Content List Available at ThaiJo
Khon Kaen Agriculture Journal
Journal Home Page : https://li01.tci-thaijo.org/index.php/agkasetkaj

ประสิทธิภาพการใช้เอนไซม์รวมเพื่อปรับปรุงคุณภาพของกากถั่วเหลืองต่อคุณค่าทางโภชนการและประสิทธิภาพการย่อยได้ของสารอาหารในกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*)

The efficacy of using exogenous enzymes treatment for improve soybean meal quality of nutritive value and nutrients digestibility in Pacific whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

วริทธิ์ ไทยประสงค์[1], ศิริพร โทลา[1], เสจ ไชยเพ็ชร[2] และ บัณฑิต ยวงสร้อย[1]*

Warit Thaiprasong[1], Siriporn Tola[1], Sage Chaiyapechara[2] and Bundit Yuangsoi[1]*

[1] สาขาวิชาประมง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ขอนแก่น 40002
[1] Department of Fisheries, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002
[2] ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ อุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย ปทุมธานี 12120
[2] National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Science Park BIOTEC, Pathum Thani 12120

บทคัดย่อ: กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งโปรตีนจากพืชที่นิยมนำมาใช้เป็นวัตถุดิบหลักในอาหารสัตว์น้ำ เนื่องจากมีปริมาณโปรตีนสูง กรดอะมิโนที่จำเป็นและสารอาหารสำคัญหลายชนิด แต่กลับพบว่ามีสารต้านการใช้โภชนะ (Anti-nutritional factors; ANFs) ซึ่งไปขัดขวางการใช้ประโยชน์ได้ของสารอาหารทำให้ใช้ได้ในปริมาณจำกัดในอาหารสัตว์น้ำ การวิจัยนี้ได้ทำการใช้เอนไซม์รวม (Cocktail enzymes) ในการย่อยกากถั่วเหลือง (SBM-ENZ) ที่ความเข้มข้น 0, 10, 20 และ 30 กรัม/กิโลกรัม เป็นระยะเวลา 0, 1, 2, 4 และ 6 ชั่วโมง โดยวางแผนการทดลองแบบ Factorial experiments in CRD (4x5) และทำการวิเคราะห์หาปริมาณกรดไฟติก และประสิทธิภาพการย่อยได้ของโปรตีนและคาร์โบไฮเดรต ด้วยเทคนิค *in vitro* digestibility จากผลการทดลองพบว่ากรดไฟติกลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ที่เวลา 1 ชั่วโมง เมื่อใช้เอนไซม์ 20 กรัม/กิโลกรัม ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสม องค์ประกอบทางเคมีพบว่าเยื่อใยลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ส่วนประสิทธิภาพการย่อยได้ของโปรตีนและคาร์โบไฮเดรต พบว่ามีแนวโน้มสูงสุดที่ 4 และ 2 ชั่วโมง ($P<0.05$) ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกากถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านย่อยด้วยเอนไซม์ จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการใช้เอนไซม์รวมทำการย่อยกากถั่วเหลือง สามารถช่วยปรับปรุงให้กากถั่วเหลืองมีปริมาณกรดไฟติกลดลง และส่งผลทำให้ประสิทธิภาพการย่อยได้โปรตีนและคาร์โบไฮเดรตสูงขึ้น ซึ่งชี้ให้เห็นว่าสามารถใช้กากถั่วเหลืองในสูตรอาหารสัตว์น้ำได้ในปริมาณที่สูงขึ้น เพื่อทดแทนการใช้ปลาป่นและสร้างความยั่งยืนทางด้านอาหารสัตว์น้ำในอนาคต
คำสำคัญ: กากถั่วเหลือง; เอนไซม์; กรดไฟติก; ประสิทธิภาพการย่อยสารอาหาร

ABSTRACT: Soybean meal (SBM) is widely used as a plant-based protein source in aquatic animal diets due to its high protein content, essential amino acids, and critical nutrients. However, its utilization is limited by anti-nutritional factors (ANFs), particularly phytic acid, which hinder nutrient absorption. This study investigated the use of a cocktail enzyme treatment to mitigate ANFs and improve SBM digestibility. The enzyme was applied at concentrations of 0, 10, 20, and 30 g/kg for treatment times of 0, 1, 2, 4, and 6 hours. A 4x5 factorial arrangement in a completely randomized design (CRD) with three replication runs was carried out for each treatment. The phytic acid content, *in vitro* protein and carbohydrate digestibility and chemical composition were analyzed. Results showed that enzymatic

* Corresponding author: bundyu@kku.ac.th
Received: date; April 21, 2025 Reivised date; July 3, 2025
Accepted: date; July7, 2025 Published: date; December 18, 2025

treatment significantly reduced phytic acid content within the first hour (P<0.05), with an optimal enzyme concentration of 20 g/kg. Chemical composition analysis revealed reduced fiber content (P<0.05). The highest protein and carbohydrate digestibility, was observed at 4 and 2 hours, (P<0.05) respectively, compared to untreated SBM. These findings demonstrate that enzymatic pretreatment effectively reduces phytic acid and enhances nutrient digestibility in SBM. This method supports higher inclusion rates of SBM in aquafeed, reducing reliance on fishmeal and advancing sustainable aquaculture feed production. This study supports higher inclusion rates of SBM in aquafeed, reducing reliance on fishmeal to promote sustainability in the aquaculture industry.
Keywords: soybean meal; enzymes; phytic acid; nutrient digestibility

บทนำ

กุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) ได้รับความนิยมอย่างมากในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำทั่วโลก โดยเฉพาะในแถบเอเชียและอเมริกาใต้ เนื่องจากกุ้งชนิดนี้มีความทนทานต่อโรค ระยะเวลาในการเจริญเติบโตสั้น ผลผลิตและมูลค่าต่อหน่วยการผลิตสูง (FAO, 2023) กุ้งขาวกินอาหารได้อย่างหลากหลาย และเจริญเติบโตในช่วงความเค็มที่กว้าง อีกทั้งยังสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมของประเทศไทยได้เป็นอย่างดี (กรมประมง, 2564; Figueiredo and Anderson, 2009) ประเทศไทยมีมูลค่าการผลิตจากกุ้งขาวแวนนาไมมากกว่าปีละหลายหมื่นล้านบาท โดยในระหว่างปี 2560-2566 มีอัตราการเปลี่ยนแปลงเฉลี่ยต่อปีเพิ่มขึ้นทั้งปริมาณการผลิต จำนวนฟาร์มและเนื้อที่เลี้ยงที่มีผลผลิต (กองนโยบายและแผนพัฒนาการประมง, 2566) ซึ่งพบว่าต้นทุนหลักของการผลิตนั้นมาจากค่าใช้จ่ายด้านอาหารสัตว์สูงถึง 50-70% โดยแหล่งวัตถุดิบโปรตีนที่สำคัญในอาหารกุ้งขาวคือ ปลาป่น ปัจจุบันพบว่าปริมาณการจับสัตว์น้ำเพื่อทำปลาป่นมีปริมาณลดลงเกิดจากสัตว์น้ำในทะเลลดจำนวนลงและผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงของสภาพภูมิอากาศ ทำให้ปริมาณและคุณภาพของปลาป่นลดลงส่งผลให้ราคาเกิดการผันผวน เมื่อมีการใช้ปลาป่นในอาหารสัตว์ที่สูงจึงส่งผลต่อต้นทุนการผลิตรวมที่สูงขึ้น (FAO, 2016) ซึ่งส่งผลกระทบโดยตรงต่อการผลิตกุ้งขาวแวนนาไม ด้วยเหตุนี้จึงมีความพยายามที่จะนำวัตถุดิบแหล่งโปรตีนจากกากถั่วเหลืองเพื่อมาทดแทนการใช้โปรตีนจากปลาป่น เนื่องจากมีปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็นทั้งชนิดและปริมาณสูง แต่กากถั่วเหลืองเองก็มีข้อจำกัดในการใช้เช่นเดียวกัน ได้แก่ปริมาณกรดอะมิโนจำเป็นบางชนิดได้แก่ เมทไธโอนีน ไลซีน และทริปโตเฟน ในปริมาณที่จำกัด และวัตถุดิบโปรตีนที่มาจากพืชนั้นสัตว์น้ำย่อยได้ยาก (Joachim and Felictas, 2000) อีกทั้งยังมีสารต้านโภชนาการ (Anti nutrition factors, ANFs) อาทิเช่น สารยับยั้งการทำงานน้ำย่อยโปรตีน (Protease inhibitors), กรดไฟติก (Phytic acid), สารยับยั้งการทำงานของวิตามิน (Antivitamins) และสารก่อภูมิแพ้ (Soy allergenic agents) (Francis et al., 2001) ขึ้นอยู่กับชนิดและวิธีการผลิตกากถั่วเหลือง ซึ่งสารต้านการใช้โภชนะส่งผลในแง่ลบต่อสัตว์น้ำหากมีปริมาณที่สูงในอาหารสัตว์ โดยจะเข้าไปขัดขวางกระบวนการย่อยและการใช้ประโยชน์ของสารอาหาร การดูดซึม อีกทั้งยังเกิดการอักเสบและการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ที่ดีในลำไส้สัตว์น้ำซึ่งกระทบต่อประสิทธิภาพการเจริญเติบโตและอัตรารอดที่ลดลง (Ding et al., 2015)

การใช้เอนไซม์จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจโดยเอนไซม์สามารถปรับปรุงคุณภาพของวัตถุดิบกากถั่วเหลือง (pretreatment) ก่อนนำไปใช้ประโยชน์ โดยเอนไซม์เข้าไปสลายพันธะในโมเลกุลของวัตถุดิบอาหารที่สัตว์น้ำย่อยได้ยากและปลดปล่อยโภชนะเหล่านั้นออกมา (NRC, 2011; Castillo et al., 2015; Liang et al., 2022) ซึ่งเอนไซม์แต่ละชนิดจะย่อยสารอาหารแตกต่างกันออกไป เช่น กลุ่มเอนไซม์ Protease ย่อยโปรตีนให้เป็นเปปไทด์หรือกรดอะมิโน, กลุ่มเอนไซม์ย่อยคาร์โบไฮเดรต (Carbohydrases) ย่อยแป้งและน้ำตาลเชิงซ้อนให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว, กลุ่ม Non-Starch Polysaccharides (NSP) ย่อยคาร์โบไฮเดรตที่พบในผนังเซลล์ของพืช, กลุ่มเอนไซม์ Lipolytic enzymes ย่อยไขมันให้เป็นกรดไขมันและกลีเซอรอล และเอนไซม์กลุ่มเสริมประสิทธิภาพ เช่น เอนไซม์ Phytase ย่อยกลุ่มฟอสฟอรัสในพืช การผสมเอนไซม์หลายชนิด (cocktail enzyme) นั้นช่วยเสริมประสิทธิภาพในหลากหลายด้าน โดยนำวัตถุดิบโปรตีนจากพืชผ่านกระบวนการ pretreatment พบว่าปริมาณสารต้านโภชนะลดลง (Li et al., 2020; Cristina et al., 2024) และเมื่อนำไปเลี้ยงปลา rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (Ogunkoya et al., 2006), Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*) (Ai et al., 2007), Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) (Maas et al., 2020) พบว่าช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยได้และการเจริญเติบโตของสัตว์น้ำ การประเมินประสิทธิภาพการย่อยของวัตถุดิบอาหารสัตว์น้ำสามารถดำเนินการได้หลากหลายวิธี โดยเฉพาะวิธี in vitro digestibility ซึ่งเป็นเทคนิคจำลองการย่อยอาหารในหลอดทดลองโดยใช้เอนไซม์ที่สกัดจาก

ระบบทางเดินอาหารของสัตว์น้ำ วิธีนี้มีข้อดีที่สามารถควบคุมตัวแปรต่างๆ ได้ดี มีความแม่นยำ และไม่ต้องใช้สัตว์ทดลองจำนวนมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในงานวิจัยนี้ซึ่งมุ่งประเมินผลของการเสริมเอนไซม์รวมต่อการปรับปรุงคุณภาพของกากถั่วเหลือง เทคนิค *in vitro* digestibility ถูกนำมาใช้ในการวัดค่าการย่อยได้ของโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตในระดับโมเลกุล ซึ่งสะท้อนถึงประสิทธิภาพการดูดซึมและการใช้ประโยชน์สารอาหารของสัตว์น้ำได้อย่างชัดเจน (Rungruansak-Torrisen et al., 2002; NRC, 2011) ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการเสริมเอนไซม์รวมเพื่อปรับปรุงคุณภาพของกากถั่วเหลือง และประสิทธิภาพการย่อยของวัตถุดิบอาหารในกุ้งขาวแวนนาไมด้วยวิธี *in vitro* digestibility เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในพัฒนาสูตรอาหารจากวัตถุดิบโปรตีนทดแทนจากพืชเพื่อสร้างความยั่งยืนทางด้านอาหารสัตว์น้ำในอนาคต

วิธีการศึกษา

การปรับปรุงคุณภาพของกากถั่วเหลืองด้วยเอนไซม์

วางแผนการทดลองแบบ 4x5 factorial in completely randomized design (Factorial in CRD) โดยมีปัจจัยคือความเข้มข้นของเอนไซม์ (4 ความเข้มข้นคือ 0, 10, 20 และ 30 กรัม/กิโลกรัมอาหาร) และระยะเวลา (5 ช่วงเวลาคือ 0, 1, 2, 4 และ 6 ชั่วโมง) ซึ่งเอนไซม์รวม (Cocktail enzymes) ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ เป็นผลิตภัณฑ์ทางการค้าของบริษัท บริษัท เวอร์แบค (ประเทศไทย) จำกัด มีชื่อทางการค้าคือ Zymgrow® ประกอบไปด้วยเอนไซม์ protease, amylase, phytase, xylanase และ cellulase

การเตรียมวัตถุดิบกากถั่วเหลือง

นำกากถั่วเหลืองบดให้ละเอียดและร่อนผ่านตะแกรงร่อนขนาด 0.5 มิลลิเมตร หลังจากนั้นละลายเอนไซม์รวม (Cocktail Enzymes) ที่ความเข้มข้น 10, 20 และ 30 กรัม/กิโลกรัม (Factor A) ในน้ำกลั่นปริมาตร 600 มิลลิลิตร/กิโลกรัมอาหาร และนำไปสเปรย์ให้กระจายบนกากถั่วเหลืองอย่างสม่ำเสมอ ส่วนกากถั่วเหลืองชุดควบคุมทำการสเปรย์ด้วยน้ำกลั่น (SBM-Control) โดยจะแบ่งช่วงเวลาของการย่อยออกเป็น 5 ช่วงเวลา (Factor B) คือ 0, 1, 2, 4 และ 6 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อครบตามระยะเวลาที่กำหนด นำกากถั่วเหลืองไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 ° C ทันทีเพื่อหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ ก่อนทำการวิเคราะห์ตัวอย่างกากถั่วเหลืองที่แช่แข็งไว้ที่ -20 ℃ จะต้องนำออกจากช่องแช่แข็งและทำการ ละลายน้ำแข็งที่อุณหภูมิห้อง (25±2 ℃) เพื่อป้องกันการเสื่อมสลายของสารสำคัญที่ไวต่อแสงและอุณหภูมิ โดยทำการละลายจนไม่มีผลึกน้ำแข็งหลงเหลือและใช้งานทันทีในกระบวนการวิเคราะห์ทางเคมีและทางเอนไซม์ (ตามวิธีดัดแปลงจาก Areekijseree et al., 2000 และ Rungruansak-Torrisen et al., 2002) หลังจากนั้นนำตัวอย่างกากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดไฟติก (Lee and Choi, 2011) นำผลการวิเคราะห์ที่ได้ทำการเลือกสภาวะการย่อยที่สามารถลดปริมาณกรดไฟติกได้ดีที่สุดเพื่อนำไปศึกษาประสิทธิภาพการย่อยได้ของโปรตีนและคาร์โบไฮเดรต ด้วยวิธี *in vitro* digestibility (Rungruansak et al., 2002) และวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีตามวิธีมาตรฐานของ AOAC (2000) ต่อไป

Table 1 Chemical compositions of conventional soybean meal

Chemical compositions (%)	Conventional soybean meal
Protein	44.0
Fat	1.50
Fiber	6.00
Ash	6.30
Mositure	9.50

การวิเคราะห์หาปริมาณกรดไฟติก

วางแผนการทดลองแบบ 4x5 Factorial in completely randomized design (Factorial in CRD) มีปัจจัยคือความเข้มข้นของเอนไซม์ (4 ความเข้มข้นคือ 0, 10, 20 และ 30 กรัม/กิโลกรัมอาหาร) และระยะเวลา (5 ช่วงเวลาคือ 0, 1, 2, 4 และ 6 ชั่วโมง) ทำการวิเคราะห์กรดไฟติก ตามวิธีการ Lee and Choi (2011) โดยชั่งตัวอย่างกากถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการย่อย (SBM-Control) และกากถั่วเหลืองที่ผ่านกระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์รวม (SBM-Enz) ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ตัวอย่างละ 1 กรัม แช่ในสารละลาย HCl ความเข้มข้น 2.4 % ที่ปริมาตร 20 มิลลิลิตร โดยบ่มข้ามคืนผ่านเครื่องเขย่าสาร (Shaking incubator) 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,500 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำส่วนใสที่ปริมาตร 3 มิลลิลิตรไปทำปฏิกิริยากับสารละลาย Wade's reagent 1 มิลลิลิตร (0.03% $FeCl_3$ และ 0.3% Sulfosalicylic acid) แล้วไปปั่นเหวี่ยงที่ 3,500 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นนำส่วนใสวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 nm ด้วยเครื่อง UV/VIS spectrophotometer ค่าที่ได้นำไปใช้เพื่อเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานโดยใช้ Phytic acid sodium salt hydrate

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหาร

ทำการสกัดเอนไซม์จากระบบทางเดินอาหารของกุ้งขาว (Crude enzyme extract) ในกุ้งขาวแวนนาไมน้ำหนักเฉลี่ย 0.919±0.268 กรัม/ตัว โดยบดตัวอย่างทางเดินอาหารใน Tris - HCl buffer ความเข้มข้น 50 mM pH 7.5 ที่อัตราส่วน 1:6 (*w/v*) ให้ละเอียดด้วย homogenizer จากนั้นนำตัวอย่างที่ผ่านการบดไปทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 15,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ทำการเก็บส่วนใสด้านบนและแช่ตัวอย่างที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนรวมของสารสกัดเอนไซม์เพื่อใช้ในการวิเคราะห์กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ ตามวิธีการของ Lowry et al. (1951) โดยการเติมสารสกัดเอนไซม์ ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 475 ไมโครลิตร และ Solution I 2000 ไมโครลิตร (ประกอบด้วยสารละลาย 2% sodium carbonate: 1% Copper (II) sulfate, $CuSo_4$ และ 2% Potassium Sodium Tartrateอัตราส่วน 100:1:1) หลังจากนั้นเติมสารละลาย Folin's reagent ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ก่อนนำตัวอย่างไปบ่มในที่มืด 30 นาที จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 nm ด้วยเครื่อง UV/VIS spectrophotometer ค่าที่ได้นำไปใช้เปรียบเทียบสารละลายโปรตีนมาตรฐานโดยใช้ Bovine serum albumin (BSA)

วิเคราะห์กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ทริปซิน ตามวิธีของ Rungruansak-Torrisen et al. (2006) โดยเติมสารสกัดเอนไซม์ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมลงใน substrates (1.25 mM Bensoyl-Larginine-p-nitroanilide: BAPNA) ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร หลังจากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค kinetic ที่ความยาวคลื่น 410 nm 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ด้วยเครื่อง UV/VIS spectrophotometer เพื่อใช้ในการคำนวณหาประสิทธิภาพการย่อยได้ของโปรตีนด้วยวิธี *in vitro* digestibility

วิเคราะห์กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์อะไมเลส ตามวิธีของ Areekijseree et al. (2000) โดยต้มน้ำแป้ง 5% ในน้ำเดือด เติม 62.5 ไมโครลิตร ของ 0.2 M Phosphate buffer pH 7 และ 37.5 ไมโครลิตร 20 mM NaCl ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex mixer หลังจากนั้นเติมสารสกัดเอนไซม์ ปริมาตร 125 ไมโครลิตร นำไปบ่มใน Incubator ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 15 นาที เติม 250 ไมโครลิตร ของ 1% DNS (ซึ่งละลายใน 2M NaOH และ 0.6% Sodium potassium tartrate) ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที หลังจากนั้นเติมน้ำกลั่น 2.5 มิลลิลิตรและนำตัวอย่างที่ได้วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm ด้วยเครื่อง UV/VIS spectrophotometer เพื่อใช้ในการคำนวณหาประสิทธิภาพการย่อยได้ของคาร์โบไฮเดรตด้วยวิธี *in vitro* digestibility

การวิเคราะห์ประสิทธิภาพการย่อยได้ของโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตด้วยวิธี *in vitro* digestibility

นำตัวอย่างที่ผ่านสภาวะการย่อยที่เหมาะสมที่สามารถลดปริมาณกรดไฟติกได้ดี มาทำการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยได้ของโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตด้วยวิธี *in vitro* digestibility โดยทำวางแผนการทดลองแบบ 2x5 Factorial in completely randomized design (Factorial in CRD) ปัจจัยคือความเข้มข้นของเอนไซม์ (กากถั่วเหลืองปกติ: SBM-Control และกากถั่วเหลืองที่ย่อยด้วยเอนไซม์: SBM-Enz) และระยะเวลา (5 ช่วงเวลาคือ 0, 1, 2, 4 และ 6 ชั่วโมง) จากนั้นทำการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยได้ของโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตด้วยวิธี *in vitro* digestibility ตามวิธีการของ Rungruansak-Torrisen et al. (2002) โดยทำการชั่งกากถั่วเหลือง SBM-Control และ SBM-ENZ ตัวอย่างละ 20 มิลลิกรัม ลงใน 50mM Phosphate buffer pH 8.2 ปริมาตร 40 มิลลิลิตร และเติม

0.5% Chloramphenicol ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 110 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติม Crude enzyme extract ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และทำการเก็บตัวอย่าง (control solution: undigested) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในหลอดเก็บตัวอย่าง นำไปต้มด้วยน้ำเดือด 10 นาที เพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์ และเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนอิสระและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

หลังจากนั้นทำการบ่มต่ออีก 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 110 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเก็บตัวอย่าง (Sample solution: digested) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และนำไปต้มด้วยน้ำเดือด 10 นาที เพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์ และเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ตัวอย่างที่ได้ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนอิสระ (Free amino group) ด้วยวิธี Trinitrobenzene Sulfonic Acid (TNBS) และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar) ด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS)

การวิเคราะห์หาปริมาณกรดอะมิโนอิสระด้วยวิธี TNBS โดยนำตัวอย่างที่ได้จากการย่อยในหลอดทดลองด้วยวิธี *in vitro* digestibility ตามวิธีการของ Rungruansak et al. (2002) นำตัวอย่าง 200 ไมโครลิตรเติมลงในสารละลาย 50 mM Phosphate buffer pH 8.2 ที่ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และสาร 0.1% TNBS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และนำไปบ่มในที่มืดและควบคุมอุณหภูมิที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 1 M HCl 1 มิลลิลิตร และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร โดยการคำนวณหาประมาณหมู่อะมิโนอิสระเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน DL-Alanine

การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS โดยนำตัวอย่างที่ได้จากการย่อยในหลอดทดลองด้วยวิธี *in vitro* digestibility ตามวิธีการของ Rungruansak et al. (2002) โดยนำตัวอย่าง 125 ไมโครลิตร ผสมน้ำกลั่น 125 ไมโครลิตร ก่อนเติมลงในหลอดทดลองที่มีสารละลาย 1% DNS ที่ปริมาตร 250 ไมโครลิตรของ (ละลายใน 2 M NaOH และ 0.6% Sodium potassium tartrate) ผสมให้เข้ากันและต้มในน้ำเดือด 5 นาที ปล่อยให้เย็นและเติมน้ำกลั่น 2.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยการคำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน Maltose

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของกากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์รวมที่ระยะเวลาต่างๆ ด้วยวิธี Proximate analysis (AOAC, 2000) ณ ศูนย์ศึกษาค้นคว้าวิจัยและห้องปฏิบัติการกลาง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล (Analysis of variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan’s New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS Version 28.0.0.0

ผลการศึกษาและวิจารณ์

จากผลการศึกษาปริมาณกรดไฟติกในกากถั่วเหลืองและกากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์รวม (Exogenous enzymes: protease, amylase, phytase, xylanase และ cellulase) ที่ความเข้มข้น 0, 10, 20 และ 30 กรัม/กิโลกรัมอาหาร ที่ช่วงเวลา 0, 1, 2, 4 และ 6 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่าปริมาณความเข้มข้นของเอนไซม์รวมและระยะเวลาในการย่อยส่งผลต่อปริมาณกรดไฟติกที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อมีการเพิ่มระดับความเข้มข้นของเอนไซม์รวมและช่วงเวลาในการย่อย โดยปริมาณกรดไฟติกสูงสุดในกากถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์รวมและมีปริมาณคงที่ในทุกช่วงเวลา (ปริมาณกรดไฟติกเฉลี่ยรวม 0.0385±0.0005%) และที่ระดับความเข้มของเอนไซม์รวม 10 กรัม/กิโลกรัมอาหาร พบว่าปริมาณกรดไฟติกลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ช่วงเวลาการย่อย 4 ชั่วโมง คือ 0.0371±0.0007% เมื่อเทียบกับชุดควบคุม ($P<0.05$) และมีปริมาณกรดไฟติกคงที่เมื่อผ่านการย่อย 4 ชั่วโมง (0.0371-0.0372%), ที่ระดับความเข้มของเอนไซม์รวม 20 กรัม/กิโลกรัมอาหาร พบว่าปริมาณกรดไฟติกลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ช่วงเวลาการย่อย 2 ชั่วโมง คือ 0.0353±0.0012 เมื่อเทียบกับชุดควบคุม ($P<0.05$) และมีปริมาณคงที่เมื่อผ่านการย่อยมากกว่า 2 ชั่วโมง (0.0353-0.0375%), ที่ระดับความเข้มของเอนไซม์รวม 30 กรัม/กิโลกรัมอาหาร พบว่าปริมาณกรดไฟติกลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ช่วงเวลาการย่อย 1 ชั่วโมง คือ 0.0361±0.0010% เมื่อเทียบกับชุดควบคุม ($P<0.05$) และมีปริมาณ

คงที่เมื่อผ่านการย่อยมากกว่า 1 ชั่วโมง (0.0347-0.0361%) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าปริมาณความเข้มข้นของเอนไซม์รวมและช่วงเวลาในการย่อยส่งผลต่อปริมาณของกรดไฟติกที่ลดลง (**Figure 1**)

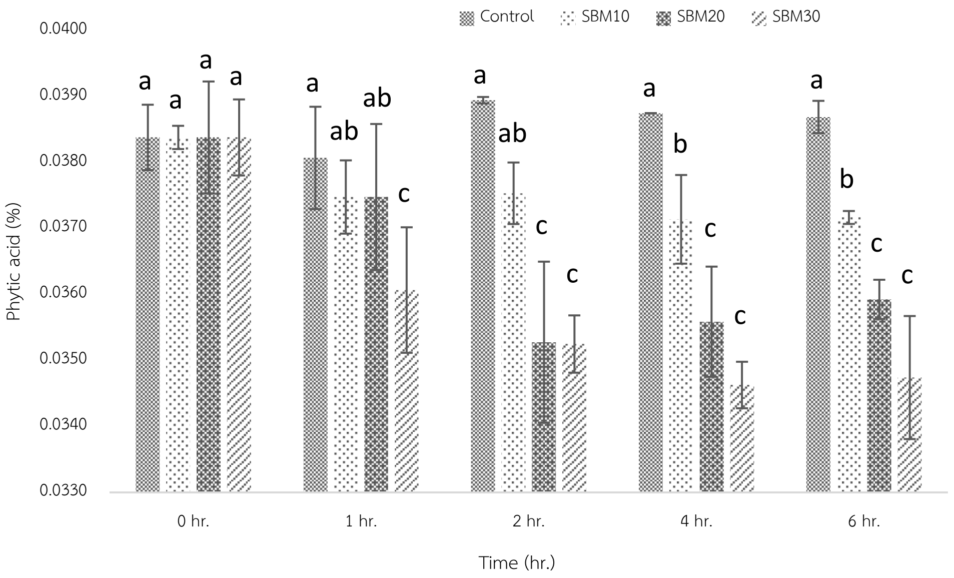

Figure 1 Phytic acids content (%) of soybean meal with enzyme treatment in different concentration and treatment time (mean±SD; n=3)

Different letters above the bars for treatment time indicate significant differences (P<0.05)

การเพิ่มระดับความเข้มข้นของเอนไซม์รวมและระยะเวลาในการย่อยส่งผลโดยตรงต่อปริมาณกรดไฟติกในกากถั่วเหลือง เนื่องจากเอนไซม์ phytase จะเร่งปฏิกิริยาการย่อยพันธะ phospho diester ซึ่งเชื่อมหมู่ฟอสเฟตเข้ากับโครงสร้าง inositol ring ของกรดไฟติก ส่งผลให้เกิดการปลดปล่อยฟอสฟอรัสในรูปของอนุมูลอิสระ orthophosphate (PO_4^{3-}) ออกมา (Cao et al., 2007; Yan et al., 2002) โดยประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์นั้นอยู่ภายใต้การควบคุมของหลายปัจจัยร่วมกัน คือ ความเข้มข้นของเอนไซม์และปริมาณซับสเตรท อุณหภูมิ (Temperature) ความเป็นกรด-ด่าง (pH) และระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา (Incubation Time) เมื่อปฏิกิริยาการย่อยเอนไซม์ถึงจุดสูงสุด ปฏิกิริยาจะลดลงและมีแนวโน้มคงที่จากการอิ่มตัวของเอนไซม์ (Enzyme saturation) (Mbira, 2024) ดังนั้นปริมาณความเข้มข้นของเอนไซม์และระยะเวลาการย่อยจึงต้องมีความเหมาะสมผลการศึกษานี้พบว่าปริมาณกรดไฟติกในกากถั่วเหลืองชุดควบคุม (SBM-Control) และชุดทดลองที่ใช้เอนไซม์ (SBM-ENZ20) มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาการบ่มนานขึ้นโดยเฉพาะที่ช่วงเวลา 4 และ 6 ชั่วโมง ซึ่งอาจเกิดจากการลดลงของประสิทธิภาพเอนไซม์ภายหลังการบ่มที่ยาวนาน (El-Toukhy et al., 2013) หรือเกิดการสังเคราะห์ซ้ำของสารประกอบฟอสฟอรัสอินทรีย์บางชนิดที่สามารถตรวจวัดเป็นกรดไฟติกได้ (Blaabjerg et al., 2010) จากผลการทดลองซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Carlson and Poulson (2003) ที่ทำการศึกษาช่วงเวลาและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการใช้เอนไซม์ไฟเตสจากจุลินทรีย์ในการหมักข้าวบาร์เลย์และข้าวสาลี พบว่าที่อุณหภูมิ 10 และ 20 องศาเซลเซียส ปริมาณของกรดไฟติกลงจาก 3.3-3.4 กรัม/กิโลกรัม เหลือเพียง 0.69–2.74 กรัม/กิโลกรัม (ลดลง 17-79%) ภายใน 8 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส ปริมาณของไฟเตทลดลงจนมีปริมาณใกล้เคียงภายใน 2 ชั่วโมงเท่านั้น นอกจากนี้ Blaabjerg et al. (2010) ได้เสริมเอนไซม์ไฟเตสในกากถั่วเหลืองและกากเรพซีดพบว่าปริมาณของไฟเตทลดลงจาก 3.05 กรัม/กิโลกรัม เหลือ 0.24 กรัม/กิโลกรัม (ลดลง 92%) และ 5.54 เหลือ 1.88 กรัม/กิโลกรัม (ลดลง 66%) ตามลำดับ ภายใน 24 ชั่วโมง โดยการลดลงของกรดไฟติกนั้นเป็นผลดีกับสัตว์น้ำ เนื่องจากกรดไฟติกหากมีปริมาณมากในอาหารสัตว์จะมีความเป็นพิษต่อสัตว์น้ำ ซึ่งจะเข้าไปจับกับกลุ่มโปรตีนส่งผลให้ประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนในอาหารลดลง และยับยั้งกระบวนการดูดซึมแร่ธาตุที่สำคัญ เช่น ฟอสฟอรัส แคลเซียม แมกนีเซียม เหล็ก และสังกะสี

(Francis et al., 2001) โดย Zheng et al. (2019) และ Liang et al. (2022) ได้ระบุว่าสัตว์น้ำขาดแคลนเอนไซม์ไฟเตส ทำให้ไม่สามารถใช้ประโยชน์จากฟอสฟอรัสและสารอาหารได้อย่างเต็มที่ การเสริมเอนไซม์ไฟเตสในอาหารสัตว์ไม่เพียงแต่เพิ่มการใช้ประโยชน์ของฟอสฟอรัสและแร่ธาตุ ยังส่งผลต่อการเจริญเติบโตของสัตว์น้ำที่สูงขึ้น และลดของเสียที่ปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อมอีกด้วย

จากการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยได้ของโปรตีน ด้วยวิธี *in vitro* digestibility จากเอนไซม์ที่สกัดจากทางเดินอาหารของกุ้งขาวแวนนาไม โดยเลือกกากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์รวมที่ความเข้มข้น 20 กรัม/กิโลกรัมอาหาร (SBM-ENZ20) ที่ช่วงเวลา 0, 1, 2, 4 และ 6 ชั่วโมง จากการทดลองก่อนหน้านี้ ซึ่งเป็นสภาวะการย่อยที่ส่งผลทำให้ปริมาณกรดไฟติกลดลงมากที่สุดเพื่อเปรียบเทียบกับกากถั่วเหลือง (SBM) ที่ช่วงเวลา 0, 1, 2, 4 และ 6 ชั่วโมง พบว่าการเสริมเอนไซม์รวมส่งผลต่อประสิทธิการย่อยได้ของโปรตีนอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) โดยมีค่าเฉลี่ยของปริมาณกรดอะมิโนอิสระใน SBM และ SBM-ENZ20 คือ 1.40±0.15 และ 1.98±0.29 ตามลำดับ (เพิ่มขึ้น 41.43 %)) ประสิทธิภาพการย่อยได้สูงที่สุดในช่วงเวลาที่ 4 ชั่วโมง คือ 3.28±0.28 μmol DL-alanine/g feed/trypsin activity ส่วนของประสิทธิภาพการย่อยได้ของคาร์โบไฮเดรตนั้น พบว่าการเสริมเอนไซม์รวมส่งผลต่อประสิทธิการย่อยได้ของคาร์โบไฮเดรตอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) โดยมีค่าเฉลี่ยของปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์ใน SBM และ SBM-ENZ20 คือ 0.24±0.04 และ 0.34±0.05 μmol maltose/g feed/amylase activity ตามลำดับ (เพิ่มขึ้น 41.67%) **(Table2)** ประสิทธิภาพการย่อยได้สูงที่สุดในช่วงเวลาที่ 2 ชั่วโมง คือ 0.55±0.04 μmol maltose/g feed/amylase activity และการผลการศึกษาสังเกตได้ว่าการลดลงของปริมาณกรดอะมิโนอิสระและน้ำตาลรีดิวซ์ที่เวลา 6 ชั่วโมงในชุดทดลอง SBM และ SBM-ENZ20 อาจเกิดจากการเสื่อมสภาพของเอนไซม์เมื่อบ่มเป็นเวลานานที่อุณหภูมิ 37°C ส่งผลให้โครงสร้างโปรตีนของเอนไซม์เปลี่ยนแปลงและสูญเสียกิจกรรม **(**Eğilmez and Haspolat, 2024) รวมถึงการสะสมของผลิตภัณฑ์และการหมดลงของสับสเตรตที่ส่งผลให้ปฏิกิริยาเข้าสู่สมดุลและผลิตภัณฑ์ใหม่ลดลง (Nath and Atkins, 2006) จากงานวิจัยของ Gong et al. (2024) ที่ได้ทำการย่อยกากถั่วเหลืองและข้าวโพดด้วยเอนไซม์รวม (ประกอบด้วยเอนไซม์ protease, amylase, lipase, cellulase, pectinase, xylanase, glucanase และgalactosidase) พบว่าโครงสร้างของวัตถุดิบอาหารทั้ง 2 ชนิด มีขนาดเล็กลงและมีรูพรุนมากขึ้น ปริมาณของกรดอะมิโนและน้ำตาลรีดิวซ์สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) และ Xu et al. (2025) ได้ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยวัตถุดิบอาหารสัตว์ที่มีส่วนประกอบหลักจากพืช (ประกอบด้วยฟางข้าวโพด ข้าวโพดหมักทั้งต้น ข้าวโพดบด รำข้าวสาลี กากถั่วเหลือง และกากฝ้าย) ด้วยเอนไซม์ในกลุ่ม Non-Starch Polysaccharides (NSP) ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์ cellulase, xylanase, pectinase และglucanase พบว่าปริมาณของคาร์โบไฮเดรตที่ย่อยได้ยากลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) กลายเป็นน้ำตาลที่ย่อยได้ง่าย นอกจากนี้ Cristina et al. (2024) ได้ทำการศึกษาการย่อยกากถั่วเหลืองด้วยเอนไซม์จากเศษเหลือจากอุตสาหกรรมการประมง (ประกอบด้วยเอนไซม์ peptidase, phytase, lipase และ glucosidase) พบว่าปริมาณของโปรตีนที่ละลายได้ (Protein Solubility) และปริมาณกรดอะมิโนอิสระสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) สารต้านโภชนะชนิด Trypsin Inhibitor (TI) ลดลง 30% กรดไฟติกลดลง 33.6% และโอลิโกแซ็กคาไรด์ลดลง 29.6% ก่อนนำไปเลี้ยงปลา *Odontesthes argentinensis* พบว่ามีการใช้ประโยชน์และการสะสมของโปรตีนในร่างกายสูงขึ้น การเผาผลาญไขมันในตับดีขึ้น อีกทั้งยังมีอัตรารอดที่สูงขึ้นอีกด้วย ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Paladines-Parrales et al. (2025) ได้ทดแทนกากถั่วเหลืองด้วยกากถั่วเหลืองที่ผ่านกระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์ (Enzyme-Treated Soybean Meal: ET-SBM) และกากถั่วเหลืองที่มีโอลิโกแซ็กคาไรด์ต่ำ (Low-Oligosaccharide Soybean Meal: LO-SBM) ในปลาดุกอเมริกัน (*Ictalurus punctatus*) พบว่ากากถั่วเหลือง ET-SBM ส่งผลต่ออัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (FCR) ที่ลดลง และในส่วนของกากถั่วเหลือง LO-SBM ส่งผลต่อประสิทธิภาพการเจริญเติบโตที่สูงขึ้นและค่า FCR ที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) เมื่อเทียบกับกากถั่วเหลืองปกติ และ Li et al. (2020) ได้ทำการศึกษาการเปรียบเทียบระหว่างกากถั่วเหลืองกะเทาะเปลือก, กากถั่วเหลืองที่หมักด้วยจุลินทรีย์ และกากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ (ประกอบด้วยเอนไซม์ phytase, pectinase, cellulase, xylanase, galactosidase และneutrase) ในปลา Largemount bass (*Micropterus salmoides*) พบว่าสามารถลดปริมาณสารต้านโภชนะ ได้แก่ สารกลุ่มก่อโรคภูมิแพ้ (glycinin และ beta-conglycinin) และกรดไฟติก อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) และการใช้เอนไซม์ส่งผลต่อปริมาณโปรตีนและประสิทธิภาพการย่อยได้เพิ่มสูงขึ้น และคาร์โบไฮเดรตในกลุ่มโอลิโกแซ็กคาไรด์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) การศึกษาของ Passos et al. (2023) แสดงให้เห็นว่าการใช้ phytase ร่วมกับ protease สามารถเพิ่มการย่อยได้ของโปรตีนและฟอสฟอรัสในกากถั่วเหลืองได้ดีกว่า

การใช้เอนไซม์แต่ละชนิดแยกกัน เนื่องจาก protease ช่วยทำลายโครงสร้างโปรตีนที่ห่อหุ้มกรดไฟติก ทำให้ phytase สามารถเข้าถึงและสลายกรดไฟติกได้เร็วและมีประสิทธิภาพมากขึ้น นอกจากนี้ xylanase ยังช่วยสลายเยื่อใยไม่ใช่แป้ง (NSP) ในผนังเซลล์ ได้ดีขึ้น

Table 2 *in vitro* protein and carbohydrate digestibility of soybean meal with enzyme treatment in different concentration and treatment time with main effect (mean±SD; n=3)

Treatment	Treatment time (hr)	Protein (μmol DL-alanine/g feed/ trypsin activity)	Carbohydrate (μmol maltose/g feed/ amylase activity)
SBM-Control	0	0.18±0.08[e]	0.17±0.05[de]
SBM-Control	1	1.32±0.13[cd]	0.25±0.05[cd]
SBM-Control	2	1.76±0.09[c]	0.32±0.04[bc]
SBM-Control	4	2.33±0.17[b]	0.32±0.04[bc]
SBM-Control	6	1.41±0.23[cd]	0.13±0.04[e]
SBM-ENZ20	0	0.18±0.08[e]	0.17±0.05[de]
SBM-ENZ20	1	2.67±0.48[b]	0.17±0.04[de]
SBM-ENZ20	2	2.58±0.31[b]	0.55±0.04[a]
SBM-ENZ20	4	3.28±0.28[a]	0.42±0.07[b]
SBM-ENZ20	6	1.21±0.04[d]	0.39±0.04[b]
P-value		<0.0001	<0.0001

Remark: *in vitro* protein digestibility determined by TNBS method, *in vitro* carbohydrate digestibility determined by DNS method

Different letters within the same column indicate significant differences (P<0.05)

นอกจากนี้องค์ประกอบทางเคมีของกากถั่วเหลืองและกากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์รวม พบว่ามีปริมาณเยื่อใยลดลงในกากถั่วเหลืองที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ที่เวลา 1 ชั่วโมง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) โดยเยื่อใยมีค่าเท่ากับ 4.08±0.08 % โดยลดลง 4.67% เมื่อเทียบกับกากถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการย่อย **(Table 3)** ส่วนปริมาณโปรตีนไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) สอดคล้องกับ Plouhinec et al. (2025) ที่ทำการใช้เอนไซม์กลุ่ม pectinase และ rhamnogalacturonan hydrolase ในรูปแบบเอนไซม์รวมสลายเพกทินในถั่วเหลืองได้ 20-30% เพิ่มการปลดปล่อยน้ำตาลอาราบิโนส กาแลคโทส และกรดยูโรนิก ส่งผลให้เยื่อใยลดลง อีกทั้งการปรับสภาพกากถั่วเหลืองด้วยเอนไซม์ lignocellulolytic สามารถช่วยลดปริมาณ Non-Starch Polysaccharides ที่เป็นองค์ประกอบของเยื่อใยได้ ส่งผลให้ความสามารถในการย่อยได้ของกากถั่วเหลืองที่ผ่านการปรับปรุงเพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับกากถั่วเหลืองที่ไม่ได้ผ่านการปรับปรุง (U-taynapun et al., 2024) เนื่องจากเอนไซม์จะย่อยและเปลี่ยนแปลงโครงสร้างในโมเลกุลให้มีขนาดเล็กลงซึ่งปลดปล่อยสารอาหารออกมา ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงค่าของโภชนะโดยรวมในวัตถุดิบอาหารลดลงเล็กน้อย แต่จะส่งผลต่อประสิทธิภาพการย่อยที่สูงขึ้น (Wang et al., 2024) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Bowyer (2016) ที่ทำการหมักถั่วลูพิน (lupin) ด้วยวิธีการหมัก Solid-state fermentation (SSF) สำหรับใช้เป็นวัตถุดิบในสูตรอาหารปลานิล (*Oreochromis niloticus*) และปลาเรนโบว์เทราต์ (*Oncorhynchus mykiss*) พบว่าปริมาณโปรตีนรวมลดลงเล็กน้อยแต่ประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนเพิ่มขึ้นโดยส่งผลดีต่อการเจริญเติบโต อีกทั้ง Fernandes et al. (2022) รายงานว่าการย่อยวัตถุดิบกากเบียร์ด้วยเอนไซม์ก่อนนำมาเป็นวัตถุดิบอาหารในการผลิตอาหารเลี้ยงปลา European seabass (*Dicentrarchus labrax*) พบว่าแนวโน้มของปริมาณโปรตีนรวมลดลงเล็กน้อยในบางกลุ่มการทดลอง ปริมาณเยื่อใยลดลง แต่ในส่วนของประสิทธิภาพการย่อยได้สูงขึ้นเช่นเดียวกัน ซึ่งจากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการทดลองในส่วนของประสิทธิภาพการย่อยได้ของโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตที่เพิ่มขึ้น

Table 3 Chemical composition of soybean meal treated with exogenous enzymes at 20 mg/kg in different treatment time with main effect (mean±SD; n=3)

Treatment	Treatment time (hr)	Crude Protein (%)	Crude Fiber (%)
SBM-Control	0	35.92±1.21	4.28±0.02[bc]
SBM-Control	1	35.77±0.25	4.35±0.03[ab]
SBM-Control	2	35.92±0.05	4.33±0.05[ab]
SBM-Control	4	35.42±0.62	4.33±0.02[ab]
SBM-Control	6	36.14±0.49	4.38±0.03[a]
SBM-ENZ20	0	35.92±1.22	4.28±0.02[bc]
SBM-ENZ20	1	35.54±0.06	4.08±0.08[d]
SBM-ENZ20	2	35.32±0.33	4.22±0.04[c]
SBM-ENZ20	4	35.57±0.51	4.30±0.03[ab]
SBM-ENZ20	6	36.04±0.12	4.34±0.04[ab]
P-value		0.8376	<0.0001

Different letters within the same column indicate significant differences (P<0.05)

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการนำวัตถุดิบกากถั่วเหลืองที่ผ่านกระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์เพื่อทดแทนแหล่งโปรตีนจากปลาป่นในสูตรอาหารสัตว์ โดย Fan et al. (2021) ทดลองในกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) พบว่าสามารถทดแทนปลาป่นได้ 48% โดยไม่ส่งผลต่ออัตรารอดและอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของกุ้งขาวแวนนาไม (P>0.05) ชนิดและจำนวนจุลินทรีย์ที่ดีในลำไส้เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) Yu et al. (2022) ได้ทำการเลี้ยงหอย abalone (*Haliotis discus hannai*) พบว่าอัตราการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) และสามารถทดแทนปลาป่นได้ถึง 75% ในสูตรอาหาร โดยไม่ส่งผลกระทบต่อระบบภูมิคุ้มกันและปริมาณจุลินทรีย์ที่ดีในระบบย่อยอาหาร และ Li et al. (2020) ทดลองในปลากะพงปากกว้าง (*Micropterus salmoides*) พบว่าสามารถทดแทนกากถั่วเหลืองปกติได้ถึง 150 กรัม/กิโลกรัม (100%) ส่งผลทำให้อัตราการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้ประโยชน์จากอาหาร ระบบภูมิต้านทาน และความยาวของวิลไลของลำไส้สูงที่สุด

จากผลการทดลองครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการปรับปรุงคุณภาพของกากถั่วเหลืองด้วยเอนไซม์รวมที่ความเข้มข้น 20 กรัม/กิโลกรัมอาหาร ที่ระยะเวลาการย่อย 2 ชั่วโมง ก่อนนำไปเป็นวัตถุดิบอาหารสัตว์นั้นส่งผลดีต่อสัตว์น้ำในทางที่ดีขึ้น โดยสามารถลดปริมาณกรดไฟติกซึ่งเป็นสารต้านโภชนะรวมถึงส่งผลต่อประสิทธิภาพการย่อยได้ของโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตที่เพิ่มสูงขึ้น ซึ่งข้อมูลการปรับปรุงคุณภาพของกากถั่วเหลืองนี้สามารถนำไปใช้ต่อยอดในการพัฒนาสูตรอาหารเพื่อลดปริมาณปลาป่นด้วยโปรตีนจากพืชในสูตรอาหารและเป็นการสร้างความยั่งยืนในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในอนาคต

การอนุญาตวิจัยในสัตว์

การทดลองนี้ได้รับอนุญาตใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ ตามเอกสารอนุญาตเลขที่ อว 660201.2.11/767 (28)

เอกสารอ้างอิง

กองนโยบายและแผนพัฒนาการประมง. 2566. สถิติผลผลิตการเลี้ยงกุ้งทะเลประจำปี 2566. แหล่งข้อมูล: https://www4.fisheries.go.th/local/file_document/20240712152754_1_file.pdf. ค้นเมื่อ 1 เมษายน 2568.

Areekijseree, M., A. Engkagul, U. Kovitvadhi, A. Thongpan, M. Mingmuang, and P. Pakkong. 2000. Temperature and pH characteristics of amylase and proteinase of adult freshwater pearl mussle, Hyriopsis (Hyriopsis) *bialatus Simson* 1900. Aquaculture. 234: 575–587.

AOAC, 2000. Official methods of analysis, 17th Edition. Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, MD USA.

Blaabjerg, K., N. G. Carlsson, J. Hansen-Møller, and H. D. Poulsen. 2010. Effect of heat-treatment, phytase, xylanase and soaking time on inositol phosphate degradation in vitro in wheat, soybean meal and rapeseed cake. Animal Feed Science and Technology. 162: 123-134.

Bowyer, P. H. A. 2016. Assessment of a solid-state fermentation product in contemporary and lupincontaining diets for commercial finfish. Ph. D. Thesis. Plymouth University, United Kingdom.

Cao, L., T. Zou, and R. W. Hardy. 2007. Application of microbial phytase in fish feed: A review. Aquaculture Nutrition. 13: 345–360.

Carlson, D., and D. Poulsen. 2003. Phytate degradation in soaked and fermented liquid feed—effect of diet, time of soaking, heat treatment, phytase activity, pH and temperature. Animal Feed Science and Technology. 103: 141-154.

Castillo, S., and D. M. Gatlin III. 2015. Dietary supplementation of exogenous carbohydrase enzymes in fish nutrition: A review. Aquaculture. 435: 286–292.

Cristina, D. V. J., R. Y. Eliana, F. I. Soledad, L. M. Victoria, L. Clara, Z. A. Nahuel, and F. G. A. Verónica. 2024. Exploring Dietary Functional Ingredients for Broodstock Female of a Potential Species for Marine Aquaculture *Odontesthes Argentinensis*. Systematic review of the published literature. Available: https://papers.ssrn.com/sol3/papers.cfm.abstract_id=4920576.

Eğilmez, H. İ., and E. Haspolat. 2024. Temperature-dependent parameters in enzyme kinetics: Impacts on enzyme denaturation. Fundamental Journal of Mathematics and Applications. 7: 226-235.

El-Toukhy, N. M. K., A. S. Youssef, and M. G. M. Mikhail. 2013. Isolation, purification and characterization of phytase from *Bacillus subtilis* MJA. African Journal of Biotechnology. 12: 2957-2967.

Fan, Y., K. Luo, Y. Gao, W. Gao, Q. Xu, W. Zhang, and K. Mai. 2021. Replacement of fish meal by enzyme-treated soybean on the growth performance, intestine microflora, immune responses and disease resistance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture Research. 52: 4619-4628.

FAO. 2016. The State of world fisheries and aquaculture. Available: https://openknowledge.fao.org. Accessed Apr.1, 2025.

Fernandes, H., C. Castro, J. H. Salgado, D. Fillipe, F. Moyano, P. Ferreira, A. Oliva-Teles, I. Belo, and H. Peres. 2022. Application of fermented brewer's spent grain extract in plant-based diets for European seabass juveniles. Aquaculture. 552: 738013.

Francis, G., H. P. S. Makkar, and K. Becker. 2001. Antinutritional factors in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. Aquaculture. 199: 197–227.

Gong, T., M. Ji, Y. Yang, J. Liu, Y. Gong, S. Liu, Y. Zhao, G. Cao, X. Guo, Y. Yang, and B. Li. 2024. Enzymatically hydrolyzed diet improves growth performance and intestinal microbiome in growing pigs. Frontiers in Nutrition. 11: 1485017.

Joachim, W. H., and P. P. Felictas. 2000. Handbook on Ingredients for Aquaculture Feeds. Kluwer academic. London.

Lee, H. H., and Y. S. Choi. 2011. Contents of phytic acid of various cereal crops produced in Korea. Korean Journal of Plant Resources. 24: 267–271.

Li, S., G. Ding, F. Song, C. Sang, A. Wang, and N. Chen. 2020. Comparison of dehulled, fermented and enzyme-treated soybean meal in diets for largemouth bass, *Micropterus salmoides*: Effects on growth performance, feed utilization, immune response and intestinal morphology. Animal Feed Science and Technology. 267: 114548.

Liang, Q., M. Yuan, L. Xu, E. Lio, F. Zhang, H. Mou, and F. Secundo. 2022a. Application of enzymes as a feed additive in aquaculture. Marine Life Science and Technology. 4: 208-221.

Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry. 193: 265–275.

Maas, R. M., M. C. J. Verdegem, T. L. Stevens, and J. W. Schrama. 2020. Effect of exogenous enzymes (phytase and xylanase) supplementation on nutrient digestibility and growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed different quality diets. Aquaculture. 529: 735723.

Mbira, C. 2024. Influence of substrate concentration on enzyme activity in bio catalysis. Journal of Chemistry. 3: 48–58.

Nath, A., and W. M. Atkins. 2006. A theoretical validation of the substrate depletion approach to determining kinetic parameters. Drug Metabolism and Disposition. 34: 1433-1435.

National Research Council. 2011. Nutrient Requirements of Fish and Shrimp. National Academies Press, Washington, D.C., USA.

Paladines-Parrales, A. R., K. Q. Nguyen, M. Tabbara, U. Padeniya, A. Adeyemi, A. Lee, Y. Lee, T. J. Bruce, and D. A. Davis. 2025. Assessment of different dietary soybean meals and corn fermented protein in practical diets for fingerling channel catfish. Animal Feed Science and Technology. 321: 116239.

Passos, A. A., V. H. C. Moita, and S. W. Kim. 2023. Individual or combinational use of phytase, protease, and xylanase for the impacts on total tract digestibility of corn, soybean meal, and distillers dried grains with soluble fed to pigs. Animal Bioscience. 36: 1869-1879.

Plouhinec, L., L. Zhang, A. Pillon, M. Haon, S. Grisel, D. Navarro, I. Black, V. Neugnot, P. Azadi, B. Urbanowicz, J. G. Berrin, and M. Lafond. 2025. Unlocking soybean meal pectin recalcitrance using a multi-enzyme cocktail approach. Scientific Reports. 15: 716.

Rungruansak-Torrisen, K., A. Rustad, J. Sunde, S. A. Eiane, H. B. Jesen, and J. Optvedt. 2002. In vitro digestibility based on fish crude enzyme extract for prediction of feed quality in growth trails. Journal of the Science of Food and Agriculture. 82: 644–654.

U-taynapun, K., O. Rattanaporn, and N. Chirapongsatonkul. 2024. Effects of fishmeal replacement by soybean meals treated with lignocellulolytic enzymes from spent mushroom substrate on growth performance, biochemical parameters and hepatopancreas histology of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). International Journal of Agricultural Technology. 20: 2195-2206.

Wang, Q., Z. Qi, W. Fu, M. Pan, X. Ren, X. Zhang, and Z. Rao. 2024. Research and prospects of enzymatic hydrolysis and microbial fermentation technologies in protein raw materials for aquatic feed. Applied Microorganisms and Industrial/Food Enzymes. 10: 648.

Xu, J., X. Wang, and H. Niu. 2025. Effects of corn straw-based fermented total mixed rations supplemented with exogenous cellulase on growth performance, digestibility, and rumen fermentation in growing beef cattle. Animal Bioscience. 38: 293-302.

Yan, W., R. C. Reigh, and Z. Xu. 2002. Effects of fungal phytase on utilization of dietary protein and minerals, and dephosphorylation of phytic acid in the alimentary tract of channel catfish *Ictalurus punctatus* fed an all-plant-protein diet. Journal of the World Aquaculture Society. 33: 10–22.

Yu, X., Z. Wu, J. Guo, Y. Fu, K. Luo, Y. Guo, W. Zhang, and K. Mai. 2022. Replacement of dietary fish meal by soybean meal on growth performance, immunity, anti-oxidative capacity and mTOR pathways in juvenile abalone *Haliotis discus hannai* Ino. Aquaculture. 551: 737914.

Zheng, C. C., J. W. Wu, Z. H. Jin, Z. F. Ye, S. Ynag, Y. Q. Sun, and H. Fei. 2019. Exogenous enzymes as functional additives in finfish aquaculture. Aquaculture Nutrition. 26: 213-224.