บทความวิจัย

กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ทริปซินและไคโมทริปซิน ของปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ที่มีอายุต่างกัน และทดสอบที่อุณหภูมิต่างกัน

วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย[1*] ศิรินาถ หอประเดิมนุสรณ์[1] ตรีรัตน์ สุขสวัสดิ์[2] และ สุบัณฑิต นิ่มรัตน์[3]

ได้รับบทความ: 4 พฤษภาคม 2563
ได้รับบทความแก้ไข: 15 มิถุนายน 2563
ยอมรับตีพิมพ์: 16 มิถุนายน 2563

บทคัดย่อ

เอนไซม์ทริปซินและไคโมทริปซิน เป็นเอนไซม์ย่อยโปรตีนในระบบทางเดินอาหารที่มีความสำคัญต่อการย่อยโปรตีนให้เป็นกรดอะมิโน การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินผลของอายุปลานิล (*Oreochromis niloticus*) และอุณหภูมิที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินและไคโมทริปซินในหลอดทดลอง โดยใช้เอนไซม์สกัดจากลำไส้ของปลานิลที่มีอายุระหว่าง 45-150 วัน มาประเมินกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ทริปซินที่อุณหภูมิระหว่าง 30-70 องศาเซลเซียส และเอนไซม์ไคโมทริปซินที่อุณหภูมิระหว่าง 20-60 องศาเซลเซียส พบว่า การแสดงออกของกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ทริปซิน (T) และไคโมทริปซิน (C) ขึ้นอยู่กับอายุปลานิล และอุณหภูมิที่ใช้ทดสอบ โดยกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ทริปซินมีค่าสูงสูดขึ้นเมื่อปลานิลมีอายุ 105 วันที่อุณหภูมิทดสอบ 70 องศาเซลเซียส และกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไคโมทริปซินมีค่าสูงสุดเมื่อปลานิลมีอายุ 120 วันและใช้อุณหภูมิทดสอบ 60 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่ทำให้กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ทริปซินและไคโมทริปซินมีค่าสูงสุด เกิดขึ้นเมื่อใช้ซับสเตรตจำเพาะที่อุณหภูมิ 70 และ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ การศึกษาค่า T/C ratio พบว่า ปลานิลอายุ 105 วัน มีค่า T/C ratio สูงสุด และอุณหภูมิทดสอบที่สูงขึ้น มีผลทำให้ค่า T/C ratio สูงขึ้น การศึกษาครั้งนี้ทำให้ทราบการแสดงออกของกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ทริปซินและไคโมทริปซินของปลานิลอายุต่างๆ กัน เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการพัฒนาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเลี้ยงปลานิลด้วยการย่อยในหลอดทดลองต่อไป

คำสำคัญ: ปลานิล กิจกรรมเอนไซม์ ทริปซิน ไคโมทริปซิน

[1]ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จ.ชลบุรี
[2]โปรแกรมวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จ.ชลบุรี
[3]ภาควิชาจุลชีววิทยาและโครงการวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จ.ชลบุรี
[*]ผู้นิพนธ์ประสานงาน, e-mail: verapong@buu.ac.th

Specific Enzyme Activities of Trypsin and Chymotrypsin in Various Age of Tilapia, *Oreochromis niloticus*, Tested at Different Temperatures

Verapong Vuthiphandchai[1*], Sirinard Hopradermnusorn[1], Treerat Sooksawat[2] and Subuntith Nimrat[3]

Received: May 4, 2020
Revised: June 15, 2020
Accepted: June 16, 2020

ABSTRACT

Trypsin and chymotrypsin are proteolytic enzymes in the digestive system responsible for digestion of protein to amino acids. The objectives of this study were to evaluate the effects of age of tilapia (*Oreochromis niloticus*) and tested temperatures on *in vitro* enzymes activities of trypsin and chymotrypsin. Extracted enzymes from the intestine of tilapia age 45-150 days were determined specific enzyme activities of trypsin and chymotrypsin at various temperatures between 30-70°C and 20-60°C, respectively. Expression of specific activities of trypsin (T) and chymotrypsin (C) depended on fish age and tested temperatures. The highest specific activity of trypsin was found in fish aged 105 days using a tested temperature of 70°C whereas that of chymotrypsin was observed at fish aged 120 days using 60°C. Tested temperatures resulting in the highest specific activities of trypsin and chymotrypsin were detected at 70°C and 60°C, respectively. The T/C ratio in fish aged 105 days had the highest value, compared to those of other fish age. An increase in tested temperatures resulted in higher T/C ratio. This study allowed understanding of the expression of specific activities of trypsin and chymotrypsin of tilapia at various age, which can be used as the baseline information for further development of suitable feed formulation of tilapia based on *in vitro* digestibility.

Keywords: tilapia, enzyme activity, trypsin, chymotrypsin

[1]Department of Aquatic Science, Faculty of Science, Burapha University, Chon Buri
[2]Biological Science Program, Faculty of Science, Burapha University, Chon Buri
[3]Department of Microbiology and Environmental Science Program, Faculty of Science, Burapha University, Chon Buri
[*]Corresponding author, e-mail: verapong@buu.ac.th

บทนำ

ปลานิล (*Oreochromis niloticus*) จัดเป็นปลาน้ำจืดเศรษฐกิจชนิดหนึ่งของไทย มีการเลี้ยงทั่วทุกภูมิภาคของประเทศไทย เนื่องจากมีการเจริญเติบโตที่ดี เลี้ยงง่าย มีการพัฒนาสายพันธุ์ปลาอย่างต่อเนื่อง สามารถนำไปแปรรูปเป็นอาหารชนิดต่างๆ ได้มากมาย มีรสชาติดี และเป็นที่นิยมในการบริโภคในประเทศไทยและต่างประเทศ โดยในปี 2560 สถิติผลผลิตของการเลี้ยงสัตว์น้ำจืดทุกชนิดของไทยมีปริมาณรวมเท่ากับ 413,263 ตัน คิดเป็นมูลค่า 22,573.9 ล้านบาท โดยปลานิลจัดเป็นปลาน้ำจืดที่มีการเลี้ยงมากที่สุดเป็นอันดับ 1 ของประเทศไทย มีผลผลิตปลานิลรวม 237,800 ตัน ได้จากการเพาะเลี้ยง 217,928 ตัน และการประมง 19,872 ตัน ซึ่งผลผลิตปลานิลคิดเป็นประมาณ 57% ของผลิตสัตว์น้ำจืดที่เลี้ยงในประเทศ และมีมูลค่าปลานิลรวมประมาณ 11,003.8 ล้านบาท [1]

โดยทั่วไปการเลี้ยงปลานิลในระยะแรกจะให้อาหารธรรมชาติเป็นหลัก เช่น ฟางแห้ง มูลสัตว์แห้ง มูลสัตว์หมัก หรือปุ๋ยพืชสดในการอนุบาลลูกปลานิล ร่วมกับการให้อาหารเสริม ได้แก่ รำละเอียด ปลาป่นผสมรำ หรือกากถั่วเหลือง เป็นต้น เพื่อรักษาสีน้ำในบ่อให้มีความเหมาะสมต่อการอนุบาลระยะแรก แต่เมื่อลูกปลานิลโตขึ้นเป็นปลานิ้วจะเริ่มให้อาหารเม็ดที่มีโปรตีนประมาณ 30% เลี้ยงปลาให้เจริญเติบโตช่วงหนึ่ง และมีการให้อาหารชนิดต่างๆ ที่มีความหลากหลายในการเลี้ยงปลานิล เช่นหญ้าเนเปียร์ จุลินทรีย์หมัก รำอัดเม็ด หรืออาหารเม็ดสำเร็จรูป เพื่อเลี้ยงปลานิลให้ได้ขนาดตลาดระหว่างการเลี้ยงประมาณ 5-6 เดือนเพื่อลดต้นทุนค่าอาหารในการเลี้ยงปลา ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับรูปแบบการเลี้ยงปลานิลว่าเป็นแบบดั้งเดิม แบบกึ่งพัฒนา หรือแบบพัฒนา [2] อย่างไรก็ตาม ปัญหาหลักในการเลี้ยงปลานิลเชิงพาณิชย์ในบ่อดินและในกระชัง คือมีปัญหาในด้านต้นทุนอาหารสำเร็จรูปที่มีราคาสูง ซึ่งคิดเป็นประมาณ 50-70% ของต้นทุนการผลิต ทำให้มีความจำเป็นที่ต้องลดต้นทุนการผลิตอาหารสำเร็จรูป ซึ่งได้มีงานวิจัยจำนวนมากทำการลดการใช้ปลาป่นบางส่วนในสูตรอาหาร [3] และ/หรือทดแทนด้วยการใช้แหล่งโปรตีนคุณภาพสูงในท้องถิ่น หรือแหล่งโปรตีนคุณภาพสูงรูปแบบอื่นๆ ที่มีราคาเหมาะสมในการเลี้ยงปลาหลายชนิด [4-5] ซึ่งการให้อาหารเพื่อการเจริญเติบโตของปลาด้วยการทดแทนปลาป่นด้วยแหล่งโปรตีนเหล่านี้ ยังขึ้นอยู่กับกิจกรรมเอนไซม์ของปลาที่จะสามารถย่อยสารอาหารและดูดซึมไปใช้ประโยชน์ [6] เนื่องจากการย่อยสารอาหารมีความเกี่ยวข้องโดยตรงกับกิจกรรมของเอนไซม์ (enzyme activity) ดังนั้นข้อมูลเกี่ยวกับลักษณะของกิจกรรมเอนไซม์ของระบบย่อยอาหารจึงมีความสำคัญในการพัฒนาสูตรอาหาร เนื่องจากทำให้ทราบความสามารถของปลาในการย่อยสารอาหาร หรือวัตถุดิบอาหารสัตว์ที่จะถูกเลือกนำมาใช้ในกระบวนการผลิตอาหารสำเร็จรูปเพื่อให้ปลาย่อยอาหารได้ดี และเจริญเติบโตเร็ว [7-8] โดยการพัฒนาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเลี้ยงปลาด้วยการพัฒนาจากการศึกษาบทบาทและหน้าที่ของระบบย่อยอาหารปลา โดยการประเมินความสามารถในการย่อยโปรตีนในหลอดทดลอง (*in vitro* protein digestibility)

ด้วยเหตุที่การเลี้ยงปลานิลมีการเลี้ยงอย่างกว้างขวางทั่วประเทศ และเกษตรกรจำนวนมากยังใช้อาหารสำเร็จรูปที่มีต้นทุนสูงในการเลี้ยงปลานิลทั้งในบริเวณน้ำจืดและชายฝั่งทะเลการศึกษาเพื่อให้ได้ฐานข้อมูล (database) ของความสามารถในการย่อยวัตถุดิบอาหารสัตว์แต่ละชนิดของน้ำย่อยปลา จำเป็นต้องทราบข้อมูลพื้นฐานของการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ในช่วงการเลี้ยงปลาที่จะมีผลต่อความสามารถในการย่อยวัตถุดิบอาหารสัตว์ เพื่อสามารถนำมาใช้ประกอบการสร้างสูตรอาหารเลี้ยงที่เหมาะสมที่ปลาย่อยได้ดี โดยเลือกใช้ชนิดและระดับของวัตถุดิบอาหารสัตว์ที่เหมาะสมจากฐานข้อมูลการย่อยอาหารที่มี เพื่อทำให้

ต้นทุนการผลิตสูตรอาหารลดต่ำลง แต่อย่างไรก็ตาม การศึกษากิจกรรมเอนไซม์ปลานิลยังมีค่อนข้างจำกัด ซึ่งโดยทั่วไปเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารสามารถย่อยสารอาหารได้หลายประเภท เช่น โปรตีน ไขมัน และคาร์โบไฮเดรต ประกอบกับสูตรอาหารสำเร็จรูปที่ใช้เลี้ยงปลานิลโดยทั่วไปมีโปรตีนเป็นองค์ประกอบหลักในปริมาณมากเพื่อทำให้ปลาเจริญเติบโตรวดเร็ว แม้ว่าปลานิลจะกินทั้งพืชและเนื้อ (omnivorous fish) แต่การศึกษาเกี่ยวกับกิจกรรมเอนไซม์ทริปซิน และเอนไซม์ไคโมทริปซินในปลานิลที่มีอายุต่างกันยังมีอยู่อย่างจำกัด ดังนั้น วัตถุประสงค์ของการวิจัยครั้งนี้ เพื่อศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์ทริปซิน และเอนไซม์ไคโมทริปซิน และประเมินกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหารประเภทโปรตีนของปลานิลในช่วงที่มีอายุต่างกัน เพื่อทราบการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ทริปซิน (specific trypsin activity) และกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไคโมทริปซิน (specific chymotrypsin activity) เพื่อให้ได้ข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเลี้ยงปลานิลต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การเตรียมปลาทดลอง

รวบรวมลูกปลานิลที่มีอายุ 21 วัน จากฟาร์มเอกชนมาอนุบาลในบ่อซีเมนต์ขนาด 2.5 ตัน ภายในโรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ภาควิชาวาริชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ด้วยการให้อาหารเม็ดลอยน้ำที่มีโปรตีน 35% ทุกวัน ให้วันละ 2 ครั้ง เช้าและเย็น ในปริมาณ 10% น้ำหนักตัวต่อวัน เพื่อให้ลูกปลาปรับตัวก่อนเริ่มการทดลอง โดยอนุบาลลูกปลาที่ความหนาแน่น 100 ตัวต่อลูกบาศก์เมตร จากนั้นเมื่อลูกปลามีอายุ 30 วัน ทำการเลี้ยงปลานิลด้วยอาหารเม็ดลอยน้ำมีโปรตีน 35% จนกระทั่งปลานิลมีอายุ 150 วัน ที่ความหนาแน่น 50 ตัวต่อลูกบาศก์เมตร ให้อากาศผ่านหัวทราย ด้วยการให้อาหารเม็ดในอัตรา 5% น้ำหนักตัว/วัน วันละ 2 ครั้ง ทำการดูดเศษตะกอนที่เหลืออยู่ในบ่อหลังให้อาหาร 2 ชั่วโมง และเปลี่ยนถ่ายน้ำในบ่อประมาณ 20% ทุกๆ 1-2 วัน พร้อมทั้งตรวจวัดคุณภาพน้ำในบ่อก่อนการเปลี่ยนถ่ายน้ำได้แก่ อุณหภูมิ ออกซิเจนที่ละลายในน้ำ และ pH ซึ่งในระหว่างการทดลองมีค่าอยู่ในช่วง 26.5-28.6 องศาเซลเซียส 6.5-8.3 ppm และ 7.2-8.1 ตามลำดับ ทั้งนี้ปลาทดลองได้ถูกเลี้ยงในบ่อที่มีช่วงเวลาที่ได้รับแสง (photo-period) ตามปกติ โดยไม่มีการกำหนดช่วงเวลาที่ได้รับแสง และการดำเนินการต่อปลาทดลองได้ผ่านการรับรองจากคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยบูรพา

การวางแผนการทดลอง

ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ทริปซิน และเอนไซม์ไคโมทริปซินในลำไส้ของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารเม็ด โดยประเมินกิจกรรมของเอนไซม์ทั้งสองชนิดตั้งแต่ลูกปลานิลมีอายุ 45 วัน จนกระทั่งปลาที่เลี้ยงไว้มีอายุ 150 วัน โดยทำการประเมินกิจกรรมของเอนไซม์ดังกล่าวทุกๆ 15 วัน การประเมินกิจกรรมเอนไซม์ของปลานิล ทำในช่วงระยะเวลาหลังจากปลานิลกินอาหารเม็ดผ่านไประยะเวลา 90 นาที ใช้สวิงสุ่มจับปลาแต่ละช่วงอายุออกมาจากบ่อซีเมนต์แล้วนำไปใส่ในถังน้ำที่มีน้ำมันกานพลูเป็นยาสลบความเข้มข้น 80 ppm พร้อมกับให้อากาศผ่านหัวทรายลงไปในน้ำ ปล่อยทิ้งไว้ประมาณ 5-10 นาที ทำการชั่งน้ำหนักและความยาวปลาทั้งหมดทุกๆ 15 วัน จากนั้นนำปลาบางส่วนที่สลบมาแช่ในน้ำแข็ง มารวบรวมเอาลำไส้จากปลาของแต่ละช่วงอายุ (45, 60, 75, 90, 105, 120, 135 และ 150 วัน) โดยปลาขนาดเล็กถูกรวบรวมครั้งละ 20 ตัว และปลาขนาดใหญ่ถูกรวบรวมครั้งละ 6-10 ตัว โดยทำการผ่าตัดบริเวณท้องของ

ปลาทดลอง นำลำไส้มาใส่ไว้ใน eppendorf tubes และเก็บรักษาในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปศึกษากิจกรรมด้านเอนไซม์ตามวิธีการของ Rungruangsak-Torrisen และคณะ [7] ต่อไป

การเตรียมเอนไซม์สกัดของปลานิล

การสกัดเอนไซม์ทำโดยนำเอาลำไส้ของปลานิลแต่ละตัวในแต่ละช่วงอายุมารวมกัน (pooled samples) นำมาบดด้วย glass homogenizer ใน 50 mM Tris-buffer pH 8.0 ที่มี 200 mM NaCl ในอัตราส่วน 1:3 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปเข้าเครื่องเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดเอาส่วนที่เป็นของเหลวด้านบนออกมาโดยระวังไม่ให้ติดส่วนที่เป็นไขมันที่ลอยอยู่ข้างบน ทำการเตรียมถุงไดอะไลซิส (dialysis tubing) ที่มีรูพรุนขนาดเล็กยอมให้สารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กกว่า (molecular weight cut off) 10 กิโลดาลตัน (kDa) แพร่ผ่านออกไปได้ โดยนำถุงไดอะไลซิสมาต้มในสารละลาย 100 mM $NaHCO_3$ และ 10 mM EDTA pH 7.0 นาน 5 นาที เพื่อกำจัดสารที่ปนเปื้อนต่างๆ แล้วนำถุงไดอะไลซิสมาล้างด้วยการแช่ในน้ำกลั่นนาน 10 นาที ทำซ้ำ 4 ครั้ง จากนั้นนำสารสกัดเอนไซม์ที่ได้ในขั้นต้นมาบรรจุในถุงไดอะไลซิสที่เตรียมไว้เพื่อนำไปทำไดอะไลซิสในสารละลาย 10 mM phosphate buffer pH 7.8 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยทำการกวนสารละลายอย่างช้าๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเปลี่ยนสารละลายในบีกเกอร์ทุกๆ 6 ชั่วโมง เมื่อได้เอนไซม์ที่สกัดออกมาจากการทำไดอะไลซิส (crude enzyme extract) นำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ทริปซิน และเอนไซม์ไคโมทริปซินต่อไป [7]

การวัดปริมาณโปรตีนในเอนไซม์สกัดโดยวิธี Bio-Rad DC assay

การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในเอนไซม์สกัดภายหลัง dialysis ทำโดยปิเปตเอนไซม์สกัดของปลานิลมาเจือจางในอัตราส่วน 1 ต่อ 50 ด้วยสารละลาย 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0 ที่มี 200 mM NaCl ละลายอยู่ จากนั้นทำการปิเปตสารละลายเอนไซม์สกัดที่ถูกเจือจางปริมาตร 50 ไมโครลิตร มาผสมกับ 250 ไมโครลิตร ของสาร reagent A เขย่าให้เข้ากัน แล้วเติมสารละลาย reagent B ลงไปในปริมาตร 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที นำสารละลายไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของโปรตีน BSA เพื่อหาค่า protein content (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) เพื่อนำไปใช้ในการคำนวณหากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ทริปซิน และเอนไซม์ไคโมทริปซิน โดยนำค่ากิจกรรมจำเพาะที่ได้มาแสดงเป็นค่าอัตราส่วนกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ทริปซินต่อเอนไซม์ไคโมทริปซินหรือค่า T/C ratio

การศึกษากิจกรรมเอนไซม์ทริปซิน และกิจกรรมเอนไซม์ไคโมทริปซิน

ในการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ทริปซิน ทำโดยนำเอนไซม์ที่สกัดไว้แล้วจากปลานิลที่มีอายุต่างๆ กัน ปริมาตร 10 ไมโครลิตรมาใส่ในคิวเวตต์ (cuvette) ก่อนแล้วเติมทริปซินซับสเตรต (1.25 mM benzoyl-L-arginine-*p*-nitroanilide หรือ BAPNA (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) ที่ละลายใน 5% dimethylformamide และ 0.2 M Tris-HCl buffer pH 8.4) ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร และนำตัวอย่างเข้าตู้ควบคุมอุณหภูมิ (incubator) ให้มีอุณหภูมิตามที่กำหนดต่างๆ กัน (30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 และ 70 องศาเซลเซียส) นาน 10 นาที หลังจากนั้นนำคิวเวตต์ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ทันทีที่ความยาวคลื่นแสง 410 nm ด้วยเครื่อง Spectrophotometer เพื่อประเมินกิจกรรมของทริปซินจากอัตราของการผลิต p-nitroaniline และกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ทริปซิน (μmol p-nitroaniline/ชั่วโมง/มิลลิกรัม โปรตีน) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไคโมทริปซินใช้หลักการเดียวกับการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ทริปซิน เพียงแต่เปลี่ยนซับสเตรตเป็น 0.1 mM N-succinyl-Ala-Ala-Pro-phe-p-nitroanilide หรือ SAPNA (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) ที่ละลายใน 0.2 M Tris-buffer pH 8.4 และ 5% dimethylformamide เพื่อประเมินอัตราการผลิต p-nitroaniline ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร โดยค่าการดูดกลืนแสงที่ได้นำไปคำนวนหาค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไคโมทริปซิน (µmol p-nitroaniline/ชั่วโมง/มิลลิกรัม โปรตีน) ของปลานิลที่มีอายุตั้งแต่ 45 ถึง 150 วัน โดยประเมินทุกๆ 15 วัน ที่อุณหภูมิระหว่าง 20-60 องศาเซลเซียส และทำการทดลอง 3 ซ้ำ

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ข้อมูลที่นำเสนอเป็น ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) นำข้อมูลกิจกรรมจำเพาะของทริปซินและไคโมทริปซินของปลานิลที่มีอายุต่างๆ กัน ทดสอบที่อุณหภูมิต่างๆ มาตรวจสอบความแตกต่างทางสถิติระหว่างการทดลองด้วย two-way analysis of variance (ANOVA) เมื่อพบมีความแตกต่างระหว่างกลุ่ม จึงนำไปวิเคราะห์หาความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's New Multiple Range Test โดยใช้โปรแกรม SPSS version 21 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ผลการทดลอง

การเจริญเติบโตของปลานิล

ผลการเจริญเติบโตของปลานิลแสดงในตารางที่ 1 โดยปลานิลขณะเริ่มการทดลอง (อายุ 30 วัน) มีความยาวเฉลี่ย 4.42 เซนติเมตร และมีน้ำหนักเฉลี่ย 5.85 กรัม ปลาที่มีอายุน้อยกว่า 90 วันมีการเจริญเติบโตช้า เช่น ปลาที่มีอายุ 45 วันมีความยาวเฉลี่ย 5.19 เซนติเมตร และมีน้ำหนักเฉลี่ย 6.55 กรัม และเมื่อปลามีอายุ 90 วันมีความยาวเฉลี่ย 7.92 เซนติเมตร และมีน้ำหนักเฉลี่ย 10.53 กรัม ซึ่งแม้ว่าจะมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ในช่วงเวลาดังกล่าว แต่เมื่อเปรียบเทียบกับการเจริญเติบโตของปลาที่มีอายุมากกว่า โดยเฉพาะปลาที่มีอายุระหว่าง 105-150 วัน พบว่าปลานิลที่มีอายุมากขึ้นมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วทั้งน้ำหนักและความยาว โดยปลาที่มีอายุครบ 150 วัน มีความยาวเฉลี่ย 16.47 เซนติเมตร และมีน้ำหนักเฉลี่ย 83.33 กรัม

ตารางที่ 1 ความยาวเฉลี่ย (เซนติเมตร) และน้ำหนักเฉลี่ย (กรัม) ของปลานิลที่อายุต่างๆ กัน

อายุปลา (วัน)	การเจริญเติบโตของปลานิล	
	ความยาวเฉลี่ย (เซนติเมตร)	น้ำหนักเฉลี่ย (กรัม)
30	4.42 ± 0.443^{a}	5.85 ± 0.51^{a}
45	5.19 ± 0.51^{a}	6.55 ± 0.45^{a}
60	6.23 ± 0.54^{ab}	8.03 ± 0.72^{b}
75	6.95 ± 0.75^{bc}	8.50 ± 0.95^{b}
90	7.92 ± 0.76^{c}	10.53 ± 1.11^{b}
105	10.63 ± 1.09^{d}	22.58 ± 1.46^{c}
120	14.29 ± 0.40^{e}	55.20 ± 1.58^{d}
135	15.67 ± 0.95^{ef}	73.66 ± 2.11^{e}
150	16.47 ± 1.23^{fg}	83.33 ± 3.26^{f}

หมายเหตุ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

การวัดกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ทริปซิน (specific trypsin activity)

กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ทริปซินของปลานิล มีค่าเพิ่มขึ้นตามอายุของปลาที่เพิ่มขึ้น และอุณหภูมิที่ใช้ทดสอบ (ตารางที่ 2) โดยเมื่อพิจารณาผลของอายุปลาที่มีต่อกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ทริปซิน พบว่าปลาที่มีอายุ 105 วัน มีค่าเฉลี่ยกิจกรรมจำเพาะทริปซินสูงสุดระหว่าง 9.45-26.7 μmol p-nitroaniline/ชั่วโมง/มิลลิกรัม โปรตีน ในทุกอุณหภูมิที่ทดสอบ ซึ่งมีความแตกต่างจากปลาช่วงอายุอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยปลาที่มีระดับกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์รองลงมาคือปลาที่มีอายุ 150 วัน และ 60 วัน ตามลำดับ ซึ่งมีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ทริปซินไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) แม้ว่าโดยภาพรวมกิจกรรมจำเพาะเอนไซม์ทริปซินเมื่อปลามีอายุมากขึ้นในบางช่วงจะมีค่าลดลง แต่ก็มีค่าเพิ่มขึ้นในภายหลังเมื่อปลามีอายุมากขึ้น เช่น เมื่อปลามีอายุ 120 และ 135 วัน ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) แต่มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ในปลาที่มีอายุ 150 วัน เป็นต้น การเพิ่มขึ้นของกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ทริปซินอย่างรวดเร็วพบในปลาที่มีอายุระหว่าง 90-105 วันในทุกอุณหภูมิที่ทำการทดสอบ

การศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ทริปซินของปลานิล พบว่า เมื่อใช้อุณหภูมิทดสอบสูงขึ้น มีผลทำให้กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ทริปซินมีค่าสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ในปลาทุกช่วงอายุ โดยกิจกรรมจำเพาะเอนไซม์ทริปซินมีค่าสูงสุดเท่ากับ 26.71 ± 0.28 μmol p-nitroaniline/ชั่วโมง/มิลลิกรัม โปรตีน พบที่อุณหภูมิทดสอบ 70 องศาเซลเซียสเมื่อปลามีอายุ 105 วัน โดยมีความแตกต่างทางสถิติ ($P<0.05$) กับทุกอุณหภูมิที่ทดสอบระหว่าง 30-65 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 2)

การวัดกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไคโมทริปซิน (specific chymotrypsin activity)

กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไคโมทริปซินของปลานิล มีค่าขึ้นอยู่กับความสัมพันธ์ของอายุปลาและอุณหภูมิที่ทดสอบแต่ละช่วง พบว่า เมื่อใช้อุณหภูมิทดสอบ 20-35 องศาเซลเซียส ค่ากิจกรรมจำเพาะเอนไซม์ไคโมทริปซินของปลาจากอายุ 45 วัน ถึง 60 วัน มีค่าเพิ่มขึ้น แต่เมื่อใช้อุณหภูมิทดสอบ 40-60 องศาเซลเซียส กิจกรรมเอนไซม์ของปลาช่วงอายุดังกล่าว มีค่าไม่เปลี่ยนแปลง หรือมีค่าลดลง อย่างไรก็ตาม กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไคโมทริปซิน มีค่าสูงสุดเมื่อปลามีอายุ 120 วัน (มีค่าเฉลี่ยระหว่าง 13.04-21.01 μmol p-nitroaniline/ชั่วโมง/มิลลิกรัม โปรตีน ในทุกอุณหภูมิที่ทดสอบ) รองลงมาคือ ปลาที่มีอายุ 90 วัน (มีค่าเฉลี่ยระหว่าง 12.24-19.47 μmol p-nitroaniline/ชั่วโมง/มิลลิกรัม โปรตีน) และ 105 วัน (มีค่าเฉลี่ยระหว่าง 6.89-19.50 μmol p-nitroaniline/ชั่วโมง/มิลลิกรัม โปรตีน) ตามลำดับ ซึ่งปลานิลในทั้งสามช่วงอายุดังกล่าว มีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไคโมทริปซินไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) แต่มีค่าเฉลี่ยของกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไคโมทริปซินสูงกว่าปลาช่วงอายุอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (ตารางที่ 3)

การศึกษาผลของอุณหภูมิที่ใช้ทดสอบต่อค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไคโมทริปซิน พบว่า เมื่อใช้อุณหภูมิทดสอบที่สูงขึ้นจาก 20-60 องศาเซลเซียส ทำให้ระดับกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไคโมทริปซินของลำไส้ปลานิลมีค่าสูงขึ้น ยกเว้นในปลาที่มีอายุ 60, 75, 105, 135 และ 150 วันที่มีค่าลดลง กิจกรรมจำเพาะเอนไซม์ไคโมทริปซินมีค่าสูงสุดเท่ากับ 21.01 ± 0.29 μmol p-nitroaniline/ชั่วโมง/มิลลิกรัม โปรตีน ซึ่งพบที่อุณหภูมิทดสอบ 60 องศาเซลเซียส เมื่อปลามีอายุ 120 วัน (ตารางที่ 3)

อัตราส่วนของกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไคโมทริปซินต่อไคโมทริปซิน (T/C ratio)

ค่าอัตราส่วนของกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ทริปซินต่อไคโมทริปซิน หรือค่า T/C ratio ได้ทำการประเมินจากกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด ที่อุณหภูมิทดสอบระหว่าง 30-60 องศาเซลเซียส พบว่าปลาที่มีอายุระหว่าง 45-90 วันมีค่า T/C ratio ที่ต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับปลาที่มีอายุ 105 วัน หลังจากนั้นเมื่อปลามีอายุ 120 และ 135 วัน ค่า T/C ratio ลดลง และกลับมามีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อปลาอายุ 150 วัน (ตารางที่ 4) อย่างไรก็ตามการเพิ่มอุณหภูมิทดสอบจาก 30-60 องศาเซลเซียส มีผลทำให้ค่า T/C ratio ของปลาแต่ละช่วงอายุมีลักษณะแตกต่างกันไป พบว่า การใช้อุณหภูมิทดสอบ 60 องศาเซลเซียส ทำให้ค่า T/C ratio ของปลาอายุ 105 วันมีค่าสูงสุดเท่ากับ 3.17 ในขณะที่การใช้อุณหภูมิทดสอบ 55 องศาเซลเซียส ทำให้ค่า T/C ratio ของปลาอายุ 150 วันมีค่าสูงสุดเท่ากับ 3.83 แต่โดยทั่วไปเมื่อใช้อุณหภูมิทดสอบที่สูงขึ้น มีผลทำให้ค่า T/C ratio สูงขึ้น โดย T/C ratio ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส มีค่าสูงกว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 2 กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ทริปซิน (μmol p-nitroaniline/ชั่วโมง/มิลลิกรัม โปรตีน) ของปลานิลอายุต่างๆ ที่อุณหภูมิต่างกัน

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	อายุปลา							
	45 วัน	60 วัน	75 วัน	90 วัน	105 วัน	120 วัน	135 วัน	150 วัน
30	2.18 ± 0.03^{a1}	7.98 ± 0.66^{b4}	4.68 ± 0.16^{a3}	5.53 ± 0.79^{a3}	9.45 ± 0.88^{a5}	3.19 ± 0.24^{a2}	3.61 ± 0.48^{a2}	8.46 ± 0.57^{a4}
35	2.49 ± 0.05^{ab1}	5.94 ± 0.44^{a45}	4.96 ± 0.59^{a34}	6.45 ± 0.46^{a6}	12.22 ± 0.62^{b7}	3.47 ± 0.24^{a12}	4.44 ± 0.83^{ab23}	11.14 ± 1.13^{b6}
40	2.96 ± 0.22^{bc1}	11.57 ± 0.10^{c4}	6.56 ± 0.59^{b3}	6.32 ± 1.04^{a3}	15.4 ± 0.89^{cd5}	3.61 ± 0.64^{a12}	4.44 ± 0.56^{ab2}	11.7 ± 0.57^{b4}
45	3.27 ± 0.22^{c1}	11.89 ± 0.44^{c6}	6.65 ± 0.43^{b3}	9.08 ± 0.40^{b4}	14.34 ± 1.04^{c7}	4.85 ± 0.48^{b2}	4.91 ± 0.16^{b2}	10.77 ± 1.06^{b56}
50	4.21 ± 0.22^{d1}	13.29 ± 0.22^{d4}	7.59 ± 0.10^{bc2}	9.47 ± 1.04^{b3}	16.88 ± 1.19^{d5}	5.41 ± 0.42^{b1}	5.01 ± 0.28^{b1}	16.78 ± 1.56^{c5}
55	5.40 ± 0.18^{e1}	20.36 ± 0.48^{f4}	8.62 ± 0.33^{c2}	9.60 ± 0.91^{b2}	21.75 ± 1.43^{e5}	6.38 ± 0.48^{bc1}	6.39 ± 0.90^{c1}	17.18 ± 1.06^{c3}
60	5.46 ± 0.22^{e1}	20.12 ± 0.96^{ef4}	9.83 ± 1.01^{d3}	9.56 ± 0.80^{b3}	21.84 ± 0.68^{e5}	6.80 ± 0.24^{c12}	7.87 ± 0.89^{cd2}	20.93 ± 0.97^{d45}
65	6.44 ± 0.79^{ef1}	19.42 ± 0.41^{e5}	10.40 ± 1.01^{d34}	11.67 ± 0.88^{c4}	22.75 ± 1.24^{e6}	8.60 ± 1.20^{d2}	9.63 ± 1.12^{e23}	21.31 ± 0.31^{d6}
70	6.24 ± 0.31^{f1}	20.02 ± 0.89^{ef4}	12.52 ± 0.62^{e3}	12.56 ± 0.41^{c3}	26.71 ± 0.28^{f6}	8.32 ± 0.42^{d2}	9.35 ± 0.85^{e2}	21.84 ± 1.32^{d45}

หมายเหตุ ตัวเลขที่เหมือนกันในแนวนอน ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)
ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

ตารางที่ 3 กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไคโมทริปซิน (µmol p-nitroaniline/ชั่วโมง/มิลลิกรัม โปรตีน) ของปลานิลอายุต่าง ๆ ที่อุณหภูมิต่างกัน

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	อายุปลา							
	45 วัน	60 วัน	75 วัน	90 วัน	105 วัน	120 วัน	135 วัน	150 วัน
20	5.77 ± 0.22^{a1}	15.01 ± 0.30^{e4}	11.24 ± 0.49^{ab2}	12.24 ± 1.12^{a3}	18.98 ± 0.60^{e5}	13.04 ± 0.87^{a3}	11.11 ± 0.39^{c2}	14.94 ± 0.50^{d4}
25	7.79 ± 0.20^{b1}	13.87 ± 0.65^{d34}	12.46 ± 0.71^{c2}	14.73 ± 0.82^{b4}	19.50 ± 0.30^{e6}	14.77 ± 0.47^{b4}	13.06 ± 0.30^{de23}	16.80 ± 0.99^{e5}
30	8.21 ± 0.65^{b1}	13.66 ± 0.36^{d3}	11.38 ± 0.39^{b2}	15.79 ± 1.12^{bc4}	16.77 ± 1.10^{d45}	17.06 ± 0.59^{b4}	11.53 ± 1.38^{cd2}	17.92 ± 0.53^{e5}
35	9.98 ± 0.30^{c1}	13.35 ± 0.36^{cd3}	13.39 ± 0.16^{d3}	15.39 ± 0.56^{bc45}	17.55 ± 1.65^{d56}	16.09 ± 0.87^{bc56}	11.94 ± 0.83^{cd2}	14.69 ± 0.57^{d4}
40	11.85 ± 0.20^{de2}	10.01 ± 0.44^{b1}	12.50 ± 0.60^{c2}	17.56 ± 0.28^{d4}	14.04 ± 0.55^{c3}	18.10 ± 0.29^{d4}	12.22 ± 0.30^{de2}	14.94 ± 2.64^{d3}
45	11.07 ± 0.66^{d23}	12.20 ± 0.89^{c3}	11.61 ± 0.32^{bc3}	18.02 ± 0.82^{de4}	9.16 ± 1.38^{b1}	19.05 ± 0.30^{ef5}	11.48 ± 0.58^{cd3}	10.27 ± 0.79^{c2}
50	12.05 ± 0.48^{de34}	8.76 ± 0.30^{a2}	11.80 ± 0.20^{bc3}	19.34 ± 0.40^{f5}	18.85 ± 0.23^{e5}	19.14 ± 0.40^{e5}	12.36 ± 0.59^{de4}	6.53 ± 0.26^{b1}
55	13.56 ± 0.22^{f4}	8.13 ± 0.63^{a2}	11.24 ± 0.40^{ab3}	18.68 ± 0.23^{ef5}	7.80 ± 0.55^{a2}	20.25 ± 0.48^{fg6}	7.78 ± 0.28^{b2}	4.48 ± 0.53^{a1}
60	14.03 ± 0.20^{f4}	8.03 ± 0.18^{a2}	10.26 ± 0.60^{a3}	19.47 ± 0.23^{f5}	6.89 ± 0.23^{a2}	21.01 ± 0.29^{g6}	3.24 ± 0.80^{a1}	9.89 ± 2.90^{c3}

หมายเหตุ ตัวเลขที่เหมือนกันในแนวนอน ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)
ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

ตารางที่ 4 อัตราส่วนกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ทริปซินต่อกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไคโมทริปซิน (T/C ratio) ของปลานิลอายุต่างๆ ที่อุณหภูมิต่างกัน

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	อายุปลา							
	45 วัน	60 วัน	75 วัน	90 วัน	105 วัน	120 วัน	135 วัน	150 วัน
30	0.27	0.58	0.41	0.35	0.56	0.19	0.31	0.47
35	0.25	0.44	0.37	0.42	0.70	0.22	0.37	0.76
40	0.25	1.16	0.52	0.36	1.10	0.20	0.36	0.78
45	0.29	0.97	0.57	0.50	1.56	0.25	0.43	1.05
50	0.35	1.52	0.64	0.49	0.89	0.28	0.41	2.57
55	0.39	2.50	0.77	0.51	2.79	0.32	0.82	3.83
60	0.39	2.51	0.96	0.49	3.17	0.32	2.42	2.12

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

เอนไซม์ทริปซินและไคโมทริปซิน เป็นเอนไซม์ย่อยโปรตีน (proteolytic enzyme) ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ตั้งแต่สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังจนถึงสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม โดยเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้จัดเป็นเอนไซม์เฉพาะที่ผลิตมาจากตับอ่อนแล้วปล่อยออกมาที่ลำไส้เพื่อย่อยอาหารจำพวกโปรตีน แตกต่างกับเอนไซม์โปรติเอส (protease) ซึ่งเป็นเอนไซม์ย่อยโปรตีนโดยรวม โดยปลากินเนื้อส่วนใหญ่จะมีกิจกรรมเอนไซม์ย่อยโปรตีนสูงกว่าปลากินพืช หรือปลากินพืชและเนื้อ และมีกิจกรรมเอนไซม์ย่อยคาร์โบไฮเดรตค่อนข้างต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับปลากินพืช หรือปลากินพืชและเนื้อ [9]

การประเมินประสิทธิภาพของกิจกรรมเอนไซม์ทริปซิน และไคโมทริปซินของปลานิลในการย่อยซับสเตรต (catalytic capacity) ในแต่ละช่วงอายุของปลาที่อุณหภูมิต่างๆ กัน เพื่อให้ได้ข้อมูลพื้นฐานการย่อยอาหารปลานิลซึ่งจัดเป็นปลากินพืชและเนื้อ แต่ปลานิลยังต้องการโปรตีนปริมาณสูงในสูตรอาหารเพื่อให้เจริญเติบโตได้ดี ซึ่งการลดต้นทุนการผลิตด้วยการใช้แหล่งโปรตีนคุณภาพดี มีราคาถูกมาทดแทนปลาป่น จำเป็นต้องมีข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับกิจกรรมเอนไซม์ทริปซิน และไคโมทริปซิน ซึ่งในขณะนี้ยังมีการศึกษาค่อนข้างจำกัดในปลานิล การศึกษาครั้งนี้โดยภาพรวมพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ทริปซิน และเอนไซม์ไคโมทริปซินในลำไส้ปลานิล มีค่าสูงขึ้นเมื่อปลานิลมีอายุมากขึ้น ในขณะที่รุ้งกานต์ กล้าหาญและคณะ [10] รายงานว่าปลานิลขนาดเล็กที่เลี้ยงด้วยอาหารเม็ด มีระดับกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส และไลเปส (lipase) สูงกว่าปลานิลขนาดใหญ่ แต่เมื่อปลานิลมีขนาดใหญ่ขึ้น กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส (amylase) จะทำงานได้ดีกว่าปลานิลขนาดเล็ก ซึ่งสาเหตุที่กิจกรรมเอนไซม์ย่อยโปรตีนในการทดลองเหล่านี้มีความแตกต่างกันเนื่องจากการตรวจวัดเอนไซม์โปรติเอส ซึ่งเป็นเอนไซม์ย่อยโปรตีนไม่เฉพาะเจาะจง ใช้ซับสเตรตในการจับกับเอนไซม์สกัดในหลอดทดลอง แตกต่างจากซับสเตรตที่ใช้ตรวจวัดเอนไซม์ทริปซินและเอนไซม์ไคโมทริปซินซึ่งมีความเฉพาะเจาะจง อีกทั้งในการทดลองของรุ้งกานต์ กล้าหาญและคณะ [10] ใช้เฉพาะปลานิลเพศผู้ในการศึกษากิจกรรมเอนไซม์ และใช้อุณหภูมิทดสอบกิจกรรมเอนไซม์ที่แตกต่างจากการทดลองในครั้งนี้ Santos และคณะ [11] ทำการเลี้ยงปลานิลในบ่อดิน และในกระชังด้วยอาหารเม็ดที่มีระดับโปรตีนต่างกัน พบว่ากิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสและไลเปสไม่มีความแตกต่างกันในปลานิลทั้งสองชุดการทดลองเมื่อเลี้ยงนาน 94 วัน แต่กิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินและไคโมทริปซินของปลานิลที่เลี้ยงในบ่อดินมีค่ามากกว่าปลานิลที่เลี้ยงในกระชัง แสดงว่าอาหารธรรมชาติที่มีในบ่อดินมีผลทำให้กิจกรรมเอนไซม์ทริปซินและไคโมทริปซินของปลานิลที่เลี้ยงในบ่อดินมีค่าสูงขึ้น และยังพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินและไคโมทริปซินของปลานิลทั้ง 2 ชุดการทดลองที่เลี้ยงในบ่อและกระชังมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อปลามีอายุ 63 วัน ก่อนจะกลับมามีค่าเพิ่มขึ้นอีกครั้งเมื่อปลามีอายุ 94 วัน ในขณะที่กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสตลอดระยะเวลาเลี้ยง 94 วันมีค่าไม่เปลี่ยนแปลง แสดงถึงความจำเพาะของรูปแบบการแสดงออกของกิจกรรมเอนไซม์ทริปซินและไคโมทริปซิน ซึ่งแตกต่างจากโปรติเอสในช่วงอายุต่างๆ ของปลานิล

ผลการศึกษาในการทดลองครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า กิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินและไคโมทริปซินในลำไส้ของปลานิล มีการแสดงออกของกิจกรรมเอนไซม์ที่แตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับอายุของปลานิลและอุณหภูมิที่ใช้ทดสอบ โดยค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ทริปซินของปลานิลที่อายุ 105 วัน มีค่าสูงสุด แล้วมีค่าลดลงเมื่อปลามีอายุ 120 และ 135 วัน ส่วนหนึ่งน่าจะมีความเกี่ยวข้องกับการเพิ่มขึ้นของ T/C ratio ที่มีค่าสูงสุดเมื่อปลามีอายุ 105 วัน เช่นกัน ซึ่งมีผลทำให้ปลามีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วตั้งแต่อายุ

90 วันจนถึง 105 วัน การปรับเปลี่ยนการแสดงออกของค่ากิจกรรมเอนไซม์เหล่านี้ของปลานิลเพื่อทำให้ปลาสามารถดูดซึมอาหารไปใช้ประโยชน์ (assimilation) เพื่อการเจริญเติบโตได้มากขึ้น [11] ทั้งนี้โดยทั่วไปพบว่า การเจริญเติบโตของปลาขึ้นอยู่กับอุณหภูมิน้ำ สภาพแวดล้อมที่เหมาะสม คุณภาพอาหารที่ได้รับ และอัตราการให้อาหาร และมีรายงานว่าในปลาบางชนิด เช่น Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) เมื่อมีอัตราการเจริญเติบโตเพิ่มมากขึ้น ระดับของกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ทริปซิน และค่า T/C ratio จะเพิ่มขึ้นตามการเจริญเติบโตของปลา แต่ในทางตรงกันข้ามกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไคโมทริปซินจะมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อปลามีการเจริญเติบโตลดลง เช่นขณะอดอาหาร ทำให้ค่า T/C ratio ลดลง นอกจากนี้ค่า T/C ratio ยังสามารถใช้ในการประเมินความสามารถในการย่อยอาหาร (digestion ability) ของปลาบางชนิด โดยค่า T/C ratio ที่สูง ส่งผลให้ปลาโตเร็ว ในขณะที่ค่า T/C ratio ต่ำ ส่งผลให้ปลาโตช้า ดังนั้นกิจกรรมจำเพาะของทริปซิน และค่า T/C ratio จึงได้ถูกนำมาใช้เป็นเอนไซม์ตัวชี้วัด (enzymatic markers) ในการประเมินอัตราการเจริญเติบโตของปลาหลังจากย่อยโปรตีนและดูดซึมกรดอะมิโนเข้าไปในร่างกาย แม้ว่าการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินและไคโมทริปซินในการศึกษาครั้งนี้จะเป็นการศึกษาในหลอดทดลอง *(in vitro)* ไม่ใช่การย่อยอาหารในตัวสัตว์ *(in vivo)* แต่ผลจากการศึกษากิจกรรมเอนไซม์ที่ได้สามารถใช้เป็นองค์ความรู้พื้นฐานที่จะนำมาประยุกต์ในการพัฒนาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเลี้ยงปลาให้เจริญเติบโตดีได้ต่อไป [8, 13]

เอนไซม์ทริปซิน และไคโมทริปซิน เป็นเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของปลากินพืชและเนื้อ และปลากินเนื้อ ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้ ในลำไส้ของปลานิลที่ได้ในการทดลองครั้งนี้ มีความสัมพันธ์กับอัตราการเจริญเติบโตของปลานิลหรืออายุปลาที่เพิ่มขึ้น ซึ่งการแสดงออกกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ทริปซินและไคโมทริปซินเปลี่ยนแปลงไปตามช่วงอายุของปลานิล โดยค่าเฉลี่ยกิจกรรมจำเพาะทริปซินมีค่าสูงสุดเมื่อปลานิลมีอายุ 105 วัน และกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไคโมทริปซิน มีค่าสูงสุดเมื่อปลามีอายุ 120 วัน แสดงให้เห็นว่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ทริปซินและไคโมทริปซินในปลานิลมีค่าเปลี่ยนแปลงไปตามอายุปลา ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายโปรตีนระหว่างการย่อยอาหารของปลานิล แม้ว่าในการทดลองครั้งนี้ปลานิลที่เลี้ยงไว้ 150 วันจะมีน้ำหนักเฉลี่ยไม่สูงมากนัก เนื่องจากไม่ได้ใช้ปลานิลที่แปลงเพศหรือปรับปรุงพันธุกรรมมาทดลอง โดยทั่วไปสัตว์น้ำแต่ละชนิดอาจมีช่วงอายุที่มีกิจกรรมเอนไซม์มีค่าสูงสุด หรือมีรูปแบบการแสดงออกของเอนไซม์ทริปซินแตกต่างกันไประหว่างการเลี้ยง เช่น Hani และคณะ [9] รายงานว่ากิจกรรมเอนไซม์ทริปซินของปลา Stickleback *(Gasterosteus aculeatus)* ซึ่งเป็นปลากินพืชและเนื้อชนิดหนึ่ง มีค่าไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อนำลำไส้ปลาที่มีอายุ 0, 60, 120, 180 และ 240 วันมาตรวจวัดกิจกรรมเอนไซม์ทริปซิน ซึ่งอาจเกิดจากการทดลองนี้วัดกิจกรรมเอนไซม์ต่อน้ำหนักลำไส้ Thongprajukaew และคณะ [8] รายงานว่ากิจกรรมจำเพาะเอนไซม์ทริปซินและไคโมทริปซินของปลากัดที่มีอายุ 10 วัน 1.5 เดือนและ 3 เดือน มีค่าเพิ่มขึ้นตามอายุของปลากัดที่เพิ่มขึ้น โดยเมื่อเข้าถึงวัยเจริญพันธุ์ แม่พันธุ์ปลากัดจะมีกิจกรรมเอนไซม์ดังกล่าวสูงกว่าพ่อพันธุ์ปลากัดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การศึกษาผลของอายุปลานิลต่อกิจกรรมทริปซินและไคโมทริปซินในการทดลองครั้งนี้ ซึ่งใช้อาหารเม็ดที่มี 35% โปรตีนและตรวจวัดกิจกรรมเอนไซม์ทั้งสองชนิดทุกๆ 15 วัน ของปลานิลทั้งสองเพศ เมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองของ Thongprajukaew และคณะ [14] ซึ่งทดสอบในปลานิลที่ปรับปรุงพันธุกรรมและแปลงเพศ (sex-reversed GIFT tilapia) เลี้ยงด้วยอาหารโปรตีนต่ำ 18%

และประเมินกิจกรรมเอนไซม์ทริปซิน และค่า T/C ratio ของปลานิล GIFTเพียงครั้งเดียวเมื่อสิ้นสุดการทดลอง แม้จะทดลองในปลานิลที่มีช่วงอายุใกล้เคียงกับการทดลองครั้งนี้ พบว่าความแตกต่างของปริมาณโปรตีนในอาหารที่ปลากิน มีผลต่อการแสดงออกของกิจกรรมเอนไซม์ทริปซินและไคโมทริปซินเมื่อปลาได้รับอาหารที่มีปริมาณโปรตีนหรือวัตถุดิบอาหารสัตว์ในสูตรอาหารต่างกัน [13, 15] เช่น ในการทดลองของ Silva และคณะ [16] อนุบาลลูกปลานิล GIFT อายุ 5 วัน ด้วยอาหารเม็ด 4 ระดับโปรตีน (30%, 36%, 42% และ 48%) นาน 30 วัน พบว่ากิจกรรมจำเพาะของทริปซินและไคโมทริปซินของลูกปลานิลอายุ 10 วันและ 20 วันมีค่าไม่แตกต่างกันเมื่อได้รับอาหารที่มีระดับโปรตีนต่างกัน 4 ระดับ แต่ลูกปลานิลอายุ 30 วัน มีค่ากิจกรรมจำเพาะทริปซินและไคโมทริปซินสูงสุดเมื่อได้อาหารที่มีโปรตีน 42% อย่างไรก็ตามกิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินและไคโมทริปซินของปลาโดยทั่วไป ยังขึ้นอยู่กับปัจจัยสภาพแวดล้อมอื่นๆ เช่น ระยะการพัฒนาของปลา [17] การอดอาหาร [15] ชนิดของอาหาร [11] อุณหภูมิน้ำ [9, 19] และเพศปลา [8] เป็นต้น Chan และคณะ [18] รายงานว่าปลาหมอเทศ *(Oreochromis mossambicus)* ที่ไม่ได้รับอาหารในเวลาสั้นๆ จะมีระดับของกิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับปลากลุ่มควบคุมที่ได้อาหารตามปกติ แต่ระดับกิจกรรมของเอนไซม์ไคโมทริปซินมีค่าสูงขึ้น ทำให้ปลาหมอเทศที่อดอาหารนานขึ้นจึงมีค่า T/C ratio ค่อยๆลดลง แต่เมื่อให้อาหารปลาหมอเทศอีกครั้งหลังอดอาหารจะทำให้ระดับของกิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินกลับมามีค่าเพิ่มขึ้นอีกครั้ง

การศึกษาครั้งนี้ได้กำหนดช่วงเวลาเก็บรวบรวมลำไส้หลังปลากินอาหาร 90 นาที เพื่อนำเอนไซม์สำหรับใช้ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ ซึ่งช่วงเวลาที่รวบรวมระบบทางเดินอาหารมาศึกษากิจกรรมเอนไซม์พบว่ามีผลโดยตรงต่อระดับกิจกรรมเอนไซม์ย่อยอาหารในสัตว์น้ำหลายชนิด เนื่องจากปลาแต่ละขนาดจะมีระยะเวลาที่เหมาะสมในการย่อยอาหารให้มีประสิทธิภาพสูงสุดแตกต่างกัน เช่น ปลาขนาดเล็กมีระบบทางเดินอาหารยังพัฒนาไม่เต็มที่และมีขนาดเล็ก ในขณะที่ปลาขนาดใหญ่มีระบบทางเดินอาหารพัฒนาเต็มที่แล้วและมีขนาดใหญ่ ซึ่งจุอาหารได้มากขึ้น ทำให้ปลาขนาดเล็กใช้ระยะเวลาในการย่อยอาหารเร็วกว่าปลาขนาดใหญ่ [6,19] อีกทั้งการศึกษากิจกรรมเอนไซม์ในปลาส่วนใหญ่ไม่ระบุช่วงเวลาที่รวบรวมกระเพาะอาหารหรือลำไส้ว่ารวบรวมก่อนหรือหลังปลากินอาหารนานเท่าไรหรือใช้ช่วงเวลารวบรวมกระเพาะอาหารหรือลำไส้ที่แตกต่างกัน ซึ่งล้วนแล้วแต่มีผลต่อระดับกิจกรรมเอนไซม์ที่อาจแตกต่างกัน นอกจากนี้กิจกรรมเอนไซม์ในหลอดทดลอง *(in vitro)* ยังขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ และความเข้มข้นของเอนไซม์สกัด ซึ่งควรใช้เอนไซม์สกัดที่อยู่ในช่วงเวลาที่มีการย่อยสูงสุดในทางเดินอาหารของตัวสัตว์ทดลอง *(in vivo)* มาทดสอบ เพราะกิจกรรมเอนไซม์ในตัวสัตว์ทดลองจะมีค่าสูงสุดเมื่อมีปริมาณน้ำย่อยหรือเอนไซม์หลั่งออกมาอย่างเหมาะสมและมีระยะเวลาเพียงพอในการย่อย [20] ทำให้ช่วงเวลาในการรวบรวมทางเดินอาหารของปลาหลังการกินอาหารจึงมีผลต่อการแสดงออกของกิจกรรมเอนไซม์ การศึกษาระยะเวลาการย่อยอาหารในปลาส่วนใหญ่ประเมินระยะเวลาที่อาหารอยู่ในกระเพาะอาหาร (gastric evacuation time) แต่ปลานิลมีกระเพาะอาหารค่อนข้างเล็กมีลำไส้ยาว ทำให้การย่อยอาหารของปลานิลจึงเกิดในลำไส้เป็นส่วนใหญ่ โดย Uscanga และคณะ. [21] ศึกษาผลของระยะเวลาที่อาหารอยู่ในลำไส้ปลานิลที่มีต่อกิจกรรมเอนไซม์ทริปซินและไคโมทริปซิน โดยนำปลานิลขนาด 30 กรัม มาเลี้ยงและให้อาหาร semi-purified diet ที่ใช้ casein เป็นแหล่งโปรตีนในอัตรา 1% น้ำหนักตัวต่อวัน แล้วรวบรวมลำไส้ปลานิลในระยะเวลาต่างๆ กันหลังกินอาหาร พบว่า ระยะเวลาทั้งหมดที่ใช้ตั้งแต่ปลานิลเริ่มกินอาหารจนกระทั่งไม่มีอาหารเหลือในลำไส้คือ 7.15 ชั่วโมง และกิจกรรมจำเพาะของ

เอนไซม์ทริปซินในลำไส้ปลานิลมีค่าเพิ่มขึ้นสัมพันธ์กับช่วงระยะเวลารวบรวมลำไส้ โดยลำไส้ที่รวบรวมหลังกินอาหารผ่านไป 360, 480 และ 610 นาที มีค่ากิจกรรมเอนไซม์จำเพาะของทริปซินไม่แตกต่างกัน และยังมีค่าสูงกว่าลำไส้ที่รวบรวมในช่วงแรกๆ ในขณะที่ระดับกิจกรรมจำเพาะเอนไซม์ไคโมทริปซินมีค่าไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อรวบรวมลำไส้ปลานิลในช่วงเวลาต่างๆ กัน ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้ได้ทำการรวบรวมลำไส้หลังการให้อาหาร 90 นาทีจากปลานิลทุกช่วงอายุตั้งแต่ 45-150 วัน จึงอาจทำให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ทริปซินและไคโมทริปซินไม่ได้อยู่ในช่วงที่มีค่าสูงสุด ซึ่งควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับผลของช่วงระยะเวลารวบรวมลำไส้ปลานิลที่มีอายุหรือขนาดต่างกันที่มีต่อกิจกรรมเอนไซม์ทริปซินและไคโมทริปซินเพิ่มเติมต่อไป

การศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินของปลานิล พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินมีค่าสูงที่สุดที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ซึ่งอุณหภูมิดังกล่าวทำให้มีค่ากิจกรรมจำเพาะสูงกว่าการทดสอบที่อุณหภูมิอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในปลานิลทุกช่วงอายุที่ศึกษาตั้งแต่ 45-150 วัน แสดงว่าการศึกษากิจกรรมเอนไซม์ทริปซินของปลานิลทุกช่วงอายุ ควรใช้อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เพราะให้ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ทริปซินที่มีค่าสูงที่สุด อย่างไรก็ตามการศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไคโมทริปซินของปลานิลที่มีอายุระหว่าง 45-150 วัน ที่ใช้อุณหภูมิทดสอบระหว่าง 20-60 องศาเซลเซียส พบว่า ภาพรวมของค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไคโมทริปซิน ขึ้นอยู่กับปฏิสัมพันธ์ของอุณหภูมิทดสอบและอายุปลา ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไคโมทริปซินของปลานิลแตกต่างกันไปขึ้นกับอายุปลา สำหรับอุณหภูมิที่เหมาะสมในการศึกษากิจกรรมเอนไซม์ไคโมทริปซินของปลานิลที่มีอายุระหว่าง 90-120 วัน คือ 60 องศาเซลเซียส เนื่องจากให้ค่ากิจกรรมสูงสุด และเมื่อใช้อุณหภูมิทดสอบที่สูงขึ้น มีผลทำให้ค่า T/C ratio สูงขึ้นแสดงว่าการเพิ่มอุณหภูมิทดสอบมีผลต่อการแสดงออกของเอนไซม์ทริปซินของปลานิลมากกว่าการแสดงออกของเอนไซม์ไคโมทริปซิน ซึ่งสาเหตุส่วนหนึ่งอาจเนื่องมาจากปลามีการเจริญเติบโตที่เพิ่มขึ้น เมื่ออยู่ในสภาพการเลี้ยงที่อุณหภูมิสูงขึ้น ซึ่งเอนไซม์ทริปซิน เป็นเอนไซม์หลักที่มีการแสดงออกในการย่อยอาหารเพื่อให้ปลามีการเจริญเติบโตตามปกติ ในขณะที่เอนไซม์ไคโมทริปซินจะแสดงออกเมื่อปลาโตช้าหรือไม่ได้รับอาหาร [12, 18] Rungruangsak-Torrissen และ Male [15] ทำการศึกษาเกี่ยวกับกิจกรรมของเอนไซม์ของปลา Atlantic salmon พบว่าอุณหภูมิมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ทริปซินและไคโมทริปซินเช่นกัน โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ทริปซินและไคโมทริปซินของปลา Atlantic salmon คือ 50 และ 40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ สมัชชา สุวรรณกาญจน์ และคณะ [17] ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ทริปซิน และไคโมทริปซินของปลาเวียน *(Tor tambroides)* พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์เหล่านี้มีค่าสูงสุดเมื่อปลาเวียนแต่ละขนาดใช้อุณหภูมิทดสอบต่างกัน โดยกิจกรรมของเอนไซม์ทริปซิน และไคโมทริปซินในปลาเวียนที่มีอายุ 7 วัน ทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 50 และ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ แต่ปลาเวียนที่มีอายุ 90 วัน กิจกรรมของเอนไซม์ทริปซิน และไคโมทริปซินทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 50 และ 15 องศาเซลเซียส ตามลำดับ อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินและไคโมทริปซินของปลานิลเพิ่มเติม โดยการศึกษาปัจจัยอื่นๆ ที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด เช่น สภาพกรด-เบส (pH) หรือสภาพความหิวของปลา (starvation) เพื่อให้ได้ข้อมูลพื้นฐานที่จำเป็นสำหรับการนำเอาองค์ความรู้กิจกรรมของเอนไซม์ไปประยุกต์ใช้ต่อไป

การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ของระบบทางเดินอาหารของปลาสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการคัดเลือกชนิดของวัตถุดิบอาหารสัตว์ที่ใช้ในการผลิตในสูตรอาหารเลี้ยงปลา โดยการศึกษาการย่อยวัตถุดิบอาหารในหลอดทดลองด้วยการใช้เอนไซม์สกัด (*in vitro* digestibility) ซึ่งระดับของกิจกรรมเอนไซม์ทริปซินและเอนไซม์ไคโมทริปซินในการทดลองครั้งนี้ที่เปลี่ยนแปลงไปตามช่วงอายุของปลานิลที่นำมาทดสอบ ถ้าได้มีการศึกษานำเอนไซม์สกัดจากปลานิลในช่วงอายุต่างกันมาย่อยวัตถุดิบอาหารสัตว์ชนิดต่างๆ ที่หาได้ง่ายในท้องถิ่นโดยเฉพาะแหล่งโปรตีนจากพืชที่มีราคาถูกภายในหลอดทดลอง จะทำให้ทราบถึงข้อมูลของวัตถุดิบอาหารสัตว์ที่เหมาะสมที่ปลานิลย่อยได้ดีที่ควรนำมาใช้ผลิตสูตรอาหารเลี้ยงปลานิลในแต่ละช่วงอายุเพื่อลดต้นทุนการผลิตต่อไป [4, 8]

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่องนี้ได้รับการสนับสนุนการวิจัยงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณพ.ศ. 2561 จากมหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (สัญญาเลขที่ 36/2561) ขอขอบคุณคุณเอกรัตน์ น้อยเพ็ง ที่ช่วยดูแลสัตว์ทดลอง และภาควิชาวาริชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพาที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือและสถานที่ทดลอง

เอกสารอ้างอิง

1. Fisheries Development Policy and Strategy Division. (2019). *Fisheries statistics of Thailand 2017* (Vol. 9, pp.87), Department of Fisheries, Thailand. (in Thai)
2. Inland Fisheries Research and Development Division. (2016). *A guideline for increasing the efficiency and cost reduction of tilapia farming* (pp.30). Department of Fisheries, Thailand (in Thai)
3. Silva, F. C. P., Nicoli, J. R., Zambonino-Infante, J. L., Le Gall, M. M., Kaushik, S., & Gatesoupe, F. J. (2010). Influence of partial substitution of dietary fish meal on the activity of digestive enzymes in the intestinal brush border membrane of gilthead sea bream, *Sparus aurata and goldfish, Carassius auratus. Aquaculture, 306*, 233-237.
4. Soltan, M. A., Hanafy, M. A., & Wafa, M. I. A. (2008). Effect of replacing fish meal by a mixture of different plant protein sources in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) diets. *Global Veterinaria, 2,* 157-164.
5. Sharma, J. G., Kumar, A., Saini, D., Targay, N. L., Khangembam, B. K., & Chakrabarti, R. (2016). In vitro digestibility study of some plant protein sources as aquafeed for carps *Labeo rohita* and *Cyprinus carpio* using pH-Stat method. *Indian Journal of Experimental Biology, 54,* 606-611.
6. Kolkovski, S. (2001). Digestive enzymes in fish larvae and juveniles-implications and applications to formulated diets. *Aquaculture, 200,* 181-201.

7. 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.
8. Thongprajukaew, K., Kovitvadhi, U., Kovitvadhi, S., Engkagul, A., & Rungruangsak-Torrissen, K. (2013). Evaluation of growth performance and nutritional quality of diets using digestive enzyme markers and in vitro digestibility in Siamese fighting fish (*Betta splendens* Regan, 1910). *African Journal of Biotechnology, 12*(14), 1689-1702.
9. Hani, Y.M.I., Marchand, A., Turies, C., Kerambrun, E., Palluel, O., Bado-Nilles, A., Beaudouin, R., Porcher, J.M., Geffard, A., & Dedourge-Geffard, O. (2018). Digestive enzymes and gut morphometric parameters of threespine stickleback *(Gasterosteus aculeatus)*: Influence of body size and temperature. *PLOS ONE, 13*(4), e0194932.
10. Klahan, R., Areechon, N., Yoonpundh, R., & Engkagul, A. (2008). Digestive enzyme activity in various sizes of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). *Journal of Fisheries Technology Research, 2*(2), 33-43. (in Thai)
11. Santos, J.F., Soares, K.L.S., Assis, C.R.D., Guerra C.A.M., Lemos, D., Carvalho, L.B.Jr., & Bezerra R.S. (2016). Digestive enzyme activity in the intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) under pond and cage farming systems. *Fish Physiology and Biochemistry, 42,* 1259-1274.
12. Rungruangsak-Torrissen, K., Moss, R., Andresen, L.H., Berg, & A., Waagbø, R. (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.
13. Sunde, J., Eiane, S.A., Rustad, A., Jensen, H.B., Opstvedt, J., Nygard, E., Venturini, G., & Rungruangsak-Torrissen, K. (2004). Effect of fish feed processing conditions on digestive protease activities, free amino acid pools, feed conversion efficiency and growth in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture Nutrition, 10,* 261-277.
14. Thongprajukaew, K., Kovitvadhi, S., Kovitvadhi, K., & Preprame, P. (2017). Effects of feeding frequency on growth performance and digestive enzyme activity of sex-reversed Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). *Agriculture and Natural Resources, 51,* 292-298.
15. Rungruangsak Torrissen, K., & Male, R. (2000). Trypsin isozymes: development, digestion and structure. In N. F. Haard, & B. K. Simpson (Eds.), *Seafood Enzymes, Utilization and Influence on Postharvest Seafood Quality* (pp. 215-269). New York, Marcel Dekker, Inc.

16. Silva, W. S., Costa, L. S., López-Olmeda, J. F., Costa, N. C. S., Santos, W. M., Ribeiro, P. A. P., & Luz, R. K. (2019). Gene expression, enzyme activity and performance of Nile tilapia larvae fed with diets of different CP levels. *Animal, 13*(7), 1376-1384.
17. Suwankan, S., Moyai, N., Klahan, R., Seanghong, S., & Chanchij, S. (2019). The activity of trypsin and chymotrypsin and T/C ratio of crude extracted from gastrointestinal of Thai mahseer *(Tor tambroides)* at different temperature. *Khon Kaen Agriculture JournalIi, 47*(1), 1217-1224. (in Thai)
18. Chan, C. R., Lee, D. N., Cheng, Y. H., Hsieh, D. J. Y., & Ching-Feng Weng, C. F. 2008. Feed deprivation and re-feeding on alterations of proteases in Tilapia *Oreochromis mossambicus. Zoological Studies, 47*(2), 207-214.
19. Gheisvandi, N., Hajimoradloo, A., & Hoseinifar, S. H. (2014). The effect of water temperature on food transit time and digestive enzymes activity in Caspian kutum *(Rutilus kutum)* larvae. *International Journal of Aquatic Biology, 2*(3), 138-146.
20. Olsson, C., & Holmgren, S. (2001). The control of gut motility. *Comparative Biochemistry and Physiology, 128A,* 479-501.
21. Uscanga, A., Moyano, F. J., & Alvarez, C. A. (2010). Assessment of enzymatic efficiency on protein digestion in the tilapia *Oreochromis niloticus. Fish Physiology and Biochemistry, 36,* 1079-1085.