นิพนธ์ต้นฉบับ

ผลของแคโรทีนอยด์ชนิดต่าง ๆ ต่อการเจริญเติบโต องค์ประกอบเลือด ความต้านทานโรค และความเครียด ในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* Fabricius)

กิจการ ศุภมาตย์[1] สุภฎา คีรีรัฐนิคม[2] ประทีป รุ่งสมบัติ[3] มะลิ บุณยรัตผลิน[4] และ อธิศักดิ์ เกลี้ยงประดิษฐ์[5]

Abstract

Supamattaya, K.[1], Kiriratnikom, S.[2], Rungsombat, P.[1], Boonyaratpalin, M.[3] and Kliangpradit, A.[4]

Effects of carotenoid sources on growth performance, blood parameters, disease resistance and stress tolerance in black tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius)

Songklanakarin J. Sci. Technol., 2005, 27(Suppl. 1) : 71-82

Two feeding trial were conducted to determine the effects of various sources of carotenoid on growth performance, disease resistance, blood parameters, stress tolerance and pigmentation in juvenile black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Trial I was performed in small shrimp (1 g average body weight). The shrimp

[1]Aquatic Animal Health Research Center, Department of Aquatic Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112 Thailand. [2]Department of Biology, Faculty of Science, Thaksin University, Muang, Songkhla 90000 Thailand. [3]Department of Fisheries, Kaset Klang, Bangkhen, Chatujak, Bangkok 10900 Thailand [4]BASF (Thai) Limited, 23rd Fl., Emporium Tower, 622 room 1-6 Sukumvit 24, Klongton, Klongtoey, Bangkok 10110 Thailand.

[1]Dr. rer. nat. (Aquatic Animal Diseases) รองศาสตราจารย์ [3]วท.บ.(วาริชศาสตร์) ศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112 [2]วท.ม.(วาริชศาสตร์), ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา 90000 [4]Ph.D.(Fish Nutrition) ผู้เชี่ยวชาญพิเศษ กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เกษตรกลาง บางเขน เขตจตุจักร กรุงเทพ 10900 [5]บริษัทบีเอเอสเอฟ (ไทย) จำกัด ชั้น 23 อาคาร เอ็มโพเรียม ทาวเวอร์ 622 ห้อง 1-6 ถนนสุขุมวิท 24 แขวงคลองตัน เขตคลองเตย กรุงเทพ 10110

Corresponding e-mail: kidchakan.s@psu.ac.th

รับต้นฉบับ 2 กันยายน 2547 รับลงพิมพ์ 11 พฤศจิกายน 2547

were fed with control diet without carotenoid (diet 1) while diets 2 to 6 contained 50 mg/kg astaxanthin (Lucanthin Pink®), 125 mg/kg β-carotene (Lucarotin®), 200 mg/kg β-carotene (Lucarotin®), 125 mg/kg Betatene® extracted from *Dunaliella* and 3% dried *Spirulina* respectively. There was an improvement in color in all groups of shrimp fed caroteniod supplemented diets, but no significant differences in weight gain or survival among the shrimps fed each test diet (p>0.05). Resistance to white spot syndrome virus (WSSV) infection and stress tolerance (salinity stress), were not significantly different among treatments.

Trial II was performed in juvenile shrimp (10 g average body weight) fed test diets containing 100 ppm astaxanthin (Lucanthin pink®), 125 mg/kg β-carotene (Lucarotin®), 250 mg/kg β-carotene (Lucarotin®), 250 mg/kg Betatene® and 3% dried *Spirulina* compared with those fed control diet without carotenoid. At the end of 6 weeks feeding period, shrimp fed control diet as well as astaxanthin and dried *Spirulina* supplemented diets had higher levels of total hemocyte counts than those of all β-carotene supplemented diets feeding group. However, phenoloxidase activity and clearance of pathogenic vibrio from the hemolymph were not significantly different among the treatments (p>0.05). Astaxanthin levels were highest in the shrimp fed all carotenoid-supplemented diets. In conclusion, a natural carotenoid i.e. dried *Spirulina* and carotenoid extracted from *Dunaliella* which have a lower production cost than analytical carotenoid showed beneficial effects on shrimp feed supplement.

Key words : carotenoid, stress tolerance, disease resistance, *Penaeus monodon*

บทคัดย่อ

กิจการ ศุภมาตย์ สุภฎา คีรีรัฐนิคม ประทีป รุ่งสมบัติ มะลิ บุณยรัตผลิน
และ อธิศักดิ์ เกลี้ยงประดิษฐ์

ผลของแคโรทีนอยด์ชนิดต่าง ๆ ต่อการเจริญเติบโต องค์ประกอบเลือด ความต้านทานโรค และความเครียด ในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* Fabricius)

ว. สงขลานครินทร์ วทท. 2548 27(ฉบับพิเศษ 1) : 71-82

ศึกษาผลของแคโรทีนอยด์ชนิดต่าง ๆ ในอาหารต่อการเจริญเติบโต ความต้านทานโรค องค์ประกอบเลือด ความต้านทานต่อความเครียด และการสะสมแคโรทีนอยด์ในกุ้งกุลาดำ การทดลองที่ 1 ทดลองในกุ้งกุลาดำขนาดเล็กน้ำหนักเฉลี่ย 1 กรัม โดยกุ้งได้รับอาหารทดลองที่ไม่เสริมแคโรทีนอยด์ (สูตรที่ 1) ขณะที่อาหารทดลอง สูตรที่ 2-6 ให้อาหารเสริมแอสตาแซนทีน (Lucanthin Pink®) 50 มก./กก., เบตาแคโรทีน (Lucarotin®) 125 มก./กก., เบตาแคโรทีน (Lucarotin®) 200 มก./กก., แคโรทีนอยด์สกัดจาก *Dunaliella* (Betatene®) 125 มก./กก. และสไปรูลินาแห้ง 3% ตามลำดับ เมื่อสิ้นสุดการทดลองในเวลา 8 สัปดาห์ พบว่ากุ้งกุลาดำในกลุ่มที่ได้รับแคโรทีนอยด์ทุกแหล่งมีสีตัวเข้มขึ้น แต่การเจริญเติบโตและการรอดตายของกุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารทดลองเสริมแคโรทีนอยด์แต่ละชนิดไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (p>0.05) กุ้งที่ได้รับอาหารทดลองเสริมแคโรทีนอยด์ทุกชนิดมีแนวโน้มจะต้านทานโรคตัวแดงดวงขาว (WSSV) และความเครียดจากการเพิ่มลดความเค็มได้สูงขึ้นแต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติในแต่ละชุดการทดลอง (p>0.05)

การทดลองที่ 2 ทดลองในกุ้งกุลาดำที่มีน้ำหนักเฉลี่ย 10 กรัม กุ้งชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมแอสตาแซนทีน (Lucanthin Pink®) 100 มก./กก., เบตาแคโรทีน (Lucarotin®) 125 มก./กก., เบตาแคโรทีน (Lucarotin®) 250 มก./กก., แคโรทีนอยด์สกัดจาก *Dunaliella* (Betatene®) 250 มก./กก. และสไปรูลินาแห้ง 3% เทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งได้รับอาหารไม่เสริมแคโรทีนอยด์เมื่อสิ้นสุดการทดลองในเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งชุดที่ได้รับอาหารชุดควบคุม อาหารเสริมแอสตาแซนทีน และเสริมสาหร่ายสไปรูลินา มีค่าสูงกว่ากุ้งที่ได้รับอาหารทดลองเสริมเบตาแคโรทีน (P<0.05) อย่างไรก็ตามความสามารถในการกำจัดแบคทีเรียออกจากน้ำเลือด และความว่องไวของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสมีค่าไม่แตกต่างกันในแต่ละชุดการทดลอง (P>0.05) ความต้านทานต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (WSSV) มีแนวโน้มสูงขึ้นแต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติระหว่างชุดการทดลอง (p>0.05) กุ้งที่ได้

รับอาหารเสริมแคโรทีนอยด์ทุกชนิดมีปริมาณของแอสตาแซนทีนสะสมในตัวกุ้ง 30.4-32.0 มก./กก. ขณะที่กุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารชุดควบคุมมีความเข้มข้นของแอสตาแซนทีนต่ำกว่า ผลการศึกษาดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าสามารถประยุกต์ใช้แคโรทีนอยด์จากวัสดุธรรมชาติคือสไปรูลินาแห้งและสารสกัดจากสาหร่าย *Dunaliella* ซึ่งมีต้นทุนการผลิตต่ำกว่าแคโรทีนอยด์สังเคราะห์เพื่อเสริมในอาหารกุ้งกุลาดำได้อย่างมีประสิทธิภาพ

แคโรทีนอยด์ ซึ่งเป็นกลุ่มรงควัตถุที่ละลายได้ดีในไขมัน (fat soluble pigments) สามารถแบ่งออกได้เป็นหลายชนิด ซึ่งสารดังกล่าวถูกสร้างผ่านวิถีเทอร์พีนอยด์ (terpenoid pathway) ในเซลล์ของพืช สาหร่าย ตลอดจนแบคทีเรีย โดยมีโครงสร้างพื้นฐานมาจากไฟโตอีน (phytoene) แคโรทีนอยด์นับว่ามีความสำคัญในระบบสรีรวิทยาของสิ่งมีชีวิตอย่างมากและถือว่าเป็นสารอาหารที่มีความสำคัญเนื่องจากทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้นของวิตามินเอ(provitamin A) ซึ่งมีผลในระบบการมองเห็น และช่วยในการพัฒนาการสร้างตัวของเนื้อเยื่อบุผิว (epidermal tissue) ซึ่งจะเป็น การช่วยป้องกันการติดเชื้อ (Lascha, 1991) นอกจากนี้แคโรทีนอยด์ยังเกิดปฏิกิริยารวมกับโปรตีนกลายเป็นแคโรทีโนโปรตีน (carotenoproteins) ในสัตว์กลุ่มกุ้ง และปู ซึ่งจะทำให้โปรตีนมีความคงสภาพมากขึ้น และมีผลให้องค์ประกอบ และ permeability ของเมมเบรนเปลี่ยนแปลงไปได้ และที่สำคัญจะทำหน้าที่เป็นสารป้องกันแสง (photoprotection) และสารป้องกันการหืน (biological antioxidant) ซึ่งจะทำหน้าที่ป้องกันเนื้อเยื่อและเซลล์มิให้ถูกทำลายจากปฏิกิริยาออกซิเดชั่นที่เกิดขึ้นในร่างกาย (Simpson *et al*., 1981) ด้วยเหตุนี้แคโรทีนอยด์จึงมีผลโดยตรงต่อระบบการทำงานต่างๆ ของร่างกาย เช่น ระบบสืบพันธุ์ ระบบการมองเห็น และระบบภูมิคุ้มกันเป็นต้น

จากความต้องการลักษณะทางกายภาพของผลิตภัณฑ์อาหารจากสัตว์น้ำในตลาดโลก ผลิตภัณฑ์เนื้อปลาในกลุ่มปลาซัลมอน (*Salmo* sp., *Oncorhynchus* sp., *Salvelinus* sp.) ควรจะมีสีชมพูถึงสีแดง เช่นเดียวกับปลาเรดซีบรีม (*Chrysophrys major*) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงควรจะมีสีชมพูแดงซึ่งจะคล้ายกับปลาที่จับจากธรรมชาติ (Sommer *et al*., 1991) นอกจากนี้ในผลผลิตกุ้งจากการเพาะเลี้ยงมักพบว่ากุ้งที่ได้รับอาหารที่มีแคโรทีนอยด์ไม่เพียงพอจะมีสีซีด (สีฟ้า) และเมื่อนำไปผ่านกระบวนการแปรรูปจะได้ผลิตภัณฑ์กุ้งต้มที่มีสีเหลืองส้ม ซึ่งไม่เป็นที่ต้องการของตลาด การเสริมสารประกอบแคโรทีนอยด์ลงในอาหารกุ้งถือเป็นแนวทางในการแก้ไขปัญหาดังกล่าวได้ เนื่องจากสารประกอบ แคโรทีนอยด์มีส่วนเกี่ยวข้องโดยตรงกับการสะสมแอสตาแซนทีนของกุ้ง เมื่อกุ้งกินอาหารที่มีแคโรทีนอยด์เข้าไปจะเกิดการสะสมในร่างกายเป็นเหตุให้สีของตัวกุ้งเข้มขึ้น และเมื่อผ่านการต้มในกระบวนการแปรรูปจะให้ผลิตภัณฑ์ที่มีสีแดงส้มที่ตรงกับความต้องการของผู้บริโภค (Lascha, 1991) ในปัจจุบันมีรายงานการใช้แคโรทีนอยด์เพื่อเป็นสารเสริมภูมิคุ้มกันในสัตว์น้ำ ทั้งนี้เนื่องจากแคโรทีนอยด์มีคุณสมบัติในการทำลายอนุมูลอิสระของออกซิเจนที่เป็นพิษซึ่งเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหายใจ (respiratory burst) ของฟาโกซัยต์ (phagocytes) (Estermann, 1994)

จากการศึกษาในกุ้งยังพบว่าการเสริมแอสตาแซนทีนในอาหารมีผลต่อความต้านทานต่อความเครียด อย่างไรก็ตามแคโรทีนอยด์หลายชนิดพบว่าให้ผลที่ดีในการเสริมการเจริญเติบโต และการเร่งสีในกุ้งกุลาดำ (Yamada *et al*., 1990) โดยยังไม่รายงานเกี่ยวกับผลที่มีต่อระบบภูมิคุ้มกัน การทดลองนี้จึงได้จัดทำขึ้นเพื่อศึกษาผลของแคโรทีนอยด์ชนิดต่างๆ ที่มีต่อการเจริญเติบโต ระบบภูมิคุ้มกัน และความต้านทานโรคในกุ้งกุลาดำขนาดเล็กและขนาดใหญ่ เพื่อเป็นข้อมูลในการประยุกต์ใช้กับสภาพการเลี้ยงจริงต่อไป

วิธีการศึกษา

การทดลองที่ 1 ผลของแคโรทีนอยด์ต่อการเจริญเติบโต อัตรารอด ความต้านทานโรคและความต้านทานต่อความเครียด ในกุ้งกุลาดำขนาดเล็ก

1.1 การเตรียมสัตว์ทดลอง

เลี้ยงกุ้งกุลาดำระยะโพสต์ลาวา 15 (PL 15) จำนวน 10,000 ตัว ในบ่อคอนกรีตขนาด 10 ตัน โดยให้

อาหารสำเร็จรูปสำหรับลูกกุ้งและอาร์ทีเมียแช่แข็งในช่วง 3 วันแรก แล้วปรับเป็นให้อาหารสำเร็จรูปอย่างเดียว ต่ออีก 3 สัปดาห์ หรือจนกระทั่งกุ้งมีขนาดเฉลี่ย 1 กรัม จึงคัดขนาด และนำลงเลี้ยงในบ่อคอนกรีตขนาด 5 ตัน ที่มีระบบน้ำไหลผ่านตลอดประมาณ 7 วัน จึงนำมาใช้ในการทดลอง

1.2 อาหารทดลอง

เตรียมอาหารทดลองที่มีระดับโปรตีนและพลังงานเท่ากันทุกสูตรตามวิธีการของ Boonyaratpalin และคณะ (2000) โดยอาหารมีปริมาณโปรตีน ไขมัน เถ้า และเยื่อใย คิดเป็น 39.96, 10.72, 8.88 และ 2.05% ตามลำดับ และมีพลังงานในอาหาร 406.19 กิโลจูล เท่ากันทุกสูตร แต่มีระดับของแคโรทีนอยด์จากแหล่งต่างๆ ไม่เท่ากัน โดยอาหารทดลองสูตรที่ 1 ไม่ผสมแคโรทีนอยด์ (ชุดควบคุม) อาหารทดลองสูตรที่ 2-6 ทำการผสมแอสตาแซนทีน (Lucanthin Pink®) 50 มก./กก., เบตาแคโรทีน (Lucarotin®) 125 มก./กก., เบตาแคโรทีน (Lucarotin®) 200 มก./กก., เบตาทีน (Betatene®: 2% beta carotenoid) 125 มก./กก. และสาหร่ายสไปรูลินาอบแห้ง 3% ตามลำดับ (Table 1)

Table 1. Composition of the test diet for small shrimp (1 g avg. body weight) in trial 1.

Ingredients (g/100 g)	Diet no.					
	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Fish meal	28	28	28	28	27.8	25
Shrimp head meal	10	10	10	10	10	10
Squid meal	5	5	5	5	5	5
Wheat gluten	6	6	6	6	6	6
Soybean meal	10	10	10	10	10	10
Wheat flour	20	20	20	20	20	20
Rice flour	10.1	10.05	9.975	9.9	9.675	10.1
Fish oil	2	2	2	2	2	2
Lecithin	2	2	2	2	2	2
Cholesterol	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Vitamin-mix[1]	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33
Choline	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Vitamin E	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
Vitamin C	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Mineral-mix[2]	4	4	4	4	4	4
BHT	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
Zeolite	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Lucantin Pink (10%)	0	0.05	-	-	-	-
Lucarotene (10%)	0	0	0.125	0.20	-	-
Betatene (2%)	0	0	0	0	0.625	-
Spirulina (%)	0	0	0	0	0	3
Total	**100**	**100**	**100**	**100**	**100**	**100**

[1] Vitamin-mix (mg/100 g feed) : Retinal (A) 0.12 mg (4,000 IU); Cholecalciferol (D3) 0.051 mg (2,000 IU); Tocopherol (E) 5 mg; Menadione sodium bisulfate 1 mg; Thiamine (B_1) 1 mg; Riboflavin (B_2) 2 mg; Pyridoxine (B_6) 2 mg; Cyanocobalamin 0.02 mg; Calcium pantothenate 20 mg; Niacin 15 mg; Folic acid 0.5 mg; Biotin 0.2 mg and Inositol 40 mg

[2] Mineral-mix (mg/ 100 g feed): $MnSO_4.H_2O$ 2.5 mg ; $ZnSO_4.7H_2O$ 2 mg; $FeSO_4.7H_2O$ 3 mg; KIO_3 0.5 mg; $CuSO_4.5H_2O$ 0.5 mg; $CoCl_2.6H_2O$ 0.005 mg and Na_2SeO_3 0.03 mg

1.3 ระบบการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด 6 ชุดการทดลอง โดยแบ่งเป็นชุดการทดลองละ 5 ซ้ำ แต่ละซ้ำประกอบด้วยตู้กระจกขนาด 200 ลิตรที่มีระบบน้ำทะเลไหลผ่านตลอดในอัตราการไหล 10 ลิตร/ชม. เลี้ยงกุ้งกุลาดำที่มีขนาดเฉลี่ย 1 กรัม ตู้ละ 15 ตัว ด้วยอาหารกุ้งทางการค้าเป็นเวลา 7 วัน ก่อนเริ่มการทดลอง การทดลองดำเนินการโดยให้อาหาร ทดลองแก่กุ้งกุลาดำในแต่ละชุดการทดลองในปริมาณที่กินหมดพอดี (7-10% ของน้ำหนักตัว/วัน) วันละ 4 ครั้ง ดูดตะกอนวันละ 1 ครั้งทุกวัน และเปลี่ยนถ่ายน้ำในตู้ทดลองแต่ละตู้ 25% ทุก 3 วัน เลี้ยงกุ้งกุลาดำในแต่ละชุดการทดลองเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ก่อนการเก็บข้อมูล และวิเคราะห์ผลการทดลอง

1.4 การเก็บข้อมูลและการวิเคราะห์ผล

1) การตรวจสอบการเจริญเติบโต

ตรวจสอบน้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารทดลองแต่ละสูตรทุก 2 สัปดาห์ ตลอดระยะเวลาการทดลอง โดยนำกุ้งจากแต่ละตู้มาทำการชั่งน้ำหนักรวมโดยวิธีการแทนที่น้ำ บันทึกจำนวนตัว และน้ำหนักอาหารที่กิน เพื่อคำนวณค่าน้ำหนักเฉลี่ย (average weight) น้ำหนักที่เพิ่ม (weight gain) อัตรารอดตาย (survival rate) และอัตราการแลกเนื้อ (feed conversion ratio, FCR)

2) การทดสอบความต้านทานโรค

เมื่อสิ้นสุดการทดลองในสัปดาห์ที่ 8 แยกกุ้งกุลาดำจำนวน 60 ตัว จากแต่ละชุดการทดลองลงเลี้ยงในตู้ทดสอบความต้านทานการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (WSSV) จำนวน 6 ตู้/ชุดการทดลอง แต่ละตู้เลี้ยงกุ้งจำนวน 10 ตัว จัดเตรียมสารแขวนลอยของอนุภาคไวรัสจากน้ำเลือดกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ โดยเจือจางในสารละลายฟอสเฟตบับเฟอร์ พีเอช 7.0 เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ (50 mM phosphate buffer pH 7.0) ซึ่งมีค่าความเจือจางของเชื้อที่ทำให้กุ้งกุลาดำตาย 50% (median lethal dose; LD_{50}) จากการทดสอบก่อนหน้าในเวลา 10 วัน เท่ากับ $1:10^7$ แยกกุ้งในแต่ละชุดการทดลองออกเป็น 2 กลุ่ม เพื่อฉีดเชื้อที่มีระดับความเจือจาง $1:10^7$ และ $1:10^{10}$ ให้กับกุ้งในแต่ละกลุ่มจากแต่ละชุดการทดลอง ตรวจสอบการรอดตายของกุ้งกุลาดำในแต่ละชุดการทดลอง เป็นระยะเวลา 13 วัน

3) การทดสอบความต้านทานต่อความเครียด

เมื่อสิ้นสุดการทดลองในสัปดาห์ที่ 8 แยกกุ้งกุลาดำจำนวน 30 ตัว จากแต่ละชุดการทดลองลงเลี้ยงในตู้ทดสอบความเครียดจากการเปลี่ยนแปลงความเค็มจำนวน 3 ตู้ต่อชุดการทดลอง แต่ละตู้เลี้ยงกุ้งจำนวน 10 ตัว ทดสอบความเครียดโดยลดระดับความเค็มของน้ำจากสภาวะปกติที่ 30 ส่วนในพันส่วน เป็นความเค็ม 5 ส่วนในพันส่วน ในทันทีหลังจากนั้น 5 ชั่วโมง จึงเปลี่ยนกลับมาเป็นน้ำที่มีความเค็มปกติ จัดระบบการเปลี่ยนแปลงความเค็มดังกล่าวติดต่อกันเป็นเวลา 5 วัน แล้วตรวจสอบการรอดตายของกุ้งกุลาดำในแต่ละชุดการทดลองต่อจนครบ 13 วัน เพื่อศึกษาความสามารถในการปรับตัวต่อการเปลี่ยนแปลงความเครียดอย่างกะทันหันของกุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารทดลองไม่ผสมและผสมสารแคโรทีนอยด์จากแหล่งต่างๆ

การทดลองที่ 2 ผลของแคโรทีนอยด์ต่อองค์ประกอบเลือด ความต้านทานโรค และปริมาณแคโรทีนอยด์ในกุ้งกุลาดำ (น้ำหนักเฉลี่ย 10 กรัม)

2.1 การเตรียมสัตว์ทดลอง

คัดเลือกกุ้งกุลาดำที่มีสุขภาพดีจากบ่อเลี้ยงกุ้งที่ไม่มีการระบาดของโรคในระยะเวลาดังกล่าว โดยคัดกุ้งที่มีขนาดเฉลี่ยประมาณ 10 กรัม จำนวน 600 ตัว เพื่อนำลงเลี้ยงในถังไฟเบอร์กลาสขนาด 3 ตัน ถังละ 100 ตัว เลี้ยงกุ้งด้วยอาหารสำเร็จรูปวันละ 4 ครั้ง เพื่อให้ปรับตัวเข้ากับสภาพการเลี้ยงก่อนเริ่มการทดลองเป็นเวลา 1 สัปดาห์

2.2 การเตรียมอาหารทดลอง

เตรียมอาหารทดลองที่มีระดับโปรตีนและพลังงานเท่ากันทุกสูตรตามวิธีการของ Boonyaratpalin และคณะ (2000) โดยอาหารมีปริมาณโปรตีน ไขมัน เถ้า และเยื่อใย คิดเป็น 39.96, 10.72, 8.88 และ 2.05% ตามลำดับ และมีพลังงานในอาหาร 406.19 กิโลจูล เท่ากันทุกสูตร แต่มีระดับของแคโรทีนอยด์จากแหล่งต่างๆ ไม่เท่ากัน โดยอาหารทดลองสูตรที่ 1 ไม่ผสมแคโรทีนอยด์ (ชุดควบคุม) ขณะที่อาหารทดลองสูตรที่ 2-6 ผสมแอสตาแซนทีน (Lucanthin Pink®) 100 มก./กก., เบตาแคโรทีน

(Lucarotin®) 125 มก./กก., เบตาแคโรทีน (Lucarotin®) 250 มก./กก., เบตาทีน (Betatene®) 250 มก./กก. และสาหร่ายสไปรูลินาอบแห้ง 3% ตามลำดับ (Table 2)

2.3 ระบบการเลี้ยงและการจัดการ

เลี้ยงกุ้งกุลาดำ จำนวน 100 ตัว ในแต่ละชุดการทดลอง ด้วยอาหารทดลองแต่ละสูตรในปริมาณ 5-7% ของน้ำหนักตัวต่อวัน วันละ 4 ครั้ง เป็นเวลา 6 สัปดาห์ ตลอดระยะเวลาการเลี้ยงดูดตะกอนและเศษอาหารที่เหลือออกทุกวัน และเปลี่ยนถ่ายน้ำ 50% ทุก 2 วัน เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาของการเลี้ยง 6 สัปดาห์ จึงสุ่มตัวอย่างกุ้งกุลาดำในแต่ละชุดการทดลองเพื่อนำไปตรวจสอบองค์ประกอบเลือด ความต้านทานโรค และปริมาณแคโรทีนอยด์ในตัวกุ้งต่อไป

2.4 การศึกษาองค์ประกอบเลือด

เมื่อสิ้นสุดการทดลองในสัปดาห์ที่ 6 ตรวจสอบผลของแคโรทีนอยด์ต่อองค์ประกอบเลือดโดยสุ่มตัวอย่างกุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารทดลองแต่ละสูตรจำนวน 20 ตัว เพื่อนำมาเจาะเลือด จากบริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 3-5 ด้วยเข็มขนาด 25G และหลอดฉีดยาขนาด 1 มล. และตรวจสอบค่าองค์ประกอบเลือดต่างๆ คือ

Table 2. Composition of the test diet for juvenile shrimp (10 g avg. body weight) in trial 2.

Ingredients (g/100 g)	Diet no.					
	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Fish meal	25	25	25	25	24.6	22
Shrimp head meal	10	10	10	10	10	10
Squid meal	5	5	5	5	5	5
Wheat gluten	6	6	6	6	6	6
Soybean meal	10	10	10	10	10	10
Wheat flour	20	20	20	20	20	20
Rice flour	13.1	13	12.975	12.85	12.25	13.1
Fish oil	2	2	2	2	2	2
Lecithin	2	2	2	2	2	2
Cholesterol	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Vitamin-mix	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33
Choline	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Vitamin E	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
Vitamin C	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Mineral-mix	4	4	4	4	4	4
BHT	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
Zeolite	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Lucantin Pink (10%)	0	0.1	0	0	0	0
Lucarotene (10%)	0	0	0.125	0.25	0	0
Betatene (2%)	0	0	0	0	1.25	0
Spirulina (%)	0	0	0	0	0	3
Total	**100**	**100**	**100**	**100**	**100**	**100**

[1] Vitamin-mix (mg/100 g feed): Retinal (A) 0.12 mg (4,000 IU); Cholecalciferol (D3) 0.051 mg (2,000 IU); Tocopherol (E) 5 mg; Menadione sodium bisulfate 1 mg; Thiamine (B_1) 1 mg; Riboflavin (B_2) 2 mg; Pyridoxine (B_6) 2 mg; Cyanocobalamin 0.02 mg; Calcium pantothenate 20 mg; Niacin 15 mg; Folic acid 0.5 mg; Biotin 0.2 mg and Inositol 40 mg

[2] Mineral-mix (mg/ 100 g feed): $MnSO_4.H_2O$ 2.5 mg ; $ZnSO_4.7H_2O$ 2 mg; $FeSO_4.7H_2O$ 3 mg; KIO_3 0.5 mg; $CuSO_4.5H_2O$ 0.5 mg; $CoCl_2.6H_2O$ 0.005 mg and Na_2SeO_3 0.03 mg

1) ปริมาณเม็ดเลือดรวม

เจือจางตัวอย่างเลือดที่เจาะจากกุ้งในแต่ละชุดการทดลองด้วยสารละลายไตรแพนบลู (trypan blue) 0.15% ในน้ำเกลือ 2.5% ตรวจนับจำนวนเม็ดเลือดทั้งหมดโดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ (hemacytometer) และคำนวณปริมาณเม็ดเลือดทั้งหมดเป็นเซลล์/ลบ.มม.

2) ความว่องไวของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส

เจาะเลือดจากกุ้งโดยใช้สารละลายแอลซีสทีอีน (L-cysteine) 3% เป็นสารป้องกันเลือดแข็งตัว จากนั้นล้างเซลล์เม็ดเลือดด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ K-199 พีเอช 7.4 (Itami *et al*., 1992) และเก็บรักษาในโซเดียมคาโคดีเลทบับเฟอร์ พีเอช 7.4 (sodium cacodylate buffer pH 7.4) จึงนำไปเตรียมเป็นสารละลายเม็ดเลือด (hemocyte lysate) โดยใช้คลื่นความถี่สูง (sonicator : Vibra Cell™) เป็นเวลา 10 วินาที จากนั้นตรวจสอบความว่องไวของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสตามวิธีการของ Smith and Soderhall (1983) โดยใช้ L-3,4-dihydroxyphenyl-alanine (L-DOPA) เป็นซับสเตรท ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงการดูดกลืนแสงทุกช่วง 2 นาที ที่ความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร และวัดปริมาณโปรตีนในตัวอย่างโดยวิธี Lowry's method (Lowry *et al*., 1951) รายงานค่าความว่องไวของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในหน่วย ยูนิต/นาที/มก.โปรตีน

3) ความสามารถในการกำจัดแบคทีเรียออกจากน้ำเลือด

เมื่อสิ้นสุดการทดลองในสัปดาห์ที่ 6 สุ่มตัวอย่างกุ้งจำนวน 15 ตัว จากแต่ละชุดการทดลอง เพื่อวัดความสามารถในการกำจัดแบคทีเรียออกจากน้ำเลือดตามวิธีการของ Martin และคณะ (1993) โดยใช้เชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* จากจานเพาะเชื้อมาเตรียมเป็นสารแขวนลอยที่มีปริมาณเชื้อ 2.7×10^7 เซลล์/มล. ในสารละลายเกลือ 1.5% จากนั้นฉีดเชื้อปริมาตร 0.1 มล. เข้าสู่บริเวณส่วนกล้ามเนื้อท้องแล้วจึงนำลงเลี้ยงในตู้ทดลองเป็นเวลา 3 ชั่วโมง เจาะเลือดกุ้งเพื่อนำมาเจือจางด้วยสารละลายเกลือ 2.5% แล้วตรวจนับปริมาณเชื้อแบคทีเรียโดยเพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง plate count agar (PCA, Merck 1.05463.) ที่ผสมเกลือ 1.5% บ่มเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ที่ 35°C นับปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วคำนวณปริมาณแบคทีเรียที่คงเหลืออยู่ในน้ำเลือดกุ้งเป็น CFU/มล.

4) การทดสอบความต้านทานโรค

เมื่อสิ้นสุดการทดลองในสัปดาห์ที่ 8 แยกกุ้งกุลาดำจำนวน 60 ตัว จากแต่ละชุดการทดลองลงเลี้ยงในตู้ทดสอบความต้านทานการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (WSSV) จำนวน 6 ตู้/ชุดการทดลอง แต่ละตู้เลี้ยงกุ้งจำนวน 10 ตัว จัดเตรียมสารแขวนลอยของอนุภาคไวรัสจากน้ำเลือดกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ โดยเจือจางในสารละลายฟอสเฟตบับเฟอร์ พีเอช 7.0 เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ซึ่งมีค่าความเจือจางของเชื้อที่ทำให้กุ้งกุลาดำตาย 50% จากการทดสอบก่อนหน้าในเวลา 10 วัน เท่ากับ 1: 10^7 แยกกุ้งในแต่ละชุดการทดลองออกเป็น 2 กลุ่ม เพื่อฉีดเชื้อที่มีระดับความเจือจาง 1: 10^7 และ 1: 10^{10} ให้กับกุ้งในแต่ละกลุ่มจากแต่ละชุดการทดลอง ตรวจสอบการรอดตายของกุ้งกุลาดำในแต่ละชุดการทดลอง เป็นระยะเวลา 10 วัน

2.5 การวิเคราะห์ชนิด และปริมาณแคโรทีนอยด์ในตัวกุ้ง

สุ่มตัวอย่างกุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารทดลองแต่ละสูตร จำนวน 20 ตัว จากแต่ละชุดการทดลอง โดยแช่เยือกแข็งในไนโตรเจนเหลว แล้วทำการขจัดน้ำออกจากตัวอย่างโดยผ่านกระบวนการแช่แข็งแล้วระเหยแห้ง (lyophilized) บดให้ละเอียดและเก็บรักษาที่ -70°C เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณแอสตาแซนทีน แคนทาแซนทีน และเบตาแคโรทีน ตามวิธีวิเคราะห์ดังนี้

1) การวิเคราะห์ปริมาณเบตาแคโรทีน (β-carotene) และแคนทาแซนทีน (Canthaxanthin)

นำตัวอย่างกุ้งบดละเอียด 1 กรัม ผสมกับ EDTA 1 กรัม แล้วย่อยตัวอย่างด้วยสารผสม 3 ชนิดคือ โปรเนส (pronase) 20 มก., ทริปซิน (trypsin) 50 มก. และเปปซิน (pepsin) 50 มก. ที่อุณหภูมิ 50°C นาน 10 นาที แล้วจึงเติมส่วนผสม ethanol : cyclohexane : ethyl acetate อัตราส่วน 2:5:1 ปริมาตร 140 มล. เขย่านาน 10 นาที แล้วทำให้สารผสมเกิดการแยกชั้นโดยเติมสารละลายเกลืออิ่มตัว 70 มล. แยกเฉพาะสารละลายส่วนบนออกมากรองด้วยเมมเบรนที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร แล้วจึงแยกสารผสมด้วย High performance liquid chromatography (HPLC) โดยฉีด

สารดังกล่าว 20 ไมโครลิตร เข้าสู่คอลัมน์ Lichrosorb Si 60 (Merck) แล้วชะ (elude) ด้วยสารผสมระหว่าง cyclohexane : ethyl acetate อัตราส่วน 5:1 ในอัตราเร็ว 0.65 มล./นาที ตรวจสอบสารที่ชะด้วย UV-VIS detector (Visi-Duo, Linear Instruments Corp.) ที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร คำนวณปริมาณสารโดยเทียบกับ β-carotene และ canthaxanthin มาตรฐาน (BASF Fine Chemical Division, 1998)

2) การวิเคราะห์ปริมาณแอสตาแซนทีน (Astaxanthin)

นำตัวอย่างบดละเอียด 10 กรัม สกัดด้วยสารผสมระหว่าง ethanol : butyl methyl ether อัตราส่วน 2:5 ปริมาตร 140 มล. แล้วเขย่า 10 นาที แล้วทำให้สารผสมเกิดการแยกชั้นโดยเติมสารละลายเกลืออิ่มตัว 70 มล. แยกเฉพาะสารละลายส่วนบนออกมาระเหยด้วยโซเดียมซัลเฟต จึงเติมสารผสม n-heptane : acetone อัตราส่วน 86:14 ผสมให้เข้ากัน แล้วกรองด้วยเมมเบรนที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร จึงนำไปแยกสารผสมด้วย HPLC โดยฉีดสารสกัด 50 ไมโครลิตร เข้าคอลัมน์ Lichrosorb Si 60 (Merck) โดยใช้สารผสม n-heptane : acetone อัตราส่วน 86:14 เป็นตัวชะในอัตราเร็ว 2 มล./นาที ตรวจสอบสารที่ผ่านการแยกด้วย diode array detector ที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร คำนวณปริมาณสารโดยเทียบกับ citranaxanthin มาตรฐาน (BASF Fine Chemical Division, 1999)

ผลการทดลอง

การทดลองที่ 1 ผลของแคโรทีนอยด์ต่อการเจริญเติบโต อัตรารอด ความต้านทานโรคและความต้านทานต่อความเครียด ในกุ้งกุลาดำขนาดเล็ก (น้ำหนักเฉลี่ย 1 กรัม)

เมื่อสิ้นสุดการทดลองในเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าน้ำหนักเฉลี่ย น้ำหนักที่เพิ่ม อัตราแลกเนื้อ (FCR) และอัตรารอดตายของกุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารทดลองเสริมแคโรทีนอยด์แต่ละชนิดไม่มีความแตกต่างกัน ($p>0.05$) (Table 3) และภายหลังการฉีดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวให้กับกุ้งกุลาดำในแต่ละชุดการทดลองเป็นเวลา 13 วัน พบว่าไม่มีความแตกต่างกัน ($p>0.05$) ทั้งในกลุ่มที่ได้รับเชื้อไวรัสที่ระดับความเจือจาง $1:10^7$ และ $1:10^{10}$ แต่มีแนวโน้มว่ากุ้งที่ได้รับอาหารทดลองเสริมแคโรทีนอยด์เกือบทุกแหล่งจะมีความต้านทานโรคสูงขึ้น ยกเว้นชุดที่ได้รับอาหารผสมเบตาแคโรทีน (Lucarotin®) 125 มก./กก. ที่มีความต้านทานต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวได้ต่ำกว่ากุ้งที่ได้รับอาหารไม่ผสมแคโรทีนอยด์ (Figure 1) และภายหลังการทดสอบผลของแคโรทีนอยด์ชนิดต่างๆ ที่มีต่อความต้านทานความเครียดจากการเปลี่ยนแปลงความเค็มเป็นเวลา 13 วัน พบว่าการรอดตายของกุ้งกุลาดำในทุกชุดการทดลอง ไม่มีความแตกต่างกัน ($p>0.05$) ดังแสดงใน Figure 2

Table 3. Growth performance of small shrimp with 1 g average initial body weight being fed diets supplemented different carotenoid pigments for an 8-week period (trial 1).

Treatments	Growth performance after a 8 week feeding period			
	Avg. weight (g)	Weight gain (%)	Survival rate (%)	FCR
T1 control	4.53 ± 0.82^{ns}	455.76 ± 62.29^{ns}	64.00 ± 15.17^{ns}	1.42 ± 0.20^{ns}
T2 astaxanthin 50 mg/kg	4.53 ± 0.63^{ns}	485.08 ± 77.71^{ns}	83.00 ± 9.75^{ns}	1.47 ± 0.21^{ns}
T3 β-carotene 125 mg/kg	4.69 ± 0.81^{ns}	468.27 ± 59.59^{ns}	70.00 ± 11.73^{ns}	1.40 ± 0.18^{ns}
T4 β-carotene 250 mg/kg	4.21 ± 0.63^{ns}	446.53 ± 66.63^{ns}	68.00 ± 16.81^{ns}	1.38 ± 0.22^{ns}
T5 Betatene 125 mg/kg	4.62 ± 0.42^{ns}	478.51 ± 23.16^{ns}	73.00 ± 13.04^{ns}	1.28 ± 0.08^{ns}
T6 *Spirulina* 3%	4.63 ± 0.46^{ns}	479.17 ± 47.54^{ns}	73.00 ± 6.71^{ns}	1.37 ± 0.09^{ns}

ns = non significant

การทดลองที่ 2 ผลของแคโรทีนอยด์ต่อองค์ประกอบเลือด ความต้านทานโรค และปริมาณแคโรทีนอยด์ในกุ้งกุลาดำ (น้ำหนักเฉลี่ย 10 กรัม)

การศึกษาองค์ประกอบเลือดของกุ้งกุลาดำที่ได้รับแคโรทีนอยด์จากแหล่งต่างๆ แสดงใน Table 4 พบปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งที่ได้รับอาหารชุดควบคุมซึ่งไม่เสริมสารสี อาหารเสริมแอสตาแซนทีน และเสริมสาหร่ายสไปรูลินา มีค่าสูงกว่ากุ้งที่ได้รับอาหารทดลองเสริมเบตาแคโรทีน ($P<0.05$) แต่ความสามารถในการกำจัดแบคทีเรียออกจากน้ำเลือด และความว่องไวของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสมีค่าไม่แตกต่างกันในแต่ละชุดการทดลอง ($P>0.05$) จากการศึกษาการรอดตายของกุ้งหลังจากได้รับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวพบว่ากุ้งที่ได้รับอาหารชุดควบคุมตายทั้งหมดภายในระยะเวลาการทดลองนาน 10 วัน แต่พบการรอดตายหลังได้รับเชื้อไวรัสไม่มีความแตกต่างกันทางระหว่างชุดการทดลอง ($P>0.05$) (Figure 3) เมื่อวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์ในกุ้งที่ได้รับอาหารทดลองแต่ละสูตรพบว่าแอสตาแซนทีนเป็นองค์ประกอบหลักของแคโรทีนอยด์ในกุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารทุกชุดการทดลอง ทั้งนี้ในกุ้งที่ได้รับอาหารเสริมแคโรทีนอยด์ทุกชนิดมีความเข้มข้นของแอสตาแซนทีนอยู่ในช่วง 30.4-32.0 มก./กก. ขณะที่กุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารชุดควบคุมมีความเข้มข้นของแอสตาแซนทีน 21.7 มก./กก. (Table 5)

วิจารณ์ผลการทดลอง

แคโรทีนอยด์จากทุกแหล่ง ทั้งชนิดสังเคราะห์คือแอสตาแซนทีน (Lucanthin Pink®) เบตาแคโรทีน (Lucarotin®) และจากแหล่งธรรมชาติคือ เบตาทีน (Betatene®) สกัดจาก *Dunaliella* และสาหร่ายสไปรูลินาอบแห้งที่ใช้ในการศึกษานี้สามารถเร่งให้กุ้งกุลาดำมีการสะสมแอสตาแซนทีนในร่างกายเพิ่มขึ้นได้ เช่นเดียวกับการศึกษาในกุ้งคุรูมา (*Penaeus japonicus*) ที่พบกุ้งสามารถเปลี่ยนเบตาแคโรทีน เป็นแอสตาแซนทีนและสะสมไว้ในร่างกายได้ (Tanaka *et al*., 1976) อย่างไรก็ตาม Chein และ Jeng (1992) รายงานว่าแอสตาแซนทีนมีประสิทธิภาพการนำไปใช้สร้างเป็นสารสีในร่างกายกุ้งได้ดีที่สุด จากการศึกษาในกุ้งกุลาดำครั้งนี้เป็นที่น่าสังเกตว่าทั้งเบตาแคโรทีนสังเคราะห์ และเบตาแคโรทีนธรรมชาติจาก

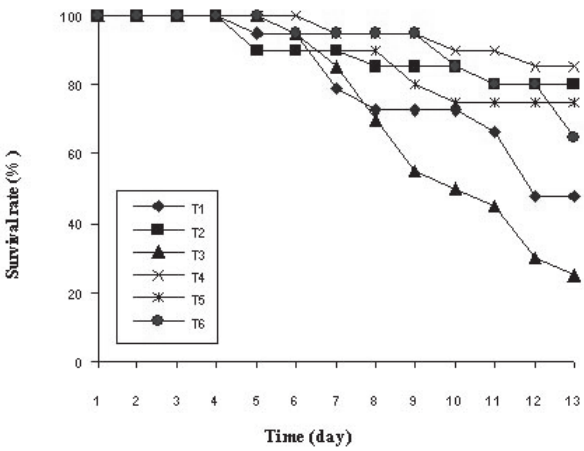

Figure 1. Survival of small shrimp with 1 g average initial body weight after feeding with each carotenoid pigment supplemented diets for an 8-week period (trial 1) and challenged with white spot syndrome virus (WSSV) at a concentration of 1:10^7 for 13 days.

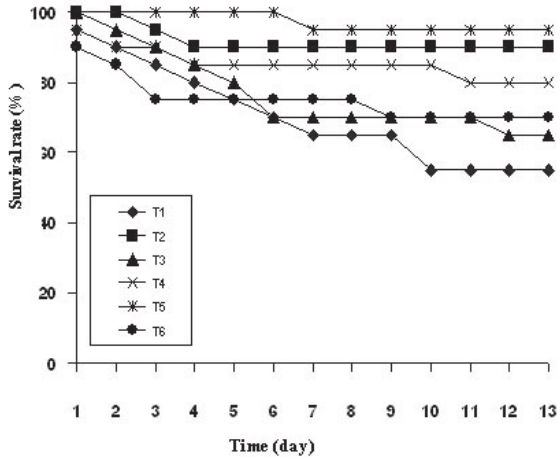

Figure 2. Survival rates of small shrimp with 1 g average initial body weight after being fed diets supplemented with different carotenoid pigments for an 8-week period (trial 1) and being to salinity stress test for 13 days.

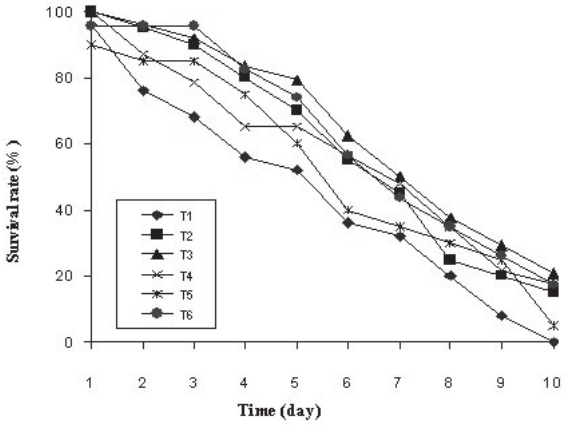

Figure 3. Survival rates of juvenile shrimp with 10 g average initial body weight after being fed diet containing different carotenoid pigments for a 6-week period (trial 2) and challenged with white spot syndrome virus (WSSV) at a concentration of 1:10^7 for 10 days.

สาหร่าย *Dunaliella* มีประสิทธิภาพดีในแง่ของการสะสมแอสตาแซนทีนในกุ้งกุลาดำ อย่างไรก็ตาม isomer ที่แตกต่างกันของเบตาแคโรทีนมีผลต่อประสิทธิภาพการนำไปใช้ประโยชน์ของเซลล์ Hieber และคณะ (2000) พบว่า 9-cis-β-carotene ที่พบเป็นสารสีหลักในสาหร่าย *Dunaliella* มีผลในแง่ของการลดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (proliferation) และลดการแสดงออกของยีน connexin 43 ในเซลล์ 10T1/2 ต่ำกว่าการใช้เบตาแคโรทีนในรูป all trans β-carotene

นอกจากนี้ยังมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องอีกหลายประการในด้านการนำแคโรทีนอยด์ไปใช้ประโยชน์ Babosa และคณะ (2000) รายงานว่าระดับไขมันในอาหารมีส่วนเกี่ยวข้องอย่างมากกับการดูดซึมแอสตาแซนทีนของปลาเรนโบว์-เทราท์ ทั้งนี้ในอาหารที่มีไขมันสูงปลาจะสามารถดูดซึมและนำเอาแอสตาแซนทีนเอสเทอร์ไปใช้ได้มีประสิทธิภาพไม่แตกต่างจากแอสตาแซนทีนอิสระ แต่ในกรณีที่อาหารมีไขมันน้อย ปลาเรนโบว์เทราท์จะนำแอสตาแซนทีนอิสระไปใช้ประโยชน์ได้มากกว่า นอกจากนี้ยังพบว่าประสิทธิภาพ

Table 4. Blood parameters and immune response of juvenile shrimp with 10 g average initial body weight after being fed diet containing different carotenoid pigments for 6-week period (trial 2).

Treatments	Blood and immune parameter		
	Total hemocytes count (x10^4 cell/ml)	Clearance ability (CFU/ml)	PO activity (unit/min/mg protein)
T1 control	5.91±2.52^a	2083.33±1599.30^{ns}	382.57±226.37^{ns}
T2 astaxanthin 100 mg/kg	5.32±2.03^a	1361.54±1296.86^{ns}	329.05±186.49^{ns}
T3 β-carotene 125 mg/kg	4.52±1.34^{ab}	638.33±842.87^{ns}	435.11±177.23^{ns}
T4 β-carotene 250 mg/kg	3.26±1.54^b	1191.67±1552.72^{ns}	471.58±153.27^{ns}
T5 Betatene 250 mg/kg	3.32±2.82^b	1057.14±1691.11^{ns}	407.63±207.03^{ns}
T6 *Spirulina* 3%	4.77±2.04^{ab}	846.67±1820.61^{ns}	528.44±218.11^{ns}

ns = non significant
Means not sharing a common superscript are significantly different (P<0.05).

Table 5. Astaxanthin and total carotenoid of juvenile shrimp after fed each experimental diet for 6 weeks (trial 2).

Treatments	Astaxanthin (mg/kg)	Canthaxanthin (mg/kg)	β-carotene (mg/kg)
T1 control	21.7	1.8	-
T2 astaxanthin 100 mg/kg	30.4	2.5	-
T3 β-carotene 125 mg/kg	31.8	3.6	-
T4 β-carotene 250 mg/kg	32.0	4.2	-
T5 Betatene 250 mg/kg	31.7	3.4	-
T6 *Spirulina* 3%	30.1	3.2	-

การนำแคโรทีนอยด์ไปใช้สะสมในตัวสัตว์น้ำยังขึ้นกับประสิทธิการย่อยและการดูดซึมของตัวสัตว์ด้วย ซึ่ง Sanderson และ Jolly (1994) พบว่าในลำไส้ของกุ้งไม่มีเอนไซม์ที่ช่วยย่อยผนังเซลล์ยีสต์ทำให้กุ้งไม่สามารถย่อยและดูดซึมแอสตาแซนทีนในเซลล์ยีสต์ไปใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทั้งที่เซลล์ของ *Phaffia rhodozyma* มีความเข้มข้นของแอสตาแซนทีนสูงมาก สอดคล้องกับ Liao และคณะ (1993) พบว่าการใช้สาหร่ายสไปรูลินาอบแห้ง 3% ในอาหารส่งผลให้กุ้งมีการเจริญเติบโตและการสะสมแคโรทีนอยด์ในเนื้อเยื่อใต้เปลือกดีกว่าการใช้เซลล์ยีสต์ *Phaffia rhodozyma* อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาจากระดับความเข้มข้นของแอสตาแซนทีนในตัวกุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารทดลองแต่ละสูตรจากการศึกษานี้พบว่าประสิทธิภาพของการใช้เบตาแคโรทีนสังเคราะห์ไม่แตกต่างจากการใช้เบตาแคโรทีนธรรมชาติจากสาหร่าย *Dunaliella* นอกจากนี้ความเข้มข้นของเบตาแคโรทีนในอาหารไม่มีผลต่อระดับแอสตาแซนทีนในตัวกุ้งกุลาดำ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Chein และ Jeng (1992) ซึ่งรายงานว่าจะต้องมีกระบวนการหลายขั้นตอนในการเปลี่ยนเบตาแคโรทีนเป็นแอสตาแซนทีน ซึ่งขั้นตอนของวิถีเมตาโบลิซึมดังกล่าวจะเป็นเหตุให้การเปลี่ยนรูปของแคโรทีนอยด์เป็นไปอย่างช้าๆ ทำให้ระดับความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์ในอาหารไม่มีผลโดยตรงต่อระดับของแอสตาแซนทีนในตัวกุ้ง

การศึกษานี้พบว่าการเสริมแคโรทีนอยด์ในอาหารมีแนวโน้มทำให้ความต้านทานโรคและความเครียดในกุ้งกุลาดำดีขึ้นถึงแม้ว่าจะไม่มีความแตกต่างทางสถิติก็ตาม ทั้งนี้ Merchie และคณะ (1998) พบว่าการใช้แอสตาแซนทีนในอาหารกุ้งกุลาดำวัยอ่อน 810 มก./กก. มีผลทำให้ลูกกุ้งมีการรอดตายจากภาวะการเปลี่ยนแปลงความเค็มได้มากขึ้น แต่ทั้งนี้เป็นการศึกษาในระดับของแคโรทีนอยด์ที่สูงมาก ซึ่ง Balon (1979) และ Chein และ Jeng (1992) รายงานว่าแคโรทีนอยด์อาจมีหน้าที่บางประการในระบบสรีรวิทยาที่จะช่วยเก็บรักษาออกซิเจนไว้ภายในเซลล์ในภาวะที่ออกซิเจนน้อยกว่าปกติ ซึ่งอาจสอดคล้องกับกรณีของกุ้งคุรูมาซึ่งมีพฤติกรรมฝังตัวในทรายซึ่งมีออกซิเจนต่ำ กุ้งชนิดดังกล่าวจึงมีความต้องการแอสตาแซนทีนในระดับสูงกว่ากุ้งกุลาดำ จึงมีความเป็นไปได้มากที่แคโรทีนอยด์ในอาหารจะช่วยให้สัตว์น้ำมีความต้านทานต่อภาวะขาดออกซิเจนได้มากขึ้น อย่างไรก็ตามยังไม่เคยมีรายงานถึงผลของแคโรทีนอยด์ปริมาณสูงๆ ในอาหารที่มีต่อความต้านทานความเครียดจากภาวะขาดออกซิเจนในกุ้ง ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องมีการศึกษาถึงผลของเบตาแคโรทีนความเข้มข้นสูงๆ ในอาหารที่มีต่อความเครียดในสัตว์น้ำเพิ่มเติมต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ บริษัท บีเอเอสเอฟ (ไทย) จำกัด ที่สนับสนุนสารสีสำหรับการศึกษาวิจัยครั้งนี้ ขอขอบคุณ น.สพ.สุจินต์ ธรรมศาสตร์ บริษัท เจริญโภคภัณฑ์อาหาร จำกัด (มหาชน) ในการสนับสนุนสัตว์ทดลอง

เอกสารอ้างอิง

Balon, E.K. 1979. Early ontogeny of *Labeotropheus* Ahl, 1927 (Mbuna, Cichlidae, Lake Malawi), with a discussion on advanced protective styles in fish reproduction and development. Environ.

Biol. Fish. 2: 147-176.

Barbosa, M. J., Morais, R. and Choubert, G. 1999. Effect of carotenoid source and dietary lipid content on blood astaxanthin concentration in rainbow trout (*Oncorhychus mykiss*). Aquacult. 176: 331-341.

BASF Fine Chemical Division. 1999. QM-System No. 00222QA000. MEP Analysis and Quality Control. BASF. 4 p.

BASF Fine Chemical Division. 1998. QM-System No. E106DA00. BASF Aktiengesellschaft. BASF. 9 p.

Boonyaratpalin, M., Supamattaya, K. and Borisuth, C. 2000. The immune system in black tiger shrimp, *Penaeus monodon* Fabricius: VIII. Effect of astaxanthin on blood parameters, immune system and disease resistance in black tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius). Songklanakarin J. Sci. Technol. 22: 633-639.

Chein, Y.H. and Jeng, S.C. 1992. Pigmentation of kuruma prawn, *Penaeus japonicus* Bate, by various pigment sources and levels and feeding regimes. Aquacult. 102: 333-346.

Estermann, R. 1994. Biological functions of carotenoids. Aquacult. 124: 219-222.

Hieber, A.D., King, T.J., Morioka, S., Fukushima, L.H., Franke, A.A. and Bertram, J.S. 2000. Comparative effects of all-trans β-carotene vs 9-cis β-carotene on carcinogen-induced neoplastic transformation and connexin 43 expression in murine 10T1/2 cells and on the differentiation of human keratinocytes. Nutrition and Cancer. 37: 234-244.

Itami, T., Yan, Y. and Takahashi, Y. 1992. Study vaccination against vibriosis in cultured kuruma prawn *Penaeus japonicus* I: effect of vaccine concentration and duration of vaccination efficacy. J. Shimonoseki University of Fisheries 40: 83-87.

Lascha, T. 1991. Carotenoids in aquatic animal nutrition. **In**: Proceeding of the Aquaculture Feed Processing and Nutrition Workshop, Bangkok, Thailand, September 19-25, 1991. pp.68-78.

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

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

Martin, G.G., Poole, D., Poole, C., Hose, J.E., Arias, M., Reynolds, L., McKrell, N. and Whang, A. 1993. Clearance of bacteria injected into the hemolymph of the penaeid shrimp, *Sicyonia ingentis*. Invertebr. Pathol. 62: 308-315.

Merchie, G., Kontara, G., Lavens, P., Robles, R., Kurmaly, K. and Sorgeloos, P. 1998. Effect of vitamin C and astaxanthin on stress and disease resistance of postlarval tiger shrimp, *Penaeus monodon* (Fabricius). Aqua. Res. 29: 579-585.

Sanderson, G.W. and Jolly, S.O. 1994. The value of *Phaffia* yeast as a feed ingredient for salmonid fish. Aquacult. 124: 193-200.

Simpson, K.L., Kitayama, T. and Chichester, C.O. 1981. Carotenoids in fish feeds. **In**: Carotenoids as Food Colorants and Vitamin A Precursors. Academic Press, New York. pp.463-538.

Sommer, T.R., Potts, W.T. and Morrissy, N.M. 1991. Utilization of microalgal astaxanthin by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Aquacult. 94: 79-88.

Smith, V.J. and Söderhäll, K. 1983. β-1,3 glucan activation of crustacean hemocytes *in vitro* and *in vivo*. Biol. Bull. 164: 299-314.

Tanaka, Y., Matsuguchi, H., Katayama, T., Simpson, K.L. and Chichester, C.O. 1976. The biosynthesis of astaxanthin. XVIII. The matabolism of the carotenoids in the prawn, *Penaeus japonicus* Bate. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 42: 197-202.

Yamada, S., Tanaka, Y., Sameshima, M. and Ito, Y. 1990. Pigmentation of prawn (*Penaeus japonicus*) with carotenoids I. Effect of dietary astaxanthin, β-carotene and canthaxanthin on pigmentation. Aquacult. 87: 323-330.