

ประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนในวัตถุดิบของเอนไซม์จากกุ้งแช่บ๊วย
***Fenneropenaeus merguensis* (De Man, 1888) วัยอ่อน ด้วยวิธีในหลอดทดลอง**
Protein Digestibility of Ingredients in Banana Shrimp

***Fenneropenaeus merguensis* (De Man, 1888)**

ธนิกันต์ บัวทอง^{1*}, ลัดดาวัลย์ ครองพงษ์¹, ทิยาวรรณ มีชิน², พิชิต พลายเพชร²,

จีราพร ฟูวุฒิ² และ จันทร์สว่าง งามผ่องใส³

Tanikan Buathong^{1*}, Laddawan Krongpong¹, Tiwawan Meechin², Pichet Plaipetch²,

Jeeraporn Foowut² and Chansawang Ngamphongsai³

¹กองวิจัยและพัฒนาอาหารสัตว์น้ำ กรมประมง ประเทศไทย

²ศูนย์วิจัยและพัฒนาอาหารสัตว์น้ำชลบุรี ประเทศไทย

³ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

อุทยานวิทยาศาสตร์ ประเทศไทย

¹Aquatic Animal Feed Research and Development Division, Department of Fisheries, Thailand

²Chonburi Aquatic Animal Feed Research and Development Center, Thailand

³National Center for Genetic Engineering and Biotechnology,

National Science and Technology Development Agency, Thailand Science Park, Thailand

Received : 6 November 2024, Received in revised form : 1 April 2025, Accepted : 1 April 2025

Available online : 11 April 2025

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์และที่มา : กุ้งแช่บ๊วยหรือ Banana Shrimp (*Fenneropenaeus merguensis*) เป็นกุ้งทะเลท้องถิ่นชนิดหลักที่สำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย แต่การเพาะเลี้ยงกุ้งแช่บ๊วยยังไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร เนื่องจากฐานข้อมูลเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงกุ้งแช่บ๊วยยังไม่ครอบคลุม รวมทั้งยังไม่มีอาหารสำเร็จรูปสำหรับการเลี้ยงกุ้งแช่บ๊วยโดยเฉพาะ ในการศึกษาครั้งนี้เพื่อทดสอบประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนของวัตถุดิบอาหารกุ้งด้วยเทคนิค *in vitro* ด้วยเอนไซม์สกัดของลูกกุ้งแช่บ๊วยตั้งแต่วัยอ่อนระยะโปรโตซัววัย 1 (PZ1) จนถึงระยะโพสต์ลาร์วา 60 (PL60) เพื่อสร้างฐานข้อมูลสำหรับการพัฒนาสูตรอาหารและออกแบบสูตรอาหารที่มีประสิทธิภาพ ตรงกับความต้องการสารอาหารเพื่อใช้ในการเจริญเติบโตและการพัฒนาการของกุ้งแช่บ๊วย และกุ้งแช่บ๊วยสามารถใช้สารอาหารจากอาหารสำเร็จรูปได้มากที่สุดโดยเหลือทิ้งน้อยที่สุดเพื่อลดปัญหาสิ่งแวดล้อม รวมทั้งเป็นการลดต้นทุนและสร้างความคุ้มค่าของการผลิตอาหารสัตว์น้ำสำเร็จรูป เพื่อการเพาะเลี้ยงกุ้งแช่บ๊วยอย่างประสบความสำเร็จและยั่งยืนในอนาคตอันใกล้

วิธีดำเนินการวิจัย : นำแม่กุ้งแช่บ๊วยไข่แก่จากธรรมชาติมาเพาะฟักในโรงเพาะฟักของ ศูนย์วิจัยและพัฒนาอาหารสัตว์น้ำชลบุรี และอนุบาลลูกกุ้งแช่บ๊วยตั้งแต่วัยอ่อนเพ็ลียสจนถึงระยะโพสต์ลาร์วา 60 เก็บตัวอย่างลูกกุ้งแช่บ๊วยระยะโปรโตซัววัย 1-3 ไมซิส 1-3 โพสต์ลาร์วา 1, 20, 30, 40, 50 และ 60 เก็บตัวอย่างที่ -80 องศาเซลเซียส จนกระทั่งนำไปวิเคราะห์ จากนั้นนำไปสกัดเอนไซม์โดยใช้ 50 mM Tris-HCl buffer pH 8 สารสกัดเอนไซม์จะถูกเก็บที่ -80 องศาเซลเซียส

เพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไป วัดฤทธิ์ที่นำมาทดสอบประสิทธิภาพการย่อยโปรตีน 10 ชนิด ได้แก่ อาร์ทีเมีย กากถั่วเหลือง กากถั่วเหลืองไฮโดรไลส หัวกุ้งปน หมึกปน ปลาปน คริล ยีสต์ สไปรูลินา และโปรตีนไฮโดรไลสจากเศษปลาทะเล สำหรับประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนศึกษาโดยการวัด Trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS) ที่ได้จากการย่อยวัตถุดิบอาหารสัตว์กับเอนไซม์สกัดจากลูกกุ้ง เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ *DL*-alanine คำนวณค่าประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนในหน่วย $\mu\text{mol } DL\text{-alanine}$ ต่อปริมาณวัตถุดิบ (กรัม) ต่อกิจกรรมจำเพาะของทริปซิน วัดกิจกรรมจำเพาะของทริปซินโดยใช้ 1.25 mM benzoyl-L-arginine-*p*-nitroanilide (BAPNA) เป็นซับสเตรต (substrate) และใช้กราฟมาตรฐานของ *p*-Nitroaniline สำหรับปริมาณโปรตีนในเอนไซม์วัดตามวิธีของ Bradford โดยใช้ bovine serum albumin (BSA) เป็นสารละลายโปรตีนมาตรฐาน จากนั้นนำผลวิเคราะห์ประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนในวัตถุดิบมาหาความแปรปรวนแบบทางเดียว (One-way ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติด้วยวิธีของ Duncan's New Multiple Range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$)

ผลการวิจัย : กุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนระยะโปรโตซูเอีย 1 ถึง โฟสต์ลาร์วา 60 มีประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนไฮโดรไลสจากเศษปลาทะเลได้ดีที่สุด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) อันดับถัดมามีความแตกต่างกันในกุ้งแชบ๊วยแต่ละระยะในทางกลับกัน ประสิทธิภาพการย่อย กากถั่วเหลืองไฮโดรไลส และกากถั่วเหลือง ของกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนระยะโปรโตซูเอีย 1 ถึง โฟสต์ลาร์วา 60 มีค่าต่ำสุด เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยของโปรตีนไฮโดรไลสจากเศษปลาทะเลกับปลาปนซึ่งเป็นวัตถุดิบโปรตีนหลักจากสัตว์ที่ใช้ในการผลิตอาหารกุ้งในปัจจุบัน พบว่า มีประสิทธิภาพสูงกว่า 1.64-2.85 เท่า ในทุกระยะของกุ้งแชบ๊วย (PZ1-PL60) และมีประสิทธิภาพสูงยิ่งขึ้นไปอีกเมื่อเทียบกับ กากถั่วเหลือง ซึ่งเป็นวัตถุดิบโปรตีนหลักอีกชนิดหนึ่งจากพืชที่ใช้ผลิตอาหารกุ้ง พบว่า โปรตีนไฮโดรไลสจากเศษปลาทะเล มีประสิทธิภาพการย่อยสูงกว่าถึง 11-22 เท่า และ 45-67 เท่า ในระยะโปรโตซูเอีย 1 ถึง โฟสต์ลาร์วา 1 และในระยะโฟสต์ลาร์วา 20-60 ตามลำดับ สำหรับ กิจกรรมจำเพาะของทริปซินในลูกกุ้งแชบ๊วยมีค่าสูงสุดในระยะโปรโตซูเอีย 2 และลดลงเล็กน้อยในระยะโปรโตซูเอีย 3 แต่โดยรวมแล้วกิจกรรมจำเพาะทริปซินในระยะโปรโตซูเอียมีค่าสูงกว่าระยะไมซิสและระยะต่อไป โดยเริ่มลดลงเมื่อลูกกุ้งพัฒนาเข้าสู่ระยะไมซิส 1 และลดลงอย่างต่อเนื่องในระยะ ไมซิส 2 และ ไมซิส 3 เมื่อลูกกุ้งเปลี่ยนเข้าสู่ระยะโฟสต์ลาร์วา 1 ค่ากิจกรรมจำเพาะของทริปซินเพิ่มขึ้นอีกครั้ง เนื่องจากค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ทริปซินคิดเป็นค่าต่อหน่วยโปรตีน ดังนั้นเมื่อลูกกุ้งมีขนาดใหญ่ขึ้นก็จะมีค่ากิจกรรมทริปซินน้อยลงจากระยะโฟสต์ลาร์วา 20 ถึงโฟสต์ลาร์วา 60

สรุปผลการวิจัย : กุ้งแชบ๊วยในระยะโปรโตซูเอีย 1 ถึงโฟสต์ลาร์วา 60 มีประสิทธิภาพในการย่อยโปรตีนไฮโดรไลสจากเศษปลาทะเลได้ดีที่สุด อันดับถัดมามีความแตกต่างกันในกุ้งแชบ๊วยแต่ละระยะ โดยที่ ยีสต์ ปลาปน หมึกปน และสไปรูลินา จัดเป็นวัตถุดิบโปรตีนที่ย่อยได้ง่าย ตามมาด้วย หัวกุ้งปน คริล และ อาร์ทีเมีย ในขณะที่ประสิทธิภาพการย่อยกากถั่วเหลืองไฮโดรไลส และกากถั่วเหลือง ของกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนระยะโปรโตซูเอีย 1 ถึง โฟสต์ลาร์วา 60 มีค่าต่ำสุด ส่วนโปรตีนไฮโดรไลสจากเศษปลาทะเลมีศักยภาพที่จะนำมาใช้เป็นวัตถุดิบอาหารสัตว์ทางเลือก โดยเฉพาะการทดแทนปลาปนในระดับที่เหมาะสม เป็นการใช้เศษของเหลือให้มีคุณค่า ลดของเสีย และนำมาเพิ่มคุณค่าทางอาหารได้ สำหรับระดับกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ทริปซินในกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อน แสดงให้เห็นถึงการกินอาหารที่เหมาะสมกับกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนในแต่ละระยะได้แก่ ระยะโปรโตซูเอียกินแพลงก์ตอนพืช (herbivores) ระยะไมซิสกินทั้งแพลงก์ตอนพืชและสัตว์ (omnivores) และระยะโฟสต์ลาร์วากินแพลงก์ตอนสัตว์ (carnivores) ตามลำดับ จากผลของการศึกษาประสิทธิภาพ

การย่อยโปรตีนในวัตถุดิบอาหารสัตว์และกิจกรรมจำเพาะของทริปซินในครั้งนี้นี้สามารถใช้เป็นแนวทางในการสร้างสูตรอาหารสำเร็จรูปที่มีประสิทธิภาพสูงสำหรับการเพาะเลี้ยงกุ้งแชบ๊วยในอนาคต

คำสำคัญ : อาหารกุ้งแชบ๊วย ; โปรตีนไฮโดรไลเสต ; วัตถุดิบอาหารกุ้ง ; ทริปซิน

Abstract

Background and Objectives : Banana Shrimp (*Fenneropenaeus merguensis*) is one of the economically important domestic species of marine shrimp in Thailand. Banana Shrimp culture has not been succeeded since the lack of basic knowledge, including the specific shrimp feed for Banana Shrimp has not been successfully formulated. This study aimed to determine the protein digestibility of shrimp feed raw materials using *in vitro* technique with crude enzyme extract of shrimp larvae from protozoal 1 (PZ1) to postlarval 60 (PL60) stages, in order to establish the data base for Banana Shrimp feed development and formulate the efficient shrimp feeds, which meet the shrimp nutrition requirements for growth and stage development, with the highest feed utilization and the least of waste to reduce the environmental problems, as well as cost saving and cost effectiveness of formulated diet for successfully and sustainably Banana Shrimp culture in the near future.

Methodology : Banana Shrimp gravid females from the wild were transferred to the hatchery in Chonburi Aquatic Animal Feed Research and Development Center. Shrimp larvae were hatched and nursed and larval samples were collected at protozoal (PZ) 1-3, mysis (M) 1-3, postlarval (PL) 1, 20, 30, 40, 50 and 60 stages and then stored at -80 °C until analyzed. Then crude enzyme was extracted using 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8, then the supernatant was collected and stored at -80 °C for further analysis. There were 10 feed ingredients tested: - *Artemia*, soybean meal, soybean meal hydrolysate, shrimp head meal, squid meal, fish meal, krill, yeast, *Spirulina* and marine fish waste protein hydrolysate. For *in vitro* digestibility, Trinitrobenzene sulphonate (TNBS) was determined in the feed ingredients which were digested with crude enzyme from Banana Shrimp, compared to *DL*-alanine standard curve as $\mu\text{mol } DL\text{-alanine per g feed per trypsin specific activity}$. Trypsin specific activity ($\mu\text{mol } p\text{-Nitroaniline}$) was measured using 1.25 mM benzoyl-L-arginine-*p*-nitroanilide (BAPNA) as substrate and *p*-Nitroaniline as a standard. For total protein was determined followed the method of Bradford and bovine serum albumin (BSA) was used as a standard. The protein digestibility of feed ingredient data were subjected to Analysis of variance (One-way ANOVA) and Duncan's New Multiple Range test at 95% confidence interval ($p < 0.05$).

Main Results : It was found that for all stages of Banana Shrimp larvae (PZ1- PL60), the significantly ($p < 0.05$) highest protein digestibility was marine fish waste protein hydrolysate (MFH). The following ranks differed among the stages of shrimp. On the other hand, soybean meal and soybean meal hydrolysate had the

significantly ($p<0.05$) lowest digestibility in all stages (PZ1- PL60) of Banana Shrimp. When compared the protein digestibility of MFH and fish meal, which is the main protein raw material from animal in shrimp feed, the digestibility of MFH was 1.64-2.85 times higher than those of fish meal in every stage of tested Banana shrimp larva. It was even higher when compared to the protein digestibility of soybean meal, which is the main protein raw material from plant in shrimp feed, the digestibility of MFH was 11-22 times and 45-67 times higher than those of soybean meal in PZ1 to PL1 and PL20-60 stages, respectively. For trypsin activity of Banana Shrimp larvae, it was peaked at PZ2 and slightly declined in PZ3, but the average trypsin in PZ stages were higher than those of Mysis and the later stages. The activity dropped, when the larvae developed into M1 stage, and continued decreasing through M2 and M3. When the larvae metamorphosed into PL1, trypsin activity increased again. As the activity defined per protein unit, therefore, the bigger the size of larvae, the smaller the trypsin activity from PL20-PL60 stages.

Conclusions : Banana Shrimp, from PZ1 to PL60 stages, had the highest efficiency for MFH protein digestibility. The following ranks differed among the stages of shrimp. Yeast, fish meal, squid meal and *Spirulina* were in high digestible protein ingredients group, followed by shrimp head meal, krill and *Artemia*. While the digestibility efficiency of hydrolyzed soybean meal and soybean meal of the PZ1 to PL60 stages of the shrimp was the lowest. MFH- marine fish waste protein hydrolysate has the potential to be used as an alternative shrimp feed ingredient, especially to replace fish meal at an appropriate level. It is a valuable use of waste, reduces waste, and increases nutritional value. For the specific trypsin activity in Banana Shrimp, it showed the suitable feeding for juvenile shrimp in each stage: - protozoa stage feeding on phytoplankton (herbivores), mysis stage feeding on both phytoplankton and zooplankton (omnivores) and postlarval stage feeding on zooplankton (carnivores), respectively. From the results of the efficiency of protein digestibility of shrimp feed raw materials and trypsin activity in Banana Shrimp from PZ1-PL60 stages could be the guidelines for formulating the feed formula for Banana Shrimp culture in the future.

Keywords : Banana Shrimp feed ; protein hydrolysate ; shrimp feed ingredients ; trypsin

*Corresponding author. E-mail : tanibua@gmail.com

Introduction

กุ้งแชบ๊วย (*Fenneropenaeus merguensis*) หรือที่รู้จักในชื่อ Banana Shrimp เป็นกุ้งทะเลท้องถิ่นชนิดหลักของประเทศไทย ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจเป็นที่นิยมในการบริโภคทั้งภายในและภายนอกประเทศเนื่องจากเนื้อ มีรสชาติดี ปัจจุบันผลผลิตกุ้งแชบ๊วยส่วนใหญ่มาจากการจับจากธรรมชาติ ข้อมูลสถิติกรมประมงพบว่าปริมาณการจับกุ้งทะเลจากธรรมชาติในปี 2566 เท่ากับ 52,556 ตัน เป็นกุ้งแชบ๊วยมากที่สุดเท่ากับ 12,209 ตัน คิดเป็น 23.23 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณการจับกุ้งทะเล (Department of Fisheries, 2024a) และในปี 2566 กลุ่มสถิติการประมง

กรมประมง รายงานว่ามี ผลผลิตกุ้งแชบ๊วยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงมีปริมาณน้อย เพียง 80 ตัน คิดเป็น 0.02 เปอร์เซ็นต์ของผลผลิตกุ้งทะเลที่ได้จากการเพาะเลี้ยง (392,470 ตัน) (Department of Fisheries, 2024b) ปัจจุบันกรมประมงเป็นหน่วยงานหลักที่เพาะพันธุ์กุ้งแชบ๊วยปล่อยลงสู่ธรรมชาติอย่างต่อเนื่อง เพื่อเป็นการอนุรักษ์สายพันธุ์กุ้งท้องถิ่นและเพิ่มปริมาณผลผลิต ในขณะที่กรมประมงได้ศึกษาและพัฒนาสายพันธุ์แม่กุ้ง การเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ การเพาะเลี้ยงกุ้งทั้งแบบกึ่งพัฒนาและแบบพัฒนา และสามารถผลิตพ่อแม่พันธุ์กุ้งจากบ่อดินได้ (Chungyampin & Phumchuai, 2000) แต่การเพาะเลี้ยงกุ้งแชบ๊วยยังไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร เนื่องจากฐานข้อมูลเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงกุ้งแชบ๊วยยังไม่ครอบคลุม รวมทั้งยังไม่ีอาหารสำเร็จรูปสำหรับการเลี้ยงกุ้งแชบ๊วยโดยเฉพาะ จึงทำให้การเพาะเลี้ยงได้ผลผลิตต่ำกว่าการเลี้ยงกุ้งขาวและกุ้งกุลาดำ

การเพาะเลี้ยงกุ้งให้ประสบความสำเร็จนั้นอาหารนับเป็นปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งเนื่องจากอาหารมีผลต่อคุณภาพของลูกกุ้ง ในอดีตการอนุบาลลูกกุ้งวัยอ่อนนิยมใช้อาหารจากธรรมชาติ ได้แก่ แพลงก์ตอนพืชและแพลงก์ตอนสัตว์ แต่มีข้อเสียคือคุณค่าทางโภชนาการไม่สม่ำเสมอขึ้นกับฤดูกาล ปัจจุบันมีการผลิตอาหารสำเร็จรูปสำหรับกุ้งวัยอ่อนตั้งแต่ระยะโปรโตซัว (protozoa, PZ) ถึงระยะโพสท์ลาร์วา (postlarva, PL) เพื่อทดแทนหรือใช้ร่วมกับอาหารธรรมชาติ อาหารกุ้งวัยอ่อนจึงต้องมีสารอาหารครบถ้วนทั้งคุณภาพและปริมาณ เช่น โปรตีน กรดอะมิโนจำเป็น ไชมัน กรดไขมันจำเป็น คอเลสเตอรอล วิตามิน แร่ธาตุ (Kanazawa, 1989) เพื่อการพัฒนาที่ดีทำให้กุ้งมีสุขภาพสมบูรณ์แข็งแรง การเจริญเติบโตและอัตราการตายสูง โดยทั่วไปแล้วการคัดเลือกวัตถุดิบอาหารจะเน้นความสำคัญไปที่แหล่งของโปรตีน พลังงาน กรดไขมันจำเป็น วิตามิน และแร่ธาตุ ซึ่งโปรตีนเป็นแหล่งสารอาหารที่มีความจำเป็นมาก เพื่อใช้สำหรับสร้าง เนื้อ หนัง อวัยวะต่างๆ เอนไซม์ ฮอร์โมน ภูมิคุ้มกัน และสารพันธุกรรม แหล่งโปรตีนสามารถได้จากแหล่งวัตถุดิบที่เป็นโปรตีนจากสัตว์ ได้แก่ ปลาป่น หมึกป่น ปลาเบ็ด เลือดป่น เป็นต้น แหล่งวัตถุดิบที่เป็นแหล่งโปรตีนจากพืช ได้แก่ กากถั่วเหลือง กากเมล็ดทานตะวัน กากงา ข้าวโพด เป็นต้น แต่โปรตีนจากพืชมีข้อจำกัดคือมีปริมาณกรดอะมิโนที่สัตว์น้ำต้องการน้อยและมีสารต้านโภชนาการ (anti-nutrition factor) ทำให้สัตว์น้ำมีความผิดปกติและเจริญเติบโตช้า ซึ่งต้องคำนึงถึงวัตถุดิบที่เป็นแหล่งของโปรตีนซึ่งส่วนใหญ่มาจากสัตว์ทะเล เช่น ปลาป่น หมึกป่น คริลป่น กุ้งป่น เป็นต้น แต่วัตถุดิบโปรตีนจากทะเลมีปริมาณลดลงและราคาสูงขึ้น โดยเฉพาะปลาป่น เนื่องจากปริมาณการจับลดลงในขณะที่ความต้องการในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์เพิ่มขึ้น (Tacon & Metian, 2008) การนำวัตถุดิบโปรตีนทางเลือกที่มีคุณภาพดี เช่น โปรตีนไฮโดรไลเสต (Protein hydrolysate) มาใช้ทดแทนเป็นการลดการนำเข้าวัตถุดิบอาหารสัตว์น้ำที่จะมีราคาสูงขึ้นในอนาคต โปรตีนไฮโดรไลเสตจากเศษทิ้งปลาทะเลมีคุณค่าทางโภชนาการสูงประกอบด้วยโปรตีน กรดอะมิโนจำเป็น และกรดไขมันจำเป็น โดยเฉพาะโอเมก้า 3 (Nguyen *et al.*, 2023; Nguyen *et al.*, 2012) นอกจากนี้มีการศึกษาพบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตยังมีกรดอะมิโนอิสระ (Free amino) และโปรตีนสายสั้น (peptides) ซึ่งมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ (Klompong *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2003) รวมทั้งยังมีปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำเพิ่มขึ้น และมีโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลขนาดเล็กเพิ่มขึ้น (Buathong, *et al.*, 2019) การเสริมโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาในอาหารในระดับที่เหมาะสมช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโต การนำอาหารไปใช้ และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน (Fan *et al.*, 2024; Sandbakken *et al.*, 2024; Nguyen *et al.*, 2023)

การผลิตอาหารกุ้งแชบ๊วยไม่เพียงแต่พิจารณาความต้องการสารอาหาร ขนาดและพฤติกรรมการกินอาหาร แต่ยังต้องคำนึงถึงข้อมูลเกี่ยวกับเอนไซม์ในแต่ละระยะของกุ้งแชบ๊วยและความรู้ด้านโภชนาการของกุ้งแชบ๊วย ซึ่งมีความ

จำเป็นต้องศึกษาข้อมูลพื้นฐานการย่อยได้ของวัตถุดิบด้วยเอนไซม์จากสัตว์น้ำ สำหรับการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยของสัตว์น้ำ มีทั้งการทดลองในสัตว์น้ำโดยตรง (*in vivo*) ต้องเลี้ยงสัตว์ทดลองเป็นเวลานาน ต้องอาศัยสถานที่ในการเลี้ยงสัตว์น้ำ ต้องใช้แรงงานและค่าใช้จ่ายสูง เหมาะกับสัตว์น้ำที่มีขนาดใหญ่เนื่องจากต้องผสมสาร indicator เข้าไปในอาหารหรือวัตถุดิบ จากนั้นเก็บมูลสัตว์น้ำมาวัดปริมาณสาร indicator และสารอาหาร ส่วนการทดลองในห้องปฏิบัติการ (*in vitro*) เป็นวิธีการจำลองให้เหมือนกับสภาวะที่เกิดขึ้นในระบบทางเดินอาหารของสัตว์น้ำ สามารถควบคุมปัจจัยจากสภาพแวดล้อมที่ส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพการย่อยได้ เช่น อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดด่าง เป็นวิธีที่รวดเร็ว น่าเชื่อถือ และค่าใช้จ่ายไม่สูง ทั้งยังใช้วัตถุดิบเพียงเล็กน้อยในการวิเคราะห์ (Fernández Gimenez *et al.*, 2009; Lemos *et al.*, 2002; Ezquerro *et al.*, 1997) ข้อมูลพื้นฐานการย่อยได้ของวัตถุดิบด้วยเอนไซม์จากสัตว์น้ำจึงเป็นฐานข้อมูลของการพัฒนาสูตรอาหารให้มีประสิทธิภาพตรงกับความต้องการสารอาหารเพื่อใช้ในการเจริญเติบโตและการพัฒนาการของกุ้งแชบ๊วย และกุ้งแชบ๊วยสามารถใช้สารอาหารจากอาหารสำเร็จรูปได้มากที่สุดโดยไม่มีเหลือทิ้ง ช่วยลดปัญหาสิ่งแวดล้อมซึ่งเป็นการลดต้นทุนและสร้างความคุ้มค่าของการผลิตอาหารสัตว์น้ำสำเร็จรูปได้อีกทางหนึ่ง นอกจากนี้ยังได้ทำการวัดกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ทริปซิน ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญต่อพัฒนาการและอัตราการรอดของลูกกุ้งวัยอ่อน มีหน้าที่ย่อยโปรตีน และช่วยในการดูดซึมสารอาหาร กิจกรรมจำเพาะของทริปซินจะแตกต่างกันไปตามตลอดระยะการพัฒนาของลูกกุ้ง แสดงให้เห็นถึงการปรับเปลี่ยนบทบาทเมื่อมีการเปลี่ยนชนิดของอาหาร ระดับกิจกรรมเฉพาะของเอนไซม์ทริปซินได้ถูกนำมาใช้อธิบายถึงการกินอาหารของสัตว์น้ำวัยอ่อนหลายชนิด โดยเฉพาะพวกครัสเตเชียในกลุ่มเดคาพอด (Decapods) ได้แก่ กุ้งกลุ่มพีนาคิด (penaeids) เช่น *Penaeus semisulcatus*; *Litopenaeus vannamei*; *P. japonicus* และ *P. indicus* เป็นต้น (Turkmen & Baysal, 2007; Puello-Cruz *et al.*, 2002; Jones, *et al.*, 1997; Kumlu, 1995; Le Vay, *et al.*, 1993) เพื่อเป็นฐานข้อมูลของการพัฒนาสูตรอาหารให้มีประสิทธิภาพ และยังเป็นข้อมูลสนับสนุนการพัฒนาการเพาะเลี้ยงกุ้งแชบ๊วยซึ่งเป็นกุ้งท้องถิ่นของประเทศไทยให้ประสบความสำเร็จ สามารถพัฒนาไปสู่ความยั่งยืนของอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ โดยไม่รบกวนประชากรปลาจากธรรมชาติที่นำมาทำปลาป่น สามารถลดต้นทุนและสร้างงานในท้องถิ่นได้ (Dominguez *et al.*, 2024, Chaklader *et al.*, 2023)

Methodology

การเตรียมสัตว์ทดลอง

นำแม่กุ้งแชบ๊วยไข่แก่จากธรรมชาติมาเพาะฟักในโรงเพาะฟักของ ศูนย์วิจัยและพัฒนาอาหารสัตว์น้ำชลบุรี และอนุบาลลูกกุ้งแชบ๊วยตั้งแต่ระยะนอเพลีสจนถึงโพสต์ลาร์วา 60 ในบ่อคอนกรีตรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า ปริมาตร 10 ลูกบาศก์เมตร เมื่อกุ้งเข้าระยะไมซิสเปลี่ยนถ่ายน้ำประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ และ เมื่อกุ้งเข้าระยะโพสต์ลาร์วาเปลี่ยนถ่ายน้ำประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ และตรวจวัดคุณภาพน้ำทุก 3 วัน โดยเมื่อลูกกุ้งระยะโปรโตซูเอีย 1 (PZ1) ถึงไมซิส 3 (M3) ให้แปลงกตอนชนิด *Chaetoceros* sp. เป็นอาหาร ให้อาหารที่เมียดตั้งแต่ไมซิส 1 ถึงระยะโพสต์ลาร์วา (PL) 1-15 และเริ่มให้อาหารสำเร็จรูปเมื่อเข้าสู่ระยะโพสต์ลาร์วา 1 จนถึงโพสต์ลาร์วา 60

การสกัดเอนไซม์จากลูกกุ้งแชบ๊วย

เก็บตัวอย่างลูกกุ้งแชบ๊วยจากบ่ออนุบาล จำนวน 3 บ่อ เพื่อเป็นตัวแทน ช้ำ 1, 2 และ 3 เก็บตัวอย่างลูกกุ้งแชบ๊วยระยะโปรโตซูเอีย 1-3 ไมซิส 1-3 โพสต์ลาร์วา 1, 20, 30, 40, 50 และ 60 หลอดทดลองถูกเก็บในน้ำแข็งเพื่อให้เอนไซม์

ไม่เสื่อมสภาพในระหว่างการบดและเตรียมตัวอย่าง เติม 50 mM Tris-HCl buffer pH 8 อัตราส่วน 1:1 บดตัวอย่างให้ละเอียดด้วย homogenizer จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 15,000xg อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แบ่งเก็บส่วนใส (supernatant) ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส (Rungruangsak-Torrissen *et al.*, 2002; Rungruangsak-Torrissen *et al.*, 2006) สำหรับใช้ศึกษา ได้แก่ ประสิทธิภาพการย่อยด้วยเทคนิค *in vitro* digestibility กิจกรรมจำเพาะของทริปซิน และ ปริมาณโปรตีนในสารสกัดเอนไซม์

การเตรียมวัตถุดิบ

นำวัตถุดิบที่เป็นแหล่งโปรตีนที่ใช้ในการศึกษาค้างนี้ 10 ชนิด ได้แก่ อาร์ทีเมีย กากถั่วเหลือง กากถั่วเหลืองไฮโดรไลเสด หัวกุ้งปน หมึกปน ปลาปน คริล ยีสต์ สไปรูลินา และโปรตีนไฮโดรไลเสดจากเศษปลาทะเล โดยนำวัตถุดิบมาบดละเอียดและร่อนผ่านตะแกรงขนาด 500 ไมครอน เพื่อรอศึกษาประสิทธิภาพการย่อยต่อไป

การศึกษาประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนด้วยเทคนิค *in vitro* digestibility

ซึ่งวัตถุดิบที่บดละเอียด 20 มิลลิกรัม เติม 50 mM phosphate buffer pH 8.2 ปริมาตร 40 มิลลิลิตร และ 0.5% Chloramphenicol ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex mixer นำไปบ่มด้วยเครื่องบ่มแบบเขย่า (Shaking incubator) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่าง 0.5 มิลลิลิตร เพื่อใช้เป็นตัวอย่างควบคุม (Control) นำตัวอย่างที่เหลือมาเติม สารสกัดเอนไซม์ที่ทราบค่ากิจกรรมจำเพาะของทริปซิน ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex mixer นำไปบ่มด้วยเครื่องบ่มแบบเขย่า (Shaking incubator) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร และนำตัวอย่างดังกล่าวพร้อมด้วยตัวอย่างควบคุมต้มในน้ำเดือดทันที เป็นเวลา 10 นาที แล้วแช่แข็งทันทีที่ -80 องศาเซลเซียส เพื่อทำลายเอนไซม์ทั้งหมด (หยุดปฏิกิริยา) และรอการนำไปใช้ในกระบวนการต่อไป ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนโดยการวัด Trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS) ที่ได้จากการย่อยวัตถุดิบอาหารสัตว์กับเอนไซม์สกัดจากลูกกุ้ง ตามวิธีของ Rungruangsak-Torrissen *et al.* (2002) วัดค่าการดูดแสงที่ 420 nm เพื่อหาค่าปริมาณ Free amino group เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ DL-alanine (DL-alanine standard curve) คำนวณค่าประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนในหน่วย μmol DL-alanine ต่อปริมาณอาหาร(กรัม) ต่อกิจกรรมจำเพาะของทริปซิน

การศึกษากิจกรรมจำเพาะของทริปซิน (Trypsin specific activity)

วิเคราะห์กิจกรรมจำเพาะของทริปซินตามวิธีการของ Rungruangsak-Torrissen *et al.* (2006) โดยใช้ 1.25 mM benzoyl-L-arginine-p-nitroanilide (BAPNA) เป็นซับสเตรต (substrate) ละลายใน 5% dimethylformamide และปรับปริมาตรด้วย 0.2 M Tris-HCl buffer, pH 8.4 วัดค่าการดูดแสงที่ 410 นาโนเมตร (nm)(A₄₁₀) โดยวัดปฏิกิริยาเริ่มต้น (initial reaction) ภายใน 10 วินาที นำค่าการเปลี่ยนแปลงของ A₄₁₀ ต่อวินาที มาสร้างกราฟระหว่างเวลา (แกน x) และ A₄₁₀ (แกน Y) เพื่อหาค่า slope แล้วนำค่า slope มาเปรียบเทียบกับ p-Nitroaniline standard curve เพื่อหาค่าปริมาณของ p-Nitroaniline ที่เกิดขึ้นต่อวินาที และคำนวณค่ากิจกรรมจำเพาะของทริปซินในหน่วย μmol p-Nitroaniline ต่อชั่วโมงต่อมิลลิกรัมโปรตีน

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในสารสกัดเอนไซม์

วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในเอนไซม์ตามวิธีของ Bradford (1976) โดยใช้ bovine serum albumin (BSA) เป็นสารละลายโปรตีนมาตรฐาน

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำผลประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนในวัตถุดิบมาวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (One-way ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติด้วยวิธีของ Duncan's New Multiple Range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$)

Results

ประสิทธิภาพการย่อยโปรตีน

ประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนของกึ่งแซบวัยระยะโปรโตซูเอีย 1 ถึง โฟสต์ลาร์ว 60 ที่ย่อยวัตถุดิบที่ใช้ทดสอบ 10 ชนิด ได้แก่ อาร์ทีเมีย กากถั่วเหลือง กากถั่วเหลืองไฮโดรไลเสต หัวกุ้งปน หมึกปน ปลาปน คริล ยีสต์ สไปรูลินา และโปรตีนไฮโดรไลเสตจากเศษปลาทะเล (Figure 1 – 2) พบว่ากึ่งแซบวัยวัยอ่อนระยะโปรโตซูเอีย 1 ถึง โฟสต์ลาร์ว 60 มีประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากเศษปลาทะเลได้ดีที่สุด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) อันดับถัดมา มีความแตกต่างกันในกึ่งแซบวัยแต่ละระยะ ดังที่ได้สรุปไว้ในย่อหน้าถัดไปและแสดงใน Figure 1 - 2 ในขณะที่ประสิทธิภาพการย่อย กากถั่วเหลืองไฮโดรไลเสต และกากถั่วเหลือง ของกึ่งแซบวัยวัยอ่อนระยะโปรโตซูเอีย 1 ถึง โฟสต์ลาร์ว 60 มีค่าต่ำสุด เมื่อเทียบประสิทธิภาพการย่อยของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากเศษปลาทะเลกับปลาปน ซึ่งเป็นวัตถุดิบโปรตีนหลักจากสัตว์ที่ใช้ในการผลิตอาหารกุ้งในปัจจุบัน พบว่า มีประสิทธิภาพสูงกว่า 1.64-2.85 เท่า ในทุกระยะของกึ่งแซบวัย แต่เมื่อเทียบกับ กากถั่วเหลือง ซึ่งเป็นวัตถุดิบโปรตีนหลักอีกชนิดหนึ่งจากพืชที่ใช้ผลิตอาหารกุ้ง พบว่า โปรตีนไฮโดรไลเสตจากเศษปลาทะเลมีประสิทธิภาพการย่อยสูงกว่าถึง 11-22 เท่า ในระยะโปรโตซูเอีย ถึง โฟสต์ลาร์ว 1 และ 45-67 เท่า ในระยะโฟสต์ลาร์ว 20-60

สำหรับประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนของวัตถุดิบอาหารในลูกกึ่งแซบวัยแต่ละระยะ แสดงไว้ดัง Figure 1-4 กราฟแท่งแสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) ตัวอักษรกำกับแท่งกราฟที่ไม่เหมือนกัน แสดงถึงความแตกต่างของค่าเฉลี่ยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) การย่อยได้ของวัตถุดิบทั้ง 10 ชนิด เรียงจากมากไปน้อยได้ดังนี้

เอนไซม์ย่อยอาหารของลูกกึ่งวัยระยะโปรโตซูเอีย (PZ) มีประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนในโปรตีนไฮโดรไลเสตจากเศษปลาทะเล สูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) รองลงมาได้แก่ ยีสต์ ปลาปน หมึกปน หัวกุ้งปน อาร์ทีเมีย สไปรูลินา คริล ส่วนกากถั่วเหลือง และกากถั่วเหลืองไฮโดรไลเสตมีค่าต่ำสุด (Figure 1)

เอนไซม์ย่อยอาหารของลูกกึ่งวัยระยะไมซิส (M) มีประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนในโปรตีนไฮโดรไลเสตจากเศษปลาทะเล สูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) รองลงมาได้แก่ ยีสต์ ปลาปน หัวกุ้งปน สไปรูลินา หมึกปน คริล อาร์ทีเมีย ส่วนกากถั่วเหลือง และกากถั่วเหลืองไฮโดรไลเสตมีค่าต่ำสุด (Figure 1)

เอนไซม์ย่อยอาหารของลูกกึ่งวัยระยะโฟสต์ลาร์ว 1 (PL1) มีประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนในโปรตีนไฮโดรไลเสตจากเศษปลาทะเล สูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) รองลงมาได้แก่ ยีสต์ สไปรูลินา ปลาปน หมึกปน หัวกุ้งปน คริล อาร์ทีเมีย กากถั่วเหลืองไฮโดรไลเสต และกากถั่วเหลือง ตามลำดับ (Figure 2a)

เอนไซม์ย่อยอาหารของลูกกึ่งวัยระยะโฟสต์ลาร์ว 20 (PL20) มีประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนในโปรตีนไฮโดรไลเสตจากเศษปลาทะเล สูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) รองลงมาได้แก่ ยีสต์ หมึกปน หัวกุ้งปน ปลาปน สไปรูลินา คริล อาร์ทีเมีย กากถั่วเหลืองไฮโดรไลเสต และกากถั่วเหลือง ตามลำดับ (Figure 2b)

เอนไซม์ย่อยอาหารของลูกกุ้งระยะโพสต์ลาร์วา 30 (PL30) มีประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนในโปรตีนไฮโดรไลเสตจากเศษปลาทะเล สูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) รองลงมาได้แก่ ยีสต์ สไปรูลินา หัวกุ้งปน หมึกปน ปลาปน คริล ส่วนกากถั่วเหลืองไฮโดรไลเสต อาร์ทีเมีย และกากถั่วเหลืองมีค่าต่ำสุด (Figure 2c)

เอนไซม์ย่อยอาหารของลูกกุ้งระยะโพสต์ลาร์วา 40 (PL40) มีประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนในโปรตีนไฮโดรไลเสตจากเศษปลาทะเล สูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) รองลงมาได้แก่ สไปรูลินา ยีสต์ หมึกปน ปลาปน หัวกุ้งปน คริล อาร์ทีเมีย ส่วนกากถั่วเหลืองไฮโดรไลเสต และกากถั่วเหลืองมีค่าต่ำสุด (Figure 2d)

เอนไซม์ย่อยอาหารของลูกกุ้งระยะโพสต์ลาร์วา 50 (PL50) มีประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนในโปรตีนไฮโดรไลเสตจากเศษปลาทะเล สูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) รองลงมาได้แก่ ยีสต์ หมึกปน สไปรูลินา ปลาปน หัวกุ้งปน คริล อาร์ทีเมีย ส่วนกากถั่วเหลืองไฮโดรไลเสต และกากถั่วเหลืองมีค่าต่ำสุด (Figure 2e)

เอนไซม์ย่อยอาหารของลูกกุ้งระยะโพสต์ลาร์วา 60 (PL60) มีประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนในโปรตีนไฮโดรไลเสตจากเศษปลาทะเล สูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) รองลงมาได้แก่ หมึกปน ยีสต์ สไปรูลินา ปลาปน หัวกุ้งปน คริล อาร์ทีเมีย ส่วนกากถั่วเหลืองไฮโดรไลเสต และกากถั่วเหลืองมีค่าต่ำสุด (Figure 2f)

สำหรับประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนของลูกกุ้งที่ย่อยวัตถุดิบอาหารแต่ละชนิด จะเห็นว่าเมื่อระยะของลูกกุ้งเปลี่ยนไป จากระยะ PZ1 ถึงระยะ PL60 จะมีประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนสูงขึ้น ดังแสดงใน Figure 1 – 2 ยกตัวอย่างเช่น ค่าเฉลี่ย ($\pm$ SD) ของประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนของลูกกุ้งที่ย่อยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากเศษปลาทะเล ในลูกกุ้งระยะ PZ, M, PL1, PL20, PL30, PL40, PL50 และ PL60 มีค่าเท่ากับ 4.57 ± 0.20 , 16.35 ± 0.86 , 15.98 ± 0.59 , 45.97 ± 1.42 , 129.33 ± 2.36 , 161.95 ± 2.20 , 231.44 ± 1.10 และ 215.05 ± 2.09 $\mu\text{mol DL-alanine}$ ต่อปริมาณอาหาร(กรัม) ต่อกิจกรรมจำเพาะของทริปซิน ตามลำดับ

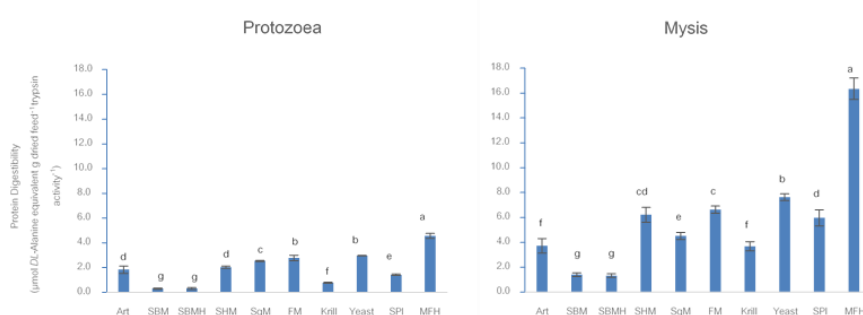


Figure 1 Protein digestibility of Banana Shrimp, protozoal and mysis stages

Note : The bars presented were means $\pm$ SD, the bars with the different superscripts indicate significantly difference ($p<0.05$).

Feed ingredients were Art=*Artemia*; SBM=soybean meal; SBMH=soybean meal hydrolysate; SHM=shrimp head meal; SqM=squid meal; FM=fish meal; Krill; Yeast; SPI=*Spirulina* and MFH = marine fish waste protein hydrolysate.

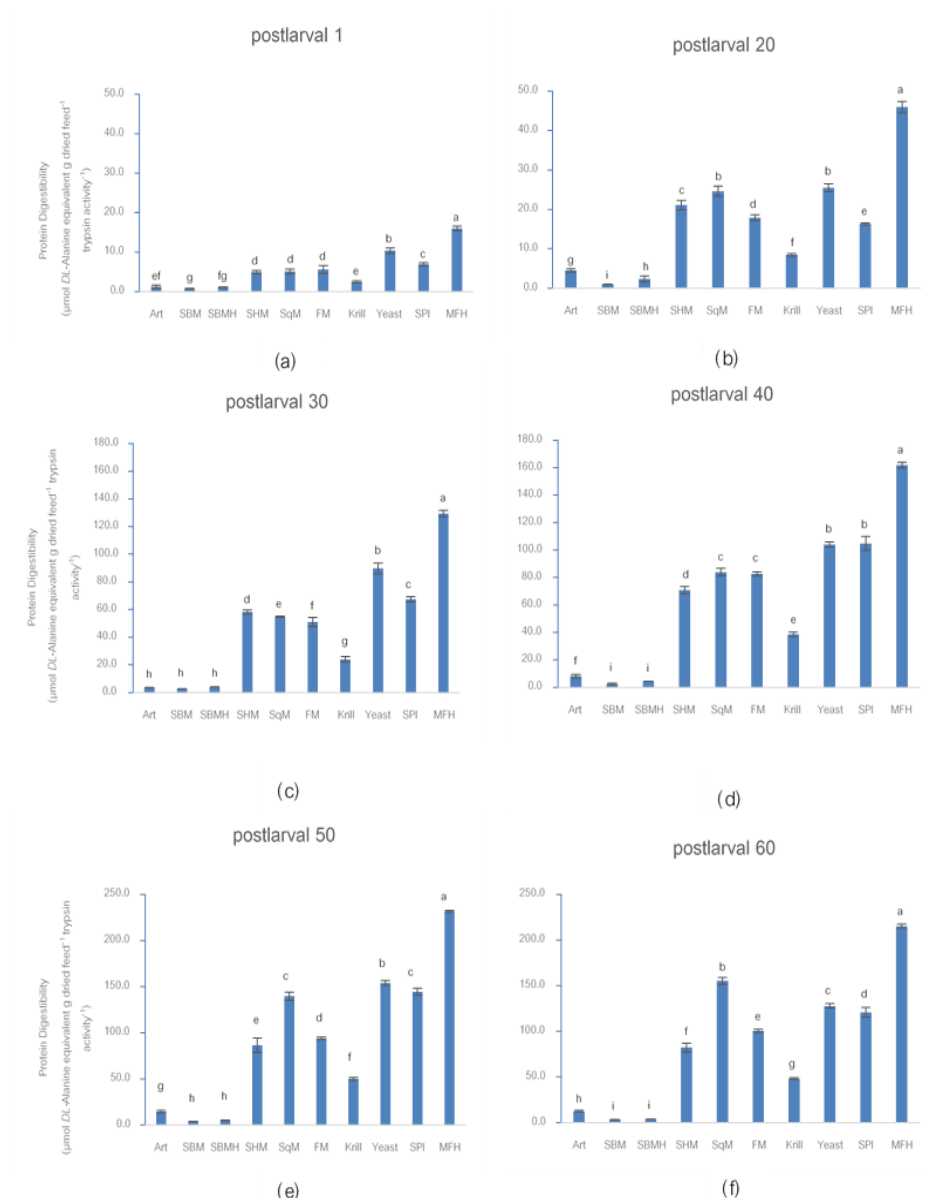


Figure 2 Protein digestibility of Banana Shrimp, postlarval 1 (a), postlarval 20 (b), postlarval 30 (c), postlarval 40 (d) postlarval 50 (e) and postlarval 60 (f) stages.

Note: The bars presented were means±SD, the bars with the different superscripts indicate significantly difference ($p < 0.05$).

Feed ingredients were Art=Artemia; SBM=soybean meal; SBMH=soybean meal hydrolysate; SHM=shrimp head meal; SqM=squid meal; FM=fish meal; Krill; Yeast; SPI=Spirulina and MFH = marine fish waste protein hydrolysate.

การศึกษากิจกรรมจำเพาะของทริปซิน (Trypsin specific activity)

กิจกรรมจำเพาะของทริปซินในกุ้งแชบ๊วยระยะโปรโตซัววัย 1 ถึงโพสต์ลาร์วา 60 ได้แสดงไว้ใน Figure 3 จะเห็นได้ว่ากิจกรรมจำเพาะของทริปซินในลูกกุ้งแชบ๊วยมีค่าสูงสุดในระยะโปรโตซัววัย 2 และลดลงเล็กน้อยในระยะโปรโตซัววัย 3 แต่โดยรวมแล้วกิจกรรมจำเพาะทริปซินในระยะโปรโตซัววัยมีค่าสูงกว่าระยะไมซิส และระยะต่อไป โดยเริ่มลดลงเมื่อ

ลูกกุ้งพัฒนาเข้าสู่ระยะไมซิส 1 และลดลงอย่างต่อเนื่องในระยะ ไมซิส 2 และ ไมซิส 3 เมื่อลูกกุ้งเปลี่ยนเข้าสู่ระยะโพสต์ลาร์วา 1 ค่ากิจกรรมจำเพาะของทริปซินเพิ่มขึ้นอีกครั้ง เนื่องจากค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ทริปซินคิดเป็นค่าต่อหน่วยโปรตีน ดังนั้นเมื่อลูกกุ้งมีขนาดใหญ่ขึ้นก็จะมีค่ากิจกรรมทริปซินน้อยลงจากระยะโพสต์ลาร์วา 20 ถึงโพสต์ลาร์วา 60

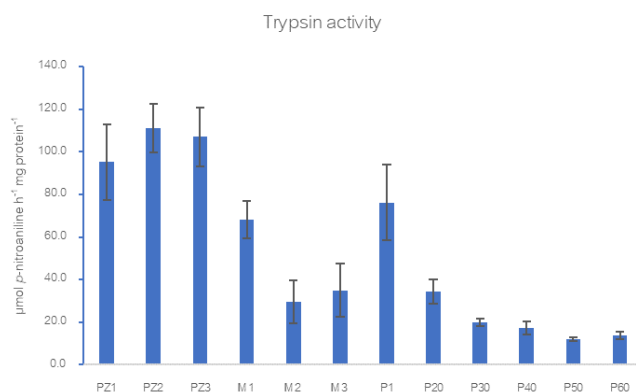


Figure 3 Trypsin activity of Banana Shrimp, protozoal 1 to postlarval 60 stages

Discussion

ในการศึกษาครั้งนี้ ประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนของกุ้งแชบ๊วยระยะโปรโตซัว 1 ถึง โพสต์ลาร์วา 60 ที่ย่อยวัตถุดิบที่ใช้ทดสอบ 10 ชนิด ได้แก่ อาร์ทีเมีย กากถั่วเหลือง กากถั่วเหลืองไฮโดรไลเสต หัวกุ้งปน หมึกปน ปลาปน คริล ยีสต์ สไปรูลีนา และโปรตีนไฮโดรไลเสตจากเศษปลาทะเล (Figure 1 – 2) พบว่ากุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนระยะโปรโตซัว 1 ถึงโพสต์ลาร์วา 60 มีประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากเศษปลาทะเลได้ดีที่สุด เนื่องจากโปรตีนไฮโดรไลเสตจากเศษปลาทะเลที่ผ่านกระบวนการหมักมาแล้วนั้น ประกอบด้วย กรดอะมิโนอิสระ เปปไทด์ และโปรตีนที่มีขนาดเล็ก (Buathong *et al.*, 2019; Klompong *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2003) อันดับถัดมามีความแตกต่างกันในลูกกุ้งแต่ละระยะ โดยที่ ยีสต์ ปลาปน หมึกปน และสไปรูลีนา จัดเป็นวัตถุดิบโปรตีนที่ย่อยได้ง่าย ตามมาด้วย หัวกุ้งปน คริล ในขณะที่ประสิทธิภาพการย่อย อาร์ทีเมีย กากถั่วเหลืองไฮโดรไลเสต และกากถั่วเหลือง ของกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนระยะโปรโตซัว 1 ถึง โพสต์ลาร์วา 60 มีค่าต่ำสุด ซึ่ง ladnoi *et al.* (2007) ได้ศึกษาการย่อยโปรตีนในหลอดทดลองของวัตถุดิบอาหารสัตว์ โดยสกัดเอนไซม์รวมจาก แอปพาโตแพนแคเรียส กระเพาะ และลำไส้ของกุ้งกุลาดำ ผลการทดลองพบว่าการย่อยโปรตีน เรียงลำดับจากมากไปน้อย ได้แก่ ปลาปน ข้าว วิกทูลูเตน สไปรูลีนา และยีสต์ เช่นเดียวกันกับการศึกษาของ Lee & Lawrence (1997) พบว่าเอนไซม์ของกุ้งกุลาดำสามารถย่อยโปรตีนจาก เคซีน วิกทูลูเตน ปลาปน และกากถั่วเหลืองปนตามลำดับ ส่วน Pongmaneerat *et al.* (2003) ได้ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนในกุ้งกุลาดำและกุ้งแชบ๊วย ของวัตถุดิบอาหารสัตว์บางชนิด ได้แก่ ปลาปน กากถั่วเหลืองปนสกัดไขมัน วิกทูลูเตน ข้าวโพดปน หัวกุ้งปน กระดุกปน และหมึกปน โดยนำวัตถุดิบเหล่านี้มาทดแทนปลาปนในสูตรอาหาร พบว่ากุ้งทั้ง 2 ชนิดสามารถย่อยโปรตีนจากปลาปน และกากถั่วเหลืองปนสกัดไขมันได้ดีกว่าวัตถุดิบชนิดอื่นๆ ผลของการใช้โปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาเสริมในอาหารสัตว์น้ำ

พบว่า โปรตีนไฮโดรไลสได้จากปลาที่มีค่าโปรตีนสูง มีกรดอะมิโนที่สมดุล เป็นแหล่งของเปปไทด์ที่มีประโยชน์หลายชนิด อาจมีส่วนช่วยในการเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหาร ทำให้มีการดูดซึมอาหารและการนำสารอาหารไปใช้ได้ดียิ่งขึ้น (Nguyen *et al.*, 2023) การใช้โปรตีนไฮโดรไลสได้จากปลาเสริมในอาหารในระดับที่เหมาะสมจะช่วยด้านการเจริญเติบโต การนำสารอาหารไปใช้และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน (Fan *et al.*, 2024; Sandbakken *et al.*, 2024; Nguyen *et al.*, 2023) ช่วยลดอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ ซึ่งแสดงว่ามีการดูดซึมและการใช้อาหารอย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น (Nguyen *et al.*, 2023) อย่างไรก็ตามการใช้โปรตีนไฮโดรไลสได้จากปลามากเกินไปจะทำให้เกิดผลลบต่อการเจริญเติบโต การนำสารอาหารไปใช้ การย่อย และสุขภาพของสัตว์น้ำได้ (Nguyen *et al.*, 2023; Xu, *et al.*, 2016; Zheng, *et al.*, 2014) การเจริญเติบโตสัตว์น้ำที่เพิ่มขึ้นเป็นผลมาจากการดูดซึมอาหารคือ เปปไทด์น้ำหนักรวมโมเลกุลต่ำและกรดอะมิโนอิสระในโปรตีนไฮโดรไลสได้จากปลาได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพผ่านผนังลำไส้ ถ้าปริมาณมากเกินไปจะทำให้เกิดความไม่สมดุลของกรดอะมิโน (Kolkovski & Tandler, 2000) ก่อให้เกิดการย่อยสลายของกรดอะมิโน ทำให้การสร้างโปรตีนในสัตว์น้ำลดลง (Ovissipour *et al.*, 2014) ส่วนเปปไทด์สายสั้นนั้นนอกจากจะเป็นสารดึงดูดการกินอาหาร ช่วยเพิ่มความอยากกินอาหาร ทำให้กินอาหารเพิ่มขึ้น (Siddik *et al.*, 2018; Xu *et al.*, 2016) ยังทำให้เกิดระสุม ซึ่งถ้าใช้มากเกินไปจะทำให้ลดความอยากอาหารและทำให้เกิดระสุม ลดการกินอาหาร การนำอาหารไปใช้ลดลง และการเจริญเติบโตของปลาต่ำลง ตามลำดับ (Siddik *et al.*, 2018) ส่วนการตอบสนองทางสรีรวิทยา พบว่า เมื่อมีการใช้โปรตีนไฮโดรไลสได้จากปลามากเกินไป มีผลต่อค่าโปรตีนรวมในน้ำเลือดและระดับกลูโคสในเลือดลดลง (Siddik *et al.*, 2018; Khosravi *et al.*, 2015) ดังนั้นการใช้โปรตีนไฮโดรไลสได้จากปลาให้เกิดประสิทธิภาพ จำเป็นที่จะต้องมีการหาระดับที่เหมาะสมในสัตว์น้ำแต่ละชนิด (Fan *et al.*, 2024; Nguyen *et al.*, 2023; Nguyen *et al.*, 2012)

ส่วนอาร์ทีเมีย จากผลการศึกษานี้มีประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนจากอาร์ทีเมียค่อนข้างต่ำ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก ตัวอย่างอาร์ทีเมียที่ใช้ในการศึกษาเป็นตัวอย่างแห้ง สำหรับอาร์ทีเมียมีชีวิตนั้นนับเป็นอาหารสัตว์น้ำที่สำคัญในการอนุบาลสัตว์น้ำวัยอ่อน เนื่องจากมีเอนไซม์ในตัวซึ่งมีความสำคัญในการช่วยย่อยอาหารของสัตว์น้ำวัยอ่อน ที่ระบบย่อยอาหารยังไม่สมบูรณ์ (Jones *et al.*, 1997; Kumlu, 1995; Le Vay *et al.*, 1993)

สาเหตุที่ประสิทธิภาพการย่อยกากถั่วเหลืองและกากถั่วเหลืองไฮโดรไลสต่ำ เนื่องจากในกากถั่วเหลืองมีสารยับยั้งทริปซิน ซึ่งมี 2 ชนิด คือ สารยับยั้งทริปซินชนิดคูนิตซ์ (Kunitz trypsin inhibitor; KTI) และ สารยับยั้งทริปซินชนิดโบว์แมน-เบิร์ก (Bowman-Birk trypsin inhibitor; BBI) ซึ่งสารชนิดนี้ยับยั้งการย่อยโปรตีน เช่นในกุ้งขาวแวนนาไม (Okedigba *et al.*, 2023) มีการทดลองในหลอดทดลอง (*in vitro*) พบว่า KTI สามารถลดกิจกรรมของทริปซินได้มากถึง 40 เปอร์เซ็นต์ (Maytorena-Verdugo *et al.*, 2017) แต่ BBI จะจับกับทริปซินได้แน่นกว่า (stronger affinity) KTI ทำให้กระบวนการย่อยยากขึ้น (Okedigba *et al.*, 2023) อย่างไรก็ตาม กุ้งสามารถปรับตัวได้โดยการผลิตเอนไซม์เปปติเดสมากขึ้นเพื่อรักษาประสิทธิภาพในการย่อยโปรตีน ถึงแม้ว่าจะสามารถสร้างน้ำย่อยเพิ่มขึ้นได้ แต่การมีสารยับยั้งทริปซินในอาหารอาจจะมีผลทำให้ระดับของโปรตีนที่นำไปใช้ได้ลดลง

สำหรับประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนของลูกกุ้งที่ย่อยวัตถุดิบอาหารแต่ละชนิด จะเห็นว่าเมื่อระยะของลูกกุ้งเปลี่ยนไป จากระยะ PZ1 ถึงระยะ PL60 จะมีประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนสูงขึ้น เนื่องจากมีหน่วยเป็น $\mu\text{mol DL-alanine}$ ต่อปริมาณอาหาร(กรัม) ต่อกิจกรรมจำเพาะของทริปซิน

การศึกษากิจกรรมจำเพาะของทริปซิน (Trypsin specific activity)

ทริปซิน เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทหลักในการควบคุมการย่อยโปรตีน โดยทำหน้าที่กระตุ้นโปรเอนไซม์ (Proenzyme) หรือไซโมเจน (Zymogen) ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยโปรตีนได้หลายชนิด ได้แก่ ทริปซินโนเจน (Trypsinogen) ไคโมทริปซินโนเจน (Chymotrypsinogen) โปรคาร์บอกซีเปปติเดส (Procarboxypeptidase) และโปรอีลาสเตส (Proelastase) ให้อยู่ในรูปที่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ (Active Enzyme) ได้แก่ ทริปซิน (Trypsin) ไคโมทริปซิน (Chymotrypsin) คาร์บอกซีเปปติเดส (Carboxypeptidase) และอีลาสเตส (Elastase) (Thongprajukaew & Kovitvadihi, 2012) การย่อยโปรตีนในกุ้งเป็นหน้าที่ของโปรตีนหลายชนิด แต่ทริปซินเป็นโปรตีนสลายอาหารที่พบมากที่สุดและมีบทบาทสำคัญ (Sanchez-Paz *et al.*, 2003) ระดับกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ทริปซินได้ถูกนำมาใช้อธิบายถึงการกินอาหารของสัตว์น้ำวัยอ่อนหลายชนิดในกลุ่มเดคาพอด ครัสตาเซียน (decapod crustacean) โดยมีรูปแบบดังนี้คือ ระยะชูเอี้ยของลูกกุ้งวัยอ่อนกลุ่มฟินาอิด (penaeids) เป็นระยะที่กินแพลงก์ตอนพืช (herbivores) จะมีระดับเอนไซม์ทริปซินสูงเนื่องจากแพลงก์ตอนพืชมีโปรตีนน้อยลูกกุ้งจึงมีอัตราการกินสูงเพื่อให้เพียงพอต่อการเจริญเติบโตและการกักเก็บอาหารในลำไส้มีระยะเวลาสั้น ส่งผลให้มีอัตราการหมุนเวียนของอาหารภายในทางเดินอาหารสูง อาหารที่เข้าสู่ระบบย่อยจะถูกย่อยและถูกขับออกอย่างรวดเร็ว นอกจากนี้แพลงก์ตอนพืชมีผนังเซลล์ทำให้ย่อยยาก จึงต้องใช้เอนไซม์ในการย่อยสูง ลูกกุ้งระยะไมซิสของลูกกุ้งวัยอ่อนกลุ่มฟินาอิดเป็นระยะที่กินทั้งแพลงก์ตอนพืชและสัตว์ (omnivores) จะมีระดับเอนไซม์ทริปซินระดับปานกลาง ส่วนกุ้งล็อบสเตอร์ (lobsters) และลูกกุ้งวัยอ่อนในกลุ่มคาริเดียน (carideans) ระยะที่กินแพลงก์ตอนสัตว์ (carnivores) จะมีระดับเอนไซม์ทริปซินต่ำ (Turkmen & Baysal, 2007; Jones *et al.*, 1997; Kumlu, 1995) ซึ่งสอดคล้องกับรูปแบบของระดับกิจกรรมเฉพาะของเอนไซม์ทริปซินที่วัดได้ในลูกกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนและการให้อาหารในการทดลองครั้งนี้ คือ ลูกกุ้งวัยอ่อนระยะชูเอี้ย 1 ถึงระยะไมซิส 2 กินแพลงก์ตอนพืช ได้แก่ *Chaetoceros* sp. และระยะไมซิส 1 ถึง โพลลาร์วา 15 กินแพลงก์ตอนสัตว์ ได้แก่ อาร์ทีเมีย ตามลำดับ ส่วน Puello-Cruz *et al.* (2002) ได้รายงานระดับทริปซินสูงสุดในกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) ในระยะชูเอี้ย 1 และลดต่ำลงเมื่อลูกกุ้งเปลี่ยนอาหารไปเป็นแพลงก์ตอนสัตว์ (carnivore) ในระยะไมซิส 1 แสดงให้เห็นว่ามีการปรับเปลี่ยนทางสรีรวิทยาเมื่อมีการเปลี่ยนอาหารที่กิน นอกจากนี้ Le Vay *et al.* (1993) และ Kumlu (1995) ได้รายงานว่าสำหรับลูกกุ้งในกลุ่มฟินาอิดระยะชูเอี้ยที่มีการใช้เซลล์สาหร่ายเป็นอาหารเป็นการกระตุ้นเอนไซม์ในทางเดินอาหารช่วยในการเจริญเติบโตและพัฒนาการของลูกกุ้ง และ Jones *et al.* (1997) รายงานว่าการเพิ่มขึ้นของปริมาณเอนไซม์ทริปซินในระยะชูเอี้ยของกุ้งในกลุ่มฟินาอิดชนิดอื่น ๆ มีความสัมพันธ์กับการพัฒนาของ anterior mid-gut diverticula ซึ่งเป็นโครงสร้างสำคัญที่ช่วยในการย่อยอาหารและเมื่อเข้าสู่ระยะไมซิสปริมาณทริปซินลดลงเนื่องจากการเสื่อมสลายของอวัยวะดังกล่าว Lemos *et al.* (1999) รายงานถึงการเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมของเอนไซม์มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของลักษณะรูปร่าง (morphology) และการเปลี่ยนแปลงของพฤติกรรม (behavior) ระหว่างการพัฒนาการของลูกกุ้งฟินาอิด (penaeid) *Farfantepenaeus paulensis* การที่ระดับกิจกรรมของทริปซินสูงสุดที่ระยะ PZ2, PZ3 และ M1 สะท้อนให้เห็นถึงการหมุนเวียนของพลังงานที่เพิ่มขึ้น ที่เกี่ยวเนื่องกับพฤติกรรมการว่ายน้ำและการกินอาหารอย่างมาก ระดับทริปซินใน ไช้ และ ระยะนอเพลียส 3 มีเพียงเล็กน้อย และเพิ่มขึ้นในระยะ PZ1 จนสูงสุดในระยะ PZ3 และลดลงอีกครั้งหลังจากเมตามอร์โฟซิส (metamorphosis) เข้าสู่ระยะ PL

Conclusions

การศึกษาประสิทธิภาพของการย่อยโปรตีนในหลอดทดลอง (*in vitro*) ของกึ่งแซบวียว้ยอ่อนจากระยะโปรโตซัววัย 1 จนถึงระยะโพสต์ลาร์วา 60 ในวัตถุดิบอาหารสัตว์ 10 ชนิด ได้แก่ อาร์ทีเมีย กากถั่วเหลือง กากถั่วเหลืองไฮโดรไลเสด หัวกุ้งปน หมึกปน ปลาปน คริล ยีสต์ สไปรูลีนา และโปรตีนไฮโดรไลเสดจากเศษปลาทะเล ผลการทดสอบพบว่า เอนไซม์ในกึ่งแซบวียว้ยในระยะเวลาโปรโตซัววัย 1 ถึงโพสต์ลาร์วา 60 มีประสิทธิภาพในการย่อยโปรตีนไฮโดรไลเสดจากเศษปลาทะเล ได้ดีที่สุด อันดับถัดมามีความแตกต่างกันในกึ่งแซบวียว้ยแต่ละระยะ โดยที่ ยีสต์ ปลาปน หมึกปน และสไปรูลีนา จัดเป็นวัตถุดิบโปรตีนที่ย่อยได้ง่าย ตามมาด้วย หัวกุ้งปน คริล ในขณะที่ประสิทธิภาพการย่อย อาร์ทีเมีย กากถั่วเหลือง ไฮโดรไลเสด และกากถั่วเหลือง ของกึ่งแซบวียว้ยอ่อนระยะโปรโตซัววัย 1 ถึง โพสต์ลาร์วา 60 มีค่าต่ำสุด สำหรับระดับกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ทริปซินในกึ่งแซบวียว้ยอ่อน แสดงให้เห็นถึงการกินอาหารที่เหมาะสมกับกึ่งแซบวียว้ยอ่อนในแต่ละระยะได้แก่ ระยะโปรโตซัววัยกินแพลงก์ตอนพืช (herbivores) ระยะไมซิสกินแพลงก์ตอนพืชและสัตว์ (omnivores) และระยะโพสต์ลาร์วากินแพลงก์ตอนสัตว์ (carnivores) ตามลำดับ ส่วนโปรตีนไฮโดรไลเสดจากเศษปลาทะเลมีศักยภาพที่จะนำมาใช้เป็นวัตถุดิบอาหารสัตว์ทางเลือก โดยเฉพาะการทดแทนปลาปนในระดับที่เหมาะสม เป็นการใช้เศษของเหลือให้มีคุณค่า ลดของเสีย และนำมาเพิ่มคุณค่าทางอาหารได้ จากผลของการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนในวัตถุดิบอาหารสัตว์และกิจกรรมจำเพาะของทริปซินในครั้งนี้สามารถใช้เป็นแนวทางในการสร้างสูตรอาหารสำเร็จรูปที่มีประสิทธิภาพสูงสำหรับการเพาะเลี้ยงกึ่งแซบวียว้ยในอนาคต

References

- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- Buathong, T., Foowut, J., & Krongpong, L. (2019). Potential of protein hydrolysate production from marine fish waste with 3 selected bacteria strains. In *Proceeding Annual Conference on Fisheries 2019*. (pp. 55-66.) Bangkok: Department of Fisheries. (in Thai)
- Chaklader, M.R., Howieson, J., Foysal, M.J., Hanif, M.A., Abdel-Latif, H.M.R., & Fotedar, R. (2023). Fish waste to sustainable additives: Fish protein hydrolysates alleviate intestinal dysbiosis and muscle atrophy induced by poultry by-product meal in *Lates calcarifer* juvenile. *Frontiers in Nutrition*, 10, 1145068.
doi.org/10.3389/fnut.2023.1145068.
- Chungyampin, S., & Phumchuai, C. (2000). Culture of banana shrimp, *Penaeus merguensis* De Man, for broodstock in earthen ponds. No.24/2000. Trang Coastal Aquaculture Station, Coastal Aquaculture Division, Department of Fisheries, 18 p. (in Thai)

- Department of Fisheries. (2024a). FISHERIES STATISTICS OF THAILAND 2023. No. 11/2024. Fishery Statistics Group, Fisheries Development Policy and Planning Division, Department of Fisheries, Thailand, 93 p. (in Thai)
- Department of Fisheries. (2024b). STATISTICS OF MARINE SHRIMP CULTURE 2023. No. 10/2024. Fishery Statistics Group, Fisheries Development Policy and Planning Division, Department of Fisheries, Thailand, 44 p. (in Thai)
- Domínguez, H., Iñarra, B., Labidi, J., & Bald, C. (2024). Fish viscera hydrolysates and their use as biostimulants for plants as an approach towards a Circular Economy in Europe: A Review. *Sustainability*, 16(20), 8779. doi.org/10.3390/su16208779.
- Ezquerro, J.M., García Carreño, F.L., Civera, R., & Haard, N. (1997). pH-stat method to predict protein digestibility in white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Aquaculture*, 157, 251-262. doi.org/10.1016/S0044-8486(97)00058-6.
- Fan, Z., Wu, D., Li, C. Zhou, M., Wang, L., Zhang, H., Li, J., Rong, X., Miao, L., Zhao, D., & Wang, J. (2024). Application of fish protein hydrolysates in common carp (*Cyprinus carpio*) diets for fish meal sparing: Evidence from growth, intestinal health and microflora composition. *Aquaculture Reports*, 36, 102160. doi.org/10.1016/j.aqrep.2024.102160.
- Fernández Gimenez, A. V., Díaz, A. C., Velurtas, S. M., & Fenucci, J. L. (2009). *In vivo* and *in vitro* protein digestibility of formulated feeds for *Artemesia longinaris* (Crustacea, Penaeidae). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52(6), 1379-1386. doi.org/10.1590/S1516-89132009000600009.
- Iadnoi, Y., Ingkhakul, A., Kovitwathi, U., & Thankitjanukit, S. (2007). Characterization and *in vitro* digestibility of digestive enzyme in giant black tiger shrimp *Penaeus monodon*, white shrimp *Penaeus vannamei* and giant fresh water prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Journal of Fisheries Technology Research*, 1(2), 248-260. (in Thai)
- Jones, D.A., Kumlu, M., Le Vay, L., & Fletcher, D.J. (1997). The digestive physiology of herbivorous, omnivorous and carnivorous crustacean larvae: a review. *Aquaculture*, 155(1-4), 285-295. doi.org/10.1016/S0044-8486(97)00129-4.
- Kanazawa, A. (1989). Microparticulate feeds for Penaeid larvae. *Advances in tropical aquaculture*, pp.395-404.

- Khosravi, S., Bui, H.T.D., Rahimnejad, S., Herault, M., Fournier, V., Jeong, J.B., & Lee, K.-J. (2015). Effect of dietary hydrolysate supplementation on growth performance, non-specific immune response and disease resistance of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) challenged with *Edwardsiella tarda*. *Aquaculture nutrition*, 21(3), 321-331. doi.org/10.1111/anu.12157.
- Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D., & Shahidi, F. (2007). Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selariodes leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. *Food chemistry*, 102(4), 1317-1327. doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.07.016.
- Kolkovski, S., & Tandler, A. (2000). The use of squid protein hydrolysate as a protein source in microdiets for gilthead seabream *Sparus aurata* larvae. *Aquaculture Nutrition*, 6(1), 11-15. doi.org/10.1046/j.1365-2095.2000.00125.x.
- Kumlu, M. (1995). Physiology of decapod crustacean larvae with special reference to diet. (Ph.D. Thesis). School of Ocean Science, University of Wales, Bangor, UK.
- Lee, P.G., & Lawrence, A.L. (1997). Digestibility. *Advances in World Aquaculture*, 6, 194-260.
- Lemos, D., Garcia-Carreño, F.L., Hernandez, P., & Navarrete del Toro, A. (2002). Ontogenetic variation in digestive proteinase activity, RNA and DNA content of larval and post larval white shrimp *Litopenaeus schmitti*. *Aquaculture*, 214, 363-380. doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00253-3.
- Lemos, D., Hernandez-Cortes, M. P., Navarrete, A., García-Carreño, F., & Phan, V. N. (1999). Ontogenetic variation in digestive proteinase activity of larvae and postlarvae of the pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis* (Crustacea: Decapoda: Penaeidae). *Marine Biology*, 135(4), 653–662. doi.org/10.1007/S002270050666.
- Le Vay, L., Rodríguez, A., Kamarudin, M.S., & Jones, D.A. (1993). Influence of live and artificial diets on tissue composition and trypsin activity in *Penaeus japonicus* larvae. *Aquaculture*, 118(3-4), 287-297. doi.org/10.1016/0044-8486(93)90463-9.
- Maytorena-Verdugo, C. I., Córdova-Murueta, J. H., & García-Carreño, F. (2017). Peptidase compensation in the digestive system of white leg shrimp *Penaeus vannamei* against dietary Kunitz-type soybean trypsin inhibitor. *Aquaculture Nutrition*, 23(5), 1095–1103. doi.org/10.1111/ANU.12477.

- Nguyen, H. T. M., Perez-Galvez, R. , & Berge, J. P. (2012). Effect of diets containing tuna head hydrolysate on the survival and growth of shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 324-325, 127-134.
doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.11.014.
- Nguyen, M.C., Fotedar, R., & Giridharan, B. (2023). The effects of fish protein hydrolysate as supplementation on growth performance, feed utilization and immunological response in fish:
A review. MATEC web of conferences. doi.org/10.1051/matecconf/202337701020.
- Okedigba, A. O., Gómez Rosso, L., Yu, D., Shang, C., Huang, H., Zhang, B., & Capelluto, D. G. S. (2023). Comparative binding affinity analysis of soybean meal Bowman-Birk and Kunitz trypsin inhibitors in interactions with animal serine proteases. *ACS Food Science & Technology*, 3(8), 1344–1352.
doi.org/10.1021/acsfoodscitech.3c00158.
- Ovissipour, R., Abedian Kenari, A., Nazari, R., Motamedzadegan, A., & Rasco, B. (2014). Tuna viscera protein hydrolysate: nutritive and disease resistance properties for Persian sturgeon (*Acipenser persicus* L.) larvae. *Aquaculture research*, 45(4), 591-601. doi.org/10.1111/j.1365-2109.2012.03257.x.
- Pongmaneerat, J., Chainark, P., & Chindamaikul, T. (2003). Protein digestibility of some feed ingredients in diets black tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius) and banana prawn (*Penaeus merguensis*). No.15/2003. Phangnga Coastal Fisheries Rearch and Development Center, Department of Fisheries, 22 p. (in Thai)
- Puello-Cruz, A. C., Sangha, R. S., Jones, D. A., & Le Vay, L. (2002). Trypsin enzyme activity during larval development of *Litopenaeus vannamei* (Boone) fed on live feeds. *Aquaculture Research*, 33(5), 333-338. doi.org/10.1046/j.1365-2109.2002.00676.x.
- Rungruangsak-Torrissen, K., Rustad, A., Sunde, J., Eiane, S.A., Jensen, H.B., Opstvedt, J., Nygard, E., Samuelsen, T.A., Mundheim, H., Luzzana, U., & Venturini, G. (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. doi.org/10.1002/jsfa.1089.
- Rungruangsak-Torrissen, K., Moss, R., Andresen, L.H., & Waagbø, R. (2006). Different expressions of trypsin and chymotrypsin in relation to growth in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Physiology and Biochemistry*, 32, 7–23. doi.org/10.1007/s10695-005-0630-5.

- Sanchez-Paz, A., Garcia-Carreno, L.F., Muhlia-Almazan, A., Hernandez-Saavedra, N., & Yepiz-Plascencia, G. (2003). Differential expression of trypsin mRNA in the white shrimp *Penaeus vannamei* midgut gland under starvation conditions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 292, 1-7. doi.org/10.1016/S0022-0981(03)00142-4.
- Sandbakken, I.S., Johansen L., Zhang, Y., Ringø, E., Røsbak, R., Yakovlev, I., Five, K., & Olsen, R.E. (2024). Replacing fishmeal with salmon hydrolysate reduces the expression of intestinal inflammatory markers and modulates the gut microbiota in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Frontiers in Marine Science*, 11, 1376516. doi.org/10.3389/fmars.2024.1376516.
- Siddik, S., Howieson, J., Partridge, G., Fotedar, R., & Gholipourkanani, H. (2018). Dietary tuna hydrolysate modulates growth performance, immune response, intestinal morphology and resistance to *Streptococcus iniae* in juvenile barramundi, *Lates calcarifer*. *Scientific Reports*, 8(1), 15942-13. doi.org/10.1038/s41598-018-34182-4.
- Tacon, A.G.J., & Metian, M. (2008). Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects. *Aquaculture*, 285, 146-158. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.08.015.
- Thongprajukaew, K., & Kovitvadhi, U. (2012). Enzymes and Food Development for Aquaculture. *The Journal of King Mongkut's University of Technology North Bangkok*, 22(3), 710-720. (in Thai)
- Turkmen, G., & Baysal, S. H. (2007). Trypsin Enzyme Activity during Larval Development of *Penaeus semisulcatus* De Haan, 1844, Fed on Live Feeds. *Crustaceana*, 80(2), 225–234. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/20107798>.
- Wu, H. C., Chen, H. M., & Shiau, C. Y. (2003). Free amino acid and peptide as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). *Food Research International*, 36, 949-957. doi.org/10.1016/S0963-9969(03)00104-2.
- Xu, H., Mu, Y., Zhang, Y., Li, J., Liang, M., Zheng, K., & Wei, Y. (2016). Graded levels of fish protein hydrolysate in high plant diets for turbot (*Scophthalmus maximus*): effects on growth performance and lipid accumulation. *Aquaculture*, 454, 140-147. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.12.006.
- Zheng, K., Xu, T., Qian, C., Liang, M., & Wang, X. (2014). Effect of low molecular weight fish protein hydrolysate on growth performance and IGF-I expression in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) fed high plant protein diets. *Aquaculture nutrition*, 20(4), 372-380. doi.org/10.1111/anu.12090.