วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา ปีที่ 28 (ฉบับที่ 3) กันยายน – ธันวาคม พ.ศ. 2566
BURAPHA SCIENCE JOURNAL Volume 28 (No.3) September – December 2023 บทความวิจัย

พัฒนาการของเอนไซม์ย่อยอาหารของปลาตะกรับ (*Scatophagus argus* Linnaeus, 1766)

Ontogeny of Digestive Enzymes in Spotted Scat (*Scatophagus argus* Linnaeus, 1766)

วัชริศ ตั่นไพโรจน์[1], อาระฟิน รามาน[1], มณี ศรีชะนันท์[2], บัลลิกา หลงอะหลี[1],
สุดารัตน์ จันทะคาม[1], อัตรา ไชยมงคล[3] และ ชุติมา ตันติกิตติ[1*]
Watcharit Tanpairoj[1], Arefin Rahman[1], Manee Srichanun[2], Bullika Hlongahlee[1],
Sudarat Chantakam[1], Atra Chaimongkol[3] and Chutima Tantikitti[1*]
[1]สาขาวิชาวาริชศาสตร์และนวัตกรรมการจัดการ คณะทรัพยากรธรรมชาติ
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่, ประเทศไทย
[2]สาขาวิชาเทคโนโลยีเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะเกษตรศาสตร์
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตนครศรีธรรมราช, ประเทศไทย
[3]ศูนย์วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีและนวัตกรรมสัตว์น้ำชายฝั่ง กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ สงขลา, ประเทศไทย
[1]Aquatic Science and Innovative Management Division, Faculty of Natural Resources,
Prince of Songkla University, Hat Yai Campus, Thailand
[2]Department of Fisheries, Faculty of Agriculture, Rajamangala University of Technology Srivijaya,
Nakhon Si Thammarat Campus, Thailand
[3]Coastal Aquaculture Technology and Innovation Research and Development Center, Department of Fisheries,
Ministry of Agriculture and Cooperatives, Songkhla, Thailand

Received : 22 May 2023
Revised : 27 September 2023
Accepted : 17 October 2023

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหารหลัก คือ เปปซิน ทริปซิน ไลเปส และอะไมเลส ในปลาตะกรับตั้งแต่อายุแรกฟักจนถึงอายุ 30 วัน โดยการวิเคราะห์ระดับ pH ที่เหมาะสมของกิจกรรมเอนไซม์แต่ละชนิดในอวัยวะย่อยอาหาร จากนั้นจึงทำการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ดังกล่าวในปลาวัยอ่อน ผลการศึกษาระดับ pH ที่เหมาะสมของเอนไซม์ในกระเพาะอาหาร พบว่าเปปซินมีกิจกรรมสูงสุดที่ pH 2.0 เท่ากับ 178.20±19.59 unit/mg protein ($P<0.05$) ในไส้ติ่ง และลำไส้ พบว่าทริปซินมีกิจกรรมสูงสุดที่ pH 8.0 เท่ากับ 7.71±1.46 และ 13.21±0.51 unit/mg protein ตามลำดับ ไลเปสมีกิจกรรมสูงสุดในไส้ติ่งที่ pH 8.5 และในลำไส้ที่ pH 8.0 เท่ากับ 3.13±0.78 ($P<0.05$) และ 0.70±0.15 unit/mg protein ($P<0.05$) ตามลำดับ ส่วนอะไมเลสมีกิจกรรมสูงสุดที่ pH 7.0 เท่ากับ 177.79±15.38 และ 115.77±7.20 unit/mg protein ($P<0.05$) ในไส้ติ่งและลำไส้ ตามลำดับ ผลการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหารในปลาอายุแรกฟักถึง 30 วัน (ความยาวเหยียดเฉลี่ย 8.50±0.50 มิลลิเมตร และน้ำหนักเฉลี่ย 28.67±1.41 มิลลิกรัม) พบว่ากิจกรรมของเปปซินเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนถึงอายุ 30 วัน กิจกรรมของ ทริปซินมีการเพิ่มขึ้นอย่างช้า ๆ จนถึงอายุ

15 วัน และเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อเข้าสู่วันที่ 17 จนถึงอายุ 30 วัน สำหรับกิจกรรมของไลเปสมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง และเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อลูกปลาอายุ 30 วัน ในส่วนของอะไมเลส พบว่าปลาอายุ 3-4 วัน มีระดับกิจกรรมของเอนไซม์ในระดับต่ำ มีการเพิ่มขึ้นอย่างช้า ๆ ในช่วงอายุ 5-21 วัน จากนั้นเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อลูกปลาอายุ 24-30 วัน ผลการศึกษาสามารถนำไปใช้เพื่อประเมินความสามารถการย่อยอาหาร และการเจริญเติบโตของลูกปลา ซึ่งเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการพัฒนาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับลูกปลาตะกรับแต่ละระยะได้

คำสำคัญ : ปลาตะกรับ ; *Scatophagus argus* ; กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหาร ; ระดับ pH ที่เหมาะสม

Abstract

The study aimed at examining digestive enzyme activities of pepsin, trypsin, lipase and amylase in spotted scat from hatching to 30 days post hatching (DPH). Optimal pH for each digestive enzyme activity was determined in the first step. Subsequently, analysis of activities of the four enzymes were followed in the larval fish digestive system. For the optimal pH study, the highest pepsin activities (178.20±19.59 unit/mg protein) in fish stomach were at pH 2.0 ($P<0.05$). In pyloric caeca and intestine, the highest trypsin activities were at pH 8.0 (7.71±1.46 and 13.21±0.51 unit/mg protein, respectively). The highest lipase activities ($P<0.05$) in pyloric caeca were at pH 8.5 (3.13±0.78 unit/mg protein) while those in intestine at pH 8.0 (0.70±0.15 unit/mg protein). The highest amylase activities were at pH 7.0 (177.79±15.38 and 115.77±7.20 unit/mg protein, ($P<0.05$)) in pyloric caeca and intestine, respectively. Investigation on digestive enzyme activities from hatching (0 DPH) to 30 DPH (average body length and weight of 8.50±0.50 mm, 28.67±1.41 mg, respectively) showed that pepsin activities increased at a constant rate until 30 DPH. Trypsin activities slowly increased from hatching until 15 DPH and risened rapidly from 17-30 DPH while those of lipase exhibited an increasing trend from hatching and a sharp increase at 30 DPH. Amylase activities appeared at low levels during 3-4 DPH then, increased slowly during 5-21 DPH and rapidly amplified during 24-30 DPH. The results from the present study are useful for estimating larval fish digestibility and growth that are fundamental for development of suitable feed for larval stages of spotted scat.

Keywords : spotted scat ; *Scatophagus argus* ; digestive enzyme activities ; optimum pH

***Corresponding author. E-mail** : chutima.t@psu.ac.th

บทนำ

ปลาตะกรับ (*Scatophagus argus* Linnaeus, 1766) หรือในท้องถิ่นภาคใต้เรียกว่า ปลาขี้ตัง มีชื่อสามัญ Spotted scat เป็นปลาประจำถิ่นของทะเลสาบสงขลา และสามารถพบได้ตลอดปี (Choonhapran, 1997) จัดอยู่ในวงศ์ Scatophagidae เป็นปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจทั้งในตลาดปลาสวยงาม และตลาดปลาเนื้อ ที่ได้รับความนิยมบริโภคในหลายประเทศโดยเฉพาะเขตอินโดแปซิฟิก (Barry & Fast, 1988) รวมถึงประเทศไทย เนื่องจากเป็นปลาเนื้อสีขาวที่มีรสชาติดี และมีราคาค่อนข้างแพง กรมประมงจึงได้ทำการศึกษาการเพาะขยายพันธุ์ และอนุบาลปลาชนิดนี้จนประสบความสำเร็จ (Ruensirikul *et al*., 2008; Ruensirikul *et al*., 2009) เนื่องจากเป็นปลาที่สามารถปรับตัวได้ดีในสิ่งแวดล้อมที่มีความผันแปรของอุณหภูมิและความเค็มในช่วงกว้างทั้งในน้ำจืด น้ำกร่อย และน้ำทะเล มีนิสัยกินอาหารทุกอย่างตามที่สภาพแวดล้อมอำนวยให้ (Musikasung *et al*., 2014; Wongchinawit & Paphavasit, 2009) จัดอยู่ในกลุ่มปลาที่สามารถกินอาหารได้ทุกประเภท (omnivorous fish) จึงเป็นปลาที่มีศักยภาพในการเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มผลผลิตให้เพียงพอต่อความต้องการของตลาด (Ruensirikul & Chiayvareesajja, 2019) อาหารที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของสัตว์น้ำมีความสำคัญอย่างมากต่อความสำเร็จของการเพาะเลี้ยงปลาชนิดต่าง ๆ ซึ่งในปัจจุบันยังไม่มีอาหารทางการค้าสำหรับการเลี้ยงปลาตะกรับทุกช่วงอายุ ในการอนุบาลลูกปลาทะเลโดยทั่วไปยังจำเป็นต้องใช้อาหารมีชีวิตซึ่งแบ่งการอนุบาลเป็นสองระยะ คือ ระยะแรกที่ถุงไข่แดงยุบหมดและลูกปลาเริ่มหาอาหารเอง จะให้โรติเฟอร์เป็นอาหารหลัก ระยะที่สองเมื่อลูกปลามีขนาดโตขึ้นจึงเริ่มให้อาร์ทีเมียแรกฟักเป็นอาหารหลัก (Assavaaree *et al*., 2019) โดยการผลิตอาหารที่เหมาะสมสำหรับปลาตะกรับจำเป็นต้องมีข้อมูลด้านสรีรวิทยาและการพัฒนาของระบบทางเดินอาหาร พัฒนาการของเอนไซม์ย่อยอาหาร และความต้องการสารอาหารของปลาตลอดช่วงอายุการเจริญเติบโต ซึ่งจะส่งผลให้มีอัตราการรอดตายสูงและการเจริญเติบโตดี

การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษากิจกรรมของเอนไซม์หลักในระบบย่อยอาหารของลูกปลาวัยอ่อนตั้งแต่เริ่มฟักจนถึงอายุ 30 วัน ซึ่งเป็นข้อมูลสำคัญในการประเมินความสามารถในการกินและย่อยอาหารในช่วงลูกปลาวัยอ่อนจนถึงอายุ 30 วัน (ระยะวัยรุ่น) ทำให้สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการวางแผนการให้อาหารในระยะอนุบาล และการพัฒนาสูตรอาหารที่เหมาะสมกับการพัฒนาระบบย่อยอาหารและการทำงานของน้ำย่อยที่เหมาะสมกับช่วงอายุของปลา เพื่อการเพาะเลี้ยงลูกปลาตะกรับได้

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างเพื่อศึกษาการเจริญเติบโต

ทำการเก็บตัวอย่างลูกปลาตะกรับจากบ่ออนุบาลของศูนย์วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีและนวัตกรรมสัตว์น้ำชายฝั่ง จังหวัดสงขลา ซึ่งมีการอนุบาลลูกปลาในบ่อขนาดแตกต่างกันและที่ระดับความหนาแน่นต่างกันตามอายุของลูกปลาตั้งแต่เริ่มฟัก จนถึงอายุ 60 วัน โดยตั้งแต่อายุเริ่มฟัก - 15 วัน อนุบาลในถังขนาด 3 ลบม. (50,000 ตัว/ลบม.) จากนั้นช่วงอายุ 15-30 วัน จึงย้ายลงบ่อขนาด 3.5X5.7X1.24 ม. ความหนาแน่น 3,000 ตัว/ลบม. สุ่มเก็บตัวอย่างตั้งแต่แรกฟักออกเป็นตัวจนถึงอายุ 30 วัน โดยเก็บตัวอย่างครั้งละ 20 ตัว จำนวน 2 ครั้ง แบ่งการเก็บตัวอย่างออกเป็น 3 ระยะ คือ ลูกปลาแรกฟัก ถึงอายุ 7 วัน สุ่มเก็บตัวอย่างปลาทุกวัน ลูกปลาอายุ 8 ถึง 21 วัน สุ่มเก็บตัวอย่างทุก ๆ 2 วัน และ

ลูกปลาอายุ 22 ถึง 30 วัน สุ่มเก็บตัวอย่างปลาทุก ๆ 3 วัน ซึ่งตัวอย่างปลาที่นำขึ้นมาจากบ่อจะไม่นำกลับไปคืนบ่อเพาะเลี้ยง นำตัวอย่างลูกปลามาวัดความยาวโดยใช้ Vernier caliper เพื่อวัดความยาวเหยียดลำตัวลูกปลาทุกตัว ทำการจดบันทึก และหาค่าเฉลี่ย ชั่งน้ำหนักรวมด้วยเครื่องชั่งทศนิยมสี่ตำแหน่ง แล้วคำนวณหาค่าน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัว และคำนวณค่าการเจริญเติบโตดังนี้

1. ค่าน้ำหนักหรือความยาวที่เพิ่มขึ้น (Absolute growth) จากสมการ

   Absolute growth = น้ำหนักหรือความยาวสุดท้าย – น้ำหนักหรือความยาวเริ่มต้น

2. อัตราการเจริญเติบโตต่อวัน (Absolute growth rate) จากสมการ

   Absolute growth rate = น้ำหนักหรือความยาวเพิ่มขึ้น / จำนวนวันที่เก็บตัวอย่าง

3. อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific growth rate, SGR) จากสมการ

   SGR (%/day) = $e^{g} - 1 \times 100$

   เมื่อ g = (ln final weight – ln initial weight) / experimental days (Houde & Scheckter, 1981)

ณ ช่วงเวลาเก็บตัวอย่าง มีการวัดความเค็มและ และอุณภูมิของน้ำ โดยวัดความเค็มด้วย Hand-held salinity refractometer (ATAGO-S/Mill-E) และวัดอุณหภูมิด้วยเทอร์โมมิเตอร์แบบ Alcohol filled thermometer (SK Sato)

<u>2. การศึกษาระดับ pH ที่เหมาะสมของกิจกรรมเอนไซม์ในระบบย่อยอาหารของปลาตะกรับ</u>

2.1) การเก็บตัวอย่างปลา

ทำการศึกษาโดยใช้ตัวอย่างปลาตะกรับอายุ 50 วัน ที่มีอวัยวะทางเดินอาหารสมบูรณ์ จำนวน 100 ตัว มีน้ำหนักเฉลี่ยเท่ากับ 4 กรัม/ตัว เนื่องจากปลามีขนาดเล็ก จึงจำเป็นต้องใช้จำนวนปลาให้เพียงพอต่อการผ่าตัดเก็บตัวอย่างอวัยวะทางเดินอาหาร โดยทำการผ่าตัดบริเวณช่องท้องของปลาเพื่อเก็บตัวอย่างกระเพาะอาหาร ไส้ติ่ง และลำไส้ โดยแต่ละอวัยวะเก็บตัวอย่างรวมกัน (pooled sample) ประมาณ 5 ตัว/ซ้ำ/อวัยวะ จำนวน 5 ซ้ำ น้ำหนักเฉลี่ยซ้ำละ 3-5 กรัม เก็บรักษาตัวอย่างในไนโตรเจนเหลว

2.2) การศึกษาระดับ pH ที่เหมาะสมสำหรับกิจกรรมของเอนไซม์แปปซิน ทริปซิน อะไมเลส และไลเปส

ทำการหาค่า pH ที่เหมาะสมสำหรับกิจกรรมของเอนไซม์เปปซิน ทริปซิน อะไมเลส และไลเปส โดยการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่ช่วง pH ต่าง ๆ ตามวิธีการของ Bergmeyer *et al.* (1974) โดยเปปซินใช้บัฟเฟอร์ 0.2 โมลาร์ Glycine – NaCl.HCl ทดสอบระดับ pH ที่ 2, 2.5, 3, 3.5 และ 4 สำหรับทริปซิน อะไมเลส และไลเปส ใช้บัฟเฟอร์ 0.05 M Tris-HCl ที่ผสม 0.02 M $CaCl_2$ ตามลำดับ ทดสอบระดับ pH ที่ 7, 7.5, 8, 8.5, 9 โดยแต่ละระดับ pH ของแต่ละเอนไซม์ทำการวิเคราะห์จำนวน 4 ซ้ำ

<u>3. การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ในระบบย่อยอาหารของปลาตะกรับวัยอ่อนอายุแรกฟักออกเป็นตัวจนถึงอายุ 30 วัน</u>

3.1) การเก็บตัวอย่างปลา

สุ่มเก็บตัวอย่างลูกปลาตะกรับจำนวน 15 ตัวต่อครั้ง จากบ่ออนุบาลของศูนย์วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีและนวัตกรรมสัตว์น้ำชายฝั่ง จังหวัดสงขลา ตั้งแต่ระยะแรกฟักออกเป็นตัวจนถึงอายุ 30 วัน โดยเก็บตัวอย่างทุกวันตั้งแต่อายุแรกฟักถึงอายุ 7 วัน สำหรับลูกปลาอายุ 8-21 วัน และ 22-30 วัน เก็บตัวอย่างทุก ๆ 2 และ 3 วัน ตามลำดับ โดยก่อนการ

เก็บตัวอย่างไม่มีการให้อาหารเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้ทางเดินอาหารปราศจากอาหาร จากนั้นสุ่มเก็บตัวอย่างปลาและเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลวเพื่อรอการวิเคราะห์

3.2) การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เปปซิน ทริปซิน อะไมเลส และไลเปส

วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เปปซิน ทริปซิน อะไมเลส และไลเปส ตามวิธีการของ Bergmeyer *et al.* (1974) โดยปลาอายุแรกฟักถึงอายุ 19 วัน ทำการศึกษาโดยใช้ลูกปลาทั้งตัวในการสกัดเอนไซม์ แต่ในลูกปลาอายุ 21 ถึง 30 วัน ทำการศึกษาโดยการผ่าตัดเฉพาะช่องท้องและแยกอวัยวะส่วนทางเดินอาหารเพื่อนำไปสกัดเอนไซม์

3.2.1) การสกัดเอนไซม์

นำตัวอย่างลูกปลาทั้งตัว (แรกฟัก – 19 วัน) และตัวอย่างช่องท้อง สกัดเอนไซม์ด้วยน้ำกลั่นปราศจากอิออน (Deionized distilled water, DDW) ที่แช่เย็น ในสัดส่วน 1: 5 น้ำหนัก/ปริมาตร (1:5 w/v) บดตัวอย่างให้ละเอียดในสภาพแวดล้อมที่เย็น อุณหภูมิไม่เกิน 4°C เพื่อรักษาสภาพของเอนไซม์ จากนั้นนำตัวอย่างหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ / นาที อุณหภูมิ 4°C แล้วดูดสารละลายส่วนใส (supernatant) เพื่อวัดกิจกรรมเอนไซม์

3.2.2) การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เปปซิน

ดูดสารละลายบัฟเฟอร์ 0.2 โมลาร์ Glycine – NaCl.HCl pH 2.0 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาดเล็ก (Microtube) เติมซับสเตรตคือฮีโมโกลบิน (Haemoglobin) 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 125 ไมโครลิตร ตามด้วยการเติมเอนไซม์สกัด (เจือจางให้อยู่ในช่วงที่สามารถเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานได้) ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 26±1 องศาเซลเซียส) นาน 5 นาที จึงหยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย Trichloroacetic acid 5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 375 ไมโครลิตร เพื่อตกตะกอนโปรตีน และนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที จากนั้นดูดส่วนใสและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร และคำนวณค่าที่ได้ด้วยการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน L-Tyrosine โดยค่าหน่วย (Unit) ของเอนไซม์เปปซินคือปริมาณของไทโรซีนที่เพิ่มขึ้นต่อนาที (μmol/min)

3.2.3) การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ทริปซิน

ดูดเอนไซม์สกัดปริมาตร 10 ไมโครลิตร ใส่ถาดหลุมก้นแบน 96 ช่อง (96 well plate) จากนั้นเติมซับสเตรตคือสารละลาย BAPNA 1 mM ที่ละลายในบัฟเฟอร์ 0.05 M Tris-HCl ที่ผสม 0.02 M $CaCl_2$ pH 8.0 ปริมาตร 190 ไมโครลิตร และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร ทุก ๆ 15 วินาที เป็นเวลา 3 นาที นำข้อมูลไปสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความยาวคลื่นและเวลา เพื่อหาค่าอัตราเร็วเริ่มต้นของการเกิดปฏิกิริยา (Initial velocity) จากความชัน เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ Para-nitroaniline โดยค่าหน่วย (Unit) ของเอนไซม์ทริปซินคือปริมาณของผลิตภัณฑ์ (Para-nitroaniline) ที่เพิ่มขึ้นต่อนาที (μmol/min)

3.2.4) การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส

ดูดสารละลายบัฟเฟอร์ 0.05 M Tris-HCl ที่ผสม 10 mM NaCl pH 7.0 ปริมาตร 125 ไมโครลิตร ในหลอดทดลอง เติมเอนไซม์สกัดปริมาตร 25 ไมโครลิตร จากนั้นเติมซับสเตรตคือ 1% starch solution ปริมาตร 125 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำหลอดทดลองไปบ่มที่อุณหภูมิ 26±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบตามระยะเวลาแล้วจึงเติมสารละลาย DNS 1 เปอร์เซ็นต์ปริมาตร 125 ไมโครลิตร หลังจากนั้นจึงนำไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)

100 °C องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลาเจือจางตัวอย่างด้วยการเติมน้ำกลั่น 250 ไมโครลิตร ทำให้เย็น และวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน Maltose โดยค่าหน่วย (Unit) ของเอนไซม์อะไมเลส คือปริมาณของผลิตภัณฑ์ (maltose) ที่เพิ่มขึ้นต่อนาที (μmol/min)

3.2.5) การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

ดูดเอนไซม์สกัดปริมาตร 10 ไมโครลิตร ใส่ลงในถาดหลุมก้นแบน 96 ช่อง จากนั้นเติมซับสเตรตคือ p-nitrophenylpalmitate (p-NPP, Sigma 2752) ที่ละลายในบัฟเฟอร์ 50 mM Tris–HCl pH 8.5 ปริมาตร 190 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร ทุก ๆ 15 วินาที เป็นเวลา 3 นาที และนำข้อมูลที่ได้ไปสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความยาวคลื่นและเวลาเพื่อหาค่า Initial velocity แล้วนำมาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน Para-nitrophenol โดยค่าหน่วย (Unit) ของเอนไซม์อะไมเลสคือปริมาณของผลิตภัณฑ์ (para-nitrophenol) ที่เพิ่มขึ้นต่อนาที (μmol/min)

3.2.6 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและการรายงานผลกิจกรรมเอนไซม์

ปริมาณโปรตีนของเอนไซม์สกัดวิเคราะห์ด้วยวิธีการของ Lowry protein assay (Lowry *et al*., 1951) โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายอัลบูมิน (Bovine serum albumin) เพื่อนำไปใช้สำหรับการรายงานค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่แสดงเป็นค่ากิจกรรมจำเพาะ (unit/mg protein)

4. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลการเจริญเติบโตด้านน้ำหนักและความยาวในช่วงปลาอายุแรกฟัก – 30 วัน มาวิเคราะความสัมพันธ์แบบเอกซ์โปเนนเชียล วิเคราะห์ข้อมูลระดับ pH ที่เหมาะสมสำหรับเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ และกิจกรรมของเอนไซม์เปปซิน ทริปซิน ไลเปส และอะไมเลส ของลูกปลาที่อายุแตกต่างกัน โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย Tukey's HSD Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P<0.05$)

ผลการวิจัย

1. การเจริญเติบโตของลูกปลาเมื่อแรกฟักถึงอายุ 30 วัน

จากการศึกษาการเจริญเติบโตโดยการวัดความยาวและชั่งน้ำหนักของลูกปลาตะกรับตั้งแต่อายุแรกฟัก ถึงอายุ 30 วัน (Table 1) พบว่า ลูกปลาตะกรับเมื่อแรกฟักมีความยาวลำตัวเฉลี่ยเท่ากับ 1.51±0.29 มิลลิเมตร โดยความยาวลำตัวมีการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อลูกปลาอายุได้ 15 ถึง 30 วัน เมื่อคำนวณค่าความยาวที่เพิ่มขึ้นมีค่า 6.78 มิลลิเมตร ค่าอัตราการเจริญเติบโตต่อวัน คือ 0.23 มิลลิเมตร/วัน สำหรับน้ำหนักเฉลี่ยของลูกปลาสามารถชั่งน้ำหนักรวมของลูกปลาได้เมื่ออายุ 5 วันขึ้นไป โดยพบว่าเมื่อลูกปลาอายุ 5-13 วัน มีอัตราการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวน้อยมาก โดยมีน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวเท่ากับ 0.13±0.01 ถึง 0.36±0.01 มิลลิกรัม เมื่อลูกปลาอายุ 15 วัน ถึง 21 วัน มีน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวเท่ากับ 2.03±0.18 ถึง 4.56±0.07 มิลลิกรัม และเมื่อลูกปลาอายุ 24 ถึง 30 วัน มีการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวอย่างรวดเร็ว มีน้ำหนักเฉลี่ยเท่ากับ 15.33±0.66 และ 28.67±1.41 มิลลิกรัม ตามลำดับ เมื่อคำนวณค่าน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นตั้งแต่แรกฟัก – 30 วัน มีค่า 28.54 มิลลิกรัม มีค่าอัตราการเจริญเติบโตต่อวัน คือ 1.14 มิลลิกรัม/วัน และมีค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะคือ 19.71 %/วัน

จากการคำนวณค่าความสัมพันธ์ระหว่างความยาว และน้ำหนักของลูกปลาตะกรับ กับอายุของลูกปลาพบว่ามีความสัมพันธ์กันแบบเอกซ์โปเนนเชียล โดยมีสมการความสัมพันธ์ด้านน้ำหนักคือ $y = 0.03e^{0.245x}$ และ $R^2 = 0.96$ และด้านความยาว มีสมการคือ $y = 1.746e^{0.053x}$ $R^2 = 0.96$ (Figure 1) แสดงให้เห็นว่าลูกปลามีความยาวลำตัวและน้ำหนักที่สัมพันธ์กันสูงเมื่อลูกปลามีการเจริญเติบโตที่เพิ่มขึ้น สำหรับความเค็ม และอุณภูมิของน้ำ ณ ช่วงเวลาเก็บตัวอย่าง (Table 1) อยู่ในช่วง 35-15 ppt และ 27.2-28.1°C ตามลำดับ

Table 1 Average total length (mm) and body weight (mg) of spotted scat (*Scatophagus argus*) from hatching to 30 days post hatching

Age (day)	Average total length (mm) [1]	Average body weight (mg) [1]	Salinity (ppt)	Temperature (°C)
1	1.51±0.09	-	35	27.2
2	2.05±0.02	-	35	27.2
3	2.21±0.07	-	35	27.4
4	2.26±0.01	-	35	27.9
5	2.27±0.05	0.1293±0.0152	30	28.1
6	2.66±0.04	0.1353±0.0039	30	27.7
7	2.79±0.02	0.1585±0.0078	30	27.6
9	2.87±0.01	0.2473±0.0018	25	27.2
11	3.15±0.01	0.2528±0.0039	25	27.5
13	3.16±0.01	0.3603±0.0081	25	28.0
15	3.21±0.06	2.0273±0.1828	25	27.4
17	4.20±0.09	3.4320±0.0170	20	27.2
19	4.36±0.11	3.8425±0.0530	20	27.5
21	5.17±0.29	4.5628±0.0661	20	27.9
24	7.22±0.03	15.3298±0.6565	15	28.1
27	7.60±0.47	22.9183±0.5455	15	28.1
30	8.29±0.30	28.6673±1.4124	15	28.0

[1] Means ± SD (n=2 samplings, 20 fish/sampling)

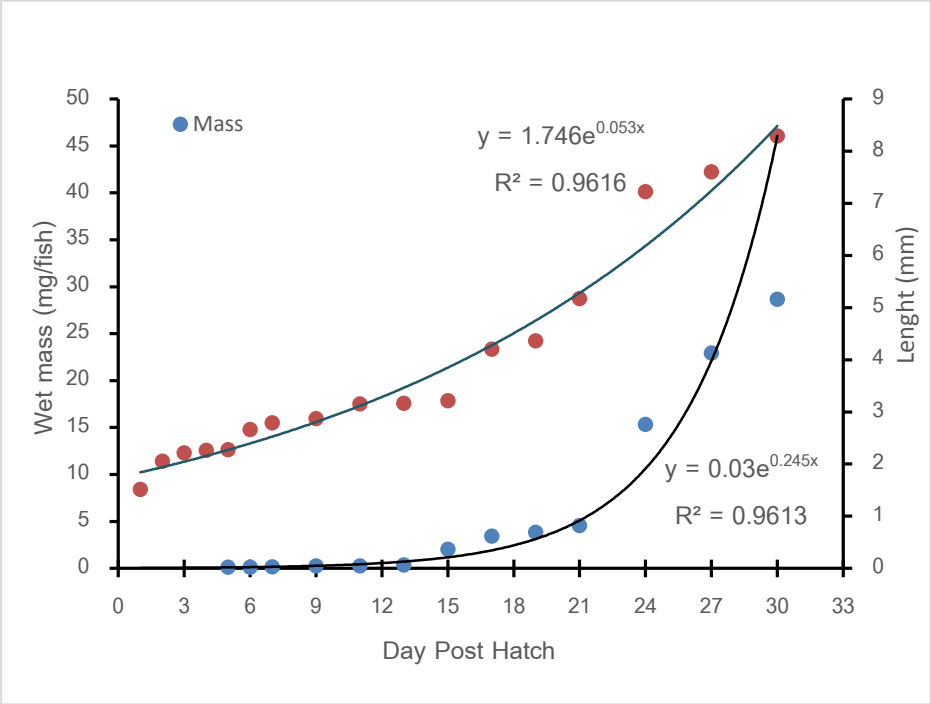

Figure 1 Body length and weight of larval spotted scat (*Scatophagus argus*) from day 1- 30 post hatching.

<u>2.ระดับ pH ที่เหมาะสมของกิจกรรมเอนไซม์ย่อยอาหารของปลาตะกรับ</u>

1) ระดับ pH ที่เหมาะสมของกิจกรรมเอนไซม์ในกระเพาะอาหาร

ผลการวิเคราะห์ระดับ pH ที่เหมาะสมของกิจกรรมเอนไซม์ในกระเพาะอาหาร คือ เปปซิน ดังแสดงใน Table 2 พบว่า เปปซินมีค่าเฉลี่ยของกิจกรรมสูงที่สุดที่ระดับ pH 2.0 โดยมีค่าเฉลี่ยของกิจกรรมเท่ากับ 178.200±19.59 unit/mg protein และรองลงมา คือ pH 2.5 ที่มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 154.08±27.66 unit/mg protein ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับระดับ pH 3.0, 3.5 และ 4.0 (P<0.05)

Table 2 Pepsin activities at different pH levels using crude enzyme extracted from stomach of juvenile spotted scat (*Scatophagus argus*)

Enzyme	Enzyme activity (unit/mg protein)[1]				
pH Level	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0
Pepsin	178.20±19.59[b]	154.08±27.66[b]	47.99±14.53[a]	39.26±14.69[a]	63.29±21.74[a]

[1] Means±SD (n=6). Values on the same row with different superscripts are statistically different (P<0.05)

2) ระดับ pH ที่เหมาะสมของกิจกรรมเอนไซม์ในไส้ติ่ง

ผลการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ 3 ชนิดคือ ทริปซิน อะไมเลส และ ไลเปส ที่ระดับ pH ต่าง ๆ ดังแสดงใน Table 3 พบว่า กิจกรรมของทริปซินที่ pH 7-8.5 อยู่ในระดับสูงใกล้เคียงกัน โดยมีกิจกรรมสูงที่สุดที่ pH 8.0 (7.71±1.46 unit/mg protein) และสูงกว่าที่ระดับ pH 9.0 (3.98±2.15 unit/mg protein) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) สำหรับอะไมเลสมีกิจกรรมสูงสุดที่ระดับ pH 7.0 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 177.79±15.38 unit/mg protein (P<0.05) โดยกิจกรรมของอะไมเลสที่ระดับ pH 7.5-9.0 อยู่ในช่วง 72.06±15.98 - 121.15±7.91 unit/mg protein ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) ไลเปสมีกิจกรรมสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ pH 8.5 มีค่าเฉลี่ยของกิจกรรมเท่ากับ 3.13±0.78 unit/mg protein โดยกิจกรรมของไลเปสที่ pH 7.0, 7.5, 8.0 และ 9.0 อยู่ในช่วง 1.22±0.38 -1.90±0.42 unit/mg protein ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)

Table 3 Activities of digestive enzymes at different pH levels using crude enzyme extracted from pyloric caeca of juvenile spotted scat (*Scatophagus argus*)

Enzyme	Enzyme activity (unit/mg protein)[1]				
pH Level	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0
Trypsin	6.54±1.62[ab]	6.62±1.48[ab]	7.71±1.46[b]	6.39±1.65[ab]	3.98±2.15[a]
Amylase	177.79±15.38[c]	72.06±15.98[a]	86.92±13.90[a]	96.86±14.91[ab]	121.15±7.91[b]
Lipase	1.35±0.36[a]	1.90±0.69[a]	1.90±0.42[a]	3.13±0.78[b]	1.22±0.38[a]

[1] Means±SD (n=6). Values on the same row with different superscripts are statistically different (P<0.05).

3) ระดับ pH ที่เหมาะสมของกิจกรรมเอนไซม์ในลำไส้

ผลการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ 3 ชนิด ได้แก่ ทริปซิน อะไมเลส และ ไลเปส ที่ระดับ pH ต่าง ๆ ดังแสดงใน Table 4 พบว่า กิจกรรมของทริปซินที่ระดับ pH 8.0 มีค่าเฉลี่ยของกิจกรรมสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) เท่ากับ 13.21±0.51 unit/mg protein ซึ่งใกล้เคียงกับ pH 7.0, 7.5 และ 9.0 (P>0.05) แต่สูงกว่าที่ pH 8.5 ในส่วนของอะไมเลส พบว่ามีกิจกรรมสูงที่สุดที่ระดับ pH 7.0 โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 115.77±18.15 unit/mg protein ใกล้เคียงกับกิจกรรมของเอนไซม์ที่ระดับ pH 7.5 และ 8.0 (P>0.05) ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) กับกิจกรรมที่ pH 8.5 (48.52±20.10) สำหรับไลเปส พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์มีระดับต่ำในช่วง 0.62±0.06-0.70±0.07 unit/mg protein ที่ระดับ pH ต่าง ๆ และไม่มีความแตกต่างกันอย่ามีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) ซึ่งกิจกรรมมีระดับสูงที่สุดที่ pH 8.0 โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.70±0.07 unit/mg protein และรองลงมาคือ pH 7.5 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.68±0.04 unit/mg protein

Table 4 Activities of digestive enzymes at different pH levels using crude enzyme extracted from intestine of juvenile spotted scat (*Scatophagus argus*)

Enzyme	Enzyme activity (unit/mg protein)[1]				
pH Level	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0
Trypsin	11.80±2.57[ab]	11.42±2.48[ab]	13.21±0.51[b]	8.94±1.37[a]	11.87±0.83[ab]
Amylase	115.77±18.15[c]	82.95±37.93[abc]	108.72±15.37[bc]	48.52±20.10[a]	66.63±16.56[ab]
Lipase	0.67±0.04[a]	0.69±0.04[a]	0.70±0.07[a]	0.68±0.04[a]	0.63±0.06[a]

[1] Means±SD (n=6). Values on the same row with different superscripts are statistically different (P<0.05)

3. กิจกรรมของเอนไซม์ในระบบย่อยอาหารของปลาตะกรับวัยอ่อน (แรกฟักออกเป็นตัว–อายุ 30 วัน)

1) กิจกรรมของเปปซิน

ผลการศึกษากิจกรรมของเปปซินในปลาตะกรับอายุแรกฟักจนถึงอายุ 30 วัน (Figure 2) พบว่าสามารถวัดกิจกรรมเอนไซม์ได้เมื่อลูกปลาอายุ 4 วันขึ้นไป โดยในลูกปลาอายุ 4 และ 5 วัน กิจกรรมของเปปซินไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) มีค่าเฉลี่ยของกิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 1.98±0.01และ 2.10±0.03 unit/mg protein ตามลำดับ ขณะที่กิจกรรมของเอนไซม์มีการเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องในลูกปลาอายุ 6 วัน (2.79±0.10 unit/mg protein) และ 7 วัน (2.97±0.09 unit/mg protein) และมีค่าสูงขึ้นโดยแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในลูกปลาอายุ 9 วัน (P<0.05) ที่มีค่า 3.60±0.05 unit/mg protein ตามลำดับ และมีการเพิ่มขึ้นอย่างช้า ๆ และสม่ำเสมอเมื่อลูกปลามีอายุถึง 15 วัน และเมื่อมีอายุ 17, 24 และ 30 วัน โดยมีกิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 3.76±0.05, 4.22±0.02 และ 4.48±0.09 unit/mg protein ตามลำดับ (P<0.05)

2) กิจกรรมของทริปซิน

ผลการศึกษากิจกรรมของทริปซินในปลาตะกรับอายุแรกฟักจนถึงอายุ 30 วัน (Figure 3) พบว่า สามารถวิเคราะห์ระดับกิจกรรมของทริปซินเมื่อลูกปลาอายุ 3 วัน โดยมีระดับของกิจกรรมเอนไซม์ต่ำมากเท่ากับ 0.09±0.00 unit/mg protein และมีการเพิ่มขึ้นอย่างช้า ๆ จนลูกปลามีอายุ 15 วัน เมื่อลูกปลาเข้าสู่วันที่ 17 กิจกรรมของเอนไซม์มีการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว มีค่าเฉลี่ยของกิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 0.46±0.24 unit/mg protein ทั้งนี้กิจกรรมของทริปซินในช่วงอายุ 3 วัน ถึง 17 วัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) เมื่อลูกปลาอายุ 19 วันมีค่าเฉลี่ยของกิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 0.50±0.12 unit/mg protein และเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) จนกระทั่งลูกปลาอายุได้ 30 วัน มีค่าเฉลี่ยของกิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 0.79±0.16 unit/mg protein โดยค่าเฉลี่ยของกิจกรรมเอนไซม์ของปลาอายุ 19 วันถึงอายุ 30 วันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)

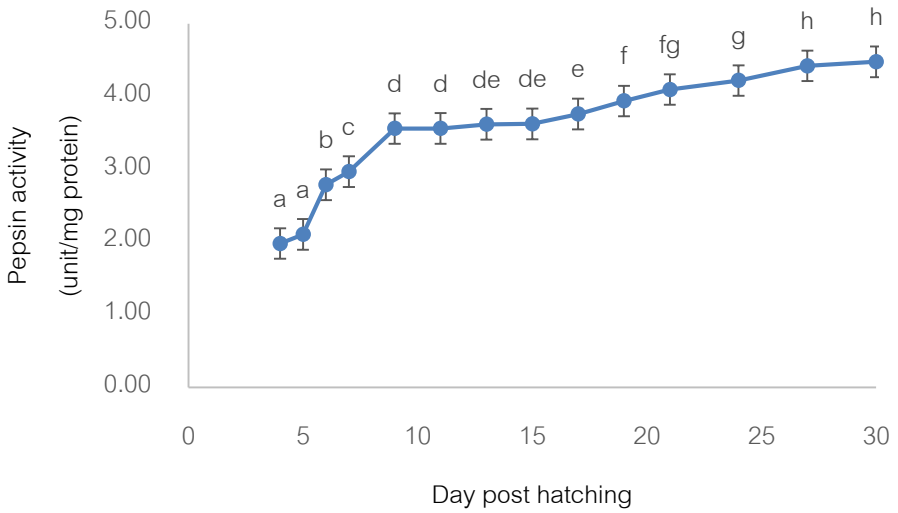

Figure 2 Pepsin activities (means±SD, n=4) of larval spotted scat (*Scatophagus argus*) from day 1- 30 post hatching. Means having different alphabets are statistically different (P<0.05).

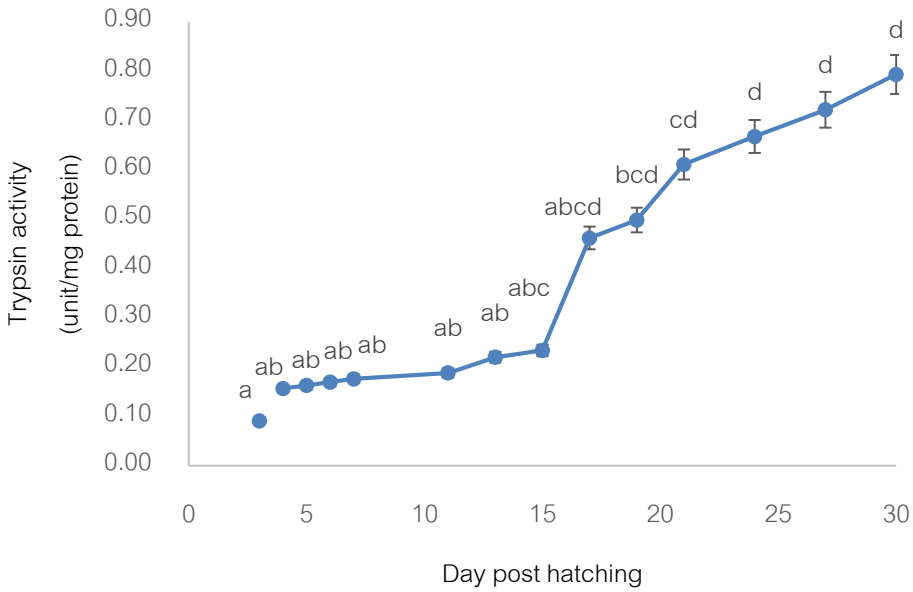

Figure 3 Trypsin activities (means±SD, n=4) of larval spotted scat (*Scatophagus argus*) from day 1-30 post hatching. Means having different alphabets are statistically different (P<0.05).

3) กิจกรรมของไลเปส

ผลการศึกษากิจกรรมของไลเปสในปลาตะกรับอายุแรกฟักจนถึงอายุ 30 วัน (Figure 4) พบว่า ลูกปลาอายุ 3 วัน มีค่าเฉลี่ยของกิจกรรมเอนไซม์ในระดับต่ำเพียง 0.07±0.01 unit/mg protein เมื่อลูกปลาอายุ 4 วัน มีค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์สูงขึ้นเท่ากับ 0.10±0.04 unit/mg protein และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง จนกระทั่งลูกปลาอายุ 27 วัน มีระดับกิจกรรมของเอนไซม์เฉลี่ยเท่ากับ 0.18±0.02 unit/mg protein และเมื่อลูกปลามีอายุ 30 วัน มีระดับกิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.22±0.01 unit/mg protein

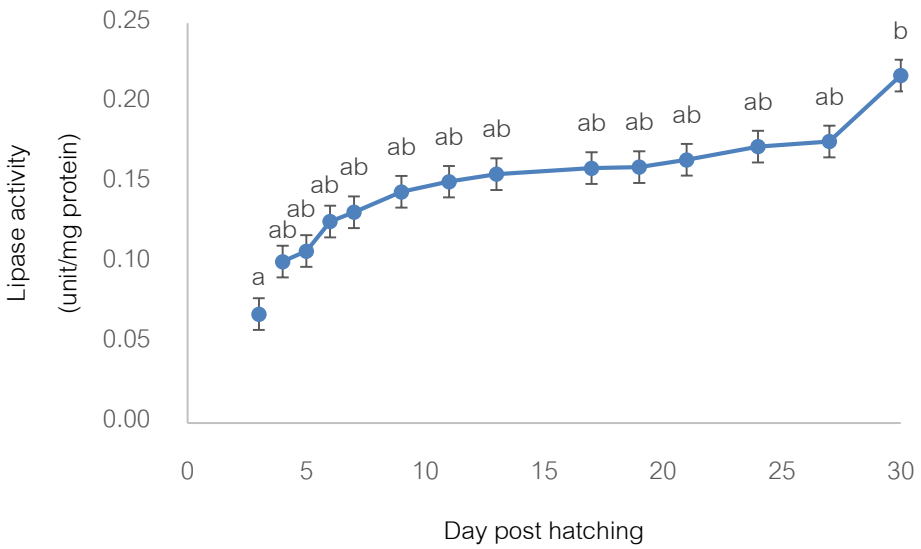

Figure 4 Lipase activities (means±SD, n=4) of larval spotted scat (*Scatophagus argus*) from day 1-30 post hatching. Means having different alphabets are statistically different (P<0.05).

4) กิจกรรมของอะไมเลส

ผลการศึกษากิจกรรมของอะไมเลสในปลาตะกรับอายุแรกฟักจนถึงอายุ 30 วัน (Figure 5) พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ในลูกปลาอายุ 3 และ 4 วัน มีระดับต่ำมากโดยมีค่าเฉลี่ยของกิจกรรมเอนไซม์เพียง 0.003±0.001 - 0.004±0.008 unit/mg protein เมื่อเข้าสู่วันที่ 5 จึงเริ่มมีการเพิ่มขึ้นอย่างช้า ๆ และคงที่ จนถึงวันที่ 21 โดยค่าเฉลี่ยกิจกรรมเอนไซม์ในวันที่ 5 เท่ากับ 0.011±0.009 unit/mg protein และวันที่ 21 เท่ากับ 0.026±0.004 unit/mg protein เมื่อลูกปลาอายุ 24 – 30 วัน กิจกรรมของเอนไซม์มีการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยลูกปลาอายุ 24 วันมีค่าเฉลี่ยของกิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 0.039±0.003 unit/mg protein และอายุ 30 วัน มีกิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 0.112±0.021 unit/mg protein ซึ่งมีความแตกต่างกับช่วงอายุอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

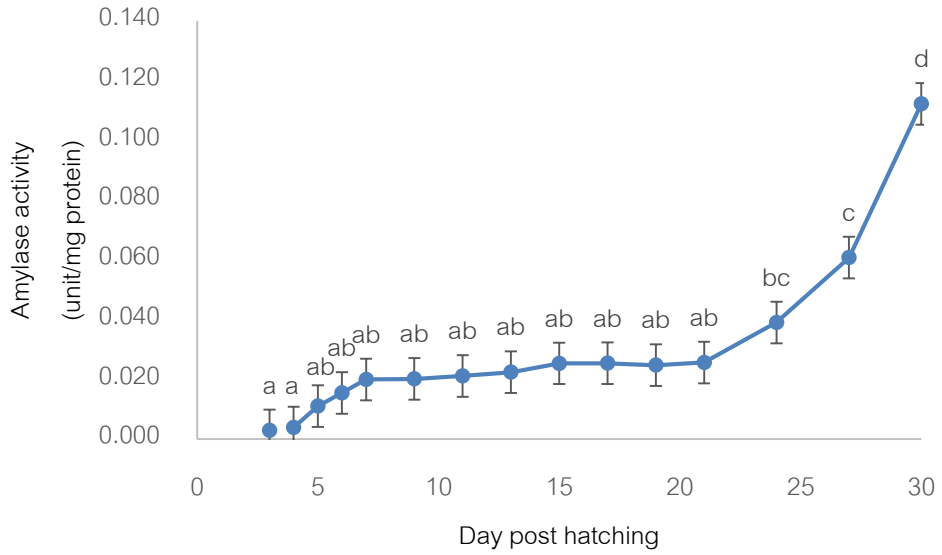

Figure 5 Amylase activities (means±SD, n=4) of larval spotted scat (*Scatophagus argus*) from day 1-30 post hatching. Means having different alphabets are statistically different (P<0.05).

วิจารณ์ผลการวิจัย

จากการศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของลูกปลาตะกรับ พบว่า ลูกปลาตั้งแต่แรกฟักถึงอายุ 13 วัน มีการเจริญเติบโตด้านน้ำหนักและความยาวช้ามาก แต่มีการเจริญเติบโตที่รวดเร็วขึ้นเมื่อลูกปลาอายุ 15-30 วัน โดยมีการเจริญเติบโตด้านน้ำหนักที่สูงกว่าด้านความยาว คือ มีค่าน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นตั้งแต่แรกฟัก – 30 วัน มีค่า 28.54±1.40 มิลลิกรัม ค่าอัตราการเจริญเติบโตต่อวัน คือ 1.14±0.06 มิลลิกรัม/วัน ในขณะที่การเจริญเติบโตด้านความยาวมีค่าความยาวที่เพิ่มขึ้น 6.78 มิลลิเมตร ค่าอัตราการเจริญเติบโตต่อวัน คือ 0.23 มิลลิเมตร/วัน และค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะด้านน้ำหนักเท่ากับ 19.74±0.27 %/วัน ซึ่งอัตราการเจริญเติบโตของลูกปลาตะกรับให้ผลที่สอดคล้องกับการศึกษาของ Mandal *et al.* (2021) .ในการศึกษาผลของความหนาแน่นของการอนุบาลลูกพันธุ์ปลาตะกรับแรกฟัก- 30 วัน พบว่า ลูกปลาตะกรับมีค่า SGR อยู่ในช่วง 16.50 – 18.79 %/วัน และลูกปลามีค่าความยาวเหยียดทั้งตัว 10.25±0.68 มิลลิเมตร อย่างไรก็ตามอัตราการเจริญเติบโตของลูกปลาทะเลชนิดต่าง ๆ มีอัตราการเจริญเติบโตที่ต่างกัน เช่นปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*) อายุ 15-30 วัน มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะต่อวันคือ 25.08 ± 1.04% ซึ่งสูงกว่าในช่วง 3-12 วันที่มีการเจริญเติบโต 13.17 ± 0.38 %/วัน (Srichanun *et al.*, 2012) เมื่อคำนวณค่าความสัมพันธ์ระหว่างความยาว และน้ำหนักของลูกปลาตะกรับ กับอายุของลูกปลาพบว่ามีความสัมพันธ์กันแบบเอกซ์โปเนนเชียล โดยมีสมการความสัมพันธ์ด้านน้ำหนักคือ $y = 0.03e^{0.245x}$ $R^2 = 0.96$ และด้านความยาว มีสมการคือ $y = 1.746e^{0.053x}$ $R^2 = 0.96$ ซึ่งสอดคล้องกับการเจริญเติบโตในลูกปลาตั้งแต่แรกฟัก ถึง วัยรุ่นในปลาหลายชนิด เช่น ปลากะพงขาว (Srichanun *et al.*, 2013) ปลากะพงยุโรป (*Dicentracus labrax*)(Zambonino Infante & Cahu, 1994) ปลา Yellow croaker (Ma *et al.*, 2005) และปลากดเหลือง (Yellow catfish) (Yang *et al.*, 2010) เป็นต้น ซึ่งจากกราฟสมการความสัมพันธ์จะเห็นได้ชัดว่าปลาตะกรับมีการเจริญเติบโตทั้งด้านน้ำหนักและความยาวที่สูงมากในช่วงอายุ 21-30 วัน

ในการศึกษาระดับ pH ที่เหมาะสมสำหรับกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหารหลัก ได้แก่ เปปซิน ทริปซิน ไลเปส และอะไมเลส ในกระเพาะอาหาร ไส้ติ่ง และลำไส้ พบว่า เปปซินเป็นเอนไซม์หลักทำหน้าหน้าที่ย่อยโปรตีน มีกิจกรรมของเอนไซม์ระดับสูงในกระเพาะอาหาร โดยระดับของ pH ที่เหมาะสมระหว่าง 2.0-2.5 ใกล้เคียงกับปลาชนิดต่าง ๆ เช่น ปลาทูน่าครีบยาว (Albacore tuna) (pH 2) และ ปลาไหลยุโรป (pH 2.5) (Nalinanon *et al*., 2004; Zhao *et al*., 2011) อย่างไรก็ตามระดับ pH ที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเปปซินมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของปลา ดังการศึกษาของ Natalia *et al*. (2004) ในปลาตะพัด (*Scleropages formosus*) พบว่า Acidic pepsin-like enzyme มีระดับของกิจกรรมสูงสุดในกระเพาะอาหารที่ pH 1.5-2.0 โดยทั่วไปเปปซินทำงานได้ดีในสภาพที่เป็นกรดซึ่งมี pH ในช่วง 2-3.5 (Zhao *et al*., 2011) เนื่องจากเปปซินหลั่งออกมาโดยต่อมในกระเพาะอาหารในรูปเปปซิโนเจน (Pepsinogen) และเปลี่ยนเป็นเปปซินด้วยการกระตุ้นของกรดเกลือ (HCl) ที่หลั่งออกมาโดยเซลล์อ๊อกซินติโคเปปติก (Oxynticopeptic cells) ของต่อมแกสตริก (Gastric gland) ในกระเพาะอาหาร (Rust, 2005) ในส่วนของทริปซินซึ่งทำหน้าที่ย่อยโปรตีนในไส้ติ่งและลำไส้ มีค่าเฉลี่ยของกิจกรรมสูงที่สุดที่ pH 8.0 (7.71±1.46 และ 13.21±0.51 unit/mg protein ตามลำดับ) จึงเป็นระดับที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของทริปซิน เช่นเดียวกับการศึกษาของ Sabapathy & Teo (1995) ซึ่งพบว่าระดับ pH ที่เหมาะสมสำหรับทริปซินในลำไส้ของปลาสลิดหิน (Rabbitfish) คือ 8.0 และในปลากะพงขาววัยรุ่นที่ศึกษาโดย Boonprasert *et al*. (2019) ซึ่งปลาหลายชนิดมีระดับ pH ที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของทริปซินอยู่ในช่วง 8.0-8.3 (Krogdahl *et al*., 2015) การศึกษาครั้งนี้พบว่า กิจกรรมของทริปซินในลำไส้ของปลาตะกรับมีระดับสูงกว่าในไส้ติ่ง แสดงให้เห็นว่าลำไส้เป็นอวัยวะที่เกิดการย่อยโปรตีนโดยทริปซินได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในส่วนของไลเปสในไส้ติ่ง มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุดที่ pH 8.5 และสูงกว่าในลำไส้ถึง 3.4 เท่า ซึ่งมีระดับ pH ช่วงกว้างเท่ากับ 7.0-8.5 แสดงให้เห็นว่าการย่อยไขมันมีประสิทธิภาพสูงบริเวณไส้ติ่งของปลาตะกรับ Solovyeva *et al*. (2015) ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ในปลาทอง (*Carassius auratus gibelio*) และปลาไน (*Cyprinus carpio*) พบว่าระดับ pH ที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 8-9 และในปลาแอตแลนติกแซลมอน Krogdahl *et al*. (2015) รายงานระดับที่เหมาะสม คือ pH 7.95 โดยการย่อยไขมันในปลาชนิดต่าง ๆ เกิดขึ้นที่ลำไส้และไส้ติ่งโดยเอนไซม์แพนครีเอติกไลเปส (Pancreatic lipase) จากตับอ่อนและเอนไซม์ไลเปสชนิดต่าง ๆ จากผนังลำไส้ (Enterocyte) และทำการย่อยไตรกลีเซอไรด์ให้แตกตัวเป็นกลีเซอรอลและกรดไขมันอิสระที่มีขนาดโมเลกุลเล็กเพื่อดูดซึมไปใช้ได้ (Rust, 2002) สำหรับกิจกรรมของอะไมเลสมีระดับ pH ที่เหมาะสมในลำไส้และไส้ติ่งที่ระดับเดียวกัน คือ pH 7.0 แต่กิจกรรมของอะไมเลสที่ pH 8.0 มีระดับสูงไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) แสดงให้เห็นว่าอะไมเลส สามารถทำงานได้ดีในช่วง pH 7.0-8.0 ในลำไส้ของปลาตะกรับ ในการศึกษาของ Solovyeva *et al*. (2015) พบกิจกรรมของอะไมเลส (α-amylase activity) ในระดับสูงทั้งที่ pH 7 และ 9 เช่นเดียวกัน โดยทั่วไปแล้วระดับ pH ที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของไลเปส และอะไมเลส อยู่ในช่วง pH ที่เป็นกลาง (Rust, 2005) แต่มีความแตกต่างกันได้ในปลาชนิดต่าง ๆ

จากการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เปปซิน ทริปซิน อะไมเลส และไลเปส ในปลาตะกรับอายุแรกฟักจนถึงอายุ 30 วัน พบว่าเปปซิน และทริปซิน มีค่าของกิจกรรมเพิ่มขึ้นเมื่อลูกปลามีอายุมากขึ้น สอดคล้องกับการรายงานของ Engrola *et al*. (2009) ซึ่งรายงานว่าเปปซิน และทริปซินมีระดับกิจกรรมเพิ่มขึ้นสอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อวิทยาของระบบย่อยอาหาร ซึ่งพบการเจริญของอวัยวะที่เกี่ยวข้องต่าง ๆ และการเพิ่มขึ้นของขนาดอวัยวะย่อยอาหารตาม

การเจริญเติบโต สำหรับกิจกรรมของไลเปส พบว่าลูกปลาตะกรับที่อายุ 3-4 วันมีกิจกรรมของเอนไซม์ในระดับต่ำ และเมื่อลูกปลามีอายุมากขึ้นมีแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของกิจกรรมเอนไซม์อย่างต่อเนื่องจนถึง 30 วัน ซึ่งมีค่าเฉลี่ยของกิจกรรมเอนไซม์อยู่ที่ 0.2174±0.014 unit/ mg protein ซึ่งมีระดับของกิจกรรมต่ำกว่ากิจกรรมของเปปซินและทริปซิน แต่มีแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของกิจกรรมเมื่อลูกปลามีอายุเพิ่มมากขึ้นเช่นเดียวกัน โดยธรรมชาติปลาขนาดเล็กเป็นปลาที่มีอัตราการเจริญเติบโตสูง มีการสังเคราะห์โปรตีน และมีความต้องการโปรตีนและพลังงานสูง (Vuthiphandchai, 1993) ดังนั้นกิจกรรมของเอนไซม์ โปรติเอส และไลเปส จึงต้องมีมากเพื่อตอบสนองต่อการใช้ประโยชน์จากโปรตีนและไขมันที่ได้รับจากอาหาร ในส่วนของกิจกรรมของอะไมเลส พบว่าลูกปลาอายุ 3 และ4 วันมีกิจกรรมเอนไซม์ต่ำมากเพียง 0.003-0.004 unit/mg protein และเริ่มมีการเพิ่มขึ้นอย่างช้า ๆ และคงที่ระหว่างวันที่ 5 ถึง 21 หลังจากนั้นเมื่อลูกปลาอายุ 24 วันถึง 30 วัน ค่าเฉลี่ยของกิจกรรมเอนไซม์จะเพิ่มขึ้น Kuz'mina (1996) รายงานว่าความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสกับอายุปลามีความหลากหลายมากกว่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส เช่นกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสในปลา Pike และ Perch ซึ่งเป็นปลากินเนื้อที่ชอบล่าเหยื่อ (Predator) กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสจะลดลงเมื่อปลามีอายุมากขึ้น ขณะที่ปลา Bream และ Roach ซึ่งเป็นปลากินสัตว์หน้าดิน กิจกรรมของเอนไซม์จะมีค่าผันแปรไม่สัมพันธ์กับอายุ ซึ่งแตกต่างจากปลาตะกรับที่ทำการศึกษาครั้งนี้ พบว่าเมื่อปลาอายุเพิ่มมากขึ้นจะพบกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสที่เพิ่มขึ้นด้วยเช่นกัน สอดคล้องกับ De Silva & Anderson (1995) กล่าวว่าการเพิ่มขึ้นของกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสมีความสัมพันธ์กับอาหารที่ได้รับ คือชนิดและปริมาณอาหารจำพวกคาร์โบไฮเดรตสามารถกระตุ้นให้เอนไซม์อะไมเลสมีการทำงานเพิ่มขึ้นได้ ซึ่งหากปลาตะกรับได้รับอาหารที่มีระดับแป้งสูงกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสจะสูงขึ้นด้วย

สรุปผลการวิจัย

จากการวิเคราะห์ระดับ pH ที่เหมาะสมของกิจกรรมเอนไซม์ย่อยอาหารหลัก คือ เปปซิน ทริปซิน ไลเปส และอะไมเลสของปลาวัยรุ่นเพื่อเป็นระดับที่นำไปวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์แต่ละชนิดในปลาตะกรับตั้งแต่อายุแรกฟักจนถึงอายุ 30 วัน พบว่าเปปซินมีกิจกรรมสูงสุดที่ pH 2.0 ทริปซิน และอะไมเลสทั้งในไส้ติ่งและลำไส้มีระดับกิจกรรมเอนไซม์สูงสุด เท่ากันคือมี มีกิจกรรมสูงสุดที่ pH 8.0 และ pH 7.0 ตามลำดับ ส่วนไลเปสมีกิจกรรมสูงสุดในไส้ติ่งที่ pH 8.5 และในลำไส้ที่ pH 8.0 เมื่อศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหารในปลาอายุแรกฟักถึง 30 วันพบว่ากิจกรรมของเปปซินเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนถึงอายุ 30 วัน กิจกรรมของ ทริปซินมีการเพิ่มขึ้นอย่างช้า ๆ จนถึงอายุ 15 วัน และเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อเข้าสู่วันที่ 17 จนถึงอายุ 30 วัน สำหรับกิจกรรมของไลเปสมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง และเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อลูกปลาอายุ 30 วัน ในส่วนของอะไมเลสมีระดับกิจกรรมของเอนไซม์ในระดับต่ำและค่อย ๆ เพิ่มขึ้นในช่วงอายุ 5-21 วัน จากนั้นเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อลูกปลาอายุ 24-30 วัน จากข้อมูลความสามารถด้านการย่อยสารอาหารของลูกปลาตะกรับวัยอ่อนอายุแรกฟักถึง 30 วัน พบว่าลูกปลามีความสามารถในการย่อยโปรตีนได้เป็นอันดับแรกโดยเปปซินมีกิจกรรมสูงตั้งแต่ลูกปลาอายุ 11 วันขึ้นไป ส่วนทริปซินมีสูงในลูกปลาอายุ 17 วัน ส่วนไขมันและคาร์โบไฮเดรตพบว่าลูกปลามีความสามารถในการย่อยได้ต่ำในช่วงแรก และสูงขึ้นในช่วงอายุ 24-30 วัน

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสาขาความเป็นเลิศการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำอย่างยั่งยืน (Discipline of Excellence in Sustainable Aquaculture) มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ในการสนับสนุนทุนการศึกษาสำหรับนายวัชริศ ตั่นไพโรจน์ในการศึกษาระดับปริญญาโท สาขาวาริชศาสตร์ และศูนย์วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีและนวัตกรรมสัตว์น้ำชายฝั่ง กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ สำหรับความอนุเคราะห์ลูกปลาตะกรับสำหรับการศึกษาครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

Assavaaree, M., Ruensirikul, J. & Chusrirat, L. (2019). Effect of stocking densities on growth and survival of spotted scat (*Scatophagus argus* Linnaeus, 1766). Annual Report of Coastal Aquaculture Research and Development Center Region 6 (Songkhla). (pp 50-67), Department of Fisheries, Ministry of Agriculture and Cooperatives, Thailand. (in Thai)

Barry, T.P. & Fast, A.W. (1988). Natural history of the spotted scat (*Scatophagus argus*) In: A.W. Fast (Ed) Spawning Induction and Pond Culture of the Spotted Scat (*Scatophagus argus*) in Philippines. (pp 4-30). Technical Report. USA: Hawaii Institute of Marine Biology.

Bergmeyer, H. U., Bergmeyer, J. & Grassl, M. (1974). Methods of Enzymatic Analysis. 2nd Edition, Volume II. New York: Academic Press.

Boonprasert, W., Chaibu, P., Mengumphan, K., Promya, J. & Chitmanat, C. 2019. Effect of artificial water colors on enzymes activity, TC/ratio and growth performance of juveniles Asian seabass (*Lates calcarifer* Bloch, 1790) rearing in recirculating aquaculture system (RAS). *Journal of Fisheries Technology Research*, *13*(2), 11-24. (in Thai)

Choonhapran, A. (1997). Study on fisheries resource and population change in Songkhla Lake. Proceedings of the 35th Kasetsart University Annual Conference: Fisheries, Science, Engineering, Environmental Management, Home Economics, Education and Economics. (pp. 17-26). Bangkok: Kasetsart University. (in Thai)

De Silva, S. S. & Anderson, T. A. (1995). Fish Nutrition in Aquaculture. London: Chapman and Hall.

Engrola, S., Figucira, L., Conceicao, L.E.C., Gavaia, P.J., Ribeiro, L. & Dinis, M.T. (2009). Co-feeding in Senegalese sole larvae with inert diet from mouth opening promotes growth at weaning. *Aquaculture*, *288*, 264-227

Houde, D.E. & Scheckter, R.C. (1981). Growth rates, rations and cohort consumption of marine fish larvae in relation to prey concentrations. *Rapports et Proces-verbaux des Réunions. Conseil International pour l'Éxploration de la Mer*, *178,* 441–453.

Krogdahl, A., Sundby, A. & Holm, H. (2015). Characteristics of digestive processes in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Enzyme pH optima, chyme pH, and enzyme activities. *Aquaculture, 449*, 27-36

Kuz'mina, V.V. (1996). Influence of age on digestive enzyme activity in some freshwater teleosts. *Aquaculture, 148*, 25-37

Ma, H., Cahu, C., Zambonino, J., Yu, H., Duan, Q., Le Gall, M.M. & Mai, K. (2005). Activities of selected digestive enzymes during larval development of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*). *Aquaculture, 245*, 239–248.

Musikasung, W., Assava-aree, A., Tongsaksa, V. & Prasertsom, P. (2014). Feeding of *Scatophagus argus* (Linnaeus, 1766) in the Outer Songkhla Lake. *Proceedings of 52nd Kasetsart University Annual Conference: Fisheries, Agricultural Extension and Home Economics*. (pp. 106-113). Bangkok: Kasetsart University. (in Thai)

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, *193* (1), 265–75

Nalinanon, S., Benjakul, S. & Kishimura, H. (2010). Biochemical properties of pepsinogen and pepsin from the stomach of albacore tuna (*Thunnus alalunga*). *Food Chemistry, 121*, 49-55

Natalia, Y., Hashim, R., Ali, A. & Chong, A. (2004). Characterization of digestive enzymes in a carnivorous ornamental fish, the Asian bony tongue *Scleropages formosus* (Osteoglossidae). *Aquaculture*, *233*,305-320

Ruensirikul, J., Assawaaree, M., Danayadol, Y. & Chusrirat, L. (2008). Successful in artificial insemination of spotted scat, *Scatophagus argus* Linnaeus, 1766 using LHRHa. *Thai Fisheries Gazette*, *61*, 413-420. (in Thai)

Ruensirikul, J., Assawaaree, M., Danayadol, Y. & Chusrirat, L. (2009). Nursing and larval development of spotted scat, *Scatophagus argus* Linnaeus, 1766. *Thai Fisheries Gazettte*, *62*,13- 22. (in Thai)

Ruensirikul, J. & Chiayvareesajja, S. (2019). Timing of oocyte recruitment and reproductive performance of female hatchery-reared spotted scat (*Scatophagus argus* Linnaeus, 1766) after artificial insemination. *Maejo International Journal of Science and Technology, 13*(2), 148-160

Rust, M.B. (2002). Nutritional physiology. In: Halver, J.E. & Hardy, R. W. (Eds) Fish Nutrition (3rd Edition). (pp. 368-446). California: Elsevier Science.

Sabapathy, U. & Teo, L.H. (1995). Some properties of the intestinal proteases of the rabbitfish, *Siganus canaliculatus* (Park). *Fish Physiology Biochemistry, 14,* 215–221

Solovyeva, M.M., Kashinskayaa, E.N., Izvekovab, G.I. & Glupova, V.V. (2015). pH values and activity of digestive enzymes in the gastrointestinal tract of fish in Lake Chany (West Siberia). *Journal of Ichthyology, 55* (2), 251–258

Srichanun, M., Tantikitti, C., Utarabhandnd, P. & Kortner, T.M. (2013). Gene expression and activity of digestive enzymes during the larval development of Asian seabass (*Lates calcarifer*). *Comparative Biochemistry and Physiology B, 165*, 1–9.

Vuthiphandchai, V. (1993). Fish Nutrition. Bangkok: OA Printing (in Thai)

Wongchinawit, S. & Paphavasit, N. (2009). Ontogenetic niche shift in the spotted scat, *Scatophagus argus*, in Pak Phanang estuary, Nakhon Si Thammarat Province, Thailand. *The Natural History Journal of Chulalongkorn University, 9*(2), 143-169

Yang, R., Xie, C., Fan, Q., Gao, C. & Fang, L. (2010). Ontogeny of the digestive tract in yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* larvae. *Aquaculture, 302*, 112–123.

Zambonino Infante, J.L.& Cahu, C.L. (1994). Influence of diet on pepsin and some pancreatic enzymes in seabass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology* A, *109*, 209–212.

Zhao, L., Budge, S.M., Ghaly, A.E., Brooks, M.S. & Dave, D. (2011). Extraction, purification and characterization of fish pepsin: A critical review. *Journal of Food Process Technology, 2,*126. doi:10.4172/2157-7110.1000126