



ใบรับรองวิทยานิพนธ์  
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (ชีวเคมี)

ปริญญา

ชีวเคมี	ชีวเคมี
สาขา	ภาควิชา
เรื่อง	การพัฒนาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงปลานิลเชิงพาณิชย์ Development of Suitable Feed for Commercial Production of Nile Tilapia, <i>Oreochromis niloticus</i>
نامผู้วิจัย	นางสาวจุฑามาศ สุนทรโชติ
ได้พิจารณาเห็นชอบโดย	
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	( ผู้ช่วยศาสตราจารย์เกียรติทิพย์ ชูวงศ์โกมล, Ph.D. )
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	( ผู้ช่วยศาสตราจารย์อรุณี อิงคากุล, Ph.D. )
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	( รองศาสตราจารย์อุทัยวรรณ โกวิทวาทิ, Ph.D. )
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	( อาจารย์ศศิมนัส อุณจักษ์, Ph.D. )
หัวหน้าภาควิชา	( ผู้ช่วยศาสตราจารย์เกียรติทิพย์ ชูวงศ์โกมล, Ph.D. )

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

( รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr. )

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ..... เดือน ..... พ.ศ. ....

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การพัฒนาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงปลานิลเชิงพาณิชย์

Development of Suitable Feed for Commercial Production of Nile Tilapia,  
*Oreochromis niloticus*

โดย

นางสาวจุฑามาศ สุนทรโชติ

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์  
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)

พ.ศ. 2553

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จุฑามาศ สุนทรโชติ 2553: การพัฒนาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงปลานิล  
เชิงพาณิชย์ ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี) สาขาชีวเคมี ภาควิชาชีวเคมี  
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์เกียรติทิพย์ ชวงศ์โกมล, Ph.D.  
118 หน้า

ปลานิลเป็นปลาน้ำจืดที่มีมูลค่ารวมของการส่งออกสูงสุดในประเทศไทย แต่ ณ เวลานี้  
เนื่องจากมีปัญหาเกี่ยวกับความไม่เหมาะสมของอาหารต่อการเพาะเลี้ยงปลานิล ทำให้ส่งผลกระทบต่อ  
ต่อการพัฒนาสายพันธุ์ อัตราการรอด และการเจริญเติบโต งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนา  
สูตรอาหารให้เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงโดยใช้วิธี *in vitro* digestibility และศึกษาคุณลักษณะของ  
ไอโซไซม์ทริปซิน โดยวิธี polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Substrate-SDS-  
PAGE ผลจากการศึกษา crude enzymes ที่สกัดจากลำไส้ปลานิลแปลงเพศ มาวิเคราะห์ความสามารถ  
การย่อยวัตถุดิบอาหารที่ผ่านการฉายและไม่ผ่านฉายรังสี พบว่า วัตถุดิบอาหารที่ผ่านการฉายรังสี  
สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตได้ดีกว่าวัตถุดิบที่ไม่ผ่านการฉายรังสี  
จากข้อมูลที่ได้บ่งชี้ว่า ปลาป่น กากถั่วเหลือง และวัตถุดิบอาหารแหล่งคาร์โบไฮเดรตจากพืชที่ผ่าน  
การฉายรังสีสามารถนำมาพัฒนาสูตรอาหารให้เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงปลานิล นอกจากนี้  
การศึกษาเปรียบเทียบระหว่างสูตรอาหารที่พัฒนาจากวัตถุดิบอาหารแหล่งโปรตีนจากพืชและสัตว์  
ด้วยการวิเคราะห์ไซโมแกรม เพื่อศึกษารูปแบบไอโซไซม์ของทริปซินบน SDS-PAGE สามารถ  
นำมาใช้ศึกษาการแสดงออกของไอโซไซม์ทริปซิน ซึ่งเป็นดัชนีบ่งชี้การเจริญเติบโต แสดงให้  
เห็นว่าไอโซไซม์ทริปซินที่พบในปลา มีรูปแบบที่แตกต่างกัน

*In vitro* digestibility เป็นวิธีการเบื้องต้นสำหรับการคัดเลือกวัตถุดิบอาหารให้  
มีความเหมาะสมต่อการเลี้ยงปลา จากประสิทธิภาพการย่อยทริปซินและอะไมเลสของวัตถุดิบ  
อาหารที่ผ่านการฉายรังสี นอกจากนี้ รูปแบบของเอนไซม์ทริปซินมีความแตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบ  
ปลาที่ได้รับวัตถุดิบอาหารแหล่งโปรตีนจากพืชและสัตว์

Jutamas Sunthornchot 2010: Development of Suitable Feed for Commercial Production of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. Master of Science (Biochemistry), Major Field: Biochemistry, Department of Biochemistry. Thesis Advisor: Assistant Professor Kiattawee Choowongkomon, Ph.D. 118 pages.

Nile tilapia is a famous consumed fish in Thailand. Until now, there is no specific commercial fish feed for Nile tilapia and these may affect maturation, rate of survival, and rate of growth. The objectives of this study is to develop of appropriated raw materials for making suitable feed formula to increase quality of cultivated fish by using *in vitro* digestibility method and characterize trypsin isoforms by polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Substrate-SDS-PAGE. Crude intestine enzymes were assayed for digestion ability of raw materials comparing between food with and without irradiation by *in vitro* digestibility. It was found that raw-materials with radiation and without radiation were similar, digestion of carbohydrate and protein of radiated-raw materials. The results showed that radiated-raw materials to better improve digestive ability than without radiation. The data also indicated that fish meal, soybean and all radiation carbohydrate source raw materials form plants become suitable raw materials for develop food formula for adult Nile tilapia. Zymogram analysis of trypsin activity on SDS-PAGE was also used to examine the expression of trypsin isozymes (indicated for growth of fish). The studied was compared the patterns of trypsin isozyme between fish feed formula which obtain protein source originate from animal and plant materials. The discrepancies of trypsin isozymes were detected in fish cultivated in food formula which obtain protein source originate from animal and plant materials.

*In vitro* digestibility is a preliminary analysis for select appropriated raw materials of fish feed. The efficiency of trypsin and amylase were improved in radiated raw materials. Moreover, the trypsin protease patterns seem to be difference in fish cultured with protein from plant source and animal source.

---

Student's signature

---

Thesis Advisor's signature

## กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.เกียรติทิพย์ ชูวงศ์โกมล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก เป็นอย่างสูงที่ได้อบรมสั่งสอนให้ความรู้และให้คำปรึกษาในด้านการทดลองทางการทำวิทยานิพนธ์ การเรียบเรียง และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนสมบูรณ์ ขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.อรุณี อิงคาคุณ รศ.ดร.อุทัยวรรณ โกวิทวาทิ และ ดร.ศศิมนัส อุณจักร์ อาจารย์ ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ Dr. Krisna Rungruangsak-Torrissen Institute of Marine Research, Norway ที่กรุณาให้คำแนะนำ และข้อเสนอแนะเกี่ยวกับเทคนิค *in vitro* digestibility ตลอดจนให้คำปรึกษาแนวทางการทำวิทยานิพนธ์ ผศดร.สาธิต โกวิทวาทิ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเก็บตัวอย่างผศ.พรณี พักคง ภาควิชารังสีประยุกต์ และไอโซโทป คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการฉายรังสีวัตถุดิบอาหารที่นำมาทดลอง คุณกมลพร มาแสวง เจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการ กลางภาควิชาสัตววิทยา ที่ให้คำแนะนำในการวิเคราะห์วัตถุดิบอาหารสัตว์ที่ใช้ในการทดลอง ขอขอบคุณภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้สถานที่ทำการทดลอง ขอขอบพระคุณ คุณสาวิตร พิศาลบุตร และ คุณอรุณี พิศาลบุตร บริษัท ฟีดสเปเชียลตี้ จำกัด (Feed Specialties Co., Ltd.) อ.เมือง จ.ปทุมธานี ที่กรุณาช่วยจัดหาวัตถุดิบอาหาร ขอขอบพระคุณ โครงการวิจัย จาก โครงการสมองไหลกลับ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) ที่ให้ความอนุเคราะห์ข้อมูลวัตถุดิบ และตัวอย่างสูตรอาหารเบื้องต้นสำหรับเลี้ยงปลาชนิด และขอขอบพระคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัยร่วมกับสำนักงานส่งเสริมวิสาหกิจขนาดกลางและขนาดย่อม สกว-สสว. ที่ให้ความกรุณาเงินทุนสนับสนุนการทำงานวิจัยในครั้งนี้และที่สำคัญขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำ และคำปรึกษา

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อคุณแม่ที่ให้การอบรม สั่งสอน ให้การสนับสนุน ในด้านการศึกษา และให้กำลังใจลูกเสมอมา ท้ายที่สุดนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณครูอาจารย์ทุกท่าน ที่ได้ให้ความรู้แก่ข้าพเจ้า ทั้งหมดนี้เพื่อให้ข้าพเจ้าประสบความสำเร็จครั้งนี้

จุฑามาศ สุนทรโชติ

พฤศจิกายน 2553

## สารบัญ

## หน้า

สารบัญ (1)	
สารบัญตาราง (	2)
สารบัญภาพ (	4)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (8)	
คำนำ 1	
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	29
อุปกรณ์	29
วิธีการ	31
ผลและวิจารณ์	43
ผล	43
วิจารณ์	73
สรุปและข้อเสนอแนะ	80
สรุป	80
ข้อเสนอแนะ	80
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	82
ภาคผนวก 93	
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	118

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ผลของการฉายรังสีที่มีต่อกิจกรรมตัวยับยั้งทริปซินและโคโมทริปซิน และประสิทธิภาพ	22
2	อาหารชนิดต่างๆ ที่ใช้ในการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยของเอนไซม์ย่อยอาหารที่สกัดจากลำไส้ปลานิลแปลงเพศระยะวัยอ่อนจนถึงตัวเต็มวัย โดยวิธี <i>in vitro</i> digestibility เปรียบเทียบระหว่างวัตถุดิบที่ผ่านการฉายและไม่ผ่านฉายรังสี	32
3	การเตรียมสารสำหรับ SDS-PAGE	37
4	คุณค่าทางโภชนาของอาหารชนิดต่างๆ ที่ใช้ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรต และ โปรตีนของเอนไซม์ที่สกัดจากลำไส้เล็กของปลานิลแปลงเพศ ตั้งแต่ระยะวัยอ่อนจนถึงตัวเต็มวัย โดยวิธี <i>In vitro</i> digestibility วิเคราะห์ตัวอย่างจำนวน 3 ซ้ำ	60
<b>ตารางผนวกที่</b>		
1	คุณค่าทางโภชนาของวัตถุดิบอาหารสัตว์บางชนิด	99
2	ประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนในอาหารชนิดต่างๆ โดยเอนไซม์ที่สกัดจากลำไส้ปลานิลแปลงเพศ อายุ 1 เดือน วิเคราะห์โดยวิธี <i>in vitro</i> digestibility	106
3	ประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนในอาหารชนิดต่างๆ โดยเอนไซม์ที่สกัดจากลำไส้ปลานิลแปลงเพศ อายุ 2 เดือน วิเคราะห์โดยวิธี <i>in vitro</i> digestibility	108
4	ประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนในอาหารชนิดต่างๆ โดยเอนไซม์ที่สกัดจากลำไส้ปลานิลแปลงเพศ อายุ 3 เดือน วิเคราะห์โดยวิธี <i>in vitro</i> digestibility	109

### สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
5	ประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนในอาหารชนิดต่างๆ โดยเอนไซม์ที่สกัดจากลำไส้ปลานิลแปลงเพศ อายุ 4 เดือน วิเคราะห์โดยวิธี <i>in vitro</i> digestibility	110
6	ประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนในอาหารชนิดต่างๆ โดยเอนไซม์ที่สกัดจากลำไส้ปลานิลแปลงเพศ อายุ 5 เดือน วิเคราะห์โดยวิธี <i>in vitro</i> digestibility	111
7	ประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนในอาหารชนิดต่างๆ โดยเอนไซม์ที่สกัดจากลำไส้ปลานิลแปลงเพศ อายุ 6 เดือน วิเคราะห์โดยวิธี <i>in vitro</i> digestibility	112
8	ประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนในอาหารชนิดต่างๆ โดยเอนไซม์ที่สกัดจากลำไส้ปลานิลแปลงเพศ อายุ 8 เดือน วิเคราะห์โดยวิธี <i>in vitro</i> digestibility	113
9	ประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนในอาหารชนิดต่างๆ โดยเอนไซม์ที่สกัดจากลำไส้ปลานิลแปลงเพศ อายุ 10 เดือน วิเคราะห์โดยวิธี <i>in vitro</i> digestibility	114
10	เปรียบเทียบสูตรอาหารสำเร็จรูป 3 ชนิด สำหรับเลี้ยงปลานิลแปลงเพศ ในห้องปฏิบัติการ	115

## สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ปลานิล <i>Oreochromis niloticus</i> ระยะตัวเต็มวัย	4
2	ปลานิล <i>Oreochromis niloticus</i> แปลงจากเพศเมียเป็นเพศผู้ ด้วยฮอร์โมนแอนโดรเจน ชนิด 17 $\alpha$ -methyltestosterone (MT)	6
3	โครงสร้างเรโซแนนซ์ที่เกิดจากการฉายรังสีในกรดกรดไลโนเลอิก	19
4	ออกซิเจนที่มีอยู่ในตัวกลางเข้าทำปฏิกิริยากับ R $\cdot$ ได้เป็น peroxide radical (ROO $\cdot$ )	20
5	<i>In vitro</i> digestibility ของการย่อย โปรตีนและคาร์โบไฮเดรต ของวัตถุดิบอาหาร 13 ชนิด ที่ผ่านและไม่ผ่านการฉายรังสี โดยใช้เอนไซม์สกัดจากลำไส้ปลานิลแปลงเพศ อายุ 1 เดือน	46
6	<i>In vitro</i> digestibility ของการย่อย โปรตีนและคาร์โบไฮเดรต ของวัตถุดิบอาหาร 13 ชนิด ที่ผ่านและไม่ผ่านการฉายรังสี โดยใช้เอนไซม์สกัดจากลำไส้ปลานิลแปลงเพศ อายุ 2 เดือน	47
7	<i>In vitro</i> digestibility ของการย่อย โปรตีนและคาร์โบไฮเดรต ของวัตถุดิบอาหาร 13 ชนิด ที่ผ่านและไม่ผ่านการฉายรังสี โดยใช้เอนไซม์สกัดจากลำไส้ปลานิลแปลงเพศ อายุ 3 เดือน	48
8	<i>In vitro</i> digestibility ของการย่อย โปรตีนและคาร์โบไฮเดรต ของวัตถุดิบอาหาร 13 ชนิด ที่ผ่านและไม่ผ่านการฉายรังสี โดยใช้เอนไซม์สกัดจากลำไส้ปลานิลแปลงเพศ อายุ 4 เดือน	49
9	<i>In vitro</i> digestibility ของการย่อย โปรตีนและคาร์โบไฮเดรต ของวัตถุดิบอาหาร 13 ชนิด ที่ผ่านและไม่ผ่านการฉายรังสี โดยใช้เอนไซม์สกัดจากลำไส้ปลานิลแปลงเพศ อายุ 5 เดือน	50
10	<i>In vitro</i> digestibility ของการย่อย โปรตีนและคาร์โบไฮเดรต ของวัตถุดิบอาหาร 13 ชนิด ที่ผ่านและไม่ผ่านการฉายรังสี โดยใช้เอนไซม์สกัดจากลำไส้ปลานิลแปลงเพศ อายุ 6 เดือน	51

## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
11	<i>In vitro</i> digestibility ของการย่อย โปรตีนและคาร์โบไฮเดรต ของวัตถุดิบอาหาร 13 ชนิด ที่ผ่านและไม่ผ่านการฉายรังสี โดยใช้เอนไซม์สกัดจากลำไส้ปลานิลแปลงเพศ อายุ 8 เดือน	52
12	<i>In vitro</i> digestibility ของการย่อย โปรตีนและคาร์โบไฮเดรต ของวัตถุดิบอาหาร 13 ชนิด ที่ผ่านและไม่ผ่านการฉายรังสี โดยใช้เอนไซม์สกัดจากลำไส้ปลานิลแปลงเพศ อายุ 10 เดือน	53
13	ผลรวมของการเปลี่ยนแปลงอัตราการย่อยโปรตีนของวัตถุดิบอาหาร 3 ชนิด ตลอดการทดลอง โดยใช้เอนไซม์สกัดจากลำไส้ปลานิลอายุ-10 เดือน จากการทดลองที่ 1 เปรียบเทียบแต่ละชนิดของวัตถุดิบอาหารระหว่างที่ผ่านการฉายรังสี (กราฟแท่งที่ 1) และที่ไม่ผ่านการฉายรังสี (กราฟแท่งที่ 2)	54
14	ผลรวมของการเปลี่ยนแปลงอัตราการย่อยคาร์โบไฮเดรตของวัตถุดิบอาหาร 13 ชนิด ตลอดการทดลอง โดยใช้เอนไซม์สกัดจากลำไส้ปลานิลอายุ-10 เดือน จากการทดลองที่ 1 เปรียบเทียบแต่ละชนิดของวัตถุดิบอาหารระหว่างที่ผ่านการฉายรังสี (กราฟแท่งที่ 1) และที่ไม่ผ่านการฉายรังสี (กราฟแท่งที่ 2)	55
15	ผลรวมของการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของการย่อยโปรตีนและคาร์โบไฮเดรต ของวัตถุดิบอาหาร 13 ชนิด ตลอดการทดลอง โดยใช้เอนไซม์สกัดจากลำไส้ปลานิลอายุ 1-10 เดือน จากการทดลองที่ 1 เปรียบเทียบแต่ละชนิดของวัตถุดิบอาหารระหว่างที่ผ่านการฉายรังสี (กราฟแท่งที่ 1) และที่ไม่ผ่านการฉายรังสี (กราฟแท่งที่ 2)	56
16	<i>In vitro</i> digestibility ของการย่อย โปรตีนและคาร์โบไฮเดรต ของวัตถุดิบอาหาร ปลาด่าน โดยใช้เอนไซม์สกัดจากลำไส้ปลานิลแปลงเพศที่อายุ 1-5, 6, 8 และ 10 เดือน	57
17	<i>In vitro</i> digestibility ของการย่อย โปรตีนและคาร์โบไฮเดรต ของวัตถุดิบอาหาร กากถั่วเหลือง โดยใช้เอนไซม์สกัดจากลำไส้ปลานิลแปลงเพศที่อายุ 1-5, 6, 8 และ 10 เดือน	58

## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
18	รูปแบบของแถบโปรตีนของวัตถุดิบอาหาร ปลาป่น เลือดป่น เนื้อและกระดูกป่น โปรตีน ข้าวโพด และกากถั่วเหลือง บน 12% SDS-PAGE เปรียบเทียบระหว่างวัตถุดิบที่ผ่านการฉายรังสี (R) และไม่ผ่านการฉายรังสี (N) โดย M แสดงโปรตีนมาตรฐานที่ใช้เครื่องหมาย (standard protein marker) ซึ่งแต่ละแถบโปรตีนแสดงน้ำหนักโมเลกุลมีหน่วยเป็นกิโลดาลตัน (kDa)	62
19	รูปแบบของแถบโปรตีนของวัตถุดิบอาหาร กากถั่วลิสง สไปรูลิน่า รำข้าวสาลี รำละเอียด และรำหยาบ บน 12% SDS-PAGE เปรียบเทียบระหว่างวัตถุดิบที่ผ่านการฉายรังสี (R) และไม่ผ่านการฉายรังสี (N) โดย M แสดงโปรตีนมาตรฐานที่ใช้เครื่องหมาย (standard protein marker) ซึ่งแต่ละแถบโปรตีนแสดงน้ำหนักโมเลกุลมีหน่วยเป็น กิโลดาลตัน (kDa)	63
20	รูปแบบของแถบโปรตีนของวัตถุดิบอาหาร กากเมล็ดปาล์ม กากมะพร้าว และกากมันสำปะหลัง บน 12% SDS-PAGE เปรียบเทียบระหว่างวัตถุดิบที่ผ่านการฉายรังสี (R) และไม่ผ่านการฉายรังสี (N) โดย M แสดงโปรตีนมาตรฐานที่ใช้เครื่องหมาย (standard protein marker) ซึ่งแต่ละแถบโปรตีนแสดงน้ำหนักโมเลกุลมีหน่วยเป็นกิโลดาลตัน (kDa)	64
21	รูปแบบของ ไอโซไซม์ทริปซิน (Trypsin isozyme patterns) บน SDS-PAGE โดยใช้เอนไซม์สกัดจากลำไส้ปลานิลแปลงเพศ เปรียบเทียบในแต่ละช่วงอายุที่เลี้ยงด้วยอาหารแตกต่างกัน ทั้งในการทดลองที่ 1 และการทดลองที่ 2	67
22	กิจกรรมทริปซินที่พบในสารละลายเอนไซม์ที่ตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ด้วยความเข้มข้นอิ่มตัวแอมโมเนียมซัลเฟตช่วง 0-20% (ก) และ 20-40% (ข)	69
23	กิจกรรมทริปซินที่พบในสารละลายเอนไซม์ ที่ตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ด้วยความเข้มข้นอิ่มตัวแอมโมเนียมซัลเฟตช่วง 40-60% (ก) และ 60-80% (ข)	70

## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
24	โครมาโตแกรมของโปรตีนจาก crude enzyme extract ของปลานิลที่ตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นอิ่มตัว แอมโมเนียมซัลเฟตช่วง 40-60% นำมาแยกเอนไซม์ทริปซินให้บริสุทธิ์ โดยผ่านคอลัมน์ Sephadex G-100 คอลัมน์ชะด้วย SB ที่มีอัตราไหลคงที่ 0.5 ml/hr	71
25	โครมาโตแกรมของโปรตีนจาก crude enzyme extract ของปลานิลที่นำมาแยกเอนไซม์ทริปซินให้บริสุทธิ์ โดยผ่านคอลัมน์ Q-sepharose คอลัมน์ชะด้วย SB ที่มี 1 M NaCl ที่มีอัตราไหลคงที่ 0.5 ml/hr และรูปด้านบนแสดง SDS-PAGE ขององค์ประกอบโปรตีนส่วน Flow through Peak ที่ 1 และ Peak ที่ 2 โดย M: Protein Marker, Pre: สารละลายเอนไซม์ทริปซิน ที่ได้จากการผ่านคอลัมน์ Sephadex G-100 นำมา pool รวมกันก่อนผ่านคอลัมน์	72
ภาพผนวกที่		
1	กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน BSA (mg/ml) กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 nm	95
2	กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน DL-alanine ( $\mu\text{M}/\text{ml}$ ) กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 420 nm	96
3	กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานน้ำตาลมอลโทส ( $\mu\text{M}/\text{ml}$ ) กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm	97
4	กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน p-nitroaniline ( $\mu\text{M}/\text{ml}$ ) กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 nm	98
5	ตารางคำนวณปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต (g) ที่ใช้เติมในสารละลาย 1 ลิตร และความเข้มข้นสุดท้ายของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต: % ความอิ่มตัว	116
6	Electrophoretic zymograms ของ trypsin isozyme patterns ในลำไส้ส่วน pyloric caeca ของปลา Atlantic salmon และ Arctic charr (2 ชนิด: Skogseid และ Hammerfest) ซึ่งเป็นจาวกปลากินสัตว์ (carnivorous fish) โดยใช้วิธี isoelectric focusing บนเจล Agarose-IEF ที่ pH 4-6.5	117

## คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

### คำอธิบายสัญลักษณ์

kGy	=	Kilogray (กิโลเกรย์)
M	=	Molar (โมลาร์)
mM	=	millimolar (มิลลิโมลาร์)
s	=	second (วินาที)
<	=	ช่วงขนาดน้อยกว่า
>	=	ช่วงขนาดมากกว่า
°C	=	องศาเซลเซียส
%	=	เปอร์เซ็นต์
V	=	โวลต์
mg	=	มิลลิกรัม
g	=	กรัม
ml	=	มิลลิลิตร
μl	=	microliter (ไมโครลิตร)
nm	=	nanometre (นาโนเมตร)
ml/hr.	=	microliter per hour (มิลลิลิตรต่อชั่วโมง)
μM	=	micromolar (ไมโครโมลาร์)

### คำอธิบายอักษรย่อ

SPSS	=	Statistical Package for Social Science
P value	=	Probability value

## คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

### คำอธิบายอักษรย่อสารเคมี

BAPNA	=	Benzoyl- <i>DL</i> -arginine-p-nitroanilide
DMSO	=	Dimethylsulfoxide
TAME	=	Tosyl arginine methyl ester
Tris	=	Tris hydroxymethyl aminomethane
HCl	=	Hydrochloric acid

# การพัฒนาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงปลานิลเชิงพาณิชย์

## Development of Suitable Feed for Commercial Production of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*

### คำนำ

ปลานิล (Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*) เป็นปลาที่ใช้เป็นอาหารของมนุษย์ที่นิยมเลี้ยงกันแพร่หลายทั่วโลก และมีมูลค่าการส่งออกสูงสุดในประเภทปลาน้ำจืด คือ 788,616,526 บาท (กรมศุลกากร 2549) ซึ่งมีอัตราการใช้อาหารเลี้ยงปลาชนิดนี้ในปริมาณสูงและเนื่องมาจากนโยบายหลักของประเทศไทยที่สนับสนุนการผลิตปลานิลให้เป็นสัตว์เศรษฐกิจ แต่เนื่องจากขาดความรู้การผลิตอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยง ทำให้การผลิตปลานิลได้คุณภาพเนื้อ และการเจริญเติบโตที่ไม่สม่ำเสมอ ดังนั้น อาหารที่ใช้เลี้ยงจึงนับว่ามีความสำคัญ ถ้าไม่สามารถควบคุมคุณภาพของอาหารจะมีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมอาจก่อให้เกิดโรคระบาด รวมทั้งทำให้เกิดมลพิษต่อแหล่งน้ำ ซึ่งจะส่งผลกระทบต่ออัตราการรอด การเจริญเติบโต การพัฒนาสายพันธุ์ รวมทั้งส่งผลกระทบต่อปริมาณการผลิต และการส่งออก ดังนั้นสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง จะทำได้ก็ต่อเมื่อมีการปรับปรุงวัตถุดิบอาหารให้เหมาะสมในการพัฒนาสูตรอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงปลานิลในเชิงพาณิชย์ต่อไป วิธีการเบื้องต้นที่สามารถใช้ประเมินคุณภาพวัตถุดิบอาหารและประสิทธิภาพการย่อยอาหารของปลานิลต้องศึกษาโดยตรงก่อนนำไปทดลองเลี้ยงจริง ดังนั้นในการศึกษานี้จึงเลือกใช้เทคนิค *in vitro* digestibility โดยข้อดีของเทคนิคนี้มีหลายประการ เช่น ขั้นตอนไม่ยุ่งยาก สะดวก มีค่าใช้จ่ายไม่แพง และใช้เวลาสั้น วิธีดำเนินการของเทคนิคนี้คือสกัดเอนไซม์ย่อยอาหารของปลานิลแปลงเพศ ทำการทดลองเปรียบเทียบการย่อยวัตถุดิบอาหารในหลอดทดลองระดับห้องปฏิบัติการ ในที่นี้สนใจการเปรียบเทียบการย่อยระหว่างวัตถุดิบอาหารที่ผ่านการฉายรังสีกับวัตถุดิบอาหารที่ไม่ผ่านการฉายรังสี ซึ่งมีการรายงานพบว่า การฉายรังสีแกมมาในเมล็ดถั่วเหลืองสามารถลดกิจกรรมของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน (Farag, 1998)

เนื่องจากปลาแต่ละชนิดในแต่ละวัย มีความสามารถในการใช้อาหารแต่ละชนิดที่แตกต่างกัน การทดลองจึงต้องครอบคลุมตัวอย่างสัตว์ ตั้งแต่วัยอ่อนจนถึงตัวเต็มวัย การศึกษาพื้นฐานทางชีวเคมีของวัตถุดิบอาหาร โดยศึกษาองค์ทางโภชนาวัตถุดิบอาหารและศึกษาความแตกต่างขององค์ประกอบโปรตีนในวัตถุดิบอาหารที่ผ่านการฉายรังสีเปรียบเทียบกับวัตถุดิบอาหารที่ไม่ผ่านการฉายรังสี ทั้ง

ปริมาณและเชิงคุณภาพ ศึกษาลักษณะความแตกต่างของรูปแบบไอโซไซม์ของเอนไซม์ทริปซิน (Trypsin isozyme patterns) จากลำไส้ปลานิลแปลงเพศ ในแต่ละช่วงอายุ โดยวิธี Substrate-gel-electrophoresis ซึ่งรูปแบบของไอโซไซม์ทริปซิน (trypsin phenotypes) จะแตกต่างกัน โดยเอนไซม์ทริปซินเป็นดัชนีบ่งชี้การเจริญเติบโต ในแต่ละช่วงอายุ และแสดงออกในระดับที่ต่างกัน เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารที่มีแหล่งโปรตีนแตกต่างกัน ตลอดจนศึกษาความบริสุทธิ์โปรตีนทริปซินในเบื้องต้น ความรู้ที่ได้จากการทำงานวิจัยครั้งนี้ จะนำไปสู่การพัฒนาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยง เพื่อการเจริญเติบโตอย่างมีคุณภาพของปลานิล อันเป็นการพัฒนาเพื่อให้เกิดความยั่งยืนในการเลี้ยงอย่างมีคุณภาพและยังส่งผลต่อความสามารถในการเพิ่มคุณภาพของผลผลิต

## วัตถุประสงค์

1. ศึกษาประสิทธิภาพการย่อย (โปรตีนและคาร์โบไฮเดรต) วัตถุดิบอาหารที่ผ่านการฉายรังสีเปรียบเทียบกับวัตถุดิบอาหารที่ไม่ผ่านการฉายรังสี โดยวิธีย่อยในหลอดทดลอง (*in vitro* digestibility) เพื่อคัดเลือกวัตถุดิบอาหารสัตว์ที่เหมาะสมสำหรับใช้พัฒนาสูตรอาหารสำหรับเลี้ยงปลานิล
2. ศึกษาผลของรังสีแกมมาที่มีต่อองค์ประกอบพื้นฐานทางโภชนาในวัตถุดิบอาหารสัตว์ โดยวิธีวิเคราะห์โดยประมาณ (proximate analysis)
3. ศึกษาความแตกต่างองค์ประกอบโปรตีนในวัตถุดิบอาหารสัตว์ โดยวิธีSodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)
4. ศึกษาความแตกต่างของรูปแบบไอโซไซม์ทริปซิน(Trypsin isozyme patterns) ในแต่ละช่วงอายุของปลานิล โดยวิธี Substrate-SDS-PAGE
5. ศึกษาการแยกทำบริสุทธิ์ทริปซิน

## การตรวจเอกสาร

### 1. อนุกรมวิธานและชีววิทยา

ปลานิล *Oreochromis niloticus* (Trewavas, 1983) (ภาพที่1) เป็นปลาน้ำจืด สามารถจัดลำดับอนุกรมวิธานตาม (Trewavas, 1983) ได้ดังนี้

Phylum Chordata

Class Actinopterygii

Order Perciforms

Family Cichlidae

Genus *Oreochromis*

Species *niloticus*



ภาพที่ 1 ปลานิล *Oreochromis niloticus* ระยะตัวเต็มวัย

ปลานิล *Oreochromis niloticus* เป็นปลาน้ำจืดที่นิยมเลี้ยงกันแพร่หลายทั่วโลก ประเทศไทยมีการเพาะเลี้ยงปลานิลนี้เพื่อการส่งออก และทำรายได้ให้แก่ประเทศเป็นอย่างมากปีละไม่ต่ำกว่า 1,084 ล้านบาท (กรมศุลกากร 2549) โดยมีถิ่นกำเนิดในทวีปแอฟริกา และได้นำมาเลี้ยงในประเทศไทยครั้งแรกเมื่อปี พ.ศ. 2508 ผลผลิตจากปลานิลมีการส่งออกในหลายรูปแบบได้แก่ ปลามีชีวิต ปลสด หรือแช่เย็น ปลาแช่แข็ง และปลาแห้งใส่เกลือ รวมมูลค่าไม่ต่ำกว่า 269 ล้านบาท (ประมาณ 6,412 ตัน) และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในอนาคต ปลานิลมีปริมาณการเพาะเลี้ยง 98,306 ตัน นับเป็นอันดับสองของปลาน้ำจืดชนิดต่างๆ ที่ผลิตในประเทศไทย ( อันดับที่หนึ่ง คือ ปลาคู 101,606 ตัน) ซึ่งเป็นข้อมูล

ทางสถิติ พ.ศ. 2546 ของผลผลิตการเลี้ยงสัตว์และสถิติการประมงแห่งประเทศไทย ซึ่งปลานิลได้รับการยอมรับจากนานาประเทศทั่วโลกว่าเป็นปลาที่มีศักยภาพในการเพาะเลี้ยงและมีคุณค่าทางเศรษฐกิจ มีสมบัติเฉพาะตัวคือเลี้ยงง่าย โตเร็ว กินอาหารได้แทบทุกชนิดทั้งพืชและสัตว์ เป็นปลาที่สามารถใช้ประโยชน์จากอาหารธรรมชาติในบ่อได้เป็นอย่างดี มีความแข็งแรง อดทนต่อโรคพยาธิ มีการเจริญเติบโตดี และที่สำคัญมีความสามารถในการปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมต่างๆ ทั้งในธรรมชาติและระบบการเพาะเลี้ยงได้เป็นอย่างดีเนื้อปลามีรสชาติดี ทำให้เป็นปลาที่นิยมบริโภคโดยทั่วไป ตลาดมีความต้องการสูง

ปัจจุบันมีการเลี้ยงปลานิลแบบพัฒนา ซึ่งมุ่งไปสู่การเลี้ยงเชิงพาณิชย์ที่ต้องการปลานิลขนาดใหญ่และผลผลิตสูง โดยทั่วไปปลานิลเพศผู้จะเจริญเติบโตได้ดี และมีขนาดที่ใหญ่กว่าปลานิลเพศเมีย เนื่องจากปลานิลเพศเมียจะเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ได้เร็วและสามารถวางไข่ได้ตลอดทั้งปีทำให้มีพัฒนาการที่เจริญเติบโตช้ากว่าเพศผู้เพราะในช่วงที่ฟักไข่และอนุบาลลูกปลาในปากซึ่งกินเวลาประมาณ เดือน แม่ปลาจะไม่กินอาหาร จึงเป็นปัญหาต่อระบบการเลี้ยงเชิงพาณิชย์ ซึ่งมีความต้องการปลานิลขนาดใหญ่และเจริญเติบโตสม่ำเสมอ

การพัฒนาเทคนิคเพื่อผลิตพันธุ์ปลานิลเพศผู้ และเทคนิคการแปลงเพศ ในช่วงแรกที่ลูกปลาฟักเป็นตัวใหม่ๆ ยังไม่มีการพัฒนาเป็นเพศใดเพศหนึ่งอย่างชัดเจน การเพิ่มฮอร์โมนเพศจากภายนอกในช่วงเวลาดังกล่าว จึงสามารถควบคุมให้แสดงออกเป็นเพศใดเพศหนึ่งได้ขึ้นกับชนิดของฮอร์โมน โดยฮอร์โมนแอนโดรเจน (androgen) ทำให้เป็นปลาเพศผู้ และเอสโตรเจน (estrogen) ทำให้เป็นปลาเพศเมีย



**ภาพที่ 2** ปลานิล *Oreochromis niloticus* แปลงจากเพศเมียเป็นเพศผู้ ด้วยฮอร์โมนแอนโดรเจน ชนิด 17 $\alpha$ -methyltestosterone (MT)

**ที่มา:** เกரியงศักดิ์ (2552)

ฮอร์โมน 17 $\alpha$ -methyltestosterone (MT) เป็นฮอร์โมนแอนโดรเจนที่นิยมใช้มากในการแปลงเพศปลา เพื่อให้เป็นเพศผู้โดยใช้ผสมในอาหารให้กินทันทีที่ดูไข่แดงของลูกปลายุบ ซึ่งหากกระบวนการต่างๆ ในการแปลงเพศเป็นไปอย่างสมบูรณ์ประสิทธิภาพในการแปลงเพศอาจได้ลูกปลาเพศผู้ 85-88% (โสภิต, 2550) หรืออาจแปลงเพศผู้ได้ 100% (ศูนย์วิจัยและการพัฒนาประมงน้ำจืดอุดรธานี, 2549)

## 2. ความสามารถในการย่อยอาหารของเอนไซม์ที่สกัดจากระบบย่อยอาหารของสัตว์น้ำ

ประสิทธิภาพการย่อยอาหารของเอนไซม์ในปลาชนิดต่างๆ ไม่ว่าจะปลากินพืช ปลากินเนื้อ และปลากินเนื้อและพืช ได้มีการศึกษาอย่างแพร่หลาย แต่ปลากินพืชมักจะมีสัมประสิทธิ์การย่อยต่ำกว่าปลากินเนื้อ เนื่องจากอาหารที่กินส่วนใหญ่เป็นพืชจะย่อยได้ยากกว่าเนื้อสัตว์ ถึงแม้ว่าปลากินพืชจะมีการพัฒนาของท่อทางเดินอาหารช่วยในการย่อยอาหารและยังมีจุลินทรีย์ในลำไส้ที่ติดเข้ามาพร้อมกับพืชขณะที่กินช่วยทำหน้าที่ย่อยและดูดซึมก็ตาม (วีรพงษ์, 2536)

## 2.1 ประสิทธิภาพการย่อยโปรตีน (Protein digestibility)

โดยทั่วไปเอนไซม์ย่อยอาหารในปลามีประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนได้ดี โดยปลากินเนื้อ มีประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนดีที่สุด เพราะมีเอนไซม์ย่อยโปรตีนในปริมาณมากที่สุด ยกเว้นปลา กินพืชบางชนิดที่มีความสามารถในการย่อยโปรตีนได้ดีเช่นกัน ตัวอย่างมีการทดลองในปลาหมอเทศ ซึ่งจัดเป็นปลากินพืช เมื่อได้รับอาหารเป็นคัปละและสาหร่ายและอินทรีวัตถุ พบว่าสัมประสิทธิภาพการย่อยอาหารมีค่าเป็น 95%, 79% และ 42% ตามลำดับ ปลาส่วนใหญ่สามารถใช้แหล่งโปรตีนจากสัตว์ได้ดีกว่าแหล่งโปรตีนจากพืชเนื่องจากย่อยได้ง่ายกว่า (วีรพงษ์, 2536)

## 2.2 ประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรต (Carbohydrate digestibility)

ประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรตของปลาขึ้นอยู่กับชนิดของปลา ชนิดของแป้ง ปริมาณแป้ง และความสุกของแป้ง ปลากินพืชมีประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรตดีกว่าปลากินเนื้อ และปลาที่กินทั้งพืชและเนื้อ เนื่องจากปลากินพืชมีเอนไซม์ย่อยคาร์โบไฮเดรตในปริมาณที่มากกว่า คาร์โบไฮเดรตที่ปลาเป็นอาหารได้แก่ แป้ง น้ำตาลและกลูโคส โดยพบว่าปลาสามารถใช้ประโยชน์จากแป้งได้มากที่สุด สาเหตุดังกล่าวเกิดจากเมื่อแป้งถูกย่อยเป็นน้ำตาลจะถูกดูดซึมไปใช้ประโยชน์อย่างช้าๆ เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำตาลซึ่งจะถูกดูดซึมเร็วกว่า ทำให้น้ำตาลในเลือดสูงอย่างรวดเร็ว จนทำให้น้ำตาลบางส่วนถูกขับออกนอกร่างกายทางปัสสาวะ โดยยังไม่ได้ใช้ประโยชน์ (กลุ่มวิจัยอาหารสัตว์น้ำ, 2534) ปริมาณแป้งที่เหมาะสมในอาหารปลาแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน เนื่องจากปลากินพืชย่อยแป้งได้ดีกว่าปลากินเนื้อทำให้สามารถใช้ประโยชน์จากแป้งได้ดีกว่า ปริมาณแป้งที่เหมาะสมในอาหารปลา กินพืช ปลา กินพืชและเนื้อ และปลา กินเนื้อ ควรอยู่ระหว่าง 40-50% 30-40% และ 10-20% ตามลำดับ การทำให้แป้งสุกจะช่วยให้ปลาย่อยแป้งได้ดีขึ้นและทำให้ประสิทธิภาพการย่อยสูงขึ้นประมาณ 25-30% (กลุ่มวิจัยอาหารสัตว์น้ำ, 2534)

## 2.3 ประสิทธิภาพการย่อยไขมัน (Lipid digestibility)

โดยทั่วไปปลามีประสิทธิภาพการย่อยไขมันได้ดี เพราะปลาส่วนมากมีความต้องการไขมันในปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับโปรตีน และอีกทั้งปริมาณไขมันที่มีในอาหารธรรมชาติหรืออาหารสำเร็จรูปที่อยู่ในเกณฑ์ต่ำจึงทำให้เอนไซม์ย่อยไขมันสามารถย่อยได้ดี ประสิทธิภาพการย่อยไขมันของปลาขึ้นอยู่กับองค์ประกอบหรือชนิดของกรดไขมัน โดยพบว่าประสิทธิภาพการย่อยไขมันมีค่า

ลดลงเมื่อความยาวของไฮโดรคาร์บอนเพิ่มขึ้น และมีค่าเพิ่มขึ้นถ้าจำนวนพันธะคู่เพิ่มขึ้น ดังนั้นปลา จึงมีแนวโน้มที่จะย่อยกรดไขมันไม่อิ่มตัว เช่น กรดไขมันจากพืชได้ดีกว่ากรดไขมันจากสัตว์ซึ่งเป็น กรดไขมันอิ่มตัว (วีรพงศ์, 2536)

### 3. ความต้องการสารอาหารของสัตว์น้ำ

อาหารนับว่ามีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการเพาะเลี้ยง ถ้าไม่สามารถควบคุมคุณภาพของอาหาร จะส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมอาจก่อให้เกิดโรคระบาด รวมทั้งทำให้เกิดมลพิษต่อแหล่งน้ำ ซึ่งส่งผลกระทบต่ออัตราการรอด การเจริญเติบโต การพัฒนาสายพันธุ์ ปริมาณการผลิต รวมทั้งการส่งออก ซึ่งอาหารที่สัตว์น้ำกิน หลังจากถูกย่อยเป็นสารอาหารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กจะถูกดูดซึมขนส่งไปยัง เซลล์ต่างๆ เพื่อให้สัตว์น้ำได้ใช้ประโยชน์ในการดำรงชีวิตประจำวัน การเจริญเติบโตและการสืบพันธุ์ โดยที่สารอาหารแต่ละประเภทจะมีบทบาทที่แตกต่างกันไป (วีรพงศ์, 2536)

#### 3.1 ความต้องการโปรตีน

รายงานทางด้านอาหารสัตว์น้ำมักระบุถึงความต้องการ โปรตีนของสัตว์น้ำ เช่น ปลา ต้องการโปรตีน 32% ซึ่งระดับโปรตีนที่ทำให้สัตว์น้ำเจริญเติบโตดีมีสัดส่วนประกอบของกรดอะมิโน ที่สมดุลด้วย ดังนั้นเพื่อความสะดวกจึงมีการอนุโลมให้รายงานเป็นความต้องการ โปรตีนที่มีเพียง ค่าเดียว แทนความต้องการกรดอะมิโนจำเป็นซึ่งมีหลายกรดอะมิโนที่จำเป็นในอาหารสัตว์น้ำได้แก่ อาร์จินีน ฮิสติดีน ไอโซลิวซีน ไลซีน เมทไทโอนีน ฟินิลอะลานีน ทรีโอนีน ทริปโตเฟน และวาลีน หากขาดกรดอะมิโนชนิดใดชนิดหนึ่งจะมีผลทำให้สัตว์น้ำเจริญเติบโตช้า กินอาหารลดลง และรูปร่างลักษณะเปลี่ยนแปลงไป ปลาที่ได้รับอาหารที่ขาดกรดอะมิโนจำเป็นชั่วคราวจะมีการเจริญเติบโตช้า แต่เมื่อได้รับอาหารที่มีกรดอะมิโนจำเป็นการเจริญเติบโตก็จะเข้าสู่สภาวะปกติ (ประเสริฐ และคณะ, 2525)

ร่างกายของสัตว์ในวัยและภาวะแตกต่างกันมีความต้องการ โปรตีนในแต่ละวันในปริมาณที่ แตกต่างกัน ความต้องการนี้จะเป็นเท่าใดขึ้นกับหลักการที่ว่าโปรตีนที่สัตว์กินเมื่อผ่านกระบวนการย่อยและกระบวนการดูดซึมแล้ว ก่อนอื่นจะถูกนำไปใช้บำรุงซ่อมแซมหรือแทนที่โปรตีนที่เสื่อม แล้วสลายตัวถูกขับออกจากร่างกาย สำหรับสัตว์โตเต็มวัยปกติถ้ากิน โปรตีนมากเพียงพอ ปริมาณ โปรตีนที่ขับถ่ายออกจะเท่ากับปริมาณโปรตีนที่กิน และนิยมเรียกว่า โปรตีนอยู่ในภาวะสมดุล

ที่ภาวะนี้ปริมาณโปรตีนจะไม่เหลือเพื่อการเจริญเติบโต หากจะให้มีการเจริญเติบโตร่างกายจะต้องได้รับโปรตีนมากขึ้น สัตว์น้ำวัยอ่อนมีความต้องการโปรตีนสูงและความต้องการโปรตีนจะลดลงเมื่อสัตว์น้ำโตขึ้น มีการศึกษาความต้องการโปรตีนในปลาหลายชนิดซึ่งพอกกล่าวได้ว่าความต้องการโปรตีนโดยเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 24-57 % ซึ่งเท่ากับ 30-70 % ของพลังงานทั้งหมดในอาหารซึ่งสูงกว่าความต้องการโปรตีนในสัตว์บกมาก เหตุผลที่สัตว์น้ำต้องการโปรตีนในอาหารที่ค่อนข้างสูงเนื่องมาจากธรรมชาติสัตว์น้ำใช้พลังงานจากโปรตีนได้ดีกว่าคาร์โบไฮเดรต ปลาจดหลวง *Ictalurus punctatus* ขนาด 3 g มีความต้องการโปรตีนในอาหารสูงกว่าปลาขนาด 250 g ประมาณ 4 เท่า (Mangalik, 1986) คล้ายกับ Lovell (1975) พบว่า ปลาจดหลวงขนาดเดียวกัน คุณภาพโปรตีนในอาหารมีผลต่อระดับโปรตีนที่ปลาต้องการ กล่าวคือ อาหารที่ประกอบด้วยโปรตีนจากปลาป่นซึ่งเป็นโปรตีนคุณภาพสูงหรือมีกรดอะมิโนที่จำเป็นครบถ้วน แม้จะมีระดับโปรตีนต่ำก็สามารถทำให้ปลาเจริญเติบโตดีเท่ากับอาหารที่มีโปรตีนสูงจากพืชซึ่งเป็นโปรตีนคุณภาพต่ำ ความต้องการโปรตีนจากสัตว์น้ำชนิดเดียวจากหลายการทดลองอาจไม่เท่ากัน เนื่องจากวิธีการทดลอง ขนาดสัตว์ทดลอง ชนิดและปริมาณโปรตีน ระดับพลังงานในอาหาร วิธีการให้อาหาร อุณหภูมิและปริมาณอาหาร ธรรมชาติในการทดลองนั้นๆ ไม่เหมือนกัน ปัจจัยที่มีผลต่อความต้องการโปรตีนของปลาคือ ขนาด อุณหภูมิ คุณภาพโปรตีน ระดับพลังงานในอาหารและอัตราการให้อาหาร โดยทั่วไปความต้องการโปรตีนของปลามีค่าลดลงเมื่อปลามีขนาดหรืออายุมากขึ้น เพราะเมื่อปลาขนาดใหญ่ขึ้นจะมีอัตราการเจริญเติบโตช้าลง อันเนื่องมาจากอัตราการสังเคราะห์โปรตีนในร่างกายต่ำกว่าปลาขนาดเล็ก ปลามีแนวโน้มต้องการโปรตีนมากขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น เช่น ปลาชินุคแซลมอน *Oncorhynchus tshawytscha* ที่เลี้ยงในอุณหภูมิ 8 °C และ 15 °C มีความต้องการโปรตีนเป็น 40 และ 55 % ตามลำดับ (Delong *et al.*, 1958 อ้างใน วีรพงศ์, 2536 ) แต่อย่างไรก็ตามพบว่าปลาบางชนิดเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นก็ยังมีความต้องการโปรตีนเท่าเดิม สาเหตุที่อุณหภูมิมีผลต่อความต้องการโปรตีน อาจเนื่องมาจากปลาได้รับอาหารอย่างจำกัดหรือน้อยเกินไปในขณะที่ปลาจะมีระดับเมแทบอลิซึมสูงขึ้น และระยะเวลาที่อาหารหมดจากกระเพาะอาหารเร็วขึ้น ดังนั้น อาหารที่มีระดับโปรตีนสูงกว่าจึงทำให้ปลาเจริญเติบโตดีกว่าอาหารที่มีระดับโปรตีนต่ำกว่า

### 3.2 ความต้องการไขมัน

ไขมันเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญโดยเฉพาะอย่างยิ่งปลากินเนื้อซึ่งได้รับคาร์โบไฮเดรตจากธรรมชาติในปริมาณน้อย อาหารสัตว์น้ำโดยทั่วไปมีไขมัน 2.5-15 % (เวียง, 2542) อาหารปลาแซลมอน *Oncorhynchus keta* และปลาเทร้า *Salminus maxillosus* ควรมีไขมัน 6-14 % (Hardy,

1989) ปลาไหล *Fluta alba* 5-10 เปอร์เซ็นต์ (Arai, 1989) ปลาจุกหวาง *Ictalurus punctatus* 8-12% (Lovell, 1989) ปลาไน *Cyprinus carpio* 10-15 % (Takeuchi *et al.*, 1979) และกึ่งกุกาทะเล *Parapenaeopsis affinis* 4-6% (Lim and Persyn, 1989)

การศึกษาความต้องการกรดไขมันของปลาจะศึกษาทั้งด้านคุณภาพและปริมาณ โดยการศึกษาทางด้านคุณภาพทำให้ทราบว่าปลาต้องการกรดไขมันที่จำเป็นต่อร่างกาย 2 ชนิด ได้แก่ linoleic acid (18:2n-6) และ linolenic acid (18:3n-3) ซึ่งไม่สามารถสังเคราะห์เองได้ต้องได้รับจากอาหารเท่านั้น การได้รับไขมันมากเกินไปทำให้น้ำหนักตัวของสัตว์น้ำเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วพร้อมกับมีไขมันสะสมในร่างกายมากเกินไป เป็นเหตุให้สัตว์น้ำเคลื่อนไหวช้าลง อัตราการทำงานในร่างกายต่ำลง ใช้พลังงานและกินอาหารน้อยลงจนในที่สุดทำให้น้ำหนักตัวลดลง ส่วนการที่สัตว์น้ำได้รับไขมันน้อยเกินไปทำให้ร่างกายได้รับพลังงานและกรดไขมันชนิดจำเป็นน้อยตามไปด้วย ร่างกายจึงต้องหาพลังงานจากแหล่งอื่นมาทดแทนโดยการสลายโปรตีนและคาร์โบไฮเดรต จากอาหาร รวมทั้งการสลายไขมันที่สะสมในร่างกาย โปรตีนจึงถูกเผาผลาญเป็นพลังงานแทนที่จะถูกนำไปใช้เพื่อการเจริญเติบโต ในที่สุดทำให้น้ำหนักตัวผอมและมีน้ำหนักลดลง (วีรพงศ์, 2536)

### 3.3 ความต้องการคาร์โบไฮเดรต

ปลาเหมือนกับสัตว์ทั่วไปที่ไม่สามารถสังเคราะห์คาร์โบไฮเดรตได้ ดังเช่น พืชทำให้ปลาต้องได้รับคาร์โบไฮเดรตจากพืช ซึ่งสามารถสังเคราะห์ได้จากการสังเคราะห์ด้วยแสง ในปัจจุบันบทบาท และหน้าที่ของคาร์โบไฮเดรตต่อการผลิตอาหารปลานับว่ามีความสำคัญอย่างมาก ทั้งนี้เพราะคาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งพลังงานราคาถูกที่สุด ปลามีความต้องการคาร์โบไฮเดรตในปริมาณมากทำให้การศึกษาส่วนใหญ่มุ่งเน้นเกี่ยวกับระดับคาร์โบไฮเดรตที่เหมาะสมในสูตรอาหารปลา อย่างไรก็ตามคาร์โบไฮเดรตก็อาจจัดได้ว่าไม่ใช่ธาตุอาหารที่สำคัญของปลา ซึ่งรายงานทดลอง แสดงให้เห็นว่าปลาที่ได้รับอาหารที่ไม่มีคาร์โบไฮเดรตก็สามารถเจริญเติบโตได้อย่างปกติและไม่มีการผิดปกติของอวัยวะใดๆ เลยถ้าปลาได้รับอาหารที่มีสัดส่วนที่เหมาะสมของพลังงานและโปรตีน เนื่องจากปลาสามารถนำพลังงานจากไขมันมาใช้ประโยชน์ได้ แต่ถ้าปลาได้รับคาร์โบไฮเดรตต่ำกว่าความต้องการจะนำเอาโปรตีนหรือไขมันที่สะสมในร่างกายมาเผาผลาญให้เกิดพลังงาน มีผลทำให้ปลาผอมลงหรืออาจนำเอาโปรตีนในอาหารมาเผาผลาญให้เกิดพลังงานแทนที่จะใช้เพื่อการเจริญเติบโตอย่างเดียวทำให้ปลามีการเจริญเติบโตช้าลง กรณีที่ได้รับคาร์โบไฮเดรตมากเกินไปความต้องการจะทำให้ปลาย่อยคาร์โบไฮเดรตได้น้อยลงและอาจนำคาร์โบไฮเดรตมาสะสมที่ตับในรูปของไกลโคเจน ซึ่ง

ปลาอาจนำมาสลายพลังงานเมื่อขาดอาหาร หรืออาจเปลี่ยนรูปเป็นไขมันสะสมในเนื้อเยื่อของร่างกาย ทำให้ปลามีขนาดใหญ่ขึ้น นอกจากนั้นความสามารถของปลาในการย่อยคาร์โบไฮเดรต ยังขึ้นอยู่กับชนิดของคาร์โบไฮเดรต เช่น ปลาคอดอเมริกันสามารถใช้น้ำตาลกลูโคสได้ถึง 90% ย่อยแป้งได้ 50-80% และย่อยเซลลูโลสจากเชื้อยีสได้น้อยหรือไม่ได้เลย แต่จากการทดลองพบว่าการใช้กลูโคสเป็นแหล่งพลังงานในอาหารจะทำให้ปลาเจริญเติบโตช้า เพราะว่ากลูโคสถูกดูดซึมง่ายและเร็ว จึงทำให้ปริมาณน้ำตาลในเลือดสูง แต่การสร้างฮอร์โมนอินซูลินของปลาไม่เพียงพอสำหรับการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด น้ำตาลจึงถูกขับออกทางปัสสาวะ (วีรพงศ์, 2536)

### 3.4 ความต้องการวิตามิน

สัตว์น้ำต้องการวิตามินในปริมาณเล็กน้อยแต่ขาดไม่ได้ จากการศึกษาความต้องการวิตามิน โดยใช้อาหารที่ทำจากวัตถุดิบสังเคราะห์และวัตถุดิบธรรมชาติ พบว่า มีวิตามินอยู่ 15 ชนิด ที่สัตว์น้ำต้องการในอาหาร คือ วิตามินเอ วิตามินดี วิตามินอี วิตามินเค ไทอะมีน ไรโบฟลาวิน ไพริดอกซิน กรดแพนโทเทนิค ไนอะซิน กรดโฟลิก โคลาลามีน ไบโอติน โคลีน อินอซิทอล และกรดแอสคอร์บิก ความต้องการอาจแตกต่างกันไปตามชนิด วัยหรือขนาด สุขภาพของสัตว์น้ำ สารลดประสิทธิภาพของวิตามินและสัดส่วนของสารอาหารในอาหาร รวมทั้งระบบการเลี้ยงและสิ่งแวดล้อม อาหารธรรมชาติในบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำเป็นแหล่งของวิตามินที่สำคัญหลายชนิด ปริมาณของวิตามินจากอาหารธรรมชาติมีเพียงพอสำหรับการเลี้ยงสัตว์น้ำแบบไม่หนาแน่น แต่จะไม่เพียงพอและจำเป็นต้องเติมในอาหารสำหรับเลี้ยงกรณีที่ปล่อยสัตว์น้ำหนาแน่นเกินไป เช่น การเลี้ยงปลากดหลวง จำเป็นต้องเติมวิตามินซีในอาหารเฉพาะกรณีที่ต้องการปล่อยปลาจำนวนมากเพื่อให้ได้ผลผลิตต่อไร่สูงกว่า 480 กิโลกรัมเท่านั้น (Parther and Lovell, 1972) แม้ว่าปลามีความต้องการวิตามินเพียงเล็กน้อย แต่ถ้าปลาไม่ได้รับวิตามินจากอาหารเลยก็จะแสดงอาการขาดวิตามินปรากฏออกมาแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดปลาและชนิดของวิตามิน อาการขาดวิตามินเบื้องต้นของปลาจะเหมือนกัน คือ เบื่ออาหาร อัตราการเจริญเติบโตลดลง อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อสูงขึ้น และลำตัวสีเข้มขึ้น แต่จะมีอาการเฉพาะแตกต่างกันไป (วีรพงศ์, 2536)

### 3.5 ความต้องการแร่ธาตุ

สัตว์น้ำได้รับเกลือแร่จากอาหารและน้ำ สัตว์น้ำเค็มได้รับเกลือแร่จากน้ำโดยการกินน้ำ แล้วดูดซึมเกลือแร่จากทางเดินอาหาร ส่วนสัตว์น้ำจืดดูดซึมเกลือแร่จากน้ำโดยตรงทางเหงือกและผิวหนัง ปริมาณของเกลือแร่ที่สัตว์น้ำได้รับจากน้ำจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับปริมาณของเกลือแร่ในน้ำและอาหาร แร่ธาตุหลักที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของปลา มี 7 ชนิด ได้แก่ แคลเซียม ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม โซเดียม โพแทสเซียม คลอไรด์ และกำมะถัน ต้องมีการใส่ลงไปในการให้อาหารในปริมาณมาก เพื่อให้ร่างกายเจริญเติบโตได้ตามปกติ ส่วนแร่ธาตุรองมี 7 ชนิดเช่นกัน ได้แก่ เหล็ก ทองแดง แมงกานีส สังกะสี ซีลีเนียม ไอโอดีน และโคบอลต์ แม้ว่าปลามีความต้องการแร่ธาตุน้อยมาก เมื่อเปรียบเทียบกับธาตุอาหารชนิดอื่นๆ แต่อย่างไรก็ตามการใส่แร่ธาตุสมทบในรูปพรีมิกซ์ในอาหารปลาก็มีความจำเป็นมาก เนื่องจากสาเหตุหลายประการด้วยกัน กล่าวคือ แร่ธาตุบางชนิดอาจทำงานเสริมฤทธิ์กัน เช่น เหล็กกับทองแดง หรืออาจทำงานยับยั้งกัน เช่น ซีลีเนียมช่วยลดความเป็นพิษของปรอทและเงิน นอกจากนี้ปริมาณแร่ธาตุที่มีในวัตถุดิบอาหารสัตว์ก็มีปริมาณไม่แน่นอนและอาจอยู่ในรูปที่รวมตัวกับสารอื่น ทำให้ปลาย่อยและดูดซึมมาใช้ประโยชน์ได้ต่ำจึงควรใส่แร่ธาตุให้ครบทั้งคุณภาพและปริมาณ เพื่อให้ปลาเจริญเติบโตได้ตามปกติ (วีรพงษ์, 2536)

## 4. วัตถุดิบอาหารสัตว์

วัตถุดิบอาหารสัตว์ที่นำมาใช้ในการผลิตอาหารสัตว์น้ำหรืออาหารปลาจะมีจำนวนน้อยกว่าวัตถุดิบอาหารสัตว์ที่ใช้ในการผลิตอาหารสัตว์บก สิ่งสำคัญประการแรกของการนำวัตถุดิบอาหารสัตว์มาผลิตเป็นอาหารเม็ด คือ ต้องทราบลักษณะของวัตถุดิบอาหารสัตว์ที่มีคุณภาพ รวมทั้งคุณค่าทางโภชนาการที่สำคัญ วัตถุดิบอาหารสัตว์ที่นิยมนำมาใช้ผลิตอาหารปลาอาจแบ่งออกได้เป็น 5 กลุ่มใหญ่ๆ (วีรพงษ์, 2536) ดังนี้

### 4.1 วัตถุดิบอาหารสัตว์ประเภทโปรตีนต่ำหรือประเภทแป้ง

วัตถุดิบอาหารสัตว์เหล่านี้มีราคาถูกที่สุด นิยมใช้ในการลดต้นทุนการผลิตอาหารมีโปรตีนต่ำประมาณ 8-14% และมีแป้งมากประมาณ 70-90% ได้แก่

4.1.1 ปลายข้าว ประกอบด้วยเศษข้าวที่หักและส่วนของจมูกข้าว ปลายข้าวทั่วไปมีโปรตีนประมาณ 8% ไขมัน 0.9 % เยื่อใย 1.0 % และความชื้น 12 % เก็บไว้ใช้ได้นานโดยไม่หืน ปลายข้าวมี 3 ขนาด คือ ขนาดเล็ก กลางและใหญ่หรือที่เรียกกันว่าข้าวท่อน ปลายข้าวขนาดเล็กมักมีส่วนของจมูกข้าวซึ่งเป็นต้นอ่อนที่มีโปรตีน ไขมัน วิตามิน และแร่ธาตุมากกว่าส่วนอื่นของเมล็ด ทำให้สัตว์สามารถย่อยและใช้ประโยชน์ได้ดีกว่า ดังนั้นปลายข้าวขนาดเล็กจึงเป็นที่นิยมใช้เลี้ยงสัตว์มากกว่า แต่มักมีราคาแพงและหาซื้อได้ยาก การนำปลายข้าวมาหนึ่งหรือคัมก่อนนำไปผลิตอาหารจะช่วยให้ปลายย่อยอาหารดีขึ้น ปลายข้าวเจ้า ราคา 9.10 บาทต่อกิโลกรัม (กรมการค้าภายใน, 2550)

4.1.2 รำข้าว เป็นผลพลอยได้จากการสีข้าวเช่นเดียวกับปลายข้าว สามารถแบ่งแยกออกได้หลายชนิดได้แก่ รำหยาบ มีส่วนของเปลือกนอกติดกับเมล็ดข้าว (bran) ส่วนของจมูกข้าว (germ) ส่วนของปลายข้าว (broken rice) ส่วนของเมล็ดข้าว (endosperm) และอาจมีส่วนของแกลบปนมาบ้าง รำหยาบมีเยื่อใยและซิลิกาค่อนข้างสูงมีโปรตีนรวมประมาณ 7-8% เยื่อใยประมาณ 13% และมีไขมันประมาณ 10% รำละเอียด ประกอบด้วยเยื่อหุ้มเมล็ดข้าว ปลายข้าวและมีแกลบปนเล็กน้อย มีโปรตีนประมาณ 12% มีไขมันค่อนข้างสูงประมาณ 12-13% นอกจากนี้ยังมีการนำรำละเอียดไป สกัดน้ำมัน กากที่เหลือเรียกว่ากากรำหรือรำสกัดน้ำมัน มีโปรตีนสูงประมาณ 14-15% เยื่อใย 13-15% รำละเอียดมีไขมันเป็นส่วนประกอบอยู่ในระดับค่อนข้างสูง และเป็นไขมันที่หืนได้ง่าย ในสภาวะที่ อากาศร้อน หากเก็บไว้เกิน 60 วัน ไม่เหมาะที่จะนำมาใช้เลี้ยงสัตว์ การใช้รำละเอียดหรือรำสกัดน้ำมันเป็นส่วนผสมในสูตรอาหารปลากินเนื้อไม่ควรมากเกินไปถึง 20 % แต่ปลากินพืชอาจผสมได้ถึง 30-40 % รำละเอียดมักจะมีการปลอมปนด้วยแกลบป่น ละอองข้าวหรือดินขาวปน ทำให้คุณค่าทางอาหารต่ำลง ถ้าเป็นรำข้าวนาปรัง ควรระวังเรื่องยาฆ่าแมลง ที่ปะปนมาในระดับสูง รำสกัดน้ำมันได้จากการนำเอารำละเอียดไปสกัดเอาไขมันออก ใช้ทดแทนรำละเอียดได้ดี แต่ต้องระวังเรื่องระดับพลังงาน เพราะรำสกัดน้ำมันมีค่าพลังงานใช้ประโยชน์ได้ต่ำกว่ารำละเอียด แต่รำละเอียดมีเยื่อใยเป็นส่วนประกอบในระดับสูง จึงมีลักษณะฟาง ไม่ควรใช้เกิน 30 % ในสูตรอาหาร รำละเอียดคุณสมบัติเป็นยาระบาย กากรำสกัด ราคา 6.20-6.30 บาท/กิโลกรัม รำข้าวขาว ราคา 6.80-6.90 บาทต่อกิโลกรัม (กรมการค้าภายใน, 2550)

4.1.3 ข้าวโพด มีโปรตีนรวมประมาณ 8-13% แป้ง 65% ไขมัน 3-6% และมีเยื่อใยอยู่ในระดับต่ำ นิยมนำมาใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตอาหารปลาเลี้ยงน้ำ ข้าวโพดที่ดีควรเป็นข้าวโพดที่บดอย่างละเอียด ไม่มีมอดกิน ไม่มีสิ่งปลอมปน และที่สำคัญที่สุดจะต้องไม่ขึ้นรา และไม่มียาฆ่าแมลงปลอมปน ข้าวโพดสามารถใช้ทดแทนปลายข้าวได้ แต่มีข้อเสีย คือ เชื้อราและยาฆ่าแมลง

เนื่องจากการเก็บเกี่ยวและการเก็บรักษาไม่ดีพอ เมล็ดข้าวโพดที่มีความชื้นเมล็ดสูงกว่า 25 เปอร์เซ็นต์ มีโอกาสที่เชื้อรา *Aspergillus flavus* จะเข้าทำลายและสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินได้สูง (พันทิพา, 2533) ดังนั้นควรเลือกซื้อเมล็ดข้าวโพดที่มีความชื้นไม่เกิน 13 % และควรบดให้ละเอียดก่อนเพราะข้าวโพดขนาดใหญ่ย่อยยากและช่วยให้การผสมได้ผลดีขึ้น ข้าวโพด ราคา 792-796 บาทต่อ 100 กิโลกรัม

4.1.4 ข้าวฟ่าง มีคุณค่าทางโภชนาการใกล้เคียงกับข้าวโพด มีโปรตีนประมาณ 10% ไขมัน 2-3% แป้งประมาณ 68 % ข้าวฟ่างโดยทั่วไปจะมีสารแทนนิน (ประมาณ 0.1-0.3%) ทำให้มีรสฝาด (สถาบันวิจัยพืชไร่, 2537) สารแทนนินมีผลทำให้การย่อยได้ของโปรตีนและพลังงานลดลง ดังนั้นจึงเป็นข้อจำกัดในการใช้ข้าวฟ่าง นอกจากนี้ควรเอาเปลือกหุ้มเมล็ดออกแล้วบดให้ละเอียดก่อนนำมาผสมในสูตรอาหารปลาและควรใช้ร่วมกับปลาป่นหรือกากถั่วเหลือง เนื่องจากข้าวฟ่างมีกรดอะมิโนไลซีนและทรีโอนีนต่ำ

4.1.5 มันสำปะหลัง มี 3 ลักษณะได้แก่ หัวมันสด มันเส้น และแป้งมันสำปะหลัง มักมีปัญหาเรื่องสารพิษไซยานิน จึงควรตัดเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วนำมาตากแดดให้แห้งประมาณ 3-5 วันก่อนก็จะทำให้สารพิษดังกล่าวสลายไปได้ การใช้มันเส้นหรือมันสำปะหลังผสมในสูตรอาหารปลากินเนื้อไม่ควรเกิน 15-20 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่สูตรอาหารปลากินพืชอาจผสมได้ถึง 30-40 เปอร์เซ็นต์ต้นเส้น ราคา 345-380 บาทต่อ 100 กิโลกรัม

#### 4.2 วัตถุดิบอาหารสัตว์ประเภทโปรตีนสูง

วัตถุดิบอาหารสัตว์เหล่านี้มักมีปริมาณโปรตีนมากกว่าความต้องการของปลาและส่วนใหญ่เป็นโปรตีนที่มีคุณภาพดี

##### 4.2.1 อาหารโปรตีนที่ได้จากสัตว์

ปลาป่น เป็นวัตถุดิบอาหารสัตว์ประเภทโปรตีนสูงจากสัตว์และเป็นที่ยอมรับใช้ในการผลิตอาหารปลา เนื่องจากมีโปรตีนที่มีคุณภาพสูงมากประมาณ 55-60% มีกรดอะมิโนไลซีนและเมทไทโอนีนสูง ความชื้น 8-10 % ไขมัน 8-10 % เถ้า 20-25 % และมีเชื้อไขอยู่ในระดับต่ำ คุณภาพปลาป่นขึ้นอยู่กับชนิดของปลาที่ใช้ทำปลาป่น รวมทั้งกรรมวิธีการผลิต เช่น ถ้าใช้ความร้อนสูงทำให้คุณค่าทางอาหารต่ำลงปลาป่นมีคุณค่าทางอาหารสูงเนื่องจากมีกรดอะมิโนครบถ้วนทุกชนิด นอกจากนี้

ยังมีแคลเซียมและฟอสฟอรัสปริมาณมาก และยังมีกลิ่นที่ดีช่วยกระตุ้นให้ปลากินอาหารได้มากขึ้น แต่มีข้อจำกัดในการใช้ คือ ราคาแพงทำให้เกิดปัญหาการปลอมปนด้วยวัสดุอื่นที่มีราคาถูก เช่น ทราเย เปลือกหอยบด ยูเรีย ขนไก่ เป็นต้น ทำให้คุณค่าทางอาหารลดลง ปลาป่นเบอร์ 1 (โปรตีน ร้อยละ 60-64.99) ราคา 24.26 บาทต่อกิโลกรัม ปลาป่นเบอร์ 2 (โปรตีนร้อยละ 60) ราคา 23.50 บาท/กิโลกรัม ปลาป่นเบอร์ 3 (โปรตีนร้อยละ 59.99) ราคา 20.10 บาทต่อกิโลกรัม ปลาป่นนำเข้าโปรตีน ร้อยละ 60 ลงมา เบอร์ 3 ราคา 20.60 บาทต่อกิโลกรัม (กรมการค้าภายใน, 2550)

#### 4.2.2 อาหารโปรตีนที่ได้จากพืช

4.2.2.1 กากถั่วเหลือง เป็นวัตถุดิบอาหารสัตว์ประเภทโปรตีนจากพืชที่ดีที่สุด เป็นผลพลอยได้จากการสกัดน้ำมันออกจากเมล็ดถั่วเหลือง มีโปรตีนคุณภาพดีรองจากปลาป่น ประมาณ 42-48% ขึ้นอยู่กับกระบวนการสกัดน้ำมัน ไขมันประมาณ 1% แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ กากถั่วเหลือง ที่ได้จากกระบวนการอัดน้ำมัน และกากถั่วเหลืองที่ได้จากกระบวนการสกัดน้ำมันด้วยสารเคมี แต่มีข้อจำกัดในการใช้ คือ มีเอนไซม์ยับยั้งทริปซิน (trypsin inhibitor) หลงเหลืออยู่ถ้ากากถั่วเหลืองได้รับความร้อนไม่เพียงพอโดยเฉพาะกากถั่วเหลืองอัดน้ำมัน มีผลทำให้การย่อยได้ลดลงส่วนกากถั่วเหลืองที่ได้รับความร้อนมากเกินไปจะมีสีน้ำตาลคล้ำ มีกลิ่นเหม็นไหม้ มีผลทำให้การย่อยได้ของไลซีนต่ำลง กากถั่วเหลืองสกัดน้ำมันชนิดกะเทาะเปลือกมีโปรตีนและเยื่อใยประมาณ 50 และ 4 % ตามลำดับ ในขณะที่ถั่วเหลืองสกัดน้ำมันชนิดไม่กะเทาะเปลือกมี 45 และ % ตามลำดับ ดังนั้นกากถั่วเหลืองสกัดน้ำมันชนิดกะเทาะเปลือกมีคุณค่าทางโภชนาการดีกว่า เนื่องจากการกะเทาะเปลือกก่อนการสกัดน้ำมันจะเหลือแต่เมล็ดถั่วเหลืองเท่านั้นจึงทำให้มีคุณค่าทางโภชนาการดีกว่าถั่วเหลืองนำเข้าโปรตีน 42-45% ราคา 10.50-10.60 บาท/กิโลกรัม กากถั่วเหลืองที่ผลิตในประเทศ (นำเข้าเมล็ด) ราคา 11.00-11.10 บาทต่อกิโลกรัม

4.2.2.2 กากมะพร้าว เป็นผลพลอยได้จากการสกัดน้ำมันมะพร้าวจากเนื้อมะพร้าวของโรงงานผลิตน้ำมันพืช เนื้อในมะพร้าวเมื่อแยกเอาน้ำมันออกแล้วจะเหลือส่วนของกากประมาณ 30-40% ส่วนใหญ่จะสกัดน้ำมันออกด้วยวิธีการอัดน้ำมัน (expeller) ซึ่งจะเหลือน้ำมันอยู่ประมาณ 8% กากมะพร้าว มีโปรตีนประมาณ 19.6% เยื่อใยประมาณ 15% กากมะพร้าวที่ดีควรมีสีค่อนข้างขาวนวล หรือ สีน้ำตาลอ่อน ถ้าอัดน้ำมันออกใหม่ๆ จะมีกลิ่นหอมน่ากิน แต่ถ้าเป็นกากมะพร้าวจากการคั่นกะทิ จะมีโปรตีนต่ำมาก ประมาณ 1.2 % มีเยื่อใยสูงประมาณ 12 % ไขมันสูง ประมาณ 6 % ทำให้หืนง่ายและใช้ในสูตรอาหารได้น้อย

4.2.2.3 กากถั่วลิสง เป็นผลพลอยได้จากการสกัดน้ำมันออก มีโปรตีนอยู่ประมาณ 44-50% เชื้อใยประมาณ 5.5 % การใช้กากถั่วลิสงอย่างเดียวในอาหาร จะทำให้สัตว์เจริญเติบโตช้า เนื่องจากความไม่สมดุลของกรดอะมิโน ดังนั้นจึงควรใช้กากถั่วลิสงร่วมกับกากถั่วเหลืองและปลาป่น การเก็บรักษากากถั่วลิสง ถ้ามีความชื้นสูงจะเสียเร็ว เนื่องจากถั่วลิสงเป็นพืชที่มีน้ำมันมาก จึงเก็บไว้นานไม่ได้ เนื่องจากเกิดการเหม็นหืน และมีราเกิดขึ้นได้ง่าย ดังนั้นควรเลือกใช้กากถั่วลิสงที่ใหม่ มีไขมันต่ำ และควรเก็บไว้ในที่ไม้อ่อนและชื้น

#### 4.2.3 วัตถุดิบอาหารสัตว์ประเภทพลังงานสูง

โดยทั่วไปวัตถุดิบประเภทนี้ได้แก่ น้ำตาลทราย กากน้ำตาล และไขมันชนิดต่างๆ แต่ปลาใช้น้ำตาลทรายและกากน้ำตาลได้น้อยมาก จึงไม่มีการใช้ในการผลิตอาหารปลา การใช้ไขมันหรือน้ำมันผสมในอาหารปลานิยมใช้ในสูตรอาหารที่มีพลังงานต่ำและเชื้อใยสูง ช่วยทำให้ปลาเจริญเติบโตดีขึ้น น้ำมันที่นิยมใส่ในสูตรอาหารปลา คือ น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันรำ น้ำมันข้าวโพด น้ำมันตับปลา เป็นต้น เนื่องจากน้ำมันเหล่านี้ส่วนใหญ่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวเป็นองค์ประกอบและมีกลิ่นหอม จะช่วยกระตุ้นการกินอาหารให้ดีขึ้น

#### 4.2.4 วัตถุดิบอาหารสัตว์ประเภทวิตามินและแร่ธาตุ

โดยทั่วไปวัตถุดิบอาหารสัตว์จะมีวิตามินและแร่ธาตุอยู่แล้ว แต่อาจอยู่ในรูปที่จับตัวกับสารอื่นๆ ทำให้ปลาใช้ประโยชน์ได้ไม่เต็มที่หรืออาจมีปริมาณต่ำกว่าความต้องการ จึงจำเป็นต้องใส่วิตามินและแร่ธาตุสมทบเข้าไป เพื่อให้มีปริมาณเพียงพอกับความต้องการ ได้แก่ ปริเม็กซ์ ไคแคลเซียมฟอสเฟต และกระดูกป่น

#### 4.2.5 วัตถุดิบอาหารสัตว์ประเภทกรดอะมิโนสังเคราะห์

กรดอะมิโนสังเคราะห์อาจจำเป็นต้องใช้เมื่ออาหารปลาที่ผลิตได้มีระดับกรดอะมิโนต่ำกว่าความต้องการของร่างกาย อย่างไรก็ตามถ้าใช้วัตถุดิบอาหารที่มีคุณภาพสูง กรดอะมิโนครบถ้วนก็ไม่จำเป็นต้องใช้กรดอะมิโนสังเคราะห์เนื่องจากมีราคาแพง

## 5. กระบวนการฉายรังสีในเชิงเคมีและฟิสิกส์

การฉายรังสีในอาหารเป็นกระบวนการทางฟิสิกส์ที่เกี่ยวข้องกับ energy-input ที่ไม่ได้เหนี่ยวนำให้เกิดสารกัมมันตรังสีในอาหารแต่ energy-input นั้น กล่าวถึงปริมาณรังสีที่ถูกดูดกลืนโดยสิ่งมีชีวิต ในรูปของพลังงาน และวัดปริมาณเป็นหน่วย Grays ( $1\text{Gy} = 1\text{Jkg}^{-1}$ ) ระดับการฉายรังสีในอาหาร ส่วนใหญ่แล้วไม่พบการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมี ทั้งนี้เนื่องจากในธรรมชาติการฉายรังสีมีผลต่อการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนออบิทอลในอะตอมที่ประกอบอยู่ในโมเลกุลของอาหาร เมื่อกระตุ้นอิเล็กตรอนออบิทอลให้ออกจากอะตอมในทางเคมีการเปลี่ยนแปลงจะเกิดขึ้นในอะตอมและโมเลกุล กระบวนการนี้เรียกว่า ionization การสร้างอะตอมหรือโมเลกุลที่มีประจุบวกที่เรียกว่า cations (positive ions) สร้างโดยไอออนที่มีประจุบวกจะมีอิเล็กตรอนน้อยกว่าโปรตรอนส่วนไอออนที่มีประจุลบจะมีอิเล็กตรอน ในชั้นอิเล็กตรอนมากกว่าโปรตรอนในนิวเคลียสเรียกว่า anions (negative ions) กระบวนการ ionization เป็นการสร้างอะตอมหรือโมเลกุลที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาขึ้นอย่างรวดเร็วเรียกว่า อนุมูลอิสระ (free radicals) อนุมูลอิสระที่เกิดในมนุษย์สร้างขึ้นโดยกระบวนการเมแทบอลิซึมในร่างกาย เช่น กระบวนการ รอกซิเดชัน (oxidation) และ กระบวนการหายใจ (respiration) กระบวนการนี้มีความคล้ายคลึงกับการเปลี่ยนแปลงที่นำไปสู่การเกิดโรคในมนุษย์ได้ (Pryor, 1984) ในอาหาร อนุมูลอิสระสร้างจากความร้อน ที่เกิดจากการทำอาหาร เช่น รังสีอินฟราเรด ไมโครเวฟ เป็นต้น การต้ม การฟอก หรือการเผาอาหาร (Lagunas-Solar, 1995)

### 5.1 การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นจากการฉายรังสีในอาหาร

การฉายรังสีเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีในอาหารซึ่งสัมพันธ์โดยตรงกับระดับการฉายรังสีโดยทั่วไปชนิดของปฏิกิริยาที่เหนี่ยวนำโดยการฉายรังสีมีดังนี้) การกระบวนการออกซิเดชัน (oxidation) ของโลหะหนัก และไอออน 2) การเกิด ออกซิเดชัน (oxidation) และรีดักชัน (reduction) ของหมู่ คาร์บอนิล (carbonyls) จากอนุพันธ์ของไฮดรอกซิล (hydroxyl) 3) การทำลายพันธะคู่ 4) การลดความเป็นอะโรมาติก (aromaticity) ใน หมู่อะโรมาติก (aromatic) และสารประกอบที่เป็นเฮเทอโรไซคลิก (heterocyclic) 5) การเกิดไฮดรอกซีเลชัน (hydroxylation) ของสารประกอบอะโรมาติกและเฮเทอโรไซคลิก (heterocyclic) เมื่อมีออกซิเจนอนุมูลอิสระจะถูกออกซิไดซ์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydroperoxides) จะถูกสร้างขึ้น (Siddhurajua *et al.*, 2002)

## 5.2 ผลของรังสีต่อสารชีวโมเลกุล

รังสี (radiation) เป็นพลังงานรูปหนึ่งที่ปล่อยออกมาจากแหล่งกำเนิด แล้วเคลื่อนที่ผ่านตัวกลาง ซึ่งพลังงานที่ปลดปล่อยออกไปอาจอยู่ในรูปของคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า (electromagnetic radiation) หรือลำของอนุภาค (particle หรือ corpuscular radiation) ขึ้นกับสมบัติทางฟิสิกส์ของรังสี โดยรังสีอาจถ่ายเทพลังงานโดยตรงให้กับสารชีวโมเลกุล แล้วก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในโมเลกุล หรือรังสีอาจถ่ายเทพลังงานให้กับโมเลกุล ทำให้อิเล็กตรอนของอะตอมหลุดออก เกิดเป็นโมเลกุลที่มีประจุไฟฟ้า เกิดเป็นอนุมูลอิสระ ซึ่งมีความไวในการทำปฏิกิริยาทางเคมี ไปทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุล ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโมเลกุล รังสีอาจทำให้เกิดความเสียหายในสารชีวโมเลกุลต่างๆ เช่น โปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน เป็นต้น (Casarett, 1968; Hall *et al.*, 1994; Siddhuraja *et al.*, 2002a)

### 5.2.1 ผลของรังสีต่อโปรตีน

โปรตีนเป็นสารชีวโมเลกุลที่โปรตีนหลายชนิดทำหน้าที่เป็นโครงสร้างของเซลล์ เป็นเอนไซม์ที่ใช้เร่งปฏิกิริยาทางชีวเคมี เป็นฮอร์โมนบางชนิด เพื่อควบคุมการทำงานของระบบอวัยวะต่างๆ เป็นสารที่ใช้ในการเคลื่อนย้ายสารต่าง เป็นสารที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย โมเลกุลของโปรตีนประกอบด้วยสายของกรดอะมิโน อาจอยู่ในรูปร่างที่เป็นเส้นหรือเป็นก้อนกลม เมื่อโปรตีนได้รับรังสีจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง เช่น เกิดการรวมตัว การเกิดเชื่อมข้าม ของโมเลกุลโปรตีน การขาดของสายโพลีเปปไทด์ การหลุดออกของหมู่ฟังก์ชันจากของกรดอะมิโน ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวอาจทำให้ความเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักโมเลกุล ความสามารถในการละลายน้ำ รวมถึงการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง และ/หรือหน้าที่ของโปรตีน (Siddhurajua *et al.*, 2002)

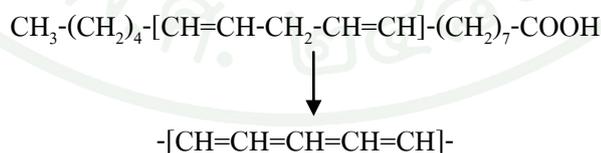
### 5.2.2 ผลของรังสีต่อคาร์โบไฮเดรต

คาร์โบไฮเดรต หรือแซคคาไรด์ (saccharides) คือ สารประกอบ แอลดีไฮด์ หรือ คีโตน ที่ประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) คาร์โบไฮเดรต ที่มีทั้งชนิดที่ประกอบด้วยคาร์บอน 5 อะตอม หรือ 6 อะตอม เรียกว่า โมโนแซคคาไรด์ เช่น กลูโคสและฟรุกโทส หรือ โมโนแซคคาไรด์ 2 โมเลกุลเชื่อมต่อกัน เรียกว่า ไดแซคคาไรด์ หรือหลายๆ โมเลกุลมาต่อเชื่อมกันเป็นโพลีแซคคาไรด์ ซึ่งมีหน้าที่ต่างๆ เช่น โกลโคเจน และแป้งเป็นอาหารพวกคาร์โบไฮเดรต ทำหน้าที่เป็น

โครงสร้างเซลล์ (เซลล์โลสในเซลล์พืช และโคตินในเซลล์สัตว์) (Mathon *et al.*, 1993) ซึ่งผลของรังสีต่อโพลีแซคคาไรด์อาจทำให้เกิด การทำลาย, สายโซ่โพลีเปปไทด์ เกิดการแตกหัก หรือเกิดการรวมตัว (Casarett, 1968) โพลีแซคคาไรด์บางชนิด เช่น ไกลโคเจนทำหน้าที่สะสมอาหารพวกคาร์โบไฮเดรต และเซลล์โลส ซึ่งเป็นโครงสร้างของเซลล์พืช รังสีอาจทำให้เกิดปฏิกิริยา การขจัดลิกนิน (delignification) และการย่อยสลาย (decomposition) ในเส้นใยของพืช เป็นต้น (Sandeve and Karaiyanov, 1977)

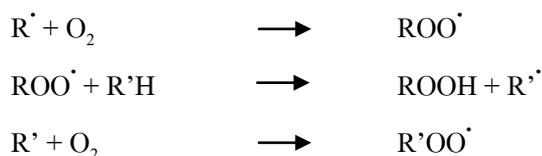
### 5.2.3 ผลของรังสีต่อไขมัน

ไขมันประกอบด้วย คาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน โมเลกุลของไขมันประกอบด้วยกลีเซอริน 1 โมเลกุล และกรดไขมัน 3 โมเลกุล ซึ่งอาจเป็นกรดไขมันชนิดเดียวกันหรือต่างกันได้ ไขมันมีหน้าที่สำคัญ คือ ให้ความอบอุ่นแก่ร่างกาย และเป็นองค์ประกอบของเยื่อชีวภาพต่างๆ เช่น เยื่อหุ้มเซลล์ เยื่อหุ้ม ไมโทคอนเดรีย เอนโดพลาสมิกเรติคูลัม และไลโซโซม โดยรังสีจะมีผลต่อไขมันโดยเฉพาะอย่างยิ่ง กรดไขมันไม่อิ่มตัว เช่น กรดไลโนเลอิก รังสีทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระ ( $\text{OH}^{\cdot}$ ,  $\text{H}^{\cdot}$ ,  $\text{HO}_2^{\cdot}$ ) แล้วอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจะเข้าทำปฏิกิริยากับคาร์บอนอะตอมระหว่างพันธะคู่ของกรดไขมันไม่อิ่มตัว ดึงเอา H ระหว่างพันธะคู่ออก เกิดเป็นโครงสร้างเรโซแนนซ์ (resonance structure) (ภาพที่ 3) ได้เป็น organic free radical ( $\text{R}^{\cdot}$ ) ซึ่งอาจทำให้เกิดกระบวนการ lipid peroxidation โดย  $\text{R}^{\cdot}$  ที่เกิดขึ้นทำปฏิกิริยากับออกซิเจนได้เป็น peroxide radical ( $\text{ROO}^{\cdot}$ ) จากนั้นจะไปทำปฏิกิริยากับ RH อื่นๆ ได้เป็น hydroperoxide radicals ( $\text{ROOH}$ ) ซึ่งไม่เสถียรและแตกตัวให้สารต่างๆ รวมถึงอนุมูลอิสระและทำปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นๆ ต่อไปเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (ภาพที่ 4) (Casarett, 1968; Mathon *et al.*, 1993)



ภาพที่ 3 โครงสร้างเรโซแนนซ์ที่เกิดจากการฉายรังสีในกรดกรดไลโนเลอิก

ที่มา: Casarett (1968)



ภาพที่ 4 ออกซิเจนที่มีอยู่ในตัวกลางเข้าทำปฏิกิริยากับ R' ได้เป็น peroxide radical (ROO')

ที่มา: Casarett (1968)

### 5.3 ข้อดีของการฉายรังสีเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่น

การลดกิจกรรมของสารยับยั้งในธัญญาพืชโดยวิธีการฉายรังสีมีข้อดีกว่าวิธีอื่นหลายประการ เช่น การฉายรังสีทำได้ง่าย ใช้เวลาน้อย และรักษาคคุณค่าทางโภชนาการไว้ได้ดี โดยมีการทดสอบคุณค่าทางโภชนาการและความเป็นพิษในอาหารสัตว์ที่ผ่านการฉายรังสี เช่น ข้าวสาลีที่ผ่านการฉายรังสีที่ปริมาณ 0.2-2 kGy พบว่าไม่เป็นอันตรายต่อหนูและไม่มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตหรือการสืบพันธุ์ในหนู (Hickman *et al.*, 1964; Fifield *et al.*, 1967) นอกจากนี้ยังพบว่าการฉายรังสีข้าวสาลีที่ปริมาณ 5-50 kGy มีผลเพิ่มปริมาณโปรตีน และฟอสฟอรัส ที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ โดยไก่ที่ได้รับอาหารฉายรังสีเป็นเวลา 1 สัปดาห์ มีน้ำหนักตัว ไชมัน และคุณค่าทางโภชนาการในเนื้อไก่เพิ่มมากขึ้น (Moran *et al.*, 1968) ขณะที่การลดกิจกรรมของสารยับยั้งที่ปนด้วยความร้อนมีผลต่อปริมาณของกรดอะมิโนและคุณภาพของสารอาหาร โดยมีรายงานว่าหนูที่บริโภคธัญพืชที่ผ่านการนึ่งด้วยหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 120°C นาน 30 นาที มีอัตราการเจริญเติบโตลดลง (Hayakawa *et al.*, 1985) และการใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 102°C นาน 5 นาที มีผลต่อโครงสร้างของโปรตีนในอาหาร (Provansal *et al.*, 1975) การใช้รังสีแกมมาที่ปริมาณรังสีตั้งแต่ 10-60 kGy สามารถลดกิจกรรมของสารยับยั้งที่ปนลดลงเฉลี่ยร้อยละ 11.30-60.29 ตามลำดับ ซึ่งพบว่าองค์ประกอบทางโภชนาการไม่เปลี่ยนแปลงหลังจากการฉายรังสี (ศราวุฑฒ, 2551) รังสีแกมมาที่ปริมาณ 60 และ 100 kGy ไม่มีผลต่อองค์ประกอบพื้นฐานทางเคมี ได้แก่ ความชื้น ไชมัน เถ้า และโปรตีนของเมล็ดสับดูดำสายพันธุ์ KU BP-16, KU BP-20, KU BP-27, KU BP 78-9 และ KU BP 80-3 และสามารถเพิ่มความสามารถในการย่อยโปรตีนในกากเมล็ดสับดูดำให้สูงขึ้นได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งสอดคล้องกับกิจกรรมของสารยับยั้งที่ปนที่ลดลง (พิพัฒน์พงษ์, 2553)

## 5.4 ผลของการฉายรังสีต่อสารต้านโภชนา (Anti-nutritional factor) ในวัตถุดิบอาหารที่มาจากพืช

### 5.4.1 ผลต่อสารยับยั้งโปรตีน (Protease inhibitor)

สารยับยั้งโปรตีนในพืชจัดเป็นกลุ่มของสารประกอบที่มีอย่างหลากหลาย ยับยั้งการย่อยโปรตีนในสัตว์โดยเฉพาะสัตว์กินพืชที่มีกระเพาะเดี่ยว และสามารถลดการเจริญเติบโตของสัตว์ สารประกอบบางชนิด เช่น สารยับยั้งทริปซิน อาจทำให้ลดความสามารถในการหลั่งเอนไซม์ย่อยอาหาร ทั้งทริปซิน ไคโมทริปซิน และอีลาสเทสซึ่งเป็นการเหนี่ยวนำที่ทำให้เกิดโรค hyperplasia ในตับอ่อน อาจนำไปสู่ข้อสันนิษฐานได้ว่า สภาวะที่การเจริญเติบโต ถูกยับยั้งอาจมีสาเหตุจากสารยับยั้งทริปซิน โดยเกิดการสูญเสียบางกรดอะมิโนที่อยู่ในรูปของเอนไซม์ซึ่งถูกปลดปล่อยภายในเซลล์ทำให้เกิด hyperactive ที่ตับอ่อน (Liener, 1994a, 1994b) การสลายตัวของสารยับยั้งโปรตีนที่เกิดขึ้นเมื่อฉายรังสีแกมมาเป็นส่วนโดยตรงของระดับการฉายรังสี ในเมล็ดถั่วเหลืองระดับการกระตุ้นกิจกรรมของสารยับยั้งทริปซินเพิ่มขึ้นเป็นเส้นตรงเมื่อเพิ่มระดับของการฉายรังสี (การสูญเสียกิจกรรมของสารยับยั้งทริปซินที่ 41.8 56.3 62.7 และ 72.5 % ในระดับของการฉายรังสีที่ 5, 15, 30 และ 60 kGy ตามลำดับ (Farag, 1998) ประสิทธิภาพการยับยั้งสารต้านโภชนาที่ปรากฏในเมล็ดถั่วเหลืองที่ได้ผลดีที่สุด คือ ผ่านกระบวนการฉายรังสีที่ระดับ 60 kGy ขึ้นไป การยับยั้งกิจกรรมของสารยับยั้งทริปซินจากตัวอย่างที่ผ่านการฉายรังสี เชื่อว่าการฉายรังสีมีผลต่อการทำลาย พันธะไดซัลไฟด์ (S-S) โดย Lee (1962) ได้รายงานว่าหมู่ซัลไฟด์ไฮดริล (-SH) และพันธะไดซัลไฟด์ (S-S) ในโปรตีนเป็นส่วนที่ไวต่อการฉายรังสีสูง และ Khattak and Klopfenstein (1989) ได้แสดงให้เห็นว่า กรดอะมิโนที่มีซัลเฟอร์อาจจะถูกทำลายโดยการฉายรังสี โดยเฉพาะอย่างยิ่งในพืชตระกูลถั่วโปรตีนที่มีองค์ประกอบเริ่มแรกเกือบคล้ายกันนั้นย่อมมีความแตกต่างกันในการตอบสนองต่อการฉายรังสี การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเพียงตัวเดียวมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงหน้าที่ภายในโมเลกุลเกิดขึ้น เมื่อถูกทำลายด้วยการฉายรังสี (Lynn, 1973) การฉายรังสีมีผลต่อตำแหน่งพันธะไดซัลไฟด์ซึ่งเกิดขึ้นจาก electron aqueous ( $e_{aq}^-$ ) และอนุมูลอิสระของไฮดรอกซิล (OH) โดยผลที่เกิดขึ้นจะเปลี่ยนแปลงตรงตำแหน่งพันธะไดซัลไฟด์สร้างเป็นลูป (loops) ซึ่งมีผลทั้งตำแหน่งที่ยับยั้งทริปซินและไคโมทริปซิน การฉายรังสีที่ระดับ 10 kGy สามารถลดกิจกรรมสารยับยั้งทริปซินและไคโมทริปซินได้ 35 และ 71% ตามลำดับ ในเมล็ดถั่วเหลือง ขณะที่การฉายรังสียังช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนจากอาหารในหลอดทดลองได้ 80-84% (Abu-Tarboush, 1998)

ตารางที่ 1 ผลของการฉายรังสีที่มีต่อกิจกรรมตัวยับยั้งทริปซินและไคโมทริปซิน และประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนในหลอดทดลองของกากถั่วเหลือง

Dose (kGy)	Trypsin inhibitor (units/mg)	Destruction (%)	Chymotrypsin inhibitor (units/mg)	Destruction (%)	In vitro protein digestibility (%)
0	76.8a		9.8a		79.8d
1	73.3b	4.6	8.6b	12.2	81.2c
3	68.2e	11.2	7.0c	28.6	81.8bc
5	65.8d	14.3	4.2d	57.1	82.3bc
7	56.0e	27.1	4.1d	58.2	83.1ab
10	50.0f	34.9	2.8e	71.4	84.2a

\* Means in column and nearscripts with different letters differ significantly ( $p < 0.05$ )

ที่มา: Abu-Tarboush (1998)

#### 5.4.2 ผลต่อสารยับยั้งแอลฟา-อะไมเลส ( $\alpha$ Amylase inhibitor)

นอกจากการยับยั้งสารต้านทริปซินและไคโมทริปซิน สารต้านแอลฟาอะไมเลสยังเคยมีการรายงานต่อการตอบสนองของพืชกิจกรรมของสารต้านแอลฟาอะไมเลสในเมล็ดพืชของ *Moringa peregrine* ถูกทำให้ลดลงถึง 44 และ 48% จากการฉายรังสีที่ 7 และ 10 kGy ตามลำดับ (Abu-Tarboush, 1998) และการฉายรังสีที่ 7 kGy จะมีประสิทธิภาพดีกว่าการให้ความร้อนที่ 70°C เป็นเวลา 120 นาที เพื่อยับยั้งสารต้านแอลฟา-อะไมเลส (Al-Kahtani, 1995)

Thompson (1993) พบว่า สารต้านโภชนาการโดยทั่วไปพบได้ในพืช ซึ่งเป็นอันตรายและมีผลต่อสุขภาพ ยกตัวอย่างสารต้านโภชนาการ เช่น กรดไฟติก กรดอินทรีย์ สารประกอบฟีนอลิก (แทนนิน) ซาโปนิน และตัวยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสและโปรตีนเนส สามารถลดระดับสารอาหารที่จำเป็นและเป็นสาเหตุของการยับยั้งการเจริญเติบโต ในขณะที่ไฟโตเอสโตรเจน และลิกแนน

มีความเกี่ยวข้องกับปัญหาในเรื่องอัตราการเจริญเติบโต แต่อย่างไรก็ตามกรดไฟติกดิน สารประกอบ โนลิก (แทนนิน) ซาโปนิน และตัวยับยั้งเอนไซม์อะไมเลส พบการลดระดับกลูโคสในเลือดและการตอบสนองของอินซูลินที่มีผลต่ออาหารประเภทแป้ง หรือระดับของคอเลสเตอรอลและไตรกลีเซอไรด์ในพลาสมา นอกจากนี้กรดไฟติก, เลคติน, สารประกอบที่เป็นฟิโนลิก (แทนนิน), ซาโปนิน และตัวยับยั้งเอนไซม์โปรตีนสไฟโตเอสโตรเจน และลิกแนน ยังมีความสำคัญ ในการลดความเสี่ยงของการเกิดโรคมะเร็ง

## 6. การทดสอบประสิทธิภาพการย่อยในหลอดทดลอง (*in vitro* digestibility)

การใช้เทคนิค *in vitro* digestibility เป็นการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยอาหาร สกัดเอนไซม์จากอวัยวะหรือตัวสัตว์ที่ต้องการศึกษา และนำมาทดสอบการย่อยอาหารในหลอดทดลอง เป็นวิธีการเบื้องต้นสำหรับประเมินประสิทธิภาพการย่อยวัตถุดิบอาหาร สูตรอาหาร หรืออาหารสำเร็จรูป อาศัยการย่อยโปรตีนของเอนไซม์ทริปซินเป็นพื้นฐาน เนื่องจากเอนไซม์ทริปซินเป็นปัจจัยสำคัญอันดับแรกที่มีผลต่อประสิทธิภาพการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (feed conversion efficiency: FEC) และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate: SGR)

Hania F.G. El-Niely (2007) ได้ศึกษาประสิทธิภาพการฉายรังสีแกมมาในระดับ 5 7.5 และ 10 kGy ที่มีผลต่อคุณลักษณะของ สารอาหารในถั่ว (*Pisum sativum* L) ถั่วพุ่ม (*Vigna unguiculata* L. Walp) ถั่วเลนทิล (*Lens culinaris* Med) ถั่วขาว (*Phaseolus vulgaris* L) และถั่วเขียว (*Pisum sativum* L) พบว่าการวิเคราะห์องค์ประกอบของอาหารโดยรวม ระดับสารต้านอนุมูลอิสระ (กรดไฟติก และแทนนิน) ไลซีนที่ใช้ประโยชน์ได้ *in vitro* protein digestibility (IVPD) และประสิทธิภาพการใช้โปรตีนในการเจริญเติบโตของหนู มีค่าความชื้น โปรตีนรวม ไขมันรวม เยื่อใยหยาบ และถั่วไม่มี การเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นในวัตถุดิบที่ฉายรังสี โดยการฉายรังสีมีผลต่อการลดระดับกรดไฟติก แทนนิน และในขณะที่ IVPD และประสิทธิภาพการใช้โปรตีนเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญของระดับการฉายรังสี ซึ่งเปรียบเทียบกับวัตถุดิบชนิดเดียวกันที่ไม่ผ่านการฉายรังสีเป็นตัวควบคุม

การศึกษาค่าทางอาหารของเมล็ดถั่วเหลืองที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาในระดับ 5 15 30 และ 60 kGy พบว่าองค์ประกอบโดยรวมทั้งหมดของวัตถุดิบมีความคล้ายคลึงกับถั่วชนิดอื่นที่ผ่านการฉายรังสี ค่าไลซีนที่ใช้ประโยชน์ได้ ลดลง 2.8% 4.4% และ 5.5% เมื่อได้รับรังสีที่ระดับ 15 30 และ 60 kGy ตามลำดับ รวมทั้งค่ากิจกรรมของตัวยับยั้งทริปซินลดลงจาก 35.9 ถึง 9.9 UTI/g แสดง

ให้เห็นว่าที่ระดับการฉายรังสี 60 kGy ลดการกระตุ้นสารต้านโภชนาการและสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการใช้โปรตีนทั้งหมด ได้ถึง 96% จึงสรุปได้ว่าการฉายรังสีมีส่วนทำให้เมล็ดถั่วเหลืองเหมาะสมต่อการนำมาใช้ผลิตเป็นอาหารไก่ ถึงแม้จะสูญเสียไลซีนที่ใช้ประโยชน์แต่ไม่มีผลต่อคุณค่าทางอาหาร (Farg, 1998) ความเป็นไปได้ในการฉายรังสีเมล็ดถั่วเหลืองที่ระดับ 2, 4 และ 8 kGy หรือการใช้ความร้อนมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงคุณค่าทางอาหาร ซึ่งค่าสารประกอบ ฟีนอลิก มี 2.46 ถึง 10.83 mg/g สามารถยับยั้งทริปซินได้ตั้งแต่ 18.19 ถึง 71.64 UTI/g ลดปริมาณแทนนินจาก 0.01 ถึง 0.39 mg/g ตามลำดับ ผลการทดลองบ่งชี้ว่าทั้งสองวิธีนี้สามารถลดระดับสารต้านโภชนาการได้เมื่อเพิ่มการฉายรังสีและระดับการให้ความร้อน (Toledo *et al.*, 2007)

การฉายรังสีแกมมาที่ระดับ 1 ถึง 10 kGy มีผลต่อตัวยับยั้งทริปซิน ไคโมทริปซิน แอลฟา - อะไมเลสของถั่วเหลือง และเมล็ด *Moringa peregrine* มีผลต่อสารแทนนินใน ข้าวฟ่าง และสารพิษที่อยู่ในฝ้าย คือ สารกอสพิทอปอล (gossypol) ซึ่งการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยถั่วเหลือง ที่ระดับการฉายรังสี 10 kGy สามารถลดระดับตัวยับยั้งทริปซินและไคโมทริปซินได้ 34.9% และ 71.4% ตามลำดับ ในขณะที่ประสิทธิภาพการย่อยถั่วเหลืองเพิ่มขึ้นจาก 79.8 ถึง 84.2% แต่กิจกรรมของตัวยับยั้งแอลฟา-อะไมเลสใน *M. peregrine* ลดลง 43.6 และ 47.8% ในระดับการฉายรังสีที่ 7 และ 10 kGy ตามลำดับ การฉายรังสีนี้สามารถลดปริมาณแทนนินได้อย่างมีนัยสำคัญในข้าวฟ่างสายพันธุ์ Shahlila แต่ไม่สามารถลดปริมาณแทนนินในสายพันธุ์ Hemaira โดยปริมาณของสารกอสพิทอปอลจะลดลงเพียงเล็กน้อยในเมล็ดฝ้ายที่ฉายรังสี อย่างไรก็ตามการฉายรังสีในระดับที่เพิ่มขึ้นจะช่วยให้ปริมาณของสารกอสพิทอปอลลดลงมากขึ้นด้วย (Abu-Tarboush, 1998) เช่นเดียวกับ (Viljanen, 2005) ที่ศึกษาผลการฉายรังสีแกมมาที่ระดับ 20 kGy ในเมล็ดถั่วเหลืองสามารถเพิ่มอัตราการเจริญเติบโต และมีผลต่อประสิทธิภาพการเปลี่ยนแปลงอาหารที่ได้รับเข้าไปในแกะบาร์บารีอายุ 3 ถึง 4 เดือน ซึ่งระดับเมตาบอลิซึมในเลือดและทั้งความเข้มข้นของกลูโคส คอเลสเตอรอล non-esterified fatty acid (NEFA), แอมโมเนีย ( $\text{NH}_3$ ) และยูเรีย ไม่มี การเปลี่ยนแปลงเมื่อได้รับวัตถุดิบอาหารชนิดนี้เข้าไปในร่างกาย จึงคาดว่าทำให้อาหารเมล็ดถั่วเหลืองที่ผ่านการฉายรังสีนั้นมีประโยชน์ต่อสัตว์ที่ได้รับ (Stajner *et al.*, 2007) ทำการศึกษาระดับการฉายรังสีแกมมา 1 ถึง 10 kGy ที่ส่งผลต่อสารประกอบ ฟีนอลิก ปริมาณแทนนิน lipid peroxidation ความเข้มข้นการเกิดออกซิเดชันของโปรตีนและปริมาณโปรตีนในเมล็ดถั่วเหลืองโดยใช้วิธี Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) และ 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazil radical (DPPH) สำหรับตรวจหาความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิก โดยรวมและปริมาณแทนนินกับ DPPH scavenger activity เพิ่มขึ้นในขณะที่ความเข้มข้นการเกิดออกซิเดชันของโปรตีนกับลดลงเมื่อระดับการฉายรังสีเพิ่มขึ้น

ทำให้การฉายรังสีแกมมามีผลต่อการเปลี่ยนแปลง ลิปิด เปอร์ออกซิเดส (lipid peroxidation) และ ปริมาณของโปรตีน ความเข้มข้น การเกิดออกซิเดชันของโปรตีน ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อฉายรังสี ที่ระดับ 10 kGy ผลที่เกิดขึ้นนี้เกี่ยวพันกับการเพิ่มปริมาณ สารต้านอนุมูลอิสระ และความคงตัวของ โปรตีนที่เกิดขึ้นในเมล็ดถั่วเหลืองและเพิ่มขึ้นเมื่อได้ผ่านการฉายรังสีแกมมา วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ ได้จากพืช เช่น เมล็ดถั่วต่างๆ และ กากงาอัดน้ำมัน รวมถึงใบพืชป่าน ความเข้มข้นของโปรตีนในใบ และรากและหัวป่าน ที่เป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตอาหารปลาซึ่งถูกจำกัดโดยสารต้านโภชนาการต่างๆ เช่น ตัวยับยั้งโปรตีน ไฟเตส กลูโคซิโนเลต ซาโปนิน เลคติน แทนนิน โอลิโกแซคคาไรด์ และ non-starch polysaccharides ไฟโตรเอสโตรเจน แอลคา-ลอยด์ antigenic compounds กอสวิสปอล ไชยาโนเจนส์ มิโมซิน ไซโคลโพรพีนอยด์ แพลตตี แอซิดคานาวานิน สารต้านวิตามิน และฟอรับอล เอสเทอร์ ซึ่งสารต้านโภชนาการสามารถลดปริมาณลงได้ด้วยการใช้ความร้อนและเอนไซม์ (Francis *et al.*, 2001) ส่วนผลจากการศึกษาปริมาณของจุลินทรีย์ในวัตถุดิบที่ได้จากพืชมี ซึ่ง เหมาะสมใน การบริโภคของมนุษย์ (Khattak *et al.*, 2009) โดยการฉายรังสีแกมมาในตัวอย่าง rhizome (*Nelumbo nucifera*) สำหรับกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ กระบวนการฉายรังสีที่ระดับ 1 2 4 และ 6 kGy เปรียบเทียบกับ ตัวอย่างควบคุมที่มีเชื้อจุลินทรีย์ที่วิเคราะห์ปริมาณการลดจุลินทรีย์ องค์ประกอบทางโภชนาการ วัตถุประสงค์ ปริมาณฟีนอลิก และวัดกิจกรรม 1, 1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) scavenging พบว่า การฉาย รังสีแกมมามีผลในการลดปริมาณจุลินทรีย์อย่างมีนัยสำคัญ และยืดอายุการเก็บรักษาของตัวอย่างที่ ฉายรังสี ปริมาณการสลายจุลินทรีย์และปริมาณฟีนอลิกจะเพิ่มขึ้นตามระดับการฉายรังสี นอกจากนี้ การฉายรังสีแกมมายังเพิ่มค่า DPPH scavenging activity ได้ด้วย

Al-Masri (1998) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงค่าไนโตรเจน (N) ประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนใน หลอดทดลอง (*in vitro* digestible crude protein, IVDCP) ประสิทธิภาพการย่อยสารอินทรีย์ใน หลอดทดลอง (*in vitro* apparent organic matter digestibility, IVOMD) ปริมาณเยื่อใยและ องค์ประกอบของ cell-wall (Neutral-detergent fiber, NDF Acid-detergent fiber, ADF Acid-detergent lignin, ADL) ภายใต้ผลที่เกิดขึ้น คือ 1) การทำให้แห้งด้วยความร้อน 175°C 10 นาที และ ทำให้แห้งที่ความร้อน 55°C นาน 5 วัน 2) การฉายรังสีแกมมาที่ระดับต่างๆกัน (0 10 50 100 150 kGy) พบว่า ค่า NDF และ ADF (7%) CF และ IVDCP (13%) และ N (16%) มีปริมาณลดลงอย่างมี นัยสำคัญ ซึ่งเป็นผลจากการทำให้แห้งด้วยความร้อนที่กล่าวมาข้างต้น และค่า NDF และ ADF (6%), CF (12%) มีปริมาณลดลง และค่า IVOMD เพิ่มขึ้น 13% โดยเป็นผลมาจากการฉายรังสีแกมมาที่ ระดับ 100 kGy เมื่อเปรียบเทียบกับตัวควบคุม การฉายรังสีแกมมาไม่มีผลต่อ N, ADL และ IVDCP และเมื่อทดลองโดยการทำให้แห้งและการฉายรังสีผล ปรากฏว่า สามารถลดระดับความเข้มข้นของ

NDF, ADF และ ADL และสามารถเพิ่มค่า IVOMD ได้มากขึ้น การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของค่าประสิทธิภาพการย่อยสารอินทรีย์ในหลอดทดลอง (IVOMD) และประสิทธิภาพพลังงานในการใช้ย่อยในหลอดทดลอง (IVDE) ของ wheat straw (WS), cotton seed shell (CSS), peanut shell (PS), soybean shell (SS), extracted olive cake (EOC) และ extracted unpeeled sunflower seeds (ESS) ภายหลังจากผ่านการฉายรังสีในระดับของการฉายรังสีแกมมาที่แตกต่างกัน คือ 0, 100, 150, 200 kGy (Al-Masri, 1999) พบว่า ค่า IVOMD และ IVDE เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทุกระดับการฉายรังสีในตัวอย่าง และการศึกษาการฉายรังสีแกมมาที่มีต่อปัจจัยด้านสารโคชนาการ (ตัวยับยั้งทริปซิน Trypsin inhibitor, TI) กรดไฟติก และโอลิโกแซคคาไรด์ ของถั่วปากอ้า เมล็ดถั่วฉายรังสีที่ระดับ 0 2.5 5 7.5 และ 10 kGy ตามลำดับ โดยใช้การฉายรังสีแกมมาโคบอลต์ 60 ด้วยอัตราระดับ 2.37 kGy ต่อชั่วโมง สามารถลดค่า TI ได้ 4.5% 6.7% 8.5% และ 9.2% ที่ระดับการฉายรังสี 2.5 5 7.5 และ 10 kGy ตามลำดับ ในขณะที่การฉายรังสีที่ระดับ 10.2 12.3 15.4 และ 18.2 kGy สามารถลดปริมาณกรดไฟติก ซึ่งโอลิโกแซคคาไรด์ที่ทำให้เกิดการท้องอืดท้องเฟ้อสามารถลดปริมาณลงเมื่อเพิ่มระดับการฉายรังสี องค์ประกอบทางเคมี (โปรตีน ไขมัน เถ้า และคาร์โบไฮเดรต) ที่ถูกตรวจสอบภายหลังจากการฉายรังสีพบว่าไม่มีผลต่อองค์ประกอบทางเคมี นอกจากนี้ Casare *et al.*, (2004) ได้ใช้โครมาตินเป็นโมเดลในการตรวจสอบการฉายรังสีแกมมาที่มีผลต่อโครงสร้างของโพลีเปปไทด์ ตัวอย่างสารพิษจะถูกฉายรังสีที่ระดับ 400 2000 หรือ 10,000 kGy ที่ 5.17 kGy ต่อชั่วโมงในการฉายรังสีแกมมาโคบอลต์ 60 ภายหลังจากการฉายรังสีแกมมา ตัวอย่างถูกตรวจสอบด้วย solvent-mediated quenching และ UV spectroscopy ซึ่งผลทำให้โครงสร้างภายในโครมาตินเกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่สามารถนำไปพัฒนาการยับยั้งการเกิด myotoxic activity ในกล้ามเนื้อได้

## 7. ศึกษาลักษณะความแตกต่างของ Trypsin isoforms แต่ละช่วงอายุของปลานิล

Berndtson *et al.* (1988) ได้ศึกษากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสในปลา Brook Trout (*Salvelinus fontinalis*) ที่ follicle wall โดยใช้วิธี Substrate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis พบว่า เอนไซม์โปรติเอส ทั้ง 6 ชนิดมีขนาดน้ำหนักโมเลกุลที่ (78 70 67 59 22 และ 20 kDa) ถูกพบเมื่อสกัด follicle wall และนำมาทำ electrophoresis แล้วบ่มในเจลที่มีเจลาติน จากเอนไซม์ทั้ง 6 ชนิดจะมีเพียง 2 เอนไซม์ (20 และ 22 kDa) ที่ปรากฏให้เห็นเมื่อสกัด follicle wall และบ่มต่อในเจลที่มีเคซีน กิจกรรมของเอนไซม์ที่ 78 70 67 และ 59 kDa ถูกยับยั้งด้วยตัวยับยั้งโปรตีนอย่างสมบูรณ์ ส่วน 22 และ 20 kDa ถูกยับยั้งด้วยตัวยับยั้งโปรตีน เซอรินเพียงอย่างเดียว ส่วนการทดลองแยกชนิดของ alkaline proteases ระหว่างระยะ larval ของgilthead sea bream, *Sparus aurata* โดยใช้ SDS-PAGE และตัว

ยับยั้งที่จำเพาะ ซึ่งวิธีนี้นำมาใช้ในการกำหนดชนิดของเอนไซม์โปรติเอสที่มีอยู่ใน rotifers, *Brachionus plicatilis* และ *Artemia nauplii* ซึ่งใช้เป็นอาหารของ larvae ที่มีโปรติเอสเทียบเท่ากับปลาตัวเต็มวัย (D'iaz *et al.*, 1997) โดยพบว่าในระหว่าง 4 สัปดาห์ trypsin-like proteases กลับลดลงในปลาตัวเต็มวัย และ Alkaline proteases ที่พบใน rotifers และ *Artemia* จะแสดงให้เห็นความแตกต่างที่ชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับ larvae ชนิดอื่น

Ahsan and Watabe (2001) ทำการทดลองซึ่งได้ทริปซินของปลา anchovy 2 ไอโซฟอร์ม คือ aT-I และ aT-II ด้วยการทำบริสุทธิ์เอนไซม์ทริปซินจากการสกัดส่วนเครื่องในปลาด้วยวิธี affinity chromatography gel filtration และ ion-exchange chromatography พบว่า homogeneity ของการแยกด้วยการทำบริสุทธิ์ ถูกตรวจสอบด้วยการทำ native- และ SDS-PAGE รวมทั้งวิธี gelatin zymography พบว่า สามารถแยกทริปซินได้เป็น aT-I และ aT-II และพิสูจน์ด้วยการทำ N-terminal amino acid sequencing ซึ่งผลที่ได้ตรงกันกับ ลำดับของกรดอะมิโนที่มาจาก molecular cloning (Ahsan *et al.*, 2000), *Marine Biotechnol.*, in press ทั้ง 2 ไอโซฟอร์มสามารถถูกยับยั้งด้วย serine protease inhibitors ที่เทียบเท่ากับการถูกยับยั้งด้วย specific trypsin inhibitors การทำบริสุทธิ์ของทริปซินในปลา anchovy แสดงให้เห็นถึงค่า catalytic efficiencies ( $K_{cat}/K_m$ ) ที่สูงกว่าทริปซินใน วัชที่วัดด้วย benzoyl-arginine *p*-nitroanilide (BAPNA) และ benzoyl-arginine ethyl ester (BAEE) ที่อุณหภูมิ 25°C ในขณะที่ การศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์โปรติเอสในงูเดินอาหารของปลา discus *Symphysodon aequifasciata* โดยใช้วิธี Casein digestion แสดงให้เห็นว่า acidic protease ที่ได้จากส่วนของกระเพาะมีค่า pH เหมาะสมอยู่ที่ pH 2.0 และ alkaline proteases ที่ได้จากส่วนของลำไส้มีค่า pH เหมาะสมอยู่ที่ pH ช่วงระหว่าง 7.5-9.0 และ 11.5-12.5 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังวิเคราะห์โดยใช้ สับสเตรทที่จำเพาะ และ pre-incubation ด้วย ตัวยับยั้งโปรตีนจำเพาะ แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของ ทริปซิน และ ไคโมทริปซิน ในกระบวนการย่อยโปรตีนการใช้วิธี SDS-PAGE โดยใช้เคซีนเป็นสับสเตรท และ ใช้ตัวยับยั้งโปรตีนจำเพาะ แสดงถึงความแตกต่างที่ชัดเจนของเอนไซม์โปรติเอสในช่วงระหว่าง 19.2-76.5 kDa (Chong *et al.*, 2002)

รูปแบบไอโซไซม์ทริปซินที่เกิดจากความผันแปรทางพันธุกรรม ในลำไส้ของปลาแซลมอน (*Salmo salar* L.) เกิดจากปัจจัยแรกที่มีผลในการเปลี่ยนแปลงประสิทธิภาพของอาหาร และการเจริญเติบโตที่ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ (Rungruangsak *et al.*, 1993) การพัฒนาการเจริญเติบโต มีความเกี่ยวข้องกับ ความหลากหลายของทริปซิน TRP-2\*92 ที่อยู่ในลำไส้ของปลาแซลมอน (*Salmo salar* L.) (Rungruangsak., 1987, 1991; Rungruangsak *et al.*, 1993) โดยพบว่า การเจริญเติบโตเกี่ยวข้องกับ

กิจกรรมของทริปซินในลำไส้ และระดับอินซูลินในพลาสมาของปลาแซลมอน (*Salmo salar* L.) และการลดระดับกิจกรรมของทริปซินสัมพันธ์กับอัตราการเพิ่มของน้ำหนัก ระดับอินซูลินในพลาสมา และการเจริญเติบโตของปลา (Rungruangsak *et al.*, 1999)



## อุปกรณ์และวิธีการ

### อุปกรณ์

#### 1. อุปกรณ์

- 1.1 เครื่องถั่ง Kjeltec TM 2100
- 1.2 เครื่องชั่งวิเคราะห์ ( analytical balance): Denver Balance, USA
- 1.3 เครื่องชั่งหาความชื้น SARTORIUS รุ่น MA 3
- 1.4 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง ( UV spectrophotometer): Cary 50 Conc, Varian, Australia
- 1.5 เครื่องวัดความเป็นกรดต่าง ( pH-meter): Seven Easy pH meter, Mattler Toledo, USA
- 1.6 เครื่อง วัดปริมาณไขมัน SOXTEC SYSTEM HT 1043 Extraction Unit
- 1.7 เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมความเย็น (refrigerated centrifuge): Hermle refrigerate centrifuge Z383K, Hermle Labortechnik GmbH, Germany
- 1.8 เครื่องผสมสาร (vortex mixer): Scientific Industries Inc., Bohemia, New York, USA
- 1.9 เครื่องอุปกรณ์จ่ายไฟ (Power supply): AE 8750, ATTO, Japan
- 1.10 เครื่อง Fast protein liquid chromatography (FPLC): AKT Aprime plus, GE Healthcare, Sweden
- 1.11 เครื่อง Freeze-dryer
- 1.12 ชุดอุปกรณ์อิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis equipment): AE 6530 ATTO, Japan
- 1.13 เตาเผาถ้ำ
- 1.14 เป้าหลอม (crucible)
- 1.15 ปิเปตต์อัตโนมัติ (autopipette): Gilson, Germany
- 1.16 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath): Memmert, Germany

## 2. สารเคมี

- 2.1 Acrylamide: Bio Basic, Canada
- 2.2 Ammonium persulphate: Ajax Finechem, Australia
- 2.3 Ammonium sulphate ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>): Bio Basic, Canada
- 2.4 Benzoyl-L-tyrosine ethyl ester (BTEE): Sigma-Adrich, USA
- 2.5 Beta-mercaptoethanol: Merck, Germany
- 2.6 Bis-Acrylamide: Bio Basic, Canada
- 2.7 Bromophenolblue: Fisher Scientific, UK
- 2.8 Calcium chloride (CaCl<sub>2</sub>): Merck, Germany
- 2.9 Coomassie brilliant blue R-250: Bio basic, Canada
- 2.10 Diethylaminoethyl cellulose (DEAE-cellulose): Phamacia Biotech, Sweden
- 2.11 Folin-Ciocalteu's phenol reagent (Fluka, Switzerland)
- 2.12 Glycerol: Ajax Finechem, Australia
- 2.13  $\alpha$ -N- $\rho$ -tosyl-L-arginyl-methyl ester (L-TAME): Sigma-Adrich, USA
- 2.14 Methanol: Ajax Finechem, Australia
- 2.15 Naphthylethylenediamine: Sigma-Adrich, USA
- 2.16 N-benzoyl-L-arginine-p-nitroanilide (BAPNA): Sigma-Adrich, USA
- 2.17 Petroleum ether: Sigma-Adrich, USA
- 2.18 Sephadex G-100: Phamacia Biotech, Sweden
- 2.19 Sodium chloride (NaCl): J. T. Baker, Malaysia
- 2.20 Sodium dodecyl sulphate (SDS): Bio Basic, USA
- 2.21 Sodium hydroxide: Merck, Germany
- 2.22 Sodium nitrite: Sigma-Adrich, USA
- 2.23 Tetramethylethylenediamine (TEMED): Bio Basic, USA
- 2.24 Trichloroacetic acid (TCA): Sigma-Adrich, USA
- 2.25 Trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS): Sigma-Adrich, USA
- 2.26 Tris (hydroxymethyl)-aminomethane: Research Organic, USA
- 2.27 Triton<sup>®</sup> X-100: USB Corporation, USA

## วิธีการ

### 1. การเก็บตัวอย่างปลานิลแปลงเพศ

ตัวอย่างปลานิลแปลงเพศ *Oreochromis niloticus* ที่แปลงมาเป็นเพศผู้ด้วยฮอร์โมน 17 $\alpha$ -methyltestosterone (MT) ตั้งแต่ระยะวัยอ่อนจนถึงตัวเต็มวัย

การทดลองที่ 1 ตัวอย่างปลานิลแปลงเพศ ได้จากการศึกษาเบื้องต้นเพื่อสร้างสูตรอาหารเลี้ยงปลานิล ได้รับความอนุเคราะห์ จากสถานีประมงน้ำจืด คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ปลานิลแปลงเพศถูกสุ่มเก็บจากแต่ละกระชังเมื่ออายุครบ 1 2 3 4 5 6 8 และ 10 เดือน

การทดลองที่ 2 ตัวอย่างปลานิลแปลงเพศ ที่ได้จากการทดลองเลี้ยงปลานิลด้วยอาหารสำเร็จรูปในห้องปฏิบัติการ ได้รับความอนุเคราะห์ จาก โรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของภาควิชาเกษตรศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา ปลานิลแปลงเพศถูกสุ่มเก็บจากแต่ละตู้ปลาอายุ 1 2 3 4 5 6 และ 7 เดือน จากนั้นบันทึกข้อมูล ความยาวมาตรฐานและน้ำหนักของตัวอย่างปลานิลแปลงเพศ

## 2. ตัวอย่างวัตถุดิบอาหารสัตว์

ตัวอย่างวัตถุดิบอาหารที่นำมาใช้ในการทดลอง ประกอบด้วยวัตถุดิบอาหารสัตว์ 13 ชนิด ตามตารางดังต่อไปนี้

ตารางที่ 2 อาหารชนิดต่างๆ ที่ใช้ในการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยของเอนไซม์ย่อยอาหารที่สกัดจากลำไส้ปลานิลแปลงเพศระยะวัยอ่อนจนถึงตัวเต็มวัย โดยวิธี *in vitro* digestibility เปรียบเทียบระหว่างวัตถุดิบที่ผ่านการฉายและไม่ผ่านฉายรังสี

วัตถุดิบแหล่งโปรตีนที่ได้จากสัตว์	วัตถุดิบแหล่งโปรตีนที่ได้จากพืช	วัตถุดิบแหล่งคาร์โบไฮเดรตที่ได้จากพืช
ปลาป่น	โปรตีนข้าวโพด	รำข้าวสาลี
เลือดป่น	กากถั่วเหลือง	รำละเอียด
เนื้อและกระดูกป่น	กากถั่วลิสง	รำหยาบ
		กากเมล็ดปาล์ม
		กากมะพร้าว
		กากมันสำปะหลัง

วัตถุดิบอาหารสัตว์แบ่งออกเป็นสองกลุ่ม คือ กลุ่มที่ไม่ผ่าน การฉายรังสี และกลุ่มที่ผ่านการฉายรังสีแกมมา (โคบอลต์-60) แบบเฉียบพลัน ที่ปริมาณรังสี 60 kGy ด้วยเครื่องฉายรังสีแกมมา Gamma cell 220 ของสำนักงานปรมาณูเพื่อสันติ อัตรารังสี 0.1748 kGy ต่อนาที

## 3. การสกัดเอนไซม์จากลำไส้ปลานิลแปลงเพศ

ลำไส้ปลานิลแปลงเพศ ที่เก็บรักษาในตู้แช่เย็นอุณหภูมิต่ำ  $-80^{\circ}\text{C}$  นำมาสกัด crude enzyme extract ในหลอดเซนต์ปีฟส์ ขนาด 15 ml โดยบดละเอียดด้วย homogenizer ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 ในระหว่างบดจะแช่ในอ่างน้ำแข็ง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 xg นาน 20 นาที อุณหภูมิ  $4^{\circ}\text{C}$  แล้วแบ่งเก็บส่วนใสที่ได้ในอุณหภูมิต่ำ  $-80^{\circ}\text{C}$  เพื่อใช้เป็น crude enzyme extract สำหรับตรวจสอบสถานะที่เหมาะสมต่อการแสดงกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ย่อยอาหาร และความสามารถในการย่อยอาหารชนิดต่างๆ โดยวิธี *in vitro* digestibility เมื่อต้องการใช้งาน crude enzyme จะถูก

นำมา dialyze เพื่อกำจัดเกลือที่มากเกินไป โดยนำเอนไซม์ที่ได้ไป โดอะไลซิสข้ามคืน ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 10 mM pH 7 ที่อุณหภูมิ 4<sup>0</sup>C และ crude enzyme ที่ได้จากการสกัด เก็บรักษาในตู้แช่เย็นที่อุณหภูมิ -80<sup>0</sup>C

#### 4. การศึกษาประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนในวัตถุดิบอาหารสัตว์ โดยใช้เอนไซม์ที่สกัดจากระบบย่อยอาหารของปลานิลทุกช่วงอายุที่ทำการศึกษา โดยวิธี *in vitro* digestibility ดัดแปลงจากวิธีการของ Rungruangsak-Torrissen *et al.* (2000)

4.1 นำวัตถุดิบอาหารสัตว์ มาบดละเอียดโดยใช้ Homogenizer หรือ Blender (แช่ในน้ำแข็งตลอดเวลาเพื่อเอนไซม์จะไม่ถูกทำลายทำให้แห้งโดยเครื่องทำแห้งแบบแช่แข็ง Freeze-dryer) แล้วเก็บในแช่แข็งเพื่อป้องกันความชื้น

4.2 การทดสอบประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนในอาหารแต่ละชนิด โดยใช้เอนไซม์ที่สกัดได้จากปลานิลแต่ละช่วงอายุ คือ 1 2 3 4 5 6 8 และ 10 เดือนทำดังนี้ ซึ่งวัตถุดิบอาหารสัตว์ (ข้อ 4.1) ในแต่ละชนิด ประมาณ 5 mg ในสารละลาย 5 ml ของ 50 mM ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8.2 ที่มี 0.5% คลอแรมฟินิคอล ผสมให้เข้ากัน บ่มและเขย่าที่อุณหภูมิ 30<sup>0</sup>C นาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเติม dialyzed crude enzyme extract ปริมาตร 50  $\mu$ l ผสมให้เข้ากัน บ่มและเขย่าที่อุณหภูมิ 30<sup>0</sup>C นาน 24 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยนำหลอดไปต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที แล้วดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ นำไปวิเคราะห์ผลผลิตของปฏิกิริยา คือ เพปไทด์สายสั้นและน้ำตาลมอลโทสตามวิธีการในข้อ 4.2.1 และ 4.2.2

ชุดควบคุม เตรียมตัวอย่างวัตถุดิบอาหารสัตว์ (ข้อ 4.2) ในแต่ละชนิด ประมาณ 5 mg ในสารละลาย 5 ml ของ 50 mM ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8.2 ที่มี 0.5% คลอแรมฟินิคอล ผสมให้เข้ากัน บ่มและเขย่าที่อุณหภูมิ 30<sup>0</sup>C นาน 24 ชั่วโมง ต้มในน้ำเดือด นาน 10 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 xg นาน 10 นาที แล้วดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ นำไปวิเคราะห์ผลผลิตของปฏิกิริยา คือ เพปไทด์สายสั้นและน้ำตาลมอลโทสตามวิธีการในข้อ 4.2.1 และ 4.2.2

4.2.1 การวิเคราะห์ปริมาณเพปไทด์สายสั้นโดยวิธี Trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS) ดูตัวอย่างส่วนใดจากข้อ 4.2 ปริมาตร 200  $\mu$ l เติม 50 mM ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8.2 ปริมาตร 1 ml และเติม 0.1% สารละลาย TNBS ปริมาตร 500  $\mu$ l แล้วบ่มในที่มืดอุณหภูมิ 60<sup>o</sup>C นาน 1 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยเติม 1 M กรดไฮโดรคลอริก ปริมาตร 500  $\mu$ l ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 420 nm เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ DL-alanine (ภาพผนวกที่ 2)

4.2.2 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลมอลโทส โดยวิธีการของ Bemfeld (1951) ดูตัวอย่างส่วนใดจากข้อ 4.2 ปริมาตร 1 ml เติม 10% สารละลาย DNS ปริมาตร 500  $\mu$ l ผสมให้เข้ากัน แล้วต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที ทำให้เย็น นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของน้ำตาลมอลโทส (ภาพผนวกที่ 3)

## 5. การวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการที่ใช้เลี้ยงปลานิลแปลงเพศ ตามวิธีการของ AOAC (2000)

การวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการที่ใช้เลี้ยงปลานิลเป็นการนำวัตถุดิบอาหารสัตว์ จากข้อ 4.1 ที่ใช้ทำการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนของเอนไซม์ที่สกัดจากปลานิลทุกช่วงอายุ มาวิเคราะห์ปริมาณ โปรตีน ไขมัน เถ้า (ash) เยื่อใย (fiber) ความชื้น (moisture) และคาร์โบไฮเดรต ดังนี้

5.1 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนตามวิธี AOAC (2000) โดยใช้เครื่องกลั่น Kjeltac<sup>TM</sup> 2100 (ภาคผนวก)

5.2 การวิเคราะห์ปริมาณไขมันตามวิธี AOAC (2000) โดยใช้เครื่อง SOXTEC SYSTEM HT 1043 Extraction Unit (ภาคผนวก)

5.3 การวิเคราะห์ปริมาณเถ้าตามวิธี AOAC (2000) (ภาคผนวก)

5.4 การวิเคราะห์ปริมาณเยื่อใยตามวิธี AOAC (2000) (ภาคผนวก)

5.5 การวิเคราะห์ปริมาณความชื้นตามวิธี AOAC (2000) โดยใช้เครื่องชั่งหาความชื้น SARTORIUS รุ่น MA 30 (ภาคผนวก)

5.6 การวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตตามวิธี AOAC (2000) (ภาคผนวก)

## 6. การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลจากการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยอาหารชนิดต่างๆของเอนไซม์ที่สกัดจากลำไส้ของปลานิลทุกช่วงอายุ นำมาหาค่าเฉลี่ย ( average) มี  $\pm$  Standard error of the mean (SEM) เป็นการประมาณค่าความคลาดเคลื่อนของค่าเฉลี่ยหารหาส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) วิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ซึ่งนำข้อมูลทั้งหมดเข้าโปรแกรม SPSS เป็นโปรแกรมเกี่ยวกับการหาค่าทางสถิติ สำหรับการวิเคราะห์ข้อมูลทางการวิจัย และกำหนดค่า P value เท่ากับ 0.05 ถ้าค่าของชุดข้อมูลทั้งสองชุดที่เปรียบเทียบมีค่าน้อยกว่า 0.05 แสดงว่าชุดข้อมูลที่เปรียบเทียบมีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95% แต่ถ้าค่า P value มีค่าน้อยกว่า 0.05 แสดงให้เห็นว่าชุดข้อมูลทั้งสองไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

## 7. ศึกษาลักษณะความแตกต่างของ Trypsin isozyme patterns จากลำไส้ปลานิลแปลงเพศ ในแต่ละช่วงอายุ โดยวิธี Substrate-gel-electrophoresis

SDS-PAGE เป็นเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสที่ใช้ในการแยกโปรตีนบนเจลพอลิอะคริลามิడ్ที่ทำให้โปรตีนเสียสภาพ โดยมีการเติมสารละลาย running buffer (เตรียมตามข้อ 6) เข้าไปภายในเจล ซึ่งมีผลทำให้การเคลื่อนที่บนสนามไฟฟ้าของโปรตีนขึ้นกับขนาดเพียงอย่างเดียว โดยมี sodium dodecyl sulfate (SDS) เป็น anionic detergent ที่มีประจุลบ ประกอบด้วยส่วนที่เป็นไม่มีขั้ว (Hydrophobic tail) และส่วนที่มีขั้ว (Hydrophilic head) ทำให้โปรตีนเปลี่ยนรูปร่างคล้ายเส้นตรง (Rod like-shape) จากการจับกันระหว่างส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic) ของโพลีเพปไทด์และโมเลกุลของ SDS บริเวณส่วนปลายของโมเลกุล SDS จะมีประจุลบอยู่มาก ประจุลบเหล่านี้จะมีการผลักกันเองของแรงระหว่างประจุลบ ทำให้สายโพลีเพปไทด์ที่ขม้วนอยู่คลายตัวออกจากกันเป็นเส้นตรง และประจุสุทธิของโปรตีนจะเป็นลบเหมือนกันหมด นอกจากนั้นยังมี beta-mercaptoethanol ซึ่งเป็นสารรีดิวซ์จะเข้าไปทำลายพันธะไดซัลไฟด์ที่จับอยู่ระหว่างหน่วยย่อยของโปรตีน ดังนั้นโปรตีน

ที่แยกได้จึงเป็นหน่วยย่อยของโปรตีน ซึ่งข้อดีสำหรับ SDS-PAGE สามารถหาน้ำหนักโมเลกุลของหน่วยย่อยโปรตีนได้โดยเทียบน้ำหนักโมเลกุลกับโปรตีนมาตรฐาน

ขั้นตอนการเตรียม Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

#### วิธีเตรียมสารเคมีสำหรับ SDS-PAGE

- 1) เตรียมสารละลาย 30% Acrylamide + 0.8% Bis- acrylamide/100 ml
  - 30% Acrylamide acrylamide 30 g
  - N,N'*-methylenebisacrylamide (BIS) 0.8 g
- 2) เตรียม 10% Amonium persulfate/1 ml
  - Amonium persulfate 100 mg
- 3) เตรียมสารละลาย Separating 1.5 M tris pH 8.8/200 ml
  - Tris base 36.3 g
- 4) เตรียมสารละลาย Stacking 0.5 M tris pH 6.8/100 ml
  - Tris base 6 g
- 5) เตรียม 6x Protein sample loading dye
 

0.5M tris pH 6.8	7 ml
Glycerol	3 ml
SDS	1 g
Bromophenol blue	1.2 mg
- 6) เตรียม 5x running buffer/1000 ml
 

0.125 M Tris base	15.1 g
0.96 M Glycine	72.0 g
0.5%w/v SDS	5 g

## 7) เตรียม 5x Staining solution/500 ml

0.5%w/v Coomassie blue R250	2.5 g
40% Methanol	200 ml
10% Acetic acid	50 ml

## 8) เตรียม Destain/1000 ml

40% Methanol หรือ ethanol	400 ml
10% Acetic acid	100 ml

วิธีเตรียมแผ่นเจลพอลิอะคริลาไมด์ชนิดโปรตีนเสียสภาพ โดยเตรียม 12% separating gel และเตรียม 5% stacking gel โดยใช้สัดส่วนดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 การเตรียมสารสำหรับ SDS-PAGE

สารเคมี	12% Separating Gel (ml)	5% Stacking Gel (ml)
30% Bis-Acrylamide	2.0	0.33
Separating buffer	1.3	-
Stacking buffer	-	0.25
10% Amonium persulfate	0.05	0.02
10% SDS	0.05	0.02
TEMED	0.002	0.002
Water	1.6	1.4
total	5.0	2.0

เตรียม separating gel 12% (ตารางที่ 2) โดยใส่แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตเป็นอันดับสุดท้าย จากนั้นจึงเท separating gel ลงไปในช่องว่างระหว่างแผ่นกระจกคู่โดยทันที (ในการทดลองใช้ชุดทำเจลพอลิอะคริลาไมด์ รุ่น AE 6530 ATTO, Japan) จนมีความสูง 5.5 เซนติเมตร จากนั้นค่อยๆ หยคน้ำกลั่นตามลงไปบนผิวเจล ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที เมื่อสังเกตเห็นรอยต่อระหว่างเจลและน้ำกลั่นอย่างชัดเจน จึงเทน้ำกลั่นออกจากเจล เตรียม stacking gel (ตารางที่ 2) หลังจากเติมแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตลงไปแล้ว เติม stacking gel ทับลงไปบน separating gel เสียขหวี (comb) เพื่อให้เกิดช่องว่างสำหรับหยดสารตัวอย่าง ปล่อยให้เจลแข็งตัวประมาณ 15 นาที จากนั้นค่อยดึงขหวีออก

## วิธีการทำอิเล็กโตรโฟรีซิส

ใส่แผ่นเจล SDS-PAGE ลงในอ่างบัฟเฟอร์ในแนวตั้ง ใส่ running buffer ลงในอ่างบัฟเฟอร์ จนท่วมแผ่นเจลทั้งปลายด้านบนและด้านล่าง หยอดสารละลายตัวอย่างซึ่งผสมกับ sample dye buffer 20  $\mu$ l ต่อหลุมลงเจล หลังจากนั้นจะผ่านกระแสไฟฟ้า ขนาด 10 มิลลิแอมป์ต่อแผ่นเจล โดยกำหนดให้ ขั้วลบอยู่ด้านบน รอจนกระทั่งแถบสีของ sample dye buffer เคลื่อนไปจนถึงระยะอีก 0.5 เซนติเมตร จากปลายล่างของเจล จึงหยุดกระแสไฟฟ้า จากนั้น แยกแผ่นเจล SDS-PAGE ออกจากแผ่นกระจก แล้วนำเจลไปแช่น้ำย้อมสีโปรตีน (staining solution) ที่ไว้ประมาณ 20 นาที และล้างสีที่ไม่จับกับ โปรตีนออกด้วยน้ำยาล้างสีโปรตีน (destaining solution) จนกระทั่งเจลใสและได้แถบโปรตีนปรากฏ อย่างชัดเจน

### 7.1 ศึกษาารูปแบบแถบโปรตีนทั้งหมดของปลานิลทุกช่วงอายุ โดยวิธี SDS-PAGE ตาม ตารางที่ 3

วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของปลานิลทุกช่วงอายุ โดยวิธีการของ Lowry *et al.* (1951) ตามภาคผนวก เพื่อให้ได้ตัวอย่างในปริมาณโปรตีนที่เท่ากันทุกหลุมของแผ่นเจลก่อนตรวจสอบด้วย SDS-PAGE จากนั้นเตรียมตัวอย่างที่ใช้คือ crude enzyme extract ผสมด้วย running buffer นำตัวอย่างไปต้มในน้ำเดือดประมาณ 20 นาที แล้วจึงนำตัวอย่างที่ผ่านการต้มไป ใส่ลงในแผ่นเจล SDS-PAGE ซึ่งแผ่นเจลจะประกอบด้วย stacking gel ความเข้มข้น 5% และ separating gel ความเข้มข้น 12% ตามวิธีของ Bollag and Edelstein (1991) จากนั้นนำแผ่นเจล SDS-PAGE ที่ทำตามหลัก ของอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยตั้งกระแสไฟฟ้าที่ 120 V ใช้เวลาประมาณ 90 นาที

### 7.2 ศึกษาลักษณะของแถบเอนไซม์ทริปซิน เพื่อดูความแตกต่างของ ไอโซไซม์ (isozymes) ในปลานิลแต่ละช่วงอายุ และหาน้ำหนักโมเลกุลที่แน่นอนของเอนไซม์ทริปซิน โดยวิธีการ Substrate-SDS-PAGE ดัดแปลงจากวิธีของ Chong *et al.* (2002)

วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของปลานิลทุกช่วงอายุ โดยวิธีการของ Lowry *et al.* (1951) ตาม ภาคผนวก เพื่อให้ได้ตัวอย่างในปริมาณโปรตีนที่เท่ากันทุกหลุมของแผ่นเจลก่อนทำ SDS-PAGE จากนั้นเตรียมตัวอย่างที่ใช้คือ crude enzyme extract ผสมด้วย running buffer ที่ไม่เติม beta-mercaptoethanol และไม่ต้มตัวอย่าง จากนั้นนำตัวอย่าง ใส่ลงในแผ่นเจล SDS-PAGE ซึ่งแผ่นเจลจะ

ประกอบด้วย stacking gel ความเข้มข้น 5% และ separating gel ที่ความเข้มข้น 12% ตามวิธีของ Bollag and Edelstein (1991) แล้วนำแผ่นเจล SDS-PAGE ที่ทำตามหลักของอิลีคโตโฟลิซิส โดยตั้งกระแสไฟฟ้าที่ 120 V ใช้เวลาประมาณ 90 นาที แล้วจึงนำแผ่นเจล SDS-PAGE ที่ทำเสร็จแล้วมาบ่มกับ สารละลายสับสเตรท 5 mM tosyl arginine methyl ester (TAME) ที่เป็นสับสเตรทสำหรับ เอนไซม์ทริปซิน เตรียมความเข้มข้นตามวิธีการหารูปแบบไอโซไซม์ทริปซิน (Trypsin isozyme patterns) โดยวิธี isoelectric focusing ของ Rungruangsak-Torrissen (1984) ประมาณ 15-30 นาที ที่อุณหภูมิ 25-30°C

## 8. ศึกษาการแยกบริสุทธิ์โปรตีนทริปซิน

### 8.1 การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

การ ตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือความเข้มข้นสูง อาศัยหลักการ คือ เมื่อเติมเกลือลงไป ในสารละลายโปรตีนเรื่อยๆ เกลือจะเพิ่ม ionic strength ของสารละลายให้สูงขึ้น จนถึงระดับหนึ่ง ที่ไอออนเกลือเข้าไปแทนที่โมเลกุลน้ำที่ล้อมรอบโมเลกุลโปรตีน คือ เกิดแรงกิริยาทางไฟฟ้าระหว่าง โมเลกุลโปรตีนกับโมเลกุลเกลือมากกว่าโมเลกุลของน้ำ มีผลทำให้ความสามารถในการละลายน้ำ ของโปรตีนลดลง และเกิดการตกตะกอนโปรตีนลงมา เนื่องจากแรงกิริยาทางไฟฟ้าระหว่างโปรตีน กับน้ำลดลง ส่วนไม่ชอบน้ำบนโมเลกุลโปรตีนจึงเข้ามารวมตัวกันด้วยแรงปฏิสัมพันธ์ไฮโดรโฟบิก เกิดเป็นกลุ่มก้อน โปรตีนที่มีขนาดใหญ่ขึ้นเมื่อน้ำหนักสะสมเพิ่มขึ้น ก็เกิดการตกตะกอนลงมา เรียกปรากฏการณ์นี้ว่า “salting out” เกลือที่นิยมใช้กันมากที่สุด คือแอมโมเนียมซัลเฟต เนื่องจากเกลือ ชนิดนี้มีค่าการละลายน้ำสูง และมีค่าสัมประสิทธิ์อุณหภูมิของการละลายค่อนข้างต่ำ ( temperature coefficient of solubility) คือ ในช่วง 0-30°C ทำให้สามารถใช้ในการตกตะกอนโปรตีนที่อุณหภูมิต่ำได้ โดยไม่เกิดการสลายตัวของโครงสร้างโปรตีนหรือเอนไซม์ที่สลายตัวได้ง่ายที่อุณหภูมิสูง

นำ crude enzyme ที่สกัดได้จากลำไส้ของปลานิลแปลงเพศ อายุ 7 เดือน ตามวิธี ข้อ 3. ทำการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นอิ่มตัวด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ช่วงต่างๆ ดังนี้คือ 0-20% 20-40% 40-60% และ 60-80%

8.1.1 วัดปริมาณ crude enzyme ที่นำมาตกตะกอนโปรตีน คำนวณปริมาณเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่จะเติมลงไปในช่วงความเข้มข้นอิ่มตัวแอมโมเนียมซัลเฟต-20% ตามภาคผนวก เริ่มทำการตกตะกอนโปรตีนโดยเติมแอมโมเนียมซัลเฟตใน crude enzyme อย่างช้าๆ พร้อมทั้งคนเบาๆ ด้วยเครื่องกวนแท่งแม่เหล็ก ที่อุณหภูมิ 4°C จนเกลือละลายหมด หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 30 นาที แยกส่วนใสออกจากตะกอน

8.1.2 นำส่วนใสวัดปริมาณ และคำนวณช่วง % แอมโมเนียมซัลเฟตที่จะทำการตกตะกอนโปรตีน โดยทำเช่นเดียวกับวิธีการในข้อ 8.1.1 ทำการตกตะกอนโปรตีนในช่วงความเข้มข้นอิ่มตัวแอมโมเนียมซัลเฟต 20-40% 40-60% และ 60-80% ตามลำดับ

8.1.3 นำตะกอนที่ได้ทั้ง 4 ส่วน คือช่วงความเข้มข้นอิ่มตัวแอมโมเนียมซัลเฟต 0-20% 20-40% 40-60% และ 60-80% ตามลำดับ ละลายและไดอะไลส์เพื่อแยกเอาเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตออก ด้วยบัฟเฟอร์ที่มี (10 mM Tris-HCl pH 8 และ 1 mM CaCl<sub>2</sub>) ซึ่งเป็นบัฟเฟอร์เริ่มต้น (Starting buffer, SB) ที่อุณหภูมิ 4°C จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 30 นาที เก็บเฉพาะส่วนใส วัดปริมาณสารละลาย ตรวจวัดปริมาณโปรตีน ตามวิธี Lowry *et al.* (1951) ตามภาคผนวก(ก) และกิจกรรมของเอนไซม์ทริปซิน ตามวิธีข้อ 8.4 ของแต่ละส่วน ซึ่งจะนำส่วนที่มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ทริปซินสูงที่สุด ไปทำให้บริสุทธิ์ต่อโดยคอลัมน์โครมาโตกราฟี

8.2 การแยกเอนไซม์ทริปซินให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโตกราฟี ผ่านคอลัมน์ Sephadex G-100

เทคนิคเจลฟิльтраชันโครมาโตกราฟี (gel filtration chromatography) หรือ Size exclusion เป็นเทคนิคที่ใช้แยกสารต่างๆออกจากกัน โดยอาศัยความแตกต่างกันของขนาดโมเลกุลของสาร เทคนิคแบบนี้ประกอบด้วย ส่วนเคลื่อนที่ (mobile phase) คือตัวทำละลายหรือบัฟเฟอร์ กับ ส่วนคงที่ (stationary phase) คือ เม็ดเจลซึ่งมีลักษณะเป็นรูพรุน ที่ยอมให้สารขนาดโมเลกุลเล็กผ่านเข้าไปในเจลได้ดีกว่าสารโมเลกุลขนาดใหญ่ ดังนั้นเมื่อถูกชะด้วยตัวทำละลาย สารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กจึงถูกชะออกจากคอลัมน์ได้ช้ากว่าสารโมเลกุลขนาดใหญ่ ซึ่งเป็นเพราะสารโมเลกุลขนาดเล็กจะใช้เวลานานในการผ่านเข้าไปตามรูพรุนของเม็ดเจล ในขณะที่สารโมเลกุลขนาดใหญ่จะผ่าน

เข้าไปในรูพรุนของเจลได้เฉพาะด้านนอกของเจลหรือผ่านไม่ได้เลย ดังนั้นจึงถูกชะออกจากคอลัมน์ก่อนสารโมเลกุลขนาดเล็ก

นำสารละลายเอนไซม์ ที่มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่รีปซินสูงที่สุด จากข้อ 8.1.3 นำมาผ่านลงในคอลัมน์ Sephadex G-100 ละเอียดด้วย SB ด้วยอัตราการไหลคงที่ 0.5 ml/hr แยกเก็บสารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์หลอดละ 1.5 ml ติดต่อกันด้วยเครื่องเก็บแยกส่วนแล้วนำสารละลายที่ได้แต่ละหลอดมาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 280 nm และวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่รีปซินตามวิธีข้อ 8.4 รวมหลอดที่มีกิจกรรมเอนไซม์ที่รีปซิน ไปทำให้บริสุทธิ์ต่อโดย Fast Flow Protein Liquid Chromatography (FFPLC) ด้วยคอลัมน์ Q-sepharose

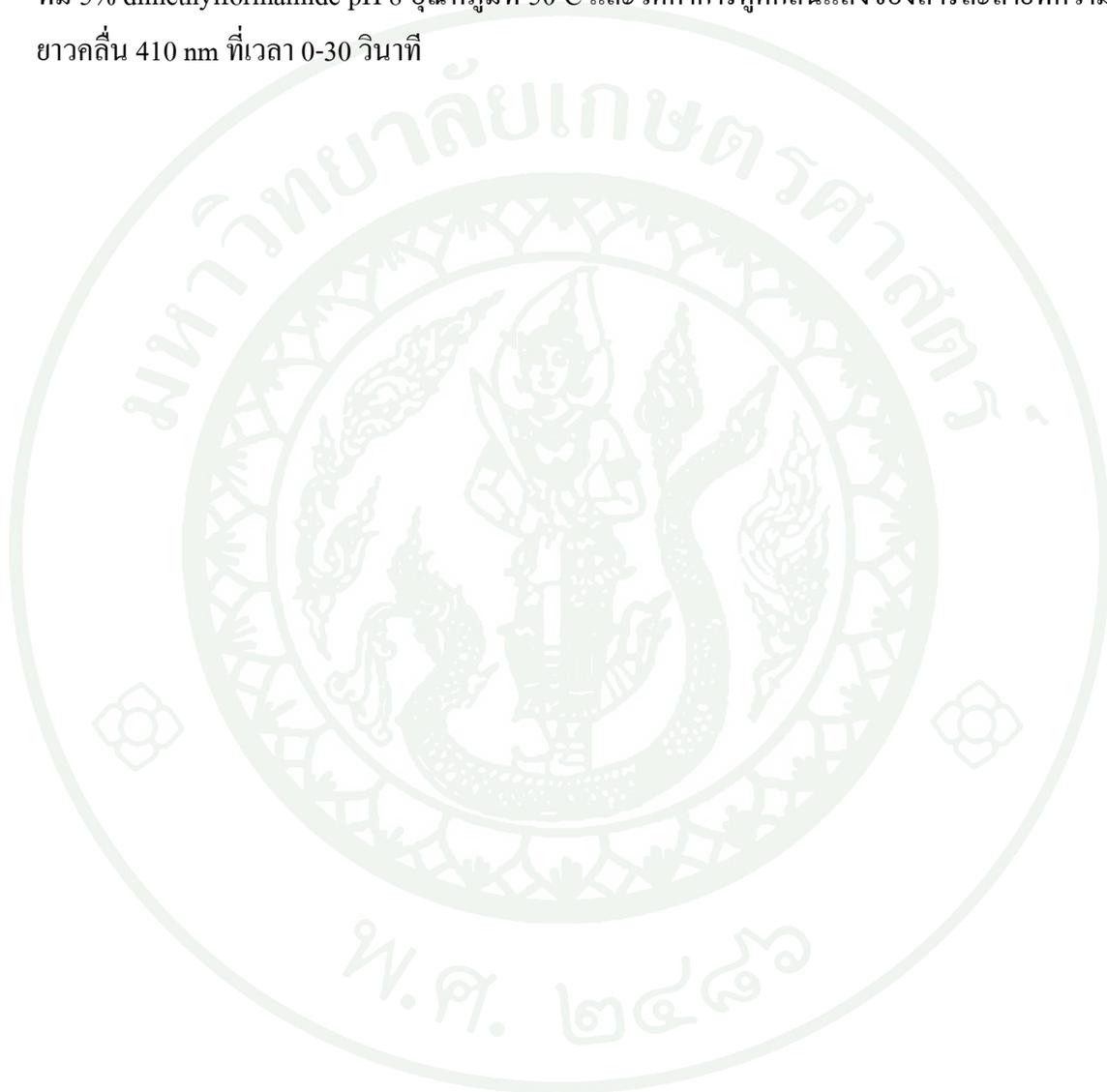
### 8.3 การแยกเอนไซม์ที่รีปซินให้บริสุทธิ์โดย Fast Flow Protein Liquid Chromatography (FFPLC) ผ่านคอลัมน์ Q-sepharose

โครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (ion-exchanger chromatography) มีการแยกสารต่างๆ โดยอาศัยความแตกต่างกันของประจุบนโมเลกุล ประกอบด้วยส่วนเคลื่อนที่ซึ่งเป็นสารละลายหรือบัฟเฟอร์ กับส่วนคงที่ซึ่งเป็นของแข็งที่มีประจุที่เรียกว่า ตัวแลกเปลี่ยนประจุ (ion exchanger) การแยกสารโดยวิธีนี้เกิดขึ้น 2 ขั้นตอน คือ 1) เกิดการจับกันระหว่างสารตัวอย่างกับตัวแลกเปลี่ยนประจุซึ่งมีประจุตรงข้ามกัน ส่วนสารที่ประจุตรงกับตัวแลกเปลี่ยนประจุก็จะถูกชะออกไปด้วยบัฟเฟอร์ 2) สารที่จับกับตัวแลกเปลี่ยนประจุจะถูกชะออกจากคอลัมน์โดยมีอัตราเร็วในการหลุดจากการชะออกที่แตกต่างกัน โดยขึ้นอยู่กับแรงยึดเหนี่ยวของสารแต่ละชนิดกับตัวแลกเปลี่ยนประจุ เนื่องจากมีประจุสุทธิบนโมเลกุลที่แตกต่างกันของโปรตีน ความจำเพาะดังกล่าวนี้สามารถควบคุมการเปลี่ยนแปลงได้ โดยการเปลี่ยนค่าพีเอช หรือค่า ionic strength ของสารละลายในระบบ จึงสามารถแยกโปรตีนชนิดที่ต้องการ ออกจากสารละลายโปรตีนผสมได้

รวมหลอดสารละลายที่มีกิจกรรมเอนไซม์ที่รีปซิน จากข้อ 8.2 ไปทำให้บริสุทธิ์ต่อโดย Fast Flow Protein Liquid Chromatography (FFPLC) ด้วยคอลัมน์ Q-sepharose ซึ่งเป็น anion-exchanger โดยใช้เครื่อง FFPLC ชะโปรตีนส่วนที่ไม่จับกับคอลัมน์ออกด้วย SB ที่มี 1 M NaCl อัตราการไหลคงที่ 0.5 ml/hr แยกเก็บสารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์หลอดละ 1.5 ml โดยนำหลอดส่วนของ flow through และ peak ที่เกิดขึ้น ศึกษาารูปแบบของแถบโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE และวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่รีปซิน ตามวิธีข้อ 8.4

8.4 วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินตามวิธีการของ Sunde *et al.* (2001) โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Torrissen *et al.* (1994) ดังนี้

เตรียมสารละลายสับสเตรท คือ 1.25 mM N-benzoyl-L-arginine-*p*-nitroanilide (BAPNA) ที่มี 5% dimethylformamide pH 8 อุณหภูมิที่ 50<sup>0</sup>C และวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 410 nm ที่เวลา 0-30 วินาที



## ผลและวิจารณ์

### ผล

#### 1. การศึกษาประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรตและโปรตีน ในวัตถุดิบอาหารสัตว์ โดยเอนไซม์ ที่สกัดจากลำไส้เล็กปลานิลแปลงเพศ ระยะวัยอ่อนจนถึงตัวเต็มวัย โดยวิธี *in vitro digestibility* ตัดแปลงจากวิธีการของ Rungruangsak-Torrissen *et al.* (2000)

จากการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยวัตถุดิบอาหาร โดยใช้เอนไซม์สกัดจากปลานิลอายุ 1-5 6 8 และ 10 เดือน ซึ่งได้ตัวอย่างจากการทดลองที่ 1 โดยเปรียบเทียบ ประสิทธิภาพการย่อยโปรตีน ของเอนไซม์ ทริปซิน และเปรียบเทียบ ประสิทธิภาพการย่อย คาร์โบไฮเดรตของเอนไซม์อะไมเลส พบว่า วัตถุดิบอาหารบางชนิดที่ผ่านการฉายรังสี และไม่ผ่านการฉายรังสีจะมีคุณสมบัติในการถูกย่อยแตกต่างกัน ซึ่งแสดงถึงความแตกต่างทั้งคุณภาพของโปรตีน และคาร์โบไฮเดรตของวัตถุดิบอาหารแต่ละชนิด และยังแสดงให้เห็นความแตกต่างในประสิทธิภาพการย่อยวัตถุดิบอาหารของปลานิลที่มีอายุต่างกัน

ปลานิลแปลงเพศอายุ 1 เดือน ประสิทธิภาพการย่อยโปรตีน ของวัตถุดิบอาหารที่ผ่านกระบวนการฉายรังสี พบว่า ย่อย ปลาป่น ได้ดีที่สุดใน รองลงมา คือ กากถั่วเหลือง กากถั่วลิสง รำหยาบ และรำละเอียด ตามลำดับ และประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรตของวัตถุดิบอาหารที่ผ่านกระบวนการฉายรังสี พบว่า ย่อย กากมะพร้าว ได้ดีที่สุดใน รองลงมา คือ รำละเอียด กากถั่วลิสง ปลาป่น สไปรูลิน่า และกากถั่วเหลือง ตามลำดับ (ภาพที่ 5)

ปลานิลแปลงเพศอายุ 2 เดือน ประสิทธิภาพการย่อยโปรตีน ของวัตถุดิบอาหารที่ผ่านกระบวนการฉายรังสี พบว่า ย่อย กากถั่วเหลือง ได้ดีที่สุดใน รองลงมา คือ โปรตีนข้าวโพด ปลาป่น รำข้าวสาลี และกากมันสำปะหลัง ตามลำดับ และประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรตของวัตถุดิบอาหารที่ผ่านกระบวนการฉายรังสี พบว่า ย่อยรำละเอียด ได้ดีที่สุดใน รองลงมา คือ กากถั่วเหลือง ปลาป่น โปรตีนข้าวโพด และรำข้าวสาลี ตามลำดับ (ภาพที่ 6)

ปลานิลแปลงเพศอายุ 3 เดือน ประสิทธิภาพการย่อยโปรตีน ของวัตถุดิบอาหารที่ผ่านกระบวนการฉายรังสี พบว่า ย่อย เนื้อและกระดูกป่น ได้ดีที่สุด รองลงมา คือ ปลาป่น สไปรูลิน่า กากถั่วเหลือง และกากเมล็ดปาล์ม ตามลำดับ และประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรต ของวัตถุดิบอาหารที่ผ่านกระบวนการฉายรังสี พบว่า ย่อย ปลาป่น ได้ดีที่สุด รองลงมา คือ สไปรูลิน่า รำละเอียด รำหยาบ และกากเมล็ดปาล์ม ตามลำดับ (ภาพที่ 7)

ปลานิลแปลงเพศอายุ 4 เดือน ประสิทธิภาพการย่อยโปรตีน ของวัตถุดิบอาหารที่ผ่านกระบวนการฉายรังสี พบว่า ย่อย กากถั่วเหลือง ได้ดีที่สุด รองลงมา คือ ปลาป่น กากถั่วลิสง เนื้อและกระดูกป่น และกากมะพร้าว ตามลำดับ และประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรตของวัตถุดิบอาหารที่ผ่านกระบวนการฉายรังสี พบว่า ย่อย รำหยาบ ได้ดีที่สุด รองลงมา คือ กากถั่วเหลือง กากมันสำปะหลัง กากมะพร้าว และปลาป่น ตามลำดับ (ภาพที่ 8)

ปลานิลแปลงเพศอายุอายุ 5 เดือน ประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนของวัตถุดิบอาหารที่ผ่านกระบวนการฉายรังสี พบว่าย่อย กากถั่วเหลือง ได้ดีที่สุด รองลงมา คือ กากถั่วลิสง เนื้อและกระดูกป่น ปลาป่น ละเอียด และกากมะพร้าว ตามลำดับ และประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรตของวัตถุดิบอาหารที่ผ่านกระบวนการฉายรังสี พบว่า ย่อยกากถั่วลิสง ได้ดีที่สุด รองลงมา คือ ปลาป่น กากถั่วเหลือง รำละเอียด และ รำหยาบ ตามลำดับ (ภาพที่ 9)

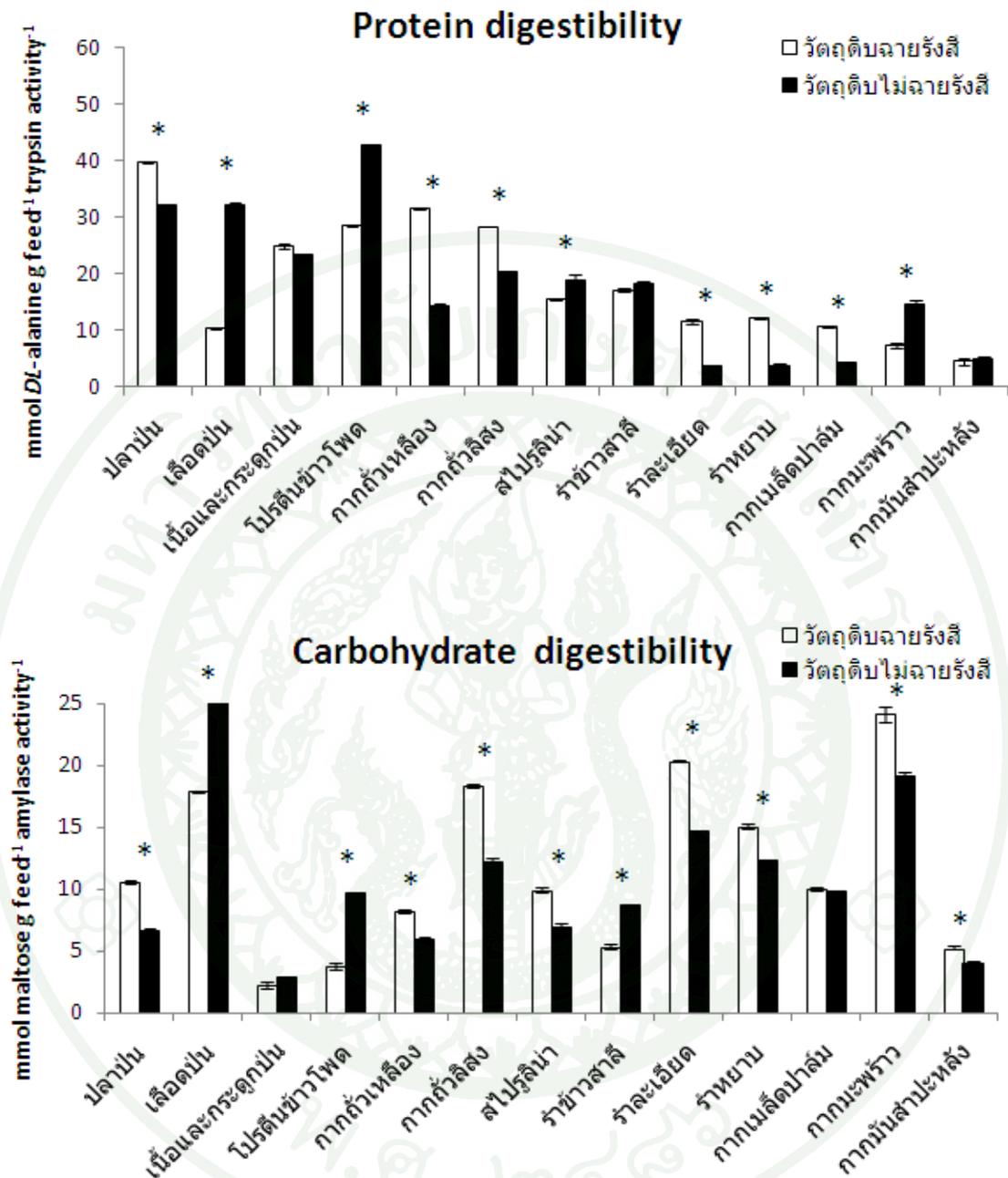
ปลานิลแปลงเพศอายุอายุ 6 เดือน ประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนของวัตถุดิบอาหารที่ผ่านกระบวนการฉายรังสี พบว่า ย่อย ปลาป่น ได้ดีที่สุด รองลงมา คือ กากถั่วลิสง กากถั่วเหลือง โปรตีนข้าวโพด และกากมะพร้าว ตามลำดับ และประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรต ของวัตถุดิบอาหารที่ผ่านกระบวนการฉายรังสี พบว่า ย่อย กากถั่วเหลืองได้ดีที่สุด รองลงมา คือ ปลาป่น รำละเอียด กากมันสำปะหลัง และโปรตีนข้าวโพด ตามลำดับ (ภาพที่ 10)

ปลานิลแปลงเพศอายุอายุ 8 เดือน ประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนของวัตถุดิบอาหารที่ผ่านกระบวนการฉายรังสี พบว่า ย่อย กากถั่วเหลือง ได้ดีที่สุด รองลงมา คือ ปลาป่น เนื้อและกระดูกป่น กากมะพร้าว โปรตีนข้าวโพด และรำข้าวสาลี ตามลำดับ และประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรตของวัตถุดิบอาหารที่ผ่านกระบวนการฉายรังสี พบว่า ย่อย กากถั่วเหลืองได้ดีที่สุด รองลงมา คือ ปลาป่น กากมันสำปะหลัง รำละเอียด และกากมะพร้าว ตามลำดับ (ภาพที่ 11)

ปลานิลแปลงเพศอายุอายุ 10 เดือน ประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนของวัตถุดิบอาหารที่ผ่านกระบวนการฉายรังสี พบว่าย่อย ปลาป่น ได้ดีที่สุด รองลงมา คือ เนื้อและกระดูกป่น และกากถั่วเหลือง ตามลำดับ และประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรต ของวัตถุดิบอาหารที่ผ่านกระบวนการฉายรังสี พบว่า ย่อย รำละเอียด ได้ดีที่สุด รองลงมา คือ กากถั่วลิสง กากมันสำปะหลัง กากถั่วเหลือง ปลาป่น และรำหยาบ ตามลำดับ (ภาพที่ 12)

เมื่อศึกษาผลรวมตลอดการทดลองของประสิทธิภาพการย่อยวัตถุดิบอาหาร 3 ชนิด เปรียบเทียบระหว่างวัตถุดิบที่ผ่านการฉายรังสีกับวัตถุดิบอาหารชนิดเดียวกันที่ไม่ผ่านการฉายรังสีโดยใช้เอนไซม์ที่สกัดได้จากลำไส้ปลานิลแปลงเพศอายุ 1-5 6 8 และ 10 เดือน พบว่า การฉายรังสีจะเพิ่มประสิทธิภาพของการย่อยโปรตีนของปลาป่น กากถั่วเหลือง กากถั่วลิสง รำละเอียด รำหยาบ กากเมล็ดปาล์ม กากมะพร้าว และกากมันสำปะหลัง แต่ลด ประสิทธิภาพของเลือดป่น และ โปรตีนข้าวโพด อย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) (ภาพที่ 13) สำหรับการย่อยคาร์โบไฮเดรต พบว่า การฉายรังสีจะเพิ่มประสิทธิภาพของ ปลาป่น กากถั่วเหลือง กากถั่วลิสง รำละเอียด รำหยาบ กากมะพร้าว และกากมันสำปะหลัง แต่ลดประสิทธิภาพของ เลือดป่นเนื้อและกระดูกป่นสไปรูลิน่า และกากเมล็ดปาล์ม อย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) (ภาพที่ 14) เมื่อพิจารณาผลรวมของอัตราส่วนการย่อยโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตของวัตถุดิบอาหารทั้ง 13 ชนิด (ภาพที่ 15) พบว่า วัตถุดิบอาหารส่วนใหญ่เมื่อผ่านการฉายรังสี ส่งผลให้อัตราส่วนของการย่อยโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตลดลง โดยจะลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) ในปลาป่น เลือดป่น โปรตีนข้าวโพดกากถั่วเหลือง รำละเอียด กากเมล็ดปาล์ม และกากมันสำปะหลัง ยกเว้นสไปรูลิน่า และกากมะพร้าว ที่เมื่อผ่านการฉายรังสีแล้ว อัตราส่วนของการย่อยโปรตีนและคาร์โบไฮเดรต จะเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ )

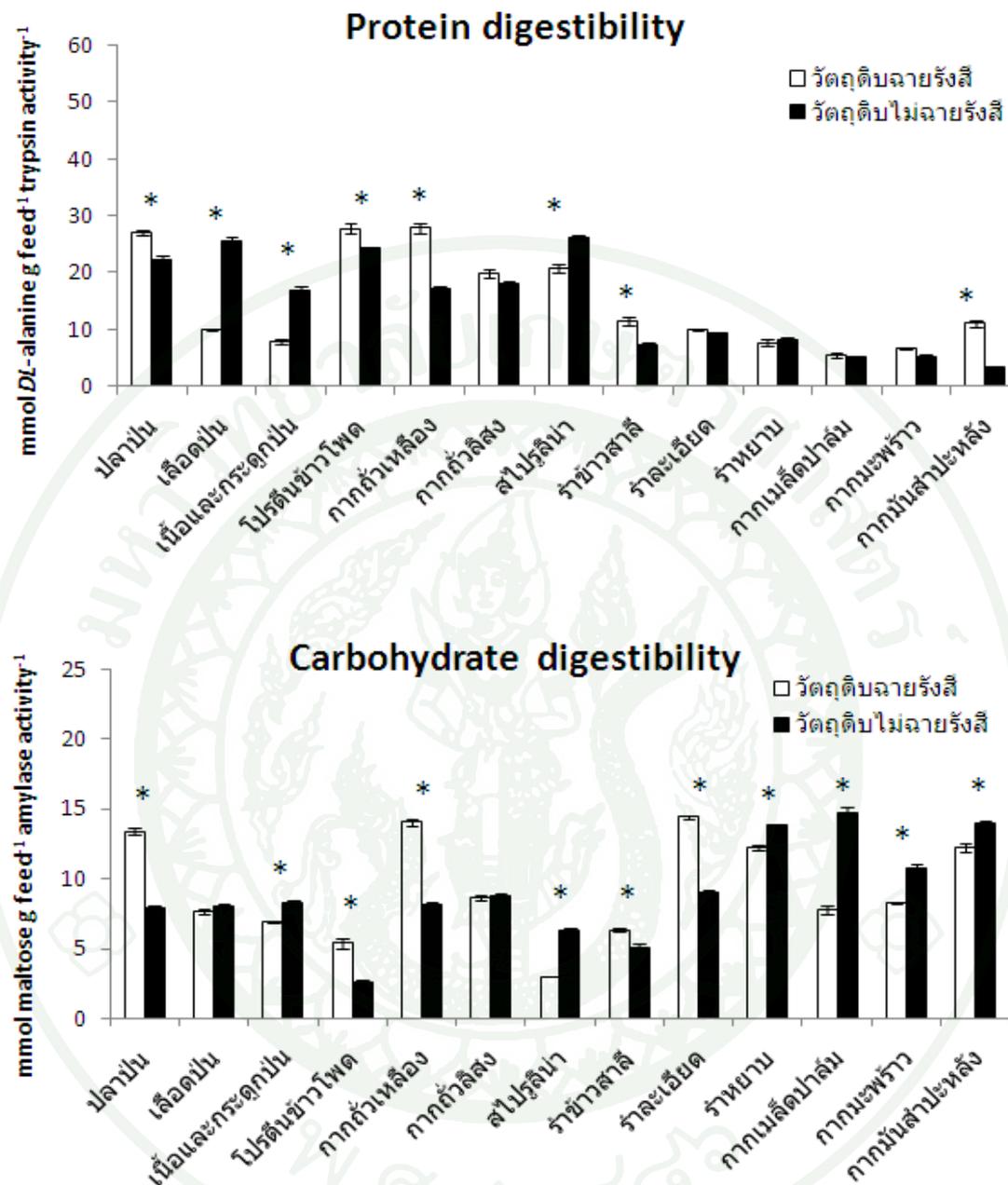
จากการศึกษา *in vitro* digestibility ของประสิทธิภาพการย่อยโปรตีน และคาร์โบไฮเดรตของวัตถุดิบอาหาร 13 ชนิด ที่ผ่านการฉายรังสีเปรียบเทียบกับวัตถุดิบอาหารชนิดเดียวกันที่ไม่ผ่านการฉายรังสี พบว่า วัตถุดิบอาหาร ปลาป่น และกากถั่วเหลือง มีประสิทธิภาพการย่อยทั้งโปรตีนและคาร์โบไฮเดรต ได้ดีทุกช่วงอายุของปลานิลแปลงเพศ (ภาพที่ 16 และ 17)



ภาพที่ 5 *In vitro* digestibility ของการย่อยโปรตีนและคาร์โบไฮเดรต ของวัตถุดิบอาหาร 13 ชนิด ที่ผ่านและไม่ผ่านการฉายรังสี โดยใช้เอนไซม์สกัดจากลำไส้ปลานิลแปลงเพศ อายุ 1 เดือน

หมายเหตุ ดอกจัน (\*) แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างวัตถุดิบอาหารฉายรังสีและไม่ฉายรังสี ( $P < 0.05$ )

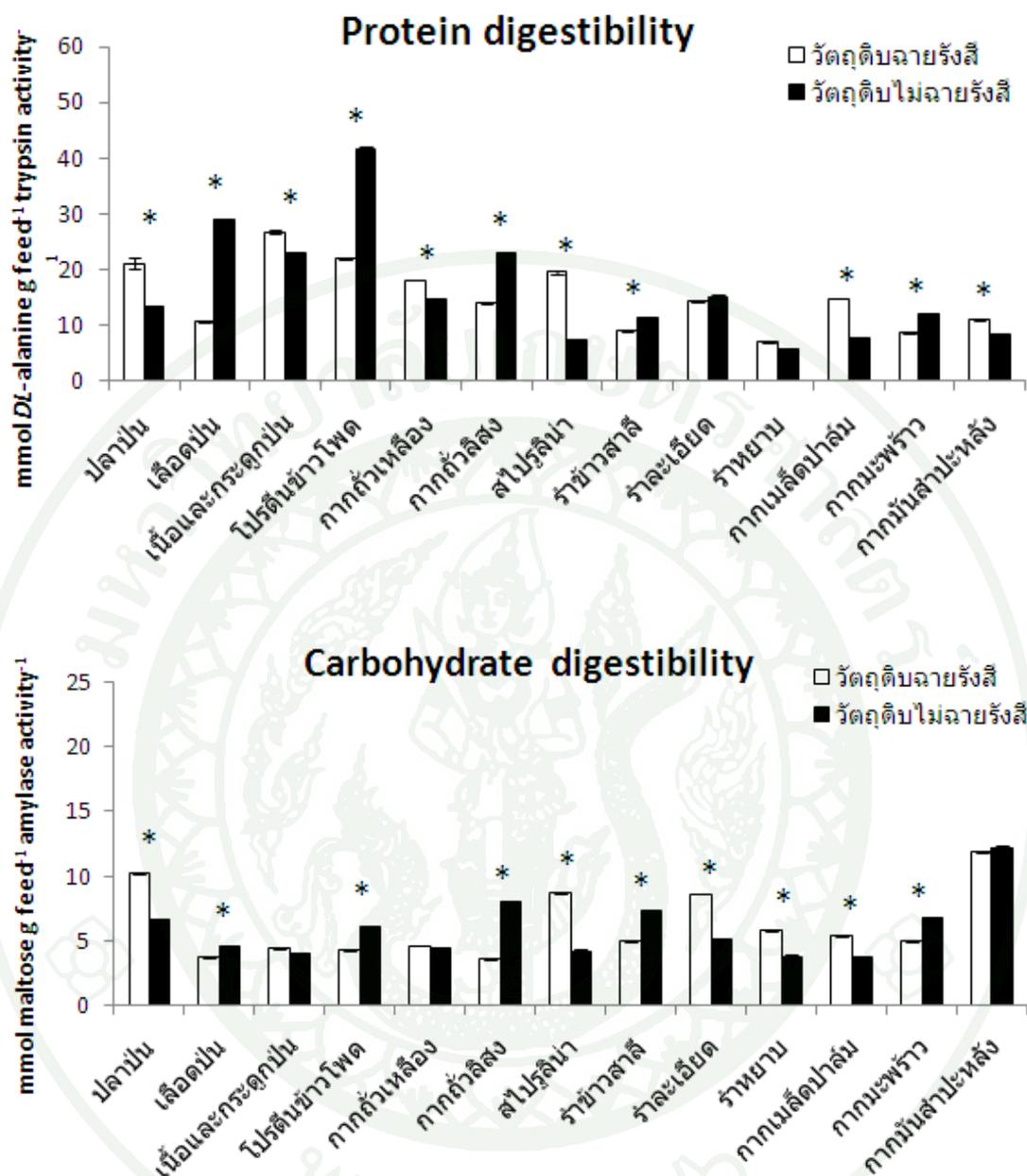
ดูรายละเอียดที่ตารางผนวกที่ 2



ภาพที่ 6 *In vitro* digestibility ของการย่อยโปรตีนและคาร์โบไฮเดรต ของวัตถุดิบอาหาร 13 ชนิด ที่ผ่านและไม่ผ่านการฉายรังสี โดยใช้เอนไซม์สกัดจากลำไส้ปลาไนแปลงเพศ อายุ 2 เดือน

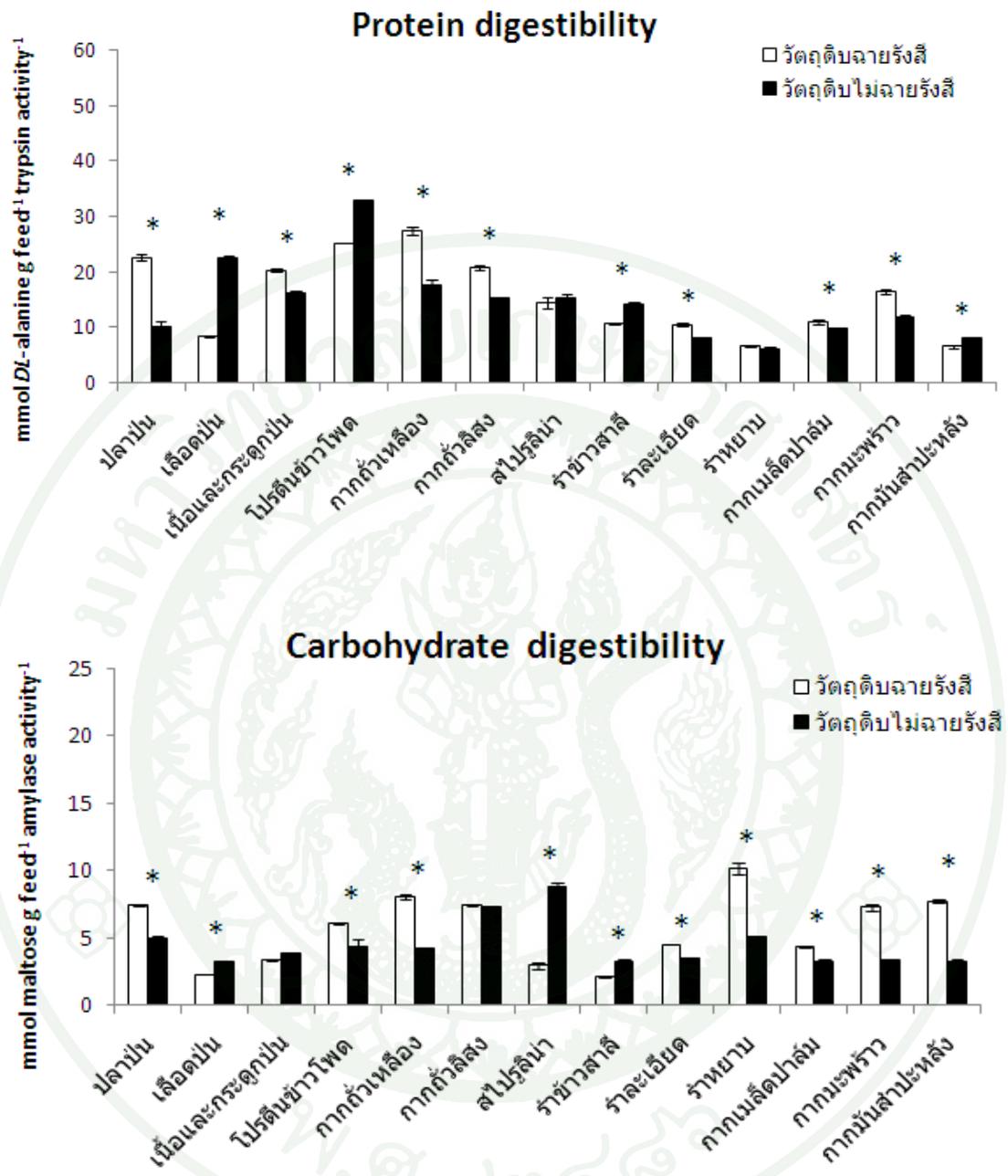
หมายเหตุ ดอกจัน (\*) แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างวัตถุดิบอาหารฉายรังสีและไม่ฉายรังสี ( $P < 0.05$ )

ดูรายละเอียดที่ตารางผนวกที่ 3



ภาพที่ 7 *In vitro* digestibility ของการย่อยโปรตีนและคาร์โบไฮเดรต ของวัตถุดิบอาหาร 13 ชนิด ที่ผ่านและไม่ผ่านการฉายรังสี โดยใช้เอนไซม์สกัดจากลำไส้ปลานิลแปลงเพศ อายุ เดือน

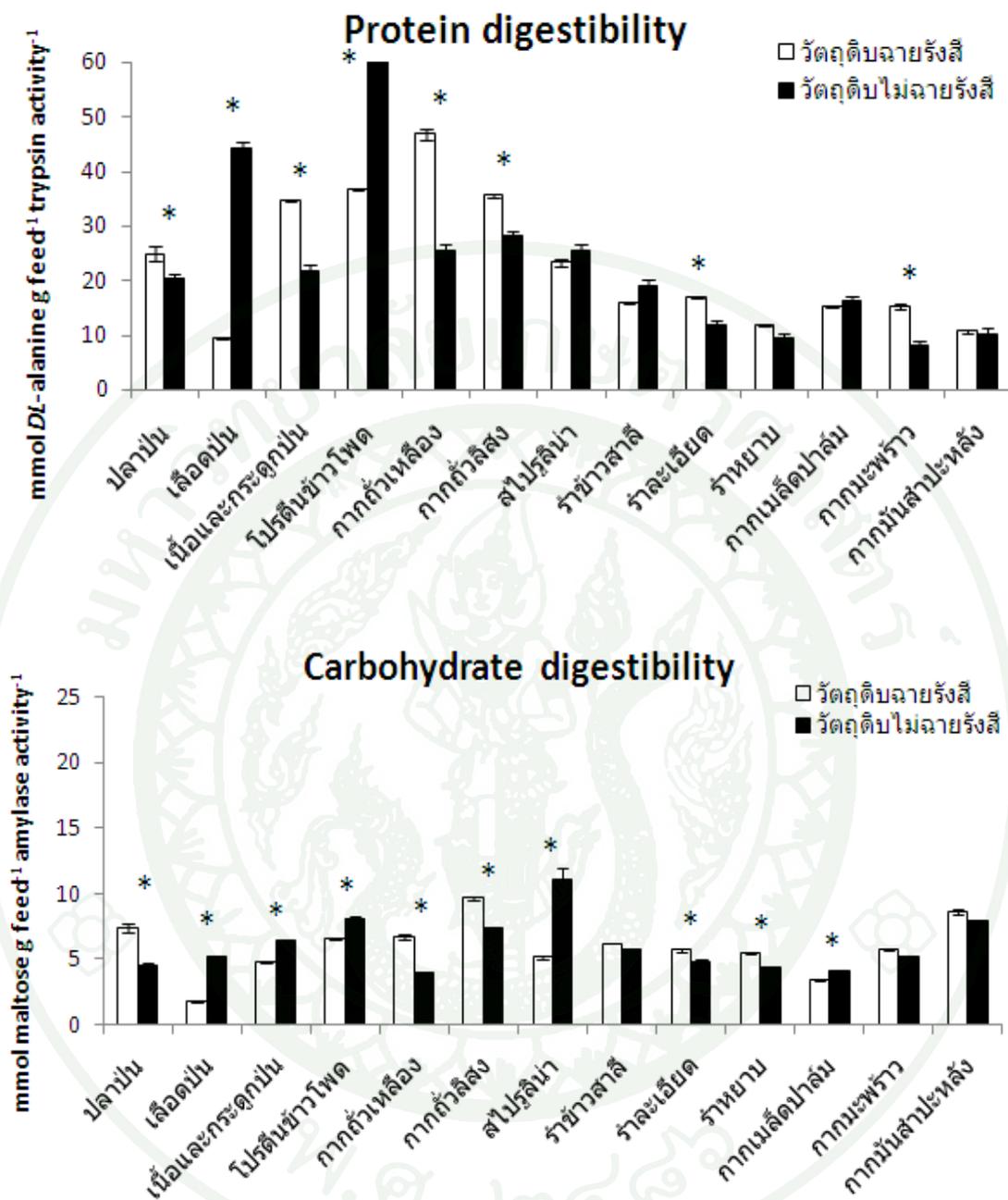
หมายเหตุ ดอกจัน (\*) แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างวัตถุดิบอาหารฉายรังสีและไม่ฉายรังสี ( $P < 0.05$ )  
ดูรายละเอียดที่ตารางผนวกที่ 4



ภาพที่ 8 *In vitro* digestibility ของการย่อยโปรตีนและคาร์โบไฮเดรต ของวัตถุดิบอาหาร 13 ชนิด ที่ผ่านและไม่ผ่านการฉายรังสี โดยใช้เอนไซม์สกัดจากลำไส้ปลาชนิดแปลงเพศ อายุ เดือน

หมายเหตุ ดอกจัน (\*) แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างวัตถุดิบอาหารฉายรังสีและไม่ฉายรังสี ( $P < 0.05$ )

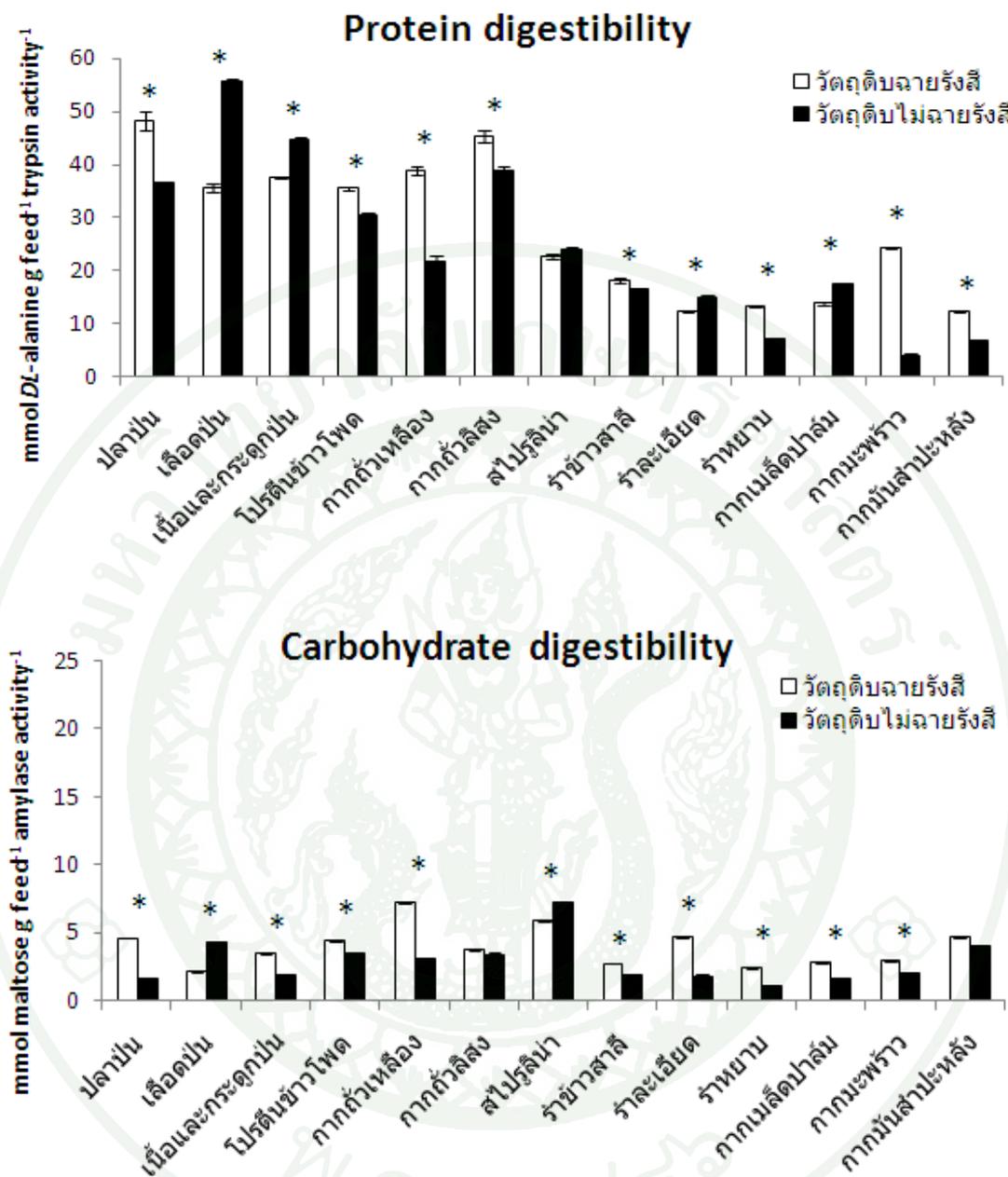
ดูรายละเอียดที่ตารางผนวกที่ 5



ภาพที่ 9 *In vitro* digestibility ของการย่อย โปรตีนและคาร์โบไฮเดรต ของวัตถุดิบอาหาร 13 ชนิด ที่ผ่านและไม่ผ่านการฉายรังสี โดยใช้เอนไซม์สกัดจากลำไส้ปลาไนลแปลงเพศ อายุ เดือน

หมายเหตุ ดอกจัน (\*) แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างวัตถุดิบอาหารฉายรังสีและไม่ฉายรังสี ( $P < 0.05$ )

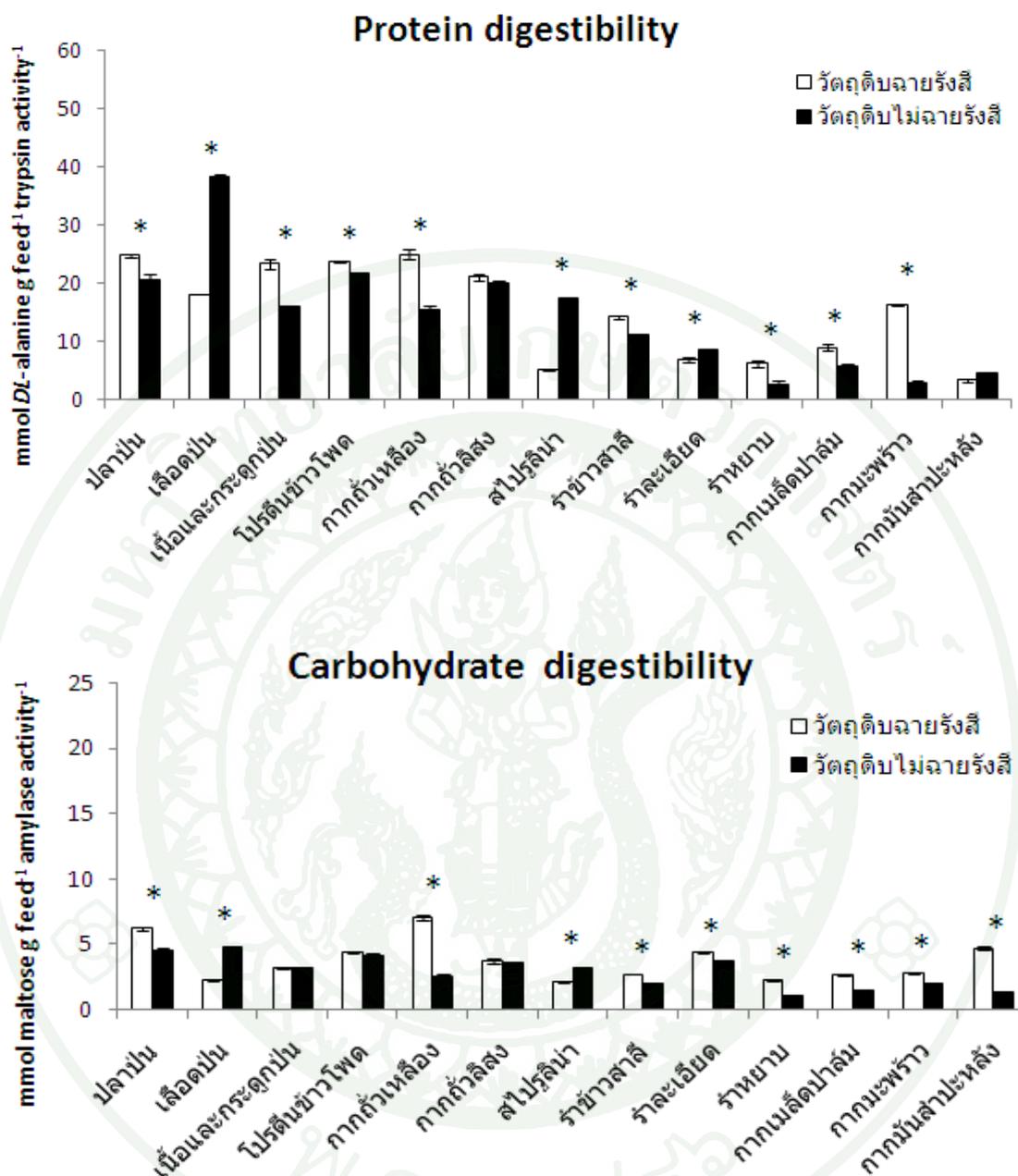
ดูรายละเอียดที่ตารางผนวกที่ 6



ภาพที่ 10 *In vitro* digestibility ของการย่อยโปรตีนและคาร์โบไฮเดรต ของวัตถุดิบอาหาร 13 ชนิด ที่ผ่านและไม่ผ่านการจายรังสี โดยใช้เอนไซม์สกัดจากลำไส้ปลานิลแปลงเพศ อายุ 6 เดือน

หมายเหตุ ดอกจัน (\*) แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างวัตถุดิบอาหารจายรังสีและไม่จายรังสี ( $P < 0.05$ )

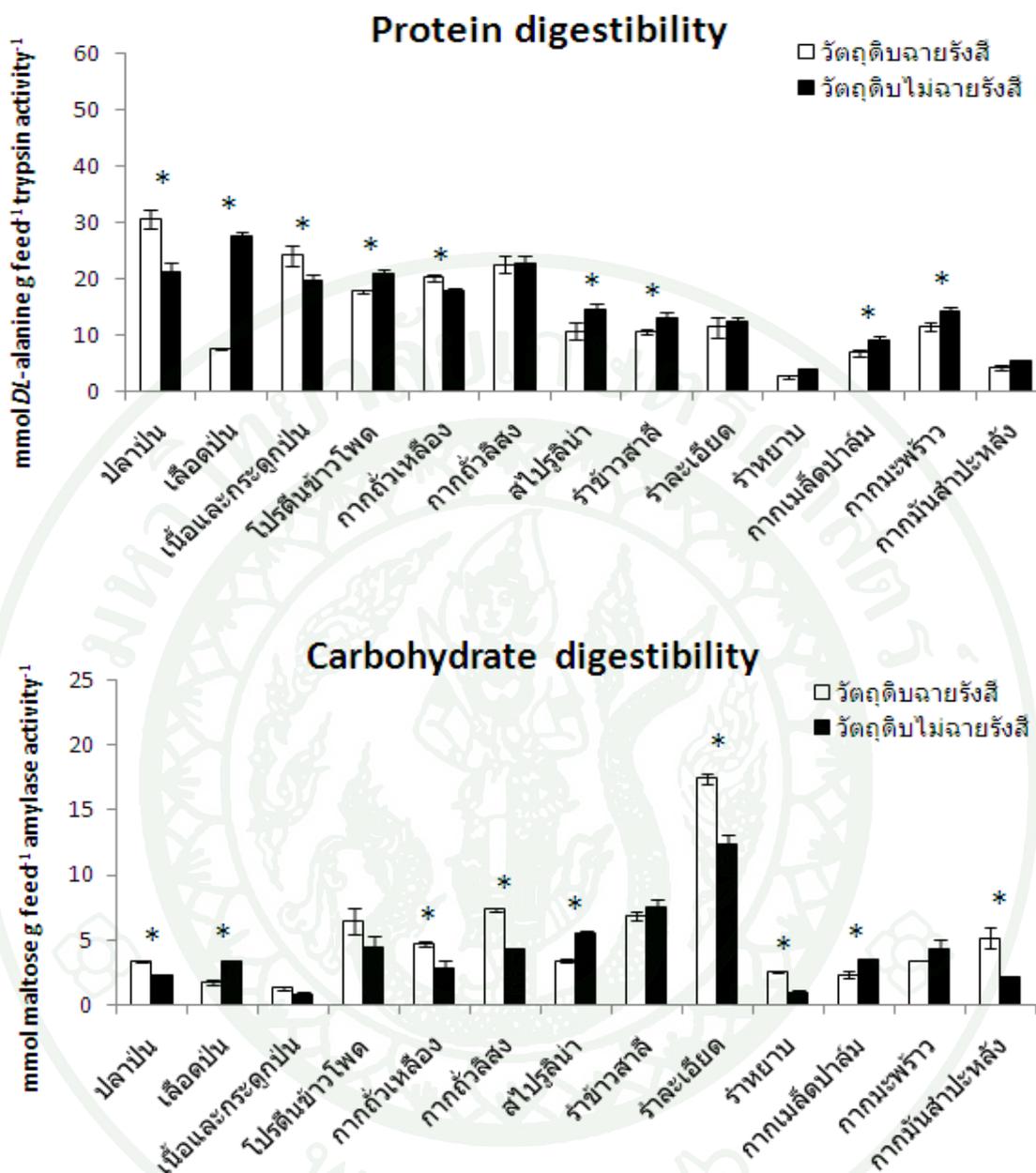
ดูรายละเอียดที่ตารางผนวกที่ 7



ภาพที่ 11 *In vitro* digestibility ของการย่อยโปรตีนและคาร์โบไฮเดรต ของวัตถุดิบอาหาร 13 ชนิด ที่ผ่านและไม่ผ่านการฉายรังสี โดยใช้เอนไซม์สกัดจากลำไส้ปลาไนลแปลงเพศ อายุ 8 เดือน

หมายเหตุ ดอกจัน (\*) แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างวัตถุดิบอาหารฉายรังสีและไม่ฉายรังสี ( $P < 0.05$ )

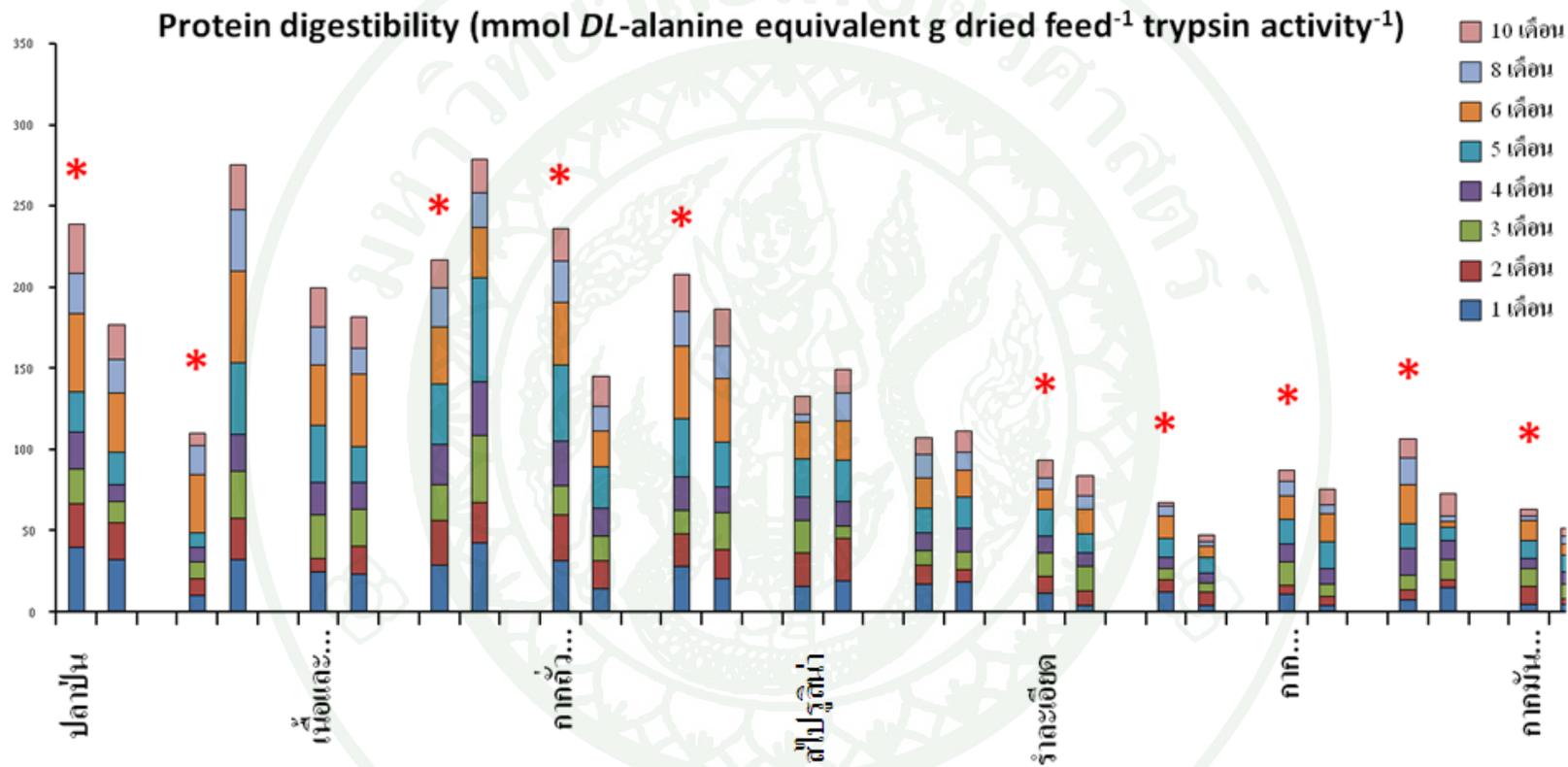
ดูรายละเอียดที่ตารางผนวกที่ 8



ภาพที่ 12 *In vitro* digestibility ของการย่อยโปรตีนและคาร์โบไฮเดรต ของวัตถุดิบอาหาร 13 ชนิด ที่ผ่านและไม่ผ่านการฉายรังสี โดยใช้เอนไซม์สกัดจากลำไส้ปลานิลแปลงเพศ อายุ 10 เดือน

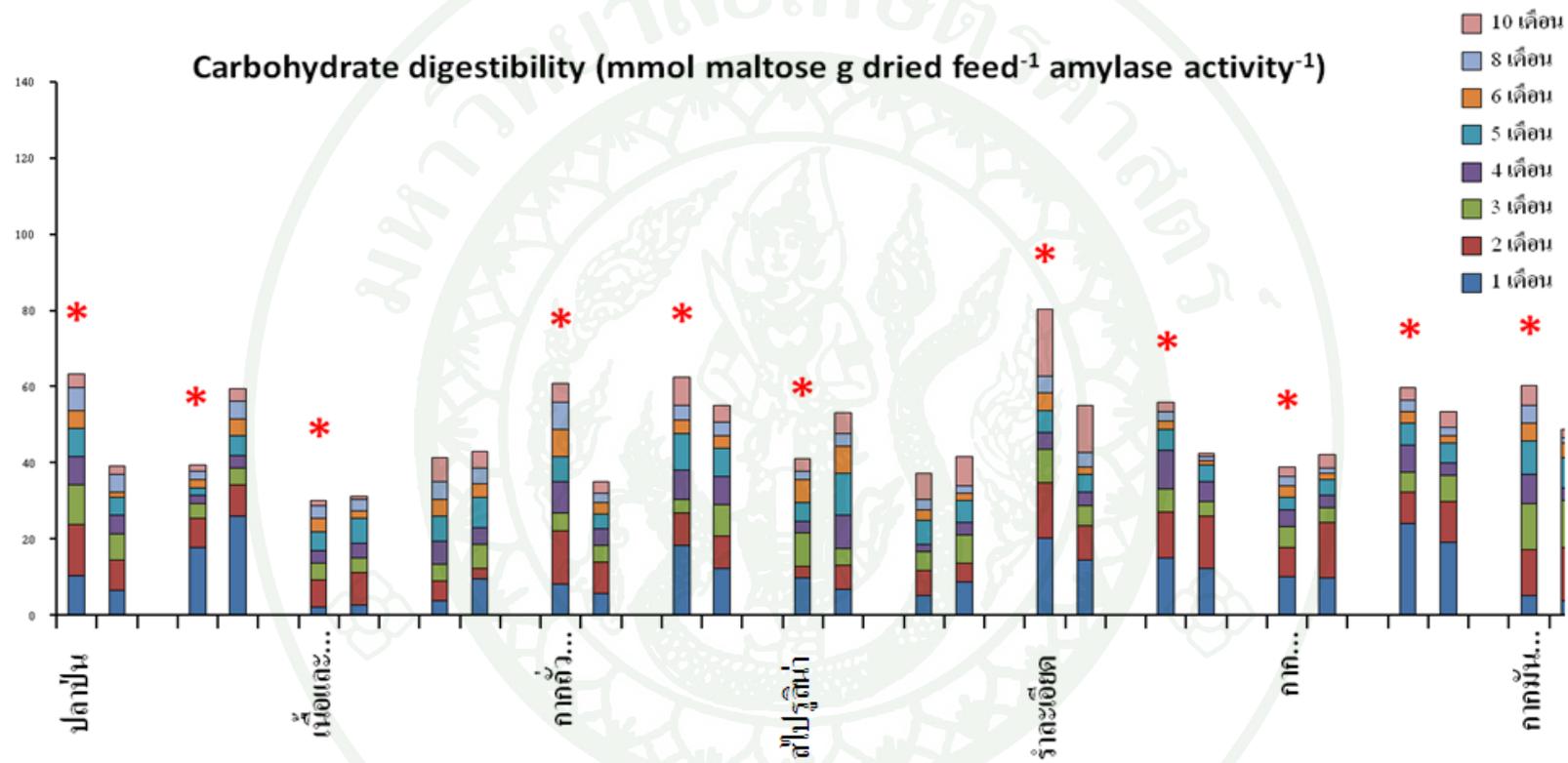
หมายเหตุ ดอกจัน (\*) แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างวัตถุดิบอาหารฉายรังสีและไม่ฉายรังสี ( $P < 0.05$ )

ดูรายละเอียดที่ตารางผนวกที่ 9



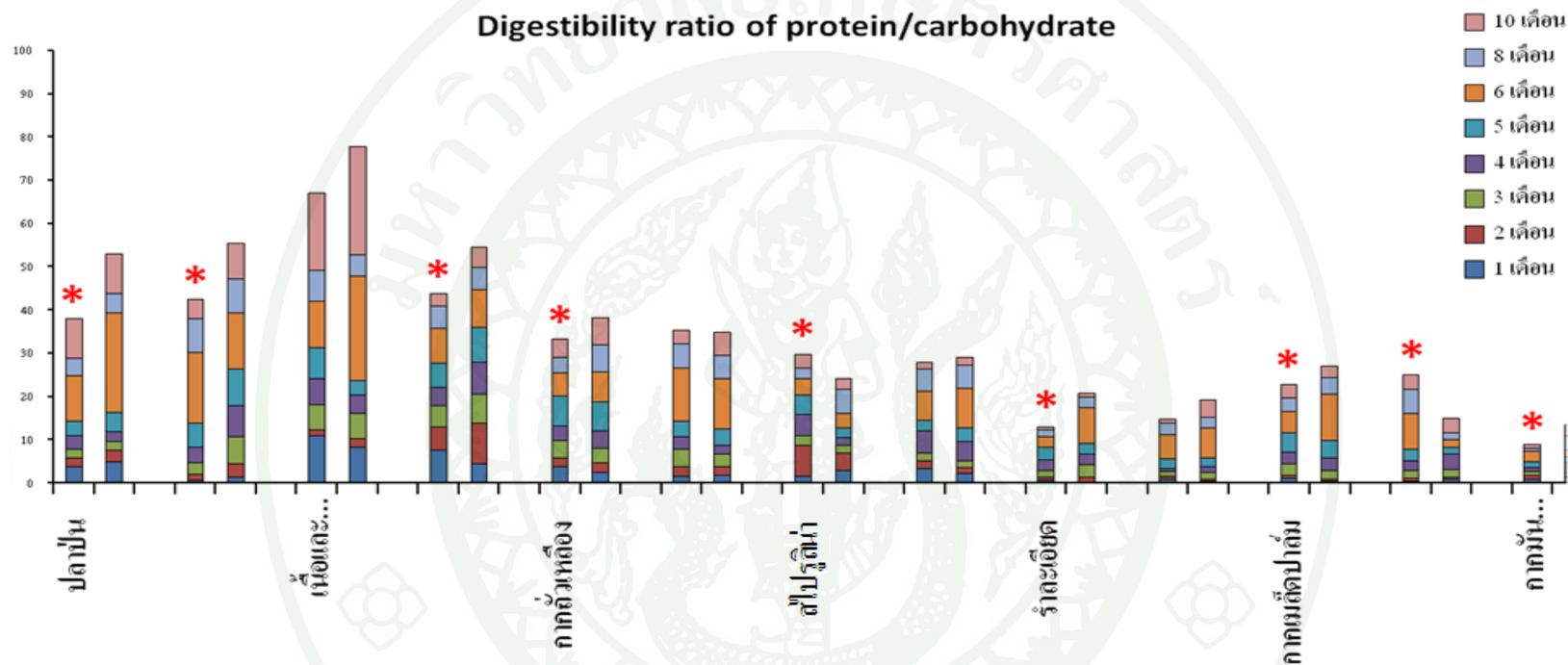
ภาพที่ 13 ผลรวมของการเปลี่ยนแปลงอัตราการย่อยโปรตีนของวัตถุดิบอาหาร 3 ชนิด ตลอดการทดลอง โดยใช้เอนไซม์สกัดจากลำไส้ปลานิลอายุ-10 เดือน จากการทดลองที่ 1 เปรียบเทียบแต่ละชนิดของวัตถุดิบอาหารระหว่างที่ผ่านการฉายรังสีกราฟแท่งที่ 1) และที่ไม่ผ่านการฉายรังสี(กราฟแท่งที่ 2)

หมายเหตุ ดอกจัน (\*) แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างวัตถุดิบอาหารฉายรังสีและไม่ฉายรังสี ( $P < 0.05$ )



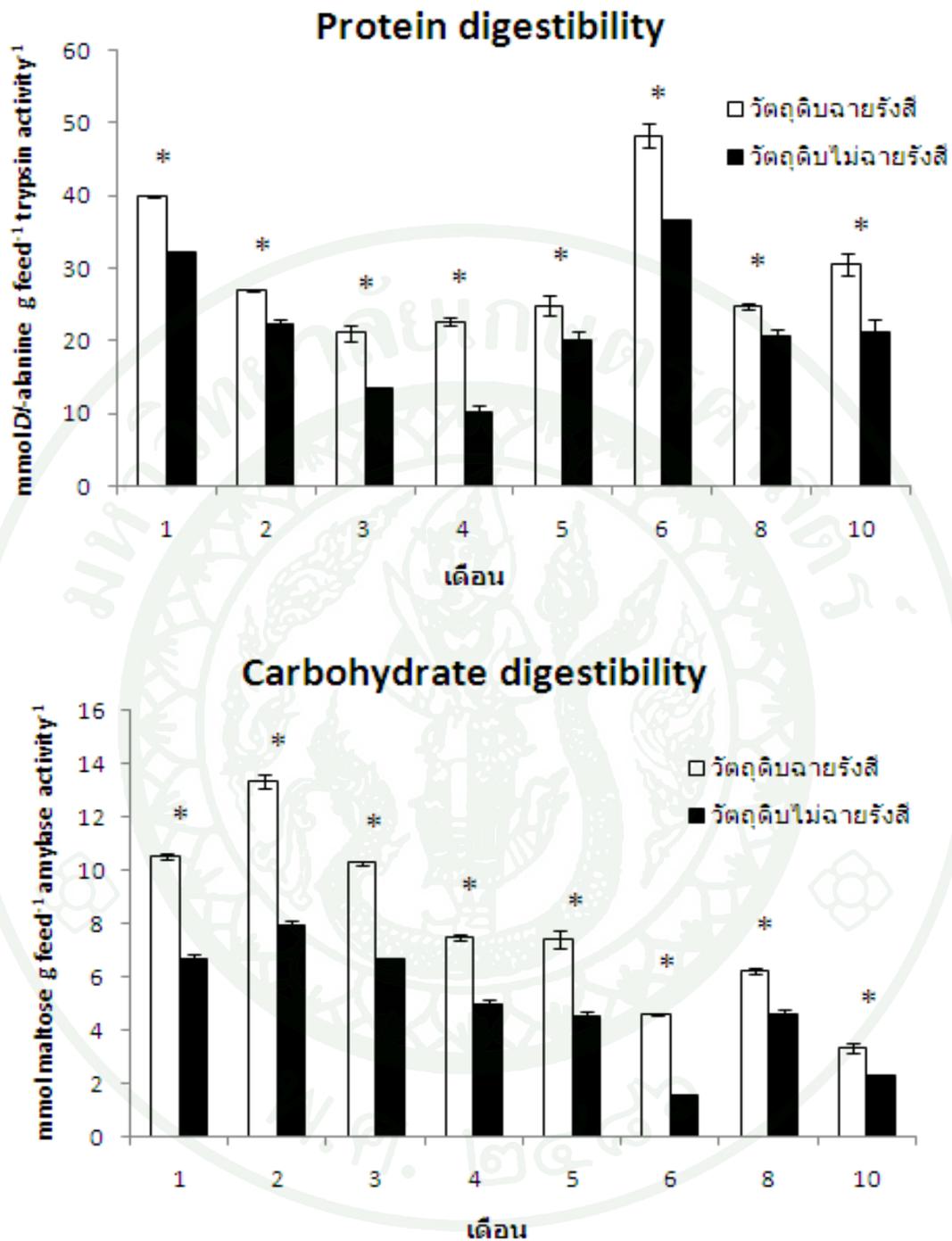
ภาพที่ 14 ผลรวมของการเปลี่ยนแปลงอัตราการย่อยคาร์โบไฮเดรตของวัตถุดิบอาหาร 13 ชนิด ตลอดการทดลองโดยใช้เอนไซม์สกัดจากลำไส้ปลานิลอายุ-10 เดือน จากการทดลองที่ 1 เปรียบเทียบแต่ละชนิดของวัตถุดิบอาหารระหว่างที่ผ่านการฉายรังสี (กราฟแท่งที่ 1) และที่ไม่ผ่านการฉายรังสี (กราฟแท่งที่ 2)

หมายเหตุ ดอกจัน (\*) แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างวัตถุดิบอาหารฉายรังสีและไม่ฉายรังสี ( $P < 0.05$ )



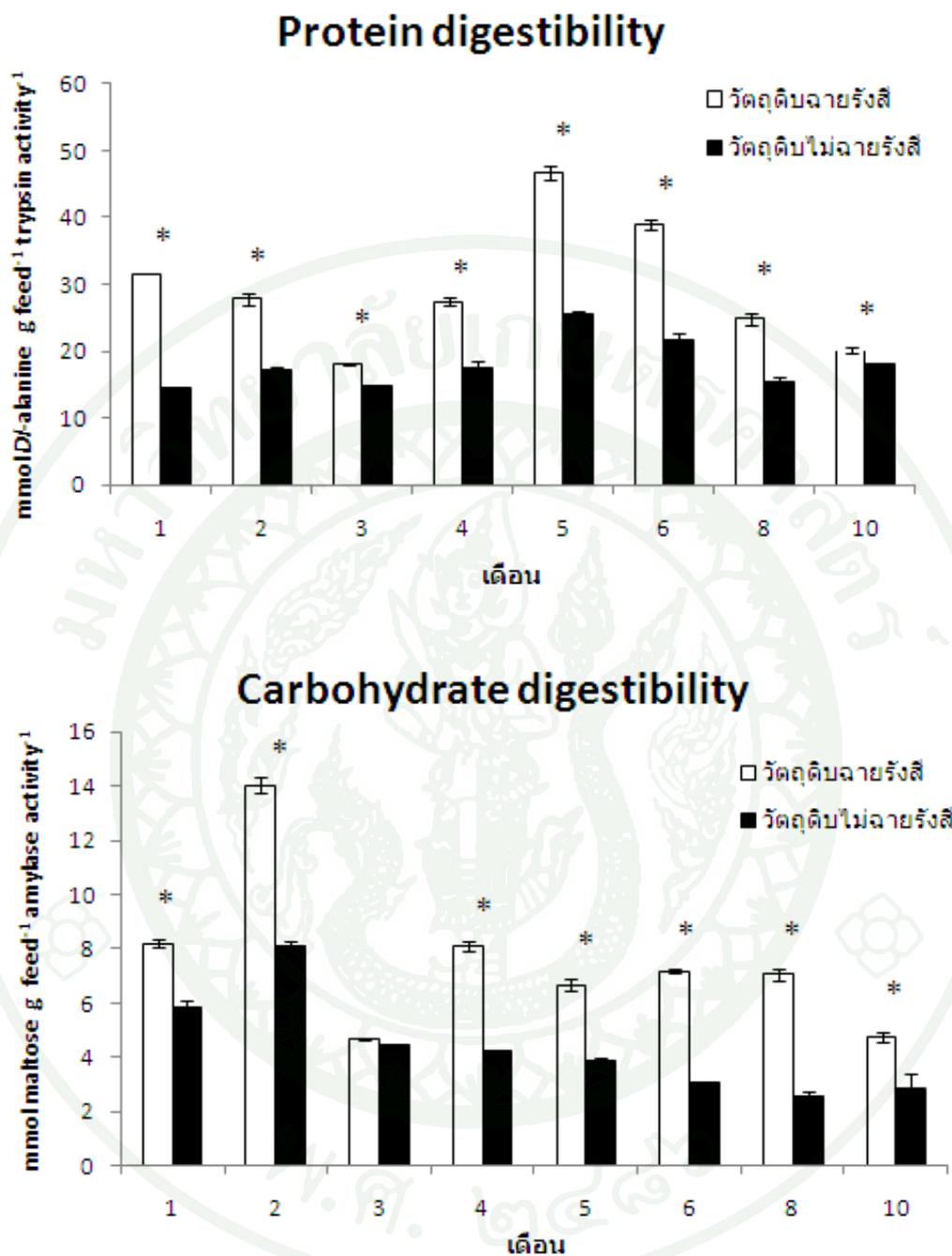
ภาพที่ 15 ผลรวมของการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของการย่อยโปรตีนและคาร์โบไฮเดรต ของวัตถุดิบอาหาร 3 ชนิด ตลอดจนการทดลอง โดยใช้เอนไซม์สกัดจากลำไส้ปลานิลอายุ 1-10 เดือน จากการทดลองที่ 1 เปรียบเทียบแต่ละชนิดของวัตถุดิบอาหารระหว่างที่ผ่านการฉายรังสีกราฟแท่งที่ 1) และที่ไม่ผ่านการฉายรังสี (กราฟแท่งที่ 2)

หมายเหตุ ดอกจัน (\*) แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างวัตถุดิบอาหารฉายรังสีและไม่ฉายรังสี ( $P < 0.05$ )



ภาพที่ 16 *In vitro* digestibility ของการย่อยโปรตีนและคาร์โบไฮเดรต ของวัตถุดิบอาหาร ปลาป่น โดยใช้เอนไซม์สกัดจากลำไส้ปลานิลแปลงเพศที่อายุ 1-5, 6, 8 และ 10 เดือน

หมายเหตุ ดอกจัน (\*) แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างวัตถุดิบอาหารปลาป่น ที่ละลายรังสีและไม่ละลายรังสี ( $P < 0.05$ )



ภาพที่ 17 *In vitro* digestibility ของการย่อยโปรตีนและคาร์โบไฮเดรต ของวัตถุดิบอาหาร กากถั่วเหลือง โดยใช้เอนไซม์สกัดจากถั่วใส่ปลานิลแปลงเพศที่อายุ 1-5, 6, 8 และ 10 เดือน

หมายเหตุ ดอกจัน (\*) แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างวัตถุดิบอาหารกากถั่วเหลือง ที่ฉายรังสีและไม่ฉายรังสี ( $P < 0.05$ )

## 2. วิเคราะห์องค์ประกอบทางโภชนาของวัตถุดิบอาหารที่ใช้ในการทดลองเปรียบเทียบระหว่างวัตถุดิบอาหารที่ผ่านการฉายรังสีและไม่ผ่านฉายรังสี

จากการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนา (proximate analysis) วัตถุดิบอาหาร 13 ชนิด (ตารางที่ 4) ที่ใช้เลี้ยงปลานิลเปรียบเทียบระหว่างวัตถุดิบอาหารที่ผ่านกระบวนการฉายและไม่ผ่านฉายรังสี โดยทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ และหาค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยตัวอย่าง ( STD) พบว่า ค่าตัวเลขที่ได้ทั้งค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้น โปรตีน ไขมัน เยื่อใย เถ้า และคาร์โบไฮเดรต (Nitrogen Free Extract, NFE โดย NFE หรือ Non Structural carbohydrate เป็นคาร์โบไฮเดรตส่วนที่สัตว์ทุกชนิดย่อยง่าย และนำไปใช้ประโยชน์ได้) ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยสามารถแบ่งตัวอย่างวัตถุดิบอาหารจากการวิเคราะห์ออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ

- 1) กลุ่มที่มีโปรตีนสูง (Protein Rich)
- 2) กลุ่มที่มีโปรตีนต่ำหรือประเภทคาร์โบไฮเดรต (Carbohydrate Rich)

กลุ่มที่ 1 กลุ่มที่มีโปรตีนสูงประมาณ 40-60% แบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ โปรตีนจากสัตว์ ได้แก่ ปลาป่น เนื้อและกระดูกป่น และเลือดป่นซึ่งมีโปรตีนสูงถึง 80% และโปรตีนจากพืช ได้แก่ โปรตีนข้าวโพด สไปรูลิน่า กากถั่วลิสง และกากถั่วเหลือง (ตารางที่ 4)

กลุ่มที่ 2 กลุ่มที่มีโปรตีนต่ำหรือประเภทคาร์โบไฮเดรต โปรตีนประมาณ 1-19% และแป้งสูงประมาณ 35-60% ได้แก่ กากมันสำปะหลัง รำข้าวสาลี กากมะพร้าว รำละเอียด กากเมล็ดปาล์ม และรำหยาบ (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 คุณค่าทางโภชนาของอาหารชนิดต่างๆ ที่ใช้ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรต และ โปรตีนของเอนไซม์ที่สกัดจากลำไส้เล็กของปลานิล  
 แปลงเพศ ตั้งแต่ระยะวัยอ่อนจนถึงตัวเต็มวัย โดยวิธี *In vitro* digestibility วิเคราะห์ตัวอย่างจำนวน 3 ซ้ำ

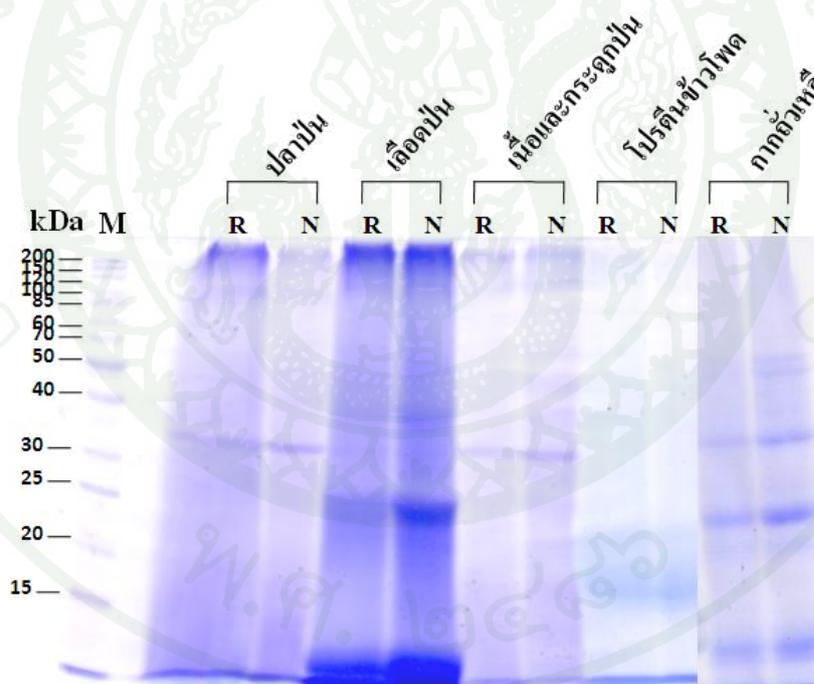
ชนิดวัตถุดิบอาหาร	เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง					
	ความชื้น		โปรตีน		ไขมัน	
	ฉายรังสี	ไม่ฉายรังสี	ฉายรังสี	ไม่ฉายรังสี	ฉายรังสี	ไม่ฉายรังสี
ปลาป่น	8.27 ± 0.34	6.87 ± 0.21	57.63 ± 0.37	58.99 ± 0.66	10.39 ± 1.12	12.52 ± 2.28
เลือดป่น	7.99 ± 0.85	7.94 ± 0.13	82.33 ± 0.36	83.44 ± 0.14	1.60 ± 0.30	1.38 ± 0.13
เนื้อและกระดูกป่น	5.64 ± 0.31	5.23 ± 0.42	50.45 ± 0.35	49.11 ± 0.55	11.90 ± 0.62	11.88 ± 0.71
โปรตีนข้าวโพด	5.86 ± 0.83	5.55 ± 0.60	63.55 ± 0.16	66.00 ± 0.08	3.72 ± 0.05	4.07 ± 0.11
กากถั่วเหลือง	9.87 ± 0.47	9.38 ± 1.08	44.30 ± 0.06	43.27 ± 0.13	3.06 ± 0.05	3.28 ± 0.06
กากถั่วลิสง	6.81 ± 0.18	7.26 ± 0.36	49.05 ± 0.20	50.04 ± 0.06	5.67 ± 0.13	5.39 ± 0.51
สไปรูลิน่า	9.19 ± 0.30	9.05 ± 0.29	56.96 ± 0.17	57.42 ± 0.06	6.30 ± 0.99	6.13 ± 0.74
รำข้าวสาลี	10.58 ± 1.86	10.00 ± 1.27	15.51 ± 0.28	16.36 ± 0.08	1.24 ± 0.16	1.45 ± 0.27
รำละเอียด	8.91 ± 0.42	9.09 ± 0.88	14.84 ± 0.01	14.52 ± 0.02	18.22 ± 0.59	18.05 ± 0.75
กากเมล็ดปาล์ม	8.07 ± 0.36	7.00 ± 0.79	10.52 ± 0.25	10.80 ± 0.04	10.53 ± 1.23	12.48 ± 0.59
รำหยาบ	8.17 ± 0.31	8.38 ± 0.68	5.50 ± 0.47	6.32 ± 0.12	2.81 ± 0.13	2.95 ± 0.03
กากมะพร้าว	5.15 ± 0.08	5.08 ± 0.08	19.47 ± 0.09	19.87 ± 0.42	7.35 ± 0.14	7.43 ± 0.39
กากมันสำปะหลัง	10.19 ± 0.37	10.72 ± 0.84	1.52 ± 0.05	1.15 ± 0.17	0.59 ± 0.18	0.51 ± 0.08

ตารางที่ 4 (ต่อ)

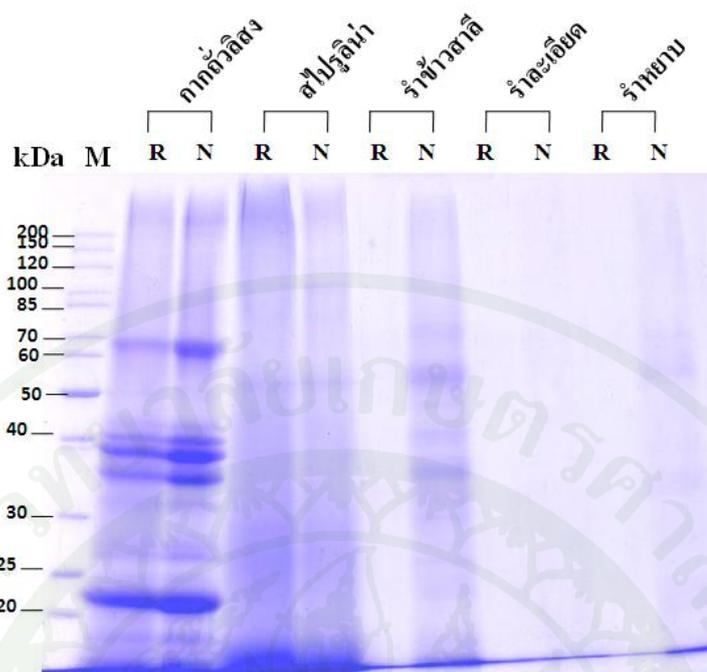
ชนิดวัตถุดิบอาหาร	เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง					
	กากหรือเยื่อใย		เถ้า		NFE	
	จายรังสี	ไม่จายรังสี	จายรังสี	ไม่จายรังสี	จายรังสี	ไม่จายรังสี
ปลาป่น	0.87 ± 0.11	0.79 ± 0.38	20.08 ± 0.28	20.86 ± 0.07	2.74 ± 0.57	2.42 ± 0.65
เลือดป่น	0.90 ± 0.41	0.58 ± 0.20	6.14 ± 0.64	5.40 ± 0.21	1.04 ± 0.54	1.25 ± 0.07
เนื้อและกระดูกป่น	2.47 ± 0.22	2.22 ± 0.27	24.56 ± 0.25	24.16 ± 0.69	4.97 ± 0.29	7.39 ± 0.17
โปรตีนข้าวโพด	3.16 ± 0.29	3.62 ± 1.02	1.93 ± 0.07	2.05 ± 0.09	21.76 ± 0.13	18.72 ± 2.00
กากถั่วเหลือง	6.56 ± 1.33	7.93 ± 0.94	7.24 ± 0.06	7.04 ± 0.11	28.25 ± 0.19	28.46 ± 2.09
กากถั่วลิสง	4.43 ± 1.15	5.08 ± 2.89	7.29 ± 0.10	7.02 ± 0.16	23.67 ± 0.77	23.08 ± 2.69
สไปรูulina	1.36 ± 0.25	0.92 ± 0.52	1.74 ± 0.13	2.92 ± 0.09	24.71 ± 0.84	23.51 ± 0.18
รำข้าวสาลี	10.94 ± 1.39	10.85 ± 1.03	5.27 ± 0.01	4.77 ± 0.07	59.03 ± 2.61	59.56 ± 1.17
รำละเอียด	5.62 ± 1.47	6.50 ± 0.95	8.88 ± 0.14	8.67 ± 0.01	44.27 ± 1.45	43.87 ± 1.02
กากเมล็ดปาล์ม	20.61 ± 0.82	22.55 ± 3.58	5.69 ± 0.02	5.57 ± 0.02	43.46 ± 0.46	39.53 ± 0.33
รำหยาบ	21.83 ± 9.97	24.34 ± 2.25	21.20 ± 0.15	22.37 ± 0.26	43.49 ± 1.42	38.94 ± 1.48
กากมะพร้าว	10.81 ± 1.53	11.60 ± 0.99	6.77 ± 0.01	6.70 ± 0.01	48.78 ± 0.83	47.13 ± 0.89
กากมันสำปะหลัง	9.05 ± 0.62	9.08 ± 0.73	18.13 ± 0.19	14.01 ± 0.04	60.51 ± 0.39	64.51 ± 0.39

### 3. ศึกษาความแตกต่างขององค์ประกอบโปรตีนในวัตถุดิบอาหารทั้ง 13 ชนิดเปรียบเทียบระหว่างวัตถุดิบที่ผ่านการฉายรังสีกับไม่ผ่านการฉายรังสี โดยวิธี SDS-PAGE

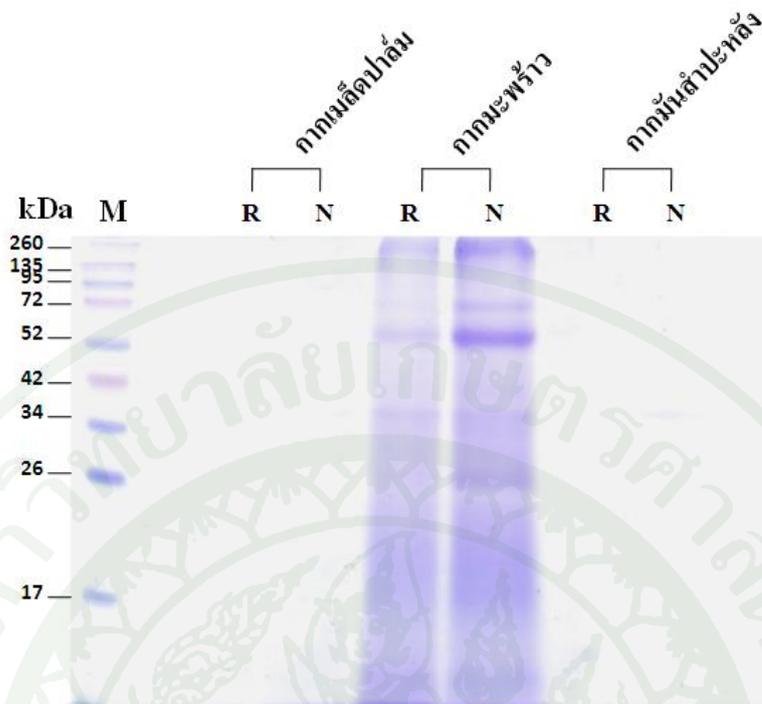
จากการศึกษา เปรียบเทียบวัตถุดิบทั้ง 13 ชนิด ระหว่างวัตถุดิบอาหารที่ผ่านการฉายรังสีและไม่ผ่านการฉายรังสีโดยวิธี 12% SDS-PAGE (ภาพที่ 18-20) พบว่า วัตถุดิบอาหารแต่ละชนิด มีความซับซ้อนของโปรตีนโมเลกุล (complex proteins) ต่างกัน ทำให้วิธีการสกัดที่ใช้สำหรับสกัดโปรตีนที่ไม่มีความซับซ้อนของโมเลกุล (non-complex proteins) ไม่สามารถสกัดโปรตีนจากวัตถุดิบอาหารได้เต็มที่ จึงทำให้ไม่สามารถเห็นแถบโปรตีนจากวัตถุดิบอาหารส่วนใหญ่บน SDS-PAGE แต่มีวัตถุดิบอาหารบางชนิดที่เห็นแถบโปรตีน เช่น เลือดปน กากถั่วเหลือง (ภาพที่ 18) กากถั่วลิสง รำข้าวสาลี รำหยาบ (ภาพที่ 19) และกากมะพร้าว (ภาพที่ 20) เมื่อผ่านการฉายรังสี จะแสดงแถบโปรตีนที่จางกว่าเมื่อเทียบกับแถบโปรตีนที่ไม่ฉายรังสี



**ภาพที่ 18** รูปแบบของแถบโปรตีนของวัตถุดิบอาหาร ปลาปน เลือดปน เนื้อและกระดูกปน โปรตีน ข้าวโพด และกากถั่วเหลือง บน 12% SDS-PAGE เปรียบเทียบระหว่างวัตถุดิบที่ผ่านการฉายรังสี (R) และไม่ผ่านการฉายรังสี (N) โดย M แสดงโปรตีนมาตรฐานที่ใช้เครื่องหมาย (standard protein marker) ซึ่งแต่ละแถบโปรตีนแสดงน้ำหนักโมเลกุลมีหน่วยเป็นกิโลดาลตัน (kDa)



**ภาพที่ 19** รูปแบบของแถบโปรตีนของวัตถุดิบอาหาร กากถั่วลิสง สไปรูulina รำข้าวสาลี รำละเอียด และรำหยาบ บน 12% SDS-PAGE เปรียบเทียบระหว่างวัตถุดิบที่ผ่านการฉายรังสี (R) และไม่ผ่านการฉายรังสี (N) โดย M แสดงโปรตีนมาตรฐานที่ใช้เครื่องหมาย (standard protein marker) ซึ่งแต่ละแถบโปรตีนแสดงน้ำหนักโมเลกุล มีหน่วยเป็น กิโลดาลตัน (kDa)



ภาพที่ 20 รูปแบบของแถบโปรตีนของวัตถุดิบอาหาร กากเมล็ดปาล์ม กากมะพร้าว และกากมันสำปะหลัง บน 12% SDS-PAGE เปรียบเทียบระหว่างวัตถุดิบที่ผ่านการฉายรังสี (R) และไม่ผ่านการฉายรังสี (N) โดย M แสดง โปรตีนมาตรฐานที่ใช้เครื่องหมาย (standard protein marker) ซึ่งแต่ละแถบโปรตีนแสดงน้ำหนักโมเลกุลมีหน่วยเป็นกิโลดาลตัน (kDa)

#### 4. ศึกษาลักษณะความแตกต่างของรูปแบบไอโซไซม์ของทริปซิน (Trypsin isozyme patterns)

##### จากลำไส้ปลานิลแปลงเพศ ในแต่ละช่วงอายุ โดยวิธี Substrate-gel-electrophoresis

นำเอนไซม์ที่สกัดจากลำไส้ปลานิลแปลงเพศ จากการทดลองที่ 1 คือ อายุ 8 และ 10 เดือน และเอนไซม์ที่สกัดได้จากลำไส้ปลานิล จากการทดลองที่ อายุ 1 2 3 4 5 6 และ 7 เดือน ศึกษาโดยวิธี SDS-PAGE ซึ่งการทดลองนี้ต่างจากการทดลองวิธี SDS-PAGE ปกติ คือ แผ่นเจลที่ได้จากการทดลองนี้ นำมาบ่มต่อด้วยสับสเตรทของทริปซินซึ่งใช้ 5 mM ของ N-p-tosyl-L-arginine methyl ester hydrochloride (TAME) เป็น substrate-staining solution

##### 4.1 ปลานิลในกลุ่มโปรตีนสัตว์ (กลุ่ม A35)

เลือกใช้ลำไส้ปลานิลแปลงเพศกลุ่ม A35 ซึ่งเลี้ยงด้วยอาหารที่มีแหล่งโปรตีนสัตว์35% (ตารางผนวกที่ 10) พบว่า ประกอบด้วย เอนไซม์ทริปซินอย่างน้อย 6 ไอโซไซม์ (ภาพที่ 21 ก) โดย ไอโซไซม์ 3 4 และ 5 แสดงกิจกรรมในระดับสูง ขณะที่ไอโซไซม์ 1 2 และ 6 แสดงกิจกรรมในระดับต่ำ ไอโซไซม์ที่ 4 และ 5 จะพบในทุกช่วงอายุ 1-7 เดือน แต่ไอโซไซม์ 6 จะพบเฉพาะที่อายุ 1 เดือน

ซึ่งอาจจำเป็นสำหรับปลาวัยอ่อน และไอโซไซม์ 4 จะมีกิจกรรมลดลงที่อายุ 6 เดือน สำหรับไอโซไซม์ 1 2 และ 3 นั้น อาจแสดงความแตกต่างของฟีโนไทป์ ในปลานิล ซึ่งแสดงกิจกรรมแตกต่างกันในช่วงอายุที่พบ เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบกับรูปแบบไอโซไซม์ของทริปซิน จากปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีทั้งโปรตีนสัตว์และพืช ในการทดลองที่ 1 ที่อายุ 8 และ 10 เดือน พบว่า ไอโซไซม์ 4 และ 5 เป็นไอโซไซม์หลัก และควรมีความสำคัญต่อการย่อยโปรตีนในอาหารของปลานิล ไม่ว่าจะกินโปรตีนสัตว์หรือพืช

##### 4.2 ปลานิลในกลุ่มโปรตีนพืช (กลุ่ม P35)

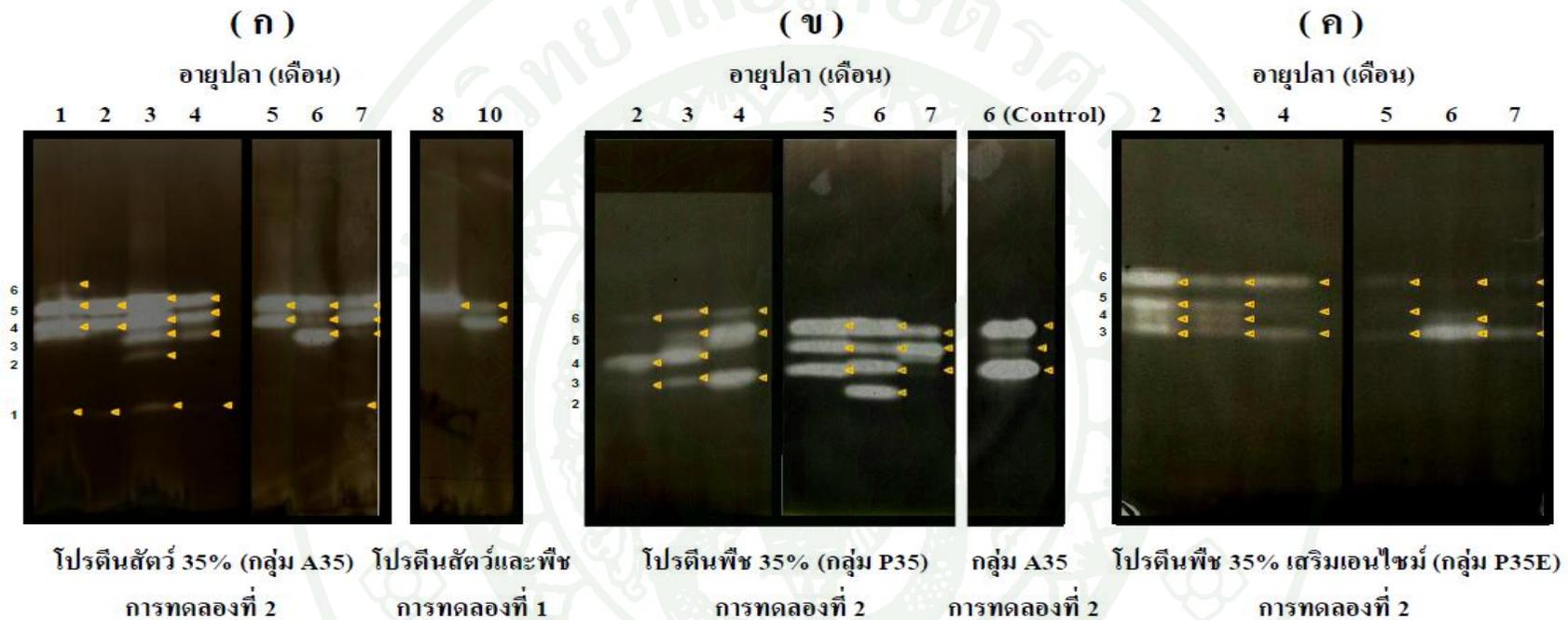
เลือกใช้ลำไส้ปลานิลกลุ่มP35 ซึ่งเลี้ยงด้วยอาหารที่มีแหล่งโปรตีนพืช35% (ตารางผนวกที่ 10) พบว่า ประกอบด้วยเอนไซม์ทริปซินอย่างน้อย 5 ไอโซไซม์ (ภาพที่ 21 ข) โดยไม่พบไอโซไซม์ 1 ซึ่งอาจเนื่องมาจากไม่มีไอโซไซม์นี้ หรืออาจมีค่ากิจกรรมต่ำมาก ทำให้ไม่สามารถเห็น activity band โดยไอโซไซม์ 6 จะพบที่อายุ 2-4 เดือน ในกลุ่มโปรตีนพืช (ภาพที่ 21 ข) แต่ไม่พบในกลุ่มโปรตีน

สัตว์ในช่วงอายุเดียวกัน (ภาพที่ 21 ก) ทั้งนี้อาจแสดงถึงการพัฒนาาระบบย่อยอาหารในกลุ่มโปรตีนพืชที่ช้ากว่า หรือมีความต้องการไอโซไซม์ 6 ของปลาในกลุ่มโปรตีนพืชที่มากกว่า ซึ่งแสดงถึงการพัฒนาเอนไซม์ทริปซินในระบบย่อยอาหาร ที่แตกต่างจากปลาในกลุ่มโปรตีนสัตว์ เนื่องจากโปรตีนที่กระตุ้นให้เกิดการเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์มีคุณภาพแตกต่างกัน ฉะนั้น ปลาในกลุ่มโปรตีนพืชซึ่งมีรูปแบบไอโซไซม์ทริปซิน คล้ายคลึงกับปลาในกลุ่มโปรตีนสัตว์แต่มีการแสดงออกของกิจกรรมในแต่ละไอโซไซม์ ที่แตกต่างจากปลาในกลุ่มโปรตีนสัตว์

ปลาในกลุ่มโปรตีนสัตว์ จะพบไอโซไซม์ 4 และ 5 ซึ่งน่าจะเป็นไอโซไซม์หลักเช่นกันสำหรับปลาในกลุ่มโปรตีนพืช เพราะพบการแสดงออกอย่างเด่นชัดในช่วงอายุ 5-7 เดือน แต่อาจจะยังพัฒนา ไอโซไซม์ 4 หรือ 5 ไม่เต็มที่ในช่วงอายุ 2-4 เดือน (ภาพที่ 21 ข) ซึ่งเป็นช่วงอายุที่มีความแตกต่างของกิจกรรมจำเพาะของทริปซิน ระหว่างกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีแหล่งโปรตีนแตกต่างกัน (ตารางผนวกที่ 10 ) นอกจากนี้คือ ปลาในกลุ่มโปรตีนพืชที่อายุ 6 เดือน จะมีการแสดงออกของไอโซไซม์ 4 ในระดับที่ต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับ ไอโซไซม์ 3 และ 5 เช่นเดียวกับที่พบในกลุ่มโปรตีนสัตว์ (ภาพที่ 21 ข) และยังพบการแสดงกิจกรรมที่สูงของไอโซไซม์ 2 ซึ่งพบว่ามีการแสดงกิจกรรมที่ต่ำในกลุ่มโปรตีนสัตว์ (ภาพที่ 21 ก และ 21 ข)

#### 4.3 ปลานิลในกลุ่มโปรตีนพืชเสริมเอนไซม์ (กลุ่ม P35E)

เลือกใช้ลำไส้ปลานิลกลุ่ม P35E ซึ่งเลี้ยงด้วยอาหารที่มีแหล่งโปรตีนพืช 35% และเสริมด้วยกลุ่มเอนไซม์อะไมเลส เพื่อช่วยย่อยคาร์โบไฮเดรต (ตารางผนวกที่ 10) พบว่า ประกอบด้วยทริปซิน อย่างน้อย 4 ไอโซไซม์ (ภาพที่ 21ค) โดยไม่พบไอโซไซม์ 1 และ 2 อาจเนื่องมาจากไม่มีไอโซไซม์เหล่านี้ หรืออาจมีค่ากิจกรรมต่ำมาก ทำให้ไม่สามารถเห็น activity band ได้ และจะพบไอโซไซม์ของทริปซิน 6 ตลอดทุกช่วงอายุในปลากลุ่มนี้ซึ่งอาจแสดงถึงความสำคัญของไอโซไซม์ 6 ในการย่อยโปรตีนพืชซึ่งไม่พบในกลุ่มโปรตีนสัตว์หลังจากเลี้ยงด้วยอาหารทดลองในระยะ 2-7 เดือน (ภาพที่ 21 ก) แต่ก็ไม่พบในกลุ่มโปรตีนพืชที่อายุ 5-7 เดือน (ภาพที่ 21 ข) แสดงถึงการเสริมกลุ่มเอนไซม์อะไมเลส ซึ่งแม้ว่าจะเพื่อช่วยย่อยคาร์โบไฮเดรตแต่ก็ยังมีผลต่อการแสดงออกของไอโซไซม์ของทริปซิน 6



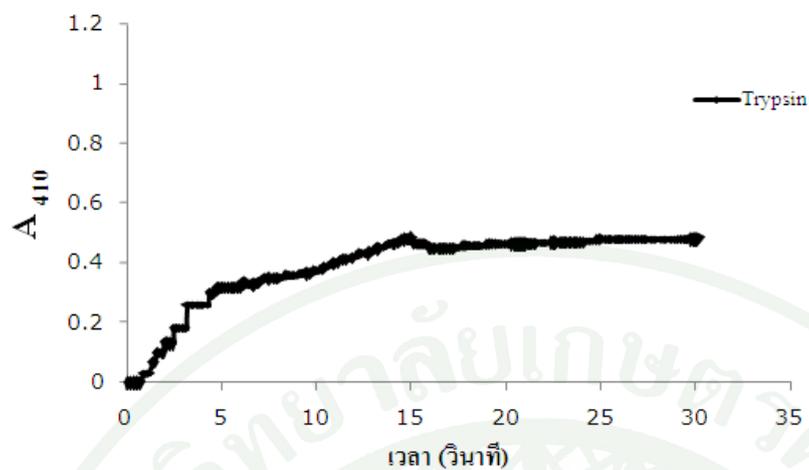
ภาพที่ 21 รูปแบบของ ไอโซไซม์ทริปซิน (Trypsin isozyme patterns) บน SDS-PAGE โดยใช้เอนไซม์สกัดจากลำไส้ปลานิลแปลงเพศ เปรียบเทียบในแต่ละช่วงอายุ ที่เลี้ยงด้วยอาหารแตกต่างกัน ทั้งในการทดลองที่ 1 และการทดลองที่ 2

หมายเหตุ ระดับ expression เปรียบเทียบกัน ไม่ได้ระหว่างอายุ เนื่องจากไม่ได้ควบคุมปริมาณโปรตีนในตัวอย่าง และน้ำหนักโมเลกุลของแต่ละแถบโปรตีนไม่ได้แสดงไว้ในที่นี้ เนื่องจากเป็นการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ในรูปของ native form โดยไอโซไซม์ทริปซินที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากัน ไม่จำเป็นต้องแสดงแถบที่เดียวกัน)

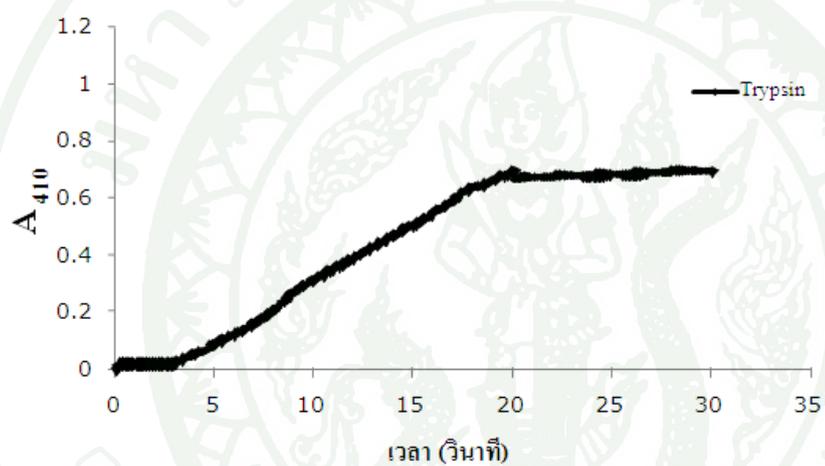
## 5. ข้อมูลเบื้องต้นสำหรับศึกษาการแยกบริสุทธิ์โปรตีนทริปซิน

การสกัด crude enzyme จากลำไส้ปลานิลแปลงเพศ อายุ 7 เดือน สามารถประยุกต์ใช้ในการศึกษาการทำโปรตีนทริปซินให้บริสุทธิ์ได้ โดยในเบื้องต้นได้นำ crude enzyme ที่สกัดได้จากลำไส้ปลานิลแปลงเพศ มาทำการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นอิ่มตัว แอมโมเนียมซัลเฟตช่วงต่างๆ ดังนี้คือ 0-20% 20-40% 40-60% และ 60-80% ตามลำดับ หลังจากนั้นนำตะกอนโปรตีนที่ได้ละลายและไดอะไลส์ด้วยบัฟเฟอร์ที่มี (10 mM Tris-HCl, pH 8 และ 1 mM CaCl<sub>2</sub>) เป็นบัฟเฟอร์เริ่มต้น (Starting buffer, SB) จากนั้นนำเอนไซม์แต่ละส่วนไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและกิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินโดยใช้ BAPNA เป็นสับสเตรท พบว่า สารละลายเอนไซม์ที่ตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 0-20% 20-40% และ 60-80% (ภาพที่ 22 ก 22 ข และ 23 ข) มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินน้อยกว่าช่วงการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 40-60% ดังภาพที่ 23 ก ซึ่งช่วงการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 40-60% มีค่าปริมาณโปรตีนทั้งหมด (total protein) สูงสุด คือ 129.63 มิลลิกรัม และมีค่ากิจกรรมทั้งหมด (total activity) สูงสุด

เมื่อนำสารละลายเอนไซม์ที่ตกตะกอนโปรตีนด้วย เกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นอิ่มตัวแอมโมเนียมซัลเฟตช่วง 40-60% มาทำให้บริสุทธิ์โดยนำมาผ่านคอลัมน์ Sephadex G-100 ละเอียดด้วย SB ด้วยอัตราการไหลคงที่ 0.5 ml/hr แยกเก็บสารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์หลอดละ 1.5 ml แล้วนำสารละลายที่ได้แต่ละหลอดมาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 280 nm และวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ทริปซิน ได้ผลการแยกโปรตีน ดังแสดงในภาพที่ 24 เห็นได้ว่าปริมาณโปรตีน 2 ใน 3 จะออกมาในปริมาตร 108 ml (หลอดที่ 22-88) ส่วนเอนไซม์ทริปซินจะออกมาที่ปริมาตรที่ 43.5 ml (หลอดที่ 95-123) รวมหลอดที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินเข้าด้วยกัน คือ หลอดที่ 95-123 นำสารละลายเอนไซม์ที่ได้ไปผ่านคอลัมน์ Q-sepharose ละเอียดด้วย SB ที่มี 1 M NaCl อัตราการไหลคงที่ 0.5 ml/hr จากภาพที่ 25 พบว่า มีโปรตีนที่เกิดขึ้น 2 peak เมื่อนำหลอดที่แยกเก็บส่วนของ flow through (หลอดที่ 1 3 และ 5) peak ที่ 1 (หลอดที่ 22-26) และ peak ที่ 2 (หลอดที่ 29-32) ตรวจสอบรูปแบบของแถบโปรตีน ด้วยวิธี SDS-PAGE พร้อมทั้งวิเคราะห์กิจกรรมของทริปซินโดยใช้ BAPNA เป็นสับสเตรท พบว่าทั้งส่วน flow through peak ที่ 1 และ peak ที่ 2 ต่างมีเอนไซม์ทริปซินและมีแถบโปรตีนอยู่หลายแบบในเบื้องต้นนี้เรายังไม่สามารถทำการแยกบริสุทธิ์เอนไซม์ทริปซินได้ ดังภาพที่ 25

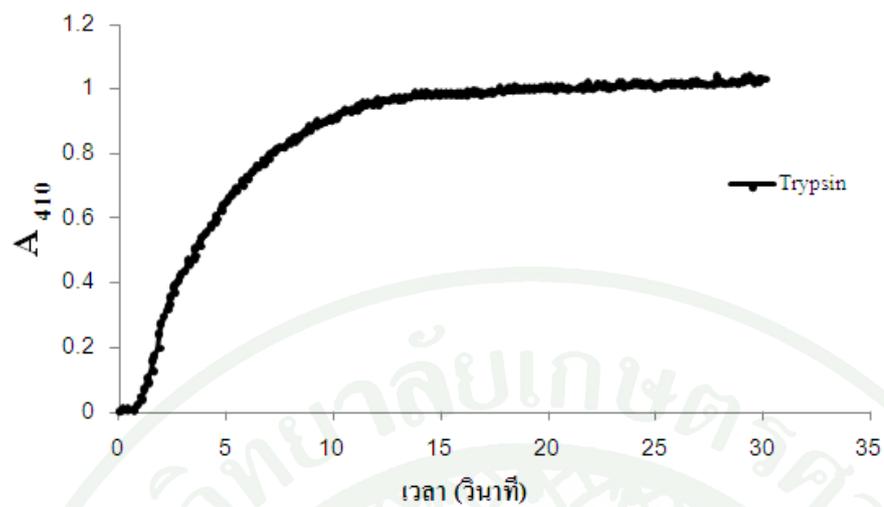


(ก)

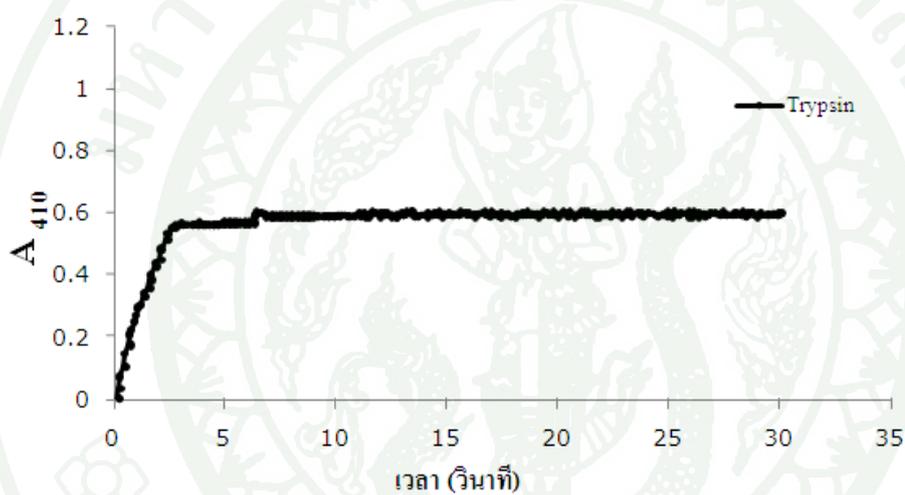


(ข)

ภาพที่ 22 กิจกรรมทริปซินที่พบในสารละลายเอนไซม์ที่ตัดตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ด้วยความเข้มข้นอิ่มตัวแอมโมเนียมซัลเฟตช่วง 0-20% (ก) และ 20-40% (ข)

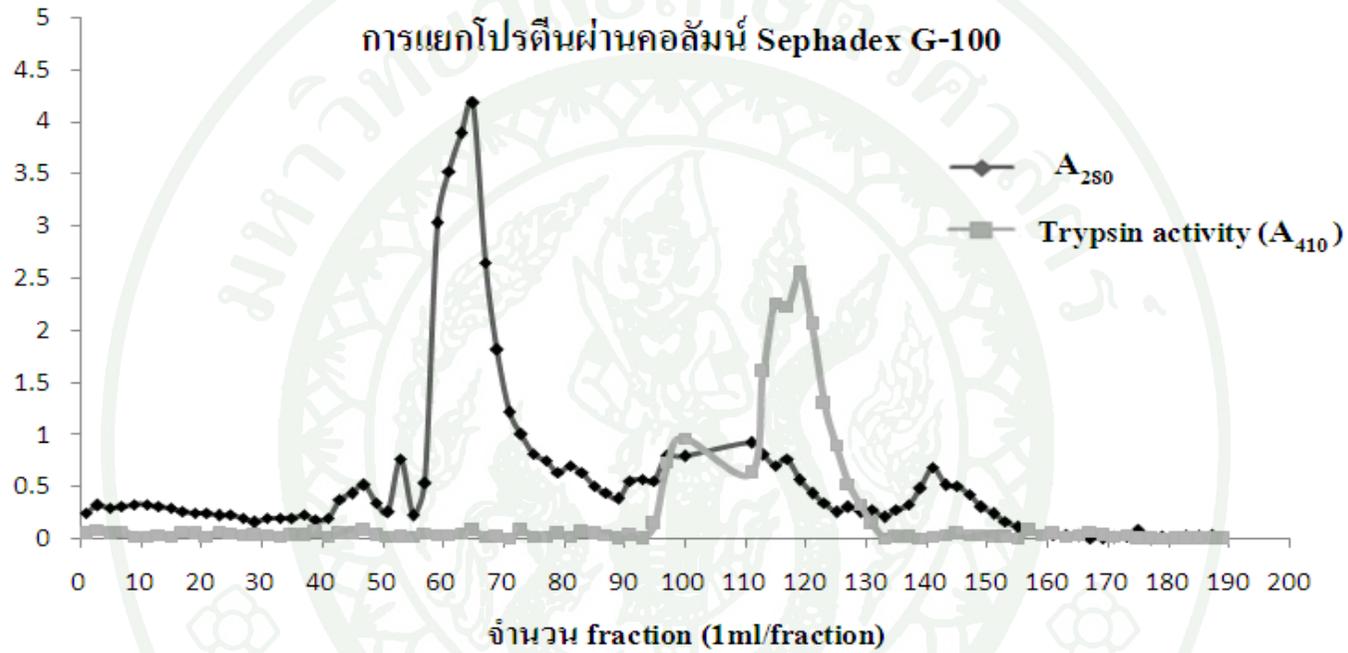


(ก)

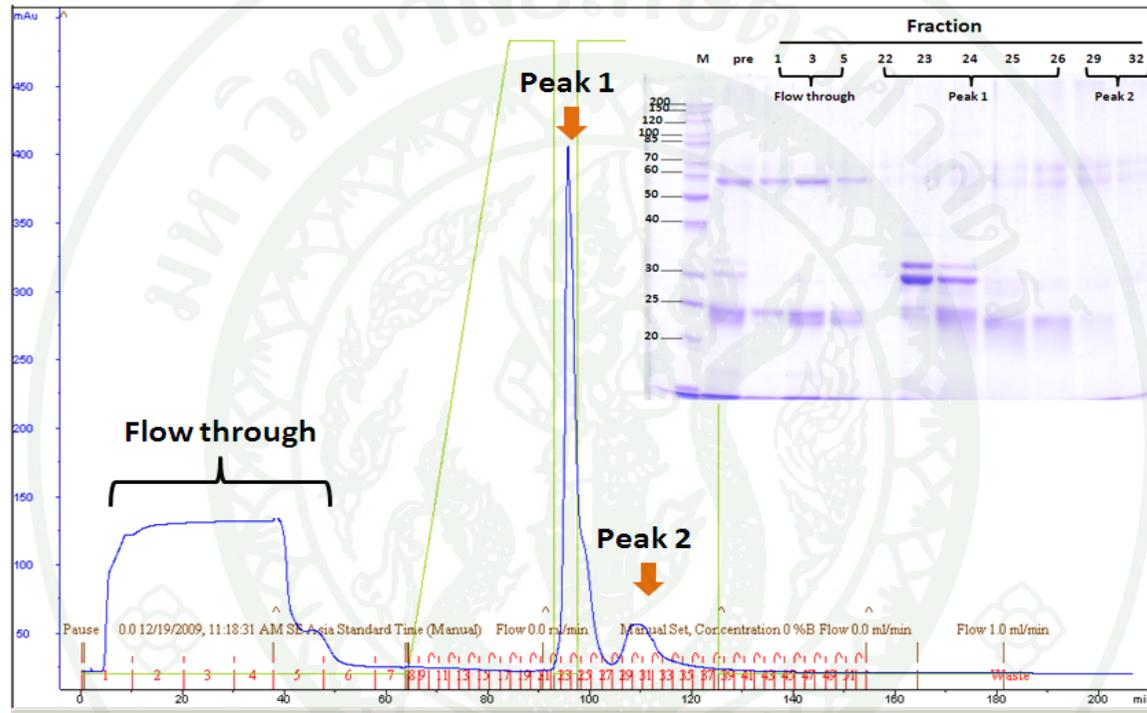


(ข)

ภาพที่ 23 กิจกรรมทริปซินที่พบในสารละลายเอนไซม์ ที่ตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ด้วยความเข้มข้นอิ่มตัวแอมโมเนียมซัลเฟตช่วง 40-60% (ก) และ 60-80% (ข)



**ภาพที่ 24** โครมาโตแกรมของโปรตีนจาก crude enzyme extract ของปลานิลที่ตกตะกอน โปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นอิ่มตัว แอมโมเนียมซัลเฟตช่วง 40-60% นำมาแยกเอนไซม์ทริปซินให้บริสุทธิ์ โดยผ่านคอลัมน์ Sephadex G-100 คอลัมน์ชะด้วย SB ที่มีอัตราไหล คงที่ 0.5 ml/hr



ภาพที่ 25 โครมาโตแกรมของโปรตีนจาก crude enzyme extract ของปลานิลที่นำมาแยกเอนไซม์ทริปซินให้บริสุทธิ์ โดยผ่านคอลัมน์ Q-sepharose คอลัมน์จะด้วย SB ที่มี 1 M NaCl ที่มีอัตราไหลคงที่ 0.5 ml/hr และรูปด้านบนแสดง SDS-PAGE ขององค์ประกอบโปรตีนส่วน Flow through Peak ที่ 1 และ Peak ที่ 2 โดย M: Protein Marker, Pre: สารละลายเอนไซม์ทริปซิน ที่ได้จากการผ่านคอลัมน์ Sephadex G-100 นำมา pool รวมกันก่อนผ่านคอลัมน์ Q-sepharose

## วิจารณ์

### 1. การทดสอบประสิทธิภาพการย่อยวัตถุดิบอาหารที่ผ่านการฉายรังสี เปรียบเทียบกับวัตถุดิบอาหารที่ไม่ผ่านการฉายรังสี โดยวิธี *in vitro* digestibility

วัตถุดิบอาหารสัตว์ทั้ง 13 ชนิด (ดังตารางที่ 2) ที่ใช้สำหรับทดสอบความสามารถในการย่อยคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนของเอนไซม์อะไมเลสและทริปซิน ที่สกัดจากลำไส้ปลานิลแปลงเพศของการทดลองที่ 1 ทดลองปลานิลช่วงอายุ 1-5 6 8 และ 10 เดือน วิเคราะห์โดยวิธี *in vitro* digestibility คัดเลือกตามเกณฑ์ คือ นิยมใช้เลี้ยงอย่างแพร่หลาย หาซื้อง่ายราคาถูก และเป็นผลพลอยได้จากโรงงานอุตสาหกรรมการทดลองนี้ แบ่งวัตถุดิบอาหารทั้ง 13 ชนิด โดยแบ่งวัตถุดิบสำหรับการทดลองออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 วัตถุดิบอาหารที่ผ่านการฉายรังสี ระดับ 60 kGy และกลุ่มที่ 2 วัตถุดิบอาหารชนิดเดียวกันแต่ไม่ผ่านการฉายรังสี

จากผลการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนของเอนไซม์ทริปซิน พบว่า วัตถุดิบอาหารแหล่งโปรตีนจากพืชที่ผ่านการฉายรังสีแกมมามีประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนได้ดีกว่าวัตถุดิบแหล่งโปรตีนจากพืชที่ไม่ผ่านการฉายรังสี โดยวัตถุดิบที่มีประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนได้ดีที่สุด คือ กากถั่วเหลือง รองลงมาคือ กากถั่วลิสง และโปรตีนข้าวโพด โดยเฉพาะกากถั่วเหลือง พบว่าตัวอย่างปลานิลแปลงเพศที่ได้จากการทดลองที่ 1 ทุกช่วงอายุของปลานิล ประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนรวมทั้งประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรตของเอนไซม์อะไมเลสต่างให้ค่าสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกากถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการฉายรังสี เนื่องจากการฉายรังสีมีส่วนช่วยในการลดตัวยับยั้งโปรตีน โดยเฉพาะตัวยับยั้งทริปซิน รวมทั้งตัวยับยั้งอะไมเลส (Abu-Tarboush, 1998) ซึ่งในพืชตระกูลถั่ว เช่น ถั่วเหลือง ถั่วลิสง ถั่วลิมา ถั่วปากอ้า เป็นต้นส่วนใหญ่ นอกจากจะมีสารต้านโภชนาการจำพวก ตัวยับยั้งโปรตีน ตัวยับยั้งอะไมเลสแล้วยังมี กรดไฟติก ซาโปนิน และสารต้านวิตามินอยู่ด้วย (Thompson, 1993) โดยเฉพาะตัวยับยั้งทริปซินทำหน้าที่ยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน ที่ส่งผลกระทบต่อการทำงานของโปรตีนในสัตว์ มีบทบาทสำคัญต่อการเจริญเติบโต จากรายงานการศึกษา กิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินที่สกัดได้จากลำไส้ของปลาแซลมอน *Salmo salar* L พบว่ามีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการย่อยอาหารในช่วงที่มีการเจริญเติบโต ส่วนเอนไซม์ไลโซโมทิ -ปซินมีบทบาทสำคัญในช่วงอดอาหาร (Rungruangsak-Torrissen *et al.*, 2006) การฉายรังสีมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีของวัตถุดิบอาหาร โดยไปทำลายพันธะไดซัลไฟด์ S-S ด้วย electron aqueous ( $e_{aq}^-$ ) และอนุมูลอิสระของไฮดรอกซิล (OH) สิ่งที่เกิดขึ้นนี้ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง

กลายเป็นพันธะไคซัลไฟด์ที่มี ลูป (loops) ส่งผลต่อตำแหน่งที่ทำงานได้ของสารต้านทริปซินและไคโมทริปซิน มีการรายงานผลที่เกิดขึ้นต่อการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งที่ทำงานได้ของสารต้านทริปซินและไคโมทริปซิน ว่ามีการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของกรดอะมิโนเพียงตำแหน่งเดียวของตัวยับยั้งโปรตีนในถั่วลิมา (Lynn and Raoult, 1976) และการฉายรังสีที่ 10 kGy สามารถลดระดับกิจกรรมของสารต้านทริปซินและไคโมทริปซิน ได้ 35% และ 71% ตามลำดับในกากถั่วเหลือง

ขณะที่นำกากถั่วเหลืองมาทดสอบประสิทธิภาพการย่อยในหลอดทดลองพบว่าสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนได้ 80% ถึง 84% (Abu-Tarboush, 1998) นอกจากนี้ (El-Shibawi, 1984) ได้รายงานถึงการฉายรังสีในถั่ว Faba มีผลต่อการลดสารต้านทริปซินซึ่งจะไปทำลายที่พันธะไคซัลไฟด์ เป็นที่น่าสนใจว่าการฉายรังสีในวัตถุดิบอาหารจากแหล่งโปรตีนที่ได้จากสัตว์ เช่น ปลาป่น จะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตของเอนไซม์ที่สกัดได้จากปลาป่น ได้ดีกว่าปลาป่นที่ไม่ฉายรังสีอย่างมีนัยสำคัญทุกช่วงอายุของปลานิล

เมื่อทดสอบประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรตของเอนไซม์อะไมเลส พบว่า วัตถุดิบแหล่งคาร์โบไฮเดรตจากพืชที่ผ่านการฉายรังสีมีประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรตโดยรวมได้ดีกว่าวัตถุดิบที่ไม่ฉายรังสี ซึ่งวัตถุดิบแหล่งคาร์โบไฮเดรตจากพืชที่มีประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรตได้ดีที่สุดคือ รำละเอียด รองลงมาคือ กากเมล็ดปาล์ม และกากมะพร้าว ปฏิบัติการของการฉายรังสีมีผลโดยตรงต่อการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลโมลกุลเดี่ยวหลายตัว (monosaccharide units) ในสายของโพลีเมอร์ โดยการฉายรังสีเหนี่ยวนำให้เกิดการสลายน้ำ (dehydration) และเกิด beta-splitting ที่ทำให้เกิดการสร้าง deoxycarbonyl หรือ deoxyacid groups ในสายขึ้น มีการรายงานถึงกิจกรรมของสารต้านอะไมเลสที่มีอยู่ในถั่ว *Moringa peregrine* ลดลง 44% และ 48% เมื่อผ่านการฉายรังสีที่ 7.0 kDa และ 10 kDa ตามลำดับ (Abu-Tarboush, 1998)

การศึกษาประสิทธิภาพการย่อยอาหารได้มุ่งเน้นไปที่ประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตมากกว่าไขมัน เนื่องจากปัจจัยสำคัญในการเจริญเติบโตของปลาคือสารอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรต เพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานและสารอาหารประเภทโปรตีนเพื่อการสร้างและซ่อมแซมเนื้อเยื่อในขณะที่ไขมันถือเป็นแหล่งพลังงานสำรอง เอนไซม์โปรติเอสที่สำคัญคือ เอนไซม์ทริปซิน เนื่องจากเป็นปัจจัยสำคัญอันดับแรกที่มีผลต่อประสิทธิภาพการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อเนื้อ (feed conversion efficiency; FCE) และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate; SGR)

การฉายรังสีในวัตถุดิบอาหาร ส่วนใหญ่จะเพิ่มประสิทธิภาพของวัตถุดิบอาหารที่ได้จากพืช ดีกว่าสัตว์ โดยการเพิ่มการย่อยคาร์โบไฮเดรตได้ดีกว่าการเพิ่มการย่อยโปรตีน จึงทำให้อัตราส่วนของ การย่อยโปรตีนและคาร์โบไฮเดรต ลดลง (ยกเว้น กากมะพร้าว) และเมื่อพิจารณาประสิทธิภาพ การย่อยโปรตีนและคาร์โบไฮเดรต โดยเอนไซม์สกัดจากลำไส้ปลานิลทุกช่วงอายุ (ภาพที่ 5-17) จะ พบว่าปลาปน และกากถั่วเหลือง เป็นวัตถุดิบอาหารที่เมื่อผ่านการฉายรังสี และนำมาศึกษา *in vitro* digestibility มีผลทำให้ประสิทธิภาพการย่อยทั้ง โปรตีน คาร์โบไฮเดรต ดีกว่าวัตถุดิบอาหารชนิดอื่น ๆ ทุกช่วงอายุ แสดงถึงควมมีคุณภาพที่ดีในการใช้เป็นวัตถุดิบอาหารสัตว์

## 2. การวิเคราะห์คุณภาพอาหารที่ใช้เลี้ยงปลานิล

การวิเคราะห์คุณภาพอาหารสัตว์สำหรับใช้เลี้ยงปลานิลแปลงเพศ วิธีการนี้สามารถใช้เป็น เกณฑ์ในการตรวจสอบหรือประเมินคุณค่าเชิงปริมาณทาง โภชนะหรือสารอาหารที่เป็นองค์ประกอบ ของวัตถุดิบอาหารแต่ละชนิด สำหรับใช้ในการคำนวณสูตรอาหารหรือกำหนดราคาวัตถุดิบอาหาร ควบคุมคุณภาพการผลิตให้มีความถูกต้อง โดยข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ปริมาณ โภชนะในวัตถุดิบ อาหารไม่สามารถบอกถึงความต้องการของร่างกายสัตว์ที่สามารถนำไปใช้ได้มากนักเพียงใด ฉะนั้น จึงต้องพิจารณาร่วมกับข้อมูลการย่อยวัตถุดิบอาหารในหลอดทดลอง และการใช้ประโยชน์ได้ของ โภชนะ (*in vitro* digestibility and availability) เพื่อให้ประเมินคุณภาพอาหารสัตว์ได้อย่างถูกต้อง เหมาะสม

ค่าที่ได้จากการวิเคราะห์เถ้าออกมาเป็นปริมาณเถ้ารวม ( total ash) ในอาหารนั้น คือ สาร อนินทรีย์ที่เหลืออยู่ภายหลังจากการเผาตัวอย่างด้วยความร้อนสูง สารอนินทรีย์ที่เหลืออยู่ คือ ปริมาณ แร่ธาตุหลายๆ ชนิดที่มีอยู่ในอาหาร แต่ปริมาณเถ้าที่ได้ไม่ใช่ปริมาณแร่ธาตุทั้งหมดที่มีอยู่ในอาหารจริง เนื่องจากแร่ธาตุบางส่วนอาจสูญหายจากการระเหยและอาจมีบางส่วนเกิดแปรสภาพโดยทำปฏิกิริยากับ สารประกอบอื่น ในขณะที่เผาด้วยความร้อนสูง แต่โดยทั่วไปปริมาณเถ้ามีค่าค่อนข้างคงที่สำหรับอาหาร ชนิดนั้นๆ แต่กรณีที่มีปริมาณเถ้าสูงกว่าปกติ อาจเป็นเพราะอาหารนั้นเกิดการปลอมปน ผลวิเคราะห์ ไขมันทำให้ได้ค่าปริมาณไขมันซึ่งเป็นสารอินทรีย์ มีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำแต่ละลายในตัวทำละลาย อินทรีย์ได้ดี การทดลองนี้ใช้ปิโตรเลียมอีเทอร์เป็นสารสกัด ไขมันที่ต้องการพร้อมกับตัวทำละลาย จึงทำให้ได้ค่าสารที่ไม่ใช่ไขมันแถมรวมอยู่ เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนใช้วิธีการของ เคดาห์ล (Kjeldahl method) คือ วัดปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดที่มีในอาหารรวมทั้งสารที่ไม่ใช่โปรตีน (non-protein nitrogen, NPN) ทำให้ค่าที่ได้เป็นปริมาณรวมซึ่งจะได้ค่ามากกว่าความเป็นจริง

ปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่คำนวณได้ มาจากคาร์โบไฮเดรต ส่วนที่สัตว์น้ำย่อยไม่ได้ (เยื่อใย) และคาร์โบไฮเดรตที่สัตว์น้ำใช้ประโยชน์ได้ คือ สารอินทรีย์ส่วนที่เรียก nitrogen-free extract (NFE) เป็นส่วนของคาร์โบไฮเดรตที่อยู่ในรูปแป้งและน้ำตาลเป็นส่วนใหญ่ ทำให้การคำนวณโดยวิธีนี้ไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในด้านอาหารสัตว์น้ำ จากการวิเคราะห์ปริมาณเยื่อใย ซึ่งใช้กรดอ่อนและด่างอ่อนละลายสารอินทรีย์ส่วนที่สัตว์สามารถย่อยได้ออกจากตัวอย่าง เช่น น้ำตาล โปรตีน แป้ง เป็นต้น ส่วนที่เหลือ คือ สารอินทรีย์ส่วนที่ย่อยไม่ได้ (เยื่อใย) เช่น เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน และสารอินทรีย์พวกแร่ธาตุต่างๆ หลังจากนำส่วนที่เหลือไปเผาจะได้ปริมาณสารอินทรีย์ที่อยู่ในอาหาร ส่วนปริมาณสารอินทรีย์ที่หายไปหลังการเผา คือ ปริมาณเยื่อใยในตัวอย่างอาหาร

การ วิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาวัตถุดิบอาหาร 13 ชนิด (proximate analysis) (ตารางที่ 3) ที่ใช้เลี้ยงปลานิลแปลงเพศ เปรียบเทียบระหว่างวัตถุดิบอาหารที่ผ่านกระบวนการฉายรังสีและวัตถุดิบอาหารชนิดเดียวกันแต่ไม่ผ่านการฉายรังสี พบว่า ค่าตัวเลขที่ได้ทั้งค่า % ความชื้น โปรตีน ไขมัน เยื่อใย เถ้า และคาร์โบไฮเดรต ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ รวมทั้งค่าตัวเลขที่ได้ยังมีค่าใกล้เคียงกับผล proximate analysis ทั่วๆ ไป (ตารางผนวกที่ 1) เป็นไปได้ว่าการฉายรังสีไม่มีผลกระทบต่อวัตถุดิบอาหารสัตว์ในเชิงปริมาณ แต่อาจมีผลต่อวัตถุดิบอาหารสัตว์ในเชิงคุณภาพ เช่น การฉายรังสีที่วัตถุดิบอาหารทำให้ออกซิเดชันของไขมันถูกกระตุ้นให้ออกจากอะตอมซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงเชิงเคมีในอะตอมและโมเลกุลเรียกกระบวนการนี้ว่า ionization ซึ่งเป็นการสร้างอะตอมหรือโมเลกุลให้มีประจุบวก (cations) จากการสูญเสียอิเล็กตรอนที่เป็นประจุลบ กระบวนการนี้ทำให้เกิด อิเล็กตรอนอิสระ (free radical) (Siddhuraju *et al.*, 2002) ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโมเลกุลเชิงเคมีของคาร์โบไฮเดรต และโปรตีนภายในวัตถุดิบอาหาร การฉายรังสีที่ระดับ 10 kGy หรือ 50 kGy ของรำข้าวสาลีสำหรับให้อาหารไก่ไม่มีผลในการเปลี่ยนแปลงคุณค่าทางอาหาร (Wang *et al.*, 1997) นอกจากความเข้มข้นของกรดอะมิโนไลซีนและอะจินินในโปรตีนของรำข้าวสาลี หรือโปรตีนข้าวโพดที่ผ่านการฉายรังสีระดับ 28 kGy หรือ 93 kGy ตามลำดับ จะไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงแล้ว แต่ยังมีผลต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยโปรตีน (protein digestibility) ในไก่ด้วย (Metta and Johnson, 1959)

### 3. ศึกษาความแตกต่างของรูปแบบโปรตีนในวัตถุดิบอาหาร 13 ชนิด เปรียบเทียบระหว่างวัตถุดิบอาหารที่ผ่านการฉายรังสีและวัตถุดิบอาหารชนิดเดียวกันที่ไม่ผ่านการฉายรังสี โดยวิธี SDS-PAGE

ในกระบวนการผลิตวัตถุดิบอาหารจากโปรตีนสัตว์ เช่น ปลาป่น เลือดป่น และเนื้อและกระดูกป่น (ภาพที่ 18) ทำให้เกิดการจับซ้อนของโปรตีนโมเลกุล นั่นคือ การพันธะไดซัลไฟด์อย่างที่เกิดขึ้นในปลาป่น (Rungruangsak *et al.*, 2002) ทำให้ต้องมีการพัฒนาเทคนิคใหม่ในการศึกษาปริมาณโปรตีนของปลาป่น (Rungruangsak *et al.*, 2002) สำหรับโปรตีนพืช เช่น สไปรูลิน่า และวัตถุดิบที่มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตสูง เช่น รำข้าวสาลี รำละเอียด และรำหยาบ (ภาพที่ 19) กากเมล็ดปาล์ม และกากมันสำปะหลัง (ภาพที่ 20) ในการสกัด จะเกิดการรบกวนของคาร์โบไฮเดรตที่รวมอยู่กับโปรตีน ที่ไม่สามารถเห็นแถบโปรตีนจากวัตถุดิบอาหารเป็นส่วนใหญ่ ถึงแม้จะใส่ปริมาณโปรตีนที่เท่ากันในแต่ละตัวอย่าง ในวัตถุดิบอาหารที่เห็นแถบโปรตีน เช่น เลือดป่น และกากถั่วเหลือง (ภาพที่ 18) กากถั่วลิสง รำข้าวสาลี รำหยาบ (ภาพที่ 19) และ กากมะพร้าว (ภาพที่ 20) เมื่อผ่านการฉายรังสี จะแสดงแถบโปรตีนที่จางกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับแถบโปรตีนที่ไม่ฉายรังสี ซึ่งอาจแสดงถึงการฉายรังสีมีผลต่อการทำลายโครงสร้างของโปรตีนในวัตถุดิบอาหาร โดยวัตถุดิบอาหาร บางชนิดเมื่อฉายรังสี แล้วนำมาศึกษาด้วยวิธี *in vitro* digestibility จะมีผลทำให้ประสิทธิภาพการย่อยวัตถุดิบอาหารชนิดเปลี่ยนแปลงไป เช่น กากถั่วเหลือง (Farag, 1998) หรือ พีชตระกูลถั่วต่างๆ (El-Niely, 2007) เมื่อผ่านการฉายรังสี และทำการศึกษาดูด้วยวิธี *in vitro* digestibility พบว่า มีประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนเพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับวัตถุดิบชนิดเดียวกันที่ไม่ผ่านการฉายรังสี ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับทั้งชนิดของวัตถุดิบอาหารและอายุปลาที่ใช้เอนไซม์สกัด

### 4. ศึกษาลักษณะความแตกต่างของรูปแบบไอโซไซม์ทริปซิน (Trypsin isozyme patterns) จากลำไส้ปลานิลแปลงเพศ ในแต่ละช่วงอายุ โดยวิธี Substrate-gel-electrophoresis

เอนไซม์ทริปซินจากลำไส้ปลานิลมีหลายไอโซไซม์ และแสดงออก (express) ในหลายรูปแบบ (patterns) ดังแสดงในภาพที่ 21 โดยรูปแบบของไอโซไซม์ทริปซิน (trypsin phenotypes) จะแตกต่างกันในแต่ละช่วงอายุและแสดงออกในระดับที่แตกต่างกันเมื่อเลี้ยงด้วยอาหารที่มีแหล่งโปรตีนแตกต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบ รูปแบบไอโซไซม์ทริปซินระหว่างปลานิล (ภาพที่ 21) กับปลา Atlantic salmon และ Arctic charr (ภาพผนวก ฅ) ซึ่งได้ทำการศึกษามาก่อน (Rungruangsak *et al.*, 1985, 2000) พบว่ามีรูปแบบคล้ายคลึงกันมากกับปลา Atlantic salmon คือ จะพบเอนไซม์ทริปซิน อย่างน้อย 6 ไอโซไซม์

เช่นกัน และอาจสามารถลองเปรียบเทียบแต่ละไอโซไซม์ของปลานิล กับปลา Atlantic salmon ได้ ดังนี้

$$\begin{array}{lll} \text{ไอโซไซม์ 1} = \text{TRP-1*75} & \text{ไอโซไซม์ 2} = \text{TRP-1*91} & \text{ไอโซไซม์ 3} = \text{TRP-1*100} \\ \text{ไอโซไซม์ 4} = \text{TRP-2*92} & \text{ไอโซไซม์ 5} = \text{TRP-2*100} & \text{ไอโซไซม์ 6} = \text{TRP-3} \end{array}$$

รูปแบบของ ไอโซไซม์ทริปซิน (trypsin phenotypes) จะพบได้น้อย 10 รูปแบบในปลา Atlantic salmon และอย่างน้อย 2 รูปแบบในปลา Arctic charr (ภาพผนวก ฉ) สำหรับในปลานิลจะพบได้น้อย 10 รูปแบบ (ภาพที่ 22) ทั้งนี้ (Rungruangsak *et al.*, 1998) ได้ศึกษาคุณสมบัติของ trypsin phenotypes ในปลา Atlantic salmon พบว่า ทริปซิน TRP-2\*100 มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตที่อุณหภูมิสูง ( $> 8^{\circ}\text{C}$ ) และ ทริปซิน TRP-2\*92 มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตที่อุณหภูมิต่ำ ( $\leq 8^{\circ}\text{C}$ ) โดยเฉพาะที่อุณหภูมิ  $< 6^{\circ}\text{C}$  (Rungruangsak and Stensholt, 2001) ได้ศึกษาคุณสมบัติของ trypsin phenotypes ในปลา Atlantic salmon ในทะเล (Norwegian Sea) พบว่าในสภาวะที่มีอาหารจำกัด ปลาจะกระจายตัวอยู่ในแหล่งทะเลที่มีอุณหภูมิสอดคล้องและเหมาะสมกับ trypsin phenotype เพื่อให้การย่อยโปรตีนในอาหารมีผลดีที่สุด

## 5. การแยกบริสุทธิ์โปรตีนทริปซินในลำไส้ปลานิลแปลงเพศ

การแยกทำบริสุทธิ์เอนไซม์ทริปซินในลำไส้ปลานิลแปลงเพศ อายุ 7 เดือน ในเบื้องต้น ได้ทำการตกตะกอนโปรตีนในลำไส้ปลานิล ด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นอิ่มตัว แอมโมเนียมซัลเฟตช่วง 0-20% 20-40% 40-60% และ 60-80% ตามลำดับ พบว่าเมื่อนำสารละลายเอนไซม์ในแต่ละส่วนวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน และกิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินโดยใช้ BAPNA เป็นสับสเตรท พบว่า ช่วงการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 40-60% มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินสูงสุด และค่าปริมาณโปรตีนทั้งหมด (total protein) สูงสุด คือ 129.63 มิลลิกรัม จากนั้นนำสารละลายเอนไซม์ ที่ตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นอิ่มตัว แอมโมเนียมซัลเฟตช่วง 40-60% มาทำให้บริสุทธิ์โดยนำมาผ่านคอลัมน์ Sephadex G-100 ซะคอลัมน์ ด้วย บัฟเฟอร์ที่มี (10 mM Tris-HCl, pH 8 และ 1 mM  $\text{CaCl}_2$ ) เป็นบัฟเฟอร์เริ่มต้น (Starting buffer, SB) แยกเก็บสารละลาย และนำสารละลายที่แยกเก็บในหลอดทดลอง นำแต่ละหลอดวัดปริมาณโปรตีนที่ค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 280 nm และวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ทริปซิน พบว่า ส่วนเอนไซม์ทริปซินจะออกมาที่ปริมาตรที่ 43.5 ml (หลอดที่ 95-123) รวมหลอดที่มีกิจกรรมของเอนไซม์

ทริปซินเข้าด้วยกัน และนำสารละลายเอนไซม์ที่ได้ไปผ่านคอลัมน์ Q-sepharose ๕ ด้วย SB ที่มี 1 M NaCl แยกเก็บสารละลายในหลอดทดลองทั้งส่วนของ flow through (หลอดที่ 1 3 และ 5) peak ที่ 1 (หลอดที่ 22-26) และ peak ที่ 2 (หลอดที่ 29-32) จากนั้นตรวจสอบรูปแบบของแถบโปรตีน ด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่าส่วนของ flow through peak ที่ 1 และ peak ที่ 2 มีแถบโปรตีนมากกว่า 1 แถบ และวิเคราะห์กิจกรรมของทริปซิน โดยใช้ BAPNA เป็นสับสเตรท พบว่าทั้งส่วน flow through peak ที่ 1 และ peak ที่ 2 ต่างมีกิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินอยู่ โดยในเบื้องต้นนี้เรายังไม่สามารถทำการแยกบริสุทธิ์เอนไซม์ทริปซินได้ จึงต้องมีการศึกษาการทำบริสุทธิ์เอนไซม์ทริปซินด้วยวิธีอื่น ๆ ต่อไปและจากการศึกษาการทำบริสุทธิ์เอนไซม์ทริปซินในปลากระพงขาว *Coryphaenoides pectoralis* ปลาทูน่า *Katsuwonus pelamis* (Klomkao et al., 2009, 2007) และปลาดาว *Asterina pectinifera* (Kishimura and Hayashi, 2002) พบว่า ขั้นตอนการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต Sephacryl S-200 DEAE-cellulose และ Sephadex G-50 สามารถหาความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ทริปซินได้ โดยเอนไซม์นี้มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ที่ 24 24 และ 28 kDa ตามลำดับ จากการหาโดยวิธี SDS-PAGE และในปลากระพงข้างเหลือง *Pracanthus macracanthus* (Benjakul and Hau, 2006) สามารถใช้การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต และ Soybean trypsin inhibitor -affinity chromatography หาความบริสุทธิ์เอนไซม์ทริปซินได้ โดยเอนไซม์ทริปซินมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ที่ 23.8 kDa ซึ่งได้จากการตรวจสอบโดยวิธี SDS-PAGE เช่นกัน

## สรุปและข้อเสนอแนะ

### สรุป

1. วัตถุดิบอาหารสัตว์ ชนิด กากถั่วเหลือง และปลาป่นที่ผ่านการฉายรังสี สามารถนำไปพัฒนาเป็นสูตรอาหารสำหรับเลี้ยงปลานิล
2. การฉายรังสีในวัตถุดิบอาหารสัตว์ มีส่วนช่วยให้ประสิทธิภาพการย่อย โปรตีนและคาร์โบไฮเดรตในหลอดทดลองเพิ่มสูงขึ้น และไม่มีผลในการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบพื้นฐานทางโภชนา
3. โปรตีนของวัตถุดิบอาหารมีความซับซ้อนของโมเลกุลที่แตกต่างกัน ทำให้ต้องมีการพัฒนาเทคนิคใหม่ในการสกัดปริมาณโปรตีนก่อนศึกษาด้วยวิธี SDS-PAGE
4. รูปแบบของไอโซไซม์ทริปซิน (trypsin phenotypes) แตกต่างกันในแต่ละช่วงอายุของปลานิล และแสดงออกในระดับที่แตกต่างกัน เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารที่มีแหล่งโปรตีนแตกต่างกัน

### ข้อเสนอแนะ

1. วัตถุดิบอาหารสัตว์ที่ผ่านการฉายรังสีซึ่งได้คัดเลือกไว้ ควรนำไปพัฒนาเป็นสูตรอาหารและนำไปทดลองเลี้ยงจริงโดยพิจารณาร่วมกับปัจจัยอื่นๆ ที่มีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตของปลา
2. การพัฒนาสูตรอาหารที่ผ่านการฉายรังสี สำหรับเลี้ยงปลานิลนอกจากต้องทราบคุณค่าทางโภชนาของวัตถุดิบและข้อมูลด้านการย่อยแล้วยังต้องพิจารณาความต้องการสารอาหารแต่ละชนิดโดยอ้างอิงจากปลากินพืชหรือปลากินพืชและเนื้อ คือ โปรตีน 20-25% และ 25-35% ตามลำดับ แป้ง 40-50% และ 30-40% ส่วนไขมัน 10% สำหรับวิตามินและแร่ธาตุไม่นิยมผสมในอาหารโดยตรงเนื่องจากใช้ในปริมาณน้อยมากในสูตรอาหารจึงมักถูกผสมไว้ล่วงหน้ากับสื่อบางชนิด เรียกว่า สารผสมล่วงหน้า (premix) จากนั้นจึงนำสารผสมล่วงหน้าไปผสมในสูตรอาหารต่อไป นอกจากนี้ยังมีวัตถุดิบที่ช่วยเสริมคุณภาพของอาหาร เช่น สารประสานอาหาร สารแต่งกลิ่นอาหาร สารกันหืน และรา เป็นต้น โดยนำข้อมูลที่ได้ทั้งหมดมาพิจารณาร่วมกัน

3. การศึกษาความแตกต่างของรูปแบบโปรตีนในวัตถุดิบอาหาร 13 ชนิด เปรียบเทียบระหว่างวัตถุดิบอาหารที่ผ่านการฉายรังสีและวัตถุดิบอาหารชนิดเดียวกันที่ไม่ผ่านการฉายรังสี โดยการศึกษาขั้นต่อไป จำเป็นต้องศึกษาวิธีการสกัดโปรตีนจากวัตถุดิบอาหาร เพื่อให้ได้โปรตีนทั้งหมดสำหรับศึกษาโดย SDS-PAGE เพื่อให้เห็นการแสดงออกของแถบโปรตีนได้ชัดเจน

4. การศึกษาลักษณะความแตกต่างของรูปแบบไอโซไซม์ทริปซิน (Trypsin isozyme patterns) จากลำไส้ปลานิลแปลงเพศ ในแต่ละช่วงอายุ โดยวิธี Substrate-gel-electrophoresis สำหรับในปลาชนิดอื่นๆ รวมทั้งปลานิล ยังเคยมีการศึกษาในรายละเอียดเช่นนี้มาก่อน การศึกษา trypsin phenotypes ในปลานิล ทำให้สังเกตได้ว่า ปลานิลซึ่งเป็นจำพวกปลาที่กินทั้งพืชและสัตว์ มีรูปแบบของ trypsin phenotypes คล้ายคลึงกับปลาจากพวกที่กินสัตว์ เช่น Atlantic salmon และคุณภาพของโปรตีนในอาหารมีผลต่อการพัฒนาการผลิตแต่ละไอโซไซม์ของทริปซินในลำไส้ ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อ การเจริญเติบโตที่สภาวะแตกต่างกัน สิ่งที่น่าสนใจเพิ่มเติม คือ ควรศึกษา trypsin phenotypes ในปลาเฉพาะจำพวกที่กินพืช เพื่อศึกษาเปรียบเทียบรูปแบบที่แตกต่างไปจากปลานิล และปลา Atlantic salmon หรือไม่ นอกจากนี้ควรเพิ่มรายละเอียดในการศึกษาปลานิล ด้วยจำนวนปลามากกว่านี้ของแต่ละช่วงอายุ เพื่อจะได้เห็นการเปลี่ยนแปลงของแต่ละไอโซไซม์ที่สภาวะแตกต่างกัน

5. ควรใช้วิธี Substrate-gel-SDS-PAGE ตรวจสอบไอโซไซม์ทริปซินจากปลานิลที่ได้รับสูตรอาหารที่พัฒนาจากวัตถุดิบอาหารที่ผ่านการฉายรังสี

6. ในเบื้องต้นไม่สามารถแยกทำบริสุทธิ์โปรตีนทริปซิน เนื่องจากโปรตีนที่ได้มีมากกว่า 1 peak แต่ละ peak เมื่อตรวจสอบด้วย SDS-PAGE กลับพบว่า มีโปรตีนมากกว่า 1 แบน ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาทำบริสุทธิ์ด้วยขั้นตอนการแยกวิธีอื่นๆต่อไป

## เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กรมการค้าภายใน. 2550. ราคาดินค้าพืชไร่และวัตถุดิบอาหารสัตว์. แหล่งที่มา:

<http://www.dit.go.th/contentdetail.asp?TypeID=4&catid=109&id=192>, 30 มีนาคม 2550.

กรมศุลกากร. 2549. ข้อมูลการส่งออกปลาสำเร็จในประเทศไทย ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2545-2549.

แหล่งที่มา: <http://www.customs.go.th/>, 5 สิงหาคม 2549.

การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ. 2552. การคัดเลือกพันธุ์และการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่สำคัญ. แหล่งที่มา:

<http://coursewares.mju.ac.th/section2/fa301/Lession/lession2.htm>, 22 กุมภาพันธ์ 2553.

กลุ่มวิจัยอาหารสัตว์น้ำ. 2534. อาหารสัตว์น้ำ. เอกสารพิมพ์เผยแพร่โดยฝ่ายฝึกอบรม

กองส่งเสริมการประมง กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

โสภิต สร้อยสอดศรี. 2550. ปัญหาการให้อาหารปลานิลแปลงเพศ เทคนิคการแปลงเพศ

โดยวิธีการแช่. แหล่งที่มา: [http://naffi.trf.or.th/document/telapia\\_doc/19y6is1p24-25.pdf](http://naffi.trf.or.th/document/telapia_doc/19y6is1p24-25.pdf),

9 สิงหาคม 2553.

ประเสริฐ สีตะสิทธิ์, มะลิ บุญยรัตผลิน และ นันทิยา อุ่นประเสริฐ. 2525. อาหารปลา.

สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

พันทิพา พงษ์เพ็ญจันทร์. 2533. หลักการอาหารสัตว์ หลักโภชนศาสตร์และการประยุกต์.

ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.

พิพัฒน์พงษ์ จันทร์แดง. 2553. ผลของรังสีแกมมาต่อความสามารถในการย่อยโปรตีน

ในห้องปฏิบัติการของกากเมล็ดสบู่ดำ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท,

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. 2536. อาหารปลา. โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ.

สุกัญญา จัตตุพรพงษ์. 2530. วัตถุดิบอาหารสัตว์: การใช้และการตรวจสอบคุณภาพ. ศูนย์วิจัยและฝึกอบรมการเลี้ยงสุกรแห่งชาติ.

ศรายุทธ ขัดคำ. 2551. ผลของรังสีแกมมาต่อกิจกรรมของสารยับยั้งทริปซินในเมล็ดสับดูดา. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดอุดรธานี. 2549. คู่มือการผลิตปลานิลแปลงเพศ. แหล่งที่มา: <http://www.fisheries.go.th/if-udonthani/data/Sex%20reversal%20tilapia.pdf>, 8 ธันวาคม 2552.

ศูนย์สารสนเทศ กรมประมง. 2548. สถิติการประมงแห่งประเทศไทย พ.ศ. 2546. เอกสารเผยแพร่ฉบับที่ 6/2548. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

Abu-Tarboush, H. 1998. Irradiation Inactivation of Some Antinutritional Factors in Plant Seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 46: 2698-2702.

Ahsan, M. and S. Watabe. 2001. Kinetic and Structural Properties of Two Isoforms of Trypsin Isolated from the Viscera of Japanese Anchovy, *Engraulis japonicas*. **Journal of Protein Chemistry**. 20: 49-58.

Al-Kahtani, H. A. 1995. Some antinutritional factors in *Moringa peregrina* (Al-Yassar or Al-ban) and soybean products. **Journal of Food Science**. 60: 395-398.

Al-Kaisey, M., H. Abdul-Kader, H. Manal, A. Mohammad and A. Saeed. 2003. Effect of gamma irradiation on antinutritional factors in broad bean. **Radiation Physics and Chemistry**. 67: 493-496.

Al-Masri, M. R. 1998. Changes in Contents and In vitro Digestibility of Laying-hens Excreta used as Feedstuffs of Laying-hens Excreta used as Feedstuffs due to Drying and Gamma Irradiation. **Applied Radiation and Isotopes**. 7: 767-771.

- Al-Masri, M. R. 1999. In vitro digestibility energy of some agricultural residues, as influenced by gamma irradiation and sodium hydroxide. **Applied Radiation and Isotopes**. 50: 295-301.
- AOAC. 2000. Animal feed, pp.1-54. *In* Firestone, D. **Official methods of analysis of AOAC International, 17<sup>th</sup> ed. Chapter 4**. Maryland, USA.
- Arai, S. 1989. Practical feeding: Eels, pp. 223-230. *In* Lovell, T., ed. **Nutrition and feeding of fish**. Van Nostrand Reinhold, New York.
- Benjakul, H. and P. Hau. 2006. Purification and characterization of trypsin from pyloric caeca of bigeye anapper (*Pricanthus macracantrus*). **Journal of Food Biochemistry**. 30: 478-495.
- Berndtson, A. and F. Goetz. 1988. Protease activity in Brook Trout (*Salvelinus fontinalis*) follicle walls demonstrated by Substrate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. **Biology of reproduction**. 38: 511-516.
- Bernfeld, P. 1951. Enzymes of starch degradation and synthesis. **Advanced Enzyme**. 12: 379.
- Bezerra, R., E. Lins, R. Alencar, P. Paiva, M. Chaves, L. Coelho and L. Carvalho. 2005. Alkaline proteinase from intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Process Biochemistry**. 40: 1829-1834.
- Bollag, D. M., S. J. Edelstein. 1991. **Protein Methods**. Wiley, New York.
- Carpenter, K. J. 1960. The Estimation of the Available Lysine in Animal-Protein Foods. **Biochemical Journal**. 77: 604-610.

- Casare, M. S., J. A. Baptista, P. J. Spencer and N. Nascimento. 2004. Effects of  $^{60}\text{Co}$  radiation on the molecular structure of crotonamine. **Radiation Physics and Chemistry**. 71: 417-418.
- Casarett, A.P. 1968. **Radiation Biology**. Prentice-Hall, New Jersey.
- Castillo-Yañeza, F., R. Pacheco-Aguilarb, F. Garcí'a-Carren˜oc and M. Navarrete-Del Toro. 2005. Isolation and characterization of trypsin from pyloric caeca of Monterey sardine *Sardinops sagax caerulea*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**. 140: 91-98.
- \_\_\_\_\_, R. Pacheco-Aguilarb, M. Lugo-Sanchez, G. Garcia-Sanchez and I. Quintero-Reyes. 2009. Biochemical characterization of an isoform of chymotrypsin from the viscera of Monterey sardine (*Sardinops sagax caerulea*), and comparison with bovine chymotrypsin. **Food Chemistry**. 112: 634-639.
- Chong, A., R. Hashim, L. Chow-Yang and A. Ali. 2002. Partial characterization and activities of proteases from the digestive tract of discus fish (*Symphysodon aequifasciata*). **Aquaculture**. 203: 321-333.
- D'iaz, M., F. J. Moyano, F. L. Garcí'a-Carren˜o, F. J. Alarco'n1 and M. C. Sarasquete. 1997. Substrate-SDS-PAGE determination of protease activity through larval development in sea bream. **Aquaculture International**. 5: 461-471.
- Ee, K. Y., J. Zhao, A. Rehman and S. Agboola. 2008. Characterisation of trypsin and alpha chymotrypsin inhibitors in Australian wattle seed (*Acacia victoriae* Bentham). **Food Chemistry**. 107:337-343.

- El-Shibawi, K. M. S. 1984. **biochemical changes in protein of some food stuffs by ionizing radiation**. MSc thesis, Biochemistry Department Faculty of Agriculture, Cairo University, Giza.
- Farag, M. D. E. H. 1998. The nutritive value for chicks of full-fat soybeans irradiated at up to 60 kGy. **Animal Feed Science and Technology**. 73: 319-328.
- Fifield, C. C., C. Golumbia and J. L. Pearson. 1967. Effects of irradiation on the biochemical storage and bread making properties of wheat. **Cereal Science**. 12: 253-257.
- Francis, G., H. P. S. Marker and K. Becker. 2001. Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. **Aquaculture**. 199: 197-227.
- Froese, R. and D. Pauly. 2010. FishBase. World Wide Web electronic publication. Available Source: [www.fishbase.org](http://www.fishbase.org), August 1, 2010.
- Hall, E. J., D. Phil and F. A. C. R. 1994. **Radiobiology for the Radiologist**. 4<sup>th</sup> ed. J. B. Lippincott Company, Philadelphia.
- Hania, F. G. 2007. Effect of radiation processing on antinutrients, in-vitro protein digestibility and protein efficiency ratio bioassay of legume seeds. **Radiation Physics and Chemistry**. 76: 1050-1057.
- Hau, P. and H. Benjakul. 2006. Purification and Characterization of Trypsin from Pyloric caeca of Bigeye Snapper (*PRICANTHUS MACRACANTHUS*). **Journal of Food Biochemistry**. 30: 478-495.
- Hardy, R. W. 1989. Practical feeding Salmon and trout, pp. 185-203. In Lovell, T. **Nutrition and feeding of fish**. Van Nostrand Reinhold, New York.

- Hayakawa, S., H. Suzuki, T. Hayashi and K. Kawashima. 1985. Effect of gamma-irradiation on the nutritive value of domestic animal feeds. **Reports of Natural Food Research Institute**. 46: 109-113.
- Hickman, J. R., D. L. A. Mclean and F. J. Ley. 1964. Rat feeding studies on wheat treated with gamma irradiation 1 Reproduction. **Food and Cosmetics Toxicology**. 2: 15-20.
- Khattak, A. B. and C. F. Kloppenstein. 1989. Effects of gamma irradiation on the nutritional quality of grain and legume. **Cereal Chemistry**. 66: 170-171.
- \_\_\_\_\_, T. Simpson and Ihasnullah. 2009. Effect of gamma irradiation on the microbial load, nutrient composition and free radical scavenging activity of *Nelumbo nucifera* rhizome. **Radiation Physics and Chemistry**. 78: 206-212.
- Kishimura, H., S. Klomklao, S. Benjakul and B. Chun. 2008. Characteristics of trypsin from the pyloric ceca of walleye pollock (*Theragra chalcogramma*). **Food Chemistry**. 106: 194-199.
- \_\_\_\_\_ and Hayashi, K. 2002. Isolation and characteristics of trypsin from pyloric ceca of the starfish *Asterina pectinifera*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**. 132: 485-490.
- Klomklao, S., S. Benjakul and W. Visessanguan. 2004. Comparative Studies on Proteolytic activity of Splenic Extract from Three Tuna species commonly used in Thailand. **Journal of Food Biochemistry**. 28: 355-372.
- \_\_\_\_\_, S. Benjakul, W. Visessanguan, K. Kishimura and B. Simpson. 2007. Purification and characterisation of trypsins from the spleen of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). **Food Chemistry**. 100: 1580-1589.

- Klomklao, S., H. Kishimura, Y. Nonami and S. Benjakul. 2009. Biochemical properties of two isoforms of trypsin purified from the Intestine of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). **Food Chemistry**. 115:155-162.
- \_\_\_\_\_, H. Kishimura and S. Benjakul. 2009. Trypsin from the Pyloric Ceca of Pectoral Rattail (*Coryphaenoides pectoralis*): Purification and Characterization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Available Source: <http://pubs.acs.org> | doi: 10.1021/jf901157f., August 9, 2010.
- Lagunas-Solar, M. C. 1995. Radiation processing of foods. An overview of scientific principles and current status. **Journal of Food Protection**. 58:186-192.
- Lee, C. C. 1962. Electron paramagnetic resonance (EPR) and packing studies on g-irradiation flour. **Cereal Chemistry**. 39: 147-155.
- Liener, I. E. 1994a. Antinutritional factors related to proteins and amino acids. *In* Y. H. Hui, J. R. Gorham, K. D. Murrel and D. O. Cliver (Eds.). **Foodborne disease handbook (vol. 3)**. Marcel Dekker Inc., New York.
- \_\_\_\_\_. 1994b. Implications of antinutritional components in soybean foods. **Food Science and Nutrition**. 34: 31-67.
- Lim, C. and A. Persyn. 1989. Practical feeding: Penaeid shrimps, pp. 205-222. *In* Lovell, T., ed. **Nutrition and feeding of fish**. Van Nostrand Reinhold, New York.
- Lovell, T. 1975. **How much protein in feeds for channel catfish**. The Commercial Fish Farmer and Aquaculture News, March-April 1975.
- Lynn, K. R. 1973. Some effects of gamma-irradiation on dilute solution of chymotrypsinogen. **International Journal of Radiation Biology**. 23: 227-233.

- Lynn, K. R. and A. P. D. Raoult. 1976. Irradiation of lima bean protease inhibitor in dilute aqueous Solutions. **Radiation Research.** 65: 41-49.
- Mangalik, A. 1986. **Dietary energy requirements for channel catfish.** Ph.D. Dissertation, Auburn University, Auburn, Alabama.
- Mani, V. and P. Chandra. 2005. Effect of feeding-irradiated soybean on growth performance and blood metabolites in barbari kids. **Small Ruminant Research.** 57: 213-219.
- Maton, A., J. Hopkins, C. W. McLaughlin, S. Johnson, M. Q. Warner, D. LaHart and J. D. Wright. 1993. **Human Biology and Health.** Prentice Hall, New Jersey.
- Metta, V. C. and B. C. Johnson. 1959. Biological value of gamma irradiated corn protein and wheat gluten. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** 7: 131-133.
- Moran, E. T., J. D. Summers and H. S. Blayley. 1968. Effect of cobalt 60 gamma irradiation on the utilisation of energy, protein and phosphorus from wheat bran by the chicken. **Cereal Chemistry.** 45: 469-479.
- Parther, E. E. and R. T. Lovell. 1972. Effect of vitamin fortification in Auburn No. 2 fish feed, pp. 479-483. *In Proc. S. and E. Assoc, eds.* **Game and Fish Common.** No 25.
- Provansal, M. M. P., J. A. Cug and J. Cheftel. 1975. Chemical and nutritional modifications of sunflower proteins due to alkaline processing Formation of amino acid cross-links and isomerization of lysine residues. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** 23: 938-943.
- Pryor, W. A. 1984. **Free radicals in biology.** Academic Press, London.

Rungruangsak-Torrissen, K. 1993. **Trypsin isozyme TRP-2(92): a growth marker in Atlantic salmon (*Salmon salar L.*) and its effect on digestion and absorption of dietary protein.** Doctor philos. Thesis, University of Bergen, Norway.

\_\_\_\_\_. 1987. Genetic variation of trypsin-like isozymes correlated to fish size of Atlantic salmon (*Salmon salar*). **Aquaculture.** 62: 1-10.

\_\_\_\_\_. 1991. Genetic variation in growth rate of Atlantic salmon with different trypsin-like isozyme patterns. **Aquaculture.** 93: 299-312.

\_\_\_\_\_ and R. Male. 2000. Trypsin isozymes: development, digestion and structure, pp.215-269. *In* Haard, N. F. and B. K. Simpson, eds. **Seafood enzymes, utilization and influence on postharvest seafood quality.** Marcel Dekker, Inc., New York.

\_\_\_\_\_ and O. J. Torrissen. 1985. Protease activities and carotenoid levels during the sexual maturation of Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Aquaculture.** 50: 113-122.

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

\_\_\_\_\_, C. G. Carter, A. Sundby, A. Berg and D. F. Houlihan. 1999. Maintenance ration, protein synthesis capacity, plasma insulin and growth of Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) with genetically different trypsin isozymes. **Fish Physiology and Biochemistry.** 21: 223-233.

- Rungruangsak-Torrissen, K. and B. K. Stensholt. 2001. **Spatial distribution of Atlantic salmon post-smolts: Association between genetic differences in trypsin isozymes and environmental variables.** *In: Spatial Processes and Management of Marine Populations.* (ed. by G. H. Kruse, N. Bez, A. Booth, M. W. Dorn, S. Hills, R. N. Lipcius, D. Pelletier, C. Roy, S. J. Smith and D. Witherell), pp. 415–429. University of Alaska Sea Grant, AK-SG-01-02, Fairbanks.
- \_\_\_\_\_, A. Rustad, J. Sunde, S. A. Eiane, H. B. Jensen, J. Opstvedt, E. Nygaard, T. A. Samuelsen, H. Mundheim, U. Luzzana and G. Venturini. 2002. *In vitro* digestibility based on fish crude enzyme extract for prediction of feed quality in growth trials. **Journal of the Science of Food and Agriculture.** 82: 644-654.
- \_\_\_\_\_, R. Moss, L. H. Andresen, A. Berg and R. Waagbo. 2006. Different expressions of trypsin and chymotrypsin in relation to growth in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Fish Physiology and Biochemistry.** 32: 7-23.
- Sandev, S. and I. Karaivanov. 1977. The composition and digestibility of irradiated roughage: treatment with gamma irradiation. **Tierernahr Fuetter.** 10: 238-242.
- Scopes, R. K. and T. Fifis. 1978. Purification of 3-phosphoglycerate kinase from diverse sources by affinity elution chromatography. **Biochemical Journal.** 175: 311-319.
- Siddhurajua, P., H. P. S. Makkarb and K. Beckera. 2002. The effect of ionising radiation on antinutritional factors and the nutritional value of plant materials with reference to human and animal food. **Food Chemistry.** 78: 187-205.
- \_\_\_\_\_, H. P. S. Makkarb and K. Beckera. 2002a. Efeect of various indigenous processing methods on alpha-galactoside, mono-disaccharide content of Indian tribal pulse, *Mucuna pruriens* var. *utilis*. **Journal of the Science of Food and Agriculture.** 81: 718-725.

- Štajner, D., M. Milošević and M. Popović. 2007. Irradiation Effects on Phenolic Content, Lipid and Protein Oxidation and Scavenger Ability of Soybean Seeds. **International Journal of Molecular Sciences**. 8: 618-627.
- Takeuchi, T., T. Watanabe and C. Ogino. 1979. Availability of carbohydrate and lipid as dietary energy sources for carp. **Bulletin of Japanese of Society of Science and Fisheries**. 45: 977-982
- Thompson, U. 1993. Potential health benefits and problems associated with antinutrients in foods **Food Research International**. 2: 131-149.
- Toledo, T., S. Canniatti-Brazaca, V. Arthur and S. M. S. Piedade. 2007. Effects of gamma radiation on total phenolics, trypsin and tannin inhibitors in soybean grains. **Radiation Physics and Chemistry**. 76: 1653-1656.
- Trewavas, E. 1983. Tilapiine fishes of the genera *Sarotherodon*, *Oreochromis* and *Danakilia*. **Bulletin of the British Museum (Natural History)**. London, UK.
- Viljanen, K. 2005. Protein oxidation and protein-lipid interactions in different food models in the presence of berry phenolics. Academic dissertation. University of Helsinki, Department of Applied Chemistry and Microbiology. 87 pp.
- Wang, G. J., R. R. Marquardt, W. Guenter, Z. Zhang and Z. Han. 1997. Effects of enzyme supplementation and irradiation of rice bran on the performance of growing Leghorn and broiler chickens. **Animal Feed Science and Technology**. 66: 47-61.



(ก) การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนใน crude enzyme extract โดยวิธีการของ Lowry *et al.* (1951)

สารเคมี:

1. สารละลายมาตรฐานโปรตีน ได้แก่ สารละลาย bovine serum albumin (BSA) เข้มข้น 1 mg/ml

2. สารละลาย A ประกอบด้วย

- โซเดียมคาร์บอเนต 20 g

- น้ำกลั่น 960 ml

- สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 3 นอร์มอล ปริมาตร 35 ml

3. สารละลาย B ประกอบด้วย

- คอปเปอร์ (II) ซัลเฟต 1 g

- น้ำกลั่น 100 ml

4. สารละลาย C ประกอบด้วย

- โพแทสเซียม

- โซเดียมทาร์เตรต 2 g

- น้ำกลั่น 100 ml

เตรียม reagent โดยผสมสารละลาย A:B:C = 100:1:1 (โดยผสมสารละลาย B กับ C ให้เข้ากันก่อน จึงผสมสารละลาย A ลงไป)

5. Folin-Ciocalteu (ผสมกับน้ำอัตราส่วน 1:1 ก่อนใช้)

## วิธีการ:

### 1. การเตรียมสารละลายมาตรฐาน BSA

เตรียมสารละลาย BSA เข้มข้น 1 mg/ml เจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0.1-1.0 mg/ml ปิเปตมาความเข้มข้นละ 100  $\mu$ l เติม reagent ปริมาตร 3 ml ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu ปริมาตร 300  $\mu$ l ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดนาน 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 750 nm เขียนกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น BSA (mg/ml) กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 750nm

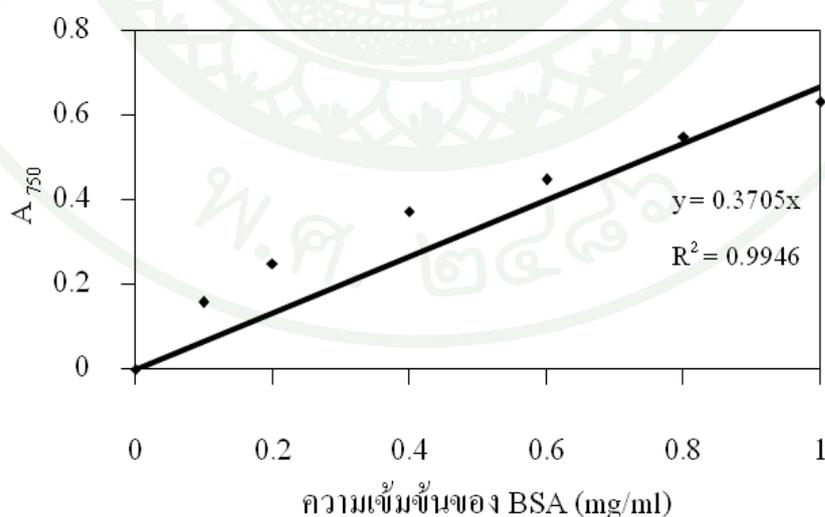
### 2. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนใน crude enzyme extract

2.1 ปิเปต crude enzyme extract ปริมาตร 100  $\mu$ l (เจือจาง 100 เท่า) ผสมกับ reagent ปริมาตร 3 ml ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที

2.2 เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu ปริมาตร 300  $\mu$ l ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดนาน 30 นาที

2.3 วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 750 nm

2.4 เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน BSA



ภาพผนวกที่ 1 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน BSA (mg/ml) กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 nm

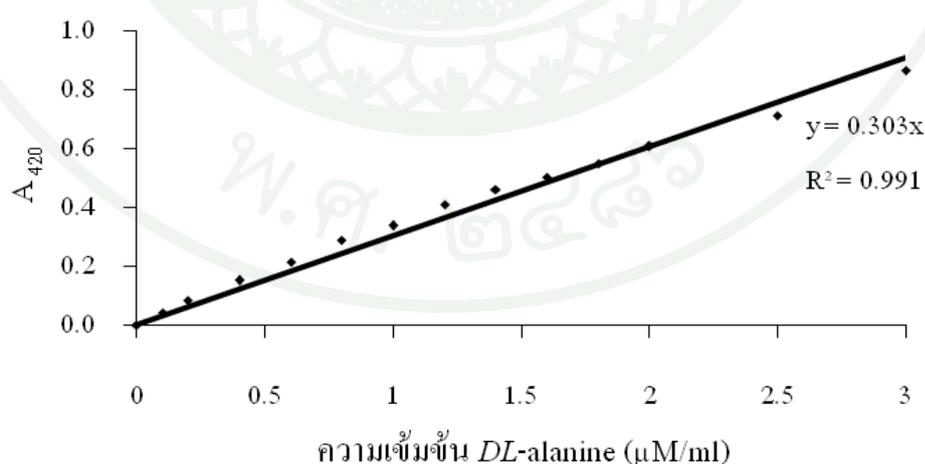
(ข) การเตรียมกราฟมาตรฐาน *DL*-alanine สำหรับ *in vitro* digestibility

สารเคมี:

1. สารละลาย มาตรฐาน *DL*-alanine เข้มข้น 0.02-0.20  $\mu\text{M}/\text{ml}$
2. สารละลาย TNBS เข้มข้น 0.1%
3. กรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 1 M

วิธีการ:

1. เจือจางสารละลาย มาตรฐาน *DL*-alanine ให้ได้ความเข้มข้น 0.2-3.0  $\mu\text{M}/\text{ml}$
2. ปิเปตสารละลายมาตรฐาน *DL*-alanine แต่ละความเข้มข้นปริมาตร 400  $\mu\text{l}$  ใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลาย TNBS เข้มข้น 0.1% ปริมาตร 500  $\mu\text{l}$  ผสมให้เข้ากัน
3. บ่มในที่มืดอุณหภูมิ 60°C นาน 1 ชั่วโมง
4. หยุดปฏิกิริยาด้วยกรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 1 M ปริมาตร 500  $\mu\text{l}$
5. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 nm
6. นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาเขียนกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ *DL*-alanine ( $\mu\text{M}/\text{ml}$ ) กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 nm



ภาพผนวกที่ 2 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน *DL*-alanine ( $\mu\text{M}/\text{ml}$ ) กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 420 nm

(ค) การเตรียมกราฟมาตรฐานน้ำตาลมอลโทส สำหรับ *in vitro* digestibility

สารเคมี:

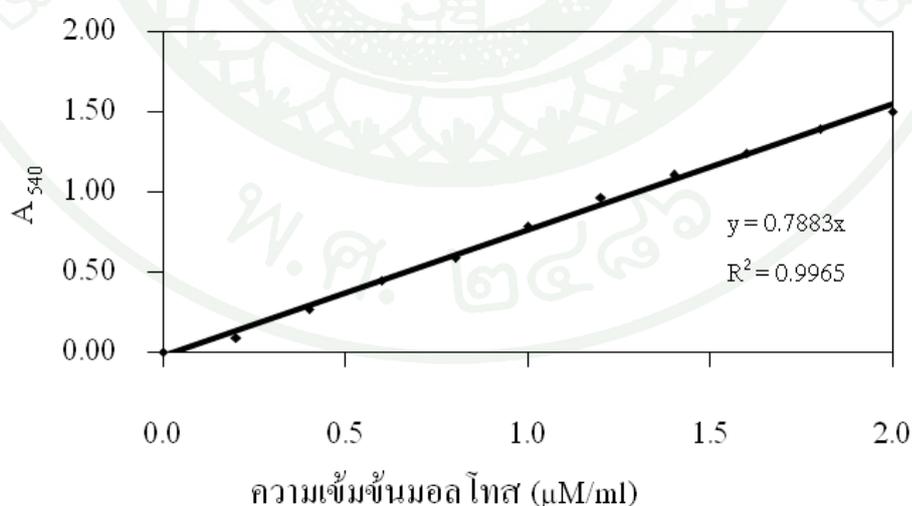
1. สารละลายมาตรฐานน้ำตาลมอลโทส เข้มข้น 10  $\mu\text{M}/\text{ml}$
2. สารละลาย 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) เข้มข้น 10 %

วิธีการ:

1. เจือจางสารละลายมาตรฐานน้ำตาลมอลโทสให้ได้ความเข้มข้น 0.2-3.0  $\mu\text{l}/\text{ml}$
2. ปิเปตสารละลายมาตรฐานน้ำตาลมอลโทสแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 1 ml

ใส่ในหลอดทดลอง

3. เติมสารละลาย DNS เข้มข้น 10% ปริมาตร 500  $\mu\text{l}$  ผสมให้เข้ากัน
4. ต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น
5. วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 540 nm
6. นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาเขียนกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโทส ( $\mu\text{M}/\text{ml}$ ) กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm



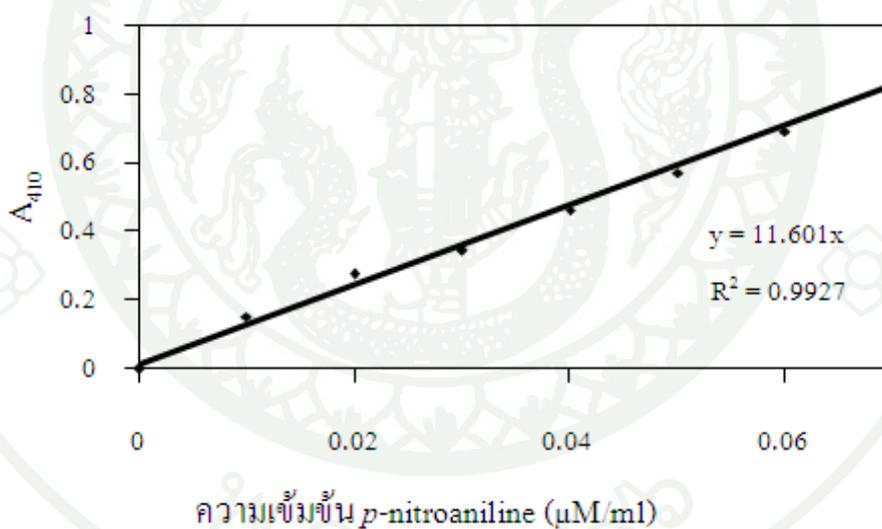
ภาพผนวกที่ 3 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานน้ำตาลมอลโทส ( $\mu\text{M}/\text{ml}$ ) กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm

### (ง) การเตรียมกราฟมาตรฐาน *p*-nitroaniline

สารเคมี: สารละลาย *p*-nitroaniline มาตรฐาน เข้มข้น 1  $\mu\text{M}/\text{ml}$  ที่มีสารละลาย dimethylformamide เข้มข้น 5% ผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl pH 8.2

วิธีการ:

1. เจือจางสารละลาย *p*-nitroaniline มาตรฐาน ให้ได้ความเข้มข้น 0.001-1.0  $\mu\text{M}/\text{ml}$
2. ปิเปิดสารละลาย *p*-nitroaniline แต่ละความเข้มข้นปริมาตร 1 ml ใส่ในคิวเวต
3. วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 410 nm
4. นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาเขียนกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ *p*-nitroaniline ( $\mu\text{M}/\text{ml}$ ) กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 nm



ภาพผนวกที่ 4 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน *p*-nitroaniline ( $\mu\text{M}/\text{ml}$ ) กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 nm

## (จ) การวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของวัตถุดิบอาหารที่ใช้เลี้ยงปลาชนิด

ตารางผนวกที่ 1 คุณค่าทางโภชนาการของวัตถุดิบอาหารสัตว์บางชนิด

วัตถุดิบ	เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักแห้ง					
	โปรตีน	ไขมัน	เยื่อใย	เถ้า	ความชื้น	คาร์โบไฮเดรต
ปลาป่น	55.90	6.24	0.72	25.77	7.94	-
เลือดป่น	82.00	1.0	0.67	4.63	10.00	1.70
เนื้อป่น	61.15	13.97	1.16	12.34	9.41	1.97
กระดูกป่น	12.90	1.21	0.62	73.62	5.42	6.23
โปรตีนข้าวโพด	<10.00	70.30	5.70	3.90	0.80	-
กากถั่วเหลือง	46-47	1.5-3.32	6.34-7	7.13	13.00	26.71
กากถั่วลิสง	45.91	5.79	3.95	8.18	7.59	-
สไปรูไลนา	>65.00	<6.00	0.65	<4.50	<10.00	11.00
รำข้าวสาลี	12-13	13-14	<18.67	6.00	5.60	42.73
รำละเอียด	12.38	18.82	6.18	8.6	9.65	44.37
รำหยาบ	6.09	3.45	25.59	16.54	9.74	38.59
กากเมล็ดปาล์ม	10.18	10.22	21.14	4.25	9.67	44.54
กากมะพร้าว	18.05	10.90	10.95	6.60	8.84	44.61
กากมันสำปะหลัง	1.75	0.48	9.24	10.76	12.74	65.03

ที่มา: ประเสริฐ, มะลิ และ นันทิยา (2525)

## (จ.1) วิธีวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (AOAC, 2000)

## สารเคมี

1. สารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (conc. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)
2. ตัวเร่งปฏิกิริยา ประกอบด้วย CuSO<sub>4</sub> 7 g และ K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 100 g
3. สารละลาย โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 40%
4. สารละลาย กรดบอริกเข้มข้น 4 % ผสมอินดิเคเตอร์ (ประกอบด้วยเมธิลเรด 20 mg และโบรโมครีซอล กรีน 100 mg ในสารละลายเอทานอลปริมาตร 100 ml) ประมาณ 4 หยด
5. สารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 0.1 M

## วิธีการทดลอง

1. ขั้นตอนการย่อยในเครื่องย่อย
  - 1.1 ชั่งน้ำหนักตัวอย่าง อาหารที่แน่นอน ประมาณ 0.5-1.0 g ใส่ลงในหลอดย่อย (W1)
  - 1.2 ใส่ตัวเร่งปฏิกิริยาประมาณ 8 g ลงในหลอดย่อยแต่ละหลอด
  - 1.3 เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้นหลอดละ 12 ml
  - 1.4 ตั้งอุณหภูมิเครื่องย่อยไว้ที่ 420 °C
  - 1.5 ตั้งหลอดย่อยบนที่ตั้งหลอด (stand) รอจนอุณหภูมิของเครื่องย่อยเป็น 420 °C  
จึงนำ stand พร้อมหลอดย่อยไปใส่ในเครื่องย่อย สวม exhaust manifold และ aspirator ลงที่ส่วนบนของหลอดย่อย
  - 1.6 เปิด power ของ exhaust manifold ปรับอัตราการดูดอากาศของ exhaust manifold ในช่วง 5 นาทีแรกของการย่อยให้มีอัตราการไหลของอากาศแรงที่สุด หลังจากนั้นจึงปรับลดอัตราการดูดอากาศให้เบาลง
  - 1.7 ย่อยต่อเป็นเวลา 30-45 นาที จนได้สารละลายสีเขียวใส แสดงว่าการย่อยเสร็จสมบูรณ์
  - 1.8 ยก stand พร้อมหลอดย่อยและ exhaust manifold ออกจากเครื่องย่อย
  - 1.9 เติมน้ำกลั่นประมาณ 70 ml ลงในหลอดย่อยแต่ละหลอดซึ่งจะทำให้เกิดผลึก เขียว จนได้สารละลายสีฟ้าใส

## 2. ขั้นตอนการกลั่นในเครื่องกลั่น รุ่น Kjeltac™ 2100

- 2.1 เปิดก๊อกหล่อเย็นที่เครื่อง
- 2.2 เปิด power ของเครื่องกลั่นตั้งเวลาในการกลั่น 4 นาที
- 2.3 อุ่นเครื่องกลั่น โดยใช้ erlenmeyer flask เป่ารองรับ และใส่หลอดที่มีน้ำกลั่นอยู่ประมาณ 1/4 ของหลอด เปิดให้ไอน้ำกลั่นประมาณ 4 นาที ทำซ้ำ 3 ครั้ง
- 2.4 ปิด power ของเครื่องแล้วเปิดเครื่องอีกครั้ง โดยตั้งเวลาที่ใช้ในการกลั่นประมาณ 4 นาที และปริมาตรค้างที่ใช้ประมาณ 50 ml
- 2.5 นำ flask ที่มีสารละลายกรดบอริก เข้มข้น 4 % ประมาณ 50 ml และอินดิเคเตอร์ไปตั้งไว้ที่ฐาน โดยให้ปลายแท่งแก้วจุ่มในสารละลาย
- 2.6 ใส่หลอดย่อยที่เตรียมไว้ในเครื่องกลั่น
- 2.7 ปิดหน้าต่างป้องกันลงมา กด start เครื่องกลั่นจะเริ่มทำงาน
- 2.8 เมื่อกลั่นเสร็จแล้วเลื่อนหน้าต่างป้องกันขึ้น และถอดหลอดย่อยออก
- 2.9 นำ flask ออกมาไทเทรตกับสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 0.1 M จนได้สารละลายสีชมพูอ่อน แสดงว่าถึงจุดยุติ จดปริมาตรกรดที่ใช้
- 2.10 คำนวณหาปริมาณโปรตีนจากความสัมพันธ์

$$\%N = \frac{1.4 \times (\text{ปริมาตรกรดที่ใช้ไทเทรตตัวอย่าง} - \text{ปริมาตรกรดที่ใช้ไทเทรตblank}) \times \text{ความเข้มข้นกรด (M)}}{\text{น้ำหนักสารเริ่มต้น (W1)}}$$

$$\% \text{ โปรตีน} = \% N \times 6.25$$

%N คือ ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในอาหาร ปริมาณ N ที่ได้จะนำมาคำนวณเป็นปริมาณโปรตีนในอาหารทั้งหมดได้ โดยเทียบปริมาณ N ในโปรตีนทั่วไป มีค่าเฉลี่ยเป็น 16 % (100/16 = 6.25)

W1 คือ น้ำหนักอาหารเริ่มต้น (g)

## (จ.2) วิธีวิเคราะห์ปริมาณไขมัน (AOAC, 2000)

สารเคมี

1. ตัวทำละลายปิโตรเลียมอีเทอร์

วิธีการทดลอง

1. ชั่งน้ำหนักตัวอย่าง ที่แน่นอนบนกระดาษกรองเบอร์ 1 ประมาณ 2 g (W1) ห่อให้มิดชิด
2. อบที่อุณหภูมิ 100°C นาน 4 ชั่วโมง ทำให้เย็นในเดซิกเคเตอร์ นาน 15 นาที
3. ชั่งน้ำหนักตัวอย่างพร้อมกระดาษกรอง บนตีกน้ำหนักที่แน่นอน(W2) ใส่ลงใน thimble
4. เปิด power ของเครื่อง extraction unit ตั้งอุณหภูมิเครื่องไว้ที่ 110°C
5. เปิด cooling unit ซึ่งประกอบด้วยก๊อคน้ำเย็นสำหรับ condensers อุณหภูมิประมาณ 10°C
6. นำ thimble ใส่ลงในเครื่อง โดยใช้ adaptor สวม
7. เติมตัวทำละลายปิโตรเลียมอีเทอร์ลงใน extraction cups ประมาณ 50 ml
8. ใส่ extraction cups เข้าไปในเครื่องพร้อมทั้ง โยกคัน โยกลง
9. เลื่อนคัน โยกไปที่ตำแหน่ง boiling ให้ thimble จุ่มอยู่ในตัวทำละลายประมาณ 20 นาที
10. โยกคัน โยกมาที่ตำแหน่ง rinsing เพื่อ rinse เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
11. เลื่อนคัน โยกขึ้น นำ extraction cups ออก
12. ถอด thimble ออกจากเครื่อง นำตัวอย่างอาหารพร้อมกระดาษกรองไปอบที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 30 นาทีเพื่อไล่ปิโตรเลียมอีเทอร์ออกให้หมด
13. ทำให้เย็นในเดซิกเคเตอร์นาน 15 นาที
14. ชั่งน้ำหนักอาหารพร้อมกระดาษกรอง (W3) บนตีกน้ำหนักที่แน่นอน
15. คำนวณหาปริมาณไขมันจากความสัมพันธ์

$$\% \text{ ไขมัน} = \frac{(W2 - W3)}{W1} \times 100$$

W1 คือ น้ำหนักอาหารเริ่มต้น (g)

W2 คือ น้ำหนักอาหารก่อนสกัด (g)

W3 คือ น้ำหนักอาหารหลังสกัด (g)

**(จ.3) วิธีวิเคราะห์ปริมาณเถ้า (AOAC, 2000)**

## วิธีการทดลอง

1. ชั่งน้ำหนักวัตถุดิบอาหาร ที่แน่นอนประมาณ 2 g บันทึกน้ำหนัก (W1)
2. อบที่อุณหภูมิ 100°C นาน 4 ชั่วโมงทำให้เย็นในเดซิกเคเตอร์นาน 15 นาที
3. อบ crucible ที่อุณหภูมิ 100°C นาน 4 ชั่วโมง
4. ทำให้เย็นในเดซิกเคเตอร์ นาน 15 นาทีชั่งน้ำหนักcrucible บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน(W2)
5. เทวัตถุดิบอาหารลงใน crucible เเผาที่อุณหภูมิ 100°C นาน 30 นาที อุณหภูมิ 200°C นาน 30 นาที อุณหภูมิ 400°C นาน 30 นาที และอุณหภูมิ 600°C นาน 6 ชั่วโมง ทำให้เย็นในเดซิกเคเตอร์นาน 15 นาที
6. ชั่งน้ำหนัก crucible พร้อมถ้ำบันทึกน้ำหนัก (W3)
7. คำนวณหาปริมาณเถ้าจากความสัมพันธ์

$$\% \text{ เถ้า} = \frac{(W3-W2)}{W1} \times 100$$

W1 คือ น้ำหนักอาหารเริ่มต้น (g)

W2 คือ น้ำหนัก crucible (g)

W3 คือ น้ำหนัก crucible รวมอาหารหลังเผา (g)

**(จ.4) วิธีวิเคราะห์ปริมาณเยื่อใย (AOAC, 2000)**

## สารเคมี

1. สารละลายกรดซัลฟิวริก เข้มข้น 1.25%
2. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 1.25%
3. สารละลายเอทานอล เข้มข้น 70%

### วิธีการทดลอง

1. ชั่งน้ำหนักตัวอย่างอาหารที่เหลือจากการวิเคราะห์ปริมาณไขมัน บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน (W1) เทใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 600 ml
  2. เติมสารละลายกรดซัลฟิวริก เข้มข้น 1.25% ประมาณ 200 ml
  3. ต้มให้เดือดนาน 30 นาที (จับเวลาตั้งแต่เริ่มเดือด)
  4. กรองโดยผ่านเครื่องกรองสุญญากาศ ใช้น้ำร้อนชะตัวอย่างออกจากบีกเกอร์ให้หมด เก็บตะกอนที่ได้ใส่ในบีกเกอร์เดิม
  5. เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 1.25% ประมาณ 200 ml
6. ต้มให้เดือดนาน 30 นาที (จับเวลาตั้งแต่เริ่มเดือด)
  7. กรองโดยผ่านเครื่องกรองสุญญากาศ ใช้น้ำร้อนชะตัวอย่างออกจากบีกเกอร์ให้หมด เก็บตะกอนที่ได้ใส่ใน centrifuge glass
  8. ชะด้วยเอทานอล เข้มข้น 70% ประมาณ 2 ml กรองโดยผ่านเครื่องกรองสุญญากาศ เพื่อไล่น้ำที่เหลือออกให้หมด
  9. อบ centrifuge glass ที่อุณหภูมิ 70°C 30 นาที ทำให้เย็นในเดซิกเคเตอร์
10. ชั่งน้ำหนักตะกอนพร้อมด้วย centrifuge glass บันทึกน้ำหนักที่แน่นอนไว้ (W2)
  11. เผาตะกอนพร้อมด้วย centrifuge glass ที่อุณหภูมิ 420°C นาน 4 ชั่วโมง
  12. นำ centrifuge glass ออก มาอบที่ 70°C นาน 30 นาที ทำให้เย็นในเดซิกเคเตอร์
  13. ชั่งน้ำหนัก centrifuge glass บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน (W3)
  14. คำนวณหาปริมาณเยื่อใยจากความสัมพันธ์

$$\% \text{ เยื่อใย} = \frac{(W2 - W3) \times 100}{W1}$$

W1 คือ น้ำหนักอาหารเริ่มต้น (g)

W2 คือ น้ำหนักอาหารก่อนเผา (g)

W3 คือ น้ำหนักอาหารหลังเผา (g)

### (จ.5) วิธีวิเคราะห์ปริมาณความชื้น (AOAC, 2000)

#### วิธีการทดลอง

1. เปิดเครื่อง (เครื่องจะทำการทดสอบตัวเองโดยอัตโนมัติ)
2. ตั้งค่าโปรแกรมการทำงานของเครื่องดังนี้
 

อุณหภูมิ	: 100 <sup>0</sup> C
เริ่มการทำงาน	: โดยปิดฝาครอบ
เวลา	: หยุดเองอัตโนมัติ เมื่อความชื้นคงที่
แสดงผล	: 0-100% ความชื้น
3. วางจานอลูมิเนียมเปล่าที่อบแล้ว 4 ชั่วโมง อุณหภูมิ 70<sup>0</sup>C บนแท่นวางจาน ปิดฝาครอบ กด ENTER คำว่า TAR จะหายไป ตัวเลขจะเป็น 0.000 g ถ้าไม่เป็น 0.000 g ให้ CF แล้วกด ENTER อีกครั้ง
4. เปิดฝาครอบ ใส่ตัวอย่างประมาณ 2 g เกลี่ยให้ทั่วจาน
5. ปิดฝาครอบ เครื่องจะทำงานเองโดยอัตโนมัติ
6. เมื่อความชื้นคงที่ เครื่องจะหยุดเองโดยอัตโนมัติ บันทึกความชื้นที่ปรากฏ

$$\% \text{ ความชื้น} = \frac{\text{น้ำหนักเริ่มต้น} - \text{น้ำหนักที่เหลือ}}{\text{น้ำหนักเริ่มต้น}} \times 100$$

### (จ.6) วิธีวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรต (NFE) (AOAC, 2000) จากความสัมพันธ์

$$\% \text{ คาร์โบไฮเดรต} = 100 - \% \text{ โปรตีน} - \% \text{ ไขมัน} - \% \text{ เยื่อใย} - \% \text{ เถ้า} - \% \text{ ความชื้น}$$

(จ) ประสิทธิภาพการย่อยอาหารชนิดต่างๆ ของเอนไซม์ย่อยอาหารที่สกัดจากระบบย่อยอาหารของปลานิลแปลงเพศระยะวัยอ่อนจนถึงตัวเต็มวัย โดยวิธี *in vitro* digestibility

ตารางผนวกที่ 2 ประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนในอาหารชนิดต่างๆ โดยเอนไซม์ที่สกัดจากลำไส้ปลานิลแปลงเพศ อายุ 1 เดือน วิเคราะห์โดยวิธี *in vitro* digestibility

ช่วงอายุ ปลานิล (เดือน)	* ชนิดอาหาร	ประสิทธิภาพการย่อยโปรตีน mmol DL-alanine/g feed/ trypsin activity	ประสิทธิภาพการย่อย คาร์โบไฮเดรต mmol maltose/g feed/ amylase activity	
1	ฉายรังสี	ปลาป่น	39.85±0.19	10.52±0.12
		เลือดป่น	10.33±0.01	17.86±0.09
		เนื้อกระดูกป่น	24.92±0.46	2.26±0.30
		โปรตีนข้าวโพด	28.50±0.22	3.73±0.27
		กากถั่วเหลือง	31.65±0.51	8.19±0.15
		กากถั่วลิสง	28.35±0.07	18.31±0.15
		สไปรูลิน่า	15.61±0.15	9.89±0.20
		รำข้าวสาลี	17.12±0.25	5.33±0.18
		รำละเอียด	11.62±0.42	20.34±0.05
		รำหยาบ	12.22±0.08	15.07±0.15
		กากเมล็ดปาล์ม	10.57±0.07	9.99±0.08
		กากมะพร้าว	7.30±0.44	24.14±0.61
		กากมันสำปะหลัง	4.51±0.63	5.13±0.24
		ไม่ฉายรังสี	ปลาป่น	ปลาป่น
เลือดป่น	32.22±0.37			26.09±0.10
เนื้อกระดูกป่น	23.33±0.19			2.83±0.14
โปรตีนข้าวโพด	42.82±0.04			9.72±0.02
กากถั่วเหลือง	14.42±0.31			5.85±0.25
กากถั่วลิสง	20.33±0.31			12.22±0.25
สไปรูลิน่า	18.94±1.04			6.85±0.41
รำข้าวสาลี	18.36±0.41			8.71±0.09

ตารางผนวกที่ 2 (ต่อ)

ช่วงอายุ ปลานิล (เดือน)	* ชนิดอาหาร	ประสิทธิภาพการย่อยโปรตีน mmol <i>DL</i> -alanine/g feed/ trypsin activity	ประสิทธิภาพการย่อย คาร์โบไฮเดรต mmol maltose/g feed/ amylase activity
	รำละเอียด	3.71±0.25	14.63±0.03
	รำหยาบ	3.82±0.24	12.30±0.05
	กากเมล็ดปาล์ม	4.20±0.11	9.76±0.01
	กากมะพร้าว	14.78±0.47	19.07±0.41
	กากมันสำปะหลัง	5.07±0.42	3.95±0.18

หมายเหตุ \* ดูรายละเอียดที่ตารางผนวกที่ 1

ตารางผนวกที่ 3 ประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนในอาหารชนิดต่างๆ  
โดยเอนไซม์ที่สกัดจากลำไส้ปลานิลแปลงเพศ อายุ 2 เดือน วิเคราะห์โดยวิธี  
*in vitro* digestibility

ช่วงอายุ ปลานิล (เดือน)	* ชนิดอาหาร	ประสิทธิภาพการย่อยโปรตีน mmol DL-alanine/g feed/ trypsin activity	ประสิทธิภาพการย่อย คาร์โบไฮเดรต mmol maltose/g feed/ amylase activity	
2	ฉายรังสี	ปลาป่น	27.01±0.49	15.36±0.25
		เลือดป่น	10.07±0.23	7.64±0.20
		เนื้อกระดูกป่น	7.86±0.35	6.91±0.05
		โปรตีนข้าวโพด	27.77±0.83	5.37±0.41
		กากถั่วเหลือง	27.85±0.96	14.04±0.27
		กากถั่วลิสง	19.87±0.71	8.62±0.16
		สไปรูลิน่า	20.81±0.71	2.96±0.01
		รำข้าวสาลี	11.50±0.72	6.35±0.18
		รำละเอียด	9.98±0.19	14.42±0.09
		รำหยาบ	7.74±0.53	12.17±0.18
		กากเมล็ดปาล์ม	5.60±0.42	7.79±0.34
		กากมะพร้าว	6.60±0.09	8.26±0.09
	กากมันสำปะหลัง	11.11±0.56	12.26±0.29	
	ไม่ฉายรังสี	ปลาป่น	22.42±0.53	7.95±0.18
		เลือดป่น	25.69±0.54	8.04±0.11
		เนื้อกระดูกป่น	16.99±0.66	8.31±0.21
		โปรตีนข้าวโพด	24.39±0.13	2.62±0.18
		กากถั่วเหลือง	17.33±0.31	8.11±0.19
		กากถั่วลิสง	18.16±0.50	8.71±0.17
		สไปรูลิน่า	26.32±0.45	6.29±0.14
		ลำข้าวสาลี	7.46±0.25	5.03±0.32
		รำละเอียด	9.42±0.04	9.04±0.20
		รำหยาบ	8.22±0.43	13.79±0.09
		กากเมล็ดปาล์ม	5.23±0.14	14.71±0.36
กากมะพร้าว		5.16±0.53	10.71±0.35	
กากมันสำปะหลัง	3.38±0.34	13.92±0.22		

ตารางผนวกที่ 4 ประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนในอาหารชนิดต่างๆ  
โดยเอนไซม์ที่สกัดจากลำไส้ปลานิลแปลงเพศ อายุ 3 เดือน วิเคราะห์โดยวิธี  
*in vitro* digestibility

ช่วงอายุ ปลานิล (เดือน)	* ชนิดอาหาร	ประสิทธิภาพการย่อยโปรตีน mmol DL-alanine/g feed/ trypsin activity	ประสิทธิภาพการย่อย คาร์โบไฮเดรต mmol maltose/g feed/ amylase activity	
3	ฉายรังสี	ปลาป่น	21.08±1.00	10.27±0.06
		เลือดป่น	10.68±0.23	3.81±0.06
		เนื้อกระดูกป่น	26.84±0.25	4.52±0.08
		โปรตีนข้าวโพด	21.94±0.16	4.34±0.03
		กากถั่วเหลือง	18.10±0.03	4.68±0.02
		กากถั่วลิสง	14.16±0.21	3.59±0.01
		สไปรูลิน่า	19.64±0.42	8.73±0.10
		รำข้าวสาลี	9.17±0.08	4.96±0.02
		รำละเอียด	14.46±0.06	8.68±0.04
		รำหยาบ	7.05±0.05	5.86±0.03
		กากเมล็ดปาล์ม	14.88±0.09	5.48±0.05
		กากมะพร้าว	8.69±0.05	5.06±0.04
	กากมันสำปะหลัง	11.00±0.14	11.93±0.03	
	ไม่ฉายรังสี	ปลาป่น	13.48±0.10	6.70±0.03
		เลือดป่น	28.96±0.11	4.58±0.05
		เนื้อกระดูกป่น	23.19±0.08	4.03±0.06
		โปรตีนข้าวโพด	41.51±0.64	6.16±0.11
		กากถั่วเหลือง	14.79±0.12	4.44±0.01
		กากถั่วลิสง	22.89±0.14	8.09±0.08
		สไปรูลิน่า	7.31±0.09	4.26±0.09
รำข้าวสาลี		11.43±0.17	7.38±0.03	
รำละเอียด	15.15±0.32	5.11±0.08		
รำหยาบ	5.81±0.01	3.85±0.08		
กากเมล็ดปาล์ม	7.74±0.14	3.79±0.01		
กากมะพร้าว	12.13±0.14	6.83±0.05		
กากมันสำปะหลัง	8.34±0.02	12.20±0.15		

ตารางผนวกที่ 5 ประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนในอาหารชนิดต่างๆ  
โดยเอนไซม์ที่สกัดจากลำไส้ปลานิลแปลงเพศ อายุ 4 เดือน วิเคราะห์โดยวิธี  
*in vitro* digestibility

ช่วงอายุ	* ชนิดอาหาร		ประสิทธิภาพการย่อยโปรตีน mmol DL-alanine/g feed/ trypsin activity	ประสิทธิภาพการย่อย คาร์โบไฮเดรต mmol maltose/g feed/ amylase activity
4 เดือน	ฉายรังสี	ปลาป่น	22.61±0.56	7.47±0.11
		เลือดป่น	8.41±0.01	2.32±0.02
		เนื้อกระดูกป่น	20.37±0.22	3.40±0.08
		โปรตีนข้าวโพด	25.23±0.03	6.13±0.09
		กากถั่วเหลือง	27.46±0.62	8.11±0.21
		กากถั่วลิสง	20.81±0.51	7.47±0.10
		สไปรูลิน่า	14.49±0.93	2.94±0.19
		รำข้าวสาลี	10.66±0.08	2.10±0.07
		รำละเอียด	10.48±0.28	4.52±0.03
		รำหยาบ	6.60±0.14	10.18±0.40
		กากเมล็ดปาล์ม	10.02±0.32	4.32±0.01
		กากมะพร้าว	16.51±0.37	7.28±0.26
	กากมันสำปะหลัง	6.59±0.26	7.77±0.12	
	ไม่ฉายรังสี	ปลาป่น	10.24±1.02	4.99±0.19
		เลือดป่น	22.45±0.59	3.19±0.03
		เนื้อกระดูกป่น	16.17±0.38	3.82±0.14
		โปรตีนข้าวโพด	32.83±0.36	4.39±0.59
		กากถั่วเหลือง	17.56±1.04	4.22±0.01
		กากถั่วลิสง	15.38±0.22	7.33±0.10
		สไปรูลิน่า	15.28±0.79	8.78±0.41
		รำข้าวสาลี	14.27±0.43	3.30±0.15
		รำละเอียด	8.20±0.05	3.47±0.02
		รำหยาบ	6.25±0.20	5.07±0.04
		กากเมล็ดปาล์ม	9.78±0.16	3.27±0.16
กากมะพร้าว		11.84±0.53	3.33±0.06	
กากมันสำปะหลัง	8.02±0.11	3.29±0.08		

ตารางผนวกที่ 6 ประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนในอาหารชนิดต่างๆ  
โดยเอนไซม์ที่สกัดจากลำไส้ปลานิลแปลงเพศ อายุ 5 เดือน วิเคราะห์โดยวิธี  
*in vitro* digestibility

ช่วงอายุ ปลานิล (เดือน)	* ชนิดอาหาร	ประสิทธิภาพการย่อยโปรตีน mmol DL-alanine/g feed/ trypsin activity	ประสิทธิภาพการย่อย คาร์โบไฮเดรต mmol maltose/g feed/ amylase activity	
5	ฉายรังสี	ปลาป่น	24.83±1.42	7.39±0.33
		เลือดป่น	9.38±0.01	1.74±0.03
		เนื้อกระดูกป่น	34.57±0.19	4.81±0.03
		โปรตีนข้าวโพด	36.67±0.05	6.54±0.12
		กากถั่วเหลือง	46.75±1.02	6.68±0.22
		กากถั่วลิสง	35.56±0.35	9.66±0.16
		สไปรูลิน่า	23.32±0.68	5.14±0.14
		รำข้าวสาลี	15.79±0.09	6.22±0.06
		รำละเอียด	16.76±0.02	5.71±0.16
		รำหยาบ	11.87±0.14	5.42±0.03
		กากเมล็ดปาล์ม	15.25±0.19	3.39±0.05
		กากมะพร้าว	15.21±0.35	5.77±0.09
	กากมันสำปะหลัง	10.63±0.33	8.63±0.19	
	ไม่ฉายรังสี	ปลาป่น	20.21±1.24	4.51±0.19
		เลือดป่น	44.32±2.19	5.22±0.10
		เนื้อกระดูกป่น	21.79±0.51	6.47±0.06
		โปรตีนข้าวโพด	64.44±0.55	8.12±0.12
		กากถั่วเหลือง	25.58±0.36	3.91±0.09
		กากถั่วลิสง	28.09±0.37	7.43±0.08
		สไปรูลิน่า	25.53±2.98	11.08±0.89
		รำข้าวสาลี	19.12±0.05	5.81±0.02
		รำละเอียด	11.74±0.43	4.85±0.10
		รำหยาบ	9.27±0.18	4.36±0.02
		กากเมล็ดปาล์ม	16.09±0.42	4.07±0.08
กากมะพร้าว		8.00±0.41	5.19±0.02	
กากมันสำปะหลัง	10.25±0.09	7.94±0.01		

ตารางผนวกที่ 7 ประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนในอาหารชนิดต่างๆ  
โดยเอนไซม์ที่สกัดจากลำไส้ปลานิลแปลงเพศ อายุ 6 เดือน วิเคราะห์โดยวิธี  
*in vitro* digestibility

ช่วงอายุ ปลานิล (เดือน)	* ชนิดอาหาร	ประสิทธิภาพการย่อยโปรตีน mmol DL-alanine/g feed/ trypsin activity	ประสิทธิภาพการย่อย คาร์โบไฮเดรต mmol maltose/g feed/ amylase activity	
6	ฉายรังสี	ปลาป่น	48.21±1.66	4.60±0.05
		เลือดป่น	35.77±0.81	2.17±0.03
		เนื้อกระดูกป่น	37.49±0.13	3.54±0.08
		โปรตีนข้าวโพด	35.56±0.35	4.43±0.13
		กากถั่วเหลือง	38.93±0.72	7.19±0.05
		กากถั่วลิสง	45.27±1.18	3.70±0.04
		สไปรูลิน่า	22.73±0.45	5.85±0.03
		รำข้าวสาลี	18.29±0.46	2.75±0.04
		รำละเอียด	12.23±0.02	4.71±0.04
		รำหยาบ	13.33±0.04	2.40±0.06
		กากเมล็ดปาล์ม	13.94±0.31	2.87±0.06
		กากมะพร้าว	24.39±0.08	2.94±0.11
	กากมันสำปะหลัง	12.18±0.11	4.69±0.06	
	ไม่ฉายรังสี	ปลาป่น	36.55±0.22	1.58±0.02
		เลือดป่น	55.94±0.22	4.29±0.05
		เนื้อกระดูกป่น	44.69±0.46	1.85±0.05
		โปรตีนข้าวโพด	30.49±0.56	3.44±0.09
		กากถั่วเหลือง	21.71±1.06	3.04±0.06
		กากถั่วลิสง	38.81±0.71	3.36±0.14
		สไปรูลิน่า	24.10±0.39	7.19±0.06
		รำข้าวสาลี	16.52±0.13	1.84±0.06
		รำละเอียด	14.97±0.57	1.77±0.21
		รำหยาบ	7.26±0.21	1.06±0.05
		กากเมล็ดปาล์ม	17.52±0.22	1.63±0.03
กากมะพร้าว		3.99±0.45	2.08±0.02	
กากมันสำปะหลัง	6.87±0.23	3.99±0.02		

ตารางผนวกที่ 8 ประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนในอาหารชนิดต่างๆ  
โดยเอนไซม์ที่สกัดจากลำไส้ปลานิลแปลงเพศ อายุ 8 เดือน วิเคราะห์โดยวิธี  
*in vitro* digestibility

ช่วงอายุ ปลานิล (เดือน)	* ชนิดอาหาร	ประสิทธิภาพการย่อยโปรตีน mmol DL-alanine/g feed/ trypsin activity	ประสิทธิภาพการย่อย คาร์โบไฮเดรต mmol maltose/g feed/ amylase activity	
8	ฉายรังสี	ปลาป่น	24.78±0.35	6.24±0.13
		เลือดป่น	18.08±0.03	2.30±0.01
		เนื้อกระดูกป่น	23.37±0.89	3.23±0.11
		โปรตีนข้าวโพด	23.57±0.13	4.45±0.07
		กากถั่วเหลือง	24.94±0.89	7.05±0.22
		กากถั่วลิสง	21.01±0.51	3.72±0.18
		สไปรูลิน่า	5.16±0.26	2.18±0.07
		รำข้าวสาลี	14.22±0.31	2.77±0.01
		รำละเอียด	6.85±0.41	4.46±0.06
		รำหยาบ	6.18±0.49	2.31±0.03
		กากเมล็ดปาล์ม	8.94±0.58	2.70±0.02
		กากมะพร้าว	16.35±0.06	2.88±0.08
	กากมันสำปะหลัง	3.35±0.37	4.75±0.18	
	ไม่ฉายรังสี	ปลาป่น	20.59±0.98	4.59±0.17
		เลือดป่น	38.11±0.52	4.85±0.06
		เนื้อกระดูกป่น	15.87±0.34	3.21±0.14
		โปรตีนข้าวโพด	21.58±0.19	4.23±0.12
		กากถั่วเหลือง	15.48±0.63	2.54±0.22
		กากถั่วลิสง	20.03±0.28	3.64±0.06
		สไปรูลิน่า	17.40±0.25	3.19±0.09
		รำข้าวสาลี	11.20±0.16	2.03±0.07
		รำละเอียด	8.48±0.26	3.77±0.01
		รำหยาบ	2.70±0.62	1.09±0.15
		กากเมล็ดปาล์ม	5.76±0.38	1.47±0.02
กากมะพร้าว		2.98±0.25	2.08±0.06	
กากมันสำปะหลัง	4.48±0.03	1.37±0.03		

ตารางผนวกที่ 9 ประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนในอาหารชนิดต่างๆ  
โดยเอนไซม์ที่สกัดจากลำไส้ปลานิลแปลงเพศ อายุ 10 เดือน วิเคราะห์โดยวิธี  
*in vitro* digestibility

ช่วงอายุ	ประสิทธิภาพการย่อยโปรตีน		ประสิทธิภาพการย่อย	
ปลานิล	* ชนิดอาหาร	mmol DL-alanine/g feed/ trypsin activity	คาร์โบไฮเดรต mmol maltose/g feed/ amylase activity	
(เดือน)				
10	ฉายรังสี	ปลาป่น	30.61±1.55	3.32±1.04
		เลือดป่น	7.59±0.05	1.72±0.21
		เนื้อกระดูกป่น	24.11±1.80	1.35±0.13
		โปรตีนข้าวโพด	17.79±0.30	6.44±0.98
		กากถั่วเหลือง	20.17±0.59	4.74±0.17
		กากถั่วลิสง	22.54±1.56	7.38±0.13
		สไปรูลิน่า	10.76±1.53	3.44±0.09
		รำข้าวสาลี	10.58±0.38	6.89±0.31
		รำละเอียด	11.39±1.80	17.43±0.38
		รำหยาบ	2.65±0.26	2.53±0.02
		กากเมล็ดปาล์ม	6.88±0.55	2.34±0.25
		กากมะพร้าว	11.59±0.82	3.43±0.02
		กากมันสำปะหลัง	4.19±0.41	5.16±0.81
		ไม่ฉายรังสี	ปลาป่น	21.15±1.77
	เลือดป่น		27.61±0.80	3.32±0.08
	เนื้อกระดูกป่น		19.70±0.1.12	0.79±0.29
	โปรตีนข้าวโพด		20.81±0.93	4.42±0.97
	กากถั่วเหลือง		17.99±0.39	2.86±0.56
	กากถั่วลิสง		22.77±1.17	4.28±0.09
	สไปรูลิน่า		14.64±0.88	5.50±0.24
	รำข้าวสาลี		13.05±1.07	7.58±0.57
	รำละเอียด		12.49±0.62	12.33±0.77
	รำหยาบ		3.91±0.17	0.94±0.19
	กากเมล็ดปาล์ม		9.12±0.75	3.46±0.18
	กากมะพร้าว		14.31±0.58	4.26±0.86
	กากมันสำปะหลัง	5.38±0.19	2.19±0.05	

## (ข) อาหารสำเร็จรูปสำหรับเลี้ยงปลานิลแปลงเพศในห้องปฏิบัติการ

ตารางผนวกที่ 10 เปรียบเทียบสูตรอาหารสำเร็จรูป 3 ชนิด สำหรับเลี้ยงปลานิลแปลงเพศ  
ในห้องปฏิบัติการ

วัตถุดิบ	โปรตีนจากสัตว์ (35%)	โปรตีนจากพืช (35%)	โปรตีนจากพืช (35%) ใส่เอนไซม์อะไมเลส
ปลายข้าว	35	30	30
รำละเอียด	4	0	0
กากถั่วเหลือง 42%	6	40	40
ปลาป่น 58%	34	0	0
เนื้อและกระดูกป่น 50%	20	3	3
คอนกลูเต็น 60%	0	22	22
น้ำมันปลา	1	4	4
วิตามินพรีมิกซ์	0.5	0.5	0.5
เอนไซม์	-	-	+

ที่มา: การพัฒนาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับเพาะเลี้ยงปลานิลเชิงพาณิชย์ และหน่วยประเมิน  
ประสิทธิภาพอาหารสัตว์ทางชีวเคมี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, โครงการสนับสนุนภายใต้  
โครงการสมองไหลกลับ สำนักงานวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.)  
(2550-2553)

(ข) จำนวนปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต (g) ที่ใช้เติมในสารละลาย 1 ลิตร และความเข้มข้น  
สุดท้ายของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต: %ความอิมตัว

From % ↘	To % →	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100	
0		27	55	84	113	144	176	208	242	277	314	351	390	430	472	516	561	608	657	708	761	
	5		27	56	85	115	146	179	212	246	282	319	357	397	439	481	526	572	621	671	723	
	10			28	57	86	117	149	182	216	251	287	325	364	405	447	491	537	584	634	685	
	15				28	58	89	119	151	185	219	255	292	331	371	413	456	501	548	596	647	
	20					29	59	89	121	154	188	223	260	298	337	378	421	465	511	559	609	
	25						29	50	91	123	157	191	227	265	304	344	386	429	475	522	571	
	30							30	61	92	126	160	195	232	270	309	351	393	438	485	533	
	35								35	62	94	128	163	199	236	275	316	358	402	447	495	
	40									40	63	96	130	166	202	241	281	322	365	410	457	
	45										45	64	97	132	169	206	245	286	329	373	419	
	50											50	65	99	135	172	210	250	292	335	381	
	55												55	66	101	138	175	215	256	298	343	
	60													60	67	103	140	179	219	261	305	
	65														65	69	105	143	183	224	266	
	70															70	34	70	107	146	186	228
	75																75	35	72	110	149	190
	80																	80	36	73	112	152
	85																		85	37	75	114
	90																			90	37	76
	95																				95	38

ภาพผนวกที่ 5 ตารางจำนวนปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต (g) ที่ใช้เติมในสารละลาย 1 ลิตร และ  
ความเข้มข้นสุดท้ายของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต: % ความอิมตัว

ที่มา: Scope (1978)

(ก) Electrophoretic zymograms ของ trypsin isozyme patterns ในลำไส้ส่วน pyloric caeca ของปลา Atlantic salmon และ Arctic charr

Designated name	pI	Atlantic salmon										Arctic charr			
		Trypsin isozyme pattern										Skog-seid 1	Hammerfest		Similar isozyme
		1	2	2'	3	2+3	2'+3	4	2+4	2'+4	3+4		2	2'	
TRP-3	4.16											Skog-seid 1	Hammerfest		TRP-3
TRP-2*100	4.29														TRP-2*100
TRP-2*92	4.35														TRP-2*92
TRP-1*100	4.48														TRP-1*100
TRP-1*91	4.61														TRP-1*91
TRP-1*75	4.82	TRP-1													

ภาพผนวกที่ 6 Electrophoretic zymograms ของ trypsin isozyme patterns ในลำไส้ส่วน pyloric caeca ของปลา Atlantic salmon และ Arctic charr (2 ชนิด: Skogseid และ Hammerfest) ซึ่งเป็นจำพวกปลากินสัตว์ (carnivorous fish) โดยใช้วิธี isoelectric focusing บนเจล Agarose-IEF ที่ pH 4-6.5

ที่มา: Rungruangsak Torrissen and Male (2000)

## ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวจุฑามาศ สุนทรโชติ
วัน เดือน ปี ที่เกิด	22 มกราคม พ.ศ. 2528
สถานที่เกิด	จังหวัดเพชรบูรณ์
ประวัติการศึกษา	กศ.บ. (ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยนเรศวร 2550
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	สำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัยร่วมกับสำนักงานส่งเสริมวิสาหกิจขนาดกลางและขนาดย่อม สกว.-สสว. (TRF-MAG Window I: OSMEP505S037)