เอนไซม์ย่อยอาหารกับการพัฒนาอาหารเพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ
Digestive Enzymes and Food Development for Aquaculture

การุณ ทองประจุแก้ว[1]* และ อุทัยวรรณ โกวิทวที[2]
Karun Thongprajukaew[1]* and Uthaiwan Kovitvadhi[2]

บทคัดย่อ

เอนไซม์ย่อยอาหารมีบทบาทสำคัญต่อการเติบโตและการดำรงชีวิตของสัตว์น้ำ โดยกิจกรรมของเอนไซม์มีความสัมพันธ์กับการตอบสนองทางโภชนาการ การเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยา และพฤติกรรมการกินอาหาร เอนไซม์ย่อยอาหารถูกสร้างขึ้นจากอวัยวะหลัก ได้แก่ กระเพาะอาหาร ลำไส้เล็ก และอวัยวะช่วยย่อยอาหาร (ตับอ่อน ตับและตับอ่อน หรือไพลอริกซีกา) เอนไซม์ย่อยอาหารที่มีบทบาทสำคัญในการเปลี่ยนแปลงสารชีวโมเลกุลกลุ่มหลักให้เป็นพลังงาน ได้แก่ แอลฟาอะไมเลส ไลเปส โปรติเอส ทริปซิน และไคโมทริปซิน ดังนั้น การประยุกต์ใช้ความรู้ด้านเอนไซม์ย่อยอาหารจึงเป็นสิ่งสำคัญในการพัฒนาอาหารให้เหมาะสมกับความต้องการของสัตว์น้ำ และเพิ่มประสิทธิภาพการใช้อาหารได้อย่างเต็มที่ นอกจากนี้ยังช่วยลดปริมาณของเสียที่เกิดจากการย่อยอาหารแบบไม่สมบูรณ์ รวมทั้งลดต้นทุนในการผลิตอีกด้วย การศึกษาเอนไซม์ย่อยอาหารสามารถประยุกต์ได้หลากหลายทาง เช่น การคัดเลือกและการปรับปรุงคุณภาพของวัตถุดิบเพื่อสร้างสูตรอาหาร การจัดการอาหารเพื่อให้เกิดความคุ้มทุน การประเมินคุณภาพการเติบโตโดยใช้เอนไซม์เป็นตัวชี้วัด และการเสริมเอนไซม์เพื่อให้เกิดการย่อยอย่างมีประสิทธิภาพ

คำสำคัญ: สัตว์น้ำ เอนไซม์ย่อยอาหาร อะไมเลส ไลเปส โปรติเอส ทริปซิน ไคโมทริปซิน

Abstract

Digestive enzymes play an important role in growth and existence of aquatic animals. Activities of digestive enzymes generally correlate with nutritional response, physiological alteration and feeding performances. Digestive enzymes are produced by main organs including stomach, intestine, and some other digestive organs (such as pancreas, hepatopancreas or pyloric caeca). Important digestive enzymes for converting main biomolecules into energies comprise α-amylase, lipase, protease, trypsin and chymotrypsin. Application of digestive enzyme knowledge, is therefore, vital for feed development to meet the need of aquatic animals and to increase feed efficiency. Moreover, it might be helpful for reducing waste caused by animals' incomplete digestion as well as the production cost. Knowledge of digestive enzymes can be applied to various aspects such as selecting and improving raw materials to initiate feed formula, feed

1 อาจารย์ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
2 รองศาสตราจารย์ ภาควิชาสัตววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
* Corresponding Author, Tel 0-7428-8562, E-mail: karun.t@psu.ac.th

รับเมื่อ 12 ตุลาคม 2554 ตอบรับเมื่อ 30 มกราคม 2555

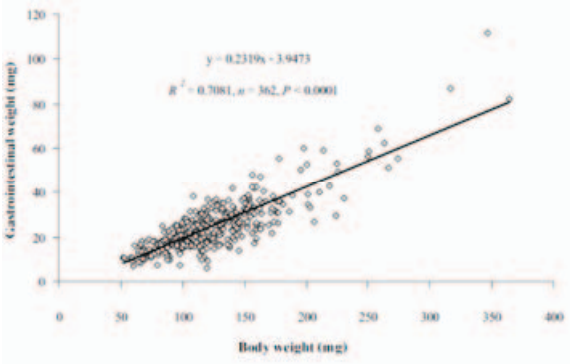
management for breakeven, evaluating growth quality using enzymatic indicator, and supplementing enzyme for effective digestion.

Keywords: Aquatic Animals, Digestive Enzymes, Amylase, Lipase, Protease, Trypsin, Chymotrypsin

1. บทนำ

การพัฒนาอาหารมีความสำคัญต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เนื่องจากอาหารเป็นต้นทุนผันแปรที่มีค่าสูงสุดในระบบการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งพัฒนา (Semi-Intensive System) หรือแบบพัฒนา (Intensive System) การขาดความรู้เกี่ยวกับโภชนาการและการจัดการอาหารที่เหมาะสมจะทำให้การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำขาดคุณภาพ โดยสัตว์จะย่อยและดูดซึมสารอาหารได้น้อย ส่งผลให้ไม่คุ้มทุน นอกจากนี้ การให้อาหารที่ไม่เหมาะสมจะส่งผลต่อการรอดชีวิต และการเจริญตั้งแต่ระยะวัยอ่อนจนถึงตัวเต็มวัย รวมทั้งการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์ของสัตว์น้ำ

การพัฒนาของระบบย่อยอาหารมีความสัมพันธ์กับการเติบโตของสัตว์น้ำ เช่น ในปลากัด (รูปที่ 1) เนื่องจากการเติบโตที่เพิ่มขึ้นต้องอาศัยการย่อยและดูดซึมสารอาหาร เพื่อนำมาใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึมที่เพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน การศึกษาด้านโภชนาการพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหาร (Digestive Enzymes) มีความสัมพันธ์กับการตอบสนองทางสรีรวิทยาเมื่อสัตว์น้ำมีการเปลี่ยนแปลงสภาพทางโภชนาการ [1]–[5] การวิจัยเกี่ยวกับเอนไซม์ย่อยอาหารส่วนใหญ่มุ่งเน้นศึกษาเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสารชีวโมเลกุลที่สำคัญ ได้แก่ อะไมเลส (ย่อยคาร์โบไฮเดรต) ไลเปส (ย่อยไขมัน) โปรติเอส ทริปซิน และไคโมทริปซิน (ย่อยโปรตีน) เพื่อให้ทราบเกี่ยวกับพฤติกรรมการกินอาหาร [6], [7] ระยะเวลาที่อาหารอยู่ในท่อทางเดินอาหาร [2], [8] และประสิทธิภาพการย่อยอาหารของสัตว์น้ำ [1], [9]–[13] นอกจากนี้ เทคโนโลยีของเอนไซม์ย่อยอาหารยังสามารถประยุกต์ใช้เพื่อการผลิตและพัฒนาการสร้างสูตรอาหาร



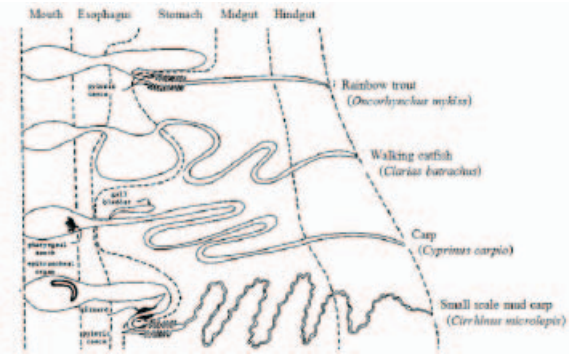
รูปที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักของท่อทางเดินอาหารกับน้ำหนักร่างกายของปลากัดวัยอ่อน [14]

ตลอดจนการจัดการอาหารสัตว์น้ำให้มีประสิทธิภาพ ดังนั้น ความรู้เกี่ยวกับกิจกรรมและบทบาทของเอนไซม์ย่อยอาหารจึงเป็นแนวทางหนึ่งที่ช่วยส่งเสริมการพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำอย่างมีคุณภาพ

2. อวัยวะย่อยอาหาร

เอนไซม์ย่อยอาหารสามารถสร้างจากอวัยวะในท่อทางเดินอาหาร (Digestive Tract) ได้แก่ ปาก (Mouth) หลอดอาหาร (Esophagus) กระเพาะอาหาร (Stomach) และลำไส้เล็ก (Small Intestine) หรืออวัยวะช่วยย่อยอาหาร (Accessory Organ) ได้แก่ ตับอ่อน (Pancreas) ตับและตับอ่อน (Hepatopancreas) หรือไพโลริกซีกา (Pyloric Caeca) โดยปลาแต่ละกลุ่มจะมีการปรับตัวด้านโครงสร้างของระบบย่อยอาหารให้สอดคล้องกับพฤติกรรมการกินอาหาร (รูปที่ 2) อย่างไรก็ตาม อวัยวะหลักที่เกิดการย่อยและดูดซึมสารอาหารเกือบทุกชนิด คือ ลำไส้เล็ก [15]

การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของลำไส้มีความสอดคล้องกับพฤติกรรมการกินอาหารของปลา โดยปลากินพืช (Herbivorous Fish) มีอัตราส่วนระหว่างความยาวลำไส้ต่อความยาวลำตัวทั้งหมด (Total Length) สูง ขณะที่ปลากินเนื้อ (Carnivorous Fish) มีอัตราส่วนดังกล่าวต่ำ [15] อย่างไรก็ตาม อัตราส่วนดังกล่าวอาจเปลี่ยนแปลงได้เมื่อปลามีพฤติกรรมการกินอาหาร



รูปที่ 2 ท่อทางเดินอาหารของปลาชนิดต่างๆ ที่มีพฤติกรรมการกินอาหารต่างกัน (ดัดแปลงจาก [16])

ที่เปลี่ยนไป สำหรับอวัยวะย่อยอาหารส่วนอื่นพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงเช่นกัน เพื่อให้มีประสิทธิภาพการย่อยและดูดซึมสารอาหารให้ดียิ่งขึ้น เช่น ปลาเฉา (Ctenopharyngodon idella) มีฟันขนาดใหญ่ที่คอหอยเพื่อช่วยย่อยอาหาร หรือปลานวลจันทร์ (Cirrhinus microlepis) มีการม้วนตัวของหลอดอาหารเพื่อเพิ่มพื้นที่ผิว และสร้างเอนไซม์ย่อยอาหาร [17] เป็นต้น

3. การสร้างเอนไซม์ย่อยอาหาร

เอนไซม์กลุ่มที่ย่อยคาร์โบไฮเดรต (Carbohydrate Digesting Enzymes) ที่ศึกษากันมากในสัตว์น้ำ คือ อะไมเลส การสร้างเอนไซม์ดังกล่าวในปลากินพืช และปลากินพืชและเนื้อ (Omnivorous Fish) ส่วนใหญ่เกิดจากเซลล์ในผนังกระเพาะอาหาร ผนังลำไส้ ตับอ่อน ตับและตับอ่อน (เฮพาโตแพนเครียส) หรือไพโลริกซีกา ขณะที่ปลากินเนื้อมักสร้างจากตับอ่อนและส่งมายังลำไส้ อย่างไรก็ตาม อะไมเลสในปลากินเนื้ออาจพบในกระเพาะอาหาร เนื่องจากการปนเปื้อนของอาหารจากการหดตัวของลำไส้เล็ก [18] หรือได้รับจากอาหารที่ปลากินเข้าไป [19]

เอนไซม์กลุ่มที่ย่อยไขมัน (Lipid Digesting Enzymes) ชนิดหลัก คือ ไลเปส การทำงานของเอนไซม์ดังกล่าวในกระเพาะอาหารมีค่าต่ำกว่าในลำไส้ เนื่องจากกระเพาะอาหารมีสภาพเป็นกรดสูงจึงมีหน้าที่เพียงผสมไขมันเพื่อส่งเข้าลำไส้เท่านั้น หลังจากนั้นไลเปสจากตับอ่อน (Pancreatic Lipase) และจากลำไส้ (Intestinal Lipase) จะย่อยต่อ ทำให้โมเลกุลของไขมันในรูปของไตรกลีเซอไรด์แตกตัวเป็นไดกลีเซอไรด์ โมโนกลีเซอไรด์ กลีเซอรอล และกรดไขมันอิสระ ซึ่งจะถูกดูดซึมไปใช้ต่อไป

เอนไซม์กลุ่มที่ย่อยโปรตีน (Proteolytic Enzymes) มีการสร้างมาจากอวัยวะหลายแหล่ง เช่น กระเพาะอาหาร ลำไส้เล็ก ตับอ่อน ตับและตับอ่อน หรือไพโลริกซีกา โดยอะซีดิกโปรติเอสมักสร้างจากกระเพาะอาหาร และทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นกรดสูง เช่น เปปซิน (Pepsin) [18], [20] ขณะที่อัลคาไลน์โปรติเอส เช่น ทริปซิน และไคโมทริปซิน พบว่าสร้างมาจากตับอ่อนหรือไพลอริกซีกา และจะทำงานในลำไส้เล็กซึ่งมีสภาวะเป็นเบส รายละเอียดเกี่ยวกับอวัยวะย่อยอาหารที่ทำหน้าที่ผลิตเอนไซม์ และอวัยวะที่เกิดการย่อยอาหารแสดงในตารางที่ 1

4. เอนไซม์ย่อยอาหาร

ตารางที่ 1 อวัยวะย่อยอาหารที่ทำหน้าที่ผลิตเอนไซม์ (*) และอวัยวะที่เกิดการย่อยอาหาร (**)

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

เอนไซม์ย่อยอาหารที่ย่อยสารชีวโมเลกุลหลักซึ่งทำหน้าที่เป็นแหล่งพลังงานและการเติบโตของสัตว์น้ำที่นิยมศึกษา ได้แก่ แอลฟาอะไมเลส ไลเปส โปรติเอส ทริปซิน และไคโมทริปซิน

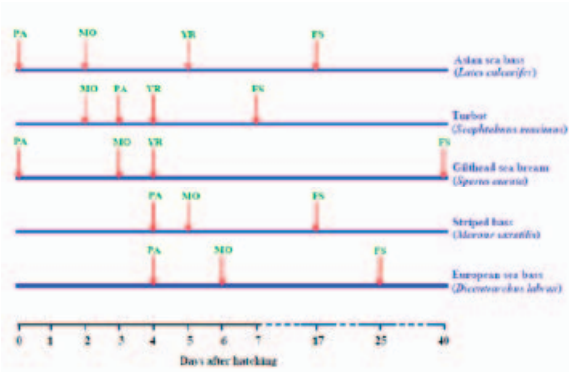
4.1 แอลฟาอะไมเลส (α-Amylase)

แอลฟาอะไมเลส (EC 3.2.1.1) เป็นเอนไซม์ที่ย่อยคาร์โบไฮเดรตให้เป็นกลูโคสและมอลโตส โดยย่อยแป้งที่ตำแหน่ง α-1,4 Glycosidic Bond ดังนั้น การศึกษากิจกรรมของอะไมเลสจึงมีบทบาทสำคัญต่อการประเมินประสิทธิภาพ

การย่อยคาร์โบไฮเดรต [1], [12], [13] แอลฟาอะไมเลสทำงานได้ดีในช่วงพีเอชที่แตกต่างกัน เนื่องจากความแปรผันของไอโซฟอร์ม เช่น อะซิดิกอะไมเลส (Acidic Amylase) ทำงานได้ดีที่พีเอช 4.5–5 ใน Redfish *(Sebastes mentella)* [19] นิวทรัลอะไมเลส (Neutral Amylase) ทำงานได้ดีที่พีเอช 7 ในหอยมุกน้ำจืด *(Hyriopsis (Hyriopsis) bialatus)* [13], [21] และอัลคาไลน์อะไมเลส (Alkaline Amylase) ทำงานได้ดีที่พีเอช 8 ในปลากัด (Betta splendens) [22] เป็นต้น อย่างไรก็ตาม อาจพบแอลฟาอะไมเลสที่ทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นเบสสูง เช่น พีเอช 11 [21], [22] เป็นต้น กิจกรรมของอะไมเลสในปลาหลายชนิดมีค่าเพิ่มขึ้นตามอายุ [20], [22] และกิจกรรมของเอนไซม์มีความแปรผันเนื่องจากพฤติกรรมการกินอาหาร [6] และเพศ [21], [23]

4.2 ไลเปส (Lipase)

ไลเปส (EC 3.1.1.3) เป็นเอนไซม์ที่ช่วยย่อยไขมันโดยเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ระหว่างกรดไขมันโมเลกุลยาวกับกลีเซอรอลให้เป็นไตรกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ โมโนกลีเซอไรด์ กรดไขมัน หรือกลีเซอรอล ไลเปสทำงานร่วมกับน้ำดี (Bile Salt) ซึ่งทำให้ไขมันแตกตัวเป็นโมเลกุลเล็ก ก่อนที่จะเกิดการย่อยทางเคมี (Chemical Digestion) ไลเปสทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นกลางถึงเบส แต่อาจมีความแปรผันของไอโซฟอร์ม เช่น นิวทรัลไลเปส (Neutral Lipase) ทำงานได้ดีที่พีเอช 7 ใน Red Drum (*Sciaenop ocellatus*) [20] และอัลคาไลน์ไลเปส (Alkaline Lipase) ทำงานได้ดีที่พีเอช 8 ในปลากัด [22] และหอยมุกน้ำจืด [23] เป็นต้น กิจกรรมของไลเปสในปลากินเนื้อมีค่าสูงกว่าปลากินพืชและสัตว์และปลากินพืช ตามลำดับ เนื่องจากอาหารธรรมชาติส่วนใหญ่ของปลากินเนื้อจะมีไขมันในปริมาณมาก [22] รวมทั้งปลาอาจได้รับเอนไซม์จากอาหารที่กินเข้าไป [24] การศึกษาระดับการแสดงออกของไลเปสในปลาวัยอ่อนพบว่ามีความสัมพันธ์กับการสลายไขมันเพื่อใช้ในการเปลี่ยนแปลงเมทามอโฟซิส (Metamorphosis) [25] ขณะที่ในปลาวัยเจริญพันธุ์ ความแตกต่างของรูปแบบไลเปสในสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันอาจมีอิทธิพลมาจากเพศ [21], [22]

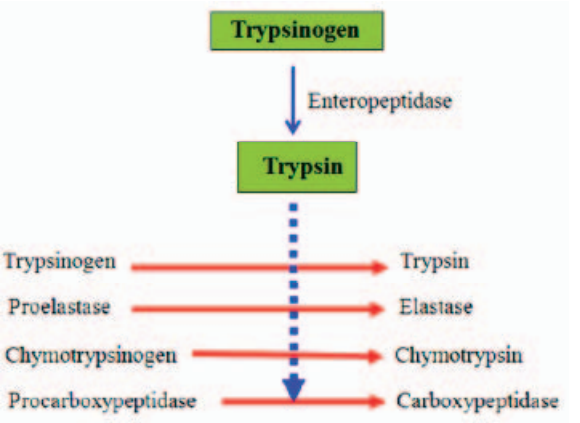


รูปที่ 3 กิจกรรมของโปรติเอสในช่วงวัยอ่อนของปลาชนิดต่าง ๆ (FS: Functional Stomach; MO: Mounth Opening; PA: Protease Activity; YR: Yolk Resorption) (ดัดแปลงจาก [24])

4.3 โปรติเอส (Proteases)

โปรติเอสเป็นกลุ่มเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการสลายพันธะเพปไทด์ของโปรตีน เพื่อนำกรดอะมิโนมาใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึม โปรติเอสมีการแสดงออกได้หลายรูปแบบ เนื่องจากประกอบด้วยหลายไอโซฟอร์มซึ่งทำงานได้ดีในสภาวะที่มีพีเอชและอุณหภูมิต่างกัน [13], [18], [21], [26], [27] โปรติเอสมีบทบาทสำคัญในปลากินเนื้อและปลากินพืชและเนื้อ สำหรับในปลากินพืช การกระตุ้นการแสดงออกของอะไมเลสพบว่าสามารถช่วยส่งเสริมการแสดงออกของโปรติเอสได้ [1], [14] โปรติเอสแต่ละชนิดมีความจำเพาะในการตัดสายพอลิเพปไทด์ในตำแหน่งต่างกัน การแสดงออกของโปรติเอสมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามอายุ [12], [27], [28] และมีอิทธิพลของเพศเข้ามาเกี่ยวข้อง [21], [27]

กิจกรรมของโปรติเอสในปลาวัยอ่อนมีความสำคัญต่อการกินอาหารในช่วงแรก การสลายไข่แดง และการย่อยอาหารของกระเพาะ (รูปที่ 3) การศึกษาพัฒนาการของโปรติเอสในปลากัดพบว่าอะซิดิกโปรติเอสมีบทบาทหลักในการย่อยโปรตีนเมื่อปลาอยู่ในวัยอ่อน ขณะที่อัลคาไลส์โปรติเอสมีบทบาทหลักเมื่อปลามีอายุ



รูปที่ 4 กลไกการกระตุ้นไซโมเจนของทริปซิน

มากขึ้น โดยกิจกรรมของเอนไซม์ดังกล่าวจะมีความสัมพันธ์กับกิจกรรมของทริปซินและไคโมทริปซิน [27] อย่างไรก็ตาม การใช้โปรติเอสเพื่อประเมินการเติบโตในสัตว์น้ำมักได้ผลที่มีการตอบสนองต่ำ เนื่องจากมีรูปแบบการแสดงออกที่ทับซ้อนกันของทริปซินและไคโมทริปซิน ซึ่งมีบทบาทต่อการควบคุมการเติบโตในทิศทางที่ตรงกันข้าม [2], [4]

4.4 ทริปซิน (Trypsin)

ทริปซิน (EC 3.4.21.4) เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทหลักในการควบคุมการย่อยโปรตีน โดยทำหน้าที่กระตุ้นโปรเอนไซม์ (Proenzyme) หรือไซโมเจน (Zymogen) ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยโปรตีนได้หลายชนิด ได้แก่ ทริปซิโนเจน (Trypsinogen) ไคโมทริปซิโนเจน (Chymotrypsinogen) โปรคาร์บอกซีเปปติเดส (Procarboxypeptidase) และโปรอีลาสเตส (Proelastase) ให้อยู่ในรูปที่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ (Active Enzyme) ได้แก่ ทริปซิน (Trypsin) ไคโมทริปซิน (Chymotrypsin) คาร์บอกซีเปปติเดส (Carboxypeptidase) และอีลาสเตส (Elastase) ตามลำดับ (รูปที่ 4) ดังนั้น การศึกษากิจกรรมของทริปซินจึงมีบทบาทสำคัญต่อการประเมินประสิทธิภาพการย่อยโปรตีน [1], [11], [13]

ทริปซินเป็นอัลคาไลน์โปรติเอสที่เร่งปฏิกิริยาได้ดีในช่วงพีเอช 7–10 [1], [18], [20], [26], [27] โดยสามารถตัดพันธะเอไมน์ (Amidase Activity) และเอสเทอร์ (Esterase Activity) หลังกรดอะมิโนที่โซ่ข้างมีขั้วและประจุบวก ได้แก่ ไลซีน และอาร์จินีน [29] สารสังเคราะห์ซึ่งนิยมใช้เพื่อศึกษาการยับยั้งกิจกรรมของทริปซิน คือ Tosyl Lysine Chloromethyl Ketone (TLCK) และ Leupeptin ส่วนสารยับยั้งจากธรรมชาติ ได้แก่ Soybean Trypsin Inhibitor (SBTI) กิจกรรมของทริปซินมีการศึกษากันมาก เนื่องจากบทบาทของทริปซินมีความสำคัญต่อพัฒนาการของสัตว์น้ำแต่ละช่วงวัย ดังต่อไปนี้

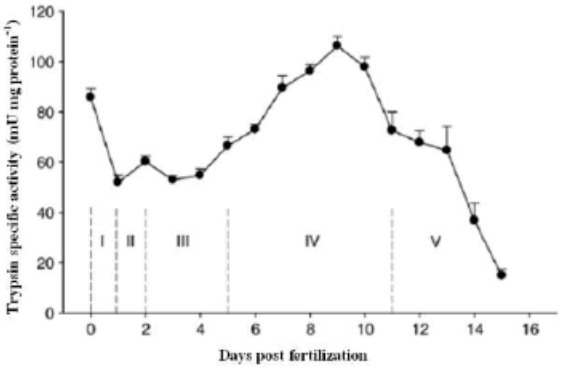
4.4.1 พัฒนาการก่อนระยะฟักตัว (Prehatching Stage)

ทริปซินมีบทบาทสำคัญต่อการสร้างไข่แดง (Yolk Formation) สลายไข่แดง (Yolk Degradation) [30] การสร้างเอ็มบริโอ (Embryogenesis) และการฟักตัวของลูกปลา [31] กิจกรรมของทริปซินมีความสำคัญต่อการสลายโปรตีนเพื่อแบ่งตัวสร้างเซลล์และอวัยวะใหม่ ทำให้การเปลี่ยนแปลงระดับโปรตีนในเซลล์ไข่มีค่าสูงกว่าในเซลล์ร่างกาย [1], [32] กรดอะมิโนที่ได้จากการสลายของโปรตีนโดยทริปซินมีความสำคัญต่อการควบคุมแรงดันออสโมติก (Osmotic Pressure) และการลอยตัวของเอ็มบริโอในระยะเริ่มแรก [33]

กิจกรรมของทริปซินในไข่มีความแปรผัน เนื่องจากคุณภาพของอาหารที่แม่พันธุ์ได้รับ [10] ช่วงพัฒนาการของไข่ [4] และระยะของเอ็มบริโอ [31] การศึกษาใน Atlantic Cod พบว่ากิจกรรมของทริปซินมีค่าสูงเมื่อเอ็มบริโออยู่ในช่วงที่มีการสร้างอวัยวะ (Organogenesis) และมีค่าต่ำเมื่อปลามีการฟักตัว (รูปที่ 5) ดังนั้น อัตราการรอดหลังระยะฟักตัวของสัตว์น้ำอาจเพิ่มขึ้น หากมีระดับของทริปซินที่เหมาะสม [31]

4.4.2 พัฒนาการหลังระยะฟักตัว (Posthatching Stage) ถึงวัยอ่อน (Larval Stage)

การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของทริปซินในสัตว์น้ำวัยอ่อนมีอิทธิพลมาจากอุณหภูมิการฟักไข่และอุณหภูมิน้ำ [34] ปริมาณโปรตีนในอาหาร [3] และการอดอาหาร [5] การศึกษากิจกรรมของทริปซินในสัตว์น้ำ



รูปที่ 5 การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของทริปซินในไข่ระยะต่างๆ ของ Atlantic Cod *(Gadus morhua)* หลังจากปฏิสนธิ (I = Cleavage; II = Blastula; III = Gastrula; IV = Segmentation; V = Hatching and Early Larva) [31]

วัยอ่อนมีความสำคัญมาก เนื่องจากสัตว์น้ำในระยะนี้ปรับตัวต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมได้น้อย รวมทั้งระบบทางเดินอาหารยังทำงานไม่เต็มประสิทธิภาพ ทำให้สัตว์น้ำมีการตายสูง ดังนั้น การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ในสัตว์น้ำวัยอ่อนจึงอาจแก้ปัญหาจุดวิกฤติของการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำได้ การศึกษาในปลาวัยอ่อนพบว่ากิจกรรมของทริปซินมีค่าเพิ่มขึ้นหลังจากถูกฟักออกจากไข่ และมีค่าลดลเมื่อสัตว์น้ำมีการเปลี่ยนแปลงเมทามอร์โฟซิส [5] และหลังจากนั้นกิจกรรมจะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามอายุ [27], [28]

4.4.3 พัฒนาการของสัตว์น้ำวัยเจริญพันธุ์

กิจกรรมของทริปซินมีความผันแปรกับอุณหภูมิ [4] อายุและเพศ [1], [27] หรือสภาพแวดล้อมในระบบนิเวศที่ต่างกัน [34] การแสดงออกของทริปซินในสัตว์น้ำมีอิทธิพลมาจากปัจจัยต่างๆ ได้แก่ คุณภาพของอาหาร [35] แสง [36] การแสดงออกของยีนและการได้รับฮอร์โมน [37] และระบบภูมิคุ้มกัน [39] การศึกษาของ Sunde และคณะ [35], [36] พบว่าอัตราการเจริญเติบโตของสัตว์น้ำมีความสัมพันธ์กับกิจกรรมของทริปซิน กรดอะมิโนจำเป็น กรดอะมิโนทั้งหมด และปริมาณอาร์เอ็นเอในกล้ามเนื้อ โดยกิจกรรมของทริปซินจะมีค่าสูงในช่วงที่สิ่งมีชีวิตมีการเติบโตเร็ว

4.5 ไคโมทริปซิน (Chymotrypsin)

ไคโมทริปซิน (EC 3.4.21.1) เป็นเอนไซม์ที่เกิดจากการกระตุ้นของทริปซิน สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่พีเอช 7–10 [1], [10], [18], [26], [27] ไคโมทริปซินมีความจำเพาะต่อชนิดของสารตั้งต้น และสามารถตัดพันธะเอไมน์ และเอสเทอร์ได้เช่นเดียวกับทริปซิน โดยตัดพันธะเปปไทด์หลังกรดอะมิโนที่มีโซ่ข้างเป็นวงแหวน ได้แก่ ฟีนิลอะลานีน ทริปโทเฟน ไทโรซีน และกรดอะมิโนที่มีโซ่ข้างเป็นไฮโดรโฟบิก เช่น เมทไธโอนีน [29] สารยับยั้งการทำงานของไคโมทริปซิน คือ Tosyl Phenyl Alanine Chloromethyl Ketone (TPCK) และ Chymostatin การศึกษากิจกรรมของไคโมทริปซินมักทำควบคู่กับทริปซินตั้งแต่ก่อนระยะฟักตัวถึงวัยเจริญพันธุ์ การศึกษาในสัตว์น้ำพบว่าการแสดงออกไคโมทริปซินมีผลต่อการเติบโตในทิศทางตรงกันข้ามกับทริปซิน โดยกิจกรรมของไคโมทริปซินจะมีค่าสูงในช่วงที่สิ่งมีชีวิตเติบโตช้าหรือถูกจำกัดโดยปัจจัยต่างๆ [2], [4] ขณะที่การศึกษาการแสดงออกของไคโมทริปซินในปูแมงมุม (*Maja brachydactyla*) พบว่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามอายุ และมีค่าสูงสุดเมื่อปูเข้าสู่ระยะที่มีการเปลี่ยนแปลงเมทามอร์โฟซิส [39]

5. การประยุกต์ใช้ความรู้ด้านเอนไซม์ย่อยอาหาร

เทคโนโลยีทางด้านเอนไซม์ย่อยอาหารมีบทบาทสำคัญต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการใช้ประโยชน์จากอาหาร การศึกษาในปัจจุบันได้นำความรู้ดังกล่าวมาประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ ดังต่อไปนี้

5.1 การคัดเลือกวัตถุดิบอาหารหรืออาหาร

การประเมินประสิทธิภาพการย่อยในหลอดทดลอง (*In Vitro* Digestibility) สามารถใช้เพื่อคัดเลือกวัตถุดิบอาหารหรืออาหารสัตว์ก่อนการทดลองเลี้ยงจริง เนื่องจากค่าดังกล่าวแสดงถึงความสามารถของสัตว์ในการย่อยวัตถุดิบแต่ละชนิด นอกจากนี้ยังสามารถใช้เพื่อพยากรณ์

เกี่ยวกับผลของอาหารต่อการเติบโตของสิ่งมีชีวิต [10], [11], [14] การประเมินประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนอาศัยความสามารถในการย่อยของทริปซิน [1], [11] ขณะที่ประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรตอาศัยความสามารถในการย่อยของอะไมเลสเป็นหลัก [12], [13]

การประเมินประสิทธิภาพการย่อยในหลอดทดลองเป็นเทคนิคที่สามารถวิเคราะห์ได้รวดเร็ว มีค่าใช้จ่ายน้อย และมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับการย่อยในตัวสัตว์ ตัวอย่างการประยุกต์ใช้เทคนิคดังกล่าวเพื่อคัดเลือกวัตถุดิบอาหารสำหรับสัตว์น้ำ เช่น การคัดเลือกวัตถุดิบอาหารสำหรับปลากัด [1] กุ้งมังกร (*Panulirus argus*) [9] หรือการคัดเลือกชนิดของสาหร่ายเพื่อการเพาะเลี้ยงหอยมุกน้ำจืด [12], [13] เป็นต้น นอกจากนี้ การประเมินประสิทธิภาพการย่อยในหลอดทดลองสามารถนำมาปรับปรุงคุณภาพของวัตถุดิบอาหาร เพื่อให้สัตว์น้ำสามารถย่อยและดูดซึมอาหารได้ดียิ่งขึ้น เช่น การคัดเลือกสภาวะ ระดับ หรือวิธีการที่เหมาะสมในการดัดแปรวัตถุดิบอาหารให้เอนไซม์ย่อยอาหารมีการไฮโดรไลส์ได้ดีขึ้น [1], [14]

5.2 การปรับปรุงวัตถุดิบอาหารหรืออาหารให้ย่อยง่าย

สัตว์น้ำวัยอ่อนมักมีปัญหาเกี่ยวกับการย่อยอาหาร เนื่องจากในช่วงอายุดังกล่าวมีการผลิตเอนไซม์ได้น้อย ทำให้มีประสิทธิภาพการย่อยต่ำ ดังนั้น การให้อาหารที่มีอนุภาคขนาดเล็ก (Microdiet) อาจทำให้ประสิทธิภาพการย่อยของสัตว์สูงขึ้น เนื่องจากการเพิ่มพื้นที่ผิวของอาหารมีผลต่อการไฮโดรไลส์ของเอนไซม์ [1] นอกจากนี้ การใช้โปรตีนที่ผ่านการย่อยบางส่วน (Hydrolysate) หรือกรดอะมิโนอิสระ (Free Amino Acid) พบว่าช่วยเพิ่มความสามารถในการย่อยและดูดซึมในสัตว์น้ำวัยอ่อนได้เป็นอย่างดี [24]

5.3 การเสริมเอนไซม์ย่อยอาหาร

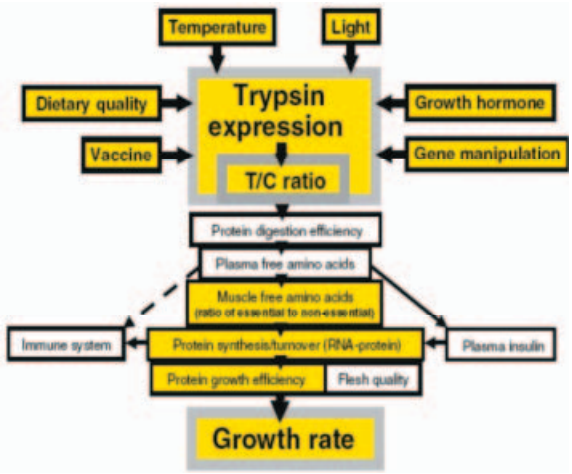
การเพิ่มประสิทธิภาพการใช้อาหารของสัตว์น้ำสามารถกระตุ้นโดยใช้เทคนิคต่างๆ เช่น การเสริมเอนไซม์ย่อยอาหาร (Exogenous Enzymes) ซึ่งอาจมีแหล่งที่มาจากการสังเคราะห์ (Synthetic Enzymes) อย่างไรก็ตาม ประสิทธิภาพการใช้ประโยชน์จากอาหารขึ้นอยู่กับระดับ [40] และชนิดของเอนไซม์ที่ใช้ [41] นอกจากนี้ การให้อาหารมีชีวิต (Live Diet) เช่น อาร์ทีเมีย (Brine Shrimp) หรือไรแดง (Water Fleas) เพื่อเป็นแหล่งของเอนไซม์ร่วมกับการให้อาหารสำเร็จรูป (Co-Feeding) พบว่าสามารถส่งเสริมการย่อยและการเติบโตของสัตว์น้ำวัยอ่อนได้หลายชนิด [24]

5.4 การจัดการอาหาร

ความรู้ด้านเอนไซม์ย่อยอาหารสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการใช้ประโยชน์จากอาหารได้ เช่น การศึกษาผลของความถี่ในการให้อาหารต่อกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหาร [42], [43] เพื่อหาความถี่ของมื้ออาหารที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงสัตว์น้ำ และเกิดความคุ้มทุน หรือการอดอาหาร (Starvation) เพื่อให้ท่อทางเดินอาหารว่างและกลับมาให้อาหารอีกครั้ง (Re-Feeding) เพื่อกระตุ้นให้สัตว์น้ำอยากกินอาหารมากขึ้น (Appetite) [2], [8] นอกจากนี้ การใช้นิวโรเพปไทด์ (Neuropeptides) เช่น Bombesin, Gastrin, Somatostatin, Substance P หรือ Vasoactive Intestinal Polypeptides เป็นต้น ก็สามารถกระตุ้นให้สัตว์น้ำหลั่งเอนไซม์และย่อยอาหารให้ดีขึ้น [24] หรืออาจเสริมฮอร์โมนที่มีผลต่อพัฒนาการของระบบย่อยอาหารของปลาวัยอ่อน เช่น Growth Hormones หรือ Thyroid Hormones (T3 และ T4) เป็นต้น

5.5 การประเมินการเติบโต

การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหารสามารถบอกถึงการเติบโตและพัฒนาการของสัตว์น้ำได้ การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของทริปซินและไคโมทริปซินทำให้อัตราส่วนระหว่างทริปซินต่อไคโมทริปซิน (Activity Ratio of Trypsin to Chymotrypsin: T/C Ratio) มีการเปลี่ยนแปลง ส่งผลต่อประสิทธิภาพการย่อยโปรตีน ปริมาณกรดอะมิโนอิสระในพลาสมาและในกล้ามเนื้อ สมดุลของการสร้างและการสลายโปรตีน และอัตราการเติบโต [37] (รูปที่ 6) ทั้งนี้ เนื่องจากอัตราการหลั่งของ



รูปที่ 6 กลไกควบคุมการเติบโตในสัตว์น้ำโดยการแสดงออกของทริปซิน และค่า T/C Ratio [4]

ทริปซินและไคโมทริปซินมีความสัมพันธ์กับความอยากอาหารของปลา อัตราการดูดซึม การสังเคราะห์กรดอะมิโนที่จำเป็นสำหรับการสร้างโปรตีน และระดับการหลั่งของพลาสมาอินซูลิน [44] ดังนั้น อัตราส่วนดังกล่าวจึงสัมพันธ์การเติบโต และไม่ขึ้นกับการแสดงออกของทริปซินหรือไคโมทริปซิน [2], [4] นอกจากนี้ อัตราส่วนของอะไมเลสต่อทริปซิน (Activity Ratio of Amylase to Trypsin: A/T Ratio) ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการใช้ประโยชน์คาร์โบไฮเดรตและโปรตีน พบว่าสามารถใช้ประเมินพฤติกรรมการกินอาหารของสัตว์น้ำได้เช่นกัน [1], [7], [14]

6. สรุป

กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหารมีความสัมพันธ์กับการเติบโตและการเปลี่ยนแปลงทางโภชนาการของสัตว์น้ำในแต่ละช่วงวัย การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหารสามารถนำมาประยุกต์ใช้เพื่อพัฒนากระบวนการผลิตอาหารสัตว์น้ำให้มีประสิทธิภาพได้ ตัวอย่างเทคโนโลยีด้านเอนไซม์ย่อยอาหารที่นิยมใช้ เช่น การคัดเลือกและปรับปรุงคุณภาพของวัตถุดิบอาหารให้เหมาะสมโดยการประเมินประสิทธิภาพการย่อยในหลอดทดลอง การจัดการอาหารเพื่อให้เกิดความคุ้มทุน การประเมินคุณภาพเติบโตและการใช้ประโยชน์จากอาหารโดยใช้เอนไซม์เป็นตัวบ่งชี้ และการเสริมเอนไซม์ย่อยอาหารเพื่อเพิ่มศักยภาพในการย่อยอาหาร

เอกสารอ้างอิง

[1] K. Thongprajukaew, "*Feed Development using Digestive Enzyme Technology for Successive Growth in Siamese Fighting Fish (Betta splendens Regan, 1910)*," Ph.D. Thesis, Kasetsart University, 2011 (in Thai).

[2] C-R. Chan, D-L. Lee, Y-H. Cheng, D. J-Y. Hsieh, and C-F. Weng, "Feed deprivation and re-feeding on alterations of proteases in tilapia *Oreochromis mossambicus*," *Zoological Studies*, vol. 47, no. 2, pp. 207–214, 2008.

[3] C. Wang, S. Xie, X. Zhu, W. Lei, Y. Yang, and J. Liu, "Effects of age and dietary protein level on digestive enzyme activity and gene expression of *Pelteobagrus fulvidraco* larvae," *Aquaculture*, vol. 254, no. 1–4, pp. 554–562, 2006.

[4] K. Rungruangsak-Torrissen, R. Moss, L. H. Andresen, A. Berg, and R. Waagbo, "Different expressions of trypsin and chymotrypsin in relation to growth in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)," *Fish Physiology and Biochemistry*, vol. 32, no. 1, pp. 7–23, 2006.

[5] S. Bolasina, A. Perez, and Y. Yamashita, "Digestive enzymes activity during ontogenetic development and effect of starvation in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus," Aquaculture*, vol. 252, no. 2–4, pp. 503–515, 2006.

[6] M.C. Hidalgo, E. Urea, and A. Sanz, "Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities," *Aquaculture*, vol. 170, no. 3–4, pp. 267–283, 1999.

[7] R. Hofer, F. Schiemer, "Proteolytic activity in the digestive tract of several species of fish with different feeding habits," *Oecologia*, vol. 48, no. 3, pp. 342–345, 1981.

[8] M. Riche, D.I. Haley, M. Oetker, S. Garbrecht, and D. L. Garling, "Effect of feeding frequency on gastric evacuation and the return of appetite in tilapia *Oreochromis niloticus* (L.)," *Aquaculture*, vol. 234, no. 1–4, pp. 657–673, 2004.

[9] E. Perera, F.J. Moyano, L. Rodriguez-Viera, A. Cervantes, G. Martinez-Rodriguez, and J.M. Mancera, "*In vitro* digestion of protein sources by crude enzyme extracts of the spiny lobster *Panulirus argus* (Latreille, 1804) hepatopancreas with different isoenzyme patterns," *Aquaculture*, vol. 310, no. 1, pp. 178–185, 2010.

[10] K. Rungruangsak-Torrissen, "Digestive efficiency, growth and qualities of muscle and oocyte in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed on diets with krill meal as an alternative protein source," *Journal of Food Biochemistry*, vol. 31, no. 1, pp. 509–540, 2007.

[11] K. Rungruangsak-Torrissen, A. Rustad, J. Sunde, S.A. Eiane, H.B. Jensen, J. Opstvedt, E. Nygard, T.A. Samuelsen, H. Mundheim, U. Luzzana, and G. Venturini, "*In vitro* digestibility based on fish crude enzyme extract for prediction of feed quality in growth trials," *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 82, no. 6, pp. 644–654, 2002.

[12] M. Areekijseree, A. Engkagul, S. Kovitvadhi, U. Kovitvadhi, A. Thongpan, and K. Rungruangsak-Torrissen, "Development of digestive enzymes and *in vitro* digestibility of different species of phytoplankton for culture of early juveniles of the freshwater pearl mussel, *Hyriposis (Hyriopsis) bialatus* Simpson, 1900," *Invertebrate Reproduction and Development*, vol. 49, no. 4, pp. 255–262, 2006.

[13] P. Supannapong, T. Pimsalee, T. A-komol, A. Engkakul, U. Kovitvadhi, S. Kovitvadhi, and K. Rungruangsak-Torrissen, "Digestive enzymes and *in vitro* digestibility of different species of phytoplankton for culture of the freshwater pearl mussel, *Hyriopsis (Hyriopsis) bialatus," Aquaculture International*, vol. 16, no. 5, pp. 437–453, 2008.

[14] K. Thongprajukaew, U. Kovitvadhi, S. Kovitvadhi, P. Somsueb, K. Rungruangsak-Torrissen, "Effects of different modified diets on growth, digestive enzyme activities and muscle compositions in juvenile Siamese fighting fish (*Betta splendens* Regan, 1910)," *Aquaculture*, vol. 322–323, no. 1, pp. 1–9, 2011.

[15] V. Vuthiphandchai, *Fish Feed,* Bangkok: O.S. Printing House Co., Ltd., 1993 (in Thai).

[16] L.S. Smith, *Digestive Functions in Teleost Fishes*, *In: Fish Nutrition* (J. E. Halver, ed), San Diego: Academic Press, Inc., 1989.

[17] T.J. Pandian and E. Vivekanandan, *Energetics of Feeding and Digestion*, *In: Fish Energetic: New Perspective* (P. Tytler, P. Calow, eds), Maryland Johns Hopkins University Press.1985.

[18] Y. Natalia, R. Hashim, A. Ali, and A. Chong, "Characterization of digestive enzymes in a carnivorous ornamental fish, the Asian bony tongue *Scleropages formusus* (Osteoglossidae)," *Aquaculture*, vol. 233, no. 1–4, pp. 305–320, 2004.

[19] R. Munilla-Moran and F. Saborido-Rey, "Digestive enzymes in marine species. II. Amylase activities in gut from seabream (*Sparus aurata*), turbot (*Scophthamus maximus*) and redfish (*Sebastes mentella*),"*Comparative Biochemistry and Physiology*, vol. 113, no. 4, pp. 827–834, 1996.

[20] J.P. Lazo, R. Mendoza, G.J. Holt, C. Aguilera,

and C.R. Arnold, "Characterization of digestive enzymes during larval development of red drum (*Sciaenop ocellatus*)," *Aquaculture*, vol. 265, no. 1–4, pp. 194–205, 2007.

[21] M. Areekijseree, A. Engkagul, U. Kovitvadhi, A. Thongpan, M. Mingmuang, P. Pakkong, and K. Rungruangsak-Torrissen, "Temperature and pH characteristics of amylase and proteinase of adult freshwater pearl mussel, *Hyriopsis (Hyriopsis) bialatus* Simpson 1900," *Aquaculture,* vol. 234, no. 1–4, pp. 575–587, 2004.

[22] K. Thongprajukaew, U. Kovitvadhi, A. Engkagul, and K. Rungruangsak-Torrissen, "Temperature and pH characteristics of amylase and lipase at different developmental stages of Siamese fighting fish (*Betta splendens* Regan, 1910)," *Kasetsart Journal (Natural Science)*, vol. 44, no. 2, pp. 210–219, 2010.

[23] M. Areekijseree, A. Engkagul, U. Kovitvadhi, A. Thongpan, M. Mingmuang, and S. Kovitvadhi, "Activity profiles at different pH and temperature of cellulases and lipases in freshwater pearl mussel: *Hyriopsis (Hyriopsis) bialatus*, Simpson 1900. *Kasetsart Journal (Natural Science)*, vol. 36, no. 4, pp. 399–407, 2002.

[24] S. Kolkovski, "Digestive enzymes in fish larvae and juveniles-implications and application to formulated diets," *Aquaculture*, vol. 200, no. 1–2 pp. 181–201, 2001.

[25] I. Martinez, F.J. Moyano, C. Fernandez-Diaz, and M. Yufera, "Digestive enzyme activity during larval development of the Senegal sole (*Solea senegalensis*)," *Fish Physiology and Biochemistry*, vol. 21, no. 4, pp. 317–323, 1999.

[26] A.S.C. Chong, R. Hashim, L. Chow-Yang, and A.B. Ali, "Partial characterization and activities of proteases from digestive tract of discus fish (*Symphysodon aequifasciata*)," *Aquaculture*, vol. 203, no. 3–4, pp. 321–333, 2002.

[27] K. Thongprajukaew, U. Kovitvadhi, A. Engkagul, and K. Rungruangsak-Torrissen, "Characterization and expression levels of protease enzymes at different developmental stages of Siamese fighting fish (*Betta splendens* Regan, 1910)," *Kasetsart Journal (Natural Science)*, vol. 44, no. 3, pp. 411–423, 2010.

[28] R.M. Rathore, S. Kumar, and R. Chakrabarti, "Digestive enzyme patterns and evaluation of protease classes in *Catla catla* (Family: Cyprinidae) during early developmental stages," *Comparative Biochemistry and Physiology*, vol. 142, no. 1, pp. 98–106, 2005.

[29] L. Stryer, *Biochemistry*, 3rd eds, New York: WH Freeman, 1988.

[30] N. Hiramatsu, N. Ichikawa, H. Fukada, T. Fujita, C.V. Sullivan, and A. Hara, "Identification and characterization of proteases involved in specific proteolysis of vitellogenin and yolk proteins in salmonids,"*Journal of Experimental Zoology*, vol. 292, no. 1, pp. 11–25, 2002.

[31] H. Sveinsdottir, H. Thorarensen, and A. Gudmundsdottir, "Involvement of trypsin and chymotrypsin activities in Atlantic cod (*Gadus morhua*) embryogenesis," *Aquaculture*, vol. 260, no. 1, pp. 307–314, 2006.

[32] K. Rungruangsak-Torrissen and J.E. Fosseidengen, "Effect of artificial feeding on digestive efficiency, growth and qualities of muscle and oocyte in maturing Atlantic mackerel (*Scomber scombrus* L.)," *Journal of Food Biochemistry*, vol. 31, no. 6, pp. 726–747, 2007.

[33] R.N. Finn, G.C. Ostby, B. Norberg, and H.J.

Fyn, "*In vivo* oocyte hydration in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*); proteolytic liberation of free amino acid, and ion transport, are driving forces for osmotic water influx," *Journal of Experimental Biology*, vol. 205, no. 2, pp. 211–224, 2002.

[34] K. Rungruangsak-Torrissen, G.M. Pringle, R. Moss, and D.F. Houlihan, "Effects of varying rearing temperatures on expression of different trypsin isozymes, feed conversion efficiency and growth in Atlantic salmon *(Salmo salar L.)*," *Fish Physiology and Biochemistry*, vol. 19, no. 3, pp. 247–255, 1998.

[35] J. Sunde, S.A. Eiane, A. Rustad, H.B. Jensen, J. Opstevedt, E. Nygard, G. Venturini, and K. Rungruangsak-Torrissen, "Effect of fish feed processing conditions of digestive protease activities, free amino acid pools, feed conversion efficiency and growth in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)," *Aquaculture Nutrition*, vol. 10, no. 4, pp. 261–277, 2004.

[36] J. Sunde, G.L. Taranger, and K. Rungruangsak–Torrissen, "Digestive protease activities and free amino acids in white muscle as indicators for feed conversion efficiency and growth rate in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)," *Fish Physiology and Biochemistry*, vol. 25, no.4, pp. 335–345, 2001.

[37] K. Rungruangsak-Torrissen and A. Sundby, "Protease activities, plasma free amino acids and insulin at different ages of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) with genetically different trypsin isozymes," *Fish Physiology and Biochemistry*, vol. 22, no. 4, pp. 337–347, 2000.

[38] K. Rungruangsak-Torrissen, H.I. Wergeland, J. Glette, and R. Waagbø, "Disease resistance and immune parameters in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) with genetically different trypsin isozymes," *Fish and Shellfish Immunology*, vol. 9, no. 7, pp. 557–568, 1999.

[39] M. Andrés, E. Gisbert, M. Díaz, F.J. Moyano, A. Estévez, and G. Rotllant, "Ontogenetic changes in digestive enzymatic capacities of the spider crab, *Maja brachydactyla* (Decapoda: Majidae)," *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, vol. 389, no.1, pp. 75–84, 2010.

[40] D.A.J. Stone, G.L. Anderson, and A.J. Anderson, "Carbohydrate utilization by juvenile silver perch, *Bidyanus bidyanus* (Mitchell) IV. Can dietary enzyme increase digestible energy from wheat starch, wheat and dehulled lupin?," *Aquaculture Research*, vol. 34, no. 2, pp. 135–147, 2003.

[41] M. Farhangi and C.G. Carter, "Effect of enzyme supplementation to dehulled lupin-based diets on growth, feed efficiency, nutrient digestibility and carcass composition of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum),"*Aquaculture Research*, vol. 38, no. 12, pp. 1274–1282, 2007.

[42] F. Xie, Q. Ai, K. Mai, W. Xu, and H. Ma, "The optimal feeding frequency of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*, Richardson) larvae," *Aquaculture*, vol. 311, no. 1–4, pp.162–167, 2011.

[43] W. Wu, Z. Xi-Xun, M. Xu-Zhou, and L. Wei-Chun, "Effect of feeding frequency on the growth and protease activities of *Pelteobagrus vachelli*," 2007. (Abstract).

[44] S. Einarsson, D.P. Spencer, and C. Talbot, "The effect of feeding on the secretion of trypsin, pepsin and chymotrypsin," *Fish Physiology and Biochemistry*, vol. 15, no. 5, pp. 439–446, 1996.