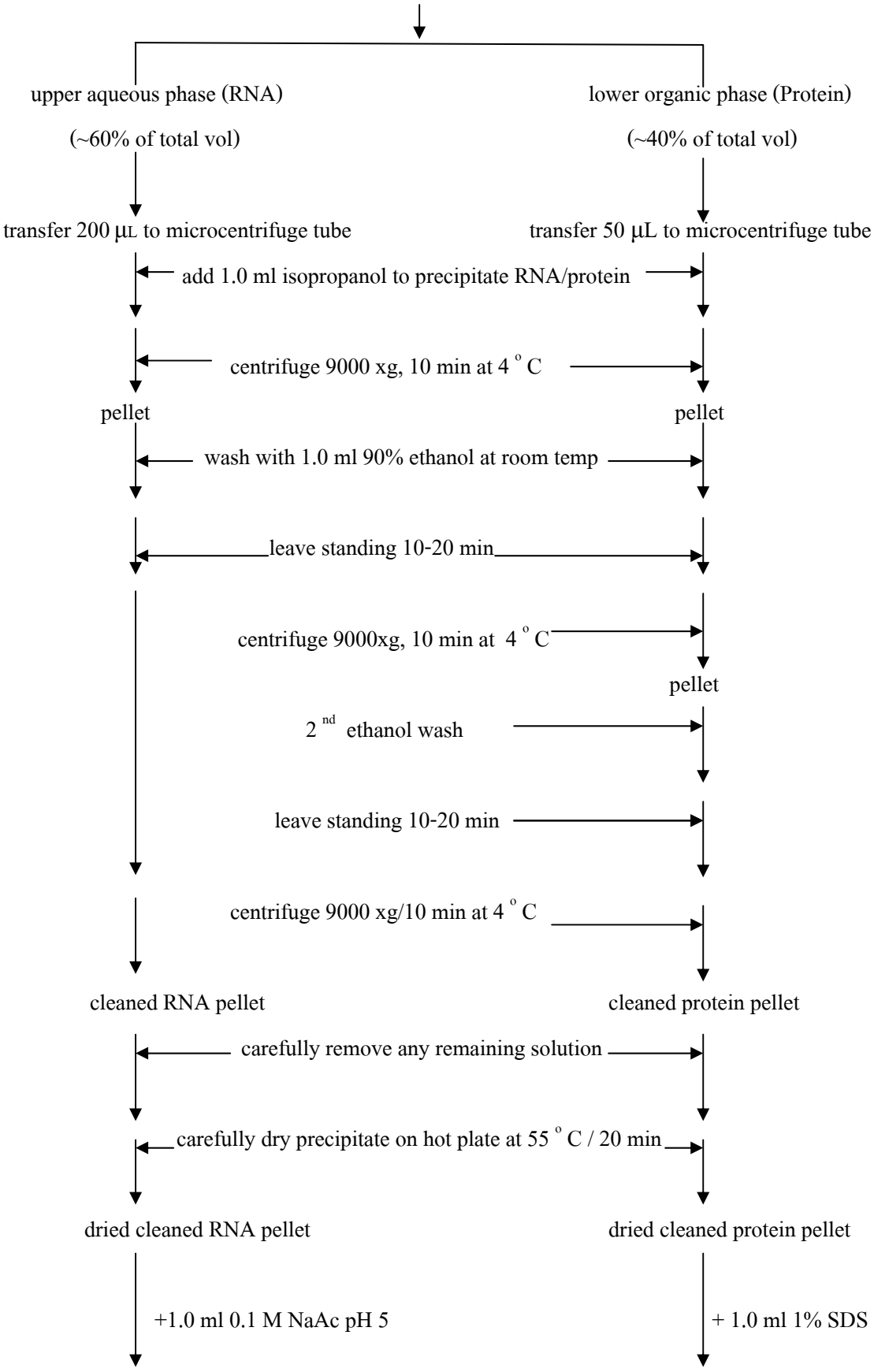
1. เครื่อง sonicator
2. เครื่อง centrifuge
3. microcentrifuge tube

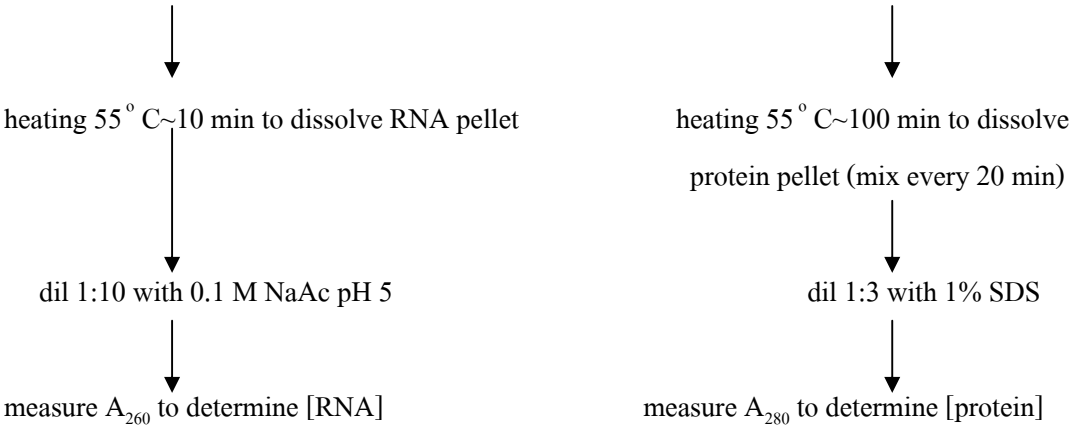
สารเคมี

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

วิธีการ




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



การคำนวณ

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}

การวิเคราะห์หาปริมาณฟอสฟาติดิลโคลีน

การสกัดไขมัน (Bligh and Dryer, 1959)

อุปกรณ์

1. homogenizer
2. filter paper no. 1
3. grass wear : pear flask, tube , beaker
4. rotary evaporation

สารเคมี

1. chloroform
2. methanol
3. KCl 0.88%
4. sodium sulfate anhydrous
5. น้ำกลั่น
6. ก๊าซไนโตรเจน

วิธีการ

น้ำหนักตัวอย่าง 1 ส่วน + อัตราส่วน chloroform : methanol : น้ำ (1:2:0.8)
(น้ำหนักตัวอย่าง 50 g + chloroform 50 ml : methanol 100 ml : น้ำ 4 ml)

↓

homogenize 13500 รอบ/นาที จนละเอียดหรือ 2 นาที

↓

เติม chloroform 10 ml , homogenize 30 นาที

↓

เติม น้ำ 10 ml , homogenize 30 นาที

↓

กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1

(ฉีดล้างกระดาษกรองด้วย chloroform)

↓

นำส่วนที่กรองได้ใส่ในกรวยแยก

↓

เติม 0.88% KCl อัตราส่วน 1 ใน 4 ของปริมาตรส่วนที่กรองได้

↓

ไขส่วน chloroform ชั้นล่างออก

↓

เติม sodium sulfate anhydrous เล็กน้อยให้สารละลายใส

↓

ใส่ในขวดแก้วรูป pear ที่ทราบน้ำหนักแน่นอน

↓

ระเหย chloroform ด้วย rotary evaporation

↓

ชั่งน้ำหนักและหาน้ำหนักของไขมันที่สกัดได้

↓

เก็บรักษาโดยฉีดก๊าซไนโตรเจน และเก็บไว้ -20 ^{0}C

<u>การแยกไขมัน polar lipid และ non-polar lipid</u> (Watanabe, nd.)

อุปกรณ์

1. syringe : 20 ml
2. sep-pack silica cartridge
3. grass wear : pear flask

สารเคมี

1. chloroform
2. methanol
3. chloroform : methanol mixture : 49:1 (V/V)

วิธีการ

dissolve 30-100 mg of crude lipid in 0.5-1 ml chloroform

↓

inject the sample at the top of the cartridge

↓

connect the syringe containing 20 ml of chloroform to the top of the cartridge and push the chloroform through the cartridge (flow rate 25 ml/min.)

↓

non polar lipid fraction is collected

↓

then a chloroform : methanol mixture is use to elute the remaining monoglycerides in the cartridge

↓

monoglycerides are also added to the non-polar lipid fraction

↓

30 ml of methanol are use to elute the polar lipids

↓

polar lipid fraction is collected

↓

non-polar lipid and polar lipid are evaporated

<u>การแยก phophatidylcholine จาก polar lipid</u> โดยวิธี thin layer chromatography (TLC) (Schineck, Fried and Sherma, 2003 and Kornena *et al*, 2003)

อุปกรณ์

1. TLC plate (Kieselgel G60) 20x10 cm 0.25 prekote
2. developing tank
3. microcaps 1-5 µl / Auto spotting
4. drying oven : set 110, 140 ^{O}C
5. sprayer
6. micropipette
7. grass wear : tube

สารเคมี

1. chloroform
2. developing solvent
   - chloroform : methanol : water (65:25:4)
   - chloroform : methanol : acetic acid (65:25:8)
3. 10% cupric sulfate solution (dissolving 100 g $CuSO_4$ and 100 ml phosphoric acid in water and making up to 1 L)
4. phosphatidylcholine standard (dissolve in chloroform 0.5, 5, 10, 15, 20,25 mg/ml)

วิธีการ

Dry TLC-plate for 1 hr. in drying oven (110 ^{o}C)

↓

Dissolved polar lipid in chloroform rate 30 -100 mg/ml chloroform

↓

Spot polar lipid and standard phosphatidylcholine on TLC-plate form bottom 1.5 cm.

↓

Put TLC plate in developing solvent tank

1st developing solvent : chloroform : methanol : water (65:25:4)

↓

Dry the TLC plate at room temperature

↓

Develop the plate with second solvent

2nd developing solvent : chloroform : methanol : acetic acid (65:25:8)

↓

Dry the TLC plate at room temperature

↓

Spray the TLC plate with 10% cupric sulfate solution

↓

Dry in drying oven 140 ^{O}C

<u>การวิเคราะห์หาปริมาณ phosphatidylcholine</u>

อุปกรณ์

1. เครื่อง Densitometer

วิธีการ

phosphatidylcholine ที่แยกตามวิธี TLC

↓

scan ที่เครื่อง densitometer

(ความยาวคลื่น 370 nm, absorption, Hg lamp,)

↓

นำค่าที่ได้มาคำนวณปริมาณ phosphatidylcholine ต่อตัวอย่างน้ำหนักกุ้ง

ตารางผนวกที่ 6 คุณภาพน้ำระหว่างการทดลอง

พารามิเตอร์	หน่วย	ผลวิเคราะห์คุณภาพน้ำ
ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ	mg/l	4.6-5.8
ความเป็นกรดเป็นด่าง	-	8.3-8.7
อุณหภูมิ	^{O}C	28-30
ความเป็นด่าง	mg/l as $CaCO_3$	99-102
แอมโมเนีย	mg NH_3-N/l	0.12-0.24
ไนไตรท์	mg NO^-_2-N/l	0.02-0.13
ไนเตรท	mg NO^-_3-N/l	0.15-0.21
TKN	mg/l	2.0-5.5
BOD	mg/l	1.05-2.33