

การใช้ข้าวโพดร่วมกับสารประสานเม็ดทดแทนแป้งสาลีในอาหารของกุ้งขาว
(*Litopenaeus vannamei*) ต่อสมรรถภาพการเติบโต ภูมิคุ้มกัน และการย่อยได้ของอาหาร

Use of Corn with Pellet Binder as Replacement for Wheat Flour in Diet of Whiteleg Shrimp
(*Litopenaeus vannamei*) on Growth Performance, Immunity, and Feed Digestibility

ยิ่งยศ โสมยไพศาลศิลป์^{1*} ศรีน้อย ชุ่มคำ² ศุภวิทย์ ไตรวุฒานนท์³ และ อรพินท์ จินตสถาพร¹
Yingyos Sompaisansin^{1*}, Srinoy Chumkam², Supawit Triwutanon³ and Orapint Jintasataporn¹

¹ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

¹Department of Aquaculture, Faculty of Fisheries, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand

²คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ จ.ปทุมธานี 13180

²Faculty of Agricultural Technology, Valaya Alongkorn Rajabhat University Under the Royal Patronage,
Pathum Thani 13180, Thailand

³คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม 73140

³Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140, Thailand

*Corresponding author: Email: yingyos.so@ku.th, ffishora@ku.ac.th

(Received: 14 March 2024; Accepted: 26 June 2024)

Abstract: This study on the application of corn with a pellet binder for replacement wheat flour was conducted by focusing on the growth performance and immunity of whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). The experimental design was a completely randomized design (CRD) with 3 treatments and 4 replicates, corn replacement for wheat flour at 0% combined with the pellet binder at 0% (T1), corn replacement for wheat flour at 50% combined with the pellet binder at 0% (T2) and corn replacement wheat flour at 50% combined with the pellet binder at 0.4% (T3). The pellet binder used in this trial was lignosulfonate + guar gum. The results showed that shrimp fed T2 with diet had the highest feed conversion ratio (FCR) ($P < 0.05$). The average daily gain (ADG) and specific growth (SGR) were the lowest ($P < 0.01$). Shrimp fed with T3 diet had growth performance in the same range with shrimp fed with T1 diet ($P > 0.05$). In addition, shrimp fed with T2 and shrimp fed with T3 had increased the amount of hemolymph protein ($P < 0.05$) and had increased the amount of superoxide dismutase activity ($P < 0.01$). Shrimp fed with T2 and shrimp fed with T3 trended to have red color after cooked than shrimp fed with diet control T1 ($P = 0.052$). The protein and carbohydrate digestibility (*in vitro* digestibility) were not significantly difference ($P > 0.05$) among these three diets. Therefore, corn combined with pellet binder at 0.4% can be used to replace wheat flour at 50% without affecting the growth performance of whiteleg shrimp.

Keywords: Corn, wheat flour, pellet binder, whiteleg shrimp

บทคัดย่อ: การศึกษาการใช้ข้าวโพดร่วมกับสารประสานเม็ดทดแทนแป้งสาลีในอาหารต่อสมรรถภาพการเติบโตและภูมิคุ้มกันของกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) จำนวน 3 กลุ่มทดลองๆ ละ 4 ซ้ำ คือ อาหารสูตรควบคุมข้าวโพดทดแทนแป้งสาลีที่ระดับ 0% ร่วมกับสารประสานเม็ดที่ระดับ 0% (T1) อาหารสูตรข้าวโพดทดแทนแป้งสาลีที่ระดับ 50% ร่วมกับสารประสานเม็ดที่ระดับ 0% (T2) และอาหารสูตรข้าวโพดทดแทนแป้งสาลีที่ระดับ 50% ร่วมกับสารประสานเม็ดที่ระดับ 0.4% (T3) ซึ่งสารประสานเม็ดที่ใช้ คือ สารลิกโนซัลโฟเนตผสมกับกากมัน ผลการศึกษาพบว่า กลุ่มที่ใช้อาหาร T2 มีอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนัก (FCR) เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และมีอัตราการเติบโตเฉลี่ยต่อวัน (ADG) อัตราการเติบโตจำเพาะ (SGR) ลดน้อยลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) แต่กลุ่มที่ใช้อาหาร T3 นั้น สมรรถภาพการเติบโตมีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) กับอาหารสูตรควบคุม T1 นอกจากนี้พบว่า กลุ่มที่ใช้อาหาร T2 และกลุ่มที่ใช้อาหาร T3 มีปริมาณโปรตีนในน้ำเลือดเพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และปริมาณซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตสเพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) สีกุ้งขาวในกลุ่มที่ใช้อาหาร T2 และกลุ่มที่ใช้อาหาร T3 มีแนวโน้มสีแดงกว่ากลุ่มที่ได้รับอาหารสูตรควบคุม T1 ($P = 0.052$) และค่าการย่อยได้ของโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตในหอยปฏิบัติการของอาหารทั้ง 3 สูตรมีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ดังนั้นสามารถใช้ข้าวโพดทดแทนแป้งสาลีที่ระดับ 50% ร่วมกับสารประสานเม็ดที่ระดับ 0.4% ได้ โดยไม่ส่งผลกระทบต่อสมรรถภาพการเติบโตของกุ้งขาว

คำสำคัญ: ข้าวโพด แป้งสาลี สารประสานเม็ด กุ้งขาว

คำนำ

กุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) เป็นสัตว์น้ำที่มีความสำคัญของประเทศ สามารถพัฒนาการเลี้ยงแบบมีความหนาแน่นสูง โดยเลี้ยงได้ในความเค็มในช่วงกว้างตั้งแต่ 3-35 พีพีที เติบโตเร็วและให้ผลผลิตสูง แต่ต้นทุนในการเลี้ยงกุ้งสูง โดยอาหารกุ้งเป็นต้นทุนหลักในการเลี้ยง (Farmanfarmaian *et al.*, 1982) อีกทั้งอาหารกุ้งเป็นปัจจัยที่สำคัญต่ออัตราการเติบโต การต้านทานโรค อัตราการรอดชีวิต และส่งผลกระทบต่อภาวะแวดล้อมในการเลี้ยง (Obaldo *et al.*, 2002) ดังนั้นเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งจึงให้ความสำคัญมากกับคุณภาพของอาหารที่นำมาใช้เลี้ยงกุ้ง ซึ่งองค์ประกอบหลักของอาหารกุ้งมีคาร์โบไฮเดรตที่เป็น 1 ใน 3 ของสารอาหารหลักที่จำเป็นสำหรับสัตว์น้ำ โดยทำหน้าที่สำคัญ 2 อย่าง คือ (1) เป็นตัวประสานยึดองค์ประกอบของเม็ดอาหาร ควบคุมคุณลักษณะทางกายภาพของเม็ดอาหาร (Hemre and Deng, 2015) ได้แก่ ความคงตัวของเม็ดอาหารในน้ำ ความหนาแน่น เป็นต้น (2) เป็น

แหล่งพลังงานที่ราคาถูกกว่าการใช้ไขมัน หรือโปรตีน โดยแหล่งคาร์โบไฮเดรตที่แตกต่างกันนั้น จะมีคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพที่ต่างกัน เช่น อัตราส่วนระหว่างอะไมโลสและอะไมโลเพกติน ความสามารถในการเจลาติไนเซชัน เป็นต้น คุณสมบัติเหล่านี้อาจจะส่งผลต่อคุณค่าทางโภชนาการและการเติบโตของสัตว์น้ำได้ (Romano and Kumar, 2019)

วัตถุดิบหลักที่นิยมใช้เป็นแหล่งของคาร์โบไฮเดรตในอาหารกุ้งคือแป้งสาลี ซึ่งมีคุณสมบัติเฉพาะที่ต่างจากแป้งอื่น คือ แป้งสาลีมีโปรตีนกลูเตนิน (glutenin) และไกลอะดิน (gliadin) ซึ่งเมื่อละลายน้ำโปรตีนทั้ง 2 ชนิดสร้างพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) และรวมตัวกันเป็นกลูเตน (gluten) ที่มีลักษณะเหนียวและมีความยืดหยุ่นสูง มีคุณสมบัติเป็นสารประสานเม็ดที่ดี (Apper-Bossard *et al.*, 2013) แต่ข้าวสาลีต้องนำเข้าจากต่างประเทศทำให้ต้นทุนอาหารเพิ่มขึ้นจากค่าขนส่งนำเข้าและจัดเก็บ หากสามารถใช้ข้าวโพดที่มีการเพาะปลูกในภูมิภาค มาใช้เป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตในอาหารกุ้งทดแทนแป้งสาลีช่วยลดต้นทุนในอุตสาหกรรมการผลิต

กุ้งได้ และยังเป็นประโยชน์ให้กับเกษตรกรผู้เพาะปลูกข้าวโพด โรงงานผู้ผลิตอาหารกุ้ง และเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้ง ข้าวโพดไม่มีสารต้านโภชนา (Novriadi *et al.*, 2023) และเป็นแหล่งของโปรตีนและกรดอะมิโน (Novriadi *et al.*, 2022) แม้จะขาดไลซีน (Nascimento *et al.*, 2020) แต่สามารถปรับสมดุลกรดอะมิโนในอาหารให้เหมาะสมได้ Alkoei *et al.* (2024) รายงานว่าสามารถใช้ข้าวโพดทดแทนแป้งสาลีได้ทีละระดับ 33%-66% ในอาหารปลาเรนโบว์เทราท์ โดยไม่มีผลกระทบต่อลักษณะทางกายภาพของอาหารและประสิทธิภาพการเจริญเติบโต ในขณะที่รายงานการศึกษาของ Niu *et al.* (2012) พบว่า กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารซึ่งใช้แป้งสาลีทีละระดับ 20% มีประสิทธิภาพการเจริญเติบโตที่ดีกว่ากุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารซึ่งใช้แป้งข้าวโพดทีละระดับ 20% อย่างไรก็ตามพบการศึกษาการใช้ข้าวโพดในสูตรอาหารปลาและสัตว์น้ำอื่น ๆ มากกว่าในอาหารกุ้ง (Tiamiyu and Solomon, 2012) เพราะว่าแป้งในข้าวโพดมีปริมาณอะไมโลสและอะไมโลเพกทินใกล้เคียงกับแป้งสาลี (Swinkles, 1985) แต่ขนาดเม็ดแป้งใหญ่กว่าแป้งสาลี และมีคุณสมบัติในการพองตัวมากกว่าแป้งสาลี ซึ่งเมื่อผ่านการขึ้นรูปเม็ดอาหารที่ถูกควบคุมจำกัดปริมาณของน้ำทำให้เกิดการเจลาติไนซ์ของแป้งเปลี่ยนให้มีคุณสมบัติในการเป็นสารประสานเม็ดน้อย (Lund and Lorenz, 1984) การใช้ข้าวโพดทดแทนแป้งสาลีในอาหารสัตว์น้ำจึงอาจมีปัญหาด้านลักษณะทางกายภาพของอาหาร (Alkoei *et al.*, 2024) โดยเฉพาะความคงทนในน้ำ ซึ่งเป็นสิ่งสำคัญในการผลิตอาหารสัตว์น้ำโดยเฉพาะอาหารกุ้ง (Farmanfarmaian *et al.*, 1982) เพราะกุ้งกินอาหารช้าและกินอาหารอย่างต่อเนื่อง (Jussila and Evans, 1998; Obaldo *et al.*, 2002) อีกทั้งข้าวโพดมีแป้งแข็งซึ่งดูดน้ำเข้า ส่งผลต่อการย่อยในระบบทางเดินอาหารและการใช้ประโยชน์ของสารอาหาร การใช้ข้าวโพดมาทดแทนแป้งสาลีในอาหารกุ้งจึงจำเป็นต้องคำนึงถึงการสูญเสียสารอาหารจากการละลายน้ำ การย่อยได้ของอาหารและผลต่อสมรรถภาพการเติบโตของกุ้งด้วย แม้ข้าวโพดมีข้อจำกัดแต่หากจำเป็นข้าวโพดก็ยังใช้ทดแทนข้าวสาลีได้ในระดับหนึ่ง และสามารถเพิ่มปริมาณการใช้ด้วยการใช้ร่วมกับเอนไซม์ไซลาลเนส

และเบต้ากลูคาเนสโดยการประยุกต์จากการศึกษาของ Macedo *et al.* (2023) และ Nascimento *et al.* (2023) เป็นต้น โดยการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการใช้ข้าวโพดร่วมกับสารประสานเม็ดทดแทนแป้งสาลีในอาหารต่อสมรรถภาพการเติบโตและภูมิคุ้มกันของกุ้งขาว โดยสารประสานเม็ดที่นำมาใช้คือ ลิกโนซัลโฟเนต (lignosulfonate) ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากการผลิตกระดาษ มีรายงานการใช้ลิกโนซัลโฟเนตทีละระดับ 1% - 3% มีประสิทธิภาพในการเป็นสารยึดเกาะในอาหารสัตว์ปีก (Saleh *et al.*, 2021) และสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการเติบโตของไก่เนื้อและการย่อยได้ของสารอาหาร (Corey *et al.*, 2014) และการใช้ลิกโนซัลโฟเนต 5% ในปลาเทราท์ (Bampidis *et al.*, 2020) ไม่พบความแตกต่างที่มีนัยสำคัญของประสิทธิภาพการเจริญเติบโต และภูมิคุ้มกัน

อุปกรณ์และวิธีการ

สัตว์ทดลอง

ลูกกุ้งขาวขนาด 1.27 ± 0.04 กรัม จำนวน 120 ตัว จากฟาร์มเอกชนในจังหวัดสมุทรสงคราม ประเทศไทย โดยการใช้สัตว์ทดลองผ่านการรับรองอนุมัติให้ดำเนินการเลี้ยงและใช้สัตว์ทดลองเพื่องานทางวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เลขที่ ACKU61-FIS-040 ตามโครงการประเมินประสิทธิภาพสารเสริมอาหารสัตว์น้ำและสิ่งแวดล้อม

แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) จำนวน 3 กลุ่มทดลอง ๆ ละ 4 ซ้ำ ดังนี้ กลุ่มที่ 1 ใช้อาหารสูตรข้าวโพดทดแทนแป้งสาลี 0% ร่วมกับสารประสานเม็ด 0% (T1) กลุ่มที่ 2 ใช้อาหารสูตรข้าวโพดทดแทนแป้งสาลี 50% ร่วมกับสารประสานเม็ด 0% (T2) และ กลุ่มที่ 3 ใช้อาหารสูตรข้าวโพดทดแทนแป้งสาลี 50% ร่วมกับสารประสานเม็ด 0.4% (T3)

อาหารทดลอง

เตรียมอาหาร 3 สูตร โดยใช้วัตถุดิบดังแสดงใน Table 1 นำไปบดจนมีขนาด 150 - 250 ไมครอน ทำการชั่งวัตถุดิบผสมแล้วขึ้นรูปอาหารที่มีขนาดความยาว 2-3 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 1.4 มิลลิเมตร โดยการเติมน้ำ 25 มิลลิลิตร ลงในส่วนผสมอาหารผงแห้ง 100 กรัม แล้วอัดเม็ดผ่านการเครื่องอัดเม็ดแบบสกรู หนึ่งด้วยไอน้ำ 45 นาที และอบแห้งที่อุณหภูมิ 90 องศา

เซลเซียส 30 นาที จากนั้นทำให้เย็นลงและเก็บในถุงพลาสติกเพื่อใช้ทดลอง แล้วสับตัวอย่างไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ ความชื้น โปรตีน ไขมัน เยื่อใย เถ้า ตามวิธีของ AOAC (2000) คำนวณคาร์โบไฮเดรต (nitrogen free extract, NFE) และพลังงานที่ย่อยได้ (digestible energy, DE) ตามวิธีของ National Research Council (1993)

Table 1. Feed ingredient composition and nutritional value of experimental diets

Parameter	T1	T2	T3
Ingredients (%)			
Wheat flour	20	10	10
Corn grain	0	10	10
Pellet binder ¹	0	0	0.4
Fish meal	16	16	16
Soybean meal ²	43.5	44.5	44.5
Fish oil	1.5	1.5	1.5
Lecithin	1.5	1.5	1.5
Vitamins and minerals	12.8	12.8	12.8
Rice husk as filler ²	4.7	3.7	3.3
Total	100	100	100
Feed cost ³ (THB/kg)	27.27	26.99	27.17
Proximate of nutritional value (%)			
Moisture	9.07	8.40	10.90
Crude protein	40.84	40.97	39.67
Crude fat	5.84	5.64	5.98
Fiber	4.50	4.27	4.14
Ash	10.61	10.58	10.35
NFE ⁴	29.15	30.14	28.96
GE ⁵ (kcal/kg)	4,052.74	4,081.88	3,992.16
DE ⁶ (kcal/kg)	2,631.19	2,644.29	2,596.83

¹lignosulfonate 95% + guar gum 5% (Kembind Dry; Kemin Industries, USA), ²Adjust nutrition to be same

³Ingredients price (THB/kg): wheat flour, 16.25; corn grain, 12.10; pellet binder, 45.00; fish meal 38.50; soybean meal, 16.00; fish oil, 41.70; lecithin, 37.20; vitamins and minerals, 75.10; rice husk, 2.25

⁴NFE = 100 – (%protein + %fat + %fiber + %ash + %moisture)

⁵GE, gross energy = (%Crude protein x 5.64) + (%Crude fat x 9.44) + (%NFE x 4.11)

⁶DE, digestible energy = (%protein x 3.5) + (%fat x 8.1) + (%NFE x 2.5)

สภาวะการทดลอง

เลี้ยงกุ้งขาวขนาด 1.27 ± 0.04 กรัมในตู้กระจก ขนาด 100 ลิตรที่มีน้ำ 80 ลิตร จำนวนกุ้ง 10 ตัวต่อตู้ ชุดการทดลองละ 4 ตู้ ควบคุมความเค็มน้ำ 12-15 พีพีที แอมโมเนียน้อยกว่า 1 มิลลิกรัม/ลิตร ออกซิเจนละลายน้ำมากกว่า 5 มิลลิกรัม/ลิตร พีเอช 7.6-7.9 อัตราไหล่มากกว่า 120 มิลลิกรัม/ลิตร เปลี่ยนถ่ายน้ำ 20 เปอร์เซ็นต์ ทุก 2 วัน ให้อาหารที่อัตรา 10 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักกุ้ง แล้วปรับลดอาหารลง 2 เปอร์เซ็นต์ทุก 2 สัปดาห์ โดยแบ่งให้อาหารเป็น 3 มื้อต่อวัน ด้วยอาหารสูตรข้าวโพดทดแทนแป้งสาลีร่วมกับสารประสานเม็ดเป็นเวลา 8 สัปดาห์

การเก็บรวบรวมข้อมูล

การศึกษาลักษณะทางกายภาพ

ดัชนีการในการละลายน้ำ (water solubility index) ตามวิธีการของ Machado *et al.* (1998) โดยนำตัวอย่าง 25 กรัม ไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 135 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ซึ่งน้ำหนักเพื่อคำนวณค่าดัชนีการในการละลายน้ำ

ดัชนีการในการละลายน้ำ = $100 - [(น้ำหนักของตัวอย่างหลังอบ \times F \times 100) / น้ำหนักของตัวอย่างเริ่มต้น]$

โดย $F = [100 + (ความชื้นของตัวอย่างเริ่มต้น - ความชื้นของตัวอย่างหลังอบ)] / 100$

ความคงตัวของเม็ดอาหารกึ่งในน้ำ (water stability) ตามวิธี มอก.1198 (Thai Industrial Standards Institute, 1993) โดยอบตัวอย่างที่อุณหภูมิ 65 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วชั่ง 5 กรัม แช่น้ำลึก 15 เซนติเมตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 65 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วชั่งหาน้ำหนักที่เหลืออยู่ เพื่อหาค่าความคงตัวของเม็ดอาหารในน้ำ

ความคงตัวของเม็ดอาหารกึ่งในน้ำ = $(น้ำหนักของตัวอย่างที่เหลือ / น้ำหนักของตัวอย่างเริ่มต้น) \times 100$

การศึกษาการเติบโตของกุ้งขาว

อัตราการเติบโตเฉลี่ยต่อวัน (average daily gain; ADG, g/shrimp) = $\text{น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น} / \text{จำนวนวันที่เลี้ยง}$

การเติบโตจำเพาะ (specific growth rate; SGR, %/day) = $100 \times (\ln \text{น้ำหนักเฉลี่ยเมื่อสิ้นสุดการทดลอง} - \ln \text{น้ำหนักเฉลี่ยเมื่อเริ่มต้น}) / \text{จำนวนวันที่เลี้ยง}$

อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนัก (feed conversion ratio; FCR) = $\text{ปริมาณอาหารที่ใช้ทั้งหมด} / \text{น้ำหนักตัวที่เพิ่มทั้งหมด}$ โดยคำนวณเป็นรายตู้

อัตราการรอดตาย (survival rate; SR, %) = $(\text{จำนวนกุ้งที่เหลือรอดเมื่อสิ้นสุดการทดลอง} / \text{จำนวนกุ้งเริ่มต้นการทดลอง}) \times 100$

การศึกษาภูมิคุ้มกันและสีกึ่งต้มสุก

วิเคราะห์ปริมาณเม็ดเลือดรวมทั้งหมด (total hemocyte count) โดยวิธีการของ Supamattaya *et al.* (2000) โดยนำเลือดกึ่งผสมกับ trypan blue จากนั้นนำไปส่องใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อบันทึกจำนวนเม็ดเลือด

วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในน้ำเลือด (hemolymph protein) ตามวิธีการของ Supamattaya *et al.* (2000) โดยนำเลือดกึ่งผสมกับสารละลายทองแดงสำหรับวิเคราะห์ บมไนที่มีดแล้วเติม Folin บมไนที่มีดอีกครั้ง แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 640 นาโนเมตร และเปรียบเทียบกับ standard curve ของ bovine serum albumin

วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase activity) โดยวิธีการดัดแปลงจาก Smith and Söderhäll (1991) นำตัวอย่างเลือดกึ่ง ผสมกับ L-DOPA และ Heper บมไนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร

วิเคราะห์กิจกรรมของไลโซไซม์ (lysozyme activity) ตามวิธีการของ Ellis (1990) โดยผสมน้ำเลือดกึ่งกับสารละลายเชื้อ *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) ใน sodium phosphate buffer, pH 6.24 ตรวจจบการเกิดปฏิกิริยาโดยวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

ที่เวลา 1 นาที และ 6 นาที คำนวณหน่วยของ lysozyme activity โดยหนึ่งหน่วยจะทำให้ค่าดูดกลืนแสงเปลี่ยนแปลง 0.001 ต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน

วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ ดิสมิวเตส (SOD) ตามวิธีการของ Ukeda *et al.* (1999) โดยใช้ SOD Assay Kit#19160-1KTF (Sigma-Aldrich, Buchs, Switzerland)

วิเคราะห์ปริมาณกลูตาไธโอน โดย Glutathione Assay Kit (CS0260; Sigma-Aldrich, Buchs, Switzerland)

วิเคราะห์สีกึ่งต้มสุก โดยสุ่มกึ่งมาชุดทดลองชุดละ 8 ตัว นำไปต้มในน้ำอุณหภูมิ 100 °C นาน 1 นาที ตามวิธีการของ Parisenti *et al.* (2011) แล้วนำมาเปรียบเทียบกับสีด้วยพัดสี (SalmoFan No.)

การศึกษาการย่อยได้ของอาหารในห้องปฏิบัติการ (in vitro digestibility)

ศึกษาการย่อยได้ของโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตของอาหารกุ้งตามวิธีการของ Hahor *et al.* (2022)

1. สกัดเอนไซม์จากกุ้งขาว 12 ตัว ที่มีน้ำหนักกึ่งเฉลี่ย 8-10 กรัม/ตัว โดยเก็บรวบรวมระบบย่อยอาหารของกุ้งส่วนของตับและลำไส้รวมกัน แล้วปั่นละเอียดให้เป็นเนื้อเดียวกัน ผสมกับสารละลาย Tris-HCL 50 mM pH 7.4 ผสมให้เข้ากันโดยใช้ micro-homogenizer (THP-220, OMNI International, USA) และทำการเหวี่ยงแยกให้ตกตะกอน จากนั้นนำส่วนที่ใสไว้ทำการทดลองศึกษาการย่อยได้ในหลอดทดลอง โดยใช้เซรัมอัลบูมินเป็นสารละลายโปรตีนมาตรฐาน วัดความเข้มข้นโปรตีนทั้งหมดของสารสกัดเอนไซม์วิเคราะห์ตามวิธีการของ Lowry *et al.* (1951)

2. นำอาหารกุ้งที่ใช้ในการทดลองมาศึกษาการย่อยได้ในหลอดทดลอง โดยชั่งน้ำหนักตัวอย่างบด แล้วเติม phosphate buffer pH 8.0 เติมน้ำปฏิกิริยาเพื่อควบคุมจุลินทรีย์ แบ่งสารละลายเป็น 2 ส่วน ส่วนที่ไม่มีการเติมเอนไซม์จากกุ้งและส่วนที่เหลือนำมาเติมเอนไซม์ที่สกัดได้จากทางเดินอาหารกุ้ง นำไปบ่ม 16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง 25 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงแล้วเก็บส่วนใสมาประเมินการย่อยได้ของโปรตีนและคาร์โบไฮเดรต (Hahor *et al.*, 2022)

3. การศึกษาประสิทธิภาพการย่อยได้ของโปรตีนของอาหารกุ้งในหลอดทดลองโดยวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนที่ถูกย่อยและปลดปล่อยจากอาหารโดยวิธี ninhydrin assay (Eid and Matty, 1989) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 507 นาโนเมตร คำนวณประสิทธิภาพในการย่อยได้ในหลอดทดลองของโปรตีน

4. การศึกษาประสิทธิภาพการย่อยได้ของโปรตีน โดยวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ถูกย่อยและละลายน้ำ (soluble protein; peptide) โดยวิธี biuret test (Plummer, 1988) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร คำนวณความเข้มข้นของโปรตีนที่ละลายน้ำโดยใช้ โดยใช้เซรัมอัลบูมินเป็นสารละลายมาตรฐาน

5. การศึกษาประสิทธิภาพการย่อยได้ของคาร์โบไฮเดรตของอาหารกุ้งในหลอดทดลอง โดยวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วย 3,5- dinitrosalicylic acid (DNS) ตามวิธีการของ Bedford and Classen (1993) และ Miller (1959) โดยนำสารละลายทั้ง 3 ส่วนที่ปั่นเหวี่ยงแล้ว มาทำปฏิกิริยากับสารละลาย DNS จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้อง 25 องศาเซลเซียส หยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส แล้วทำให้เย็นลงด้วยน้ำเย็นจัดและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลทั้งหมดวิเคราะห์ความแปรปรวนตามแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างทรีทเมนต์ด้วยวิธีการของ Duncan's new multiple range test (DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ผลการทดลองและวิจารณ์

คุณลักษณะทางกายภาพของอาหารกุ้งขาวที่ใช้ข้าวโพดทดแทนแป้งสาลี (Table 2) พบว่า มีแนวโน้มค่าดัชนีในการละลายน้ำเพิ่มขึ้น ($P=0.066$) และมีแนวโน้มค่าความคงตัวของเมืออาหารกุ้งในน้ำลดลง ($P=0.077$) เนื่องจากแป้งข้าวโพดมีส่วนประกอบทั้งแป้งอ่อน และแป้งแข็งที่ดูดน้ำเข้ามาในโมเลกุลช้า ทำให้การเจลาติไนซ์ของแป้งเปลี่ยนให้มีคุณสมบัติใน

Table 2. Physical properties of shrimp feed pellets composed of corn replacing wheat flour

Item	T1	T2	T3	SEM	P-value
Water solubility index (%)	19.97±0.50	25.00±1.12	22.57±3.36	0.94	0.066
Water stability (%)	82.77±0.15	81.97±0.35	82.40±0.46	0.15	0.077

Mean with different superscripts in the same row are significantly different ($P < 0.05$), SEM = standard error of means

การเป็นสารประสานเม็ดได้น้อย (Lund and Lorenz, 1984) กว่าแป้งสาลี แต่เมื่อเติมสารประสานเม็ดเพิ่มลงไปแล้วความคงตัวในน้ำและค่าดัชนีในการละลายน้ำมีแนวโน้มดีขึ้น (Farmanfarmaian *et al.*, 1982) โดยมีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) กับกลุ่มควบคุม

ผลการเติบโตของกุ้งขาว (Table 3) พบว่ากลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรข้าวโพดทดแทนแป้งสาลี 50% โดยไม่มีสารประสานเม็ด (T2) มีอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนักมากกว่ากลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรใช้ข้าวโพดทดแทนแป้งสาลี 0% (T1) และกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรข้าวโพดทดแทนแป้งสาลี 50% ร่วมกับสารประสานเม็ด 0.4% (T3) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เนื่องจากในแป้งสาลีมีโปรตีนกลูเตนิน (glutenin) และไกลอะดิน (gliadin) ที่รวมตัวกันเป็นกลูเตน (gluten) มีลักษณะเหนียวและมีความยืดหยุ่นสูง (Apper-Bossard *et al.*, 2013) ทำให้อาหารสูตรที่มีปริมาณแป้งสาลีต่อข้าวโพดมากกว่ามีความคงตัวของเม็ดอาหารกึ่งในน้ำมากกว่าและดัชนีในการละลายน้ำน้อยกว่าดัง Table 2 ซึ่งความคงตัวของเม็ดอาหารกึ่งในน้ำเป็นคุณสมบัติสำคัญของอาหารกึ่ง (Farmanfarmaian *et al.*, 1982) เนื่องจากกุ้งกินอาหารช้าและกินอาหารอย่างต่อเนื่อง (Jussila and Evans, 1998; Obaldo *et al.*, 2002) ในกรณีที่ความคงตัวของเม็ดอาหารกึ่งในน้ำไม่ดีเมื่ออาหารเม็ดจมน้ำเกิดการแตกกระจายของเม็ดอาหารและละลายไปกับน้ำส่วนหนึ่ง ทำให้เกิดการสูญเสียของอาหารและเป็นสาเหตุของน้ำเน่าเสีย (Ali *et al.*, 2005) แต่เมื่อเพิ่มสารประสานเม็ด 0.4% ส่งผลให้ความคงตัวของเม็ดอาหารกึ่งในน้ำเพิ่มขึ้นและดัชนีในการละลายน้ำลดลง โดยสารประสานเม็ดช่วยให้อาหารจับตัวกันแน่นขึ้นในการอัดเม็ดอาหาร ทำให้ระยะเวลา

คงตัวของเม็ดอาหารในน้ำได้นานขึ้น ลดการการสูญเสียของอาหารที่ละลายไปกับน้ำ สอดคล้องกับผลการเติบโตของกุ้งขาวกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหาร T1 และกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหาร T3 ซึ่งมีอัตราการเติบโตเฉลี่ยต่อวัน (ADG) และการเติบโตจำเพาะ (SGR) มากกว่ากลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหาร T2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) สารประสานเม็ดรักษาความสมบูรณ์ทางกายภาพของเม็ดอาหารให้มีการสลายตัวและถูกชะล้างสารอาหารขณะอยู่ในน้ำน้อยที่สุดจนกว่ากุ้งจะได้อกิน (Obaldo *et al.*, 2002) ทำให้กุ้งได้รับโภชนาการมากขึ้นจึงส่งผลให้มีการเติบโตดีขึ้น ใกล้เคียงกับกุ้งกลุ่มที่ได้รับอาหารจากแป้งสาลี ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาการใช้ข้าวโพดในอาหารกุ้งและการใช้ข้าวโพดอาหารสัตว์น้ำอื่น ๆ ของผู้วิจัยหลายท่าน (Niu *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2016)

การศึกษาภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง 3 กลุ่ม (Table 4) พบว่า กุ้งที่ได้รับอาหารใช้ข้าวโพดทดแทนแป้งสาลีที่ระดับ 50% (T2) และข้าวโพดทดแทนแป้งสาลีที่ระดับ 50% ร่วมกับสารประสานเม็ด 0.4% (T3) มีปริมาณโปรตีนในน้ำเลือดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แสดงถึงความสามารถในการย่อยและดูดซึมสารอาหารโดยเฉพาะโปรตีนมีประสิทธิภาพดี ปริมาณซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตสเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) ซึ่งเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตสทำหน้าที่ต้านอนุมูลอิสระโดยเร่งปฏิกิริยาเปลี่ยนอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออนให้เป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Nimse and Pal, 2015) เนื่องจากการที่อาหารมีค่าความคงทนของอาหารในน้ำดีสูญเสียสารอาหารในน้ำน้อย กุ้งกินอาหารได้มาก สารอาหารที่ได้รับจึงส่งผลต่อการสร้างสารในระบบภูมิคุ้มกัน ทำให้กุ้งแข็งแรงมีสุขภาพดี ภูมิคุ้มกันโรคดี

Table 3. Growth performance of whiteleg shrimp fed with experimental diets

Growth performance	T1	T2	T3	SEM	P-value
Initial weight (g/shrimp)	1.26±0.03	1.27±0.04	1.28±0.06	0.01	0.820
Final weight (g/shrimp)	9.60±0.23 ^a	8.40±0.32 ^b	9.46±0.08 ^a	0.17	<0.001
Weight gain (g/shrimp)	8.34±0.21 ^a	7.13±0.32 ^b	8.19±0.06 ^a	0.17	<0.001
Average daily gain (g/shrimp/day)	0.15±0.00 ^a	0.13±0.01 ^b	0.15±0.00 ^a	0.00	<0.001
Specific growth rate (%/day)	3.63±0.01 ^a	3.38±0.08 ^b	3.58±0.07 ^a	0.04	0.001
Survival rate (%)	92.50±9.57	92.50±5.00	85.00±5.77	2.13	0.274
Feed conversion ratio	1.30±0.11 ^b	1.51±0.07 ^a	1.43±0.09 ^{ab}	0.04	0.029
Protein efficiency ratio	1.90±0.16 ^a	1.62±0.07 ^b	1.76±0.11 ^{ab}	0.05	0.024

Mean with different superscripts in the same row are significantly different ($P<0.05$), SEM = standard error of means

Table 4. Immune parameters of whiteleg shrimp fed with experimental diets

Parameter	T1	T2	T3	SEM	P-value
Total haemocyte count ($\times 10^5$ cell/ml)	33.00±1.41	34.75±1.50	35.25±3.86	0.72	0.450
Hemolymph protein (g/dL)	4.42±0.19 ^b	5.03±0.15 ^a	5.28±0.39 ^a	0.13	0.004
Phenoloxidase activity (unit/min/mg protein)	70.86±6.71	68.33±4.07	71.04±5.84	1.52	0.757
Lysozyme activity (unit/ml)	310.00±107.08	166.67±28.67	251.67±79.93	27.19	0.083
Superoxide dismutase activity (unit/ml)	10.90±0.56 ^b	13.62±0.81 ^a	14.27±0.92 ^a	0.48	<0.001
Glutathione (nMole/ml)	31.91±1.29 ^a	31.18±0.59 ^{ab}	30.22±0.05 ^b	0.30	0.049
Color (SalmoFan No.)	21.38±0.52	22.75±0.71	21.75±1.67	0.24	0.052

Mean with different superscripts in the same row are significantly different ($P<0.05$), SEM = standard error of means

(Kantho *et al.*, 2008; Lessard and Brisson, 1987) อีกทั้งในข้าวโพดมีสารต้านอนุมูลอิสระในกลุ่มแคโรทีนอยด์ (carotenoids) ได้แก่ ซีแซนทีน (zeaxanthin) ลูทีน (lutein) คริปโตแซนทีน (cryptoxanthin) และเบต้าแคโรทีน (beta carotene) ซึ่งส่งเสริมภูมิคุ้มกันโรคในสัตว์น้ำหลายชนิด เช่น ปลาคู้ (*Piaractus mesopotamicus*) กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) และกุ้งขาว (*Penaeus vannamei*) เป็นต้น (Rossi *et al.*, 2020; Song *et al.*,

2024; Wang *et al.*, 2021) จึงทำให้พบปริมาณซูเปอร์ออกไซด์ดีสมิวเตสและปริมาณโปรตีนในน้ำเลือดของกุ้งที่ได้รับอาหาร T2 และ T3 มากกว่ากุ้งที่ได้รับอาหาร T1 และทำให้กุ้งในกลุ่มที่ได้รับอาหาร T2 และ T3 มีแนวโน้มของสีกุ้งเข้มสุด (Table 4) เข้มกว่ากุ้งที่ได้รับอาหาร T1 เล็กน้อย ($P=0.052$) ทั้งนี้การศึกษาระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวครั้งนี้เป็นการศึกษาในสภาวะปกติทั่วไปที่ไม่มีการเหนี่ยวนำความเครียด และการเกิดโรค

การศึกษาค่าการย่อยได้ของโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตของอาหารกุ้งในห้องปฏิบัติการ (Table 5) พบว่า อาหารทั้ง 3 สูตรคืออาหารสูตรข้าวโพดทดแทนแป้งสาลี 0% ร่วมกับสารประสานเม็ด 0% (T1), อาหารสูตรข้าวโพดทดแทนแป้งสาลี 50% ร่วมกับสารประสานเม็ด 0% (T2) และอาหารสูตรข้าวโพดทดแทนแป้งสาลี 50% ร่วมกับสารประสานเม็ด 0.4% (T3) มีค่าการย่อยได้ของโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตในห้องปฏิบัติการไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) โดยมีแนวโน้มการย่อยได้ของกรดอะมิโนในอาหารที่ใช้ข้าวโพดทดแทนแป้งสาลี 50% ร่วมกับสารประสานเม็ด 0.4% มีค่าการย่อยได้สูงกว่ากลุ่มอื่นๆ ($P = 0.068$) นอกจากนี้อาหารในกลุ่มควบคุม (T1) และกลุ่มที่ใช้ข้าวโพดทดแทนแป้งสาลี 50% ร่วมกับสารประสานเม็ด 0.4% มีแนวโน้มการย่อยได้ของเฮมิเซลลูโลส ($P = 0.055$) และคาร์โบไฮเดรตโดยรวมสูงกว่ากลุ่มใช้ข้าวโพดทดแทนแป้งสาลี 50% โดยไม่เติมสารประสานเม็ด ($P = 0.060$) แสดงว่าการใช้สารประสานเม็ดมีผลให้อาหารมีการย่อยได้ดีขึ้นเนื่องจากในสารประสานเม็ดมีแร่ธาตุแคลเซียมและแร่ธาตุอื่นๆ จำนวนหนึ่งจึงอาจมีผลต่อการเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์ในทางเดินอาหารที่ใช้ในการย่อยโปรตีนและเยื่อใย (Maugle *et al.*, 1982;

Silva *et al.*, 2016) นอกจากนี้จากผลการศึกษาโดยรวมแล้ว พบว่า การย่อยได้ของโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตของข้าวสาลี และข้าวโพด ในกุ้งขาวไม่แตกต่างกันมากนัก ยกเว้น การย่อยได้ของเฮมิเซลลูโลสในข้าวโพดที่มีข้อมูลเชิงตัวเลขต่ำกว่าการย่อยได้ของเฮมิเซลลูโลสในข้าวสาลีค่อนข้างมาก แสดงว่าประเด็นเรื่องการเติบโตเป็นผลจากลักษณะทางกายภาพของอาหารที่ใช้ข้าวโพดมีการละลายน้ำสูง กุ้งได้รับสารอาหารน้อยลงจึงส่งต่อการเติบโตช้า แต่เมื่อมีการเสริมสารประสานเม็ดค่าการละลายน้ำของเม็ดอาหารลดลง และการย่อยของอาหารดีขึ้น จึงมีผลให้การเติบโตดีขึ้น

การใช้ข้าวโพดทดแทนแป้งสาลีทำให้ต้นทุนราคาอาหารกุ้งมีแนวโน้มลดลง แต่หากพิจารณาเรื่องอัตราการเจริญเติบโต อาจมีต้นทุนในการผลิตกุ้งที่สูงขึ้นเนื่องจากกุ้งโตช้า อัตราการรอดต่ำ ดังนั้นแม้ว่าสามารถทำสูตรอาหารที่ได้ต้นทุนราคาต่ำ แต่ถ้าสูตรอาหารไม่ส่งผลให้กุ้งมีการเจริญเติบโตที่ดีก็ไม่ได้ทำให้ต้นทุนการผลิตกุ้งลดลงเสมอไป ซึ่งจากการศึกษานี้พบว่าเมื่อมีการใส่สารประสานเม็ดลงในสูตรอาหารพบว่ากุ้งมีการเจริญเติบโตดีขึ้น และได้ผลผลิตกุ้งมากขึ้น เนื่องจากคุณภาพทางกายภาพอาหารดีขึ้น โดยความคงตัวของเม็ดอาหารกุ้งในน้ำมากขึ้น ค่าดัชนีในการละลายน้ำลดลง

Table 5. *In vitro* digestibility of shrimp diet composed of corn replacing wheat flour

Digestibility	T1	T2	T3	SEM	<i>P</i> -value
Amino acid (g/100g)	3.79±0.17	3.61±0.26	4.14±0.24	0.10	0.068
Soluble protein (g/100g)	20.25±1.83	21.58±0.61	22.30±1.25	0.49	0.236
Sugar and starch (g/100g)	3.54±0.05	3.54±0.06	3.56±0.03	0.01	0.713
Hemicellulose (g/100g)	8.37±0.37	5.73±1.01	9.01±2.10	0.64	0.055
Cellulose (g/100g)	2.00±0.08	2.04±0.04	2.07±0.05	0.02	0.328
Mannan (g/100g)	1.70±0.08	1.74±0.02	1.78±0.07	0.02	0.342
Carbohydrate digestibility (g/100g)	15.61±0.18	13.05±1.13	16.43±2.17	0.65	0.060
Protein digestibility (g/100g)	24.04±1.97	25.19±0.44	26.43±1.49	0.54	0.207

SEM = standard error of means

สรุป

อาหารเม็ดสำหรับกุ้งขาวสามารถใช้ข้าวโพดทดแทนแป้งสาลีที่ระดับ 50% (คิดเป็นสัดส่วน 10% ในสูตรอาหาร) ร่วมกับการใช้สารประสานเม็ด (ลิกโนซัลโฟเนตผสมกับกัวกัม) ที่ระดับ 0.4% ในอาหาร โดยไม่ส่งผลกระทบต่อค่าการย่อยได้ของอาหาร ($P > 0.05$) และไม่ส่งผลกระทบต่อผลผลิตต่อสมรรถภาพการเติบโตและภูมิคุ้มกันของกุ้งขาว

เอกสารอ้างอิง

- Ali, S.A., C. Gopal, J.V. Ramana and A.R. Nazer. 2005. Effect of different sources of starch and guar gum on aqua stability of shrimp feed pellets. *Indian Journal of Fisheries* 52(3): 301-305.
- Alkoei, A.S., S.M.A. Jalali, S.A.H. Jalali and F. Kheiri. 2024. Effects of dietary corn and protein levels on physical properties of extruded feed pellets and growth performance of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of the World Aquaculture Society* 55(1): 125-148.
- AOAC. 2000. Animal feed. pp. 1-54. *In*: W. Horwitz (ed.). *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 17th ed. Association of Official Analytical Chemists (AOAC) International, Gaithersburg, Maryland.
- Apper-Bossard, E., A. Feneuil, A. Wagner and F. Respondek. 2013. Use of vital wheat gluten in aquaculture feeds. *Aquatic Biosystems* 9: 21, doi: 10.1186/2046-9063-9-21
- Bampidis, V., G. Azimonti, M. de Lourdes Bastos, H. Christensen, B. Dusemund, M. Kouba, M.K. Durjava, M. Lopez-Alonso, S.L. Puente, F. Marcon, B. Mayo, A. Pechova, M. Petkova, F. Ramos, Y. Sanz, R.E. Villa, R. Woutersen, G. Aquilina, G. Bories, J. Gropp, C. Nebbia, A. Finizio, A. Focks, I. Teodorovic, M.L. Innocenti and J. Tarres-Call. 2020. Safety of lignosulphonate for all animal species. *EFSA Journal* 18(2): e06000, doi: 10.2903/j.efsa.2020.6000.
- Bedford, M.R. and H.L. Classen. 1993. An *in vitro* assay for prediction of broiler intestinal viscosity and growth when fed rye-based diets in the presence of exogenous enzymes. *Poultry Science* 72(1): 137-143.
- Corey, A.M., K.G.S. Wamsley, T.S. Winowski and J.S. Moritz. 2014. Effects of calcium lignosulfonate, mixer-added fat, and feed form on feed manufacture and broiler performance. *Journal of Applied Poultry Research* 23(3): 418-428.
- Eid, A.E. and A.J. Matty. 1989. A simple *in vitro* method for measuring protein digestibility. *Aquaculture* 79(1-4): 111-119.
- Ellis, A.E. 1990. Lysozyme assays. pp. 101-103. *In*: J.S. Stolen, T.C. Fletcher, D.P. Anderson, B.S. Roberson and W.B. Van Muiswinkel (eds.). *Techniques in Fish Immunology*. SOS Publications, Fair Haven.
- Farmanfarmaian, A., T. Lauterio and M. Ibe. 1982. Improvement of the stability of commercial feed pellets for the giant shrimp (*Macrobrachium rosenbergii*). *Aquaculture* 27(1): 29-41.
- Hahor, W., K. Thongprajukaew, N. Nuntapong, S. Saekhow, K. Rungruangsak-Torrissen, T. Dumrongrittamatt and A. Phonchai. 2022. Partial pretreatment of ingredient mixture effectively improved feed chemical composition, physicochemical properties and *in vitro* digestibility. *Animal Feed*

- Science and Technology 285: 115216, doi: 10.1016/j.anifeedsci.2022.115216.
- Hemre, G.-I. and D.-F. Deng. 2015. Carbohydrates. pp. 95-110. In: C.-S. Lee, C. Lim, D. M. Gatlin III and C.D. Webster (eds.). Dietary Nutrients, Additives and Fish Health. John Wiley and Sons, Hoboken, New Jersey.
- Jussila, J. and L.H. Evans. 1998. Growth and condition of marron *Cherax tenuimanus* fed pelleted diets of different stability. Aquaculture Nutrition 4(3): 143-149.
- Kanto, U., S. Juttupornpong and W. Jintanavich. 2008. Cassava feed formula for pigs, poultry, cattle, dairy cattle and fish. Animal Nutrition Research and Development Center of Kasetsart University, Nakhon Pathom. 56 p. (in Thai)
- Lessard, M. and G.J. Brisson. 1987. Effect of a *Lactobacillus* fermentation product on growth, immune response and fecal enzyme activity in weaned pigs. Canadian Journal of Animal Science 67(2): 509-516.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry 193(1): 265-275.
- Lund, D. and K.J. Lorenz. 1984. Influence of time, temperature, moisture, ingredients, and processing conditions on starch gelatinization. C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition 20(4): 249-273.
- Macedo, E.S., A.V. Urbich, J.S.T. Nakamura, T.P. da Cruz, P.A.P. Panaczewicz, B. Wernick, V.R.B. Furuya, L.E. Pezzato, D.M. Gatlin Iii and W.M. Furuya. 2023. Effect of xylanase and β -glucanase on growth performance, activity of digestive enzymes, digestibility, and microbiome diversity of juvenile Nile tilapia fed soybean meal and/or sorghum distillers dried grains with solubles-based diets. Aquaculture 565: 739134, doi: 10.1016/j.aquaculture.2022.739134.
- Machado, M.F., F.A.R. Oliveira, V. Gekas and R.P. Singh. 1998. Kinetics of moisture uptake and soluble-solids loss by puffed breakfast cereals immersed in water. International Journal of Food Science & Technology 33(3): 225-237.
- Maugle, P.D., O. Deshimaru, T. Katayama and K.L. Simpson. 1982. Characteristics of amylase and protease of the shrimp *Penaeus japonicus*. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries 48(12): 1753-1757.
- Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical chemistry 31(3): 426-428.
- Nascimento, A.A., E.S. de Macedo, G.S. Gonçalves, T.P. da Cruz, B. Wernick, V.R.B. Furuya and W.M. Furuya. 2023. Xylanase and β -glucanase in tandem improve performance, digestive enzymes activity and digestibility in juvenile Nile tilapia fed corn distillers' dried grains with solubles-added diet. Animal Feed Science and Technology 306: 115816, doi: 10.1016/j.anifeedsci.2023.115816.
- Nascimento, T.M.T., H. Buzollo, L.C.G. de Sandre, L.M. Neira, E.G. Abimorad and D.J. Carneiro. 2020. Apparent digestibility coefficients for amino acids of feed ingredients in tambaqui (*Colossoma macropomum*) diets. Revista Brasileira de Zootecnia 49: e20190032.

- National Research Council. 1993. Nutrient Requirements of Fish. National Academies Press, Washington, DC. 114 p.
- Nimse, S.B. and D. Pal. 2015. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. RSC Advances 5(35): 27986-28006.
- Niu, J., H.-Z. Lin, S.-G. Jiang, X. Chen, K.-C. Wu, L.-X. Tian and Y.-J. Liu. 2012. Effect of seven carbohydrate sources on juvenile *Penaeus monodon* growth performance, nutrient utilization efficiency and hepatopancreas enzyme activities of 6-phosphogluconate dehydrogenase, hexokinase and amylase. Animal Feed Science and Technology 174(1-2): 86-95.
- Novriadi, R., E. Suwendi and R. Tan. 2022. The use of corn distiller's dried grains with solubles as a protein source in practical diets for Pacific white leg shrimp *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture Reports 25: 101209, doi: 10.1016/j.aqrep.2022.101209.
- Novriadi, R., I. Istiqomah, A. Isnansetyo, D. Balk, M. Jolly-Breithaupt and S. Davies. 2023. Corn fermented protein in production diets for pacific white legged shrimp *Litopenaeus vannamei*: Improved growth performance, health status and resistance to infection. Aquaculture Reports 30: 101571, doi: 10.1016/j.aqrep.2023.101571.
- Obaldo, L.G., S. Divakaran and A.G. Tacon. 2002. Method for determining the physical stability of shrimp feeds in water. Aquaculture Research 33(5): 369-377.
- Parisenti, J., L.H. Beirao, V.L.C.G. Tramonte, F. Ourique, C.C. da Silveira Brito and C.C. Moreira. 2011. Preference ranking of colour in raw and cooked shrimps. International Journal of Food Science & Technology 46(12): 2558-2561.
- Plummer, D.T. 1988. An Introduction to Practical Biochemistry. 3rd ed. Tata McGraw Hill Publishing Co. Ltd., New Delhi. 292 p.
- Romano, N. and V. Kumar. 2019. Starch gelatinization on the physical characteristics of aquafeeds and subsequent implications to the productivity in farmed aquatic animals. Aquaculture 11(4): 1271-1284.
- Rossi, L.T., A.R. Sharpen, J.A. Zimmermann, C.R. Olivero, M.V. Zbrun, L.S. Frizzo, M.L. Signorini, C. Bacchetta, R.E. Cian, J. Cazenave, L.P. Soto and S.R. Drago. 2020. Intestinal microbiota modulation in juvenile Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) by supplementation with *Pyropia columbina* and β -carotene. Aquaculture International 28(3): 1001-1016.
- Saleh, A.A., A.M. Elnagar, Y.Z. Eid, T.A. Ebeid and K.A. Amber. 2021. Effect of feeding wheat middlings and calcium lignosulfonate as pellet binders on pellet quality growth performance and lipid peroxidation in broiler chickens. Veterinary Medicine and Science 7(1): 194-203.
- Silva, B.C., H. Nolasco-Soria, F. Magallon-Barajas, R. Civera-Cerecedo, R. Casillas-Hernandez and W. Seiffert. 2016. Improved digestion and initial performance of whiteleg shrimp using organic salt supplements. Aquaculture Nutrition 22(5): 997-1005.
- Smith, V.J. and K. Soderhall. 1991. A comparison of phenoloxidase activity in the blood of marine invertebrates. Developmental & Comparative Immunology 15(4): 251-261.

- Song, G., Y. Zhao, J. Lu, Z. Liu, J. Quan and L. Zhu. 2024. Effects of astaxanthin on growth performance, gut structure, and intestinal microorganisms of *Penaeus vannamei* under microcystin-LR stress. *Animals* 14(1): 58, doi: 10.3390/ani14010058.
- Supamattaya, K., J. Raungsri, S. Kiriratnikom and N. Suanyuk. 2000. Immune system in black tiger shrimp, *Penaeus monodon* Fabricius: VI. Effect of diseases on immuno-physiological function and blood components in black tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius). *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 22(Suppl.): 615-621. (in Thai)
- Swinkels, J.J.M. 1985. Composition and properties of commercial native starches. *Starch* 37(1): 1-5.
- Thai Industrial Standards Institute (TISI). 1993. Thailand Industrial Standard for Prawn Feed (TIS 1198). Thai Industrial Standards Institute, Bangkok. 16 p. (in Thai)
- Tiamiyu, L.O. and S.G. Solomon. 2012. Effects of different grain starches as feed binders for on-farm aqua-feeds. *Global Journal of Pure and Applied Sciences* 18(1&2): 19-23.
- Ukeda, H., D. Kawana, S. Maeda and M. Sawamura. 1999. Spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on the reduction of highly water-soluble tetrazolium salts by xanthine-xanthine oxidase. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 63(3): 485-488.
- Wang, W., M. Liu, S. Fawzy, Y. Xue, M. Wu, X. Huang, G. Yi and Q. Lin. 2021. Effects of dietary *Phaffia rhodozyma* astaxanthin on growth performance, carotenoid analysis, biochemical and immune-physiological parameters, intestinal microbiota, and disease resistance in *Penaeus monodon*. *Frontiers in Microbiology* 12: 762689, doi: 10.3389/fmicb.2021.762689.
- Wang, X., E. Li, C. Xu, J.G. Qin, S. Wang, X. Chen, Y. Cai, K. Chen, L. Gan, N. Yu, Z.-Y. Du and L. Chen. 2016. Growth, body composition, ammonia tolerance and hepatopancreas histology of white shrimp *Litopenaeus vannamei* fed diets containing different carbohydrate sources at low salinity. *Aquaculture Research* 47(6): 1932-1943.