



พัฒนาการทางเนื้อเยื่อวิทยาของระบบย่อยอาหาร
และการพัฒนาอาหารสำเร็จรูปขนาดเล็กสำหรับปลา
กะพงขาววัยอ่อน (*Lates calcarifer* Bloch)

Histological development of digestive tract and
development of microparticulate diets for
Asian seabass larvae (*Lates calcarifer* Bloch)

ผศ.ดร. ชุติมา ตันติกิตติ

ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ หาดใหญ่ สงขลา

เมษายน 2561



การเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อของทางเดินอาหารและการพัฒนาอาหารสำเร็จรูป
ขนาดเล็กสำหรับปลากะพงขาว (*Lates calcarifer* Bloch) วัยอ่อน

Histological changes of digestive tract and development of microparticulate
diets for Asian seabass (*Lates calcarifer* Bloch) larvae

บทคัดย่อ

การศึกษาประกอบด้วย 2 การทดลอง ได้แก่ การศึกษาพัฒนาการทางเนื้อเยื่อวิทยาของระบบย่อยอาหารในปลากะพงขาววัยอ่อนอายุแรกฟักออกเป็นตัว จนถึงอายุ 30 วัน และการศึกษาผลของชนิดสารเชื่อมประสานและระดับโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุแวกต่ออัตราการรอดตาย การเจริญเติบโต กิจกรรมเอนไซม์ย่อยอาหารหลัก และการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อวิทยาในปลากะพงขาววัยอ่อน

การทดลองที่ 1 ศึกษาพัฒนาการทางเนื้อเยื่อวิทยาของระบบย่อยอาหาร โดยสุ่มเก็บตัวอย่างลูกปลาทุกวันก่อนให้อาหารตั้งแต่อายุแรกฟัก-7 วัน และทุก 2 และ 3 วัน สำหรับลูกปลาอายุ 8-21 วัน และ 22-30 วัน ตามลำดับ พบว่าลูกปลาอายุแรกฟักออกเป็นตัว มีระบบย่อยอาหารเป็นแบบท่อตรง และถุงสะสมอาหารขนาดใหญ่อยู่บริเวณส่วนหน้าติดกับส่วนหัว ในระยะนี้ลูกปลาจึงอาศัยอาหารภายในถุงสะสมอาหาร จนกระทั่งมีอายุ 2 วัน จึงสามารถกินอาหารจากภายนอกได้ ช่องปากและคอหอยมีการพัฒนาขึ้น แต่ยังไม่สามารถแยกกระเพาะอาหารและลำไส้ออกจากกันได้ชัดเจน จนกระทั่งอายุ 4 วัน เมื่อลูกปลาอายุ 3 วัน เริ่มกินโรติเฟอร์เป็นอาหาร ระบบทางเดินอาหารจึงเริ่มพัฒนามากขึ้น โดยพบเยื่อผิวบริเวณหลอดอาหารมีการยกตัวขึ้น และพบ Goblet cell เล็กน้อย พบเซลล์ตับอยู่บริเวณใต้ถุงสะสมอาหารตั้งแต่ลูกปลาอายุ 1 วัน เมื่อลูกปลาอายุ 4 วัน จึงพบเซลล์ตับอ่อนอยู่รวมกันเป็นกลุ่มแทรกอยู่ระหว่างเซลล์ตับ เมื่อถุงสะสมอาหารยุบลงในวันที่ 5 พบถุงลมพัฒนาขึ้นมาแทน พบพิน และตุ่มรับรสในวันที่ 6 และ 11 หลังฟักออกเป็นตัว จากนั้นมีการเพิ่มขนาดและปริมาณเซลล์ของอวัยวะในระบบย่อยอาหารตามการเจริญเติบโตของลูกปลา โดยเมื่อลูกปลาอายุ 17 วัน พบต่อมแกสตริก (Gastric gland) บริเวณกระเพาะอาหารตอนต้น ซึ่งเป็นลักษณะบ่งชี้ถึงการเจริญเป็นปลาเต็มวัยที่มีระบบย่อยอาหารสมบูรณ์

การทดลองที่ 2 ใช้ปลากะพงขาวอายุ 16 วัน หลังฟักเป็นตัว ที่มีน้ำหนักเริ่มต้นเฉลี่ย 0.0031-0.0042 กรัมต่อตัว ศึกษาการใช้อาหารที่มีการแทนที่โปรตีนปลาป่นด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสต จากปลาทุแวกที่ระดับ 0, 15 และ 30 เปอร์เซ็นต์ ใช้เจลาติน และคาร์ราจีแนน เป็นสารเชื่อมประสาน กำหนดระดับโปรตีนและไขมันในอาหาร เท่ากับ 50 และ 20 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีการทดลองอ้างอิงเป็นเนื้อปลาทุสดและอาหารอนุบาลปลาทะเลทางการค้า ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ เลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ภายหลังจากให้อาหารเป็นเวลา 7 วัน พบว่า ปลาที่ได้รับอาหารแต่ละชุดการทดลองมีอัตราการรอดตายไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) แต่ปลาที่ได้รับเนื้อปลาทุสดและอาหารอนุบาลปลาทะเลทางการค้าทยอยตายจนหมดในสัปดาห์ที่ 3 เนื่องจาก

ไม่ยอมรับประทานอาหาร เมื่อสิ้นสุดการทดลองในสัปดาห์ที่ 4 พบว่า ไม่มีอิทธิพลร่วมระหว่างชนิดของสารเชื่อมประสานและระดับของโปรตีนไฮโดรไลเสต ($P>0.05$) ต่ออัตราการอดตาย น้ำหนักสุดท้าย น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ แต่ปลาที่ได้รับอาหารที่มีโปรตีนไฮโดรไลเสต ที่ระดับ 0 เปอร์เซ็นต์ (ชุดควบคุม) และ 30 เปอร์เซ็นต์ มีค่าสูงกว่าที่ระดับ 15 เปอร์เซ็นต์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีน มีผลจากอิทธิพลร่วมระหว่างชนิดของสารเชื่อมประสานและระดับของโปรตีนไฮโดรไลเสต ($P<0.05$) โดยกิจกรรมเอนไซม์เปปซินในปลากระพงขาวที่ได้รับอาหารที่มีโปรตีนไฮโดรไลเสต 30 เปอร์เซ็นต์ และใช้การาจีแนน เป็นสารเชื่อมประสานในอาหาร มีค่าสูงที่สุด ($P<0.05$) และกิจกรรมเอนไซม์ ทรูปซิน ในปลากระพงขาวที่ได้รับอาหารที่ใช้การาจีแนนเป็นสารเชื่อมประสานและไม่มี การแทนที่โปรตีนปลาป่น มีค่าสูงที่สุด แตกต่างจากชุดการทดลองอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสในปลาที่ได้รับอาหารที่มีโปรตีนไฮโดรไลเสต 30 เปอร์เซ็นต์ มีระดับของกิจกรรมต่ำที่สุด ($P<0.05$) สำหรับการศึกษากการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อวิทยาของระบบย่อยอาหาร พบการเพิ่มขนาดของอวัยวะ ปริมาณและขนาดของเซลล์ในเนื้อเยื่อ ตามการเจริญเติบโตของปลากระพงขาว

ดังนั้น อาหารเม็ดจืดที่มีการแทนที่โปรตีนปลาป่นด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุแวก และใช้เจลาติน และการาจีแนน เป็นสารเชื่อมประสาน ส่งผลให้ปลากระพงขาวอายุ 16-17 วัน ที่มีระบบย่อยอาหารเจริญสมบูรณ์ สามารถยอมรับประทานอาหารได้ดี เมื่อพิจารณาอัตราการอดตาย การเจริญเติบโต กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีน และต้นทุนของสารเชื่อมประสาน พบว่า อาหารที่มีการแทนที่โปรตีนปลาป่นด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุแวกที่ระดับ 30 เปอร์เซ็นต์ และใช้เจลาตินเป็นสารเชื่อมประสาน มีความเหมาะสมสำหรับการเลี้ยงปลากระพงขาวในช่วงอายุนี้

ABSTRACT

The study consisted of two experiments: Experiment 1, the study on histological changes of the digestive systems in Asian seabass (*Lates calcarifer*) larval stages (0-30 days post hatch, DPH) and Experiment 2, the study on types of binders and levels of round scad mackerel hydrolysate on acceptability, survival rate, growth, enzyme activity and histological changes in Asian seabass larvae.

In the first experiment, samples of larvae for histological study were collected randomly before morning feeding every day at first hatch–7 DPH and every 2 to 3 days at 8-21 and 22-30 DPH, respectively. At hatching, the digestive system was a simple tube with a large yolk sac. During yolk sac absorption (1-2 DPH), the oral cavity and pharynx was develop but stomach and intestine were not differentiated until 4 DPH. At 3 DPH, started feeding on rotifer, the epithelium lining of digestive tract was folding and goblet cell well developed. The liver appeared at hatching and continued to develop and at 4 DPH, the exocrine cells of the pancreas were found. At 5 DPH, the yolk sac is depleted while the swim bladder was developed. The teeth and taste buds were developing at 6 and 11 DPH. The digestive system was well developed with extension and increase in size paralleled with the growth of fish larvae. Gastric glands were indentified in submucosa of interior stomach which was indicative of the full functional digestive system.

The second experiment, 16 DPH seabass (initial body weight of 0.0031-0.0042 g fish⁻¹) was used to study utilization of round scad mackerel hydrolysate to replace fish meal protein at 0, 15 and 30 % using either gelatin or carrageenan as binders. The experimental diets were formulated containing protein and lipid at 50% and 12%, respectively. Minced fresh mackerel and commercial diet were included as reference diets. Each treatment consisted of three replicate groups of fish that were fed with respective diets for four weeks. After seven days of feeding, survival rate of fish fed the experimental diets were not significantly different ($P>0.05$). During the third week, all fish in the reference groups died. After four weeks, the survival rate, final weight, weight gain and specific growth rate were not influenced by combination factors of type of binders and level of round scad mackerel hydrolysate ($P>0.05$) however, 0% (control group) and 30 % fishmeal protein substitution fed groups showed better performance than those fed 15 % substitution ($P<0.05$). Proteolytic enzyme activity were influenced by type of binders and level of round scad mackerel hydrolysate ($P<0.05$). Pepsin activity level in fish fed the diet

with 30 % substitution for fishmeal protein and with carrageenan as a binder was the highest ($P<0.05$). Level of trypsin activity of fish fed the diet using carrageenan as a binder at 0% replacement level was significantly the highest ($P<0.05$). Amylase activity level in fish fed the diet with 30 % fish protein hydrolysate was significantly the lowest ($P<0.05$). The digestive system of the fish in this experiment was well developed with extension and increase in size paralleling the fish growth.

Therefore, the microbound diets that replaced fish meal protein with round scad mackerel hydrolysate using gelatin and carrageenan as a binder were effective diet showing good acceptability in 16-17 DPH Asian seabass which developed the full functional digestive system . Considering survival rate, growth performance, proteolytic enzyme activity and binder cost, the diet containing round scad mackerel hydrolysate at 30 % replacing fishmeal protein using gelatin as a binder was suitable for the fish at this stage.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยใคร่ขอขอบพระคุณสถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง สงขลา ที่ให้ความอนุเคราะห์พันธุ์ปลากะพงขาว และอำนวยความสะดวกต่างๆ ตลอดการเก็บตัวอย่างในช่วงที่ทำการทดลองที่ 1 ขอขอบพระคุณศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งสตูล ที่ให้ความอนุเคราะห์พันธุ์ปลากะพงขาวสำหรับการทดลองที่ 2 ขอขอบพระคุณศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งนครศรีธรรมราช ที่ให้ความอนุเคราะห์อาหารอนุบาลปลาทะเลทางการค้า ขอขอบพระคุณบริษัท เจริญโภคภัณฑ์อาหาร จำกัด (มหาชน) โรงงานผลิตอาหารสัตว์น้ำบ้านพรุ ที่ให้ความอนุเคราะห์น้ำมันปลา และบริษัท ไทยยูเนี่ยน ฟีดมิลล์ จำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์วิตามินผสม และเลซิดิน

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ฤดีกร วิวัฒน์ปฐพี ที่ให้คำปรึกษาในการเตรียมอาหารขนาดเล็ก และขอขอบคุณนักศึกษาปริญญาเอก ปริญญาโท และเจ้าหน้าที่ศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ กิจการ สุขุมมาตย์ ทุกคน ที่คอยให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อ	II
Abstract	IV
กิตติกรรมประกาศ	VI
สารบัญ	VII
สารบัญตาราง	IX
สารบัญภาพ	X
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 การทดลองที่ 1	17
2.1 บทคัดย่อ	17
2.2 บทนำ	18
2.3 วัตถุประสงค์	19
2.4 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง	19
2.5 การเก็บตัวอย่างปลาพะพงขาว	20
2.6 ผลการศึกษา	21
2.7 วิจารณ์ผลการศึกษา	34
2.8 สรุปผลการศึกษา	39
บทที่ 3 การทดลองที่ 2	40
3.1 บทคัดย่อ	40
3.2 บทนำ	41
3.3 วัตถุประสงค์	43
3.4 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง	43
3.5 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	50
3.6 ผลการศึกษา	51
3.7 วิจารณ์ผลการศึกษา	69
3.8 สรุปผลการศึกษา	77
บทที่ 4 สรุปผลการศึกษา	78
เอกสารอ้างอิง	80

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ความยาวลำตัวเฉลี่ย และน้ำหนักตัวเฉลี่ยของลูกปลา การให้อาหาร และคุณภาพน้ำในระบบเลี้ยงลูกปลากะพงขาวอายุแรกฟักถึง 30 วัน หลังฟักออกเป็นตัว	22
2	องค์ประกอบทางโภชนาการของวัตถุดิบอาหาร	46
3	องค์ประกอบของอาหารทดลองที่ใช้สารเชื่อมประสาน 2 ชนิด ที่มีการแทนที่โปรตีนปลาป่นด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุแวกปนที่ระดับต่าง ๆ	47
4	วิธีการให้อาหารปลากะพงขาวด้วยการปรับลดสัดส่วนของอาร์ทีเมียและเพิ่มสัดส่วนของอาหารทดลองในช่วง 7 วัน เมื่อเริ่มการทดลอง	49
5	องค์ประกอบทางเคมี กรดอะมิโน และขนาดเปปไทด์ ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุแวก	52
6	องค์ประกอบทางเคมี (As-fed basis) และสมบัติทางกายภาพของอาหารทดลอง	54
7	องค์ประกอบของกรดอะมิโน (เปอร์เซ็นต์โปรตีนในอาหาร) ในอาหารทดลอง	55
8	อัตราการตายของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารเม็ดจืดที่ใช้สารเชื่อมประสาน 2 ชนิด และแทนที่โปรตีนปลาป่นด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุแวกที่ระดับต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์	58
9	น้ำหนักสุดท้าย น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารเม็ดจืดที่ใช้สารเชื่อมประสาน 2 ชนิด และแทนที่โปรตีนปลาป่นด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสต จากปลาทุแวกที่ระดับต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์	59
10	กิจกรรมเอนไซม์เปปซิน ทริปซิน อะไมเลส และไลเปส ในปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารเม็ดจืดที่ใช้สารเชื่อมประสานทั้ง 2 ชนิด และแทนที่โปรตีนปลาป่นด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสต จากปลาทุแวกที่ระดับต่างๆ เป็นเวลา 1 สัปดาห์	61
11	กิจกรรมเอนไซม์เปปซิน ทริปซิน อะไมเลส และไลเปส ในปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารเม็ดจืดที่ใช้สารเชื่อมประสานทั้ง 2 ชนิด และแทนที่โปรตีนปลาป่นด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสต จากปลาทุแวกที่ระดับต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์	63

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	การพัฒนาทางเดินอาหารของปลาในกลุ่ม Cyprinid	5
2	การเจริญเติบโตของลูกปลากะพงขาวตั้งแต่แรกฟักออกเป็นตัว-30 วัน	21
3	ลูกปลาอายุ 0 และ 1 วัน หลังฟักออกเป็นตัว	23
4	ระบบย่อยอาหาร ลูกปลาอายุ 2 และ 3 วัน หลังฟักออกเป็นตัว	25
5	ระบบย่อยอาหาร ลูกปลาอายุ 4 วัน หลังฟักออกเป็นตัว	26
6	ระบบย่อยอาหาร ลูกปลาอายุ 5 วัน หลังฟักออกเป็นตัว	27
7	ลูกปลาอายุ 6 และ 7 วัน หลังฟักออกเป็นตัว	28
8	ลูกปลาอายุ 11 และ 15 วัน หลังฟักออกเป็นตัว	29
9	ลูกปลาอายุ 17, 19 และ 21 วัน หลังฟักออกเป็นตัว	31
10	คอกหอย หลอดอาหาร และกระเพาะอาหารตอนต้น ลูกปลาอายุ 24, 27 และ 30 วัน หลังฟักออกเป็นตัว	32
11	ลำไส้ ลูกปลาอายุ 24, 27 และ 30 วัน หลังฟักออกเป็นตัว	33
12	ลักษณะภายนอกของอาหารอนุบาลปลาทะเลทางการค้า อาหารเม็ดจืดที่มีเจลาติน และคาร์ราจีแนนเป็นสารเชื่อมประสาน	53
13	อัตราการรอดตายของปลากะพงขาวอายุ 23 DPH ที่ได้รับเนื้อปลาหุสดี อาหารอนุบาล ปลาทะเลทางการค้า (CMD) อาหารทดลองที่มีเจลาตินและแทนที่โปรตีนปลาปนด้วย โปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาหุสดีที่ระดับ 0, 15 และ 30 เปอร์เซ็นต์ และอาหารทดลอง ที่มีคาร์ราจีแนนและแทนที่โปรตีนปลาปนด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาหุสดี ที่ระดับ 0, 15 และ 30 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 7 วัน	56
14	ลูกปลาเริ่มต้นการทดลอง อายุ 16 วัน หลังฟักออกเป็นตัว	65
15	หลอดอาหาร ลูกปลาอายุ 44 วัน หลังฟักออกเป็นตัว ที่ได้รับอาหารเม็ดจืดที่ใช้เจลาติน และคาร์ราจีแนน เป็นสารเชื่อมประสาน และแทนที่ปลาปนด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสต จากปลาหุสดีที่ระดับ 0, 15 และ 30 เปอร์เซ็นต์	66
16	กระเพาะอาหารตอนต้น ลูกปลาอายุ 44 วัน หลังฟักออกเป็นตัว ที่ได้รับอาหารเม็ดจืด ที่ใช้เจลาติน และคาร์ราจีแนน เป็นสารเชื่อมประสาน และแทนที่ปลาปนด้วยโปรตีน ไฮโดรไลเสตจากปลาหุสดีที่ระดับ 0, 15 และ 30 เปอร์เซ็นต์	67

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
17	ลำไ้ ลูกลปลาอายุ 44 วัน หลังฟักออกเป็นตัว ที่ได้รับอาหารเม็ดจิ๋วที่ใช้เจลาติน และคาร์ราจีแนน เป็นสารเชื่อมประสาน และแทนที่ปลาปนด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสต จากปลาทุแวกที่ระดับ 0, 15 และ 30 เปอร์เซ็นต์	68

บทที่ 1

บทนำ

ปลากะพงขาว (*Lates calcarifer* Bloch, 1790) เป็นปลาน้ำกร่อยขนาดใหญ่ที่สามารถอาศัยอยู่ได้ทั้งในพื้นที่น้ำจืด น้ำกร่อย และน้ำเค็ม ปัจจุบันมีการเลี้ยงอย่างแพร่หลายในเขตจังหวัดชายทะเลของประเทศไทย โดยคิดเป็น 97 เปอร์เซ็นต์ และการจับจากธรรมชาติ 3 เปอร์เซ็นต์ (นเรศ, 2553) เนื่องจากปลากะพงขาวเป็นปลาที่เลี้ยงง่าย โตเร็ว เนื้อปลามีรสชาติดี และมีราคาสูง คุ่มค่ากับการลงทุน โดยจะมีราคาเฉลี่ยประมาณ 165 บาทต่อกิโลกรัม จึงทำให้มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย ซึ่งผลผลิตส่วนใหญ่เป็นการเลี้ยงในกระชัง 78 เปอร์เซ็นต์ (9.7 พันตัน) และเลี้ยงในบ่อดิน 22 เปอร์เซ็นต์ (2.7 พันตัน) นอกจากนี้จะเป็นที่นิยมบริโภคของประชาชนภายในประเทศยังมีการส่งออกไปต่างประเทศอีกด้วย โดยตลาดส่งออกปลากะพงขาวที่สำคัญของประเทศไทยปี 2552 ได้แก่ ประเทศจีนปริมาณ 139.32 ตัน (50%) รองลงมาคือเวียดนาม 57.48 ตัน (21%) ออสเตรเลีย 57.26 ตัน (21%) และประเทศอื่นๆ 3.24 ตัน (8%) (นเรศ, 2553)

การเลี้ยงปลากะพงขาวส่วนใหญ่เกษตรกรนิยมใช้ปลาเป็ดและปลาสดเป็นอาหาร โดยเฉพาะกลุ่มเกษตรกรผู้อนุบาลลูกปลากะพงขาวในกระชังบริเวณทะเลสาบ ปากแม่น้ำ ลำคลอง ในจังหวัดชายแดนภาคใต้ เช่น จังหวัดสงขลา ปัตตานี นราธิวาส และสตูล เนื่องจากทำให้ปลาเจริญเติบโตและอัตราการรอดตายสูงถึง 90 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งบุญชูและคณะ (2530) อ่างโดย ธวัช และคณะ (2543) รายงานว่าปลากะพงขาววัยรุ่นที่เลี้ยงด้วยปลาเป็ดมีการเจริญเติบโตสูงกว่าการใช้อาหารสำเร็จรูปสูตรที่มีโปรตีน 35, 40 และ 45 เปอร์เซ็นต์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) แต่ในช่วงฤดูมรสุมเรือประมงไม่สามารถออกทำการประมงได้ เกษตรกรมักประสบปัญหาการขาดแคลนปลาสดและมีราคาสูงมาก ซึ่งหากอาหารมีคุณค่าทางโภชนาการที่ไม่สมดุล คุณภาพ และปริมาณไม่แน่นอนขึ้นอยู่กับฤดูกาล อาจส่งผลให้ปลาที่เลี้ยงอ่อนแอ เป็นโรคน้ำอืด อัตราการตายสูง และยังมีผลให้แหล่งน้ำเสื่อมโทรม น่าเสียดายจึงส่งผลให้ในปัจจุบันปลากะพงขาวที่เลี้ยงในกระชังบริเวณดังกล่าวมีอัตราการรอดตายไม่ถึง 40 เปอร์เซ็นต์ (นเรศ, 2555) การพัฒนารูปแบบของอาหารจากอาหารธรรมชาติเป็นอาหารสำเร็จรูปจึงมีความสำคัญมาก จากการศึกษาของธวัช (2538) ได้ศึกษาชนิดของอาหารเพื่อทดแทนการใช้ปลาสด พบว่าการใช้ปลาหลังเขียวครบถ้วนกับอาหารสำเร็จรูปสำหรับกึ่งกุลาค่า ทำให้ลูกปลากะพงขาวเจริญเติบโต และมีอัตราการรอดตายสูงกว่าการให้อาหารผสมอัดเม็ด อาหารปลาดุกขุน และอาหารกบ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) และการศึกษาของธวัช และคณะ (2543) ได้ศึกษาการให้อาหารเม็ดแทนปลาสด ในการอนุบาลลูกปลากะพงขาวจากขนาด 1 นิ้ว ให้มีขนาด 3 นิ้ว ในกระชัง พบว่า การใช้ปลาหลังเขียวสดมีอัตราการเจริญเติบโตสูงกว่า

การใช้อาหารเม็ดกึ่งกุดาค้า และอาหารเม็ดลอยน้ำ แต่มีอัตราการตายไม่แตกต่างกัน ดังนั้นการใช้อาหารสำเร็จรูปจึงเข้ามามีบทบาทสำคัญในการพัฒนาการเลี้ยงสัตว์น้ำเศรษฐกิจให้ประสบความสำเร็จได้ในเชิงธุรกิจ

ในปัจจุบันการขยายตัวการเพาะเลี้ยงปลากะพงขาวเพิ่มสูงขึ้น จึงมีความต้องการลูกพันธุ์เพื่อการเลี้ยงเป็นจำนวนมาก แต่การเพาะเลี้ยงปลาดังกล่าวจะต้องอนุบาลลูกปลาวัยอ่อนเป็นจำนวนมากตั้งแต่ลูกปลาวัยอ่อนถึงปลาวัยรุ่น ซึ่งระหว่างการเจริญเติบโตจะต้องผ่านภาวะวิกฤติที่เรียกว่า Bottle neck ที่ส่งผลให้ลูกปลาอัตราการตายสูง คือ การเปลี่ยนอาหาร ซึ่งในการอนุบาลลูกปลากะพงขาวตามโรงเพาะฟักทั่วไปมี 3 ช่วง คือ เปลี่ยนจากการได้รับอาหารสำรองจากถุงสะสมอาหาร (Endogenous feeding) เป็นได้รับอาหารจากภายนอก (Exogenous feeding) ซึ่งเป็นโรติเฟอร์น้ำกร่อยและอาร์ทีเมีย การเปลี่ยนจากอาหารมีชีวิตดังกล่าวเป็นปลาสด และเปลี่ยนเป็นการให้อาหารสำเร็จรูป (สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง, สงขลา) ซึ่งหากลูกปลาไม่สามารถกินอาหารได้ในแต่ละช่วงดังกล่าว ลูกปลาจะอยู่ในสภาวะอดอาหารและตาย นอกจากนี้ถ้าลูกปลาสามารถกินอาหารได้แต่ไม่สามารถนำสารอาหารไปใช้ประโยชน์ได้ ก็อาจจะทำให้ลูกปลาวัยอ่อนอยู่ในสภาวะที่มีอัตราการตายสูงได้เช่นเดียวกัน ดังนั้นความรู้และความเข้าใจด้านความสมบูรณ์ของโครงสร้างและการทำงานของอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับระบบย่อยอาหารจึงมีความสำคัญในการพัฒนารูปแบบและวิธีการเพาะเลี้ยงปลาให้มีประสิทธิภาพสูงสุด

นอกจากความรู้เกี่ยวกับความสมบูรณ์ของโครงสร้างและการทำงานของอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับระบบย่อยอาหารแล้ว ปัจจัยสำคัญที่ทำให้คน สัตว์ และสิ่งมีชีวิตทุกชนิดสามารถดำรงชีวิต และเจริญเติบโตได้คือ อาหาร ซึ่งอาหารสำหรับอนุบาลลูกปลากะพงขาววัยอ่อนส่วนใหญ่ยังใช้อาหารธรรมชาติจำพวกตัวอ่อนอาร์ทีเมีย ไรแดง และปลาสดเป็นอาหารอนุบาล แต่ต้องใช้ปริมาณมากจึงทำให้ค่าใช้จ่ายในการผลิตอาหารมีชีวิตสูง คิดเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ ของต้นทุนค่าอาหารทั้งหมด (Person-Le Ruyet *et al.*, 1993) นอกจากนี้ตลอดการผลิตยังไม่สามารถควบคุมคุณค่าทางโภชนาการในอาหารให้คงที่ได้ และขั้นตอนการผลิตอาจเกิดเชื้อแบคทีเรียซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคในลูกปลาด้วย (Langdon, 2003) จึงมีการพัฒนาอาหารสำเร็จรูปขนาดเล็กเพื่อทดแทน หรือใช้ควบคู่กับอาหารมีชีวิตในลูกปลาทะเลหลายชนิด (Rosenlund *et al.*, 1997; Canavate and Fernandez-Diaz, 1999; Cahu and Zambonino-Infante, 2001; Kolkovski, 2001; Koven *et al.*, 2001; Liao *et al.*, 2001) โดยสิ่งที่ต้องคำนึงถึงในการผลิตอาหารสำหรับลูกปลาวัยอ่อน คือ วัตถุดิบโปรตีน ซึ่งการผลิตอาหารลูกปลาวัยอ่อนจะนิยมใช้โปรตีนไฮโดรไลเสต เนื่องจากเป็นผลิตภัณฑ์ที่ผ่านการย่อยก่อน (Pre-digested protein source) ด้วยสารเคมีหรือเอนไซม์กลุ่มโปรติเอสที่จะได้ผลิตภัณฑ์ที่ประกอบด้วยเปปไทด์สายสั้นๆ ช่วยให้ลูกปลาสามารถดูดซึมสารอาหารได้ง่ายขึ้น และดึงดูดการ

กินอาหารเพิ่มขึ้น (Carvalho *et al.*, 1997; Zambonino-Infante *et al.*, 1997; Cahu *et al.*, 1999; Kolkovski and Tandler, 2000) นอกจากนี้การอนุบาลลูกปลากะพงขาวจนสามารถจำหน่ายให้แก่เกษตรกรเพื่อนำไปเลี้ยงในบ่อดิน หรือกระชัง ต้องใช้เวลาประมาณ 30-45 วัน หากเราทราบความสมบูรณ์ของโครงสร้างและการทำงานของอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับระบบย่อยอาหาร และพัฒนาอาหารเม็ดสำเร็จรูปที่เหมาะสมสำหรับการอนุบาลลูกปลากะพงขาววัยอ่อนแล้ว จะทำให้สามารถลดระยะเวลาการอนุบาล ปัจจัยเสี่ยงที่ส่งผลให้ลูกปลา มีอัตราการตายสูง และลดต้นทุนค่าอาหารลดความเสี่ยงของความไม่แน่นอนทางธรรมชาติ

1.1 พัฒนาการทางเนื้อเยื่อวิทยาของระบบย่อยอาหารในลูกปลาวัยอ่อน

การพัฒนาของอวัยวะในระบบย่อยอาหารมีความสำคัญต่อการกิน การย่อย และการดูดซึมสารอาหารต่อลูกปลาวัยอ่อนมาก โดยการพัฒนาจะมีการเปลี่ยนแปลงทั้งทางด้านสรีรวิทยาและทางเนื้อเยื่อวิทยาของเซลล์ไปพร้อมกัน ซึ่งสามารถแบ่งการพัฒนาได้ 3 ระยะ (Buddington, 1985; Boulhic and Gabaudan, 1992; Bisbal and Bengtson, 1995; Santamaria *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2006) คือ

ระยะที่ 1 ลูกปลาเพิ่งฟักออกจากไข่ และได้รับอาหารสำรองจากไข่แดง (Endogenous feeding)

ระยะที่ 2 หลังจากไข่แดงยุบหมดและเริ่มกินอาหารจากภายนอก ก่อนสร้างต่อมแกสตริกในกระเพาะอาหาร ในระยะนี้ยังไม่สามารถย่อยอาหารได้สมบูรณ์ เป็นการย่อยและดูดซึมอาหารแบบ Pinocytosis และย่อยภายในเซลล์ (Intracellular digestion) เท่านั้น

ระยะที่ 3 ลูกปลามีอวัยวะในระบบย่อยอาหารสมบูรณ์ โดยเริ่มพบต่อมแกสตริก และไส้ติ่ง นอกจากนี้ Dabrowski (1984) อ้างโดย ชุตินา (2547) ได้แบ่งลักษณะตัวอ่อนของลูกปลาวัยอ่อนตามลักษณะของทางเดินอาหารและน้ำย่อยชนิดต่างๆ ที่หลั่งออกมาบริเวณทางเดินอาหารเป็น 3 กลุ่มได้แก่

กลุ่มที่ 1 ลูกปลาที่มีกระเพาะอาหารที่ทำงานได้ก่อนจะมีการเปลี่ยนแปลงการได้รับสารอาหารจากอาหารสำรองเป็นการกินอาหาร เช่น ลูกปลาแซลมอน (Salmon) และปลากดอเมริกัน (Channel catfish)

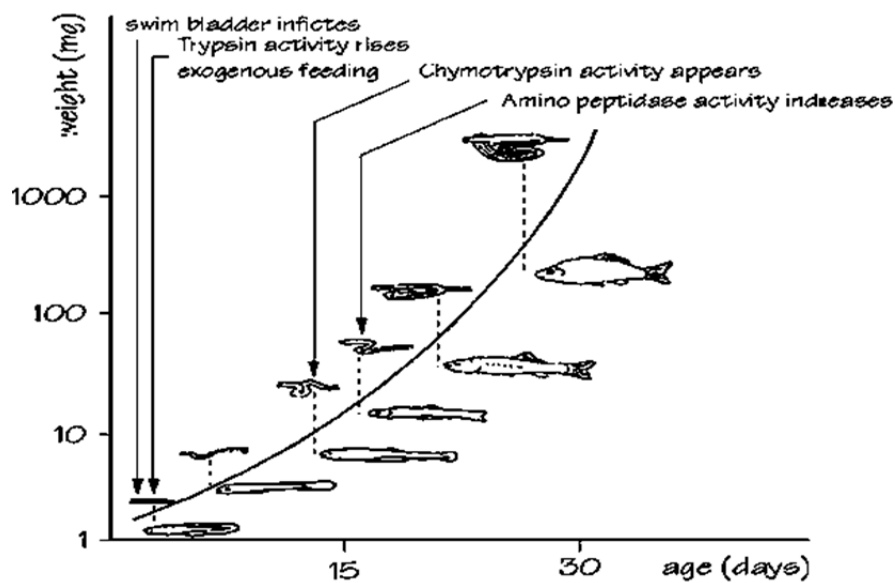
กลุ่มที่ 2 กลุ่มลูกปลาที่มีทางเดินอาหารเป็นท่อตรง ไม่มีกระเพาะอาหารหรือต่อมแกสตริกหลังสารช่วยย่อย โดยกลุ่มนี้จะมีการพัฒนาเปลี่ยนแปลงอวัยวะและหน้าที่ของทางเดินอาหารที่ซับซ้อน (Complex metamorphosis) เช่น ลูกปลาทะเลชนิดต่างๆ

กลุ่มที่ 3 กลุ่มลูกปลาที่มีการพัฒนาระบบทางเดินอาหารที่ดี โดยในระยะที่เริ่มกินอาหาร จะมีทางเดินอาหารที่มีโครงสร้างและหน้าที่ของแต่ละส่วนที่ชัดเจน แต่ปลากลุ่มนี้เป็นปลาที่ไม่มีกระเพาะอาหารตลอดชีวิต และเป็นกลุ่มที่มีปัญหาน้อยที่สุดในระยะที่เริ่มกินอาหาร

การเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อของอวัยวะในระบบย่อยอาหารของปลาแต่ละชนิดจะมีความคล้ายคลึงกัน แต่ช่วงเวลาในการเปลี่ยนแปลงของปลาแต่ละชนิดจะแตกต่างกัน โดยปลาในเขตร้อนจะมีระยะเวลาในการเปลี่ยนเร็วกว่าในปลาเขตหนาว ซึ่งสามารถสรุปเหตุการณ์สำคัญที่เกิดขึ้นระหว่างการพัฒนา คือ ลูกปลาที่เพิ่งฟักออกจากไข่จะมีท่อทางเดินอาหารแบบท่อตรงสั้นๆ ยาวตลอดถึงปาก เมื่อลูกปลาใช้สารอาหารสำรองจนหมดไข่แดงยุบ หลอดอาหารจึงเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงและพัฒนาเป็น Buccopharynx ทางเดินอาหารส่วนหน้า (Foregut) ทางเดินอาหารส่วนกลาง (Midgut) และทางเดินอาหารส่วนท้าย (Hindgut หรือ Rectum) จากนั้นจะมีการสร้างต่อมแกสตริก และอวัยวะช่วยย่อยต่างๆ โดยตับและตับอ่อนจะพบตั้งแต่แรกฟักซึ่งเริ่มทำงานเมื่อให้อาหาร มีการเพิ่มความยาวและความซับซ้อนของทางเดินอาหารขึ้นตามการเจริญเติบโตของลูกปลา (ภาพที่ 1)

- ท่อทางเดินอาหาร (Digestive tract)

ลูกปลาส่วนใหญ่ เช่น ปลากัด (สุปรานี และคณะ, 2534) ปลาช่อน (สุปรานี และคณะ, 2536) ปลากดเหลือง (อุมาพร, 2542) ปลาดุก (ชาติรี, 2543) ปลาน้ำทราย (เบญจสุกัลกษณ์, 2545) ปลาซีกเดียว (*Solea solea*) (Boulhic and Gabaudan, 1992) ปลา Summer flounder (Bisbal and Bengtson, 1995) ปลา Walleye pollock (Porter and Theilacker, 1999) ปลา Dover sole (Ribeiro *et al.*, 1999) และปลา Spotted sand bass (Pena *et al.*, 2003) เมื่อแรกฟักออกจากไข่ ระบบการย่อยอาหารยังพัฒนาไม่สมบูรณ์ โดยท่อทางเดินอาหารยังเป็นท่อตรง ปากและทวารหนักยังไม่เปิด ส่วนของริมฝีปากยังไม่แยกออกจากกัน แต่จะมีการพัฒนาไปเป็นริมฝีปากบนและล่าง โดยการเปิดปากของลูกปลาจะมีความสัมพันธ์กับการยุบตัวของไข่แดง คือ จะเปิดปากก่อนที่ไข่แดงจะยุบหมด เพื่อเตรียมพร้อมที่จะกินอาหารจากภายนอก (Boulhic and Gabaudan, 1992; Kjorsvik and Reiersen, 1992; Segner *et al.*, 1994; Bisbal and Bengtson, 1995; Sarasquete *et al.*, 1995; Porter and Theilacker, 1999; Ribeiro *et al.*, 1999)



ภาพที่ 1 การพัฒนาทางเดินอาหารของปลาในกลุ่ม Cyprinid

ที่มา : Dabrowski (1984) อ้างโดย Patrick and Patrick (1996)

- ช่องปาก คอหอย

ระยะแรกที่เพิ่งฟักออกจากไข่ ริมฝีปากบนและล่างของลูกปลายังไม่แยกออกจากกัน โดยจะมีเนื้อเยื่อเกี่ยวพันบางๆ เชื่อมติดไว้ (ชลอ และคณะ, 2530; วันเพ็ญ และนางนุช, 2530; นันทนา, 2531; จันทวรจักร, 2532) มีเยื่อผิวหนังแบบแบนบางเรียงตัวชั้นเดียว (Simple squamous epithelium) และมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ผิวหนังแบบแบนบางเรียงตัวหลายชั้น (Stratified squamous epithelium) เพื่อป้องกันการเสียดสีที่เกิดจากการกินอาหาร

เมื่อถุงไข่แดงเริ่มเล็กลงและลูกปลาเริ่มกินอาหารจากภายนอก (Exogenous feeding) จะเกิดช่องว่างภายในลำตัวชั้น ริมฝีปากเริ่มแยกออกจากกัน โดยจะมี Oral valve ยื่นยาวออกจากเยื่อ ริมฝีปากด้านบนและด้านล่างงอโค้งเข้าไปในช่องปาก และพบตุ่มรับรสกระจายอยู่แต่มีจำนวนน้อย ถัดเข้าไปจากช่องปากเริ่มแยกเป็นส่วนของคอหอย (Pharynx) พบฟัน (Pharyngeal teeth) และ ตุ่มรับรสแทรกอยู่ในชั้นเยื่อผิวหนัง และจะเพิ่มจำนวนและขนาดตามการเจริญเติบโต และจะพบฟันโพล์ยื่นขึ้นพ้นเยื่อผิวหนังเมื่อลูกปลามีอายุมากขึ้น บริเวณช่องปากจะพบลิ้นมีลักษณะเป็นแผ่นติดกับคอหอยด้านล่าง ประกอบด้วยเซลล์ผิวหนังแบบแบนบางเรียงตัวหลายชั้นยึดติดกับแกนกระดูกอ่อน (เบญจสุภัทก์, 2545; Bisbal and Bengtson, 1995)

- หลอดอาหาร

หลอดอาหารจะมีลักษณะเป็นท่อตรงยังไม่แบ่งเป็นส่วนต่างๆ มีเซลล์บุผิวแบบแบนบางเรียงตัวหลายชั้น (Stratified squamous epithelium) พบคุ่มรับรส ต่อมผลิตเมือก และพบ Goblet cell แทรกอยู่ระหว่างเซลล์บุผิว โดยจะพบเมื่อปลาอายุ 2 วันหลังฟักออกเป็นตัว พร้อมกับการเปิดปาก (เบญจสุภักดิ์, 2545; Ferraris *et al.*, 1987; Boulhic and Gabaudan, 1992; Ribeiro *et al.*, 1999) การเกิด Goblet cell ในลูกปลาวัยอ่อนส่วนใหญ่จะเกิดก่อนกินอาหารจากภายนอก แต่ในลูกปลา Turbot และปลาชีปรีม (Cousin and Baudin-Laurencin, 1985; Sarasquete *et al.*, 1995) จะพบ Goblet cell หลังจากกินอาหารจากภายนอก จะพบปรากฏขึ้นเล็กน้อย และจะมีปริมาณมากขึ้น เมื่อปลามีการเจริญเติบโตขึ้น Goblet cell บริเวณหลอดอาหารเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่ในการสร้างสารเมือกจำพวก Acid glycoprotein เพื่อใช้ในการหล่อลื่นให้อาหารเคลื่อนผ่านท่อทางเดินอาหารได้สะดวก และเคลือบลำไส้ป้องกันการกัดกร่อนจากกรดในกระเพาะอาหาร เมื่อปลาเจริญเป็นตัวเต็มวัย ภายในเซลล์จะประกอบด้วยสารจำพวก Acid mucosubstance (เบญจสุภักดิ์, 2545; Boulhic and Gabaudan, 1992) ในขณะที่ในปลาบางชนิดจะพบสารพวก Sulphate mucosubstance และ Carboxylate mucosubstance (Ribeiro *et al.*, 1999) การยกตัวของเยื่อหลอดอาหาร (Mucosa fold) จะเริ่มพบแตกต่างกันในปลาแต่ละชนิด เช่น ปลานูและปลานวลจันทร์ทะเลจะพบวันที่ 7 หลังฟักออกเป็นตัว (เบญจสุภักดิ์, 2545; Ferraris *et al.*, 1987) แต่ปลาช่อนจะพบวันที่ 2 หลังฟักออกเป็นตัว และจะยกตัวมากขึ้นเมื่อปลามีการเจริญเติบโตขึ้น สำหรับเยื่อผิวหลอดอาหารส่วนปลายบริเวณที่ติดกับกระเพาะอาหารส่วนต้น จะค่อยๆ เปลี่ยนจากเซลล์แบบแบนบางเรียงตัวหลายชั้น (Stratified squamous epithelium) ไปเป็นเซลล์รูปแท่งเรียงตัวชั้นเดียว (Simple columnar epithelium)

- กระเพาะอาหาร

กระเพาะอาหารจะมีการพัฒนาช้ากว่าอวัยวะอื่นๆ ซึ่งในช่วงแรกจะไม่สามารถแยกจากลำไส้ได้ชัดเจน มีเซลล์บุผิวรูปแท่งเรียงตัวชั้นเดียว (Simple columnar epithelium) นิวเคลียสติดสีน้ำเงิน เมื่อย้อมด้วยสี H&E อยู่ที่ฐานของเซลล์ พบ Brush border ที่เซลล์เยื่อผิว เริ่มมีการยกตัวของเยื่อผิวกระเพาะอาหาร และมีการยกตัวมากขึ้นเมื่ออายุมากขึ้น การเกิดต่อมแกสตริกบริเวณกระเพาะอาหารมีส่วนสำคัญในการย่อยอาหาร โดยต่อมแกสตริกจะหลั่งกรดไฮโดรคลอริก (HCl) เพื่อกระตุ้นเปปซิโนเจน (Pepsinogen) ให้เปลี่ยนเป็นเอนไซม์เปปซิน (Kapoor *et al.*, 1976) ช่วยในการย่อยโปรตีนให้มีโมเลกุลขนาดเล็กลง ซึ่งในปลาแต่ละชนิดจะพบการพัฒนาของต่อมแกสตริกช้าเร็วแตกต่างกัน เช่น ในปลานูทรายจะเริ่มพบต่อมแกสตริกในวันที่ 30 หลังฟักออกเป็นตัว ซึ่งช้ากว่าในปลาช่อนที่พบในวันที่ 3 (สุปราณี และคณะ, 2536) ปลา கடเลื่องพบในวันที่ 4-5 (อุมาพร,

2542) ปลาคอกุยพบในวันที่ 4 (ชาติรี, 2543) ปลา Siberian sturgeon (Gisbert *et al.*, 1998) ปลา Dover sole พบในวันที่ 22 (Ribeiro *et al.*, 1999) และปลา Yellowtail kingfish พบในวันที่ 15 (Chen *et al.*, 2006) แต่พบเร็วกว่าในปลานวลจันทร์ทะเลพบในวันที่ 42 (Ferraris *et al.*, 1987) และปลา Summer flounder พบในวันที่ 31 (Bisbal and Bengtson, 1995) ในขณะที่ปลา Walleye pollock ยังไม่พบการพัฒนาของต่อมแกสตริกแม้จะมีอายุ 31 วัน (Porter and Theilacker, 1999)

- ลำไส้

วันแรกหลังฟักออกจากไข่ ส่วนของลำไส้เป็นท่อตรง เซลล์ของเยื่อผนังลำไส้เป็นเซลล์รูปแท่งเรียงตัวชั้นเดียว (Simple columnar epithelium) ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีคุณสมบัติในการดูดซึมสารอาหารได้ดี เมื่อพบว่าทวารเริ่มแยกออกจากกัน จะสามารถแบ่งลำไส้ได้เป็น 2 ส่วน คือ ลำไส้ส่วนต้น และส่วนท้ายชัดเจน โดยมี Intestinal valve กั้นอยู่ระหว่างลำไส้ทั้ง 2 ส่วน เยื่อผนังบริเวณลำไส้จะยกตัวขึ้นตั้งแต่ลูกปลากินอาหารจากภายนอก และยกตัวมากขึ้นเมื่อเจริญเติบโตขึ้น ทำให้เกิดเป็น Villi จำนวนมากซึ่งเป็นการเพิ่มพื้นที่ในการดูดซึมอาหาร (Grizzle and Rogers, 1976) นอกจากนี้บริเวณลำไส้ยังประกอบด้วยเซลล์ Enterocyte และพบ Goblet cell ในลำไส้เมื่อปลาอายุ 15 วัน หลังฟักออกเป็นตัว (เบญจสุกฤษณ์, 2545; Ribeiro *et al.*, 1999) โดย Goblet cell จะเกิดขึ้นก่อนที่กระเพาะอาหารจะเริ่มทำงาน เพื่อหลังเมือกมาเคลือบลำไส้ป้องกันการกัดของกรดจากกระเพาะอาหาร (เบญจสุกฤษณ์, 2545; Boulhic and Gabaudan, 1992; Sarasquete *et al.*, 1995)

ลำไส้ส่วนต้น (Anterior intestine) มีการสะสมของ Lipid vacuole ในชั้นมิวโคซา (เบญจสุกฤษณ์, 2545; Boulhic and Gabaudan, 1992; Sarasquete *et al.*, 1995; Gisbert *et al.*, 1998; Porter and Theilacker, 1999; Ribeiro *et al.*, 1999) เป็นการแสดงถึงการดูดซึมไขมันในท่อทางเดินอาหาร ส่วนในลำไส้ตอนท้าย (Posterior intestine) มีการสะสม Eosinophilic granule (Cousin and Baudin-Laurencin, 1985; Boulhic and Gabaudan, 1992; Bisbal and Bengtson, 1995) ซึ่งแสดงถึงการดูดซึมโปรตีน โดยเป็นการนำโปรตีนเข้าสู่เซลล์แบบ Pinocytosis และหลุดออกเป็น Vesicle ปรากฏอยู่ในลำไส้ตอนท้าย (Govoni *et al.*, 1986)

- อวัยวะช่วยย่อยอาหาร (Accessory gland)

การเจริญของตับ และตับอ่อน จะพบตั้งแต่วันแรกหลังฟักออกจากไข่ (วันเพ็ญ และนางนุช, 2530; นันทนา, 2531; สุปราณี และคณะ, 2536; Cousin and Baudin-Laurencin, 1985; Govoni *et al.*, 1986; Boulhic and Gabaudan, 1992; Sarasquete *et al.*, 1995; Falk-Peterson and Hansen, 2001; Kolkovski, 2001) ท่อน้ำดีจะเริ่มเจริญอยู่ใกล้เซลล์ตับซึ่งพัฒนาไปพร้อมๆ กับตับ พบเซลล์ตับ (Hepatocyte) เกิดขึ้น พบการเจริญของ Sinusoid และเริ่มมีเม็ดเลือดแทรกอยู่ ตับอ่อนจะประกอบด้วยเซลล์มารวมกลุ่มกันเป็น Acinar cell และจะค่อยๆ ม้วนไปตามลำไส้ ในขณะที่เดียวกัน พบว่ามีการสร้างต่อมไร้ท่อ (Islet of Langerhans) ที่ทำหน้าที่ในการหลั่งฮอร์โมน เพื่อกระตุ้นการหลั่งเอนไซม์จำพวก เอนไซม์ไทโรซีน, ไลซีน, อาร์จินีน และเอนไซม์ทริปโตเฟน จากตับอ่อน เพื่อช่วยย่อยอาหารเมื่อกินอาหารจากภายนอก

- การศึกษาทางฮิสโตเคมี

เอนไซม์ Alkaline phosphatase เป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในการดูดซึมสารอาหาร เช่น น้ำตาล ไขมัน แคลเซียม และฟอสฟอรัส (Roubaty and Portmann, 1988) และกระบวนการลำเลียงสารอาหารผ่านเยื่อบุผิวในลูกปลาวัยอ่อนจะพบมากในถุงสะสมอาหาร และลำไส้ และจะพบปริมาณมากขึ้นเมื่อปลาเจริญเติบโตขึ้น (Govoni *et al.*, 1986) โดยปลาส่วนใหญ่จะมีการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้ในทางเดินอาหารตั้งแต่แรกฟักออกเป็นตัว และจะมีปริมาณมากขึ้นเมื่อปลาเจริญเติบโตขึ้น จากการศึกษาฮิสโตเคมีในทางเดินอาหารในปลา พบว่าบริเวณ Brush border ของเยื่อบุผิวลำไส้เล็กมีการทำงานของเอนไซม์ Alkaline phosphatase ในปริมาณมาก เช่น ปลาเก๋า (*Epinephelus malabaricus*) (จินตมาศ, 2533) ปลานู๋ (*Oxyeleotris marmoratus*) (เบญจสุภักดิ์, 2545) ปลา Turbot (Cousin and Baudin-Laurencin, 1985) ปลานวลจันทร์ทะเล (Ferraris *et al.*, 1987) ปลา Yellow tail และ ปลา Winter flounder (Baglole *et al.*, 1998) ปลา Siberian sturgeon (Gisbert *et al.*, 1998) และปลาซีกเดียว (*Solea senegolensis*) (Ribeiro *et al.*, 1999) การพบเอนไซม์ Alkaline phosphatase และ เอนไซม์เกี่ยวกับการย่อยอาหารในระบบทางเดินอาหารของปลาวัยอ่อน แสดงให้เห็นถึงการย่อย และดูดซึมสารอาหาร (โปรตีน ไขมัน และไกลโคเจน) ไปใช้ในการเจริญเติบโต

1.2. การพัฒนาของลูกปลากระพงขาววัยอ่อน (ชโล และคณะ, 2528)

1.2.1 การพัฒนารูปร่างภายนอก

- ลูกปลาอายุ 1 วัน มีความยาวประมาณ 1.5 มิลลิเมตร ลำตัวมีลักษณะบางใสเมื่อมองด้วยตาเปล่า ส่วนหัวยังไม่แยกออกจากถุงผสมอาหาร ถุงผสมอาหารมีลักษณะเรียวยาวเป็นรูปไข่ มีขนาดยาวประมาณครึ่งหนึ่งของความยาวลำตัว บริเวณขอบรอบนอกสีม่วง ส่วนด้านในมีสีเหลือง Fin fold ติดกันเป็นแผ่นรอบลำตัว ด้านท้ายลำตัวมีลักษณะแหลม Notochord ตรงและยาวตลอดลำตัว

- ลูกปลาอายุ 2 วัน ลำตัวมีลักษณะสีขาวขุ่น เริ่มมีจุดสี (Melanophore) เกิดบริเวณก้น (Ventral contour) 2-3 จุด ส่วนหัวแยกออกห่างจากถุงผสมอาหาร ถุงผสมอาหารมีลักษณะค่อนข้างกลมมีสีเข้มขึ้นจนเกือบเป็นสีดำ มีความยาว 1 ใน 6 ส่วนของความยาวลำตัว เห็น Fin fold ชัดเจนขึ้นและยังคงยาวตั้งแต่หัวจรดหาง ครีบหูเริ่มเกิดเป็นตุ่มขึ้นๆ ลูกตาเป็นจุดสีดำชัดเจน ปากเริ่มอ้า ทางเดินอาหารเป็นท่อตรงสั้น

- ลูกปลาอายุ 3-4 วัน ถุงผสมอาหารมีขนาดเล็กลง Notochord ตรงและยาวตลอดลำตัว ปากอ้ามากขึ้น มีเม็ดสีกระจายทั่วลำตัว เห็นครีบหูชัดเจน

- ลูกปลาอายุ 5 วัน ลำตัวมีสีน้ำตาลอ่อน ถุงผสมอาหารยุบหมดแล้ว ลำไส้ขดเป็น Caudal fin fold เริ่มโค้งเว้าแต่ด้านปลายยังคงแหลมอยู่ บริเวณลำตัวมีเม็ดสีม่วงและสีน้ำตาลมากขึ้นและมีขนาดใหญ่ขึ้น

- ลูกปลาอายุ 6-7 วัน ลำตัวมีสีน้ำตาลอ่อน ถุงผสมอาหารยุบหมด เห็นอวัยวะภายในชัดเจน Notochord ตรงและยาวตลอดลำตัว เริ่มเกิดก้านครีบหาง

- ลูกปลาอายุ 10 วัน ลำตัวมีสีน้ำตาลเข้มขึ้นเล็กน้อย เริ่มเห็นกระดูกสันหลังแบ่งเป็นข้อๆ นับได้ 20-21 ข้อ ก้านครีบก้นมี 8 ก้าน ก้านครีบหลังมี 9-10 ก้าน Notochord ตอนปลายเริ่มโค้งงอ

- ลูกปลาอายุ 12-13 วัน ลำตัวมีสีน้ำตาลเข้มขึ้น ครีบต่างๆ ยังคงเชื่อมติดกัน Notochord เริ่มหดสั้นลง ฟันที่ปากเริ่มเจริญดี

- ลูกปลาอายุ 20-27 วัน ลำตัวมีสีเทาปนดำ ครีบทุกครีบเจริญเหมือนตัวเต็มวัยโดยแยกจากกันหมด มีก้านครีบหาง 17 ก้าน ก้านละ 13 ข้อ มีก้านครีบก้น 11 ก้าน ก้านละ 10 ข้อ ครีบอกมีก้านครีบ 6-7 ก้าน

1.2.2 การพัฒนาทางเนื้อเยื่อวิทยา

- ลูกปลาอายุ 1 วัน ส่วนหัวติดกับถุงสะสมอาหาร สมองเริ่มเจริญ อวัยวะภายในระบบย่อยอาหารและอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับระบบย่อยอาหารยังไม่เจริญ แต่เริ่มมีการเจริญของหัวใจโดยเห็นเป็นกลุ่มเม็ดเลือดแดงอยู่บริเวณด้านบนของถุงสะสมอาหาร

- ลูกปลาอายุ 2 วัน ลำไส้มีลักษณะเป็นท่อตรงสั้นๆ ยังเจริญไม่สมบูรณ์ มีการแยกของปากเป็นริมฝีปากบนและล่าง สมองเจริญดีขึ้นเห็นเป็นส่วนๆ ชัดเจน หัวใจมีการเจริญเติบโตดีขึ้น

- ลูกปลาอายุ 3-4 วัน หลอดอาหารมีลักษณะตรงและสั้น มีการยกตัวเล็กน้อยของชั้นมิวโคซา (Mucosa) ยังไม่เห็นชั้นมัสคิวลาริส (Muscularis) ของหลอดอาหาร เริ่มมีการเจริญของกระดูกเหงือกแต่ยังไม่สมบูรณ์

- ลูกปลาอายุ 5-6 วัน เริ่มเกิดท่อไตประมาณ 2-3 ท่อ บริเวณท่อไตพบ Hematopoietic tissue มีการเจริญของเหงือกมากขึ้น มีลักษณะกลม พบเหงือก 4 คู่ เจริญมากขึ้นอยู่ภายใน Pharyngeal cavity เหงือกแต่ละคู่มีแขนงยื่นออกไป ภายในช่องท้องหลายตำแหน่งเริ่มพบ Exocrine pancreas โดยเห็น Pancreatic tissue และเนื้อเยื่อเกี่ยวพันชัดเจน แต่ยังไม่พบ Exocrine pancreas ภายนอก เริ่มเห็น Pharyngeal teeth ในตำแหน่ง Pharyngeal bone ชัดเจน หัวใจมีการเจริญขึ้นจนเห็นลักษณะที่จะแยกเป็น Atrium และ Ventricle เริ่มเห็นถุงลมบริเวณด้านหลังเหนือระดับของอวัยวะในระบบย่อยอาหาร ลำไส้ขยายใหญ่มากขึ้น กระเพาะอาหารยังไม่เจริญ

- ลูกปลาอายุ 7 วัน ท่อไตมีจำนวนเพิ่มมากขึ้น ท่อทางเดินอาหารเจริญดีขึ้นเป็นหลอดอาหารเริ่มตั้งแต่คอหอยจนถึงลำไส้ หลอดอาหารมีลักษณะยาว ตรง และมีการยกตัวของชั้นต่างๆ มากขึ้น มีช่องว่างทางเดินอาหาร (Lumen) แคบๆ เริ่มพบ Goblet cells เล็กน้อยที่ผนังชั้นนอกสุด ส่วนผนังชั้นอื่นๆ ยังแบ่งไม่ชัดเจน ลำไส้เจริญดีและแบ่งเป็นชั้นๆ ชัดเจน ผนังชั้นมิวโคซามีการยกตัวสูงและค่อนข้างถี่ มีเซลล์เยื่อบุผิวแบบทรงกระบอก (Columnar epithelium) หัวใจเจริญมากขึ้นแยกเป็น Atrium และ Ventricle อย่างชัดเจน ส่วนของหัวใจขยายใหญ่ขึ้นจนชิดกับตับและติดด้านหลังของช่องท้อง

- ลูกปลาอายุ 8 วัน ถุงลมมีการเจริญดีขึ้น โดยเริ่มขยายยาวลงมาทางด้านหลังตามความยาวของลำตัวถึงบริเวณลำไส้ตอนกลาง ภายในถุงมีช่องว่างขนาดใหญ่พบ Exocrine pancreas มากขึ้น โดยอยู่เป็นกลุ่มๆ หนาแน่นติดกับท่อทางเดินอาหารและบริเวณตับ ผนังชั้นมิวโคซา ชั้นมิวโคซา (Submucosa) และมัสคิวลาริส ของลำไส้มีความหนาเพิ่มขึ้น

- ลูกปลาอายุ 9-10 วัน เริ่มมีการโค้งงอของ Notochord ตอนปลายบริเวณใกล้หาง Notochord ยาวตลอดลำตัว เริ่มมีการเจริญของท่อไตส่วนท้ายและมีจำนวนท่อไตมากขึ้น ลำไส้มีความยาวมากขึ้น พร้อมกับพบ Goblet cells เป็นจำนวนมากและเจริญคล้ายกับตัวเต็มวัย

หลอดอาหารมีการยกตัวและแบ่งเป็นชั้นๆ และพบ Goblet cells ตลอดแนวชั้นมีวโคซา Exocrine pancreas อยู่ชิดกับตับมากขึ้น มีการแบ่งแยกของ Atrium และ Ventricle ของหัวใจชัดเจน ในระบบย่อยอาหาร Pharyngeal teeth เจริญดีและยาวขึ้น Pharyngeal bone มากขึ้น พบ Pseudobranchiae

- ลูกปลาอายุ 11-13 วัน ลูกปลามีลักษณะยาวไปทางด้านท้ายมากขึ้น หัวใจมีขนาดใหญ่ขึ้น ท่อทางเดินอาหารช่วงต่อระหว่างหลอดอาหารกับลำไส้มีลักษณะยาวและตรงมากขึ้น แสดงให้เห็นว่าเริ่มมีการเจริญของกระเพาะอาหาร

- ลูกปลาอายุ 14-15 วัน เริ่มมีการเจริญของกระเพาะอาหารมากขึ้นเห็นเป็นรูปตัวเจ (J-shape) มีผนังบางๆ เพียงชั้นเดียว มีการเรียงของเซลล์แบบทรงกระบอก ภายในกระเพาะอาหารมีอาหารจำนวนมาก

- ลูกปลาอายุ 20 วัน พบ Exocrine pancreas เริ่มเข้ามาอยู่ภายในตับ และเห็นเส้นเลือด Portal vein ชัดเจน Olfactory organ เจริญดี เห็นชั้นมีวโคซา ชับมีวโคซา และ Olfactory lamellae ชัดเจน Pharyngeal teeth เจริญดีเห็นชัดเจน หลอดอาหารมีการยกตัวเหมือนตัวเต็มวัยและมี Goblet cells จำนวนมาก กระเพาะอาหารยังเจริญไม่เต็มที่ ชั้นชับมีวโคซา และมีสกูลาริส มีลักษณะค่อนข้างบาง มีการยกตัวของกระเพาะอาหาร เริ่มพบต่อมแกสตริก (Gastric gland) ที่กระเพาะอาหารตอนต้น (Fundic region) และพบ Goblet cells บริเวณชั้นมีวโคซา บริเวณกระเพาะอาหารตอนท้าย (Pyloric region)

- ลูกปลาอายุ 23-27 วัน อวัยวะในระบบย่อยอาหารและอวัยวะต่างๆ เจริญเต็มที่เหมือนตัวเต็มวัย กระเพาะอาหารแบ่งเป็นชั้นๆ ชัดเจน พบต่อมแกสตริกในกระเพาะอาหารส่วนต้นมากขึ้น ภายในช่องปิดเหงือก (Opercular region) ใกล้ขอบด้านบนของเหงือกจะพบต่อมไทมัสเจริญดีมาก บริเวณท่อไตพบเม็ดเลือดขาวจำนวนมาก พบ Pancreatic islets กระจายอยู่ใน Exocrine pancreas อยู่ใน Mesentary

1.3 ความต้องการสารอาหารของปลากะพงขาว

โปรตีนเป็นสารอาหารที่จำเป็นต่อการมีชีวิตและการเจริญเติบโต ในปลาวัยอ่อนต้องการโปรตีนระดับที่สูง และความต้องการโปรตีนจะลดลงเมื่อปลาโตขึ้น โดย Cuzon (1988) และ Sakaras และคณะ (1989) อ้างโดย Glencross (2006) รายงานว่า ระดับโปรตีนที่เหมาะสมในปลากะพงขาวขนาด 7.5 กรัม คือ 45-50 เปอร์เซ็นต์ Catacutan และ Coloso (1995) รายงานว่า ระดับโปรตีนและไขมันที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของปลาน้ำหนักเริ่มต้น 1.34 กรัม คือ 42.5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ไขมันเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญในกระบวนการเมแทบอลิซึมต่างๆ ของร่างกาย เป็นส่วนประกอบของเนื้อเยื่อ และยังช่วยเกี่ยวกับการลำเลียงและดูดซึม (Biological carrier) วิตามินที่ละลายในไขมัน รวมทั้งเป็นองค์ประกอบของคอเลสเตอรอลและกรดน้ำดี Sakaras และคณะ (1988) รายงานว่า ที่ระดับโปรตีน 45-50 เปอร์เซ็นต์ ปลากระพงขาวจะมีการเจริญเติบโตดีที่สุดเมื่อได้รับอาหารที่มีไขมันในระดับ 15-18 เปอร์เซ็นต์ Tucker และคณะ (1988) อ้างโดย Glencross (2006) รายงานว่า ที่ระดับโปรตีน 45-50 เปอร์เซ็นต์ และไขมัน 9-13 เปอร์เซ็นต์ จะส่งผลให้ปลามีการเจริญเติบโตดีที่สุด เช่นเดียวกัน Catacutan และ Coloso (1995) รายงานว่า ไขมันในระดับ 10 เปอร์เซ็นต์ และโปรตีนในระดับ 42.5 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้ปลาขนาด 1.3 กรัม มีการเจริญเติบโตดีที่สุด Catacutan และ Coloso (1997) รายงานว่า ปลากระพงขาวขนาดเริ่มต้น 0.9 กรัม มีการเจริญเติบโตดีที่สุด เมื่อได้รับอาหารที่มีไขมันในระดับ 6-18 เปอร์เซ็นต์ และคาร์โบไฮเดรตในระดับ 20 เปอร์เซ็นต์

ปลาสามารถสังเคราะห์คาร์โบไฮเดรตจากสารอาหารประเภทไขมันและโปรตีน (Glencross, 2006) คาร์โบไฮเดรตสามารถใช้เป็นแหล่งพลังงานในอาหารปลาแทนแหล่งพลังงานจากไขมันได้ เนื่องจากมีราคาที่ถูกกว่าและยังสามารถใช้เป็นสารเชื่อมประสานเพื่อความคงรูปของเม็ดอาหาร จึงมีการนำสารอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรตมาใช้เพื่อลดต้นทุน แต่ไม่ควรใช้ในอาหารลูกปลากระพงขาวมากกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ (Boonyaratpalin, 1991) โดยการศึกษาของ Catacutan และ Coloso (1997) รายงานว่าคาร์โบไฮเดรตระดับ 20 เปอร์เซ็นต์ และไขมันระดับ 6-18 เปอร์เซ็นต์ เป็นระดับที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของปลากระพงขาว

วิตามินที่ปลากระพงขาวต้องการ ได้แก่ วิตามินเอ วิตามินบี วิตามินซี วิตามินดี วิตามินอี วิตามินเค วิตามินซี ไธอามีนและวิตามินอี ซึ่งมีการศึกษาความต้องการวิตามินซี โดยสิทธิ และคณะ (2532) พบว่าปลากระพงขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีระดับวิตามินซี 0.10-0.25 เปอร์เซ็นต์ มีองค์ประกอบเลือดและค่าไกลโคเจนใกล้เคียงกันและอยู่ในเกณฑ์ปกติ มีการเจริญเติบโตดีและมีความต้านทานโรคสูง และ Boonyaratpalin (1991) ศึกษาความต้องการวิตามินเอ วิตามินบี และกรดแพนโททีนิก พบว่ามีความต้องการปริมาณ 700 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

ปริมาณความต้องการแร่ธาตุในปลากระพงขาวมีการศึกษาน้อย เนื่องจากวิธีการศึกษาต้องใช้อาหารบริสุทธิ์ (Purified diet) จึงทำให้ปลากระพงขาวยอมรับอาหารได้น้อย แร่ธาตุที่มีการศึกษา คือ โมโนโซเดียมฟอสเฟต และฟอสฟอรัส โดยพบว่า ปลากระพงขาวมีความต้องการโมโนโซเดียมฟอสเฟต 0.5-1.0 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร และฟอสฟอรัส 0.55-0.65 เปอร์เซ็นต์ (มะลิ และจوزهดี, 2533)

1.4 ความต้องการสารอาหารในลูกปลาทะเลวัยอ่อน

การศึกษาความต้องการสารอาหารในลูกปลาวัยอ่อนมีข้อจำกัด เนื่องจากลูกปลา มีขนาดเล็ก จึงยากต่อการประเมินปริมาณการกิน ย่อยและดูดซึมสารอาหาร ส่วนใหญ่จึงเป็นการศึกษาความต้องการด้านคุณภาพ (Qualitative requirement) มากกว่าความต้องการด้านปริมาณ (Quantitative requirement) โดยยึดองค์ประกอบของสารอาหารต่างๆ ในอาหารมีชีวิตที่ใช้ในการอนุบาล เช่น โคพีพอด (Copepods) โรติเฟอร์ (Rotifer) และอาร์ทีเมีย (*Artemia* sp.) เป็นหลักในการผลิตอาหาร

ลูกปลาทะเลวัยอ่อนจะมีความต้องการโปรตีนระดับที่สูง และความต้องการโปรตีนจะลดลงเมื่อปลาโตขึ้น โดยปริมาณโปรตีนที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตประมาณ 50-70 เปอร์เซ็นต์ เช่น ในอาหารลูกปลา Sea bream มีระดับโปรตีน 73 เปอร์เซ็นต์ (Salhi *et al.*, 1994) อาหารลูกปลา Red drum (*Sciaenops ocellatus*) (Brinkmeyer and Holt, 1995) และอาหารลูกปลากะพงยุโรป (*Dicentrarchus labrax*) (Peres *et al.*, 1996) ที่ระดับโปรตีน 50 เปอร์เซ็นต์ ลูกปลามีการเจริญเติบโตดี

การศึกษาระดับไขมันในอาหารลูกปลาทะเลวัยอ่อนโดยทั่วไปมักจะค่อนข้างสูง เพราะในไข่ปลา มีปริมาณของไขมันสูงประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ (Cahu and Zambonino-Infante, 2001) เช่น อาหารสำหรับลูกปลา Red seabream วัยอ่อนมีระดับไขมัน 18 เปอร์เซ็นต์ของส่วนประกอบอาหาร (Salhi *et al.*, 1999) ในอาร์ทีเมียสำหรับใช้ออนุบาลลูกปลา Sea bream และปลา Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) มีระดับไขมันสูงถึง 29-37 เปอร์เซ็นต์ (Koven *et al.*, 1992) และ 25 เปอร์เซ็นต์ (Furuita *et al.*, 1998) ตามลำดับ และในการศึกษาของ Brinkmeyer และ Holt (1995) ในลูกปลา Red drum พบว่าที่ระดับไขมัน 18 เปอร์เซ็นต์ ลูกปลามีการเจริญเติบโตดีที่สุด

สำหรับการศึกษาความต้องการฟอสโฟลิพิดของ Sargent และคณะ (1993) ในอาหารลูกปลาทะเลวัยอ่อนจะประกอบด้วยฟอสโฟลิพิดจากปลาทะเลระดับ 10 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากไข่ปลา และถุงไข่แดงมีปริมาณฟอสโฟลิพิด 10 เปอร์เซ็นต์ และในอาหารลูกปลากะพงยุโรป มีระดับฟอสโฟลิพิด 6.6 เปอร์เซ็นต์ (Zambonino-Infante and Cahu, 1999) ส่งผลให้ลูกปลามีการเจริญเติบโตและอัตราการรอดตายดีที่สุด

ความต้องการกรดไขมันจำเป็นในอาหารสำหรับลูกปลาทะเลวัยอ่อนจะมุ่งเน้นกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง Eicosapentaenoic (EPA=C20:5n-3) และ Docosahexaenoic (DHA=C22:6n-3) เนื่องจากพบปริมาณมากในเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งระดับ DHA:EPA ที่เหมาะสมในอาหารลูกปลา มีค่าประมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง (Izquierdo *et al.*, 1989; Watanabe and Kiron, 1994; Zambonino-Infante and Cahu, 1999)

1.5 การใช้อาหารสำเร็จรูปในลูกปลาวัยอ่อน

1.5.1 แหล่งวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตอาหารสำเร็จรูป

1) โปรตีน

แหล่งโปรตีนที่สำคัญ คือ ปลาป่น แต่เนื่องจากปลาป่นเป็นแหล่งโปรตีนที่กำลังขาดแคลน จึงต้องนำวัตถุดิบตัวเลือกอื่นๆ มาแทนที่เพื่อลดการใช้ปลาป่น เช่น การใช้แหล่งโปรตีนจากปลาป่น และหมึกป่น ในอาหารอนุบาลลูกปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*) วัยอ่อน (Nankervis and Southgate, 2006) และการศึกษาของ Kanazawa และ Teshima (1988; อ้างโดย Langdon, 2003) ใช้ปลาป่น ยีสต์ กุ้งเคยป่น ปูป่น และกูดเป็นแหล่งโปรตีนในอาหารปลาซีกเดียว (*P. olivaceus*) ส่งผลให้การเจริญเติบโตและอัตราการรอดตายเพิ่มสูงขึ้น โดยรูปแบบของโปรตีนที่ใช้ในการผลิตอาหารสำหรับลูกปลาวัยอ่อน ได้แก่ โปรตีนไฮโดรไลเสต (Protein hydrolysate) และกรดอะมิโนอิสระ (Free amino acids) เป็นต้น โดยโปรตีนไฮโดรไลเสตส่วนใหญ่มีปริมาณโปรตีนสูงกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ (Carvalho *et al.*, 1997; Zambonino-Infante *et al.*, 1997; Cahu *et al.*, 1999; Kolkovski and Tandler, 2000) เช่น Jany (1976) ศึกษาการใช้โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์โปรติเอสในอาหารปลาไม่มีกระเพาะอาหาร (*Carassius auratus gibelio*) พบว่าปลาสามารถย่อยอาหารบริเวณลำไส้ได้ดีขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับปลาชุดที่ได้รับอาหารที่มีโปรตีนตามธรรมชาติ ดังนั้นจึงมีการศึกษาเพื่อนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตอาหารสำหรับลูกปลาวัยอ่อนมากขึ้น เนื่องจากมีผลดีต่อลูกปลา (Gabaudan *et al.*, 1980) มีผลดีต่อลักษณะทางกายภาพของอาหารสำเร็จรูปในด้านการทำให้อาหารมีความคงตัวสูงขึ้น (Kolkovski, 2001) และมีศักยภาพช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโต กระตุ้นการกินอาหารซึ่งทำให้อาหารมีความน่ากินขึ้น (Kolkovski and Tandler, 2000) จากการศึกษาของ Kolkovski และ Tandler (2000) ทำการทดลองใช้โปรตีนไฮโดรไลเสตจากหมึกเป็นแหล่งโปรตีนในอาหารปลากะพงแดง (*Sparus aurata*) วัยอ่อน พบว่าสามารถใช้โปรตีนไฮโดรไลเสต จากหมึกในอาหารร่วมกับโปรตีนจากหมึกป่นได้ที่ระดับ 50 เปอร์เซ็นต์ โดยไม่ส่งผลต่ออัตราการรอดตาย แต่ถ้าใช้ในระดับที่สูงขึ้นถึง 100 เปอร์เซ็นต์ จะส่งผลให้การเจริญเติบโตลดลงสำหรับกรดอะมิโนอิสระ (Free amino acids) ลูกปลาวัยอ่อนในระยะแรก มีความต้องการกรดอะมิโนอิสระเนื่องจากขาดกรดเกลือ และเอนไซม์ เปปซินที่สังเคราะห์จากกระเพาะอาหารช่วยในการย่อยโปรตีน Naess และคณะ (1995) รายงานว่าในอาร์ทีเมียที่มีปริมาณกรดอะมิโนอิสระ 7 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักแห้ง เพียงพอต่อการเจริญเติบโตของลูกปลา Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) แต่การเสริมกรดอะมิโนจำเป็นในปลาป่นระดับ 10 เปอร์เซ็นต์ พบว่าไม่เพิ่มการเจริญเติบโตและอัตราการรอดตายในปลากะพงวัยอ่อน เมื่อเปรียบเทียบกับลูกปลาที่ได้รับอาหารที่มีเปอร์เซ็นต์โปรตีนเท่ากัน (Cahu and Zambonino-Infante, 1995)

2) ไขมัน

ส่วนประกอบของวัตถุดิบแหล่งไขมันในอาหารสัตว์น้ำวัยอ่อนบางส่วนจะได้อาจมาจากปลาป่นหรือ ส่วนประกอบอื่นที่ใช้เป็นแหล่งโปรตีนในอาหาร แต่ส่วนใหญ่เป็นน้ำมันจากพืช หรือผลิตภัณฑ์ที่ได้มาจากการแปรรูปสัตว์ทะเล เช่น น้ำมันตับปลา (Cod liver oil) หรือน้ำมันปลา ที่มีการเสริมไตรกลีเซอไรด์และฟอสโฟลิพิด ด้วยเลซิทินจากถั่วเหลือง (Soya lecithin) หรือฟอสโฟลิพิดจากปลาทะเล (Geurden *et al.*, 1995) โดยแหล่งฟอสโฟลิพิดในอาหารที่สำคัญ คือ เลซิทินจากถั่วเหลือง จากการศึกษาของ Zambonino-Infante และ Cahu (1999) ในอาหารลูกปลากะพงยุโรปวัยอ่อน โดยใช้ไขมันตับปลา และเลซิทินจากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไขมัน พบว่า การเจริญเติบโตและอัตราการรอดตายของลูกปลามีความสัมพันธ์กับระดับไขมันที่เพิ่มขึ้นในอาหาร ซึ่งที่ระดับไขมัน 30 เปอร์เซ็นต์ ลูกปลามีการเจริญเติบโตและอัตราการรอดตายดีที่สุด

1.5.2 รูปแบบของอาหารสำเร็จรูปขนาดเล็ก (Microdiet) ที่ใช้ในการอนุบาลลูกปลาวัยอ่อน

การกำหนดสูตรอาหารปลาที่มีคุณภาพดีต้องมีสัดส่วนของ โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต วิตามิน และแร่ธาตุครบถ้วนทั้งคุณภาพและปริมาณเพียงพอต่อความต้องการของปลา โดยเฉพาะอาหารลูกปลาวัยอ่อนจะต้องมีความพิเศษ คือ ต้องมีขนาดเล็กมาก เพื่อให้เหมาะสมต่อขนาดปากของลูกปลาวัยอ่อนที่มีขนาดเล็ก โดยอาหารควรมีขนาด 40-700 ไมโครเมตร (Hardy and Barrows, 2002) เช่น การอนุบาลลูกปลากะพงยุโรประยะแรก อายุ 14-25 วัน และ 40 วัน ด้วยอาหารเม็ดขนาด 50-125 ไมโครเมตร, 125-200 ไมโครเมตร และ 400 ไมโครเมตร ตามลำดับ (Cahu and Zambonino-Infante, 1994) สำหรับปลาที่กินอาหารแบบกรองกินควรมีขนาดของอาหารเล็กกว่า คือ 5-150 ไมโครเมตร (Hardy and Barrows, 2002) ซึ่งอาหารลูกปลาวัยอ่อนจะมีคุณค่าทางโภชนาการสูงมาก และมีราคาค่อนข้างแพงเพราะต้องใช้กรรมวิธีและเทคโนโลยีสูงในการผลิตให้ได้อาหารอนุภาคขนาดเล็ก และอาหารบางชนิดต้องเคลือบผิวด้วยเยื่อบาง เพื่อป้องกันการละลายน้ำของสารอาหารในเม็ดอาหารเพราะอาหารมีขนาดเล็ก จึงมีพื้นที่ผิวในการสัมผัสกับน้ำมากจึงทำให้เม็ดอาหารละลายน้ำได้เร็ว ในการผลิตอาหารสำหรับลูกปลาวัยอ่อนมีจุดมุ่งหมายเพื่อให้ลูกปลาสามารถนำสารอาหารในเม็ดอาหารไปใช้ในการเจริญเติบโตได้เต็มที่ มีการสูญเสียสารอาหาร (Leaching) ในน้ำน้อยที่สุด

อาหารสำเร็จรูปขนาดเล็กที่มีการผลิตสำหรับการอนุบาลลูกปลาวัยอ่อนมีทั้งหมด 3 รูปแบบ (Person-Le Ruyet, 1989) ได้แก่ อาหารแผ่น (Flakes and expanded diets) อาหารเม็ดจืดที่มีสารเชื่อมประสาน (Microbound diets) และอาหารเคลือบเม็ดจืด (Microcoated or Microencapsulated diets) ซึ่งแต่ละชนิดมีข้อดีข้อเสียแตกต่างกัน โดยอาหารลูกปลาวัยอ่อนส่วน

ใหญ่ที่มีจำหน่ายในตลาดจะเป็นอาหารที่มีสารเชื่อมประสาน เนื่องจากใช้ง่าย ต้นทุนการผลิตต่ำ จึงสามารถผลิตเป็นอุตสาหกรรมได้ และไม่มีส่วนประกอบของสารที่เป็นพิษ และสามารถนำอาหารนี้ไปใช้ในการอนุบาลลูกปลาวัยอ่อนเพื่อลดการใช้อาหารมีชีวิต เช่น จากการศึกษาของ Holt (1993) พบว่าสามารถใช้อาหารสำเร็จรูปขนาดเล็กอนุบาลลูกปลา Red drum ได้ตั้งแต่อายุ 5 วัน และมีอัตราการรอดตายสูงถึง 60 เปอร์เซ็นต์ และการศึกษาของ Baskerville-Bridges และ Kling (2000a) พบว่าสามารถใช้อาหารสำเร็จรูปอนุบาลลูกปลา Atlantic cod (*Gadus morhua*) ได้ตั้งแต่อายุ 8 วัน และมีอัตราการรอดตาย 35 เปอร์เซ็นต์

1.6 วัตถุประสงค์ของการศึกษา

- 1) ศึกษาการพัฒนาทางเนื้อเยื่อวิทยาของระบบย่อยอาหารในปลากะพงขาววัยอ่อนอายุแรกฟักจนถึง 30 วัน หลังฟักออกเป็นตัว เพื่อทราบอายุของลูกปลากะพงขาวที่มีระบบย่อยอาหารสมบูรณ์
- 2) ศึกษาชนิดของสารเชื่อมประสานที่เหมาะสมสำหรับผลิตอาหารขนาดเล็ก เพื่ออนุบาลปลากะพงขาว
- 3) ศึกษาระดับของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุแบกที่เหมาะสมต่อการเป็นแหล่งโปรตีนในอาหารสำหรับปลากะพงขาว ที่สามารถนำมาใช้ทดแทนอาหารธรรมชาติที่มีชีวิตได้

บทที่ 2

การทดลองที่ 1

การศึกษาพัฒนาการทางเนื้อเยื่อวิทยาของระบบย่อยอาหารในปลากะพงขาววัยอ่อนอายุแรกฟักออกเป็นตัว จนถึงอายุ 30 วัน

2.1 บทคัดย่อ

ศึกษาพัฒนาการทางเนื้อเยื่อวิทยาของระบบย่อยอาหารและการเจริญเติบโตในปลากะพงขาววัยอ่อนตั้งแต่อายุแรกฟักออกจากไข่จนถึงอายุ 30 วัน หลังฟักออกเป็นตัว (Days post hatch, DPH) โดยสุ่มเก็บตัวอย่างทุกวันก่อนให้อาหารตั้งแต่อายุแรกฟัก-7 วัน และทุก 2 และ 3 วัน สำหรับลูกปลา อายุ 8-21 วัน และ 22-30 วัน ตามลำดับ จากการชั่งน้ำหนักและวัดความยาวของลูกปลาเพื่อศึกษาการเจริญเติบโต พบว่าลูกปลาอายุแรกฟักออกเป็นตัว มีความยาวเฉลี่ยเท่ากับ 1.83 ± 0.29 มิลลิเมตร และเพิ่มขึ้นช้าๆ ในช่วง 13 วัน ($P > 0.05$) แต่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงอายุ 15-30 วัน ($P < 0.05$) จึงสามารถแบ่งช่วงการเจริญเติบโตของลูกปลากะพงขาววัยอ่อนได้เป็น 2 ช่วง คือ ช่วงอายุแรกฟักออกเป็นตัว-13 วัน และ 15-30 วัน จากการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา พบว่าลูกปลาอายุแรกฟักออกเป็นตัวมีถุงสะสมอาหารขนาดใหญ่อยู่บริเวณส่วนหน้าติดกับส่วนหัว ภายในย้อมติดสีแดงของอีโอซิน (Eosin) ในระยะนี้ปากลูกปลายังไม่เปิดจึงอาศัยอาหารภายในถุงสะสมอาหาร จนกระทั่งลูกปลามีอายุ 2 วัน ปากและทวารเริ่มเปิดจึงสามารถกินอาหารจากภายนอกได้ ช่องปากและคอหอยมีการพัฒนาขึ้นมีเยื่อผิวหนังแบบแบนบางเรียงตัวชั้นเดียว ทางเดินอาหารยังคงเป็นแบบท่อตรง ไม่สามารถแยกกระเพาะอาหารและลำไส้ออกจากกันได้ชัดเจน มีเซลล์ผิวหนังแบบทรงกระบอกเรียงตัวชั้นเดียว และพบเซลล์ตับ (Hepatocyte cell) อยู่บริเวณใต้ถุงสะสมอาหาร ตั้งแต่ลูกปลาอายุ 1 วัน เมื่อลูกปลาอายุ 3 วัน เริ่มกิน โรติเฟอร์เป็นอาหาร ระบบทางเดินอาหารเริ่มพัฒนามากขึ้น โดยพบเยื่อผิวหนังบริเวณหลอดอาหารมีการยกตัวขึ้น มีเยื่อผิวหนังแบบแบนบางเรียงตัวหลายชั้น และพบ Goblet cell เล็กน้อย เมื่อลูกปลาอายุ 4 วัน เห็นกระเพาะอาหารเป็นรูปตัวเจ มีเซลล์ผิวหนังแบบทรงกระบอกเรียงตัวชั้นเดียว และลำไส้มีเซลล์เยื่อผิวหนังเป็นแบบทรงกระบอกเรียงตัวชั้นเดียว ที่มี Goblet cell แทรกอยู่ระหว่างเซลล์ผิวหนัง พบเซลล์ตับอ่อน (Pancreas) อยู่รวมกันเป็นกลุ่มแทรกอยู่ระหว่างเซลล์ตับ เมื่อถุงสะสมอาหารยุบลงในวันที่ 5 พบถุงลมพัฒนาขึ้นมาแทน พบฟัน และคูดมรับรสในวันที่ 6 และ 11 หลังฟักออกเป็นตัว จากนั้นอวัยวะในระบบย่อยอาหารมีการเพิ่มขนาด และปริมาณเซลล์มากขึ้นตามการเจริญเติบโตของลูกปลา โดยเมื่อลูกปลาอายุ 17 วัน สามารถแบ่งชั้นต่างๆ ของทางเดินอาหารได้เป็นชั้นมิวโคซา ชั้นมิวโคซา และมัสคิวลาริส และพบต่อมแกสตริก

บริเวณกระเพาะอาหารตอนต้น ซึ่งเป็นลักษณะบ่งชี้ถึงการเจริญเป็นปลาระยะวัยรุ่น (Juvenile) ที่มีลักษณะเหมือนปลาตัวเต็มวัย ผลการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าระบบย่อยอาหารของปลากะพงขาวเจริญสมบูรณ์เมื่ออายุ 17 วัน จึงสามารถนำไปใช้ในการจัดการด้านการใช้อาหารสำเร็จรูปเพื่ออนุบาลลูกปลากะพงขาวให้มีอัตราการตายลดลง และมีการเจริญเติบโตที่ดีที่สุด

2.2 บทนำ

การเพาะเลี้ยงปลาทะเลเพื่อให้ได้ผลผลิตดี และมีคุณภาพตรงตามความต้องการของผู้บริโภคจะต้องคำนึงถึงปัจจัยสำคัญหลายด้าน เช่น แหล่งพันธุ์ปลา สถานที่เลี้ยง การคมนาคมและสาธารณูปโภค สภาพอากาศ และการให้อาหาร เป็นต้น นอกจากนี้ปัจจัยดังกล่าว สุขภาพและความสมบูรณ์ของลูกพันธุ์ปลายังเป็นปัจจัยที่สำคัญประการหนึ่งที่สามารถทำให้ประสบความสำเร็จหรือล้มเหลวได้ (Hamlin *et al.*, 2000) เนื่องจากการเพาะเลี้ยงปลาจะต้องอนุบาลลูกปลาไว้อ่อนเป็นจำนวนมากตั้งแต่ลูกปลาไว้อ่อนถึงปลาวัยรุ่น ซึ่งระหว่างการเจริญเติบโตจะต้องผ่านภาวะวิกฤติที่ส่งผลให้ลูกปลามีอัตราการตายสูง คือ การเปลี่ยนอาหารซึ่งหากลูกปลาไม่สามารถกินอาหารได้ในระยะนี้ ลูกปลาจะอยู่ในสภาวะอดอาหารและตายได้ นอกจากนี้ถ้าลูกปลาสามารถกินอาหารได้แต่ไม่สามารถนำสารอาหารไปใช้ประโยชน์ได้ ก็อาจจะทำให้ลูกปลาไว้อ่อนอยู่ในสภาวะที่มีอัตราการตายสูงได้เช่นเดียวกัน ดังนั้นความรู้และความเข้าใจด้านความสมบูรณ์ของโครงสร้างและการทำงานของอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับระบบย่อยอาหารจึงมีความสำคัญในการพัฒนารูปแบบ และวิธีการเพาะเลี้ยงปลาให้มีประสิทธิภาพสูงสุด

การศึกษาที่เกี่ยวข้องกับพัฒนาการของระบบย่อยอาหารในลูกปลาไว้อ่อนจนถึงระยะปลาวัยรุ่นมีทั้งในปลาน้ำจืดและปลาทะเล จากการศึกษาของ Dabrowski และ Culver (1991) สามารถแบ่งลูกปลาตามลักษณะรูปร่างของทางเดินอาหารและน้ำย่อยที่หลังเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ลูกปลาที่มีกระเพาะอาหารตั้งแต่เกิด เช่น ปลาแซลมอน กลุ่มที่ 2 ลูกปลาที่อยู่ในระยะไว้อ่อนยังไม่มีการพัฒนาของกระเพาะอาหาร หรือ ต่อมแกสตริก แต่จะทำงานได้เมื่อมีการพัฒนาของอวัยวะในการย่อยอาหารสมบูรณ์ เช่น ลูกปลาทะเลชนิดต่างๆ และกลุ่มที่ 3 ลูกปลาที่ไม่มีกระเพาะอาหารตลอดชีวิต แต่มีทางเดินอาหารที่มีโครงสร้างและทำหน้าที่ชัดเจน การอนุบาลปลาทะเลไว้อ่อนส่วนใหญ่จึงต้องอนุบาลด้วยอาหารธรรมชาติที่มีชีวิตจำพวกอาร์ทีเมีย ไรแดง และปลาสด ซึ่งจะช่วยให้ปลาไว้อ่อนรอดตายสูงขึ้นเนื่องจากลูกปลาไว้อ่อนสามารถกินและอาศัยเอนไซม์ย่อยที่มีอยู่ในอาหารมีชีวิตช่วยในกระบวนการย่อยอาหารในทางเดินอาหารได้ดี (Dabrowski, 1979) แต่ขั้นตอนการผลิตอาหารอนุบาลดังกล่าวมีข้อจำกัดและปัจจัยเสี่ยงหลายประการ จึงมีการศึกษาการอนุบาลลูกปลากายหลังจากทางเดินอาหารพัฒนาเต็มที่ ประมาณ 1-2 สัปดาห์ เพื่อลดอัตราการตายของลูก

ปลาและลดต้นทุนการผลิตอาหารที่มีชีวิตดังกล่าว (Galaviz *et al.*, 2011) และได้มีการศึกษาการพัฒนาการของทางเดินอาหารในลูกปลาทะเลวัยอ่อนอีกหลายชนิด เช่น ปลา Gilthead seabream (Sarasquete *et al.*, 1995) ปลา California halibut (Alvarez-Gonzalez *et al.*, 2006; Gisbert *et al.*, 2004) ปลา Yellow croaker (Ma *et al.*, 2005; Mai *et al.*, 2005) และปลา Spotted sand bass (Alvarez-Gonzalez *et al.*, 2008; Pena *et al.*, 2003) ดังนั้นการศึกษาเกี่ยวกับระบบย่อยอาหารเพื่อทราบถึงความพร้อมในการทำงานทั้งทางโครงสร้างและหน้าที่จะช่วยให้การเพาะเลี้ยงลูกปลาทะเลประสบความสำเร็จดียิ่งขึ้น

2.3 วัตถุประสงค์

ศึกษาการพัฒนาทางเนื้อเยื่อวิทยาของระบบย่อยอาหารในปลากะพงขาววัยอ่อน เพื่อทราบอายุของลูกปลากะพงขาวที่มีระบบย่อยอาหารสมบูรณ์ และนำความรู้ไปใช้ในการพัฒนาอาหารและการให้อาหารในการอนุบาลลูกปลากะพงขาววัยอ่อน

2.4 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการศึกษา

2.4.1 ลูกปลากะพงขาว

ตัวอย่างปลากะพงขาววัยอ่อนแรกฟักออกเป็นตัวถึงอายุ 30 วัน ได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง ถนนแก้วแสน ตำบลเขารูปช้าง อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา

2.4.2 ระบบการเลี้ยงและให้อาหารปลากะพงขาววัยอ่อน

การอนุบาลลูกปลาดำเนินการตามระบบการเลี้ยงของสถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง คือ การอนุบาลลูกปลาในระยะงูไข่แดงยังไม่ยุบตัว (อายุ 1-2 วัน DPH) ปากยังไม่เปิด และไม่ต้องให้อาหารจากภายนอก ระยะนี้จะใช้น้ำเค็มประมาณ 28-30 ส่วนต่อพันส่วน เมื่อลูกปลาอายุ 2-9 วัน จะเริ่มให้โรติเฟอร์น้ำกร่อยเป็นอาหาร จนกระทั่งลูกปลาอายุ 10 วัน จะเริ่มปรับการให้อาหารจากโรติเฟอร์น้ำกร่อยเป็นอาร์ทีเมียตัวเล็ก (Eagle, Switzerland) โดยการปรับลดปริมาณลง 50 เปอร์เซ็นต์ ใช้เวลาประมาณ 3 วัน ลูกปลาจึงสามารถกินอาร์ทีเมียตัวเล็กเป็นอาหารได้ทั้งหมด เมื่อลูกปลาอายุ 15 วัน จึงเริ่มมีการคัดขนาดลูกปลาเพื่อลดการกินกันเอง และเริ่มปรับเปลี่ยนอาหารจากอาร์ทีเมียตัวเล็กเป็นตัวโต ในระยะนี้จะปรับเปลี่ยนความเค็มของน้ำที่ใช้เลี้ยงลงทุกวันจนถึงระดับความเค็ม 15 ส่วนต่อพันส่วน และมีการเปลี่ยนถ่ายน้ำทุกวันๆ ละ 50-70 เปอร์เซ็นต์ เมื่อลูกปลามีอายุประมาณ 30 วัน จึงฝึกให้กินเนื้อปลาเหยื่อเป็นอาหาร

2.5 การเก็บตัวอย่างปลากะพงขาว

2.5.1 การศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา

เก็บตัวอย่างลูกปลากะพงขาวก่อนการให้อาหารจากบ่ออนุบาลของสถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง ตั้งแต่แรกฟักออกเป็นตัวจนกระทั่งถึงอายุ 30 วัน โดยสุ่มเก็บตัวอย่างทุกวัน ก่อนให้อาหารตั้งแต่อายุแรกฟัก-7 วัน ทุก 2 และ 3 วัน สำหรับลูกปลา อายุ 8-21 วัน และ 22-30 วัน ตามลำดับ จำนวน 40 ตัวต่อครั้ง โดยสลบลูกปลาทั้งตัวด้วยน้ำแข็งอุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-10 นาที จากนั้นจึงนำตัวอย่างปลาทั้งตัวใส่ในขวดที่มีน้ำยาของ Bouin's fluid (Bio-optica, Milano Italy) ในอัตราส่วน ตัวอย่าง:น้ำยาของเท่ากับ 1:50 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบตามเวลาที่กำหนดแล้วจึงเปลี่ยนน้ำยาของเป็นแอลกอฮอล์ 50 และ 70 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยต้องเปลี่ยนน้ำยาใหม่ทุกๆ 24 ชั่วโมง จนกระทั่งไม่มีสีของ Bouin's fluid เพราะจะทำให้การย้อมสีเนื้อเยื่อไม่คงทน จากนั้นจึงนำไปสู่ขั้นตอนการดึงน้ำออกจากเซลล์ (Dehydration) ด้วยเครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติ (Automatic tissue processor) ของ Technicon Corporation รุ่น Autotechnicon Mono MOD.2A โดยนำตัวอย่างผ่านไอโซโพรพิลแอลกอฮอล์ (Isopropyl alcohol) และไซลีน (Xylene) และการฝังตัวอย่าง (Embedded) ในพาราฟิน (Paraffin) ด้วยเครื่องเอบเบดดิ้ง (Embedding center) นำเนื้อเยื่อไปตัดด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อไมโครโทม (Sliding microtome ยี่ห้อ Jung AG Heidelberg) ให้มีความหนา 3-5 ไมโครเมตร ติดลงบนสไลด์ จากนั้นจึงนำไปย้อมด้วยสีฮีมาทอกไซลีน (Hematoxylin) และอีโอซิน (Eosin, 1979) หลังจากนั้นนำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ และบันทึกภาพ โดยศึกษาอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับระบบย่อยอาหาร ได้แก่ ช่องปากและคอหอย หลอดอาหาร กระเพาะอาหาร ลำไส้ ตับ และตับอ่อน

2.5.2 การศึกษาการเจริญเติบโต

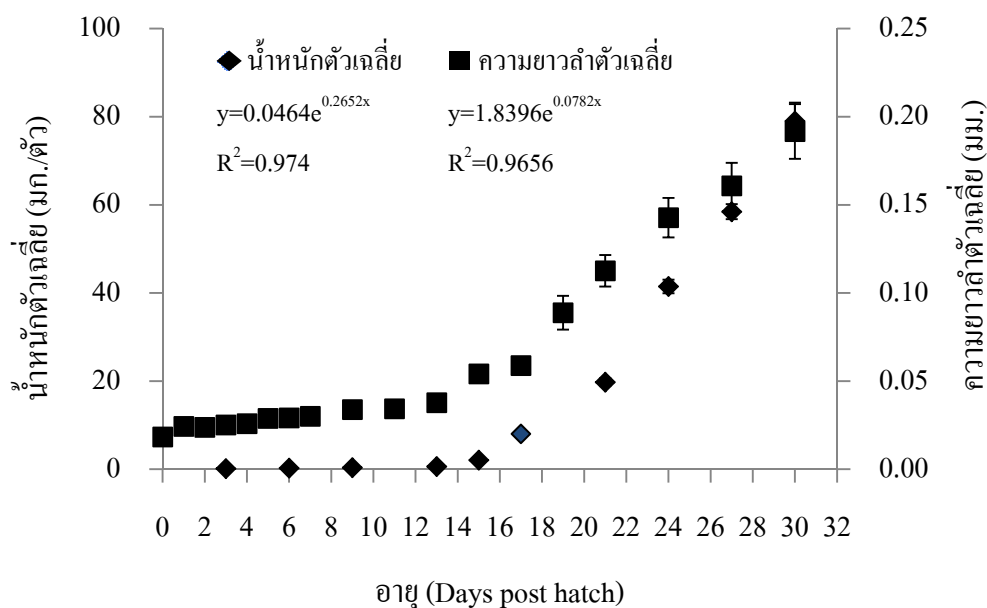
เก็บตัวอย่างลูกปลากะพงขาวเช่นเดียวกับข้อ 3.4.3.1 จำนวน 30 ตัวต่อครั้งเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างอายุและขนาดลำตัวปลา โดยวัดความยาวลำตัว (Total length, มม.) ด้วยเครื่องเวอร์เนีย (Vernier caliper) และน้ำหนักตัว (Body wet weight, มก.) ด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Satorius รุ่น Research) ของปลาทุกตัวในแต่ละเวลาของการเก็บตัวอย่าง นำมาหาค่าเฉลี่ยและทดสอบหาความสัมพันธ์ระหว่างอายุกับความยาวลำตัวเฉลี่ยและน้ำหนักตัวเฉลี่ย และศึกษาความแตกต่างของการเจริญเติบโตของปลาในแต่ละช่วงอายุ โดยการนำไปวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล (Analysis of Variance) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย Tukey's HSD Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

2.6 ผลการศึกษา

2.6.1 การเจริญเติบโต

จากการศึกษาการเจริญเติบโตของลูกปลากะพงขาวระหว่างอายุ 0-30 วันหลังฟักออกเป็น ตัว ซึ่งเลี้ยงในน้ำที่มีความเค็ม 15-30 พีพีที (ppt) อุณหภูมิ 27-29 องศาเซลเซียส พบว่า ที่อายุแรกฟัก ออกเป็นตัว มีความยาวลำตัวเฉลี่ยเท่ากับ 1.83 ± 0.29 มิลลิเมตร และเพิ่มขึ้นช้าๆ ในช่วง 13 วัน ($P > 0.05$) แต่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงอายุ 15-30 วัน ($P < 0.05$) โดยมีความสัมพันธ์ระหว่างอายุ และความยาวเฉลี่ยเป็นแบบเอ็กซ์โพเนนเชียล มีค่า $R^2 = 0.9656$

สำหรับน้ำหนักตัวเฉลี่ยของลูกปลาอายุ 3-13 วัน มีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้นช้าๆ ($P > 0.05$) และ เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงอายุ 15-30 วัน ($P < 0.05$) โดยมีความสัมพันธ์ระหว่างอายุและน้ำหนักตัว เฉลี่ยแบบเอ็กซ์โพเนนเชียล มีค่า $R^2 = 0.974$ สามารถแบ่งช่วงการเจริญเติบโตของลูกปลากะพงขาว วยอ่อนได้เป็น 2 ช่วง คือ ช่วงอายุแรกฟักออกเป็นตัว-13 วัน และ 15-30 วัน (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 การเจริญเติบโตของลูกปลากะพงขาวตั้งแต่แรกฟักออกเป็นตัว-30 วัน หลังฟักออกเป็นตัว

ตารางที่ 1 ความยาวลำตัวเฉลี่ย และน้ำหนักตัวเฉลี่ยของลูกปลา การให้อาหาร และคุณภาพน้ำ ในระบบเลี้ยงลูกปลากะพงขาวอายุแรกฟัก-30 วัน หลังฟักออกเป็นตัว (DPH¹)

อายุของ ลูกปลา (DPH)	ความยาวเฉลี่ย (มม.ต่อตัว) ³	น้ำหนักเฉลี่ย (มก.ต่อตัว) ³	ชนิดของอาหาร		คุณภาพน้ำ	
			<i>Rotifer sp.</i>	<i>Artemia sp.</i> ⁴	ความเค็ม (ppt)	อุณหภูมิ (°C)
0	1.83±0.29 ^{k2}	-	-	-	30	27
1	2.44±0.08 ^{ij}	-	-	-	30	29
2	2.37±0.35 ^{ik}	-	-	-	30	29
3	2.52±0.12 ^{ij}	0.13±0.02 ^f	25%	-	25	28
4	2.58±0.08 ^{ij}	-	50%	-	25	28
5	2.88±0.12 ^{hij}	-	75%	-	25	28
6	2.91±0.10 ^{hij}	0.26±0.00 ^f	100%	-	25	27
7	3.00±0.12 ^{hi}	-	100%	-	25	28
9	3.39±0.11 ^{gh}	0.37±0.01 ^f	100%	-	25	28
11	3.43±0.23 ^{gh}	-	100%	-	15	28
13	3.78±0.26 ^g	0.60±0.05 ^f	75%	25%	15	28
15	5.41±0.48 ^f	2.08±0.11 ^f	50%	50%	15	28
17	5.89±0.47 ^f	8.02±0.54 ^c	25%	75%	15	27
19	8.88±0.96 ^c	-	-	100%	20	27
21	11.26±0.90 ^d	19.76±0.91 ^d	-	100%	20	27
24	14.27±1.12 ^c	41.48±1.55 ^c	-	100%	20	29
27	16.08±1.30 ^b	58.45±1.71 ^b	-	100%	20	29
30	19.16±1.55 ^a	78.99±4.23 ^a	-	100%	20	29

¹DPH = Days post hatch

²ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยค่าเฉลี่ยในสคริปต์เดียวกันที่มีอักษรเหมือนกันกำกับไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (P>0.05)

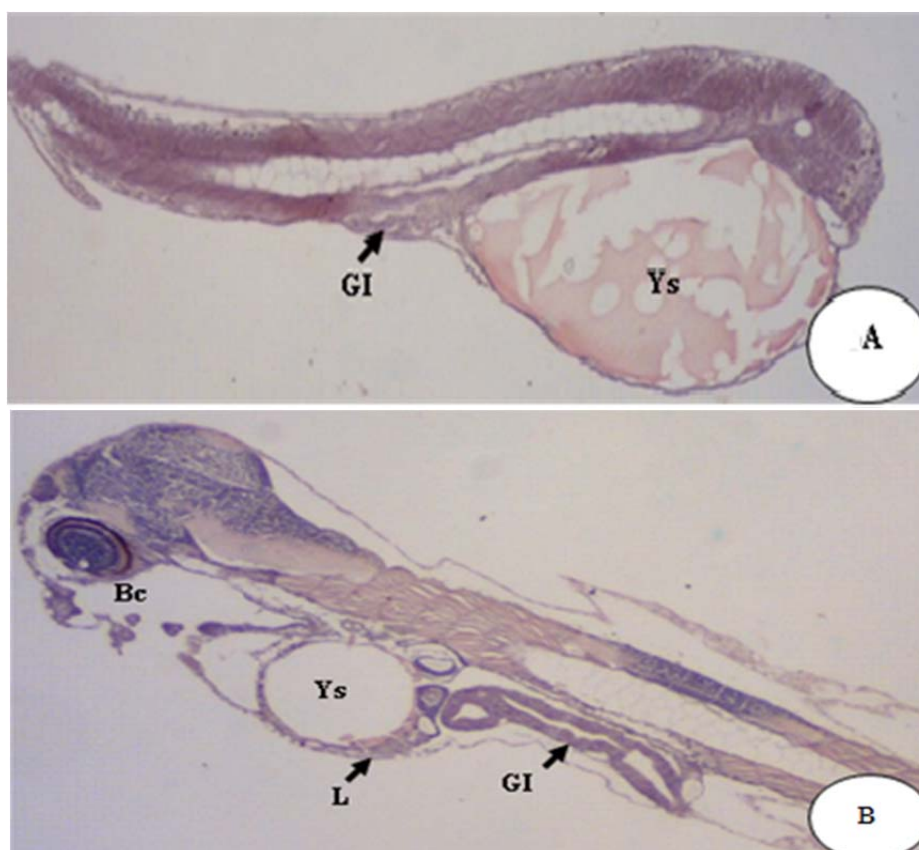
³จำนวนตัวอย่าง; ความยาวลำตัวเฉลี่ย = 30 ตัวต่อครั้ง; น้ำหนักตัวเฉลี่ย อายุ 3 และ 6 DPH = 250 ตัว, อายุ 9 DPH = 200 ตัว, อายุ 13 และ 15 DPH = 100 ตัว, อายุ 17, 21, 24, 27 และ 30 DPH = 10 ตัว

⁴อาร์ทีเมียน้ำเค็ม บริษัท Eagle Artemia Cysts (Switzerland)

2.6.2 การพัฒนาทางเนื้อเยื่อวิทยาของระบบย่อยอาหาร

1) ลูกปลาอายุแรกฟักออกเป็นตัว จะอาศัยอาหารภายในถุงสะสมอาหาร โดยพบถุงสะสมอาหาร มีลักษณะเป็นรูปรีอยู่บริเวณส่วนหน้าติดกับส่วนหัว มีความยาวเป็นครึ่งหนึ่งของลำตัว ภายในล้อมติดสีแดงของอีโอซิน มีท่อทางเดินอาหารลักษณะเป็นท่อตรงบริเวณส่วนหลังของถุงสะสมอาหาร แต่ยังไม่พบอวัยวะภายในที่เกี่ยวข้องกับระบบย่อยอาหารอื่นๆ (ภาพที่ 3A)

2) ลูกปลาอายุ 1 วัน ถุงสะสมอาหารมีขนาดเล็กลงและปริมาณไข่แดงลดลงแต่ยังไม่หมด ระยะเวลาปากยังไม่เปิดลูกปลาจึงยังไม่กินอาหารจากภายนอก ช่องปากและคอหอยเริ่มเห็นชัดเจน มีเยื่อผิวหนังเป็นแบบแบนบางเรียงตัวชั้นเดียว ท่อทางเดินอาหารมีลักษณะเริ่มโค้งงอ มีเยื่อผิวหนังเป็นแบบทรงกระบอกเรียงตัวชั้นเดียว แต่ยังไม่สามารถแยกกระเพาะอาหารและลำไส้ออกจากกันได้ชัดเจน และเริ่มพบเซลล์ตับ และตับอ่อน อยู่บริเวณใต้ถุงสะสมอาหารก่อนไปทางด้านหลัง และทวารยังไม่เปิดออก (ภาพที่ 3B)



ภาพที่ 3 ลูกปลาอายุ 0 และ 1 วัน หลังฟักออกเป็นตัว

A = ลูกปลาอายุ 0 วัน หลังฟักออกเป็นตัว

B = ระบบย่อยอาหาร ลูกปลาอายุ 1 วัน หลังฟักออกเป็นตัว

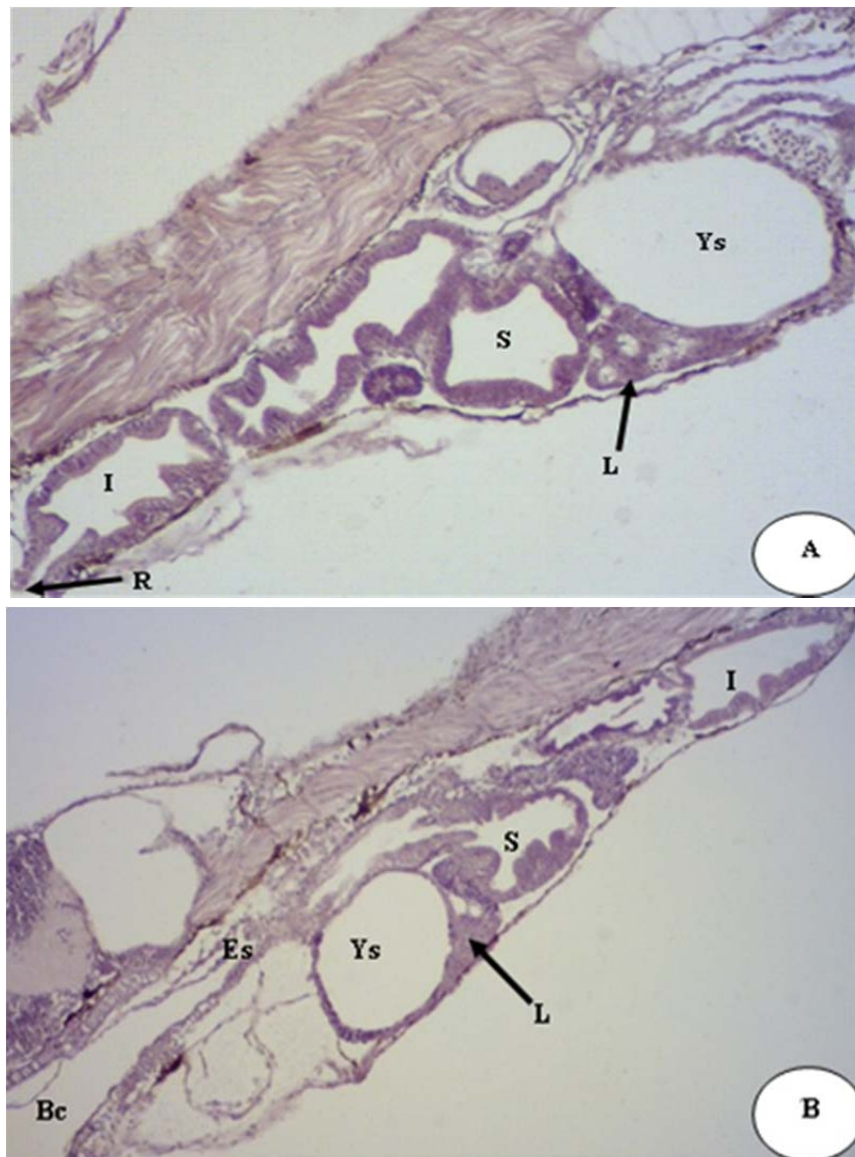
Bc = Buccal cavity, GI = Gastro-Intestinal tract, L = Liver, Ys = Yolk sac (กำลังขยาย 40x)

3) ลูกปลาอายุ 2 วัน อุณหภูมิอาหารมีขนาดเล็กมากและปริมาณไข่แดงมีน้อยมาก จนไม่พบติดสีข้อมือไอซัน เยื่อบุผิวบริเวณปาก และทวาร (Anus) แยกออกจากกัน หลอดอาหาร (Esophagus) เริ่มพบเยื่อบุผิวมีการยกตัวขึ้น สามารถแยกกระเพาะและลำไส้ออกจากกันแต่ยังไม่ชัดเจน เยื่อบุผิวมีการยกตัวขึ้นเข้าสู่ช่องว่างทางเดินอาหารเล็กน้อย เริ่มเห็นเซลล์ตับมีรูปร่างหลายเหลี่ยม มีนิวเคลียสติดสีเข้มอยู่กลางเซลล์ (ภาพที่ 4A)

4) ลูกปลาอายุ 3 วัน อุณหภูมิอาหารมีขนาดเล็กแต่ยังไม่หมด ระยะเวลาเริ่มให้โรติเฟอร์เป็นอาหารจึงพบก้อนอาหารบริเวณท่อทางเดินอาหาร หลอดอาหารเริ่มพบเยื่อบุผิวมีการยกตัวขึ้น มีเซลล์เยื่อบุผิวแบบแบนบางเรียงตัวหลายชั้น เพราะต้องสัมผัสกับอาหารจึงมีการหลุดลอกของเยื่อบุผิวจึงมีลักษณะหลายชั้นดังกล่าว และพบ Goblet cell ซึ่งเป็นเซลล์ผลิตเมือกแทรกอยู่ตามเซลล์เยื่อบุผิวของหลอดอาหารเล็กน้อย (ภาพที่ 4B)

5) ลูกปลาอายุ 4 วัน อุณหภูมิอาหารยังยุบไม่หมด บริเวณช่องปากพบลิ้นมีลักษณะเป็นแผ่น โดยมีแกนเป็นกระดูกอ่อน มีเซลล์เยื่อบุผิวแบบแบนบางเรียงตัวชั้นเดียว (ภาพที่ 5A) พบก้อนอาหารมากขึ้นแสดงว่าลูกปลาสามารถกินอาหารได้ดี สามารถเห็นกระเพาะอาหารโค้งงอเป็นรูปตัวเจ เยื่อบุผิวไม่มีการยกตัวขึ้นเนื่องจากภายในมีอาหารอยู่ภายใน และลำไส้เริ่มม้วนและเยื่อบุผิวยกตัวมากขึ้น โดยลำไส้มีเซลล์เยื่อบุผิวเป็นแบบทรงกระบอกเรียงตัวชั้นเดียว และเริ่มพบ Goblet cell บริเวณเยื่อบุผิวของลำไส้ และ Lipid vacuole ในชั้นมิวโคซา (ปลายลูกศร) พบลิ้นกั้นระหว่างกระเพาะอาหารกับลำไส้ พบเซลล์ตับอ่อน อยู่รวมกันเป็นกลุ่มแทรกอยู่ระหว่างเซลล์ตับ ซึ่งจะติดสีน้ำเงินของฮีมาทอกไซลินเข้มกว่าเซลล์ตับชัดเจน (ภาพที่ 5B)

6) ลูกปลาอายุ 5 วัน อุณหภูมิอาหารยุบหมด เริ่มพบการพัฒนาของถุงลม (Swim bladder) ใกล้บริเวณด้านบนของทางเดินอาหาร เยื่อบุผิวบริเวณกระเพาะอาหารส่วนของชั้นมิวโคซา มีการยกตัวเพิ่มมากขึ้น ยังไม่พบส่วนของชั้นมัสคิวลาริส ที่เป็นชั้นกล้ามเนื้อ เยื่อบุผิวลำไส้หนาขึ้นและมียกตัวมากขึ้นเช่นกัน พบ Goblet cell ในลำไส้มากขึ้น ตับและตับอ่อนมีขนาดใหญ่ขึ้น พบเซลล์ตับอ่อนม้วนตัวไปตามทางเดินอาหาร และพบกลุ่มเซลล์ที่เป็นต่อมไร้ท่อ เรียกว่า Islet of Langerhans ที่มีลักษณะติดสีจางในเนื้อเยื่อตับอ่อน (ปลายหัวลูกศร) (ภาพที่ 6)

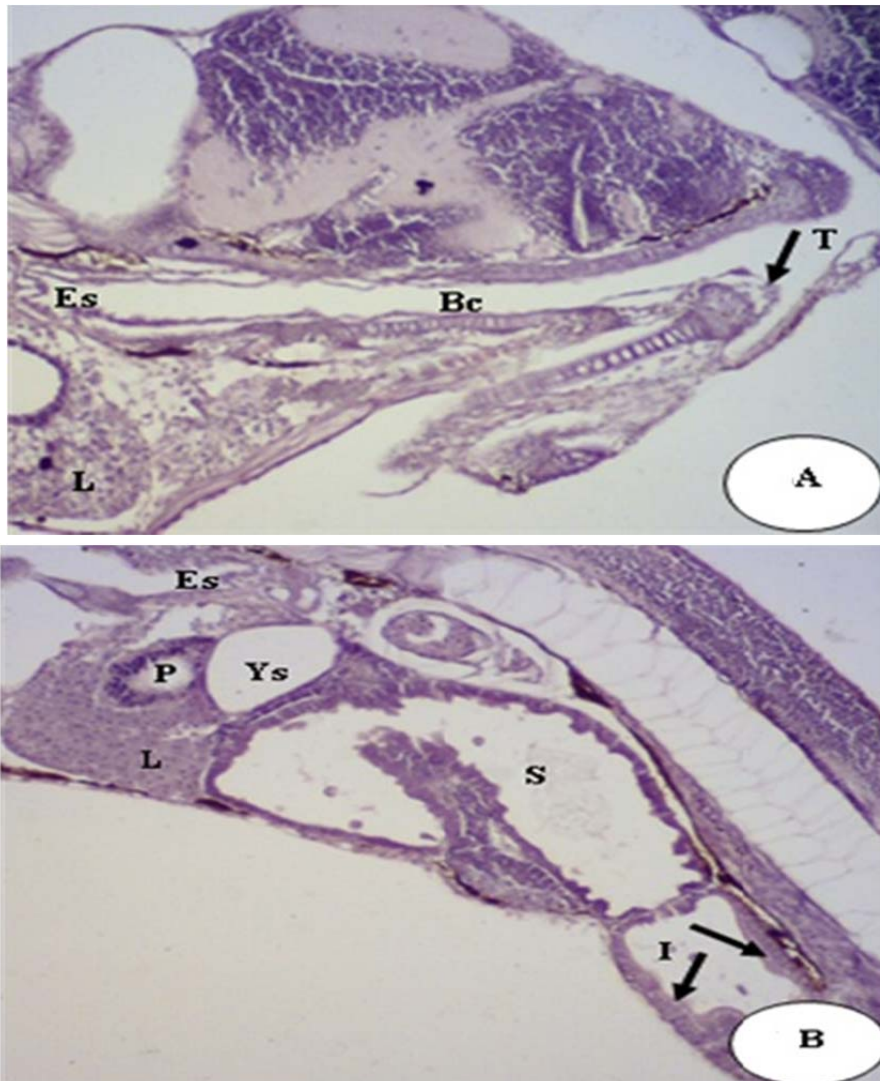


ภาพที่ 4 ระบบย่อยอาหาร ลูกปลาอายุ 2 และ 3 วัน หลังฟักออกเป็นตัว;

A = ลูกปลาอายุ 2 วัน หลังฟักออกเป็นตัว

B = ลูกปลาอายุ 3 วัน หลังฟักออกเป็นตัว

Bc = Buccal cavity, Es = Esophagus, I = Intestine, L = Liver, R = Rectum, S = Stomach, Ys = Yolk sac (กำลังขยาย 100x)



ภาพที่ 5 ระบบย่อยอาหาร ลูกปลาอายุ 4 วัน หลังฟักออกเป็นตัว

Bc = Buccal cavity, Es = Esophagus, I = Intestine, L = Liver, P = Pancreas, S = Stomach,
T = Tongue, Ys = Yolk sac (กำลังขยาย 100x)



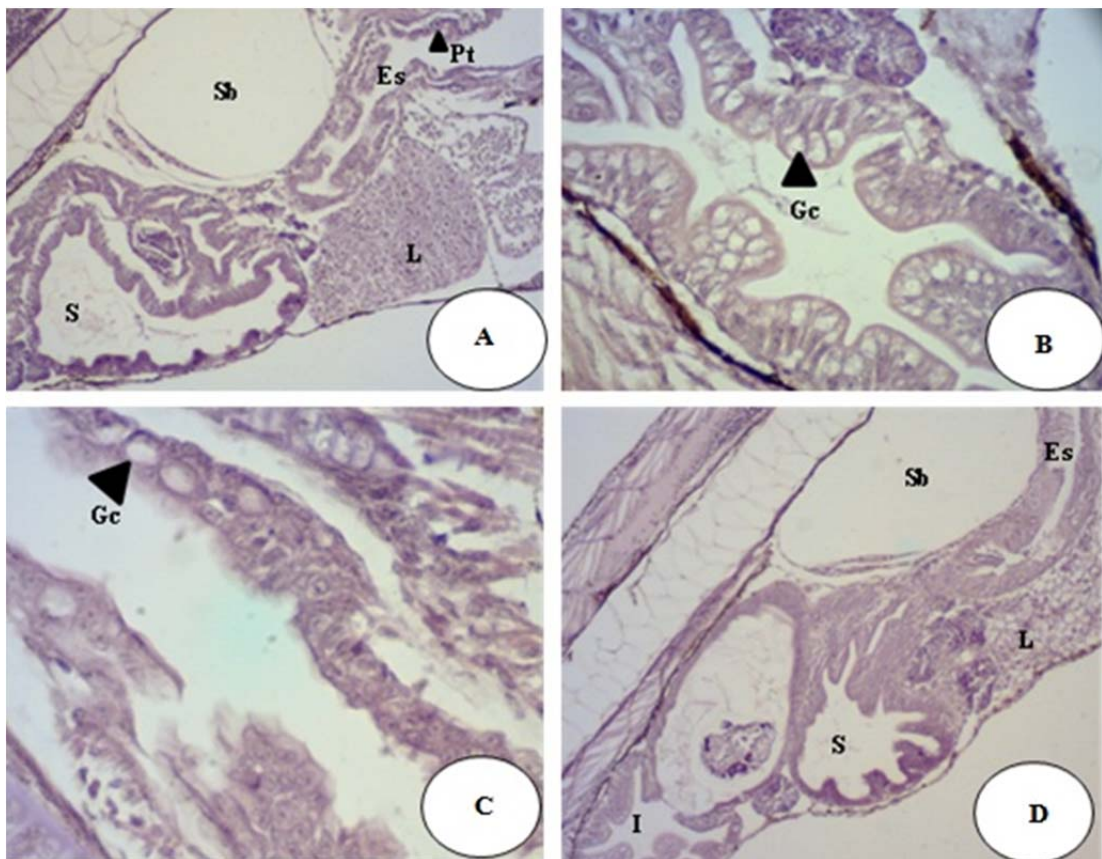
ภาพที่ 6 ระบบย่อยอาหาร ลูกปลาอายุ 5 วัน หลังฟักออกเป็นตัว

Es = Esophagus, I = Intestine, L = Liver, P = Pancreas, S = Stomach, Sb = Swim bladder
(กำลังขยาย 100x)

7) ลูกปลาอายุ 6-7 วัน เริ่มพบพื้นบริเวณคอหอยเล็กน้อย แต่ยังไม่โผล่ขึ้นพื้นเยื่อบุผิว ถุงลมมีขนาดใหญ่ขึ้น เยื่อบุผิวบริเวณหลอดอาหารมีการยกตัวมากขึ้น จึงทำให้ช่องว่างทางเดินอาหารแคบลง และมีปริมาณ Goblet cell มากขึ้น เยื่อบุผิวของหลอดอาหารส่วนปลายบริเวณที่ต่อกับกระเพาะอาหารส่วนต้นจะเปลี่ยนจากเซลล์แบบแบนบางเรียงตัวหลายชั้นเป็นไปเป็นเซลล์แบบทรงกระบอกเรียงตัวชั้นเดียวชัดเจน เริ่มพบ Brush border ที่เยื่อบุผิวลำไส้และพบ Goblet cell แทรกอยู่ระหว่างเซลล์บุผิวมากขึ้น (ภาพที่ 7A-D)

8) ลูกปลาอายุ 9-11 วัน พบพื้นบริเวณคอหอยมากขึ้น และเริ่มพบปุ่มรับรส (Taste bud) กระจายอยู่บริเวณช่องปาก และเยื่อบุผิวหลอดอาหารมีการยกตัวมากขึ้น และมีปริมาณ Goblet cell มากขึ้น ทางเดินอาหารพบการพัฒนาของชั้นซับมิวโคซาชัดเจนขึ้น โดยจะพบเส้นเลือดมาหล่อเลี้ยงบริเวณนี้ แต่ยังไม่พบชั้นมัสคิวลิสที่ชัดเจน บริเวณลำไส้พบ Goblet cell แทรกอยู่ระหว่างเซลล์บุผิวมากขึ้น (ภาพที่ 8A-B)

9) ลูกปลาอายุ 13-15 วัน พบพบบริเวณคอหอยโผล่ยื่นพื้นเยื่อผิวหนังมากขึ้น พบ Goblet cell บริเวณหลอดอาหารมีขนาดใหญ่และปริมาณมากขึ้น ถุงลมมีขนาดยาวไปด้านท้ายของลำตัว เยื่อผิวหนังบริเวณกระเพาะอาหารและลำไส้มีการยกตัวของเยื่อผิวหนังสูงขึ้น และมีความยาวและคงอไปมามากขึ้น พบ Lipid vacuole ในชั้นมิวโคซาบริเวณลำไส้มีปริมาณมากขึ้น (ปลายลูกศร) (ภาพที่ 8C) ตับและตับอ่อนมีขนาดใหญ่ขึ้นและพบเม็ดเลือดแดงแทรกอยู่ในแอ่งเลือด (Sinusoid) ของตับชัดเจน (ภาพที่ 8D)



ภาพที่ 7 ลูกปลาอายุ 6 และ 7 วัน หลังฟักออกเป็นตัว

A = หลอดอาหาร กระเพาะอาหารและตับ ลูกปลาอายุ 6 วัน หลังฟักออกเป็นตัว (กำลังขยาย 100x)

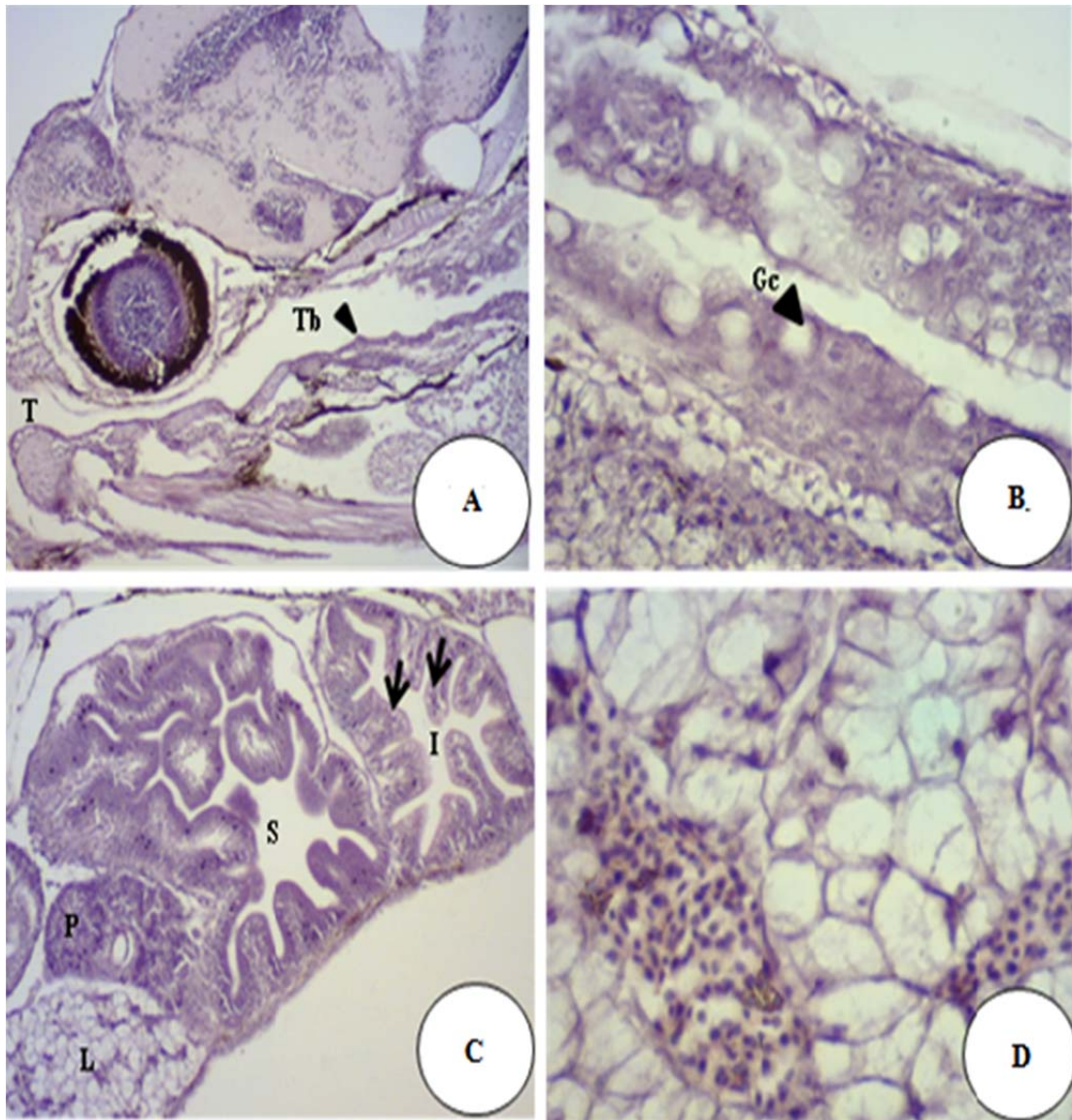
B = ลำไส้ของลูกปลาอายุ 6 วัน หลังฟักออกเป็นตัว (กำลังขยาย 400x)

C = หลอดอาหาร ลูกปลาอายุ 7 วัน หลังฟักออกเป็นตัว (กำลังขยาย 400x)

D = หลอดอาหาร กระเพาะอาหาร ตับ และลำไส้ ลูกปลาอายุ 7 วัน หลังฟักออกเป็นตัว (กำลังขยาย 100x)

Es = Esophagus, Gc = Goblet cell, I = Intestine, L = Liver, Pt = Pharyngeal teeth, S = Stomach,

Sb = Swim bladder



ภาพที่ 8 ลูกปลาอายุ 11 และ 15 วัน หลังฟักออกเป็นตัว

A = ช่องปากและคอหอย ลูกปลาอายุ 11 วัน หลังฟักออกเป็นตัว (กำลังขยาย 100x)

B = หลอดอาหารของลูกปลาอายุ 11 วัน หลังฟักออกเป็นตัว (กำลังขยาย 400x)

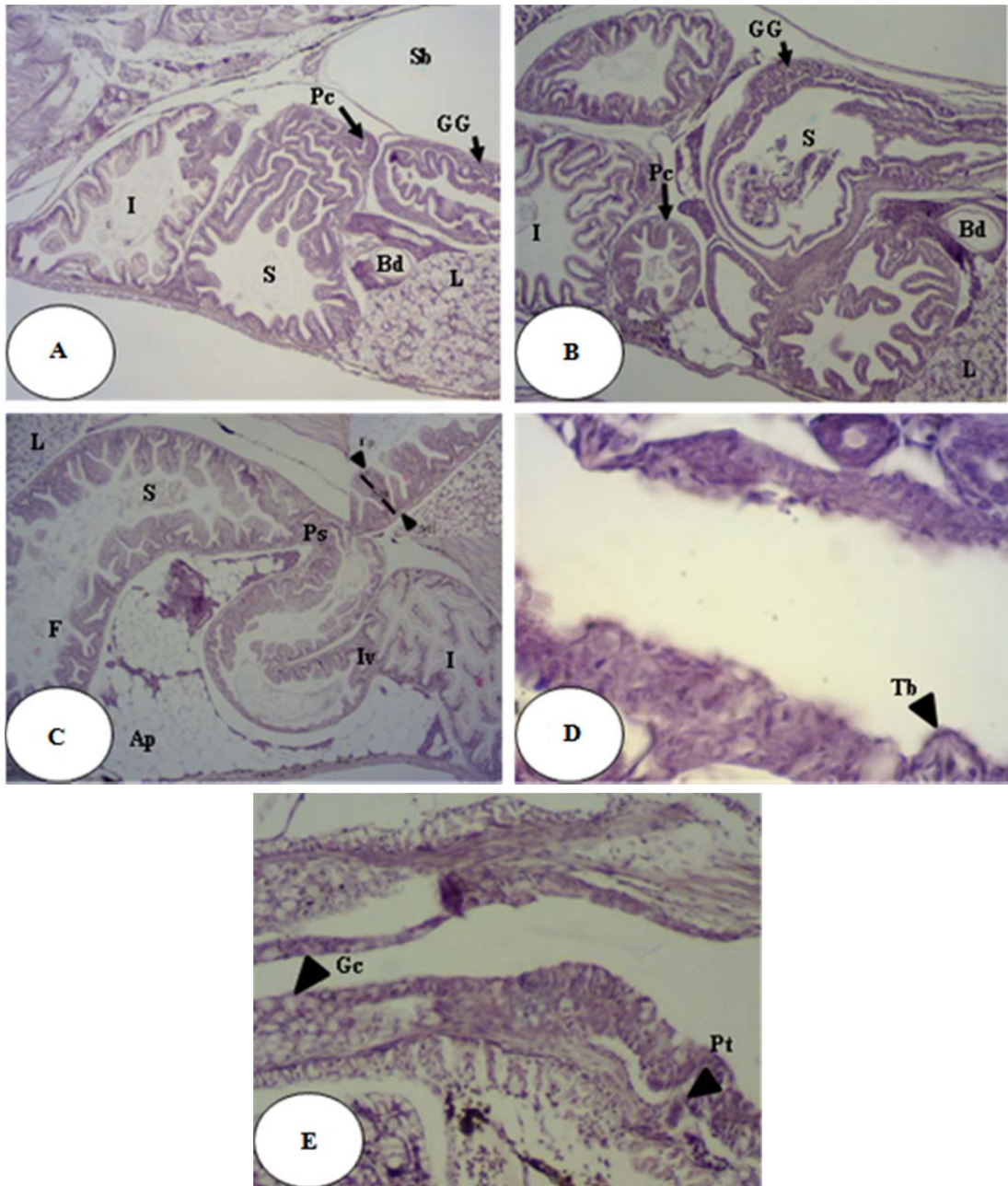
C = ทางเดินอาหารของลูกปลาอายุ 15 วัน หลังฟักออกเป็นตัว (กำลังขยาย 100x)

D = ตับของลูกปลาอายุ 15 วัน หลังฟักออกเป็นตัว (กำลังขยาย 400x)

Gc = Goblet cell, I = Intestine, L = Liver, P = Pancreas, S = Stomach, T = Tongue, Tb = Taste bud

10) ลูกปลาอายุ 17-21 วัน เริ่มพบไส้ตั้ง (Pyloric caeca) ที่มีเซลล์บุผิวเป็นแบบทรงกระบอกเรียงตัวชั้นเดียว แต่ช่องว่างทางเดินอาหารยังมีขนาดแคบ ช่วงอายุนี้ลูกปลากะพงขาววัยอ่อนมีลักษณะภายนอกและอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับระบบย่อยอาหารเหมือนตัวเต็มวัย แต่ยังไม่เต็มที่ได้ โดยจะพบชั้นต่างๆ ของทางเดินอาหาร ได้แก่ ชั้นมิวโคซา ชั้นซับมิวโคซา และมัสคิวลารีส เจริญดีขึ้นแต่มีลักษณะค่อนข้างบาง บริเวณช่องปากและหลอดอาหารพบ Goblet cell และต่อมรับรสขนาดใหญ่และปริมาณมากขึ้น พบพื้นบริเวณคอกอหอยมีขนาดยาวโผล่พื้นเยื่อบุผิวมากขึ้น และจะมีการเพิ่มขนาดและปริมาณมากขึ้นเมื่อลูกปลามีอายุมากขึ้น เริ่มพบต่อมแกสตริก เมื่อลูกปลาอายุ 17 วัน บริเวณกระเพาะอาหารตอนต้น (Fundic region) เล็กน้อยในชั้นซับมิวโคซา โดยเซลล์บุผิวมีลักษณะเป็นแบบลูกบาศก์เรียงตัวชั้นเดียว (Simple cuboidal epithelium) เมื่อลูกปลาเจริญเติบโตขึ้นก็จะมีจำนวนเพิ่มมากขึ้น พบกล้ามเนื้อหูรูด (Pyloric sphincter) กั้นระหว่างกระเพาะอาหารและลำไส้ชัดเจน บริเวณลำไส้มีการยกตัวของเซลล์เยื่อบุผิวมากขึ้นจึงทำให้เกิดเป็น Villi จำนวนมากซึ่งเป็นการเพิ่มพื้นที่ในการดูดซึมสารอาหาร และมี Intestinal valve กั้นอยู่ระหว่างลำไส้ทั้ง 2 ตอนชัดเจน นอกจากนี้จะพบท่อน้ำดี (Bile duct) บริเวณตับ และเนื้อเยื่อไขมัน (Adipose tissue) ที่เป็นส่วนของเนื้อเยื่อยึดอวัยวะภายในช่องท้อง ที่มีลักษณะเป็นเซลล์ขนาดใหญ่ที่มีนิวเคลียสแบนอยู่ขอบเซลล์ ภายในมีไซโทพลาสซึมเป็นฟิล์มบางๆ ล้อมรอบหยดไขมัน (Lipid droplet) ขนาดใหญ่ รวมตัวกันเป็นกลุ่ม (ภาพที่ 9A-E)

11) ลูกปลาอายุ 24-30 วัน เป็นลูกปลาที่มีลักษณะภายนอกและอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับระบบย่อยอาหารเหมือนตัวเต็มวัยและเจริญเต็มที่ คือ ชั้นต่างๆ ของทางเดินอาหารจะแบ่งเป็นชั้นๆ ชัดเจน ซึ่งชั้นมัสคิวลารีสสามารถแบ่งเป็น Inner circular layer และ Outer longitudinal layer ได้ชัดเจน ช่องปากและคอกอหอย มีการยกตัวของเยื่อบุผิวมากขึ้น มีต่อมรับรสขนาดใหญ่และปริมาณมากขึ้น หลอดอาหารมี Goblet cell มากขึ้น และกระเพาะอาหารสามารถแบ่งเป็นกระเพาะอาหารตอนต้นและกระเพาะอาหารตอนท้าย (Pyloric region) ได้ชัดเจน โดยบริเวณกระเพาะตอนต้นจะมีปริมาณต่อมแกสตริกมากขึ้น เยื่อบุผิวมีการยกตัวทำให้กระเพาะอาหารมีพื้นที่เพิ่มมากขึ้น ตับและตับอ่อนมีขนาดใหญ่ขึ้นตามการเจริญเติบโตของปลา (ภาพที่ 10A-F) และมี Intestinal valve กั้นระหว่างลำไส้ทั้ง 2 ส่วนชัดเจน บริเวณลำไส้พบการยกตัวของเยื่อบุผิวมากขึ้น จึงทำให้มี Villi เพิ่มมากขึ้นเช่นกัน พบมีการสะสมของ Lipid vacuole ในชั้นมิวโคซามากขึ้น (ปลายลูกศร) และพบเนื้อเยื่อไขมันบริเวณช่องท้องมากขึ้น (ภาพที่ 11A-E)



ภาพที่ 9 ลูกปลาอายุ 17, 19 และ 21 วัน หลังฟักออกเป็นตัว

A และ B = ทางเดินอาหาร ลูกปลาอายุ 17 และ 19 วัน หลังฟักออกเป็นตัว (กำลังขยาย 40x),

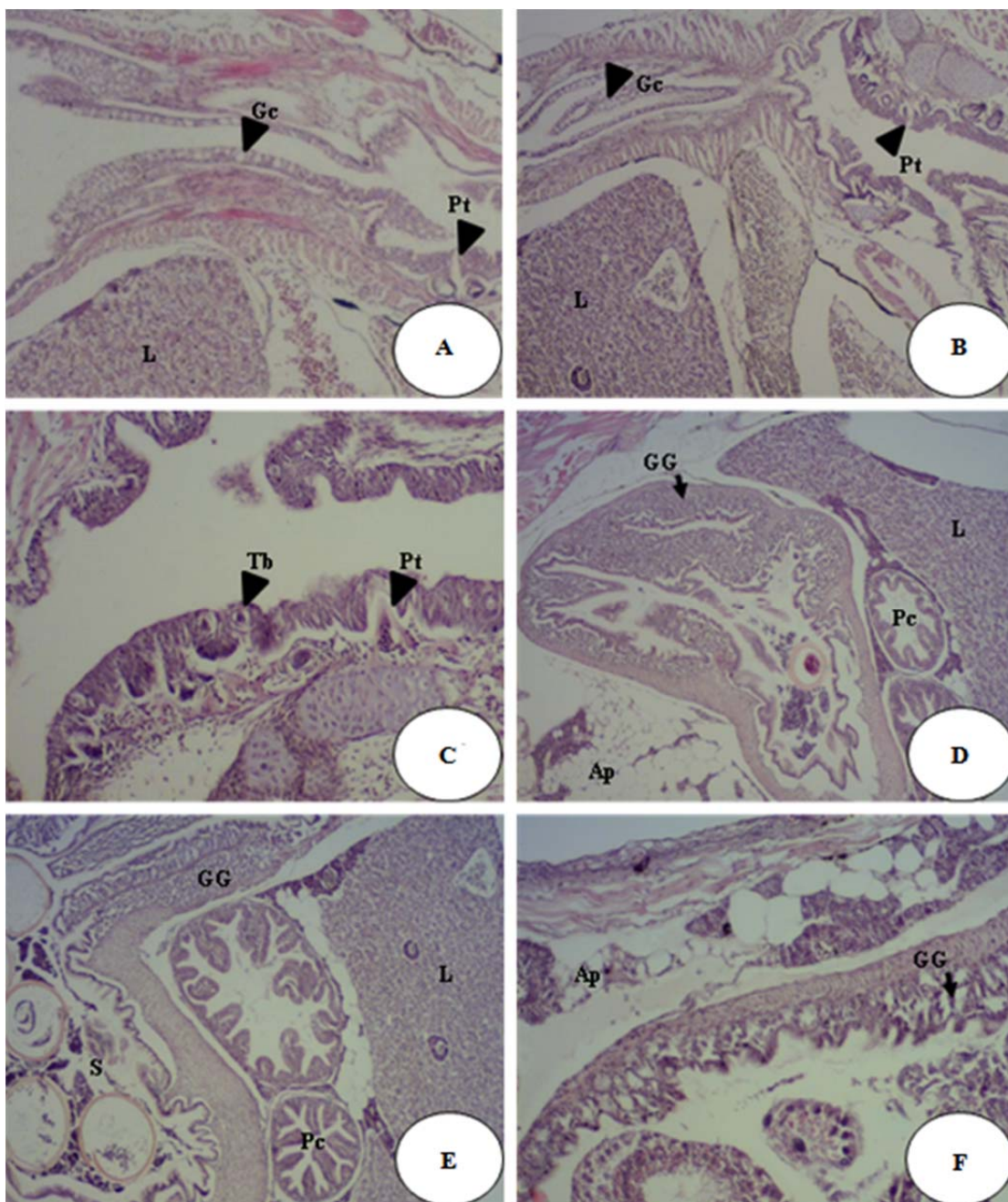
C = กระเพาะอาหารและลำไส้ ลูกปลาอายุ 21 วัน หลังฟักออกเป็นตัว (กำลังขยาย 40x),

D และ E = หลอดอาหารและช่องปาก ลูกปลาอายุ 17 และ 19 วัน หลังฟักเป็นตัว (กำลังขยาย 400x และ 100x)

Ap = Adipose tissue, Bd = Bile duct, Ep = Epithelium, F = Food, Gc = Goblet cell, GG = Gastric gland,

I = Intestine, Iv = Intestinal valve, L = Liver, Ml = Muscularis layer, Pc = Pyloric caeca, Ps = Pyloric sphincter,

Pt = Pharyngeal teeth, S = Stomach, Sb = Swim bladder, Sm = Submucosa, Tb = Taste bud

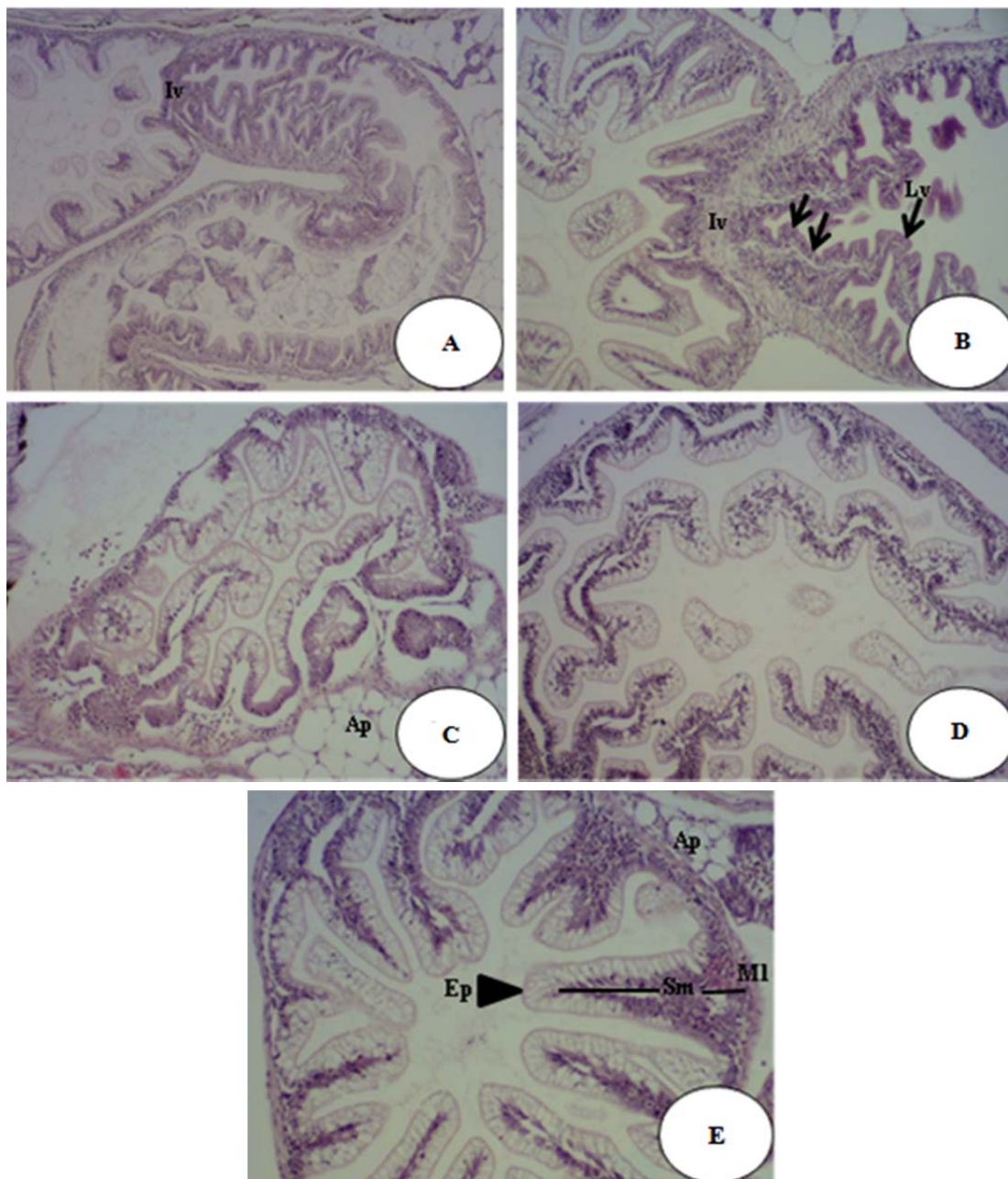


ภาพที่ 10 คอหอย หลอดอาหาร และกระเพาะอาหารตอนต้น ลูกปลาอายุ 24, 27 และ 30 วัน หลังฟักออกเป็นตัว

A, B และ C = คอหอย และหลอดอาหาร (กำลังขยาย 40x, 100x และ 100x)

D, E และ F = ทางเดินอาหารตอนต้น (กำลังขยาย 40x, 40x และ 100x)

Ap = Adipose tissue, Gc = Goblet cell, GG = Gastric gland, L = Liver, Pc = Pyloric caeca, Pt = Pharyngeal teeth, S = Stomach, Tb = Taste bud



ภาพที่ 11 ลำไส้ ลูกปลาอายุ 24, 27 และ 30 วัน หลังฟักออกเป็นตัว

A และ B = ลำไส้ตอนต้นและตอนท้าย ลูกปลาอายุ 27 และ 30 วัน หลังฟักออกเป็นตัว
(กำลังขยาย 40x และ 100x)

C, D และ E = ลำไส้ ลูกปลาอายุ 24, 27 และ 30 วัน หลังฟักออกเป็นตัว (กำลังขยาย 100x)

Ap = Adipose tissue, Ep = Epithelium, Iv = Intestinal valve, Lv = Lipid vacuole, MI = Muscularis layer,
Sm = Submucosa

จากผลการศึกษาพัฒนาการทางเนื้อเยื่อวิทยาของระบบย่อยอาหารจึงสามารถแบ่งระยะการ พัฒนาได้ 3 ระยะ คือ

ระยะที่ 1 ลูกปลากะพงขาวอายุแรกฟักออกเป็นตัว-2 วัน เป็นระยะที่ลูกปลาเพิ่งฟักออกจากไข่ มีทางเดินอาหารแบบทอตรง และได้รับอาหารสำรองจากถุงสะสมอาหาร

ระยะที่ 2 ลูกปลากะพงขาวอายุ 3-15 วัน เป็นระยะที่ปากของลูกปลาเปิดแล้ว เริ่มกินอาหารจากภายนอก และอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับระบบย่อยอาหารมีการเจริญอย่างรวดเร็ว โดยพบเยื่อผิวนบริเวณทางเดินอาหารมีการยกตัวมากขึ้น

ระยะที่ 3 ลูกปลากะพงขาวอายุ 17-30 วัน เป็นระยะที่ลูกปลามีอวัยวะในระบบย่อยอาหารสมบูรณ์ โดยเริ่มพบต่อม แกสตริก และมีการเจริญของชั้นต่างๆ บริเวณทางเดินอาหารให้มีขนาดใหญ่ขึ้นชัดเจน

2.7 วิจารณ์ผลการศึกษา

จากผลการศึกษาการเจริญเติบโตของลูกปลากะพงขาวตั้งแต่แรกฟักออกเป็นตัวถึงอายุ 30 วัน พบว่าลูกปลาที่มีความยาวลำตัวเฉลี่ยเริ่มต้นเท่ากับ 1.83 ± 0.29 มิลลิเมตร สอดคล้องกับการศึกษาของ ชลอ และคณะ (2528) และ Walford และ Lam (1993) ที่ศึกษาในลูกปลากะพงขาวตั้งแต่แรกฟักพบว่ามีความยาวเริ่มต้นเฉลี่ยเท่ากับ 1.5-1.6 มิลลิเมตร และมีความยาวใกล้เคียงกับลูกปลาเห็ดโคน (*Sillago sihama*) ลูกปลาเก๋าเสือ (*Epinephelus fuscoguttatus*) ลูกปลา Greasy grouper (*E. tauvina*) ลูกปลากะรังจุดน้ำตาล (*E. malabaricus*) และลูกปลากะบอก (*Mugil cephalus*) (สุนิตย์ และคณะ, 2540; อาคม และคณะ, 2546; Ruangpanit *et al.*, 1993; Lavens and Sorgeloos, 1996) ที่เป็นปลาทะเลทั้งสิ้น โดยลูกปลากะพงขาวมีความยาวเพิ่มขึ้นในอัตราที่สม่ำเสมอในช่วง 13 วัน ($P > 0.05$) จากนั้นจึงมีความยาวเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วระหว่างอายุ 15-30 วัน ($P < 0.05$) โดยมีความสัมพันธ์ระหว่างอายุและความยาวเฉลี่ยแบบเอ็กซ์โพเนนเชียล จึงสามารถแบ่งช่วงการเจริญเติบโตของลูกปลากะพงขาววัยอ่อนได้เป็น 2 ช่วง คือ ช่วงอายุแรกฟักออกเป็นตัว-13 วัน และ 15-30 วัน เมื่อพิจารณาร่วมกับผลการศึกษาพัฒนาการทางเนื้อเยื่อวิทยา พบว่าเมื่อลูกปลากะพงขาวอายุ 17 วันหลังฟักออกเป็นตัว ปลาจะเข้าสู่ระยะวัยรุ่นที่มีลักษณะเหมือนตัวเต็มวัย แสดงให้เห็นว่าในช่วงอายุแรกฟักออกเป็นตัว-15 วัน ระบบย่อยอาหารของลูกปลายังมีโครงสร้างไม่สมบูรณ์ เมื่อได้รับอาหารจากภายนอก ลูกปลาจึงไม่สามารถใช้ประโยชน์จากอาหารได้เต็มที่ เพราะต้องอาศัยเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่มีอยู่ในอาหารมีชีวิตช่วยในกระบวนการย่อยอาหารในทางเดินอาหาร (Dabrowski, 1979) เพียงอย่างเดียว ลูกปลาจึงมีความยาวลำตัวและน้ำหนักเพิ่มขึ้นในอัตราคงที่สม่ำเสมอ เมื่อลูกปลามีอายุ 17-30 วัน ที่มีลักษณะเหมือนปลากะพงขาวตัวเต็มวัย

ระบบย่อยอาหารมีโครงสร้างและหน้าที่สมบูรณ์สามารถย่อยและดูดซึมสารอาหารเพื่อนำไปใช้ในการเจริญเติบโตได้ดี จึงส่งผลให้ลูกปลามีความยาวลำตัวและน้ำหนักเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเป็น 2 เท่าในแต่ละ ช่วงอายุที่มากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาในลูกปลาหลายชนิด เช่น ปลากระพงยุโรป (Zambonino-Infante and Cahu, 1994) ปลา Yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) (Ma *et al.*, 2005) ปลา Flatfish brill (*Scophthalmus rhombus*) (Hachero-Cruzado *et al.*, 2009) ปลา White seabass (*Atractoscion nobilis*) (Galaviz *et al.*, 2011) และปลากดเหลือง (*Mystus nemuru*) (Srichanun *et al.*, 2012)

พัฒนาการทางเนื้อเยื่อของระบบย่อยอาหารของลูกปลากระพงขาววัยอ่อนสามารถแบ่งระยะการพัฒนาได้ 3 ระยะ ได้แก่ ระยะที่ 1 ลูกปลาแรกฟักออกเป็นตัว-2 วัน และได้รับอาหารสำรองจากถุงสะสมอาหาร ระยะที่ 2 ลูกปลากระพงขาวอายุ 3-15 วัน ได้รับอาหารจากภายนอก และระยะที่ 3 ลูกปลามีอวัยวะในระบบย่อยอาหารสมบูรณ์ และเริ่มพบต่อมแกสตริก ซึ่งลูกปลาทะเลหลายชนิดจะมีลำดับการเปลี่ยนแปลง (การเกิด) ของอวัยวะเป็นรูปแบบเดียวกันข้างต้น โดยปัจจัยที่มีผลให้เกิดความแตกต่างกัน คือ เวลาในการเกิดซึ่งจะขึ้นอยู่กับสุขภาพและคุณภาพเซลล์สืบพันธุ์ของพ่อแม่พันธุ์ปลา สภาพแวดล้อม (อุณหภูมิและคุณภาพน้ำ) ในการฟักไข่ อาหารสำรองของลูกปลาวัยอ่อนวิธีการที่เหมาะสมในการให้อาหาร และปัจจัยเสี่ยงที่มีผลต่ออัตราการรอดตาย การเจริญเติบโต การเกิดอวัยวะ และการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง เช่น ช่วงการเปลี่ยนอาหารจากการอาศัยอาหารภายในถุงสะสมอาหาร เป็นการกินอาหารจากภายนอก (Gisbert *et al.*, 2008; Zambonino-Infante *et al.*, 2008) และชนิดของอาหารที่ให้อาหารในช่วงที่ปากเปิด (First exogenous feeding) ซึ่งจะใช้อาหารมีชีวิตที่มีเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่มีผลช่วยกระตุ้นการกินอาหาร เพิ่มกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส และชักนำให้เซลล์และเนื้อเยื่อมีการพัฒนาได้ดีขึ้น (Kolkovski *et al.*, 1997; Lazo *et al.*, 2000; Engrola *et al.*, 2009)

ลูกปลากระพงขาวแรกฟักออกเป็นตัว มีระบบทางเดินอาหารและอวัยวะที่เกี่ยวข้องที่ยังไม่พัฒนา และอาศัยอาหารภายในถุงสะสมอาหาร และมีท่อทางเดินอาหารลักษณะเป็นท่อตรง เมื่อลูกปลาอายุ 1-2 วัน ถุงสะสมอาหารจึงจะเริ่มมีขนาดเล็กลงและปริมาณไข่แดงลดลงแต่ยังไม่หมดระบบทางเดินอาหารและอวัยวะที่เกี่ยวข้องเริ่มมีการพัฒนา ได้แก่ ช่องปาก คอหอย หลอดอาหาร กระเพาะ ลำไส้ ตับ และตับอ่อน เชื้อนิวคิวกปากและทวารแยกออกจากกัน พร้อมกับการกินอาหารจากภายนอก ในวันที่ 3 หลังฟักออกเป็นตัว ซึ่งสอดคล้องกับการพัฒนาระบบย่อยอาหารในลูกปลาทะเลวัยอ่อนหลายชนิด เช่น ปลาช่อน ปลานู๋ทราย ปลา Summer flounder ปลา Walleye pollock ปลา Spotted sand bass ปลา Yellow croaker และปลา White seabass (สุปราณี และคณะ, 2536; เบญจศุภลักษณ์, 2545; Bisbal and Bengtson, 1995; Porter and Thelilacker, 1999; Pena *et al.*, 2003; Mai *et al.*, 2005; Galaviz *et al.*, 2011) ซึ่งพบว่าลูกปลาแรกฟักออกจากไข่

ระบบการย่อยอาหารยังพัฒนาไม่สมบูรณ์และมีท่อทางเดินอาหารเป็นท่อตรง จะเห็นว่าการเปิดปาก และการพัฒนาของระบบย่อยอาหารของลูกปลามีความสัมพันธ์กับการยุบตัวของถุงสะสมอาหาร โดยลูกปลาจะเปิดปากและพัฒนาาระบบย่อยอาหารก่อนที่ถุงสะสมอาหารจะยุบหมด เพื่อเตรียมพร้อมสำหรับการกินอาหารจากภายนอก (Boulhic and Gabaudan, 1992; Kjorsvik and Reiersen, 1992; Segner *et al.*, 1994; Bisbal and Bengtson, 1995; Sarasquete *et al.*, 1995; Porter and Theilacker, 1999; Ribeiro *et al.*, 1999) แต่ระยะเวลาในการยุบตัวของถุงสะสมอาหารจะแตกต่างกันไปในลูกปลาแต่ละชนิดที่มีขนาดของลำตัวและถุงสะสมอาหารต่างกัน ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้พบว่าถุงสะสมอาหารจะยุบหมดในวันที่ 5

ปากของลูกปลากะพงขาวอายุแรกฟักออกเป็นตัว มีเยื่อผิวหนังบริเวณปากไว้ไม่แยกออกจากกัน และริมฝีปากเริ่มแยกออกจากกันเมื่อลูกปลาอายุ 2 วันหลังฟักออกเป็นตัว สอดคล้องกับการศึกษาในปลาหลายชนิด เช่น ปลานู๋ทราย (เบญจสุภักดิ์, 2545) ปลา Dover sole (Boulhic and Gabaudan, 1992) ปลา Yellowtail kingfish (Chen *et al.*, 2006) ปลา Flatfish brill (Hachero-Cruzado *et al.*, 2009) ซึ่งจะเร็วกว่าในปลา Summer flounder ปลา Yellow croaker และปลา White seabass เริ่มเปิดปากในวันที่ 3 (Bisbal and Bengtson, 1995; Mai *et al.*, 2005; Galaviz *et al.*, 2011) และปลา Common dentex (Santamaria *et al.*, 2004) เริ่มเปิดในวันที่ 3 ซึ่งพบว่าปากของลูกปลาจะเริ่มเปิดก่อนกินอาหารจากภายนอก โดยขึ้นอยู่กับชนิดของปลาที่มีขนาดของถุงสะสมอาหารเล็กและใหญ่แตกต่างกัน และอุณหภูมิที่ต่างกัน คือ ปลาส่วนใหญ่ที่อาศัยอยู่ในอุณหภูมิต่ำจะมีถุงสะสมอาหารขนาดใหญ่ จึงใช้เวลามากกว่าไข่แดงภายในจะหมดและทำให้ถุงสะสมอาหารยุบจนหมด

สำหรับช่องปากและคอหอยเริ่มเห็นชัดเจนเมื่อลูกปลากะพงขาวมีอายุ 1 วันหลังฟักออกเป็นตัว มีเยื่อผิวหนังเป็นแบบแบนบางเรียงตัวชั้นเดียว พบตุ่มรับรส กระจายอยู่บริเวณช่องปาก ซึ่งเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่รับความรู้สึก พบลิ้นบริเวณช่องปากมีลักษณะเป็นแผ่น โดยมีแกนเป็นกระดูกอ่อน มีเยื่อผิวหนังแบบแบนบางเรียงตัวชั้นเดียว เพราะลิ้นของปลาจะไม่เจริญและพัฒนาเหมือนสัตว์มีกระดูกสันหลังส่วนใหญ่ จึงมีโครงสร้างที่ไม่ซับซ้อน และพบฟันบริเวณคอหอยเล็กน้อย เมื่อลูกปลาอายุ 6 วันหลังฟักออกเป็นตัว แต่ยังไม่โผล่ขึ้นพ้นเยื่อผิวหนัง จนกระทั่งอายุ 9-11 วันหลังฟักออกเป็นตัว และจะมีปริมาณมากขึ้น เมื่อลูกปลาเจริญเติบโตขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในปลากินเนื้อหลายชนิด เช่น ปลาช่อน ปลานู๋ทราย ปลา Siberian sturgeon และปลา Summer flounder (สุปรานี และคณะ, 2536; เบญจสุภักดิ์, 2545; Gisbert *et al.*, 1998; Bisbal and Bengtson, 1995) จะพบฟันที่มีลักษณะเรียว และแหลมบริเวณใต้เยื่อผิวหนัง และมีขนาดใหญ่ขึ้นตามการเจริญเติบโต

หลอดอาหารของลูกปลากะพงขาววัยอ่อนจะเริ่มพัฒนาเมื่ออายุ 2 วัน โดยเยื่อผิวหนังตัวชั้นเล็กน้อย มีเซลล์แบบแบนบางเรียงตัวหลายชั้น เพราะต้องสัมผัสกับอาหารจึงมีการหลุดลอกของ

เยื่อผิวที่เกิดจากการกินอาหาร และพบ Goblet cell ซึ่งเป็นเซลล์ทำหน้าที่ผลิตเมือก (Acid glycoprotein) เพื่อเคลือบป้องกันเยื่อผิวจากการหลุดลอก และคลุกเคล้ากับอาหารที่กินเข้าไป ให้สามารถเคลื่อนที่ไปยังกระเพาะอาหารได้สะดวกขึ้น ซึ่งจะพบแทรกอยู่ตามเซลล์เยื่อผิวของหลอดอาหาร บางครั้งในปลาบางชนิดจะพบเป็นสารพวก Sulphate mucosubstance และ Carboxylate mucosubstance (Ribeiro *et al.*, 1999) ซึ่งจะพบการพัฒนาของอวัยวะดังกล่าวพร้อมกับการเปิดปาก สอดคล้องกับในปลาน้ำจืดหลาย ปลา Milkfish ปลา Summer flounder และปลา *Solea senegalensis* (เบญจสุกฤษณ์, 2545; Ferraris *et al.*, 1987; Boulhic and Gabaudan, 1992; Ribeiro *et al.*, 1999) แต่ในลูกปลา Turbot และปลา Gilthead seabream (Cousin and Baudin-Laurencin, 1985; Sarasquete *et al.*, 1995) จะพบ Goblet cell หลังจากกินอาหารจากภายนอก

กระเพาะอาหารของลูกปลากะพงขาววัยอ่อนเริ่มพัฒนาเมื่ออายุ 2 วัน แต่มีการพัฒนาให้สมบูรณ์ทั้งโครงสร้างและการทำหน้าที่ช้ากว่าวัยอื่น ๆ ซึ่งในช่วงแรกไม่สามารถแยกออกจากลำไส้ได้ชัดเจน หลังจากนั้นเมื่ออายุ 4 วัน จึงสามารถเห็นกระเพาะชัดเจนเป็นรูปตัวจ และมีการพัฒนาลึ้นก้นระหว่างกระเพาะอาหารกับลำไส้ เยื่อผิวชั้นมิวโคซา มีการยกตัวมากขึ้น จนกระทั่งเมื่อลูกปลาอายุ 17 วันหลังฟักออกเป็นตัว พบต่อมแกสตริก ที่เป็นเครื่องหมายแสดงถึงกระเพาะอาหารสามารถทำงานได้เต็มที่ (Stroband and Kroon, 1981) ซึ่งเป็นเกณฑ์ของการศึกษาการพัฒนาทางเนื้อเยื่อวิทยาที่จะบอกความแตกต่างระหว่างปลาวัยอ่อนกับวัยรุ่นได้ (Tanaka, 1971; Sarasquete *et al.*, 1995) สอดคล้องกับการศึกษาของ Walford และ Lam (1993) ที่ศึกษาการพัฒนาของระบบทางเดินอาหารและกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีนในปลากะพงขาววัยอ่อนและวัยรุ่น พบว่ากระเพาะอาหารจะสามารถทำหน้าที่ได้เต็มที่เมื่อลูกปลามีอายุ 17 วันหลังฟักออกเป็นตัว เนื่องจากตรวจพบค่ากิจกรรมของเอนไซม์เปปซินมีค่าสูงในช่วงลูกปลาอายุ 17-30 วันหลังฟักออกเป็นตัว เมื่อ พีเอช (pH) ในกระเพาะอาหารมีค่าลดลงเหลือ 3.2 แต่ให้ผลการศึกษาแตกต่างจากการศึกษาของ ชลอ และคณะ (2528) ซึ่งเริ่มพบต่อมแกสตริกบริเวณกระเพาะอาหารส่วนต้นในลูกปลากะพงขาวอายุ 20 วันหลังฟักออกเป็นตัว เนื่องจากในการศึกษากำหนดช่วงอายุในการเก็บตัวอย่างลูกปลากะพงขาวต่างกัน คือ การศึกษาในครั้งนี้แบ่งการเก็บตัวอย่างเป็น 3 ช่วง คือ ลูกปลาตั้งแต่อายุแรกฟัก-7 วัน เก็บทุกวัน อายุ 8-21 วัน เก็บทุก 2 วัน และอายุ 22-30 วัน เก็บทุก 3 วัน ตามลำดับ แต่การศึกษาของ ชลอ และคณะ (2528) เก็บตัวอย่างเมื่อลูกปลาอายุ 1-15 วันติดต่อกัน แล้วเก็บอีกครั้งเมื่อลูกปลาอายุ 20, 23 และ 27 วัน จึงทำให้ได้ผลการศึกษาที่แตกต่างกัน เพราะลูกปลาอาจมีการพัฒนาต่อมแกสตริกก่อนการเก็บตัวอย่างดังกล่าว ซึ่งในปลาแต่ละชนิดจะพบการพัฒนาของต่อมแกสตริกช้า เร็วแตกต่างกัน เช่น ปลาช่อนพบในวันที่ 3 หลังฟักออกเป็นตัว (สุปราณี และคณะ, 2536) ปลา Yellowtail kingfish พบในวันที่ 15 หลังฟักออกเป็นตัว (Chen *et al.*, 2006)

ปลา White seabass พบในวันที่ 16 หลังฟักออกเป็นตัว (Galaviz *et al.*, 2011) ซึ่งพบเร็วกว่าในปลา บู่ทรายซึ่งเริ่มพบต่อมแกสตริกในวันที่ 30 หลังฟักออกเป็นตัว ปลา Siberian sturgeon (Gisbert *et al.*, 1998) ปลา Dover sole พบในวันที่ 22 (Ribeiro *et al.*, 1999) และปลานวลจันทร์ทะเลที่พบในวันที่ 42 (Ferraris *et al.*, 1987) และปลา Summer flounder พบในวันที่ 31 (Bisbal and Bengtson, 1995) ในขณะที่ปลา Walleye pollock ยังไม่พบการพัฒนาของต่อมแกสตริกแม้จะมีอายุ 31 วัน (Porter and Theilacker, 1999) ซึ่งจากผลการศึกษาการพบเนื้อเยื่อต่อมแกสตริกจะสอดคล้องกับการพบกิจกรรมเอนไซม์เปปซินที่เกี่ยวข้องในปลาหลายชนิดที่มีการศึกษาด้วยเทคนิคทางชีวเคมีควบคู่ไปด้วย เนื่องจากต่อมแกสตริกจะประกอบด้วยเซลล์ที่สำคัญ 2 ชนิด ที่มีผลให้กระเพาะอาหารทำหน้าที่สมบูรณ์ คือ Parietal cell เป็นเซลล์ที่มีลักษณะกลมหรือรูปพีระมิด (Eosinophilia) ทำหน้าที่สร้างกรดเกลือ (HCl) เพื่อทำให้ Chief cell (Basophilia) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น Protein-secreting cell ภายในมีเอนไซม์ที่ยังทำงานไม่ได้ (Proenzyme) คือ เปปซิโนเจน (Pepsinogen) เมื่อหลั่งออกมาในกระเพาะอาหารที่มีสภาพเป็นกรด จึงถูกเปลี่ยนเป็นเอนไซม์เปปซิน (Pepsin) ที่ทำหน้าที่ได้และใช้ในการย่อยโปรตีนให้มีโมเลกุลเล็กลง (ปิยธำรงรัตน์, 2546) จึงสามารถวัดกิจกรรมเอนไซม์เปปซินดังกล่าวควบคู่กันเพื่อเป็นการยืนยันได้เช่นกัน

ลำไส้ของลูกปลากะพงขาววัยอ่อนเริ่มพัฒนาเมื่ออายุ 2 วัน โดยมีการม้วนตัวและเยื่อพิวคักตัวมากขึ้นเมื่ออายุ 4 วัน ลักษณะเซลล์เยื่อพิวคักเป็นแบบทรงกระบอกเรียงตัวชั้นเดียว ที่มี Goblet cell แทรกอยู่ระหว่างเซลล์พิวคัก โดยที่ Goblet cell จะเกิดขึ้นก่อนที่กระเพาะอาหารจะเริ่มทำงานเพื่อทำหน้าที่สร้างและหลั่งเมือกที่มีฤทธิ์เป็นเบสมาเคลือบลำไส้ป้องกันการกัดของกรดเกลือจากกระเพาะอาหาร (เบญจสุภักดิ์, 2545; Boulhic and Gabaudan, 1992; Sarasquete *et al.*, 1995) และจะเห็นลักษณะของ Brush border จำนวนมากที่เกิดจากการยกตัวของเยื่อพิวคัก เมื่อลูกปลาอายุ 6-7 วัน หลังฟักออกเป็นตัว ทำให้เกิดเป็น Villi จำนวนมาก ที่มีคุณสมบัติในการเพิ่มพื้นที่ผิวในการดูดซึมสารอาหาร เมื่อลูกปลาอายุ 21 วัน จะพบกล้ามเนื้อหูรูด กั้นระหว่างกระเพาะอาหารและลำไส้ และมี Intestinal valve กั้นระหว่างลำไส้ตอนต้นและตอนท้ายชัดเจน เพื่อป้องกันไม่ให้อาหารไหลย้อนกลับ แสดงว่าบริเวณลำไส้มีการพัฒนาให้มีขนาดและความยาวมากขึ้น นอกจากนี้ยังพบ Lipid vacuole ในชั้นมิวโคซาที่เป็นการแสดงถึงการดูดซึมไขมันในลำไส้ของลูกปลากะพงขาวเมื่ออายุ 4 วัน ซึ่งในปลาแต่ละชนิดจะพบการพัฒนาช้า เร็วต่างกัน เช่น ปลา Yellowtail kingfish (Chen *et al.*, 2006) เริ่มพบ Lipid vacuole ใน Enterocytes บริเวณลำไส้ตอนต้นเมื่ออายุ 5 วัน ในขณะที่ปลาบู่ทราย (เบญจสุภักดิ์, 2545) พบการสะสมของ Lipid vacuole เมื่อลูกปลาอายุ 17 วัน เมื่อลูกปลามีการเจริญเติบโตขึ้นก็จะพบ Lipid vacuole บริเวณลำไส้มากขึ้น ซึ่งจะสามารถพบได้ทั้งลำไส้ตอนต้นและลำไส้ตอนท้าย

การเจริญของตับ และตับอ่อน จะเริ่มพัฒนาตั้งแต่ลูกปลาปะพงขาวอายุ 1 วัน หลังฟัก ออกเป็นตัว ก่อนการกินอาหารจากภายนอก ซึ่งจะสอดคล้องกับการศึกษาในปลาหลายชนิดที่พบว่า จะมีการพัฒนาของตับเพื่อทำหน้าที่เก็บสะสมสารอาหาร ดังเคราะห์โปรตีน สร้างน้ำดี และทำลาย พิษ และตับอ่อนทำหน้าที่สร้างเอนไซม์ ตั้งแต่ลูกปลาที่มีอายุ 1 วัน หลังฟักออกเป็นตัว (วันเพ็ญ และ นงนุช, 2530; นันทนา, 2531; สุปราณี และคณะ, 2536; Cousin and Baudin-Laurencin, 1985; Govoni *et al.*, 1986; Boulhic and Gabaudan, 1992; Sarasquete *et al.*, 1995; Falk-Peterson and Hansen, 2001; Kolkovski, 2001; Chen *et al.*, 2006) จากนั้นตับและตับอ่อนจะมีขนาดใหญ่ขึ้น พบ เม็ดเลือดแดงแทรกอยู่ในแอ่งเลือด และเริ่มพบท่อน้ำดี บริเวณตับที่มีการพัฒนาไปพร้อมๆ กัน ใน ขณะเดียวกันจะพบต่อมไร้ท่อที่ทำหน้าที่ในการหลั่งฮอร์โมน เพื่อกระตุ้นการหลั่งเอนไซม์จำพวก เอนไซม์ไทโรซีน ไลซีน อาร์จินีน และทริปโตเฟน จากตับอ่อน เพื่อช่วยย่อยอาหารเมื่อกินอาหาร จากภายนอก นอกจากนี้จะพบเนื้อเยื่อไขมัน ที่เป็นส่วนของเนื้อเยื่ออวัยวะภายในช่องท้อง เมื่อ ลูกปลาที่มีอายุ 21 วัน หลังฟักออกเป็นตัว ซึ่งเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่ในการเก็บสะสมไขมันในรูป ไตรกลีเซอไรด์ (Triglyceride) ไขมันเป็นพลังงานของร่างกาย ที่มีลักษณะเป็นเซลล์ขนาดใหญ่ที่มี นิวเคลียสแบนอยู่ขอบเซลล์ ภายในมีไซโทพลาสซึมเป็นฟิล์มบางๆ ล้อมรอบหยดไขมันขนาดใหญ่ รวมตัวกันเป็นกลุ่ม (ปิยธำรงรัตน์, 2546) แสดงให้เห็นว่าลูกปลาปะพงขาวมีการสะสมไขมันไว้เป็น พลังงานสำหรับการเจริญเติบโตของร่างกายมากขึ้น

2.8 สรุปผลการศึกษา

ปลาปะพงขาวอายุ 17 วัน หลังฟักออกเป็นตัว จะมีระบบย่อยอาหารสมบูรณ์และการ เจริญเติบโตของลูกปลาในช่วงอายุ 15-30 วัน มีความยาวและน้ำหนักเฉลี่ยเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ($P < 0.05$) แสดงให้เห็นว่าปลาสามารถย่อยและดูดซึมสารอาหารไปใช้ในการเจริญเติบโตได้ดี สอดคล้องกับผลการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาที่พบอวัยวะต่างๆ ในระบบย่อยอาหาร พัฒนาทั้งด้าน โครงสร้าง ขนาดและปริมาณของเซลล์ จนกระทั่งสามารถแบ่งชั้นต่างๆ ของทางเดินอาหารได้ ชัดเจน และพบต่อมแกสตริก บริเวณกระเพาะอาหารตอนต้น ซึ่งเป็นลักษณะบ่งชี้ถึงการเจริญเป็น ปลาระยะวัยรุ่น ที่มีลักษณะของอวัยวะและการทำงานเหมือนปลาตัวเต็มวัย ดังนั้นจึงสามารถนำผล การศึกษาครั้งนี้ไปใช้ในการจัดการด้านการใช้อาหารสำเร็จรูปเพื่ออนุบาลลูกปลาปะพงขาวให้มี อัตรารอดตายสูงขึ้น และมีการเจริญเติบโตที่ดีที่สุด

บทที่ 3

การทดลองที่ 2

การศึกษาผลของชนิดสารเชื่อมประสานและระดับโปรตีนไฮโดรไลเสต จากปลาทูแขก ต่ออัตราการรอดตาย การเจริญเติบโต กิจกรรมเอนไซม์ย่อยอาหารหลัก และการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อวิทยาในปลากะพงขาววัยอ่อน

3.1 บทคัดย่อ

ศึกษาผลของชนิดสารเชื่อมประสานและระดับของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทูแขกต่อการยอมรับอาหาร อัตราการรอดตาย การเจริญเติบโต กิจกรรมเอนไซม์ย่อยอาหารหลัก และการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อวิทยาในปลากะพงขาววัยอ่อน ด้วยอาหารสำเร็จรูปเม็ดจิ๋ว (Microbound diet) ที่มีการแทนโปรตีนปลาปนด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทูแขกที่ระดับ 0, 15 และ 30 เปอร์เซ็นต์ และใช้เจลาติน และการาจีแนน เป็นสารเชื่อมประสาน กำหนดระดับโปรตีนและไขมันในอาหารใกล้เคียงกันเท่ากับ 50 และ 20 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีชุดการทดลองอ้างอิงเป็นเนื้อปลาทูสดและอาหารอนุบาลปลาทะเลทางการค้า ทดลองในปลากะพงขาววัยอ่อนอายุ 16 วัน หลังฟักเป็นตัว ที่มีน้ำหนักเริ่มต้นเฉลี่ย 0.0031 ± 0.0002 ถึง 0.0042 ± 0.0016 กรัมต่อตัว ที่ความหนาแน่น 5 ตัวต่อลิตร จำนวน 3 ซ้ำต่อชุดการทดลอง โดยให้อาหารจนอิ่มวันละ 3 มื้อ เลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าปลากะพงขาวทุกชุดการทดลองมีอัตราการรอดตายไม่แตกต่างกัน แต่ระหว่างการเลี้ยงสัปดาห์ที่ 3 ปลาที่ได้รับเนื้อปลาทูสดและอาหารอนุบาลปลาทะเลทางการค้าทยอยตายจนหมดเนื่องจากไม่ยอมรับอาหาร เมื่อสิ้นสุดการทดลองในสัปดาห์ที่ 4 พบว่า ไม่มีอิทธิพลร่วมระหว่างชนิดของสารเชื่อมประสานและระดับของโปรตีนไฮโดรไลเสต ($P > 0.05$) ต่ออัตราการรอดตาย น้ำหนักสุดท้าย น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ แต่ระดับของโปรตีนไฮโดรไลเสตมีผลต่อน้ำหนักสุดท้าย น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ โดยปลาชุดควบคุม (ระดับการแทนที่ 0 เปอร์เซ็นต์) มีค่าสูงที่สุด ไม่แตกต่างกับที่ 30 เปอร์เซ็นต์ ($P > 0.05$) แต่สูงกว่าที่ระดับ 15 เปอร์เซ็นต์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) จากผลกิจกรรมเอนไซม์ย่อยอาหารหลักพบว่ากิจกรรมเอนไซม์เปปซิน และทริปซินมีผลจากอิทธิพลร่วมระหว่างชนิดของสารเชื่อมประสานและระดับของโปรตีนไฮโดรไลเสต ($P < 0.05$) กิจกรรมเอนไซม์เปปซินในปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารที่มีโปรตีนไฮโดรไลเสตที่แทนที่โปรตีนปลาปน 30 เปอร์เซ็นต์ และใช้การาจีแนนเป็นสารเชื่อมประสานในอาหาร มีค่าสูงกว่าที่ระดับ 15 เปอร์เซ็นต์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

กิจกรรมเอนไซม์ทริปซินในปลากระพงขาวที่ได้รับอาหารที่ใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นสารเชื่อมประสาน และไม่มีคาร์โบไฮเดรตที่โปรตีนปลาปน มีค่าสูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารที่ใช้เจลาตินเป็นสารเชื่อมประสานอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส และไลเปส ไม่มีผลจากอิทธิพลร่วมระหว่างชนิดของสารเชื่อมประสานและระดับของโปรตีนไฮโดรไลเซต ($P > 0.05$) แต่ระดับของโปรตีนไฮโดรไลเซตมีผลต่อกิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส ($P < 0.05$) โดยปลาที่ได้รับอาหารที่มีการแทนที่โปรตีนไฮโดรไลเซต 30 เปอร์เซ็นต์ มีระดับของกิจกรรมต่ำที่สุด ($P < 0.05$) สำหรับการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อวิทยา พบการเพิ่มขนาดของอวัยวะ ปริมาณและขนาดของเซลล์ในเนื้อเยื่อของระบบย่อยอาหารตามการเจริญเติบโตของปลากระพงขาว ดังนั้นปลากระพงขาววัยอ่อน อายุ 16 วัน สามารถยอมรับอาหารสำเร็จรูปที่ผลิตขึ้นได้ ที่มีการแทนที่โปรตีนปลาปนด้วยโปรตีนไฮโดรไลเซตจากปลาทุแวกในอาหารได้ถึงระดับ 30 เปอร์เซ็นต์ และใช้เจลาตินเป็นสารเชื่อมประสาน โดยมีอัตราการรอดตาย การเจริญเติบโต ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีน ไม่แตกต่างจากชุดควบคุม และมีต้นทุนของสารเชื่อมประสานในการผลิตอาหารต่ำ

3.2 บทนำ

ปัจจุบันการเพาะเลี้ยงปลากระพงขาว (*Asian seabass, *Lates calcarifer**) มีความต้องการลูกพันธุ์เพื่อการเลี้ยงเป็นจำนวนมาก แต่การอนุบาลลูกปลากระพงขาววัยอ่อนตั้งแต่แรกฟักจนถึงระยะพัฒนาเป็นปลาวัยรุ่นเพื่อการจำหน่าย ส่วนใหญ่ยังใช้อาหารธรรมชาติจำพวกตัวอ่อนอาร์ทีเมียไรแดง และปลาสดเป็นอาหารอนุบาล ซึ่งต้องใช้ปริมาณมากจึงทำให้ค่าใช้จ่ายในการผลิตอาหารมีชีวิตสูง คิดเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ ของต้นทุนค่าอาหารทั้งหมด (Person-Le Ruyet *et al.*, 1993) นอกจากนี้ยังไม่สามารถควบคุมคุณค่าทางโภชนาการในอาหารมีชีวิตให้คงที่ และอาจเกิดเชื้อแบคทีเรียในขั้นตอนการผลิต ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคในลูกปลาด้วย (Langdon, 2003) ดังนั้นการพัฒนาอาหารเม็ดสำเร็จรูปสำหรับการอนุบาลลูกปลากระพงขาววัยอ่อนจึงมีความสำคัญต่อการพัฒนาการเพาะเลี้ยงปลากระพงขาว

อาหารสำเร็จรูปขนาดเล็ก ที่ใช้ในการอนุบาลลูกปลาวัยอ่อนจะต้องมีขนาดเล็กเหมาะสมกับขนาดปากของลูกปลา และมีคุณสมบัติที่ปลาชอบรับประทานได้ดี ซึ่งอาหารลูกปลาวัยอ่อนส่วนใหญ่จะมีคุณค่าทางโภชนาการสูง และมีราคาค่อนข้างแพงเพราะต้องใช้กรรมวิธีและเทคโนโลยีที่มีต้นทุนการผลิตสูง ซึ่งมีทั้งหมด 3 รูปแบบ (Person-Le Ruyet, 1989) ได้แก่ อาหารแผ่น มักจะนิยมใช้ในการผลิตอาหารสำหรับปลาสวยงาม และสัตว์น้ำที่กินอาหารแบบกรองกิน อาหารเม็ดจืดที่มีสารเชื่อมประสาน จะใช้สารเชื่อมประสาน ที่เป็นสารประเภทโปรตีน หรือแป้งที่เป็นส่วนประกอบในอาหาร หรือสารที่มีคุณสมบัติเฉพาะใช้เป็นสารเชื่อมประสานเพียงอย่างเดียว เช่น ซีน อัลจินท

วุ้น การาจีแนน และเจลาติน ทำหน้าที่ช่วยให้ส่วนประกอบของอาหารทั้งหมดเกาะตัวกันดีขึ้น โดยปลาแต่ละชนิดมีความสามารถในการใช้สารเชื่อมประสานแต่ละชนิดได้แตกต่างกัน เช่น Partridge และ Southgate (1999) พบว่าปลากะพงขาว (*L. calcarifer*) วัยอ่อน สามารถใช้เจลาตินและคาร์ราจีแนนได้ดี ที่ระดับ 2-3 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งของอาหาร แต่ไม่เหมาะสมสำหรับอาหารอนุบาลลูกปลา White sturgeon (*Acipenser transmontanus*) และปลา Walleye (*Stizostedion vitreum*) เนื่องจากมีประสิทธิภาพการย่อยและการยอมรับอาหารได้ต่ำ (Gawlicka *et al.*, 1996; Guthrie *et al.*, 2000) เป็นต้น ส่วนอาหารเคลือบเม็ดจิว จะใช้สารเคลือบผิวเม็ดอาหารให้มีการละลายในน้ำช้าลง เช่น โปรตีนที่มีโครงสร้างเชื่อมต่อกัน แคลเซียมอัลจิเนต และไขมัน เป็นต้น นอกจากนี้ปัจจัยที่สำคัญต่อการผลิตอาหารสำหรับลูกปลาวัยอ่อนให้ประสบความสำเร็จ คือ ชนิดและประเภทวัตถุดิบโปรตีนในอาหาร ซึ่งจะประกอบด้วยแหล่งโปรตีนจากปลาป่นเป็นหลัก แต่เนื่องจากปลาป่นเป็นแหล่งโปรตีนที่กำลังขาดแคลนและมีคุณภาพต่ำลง จึงมีการนำวัตถุดิบตัวเลือกอื่นมาแทนที่เพื่อลดการใช้ปลาป่น สำหรับการผลิตอาหารลูกปลาวัยอ่อนนิยมใช้โปรตีนไฮโดรไลเสต เนื่องจากเป็นผลิตภัณฑ์ที่ผ่านการย่อยด้วยสารเคมีหรือเอนไซม์กลุ่มโปรติเอสที่จะได้ผลิตภัณฑ์ที่ประกอบด้วยเปปไทด์สายสั้นๆ ช่วยให้ลูกปลาสามารถดูดซึมสารอาหารได้ง่ายขึ้น (Carvalho *et al.*, 1997; Zambonino-Infante *et al.*, 1997; Cahu *et al.*, 1999; Kolkovski and Tandler, 2000) เช่น Kolkovski และ Tandler (2000) ศึกษาการใช้โปรตีนไฮโดรไลเสตจากหมึกเป็นแหล่งโปรตีนในอาหารปลากะพงแดง (*Sparus aurata*) วัยอ่อน พบว่าสามารถใช้ในอาหารร่วมกับโปรตีนจากหมึกป่นได้ดีที่ระดับ 50 เปอร์เซ็นต์ โดยไม่ส่งผลกระทบต่ออัตราการรอดตาย Cahu (1998) ศึกษาการใช้โปรตีนไฮโดรไลเสตร่วมกับยีสต์แทนที่โปรตีนจากปลาป่นในปลากะพงยุโรป (*Dicentrarchus labrax*) และปลาไน (*Cyprinus carpio*) วัยอ่อน พบว่าปลาไม่อัตราการรอดตายสูงกว่าการใช้โปรตีนเข้มข้นจากถั่วเหลืองและยีสต์ และการใช้ปลาป่นอย่างเดียว ส่วนในปลาไนวัยอ่อน พบว่าปลาสามารถใช้โปรตีนไฮโดรไลเสตร่วมกับยีสต์แทนที่โปรตีนปลาป่นในอาหาร โดยมีการเจริญเติบโตและอัตราการรอดตายสูงสุด และการศึกษาของ Cahu (1999) พบว่าปลากะพงยุโรปวัยอ่อนที่ได้รับอาหารที่ใช้โปรตีนไฮโดรไลเสตแทนที่โปรตีนปลาป่นที่ระดับ 25 เปอร์เซ็นต์ ให้การเจริญเติบโตไม่แตกต่างปลาชุดควบคุม และมีอัตราการรอดตายสูงกว่าชุดควบคุม

ดังนั้นการศึกษาและพัฒนาอาหารสำเร็จรูปสำหรับลูกปลากะพงขาววัยอ่อน เพื่อสามารถนำมาทดแทนอาหารธรรมชาติบางส่วน โดยลูกปลาสามารถกิน ย่อยและดูดซึมสารอาหารไปใช้ในการเจริญเติบโตได้เต็มที่ และมีการสูญเสียสารอาหาร (Leaching) ในน้ำน้อยที่สุด จะช่วยส่งเสริมให้การเพาะเลี้ยงลูกปลาทะเลตามโรงเพาะพันธุ์ทั่วไปประสบผลสำเร็จและมีความยั่งยืนยิ่งขึ้น

3.3 วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาชนิดของสารเชื่อมประสานที่เหมาะสมสำหรับผลิตอาหารอนุบาลปลากะพงขาว
2. เพื่อศึกษาระดับของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุแวกที่เหมาะสมต่อการเป็นแหล่งโปรตีนในอาหารสำหรับปลากะพงขาว ที่สามารถนำมาใช้ทดแทนอาหารธรรมชาติที่มีชีวิตได้

3.4 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการศึกษา

3.4.1 การผลิต และวิเคราะห์ระดับการย่อยสลาย ปริมาณกรดอะมิโนอิสระ และน้ำหนัก

โมเลกุลของเปปไทด์ ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุแวก

ปลาทุแวก (Round scad mackerel) สดทั้งตัวจากตลาดนำมาล้างด้วยน้ำสะอาด แล้วตัดแยกหัวปลาเพื่อนำมาสับให้ละเอียดก่อนนำไปบดรวมกันกับส่วนอื่นด้วยเครื่องบดเนื้ออีกครั้ง จากนั้นบรรจุใส่ถุงโพลีเอทิลีนประมาณ 100 กรัมต่อถุง และนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ระหว่างรอการนำมาใช้

1) การผลิตและทำแห้งโปรตีนไฮโดรไลเสต

ผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสต โดยวิธีที่ดัดแปลงจาก Thiansilakul (2006) โดยชั่งน้ำหนักปลาทุแวกบดละเอียดผสมกับน้ำกลั่นฆ่าเชื้ออัตราส่วน 1:2 (w/v) ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่น (Braun, MR 400 HC MultiQuick, UK) ปรับพีเอชเท่ากับ 8 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เติมเอนไซม์อัลคาเลส (Sigma. EC No. 232, Denmark) ปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ (w/w) จากนั้นนำไปย่อยสลายที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ด้วยเครื่องเขย่า หยุดการย่อยสลายที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที นำไปกรองด้วยผ้าขาวเพื่อแยกเกล็ด และกระดุกปลาออกจากสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสต จากนั้นนำมาทำแห้งโดยการนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนกระทั่งน้ำระเหยออกจนหมด แล้วนำไปบดให้ละเอียด บรรจุใส่ถุงโพลีเอทิลีนและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ ความชื้น โปรตีน ไบโอมิน และเถ้า (AOAC, 1990)

2) การวิเคราะห์ระดับการย่อยสลาย (Degree of hydrolysate, DH)

วิเคราะห์ระดับการย่อยสลายตามวิธีการของ Benjakul และ Morrissey (1997) โดยดูดตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเสตที่เวลา 0 และ 60 นาที ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมใน 2 เปอร์เซ็นต์ SDS (Sodium dodecyl sulfate) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร นำหลอดไปแช่ที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ตั้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้องประมาณ 27 ± 1 องศาเซลเซียส จากนั้นนำตัวอย่างมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ ดูดตัวอย่างที่เจือจางแล้วปริมาตร 125 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองเติม 0.2125 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate buffer พีเอช 8.2) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

และ 0.01 เปอร์เซ็นต์ TNBS (Trinitrobenzene sulfonic acid) 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ในที่มืด แล้วเติม 0.1 โมลาร์ โซเดียมซัลไฟท์ (Sodium sulfite, Na_2SO_3) ตั้งที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร ค่าที่ได้เทียบกับกราฟมาตรฐานของ L-leucine เป็นปริมาณกรดอะมิโนในตัวอย่าง และนำไปคำนวณค่าระดับการย่อยจากสูตร

$$\text{DH (\%)} = [(L_t - L_0) / (L_{\text{max}} - L_0)] \times 100$$

เมื่อ L_t = ปริมาณกรดอะมิโนที่ปลดปล่อย ที่เวลา 60 นาที

L_0 = ปริมาณกรดอะมิโนเริ่มต้นในตัวอย่างปลาทุแยกบด ที่เวลา 0 นาที

L_{max} = ปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดในตัวอย่างปลาทุแยกบดย่อยด้วยกรดเกลือเข้มข้น (6 N HCl) ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

3) การวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนอิสระ

วิเคราะห์โดยใช้ High performance liquid chromatography (HPLC) ตามวิธีการของ Lindroth และ Mopper (1979) อ้างโดย Flynn (1988) โดยละลายไฮโดรไลเสตที่ผ่านการทำแห้งแล้วด้วย 0.05 โมลาร์ โซเดียมอะซีเตทบัฟเฟอร์ (Merck, Darmstadt, Germany) พีเอช 5.5 นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 7840×g นาน 10 นาที (KUBOTA 3500, Tokyo, Japan) แยกโดยใช้เครื่อง HPLC ด้วยคอลัมน์ NovaPak C18 (Water, Milford, MA, USA) และนำตัวอย่างมา Derivatization ด้วยวิธี OPA (O-phthalaldehyde) ใช้ SIL-9A เป็นตัวฉีดตัวอย่าง LC-9A เป็น Liquid Chromatograph และ RF-530 Fluorescence (Shimadzu Corporation, Japan) เป็นตัวตรวจวัด

4) การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของเปปไทด์

เจลฟิльтраชัน (Gel filtration) เป็นวิธีการที่ใช้ในการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของเปปไทด์ โดยละลายไฮโดรไลเสต 10 มิลลิกรัม ด้วย 0.05 โมลาร์ โซเดียมอะซีเตทบัฟเฟอร์ (Merck, Darmstadt, Germany) พีเอช 5.5 นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 7840×g นาน 10 นาที (KUBOTA 3500, Tokyo, Japan) แยกโดยใช้เครื่อง FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) ผ่านคอลัมน์ Superdex™ peptide 10/300 GL (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) คำนวณน้ำหนักโมเลกุลของเปปไทด์และเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ไซโตโครมซี (Cytochrome c, $M_w = 12,384$) อโปรตีนิน (Aprotinin, $M_w = 6512$) และวิตามินบี 12 (Vitamin B12, $M_w = 1355$) (Sigma Chemical, MO, USA) รายงานผลเป็นเปอร์เซ็นต์ (Slizyte *et al.*, 2005)

3.4.2 การศึกษาระดับของโปรตีนไฮโดรไลสได้จากปลาทุแวก และชนิดของสารเชื่อมประสานในอาหารปลากะพงขาว

1) แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design, CRD) โดยจัดชุดการทดลองแบบแฟกทอเรียล 3×2 ประกอบด้วย 2 ปัจจัย คือ ระดับของโปรตีนไฮโดรไลสได้จากปลาทุแวกในอาหาร 3 ระดับ คือ 0, 15 และ 30 เปอร์เซ็นต์ และสารเชื่อมประสาน 2 ชนิด ได้แก่ เจลาติน และคาราจีแนน ที่ระดับ 3 เปอร์เซ็นต์ มีชุดการทดลองอ้างอิงเป็นอาหารเนื้อปลาทุสด และอาหารอนุบาลปลาทะเลทางการค้า (Commercial diet, CMD) ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งนครศรีธรรมราช รวม 8 ชุดการทดลองๆ ละ 3 ซ้ำ ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 เนื้อปลาทุสด

ชุดการทดลองที่ 2 อาหารอนุบาลปลาทะเลทางการค้า

ชุดการทดลองที่ 3 อาหารที่มีเจลาตินเชื่อมประสาน+โปรตีนไฮโดรไลส 0 เปอร์เซ็นต์
(G0)

ชุดการทดลองที่ 4 อาหารที่มีเจลาตินเชื่อมประสาน+โปรตีนไฮโดรไลส 15 เปอร์เซ็นต์
(G15)

ชุดการทดลองที่ 5 อาหารที่มีเจลาตินเชื่อมประสาน+โปรตีนไฮโดรไลส 30 เปอร์เซ็นต์
(G30)

ชุดการทดลองที่ 6 อาหารที่มีคาราจีแนนเชื่อมประสาน+โปรตีนไฮโดรไลส 0
เปอร์เซ็นต์ (C0)

ชุดการทดลองที่ 7 อาหารที่มีคาราจีแนนเชื่อมประสาน+โปรตีนไฮโดรไลส 15
เปอร์เซ็นต์ (C15)

ชุดการทดลองที่ 8 อาหารที่มีคาราจีแนนเชื่อมประสาน+โปรตีนไฮโดรไลส 30
เปอร์เซ็นต์ (C30)

2) การเตรียมอาหารทดลอง

ผลิตอาหารสำเร็จรูปเม็ดจืดที่มีระดับโปรตีน 50 เปอร์เซ็นต์ และไขมัน 20 เปอร์เซ็นต์ โดยมีชุดการทดลองอ้างอิงเป็นอาหารเนื้อปลาทุสด และอาหารอนุบาลปลาทะเลทางการค้า (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-1.0 มม.) (ชุดการทดลองที่ 1 และ 2) ชุดการทดลองที่ 3-5 มีเจลาตินเป็นสารเชื่อมประสาน ที่มีโปรตีนไฮโดรไลสได้จากปลาทุแวกแทนที่โปรตีนจากปลาป่นที่ระดับ 0, 15 และ

30 เปอร์เซ็นต์ และชุดการทดลองที่ 6-8 มีคาร์บอนเป็นสารเชื่อมประสาน ที่มีโปรตีนไฮโดรไลสได้จากปลาทุกประเภทที่โปรตีนจากปลาป่นที่ระดับ 0, 15 และ 30 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3)

บดแล้วร่อนวัตถุดิบอาหารด้วยตะแกรงร่อนขนาด 125 ไมโครเมตร ซึ่งส่วนผสมตามปริมาณดังแสดงในตารางที่ 3 นำมาผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมอาหาร (Krupps, F417 PowerMix, France) 15 นาที เติมน้ำมันและเลซิดินผสมต่อ 15 นาที จากนั้นค่อย ๆ เติมน้ำจนอาหารสามารถจับตัวเป็นก้อนเล็กน้อย ผสมต่อ 10 นาที เมื่อวัตถุดิบอาหารทั้งหมดผสมเข้ากันดี จึงนำไปกดผ่านตะแกรงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 มิลลิเมตร จากนั้นจึงนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนแห้ง และนำมาร่อนแยกขนาดด้วยตะแกรงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 และ 1 มิลลิเมตร แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3) ระบบเลี้ยง

ตู้ทดลองที่ใช้มีขนาด 12×16×14 นิ้ว โดยใช้น้ำจืดที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยผงคลอรีนความเข้มข้น 20 พีพีเอ็ม (ppm) อย่างน้อย 2 วัน แล้วกำจัดด้วยโซเดียมไทโอซัลเฟต (Sodium thiosulfate) และการให้อากาศ เมื่อน้ำสะอาดและปราศจากคลอรีนแล้วจึงนำไปใส่ตู้ทดลอง ที่มีการให้อากาศตลอดเวลา ตรวจวัดคุณภาพน้ำตลอดการทดลอง ได้แก่ อุณหภูมิด้วยเทอร์โมมิเตอร์ออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (Dissolved oxygen, DO) ด้วยเครื่องวัด (HANNA รุ่น HI9147-04, Romania) และพีเอชด้วยเครื่องวัด (Mettler toledo, Seven easy) ปริมาณแอมโมเนียและไนโตรที่ด้วยชุดทดสอบ (Aqua-VBC, Thailand)

ตารางที่ 2 องค์ประกอบทางโภชนาการของวัตถุดิบอาหาร

วัตถุดิบ	องค์ประกอบทางโภชนาการ (เปอร์เซ็นต์)			
	โปรตีน	ไขมัน	เถ้า	ความชื้น
ปลาป่น	69.81±0.11	9.32±0.45	5.00±0.21	17.82±0.24
หมึกป่น	62.54±0.39	11.85±1.41	3.73±0.11	11.17±0.30
คาร์บอน	1.78±0.23	0.66±0.01	-	-
เจลาติน	96.16±0.19	0.33±0.23	-	-

ตารางที่ 3 องค์ประกอบของอาหารทดลองที่ใช้สารเชื่อมประสาน 2 ชนิด ที่มีการแทนที่โปรตีนปลาปนด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาหูแฮกปนที่ระดับต่าง ๆ (กรัมต่ออาหาร 100 กรัม)

วัตถุดิบ	สูตรอาหาร					
	G0 ¹	G15	G30	C0	C15	C30
ปลาปน	60.75	51.64	42.53	64.40	54.75	45.08
หมึกปน	7.53	7.53	7.53	7.98	7.98	7.98
โปรตีนไฮโดรไลเสต	0	7.81	15.63	0	8.28	16.57
สารเชื่อมประสาน	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
เด็กซ์ตริน	8.80	9.50	10.19	5.10	5.87	6.55
น้ำมันปลา	12.50	13.10	13.70	12.10	12.70	13.40
เลซิทิน	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
วิตามินซี	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
วิตามินรวม ²	1.20	1.20	1.20	1.20	1.20	1.20
แร่ธาตุรวม ³	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00
NaCl	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
บีเอสที	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
ปริมาณรวม	100	100	100	100	100	100

¹G = Gelatin และ C = Carrageenan และระดับโปรตีนไฮโดรไลเสตปน

²วิตามินรวม ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท ไทยยูเนียน ฟีดมิลล์ จำกัด

³แร่ธาตุรวม (กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม): CaHPO₄ 8, NaH₂PO₄ · 2H₂O 15, KH₂PO₄ 10, KCl 5

4) การเตรียมปลาทดลอง

ปลากระพงขาววัยอ่อนอายุ 9 วัน หลังฟักออกเป็นตัว ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งสตูล จ.สตูล จำนวน 20,000 ตัว นำมาอนุบาลในถังไฟเบอร์ขนาด 1 ตัน ด้วยอาร์ทีเมียและปรับลดความเค็มของน้ำจนเป็น 0 พีพีที (ppt) ภายในเวลา 6 วัน จนกระทั่งลูกปลาอายุ 16 วัน หลังฟักออกเป็นตัว (เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1) จากนั้นจึงคัดปลาขนาดใกล้เคียงกัน และชั่งน้ำหนัก ใส่ตู้ทดลองที่ความหนาแน่น 5 ตัวต่อลิตร จำนวน 150 ตัวต่อตู้ วัดความยาวลำตัวเฉลี่ย ความกว้างของช่องปาก (Mouth gap, มม.) และเก็บตัวอย่างปลาก่อนทดลอง เพื่อศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เปปซิน ทริปซิน อะไมเลส และไลเปส และการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อวิทยา

3.4.3 การศึกษาคุณสมบัติของอาหารทดลอง

1) การศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพ

คู่มืออาหารสำเร็จรูปทางการค้า และอาหารทดลอง เพื่อศึกษาความคงตัวของเม็ดอาหาร (Pellet stability) (Hasting and Higgs, 1978) โดยชั่งน้ำหนักอาหารประมาณ 10 กรัม (WO) ใส่ในถุงผ้าที่สามารถเคลื่อนไหวได้อิสระ นำไปใส่ตู้ทดลองและให้อากาศเป็นเวลา 10 นาที (ดังสภาพการทดลอง) เก็บตัวอย่างใส่ถาดฟอยด์แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นในโถสุญญากาศ นำมาชั่งน้ำหนัก (WT) เพื่อคำนวณความคงทนของเม็ดอาหารในน้ำ ดังสมการ

$$\text{ความคงทนของอาหารเม็ดในน้ำ (\%, as-fed basis)} = (\text{WT}/\text{WO}) \times 100$$

2) การศึกษาคุณสมบัติทางเคมี

โดยการวิเคราะห์ห่อองค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ โปรตีน ไขมัน ความชื้น และเถ้า ตามวิธีมาตรฐานของ AOAC (1990) และวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนในอาหารทดลองตามวิธีการของ Hugli และ Moore (1972) โดยย่อยด้วยกรดเกลือ (HCl) เข้มข้น 6 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 23 ชั่วโมง สำหรับการวิเคราะห์กรดอะมิโนทริปโตเฟน (Tryptophan) และไทโรซีน (Tyrosine) ย่อยด้วยด่าง (NaOH) เข้มข้น 4.2 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3.5 ชั่วโมง รายงานผลกรดอะมิโนซิสทีนและเมทไธโอนีนในรูปของกรดซิสเตอิก (Cysteic acid) และ เมทไธโอนีนซัลโฟน (Methionine sulfone)

3.4.4 การศึกษาการยอมรับอาหาร อัตรารอดตาย และการเจริญเติบโต

ศึกษาการยอมรับอาหารโดยการปรับลดสัดส่วนของอาร์ทีเมียและเพิ่มสัดส่วนของอาหารทดลอง (ตารางที่ 4) ต่อเนื่องกันเป็นเวลา 7 วัน เมื่อเริ่มการทดลอง จากนั้นศึกษาการเจริญเติบโตเป็นเวลา 4 สัปดาห์ โดยชุดอ้างอิงปรับอาหารเป็นเนื้อปลาทุสดตามระบบการเลี้ยงในโรงเพาะฟักทั่วไป และอาหารอนุบาลปลาทะเลทางการค้า ซึ่งให้ปลากินอาหารจนอิ่มวันละ 3 มื้อ คือ เวลา 08.00, 12.00 และ 17.00 น. ก่อนให้อาหารทุกมื้อจะดูดสิ่งขับถ่ายและเศษอาหารในตู้ทดลองออกให้หมด รวบรวมและบันทึกจำนวนปลาตาย และเปลี่ยนถ่ายน้ำประมาณ 50-70 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรน้ำทั้งหมด ทุกวันก่อนให้อาหารเวลา 17.00 น. ระหว่างการให้อาหารสังเกตพฤติกรรมต่างๆ และบันทึกน้ำหนักอาหารที่ปลากินทุกวัน สุ่มชั่งน้ำหนักและเก็บตัวอย่างปลาระหว่างการเลี้ยงทุก ๆ 7 วัน ด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง

เมื่อสิ้นสุดการทดลองชั่งน้ำหนักปลาสุดท้าย (Final wet weight) และนับจำนวนปลาที่เหลือ และนำข้อมูลที่ได้มาหา อัตรารอดตาย น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ดังนี้

1) อัตรารอดตาย (Survival rate, เปอร์เซ็นต์)

$$= \frac{\text{จำนวนปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (ตัว)} \times 100}{\text{จำนวนปลาเมื่อเริ่มต้น (ตัว)}}$$

2) น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (Weight gain, กรัมต่อตัว)

$$= \text{นน.ปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (กรัม)} - \text{นน.ปลาเมื่อเริ่มต้นการทดลอง (กรัม)}$$

3) อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific growth rate, เปอร์เซ็นต์ต่อวัน)

$$= \frac{(\ln W_2 - \ln W_1) \times 100}{T_2 - T_1}$$

โดยที่ $W_1 =$ น้ำหนักปลาเมื่อเริ่มต้นการทดลอง

$W_2 =$ น้ำหนักปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง

$T_1 =$ วันที่เมื่อเริ่มต้นการทดลอง

$T_2 =$ วันที่เมื่อสิ้นสุดการทดลอง

ตารางที่ 4 วิธีการให้อาหารปลากะพงขาวด้วยการปรับลดสัดส่วนของอาร์ทีเมียและเพิ่มสัดส่วนของอาหารทดลองในช่วง 7 วัน เมื่อเริ่มการทดลอง

อาหาร	สัดส่วนของอาหาร						
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5	วันที่ 6	วันที่ 7
อาร์ทีเมีย	100	80	60	50	50	40	20
(<i>Artemia sp.</i>) ¹	(30,000)	(24,000)	(18,000)	(15,000)	(15,000)	(12,000)	(6,000)
อาหารทดลอง ²	0	20	40	50	50	60	80
อายุของปลา (DPH) ³	16	17	18	19	20	21	22

¹อาร์ทีเมียน้ำเค็ม บริษัท Eagle Artemia Cysts (Switzerland) ปริมาณ 1 ตัว/มิลลิลิตร/มือ, ตัวเลขในวงเล็บ คือ จำนวนตัว/ตู้/มือ

²ปริมาณอาหาร 10 เปอร์เซ็นต์/ตัว/วัน

³DPH= Days post hatch

3.4.5 การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหาร

เก็บตัวอย่างปลากะพงขาวเริ่มต้นและทุก ๆ 7 วัน โดยใช้ตัวอย่างปลาที่อดอาหารเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้ทางเดินอาหารปราศจากอาหารทดลอง จากนั้นสุ่มเก็บตัวอย่างให้ได้น้ำหนักรวมประมาณ 0.05-0.20 กรัมต่อตัว ซึ่งตัวอย่างปลาเริ่มต้นการทดลอง-สัปดาห์ที่ 3 ไม่สามารถผ่าตัดทางเดินอาหารได้จึงต้องสกัดเอนไซม์จากปลาทั้งตัว แต่สำหรับตัวอย่างของสัปดาห์ที่ 4 ผ่าตัดเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารเพื่อนำไปวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เปปซิน ไส้ติ่งและลำไส้นำไปวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ทริปซิน อะไมเลส และไลเปส ชั่งน้ำหนักแล้วเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อบริการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เปปซิน ทริปซิน อะไมเลส และไลเปส ตามวิธีการของ Bergmeyer และคณะ (1974)

3.4.6 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อวิทยา

เก็บตัวอย่างปลากะพงขาวเริ่มต้นและทุก ๆ 7 วัน จำนวน 5 ตัวต่อตัว โดยใช้ตัวอย่างที่อดอาหารเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำลูกปลาทั้งตัวมาสลบด้วยน้ำแข็งอุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-10 นาที จากนั้นจึงนำไปใส่ในขวดที่มีน้ำยาดอง Bouin's fluid (Bio-optica, Milano Italy) ในอัตราส่วน ตัวอย่าง:น้ำยาดองเท่ากับ 1:50 เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เมื่อปลามีขนาดลำตัวใหญ่ขึ้นจะต้องตัดบริเวณคอคหาง (Caudal fin) หรือใช้เข็มฉีดยาน้ำยาดองเข้าสู่ตัวปลา เพื่อให้น้ำยาดองเข้าสู่เนื้อเยื่อดีขึ้น เมื่อครบตามเวลาที่กำหนดแล้วจึงเปลี่ยนน้ำยาดองเป็นแอลกอฮอล์ 50 และ 70 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยต้องเปลี่ยนน้ำยาใหม่ทุก ๆ 24 ชั่วโมง จนกระทั่งไม่มีสีของ Bouin's fluid เพราะจะทำให้การย้อมสีเนื้อเยื่อไม่คงทน จากนั้นจึงดึงน้ำออกจากเซลล์ (Dehydration) ด้วยเครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติ ของ Technicon Corporation รุ่น Autotechnicon Mono MOD.2A โดยนำตัวอย่างผ่านไอโซโพรพิลแอลกอฮอล์ และไซลีน และการฝังตัวอย่าง ในพาราฟิน ด้วยเครื่องเอ็มเบดดิ้ง นำเนื้อเยื่อไปตัดตามยาวด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อไมโครโทม (Sliding microtome บริษัท Jung AG Heidelberg) ให้มีความหนา 3-5 ไมโครเมตร ติดลงบนสไลด์ จากนั้นจึงนำไปย้อมด้วยสีฮีมาทอกไซลีน และอีโอซิน (Humason, 1979) หลังจากนั้นนำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ และบันทึกภาพ

3.5 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลอัตราการรอดตาย การเจริญเติบโต และกิจกรรมของเอนไซม์ นำมาหาค่าเฉลี่ย และวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล แบบ 2 ทาง (Two-way ANOVA) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย Tukey's HSD Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

3.6 ผลการศึกษา

3.6.1 องค์ประกอบทางเคมี ระดับการย่อยสลาย ปริมาณกรดอะมิโนอิสระ และน้ำหนักโมเลกุลของเปปไทด์ ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุแวก

องค์ประกอบทางเคมีของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุแวกรูปแบบแห้ง มีความชื้น 8.32 ± 0.15 โปรตีน 81.48 ± 0.03 ไขมัน 2.78 ± 0.72 และเถ้า 6.98 ± 0.00 เปอร์เซ็นต์ (As-fed basis) ตามลำดับ ระดับการย่อยสลาย เท่ากับ 71.73 ± 3.97 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 5)

องค์ประกอบของกรดอะมิโนอิสระ พบว่า มีกรดอะมิโนชนิดกรดกลูตามิกสูงที่สุดเท่ากับ 111.98 ± 5.74 มิลลิกรัมต่อกรัม รองลงมา คือ อาร์จินีน/ไกลซีน กรดแอสพาร์ติก ไลซีน และลิวซีน เท่ากับ 102.03 ± 5.80 , 78.71 ± 4.29 , 75.64 ± 2.56 และ 61.91 ± 2.88 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ และมีปริมาณกรดอะมิโนเมทไธโอนีนต่ำที่สุดเท่ากับ 8.75 ± 10.62 มิลลิกรัมต่อกรัม (ตารางที่ 5)

น้ำหนักโมเลกุลของเปปไทด์ส่วนใหญ่ประกอบด้วย กรดอะมิโนอิสระ (< 200 Da) เท่ากับ 39.83 ± 6.39 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ ได/ไตรเปปไทด์ ($200-500$ Da) โอลิโกเปปไทด์ ($500-2,500$ Da) และ โพลีเปปไทด์ ($> 2,500$ Da) ตามลำดับ (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 องค์ประกอบทางเคมี (As-fed basis) กรดอะมิโน และขนาดเปปไทด์ (Peptide molecular weight) ของโปรตีนไฮโดรไลสได้จากปลาทุแวก¹

องค์ประกอบทางเคมี (เปอร์เซ็นต์)	
ความชื้น	8.32±0.15
โปรตีน	81.48±0.03
ไขมัน	2.78±0.72
เถ้า	6.98±0.00
กรดอะมิโน (มิลลิกรัมต่อกรัม)	
กรดอะมิโนจำเป็น (Essential Amino Acids, EAA)	
Arginine (Arg)/Glycine (Gly)	102.03±5.80
Histidine (His)	33.64±2.10
Isoleucine (Ile)	34.63±1.63
Leucine (Leu)	61.91±2.88
Lysine (Lys)	75.64±2.56
Methionine(Met)	8.75±10.62
Phenylalanine(Phe)	46.28±19.90
Threonine (Thr)	33.98±2.24
Valine (Val)	25.99±16.86
กรดอะมิโนที่ไม่จำเป็น (Non Essential Amino Acids, NEAA)	
Alanine (Ala)	47.25±3.06
Aspartic acid (Asp)	78.71±4.29
Glutamic Acid (Glu)	111.98±5.74
Serine (Ser)	27.87±1.68
Tyrosine (Tyr)	24.30±0.26
น้ำหนักโมเลกุลของเปปไทด์ (เปอร์เซ็นต์)	
< 200 Da	39.83±6.39
200-500 Da	26.82±16.08
500-2,500 Da	24.33±2.01
> 2,500 Da	9.02±11.69

¹ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=2)

3.6.2 องค์ประกอบทางเคมีและกายภาพของอาหารทดลอง

อาหารทดลองที่ผลิตขึ้น ใช้เจลาติน และคาร์ราจีแนนเป็นสารเชื่อมประสาน เมื่อเปรียบเทียบลักษณะภายนอกกับอาหารอนุบาลปลาทะเลทางการค้า พบว่ามีขนาดใกล้เคียงกัน แต่อาหารที่ผลิตขึ้นเองจะมีขนาดของเม็ดอาหารแตกต่างกันมากกว่า และมีรูปร่างค่อนข้างเป็นทรงกระบอก ลักษณะผิวภายนอกจะขรุขระ และมีสีน้ำตาลค่อนข้างดำ ในขณะที่อาหารอนุบาลปลาทะเลทางการค้าจะมีสีส้มคล้ายกับสีของตัวอ่อนอาร์ทีเมีย (ภาพที่ 12)



ภาพที่ 12 ลักษณะภายนอกของอาหารอนุบาลปลาทะเลทางการค้า อาหารเม็ดจืดที่มีเจลาติน และคาร์ราจีแนนเป็นสารเชื่อมประสาน

องค์ประกอบทางเคมีของอาหารทดลอง (ตารางที่ 6) พบว่า อาหารอนุบาลปลาทะเลทางการค้ามีปริมาณโปรตีนสูงที่สุดเท่ากับ 52.79 ± 0.27 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างกับอาหารเม็ดจืดที่ใช้สารเชื่อมประสานทั้ง 2 ชนิด และแทนที่ปลาป่นด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุกระดับต่างๆ ที่มีค่าอยู่ระหว่าง 49.01-49.78 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณไขมันในอาหารอนุบาลปลาทะเลทางการค้ามีปริมาณไขมันต่ำที่สุดเท่ากับ 12.52 ± 0.74 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างกับอาหารเม็ดจืดที่ใช้สารเชื่อมประสานทั้ง 2 ชนิด และแทนที่ปลาป่นด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุกระดับต่างๆ ที่มีค่าอยู่ระหว่าง 19.23-19.71 เปอร์เซ็นต์

อาหารอนุบาลปลาทะเลทางการค้า และอาหารเม็ดจืดที่ใช้สารเชื่อมประสานทั้ง 2 ชนิด และแทนที่ปลาป่นด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุกระดับต่างๆ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางระหว่าง 0.5-1.0 มิลลิเมตร สำหรับค่าความคงตัวของเม็ดอาหารในน้ำของอาหารที่ใช้สารเชื่อมประสานทั้ง 2 ชนิด จะมีค่าลดลงตามระดับการแทนที่โปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุกระดับที่สูงขึ้น

โดยอาหารเม็ดจืดที่มีเจลาตินเชื่อมประสานและแทนที่ปลาปนด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุ
 แยกที่ 30 เปอร์เซนต์ (G30) มีค่าต่ำที่สุดเท่ากับ 80.20 ± 7.57 เปอร์เซนต์ แต่อาหารเม็ดจืดที่มี
 การจันเชื่อมประสานและแทนที่ปลาปนด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุแยกที่ 0 เปอร์เซนต์
 ที่มีค่าสูงที่สุดเท่ากับ 90.32 ± 2.78 เปอร์เซนต์

ตารางที่ 6 องค์ประกอบทางเคมี (As-fed basis) และสมบัติทางกายภาพของอาหารทดลอง¹

ชุดการทดลอง	องค์ประกอบทางเคมี (เปอร์เซนต์)				ความคงตัวของเม็ดอาหาร ⁶ (เปอร์เซนต์)
	ความชื้น	โปรตีน	ไขมัน	เถ้า	
เนื้อปลาทุสด ²	75.79 ± 0.42^5	18.42 ± 0.03	0.19 ± 0.03	1.39 ± 0.05	-
CMD ³	8.89 ± 0.27	52.79 ± 1.71	12.52 ± 0.74	12.14 ± 0.23	83.30 ± 0.14
G0 ⁴	7.83 ± 0.11	49.01 ± 0.23	19.26 ± 0.14	13.52 ± 0.04	82.98 ± 3.35
G15	7.98 ± 0.19	49.56 ± 0.84	19.23 ± 0.26	12.59 ± 0.13	81.57 ± 3.45
G30	7.18 ± 0.01	49.78 ± 0.56	19.44 ± 1.14	13.88 ± 0.17	80.20 ± 7.57
C0	6.50 ± 0.09	49.69 ± 0.71	19.29 ± 1.29	14.03 ± 0.11	90.32 ± 2.78
C15	7.91 ± 0.24	49.32 ± 1.41	19.65 ± 0.80	13.19 ± 0.24	88.91 ± 1.24
C30	6.17 ± 0.28	49.77 ± 0.08	19.71 ± 0.23	14.74 ± 0.08	87.64 ± 5.03

¹อาหารทดลองมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-1.0 มิลลิเมตร

²เนื้อปลาทุสดผสมวิตามินซี 1 เปอร์เซนต์

³CMD = Commercial diet ขนาด 0.5-1.0 มิลลิเมตร ได้รับความอนุเคราะห์จาก ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง
 นครศรีธรรมราช

⁴G = Gelatin และ C = Carrageenan และระดับโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุแยกปน

⁵ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

⁶ความคงตัวของเม็ดอาหาร (%) = $(\text{น้ำหนักสุดท้ายหลังจากแช่น้ำ} / \text{น้ำหนักก่อนแช่น้ำ}) \times 100$

องค์ประกอบของกรดอะมิโนในอาหารทดลองดังแสดงในตารางที่ 7 พบว่าอาหารเม็ดจืดที่
 ใช้สารเชื่อมประสานทั้ง 2 ชนิด และแทนที่ปลาปนด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุแยกที่ระดับ
 ต่างๆ มีกรดอะมิโนชนิดกรดกลูตามิกสูงที่สุดระหว่าง $6.82-7.05$ เปอร์เซนต์โปรตีนในอาหาร
 รองลงมา คือ กรดแอสพาร์ติก และมีปริมาณกรดอะมิโนลิซีน ไลซีน และไกลซีนใกล้เคียงกัน
 ซึ่งปริมาณกรดอะมิโนแต่ละชนิดมีปริมาณใกล้เคียงกับอาหารอนุบาลปลาทะเลทางการค้า

ตารางที่ 7 องค์ประกอบของกรดอะมิโน (เปอร์เซ็นต์โปรตีนในอาหาร) ในอาหารทดลอง

กรดอะมิโน	อาหารทดลอง							
	เนื้อปลา หุสค	CMD ¹	G0 ²	G15	G30	C0	C15	C30
Arginine	5.19	2.63	3.00(84) ³	2.99(83)	2.99(81)	2.93(81)	2.82(77)	2.81(76)
Histidine	4.02	1.18	1.34(37)	1.42(39)	1.54(42)	1.38(38)	1.45(40)	1.55(42)
Isoleucine	4.36	2.10	2.03(57)	2.01(56)	2.07(56)	2.09(57)	2.07(57)	2.08(56)
Leucine	6.98	3.56	3.36(94)	3.34(93)	3.43(93)	3.42(94)	3.41(94)	3.45(93)
Lysine	7.88	3.19	3.59(100)	3.61(100)	3.68(100)	3.64(100)	3.64(100)	3.71(100)
Methionine	2.67	1.31	1.35(38)	1.36(38)	1.39(38)	1.42(39)	1.38(38)	1.39(37)
Phenylalanine	3.75	2.05	1.90(53)	1.93(53)	1.94(53)	1.96(54)	1.98(54)	1.87(50)
Threonine	4.03	1.89	1.98(55)	1.97(55)	2.01(55)	2.00(55)	1.99(55)	2.01(54)
Tryptophan	1.18	0.54	0.54(15)	0.55(15)	0.55(15)	0.58(16)	0.56(15)	0.56(15)
Valine	4.84	2.34	2.32(65)	2.31(64)	2.36(64)	2.34(64)	2.31(63)	2.33(63)
Alanine	5.16	2.64	3.08(86)	3.13(87)	3.13(85)	2.97(82)	2.94(81)	2.95(80)
Aspartic acid	8.71	4.01	4.37(122)	4.37(121)	4.43(120)	4.40(121)	4.33(119)	4.36(118)
Cysteine	0.90	0.49	0.43(12)	0.43(12)	0.44(12)	0.46(13)	0.44(12)	0.44(12)
Glutamic Acid	13.57	8.90	6.94(193)	6.95(193)	7.05(192)	6.94(191)	6.82(187)	6.84(184)
Glycine	3.88	2.71	3.84(107)	3.92(109)	3.72(101)	3.29(90)	3.17(87)	3.11(84)
Hydroxylysine	0.09	0.12	0.23(6)	0.24(7)	0.22(6)	0.20(5)	0.18(5)	0.17(5)
Proline	3.41	3.15	2.94(82)	2.81(78)	2.85(77)	2.58(71)	2.31(63)	2.28(61)
Serine	3.51	2.01	1.91(53)	1.90(53)	1.91(52)	1.88(52)	1.84(51)	1.85(50)
Taurine	0.38	0.37	0.45(13)	0.45(12)	0.45(12)	0.45(12)	0.45(12)	0.45(12)
Tyrosine	3.13	1.64	1.51(42)	1.47(41)	1.49(40)	1.57(43)	1.55(43)	1.57(42)

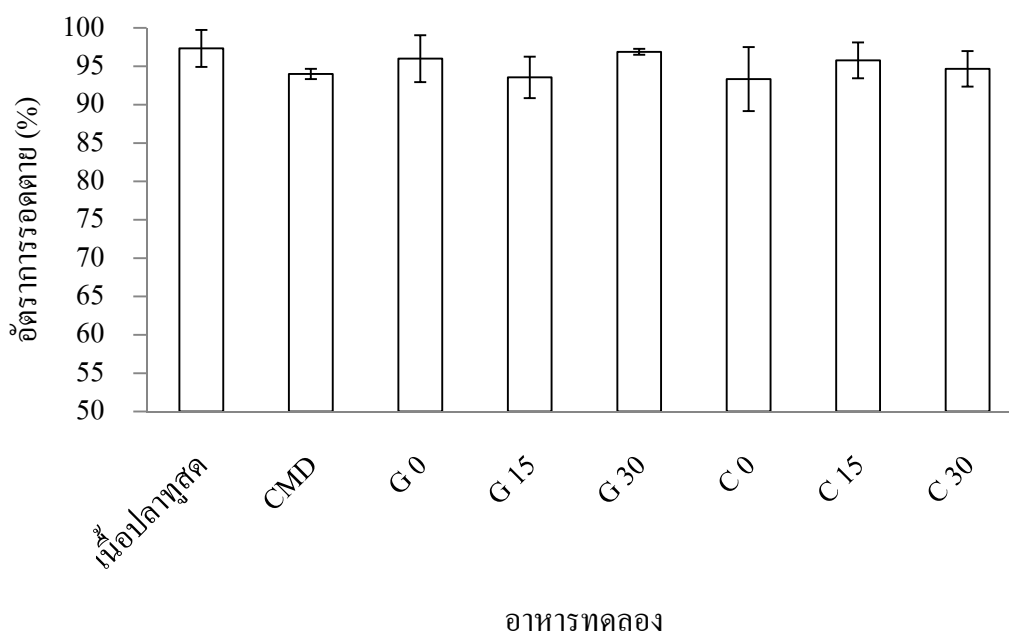
¹CMD = Commercial diet ได้รับความอนุเคราะห์จาก ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งนครศรีธรรมราช

²G = Gelatin และ C = Carrageenan และระดับโปรตีนไฮโดรไลเสดจากปลาทุแขกป่น

³Amino acid ratio

3.6.3 การยอมรับอาหาร อัตรารอดตาย และการเจริญเติบโต

ศึกษาการยอมรับอาหารในปลากะพงขาวอายุ 16 DPH ที่ได้รับอาหารเม็ดจืดที่มีสารเชื่อมประสาน 2 ชนิด คือ เจลาตินและคาราจีแนน และมีการแทนที่โปรตีนปลาป่นด้วยโปรตีนไฮโดรไลสได้จากปลาทุบแช่ที่ระดับ 0, 15 และ 30 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 7 วัน พบว่า ปลากะพงขาว (อายุ 23 DPH) มีอัตราการรอดตายไม่แตกต่างกันในชุดการทดลองที่ได้รับอาหารทดลอง ซึ่งมีค่าระหว่าง 93.33-97.33 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 13) แต่ปลากะพงขาวชุดการทดลองที่ได้รับเนื้อปลาทุบสด และอาหารอนุบาลปลาทะเลทางการค้าทยอยตายเป็นจำนวนมาก และตายทั้งหมดในสัปดาห์ที่ 3



ภาพที่ 13 อัตราการรอดตายของปลากะพงขาวอายุ 23 DPH ที่ได้รับเนื้อปลาทุบสด อาหารอนุบาลปลาทะเลทางการค้า (Commercial diet, CMD) อาหารทดลองที่มีเจลาตินและแทนที่โปรตีนปลาป่นด้วยโปรตีนไฮโดรไลสได้จากปลาทุบแช่ที่ระดับ 0, 15 และ 30 เปอร์เซ็นต์ (G0, G15 และ G30) และอาหารทดลองที่มีคาราจีแนนและแทนที่โปรตีนปลาป่นด้วยโปรตีนไฮโดรไลสได้จากปลาทุบแช่ที่ระดับ 0, 15 และ 30 เปอร์เซ็นต์ (C0, C15 และ C30) เป็นเวลา 7 วัน

อัตราการรอดตายในปลากะพงขาวอายุ 44 DPH ที่ได้รับอาหารเม็ดจืดที่มีสารเชื่อมประสาน 2 ชนิด คือ เจลาตินและคาราจีแนน และมีการแทนที่โปรตีนปลาปนด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุแวกที่ระดับ 0, 15 และ 30 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (ตารางที่ 8) พบว่า ไม่มีผลจากอิทธิพลร่วมระหว่างชนิดของสารเชื่อมประสานและระดับของโปรตีนไฮโดรไลเสต ($P>0.05$) ซึ่งปลาที่ได้รับอาหารทดลองที่มีเจลาตินและแทนที่ด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุแวกที่ระดับต่างๆ มีแนวโน้มลดลงตามระดับการแทนที่ที่สูงขึ้น แต่ปลากลุ่มที่ได้รับอาหารทดลองที่มีคาราจีแนนและแทนที่ด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุแวกที่ระดับต่างๆ มีแนวโน้มสูงขึ้นตามระดับการแทนที่ที่สูงขึ้น

น้ำหนักสุดท้าย น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ตารางที่ 9) พบว่า ไม่มีอิทธิพลร่วมระหว่างชนิดของสารเชื่อมประสานและระดับของโปรตีนไฮโดรไลเสต ($P>0.05$) แต่ระดับของโปรตีนไฮโดรไลเสตมีผลต่อน้ำหนักสุดท้าย น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ โดยปลาที่ได้รับอาหารแทนที่โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ 0 เปอร์เซ็นต์ มีน้ำหนักสุดท้ายและน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นสูงที่สุดเท่ากับ 0.1719 ± 0.0234 และ 0.1679 ± 0.0232 กรัมต่อตัว ตามลำดับ ไม่แตกต่างกับที่ 30 เปอร์เซ็นต์ ($P>0.05$) แต่สูงกว่าที่ระดับ 15 เปอร์เซ็นต์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะในปลาที่ได้รับอาหารแทนที่โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ 30 เปอร์เซ็นต์ มีค่าสูงที่สุดเท่ากับ 13.56 ± 0.97 เปอร์เซ็นต์ต่อวัน ไม่แตกต่างกับที่ 0 เปอร์เซ็นต์ ($P>0.05$) แต่สูงกว่าที่ระดับ 15 เปอร์เซ็นต์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ตารางที่ 8 อัตรารอดตายของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารเม็ดจืดที่ใช้สารเชื่อมประสาน 2 ชนิด และแทนที่โปรตีนปลาป่นด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุแยกที่ระดับต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (อายุ 44 DPH)

สารเชื่อมประสาน	ระดับการแทนที่ ¹ (%)	อัตราการรอดตาย ² (%)
เจลาติน	0	30.66±4.16 ³
เจลาติน	15	28.45±4.02
เจลาติน	30	26.89±4.44
คาราจีแนน	0	28.44±4.73
คาราจีแนน	15	30.00±6.36
คาราจีแนน	30	35.11±2.04
ANOVA		
สารเชื่อมประสาน		
<i>Probability level</i>		0.256
เจลาติน		28.67±3.99
คาราจีแนน		31.18±5.09
ระดับการแทนที่ (%)		
<i>Probability level</i>		0.770
0		29.55±4.17
15		29.22±4.83
30		31.00±5.46
สารเชื่อมประสาน×ระดับการแทนที่		
<i>Probability level</i>		0.166

¹ระดับโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุแยกป่น

²อัตราการรอดตาย = (จำนวนปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (ตัว)/จำนวนปลาเมื่อเริ่มต้น (ตัว)) × 100

³ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3) ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีตัวอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P>0.05)

ตารางที่ 9 น้ำหนักสุดท้าย น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของปลากะพงขาว ที่ได้รับอาหารเม็ดจืดที่ใช้สารเชื่อมประสาน 2 ชนิด และแทนที่โปรตีนปลาปนด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสต จากปลาทุแวกที่ระดับต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์¹ (อายุ 44 DPH)

สารเชื่อม ประสาน	ระดับการแทนที่ ² (%)	น้ำหนักสุดท้าย ³ (กรัมต่อตัว)	น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น ⁵ (กรัมต่อตัว)	อัตราการเจริญเติบโต จำเพาะ ⁶ (%/วัน)
เจลาติน	0	0.1768±0.0112 ⁴	0.1727±0.0099	13.57±1.23
เจลาติน	15	0.1059±0.0157	0.1023±0.0162	12.10±1.15
เจลาติน	30	0.1652±0.0187	0.1621±0.0188	14.15±0.51
การาจีนแน	0	0.1671±0.0343	0.1631±0.0344	13.46±1.51
การาจีนแน	15	0.1029±0.0026	0.0992±0.0027	11.90±0.35
การาจีนแน	30	0.1521±0.0297	0.1481±0.0297	12.97±1.02
ANOVA				
สารเชื่อมประสาน				
<i>Probability level</i>		0.414	0.400	0.333
เจลาติน		0.1493±0.0356	0.1457±0.0355	13.27±1.27
การาจีนแน		0.1407±0.0369	0.1368±0.0368	12.78±1.16
ระดับการแทนที่ (%)				
<i>Probability level</i>		< 0.001	< 0.001	0.038
0		0.1719±0.0234 ^A	0.1679±0.0232 ^A	13.52±1.23 ^A
15		0.1044±0.0102 ^B	0.1008±0.0105 ^B	12.00±0.77 ^B
30		0.1587±0.0233 ^A	0.1551±0.0235 ^A	13.56±0.97 ^A
สารเชื่อมประสาน×ระดับการแทนที่				
<i>Probability level</i>		0.919	0.909	0.630

¹ปลากะพงขาวเริ่มทดลองอายุ 16 DPH มีความกว้างของปากเฉลี่ย 0.99±0.26 มม. และมีความยาวลำตัวเฉลี่ย 0.79±0.12 ซม. (n=10)

²ระดับโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุแวกปน

³น้ำหนักปลาเริ่มทดลองมีค่าในช่วง 0.0031-0.0042 กรัมต่อตัว

⁴ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3) ค่าเฉลี่ยในสัปดาห์ที่มีตัวอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P>0.05)

⁵น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น = นน.ปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (กรัม) - นน.ปลาเมื่อเริ่มต้นการทดลอง (กรัม)

⁶อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ = ((ln น้ำหนักสุดท้าย - ln น้ำหนักเริ่มต้น) / จำนวนวันที่เลี้ยง) × 100

3.6.4 กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหารหลัก

กิจกรรมเอนไซม์เปปซิน ทริปซิน อะไมเลส และไลเปส ของปลากระพงขาว เมื่อเริ่มต้น การทดลองอายุ 16 DPH เท่ากับ 123.37 ± 21.81 Unit/mg protein, 0.46 ± 0.24 mUnit/mg protein, 1.50 ± 0.14 Unit/mg protein และ 0.21 ± 0.04 mUnit/mg protein ตามลำดับ เมื่อปลากระพงขาวได้รับ อาหารเนื้อปลาสด อาหารอนุบาลปลาทะเลทางการค้า และอาหารเม็ดจืดที่มีสารเชื่อมประสาน 2 ชนิด คือ เจลาตินและคาราจีแนน และมีการแทนที่โปรตีนปลาปนด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจาก ปลาทูแวกที่ระดับ 0, 15 และ 30 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 สัปดาห์ (อายุ 23 DPH) พบมีการเพิ่มขึ้น ของกิจกรรมเอนไซม์เปปซิน และทริปซิน ยกเว้นเอนไซม์อะไมเลส และไลเปสที่มีค่าลดลง (ตารางที่ 10)

ปลากระพงขาวอายุ 23 DPH ที่ได้รับอาหารเม็ดจืดที่มีสารเชื่อมประสาน 2 ชนิด คือ เจลาติน และคาราจีแนน และมีการแทนที่โปรตีนปลาปนด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทูแวกที่ระดับ 0, 15 และ 30 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 สัปดาห์ พบว่ากิจกรรมเอนไซม์เปปซินมีผลจากอิทธิพลร่วม ระหว่างชนิดของสารเชื่อมประสานและระดับของโปรตีนไฮโดรไลเสต ($P < 0.05$) โดยปลากระพง ขาวที่ได้รับอาหารที่มีคาราจีแนนและแทนที่ปลาปนด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทูแวกที่ 30 เปอร์เซ็นต์ มีค่าสูงที่สุดเท่ากับ 251.83 ± 17.30 Unit/mg protein แตกต่างจากปลาในกลุ่มทดลอง อื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยปลาที่ได้รับอาหารที่มีเจลาตินและแทนที่ปลาปนด้วย โปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทูแวกที่ 30 เปอร์เซ็นต์ มีค่าต่ำที่สุดเท่ากับ 159.42 ± 9.04 Unit/mg protein

กิจกรรมเอนไซม์ทริปซิน อะไมเลส และไลเปส ไม่มีผลจากอิทธิพลร่วมระหว่างชนิดของ สารเชื่อมประสานและระดับของโปรตีนไฮโดรไลเสต ($P > 0.05$) โดยมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ ทริปซิน อยู่ในช่วง $0.52 \pm 0.20 - 0.85 \pm 0.18$ mUnit/mg protein และกิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส อยู่ในช่วง $0.53 \pm 0.18 - 1.32 \pm 0.02$ Unit/mg protein แต่ระดับของโปรตีนไฮโดรไลเสตมีผลต่อกิจกรรมเอนไซม์ ไลเปส ($P < 0.05$) โดยมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ลดลงตามระดับการแทนที่ด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ สูงขึ้นในปลาที่ได้รับอาหารที่มีการแทนที่โปรตีนไฮโดรไลเสต 30 เปอร์เซ็นต์ มีค่าต่ำที่สุด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตารางที่ 10 กิจกรรมเอนไซม์เปปซิน ทริปซิน อะไมเลส และไลเปส ในปลากระพงขาวที่ได้รับอาหารเม็ดจืดที่ใช้สารเชื่อมประสานทั้ง 2 ชนิด และแทนที่โปรตีนปลาป่นด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุแวกที่ระดับต่างๆ เป็นเวลา 1 สัปดาห์¹ (อายุ 23 DPH)

ชุดการทดลอง	สารเชื่อม ประสาน	ระดับการ แทนที่ (%)	Proteolytic enzyme activity		Carbohydrase	Lipase
			Pepsin (Unit/mg protein)	Trypsin (mUnit/mg protein)	α -Amylase (Unit/mg protein)	Lipase (mUnit/mg protein)
เนื้อปลาทุสด ²			161.75±11.03	0.53±0.06	0.78±0.17	0.09±0.05
CMD			178.37±22.11	0.49±0.15	0.64±0.34	0.13±0.02
G0	เจลาติน	0	175.63±22.77 ^b	0.58±0.14	0.53±0.18	0.12±0.04
G15	เจลาติน	15	184.55±7.88 ^b	0.52±0.20	0.86±0.73	0.07±0.02
G30	เจลาติน	30	159.42±9.04 ^b	0.85±0.18	0.99±0.43	0.07±0.02
C0	คาราจีแนน	0	182.65±6.34 ^b	0.61±0.15	0.87±0.19	0.13±0.05
C15	คาราจีแนน	15	192.72±35.27 ^b	0.61±0.15	0.76±0.42	0.12±0.01
C30	คาราจีแนน	30	251.83±17.30 ^a	0.78±0.09	1.32±0.02	0.09±0.02
ANOVA						
สารเชื่อมประสาน						
<i>Probability level</i>			0.003	0.839	0.420	0.087
เจลาติน			173.20±16.95	0.65±0.21	0.79±0.48	0.09±0.04
คาราจีแนน			203.72±36.24	0.65±0.14	0.95±0.36	0.12±0.03
ระดับการแทนที่ (%)						
<i>Probability level</i>			0.129	0.053	0.280	0.032
0			179.14±15.43	0.59±0.13	0.67±0.24	0.13±0.04 ^A
15			188.64±23.29	0.56±0.16	0.81±0.53	0.10±0.03 ^{AB}
30			196.38±51.74	0.82±0.14	1.12±0.35	0.07±0.02 ^B
สารเชื่อมประสาน×ระดับการแทนที่						
<i>Probability level</i>			0.007	0.698	0.656	0.466

¹กิจกรรมเอนไซม์เปปซิน ทริปซิน อะไมเลส และไลเปส ในปลากระพงขาวอายุ 16 DPH (เริ่มต้น) เท่ากับ 123.37±21.81, 0.46±0.24, 1.50±0.14 และ 0.21±0.04 mUnit/mg protein ตามลำดับ

²เนื้อปลาทุสดผสมวิตามินซี 1 เปอร์เซ็นต์ และปลาทดลองตายทั้งหมดในสัปดาห์ที่ 3 ของการทดลอง

³ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3) ค่าเฉลี่ยในสัปดาห์ที่มีตัวอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P>0.05)

สำหรับปลากระพงขาวที่ได้รับอาหารทดลอง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ จนมีอายุ 44 DPH พบว่า กิจกรรมเอนไซม์เปปซิน และทริปซิน (ตารางที่ 11) มีผลจากอิทธิพลร่วมระหว่างชนิดของสารเชื่อมประสานและระดับของโปรตีนไฮโดรไลเสต ($P < 0.05$) กิจกรรมเอนไซม์เปปซินในปลากระพงขาวที่ได้รับอาหารที่มีคาร์โบไฮเดรตและแทนที่ปลาป่นด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุแวกที่ 30 เปอร์เซ็นต์ มีค่าสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เท่ากับ 3515.52 ± 107.80 Unit/mg protein แตกต่างจากปลาที่ได้รับอาหารที่มีคาร์โบไฮเดรตมีการแทนที่ปลาป่นด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสต จากปลาทุแวกที่ 15 เปอร์เซ็นต์ ที่มีค่าต่ำที่สุดเท่ากับ 2215.72 ± 472.25 Unit/mg protein

กิจกรรมเอนไซม์ทริปซินในปลากระพงขาวที่ได้รับอาหารที่มีคาร์โบไฮเดรตและไม่มีคาร์โบไฮเดรตมีการแทนที่ปลาป่นด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุแวก มีค่าสูงที่สุดเท่ากับ 3.89 ± 0.30 mUnit/mg protein แตกต่างจากปลาที่ได้รับอาหารที่มีเจลาตินมีการแทนที่ปลาป่นด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสต จากปลาทุแวกที่ระดับต่างๆ โดยที่ระดับ 15 เปอร์เซ็นต์ ที่มีค่าต่ำที่สุดเท่ากับ 1.09 ± 0.26 mUnit/mg protein อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส และไลเปส ไม่มีผลจากอิทธิพลร่วมระหว่างชนิดของสารเชื่อมประสานและระดับของโปรตีนไฮโดรไลเสต ($P > 0.05$) แต่ระดับของโปรตีนไฮโดรไลเสตมีผลต่อกิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส ($P < 0.05$) โดยปลาที่ได้รับอาหารที่มีการแทนที่โปรตีนไฮโดรไลเสต 30 เปอร์เซ็นต์ มีค่าต่ำที่สุด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) สำหรับกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสอยู่ในช่วง $0.26 \pm 0.033 - 0.36 \pm 0.10$ mUnit/mg protein ($P > 0.05$)

ตารางที่ 11 กิจกรรมเอนไซม์เปปซิน ทริปซิน อะไมเลส และไลเปส ในปลากระพงขาวที่ได้รับอาหารเม็ดจืดที่ใช้สารเชื่อมประสานทั้ง 2 ชนิด และแทนที่โปรตีนปลาปนด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุแวกที่ระดับต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (อายุ 44 DPH)

สารเชื่อม ประสาน	ระดับการ แทนที่ ¹ (%)	Proteolytic enzyme activity		Carbohydrase	Lipase
		Pepsin (Unit/mg protein)	Trypsin (mUnit/mg protein)	α -Amylase (Unit/mg protein)	Lipase (mUnit/mg protein)
เจลาติน	0	2649.82±135.92 ^{ab2}	1.23±0.95 ^c	8.18±0.46	0.27±0.03
เจลาติน	15	2663.15±36.37 ^{ab}	1.09±0.26 ^c	8.01±1.82	0.30±0.09
เจลาติน	30	2734.55±216.35 ^{ab}	1.39±0.44 ^{bc}	5.45±1.87	0.36±0.10
คาราจีแนน	0	3009.47±625.74 ^{ab}	3.89±0.30 ^a	7.42±0.65	0.26±0.03
คาราจีแนน	15	2215.72±472.25 ^b	2.16±0.27 ^{bc}	6.61±0.43	0.32±0.08
คาราจีแนน	30	3515.52±107.80 ^a	2.58±0.34 ^{ab}	6.33±0.33	0.34±0.03
ANOVA					
สารเชื่อมประสาน					
<i>Probability level</i>		0.185	< 0.001	0.441	0.858
เจลาติน		2682.51±134.94	1.24±0.55	7.21±1.87	0.31±0.08
คาราจีแนน		2913.57±697.95	2.88±0.83	6.79±0.65	0.31±0.06
ระดับการแทนที่ (%)					
<i>Probability level</i>		0.017	0.020	0.034	0.122
0		2829.64±465.43	2.56±1.59	7.80±0.65 ^A	0.27±0.03
15		2439.43±387.03	1.63±0.63	7.31±1.41 ^{AB}	0.31±0.07
30		3125.04±454.25	1.99±0.74	5.89±1.29 ^B	0.35±0.06
สารเชื่อมประสาน×ระดับการแทนที่					
<i>Probability level</i>		0.029	0.027	0.244	0.872

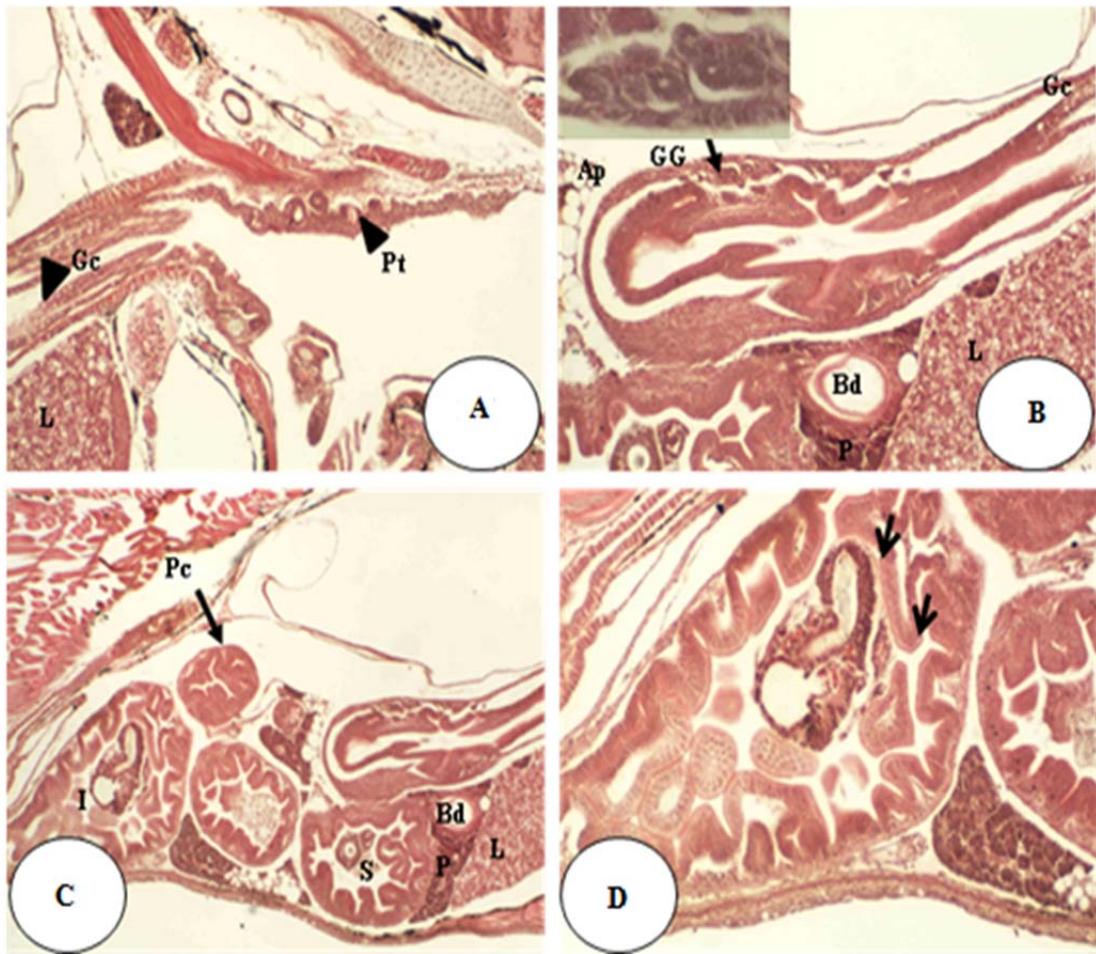
¹ระดับโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุแวกปน

²ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3) ค่าเฉลี่ยในสมภักที่มีตัวอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ (P>0.05)

3.6.5 ผลการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อระบบย่อยอาหารของปลากะพงขาวอายุ 16 DPH พบว่าปลากะพงขาวมีลักษณะภายนอกและอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับระบบย่อยอาหารเหมือนตัวเต็มวัย แต่ยังมีเจริญไม่เต็มที่ โดยจะพบชั้นต่างๆ ของทางเดินอาหาร ได้แก่ ชั้นมีวโคซา ชั้นมีวโคซา และมัสคิวลาริส พัฒนาคือแต่มีลักษณะค่อนข้างบาง พบพินบริเวณคอหอย โผล่ยื่นพื้นเยื่อบุผิว Goblet cell บริเวณหลอดอาหารปริมาณมาก เริ่มพบต่อมแกสตริก บริเวณกระเพาะอาหารตอนต้น ในชั้นชั้นมีวโคซา โดยมีเซลล์บุผิวลักษณะเป็นแบบลูกบาศก์เรียงตัวชั้นเดียว เริ่มพบไส้ติ่ง ที่มีเซลล์บุผิวเป็นแบบทรงกระบอกเรียงตัวชั้นเดียวเหมือนกับกระเพาะอาหาร แต่ช่องว่างทางเดินอาหารยังมีขนาดเล็ก เยื่อบุผิวบริเวณกระเพาะอาหารและลำไส้มีการยกตัวของเยื่อบุผิวสูงขึ้น และพบ Lipid vacuole ในชั้นมีวโคซาบริเวณลำไส้ (ปลายลูกศร) (ภาพที่ 14D) ตับและตับอ่อนมีขนาดใหญ่ นอกจากนี้จะพบท่อน้ำดี บริเวณตับ และเนื้อเยื่อไขมัน ที่เป็นส่วนของเนื้อเยื่ออวัยวะภายในช่องท้อง (ภาพที่ 14 A-D)

เมื่อสิ้นสุดการทดลองเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ไม่พบความแตกต่างของโครงสร้างอวัยวะต่างๆ ที่เกี่ยวกับระบบย่อยอาหารของปลากะพงขาวอายุ 44 DPH ที่ได้รับอาหารทดลองที่มีสารเชื่อมประสาน 2 ชนิด คือ เจลาตินและคาราจีแนน และมีการแทนที่โปรตีนปลาปนด้วยโปรตีน ไฮโดรไลเสตจากปลาทูแขกที่ระดับ 0, 15 และ 30 เปอร์เซ็นต์ แต่พบการเพิ่มขนาดของอวัยวะ ปริมาณและขนาดของเซลล์ในเนื้อเยื่อของระบบย่อยอาหารตามการเจริญเติบโตของปลากะพงขาว (ภาพที่ 15-17)



ภาพที่ 14 ลูกปลาเริ่มต้นการทดลอง อายุ 16 วัน หลังฟักออกเป็นตัว

A = ช่องปากคอหอย และหลอดอาหาร (กำลังขยาย 100x)

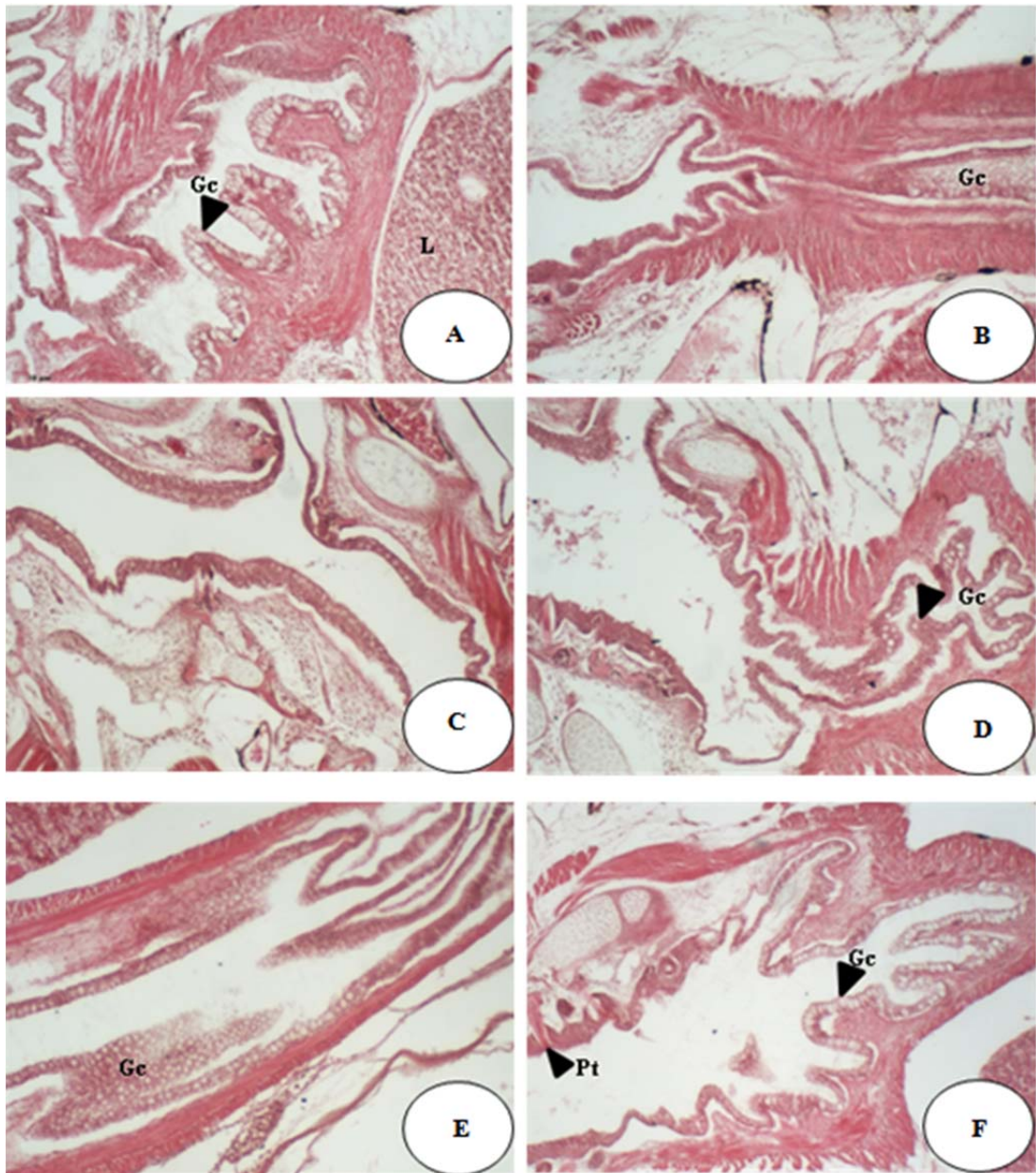
B = กระเพาะอาหารตอนต้น (กำลังขยาย 100x)

C = ทางเดินอาหาร (กำลังขยาย 40x)

D = ลำไส้ (กำลังขยาย 100x)

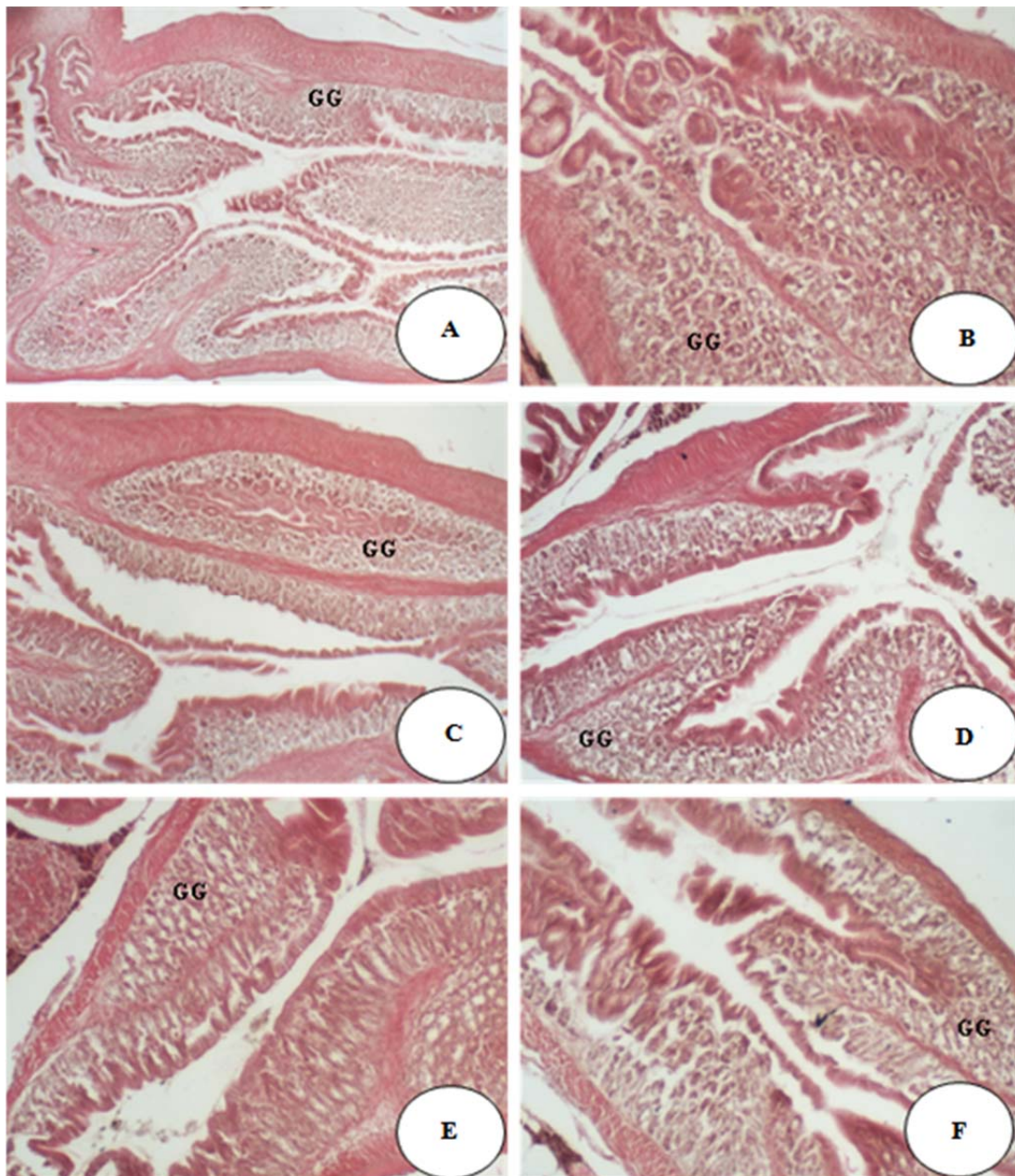
Ap = Adipose tissue, Bd = Bile duct, Gc = Goblet cell, GG = Gastric gland, I = Intestine, L = Liver,

P = Pancreas, Pc = Pyloric caeca, Pt = Pharyngeal teeth, S = Stomach



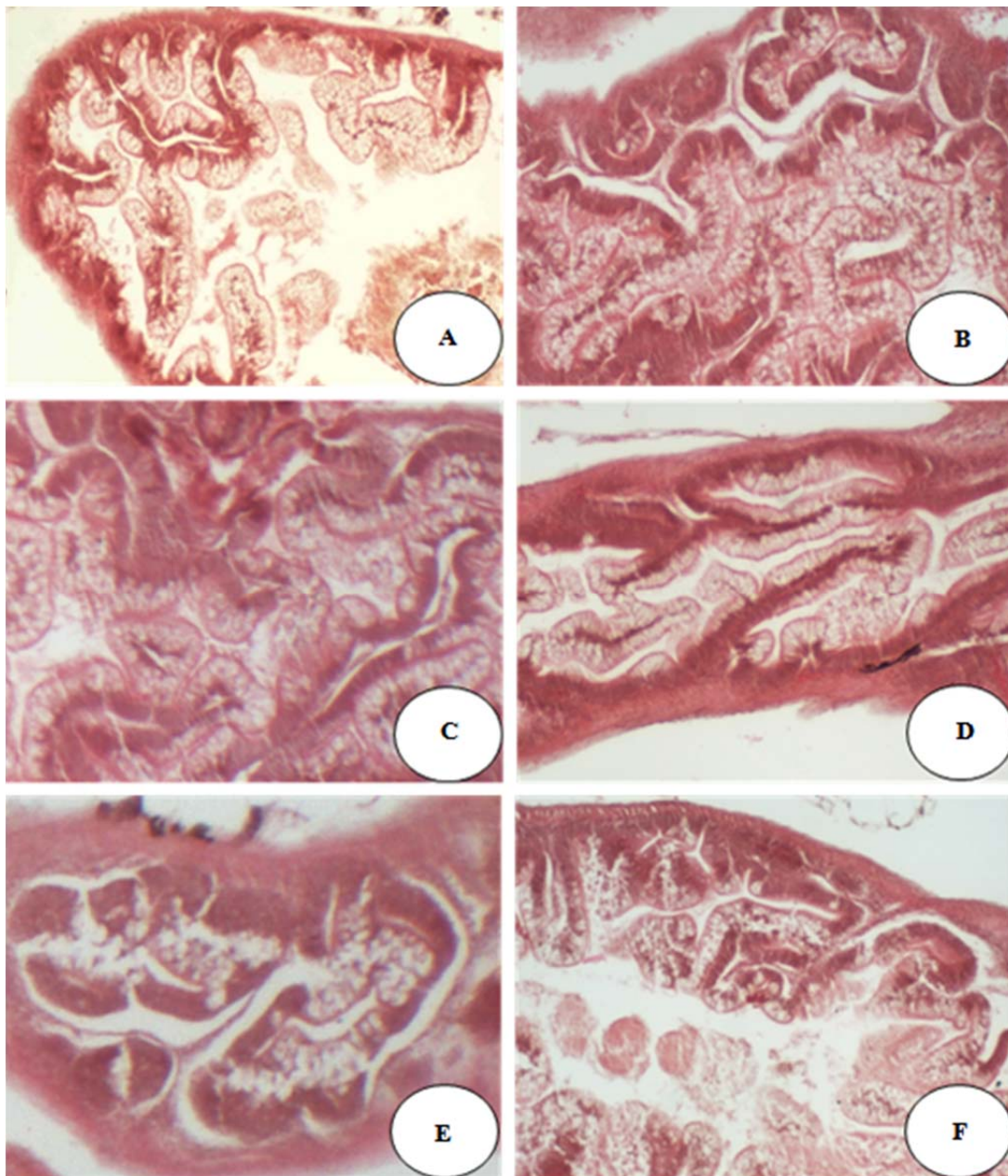
ภาพที่ 15 หลอดอาหาร ลูกปลาอายุ 44 วัน หลังฟักออกเป็นตัว ที่ได้รับอาหารเม็ดจืดที่ใช้เจลาติน (A, B และ C) (100x) และการจี้แนน (D, E และ F) (100x, 100x และ 40x) เป็นสารเชื่อมประสาน และแทนที่ปลาปนด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุบแช่ที่ระดับ 0, 15 และ 30 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Gc = Goblet cell, L = Liver, Pt = Pharyngeal teeth



ภาพที่ 16 ภาวะอาหารตอนต้น ลูกปลาอายุ 44 วัน หลังฟักออกเป็นตัว ที่ได้รับอาหารเม็ดจืดที่ใช้ เจลาติน (A, B และ C) (40x, 100x และ 40x) และการิจิแนน (D, E และ F) (100x) เป็นสารเชื่อมประสาน และแทนที่ปลาป่นด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุแวกที่ระดับ 0, 15 และ 30 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

GG = Gastric gland



ภาพที่ 17 ลำไส้ ลูกปลาอายุ 44 วัน หลังฟักออกเป็นตัว ที่ได้รับอาหารเม็ดจืดที่ใส่เจลาติน (A, B และ C) (100x, 100x และ 40x) และคาร์จีแนน (D, E และ F) (100x, 40x และ 100x) เป็นสารเชื่อมประสาน และแทนที่ปลาป่นด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทูแซกที่ระดับ 0, 15 และ 30 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

3.6.6 คุณภาพน้ำในตู้ทดลอง

ผลการวิเคราะห์คุณภาพน้ำตลอดการทดลอง พบว่าน้ำมีอุณหภูมิอยู่ในช่วง 26-29 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่างช่วง 6.72-7.43 ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ (Dissolved oxygen, DO) ช่วง 7.7-7.8 มก./ล. ปริมาณแอมโมเนีย (NH₃) 0.25-0.5 มก./ล. และปริมาณไนไตรท์ (NO₂) 0.05-0.1 มก./ล. ซึ่งแต่ละพารามิเตอร์อยู่ในช่วงที่เหมาะสม เนื่องจากมีการเปลี่ยนถ่ายน้ำทุกวัน

3.7 วิจารณ์ผลการศึกษา

จากผลการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุแวก (Round scad hydrolysate) รูปแบบแห้ง พบว่ามีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 81.48 ± 0.03 ไขมัน 2.78 ± 0.72 ความชื้น 8.32 ± 0.15 และเถ้า 6.98 ± 0.00 เปอร์เซ็นต์ (As-fed basis) เห็นได้ว่ามีระดับโปรตีนสูงเหมาะสมสำหรับเป็นแหล่งโปรตีนในอาหารลูกปลาวัยอ่อน สอดคล้องกับการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในโปรตีนปลาไฮโดรไลเสต (Fish protein hydrolysate) ที่ประกอบด้วยโปรตีน ไขมัน และเถ้า อยู่ในช่วง 70-90, 2-4 และ 6-7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Mackie, 1982; Liceaga-Gesualdo and Li-Chan, 1999; Dong *et al.*, 2005) แต่ให้ผลแตกต่างจากการศึกษาของ Thiansilakul (2006) ที่ศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากกล้ามเนื้อปลาทุแวก ที่มีปริมาณโปรตีน ไขมัน ความชื้น และเถ้า เท่ากับ 68.97 ± 3.57 , 0.15 ± 0.03 , 8.75 ± 0.40 และ 24.56 ± 2.56 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เนื่องจากวัตถุดิบที่นำมาใช้ในการผลิตไฮโดรไลเสตแตกต่างกัน ถึงแม้จะเป็นวัตถุดิบจากปลาชนิดเดียวกัน คือ ปลาทุแวก (*Decapterus* sp.) แต่การใช้ปลาทั้งตัวมีความครบถ้วนทางโภชนาการ และมีค่าสูงกว่าการใช้เฉพาะเนื้อปลา (Fillet) เพียงอย่างเดียว หรืออาจเกิดจากการกรองส่วนของแข็งที่ไม่ละลายน้ำออก (Insoluble solid matter) จำพวกกระดูก เก็ด็ด ในขั้นตอนการเก็บผลผลิต สำหรับปริมาณไขมันที่สูงกว่า เนื่องจากการศึกษาที่เกี่ยวกับโปรตีนปลาไฮโดรไลเสตส่วนใหญ่ มีการกำจัดไขมันออกจากวัตถุดิบ ซึ่งมีหลายวิธี เช่น การใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ ความร้อน การใช้กรดหรือด่าง หรือการหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิต่ำ 4 องศาเซลเซียส จนทำให้ไขมันแข็งและแยกชั้นกับสารละลายไฮโดรไลเสต จึงสามารถกำจัดไขมันออกได้ เนื่องจากวัตถุดิบส่วนใหญ่จะเป็นปลาทะเล หรือเศษเหลือจากอุตสาหกรรมที่มีปริมาณไขมันสูง เช่น ปลา Herring หัวกุ้งกุลาดำ เครื่องในปลา Mackerel และปลา Anchovy เป็นต้น เพราะไขมันดังกล่าวจะทำให้ไฮโดรไลเสตเกิดกลิ่นหืนและสารพิษจากปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ (ไตรตะวัน, 2542; Shahidi *et al.*, 1995; Liceaga-Gesualdo and Li-Chan, 1999; Thiansilakul, 2006) นอกจากนี้ปริมาณเถ้าในตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ระดับ 6.98 ± 0.00 เปอร์เซ็นต์ เป็นระดับที่ต่ำกว่าที่มีการรายงานในการศึกษาของ สุภาพร (2549) Hoyle และ Merritt (1994) Shahidi และคณะ (1995) Liceaga-Gesualdo และ

Li-Chan (1999) และ Thiansilakul (2006) ที่มีแก๊สอยู่ในช่วง 12.05-24.56 เปอร์เซ็นต์ อาจมีสาเหตุจากการใช้สารละลายบัฟเฟอร์ กรดหรือด่างเข้มข้นในการปรับความเป็นกรด-ด่างเพื่อให้มีความเหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ จึงเกิดเป็นสารอนินทรีย์ในปริมาณสูงขึ้นได้ แต่การผลิตโปรตีนไฮโดรไลสได้จากปลาทุแวกในการศึกษาครั้งนี้ ผลิตโดยการใช้ น้ำกลั่นฆ่าเชื้อเป็นตัวละลาย วัตถุประสงค์แทนการใช้บัฟเฟอร์

ผลการศึกษาระดับการย่อยสลาย พบว่ามีค่าเท่ากับ 71.73 ± 3.97 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งค่อนข้างสูง โดยทั่วไประดับการย่อยสลายโปรตีนไฮโดรไลสเพิ่มขึ้นอยู่กับ ความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ ระยะเวลา ชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ ซึ่งความเป็นกรด-ด่างจะมีผลโดยตรงกับการทำงานของเอนไซม์ โดยพบว่า pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการย่อยสลายเปปไทด์ของเอนไซม์อัลคาเลส คือ pH 8-9.5 อุณหภูมิ 50-70 องศาเซลเซียส (Quaglia and Orban, 1990; Hoyle and Merritt, 1994; Baek and Cadwallader, 1995; Benjakul and Morrissey, 1997; Thiansilakul, 2006) ระยะเวลาในการย่อยสลายอยู่ที่ 1 ชั่วโมง และที่ pH เป็นกรดหรือ pH สูงกว่า 10 ที่อุณหภูมิสูง 80 องศาเซลเซียส จะสูญเสียสภาพธรรมชาติของเอนไซม์ส่งผลให้กิจกรรมการย่อยสลายลดลง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในครั้งนี้ที่ใช้ pH เท่ากับ 8 และย่อยสลายที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และพบว่าระดับการย่อยสลายจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วใน 10-20 นาทีแรกของการย่อยสลาย หลังจากนั้นระดับการย่อยสลายจะเพิ่มขึ้นเล็กน้อย และชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ คือ เอนไซม์อัลคาเลส ที่ 1 เปอร์เซ็นต์ (w/w) เพราะเอนไซม์อัลคาเลสจะมีคุณสมบัติในการตัดสายเปปไทด์แบบสุ่มและไม่มีความจำเพาะต่อกรดอะมิโน (Adler-Nissen, 1986) จึงทำให้สามารถย่อยสลายโปรตีนและตัดพันธะเปปไทด์ได้สูง การที่ระดับการย่อยสลายเกิดขึ้นสูงอาจเกิดจาก วัตถุประสงค์ที่นำมาใช้เป็นปลาทั้งตัวที่มีเอนไซม์อยู่ภายในด้วย จึงทำให้ในสภาพปกติวัตถุประสงค์มีความสามารถในการย่อยตัวเอง (Autolysis) อยู่แล้ว เมื่อนำมาผลิตโปรตีนไฮโดรไลสจึงทำให้มีปริมาณเอนไซม์ที่ช่วยในการย่อยได้เพิ่มขึ้นด้วย

องค์ประกอบของกรดอะมิโนอิสระ พบว่ามีกรดอะมิโนกรดกลูตามิกสูงที่สุดเท่ากับ 111.98 ± 5.74 มิลลิกรัมต่อกรัม รองลงมา คือ อาร์จินีน/ไกลซีน กรดแอสพาร์ติก ไลซีน และลิซีน เท่ากับ 102.03 ± 5.80 , 78.71 ± 4.29 , 75.64 ± 2.56 และ 61.91 ± 2.88 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ และมีปริมาณกรดอะมิโนเมทไธโอนีนต่ำที่สุดเท่ากับ 8.75 ± 10.62 มิลลิกรัมต่อกรัม ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ อานัส (2551) ที่ศึกษาโปรตีนไฮโดรไลสจากเครื่องในรวมปลาทุแวกที่พบกรดอะมิโนกลูตามิกสูงที่สุด รองลงมาคือ โพรลีน ไกลซีน อะลานีน และไลซีน เท่ากับ 9.92, 4.79, 3.52 และ 3.13 กรัม/100 กรัม ตามลำดับ และการศึกษาของวันชัย (2545) และสุภาพร (2549) ที่พบว่าโปรตีนไฮโดรไลสจากเครื่องในรวมปลาทุแวก ที่มีปริมาณของกรดอะมิโนกลูตามิกสูงที่สุด เท่ากับ 4.85 และ

6.16 กรัม/100 กรัม เมื่อนำไปผลิตอาหารทดลอง พบว่า องค์ประกอบของกรดอะมิโนในอาหารเม็ดจิ๋วที่ใช้สารเชื่อมประสานทั้ง 2 ชนิด และแทนที่ปลาปนด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุกระดับต่างๆ มีกรดอะมิโนชนิดกรดกลูตามิกสูงที่สุดระหว่าง 6.82-7.05 เปอร์เซ็นต์ โดยมีกรดอะมิโนที่จำเป็นไลซีน อาร์จินีน และฮีสติดีน สูงกว่า อาหารอนุบาลปลาทะเลทางการค้า จากการศึกษาในปลาทะเลหลายชนิด พบว่า กรดอะมิโนลิซีน อะลานีน ฮีสติดีน และกรดกลูตามิก เป็นสารกระตุ้นการกินอาหารได้ดี นอกจากนี้กรดอะมิโนที่มีปริมาณมาก เป็นกรดอะมิโนชนิดที่ให้กลิ่นที่ดี คือ กรดกลูตามิก กรดแอสพาร์ติก ไกลซีน จึงทำให้อาหารเม็ดจิ๋วที่ผลิตโดยใช้สารเชื่อมประสานทั้ง 2 ชนิด และแทนที่ปลาปนด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุกระดับต่างๆ มีคุณสมบัติดึงดูดการกินอาหารในลูกปลาวัยอ่อนด้วย

น้ำหนักโมเลกุลของเปปไทด์ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากการผลิตครั้งนี้ ส่วนใหญ่ประกอบด้วย กรดอะมิโนอิสระ (< 200 Da) เท่ากับ 39.83 ± 6.39 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ ได/ไตรเปปไทด์ (200-500 Da) โอลิโกเปปไทด์ (500-2,500 Da) และโพลีเปปไทด์ (> 2,500 Da) เนื่องจากการผลิตใช้เอนไซม์อัลคาเลสซึ่งมีคุณสมบัติในการตัดสายเปปไทด์แบบสุ่มและไม่มีความจำเพาะต่อกรดอะมิโน (Adler-Nissen, 1986) จึงทำให้สามารถย่อยสลายโปรตีนและตัดพันธะเปปไทด์ได้สูง จึงมีปริมาณกรดอะมิโนอิสระสูง นอกจากนี้วิธีในการเก็บผลผลิตใช้วิธีการกรองด้วยผ้าขาวซึ่งแตกต่างจากการศึกษาทั่วไป ที่จะนำสารละลายไฮโดรไลเสตที่หยุดปฏิกิริยาการย่อยสลายแล้วมาหมุนเหวี่ยง และเก็บเฉพาะสารละลายส่วนบนเท่านั้น เพราะการศึกษาในครั้งนี้ นำโปรตีนไฮโดรไลเสตมาเป็นแหล่งโปรตีนในอาหาร จึงสามารถใช้ทั้งเปปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง และกรดอะมิโนอิสระที่มีคุณสมบัติเป็นสารดึงดูดการกินอาหาร

คุณสมบัติของอาหารสำเร็จรูปสำหรับอนุบาลปลาจะต้องมีลักษณะสำคัญ คือ รูปร่างและขนาดของอาหารต้องง่ายต่อการมองเห็นและกินของลูกปลา มีความน่ากินกระตุ้นการกินอาหารของปลา มีความคงตัวในน้ำสามารถนำส่งสารอาหารไปสู่ปลาได้ และปลาสามารถย่อยและนำสารอาหารไปใช้ได้ดี (Yufera *et al.*, 2000; Kvale *et al.*, 2006) ซึ่งการทดลองครั้งนี้ได้ผลิตอาหารสำเร็จรูปเม็ดจิ๋ว (Microbound diet) โดยใช้เจลาตินและคาราจีแนนเป็นสารเชื่อมประสาน ที่มีแทนที่โปรตีนปลาปนด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุกระดับ 0, 15 และ 30 เปอร์เซ็นต์ เม็ดอาหารมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางระหว่าง 0.5-1.0 มิลลิเมตร ซึ่งมีขนาดเหมาะสมกับขนาดปากของปลากระพงขาวอายุ 16 วัน ที่มีความกว้างของปากเฉลี่ย 0.99 ± 0.26 มม. ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับการศึกษาของ Cumow และคณะ (2006) ที่พบว่าปลากระพงขาวอายุ 18-20 วัน มีขนาดปากเท่ากับ 1.0-1.5 มิลลิเมตร ดังนั้นหากเม็ดอาหารมีขนาดเล็กมากอาจทำให้ลูกปลาไม่สามารถมองเห็นและกินได้ หรือถ้ามีขนาดใหญ่เกินไปกว่าขนาดปากของลูกปลาอาจทำให้ลูกปลากินอาหารได้ยากเช่นกัน

ขนาดของเมล็ดอาหารจึงต้องเหมาะสมกับความกว้างของปากลูกปลา โดยควรมีขนาด 25-50 เปอร์เซ็นต์ ของความกว้างปากลูกปลา (Hunter, 1984; Fernandez-Diaz *et al.*, 1994) นอกจากนี้ ขั้นตอนและวิธีการผลิตอาหารเพื่อให้ได้ขนาดของเมล็ดอาหารตามที่ต้องการก็มีความสำคัญเช่นกัน เพราะจะทำให้ปลายอมรับเมล็ดอาหารที่เหมาะสมกับขนาดของปากได้ดีขึ้น โดยวิธีการสำหรับอาหารเม็ดจืดที่มีสารเชื่อมประสานจะใช้วิธีกดผ่านตะแกรงที่มีขนาดตา 1 มิลลิเมตร ซึ่งจะดีกว่าการใช้ตะแกรงร้อนเพื่อแยกขนาดเมล็ดอาหารภายหลัง เพราะจะทำให้เมล็ดอาหารแตกและกร่อนมากขึ้น สำหรับความคงตัวของเมล็ดอาหารในน้ำของอาหารที่ใช้สารเชื่อมประสานทั้ง 2 ชนิด จะมีค่าลดลงตามระดับการแทนที่ด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุแวกที่สูงขึ้น โดยอาหารเม็ดจืดที่มีเจลาตินเป็นสารเชื่อมประสานและแทนที่ปลาป่นด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุแวกที่ 30 เปอร์เซ็นต์ มีความคงตัวต่ำที่สุดเท่ากับ 80.20 ± 7.57 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่อาหารเม็ดจืดที่มีคาราจีแนนเป็นสารเชื่อมประสานและแทนที่ปลาป่นด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุแวกที่ 0 เปอร์เซ็นต์ มีความคงตัวสูงที่สุดเท่ากับ 90.32 ± 2.78 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งการศึกษาการใช้คาราจีแนน และเจลาตินเป็นสารเชื่อมประสานในอาหาร และใช้ซินเคลือบอาหาร พบการสูญเสียกรดอะมิโนอิสระ 81 เปอร์เซ็นต์ ภายหลังให้อาหารลูกปลาเพียง 1 นาที (Baskerville-Bridges and Kling, 2000b) แสดงให้เห็นว่าอาหารมีการละลาย (Leaching) ของกรดอะมิโนสูง ซึ่งจากผลการศึกษาจะเห็นว่า การใช้เจลาตินเป็นสารเชื่อมประสานจะมีความคงตัวต่ำกว่าการใช้คาราจีแนน เนื่องจากเจลาตินเป็นสารประเภทโปรตีนที่มีความสามารถในการละลายน้ำสูงกว่าคาราจีแนนที่จะมีความสามารถในการละลายขึ้นอยู่กับชนิดของเกลือของไอออน นอกจากนี้ความคงตัวของเมล็ดอาหารในน้ำยังมีค่าลดลงตามระดับการแทนที่ด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุแวกที่สูงขึ้น เพราะโปรตีนไฮโดรไลเสตผลิตจากการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส จนได้ปริมาณเปปไทด์เป็นกรดอะมิโนอิสระหรือเปปไทด์สายสั้นจำนวนมาก จึงมีความสามารถละลายน้ำได้ดี นอกจากการผลิตอาหารให้มีความครบถ้วนทางด้านโภชนาการ และสามารถดึงดูดการกินอาหารได้ดีแล้ว การผลิตอาหารให้มีสีส้มและการเคลื่อนไหว (การลอยตัว) คล้ายอาร์ทีเมีย จะสามารถเพิ่มปริมาณการกินอาหารให้สูงขึ้นได้ (Kolkovski *et al.*, 1997)

องค์ประกอบทางเคมีของอาหารทดลอง พบว่า อาหารอนุบาลปลาทะเลทางการค้ามีปริมาณโปรตีนสูงที่สุดเท่ากับ 52.79 ± 0.27 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างกับอาหารเม็ดจืดที่ใช้สารเชื่อมประสานทั้ง 2 ชนิด และแทนที่ปลาป่นด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุแวกที่ระดับต่างๆ ที่มีค่าอยู่ระหว่าง 49.01-49.78 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณไขมันในอาหารอนุบาลปลาทะเลทางการค้ามีปริมาณไขมันต่ำที่สุดเท่ากับ 12.52 ± 0.74 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างกับอาหารเม็ดจืดที่ใช้สารเชื่อมประสานทั้ง 2 ชนิด และแทนที่ปลาป่นด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุแวกที่ระดับต่างๆ ที่มีค่าอยู่ระหว่าง

19.23-19.71 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องและมีค่าใกล้เคียงกับความต้องการของลูกปลาทะเลวัยอ่อนที่มีปริมาณโปรตีนในอาหารประมาณ 50-70 เปอร์เซ็นต์ เช่น อาหารลูกปลากะพงยุโรป (*Dicentrarchus labrax*) (Peres *et al.*, 1996) มีโปรตีนที่ระดับ 50 เปอร์เซ็นต์ ให้การเจริญเติบโตดีที่สุด และปริมาณไขมันประมาณไม่ต่ำกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ เช่น การศึกษาในอาหารสำหรับลูกปลา Red seabream วัยอ่อนมีระดับไขมัน 18 เปอร์เซ็นต์ของส่วนประกอบอาหาร (Salhi *et al.*, 1999) ในอาร์ทีเมียสำหรับใช้อุบลูกปลา Seabream และปลา Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) มีระดับไขมันสูงถึง 29-37 เปอร์เซ็นต์ (Koven *et al.*, 1992) และ 25 เปอร์เซ็นต์ (Furuita *et al.*, 1998) ตามลำดับ และในการศึกษาของ Brinkmeyer และ Holt (1995) ในลูกปลา Red drum พบว่าที่ระดับไขมัน 18 เปอร์เซ็นต์ ลูกปลาจะมีการเจริญเติบโตดีที่สุด ซึ่งองค์ประกอบทางเคมีที่นำมาอ้างอิงสำหรับผลิตอาหารสำหรับลูกปลาทะเลวัยอ่อนจะกำหนดให้มีค่าใกล้เคียงกับองค์ประกอบทางเคมีของอาร์ทีเมีย (Hamre, 2006)

จากการศึกษาการยอมรับอาหารในปลากะพงขาวอายุ 16 DPH ที่ได้รับอาหารเม็ดจืดที่มีเจลาตินและคาร์โบไฮเดรต เป็นสารเชื่อมประสาน และมีการแทนที่โปรตีนปลาปนด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุแวกที่ระดับ 0, 15 และ 30 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 7 วัน พบว่าปลากะพงขาว (อายุ 23 DPH) มีอัตราการรอดตาย 93.33-97.33 เปอร์เซ็นต์ ไม่แตกต่างกันในทุกชุดการทดลอง แสดงให้เห็นว่าการให้อาหารสำเร็จรูปร่วมกับอาร์ทีเมีย ซึ่งเป็นอาหารมีชีวิต ส่งผลให้ลูกปลาสามารถกินและย่อยอาหารได้ สอดคล้องกับการศึกษาในลูกปลาวัยอ่อนหลายชนิดที่สามารถกินอาหารสำเร็จรูปได้ดีเมื่อให้ร่วมกับอาหารมีชีวิต (เจนจิตต์ และคณะ, 2546; มาวิทย์ และจิระยุทธ, 2551; Walford and Lam, 1991; Koven *et al.*, 2001; Blair *et al.*, 2003; Curnow *et al.*, 2006; Engrola *et al.*, 2009) การให้อาหารทดลองร่วมกับตัวอ่อนอาร์ทีเมีย จึงทำให้มีตัวกระตุ้นทางเคมีและการเคลื่อนไหวของ อาร์ทีเมีย ช่วยดึงดูดการกินอาหารของลูกปลาให้สูงขึ้น และสามารถนำสารอาหารไปใช้ได้ดี เนื่องจากลูกปลากะพงขาวอายุ 16 DPH ที่นำมาศึกษาในครั้งนี้มีระบบย่อยอาหารสมบูรณ์ (จากผลการทดลองที่ 1) มีกิจกรรมเอนไซม์ย่อยอาหารหลัก ได้แก่ เอนไซม์เปปซิน ทริปซิน อะไมเลส และไลเปส ครบถ้วน สอดคล้องกับการพบอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับระบบย่อยอาหารต่างๆ ครบถ้วน นอกจากนี้อาหารทดลองเม็ดจืดที่ผลิตขึ้นเอง มีปริมาณโปรตีนต่ำกว่าอาหารอนุบาลปลาทะเลทางการค้า แต่ลูกปลาสามารถยอมรับอาหารได้ดี เพราะการผลิตใช้แหล่งวัตถุดิบโปรตีนที่มีคุณภาพดี ได้แก่ ปลาปน และหมึกปน ที่มีปริมาณโปรตีนสูงเท่ากับ 69.81 ± 0.11 และ 62.54 ± 0.39 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีการแทนที่ด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุแวกที่เป็นแหล่งโปรตีนคุณภาพดีที่มีปริมาณโปรตีนสูงเท่ากับ 81.48 ± 0.03 เปอร์เซ็นต์ และอาหารทดลองมีปริมาณกรดอะมิโนจำเป็น ได้แก่ อาร์จินีน ฮิสติดีน ไลซีน เมทไธโอนีน และทรีโอนีน และกรดอะมิโนไม่จำเป็น

ได้แก่ อะลานีน กรดแอสพาร์ติก ไกลซีน ไฮดรอกซีไลซีน และทอรีน สูงกว่าอาหารอนุบาลทางการค้า ซึ่งเป็นสารตั้งดูการกินอาหารและมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตสำหรับลูกปลา จึงทำให้ลูกปลา กินอาหารและนำสารอาหารไปใช้ในการเจริญเติบโตได้ดีขึ้น

ระหว่างการเลี้ยงตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 พบว่าปลากระพงขาวชุดการทดลองที่ได้รับเนื้อปลาทูสคและอาหารอนุบาลปลาทะเลทางการค้าทยอยตายเป็นจำนวนมาก และตายทั้งหมดในสัปดาห์ที่ 3 ให้ผลแตกต่างจากการศึกษาของ จุฑารัตน์ และคณะ (2556) ที่ศึกษาผลของรูปแบบอาหารสำเร็จรูปในปลากระพงขาวอายุ 20 วัน (น้ำหนักเริ่มต้น 0.07 ± 0.01 กรัมต่อตัว) ซึ่งเป็นช่วงอายุที่มีระบบย่อยอาหารสมบูรณ์แล้ว โดยมีการนำเนื้อปลาทูสคและอาหารอนุบาลปลาทะเลทางการค้ามาเป็นอาหารชุดควบคุมและอ้างอิง เมื่อสิ้นสุดการศึกษาปลากระพงขาวมีอัตราการรอดตาย เท่ากับ 2.00 ± 0.00 และ 20.00 ± 5.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อพิจารณาน้ำหนักปลากระพงขาว พบว่า ในการศึกษาครั้งนี้มีน้ำหนักเฉลี่ยเท่ากับ 0.01 ± 0.01 กรัมต่อตัว ซึ่งต่ำกว่าจึงอาจมีผลทำให้ความสามารถในการยอมรับอาหารแตกต่างกัน สำหรับพฤติกรรมการกินอาหาร พบว่า ปลาทั้ง 2 ชุดการทดลองนี้ จะว่ายน้ำตามอาหารลงไปในพื้นที่ที่ปล่อย และว่ายน้ำวนเวียนใกล้อาหารในช่วงระยะเวลาสั้นๆ หลังจากนั้นจึงว่ายน้ำกลับไปยังบริเวณผิวน้ำเช่นเดิม ลูกปลาอาจจะต้องได้รับการกระตุ้นจากคุณสมบัติของอาหาร ทั้งทางเคมี และการมองเห็นมากกว่านี้ จึงจะทำให้การกินอาหารเพิ่มขึ้น (Kolkovski *et al.*, 1997) นอกจากนี้อาจเกิดจากลักษณะเนื้อ (Texture) ของเม็ดอาหาร ที่มีความเหนียวหรือ แข็งเกินไปสำหรับลูกปลาอายุ 16 DPH

เมื่อเลี้ยงลูกปลาด้วยอาหารทดลองต่อเนื่องเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า อัตราการรอดตายของลูกปลากระพงขาว มีแนวโน้มสูงขึ้นตามระดับการแทนที่ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในลูกปลาวัยอ่อนหลายชนิด พบว่า การใช้โปรตีนไฮโดรไลเสตเป็นแหล่งโปรตีนในอาหารลูกปลาในระดับไม่เกิน 50 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้อัตราการรอดตายและการเจริญเติบโตดีขึ้น เช่น การศึกษาของ Zambonino-Infante และคณะ (1997) และ Cahu และคณะ (1998) พบว่า การใช้โปรตีนไฮโดรไลเสตในอาหารสำหรับอนุบาลลูกปลากระพงยุโรป (*Dicentrarchus labrax*) ที่ระดับ 20 และ 40 เปอร์เซ็นต์โปรตีน ตามลำดับ มีผลเพิ่มอัตราการรอดตายและการเจริญเติบโต และการศึกษาของ Kotzamanis และคณะ (2007) พบว่า การใช้โปรตีนไฮโดรไลเสตในอาหารสำหรับอนุบาลลูกปลากระพงยุโรป ที่ระดับ 10 เปอร์เซ็นต์ในอาหาร มีผลเพิ่มอัตราการรอดตายและการเจริญเติบโตเช่นกัน เนื่องจากปลามีการพัฒนาระบบย่อยอาหารสมบูรณ์แล้ว และโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทูสคที่นำมาใช้ เป็นโปรตีนจากปลาทั้งตัวที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส ที่มีปริมาณกรดอะมิโนอิสระสูง เป็นสารตั้งดูการกินอาหาร จึงทำให้อาหารมีความน่ากินมากขึ้น และอาจมีผลเพิ่มการย่อยและดูดซึมสารอาหารในทางเดินอาหารลูกปลาวัยอ่อนได้ดีขึ้น (Carvalho *et al.*, 1997;

Zambonino-Infante *et al.*, 1997; Cahu *et al.*, 1999; Kolkovski and Tandler, 2000) ซึ่งสอดคล้องกับการเจริญเติบโตของลูกปลากะพงขาวที่ดีขึ้น พบว่าระดับของโปรตีนไฮโดรไลเสตมีผลต่อน้ำหนักสุดท้าย น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ โดยปลาที่ได้รับอาหารที่ไม่มีการแทนที่โปรตีนไฮโดรไลเสต มีน้ำหนักสุดท้ายและน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นสูงที่สุดเท่ากับ 0.1719 ± 0.0234 และ 0.1679 ± 0.0232 กรัมต่อตัว ตามลำดับ ไม่แตกต่างกับที่ 30 เปอร์เซ็นต์ ($P > 0.05$) แต่สูงกว่าที่ระดับ 15 เปอร์เซ็นต์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะในปลาที่ได้รับอาหารแทนที่โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ 30 เปอร์เซ็นต์ มีค่าสูงที่สุดเท่ากับ 13.56 ± 0.97 เปอร์เซ็นต์ต่อวัน ไม่แตกต่างกับที่ 0 เปอร์เซ็นต์ ($P > 0.05$) แต่สูงกว่าที่ระดับ 15 เปอร์เซ็นต์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เนื่องจากวัตถุดิบปลาป่นที่นำมาใช้ผลิตอาหารมีคุณภาพดี คือ มีปริมาณโปรตีน และไขมันสูง เท่ากับ 69.81 ± 0.11 และ 9.32 ± 0.45 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จึงทำให้อาหารมีกลิ่นและความน่ากินสูง และมีความคงตัวของเม็ดอาหารที่ดีกว่าอาหารที่มีโปรตีนไฮโดรไลเสต ซึ่งมีความคงตัวของเม็ดอาหารในน้ำ ลดลงตามระดับการแทนที่ที่สูงขึ้น อาจมีสาเหตุจากโปรตีนและกรดอะมิโนที่จำเป็นละลายน้ำเร็ว ทำให้ลูกปลากะพงขาวไม่สามารถนำสารอาหารไปใช้ในการเจริญเติบโตได้ ส่งผลให้ลูกปลาที่ได้รับอาหารที่ไม่มีการแทนที่ด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุแวก มีการเจริญเติบโตสูงที่สุด นอกจากนี้จะเห็นว่าลูกปลาที่ได้รับอาหารที่มีโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทุแวกที่ 15 เปอร์เซ็นต์ มีการเจริญเติบโตต่ำแตกต่างออกไป อาจเกิดจากการเป็นปฏิปักษ์ของกรดอะมิโนชนิดจำเป็น (Antagonism) ในอาหาร เนื่องจากกรดอะมิโนจำเป็นและไม่จำเป็นบางชนิดมีผลต่อความต้องการกรดอะมิโนจำเป็นที่มีโครงสร้างทางเคมีที่คล้ายคลึงกัน และมีบทบาทในกระบวนการเมตาบอลิซึมในแง่ของการยับยั้งและแข่งขันกันทำปฏิกิริยา (Asgard and Austreng, 1986) และอาจมีผลต่อการเจริญเติบโตของสัตว์ลดลง ซึ่งจากสัดส่วนของกรดอะมิโนจำเป็นในอาหารทดลอง พบว่า เมทไธโอนีนมีส่วนที่ต่ำ จึงอาจทำให้ไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตของปลา เพราะในกระบวนการสังเคราะห์กรดอะมิโนซีสทีนจะใช้เมทไธโอนีนเป็นสารประกอบตั้งต้น ดังนั้นหากปลาได้รับอาหารที่มีซีสทีนในปริมาณน้อย เมทไธโอนีนส่วนหนึ่งจะถูกนำไปใช้ในการสังเคราะห์ซีสทีนเพื่อให้เพียงพอในการสังเคราะห์โปรตีน (ชุติมา และคณะ, 2545) นอกจากนี้อาจมีสาเหตุจากพฤติกรรมของปลากะพงขาวที่เป็นปลากินเนื้อ คือ หากลูกปลามีขนาดแตกต่างกันมาก และอยู่ในช่วงการปรับเปลี่ยนอาหารจะมีอัตราการกินกันเองสูง อาจมีการเจริญเติบโตที่มาจาก การกินลูกปลาด้วยกันเองด้วย จึงทำให้มีการเจริญเติบโตแตกต่างกัน ดังนั้นการเลี้ยงและอนุบาลปลากะพงขาวจึงต้องคำนึงถึง วิธีการให้อาหาร คือ ความถี่ คุณภาพและปริมาณ ขนาด และการกระจายของอาหารจะต้องเหมาะสมและเพียงพอต่อการกินของปลา (Katavic *et al.*, 1989) จึงจะสามารถลดอัตราการกินกันเอง และอัตราการตายของลูกปลาได้

กิจกรรมเอนไซม์เปปซิน ทริปซิน อะไมเลส และไลเปส ในปลากระพงขาวอายุ 16 DPH เมื่อเริ่มต้นการทดลอง เท่ากับ 123.37 ± 21.81 Unit/mg protein, 0.46 ± 0.24 mUnit/mg protein, 1.50 ± 0.14 Unit/mg protein และ 0.21 ± 0.04 mUnit/mg protein ตามลำดับ โดยเอนไซม์เปปซิน และ ทริปซิน มีกิจกรรมเพิ่มขึ้น ขณะที่เอนไซม์อะไมเลส และไลเปส ลดลง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษา การเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อวิทยาของระบบย่อยอาหารที่พบการเจริญของอวัยวะที่เกี่ยวข้องต่างๆ ครบถ้วน และมีการเพิ่มขนาดของอวัยวะ ปริมาณและขนาดของเซลล์ในเนื้อเยื่อของระบบย่อย อาหารตามการเจริญเติบโตของปลากระพงขาว เนื่องจากช่วงแรกที่ศึกษาการยอมรับอาหาร เมื่อลูก ปลากินอาหารทดลองร่วมกับอาร์ทีเมียที่มีเอนไซม์ย่อยโปรตีนด้วย จึงมีผลช่วยกระตุ้นการกิน อาหาร กระตุ้นการหลั่งเอนไซม์โปรติเอส และชักนำให้เซลล์และเนื้อเยื่อมีการพัฒนาเพื่อหลั่ง เอนไซม์และย่อยอาหารได้ดีขึ้น (Person-Le Ruyet *et al.*, 1993; Kolkovski *et al.*, 1997; Lazo *et al.*, 2000; Engrola *et al.*, 2009) และสูงขึ้นตามการเจริญเติบโตของปลากระพงขาว ซึ่งการผลิตเอนไซม์ ย่อยอาหารจะสอดคล้องการเกิดอวัยวะต่างๆ ที่เกี่ยวกับระบบย่อยอาหาร คือ เอนไซม์เปป ซินผลิต จากกระเพาะอาหาร เอนไซม์อะไมเลส ไลเปส และทริปซินผลิตจากตับอ่อน (การุณ และ อุทัยวรรณ, 2555)

เมื่อปลากระพงขาวอายุ 44 DPH พบว่ากิจกรรมเอนไซม์เปปซิน และทริปซินมีผลจาก อิทธิพลร่วมระหว่างชนิดของสารเชื่อมประสานและระดับของโปรตีนไฮโดรไลเซต ($P < 0.05$) โดย กิจกรรมเอนไซม์เปปซินในปลากระพงขาวที่ได้รับอาหารที่มีคาร์ราจีแนนและแทนที่ปลาปนด้วย โปรตีนไฮโดรไลเซต จากปลาทุแวกที่ 30 เปอร์เซนต์ มีระดับสูงที่สุดเท่ากับ 3515.52 ± 107.80 Unit/mg protein ($P < 0.05$) และกิจกรรมเอนไซม์ทริปซินในปลากระพงขาวที่ได้รับอาหารที่มีคาร์รา จีแนนและไม่มีการแทนที่ปลาปนด้วยโปรตีนไฮโดรไลเซตจากปลาทุแวก มีค่าสูงที่สุดเท่ากับ 3.89 ± 0.30 mUnit/mg protein แตกต่างจากปลาที่ได้รับอาหารที่มีเจลาตินมีการแทนที่ปลาปนด้วย โปรตีนไฮโดรไลเซตจากปลาทุแวกที่ระดับต่างๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) จากผลของ ชนิดของสารเชื่อมประสานที่พบว่าปลาที่ได้รับอาหารที่ใช้คาร์ราจีแนนมีกิจกรรมเอนไซม์ย่อย โปรตีนสูง สอดคล้องกับการศึกษาของ Partridge และ Southgate (1999) ที่ใช้เจลาติน คาร์ราจีแนน และสารอื่นๆ เป็นสารเชื่อมประสานในอาหารปลากระพง พบว่าปลาที่มีประสิทธิภาพการย่อยและดูด ซึมอาหารที่มีคาร์ราจีแนนที่มีค่าเท่ากับ 2.19 ± 0.29 $\mu\text{g}/\text{mg}/\text{h}$ สูงกว่า เจลาตินที่มีค่าเท่ากับ 1.60 ± 0.22 $\mu\text{g}/\text{mg}/\text{h}$ แต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อพิจารณาระดับการแทนที่ปลาปนด้วย โปรตีนไฮโดรไลเซตจากปลาทุแวก พบว่ากิจกรรมเอนไซม์เปปซิน และทริปซินมีแนวโน้มสูงขึ้น ตามระดับการแทนที่ที่สูงขึ้น สอดคล้องกับการศึกษาในลูกปลาวัยอ่อนหลายชนิดที่ พบว่าการใช้ โปรตีนไฮโดรไลเซตหรือการเสริมเอนไซม์ลงในอาหารลูกปลาวัยอ่อน จะมีผลเพิ่มการย่อยและดูด

ซึ่มสารอาหารในระบบย่อยอาหาร (Carvalho *et al.*, 1997; Zambonino-Infante *et al.*, 1997; Cahu *et al.*, 1999; Kolkovski and Tandler, 2000) อาจทำให้กิจกรรมเอนไซม์เพิ่มขึ้น

สำหรับราคาของสารเชื่อมประสานทั้ง 2 ชนิด ที่ใช้ในอาหาร พบว่าการใช้เจลาติน และ คาราจีแนน มีราคาเท่ากับ 11.40 และ 51.0 บาทต่อกิโลกรัมอาหาร ตามลำดับ ซึ่งเจลาตินมีราคาต่ำกว่าคาราจีแนนประมาณ 5 เท่า นอกจากนี้เมื่อพิจารณาปริมาณการใช้วัตถุดิบแหล่งโปรตีนจากตารางที่ 6 พบว่า ในสูตรอาหารที่ใช้เจลาตินเป็นสารเชื่อมประสาน จะใช้ปริมาณต่ำกว่าสูตรที่ใช้คาราจีแนน เพราะเจลาตินมีโปรตีนสูงเท่ากับ 96.16 ± 0.19 เปอร์เซ็นต์ เพื่อให้สูตรอาหารทุกสูตรมีปริมาณโปรตีนใกล้เคียงกัน จึงต้องลดปริมาณวัตถุดิบโปรตีนลง ส่งผลให้ราคาค้นทุนในการผลิตอาหารสูตรที่ใช้เจลาตินมีราคาต่ำกว่า

3.8 สรุปผลการศึกษา

ปลากะพงขาวอายุ 16 วัน หลังฟักออกเป็นตัว ที่มีระบบย่อยอาหารสมบูรณ์ สามารถยอมรับอาหารเม็ดจืดที่มีการแทนที่โปรตีนปลาปนด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทูแวกที่ระดับ 0, 15 และ 30 เปอร์เซ็นต์ และใช้สารเชื่อมประสาน 2 ชนิด คือ เจลาตินและคาราจีแนน และพบว่าสามารถใช้เจลาตินเป็นสารเชื่อมประสาน และมีการแทนที่โปรตีนปลาปนด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทูแวกในอาหารได้ถึงระดับ 30 เปอร์เซ็นต์ โดยปลาไม่อัตราการรอดตาย การเจริญเติบโต และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีน ไม่แตกต่างจากชุดควบคุม แต่มีแนวโน้มสูงกว่า นอกจากนี้ยังมีต้นทุนของสารเชื่อมประสานในการผลิตอาหารต่ำกว่า

บทที่ 4

สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาพัฒนาการทางเนื้อเยื่อวิทยาของระบบย่อยอาหารในปลากะพงขาววัยอ่อนอายุแรกฟักออกเป็นตัว จนถึงอายุ 30 วัน ในการทดลองที่ 1 พบว่าปลากะพงขาวอายุ 17 วัน หลังฟักออกเป็นตัว มีระบบย่อยอาหารสมบูรณ์ เนื่องจากลูกปลามีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงอายุ 15-30 DPH แสดงให้เห็นว่าลูกปลาสามารถย่อยและดูดซึมสารอาหารไปในการเจริญเติบโตได้ดี และสอดคล้องกับผลการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาที่พบอวัยวะต่างๆ ในระบบย่อยอาหารพัฒนาทั้งด้านโครงสร้าง ขนาดและปริมาณของเซลล์ จนกระทั่งสามารถแบ่งชั้นต่างๆ ของทางเดินอาหาร ได้ชัดเจน และพบต่อมแกสตริกบริเวณกระเพาะอาหารตอนต้น ซึ่งเป็นลักษณะบ่งชี้ถึงการเจริญเป็นปลาระยะวัยรุ่น

จากนั้นจึงนำข้อมูลมาศึกษาต่อเนื่องในการทดลองที่ 2 โดยนำลูกปลากะพงขาวอายุ 16 DPH มาศึกษาผลของชนิดสารเชื่อมประสานและระดับโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาหมึกต่ออัตราการรอดตาย การเจริญเติบโต กิจกรรมเอนไซม์ย่อยอาหารหลัก และการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อวิทยา พบว่าลูกปลามีอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับระบบย่อยอาหารต่างๆ ครบถ้วน และพบกิจกรรมเอนไซม์ย่อยอาหารหลัก ได้แก่ เอนไซม์เปปซิน ทริปซิน อะไมเลส และไลเปส ตั้งแต่เมื่อเริ่มการทดลอง

เมื่อพิจารณาการเจริญเติบโตของลูกปลาอายุ 17 DPH ในการทดลองที่ 1 จะมีความยาวลำตัวต่ำกว่า แต่มีน้ำหนักสูงกว่า ลูกปลาอายุ 16 DPH ในการทดลองที่ 2 อาจมีสาเหตุจาก ในการทดลองที่ 2 จะต้องขนส่งลูกปลากะพงขาวตั้งแต่อายุ 9 DPH จากจังหวัดสตูล จึงอาจทำให้การเจริญเติบโตหยุดชะงักไป แต่เมื่อนำมาอนุบาลพบว่าลูกปลาก็มีการเจริญเติบโต นอกจากนี้ยังอาจเกิดจากปัจจัยที่เกี่ยวกับสุขภาพและคุณภาพเซลล์สืบพันธุ์ของพ่อแม่พันธุ์ปลา สภาพแวดล้อม (อุณหภูมิและคุณภาพน้ำ) ในการฟักไข่ วิธีการที่เหมาะสมในการให้อาหาร และปัจจัยเสี่ยงที่มีผลต่ออัตราการรอดตาย การเจริญเติบโต (Gisbert *et al.*, 2008; Zambonino-Infante *et al.*, 2008)

การเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อวิทยาที่เกี่ยวข้องกับระบบย่อยอาหาร พบว่ามีความสมบูรณ์ในอายุที่แตกต่างกัน 1 วัน เนื่องจากการเก็บตัวอย่างในการทดลองที่ 1 มีการเว้นช่วงที่อายุ 16 DPH ซึ่งลูกปลาอาจมีความสมบูรณ์แล้วเช่นกัน แต่เมื่อศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เปปซินที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของต่อมแกสตริกที่เป็นอวัยวะ และลักษณะบ่งชี้ถึงการเจริญเป็นปลาระยะวัยรุ่น ที่มีลักษณะของอวัยวะและการทำงานเหมือนปลาตัวเต็มวัย บ่งบอกว่ามีระบบย่อยอาหารสมบูรณ์แล้วในการทดลองที่ 2 การพบเนื้อเยื่อต่อมแกสตริกจะสอดคล้องกับการพบกิจกรรมเอนไซม์เปปซิน ซึ่งในปลาหลายชนิดมีการศึกษาด้วยเทคนิคทางชีวเคมีควบคู่ไปด้วย เนื่องจากต่อมแกสตริก

จะประกอบด้วยเซลล์ที่สำคัญ 2 ชนิด ที่มีผลให้กระเพาะอาหารทำหน้าที่สมบูรณ์ คือ Parietal cell เป็นเซลล์ทำหน้าที่สร้างกรดเกลือเพื่อทำให้ Chief cell ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น Protein-secreting cell ภายในมีเอนไซม์ที่ยังทำงานไม่ได้ คือ เปปซิโนเจน เมื่อหลั่งออกมาในกระเพาะอาหารที่มีสภาพเป็นกรด จึงถูกเปลี่ยนเป็นเอนไซม์เปปซิน ที่ทำหน้าที่ได้และใช้ในการย่อยโปรตีนให้มีโมเลกุลเล็กลง (กนกธร, 2546) จึงสามารถวัดกิจกรรมเอนไซม์เปปซินดังกล่าวควบคู่กันเพื่อเป็นการยืนยันได้เช่นกัน นอกจากนี้ยังพบกิจกรรมเอนไซม์ทริปซิน อะไมเลส และไลเปส ซึ่งการตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์แต่ละตัว เป็นการแสดงการเกิดของอวัยวะในระบบย่อยอาหารเช่นเดียวกัน โดยเอนไซม์ทริปซิน ไลเปส และอะไมเลส จะผลิตจากตับอ่อน ซึ่งตับอ่อนจะพบตั้งแต่ลูกปลาฟักออกเป็นตัวและดูไข่แดงเริ่มยุบ ซึ่งจะทำหน้าที่สร้างเอนไซม์ ตั้งแต่ลูกปลามีอายุ 1 วัน หลังฟักออกเป็นตัว (วันเพ็ญ และนนุช, 2530; นันทนา, 2531; สุปราณี และคณะ, 2536; Cousin and Baudin-Laurencin, 1985; Govoni *et al.*, 1986; Boulhic and Gabaudan, 1992; Sarasquete *et al.*, 1995; Falk-Peterson and Hansen, 2001; Kolkovski, 2001; Chen *et al.*, 2006) ดังนั้นลูกปลาที่นำมาใช้ศึกษาในการทดลองที่ 2 มีระบบย่อยอาหารเจริญทั้งทางด้านโครงสร้าง และหน้าที่ เพราะตรวจพบต่อมแกสตริกบริเวณกระเพาะอาหารด้วยเทคนิคทางเนื้อเยื่อวิทยา และตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหารหลักครบถ้วนเป็นการยืนยัน จึงทำให้ลูกปลากะพงขาวอายุ 16 DPH มีความพร้อมในการใช้อาหารสำเร็จรูปที่ผลิตขึ้น โดยวิธีการให้อาหารสำเร็จรูปร่วมกับอาร์ทีเมีย

ข้อเสนอแนะ

1. การศึกษานี้เป็นการศึกษาในตู้ทดลองขนาดเล็ก ซึ่งมีข้อจำกัดในพื้นที่และจำนวนปลาที่ใช้ จึงควรมีการทดลองในโรงเพาะพันธุ์ปลากะพงขาวทั่วไป และเนื่องจากปลากะพงขาวเป็นปลากินเนื้อ จึงควรมีการออกแบบตู้หรือถังเลี้ยงให้สามารถคัดขนาดได้ขณะทำการศึกษา โดยไม่มีผลกระทบต่อปลาทดลอง
2. ควรมีการศึกษากิจกรรมเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการดูดซึมกรดอะมิโนเพิ่มเติม และอาจมีการศึกษาประสิทธิภาพย่อยอาหารด้วย เพื่อยืนยันความสามารถในการใช้อาหารของลูกปลา

เอกสารอ้างอิง

- กนกธร ปิยขำรังรัตน์. 2546. เนื้อเยื่อวิทยา. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์.
- การุณ ทองประจุกแก้ว และอุทัยวรรณ โกวิทวาทิ. 2555. เอนไซม์ย่อยอาหารกับการพัฒนาอาหารเพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ. วารสารวิชาการพระจอมเกล้าพระนครเหนือ 22: 710-720.
- จันทวัจจรี จันทรสารทูล. 2532. ผลของฮอร์โมนต่อการพัฒนาของไข่ปลาอุกอุยและปลาอุกค้ำ และลักษณะทางเนื้อเยื่อของลูกปลาวัยอ่อน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- จินตมาศ สุวรรณจรัส. 2533. การศึกษาเยื่อผนังลำไส้เล็กของปลาแก้ว ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบแสงและวิธีทางฮิสโตเคมี. วารสารสงขลานครินทร์ 12: 338-349.
- จุฑารัตน์ คชเวช, ชุติมา ตันติกิตติ และฤดีกร วิวัฒน์ปฐพี. 2556. ผลของรูปแบบอาหารสำเร็จรูปต่อการยอมรับอาหาร อัตรารอดตาย และการเจริญเติบโตในปลากะพงขาววัยรุ่นตอนต้น (*Lates calcarifer* Bloch, 1790). วารสารการประมง 66: (กำลังอยู่ระหว่างการตีพิมพ์).
- เจนจิตต์ คงกำเนิด, สุนิตย์ โรจนพิทยากุล และอัครา ไชยมงคล. 2546. การอนุบาลลูกปลากะรัง (*Epinephelus coioides*, Hamilton) วัยอ่อนด้วยอาหารสำเร็จรูป. เอกสารวิชาการฉบับที่ 21 สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง.
- ชลอ ลีสุวรรณ, สุปราณี ชินบุตร, นิตยา วชิรชัยไพศาล และทวี หอมขง. 2528. การศึกษาการเกิดอวัยวะและลักษณะทางเนื้อเยื่อของปลากะพงขาววัยอ่อน. เอกสารวิชาการฉบับที่ 49 สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ.
- ชาติรี ฤทธิ์ทอง. 2543. การศึกษาการเจริญของเนื้อเยื่อระบบย่อยอาหาร ตา และสมองในปลาอุกอุยวัยอ่อน Gunther's walking catfish, *Clarias macrocephalus*. โครงการงานทางชีววิทยาหลักสูตรปริญญาตรี, ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- ชุติมา ตันติกิตติ. 2547. กายวิภาคและสรีรวิทยาการย่อยอาหารของลูกปลาอุกอุยวัยอ่อน. เอกสารประกอบการฝึกอบรมเรื่อง "Molecular Biological Approaches to Digestion and Feeding in Larval Marine Fish and Shrimp" 6-8 กรกฎาคม 2547. ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. หน้า 51-71.
- ชุติมา ตันติกิตติ, อมรรัตน์ เสริมวัฒนากุล, วิมล จันทรโรทัย และกิจการ สุขมาตย์. 2545. รายงานวิจัยเรื่อง "การศึกษาความต้องการกรดอะมิโนด้านปริมาณของปลากดเหลือง (*Mystus nemurus* Cuv.& Val.)". ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

- ไตรตะวัน คงแก้ว. 2542. โพรตีนไฮโดรไลเสตและน้ำมันดิบจากหัวกุ้งกุลาดำ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาเทคโนโลยีผลิตภัณฑ์ประมง คณะอุตสาหกรรมเกษตร, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- ธวัช ศรีวีระชัย .2538 .การอนุบาลลูกปลากะพงขาวในกระชังด้วยอาหารต่างชนิดเอกสารวิชาการ. ฉบับที่ 45 สถานีเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งจังหวัดนครราชสีมา.
- ธวัช ศรีวีระชัย, ฐานันดร ทัดตานนท์และวิชัย ชัยชนะกสิกรรมการใช้อาหารเม็ดทดแทน .2543 . เอกสาร .นี้ว ในกระชัง 3 นิ้ว ให้มีขนาด 1 ปลายในการอนุบาลปลากะพงขาว จากขนาด ศูนย์พัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งจังหวัดนครราชสีมา.
- นันทนา ศรีรัตนกุล. 2531. ผลของโซเดียมไซโอซัลเฟตต่ออัตราการฟักและลักษณะทางเนื้อเยื่อของปลาแพนซีคาร์พวียอ่อน (*Cyprinus carpio*). วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- นเรศ กิจจาพัฒน์พันธ์. 2553. สถานการณ์ปลากะพงขาวไตรมาสที่ 1 ปี 2553. สืบค้นได้จาก <http://fishco.fisheries.go.th/> (สืบค้นเมื่อ 2 มกราคม 2554).
- นเรศ กิจจาพัฒน์พันธ์. 2555. ต้นทุนการเพาะเลี้ยงปลากะพงขาวขนาดใหญ่ที่เกาะขอม. สืบค้นได้จาก <http://fishco.fisheries.go.th/> (สืบค้นเมื่อ 17 ธันวาคม 2555).
- เบญจศุภลักษณ์ อุดรโพธิ์. 2545. พัฒนาการทางเนื้อเยื่อวิทยาและฮิสโตเคมีของระบบย่อยอาหารในปลาบู่ทรายระยะวัยอ่อน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- มะลิ บุญยรัตผลิน และจوزهดี พงศ์มณีรัตน์. 2533. ความต้องการฟอสฟอรัสในอาหารปลากะพงขาว. เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 4 สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง.
- มาวิทย์ อัสวารีย์ และจิระยุทธ รื่นศิริกุล. 2551. การอนุบาลลูกปลากะรังดอกแดง (*Epinephelus coioides* Hamilton, 1822) โดยการใช้อาร์ทีเมียร่วมกับอาหารสำเร็จรูป. เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 31 สำนักวิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง.
- วันชัย เกียรติพิมล. 2545. การผลิตและการใช้โปรตีนไฮโดรไลเสตและสารสกัดจากปลาจากวัสดุเศษเหลือโรงงานแปรรูปอาหารทะเล เป็นสารตั้งต้นการกินอาหารของปลากดเหลือง (*Mystus nemurus*). วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- วันเพ็ญ มินกาญจน์ และนนุช อ่องสุวรรณ. 2530. การผสมเทียมปลาทรงเครื่อง. เอกสารเผยแพร่ ฉบับที่ 8 สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ.

- สุนิตย์ โจรนพิทยากุล, เจนจิตต์ คงกำเนิด และสรณ์ภูษิ์ ศิริสวย. 2540. ชีววิทยาและพัฒนาการของลูกปลาเห็ดโคน *Sillago sihama* วัยอ่อนระยะแรก. เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 11 ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งกระบี่.
- สิทธิ บุญรัตน์ผลิน, กิจการ ศุภมาตย์ และสถาพร ดิเรกบุษราคม. 2532. ผลของวิตามินซีต่อการเจริญเติบโต องค์ประกอบเลือดและความต้านทานโรคของปลากะพงขาว. เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 6 สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง.
- สุปราณี ชินบุตร, กัลยา จำเริญรัตน์ และชลอ ลิมสุวรรณ. 2536. เนื้อเยื่อปลาช่อน. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: ฟีนี พับลิชชิง.
- สุปราณี ชินบุตร, พรเลิศ จันทร์รัชชกุล และนงนุช เลาหะวิสุทธิ. 2534. การศึกษาการเกิดอวัยวะและลักษณะทางเนื้อเยื่อของปลากัดวัยอ่อน *Betta splendens*, Regan. วิทยาศาสตร์ 25: 421-429.
- สุภาพร มหันต์กิจการใช้วัสดุเศษเหลือจากโรงงานอุตสาหกรรมแปรรูปสัตว์น้ำเป็นแหล่ง . โปรตีนทดแทนปลาป่นในอาหารปลากะพงขาว (*Lates calcarifer* Bloch). วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต, สาขาวิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- อาคม สิงหนุญ, ไพบูลย์ บุญลิปตานนท์ และสามารถ เดชสถิตย์. 2546. พัฒนาการคัพภะและลูกปลาวัยอ่อนของปลาเก๋าเสือ *Epinephelus fuscoguttatus* (Forsskal, 1775). เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 28 ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งกระบี่.
- อานัส แซะอาหลี .2551. การใช้เครื่องในปลาทูน่าไฮโดรไลสเป็นสารกระตุ้นการกินในอาหารสำหรับกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) ที่มีฮีโมโกลบินปนแทนที่ปลาป่น .วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต, สาขาวิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- อุมาพร เจริญกุล .2542. การศึกษาลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยา และการเจริญของระบบย่อยอาหาร ตา และสมองในปลากดเหลือง, *Mystus nemurus*. โครงการงานทางชีววิทยา หลักสูตรปริญญาตรี, ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- Adler-Nissen, J. 1986. Enzymic Hydrolysis of Food Protein. UK: Elsevier Applied Science Publishers, Barking.
- Alvarez-Gonzalez, C.A., Cervantes-Trujano, M., Tovar-Ramirez, D., Conklin, D.E., Nolasco, H., Gisbert, E. and Piedrahita, R. 2006. Development of digestive enzymes in California halibut *Paralichthys californicus* larvae. Fish Physiology and Biochemistry 31: 83-93.

- Alvarez-Gonzalez, C.A., Moyano-Lopez, F.J., Civera-Cerecedo, R., Carrasco-Chavez, V., Ortiz-Galindo, J.L. and Dumas, S. 2008. Development of digestive enzymes activity in larvae of spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus*. I: Biochemical analysis. *Fish Physiology and Biochemistry* 34: 373-384.
- AOAC. 1990. Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists. 15th edition, Washington, D.C.
- Asgard, T. and Austreng, E. 1986. Blood, ensiled or frozen, as feed for salmonids. *Aquaculture* 55: 263-284.
- Baek, H.H. and Cadwallader, K.R. 1995. Enzymatic hydrolysis of crayfish processing by-products. *Journal of Food Science*. 60: 929-935.
- Baglolle C.J., Goff G.P., Wright G.M., 1998. Distribution and ontogeny of digestive enzymes in larval yellowtail and winter flounder. *Journal of Fish Biology* 53: 767– 784.
- Bancroft, J.D. 1975. Histochemical Techniques. 2nd Edition. London: Butterworths.
- Baskerville-Bridges, B. and Kling, L.J. 2000a. Early weaning of Atlantic cod (*Gadus morhua*) larvae onto a microparticulate diet. *Aquaculture* 189: 109-117.
- Baskerville-Bridges, B. and Kling, L.J. 2000b. Development and evaluation of microparticulate diets for early weaning of Atlantic cod (*Gadus morhua*) larvae. *Aquaculture Nutrition* 6: 171-182.
- Bergmeyer, H.U., Bergmeyer, J. and Grassl, M. 1974. Methods of Enzymatic Analysis. 2nd Edition, volume II. New York: Academic Press.
- Benjakul, S. and Morrissey, M. T. 1997. Protein hydrolysates from Pacific whiting solid waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61: 131-138.
- Bisbal, G.A. and Bengtson, D.A. 1995. Development of digestive tract in larvae summer flounder. *Journal of Fish Biology* 47: 227-291.
- Blair, T., Castell, J., Neil, S., D'Abramo, L., Cahu, C., Harmon, P. and Ogunmoye, K. 2003. Evaluation of microdiets versus live feeds on growth, survival and fatty acid composition of larval haddock (*Melanogrammus aeglefinus*). *Aquaculture* 225: 451-461.
- Boonyaratpalin, M. 1991. Nutritional studies on seabass (*Lates calcarifer*). In *Fish Nutrition Research in Asia. Proceeding of the Fourth Asian Fish Nutrition Workshop* (ed. De Silva, S.S.). Philippines: Asian Fisheries Society. 33-41.

- Boonyaratpalin, M. and Williams, K. 2002. Nutrient Requirement and Feeding of Finfish for Aquaculture: CAB International. 40-49.
- Boulhic, M. and Gabaudan, J. 1992. Histological study of the organogenesis of the digestive system and swim bladder of the dover sole, *Solea solea* (Linnaeus, 1758). Aquaculture 102: 373-396.
- Brinkmeyer, R.L. and Holt, G.J. 1995. Response of red drum larvae to grade levels of menhaden oil in semipurified microparticulate diets. Progress in Fish-Culture 57: 30-36.
- Buddington, B.K. 1985. Digestive secretions of lake sturgeon, *Acipenser fulvescens*, during early development. Journal of Fish Biology 26: 715-723.
- Cahu, C.L. and Zambonino-Infante, J.L. 1994. Early weaning of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae with a compound diets: effect on digestive enzymes. Comparative Biochemistry and Physiology 109A: 213-222.
- Cahu, C.L. and Zambonino-Infante, J.L. 1995. Maturation of the pancreatic and intestinal digestive functions of sea bass (*Dicentrarchus labrax*): effect of weaning with different protein sources. Fish Physiology and Biochemistry 14: 431-437.
- Cahu, C.L. and Zambonino-Infante, J.L. 2001. Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae. Aquaculture 200: 161-180.
- Cahu, C.L., Zambonino-Infante, J.L., Escaffre, A.M., Bergot, P. and Kaushik, S. 1998. Preliminary results on sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae rearing with compound diet from first feeding comparison with carp larvae *Cyprinus carpio*. Aquaculture 169: 1-7.
- Cahu, C.L., Zambonino-Infante, J.L., Quazuguel, P. and Le Gall, M.M. 1999. Protein hydrolysate vs. fishmeal in compound diets for 10-day old sea bass *Dicentrarchus labrax* larvae. Aquaculture 171: 109-119.
- Cañavate JP and Fernández-Díaz, C. 1999. Influence of co-feeding larvae with live and inert diet on weaning the sole *Solea senegalensis* onto commercial dry feeds. Aquaculture 174: 255-263.
- Carvalho, A.P., Escaffre, A.M., Oliva Teles, A. and Bergot, P. 1997. First feeding of common carp larvae on diets with high levels of protein hydrolysates. Aquaculture International 5: 361-367.

- Catacutan, M.R. and Coloso, R.M. 1995. Effect of dietary protein to energy ratio on growth, survival and body composition of juvenile Asian seabass, *Lates calcarifer*. Aquaculture 131: 125-133.
- Catacutan, M.R. and Coloso, R.M. 1997. Growth of juvenile Asian seabass, *Lates calcarifer*, fed varying carbohydrate and lipid levels. Aquaculture 149: 137-144.
- Chen, B.N., Quin, J.G., Kumar, M.S., Hutchinson, W. and Clarke, S. 2006. Ontogenetic development of digestive system in yellowtail kingfish *Seriola lalandi* larvae. Aquaculture 256: 489-501.
- Cousin, J.C.B. and Baudin-Laurencin, F. 1985. Morphogenese de l'appareil digetif de la vassie gazeuse du turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). Aquaculture 47: 305-319.
- Curnow, J., King, J., Pertridge, G. and Kolkovski, S. 2006. Effects of two commercial microdiets on growth and survival of baramandi (*Lates calcarifer*) larvae within various early weaning protocols. Aquaculture Nutrition 12: 247-255.
- Dabrowski, K.R. 1979. The role of proteolytic enzymes in fish digestion. In Styczynska-Jurewicz, E., Backiel, E., Jaspers, T. and Persoone, E. (Eds). Cultivation of Fish Fry and Its Live Food. European Mariculture Society, Bredene. Belgium: Special Publication. 107-126.
- Dabrowski, K. and Culver, D. 1991. The physiology of larval fish: digestive tract and formulation of starter diets. Aquaculture 17: 49-61.
- Dong, Y., Sheng, G., Fu, J. and Wen, K. 2005. Chemical characterization and anti-anaemia activity of fish protein hydrolysate from *Saurida elongate*. Journal of the Science of Food and Agriculture 85: 2033-2039.
- Engrola, S., Figueira, L., Conceicao, L.E.C., Gavaia, P.J., Ribeiro, L. and Dinis, M.T., 2009. Co-feeding in *Senegalese sole* larvae with inert diet from mouth opening promotes growth at weaning. Aquaculture 288: 264-227.
- Falk-Petersen, I.B. and Hansen, T.K. 2001. Organ differentiation in newly hatched common wolffish. Journal of Fish Biology 59: 1465-1482.
- Fernandez-Diaz, C., Pascual, E. and Yufero, M. 1994. Feeding behavior and prey size selection of gilthead seabream, *Sparus aurata*, larvae fed on inert and live food. Marine biology 118: 323-328.

- Ferraris, R.P., Tan, T.D. and De la Cruz, M.C. 1987. Development of digestive tract of milkfish, *Chanos chanos* (Forsk.) histology and histochemistry. *Aquaculture* 61: 241-257.
- Flynn, K. J. 1988. Some practical aspects of measurements of dissolved free amino acids in natural waters and within microalgae by the use of HPLC. *Chemistry and Ecology* 3: 269-293.
- Furuita, H., Takeuchi, T. and Uematsu, K. 1998. Effects of eicosapentaenoic and docohexaenoic acids on growth, survival and brain development of larval Japanese flounder (*Paralichthys oliaceus*). *Aquaculture* 161: 269–279.
- Gabaudan, J., Pigott, G. and Halver, J.E. 1980. The effect of processing on protein ingredients for larval diets: biological evaluation. *Proceedings of World Mariculture Society* 11: 424-432.
- Galaviz, M., Garcia-Gasca, A., Drawbridge, M., AlvarezGonzalez, C.A. and Lopez, L. 2011. Ontogeny of the digestive tract and enzymatic activity in white seabass, *Atractoscion nobilis*, larvae. *Aquaculture* 318: 162-168.
- Gawlicka, A., McLaughlin, L., Hung, S.S.O. and de la Noue, J. 1996. Limitations of carrageenan microbound diets for feeding white sturgeon, *Acipenser transmontanus*, larvae. *Aquaculture* 141: 245-265.
- Geurden, I., Raduńz-Neto, J. and Bergot, P. 1995. Essentiality of dietary phospholipids for carp (*Cyprinus carpio*) larvae. *Aquaculture* 131: 303–314.
- Gisbert, E., Ortiz-Delgado, J.B. and Sarasquete, C. 2008. Nutritional cellular biomarkers in early life stages of fish. *Histology and Histopathology* 23: 1525-1539.
- Gisbert, E., Piedrahita, R.H. and Conklin, D.E. 2004. Ontogenetic development of the digestive system in California halibut (*Paralichthys californicus*) with notes on feeding practices. *Aquaculture* 232: 455-470.
- Gisbert, E., Rodriquez, A., Castello-Orvay, F. and Williot, P. 1998. A histology study of development of the digestive tract of Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*) during early ontogeny. *Aquaculture* 167: 195-209.
- Glencross, B. 2006. The nutritional management of barramundi, *Lates calcarifer* - a review. *Aquaculture Nutrition* 12: 291-309.

- Govoni, J.J., Boehlert, G.W. and Watanabe, Y. 1986. The physiology of digestion in fish larvae. *Environmental Biology of Fisheries* 16: 59-77.
- Grizzle, J.M. and Rogers, W.A. 1976. *Anatomy and Histology of the Channel Catfish*. Alabama: Auburn University Agricultural Experiment Station, Auburn.
- Guthrie, K.M., Rust, M.B., Langdon, C.L. and Barrows, F.T. 2000. Acceptability of various microparticulate diets to first feeding walleye (*Stizostedion vitreum*) larvae. *Aquaculture Nutrition* 6: 153-158.
- Hachero-Cruzado, I., Ortiz-Delgado, J.B., Borrega, B., Herrera, M., Navas, J.I. and Sarasquete, C. 2009. Larval organogenesis of flatfish brill *Scophthalmus rhombus* L: Histological and histochemical aspects. *Aquaculture* 286: 138-149.
- Hamlin, H.J., Hunt von Herbing, I. and Kling, L.J. 2000. Histological and morphological evaluations of the digestive tract and associated organs of haddock throughout post-hatching ontogeny. *Journal of Fish Biology* 57: 716-732.
- Hamre, K. 2006. Nutrition in cod (*Gadus morhua*) larvae and juveniles. *ICES Journal of Marine Science* 63: 267-274.
- Hardy, R.W. and Barrows, F.T. 2002. Diet formulation and manufacture. In Halver, J.E. and Hardy, R.W. (Eds.). *Fish Nutrition*. 3rd Edition. California: Academic Press.
- Hasting, W.H. and Higgs, D. 1978. Feed milling processes. In *Fish Feed Technology*, Chapter 18. FAO Publication ADCP/REP/80/11. Rome, Italy: FAO.
<http://www.fao.org/docrep/X5738E/x5738e0j.htm#4.%20pelleting> (Accessed 9 August 2011).
- Holt, G.J. 1993. Feeding larval red drum on microparticulate diets in a close recirculation water system. *Journal of World Aquaculture Society* 24: 225-230.
- Hoyle, N.T. and Merritt, J.H. 1994. Quality of fish protein hydrolysate from herring (*Clupea harengus*). *Journal of Food Science* 59: 309-314.
- Hugli, T.E. and Moore, S. 1972. Determination of the tryptophan content of proteins by ion-exchange chromatography of alkaline hydrolysates. *Journal of Biological Chemistry* 247: 2828-2834.
- Humason, G.L. 1979. *Animal Tissue Techniques*. 4th Edition. San Francisco: W.H. Freeman and Company.

- Hunter, J.R. 1984. Synopsis of culture methods for marine fish larvae. American Society of Ichthyologists and Herpetologists Special Publication 1: 24-27.
- Izquierdo, M.S., Watanabe, T., Takeuchi, T., Arakawa, T. and Kitajima, C. 1989. Requirement of larval seabream *Pagrus major* for essential fatty acids. Nippon Suisan Gakkaishi 55: 859-867.
- Jany, K.D. 1976. Studies on the digestive enzymes of the stomachless bonefish *Carassius auratus gibelio* endopeptidases. Fish Physiology and Biochemistry 53: 31-38.
- Kapoor, B.G., Smith, H. and Verghina, I.A. 1976. The alimentary canal and digestion in teleosts. Advance in Marine Biology 13: 109-239.
- Katavic, I., Jug-Dujakovic, J. and Glamuzina, B. 1989. Cannibalism as a factor affecting the survival of intensively cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fingerlings. Aquaculture 77: 135-143.
- Kjørsvik, E. and Reiersen, A.L. 1992. Histomorphology of the early yolk-sac larvae of the Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.)-an indication of the timing of functionality. Journal of Fish Biology 41: 1-19.
- Kolkovski, S. 2001. Digestive enzymes in fish larvae and juveniles-implications and applications to formulated diets. Aquaculture 200: 181-201.
- Kolkovski, S. and Tandler, A. 2000. The use of squid protein hydrolysate as a protein source in microdiets for gilthead seabream *Sparus aurata* larvae. Aquaculture Nutrition 6: 11-15.
- Kolkovski, S. and Tandler, A. and Izquierdo, M.S. 1997. Effect of live food and dietary digestive enzyme on the efficiency of microdiet for seabass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. Aquaculture 148: 313-322.
- Kotzamanis, Y.P., Gisbert, E., Gatesoupe, F.J., Zambonino-Infante, J. and Cahu, C. 2007. Effects of different dietary levels of fish protein hydrolysate on growth, digestive enzymes, gut microbiota, and resistance to *Vibrio anguillarum* in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. Comparative Biochemistry and Physiology 147: 205-214.
- Koven, M.W., Kolkovski, S., Hasas, E., Gamsiz, K. and Tandler, A. 2001. Advance in the development of microdiets for gilthead seabream, *Sparus aurata*: a review. Aquaculture 194: 107-121.

- Koven, W.M., Tandler, A., Kissil, W. and Sklan, D. 1992. The importance of n-3 highly unsaturated fatty acids for growth in larval *Sparus aurata* and their effect on survival, lipid composition and size distribution. *Aquaculture* 104: 91–104.
- Kvåle, A., Yufera, M., Nygard, E., Aursland, K., Harboe, T. and Hamre, K. 2006. Leaching properties of three different microparticulate diets and preference of the diets in cod (*Gadus morhua* L.) larvae. *Aquaculture* 251: 402-415.
- Langdon, C. 2003. Microparticle types for delivering nutrients to marine fish larvae. *Aquaculture* 227: 259-275.
- Lavens, P. and Sorgeloos, P. 1996. Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture. FAO, Fisheries Technical paper, No. 361. Rome: FAO.
- Lazo, J.P., Dinis, M.T., Holt, G.J., Faulk, C. and Arnold, C.R. 2000. Co-feeding microparticulate diets with algae: towards eliminating the need of zooplankton at first feeding in larval red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture* 188: 339-351.
- Liao, I.C., Su, H.M. and Chang, E.Y. 2001. Techniques in finfish larviculture in Taiwan. *Aquaculture* 200: 1-31.
- Liceaga-Gesualdo, A.M. and Li-Chan, E.C.Y. 1999. Functional properties of fish protein hydrolysates from herring (*Clupea harengus*). *Journal of Food Science*. 64: 1000-1004.
- Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Follin Phenol Reagent. *The Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275.
- Ma, H., Cahu, C., Zambonino-Infante, J., Yu, H., Duan, Q., Le Gall, M.M. and Mai, K. 2005. Activities of selected digestive enzymes during larval development of large yellow croaker *Pseudosciaena crocea*. *Aquaculture* 245: 239-248.
- Mackie, L.M. 1982. Fish protein hydrolysates. *Process Biochemistry* 17: 26-31.
- Mai, K., Yu, H., Ma, H., Duan, Q., Gisbert, E., Zambonino-Infante, J.L. and Cahu, C.L. 2005. A histological study on the development of the digestive system of *Pseudosciaena crocea* larvae and juveniles. *Journal of Fish Biology* 67: 1094-1106.
- Moore, R. 1979. Natural sex inversion in the giant perch (*Lates calcarifer*). *Australian Journal of Marine and Freshwater Research* 30: 803-813.

- Næss, T., Germain-Henry, M. and Naas, K.E. 1995. First feeding of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) using different combination of *Artemia* and wild plankton. *Aquaculture* 130: 235-250.
- Nankervis, L. and Southgate, P.C. 2006. An integrated assessment of gross marine protein sources used in formulated microbound diets for barramundi (*Lates calcarifer*) larvae. *Aquaculture* 257: 453-464.
- Partridge, G.J. and Southgate, P.C. 1999. The effect of binder composition on ingestion and assimilation of microbound diets (MBD) by barramundi *Lates calcarifer* Bloch larvae. *Aquaculture Research* 30: 879-886.
- Patrick, L. and Patrick, S. 1996. Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture. **Available from:**
<http://www.fao.org/docrep/003/W3732E/w3732e02.htm#1.%20> (Accessed 10 August 2009).
- Peña, R., Dumas, S., Villalejo-Fuerte, M. and Ortíz-Galindo, J.L. 2003. Ontogenetic development of the digestive tract in reared spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* larvae. *Aquaculture* 219: 633-644.
- Peres, A., Cahu, C., Zambonino-Infante, J.L. Le Gall, M.M. and Quazuguel, P. 1996. Amylase and trypsin response to intake of dietary carbohydrate and protein depend on the development stage in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Fish Physiology and Biochemistry* 15: 237-242.
- Person-Le Ruyet, J. 1989. Early weaning of marine fish larvae onto microdiets: constraints and perspectives. In *Advances in Tropical Aquaculture*, Tahiti. February 20-March 4, 1989. IFREMER, Actes de Colloque Brest France. 625-642.
- Person-Le Ruyet, J., Alexander, J.C., Thebaud, L. and Mugnier, C. 1993. Marine fish larvae feeding: formulated diets or live prey? *Journal of World Aquaculture Society* 24: 211-224.
- Porter, S.M., and Thelilacker, G.H. 1999. The development of the digestive tract and eye in larval walleye pollock, *Theragra chalcogramma*. *Fishery Bulletin* 97: 722-729.

- Quaglia, G.B. and Orban, E. 1990. Influence of hydrolysis on structure and emulsifying properties of sardine (*Sardina pilchardus*) protein hydrolysates. *Journal of Food Science*. 55: 1571-1573.
- Ribeiro, L., Sarasquete, C. and Dinis, M.T. 1999. Histological and histochemistry development of digestive system of *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) larvae. *Aquaculture* 171: 293-308.
- Rosenlund, G., Stoss, J. and Talbot, C. 1997. Co-feeding marine fish larvae with inert and live diets. *Aquaculture* 155: 183-191.
- Ruanpanit, N., Yashiro, R., Boonliptanon, P., Vattanukul, V., Techanarawong, S. and Nogami, K. 1993. Hatching and biology of early larval stages of grouper, *Epinephelus malabaricus*. In grouper culture. The Proceedings of Grouper Culture, November 30-December 1, 1993, Viva Hotel, Songkhla, Thailand. Japan International Cooperation Agency and National Institute of Coastal Aquaculture, Department of Fisheries, Thailand.
- Sakaras, W., Boonyaratpalin, M., Unprasert, N. and Kumpang, P. 1988. Optimum Dietary Protein Energy Ratio in Seabass Feed I. Technical paper No.7. Thailand: Rayong Brackishwater Fisheries Station.
- Salhi, M., Hernandez-Cruz, C.M., Bessonart, M., Izquierdo, M.S. and Fernandez-Palacios, H. 1999. Effect of different dietary polar lipid level and different n-3 HUFA content in polar lipids on gut and liver histological structure of gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae. *Aquaculture* 179: 253-263.
- Salhi, M., Izquierdo, M.S., Hernandez-Cruz, C.M., Gonzalez, M. and Fernandez-Palacios, H. 1994. Effect of lipid and n-3 HUFA levels in microdiets on growth, survival and fatty acids composition of larval gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 124: 275-282.
- Santamaria, C.A., Marin de Mateo, M., Traveset, R., Sala, R., Grau, A., Pastor, E., Sarasquete, C. and Crespo, S. 2004. Larval organogenesis in common dentex *Dentex dentex* L. (Sparidae): histological and histochemical aspects. *Aquaculture* 237: 207-228.
- Sarasquete, M.C., Polo, A. and Yufera, M. 1995. Histology and histochemistry of the development of digestive system of larval gilthead seabream, *Sparus aurata* L. *Aquaculture* 130: 79-82.

- Sargent, J., Bell, J.G., Bell, M.V., Henderson, R.J. and Tocher, D.R. 1993. The metabolism of phospholipids and polyunsaturated fatty acids in fish. In Lalhou, B. and Vitiello, P. (Eds.), *Aquaculture: Fundamental and Applied Research. Coastal and Estuarine Studies, Volume 43*. Washington D.C.: American Geophysical Union.
- Segner, H., Storch, V., Reinecke, M., Kloas, W. and Hanke, W. 1994. The development of functional digestive and metabolic organs in turbot, *Scophthalmus maximus*. *Marine Biology* 119: 471-486.
- Shahidi, F., Xiao-Qing, H. and Synowiecki, J. 1995. Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). *Food Chemistry* 53: 285-293.
- Slizyte, R., Dauklas, E., Falch, E., Storrol, I. and Rustad, T. 2005. Yield and composition of different fractions obtained after enzymatic hydrolysis of cod (*Gadus morhua*) by-products. *Process Biochemistry* 40: 1415-1424.
- Srichanun, M., Tantikitti, C., Vatanakul, V. and Musikarune, P. 2012. Digestive enzyme activity during ontogenetic development and effect of live feed in green catfish larvae (*Mystus nemurus* Cuv.&Val.). *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 34: 247-254.
- Stroband, H.W.J. and Kroon, A.G. 1981. The development of the stomach in *Clarias lazera* and the intestinal absorption of protein macromolecules. *Cell and Tissue Research* 215: 397-415.
- Walford, J. and Lam, T.J. 1993. Development of digestive tract and proteolytic enzyme activity in seabass (*Lates calcarifer*). *Aquaculture* 109: 187-205.
- Walford, J., Lim, T.M. and Lam, T.J. 1991. Replacing live foods with microencapsulated diets in the rearing of seabass (*Lates calcarifer*) larvae: do the larvae ingest and digest protein-membrane microcapsules? *Aquaculture* 92: 225-235.
- Watanabe, T. and Kiron, V. 1994. Prospects in larval fish dietetics. *Aquaculture* 124: 223-251.
- Tanaka, M. 1971. Studies on the structure and function of the digestive system in teleosts larvae. III. Development of the digestive system during postlarval stage. *Japanese Journal of Ichthyology* 18: 164-174.
- Thiansilakul, Y. 2006. Antioxidative Activity and Functional of Protein Hydrolysate from Round Scad (*Decapterus maruadsi*) Muscle. Master of Science Thesis, Prince of Songkla University.

- Yufero, M., Fernandez-Diaz, C., Pascual, E., Sarasquete, M.C., Moyano, F.J., Diaz, M., Alarcon, F.J., Garcia-Gallego, M. and Parra, G. 2000. Towards an inert diet for first-feeding gilthead sea bream *Sparus aurata* L. larvae. *Aquaculture Nutrition* 6: 143-152.
- Zambonino-Infante, J.L. and Cahu, C.L. 1994. Development and response to a diet change of some digestive enzymes in seabass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Fish Physiology and Biochemistry* 12: 399-408.
- Zambonino-Infante, J.L. and Cahu, C.L. 1999. High dietary lipid levels enhance digestive tract maturation and improve *Dicentrarchus labrax* larval development. *Journal of Nutrition* 129: 1195-1200.
- Zambonino-Infante, J.L., Cahu, C.L. and Péres, A. 1997. Partial substitution of di- and tripeptides for native proteins in sea bass diet improves *Dicentrarchus labrax* larval development. *Journal of Nutrition* 127: 608-614.
- Zambonino-Infante, J.L., Gisbert, E., Sarasquete, C., Navarro, I., Gutierrez, J. and Cahu, C.L. 2008. Ontogeny and physiology of the digestive system of marine fish larvae. In Cyrino, J.E.O., Bureau, D., Kapoor, B.G. (Eds.), *Feeding and Digestive Functions of Fish*. Enfield: Science Publishers, Inc.