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

ผลของการเสริมเอนไซม์โปรติเอสและไฟเตสในอาหารต่อประสิทธิภาพการเจริญเติบโต อัตรารอด อัตราแลกเนื้อ ประสิทธิภาพของอาหาร และประสิทธิภาพการย่อยอาหารของปลาดุกลูกผสม (*Clarias macrocephalus* X *Clarias gariepinus*)

Effects of Protease and Phytase Supplemented in Pellet Feed on Growth Performance, Survival Rate, Feed Conversion Ratio, Feed Efficiency and Feed Digestibility of Hybrid Catfish (*Clarias macrocephalus* X *Clarias gariepinus*)

บุญรัตน์ ประทุมชาติ*

Boonyarath Pratoomchat*

ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ประเทศไทย

Department of Aquatic Science, Faculty of Science, Burapha University, Thailand

Received : 13 Feburary 2023

Revised : 6 April 2023

Accepted : 19 April 2023

บทคัดย่อ

ทำการทดลองใช้โปรติเอสร่วมกับไฟเตสมาเสริมในอาหารสำเร็จรูป เพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพการเจริญเติบโต อัตรารอด การใช้ประโยชน์จากอาหาร และประสิทธิภาพการย่อยได้ของวัตถุแห้ง (ADMD) โปรตีน (ACPD) และไขมัน (ALD) ของปลาดุกลูกผสม (*Clarias macrocephalus* X *Clarias gariepinus*) โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด แบ่งออกเป็น 4 ชุดการทดลอง ตามความเข้มข้นของโปรติเอสในสูตรอาหาร ประกอบด้วย 500 ยูนิต/กิโลกรัม 1,000 ยูนิต/กิโลกรัม, 2,000 ยูนิต/กิโลกรัม ร่วมกับไฟเตส 500 ยูนิต/กิโลกรัม ทั้ง 3 สูตร และชุดควบคุมที่ไม่เติมเอนไซม์ โดยผสมลงให้ทั่วในอาหารสำเร็จรูปที่บดละเอียดที่มีโปรตีน 31.98±0.06 เปอร์เซ็นต์ ตามด้วยผสมโครมิกออกไซด์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักอาหาร นำไปอัดเม็ด ผึ่งให้แห้งแล้วจึงไปเคลือบด้วยน้ำมันตับปลา 0.5 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักอาหาร นำมาทดสอบเลี้ยงปลาดุกลูกผสมขนาดเริ่มต้นที่น้ำหนัก 5.45±0.05 กรัม และความยาว 9.22±0.04 เซนติเมตร ในบ่อคอนกรีตขนาด 1 ลูกบาศก์เมตร ที่ความหนาแน่น 30 ตัวต่อตารางเมตร ให้อาหาร 5 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักตัว วันละ 3 ครั้ง ทำ 3 ซ้ำ ทำการสุ่มปลาจำนวน 10 ตัว (33 เปอร์เซ็นต์) ทุกๆ 10 วัน ของแต่ละซ้ำเพื่อประเมินความยาวและน้ำหนัก และเมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงครบ 70 วัน ทำการเก็บขี้ปลาเพื่อนำไปหาประสิทธิภาพการย่อยสารอาหาร ผลการทดลองพบว่า ปลาทุกกลุ่มมีอัตรารอด เปอร์เซ็นต์น้ำหนักและความยาวที่เพิ่มขึ้น การเจริญเติบโตจำเพาะ ความแปรปรวนของขนาด อัตราแลกเนื้อมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นต่อวัน ประสิทธิภาพของอาหาร น้ำหนักอาหารที่ปลากิน ประสิทธิภาพการย่อยวัตถุแห้งและประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนของปลาชุดที่ได้รับอาหารเสริมโปรติเอส 500 ยูนิต/กิโลกรัม ร่วมกับไฟเตส 500 ยูนิต/กิโลกรัม มีค่าสูงกว่าปลาชุดได้รับอาหารชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) แต่ไม่แตกต่างกับปลาชุดที่ได้รับอาหารเสริมโปรติเอส 1,000 ยูนิต/กิโลกรัม ร่วมกับไฟเตส 500 ยูนิต/กิโลกรัม และปลาชุดที่ได้รับอาหารเสริมโปรติเอส 2,000 ยูนิต/กิโลกรัม ร่วมกับไฟเตส 500 ยูนิต/กิโลกรัม อย่างมีนัยสำคัญ

(p>0.05) ขณะที่ประสิทธิภาพการย่อยไขมันของปลาที่รับอาหารเสริมโปรติเอส 500, 1,000 และ 2,000 ยูนิต/กิโลกรัม ร่วมกับ ไฟเตส 500 ยูนิต/กิโลกรัม มีค่าสูงกว่าปลาชุดที่ได้รับอาหารชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) ชี้ให้เห็นว่าการเสริมเอนไซม์โปรติเอส 500 ยูนิต/กิโลกรัม ร่วมกับเอนไซม์ไฟเตส 500 ยูนิต/กิโลกรัม เป็นระดับเหมาะสมในการเลี้ยงปลาดุกลูกผสมที่ส่งผลให้มีประสิทธิภาพการเจริญเติบโตและการใช้ประโยชน์จากอาหารดีขึ้น

คำสำคัญ : ปลาดุกลูกผสม ; เอนไซม์ ; โปรติเอส ; ไฟเตส ; ประสิทธิภาพการย่อย

Abstract

The effect of inclusion of protease and phytase on growth performance, survival rate, feed utilization and apparent digestibility of dry matter (ADMD), protein (ACPD) and lipid (ALD) of hybrid catfish (*Clarias macrocephalus* X *Clarias gariepinus*), the four experimental feeds were designed by CRD (Completely Randomized Design) as protease levels supplemented in feed formular as followed 500 U/kg (T1), 1,000 U/Kg (T2) 2,000 U/kg (T3) and plus 500 U/kg phytase of these formulas and without enzyme supplementation (C). Enzymes was thoroughly mixed in finely ground feed with 31.98±0.06% protein followed by chromic oxide at 0.5% dry weight and thoroughly mixed, pelleting, drying, then coating with fish liver oil at 0.5% dry weight. The hybrid catfish at initial size of 5.45±0.05 g and 9.22±0.04 cm in size was raised in 1m^3 concrete tank at density of 30 fish/m^2. They were fed at 5% of body wet weight and three times daily. The three replications were applied. Ten fishes per replication (33%) were randomly sampled for size evaluation every ten days until at day 70 of culture, the fish fecal was collected for digestibility test. Results found that survival rate, %weight and length gains, specific growth rate, size variation and feed conversion ratio were not different (p>0.05) among groups. Average daily weight gain, feed efficiency, feed consumption, ADMD and ACPD of fish fed with feed mixed with 500 U/kg protease and 500 U/kg phytase were significantly higher (p<0.05) than that of control feed but not different (p>0.05) with feed mixed with 1,000 U/kg protease and 500 U/kg phytase and feed mixed with 2,000 U/kg protease and 500 U/kg phytase. ALD of fish fed with feed mixed with 500 U/kg, 1,000 U/kg , and 2,000 U/kg protease and 500 U/kg phytase was significantly higher (p<0.05) than that of control feed. This indicates that the supplementation of protease 500 U/kg and phytase 500 U/kg in feed is the most suitable level for raising this species in terms of growth performance and feed utilization.

Keywords : hybrid catfish ; enzyme ; protease ; phytase ; digestibility

***Corresponding author E-mail** : boonyara@buu.ac.th

บทนำ

ปลาดุกลูกผสม จัดอยู่ใน Family Clariidae ชื่อวิทยาศาสตร์ (*Clarias macrocephalus* X *Clarias gariepinus*) ชื่อสามัญอังกฤษ Hybrid catfish (Tavarutmaneegul *et al.,* 1992) ปลาดุกลูกผสมยังคงเป็นที่นิยมของผู้เลี้ยงปลาของประเทศไทย เนื่องจากปลาชนิดนี้เลี้ยงง่าย เจริญเติบโตเร็ว และมีความต้านทานโรค เป็นที่นิยมบริโภค และได้มีการนำปลาดุกลูกผสมไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ทางอุตสาหกรรมหลายชนิด แต่เนื่องจากอาหารเป็นต้นทุนสูงถึง 50–60 เปอร์เซ็นต์ของต้นทุนทั้งหมดในการเลี้ยง ประกอบกับแหล่งวัตถุดิบอาหาร (feedstuffs) มีราคาสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยเฉพาะอย่างยิ่งปลาป่น คุณภาพไม่คงที่ บางฤดูกาลไม่สามารถหาได้เพียงพอ (Boonyaratpalin, 1988) ปลาดุกลูกผสมจำเป็นต้องได้รับอาหารโปรตีนเพื่อนำกรดอะมิโนไปสร้างกล้ามเนื้อเพื่อการเจริญเติบโต ถ้าได้รับโปรตีนไม่เพียงพอต่อความต้องการก็จะทำให้เจริญเติบโตช้า ปลาดุกความยาวเฉลี่ย 1 เซนติเมตร ต้องการอาหารที่มีโปรตีน 35-40 เปอร์เซ็นต์ ปลาดุกขนาด 1 นิ้ว ถึงปลาเต็มวัยต้องการอาหารที่มีโปรตีน 25–35 เปอร์เซ็นต์ (Vuthiphandchai,1993) แหล่งโปรตีนในอาหารปลาดุก เช่น ปลาป่น กากถั่วเหลือง กากถั่วลิสง กากงา กากถั่วเขียว โดยทั่วไปไขมันที่จะเติมในอาหารปลาดุกจะไม่เกิน 6 เปอร์เซ็นต์ เพราะในวัตถุดิบ เช่น ปลาป่น กากถั่วเหลือง และรำข้าว มีไขมันอยู่พอสมควร (Boonyaratpalin, 1988)

เป็นที่ทราบกันดีว่าปลาป่นเป็นแหล่งวัตถุดิบโปรตีนที่มีคุณภาพเพื่อนำมาเป็นองค์ประกอบสำคัญในสูตรอาหารสัตว์น้ำ แต่ปัจจุบันปลาป่นมีราคาสูงและขาดแคลน จึงทำให้ต้องลดการใช้ปลาป่นลงด้วยการแทนด้วยวัตถุดิบจากพืชที่มีโปรตีนสูงซึ่งมีราคาถูกกว่าและหาได้ง่าย อย่างไรก็ตามวัตถุดิบจากพืชโปรตีนสูงโดยปกติจะมีกรดไฟติก (phytic acid) ปริมาณที่สูง ซึ่งจะไปรวมกับฟอสฟอรัสให้อยู่ในรูปไฟเตทฟอสฟอรัส (phytate phosphorus) (Liu *et al*., 1998; Sugiura *et al*., 2001; Cao *et al*., 2007) จึงทำให้สัตว์น้ำทั้งกุ้งและปลาไม่สามารถใช้ประโยชน์จากไฟเตทฟอสฟอรัสได้ในระบบทางเดินอาหารเนื่องจากขาดไฟเตส (phytase) (Ramseyer *et al*., 1999; Adeoye *et al*., 2016) เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าวในการผลิตอาหารสัตว์น้ำจึงเติมฟอสฟอรัสในรูปอนินทรีย์ (inorganic phosphorus) ในการผลิตอาหารเพื่อทำให้สัตว์น้ำได้รับฟอสฟอรัสอย่างเพียงพอ แต่ปัญหาที่พบคือไฟเตทฟอสฟอรัสที่ไม่สามารถถูกใช้นั้นถูกขับออกมาทางมูลสัตว์น้ำ ทำให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อมอย่างมาก มีผลทำให้เกิดแพลงก์ตอนแพร่ขยายพันธุ์อย่างรวดเร็ว (eutrophication) (Rahmati-Holasoo *et al*., 2020) นอกจากนี้กรดไฟติกในอาหารสัตว์น้ำยังไปลดประสิทธิภาพการเจริญเติบโต อัตราการใช้ประโยชน์จากอาหาร และกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหาร (digestive enzyme activity) และยังไปมีผลกระทบต่อการดูดซึมแคลเซียม ฟอสฟอรัส และธาตุอาหารอีกหลายชนิด (Humer *et al*., 2015; Lemos & Tacon, 2017) เนื่องจากไฟเตทจะไปยึดเหนี่ยวกับแร่ธาตุ แป้ง และโปรตีนเป็นสารประกอบในรูปคีเลต (chelate) ในกระเพาะอาหาร (Kies *et al*., 2001) วัตถุดิบทดแทนปลาป่นจากพืชยังพบความไม่สมดุลของกรดอะมิโน และต้านโภชนาการ (antinutritional factors) (Kumar *et al*., 2012; Maas *et al*., 2020) เช่น การยับยั้งโปรติเอส (protease inhibitors) (Gatlin *et al*., 2007) โดยไฟเตทไปเชื่อมติดกับตำแหน่งที่ว่องไวต่อปฏิกิริยา (active site) ของโปรติเอส จึงทำให้ลดกิจกรรมของเอนไซม์ที่ใช้ย่อยอาหาร (digestive enzyme activity) ยับยั้งการทำงานของทริปซิน (trypsin inhibitor) ซึ่งไปลดประสิทธิภาพการย่อยโปรตีน (Cheng & Hardy, 2003; Cheng *et al*., 2004; Cao *et al*., 2007; Kumar *et al*., 2012; Riche & Garling, 2004) ส่งผลลบต่อการไปใช้ประโยชน์ของสารอาหาร นอกจากนี้ยังพบโพลีแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้ง (non-starch

polysaccharides) ซึ่งมีผลทำให้สัตว์น้ำย่อยได้ยากและกระตุ้นการต่อต้านโภชนาการ เนื่องจากไปสร้างการเปลี่ยนแปลงสรีระ ความหนืด รูปร่าง และจุลินทรีย์ของกระเพาะอาหาร (Sinha *et al*., 2011)

การนำเอนไซม์มาเสริมในอาหารสัตว์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยและการใช้ประโยชน์จากอาหารมีการพิจารณากันมาพอสมควรในอุตสาหกรรมผลิตอาหาร โดยพิจารณาจากความคุ้มทุน และปัจจัยทางชีวภาพ ทั้งชนิดสัตว์ อายุ และสิ่งแวดล้อม อุณหภูมิ ความเป็นกรดด่าง ตลอดจนวัตถุดิบในสูตรอาหาร ซึ่งทั้งหมดนี้มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ในร่างกายสัตว์ โดยเอนไซม์กลุ่มโปรติเอสนับว่ามีบทบาทสำคัญต่อการย่อยโปรตีนจากอาหารที่ผู้ผลิตอาหารให้ความสำคัญเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนเพื่อให้สัตว์สามารถนำโปรตีนไปใช้ประโยชน์ต่อร่างกายได้ดีขึ้น (Bao *et al*., 2013) ซึ่งส่วนใหญ่พบว่ามีการเสริมโปรติเอสในอาหารมนุษย์ (Tavano *et al*., 2018) จากรายงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าโปรติเอสสามารถลดผลกระทบจากการยับยั้งการทำงานของทริปซิน (Caine *et al*., 1998) และเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยโปรตีน (Drew *et al*., 2005; Dalsgaard *et al*., 2012) และประสิทธิภาพการใช้อาหาร (feed efficiency) (Drew *et al*., 2005) การเสริมโปรติเอส 0.175 กรัม/กิโลกรัม ลงในอาหารสูตรที่ลดปลาป่นและลดโปรตีนลง 5-10 เปอร์เซ็นต์ ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) (Li *et al*., 2016) และโปรติเอสที่เสริมในอาหารยังไปช่วยเพิ่มกิจกรรมการเผาผลาญ (metabolic activity) ในปลา ดังงานวิจัยของ Hassaan *et al*. (2019) ที่ทดสอบอาหารที่มีสัดส่วนของปลาป่นและกากเมล็ดฝ้ายต่างๆกันร่วมกับการเสริมโปรติเอส 250 ยูนิต/กิโลกรัม ในสูตรอาหารเลี้ยงปลานิล (*Oreochromis niloticus*) พบว่าอาหารที่มีการเสริมโปรติเอสส่งผลให้ปลานิลมีการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหารและประสิทธิภาพการใช้โปรตีนสูงกว่าอย่างชัดเจน และยังพบการแสดงออกของ insulin-like growth factor I gene ในตับและในสมองของปลานิลสูงกว่าอีกด้วย การใช้โปรติเอสเสริมในอาหารที่ไม่ใช้ปลาป่นเลี้ยงปลานิล (*Oreochromis niloticus* X *Oreochromis aureus*) สามารถทำให้น้ำหนักปลาเพิ่มขึ้น 1,169 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารที่ไม่ได้เสริมโปรติเอส (1,052 เปอร์เซ็นต์) (Li *et al*. 2019) ให้ผลดีในปลา Gibel carp (*Carassius auratus gibelio*) เช่นกัน เมื่อมีการใช้โปรติเอสผสมในอาหารปกติที่มีปลาป่น พบน้ำหนักเพิ่มขึ้น 231 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเพียง 188 เปอร์เซ็นต์ (Shi *et al*. 2016) ทั้งนี้มีความเป็นได้ว่าการเสริมโปรติเอสในอาหารนั้นไปเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยอาหาร ดังรายงานวิจัยในการเลี้ยงปลาเรนโบว์ เทราท์ (*Oncorhynchus mykiss*) (Dalsgaard *et al*., 2012)

การเสริมไฟเตสช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการรับฟอสฟอรัสและแร่ธาตุอีกหลายชนิด (Kumar *et al*., 2012) เพิ่มประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรตและโพลีแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้ง (Maas *et al*., 2018) ไฟเตสสามารถไปทำหน้าที่ไฮโดรไลซ์ (hydrolyze) กลุ่มฟอสเฟตจากกรดไฟติก ทำให้กรดไฟติกลดการยึดเหนี่ยวลง (lower affinity) จึงทำให้กรดไฟติกปลดปล่อยสารอาหารออกมา มีผลทำให้สัตว์น้ำเพิ่มการใช้สารอาหารต่างๆได้ดีขึ้น ไปลดการปลดปล่อยฟอสฟอรัสและไนโตรเจนสู่ระบบการเลี้ยง จึงช่วยลดการเกิดการแพร่ขยายพันธุ์อย่างรวดเร็ว (eutrophication) ในสิ่งแวดล้อมได้ในทางอ้อมจากการการปล่อยน้ำทิ้ง (Amirkolaie, 2011) และยังมีผลทำให้สัตว์น้ำมีประสิทธิภาพการเจริญเติบโต (growth performance) เมื่อใช้ไฟเตส 1,000 phytase activity unit (FTU)/กิโลกรัม ในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) (Rachmawati & Samidjan, 2016) การเสริมไฟเตส 0.2-0.4 กรัม/กิโลกรัม ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหาร กิจกรรมเอนไซม์ย่อยอาหาร และการต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ในกุ้งเครฟิช (*Procambarus clarkii*) (Yang *et al*., 2022) การเสริมไฟเตสช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการรับฟอสฟอรัสและแร่ธาตุอีกหลาย

ชนิดและมีเจริญเติบโตดีขึ้น (Kumar *et al*., 2012) เพิ่มประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรตและโพลีแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้ง (Maas *et al*., 2018) อาหารที่เสริมไฟเตสหรือโปรติเอสในสูตรอาหารที่มีฟอสฟอรัสและปลาป่นต่ำ ฟอสฟอรัสต่ำ หรือปลาป่นต่ำ ช่วยเพิ่มการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการย่อยอาหารและโปรตีน เพิ่มกิจกรรมของออกเอนไซม์ไลเปส (lipase) ทริปซิน (trypsin) อะไมเลส (amylase) และไคโมทริปซิน (chymotrypsin) ในตับและในทางเดินอาหาร เพิ่มไลโลไซม์ (lysozyme) ในตับ เพิ่มระดับซูเปอร์ออกไซด์ ไดมิวเตส (superoxide dismutase, SOD) กลูทาไธโอน เปอร์ออกซิเดส (glutathione peroxidase) และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระทั้งหมด (total antioxidant capacity, T-AOC) และเพิ่มกรดอะมิโน เช่น วาลีน (valine) ลิวซีน (leucine) และ เมทไธโอนีน (methionine) ในกล้ามเนื้อ และหากเพิ่มทั้งไฟเตสและโปรติเอสในอาหารจะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพที่กล่าวมาข้างต้นได้ดีเพิ่มขึ้นอีกด้วยจากการวิจัยในปลา Gibel carp (*Carassius auratus gibelio*) (Xu *et al*., 2022) มีการเสริมโปรติเอส 500 ยูนิต/กิโลกรัม ร่วมกับไฟเตส 500 ยูนิต/กิโลกรัม ผสมในอาหารเพื่ออนุบาลลูกปลากะพง (*Dicentrarchus labrax*) อายุ 20–29 วัน มีแนวโน้มทำให้การเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการย่อยอาหาร การดูดซึมและอัตราการรอดตายของลูกปลากะพงสูงกว่าสูตรควบคุม (Kolkovski *et al.,* 1997) การเลี้ยงปลาแซลมอน (*Salmo salar*) ด้วยอาหารผสมไฟเตส 1,500 ยูนิต/กิโลกรัม ช่วยให้ปลาย่อยโปรตีนจากปลาป่นและถั่วเหลืองได้ดีขึ้น ทำให้ปลามีผลผลิตดีและมีอัตราการรอดสูง (Storebakken *et al.,* 1998) การเสริมเอนไซม์จากภายนอก (exogenous enzymes) หลายชนิดเพื่อปรับปรุงประสิทธิภาพการย่อยอาหารสำหรับสัตว์น้ำได้มีการใช้และยอมรับกันอย่างแพร่หลายขึ้น (Drew *et al*., 2005) รวมถึงโปรติเอสและไฟเตส (Eyiwunmi *et al*., 2017; Lemos & Tacon, 2017) การเสริมไฟเตสอาหารทำให้ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยฟอสฟอรัส และเพิ่มประสิทธิภาพการเจริญเติบโตในสัตว์น้ำหลายชนิดในการวิจัยที่ผ่านมา ได้แก่ ปลานิล (*O. niloticus*) (Liebert & Portz, 2005) ปลากะพงญี่ปุ่น (*Lateolabrax japonicus*) (Luo *et al*., 2010) และกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) (Qiu & Davis, 2016) แต่ยังมีงานวิจัยที่น้อยมากที่ทำการวิจัยด้วยการเสริมเอนไซม์จากภายนอกร่วมกันระหว่างโปรติเอสและไฟเตสเพื่อปรับปรุงประสิทธิภาพการย่อยอาหารสำหรับสัตว์น้ำ และยังไม่พบงานวิจัยที่ทดสอบปลาดุกลูกผสม (*C. macrocephalus* X *C. gariepinus*) เนื่องจากปลาดุกลูกผสมเป็นปลาที่กินเนื้อเป็นอาหารไม่มีความสามารถในการย่อยโปรตีนจากพืชและนำสารอาหารไปใช้ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ระบบทางเดินอาหารส่วนล่างของปลากินเนื้อจะมีกระเพาะแท้จริงซึ่งมีการผลิตโปรติเอส เช่น เปปซิน (pepsin) และเปปติเดส (peptidase) เพื่อย่อยโปรตีน (García-Meilan *et al*., 2013) ด้วยเหตุผลดังกล่าวข้างต้นจึงได้ทดลองนำโปรติเอสและไฟเตสมาใช้เป็นส่วนผสมของอาหารปลาดุกลูกผสมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนจากพืชที่มีปริมาณมากในอาหารสำเร็จรูป ปลาจะได้นำสารอาหารไปใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้อัตราแลกเนื้อลดลง น่าจะเป็นแนวทางในการลดต้นทุนทางด้านวัตถุดิบอาหารได้ หากผลเป็นที่น่าพอใจก็จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการส่งเสริมการเลี้ยงปลาดุกลูกผสมเชิงพาณิชย์ต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

1. สถานที่และระยะเวลาทดลอง

การวิจัยนี้ดำเนินการที่อาคารปฏิบัติการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ และห้องปฏิบัติการของภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ตำบลแสนสุข อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี

2. การเตรียมสัตว์ทดลอง

เตรียมพันธุ์ปลาดุกลูกผสม (*C. macrocephalus* X *C. gariepinus*) อายุ 2 เดือน ที่ขนาดเริ่มต้นที่ความยาว 9.22 ± 0.04 เซนติเมตร น้ำหนัก 5.45 ± 0.05 กรัม จำนวน 360 ตัว จากฟาร์มเอกชน อำเภอพนัสนิคม จังหวัดฉะเชิงเทรา

3. การเตรียมวัตถุดิบ

ในการทดลองได้ทำการซื้อวัตถุดิบจากบริษัทอาหารสัตว์เอกชน ที่มีปริมาณโปรตีนไม่ต่ำกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ ไขมันไม่ต่ำกว่า 4 เปอร์เซ็นต์ ความชื้นไม่มากกว่า 12 เปอร์เซ็นต์ กากไม่มากกว่า 8 เปอร์เซ็นต์ และเอนไซม์โปรติเอสและไฟเตสที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Aeromonas* sp.

4. การวางแผนการทดลอง

แผนการทดลองแบ่งออกเป็น 4 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ (replications) ทำการเสริมเอนไซม์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ โปรติเอส 500 ยูนิต/กิโลกรัม ร่วมกับไฟเตส 500 ยูนิต/กิโลกรัม (T1); โปรติเอส 1,000 ยูนิต/กิโลกรัม ร่วมกับ ไฟเตส 500 ยูนิต/กิโลกรัม (T2) และโปรติเอส 2,000 ยูนิต/กิโลกรัม ร่วมกับ ไฟเตส 500 ยูนิต/กิโลกรัม (T3) และชุดควบคุม (C) ที่ไม่เสริมเอนไซม์

5. การผลิตอาหารทดลอง

นำอาหารเม็ดสำเร็จรูปตามข้อ 3 มาทำการบดละเอียดด้วยเครื่องบดวัตถุดิบอาหารจนได้ขนาด 0.5 ไมโครเมตร ไปชั่งน้ำหนัก แล้วผสมเอนไซม์แต่ละชุดการทดลองตามข้อ 4 ด้วยการผสมเอนไซม์ในน้ำกลั่น 2 เปอร์เซ็นต์ ตามน้ำหนักอาหาร โดยการใช้กระบอกฉีดน้ำฉีดพ่นเป็นละอองผสมคลุกเคล้าอาหารให้ทั่ว ส่วนอาหารชุดควบคุมผสมด้วยน้ำกลั่น 2เปอร์เซ็นต์ตามน้ำหนักอาหาร แล้วทำการผสมโครมิกออกไซด์ (chromic oxide) 0.5 เปอร์เซ็นต์ ตามน้ำหนักอาหาร คลุกเคล้าโครมิกออกไซด์กับอาหารให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องผสมอาหาร เมื่อผสมให้เข้ากันดีแล้ว จึงนำไปอัดเม็ดด้วยเครื่องอัดอาหารเม็ดจมน้ำ (Mincer) นำไปผึ่งให้แห้งในที่ร่มนาน 48 ชั่วโมง แล้วจึงนำมาเคลือบด้วยน้ำมันตับปลา 0.5 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักอาหาร ผึ่งให้แห้งในที่ร่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาใส่ถุงและปิดสนิท นำเก็บที่อุณหภูมิ – 4 ^{O}C อาหารทุกสูตรนำไปวิเคราะห์หาคุณค่าอาหารด้วยวิธี Proximate Analysis (AOAC, 1984) ซึ่งคุณค่าทางอาหารแต่ละรายการโดยเปรียบเทียบแต่ละชุดการทดลองมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p>0.05) (Table 1)

Table 1 Chemical composition of experimental feeds.

Experimental feed	%Protein	%Lipid	%Fiber	%Ash	%Moisture
C	31.95 (0.12)	4.11 (0.02)	7.65 (0.06)	5.64 (0.12)	11.21 (0.12)
T1	32.05 (0.08)	4.14 (0.04)	7.58 (0.08)	5.49 (0.15)	11.24 (0.09)
T2	31.98 (0.15)	4.08 (0.06)	7.55 (0.05)	5.60 (0.10)	11.32 (0.14)
T3	32.01 (0.21)	4.12 (0.02)	7.62 (0.09)	5.67 (0.17)	11.28 (0.12)

Mean (SD)

C =Control; T1=Protease 500 U/kg and Phytase 500 U/kg; T2= Protease 1,000 U/kg and Phytase 500 U/kg; T3= Protease 2,000 U/kg and Phytase 500 U/kg

6. การตรวจสอบขนาดและการเลี้ยง

ก่อนดำเนินการทดลองได้ทำการสุ่มปลามาชั่งวัดความยาวและน้ำหนักเริ่มต้นโดยทำการสุ่มปลาดุกลูกผสม 120 ตัว จากปลาที่คัดขนาดมาทั้งสิ้น 360 ตัว แล้วจึงเริ่มทำการสุ่มปลาลงในบ่อคอนกรีตสี่เหลี่ยมจัตุรัสความจุ 1,000 ลิตร (กว้าง 100 เซนติเมตร x ยาว 100 เซนติเมตร x สูง 100 เซนติเมตร) ระดับน้ำสูง 50 เซนติเมตร โดยสุ่มนับลงบ่อละ 30 ตัว (ความหนาแน่น 30 ตัวต่อตารางเมตรหรือ 60 ตัวต่อลูกบาศก์เมตร) เลี้ยงนาน 70 วัน ทุกๆ 10 วัน ทำการสุ่มปลาจำนวน 10 ตัว (33 เปอร์เซ็นต์) ของแต่ละบ่อมาวัดความยาวและน้ำหนัก ตรวจสอบปลาตายทุกวัน จนสิ้นสุดการทดลอง

7. การให้อาหาร

หลังจากปลาปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมเวลา 3 วันในบ่อทดลอง จึงเริ่มต้นให้อาหารทดลอง โดยให้อาหาร 5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัวปลา วันละ 3 ครั้ง คือเวลา 8.00, 13.00, และ18.00 นาฬิกา ตามลำดับ อาหารที่เหลือจากการให้จะนำมาเก็บไว้แล้วนำไปอบแห้งเพื่อนำไปหักลบกับน้ำหนักอาหารที่ให้ทั้งหมดเพื่อหาค่าอัตราแลกเนื้อ (FCR)

8. การหาประสิทธิภาพการย่อยสารอาหาร

นำปลาดุกที่เลี้ยงครบ 70 วัน มาใส่ในกระชังสี่เหลี่ยมขนาด 70 เซนติเมตร x 90 เซนติเมตรx 60 เซนติเมตร ที่แขวนในบ่อคอนกรีตเดิมที่ใช้เลี้ยงปลา หลังจากให้อาหารปลาผ่านไปแล้ว 2 ชั่วโมง ปลาจะเริ่มขับถ่าย จึงเก็บขี้ปลาภายใน 1 ชั่วโมง หลังจากเริ่มเห็นมีการขับถ่าย โดยก่อนเก็บขี้ปลาด้วยการดูดด้วยสายยาง และแยกเอาเศษอาหารที่เหลือออกเมื่อมีการปนเปื้อน แล้วนำขี้ปลาที่เก็บได้ไปเก็บที่อุณหภูมิ -40 ^{O}C ดำเนินการทั้งสิ้น 15 วัน จึงได้ขี้ปลาเพียงพอ และนำไปอบให้แห้งด้วยเครื่องอบแห้งแบบระเหิด (Freeze dryer, Flexi-dry DF-3-550MP) ก่อนนำไปวิเคราะห์หาค่าโปรตีนและไขมัน เพื่อประเมินประสิทธิภาพการย่อยวัตถุแห้ง ประสิทธิภาพการย่อยโปรตีน และประสิทธิภาพการย่อยไขมันต่อไป วิธีการวิเคราะห์คุณค่าทางอาหารใช้วิธี Proximate Analysis (AOAC, 1984)

9. การจัดการคุณภาพน้ำ

ทำการดูดตะกอนและเก็บอาหารที่เหลือทุกวัน เปลี่ยนถ่ายน้ำ 20 เปอร์เซ็นต์ ทุกวัน และทุก ๆ 5 วัน ทำการวัดคุณภาพน้ำ ประกอบด้วย ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (dissolved oxygen) อุณหภูมิ ความเป็นกรดด่าง (pH) ไนไตรท์ (nitrite) และแอมโมเนีย (ammonia) ของน้ำในบ่อเลี้ยง

10. การวิเคราะห์ข้อมูลผลการทดลอง

หลังจากได้ผลการทดลองแล้วจึงนำข้อมูลที่ได้มาทำการวิเคราะห์ผลการทดลองดังต่อไปนี้

10.1 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น (%Weight gain)

$$= \frac{\text{น้ำหนักเฉลี่ยของปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง - น้ำหนักเฉลี่ยของปลาเมื่อเริ่มต้น}}{\text{น้ำหนักเฉลี่ยของปลาเริ่มต้น}} \times 100$$

10.2 เปอร์เซ็นต์ความยาวปลาที่เพิ่มขึ้น (%Length gain)

$$= \frac{\text{ความยาวเฉลี่ยของปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง - ความยาวเฉลี่ยของปลาเมื่อเริ่มต้นทดลอง}}{\text{ความยาวเฉลี่ยของปลาเริ่มต้น}} \times 100$$

10.3 การเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific Growth Rate,%/วัน)

$$= \frac{(\ln \text{น้ำหนักปลา (ความยาวปลา) เมื่อสิ้นสุดการทดลอง} - \ln \text{น้ำหนักปลา (ความยาวปลา) เมื่อเริ่มต้นทดลอง})}{\text{ระยะเวลาทดลอง (วัน)}} \times 100$$

10.4 น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นต่อวัน (Average daily weight gain, ADG กรัม/วัน)

$$= \frac{\text{น้ำหนักที่เฉลี่ยปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง} - \text{น้ำหนักที่เฉลี่ยปลาเมื่อเริ่มการทดลอง}}{\text{จำนวนวันที่เลี้ยง}}$$

10.5 ความแปรปรวนของขนาดปลาทั้งน้ำหนักและความยาว (Size Variation)

$$= \frac{\text{ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของน้ำหนัก (ความยาว) ปลา} \times 100}{\text{ค่าเฉลี่ยของน้ำหนัก (ความยาว) ปลา}}$$

10.6 อัตราแลกเนื้อ (Feed conversion ratio, FCR)

$$= \frac{\text{น้ำหนักอาหารแห้งที่ปลากินทั้งหมด}}{\text{น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้นเมื่อสิ้นสุดการทดลอง}}$$

10.7 อัตรารอด (Survival rate, SR %)

$$= \frac{\text{จำนวนปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง}}{\text{จำนวนปลาเมื่อเริ่มต้น}} \times 100$$

10.8 น้ำหนักอาหารที่ปลากิน (Feed consumption, FC กรัม/ตัว)

$$= \frac{\text{น้ำหนักอาหารทั้งหมดที่ปลากิน}}{\text{จำนวนปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง}}$$

10.9 ประสิทธิภาพของอาหาร (Feed efficiency, FE, %)

$$= \frac{\text{น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น}}{\text{น้ำหนักอาหารที่ปลากินทั้งหมด}} \times 100$$

10.10 ประสิทธิภาพการย่อยวัตถุแห้ง (Apparent dry matter digestibility, ADMD %)

$$= 100 - \left(100 \times \frac{\text{โครมิกออกไซด์ในอาหาร}}{\text{\% โครมิกออกไซด์ในมูลปลา}}\right)$$

10.11 ประสิทธิภาพการย่อยโปรตีน (Apparent protein digestibility, APD %)

$$= 100 - \left(100 \times \frac{\text{\% โครมิกออกไซด์ในอาหาร x \%โปรตีนในมูลปลา}}{\text{\% โครมิกออกไซด์ในมูลปลา x \%โปรตีนในอาหาร}}\right)$$

10.12 ประสิทธิภาพการย่อยไขมัน (Apparent lipid digestibility, ALD %)

$$= 100 - \left(100 \times \frac{\%\text{โครมิกออกไซด์ในอาหาร} \times \%\text{ไขมันในมูลปลา}}{\%\text{โครมิกออกไซด์ในมูลปลา} \times \%\text{ไขมันในอาหาร}}\right)$$

10.13 นำข้อมูลที่ได้จากวิเคราะห์ผลตามข้อ 10.1-10.12 มาทำการวิเคราะห์หาความแตกต่างทางสถิติด้วย Analysis of Variance (ANOVA) แล้วทำการทดสอบความแตกต่างระหว่างกลุ่มด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ผลการวิจัย

1. อัตรารอด

ปลาดุกลูกผสมที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองทั้ง 4 สูตรเป็นเวลา 70 วัน พบว่าปลาดุกลูกผสมทุกกลุ่มมีอัตราการรอดตาย 100 เปอร์เซ็นต์ มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p>0.05) (Table 2)

2. การเจริญเติบโตและความแปรปรวนของขนาด

ปลาดุกลูกผสมที่เลี้ยงด้วยอาหารทุกสูตรมีน้ำหนักสุดท้ายเฉลี่ย 104-122 กรัม และความยาว 23.0-24.5 เซนติเมตร โดยพบว่าเปอร์เซ็นต์น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น เปอร์เซ็นต์ความยาวปลาที่เพิ่มขึ้น ความแปรปรวนของขนาดปลาทั้งน้ำหนักและความยาว มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p>0.05) น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นต่อวันของปลาชุดที่ได้รับอาหารผสมเอนไซม์โปรติเอส 500 ยูนิต/กิโลกรัม ร่วมกับไฟเตส 500 ยูนิต/กิโลกรัม มีค่าสูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p>0.05) กับปลาชุดที่ได้รับอาหารผสมเอนไซม์โปรติเอส 1,000 ยูนิต/กิโลกรัม ร่วมกับไฟเตส 500 ยูนิต/กิโลกรัม และอาหารผสมเอนไซม์โปรติเอส 1,500 ยูนิต/กิโลกรัม ร่วมกับไฟเตส 500 ยูนิต/กิโลกรัม (Table 2)

3. อัตราแลกเนื้อ (FCR) น้ำหนักอาหารที่ปลากิน (FC) และประสิทธิภาพของอาหาร (FE)

อัตราแลกเนื้อของปลาดุกลูกผสมที่เลี้ยงด้วยอาหารทุกสูตรไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p>0.05) น้ำหนักอาหารที่ปลากินของปลาชุดที่ได้รับอาหารผสมเอนไซม์โปรติเอส 500 ยูนิต/กิโลกรัม ร่วมกับไฟเตส 500 ยูนิต/กิโลกรัม มีค่าสูงกว่าปลาชุดที่ได้รับอาหารชุดควบคุมและชุดอาหารผสมเอนไซม์โปรติเอส 1,000 ยูนิต/กิโลกรัม ร่วมกับไฟเตส 500 ยูนิต/กิโลกรัม อย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) และประสิทธิภาพของอาหารของปลาชุดที่ได้รับอาหารผสมเอนไซม์โปรติเอส 500 ยูนิต/กิโลกรัม ร่วมกับไฟเตส 500 ยูนิต/กิโลกรัม สูงกว่าปลาชุดที่ได้รับอาหารชุดควบคุม แต่ไม่แตกต่างกับชุดที่ได้รับอาหารผสมเอนไซม์โปรติเอส 1,000 ยูนิต/กิโลกรัม ร่วมกับไฟเตส 500 ยูนิต/กิโลกรัม และปลาชุดที่ได้รับอาหารผสมเอนไซม์โปรติเอส 2,000 ยูนิต/กิโลกรัม ร่วมกับไฟเตส 500 ยูนิต/กิโลกรัม อย่างมีนัยสำคัญ (p>0.05) (Table 2)

Table 2 Growth performance, feed utilization and survival rate of hybrid catfish (*C. macrocephalus* X *C. gariepinus*).

Experimental feed	% WG	% LG	SGRW (%/day)	SGRL (%/day)	ADG (g/day)	FCR	FC (g/fish)	% FE	% CVW	% CVL	% SR
C	1877 (213)	140 (22)	4.26 (0.15)	1.30 (0.03)	1.42 (0.11)^{b}	1.004 (0.02)	76.4 (2.0)^{c}	90.7 (1.0)^{b}	12.14 (2.22)	3.77 (0.29)	100 (0)
T1	2109 (187)	167 (31)	4.42 (0.12)	1.36 (0.05)	1.67 (0.07)^{a}	0.995 (0.04)	91.6 (6.4)^{a}	98.1 (1.2)^{a}	9.72 (1.24)	3.48 (0.48)	100 (0)
T2	1943 (167)	154 (26)	4.31 (0.12)	1.33 (0.05)	1.52 (0.03)^{ab}	0.999 (0.10)	86.1 (5.9^{ab}	95.9 (1.3)^{ab}	11.67 (1.03)	3.64 (0.34)	100 (0)
T3	1990 (187)	153 (28)	4.34 (0.13)	1.35 (0.04)	1.54 (0.09)^{ab}	1.002 (0.04)	84.9 (3.4)^{ab}	94.6 (1.1)^{ab}	10.41 (1.26)	3.69 (0.26)	100 (0)

Mean (SD)

The different letter of superscript within the same column indicates significant different (p<0.05)

C =Control; T1=Protease 500 U/kg and Phytase 500 U/kg; T2= Protease 1,000 U/kg and Phytase 500 U/kg;

T3= Protease 2,000 U/kg and Phytase 500 U/kg

4. ประสิทธิภาพในการย่อยสารอาหาร

ประสิทธิภาพในการย่อยวัตถุแห้ง และประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนของปลาดุกลูกผสมชุดได้รับอาหารผสมเอนไซม์โปรติเอส 500 ยูนิต/กิโลกรัม ร่วมกับไฟเตส 500 ยูนิต/กิโลกรัม มีค่าสูงกว่าปลาชุดได้รับอาหารชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ(p>0.05) กับปลาที่ได้รับอาหารอาหารผสมเอนไซม์โปรติเอส 1,000 ยูนิต/กิโลกรัม ร่วมกับไฟเตส 500 ยูนิต/กิโลกรัม และปลาชุดที่ได้รับอาหารผสมเอนไซม์โปรติเอส 2,000 ยูนิต/กิโลกรัม ร่วมกับไฟเตส 500 ยูนิต/กิโลกรัม ขณะที่ประสิทธิภาพการย่อยไขมันของปลาดุกลูกผสมชุดได้รับอาหารผสมเอนไซม์ทั้ง 3 ชุดการทดลอง มีค่าสูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) (Table 3)

5. คุณภาพน้ำ

จากการตรวจวัดคุณภาพน้ำตลอดการเลี้ยง 70 วัน พบว่าอุณหภูมิมีค่า 24.83–28.33 ^{O}C ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำมีค่า 5.5-6.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเป็นกรดด่าง 7.60-7.85 แอมโมเนีย 0.8-1.2 มิลลิกรัมต่อลิตร และไนไตรท์ 0.3-0.8 มิลลิกรัมต่อลิตร

Table 3 Apparent dry matter digestibility (ADMD), apparent protein digestibility (APD) and apparent lipid digestibility (ALD) of experimental hybrid catfish (*C. macrocephalus* X *C. gariepinus*).

Experimental feed	% ADMD	%APD	%ALD
C	80.11±2.43 [b]	87.95±1.21 [b]	83.24±1.16 [b]
T1	89.16±1.10 [a]	96.74±1.09 [a]	95.70±0.72 [a]
T2	84.89±1.67 [ab]	92.42±1.03 [ab]	94.47±0.86 [a]
T3	85.31±1.08 [ab]	93.19±1.20 [ab]	94.74±1.18 [a]

Mean (SD)

The different letter of superscript within the same column indicates significant different (p<0.05)

C =Control; T1=Protease 500 U/kg and Phytase 500 U/kg; T2= Protease 1,000 U/kg and Phytase 500 U/kg; T3= Protease 2,000 U/kg and Phytase 500 U/kg

วิจารณ์ผลการวิจัย

จากผลการทดลองอธิบายได้ว่าการเลี้ยงปลาดุกลูกผสมด้วยอาหารทดลองที่มีการผสมเอนไซม์ทุกสูตรให้ผลดีกว่าชุดควบคุมที่ไม่ผสมเอนไซม์ โดยปลาดุกลูกผสมที่ได้รับอาหารผสมเอนไซม์โปรติเอส 500 ยูนิต/กิโลกรัม ร่วมกับไฟเตส 500 ยูนิต/กิโลกรัม มีค่าน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นต่อวัน น้ำหนักอาหารที่ปลากิน ประสิทธิภาพของอาหาร ประสิทธิภาพในการย่อยวัตถุแห้ง และประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนสูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) อีกทั้งประสิทธิภาพการย่อยไขมันของปลาทุกชุดทดลองที่ได้รับอาหารผสมเอนไซม์มีค่าสูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) ชี้ให้เห็นว่าปลาดุกลูกผสมเมื่อได้รับอาหารผสมโปรติเอส 500 ยูนิต/กิโลกรัม ร่วมกับไฟเตส 500 ยูนิต/กิโลกรัม มีอัตราการเจริญเติบโตสูงกว่า ทั้งนี้มีผลมาจากการใช้โปรติเอสร่วมกับไฟเตสผสมลงไปในอาหารมีผลต่อประสิทธิภาพการใช้อาหารดีขึ้น การกินอาหารดีขึ้น ชี้ให้เห็นว่าการเสริมเอนไซม์ยังมีส่วนช่วยกระตุ้นให้ปลาอยากกินอาหารมากขึ้นและมีประสิทธิภาพการใช้อาหารดีกว่าสูตรควบคุม อีกทั้งเสริมสร้างประสิทธิภาพการย่อยดีกว่า จากผลการวิจัยที่พบว่ากุ้งมีประสิทธิภาพการย่อยวัตถุแห้ง โปรตีน และไขมัน มีค่าสูงกว่าชุดควบคุม ทั้งนี้อาจเนื่องจากไฟเตสช่วยในการย่อยกรดไฟติกที่มีอยู่ในอาหารสำเร็จรูป ไฟเตสสามารถไปย่อยสลายไฟเตทเพื่อให้เป็น myoinositol penta-, tetra-, tri-, di-, และ mono-phosphates และทำให้เป็นกลางต่อปัญหาจากการที่ไฟเตทจับโปรตีนและสารอาหารอื่น (Mitchell *et al*., 1997) ซึ่งการเสริมไฟเตสจากจุลินทรีย์ (microbial phytase) สามารถช่วยเพิ่มการนำฟอสฟอรัสไปใช้ประโยชน์ได้ดีขึ้น (Gatlin *et al*., 2007) จึงมีส่วนทำให้โปรติเอสในร่างกายและที่เสริมเข้าไปสามารถย่อยโปรตีนในอาหารสำเร็จรูปได้ดีขึ้น อีกทั้งทำให้ปลาดุกลูกผสมสามารถหลั่งเอนไซม์ช่วยย่อยไขมันที่มีอยู่ในระบบทางเดินอาหารได้มากและมีประสิทธิภาพการย่อยดีขึ้น ปลาดุกลูกผสมในชุดที่มีการเสริมเอนไซม์จึงมีความได้เปรียบเรื่องการนำสารอาหาร โดยเฉพาะอย่างยิ่งโปรตีนไปใช้ประโยชน์ได้ดีกว่า เพราะไฟเตทที่มีอยู่ในอาหารถูกย่อยโดยไฟเตสซึ่งจะส่งผลให้เอนไซม์ช่วยย่อยไขมัน โปรตีน และคาร์โบไฮเดรต มี

ประสิทธิภาพสูงขึ้น (Storebakken *et al.,* 1998) เห็นได้จากผลการวิจัยนี้ที่เสริมเอนไซม์ในอาหารสูตรทดลองมีประสิทธิภาพการย่อยไขมันสูงกว่าสูตรควบคุม (p<0.05) สอดคล้องกับผลการวิจัยของ Forster *et al.* (1999) ซึ่งใช้เอนไซม์ไฟเตส 1,500 ยูนิต/กิโลกรัม เพียงอย่างเดียวผสมอาหารใช้เลี้ยงปลาเรนโบว์ เทราท์ (*Oncorhynchus mykiss*) ปรากฏว่า ประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนและการเจริญเติบโตดีกว่าปลาที่ได้รับอาหารสูตรควบคุม ในทำนองเดียวกันกับการใช้ไลซีน (lysine) 500 ยูนิต/กิโลกรัม ร่วมกับไฟเตส 1,200 ยูนิต/กิโลกรัม ผสมในอาหารเลี้ยงปลาเรนโบว์ เทราท์ (*O. mykiss*) ซึ่งใช้โปรตีนจากกากถั่วเหลืองทดแทนปลาป่น พบน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นสูงกว่าปลาชุดควบคุม และยังแสดงให้เห็นว่าปลาที่ได้รับอาหารเสริมไฟเตสสามารถใช้โปรตีนจากถั่วเหลืองแทนปลาป่นได้ดีโดยไม่มีผลเสียต่อการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการกินอาหารเมื่อเลี้ยงในสภาพอากาศที่เหมาะสม (Vielma *et al.,* 2000)

นอกจากนี้มีงานวิจัยในอดีตที่มีการเสริมอาหารด้วยโปรติเอส 500 ยูนิต/กิโลกรัม และ ไฟเตส 500 ยูนิต/กิโลกรัม คล้ายคลึงกับการวิจัยนี้ เพื่อทดสอบการอนุบาลลูกปลากะพง (*Dicentrarchus labrax*) พบว่าปลาชุดที่ได้รับอาหารที่เสริมเอนไซม์ดังกล่าวมีการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการย่อยอาหาร และการดูดซึมอาหาร สูงกว่าลูกปลากะพงที่ได้รับอาหารสูตรควบคุม (Kolkovski *et al.,* 1997; Oliva-Teles *et al*., 1998) อีกทั้งมีรายงานยืนยันประโยชน์ของการเสริมไฟเตสในอาหารต่อการเลี้ยงปลาอีกหลายชนิด ดังเช่น การเสริมไฟเตส 1,000 ยูนิต/กิโลกรัม สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยอาหาร ประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนและฟอสฟอรัส การเจริญเติบโต ปริมาณเถ้า โปรตีน แคลเซียม และฟอสฟอรัสในร่างกาย การเพิ่มแคลเซียมและฟอสฟอรัสในกระดูก และลดอัตราแลกเนื้อในปลา Yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) นอกจากนี้การเสริมไฟเตส 1,000 ยูนิต/กิโลกรัม ร่วมกับกรดอินทรีย์ 4 กรัม/กิโลกรัม ทำให้ปลาเพิ่มค่า reactive oxygen species (ROS) กิจกรรมซุปเปอร์ออกไซด์ ไดมิวเตส (superoxide dismutase, SOD) และ คาตาเลส (catalase,CAT) ในซีรัม (serum) ซึ่งชี้ให้เห็นว่าเป็นการเพิ่ม oxidative stress (Zhu *et al*., 2014) อีกทั้งการเสริมไฟเตสในอาหารที่มีการลดปลาป่นในสูตรอาหารก็ยังคงมีประสิทธิภาพดีดังปรากฏในการทดสอบในปลา Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius* Kessler, 1877) เลี้ยงด้วยอาหารสูตรที่มีกากถั่วเหลืองทดแทนปลาป่นที่ 20 เปอร์เซ็นต์ (1) กากถั่วเหลืองทดแทนปลาป่น 20 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับไฟเตส 0.02 เปอร์เซ็นต์ (2) กากถั่วเหลืองทดแทนปลาป่น 40 เปอร์เซ็นต์ (3) กากถั่วเหลืองทดแทนปลาป่น 40 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับไฟเตส 0.02 เปอร์เซ็นต์ (4) อาหารชุดควบคุม (5) และชุดควบคุมร่วมกับไฟเตส 0.02 เปอร์เซ็นต์ (6) พบว่าปลาที่ได้อาหารสูตร 1, 2, 3 และ 4 มีประสิทธิภาพการย่อยอาหารของปลาเพิ่มสูงขึ้น (p<0.05) เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารสูตร 5 และ 6 และพบโปรตีนในกล้ามเนื้อสูงสุดในปลากลุ่มที่ได้รับอาหารสูตร 6 สูงกว่ากลุ่มที่ได้รับอาหารสูตร 3 (Mohseni *et al*., 2023) หรือการใช้โปรติเอสเพียงอย่างเดียวเสริมในอาหารยังมีผลดีต่อประสิทธิภาพการเลี้ยงปลานิล (*Oreochromis niloticus*) เนื่องจากปลานิลที่ได้รับอาหารโปรตีน 29 เปอร์เซ็นต์ เสริมโปรติเอส 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม มีอัตราการเจริญเติบโต การกินอาหาร อัตราแลกเนื้อ ไม่แตกต่างกับปลาที่กินอาหารควบคุมที่มีโปรตีน 30 เปอร์เซ็นต์ แต่ปลามีประสิทธิภาพค่าข้างต้นลดลงอย่างชัดเจนถ้าปลาได้รับอาหารโปรตีน 29 เปอร์เซ็นต์ ที่ไม่เสริมโปรติเอส อีกทั้งปลานิลที่ได้รับอาหารโปรตีน 30 เปอร์เซ็นต์ และเสริมโปรติเอส 250 มิลลิกรัม/กิโลกรัม มีผลทำให้ค่าไนไตรท์และแอมโมเนียในน้ำที่ใช้เลี้ยงปลาลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) เนื่องจากอาหารทั้งหมดที่มีการเพิ่มโปรติเอส มีผลทำให้วิลไล (villi) ในลำไส้มีขนาดใหญ่ขึ้น จึงมีส่วนช่วยในเรื่องการดูดซึมสารอาหารไปใช้ประโยชน์ต่อร่างกายได้ดีขึ้นทั้งนี้ยังสรุปด้วยว่า การใช้โปรติเอสผสมในอาหารสามารถลดต้นทุนค่าอาหารลงได้เมื่อ

พิจารณาจากน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของปลานิล (Saleh *et al*., 2022) และยังมีข้อมูลงานวิจัยที่ผ่านมาที่ได้ทดสอบการเสริมไฟเตสร่วมกับเอนไซม์ชนิดอื่นในอาหารเพื่อเลี้ยงสัตว์น้ำซึ่งทั้งหมดได้ผลเชิงบวก ดังเช่นการใช้เอนไซม์ร่วมกันระหว่างไฟเตสและไซลาเนส (xylanase) มีผลดีต่อประสิทธิภาพการเจริญเติบโตในปลานิล (*O. niloticus*) (Maas *et al*., 2018) การเสริม ไฟเตสและไซลาเนส 660 FTU/กิโลกรัม และไซลาเนส 6,596 ยูนิต/กิโลกรัม ในอาหารที่มีระดับโปรตีนต่างกันเลี้ยงปลานิล (*O. niloticus*) พบว่าการใช้ไฟเตสอย่างเดียวช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการย่อยอาหารทั้งคาร์โบไฮเดตและโพลีแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้ง (non-starch polysaccharides, NSP) เมื่อใช้อาหารที่มีโปรตีน 30, 32 และ 36 เปอร์เซ็นต์ และลดค่าอัตราแลกเนื้อ ขณะที่ไซลาเนสก็สามารถช่วยได้เหมือนกันเมื่อใช้อาหารที่มีโปรตีนต่ำ (30 และ 32 เปอร์เซ็นต์) (Maas *et al*., 2020) ในปลาชนิดเดียวกัน ได้มีการทดลองเสริมไฟเตสไซลาเนสและเบต้า-กลูคาเนส (β-glucanase) ทั้งการให้เพียงชนิดใดชนิดหนึ่งหรือใช้ร่วมกันในอาหารเพื่อเลี้ยงปลานิล (*O. niloticus*) พบว่าช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยวัตถุแห้ง ประสิทธิภาพการย่อยเถ้า ฟอสฟอรัส และแคลเซียมได้ดี ลดค่าอัตราแลกเนื้อ การเจริญเติบโตดีขึ้น ทั้งๆที่ใช้โพลีแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้งในอาหารถึง 140 กรัม/กิโลกรัม (Maas *et al*., 2021) ชี้ให้เห็นว่าไฟเตสจากจุลินทรีย์ คือ phytate-degrading phosphohydrolase สามารถช่วยทำให้สัตว์ใช้ประโยชน์อาหารที่ใช้พืชเป็นวัตถุดิบอาหารสัตว์ (Nadeem *et al*., 2023) ได้ดี ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยนี้ที่ใช้เอนไซม์ที่ผลิตจากแบคทีเรีย

แต่ก็มีงานวิจัยที่พบว่าการเสริมเอนไซม์ไม่ได้ประโยชน์ในปลาปลาเรนโบว์ เทราท์ (*O. mykiss*) เมื่อมีการเสริมโปรติเอส (75,000 PROT ต่อกรัม) ที่ 1 และ 2 กรัม/กิโลกรัม ไฟเตส (10,000 FYT/กรัม) ที่ 1และ 2 กรัม/กิโลกรัม และการเสริมโปรติเอส 0.5 กรัม/กิโลกรัม ร่วมกับไฟเตส 0.5 กรัม/กิโลกรัม และการเสริมโปรติเอส 1 กรัม/กิโลกรัม ร่วมกับไฟเตส 1 กรัม/กิโลกรัม ในอาหารที่มีปลาป่น 31 เปอร์เซ็นต์ และอาหารที่มีกากถั่วเหลืองที่กำจัดเฮกเซน (dehulled hexane extracted soybean meal) 44 เปอร์เซ็นต์ ทดสอบเลี้ยงปลาเรนโบว์ เทราท์ (*O. mykiss*) ที่พบว่าไม่มีผลต่อการเจริญเติบโต อัตราแลกเนื้อ ประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนและไขมัน (Yigit *et al*., 2018)

การเสริมเอนไซม์ไม่มีผลต่ออัตรารอดของปลาดุกลูกผสม (อัตรารอด 100 เปอร์เซ็นต์ ในทุกสูตรอาหาร) และความแปรปรวนของขนาด ชี้ได้ว่าการเสริมเอนไซม์ทุกระดับที่ได้ทำการทดลองนี้ไม่มีผลเชิงลบต่อการรอดตายและความแตกต่างของขนาดปลาดุกลูกผสม แต่จากปัจจัยที่ชี้วัดต่างๆในผลการวิจัยนี้ยังไม่เห็นความจำเป็นที่ต้องใช้เอนไซม์โปรติเอสในสูตรอาหารมากกว่า 500 ยูนิต/กิโลกรัม อย่างไรก็ตามผลงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าการนำโปรติเอส 500 ยูนิต/กิโลกรัม ร่วมกับ ไฟเตส 500 ยูนิต/กิโลกรัม ผสมในอาหารเพื่ออนุบาลลูกปลากะพง (*D. labrax*) มีอัตรารอดตายของลูกปลากะพงสูงกว่าปลาที่กินอาหารสูตรควบคุม (Kolkovski *et al*., 1997) แต่สิ่งต้องพึงระวังคือการเสริมเอนไซม์ในอาหารนั้นโดยเฉพาะอย่างยิ่งไฟเตสมีการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วต่อพีเอชและอุณหภูมิ (Cao *et al*., 2007) ในการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารต้องพิจารณาต่อไป

อุณหภูมิของน้ำตลอดการทดลองไม่เปลี่ยนแปลงมากนักและมีค่าใกล้เคียงกัน ซึ่งอุณหภูมิของน้ำที่เปลี่ยนแปลงเล็กน้อยไม่มีผลเสียต่อการเจริญเติบโตและการใช้ประโยชน์จากอาหารของปลา อุณหภูมิที่เหมาะสมของปลาเขตร้อนอยู่ระหว่าง 25–32 ^{O}C ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ แอมโมเนีย และไนไตรท์ในน้ำด้วยอาหารทดลองทั้ง 4 สูตร มีค่าใกล้เคียงกัน และมีระดับที่ไม่มีผลกระทบต่อการดำรงชีวิตของปลาดุกลูกผสม (Tavarutmaneegul *et al*., 1992; Vuthiphandchai,1993)

สรุปผลการวิจัย

ปลาดุกลูกผสมที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีการเสริมโปรติเอส 500 ยูนิต/กิโลกรัม ร่วมกับไฟเตส 500 ยูนิต/กิโลกรัม เป็นระดับที่เหมาะสมที่สุด เมื่อพิจารณาจากค่าน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นต่อวัน น้ำหนักอาหารที่ปลากิน ประสิทธิภาพของอาหาร ประสิทธิภาพในการย่อยวัตถุแห้ง ประสิทธิภาพการย่อยโปรตีน และประสิทธิภาพการย่อยไขมัน

เอกสารอ้างอิง

AOAC. (1984). *Official methods of analysis*. Association of Official Analytical Chemists, 14th ed. Association of Official Analytical Chemists Inc. Arlingtion,1411 pp.

Adeoye A.A., Jaramillo-Torres A., Fox S.W., Merrifield D.L., & Davies S.J. (2016). Supplementation of formulated diets for tilapia (*Oreochromis niloticus*) with selected exogenous enzymes: overall performance and effects on intestinal histology and microbiota. *Animal Feed Science Technology*, *215*, 133–143.

Amirkolaie, A.K. (2011). Reduction in the environmental impact of waste discharged by fish farms through feed and feeding. *Review Aquaculture*, *3*, 19–26.

Bao, Y.M., Romero, L.F., & Cowieson, A.J. (2013). Functional patterns of exogenous enzymes in different fed ingredients. *World Poultry Science Annexation*, *69*, 759-774.

Boonyaratpalin, M. (1988). *Catfish feed*. National Inland Fisheries Institute, Department of Fisheries, Ministry of Agriculture and Cooperatives. 17 pp. (in Thai)

Caine W.R., Verstegen M.W.A., Sauer W.C., Tamminga S.,& Schulze H. (1998). Effect of protease treatment of soybean meal on content of total soluble matter and crude protein and level of soybean trypsin inhibitors. *Animal Feed Science Technology*, *71*, 177–183.

Cao, L., Wang, W., Yang, C, Yang, Y.,Diana, J.Yakupitiyage, A., Luo, Z., & Li, D. (2007). Application of microbial phytase in fish feed. *Enzyme and Microbial Technology*, *40(4)*, 497-507.

Castillo, S. & Gatlin III, D.M. (2015). Dietary supplementation of exogenous carbohydrase enzymes in fish nutrition: a review. *Aquaculture*, *435*, 286–292.

Cheng Z.J., & Hardy R.W. (2003). Effects of extrusion and expelling processing, and microbial phytase supplementation on apparent digestibility coefficients of nutrients in full-fat soybeans for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, *218*, 501–514.

Cheng, Z.J., Hardy, R.W., Verlhac, V., & Gabaudan, J. (2004). Effects of microbial phytase supplementation and dosage on apparent digestibility coefficients of nutrients and dry matter in soybean product-based diets for rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of World Aquaculture Society*, *35*, 1–15.

Dalsgaard J., Verlhac V., Hjermitslev N.H., Ekmann K.S., Fischer M., Klausen M., & Pedersen P.B. (2012). Effects of exogenous enzymes on apparent nutrient digestibility in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets with high inclusion of plant-based protein. *Animal Feed Science Technology*, *171*, 181–191.

Drew M.D., Racz V.J., Gauthier R., & Thiessen D.L. (2005). Effect of adding protease to coextruded flax:pea or canola:pea products on nutrient digestibility and growth performance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Animal Feed Science Technology*, *119*, 117–128.

Eyiwunmi A., Kolawole E., & Kazeem O. (2017). Effect of phytase supple- mentation on the growth, mineral composition and phosphorus digestibility of African catfish (*Clarias gariepinus*) Juveniles. *Animal Research 14*, 2741–2750

Forster, I. Higg, D.A. Dosanjh, B.S. Rowshandeli, M., & Parr, J. (1999). Potential for dietary phytase to improve the nutritive value of canola protein concentrate and decrease phosphorus output in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) held in 11 °C fresh water. *Aquaculture*, *179*, 109–125.

García-Meila □n, I., Valentín, J.M., Fontanillas, R., & Gallardo, M.A. (2013). Different protein to energy ratio diets for gilthead sea bream (*Sparus aurata*): Effects on digestive and absorptive processes. *Aquaculture*, *412–413*, 1–7.

Gatlin, D.M., Barrows, F.T., Brown, P., Dabrowski, K., Gaylord, G., Hardy, R.W., Herman, E., Hu, G., Krogdahl, A., Nelson, R., Overturf, K., Rust, M., Sealey, W., Skonberg, D., Souza, E.J., Stone, D., Wilson, R., & Wurtele, E. (2007). Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review. *Aquaculture Research*, *38(6)*, 551-579

Humer E., Schwarz C., & Schedle K. (2015) Phytate in pig and poultry nutrition. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, *99*, 605–625.

Hassaan M.S., El-Sayed A.I.M., Soltan M.A., Iraqi M.M., Goda A.M., Davies S.J., El-Haroun E.R., & Ramadan H.A. (2019). Partial dietary fish meal replacement with cotton seed meal and supplementation with exogenous protease alters growth, feed performance, hematological indices and associated gene expression markers (GH, IGF-I) for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, *503*, 282–292.

Kies,A.K., Van Hemert, K.H.F., & Sauer, W.C. (2001). Effect of phytase on protein and amino acid digestibility and energy utilisation. *World's Poultry Science Journal*, *57(2)*, 109-126.

Kolkovski, S. Tandler, A., & Izquierdo, M.S. (1997). Effects of live food and dietary digestive enzymes on the efficiency of microdiets for seabass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Aquaculture*, *148*, 313–322.

Kumar, V., Sinha, A., Makkar, H., De Boeck, G., & Becker, K. (2012). Phytate and phytase in fish nutrition. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 96, 335–364.

Lemos D., & Tacon A.G.J. (2017). Use of phytases in fish and shrimp feeds: a review. *Review Aquaculture*, *9*, 266–282.

Li X.Q., Chai X.Q., Liu D.Y., Chowdhury M.A.K., & Leng X.J. (2016). Effects of temperature and feed processing on protease activity and dietary protease on growths of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and tilapia, *Oreochromis niloticus × O. aureus*. *Aquaculture Nutrition*, *22*, 1283–1292.

Li X.Q., Zhang X.Q., Chowdhury M.A.K., Zhang Y., & Leng X.J. (2019). Dietary phytase and protease improved growth and nutrient utilization in tilapia (*Oreochromis niloticus × Oreochromis aureus*) fed low phosphorus and fishmeal-free diets. *Aquaculture Nutrition*, *25*, 46–55.

Liebert, F., & Portz, L. (2005). Nutrient utilization of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* fed plant based low phosphorus diets supplemented with graded levels of different sources of microbial phytase. *Aquaculture*, *248*, 111–119.

Liu B.L., Rafing A., & Tzeng Y.M. (1998). The induction and characterization of phytase and beyond. *Enzyme Microbial Technology*, *22*: 415–24.

Luo, G., Xu, J., teng, Y., Ding, C., & Yan, B. (2010). Effects of dietary lipid levels on the growth, digestive enzyme, feed utilization and fatty acid composition of Japanese sea bass (*Lateolabrax japonicus* L.) reared in freshwater *Aquaculture Research*, *41(2)*, 210-219.

Maas, R.M., Verdegem, M.C.J., Dersjant-Li, Y., & Schrama, J.W. (2018). The effect of phytase, xylanase and their combination on growth performance and nutrient utilization in Nile tilapia. *Aquaculture*, *487*, 7–14.

Maas, R.M., Verdegem, M.C.J. , Lee, C-N, & Schrama, J.W. (2021). Effects and interactions between phytase, xylanase and β-glucanase on growth performance and nutrient digestibility in Nile tilapia *Animal Feed Science and Technology*, *271*, 114767.

Maas, R.M., Verdegem, M.C., Wiegertjes, G.F., & Schrama, J.W. (2020). Carbohydrate utilisation by tilapia: a meta-analytical approach. *Review Aquaculture*, 1–16.

Mitchell, D.B., Vogel, K., Weimann, B.J., Pasamontes, L., & Van Loon, A.P.G.M. (1997). The phytase subfamily of histidine acid phosphatases: isolation of genes for two novel phytases from the fungi *Aspergillus terreus* and *Myceliophthora thermophila*. *Microbiology*, *143*, 245–252.

Mohseni, M. Aftabgard, M., & Lashgari, S.N. (2023). Effects of *Escherichia coli*-derived phytase on growth performance, serological parameters, apparent nutrient digestibility, liver antioxidant, and gut proteolytic enzymes of Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius* Kessler, 1877) *Aquaculture Reports*, *28*, 101448

Nadeem,H., Shah, S.Z.H, Fatima, M., & Bilal, M. (2023). Prospects of microbial phytases in the food and feed industry *In: A. Kumar, L.F.R., Ferreira, B. Muhammad, & M. Kumari* (Eds.) *Microbial Biomolecules Emerging Approach in Agriculture, Pharmaceuticals and Environment Management Developments in Applied Microbiology and Biotechnology*. (pp. 325-351). Academic press, Elsevier Inc.

Nolan, K.B., Duffin, P.A., & McWeeny, D.J. (1987). Effects of phytate on mineral bioavailability. In vitro studies on Mg^{2+}, Ca^{2+}, Fe^{3+}, Cu^{2+} and Zn^{2+} (also Cd^{2+}) solubilities in the presence of phytate. *The Journal of the Science of Food and Agriculture*, *40*, 79–85.

Oliva-Teles, A., Pereira, J.P., Gouveia, A., & Gomes, E. (1998). Utilisation of diets supplemented with microbial phytase by seabass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquatic Living Resources*, *11*, 255–259.

Portz, L., & Liebert, F. (2004). Growth, nutrient utilization and parameters of mineral metabolism in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) fed plant-based diets with graded levels of microbial phytase. *Journal Animal Physiology and Animal Nutrition*, *88*, 311–320.

Qiu, X., & Davis, D.A. (2016). Effects of dietary phytase supplementation on growth performance and apparent digestibility coefficients of Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei. Aquaculture Nutrition*, 1-10.

Rahmati-Holasoo, H., Hadadi, A., Ebrahimzadeh Mousavi, H., Taheri Mirghaed, A., & Sadeghinezhad, J. (2020). Effect of monoammonium phosphate on some blood factors, bone analysis and growth rate of ornamental Koi Fish (*Cyprinus carpio* Koi.). *Journal of Veterinary Research*, *75*, 442–451.

Rachmawati, D., & Samidjan, I. (2016) Effect of phytase enzyme on growth boost in the artificial feed made of plant protein to shorten production time of giant tiger prawn (*Penaeus monodon*, Fabricus 1798) *Aquatic Procedia*, *7*, 46-53.

Ramseyer L., Garling, D., Hill, G., & Link. J. (1999). Effect of dietary zinc supplementation and phytase pre-treatment of soybean meal or corn gluten meal on growth, zinc status and zinc-related metabolism in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss. Fish Physiology and Biochemistry*, *20*, 251–261.

Riche, M., & Garling Jr., D. (2004). Effect of phytic acid on growth and nitrogen retention in tilapia *Oreochromis niloticus* L. *Aquaculture Nutrition*, *10*, 389–400.

Saleh, E.S.E., Tawfeek, S.S., Abdel-Fadeel, A.A.A., Abdel-Daim, A.S.A., Abdel-Razik, A-R.H., & Youssef I.M.I. (2022). Effect of dietary protease supplementation on growth performance, water quality, blood parameters and intestinal morphology of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) *Journal Animal Physiology and Animal Nutrition*, *106(2)*, 419-428.

Shi Z., Li, X.Q., Chowdhury, M.A.K., Chen, J.N., & Leng, X.J. (2016). Effects of protease supplementation in low fish meal pelleted and extruded diets on growth, nutrient retention and digestibility of gibel carp, *Carassius auratus gibelio*. *Aquaculture*, *460*, 37–44.

Sinha, A.K., Kumar, V., Makkar, H.P., De Boeck, G., & Becker, K. (2011). Non-starch polysaccharides and their role in fish nutrition–a review. *Food Chemistry*, *127*,1409–1426.

Storebakken, T. Shearer, K.D., & Roem. A.J. (1998). Availability of protein, phosphorus and other elements in fish meal, soy–protein concentrate and phytase–treated soy–protein–concentrate–based diets to Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture*, *161*, 365–379.

Sugiura S.H., Gabaudan, J., Dong, F.M., & Hardy, R.W. (2001). Dietary microbial phytase supplementation and the utilization of phosphorus, trace min- erals and protein by rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), and fed soybean meal based diets. *Aquaculture Research*, *32*, 583–592.

Tavano, O.L., Berenguer-Murcia A., Secundo F., & Fernandez-Lafuente R. (2018). Biotechnological applications of proteases in food technology. *Comparative Reviews in Food Science and Food Safety*, *17*, 412–436.

Tavarutmaneegul, P. Nukwan, S., & Lawonyawut, K. (1992). Walking catfish (*Clarias* spp.) and their hybrids. *Extension Paper no. 28*. National Inland Fisheries Institute Department of Fisheries.16 pp.

Vuthiphandchai, V. (1993). *Fish feed.* Teaching Materials, Department of Aquatic Science, Burapha University, Chonburi, 216 pp. (in Thai)

Vielma, J. Makinen, T. Ekholm, P., & Koskela, J. (2000). Influence of dietary soy and phytase levels on performance and body composition of large rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and algal availability of phosphorus load. *Aquaculture*, *183*, 349–362.

Xu, S-D., Zheng, X, Dong, X-J., Ai, Q-H., & Mai, K-H. (2022). Beneficial effects of phytase and/or protease on growth performance, digestive ability, immune response and muscle amino acid profile in low phosphorus and/or low fish meal gibel carp (*Carassius auratus gibelio*) diets. *Aquaculture*, *555*, 738157.

Yang,W., Gu, Z., Chen, X Gao,W., Wen, H., Wu, F., & Tian, J. (2022). Effects of phytase supplementation of high-plant-protein diets on growth, phosphorus utilization, antioxidant, and digestion in red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*). *Fish & Shellfish Immunology*,*127*, 797-803.

Yigit, N.O., Koca, S.B., Didinen, B.I., & Diler, I. (2018). Effect of protease and phytase supplementation on growth performance and nutrient digestibility of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) fed soybean meal-based diets. *Journal of Applied Animal Research*, *46 (1)*, 29-32.

Zhu,Y., Qiu, X., Ding, Q. Duan,M., & Wang, C. (2014). Combined effects of dietary phytase and organic acid on growth and phosphorus utilization of juvenile yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco. Aquaculture*, *430*, 1-8.