คุณลักษณะของเอนไซม์ย่อยอาหารในกุ้งก้ามกรามวัยอ่อน *Macrobrachium rosenbergii* (de Man)

Characterization of digestive enzymes in juvenile prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man)

ปัทมา ตั้งใจ[1] อรุณี อิงคากุล[1] นิวุฒิ หวังชัย[2] และ อุทัยวรรณ โกวิทวที[3]

Pattama Tangjai[1] , Arunee Engkagul[1] , Niwoot Wangchai[2] and Uthaiwan Kovitvadhi[3]

[1];ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

[2]:คณะเทคโนโลยีการประมง และทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

[3]:ภาควิชาสัตววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

บทคัดย่อ

ศึกษากิจกรรมและคุณลักษณะของเอนไซม์อะไมเลส โปรติเนส ไลเปส และเซลลูเลสจากเฮพาโตแพนเครียสและลำไส้ของกุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) ระยะวัยอ่อน (larval, post larval) ที่เลี้ยงในภาคเหนือ พบว่าในเฮพาโตแพนเครียสมีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์อะไมเลสสูงกว่าในลำไส้ ซึ่งตรงข้ามกับเอนไซม์เซลลูเลสและไลเปส ส่วนกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์โปรติเนสในเฮพาโตแพนเครียสและลำไส้มีค่าใกล้เคียงกันทั้งสองระยะ โดยสรุปในเฮพาโตแพนเครียสและลำไส้ของกุ้งก้ามกรามมีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสสูงสุดรองลงไปคือเอนไซม์อะไมเลส โปรติเนส และเซลลูเลส ตามลำดับ แตกต่างจากกุ้งก้ามกรามตัวเต็มวัยซึ่งมีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสสูงสุดรองลงไปคือเอนไซม์โปรติเนส อะไมเลส และเซลลูเลส ตามลำดับ แสดงว่าอาหารที่เหมาะสมในการเลี้ยงกุ้งก้ามกรามในระยะตัวเต็มวัยและระยะวัยอ่อนต้องมีสัดส่วนของโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตที่ต่างกัน ดังนั้นผลจากการศึกษานี้จึงสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานส่วนหนึ่งในการคัดเลือกและกำหนดสัดส่วนของวัตถุดิบอาหารที่เหมาะสมในการเลี้ยงกุ้งก้ามกรามในภาคเหนือเชิงพาณิชย์ต่อไป

Abstract

Characterization of amylase, proteinase, lipase and cellulase from hepatopancreas and intestine of larval and post larval prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man), reared in Northern Thailand, showed that the specific activity of amylase in hepatopancreas was higher than that in the intestine in opposite to the specific activities of cellulase and lipase which were higher in the intestine. The specific activities of proteinases were similar in the hepatopancreas and the intestine of the two stages. The specific activities of digestive enzymes in both organs in decreasing order were lipase, amylase, proteinase and cellulase, respectively, which were different from those in adult indicating different ratio of protein and carbohydrate in feed formulation suitable for rearing juvenile and adult

prawn. The information obtained from this study will be used as a basis for selection and determination of appropriate composition ratio of raw materials used in feed formulation for commercial culture of the prawn.

คำนำ

กุ้งก้ามกรามเป็นกุ้งน้ำจืดที่มีขนาดใหญ่ที่สุด พบได้ในแหล่งน้ำจืดธรรมชาติและแหล่งน้ำกร่อยทั่วไป เป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่สำคัญ ได้รับความสนใจจากผู้บริโภคและเป็นที่ต้องการของตลาดทั้งในและต่างประเทศสูงมาก ปัจจุบันปริมาณกุ้งก้ามกรามในแหล่งน้ำธรรมชาติลดลงอย่างมากเนื่องจากหลายสาเหตุ เช่น มลภาวะทางน้ำมีความเป็นพิษเพิ่มขึ้น ความต้องการของผู้บริโภคมีปริมาณมากขึ้น ดังนั้นจึงมีการแก้ปัญหาโดยการทำฟาร์มเพาะเลี้ยงเพื่อให้มีผลผลิตเพียงพอต่อความต้องการ และเนื่องจากกุ้งก้ามกรามมีรสชาติดีและราคาค่อนข้างสูง ทำให้มีเกษตรกรสนใจเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกรามมากขึ้น (วารสารข่าวกุ้ง, 2547)

ปัจจุบันการเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกรามมีผลผลิตจากพื้นที่ภาคกลางเป็นส่วนใหญ่ (เอกสารเผยแพร่เกี่ยวกับสัตว์น้ำ, 2549) อย่างไรก็ตามเนื่องจากการเลี้ยงกุ้งก้ามกรามให้ผลตอบแทนสูง ทำให้การผลิตกุ้งก้ามกรามได้รับความสนใจอย่างมากจากเกษตรกรทางภาคเหนือ แต่ด้วยสภาพทางภูมิอากาศในเขตภาคเหนือมีผลทำให้กุ้งก้ามกรามโตช้า ใช้ระยะเวลาในการเลี้ยงนานเนื่องจากการกินอาหารของกุ้งลดลงเพราะอุณหภูมิต่ำในฤดูหนาว ดังนั้นจึงมีแนวคิดที่จะพัฒนาการเลี้ยงกุ้งก้ามกรามให้ใช้เวลาในการเลี้ยงสั้นลงโดยการปรับปรุงสูตรอาหารให้เหมาะสมกับความต้องการสารอาหารและความสามารถในการย่อยของกุ้งก้ามกรามที่เจริญเติบโตในสภาวะอุณหภูมิต่ำ

การทำฟาร์มเลี้ยงกุ้งต้องให้อาหารที่กุ้งต้องการเพื่อเพิ่มขนาดและอัตราการลอกคราบ เพราะกุ้งเป็นสัตว์น้ำที่ขยายขนาดโดยการลอกคราบ ดังนั้นอาหารจึงมีบทบาทสำคัญต่อการเพิ่มผลผลิตและการลดต้นทุนการผลิตกุ้งอย่างมาก และอาหารที่เหมาะสมจะทำให้มีของเสียตกค้างภายในบ่อเลี้ยงน้อยลง ทำให้ไม่ต้องมีการเปลี่ยนน้ำบ่อยๆเป็นผลดีต่อผู้เลี้ยงและกุ้ง เนื่องจากเมื่อมีการเปลี่ยนน้ำในบ่อเลี้ยงใหม่จะทำให้กุ้งเกิดความเครียดและกินกันเองทำให้กุ้งในบ่อเลี้ยงที่มีการเปลี่ยนน้ำบ่อยเกินไปให้ผลผลิตที่ต่ำกว่าบ่อทั่วไป ปัญหาทางด้านการเลี้ยงสัตว์น้ำหลายชนิดเกิดจากการขาดข้อมูลเกี่ยวกับความต้องการสารอาหารที่แท้จริง การศึกษาหาความเหมาะสมของอาหารที่ใช้เลี้ยงสัตว์โดยวิธีการแบบดั้งเดิมจะมีขั้นตอนที่ยุ่งยาก ใช้เวลานาน ค่าใช้จ่ายสูง ปัจจุบันได้มีการพัฒนาเทคนิคทางห้องปฏิบัติการ ได้แก่วิธี *in vitro* digestibility และการศึกษาด้านพื้นฐานทางชีวเคมีของการย่อยอาหาร โดยศึกษาสมบัติและกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ต่างๆโดยเฉพาะ Trypsin / chymotrypsin activity ratio และการศึกษาคุณภาพของเนื้อสัตว์ทางชีวเคมี โดยศึกษา protein synthesis capacity (ปริมาณของRNA, protein /lipid ratio และ RNA/protein ratio) ในกล้ามเนื้อ ซึ่งสามารถใช้ประเมินคุณภาพของอาหาร ประสิทธิภาพการย่อย ประสิทธิภาพการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ และการเจริญเติบโตของสัตว์น้ำ ข้อดีของเทคนิค

ดังกล่าวคือ สะดวก ขั้นตอนไม่ยุ่งยาก ใช้เวลาน้อยและค่าใช้จ่ายไม่แพง ข้อมูลที่ได้สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานก่อนการทดลองเลี้ยงจริง ซึ่งเทคนิคดังกล่าวข้างต้นจะนำไปสู่การพัฒนาสูตรอาหารที่เหมาะสมกับศักยภาพการย่อยอาหารและการใช้อาหารของสัตว์ในแต่ละช่วงอายุ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของประเทศในอนาคต เพื่อช่วยลดต้นทุนการผลิตและผลกระทบต่อสภาพแวดล้อม

งานวิจัยครั้งนี้ เป็นการศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์อะไมเลส โปรติเนส ไลเปสและเซลลูเลส เพื่อใช้เปรียบเทียบกับคุณลักษณะของเอนไซม์เหล่านี้ในสัตว์น้ำชนิดอื่น และเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาศักยภาพการย่อยวัตถุดิบอาหารโดยเทคนิค *in vitro* digestibility และการพัฒนาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงกุ้งก้ามกรามในภาคเหนือต่อไป เพื่อลดต้นทุนการผลิต เพิ่มการเจริญเติบโต ซึ่งเป็นแนวทางในการพัฒนาให้เกิดความยั่งยืนในการเลี้ยงกุ้งก้ามกรามอย่างมีคุณภาพ

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

ศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์อะไมเลส โปรติเนส ไลเปส และเซลลูเลส ที่สกัดจากเฮพาโตแพนเครียสและลำไส้ของกุ้งก้ามกรามระยะวัยอ่อนที่เลี้ยงในภาคเหนือ เพื่อให้ทราบสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์แต่ละชนิดเพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการทำวิจัยขั้นต่อไป

วิธีการทดลอง

การเก็บตัวอย่างกุ้งก้ามกราม

เก็บตัวอย่างกุ้งก้ามกรามวัยอ่อนจากศูนย์เพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกราม คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่ โดยเก็บตัวอย่าง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ตัว โดยเก็บตัวอย่างในระยะ larval น้ำหนักเฉลี่ย 15 ± 1.5 กรัม ขนาดเฉลี่ย 9 ± 0.3 เซนติเมตร ต่อตัว และเก็บตัวอย่างในระยะ post larval น้ำหนักเฉลี่ย 21 ± 0.7 กรัม ขนาดเฉลี่ย 13 ± 0.5 เซนติเมตร ต่อตัว

การสกัดเอนไซม์ย่อยอาหารจากกุ้งก้ามกราม

สกัดเอนไซม์ย่อยอาหารจากกุ้งก้ามกรามระยะวัยอ่อน (larval และ post larval) โดยเก็บเฮพาโตแพนเครียสและลำไส้มาแยกบดละเอียดด้วย homogenizer แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000×g นาน 15 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส ส่วนใสแบ่งเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็น crude enzyme extract สำหรับวิเคราะห์กิจกรรมและตรวจสอบสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ย่อยอาหารและความสามารถในการย่อยอาหารชนิดต่างๆ

การศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์ย่อยอาหาร

ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์อะไมเลส

วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสในสภาวะเปลี่ยนแปลง pH 2-12 และในสภาวะเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ

20- 80 องศาเซลเซียสตามวิธีของ Areekijseree *et al.* (2004) โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Bernfeld (1957) ใช้สารละลายน้ำแป้งความเข้มข้น 1 % เป็นสับสเตรท วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของน้ำตาลมอลโทส

ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์โปรติเนส

วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเนสในสภาวะเปลี่ยนแปลง pH 2-12 และในสภาวะเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ 20- 80 องศาเซลเซียสตามวิธีของ Areekijseree *et al.* (2004) โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Vega-Villasante *et al.* (1995) ใช้สารละลาย azocasein ความเข้มข้น 0.5 % เป็นสับสเตรท วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร

ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์ไลเปส

วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสในสภาวะเปลี่ยนแปลง pH 2-12 และในสภาวะเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ 20- 80 องศาเซลเซียสตามวิธีของ Areekijseree *et al.* (2002) โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Winkler and Stuckmann (1979) ใช้ p-NPP (para-nitrophenyl palmitate) ใน propanol ความเข้มข้น 0.01 M เป็นสับสเตรท วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร

ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส

วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในสภาวะเปลี่ยนแปลง pH 2-12 และในสภาวะเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ 20- 80 องศาเซลเซียสตามวิธีของ Areekijseree *et al.* (2002) โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Mendels *et al.* (1976) ใช้สารละลาย CMC (carboxy methyl cellulose) ความเข้มข้น 0.5 % เป็นสับสเตรท วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

คุณลักษณะของเอนไซม์อะไมเลส

จากการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสในสภาวะเปลี่ยนแปลง pH 2-12 ที่อุณหภูมิห้อง (Figure 1a) พบว่าเอนไซม์อะไมเลสที่สกัดจากเฮพาโตแพนเครียสของกุ้งก้ามกรามวัยอ่อน 2 ระยะ คือ larval และ post larval มีกิจกรรมจำเพาะสูงในช่วง pH 5-8 และ 12 โดยในระยะ larval เอนไซม์อะไมเลสมี optimum pH เท่ากับ 6-7 และ 12 ส่วนในระยะ post larval มี optimum pH เท่ากับ 6 และ 12 คล้ายกับเอนไซม์อะไมเลสที่สกัดจากลำไส้ซึ่งสามารถแสดงกิจกรรมได้ในช่วง pH 5-7 และ 12 โดยเอนไซม์จากอวัยวะทั้งสองแสดงกิจกรรมสูงสุดที่ pH 6 และ 12 สอดคล้องกับรายงานของ van Weel (1970) ซึ่งพบว่าเอนไซม์อะไมเลสใน *Hormarus americanus* ทำงานได้ดีที่ pH ประมาณ 5.2 คล้ายกับครัสเตเชียนชนิดอื่นเช่นกัน เมื่อเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์

อะไมเลสที่สกัดจากเฮพาโตแพนเครียสในกุ้งก้ามกรามวัยอ่อนและตัวเต็มวัย (ปัทมาและคณะ, 2549) พบว่าคล้ายคลึงกันคือสามารถแสดงกิจกรรมจำเพาะในช่วง pH 5-7 และ 11-12 โดยที่กุ้งก้ามกรามระยะตัวเต็มวัยสามารถแสดงกิจกรรมจำเพาะสูงสุดรองลงมาคือระยะ post larval และ larval ตามลำดับ ส่วนเอนไซม์อะไมเลสที่สกัดจากลำไส้มีกิจกรรมจำเพาะต่ำในทุกระยะการเจริญเติบโต โดยพบว่ากุ้งก้ามกรามระยะ post larval สามารถแสดงกิจกรรมจำเพาะสูงสุด ส่วนระยะ larval และระยะตัวเต็มวัยสามารถแสดงกิจกรรมจำเพาะได้ใกล้เคียงกัน

เมื่อศึกษากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสในสภาวะเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ 20-80 องศาเซลเซียส ที่ pH 6 (Figure 1b) พบว่าเอนไซม์อะไมเลสที่ได้จากเฮพาโตแพนเครียสและลำไส้ของกุ้งก้ามกรามวัยอ่อน 2 ระยะ คือ larval และ post larval มีกิจกรรมสูงในช่วง 30-60 และ 80 องศาเซลเซียส และมี optimum temperature ที่ 50 องศาเซลเซียสคล้ายกัน เมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์อะไมเลสที่สกัดจากเฮพาโตแพนเครียสและลำไส้ของกุ้งก้ามกรามตัวเต็มวัย (ปัทมาและคณะ, 2549) พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสในกุ้งก้ามกรามวัยอ่อนมีคุณลักษณะคล้ายกับเอนไซม์ในระยะตัวเต็มวัย คือแสดงกิจกรรมจำเพาะในช่วง 30,50 และ 80 องศาเซลเซียสเช่นเดียวกัน แต่เอนไซม์อะไมเลสที่สกัดจากเฮพาโตแพนเครียสและลำไส้ในกุ้งระยะ post larval มีกิจกรรมจำเพาะสูงสุดรองลงมาคือระยะตัวเต็มวัยและระยะ larval ตามลำดับ

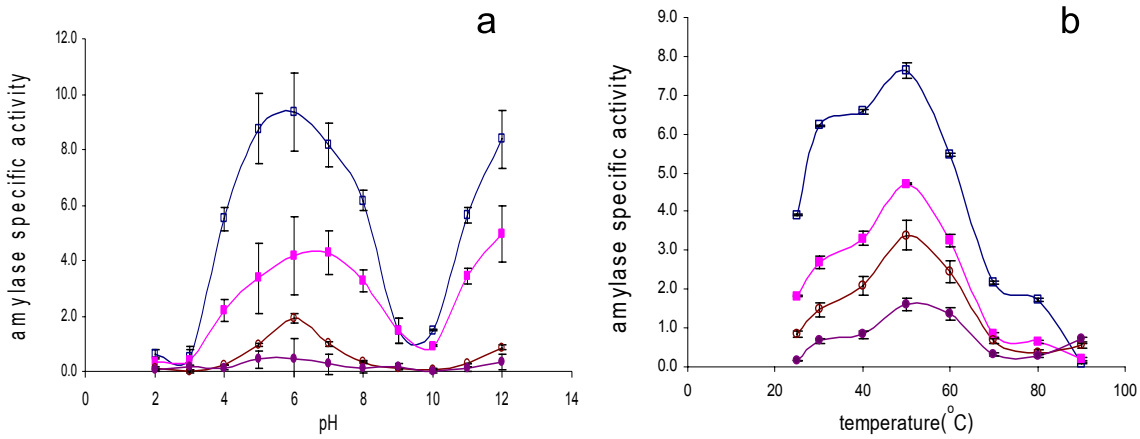

Figure 1. specific activity of amylase (μU mg protein^{-1}) from hepatopancreas of larval (—■—), hepatopancreas of post larval (—□—), intestine of larval (—✚—) and intestine of post larval (—○—) of *Macrobrachium rosenbergii* at pH 2-12 at room temperature (a) and at temperature 20-80 °C pH 6 (b)

คุณลักษณะของเอนไซม์โปรติเนส

จากการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเนสในสภาวะเปลี่ยนแปลง pH 2-12 ที่อุณหภูมิห้อง (Figure 2a) พบว่าเอนไซม์โปรติเนสที่สกัดจากเฮพาโตแพนเครียสของกุ้งก้ามกรามวัยอ่อน 2 ระยะ คือ larval และ post larval มีกิจกรรมสูงในช่วง pH 5-8 และ 12 โดยในระยะ larval เอนไซม์โปรติเนสมี optimum pH เท่ากับ 5,8 และ 12 ส่วนในระยะ post larval มี optimum pH เท่ากับ 6,8 และ 12 ส่วนเอนไซม์โปรติเนสที่สกัดจากลำไส้ของกุ้งระยะ larval แสดงกิจกรรมได้ในช่วง pH 4,6,8 และ 12 และเอนไซม์โปรติเนสจากลำไส้ของกุ้งระยะ post larval สอดคล้องกับรายงานของ Garcia-Carreno (1992a) ที่ได้ศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์ย่อยอาหารในครัสเตเชียน พบว่าเอนไซม์โปรติเนสมีกิจกรรมของเอนไซม์ในช่วง pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานต่างกัน โดยทั่วไปเอนไซม์โปรติเนสในครัสเตเชียนส่วนใหญ่จะมีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดในช่วง pH 5.5-9.0 เมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์โปรติเนสที่สกัดจากเฮพาโตแพนเครียสของกุ้งตัวเต็มวัย (ปัทมาและคณะ, 2549) พบว่าคุณลักษณะของเอนไซม์โปรติเนสในกุ้งก้ามกรามวัยอ่อนคล้ายกับระยะตัวเต็มวัย คือแสดงกิจกรรมจำเพาะในช่วง pH 4-8 และ 11-12 เช่นเดียวกัน โดยเอนไซม์โปรติเนสที่สกัดจากเฮพาโตแพนเครียส ในกุ้งระยะตัวเต็มวัยและระยะ post larval มีกิจกรรมจำเพาะสูงใกล้เคียงกัน ส่วนระยะ larval มีกิจกรรมประมาณร้อยละ 30 ถึง 50 ของกิจกรรมในระยะตัวเต็มวัย ส่วนเอนไซม์โปรติเนสที่สกัดจากลำไส้ในกุ้งก้ามกรามวัยอ่อนระยะ larval, post larval และระยะตัวเต็มวัยมีกิจกรรมจำเพาะใกล้เคียงกันที่ pH 6

เมื่อศึกษากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเนสในสภาวะเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ 20-80 องศาเซลเซียส ที่ pH 6 (Figure 2b) พบว่าเอนไซม์โปรติเนสที่ได้จากกุ้งก้ามกรามวัยอ่อน 2 ระยะ คือ larval และ post larval มีกิจกรรมสูงในช่วง 40-70 องศาเซลเซียส และมี optimum temperature ที่ 60 องศาเซลเซียส คล้ายกับเอนไซม์โปรติเนสที่สกัดจากลำไส้ ซึ่งสามารถแสดงกิจกรรมได้ในช่วง 50-70 องศาเซลเซียสและแสดงกิจกรรมสูงสุดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเช่นเดียวกัน เมื่อเปรียบเทียบกับ optimum temperature ของเอนไซม์โปรติเนสที่สกัดจากเฮพาโตแพนเครียสและลำไส้ของกุ้งตัวเต็มวัย (ปัทมาและคณะ, 2549) พบว่าเอนไซม์ในกุ้งก้ามกรามวัยอ่อนมีคุณลักษณะคล้ายกับเอนไซม์ในระยะตัวเต็มวัย โดยเอนไซม์โปรติเนสมีกิจกรรมจำเพาะสูงสุดที่ 60 องศาเซลเซียสเช่นเดียวกัน โดยเอนไซม์โปรติเนสที่สกัดจากเฮพาโตแพนเครียสและลำไส้กุ้งระยะ larval มีกิจกรรมจำเพาะสูงสุดรองลงมาคือระยะตัวเต็มวัยและระยะ post larval ตามลำดับ เอนไซม์โปรติเนสที่สกัดจากเฮพาโตแพนเครียสและลำไส้ของกุ้งก้ามกรามระยะ larval post larval และตัวเต็มวัย พบว่ามีกิจกรรมจำเพาะในช่วง pH กว้าง คือ เอสิดโปรติเนสที่ทำงานได้ดีในช่วง pH เป็นกรด นิวทรัลโปรติเนสที่ทำงานได้ดีในช่วง pH เป็นกลาง และ อัลคาไลน์โปรติเนสที่ทำงานได้ดีในช่วง pH เป็นด่าง เพราะกุ้งก้ามกรามเป็นสัตว์กินพืชและเนื้อ แต่กินเนื้อเป็นส่วนใหญ่ จึงมีเอนไซม์โปรติเนสหลากหลายชนิด

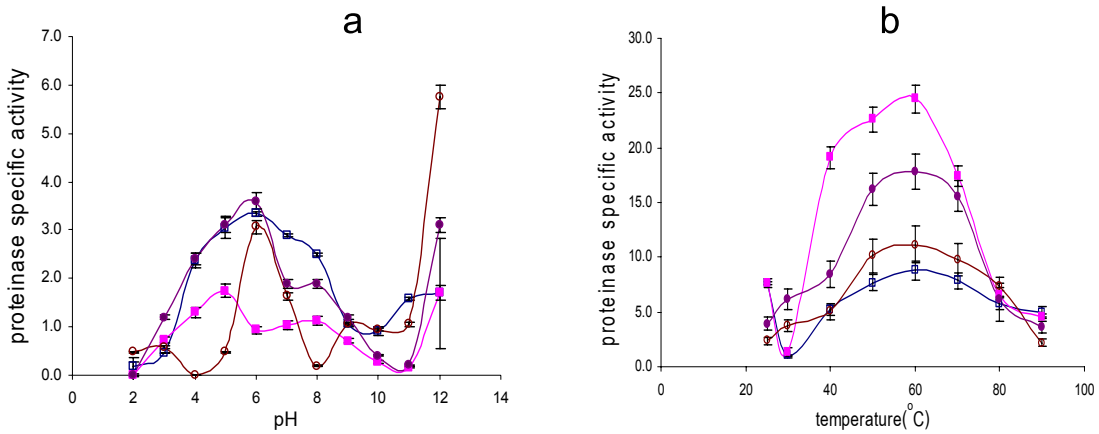

Figure 2. specific activity of proteinase (mU mg protein^{-1}) from hepatopancreas of larval (▬), hepatopancreas of post larval (▭), intestine of larval (✚) and intestine of post larval (◇) of *Macrobrachium rosenbergii* at pH 2-12 at room temperature (a) and at temperature 20-80 °C pH 6 (b)

คุณลักษณะของเอนไซม์ไลเปส

จากการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสในสภาวะเปลี่ยนแปลง pH 2-12 ที่อุณหภูมิห้อง (Figure 3a) พบว่าเอนไซม์ไลเปสที่สกัดจากเฮพาโตแพนเครียสของกุ้งก้ามกรามวัยอ่อน 2 ระยะ คือ larval และ post larval มีกิจกรรมสูงในช่วง pH 5 และ 9-12 โดยในระยะ larval และ post larval เอนไซม์ไลเปสที่สกัดจากเฮพาโตแพนเครียสมี optimum pH เท่ากับ 9 ส่วนเอนไซม์ไลเปสที่สกัดจากลำไส้ของกุ้งระยะ larval และ post larval แสดงกิจกรรมในช่วง pH 9 และ 12 และเอนไซม์ไลเปสจากลำไส้ของกุ้งระยะ post larval มี optimum pH เท่ากับ 9 เหมือนกับเอนไซม์ไลเปสที่สกัดจากเฮพาโตแพนเครียส เมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ไลเปสที่สกัดจากเฮพาโตแพนเครียสของกุ้งตัวเต็มวัย (ปัทมาและคณะ, 2549) พบว่าคุณลักษณะของเอนไซม์ไลเปสในกุ้งก้ามกรามวัยอ่อนคล้ายกับระยะตัวเต็มวัย คือแสดงกิจกรรมจำเพาะในช่วง pH 5,7,10 และ 12 เช่นเดียวกัน โดยเอนไซม์ไลเปสที่สกัดจากเฮพาโตแพนเครียสและลำไส้ของกุ้งระยะ post larval มีกิจกรรมจำเพาะสูงสุด รองลงมาคือ ระยะตัวเต็มวัยและ larval ตามลำดับ ดังนั้นควรมีสัดส่วนของไขมันในอาหารกุ้งระยะ post larval มากกว่า larval และตัวเต็มวัย เมื่อเปรียบเทียบกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสที่สกัดจากเฮพาโตแพนเครียสและลำไส้พบว่าเอนไซม์ไลเปสที่สกัดจากลำไส้มีกิจกรรมจำเพาะสูงกว่าเอนไซม์ที่สกัดจากเฮพาโตแพนเครียส พบว่าในลำไส้มี pH สูงกว่าในเฮพาโตแพนเครียส ซึ่งเหมาะสมกับการแสดงกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสมากกว่า

เมื่อศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสในสภาวะเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ 20-80 องศาเซลเซียส ที่ pH 9

(Figure 3b) พบว่าเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากเฮพาโตแพนเครียสของกุ้งก้ามกรามวัยอ่อน 2 ระยะ คือ larval และ post larval มีกิจกรรมสูงที่อุณหภูมิ 25 และ 60 องศาเซลเซียส และมี optimum temperature เท่ากับ 25 องศาเซลเซียส คล้ายกับเอนไซม์ไลเปสที่สกัดจากลำไส้ซึ่งสามารถแสดงกิจกรรมได้ใน ช่วง 25-60 และ 80 องศาเซลเซียสเช่นเดียวกัน โดยแสดงกิจกรรมสูงสุดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เมื่อเปรียบเทียบกับ optimum temperature ของเอนไซม์ไลเปสที่สกัดจากเฮพาโตแพนเครียสและลำไส้ของกุ้งตัวเต็มวัย (ปัทมาและคณะ, 2549) พบว่าเอนไซม์ในกุ้งก้ามกรามวัยอ่อนมีคุณลักษณะคล้ายกับเอนไซม์ในตัวเต็มวัย โดยเอนไซม์ไลเปสมีกิจกรรมจำเพาะสูงสุดที่ 25 องศาเซลเซียสเช่นเดียวกัน โดยเอนไซม์ไลเปสที่สกัดจากเฮพาโตแพนเครียสของกุ้งระยะตัวเต็มวัยมีกิจกรรมจำเพาะสูงสุด รองลงมาคือระยะ larval และpost larval ตามลำดับ และกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสที่สกัดจากลำไส้กุ้งระยะ post larval มีกิจกรรมจำเพาะสูงสุดรองลงมาคือระยะตัวเต็มวัยและระยะ larval ตามลำดับ

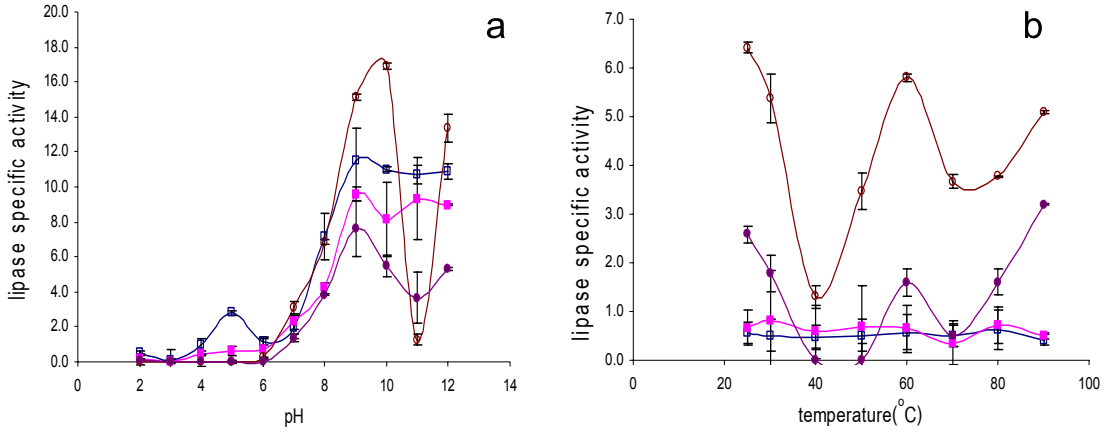

Figure 3. specific activity of lipase (mU mg protein^{-1}) from hepatopancreas of larval (—▬—), hepatopancreas of post larval (—▭—), intestine of larval (—✚—) and intestine of post larval (—○—) of *Macrobrachium rosenbergii* at pH 2-12 at room temperature (a) and at temperature 20-80 °C pH 9 (b)

คุณลักษณะของเอนไซม์เซลลูเลส

จากการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในสภาวะเปลี่ยนแปลง pH 2-12 ที่อุณหภูมิห้อง (Figure 4a) พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสที่สกัดจากเฮพาโตแพนเครียสของกุ้งก้ามกรามวัยอ่อน 2 ระยะ คือ larval และ post larval มีกิจกรรมสูงในช่วง pH 4-7 และ 12 โดยในระยะ larval และ post larval เอนไซม์เซลลูเลสที่สกัดจากเฮพาโตแพนเครียสมี optimum pH เท่ากับ 4 ส่วนเอนไซม์เซลลูเลสที่สกัดจากลำไส้ของกุ้งระยะ larval และ post larval มี

กิจกรรมสูงในช่วง pH 5-6 และ 12 และมี optimum pH เท่ากับ 5-6 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Pavasovic และคณะ (2004) ที่พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสใน *Scylla serrata* (mud crab) ทำงานได้ดีที่ pH ประมาณ 5.5 และ 50 องศาเซลเซียส คล้ายกับครัสเตเชียนชนิดอื่นเช่นกัน เมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์เซลลูเลสที่สกัดจากเฮพาโตแพนเครียสของกุ้งก้ามกรามตัวเต็มวัย (ปัทมาและคณะ, 2549) พบว่าคุณลักษณะของเอนไซม์เซลลูเลสในระยะวัยอ่อนคล้ายกับตัวเต็มวัย คือสามารถแสดงกิจกรรมจำเพาะในช่วง pH 4-6 และ 12 เช่นเดียวกัน โดยเอนไซม์เซลลูเลสที่สกัดจากเฮพาโตแพนเครียสและลำไส้ของกุ้งระยะ post larval มีกิจกรรมจำเพาะสูงสุดรองลงมาระยะตัวเต็มวัยและระยะ larval ตามลำดับ

เมื่อศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในสภาวะเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ 20-80 องศาเซลเซียส ที่ pH 6 (Figure 4b) พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสที่ได้จากเฮพาโตแพนเครียสของกุ้งก้ามกรามวัยอ่อน 2 ระยะ คือ larval และ post larval มี optimum temperature เท่ากับ 60 องศาเซลเซียส คล้ายกับเอนไซม์เซลลูเลสที่สกัดจากลำไส้ซึ่งสามารถแสดงกิจกรรมได้ในช่วง 40-60 องศาเซลเซียส โดยแสดงกิจกรรมสูงสุดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์เซลลูเลสในกุ้งตัวเต็มวัยพบว่าเอนไซม์ในกุ้งก้ามกรามวัยอ่อนมีคุณลักษณะคล้ายกับระยะตัวเต็มวัยคือเอนไซม์เซลลูเลสที่สกัดจากเฮพาโตแพนเครียสมี optimum temperature ในช่วง 40-60 องศาเซลเซียสเช่นเดียวกัน โดยเอนไซม์เซลลูเลสที่สกัดจากเฮพาโตแพนเครียสของกุ้งระยะ post larval มีกิจกรรมจำเพาะสูงสุดรองลงมาคือ ระยะlarval และตัวเต็มวัยตามลำดับ ส่วนเอนไซม์เซลลูเลสที่สกัดจากลำไส้พบว่าในกุ้งทั้งสามระยะมีกิจกรรมจำเพาะสูงสุดใกล้เคียงกัน

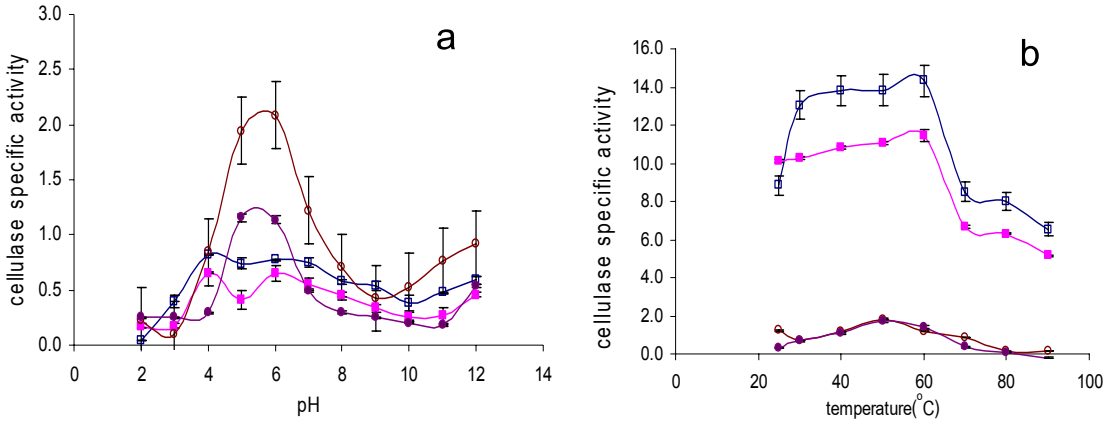

Figure 4. specific activity of cellulase (μU mg protein^{-1}) from hepatopancreas of larval (▬), hepatopancreas of post larval (▭), intestine of larval (◆) and intestine of post larval (○) of *Macrobrachium rosenbergii* at pH 2-12 at room temperature (a) and at temperature 20-80 °C pH 6 (b)

การศึกษาคุณลักษณะเอนไซม์อะไมเลส โปรติเนส ไลเปส และเซลลูเลส จากเฮพาโตแพนเครียสและลำไส้ของกุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) ระยะวัยอ่อนที่เลี้ยงในภาคเหนือซึ่งมีอุณหภูมิต่ำ พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสในเฮพาโตแพนเครียสของกุ้งก้ามกรามระยะ larval และ post larval มีกิจ กรรมจำเพาะสูงกว่าในลำไส้ ดังนั้นการย่อยอาหารพวกแป้งที่มีพันธะ □ 1,4 glycosidic จะเกิดขึ้นในเฮพาโตแพนเครียส ส่วนในลำไส้พบว่ามีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์โปรติเนส ไลเปส และเซลลูเลสสูงกว่า ดังนั้นการย่อยโปรตีน ไลเปส และเซลลูโลสเกิดขึ้นมากที่ลำไส้ซึ่งสอดคล้องกับคุณลักษณะของเอนไซม์โปรติเนส ไลเปส ที่มี optimum pH ในช่วงเป็นด่าง ซึ่งในลำไส้จะมี pH เป็นด่างจึงทำให้เอนไซม์มีสภาวะที่เหมาะสมกับการทำงาน เมื่อเปรียบเทียบเอนไซม์ที่สกัดจากเฮพาโตแพนเครียสของกุ้งก้ามกราม พบว่าระยะ larval และ post larval มีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสสูงสุด รองลงไปคือเอนไซม์อะไมเลส โปรติเนส และเซลลูเลส ตามลำดับ ส่วนเอนไซม์ที่สกัดจากเฮพาโตแพนเครียสของกุ้งระยะตัวเต็มวัย มีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์อะไมเลสสูงสุด รองลงไปคือเอนไซม์ไลเปส โปรติเนส และเซลลูเลส ตามลำดับ และเอนไซม์ที่สกัดจากลำไส้ของกุ้งก้ามกรามพบว่าระยะ larval และ post larval มีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสสูงสุด รองลงไปคือเอนไซม์โปรติเนส เซลลูเลส และอะไมเลส ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของอรพินท์และคณะ (2548) พบว่ามีเอนไซม์โปรติเนสที่สกัดจากเฮพาโตแพนเครียสของกุ้งก้ามกรามมีกิจกรรมจำเพาะสูงกว่าเอนไซม์อะไมเลสและไลเปส และสอด คล้องกับการศึกษาของ Pavasovic *et al.* (2004) พบว่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์อะไมเลสที่สกัดจากมิดกัทของปู (mud crab) มีค่าสูงสุดที่ pH 7 ส่วนเอนไซม์เซลลูเลสมีกิจกรรมจำเพาะสูงที่ pH 5.5 และมีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์โปรติเอสสูงกว่าอะไมเลส ซึ่งแตกต่างกับกุ้งระยะตัวเต็มวัยที่มีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์โปรติเนสสูงกว่าเอนไซม์ไลเปส เมื่อพิจารณาจากคุณลักษณะของเอนไซม์ที่สกัดจากเฮพาโตแพนเครียสและลำไส้ของกุ้งก้ามกรามพบว่าอาหารที่น่าจะเหมาะสมกับกุ้งก้ามกรามระยะ larval และ post larval ที่เลี้ยงในภาคเหนือควรนำข้อมูลที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้ใช้ในการคัดเลือกอาหารที่ใช้เลี้ยงกุ้งก้ามกราม ซึ่งสามารถใช้เป็นข้อมูลในการการพัฒนาสูตรอาหารเพื่อใช้เลี้ยงกุ้งก้ามกรามในภาคเหนือต่อไป จากการศึกษาของ Whangchai *et al.* (2007) พบว่าเมื่อใช้แผ่นพลาสติกเป็นโรงเรือนคลุมบ่อเลี้ยงทำให้ลูกกุ้งก้ามกรามที่อนุบาลไว้มีอัตราการเจริญสูงกว่าลูกกุ้งในบ่อเลี้ยงที่ไม่มีการคลุมด้วยแผ่นพลาสติก คาดว่าเกิดจากเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารของกุ้งก้ามกรามที่มีสภาวะเหมาะสมในการย่อยอาหารทำให้ลูกกุ้งในบ่อเลี้ยงมีอัตราการเจริญที่สูงกว่า ข้อมูลและงานวิจัยนี้แสดงประสิทธิ ภาพในการย่อยอาหารของกุ้งก้ามกรามที่เลี้ยงในสภาพอากาศหนาว และจะมีการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยของเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหาร (*in vitro* digestibility) เพื่อใช้ในการคัดเลือกและกำหนดสัดส่วนของวัตถุ ดิบอาหารที่เหมาะสมกับศักยภาพการย่อยอาหารของกุ้ง ซึ่งข้อมูลที่ได้สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานก่อนการเลี้ยงจริงเพื่อใช้เลี้ยงกุ้งก้ามกรามในภาคเหนือเชิงพาณิชย์ต่อไป

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาคุณลักษณะเอนไซม์อะไมเลส โปรติเนส ไลเปส และเซลลูเลส จากเฮพาโตแพนเครียสและลำไส้ของกุ้งก้ามกราม ได้สภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ของกุ้งก้ามกราม ระยะ larval และ post larval (Table 1)

Enzyme	Hepatopancreas		Intestine	
	Larval	Post larval	Larval	Post larval
amylase	pH 6, 50 ºC	pH 6, 50 ºC	pH 6, 50 ºC	pH 6, 50 ºC
proteinase	pH 5, 60 ºC	pH 6, 60 ºC	pH 6, 60 ºC	pH 6, 60 ºC
lipase	pH 9, 25 ºC	pH 9, 25 ºC	pH 9, 25 ºC	pH 9, 25 ºC
cellulase	pH 4, 50 ºC	pH 4, 50 ºC	pH 5-6,60 ºC	pH 5-6,60 ºC

Table 1. optimum condition of digestive enzymes from hepatopancreas and intestine of larval and post larval of *Macrobrachium rosenbergii*.

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ Dr. Krisna Rungruangsak-Torrissen. Institue of Marine Research-Matre, N-5984, Matredal, Norway. ที่กรุณาให้คำแนะนำวิธีการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ และ ข้อเสนอแนะ ขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัย(สกว.)ที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัย และขอขอบคุณ คุณขจร เรเชียงแสน บริษัทอะควาเทคโนโลยีแอนด์ซายน์ นนทบุรี ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเก็บตัวอย่าง ขอขอบคุณพี่ๆที่คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่ ที่ช่วยเก็บตัวอย่าง

เอกสารอ้างอิง

วารสารข่าวกุ้ง. 2547. อ้างโดย ชะลอ ลิ้มสุวรรณ และ พรเลิศ จันทร์รัชชกุล. 2547. สถานการณ์การส่งออกกุ้งของประเทศไทย. อุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งในประเทศไทย, 16-20.

ปัทมา ตั้งใจ อรุณี อิงคากุล นิวุฒิ หวังชัย และ อุทัยวรรณ โกวิทวที. 2549. คุณลักษณะของเอนไซม์ย่อยอาหารในกุ้งก้ามกรามMacrobrachium rosenbergii (de Man). ในรายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45 (สาขาประมง). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อรพินท์ จินตสถาพร และ รุ่งกานต์ กล้าหาญ. 2548. ความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์ใน hepatopancreas กับ ระยะลอกคราบในกุ้งก้ามกราม(Macrobrachium rosenbergii), น. 379-388. ในรายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 43 (สาขาประมง). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Areekijseree, M., A. Engkagul, U. Kovitvadhi, A. Thongpan, M. Mingmuang and S. Kovitvadhi. 2002. Activity profiles at different pH and temperature of cellulose and lipase in freshwater pearl mussel : Hyri opsis (Hyriopsis bialatus, simpson 1900), Kasetsart J. (Nat.Sci.) 36:399-407.

Areekijseree, M., A. Engkagul, U. Kovitvadhi, A. Thongpan, M. Mingmuang, P. Pakkongand and K. Rungruangsak-Torrissen. 2004. Temperature and pH characteristics of amylase and proteinase of adult freshwater pearl mussel : Hyri opsis (Hyriopsis bialatus, simpson 1900), Aquaculture. 234:575-578.

Bernfeld, P. 1957. Enzymes of starch degradation and synthesis. Adv. Enzym. 12: 379-384.

Brockerhoff, H. 1970. Substrate specificity of pancreatic lipase. Influence of the structure of fatty acids on the reactivity of esters. Biochim. biophys. Acta (Amst.) 212: 92–101.

Crawford, A.C., Richardson, N.R. and Mather, P.B. 2005. A comparative study of cellulase and xylanase activity in freshwater crayfish and marine prawns. Aquaculture Research 36: 586-592.

Garcia-Carreno, F.L., Albuquerque-Cavalcanti, C., Navarrete del Toro, M. and Zaniboni-Filho, E. 2002. Digestive proteinases of Brycon orbinyanus characteristics and effects of protein quality. Comp. Biochem. Phsiol., 132B: 343-352.

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

MILLER, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical. Chemistry 31: 426–428.

Nirpjit S. D. and J. Kaur. 2002. Immobilization, stability and esterification studies of a lipase from a Bacilus sp., Biotechnol. Appl. Biochem. 36:7-12.

Pavasovic, M., N.A., Richardson, A.J., Anderson, D. Mann and P.B. Mather. 2004. Effect of pH, temperature and diet on digestive enzyme profiles in the mud crab, *Scylla serrata* Aquaculture. 242:641-654.

Van Weel P.B. 1970. Digestion in crustacea.pp. 97-115. *In* Florkin M, Scheer BT (eds). Chemical zoology. Academic Press, New York, London.

Vega-Villasante, F., H. Nolasco and R. Civera. 1995. The digestive enzymes of the Pacific brown shrimp Penaeus califoriensis PropertiesII of protease activity in the whole digestive tract. J. Comp. Biochem. Physiol. 112 B.: 123-129.

Whangchai, N., Ungsethaphand, T., Chitmanat, C., Mengumphan, K., and S, Uriwan. 2007. Performance of Giant Freshwater Prawn (Macrobrachium rosenbergii de Man) Reared in Earthen Ponds Beneath Plastic Film Shelters. Chiang Mai J. Sci. 34(1):1-8.

Winkler U.K. and M. Stuckmann, Glucogen. 1979 hyaluronate and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by Serratia marcescens, J. Bacteriol. 138: 663-670.