ผลของคาโรทีนอยด์จากสไปรูลินา *Spirulina platensis* ต่อการรอดและการเติบโต
ของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* วัยอ่อน

นางสาวมุทิตา ธรรมสังคม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2545
ISBN 974-17-2953-7
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECTS OF CAROTENOIDS FROM *Spirulina platensis* ON SURVIVAL AND GROWTH OF BLACK TIGER SHRIMP *Penaeus monodon* LARVAE

Miss Mutita Thamsangkom

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Marine Science

Department of Marine Science
Faculty of Science
Chulalongkorn University

Academic Year 2002

ISBN 974-17-2953-7

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของคาโรทีนอยด์จากสไปรูลินา *Spirulina platensis* ต่อการรอดและการเติบโตของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* วัยอ่อน
โดย	นางสาวมุทิตา ธรรมสังคม
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์ทางทะเล
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.สมเกียรติ ปิยะธีรธิติวรกุล

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร.วันชัย โพธิ์พิจิตร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ไทยถาวร เลิศวิทยาประสิทธิ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร.สมเกียรติ ปิยะธีรธิติวรกุล)

..... กรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร.เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เจริญ นิติธรรมยง)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร.วรณพ วิยกาญจน์)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

มุทิตา ธรรมสังคม : ผลของคาโรทีนอยด์จากสไปรูลินา *Spirulina platensis* ต่อการรอดและการเติบโตของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* วัยอ่อน. (EFFECTS OF CAROTENOIDS FROM *Spirulina platensis* ON SURVIVAL AND GROWTH OF BLACK TIGER SHRIMP *Penaeus monodon* LARVAE) อ.ที่ปรึกษา : รศ.ดร.สมเกียรติ ปิยะธีรธิติวรกุล, 66 หน้า. ISBN 974-17-2953-7.

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบผลของคาโรทีนอยด์จากสาหร่ายสไปรูลินา (*Spirulina platensis*) และแอสตาแซนทินสังเคราะห์ ที่มีต่อการรอด การเติบโต และ ปริมาณแอสตาแซนทินสะสมในกุ้งกุลาดำวัยอ่อน

ดำเนินการศึกษาโดยสร้างสูตรอาหาร 4 สูตร ได้แก่ อาหารควบคุม (ไม่มีรงควัตถุ), อาหารเสริมแอสตาแซนทินสังเคราะห์ 200 ppm, อาหารเสริมสไปรูลินา 5% และ อาหารเสริมสไปรูลินา 10% ออกแบบการทดลองแบบสุ่มตลอด แต่ละชุดการทดลองทำ 3 ซ้ำ แบ่งการทดลองตามการพัฒนาของลูกกุ้งวัยอ่อนเป็น 3 ระยะ คือ ซูเอีย, ไมซิส และโพสลาวา พบว่าคาโรทีนอยด์ ในอาหารทดลองจากสไปรูลินา และ แอสตาแซนทินสังเคราะห์ไม่มีผลต่อการรอด การเติบโต และการสะสมแอสตาแซนทินในตัว ของกุ้งกุลาดำวัยอ่อนทั้ง 3 ระยะ อย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) แต่อาหารที่เสริมสไปรูลินา 5% และ 10% มีแนวโน้มให้ผลดีต่อการรอด และ การเติบโตของกุ้งกุลาดำวัยอ่อนทุกระยะ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา วิทยาศาสตร์ทางทะเล ลายมือชื่อนิสิต.....
สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ทางทะเล ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ปีการศึกษา 2545 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4272368123 : MAJOR MARINE SCIENCE

KEY WORD: CAROTENOID / *Spirulina platensis* / *Penaeus monodon* / LARVAE

MUTITA THAMSANGKOM : EFFECTS OF CAROTENOIDS FROM *Spirulina platensis* ON SURVIVAL AND GROWTH OF BLACK TIGER SHRIMP *Penaeus monodon* LARVAE. THESIS ADVISOR:ASST.PROF.SOMKIAT PIYATIRATITIVORAKUL Ph.D., 66 pp. ISBN 974-17-2953-7.

The aim of the present study is to compare the efficiency of carotenoids from *Spirulina platensis* and synthetic astaxanthin on survival, growth and astaxanthin content of *Penaeus monodon* larvae.

Four experimental diets containing; control diet (free-pigment), synthetic astaxanthin-added diet 200 ppm, spirulina 5% added diet and spirulina 10%-added diet were fed to shrimp larvae at different stages. The result indicated no effects of carotenoids from *Spirulina platensis* and astaxanthin synthetic on survival growth and astaxanthin accumulation on *Penaeus monodon* larvae. However, the larvae fed with spirulina 5% and 10% added-diet showed higher survival and growth than others.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Department Marine science	Student's signature……
Field of study Marine science	Advisor's signature…….
Academic year 2002	Co-advisor's signature……..

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ลงได้โดยได้รับความกรุณาจากอาจารย์ที่ปรึกษา รศ.ดร.สมเกียรติ ปิยะธีรธิติวรกุล ที่ได้ให้คำแนะนำ ข้อคิดเห็นและช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ให้สมบูรณ์ ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

กราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.ไทยถาวร เลิศวิทยาประสิทธิ ศ.ดร.เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต ผศ.ดร.เจริญ นิติธรรมยง และ อาจารย์ ดร.วรณพ วิยกาญจน์ ที่กรุณาเป็นกรรมการในการสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้เสร็จสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเลทุกท่านโดยเฉพาะ คุณเสรี ดอนเหนือ คุณเอกพล อ่วมนุช รวมทั้ง พี่ ๆ เพื่อน ๆ และ น้อง ๆ ที่ได้มีส่วนช่วยเหลือ และขอขอบคุณ คุณ ธนบดี ยอดมนต์ ที่เป็นกำลังใจ และช่วยเหลือให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ บริษัท สยามแอลจี จำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์สาหร่ายสไปรูลินา ผง บริษัท โรวิไทย จำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์ คาโรฟิลด์ พิงค์ บริษัท โคเดล (ประเทศไทย) จำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์ วิตามินรวม และ แร่ธาตุรวม และ รุ่งอรุณฟาร์ม ที่ให้ความอนุเคราะห์ลูกพันธุ์กุ้งกุลาดำวัยอ่อน ที่ใช้ในการทดลอง

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ญาติ พี่ น้อง ที่ได้ให้กำลังใจ และช่วยเหลือ สนับสนุนตั้งแต่ต้นจนเสร็จสมบูรณ์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย .....ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ
กิตติกรรมประกาศ..... ฉ
สารบัญ ..... ช
สารบัญตาราง..... ฌ
สารบัญภาพ..... ญ
บทที่
1. บทนำ.....1
2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....3
3. วิธีดำเนินการวิจัย.....16
4. ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....26
5. อภิปรายผล 33
6. สรุปผลการวิจัย.....41
รายการอ้างอิง.....43
ภาคผนวก.....49
ภาคผนวก ก.....50
ภาคผนวก ข.....55
ภาคผนวก ค 56
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 66

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตาราง หน้า

1. องค์ประกอบกรดอะมิโน, กรดไขมัน, วิตามิน และแร่ธาตุ ของ *Spirulina platensis*..... 13
2. ชนิดและปริมาณของรงควัตถุและคาโรทีนอยด์ใน *Spirulina platensis*..... 15
3. ส่วนประกอบอาหารทดลองในแต่ละสูตร (ร้อยละ) 17
4. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์คาโรทีนอยด์และแอสตาแซนทินในอาหารและเนื้อกุ้งทดลอง.... 21
5. องค์ประกอบทางโภชนาการของอาหารกุ้งกุลาดำวัยอ่อนที่ใช้ในการทดลอง 26
6. ปริมาณคาโรทีนอยด์ของอาหารกุ้งกุลาดำวัยอ่อนที่ใช้ในการทดลอง..... 26
7. คุณภาพน้ำระหว่างการทดลอง 28
8. การรอดของกุ้งกุลาดำวัยอ่อนที่ได้รับอาหารทดลองสูตรต่าง ๆ 29
9. การเติบโตของกุ้งกุลาดำวัยอ่อนระยะซูเอียและไมซิสที่ได้รับอาหารทดลองสูตรต่าง ๆ..... 30
10. การเติบโตของกุ้งกุลาดำวัยอ่อนระยะโพสลาวาที่ได้รับอาหารทดลองสูตรต่าง ๆ..... 31
11. ปริมาณแอสตาแซนทินสะสมในกุ้งระยะโพสลาวา 18 ที่ได้รับอาหารทดลองสูตรต่าง ๆ..... 32
12. คุณภาพน้ำที่สัตว์น้ำสามารถดำรงอยู่ได้อย่างปกติ..... 55

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

ภาพประกอบ หน้า

1. รูปร่างลักษณะและการพัฒนาการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำวัยอ่อน 4
2. โครงสร้างโมเลกุลของแอสตาแซนทิน.....7
3. ขบวนการแมทาบอลิซึมและการเปลี่ยนแปลงคาโรทีนอยด์ในกุ้งทะเล 9
4. วงชีวิตของสาหร่ายสไปรูลินา.....12
5. ระบบหมุนเวียนน้ำทะเลแบบปิด 20
6. แผนผังวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณคาโรทีนอยด์ในอาหารทดลอง 22
7. แผนผังวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณแอสตาแซนทินในกุ้งทดลอง.....23
8. ลักษณะและสีของอาหารทดลอง สูตร 1-4 (X40) 27
9. การรอดเฉลี่ยของกุ้งกุลาดำวัยอ่อนที่ได้รับอาหารทดลองสูตรต่าง ๆ.....29
10. ดัชนีการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำระยะซูเอีย และ ไมซิส ที่ได้รับอาหารทดลองสูตรต่าง ๆ...30
11. ความยาวที่เพิ่มขึ้น (%) ของกุ้งกุลาดำระยะโพสลาวา ที่ได้รับอาหารทดลองสูตรต่าง ๆ.....31
12. ปริมาณแอสตาแซนทินสะสมในกุ้งกุลาดำระยะโพสลาวา 18 ที่ได้รับอาหารทดลองสูตรต่าง ๆ...32

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1
บทนำ

กุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* เป็นกุ้งทะเลที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจและนิยมเลี้ยงกันมากในประเทศไทย ปัจจุบันผลผลิตกุ้งกุลาดำจากการเพาะเลี้ยงลดลง อันมีสาเหตุสำคัญสาเหตุหนึ่ง มาจากคุณภาพของลูกกุ้งต่ำลง เมื่อนำไปเลี้ยงจึงเติบโตช้า และ ติดโรคได้ง่าย แนวทางในการแก้ปัญหานี้นอกจากการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ที่ดีแล้ว การอนุบาลลูกกุ้งด้วยอาหารที่มีคุณภาพก็จะช่วยให้ลูกกุ้งมีสุขภาพที่ดีได้ อาหารมีชีวิตที่ใช้ในการอนุบาลกุ้งกุลาดำวัยอ่อน ได้แก่ แพลงก์ตอนพืช และ แพลงก์ตอนสัตว์ เช่น คีโตเซอรอส และ อาร์ทีเมีย (ไรน้ำเค็ม) เป็นต้น ซึ่งในการเตรียมอาหารมีชีวิตเหล่านี้ มีขั้นตอนการเตรียมที่ยุ่งยากต้องอาศัยธรรมชาติ คือ อุณหภูมิ และ แสงแดด ใช้พื้นที่ในการผลิตมาก ผลผลิตไม่แน่นอน และอาจพบปัญหาการปนเปื้อนของแบคทีเรีย เชื้อรา และโปรโตซัว นอกจากนี้อาร์ทีเมียยังเป็นอาหารมีชีวิตที่มีราคาแพง ซึ่งต้องนำเข้าจากต่างประเทศ จึงได้มีการส่งเสริมการใช้อาหารเสริมอื่น ๆ เช่น ไข่ตุ๋นนม และอาหารผงสำเร็จรูปแทนอาหารมีชีวิตเหล่านั้น โดยสามารถใช้อาหารผงสำเร็จแทนการใช้อาหารมีชีวิตได้ทั้งหมดในการอนุบาลกุ้งทะเลวัยอ่อน (สุพิศ ทองรอด และคณะ, 2538ก ; สุพิศ ทองรอด และคณะ, 2538ข ; Darachai, 1996 ; Jones et al., 1987) นอกจากนี้การเสริมสารอาหารจำเป็นบางชนิดในอาหารผงสามารถเพิ่มการรอดและการเติบโตของกุ้งกุลาดำวัยอ่อนได้ สารอาหารดังกล่าวได้แก่ วิตามินซี กรดไขมันจำเป็น และ รงควัตถุคาโรทีนอยด์

รงควัตถุคาโรทีนอยด์ที่นิยมใช้เสริมในอาหารกุ้งทะเลมากที่สุดคือแอสตาแซนทิน เนื่องจากพบแอสตาแซนทินสะสมมากที่สุดในกุ้งกุลาดำโดยมีปริมาณสูงถึง 98 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณคาโรทีนอยด์ทั้งหมด (Latscha, 1990) แอสตาแซนทินมีความสำคัญต่อกุ้งในการสร้างเม็ดสีบนตัว (Hunter, 1996) เพิ่มการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันโดยมีผลให้ปริมาณเม็ดเลือดเพิ่มขึ้น เพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* (มะลิ บุณยรัตผลิน และคณะ, 2543) แต่กุ้งจะไม่สามารถสังเคราะห์แอสตาแซนทินได้ ดังนั้นการเสริมแอสตาแซนทินในอาหารจึงมีผลดีต่อการเติบโต และการรอดของกุ้งทะเลระยะวัยรุ่น (นิติ ชูเชิด, 2538 ; นิตยา ไชยเนตร, 2538; Hunter, 1996; Chien and Jeng, 1992) แต่เนื่องจากแอสตาแซนทินสังเคราะห์ มีราคาแพง จึงทำให้มีการศึกษาเพื่อหาแหล่งแอสตาแซนทินหรือคาโรทีนอยด์จากธรรมชาติมาทดแทน เช่น สาหร่าย *Haematococcus pluvialis* (Darachai,1996) *Dunaliella salina* (Chien and Jeng, 1992) และ *Spirulina* sp. (Tanaka et al.,1972) แต่ในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* จะต้องควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส ซึ่งไม่เหมาะสมกับ

ภูมิอากาศในประเทศไทยซึ่งมีอากาศร้อนชื้น (Darachai, 1996) ในทำนองเดียวกันการใช้สาหร่ายที่มีเบตาคาโรทีนสูงคือ *Dunaliella salina* ยังมีข้อจำกัดในการเลี้ยงที่ต้องใช้ความเค็มสูง 100-250 ppt (สรวิศ เผ่าทองสุข, 2543) ดังนั้นสาหร่าย *Spirulina platensis* ที่สามารถผลิตเชิงอุตสาหกรรมในประเทศนั้น จึงมีความเหมาะสมมากที่สุดเพราะมีปริมาณคาโรทีนอยด์สูงถึง 4,000 mg/kg ของน้ำหนักแห้ง (Hill, 1980) ทั้งนี้สัตว์ในกลุ่มครัสตาเซียนสามารถสังเคราะห์คาโรทีนอยด์จากสไปรูลินาให้อยู่ในรูปแอสตาแซนทินและคาโรทีนอยด์อื่น ๆ เพื่อสะสมในส่วนต่าง ๆ ของร่างกายได้ (Tanaka et al., 1976; Latscha, 1990) และให้ผลดีต่อการรอด การเติบโต รวมถึงการสร้างสีบนตัวกุ้งกุลาดำวัยรุ่น (ณรงค์ศักดิ์ พ่วงลาภ, 2533) บทบาทของสไปรูลินาต่อกุ้งกุลาดำวัยอ่อนส่วนใหญ่เป็นการศึกษาโดยให้เป็นอาหารเสริมโดยตรงทั้งในรูปสาหร่ายสดและสาหร่ายผง ดังนั้นการเสริมสไปรูลินาในอาหารกุ้งกุลาดำวัยอ่อนเพื่อเป็นแหล่งคาโรทีนอยด์จากธรรมชาติ จึงเป็นงานวิจัยที่น่าสนใจศึกษาเพื่อเปรียบเทียบกับการใช้คาโรทีนอยด์สังเคราะห์

วัตถุประสงค์

1. เพื่อเปรียบเทียบการรอดและการเติบโตของกุ้งกุลาดำวัยอ่อน ที่ให้อาหารเสริมสาหร่าย สไปรูลินาและอาหารเสริมแอสตาแซนทินสังเคราะห์

2. เพื่อหาปริมาณแอสตาแซนทินสะสมในกุ้งที่ได้รับอาหารเสริมรงควัตถุจากธรรมชาติและรงควัตถุสังเคราะห์

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถนำผลการศึกษาไปใช้ในการพัฒนาอาหารเสริมของกุ้งกุลาดำวัยอ่อนที่มีราคาย่อมเยา และ ส่งเสริมการใช้สาหร่ายสไปรูลินาเป็นแหล่งรงควัตถุธรรมชาติที่สามารถผลิตได้ในประเทศ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

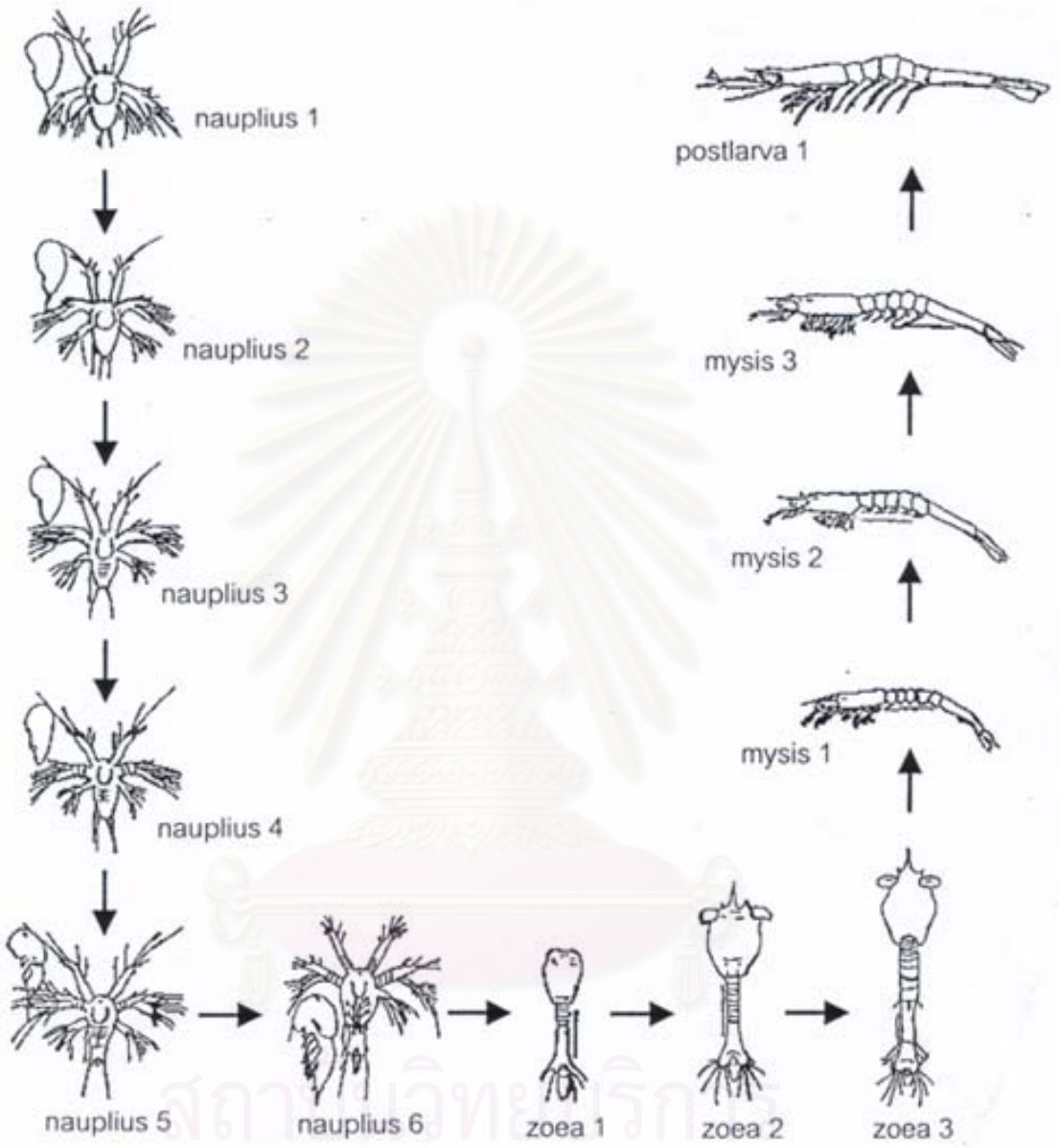
บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

กุ้งกุลาดำ

กุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* Fabricius เป็นสัตว์ในกลุ่มครัสตาเซียน จัดเป็นกุ้งที่มีขนาดใหญ่และมีความสำคัญที่สุดในวงศ์ Penaeidae มีถิ่นอาศัยอยู่ในเขตร้อนแถบมหาสมุทรอินโด-แปซิฟิก พบได้ทั่วไปตามชายฝั่งและบริเวณป่าชายเลน กุ้งกุลาดำกินอาหารได้ทั้งพืชและสัตว์ รวมถึงซากสิ่งมีชีวิตในป่าชายเลน เมื่อถึงวัยเจริญพันธุ์จะอพยพจากป่าชายเลนไปในทะเลลึกเพื่อผสมพันธุ์และวางไข่ ไข่ที่ผสมแล้วจะพัฒนาจนฟักเป็นตัวอ่อนระยะนอเพลียส ซูเอีย ไมซิส และโพสลาวา (รูปที่ 1) ซึ่งตัวอ่อนเหล่านี้จะถูกกระแสน้ำพัดเข้าสู่บริเวณชายฝั่ง และกุ้งกุลาดำระยะวัยรุ่นจะดำรงชีวิตอยู่บริเวณชายฝั่งทะเลและป่าชายเลน จนกระทั่งโตเต็มวัยจึงอพยพกลับสู่ทะเลลึกต่อไป

การพัฒนาการของกุ้งกุลาดำวัยอ่อน

ตัวอ่อนในระยะแรก คือ นอเพลียส ซึ่งมีรูปร่างแบบ pyriform ลักษณะคล้ายแมงมุม มีระยางค์ 3 คู่ ตัวอ่อนในระยะนี้ว่ายน้ำและหยุดเป็นระยะ ๆ ยังไม่มีการกินอาหารแต่ใช้พลังงานจากไข่แดง มีการลอกคราบ 6 ครั้ง ทุก 6-8 ชั่วโมง ก่อนเข้าสู่ระยะซูเอีย ซึ่งมีรูปร่างยาวขึ้น ส่วนหัวโตและเริ่มเกิดเปลือกคลุม (carapace) ส่วนอกและส่วนท้องเรียวเล็ก ซูเอียว่ายน้ำไปข้างหน้าตลอดเวลาและใช้ระยางค์ส่วนหัวกรองกินอาหารขนาด 5-100 ไมครอน อาหารที่ใช้ในการอนุบาล ได้แก่ คีโตเซอรอส (*Chaetoceros* sp.) เตตราเซลมิส (*Tetraselmis* sp.) สเกลลีโตนีมา (*Skeletonema* sp.) ยีสต์และอาหารผง ถ้ามีอาหารเพียงพอของเสียที่ซูเอียถ่ายออกมาจะเป็นเส้นยาวทึบ ซูเอียมีการลอกคราบ 3 ครั้ง ทุก 36 ชั่วโมง ในระยะซูเอีย 1 จะยังไม่มีก้านตาแต่จะเห็นจุดดำที่ส่วนหัว ระยะซูเอีย 2 ส่วนของตามีก้านตาแยกออกจากส่วนหัว และระยะซูเอีย 3 เกิดแพนหาง (uropods) แตกออก กลางลำตัวมีเส้นหนาม (spines) 2 เส้น เมื่อ ซูเอีย 3 ลอกคราบจะเข้าสู่ระยะไมซิสที่มีลักษณะคล้ายตัวเต็มวัย โดยเริ่มมีขาว่ายน้ำ มีกรีและแพนหางชัดเจน ลำตัวงอ ว่ายน้ำโดยใช้ระยางค์ส่วนอกพัดโบก และใช้แพนหางดีดตัวถอยหลัง ไมซิสกินอาหารได้ทั้งแพลงก์ตอนพืชและแพลงก์ตอนสัตว์ เช่น โรติเฟอร์และอาร์ทีเมียที่เพิ่งฟัก เป็นต้น ไมซิสมีการลอกคราบ 3 ครั้ง ทุก 24-36 ชั่วโมง ในระยะไมซิส 1 จะมีตุ่มนูน (pleobases) ที่ฐานของขาว่ายน้ำทั้ง 5 คู่



รูปที่ 1 รูปร่างลักษณะและการพัฒนาการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำวัยอ่อน
ที่มา : ดัดแปลงจาก Motoh (1979)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ระยะไมซิส 2 ตุ่มที่ฐานของขาว่ายน้ำมีขนาดใหญ่ขึ้น เกิดเป็นปล้อง 1 ปล้อง และพัฒนาเป็นขาว่ายน้ำอย่างสมบูรณ์เมื่อเข้าสู่ ระยะไมซิส 3 รวมเวลาที่ลูกกุ้งอยู่ในระยะไมซิสประมาณ 3-5 วันจึงพัฒนาเข้าสู่ระยะโพสลาวา ที่มีขนาดยาวประมาณ 5.5 มิลลิเมตร ขึ้นไป ขาเดิน 3 คู่แรกมีก้ามหนีบ มีปลายหางแหลม (telson) และมีระยางค์ครบเหมือนตัวเต็มวัย ว่ายน้ำในลักษณะขนานตามแนวราบ มักพบเกาะตามผนังหรือพื้นบ่อ การอนุบาลในระยะโพสลาวา 1-5 จะให้อาร์ทีเมียที่เพิ่งฟักไม่เกิน 30 ชั่วโมง เป็นอาหารหลัก และเสริมด้วยอาหารผงสำเร็จรูป เมื่อลูกกุ้งเข้าสู่ระยะโพสลาวา 10 ขึ้นไปจะให้อาหารสำเร็จเป็นหลัก ระยะนี้กุ้งมีการลอกคราบทุก 24 ชั่วโมง โดยแบ่งเป็นระยะโพสลาวา 1-15 รวม 15 วัน จึงเข้าสู่ระยะวัยรุ่นต่อไป (Kungvankij, 1976; Motoh, 1979)

อาหารกุ้งกุลาดำวัยอ่อน

อาหารที่ใช้ในการอนุบาลกุ้งกุลาดำวัยอ่อนแบ่งเป็น อาหารมีชีวิต และอาหารไม่มีชีวิต อาหารมีชีวิตได้แก่ แพลงก์ตอนพืช เช่น คีโตเซอรอส สเกลลีโตนีมา และแพลงก์ตอนสัตว์ เช่น โรติเฟอร์ และ อาร์ทีเมีย เป็นต้น อาหารไม่มีชีวิตได้แก่ ยีสต์ สไปรูลินาผง ไข่ตุ๋น และ อาหารผงสำเร็จรูป ปัจจุบันมีการใช้อาหารผงสำเร็จรูปมากขึ้น เนื่องจากการขยายพันธุ์แพลงก์ตอนพืชมีขั้นตอนที่ยุ่งยาก และประสบปัญหาหลายประการ เช่น อุณหภูมิไม่เหมาะสม แสงไม่พอเพียง ผลผลิตไม่แน่นอน มีการปนเปื้อนเชื้อรา แบคทีเรีย และ โปรโตซัว เป็นต้น วารินทร์ ธนาสมหวัง และคณะ (2538) พบว่า อาร์ทีเมีย และ คีโตเซอรอส มีการปนเปื้อนแบคทีเรียมากกว่าอาหารผงสำเร็จรูป นอกจากนี้ ไข่อาร์ทีเมียยังมีราคาแพง ทำให้ต้นทุนการผลิตลูกกุ้งสูงขึ้น อดุลย์ แมเร๊าะ (2542) พบว่าการอนุบาลกุ้งกุลาดำโดยใช้อาร์ทีเมียเพียงอย่างเดียวมีต้นทุนค่าอาหารสูงกว่าการอนุบาลด้วยอาร์ทีเมียร่วมกับไข่ตุ๋นหรืออาหารผงถึง 3 เท่า โดยที่ผลผลิตไม่แตกต่างกัน ด้วยเหตุนี้อาหารผงสำเร็จรูปจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ได้รับความสนใจมากขึ้น เนื่องจากสามารถควบคุมโภชนาการได้ง่าย เก็บรักษาได้นาน และสามารถทดแทนอาหารมีชีวิตได้บางส่วนหรือทั้งหมด (สุพิศ ทองรอด และคณะ, 2538ข; สมประสงค์ ขันถม และคณะ, 2542; อดุลย์ แมเร๊าะ, 2542; Sutjaritvongsanon, 1984; Jones et al, 1987; Kurmaly et al., 1989) นอกจากนี้การเสริมสารอาหารจำเป็นบางชนิดในอาหารผงยังช่วยเพิ่ม การรอด และ การเติบโต ของกุ้งกุลาดำวัยอ่อนได้ สารอาหารดังกล่าวได้แก่ วิตามินซี กรดไขมันจำเป็น (สุพิศ ทองรอด และคณะ, 2538ก) เลซิทิน คลอเรสเทอรอล (Paibulkichakul et al., 1998) และรงควัตถุ แอสตาแซนทิน (Darachai, 1996)

คาโรทีนอยด์ (Carotenoid)

คาโรทีนอยด์เป็นรงควัตถุที่พบทั่วไปในธรรมชาติ ทั้งในพืชและสัตว์ พืชสามารถสังเคราะห์คาโรทีนอยด์ขึ้นเองได้ แต่สัตว์ไม่สามารถสังเคราะห์ได้จึงต้องได้รับจากอาหารเท่านั้น ชนิดและโครงสร้างของคาโรทีนอยด์ แบ่งตามโครงสร้างโมเลกุลได้เป็นสองกลุ่มคือ

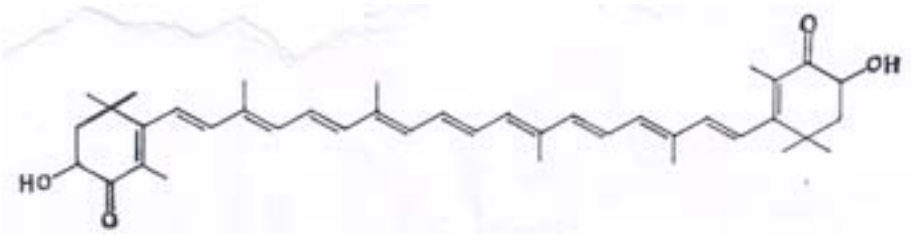
1. **คาโรทีน** (Carotene) – เป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนไม่อิ่มตัว ประกอบด้วยอะตอมของคาร์บอนเชื่อมต่อกันเป็นสายยาวด้วยพันธะเดี่ยวสลับกับพันธะคู่ และที่ปลายข้างใดข้างหนึ่งหรือทั้งสองปลาย จะมีอะตอมของคาร์บอนมาเกาะกันเป็นวงเรียกว่า ไอโอโนนริง แบ่งได้ 3 ชนิด คือ แอลฟาคาโรทีน (α-carotene), เบตาคาโรทีน (β-carotene) และแกมมาคาโรทีน (γ-carotene) คาโรทีนส่วนใหญ่จะมีสีส้ม ชนิดที่สำคัญคือ เบตาคาโรทีน เพราะเป็นสารตั้งต้นของวิตามินเอ (Greenberg, 1960)

2. **แซนโทฟิล** (Xanthophyll) – เกิดจากการออกซิเดชันของคาโรทีน โดยทั่วไปจะพบใน 3 รูปแบบคือ freefrom, ester และ carotenoproteins ชนิดที่พบมากในสัตว์น้ำได้แก่ ลูทีน (lutein), ซีเอแซนทิน (zeaxanthin), แคนตาแซนทิน (canthaxanthin) และที่พบมากในครัสตาเชียนคือ แอสตาแซนทิน (astaxanthin) (Greenberg, 1960)

คาโรทีนอยด์ที่พบในครัสตาเชียน

ครัสตาเชียนไม่สามารถสังเคราะห์คาโรทีนอยด์ขึ้นเองได้ แต่สามารถสะสมจากอาหาร เมื่ออาหารถูกย่อยคาโรทีนอยด์จะถูกดูดซึมผ่านผนังทางเดินอาหารร่วมกับไขมัน ส่งผ่านไปสะสมในส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย ทำให้เกิดสีที่ ตา เลือด ไข่ เปลือก ตับ รังไข่ และ อวัยวะสืบพันธุ์ ชนิดของคาโรทีนอยด์ที่พบมากในครัสตาเชียนมี 3 ชนิด ได้แก่ แอสตาแซนทิน เบตาคาโรทีน และแซนโทฟิล (Goodwin, 1984)

แอสตาแซนทิน (astaxanthin : 3,3'-dihydroxy-β, β-carotene,4,4'-dione) มีโครงสร้างโมเลกุลดังรูปที่ 2 แอสตาแซนทินเป็นคาโรทีนอยด์ที่พบในครัสตาเชียนเกือบทุกชนิด (Kobayashi et al., 1992) โดยเฉพาะกุ้งทะเลในกลุ่ม *Penaeus* พบแอสตาแซนทินสูงถึง 65-98% ของปริมาณคาโรทีนอยด์ทั้งหมด (Latscha, 1990) และยังเป็นรงควัตถุสำคัญที่ทำให้กุ้งมีสีส้มแดงเมื่อต้มสุก



รูปที่ 2 โครงสร้างโมเลกุลของแอสตาแซนทิน (ที่มา : Bauern feind, 1981)

แอสตาแซนทินมี 3 รูปแบบด้วยกัน คือ

1. free form หรือ unesterified – มีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ พบสะสมมากในตับ (hapatopancreas)
2. esterified – อยู่ร่วมกับไขมันในตับ มีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ พบสะสมที่บริเวณ epidermis ซึ่งมี haemolymph เป็นตัวขนส่งแอสตาแซนทินไปยังส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย
3. chromoprotein หรือ carotenoprotein – มีคุณสมบัติละลายน้ำได้ เป็นแอสตาแซนทินที่จับตัวกับโปรตีน พบสะสมในไข่ รังไข่ เรตินา hypodermis cuticle (chitin) ลำไส้ และในตับ (Ghidalia, 1985)

เบตาคาโรทีน (β-carotene) เป็นคาโรทีนอยด์ที่สำคัญชนิดหนึ่ง และพบในครัสตาเซียนในปริมาณที่น้อยกว่าแอสตาแซนทิน โดยจะแพร่กระจายอยู่ทั่วร่างกาย และพบมากที่ hepatopancreas Okada et al. (1994) พบเบตาคาโรทีนที่เปลือกของกุ้งกุลาดำประมาณ 3.6 เปอร์เซ็นต์ ของคาโรทีนอยด์รวม

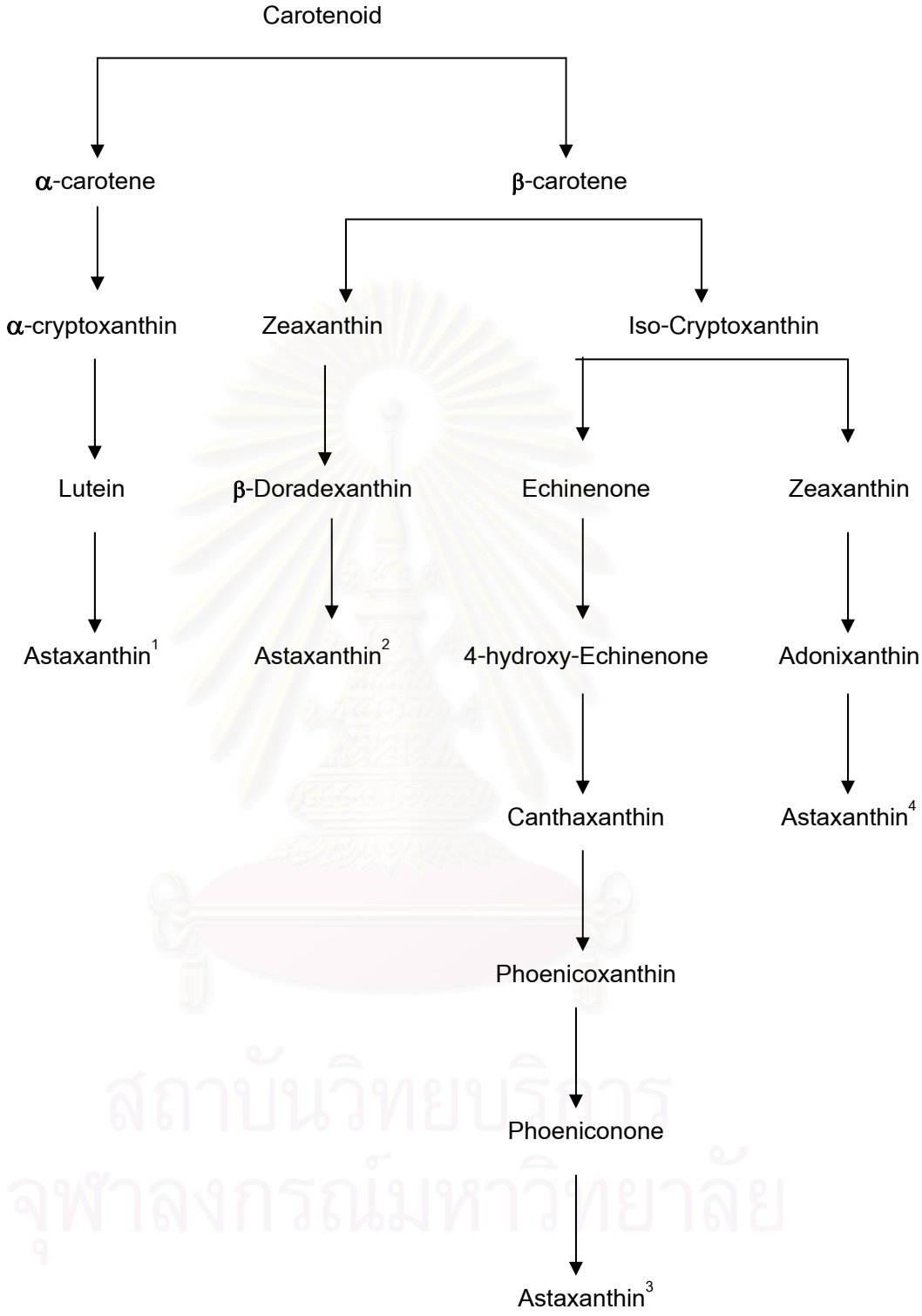
แซนโทฟิลชนิดอื่น ๆ ที่ไม่ใช่แอสตาแซนทิน เช่น คริปโตแซนทิน (cryptoxanthin) พบในปริมาณน้อย และสะสมใน hepatopancreas เลือด ไข่ และที่ตา กลุ่มที่พบมาก พบได้ใน isopod (*Asellus aquaticus*) และที่เปลือกของ *Carcinus maenas* (Goodwin, 1984)

การสังเคราะห์คาโรทีนอยด์ในกุ้งทะเล

คาโรทีนอยด์ในอาหารจะมี keto-group 1 หรือ 2 group ที่ C-4 หรือ C-4' และมี hydroxyl group (OH-group) เกาะที่ C-3 หรือ C-3' เรียกว่า "keto-carotenoid" กุ้งจะสังเคราะห์คีโตคาโรทีนอยด์ได้ทั้งแบบที่มีและไม่มี OH-group ซึ่งก็คือ แซนโทฟิลและคาโรทีน ดังนั้นกุ้งจึงสามารถเปลี่ยนคาโรทีนอยด์ในอาหารให้เป็นรงควัตถุที่ต้องการได้ (Goodwin, 1984) โดยการออกซิไดซ์ปลาย 3,3' และปลาย 4,4' ของไอโอโนนริง (ionone ring) ของคาโรทีน 1 หรือ 2 ตำแหน่ง ทำให้กุ้งสามารถเปลี่ยน เบตาคาโรทีน, ซีเอแซนทิน (zeaxanthin : β,β-carotene-3,3'-diol), แคนตาแซนทิน (canthaxanthin : β,β-carotene-4,4'-dione) และคาโรทีนอื่น ๆ ให้อยู่ในรูปของแอสตาแซนทินได้ (Latscha, 1990; Schiedt et al., 1993) ดังแสดงในรูปที่ 3 ซึ่งการเปลี่ยนแปลงคาโรทีนอยด์เป็นแอสตาแซนทิน จะเกิดที่อวัยวะภายในของกุ้ง (Katayama et al., 1971)

แหล่งของคาโรทีนอยด์ที่สำคัญต่อการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล

คาโรทีนอยด์เป็นสารอาหารปริมาณน้อยที่มีความจำเป็นต่อกุ้งทะเล เนื่องจากมีบทบาทสำคัญต่อระบบชีวภาพ ได้แก่ การทำงานของเซลล์ โดยช่วยให้ผนังเซลล์มีความคงตัว ป้องกันเซลล์จากอุณหภูมิสูง รังสีที่เป็นอันตราย และการเกิดอนุมูลอิสระ มีความสำคัญต่อการเกิดสีและการมองเห็น (Goodwin and Jamikorn, 1954; Latscha, 1990) ถ้ากุ้งขาดคาโรทีนอยด์เป็นเวลานานจะทำให้กุ้งมีสีซีดจาง หรือที่เรียกว่า "โรคตัวฟ้า" เมื่อนำกุ้งเหล่านี้ไปต้มจะมีสีเหลืองส้ม ซึ่งไม่เป็นที่ต้องการของตลาด สามารถป้องกันได้โดยการเพิ่มสารคาโรทีนอยด์ในอาหาร (Choosuwan, 1991; Hunter, 1996) แหล่งของคาโรทีนอยด์ที่สำคัญคือ รงควัตถุสังเคราะห์ เบตาคาโรทีน ซีเอแซนทิน แคนตาแซนทิน และ แอสตาแซนทิน ซึ่งแอสตาแซนทินสังเคราะห์ให้ผลดีที่สุดเนื่องจากกุ้งสามารถดูดซึมไปใช้ได้ทันที (Yamada et al., 1990; Choosuwan, 1991; Chieng and Jeng, 1992) สารแอสตาแซนทินสังเคราะห์บริสุทธิ์ เป็นผงละเอียดมีสีน้ำตาลอมม่วง มีจุดหลอมเหลวที่ 224 องศาเซลเซียส มีผลิตเป็นการค้าเพื่อใช้ผสมในอาหารสัตว์โดยใช้ชื่อว่า Carophyll Pink® (Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Switzerland) โดยที่มีสารแอสตาแซนทินบริสุทธิ์ 8% เคลือบด้วยเจลาติน และเติมสารป้องกันการเกิดออกซิเดชัน ลักษณะเป็นผงละเอียดสีน้ำตาลอมม่วง แอสตาแซนทินสังเคราะห์มี isomer เป็นรูปแบบ *all-trans* และทั้งหมดเป็น free astaxanthin (Latscha, 1990) การเสริมแอสตาแซนทินสังเคราะห์ในปริมาณ



รูปที่ 3 ขบวนการแมทาบอลิซึมและการเปลี่ยนแปลงคาโรทีนอยด์ในกุ้งทะเล

ที่มา : 1, 4 = Latscha (1990)

2 = Tanaka et al. (1976)

3 = Katayama et al. (1971)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

50-100 ppm ให้กุ้งกิน 4 สับดาห์ก่อนจับ ทำให้เนื้อทำให้เนื้อกุ้งต้มมีสีแดงสดเป็นที่ต้องการของตลาด (Chieng and Jeng, 1992) นอกจากนี้ยังพบว่าการเสริมแอสตาแซนทินสังเคราะห์ส่งผลดีต่ออัตรารอด (Hunter et al., 1998; นิตยา ไชยเนตร, 2538; Negre-Sadorgues et al., 1993) การเติบโต (นิติ ชูเชิด, 2538) ของกุ้งทะเลวัยรุ่น มีรายงานสนับสนุนว่าสารแอสตาแซนทินช่วยเสริมความต้านทานให้กุ้ง โดย มะลิ บุญรัตผลิน และคณะ (2543) พบว่าการเสริมแอสตาแซนทินสังเคราะห์ 50 ppm ขึ้นไป มีผลทำให้ปริมาณเม็ดเลือดกุ้งเพิ่มขึ้น และเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* ที่เป็นสาเหตุของโรคเรืองแสง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของนิตยา ไชยเนตร (2538) ที่รายงานว่ากุ้งมีแนวโน้มต้านทานต่อโรคหัวเหลือง เมื่อได้รับอาหารเสริมแอสตาแซนทินสังเคราะห์ 200 ppm อย่างไรก็ดีแอสตาแซนทินสังเคราะห์เป็นสารที่มีราคาแพง ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ และยังไม่ได้รับการเห็นชอบจากองค์การอาหารและยาแห่งประเทศสหรัฐอเมริกา ในการใช้เร่งสีปลาแซลมอน (Johnson and An, 1991) นอกจากนี้แอสตาแซนทินสังเคราะห์ยังไม่เหมาะสมต่อกุ้งกุลาดำวัยอ่อนระยะซูเอียและไมซิส เนื่องจากเป็นสารเคมีที่อาจเป็นอันตรายต่อกุ้งในระยะนี้ (Darachai, 1996) ด้วยสาเหตุข้างต้นจึงมีการวิจัยหาแหล่งคาโรทีนอยด์จากธรรมชาติมาใช้ทดแทนคาโรทีนอยด์สังเคราะห์

แหล่งคาโรทีนอยด์จากธรรมชาติ เช่น เปลือกกุ้ง-ปู ยีสต์ *Phaffia rhodozyma* แบคทีเรีย รา และ สาหร่าย เป็นต้น สาหร่ายเป็นแหล่งคาโรทีนอยด์ที่สำคัญเนื่องจากมีปริมาณคาโรทีนอยด์สูงและมีคุณค่าทางอาหารที่ดี สาหร่ายชนิดที่สำคัญ คือ *Haematococcus pluvialis* *Dunaliella salina* และ *Spirulina platensis* สาหร่าย *H. pluvialis* เป็นแหล่งแอสตาแซนทินที่ดี มีปริมาณแอสตาแซนทินสูง 0.5-2.0 % ของน้ำหนักแห้ง และเป็น esterified astaxanthin 87% (Kakizono et al., 1992) เมื่อนำมาผสมในอาหารกุ้งกุลาดำวัยอ่อนให้มีปริมาณแอสตาแซนทิน 200 ppm พบว่าให้ผลการรอดและการเติบโตดีกว่าแอสตาแซนทินสังเคราะห์อย่างมีนัยสำคัญ (Darachai, 1996) อย่างไรก็ดีการผลิตสาหร่ายชนิดนี้จะต้องควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส ซึ่งไม่เหมาะสมต่อสภาพภูมิอากาศในประเทศไทย ในทำนองเดียวกันสาหร่าย *Dunaliella salina* ซึ่งมีเบตาคาโรทีนสูง และให้สีที่ดีต่อกุ้ง *Penaeus japonicus* ระยะวัยรุ่น เมื่อเปรียบเทียบกับแอสตาแซนทิน และเบตาคาโรทีนสังเคราะห์ (Chieng and Jeng, 1992) แต่ยังมีข้อจำกัดในการผลิตซึ่งต้องใช้ความเค็มสูง 100-250 ppt จึงจะได้ผลผลิตที่ดี (สรวิศ เผ่าทองสุข, 2543) สาหร่ายสไปรูลินาเป็นสาหร่ายอีกชนิดหนึ่งที่มีคุณค่าอาหารที่ดี คาโรทีนอยด์สูง และมีการผลิตสาหร่ายสไปรูลินาเป็นอุตสาหกรรมในประเทศไทย เพื่อใช้เป็นอาหารเสริมของมนุษย์และสัตว์ การใช้สไปรูลินาเป็นแหล่งโปรตีนอาหารในสัตว์น้ำทำให้การเติบโตสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว ช่วยเร่งสีได้ดี

ในปลาสวยงาม และมีคุณสมบัติเหมาะสมในการอนุบาลปลาและกุ้งวัยอ่อน (Nakamura, 1982) นอกจากนี้การใช้สไปรูลินาเป็นแหล่งคาโรทีนอยด์ในกุ้งทะเลวัยรุ่นพบว่าให้ผลดีต่อการรอด การเติบโต และการสร้างเม็ดสีบนตัวกุ้ง (ณรงค์ศักดิ์ พ่วงลาภ, 2533; Katayama et al., 1972; Tanaka et al., 1976; Liao et al., 1993)

สาหร่ายสไปรูลินา

สไปรูลินาเป็นสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจัดอยู่ใน Phylum Cyanophyta Family Oscillatoriaceae (Bold and Wynne, 1985) มีลักษณะเป็นเส้นสายที่เกิดจากเซลล์รูปทรงกระบอกเรียงต่อกัน และไม่แตกแขนง เรียกแต่ละเส้นสายนี้ว่าไตรโคม (Trichome) ไตรโคมจะบิดเป็นเกลียวแตกต่างกันไปขึ้นกับสายพันธุ์และสภาพแวดล้อม ขนาดของไตรโคมมีตั้งแต่ 2-3 มิลลิเมตร และอาจพบยาวถึง 20 มิลลิเมตร ในบางสภาวะ สไปรูลินาที่พบทั่วโลกมีกว่า 30 สายพันธุ์ แต่ชนิดที่มีการศึกษาและนำมาใช้ประโยชน์มากที่สุดได้แก่ *Spirulina platensis* และ *S. maxima* (Venkataraman, 1983; Ciferri, 1983; Richmond, 1986) สไปรูลินาสามารถเคลื่อนที่ได้แบบ creeping หรือ gliding เป็นการหมุนบิดตัวเป็นเกลียวรอบแกนตามความยาว ลักษณะคล้ายควงสว่าน ทำให้เคลื่อนที่ไปข้างหน้าหรือหลังได้ มีข้อสันนิษฐานว่าเกิดจากการขับเมือกออกทางรูเล็ก ๆ ของผนังเซลล์ และเกิดจากการเคลื่อนไหวแบบลูกคลื่นที่ผิวเซลล์ (Dawes, 1981; Bold and Wynne, 1985) ผนังเซลล์ประกอบด้วย Mucoprotein และ pectin ผนังชั้นนอกสุดเป็นโพลีแซคคาไรด์ ไม่มีเมือกหุ้มจึงยากต่อการเกาะของจุลินทรีย์อื่น ๆ และยังทำให้เก็บเกี่ยวโดยการกรองได้ง่ายขึ้น (Nakamura, 1982) ในสายพันธุ์ที่มีไตรโคมขนาดใหญ่จะพบ gas vacuoles ทำให้ลอยตัวในน้ำได้ดี เช่น *S. platensis* และ *S. maxima* ภายในเซลล์ของสไปรูลินาไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส ทำให้มีกรดนิวคลีอิคกระจายอยู่ทั่วไปในเซลล์ มีน้ำหนักประมาณ 5% ของน้ำหนักแห้ง ซึ่งต่ำกว่าในแบคทีเรียและยีสต์ซึ่งมีระหว่าง 9-22 % (ในการผลิตระดับอุตสาหกรรม) ภายในเซลล์ไม่มี พลาสติดหรือโครมาโตฟอร์ (กาญจภาชน์ ลิ่วมโนมนต์, 2527) การสืบพันธุ์เป็นแบบไม่อาศัยเพศหรือเรียกว่าแบบ fragmentation โดยไตรโคมที่เจริญเต็มที่จะมีเซลล์พิเศษที่เรียกว่า necridia เซลล์นี้จะย่อยสลายไปทำให้ไตรโคมขาดออกเป็นท่อน ท่อนละ 2-4 เซลล์ แต่ละท่อนคือ hormogonium ระหว่างขบวนการนี้เซลล์จะมีสีซีดเนื่องจากของเหลวภายในเซลล์มีความเข้มข้นต่ำ เมื่ออยู่ในสภาวะที่เหมาะสมเซลล์จะมีสีเข้มขึ้นและโฮโมโกเนียมจะเพิ่มจำนวนเซลล์เจริญเป็นไตรโคมสายใหม่ที่ยาวขึ้นและบิดเป็นเกลียว (รูปที่ 4) (Ciferri, 1983; Bold and Wynne, 1985; Richmond, 1986) สไปรูลินาพบได้ตามแหล่งน้ำจืด น้ำกร่อย น้ำเสีย หรือในน้ำที่มีความ

เป็นด่างและความเค็มสูง เช่น ในน้ำที่มีความเค็มสูงถึง 85 – 270 กรัมต่อลิตร เป็นต้น แต่ช่วงความเค็มที่เหมาะสมคือ 20-70 กรัมต่อลิตร (Ciferri, 1983) ซึ่งปริมาณและชนิดของเกลือในแหล่งน้ำจะมีอิทธิพลต่อชนิดและปริมาณของสาหร่าย นอกจากนี้ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสไปรูลินา ได้แก่ ความเข้มแสง อุณหภูมิ และความเป็นกรด-เบส ความเข้มแสงที่เหมาะสม คือ 30-35 กิโลลักซ์ (Venkataraman, 1983) ในช่วงความยาวคลื่น 400-700 นาโนเมตร สไปรูลินาชอบอุณหภูมิค่อนข้างสูงในช่วง 35 – 37 องศาเซลเซียส และที่ความเป็นกรด-เบส ในช่วง 8.3 – 10.5 (Richmond, 1986)

รูปที่ 4 วงชีวิตของสาหร่ายสไปรูลินา (ที่มา : Richmond, 1986)

Spirulina platensis มีคุณค่าทางอาหารที่ดี โดยมี โปรตีน 46-62.2 % ไขมัน 3-9 % คาร์โบไฮเดรต 8-14 % ของน้ำหนักแห้ง (Richmond, 1986) และยังมี กรดอะมิโนจำเป็น กรดไขมันจำเป็น วิตามิน และ แร่ธาตุที่มีคุณค่าต่อทั้งมนุษย์และสัตว์ (ตารางที่1) สไปรูลินามีคาโรทีนอยด์สูง ซึ่งเป็นที่นิยมในการเสริมในอาหารสัตว์น้ำเพื่อเพิ่มปริมาณเม็ดสี (ตารางที่ 2) ซึ่งรงควัตถุเหล่านี้ สัตว์ในกลุ่มครัสตาเซียน สามารถสังเคราะห์เป็นแอสตาแซนทินสะสมในส่วนต่าง ๆ ของร่างกายได้ (ณรงค์ศักดิ์ พ่วงลาภ, 2533; Katayama et al., 1972; Tanaka et al., 1976; Liao et al., 1993)

ตารางที่ 1 องค์ประกอบกรดอะมิโน, กรดไขมัน, วิตามิน และแร่ธาตุ ของ *S. platensis*

ชนิดของกรดอะมิโน	ปริมาณ (กรัม/16 กรัม ไนโตรเจน)
- Eessential amino acid.	
Isoleucine	6.7
Leucine	9.8
Valine	7.1
Lysine	4.8
Phenylalanine	5.3
Methionine	2.5
Tryptophan	0.3
Threonine	6.2
- Non Eessential amino acid.	
Tryptoalanine	5.3
Cystine	0.9
Alanine	9.8
Arginine	7.3
Aspatic acid	11.8
Glycine	10.3
Histidine	5.7
Proline	2.2
Serine	4.2
ชนิดของแร่ธาตุ	(มิลลิกรัม / กิโลกรัม)
แคลเซียม	7.5
ฟอสฟอรัส	14.2
โซเดียม	4.5
แมกนีเซียม	9.0
เหล็ก	1.2
โปแตสเซียม	14.2

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ชนิดของวิตามิน	(มิลลิกรัม / กิโลกรัม)
Provitamin A	840
Vitamin E	120
Thiamine B_1	44
Riboflavin B_2	37
Pyridoxine B_6	3
Cobalamine B_{12}	7
Vitamin C	80
Biotin	0.3
Inositol	380
Folic acid	0.4
d-Ca-Pantohenate	1.3
ชนิดของไขมัน	(มิลลิกรัม / กิโลกรัม)
ไขมันทั้งหมด	7 %
กรดไขมัน	5.7%
Lauric (C-12)	229
Myristic (C-14)	664
Palmitic (C-16)	21,141
Palmitoleic (C-16)	2,035
Palmitolinoleic (C-16)	2,565
Heptadecanoic (C-17)	142
Stearic (C-18)	353
Oleic (C-18)	3,009
Linoleic (C-18)	13,784
∝-linolenic (C-18)	11970
ϒ-linolenic (C-18)	427
อื่น ๆ	699

ที่มา : Richmond (1986)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 ชนิดและปริมาณของรงควัตถุและคาโรทีนอยด์ใน *Spirulina platensis*

ชนิดและปริมาณรงควัตถุ	(มิลลิกรัม / กิโลกรัม)
Carotenoid	4,000
B-carotene	1,700
Xanthophyll	1,000
Cryptoxanthin	556
Echinenone	439
Zeaxanthin	316
Lutein + uglenanone	289

ที่มา : Hill (1980)

ในการเสริมสไปรูลินาในอาหารกุ้งทะเลระยะวัยรุ่นเพื่อเป็นแหล่งคาโรทีนอยด์ พบว่าสไปรูลินาเป็นแหล่งของคาโรทีนอยด์ได้ดีเมื่อเปรียบเทียบกับรงควัตถุสังเคราะห์ โดยการเสริม *S. platensis* ในอาหาร 3-10% (ณรงค์ศักดิ์ พ่วงลาภ, 2533; Katayama et al., 1972; Tanaka et al., 1976; Cuzon et al., 1981; Liao et al., 1993) ให้กุ้งกินก่อนทำการจับ 1 เดือน จะทำให้กุ้งมีสีตามธรรมชาติ และมีสีแดงส้มเมื่อต้มสุก นอกจากนี้การเสริมสไปรูลินายังส่งผลดีต่อการเติบโตและการรอดของกุ้งกุลาดำวัยรุ่น (ณรงค์ศักดิ์ พ่วงลาภ, 2533) และกุ้ง *Penaeus japonicus* (Cuzon et al., 1981) สไปรูลินามีบทบาทในการอนุบาลกุ้งทะเลวัยอ่อนเฉพาะการใช้ในรูปสาหร่ายสดหรือผงให้กุ้งเป็นอาหารโดยตรง (โชติ สหกิจรุ่งเรือง, 2533; บุษยา อภิชัยเสถียรโชติ, 2534; Cao and Xiang, 1992; Gu et al., 1989; Lim et al., 1978) แต่จะต้องใช้เสริมร่วมกับการให้อาหารธรรมชาติ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

สถานที่ดำเนินการทดลอง

การศึกษาครั้งนี้ใช้สถานที่เพื่อการเตรียมอาหาร และวิเคราะห์คุณภาพอาหารที่ห้องปฏิบัติการโภชนาการอาหารสัตว์น้ำ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และดำเนินการทดลองอนุบาลกุ้งกุลาดำวัยอ่อนที่ สถานีวิจัยสัตว์ทะเลอ่างศิลา ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตำบลอ่างศิลา อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี

อาหารทดลอง

อาหารทดลองเป็นอาหารเตรียมจากวัตถุดิบธรรมชาติเป็นหลัก (practical diet) โดยดัดแปลงจากสูตรของ Kanazawa et al. (1985) ให้มีโปรตีน 40% และไขมัน 10% อาหารทดลองมีทั้งหมด 4 สูตร มีส่วนประกอบอาหารตามตารางที่ 3 คือ สูตร 1 อาหารควบคุม ไม่มีการเติมแอสตาแซนทินหรือรงควัตถุอื่นๆ, สูตร 2 อาหารเสริมแอสตาแซนทินสังเคราะห์ 200 ppm, สูตร 3 อาหารเสริมสาหร่ายสไปรูลินา 5% และ สูตร 4 อาหารเสริมสาหร่ายสไปรูลินา 10% โดยมีปริมาณคาโรทีนอยด์รวมในอาหารสูตร 2 และสูตร 3 ประมาณ 200 ppm และมีปริมาณคาโรทีนอยด์รวมในอาหารสูตร 4 ประมาณ 400 ppm (2 เท่าของสูตร 2 และ 3)

ขั้นตอนการทำอาหาร

เตรียมวัตถุดิบอาหารกุ้งกุลาดำวัยอ่อนดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 3 บดวัตถุดิบแต่ละชนิดให้มีขนาดอนุภาคเล็กกว่า 20 ไมครอน ผสมตามสัดส่วนให้เข้ากันแล้วเติมน้ำสะอาด 1 ลิตรต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ผสมให้เข้ากันจนเป็นอาหารเหลว เติมสารละลาย 20% แคลเซียมคลอไรด์ปริมาณ 300 ลูกบาศก์เซนติเมตร ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เพื่อทำปฏิกิริยากับสารเหนียว (Na-alginate) ผสมให้เข้ากันเป็นเนื้อเดียวในเครื่องผสมอาหาร (mixer) เทอาหารเหลวใส่ถาดที่ทนความร้อนให้อาหารหนาไม่เกิน 3 มิลลิเมตร ทิ้งไว้ให้แข็งตัวแล้วตัดอาหารในถาดให้มีขนาดประมาณ 2 X 2 เซ็นติเมตร อบให้แห้งสนิทที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ประมาณ 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นแล้วนำมาบดด้วยเครื่องบดอาหารให้มีขนาดเล็กกว่า 1,000 ไมครอน ใช้เครื่องร่อนแยกขนาด

ตารางที่ 3 ส่วนประกอบอาหารทดลองในแต่ละสูตร (ร้อยละ)

ส่วนประกอบอาหาร	สูตรที่ 1 Control	สูตรที่ 2 Astaxanthin 200 ppm	สูตรที่ 3 Spirulina 5%	สูตรที่ 4 Spirulina 10%
Synthetic Astaxanthin[1]	0	200 ppm	0	0
Spirulina powder[2] (60% crude protein)	0	0	5	10
Fish meal (60% crude protein)	55.5	55.5	50.5	45.5
Wheat flour	20	20	20	20
Squid meal	5	5	5	5
Shrimp head meal	5	5	5	5
Ca-alginate	3	3	3	3
Tuna oil	5	5	5	5
Mineral mix [3]	2	2	2	2
Vitamin mix[4]	2	2	2	2
Lecitin	1.5	1.5	1.5	1.5
Cholesterol	1	1	1	1

1. CAROPHYLL Pink$^{(R)}$ 8% ชื่อทางการค้าของแอสตาแซนทินสังเคราะห์ มีแอสตาแซนทิน 8% เคลือบด้วยเจลาติน คาร์โบไฮเดรต และสารป้องกันการเกิดออกซิเดชั่น (antioxidants) (ผลิตภัณฑ์จาก บริษัท โรวิไทย จำกัด)
2. SPIRULINA POWDER feed grade สไปรูลินาผง ทำแห้งโดยใช้วิธี Spray drying (ผลิตภัณฑ์จาก บริษัท สยามแอลจี จำกัด)
3. อัตราส่วนในแร่ธาตุรวม 1 กิโลกรัม ประกอบด้วย $MnSO_4$ 80 กรัม, $FeSO_4$150 กรัม, $ZnSO_4$ 150 กรัม, $CuSO_4$ 20 กรัม, KI 2 กรัม, $CoSO_4$1 กรัม และ Selenium 0.25 กรัม (ผลิตภัณฑ์จาก บริษัท โคเดล ประเทศไทย จำกัด)
4. อัตราส่วนในไวตามินรวม 1 กิโลกรัม ประกอบด้วย ไวตามิน เอ 5,000,000 IU, ไวตามิน ดี 1,000,000 IU, ไวตามิน อี 10 กรัม, ไวตามิน เค 0.72 กรัม, ไวตามิน บี 1 0.5 กรัม, ไวตามิน บี 2 5 กรัม, ไวตามิน บี 6 1.5 กรัม, Nicotinamide 22 กรัม, Cal. Pantothenate 4.250 กรัม, Folic acid 0.1 กรัม, Lysine 150 กรัม, Methionine 50 กรัม, Biotin 0.22 กรัม และ Choline chloride 100 กรัม (ผลิตภัณฑ์จาก บริษัท โคเดล ประเทศไทย จำกัด)

โดยอาหารขนาดเล็กกว่า 60 ไมครอน สำหรับกุ้งระยะซูเอีย ขนาด 60 –125 ไมครอน และสำหรับกุ้งระยะไมซิส ขนาดใหญ่กว่า 125 ไมครอน สำหรับกุ้งระยะโพสลาวาตามคำแนะนำของ Kanazawa et al. (1985) รักษาคุณภาพอาหารระหว่างการทดลองโดยเก็บในที่มืดที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส วิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการในอาหารตามวิธีของ (AOAC, 1980) รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ก และวิเคราะห์ปริมาณคาโรทีนอยด์ในอาหารตามวิธีของ Webber (1990)

แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด ประกอบด้วยอาหาร 4 สูตร แต่ละสูตรอาหารมี 3 ซ้ำ จัดชุดการทดลองและซ้ำโดยการสุ่ม แบ่งการทดลองเป็น 3 ช่วง ตามการพัฒนาของกุ้งกุลาดำวัยอ่อนคือ ระยะซูเอีย 1-3, ระยะไมซิส 1-3 และระยะโพสลาวา 3-17 โดยใช้ลูกกุ้งจากโรงเพาะฟักเอกชนในจังหวัดชลบุรีและจังหวัดฉะเชิงเทรา

1. <u>ระยะซูเอีย 1-3</u> นำกุ้งกุลาดำระยะนอเพลียส 5 - 6 มาอนุบาล เมื่อกุ้งพัฒนาเข้าสู่ระยะซูเอีย 1 แล้วจึงให้อาหารธรรมชาติ คือ แพลงก์ตอนพืช คีโตเซอรอส ร่วมกับอาหารสูตรควบคุม 1 ครั้ง หลังจากนั้นจึงทำการสุ่มกุ้งลงถังทดลองขนาด 10 ลิตร ถังละ 1,000 ตัว ให้อาหารทดลองขนาดเล็กกว่า 60 ไมครอน การให้อาหารจะให้ทุก 4 ชั่วโมง (เวลา 6.00, 10.00, 14.00, 18.00 และ 22.00 น.)

2. <u>ระยะไมซิส 1-3</u> นำกุ้งกุลาดำระยะซูเอีย 3 มาอนุบาล เมื่อกุ้งพัฒนาเข้าสู่ระยะไมซิส 1 จึงให้อาหารธรรมชาติ คือ อาร์ทีเมียที่เพิ่งฟักร่วมกับอาหารสูตรควบคุม 1 ครั้ง หลังจากนั้นจึงสุ่มลงถังทดลองขนาด 10 ลิตร ถังละ 500 ตัว ให้อาหารขนาด 60 - 125 ไมครอน การให้อาหารจะให้ทุก 4 ชั่วโมง (เวลา 6.00, 10.00, 14.00, 18.00 และ 22.00 น.)

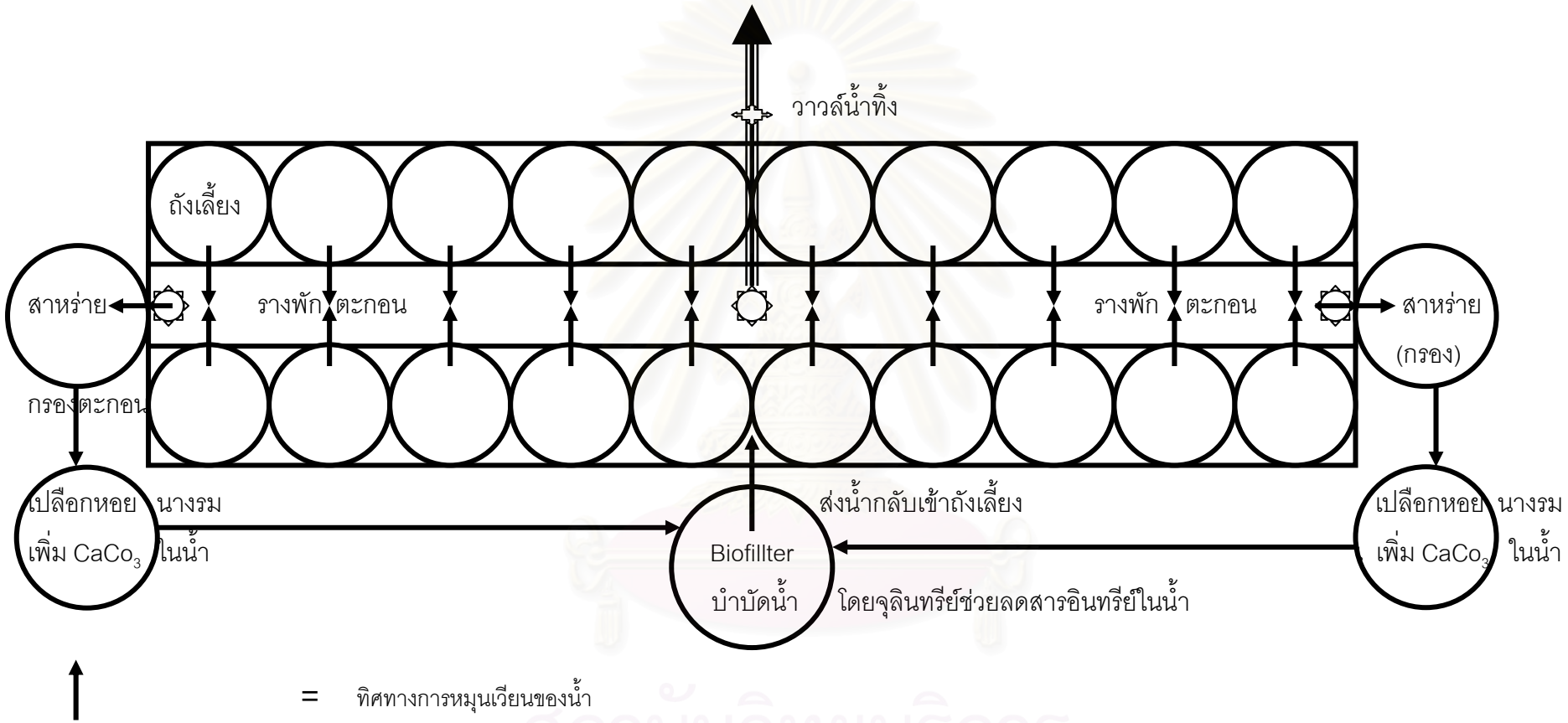
ปริมาณของอาหารที่ให้ดัดแปลงจาก สุพิศ ทองรอด และคณะ (2538ก) คือ ระยะซูเอีย 1-2 ให้อาหารปริมาณ 20 กรัมต่อกุ้ง 1 ล้านตัวต่อวัน ระยะซูเอีย2-ไมซิส3 ให้อาหารปริมาณ 30-40 กรัมต่อกุ้ง 1 ล้านตัวต่อวัน และ ปรับปริมาณตามความต้องการของกุ้ง เปลี่ยนถ่ายน้ำประมาณวันละ 30-50 % โดยใช้น้ำทะเลความเค็ม 30 ppt ที่ผ่านการกรองและฆ่าเชื้อด้วยโอโซน ให้อากาศตลอดเวลาผ่านหัวทรายโดยปรับปริมาณลมปานกลาง ควบคุมอุณหภูมิที่ 28-30 องศาเซลเซียส บันทึกการรอดในระยะไมซิส 1 และโพสลาวา 1 โดยการสุ่มด้วยบีกเกอร์ขนาด 200 มิลลิลิตร แล้วนับจำนวน ทำซ้ำ 3 ครั้ง หาค่าเฉลี่ยแล้วคำนวณกลับตามปริมาตรน้ำในถังเลี้ยง

บันทึกการเติบโตโดยสุ่มกุ้งถังละ 10% และนับจำนวนลูกกุ้งที่พัฒนาเข้าสู่ระยะต่าง ๆ ทุกวันภายใต้กล้องสเตอริโอ

3. ระยะโพสลาวา 3-17 นำกุ้งกุลาดำระยะโพสลาวา 2 มาอนุบาล โดยให้อาหารธรรมชาติคืออาร์ทีเมียที่เพิ่งฟักร่วมกับอาหารสูตรควบคุม เมื่อกุ้งเข้าสู่ระยะโพสลาวา 3 จึงสุ่มกุ้ง 2,000 ตัว ลงถังทดลองขนาด 500 ลิตร ซึ่งมีปริมาตรน้ำคงที่ประมาณ 350 ลิตร โดยเลี้ยงในระบบหมุนเวียนน้ำทะเลแบบปิด (รูปที่ 5) ซึ่งเปิดน้ำไหลผ่านตลอด 24 ชั่วโมง (ประมาณ 400% ต่อวัน) ให้อาหารทดลองขนาดใหญ่กว่า 125 ไมครอน ทุก 4 ชั่วโมง (เวลา 6.00, 10.00, 14.00, 18.00 และ 22.00 น.) สิ้นสุดการทดลองเมื่อกุ้งเข้าสู่ระยะโพสลาวา 18 รวมระยะเวลาเลี้ยงทั้งหมด 15 วัน บันทึกการรอดโดยนับจำนวนลูกกุ้งที่ระยะโพสลาวา 18 ทุกตัว บันทึกการเติบโตโดยวัดความยาวเหยียด (Total length) ที่ระยะโพสลาวา 3 และ 18 จากการสุ่มลูกกุ้งถังละ 50 ตัว เก็บลูกกุ้งที่รอดทั้งหมดในแต่ละถังในที่มืดที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส ก่อนการวิเคราะห์ปริมาณแอสตาแซนทินโดยใช้ HPLC ตามวิธีของ Weber (1990)

การวิเคราะห์ปริมาณคาโรทีนอยด์ในอาหารและแอสตาแซนทินในเนื้อกุ้งโดยใช้ HPLC (Weber, 1990)

การวิเคราะห์คาโรทีนอยด์โดยใช้ HPLC ตามวิธีของ Weber (1990) โดยบดอาหารทดลอง ชั่งน้ำหนักและใช้ MAXATASE เป็นเอ็นไซม์ในการย่อยสารเคลือบอนุภาคแอสตาแซนทิน ใช้ ethanol และ dichloromethane เป็นสารสกัดแอสตาแซนทินจากตัวอย่างอาหาร ทำสารละลายตัวอย่างให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโตกราฟี นำสารละลายตัวอย่างที่ได้ฉีดเข้าเครื่อง High Pressure Liquid Chromatography (HPLC, Model: Water 501) คอลัมน์ที่ใช้ภายในบรรจุด้วย LiChrosorb Si 60, 5 ไมครอน ยาว 125 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร สำหรับเนื้อกุ้งทดลองจะบดและชั่งน้ำหนัก สกัดแอสตาแซนทินจากเนื้อกุ้งโดยใช้ acetone สารละลายตัวอย่างที่ได้ครึ่งหนึ่งจะนำมาระเหยและฉีดเข้าเครื่อง HPLC สารละลายตัวอย่างที่เหลืออีกครึ่งหนึ่งจะนำมาผ่านขบวนการ Saponification เพื่อทำลายพันธะของหมู่ ester ที่จับกับกรดไขมัน เพื่อให้ได้แอสตาแซนทินอิสระ (Astaxanthin free) และฉีดเข้าเครื่อง HPLC สารเคมีที่ใช้สกัดแอสตาแซนทีนแสดงในตารางที่ 4 และวิธีการวิเคราะห์แสดงในแผนผัง รูปที่ 6 และ 7



รูปที่ 5 ระบบหมุนเวียนน้ำทะเลแบบปิด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์คาโรทีนอยด์และแอสตาแซนทินแสดงในอาหารและเนื้อกุ้งทดลอง

สารเคมี	ประเภท
Chloroform	A.R.
n-Hexane, free of fluorescence	A.R.
Diethyl ether, peroxide free	A.R.
Dichloromethane	A.R.
MAXATASE	P440000 encapsulated (International Biosynthetics, Rijswijk, Netherland)
Silica gel 60	particle size 0.2-0.5 mm. for column chromatography
Ethanol, absolute	A.R.
Ortho-phosphoric acid 85%	A.R.
Methanol	A.R.
Astaxanthin crystal	RO 11-3741, Sealed under Argon
t-Butyl methyl ether	A.R.
Potassium hydroxide	A.R.
n-Hexane	HPLC grade
Acetone	HPLC grade
Magnesium sulfate hydrate 22.5-25 % H_2O	A.R.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชั่งตัวอย่างอาหารที่บดแล้ว 10 กรัม ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ที่ทราบน้ำหนัก

⇩

ใส่ MAXATASE 100 มิลลิกรัม เติมน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร

⇩

อุ่นใน waterbath ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 30 นาที

⇩

ปล่อยให้เย็น ชั่งน้ำหนักอีกครั้ง จากนั้นชั่งน้ำหนักตัวอย่างมา 10 กรัม
ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 250 มิลลิลิตร

⇩

เติม ethanol 100 มิลลิลิตร เขย่า เติม dichloromethane จนได้ปริมาตร 250 มิลลิลิตร

⇩

ทำตัวอย่างให้บริสุทธิ์ โดยนำตัวอย่างมา 25 มิลลิลิตร

⇩

ผ่านตัวอย่างลงในหลอดโครมาโตกราฟี่ แล้วเติมด้วย n-Hexane:ether (1:1) 120 มิลลิลิตร

⇩

รวบรวมตัวอย่างที่ได้ใส่ในขวดก้นกลมขนาด 250 มิลลิลิตร

⇩

ระเหยสารตัวอย่างที่รวบรวมได้ แล้วละลายตัวอย่างที่ได้ด้วย
n-Hexane:ether (86:14) 5-10 มิลลิลิตร

⇩

ฉีด HPLC

⇩

อ่านค่าที่ได้แล้วนำไปประมวลผล

รูปที่ 6 แผนผังวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณคาโรทีนอยด์ในอาหารทดลอง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชั่งตัวอย่างกุ้ง 10 –20 กรัม ใส่ magnesium sulfate hydrate 5 กรัม

⇩

เติม Acetone 40 มิลลิลิตร บดส่วนผสมทั้งหมด แยกสารละลายใสไว้ แล้วเติม Acetone บดซ้ำอีก ทำซ้ำจนสารละลายที่ได้ไม่มีสี รวบรวมสารละลายทั้งที่ได้วัดปริมาตร

⇩

นำสารละลายครึ่งหนึ่งมาทำการระเหยที่ 50 องศาเซลเซียส

⇩

ละลายตัวอย่างหลังการระเหยด้วย n-Hexane:ether (86:14) ประมาณ 5 มิลลิลิตร

⇩

ฉีด HPLC แล้วนำค่าที่ได้ไปประมวลผล

นำสารละลายที่เหลืออีกครึ่งหนึ่งมาระเหยที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส
ละลายตัวอย่างหลังระเหยด้วย ethanol 60 มิลลิลิตร

⇩

t-butyl methyl ether 10 มิลลิลิตร และ 50% สารละลาย potassium hydroxide 5 มิลลิลิตร

⇩

นำสารละลายทั้งหมดไปทำการ reflux 30 นาที อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส
เติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร ทำให้เย็น

⇩

เทสารละลายทั้งหมดใส่กรวยแยกขนาด 500 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร
เติม diethyl ether 100 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรงและค่อย ๆ ปล่อยก๊าซที่เกิดขึ้นออกมา

⇩

ตั้งทิ้งไว้ให้สารละลายแยกชั้น หลังจากนั้นไขเอาชั้นน้ำออกมาทำการสกัดต่อ โดยเติม diethyl ether 100 มิลลิลิตร และเขย่าอีก 2 ครั้ง

⇩

รวบรวมชั้นสารละลายที่ได้มาเติมน้ำกลั่น และเขย่า ทำจน pH ของสารละลายเป็นกลาง ระเหยสารละลาย ether ที่เป็นกลาง ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

⇩

เติม n-Hexane:ether (86:14) ละลายตัวอย่างที่ได้หลังระเหย นำไปฉีด HPLC และประมวลผล

รูปที่ 7 แผนผังวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณแอสตาแซนทินในกุ้งทดลอง

การเตรียมสารมาตรฐานแอสตาแซนทิน (Weber, 1990)

โดยชั่งผลึกแอสตาแซนทินบริสุทธิ์ประมาณ 3 มิลลิกรัม ละลายด้วย chloroform 10 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วย n-Hexane ดูดสารละลายผสมนี้มา 5 มิลลิลิตรเติม chloroform 4 มิลลิลิตร และเจือจางด้วย n-Hexane จนมีปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วนำสารละลายมาตรฐานที่ได้ไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC วัดค่าดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร และคำนวณตามสูตรต่อไปนี้

Astaxanthin (mg/l) = (Absorption x 10,000)/ 2,100

สภาวะเครื่อง HPLC ในการวิเคราะห์หาแอสตาแซนทิน

คอลัมน์	เตรียมคอลัมน์ Lichrosorb Si 60 ด้วยการผ่านสารละลายกรด phosphoric ใน methanol (1 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร) อัตราการไหลของสาร 1 มิลลิลิตรต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างคอลัมน์ด้วยเฟสเคลื่อนที่ อัตราการไหลของสาร 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที เป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมง
เฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase)	n-Hexane:acetone (HPLC grade) 86:14
อัตราการไหล	1.2 มิลลิลิตรต่อนาที
ความดัน	ประมาณ 80 bar
อุณหภูมิ	28 องศาเซลเซียส
ปริมาณที่ฉีด	20 ไมโครลิตร
การตรวจค้น	VIS-detection ที่ 470 นาโนเมตร
เวลาในการแยกสาร	15 นาที

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คุณภาพน้ำ

ตรวจสอบคุณภาพน้ำของหน่วยทดลองทุกวัน ได้แก่ อุณหภูมิ วัดโดยใช้เทอร์โมมิเตอร์แบบแอลกอฮอล์ชนิดแท่งแก้ว, ความเค็ม วัดโดยใช้ Reflectometer ยี่ห้อ ATAGO รุ่น S-10E, ความเป็นกรด-เบส (pH) วัดโดย pH meter ยี่ห้อ WTW รุ่น pH 320, ออกซิเจนละลายน้ำ (DO) วัดโดย Oxygen meter ยี่ห้อ YSI รุ่น 51 B, ปริมาณแอมโมเนียรวม, ไนไตรท์ วัดโดยใช้ชุดตรวจสอบคุณภาพน้ำ Primatech's Test kits

การวิเคราะห์ผลการทดลอง

วิเคราะห์ผลของอาหารทดลองแต่ละสูตรต่อการเติบโต โดยใช้ข้อมูลความยาวของกุ้งที่เพิ่มขึ้นสำหรับกุ้งระยะโพสลาวา สำหรับระยะซูเอียและไมซิสวิเคราะห์จากข้อมูลดัชนีการเจริญเติบโต (growth index) (Kanazawa et al., 1985) ดัชนีการเจริญเติบโตเป็นผลรวมของการพัฒนาการการเติบโตของกุ้งวัยอ่อนทุกระยะ โดยกำหนดค่าให้กับระยะต่าง ๆ ดังนี้ ซูเอีย 1 = 1, ซูเอีย 2 = 2, ซูเอีย 3 = 3, ไมซิส 1 = 4, ไมซิส 2 = 5, ไมซิส 3 = 6 และ โพสลาวา 1 = 7 และนำไปแทนค่าในสูตรต่อไปนี้

$$\text{ดัชนีการเจริญเติบโต} = \sum (SnNn / T)$$

Sn = การพัฒนาการเจริญเติบโตของกุ้งระยะ n
Nn = จำนวนกุ้งในการพัฒนาการเติบโตระยะ n
T = จำนวนกุ้งทั้งหมด

วิเคราะห์ความแตกต่างผลของอาหารทดลองแต่ละสูตร ต่อการเติบโต การรอด และปริมาณแอสตาแซนทินสะสมในตัวกุ้งกุลาดำ โดยใช้ ANOVA วิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

คุณค่าทางโภชนาการของอาหารทดลอง

องค์ประกอบทางโภชนาการของอาหารทดลอง 4 สูตร แสดงในตารางที่ 5 โดยมีโภชนาการหลักใกล้เคียงกับที่กำหนดไว้ แต่ปริมาณคาโรทีนอยด์ในอาหารสูตร ที่ 2,3 และ 4 มีค่าต่ำกว่าที่กำหนดไว้ (ตารางที่ 6) และมีลักษณะสีแตกต่างกันดังรูปที่ 8

ตารางที่ 5 องค์ประกอบทางโภชนาการของอาหารกุ้งกุลาดำวัยอ่อนที่ใช้ในการทดลอง

สูตรอาหาร	องค์ประกอบหลักทางโภชนาการ (%)[1]				
	โปรตีน	ไขมัน	เถ้า	ความชื้น	เยื่อใย
สูตร 1	37.48 $\pm$ 0.20	12.70 $\pm$ 2.89	10.68 $\pm$ 0.03	8.18 $\pm$ 0.30	4.95 $\pm$ 0.28
สูตร 2	38.73 $\pm$ 0.28	13.06 $\pm$ 1.23	10.41 $\pm$ 0.16	8.26 $\pm$ 0.33	3.53 $\pm$ 0.82
สูตร 3	38.97 $\pm$ 0.07	12.01 $\pm$ 1.82	9.49 $\pm$ 0.81	6.17 $\pm$ 0.20	3.36 $\pm$ 0.33
สูตร 4	38.32 $\pm$ 0.27	13.53 $\pm$ 1.27	9.01 $\pm$ 0.08	6.51 $\pm$ 0.37	2.63 $\pm$ 0.07

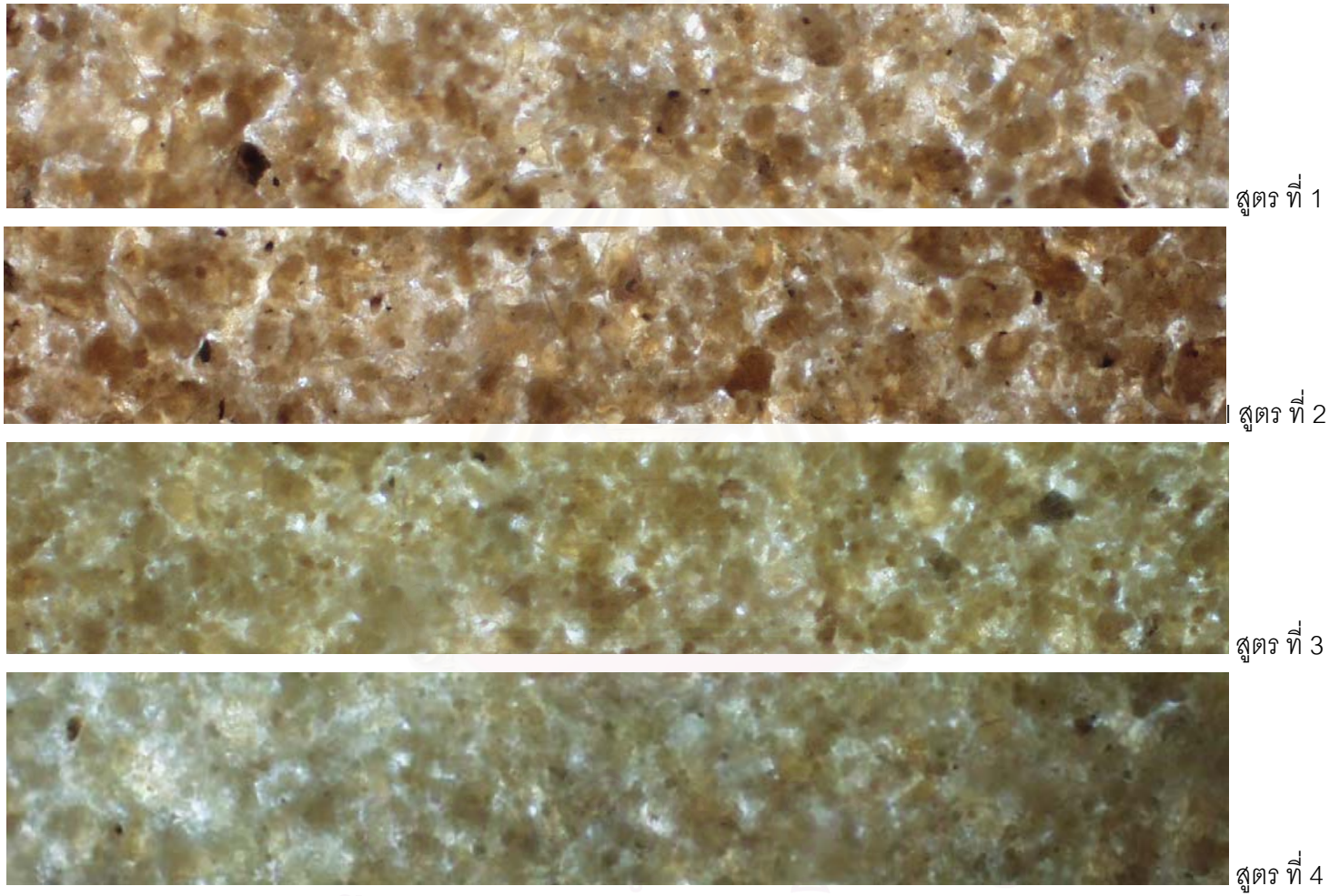
1 = ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตารางที่ 6 ปริมาณคาโรทีนอยด์ของอาหารกุ้งกุลาดำวัยอ่อนที่ใช้ในการทดลอง

สูตรอาหาร	ปริมาณคาโรทีนอยด์รวม (ppm)[1]
สูตร 1	0.35 $\pm$ 0.44
สูตร 2	29.54 $\pm$ 2.91
สูตร 3	4.57 $\pm$ 1.15
สูตร 4	8.11 $\pm$ 0.44

1 = ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 8 ลักษณะและสีของอาหารทดลองสูตรที่ 1-4 (x40)

คุณภาพน้ำ

คุณภาพน้ำตลอดการทดลองพบว่าความเค็มมีค่าอยู่ระหว่าง 28-32 ppt และอุณหภูมิมีค่าอยู่ระหว่าง 27-29 องศาเซลเซียส คุณภาพน้ำอื่น ซึ่งได้แก่ ความเป็นกรดเป็นด่าง, ออกซิเจนละลายน้ำ, อัลคาลินิตี้, แอมโมเนีย และ ไนไตรท์ มีค่าอยู่ในช่วงใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 7) และอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานปลอดภัยสำหรับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเมื่อเปรียบเทียบกับตารางคุณภาพน้ำที่สัตว์น้ำสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้อย่างปกติ รายละเอียดแสดงดังภาคผนวก ข

ตารางที่ 7 คุณภาพน้ำระหว่างการทดลอง

ระยะ	สูตรอาหาร	การละลายของออกซิเจน (mg/l)	ความเป็นกรด-เบส	อัลคาลินิตี้ (mg/l $CaCo_3$)	แอมโมเนีย (mg/l)	ไนไตรท์ (mg/l)
ซูเอีย	1	8.0 - 10	7.8 - 8.4	119	0 – 0.1	0 – 1.0
	2	8.4 - 10	7.8 - 8.3	119	0 – 0.1	0 – 0.5
	3	9.0 - 10	7.8 - 8.3	119	0 – 0.1	0 – 1.0
	4	8.2 - 10.2	7.7 - 8.4	119	0 – 0.1	0 – 1.0
ไมซิส	1	7.6 - 8.2	7.6 - 8.3	153	0 – 0.25	0 – 0.15
	2	7.8 - 9.0	7.6 - 8.3	153	0 – 0.25	0 – 0.15
	3	7.9 - 8.4	7.6 - 8.3	153	0 – 0.25	0 – 0.15
	4	6.9 - 8.6	7.6 - 8.3	153	0 – 0.25	0 – 0.15
โพสลาวา	1	6.5 - 7.8	8.4 – 8.5	85 - 136	0	0 – 0.3
	2	6.4 - 7.8	8.4 – 8.5	85 – 136	0	0 – 0.3
	3	6.2 - 7.9	8.4 – 8.5	85 – 136	0	0 – 0.3
	4	6.2 - 7.8	8.4 – 8.5	85 - 136	0	0 – 0.3

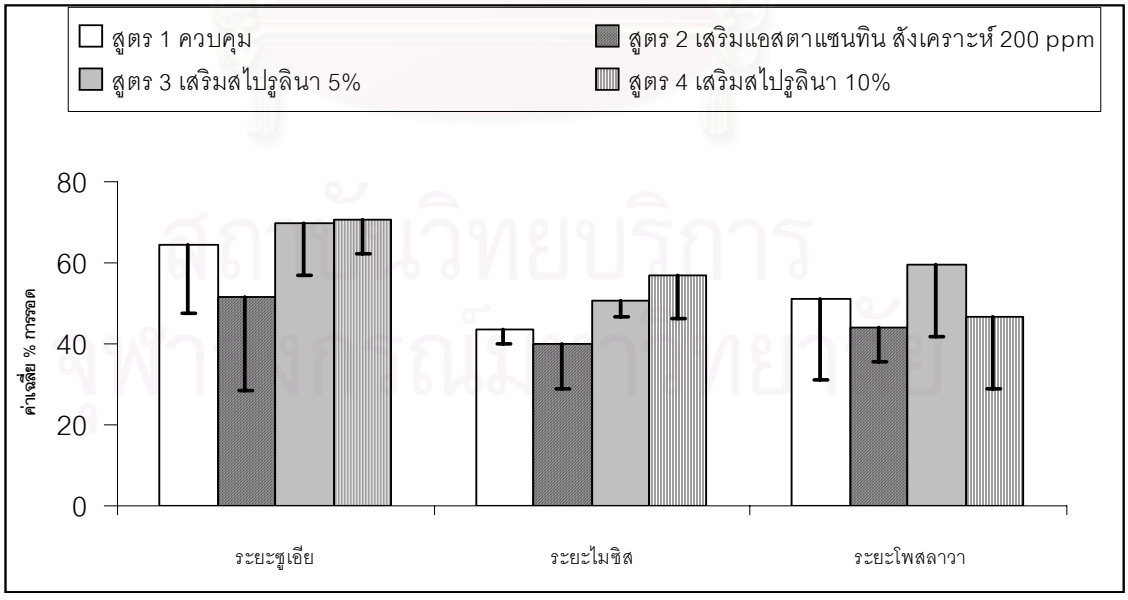
ผลของคาโรทีนอยด์ต่อการรอดของกุ้งกุลาดำวัยอ่อน

การรอดของกุ้งกุลาดำวัยอ่อนระยะซูเอีย, ไมซิส และ โพสลาวา ที่ให้อาหารทดลองทั้ง 4 สูตร ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 8 และรูปที่ 9) ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแสดงรายละเอียดในภาคผนวก ค จากการทดลองพบว่ากุ้งกุลาดำวัยอ่อนทั้ง 3 ระยะที่ได้รับอาหารสูตร 2 เสริมแอสตาแซนทินสังเคราห์ 200 ppm มีค่าเฉลี่ยการรอดต่ำกว่ากลุ่มที่ได้รับอาหาร สูตรควบคุม สูตรที่ 3 เสริมสไปรูลินา 5% และสูตรที่ 4 เสริมสไปรูลินา 10%

ตารางที่ 8 การรอดของกุ้งกุลาดำวัยอ่อนที่ได้รับอาหารทดลองสูตรต่าง ๆ

สูตรอาหาร	การรอดของกุ้งกุลาดำวัยอ่อน (เปอร์เซ็นต์)[1]		
	ระยะซูเอีย	ระยะไมซิส	ระยะโพสลาวา
สูตร 1	64.38 $\pm$ 16.97	43.34 $\pm$ 3.17	50.99 $\pm$ 19.66
สูตร 2	51.41 $\pm$ 22.90	40.21 $\pm$ 11.22	43.93 $\pm$ 8.53
สูตร 3	69.69 $\pm$ 12.98	50.62 $\pm$ 4.02	59.62 $\pm$ 17.66
สูตร 4	70.54 $\pm$ 8.45	57.01 $\pm$ 10.60	46.57 $\pm$ 17.74

1 = ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน



รูปที่ 9 การรอดเฉลี่ยของกุ้งกุลาดำวัยอ่อนที่ได้รับอาหารทดลองสูตรต่าง ๆ

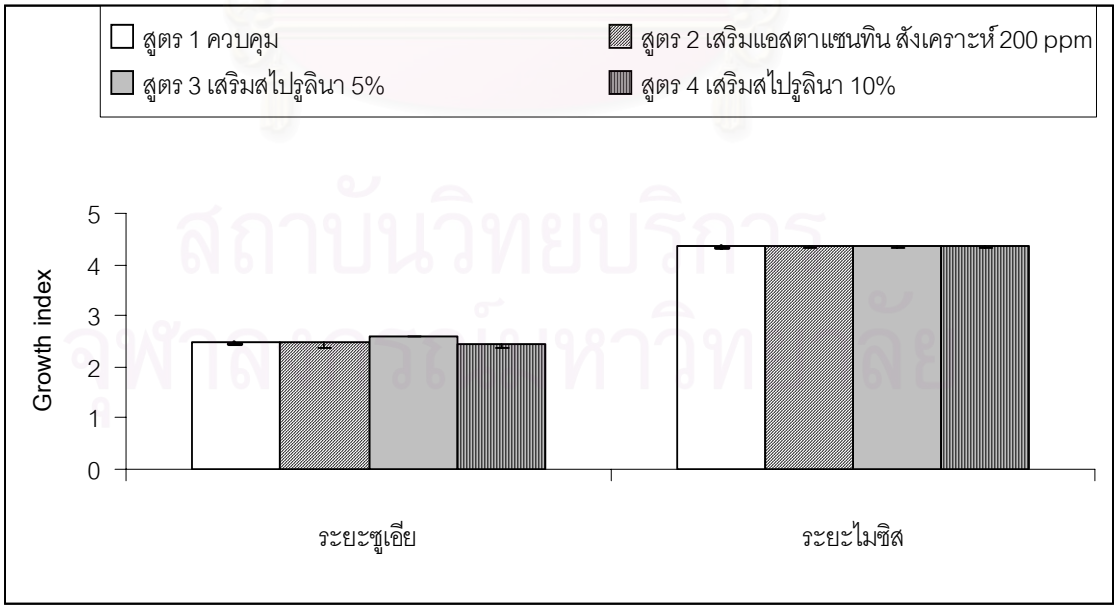
ผลของคาโรทีนอยด์ต่อการเติบโตของกุ้งกุลาดำวัยอ่อน

การเติบโตของกุ้งระยะซูเอียและไมซิสคำนวณจากดัชนีการเจริญเติบโต แสดงในตารางที่ 9 และรูปที่ 10 และการเติบโตของกุ้งระยะโพสลาวาคำนวณจากความยาวที่เพิ่มขึ้น (%) แสดงในตารางที่ 10 และรูปที่ 11 จากการทดลองพบว่าการเติบโตของกุ้งระยะซูเอีย ไมซิส และโพสลาวา ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแสดงรายละเอียดในภาคผนวก ค

ตารางที่ 9 การเติบโตของกุ้งกุลาดำวัยอ่อนระยะซูเอียและไมซิสที่ได้รับอาหารทดลองสูตรต่าง ๆ

สูตรอาหาร	ดัชนีการเจริญเติบโต	
	ระยะซูเอีย[1]	ระยะไมซิส[1]
สูตร 1	2.48 $\pm$ 0.04	4.36 $\pm$ 0.03
สูตร 2	2.50 $\pm$ 0.13	4.37 $\pm$ 0.03
สูตร 3	2.60 $\pm$ 0.02	4.35 $\pm$ 0.01
สูตร 4	2.45 $\pm$ 0.07	4.35 $\pm$ 0.01

1 = ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

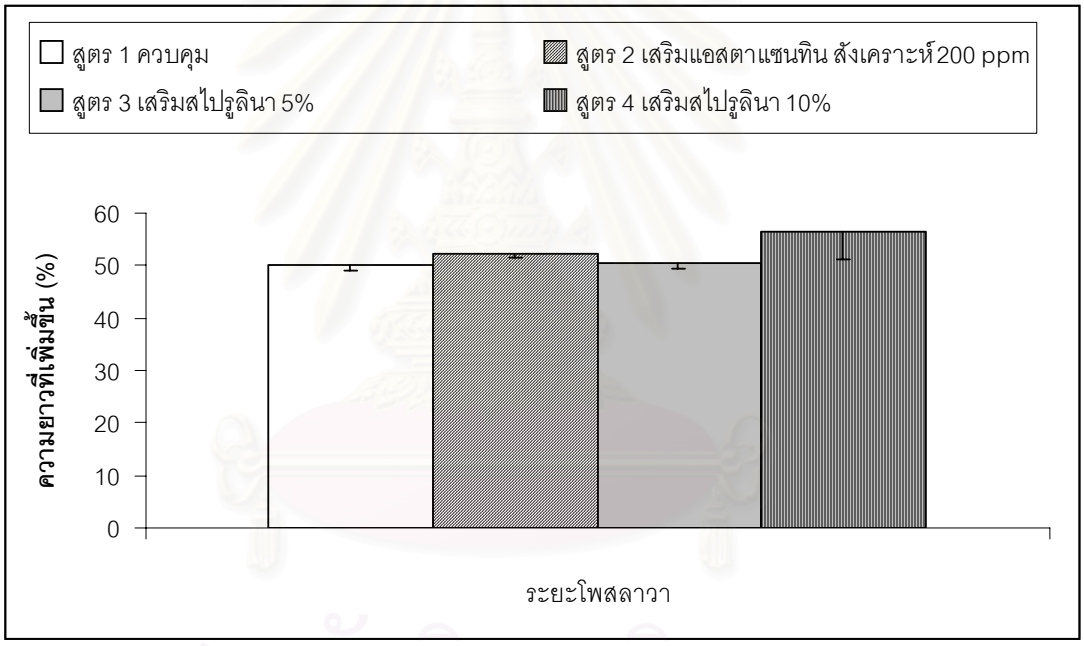


รูปที่ 10 ดัชนีการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำระยะซูเอีย และ ไมซิส ที่ได้รับอาหารทดลองสูตรต่าง ๆ

ตารางที่ 10 การเติบโตของกุ้งกุลาดำวัยอ่อนระยะโพสลาวาที่ได้รับอาหารทดลองสูตรต่าง ๆ

สูตรอาหาร	ความยาวของกุ้งระยะโพสลาวาที่เพิ่มขึ้น (%)[1]
	ระยะโพสลาวา
สูตร 1	50.05 ± 1.06
สูตร 2	52.13 ± 0.64
สูตร 3	50.32 ± 0.84
สูตร 4	56.50 ± 5.26

1 = ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน



รูปที่ 11 ความยาวที่เพิ่มขึ้น (%) ของกุ้งกุลาดำระยะโพสลาวา ที่ได้รับอาหารทดลองสูตรต่าง ๆ

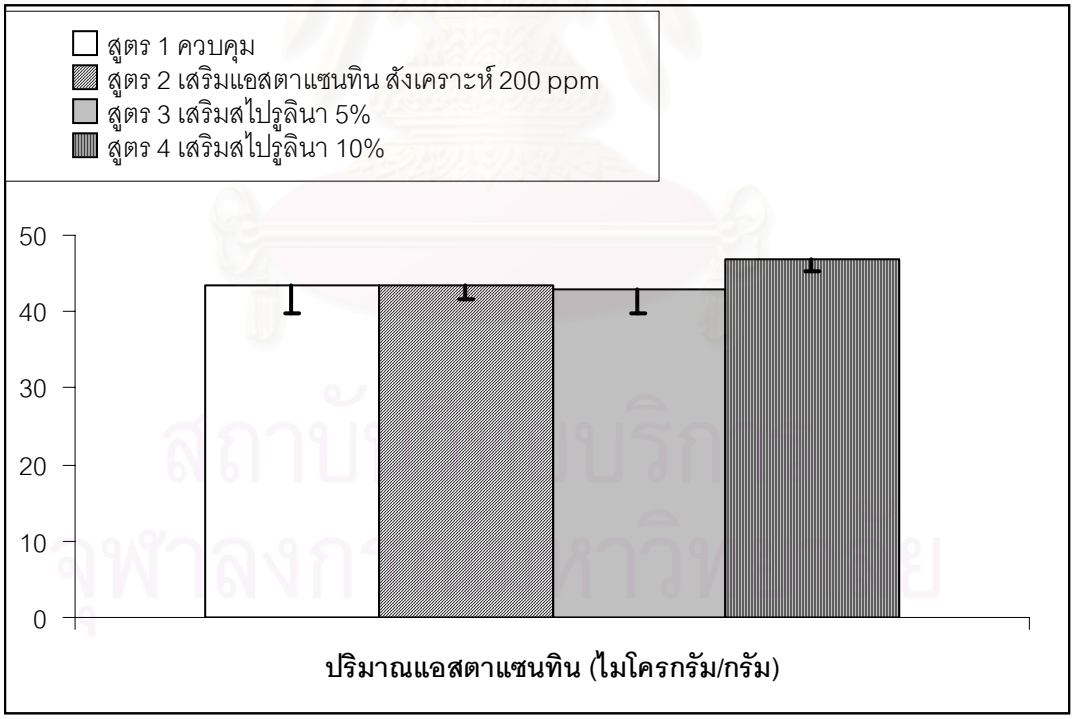
การสะสมปริมาณแอสตาแซนทินในตัวกุ้งกุลาดำวัยอ่อน

ปริมาณแอสตาแซนทินสะสมในตัวกุ้งระยะโพสลาวา 18 ที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง 4 สูตร ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 11 และรูปที่ 12)

ตารางที่ 11 ปริมาณแอสตาแซนทินสะสมในตัวกุ้งระยะโพสลาวา 18 ที่ได้รับอาหารทดลองสูตรต่าง ๆ

สูตรอาหาร	ปริมาณแอสตาแซนทิน (ไมโครกรัม/กรัม)[1]
สูตร 1	43.34 $\pm$ 3.44
สูตร 2	43.49 $\pm$ 1.82
สูตร 3	43.02 $\pm$ 3.15
สูตร 4	46.92 $\pm$ 1.62

1 = ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน



รูปที่ 12 ปริมาณแอสตาแซนทินสะสมในกุ้งกุลาดำระยะโพสลาวา 18 ที่ได้รับอาหารทดลองสูตรต่าง ๆ

บทที่ 5
อภิปรายผล

อาหารทดลอง

จากการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการและปริมาณคาโรทีนอยด์ในอาหารทดลอง 4 สูตร พบว่ามีคุณค่าทางโภชนาการใกล้เคียงกัน แต่ปริมาณคาโรทีนอยด์แตกต่างจากที่กำหนดไว้ ซึ่งอาจเกิดจากสาเหตุสำคัญสองประการ ประการแรก เกิดการสูญเสียคาโรทีนอยด์ส่วนใหญ่ในระหว่างการเก็บรักษา กระบวนการการสกัดคาโรทีนอยด์ และ การผลิตอาหาร ในการเก็บรักษาอาหารได้ป้องกันการสูญเสียคาโรทีนอยด์เบื้องต้นตามวิธีของ Yamada et al. (1990) โดยการเก็บในที่มืด และอุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส แต่ไม่มีการเติมสารป้องกันการเกิดออกซิเดชัน ethoxyquin และไม่ได้เก็บอาหารในที่สุญญากาศ ทำให้คาโรทีนอยด์ในอาหารสัมผัสกับออกซิเจน ทั้งนี้สามารถป้องกันได้โดยการเติมสารแอนตี้ออกซิแดน และเก็บในที่สุญญากาศหรือใต้ก๊าซไนโตรเจน นอกจากนี้ยังมีการสูญเสียคาโรทีนอยด์ในกระบวนการสกัดคาโรทีนอยด์ เนื่องจากทำการสกัดในที่มีแสง ซึ่ง Bauernfeind (1981) ได้อธิบายว่า แสงมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงจำนวนและตำแหน่งของ โครงสร้างโมเลกุล *cis-trans* ของพันธะคู่ ทำให้คุณสมบัติการดูดกลืนแสงและการให้สีของคาโรทีนอยด์เสียไป สามารถป้องกันได้โดยการเติม butylated hydroxyanisole และ butylated hydroxytoluene หรือหลีกเลี่ยงแสงในระหว่างการเก็บรักษาและการสกัดคาโรทีนอยด์ รวมไปถึงการป้องกันการสูญเสียคาโรทีนอยด์จากความร้อน, ออกซิเจน, กรด-เบส และ เอ็นไซม์บางชนิด ซึ่งมีผลทำให้คาโรทีนอยด์เสื่อมสภาพและเกิดการเปลี่ยนรูปไป ด้วยเหตุผลดังกล่าวคาโรทีนอยด์ในอาหารจึงลดลง นอกจากนี้ในขั้นตอนการทำอาหาร รงควัตถุแอสตาแซนทินซึ่งใส่ในปริมาณน้อย (คาโรฟิลล์พิงค์ 16 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม) อาจมีการกระจายตัวไม่ทั่วถึง ทำให้รงควัตถุในอาหารไม่สม่ำเสมอ จึงเป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ทำปริมาณคาโรทีนอยด์ในอาหารมีค่าต่ำ

ประการที่สอง เกิดจากการใช้วิธีวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ตามวิธีของ Weber (1990) ซึ่งวิธีการนี้สามารถวิเคราะห์คาโรทีนอยด์ในกลุ่มแซนโทฟิล เช่น แคนตาแซนทิน, ซีแซนทิน, เอคไคนีโนน และ ลูทิน เป็นต้น ที่อยู่ในรูปของ free-carotenoid เท่านั้น (Darachai, 1996) จากตารางที่ 6 พบว่าอาหารสูตรที่ 2 เสริมด้วยแอสตาแซนทินสังเคราะห์ 200 ppm มีปริมาณคาโรทีนอยด์รวมในอาหารสูงที่สุดเนื่องจากในแอสตาแซนทินสังเคราะห์ มีแอสตาแซนทินในรูป free-astaxanthin ทั้งหมด และมีการเติมสารป้องกันการเกิดออกซิเดชันในตัวรงควัตถุจากโรงงานมาแล้ว (Latscha, 1990) แต่ในสูตรที่ 3 และ 4 มีคาโรทีนอยด์จากสไปรูลินาซึ่งเป็นคาโรทีนอยด์จากธรรมชาติ ที่มีแซนโทฟิลได้แก่ คริบโตแซนทิน, เอคไคนีโนน, ซีเอแซนทิน, ลูทิน และ ยูกลีนาโนน

ที่อยู่ในรูป free และ ester-carotenoid ทำให้การวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ตามวิธีของ Weber (1990) ไม่สามารถตรวจสอบแซนโทฟิลที่อยู่ในรูป ester-carotenoid จากสไปรูลินาได้ แต่จะสามารถวิเคราะห์แซนโทฟิลในรูป free-carotenoid และ เบตาคาโรทีนเท่านั้น ดังนั้นคาโรทีนอยด์ที่พบในสูตรอาหารที่ 3 และ 4 จึงมีปริมาณน้อยกว่าความเป็นจริง ทั้งนี้วิธีที่สามารถตรวจสอบปริมาณคาโรทีนอยด์ได้ทั้งในรูป free และ esterified คือการวิเคราะห์ด้วย spectrophotometer ตามวิธีของ Boussiba and Vonshak (1991) แต่ในการทดลองครั้งนี้ไม่สามารถวิเคราะห์คาโรทีนอยด์รวมในอาหารด้วยวิธีนี้ได้เนื่องจากกระบวนการสกัดคาโรทีนอยด์กระทำในช่วงท้ายของการศึกษา จึงทำให้มีเวลาจำกัด ในการเริ่มศึกษาวิธีการสกัดและวิธีวิเคราะห์คาโรทีนอยด์ด้วย spectrophotometry

ผลของอาหารเสริมรงควัตถุคาโรทีนอยด์ต่อการรอดของกุ้งกุลาดำวัยอ่อน

การรอดของกุ้งระยะซูเอีย ไมซิส และ โพสลาวา ที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง 4 สูตร ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ จากการทดลองครั้งนี้สังเกตได้ว่าในกุ้งกุลาดำวัยอ่อนทุกระยะที่ได้รับอาหารเสริมแอสตาแซนทินสังเคราะห์ 200 ppm มีแนวโน้มของการรอดต่ำ และกุ้งที่ได้รับอาหารเสริมสไปรูลินามีแนวโน้มการรอดที่ดี แสดงให้เห็นว่ากุ้งกุลาดำวัยอ่อนสามารถยอมรับคาโรทีนอยด์จากสไปรูลินาได้ดีกว่าแอสตาแซนทินสังเคราะห์ สอดคล้องกับการทดลองของ Darachai (1996) ที่พบว่าแหล่งแอสตาแซนทินจากธรรมชาติมีผลดีต่อการรอดของกุ้งกุลาดำวัยอ่อนโดยเฉพาะระยะซูเอีย และ ไมซิส ซึ่งพบว่ากุ้งที่ได้รับแอสตาแซนทิน 200 ppm จากสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* มีการรอดสูงกว่ากลุ่มที่ได้รับแอสตาแซนทินสังเคราะห์ 200 ppm อย่างมีนัยสำคัญ สาเหตุที่ผลของคาโรทีนอยด์จากธรรมชาติให้ผลการรอดของกุ้งทะเลวัยอ่อนดีกว่าแหล่งคาโรทีนอยด์สังเคราะห์ โดยเฉพาะในระยะซูเอียและไมซิส เนื่องจากในธรรมชาติ ซูเอียและ ไมซิส กินแพลงก์ตอนพืช เช่น ศีโตเซอรอส, สเกลลีโตนีมา และ เตตราเซลมิส เป็นอาหารหลักอยู่แล้ว ดังนั้นจึงทำให้กุ้งสามารถยอมรับคาโรทีนอยด์จากสาหร่ายสไปรูลินา และสาหร่าย *H. pluvialis* (Darachai, 1996) ได้ดีกว่าคาโรทีนอยด์สังเคราะห์ ซึ่งเป็นไปได้ว่าในคาโรทีนอยด์สังเคราะห์จะมีสารเคมีที่เป็นอันตรายต่อกุ้งทะเลวัยอ่อนระยะ ซูเอียและไมซิส ที่มีความอ่อนแอสูงต่อสภาพแวดล้อม รวมไปถึงความสามารถในการใช้คาโรทีนอยด์จากสารสังเคราะห์ที่มีโครงสร้างโมเลกุลในรูป *all-trans* ที่ไม่พบในธรรมชาติ จึงยากต่อการนำไปใช้ของกุ้งทะเลวัยอ่อน ซึ่งเคยชินกับการใช้คาโรทีนอยด์จากธรรมชาติที่อยู่ในรูป *cis-trans* (John และ An, 1991) แต่จะพบว่าในกุ้งทะเลระยะโพสลาวาจะสามารถใช้คาโรทีนอยด์สังเคราะห์ได้ดีขึ้น โดยมีการรอดไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ได้รับสาหร่าย *H. pluvialis* เป็นอาหาร (Darachai, 1996) และให้ผลดีเช่นเดียวกันในกุ้งทะเล

ระยะโพสลาวา 15 ขึ้นไป Thongrod et al. (1995) พบว่ากุ้งกุลาดำระยะโพสลาวา 15 ที่ได้รับอาหารเสริมแอสตาแซนทินสังเคราะห์ 60 ppm 1 เดือน มีการรอดที่สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ

จากการทดลองครั้งนี้พบว่าคาโรทีนอยด์ในอาหารไม่มีผลต่อการรอดของ กุ้งกุลาดำวัยอ่อน เช่นเดียวกับการทดลองของ Darachai (1996) พบว่าการรอดของกุ้งกุลาดำวัยอ่อนระยะซูเอีย และ โพสลาวา ที่ได้รับอาหารเสริมแอสตาแซนทิน 200 ppm จากสาหร่าย *H. pluvialis* และอาหารควบคุม (ไม่มีการเติมรงควัตถุ) ไม่แตกต่างกัน และในทำนองเดียวกันกับการทดลองในกุ้งทะเลระยะวัยรุ่น ที่พบว่า อาหารเสริมคาโรทีนอยด์ไม่มีผลที่ชัดเจนต่อการรอด ดังการทดลองของ นิติ ชูเชิด (2538) พบว่าการเสริมแอสตาแซนทินสังเคราะห์ 50 ppm ในอาหาร กุ้งกุลาดำ นาน 16 สัปดาห์ไม่ทำให้การรอดแตกต่างจากกลุ่มควบคุม แม้ว่าจะมีการทดลองให้แอสตาแซนทินสังเคราะห์ในระดับที่สูงขึ้น 50 – 200 ppm เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ก็ไม่มีผลในการเพิ่มอัตรารอด (มะลิ บุญรัตผลิน และคณะ, 2543; Choosuwan, 1991) จากการทดลองของ Yamada et al. (1990) พบว่าอาหารเสริม เบตาคาโรทีน สังเคราะห์ 100 ppm ในอาหารไม่มีผลต่อการรอดของกุ้ง *Penaeus japonicus* ระยะวัยรุ่น เช่นกัน แต่ในหลายงานวิจัยพบว่าคาโรทีนอยด์สังเคราะห์มีผลดีต่อการรอดของกุ้งทะเลระยะวัยรุ่น เช่น จากผลการทดลองของ นิตยา ไชยเนตร (2538) ซึ่งพบการรอดที่ดีในกลุ่มกุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารเสริมแอสตาแซนทินสังเคราะห์ 200 ppm นาน 6 สัปดาห์ และ Negre-Sadargues และคณะ (1993) พบว่า แอสตาแซนทิน 50 ppm ผสมกับ แคนตาแซนทิน 50 ppm ในอาหารส่งผลในทางบวกร่วมกันต่อการรอดของกุ้ง *P. japonicus* ระยะวัยรุ่น โดยพบการรอดที่ดีกว่ากลุ่มควบคุม Chien และ Jeng (1992) พบว่ากุ้ง *P. japonicus* ที่ได้รับแอสตาแซนทินสังเคราะห์ 500 ppm มีการรอดที่สูงกว่ากลุ่มควบคุม และสูงกว่ากลุ่มที่ได้รับแอสตาแซนทินสังเคราะห์ 1,000 และ 2,000 ppm และการรอดจะสูงขึ้นเมื่อกุ้งได้รับแอสตาแซนทินนานขึ้น โดยที่ระยะเวลา 3 เดือน จะมีการรอดที่สูงกว่า 2 และ 1 เดือน ตามลำดับ สรุปได้ว่าคาโรทีนอยด์สังเคราะห์ในอาหารจะมีผลดีต่อการรอดเมื่อระยะเวลาที่ได้รับนานขึ้น และในปริมาณสูงตั้งแต่ 200 ppm ขึ้นไป แต่ไม่ควรเกิน 1,000 ppm

จากการทดลองครั้งนี้ผลของคาโรทีนอยด์จากสไปรูลินาไม่มีผลต่อการรอดของกุ้งกุลาดำวัยอ่อน สอดคล้องกับการทดลองในกุ้งกุลาดำวัยรุ่น โดย สุกิจ รัตนวนิจกุล และ พูนสิน พานิชสุข (2538) พบว่ากุ้งกุลาดำวัยรุ่นที่ได้รับอาหารเสริมคาโรทีนอยด์จากสไปรูลินา 8.5% และกลีบดอกดาวเรือง 8.5% นาน 1 เดือน มีการรอดที่ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาของ ณรงค์ศักดิ์ พ่วงลาภ (2533) พบว่ากุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารเสริมคาโรทีนอยด์จาก

สไปรูลินา ตั้งแต่ 1-25% นาน 10 สัปดาห์ มีการรอดที่สูงกว่ากลุ่มที่ได้รับอาหารควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ทำนองเดียวกันกับ Cuzon et al, (1981) พบว่าการเสริมสไปรูลินาในอาหาร 8% มีผลดีต่อการรอดของกุ้ง *P. japonicus*

ดังนั้นจากการทดลองครั้งนี้ คาโรทีนอยด์ไม่มีผลต่อการรอดของกุ้งกุลาดำวัยอ่อนอย่างชัดเจนเนื่องมาจาก ระยะเวลาในการเลี้ยงกุ้งแต่ละระยะใช้เวลาสั้น โดยในระยะซูเอียและไมซิสใช้เวลาในการทดลองประมาณ 5 วัน และระยะโพสลาวาประมาณ 15 วัน จึงทำให้เห็นผลได้ไม่ชัดเจน และอาจมีการใช้ปริมาณคาโรทีนอยด์ที่มากหรือน้อยเกินไปจนไม่เหมาะสมต่อการนำไปใช้ของกุ้งกุลาดำวัยอ่อน ปัจจุบันยังมีการศึกษาการใช้คาโรทีนอยด์ในกุ้งทะเลวัยอ่อนค่อนข้างน้อยทำให้ต้องใช้การเปรียบเทียบปริมาณที่เหมาะสมจากการศึกษาในกุ้งทะเลระยะวัยรุ่นแทน แต่ในความเป็นจริงกุ้งทะเลในแต่ละระยะอาจมีความต้องการปริมาณคาโรทีนอยด์ที่แตกต่างกัน

ผลของคาโรทีนอยด์ในอาหารต่อการรอดของกุ้งทะเลจะชัดเจนมากขึ้นเมื่อกุ้งได้รับความเครียด ในแต่ละการทดลองอาจมีสภาพแวดล้อมต่างกัน จึงทำให้ผลของการรอดที่แสดงออกมาไม่ชัดเจน แต่เมื่อสร้างความเครียดให้กับกุ้ง จะเห็นได้ชัดว่า คาโรทีนอยด์มีผลต่อการรอด เช่น การทดสอบการเปลี่ยนแปลงความเค็มอย่างรวดเร็ว ดังการทดลองของ Darachai (1996) พบว่า เมื่อลดความเค็มจาก 30 ppt เหลือ 2 ppt กุ้งระยะโพสลาวา 15 ที่ได้รับคาโรทีนอยด์ทั้งจากธรรมชาติ และจากสารสังเคราะห์ มีการตาย 50% ที่เวลาช้ากว่ากลุ่มควบคุม อย่างชัดเจน คือที่เวลา 44.86 นาที, 36.63 นาที และ 32.23 นาที ตามลำดับ สอดคล้องกับการทดลองของ Merchie (อ้างโดย Hunter, 1996) พบว่าปริมาณแอสตาแซนทินสังเคราะห์ที่สูงขึ้น 230-810 ppm มีผลในทางบวกต่อการรอดของกุ้งที่ได้รับความเครียดจากการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วของอุณหภูมิ, ความเค็ม และ ปริมาณออกซิเจน และจะมีความสัมพันธ์ร่วมกันในทางบวกกับปริมาณของวิตามินซี (L-ascobyl-2-polyphosphate) ที่เพิ่มขึ้น

ผลของคาโรทีนอยด์ต่อการเพิ่มความต้านทานเชื้อที่ทำให้เกิดโรคในกุ้งทะเลระยะวัยรุ่น จากการศึกษาของ นิตยา ไชยเนตร (2538) ได้ทดสอบความต้านทานต่อเชื้อไวรัสที่ทำให้เกิดโรคหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำ โดยการให้กุ้งกินเนื้อกุ้งที่เป็นโรคแล้วเลี้ยงต่อไปด้วยอาหารทดลอง พบว่ากลุ่มของกุ้งที่ได้รับแอสตาแซนทินสังเคราะห์ 200 ppm มีความต้านทานต่อโรคหัวเหลืองได้ดีกว่าโดยพบการรอดสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างเห็นได้ชัด โดยพบการรอดที่ 58% และ 26% ตามลำดับ สอดคล้องกับการทดลองของ สมเกียรติ ปิยะธีรธิติวรกุล และ เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต (อ้างโดย Hunter, 1996) พบว่ากุ้งในกลุ่มที่ได้รับแอสตาแซนทินสังเคราะห์ 200 และ 400

ppm มีความต้านทานต่อเชื้อไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคหัวเหลืองและเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio alginolyticus* ที่ก่อให้เกิดโรคตายเดือน เมื่อได้รับเชื้อจากการกินเนื้อกุ้งที่เป็นโรค แต่จะไม่มีความต้านทานเมื่อได้รับเชื้อจากการฉีดเข้าไปโดยตรง และไม่มีผลต่อกุ้งที่เป็นโรคอยู่แล้ว ให้ผลเช่นเดียวกับ นิติ ชูเชิด (2538) ที่พบว่าแอสตาแซนทินสังเคราะห์ 50 ppm ไม่มีผลต่อความต้านทานของกุ้งที่ได้รับเชื้อ *V. alginolyticus* และ *V. parahaemolyticus* จากการฉีดเข้าไปโดยตรง

มะลิ บุญรัตผลิน และคณะ (2543) ได้ทดสอบผลของคาโรทีนอยด์จากแอสตาแซนทินสังเคราะห์ ต่อความสามารถในการสร้างภูมิคุ้มกัน และ ความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* ที่ก่อให้เกิดโรคเรืองแสงในกุ้งทะเล พบว่า กลุ่มกุ้งที่ได้รับแอสตาแซนทิน 25 - 150 ppm มีปริมาณเม็ดเลือดมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งแอสตาแซนทินอาจมีผลช่วยป้องกันเม็ดเลือดจากการเกิดอนุมูลอิสระซึ่งเป็นคุณสมบัติเด่นของคาโรทีนอยด์ และยังอาจมีส่วนช่วยในการสร้างเม็ดเลือด นอกจากนี้กลุ่มที่ได้รับแอสตาแซนทินปริมาณสูงยังมีแนวโน้มในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคเรืองแสง ได้ดีกว่าในกลุ่มควบคุม ซึ่งแสดงว่าคาโรทีนอยด์มีผลต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในด้านการกำจัดสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อโรคออกจากตัวกุ้ง จึงทำให้กุ้งที่ได้รับผลกระทบเรื่องโรคมีแนวโน้มของการรอดสูงกว่ากุ้งที่ไม่ได้รับคาโรทีนอยด์ในอาหาร

ผลของอาหารเสริมรงควัตถุคาโรทีนอยด์ต่อการเติบโตของกุ้งกุลาดำวัยอ่อน

จากการทดลองครั้งนี้คาโรทีนอยด์ในอาหารไม่มีผลต่อการเติบโตของกุ้งกุลาดำวัยอ่อนระยะซูเอีย ไมซิส และโพสลาวา เช่นเดียวกับผลการทดลองในกุ้งกุลาดำวัยรุ่น โดย Choosuwan (1991) พบว่าอาหารเสริมคาโรทีนอยด์สังเคราะห์แอสตาแซนทิน 25-100 ppm และแคนตาแซนทิน 50-200 ppm เป็นเวลา 2 เดือน มีผลการเติบโตที่ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม เช่นเดียวกับการทดลองของ มะลิ บุญรัตผลิน และคณะ (2543) พบว่าอาหารเสริมแอสตาแซนทินสังเคราะห์ 25-150 ppm ให้ผลการเติบโตของกุ้งกุลาดำไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ดีมีหลายงานวิจัยพบว่าคาโรทีนอยด์สังเคราะห์ มีผลดีต่อการเติบโตของกุ้งทะเลระยะวัยรุ่น โดย นิติ ชูเชิด (2538) พบว่ากุ้งกุลาดำวัยรุ่นที่ได้รับอาหารเสริมแอสตาแซนทินสังเคราะห์ 50 ppm 16 สัปดาห์ มีอัตราการเติบโตที่สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ เช่นเดียวกับการทดลองของ Negre-Sadargues et al. (1993) พบการเติบโตของกุ้ง *P. japonicus* ระยะวัยรุ่น ที่ได้รับแอสตาแซนทิน 50 ppm ผสมกับ แคนตาแซนทิน 50 ppm 4 สัปดาห์ ดีกว่ากลุ่มควบคุม และในทำนองเดียวกันกับ นิตยา ไชยเนตร (2538) พบว่ากุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารเสริมแอสตาแซนทินสังเคราะห์ 200 ppm 1 เดือน มีการเติบโตที่ดีกว่ากลุ่มควบคุม และแอสตาแซนทินจะส่งผลต่อการ

เติบโตมากขึ้นเมื่อเสริมด้วย โคลีน 600 ppm วิตามินซี 2,000 ppm และน้ำมันปลาทูนา 3 % ทั้งนี้ การเติบโตของกุ้งทะเลมีปัจจัยอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องเช่นความเค็ม อุณหภูมิ ซึ่งคาโรทีนอยด์อาจจะไม่มีผลโดยตรงต่อการเติบโตของกุ้ง แต่มีส่วนให้กุ้งมีสุขภาพที่ดี และช่วยลดความเครียด (Lastcha, 1990) ทำให้กุ้งมีการกินอาหารอย่างปกติ การเติบโตจึงดีขึ้น

มีหลายงานวิจัยที่พบว่า คาโรทีนอยด์จากธรรมชาติส่งผลดีต่อการรอดของกุ้งทะเล ดังการทดลองของ Darachai (1996) พบว่ากุ้งกุลาดำระยะโพสลาวา ที่ได้รับอาหารเสริมแอสตาแซนทิน 200 ppm จากสาหร่าย *H. pluvialis* มีการเติบโตสูงกว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับแอสตาแซนทินสังเคราะห์ 200 ppm อย่างมีนัยสำคัญ เนื่องจากแอสตาแซนทินในสาหร่ายอยู่ในรูปของ esterified form ที่พบละลายในไขมันบริเวณตับซึ่งกุ้งสามารถส่งไปใช้ยังส่วนต่าง ๆ ของร่างกายได้ทันที (Ghidalia, 1985) Latscha (1990) ยืนยันข้อสังเกตุนี้โดยพบว่ากุ้งกุลาดำสะสมแอสตาแซนทินในรูป esterified astaxanthin ถึง 85.7% มากกว่า free astaxanthin 14.3% และแอสตาแซนทินสังเคราะห์จะอยู่ในรูปของ free astaxanthin ทั้งหมด จากการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าคาโรทีนอยด์จากธรรมชาติส่งเสริมการเติบโตต่อกุ้งทะเลวัยอ่อนได้ดี มีผลที่คล้ายกันในกุ้งทะเลระยะวัยรุ่น โดย Chien and Jeng (1992) พบว่ากุ้ง *P. japonicus* ระยะวัยรุ่นในกลุ่มที่ได้รับอาหารเสริมสาหร่าย *Dunliella* sp. 1,000 ppm มีการเติบโตสูงกว่ากลุ่มที่ได้รับคาโรทีนอยด์สังเคราะห์ เบตาคาโรทีน 1,000 ppm ขณะที่การรอดไม่ต่างกัน สอดคล้องกับ ณรงค์ศักดิ์ พ่วงลาภ (2533) พบว่ากุ้งกุลาดำวัยรุ่นที่ได้รับอาหารเสริมสไปรูลินา 10 % 10 สัปดาห์ มีการเติบโตที่มากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ยังมีค่าการแลกเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อต่ำที่สุด ทำนองเดียวกันกับการทดลองในกุ้ง *P. japonicus* ระยะวัยรุ่น พบว่ากุ้งที่ได้รับอาหารเสริมสไปรูลินา 3 - 8 % มีการเติบโตดีกว่ากลุ่มที่ได้รับอาหารควบคุม (Cuzon et al.,1981) อาหารเสริม เบตาคาโรทีนสังเคราะห์ 100 ppm, อาหารเสริม Phaffia 12 % และอาหารเสริม krill oil 11 % อย่างมีนัยสำคัญ (Liao et al., 1993) ทั้งนี้เนื่องจากในสาหร่ายสไปรูลินาเป็นสาหร่ายที่มีเบตาคาโรทีนสูง และยังมีคาโรทีนอยด์อื่น ๆ ที่กุ้งสามารถสังเคราะห์และเก็บสะสมในร่างกายได้ นอกจากนี้สไปรูลินายังเป็นสาหร่ายที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง โดยมีโปรตีนสูงถึง 60 % กรดไขมันจำเป็น วิตามิน และแร่ธาตุ ที่มีประโยชน์ต่อสิ่งมีชีวิต (Hill, 1980) ซึ่งสรุปได้ว่าคาโรทีนอยด์จากธรรมชาติจะมีผลการเติบโตที่ดีต่อกุ้งทะเลทั้งระยะวัยอ่อนและระยะวัยรุ่น แต่แหล่งคาโรทีนอยด์สังเคราะห์นั้นจะมีผลไม่ชัดเจนต่อการเติบโตในกุ้งทะเลระยะวัยรุ่น

ผลของอาหารเสริมรงควัตถุคาโรทีนอยด์ต่อการสะสมแอสตาแซนทินของกุ้งกุลาดำวัยอ่อน

จากการทดลองครั้งนี้ได้ทำการทำการเปรียบเทียบปริมาณแอสตาแซนทินสะสมของกุ้งกุลาดำระยะโพสลาวา 18 ที่ได้จากการวิเคราะห์โดยใช้ HPLC ตามวิธีของ Weber (1990) พบว่าปริมาณแอสตาแซนทินสะสมไม่แตกต่างกัน ทั้งนี้น่าจะเป็นผลจากการสูญเสียคาโรทีนอยด์ของกุ้ง โดยการลอกคราบซึ่งที่เปลือกกุ้งกุลาดำวัยรุ่นมีปริมาณคาโรทีนอยด์ ประมาณ 66-68 % ของปริมาณคาโรทีนอยด์ทั้งหมด (ณรงค์ศักดิ์ พ่วงลาภ, 2533) ดังนั้นเมื่อกุ้งลอกคราบแต่ละครั้งทำให้สูญเสียคาโรทีนอยด์ส่วนใหญ่ไป ซึ่งกุ้งระยะโพสลาวานั้น เป็นกุ้งที่มีการลอกคราบทุก 24 ชั่วโมง จึงทำให้ปริมาณคาโรทีนอยด์สะสมในตัวมีปริมาณต่ำและไม่แตกต่างกันในทุกสูตรอาหาร เพราะกุ้งจะใช้คาโรทีนอยด์ที่ได้จากอาหารอย่างรวดเร็ว อย่างไรก็ดีจากการวิเคราะห์ด้วย HPLC ทำให้ปริมาณคาโรทีนอยด์ที่ได้นั้นแสดงเฉพาะค่าของ free-carotenoid ซึ่งในการทดลองครั้งนี้นำมาเปรียบเทียบเฉพาะค่าของ free-astaxanthin ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างกัน เช่นเดียวกับการทดลองของ Yamada et al. (1990) พบว่ากุ้ง *P. japonicus* ระยะวัยรุ่นที่ให้อาหารเสริมคาโรทีนอยด์สังเคราะห์ ปริมาณ 100 ppm ของแอสตาแซนทิน เบตาคาโรทีน และแคนตาแซนทิน พบว่าปริมาณของ free-sataxanthin ไม่แตกต่างกันกับกลุ่มควบคุม

ผลของอาหารเสริมคาโรทีนอยด์จากธรรมชาติต่อการสะสมคาโรทีนอยด์ในกุ้งทะเล จากการทดลองของ Darachai (1996) พบว่ากุ้งกุลาดำระยะโพสลาวา 15 ที่ได้รับอาหารเสริมแอสตาแซนทิน 200 ppm จากสาหร่าย *H. pluvialis* มีปริมาณคาโรทีนอยด์สะสมในตัวมากกว่ากลุ่มที่ได้รับอาหารเสริมแอสตาแซนทินสังเคราะห์ 200 ppm อย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ยังพบว่ากลุ่มที่ได้รับอาร์ทีเมียเป็นอาหารมีปริมาณคาโรทีนอยด์สะสมสูงที่สุด ทั้งนี้เนื่องจากอาร์ทีเมียมีคาโรทีนอยด์ที่หลากหลายซึ่งกุ้งสามารถสังเคราะห์และสะสมในตัวได้ดี สอดคล้องกับการทดลองในกุ้งทะเลระยะวัยรุ่นที่พบว่าแหล่งคาโรทีนอยด์จากธรรมชาติ มีผลต่อการสะสมสีบนตัวได้ดีกว่าหรือเท่ากับแหล่งคาโรทีนอยด์สังเคราะห์ จากการทดลองของ Tanaka et al. (1976) พบว่ากุ้ง *P. japonicus* ที่ได้รับอาหารเสริมคาโรทีนอยด์จากสไปรูลินา 10 % มีปริมาณแอสตาแซนทินสะสมในตัวสูงกว่ากลุ่มที่ได้รับแคนตาแซนทินสังเคราะห์ 3 % ซึ่งแสดงให้เห็นว่ากุ้งสามารถเปลี่ยนคาโรทีนอยด์จากสไปรูลินา เช่น เบตาคาโรทีน และ ซีเอแซนทิน เป็นต้น ให้อยู่ในรูปแอสตาแซนทิน สะสมในร่างกายได้ ซึ่งจะเห็นว่าแซนโทฟิลที่พบในสไปรูลินา ได้แก่ คริบโตแซนทิน เอคไคนีโนน ซีเอแซนทิน ลูทิน และ ยูกลีนาโนน ไม่พบสะสมในกุ้ง แสดงว่ากุ้งสามารถเปลี่ยนแซนโทฟิลเหล่านี้ให้อยู่ในรูปของแอสตาแซนทินได้ เช่นเดียวกับการทดลองของ Liao et al. (1993)

ที่พบว่าแหล่ง คาโรทีนอยด์จากสไปรูลินา 3% ให้ผลการสะสมคาโรทีนอยด์ในกุ้ง *P. japonicus* สูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับแหล่งคาโรทีนอยด์อื่น ๆ ได้แก่ เบตาคาโรทีนสังเคราะห์ 100 ppm Phaffia 12% และ Krill oil 11% นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้สไปรูลินาเพื่อเป็นแหล่งคาโรทีนอยด์ในอาหารกุ้งทะเลวัยรุ่นที่ระดับต่าง ๆ พบว่าการเสริมสไปรูลินาที่ระดับ 8 - 10 % ให้ผลดีต่อการสร้างเม็ดสีบนตัวกุ้ง และปริมาณคาโรทีนอยด์สะสม แต่ไม่ได้มีการเปรียบเทียบกับแหล่งคาโรทีนอยด์สังเคราะห์ (ณรงค์ศักดิ์ พ่วงลาภ, 2533; สุกิจ รัตนวนิจกุล และ พูนสิน พานิชสุข, 2538; Cuzon et al., 1981) การที่สไปรูลินาสามารถเป็นแหล่งคาโรทีนอยด์ที่ดีในอาหารกุ้งทะเลนั้น เนื่องจากสไปรูลินามีคาโรทีนอยด์หลายชนิด และมีปริมาณสูงถึง 4,000 ppm นอกจากนี้ยังเป็นคาโรทีนอยด์ที่มีโครงสร้างโมเลกุล 2 รูปแบบ *cis-trans* รวมทั้งมีเบตาคาโรทีน (9-cis-betacarotene) ที่พบทั่วไปในธรรมชาติ จึงไม่มีสารที่เป็นอันตราย และกุ้งสามารถนำไปใช้ได้ทันที แต่อย่างไรก็ดีคาโรทีนอยด์สังเคราะห์ก็ยังเป็นประโยชน์ต่อการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล โดยแอสตาแซนทินเป็นคาโรทีนอยด์ที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุด โดย Chien and Jeng (1992) และ Yamada et al. (1990) พบว่าแอสตาแซนทิน มีประสิทธิภาพในการสะสมในเนื้อเยื่อกุ้งได้ดีกว่า เบตาคาโรทีน แคนตาแซนทิน และสาหร่าย *Dunaliella* sp. ที่ให้ในปริมาณที่เท่ากัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 6
สรุปผลการวิจัย

1. จากการทดลองพบว่าคาโรทีนอยด์จากธรรมชาติ สาหร่ายสไปรูลินา และจากสารสังเคราะห์แอสตาแซนทิน ไม่มีผลต่อ การรอด การเติบโต และปริมาณแอสตาแซนทินสะสม (free-astaxanthin) ของกุ้งกุลาดำวัยอ่อน ระยะซูเอีย ไมซิส และโพสลาวา 3-18

2. อาหารเสริมสาหร่ายสไปรูลินามีแนวโน้มที่ดีต่อการรอดและการเติบโตของกุ้งกุลาดำวัยอ่อนทุกระยะ อาหารเสริมแอสตาแซนทินสังเคราะห์มีผลค่อนข้างลบต่อการรอดของกุ้งกุลาดำวัยอ่อนโดยเฉพาะระยะซูเอีย และไมซิส

ข้อเสนอแนะ

1. ควรเลือกใช้วิธี spectrophotometer ในการวิเคราะห์คาโรทีนอยด์ที่มีแหล่งรงควัตถุจากธรรมชาติ และควรมีการวิเคราะห์ปริมาณคาโรทีนอยด์เริ่มต้นของสัตว์ทดลอง เพื่อเปรียบเทียบปริมาณคาโรทีนอยด์ที่กุ้งสะสมได้

2. อาหารที่ใช้ทดลองเพื่อศึกษาผลของรงควัตถุที่มีความเสถียรต่ำ ควรมีการป้องกันการถูกทำลาย และเติมด้วยสารป้องกันการเกิดออกซิเดชัน รวมทั้งควรระมัดระวังทุกขั้นตอนในการเก็บรักษาอาหาร และขั้นตอนในการสกัดคาโรทีนอยด์ จากแสง ความร้อน ออกซิเจน ความชื้น และ กรด-เบส

3. อาหารทดลองไม่ควรเก็บไว้นานเกินไป หรือควรทำอาหารใหม่ทุก 2 เดือน เพื่อป้องกันการสูญเสียคาโรทีนอยด์ในอาหาร

4. ควรทำการทดสอบความทนต่อสภาวะที่ก่อให้เกิดความเครียดของกุ้งวัยอ่อน เช่น การเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วของ ความเค็ม อุณหภูมิ ปริมาณออกซิเจน แอมโมเนีย ไนไตรท์ เป็นต้น เนื่องจากคาโรทีนอยด์เป็นสารอาหารปริมาณน้อยที่ใช้เสริมในอาหารลดความเครียด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5. ควรทำการทดลองในโรงเพาะฟักจริงที่มีการผลิตลูกกุ้งในปริมาณมาก เพื่อให้เกิดสภาพแวดล้อมจริงในการอนุบาล เนื่องจากในการทดลองใช้ถังขนาดเล็กในการอนุบาลซึ่งมีการแปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำอย่างรวดเร็ว เช่น อุณหภูมิ สารอินทรีย์ แอมโมเนีย ไนไตรท์ ไนเตรท เป็นต้น

6. ควรมีการทดลองอนุบาลลูกกุ้งอย่างต่อเนื่อง โดยใช้อาหารทดลองอนุบาลตั้งแต่ระยะซูเอีย 1 จนถึงระยะโพสลาวา 15 เพื่อให้กุ้งได้รับอาหารเสริมคาโรทีนอยด์เป็นเวลานานขึ้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กรมประมง. 2536. การเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย.

กาญจนภาชน์ ลิ่วมโนมนต์. 2527. สาหร่าย. คณะประมง, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ : กรุงเทพมหานคร.

ชะลอ ลิ้มสุวรรณ. 2534. คัมภีร์การเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. กรุงเทพมหานคร : ฐานเศรษฐกิจ.

โชติ สหกิจรุ่งเรือง. 2533. ผลของการใช้อาหารชนิดต่าง ๆ ที่มีต่อคุณสมบัติบางประการของน้ำและอัตรารอดตายของลูกกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* Fabricius). วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์การประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ณรงค์ศักดิ์ พ่วงลาภ. 2533. การใช้สาหร่ายสไปรูลินาเป็นแหล่งรงควัตถุคาโรทีนอยด์สำหรับผสมอาหารเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* Fabricius). วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นิตยา ไชยเนตร. 2538. การเสริมแอสตาแซนทิน, วิตามินซี และน้ำมันปลา ในอาหารเพื่อเพิ่มความต้านทานโรคหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำวัยรุ่น. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีทางชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

นิติ ชูเชิด. 2538. ผลของสารแอสตาแซนทินต่ออัตราการเจริญเติบโต การรอดตาย และความทนทานต่อเชื้อแบคทีเรียของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในสภาพความเค็มต่ำ. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

บุษยา อภิชัยเสถียรโชติ. 2534. การเพาะเลี้ยงสาหร่ายเกลียวทองเพื่อใช้เป็นอาหารสำหรับกุ้งกุลาดำวัยอ่อน. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

มะลิ บุณยรัตผลิน, กิจการ ศุภมาตย์ และ ชูศักดิ์ บริสุทธิ์. 2543. ระบบภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำ : VIII. ผลของสารสี (astaxanthin) ต่อการเจริญเติบโต องค์ประกอบเลือด ระบบภูมิคุ้มกันโรคและความต้านทานโรคในกุ้งกุลาดำ. วารสารสงขลานครินทร์ วทท. 22 (ฉบับพิเศษ) : 633-639.

วารินทร์ ธนาสมหวัง, ทวีชัย สุไพรวัลย์ และสมประสงค์ ขันถม. 2538. แบคทีเรียฟลอราของลูกกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*). ศูนย์พัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งสมุทรสาคร, กองเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง : กรมประมง.

สมประสงค์ ขันถม, บัวคำ ลิ้มสุรัตน์ และ วิชัย ชัยชนะกสิกรรม. 2543. เปรียบเทียบการอนุบาลลูกกุ้งกุลาดำโดยใช้อาร์ทีเมียและไรแดงน้ำจืดเป็นอาหาร. เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 1/2543, กรมประมง.

สรวิศ เผ่าทองศุข. 2543. ศักยภาพการวิจัยและพัฒนาเพื่อการใช้ประโยชน์จากสาหร่ายในประเทศไทย. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ โครงการประมวลสถานภาพองค์ความรู้ : สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย.

สุกิจ รัตนวินิจกุล และ พูนสิน พานิชสุข. 2538. ผลการเสริมสไปรูลินาและดอกดาวเรืองในอาหารต่อสีของกุ้งกุลาดำ. เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 3/2538 กองเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง กรมประมง.

สุพิศ ทองรอด, อนันต์ ตันสุตะพานิช, ธนัญช์ สังกรธนกิจ และปราณี สระบัว. 2538ก . การศึกษาเบื้องต้นในการอนุบาลกุ้งกุลาดำวัยอ่อนระยะ Nauplius ถึง Mysis-3 ด้วยอาหารสำเร็จเสริมน้ำมันปลา และเปรียบเทียบกับอาหารมีชีวิต. วารสารการประมง 48(3) : 241-248.

สุพิศ ทองรอด, อนันต์ ตันสุตะพานิช, มะลิ บุณยรัตผลิน และ ธีรวัฒน์ จริตงาม. 2538ข. การเปรียบเทียบการเจริญเติบโต, อัตรารอด และความเครียดของลูกกุ้งกุลาดำที่อนุบาลด้วยอาหารผงสำเร็จชนิดต่าง ๆ . วารสารการประมง 48(3) : 249-254.

อดุลย์ แมเร๊าะ. 2542. การอนุบาลลูกกุ้งกุลาดำระยะโพสลาวา โดยใช้อาหารต่างชนิด. เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 6/2542 : กรมประมง.

ภาษาอังกฤษ

Association of Official Analytical Chemists. 1980. Official methods analysis. 13th ed. Washington, D.C. : Association of Official Analytical Chemists.

Bauernfeind, J.C. 1981. Carotenoids as Colorants and Vitamin A Precursers. New York : Academic Press.

Bold, H.C. and Wynne, M.J. 1985. Introduction to the Algae : Structure and Reproduction. 2nd edition. New Jersey : Prentice-Hall.

Boyd, C.E. and Tucker, C.S. 1992. Water quality and pond soli analysis for aquaculture. Alabama : Auburn University.

Boussiba, S. and Vonshak, A. 1991. Astaxanthin accumulation in the green algae *Haematococcus pluvialis*. Plant Cell Physiol. 32 (7) : 1077-1082.

Cao, S. and Xiang, B. 1992. Experimental studies on *Spirulina platensis* as food for mysis of *Penaeus orientalis*. Marine Science bulletin/Haiyang Tongbao vol. 11, no. 1 : 28-31.

Chen, J.C. and Chin, T.S. 1988. Acue toxicity of nitrite to tiger prawn, *Penaeus monodon*, Larvae. Aquaculture 69: 253-262.

Cheng, J.H. and Liao, I.C. 1986. The effect of salinity on the osmotic and ionic concentration in the haemolymp of *Penaeus monodon* and *Penaeus penicillatus*. The first Asian Fisheries Forum. Manila Philipines.

Chien,Y. H. and Jeng, S. C. 1992. Pigmenttation of Kuruma prawn, *Penaeus japonicus* Bate, by various pigment sources and levels and Feeding regimes. Aquaculture V.102(4) : 333-346.

Choosuwan, J. 1991. Effect of astaxanthin on coloration and maturation of giant tiger prawn (*Penaeus monodon* Fabricius). Thesis of Master Degree Dept of Marine science Chulalongkorn University.

Ciferri, O. 1983. Spirulina the Edible Microorganism. Microbiological Review 47(4) : 551-578.

Cuzon, G., Dos Santos, R., Hew, M., and Poullaouec, G. 1981. Use of Spirulina in Shrimp (*Penaeus japonicus*) diet. J. World Maricult. Soc. vol.12, no. 2 : 282-291

Darachai, J. 1996. Effect of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* NIES144 on growth of *Penaeus monodon* larvae. Thesis of Master Degree Dept of Biotechnology Chulalongkorn University.

Dawes, G. 1981. Marine Botany. New York : John Wiley and Sons.

Ghidalia, W. 1985. Structural and Biological Aspects of Pigment. In D.E. bliss and L.H. mentel (Editors) The Biological of Crustacae. Vol 9, Integument, Pigment and Hormonal Processes. London : Academic Press.

Goodwin, T.W. 1951. Carotenoids in Fish. New York : Chem. Publ. Co., Inc.

Goodwin, T.W. 1980. The Biochemistry of the carotenoids Vol 1 Plants. 2nd ed. London and New York : Chapman and Hall.

Goodwin, T.W. 1984. The Biochemistry of the carotenoids Volume 2 Animals. London : Chapman and Hal.

Goodwin, T.W. and Jamikorn, M. 1954. Studies in carotenogenesis 2. Carotenoid synthesis in the alga *Haematococcus pluvialis*. Biochem 57:376-380.

Greenberg, D.M. 1986. Metabolic Pathways. New York : Academic Press.

Gu, T., Zhang, H., Zhang, J. and Zhang, F. 1989. The use of *Spirulina platensis* as a feed for prawn larvae. MAR. SCI./HAIYANG KEXUE No3 : 48-51 .

Hill, C. 1980. The Secret of Spirulina. California : University of The Trees.

Hunter, B. 1996. รายงานการค้นคว้าล่าสุดของแอสตาแซนทิน. Roche Aquaculture News V.6-N.1(1996) : 3.

Johnson, E. A. and An, G. H. 1991. Astaxanthin from microbial sources. Critical Reviews in Biotechnology 11(4) : 297-326.

Jones, D. A., Kurmaly, K., and Arshard, A. 1987. Penaeid shrimp hatchery trials using microencapsulated diets. Aquaculture 64 : 133-142.

Kakizono, T., Kobayashi, M. and Nagai, S. 1992. Effect of carbon/nitrogen ratio on encystment accompanied with astaxanthin formation in a green alga, Haematococcus pluvialis. Fermentation and Bioengineering 74 (6) : 403-405.

Kanazawa, A., Teshima, S. and Sakamoto, M. 1985. Effects of dietary lipids, fatty acid, and phospholipids on growth and survival of prawn (*Penaeus japonicus*) Larvae. Aquaculture 50: 39-49.

Kangvankij, P. 1976. Early davelopment stage of jumbo tiger shrimp *Penaeus monodon* (Fabricus). Phuket Mar. Fish contrib No. 6: 24.

Katayama, T., Hirata, K. and Chichester, C.O. 1971. The Biosynthesis of astaxanthin-IV. The Caroteniods in the prawn, *Penaeus japonicus* Bate (Part 1). Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 37(7) : 614-620.

Kobayashi, M., Kakisono, T., Nishio, N. and Nagai, S. 1992. Effect of Light Intensity, light quality and illumination cycle on astaxantihn formation in a green alga, Haematococcus pluvialis. Fermentation and Bioengineering 74(1) : 61-63.

Kurmaly, K., Jones, D.A., Yule, A.B. and East, J. 1989. Comparative Analysis of Growth and Survival of Penaeus monodon (Fabricius) Larvae from Protozoae 1 to Postlava 1, on Live Feeds, Artificial Diets and on Combinations of both. Aquaculture 81: 27-45.

Latscha, T. 1990. Carotenoids in Aquatic animal Nutrition. Roche publication No. 2175 (in press) : 68-79.

Liao, W. L., Nur-E-Borhan, S. A., Okada, S., Matsui, T., and Yamaguchi, K. 1993. Pigmentation of cultured black tiger prawn by feeding with a *Spirulina*-supplemented diet. Nippon Suisan Gakkaishi 59 : 165-169.

Lim, C., Suraniranat, P. and Platon, R. 1978. A preliminary study on the evaluation of casein, shrimp meal, squid meal and spirulina as protein sources of *Penaeus monodon* (Fabricius) postlarvae. Q. Res. Rep. Aquaculture Dep. Southeast Asian Fish. Dev. Cent. 2(2) : 13-18.

Motoh, H. 1979. Larvae of Decapod Crustacea of the Philippines III. Larval development of the giant tiger prawn *Penaeus monodon* reared in the laboratory. Bull. Jpn. Soc. Soi. Fish. 45(10) : 1201-1216.

Nakamura, H. 1982. Spirulina: Food for a Hungry World. A Pioneer's Story. California : University of the Tress Press.

Negre-Sadargues, G., Castillo, R., Petit, H., Sance, S., Martinez, R.G., Milicua, J.G., Choubert, G. and Trilles, J.P. 1993. Utilization of synthetic carotenoids by the prawn *Penaeus japonicus* reared under laboratory conditions. Aquaculture 110 :151-159.

Paibulkichakul, C., Piyatiratitivorakul, S., Kittakoop, P., Viyakarn, V. Fast, A.W. and Menasaveta, P. 1998. Optimal diets levels of lecithin and cholesterol for black tiger prawn *Penaeus monodon* larvae and postlarvae. Aquaculture 167 : 273-281.

Richmond, A.E. 1986. Microalgaculture. CRC. Critical Reviews. In Biotechnology 4 : 369-438.

Shiedt, K., Bischof, S. and Gling, E. 1993. Metabolism of carotenoids and in vivo racemization of (3S,3'S)-astaxanthin in the crustacean penaeus. Methods in Enzymology vol 14. Academic Press Inc.

Sutjaritvongsanon, S. 1984. Rearing of larvae stages of prawn, *Penaeus japonicus* Bate, using micro-particulated Diets. Thai Fisheries GaZette 37(3) : 243-248.

Tanaka, Y., Matsugushi, H., Katayama, T., Simpson, K. L., and Chichester, C. O. 1976. The Biosynthesis of Astaxanthin-XVIII. The Metabolism of the Carotenoids in the Prawn *Penaeus japonicus* Bate. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 42(2) : 197-202.

Thongrod, S., Tansutapanich, A., and Torrissen, O.J. 1995. Effect of dietary astaxanthin supplementation on accumulation, survival and growth in postlarvae *of Penaeus monodon* Fabricius. In LARVI'95-Fish & Shellfish Larviculture Symposium, Lavens, P., Jaspers, E., and Roelants, I. (Eds). European Aquaculture Society, Speacial Publication No. 24, Belgium.1995 : 251-254.

Venkataraman, L.V. 1983. A Monograph on *Spirulina platensis*. Mysore : CFIRI Press.

Webber, S. 1990. Determination of added stabilized astaxanthin in fish feeds and premix with HPLC. Roche-publication Index No. 2101, 59-61.

Yamada, S., Tanaka, Y., Sameshima, M. and Ito, Y. 1990. Pigmentation of prawn (*Penaeus japonicus*) with carotenoids 1. Effect of Dietary astaxanthin, B-carotene and cantaxanthin on pigmentation. Aquaculture 87 : 323-330.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

วิธีวิเคราะห์อาหารแบบ proximate analysis (AOAC, 1980)

1. **การวิเคราะห์เถ้าในอาหารสัตว์**

<u>อุปกรณ์</u>

1. เตาเผาความร้อนสูง (Carbolite, model EML 11/2 serial no. 11/86/1468, Bandford, Sheffield, England)
2. โหลดูดความชื้น (Desicator)

<u>วิธีวิเคราะห์</u>

1. เผาถ้วยกระเบื้อง (porcelain crucible) ในเตาเผาความร้อนสูงที่อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นย้ายถ้วยกระเบื้องจากเตาเผาไปไว้ที่โหลดูดความชื้นทิ้งไว้ให้เย็น นำไปชั่งหาน้ำหนักที่แน่นอน

2. ชั่งตัวอย่างอาหารแห้งประมาณ 2-3 กรัม ใส่ลงในถ้วยกระเบื้องที่ทราบน้ำหนักแล้ว นำไปเผาในตู้ดูดควันบน hot plate จนหมดควันก่อนแล้วจึงนำไปเผาในเตาเผาความร้อนสูงที่อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส ประมาณ 3-4 ชั่วโมง

3. นำถ้วยกระเบื้องออกจากเตาเผาทิ้งไว้ให้เย็นในโหลดูดความชื้นแล้วชั่งน้ำหนักของถ้วยกระเบื้องโดยละเอียด

4. วิธีคำนวณ

เปอร์เซ็นต์เถ้าทั้งหมดในอาหาร = (b – a)/w X 100

a = น้ำหนักของถ้วยกระเบื้อง (กรัม)

b = น้ำหนักของถ้วยกระเบื้องรวมกับน้ำหนักของเถ้าหลังการเผา (กรัม)

w = น้ำหนักของตัวอย่างอาหารที่ใช้ในการวิเคราะห์ (กรัม)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. การวิเคราะห์ไขมันในอาหารสัตว์

อุปกรณ์

1. เครื่องสกัดไขมัน Soxtherm automatic S-11, Gerhardt
2. โหลดูดความชื้น (desicator)

วิธีวิเคราะห์

1. นำบีกเกอร์ปากกลมสำหรับเครื่องสกัดไขมันมาอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโหลดูดความชื้น และนำออกมาชั่งให้ได้น้ำหนักคงที่
2. ชั่งตัวอย่างอาหารประมาณ 2 กรัมห่อด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1
3. ใส่ตัวอย่างที่ห่อแล้วลงใน thimble แล้วใส่ thimble ลงในขวดสกัดไขมัน เติม petroleum ether ประมาณ 75 มิลลิลิตร ลงไปในขวดสกัดไขมัน (ระวังอย่าให้ thimble แช่อยู่ใน petroleum ether)
4. นำขวดสกัดไขมันจากข้อ 3 ไปประกอบกับเครื่อง soxtherm automatic โดยเปิดเครื่องสกัดไขมัน เปิดสวิทช์ของ oil bate ตั้งอุณหภูมิที่ 150°C เปิดสวิทช์ของ pressure control pump เปิด cooler ให้น้ำไหลเวียนเข้า condenser ของเครื่อง soxtherm automatic
5. เลื่อนคันโยกที่เครื่อง soxtherm automatic มายังตำแหน่งที่จะให้เกิดการ reflex กลับของ petroleum ether ปล่อยให้เกิดการสกัดเป็นเวลา 6 ชั่วโมง
6. หลังจากนั้นทำการระเหย petroleum ether ออกจากไขมันที่สกัดได้แล้วอบขวดสกัดไขมันในตู้อบที่ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโหลดูดความชื้น
7. เมื่อขวดสกัดไขมันเย็นแล้วนำไปชั่งน้ำหนักละเอียดเพื่อคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ไขมันในอาหารตามสูตรต่อไปนี้

เปอร์เซ็นต์ไขมัน = (b – a)/w X 100

a = น้ำหนักบีกเกอร์ก่อนการสกัดไขมัน (กรัม)

b = น้ำหนักบีกเกอร์หลังการสกัดไขมัน (กรัม)

w = นำหนักอาหาร (กรัม)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. การวิเคราะห์โปรตีนในอาหารสัตว์

<u>อุปกรณ์</u>

1. VELP digestion unit
2. VELP vapodest 1

<u>สารเคมี</u>

1. สารละลายกรด H_2SO_4 เข้มข้น 98%
2. สารละลายกรด H_2SO_4 เข้มข้น 0.5 N
3. สารละลาย NaOH เข้มข้น 50%
4. สารละลายกรด Boric เข้มข้น 4%
5. catalyst ชนิดเม็ด ประกอบด้วย K_2SO_4 3.5 กรัม และ Se 0.0035 กรัม
6. indicator ประกอบด้วย methyl red 0.625 กรัม และ methyllene blue 0.480 กรัม ละลายใน ethyl alcohol (50 ml, 95% v/v)

<u>วิธีวิเคราะห์</u>

1. ชั่งตัวอย่างอาหารแห้งมา 2 กรัม ใส่ลงในหลอดย่อย และเติม catalyst 2 เม็ด
2. เติมสารละลายกรด H_2SO_4 เข้มข้น 98% 25 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดย่อย

3. นำหลอดย่อยไปใส่ในเครื่อง VELP digestion unit พร้อมทั้งประกอบท่อดูดควันระบบสูญญากาศ ตั้งเวลาและอุณหภูมิโดยการย่อยครั้งแรกที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส 15 นาที, 250 องศาเซลเซียส 30 นาที, 380 องศาเซลเซียส 60 นาที และ 420 องศาเซลเซียส 15 นาที

4. จนได้สารละลายสีเหลืองใส แล้วทิ้งให้หลอดย่อยเย็นที่อุณหภูมิห้อง

5. กลั่นตัวอย่างที่ย่อยแล้วด้วยเครื่อง VELP vapodest 1 โดยใส่หลอดย่อยที่ช่องใส่ เติมน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร และเติมสารละลาย NaOH เข้มข้น 50% ประมาณ 50 มิลลิลิตร หรือจนกว่าจะได้สารละลายสีดำ ที่ปลายหลอดนำก๊าซใส่ฟลาสขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มีสารละลายกรดบอริก 4 เปอร์เซ็นต์ 75 มิลลิลิตร และหยดด้วย indicator 2-3 หยด จะได้สารละลายสีชมพู เมื่อทำการกลั่นจะได้สารละลายสีเขียวใส กลั่นจนมีสารละลายเพิ่มเป็น 300 มิลลิลิตร

6. ไตเตรตสารละลายที่ได้ด้วยสารละลายกรด H_2SO_4 เข้มข้น 0.5 N จนได้สารละลายสีชมพู บันทึกปริมาณกรดที่ใช้

7. คำนวณ

$$\text{เปอร์เซนต์โปรตีน} = (a \times b \times 6.25 \times 1.4) / w$$

เมื่อ a = ความเข้มข้นของกรด H_2SO_4 ในกรณีนี้คือ 0.5 N b = ปริมาณกรด ที่ใช้ ไตเตรต (มิลลิลิตร) และ w = น้ำหนักตัวอย่างเป็นกรัม

4. การวิเคราะห์ความชื้นในอาหารสัตว์

<u>อุปกรณ์</u>

1. ตู้อบแห้ง (hot air oven)
2. โหลดูดความชื้น
3. ถ้วยกระเบื้อง

<u>วิธีการ</u>

1. อบถ้วยกระเบื้องที่ 120 องศาเซลเซียส ในตู้อบแห้งเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโหลดูดความชื้น และชั่งน้ำหนักอย่างละเอียด
2. ชั่งน้ำหนักตัวอย่างใส่ในถ้วยกระเบื้องประมาณ 1-2 กรัม
3. นำถ้วยกระเบื้องจากข้อ 2 ไปอบที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส 4 ชั่วโมง
4. นำถ้วยกระเบื้องออกจากตู้อบ ทิ้งให้เย็นในโหลดูดความชื้นแล้วชั่งน้ำหนักอย่างละเอียด
5. ทำซ้ำกับข้อ 3 จนได้น้ำหนักที่คงที่ แสดงว่าน้ำระเหยออกจากตัวอย่างหมดแล้ว
6. การคำนวณ

เปอร์เซนต์ความชื้น = (a-b)/w X 100

เมื่อ a = น้ำหนักถ้วยกระเบื้องและตัวอย่างก่อนอบ, b = น้ำหนักถ้วยกระเบื้องและตัวอย่างหลังอบ และ w = น้ำหนักตัวอย่างอาหารที่ใช้วิเคราะห์

5. การวิเคราะห์เยื่อใยในอาหารสัตว์

<u>อุปกรณ์</u>

1. crude fiber digestion apparatus ประกอบด้วย digestion beaker, condensor
2. กระดาษกรอง Ashless (Whatman no. 41)
3. ถ้วยกระเบื้อง
4. โหลดูดความชื้น
5. เตาเผาความร้อนสูง (muffle furnace)
6. กรวยกรอง (funnel)

7. กระดาษลิตมัส

<u>สารเคมี</u>

1. สารละลายกรด H_2SO_4 เข้มข้น 0.255 N
2. สารละลาย NaOH เข้มข้น 0.313 N
3. 95 % ethyl alcohol

<u>วิธีการ</u>

1. นำตัวอย่างที่สกัดไขมันแล้วประมาณ 1-2 กรัม (ทราบน้ำหนักอย่างละเอียด) ใส่ในบีกเกอร์ปากเรียบขนาด 600 มิลลิลิตร (digestion beaker) เติม สารละลายกรด H_2SO_4 เข้มข้น 0.255 N 200 มิลลิลิตร ต่อ condensor เข้ากับบีกเกอร์เพื่อรักษาความเข้มข้นของกรดให้คงที่ เปิดฮีทเตอร์ให้ความร้อนจนกรดเดือด ทิ้งไว้ 30 นาที

2. อบกระดาษกรองและถ้วยกระเบื้อง ทิ้งให้เย็นในโหลดูดความชื้น แล้วชั่งหาน้ำหนักคงที่

3. กรองสารละลายที่ได้จากข้อ 1 ด้วยกระดาษกรองจากข้อ 2 จนหมด ใช้น้ำกลั่นล้างตะกอนจนตะกอนมีสภาพเป็นกลาง ทดสอบด้วยกระดาษลิตมัส

4. นำตะกอนไปใส่ในบีกเกอร์เช่นเดียวกับข้อ 1 แต่เปลี่ยนสารละลายเป็น NaOH เข้มข้น 0.313 N 200 มิลลิลิตร ต้มให้เดือดทิ้งไว้ 30 นาที

5. กรองตะกอนจากข้อ 4 ด้วยกระดาษกรองแผ่นเดิม ล้างตัวอย่างจนเป็นกลางแล้วล้างด้วย 95 % ethyl alcohol 15 มิลลิลิตร นำตัวอย่างที่ได้พร้อมกระดาษกรองไปอบให้แห้งที่ 120 องศาเซลเซียส เพื่อหาน้ำหนักตะกอน

6. นำตะกอนพร้อมกระดาษกรองไปเผาในเตาเผาที่ 600 องศาเซลเซียส 3 ชั่วโมง เพื่อหาน้ำหนักเถ้า แล้วนำไปคำนวณ

7. การคำนวณ

เปอร์เซนต์เยื่อใย = $[(a+b) - (b-c)] / w \times 100$

เมื่อ a = น้ำหนักตะกอนเป็นกรัม, b = น้ำหนักกระดาษกรอง, c = น้ำหนักเถ้า และ w = น้ำหนักตัวอย่างอาหาร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

ตารางที่ 12. คุณภาพน้ำที่สัตว์น้ำสามารถดำรงอยู่ได้อย่างปกติ

ค่าคุณภาพน้ำ	ช่วงที่เหมาะสม	แหล่งที่มา
อุณหภูมิ	25 – 30	Boyd and Tucker (1992)
(องศาเซลเซียส)	25 – 30	กรมประมง (2536)
ความเค็ม (ppt)	23 – 25	Cheng and Laio (1986)
	15 – 25	กรมประมง (2534)
	15 – 30	Boyd and Tucker (1992)
ความเป็นกรด – ด่าง	7 – 9	Boyd and Tucker (1992)
	7.5 – 8.5	ชลอ ลิ้มสุวรรณ (2534)
	7.5 – 8.5	กรมประมง (2534)
ออกซิเจนละลายน้ำ	$\geq$ 3.5 - อิ่มตัว	Boyd and Tucker (1992)
(ppm)	5 – 7.5	กรมประมง (2534)
แอมโมเนีย (mg/l)	0.4 – 2.0	Boyd and Tucker (1992)
	0.4 – 2.0	กรมประมง (2534)
ไนไตรท์ (ppm)	0.1-1.0	Chen and Chin (1988)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

1. การวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบการรอดของกุ้งระยะซูเอีย ทางสถิติ

Analysis of Variance Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
TRT	4	1 2 3 4

Number of observations in data set = 24

Analysis of Variance Procedure

Dependent Variable: ZSUR

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	3	1402.571300	467.523767	1.78	0.1840
Error	20	5263.443300	263.172165		
Corrected Total	23	6666.014600			

R-Square	C.V.	Root MSE	ZSUR Mean
0.210406	25.34580	16.22258	64.0050000

Analysis of Variance Procedure

Dependent Variable: ZSUR

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	3	1402.571300	467.523767	1.78	0.1840

Analysis of Variance Procedure

Duncan's Multiple Range Test for variable: ZSUR

NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate

Alpha= 0.05 df= 20 MSE= 263.1722

Number of Means	2	3	4
Critical Range	19.51	20.49	21.17

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	TRT
A	70.538	6	4
A			
A	69.688	6	3

Analysis of Variance Procedure

Duncan Grouping	Mean	N	TRT
A			
A	64.383	6	1
A			
A	51.410	6	2

2. การวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบการรอดของกุ้งระยะไมซิส ทางสถิติ

Analysis of Variance Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
TRT	4	1 2 3 4

Number of observations in data set = 12

Analysis of Variance Procedure

Dependent Variable: MSUR

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	3	510.4358917	170.1452972	1.72	0.2405
Error	8	793.0706000	99.1338250		
Corrected Total	11	1303.5064917			

R-Square	C.V.	Root MSE	MSUR Mean
0.391587	20.83224	9.956597	47.7941667

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Analysis of Variance Procedure

Dependent Variable: MSUR

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	3	510.4358917	170.1452972	1.72	0.2405

Analysis of Variance Procedure

Duncan's Multiple Range Test for variable: MSUR

NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate

Alpha= 0.05 df= 8 MSE= 99.13382

Number of Means 2 3 4

Critical Range 18.72 19.52 19.99

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	TRT
A	57.007	3	4
A			
A	50.617	3	3

Analysis of Variance Procedure

Duncan Grouping	Mean	N	TRT
A			
A	43.340	3	1
A			
A	40.213	3	2

3. การวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบการรอดของกุ้งระยะโพสลาวา ทางสถิติ

Analysis of Variance Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
TRT	4	1 2 3 4

Number of observations in data set = 24

Analysis of Variance Procedure

Dependent Variable: PSUR

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	3	850.1220833	283.3740278	1.05	0.3941
Error	20	5420.7225000	271.0361250		
Corrected Total	23	6270.8445833			

R-Square	C.V.	Root MSE	PSUR Mean
0.135567	32.74353	16.46317	50.2791667

Analysis of Variance Procedure

Dependent Variable: PSUR

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	3	850.1220833	283.3740278	1.05	0.3941

Analysis of Variance Procedure

Duncan's Multiple Range Test for variable: PSUR

NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate

Alpha= 0.05 df= 20 MSE= 271.0361

Number of Means 2 3 4

Critical Range 19.80 20.79 21.48

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	TRT
A	59.617	6	3
A			
A	50.992	6	1

Analysis of Variance Procedure

Duncan Grouping	Mean	N	TRT
A			
A	46.575	6	4
A			
A	43.933	6	2

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. การวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบการเติบโตของกุ้งระยะซูเอีย ทางสถิติ

Analysis of Variance Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
TRT	4	1 2 3 4

Number of observations in data set = 12

Analysis of Variance Procedure

Dependent Variable: Z_GI

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	3	0.03519225	0.01173075	1.89	0.2103
Error	8	0.04975267	0.00621908		
Corrected Total	11	0.08494492			

R-Square	C.V.	Root MSE	Z_GI Mean
0.414295	3.143236	0.078861	2.50891667

Analysis of Variance Procedure

Dependent Variable: Z_GI

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	3	0.03519225	0.01173075	1.89	0.2103

Analysis of Variance Procedure

Duncan's Multiple Range Test for variable: Z_GI

NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate

Alpha= 0.05 df= 8 MSE= 0.006219

Number of Means	2	3	4
Critical Range	0.148	0.155	0.158

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	TRT
A	2.5967	3	3
A			
A	2.5057	3	2

Analysis of Variance Procedure

Duncan Grouping	Mean	N	TRT
A			
A	2.4817	3	1
A			
A	2.4517	3	4

5. การวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบการเติบโตของกุ้งระยะไมซิส ทางสถิติ

Analysis of Variance Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
TRT	4	1 2 3 4

Number of observations in data set = 12

Analysis of Variance Procedure

Dependent Variable: M_GI

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	3	0.00068425	0.00022808	0.44	0.7338
Error	8	0.00419267	0.00052408		
Corrected Total	11	0.00487692			

R-Square	C.V.	Root MSE	M_GI Mean
0.140304	0.525478	0.022893	4.35658333

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Analysis of Variance Procedure

Dependent Variable: M_GI

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	3	0.00068425	0.00022808	0.44	0.7338

Analysis of Variance Procedure

Duncan's Multiple Range Test for variable: M_GI

NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate

Alpha= 0.05 df= 8 MSE= 0.000524

Number of Means 2 3 4

Critical Range .0430 .0449 .0460

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	TRT
A	4.3677	3	2
A			
A	4.3587	3	1

Analysis of Variance Procedure

Duncan Grouping	Mean	N	TRT
A			
A	4.3527	3	3
A			
A	4.3473	3	4

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6. การวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบการเติบโตของกุ้งระยะโพสลาวา ทางสถิติ

Analysis of Variance Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
TRT	4	1 2 3 4

Number of observations in data set = 12

Analysis of Variance Procedure

Dependent Variable: P_GW

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	3	79.79646667	26.59882222	3.56	0.0672
Error	8	59.84773333	7.48096667		
Corrected Total	11	139.64420000			

R-Square	C.V.	Root MSE	P_GW Mean
0.571427	5.234709	2.735136	52.2500000

Analysis of Variance Procedure

Dependent Variable: P_GW

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	3	79.79646667	26.59882222	3.56	0.0672

Analysis of Variance Procedure

Duncan's Multiple Range Test for variable: P_GW

NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate

Alpha= 0.05 df= 8 MSE= 7.480967

Number of Means	2	3	4
Critical Range	5.143	5.363	5.491

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	TRT
A	56.497	3	4
A			
B A	52.130	3	2

Analysis of Variance Procedure

Duncan Grouping	Mean	N	TRT
B			
B	50.320	3	3
B			
B	50.053	3	1

7. การวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบปริมาณแอสตาแซนทินสะสมของกุ้งระยะซูเอีย ทางสถิติ

Analysis of Variance Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
TRT	4	1 2 3 4

Number of observations in data set = 12

Analysis of Variance Procedure

Dependent Variable: P_CT

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	3	30.11932867	10.03977622	1.45	0.2985
Error	8	55.29872133	6.91234017		
Corrected Total	11	85.41805000			

R-Square	C.V.	Root MSE	P_CT Mean
0.352611	5.949476	2.629133	44.1910000

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Analysis of Variance Procedure

Dependent Variable: P_CT

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	3	30.11932867	10.03977622	1.45	0.2985

Analysis of Variance Procedure

Duncan's Multiple Range Test for variable: P_CT

NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate

Alpha= 0.05 df= 8 MSE= 6.91234

Number of Means 2 3 4

Critical Range 4.944 5.155 5.279

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	TRT
A	46.919	3	4
A			
A	43.487	3	2

Analysis of Variance Procedure

Duncan Grouping	Mean	N	TRT
A			
A	43.343	3	1
A			
A	43.015	3	3

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาว มุทิตา ธรรมสังคม เกิดเมื่อวันที่ 18 มิถุนายน 2521 ที่โรงพยาบาลศิริราช กรุงเทพมหานคร จบการศึกษาชั้นมัธยมปลายสายวิทย์-คณิต จากโรงเรียนสตรีมหาพฤฒาราม จบการศึกษาระดับปริญญาตรี สาขาวิทยาศาสตร์บัณฑิต (วทบ.) ในปี พ.ศ. 2541 จากภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เริ่มศึกษาระดับปริญญาโทในปี พ.ศ. 2542 ที่ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย