

ผลของสีน้ำเทียมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ อัตราส่วนระหว่างทริปซิน
โคโมทริปซิน (T/C ratio) และการเจริญเติบโตของปลากะพงขาววัยรุ่น
ที่เลี้ยงในระบบน้ำหมุนเวียน

Effect of Artificial Water Colors on Enzymes Activity, TC/ratio and Growth
Performance of Juveniles Asian Seabass (*Lates Calcarifer* Bloch, 1790) Rearing in
Recirculating Aquaculture System (RAS)

วิญญู บุญประเสริฐ^{1*}, ประจวบ ฉายบุ², เกียรติศักดิ์ เม่งอำพัน³, จงกล พรมยะ⁴
และชนกันต์ จิตมนัส⁵

Winyoo Boonprasert^{1*}, Prachaub Chaibu², Kriangsak Mengumphan³, Jongkol Promya⁴
and Chanagun Chitmanat⁵

คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290

Faculty of Fisheries Technology and Aquatic Resources, Maejo University, Chiangmai, 50290

Corresponding author: lactasai@hotmail.com

บทคัดย่อ

การศึกษานี้ได้ศึกษาผลของสีน้ำเทียมที่แตกต่างกัน 4 สีต่อกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ อัตราส่วนระหว่างทริปซินและโคโมทริปซิน (T/C ratio) และการเจริญเติบโตของปลากะพงขาววัยรุ่น (*Lates Calcarifer*) โดยเลี้ยงในสีน้ำที่แตกต่างกัน คือ สีน้ำธรรมชาติ (ชุดควบคุม) สีน้ำตาล สีน้ำเงิน และสีเขียวอมน้ำเงิน เลี้ยงปลาเป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์ เมื่อสิ้นสุดการทดลอง พบว่าชุดการทดลองที่ 4 มีการเจริญเติบโตดีกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยมีน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น 58.08 ± 2.72 กรัม และอัตราการรอด 83.11 ± 6.48 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อประเมินผลของสีน้ำที่แตกต่างกันต่อประสิทธิภาพของเอนไซม์ย่อยอาหารคือ ทริปซินและโคโมทริปซิน พบว่าชุดการทดลองที่ 4 มีกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ทริปซินและโคโมทริปซิน รวมทั้งอัตราส่วนระหว่างทริปซินและโคโมทริปซิน (T/C ratio) ดีกว่าชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แสดงให้เห็นว่าสีน้ำเป็นปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งต่อการดำรงชีวิตของสัตว์น้ำชนิดนี้ และสามารถนำไปปรับปรุงระบบการเลี้ยง เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตปลากะพงขาวในระบบน้ำหมุนเวียนแบบปิด (RAS) ได้

คำสำคัญ: ปลากะพงขาววัยรุ่น สีน้ำเทียม กิจกรรมเอนไซม์ ทริปซิน โคโมทริปซิน ระบบน้ำหมุนเวียน

Abstract

This study investigated the effects of four different artificial water colors on enzymes activity, TC/ratio and growth performance of juveniles Asian seabass (*Lates Calcarifer*). Asian seabass were reared for 10 weeks in four artificial water colors (natural water (control), brown, blue, blue-green). The result showed that juveniles Asian seabass in treatment 4 were significantly greater growth than those in control ($p < 0.05$) with an increased weight of 58.08 ± 2.72 gram. The survival rate was 83.11 ± 6.48 percent. For the effect of water colors on digestibility of trypsin and chymotrypsin,

treatment 4 showed the tendency of activity and the ratio of trypsin and chymotrypsin (T / C ratio) of fish was significantly greater quality than those of other treatments ($p < 0.05$). It was concluded that the water color is an important factor for this species survival and may benefit for improving culture system, particularly for optimizing performance of Asian seabass rearing in recirculating aquaculture system (RAS).

Keywords: Juveniles Asian seabass, Artificial water colors, Enzymes activity, T/C ratio, RAS

บทนำ

ปลากะพงขาว (*Lates Calcarifer* Bloch, 1790) เป็นปลาที่อาศัยอยู่ได้ทั้งน้ำเค็ม น้ำกร่อยจนกระทั่งน้ำจืด และเป็นปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจมีคุณค่าทางโภชนาการเป็นที่นิยมบริโภคกันอย่างแพร่หลาย นับวันความต้องการบริโภคปลากะพงขาวจึงเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ประกอบกับผลผลิตทางทะเลเริ่มมีแนวโน้มในอัตราที่ลดลง สืบเนื่องจากความเสื่อมโทรมของแหล่งน้ำธรรมชาติ และการขยายเขตน่านน้ำของประเทศเพื่อนบ้านอื่นๆ จึงส่งผลให้ทรัพยากรสัตว์น้ำที่จับจากธรรมชาติมีปริมาณน้อยลง ดังนั้น การเพาะเลี้ยงปลากะพงขาวจึงเริ่มมีความสำคัญ และได้ขยายฐานการผลิตปลากะพงขาวเพิ่มมากขึ้น แต่ก็ไม่เพียงพอกับความต้องการของผู้บริโภค อีกทั้งปลากะพงขาวที่จำหน่ายในพื้นที่ภาคเหนือมีราคาที่สูงและมีคุณภาพความสดน้อย ผู้วิจัยจึงได้สนใจที่จะพัฒนาการเลี้ยงปลากะพงขาวในเขตพื้นที่ภาคเหนือของประเทศไทยในขั้นตอนต่างๆ ของการผลิต โดยใช้วิธีการเรียนแบบสภาพแวดล้อมตามธรรมชาติโดยการใช้สีน้ำเทียมมาช่วยในการจำลองสีของน้ำตามแหล่งที่อยู่อาศัยในธรรมชาติของปลากะพงขาว เพื่อศึกษาระบบการกินอาหาร การเจริญเติบโตที่เหมาะสมโดยได้ใช้ดัชนีชี้วัดคือ คุณลักษณะและประสิทธิภาพของเอนไซม์ย่อยอาหาร คือ ทริปซิน และโคโมทริปซินในลำไส้ของปลากะพงขาว ซึ่งในสัตว์หลายชนิดเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้สามารถใช้เป็นตัวชี้วัดการเจริญเติบโตจากการให้อาหารได้

การพัฒนาของระบบย่อยอาหารมีความสัมพันธ์กับการเติบโตของสัตว์น้ำเนื่องจากการเติบโตที่เพิ่มขึ้นต้องอาศัยการย่อยและดูดซึมสารอาหาร เพื่อนำมาใช้ในกระบวนการเมตาบอลิซึมที่เพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน การศึกษาด้านโภชนาการพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหาร (Digestive Enzymes) มีความสัมพันธ์กับการตอบสนองทางสรีรวิทยา เมื่อสัตว์น้ำมีการเปลี่ยนแปลงสภาพทางโภชนาการ (Thongprajukaew, 2011 and Bolasina *et al.*, 2006) การวิจัยเกี่ยวกับเอนไซม์ย่อยอาหารส่วนใหญ่มุ่งเน้นศึกษาเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสารชีวโมเลกุลที่สำคัญได้แก่ อะไมเลส (ย่อยคาร์โบไฮเดรต) ไลเปส (ย่อยไขมัน) โปรติเอส ทริปซิน และโคโมทริปซิน (ย่อยโปรตีน) เพื่อให้ทราบเกี่ยวกับพฤติกรรมการกินอาหาร (Hidalgo *et al.*, 1999 and Hofer *et al.*, 1981) ระยะเวลาที่อาหารอยู่ในท่อทางเดินอาหาร (Chan *et al.*, 2008 and Riche *et al.*, 2004) และประสิทธิภาพการย่อยอาหารของสัตว์น้ำ (Thongprajukaew, 2011 and Supannapong *et al.*, 2008)

ทริปซิน (EC 3.4.21.4) เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทหลักในการควบคุมการย่อยโปรตีน โดยทำหน้าที่กระตุ้นโปรเอนไซม์ (Proenzyme) หรือไซโมเจน (Zymogen) ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยโปรตีนได้หลายชนิด ได้แก่ ทริปซิโนเจน (Trypsinogen) โคโมทริปซิโนเจน (Chymotrypsinogen) โปรคาร์บออกซีเปปติเดส

(Procarboxypeptidase) และโปรอีลาสเตส (Proelastase) ให้อยู่ในรูปที่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ (Active Enzyme) ได้แก่ ทริปซิน (Trypsin) ไคโมทริปซิน (Chymotrypsin) คาร์บอกซีเปปติเดส (Carboxypeptidase) และอีลาสเตส (Elastase) ตามลำดับ ดังนั้น การศึกษากิจกรรมของทริปซินจึงมีบทบาทสำคัญต่อการประเมินประสิทธิภาพการย่อยโปรตีน (Thongprajukaew, 2011, Rungruangsak-Torrissen *et al.* 2002 and Supannapong *et al.*, 2008 อ้างโดย Thongprajukaew and Kovitvadh, 2012)

ไคโมทริปซิน (EC 3.4.21.1) ที่บริเวณเร่งปฏิกิริยามีความจำเพาะต่อกรดอะมิโนไทโรซีน ทริปโตเฟน และเฟนิลอะลานีน สารยับยั้งการทำงาน คือ tosyl-phenylalanine chloromethyl ketone (TPCK) และ chymostatin ถูกหลั่งออกมาจากตับไปยังลำไส้เล็กในรูปที่ยังไม่สามารถทำงานได้ เรียกว่า ไคโมทริปซินโนเจน ถูกเปลี่ยนเป็นไคโมทริปซิน โดยเอนไซม์ทริปซิน (Nuchasuk *et al.*, 2007) แม้ว่ากรดอะมิโนไทโรซีนในสภาวะที่เหมาะสมจะมีนัยสำคัญในการกำหนดความถูกต้องของกิจกรรมเป็นอย่างมาก แต่มีรายงานการวิจัยน้อยมากในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้ในปลากระพงขาววัยรุ่น ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของพีเอช และอุณหภูมิ รวมทั้งประสิทธิภาพของเอนไซม์ในลำไส้ปลากระพงขาววัยรุ่นที่เลี้ยงด้วยน้ำที่แตกต่างกันในระบบหมุนเวียนน้ำแบบปิด เพื่อเป็นความรู้เกี่ยวกับกิจกรรมและบทบาทของเอนไซม์ย่อยอาหารทั้ง 2 ชนิดนี้ และเป็นแนวทางหนึ่งที่จะช่วยส่งเสริมการพัฒนาการเพาะเลี้ยงปลากระพงขาวอย่างมีคุณภาพต่อไปได้

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

การเตรียมสัตว์ทดลอง

ลูกปลากระพงขาววัยรุ่น น้ำหนักเฉลี่ย 10.09 ± 1.09 กรัม และความยาวเฉลี่ย 8.06 ± 1.03 เซนติเมตร ที่ได้จากการอนุบาลและปรับสภาพน้ำจืดได้แล้ว ณ พื้นที่ปฏิบัติการคณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้เชียงใหม่ โดยเลี้ยงปลากระพงขาวในบ่อซีเมนต์ขนาด $1 \times 1.5 \times 1$ เมตร ในอัตรา 153 ตัว/ลูกบาศก์เมตร (Nikhom *et al.*, 2011) เลี้ยงปลาเป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์ ก่อนการทดลองมีการควบคุมดูแลพฤติกรรมและสภาพแวดล้อมของปลาก่อนเป็นระยะเวลา 1 เดือน หลังจากนั้นจึงเริ่มการทดลอง โดยเก็บข้อมูลด้านคุณลักษณะและประสิทธิภาพของเอนไซม์ทริปซิน และไคโมทริปซิน การเจริญเติบโต อัตราการรอด รวมทั้งคุณภาพน้ำ จนเสร็จสิ้นการทดลอง

การวางแผนการทดลอง

การศึกษาผลของน้ำที่เติมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ อัตราส่วนระหว่างทริปซิน ไคโมทริปซิน (T/C ratio) และการเจริญเติบโตของปลากระพงขาววัยรุ่นที่เลี้ยงในระบบหมุนเวียนน้ำแบบปิด โดยใช้สื่อน้ำเทียมหรือสื่อน้ำวิทยาศาสตร์ ที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในฟาร์มเลี้ยงขนาดใหญ่ เช่น ปลา กุ้ง และสัตว์น้ำอื่นๆ ซึ่งมีคุณสมบัติละลายได้เร็ว ไม่มีพิษโลหะหนัก และย่อยสลายในธรรมชาติ โดยใช้ในอัตรา 0.19 กรัมต่อน้ำ 750 ลิตร วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Random Design; CRD) โดยแบ่งออกเป็น 4 ชุดการทดลอง (Treatment) แต่ละชุดแบ่งออกเป็น 3 ซ้ำ (Replication) ดังนี้

- ชุดการทดลองที่ 1 เลี้ยงในบ่อสีน้ำธรรมชาติ
- ชุดการทดลองที่ 2 เลี้ยงในบ่อโดยใช้สีน้ำเทียมสีน้ำตาล
- ชุดการทดลองที่ 3 เลี้ยงในบ่อโดยใช้สีน้ำเทียมสีน้ำเงิน
- ชุดการทดลองที่ 4 เลี้ยงในบ่อโดยใช้สีน้ำเทียมสีเขียวอมน้ำเงิน

การให้อาหารสัตว์ทดลอง

ให้อาหารเม็ดสำเร็จรูปโปรตีน 42 เปอร์เซ็นต์ วันละ 2 มื้อ คือ 8.00 น. และ 17.00 น. ทั้งนี้การให้อาหารจะให้กินจนอิ่มตลอดระยะเวลาการเลี้ยง

การเตรียม crude enzyme extract

นำปลาแช่แข็งเพื่อให้สลบจากนั้นก็ทำการผ่าช่องท้องและตัดชิ้นส่วนลำไส้มาล้างและปั่นให้เป็นเนื้อเดียวด้วย homogenizer โดยแช่อยู่ในน้ำแข็งตลอดเวลา เจือจางด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 2-12 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบ นาน 15 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดส่วนที่เป็นชั้นไขมันที่ลอยอยู่ด้านบน ออก แบ่งเก็บส่วนใสที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

การศึกษาคุณลักษณะและประสิทธิภาพของเอนไซม์ย่อยอาหาร

1. ศึกษากิจกรรมและสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์ทริปซินในสภาพเปลี่ยนแปลง pH 2-12 และอุณหภูมิ 30-80 องศาเซลเซียสตามวิธีการของ Sunde *et al.* (2001) โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Rungruangsak-Torrissen *et al.* (1998) ดังนี้

วิธีวิเคราะห์กิจกรรมของทริปซิน โดยเตรียมสารละลายซับสเตรต คือ สารละลาย N-benzoyl-L-arginine-p-nitroanilide (BAPNA) ความเข้มข้น 1.25 มิลลิโมลาร์ ที่มีสารละลาย dimethylformamide เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับสารละลายสารละลายบัฟเฟอร์ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 8.2 ดูด crude enzyme extract ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ใส่ในคิวเวต เติมซับสเตรตปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร ที่เวลา 0-15 วินาที เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง A410 กับเวลา(วินาที) เพื่อหาค่าอัตราเร็วเริ่มต้นของการเกิดปฏิกิริยา (Vi) จากความชัน เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน p-nitroaniline

2. ศึกษากิจกรรมและสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์โคโมทริปซินในสภาพเปลี่ยนแปลง pH 2-12 และอุณหภูมิ 30-80 องศาเซลเซียสตามวิธีการของ Sunde *et al.* (2001) โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Rungruangsak-Torrissen *et al.* (1998) ดังนี้

วิธีวิเคราะห์กิจกรรมของโคโมทริปซิน โดยเตรียมสารละลายซับสเตรต คือ สารละลาย N-succinyl-ala-ala-pro-phenylalanine-p-nitroanilide (SAPNA) ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ที่มีสารละลาย dimethylformamide เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับสารละลายสารละลายบัฟเฟอร์ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 8.2 ดูด crude enzyme extract ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ใส่ในคิวเวต เติมซับสเตรตปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร ที่เวลา 0-15 วินาที เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง A410 กับเวลา (วินาที) เพื่อหาค่าอัตราเร็วเริ่มต้นของการเกิดปฏิกิริยา (Vi)

จากความชันเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน *p*-nitroaniline แบลงค์ประกอบด้วยสารละลายซัสเตรต โดยไม่เติม crude enzyme extract

3. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนใน crude enzyme extract ตามวิธีการของ Lowry *et al.* (1951) โดยเตรียมสารละลาย bovine serum albumin (BSA) เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นสารละลายมาตรฐาน โปรตีนวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่มีความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน BSA

การจัดการระหว่างการเลี้ยงและการวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

ตรวจสอบคุณสมบัติของน้ำ ก่อนทดลอง และระหว่างการทดลองทุก ๆ 2 สัปดาห์ จนถึงสิ้นสุดการทดลอง ได้แก่ อุณหภูมิ, ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ, ความเป็นกรด-ด่าง, แอมโมเนีย-ไนโตรเจน, ไนโตรท-ไนโตรเจน, ไนเตรท-ไนโตรเจน และฟอสฟอรัสรวม โดยมีวิธีการดังต่อไปนี้

Table 1 The methods of analysis of different parameters of water quality

Parameters	Methods
pH	pH-meter (pH / Ion 510)
Dissolved Oxygen (mg./l)	Azide modification
Ammonia (mg./l)	Phenol method
Nitrite (mg./l)	Reddish purple azo dye
Nitrate (mg./l)	Phenoldisulphonic acid
Phosphorus (mg./l)	Stannous chloride
Temperature (°C)	Thermometer

การเก็บและวิเคราะห์ข้อมูลการเจริญเติบโต

วัดความยาว ชั่งน้ำหนัก และนับจำนวนลูกปลาปะพงขาววัยรุ่นในแต่ละหน่วยการทดลองทุก ๆ 2 สัปดาห์ ตลอดการทดลอง และนำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณเปรียบเทียบค่าต่างๆ ดังนี้

Weight gain, WG (%)

= น้ำหนักเฉลี่ยเมื่อสิ้นสุดการทดลอง - น้ำหนักเฉลี่ยเมื่อเริ่มการทดลอง

Average daily gain (g./body/day)

= $\frac{\text{น้ำหนักเฉลี่ยเมื่อสิ้นสุดการทดลอง} - \text{น้ำหนักเฉลี่ยเมื่อเริ่มการทดลอง}}{\text{ระยะเวลาในการทดลอง}}$

Feed conversion ratio, FCR = $\frac{\text{น้ำหนักอาหารที่ปลากิน}}{\text{น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น}}$

Survival rate (%) = $\frac{\text{จำนวนปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง}}{\text{จำนวนปลาเมื่อเริ่มการทดลอง}} \times 100$

Consumption rate (%) ตามวิธีการของ Yone และ Fujii (1975) จากสมการดังนี้
อัตราการกินอาหาร (เปอร์เซ็นต์ต่อตัวต่อวัน) =

$$\frac{F \times 100}{\frac{W_o + W_t}{2} \times \frac{N_o + N_t}{2} \times t}$$

โดย

F = น้ำหนักอาหารแห้งที่ปลากิน (กรัม) N_o = จำนวนปลาเริ่มต้น (ตัว)
 W_o = น้ำหนักปลาเฉลี่ยเริ่มต้น (กรัม) N_t = จำนวนปลาสุดท้าย (ตัว)
 W_t = น้ำหนักปลาเฉลี่ยสุดท้าย (กรัม) t = ระยะเวลาที่ปลาได้รับอาหารทดลอง (วัน)

อัตราส่วนระหว่างของเอนไซม์ทริปซินและโคโมทริปซิน (T/C ratio) ตามวิธีของ Rungruangsak-Torrissen *et al.* (1998) ดังนี้

$$\text{T/C ratio} = \frac{\text{เอนไซม์ทริปซิน}}{\text{เอนไซม์โคโมทริปซิน}}$$

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิเคราะห์ทางสถิติ โดยวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) เพื่อศึกษาความแตกต่างของแต่ละชุดการทดลอง จากนั้นเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของแต่ละชุดการทดลองโดยวิธี Tukey-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป IBM SPSS Statistics 22

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

คุณลักษณะและกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ทริปซินและโคโมทริปซิน

จากการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินและโคโมทริปซินที่สกัดจากลำไส้ปลากะพงขาววัยรุ่นในสภาวะเปลี่ยนแปลง pH ตั้งแต่ 2-12 (Figure 1A) พบว่าเอนไซม์ทริปซินและโคโมทริปซินแสดงกิจกรรมจำเพาะสูงสุดที่ pH 8.0 และ 5.0 ตามลำดับ จากรายงานของ Erlanger, B.F. *et al.* (1961) และ Jantaro *et al.* (2000) พบว่า เอนไซม์ทริปซินในปลาทูน่าครีบลีองมีกิจกรรมจำเพาะสูงสุดที่ pH 8.2 และ 8.0 ส่วนในปลา anchovy มีค่ากิจกรรมจำเพาะเอนไซม์ทริปซินและโคโมทริปซินสูงสุดอยู่ที่ 8.0-9.0 และ 7.5-8.5 (Krogdahl *et al.* 1994) ตามลำดับ

เมื่อศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินและโคโมทริปซินในสภาวะอุณหภูมิตั้งแต่ 30-80 องศาเซลเซียส ที่ pH 8.0 และ pH 5.0 (Figure 1B) พบว่าค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ทริปซินและโคโมทริปซินสูงสุด ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ของทั้ง 2 เอนไซม์ ซึ่ง Krogdahl *et al.* (1994) ได้กล่าวไว้ว่า กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ทริปซินและโคโมทริปซินในปลากะพงขาวจะเพิ่มขึ้นตามอุณหภูมิที่เพิ่มสูงขึ้น แม้ว่าจะมีอุณหภูมิสูงถึง 80 องศาเซลเซียส ส่วนในปลาอื่นๆ เช่น ปลากะตัก เอนไซม์ทริปซินและโคโมทริปซิน มีค่ากิจกรรมจำเพาะสูงสุดที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงถึง 50 องศาเซลเซียส และหยุดกิจกรรมที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส

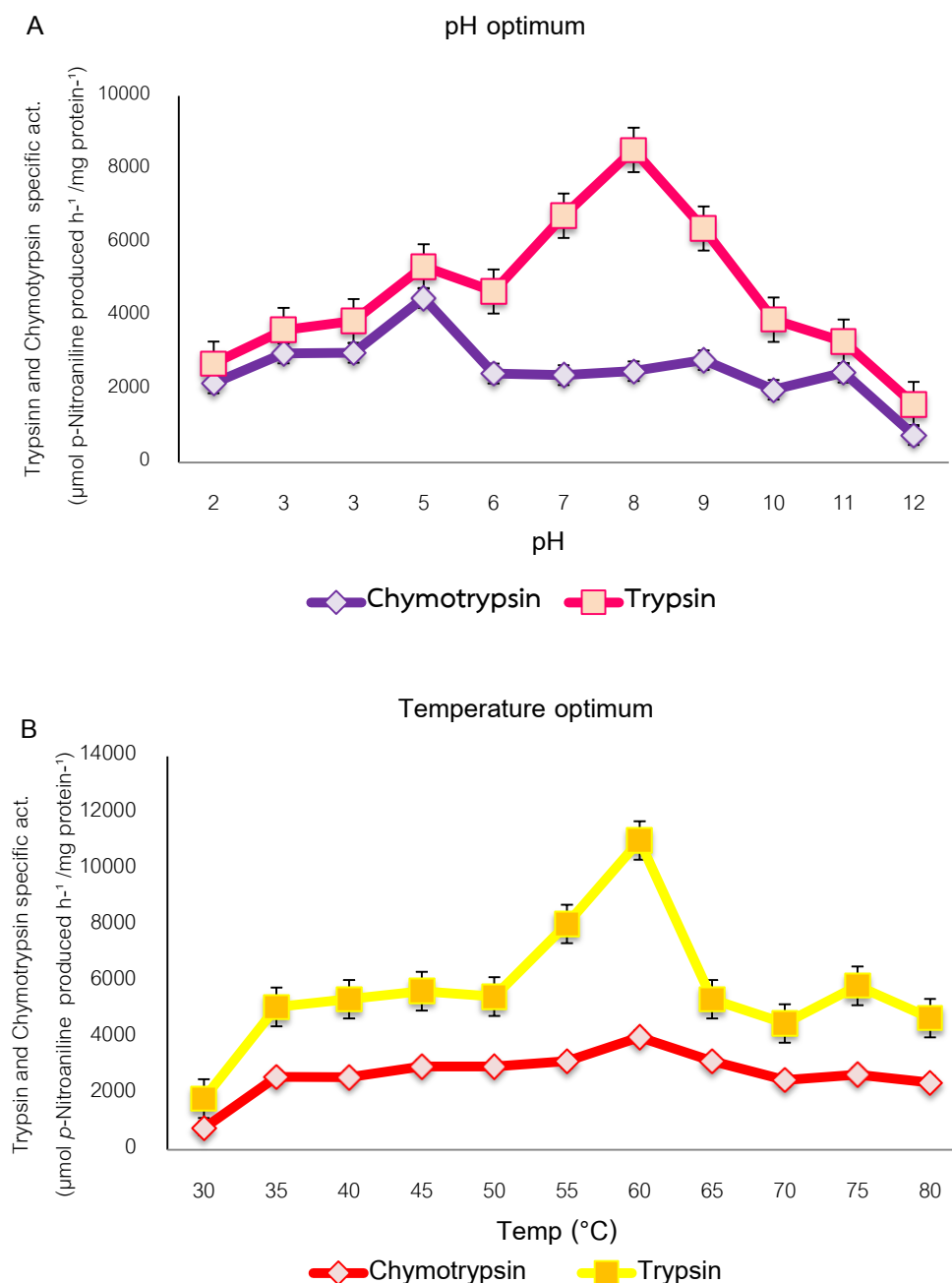


Figure 1 optimum pH and temperature of trypsin and chymotrypsin specific activity ($\mu\text{mol } p\text{-nitroaniline produced h}^{-1} / \text{mg protein}^{-1}$)

ผลของสีน้ำที่แตกต่างกันต่อประสิทธิภาพกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ทริปซินและไคโมทริปซิน

จากการวิเคราะห์กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ทริปซิน และเอนไซม์ไคโมทริปซิน พบว่าเอนไซม์ทริปซินในลำไส้ของปลากะพงขาววัยรุ่นในชุดการทดลองที่ 4 มีค่าสูงสุดคือ $63,237.81 \pm 0.01 \mu\text{mol } p\text{-Nitroaniline/h}^{-1} / \text{mg protein}^{-1}$ รองลงมาคือ ชุดการทดลองที่ 3 ($51,900.68 \pm 0.01$), 2 ($26,910.81 \pm 0.02$) และ 1 ($22,248.09 \pm 0.01$) ซึ่งมีแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (Figure 2A) ส่วนไคโมทริปซินใน

ชุดการทดลองที่ 1 มีค่าสูงสุดคือ $84,801.45 \pm 0.02 \mu\text{mol } p\text{-Nitroaniline/h}^{-1}/\text{mg protein}^{-1}$ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับชุดการทดลองที่ 3 ($69,445.08 \pm 0.02$), 2 ($68,866.42 \pm 0.01$) และชุดการทดลองที่ 4 ($66,380.57 \pm 0.01$) ตามลำดับ (Figure 2B)

การแสดงออกของเอนไซม์ทริปซินมีผลต่อการเติบโตในทิศทางตรงกันข้ามกับเอนไซม์ไคโมทริปซิน โดยกิจกรรมของไคโมทริปซินจะมีค่าสูงในช่วงที่สิ่งมีชีวิตเติบโตช้า ส่วนกิจกรรมของทริปซินจะมีค่าสูงในช่วงที่สัตว์น้ำมีการเติบโตสูง (Rungruangsak-Torrissen *et al.*, 2006) การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหารทั้ง 2 ชนิดนี้สามารถบอถึงการเจริญเติบโตและพัฒนาการของสัตว์น้ำได้ โดยการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินและไคโมทริปซินทำให้ T/C ratio มีการเปลี่ยนแปลงส่งผลต่อประสิทธิภาพการย่อยโปรตีน ปริมาณกรดอะมิโนอิสระในพลาสมา กล้ามเนื้อ สมดุลของการสร้าง การสลายโปรตีน และอัตราการเจริญเติบโต

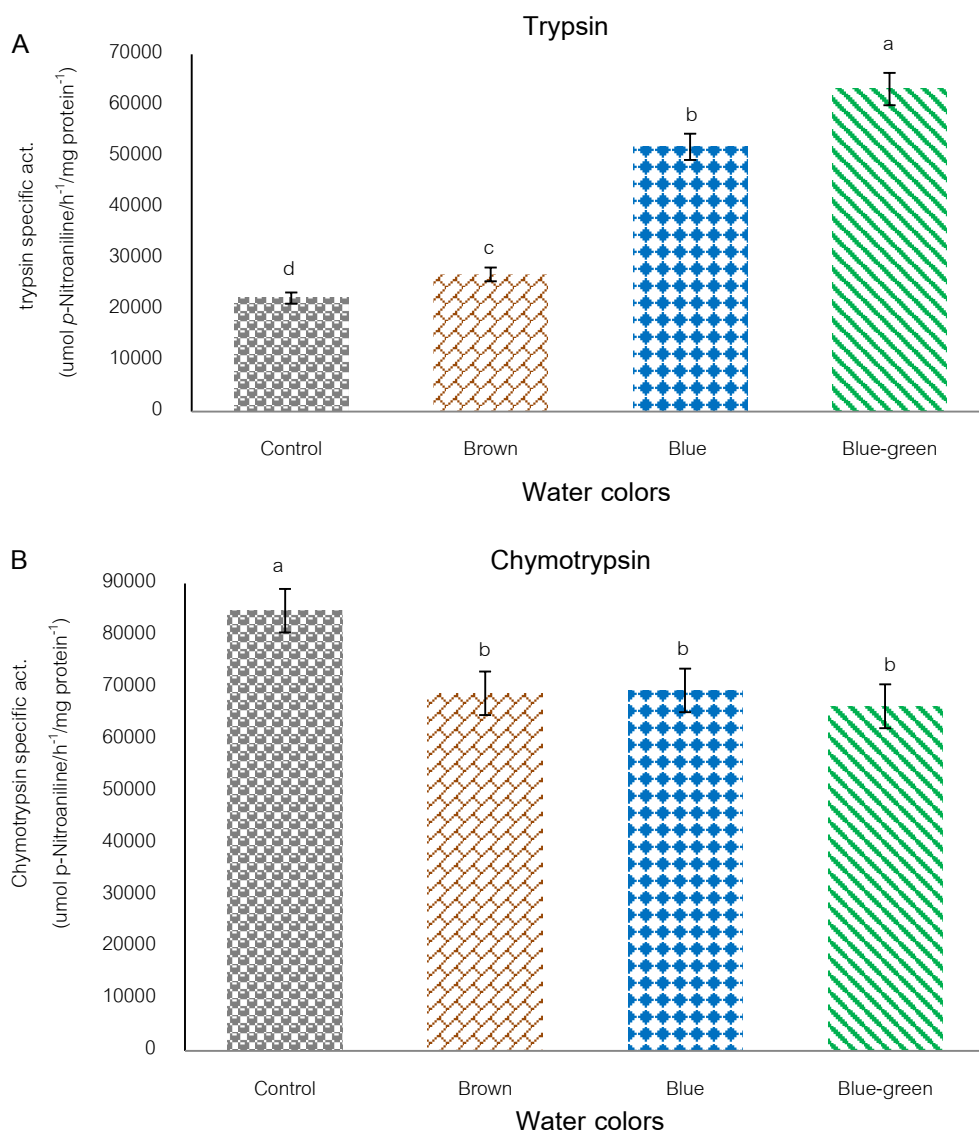


Figure 2 Trypsin and chymotrypsin specific activity ($\mu\text{mol } p\text{-nitroaniline produced h}^{-1}/\text{mg protein}^{-1}$)

Note: different letters in the same row are statistically different. ($p < 0.05$)

เมื่อเปรียบเทียบอัตราส่วนระหว่างทริปซินและไคโมทริปซิน (T/C ratio) พบว่า ในปลากระพงขาววัยรุ่นที่เลี้ยงในชุดการทดลองที่ 4 มีค่าสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) รองลงมาคือปลากระพงขาววัยรุ่นที่เลี้ยงในชุดการทดลองที่ 3 โดยมีค่าเท่ากับ 0.92 ± 0.2 และ 0.62 ± 0.1 ตามลำดับ ส่วนค่า T/C ratio ต่ำสุดคือชุดการทดลองที่ 2 เท่ากับ 0.33 ± 0.04 (Figure 3) ซึ่งค่า T/C ratio จะมีแนวโน้มเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับอัตราการกินอาหาร คือ มีค่าสูงสุดในชุดการทดลองที่ 4 รองลงมาคือ ชุดการทดลองที่ 3 2 และ 1 เท่ากับ 3.84, 3.70, 3.49 และ 3.29 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Figure 4)

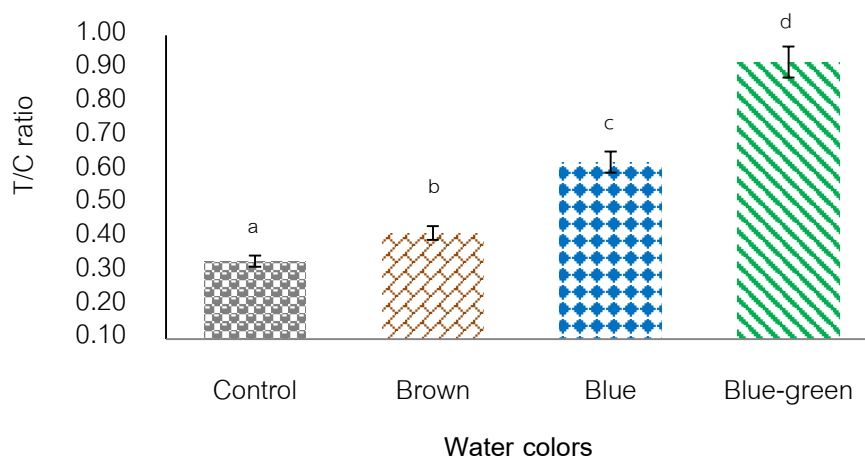


Figure 3 Trypsin and chymotrypsin ratio

Note: different letters in the same row are statistically different. ($p < 0.05$)

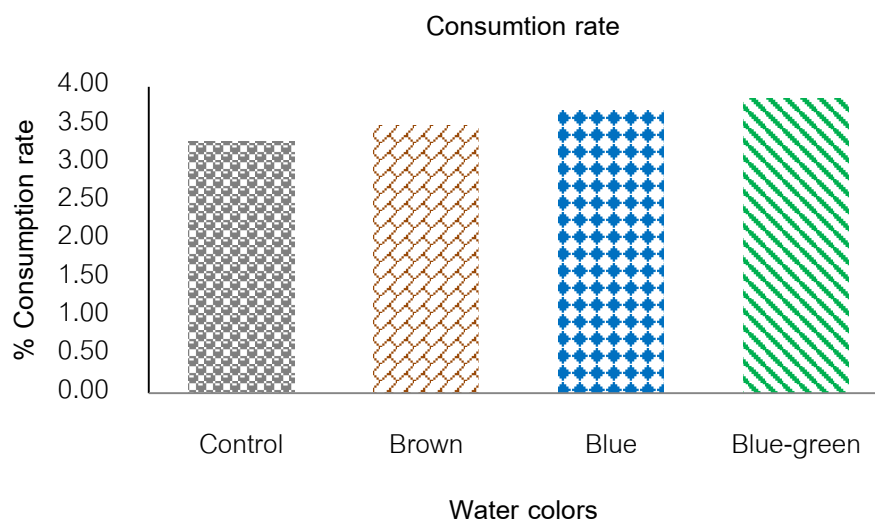


Figure 4 Consumption rate of juveniles Asian seabass

โดยการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหารสามารถบอกถึงการเติบโตและพัฒนาการของสัตว์น้ำได้ การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของทริปซินและโคโมทริปซินทำให้ T/C ratio มีการเปลี่ยนแปลง ส่งผลต่อประสิทธิภาพการย่อยโปรตีน ปริมาณกรดอะมิโนอิสระในพลาสมาและในกล้ามเนื้อ สมดุลของการสร้าง การสลายโปรตีน และอัตราการเติบโต (Rungruangsak-Torrissen *et al.*, 2000) ทั้งนี้ เนื่องจากอัตราการหลั่งของทริปซินและโคโมทริปซินมีความสัมพันธ์กับความอยากอาหารของปลา อัตราการดูดซึม การสังเคราะห์กรดอะมิโนที่จำเป็นสำหรับการสร้างโปรตีน และระดับการหลั่งของพลาสมาอินซูลิน (Einarsson, 1996) ดังนั้นอัตราส่วนดังกล่าวจึงสัมพันธ์การเติบโต เช่นเดียวกับการศึกษาของ Sunde *et al.* (2001) พบว่า T/C ratio ในปลาแอตแลนติกแซลมอน *Salmo salar* L. มีความสัมพันธ์กับการเจริญเติบโต นอกจากนี้ Hofer (1981) พบว่าการใช้ประโยชน์ของโปรตีนสามารถใช้ประเมินพฤติกรรมกินอาหารของสัตว์น้ำได้เช่นกัน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Rungruangsak-Torrissen *et al.* (2006) ได้ศึกษาในปลาแอตแลนติกแซลมอน *Salmo salar* พบว่า T/C ratio มีความสัมพันธ์กับอัตราการเจริญเติบโตของปลา โดยเมื่อปลาอยู่ในระยะที่มีการเจริญเติบโต T/C ratio จะมีค่าสูง และจะมีค่าต่ำลงเมื่ออัตราการเจริญเติบโตของปลาลดลง เนื่องจากทริปซินแสดงกิจกรรมจำเพาะได้สูงและมีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการย่อยอาหารในช่วงที่ปลามีการเจริญเติบโตสูง ตรงข้ามกับเอนไซม์โคโมทริปซินซึ่งแสดงกิจกรรมจำเพาะได้สูงขึ้น เมื่ออัตราการเจริญเติบโตลดลง ดังนั้น T/C ratio จึงสามารถใช้เป็นดัชนีวัดคุณภาพการเจริญเติบโตของสัตว์แต่ละระยะได้

ผลของสีน้ำที่แตกต่างกันต่อการเจริญเติบโตของปลากะพงขาววัยรุ่น

การศึกษากการเลี้ยงลูกปลากะพงขาววัยรุ่นน้ำหนักและความยาวเฉลี่ย 10.09 ± 1.09 กรัม 8.06 ± 1.03 เซนติเมตร ตามลำดับ ภายใต้สีน้ำที่แตกต่างกัน 4 ชุดการทดลอง เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่าค่าเฉลี่ยของน้ำหนัก อัตราการเจริญเติบโตต่อวัน อัตราการรอด ของลูกปลากะพงขาววัยรุ่นในชุดการทดลองที่ 4 มีค่าแนวโน้มที่สูงกว่าทุกชุดการทดลองอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) คือ 58.08 ± 2.72 กรัมต่อตัว, 0.78 ± 0.40 กรัมต่อตัวต่อวัน และ 83.11 ± 6.48 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ รองลงมาคือ ชุดการทดลองที่ 3, 2 และ 1 เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยทางสถิติของ ความยาว อัตราการรอด รวมทั้งอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อของทุกชุดการทดลองนั้น พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 2)

ประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของลูกปลากะพงขาววัยรุ่นในชุดการทดลองที่ 4 พบว่า น้ำหนักเมื่อสิ้นสุดการทดลอง น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น ความยาวเมื่อสิ้นสุดการทดลอง ความยาวที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโต อัตราการแลกเนื้อ และอัตราการรอด มีแนวโน้มสูงกว่าของแต่ละชุดการทดลอง (ตารางที่ 2) เช่นเดียวกับการทดลองของ Ustundag and Rad. (2015) พบว่า ลูกปลา Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) มีแนวโน้มของน้ำหนักตัวเพิ่มสูงขึ้นในถังเลี้ยงปลาพลาสติกที่มีพื้นหลังสีเขียวเข้ม และเขียวสว่างคือ 69.44 ± 8.81 และ 68.87 ± 6.42 กรัม เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 60 วัน เช่นเดียวกับการทดลองของ Luchiaro and Pirhonen. (2008) ได้กล่าวไว้ว่า สภาพแวดล้อมโทนสีเขียวเหมาะสมกับการเลี้ยงลูกปลา Rainbow trout วัยรุ่น เช่นเดียวกับ Sierra-Flores *et al.* 2016 ที่รายงานว่าลูกปลา Turbot (*Scophthalmus maximus*) ที่เลี้ยงด้วยความเข้มแสงสีเขียว (530 nm.) มีอัตราการรอดและมีน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นสูงกว่าความเข้มแสงสีน้ำเงิน (455 nm.) สีแดง (640 nm.) และสีขาว ตามลำดับ ในการทดลองครั้งนี้แม้ว่าข้อมูลทางสถิติจะไม่แตกต่างกันมากระหว่างชุดการ

ทดลองที่ 3 และ 4 แต่ค่าเฉลี่ยประสิทธิภาพการเจริญเติบโต ในชุดการทดลองที่ 4 (สีเขียมน้ำเงิน) มีค่าสูงที่สุดเมื่อเทียบกับค่าประสิทธิภาพการเจริญเติบโตกับชุดการทดลองที่ 3 (สีน้ำเงิน), 2 (สีน้ำตาล) และ 1 (สีน้ำธรรมชาติ)

Table 2. Growth performance of juveniles Asian seabass in recirculating aquaculture systems (RAS)

Parameter \ Treatment	Control	Brown	Blue	Blue-green
Weight gain (g.)	42.91±1.15 ^a	43.93±2.41 ^a	54.87±2.24 ^b	58.08±2.72 ^b
Average daily gain (g./body/day)	0.57±0.02 ^a	0.58±0.03 ^a	0.73±0.03 ^b	0.78±0.40 ^b
Survival rate (%)	79.33 ± 2.40 ^a	79.78 ± 7.78 ^a	80.89 ± 2.34 ^a	83.11 ± 6.48 ^a
Feed conversion ratio (FCR)	1.27 ± 0.35 ^a	1.25 ± 0.06 ^a	1.15 ± 0.04 ^a	1.07 ± 0.04 ^a

Note: different letters in the same row are statistically different. ($p < 0.05$)

ส่วนค่าของคุณภาพน้ำ เมื่อสิ้นสุดการทดลอง พบว่า คุณภาพน้ำในชุดการทดลองที่ 1 และ 4 มีความแตกต่างกันกับชุดการทดลองที่ 2 และ 3 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ส่วนปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ ความเป็นกรด-ด่าง แอมโมเนีย-ไนโตรเจน ไนไตรท์-ไนโตรเจน ไนเตรท-ไนโตรเจน และฟอสฟอรัสรวม ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 3)

Table 3. Water quality in recirculating aquaculture systems (RAS)

Water quality	Treatment			
	Control	Brown	Blue	Blue-green
pH	8.52 ± 0.78 ^a	8.08 ± 0.02 ^a	8.1 ± 0.02 ^a	8.04 ± 0.04 ^a
Dissolved Oxygen (mg/l)	4.31 ± 2.16 ^a	5.29 ± 2.64 ^a	4.96 ± 2.48 ^a	4.36 ± 2.18 ^a
Ammonia (mg/l)	0.31 ± 0.13 ^a	0.18 ± 0.10 ^a	0.29 ± 0.11 ^a	0.32 ± 0.18 ^a
Nitrite (mg/l)	0.31 ± 0.30 ^a	0.28 ± 0.16 ^a	0.34 ± 0.28 ^a	0.26 ± 0.27 ^a
Nitrate (mg/l)	0.40 ± 0.27 ^a	0.42 ± 0.29 ^a	0.51 ± 0.33 ^a	0.39 ± 0.26 ^a
Phosphorus (mg/l)	0.35 ± 0.13 ^a	0.26 ± 0.10 ^a	0.32 ± 0.15 ^a	0.32 ± 0.13 ^a
Temperature (°C)	29.60 ± 0.00 ^b	28.63 ± 0.06 ^a	28.53 ± 0.06 ^a	29.53 ± 0.06 ^b

Note: different letters in the same row are statistically different. ($p < 0.05$)

สรุปผลการวิจัย

เมื่อประเมินผลของสื่อน้ำที่แตกต่างกันต่อประสิทธิภาพของเอนไซม์ย่อยอาหารคือ ทริปซินและโคโม-ทริปซิน พบว่าชุดการทดลองที่ 4 มีแนวโน้มของกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ทริปซินและโคโมทริปซิน รวมทั้งอัตราส่วนระหว่าง ทริปซินและโคโมทริปซิน (T/C ratio) มีค่าสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับประสิทธิภาพอัตราการเจริญเติบโตของปลากะพงขาววัยรุ่นในชุดการทดลองที่ 4 เช่นเดียวกัน การทดลองครั้งนี้จึงสามารถสรุปได้ว่าสื่อน้ำสีเขียวอมน้ำเงินมีความเหมาะสมต่อการเลี้ยงปลากะพงขาววัยรุ่นในระบบน้ำหมุนเวียนแบบปิด recirculating aquaculture system (RAS) รวมทั้งการหาอุณหภูมิ และ pH ที่เหมาะสมของเอนไซม์ก่อนการประเมินประสิทธิภาพนั้นมีบทบาทสำคัญต่อการแสดงกิจกรรมและเสถียรภาพของเอนไซม์ และเป็นปัจจัยชี้วัดการย่อยอาหารของสัตว์อย่างหนึ่ง ซึ่งสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการเลี้ยงปลากะพงขาวเชิงพาณิชย์ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับงบประมาณสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ปี 2560 และสำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ปี 2561 ทางคณะผู้วิจัยใคร่ขอขอบคุณไว้ ณ. ที่นี้ และขอขอบคุณคณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการทำวิจัย ตลอดจนบุคลากรทุกท่านที่มีส่วนร่วมทำให้การวิจัยครั้งนี้ประสบผลสำเร็จ

เอกสารอ้างอิง

- Bolasina S., Perez A. and Yamashita Y., 2006. "Digestive enzymes activity during ontogenetic development and effect of starvation in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*," Aquaculture, vol. 252, no. 2-4, 503-515 p,
- Chan C-R., Lee D-L., Cheng Y-H., Hsieh D J-Y, and. Weng C-F., 2008. "Feed deprivation and re-feeding on alterations of proteases in tilapia *Oreochromis mossambicus*," Zoological Studies, vol. 47, no. 2., 207-214 p,
- Erlanger B. F., Kokowsky N. and Cohen W., 1961, "The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin". Arch. Biochem. Biophys., 95: 271-278 p.
- Einarsson S., Spencer D.P., and Talbot, C., 1996. The effect of feeding on the secretion of trypsin, pepsin and chymotrypsin. Fish Physiology and Biochemistry. 15:5:439-446 p.
- Hidalgo M. C., Urea E., and Sanz A., 1999. "Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities," Aquaculture, vol. 170, no. 3-4, 267-283 p,
- Hofer R., Schiemer F., 1981 "Proteolytic activity in the digestive tract of several species of fish with different feeding habits," Oecologia, vol. 48, no.3, 342-345 p.

- Jantaro S., 2000. "Purification and Characterization of Trypsin and Chymotrypsin from Viscera of Yellowfin Tuna (*Thunnus albacares*) and Application", M. S. thesis, Prince of Songkla University. [in Thai]
- Kroghdahl A., Lea T.B., and Olli J.L., 1994. "Soybean proteinase inhibitors affect intestinal trypsin activities and amino acid digestibilities in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)". *Comp. Biochem. Physiol.*, 107: 215-219 p.
- Lowry, H.O., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275 p.
- Luchiari A C., Pirhonen J. 2008. Effects of ambient colour on colour preference and growth of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Journal of Fish Biology* 72: 1504-1514 p.
- Nikhom L., Lakana L., Patchara M., and Kom S. 2011. Culture of barramundi (*Lates calcarifer* BLOCH, 1790) size 4 to 6 inches in a recirculating system. *Proceedings of 49th Kasetsart University Annual Conference: Fisheries.* 553 p. [in Thai]
- Nuchsuk, C. 2007. Feed Development Using Digestive Enzyme Technology for Culture of Shark Catfish, *Helicophagus leptorhynchus* Ng & Kottelat, 2000. Thesis. Science (Biochemistry). kasetsart university. 145 p. [in Thai]
- Riche M., Haley D.I., Oetker M., Garbrecht S., and Garling D. L., 2004. "Effect of feeding frequency on gastric evacuation and the return of appetite in tilapia *Oreochromis niloticus* (L.)," *Aquaculture*, vol. 234, no. 1-4, 657-673 p.
- Rungruangsak-Torrissen, K., E. Lied and M. Espe. 1998. Differences in digestion and absorption of dietary protein in Atlantic salmon (*Salmo salar*) with genetically different trypsin isozymes. *J. Fish Biol.* 45: 1087-1104 p.
- Rungruangsak-Torrissen, K. and R. Male. 2000. Trypsin isozymes: development, digestion and structure, In N.F. Haard and B.K. Simpson, eds. *Seafood Enzymes, Utilization and Influence on Postharvest Seafood Quality.* Marcel Dekker, Inc., New York. 215-269 p.
- Rungruangsak-Torrissen K., A. Rustad, J. Sunde, S.A. Eiane, H.B. Jensen, J. Opstvedt, E. Nygard, 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*, vol. 82, no. 6, 644-654 p.
- Rungruangsak-Torrissen, 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.* 32:1:7-23 p.

- Sierra-Flores R., Davie A., Grant B., Carboni S., Atack T., Migaud H. 2016. Effects of light spectrum and tank background colour on Atlantic cod (*Gadus morhua*) and turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae performances. *Aquaculture*. 450: 6-13 p.
- Sunde, J., G.L. Taranger and K. Rungruangsak-Torrissen. 2001. Digestive protease activity and free amino acids in white muscle as indicators for feed conversion efficiency and growth rate in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish Physiol. Biochem.* 25: 335-345 p.
- Supannapong P. , Pimsalee T. , A-komo T. , Engkakul A. , Kovitvadh U. , Kovitvadh S. , and Rungruangsak-Torrissen K. , 2008. "Digestive enzymes and in vitro digestibility of different species of phytoplankton for culture of the freshwater pearl mussel, *Hyriopsis (Hyriopsis) bialatus*," *Aquaculture International*, vol. 16, no. 5, 437-453 p.
- Thongprajukaew K., 2011 "Feed Development using Digestive Enzyme Technology for Successive Growth in Siamese Fighting Fish (*Betta splendens Regan, 1910*)," Ph.D. Thesis, Kasetsart University, [in Thai]
- Thongprajukaew K., Kovitvadh U., 2012. "Digestive Enzymes and Food Development for Aquaculture" *The Journal of KMUTNB.*, Vol. 22, No. 3. 710-720 p. [in Thai]
- Ustundag M., Rad F. 2015. Effect of Different Tank Colors on Growth Performance of Rainbow Trout Juvenile (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792). *Journal of Agricultural Sciences* 21, 144-151 p.
- Yone, Y. and Fujii, M. 1975. Studies on Nutrition of red sea bream-XI Effect of 3 fatty acid supplement in a corn oil diet on growth rate and feed efficiency. *Bull. Jap.Soc.sci Fish*, 41: 73-77 p.