ผลของการเสริมเอนไซม์โปรติเอสในอาหารต่อการเจริญเติบโตและสัมประสิทธิ์การย่อยอาหารในกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*)

Effect of dietary protease supplementation on growth performance and digestibility coefficient in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

พัธพงค์ แซ่ตู[1], นัทท์ นันทพงศ์[1], สุพรชัย ศรีหนองห้าง[2] และ วุฒิพร พรหมขุนทอง[1*]

Pattapong Saetoo[1], Nutt Nuntapong[1], Supornchai Sri-Nhonghang[2] and Wutiporn Phromkunthong[1*]

บทคัดย่อ: ศึกษาผลของการเสริมเอนไซม์โปรติเอสในอาหารกุ้งขาวที่มีการลดปลาป่นและใช้โปรตีนจากกากถั่วเหลืองทดแทนต่อการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหาร และสัมประสิทธิ์การย่อยสารอาหาร วางแผนการทดลองแบบ 3 × 2 แฟคทอเรียล โดยศึกษา 2 ปัจจัยได้แก่ ระดับปลาป่นต่างกัน 3 ระดับคือ 18%, 10% และ 0% โดยแต่ละระดับปลาป่นแบ่งเป็นกลุ่มที่ไม่เสริมและเสริมเอนไซม์โปรติเอสที่ระดับ 175 มก./กก. อาหาร อาหารทดลองมี 6 สูตรกำหนดให้อาหารทุกสูตรมีโปรตีน 38% และพลังงาน 4,700 กิโลแคลอรี่/กก.อาหาร ใกล้เคียงกัน เมื่อสิ้นสุดการทดลองเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบว่ากุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่มีปลาป่น 10% มีการเจริญเติบโต (น้ำหนักเฉลี่ยสุดท้ายและเปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น) ไม่แตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$) กับกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่มีปลาป่น 18% แต่จะมีสัมประสิทธิ์การย่อยวัตถุแห้งและโปรตีนต่ำกว่า ($P < 0.05$) ส่วนกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่ไม่มีปลาป่นมีการเจริญเติบโต กิจกรรมของเอนไซม์ไคโมทริปซิน และสัมประสิทธิ์การย่อยโปรตีนต่ำที่สุด ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่มีปลาป่น 18% และ 10% ทั้งนี้การเสริมเอนไซม์โปรติเอสส่งผลให้กุ้งขาวมีประสิทธิภาพการใช้อาหาร กิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินและไคโมทริปซิน และสัมประสิทธิ์การย่อยอาหารเพิ่มสูงขึ้นในทุกระดับปลาป่น ($P < 0.05$) ดังนั้นสามารถลดระดับปลาป่นในอาหารกุ้งขาวจาก 18% ลงเหลือ 10% ได้โดยการทดแทนด้วยโปรตีนจากกากถั่วเหลือง และการเสริมเอนไซม์โปรติเอสสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการใช้อาหารและสัมประสิทธิ์การย่อยอาหารให้สูงขึ้น

คำสำคัญ: โปรติเอส, ปลาป่น, การเจริญเติบโต, การย่อย, กุ้งขาว

Received August 26, 2018

Accepted December 13, 2018

[1] ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ หาดใหญ่ สงขลา 90112
Department of Aquatic Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, 90112 Thailand.

[2] 29 ซอยอุดมสุข 45 ถนนสุขุมวิท 103 บางจาก เขตพระโขนง กรุงเทพฯ 10260
29 Soi Udomsuk 45, Sukhumvit 103 Road, Bangchak, Phra Khanong, Bangkok, 10260

[*] Corresponding author: Wutipornp@yahoo.com

ABSTRACT: This study was investigated the effects of exogenous protease supplementation in Pacific white shrimp feed in which fish meal level was replaced by supplementing soybean meal on growth performance, feed utilization, and apparent nutrient digestibility coefficients. A 3×2 factorial treatment design was operated by means of study 2 factors: 3 different levels of fish meal including 18%, 10% and 0%; and each fish meal level either un-supplemented or supplemented with 175 mg/kg exogenous protease. Six diets were formulated to be iso-proteic (38%) and iso-energetic (4,700 kcal/kg feed). At the end of the 8 weeks feeding trial, growth performance (mean final weight and percent weight gain) were not significantly different between shrimp fed with 10% and 18% fish meal diet ($P > 0.05$), whereas shrimp fed with 10% fish meal diet exhibited lower apparent digestibility coefficients (dry matter and crude protein) ($P < 0.05$). The result also exhibited that growth performance, chymotrypsin activity and apparent digestibility coefficient of crude protein were lowest in shrimp fed with 0% fish meal diet ($P < 0.05$). Dietary protease supplementation in each fish meal level resulted in increases of feed utilization, trypsin and chymotrypsin activity as well as apparent digestibility coefficients in the shrimp ($P < 0.05$). Thereby, this study signified that Pacific white shrimp feed can be reduced of fish meal level from 18% to 10% by means of replacing fish meal level with soybean meal. In addition, dietary supplementation with protease performed better improvement of feed utilization and apparent digestibility coefficients.

Keywords: protease, fish meal, growth, digestibility, Pacific white shrimp

บทนำ

กุ้งขาวเป็นสัตว์น้ำที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ โดยมีการเพาะเลี้ยงกันอย่างแพร่หลายในพื้นที่ชายฝั่งติดทะเลของประเทศไทย เนื่องจากกุ้งขาวมีรสชาติดี มีการเจริญเติบโตเร็ว และสามารถเลี้ยงได้ในความเค็มช่วงกว้าง ประกอบกับประเทศไทยมีศักยภาพในการผลิตสูงจึงเป็นผู้นำด้านการส่งออกในตลาดโลก ในปี พ.ศ. 2560 ประเทศไทยสามารถผลิตกุ้งขาวจากการเพาะเลี้ยงแบบพัฒนาได้ 245,784 ตัน มีปริมาณการส่งออก 175,146.12 ตัน คิดเป็นมูลค่า 58,933.34 ล้านบาท (สุทธสินี, 2561) จากความสำคัญทางเศรษฐกิจของกุ้งขาว ในปัจจุบันได้มีการศึกษาเพื่อหาแนวทางในการเพิ่มขีดความสามารถด้านการผลิตและการพัฒนาคุณภาพของผลิตภัณฑ์ ซึ่งการลดต้นทุนค่าอาหารสำหรับการเลี้ยงกุ้งขาวเป็นแนวทางหนึ่งที่สำคัญ เนื่องจากต้นทุนหลักของการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวประมาณ 40-50% มาจากค่าอาหาร ซึ่งส่วนใหญ่มาจากวัตถุดิบที่เป็นแหล่งของโปรตีนที่มีราคาแพงโดยเฉพาะปลาป่น ซึ่งในปัจจุบันมีการใช้อยู่ที่ 20-28% ในสูตรอาหาร (ชลอ และคณะ, 2553; Tacon and Metian, 2008; Lebel et al., 2010) เนื่องจากปลาป่นเป็นแหล่งโปรตีนที่สำคัญเพราะมีปริมาณและคุณภาพของสารอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของกุ้งขาว แต่ในปัจจุบันปลาป่นมีราคาเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง ในทางกลับกันปริมาณผลผลิตปลาป่นซึ่งได้มาจากการจับปลาจากธรรมชาติมีแนวโน้มลดลง (Tacon and Metian, 2015; Song et al., 2016) ดังนั้นการนำแหล่งโปรตีนจากพืชมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตอาหารกุ้งขาวจึงเป็นการลดต้นทุนค่าอาหารและลดผลกระทบด้านสิ่งแวดล้อม อีกทั้งยังส่งเสริมการเลี้ยงกุ้งของประเทศไทยให้พัฒนาสู่ความยั่งยืนต่อไปในอนาคต แต่แหล่งโปรตีนทดแทนจากพืชมีข้อจำกัดหลายประการอาทิเช่น สารต้านโภชนาการ กรดอะมิโนจำเป็นที่ไม่สมดุล สามารถย่อยได้ต่ำ เช่น กากถั่วเหลืองมีสารยับยั้งเอนไซม์โปรติเอส แลกติน และโปรตีนที่มีความเป็นพิษ (antigenic protein) (Ghazi et al., 2002; Hassaan et al., 2015; Song et al., 2016) ทั้งยังมีกรดอะมิโนที่จำเป็นได้แก่ เมทไธโอนิน ไลซีน และทรีโอนินที่จำกัด (Amaya et al., 2007) การเสริมเอนไซม์โปรติเอสเป็นแนวทางหนึ่งในการเพิ่มการใช้ประโยชน์จากวัตถุดิบโปรตีนทดแทน ดังแสดงในรายงานวิจัยผลของการเสริมเอนไซม์โปรติเอสในอาหารสัตว์น้ำที่ใช้แหล่งโปรตีนทดแทนจากพืช ในปลาพบว่าสามารถเพิ่มสัมประสิทธิ์การย่อยสารอาหารของปลาเรนโบว์เทราต์ให้สูงขึ้น (Drew et al., 2005; Dalsgaard et al., 2012) และสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของปลานิล (Li et

al., 2015) ปลาช่อน (Thanh Huong et al., 2015) และปลา gibel carp (Shi et al., 2016) ให้สูงขึ้น ส่วนในกุ้งขาวพบว่าสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโต และเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหาร รวมถึงความต้านทานต่อโรคและความเครียด (Song et al., 2016) สอดคล้องกับ Li et al. (2015) ที่รายงานว่าการเสริมเอนไซม์โปรติเอสสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโต และทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหารในกุ้งขาวเพิ่มสูงขึ้น นอกจากนี้ Davis et al. (1998) รายงานว่าสามารถเพิ่มสัมประสิทธิ์การย่อยโปรตีนของกุ้งขาวให้สูงขึ้นอีกด้วย

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการเสริมเอนไซม์โปรติเอสในอาหารกุ้งขาวที่มีการลดระดับปลาป่นโดยใช้แหล่งโปรตีนจากกากถั่วเหลืองมาทดแทน เปรียบเทียบกับสูตรอาหารที่มีการใช้ปลาป่นเป็นแหล่งโปรตีนหลักต่อการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหาร และสัมประสิทธิ์การย่อยสารอาหาร เพื่อลดการใช้โปรตีนจากปลาป่นและเพิ่มการใช้ประโยชน์จากวัตถุดิบโปรตีนทดแทนจากพืชให้สูงขึ้น

วิธีการศึกษา

การเตรียมกุ้งและอุปกรณ์ทดลอง

นำกุ้งขาวระยะโพสต์ลาวา 13 จำนวน 10,000 ตัว จากฟาร์มเอกชนกุ้งอินเตอร์ อ.สทิงพระ จ.สงขลา มาอนุบาลจนได้น้ำหนักเฉลี่ยประมาณ 2.33 ± 0.01 ก./ตัว คัดกุ้งที่มีขนาดและน้ำหนักใกล้เคียงกันลงในถังทดลอง จำนวน 30 ตัว/ถัง ใช้ถังพลาสติกทรงสี่เหลี่ยมขนาด 58×79×48 ซม. ความจุน้ำ 220 ล. ทำความสะอาดและติดตั้งอุปกรณ์ให้อากาศ จากนั้นเติมน้ำทะเลความเค็ม 15 พีพีที ให้ได้ปริมาตร 170 ล. ปิดถังทดลองด้วยตาข่ายพลาสติกเพื่อป้องกันกุ้งกระโดดออกจากถังทดลอง ปรับสภาพกุ้งให้มีความคุ้นเคยกับถังทดลองและให้กินอาหารทดลองสูตรที่ 1 เป็นเวลา 3 วัน จึงชั่งและบันทึกน้ำหนักกุ้งเริ่มต้นเพื่อนำไปคำนวณการเจริญเติบโต ระหว่างการทดลองให้อาหารทดลองแต่ละสูตรวันละ 4 ครั้ง เวลา 8.00 น. 12.00 น. 16.00 น. และ 20.00 น. โดยให้กินจนอิ่ม บันทึกน้ำหนักอาหารที่กุ้งกิน เปลี่ยนถ่ายน้ำและดูดตะกอนของเสียทุกวัน ค่าคุณภาพน้ำที่วิเคราะห์ได้ระหว่างการทดลองมีรายละเอียดดังนี้ อุณหภูมิ 26-28 องศาเซลเซียส ความเค็ม 15 พีพีที ความเป็นกรด-ด่าง 7-8 ออกซิเจนที่ละลายน้ำ 6.5-7.8 มก./ล. ความเป็นด่าง 120 มก./ล. และแอมโมเนีย 0.1-0.3 มก./ล.

เอนไซม์โปรติเอส

เอนไซม์โปรติเอส (EC 3.4.21) ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ เป็นผลิตภัณฑ์ทางการค้าของบริษัท JEFO Nutrition Inc. ประเทศแคนาดา จัดอยู่ในกลุ่มเอนโดเปปทิเดส (endopeptidase) ชนิดเซรีนโปรติเอส (serine protease) เป็นผลิตผลจากการหมักของแบคทีเรีย (Streptomyces sp.) Li et al. (2015) รายงานว่าสามารถทนต่ออุณหภูมิที่สูงในระหว่างการอัดเม็ดอาหารชนิดเม็ดจมที่อุณหภูมิ 80±5 องศาเซลเซียส และหลังจากการอบที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 25 นาที มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสเหลืออยู่ที่ระดับ 79.3% และ 67.5% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกิจกรรมเดิมของเอนไซม์ และมีสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์อยู่ในช่วงอุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียส ที่ระดับ pH 8.5 ส่วนระดับที่เหมาะสมของการเสริมเอนไซม์โปรติเอสในอาหารสำหรับกุ้งขาว Song et al. (2016) รายงานว่าอยู่ที่ระดับ 175 มก./กก.

การเตรียมอาหารทดลอง

อาหารที่ใช้ในการทดลองมีทั้งหมด 6 สูตร เป็นอาหารเม็ดจมที่เตรียมขึ้นเอง ประกอบด้วยอาหารทดลองสูตรที่มีระดับปลาป่นต่างกัน 3 ระดับ คือ 18%, 10% และ 0% และแต่ละระดับปลาป่นแบ่งเป็นกลุ่มที่ไม่เสริมและมีการเสริมเอนไซม์โปรติเอสที่ระดับ 175 มก./กก. โดยอาหารทดลองสูตรที่มีการลดระดับปลาป่นเหลือ 10% และ 0% จะใช้โปรตีนจากกากถั่วเหลืองมาทดแทน และเสริมด้วยเมทไธโอนีนให้มีปริมาณใกล้เคียงกับสูตรอาหารที่มีระดับปลาป่น 18% กำหนดให้อาหารทดลองทุกสูตรมีโปรตีน 38% ไขมัน 7% และพลังงาน 4,700 กิโลแคลอรี่/กก.อาหาร (Table 1) ในขั้นตอนการทำอาหารทดลองสำหรับสูตรอาหารที่มีการเสริมเอนไซม์จะนำเอนไซม์โปรติเอสมาผสมกับแป้งสาลีให้เข้ากันในถุงพลาสติกก่อนนำไปผสมรวมกับวัตถุดิบอาหารเช่นเดียวกับสูตรอาหารปกติด้วย

เครื่องผสมอาหารให้เข้ากัน แล้วนำไปอัดเม็ด และนำมานึ่งเป็นเวลา 7 นาที จากนั้นจึงนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที นำอาหารที่เตรียมเสร็จแล้วบรรจุลงถุงพลาสติกเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้ในการทดลอง นำอาหารไปวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการตามวิธีมาตรฐานของ AOAC (1990) ดังรายละเอียดที่แสดงไว้ใน Table 1

แผนการทดลองและการเก็บรวบรวมข้อมูล

ศึกษาผลของการเสริมเอนไซม์โปรติเอสในอาหารสำหรับกุ้งขาวที่มีการลดระดับปลาป่นและใช้แหล่งโปรตีนจากกากถั่วเหลืองมาทดแทนต่อการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหาร และสัมประสิทธิ์การย่อยอาหาร วางแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียล (factorial design) แบบ 3×2 โดยศึกษา 2 ปัจจัย ได้แก่ ระดับปลาป่นในสูตรอาหารต่างกัน 3 ระดับ คือ 18%, 10% และ 0% แต่ละระดับของปลาป่นแบ่งออกเป็นกลุ่มที่ไม่เสริมและมีการเสริมเอนไซม์โปรติเอสที่ระดับ 175 มก./กก. แบ่งการทดลองออกเป็น 6 ชุดการทดลอง แต่ละชุดการทดลองมี 5 ซ้ำ ใช้กุ้งซ้ำละ 30 ตัว ระยะเวลาในการทดลอง 8 สัปดาห์

การเจริญเติบโตและอัตราการรอดตาย

เมื่อสิ้นสุดการทดลองบันทึกน้ำหนักและจำนวนกุ้งทดลองในแต่ละถัง โดยใช้น้ำแข็งลดอุณหภูมิของน้ำลงที่ 20 องศาเซลเซียส เพื่อลดกิจกรรมของกุ้งในระหว่างการชั่งน้ำหนัก และนำข้อมูลน้ำหนักอาหารที่กุ้งกินตลอดการทดลองมาคำนวณ

น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (weight gain, WG%) ตามวิธีการที่รายงานโดย Jiang et al. (2014)

อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (feed conversion ratio, FCR) ตามวิธีการที่รายงานโดย Huo et al. (2014)

ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน (protein efficiency ratio, PER) ตามวิธีการที่รายงานโดย Jiang et al. (2014)

อัตรารอด (survival, %)

อัตราผลตอบแทนทางเศรษฐศาสตร์ต่อต้นทุนค่าอาหาร (economic conversion ratio, ECR, Bath/kg of shrimp) ตามวิธีการของ Moutinho et al. (2017)

การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหาร

เมื่อสิ้นสุดการทดลอง สุ่มตัวอย่างกุ้งชุดการทดลองละ 10 ตัว (ถังทดลองละ 2 ตัว) เก็บตัวอย่างตับและตับอ่อนของกุ้งแต่ละตัวมาสกัดเอนไซม์ ตามวิธีการของ Vega-Villasante et al. (1999) และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในสารสกัดเอนไซม์ ตามวิธีการของ Bradford (1976) เพื่อใช้ในการวิเคราะห์และคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหารได้แก่

เอนไซม์ทริปซิน (trypsin activity) ตามวิธีการของ Marina Ezguerra and Garcia-Carreno (1997) และ Xu et al. (2012) โดยใช้ N_{α}-Benzoyl-L-arginine 4-nitroanilide hydrochloride (Sigma, Japan) เป็น substrate

เอนไซม์ไคโมทริปซิน (chymotrypsin activity) ตามวิธีการของ Cordova-Murueta and Garcia-Carreno (2002) และ Rathore et al. (2005) โดยใช้ N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe p-nitroanilide (Sigma, USA) เป็น substrate

Table 1 Ingredient and proximate composition of experimental diets

Ingredients (%)	Experimental diets					
	FM 18%	FM 18%+P	FM 10%	FM 10%+P	FM 0%	FM 0%+P
Fish meal (FM)	18	18	10	10	0	0
Soybean meal	23	23	33	33	45	45
Corn protein concentrate	8	8	8	8	8	8
Wheat flour	32	32	29	29	26	26
Wheat gluten	5	5	5	5	5	5
Wheat pollard	2.19	2.17	2.83	2.812	3.3	3.282
Tuna hydrolysate	1	1	1	1	1	1
Tuna liver powder	3	3	3	3	3	3
Squid liver powder	3	3	3	3	3	3
Fish oil	1.81	1.81	1.77	1.77	1.72	1.72
Lecithin	1	1	1	1	1	1
Vitamin premix	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Mineral premix	1.7	1.7	2	2	2.48	2.48
Methionine	0	0	0.1	0.1	0.2	0.2
Protease (P)	0	0.0175	0	0.0175	0	0.0175
Total	100	100	100	100	100	100
Proximate composition (% as fed basis)						
Moisture		8.26	7.99	7.52	7.99	7.37
Crude protein	7.44	38.42	38.29	38.32	38.18	38.13
Crude lipid	38.36	6.57	6.11	6.47	6.03	6.14
Crude ash	6.74	7.34	7.04	7.13	7.04	6.99
Gross energy (kcal/kg)	7.36	4,771.12	4,738.35	4,715.89	4,719.89	4,735.38
Feed price (Baht/kg)		31.71	30.40	30.51	29.03	29.14

การศึกษาสัมประสิทธิ์การย่อยอาหาร

ใช้อาหารที่มีส่วนผสมโครมิคออกไซด์ (Cr_2O_3) 1% โดยปรับลดแป้งสาลีในสูตรอาหารแต่ละสูตร เริ่มเก็บมูลกุ้งหลังจากให้อาหารที่มีส่วนผสมโครมิคออกไซด์เป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ เพื่อให้กุ้งคุ้นเคยกับอาหาร โดยหลังจากให้อาหารกุ้งจนอิ่มเป็นเวลา 30 นาที จะทำความสะอาดถังทดลองด้วยวิธีกาลักน้ำ ดูดเอาเศษอาหารและมูลกุ้งที่ตกค้างออกจนหมด หลังจากนั้นเติมน้ำทิ้งไว้ 30 นาที จึงทำการเก็บรวบรวมมูลกุ้งโดยใช้สวิงตาถี่ นำมูลกุ้งที่ได้ไปทำให้แห้งด้วยวิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dry) เพื่อนำไปวิเคราะห์โปรตีนและพลังงาน ตามวิธีมาตรฐานของ AOAC (1990) และโครมิคออกไซด์ตามวิธีการของ Furukawa and Tsukahara (1966) นำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณค่าสัมประสิทธิ์การย่อยสารอาหาร (apparent digestibility coefficients, % ADCs) ได้แก่วัตถุแห้ง (dry matter) โปรตีน (crude protein) และพลังงาน (gross energy) ตามวิธีการของ Cruz-Suarez et al. (2007)

การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบสองทาง (two way Analysis of variance, ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของกลุ่มการทดลองด้วย Duncan's Multiple Range Test ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS (version 16.0)

ผลการศึกษา

การเจริญเติบโตและอัตราการรอดตาย

น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัว น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นและอัตราการรอดตาย

เมื่อสิ้นสุดการทดลองในสัปดาห์ที่ 8 พบว่าระดับปลาป่นส่งผลต่อการเจริญเติบโตของกุ้งขาว โดยกุ้งขาวที่ได้รับอาหารสูตรที่มีปลาป่น 18% และ 10% มีน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวและน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นสูงกว่ากุ้งขาวที่ได้รับอาหารสูตรที่ไม่มีปลาป่น ($P < 0.05$) การเสริมเอนไซม์โปรติเอสไม่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของกุ้งขาว ($P > 0.05$) และไม่พบปฏิสัมพันธ์ร่วมระหว่างระดับปลาป่นและการเสริมเอนไซม์โปรติเอส ($P > 0.05$) ทั้งนี้ระดับปลาป่นและการเสริมเอนไซม์โปรติเอสไม่ส่งผลต่ออัตราการรอดตายของกุ้งขาว ($P > 0.05$) (Table 2)

Table 2 Growth performance of the shrimp fed the 6 experimental diets for 8 weeks

Experimental diets	IBW (g)	FBW (g)	WG (%)	Survival (%)
FM 18%	2.33 ± 0.00	11.99 ± 0.79^{bx}	415.18 ± 34.71^{bx}	73.33 ± 2.72^{ax}
FM 18% + P	2.32 ± 0.01	12.14 ± 0.71^{bx}	422.34 ± 30.35^{bx}	80.00 ± 9.81^{ax}
FM 10%	2.33 ± 0.01	11.49 ± 0.26^{bx}	393.37 ± 12.73^{bx}	77.50 ± 3.19^{ax}
FM 10% + P	2.32 ± 0.01	11.82 ± 0.63^{bx}	409.01 ± 27.39^{bx}	83.34 ± 6.09^{ax}
FM 0%	2.33 ± 0.00	10.23 ± 0.32^{ax}	339.88 ± 12.80^{ax}	82.50 ± 1.67^{ax}
FM 0% + P	2.33 ± 0.01	10.45 ± 0.54^{ax}	348.30 ± 23.32^{ax}	83.33 ± 4.71^{ax}
Two-way ANOVA				
FM (a, b, c)		$P < 0.05$	$P < 0.05$	0.094
Protease (x, y)		0.341	0.321	0.060
FM × Protease		0.954	0.935	0.520

ประสิทธิภาพการใช้อาหาร

เมื่อสิ้นสุดการทดลองในสัปดาห์ที่ 8 พบว่ากุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่ไม่มีปลาป่นมีการกินอาหารต่ำกว่าชุดการทดลองอื่นๆ ($P < 0.05$) แต่ระดับปลาป่นไม่ส่งผลต่ออัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อและประสิทธิภาพการใช้โปรตีน ($P > 0.05$) ส่วนการเสริมเอนไซม์โปรติเอสส่งผลให้กุ้งขาวมีอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อดีขึ้น และมีประสิทธิภาพการใช้โปรตีนเพิ่มสูงขึ้น ($P < 0.05$) โดยไม่พบปฏิสัมพันธ์ร่วมระหว่างระดับปลาป่นและการเสริมเอนไซม์โปรติเอส ($P > 0.05$) ทั้งนี้การเสริมเอนไซม์โปรติเอสส่งผลให้ค่า ECR ลดลงเมื่อเปรียบเทียบที่ระดับปลาป่นเดียวกัน ($P < 0.05$) (Table 3)

กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหารในตับและตับอ่อน

กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหารในตับและตับอ่อนแสดงไว้ใน Table 4 พบว่าระดับปลาป่นส่งผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไคโมทริปซิน โดยกุ้งขาวที่ได้รับอาหารสูตรที่มีปลาป่น 18% และ 10% มีกิจกรรมของเอนไซม์ไคโมทริปซินสูงกว่ากุ้ง

Table 3 Feed utilization of the shrimp fed the 6 experimental diets for 8 weeks

Experimental diets	FI (g/shrimp)	FCR	PER	ECR (Baht/kg of shrimp)
FM 18%	14.68 ± 0.71^{bx}	1.53 ± 0.10^{ay}	1.72 ± 0.12^{ax}	47.05 ± 1.52^{ay}
FM 18% + P	14.39 ± 1.37^{bx}	1.47 ± 0.10^{ax}	1.78 ± 0.12^{ay}	45.21 ± 1.75^{ax}
FM 10%	14.47 ± 0.86^{bx}	1.58 ± 0.07^{ay}	1.66 ± 0.07^{ax}	48.02 ± 2.08^{ay}
FM 10% + P	13.96 ± 0.63^{bx}	1.48 ± 0.12^{ax}	1.78 ± 0.14^{ay}	45.00 ± 3.48^{ax}
FM 0%	12.72 ± 0.25^{ax}	1.61 ± 0.04^{ay}	1.63 ± 0.04^{ax}	46.73 ± 1.21^{ay}
FM 0% + P	12.32 ± 0.45^{ax}	1.52 ± 0.10^{ax}	1.73 ± 0.10^{ay}	44.34 ± 2.80^{ax}
Two-way ANOVA				
FM (a, b, c)	$P < 0.05$	0.329	0.427	0.695
Protease (x, y)	0.231	$P < 0.05$	$P < 0.05$	$P < 0.05$
FM × Protease	0.961	0.896	0.843	0.874

Table 4 Digestive enzyme in hepatopancreas of the shrimp fed the 6 experimental diets for 8 weeks.

Experimental diets	Trypsin (U/mg Protein)	Chymotrypsin (U/mg Protein)
FM 18%	2.62 ± 0.83^{ax}	1.35 ± 0.24^{bx}
FM 18%+P	3.25 ± 0.84^{ay}	1.40 ± 0.29^{by}
FM 10%	2.57 ± 0.44^{ax}	1.20 ± 0.11^{bx}
FM 10%+P	3.15 ± 0.77^{ay}	1.33 ± 0.14^{by}
FM 0%	2.60 ± 0.25^{ax}	1.04 ± 0.08^{ax}
FM 0%+P	3.08 ± 0.44^{ay}	1.22 ± 0.18^{ay}
Two-way ANOVA		
FM (a, b, c)	0.901	$P < 0.05$
Protease (x, y)	$P < 0.05$	$P < 0.05$
FM×Protease	0.941	0.590

Data in the column show mean ± SD, Means with different superscripts in the same column indicated significant difference ($P < 0.05$) ($n = 5$). The letters a, b, c indicate the difference of fish meal levels. The letters x, y indicate the difference of protease.

ขาวที่ได้รับอาหารสูตรที่ไม่มีปลาป่น ($P < 0.05$) และการเสริมเอนไซม์โปรติเอสส่งผลให้กุ้งขาวมีกิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินและไคโมทริปซินเพิ่มสูงขึ้น ($P < 0.05$) แต่ไม่พบปฏิสัมพันธ์ร่วมระหว่างระดับปลาป่นและการเสริมเอนไซม์โปรติเอส ($P > 0.05$)

สัมประสิทธิ์การย่อยอาหาร

จากผลการศึกษาสัมประสิทธิ์การย่อยอาหาร พบว่าระดับปลาป่นส่งผลต่อสัมประสิทธิ์การย่อยวัตถุแห้งและโปรตีนของกุ้งขาว โดยกุ้งขาวที่ได้รับอาหารสูตรที่มีปลาป่น 18% มีค่าสัมประสิทธิ์การย่อยวัตถุแห้งสูงกว่ากุ้งขาวที่ได้รับอาหารสูตรที่มีปลาป่น 10% และอาหารสูตรที่ไม่มีปลาป่น และมี

Table 5 Apparent digestibility coefficients of the shrimp fed the 6 experimental diets for 8 weeks

Experimental diets	Dry matter (%)	Crude protein (%)	Gross energy (%)
FM 18%	67.93 ± 0.58^{bx}	83.94 ± 1.14^{cx}	76.72 ± 2.34^{ax}
FM 18% + P	70.20 ± 2.03^{by}	85.21 ± 1.20^{cy}	78.43 ± 0.88^{ay}
FM 10%	65.25 ± 0.62^{ax}	80.60 ± 1.20^{bx}	74.91 ± 1.97^{ax}
FM 10% + P	67.94 ± 0.34^{ay}	82.54 ± 0.90^{by}	78.23 ± 0.92^{ay}
FM 0%	65.62 ± 1.51^{ax}	79.81 ± 1.28^{ax}	74.60 ± 3.02^{ax}
FM 0% + P	67.50 ± 0.25^{ay}	81.14 ± 1.23^{ay}	76.54 ± 0.75^{ay}
Two-way ANOVA			
FM (a, b, c)	$P < 0.05$	$P < 0.05$	0.074
Protease (x, y)	$P < 0.05$	$P < 0.05$	$P < 0.05$
FM × Protease	0.721	0.780	0.582

วิจารณ์ผล

การใช้วัตถุดิบจากพืชเพื่อเป็นแหล่งโปรตีนทดแทนปลาป่นเป็นแนวทางหนึ่งที่มีการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์เพื่อลดต้นทุนการผลิต อย่างไรก็ตามการใช้วัตถุดิบจากพืชมักประสบกับปัญหาความไม่สมดุลของกรดอะมิโน สารต้านโภชนาการ การกินอาหารและประสิทธิภาพการนำสารอาหารไปใช้ประโยชน์ที่ลดลง (Kader et al., 2010; Bulbul et al., 2015) จากผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่า การลดระดับปลาป่นในสูตรอาหารจากระดับ 18% ลดลงเหลือ 10% โดยใช้โปรตีนจากกากถั่วเหลืองทดแทนไม่ส่งผลเชิงลบต่อการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหาร และอัตราการรอดของกุ้งขาว แต่การไม่ใช้ปลาป่นในสูตรอาหารโดยใช้โปรตีนจากกากถั่วเหลืองทดแทน ส่งผลให้การเจริญเติบโตของกุ้งขาวลดลง สาเหตุสำคัญประการหนึ่งมาจากการกินอาหารที่ลดลงทำให้กุ้งได้รับสารอาหารไม่เพียงพอต่อการนำไปใช้ประโยชน์ จากรายงานของ Suárez et al. (2009) ศึกษาการทดแทนปลาป่นโดยใช้กากถั่วเหลืองร่วมกับกากคาโนลาในอาหารกุ้งขาว โดยใช้อาหารทดลอง 4 สูตรที่มีปลาป่น 4 ระดับคือ 15%, 10%, 6% และ 0% พบว่ากุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่ไม่มีปลาป่นมีน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นและประสิทธิภาพการใช้โปรตีนต่ำกว่าชุดการทดลองอื่นๆ แต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติของอัตราการรอดและอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อระหว่างชุดการทดลอง นอกจากนี้ Yang et al. (2015) รายงานว่ากุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่มีปลาป่น 12% โดยใช้กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งโปรตีนทดแทนมีการเจริญเติบโต อัตราการรอด รวมถึงประสิทธิภาพการใช้อาหารไม่แตกต่างกับกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่มีปลาป่น 18%

การเสริมเอนไซม์โปรติเอสเป็นแนวทางหนึ่งที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการใช้วัตถุดิบจากพืชในอาหารสัตว์น้ำ (Song et al., 2016; Shi et al., 2016) จากการศึกษาครั้งนี้บ่งชี้ว่ากุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่มีการเสริมเอนไซม์โปรติเอสมีอัตราการ

เปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อดีขึ้นและมีประสิทธิภาพการใช้โปรตีนสูงกว่าชุดที่ไม่เสริมเอนไซม์เมื่อเปรียบเทียบที่ระดับปลาป่นเดียวกัน ($P < 0.05$) สอดคล้องกับรายงานการศึกษาในสัตว์น้ำหลายชนิดได้แก่ ในปลาช่อน (Thanh Huong et al., 2015) ปลานิลแดง (Li et al., 2015) ปลา gibel carp (Shi et al., 2016) และในกุ้งขาว (Li et al., 2015; Song et al., 2016) ที่พบว่าการเสริมเอนไซม์โปรติเอสในอาหารที่มีการใช้กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งโปรตีนหลักเพื่อทดแทนโปรตีนจากปลาป่น สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหารให้เพิ่มสูงขึ้น ในวัตถุดิบแหล่งโปรตีนจากกากถั่วเหลืองจะประกอบด้วยสารต้านโภชนาการที่เป็นโปรตีน (proteinaceous anti-nutrient) เช่น protease inhibitor, lectin และโปรตีนที่มีความเป็นพิษต่อร่างกาย (antigenic protein) ได้แก่ glycinin และ β-conglycinin นอกจากนี้ยังมีสาร saponin ซึ่งมีรสขมและส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงการทำงานของลำไส้อีกด้วย (Peisker, 2001; Dalsgaard et al., 2012) ดังนั้นการลดปริมาณปลาป่นในสูตรอาหารและใช้แหล่งโปรตีนจากกากถั่วเหลืองทดแทนส่งผลให้มีสารต้านโภชนาการเพิ่มสูงขึ้น จากรายงานของ Maytorena-Verdugo et al. (2017) ระบุว่า trypsin inhibitor ซึ่งเป็นสารต้านโภชนาการที่พบในถั่วเหลืองที่ส่งผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินและไคโมทริปซินของกุ้งขาว เมื่อกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยโปรตีนลดลง ส่งผลให้ประสิทธิภาพการย่อยและการนำโปรตีนไปใช้ประโยชน์ลดลงตามไปด้วย ดังจะเห็นได้จากกิจกรรมของเอนไซม์ไคโมทริปซินซึ่งเป็นเอนไซม์ในกลุ่มเซรีนโปรติเอสในกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่ไม่มีปลาป่น มีค่าต่ำกว่ากุ้งขาวที่ได้รับอาหารสูตรที่มีปลาป่น 18% และ 10% การเสริมเอนไซม์โปรติเอสเป็นการเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารเพื่อชดเชยบางส่วนที่ถูกยับยั้งโดยสารต้านโภชนาการ และเพื่อชดเชยโปรตีนบางส่วนที่เสียสภาพระหว่างกระบวนการผลิตอาหาร (Dalsgaard et al., 2012; Chowdhury et al., 2017) สอดคล้องกับ Song et al. (2016) ที่รายงานว่าการเสริมเอนไซม์โปรติเอสในอาหารกุ้งขาวที่มีปลาป่นต่ำและใช้กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งโปรตีนหลักทดแทนสามารถเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ทริปซิน ไลเปสและอะไมเลสในตับและตับอ่อนให้สูงขึ้น นอกจากนี้การเสริมเอนไซม์โปรติเอสสามารถเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสในตับและตับอ่อนของกุ้งขาวให้สูงขึ้น (Li et al., 2015) และในปู Chinese mitten crab (Chowdhury et al., 2017) ให้สูงขึ้นเช่นกัน ทั้งนี้ปริมาณและคุณภาพของสารอาหารที่เพิ่มสูงขึ้นตามระดับปลาป่นในสูตรอาหารและการเสริมเอนไซม์โปรติเอสก็เป็นสาเหตุให้กุ้งขาวมีกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหารในตับและตับอ่อนเพิ่มสูงขึ้นเช่นกัน โดยแสดงให้เห็นได้จากการศึกษาของ Moss et al. (2001) ที่รายงานว่ากุ้งขาวที่เลี้ยงในน้ำที่มีอาหารธรรมชาติมีกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหารสูงกว่ากุ้งขาวที่เลี้ยงในน้ำที่ผ่านการกรองซึ่งเป็นผลจากอาหารธรรมชาติเช่น ไดอะตอม และสาหร่ายเป็นแหล่งสารอาหารหรือสารตั้งต้นสำหรับกุ้งขาวจึงส่งผลให้กุ้งขาวมีกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหารเพิ่มสูงขึ้น

จากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสัมประสิทธิ์การย่อยสารอาหารของกุ้งขาวมีแนวโน้มลดต่ำลงตามระดับปลาป่นในสูตรอาหารที่ลดลงโดยเฉพาะสัมประสิทธิ์การย่อยโปรตีน ซึ่งบ่งชี้ว่าปลาป่นเป็นแหล่งโปรตีนที่สำคัญในอาหารสำหรับกุ้งขาว ส่วนการเสริมเอนไซม์โปรติเอสสามารถเพิ่มสัมประสิทธิ์การย่อยวัตถุแห้ง โปรตีน และพลังงานของกุ้งขาวให้สูงขึ้น ($P<0.05$) สอดคล้องกับ Dalsgaard et al. (2012) ที่พบว่าการเสริมเอนไซม์โปรติเอสในอาหารปลาเรนโบว์เทราต์ที่ใช้กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งโปรตีนหลักสามารถเพิ่มสัมประสิทธิ์การย่อยวัตถุแห้ง โปรตีน ไขมัน เถ้า และฟอสฟอรัสให้สูงขึ้น และสอดคล้องกับรายงานการทดลองเสริมเอนไซม์โปรติเอสในอาหารที่มีปลาป่นต่ำและใช้โปรตีนจากกากถั่วเหลืองทดแทนในปลานิลแดง (Li et al., 2015) และปลา gibel carp (Shi et al., 2016) ที่พบว่ามีสัมประสิทธิ์การย่อยวัตถุแห้งและโปรตีนเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งสัมประสิทธิ์การย่อยสารอาหารที่เพิ่มสูงขึ้นก็เป็นผลมาจากปริมาณและคุณภาพของสารอาหารในปลาป่นที่มีสูงกว่าในกากถั่วเหลือง และการเสริมเอนไซม์โปรติเอสที่สามารถปรับปรุงคุณภาพและปริมาณของสารอาหารให้เพิ่มสูงขึ้นหรือจากการเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนที่เสียสภาพระหว่างกระบวนการผลิตอาหาร

สรุป

จากผลของการเสริมเอนไซม์โปรติเอสในอาหารกุ้งขาวที่มีการลดระดับปลาปนและใช้โปรตีนจากกากถั่วเหลืองทดแทนแสดงให้เห็นว่าสามารถลดระดับปลาปนในสูตรอาหารสำหรับกุ้งขาวลงจากปลาปน 18% ลดลงเหลือ 10% โดยไม่ส่งผลเชิงลบต่อการเจริญเติบโต อัตราการรอด ประสิทธิภาพการใช้อาหาร และต้นทุนค่าอาหาร แม้ว่ามีสัมประสิทธิ์การย่อยวัตถุแห้งและโปรตีนลดต่ำลงก็ตาม ทั้งนี้การเสริมเอนไซม์โปรติเอสสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการใช้อาหาร กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหาร และสัมประสิทธิ์การย่อยสารอาหารของกุ้งขาวให้สูงขึ้น อีกทั้งยังส่งเสริมให้มีผลตอบแทนทางเศรษฐศาสตร์เมื่อเปรียบเทียบกับต้นทุนค่าอาหารในการผลิตกุ้งขาวถูกลงอีกด้วย

เอกสารอ้างอิง

สุทธสินี สนธิรัตน. 2561. สถานการณ์สินค้ากุ้งทะเลและผลิตภัณฑ์ ปี 2560 และแนวโน้ม ปี 2561. แหล่งข้อมูล: http://www.fisheries.go.th/strategy/UserFiles/files/shimp.pdf. ค้นเมื่อ 17 เมษายน 2561.

ชลอ ลิ้มสุวรรณ, สุธี วงศ์มณีประทีป, สาธิต ประเสริฐศรี, แก้วตา ลิ้มเฮง, ปัทมา วิริยพัฒนทรัพย์, เกศินี หลายสุทธิสาร และอริสา ศรีหมาก สุก. 2553. ผลของอุณหภูมิต่อปริมาณการกินอาหาร การเจริญเติบโต อัตราการรอดตายและคุณภาพน้ำในการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม (Litopenaeus vannamei). น. 313-321. ใน: การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 48 3-5 กุมพาพันธ์ 2553. กรุงเทพฯ.

Amaya, E.A., A.D. Davis, and D.B. Rouse. 2007. Replacement of fish meal in practical diets for the Pacific white shrimp (Litopenaeus vannamei) reared under pond conditions. Aquaculture. 262: 393-401.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 1990. Official Methods of Analysis 15 Edition. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.

Bulbul, M., M.A. Kader, M.A. Ambak, M.S. Hossain, M. Ishikawa, and S. Koshio. 2015. Effects of crystalline amino acids, phytase and fish soluble supplements in improving nutritive values of high plant protein based diets for kuruma shrimp, Marsupenaeus japonicas. Aquaculture. 438: 98-104.

Chowdhury, M.A.K., J. Zhu, C. Cai, Y. Ye, and J. He. 2017. Dietary protease modulates nutrient retention efficiency and hepatopancreatic protease activity in juvenile Chinese mitten crab Eriocheir sinensis. Aquac. Nutr. 2017: 1-7.

Cordova-Murueta, J.H., and F.L. Garcia-Carreno. 2002. Nutritive value of squid and hydrolyzed protein supplement in shrimp feed. Aquaculture. 210: 371-384.

Cruz-Suarez, L.E., M. Nieto-Lopez, C. Guajardo-Barbosa, M. Tapia-Salazar, U. Scholz, and D. Ricque-Marie. 2007. Replacement of fish meal with poultry by-product meal in practical diets for Litopenaeus vannamei, and digestibility of the tested ingredients and diets. Aquaculture. 272: 466-476.

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

Davis, D.A., W.L. Johnston, and C.R. Arnold. 1998. The use of enzyme supplements in shrimp diets. P. 452-462. In: Symposium publication IV International Symposium on Aquatic Nutrition. 15-18 November 1998. La Paz, B.C.S., Mexico.

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

Furukawa, A., and H. Tsukahara. 1996. On the acid digestion for the determination of chromic oxide as an index substance in the study of digestibility of fish feed. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish. 32: 502-506.

Ghazi, S., J.A. Rooke, H. Galbraith, and M.R. Bedford. 2002. The potential for the improvement of the nutritive value of soya-bean meal by different proteases in broiler chicks and broiler cockerels. Br. Poult. Sci. 43: 70-77.

Hassaan, M.S., M.A. Soltan, and A.M. Ab del-Moez. 2015. Nutritive value of soybean meal after solid state fermentation with Saccharomyces cerevisiae for Nile tilapia, Oreochromis niloticus. Anim. Feed Sci. Technol. 201: 89-98.

Huo, Y.W., M. Jina, P.P. Zhou, M. Li, K.S. Mai, and Q.C. Zhou. 2014. Effects of dietary protein and lipid levels on growth, feed utilization and body composition of juvenile swimming crab, Portunus trituberculatus. Aquaculture. 434: 151-158.

Jiang, T.T., L. Feng, Y. Liu, W.D. Jiang, J. Jiang, S.H. Li, L. Tang, S.Y. Kuang, and X.Q. Zhou. 2014. Effects of exogenous xylanase supplementation in plant protein-enriched diets on growth performance, intestinal enzyme activities and microflora of juvenile Jian carp (Cyprinus carpio var. Jian). Aquac. Nutr. 20: 632-645.

Kader, M.A., S. Koshio, M. Ishikawa, S. Yokoyama, M. Bulbul. 2010. Supplemental effects of some crude ingredients in improving nutritive values of low fishmeal diets for red sea bream, Pagrus major. Aquaculture. 308: 136–144.

Li, X.Q., X.Q. Chai, D.Y. Liu, M.A.K. Chowdhury, and X.J. Leng. 2015. Effects of temperature and feed processing on protease activity and dietary protease on growths of white shrimp, Litopenaeus vannamei, and tilapia, Oreochromis niloticus x O. aureus. Aquac. Nutr. 1-10.

Lebel, L., R. Mungkung, S.H. Gheewala, and P. Lebel. 2010. Innovation cycles, niches and sustainability in the shrimp aquaculture industry in Thailand. Environ. Sci. Policy. 13: 291-202.

Marina Ezguerra, J., and F.L. Garcia-Carreno. 1997. Effects of feed diets on digestive proteases from the hepatopancreas of white shrimp (Penaeus vannamei). J. Food Biochem. 21: 401-419.

Maytorena-Verdugo, C.I., J.H. Córdova-Murueta, and F.L. García-Carreño. 2017. Litopenaeus vannamei digestive metallo peptidases compensate for anti-nutritional SBTI in feed. Aquaculture. 473: 508-512.

Moss, S.M., S. Divakaran, and B.G. Kim. 2001. Stimulating effects of pond water on digestive enzyme activity in the Pacific white shrimp, Litopenaeus vannamei (Boone). Aquac. Res. 32: 125-131.

Moutinho, S., S. Martinez-Llorens, A. Tomas-Vidal, M. Jover-Cerda, A. Oliva-Teles, and H. Peres. 2017. Meat and bone meal as partial replacement for fish

meal in diets for gilthead seabream (Sparus aurata) juveniles: Growth, feed efficiency, amino acid utilization, and economic efficiency. Aquaculture. 468: 271-277.

Peisker, M. 2001. Manufacturing of soy protein concentrate for animal nutrition. P. 103-107. In: Brufau J. (ed.). Feed manufacturing in the Mediterranean region. Improving safety: From feed to food. Zaragoza: CIHEAM, 2001. (Cahiers Options Méditerranéennes; n. 54).

Rathore, R.M., S. Kumar, and R. Chakrabarti. 2005. Digestive enzyme patterns and evaluation of protease classes in Catla catla (Family: Cyprinidae) during early developmental stages. Comp. Biochem. Physiol., Part B. 142: 98-106.

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

Song, H.L., B.P. Tan, S.Y. Chi, Y. Liu, M.A.K. Chowdhury, and X.H. Dong. 2016. The effects of a dietary protease-complex on performance, digestive and immune enzyme activity, and disease resistance of Litopenaeus vannamei fed high plant protein diets. Aquac. Res. 1-11.

Suárez, J.A., G. Gaxiola, R. Mendoza, S. Ca david, G. Garcia, G. Alanis, A. Suarez, J. Faillace, and G. Cuzon. 2009. Substitution of fish meal with plant protein sources and energy budget for white shrimp Litopenaeus vannamei (Boone, 1931). Aquaculture. 289: 118-123.

Tacon, A.G.J., and M. Metian. 2008. Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects. Aquaculture. 285: 146-158.

Tacon, A.G.J., and M. Metian. 2015. Feed matters: satisfying the feed demand of aquaculture. Rev. Fish. Sci. Aquac. 23: 1-10.

Thanh Huong, D.T., N. Isidori, H. Lucien-Brun, and M.A.K. Chowdhury. 2015. Dietary protease improves growth performance and size distribution of snakehead fed a low fish meal diet. AQUA Culture Asia Pacific Magazine. 11: 44-46.

Vega-Villasante, F., I. Fernandez, R.M. Preciado, M. Oliva, D. Tovar, and H. Nolasco. 1999. The activity of digestive enzymes during the molting stages of the arched swimming Callinectes arcuatus Ordway, 1863 (Crustacea: Decapoda: Portunidae). Bull. Mar. Sci. 65: 1-9.

Xu, W.J., L.Q. Pan, D.H. Zhao, and J. Huang. 2012. Preliminary investigation into the contribution of bioflocs on protein nutrition of Litopenaeus vannamei fed with different dietary protein levels in zero-water exchange culture tanks. Aquaculture. 350-353: 147-153.

Yang, Q., B. Tan, X. Dong, S. Chi, and H. Liu. 2015. Effect of replacing fish meal with extruded soybean meal on growth, feed utilization and apparent nutrient digestibility of Juvenile white shrimp (Litopenaeus vannamei). J. Ocean Univ. China. 14: 865-872.