การพัฒนาอาหารสำเร็จผสมสารสกัดกระเทียมที่เหมาะสมสำหรับเร่งการเจริญเติบโตในปลาบู่ (*Oxyeleotris marmoratus*)

มัลลิกา ศุภอักษร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการประมง
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้
พ.ศ. 2558

ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการประมง

ชื่อเรื่อง

การพัฒนาอาหารสำเร็จผสมสารสกัดกระเทียมที่เหมาะสมสำหรับเร่งการเจริญเติบโตในปลาบู่ (*Oxyeleotris marmoratus*)

โดย

มัลลิกา ศุภอักษร

พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการที่ปรึกษา .....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิราพร โรจน์ทินกร)
วันที่ ...29... เดือน มิถุนายน พ.ศ. 2558

กรรมการที่ปรึกษา .....
(อาจารย์ ดร.สุดาพร ตงศิริ)
วันที่ ...29... เดือน มิถุนายน พ.ศ. 2558

กรรมการที่ปรึกษา .....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ประจวบ ฉายบุ)
วันที่ ...29... เดือน มิถุนายน พ.ศ. 2558

ประธานกรรมการประจำหลักสูตร .....
(อาจารย์ ดร.สุดาพร ตงศิริ)
วันที่ ...29... เดือน มิถุนายน พ.ศ. 2558

บัณฑิตวิทยาลัยรับรองแล้ว .....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จาตุพงศ์ วาฤทธิ์)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
วันที่ ...29... เดือน มิถุนายน พ.ศ. 2558

ชื่อเรื่อง การพัฒนาอาหารสำเร็จผสมสารสกัดกระเทียมที่เหมาะสม สำหรับเร่งการเจริญเติบโตใน ปลาบู่ (*Oxyeleotris marmoratus*)

ชื่อผู้เขียน นางสาวมัลลิกา ศุภอักษร

ชื่อปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการประมง

ประธานกรรมการที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิราพร โรจน์ทินกร

บทคัดย่อ

ปลาบู่ (*Oxyeleotris marmoratus*) เป็นปลาน้ำจืดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่งมีราคาสูงและมีความต้องการของตลาดทั้งในประเทศและตลาดต่างประเทศ ปัญหาสำคัญในการเพาะเลี้ยงปลาบู่ คือ อัตราการเจริญเติบโตช้า และต้องเลี้ยงด้วยอาหารมีชีวิตหรืออาหารสด ทำให้การเพาะเลี้ยงมีต้นทุนสูง การศึกษานี้ได้ใช้สารสกัดกระเทียมด้วย น้ำ เอทานอล 50% เอทานอล 95% น้ำมัน และ ไดเอทิลอีเทอร์ เสริมในอาหารเลี้ยงปลาบู่ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0 (ชุดควบคุม), 0.3, 0.5, 1.0, 3.0 และ 5.0% (w/w) เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นศึกษาผลต่อกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ย่อยอาหาร 4 ชนิด คือ อะไมเลส ไลเปส ทริปซิน และ ไคโมทริปซิน พบว่า อาหารผสมสารสกัดกระเทียม ทั้ง 5 สารสกัด สามารถช่วยกระตุ้นกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ย่อยอาหารทั้ง 4 เอนไซม์ เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p<0.05$) โดยอะไมเลสในกลุ่มปลาบู่ที่ให้อาหารผสมสารสกัดกระเทียมด้วยน้ำที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w) ให้ผลดีที่สุด เท่ากับ 110.26±0.004 U/mg protein รองลงมากลุ่มปลาบู่ที่ให้อาหารผสมน้ำมันถั่วเหลือง ที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w) เท่ากับ 72.04±0.002 U/mg protein ไลเปสในกลุ่มปลาบู่ที่ให้อาหารผสมน้ำมันกระเทียม ที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w) เท่ากับ 4.35±0.004 mU/mg protein รองลงมาในกลุ่มปลาบู่ที่ให้อาหารผสมสารสกัดกระเทียมด้วยเอทานอล 50% ที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w) เท่ากับ 4.06±0.011 mU/mg protein ทริปซินในกลุ่มปลาบู่ที่ให้อาหารผสมสารสกัดกระเทียมด้วยน้ำที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w) ให้ผลดีที่สุด เท่ากับ 88.04±0.004 U/mg protein รองลงมาในกลุ่มปลาบู่ที่ให้อาหารผสมสารสกัดกระเทียมด้วยเอทานอล 50% ที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w) เท่ากับ 51.85±0.011 U/mg protein ไคโมทริปซินในกลุ่มปลาบู่ที่ให้อาหารผสมสารสกัดกระเทียมด้วยไดเอทิลอีเทอร์ ที่ความเข้มข้น 0.5% (w/w) ให้ผลดีที่สุด เท่ากับ 327.46±0.005 U/mg protein รองลงมาในกลุ่มปลาบู่ที่ให้อาหารผสมสารสกัดกระเทียมด้วยเอทานอล 95% ที่ความเข้มข้น 3.0% (w/w) เท่ากับ 305.64±0.006 U/mg protein และจากการเปรียบเทียบอัตราส่วนระหว่างทริปซินและไคโมทริปซิน (T/C ratio) ในกลุ่มปลาบู่ที่ให้อาหารผสมสารสกัดกระเทียมด้วยน้ำที่ความ

เข้มข้น 5.0% (w/w) ให้ผลดีที่สุด เท่ากับ 1.24±0.347 รองลงมาในกลุ่มปลาบู่ที่ให้อาหารผสมสารสกัดกระเทียมด้วยเอทานอล 50% ที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w) เท่ากับ 0.84±0.427 เมื่อทำการเลี้ยงปลาบู่ด้วยอาหารสำเร็จผสมสารสกัดกระเทียมด้วยน้ำที่ความเข้มข้น 5.0% เป็นเวลา 2 เดือน พบว่าปลาบู่มีแนวโน้มการเจริญเติบโตดีกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) โดยมีน้ำหนักเพิ่มขึ้นเท่ากับ 32.69% มีค่าประสิทธิภาพของอาหาร (FE) เท่ากับ 0.55±0.07 และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (SGR) เท่ากับ 0.219± 0.06 %/วัน ผลการศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่า สารสกัดกระเทียมช่วยให้ปลาบู่ย่อยอาหารโปรตีนได้ดีขึ้น มีแนวโน้มการเจริญเติบโตสูงขึ้น ดังนั้นคาดว่าการเลี้ยงปลาบู่ด้วยอาหารผสมสารสกัดกระเทียมจะช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตได้

Title Development of garlic extract additived feed suitable for enhancing growth in sand goby (*Oxyeleotris marmoratus*)

Author Ms. Mallika Supa-aksorn

Degree of Master of Science in Fisheries Technology

Advisory Committee Chairperson Assistant Professor Dr. Jiraporn Rojtinnakorn

ABSTRACT

Sand goby (*Oxyeleotris marmoratus*) is a fish with a high price and high demand in both domestic and international markets. The important problems were low growth rate, using living or fresh feed and the high costs. This study used garlic extracts with water, ethanol, oil and diethyl ether to additive feeds at 0 (control), 0.3, 0.5, 1.0, 3.0 and 5.0% (w/w) for 7 days. Then activities of 4 digestive enzymes i.e. amylase, lipase, trypsin and chymotrypsin were measured. Results showed that groups fed with diets containing garlic extracts 5 solvent the digestive activities of all four enzymes increased compared with the control groups was significantly different ($p<0.05$). Amylase activities in groups fed containing garlic extracts with water at 5.0% (w/w), showed good results of 110.26±0.004 U/mg protein, subordinate groups feeds containing soybean oil at 5.0% (w/w) amount 72.04±0.002 U/mg protein. Lipase activities in groups feeds containing garlic oil at 5.0% (w/w), showed good results of 4.35±0.004 mU/mg protein, subordinate groups feeds containing garlic extracts with 50% ethanol at 5.0% (w/w) amount 4.06±0.011 mU/mg protein. Trypsin activities in groups feeds containing garlic extracts with water at 5.0% (w/w), showed good results amount 88.04±0.004 U/mg protein, subordinate groups feeds containing garlic extracts with 50% ethanol at 5.0% (w/w) amount 51.85±0.011 U/mg protein. Chymotrypsin activities in groups feeds containing garlic extracts with diethyl ether at 0.5% (w/w), showed good results amount 327.46±0.005 U/mg protein, subordinate groups feeds containing garlic extracts with 95% ethanol at 3.0% (w/w) amount 305.64±0.006 U/mg protein and comparison of trypsin and chymotrypsin enzyme (T/C ratio) on feeds containing garlic extracts with water at 5.0% (w/w) in sand goby showed good results amount 1.24±0.347 subordinate groups feeds containing garlic extracts with 50% ethanol at 5.0% (w/w) amount 0.84±0.427. Group of feeds containing garlic extracts with water at 5.0% (w/w) was cultured for

2 months. It showed that trend growth rate in group of feeds containing garlic extracts with water at 5.0% (w/w) was better than the control groups and was significantly different ($p<0.05$), with weight gain increasing of 32.69%, feed efficiency (FE) of 0.55±0.07 and specific growth rate of 0.219± 0.06 %/day. In conclusion, garlic extracts can induce protein digestion and trend of growth rate. Therefore, it is expected that culturing sand goby with feed containing garlic extracts can enhance growth.

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาติชาย โขนงนุช ประธานกรรมการสอบ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จิราพร โรจน์ทินกร ประธานกรรมการที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ประจวบ ฉายบุ กรรมการที่ปรึกษา และ อาจารย์ ดร. สุดาพร ตงสิริ กรรมการที่ปรึกษา ที่ได้ให้คำปรึกษาแนะนำ ตลอดจนให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ จนกระทั่งวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) โครงการทุนวิจัยมหาบัณฑิต สกว. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (TRF-MAG)

ขอกราบขอบพระคุณบิดาและมารดา ผู้ให้ชีวิตที่คอยสนับสนุนไม่ว่าด้านกำลังทรัพย์ กำลังใจ คำปรึกษาในด้านการศึกษาแก่ลูกเสมอมา ตลอดจนญาติ พี่น้อง ที่คอยสนับสนุนขอบคุณรุ่นพี่ เพื่อนและน้องๆ ทุกคน สำหรับคำแนะนำ กำลังใจ ตลอดจนช่วยเหลืออำนวยความสะดวก จนกระทั่งวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี

ขอขอบคุณบุคลากรในคณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ ทุกท่านและห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางการประมง มหาวิทยาลัยแม่โจ้ รวมถึงอีกหลายท่านที่มิสามารถเอ่ยนามได้ทั้งหมด สำหรับความอนุเคราะห์ในเรื่องอุปกรณ์ การอำนวยความสะดวก และความช่วยเหลือในด้านต่างๆ จนกระทั่งงานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

มัลลิกา ศุภอักษร

มิถุนายน 2558

สารบัญ

สารบัญตาราง

สารบัญภาพ

ภาพ หน้า

ภาพ หน้า

สารบัญภาพผนวก

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญของปัญหา

ปลาบู่หรือปลาบู่ทราย (sand goby, *Oxyeleotoris marmorata* Bleeker 1852) เป็นปลา 2 น้ำ อยู่ได้ทั้งน้ำจืดและน้ำกร่อย พบได้ทั่วทุกภูมิภาคของประเทศไทยและแถบเอเชียอาคเนย์ ประกอบกับปลาบู่เป็นปลากินเนื้อ เช่น กุ้งฝอย ลูกปลาเล็กๆ อัตราการเจริญเติบโตอยู่ที่ 1 กิโลกรัมต่อปี ปลาบู่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่ง มีความต้องการของตลาดไฮเปอร์มาร์เกตทั้ง ในประเทศและตลาดต่างประเทศ เช่น สิงคโปร์ ฮ่องกง ไต้หวัน และ จีน โดยมีมูลค่าการส่งออกปีละหลายสิบล้านบาท ปลาบู่เป็นที่นิยมของผู้บริโภค เพราะมีเนื้อขาวที่มีรสชาติอร่อย เนื้อนุ่มฟู เหนียวไม่เละ คล้ายปลาสำลี แต่ผลผลิตปลาบู่ได้การจับลูกพันธุ์จากธรรมชาติ แล้วนำมาเลี้ยงในบ่อดินหรือกระชัง ปลาบู่ มีราคาสูง ราคาปากบ่อประมาณ 250-350 บาทต่อกิโลกรัม และราคาในภัตตาคารสูงถึง 500–700 บาทต่อกิโลกรัม อย่างไรก็ตาม เกษตรกรยังมีการเพาะเลี้ยงปลาบู่น้อยมาก เนื่องจากปัญหาที่สำคัญ คือ ลูกปลามีอัตรารอดต่ำ มีอัตราการเจริญเติบโตช้า และต้องเลี้ยงด้วยอาหารมีชีวิตหรืออาหารสด ทำให้การเพาะเลี้ยงมีต้นทุนและความเสี่ยงสูง (ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดพะเยา กรมประมง, ม.ป.ป. ; ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, ม.ป.ป.) ได้มีการวิจัยอาหารเลี้ยงปลาบู่ ซึ่งต้องใช้อาหารมีชีวิต เช่น กุ้งฝอย ลูกปลา เป็นต้น หรือต้องใช้อาหารสดที่เตรียมใหม่ๆ (ชัชชัย, 2547; พูนศักดิ์, 2552) ทำให้ต้นทุนสูง และขั้นตอนการเตรียมอาหารยุ่งยาก อีกประการหนึ่ง การฝึกปลาบู่ให้กินอาหารสำเร็จทำได้ยาก เนื่องจากมีพฤติกรรมการกินที่ชอบอาหารมีชีวิต (นิติกร และคณะ, ม.ป.ป.) ทั้งนี้ยังไม่มีรายงานความสำเร็จในการเลี้ยงปลาบู่ด้วยอาหารสำเร็จ

กระเทียมเป็นพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพหลากหลายทั้งการต้านเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา ปรสิตและเชื้อไวรัส (Yoshida et al., 1987, Harish, et al 2001) และกระตุ้นการย่อยอาหาร เพิ่มการบีบตัวของลำไส้ (Ingkaninan et al., 2003 อ้างโดย Sirinatd, 2011) โดยมีสารออกฤทธิ์ที่สำคัญ คือ อัลไลซิน (allicin) และสารประกอบซัลเฟอร์ (sulfur compunds) การสกัดด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกันจะทำให้ได้สารสำคัญต่างๆในสัดส่วนที่แตกต่างกัน กล่าวคือ สารสกัดกระเทียมด้วยน้ำ จะได้ อัลไลซิน (allicin) เอสอัลลิลซีสทีอีน (*S*-allylcysteine) เอสอัลลิลเมอแคปโตซีสทีอีน (*S*-allylmercaptocysteine) สารสกัดกระเทียมด้วยเอทานอล จะได้ อัลลิอิน (alliin) อัลลิซิน (allicin) ไดอัลลิลไดซัลไฟด์ (diallyl disulfide) และสารสกัดกระเทียมด้วย diethyl ether จะได้

เอสอัลลิลซีสทีอีน (*S*-allylcysteine) (Allison et al., 2006) สารสกัดกระเทียมด้วยน้ำมันถั่วเหลือง จะได้สารพวก ไดทีน (dithiins) และ อะโจอีน (ajoene) (Ibert et al., 1990)

จากโครงการ "การใช้สารธรรมชาติเพื่อเร่งการเจริญเติบโตในปลาบู่" ทุนสนับสนุนจาก TRFMAG สัญญาเลขที่ MRG-WI525S119 จิราพร และคณะ (2554) ได้ประสบความสำเร็จในการวิจัยให้อาหารสำเร็จเลี้ยงปลาบู่ โดยการให้อาหารสำเร็จผสมสารสกัดกระเทียม ขมิ้น กวาวเครือ สไปรูลินา และโพรไบโอติค พบว่า สารสกัดกระเทียมด้วยน้ำและเอธานอล สามารถกระตุ้นพฤติกรรมการกินของปลาบู่ได้ และกระตุ้นเอนไซม์ย่อยอาหารของปลาบู่ได้ดี มีอัตราการกินต่อวันและอัตราการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ

ในงานวิจัยนี้จึงได้นำผลการวิจัยมาพัฒนาต่อยอดองค์ความรู้เกี่ยวกับประสิทธิภาพและความแตกต่างของสารสกัดกระเทียมที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างกัน โดยใช้ตัวทำละลายชนิดต่างๆ เช่น น้ำ เอธานอล น้ำมัน diethyl ether เป็นต้นและตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหาร อัตราการกิน อัตราการเจริญเติบโต และประสิทธิภาพของอาหาร เพื่อพัฒนาสูตรอาหารสำเร็จผสมสารสกัดกระเทียมที่เหมาะสมสำหรับเร่งการเจริญเติบโตในปลาบู่ และใช้เทคนิค 2-Step RT - PCR ติดตามการแสดงออกของเอนไซม์ย่อยอาหารของปลาบู่

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดกระเทียมด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ เพื่อเพิ่มอัตราการกินอาหารของปลาบู่
2. พัฒนาการใช้สูตรอาหารสำเร็จผสมสารสกัดกระเทียมที่เหมาะสมสำหรับปลาบู่

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ข้อมูลประสิทธิภาพของสารสกัดกระเทียมชนิดต่างๆ ต่อเอนไซม์ย่อยอาหารในปลาบู่
2. ข้อมูลสูตรอาหารสำเร็จสำหรับการเลี้ยงปลาบู่ชนิดแรก โดยการผสมสารสกัดกระเทียมที่เหมาะสม
3. สามารถนำข้อมูลนี้ไปพัฒนาเป็นอาหารเม็ดที่เหมาะสมสำหรับอุตสาหกรรมการเลี้ยงปลาบู่ได้

4. สนับสนุนการผลิตปลาบู่ปลอดสารซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์มีมูลค่าทางเศรษฐกิจทั้งภายในประเทศและการส่งออก

5. สนับสนุนการใช้พืชและทรัพยากรทางธรรมชาติของไทยให้เกิดประโยชน์ทางเศรษฐกิจ และยังเป็นการพึ่งพาตนเองของชุมชนท้องถิ่น

6. สนับสนุนการเพิ่มรายได้ต่อครัวเรือนของเกษตรกร

บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

ชีววิทยาของปลาบู่ทราย

ปลาบู่ทรายสามารถจำแนกตามลักษณะทางอนุกรมวิธานได้ดังนี้ (Nelson, 1994)

Phylum Chordata

Class Osteichthyes

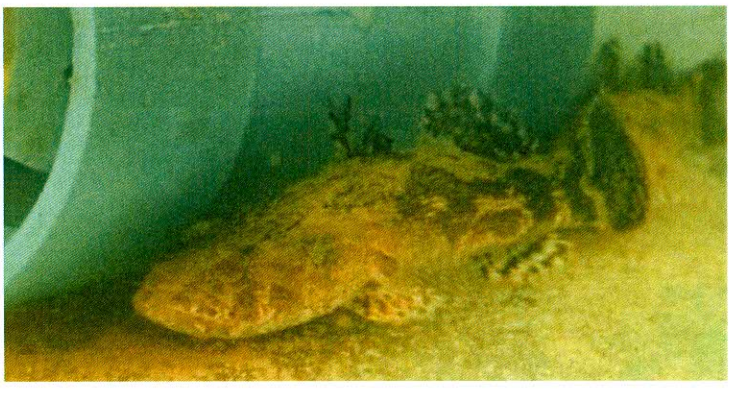
Order Perciformes

Suborder Gobiodei

Family Eleotridae

Genus *Oxyeleotris*

Species *Oxyeleotris marmoratus*



ภาพ 1 ปลาบู่ทราย *Oxyeleotris marmoratus*

ที่มา : Bleeker (1852)

รูปร่างลักษณะ

ปลาบู่ทราย *Oxyeleotris marmoratua* รูปร่างทรงกระบอก ส่วนหัวใหญ่ จะงอยปากยื่นยาว ปากกว้างมาก มีฟันเป็นเขี้ยวยาวบนขากรรไกร ตาเล็กตั้งอยู่ด้านบนของหัว ลำตัวกลมและแบนข้างเล็กน้อยที่ด้านท้าย ครีบหลังแยกกันชัดเจน ครีบอกใหญ่ปลายมน ครีบหางใหญ่ มี

เกล็ดเล็กละเอียดคลุมตัวตั้งแต่ข้างแก้มถึงทั่วตัว ตัวมีสีน้ำตาลอมแดง หรืออมเหลืองคล้ำ มีแถบลายเป็นรูปไม่แน่นอนตลอดตัว ที่โคนหางมีลายเป็นรูปตัววี ครีบใสมีลายประสีคล้ำตลอด ครีบหางมีแถบสีคล้ำ 3-5 แถบ ด้านท้องสีจาง ขนาดที่พบใหญ่ที่สุดถึง 70 เซนติเมตร แต่ที่พบทั่วไป 20-30 เซนติเมตร ปลาบู่เป็นปลากินเนื้อเป็นอาหาร ชอบอาศัยอยู่นิ่งๆ ตามที่หลบภัยต่างๆ ในแหล่งน้ำ เช่น ก้อนหิน พื้นทราย ตอไม้ เสาไม้ รากหญ้าหนาๆ และตามดินอ่อนๆ เป็นต้น ในประเทศไทยสามารถพบปลาบู่ได้ทั่วไปตามแม่น้ำ ลำคลอง อ่างเก็บน้ำตามเขื่อนต่างๆ ปลาบู่ทรายสามารถวางไข่ได้เกือบตลอดทั้งปียกเว้นช่วงฤดูหนาว (เฉิดฉัน และคณะ, 2538)

แหล่งที่อยู่อาศัย

ปลาบู่ทรายเป็นปลากินเนื้อที่ชอบอยู่นิ่งๆ ตามดินอ่อน พื้นทรายและ หลบซ่อนตามก้อนหิน ตอไม้ เสาไม้ รากหญ้าหนา ๆ เพื่อรอให้เหยื่อผ่านมาแล้วเข้าโจมตีทันทีด้วยความรวดเร็ว ปลาบู่ทรายพบทั้งในน้ำจืดและน้ำกร่อยเล็กน้อยลูกปลาบู่ทรายชอบซ่อนตัวบริเวณรากพืชพันธุ์ไม้น้ำ พวกรากจอก รากผัก (เฉิดฉัน และคณะ, 2538)

การอนุบาล

1. การอนุบาลในบ่อซีเมนต์ขนาดเล็ก การอนุบาลช่วงนี้เป็นช่วงที่สำคัญในการเพาะขยายพันธุ์ปลาบู่ การอนุบาลลูกปลาให้ได้อัตราการรอดตายต่ำหรือ สูงขึ้นอยู่กับปัจจัยสำคัญ 4 ประการ คือ อัตราการปล่อย การจัดการน้ำในการอนุบาล การให้อากาศ ชนิดอาหารและการให้อาหาร

1.1 อัตราการปล่อยลูกปลาบู่วัยอ่อน ควรปล่อยอัตรา 20,000 ตัวต่อ 6 ตารางเมตร หรือ ปริมาณ 3,300 ตัวต่อตารางเมตร

1.2 การจัดการน้ำในการอนุบาล เนื่องจากลูกปลาบู่วัยอ่อนมีขนาดเล็กมากและบอบช้ำง่าย ดังนั้น การจัดการระบบน้ำต้องทำอย่างนุ่มนวลเพื่อไม่ให้ ลูกปลาบอบช้ำ ในการอนุบาลวันแรกควรเติมน้ำต้องทำอย่างนุ่มนวลเพื่อไม่ให้ลูกปลาบอบช้ำ ในการอนุบาลวันแรกควรเติมน้ำโดยกรองผ่านผ้าโอลอนแก้วให้ได้ระดับน้ำเฉลี่ย 20-25 เซนติเมตร จนได้ระดับน้ำเฉลี่ย 40-45 เซนติเมตรจึงเริ่มถ่ายน้ำ 50 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาณน้ำทั้งหมดทุกวันจนลูกปลาอายุได้ 1 เดือน การเพิ่มระดับน้ำในระยะแรกควรเปิดน้ำเข้าช้าๆ อย่าเปิดน้ำรุนแรงเพราะลูกปลาในช่วงระยะนี้บอบบางมากและเพื่อไม่ให้ของเสียที่อยู่ก้นบ่อฟุ้งกระจายขึ้นเป็นอันตรายต่อลูกปลาวัยอ่อน ส่วนการ

ถ่ายเทน้ำในบ่อควรถ่ายน้ำออกโดยใช้วิธีกาลักน้ำผ่านกล่องกรองน้ำ การสร้างกล่องกรองน้ำนี้ควรให้มีขนาดพอเหมาะกับบ่ออนุบาลเพื่อสะดวกในการทำงานและขนย้าย กล่องกรองน้ำทำด้วยโครงไม้หรือท่อพีวีซีบุด้วยผ้าโอลอนแก้ว การถ่ายน้ำออกควรทำอย่างช้า ๆ เพราะลูกปลาบู่วัยอ่อนสู้แรงน้ำที่ดูดออกทิ้งไม่ได้ ลูกปลาจะไปติดตามแผงผ้ากรองตายได้ในช่วงท้ายของการอนุบาลประมาณ 1-2 อาทิตย์ สามารถเปลี่ยนผ้ากรองให้มีขนาดตาใหญ่ขึ้นอีกเล็กน้อยจากเดิม โดยให้มีความสัมพันธ์กับขนาดลูกปลาบู่

1.3 การให้อากาศ การให้อากาศในบ่ออนุบาลสำหรับลูกปลาวัยอ่อนในช่วงครึ่งเดือนแรกจำเป็นต้องปล่อยให้อากาศผ่านหัวทรายอย่างช้าๆ และค่อยๆ เพราะลูกปลาระยะนี้ยังไม่สามารถว่ายทวนกระแสน้ำที่เคลื่อนตามแรงดันอากาศมากๆ ได้

1.4 ชนิดอาหารและการให้อาหาร อาหารที่ใช้ในการอนุบาลลูกปลาบู่ส่วนใหญ่เป็นอาหารธรรมชาติมีชีวิต ยกเว้นระยะแรกที่ลูกปลาเพิ่งฟักจะให้อาหารไข่ระยะต่อมาให้โรติเฟอร์และไรแดง (เฉิดฉัน และคณะ, 2538)

2. การอนุบาลในบ่อซีเมนต์ขนาดใหญ่ เมื่อลูกปลาอายุได้ประมาณ 1 เดือนก็ทำการย้ายไปอนุบาลต่อในบ่อซีเมนต์ขนาด 50 ตารางเมตร ที่มีระดับน้ำประมาณ 40-50 เซนติเมตร โดยคัดลูกปลาให้มีขนาดใกล้เคียงกัน แล้วปล่อยลูกปลาในอัตราตารางเมตรละ 100-160 ตัว ในช่วงสัปดาห์แรกให้อาหารธรรมชาติมีชีวิต ได้แก่ไรแดง หนอนแดง ฯลฯ ประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัวปลา ช่วงสัปดาห์ที่สองเริ่มฝึกให้กินอาหารสมทบที่มีสูตรอาหารประกอบด้วยปลาเป็ด 94 เปอร์เซ็นต์ รำละเอียด 5 เปอร์เซ็นต์ วิตามินเกลือแร่ 1 เปอร์เซ็นต์ การฝึกให้ลูกปลาบู่กินอาหารสมทบ ควรค่อย ๆ ลดปริมาณไรแดงและเพิ่มอาหารสมทบสำหรับอาหารสมทบนั้นปั้นเป็นก้อนเล็ก ๆ โยนให้ลูกปลาบู่รอบบ่อ และควรเปลี่ยนถ่ายน้ำทุกวัน ๆ ละ 5-10 เซนติเมตร การเลี้ยงปลาบู่ในบ่อกลางแจ้งอาจประสบปัญหาสาหร่ายชนิดที่ไม่ต้องการโดยเฉพาะพวกที่เป็นเส้นใยขึ้นทั่วบ่อระหว่างอนุบาลลูกปลาซึ่งยากลำบากต่อการดูแล ควรใช้น้ำเขียวเติมเป็นระยะ ๆ ตามความเหมาะสมของคุณภาพน้ำความขุ่นและสีน้ำ อีกทั้งช่วยขยายอาหารธรรมชาติในบ่อ ได้แก่ ไรแดง อีกด้วย (เฉิดฉัน และคณะ, 2538)

3. การอนุบาลในบ่อขนาดใหญ่ หรือในบ่อดิน การอนุบาลลูกปลาบู่ขนาด 2.5 เซนติเมตรขึ้นไป ส่วนใหญ่เลี้ยงในบ่อซีเมนต์และบ่อดินส่วนการเลี้ยงในกระชัง นั้นปรากฏว่าไม่ค่อยประสบผลสำเร็จ มีอัตรารอดและอัตราการเจริญเติบโตต่ำไม่เหมาะสมที่จะใช้อนุบาลลูกปลาขนาดดังกล่าว สำหรับการอนุบาลลูกปลาขนาดดังกล่าวในบ่อซีเมนต์ลูกปลาจะมี อัตรารอดสูงกว่าบ่อดินและรวบรวมปลาบู่ได้สะดวก แต่อัตราการเจริญเติบโตช้าโดยปล่อยลูกปลาขนาด 5 เซนติเมตร จำนวน 3,000 ตัว หรือตารางเมตรละ 60 ตัว ให้อาหารปลาประกอบด้วย ปลาเป็ด 94

เปอร์เซ็นต์ รำละเอียด 5 เปอร์เซ็นต์ วิตามินเกลือแร่ 1 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลาเลี้ยง 90 วัน อัตรารอดประมาณ 85 เปอร์เซ็นต์ ลูกปลาที่มีน้ำหนักเฉลี่ย 1.46 กรัม เพิ่มขึ้นเป็น 4.97 กรัม ความยาวเฉลี่ย 5 เซนติเมตรเพิ่มเป็น 7.55 เซนติเมตร นอกจากนี้ การติดตั้งระบบน้ำหมุนเวียนโดยดึงน้ำจากบ่อพักมาเลี้ยงลูกปลาบู่แล้วปล่อยกลับสู่บ่อดินหมุนเวียนตลอดเวลาก็สามารถทำได้ ส่วนการอนุบาลลูกปลาบู่ในบ่อดินได้อัตรารอดไม่สูงนักและรวบรวมลูกปลา ได้ลำบากแต่มีการเจริญเติบโตเร็ว จากการทดลองเลี้ยงปลาบู่ในบ่อดินของสถานีเพาะเลี้ยงปลาจังหวัดปทุมธานี ใช้เวลาเลี้ยง 2 เดือน โดยใส่ปุ๋ยมูลไก่แห้งเพื่อให้เกิดอาหารธรรมชาติ และให้อาหารสมทบ (ปลาเป็ด 94 เปอร์เซ็นต์ รำละเอียด 5 เปอร์เซ็นต์ วิตามินเกลือแร่ 1 เปอร์เซ็นต์) ในอัตรา 10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนัก ปลาพบว่า ได้อัตรารอดเฉลี่ย 44 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักลูกปลาเริ่มปล่อย 0.04-0.39 กรัม ได้น้ำหนักเฉลี่ย 2.4 กรัม จากการศึกษาอัตราปล่อยลูกปลาบู่ขนาด 1.5-3.0 เซนติเมตรในบ่อดิน พบว่า อัตราปล่อย 10,000 ตัวต่อบ่อดินครึ่งไร่ หรือตารางเมตรละ 12.5 ตัวใน เวลา 1 เดือน ได้อัตรารอดมากที่สุด คือ 61.06 เปอร์เซ็นต์ (เฉิดฉันและคณะ, 2538) และ Jiwyam (2008) ได้ทำการเลี้ยงปลาบู่ (*Oxyeleotris marmoratus*) ในบ่อเลี้ยงแบบผสมผสาน โดยทำการเลี้ยงปลาบู่ร่วมกับลูกปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ธรรมชาติ ให้ลูกปลานิลเป็นอาหารของปลาบู่นอกเหนือจากอาหารธรรมชาติที่มีอยู่ในบ่อ เพื่อช่วยเพิ่มผลผลิตของปลาบู่ให้เพียงพอต่อความต้องการของตลาด

นิสัยการกินอาหาร

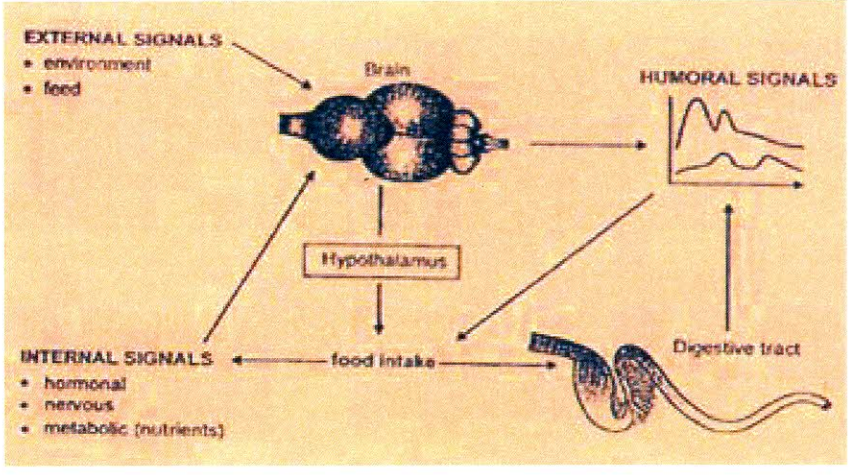
ปลาบู่ทรายเป็นปลาที่กินเนื้อเป็นอาหาร เช่น ลูกปลา กุ้ง แมลงในน้ำ หอยและปูเป็นต้น จากการวิเคราะห์นิสัยการกินอาหารของปลาบู่ พบว่าปลาบู่ขนาดประมาณ 1.0-10.0 เซนติเมตร อาหารที่พบเป็นกุ้งร้อยละ 75 ปลาร้อยละ 25 ปลาบู่ขนาดประมาณ 10.0-20.0 เซนติเมตร อาหารที่พบเป็นกุ้งร้อยละ 58 ปลาร้อยละ 40 ปูร้อยละ 2 ปลาบู่ขนาดตั้งแต่ 20 เซนติเมตรขึ้นไป อาหารที่พบเป็นปลาร้อยละ 72 กุ้งร้อยละ 28 (มานพ, 2527)

การย่อยอาหารของปลา

การกินอาหารของปลาในขั้นแรก ส่วนมากอาหารจะมีลักษณะเป็นก้อนหรือชิ้นขนาดใหญ่ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีกระบวนการแปรสภาพอาหารเหล่านั้นให้มีขนาดเล็กๆ และอยู่ในรูปสารละลายซึ่งสามารถที่จะดูดซึมผ่านผนังลำไส้เข้าสู่กระแสโลหิตหรือระบบน้ำเหลือง หลังจากนั้นร่างกายจึงจะนำเอาสารไปใช้ประโยชน์ในกระบวนการต่างๆ ของร่างกายได้ การเปลี่ยนแปลง

ของอาหารขนาดต่างๆ จากขนาดใหญ่จนกลายเป็นที่มีขนาดอณูเล็ก เรียกว่า การย่อยอาหาร (digestion) (นิวุฒิ , 2534)

ระบบย่อยอาหาร เป็นระบบหนึ่งที่มีความสำคัญโดยตรงต่อการเจริญเติบโตของปลา โดยอาหารจะถูกย่อยจากสารอาหารที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่และซับซ้อนให้เป็นสารอาหารที่มีขนาดโมเลกุลเล็ก เพื่อที่จะดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดแล้วถูกเผาผลาญในระดับเซลล์ได้เป็นพลังงานออกมาเพื่อใช้ในชีวิตประจำวัน ซึ่งปลาแต่ละชนิดจะเลือกกินอาหารที่แตกต่างกัน เนื่องจากเป็นลักษณะการคัดเลือกทางธรรมชาติของสิ่งมีชีวิตเพื่อความอยู่รอด ทำให้ปลาแต่ละชนิดมีนิสัยการกินอาหารที่แตกต่างกัน รวมไปถึงลักษณะของการเลือกชนิดก็แตกต่างกันไปด้วย (ภาพ 2) (นิวุฒิ , 2534)



ภาพ 2 แผนผังของการปลดปล่อยฮอร์โมนในประสาทต่อการอยากอาหาร
ที่มา : Guillaume et al.(1997)

ระบบการย่อยอาหารของปลาแต่ละชนิดอาจมีความแตกต่างกันทางกายวิภาคหรือทาสรีรวิทยา แต่อย่างไรก็ตามระบบการย่อยอาหารของปลาโดยทั่วไปจะประกอบด้วยส่วนสำคัญได้แก่ ท่อทางเดินอาหาร (digestive tract) อวัยวะช่วยย่อยอาหาร (accessory gland) ซึ่งได้แก่ ตับ ตับอ่อน และถุงน้ำดี และเอนไซม์ย่อยอาหาร (digestive enzymes) การศึกษาระบบการย่อยอาหารของปลาทำให้ทราบถึงพฤติกรรมการกินอาหารของปลา ระยะเวลาที่อาหารหมดจากกระเพาะอาหาร และประสิทธิภาพการย่อยอาหาร ซึ่งเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการผลิตอาหาร และการให้อาหารปลา (วีรพงศ์, 2536)

ระบบการย่อยอาหารของปลาโดยทั่วไปจะประกอบด้วยส่วนสำคัญได้แก่ ท่อทางเดินอาหาร (digestive tract) ท่อทางเดินอาหารของปลาประกอบด้วย ปาก หลอดอาหาร กระเพาะอาหาร และลำไส้ ซึ่งอาจมีรูปร่างลักษณะหลากหลายเนื่องจากพฤติกรรมการกินอาหารที่แตกต่างกัน ปลาวัยอ่อนที่เพิ่งฟักออกจากไข่จะมีระบบทางเดินอาหารที่ยังไม่พัฒนาเต็มที่ แต่เมื่อปลาเจริญเติบโตขึ้นจะมีการพัฒนาของระบบทางเดินอาหารและเอนไซม์ย่อยอาหารเพื่อทำหน้าที่ย่อยอาหารได้อย่างสมบูรณ์ (จันทกานต์, 2550)

ปาก (mouth)

ปากเป็นอวัยวะที่ใช้ในการกินอาหาร ซึ่งจะผ่านต่อไปยังหลอดอาหารและกระเพาะอาหาร ตำแหน่งและขนาดของปากของปลาแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน ขึ้นกับลักษณะการกินอาหาร (วีรพงศ์, 2536) ปากของปลาบู่ปากกว้างใหญ่เปิด ทางด้านบนตอนมุมปากเฉียงลง (มานพ, 2527) ประกอบด้วยอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับการย่อยอาหารดังนี้

1. ฟัน (teeth)

ฟันมีหน้าที่บดหรือกัดอาหารขนาดใหญ่ให้มีขนาดเล็กลงก่อนถูกนำไปย่อยในกระเพาะอาหารหรือลำไส้ (วีรพงศ์, 2536) ฟันของปลาบู่เป็นเขี้ยวยาวแหลมทั้งขากรรไกรบนและล่างมีฟันแหลมซี่เล็กๆ ลักษณะฟันเป็นฟันแถวเดียว (มานพ, 2527)

2. ซี่กรอง (gill raker)

ซี่กรองมีลักษณะคล้ายซี่หวีเรียงกันเป็นแถวอยู่บนแกนเหงือก (gill arch) มีหน้าที่ป้องกันไม่ให้อาหารหรือวัสดุชิ้นใหญ่ที่มากับน้ำติดอยู่ในช่องคอ (จันทกานต์, 2550)

ช่องปากและคอหอย (pharynx)

ช่องปากและคอหอยเป็นบริเวณที่อยู่ถัดจากอุ้งปากลงไปก่อนถึงหลอดคอ เป็นช่องแคบเหมือนกรวยก่อนจะนำไปสู่หลอดคอ ช่วงนี้จะสั้นและมีซี่กรองยื่นล้ำเข้ามา ทำหน้าที่สกัดกั้นหรือกรองอาหารแล้วส่งผ่านไปยังหลอดคอ

หลอดอาหาร (esophagus)

หลอดอาหารเป็นส่วนที่อยู่ระหว่างปากและกระเพาะอาหาร เป็นหลอดหรือท่อที่แท้จริง แต่สั้นมาก เนื่องจากปลาไม่มีคอ หลอดคอจะแคบกว่าช่องคอเล็กน้อย ทำหน้าที่เป็นทางผ่านของอาหารจากปากลงสู่กระเพาะอาหาร

กระเพาะอาหาร (stomach)

กระเพาะอาหารเป็นส่วนหนึ่งของระบบทางเดินอาหารมีหน้าที่ในการย่อยและดูดซึมสารอาหาร ปลาแต่ละชนิดจะมีขนาดและรูปร่างของกระเพาะอาหารแตกต่างกันขึ้นกับพฤติกรรมการกินอาหาร ระยะเวลาในการพัฒนาของกระเพาะอาหารจนทำหน้าที่ได้อย่างสมบูรณ์แตกต่างกันไปในปลาแต่ละชนิด กระเพาะอาหารแบ่งเป็น 2 ส่วน คือ กระเพาะอาหารส่วนต้น (cardiac portion) และกระเพาะอาหารส่วนปลาย (pyloric portion) ทั้งส่วนต้นและส่วนปลายไม่มีเส้นแบ่งเขตให้เห็นชัดเจน แต่พิจารณาจากที่ตั้งและลักษณะบางประการ คือ ส่วนต้นอยู่ติดกับหลอดคอ และยื่นเข้ามาในช่องท้องเล็กน้อย ลักษณะเป็นท่อตรง เนื้อบางกว่า มีขนาดเกือบเท่าหลอดคอ แต่อาจขยายใหญ่กว่าหลอดคอ ผิวพื้นย่นขรุขระเป็นคลื่นวิ่งไปตามส่วนกว้าง ทำให้เกิดสันเล็กๆ จำนวนมากในบริเวณนั้น เมื่อมาถึงกระเพาะอาหารส่วนปลายจะมีขนาดใหญ่ขึ้น กล้ามเนื้อหนาขึ้น ผิวภายในเป็นรอยย่นถี่เล็กลงและไม่สม่ำเสมอกัน ผิวด้านนอกเรียบเช่นเดียวกับส่วนต้น และมีต่อมเล็กๆ ทำหน้าที่ขับน้ำย่อย เซลล์บุผนังกระเพาะอาหารประกอบด้วยเซลล์ที่เรียกว่า ออกซินติค เซลล์ (oxyntic cell) ซึ่งสามารถผลิตเปปซิน (pepsin) และกรดเกลือ (HCl) ออกมาทำหน้าที่ย่อยอาหาร และมีผลทำให้กระเพาะอาหารมีสภาพเป็นกรด แม้ว่ากระเพาะอาหารจะมีสภาพเป็นกรดเมื่อมีการย่อยอาหาร แต่ผนังกระเพาะอาหารก็มีเซลล์ผลิตเมือก (mucous cell) ซึ่งผลิตสารพวกไซอาโลมิวซิน (sialomucins) หรือซัลโฟมิวซิน (sulfomucins) ออกมาทำหน้าที่เคลือบผนังกระเพาะอาหารเพื่อป้องกันการย่อยโดยน้ำย่อย (จันทกานต์, 2550 อ้างถึง Smith, 1989) ซึ่งจากการศึกษาของ ศิริลักษณ์ (2551) พบว่าลักษณะกระเพาะอาหารของปลาบู่มีรูปร่างแบบตัวไอ (I-shape) และมีอัตราส่วนความยาวลำตัวต่อความยาวทางเดินอาหาร จากตัวอย่างปลา 113 ตัว มีความยาวลำตัวเฉลี่ย 22.96±2.79 เซนติเมตร ความยาวทางเดินอาหารเฉลี่ย 10.19±1.96เซนติเมตร มีอัตราส่วนความยาวลำตัวต่อความยาวทางเดินอาหารเท่ากับ 1 : 0.44±0.042.1.5.

ลำไส้ (intestine)

ลำไส้ของปลาแบ่งออกเป็นสองส่วน ได้แก่ มิดกัท (midgut) และฮายกัท (hindgut) ซึ่งมีลักษะทางกายวิภาคใกล้เคียงกัน โดยเป็นท่อยาวไปตลอดความยาวของช่องท้องไปเปิดออกบริเวณช่องทวาร มิดกัทจะมีทั้งเซลล์หลั่งน้ำย่อย (secretory cell) และเซลล์ผลิตเมือก ในขณะที่ฮายกัทมีเฉพาะเซลล์ผลิตเมือก โดยเซลล์หลั่งน้ำย่อยสามารถหลั่งน้ำย่อยหรือเอนไซม์ออกมาย่อยโปรตีน คาร์โบไฮเดรตและไขมัน ส่วนเซลล์ผลิตเมือกจะผลิตสารจำพวก มิวโคโพลีแซคคาไรด์ (mucopolysaccharide) ออกมาเคลือบลำไส้เพื่อป้องกันการย่อยโดยน้ำย่อย รอยต่อของมิดกัทและฮายกัทเมื่อดูด้วยสายตาไม่สามารถแยกกันได้อย่างชัดเจน แต่ปลาบางชนิด เช่น ปลาแชนเนล แคทฟิช อาจมี อิลิโอซีคาล วาล์ว (ileocecal valve) ที่สามารถใช้แยกความแตกต่างได้ (จันทกานต์, 2550)

ธำรงค์ และคณะ (2545) ได้ทำการศึกษาลักษณะบางประการในระยะวัยอ่อนของลูกปลาบู่ โดยนำลูกปลาที่ฟักออกมาใหม่มาศึกษาการยุบตัวของไข่แดงพบว่าลูกปลาที่ฟักออกมาใหม่มีความยาวเฉลี่ย 2.39±0.12 มิลลิเมตร ปริมาณของไข่แดงเฉลี่ย 55.32±14.85 ลูกบาศก์ไมโครเมตร โดยไข่แดงจะยุบตัวลงอย่างสมบูรณ์ประมาณ 82 ชั่วโมงหลังจากฟักออกมาเป็นตัว การพัฒนาของปากพบว่าที่ 32 ชั่วโมงหลังจากฟัก ตัวปากของลูกปลาจะเริ่มเปิด และเมื่อมีการศึกษาการเริ่มกินอาหารของลูกปลาบู่ที่อายุ 15 วันหลังจากที่มีการฟักออกมาเป็นตัว โดยใช้โรติเฟอร์เป็นอาหาร พบว่าที่ 80 ชั่วโมงหลังจากฟักออกเป็นตัวมีการเริ่มกินอาหารของลูกปลา และเมื่อศึกษาการอดอาหารจนตายในลูกปลาบู่พบว่าลูกปลาบู่จะเริ่มตายที่ 84 ชั่วโมงหลังจากฟักเป็นตัว และจะตายที่ 130 ชั่วโมง

Abol-Munafi et al. (2006) ทำการศึกษาจุลกายวิภาคศาสตร์ของการพัฒนาระบบย่อยอาหารในตัวอ่อนปลาบู่ (*Oxyeleotris marmoratus*) พบว่า การพัฒนาของระบบย่อยอาหารในตัวอ่อนปลาบู่ marble goby *Oxyeleotris marmoratus* โดยศึกษาจุลกายวิภาคศาสตร์ในลูกปลาบู่ที่อายุ 2 ถึง 35 วันหลังจากฟักออกเป็นตัว โดยตัวอ่อนอายุ 4-5 วันหลังจากที่ฟักเป็นตัวจะยังมีถุงไข่แดงติดอยู่ อย่างไรก็ตามได้มีการให้ลูกปลาที่อายุ 2 วันหลังจากที่ฟักเป็นตัวกินอาหารภายนอก หลังจากนั้นทำการศึกษาตัวอย่างบริเวณย่อยอาหาร 5 ตำแหน่ง : ช่องปาก หลอดอาหาร กระเพาะอาหาร ลำไส้เล็ก และลำไส้ใหญ่ พบว่าในช่วงแรกส่วนของบริเวณลำไส้เริ่มมีการทำงาน แต่อย่างไรก็ตามพบว่ากระเพาะอาหารยังพัฒนาไม่สมบูรณ์ โดยในช่วงแรกการดูดซึมของลำไส้จะเริ่มในลูกปลาที่อายุ 3 วันหลังจากฟักออกเป็นตัว พบว่ามี lipid vacuoles บริเวณลำไส้ใหญ่ ตัวอ่อนจะเริ่มมี

การดูดซึมโปรตีนในวันที่ 5 หลังจากนั้นกระเพาะอาหารจะเริ่มสมบูรณ์ตั้งแต่วันที่ 10 ถึง 15 วัน มีชั้นกล้ามเนื้อวงกลมซึ่งจะกลายเป็นกล้ามเนื้อ muscularis external ตับและตับอ่อนจะพัฒนาอย่างสมบูรณ์ในช่วงแรกของตัวอ่อน หลังจากระยะ metamorphosis จะพบต่อม gastric gland ในลูกปลาที่อายุ 30 วัน สามารถชี้ให้เห็นว่าระบบการย่อยอาหารในปลาบู่สมบูรณ์

Sharifuzzaman et al. (2014) ศึกษาลักษณะการเจริญเติบโต ระบบการย่อยอาหารและปัจจัยความเครียดในปลา rainbow trout ที่กินอาหารเสริมโปรไบโอติกส์ *Kocuria* (SM1) และ *Rhodococcus* (SM2) จากการศึกษาเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่าเมื่อให้อาหารเสริมโปรไบโอติกส์ *Kocuria* (SM1) และ *Rhodococcus* (SM2) เป็นเวลา 14 วันพบว่าการเจริญเติบโตไม่มีความแตกต่างกัน (P>0.05), อย่างไรก็ตามการเสริม SM2 มีแนวโน้มช่วยเพิ่มอัตราการเจริญเติบโต ซึ่งจะพบ SM1 หรือ SM2 หลังจาก 7 วันที่ให้กินอาหารและก็จะเพิ่มสูงสุด ประมาณ 90–100% ของจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด เมื่อผ่านไป 14 วัน หลังจากนั้นโปรไบโอติกส์ภายในลำไส้ก็จะตายและลดลงในที่สุด

เอนไซม์ในระบบย่อยอาหาร

อาหารที่เข้าไปในทางเดินอาหารจะถูกย่อยให้มีขนาดเล็กพอที่จะดูดซึมผ่านเซลล์เยื่อบุทางเดินอาหารเข้าไปในกระแสโลหิต การย่อยเกิดที่ทางเดินอาหารระดับต่างๆ ซึ่งต้องอาศัยการทำงานของเอนไซม์ และปฏิกิริยาเคมีที่สลับสับซ้อน กลไกต่างๆ เหล่านี้เป็นเรื่องเฉพาะของทางชีวเคมี (นิวุฒิ, 2534) โดยโปรตีนจะถูกย่อยเป็นกรดอะมิโนส่วนไขมันจะถูกย่อยเป็นกรดไขมันและกลีเซอรอล และคาร์โบไฮเดรตถูกย่อยเป็นน้ำตาลกระบวนการเหล่านี้จำเป็นต้องมีเอนไซม์ย่อยอาหารหรือน้ำย่อยมาทำหน้าที่ย่อยอาหารก่อนเพื่อนำไปเผาผลาญให้ได้พลังงานต่อไป การย่อยอาหารของปลาจะเกิดขึ้นที่กระเพาะอาหารหรือลำไส้เท่านั้นเนื่องจากมีเอนไซม์อยู่หลายชนิด (วีรพงศ์, 2536)

เอนไซม์ย่อยคาร์โบไฮเดรต

คาร์โบไฮเดรตที่ร่างกายได้รับเข้าไปมาจากแป้ง (starch) ซึ่งเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) ขนาดใหญ่มีในอาหารหลายอย่าง ที่สำคัญคือ ข้าว น้ำตาลซูโครส แล็กโทส ซึ่งได้จากน้ำนม นอกจากนั้นยังมีคาร์โบไฮเดรตอย่างอื่นๆ อีก เช่น ไกลโคเจน ฟรักโทส แอลกอฮอล์ กรดแลคติก กรดไพรูวิค เพคติน (pectin) เดกซ์ตริน (dextrin) เซลลูโลสเป็นคาร์โบไฮเดรตที่ร่างกาย

รับเข้าไป แต่ร่างกายไม่มีเอนไซม์ย่อยเซลลูโลส การย่อยในปากและในกระเพาะอาหารไม่ค่อยสำคัญนัก เพราะอาหารอยู่ในปากชั่วระยะเวลาอันสั้นและในกระเพาะอาหารมีกรดทำให้เอนไซม์สำหรับย่อยคาร์โบไฮเดรตหยุดทำงาน ในลำไส้เล็กแป้งถูกย่อยโดยน้ำย่อยที่สร้างในลำไส้เล็กเองและที่คัดหลั่งจากตับอ่อน สิ่งคัดหลั่งจากตับอ่อนคล้ายกับน้ำลาย คือ มีอัลฟาอะไมเลส ซึ่งสามารถย่อยแป้งเป็นมอลโทส (maltose) และไอโซมอลโทส (isomaltose) ได้ ดังนั้นเมื่ออาหารผ่านจากกระเพาะเข้าไปในลำไส้จะถูกย่อยโดยเอนไซม์อะไมเลสทันที จึงทำให้แป้งถูกย่อยเป็นมอลโทสหมดก่อนที่จะผ่านจากเจจูนัมไป และอะไมเลสจากตับอ่อนยังมีฤทธิ์ย่อยแรงกว่าจากต่อมน้ำลาย คือสามารถย่อยแป้งที่มีเซลลูโลสหุ้มได้ด้วย (นิวุฒิ , 2534)

การย่อยโดยเอนไซม์ของลำไส้เล็ก เซลล์ของลำไส้เล็กมีเอนไซม์ สำหรับย่อยคาร์โบไฮเดรต 4 ชนิด คือ แลคเตส ซูเครส มอลเตส และไอโซมอลเตส ซึ่งสามารถย่อยไดแซคคาไรด์ (disaccharide) พวกแล็กโทส ซูโครส มอลโทส และไอโซมอลโทสให้เป็นโมโนแซคคาไรด์ เมื่อไดแซคคาไรด์ ผ่านบรัชบอร์เดอร์ (brush border) ของเซลล์ จะถูกย่อยเป็น โมโนแซคคาไรด์ แล้วจะถูกดูดซึมเข้าไปในกระแสเลือด ตามปกติอาหารจะมีแป้งเป็นส่วนใหญ่ ส่วนน้อยเป็นน้ำตาล เพราะฉะนั้นคาร์โบไฮเดรต ประมาณร้อยละ 80 จึงได้จากแป้ง

อะไมเลสเป็น extracellular enzyme ในปลากินพืช และปลากินพืชและเนื้อ ส่วนใหญ่จะได้มาจากการหลั่งของผนังลำไส้ กระเพาะอาหาร ตับ ตับอ่อน และไส้ติ่ง ในขณะที่ปลากินเนื้อส่วนใหญ่ เช่น ปลากะพงขาว ปลาเรนโบว์ เทร้า เป็นต้น มักจะหลั่งออกมาจากตับอ่อนแหล่งเดียวเท่านั้นจึงทำให้ปลากินเนื้อมีประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรตไม่ดี เพราะหลั่งเอนไซม์ออกมาในปริมาณที่น้อยกว่า (วีรพงศ์, 2536) อะไมเลสทำหน้าที่ย่อยสลายพันธะ α-D-1,4-glycosidic ของสายพอลิแซ็กคาไรด์ในอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรต เช่น แป้ง (starch) ซึ่งประกอบด้วยพอลิเมอร์ 2 ชนิด คือ อะไมโลส (amylose) และอะไมโลเพกติน (amylopectin) อะไมเลสสามารถย่อยสลาย อะไมโลสได้เป็นโอลิโกแซ็กคาไรด์ และส่วนใหญ่ได้เป็นไดแซ็กคาไรด์คือ มอลโทส อะไมเลสมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 50,000 ดาลตัน ถูกกระตุ้นด้วยคลอไรด์ โบรไมด์ และฟลูออไรด์ไอออน และถูกยับยั้งปฏิกิริยาโดยโลหะหนัก เช่น ตะกั่ว แคดเมียม และปรอท มี pH ที่เหมาะสมในช่วง 6.5-8.0 (จันทกานต์, 2550)

ประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate digestibility) ประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรตของปลาขึ้นอยู่กับชนิดของปลา ชนิดของแป้งปริมาณแป้ง และความสุกของแป้ง ปลากินพืชมีประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรตดีกว่าปลากินเนื้อ และปลากินพืชและเนื้อ เนื่องจากปลากินพืชมีเอนไซม์ย่อยคาร์โบไฮเดรตในปริมาณที่มากกว่าคาร์โบไฮเดรตที่ปลากินเป็นอาหาร ได้แก่ แป้ง น้ำตาลและกลูโคส โดยพบว่าปลาสามารถใช้ประโยชน์จากแป้งได้มากที่สุด

สาเหตุดังกล่าวเกิดจากเมื่อแป้งถูกย่อยเป็นน้ำตาลจะถูกดูดซึมไปใช้ประโยชน์อย่างช้าๆ เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำตาลซึ่งจะถูกดูดซึมเร็วกว่า ทำให้น้ำตาลในเลือดสูงอย่างรวดเร็วจนทำให้น้ำตาลบางส่วนถูกขับออกนอกร่างกายทางปัสสาวะโดยยังไม่ได้ใช้ประโยชน์ (กลุ่มวิจัยอาหารสัตว์น้ำ, 2534) ปริมาณแป้งที่เหมาะสมในอาหารปลาแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันเนื่องจากปลากินพืชย่อยแป้งได้ดีกว่าปลากินเนื้อทำให้สามารถใช้ประโยชน์จากแป้งได้ดีกว่าปริมาณแป้งที่เหมาะสมในอาหารปลากินพืช ปลากินพืชและเนื้อ และปลากินเนื้อ ควรอยู่ระหว่าง 40-50 เปอร์เซ็นต์ 30-40 เปอร์เซ็นต์ และ 10-20 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ การทำให้แป้งสุกจะช่วยให้ปลาย่อยแป้งได้ดีขึ้นและทำให้ประสิทธิภาพการย่อยสูงขึ้นประมาณ 25-30 เปอร์เซ็นต์ (กลุ่มวิจัยอาหารสัตว์น้ำ, 2534)

เอนไซม์ย่อยไขมัน

การย่อยไขมัน ไขมันในอาหารส่วนใหญ่เป็นไขมันที่เป็นกลาง (neutral fat) ซึ่งเรียกว่า ไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) นอกจากนี้ยังมี ฟอสโฟลิปิด โคเลสเตอรอล และเอสเตอร์ของโคเลสเตอรอล ไตรกลีเซอไรด์ขนาดเล็กถูกย่อยโดยเอนไซม์ไลเปสในกระเพาะอาหาร (gastric lipase) บ้าง แต่ไม่ค่อยสำคัญ การย่อยไขมันในลำไส้เล็ก ขั้นแรกของการย่อยคือ ทำให้ไขมัน แตกออกเป็นชิ้นเล็กๆ เพื่อให้เอนไซม์เข้าไปสัมผัสกับไขมันได้มาก เรียกวิธีนี้ว่า อีมัลสีฟิเคชัน (emulsification) ซึ่งทำได้โดยน้ำดี น้ำดีมีเกลือน้ำดีซึ่งส่วนคาร์บอกซีล (carboxyl part) ละลายได้ดีในน้ำ แต่ส่วนสเตอรอล (sterol part) ละลายได้ดีในไขมัน ดังนั้น เกลือน้ำดีจะทำให้ความตึงผิวของไขมันลดลงเมื่อได้รับความสะเทือนไขมันจะแตกตัวเป็นชิ้นเล็ก ๆ เมื่อ เปรียบเทียบการย่อยไขมันโดยไลเปส (lipase) จากตับอ่อนและจากลำไส้ แล้วพบว่า ไลเปสจากตับอ่อนมีความสำคัญมาก ส่วนไลเปสจากลำไส้มีบทบาทน้อย เมื่อย่อยแล้วจะได้กลีเซอรอล (glycerol) และกรดไขมัน (fatty acid) (นิวุฒิ , 2534)

ไลเปส หรือ กลีเซอรอล เอสเทอร์ ไฮโดรเลส (EC 3.1.1.3) (Seitz, 1974) ส่วนใหญ่ได้มาจากการหลั่งของผนังลำไส้และตับอ่อน (Hepher, 1988) จัดเป็นเอนไซม์ที่อยู่ในกลุ่มไฮโดรเลส (hydrolases) มี pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานประมาณ 7-8.8 ซึ่ง pH จะเพิ่มขึ้นตามความยาวของกรดไขมันในโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ หน้าที่ คือ เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ระหว่างกรดไขมันโมเลกุลยาวกับกลีเซอรอลในโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ได้เป็นไดกลีเซอไรด์ ไตรกลีเซอไรด์บางส่วนที่ไม่ถูกย่อย โมโนกลีเซอไรด์ กรดไขมัน และกลีเซอรอล ไลเปสของปลามีประสิทธิภาพการทำงานดีกว่าสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น ไลเปสของปลาเทอร์โบท์ (turbot) ปลาไพค์-เพิช (pike-perch) และปลาบรีม (bream) มีมากกว่าสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมประมาณ 40 เท่า (Ananichev,

1959) ไลเปสจะทำงานร่วมกับน้ำดีซึ่งมีกรดโคลิก และกรดทอโรเชนโนเดสออกซีโคลิก เป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ โดยจะทำหน้าที่ร่วมกันย่อยไขมันอย่างมีประสิทธิภาพเนื่องจากกรดเหล่านี้รวมทั้งน้ำดีจะช่วยทำให้ไขมันมีพื้นที่ผิวมากขึ้น ดังนั้นเอนไซม์ไลเปสจึงสามารถย่อยได้ง่ายขึ้น ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ย่อยไขมันในกระเพาะอาหารต่ำกว่าลำไส้ เนื่องจากกระเพาะอาหารมีสภาพเป็นกรดต่ำมากจึงมีหน้าที่เพียงบดผสมไขมันเพื่อส่งเข้าลำไส้ จากนั้นเอนไซม์จากตับอ่อน คือ แพนครีเอติกไลเปส (pancreatic lipase) และเอนไซม์จากผนังลำไส้ คือ อินเทสตินัลไลเปส (intestinal lipase) จะเข้าทำการย่อยต่อทำให้โมเลกุลของไขมันในรูปของไตรกลีเซอไรด์แตกตัวเป็นไดกลีเซอไรด์ โมโนกลีเซอไรด์ กลีเซอรอล และกรดไขมันอิสระ ทั้งกลีเซอรอลและกรดไขมันมีขนาดของโมเลกุลเล็กพอที่ร่างกายดูดซึมไปใช้ได้ (จันทกานต์, 2550)

ประสิทธิภาพการย่อยไขมัน (lipid digestibility) โดยทั่วไปปลามีประสิทธิภาพการย่อยไขมันได้ดีเพราะปลาส่วนมากมีความต้องการไขมันในปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับโปรตีนและอีกทั้งปริมาณไขมันที่มีในอาหารธรรมชาติหรืออาหารสำเร็จรูปก็อยู่ในเกณฑ์ต่ำจึงทำให้เอนไซม์ย่อยไขมันสามารถย่อยได้ดี ประสิทธิภาพการย่อยไขมันของปลาขึ้นอยู่กับองค์ประกอบหรือชนิดของกรดไขมัน โดยพบว่าประสิทธิภาพการย่อยไขมันมีค่าลดลงเมื่อความยาวของไฮโดรคาร์บอนเพิ่มขึ้น และมีค่าเพิ่มขึ้นถ้าจำนวนพันธะคู่เพิ่มขึ้น ดังนั้นปลาจึงมีแนวโน้มที่จะย่อยกรดไขมันไม่อิ่มตัว เช่น กรดไขมันจากพืชได้ดีกว่ากรดไขมันจากสัตว์ซึ่งเป็นกรดไขมันอิ่มตัว (วีรพงศ์, 2536)

เอนไซม์ย่อยโปรตีน

การย่อยโปรตีน โปรตีนถูกย่อยโดยเอนไซม์เพ็ปซิน (pepsin) จากกระเพาะอาหาร ค่า pH ที่เหมาะสำหรับการย่อยคือ 2-3 และถ้าสูงถึง 5 เพ็ปซินจะทำงานไม่ได้เลย กรดไฮโดรคลอริกที่หลั่งออกมาจากกระเพาะมีค่า pH ประมาณ 0.8 แต่เมื่อคลุกเคล้ากับอาหารจะทำให้ค่า pH สูงขึ้นจนเหมาะสำหรับการย่อย เพ็ปซินสามารถย่อยโปรตีนชนิดต่างๆ ได้ และที่สำคัญ คือ สามารถย่อยคอลลาเจน (collagen) ซึ่งเอนไซม์ชนิดอื่นย่อยไม่ค่อยได้ โปรตีนถูกย่อยให้กลายเป็นโปรเตโอส (proteose) เปปโตน (peptone) และโพลีเพ็ปไทด์ (polypeptide) ขนาดใหญ่เข้าสู่ลำไส้เล็ก และการย่อยโปรตีนที่ลำไส้เล็กอาศัยน้ำย่อยจากตับอ่อน แล้วถูกย่อยต่อไปโดยเอนไซม์ทริปซิน (trypsin) ให้กลายเป็น ไดเพ็ปไทด์ (dipeptide) เป็นส่วนใหญ่ หรือเป็นโพลีเพ็ปไทด์ขนาดเล็ก นอกจากนี้ยังมี ไคโมทริปซิน (chymortypsin) และคาร์บอกซีโพลีเพ็ปทิเดส (carboxy polypeptidase) ซึ่งมีฤทธิ์คล้ายกับทริปซิน คือ ไคโมทริปซิน ทำการย่อยเพ็ปไทด์ลิงเคจ (peptide linkage) ชนิดอื่น และคาร์บอกซีโพลีเพ็ปไทด์ ย่อยโพลีเพ็ปไทด์บางอย่างให้เป็นกรดอะมิโน ในเซลล์ลำไส้เล็กมี

เอนไซม์โพลีเพ็ปไทด์ และไดเพ็ปไทด์ ซึ่งจะถูกย่อยให้กลายเป็นกรดอะมิโน เมื่อพวกเพ็ปไทด์ผ่านเซลล์ก็จะถูกย่อยให้กลายเป็นกรดอะมิโนและถูกดูดซึมเข้ากระแสเลือด (Basic Human Anatomy, 2006)

ทริปซิน (EC 3.4.21.4) ที่บริเวณเร่งปฏิกิริยามีความจำเพาะต่อ กรดอะมิโนอาร์จินีนและไลซีน สารยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ คือ tosyl-lysine chlormethyl ketone (TLCK), leupeptin และสารยับยั้งตามธรรมชาติ เช่น soybean trypsin inhibitor (SBTI) มี pH ที่เหมาะสมในการทำงานอยู่ในช่วง 7-9 ถูกหลั่งออกมาจากตับไปยังลำไส้เล็กในรูปที่ยังไม่สามารถทำงานได้เรียกว่า ทริปซิโนเจน ถูกเปลี่ยนเป็นทริปซิน โดยเอนไซม์เอนเทอโรไคเนสและเอนไซม์ทริปซินเองการกระตุ้นโดยเอนเทอโรไคเนสเกิดขึ้นที่ pH ประมาณ 6-9 และทริปซินที่เกิดขึ้นนี้สามารถกระตุ้นทริปซิโนเจนที่เหลือไปเป็นทริปซินได้ที่ pH ประมาณ 7-8 (จันทกานต์, 2550)

ไคโมทริปซิน (EC 3.4.21.1) ที่บริเวณเร่งปฏิกิริยามีความจำเพาะต่อกรดอะมิโนไทโรซีน ทริปโตเฟน และเฟนิลอะลานีน สารยับยั้งการทำงาน คือ tosyl-phenylalaninechlormethyl ketone (TPCK) และ chymostatin ถูกหลั่งออกมาจากตับไปยังลำไส้เล็กในรูปที่ยังไม่สามารถทำงานได้ เรียกว่า ไคโมทริปซิโนเจน ถูกเปลี่ยนเป็นไคโมทริปซิน โดยเอนไซม์ทริปซิน (จันทกานต์, 2550)

ประสิทธิภาพการย่อยโปรตีน (protein digestibility) โดยทั่วไปเอนไซม์ย่อยอาหารในปลามีประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนได้ดี โดยปลากินเนื้อมีประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนดีที่สุดเพราะมีเอนไซม์ย่อยโปรตีนในปริมาณมากที่สุด ยกเว้นปลากินพืชบางชนิดที่มีความสามารถในการย่อยโปรตีนได้ดีเช่นกัน ตัวอย่างมีการทดลองในปลาหมอเทศซึ่งจัดเป็นปลากินพืช เมื่อได้รับอาหารเป็นตับแกะ สาหร่ายและอินทรียวัตถุ พบว่าสัมประสิทธิ์การย่อยอาหารมีค่าเป็น 95 79 และ 42 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ปลาส่วนใหญ่สามารถใช้แหล่งโปรตีนจากสัตว์ได้ดีกว่าแหล่งโปรตีนจากพืชเนื่องจากย่อยได้ง่ายกว่า (วีรพงศ์, 2536)

การศึกษาวิจัยเอนไซม์ย่อยอาหารในสัตว์น้ำ

สัตว์น้ำส่วนใหญ่มีเอนไซม์ย่อยโปรตีน คาร์โบไฮเดรตและไขมันเหมือนกันแต่ปริมาณของเอนไซม์แต่ละชนิดแตกต่างกันไปตามนิสัยการกินอาหารของสัตว์น้ำ ซึ่งได้มีผู้ศึกษาเอนไซม์ในสัตว์น้ำต่างๆ ไว้ดังนี้

Dany et al. (1995) ได้ตั้งสมมติฐานว่าการทำงานของเอนไซม์ย่อยอาหารนั้นสามารถใช้ศึกษาการเจริญเติบโตของปลาได้ โดยทำการตรวจวัดในกล้ามเนื้อขาวของปลา Atlantic

cod (*Gadus morhua*) ซึ่งจะมีอัตราการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน เป็นความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ไกลโคไลติก 2 เอนไซม์ และอัตราการเจริญเติบโตจะสังเกตได้จากการทำงานของเอนไซม์แสดงออกมาในหน่วยของยูนิตต่อกรัมน้ำหนักเปียกและน้ำหนักแห้งของโปรตีนและดีเอนเอในกล้ามเนื้อซึ่งจะมีผลตอบสนองต่ออัตราการเจริญเติบโต โดยจะสังเกตได้จากการทำงานของเอนไซม์ไพรูเวตไคเนส และเอนไซม์แลคเตส ดีไฮโดรจีเนส ที่แสดงออกมาเป็นหน่วยยูนิตต่อไมโครกรัมดีเอนเอ ซึ่งสามารถใช้เป็นตัวชี้วัดอัตราการเจริญเติบโตในปลาธรรมชาติได้ ในทางตรงกันข้ามการทำงานของเอนไซม์ออกซิเดทีฟและอัตราการเจริญเติบโต จะสังเกตได้จากการทำงานของเอนไซม์ไซโตโครม ซี ออกซิเดส และ เอนไซม์ซิเตรต ซินเทส ที่แสดงออกเป็นหน่วยยูนิตต่อกรัมโปรตีน อย่างไรก็ตามความสามารถในการดึงออกซิเจนเข้าไปในกล้ามเนื้อของปลา cod ยังไม่เด่นชัดว่าช่วยเพิ่มอัตราการเจริญเติบโต

Giri et al. (2000) ได้ทำการศึกษาระบบการย่อยอาหารและการทำงานของเอนไซม์ในปลา *Clarias batrachus* (Linn.) ระยะวัยรุ่น โดยให้กินปลาป่นและอวัยวะภายในของไก่รวมกันโดยใช้ น้ำมันเป็นตัวกลางในการจับตัวก้อนเป็นก้อน ซึ่งระดับของสารอาหารที่ได้จากเศษเหลือนำมาศึกษาความสามารถในการย่อยต่อไป พบว่าไม่มีความแตกต่างกันเมื่ออาหารที่มีความแตกต่างและพบเอนไซม์ไลเปส 19.59% ในปลา catfish และเอนไซม์อะไมโลไลติก และเอนไซม์โปรติโอไลติกจะพบในลำไส้ ซึ่งการทำงานของเอนไซม์โปรตีเอสจะลดลงเมื่อมีการแทนที่ของโปรตีนจากสัตว์ โดยโปรตีนจากพืชจะลดลง ($P < 0.01$) และการทำงานของเอนไซม์แอสพาเตท อะมิโนทรานเฟอร์เรสจะพบ 22% ในอาหารที่ให้ปลากิน และองค์ประกอบของไขมันบนลำตัวจะเพิ่มขึ้นเมื่อปลากินอาหารที่มีระดับของไขมันเพิ่มขึ้น

Blier et al. (2002) ได้ทำการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบระบบเมตาบอลิก และการทำงานของเอนไซม์ย่อยอาหารในปลาที่มีประสิทธิภาพการเจริญเติบโตแตกต่างกัน โดยทำการวัดการทำงานของเอนไซม์ย่อยอาหารดังนี้ ทริปซินและไคโมทริปซินในไพโลริกซีกา เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในลำไส้เล็ก เอนไซม์ไพรูเวตไคเนส เอนไซม์แลคเตต ดีไฮโดรจีเนส และเอนไซม์ซิเตรท ซินเทสในเหงือกและกล้ามเนื้อขาว จากการศึกษาพบว่าในปลา salmon จะมีการทำงานของเอนไซม์แลคเตต ดีไฮโดรจีเนส สูงมากในกล้ามเนื้อ ในทางตรงกันข้ามการทำงานของเอนไซม์ไคโมทริปซินในไพโลริกซีกา จะมีค่าการทำงานสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมและจะพบว่าการทำงานของเอ็นไซม์ซิเตรท ซินเทส เอนไซม์ทริปซิน และเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยจากการศึกษาพบว่าการทำงานของเอนไซม์ไม่มีความสัมพันธ์ต่ออัตราการเจริญเติบโตที่เพิ่มขึ้นในปลาแซลมอน

Rathore et al. (2005) รายงานผลการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหารจากปลาคาร์พ *Catla catla* ระหว่างการเจริญเติบโต สามารถตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส โปรติเนส ทริปซิน ไคโมทริปซิน และไลเปส ได้ตั้งแต่วันที่ 4 หลังจากฟักออกจากไข่และมีค่าค่อนข้างคงที่จนถึงวันที่ 22 จากนั้นมีกิจกรรมเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนถึงวันที่ 32 จึงมีกิจกรรมลดลงซึ่งอาจสัมพันธ์กับวันที่ 21 การเปลี่ยนแปลงทางด้านกายวิภาคและสรีรวิทยาก่อนที่จะเข้าสู่ระยะตัวเต็มวัย ยกเว้นเอนไซม์ไคโมทริปซินมีค่าคงที่ การเปลี่ยนแปลงของระบบย่อยอาหารระหว่างการเจริญเติบโตในช่วงแรกเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงความต้องการสารอาหารและเริ่มกินอาหารจากภายนอก ซึ่งมีความสำคัญมากต่อการเพาะเลี้ยง การให้อาหารและการสร้างสูตรอาหาร

Van et al. (2005) ได้ศึกษาผลของอาหารที่แตกต่างกันต่อการทำงานของ เอนไซม์โปรติโอไลติกในระยะแรกของตัวอ่อนปลาบู่ พบว่าระดับของเอนไซม์ทริปซิน ไคโมทริปซิน ในตัวอ่อนของปลาบู่กินอาหารที่แตกต่างชนิดกันโดยเลี้ยงในน้ำสะอาดจะมีค่า 3.635-3.916 U/mg และ 1.034-1.204 U/mg ในเนื้อเยื่อ ในขณะที่ปลาบู่ที่กินอาหารโดยเลี้ยงในน้ำเขียวจะมีระดับของเอนไซม์ที่สูง 5.274-5.873 U/mg และ 1.556-2.236 U/mg ในเนื้อเยื่อ เมื่อทำการเปรียบเทียบชุดการทดลองโดยใช้น้ำเขียวพบว่ามีระดับเอนไซม์ทริปซินและไคโมทริปซินสูง เมื่อสังเกตในตัวอ่อนที่กินอาหารที่มีชีวิต (โคพีพอดผสมกับโรติเฟอร์) อย่างไรก็ตามระดับของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดที่เพิ่มขึ้นนั้นยังไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติระหว่างกลุ่มตัวอ่อนที่กินอาหารที่ต่างกันโดยใช้น้ำสะอาดและกลุ่มที่ใช้น้ำเขียว

Alberta et al. (2007) ได้ทำการศึกษาเอนไซม์ไลเปส โดยการสกัดแล้วทำให้บริสุทธิ์และศึกษาลักษณะทางชีวเคมีบางประการจากอวัยวะภายในของปลา grey mullet (*Mugil cephalus*) โดยได้กล่าวว่าเอนไซม์ไลเปส (ไตรเอซิลกลีเซอรอล เอซิลไฮโดรเลส) เป็นเอนไซม์ที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาไตรกลีเซอรอลตลอดจนมีความสัมพันธ์กับกลีเซอรอลและกรดไขมันอิสระ ซึ่งไลเปสมีส่วนสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ไฮโดรไลติกอื่นๆ เช่น เอนไซม์โปรติเอสและคาร์โบไฮเดรส เป็นต้น ไลเปสจากสัตว์น้ำจะมีน้อยกว่าสัตว์เลี้ยงด้วยนม พืช และจุลินทรีย์

Darwis et al. (2008) ได้ทำการศึกษาผลของชนิดอาหารต่อการเจริญเติบโต อัตราการรอด และการทำงานของเอนไซม์ย่อยอาหารในลูกปลาบู่ พบว่า ลูกปลาบู่หลังจากการฟักไข่ 40 วันที่เลี้ยงด้วยอาร์ทีเมีย มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ SGR 5.32 อัตรารอด 91.3% สูงกว่าลูกปลาบู่ที่เลี้ยงด้วยปลาเป็ดและอาหารเม็ดและค่าเฉลี่ยการทำงานของเอนไซม์ทริปซิน 0.04 mU/mg protein/นาที อะไมเลส 0.114 mg maltose/mg protein/ชั่วโมง และไลเปส 9.58 mU ตามลำดับ

Kemel et al. (2009) ได้ทำการศึกษาเอนไซม์ทริปซินจากลำไส้ปลา Grey triggerfish (*Balistes capriscus*) กับประสิทธิภาพการทำงานในขณะที่อุณหภูมิต่ำ โดยนำมาทำให้บริสุทธิ์และศึกษาลักษณะ พบว่าการทำงานของเอนไซม์ที่อยู่ในช่วงพีเอช 9.0 11.5 และ12.0 จะอยู่ที่ 86.5 92.6 และ 52.4% ตามลำดับ และเมื่อศึกษาในอุณหภูมิที่ต่ำพบว่าจะมีการทำงานสูงสุดที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ซึ่งเอนไซม์ทริปซินและเอนไซม์ที่ทำหน้าที่คล้ายทริปซินเคยมีการแยกและศึกษาลักษณะจากอวัยวะภายในของสัตว์มีกระดูกสันหลังบางชนิดรวมถึงปลาในเขตน้ำอุ่นและน้ำเย็น ประกอบด้วย ศึกษาจากต่อมสร้างน้ำย่อยและตับอ่อนในปลา white shrimp (*Penaeus setiferus*) cuttlefish (*Sepia officinalis*) crayfish (*Astacus fluviatilis*) ศึกษาจากม้ามในปลา skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) และ yellowfin tuna (*Thunnus albacores*) ศึกษาจากไส้ติ่งในปลา Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) tambaqui (*Colossoma macropomum*) และ Monterey sardine (*Sardinops sagaxcaerulea*) ศึกษาบริเวณอวัยวะภายในช่องท้องทั้งหมด ในปลา true sardine (S. *melanostictus*) Japanese anchovy (*Engraulis japonica*) และ sardine (*Sardina pilchardus*) เป็นต้น

Amalia et al. (2009) ได้ทำการศึกษาสรีระวิทยาการย่อยอาหารในปลา common dentex (*Dentex dentex*) โดยศึกษาการทำงานของ เอนไซม์โปรติเอส อะไมเลส และไลเปสในบริเวณกระเพาะอาหาร ไส้ติ่ง ลำไส้ส่วนต้น และลำไส้ส่วนปลาย ที่มีอิทธิพลจากการให้กินขนาดเล็ก โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 4 กลุ่มที่มีระดับอัตราส่วนของโปรตีน:ไขมัน:คาร์โบไฮเดรตแตกต่างกัน (43:16:28, 43:24:4, 38:19:28, 38:2:13) พบว่าการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสที่เป็นกรดนั้น จะพบที่บริเวณกระเพาะอาหาร pH 1.5 และการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสที่เป็นด่างจะมีระดับที่สูง บริเวณไส้ติ่งและลำไส้ส่วนปลาย pH 8.5–9.0 ซึ่งในปลา Dentex จะมีการทำงานของเอนไซม์อะไมเลสสูงในไส้ติ่งและลำไส้ส่วนปลาย และการทำงานของเอนไซม์ไลเปสสูงในไส้ติ่งและลำไส้ทั้ง 2 ส่วน แต่ไม่มีการตรวจพบในกระเพาะอาหาร โดยการกินอาหารจะมีอิทธิพลต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสในลำไส้ทั้งส่วนต้นและปลาย โดยจะพบการทำงานที่สูงในอาหารที่มีระดับโปรตีนต่ำและคาร์โบไฮเดรตสูง อย่างไรก็ตามการทำงานของเอนไซม์อะไมเลสจะพบว่ามีมากบริเวณไส้ติ่งและลำไส้ส่วนปลาย ในกลุ่มปลาที่กินอาหารที่มีคาร์โบไฮเดรตสูงและไขมันต่ำ โดยอาหารที่มีระดับคาร์โบไฮเดรตสูงจะส่งผลให้การทำงานของเอนไซม์ไลเปสสูงตามไปด้วย แต่จะพบการทำงานเพียงบริเวณลำไส้ส่วนต้นเท่านั้น จากการศึกษาสรุปได้ว่าระบบการย่อยอาหารของปลา dentex จะพัฒนาได้ดีขึ้นอยู่กับความสามารถในการย่อยโปรตีน ซึ่งเป็นขั้นตอนที่สำคัญในการย่อยสารอาหารต่างๆ และระดับของคาร์โบไฮเดรตจะมีผลทำให้การทำงานของเอนไซม์โปรติเอส อะไมเลส และไลเปสลดลง

Rungkan et al. (2009) ได้ทำการศึกษาลักษณะและการทำงานของเอนไซม์ย่อยอาหารในปลานิล (*Oreochromis niloticus* L.) ที่มีขนาดแตกต่างกัน พบว่าการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส อะไมเลส และไลเปส จากกระเพาะอาหาร ลำไส้ส่วนต้น ลำไส้ส่วนปลาย และตับ ในปลานิลเพศผู้ ขนาด 5.7 35.8 และ 92.1 กรัม ซึ่งเอนไซม์โปรติเอส จะพบที่ pH 12 9 และ 9 โดยจะพบการทำงานสูงสุดในปลานิลขนาด 35.8 กรัม และการทำงานของเอนไซม์อะไมเลส จะพบที่ pH 6 7 และ 2 ตามลำดับ โดยจะพบการทำงานสูงสุดในปลานิลขนาด 92.1 กรัม และการทำงานของเอนไซม์ไลเปส จะพบที่ pH 8 7 และ 8 ตามลำดับ โดยจะพบการทำงานสูงสุดในปลานิลขนาด 35.8 กรัม จากการศึกษาในปลานิลทุกขนาด จะมีการทำงานของเอนไซม์อะไมเลสที่พบในตับมีค่าสูงกว่าอวัยวะอื่นๆ ($p<0.01$) ในขณะที่เอนไซม์โปรติเอสและไลเปสจะพบการทำงานบริเวณลำไส้ส่วนปลายและลำไส้ส่วนต้นตามลำดับ โดยในปลานิลขนาด 5.7 และ 35.8 กรัมจะมีค่าการทำงานที่สูงกว่าอวัยวะอื่นๆ ($p<0.01$) โดยจากการศึกษาครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าขนาดของปลาที่แตกต่างกันจะมีระดับการทำงานของเอนไซม์ที่ย่อยอาหารแตกต่างกันไปด้วย ซึ่งปลาขนาดกลางจะมีการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส และไลเปสสูง ในขณะที่ปลาขนาดใหญ่จะมีการทำงานของเอนไซม์อะไมเลสสูง โดยผลดังกล่าวใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการสร้างสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อปลานิลที่มีขนาดแตกต่างกัน ระดับสารอาหารเหมาะสมและต้นทุนต่ำ

Tameemi1 et al. (2010) ได้ทำการศึกษาและเปรียบเทียบการทำงานของเอนไซม์แอลฟา อะไมเลส ในกลุ่มปลาตะเพียน ที่มีพฤติกรรมการกินอาหารที่แตกต่างกันในแม่น้ำ Garma อยู่ทางตอนใต้ของอิรัก โดยปลา 3 ชนิด คือ ปลากินพืช bunny (*Barbus sharpeyi*) ปลากินทั้งพืชและเนื้อ common carp (*Cyprinus carpio*) และปลากินเนื้อ shilik (*Aspius vorax*) จากการศึกษาพบว่าการทำงานของเอนไซม์ในปลา common carp ที่พบในแม่น้ำ Garma และที่เลี้ยงในบ่อไม่มีความสัมพันธ์กัน โดยการทำงานของเอนไซม์แอลฟา อะไมเลส จะเด่นชัดมากซึ่งมีอิทธิพลมาจากพฤติกรรมการกินอาหาร โดยระดับการทำงานของเอนไซม์ ในปลา bunny เป็นปลากินพืช จะมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 1.84 U/mg protein ซึ่งมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.01$) รองลงมาในปลา common carp กลุ่มปลากินทั้งพืชและเนื้อ จะมีค่าการทำงานของเอนไซม์ (1.33 U/mg protein) ซึ่งมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.01$) และสุดท้ายในปลา shilik ซึ่งเป็นกลุ่มปลากินเนื้อ จะมีค่าการทำงานของเอนไซม์ (0.76 U/mg protein) โดยตัวอย่างของปลา common carp ที่เก็บตัวอย่างภายในบ่อจะมีการทำงานของเอนไซม์ แอลฟา อะไมเลส สูงถึง 1.92 U/mg protein เมื่อเปรียบเทียบปลา common carp ที่เก็บตัวอย่างจากแม่น้ำ Garma มีค่าการทำงานของเอนไซม์เพียง 1.33 U/mg protein

Manee et al. (2012) ได้ทำการศึกษาการทำงานของเอนไซม์และในระหว่างที่มีการพัฒนาการเจริญเติบโตของปลา green catfish larvae (*Mystus nemurus*) เมื่อกินอาหารที่มีชีวิต โดย

ปลาชนิดนี้เป็นปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจอีกชนิดหนึ่งในการเพาะเลี้ยงปลาน้ำจืดของประเทศไทย โดยทำการศึกษาการพัฒนาของเอนไซม์เปปซิน ทริปซิน และไคโมทริปซิน แอลฟาอะไมเลส และไลเปส พบว่ามีอิทธิพลมาจากการกินอาหารที่มีชีวิตในช่วงเริ่มมีการพัฒนาของตัวอ่อน โดยทำการศึกษาเอนไซม์ตั้งแต่วันที่ 1 จนถึง วันที่ 45 หลังจากฟักเป็นตัว แบ่งเป็น 3 ชุดทดลอง โดยช่วง 3-15 วันหลังจากฟักเป็นตัวจะให้กินไรแดง ช่วง 16-29 วันหลังจากฟักเป็นตัวให้กิน ไรแดงร่วมกับอาหารผง และช่วง 30-45 วันหลังจากฟักเป็นตัว จะให้กินอาหารสำเร็จรูป และทำการเก็บตัวอย่างตัวอ่อนใน 3 ชุดทดลอง โดยเก็บวันที่ 1, 3, 5, 7, 9, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40 และ 45 พบว่าระดับของเอนไซม์ต่ำสุดจะพบในช่วงเริ่มแรกตัวอ่อนเมื่อฟักออกมาและจะคงที่เมื่ออายุ 20 วันหลังจากการฟัก โดยพบว่าการทำงานของเอนไซม์เปปซิน ทริปซิน ไคโมทริปซิน และแอลฟา อะไมเลส ในช่วงอายุ 25-45 วันหลังจากการฟักเป็นตัว มีความแตกต่างกัน ($p<0.05$) ในขณะที่เอนไซม์ไลเปสจะเพิ่มขึ้นในช่วงอายุ 30-45 วันหลังจากการฟัก โดยมีความสัมพันธ์ต่ออัตราการเจริญเติบโตที่เพิ่มขึ้นในตัวอ่อนปลา อายุ 30 วันหลังจากการฟักเป็นตัว ($p<0.05$) โดยไรแดง มีส่วนสำคัญในการช่วยเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ทริปซิน ไคโมทริปซิน และแอลฟาอะไมเลส ในตัวอ่อนปลาที่อายุ 3-15 หลังจากฟักเป็นตัว เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอ่อนปลากลุ่มควบคุม ($p<0.05$).

Namulawa et al. (2013) ได้ทำการศึกษาปลา Nile perch (*Lates niloticus)* ซึ่งเป็นปลาที่มีมูลค่ามากและมีความสำคัญทางเศรษฐกิจในแถบทะเลสาบในแอฟริกา และมีการเพาะเลี้ยงอย่างแพร่หลาย จากผลการศึกษาพบว่าจำนวนของปลาลดลงและขาดทุนในอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงปลา Nile perch จึงมีแนวคิดที่จะฟื้นฟูจำนวนของปลาชนิดนี้ รวมไปถึงการปรับสภาพแวดล้อมให้ปลามีความเคยชิน อย่างไรก็ตามยังขึ้นอยู่กับความสามารถในการย่อยอาหารสำเร็จรูปด้วย นำไปสู่การศึกษาอัตราการรอดของปลาในระบบการเพาะเลี้ยง ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการศึกษาเอนไซม์ในลำไส้อาหารโดยใช้วิธีการมาตรฐาน พบว่ามีการทำงานของเอนไซม์อะไมเลสและทริปซินภายในลำไส้ ซึ่งสามารถชี้ให้เห็นถึงคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนที่อยู่ภายในอาหารสำเร็จรูป สำหรับการเลี้ยงปลาชนิดนี้ หลังจากนั้นทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของการทำงานเอนไซม์ในปลาระยะวัยรุ่น พบว่าสารอาหารมีความสำคัญมากสำหรับปลาระยะนี้ ซึ่งความแตกต่างของสารอาหารจะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงในระยะพัฒนาของปลา

Markus et al. (2013) ได้ทำการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ไลเปส แอลฟาอะไมเลส และไดแซคคาริเดส (ซูเครส มอลเตส ไอโซมอลเตส และทรีฮาเลส) ในกลุ่มปลา Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) ที่อายุแตกต่างกัน โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่เจริญเติบโตช้าและกลุ่มที่เจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว ซึ่งการทำงานของเอนไซม์ย่อยคาร์โบไฮเดรต (แอลฟา อะ

ไมเลสและไดแซคคาริเดส) ไลเปส ทริปซิน และไคโมทริปซิน เปรียบเทียบกันระหว่างปลา Eurasian perch และ Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) พบว่าอัตราการเจริญเติบโตและอายุไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ย่อยอาหารในปลา Eurasian perch โดยการทำงานของเอนไซม์ไลเปสสูงกว่าการทำงานของเอนไซม์คาร์โบไฮเดรต (142.0, 6.2 และ 111.0, 2.5 U/mg protein) ในปลา Eurasian perch และ Arctic char ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบปลา Arctic charr และปลา Eurasian perch จะมีการทำงานของเอนไซม์ไลเปสสูงในตับอ่อนและมีการทำงานของเอนไซม์ไลเปสต่ำในไส้ติ่งและลำไส้ส่วนกลาง และการทำงานของเอนไซม์ไคโมทริปซินสูงกว่าการทำงานของเอนไซม์ทริปซินในปลาทั้ง 2 ชนิด ในทางตรงกันข้ามการทำงานของเอนไซม์ไคโมทริปซินในปลา Arctic charr จะสูงมากกว่าปลา Eurasian perch (192.8 และ 110.2 U/mg sample ตามลำดับ ($p<0.001$) ซึ่งการทำงานของเอนไซม์ไลเปสและโปรติเอสที่สูง และการทำงานเอนไซม์คาร์โบไฮเดรตที่ต่ำในปลาทั้ง 2 ชนิดเนื่องจากเป็นกลุ่มปลากินเนื้อ อย่างไรก็ตามปลา Eurasian Perch จะมีการทำงานเอนไซม์คาร์โบไฮเดรตที่สูงกว่าปลา Arctic charr ชี้ให้เห็นว่ามีความสามารถในการย่อยคาร์โบไฮเดรตดีกว่าโดยเฉพาะกระเพาะอาหาร

ที่กล่าวมาข้างต้นเป็นการศึกษาวิจัยที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ย่อยอาหารต่อการเจริญเติบโตในสัตว์น้ำ ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1995-2013 สามารถสรุปได้ ดังนี้คือ การศึกษาเอนไซม์ย่อยอาหารในสัตว์น้ำ บทบาทสำคัญต่อการเติบโต การดำรงชีวิตของสัตว์น้ำ และการเปลี่ยนแปลงของระบบย่อยอาหารของปลาในแต่ละช่วงการเจริญเติบโต มีการเปลี่ยนแปลงความต้องการสารอาหารเพื่อให้เหมาะสมกับสรีระในระบบการย่อยสารอาหารต่างๆ ของสัตว์น้ำในแต่ละช่วงวัย และชนิดของสัตว์น้ำนั้นๆ มีความสัมพันธ์กับการตอบสนองทางโภชนาการ และพฤติกรรมการกินอาหาร เพื่อนำไปปรับใช้สำหรับการสร้างสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อไป

การศึกษายีนแสดงออกของเอนไซม์ย่อยอาหาร

การแสดงออกของยีน (gene expression)

การแสดงออกของยีน หมายถึง การถอดรหัสพันธุกรรมของยีนจากดีเอ็นเอเป็นเอ็มอาร์เอ็นเอแล้วเกิดการแปลรหัสเป็นโปรตีน รหัสพันธุกรรมของยีนในดีเอ็นเอ เป็นตัวกำหนดชนิดของโปรตีนที่เซลล์สร้าง โดยเริ่มจากการถอดรหัสพันธุกรรมที่อยู่ในดีเอ็นเอเป็นเอ็มอาร์เอ็นเอในนิวเคลียส และแปลรหัสเป็นโปรตีนในไซโตพลาสซึม ซึ่งโปรตีนนี้มีความเกี่ยวข้องในทุกกระบวนการของสิ่งมีชีวิต เช่น เป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยอาหาร เป็นส่วนประกอบของตัวรับ

สัญญาณ (receptor) และ แอนติบอดี้ (antibody) ที่ปกป้องร่างกายจากสิ่งแปลกปลอมต่างๆ (Nelson and Cox, 2000)

การควบคุมการแสดงออกของยีน (Regulation of gene expression)

การแสดงออกของยีน เป็นการถ่ายทอดข้อความทางชีวภาพหรือข้อความทางพันธุกรรมที่บรรจุอยู่ใน ดีเอ็นเอไปยังเอ็มอาร์เอ็นเอแล้วจึงแปลรหัสไปเป็นโปรตีน ในเซลล์ร่างกายของสิ่งมีชีวิตทุกเซลล์มีข้อมูลทางพันธุกรรมหรือยีนเหมือนกัน แต่ในระหว่างการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนสภาพ (differentiation) แต่ละเซลล์มีกลไกการควบคุมการแสดงออกของยีนเหล่านี้ต่างเวลาหรือต่างวาระกัน การควบคุมการแสดงออกของยีนอาจแบ่งเป็น 2 ช่วง คือ ช่วงระหว่างกระบวนการถอดรหัสพันธุกรรม (transcription) โดยเป็นการควบคุมการสังเคราะห์ mRNA ซึ่งลำดับเบสที่อยู่บนสายเอ็มอาร์เอ็นเอถูกกำหนดโดยลำดับของเบสในสายแม่พิมพ์ดีเอ็นเอ ช่วงระหว่างกระบวนการแปลรหัสพันธุกรรมมาเป็นพอลีเปปไทด์หรือโปรตีนโดยเป็นการสังเคราะห์พอลีเปปไทด์หรือการสร้างโปรตีน (Nelson and Cox, 2000)

เทคนิค Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

ปฏิกิริยาลูกโซ่แบบย้อนกลับ (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR) เป็นเทคนิคทางอณูชีววิทยาที่มีความไวสูงมากที่สุด (The highest sensitive technique) ในการตรวจวัดปริมาณการแสดงออกของยีนเป้าหมาย (gene expression) ในเซลล์เพาะเลี้ยง (Cell culture) หรือเนื้อเยื่อตัวอย่าง (Specimen) ที่มีปริมาณอาร์เอ็นเอ (Messenger ribonucleic acid, mRNA) เพียงเล็กน้อย ด้วยการสังเคราะห์ย้อนกลับจากเอ็มอาร์เอ็นเอที่มีปริมาณเพียงเล็กน้อยให้เป็นดีเอ็นเอ (Deoxyribonucleic acid, DNA) ด้วยเอนไซม์รีเวิร์สทรานสคริปเทส (reverse transcriptase) จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่มีอยู่ปริมาณเล็กน้อยนั้นให้มีจำนวนมากมายมหาศาลโดยปฏิกิริยาพีซีอาร์เทคนิคนี้จึงเป็นการประยุกต์ใช้เอ็มอาร์เอ็นเอ เพื่อเป็นตัวบ่งชี้ว่ามีการแสดงออกมากเกินไปหรือน้อยเกินไปเมื่อเปรียบเทียบกับยีนในสภาวะปกติ เซลล์ที่สนใจ ทั้งนี้นักวิทยาศาสตร์ได้พัฒนาเอนไซม์ รีเวิร์สทรานสคริปเทส ให้มีคุณสมบัติที่สามารถทนต่ออุณหภูมิสูง และออกแบบไพเมอร์ที่มีความจำเพาะกับลำดับเบสของยีนเป้าหมายเพื่อส่งเสริมให้ได้ปริมาณ ผลิตภัณฑ์อาร์ที-พีซีอาร์มากที่สุด อาร์ที-พีซีอาร์เป็นปฏิกิริยาเคมีที่ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนที่หนึ่งเป็นปฏิกิริยารีเวอร์ทรานสคริปชั่น (Reverse transcription) และขั้นตอนที่สองเป็นปฏิกิริยาพอลิเมอเรสเชนรีแอชัน

(Polymerase chain reaction) ซึ่งปฏิกิริยารีเวอร์ทรานสคริปชั่น สามารถตรวจหาการแสดงออกของยีนเป้าหมายหลายๆ ยีนในเวลาเดียวกันโดยใช้เอนไซม์รีเวิร์สทรานสคริปเทส โดยเทคนิคเซมิ-ควอนธิเทธีฟ อาร์ที-พีซีอาร์ (Semi quantitative RT-PCR) เป็นเทคนิคที่มีการพัฒนามาจากอาร์ที-พีซีอาร์เพื่อดูปริมาณการแสดงออกของยีนและนำเสนอในรูปของตัวเลขหรือกราฟ ซึ่งสะดวกสามารถที่จะเปรียบเทียบได้อย่างชัดเจน และมีความถูกต้องแม่นยำ (www.clontech.com)

การศึกษางานวิจัย

งานวิจัยการแสดงออกของยีนการทำงานของเอนไซม์ย่อยอาหารในสัตว์น้ำต่างๆ ไว้ดังนี้

Douglas et al. (2000) ได้ทำการศึกษาการวิเคราะห์ระดับโมเลกุลของการแสดงออกของยีนอะไมเลสระหว่างการวิวัฒนาการในปลา winter flounder, (*Pleuronectes americanus*) ด้วยเทคนิคอาร์ที-พีซีอาร์ พบว่าระดับการแสดงออกของยีนจากตัวอ่อน ที่ 5 13 20 27และ 41 วันหลังจากการฟักจะใช้ housekeeping gene เฉพาะต่อ actin เป็นตัวควบคุม โดยการแสดงออกของยีนอะไมเลสเกิดขึ้นครั้งแรกที่ 5 วันหลังจากการฟักและมีค่าสูงสุด ที่ 20 วันหลังจากการฟักและลดลงระหว่างการเปลี่ยนแปลงรูปร่างที่สมบรูณ์ (metamorphosis) การศึกษานี้เป็นประโยชน์ต่อการเลือกชนิดของอาหารที่ควรให้ปลา winter flounder ในแต่ละระยะให้เหมาะสมกับการย่อยอาหารเพื่อการเจริญเติบโตที่ดี

Peisong et al. (2004) ได้ทำการศึกษาลักษณะ pancreatic α-amylase gene และ promoter ในปลา seabass ซึ่งซีดีเอ็นเอของยีนแอลฟา อะไมเลส จะมี 1620 bp และมีโพลีเพปไทด์ 522 amino acids ซึ่งการทำ Southern blot จะเป็นการชี้เฉพาะเจาะจงไปที่ ยีนทั้งสามที่มีการคัดลอกในจีโนมของปลา sea bass โดยจะแสดงการหาลำดับเบส coding region และ exon/intron ซึ่งมีลักษณะเหมือนกับยีนเอนไซม์อะไมเลสของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม อย่างไรก็ตาม promoter regions จะมีลักษณะเฉพาะที่แตกต่างกันไป โดยในการศึกษาครั้งนี้จะศึกษาเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างการทำงานของเอนไซม์และระดับเอ็มอาร์เอ็นเอ ของแอลฟา อะไมเลสในช่วงที่เริ่มมีการพัฒนาในปลา seabass

Tadahide et al. (2005) ได้ทำการศึกษาจำแนกยีนเอนไซม์เปปซิโนเจนในจีโนมของปลา tomachless fish (*Takifugu rubripes*) เอนไซม์เปปซิโนเจนเป็นเอนไซม์ตั้งต้นของเอนไซม์เปปซิน ซึ่งเป็น gastric specific protease โดยในปลากระดูกแข็งบางชนิด เช่น ปลาปักเป้าและปลาม้าลาย จะไม่พบต่อมกรดเกลือ ซึ่งการหา GSS database ในปลา pufferfish (*Takifugu* rubripe)s ทำ

ให้ทราบถึงความแตกต่างกันของ aspartic proteinase genes 5 ยีนในจีโนมของปลา โดยหนึ่งในนั้น (pPep) เป็นชนิดที่มีโครงสร้างของเปปซิโนเจนอยู่ ซึ่งเปปซิโนเจนที่พบในปลาจะนำมาวิเคราะห์ phylogenic analysis จากนั้นนำ pPep antisense probe นำมาผสมกับต่อมกรดเกลือที่ได้จากกระเพาะปลา flounder สามารถสรุปได้ว่า pPep เป็นเอนไซม์เปปซิโนเจนในปลาปักเป้า pufferfish pepsinogen เอ็มอาร์เอนเอจะไม่พบอย่างชัดเจนในอวัยวะช่วยย่อยอาหารแต่จะพบมากบริเวณผิวหนังของอวัยวะช่วยย่อยอาหาร pufferfish pepsinogen จึงเป็นอีกทางหนึ่งที่จะช่วยในการย่อยอาหาร

Murray et al. (2006) ได้ทำการศึกษาการโคลนนิ่งและดูการแสดงออกของยีน digestive enzymes 3 ยีนที่ได้จากปลา Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) ในช่วงที่เริ่มมีการพัฒนาตั้งแต่ที่เริ่มมีการกินอาหารเป็นครั้งแรกจนกระทั่งถึงระยะ metamorphosis ในช่วงที่ตัวอ่อนเริ่มมีการกินอาหาร บริเวณ gastrointestinal (GI) จะถูกแบ่งออกเป็นลำไส้ส่วนหน้า กลาง ส่วนท้าย และ ตับ ตับอ่อน ในช่วงที่มีการพัฒนาของตับอ่อนจะมีการสร้างอวัยวะ (organ) กระจายไปยังเนื้อเยื่อภายในบริเวณ GI ซึ่งการทำงานของ gastric Glands จะยังไม่ปรากฏจนกระทั่งถึงอายุ 66 วันหลังจากฟักออกจากไข่ ทำการศึกษายีนโดยใช้ primers ของปลา winter flounder จากนั้นนำมาดัดแปลง sequence บางส่วนสำหรับใช้กับยีนไบล์ซอลท์ แอคติเวตเต็ดไลเปส (BAL) เอนไซม์ทริปซิโนเจน (TRP) และ เปปซิโนเจน (PEP) ที่ได้จากการสกัดอาร์เอ็นเอ จากตัวอ่อนและปลาในระยะวัยรุ่น โดยใช้เทคนิคอาร์ที-พีซีอาร์ จากนั้นก็จะนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ มาทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาออกแบบเพื่อหา halibut gene-specific primers สำหรับ BAL และ PEP ทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอาร์ที-พีซีอาร์ จากผลที่ได้แสดงให้เห็นถึงการแสดงออกของยีน BAL และ TRP ซึ่งจะมีน้อยมากในช่วงแรกที่เริ่มมีการกินอาหาร แต่ยีน PEP จะไม่สามารถตรวจพบได้จนกระทั่งอายุ 80 วันหลังจากการฟักออกจากไข่ จากนั้นทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค In situ hybridization โดยใช้ molecular probes จาก sequences ของปลา winter flounder โดยตำแหน่งที่มีการแสดงออกของยีน BAL และ TRP คือ exocrine pancreas ส่วนการแสดงออกของยีน PEP จะมีการแสดงออกที่เดียว คือ บริเวณ glandular regions ของกระเพาะอาหาร จากข้อมูลที่ได้นั้นเป็นเพียงข้อมูลพื้นฐานที่ใช้ในการศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยอาหารในปลา

Shaozhen et al. (2008) ได้ทำการศึกษาลักษณะและการแสดงออกของยีนแปบซิโนเจนและการกำหนดการทำงานของเอนไซม์เปปซินไลท์ในปลา orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) พบว่ายีนที่ได้จากการโคลนนิ่งจาก gastric mucosa ในปลา orange-spotted grouper ในระยะแรกยีนที่ได้รับจะประกอบด้วย 9 exons และยับยั้งโดย 8 introns ลำดับนิวคลีโอไทด์รวมกับบริเวณ coding region and 3′-flanking region สามารถสรุปได้ว่าลำดับโพลีนิวคลีโอ

ไทด์จะประกอบด้วย prosegment 55 residues และ pepsin 332 residues โดยการศึกษาครั้งนี้จะใช้อาร์ที-พีซีอาร์ และ Southern blot ซึ่งจะแสดงให้เห็นถึง pepsinogen C ที่พบในกระเพาะอาหาร แต่การแสดงออกในเนื้อเยื่อจะแตกต่างออกไป การทำงานของเอนไซม์เปปซินไลท์จะพบในช่วงที่มีการพัฒนาของตัวอ่อนในระยะแรกและจะเพิ่มขึ้นขึ้นจนสิ้นสุดระยะวัยรุ่น และมีระดับที่คล้ายๆกันในปลาที่มีการเจริญเติบโตเต็มที่ การวิเคราะห์ Nouthern blot พบว่าจะมีการถอดรหัสอยู่ 3 รูปแบบ และมีการแสดงออกแตกต่างกันไปในช่วงที่มีการทดลอง

Bao et al. (2008) ได้ทำการศึกษาลักษณะของเอนไซม์ทริปซินและการแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์จากไส้ติ่งในปลา mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) ที่อยู่ในรูปของ anionic form (trypsin A) และ cationic form (trypsin B) พบว่า มีความบริสุทธิ์สูงเมื่อทำการศึกษาโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟี ซึ่งประกอบด้วย DEAE-Sephacel Sephacryl S-200 HR Q-Sepharose or SP-Sepharose จากการทำการแยกเอนไซม์ทริปซินให้บริสุทธิ์ พบว่าจะเกิดแถบ 1 แถบ บน native-PAGE ซึ่งน้ำหนักโมเลกุลของ trypsin A และ trypsin B จะอยู่ที่ 21 kDa และ 21.5 kDa ตามลำดับ ในการวิเคราะห์โดยใช้ SDS–PAGE Zymography analysis พบว่าเอนไซม์ทริปซินทั้งคู่จะทำให้เคซีนลดลง โดยจะมีการยับยั้งที่อุณหภูมิสูงสุด 35 °C และ 40 °C ตามลำดับ pH ที่ 8.5 โดยใช้ Boc-Phe-Ser-Arg-MCA เป็นซับสเตรท ซึ่งจะมีความเสถียรที่อุณหภูมิสูงถึง 45 °C pH อยู่ที่ระดับ 4.5-11.0 โดยสารที่ขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ทริปซินจะไปมีผลต่อเอนไซม์ทริปซินทั้ง 2 แบบ ซึ่งจะมีความไวต่อปฏิกิริยาคล้ายคลึงกัน และจะถูกกระตุ้นปฏิกิริยาการทำงานด้วยไอออนโลหะหนัก เช่น Ca^{2+} และ Mg^{2+} และหยุดด้วย Fe^{2+} Zn^{2+} Mn^{2+} Cu^{2+} Al^{3+} Ba^{2+} และ Co^{2+} ที่ระดับต่างกัน ระดับค่า Km values ของ trypsin A และ B จะอยู่ที่ 2.18 lM และ 1.88 lM, และค่า Kcat values จะอยู่ที่ 81.6 S^{-1} and 111.3 S^{-1} สำหรับ Boc-Phe-Ser-Arg-MCA ตามลำดับ ในการวิเคราะห์ Immunoblotting analysis โดยใช้ anti-common carp trypsin A positively cross-reacted ร่วมกับเอนไซม์ทริปซินทั้ง 2 แบบ พบว่ามีความคล้ายคลึงกัน โดยลำดับ N-terminal amino acid sequence ของ trypsin B คือ IVGGYECEAH ซึ่งมีความใกล้เคียงกันมากกับเอนไซม์ทริปซินจากปลาชนิดอื่นๆ

Han et al. (2009) ทำการศึกษาการโคลนนิ่งโมเลกุลและการแพร่กระจายของ lipoprotein lipase full-length cDNA ในเนื้อเยื่อของปลา Pengze crucian carp (*Carassius auratus* var. Pengze) full-length cDNA coding lipoprotein lipase (LPL) จะทำการโคลนนิ่งจากตับของปลาโดยวิธีอาร์ที-พีซีอาร์และอาร์เอซีอี (rapid amplification of cDNA ends) โดยซีดีเอ็นเอจะได้ 1877 bp พบ 507 amino acids ประกอบด้วย putative signal peptide 23 amino acids amino acid sequence ของ lipoprotein lipase จะมีความเหมือนกันกับสิ่งมีชีวิตอื่นๆ โดย LPL cDNA จะพบในเนื้อเยื่อ

ไขมัน ตับ หัวใจ ไต และกล้ามเนื้อขาวในปลา Pengze crucian carp วิเคราะห์โดยวิธีอาร์ที-พีซีอาร์ โดยใช้ β-actin เป็นยีนควบคุม ผลที่ได้พบว่ามีการแสดงออกในทุกๆส่วนของเนื้อเยื่อที่ทำการศึกษา

Shan et al (2013) ทำการศึกษาการเจริญเติบโต การแสดงออกของยีน และการทำงานของเอนไซม์ย่อยอาหารในปลา grass carp ระยะวัยรุ่น (*Ctenopharyngodon idella*) ที่กินพืชและสัตว์เป็นอาหาร โดยขนาดของปลา ความยาวและน้ำหนัก 5.5 ซม. และ 1.8 กรัม ตามลำดับ และให้กินพืช duckweed หรือสัตว์ขนาดเล็ก หรือตัวอ่อนริ้นทะเล เป็นเวลา 60 วันพบว่าปลาที่กินพืช duckweed ลำไส้จะมีการเจริญเติบโตสูงกว่าในกลุ่มที่กินริ้นทะเล ในทางตรงกันข้ามการแสดงออกของอาร์เอ็นเอของ epidermal growth factor (Egf) จะพบสูงในปลาที่กิน ในทางตรงกันข้าม ระดับ Igf II mRNA ในปลาที่กิน duckweed จะต่ำกว่ากลุ่มที่กินตัวอ่อนริ้นน้ำจืด และระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของ neuropeptide Y (Npy) neuropeptide Y receptor Y8a (Npy Y8a) neuropeptide Y receptor Y8b (Npy Y8b) และ leptin receptor (Ob-r) ในปลาที่กินพืช duckweed จะสูงกว่ากลุ่มที่กินตัวอ่อนริ้นน้ำจืด และ leptin receptor gene related protein (Ob-rgrp) มีการแสดงออกต่ำ ซึ่งการแสดงออกที่แตกต่างกันจะเป็นตัวกระตุ้นให้ลำไส้มีการพัฒนาเพื่อเข้าสู่การกินพืชอย่างสมบูรณ์ ซึ่งระดับ RNA ของทริปซินและอะไมเลสที่กินพืช duckweed จะสูงกว่ากลุ่มที่กินตัวอ่อนริ้นน้ำจืด และการแสดงออกของไลเปสต่ำ สอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์ทริปซินะไลเปส สามารถสรุปได้ว่าปลา grass carp ระยะวัยรุ่น ที่กินพืชเป็นอาหารนั้นไม่เพียงแต่ช่วยกระตุ้นลำไส้ให้พัฒนาและยังช่วยในการแสดงออกของ Npy Npy Y8a Npy Y8b และ Ob-r เช่นเดียวกับเอนไซม์ทริปซินและอะไมเลสที่จะเพิ่มขึ้นเมื่อมีการกินและย่อยอาหารที่เป็นพืช

การศึกษาการวิจัยการแสดงออกของยีนการทำงานของเอนไซม์ย่อยอาหารในสัตว์น้ำที่กล่าวมาข้างต้น สามารถสรุปได้ดังนี้คือ เกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างการทำงานของเอนไซม์ย่อยอาหารที่แสดงออกในระดับเอ็มอาร์เอ็นเอ ของเอนไซม์ย่อยอาหาร ในสัตว์น้ำของแต่ละช่วงวัยตั้งแต่เริ่มมีการพัฒนาอวัยวะช่วยย่อยอาหาร ระยะวัยรุ่น และในปลากินพืช ปลากินเนื้อ ปลากินทั้งพืชและเนื้อ ซึ่งจากข้อมูลการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอของเอนไซม์ย่อยอาหาร เป็นประโยชน์ต่อการเลือกชนิดของอาหารที่ควรให้ปลาในแต่ละระยะให้เหมาะสมกับการย่อยอาหารเพื่อการเจริญเติบโตที่ดี

สารสกัด (extract)

สารสกัด หมายถึง สิ่งที่สกัดออกมาจากสมุนไพร โดยใช้น้ำยาสกัดหรือตัวทำละลายที่เหมาะสม โดยทั่วไปสารสกัดเป็นของผสมขององค์ประกอบทางเคมีของสมุนไพร ซึ่งจะมี

ทั้งองค์ประกอบที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ซึ่งมักเรียกว่า "องค์ประกอบสำคัญ" และองค์ประกอบที่ไม่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ซึ่งเรียกว่า "สารเฉื่อย" โดยชนิดและสัดส่วนขององค์ประกอบในสารสกัดจะแปรเปลี่ยนตามคุณภาพของสมุนไพรที่ใช้และสภาวะที่ใช้ในการสกัด ซึ่งได้มีการพัฒนาและศึกษาและนำมาใช้ประโยชน์ นอกจากจะนำมาใช้ประโยชน์ในมนุษย์แล้วยังพบว่ามีการนำมาประยุกต์ใช้ในสัตว์น้ำอีกด้วย เพื่อหลีกเลี่ยงการใช้ยาปฏิชีวนะ ซึ่งการทำให้สารธรรมชาติอยู่ในรูปของสารสกัดนั้น จะมีส่วนช่วยให้ได้ตัวยาที่บริสุทธิ์ สามารถควบคุมความแรงของยาได้ง่ายขึ้น ยังเป็นการช่วยลดการเสื่อมสภาพของตัวยา อันเนื่องมาจากการกระทำของเอนไซม์ที่ปนอยู่ในสมุนไพร นอกจากนี้ยังสะดวกในการเก็บ การขนส่ง และการนำมาใช้อีกด้วย (สิริพร, 2548)

ตัวทำละลาย (solvent)

ตัวทำละลาย เป็นของเหลวที่สามารถละลายตัวถูกละลายที่เป็นของแข็ง ของเหลว หรือก๊าซได้เป็นสารละลาย ตัวทำละลายที่คุ้นเคยมากที่สุดและใช้ในชีวิตประจำวันคือ น้ำ สำหรับคำจำกัดความที่อ้างถึง ตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent) จะหมายถึงตัวทำละลายอีกชนิดที่เป็นสารประกอบอินทรีย์ (organic compound) และมีคาร์บอนอะตอมอยู่ด้วย โดยปกติตัวทำละลายจะมีจุดเดือดต่ำ และระเหยง่าย หรือสามารถกำจัดโดยการกลั่นได้ โดยทั่วไปแล้วตัวทำละลายไม่ควรทำปฏิกิริยากับตัวถูกละลาย คือ มันจะต้องมีคุณสมบัติเฉื่อยทางเคมี ตัวทำละลายสามารถใช้สกัด (extract) สารประกอบที่ละลายในมันจากของผสมได้ตัวอย่างที่คุ้นเคยได้แก่ การต้มกาแฟ หรือชาด้วยน้ำร้อน ปกติตัวทำละลายจะเป็นของเหลวใสไม่มีสีและส่วนใหญ่จะมีกลิ่นเฉพาะตัวความเข้มข้นของสารละลายคือจำนวนสารประกอบที่ละลายในตัวทำละลายในปริมาตรที่กำหนดการละลาย (solubility) คือจำนวนสูงสุดของสารประกอบที่ละลายได้ในตัวทำละลาย ตามปริมาตรที่กำหนดที่อุณหภูมิเฉพาะ (สิริพร, 2548)

กระเทียม

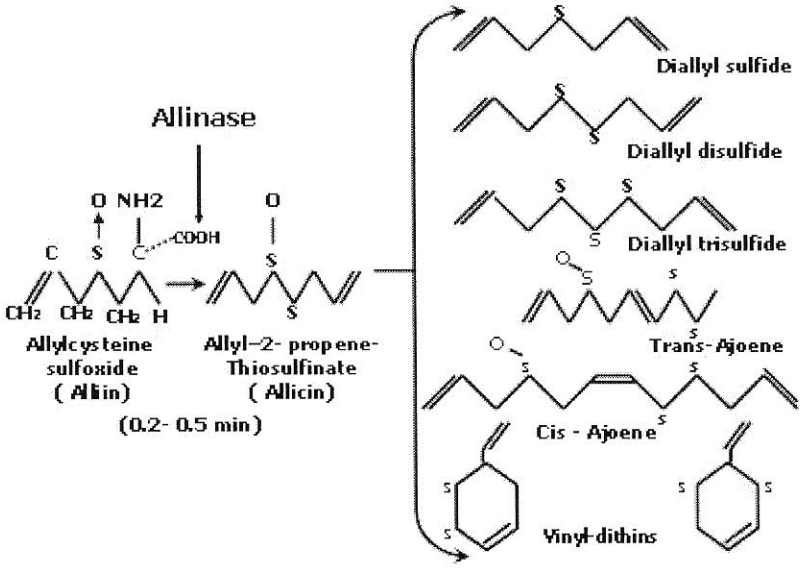
ภาพ 3 กระเทียม (*Allium sativum* Linn.)

ชื่อวิทยาศาสตร์	*Allium sativum* L.
ชื่อวงศ์	Alliaceae
ชื่ออังกฤษ	Garlic
ชื่อท้องถิ่น	กระเทียม (ภาคกลาง), หอมเทียม (ภาคเหนือ), หอมขาว (ภาคอีสาน), หอมเทียม (ภาคใต้)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

กระเทียมเป็นพืชล้มลุก ลำต้นสูงประมาณ 30-45 ซม. ใบเป็นใบเดี่ยวสีขาวแบนยาว รูปขนาดเรียวแหลม ข้างในกลวง ด้านล้างมีรอยพับเป็นเส้นตลอดความยาว ดอกสีขาวแกมม่วงหรือแกมชมพู ออกเป็นช่อติดกันเป็นกระจุก กลีบดอกมี 6 กลีบ รูปยาวแหลม ยาวประมาณ 6 มม. มีกาบหุ้มเป็นจะงอยยาว ก้านดอกยาว หัวสีขาวอยู่ใต้ดิน ลักษณะกลมแป้น แต่ละหัวมีกลีบเล็กๆหลายกลีบอยู่รวมกัน แต่ละกลีบมีเยื่อบางสีขาวหรืออมชมพู บางพันธุ์ในหนึ่งหัวมีเพียงกลีบเดียว เรียกว่ากระเทียมโทน เนื้อกระเทียมสีครีม รสเผ็ด และมีกลิ่นฉุน (ทวีทอง และ นัดดา, 2548)

องค์ประกอบทางเคมี



ภาพ 4 องค์ประกอบทางเคมีของกระเทียม (*Allium sativum* Linn.)

ที่มา : สิรินารถ (2554)

ในหัวใต้ดิน (Bulb) องค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นสารที่มีธาตุกำมะถัน ซึ่งพบว่าเป็นกลิ่นกระเทียม alliin (S-allyl cysteine sulfoxides) และ Y-L-glutamyl-S-alkyl-L-cysteine รวมกันมากกว่า 82% ของปริมาณสารกำมะถันทั้งหมด สารกลุ่ม thiosulfinater เช่น allicin ajoene และกลุ่ม sulfide ได้แก่ diallyl disulfide dallyl trisulfide ปริมาณ alliin ในกระเทียมสดมีประมาณ 0.25-1.15% และหากทำให้แห้งด้วยกระบวนการที่ดีจะพบ alliin ได้ถึง 0.7-1.7% allicin (diallyl thiosulfinate) ได้มาจากการสลายตัวของ alliin เมื่อเซลล์แตกออก และมีการทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ alliinase (1 มก. ของ alliin เท่ากับ 0.45 มก. ของ allicin) allicin เป็นสารที่ไม่คงตัว จะสลายตัวช้าหรือเร็วขึ้นกับสภาวะแวดล้อม การสกัดกระเทียมที่อุณหภูมิแตกต่างกันจะได้สารที่แตกต่างกัน เช่น การสกัดกระเทียมด้วยแอลกอฮอล์ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียส จะได้สารสกัดมี alliin สูง แต่ถ้าใช้แอลกอฮอล์ และน้ำสกัดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จะไม่พบ alliin พบเพียง allcin ถ้าสกัดด้วยการกลั่นด้วยไอน้ำ 100 องศาเซลเซียส allin ทั้งหมดจะสลายตัวเป็น diallyl sulfides ในกระเทียมแห้งที่อบด้วยอุณหภูมิสูงกว่า 60 องศาเซลเซียสทำให้เอนไซม์หยุดทำงานเช่นกัน น้ำมันกระเทียมไม่มีสี ละลายในน้ำ และรวมตัวเป็นเนื้อเดียวกับแอลกอฮอล์ เบนซิน และอีเธอร์ ถูกทำลายเมื่อถูกความร้อนโดยตรง ประกอบด้วย diallyl disulfide 26% diallyl trisulfide 19% allyl methyl trisulfide 15% allylmethyl disulfide 13% และ diallyl tetrasulfide กระเทียมที่ขายในรูปผลิตภัณฑ์มีทั้งชนิดแห้งบดเป็นผง น้ำคั้นกระเทียมสด น้ำมันกระเทียมซึ่งเป็นน้ำมันหอมระเหย และ aged garlic extract (AGE) ซึ่งเป็นสารสกัดกระเทียมเตรียมจากกระเทียมหั่นบางๆ แช่ในแอลกอฮอล์ 15-20 เปอร์เซ็นต์นาน 20 เดือน สาร allicin ในหัวกระเทียมจะเปลี่ยนเป็นสารประกอบชนิดใหม่ ได้แก่ S-allylcysteine (SAC) S-allylmercaptocysteine allicin และยังพบสารต้านออกซิเดชั่นที่ไม่พบในกระเทียมสดได้แก่ N-alpha-(I-deoxy-D-frutos-I-yl)-L-arginine (สิรินารถ, 2554)

คุณสมบัติของกระเทียม

1. ฤทธิ์ลดการบีบตัวของลำไส้ (อัจฉรา และ อุษา 2523 อ้างโดย สิรินารถ, 2554)

สารสกัดกระเทียมด้วยแอลกอฮอล์ 95% มีฤทธิ์ลดการบีบตัวของลำไส้กระต่าย น้ำสกัดกระเทียม ความเข้มข้น 1:5 ขนาด 0.2 มล. สามารถยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กหนูตะเภาที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย acetylcholine, histamine และ barium chloride ความสามารถในการยับยั้งการหดตัวจะเพิ่มขึ้นเป็นสัดส่วนกับขนาดของน้ำสกัดกระเทียมที่เพิ่มขึ้น นอกจากนั้นยังมีผลลดการหดตัวแบบอัตโนมัติ (spontaneous contraction) ของกระเพาะกบส่วน pyrolus ด้วย

2. ฤทธิ์เพิ่มการบีบตัวของลำไส้ (Ingkaninan *et al.*, 2003 อ้างโดย สิรินารถ, 2554)

สาร (E)-ajoene และ (Z)-ajoene จากกระเทียม มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ acetylcholinesterase ซึ่งทำลาย acetylcholine ทำให้ acetylcholine อยู่นานขึ้น จึงมีผลเพิ่มการบีบตัวของลำไส้แต่สารสกัดด้วยเมทานอลจากหัวกระเทียมความเข้มข้น0.1มก./มล.ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ acetylcholinesterase

3. ฤทธิ์ขับน้ำดี (Fortunatov, 1955 อ้างโดย สิรินารถ, 2554)

กระเทียมเมื่อรับประทานเข้าไป จะไปเพิ่มน้ำย่อยและน้ำดี

4. ฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา พยาธิปรสิตและไวรัส (ประเสริฐ, 2550)

การวิจัยบ่งชี้ว่ากระเทียมมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา พยาธิปรสิตและไวรัส มีผู้ใชกระเทียมสดบดนำไปรักษากลากเกลื้อน รักษาโรคอุจจาระร่วง นำไปบดผสมน้ำสวนทวารหนัก ขับพยาธิ นำไปกินเพื่อป้องกันโรคหวัด บดผสมน้ำนำไปรักษาโรคตกขาวจากเชื้อรา บดนำไปกัด หูด เป็นต้นและยังพบว่าสารสกัดด้วยน้ำ และน้ำมันหอมระเหย สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา อันเป็นสาเหตุของโรคกลาก คือ Trichophyton, Epidermophyton และ Microsporum ได้ดี สารสำคัญเป็นสารที่ไม่คงตัว พบได้น้อยในพืชในรูปของ alliin เมื่อเซลลูโลสของพืชถูกทำลาย alliin จะถูกเปลี่ยนเป็น allicin ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ และ allicin ที่อุณหภูมิต่ำๆ จะเปลี่ยนเป็น ajoene ซึ่งยังมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อรา เช่นเดียวกับ allicin

5. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (จันเพ็ญ, 2553)

การวิจัยบ่งชี้ว่าสาร S-allylcysteine (SAC) และ S-allylmercaptocysteine (SAMC) เป็นสารเคมีหลักที่พบในกระเทียม มีบทบาทในการต้านอนุมูลอิสระช่วยป้องกันไม่ให้ผนังของหลอดเลือดชั้นในถูกทำลายซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคหลอดเลือดแข็ง ออกฤทธิ์โดยจับกับอนุมูลอิสระหรือเพิ่มการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์ ได้แก่ ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (superoxide dismutase) คะตะเลส (catalase) กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส (glutathione peroxidase) และกลูตาไธโอน (glutathione) นอกจากนี้ อนุมูลอิสระรวมทั้งไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) และ TNF-α ยังมีผลกระตุ้น nuclear factor kappa B (NF-κB) ซึ่งเป็น transcription factor ทำให้มีการสร้าง adhesion molecules คือ VCAMP-1 และ ICAMP-1 เพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้เกิดการสะสมของสารต่างๆ ที่ผนังหลอดเลือด ในที่สุด จะเกิดภาวะหลอดเลือดแข็งและการตายของเซลล์ SAC และ SAMC สามารถยับยั้งขบวนการดังกล่าวได้โดยไปลดการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์หรือ

ลดการหลั่ง TNF-α และยังไปมีผลยับยั้ง activator protein-1 (AP-1) และ c-Jun N-terminal kinases (JNKs) ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมการสร้างโปรตีนจึงทำให้การสร้าง NF-κB ลดลงดังนั้นกระเทียมจึงมีประโยชน์มากในการช่วยป้องกันผลเสียจากอนุมูลอิสระและป้องกันการเกิดภาวะหลอดเลือดแข็ง

การศึกษางานวิจัย

งานวิจัยประสิทธิภาพของกระเทียมสดและสารสกัดกระเทียมในสัตว์น้ำต่างๆ ไว้ดังนี้

Shalaby et al. (2006) ได้ทำการศึกษาผลของกระเทียมร่วมกับคลอแรมฟีนิคอลที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและอัตราการรอดของปลานิล พบว่า การเสริมกระเทียมผง 3% ช่วยเพิ่มการเจริญเติบโต ลดจำนวนแบคทีเรียรวมและช่วยพัฒนาให้ปลามีสุขภาพดียิ่งขึ้น

Metwally (2009) ได้ทำการศึกษาผลของกระเทียมสด กระเทียมผง และ น้ำมันกระเทียม ผสมอาหาร พบว่า การเสริมกระเทียมในอาหาร มีส่วนช่วยในการควบคุมอัตราการเจริญเติบโต ลดอัตราการตาย และเพิ่มการทำงานของ antioxidant ภายในปลานิลได้

Puneet at el. (2009) ได้ศึกษาการเสริมวิตามินซี สารสกัดกระเทียม และทอรีน ลดแคดเมียม ลดความเครียดในปลา catfish (*Clarias batrachus*) ในการทดลองได้สันนิษฐานว่าการสะสมของแคดเมียมและการเปลี่ยนแปลงของความเครียดในเนื้อเยื่อตับและไตของปลา catfish (*Clarias batrachus*) ที่สัมผัสกับแคดเมียมและกลุ่มทดลองที่กระตุ้นเพียงน้ำปกติร่วมกับวิตามินซี สาสกัดกระเทียมหรือทอรีน โดยจะใช้ปลา *C. batrachus* 324 ตัว ความยาวเฉลี่ย 20±4 ซม. น้ำหนักเฉลี่ย 86±5 กรัม จะแบ่งปลาออกเป็น 9 กลุ่ม (I ถึง IX) แต่ละกลุ่มจะประกอบด้วยปลาจำนวน 36 ตัว โดยกลุ่ม II, III, IV และ V จะทำการทดสอบกับแคดเมียมคลอไรด์โมโนไฮเดรต ($CdCl^2$ H^2O) ที่ความเข้มข้น 5 ppm ในทางตรงกันข้ามปลาในกลุ่ม VI VII VIII และ IX จะทำการทดสอบกับ $CdCl^2$ H^2O ที่ความเข้มข้น 10 ppm เป็นระยะเวลา 45 วัน โดยกลุ่ม I จะเป็นกลุ่ม negative control ตัวอย่างปลาที่เก็บขึ้นมาจะเก็บตัวอย่างในน้ำปกติโดยไม่มีการเติมแคดเมียมลงไป ส่วนกลุ่ม II และ VI จะทำการเก็บตัวอย่างลงใน Cd จะใช้เป็นกลุ่ม positive controls และในปลากลุ่ม III และ VII IV และ VIII V และ IX จะได้รับวิตามินซี (5 ppm) สารสกัดกระเทียม (5 ppm) หรือทอรีน (5 ppm) ก่อนที่จะทดสอบกับแคดเมียมในเวลาต่อมา จากการทดลองพบว่า ความเข้มข้นของแคดเมียมที่สะสมในตับและไตจะเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดหลังจากที่มีการสัมผัสแคดเมียม โดยระดับจะค่อยๆ เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่มีการสัมผัส ในชุดการทดลองที่ทดสอบกับน้ำปกติร่วมกับวิตามินซี สารสกัดกระเทียมหรือทอรีน พบว่า มีส่วนช่วยลดการสะสมของแคดเมียมในเนื้อเยื่อเมื่อเปรียบเทียบ

กับกลุ่ม positive control แต่ระดับของกลุ่มที่มีการสัมผัสแคดเมียมจะมีระดับที่สูงกว่ากลุ่ม negative control และในปลาที่สัมผัสแคดเมียมร่วมกับวิตามินซี สารสกัดกระเทียมหรือทอรีน พบว่ามีส่วนช่วยลดการเกิดความเครียด โดยสังเกตจากระดับการทำงานของ lipid peroxides ต่ำและระดับการทำงานของ superoxide dismutase และ catalase สูง จะพบในตับ ไต และ erythrocytes เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มปลาที่สัมผัสกับแคดเมียม จากผลดังกล่าวทำให้ทราบว่ากลุ่มที่ทดสอบกับวิตามินซี สารสกัดกระเทียมและทอรีน จะช่วยลดการสะสมแคดเมียมที่ทำให้ความเครียดสูงได้ สามารถสรุปได้ว่าวิตามินซี สารสกัดกระเทียมและทอรีนมีส่วนสำคัญในการช่วยลดการสะสมแคดเมียมในเนื้อเยื่อและลดความเครียดในกลุ่มปลา catfish.

Pongsak and Parich (2009) ศึกษาผลของการเสริมน้ำมันกระเทียมในการต่อต้านและควบคุมเชื้อแบคทีเรีย *Flavobacterium columnare* ที่ฉีดเข้าไปในปลานิล Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) ในการศึกษาน้ำมันที่สกัดจากกระเทียมพบว่าจะมีองค์ประกอบของไดอัลลิลซัลไฟด์ภายในซึ่งมีส่วนช่วยในการต่อต้านเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* ในปลา โดยในน้ำมันที่สกัดได้จากกระเทียมนั้นจะพบไดอัลลิลโมโนซัลไฟด์ในระดับที่น้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับไดอัลลิลซัลไฟด์อื่นๆ (ไดอัลลิลซัลไฟด์ ไดอัลลิลไตรซัลไฟด์ และไดอัลลิลเตตระซัลไฟด์) จากการศึกษาในหลอดทดลองพบว่าน้ำมันมีผลต่อการฆ่าเชื้อแบคทีเรียเมื่อทดสอบกับเชื้อ *F. columnare* โดยสามารถยับยั้งที่ความเข้มข้นต่ำสุด (LD50) ของ FC4 ในปลานิล Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) อยู่ที่ 3.72×10^{3} CFU/ปลา หลังจากนั้นทำการศึกษาในตัวปลาพบว่าไม่มีการตายเกิดขึ้นหลังจากที่ปลากินอาหารที่เสริมด้วยน้ำมันกระเทียม 800 มก./กก. น้ำมันกระเทียม 100 มก./กก. และออกซี่เตตระไซคลิน ไฮโดรคลอไรด์ 5 วันหลังจากที่มีการฉีดเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* ตาม LD50 โดยจากผลชี้ให้เห็นว่าน้ำมันที่สกัดได้จากกระเทียมนั้นมีส่วนสำคัญในการทำหน้าที่ต่อต้านเชื้อแบคทีเรียในการควบคุมโรคในปลาที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare.*

Allah et al. (2012) ศึกษาผลของการเสริมกระเทียม (*Allium sativum*) ต่อระบบภูมิคุ้มกัน อัตราการรอด การเจริญเติบโต และการทนทานของโรคในการต่อต้านเชื้อ *Vibrio harveyi* ในปลากะพง Asian seabass (*Lates calcarifer* Bloch) จุดประสงค์ในการทดลองครั้งนี้เพื่อทำการศึกษาผลการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันและการต่อต้านโรคหลังจากที่ฉีดเชื้อ *V. harveyi* เข้าไปในลูกปลากะพง โดยมีการเสริมกระเทียม (*A. sativum*) ไปในอาหารในปริมาณ 5 10 15 และ 20 กรัมโดยให้ปลากินทุกวันเป็นเวลา 2 สัปดาห์ โดยอาหารกลุ่มควบคุมจะไม่มีการเสริมกระเทียมลงไป พบว่าการเสริมกระเทียมลงไปในอาหารให้ปลากินช่วยเพิ่มอัตราการรอดในทุกชุดการทดลองในกลุ่มที่มีการเสริมกระเทียมลงไปในอาหาร และพบว่ากลุ่มที่เสริมกระเทียม 10 กรัมต่อกิโลกรัม สามารถช่วยเพิ่มอัตราการรอดได้ถึง 83.35% เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (33.3%)

โดยช่วยเพิ่มอัตราการเจริญเติบโต น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นและอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อในกลุ่มปลาที่กินอาหารเสริมกระเทียม และในการศึกษาโลหิตวิทยา ชีวเคมี และระบบภูมิคุ้มกัน พบว่าหลังจากที่ปลากินอาหารเสริมกระเทียมการทำงานของ Erythrocytes leucocytes haematocrit haemoglobin phagocytic activity respiratory burst lysozyme anti-protease และ bactericidal จะเพิ่มขึ้น โดยระดับโปรตีน อัลบูมิน และโกลบูลินในซีรั่มสูงขึ้นอย่างเห็นได้ชัด และยังช่วยลดกลูโคส ไขมันไตรกลีเซอไรด์ และคลอเลสเตอรอลในซีรั่มเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม จากผลที่ได้ชี้ให้เห็นว่ากระเทียมสามารถช่วยเพิ่มระบบภูมิคุ้มกันในปลากะพงในการต่อต้านโรคหลังจากที่มีการฉีดเชื้อ *V. harveyi* เข้าไป

เจษฎา และคณะ (2546) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดกระเทียมด้วยน้ำในการต้านเชื้อจุลชีพที่ก่อให้เกิดโรคในไก่และสุกรพบว่าสารสกัดกระเทียม พบว่า สารสกัดกระเทียมด้วยน้ำมีฤทธิต้านเชื้อ *E. coli* และ *Salmonella* spp. ในไก่และสุกร โดยมีค่า MIC เท่ากัน ไม่เกิน 2600 μg/ml และ 5200 μg/ml ตามลำดับ และค่า MBC ไม่เกิน 5200 μg/ml และ 5200 μg/ml ตามลำดับ และสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียหลายตัวอย่างที่ดื้อต่อยา amoxicillin gentamicin และ tetracycline ได้อีกด้วย

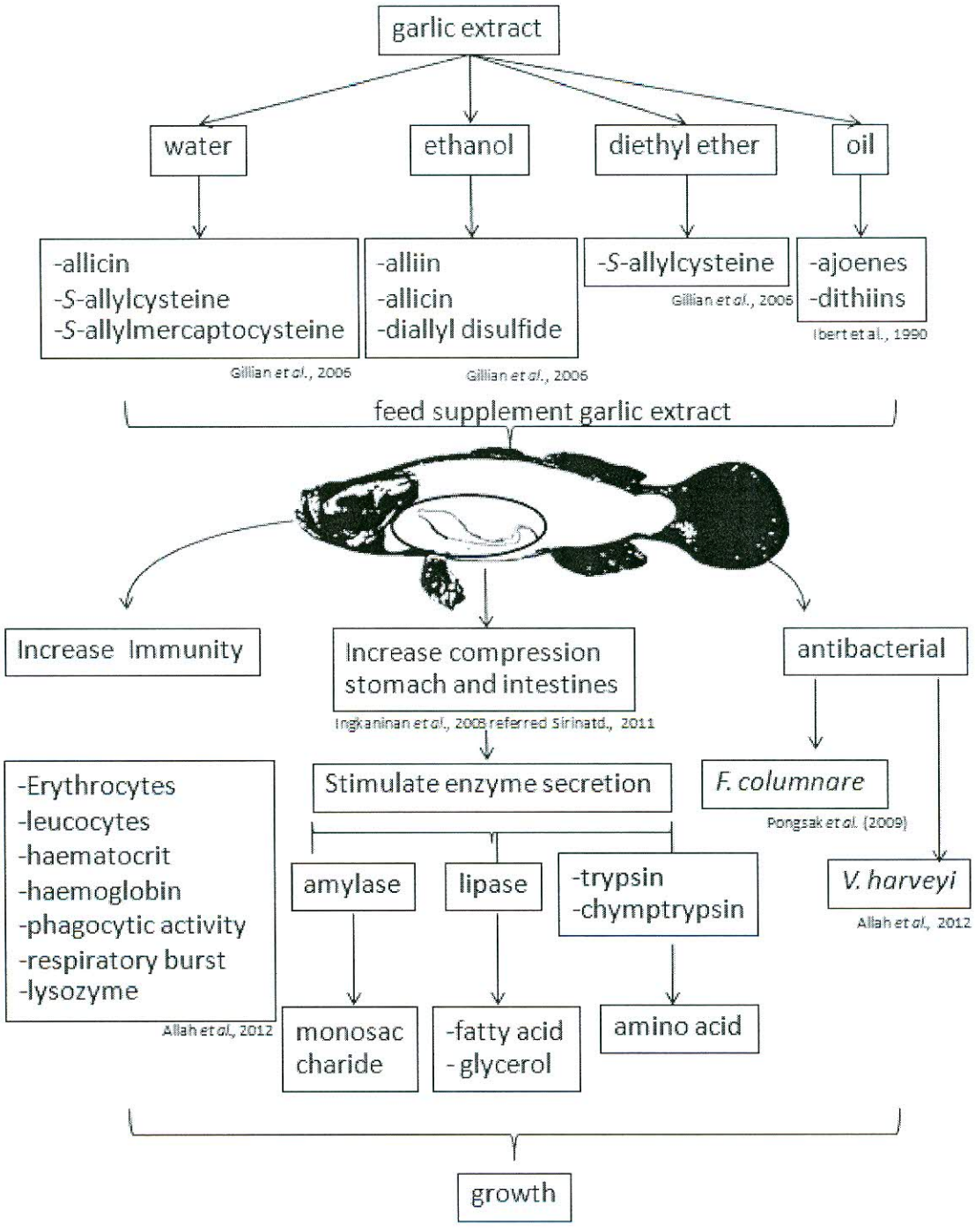
อัญชลี และจิราพร (2550) ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรไทยในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในกุ้งก้ามกราม 3 ชนิด ได้แก่ เชื้อ *Aeromonas hydrophila* (AH), *Vibrio parahaemolyticus* (VP) และ *V. harveyi* (VH) พบว่า สารสกัดกระเทียมสดด้วยเอธานอล 50% มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ VH สูงที่สุด (19.8 มม.) ดังนั้นสารสกัดกระเทียมเหมาะสมที่จะนำไปพัฒนาใช้ในการป้องกันและรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียได้อย่างมีประสิทธิภาพและมีความปลอดภัยสูง

จำเริญศรี และคณะ (2553) ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันกระเทียมในการเพิ่มการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน และความต้านทานโรคในกุ้งขาว พบว่า การเสริมน้ำมันกระเทียมในอาหารสำหรับเลี้ยงกุ้งขาวที่ระดับ 2.5 และ 5.0% ช่วยเพิ่มการทำงานของภูมิคุ้มกัน และเมื่อพิจารณาความสามารถในการต้านทานเชื้อแบคทีเรียร่วมด้วย ระดับของน้ำมันกระเทียมที่ควรเสริมในอาหารคือ 5.0% และระยะเวลาในการเลี้ยง 14 วัน

สมพร และคณะ (2553) ได้ทำการศึกษาผลของกระเทียมสดต่อระบบภูมิคุ้มกันและความต้านทานโรคในกุ้งกุลาดำ พบว่า การใช้กระเทียมสดปั่นละเอียดผสมกับอาหารเม็ดสำเร็จรูปในอัตรา 10 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีผลต่อระบบการไหลเวียนของเลือด และภูมิคุ้มกันได้ในระดับหนึ่ง แต่ไม่มีผลในการเพิ่มความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรียเรืองแสง และไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำ

จิราพร และคณะ (2554) ได้ทำการศึกษาอาหารสำเร็จผสมสารสกัดกระเทียม ขมิ้นกวาวเครือ สไปรูลินา และโพรไบโอติค พบว่า สารสกัดกระเทียมด้วยน้ำและเอธานอล สามารถกระตุ้นพฤติกรรมการกินของปลาบู่ได้ และกระตุ้นเอนไซม์ย่อยอาหารของปลาบู่ได้ดี มีอัตราการกินต่อวันและอัตราการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ

จากการศึกษางานวิจัยข้างต้นเป็นการศึกษาผลของกระเทียมสดและสารสกัดกระเทียมต่อการเจริญเติบโตของสัตว์น้ำ สามารถสรุปได้ว่า กระเทียมสดและสารสกัดกระเทียมสามารถช่วยเพิ่มอัตราการรอด อัตราการเจริญเติบโต ช่วยเพิ่มภูมิคุ้มกัน ช่วยลดการสะสมแคดเมียมในเนื้อเยื่อปลา ช่วยลดความเครียด ต้านเชื้อแบคทีเรีย และกระตุ้นเอนไซม์ย่อยอาหาร เพิ่มอัตรากินอาหารในปลาบู่ได้



ภาพ 5 แผนผังแสดงผลของกระเทียมด้วยตัวทำละลายต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของสัตว์น้ำ

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้สำหรับเลี้ยงปลาบู่

1. ถังสำหรับเลี้ยงปลาขนาด 20 ลิตร
2. ท่อพีวีซี (PVC)
3. เครื่องทำอากาศ (Pump Aeration: Sonic, China)
4. ใยกรองแก้ว

เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ (Laboratory)

1. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (analytical balance: OHAUA, New Zealand)
2. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (analytical balance: model Scout Pro SPS402F, Pine Brook, NJ USA)
3. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer: Biometra, model GeneRay, Germany)
4. เครื่องนาโนดรอปสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer Thermo Science, USA)
5. เครื่องเขย่า (platform shaker: BioSan, model PSU 5T plus, Litvia)
6. เครื่อง Vacuum filter (vacuum filtration stand: model VF100, today's, USA)
7. เครื่องเขย่าผสม (vortex: model G560E, SCIENTIFIC INDUSTRAIES,
8. เครื่อง Freezing dry (Labconco, USA)
9. เครื่องกวนผสมแบบแม่เหล็กและเตาให้ความร้อน (magnetic stirrer and hot plate: LMS, model HTS-1003, Japan) USA)
10. เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Bench Top Refrigerated centrifuge: Sanyo GLLENKAMP PLC, model HARRIER 18/80, United Kingdom)
11. หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave: Hirayama, model HVE-50, Japan)

12. ตู้บ่มเพาะเชื้อ (incubator: Binder GMBH, model ED240(E2), USA)

13. ตู้อบลมร้อน (hot air oven: WTE binder, TUTTLINGEN, Germany)

14. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR machine: Biometra, model T personal, Germany)

15. เครื่องวิเคราะห์สารพันธุกรรม (gel electrophoresis: BioRad, USA)

สารเคมี

1. 2% Starch solution (UNIVAR, Australia)
2. 0.1 M โซเดียมคาร์บอเนต (Fisher-Scientific, India)
3. Tris-HCl buffer, pH 8 (Invitrogen, USA)
4. 3,5-Dinitrosalicylic acid (Fluka, China)
5. 0.01 M p-NPP, p-Nitrophenyl Palmitate (Fisher-Scientific, India)
6. Sodium hydroxide (March, Germany)
7. Sodium Chloride (Merck, Germany)

8.8 0.1 mM N-succinyl-ala-ala-pro-phe-p-nitroanilide (Sigma-Alorich, USA)

9. 1.25 mM benzoyl-L-arginine-p-nitroanilide (Sigma-Alorich, USA)
10. Potassium sodium tartrate (Fisher-Scientific, India)
11. Folin-Ciocaltean (CARLOERBA, USA)
12. 4.5% (v/v) dimethylformamide (RCI Labscan, Thailand)
13. 0.2 M Tris-HCl buffer, pH 8.4 (Invitrogen, USA)
14. 0.5 M EDTA, pH 8.0(Promega, USA)
15. 1 Kb Sharp Ladder (RBC Bioscience, Taiwan)
16. 100 bp DNA Ladder (Gene direx, Spain)
17. Agar powder (Union Science, Thailand)
18. Agarose (Amresco, USA)
19. Ethanol (Merck, Germany)
20. Ethidium bromide (Fluka, USA)
21. TBE buffer (Viviantis, Malaysia)
22. Diethyl ether (Lab-scan, Ireland)

23. น้ำมันพืช ตรางุ่น (Market, Thailand)

24. PCR reaction mix (Gene direx, Spain)

25. 1-Step RT-PCR Kit (Thermo Scientific, European)

26. RNA Purification Kit (Thermo Scientific, European)

27. RNA Mini Kit (Biometra, Germany)

28. Thermo Scientific RevertAid First Streand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, European)

อุปกรณ์อื่นๆ

4.1 ไมโครไปเปต (micropipette)

4.2 หลอดไมโครทิวป์ (microtube)

4.3 ขวดรูปชมพู่ (flask)

4.4 กระบอกตวง (cylinder)

4.5 ขวด Duran

4.6 บีกเกอร์ (beaker)

4.7 โกร่งบดยา (mortar and pestle)

แผนการทดลอง

การทดลองแบ่งออกเป็น 2 ส่วน ดังนี้

1. วางแผนการทดลองโดยแบ่งการทดลองออกเป็น 6 กลุ่มการทดลอง ทำการเลี้ยงเพื่อศึกษากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ย่อยอาหารในปลาบู่ เป็นเวลา 7 วัน

กลุ่มการทดลองที่ 1 อาหารผสมสารสกัดกระเทียมด้วยน้ำ ที่ความเข้มข้น 0, 0.3, 0.5, 1.0, 3.0 และ 5.0% (w/w)

กลุ่มการทดลองที่ 2 อาหารผสมสารสกัดกระเทียมด้วยเอทานอล 50% ที่ความเข้มข้น 0, 0.3, 0.5, 1.0, 3.0 และ 5.0% (w/w)

กลุ่มการทดลองที่ 3 อาหารผสมสารสกัดกระเทียมด้วยเอทานอล 95 ที่ความเข้มข้น 0, 0.3, 0.5, 1.0, 3.0 และ 5.0% (w/w)

กลุ่มการทดลองที่ 4 อาหารผสมสารสกัดกระเทียมด้วยไดเอททิวอีเธอร์ ที่ความเข้มข้น 0, 0.3, 0.5, 1.0, 3.0 และ 5.0% (w/w)

กลุ่มการทดลองที่ 5 อาหารผสมสารสกัดน้ำมันกระเทียม ที่ความเข้มข้น 0, 0.3, 0.5, 1.0, 3.0 และ 5.0% (w/w)

2. วางแผนการทดลองโดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 กลุ่มการทดลอง ทำการเลี้ยงเพื่อศึกษาประสิทธิภาพของอาหารที่ผสมด้วยสารสกัดกระเทียมต่อการเจริญเติบโตของและศึกษาการแสดงออกของเอนไซม์ย่อยอาหารในปลาบู่โดยใช้เทคนิค 2-Step RT-PCR เป็นเวลา 2 เดือน

กลุ่มการทดลองที่ 1 อาหารสำเร็จสำหรับปลากินเนื้อ (กลุ่มควบคุม)

กลุ่มการทดลองที่ 2 อาหารผสมสารสกัดกระเทียมด้วยน้ำ ที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w)

วิธีการดำเนินงานวิจัย

การเตรียมตัวอย่างลูกปลาบู่ที่ใช้ในการทดลอง

1. ทำการเก็บรวบรวมปลาบู่ (*Oxyeleotris marmoratus* Bleeker) จากตลาดแม่โจ้ และตลาดแม่แก็ด อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่

2. บันทึกข้อมูล ประกอบด้วย ความยาวมาตรฐานและน้ำหนักของตัวอย่างปลาบู่โดยคัดเลือกปลาที่มีขนาดและน้ำหนักใกล้เคียงกัน คืออยู่ในช่วงน้ำหนัก 10-40 กรัม

3. นำปลาบู่มาปรับพฤติกรรมการกินอาหาร เป็นระยะเวลา 1-2 เดือน โดยให้กินอาหารมีชีวิตร่วมกับอาหารมีชีวิตแช่แข็ง คือหนอนแดงมีชีวิตและหนอนแดงแช่แข็ง ในสัดส่วน 50:30 กรัม จากนั้นก็ค่อยๆ ลดหนอนแดงมีชีวิตลง และเพิ่มหนอนแดงแช่แข็งผสมกับอาหารสำเร็จรูปและทำการลดระดับน้ำให้พอดีกับตัวปลาและค่อยๆ เพิ่มระดับน้ำ พร้อมกับการงดหนอนแดงมีชีวิตแต่ให้หนอนแดงแช่แข็งผสมอาหารสำเร็จรูป ในสัดส่วน 70:30 กรัม จากนั่นก็ค่อยๆ ลดหนอนแดงแช่แข็ง พร้อมกับปรับระดับโดยเติมน้ำให้สูงขึ้นเพื่อฝึกให้ลูกปลาบู่ค่อยๆ ยอมรับอาหารสำเร็จรูป จากนั้นคัดเลือกปลาบู่ที่มีขนาด 20-30 กรัม นำมาใส่ถังเลี้ยงขนาด 20 ลิตร จำนวน 3 ตัว/ถัง ทำการชั่งน้ำหนักและวัดความยาวก่อนการทดลอง

การเตรียมสารสกัดกระเทียม

ใช้กระเทียมที่ซื้อจากตลาดแม่โจ้ อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ ปอกเปลือกและล้างให้สะอาด ผึ่งให้แห้งและนำมาสับให้ละเอียด แล้วทำการเติมตัวทำละลายในอัตราส่วนต่อกระเทียมสับ 3:1 นำสารสกัดที่ได้มากรองหยาบด้วยตะแกรงและผ้าขาวบาง และกรองละเอียดด้วย filter membrane 0.45 μm นำสารสกัดไปทำให้แห้งโดยการ freeze dry แล้วเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้ทดลอง

การทดลองเลี้ยงปลาบู่ด้วยอาหารผสมสารสกัดกระเทียม

เลี้ยงปลาบู่ โดยให้อาหารสำเร็จสำหรับปลากินเนื้อผสมสารสกัดกระเทียมชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้น 0.3, 0.5, 1.0, 3.0 และ 5.0% (w/w) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งให้อาหารสำเร็จปกติเป็นเวลา 7 วัน สังเกตพฤติกรรมการกินของลูกปลา เมื่อสิ้นสุดการทดลองเก็บตัวอย่างระบบย่อยอาหารของปลาบู่ ทำการสกัดโปรตีนนำตัวอย่างโปรตีน ทำการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส ไลเปส ทริปซินและไคโมทริปซิน และคำนวณอัตราการกินอาหาร

การเตรียม crude enzyme extract

นำปลาบู่แช่น้ำเย็นเพื่อให้สลบ จากนั้นก็ทำการผ่าช่องท้องและตัดชิ้นส่วนลำไส้มาล้างและปั่นให้เป็นเนื้อเดียวด้วยโกร่งบดโดยแช่อยู่ในถาดน้ำแข็งตลอดเวลา เจือจางด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 xg นาน 15 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดส่วนที่เป็นชั้นไขมันที่ลอยอยู่ด้านบนออก แบ่งเก็บส่วนใสที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

การศึกษากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ย่อยอาหารในปลาบู่

1. ตรวจวัดการแสดงกิจกรรมของอะไมเลสในลำไส้ปลาบู่ตามวิธีการของ Areekijseree et al. (2002) โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Bernfeld (1951) ดังนี้

วิธีวิเคราะห์กิจกรรมของอะไมเลส เตรียมสารละลายซับสเตรต ประกอบด้วย น้ำแป้งความเข้มข้น 10% ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 ปริมาตร 45 ไมโครลิตร สารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 150 ไมโครลิตร และเติม crude

enzyme extract ที่สกัดจาก กระเพาะอาหารและลำไส้ ปริมาตร 5 ไมโครลิตรในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากัน จากนั้นบ่ม (incubate) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยเติมสารละลาย 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที ทำให้เย็น เติมน้ำกลั่นปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของน้ำตาลมอลโทส

2. ตรวจวัดการแสดงกิจกรรมของไลเปสในลำไส้ปลาบู่ตามวิธีการของ Areekijseree et al. (2002) โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Nirpjit and Kaur (2002) ดังนี้

วิธีวิเคราะห์กิจกรรมของไลเปส โดยเตรียมสารละลายซับสเตรต คือ สารละลาย *p*-nitrophenyl palmitate (*p*-NPP) ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ ปริมาตร 100ไมโครลิตร เติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 ปริมาตร 400 ไมโครลิตร จากนั้นจึงเติม crude enzyme extract ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ความเข้มข้น 0.1โมลาร์ ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 xg นาน 15 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร

3. ตรวจวัดการแสดงกิจกรรมของทริปซินในลำไส้ปลาบู่ตามวิธีการของ Sunde *et al.* (2001) โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Rungruangsak-Torrissen et al. (1998) ดังนี้

วิธีวิเคราะห์กิจกรรมของทริปซิน โดยเตรียมสารละลายซับสเตรต คือ สารละลาย N-benzoyl-L-arginine-*p*-nitroanilide (BAPNA) ความเข้มข้น 1.25 มิลลิโมลาร์ ที่มีสารละลาย dimethylformamide เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับสารละลายสารละลายบัฟเฟอร์ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 8.2 ดูด crude enzyme extract ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ใส่ในคิวเวต เติมซับสเตรตปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร ที่เวลา 0-15 วินาที เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง A410 กับเวลา(วินาที) เพื่อหาค่าอัตราเร็วเริ่มต้นของการเกิดปฏิกิริยา (Vi) จากความชัน เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน *p*-nitroaniline

4. ตรวจวัดการแสดงกิจกรรมของไคโมทริปซินในลำไส้ปลาบู่ตามวิธีการของ Sunde et al. (2001) โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Rungruangsak-Torrissen et al. (1998) ดังนี้

วิธีวิเคราะห์กิจกรรมของไคโมทริปซิน โดยเตรียมสารละลายซับสเตรต คือ สารละลาย N-succinyl-ala-ala-pro-phenylalanine-p-nitroanilide (SAPNA) ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ที่มีสารละลาย dimethylformamide เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับสารละลายสารละลาย

บัฟเฟอร์ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 8.2 ดูด crude enzyme extract ปริมาตร 10ไมโครลิตร ใส่ในคิวเวต เติมซับสเตรตปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร ที่เวลา 0-15 วินาที เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง A410 กับเวลา (วินาที) เพื่อหาค่าอัตราเร็วเริ่มต้นของการเกิดปฏิกิริยา (Vi) จากความชันเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน *p*-nitroaniline แบลงค์ประกอบด้วยสารละลายซับสเตรต โดยไม่เติม crude enzyme extract

5. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนใน crude enzyme extract ตามวิธีการของ Lowry et al. (1951)

วิธีวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนใน crude enzyme extract เตรียมสารละลาย bovine serum albumin (BSA) เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นสารละลายมาตรฐานโปรตีน เตรียม reagent โดยผสมสารละลาย A:B:C = 100:1:1 (โดยผสมสารละลาย B กับ C ให้เข้ากันก่อนจึงผสมสารละลาย A ลงไป) (สารละลาย A ประกอบด้วย โซเดียมคาร์บอเนต 20 กรัม น้ำกลั่น 960 มิลลิลิตร สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 3 นอร์มอลปริมาตร 35 มิลลิลิตร) (สารละลาย B ประกอบด้วย คอปเปอร์(II)ซัลเฟต 1 กรัม น้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร) (สารละลาย C ประกอบด้วย โพแทสเซียม-โซเดียมทาร์เทรต 2 กรัม น้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร) Folin-Ciocalteau (ผสมกับน้ำอัตราส่วน 1:1 ก่อนใช้) จากนั้นการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนใน crude enzyme extract ปิเปต crude enzyme extract ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมกับ reagent ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที เติมสารละลาย Folin-Ciocalteau ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน BSA

การคำนวณ

1. อัตราการกินอาหาร (consumption rate) ตามวิธีการของ Yone และ Fujii (1975) จากสมการดังนี้

อัตราการกินอาหาร (เปอร์เซ็นต์ต่อตัวต่อวัน) = $$\frac{F \times 100}{\frac{W_o + W_t}{2} \times \frac{N_o + N_t}{2} \times t}$$

โดย

F = น้ำหนักอาหารแห้งที่ปลากิน (กรัม)

W_o = น้ำหนักปลาเฉลี่ยเริ่มต้น (กรัม)

W_t = น้ำหนักปลาเฉลี่ยสุดท้าย (กรัม)

N_o = จำนวนปลาเริ่มต้น (ตัว)

N_t = จำนวนปลาสุดท้าย (ตัว)

t = ระยะเวลาที่ปลาได้รับอาหารทดลอง (วัน)

2. เปอร์เซ็นต์น้ำหนักเพิ่มขึ้น (% weight gain) คำนวณตามวิธีการของ Wimon et al. (1992) จากสมการ ดังนี้

น้ำหนักเพิ่มขึ้น (%)

$$= \frac{\text{น้ำหนักปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (กรัม)} - \text{น้ำหนักปลาเมื่อเริ่มต้นการทดลอง (กรัม)}}{\text{น้ำหนักเมื่อปลาเริ่มต้น (กรัม)}} \times 100$$

3. ประสิทธิภาพของอาหาร (feed efficiency) คำนวณตามวิธีการของ Wimon et al.(1992) จากสมการ ดังนี้

$$\text{ประสิทธิภาพของอาหาร (FE)} = \frac{\text{น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น}}{\text{น้ำหนักอาหารที่ปลากิน}}$$

4. อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate, SGR) คำนวณตามวิธีการของ Wimon et al. (1992) จากสมการ ดังนี้

$$\text{SGR (\%/วัน)} = \frac{(\text{ln น้ำหนักปลาสุดท้าย} - \text{Inน้ำหนักปลาเริ่มต้น})}{\text{ระยะเวลาทดลอง}} \text{X100}$$

การศึกษาประสิทธิภาพของอาหารที่ผสมด้วยสารสกัดกระเทียมต่อการเจริญเติบโตของปลาบู่

ทำการเลี้ยงปลาบู่ด้วยอาหารผสมสารสกัดกระเทียมที่ทำให้ปลาบู่มีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์สูงที่สุด ติดตามอัตราการเจริญเติบโต เป็นเวลา 2 เดือน โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ให้อาหารสำเร็จปกติ คำนวณเปอร์เซ็นต์น้ำหนักเพิ่มขึ้น (% weight gain) ประสิทธิภาพของอาหาร (FE) และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (SGR)

การศึกษายีนแสดงออก ของเอนไซม์ย่อยอาหารในปลาบู่

1. เทคนิค one-step RT-PCR

1.1. เก็บตัวอย่างกระเพาะและลำไส้ของปลาบู่ นำมาทำการบดให้ละเอียด โดยใช้ไนโตรเจนเหลว รักษาอุณหภูมิของตัวอย่างเย็นจัดตลอดเวลา เป็นการป้องกันการสลายตัวของ total RNA จากนั้นทำการสกัดแยก total RNA โดยใช้ชุดสำเร็จรูป RNA Mini Kit (Biometra, Germany) ตรวจสอบความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของ RNA เครื่องนาโนดรอปสเปกโตร

โฟโตมิเตอร์ (NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer Thermo Science, USA) ที่ค่าการดูดกลืนแสง 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร (Sambrook and Russel, 2001)

1.2. นำ total RNA มาทำปฏิกิริยา PCR ด้วยชุดสำเร็จรูป 1-Step RT-PCR Kit (Thermo Scientific, European) โดยใช้ degenerate primers ของอะไมเลส ไลเปส ทริปซิน และไคโมทริปซิน ที่ถูกออกแบบในตำแหน่งที่ประกอบด้วยลำดับเบสจำเพาะและอนุรักษ์ (conserve region) ของแต่ละเอนไซม์ ในฐานข้อมูล GenBank (ศุภลักษณ์, 2555) ซึ่งมีลำดับเบสดังนี้ คือ

- BU-Amylase-F1 (5'-TAYAAYTTRTGYTCNCGRTCN-3')
- BU-Amylase-R1 (5'-NCCRTANGGRTGNGCYAACAT-3')
- BU-Lipase-F1 (5'-AAYGTNVTNRTNRYNGAYTGG-3')
- BU- Lipase-R1 (5'-NGRRTCDATNRGNAGRTCNRY-3')
- BU-Trypsin-F1 (5'-GGNTAYCRYTTYTGYGGN-3')
- BU-Trypsin-R1 (5'-NSSNCYNCCRCTNTCNCC-3')
- BU-Chymotrypsin-F1 (5'-ATHGTNAACGGNGARRRAVGCN-3')
- BU-Chymotrypsin-R1 (5'-NCCCCANGANACDATNCCNAC-3')

1.3 ตรวจสอบ PCR product โดยใช้ agarose gel electrophoresis นำ PCR product 10 ไมโครลิตร ผสมกับ loadind dye 2 ไมโครลิตร ใช้ อะกาโรส 1% ใน 0.5 x TBE buffer (Tris-borate-EDTA buffer) ใช้สนามไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที เปรียบเทียบขนาดของยีนด้วย 100 bp ladder (Gene direx, Spain) ปริมาตร 6 ไมโครลิตร และย้อมด้วยเอทธิเดียมโบรไมด์ ความเข้มข้น 10% เป็นเวลา 10 นาที ล้างเอทธิเดียมโบรไมด์ที่เป็นส่วนเกินออก จากนั้นนำไปถ่ายภาพภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต ด้วยเครื่อง transluminator

2. เทคนิค two-step RT-PCR

2.1. เก็บตัวอย่างกระเพาะและลำไส้ของปลาบู่ และสกัดแยก RNA ตามขั้นตอนในข้อที่ 6.8.1.1

2.2. นำ RNA มาทำการสังเคราะห์ cDNA ด้วยชุดสำเร็จรูป Thermo Scientific RevertAid First Streand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, European) โดยใช้ไพเมอร์ Oligo (dT)

2.3. ตรวจสอบคุณภาพคอมพลีเมนต์ทารี่ดีเอ็นเอ โดยการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR machine: Biometra, model T personal, Germany) ใช้ไพเมอร์ Forward GAPDH และ

Reverse GAPDH (Positive controls primer) จากชุดสำเร็จรูป Thermo Scientific RevertAid First Streand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, European) ซึ่งมีขนาดแถบดีเอ็นเอ 496 bp จากนั้นตรวจสอบโดยใช้เทคนิค agarose gel electrophoresis ตามขั้นตอนในข้อที่ 6.8.1.3

2.4. นำ cDNA มาทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพเมอร์ของอะไมเลส ไลเปส ทริปซิน และไคโมทริปซิน

2.5. ตรวจสอบ PCR product โดย agarose gel electrophoresis ตามขั้นตอนดังข้อที่ 1.3.

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำข้อมูลไปวิเคราะห์หาค่าความแปรปรวน (Analysis of Variance) ด้วย one-way และ two-way ANOVA เปรียบเทียบกับกลุ่มทดลอง ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

บทที่ 4
ผลการวิจัย

ผลการศึกษาสารสกัดกระเทียมต่อเอนไซม์ย่อยอาหารในปลาบู่ โดยการทดลองแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนแรกทำการศึกษาผลของสารกระเทียมด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกันต่อกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ย่อยอาหารในปลาบู่ และติดตามกิจกรรมของเอนไซม์เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำผลของสารสกัดกระเทียมด้วยตัวทำละลายทั้ง 5 ตัวทำละลาย ที่มีผลกระตุ้นต่อค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ย่อยอาหารในปลาบู่ที่ดีที่สุด มาติดตามอัตราการเจริญเติบโต เป็นเวลา 2 เดือน และศึกษายืนแสดงออกของน้ำย่อยสารอาหารชนิดต่างๆ ของปลาบู่ ได้แก่ อะไมเลส ไลเปส ทริปซิน ไคโมทริปซิน เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ให้อาหารสำเร็จปกติมีผลการวิจัยเป็นลำดับดังนี้

การศึกษาสารสกัดกระเทียมต่อเอนไซม์ย่อยอาหารในปลาบู่

ผลการศึกษาเลี้ยงลูกปลาบู่ขนาด 20-30 กรัม โดยให้อาหารสำเร็จสำหรับปลากินเนื้อผสมสารสกัดกระเทียมชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้น 0, 0.3, 0.5, 1.0, 3.0 และ 5.0% (w/w) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งให้อาหารสำเร็จปกติเป็นเวลา 7 วัน สังเกตพฤติกรรมการกินของลูกปลา เก็บตัวอย่างระบบย่อยอาหารของปลาบู่ มาทดสอบเพื่อหาค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ 4 ชนิด ได้แก่ อะไมเลส ไลเปส ทริปซิน และไคโมทริปซิน สำหรับกลุ่มการทดลอง มีดังนี้

กลุ่มการทดลองที่ 1 อาหารผสมสารสกัดกระเทียมด้วยน้ำ ที่ความเข้มข้น 0, 0.3, 0.5, 1.0, 3.0 และ 5.0% (w/w)

กลุ่มการทดลองที่ 2 อาหารผสมสารสกัดกระเทียมด้วยเอทานอล 50% ที่ความเข้มข้น 0, 0.3, 0.5, 1.0, 3.0 และ 5.0% (w/w)

กลุ่มการทดลองที่ 3 อาหารผสมสารสกัดกระเทียมด้วยเอทานอล 95% ที่ความเข้มข้น 0, 0.3, 0.5, 1.0, 3.0 และ 5.0% (w/w)

กลุ่มการทดลองที่ 4 อาหารผสมสารสกัดกระเทียมด้วยไดเอทิลอีเทอร์ ที่ความเข้มข้น 0, 0.3, 0.5, 1.0, 3.0 และ 5.0% (w/w)

กลุ่มการทดลองที่ 5 อาหารผสมสารสกัดน้ำมันกระเทียม ที่ความเข้มข้น 0, 0.3, 0.5, 1.0, 3.0 และ 5.0% (w/w)

1. ผลของสารสกัดกระเทียมด้วยน้ำต่อเอนไซม์ย่อยอาหารในปลาบู่

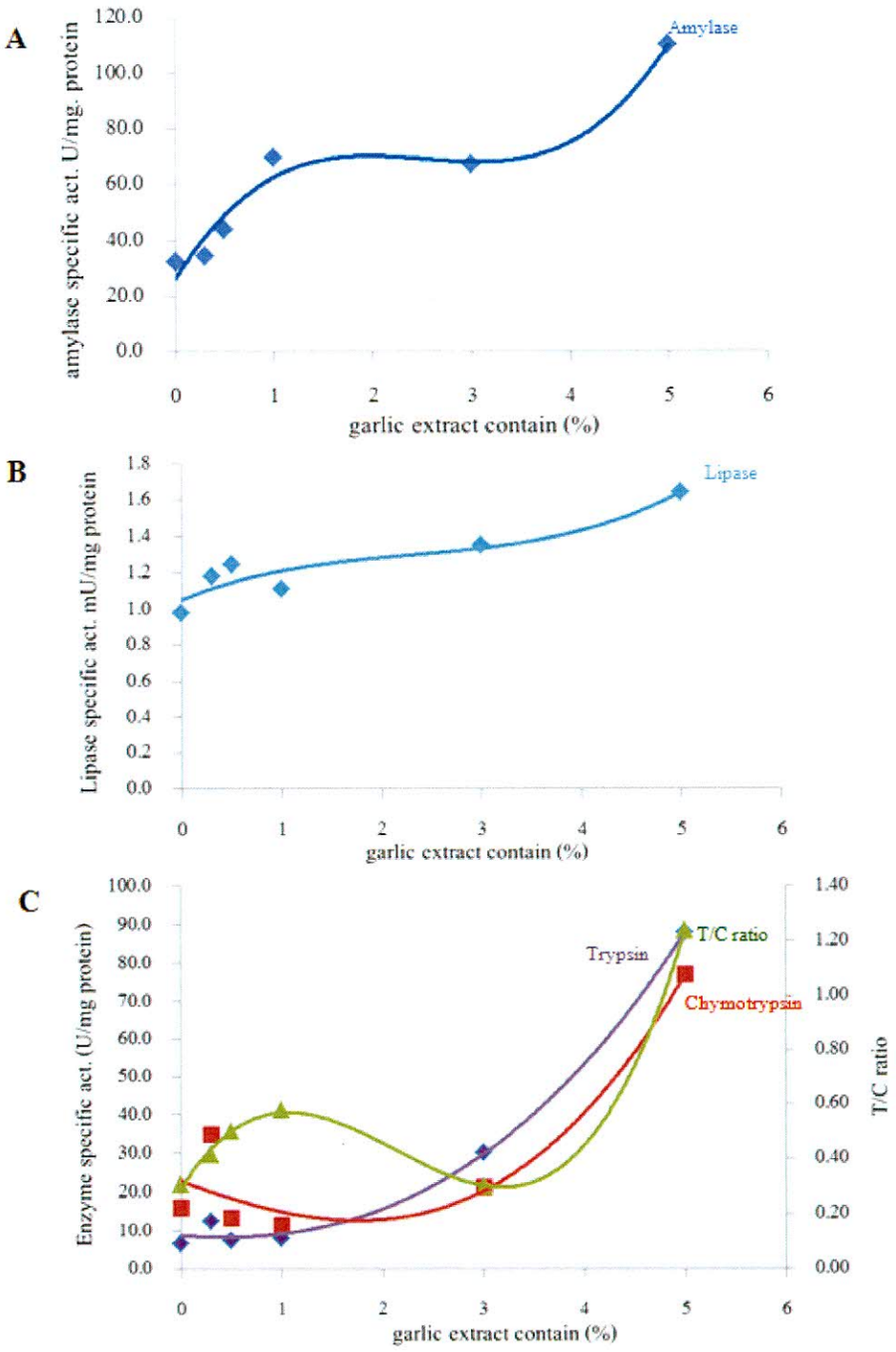
1.1 การทำงานของเอนไซม์ย่อยอาหาร

การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดกระเทียมด้วยน้ำผสมอาหารเพื่อกระตุ้นกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ในปลาบู่ ที่ความเข้มข้น 0, 0.3, 0.5, 1.0, 3.0 และ 5.0% (w/w) ตามลำดับ ให้ผลดังนี้ (ตาราง 1, ภาพ 6)

ตาราง 1 ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ย่อยอาหารในปลาบู่ที่กินอาหารผสมสารสกัดกระเทียมด้วยน้ำที่ความเข้มข้นต่างๆ

	ระดับความเข้มข้นสารสกัดกระเทียมด้วยน้ำ (w/w)					
เอนไซม์	**0%**	**0.3%**	**0.5%**	**1.0%**	**3.0%**	**5.0%**
อะไมเลส (U/mg protein)	32.48±0.006^{c}	34.30±0.002^{c}	44.40±0.013^{bc}	69.60±0.015^{b}	67.00±0.007^{b}	110.26±0.004^{a}
ไลเปส (mU/mg protein)	0.98±0.002^{a}	1.18±0.002^{a}	1.25±0.003^{a}	1.11±0.003^{a}	1.35±0.003^{a}	1.64±0.004^{a}
ทริปซิน (U/mg protein)	6.64±0.002^{c}	12.30±0.002^{c}	7.22±0.002^{c}	7.89±0.001^{c}	30.00±0.001^{b}	88.04±0.004^{a}
ไคโมทริปซิน (U/mg protein)	15.78±0.005^{b}	34.74±0.006^{b}	13.27±0.000^{b}	11.19±0.002^{b}	21.00±0.009^{b}	76.94±0.007^{a}
T/C ratio	0.30±0.394^{b}	0.41±0.654^{b}	0.50±0.167^{b}	0.58±0.684^{b}	0.30±0.520^{b}	1.24±0.347^{a}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย±SD และอักษรตัวยกภาษาอังกฤษแนวนอนแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)



ภาพ 6 ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ย่อยอาหารในปลาบู่ที่กินอาหารผสมสารสกัดกระเทียมด้วยน้ำ ที่ความเข้มข้น 0, 0.3, 0.5, 1.0, 3.0 และ 5.0% (w/w)

A: ค่ากิจกรรมการทำงานของอะไมเลส

B: ค่ากิจกรรมการทำงานของไลเปส

C: ค่ากิจกรรมการทำงานของทริปซิน ไคโมทริปซิน และ T/C ratio

จากการศึกษาค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ในบริเวณที่มีการย่อยอาหารของปลาบู่เปรียบเทียบผลกับชุดควบคุม พบว่า อะไมเลส ในบริเวณที่มีการย่อยอาหารของปลาบู่ที่กินอาหารผสมสารสกัดกระเทียมด้วยน้ำ มีค่ากิจกรรมจำเพาะสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับแต่ละกลุ่มแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) โดยที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w) ให้ผลดีที่สุด รองลงมาที่ความเข้มข้น 1.0% (w/w) และที่ความเข้มข้น 3.0% (w/w) (110.26±0.004, 69.60±0.015 และ 67.00±0.007 U/mg protein) ตามลำดับ และให้ค่าต่ำสุดที่กลุ่มควบคุม (32.48±0.006 U/mg protein) (ตาราง 1, ภาพ 6A)

ไลเปสในบริเวณที่มีการย่อยอาหารของปลาบู่ที่กินอาหารผสมสารสกัดกระเทียมด้วยน้ำ ที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w) มีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์สูงที่สุด รองลงมาที่ความเข้มข้น 3.0% (w/w) และที่ความเข้มข้น 0.5% (w/w) (1.64±0.004, 1.35±0.003 และ 1.25±0.003 mU/mg protein) และให้ค่าต่ำสุดที่กลุ่มควบคุม (0.98±0.002 mU/mg protein) ซึ่งค่ากิจกรรมจำเพาะของไลเปสมีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับแต่ละกลุ่ม ($p>0.05$) (ตาราง 1, ภาพ 6B)

ทริปซินในบริเวณที่มีการย่อยอาหารของปลาบู่ที่กินอาหารผสมสารสกัดกระเทียมด้วยน้ำ พบค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ ของเอนไซม์ ที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w) มีค่าสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับแต่ละกลุ่มแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) รองลงมาที่ความเข้มข้น 3.0% (w/w) (88.04±0.004 และ 30.00±0.001 U/mg protein) ตามลำดับ และให้ค่าต่ำสุดที่กลุ่มควบคุม (6.64±0.002 U/mg protein) (ตาราง 1, ภาพ 6C)

ไคโมทริปซินในบริเวณที่มีการย่อยอาหารของปลาบู่ที่กินอาหารผสมสารสกัดกระเทียมด้วยน้ำ พบค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ ที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w) ให้ผลสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับแต่ละกลุ่มแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) รองลงที่ความเข้มข้น 0.3% (w/w) (76.94±0.007และ 34.74±0.006 U/mg protein) ตามลำดับ และให้ค่าต่ำสุดที่ความเข้มข้น 1.0% (w/w) (11.19±0.002 U/mg protein) (ตาราง 1, ภาพ 6C)

อัตราส่วนระหว่างทริปซินและไคโมทริปซิน (T/C Ratio) ในปลาบู่ที่กินอาหารผสมสารสกัดกระเทียมด้วยน้ำ พบค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ ที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w) ให้ผลสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับแต่ละกลุ่มแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) รองลงที่ความเข้มข้น 0.3% (w/w) (1.24±0.347 และ 0.58±0.684) ตามลำดับ และให้ค่าต่ำสุดที่กลุ่มควบคุม (0.30±0.394) (ตาราง 1, ภาพ 6C)

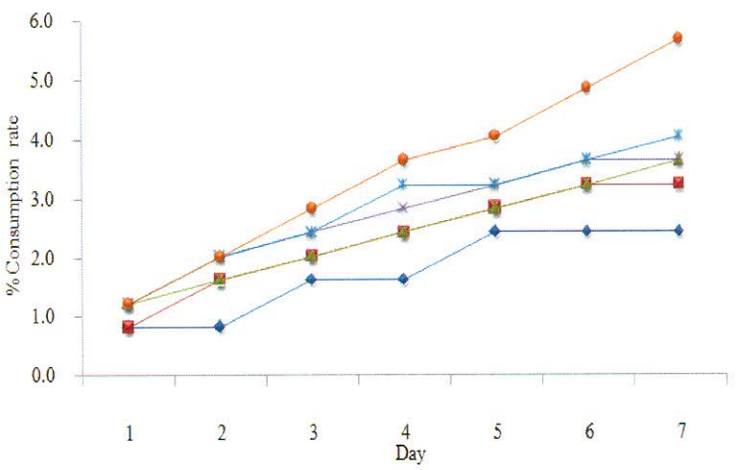
1.2. อัตราการกินอาหาร

ปลาบู่ที่กินอาหารผสมด้วยสารสกัดกระเทียมด้วยน้ำ ที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w) มีอัตราการกินอาหารสูงสุด เท่ากับ 5.67±1.56% ต่อน้ำหนักตัวต่อวัน (ในวันที่ 7) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) รองลงมาที่ความเข้มข้น 3.0% (w/w) มีอัตราการกินอาหาร เท่ากับ 4.05±0.99% ต่อน้ำหนักตัวต่อวัน (ในวันที่ 7) ตามลำดับ และมีอัตราการกินต่ำสุดในกลุ่มควบคุม เท่ากับ 2.43±0.72% ต่อน้ำหนักตัวต่อวัน (ในวันที่ 7) (ตาราง 2, ภาพ 7)

ตาราง 2 ค่าอัตราการกินอาหารในปลาบู่ที่กินอาหารผสมสารสกัดกระเทียมด้วยน้ำที่ความเข้มข้นต่างๆ

	ระดับความเข้มข้นสารสกัดกระเทียมด้วยน้ำ (w/w)					
	0%	**0.3%**	**0.5%**	**1.0%**	**3.0%**	**5.0%**
อัตราการกินอาหาร น้ำหนักตัว/วัน (%)	2.43±0.72[b]	3.24±0.89[ab]	3.64±0.87[ab]	3.64±0.89[ab]	4.05±0.99[ab]	5.67±1.56[a]

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย±SD และอักษรตัวยกภาษาอังกฤษแนวนอนแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)



ภาพ 7 อัตราการกินอาหารในปลาบู่ที่กินอาหารผสมด้วยสารสกัดกระเทียมด้วยน้ำที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

0% 0.3% 0.5% 1.0% 3.0% 5.0% (w/w)

2. ผลของสารสกัดกระเทียมด้วยเอทานอล 50% ต่อเอนไซม์ย่อยอาหารในปลาบู่

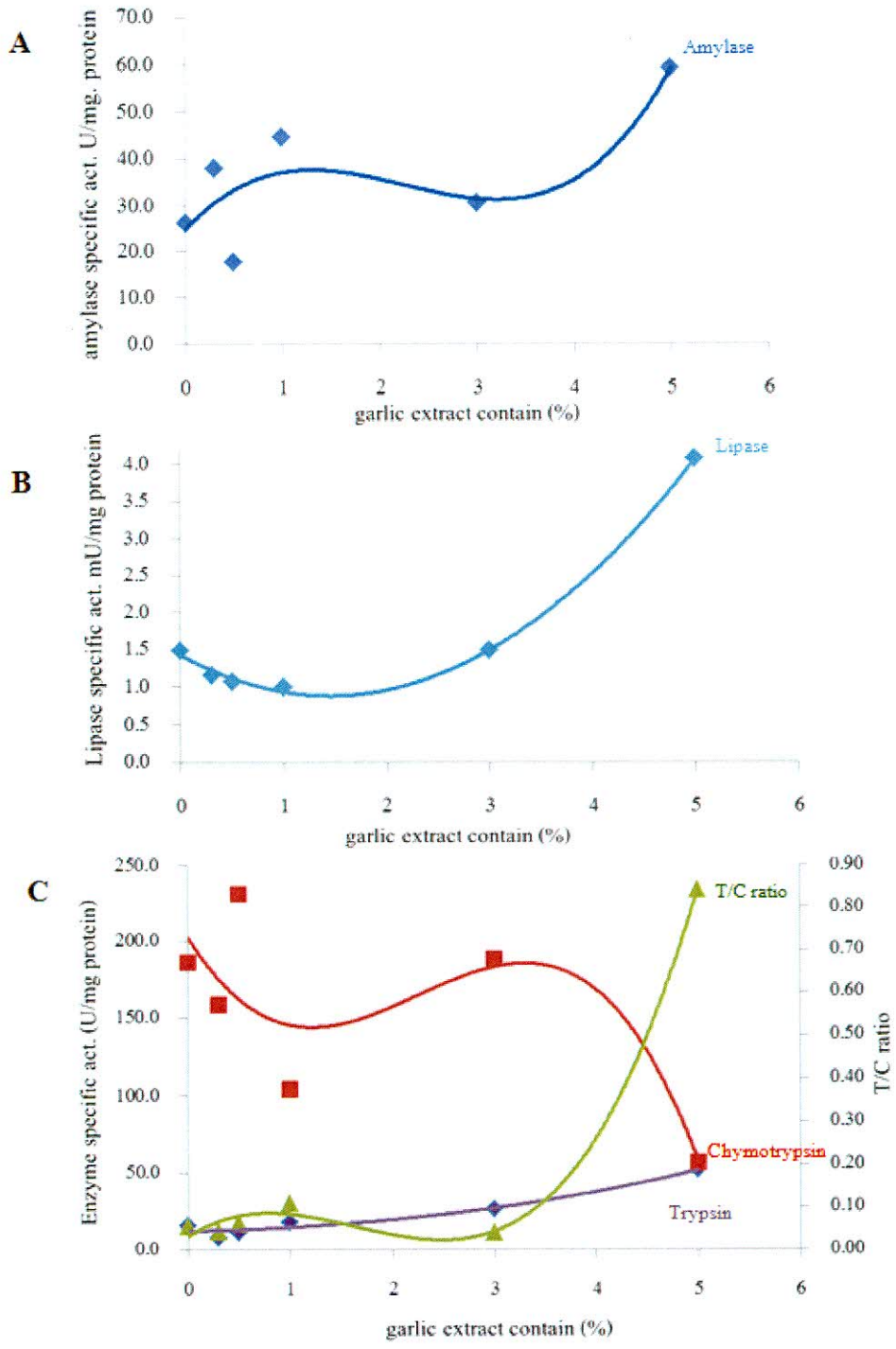
2.1. การทำงานของเอนไซม์ย่อยอาหาร

การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดกระเทียมด้วยเอทานอล 50% ผสมอาหารเพื่อกระตุ้นกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ในปลาบู่ ที่ความเข้มข้น 0, 0.3, 0.5, 1.0, 3.0 และ 5.0% (w/w) ตามลำดับ ให้ผลดังนี้ (ตาราง 3, ภาพ 8)

ตาราง 3 กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ย่อยอาหารในปลาบู่ที่กินอาหารผสมสารสกัดกระเทียมด้วยเอทานอล 50% ที่ความเข้มข้นต่างๆ

	ระดับความเข้มข้นสารสกัดกระเทียมด้วยเอทานอล 50% (w/w)					
เอนไซม์	**0%**	**0.3%**	**0.5%**	**1.0%**	**3.0%**	**5.0%**
อะไมเลส (U/mg protein)	26.27±0.003[a]	38.10±0.007[a]	17.81±0.011[a]	44.49±0.005[a]	30.59±0.008[a]	58.95±0.016[a]
ไลเปส (mU/mg protein)	1.49±0.006[b]	1.15±0.007[b]	1.07±0.007[b]	1.00±0.005[b]	1.48±0.009[b]	4.06±0.011[a]
ทริปซิน (U/mg protein)	15.46±0.006[b]	8.11±0.005[b]	11.37±0.004[b]	17.93±0.002[b]	26.48±0.001[ab]	51.85±0.011[a]
ไคโมทริปซิน (U/mg protein)	186.36±0.002[b]	158.33±0.002[c]	231.43±0.003[a]	104.21±0.001[d]	188.06±0.004[b]	56.73±0.016[e]
T/C ratio	0.05±0.051[b]	0.04±0.058[b]	0.06±0.022[b]	0.11±0.101[b]	0.04±0.068[b]	0.84±0.427[a]

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย±SD และอักษรตัวยกภาษาอังกฤษแนวนอนแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)



ภาพ 8 ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ย่อยอาหารในปลาบู่ที่กินอาหารผสมสารสกัดกระเทียมด้วยเอทานอล 50% ที่ความเข้มข้น 0, 0.3, 0.5, 1.0, 3.0 และ 5.0% (w/w)

A: ค่ากิจกรรมการทำงานของอะไมเลส

B: ค่ากิจกรรมการทำงานของไลเปส

C: ค่ากิจกรรมการทำงานของทริปซิน ไคโมทริปซิน และ T/C ratio

จากการศึกษาค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ในบริเวณที่มีการย่อยอาหารของปลาบู่เปรียบเทียบผลกับชุดควบคุม พบว่า อะไมเลส ในบริเวณที่มีการย่อยอาหารของปลาบู่ที่กินอาหารผสมสารสกัดกระเทียมด้วยเอทานอล 50% ที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w) ให้ผลดีที่สุด รองลงมาที่ความเข้มข้น 0.3% (w/w) (58.95±0.016 และ 44.49±0.005 U/mg protein) ตามลำดับ และให้ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ต่ำสุดที่ความเข้มข้น 0.5% (w/w) (17.81±0.011 U/mg protein) ซึ่งค่ากิจกรรมจำเพาะของอะไมเลสมีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับแต่ละกลุ่ม ($p>0.05$) (ตาราง 3, ภาพ 8A)

ไลเปสในบริเวณที่มีการย่อยอาหารของปลาบู่ที่กินอาหารผสมสารสกัดกระเทียมด้วยเอทานอล 50% ที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w) พบค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ สูงที่สุด เท่ากับ 4.06±0.011 mU/mg protein เมื่อเปรียบเทียบกับแต่ละกลุ่มแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) รองลงมาที่ความเข้มข้น 0% (w/w) มีค่าเท่ากับ 1.49±0.006 mU/mg protein และพบค่าต่ำสุดที่ความเข้มข้น 1.0% (w/w) อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) (1.00±0.005 mU/mg protein) (ตาราง 3, ภาพ 8B)

ทริปซินในบริเวณที่มีการย่อยอาหารของปลาบู่ที่กินอาหารผสมสารสกัดกระเทียมด้วยเอทานอล 50% พบค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ ของเอนไซม์ ที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w) ให้ผลสูงสุด เท่ากับ 51.85±0.011 U/mg protein เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) รองลงมาที่ความเข้มข้น 3.0% (w/w) เท่ากับ 26.48±0.001 U/mg protein และพบค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ ของเอนไซม์ต่ำสุดที่กลุ่มควบคุม เท่ากับ 8.11±0.005 U/mg protein (ตาราง 3, ภาพ 8B)

ไคโมทริปซินในบริเวณที่มีการย่อยอาหารของปลาบู่ที่กินอาหารผสมสารสกัดกระเทียมด้วยเอทานอล 50% พบค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ ที่ความเข้มข้น 0.5% (w/w) สูงที่สุด รองลงที่ความเข้มข้น 3.0% (w/w) (158.33±0.002 และ 188.06±0.004 U/mg protein) ตามลำดับ และให้ค่าต่ำสุดที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w) (56.73±0.016 U/mg protein) ซึ่งค่ากิจกรรมจำเพาะของไคโมทริปซินมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับแต่ละกลุ่ม ($p>0.05$) (ตาราง 2, ภาพ 8C)

อัตราส่วนระหว่างทริปซินและไคโมทริปซิน (T/C Ratio) ในปลาบู่ที่กินอาหารผสมสารสกัดกระเทียมด้วยเอทานอล 50% ที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w) พบค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ สูงที่สุด เท่ากับ 0.84±0.427 เมื่อเปรียบเทียบกับแต่ละกลุ่มแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) รองลงที่ความเข้มข้น 1.0% (w/w) เท่ากับ 0.11±0.101 และพบค่าต่ำสุดที่ความเข้มข้น 0.3% (w/w) และที่ความเข้มข้น 3.0% (w/w) (0.04±0.058 และ 0.04±0.068) ตามลำดับ (ตาราง 3, ภาพ 8C)

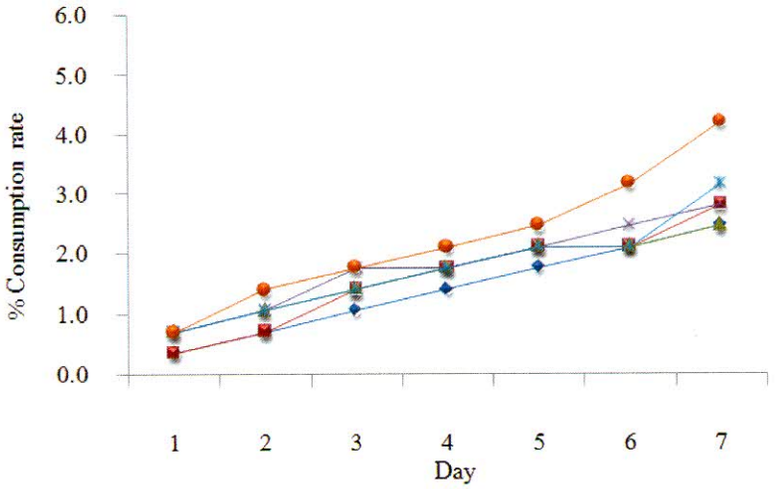
2.2. อัตราการกินอาหาร

ปลาบู่ที่กินอาหารผสมด้วยสารสกัดกระเทียมด้วยเอทานอล 50% ที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w) มีอัตราการกินอาหารสูงสุด เท่ากับ 4.21±1.16% ต่อน้ำหนักตัวต่อวัน (ในวันที่ 7) รองลงมาที่ความเข้มข้น 3.0% (w/w) มีอัตราการกินอาหาร เท่ากับ 3.16±0.80% ต่อน้ำหนักตัวต่อวัน (ในวันที่ 7) และมีอัตราการกินต่ำสุดในกลุ่มควบคุม และในกลุ่มที่ความเข้มข้น 0.5% (w/w) เท่ากับ 2.45± 0.75% และ 2.45± 0.63% ต่อน้ำหนักตัวต่อวัน (ในวันที่ 7) ตามลำดับ ซึ่งอัตราการกินอาหารมีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับแต่ละกลุ่ม ($p>0.05$) (ตาราง 4, ภาพ 9)

ตาราง 4 ค่าอัตราการกินอาหารในปลาบู่ที่กินอาหารผสมสารสกัดกระเทียมด้วยเอทานอล 50% ที่ความเข้มข้นต่างๆ

	ระดับความเข้มข้นสารสกัดกระเทียมด้วยเอทานอล 50% (w/w)					
	0%	**0.3%**	**0.5%**	**1.0%**	**3.0%**	**5.0%**
อัตราการกินอาหาร น้ำหนักตัว/วัน (%)	2.45±0.75[a]	2.81±0.85[a]	2.45±0.63[a]	2.81±0.74[a]	3.16±0.80[a]	4.21±1.16[a]

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย±SD และอักษรตัวยกภาษาอังกฤษแนวนอนแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)



ภาพ 9 อัตราการกินอาหารในปลาบู่ที่กินอาหารผสมด้วยสารสกัดกระเทียมด้วยเอทานอล 50% ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

0% 0.3% 0.5% 1.0% 3.0% 5.0% (w/w)

3. ผลของสารสกัดกระเทียมด้วยเอทานอล 95% ต่อเอนไซม์ย่อยอาหารในปลาบู่

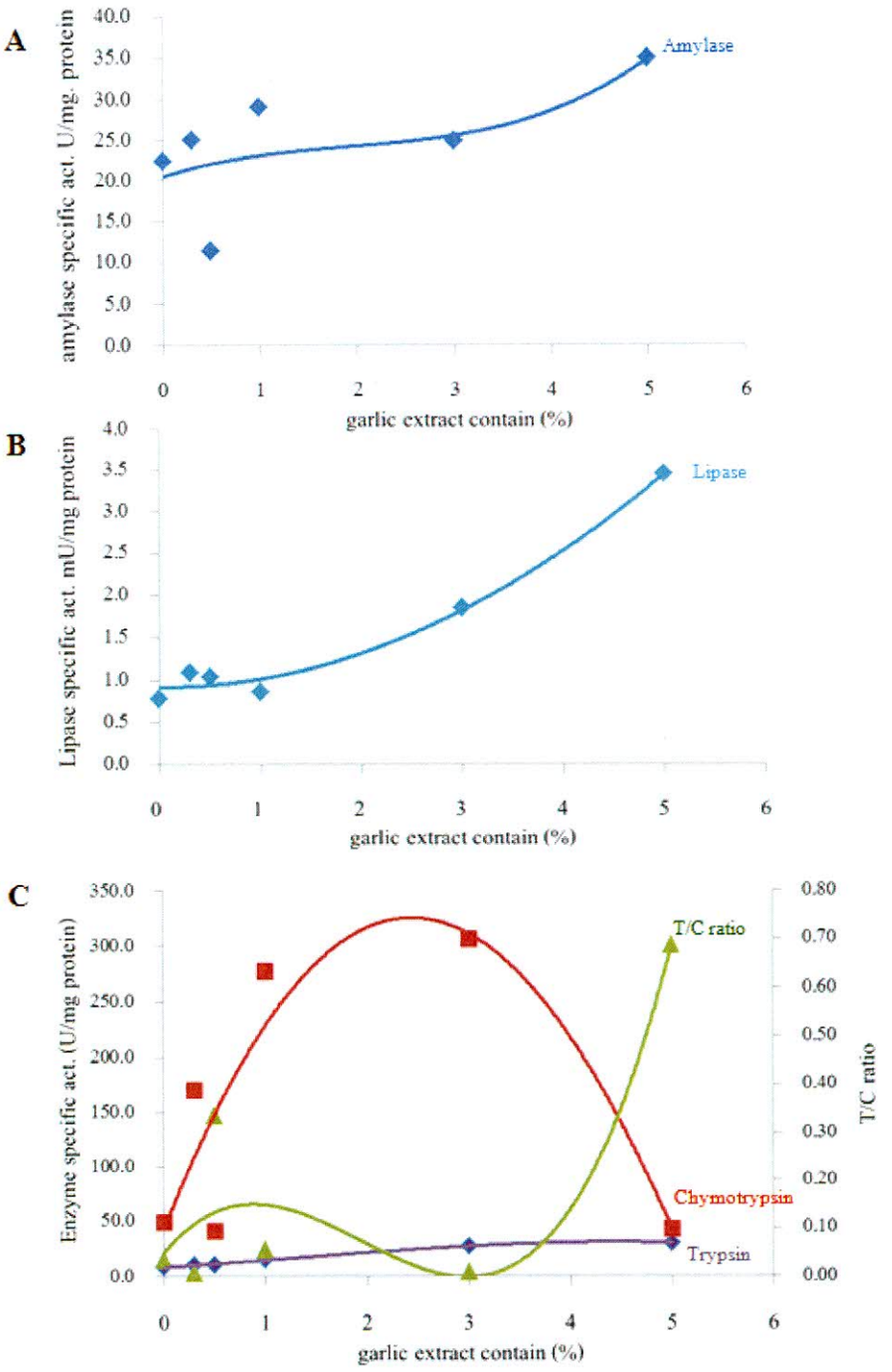
3.1. การทำงานของเอนไซม์ย่อยอาหาร

การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดกระเทียมด้วยเอทานอล 95% ผสมอาหารเพื่อกระตุ้นกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ในปลาบู่ ที่ความเข้มข้น 0, 0.3, 0.5, 1.0, 3.0 และ 5.0% (w/w) ตามลำดับ ให้ผลดังนี้ (ตาราง 5, ภาพ 10)

ตาราง 5 ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ย่อยอาหารในปลาบู่ที่กินอาหารผสมสารสกัดกระเทียมด้วยเอทานอล 95% ที่ความเข้มข้นต่างๆ

	ระดับความเข้มข้นสารสกัดกระเทียมด้วยเอทานอล 95% (w/w)					
เอนไซม์	**0%**	**0.3%**	**0.5%**	**1.0%**	**3.0%**	**5.0%**
อะไมเลส (U/mg protein)	22.39±0.003[ab]	25.09±0.003[ab]	11.37±0.004[b]	28.97±0.003[ab]	24.83±0.003[ab]	32.00±0.008[a]
ไลเปส (mU/mg protein)	0.78±0.006[b]	1.09±0.007[b]	1.04±0.007[b]	0.86±0.005[b]	1.84±0.009[b]	3.45±0.115[a]
ทริปซิน (U/mg protein)	8.14±0.006[a]	9.69±0.007[a]	10.42±0.001[a]	14.66±0.015[a]	26.68±0.006[a]	29.78±0.019[a]
ไคโมทริปซิน (U/mg protein)	49.1±0.006[c]	170.08±0.007[b]	40.20±0.001[c]	277.17±0.001[a]	305.64±0.006[a]	42.40±0.001[c]
T/C ratio	0.03±0.058[b]	0.01±0.011[b]	0.34±0.245[b]	0.05±0.064[b]	0.01±0.014[b]	0.69±0.540[a]

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย±SD และอักษรตัวยกภาษาอังกฤษแนวนอนแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)



ภาพ 10 ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ย่อยอาหารในปลาบู่ที่กินอาหารผสมสารสกัดกระเทียม ด้วยเอทานอล 95% ที่ความเข้มข้น 0, 0.3, 0.5, 1.0, 3.0 และ 5.0% (w/w)

A: ค่ากิจกรรมการทำงานของอะไมเลส

B: ค่ากิจกรรมการทำงานของไลเปส

C: ค่ากิจกรรมการทำงานของทริปซิน ไคโมทริปซิน และ T/C ratio

จากการศึกษาค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ในบริเวณที่มีการย่อยอาหารของปลาบู่เปรียบเทียบผลกับชุดควบคุม พบว่า อะไมเลส ในบริเวณที่มีการย่อยอาหารของปลาบู่ที่กินอาหารผสมสารสกัดกระเทียมด้วยเอทานอล 95% ที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w) ให้ผลดีที่สุด เท่ากับ 32.00±0.008 U/mg protein เมื่อเปรียบเทียบกับแต่ละกลุ่มแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) รองลงมาที่ความเข้มข้น 1.0% (w/w) และที่ความเข้มข้น 3.0% (w/w) (28.97±0.003 และ 24.83±0.003 U/mg protein) ตามลำดับ และให้ค่าต่ำสุดที่ความเข้มข้น 0.5% (w/w) (11.37±0.004 U/mg protein) (ตาราง 5, ภาพ 10A)

ไลเปสในบริเวณที่มีการย่อยอาหารของปลาบู่ที่กินอาหารผสมสารสกัดกระเทียมด้วยเอทานอล 95% ที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w) มีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์สูงที่สุด เท่ากับ 3.45±0.115 mU/mg protein เมื่อเปรียบเทียบกับแต่ละกลุ่มแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) รองลงมาที่ความเข้มข้น 3.0% (w/w) และที่ความเข้มข้น 0.3% (w/w) (1.84±0.009 และ 1.09±0.007 mU/mg protein) และให้ค่าต่ำสุดที่ความเข้มข้น 0% (w/w) (0.78±0.006 mU/mg protein) (ตาราง 5, ภาพ 10B)

ทริปซินในบริเวณที่มีการย่อยอาหารของปลาบู่ที่กินอาหารผสมสารสกัดกระเทียมด้วยเอทานอล 95% ที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w) พบค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ สูงที่สุด เท่ากับ 29.78±0.019 U/mg protein รองลงมาที่ความเข้มข้น 3.0% (w/w) 26.68±0.006 U/mg protein และพบค่าต่ำสุดที่กลุ่มควบคุม เท่ากับ 8.14±0.006 U/mg protein ซึ่งค่ากิจกรรมจำเพาะของทริปซินมีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($p>0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับแต่ละกลุ่ม ($p>0.05$) (ตาราง 5, ภาพ 10C)

ไคโมทริปซินในบริเวณที่มีการย่อยอาหารของปลาบู่ที่กินอาหารผสมสารสกัดกระเทียมด้วยเอทานอล 95% ที่ความเข้มข้น 3.0% (w/w) พบค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ สูงที่สุด เท่ากับ 305.64±0.006 U/mg protein รองลงที่ความเข้มข้น 1.0% (w/w) เท่ากับ 277.17±0.001 U/mg protein และพบค่าต่ำสุดที่ความเข้มข้น 1.0% (w/w) เท่ากับ 40.20±0.001 U/mg protein ซึ่งค่ากิจกรรมจำเพาะของไคโมทริปซินเมื่อเปรียบเทียบกับแต่ละกลุ่มแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) (ตาราง 5, ภาพ 10C)

อัตราส่วนระหว่างทริปซินและไคโมทริปซิน (T/C Ratio) ในปลาบู่ที่กินอาหารผสมสารสกัดกระเทียมด้วยเอทานอล 95% ที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w) พบค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ สูงที่สุด เท่ากับ 0.69±0.540 เมื่อเปรียบเทียบกับแต่ละกลุ่มมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) รองลงที่ความเข้มข้น 0.3% (w/w) เท่ากับ 0.34±0.245 และพบค่าต่ำสุดที่ความเข้มข้น 1.0% (w/w) และ 3.0% (w/w) (0.01±0.011 และ 0.01±0.014) (ตาราง 5, ภาพ 10C)

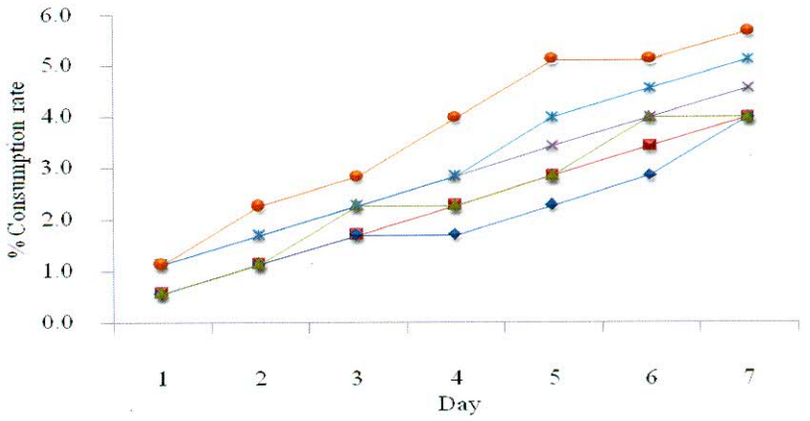
3.2. อัตราการกินอาหาร

ปลาบู่ที่กินอาหารผสมด้วยสารสกัดกระเทียมด้วยเอทานอล 95% ที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w) มีอัตราการกินอาหารสูงสุด เท่ากับ 5.66±1.56% ต่อน้ำหนักตัวต่อวัน (ในวันที่ 7) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) รองลงมาที่ความเข้มข้น 3.0% (w/w) มีอัตราการกินอาหาร เท่ากับ 5.09±1.49% ต่อน้ำหนักตัวต่อวัน (ในวันที่ 7) และพบอัตราการกินต่ำสุดในกลุ่มควบคุม ในกลุ่มที่ความเข้มข้น 0.3% (w/w) และในกลุ่มที่ความเข้มข้น 0.5% (w/w) เท่ากับ 3.96±1.12% 3.96±1.22% และ 3.96±1.29% ต่อน้ำหนักตัวต่อวัน (ในวันที่ 7) ตามลำดับ (ตาราง 6, ภาพ 11)

ตาราง 6 ค่าอัตราการกินอาหารในปลาบู่ที่กินอาหารผสมสารสกัดกระเทียมด้วยเอทานอล 95% ที่ที่ความเข้มข้นต่างๆ

	ระดับความเข้มข้นสารสกัดกระเทียมด้วยเอทานอล 95% (w/w)					
	0%	**0.3%**	**0.5%**	**1.0%**	**3.0%**	**5.0%**
อัตราการกินอาหาร น้ำหนักตัว/วัน (%)	3.96±1.12[b]	3.96±1.22[ab]	3.96±1.29[ab]	4.53±1.22[ab]	5.09±1.49[ab]	5.66±1.56[a]

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย±SD และอักษรตัวยกภาษาอังกฤษแนวนอนแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)



ภาพ 11 อัตราการกินอาหารในปลาบู่ที่กินอาหารผสมด้วยสารสกัดกระเทียมด้วยเอทานอล 95% ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

0% 0.3% 0.5% 1.0% 3.0% 5.0% (w/w)

4. ผลของสารสกัดกระเทียมด้วยไดเอทิลอีเทอร์ ต่อเอนไซม์ย่อยอาหารในปลาบู่

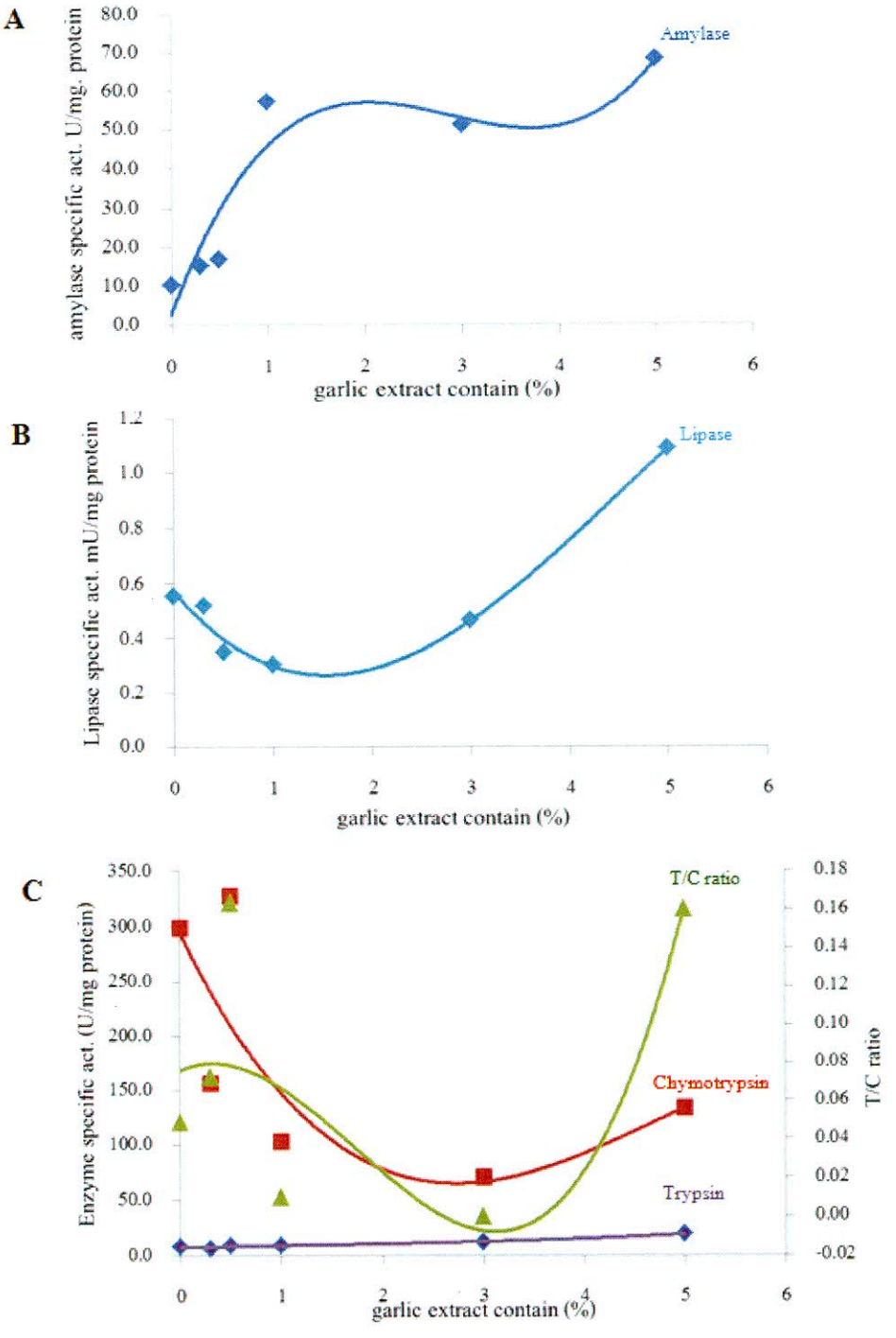
4.1. การทำงานของเอนไซม์ย่อยอาหาร

การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดกระเทียมด้วยไดเอทิลอีเทอร์ ผสมอาหารเพื่อกระตุ้นกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ในปลาบู่ ที่ความเข้มข้น 0, 0.3, 0.5, 1.0, 3.0 และ 5.0% (w/w) ตามลำดับ ให้ผลดังนี้ (ตาราง 7, ภาพ 12)

ตาราง 7 ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ย่อยอาหารในปลาบู่ที่กินอาหารผสมสารสกัดกระเทียมด้วยไดเอทิลอีเทอร์ ที่ความเข้มข้นต่างๆ

	ระดับความเข้มข้นสารสกัดกระเทียมด้วยไดเอทิลอีเทอร์ (w/w)					
เอนไซม์	**0%**	**0.3%**	**0.5%**	**1.0%**	**3.0%**	**5.0%**
อะไมเลส (U/mg protein)	10.35±0.001[c]	15.37±0.002[bc]	16.86±0.005[bc]	57.16±0.002[a]	51.29±0.005[ab]	68.41±0.008[a]
ไลเปส (mU/mg protein)	0.55±0.002[a]	0.52±0.003[a]	0.35±0.003[a]	0.30±0.001[a]	0.46±0.001[a]	1.09±0.003[a]
ทริปซิน (U/mg protein)	8.26±0.001[a]	6.07±0.003[a]	9.89±0.003[a]	9.27±0.002[a]	12.24±0.002[a]	18.91±0.002[a]
ไคโมทริปซิน (U/mg protein)	298.86±0.007[b]	155.82±0.005[c]	327.46±0.005[a]	102.95±0.004[e]	70.10±0.005[f]	132.60±0.009[d]
T/C ratio	0.05±0.074[a]	0.07±0.075[a]	0.16±0.263[a]	0.01±0.018[a]	0.00±0.000[a]	0.16±0.069[a]

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย±SD และอักษรตัวยกภาษาอังกฤษแนวนอนแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)



ภาพ 12 ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ย่อยอาหารในปลาบู่ที่กินอาหารผสมสารสกัดกระเทียมด้วยไดเอทิลอีเทอร์ ที่ความเข้มข้น 0, 0.3, 0.5, 1.0, 3.0 และ 5.0% (w/w)

A: ค่ากิจกรรมการทำงานของอะไมเลส

B: ค่ากิจกรรมการทำงานของไลเปส

C: ค่ากิจกรรมการทำงานของทริปซิน ไคโมทริปซิน และ T/C ratio

จากการศึกษาค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ในบริเวณที่มีการย่อยอาหารของปลาบู่เปรียบเทียบผลกับชุดควบคุม พบว่า อะไมเลสในบริเวณที่มีการย่อยอาหารของปลาบู่ที่กินอาหารผสมสารสกัดกระเทียมด้วยไดเอทิลอีเทอร์ ที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w) มีค่ากิจกรรมจำเพาะสูงที่สุดเท่ากับ 68.41±0.008 U/mg protein เมื่อเปรียบเทียบกับแต่ละกลุ่มแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) รองลงมาที่ความเข้มข้น 1.0% (w/w) และที่ความเข้มข้น 3.0% (w/w) เท่ากับ 57.16±0.002 และ 51.29±0.005 U/mg protein ตามลำดับ และพบค่าต่ำสุดในกลุ่มควบคุม เท่ากับ 10.35±0.001 U/mg protein (ตาราง 7, ภาพ 12A)

ไลเปสในบริเวณที่มีการย่อยอาหารของปลาบู่ที่กินอาหารผสมสารสกัดกระเทียมด้วยไดเอทิลอีเทอร์ ที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w) มีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์สูงที่สุด เท่ากับ 1.09±0.003 mU/mg protein รองลงมาที่ความเข้มข้น 0% (w/w) และที่ความเข้มข้น 0.5% (w/w) เท่ากับ 0.55±0.002 และ 0.52±0.003 mU/mg protein และพบค่าต่ำสุดที่ความเข้มข้น 1.0% (w/w) (0.30±0.001 mU/mg protein) ซึ่งค่ากิจกรรมจำเพาะของไลเปสมีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับแต่ละกลุ่ม ($p>0.05$) (ตาราง 7, ภาพ 12B)

ทริปซินในบริเวณที่มีการย่อยอาหารของปลาบู่ที่กินอาหารผสมสารสกัดกระเทียมด้วยไดเอทิลอีเทอร์ ที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w) พบค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์สูงที่สุด เท่ากับ 18.91±0.002 U/mg protein รองลงมาที่ความเข้มข้น 3.0% (w/w) เท่ากับ 12.24±0.002 U/mg protein และพบค่าต่ำสุดที่ความเข้มข้น 0.3% (w/w) เท่ากับ 6.07±0.003 U/mg protein ซึ่งค่ากิจกรรมจำเพาะของทริปซินมีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับแต่ละกลุ่ม ($p>0.05$) (ตาราง 7, ภาพ 12C)

ไคโมทริปซินในบริเวณที่มีการย่อยอาหารของปลาบู่ที่กินอาหารผสมสารสกัดกระเทียมด้วยไดเอทิลอีเทอร์ ที่ความเข้มข้น 0.5% (w/w) พบค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ สูงที่สุด เท่ากับ 327.46±0.005 U/mg protein รองลงมาที่กลุ่มควบคุม 298.86±0.007 U/mg protein และให้พบค่าต่ำสุดที่ความเข้มข้นระดับความเข้มข้น 3.0% (w/w) เท่ากับ 70.10±0.005 U/mg protein ซึ่งค่ากิจกรรมจำเพาะของไคโมทริปซิน เมื่อเปรียบเทียบกับแต่ละกลุ่มแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) (ตาราง 7, ภาพ 12C)

อัตราส่วนระหว่างทริปซินและไคโมทริปซิน (T/C Ratio) ในปลาบู่ที่กินอาหารผสมสารสกัดกระเทียมด้วยไดเอทิลอีเทอร์ ที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w) และในกลุ่มที่ความเข้มข้น 0.5% (w/w) พบค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ มีค่าสูงสุด เท่ากับ 0.16±0.069 และ 0.16±0.263 ตามลำดับ และพบค่าต่ำสุดที่ความเข้มข้น 3.0% (w/w) (0.00±0.000) ซึ่งค่า T/C Ratio มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับแต่ละกลุ่ม ($p>0.05$) (ตาราง 7, ภาพ 12C)

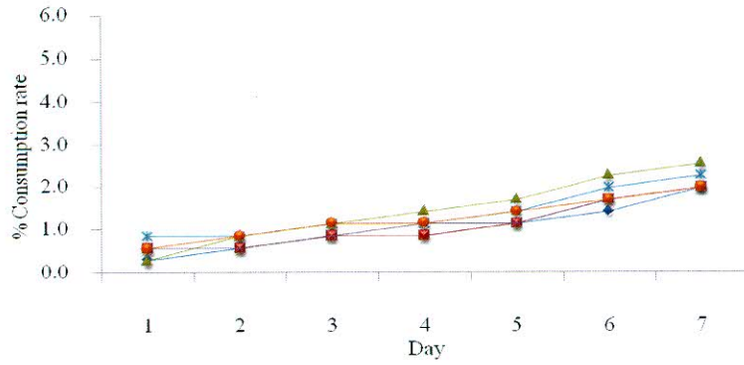
4.2. อัตราการกินอาหาร

ปลาบู่ที่กินอาหารผสมด้วยสารสกัดกระเทียมด้วยไดเอทิลอีเทอร์ ที่ความเข้มข้น 0.5% (w/w) มีอัตราการกินอาหารสูงสุด เท่ากับ 2.54±0.78% ต่อน้ำหนักตัวต่อวัน (ในวันที่ 7) รองลงมาที่ความเข้มข้น 3.0% (w/w) มีอัตราการกินอาหาร เท่ากับ 2.26±0.55% ต่อน้ำหนักตัวต่อวัน (ในวันที่ 7) และมีอัตราการกินอาหารต่ำสุดในกลุ่มควบคุม ในกลุ่มที่ความเข้มข้น 0.3% (w/w) ในกลุ่มที่ความเข้มข้น 1.0% (w/w) และในกลุ่มที่ความเข้มข้น 5.0%(w/w) เท่ากับ 1.97±0.56% 1.97±0.56% 1.97±0.54% และ1.97±0.48% ต่อน้ำหนักตัวต่อวัน (ในวันที่ 7) ตามลำดับ (ตาราง 8, ภาพ 12) ซึ่งอัตราการกินอาหารมีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับแต่ละกลุ่ม ($p>0.05$) (ตาราง 7, ภาพ 13)

ตาราง 8 ค่าอัตราการกินอาหารในปลาบู่ที่กินอาหารผสมสารสกัดกระเทียมด้วยไดเอทิลอีเทอร์ที่ความเข้มข้นต่างๆ

	ระดับความเข้มข้นสารสกัดกระเทียมด้วยไดเอทิลอีเทอร์ (w/w)					
	0%	**0.3%**	**0.5%**	**1.0%**	**3.0%**	**5.0%**
อัตราการกินอาหาร น้ำหนักตัว/วัน (%)	1.97±0.56[a]	1.97±0.55[a]	2.54±0.78[a]	1.97±0.54[a]	2.26±0.55[a]	1.97±0.48[a]

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย±SD และอักษรตัวยกภาษาอังกฤษแนวนอนแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)



ภาพ 13 อัตราการกินอาหารในปลาบู่ที่กินอาหารผสมด้วยสารสกัดกระเทียมด้วยไดเอทิลอีเทอร์ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

0% 0.3% 0.5% 1.0% 3.0% 5.0% (w/w)

5. ผลของของน้ำมันกระเทียมและน้ำมันถั่วเหลือง ต่อเอนไซม์ย่อยอาหารในปลาบู่

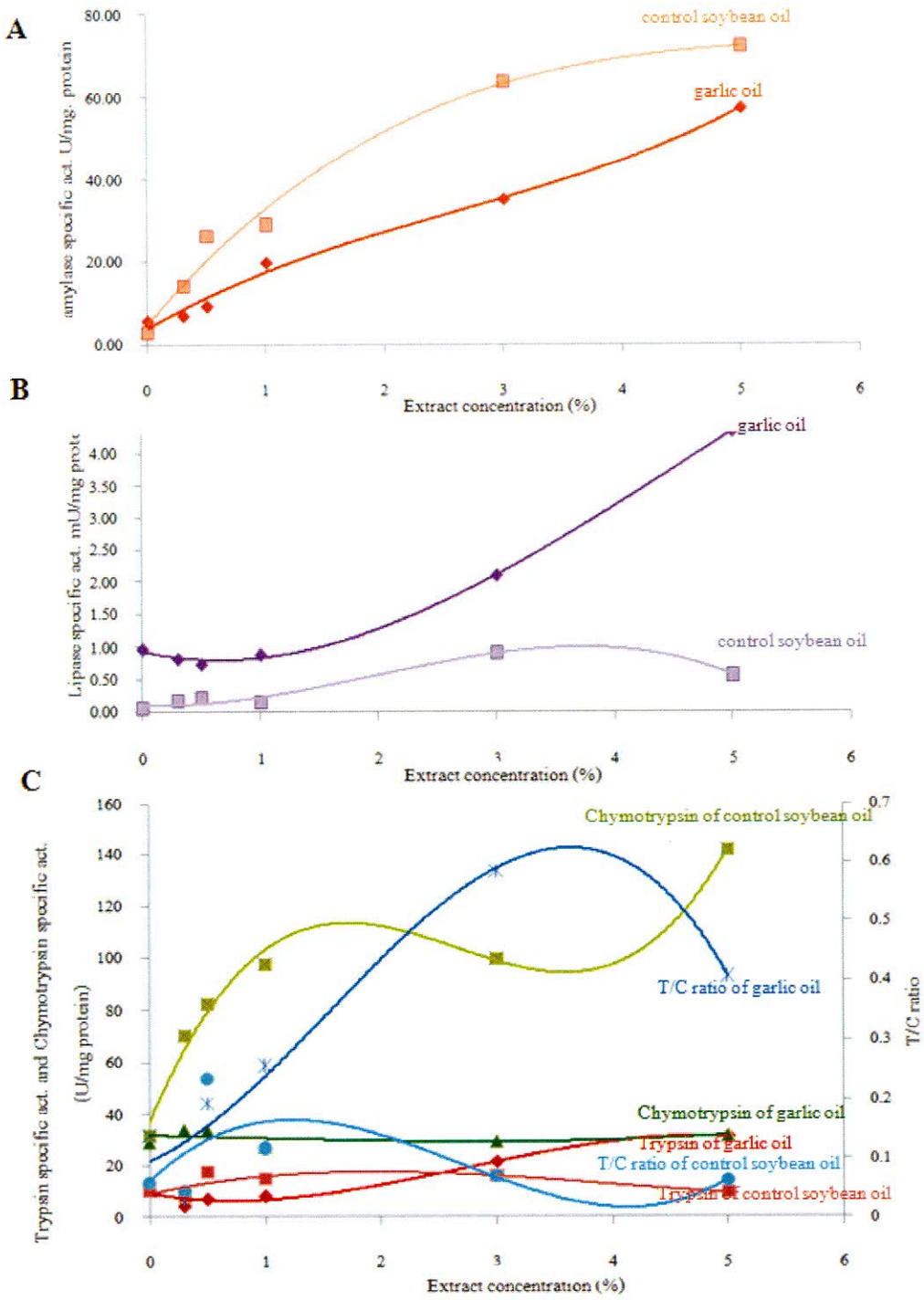
5.1. การทำงานของเอนไซม์ย่อยอาหาร

การศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันกระเทียม และน้ำมันถั่วเหลือง ที่ผสมอาหารเพื่อเร่งกระตุ้นกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ในปลาบู่ ที่ความเข้มข้น 0, 0.3, 0.5, 1.0, 3.0 และ 5.0% (w/w) ตามลำดับ ให้ผลดังนี้ (ตาราง 9, ภาพ 14)

ตาราง 9 ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ย่อยอาหารในปลาบู่ที่กินอาหารผสมน้ำมันกระเทียม และน้ำมันถั่วเหลือง ที่ความเข้มข้นต่างๆ

	ระดับความเข้มข้นของน้ำมันกระเทียมและและน้ำมันถั่วเหลือง (w/w)					
เอนไซม์	0%	0.3%	0.5%	1.0%	3.0%	5.0%
<u>อะไมเลส</u>						
(U/mg protein)						
น้ำมันกระเทียม	5.61±0.001^{d}	6.87±0.001^{d}	9.17±0.002^{d}	19.65±0.003^{c}	35.17±0.002^{b}	57.28±0.002^{a}
น้ำมันถั่วเหลือง	2.94±0.001^{c}	13.99±0.001^{c}	26.10±0.004^{b}	29.08±0.005^{b}	63.71±0.002^{a}	72.04±0.002^{a}
<u>ไลเปส</u>						
(mU/mg protein)						
น้ำมันกระเทียม	0.97±0.001^{c}	0.82±0.006^{c}	0.74±0.004^{c}	0.89±0.003^{c}	2.10±0.007^{b}	4.35±0.004^{a}
น้ำมันถั่วเหลือง	0.05±0.002^{b}	0.16±0.008^{b}	0.20±0.004^{ab}	0.14±0.003^{b}	0.91±0.086^{a}	0.56±0.003^{ab}
<u>ทริปซิน</u>						
(U/mg protein)						
น้ำมันกระเทียม	10.70±0.002^{bc}	4.10±0.003^{c}	6.72±0.002^{bc}	7.83±0.001^{bc}	21.29±0.003^{ab}	31.15±0.002^{a}
น้ำมันถั่วเหลือง	9.84±0.002^{a}	7.87±0.002^{a}	17.27±0.005^{a}	14.61±0.003^{a}	15.82±0.001^{a}	9.46±0.004^{a}
<u>ไคโมทริปซิน</u>						
(U/mg protein)						
น้ำมันกระเทียม	29.20±0.003^{a}	34.04±0.003^{a}	33.80±0.010^{a}	27.33±0.005^{a}	29.53±0.004^{a}	31.76±0.007^{a}
น้ำมันถั่วเหลือง	31.99±0.001^{b}	70.20±0.005^{b}	82.67±0.001^{ab}	97.69±0.005^{ab}	99.59±0.009^{ab}	141.85±0.006^{a}
<u>T/C ratio</u>						
น้ำมันกระเทียม	0.14±0.241^{a}	0.03±0.046^{a}	0.19±0.076^{a}	0.26±0.309^{a}	0.58±1.010^{a}	0.41±0.364^{a}
น้ำมันถั่วเหลือง	0.06±0.100^{b}	0.04±0.077^{b}	0.24±0.056^{a}	0.12±0.110^{ab}	0.07±0122^{ab}	0.06±0.054^{b}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย±SD และอักษรตัวยกภาษาอังกฤษแนวนอนแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)



ภาพ 14 ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ย่อยอาหารในปลาบู่ที่กินอาหารผสมน้ำมันกระเทียมและน้ำมันถั่วเหลือง ที่ความเข้มข้น 0, 0.3, 0.5, 1.0, 3.0 และ 5.0% (w/w)

A: ค่ากิจกรรมการทำงานของอะไมเลส

B: ค่ากิจกรรมการทำงานของไลเปส

C: ค่ากิจกรรมการทำงานของทริปซิน ไคโมทริปซิน และ T/C ratio

จากการศึกษาค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ในบริเวณที่มีการย่อยอาหารของปลาบู่เปรียบเทียบผลกับชุดควบคุม พบว่า อะไมเลสในบริเวณที่มีการย่อยอาหารของปลาบู่ที่กินอาหารผสมน้ำมันกระเทียม ที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w) พบค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ สูงที่สุด เท่ากับ 57.28±0.002 U/mg protein เมื่อเปรียบเทียบกับแต่ละกลุ่มแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) รองลงมาที่ความเข้มข้น 1.0 % (w/w) และที่ความเข้มข้น 3.0% (w/w) เท่ากับ 35.17±0.002 และ 19.65±0.003 U/mg protein ตามลำดับ และพบค่าต่ำสุดที่กลุ่มควบคุม เท่ากับ 5.61±0.001 U/mg protein และปลาบู่ที่กินอาหารผสมน้ำมันถั่วเหลือง ที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w) ให้ผลสูงสุด รองลงมาที่ความเข้มข้น 3.0 % (w/w) มีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ เท่ากับ 72.04±0.002 และ 63.71±0.002 U/mg protein ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับแต่ละกลุ่มแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) และพบค่าต่ำสุดที่กลุ่มควบคุม เท่ากับ 2.94±0.001 U/mg protein (ตาราง 9, ภาพ 14A)

ไลเปสในบริเวณที่มีการย่อยอาหารของปลาบู่ที่กินอาหารผสมน้ำมันกระเทียม ที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w) มีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์สูงสุด เท่ากับ 4.35±0.004 mU/mg protein เมื่อเปรียบเทียบกับแต่ละกลุ่มแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) รองลงมาที่ความเข้มข้น 3.0% (w/w) 2.10±0.007 mU/mg protein และพบค่าต่ำสุดที่ความเข้มข้น 0.5% (w/w) เท่ากับ 0.98±0.002 mU/mg protein และปลาบู่ที่กินอาหารผสมน้ำมันถั่วเหลือง ที่ความเข้มข้น 3.0% (w/w) มีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์สูงที่สุด เท่ากับ 0.91±0.086 mU/mg protein เมื่อเปรียบเทียบกับแต่ละกลุ่มแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) รองลงมาที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w) เท่ากับ 0.56±0.003 mU/mg protein และพบค่าต่ำสุดที่กลุ่มควบคุม เท่ากับ 0.05±0.002 mU/mg protein (ตาราง 9, ภาพ 14B)

ทริปซินในบริเวณที่มีการย่อยอาหารของปลาบู่ที่กินอาหารผสมน้ำมันกระเทียม ที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w) พบค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ สูงสุด เท่ากับ 31.15±0.002 U/mg protein เมื่อเปรียบเทียบกับแต่ละกลุ่มแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) รองลงมาที่ความเข้มข้น 3.0% (w/w) เท่ากับ 21.29±0.003 U/mg protein และให้พบค่าต่ำสุดที่ความเข้มข้น 0.3% (w/w) เท่ากับ 4.10±0.003 U/mg protein และปลาบู่ที่กินอาหารผสมน้ำมันถั่วเหลือง ที่ความเข้มข้น 0.5% (w/w) พบค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ สูงสุด เท่ากับ 17.27±0.005 U/mg protein รองลงมาที่ความเข้มข้น 3.0% (w/w) เท่ากับ 15.82±0.001 U/mg protein และพบค่าต่ำสุดที่ความเข้มข้น 0.3% (w/w) เท่ากับ 7.87±0.002 U/mg protein ซึ่งค่ากิจกรรมจำเพาะของทริปซินในปลาบู่ที่กินอาหารผสมน้ำมันถั่วเหลือง เมื่อเปรียบเทียบกับแต่ละกลุ่มมีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($p>0.05$) (ตาราง 9, ภาพ 14C)

ไคโมทริปซินในบริเวณที่มีการย่อยอาหารของปลาบู่ที่กินอาหารผสมน้ำมันกระเทียม ที่ความเข้มข้น 0.3% (w/w) พบค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ สูงที่สุด เท่ากับ 34.04±0.003 U/mg protein รองลงที่ความเข้มข้น 0.5% (w/w) เท่ากับ 33.80±0.010 U/mg protein

และพบค่าต่ำสุดที่ความเข้มข้น 1.0% (w/w) เท่ากับ 27.33±0.005 U/mg protein ซึ่งค่ากิจกรรมจำเพาะของไคโมทริปซินในกลุ่มของปลาบู่ที่กินอาหารผสมน้ำมันกระเทียมมีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับแต่ละกลุ่ม ($p>0.05$) และปลาบู่ที่กินอาหารผสมน้ำมันถั่วเหลือง ที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w) พบค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ สูงที่สุด เท่ากับ 141.85±0.006 U/mg protein เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) รองลงที่ความเข้มข้น 3.0% (w/w) เท่ากับ 99.59±0.009 U/mg protein และพบค่าต่ำสุดที่ความเข้มข้น 0.3% (w/w) เท่ากับ 70.20±0.005 U/mg protein (ตาราง 9, ภาพ 14C)

อัตราส่วนระหว่างทริปซินและไคโมทริปซิน (T/C Ratio) ในปลาบู่ที่กินอาหารผสมน้ำมันกระเทียม ที่ความเข้มข้น 3.0% (w/w) มีค่าสูงที่สุด เท่ากับ 0.58±1.010 รองลงที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w) เท่ากับ 0.41±0.364 และพบค่าต่ำสุดที่ความเข้มข้น 0.3% (w/w) เท่ากับ 0.03±0.046 ซึ่งค่ากิจกรรมจำเพาะของ T/C Ratio ในกลุ่มของปลาบู่ที่กินอาหารผสมน้ำมันกระเทียมมีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับแต่ละกลุ่ม ($p>0.05$) และปลาบู่ที่กินอาหารผสมน้ำมันถั่วเหลือง ที่ความเข้มข้น 0.5% (w/w) สูงสุด เท่ากับ 0.24±0.056 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) รองลงที่ความเข้มข้น 1.0% (w/w) เท่ากับ 0.12±0.110 และพบค่าต่ำสุดที่ความเข้มข้น 0.3% (w/w) เท่ากับ 0.04±0.077 (ตาราง 9, ภาพ 14C)

5.2. อัตราการกินอาหาร

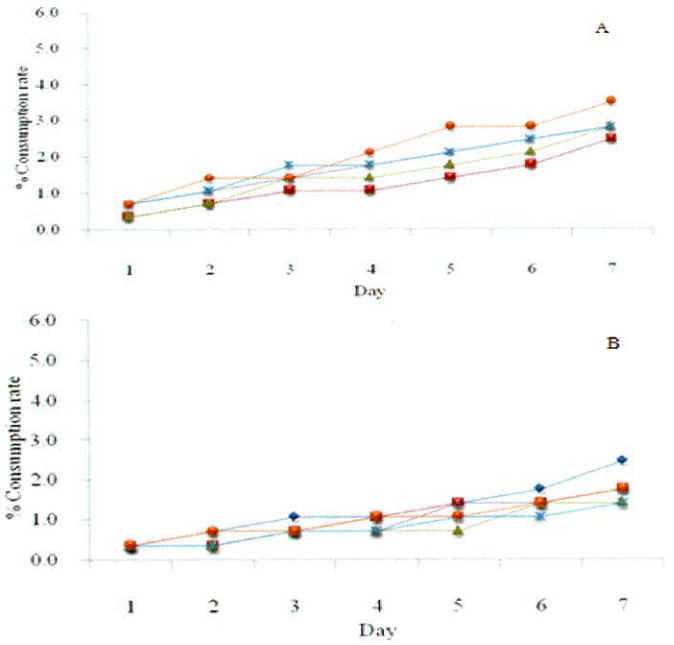
ปลาบู่ที่กินอาหารผสมน้ำมันกระเทียม ที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w) มีอัตราการกินอาหารสูงสุด เท่ากับ 3.50±0.99% ต่อน้ำหนักตัวต่อวัน (ในวันที่ 7) รองลงมาที่ความเข้มข้น 3.0% (w/w) และในกลุ่มที่ความเข้มข้น 0.5% เท่ากับ 2.80±0.74% และ 2.80±0.82% ต่อน้ำหนักตัวต่อวัน (ในวันที่ 7) ตามลำดับ และพบอัตราการกินต่ำสุดในกลุ่มที่ความเข้มข้น 1.0% (w/w) เท่ากับ 2.0±0.75 % ต่อน้ำหนักตัวต่อวัน (ในวันที่ 7) ซึ่งค่าอัตราการกินอาหารในกลุ่มของปลาบู่ที่กินอาหารผสมน้ำมันกระเทียมมีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับแต่ละกลุ่ม ($p>0.05$) และปลาบู่ที่กินอาหารผสมน้ำมันถั่วเหลือง ที่กลุ่มควบคุมมีอัตราการกินอาหารสูงสุด เท่ากับ 2.45±0.69% รองลงมาในกลุ่มที่ความเข้มข้น 0.3% (w/w) ในกลุ่มที่ความเข้มข้น 1.0% (w/w) และในกลุ่มที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w) มีอัตราการกินอาหารเท่ากับ 1.75±0.55% 1.75±0.51% และ 1.75±0.47% ต่อน้ำหนักตัวต่อวัน (ในวันที่ 7) ตามลำดับ เท่ากับรองลงมาที่ความเข้มข้น 0% (w/w) 1.75% และ 2.45% ต่อน้ำหนักตัวต่อวัน (ในวันที่ 7) ตามลำดับ และพบค่าอัตราการกินต่ำสุดในกลุ่มที่ความเข้มข้น 0.5% และในกลุ่มที่ความเข้มข้น 3.0% (w/w) เท่ากับ 1.40±0.43% และ 1.40±0.38% ต่อน้ำหนักตัว/วัน (ในวันที่ 7) ซึ่งค่าอัตราการกินอาหารในกลุ่มของปลาบู่ที่กินอาหารผสมน้ำมัน

ถั่วเหลืองมีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับแต่ละกลุ่ม ($p>0.05$) (ตาราง 10, ภาพ 15)

ตาราง 10 ค่าอัตราการกินอาหารในปลาบู่ที่กินอาหารผสมน้ำมันกระเทียม และน้ำมันถั่วเหลือง ที่ความเข้มข้นต่างๆ

	ระดับความเข้มข้นสารสกัดกระเทียมด้วยไดเอทิลอีเทอร์ (w/w)					
อัตราการกินอาหาร น้ำหนักตัว/วัน (%)	**0%**	**0.3%**	**0.5%**	**1.0%**	**3.0%**	**5.0%**
น้ำมันกระเทียม	2.45±0.69[a]	2.45±0.69[a]	2.80±0.82[a]	2.0±0.75[a]	2.80±0.74[a]	3.50±0.99[a]
น้ำมันถั่วเหลือง	2.45±0.69[a]	1.75±0.55[a]	1.40±0.43[a]	1.75±0.51[a]	1.40±0.38[a]	1.75±0.47[a]

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย±SD และอักษรตัวยกภาษาอังกฤษแนวนอนแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)



ภาพ 15 อัตราการกินอาหารในปลาบู่ที่กินอาหารผสมด้วยน้ำมันกระเทียมและน้ำมันถั่วเหลือง ที่ความเข้มข้น 0, 0.3, 0.5, 1.0, 3.0, 5.0% (w/w)

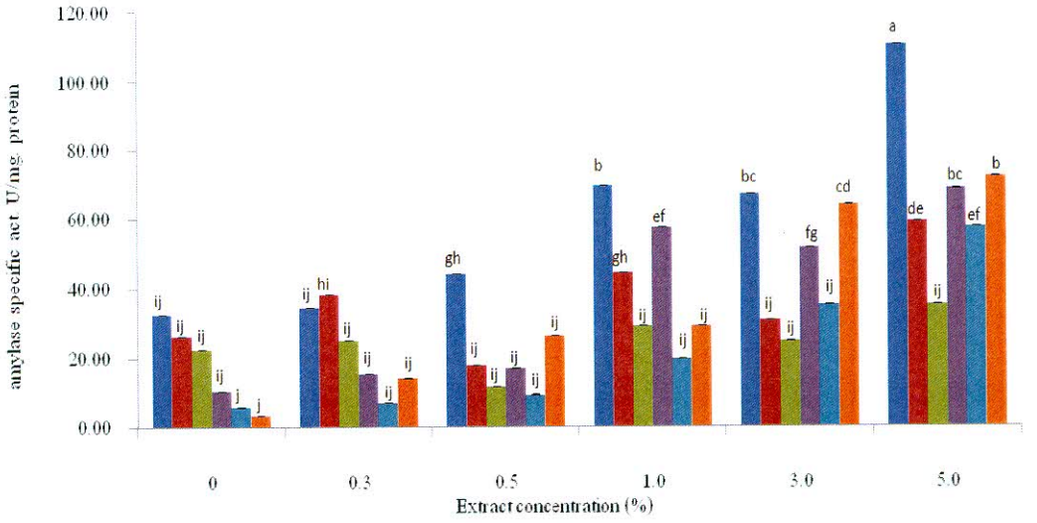
A: น้ำมันกระเทียม

B: น้ำมันถั่วเหลือง ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

0% 0.3% 0.5% 1.0% 3.0% 5.0% (w/w)

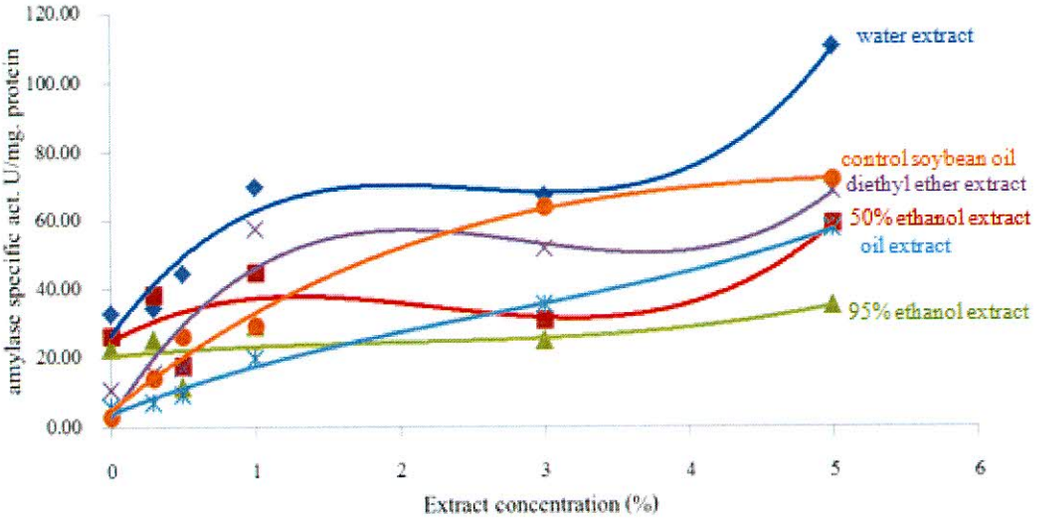
6. เปรียบเทียบค่ากิจกรรมจำเพาะของอะไมเลส

อะไมเลสในปลาบู่ที่ให้อาหารสำเร็จผสมสารสกัดกระเทียมด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน ที่ความเข้มข้น 0, 0.3, 0.5, 1.0, 3.0 และ 5.0% (w/w) เป็นเวลา 7 วัน เมื่อเปรียบเทียบกันทางสถิติของทั้ง 2 ปัจจัย ด้วย one-way และ two-way ANOVA พบว่า ปลาบู่ที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดกระเทียมของแต่ละตัวทำละลาย ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$) โดยปลาบู่ที่กินอาหารผสมสารสกัดกระเทียมด้วยน้ำ ที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w) มีค่าสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) รองลงมาคือปลาบู่ที่กินอาหารผสมน้ำมันถั่วเหลือง ที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w) และปลาบู่ที่กินอาหารผสมสารสกัดกระเทียมด้วยน้ำ ที่ความเข้มข้น 1.0% (w/w) (110.26±0.004 72.04±0.002 และ 69.60±0.015) ตามลำดับ และพบค่าต่ำสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ในกลุ่มควบคุมของปลาบู่ที่กินอาหารผสมน้ำมันกระเทียมและน้ำมันถั่วเหลือง (w/w) (5.61± 0.001 และ 2.94± 0.001) (ภาพ 16, 17)



ภาพ 16 ค่ากิจกรรมจำเพาะของอะไมเลสในปลาบู่ที่กินอาหารผสมสารสกัดกระเทียม ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

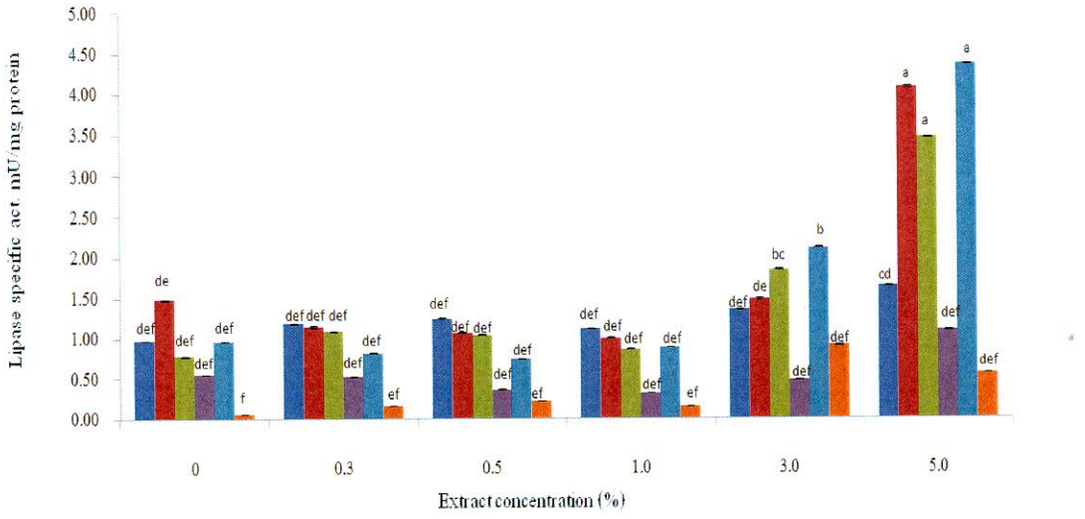
■ น้ำ ■ เอทานอล 50% ■ เอทานอล 95% ■ ไดเอทิลอีเทอร์ ■ น้ำมันกระเทียม ■ น้ำมันถั่วเหลือง



ภาพ 17 แนวโน้มค่ากิจกรรมจำเพาะของอะไมเลสในปลาบู่ที่กินอาหารผสมสารสกัดกระเทียม ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

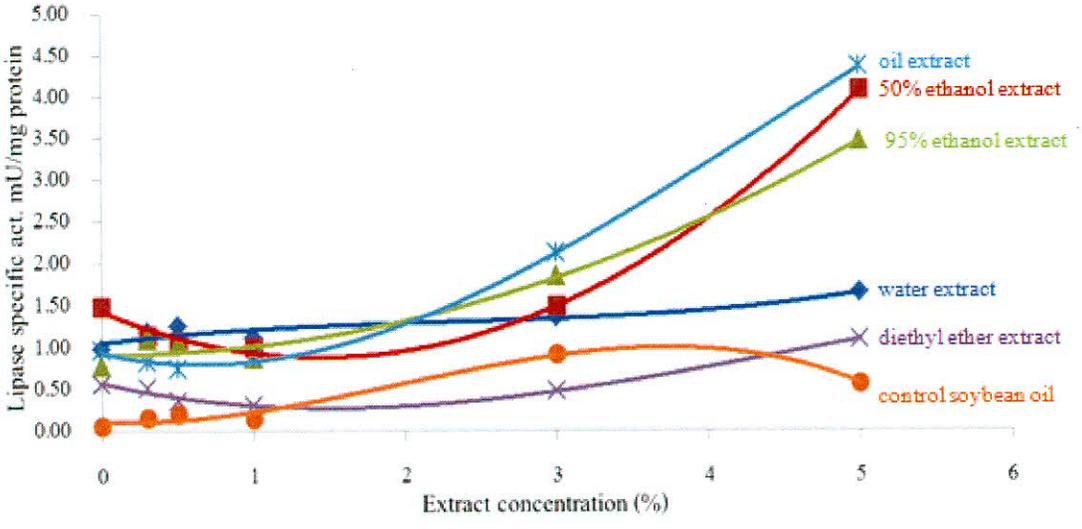
7. เปรียบเทียบค่ากิจกรรมจำเพาะของไลเปส

ไลเปสในปลาบู่ที่ให้อาหารสำเร็จผสมสารสกัดกระเทียมด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน ที่ความเข้มข้น 0, 0.3, 0.5, 1.0, 3.0 และ 5.0% (w/w) เป็นเวลา 7 วัน เมื่อเปรียบเทียบกันทางสถิติของทั้ง 2 ปัจจัย ด้วย one-way และ two-way ANOVA พบว่า ปลาบู่ที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดกระเทียมของแต่ละตัวทำละลาย ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$) โดยปลาบู่ที่กินอาหารผสมน้ำมันกระเทียม ผสมเอทานอล 50% และผสมเอทานอล 95% ที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w) (4.35±0.004 4.06±0.011 และ 3.45±0.115) ตามลำดับ มีค่าสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับทุกกลุ่มการทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) รองลงมาคือปลาบู่ที่กินอาหารผสมน้ำมันกระเทียม ที่ความเข้มข้น 3.0% (w/w) (2.10±0.007) และพบค่าต่ำสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ในกลุ่มควบคุมของปลาบู่ที่กินอาหารผสมน้ำมันถั่วเหลือง (0.05± 0.002) (ภาพ 18, 19)



ภาพ 18 ค่ากิจกรรมจำเพาะของไลเปสในปลาบู่ที่กินอาหารผสมสารสกัดกระเทียม ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

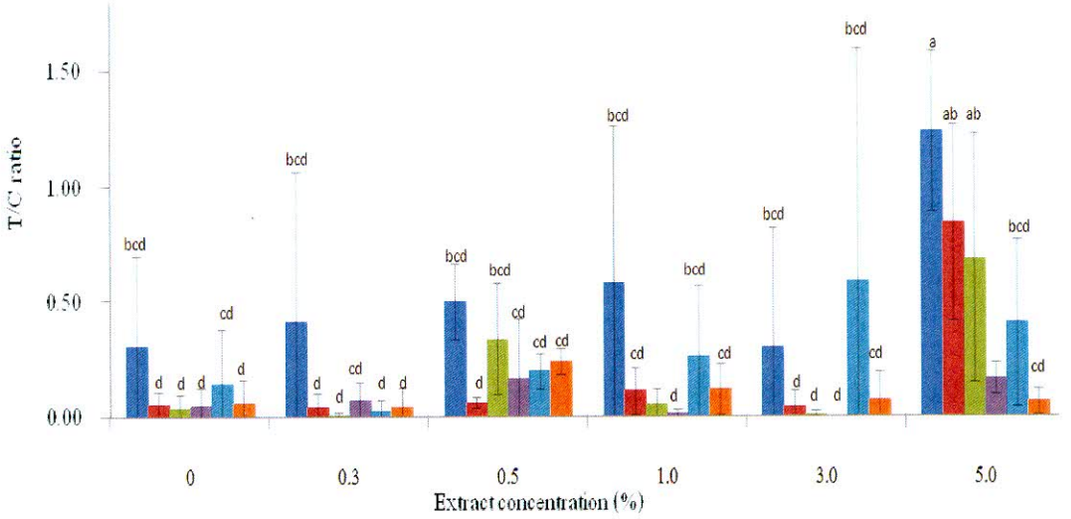
■ น้ำ ■ เอทานอล 50% ■ เอทานอล 95% ■ ไดเอทิลอีเทอร์ ■ น้ำมันกระเทียม ■ น้ำมันถั่วเหลือง



ภาพ 19 แนวโน้มค่ากิจกรรมจำเพาะของไลเปสในปลาบู่ที่กินอาหารผสมสารสกัดกระเทียม ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

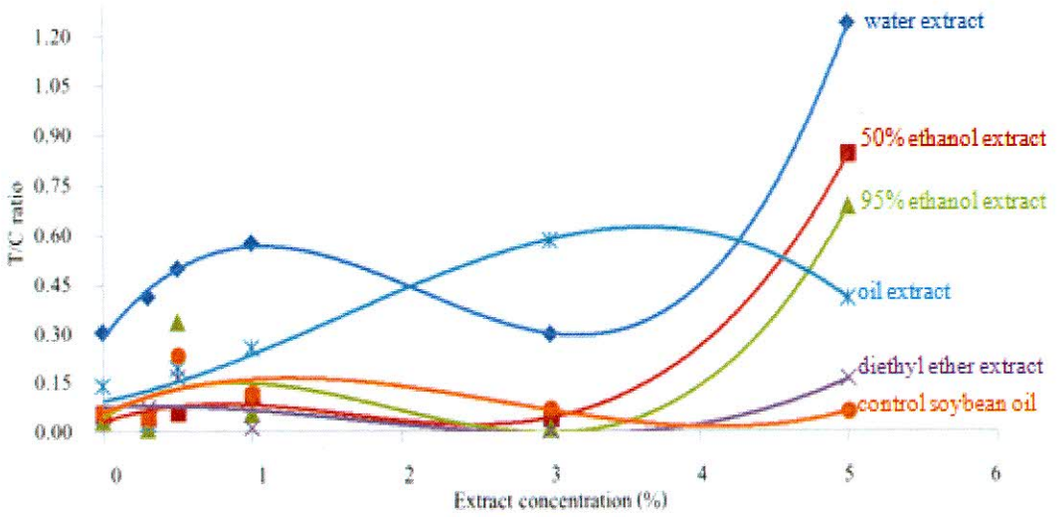
8. เปรียบเทียบอัตราส่วนระหว่างทริปซินและไคโมทริปซิน (T/C Ratio)

เปรียบเทียบอัตราส่วนระหว่างทริปซินและไคโมทริปซินซึ่งเป็นการแสดงผลการเจริญเติบโตไปในทิศทางที่ดีขึ้น โดยปลาบู่ที่ให้อาหารสำเร็จผสมสารสกัดกระเทียมด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน ที่ความเข้มข้น 0, 0.3, 0.5, 1.0, 3.0 และ 5.0% (w/w) เป็นเวลา 7 วัน เมื่อเปรียบเทียบกันทางสถิติของทั้ง 2 ปัจจัย ด้วย one-way และ two-way ANOVA พบว่า ปลาบู่ที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดกระเทียมของแต่ละตัวทำละลาย ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($p>0.05$) โดยปลาบู่ที่กินอาหารผสมสารสกัดกระเทียมด้วยน้ำ ที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w) มีค่าสูงที่สุด เท่ากับ 1.24±0.347 รองลงมาคือปลาบู่ที่กินอาหารผสมสารสกัดกระเทียมด้วยเอทานอล 50% ที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w) และปลาบู่ที่กินอาหารผสมสารสกัดกระเทียมด้วยเอทานอล 95%ที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w) (0.84±0.427 และ 0.69±0.540) ตามลำดับ และพบค่าต่ำสุดในปลาบู่ที่กินอาหารผสมสารสกัดกระเทียมด้วยไดเอทิลอีเทอร์ ที่ความเข้มข้น 3.0% (w/w) (0.00± 0.000) (ภาพ 20, 21)



ภาพ 20 อัตราส่วนระหว่างทริปซินและไคโมทริปซิน (T/C Ratio) ในปลาบู่ที่กินอาหารผสมสารสกัดกระเทียม ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

■ น้ำ ■ เอทานอล 50% ■ เอทานอล 95% ■ ไดเอทิลอีเทอร์ ■ น้ำมันกระเทียม ■ น้ำมันถั่วเหลือง



ภาพ 21 แนวโน้มอัตราส่วนระหว่างทริปซินและไคโมทริปซิน (T/C Ratio) ในปลาบู่ที่กินอาหารผสมสารสกัดกระเทียมที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

9. การศึกษาประสิทธิภาพของอาหารที่ผสมด้วยสารสกัดกระเทียมต่อการเจริญเติบโตของปลาบู่

เมื่อทำการศึกษาผลของกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ย่อยอาหารของปลาบู่ที่ให้อาหารผสมสารสกัดกระเทียมด้วยตัวทำละลายต่างๆ เป็นเวลา 7 วัน พบว่าสารสกัดกระเทียมด้วยน้ำที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w) มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ย่อยอาหารและแนวโน้มการเจริญเติบโตสูงสุด จึงเลือกมาติดตามอัตราการเจริญเติบโต เป็นเวลา 2 เดือน เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ให้อาหารสำเร็จปกติ โดยให้ผลดังนี้

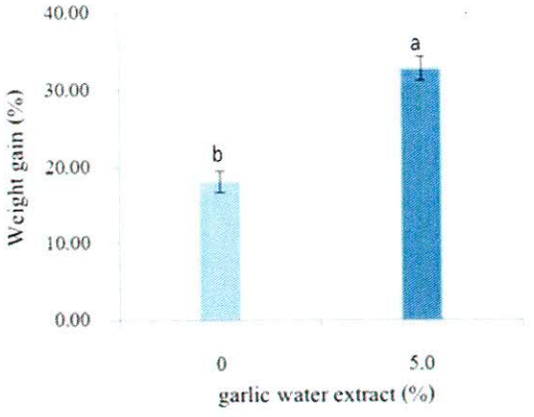
9.1. เปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น

เมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (%weight gain, %WG) พบว่าในปลาบู่ที่กินอาหารผสมด้วยสารสกัดกระเทียมด้วยน้ำ ที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w) มีน้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้นเท่ากับ 30.71±0.56 กรัม/ตัว น้ำหนักเฉลี่ยสิ้นสุดเท่ากับ 40.75±0.67 กรัม/ตัว และน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นเท่ากับ 32.69 % เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งมีน้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้นเท่ากับ 30.46±0.78 กรัม/ตัว น้ำหนักเฉลี่ยสิ้นสุดท้ายเท่ากับ 35.98±0.37 กรัม/ตัว และมีน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นเท่ากับ 18.12 % ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) (ตาราง 11, ภาพ 22)

ตาราง 11 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นในปลาบู่ที่เลี้ยง เป็นเวลา 2 เดือน

กลุ่มทดลอง	น้ำหนักปลา (กรัม/ตัว) ระยะเวลา 2 เดือน			
	น้ำหนักเริ่มต้นเฉลี่ย	น้ำหนักสิ้นสุดเฉลี่ย	น้ำหนักเพิ่มเฉลี่ย	น้ำหนักเพิ่ม (%)
ควบคุม	30.46±0.78[a]	35.98±0. 37[ab]	5.52±0.47[b]	18.12±0.02[b]
อาหารผสมสารสกัดกระเทียม ด้วยน้ำ ที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w)	30.71±0.56[a]	40.75±0.67[a]	10.04±0.45[a]	32.69±0.06[a]

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย±SD และอักษรตัวยกภาษาอังกฤษแนวนอนแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)



ภาพ 22 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นในปลาบู่ที่เลี้ยง เป็นเวลา 2 เดือน

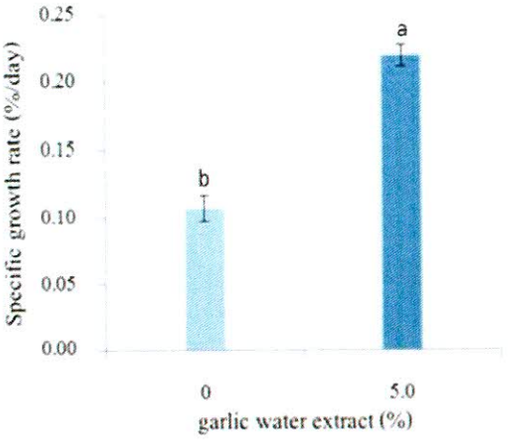
9.2. อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ

อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate, SGR) ในกลุ่มปลาบู่ที่กินอาหารผสมสารสกัดกระเทียมด้วยน้ำ ที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w) มีค่าเท่ากับ 0.219± 0.06 % ต่อวัน เทียบกับกลุ่มควบคุม มีค่าเท่ากับ 0.107±0.03 % ต่อวัน ซึ่งมีความแตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) (ตาราง 12, ภาพ 23)

ตาราง 12 อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะในปลาบู่ที่เลี้ยง เป็นเวลา 2 เดือน

กลุ่มการทดลอง	**อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (SGR)** (% /วัน)
ควบคุม	0.107 ± 0.03^{b}
อาหารผสมสารสกัดกระเทียมด้วยน้ำที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w)	0.219 ± 0.06^{a}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย±SD และอักษรตัวยกภาษาอังกฤษแนวนอนแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)



ภาพ 23 อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะในปลาบู่ที่เลี้ยง เป็นเวลา 2 เดือน

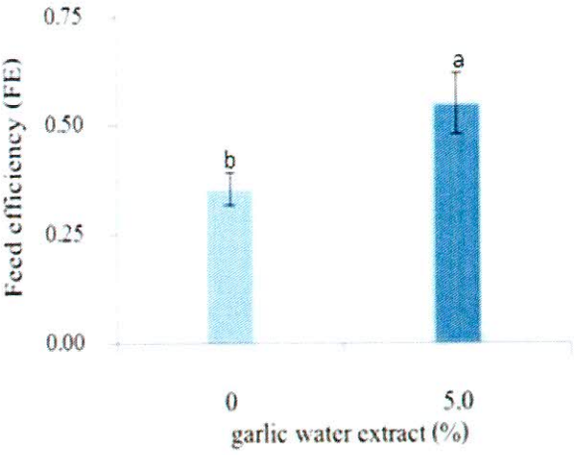
9.3. ประสิทธิภาพของอาหาร

ประสิทธิภาพของอาหาร (feed efficiency, FE) ในกลุ่มปลาบู่ที่กินอาหารผสมสารสกัดกระเทียมด้วยน้ำ ที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w) มีค่า เท่ากับ 0.55± 0.07 หรือปลาบู่มีประสิทธิภาพการใช้อาหาร 55% และกลุ่มควบคุมมีค่า เท่ากับ 0.35±0.04 หรือปลาบู่มีประสิทธิภาพการใช้อาหาร 35% ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) (ตาราง 13, ภาพ 24)

ตาราง 13 ประสิทธิภาพของอาหาร ในปลาบู่ที่เลี้ยง เป็นเวลา 2 เดือน

กลุ่มการทดลอง	ประสิทธิภาพของอาหาร (FE)
กลุ่มควบคุม	0.35 ± 0.04^{b}
อาหารผสมสารสกัดกระเทียมด้วยน้ำที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w)	0.55 ± 0.07^{a}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย±SD และอักษรตัวยกภาษาอังกฤษแนวนอนแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)



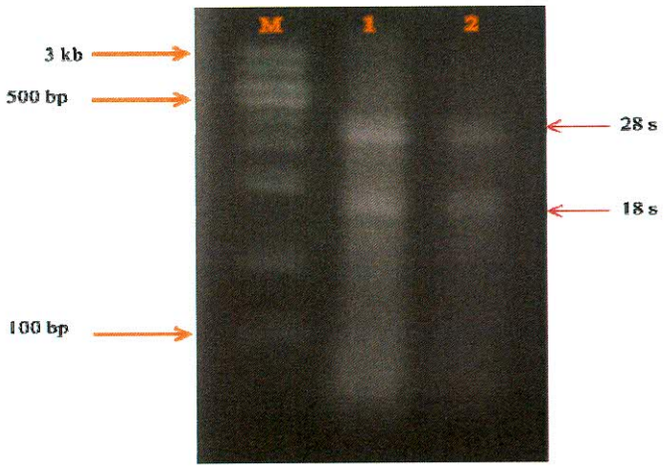
ภาพ 24 ประสิทธิภาพของอาหาร ในปลาบู่ที่เลี้ยง เป็นเวลา 2 เดือน

10. การศึกษายีนแสดงออก ของเอนไซม์ย่อยอาหารในปลาบู่

10.1. การศึกษายีนแสดงออก โดยใช้เทคนิค one-step RT-PCR

10.1.1. การเตรียม total RNA ครั้งที่ 1

หลังจากทำการศึกษากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ย่อยอาหารในบริเวณที่มีการย่อยอาหารของปลาบู่ที่ให้อาหารที่ผสมด้วยสารสกัดกระเทียมด้วยน้ำที่ ระดับ 5.0% (w/w) โดยทำการศึกษาเอนไซม์ย่อยอาหาร 4 เอนไซม์ ได้แก่ อะไมเลส ไลเปส ทริปซิน และไคโมทริปซิน พบว่าในกลุ่มของปลาบู่ที่กินอาหารผสมสารสกัดกระเทียมด้วยน้ำ มีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ของเอนไซม์ย่อยอาหารและมีแนวโน้มการเจริญเติบโตดีที่สุด ที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w) จึงทำการเลือกสารสกัดกระเทียมด้วยน้ำ นำมาศึกษายีนแสดงออกในระบบย่อยอาหารของปลาบู่เปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยนำกระเพาะและลำไส้ของปลาบู่มาทำการสกัด RNA โดยใช้ชุดสำเร็จรูป Thermo Scientific GeneJET RNA Purification Kit (Thermo Scientific, European) และตรวจสอบความเข้มข้นของ RNA ด้วยเครื่องนาโนดรอปสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer Thermo Science, USA) ที่ค่าการดูดกลืนแสง 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร (Sambrook and Russel, 2001) พบว่า ในปลาบู่ที่กินอาหารในกลุ่มควบคุมมีค่าความเข้มข้นของ RNA เท่ากับ 164.1 ng/µl และปลาบู่ที่กินอาหารผสมสารสกัดกระเทียมด้วยน้ำ ที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w) มีค่าความเข้มข้นของ RNA เท่ากับ 182 ng/µl และจากการตรวจสอบคุณภาพ RNA พบว่า RNA ที่สกัดได้มีคุณภาพดี ปรากฏแถบ 28S rRNA และ 18S rRNA (ภาพ 25)



ภาพ 25 ผลการตรวจสอบคุณภาพของ RNA ที่สกัดได้จากลำไส้ปลาบู่ ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis ที่ 1.0% gel และใช้ 0.5x TBE buffer

lane 1 คือ RNA จากลำไส้ปลาบู่ในกลุ่มควบคุม

lane 2 คือ RNA จากลำไส้ปลาบู่ในกลุ่มสารสกัดกระเทียมด้วยน้ำ ที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w)

M คือ 100 bp marker

10.1.2. การทำปฏิกิริยา one-step RT-PCR ครั้งที่ 1

total RNA มาทำปฏิกิริยา PCR ด้วยชุดสำเร็จรูป one-Step RT-PCR Kit (Thermo Scientific, European) โดยใช้ไพรเมอร์ของอะไมเลส ไลเปส ทริปซิน และไคโมทริปซิน โดยตั้งอุณหภูมิ และเวลาไว้ ดังนี้

95 °C 2 min

95 °C 20 s

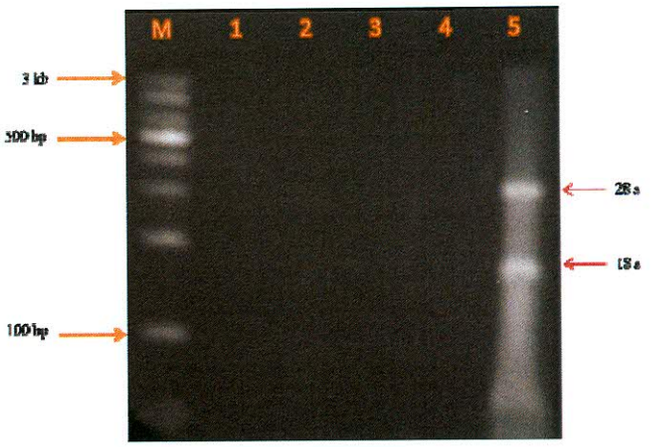
50 °C 30 s

72 °C 1 min

40 รอบ

72 °C 5 min

พบว่า ไม่มี PCR products ของทุกตัวอย่าง RNA (ภาพ 26)



ภาพ 26 PCR product ของเอนไซม์ย่อยอาหารในปลาบู่กลุ่มควบคุม ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis ที่ 1.0% gel และใช้ 0.5x TBE buffer

lane 1-4 คือ PCR product ที่ได้จากไพรเมอร์ อะไมเลส ไคโมทริปซิน ไลเปส และ ทริปซิน ตามลำดับ

lane 5 คือ RNA จากลำไส้ปลาบู่ที่กินอาหารในกลุ่มควบคุม

M คือ 100 bp marker

10.1.3. ทำการเปลี่ยนสภาวะในการทำปฏิกิริยา one-step RT-PCR เอนไซม์ย่อยอาหาร 4 เอนไซม์ คือ อะไมเลส ไลเปส ทริปซิน และไคโมทริปซิน ตั้งอุณหภูมิและเวลาไว้ดังนี้

95 °C 2 min

95 °C 20 s

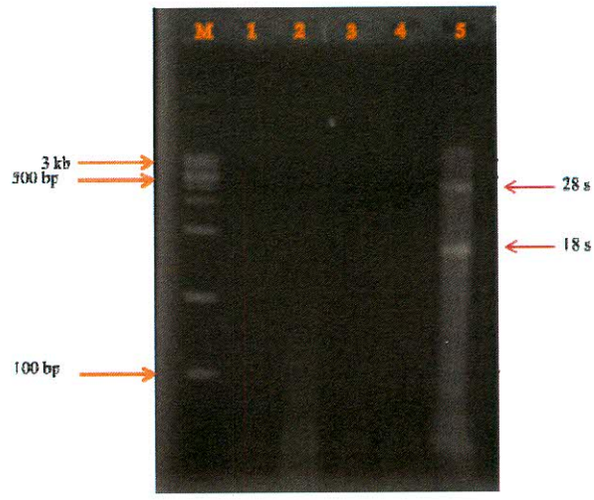
45 °C 30 s

72 °C 1 min

45 รอบ

72 °C 5 min

พบว่า ไม่มี PCR products ของทุกตัวอย่าง (ภาพ 27)



ภาพ 27 PCR product ของเอนไซม์ย่อยอาหารในปลาบู่กลุ่มควบคุม ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis ที่ 1.0% gel และใช้ 0.5x TBE buffer

lane 1-4 คือ PCR product ที่ได้จากไพรเมอร์ อะไมเลส ไคโมทริปซิน ไลเปส และ ทริปซิน ตามลำดับ

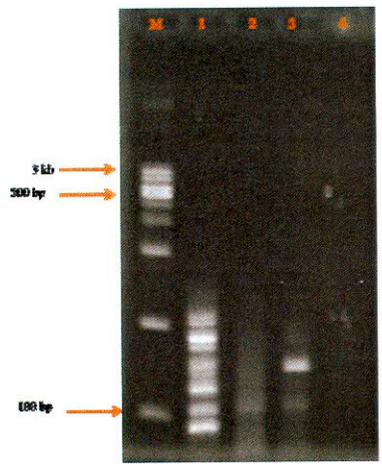
lane 5 คือ RNA จากลำไส้ปลาบู่ที่กินอาหารในกลุ่มควบคุม

M คือ 100 bp marker

จึงได้ปรับสภาวะในการทำปฏิกิริยา PCR ใหม่อีกครั้ง ดังนี้

95 °C	2 min	
95 °C	20 s	30 รอบ
45 °C	30 s	
72 °C	1 min	
72 °C	5 min	

พบว่า ไม่มี PCR products ของทุกตัวอย่าง (ภาพ 28)



ภาพ 28 PCR product ของเอนไซม์ย่อยอาหารในปลาบู่กลุ่มควบคุม ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis ที่ 1.0% gel และใช้ 0.5x TBE buffer

lane 1-4 คือ PCR product ที่ได้จากไพรเมอร์ อะไมเลส ไคโมทริปซิน ไลเปส และ ทริปซิน ตามลำดับ

M คือ 100 bp marker

10.1.4. การเตรียม total RNA ครั้งที่ 2

จากการนำกระเพาะและลำไส้ของปลาบู่มาทำการสกัด RNA โดยใช้ชุดสำเร็จรูป RNA Mini Kit (Biometra, Germany) และตรวจสอบความเข้มข้นของ RNA ด้วยเครื่องนาโนดรอปสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer Thermo Science, USA) ที่ค่าการดูดกลืนแสง 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร (Sambrook and Russel, 2001) พบว่า ในปลาบู่ที่กินอาหารกลุ่มควบคุม มีค่าความเข้มข้นของ RNA เท่ากับ 41.9 ng/µl และปลาบู่ที่กินอาหารผสมสารสกัดกระเทียมด้วยน้ำ ที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w) มีค่าความเข้มข้นของ RNA เท่ากับ 33.9 ng/µl

10.1.5. การทำปฏิกิริยา one-step RT-PCR ครั้งที่ 2

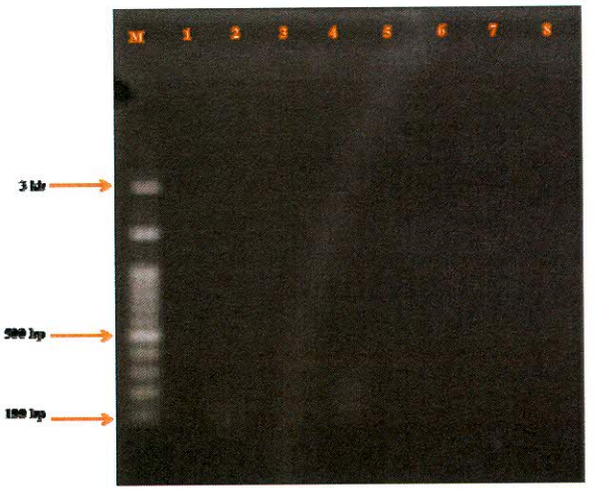
total RNA มาทำปฏิกิริยา PCR ด้วยชุดสำเร็จรูป one-Step RT-PCR Kit (Thermo Scientific, European) โดยใช้ไพรเมอร์ของอะไมเลส ไลเปส ทริปซิน และไคโมทริปซิน โดยตั้งอุณหภูมิ และเวลาไว้ ดังนี้

95 °C 2 min

95 °C 20 s
50 °C 30 s
72 °C 1 min
} 45 รอบ

72 °C 5 min

พบว่า ไม่มี PCR products ของทุกตัวอย่าง (ภาพ 29)



ภาพ 29 PCR product ของเอนไซม์ย่อยอาหารในปลาบู่กลุ่มอาหารสำเร็จผสมสารสกัดกระเทียมด้วยน้ำที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis ที่ 1.0% gel และใช้ 0.5x TBE buffer

lane 1-4 คือ PCR product ที่ได้จากไพรเมอร์ อะไมเลส ไคโมทริปซิน ไลเปส และ ทริปซิน ของกลุ่มควบคุม ตามลำดับ

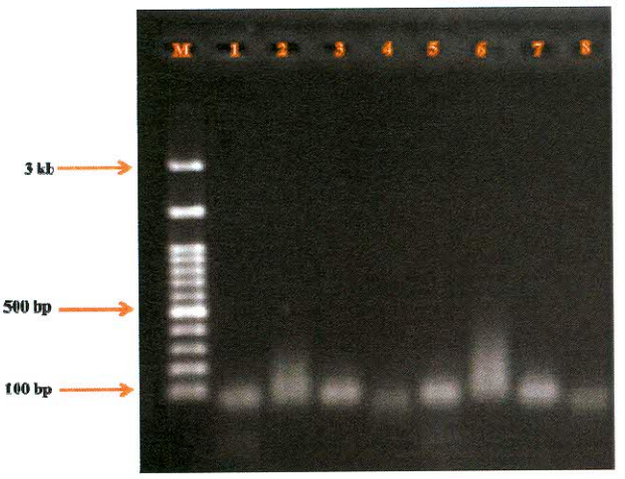
lane 5-8 คือ PCR product ที่ได้จากไพรเมอร์ อะไมเลส ไคโมทริปซิน ไลเปส และ ทริปซิน ของกลุ่มอาหารสำเร็จผสมสารสกัดกระเทียมด้วยน้ำที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w) ตามลำดับ

M คือ 100 bp marker

จึงได้ปรับสภาวะในการทำปฏิกิริยา PCR ใหม่อีกครั้ง ดังนี้

94 °C	5 min	
94°C	20 s	40 รอบ
45 °C	30 s	
72 °C	2 min	
72 °C	5 min	

พบว่า ไม่มี PCR products ของทุกตัวอย่าง (ภาพ 30)



ภาพ 30 PCR product ของเอนไซม์ย่อยอาหารในปลาบู่กลุ่มอาหารสำเร็จผสมสารสกัดกระเทียมด้วยน้ำที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis ที่ 1.0% gel และใช้ 0.5x TBE buffer

lane 1-4 คือ PCR product ที่ได้จากไพรเมอร์ อะไมเลส ไคโมทริปซิน ไลเปส และ ทริปซิน ของกลุ่มควบคุม ตามลำดับ

lane 5-8 คือ PCR product ที่ได้จากไพรเมอร์ อะไมเลส ไคโมทริปซิน ไลเปส และ ทริปซิน ของกลุ่มอาหารสำเร็จผสมสารสกัดกระเทียมด้วยน้ำที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w) ตามลำดับ

M คือ 100 bp marker

จึงได้ปรับสภาวะในการทำปฏิกิริยา PCR ใหม่อีกครั้ง ดังนี้

95 °C	2 min	
95 °C	20 s	45 รอบ
50 °C	30 s	
72 °C	1 min	
72 °C	5 min	

พบว่า ไม่มี PCR products ของทุกตัวอย่าง (ภาพ 31)

ภาพ 31 PCR product ของเอนไซม์ย่อยอาหารในปลาบู่กลุ่มอาหารสำเร็จผสมสารสกัดกระเทียมด้วยน้ำที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis ที่ 1.0% gel และใช้ 0.5x TBE buffer

lane 1-4 คือ PCR product ที่ได้จากไพรเมอร์ อะไมเลส ไคโมทริปซิน ไลเปส และ ทริปซิน ของกลุ่มควบคุม ตามลำดับ

lane 5-8 คือ PCR product ที่ได้จากไพรเมอร์ อะไมเลส ไคโมทริปซิน ไลเปส และ ทริปซิน ของกลุ่มอาหารสำเร็จผสมสารสกัดกระเทียมด้วยน้ำที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w) ตามลำดับ

lane 9 คือ RNA ของปลาบู่ที่ให้อาหารในกลุ่มควบคุม

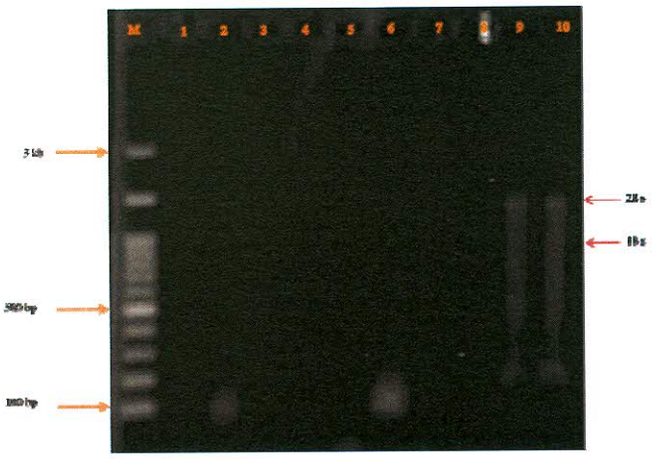
lane 10 คือ RNA ของปลาบู่ที่ให้อาหารสำเร็จผสมสารสกัดกระเทียมด้วยน้ำที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w)

M คือ 100 bp marker

จึงได้ปรับสภาวะในการทำปฏิกิริยา PCR ใหม่อีกครั้ง ดังนี้

94 °C	5 min	
94 °C	20 s	40 รอบ
45 °C	30 s	
72 °C	2 min	
72 °C	5 min	

พบว่า ไม่มี PCR products ของทุกตัวอย่าง (ภาพ 32)



ภาพ 32 PCR product ของเอนไซม์ย่อยอาหารในปลาบู่กลุ่มอาหารสำเร็จผสมสารสกัดกระเทียมด้วยน้ำที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis ที่ 1.0% gel และใช้ 0.5x TBE buffer

lane 1-4 คือ PCR product ที่ได้จากไพรเมอร์ อะไมเลส ไคโมทริปซิน ไลเปส และ ทริปซิน ของกลุ่มควบคุม ตามลำดับ

lane 5-8 คือ PCR product ที่ได้จากไพรเมอร์ อะไมเลส ไคโมทริปซิน ไลเปส และ ทริปซิน ของกลุ่มอาหารสำเร็จผสมสารสกัดกระเทียมด้วยน้ำที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w) ตามลำดับ

lane 9 คือ RNA ของปลาบู่ที่ให้อาหารในกลุ่มควบคุม

lane 10 คือ RNA ของปลาบู่ที่ให้อาหารสำเร็จผสมสารสกัดกระเทียมด้วยน้ำที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w)

M คือ 100 bp marker

10.2. การศึกษายีนแสดงออก โดยใช้เทคนิค two-step RT-PCR

10.2.1. การเตรียม total RNA

จากการนำกระเพาะและลำไส้ของปลาบู่มาทำการสกัด total RNA โดยใช้ชุดสำเร็จรูป Thermo Scientific GeneJET RNA Purification Kit (Thermo Scientific, European) และตรวจสอบความเข้มข้นของ RNA ด้วยเครื่องนาโนดรอปสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer Thermo Science, USA) ที่ค่าการดูดกลืนแสง 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร (Sambrook and Russel, 2001) พบว่า ในปลาบู่ที่กินอาหารในกลุ่มควบคุมมีค่าความเข้มข้นของ RNA เท่ากับ 5.1 ng/µl และปลาบู่ที่กินอาหารผสมสารสกัดกระเทียมด้วยน้ำ ที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w) มีค่าความเข้มข้นของ RNA เท่ากับ 2.2 ng/µl

10.2.2. การทำปฏิกิริยาการสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA)

นำ RNA มาทำการสังเคราะห์ cDNA โดยใช้ชุดสำเร็จรูป Thermo Scientific RevertAid First Streand cDNA Synthesis Kit โดยใช้ไพรเมอร์ Oligo (dT) 18 primer และตรวจสอบความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของ cDNA ด้วยเครื่องนาโนดรอปสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer Thermo Science, USA) ที่ค่าการดูดกลืนแสง 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร (Sambrook and Russel, 2001) พบว่า cDNA ของปลาบู่ที่กินอาหารในกลุ่มควบคุม มีค่าความเข้มข้น 1865.8 ng/µl

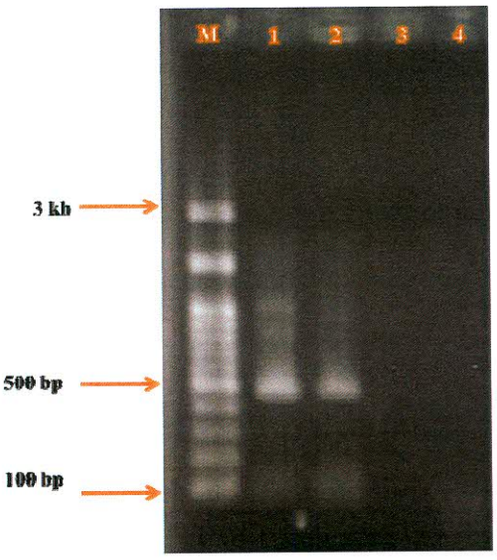
10.2.3. ตรวจสอบคุณภาพของ cDNA โดยทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ Forward GAPDH และ Reverse GAPDH (Positive controls primer) จากชุดสำเร็จรูป Thermo Scientific RevertAid First Streand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, European) ซึ่งมีขนาดแถบ DNA 496 bp โดยเปรียบเทียบกับ cDNA จากชุดสำเร็จรูป Thermo Scientific RevertAid First Streand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, European) ที่มีค่าความเข้มข้น 2002.6 ng/µl โดยตั้งสภาวะอุณหภูมิและเวลา ดังนี้

94 °C 3 min

94°C 30 s
58 °C 30 s
72 °C 45 s
} 35 รอบ

72 °C 5 min

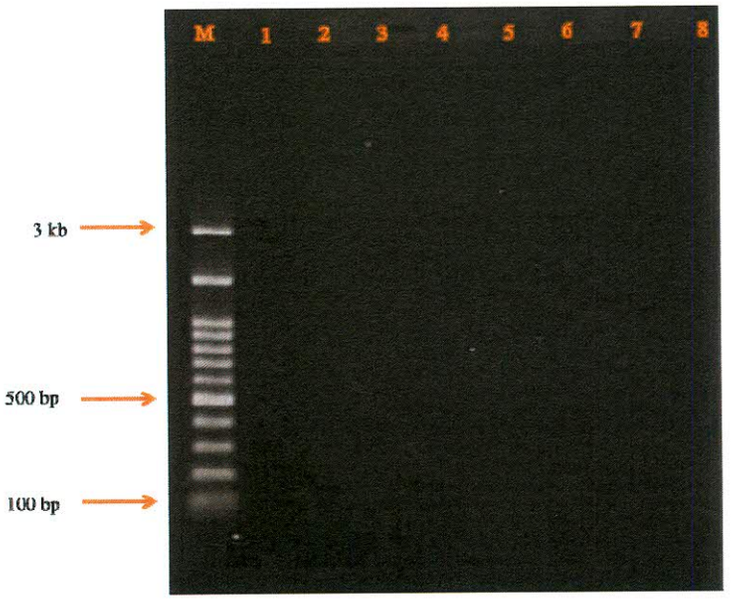
พบว่า PCR products ของ cDNA ปลาบู่ และ cDNA จากชุดสำเร็จรูป Thermo Scientific RevertAid First Streand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, European) ปรากฏแถบ DNA ขนาด 496 bp ซึ่งตรงกับขนาดของไพรเมอร์ GAPDH (Positive controls primer) ใน lane ที่ 1 และ 2 (ภาพ 33)



ภาพ 33 PCR product ของ cDNA ของปลาบู่ที่กินอาหารในกลุ่มควบคุม เปรียบเทียบกับ PCR product ของ cDNA ชุดสำเร็จรูป Thermo Scientific RevertAid First Streand cDNA Synthesis Kit ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis ที่ 1.0% gel และใช้ 0.5x TBE buffer
lane 1 คือ PCR product ของ cDNA จากชุดสำเร็จรูป Thermo Scientific RevertAid First Streand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, European) ทดสอบกับไพรเมอร์ GAPDH
lane 2 คือ PCR product ของ cDNA ของปลาบู่ที่กินอาหารในกลุ่มควบคุม ทดสอบกับไพรเมอร์ GAPDH
lane 3 คือ PCR product ของ cDNA ของปลาบู่ที่กินอาหารในกลุ่มควบคุม ทดสอบกับไพรเมอร์ ทริปซิน
lane 4 เป็นชุดควบคุมโดยใช้น้ำ แทน cDNA ทดสอบกับไพรเมอร์ GAPDH
M คือ 100 bp marker

10.2.4. การทำปฏิกิริยา two-step RT-PCR

นำ cDNA มาทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ forward primer ของเอนไซม์ อะไมเลส ไคโมทริปซิน ไลเปส และทริปซิน คู่กับ reverse primer ของแต่ละเอนไซม์ ตามลำดับ และใช้ forward primer ของ อะไมเลส ไคโมทริปซิน ไลเปส และทริปซิน คู่กับ reverse primer anchor oligo (dT) primer พบว่า ไม่มี PCR products ของทุกตัวอย่าง (ภาพ 34)



ภาพ 34 PCR product ของเอนไซม์ย่อยอาหารในปลาบู่กลุ่มกลุ่มควบคุม ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis ที่ 1.0% gel และใช้ 0.5x TBE buffer

lane 1-4 คือ PCR product ที่ทดสอบกับ forward primer คู่กับ reverse primer ของ อะไมเลส ไคโมทริปซิน ไลเปส และทริปซิน ตามลำดับ

lane 5-8 คือ PCR product ที่ทดสอบกับ forward primer ของ อะไมเลส ไคโมทริปซิน ไลเปส และทริปซิน ตามลำดับ คู่กับ reverse primer anchor oligo (dT) primer ตามลำดับ

M คือ 100 bp marker

บทที่ 5
วิจารณ์ผลการวิจัย

ผลการศึกษาสารสกัดกระเทียมต่อเอนไซม์ย่อยอาหารในปลาบู่ โดยการทดลองแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนแรกทำการศึกษาผลของสารกระเทียมด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน คือ น้ำ เอทานอล 50% และ 95% น้ำมัน diethyl ether ต่อกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ย่อยอาหารในปลาบู่ และติดตามกิจกรรมของเอนไซม์เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำผลของสารสกัดกระเทียมที่มีผลกระตุ้นกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ย่อยอาหารในปลาบู่ดีที่สุด อัตราการเจริญเติบโต เป็นเวลา 2 เดือน พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

การศึกษาสารสกัดกระเทียมต่อเอนไซม์ย่อยอาหารในปลาบู่

1. อะไมเลส

จากการศึกษาค่ากิจกรรมจำเพาะของอะไมเลสในบริเวณที่มีการย่อยอาหารของปลาบู่เปรียบเทียบผลกับชุดควบคุม พบว่า อะไมเลสในปลาบู่ที่กินอาหารผสมด้วยสารสกัดกระเทียมด้วยน้ำ เอทานอล 50% เอทานอล 95% ไดเอทิลอีเทอร์ น้ำมันกระเทียม และน้ำมันถั่วเหลือง ให้ผลดีที่สุดที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ จำเริญศรีและคณะ (2553) ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันกระเทียมในการเพิ่มการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน และความต้านทานโรคในกุ้งขาว พบว่า การเสริมน้ำมันกระเทียมในอาหารสำหรับเลี้ยงกุ้งขาวที่ความเข้มข้น 2.5 และ 5.0% ช่วยเพิ่มการทำงานของภูมิคุ้มกัน และเมื่อพิจารณาความสามารถในการต้านทานเชื้อแบคทีเรียร่วมด้วย ระดับของน้ำมันกระเทียมที่ควรเสริมในอาหารคือ 5.0% และระยะเวลาในการเลี้ยง 14 วัน และShalaby et al. (2006) ได้ศึกษาผลของกระเทียมที่ใช้เป็นตัวกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (immunostimulant) การเจริญเติบโต อัตราการเจริญเติบโต และอัตรารอดในปลานิล โดยจะให้ผสมอาหารที่ความเข้มข้น 1.0, 2.0, 3.0 และ 4.0% ต่ออาหาร พบว่าที่ 3.0% นั้นสามารถช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโต เพิ่มอัตราการรอด และช่วยลดแบคทีเรียในปลาได้

2. ไลเปส

ค่ากิจกรรมจำเพาะของไลเปสในปลาบู่ที่กินอาหารผสมด้วยสารสกัดกระเทียม พบว่า ไลเปสในปลาบู่ที่กินอาหารผสมด้วยสารสกัดกระเทียมด้วยน้ำ เอทานอล 50% เอทานอล 95% ไดเอทิลอีเทอร์ และ น้ำมันกระเทียม ให้ผลดีที่สุดที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w) ส่วนปลาบู่ที่ให้อาหารผสมน้ำมันถั่วเหลือง ให้ผลดีที่สุดที่ความเข้มข้น 3.0% (w/w) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของศุภลักษณ์ (2555) พบว่า ไลเปสมีค่าสูงในกลุ่มสารสกัดกระเทียมที่สกัดด้วยน้ำ และ 95% เอทานอล ให้ผลดีที่สุด ที่ความเข้มข้น 3.0% (w/w) แต่ในกลุ่มสารสกัดกระเทียมด้วย 50% เอทานอล ให้ผลดีที่สุด ที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w) โดยทั่วไปกิจกรรมของไลเปสจะต่ำในปลาขนาดเล็กและจะเพิ่มขึ้นในปลาขนาดใหญ่เนื่องจากเมื่อปลาฟักออกจากไข่ อาหารธรรมชาติที่ปลาได้รับส่วนใหญ่จะเป็นแพลงก์ตอนทั้งแพลงก์ตอนพืช และแพลงก์ตอนสัตว์ ซึ่งมีส่วนประกอบของโปรตีนและไขมันสูง (วีรพงศ์, 2536; Lovell, 1989) ซึ่งสอดคล้องกับ Alberta et al. (2007) ได้ทำการศึกษาไลเปส โดยการสกัดแล้วทำให้บริสุทธิ์และศึกษาลักษณะทางชีวเคมีบางประการจากอวัยวะภายในของปลา grey mullet (*Mugil cephalus*) โดยได้กล่าวว่าไลเปส (triacylglycerol acylhydrolases) เป็นเอนไซม์ที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาไตรกลีเซอรอลตลอดจนมีความสัมพันธ์กับกลีเซอรอลและกรดไขมันอิสระ ซึ่งไลเปสมีส่วนสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ไฮโดรไลติกอื่นๆ เช่น proteases และ carbohydrases เป็นต้น ไลเปสจากสัตว์น้ำจะมีน้อยกว่าสัตว์เลี้ยงด้วยนม พืช และจุลินทรีย์อีกทั้งเมื่อปลาเริ่มมีการเจริญเติบโตความต้องการของสารอาหารเพิ่มขึ้นจึงทำให้พฤติกรรมการกินอาหารของปลาเพิ่มขึ้นเช่นกัน เพื่อตอบสนองต่อการใช้ประโยชน์จากสารอาหารที่ได้รับจากอาหาร

3. ทริปซิน

ค่ากิจกรรมจำเพาะของทริปซินในปลาบู่ที่กินอาหารผสมด้วยสารสกัดกระเทียม พบว่า ปลาบู่ที่กินอาหารผสมสารสกัดกระเทียมทั้ง 5 สารสกัด ให้ผลดีที่สุดที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w) ส่วนปลาบู่ที่กินอาหารผสมน้ำมันถั่วเหลือง ให้ผลดีที่สุดที่ความเข้มข้น 0.5% (w/w) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของศุภลักษณ์ (2555) พบว่า ทริปซินในบริเวณที่มีการย่อยอาหารของปลาบู่ที่กินอาหารผสมสารสกัดกระเทียมด้วยน้ำ และ 95% เอทานอล ให้ผลดีที่สุด ที่ความเข้มข้น 3.0% (w/w) และในปลาบู่ที่กินอาหารผสมสารสกัดกระเทียมด้วย 50% เอทานอล ให้ผลดีที่สุด ที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w) ยังสอดคล้องกับรายงานของ Van et al. (2005) ได้ศึกษาผลของอาหารที่แตกต่างกัน

ต่อการทำงานของ proteolytic enzymes ในระยะแรกของตัวอ่อนปลาบู่ พบว่าระดับของทริปซิน ไคโมทริปซิน ในตัวอ่อนของปลาบู่ที่กินอาหารที่แตกต่างชนิดกันโดยเลี้ยงในน้ำสะอาดจะมีค่า 3.635-3.916 U/mg และ1.034-1.204 U/mg ในเนื้อเยื่อ ในขณะที่ปลาบู่ที่กินอาหารโดยเลี้ยงในน้ำเขียวจะมีระดับของเอนไซม์ที่สูง 5.274-5.873 U/mg และ 1.556-2.236 U/mg ในเนื้อเยื่อ เมื่อทำการเปรียบเทียบชุดการทดลองโดยใช้น้ำเขียวพบว่ามีระดับทริปซินและไคโมทริปซินสูง เมื่อสังเกตในตัวอ่อนที่กินอาหารที่มีชีวิต (โคพีพอดผสมกับโรติเฟอร์) อย่างไรก็ตามระดับของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดที่เพิ่มขึ้นนั้นยังไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติระหว่างกลุ่มตัวอ่อนที่กินอาหารที่ต่างกันโดยใช้น้ำสะอาดและกลุ่มที่ใช้น้ำเขียว ทั้งนี้ประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์ยังขึ้นอยู่กับการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิอีกด้วย Kemel et al. (2009) รายงานว่าทริปซินจากลำไส้ปลา Grey triggerfish (*Balistes capriscus*) กับประสิทธิภาพการทำงานในขณะที่อุณหภูมิต่ำ โดยนำมาทำให้บริสุทธิ์และศึกษาลักษณะ พบว่าการทำงานของเอนไซม์ที่อยู่ในช่วงพีเอช 9.0 11.5 12.0 จะอยู่ที่ 86.5 92.6 และ 52.4% ตามลำดับ และเมื่อศึกษาในอุณหภูมิที่ต่ำพบว่าจะมีการทำงานสูงสุดที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ซึ่งทริปซินและเอนไซม์ที่ทำหน้าที่คล้ายทริปซินเคยมีการแยกและศึกษาลักษณะจากอวัยวะภายในของสัตว์มีกระดูกสันหลังบางชนิดรวมถึงปลาในเขตน้ำอุ่นและน้ำเย็นประกอบด้วย ศึกษาจาก digestive gland (hepatopancreas) ใน white shrimp (*Penaeus setiferus*) cuttlefish (*Sepia officinalis*) crayfish (*Astacus fluviatilis*) ศึกษาจากม้ามในปลา skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) และ yellowfin tuna (*Thunnus albacores*) ศึกษาจาก pyloric ceca ในปลา Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) tambaqui (*Colossoma macropomum*) และ Monterey sardine (*Sardinops sagax caerulea*) ศึกษาบริเวณ viscera ในปลา true sardine (S. *melanostictus*) Japanese anchovy (*Engraulis japonica*) และ sardine (*Sardina pilchardus*) เป็นต้น

4. ไคโมทริปซิน

กิจกรรมการทำงานไคโมทริปซินในบริเวณที่มีการย่อยอาหารของปลาบู่ที่กินอาหารผสมสารสกัดกระเทียมด้วยน้ำ พบค่ากิจกรรมจำเพาะที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w) สูงที่สุด ปลาบู่ที่กินอาหารผสมสารสกัดกระเทียมด้วยเอทานอล 50% พบค่ากิจกรรมจำเพาะที่ความเข้มข้น 0.5% (w/w) สูงที่สุด ปลาบู่ที่กินอาหารผสมสารสกัดกระเทียมด้วยเอทานอล 95% พบค่ากิจกรรมจำเพาะที่ความเข้มข้น 3.0% (w/w) สูงที่สุด ปลาบู่ที่กินอาหารผสมสารสกัดกระเทียมด้วยไดเอทิลอีเทอร์ พบค่ากิจกรรมจำเพาะที่ความเข้มข้น 0.5% (w/w) สูงที่สุด ปลาบู่ที่กินอาหารผสม

น้ำมันถั่วเหลือง พบค่ากิจกรรมจำเพาะที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w) สูงที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของศุภลักษณ์ (2555) พบว่า กิจกรรมการทำงานของไคโมทริปซินในบริเวณที่มีการย่อยอาหารของปลาบู่ที่กินอาหารผสมสารสกัดกระเทียมด้วยน้ำ ให้ผลดีที่สุดที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w) และในปลาบู่ที่กินอาหารผสมสารสกัดสมุนไพรกระเทียมที่สกัดด้วย 50% และ 95% เอทานอล ให้ผลดีที่สุดที่ความเข้มข้น 3.0% (w/w) ซึ่งไคโมทริปซิน เป็นเอนไซม์ที่เกิดจากการกระตุ้นของทริปซิน สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่พีเอช 7–10 (การุณและอุทัยวรรณ, 2555) ไคโมทริปซินมีความจำเพาะต่อชนิดของสารตั้งต้น และสามารถตัดพันธะเอไมน์ และเอสเทอร์ได้เช่นเดียวกับทริปซิน โดยตัดพันธะเปปไทด์หลังกรดอะมิโนที่มีโซ่ข้างเป็นวงแหวน ได้แก่ ฟีนิลอะลานีน ทริปโทเฟน ไทโรซีน และกรดอะมิโนที่มีโซ่ข้างเป็นไฮโดรโฟบิก เช่น เมทไธโอนีน (Stryer, 1988) สารยับยั้งการทำงานของไคโมทริปซิน คือ Tosyl Phenyl Alanine Chloromethyl Ketone (TPCK) และ Chymostatin การศึกษากิจกรรมของไคโมทริปซินมักทำควบคู่กับทริปซินตั้งแต่ก่อนระยะฟักตัวถึงวัยเจริญพันธุ์ การศึกษาในสัตว์น้ำพบว่าการแสดงออกไคโมทริปซินมีผลต่อการเติบโตในทิศทางตรงกันข้ามกับทริปซิน โดยกิจกรรมของไคโมทริปซินจะมีค่าสูงในช่วงที่สิ่งมีชีวิตเติบโตช้าหรือถูกจำกัดโดยปัจจัยต่างๆ (Chan, 2008) ขณะที่การศึกษาการแสดงออกของไคโมทริปซินในปูแมงมุม (*Maja brachydactyla*) พบว่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามอายุ และมีค่าสูงสุดเมื่อปูเข้าสู่ระยะที่มีการเปลี่ยนแปลงเมทามอร์โฟซิส

ตาราง 14 อวัยวะย่อยอาหารที่ทำหน้าที่ผลิตเอนไซม์และอวัยวะที่เกิดการย่อยอาหาร

Organ	Digestive Enzyme
Stomach*, **	Pepsin
Pancreas* (Small Intestine)**	Amylase, Carboxypeptidase, Chymotrypsin, Lecithinase, Lipase, Polynucleotidase,Trypsin
Small Intestine*,**	Aminopeptidase, Dipeptidase, Maltase, Sucrase

หมายเหตุ อวัยวะย่อยอาหารที่ทำหน้าที่ผลิตเอนไซม์ (*) และอวัยวะที่เกิดการย่อยอาหาร (**)
ที่มา : การุณ และ อุทัยวรรณ (2555)

5. อัตราส่วนระหว่างทริปซินและไคโมทริปซิน (T/C ratio) และอัตราการกินอาหาร

เปรียบเทียบอัตราส่วนระหว่างทริปซินและไคโมทริปซินเป็นการแสดงผลการเจริญเติบโตไปในทิศทางที่ดีขึ้น โดยปลาบู่ที่ให้อาหารสำเร็จผสมสารสกัดกระเทียมด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน ที่ความเข้มข้น 0, 0.3, 0.5, 1.0, 3.0 และ 5.0% (w/w) มาเปรียบเทียบกัน ซึ่งให้อาหารสำเร็จปกติเป็นเวลา 7 วัน พบว่า ปลาบู่ที่กินอาหารผสมสารสกัดกระเทียมด้วยน้ำ ที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w) ให้ผลดีที่สุด รองลงมาคือปลาบู่ที่กินอาหารผสมสารสกัดกระเทียมด้วยเอทานอล 50% ที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w) และปลาบู่ที่กินอาหารผสมสารสกัดกระเทียมด้วยเอทานอล 95%ที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w) และยังสอดคล้องกับอัตราการกินอาหารสูงสุด ที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 5.67% 5.67% และ 5.66% น้ำหนักตัว/วัน ตามลำดับ โดยการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหารสามารถบอกถึงการเติบโตและพัฒนาการของสัตว์น้ำได้ การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของทริปซินและไคโมทริปซินทำให้ T/C ratio มีการเปลี่ยนแปลงส่งผลต่อประสิทธิภาพการย่อยโปรตีน ปริมาณกรดอะมิโนอิสระในพลาสมาและในกล้ามเนื้อ สมดุลของการสร้างและการสลายโปรตีน และอัตราการเติบโต (Rungruangsak-Torrissen and Sundby, 2000) ทั้งนี้เนื่องจากอัตราการหลั่งของทริปซินและไคโมทริปซินมีความสัมพันธ์กับความอยากอาหารของปลา อัตราการดูดซึม การสังเคราะห์กรดอะมิโนที่จำเป็นสำหรับการสร้างโปรตีน และระดับการหลั่งของพลาสมาอินซูลิน (Einarsson, et al. 1996) ดังนั้นอัตราส่วนดังกล่าวจึงสัมพันธ์การเติบโต และไม่ขึ้นกับการแสดงออกของทริปซินหรือไคโมทริปซิน (Chan, 2008) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Sunde et al. (2001) พบว่า T/C ratio ในปลาแอตแลนติกแซลมอน *Salmo salar* L. มีความสัมพันธ์กับการเจริญเติบโต โดยมีค่าสูงสุดในปลาสวายหนูขนาดน้อยกว่า 5 เซนติเมตร และมีค่าลดลงเมื่อปลาเจริญเติบโตแล้ว นอกจากนี้ Hofer and Schiemer (1981) พบว่ายังสัมพันธ์กับการใช้ประโยชน์ของโปรตีน พบว่าสามารถใช้ประเมินพฤติกรรมการกินอาหารของสัตว์น้ำได้เช่นกัน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Rungruangsak-Torrissen et al. (2006) ได้ศึกษาในปลาแอตแลนติกแซลมอน *Salmo salar* L. พบว่า T/C ratio มีความสัมพันธ์กับอัตราการเจริญเติบโตของปลา โดยเมื่อปลาอยู่ในระยะที่มีการเจริญเติบโต T/C ratio จะมีค่าสูง และจะมีค่าต่ำลงเมื่ออัตราการเจริญเติบโตของปลาลดลง เนื่องจากทริปซินแสดงกิจกรรมจำเพาะได้สูงและมีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการย่อยอาหารในช่วงที่ปลามีการเจริญเติบโตสูง ตรงข้ามกับไคโมทริปซิน

ซึ่งแสดงกิจกรรมจำเพาะได้สูงขึ้นเมื่ออัตราการเจริญลดลง ดังนั้น T/C ratio จึงสามารถใช้เป็นดัชนีวัดคุณภาพการเจริญเติบโตของสัตว์แต่ละระยะได้

จากอัตราส่วนระหว่างของทริปซินและไคโมทริปซิน (T/C ratio) ยังพบว่ามีความสัมพันธ์ต่ออัตราการกินอาหารในปลาบู่ทุกกลุ่มที่ให้อาหารผสมด้วยสารสกัดกระเทียม 5.0% (w/w) และ 3.0% (w/w) ตามลำดับเนื่องจากสารสกัดกระเทียมที่ใช้ในการผสมอาหารนั้น มีสารสำคัญที่ทำให้กระเทียมมีกลิ่นหอมฉุนเผ็ดร้อน คือ เอนไซม์อัลลิเนส (Allinase) ซึ่งเปลี่ยนสารอินทรีย์กำมะถันอัลลิอิน แตกตัวได้สารอัลลิซิน ซึ่งสารอัลลิซินจะสามารถละลายได้ดีในน้ำเมื่อเปรียบเทียบกับ เอทานอล น้ำมัน และ ไดเอทิลอีเทอร์ ซึ่งสารอัลลิซินมีคุณสมบัติช่วยกระตุ้นการทำงานของจุลชีพในลำไส้ (intestinal flora) ทำให้การบีบตัวของลำไส้เพิ่มขึ้น ดังนั้นจึงเป็นการช่วยกระตุ้นระบบการทำงานของการย่อยอาหารได้ดียิ่งขึ้น เมื่อระบบภายในร่างกายอยู่ในภาวะสมดุล กระบวนการเผาพลาญและกระบวนการย่อยก็จะทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ สารอัลลิซินที่มีอยู่ในกระเทียมมีส่วนช่วยกระตุ้นให้เกิดการหลั่งของเอนไซม์ในระบบย่อยอาหาร กระตุ้นการบีบและหดตัวของลำไส้ ทำให้การย่อยอาหารและขับถ่ายเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ (Ingkaninan *et al.*, 2003 อ้างโดย Sirinatd, 2011) นอกจากนี้การเสริมสารสกัดกระเทียมให้ปลาบู่กินยังช่วยเพิ่มกระตุ้นความอยากกินอาหารเนื่องมาจากกลิ่นฉุนของกระเทียมอีกด้วย ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของศุภลักษณ์ (2555) พบว่ากลิ่นฉุน เป็นตัวที่ช่วยกระตุ้นพฤติกรรมการอยากกินอาหารของปลาบู่อย่างเห็นได้ชัดเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่มีการผสมกระเทียมลงไปในอาหาร

การศึกษาประสิทธิภาพของอาหารที่ผสมด้วยสารสกัดกระเทียมต่อการเจริญเติบโตของปลาบู่

ทำการเลี้ยงปลาบู่ที่กินอาหารผสมด้วยสารสกัดกระเทียมด้วยน้ำ ที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w) ซึ่งให้ผลกิจกรรมเอนไซม์และแนวโน้มการเจริญเติบโตสูงสุด เพื่อติดตามอัตราการเจริญเติบโต เป็นเวลา 2 เดือน โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ให้อาหารสำเร็จปกติ

1. อัตราการเจริญเติบโต

พบว่า ในปลาบู่ที่กินอาหารผสมด้วยสารสกัดกระเทียมด้วยน้ำ ที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w) มีน้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้นเท่ากับ 30.71±0.05 กรัม/ตัว น้ำหนักเฉลี่ยสิ้นสุดเท่ากับ 40.75±0.06 กรัม/ตัว และน้ำหนักเพิ่มขึ้นเท่ากับ 32.69% เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งมี

น้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้นเท่ากับ 30.46±0.78 กรัม/ตัว น้ำหนักเฉลี่ยสิ้นสุดท้ายเท่ากับ 35.98±0.37 กรัม/ตัว และน้ำหนักเพิ่มขึ้นเท่ากับ 18.12% ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p< 0.05$) สอดคล้องกับ Salah et al. (2008) พบว่าอัตราการเจริญเติบโตในปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดกระเทียมทั้งในรูปแบบกระเทียมสดและแบบผงพบว่าจะมีอัตราการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในช่วงที่เลี้ยง 8 เดือน ศจีรา (2549) พบว่ากระเทียมมีผลต่อการสร้างกล้ามเนื้อในไก่ โดยเมื่อเสริมกระเทียมสดในอาหารทุกระดับ ไม่ได้มีผลทำให้ขนาดของเซลล์กล้ามเนื้อใหญ่ขึ้น แต่ทำให้เซลล์กล้ามเนื้อมีขนาดเล็กลงและมีจำนวนมากขึ้น หรืออาจกล่าวได้ว่าปริมาณเนื้อเพิ่มมากขึ้น สอดคล้องการศึกษาของ อุไร (2545) พบว่าการเสริมกระเทียมผงที่มีสารอัลลิซิน 150-250 mg/kg มีส่วนช่วยเพิ่มปริมาณเนื้อและอัตราการเจริญเติบโตอีกด้วย

2. ประสิทธิภาพการใช้อาหาร

ส่วนอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (SGR) ในปลาบู่ที่กินอาหารผสมด้วยสารสกัดกระเทียมด้วยน้ำ ที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w) มีค่าเท่ากับ 0.219± 0.06 %/วัน เทียบกับกลุ่มควบคุม มีค่าเท่ากับ 0.107±0.03 %/วัน ซึ่งมีความแตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ซึ่งผลสอดคล้องกับประสิทธิภาพของอาหาร (FE) ในปลาบู่ที่กินอาหารผสมด้วยสารสกัดกระเทียมด้วยน้ำ ที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w) มีค่า เท่ากับ 0.55± 0.07 หรือปลาบู่มีประสิทธิภาพการใช้อาหาร 55% และกลุ่มควบคุมมีค่า เท่ากับ 0.35±0.04 หรือปลาบู่มีประสิทธิภาพการใช้ 35% ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ทั้งนี้การศึกษาของ Metwally (2009) พบว่าสารสำคัญในกระเทียมสดกระทียมผงและน้ำมันกระเทียมเสริมในอาหารมีส่วนช่วยในการควบคุมอัตราการเจริญเติบโตลดอัตราการตายและเพิ่มการทำงานของ antioxidant ภายในปลานิลได้ สอดคล้องกับงานของ ซึ่งสารสกัดกระเทียมมีส่วนช่วยเพิ่มอัตราการกินอาหาร และส่งผลให้เกิดผลดีในการช่วยเพิ่มการเจริญเติบโต โดยสังเกตได้จากเปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นและค่าประสิทธิภาพของอาหาร (FE) และสอดคล้องกับรายงานของ ศุภลักษณ์ (2555) พบว่าอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อในปลาบู่ที่กินอาหารผสมสารสกัดกระเทียมด้วยน้ำ ที่ความเข้มข้น 3.0% (w/w) เป็นเวลา 2 เดือน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) โดยในกลุ่มสารสกัดกระเทียมด้วยน้ำ มีค่าเท่ากับ 2.14±0.42 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม มีค่าเท่ากับ 3.79±0.41 ส่วนงานวิจัยของ Diab et al. (2002) รายงานว่าปลานิลที่เจริญเติบโตดีเมื่อได้รับอาหารผสมกระเทียมที่ 2.5% ซึ่งสอดคล้องกับ Abou-Zeid (2002) รายงานว่ากระเทียมมีผลในทางบวกต่อ SGR ของปลานิลอีกด้วย เมื่อเพิ่มกระเทียมในอาหารปริมาณการกินอาหารก็เพิ่มขึ้นด้วย โดยการเจริญเติบโตขึ้นอยู่กับการย่อยและการขนส่งสารอาหาร จะเห็นได้ว่า

ปัจจัยหลายอย่างมีผลต่อระดับการย่อยอาหารอาจเป็นตัวส่งเสริมหรือจำกัดการเจริญเติบโต ซึ่งประกอบด้วยประสิทธิภาพในการดูดซึมและประสิทธิภาพการใช้อาหารซึ่งสัมพันธ์กับขนาดอาหารและคุณภาพของอาหารด้วย

การศึกษายีนแสดงออกของเอนไซม์ย่อยอาหารในปลาบู่

ผลการศึกษาสารสกัดกระเทียมต่อแสดงยีนแสดงออกในระบบย่อยอาหารของปลาบู่ โดยเลือกตัวอย่างปลาบู่ที่กินอาหารผสมสารสกัดกระเทียมด้วยน้ำ ที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w) เปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยนำกระเพาะและลำไส้ของปลาบู่มาทำการสกัด total RNA จากนั้นนำ total RNA มาทำการตรวจสอบความเข้มข้นของ total RNA ด้วยเครื่องนาโนดรอปสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer Thermo Science, USA) ที่ค่าการดูดกลืนแสง 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร (Sambrook and Russel, 2001) พบว่า ในปลาบู่ที่กินอาหารในกลุ่มควบคุมมีค่าความเข้มข้นของ total RNA เท่ากับ 164.1 ng/µl และปลาบู่ที่กินอาหารผสมสารสกัดกระเทียมด้วยน้ำ ที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w) มีค่าความเข้มข้นของ total RNA เท่ากับ 182 ng/µl และตรวจสอบคุณภาพ total RNA ภายใต้สนามไฟฟ้าผ่านตัวกลางชนิดวุ้น (agarose gel electrophoresis) พบว่า total RNA ที่สกัดได้จากลำไส้ปลาบู่ มีคุณภาพดี แสดงได้จากผล gel electrophoresis ที่ความเข้มข้น 1.0% (w/v) และใช้ 0.5x Tris-borate-EDTA เป็นบัฟเฟอร์ ปรากฏแถบ 28S rRNA และ 18S rRNA สอดคล้องกับรายงานของกีรติ (2544) พบว่า RNA ที่สกัดได้จาก INS-1 เซลล์ มีคุณภาพดี แสดงได้จากผล gel electrophoresis ปรากฏแถบ 28S rRNA และ 18S rRNA ชัดเจนและไม่ปรากฏแถบของ DNA แสดงถึงไม่มีการปนเปื้อนของ genomic DNA เนื่องจาก rRNA เป็น RNA ที่พบมากที่สุดประมาณ 85% จาก RNA ทั้งหมดในเซลล์ ในขณะที่ mRNA มีปริมาณน้อยมาก ซึ่งไม่มากพอที่จะตรวจวัดได้ ดังนั้น จึงใช้ rRNA เป็นตัวบ่งชี้คุณภาพของ RNA ทั้งหมด โดย RNA ที่มีคุณภาพดีจะมีอัตราส่วนระหว่าง 28S:18S rRNA เท่ากับ 2:1

จากการทำ RT-PCR ด้วยเทคนิค one-step RT-PCR และ two-step RT-PCR พบว่าไม่ปรากฏแถบ DNA ซึ่งอาจจะเกิดจาก ไพรเมอร์ซึ่งถูกออกแบบตรงตำแหน่งที่ประกอบด้วยลำดับเบสจำเพาะและตำแหน่งอนุรักษ์ (conserve region) ของแต่ละเอนไซม์ ในฐานข้อมูล GenBank ซึ่งเป็นชนิด (species) อื่นไม่ใช่ในกลุ่มปลาบู่ และยังเป็นดีเจเนอเรตไพรเมอร์ (degenerate pimer) จึงทำให้มีความจำเพาะต่ำ (low specificity) ซึ่งในการทำปฏิกิริยา PCR ได้ลดอุณหภูมิแอนนีลลิ่ง (annealing temp) ลงแล้วก็ยังไม่ได้ PCR product ทั้งนี้แม้จะสามารถได้ PCR product ที่เป็นยีนของ

เอนไซม์ย่อยอาหารทั้ง 4 เอนไซม์ได้ ก็ยังไม่สามารถบอกได้ว่า ยีนแสดงออกมีปริมาณมากหรือน้อยได้ วิธีที่จะใช้น่าจะเป็นวิธีการทำไพรเมอร์ที่เฉพาะ (specific primer) ที่สามารถจับ mRNA ของทั้ง 4 เอนไซม์ได้ โดยการทำ Northern blot analysis จึงสามารถบอกระดับของยีนแสดงออกได้

บทที่ 6
สรุปผลการวิจัย

1. ปลาบู่ที่ได้รับอาหารที่ผสมด้วยสารสกัดกระเทียมทั้ง 5 สารสกัด เป็นเวลา 7 วัน สามารถช่วยกระตุ้นกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ย่อยอาหารให้เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

อะไมเลสในปลาบู่ที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดกระเทียมด้วยน้ำ ที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w) มีค่าสูงที่สุด รองลงมาผสมน้ำมันถั่วเหลือง ที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w) และปลาบู่ที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดกระเทียมด้วยน้ำ ที่ความเข้มข้น 1.0% (w/w) แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) กับกลุ่มควบคุม โดยมีค่าเท่ากับ 110.26±0.004 72.04±0.002 และ 69.60±0.015 ตามลำดับ

ไลเปสในปลาบู่ที่กินอาหารผสมน้ำมันกระเทียม ที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w) มีค่าสูงสุด รองลงมาผสมเอทานอล 50% ที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w) และปลาบู่ที่ได้รับอาหารผสมเอทานอล 95% ที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w) แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) กับกลุ่มควบคุม โดยมีค่าเท่ากับ 4.35±0.004 4.06±0.011 และ 3.45±0.115 ตามลำดับ

ทริปซินในปลาบู่ได้รับอาหารผสมสารสกัดกระเทียมด้วยน้ำ ที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w) มีค่าสูงที่สุด รองลงมาผสมเอทานอล 50% ที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w) และปลาบู่ที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดน้ำมันกระเทียม ที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w) แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) กับกลุ่มควบคุม โดยมีค่าเท่ากับ 88.04±0.004 51.85±0.011 และ 31.15±0.002 ตามลำดับ

ไคโมทริปซินในปลาบู่ได้รับอาหารผสมสารสกัดกระเทียมด้วยไดเอทิลอีเทอร์ ที่ความเข้มข้น 0.5% (w/w) มีค่าสูงที่สุด รองลงมาผสมเอทานอล 95% ที่ความเข้มข้น 3.0% (w/w) โดยมีค่าเท่ากับ 327.46±0.005 และ 305.64±0.006 ตามลำดับ

T/C ratio ในปลาบู่ที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดกระเทียมด้วยน้ำ ที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w) มีค่าสูงที่สุด รองลงมาคือผสมสารสกัดกระเทียมด้วยเอทานอล 50% ที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w) และปลาบู่ที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดกระเทียมด้วยเอทานอล 95% ที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w)) แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) กับกลุ่มควบคุม เท่ากับ 1.24±0.347 0.84±0.427 และ 0.69±0.540 ตามลำดับ

2. ปลาบู่ที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดกระเทียมด้วยน้ำที่ความเข้มข้น 5.0% (w/w) เป็นเวลา 2 เดือน มีอัตราการเจริญเติบโต และประสิทธิภาพของอาหาร แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) กับกลุ่มควบคุม โดยมีค่าสูงขึ้นเป็น 2 เท่า และ 1.6 เท่า ตามลำดับ

บรรณานุกรม

การุณ ทองประจุแก้ว และ อุทัยวรรณ โกวิทวที. 2555. เอนไซม์ย่อยอาหารกับการพัฒนาอาหารเพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ. **วารสารวิชาการพระจอมเกล้าพระนครเหนือ** 22 (3) : 710-720.

กลุ่มวิจัยอาหารสัตว์น้ำ. 2534. **อาหารสัตว์น้ำ.** กรุงเทพฯ : ฝ่ายฝึกอบรม กองส่งเสริมการประมง กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 55 น.

จันเพ็ญ บางสำรวจ. 2553. กระเทียมกับการต้านอนุมูลอิสระ. **วารสาร มฉก.วิชาการ 114.** 14 (27) : 113-122.

จิราพร โรจน์ทินกร, ประจวบ ฉายบุ และ ศุภลักษณ์ ฤทธิแผลง. 2554. **การใช้สารธรรมชาติเพื่อเร่งการเจริญเติบโตในปลาบู่.** โครงการทุนวิจัยมหาบัณฑิต สกว. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สกว. รหัสโครงการ MRG-WI525S119. กรุงเทพฯ : สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย. 6 น.

เจษฎา จิวากานนท์, พิทยา ภาภิรมย์, อภัสรา วรราช, เนตรชนก จิวากานนท์, อรุณี บุตรตาสี และ สาธร พรตระกูลพิพัฒ. 2546. การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดกระเทียมในการต้าน เชื้อจุลชีพที่ก่อให้เกิดโรคในไก่และสุกร. **วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มข.** 13 (2) : 24-37.

จำเริญศรี พวงแก้ว, เจนจิตต์ คงกำเนิด, มณฑิรา ถาวรยุติการต์ และ จิราพร เกษรจนัทร์. 2553. ประสิทธิภาพของน้ำมันกระเทียมในการเพิ่มการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันและความต้านทานโรคในกุ้งขาว. น. 91-102. <u>ใน</u> **การประชุมวิชาการกุ้งทะเลแห่งชาติ ครั้งที่ 7.** วันที่ 7-8 กันยายน 2553 โรงแรมทวินโลตัส. นครศรีธรรมราช : สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำชายฝั่งสงขลา.

จันทกานต์ นุชสุข. 2550. **การพัฒนาสูตรอาหารโดยใช้เทคโนโลยีทางเอนไซม์ย่อยอาหารเพื่อการเพาะเลี้ยงปลาสวายหนู *Helicophagus leptorhynchus* Ng & Kottelat, 2000.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 145 น.

เฉิดฉัน อมาตยกุล, วัฒนะ ลีลาภัทร, สุรางค์ สุมโนจิตราภรณ์, ทวี วิพุทธานุมาศ, ประดิษฐ์ ศรีภัทร ประสิทธิ์ และ สมพร กุลาบุญ. 2538. **ปลาบู่ทราย.** กรุงเทพฯ : กองประมงน้ำจืด กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 89 น.

ชัชชัย ชาตะกาญจน์. 2547. **ปลาบู่ทราย-ปลาบู่จาก.** [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.nicaonline.com/articles1/site/view_article.asp?idarticle=143 (15 เมษายน 2554).

นิติกร ผิวผ่อง, ประหยัด ไชยลึก และ เรณู นิตย์สุภาพ. ม.ป.ป. **ความต้องการโปรตีนในอาหารปลาบู่ทราย.** กรุงเทพฯ : กรมประมง. 5 น.

นิวุฒิ หวังชัย. 2534. **โภชนศาสตร์สัตว์น้ำ.** เชียงใหม่: คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้. 226 น.

ประเสริฐ ทองเจริญ. 2550. กระเทียม. **พุทธชินราชเวชสาร** 24 (1) : 88-92 น.

ผ่องพันธ์ ประสารกก. 2544. **ลักษณะสมบัติของเชื้อไวรัสที่แยกได้จากปลาบู่ทราย *Oxyeleotris marmorata* (Bleeker,1852) ที่เป็นโรค.** กรุงเทพฯ : สาขาวิชาสัตววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยจุฬาลงกรณ์. 98 น.

พูนศักดิ์ ตันติเดชามงคล. 2552. การเลี้ยงปลาบู่ โดย ไชย ส่องอาชีพ. **เทคโนโลยีชาวบ้าน** 21 (451) : 100.

ทวีทอง หงส์วิวัฒน์ และ นิดดา หงษ์วิวัฒน์ . 2548. **ผัก 333 ชนิด คุณค่าอาหารและการกิน.** กรุงเทพฯ : แสงแดด. 320 น.

เทคนิค RT-PCR. ม.ป.ป. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.clontech.com/AU/Products/PCR_RT-PCR_Real-Time_qPCR (30 สิงหาคม 2555).

เทพ สุภรณ์กุล. 2555. **เผย 28 เคล็ดลับยาสมุนไพรรักษาโรค.** [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://board.postjung.com/629024.html (31 สิงหาคม 2555).

ธำรงค์ อมรสกุล, วสันต์ ศรีวัฒนา และ อุไรวรรณ ชำนาญเวช. 2545. ลักษณะบางประการในระยะวัยอ่อนของลูกปลาบู่ทราย. **วารสารสงขลานครินทร์** 24(4): 611-619.

มานพ ตั้งตรงไพโรจน์. 2527. **หนังสือคู่มือการผสมเทียมพันธุ์ปลาน้ำจืดที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจ.** [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.nicaonline.com/index.php?option=com_content&view=article&id=938:2012-03-05-02-48-58&catid=36:2012-02-20-02-57-45&Itemid=116 (28 กุมภาพันธ์ 2558).

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว. ม.ป.ป. **การเพาะเลี้ยงปลาบู่.** [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.phtnet.org/news52/view-news.asp?nID=455 (15 เมษายน 2554).

สมพร รุ่งกำเนิดวงศ์, จุไลวรรณ รุ่งกำเนิดวงศ์ และ จำเริญศรี พวงแก้ว. 2553. **ผลของกระเทียมสด (*Allium sativum* Linn.) ต่อระบบภูมิคุ้มกันและความต้านทานโรคในกุ้งกุลาดำ.** สงขลา : สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำชายฝั่ง สงขลา. 14 น.

สิรินารถ ใจตรง. 2544. **กระเทียม.** [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://sirinpharmacy.exteen.com/20110324/entry-1 (30 กันยายน 2555).

สิริพร บุญทิวา. 2548. **ผลยับยั้งของสารสกัดจากพืชสมุนไพรบางชนิดต่อการเติบโตของแบคทีเรียก่อโรค.** เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 42 น.

วิมล จันทรโรทัย และ กิจจา ใจเย็น. 2535. **การศึกษาชนิดของอาหารสำเร็จรูปเพื่อใช้ในการเลี้ยงลูกปลานิลสีแดง.** กรุงเทพฯ : สถาบันวิจัยประมงน้ำจืด กรมประมง. 11 น.

วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. 2536. **อาหารปลา.** กรุงเทพฯ : โอเดียนสโตร์. 242 น.

ศจีรา คุปพิยานันท์. 2549. **ผลของการเสริมกระเทียม (*Allium saltivum* Linn.) ในอาหารต่อลักษณะเพศผู้ในไก่เนื้อ.** นครราชสีมา: มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 37 น.

ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดพะเยา. ม.ป.ป. **การเพาะเลี้ยงปลาบู่.** [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.fisheries.go.th/ifphayao/web2/index.php?option=com_content&view=article&id=35&Itemid=46 (30 สิงหาคม 2555).

ศุภลักษณ์ ฤทธิแผลง. 2555. **การใช้สารธรรมชาติเพื่อเร่งการเจริญเติบโตในปลาบู่.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยแม่โจ้. 112 น.

ศิริลักษณ์ เมืองเงิน. 2551. นิสัยการกินอาหารของปลากราย กดเหลืองและบู่ทรายในกว๊านพะเยา. **วารสารวิจัย เทคโนโลยีการประมง** (2)1: 118-123.

อัจฉรา ภูพิพัฒน์ผล และ อุษา ศิริบุญฤทธิ์. 2523. **ผลของน้ำสกัดกระเทียมต่อกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กหนูตะเภาและกระเพาะอาหารกบ.** กรุงเทพฯ : โครงการพิเศษ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล. 11 น.

อรัญญา มโนสร้อย และ จีรเดช มโนสร้อย. 2548. **น้ำมันหอมละเหยและสารสกัดจากสมุนไพรไทย; การใช้ทางยาและเครื่องสำอาง.** เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 327 น.

อัญชลี ธำมรงค์คงสถิต และ จิราพร โรจน์ทินกร. 2550. ประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรไทยในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในกุ้งก้ามกราม. **วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง** 1(2) : 192-200.

อุไร แสนคุณท้าว. 2545. **กรรมวิธีการผลิตและผลการเสริมกระเทียมผงในอาหารต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต การควบคุมโรค และคุณภาพซากของไก่เนื้อ.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 142 น.

Abou-Zeid, S.M. 2002. **The effects of some medical plants in reproductive and productive performance of Nile tilapia fish.** Master Thesis. Cairo University. 212 p.

Abol-munafi, B., Liem, P. T., Van, M. V. and Ambak, M. A. 2006. Histological ontogeny of the digestive system of marble goby (*Oxyeleotris marmoratus*) larvae. **Journal of Sustainability Science and Management** 1(2): 79-86.

Alberta, N.A., Benjamin, K. S. and Reynaldo, V. 2007. Lipase fraction from the viscera of grey mullet (*Mugil cephalus*) Isolation, partial purification and some biochemical characteristics. **Enzyme and Microbial Technology** 44 (3) : 394-402.

Allah, D. T. and Ikhwanuddin, M. 2012. Dietary effects of garlic (*Allium sativum*) on haemato-immunological parameters, survival, growth, and disease resistance against Vibrio harveyi infection in Asian seabass, Lates calcarifer (Bloch). **Aquaculture** 364 : 6–12.

Allison, G. L., Lowe, G. M. and Rahman, K. 2006. Aged garlic extract and its constituents inhibit platelet aggregation through multiple mechanisms. **The Journal of nutrition** 136 (3) : 782S-788S.

Ananichev, A.V. 1959. Digestive enzymes of fish and seasonal changes in their activity. **Biochemistry** 24: 952-958.

Ana, A.G. S, Ian, P.G. A, Albe rico, R. E. S, Luiz, B. C. J. and Ranilson S. B. 2007. Trypsin-like enzyme from intestine and pyloric caeca of spotted goatfish (*Pseudupeneus maculatus*). **Food Chemistry** 100 : 1429–1434.

Areekijseree, M., Engkagul, A., Kovitvadhi, U., Thongpan, A., Mingmuang, M. and Kovitvadhi, S. 2002. Activity profiles at different pH and temperature of cellulase and lipase infreshwater pearl mussel: *Hyriopsis* (*Hyriopsis bialatus*, Simpson 1900). **Kasetsart J.(Nat. Sci.)** 36: 399-407.

Basic Human Anatomy. 2006. **เอนไซม์ในการย่อยอาหาร**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.bcnlp.ac.th/Anatomy/page/apichat/digestive/page/digestion.html.(30 สิงหาคม 2555).

Bao, J. L., Zhou, Cai, L. G., Hara, K., Maeda, A., Su, W. J. and Cao, M. J. 2008. Purification and characterisation of trypsins from the pyloric caeca of mandarin fish (*Siniperca chuatsi*). **Food Chemistry** 110 : 352-360 .

Bernfeld, P. 1951. Enzymes of starch degradation and synthesis. **Advances Enzymology** 12:379-428.

Blier, P.U, Lemieux, H. and Devlin, R.H. 2002. Is the growth rate of fish set by digestive enzymes or metabolic capacity of the tissues? Insight from transgenic coho salmon. **Aquaculture** 209 : 379–384.

Bleeker, P. 1852. Bijdrage tat de kennis der ichthyologische fauna van Singapore. **Natuurkd. Tijdschr. Neder.-Indië** 3 : 51-86.

Chan, C-R. Lee, D-L., Cheng, Y-H., Hsieh, D. J-Y. and Weng, C-F. 2008. Feed deprivation and re-feeding on alterations of proteases in tilapia *Oreochromis mossambicus*. **Zoological Studies** 47 (2) : 207–214.

Dany, P., Pierre, U. B., Jean, D. D. and Helga, G. 1995. How should enzyme activity be used in fish growth study?. **The Journal of Experimental Biology** 198 : 1493–1497.

Darwis, M., Raehanah, S., Tanaka, M. and Senoo, M. 2008. **Effects of Different Salinity Levels on Growth, Survival and Trypsin Activity of Early Juvenile Stage Marble Goby, *Oxyeleotris marmoratus*.** Malaysia: BMRI-University Malaysia Sabah. 20 p.

Diab, A.S, El-Nagar, G.O and Abd-El Hady. 2002. Evaluation of *Nigella sativa* (black seed; Baraka), *Allium sativum* (garlic) and BIOGEN as feed additives on growth performance and immunostimulant of O.*niloticus* fingerlings. **Suez Canal Vet. medical journal** 45 : 745-775.

Douglas, S.E., Gawlicka, A. Mandla, S. and Gallant, J. W. 2000. Ontogeny of the stomach in winter flounder:characterization and expression of the pepsinogen and proton pump genes and determination of pepsin activity. **Journal of Fish Biology.** 55 : 897-915.

Dupree, H.K. and Sneed, K.P. 1966. Response of channel catfish to different levels of major nutrients in purified diets. **Sport Fish. Wildlife, Tech** 9 (2) : 328-332.

Einarsson, S., Spencer, D.P. and Talbot, C. 1996. The effect of feeding on the secretion of trypsin, pepsin and chymotrypsin. **Fish Physiology and Biochemistry** 15(5) : 439–446.

Fortunatov, M. N. 1955. Activity of garlic phytoncides in the human body when taken internally. **Farmakol Toksikol** 18(8) : 43-6.

Giri, S.S., Sahoo, S.K., Sahu, A.K. and Mukhopadhyay, P.K. 2000. Nutrient digestibility and intestinal enzyme activity of *Clarias batrachus* (Linn.) juveniles fed on dried ®sh and chicken viscera incorporated diets. **Bioresource Technology** 71 : 97-101.

Guillaume, D.L. and Wilson, R.P. 1997. Effects of dietary carbohydrate-to-lipid rations on growth and body composition of fingerling channel catfish. **Program Fish Culture** 39 : 43-47.

Harish, J.C., Cottrell, S.L., Plummer, S. and Lloyd, D. 2001. Antimicrobial properties of *Allium sativum* (Garlic). **Applied Microbiology and Biotechnology** 57 : 282-286.

Han, l. C., Wang, X. Peng, Y., Meng, X. P., Sun, S. P. and Shi, X. Y. 2009. Molecular cloning and tissue distribution of lipoprotein lipase full-length cDNA from Pengze crucian carp (*Carassius auratus* var. Pengze). **Comparative Biochemistry and Physiology** 153 : 109-115.

He, S., Liang, X. F., Li, L., Sun J. and Shen, D. 2013. Differential gut growth, gene expression and digestive enzyme activities in young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) fed with plant and animal diets. **Aquaculture** 40 (1) : 275-287.

Hepher, B. 1988. **Nutrition of pond fishes.** New York : Cambridge University Press. 388 p.

Hofer, R. and Schiemer, F. 1981. Proteolytic activity in the digestive tract of several species of fish with different feeding habits. **Oecologia** 48 (3) : 342-345.

Ibert, B., Winkler, G. and Knobloch, K. 1990. Production of allicin transformation : ajoenes and dithiins characterization and their determination by HPLC. **Planta Med** 56 : 202-211.

Ingkaninan, K., Temkitthawon, P., Chuenchom, K., Yuyaem, T. and Thongnoi, W. 2003. Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plants used in Thai traditional rejuvenating and neurotonic remedies. **Journal of Ethnopharmacology** 89 : 261-264.

Jiwyam, W. 2008. *Oxyeleotris marmoratus*, Predator or By-Product in intergrated Aquaculture Ponds. **Pakistan Journal of Biological Sciences** 11 (4) : 532-538.

Juntarothai, W. and Jaiyen, K. 1992. **Study type of Aquaculture in red tilapia feed.** Bangkok : Freshwater Fisheries Institute, Department of Fisheries. 11 p.

Kemel, J., Ali, B., Dalel, D., Rafik, B., Ahmed, B. and Moncef, N. 2009. New alkaline trypsin from the intestine of Grey triggerfish (*Balistes capriscus*) with high activity at low temperature Purification and characterization. **Food Chemistry** 116(3) : 644-650.

Kurokawa, T., Uji, S. and Suzuki, T. 2005. Identification of pepsinogen gene in the genome of stomachless fish, *Takifugu rubripes*. **Comparative Biochemistry and Physiology** 140 : 133–140.

Khalil, R. H., Nadia, B. M. and Soliman, M. K. 2001. Effects of Biogen and Levamisol Hcl on the immune response of cultured Oreochromis niloticus to Aeromonas hydrophila vaccine. **Beni-Suef Vet. Med. J., Egypt** 2 : 381-392.

Kumar, P., Prasad, Y., Patra, A.K., Ranjan, R., Swarup, D., Patra, R.C. and Pal, S. 2009. Ascorbic acid, garlic extract and taurine alleviate cadmium-induced oxidative stress in freshwater catfish (*Clarias batrachus*). **Science of the Total Environment** 407 : 5024–5030.

Klahan, R., Areechon, N., Yoonpundh, R. and Engkagul, A. 2009. Characterization and Activity of Digestive Enzymes in Different Sizes of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). **Kasetsart J. (Nat. Sci.)** 43 : 143–153.

Lowry, H.O., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem**. 193: 265-275.

Lovell, T. 1989. **Nutrition and Feeding of Fish**. New York: Chapman & Hall. 260 p.

Langeland, M., Lindberg, J. E. and Lundh, T. 2013. Digestive Enzyme Activity in Eurasian Perch (*Perca Fluviatilis*) and Arctic Charr (*Salvelinus Alpinus*). **Journal ofAquaculture Research and Development** 5 (208) : 2.

Markweg-Hanke, M., Lang, S. and Wagner, F. 1995. Dodecanoic acid inhibition of a lipase from *Acinetobacter sp.*OPA 55. **Enzyme and microbial technology** 17 : 512-516.

Metwally, M.A.A. 2009. Effects of Garlic (*Allium sativum*) on Some Antioxidant Activities in Tilapia Nilotica (*Oreochromis niloticus*). **World Journal of Fish and Marine Sciences** 1 (1) : 56-64.

Ma, P., Liu, Y., Reddy, K. P., Chan, W. K., and Lam, T.J. 2004. Characterization of the seabass pancreatic a-amylase gene and promoter. **General and Comparative Endocrinology** 137 : 78–88 .

Murray, H.M., Gallant, J.W., Johnson, S. C. and Douglas, S. E. 2006. Cloning and expression analysis of three digestive enzymes from Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) during early development: Predicting gastrointestinal functionality. **Aquaculture** 252(2) : 394-408.

Namulawa, V. T., Kato, C. D., Rutaisire, J., Britz, P. J., Beukes, N., Pletschke, B. and Whiteley, C. 2013. Enzyme activity in the Nile perch gut: Implications to Nile perch culture. **Global Journal of Fisheries and Aquaculture** 1 (1) : 065-072.

Nelson, D. L. and Cox, M. M. 2000. **Lehninger PRINCIPLES OF BIOCHEMISTRY Fourth Edition.** New York : University of Wisconsin–Madison. 1119 p.

Nelson, J.S. 1994. **Fishes of the World**. 3rd ed. New York : John Wiley and Sons. Inc. 539 p.

Nirpjit, D.S. and Kaur, J. 2002. Immobilization, stability and esterification studies of a lipase from a *Bacillus* sp. **Biotechnology and Applied Biochemistry** 36 : 7-12.

Pérez-Jiménez, A., Cardenete, G., Morales, A. E., García-Alcázar, A., Abellán, E., and Hidalgo, M. C. 2009. Digestive enzymatic profile of Dentex dentex and response to different dietary formulations. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology** 154 (1) : 157-164.

Puneet, K., Prasad, Y., Patra, A. K., Ranjan, R., Swarup, D., Patra, R. C. and Pal, S. 2009. Ascorbic acid, garlic extract and taurine alleviate cadmium-induced oxidative stress in freshwater catfish (*Clarias batrachus*). **Science of the total environment** 407 (18) : 5024-5030.

Rattanachaikunsopon, P. and Phumkhachorn, P. 2009. Potential of Chinese chive oil as a natural antimicrobial for controlling Flavobacterium columnare infection in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. **Fish Science Journal** 75 : 1431–1437.

Rathore, R.M., Kumar, S. and Chakrabatri, R. 2005. Digestive enzyme patterns and evaluation of protease classes in *Catla catla* (Family: Cyprinidae)during early development stages. **Comparative Biochemistry and Physiology** 142 : 98-106.

Rungruangsak-Torrissen, K. and Sundby, A. 2000. Protease activities, plasma free amino acids and insulin at different ages of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) with genetically different trypsin isozymes. **Fish Physiology and Biochemistry** 22 (4) : 337–347.

Rungruangsak-Torrissen, K. and Utne, F. 1981. Effect of different acidified wet feeds on protease activities in the digestive tract and on growth rate of rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). **Aquaculture** 22 : 67–79.

Rungruangsak-Torrissen, K., Lied, E. and Espe, M. 1998. Differences in digestion and absorption of dietary protein in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) with genetically different trypsin isozymes. **Fish Physiology and Biochemistry**. 45:1087-1104.

Rungruangsak-Torrissen, K., Moss, R. L., Andresen, H., Berg, A. and Waagbo, R. 2006. Different expressions of trypsin and chymotrypsin in relation to growth in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Fish Physiology and Biochemistry** 32 (1) : 7–23.

Rungkan Klahan1, Nontawith Areechon1, Ruangvit Yoonpundh1 and Arunee Engkagul. 2009. Characterization and Activity of Digestive Enzymes in Different Sizes of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). **Kasetsart J. (Nat. Sci.)** 43 : 143–153.

Salah, M. A., Atti, N. M. A. and Mohamed, M. F. 2008. Effect of garlic on the survival, growth, resistance and quality of *Oreochromis niloticus*. pp. 207-296. In **8th International Symposium on Tilapia in Aquaculture.** Egypt Cairo : Egypt Aquaculture and Fishery.

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 (3) : 247-254.

Sirinatd Jaitong. 2011. **Garlic**. [Online]. Available http://sirinpharmacy.exteen.com/20110324/entry-1 (30 กันยายน 2555).

Stryer, L. 1988. **Biochemistry.** 3rd eds. New York: WH Freeman. 372 p.

Sunde, J., Taranger, G. L. and Rungruangsak-Torrisen, K. 2000. Protease activities, plasma free amino acids and insulin at different ages of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) with genetically different trypsin isozymes. **Fish Physiology and Biochemistry** 22 (4) : 337–347.

Sunde, J., Taranger, G. L. and Rungruangsak-Torrisen, K. 2001. Digestive protease activity and free amino acids in white muscle as indicators for feed conversion efficiency and growth rate in Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Fish Physiol. Biochem** 208 (15) : 335-345.

Sambrook, J and Russell, R. W. 2001. **Molecular cloning: A laboratory manual.** 3rd ed. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press. 220 p.

Sharifuzzaman, S.M., Al-Harbi, A.H. and Austin, B. 2014. Characteristics of growth, digestive system functionality, and stress factors of rainbow trout fed probiotics *Kocuria* SM1 and *Rhodococcus* SM2. **Aquaculture** 418–419 : 55–61.

Shalaby, A.M., Khattab, Y.A. and Abdel-Rahman, A.M. 2006. Effects of garlic (*Allium sativum*) and Chloramphenicol on growth performance, physiological parameter and survival of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Journal of *Venomous Animals* and *Toxins* including *Tropical* Diseases** 12 (2) : 172-201.

Shaozhen, F., Li, W. and Lin, H. 2008. Characterization and expression of the pepsinogen C gene and determination of pepsin-like enzyme activity from orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). **Comparative Biochemistry and Physiology** 149 (2) : 275-284.

Serviere-Zaragoza, E., Navarrete-Del Toro, M.A. and Garcia-Carreno, F.L. 1979. Protein hydrolyzing enzymes in the digestive systems of the adult Mexican abalone, *Haliotis fulgens* (Gastropoda). **Aquaculture.** 157 (3) : 325-336.

Seitz, E.W. 1974. Industrial application of microbial lipase : a review. **Amer. Oil Chem.Soc** 51 (2) : 12-16.

Tameemi1, R. Al., Aldubaikul1, A. and Salman1 N.A. 2010. Comparative study of α -amylase activity in three Cyprinid species of different feeding habits from Southern Iraq. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences** 10 (3) : 411-414.

Van, M. V., Abol-Munafi, A. B., Effendy, A. W. M., & Soh, M. A. (2005). The Effect of Different Diets on Proteolytic Enzymes Activity of Early Marble Goby (Oxyeleotris marmoratus) Larvae. **Journal of Animal and Veterinary Advances** 4 (10) : 835-838.

Yoshida, S., Kasuga, S., Hayashi, N., Ushiroguchi, T., Matsuura, H. and Nakagawa, S. 1987. Antifungal activity of ajoene derived from garlic. **Applied and Environmental Microbiology** 53 (3) : 615-617.

Yone, Y. and Fujii, M. 1975. Studies on Nutrition of red sea bream-Xl Effect of 3 fatty acid supplement in a corn oil diet on growth rate and feed efficience. **Bull. Jap. Soc.sci Fish** 41 : 73-77.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

กราฟมาตรฐาน

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนใน crude enzyme extract โดยวิธีการของ Lowry *et al.* (1951)

สารเคมี:

1. สารละลายมาตรฐานโปรตีน ได้แก่ สารละลาย bovine serum albumin (BSA) เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2. สารละลาย A ประกอบด้วย -โซเดียมคาร์บอเนต 20 กรัม

-น้ำกลั่น 960 มิลลิลิตร

-สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 3 นอร์มอลปริมาตร 35 มิลลิลิตร

3. สารละลาย B ประกอบด้วย -คอปเปอร์(II)ซัลเฟต 1 กรัม

-น้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

4. สารละลาย C ประกอบด้วย -โพแทสเซียม-โซเดียมทาร์เทรต 2 กรัม

-น้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

เตรียม reagent โดยผสมสารละลาย A:B:C = 100:1:1 (โดยผสมสารละลาย B กับ C ให้เข้ากันก่อนจึงผสมสารละลาย A ลงไป)

5. Folin-Ciocalteau (ผสมกับน้ำอัตราส่วน 1:1 ก่อนใช้)

วิธีการ:

1. การเตรียมสารละลายมาตรฐาน BSA เตรียมสารละลาย BSA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0.1-1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปิเปตมาความเข้มข้นละ 100 ไมโครลิตร เติม reagent ปริมาตร 3 มิลลิลิตรตั้งทิ้งไว้ 10 นาที เติมสารละลาย Folin-Ciocalteau ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดนาน 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร เขียนกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น BSA (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร

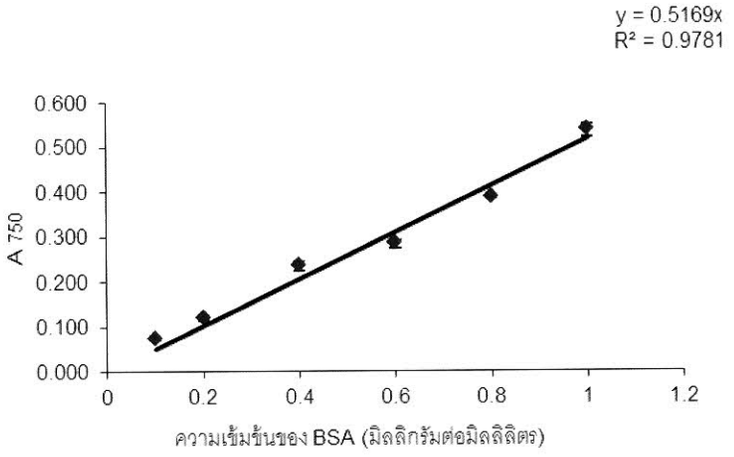
2. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนใน crude enzyme extract

2.1 ปิเปต crude enzyme extract ปริมาตร 100 ไมโครลิตร (เจือจาง 100 เท่า) ผสมกับ reagent ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที

2.2 เติมสารละลาย Folin-Ciocalteau ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดนาน 30 นาที

2.3 วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

2.4 เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน BSA



ภาพผนวก 1 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน BSA (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร

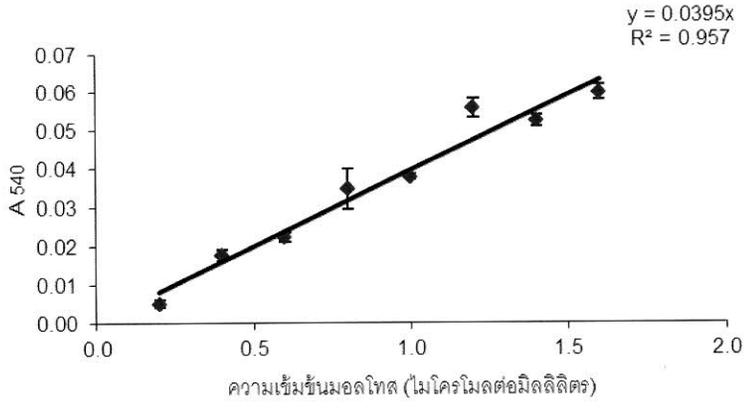
การเตรียมกราฟมาตรฐานน้ำตาลมอลโทส

สารเคมี:

1. สารละลายมาตรฐานน้ำตาลมอลโทส เข้มข้น 10 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร
2. สารละลาย 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์

วิธีการ:

1. เจือจางสารละลายมาตรฐานน้ำตาลมอลโทสให้ได้ความเข้มข้น 0.2-3.0 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร
2. ปิเปตสารละลายมาตรฐานน้ำตาลมอลโทสแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 125 ไมโครลิตรใส่ในหลอดทดลอง
3. เติมสารละลาย DNS เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน
4. ต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น
5. เติมน้ำกลั่นปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
6. วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร
7. นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาเขียนกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโทส (ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร) กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร



ภาพผนวก 2 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานน้ำตาลมอลโทส (ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร) กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร

ภาคผนวก ข

การเจริญเติบโต

อัตราการเจริญเติบโต

1. คำนวณอัตราการกินอาหาร (rate of feed intake) ตามวิธีการของ Yone และ Fujii (1975) จากสมการ ดังนี้

อัตราการกินอาหาร (เปอร์เซ็นต์ต่อตัวต่อวัน) = $\dfrac{F \times 100}{\dfrac{W_o + W_t}{2} \times \dfrac{N_o + N_t}{2} \times t}$

โดย

F = น้ำหนักอาหารแห้งที่ปลากิน (กรัม))

W_o = น้ำหนักปลาเฉลี่ยเริ่มต้น (กรัม)

W_t = น้ำหนักปลาเฉลี่ยสุดท้าย (กรัม)

N_o = จำนวนปลาเริ่มต้น (ตัว)

N_t = จำนวนปลาสุดท้าย (ตัว)

t = ระยะเวลาที่ปลาได้รับอาหารทดลอง (วัน)

2. เปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (% Weight gain) คำนวณตามวิธีการของ วิมลและคณะ (2535) จากสมการ ดังนี้

เปอร์เซ็นน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (% Weight gain)

$= \dfrac{\text{น้ำหนักปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (กรัม)} - \text{น้ำหนักปลาเมื่อเริ่มต้นการทดลอง (กรัม)}}{\text{น้ำหนักปลาเมื่อปลาเริ่มต้น (กรัม)}} \times 100$

การใช้ประโยชน์จากอาหาร

1. อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (Feeding Conversion Ration) คำนวณตาม วีรพงศ์ (2536) โดย

$\text{FCR} = \dfrac{\text{ปริมาณอาหารที่ปลากิน (Dry weight)}}{\text{น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น (Wet weight)}}$

ภาคผนวก ค

ประวัติผู้วิจัย

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล นางสาวมัลลิกา ศุภอักษร

เกิดเมื่อ 16 สิงหาคม 2531

ประวัติการศึกษา พ.ศ. 2550 ประกาศนียบัตรวิชาชีพ (ปวช.) สาขาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ วิทยาลัยประมงติณสูลานนท์ จังหวัดสงขลา

พ.ศ. 2552 ประกาศนียบัตรวิชาชีพชั้นสูง (ปวส.) สาขาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ วิทยาลัยประมงติณสูลานนท์ จังหวัดสงขลา

พ.ศ.2554 ปริญญาตรี สาขาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่

ประชุมนำเสนอผลงาน

มัลลิกา ศุภอักษร, ศุภลักษณ์ ฤทธิแผลง, สุดาพร ตงศิริ, ประจวบ ฉายบุ และ จิราพร โรจน์ทินกร. 2555. สารสกัดกระเทียมเสริมการทำงานของเอนไซม์ย่อยอาหารในปลาบู่ (*Oxyeleotris marmoratus*). น. 24. ใน **บทคัดย่อ การประชุมวิชาการการประมง ครั้งที่ 7.** เชียงใหม่ : คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

Mallika Supa-aksorn, Supaluck Rittiplang, Sudaporn Tongsiri, Prachaub Chaibu,and Jiraporn Rojtinnakorn. 2013. Trend of garlic extracts enhancing growth and immune responses in sand goby (*Oxyeleotris marmoratus*). pp. 103. In **10th Asian Fisheries and Aquaculture Forum(10AFAF) and 4th International Symposime on Cage Aqualture in Asia Abstract book.** Yeosu : Asian Fisheries Society.

Mallika Supa-aksorn, Supaluck Rittiplang, Sudaporn Tongsiri, Prachaub Chaibu,and Jiraporn Rojtinnakorn. 2015. Efficacy of garlic extract enhancing growth performance in sand goby *Oxyeleotris marmoratus*. pp. 661. In **WORLD AQUACULTURE 2015.** Jeju exhibition and Convention Center Jeju. Korea : Korean Society of Fisheries and Aquatic Science.

ผลงานลงตีพิมพ์

มัลลิกา ศุภอักษร, สุดาพร ตงศิริ, ประจวบ ฉายบุ และ จิราพร โรจน์ทินกร. 2558. แนวโน้มส่งเสริมการเจริญเติบโตของสารสกัดกระเทียมในปลาบู่ (*Oxyeleotris marmoratus*) Bleeker 1852. **วิจัยเทคโนโลยีการประมง** 9 (2)