การแทนที่กากถั่วเหลืองด้วยผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมอาหารในอาหารเลี้ยงกุ้งขาว *Litopenaeus vannamei*

นายรณวิช สิงหสุรศักดิ์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2552
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

REPLACEMENT OF SOYBEAN MEAL BY FOOD INDUSTRIAL BY-PRODUCT IN DIET FOR PACIFIC WHITE SHRIMP *Litopeneaeus vannamei*

Mr. Ronnawich Singhasurasak

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2009

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การแทนที่กากถั่วเหลืองด้วยผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมอาหารในอาหารเลี้ยงกุ้งขาว *Litopenaeus vannamei*
โดย	นายรณวิช สิงหสุรศักดิ์
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร.สมเกียรติ ปิยะธีรธิติวรกุล
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ดร.อรพร หมื่นพล
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	อาจารย์ ดร. เกียรติศักดิ์ ดวงมาลย์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์ ดร.สมเกียรติ ปิยะธีรธิติวรกุล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ดร.อรพร หมื่นพล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์ ดร. เกียรติศักดิ์ ดวงมาลย์)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชลี ไพบูลย์กิจกุล)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รณวิช สิงหสุรศักดิ์ : การแทนที่กากถั่วเหลืองด้วยผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมอาหารในอาหารเลี้ยงกุ้งขาว *Litopenaeus vannamei*. (REPLACEMENT OF SOYBEAN MEAL BY FOOD INDUSTRIAL BY-PRODUCT IN DIET FOR PACIFIC WHITE SHRIMP *Litopeneaeus vannamei*) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รองศาสตราจารย์ ดร.สมเกียรติ ปิยะธีรธิติวรกุล, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : ดร.อรพร หมื่นพล, ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เกียรติศักดิ์ ดวงมาลย์, 48 หน้า.

จากการทดลองประเมินค่าวัตถุดิบที่เป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมอาหารเพื่อใช้แทนที่กากถั่วเหลืองในการผลิตอาหารสำหรับเลี้ยงกุ้งขาวโดยการวัดปริมาณโปรตีน องค์ประกอบของกรดอะมิโน และสารต้านโภชนาการพบว่าวัตถุดิบที่มีความเป็นไปได้ในการนำมาใช้แทนที่กากถั่วเหลืองได้แก่ กากยีสต์ กากมอลต์ และ กากเมล็ดทานตะวัน จากการวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดอะมิโนในวัตถุดิบทั้งสามนั้นพบว่าในกากยีสต์มีองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่จำเป็นสำหรับอาหารกุ้งมากที่สุดซึ่งใกล้เคียงกับกากถั่วเหลืองในขณะที่ในกากเมล็ดทานตะวัน และกากมอลต์มีปริมาณของกรดอะมิโนที่จำเป็นน้อยลงมาตามลำดับ ในการวิเคราะห์สารต้านโภชนาการไฟเตทพบว่า กากถั่วเหลือง กากมอลต์ และกากเมล็ดทานตะวันมีปริมาณไฟเตทใกล้เคียงกัน แต่ไม่พบในกากยีสต์ เมื่อทดลองเลี้ยงกุ้งด้วยอาหารที่แทนที่กากถั่วเหลืองพบว่า อาหารสูตรที่แทนที่ด้วยกากยีสต์ให้ผลการเจริญเติบโตของกุ้งไม่แตกต่างจากสูตรควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในขณะที่สูตรกากเมล็ดทานตะวัน และกากมอลต์ให้ผลการเจริญเติบโตของกุ้งน้อยกว่าสูตรควบคุม ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองศึกษาค่า digestibility ที่พบว่าอาหารสูตรควบคุมมีค่า apparent protein digestibility มากที่สุดคือ 76.93% ตามด้วยสูตรแทนที่ด้วยกากยีสต์ 75.03% กากเมล็ดทานตะวัน 70.16% และกากมอลต์ 68.66% ตามลำดับ และจากการทดลองศึกษาการทำงานของเอนไซม์ protease พบว่ากุ้งที่กินอาหารสูตรที่แตกต่างกันนั้นไม่ส่งผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ protease

สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ	ลายมือชื่อ นิสิต..... ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก..... ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม..... ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....
ปีการศึกษา	2552	

4972448323 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEY WORDS WHITE SHRIMP / SOYBEAN MEAL

RONNAWICH SINGHASURASAK : REPLACEMENT OF SOYBEAN MEAL BY FOOD INDUSTRIAL BY-PRODUCT IN DIET FOR PACIFIC WHITE SHRIMP *Litopeneaeus vannamei.* THESIS ADVISOR : ASSOC.PROF.SOMKIET PIYATEERATITHIWORAKUL, Ph.D., THESIS CO - ADVISOR : ORAPORN MUENPOL, Ph.D., ASSIST.PROF.KIATTISAK DUANGMAL, Ph.D., 48 pp.

In this research we determined the feasibility of replacement soybean meal (SBM) by food industrial by product. The protein content, amino acid profile and anti-nutrition in each raw material was measured in order to select the appropriate material as the protein source for shrimp diet. The 3 raw materials, consisting of brewer's yeast (BY), brewer's malt (BM) and sunflower meal (SFM), were used to replace SB. The differentially level of protein contents in BY, BM and SFM were 42.2%, 27.8% and 38.9% protein dry weight, respectively. An amino acid profile showed that essential amino acid content in BY was similar to SBM, while in SFM and BM the essential amino acid content were less than SBM. The anti-nutrition phytate level in SBM, SFM, and BM were not different, however the anti-nutrition phytate could not be found in BY. Shrimps were fed with each substitution treatment compared with control feeding which compose of SBM. BY treatment could induce growth of shrimps compared with control group but the differences were not significant. Others treatment showed significantly lower in growth of shrimps than control group. These results correlated with the apparent protein digestibility level which showed highest 76.93% in the control group followed by 73.05% of BY, 70.16% of SFM and 68.66% of BM, respectively. The study of the protease activity showed that the treatment of different protein source did not affect protease activity.

Field of Study : Biotechnology

Academic Year : 2009

Student's Signature.....

Advisor's Signature.....

Co – Advisor's Signature.....

Co – Advisor's Signature.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ ด้วยความกรุณาช่วยเหลือเป็นอย่างดีจากอาจารย์ที่ปรึกษาและอาจารย์ที่ปรึกษาร่วมได้แก่ รองศาสตราจารย์ ดร .สมเกียรติ ปิยะธีรธิติวรกุล ดร.อรพร หมื่นพล และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เกียรติศักดิ์ ดวงมาลย์ ที่ให้คำแนะนำ คำปรึกษา และ ข้อคิดเห็นอันเป็นประโยชน์อย่างยิ่ง อีกทั้งความกรุณาดูแล ห่วงใย เอาใจใส่ ให้กำลังใจ และยังคอยกระตุ้นผู้ทำวิจัยเสมอมา ซึ่งผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

กราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร .ชลี ไพบูลย์กิจกุล กรรมการจากภายนอกมหาวิทยาลัย ที่ช่วยกรุณาสละเวลาอันมีค่าของท่านมาเพื่อทำการสอบ และแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบพระคุณ คุณ เสรี ดอนเหนือ และ คุณ ฟารีนา เก็นตาสา ที่ให้ความช่วยเหลือและแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์มาตลอด

ขอขอบพระคุณ พี่ๆ และเจ้าหน้าที่จากภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหารสำหรับความช่วยเหลือ และคำแนะนำต่างๆ ในการใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆ

ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่และครอบครัวสำหรับความรัก กำลังใจ การสนับสนุนและความช่วยเหลือทุกอย่างที่มีให้ตลอดมา

สุดท้าย ขอขอบพระคุณ พี่ ๆ และ เพื่อนทุกคนจาก ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล สำหรับคำแนะนำ คำปรึกษา ความช่วยเหลือต่าง ๆ รวมถึงความเป็นกันเองที่มีให้ กันเสมอ และ ขอขอบพระคุณ เพื่อน พี่ น้อง รวมถึงคณาจารย์จากภาควิชาพฤกษศาสตร์ สำหรับ ความช่วยเหลือต่าง ๆ และกำลังใจที่เอื้อเฟื้อให้แก่กันโดยเสมอมา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ซ

สารบัญรูปภาพ..... ฌ

บทที่ 1 บทนำ..... 1

บทที่ 2 การตรวจเอกสาร..... 3

บทที่ 3 วิธีการทดลอง..... 10

บทที่ 4 ผลการทดลอง..... 16

บทที่ 5 อภิปรายผลการทดลอง 34

บทที่ 6 สรุปผลการทดลอง 38

รายการอ้างอิง..... 39

ภาคผนวก..... 43

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 48

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

1. ปริมาณโปรตีนในวัตถุดิบแหล่งโปรตีนในสูตรอาหาร 17
2. ปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็นสำหรับอาหารกุ้งในวัตถุดิบ 18
3. สูตรอาหาร 20
4. ปริมาณโปรตีนที่คำนวณได้ในสูตรอาหารและปริมาณโปรตีนที่วัดได้ 21
5. ความสามารถในการคงตัวในน้ำของอาหารกุ้งที่ผลิต 22
6. จำนวนกุ้งที่เหลือและอัตรารอดของกุ้ง 24
7. น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งในแต่ละชุดทดลอง 25
8. ความยาวเฉลี่ยของกุ้งในแต่ละชุดทดลอง 27
9. น้ำหนักแห้งของมูลกุ้งที่เก็บได้ในตลอดการทดลองในแต่ละชุดทดลอง 29
10. ความเข้มข้นของปริมาณโปรตีน crude enzyme ที่สกัดได้ในแต่ละชุดทดลอง 32
11. protease activity ของ crude enzyme ที่สกัดได้ในแต่ละชุดทดลอง 33

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูปภาพ

รูปที่ **หน้า**

1. ปริมาณโปรตีนต่อน้ำหนักแห้งในวัตถุดิบชนิดต่างๆ..... 16
2. ปริมาณ phytate ในวัตถุดิบ (มิลลิกรัมต่อตัวอย่าง 100 กรัมโดยน้ำหนักแห้ง)..... 19
3. น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งในแต่ละชุดทดลอง..... 26
4. ความยาวเฉลี่ยของกุ้งในแต่ละชุดทดลอง..... 28
5. ปริมาณโปรตีนในมูลกุ้งในแต่ละชุดทดลอง..... 30
6. ค่า apparent protein digestibility ของอาหารแต่ละสูตร..... 31
7. กราฟมาตรฐานของโปรตีน Bovine Serum Albumin (BSA)..... 47

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในการผลิตอาหารกุ้ง โปรตีนเป็นสารอาหารที่มีความสำคัญสูงสุด เพราะ กุ้งเป็นสัตว์กินเนื้อ วัตถุดิบที่ใช้เป็นแหล่งโปรตีนหลักในอาหารกุ้งที่ได้แก่ปลาป่น และวัตถุดิบที่นำมาใช้เป็นแหล่งโปรตีนรองได้แก่กากถั่วเหลือง ซึ่งนำเข้าจากต่างประเทศเป็นหลักและมีราคาที่สูงขึ้นตลอดเวลาจึงจำเป็นต้องมีการหาวัตถุดิบอื่นเพื่อทดแทนการใช้กากถั่วเหลืองจากต่างประเทศ แหล่งโปรตีนอื่นในประเทศไทยที่มีศักยภาพ คือผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมอาหาร ได้แก่ กากมอลต์ กากยีสต์ และกากเมล็ดทานตะวัน วัตถุดิบทั้ง 3 ชนิดนี้มีปริมาณโปรตีนสูงใกล้เคียง กับกากถั่วเหลือง (กองอาหารสัตว์, 2008)

โปรตีนจากพืช มีองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของกุ้ง แตกต่างจากองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่มีในโปรตีนจากสัตว์ (El-Saidy, 2003) นอกจากนี้พืชยังมีสารต้านโภชนาการ เช่น phytate, trypsin inhibitor ซึ่งออกฤทธิ์ขัดขวางกระบวนการย่อยและการดูดซึมสารอาหารของสัตว์ (Mohamed,1990) ดังนั้นการนำโปรตีนจากพืชมาใช้ จึงต้องคำนึงถึงข้อจำกัดเหล่านี้ เช่นต้องมีการเติมกรดอะมิโนชนิดและปริมาณที่ขาด และ ควรมีการขจัดสารต้านโภชนาการด้วยวิธีต่าง ๆ

สัตว์ทดลองที่จะใช้ทดลองศึกษาครั้งนี้ได้แก่ กุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) เป็นกุ้งที่เลี้ยงง่าย มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว พฤติกรรมการกินอาหารกุ้งขาว จะจับเม็ดอาหารแล้วว่ายน้ำไปกินไป กุ้งขาวกินอาหารได้ทั้งพืชและสัตว์ เมื่อจับกุ้งจากบ่อมาตรวจสอบลำไส้ พบว่าในลำไส้จะมีอาหารเต็มตลอดเวลา แม้ว่าจะให้อาหารมานานแล้วหลายชั่วโมง จึงสันนิษฐานได้ว่าเมื่อกินอาหารที่ให้หมดแล้ว กุ้งยังสามารถกินอาหารชนิดอื่นที่อยู่ในบ่อได้อีก เช่น สาหร่าย แพลงก์ตอน สัตว์หน้าดิน (อุตสาหกรรมกุ้งไทย, 2008)

ในการทดลองนี้จะใช้อาหารกุ้งสูตรปลาป่นผสมกากถั่วเหลืองเป็นชุดควบคุม ทดลองเปรียบเทียบกับอาหาร สูตรที่มีปลาป่นผสมกับกากมอลต์ กากยีสต์ และ กาก เมล็ดทานตะวันก่อนผลิตอาหารทดลอง ทำการวิเคราะห์ค่าโปรตีน ของวัตถุดิบแต่ละชนิด รวมทั้งปริมาณของกรดอะมิโนในวัตถุดิบ เปรียบ เทียบกับปลาป่น และวิเคราะห์หาสารต้านโภชนาการ phytate จากวัตถุดิบ ทำการทดลองให้อาหารเป็นเวลาหนึ่งเดือน 1 เดือน วิเคราะห์อัตราการเจริญเติบโตและอัตรารอด เปรียบเทียบค่า digestibility ของอาหารแต่ละชนิด และพิจารณาถึงความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ protease ของกุ้งที่กินอาหารแต่ละชนิด

2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อประเมินการใช้โปรตีนจาก ผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมอาหาร ทดแทนโปรตีนจากกากถั่วเหลืองในการผลิตอาหารเลี้ยงกุ้งขาว

3. ขอบเขตของการวิจัย

1. ศึกษาปริมาณโปรตีน องค์ประกอบของกรดอะมิโน และ สารต้านโภชนาการในวัตถุดิบ
2. ศึกษาผลของการแทนที่กากถั่วเหลืองด้วยวัตถุดิบชนิดอื่นต่อการเจริญเติบโตของกุ้งขาว
3. ศึกษาผลของการแทนที่กากถั่วเหลืองด้วยวัตถุดิบชนิดอื่นต่อค่า digestibility ของอาหารกุ้งขาว
4. ศึกษาผลการทำงานของเอนไซม์ protease ของกุ้งขาวที่กินอาหารที่แทนที่กากถั่วเหลืองด้วยวัตถุดิบชนิดอื่น

4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบความเป็นไปได้ในการใช้วัตถุดิบชนิดอื่นมาเป็นแหล่งโปรตีนทดแทนโปรตีนจากกากถั่วเหลืองเพื่อลดต้นทุนในการผลิตอาหารกุ้งและลดการนำเข้าวัตถุดิบจากต่างประเทศ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

อาหารกุ้ง

ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำนั้น อาหารนับว่าเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการประสบความสำเร็จในการ เพาะ เลี้ยง เนื่องจากเป็นต้นทุนการผลิต 60-70 % ของต้นทุนการผลิตรวม นอกจากนี้อาหารยังมีผลต่อลักษณะต่าง ๆ ของ สัตว์น้ำ เช่น การเจริญเติบ โต การใช้ประโยชน์อาหาร คุณภาพและปริมาณเนื้อ ความแข็งแรง ภูมิต้านทานโรค ตลอดจน สมรรถภาพการสืบพันธุ์

สำหรับอาหารกุ้งนั้นสารอาหารที่มีความสำคัญสูง สุดคือโปรตีน เพราะกุ้งเป็นสัตว์กินเนื้อที่ต้องการโปรตีนสูง โปรตีนจะเป็นตัวชี้วัดถึงคุณภาพของอาหารซึ่งโดยทั่วไปอา หารกุ้งที่มีขายในท้องตลาดนั้นมีระดับโปรตีนที่แตกต่างกันตั้งแต่ 30 – 50% โปรตีนโดยทั่วไปแล้ววัตถุดิบหลักที่เป็นแหล่งโปรตีนในอาหารกุ้งได้แก่ปลาป่น

ปลาป่น

ปลาป่นเป็นแหล่งโปรตีนที่สำคัญ ให้โปรตีนสูงและมีคุณภาพดี ทำมาจากปลาเป็ดเศษปลาเล็กปลาน้อยหรือหัวปลาที่เหลือจากโรงงานทำปลากระป๋อง มีโปรตีนสูงประมาณ 50-60 % ขึ้นอยู่กับชนิดของปลาและขั้นตอนการผลิตปลาป่น มีกรดอะมิโน ไลซีน และเมทไธโอนีนสูง มีธาตุแคลเซียมและฟอสฟอรัสสูง มีวิตามินบีสูง โดยเฉพาะ วิตามินบี 12 และ บี 2 ปลาป่นใช้ได้สำหรับ การผลิตอาหารสำหรับเลี้ยงสัตว์ เกือบทุกชนิด ไก่ เป็ด สุกร สุนัข แมว ปลา กุ้ง และอื่นๆ แต่สำหรับสัตว์บกขณะนี้การใช้มีแนวโน้มลดลงไป เนื่องจากมีโปรตีนทดแทนตัวอื่นๆ เช่น กากถั่วเหลือง กากถั่วอื่นๆ เนื้อ กระดูกวัว ไก่ สุกร มาใช้ทดแทนปลาป่นได้บ้างในบางสูตรอาหาร แต่สำหรับอาหาร ปลาและกุ้ง เ นื่องจากภาวะตามธรรมชาติของสัตว์ดังกล่าวต้องการอาหารที่มีกลิ่นคาวปลา เพราะช่วย เติมรสชาติของอาหาร จึงหลีกไม่พ้นที่จะใช้ปลาป่นโปรตีนเป็นหลัก ดังนั้นตรา บเท่าที่อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำยังคงเติบโตขึ้นเรื่อยๆ การใช้ปลาป่นจึงมีปริมาณเพิ่มขึ้นด้วยเช่นกัน

ในปัจจุบัน ภาวะขาดแคลนปลาป่นทำให้ราคาปลาป่นโลกมีความผันผวน โดยราคาปรับเพิ่มขึ้นจากเดิม 700 เหรียญสหรัฐฯ /ตัน เป็น 1,400 เหรียญสหรัฐฯ /ตัน เฉลี่ยราคากิโลกรัมละ 40-60 บาท(วารสารข่าวกุ้ง, 2549) ซึ่งเป็นราคาที่สูงสุดเป็นประวัติการณ์ โดยมีสาเหตุมาจากผลผลิตปลาป่นทั่วโลกมีปริมาณลดลงขณะที่ความต้องการใช้ปลาป่นเพิ่มขึ้นเนื่องจากมีการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมากขึ้น เช่น การทำฟาร์มเพาะเลี้ยงปลานิล

ปลาแซลมอน ฟาร์มกุ้ง เป็นต้น ประกอบกับวิกฤติราคาน้ำมันที่เพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องทำให้ชาวประมงไม่ออกเรือจับปลาได้ตามปกติ เมื่อราคาปลาป่นสูงขึ้น ทำให้ราคาอาหารสัตว์น้ำที่ใช้ปลาป่นเป็นวัตถุดิบทั่วโลกมีราคาสูงขึ้นตามไปด้วย

จากข้อมูลจากสำนักงานส่งเสริมการค้าสินค้าเกษตร กรมการค้าภายใน ปี 2550 แสดงให้เห็นว่าในประเทศไทยเองนั้น ปลาป่นถือเป็นวัตถุดิบอาหารสัตว์ที่มีความสำคัญมาก ในแต่ละปีมีความต้องการใช้ ปลาป่นเพื่อการเลี้ยงสัตว์ภายในประเทศรวมประมาณปีละ 460,000 ตัน (สำนักงานส่งเสริมการค้าสินค้าเกษตร, 2549)

กากถั่วเหลือง

กากถั่วเหลืองเป็นผลพลอยได้จากโรงงานสกัดน้ำมันถั่วเหลือง มี 2 ชนิด คือ กากถั่วเหลืองที่ได้จากขบวนการอัดน้ำมันและกากถั่วเหลือง ที่ได้จากขบวนการสกัดน้ำมันด้วยสารเคมี กากถั่วเหลืองมีโปรตีนประมาณ 42-48 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นอยู่กับขบวนการสกัดน้ำมัน มีไขมันอยู่ประมาณ 1- 4% มีระดับธาตุแคลเซียม และ ฟอสฟอรัสต่ำ กากถั่วเหลือง มีระดับโปรตีนสูง เมื่อเทียบกับวัตถุดิบที่มาจากพืชชนิดอื่น แต่มีปริมาณกรดอะมิโนเมทไธโอนีนค่อนข้างต่ำ การใช้กากถั่วเหลืองควรระวัง สารต้านโภชนาการ trypsin inhibitor ซึ่งจะพบได้ในกากถั่วเหลืองที่ดิบ สารดังกล่าวจะ ไปมีผลต่อการย่อยโปรตีน โดยทำหน้าที่ยับยั้งเอนไซม์ trypsin ที่มีหน้าที่ย่อยโปรตีน

จากปัญหาวิกฤตก ารณ์ราคาปลาป่นทำให้มีงานวิจัยหลายชิ้นศึกษาถึงการนำกากถั่วเหลืองมาใช้เป็นแหล่งโปรตีนแทนที่ปลาป่นหรือใช้เป็นแหล่งโปรตีนเสริมควบคู่ไปกับปลาป่นในการเลี้ยงสัตว์หลายชนิดเช่นปลานิล (Deyab และคณะ, 2003) ปลาซีบรีม (Hernández และคณะ, 2007) ปลาแซลมอน (Carter และ Hauler, 2000) แม้กระทั่งในการเลี้ยงกุ้งขาว (Tzachi และคณะ , 2000) กากถั่วเหลืองจึงกลายเป็นวัตถุดิบแหล่งโปรตีนที่ใช้ควบคู่กับปลาป่นในอาหารสัตว์หลายชนิด

ในประเทศไทยนั้นแม้จะมีการผลิตกากถั่วเหลืองอยู่บ้างแต่ผลผลิตที่ได้ก็ไม่เพียงพอต่อการใช้งานโดยปัจจุบันประเทศไทยผลิตกากถั่วเหลืองในประเทศได้ประมาณ ปีละ 3 แสนตัน แต่ต้องมีการนำเข้ากากถั่วเหลืองมากถึงปีละ 2 ล้านตัน

วัตถุดิบผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมอาหาร

วัสดุเหลือใช้หรือของเสีย (residue/waste) จากโรงงานอุตสาหกรรม อาหาร คือส่วนของวัตถุดิบ (raw material) ซึ่งผู้ดำเนินการหรือเจ้าของกิจการเห็นว่าการนำวัสดุนั้นมาทำการแปรรูปให้เป็นผลผลิต (product) แล้วจะให้ผลที่ไม่คุ้มค่ากับการลงทุนแต่เนื่องจากปัญหาเกี่ยวกับสภาวะแวดล้อมในปัจจุบันทำให้การกำจัดวัสดุเหลือใช้ให้อยู่ในสภาพซึ่งสามารถทิ้งออกจากโรงงานได้มีราคาสูงมากขึ้ นเรื่อย ๆ และผลเนื่องจากสภาพทางเศรษฐศาสตร์และเทคโนโล ยีซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลาจึงทำให้เกิดการศึกษา การค้นคว้าวิจัยกันอย่างแพร่หลายมากขึ้น ที่จะนำวัสดุเหลือใช้ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ผลพลอยได้ (by product) จากโรงงานอุตสาหกรรม อาหารมาเป็นวัตถุดิบ เพื่อใช้ผลิตเ ป็นผลิตภัณฑ์ ซึ่งอาจจะเป็นการเพิ่มรายได้และช่วยลดต้นทุนในการกำจัดวัสดุเหลือใช้เหล่านั้น โดยมีจุดประสงค์หลักเพื่อลดปริมาณสารที่จะต้องกำจัดก่ อนปล่อยออกจากโรงงานอุตสาหกรรม และเพื่อใช้ทรัพยากรที่มีอยู่ให้เกิดประโยชน์สูงสุด การ ผลิตผลิตภัณฑ์ของอุตสาหกรรมอาหาร จะมีผลที่ได้จากอุตสาหกรรม 3 อย่างด้วยกัน คือ

ผลิตภัณฑ์ (product) ซึ่งเป็นจุดประสงค์หลักของการผลิต

ผลพลอยได้ (by-product) คือสิ่งที่ได้มาจากกรรมวิธีการแปรรูปวัตถุดิบ เป็นสิ่งที่สามารถนำไปทำ ผลิตภัณฑ์หรือเป็นสิ่งที่มีราคา ถึงแม้มิได้ดำเนินการต่อไปก็สามารถขายได้ ราคา เช่น กากน้ำตาล กางปลา เศษปลา ฟาง ฯลฯ

ของเหลือ (waste) คือวัสดุเหลือใช้ซึ่งเป็นผลิตผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมประเภทหนึ่ง เช่นอุตสาหกรรมน้ำตาลใช้อ้อยเป็นวัตถุดิบได้น้ำตาลทรายขาว ของเหลือคือชานอ้อย โรงสีข้าวผลิตภัณฑ์คือข้าวสาร แกลบดิบเป็นของเหลือ เป็นต้น

กากยีสต์

กากยีสต์ เป็นผลิตผลพลอยได้ จากโรงงานเบียร์ ยีสต์มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Saccharomyces cerevisiae* เป็นเชื้อยีสต์ที่มีชีวิตโดยจะถู กความร้อนทำให้ตายหมด คงเหลือแต่ผนังเซลล์ของยีสต์ ไม่มีฤทธิ์ ในการเป็นเชื้อหมัก กากยีสต์ เป็นตัวช่วยเสริมสุขภาพของสัตว์ ซึ่งจะทำให้สัตว์แข็งแรง และมีภูมิต้านทานโรคสูงขึ้น ลดความเ ครียด มีพลังงานและแร่ธาตุสูง มีวิตามิน บีรวม สูง มีกรดอะมิโน 16 ชนิด นอกจากนี้ยังมีเกลือแร่สูง คือ โครเมี่ยม สังกะสี เหล็ก ฟอสฟอรัส ซีลีเนียม ในปัจจุบันนี้ได้มีการนำยีสต์มาเป็นส่วนผสมของอาหารสัตว์ เพื่อประโยชน์ใน 2 ทางด้วยกันคือ เป็นแหล่งโปรตีนที่เราเรียกว่าโปรตีนเซลล์เดียว (single cell protein) และอีกในแง่หนึ่งคือเป็นตัวช่วยเสริมสุขภาพของ

สัตว์หรือที่เราเรียกว่าเป็น โปรไบโอติค (probiotic) ให้กับสัตว์ซึ่งจะทำให้สัตว์แข็งแรง และมีภูมิต้านทานโรคสูงขึ้น รูปแบบการนำยีสต์มาใช้ก็ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการใช้ คือ ถ้าต้องการให้ยีสต์เป็นแหล่งโปรตีนก็ไม่ต้องคำนึงว่ายีสต์ยังมีชีวิตอยู่หรือไม่ แต่ถ้าต้องให้ยีสต์ทำหน้าที่เป็นโปรไบโอติค จะต้องใช้ในสภาพที่ยังมีชีวิตอยู่เท่านั้น แต่ไม่ว่ายีสต์จ ะทำหน้าที่ใดก็ตามในสองข้อดังกล่าว ก็ถือว่าเป็นประโยชน์ต่อสัตว์เลี้ยงทั้งนั้น ดังนั้นในประเทศไทย เทคโนโลยีการผลิตยีสต์น่าจะได้รับการพัฒนาให้สามารถทำได้ง่ายขึ้น รวมทั้งสามารถใช้วัตถุดิบราคาถูกจากของเหลือใช้ทางเกษตร ที่มีอยู่ในบ้านเรา (อุทัย คันโธ, 2529)

จากการค้นคว้าข้อมูลพบว่ามีงานวิจัยหลายชิ้นที่ศึกษาการนำกากยีสต์มาใช้ในอาหารสัตว์มีการวิจัยรายงานว่ากากยีสต์สามารถใช้แทนที่ปลาป่นในอาหารเลี้ยงปลากะพงได้ถึง 50% โดยไม่ส่งผลเสียต่อการเจริญเติบโต (Oliva-Teles และ Gonzalves, 2001) และยังมีการศึกษาถึงการใช้กากยีสต์ในแง่ของ single cell protein โดยใช้เป็นอาหารของอาร์ทีเมียเพื่อนำไปเลี้ยง ลูกปลานิล (Lim และคณะ, 2005) สำหรับในกุ้งขาวมีงานวิจัยพบว่าสามารถใช้ Pekin brewers dried yeast ในอาหารได้สูงถึง 40% และนอกจากนี้แล้วกากยีสต์ยังมีความสามารถในการกระตุ้นการทำงานของ polysaccharide immune อีกด้วย (Peng และคณะ, 2009)

กากมอลต์

กากมอลต์เป็นส่วนเหลือจากขั้นตอนแรกของการทำเบียร์ จากการบ่มข้าวบาร์เลย์หรือข้าวมอล ต์ ที่สเปรย์น้ำให้เมล็ดงอก (ข้าวมอลต์) จากนั้นจะผ่านขบวนการต้มคั้นน้ำแป้งและน้ำตาล ออกเพื่อไปทำเบียร์ ส่วนที่เหลือคือกากมอล ต์หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า กากเบียร์สด ลักษณะเป็นกากอ่อนนุ่ม ซึ่งในสภาพสดจะมีความชื้นสูงประมาณ 70-80% กากเบียร์สด จะเก็บไว้ใช้ได้ไม่นาน มักบูดเน่ามีเชื้อราง่าย เมื่อนำไประเหยน้ำออกจะได้กากเบียร์แห้งเก็บไว้ใช้ เป็นอาหารสัตว์ได้ กากมอลต์มีความฟ่ามสูง เยื่อใยสูง ไม่ควรให้สัตว์กินในปริมาณมาก ๆ เพราะกากข้าวมอลต์ จะไปขยายตัวในกระเพาะก่อให้เกิดปัญหาต่อระบบการย่อย

จากข้อมูลของกรมปศุสัตว์มีรายงานว่ากากมอลต์สามารถนำไปใช้เป็นส่วนผสมในอาหารของสัตว์กระเพาะรวมเช่น โคเนื้ อ โคนม ได้แต่ไม่ควรเกิน 15 – 20% ในสูตรอาหาร สำหรับสัตว์กระเพาะเดี่ยวกระเพาะเดี่ยวกรมปศุสัตว์แนะนำให้ใช้กากมอลต์ใน

สูตรอาหารได้ไม่ควรเกิน 2 - 5% ในสูตร ส่วนในกุ้งขาวนั้นยังไม่พบงานวิจัยใดที่ศึกษาถึงการนำกากมอลต์มาใช้เป็นส่วนผสมในอาหารสำหรับเลี้ยงกุ้งขาวมาก่อน

กากเมล็ดทานตะวัน

กากเมล็ดทานตะวันคือส่วนของเมล็ดทานตะวันที่ผ่านการกะเทาะเปลือกและบีบน้ำมันออกแล้วซึ่งเป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมการผลิตน้ำมันเมล็ด ทานตะวัน กากเมล็ดทานตะวันสามารถใช้เป็นอาหารสัตว์ได้ดีเนื่องจากไม่มีสารพิษที่เป็นอันตรายต่อสัตว์ กากเมล็ดทานตะวัน มีไวตามินบีรวม ธาตุแคลเซียม และฟอสฟอรัสสูง แต่กากเมล็ดทานตะวันมีเยื่อใยค่อนข้างสูง ทำให้ไม่สามารถใช้เป็นอาหารสุกรและสัตว์ปีกในปริมาณสูงได้ เพราะจะทำให้อาหารฟ่าม ความน่ากินต่ำ

สำหรับในกากเมล็ดทานตะวันนั้นมีการนำไปใช้เป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์หลายๆชนิดจากข้อมูลของกรมปศุสัตว์มีรายงานว่าในสุกรรุ่น (20 – 60 กิโลกรัม) สามารถใช้กากเมล็ดทานตะวันแทนที่กากถั่วเหลืองได้ถึง 50% ส่วนสุกรระยะขุน (60-90 กิโลกรัม) สามารถ ใช้กากเมล็ดทานตะวัน ทดแทนกากถั่วเหลืองได้ ถึง 100% นอกจากนี้แล้ว ในอาหารไก่ไข่และไก่เนื้อ สา มารถใช้กากเมล็ ดทานตะวันแทนกากถั่วเหลืองได้ 50% หรือประมาณ 10-12% ในสูตรอาหาร สำหรับการใช้กากเมล็ดทานตะวันในอาหารสัตว์น้ำนั้นมีงานวิจัยพบว่าสามารถใช้กากเมล็ดทานตะวันแทนที่ปลาป่นในสูตรอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงปลาเรนโบว์เทราต์ ได้ถึง 40% (Sanz และคณะ, 1994) ส่วนในกุ้งขาวนั้นยังไม่พบงานวิจัยใดๆ ที่กล่าวถึงการใช้กากเมล็ดทานตะวันเป็นส่วนผสมในอาหารเลี้ยงกุ้ง

กากถั่วเขียว

กากถั่วเขียว เป็นผลพลอยได้จากการทำวุ้นเส้น โดยแยกส่วนแป้งถั่วเขียวออกไปทำวุ้นเส้น ส่วนที่เหลือจะเป็นพวกสารละลายโปรตีน เศษแป้งบางส่วน รวมทั้งเนื้อแ ละเศษแป้งติดเปลือก หลังจากนั้นนำสารละลายไปตกตะกอน จึงจะได้ออกมาเป็นกากถั่วเขียว กากถั่วเขียวมีปริมาณโปรตีนสูงและมีองค์ประกอบของกรดอะมิโนใกล้เคียงกับกากถั่วเหลือง แต่อย่างไรก็ดีกากถั่วเขียว ชนิดตกตะกอนด้วยการหมัก มีกลิ่นเหม็น ถ้าใช้ในระดับสูง อาหารผสมจะมีกลิ่นเหม็นสัตว์ไม่ชอบ

สำหรับงานวิจัยที่เกี่ยวกับการใช้งานกากถั่วเขียวนั้นมีงานวิจัยพบว่ากากถั่วเขียวสามารถใช้แทนที่กากถั่วเหลืองในอาหารสำหรับเลี้ยงไก่เนื้อได้ถึง 50% โดยไม่ส่งผลต่อสมรรถนะการผลิต (Maya Rizal และ Khajarern, 2551)

สารต้านโภชนาการ

สารต้านโภชนาการคือสารที่มีสมบัติในการทำลายหรือขัดขวางการ ย่อยและการดูดซึมไปใช้ประโยชน์ของสารอาหาร ซึ่งสารต้านโภชนาการที่พบ ส่วนใหญ่จะเป็นสารที่มาจาก พืช พบบ้างในสัตว์และผลิตภัณฑ์จากสัตว์ ซึ่งสามารถแบ่งสารต้านโภชนาการเป็น 3 กลุ่มใหญ่ ๆ ดังนี้

กลุ่มที่ 1 สารต้านวิตามิน ที่สำคัญมี 2 ชนิด ชนิดแรกคือสารต้านวิตามินบี 1 และเอนไซม์ไธอะมิเนส (antithiamin และ thiaminase) พบในปลาทั้งน้ำจืดและทะเลซึ่งเป็นปลาดิบหรือปลาที่ปรุงสุก ๆ ดิบ ๆ สารนี้จะถูกทำลายโดยความร้อนที่ใช้ในระหว่างการปรุงอาหาร ในผักบางชนิดก็พบสารนี้ด้วย เช่น กระหล่ำปลี สีม่วง และหัวผักกาดแดง เป็นต้น การทำใ ห้ผักสุกก็จะทำลายสารนี้เช่นกัน สารต้านวิตามินชนิดที่สอง คือ สารอะวิดิน (avidin) ซึ่งเป็นสารที่สามารถรวมตัวกับสารไบโอติน (biotin) ซึ่งอยู่ในตระ กูลวิตามินบี แล้วได้สารใหม่ที่ร่างกายนำไปใช้ไม่ได้ แหล่งสำคัญของอะวิดิน คือ ไข่ขาวดิบ ซึ่งสาชนิดนี้สามารถถูกทำลายด้วยความร้อน

กลุ่มที่ 2 สารต้านแร่ธาตุ ที่สำคัญในกลุ่มนี้มี 4 ชนิด คือ กอยโตเจน (goitrogens) ออกซาเลต (oxalates) ไฟเตท (phytates) แทนนิน (tannins) สารกอยโตเจนเป็นสารที่ทำให้เกิดโรคคอพอกเนื่องจากไปยับยั้งการทำงานที่ไอโอ ดีนจะเข้าไปทำหน้าที่ในต่อมไทรอยด์ สารชนิดนี้พบมากในกะหล่ำ ถั่วต่าง ๆ และพืชตระ กูลหัวหอม ซึ่งสารกอยโตเจนนี้จะถูกทำลายได้ด้วยความร้อนจากการหุงต้ม ส่วนสารออกซาเลต จับกับแร่ธาตุหลายชนิดโดยเฉพาะแคลเซียมทำให้ดูดซึมน้อยลง แหล่งของออกซาเลตคือพืชผักต่าง ๆ ที่สำคัญคื อผักขม คะน้า ชา และโกโก้ สำหรับไฟเตตนั้นจะคล้ายกับออกซาเลต คือจับกับแร่ธาตุต่าง ๆ เช่น เหล็ก สังกะสี แมกนีเซียม แคลเซียม สารนี้พบมากในพืชผักทั่วไปโดยเฉพาะถั่วเมล็ดแห้ง และสุดท้ายคือแทนนินแหล่งสำคัญคือ ชา กาแฟ และโกโก้ ซึ่งต้านแร่ธาตุเหมือนกับออกซาเลตและไฟเตท

กลุ่มที่ 3 สารต้านเอนไซม์ จะไปขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ในการย่อยอาหาร ร่างกายจึงได้รับประโยชน์จากอาหารที่รับประทานได้ไม่เต็มที่ ชนิดที่สำคัญคือสารยับยั้งเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีนพบในถั่วต่าง ๆ และเมล็ดพืชน้ำมัน ธัญพืช เป็นต้น ซึ่งส่วนใหญ่ถูกทำลายด้วยความร้อน

สารต้านโภชนาการไฟเตท

ไฟเตท (phytate) คือสารชนิดหนึ่งที่พืชสร้างขึ้น ซึ่งดึงมาจากใบและรากของพืช ในระหว่างที่มีการเจริญเติบโตพบมาก ในพืชในตระกูลถั่ว ธัญพืช และพืชที่ให้น้ำมัน ที่เมล็ดพืชจะมีการสะสมไฟเตทมากเป็นพิเศษ เพราะเป็นแหล่งสะสมแร่ธาตุต่างๆ รวมทั้ งฟอสฟอรัสด้วย เพื่อจะนำแร่ธาตุเหล่านี้มาใช้ในการงอกของเมล็ด รวมทั้งการเจริญเติบโตของพืช อีกทั้งยังเป็นการป้องกันไม่ให้มีการเจริญเติบโตของเชื้อรา ไฟเตทมีคุณสมบัติในการจับกับสารประจุบวกได้ดี เช่น เหล็ก แคลเซียม สังกะสี ฯลฯ ดังนั้น การได้รับไฟเตทในปริมาณมากจะส่งผลกระทบต่อการดูดซึมและการนำไปใช้ของสารอาหารจำพวกแร่ธาตุ ถึงกระนั้นก็ตาม การทำลายไฟเตทค่อนข้างเป็นไปได้ยากแม้แต่การใช้ความร้อนก็ทำให้ไฟเตทสลายไปน้อยมาก ซึ่งในการนำผลิต ภัณฑ์จากพืชมาใช้มาใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตอาหารสัตว์นั้นมีงานทดลองก่อนหน้านี้ร ายงานว่าการเติม phytase ผสมในอาหารเพื่อลดปริมาณ phytate จากกากถั่วเหลืองมีผลดีต่อการเจริญเติบโตของปลาซีบรีม (Biswas และคณะ, 2007)

ค่า digestibility

ค่า digestibility คืออัตราส่วนของอาหารหรือสารอาหารที่สัตว์ทดลองสามารถย่อย และดูดซึมไปใช้ได้ที่ภาวะปกติ ค่า digestibility เป็นค่าที่ใช้ในการศึกษาความสามารถในการย่อยของสัตว์ทดลอง และศึกษาถึงประสิทธิภาพของอาหาร ในการศึกษาก่อนหน้านี้ใน กุ้งขาวนั้นก็มีการศึกษาถึงค่า apparent protein digestibility หรือค่าของความสามารถในการย่อยโปรตีนในอาหาร (Akiyama และคณะ, 1989)

เอนไซม์ protease

เอนไซม์ protease คือกลุ่มของเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติในการย่อยโปรตีนโดยการสลายพันธะเปปไทด์ที่เชื่อมกรดอะมิโนแต่และชนิดไว้ด้วยกัน พบได้ในกระเพาะของสัตว์แทบทุกชนิด ในกุ้งขาวนั้นเอนไซม์ protease จะถูกสร้างจาก hepatopancreas และส่งมายังกระเพาะอาหารเพื่อทำหน้าที่ย่อยโปรตีน มีการทดลองก่อนหน้านี้ได้รายงานว่าอาหารที่กุ้งกินนั้นส่งผลต่อความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ protease ของกุ้ง (Ezquerra และคณะ, 1997)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การวางแผนการทดลองแทนที่กากถั่วเหลืองด้วยวัตถุดิบผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมอาหารในอาหารเลี้ยงกุ้งขาวแบ่งการทดลองเป็น 4 ส่วน คือ ส่วนแรกเป็นการวิเค ราะห์วัตถุดิบและผลิตอาหารกุ้ง รวบรวมวัตถุดิบจากแหล่งต่างๆ นำวัตถุดิบไปวิเคราะห์ ณ ห้องปฏิบัติการ ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อคำนวณและนำมาผลิตอาหารกุ้ง ส่วนที่ 2 เป็นการทดลองเลี้ยงกุ้งขาวและศึกษาการเจริญเติบโต ทดลองที่ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ส่วนที่ 3 คือการศึกษาค่า digestibility ของอาหารกุ้งแต่ละชนิดที่ทำการทดลอง และส่วนสุดท้ายคือการ ศึกษาการทำงานของเอนไซม์ protease ของกุ้งที่กินอาหารแต่ละชนิดที่ทำการทดลอง

1 การวิเคราะห์วัตถุดิบและผลิตอาหารกุ้ง

ในขั้นตอนการวิเคราะห์วัตถุดิบ สิ่งที่ทำการวิเคราะห์เพื่อนำมาปร ะเมินศักยภาพของวัตถุดิบแต่ละชนิดได้แก่ปริมาณโปรตีนในวัตถุดิบ องค์ประกอบของกรดอะมิโนในวัตถุดิบ และปริมาณสารต้านโภชนาการ phytate นำค่าปริมาณโปรตีนในวัตถุดิบ แต่ละชนิดมาคำนวณสูตรอาหารเพื่อให้ได้สูตรอาหารที่มีปริมาณโปรตีนใกล้เคียงกัน จากนั้นจึงผลิตอาหารกุ้งที่ใช้ในการทดลองมาตามสูตร

1.1 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

นำวัตถุดิบไปวิเคราะห์หาปริมาณความชื้นด้วยวิธี oven - drying และวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Kjeldahl method ตามวิธีการของ AOAC (1995) ดังแสดงในภาคผนวก

1.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดอะมิโน

เตรียมวัตถุดิบเพื่อวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนด้วยวิธีการย่อยด้วยกรดโดยชั่งวัตถุดิบ 0.04 กรัม ลงในหลอด vacuum hydrolysis ขนาด 19 × 100 มิลลิเมตร (Kontes, Vineland, New Jersey, USA) จากนั้นเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 6 M (ที่มีฟีนอล 0.1% w/v ผสมอยู่) 4 มิลลิลิตร ผ่านก๊าซไนโตรเจนลงในหลอดเป็นเวลา 10 นาที ดูดอากาศออกจากหลอดด้วยเครื่องปั๊มสุญญากาศ นำหลอดแก้วดังกล่าวไปอบที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียสเป็นเวลา

24 ชั่วโมง จากนั้นตั้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับ pH ของสารละลายให้ได้ 2-3 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 6 M ปรับปริมาตรเป็น 5 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น แล้วกรองสารสกัดที่ได้ผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 นำสารสกัดที่ได้ไปทำปฏิกิริยากับ Waters AccQ. reagent (Waters, USA) จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดด้วยเครื่อง HPLC (AccQ. Taq method; Waters, USA) โดยใช้คอลัมน์ Waters AccQ-Tag amino acid analysis column ขนาด 3.9 x 150 มิลลิเมตร ใช้เฟสเคลื่อนที่ คือ acetonitrile 60% v/v และ AccQ. Tag Eluent A concentrate ซึ่งใช้ระบบ gradient ในการทำงาน อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที วิเคราะห์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

1.3 วิเคราะห์หาปริมาณสารต้านโภชนาการ phytate

นำวัตถุดิบแต่ละชนิดมาวิเคราะห์หาปริมาณสารต้านโภชนาการ phytate ตามวิธี Kongkachuichai (2008) โดยนำวัตถุดิบที่จะวิเคราะห์ไปอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมงเพื่อหาน้ำหนักคงที่จากนั้นนำวัตถุดิบไปบดด้วยเครื่องบดเมล็ดกาแฟ (Kenwood CG 100) นำตัวอย่างที่บดแล้วประมาณ 0.5 กรัมมาสกัดด้วยกรดไฮโดรคลอลิคความเข้มข้น 0.67 M ปริมาตร 5 มิลลิตร ในเครื่อง ultrasonic bath (Model 1510E-MT Bransonic) เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทำการปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (Himag centrifuge CR5B2 Hitachi) ด้วยความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสมาเจือจางด้วย deionized water ปริมาตร 22.5 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ไปผ่าน anion exchange column (WAT023620, Sep-Pak Vac 1 cm^3 Water Accell Plus QMA, Water, Milford, MA) ละลายล้างออกด้วยกรดไฮโดรคลอลิคความเข้มข้น 2 M ปริมาตร 4 มิลลิลิตรนำไประเหยด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงระเหย (Model CVE-2000; EYELA, Tokyo Rikakikai Co. Ltd.) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสนำส่วนตะกอนที่เหลืออยู่ไปละลายใน deionized water ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณ phytate ด้วยวิธี reverse phase HPLC โดยใช้ คอลัมน์ C18 (Atlantis dC18) ขนาด 4.6 x 150 มิลลิเมตร เฟสเคลื่อนที่คือ เมททานอล : น้ำกลั่น ที่อัตราส่วน 3:2 อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 0.8

มิลลิลิตรต่อนาที ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสปริมาณของ phytate ที่ถูกละลายล้างออกมาจะถูกวัดด้วยเครื่อง refractive index detector (Waters IR 2414)

1.4 **คำนวณสูตรอาหารและผลิตอาหารกุ้ง**

นำค่าปริมาณโปรตีน ที่ได้จากการวิเคราะห์ม าคำนวณสูตรอาหาร โดยใช้สูตรอาหารกุ้งขาวโปรตีน 35% ของศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางเทคโนโลยีชีวภาพวิทยาศาสตร์ทางทะเลเป็นสูตรควบคุม คำนวณสูตรอาหารให้ทุกสูตรมีค่าปริมาณโปรตีนใกล้เคียงกันโดยปรับปริมาณอัตราส่วนของโปรตีนด้วยวัตถุดิบที่นำมาใช้แทนที่กากถั่วเหลือง วีท กลูเ ต็น และ แป้งสาลีเท่านั้น แหล่งโปรตีนอื่นในสูตรได้แก่ ปลาป่น หัวกุ้งป่น และ หมึกป่นใช้ในปริมาณที่เท่ากันในทุกๆสูตร ผลิตอาหารกุ้งโดย ในการผลิตอาหารกุ้งวัตถุดิบทั้งหมดจะถูกผสมให้เข้ากันโดยใช้มือคลุกจากนั้นนำไปเข้าเครื่องอัดเม็ดโดยให้ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของอาหา ร เท่ากับ 2 มิลลิเมตรจากนั้นนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมงใส่ถุงปิดสนิทเก็บที่อุณหภูมิห้อง นำอาหารไปทดสอบการยอมรับของกุ้งและทดสอบความคงตัวในน้ำโดยความเหมาะสมของอาหารจะต้องสามารถคงอยู่ในน้ำได้นานเกิน 30 นาที

2 **การทดลองเลี้ยงกุ้งขาว**

ในขั้นตอนการทดลองเลี้ยงกุ้งจะทำการปรับสภาพกุ้งให้คุ้นเคยกับสภาวะที่ใช้ในการทดลองและทดลองเลี้ยงกุ้งด้วยอาหารที่ผลิตขึ้นมาทั้งหมด 4 สูตรเป็นเวลา 1 เดือนวัดอัตารอด น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น ความยาวที่เพิ่มขึ้น และวิเคราะห์ผลทางสถิติ

2.1 **สถานที่/ระยะเวลาดำเนินการทดลอง**

ดำเนินการทดลองที่ โรงเรือนเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เริ่มทดลองในช่วงเดือนมกราคม - กุมภาพันธ์ พ .ศ. 2553 ใช้ระยะเวลาในการปรับสภาพสัตว์ทดลอง 15 วัน และทดลองเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน

2.2 สัตว์ทดลอง

ลูกกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) อายุ 15 วัน (PL15) ซื้อจากฟาร์มกุ้งในตำบลบางกรูด อำเภอบ้านโพธิ์ จังหวัดฉะเชิงเทรา ในวันที่ 14 มกราคม พ.ศ. 2553 มาทำการปรับสภาพให้คุ้นเคยกับสภาพแวดล้อมที่ใช้ทำการทดลอง จนได้อายุ 1 เดือน (PL30)

2.3 การทดลองเลี้ยง

คัดเลือกลูกกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) อายุ 1 เดือนที่ขนาดใกล้เคียงกันนำมาชั่งน้ำหนักและวัดความยาว สุ่มปล่อยลูกกุ้งลงในถังทดลองขนาด 100 ลิตร ทั้งหมด 3 ชุดทดลอง ชุดทดลองละ 3 ซ้ำ
โดยมีชุดการทดลองดังนี้

ชุดที่ 1 ชุดการทดลองควบคุมหรือชุดการทดลองที่ใช้กากถั่วเหลือง

ชุดที่ 2 ชุดการทดลองที่ใช้สูตรอาหารที่แทนที่ด้วยกากเมล็ดทานตะวัน

ชุดที่ 3 ชุดการทดลองที่ใช้สูตรอาหารที่แทนที่ด้วยกากยีสต์

ชุดที่ 4 ชุดการทดลองที่ใช้สูตรอาหารที่แทนที่ด้วยกากมอลต์

โดยมีอัตราการปล่อยกุ้ง 50 ตัวต่อถัง คุณ ภาพน้ำที่ควบคุมตลอดการทดลองคือ ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) 7.5-8.5 อุณหภูมิอยู่ในช่วง 28-32 องศาเซลเซียส ความเค็ม 10 ppt แอมโมเนียรวม 0 - 0.48 มิลลิกรัมต่อลิตร การให้อาหารจะให้ 5 % ต่อน้ำหนักตัวกุ้ง จำนวน 3 มื้อต่อวัน ที่เวลา 09.00 น. 13.00 และ 17.00 น. เก็บอาหารที่เหลือและมูลกุ้งหลังให้อาหาร 2 ชม.ปรับเพิ่มลดปริมาณอาหารที่ให้ตามอาหารที่เหลือ ทำการทดลองเลี้ยงกุ้งเป็นเวลา 1 เดือนบันทึกการเติบโตโดยการชั่งน้ำหนักและวัดความยาวเพื่อหาน้ำหนักและความยามวเฉลี่ยของกุ้ง คำนวณหาอัตรารอดของกุ้งในแต่ละซ้ำการทดลองดังสมการต่อไปนี้

$$\% \text{ อัตรารอด} = \frac{\text{จำนวนกุ้งหลังทำการทดลอง}}{\text{จำนวนกุ้งเริ่มต้น}} \times 100$$

วิเคราะห์ผลการทดลองด้วยวิธี one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's new multiple range test ที่ค่าความเชื่อมั่น 95%

3 การศึกษาค่า digestibility

นำมูลกุ้งที่เก็บสะสมในตลอดช่วงการทดลองของแต่ละซ้ำไปอบที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมงชั่งน้ำหนักหาปริมาณที่แน่นอนเพื่อนำไปคำนวณหาปริมาณโปรตีนในมูลกุ้งด้วยวิธี Kjeldahl method ตามวิธีการของ AOAC (1997) นำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาค่า digestibility ตามวิธีของ Gabuadan (1986) ดังสมการ

$$\text{apparent digestibility (\%)} = \frac{\text{(ingested nutrient – fecal nutrient)}}{\text{ingested nutrient}} \times 100$$

4 การศึกษาการทำงานของเอนไซม์ protease

ในขั้นตอนนี้จะทำการผ่าเก็บ hepatopancreas จากกุ้งที่ทำการทดลองมาเพื่อสกัดเอนไซม์ protease เพื่อนำ crude enzyme ที่ได้ไปศึกษาการทำงานด้วยวิธีที่ดัดแปลงจาก Garcia และ Haard (1993)

4.1 การสกัดเอนไซม์ protease

หลังเสร็จการทดลองเลี้ยงทำการผ่ากุ้งเพื่อเก็บ hepatopancreas จากกุ้งในแต่ละซ้ำ ให้ได้ประมาณ 2 – 3 กรัมต่อซ้ำทำการสกัด protease ตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Garcia และ Haard (1993) โดยนำ hepatopancreas ของกุ้งมาบดให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วย homogenizer โดยเติมสารละลายบัฟเฟอร์ PBS (phosphate buffered saline) วิธีการเตรียมแสดงใน ภาคผนวก pH 7.5 ในอัตราส่วนบัฟเฟอร์ 2 มิลลิลิตรต่อ hepatopancreas 1 กรัม โดยในขั้นตอนการบดจะบดในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตรที่ใส่อยู่ในถังใส่น้ำแข็งบดจน hepatopancreas กับสารละลายเข้ากันเป็นเนื้อเดียวกันใช้ไมโครปิเปตดูดเก็บ crude enzyme ที่สกัดได้ ย้ายไปยังหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ เก็บ crude enzyme ที่สกัดมาจากแต่ละซ้ำ ไว้ในตู้แช่ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

4.2 การศึกษาการทำงานของเอนไซม์ protease

นำเอนไซม์ protease ที่สกัดในในแต่ละซ้ำการทดลองมาทดสอบการทำงานโดยวิธีที่ดัดแปลงจาก Garcia และ Haard (1993) โดยใช้ 1% azocasein เป็นสารตั้งต้นเตรียมโดยละลาย azocasein ในสารละลายบัฟเฟอร์ TRIS pH 7.5 ความเข้มข้น 50 mM โดยขั้นตอนการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ protease นั้นเริ่มจากใส่ crude enzyme ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตรลงในสารละลายบัฟเฟอร์ TRIS pH 7.5 ปริมาตร 4.2 มิลลิลิตรในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตรเริ่มปฏิกิริยาโดยใส่สารละลาย 1% azocasein ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตรลงในหลอดนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาทีจากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 20% TCA (Trichloroacetic acid) ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตรเตรียมชุดควบคุมของแต่ละปฏิกิริยาโดยใส่ 20% TCA ก่อนใส่สารตั้งต้น หลังจากหยุดปฏิกิริยา นำไปปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 15,000 g เป็นเวลา 5 นาทีดูดสารละลายส่วนใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร คำนวณหาความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ protease จากการลดลงของค่าการดูดกลืนแสงที่เกิดขึ้นจากการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์จากนั้น วัดปริมาณโปรตีนของ crude enzyme ด้วยวิธี Lowry (1951) ดังแสดงในภาคผนวก เพื่อคำนวณ อัตราการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ต่อ 1 มิลลิกรัมโปรตีน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

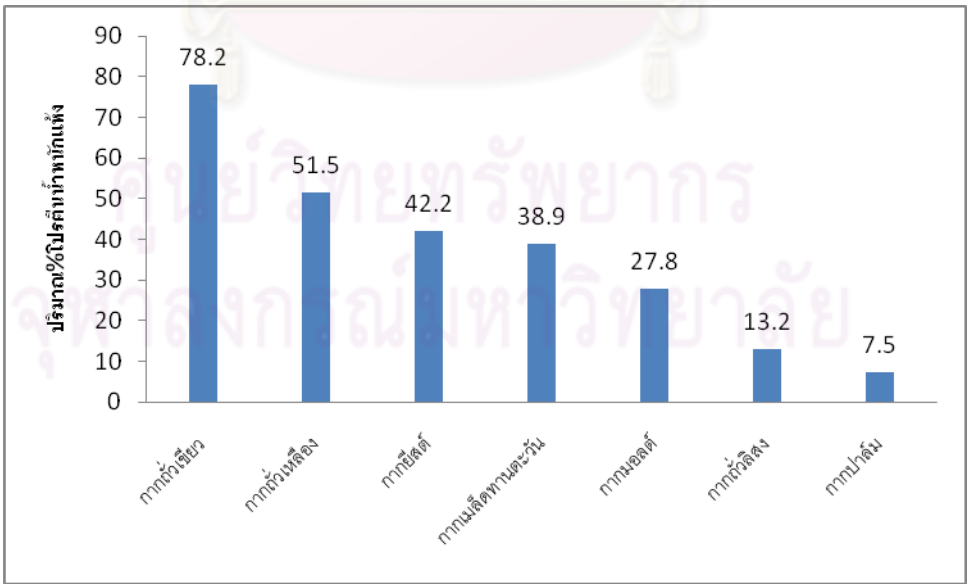
บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. การวิเคราะห์วัตถุดิบและผลิตอาหารกุ้ง

1.1 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในวัตถุดิบ

วิเคราะห์หา ปริมาณโปรตีนในวัตถุดิบที่รวบรวมมาจากแหล่งต่างๆ เปรียบเทียบกับกากถั่วเหลือง เพื่อประเมินความเป็นไปได้ในการนำมาใช้แทนที่กากถั่วเหลืองในการผลิตอาหารกุ้งขาวและวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในวัตถุดิบอื่นๆ เพื่อนำไปใช้ในการคำนวณสูตรอาหาร โดยวัตถุดิบที่รวบรวมมาเพื่อนำใช้แทนที่กากถั่วเหลืองได้แก่ กากเมล็ดทานตะวัน กากยีสต์ กากมอลต์ กากถั่วเขียว กากถั่วลิสง และ กากปาล์ม พบว่ากากถั่วเขียวมีปริมาณโปรตีน สูงสุดมากกว่ากากถั่วเหลือง ตามด้วยกากถั่วเหลือง กากยีสต์ กากเมล็ดทานตะวัน กากมอลต์ กากถั่วลิสง และ กากปาล์มตามลำดับ ดังรูปที่ 1 และปริมาณโปรตีนของวัตถุดิบ แหล่งโปรตีน ที่ใช้ในสูตรอาหาร ได้แก่ ปลาป่น กากถั่วเหลือง กากยีสต์ กากเมล็ดทานตะวัน หัวกุ้งป่น หมึกป่น กากมอ ลต์ แป้งสาลี และ วีท กลูเต็น ดังแสดงในตารางที่ 1



รูปที่ 1 ปริมาณโปรตีนต่อน้ำหนักแห้งในวัตถุดิบชนิดต่างๆคำนวณจาก conversion factor = 6.25

ตารางที่ 1 ปริมาณโปรตีนในวัตถุดิบแหล่งโปรตีนในสูตรอาหารคำนวณจาก conversion factor = 6.25

	%ความชื้น	%โปรตีนต่อน้ำหนักแห้ง	%โปรตีนต่อน้ำหนักสด
ปลาป่น	15.5	57.7	48.7
กากถั่วเหลือง	11	51.5	45.8
กากยีสต์	4	42.2	40.5
กากเมล็ดทานตะวัน	8	38.9	35.8
หัวกุ้งป่น	7	32.8	30.5
หมึกป่น	17.5	69.9	57.6
กากมอลต์	6	27.9	26.2
แป้งสาลี	12.5	12.0	10.5
วีท กลูเต็น	8.5	77.2	70.6

1.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดอะมิโน

ผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนด้วยเครื่อง HPLC ในวัตถุดิบ 5 ชนิดได้แก่ ปลาป่น กากถั่วเหลือง กากยีสต์ กากมอลต์ และ กากเมล็ดทานตะวัน มีกรดอะมิโนที่วิเคราะห์ได้ทั้งหมด 16 ชนิดได้แก่ aspartic acid, serine, glutamic acid, glycine, histidine, arginine, threonine, alanine, cyteine, valine, methionine, lysine, isoleucine, leucine, phenylalanine และ tryptophan ซึ่งในกรดอะมิโนทั้งหมด 16 ชนิดนี้ มีกรดอะมิโนที่จำเป็นสำหรับการผลิตอาหารกุ้งขาว 10 ชนิด (Akiyama and Tan, 1991) คือ tryptophan, methionine, valine, lysine, isoleucine, leucine, phenylalanine, threonine, histidine และ arginine ผลการวิเคราะห์กรดอะมิโนที่จำเป็นทั้งหมด 10 พบว่าปลาป่นมีปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็นรวมสูงที่สุดตามด้วยกากยีสต์ กากถั่วเหลือง กากเมล็ด ทานตะวัน และ กากมอลต์ตามลำดับ จากการวิเคราะห์พบว่าในวัตถุดิบทุกชนิดที่เป็นผลิตภัณฑ์จากพืชจะมีปริมาณของกรดอะมิโน methionine น้อยกว่า

ในปลาป่น กากมอลต์และกากเมล็ดทานตะวันมีปริมาณของกรดอะมิโน lysine และ phenylalanine น้อยกว่ากากถั่วเหลืองและในกากมอลต์มีปริมาณกรดอะมิโน valine น้อยกว่ากากถั่วเหลือง ดังแสดงในตารางที่ 2

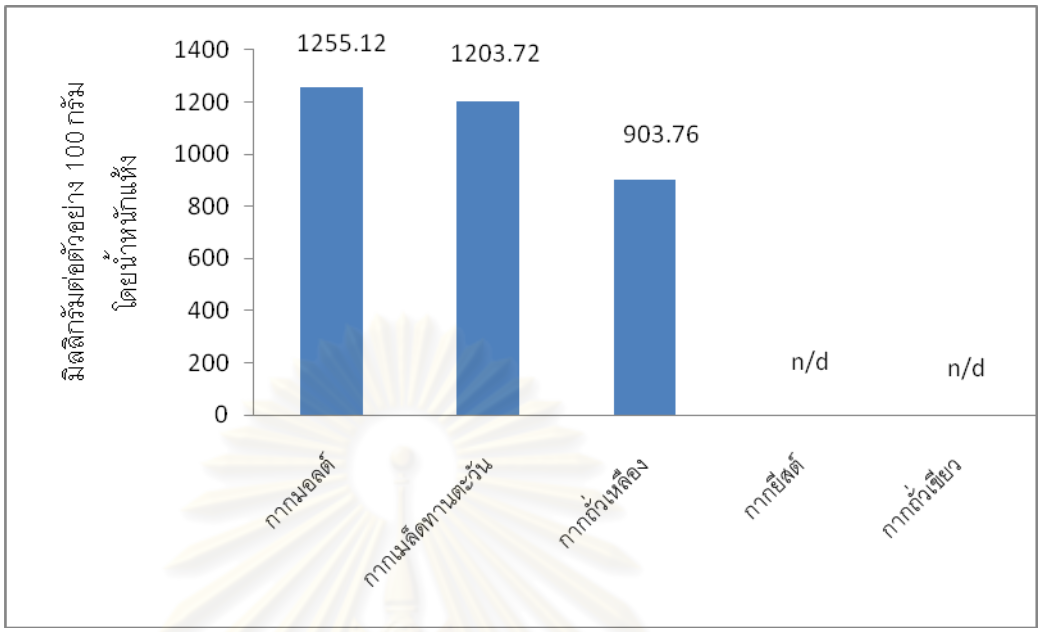
ตารางที่ 2 ปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็นสำหรับการผลิตอาหารกุ้งขาวในวัตถุดิบ (มิลลิกรัมต่อตัวอย่าง 100 กรัมโดยน้ำหนักแห้ง)

	ปลาป่น	กากถั่วเหลือง	กากยีสต์	กากมอลต์	กากเมล็ดทานตะวัน
tryptophan	44.95	35.61	28.12	13.85	22.61
methionine	14.72	7.42	9.53	5.50	8.07
valine	1.14	1.34	4.10	0.34	2.41
lysine	15.87	10.87	15.03	4.42	5.66
leucine	29.67	26.91	29.36	15.79	26.65
isoleucine	44.89	39.10	37.48	25.00	23.75
phenylalanine	5.86	2.14	2.11	0.40	0.81
threonine	219.82	119.01	188.20	90.31	93.73
histidine	32.41	23.29	55.45	13.83	22.52
arginine	15.10	9.55	40.86	3.72	9.85
total	424.43	275.24	410.23	173.18	216.06

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.3 การวิเคราะห์หาปริมาณสารต้านโภชนาการ phytate

ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารต้านโภชนาการ phytate ด้วยเครื่อง HPLC ในวัตถุดิบ 5 ชนิดได้แก่ กากถั่วเหลือง กากยีสต์ กากมอลต์ กากถั่วเขียว และ กากเมล็ดทานตะวัน พบว่ากากมอลต์มีปริมาณของ phytate สูงที่สุดตามด้วย กากเมล็ดทานตะวัน และ กากถั่วเหลืองในขณะที่กากยีสต์ และ ก ากถั่วเขียวไม่พบ phytate ในปริมาณที่ตรวจวัดได้ดังแสดงในรูปที่ 2



รูปที่ 2 ปริมาณ phytate ในวัตถุดิบที่จะนำมาใช้แทนที่กากถั่วเหลืองในอาหารกุ้งขาว (มิลลิกรัมต่อตัวอย่าง 100 กรัมโดยน้ำหนักแห้ง)

1.4 การคำนวณสูตรอาหารและผลิตอาหารกุ้ง

ในการคำนวณสูตรอา หารใช้สูตรอาหารกุ้งขาวโปรตีน 35% ของศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางเทคโนโลยีชีวภาพ วิทยาศาสตร์ทางทะเล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยเป็นสูตรควบคุมโดย ในการออกแบบอาหารสูตรทดลองจะใช้กากยีสต์ และ กากเมล็ดทานตะวันแทนที่กากถั่วเหลืองทั้งหมดในสูตรอาหารและใช้กากมอลต์ที่มีปริมาณโปรตี นต่ำกว่าแทนที่กากถั่วเหลืองครึ่งหนึ่งของปริมาณที่ใช้ในสูตรควบคุม คำนวณสูตรอาหารให้ทุกสูตรมีค่าปริมาณโปรตีนใกล้เคียงกันโดยปรับปริมาณ อัตราส่วน ของโปรตีนด้วย วัตถุดิบที่นำมาใช้แทนที่กากถั่วเหลือง วีท กลูเต็น และ แป้งสาลีเท่านั้น แหล่งโปรตีนอื่นในสูตรได้แก่ ปลาป่ น หัวกุ้งป่น และ หมึกป่นใช้ในปริมาณที่เท่ากันในทุกๆสูตร ได้สูตรอาหารทั้งหมด 4 สูตรโดยสูตรที่ใช้กากถั่วเหลืองเป็นสูตรควบคุมมีปริมาณโปรตีนในสูตร 35.29% สูตรอาหารที่แทนที่ด้วยกากยีสต์ มีปริมาณโปรตีนในสูตร 35.19% สูตรอาหารที่แทนที่ด้วยกากเมล็ดทานตะวัน มีปริมาณ โปรตีน 35.20% และ สูตรอาหารที่แทนที่ด้วย กากมอลต์มีปริมาณโปรตีน 35.13% ดังแสดงในตาราง

ตารางที่ 3 สูตรอาหารชุดควบคุมและชุดทดลองแทนที่กากถั่วเหลือง

	ร้อยละของน้ำหนักวัตถุดิบในอาหารทดลอง (%)			
	SBM	BY	SFM	BM
กากถั่วเหลือง	30			15
กากยีสต์		34		
กากเมล็ดทานตะวัน			38	
กากมอลต์				27
วีท กลูเต็น	6.5	7	8	8
แป้งสาลี	23.5	19	14	10
ปลาป่น	22.5	22.5	22.5	22.5
หมึก	4	4	4	4
หัวกุ้ง	4	4	4	4
น้ำมันปลา	3	3	3	3
Lecithin	1	1	1	1
Cholesterol	0.5	0.5	0.5	0.5
Vitamin C	0.5	0.5	0.5	0.5
Vitamin mixture*	1.5	1.5	1.5	1.5
Mineral mix**	2	2	2	2
Chromic Oxide	1	1	1	1
รวม	100	100	100	100

*คอมพลีท ดีวี จากบริษัท โคเดล (ประเทศไทย) จำกัด (ใน 1 kg ประกอบด้วย วิตามิน เอ 10,000,000 IU วิตามิน ดี 3 1,000,000 IU วิตามิน อี 10,000 มก. วิตามิน เค 3 1,000 มก. วิตามิน บี 500 มก. วิตามิน บี 2 5,000 มก. วิตามิน บี 6 1,500 มก. วิตามิน ซี 10,000 มก. โฟเลท 1,000 มก. ดีแอลเมทไธโอนีน 16,038 มก.)

**แคล พลัส จากบริษัท โคเดล (ประเทศไทย) จำกัด (ใน 1 kg ประกอบด้วย แคลเซียม 147 กรัม ฟอสฟอรัส 147 กรัม เหล็ก 2,010 มก. ทองแดง 3,621 มก. สังกะสี 6,424 มก. แมงกานีส 10,062 มก. โคบอลต์ 105 มก. ไอโอดีน 1,000 มก. ซีลีเนียม 60 มก.)

นำอาหารที่ผลิตไปวัดปริมาณโปรตี นพบว่าปริมาณโปรตีนของอาหารที่ผลิตได้มีค่าต่ำกว่าที่คำนวณไว้เล็กน้อยโดยสูตรควบคุมกากถั่วเหลืองมีปริมาณโปรตีนในอาหารต่ำกว่าที่คำนวณไว้ 1.15 % สูตรทดลองที่แทนที่ด้วยกากยีสต์มีปริมาณโปรตีนต่ำกว่าที่คำนวณไว้ 2 % สูตรทดลองที่แทนที่ด้วยกากเมล็ดทานตะวันมีปริมาณโปรตีนต่ำกว่าที่คำนวณไว้ 0.59 % และสูตรทดลองที่แทนที่ด้วยกากมอลต์มีปริมาณโปรตีนต่ำกว่าที่คำนวณไว้ 0.46 % ดังแสดงในตาราง

ตารางที่ 4 ปริมาณโปรตีนที่คำนวณได้ในสูตรอาหารและปริมาณโปรตีนที่วัดได้

	โปรตีนที่คำนวณได้ในสูตร (%)	โปรตีนที่วัดได้ (%)
SBM	35.29	34.14
BY	35.19	33.19
SFM	35.20	34.62
BM	35.13	34.67

หมายเหตุ

SBM = อาหารชุดควบคุม (กากถั่วเหลือง)

BY = อาหารชุดทดลองสูตรแทนที่ด้วยกากยีสต์

SFM = อาหารชุดทดลองสูตรแทนที่ด้วยกากเมล็ดทานตะวัน

BM = อาหารชุดทดลองสูตรแทนที่ด้วยกากมอลต์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ในการผลิตอาหารกุ้งวัตถุดิบทั้งหมดจะถูกผสมให้เข้ากันโดยใช้มือคลุกจากนั้นนำไปเข้าเครื่องอัดเม็ดโดยให้ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของอาหารเท่า ากับ 2 มิลลิเมตร จากนั้นนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมงใส่ถุงปิดสนิทเก็บที่อุณหภูมิห้อง นำอาหารกุ้งไปทดสอบการยอมรับของกุ้งพบว่ากุ้งมีพฤติกรรมกินอาหารที่ผลิตเช่นเดียวกับอา หารกุ้งที่มีจำหน่ายทั่วไปในตลาด และนำไปทดสอบการคงตัวในน้ำพบว่าอาหารสามารถคงตัวในน้ำได้เกิน 30 นาทีดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ความสามารถในการคงตัวในน้ำของอาหารกุ้งที่ผลิต

	15 นาที	30 นาที	1 ชั่วโมง
อาหารสูตรควบคุม (กากถั่วเหลือง)	คงตัว	คงตัว	คงตัว
อาหารสูตรทดลอง (กากยีสต์)	คงตัว	คงตัว	คงตัว
อาหารสูตรทดลอง (กากเมล็ดทานตะวัน)	คงตัว	คงตัว	คงตัว
อาหารสูตรทดลอง (กากมอลต์)	คงตัว	คงตัว	คงตัว

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. การทดลองเลี้ยงกุ้งขาว

2.1 การเตรียมน้ำสำหรับเลี้ยงกุ้งขาว

เตรียมน้ำที่ใช้เลี้ยงโดยผสมจากน้ำทะเลเข้มข้นกับน้ำเปล่าให้ได้ความเค็ม 10 ppt ในแต่ละถังจะมีระบบกรองที่ผลิตเองโดยใช้เปลือกหอยนางรมและใยกรองเป็นวัสดุกรองให้อากาศจากปั๊มลม 1 หัวทรายต่อหนึ่งถังโดยเตรียมน้ำก่อนการทดลองเป็นเวลา 3 สัปดาห์ ในช่วงที่เตรียมน้ำใส่อาหารกุ้งสูตรที่มีขายในท้องตลาดลงไปในแต่ละถังประมาณถังละ 2 กรัมเพื่อให้เป็นอาหารของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในวันที่เริ่มทำการทดลอง ค่าแอมโมเนียของแต่ละถังมีค่าไม่เกิน 0.48 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเค็ม 10 ppt และค่าความเป็นกรดด่าง (pH) อยู่ในช่วง 7.5-8.5 ในทุกถัง

2.2 การปล่อยกุ้งลงถังทดลอง

ในการปล่อยกุ้งลงถังทดลองจะปล่อยที่อัตรา 50 ตัวต่อหนึ่งถังโดยก่อนปล่อยจะคัดกุ้งที่มีขนาดใกล้เคียงกัน ให้ได้ปริมาณเยอะที่สุดจากนั้นทำการชั่งน้ำหนักและวัดความยาวของกุ้งเพื่อหาน้ำหนักเฉลี่ย และ ความยาวเฉลี่ย ของกุ้งก่อนทำการทดลอง โดยค่าที่ได้คือน้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งก่อนทำการทดลองมีค่าเท่ากับ 0.026 (± 0.003) กรัม และมีความยาวเฉลี่ย 1.71 (± 0.06) เซนติเมตร

2.3 อัตรารอดของกุ้ง

หลังจากทำการทดลองเป็นเวลา 1 เดือนนับจำนวนกุ้งที่เหลืออยู่ในแต่ละถังเพื่อนำมาคำนวณหาอัตรารอดโดยจำนวนกุ้ง ที่เหลืออยู่โดยเฉลี่ยของสูตรอาหารที่แทนที่ด้วยกากมอลต์มีค่าสูงสุดคือ 29 ตัว สูตรอาหารที่แทนที่ด้วยกากเมล็ดทานตะวันมีจำนวนกุ้งเหลือเฉลี่ย 23 ตัว สูตรอาหารที่แทนที่ด้วยกากยีสต์มีจำนวนกุ้งเหลือเฉลี่ย 22 ตัว และสูตรอาหารชุดควบคุมทีจำนวนกุ้งเหลือเฉลี่ยตัว 21 ซึ่งเมื่อนำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์แล้วพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

นำจำนวนตัวที่เหลือรอดของกุ้งมาคำนวณหาอัตราการรอดตายของกุ้งตลอดระยะเวลาทำการทดลอง 1 เดือนพบว่าอัตรารอดเฉลี่ยของกุ้งที่กินอาหารชุดควบคุมมีค่าน้อยที่สุดคือ 42.7% ตามมาด้วยอัตรารอดเฉลี่ยของกุ้งที่กินอาหารชุดทดลองแทนที่ด้วยกากยีสต์คือ 54.7% อัตรารอดเฉลี่ยของกุ้ งที่กินอาหารชุดทดลองแทนที่ด้วยกากเมล็ดทานตะวันคือ 56.0% และอัตรารอดเฉลี่ยของกุ้งที่กินอาหารชุดทดลองแทนที่ด้วยกากมอลต์มีค่ามากที่สุดคือ 57.3% ซึ่งเมื่อนำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์แล้วพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติดังแสดงในตาราง

ตารางที่ 6 จำนวนกุ้งที่เหลือรอดภายหลังจากการทดลองเป็นเวลา 1 เดือน โดยเฉลี่ยจาก 3 ซ้ำของแต่ละชุดทดลอง ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และอัตรารอดของกุ้ง

	จำนวนกุ้งที่เหลือเฉลี่ย ± SD	อัตรารอด(%)
อาหารสูตรทดลองกากมอลต์	29 ± 7.64[a]	42.7[a]
อาหารสูตรทดลองกากเมล็ดทานตะวัน	23 ± 8.02[a]	54.7[a]
อาหารสูตรทดลองกากยีสต์	22 ± 5.57[a]	56.0[a]
อาหารสูตรควบคุม (กากถั่วเหลือง)	21 ± 4.16[a]	57.3[a]

*ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กแสดงถึงความเหมือนหรือแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่าเฉลี่ยเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT ($P \leq 0.05$)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.4 น้ำหนักของกุ้ง

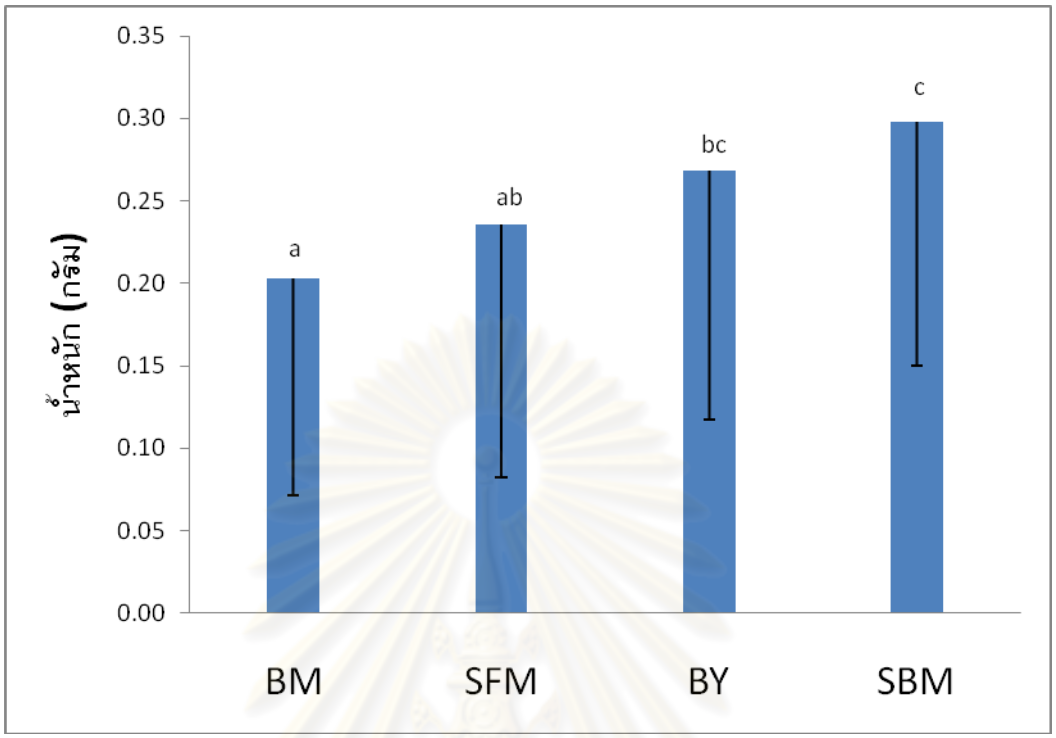
หลังจากทำการทดลองได้ 1 เดือนทำการชั่งน้ำหนักกุ้งทุกตัวที่เหลืออยู่ในแต่ละซ้ำ เผื่อหาค่าน้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งในแต่ละชุดทดลองพบว่าน้ำหนักกุ้งโดยเฉลี่ยของชุดควบคุม มีค่ามากที่สุดคือ 0.298 กรัม ตามมาด้วยน้ำหนักกุ้งโดยเฉลี่ยขอ งชุดทดลองที่แทนที่ด้วยกากยีสต์คือ 0.268 กรัม และตามด้วยน้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งที่มีค่าน้อยกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติคือชุดทดลองที่แทนที่ด้วยกากเมล็ดทานตะวันและกากมอลต์คือ 0.236 กรัมและ 0.203 กรัมตามลำดับดังแสดงในตาราง 7 และรูปที่ 3

ตารางที่ 7 น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งหลังจากทดลองให้อาหารเป็นเวลา 1 เดือน จาก 3 ซ้ำของแต่ละชุดทดลอง ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

	น้ำหนักเฉลี่ย (กรัม) ± SD
อาหารสูตรทดลองกากมอลต์	0.203 ± 0.132^{a}
อาหารสูตรทดลองกากเมล็ดทานตะวัน	0.236 ± 0.154^{ab}
อาหารสูตรทดลองกากยีสต์	0.268 ± 0.151^{bc}
อาหารสูตรควบคุม (กากถั่วเหลือง)	0.298 ± 0.148^{c}

*ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กแสดงถึงความเหมือนหรือแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่าเฉลี่ยเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT ($P \leq 0.05$)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3 น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งจากชุดทดลองละ 3 ซ้ำหลังจากการทดลองให้อาหารเป็นเวลา 1 เดือนโดยมี error bar เท่ากับค่า SDตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กแสดงถึงความเหมือนหรือแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่าเฉลี่ยเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT ($P \leq 0.05$)

หมายเหตุ

BM = ชุดทดลองอาหารสูตรแทนที่ด้วยกากมอลต์

SFM = ชุดทดลองอาหารสูตรแทนที่ด้วยกากเมล็ดทานตะวัน

BY = ชุดทดลองอาหารสูตรแทนที่ด้วยกากยีสต์

SBM = ชุดควบคุม (กากถั่วเหลือง)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

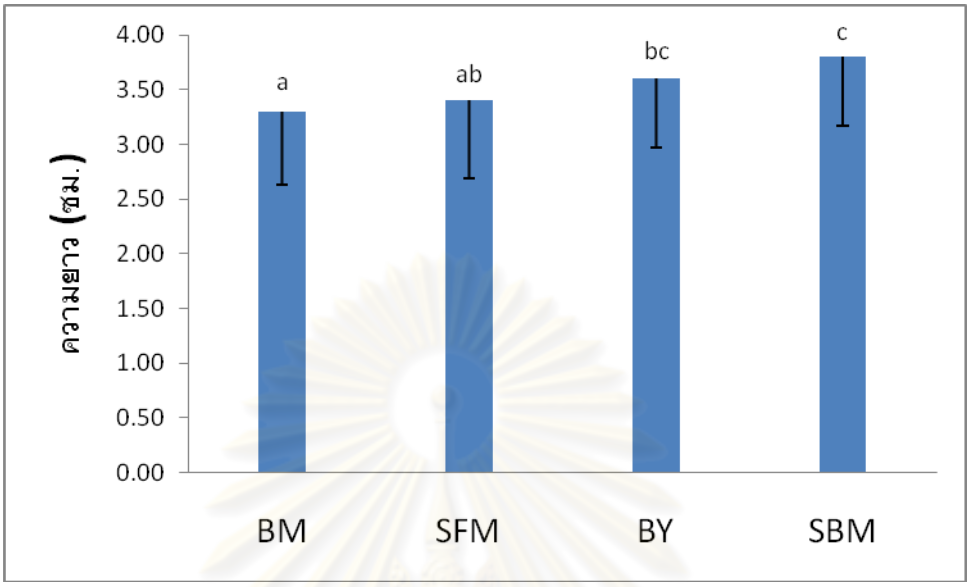
2.4 ความยาวของกุ้ง

หลังจากทำการทดลองได้ 1 เดือนทำการวัดความยาวของกุ้งทุกตัวที่เหลืออยู่ในแต่ละซ้ำเผื่อหาค่าความยาวเฉลี่ ยของกุ้งในแต่ละชุดทดลองพบว่าความยาวกุ้งโดยเฉลี่ยของชุดควบคุมมีค่ามากที่สุดคือ 3.8 เซนติเมตร ตามด้วยความยาวกุ้งโดยเฉลี่ยของชุดทดลองที่แทนที่ด้วยกากยีสต์คือ 3.6 เซนติเมตร และตามด้วยความยาวเฉลี่ยของกุ้งที่มีค่าน้อยกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติคือชุดทด ลองที่แทนที่ด้วยกากเมล็ดทานตะวันและกากมอลต์คือ 3.4 เซนติเมตร และ 3.3 เซนติเมตร ตามลำดับดังแสดงในตาราง 8 และรูปที่ 4

ตารางที่ 8 ความยาวเฉลี่ยของกุ้งหลังจากทดลองให้อาหารเป็นเวลา 1 เดือน จาก 3 ซ้ำของแต่ละชุดทดลอง ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

	ความยาวเฉลี่ย (ซ.ม.) ± SD
อาหารสูตรทดลองกากมอลต์	3.3 ± 0.67^{a}
อาหารสูตรทดลองกากเมล็ดทานตะวัน	3.4 ± 0.71^{ab}
อาหารสูตรทดลองกากยีสต์	3.6 ± 0.63^{bc}
อาหารสูตรควบคุม (กากถั่วเหลือง)	3.8 ± 0.63^{c}

*ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กแสดงถึงความเหมือนหรือแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่าเฉลี่ยเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT ($P \leq 0.05$)



รูปที่ 4 ความยาวเฉลี่ยของกุ้งจากชุดทดลองละ 3 ซ้ำหลังจากการทดลองให้อาหารเป็นเวลา 1 เดือนโดยมี error bar เท่ากับค่า SDตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กแสดงถึงความเหมือนหรือแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่าเฉลี่ยเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธีDMRT ($P \leq 0.05$)

หมายเหตุ

BM = ชุดทดลองอาหารสูตรแทนที่ด้วยกากมอลต์

SFM = ชุดทดลองอาหารสูตรแทนที่ด้วยกากเมล็ดทานตะวัน

BY = ชุดทดลองอาหารสูตรแทนที่ด้วยกากยีสต์

SBM = ชุดควบคุม (กากถั่วเหลือง)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

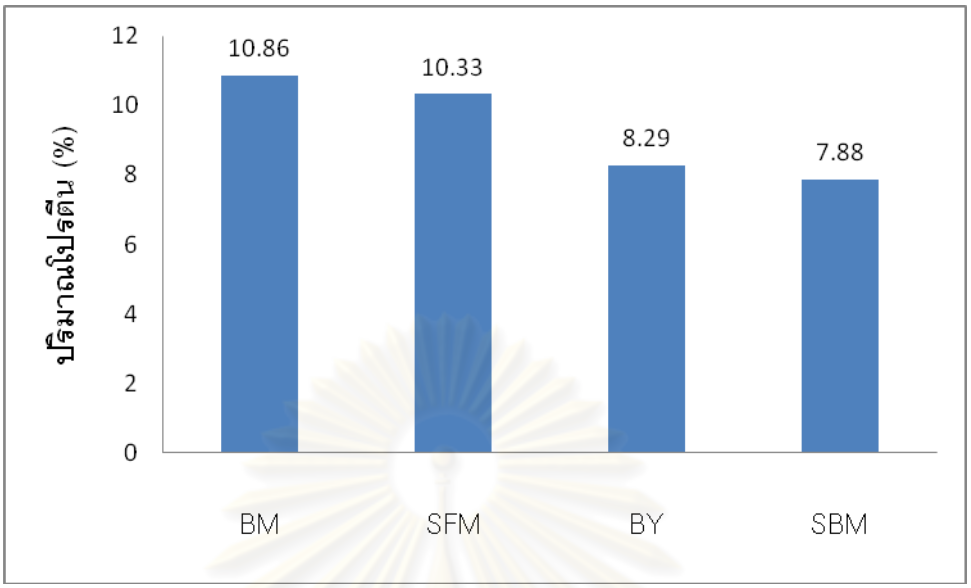
3. **การศึกษาค่า** Digestibility

เก็บมูลกุ้งหลังจากให้อาหารไปแล้ว 2 ชั่วโมงโดยใช้ หลอดหยดดูดเก็บตั้งแต่ วันแรกที่เริ่มทำการทดลองไปจนตลอดระยะเวลาทำการทดลอง 1 เดือนนำมูลกุ้ง ที่รวบรวมได้ในแต่ละชุดทดลอง ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมงนำไปชั่งน้ำหนักได้ผลดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 น้ำหนักแห้งของมูลกุ้งที่เก็บได้ในตลอดการทดลอง จาก 3 ซ้ำรวมกันของแต่ละชุดทดลอง

	น้ำหนัก (กรัม)
ชุดทดลองอาหารสูตรแทนที่ด้วยกากมอลต์	0.335
ชุดทดลองอาหารสูตรแทนที่ด้วยกากเมล็ดทานตะวัน	0.312
ชุดทดลองอาหารสูตรแทนที่ด้วยกากยีสต์	0.297
ชุดควบคุม (กากถั่วเหลือง)	0.359

นำมูลกุ้งไปวัดปริมาณโปรตีนเพื่อนำมาคำนวณหาค่า apparent protein digestibility (Gabuadan, 1986) พบว่าปริมาณโปรตีนในมูลกุ้งที่กินอาหารสูตรทดลองแทนที่ด้วยกากมอลต์มีค่าสูงสุดคือ 10.86% ตามด้วยปริมาณโปรตีนในมูล กุ้งที่กินอาหารสูตรทดลองที่แทนที่ด้วยกากเมล็ดทานตะวันคือ 10.33% ปริมาณโปรตีนในมูลกุ้งที่กินอาหารสูตรทดลองที่แทนที่ด้วยกากยีสต์คือ 8.29% และปริมาณโปรตีนในมูลกุ้งที่กินอาหารสูตรควบคุมมีค่าน้อยที่สุดคือ 7.88% ดังแสดงในรูปที่ 5 และค่า apparent protein digestibility ที่คำนวณได้คือสูตรอาหารชุดควบคุมให้ค่า apparent protein digestibility สูงสุดที่ 76.93% ตามด้วยสูตรทดลองที่แทนที่ด้วยกากยีสต์ที่ 75.03% และสูตรทดลองที่แทนที่ด้วยกากเมล็ดทานตะวันที่ 70.16% โดยสูตรทดลองที่แทนที่ด้วยกากยีสต์มีค่า apparent protein digestibility น้อยสุดที่ 68.66% ดังแสดงในรูปที่ 6



รูปที่ 5 ปริมาณโปรตีนต่อน้ำหนักแห้งในมูลกุ้งที่เก็บสะสมจาก 3 ซ้ำต่อชุดทดลองในตลอดช่วงเวลาทำการทดลองเป็นเวลา 1 เดือนคำนวนโดยใช้ conversion factor = 6.25

หมายเหตุ

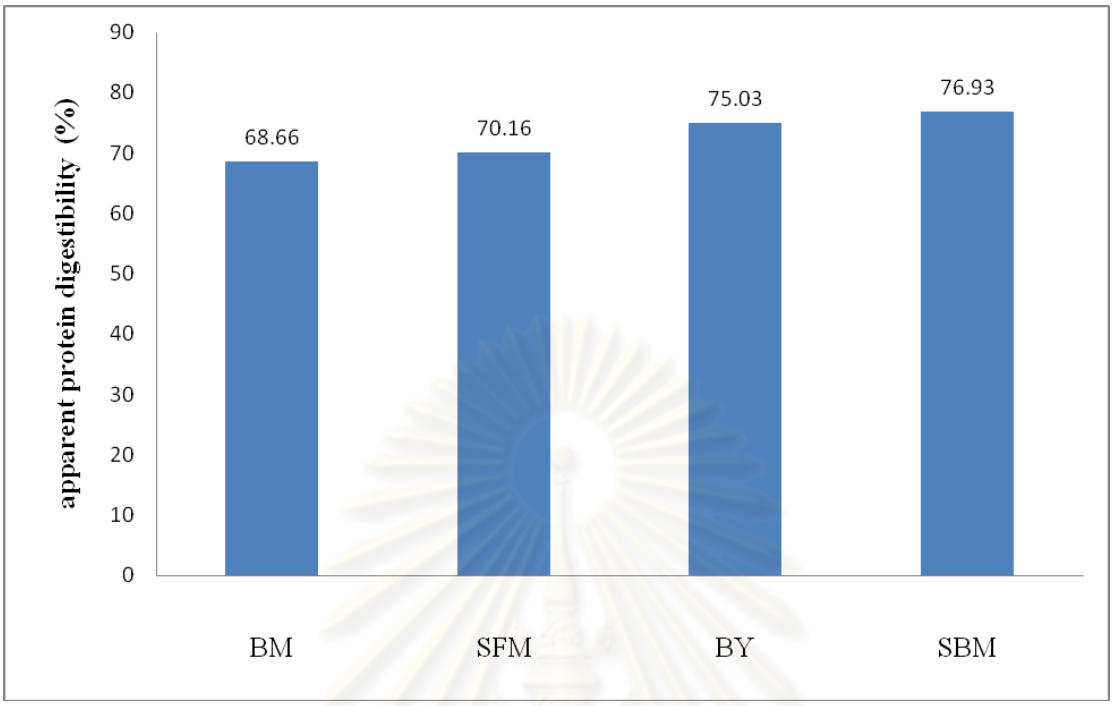
BM = ชุดทดลองอาหารสูตรแทนที่ด้วยกากมอลต์

SFM = ชุดทดลองอาหารสูตรแทนที่ด้วยกากเมล็ดทานตะวัน

BY = ชุดทดลองอาหารสูตรแทนที่ด้วยกากยีสต์

SBM = ชุดควบคุม (กากถั่วเหลือง)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 6 ค่า apparent protein digestibility ของอาหารในแต่ละชุดทดลอง

หมายเหตุ

BM = ชุดทดลองอาหารสูตรแทนที่ด้วยกากมอลต์

SFM = ชุดทดลองอาหารสูตรแทนที่ด้วยกากเมล็ดทานตะวัน

BY = ชุดทดลองอาหารสูตรแทนที่ด้วยกากยีสต์

SBM = ชุดควบคุม (กากถั่วเหลือง)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. **การศึกษาการทำงานของ** protease

4.1 การสกัดเอนไซม์ protease

หลังจากทำการทดลอง 1 เดือนทำการผ่ากุ้งเพื่อเก็บ hepatopancreas ของกุ้งทุกตัวในแต่ละซ้ำของการทดลองเพื่อนำไปสกัด crude enzyme ตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Garcia และ Haard (1993) นำ crude enzyme ที่สกัดได้ในแต่ละซ้ำมาหาความเข้มข้นของโปรตีนด้วยวิธี Lowry (1951) ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ความเข้มข้นของโปรตีน crude enzyme ที่สกัดจาก hepatopancreas ของกุ้งที่ทดลองให้อาหารเป็นเวลา 1 เดือนของแต่ละชุดทดลอง

	ความเข้มข้นของโปรตีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)
ชุดทดลองอาหารสูตรแทนที่ด้วยกากมอลต์	3.81
ชุดทดลองอาหารสูตรแทนที่ด้วยกากเมล็ดทานตะวัน	3.97
ชุดทดลองอาหารสูตรแทนที่ด้วยกากยีสต์	3.66
ชุดควบคุม (กากถั่วเหลือง)	4.16

4.2 การศึกษาการทำงานของเอนไซม์ protease

นำ crude enzyme protease ที่สกัดในในแต่ละซ้ำการทดลองมาทดสอบการทำงานโดยวิธีที่ดัดแปลงจาก Garcia และ Haard (1993) นำความเข้มข้นของโปรตีนมาคำนวณเพื่อหา อัตราการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ต่อ 1 มิลลิกรัมโปรตีนพบว่า protease ที่สกัดได้จากกุ้งที่กินอาหารสูตรที่แทนที่ด้วยกากยีสต์มีความสามารถในการทำงานดีที่สุดที่ 0.064 U/mg protein ตามสูตรที่แทนที่ด้วยกากมอลต์ที่ 0.059 U/mg protein และสูตรควบคุมที่ 0.056 U/mg protein และสูตรที่แทนที่ด้วยกากเมล็ดตะวัน ให้ค่าการทำงานน้อยที่สุด 0.052 U/mg protein ดังแสดงในตารางที่ 11

ตารางที่ 11 ค่า protease activity ของ crude enzyme ที่สกัดได้จาก hepatopancreas ของกุ้งที่ทดลองให้อาหารเป็นเวลา 1 เดือนโดยเฉลี่ยจาก 3 ซ้ำของแต่ละชุดทดลอง ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

	Protease Activity* ± SD (U)	Protease Activity ต่อ 1 mg Protein ± SD (U/mg Protein)
BM	0.067 ± 0.006[a]	0.059 ± 0.006[a]
SFM	0.062 ± 0.004[a]	0.052 ± 0.005[a]
BY	0.070 ± 0.006[a]	0.064 ± 0.007[a]
SBM	0.070 ± 0.007[a]	0.056 ± 0.006[a]

* protease activity คิดจากค่าการดูดกลืนแสงที่ 440 นาโนเมตรที่ลดลงหลังปล่อยให้ protease ทำปฏิกิริยาไป 10 นาที

**ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กแสดงถึงความเหมือนหรือแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่าเฉลี่ยเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT ($P \leq 0.05$)

หมายเหตุ

BM = ชุดทดลองอาหารสูตรแทนที่ด้วยกากมอลต์

SFM = ชุดทดลองอาหารสูตรแทนที่ด้วยกากเมล็ดทานตะวัน

BY = ชุดทดลองอาหารสูตรแทนที่ด้วยกากยีสต์

SBM = ชุดควบคุม (กากถั่วเหลือง)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง

ปัจจัยที่สำคัญที่สุดที่ใช้ในการคัดเลือกวัตถุดิบเพื่อนำมาใช้แทนที่กากถั่วเหลืองคือปริมาณโปรตีน จากการค้นคว้าข้อมูลพบว่ามีวัตถุดิบหลายชนิดที่มีการนำมาใช้ในอาหารสัตว์เพื่อ เป็นแหล่งโปรตีน ได้แก่ กากยีสต์ กากมอลต์ กากเมล็ดทานตะวัน กากถั่วเขียว กากถั่วลิสง กากปาล์มน้ำมัน กากเมล็ดฝ้าย กากมะพร้าว กากคาโนล่าหรือกากเรพซีด กากนมถั่วเหลือง กากเมล็ดยางพารา ใบกระถินป่น ใบมันสำปะหลังแห้งป่น ใบผักตบชวา ฯลฯ ผู้ทำการทดลองจึงค้นหาและรวบรวมวัตถุดิบจากแหล่งต่างๆโดยได้วัตถุดิบทั้งหมดดังนี้ กากยีสต์ กากมอลต์ กากเมล็ดทานตะวัน กากถั่วเขียว กากถั่วลิสง และ กากปาล์มน้ำมัน เมื่อทำการทดลองวัดปริมาณโปรตีนในวัตถุดิบที่รวบรวมมาได้พบว่ากากถั่วเขียวมีปริมาณโปรตีนสูงที่สุดคือ 78.2 % ซึ่งมากกว่ากากถั่วเหลืองที่มีปริมาณโปรตีน 51.5% แต่เหตุผลที่ไม่นำกากถั่วเขียวมาใ ช้ในการทดลองครั้งนี้เป็นเพราะว่ากากถั่วเขียวเป็นวัตถุดิบผลพลอยได้จากการผลิตวุ้นเส้น ซึ่งกากถั่วเขียวที่นำมาวิเคราะห์ในครั้งนี้ได้มาจากโรงงานวุ้นเส้นท่าเรือ ตำบลท่าเรือ อำเภอท่ามะกา จังหวั ดกาญจนบุรี จากการสอบถามพบว่ากากถั่วเขียวนั้นเป็นวัตถุดิบผลพลอยได้ที่มี ปริมาณจำกัด ไม่สามารถรวบรวมได้ในปริมาณมากพอที่จะนำมาผลิตอาหารกุ้งในระดับอุต สาหกรรมได้จึงเป็นเหตุผลที่ไม่ใช้ กากถั่วเขียวในการทดลองครั้งนี้ วัตถุดิบที่เลือกใช้ในการทดลองครั้งนี้ได้แก่ กากยีสต์ และ กากมอลต์ ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัทเบียร์ทิพย์ บริวเว อรี่ (1991) จำกัดและกากเมล็ดทานตะวันที่ได้รับความอนุเคราะห์จากโรงงานผลิตอาหารสัตว์น้ำมหาชัย เหตุผลที่เลือกวัตถุดิบทั้งสามชนิดดังกล่าวมาใช้ในการทดลองเพราะมีปริมาณโปรตีนค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับวัตถุดิบชนิดอื่นและเป็นวัตถุดิบที่มีจำหน่ายในท้องตลาดสามารถรวบรวม ได้ในปริมาณมากเพียงพอที่จะผลิตอาหารกุ้งขาวในระดับอุตสาหกรรมได้

ในการผลิตอาหารกุ้งกรดอะมิโนที่สำคัญทั้งหมดมี 10 ชนิดได้แก่ tryptophan, methionine, valine, lysine, isoleucine, leucine, phenylalanine, threonine, histidine และ arginine (Akiyama และคณะ, 1991) ซึ่งในปลาป่นนั้นจะมีความสมบูรณ์ของกรดอะมิโนเพียงพอ แต่ในวัตถุดิบแหล่งโปรตีนชนิดอื่นที่มาจากพืชนั้นจะมีความสมบูรณ์ของกรดอะมิโนต่ำกว่าวัตถุดิบแหล่งโปรตีนที่มาจากสัตว์ (Ousterhout และคณะ, 1959) โดยกรดอะมิโนที่พบในแหล่งโปรตีนจากพืชที่มีปริมาณที่น้อยกว่าแหล่งโปรตีนจากสัตว์อย่างชัดเจนได้แก่ methionine ซึ่งแม้แต่ในกากถั่วเหลืองเองก็มีปริมาณของ methionine ต่ำกว่าในปลาป่น ดังนั้นในการใช้แหล่งโปรตีนที่มาจาก

พืชจึงควรมีการเติมกรดอะมิโน methionine เพื่อความสมบูรณ์ของกรดอะมิโน จากการวัดปริมาณองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่นำมาแทนที่กากถั่วเหลืองพบว่ากากยีสต์มีความสมบูรณ์ของกรดอะมิโนที่จำเป็นโดยรวมสูงกว่ากากถั่วเหลืองใกล้เคียงกับปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็นโดยรวมในปลาป่น กากเมล็ดทานตะวันมีความสมบูรณ์ของกรดอะมิโนที่จำเป็นโดยรวมใกล้เคียงกับกากถั่วเหลือง และกากมอลต์มีปริมาณของกรดอะมิโน ที่จำเป็นในปริมาณที่ต่ำ ในกว่ากากถั่วเหลือง ดังนั้นหากต้องการนำกากมอลต์ไปใช้เป็นแหล่งโปรตีนควรระมัดระวังถึงปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็นอาจจะต้องมีการเติมกรดอะมิโนที่ขาดเพิ่มเติมเพื่อป้องกันปัญหาการขาดแคลนกรดอะมิโน

มีการศึกษาก่อนหน้านี้ที่พบ ว่าสารต้านโภชนาการ phytate มีผลต่อกุ้งขาวทั้งในแง่การรบกวนการทำงานของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยอาหารและยังมีผลต่อการดูดซึมแร่ธาตุต่างๆในกุ้ง (Davis และคณะ, 2007)ซึ่งในการทดลองครั้งนี้พบว่า phytate สามารถพบได้ในวัตถุดิบที่เป็นผลผลิตมากจากพืชเช่น กากถั่วเหลือง กากมอลต์ และกากเมล็ดทานตะวัน แต่ในกากถั่วเขียวนั้นไม่สามารถตรวจพบ phytate ได้เนื่องมาจากกากถั่วเขียวเป็นผลพลอยได้ที่มาจากการผลิตวุ้นเส้นในขั้นตอนตกตะกอนแป้งทำให้โปรตีนละลายออกมาอยู่ในน้ำแล้วจึงนำน้ำที่ได้ในขั้นตอนนี้ไปตกตะกอนโปรตีนอีกทีจึงได้มาเป็นกากถั่วเขียว นอกจากนี้แล้ว ในกากยีสต์นั้นก็ไม่สามารถตรวจพบ phytate ด้วยเช่นกัน ดังนั้นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการใช้งานวัตถุดิบที่เป็นผลผลิตจากพืชในการผลิตอาหารสัตว์ควรหากรรมวิธีเพื่อลดปริมาณของสารต้านโภชนาการ phytate ลง ซึ่งวิธีที่มีการศึกษาและใช้ในการลดปริมาณ phytate อย่างได้ผลคือก ารเติมเอนไซม์ phytase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความสามารถในการย่อย phytate ลงในอาหาร (Cao และคณะ, 2007)

ในการทดลองครั้งนี้สูตรอาหารที่ใช้เป็นสูตรควบคุมได้แก่ สูตรอาหารกุ้งขาวโปรตีน 35% ของศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางเทคโนโลยีชีวภาพวิทยาศาสตร์ทางทะเล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เนื่องจากเป็นสูตรที่เป็นมาตรฐานที่ใช้ในการทดลอง ทั่วไป โดยในขั้นตอนคำนวณสูตรอาหารจะคำนวณให้ใช้วัตถุดิบที่เป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมอาหารแทนที่กากถั่วเหลืองทั้งหมดในสูตรยกเว้นเพียงกากมอลต์ที่มีปริมาณโปรตีนต่ำสามารถใช้แทนที่กากถั่วเหลืองได้เพียงครึ่งหนึ่งเท่านั้น สำหรับเหตุผลที่เมื่อผลิตอาหารออกมาแล้วค่าปริมาณโปรตีนรวมในอาหารที่ผลิตต่ำกว่าค่าที่คำนวณได้ในสูตรเนื่องจากวัตถุดิบที่เก็บไว้หากไม่เก็บในที่แห้งสนิทวัตถุดิบอาจได้รับความชื้นเพิ่มทำให้ปริมาณโปรตีนต่อน้ำหนักสดลดลงเมื่อนำมาผลิตอาหารจึงมีปริมาณโปรตีนต่ำกว่าที่คำนวณไว้ดังนั้นเพื่อให้ปริมาณโปรตีนที่คำนวณและปริมาณโปรตีนในอาหารที่ผลิตไม่แตกต่างกันมากจึงควรเก็บวัตถุดิบแต่ละชนิดในที่แห้งและควรผลิตอาหารทันทีหลังจากวัดปริมาณโปรตีนในวัตถุดิบ

จากการทดลองเลี้ยงพบว่าปริมาณแอมโมเนียรวมในน้ำมีค่าอยู่ในช่วง 0 – 0.48 มิลลิกรัมต่อลิตรตลอดระยะเวลาการทดลอง 1 เดือนซึ่งเป็ นผลจากการที่เตรียมน้ำไว้ล่วงหน้า ทำให้มีจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์เกิดขึ้นในระบบซึ่งจะทำหน้าที่เปลี่ยนรูปของแอมโมเนียเป็น ไนไตรท์ และ ไนเตรทตามลำดับ ในขั้นตอนการให้อาหารจะทำการปิดระบบกรองและหัวทรายก่อนให้อาหาร โดยในช่วงแรกของการทดลองจะบดอาหารเม็ดที่ผลิตได้ให้มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1 มิลลิเมตรเนื่องจากลูกกุ้งในระยะ 30 วันนั้นมีขนาดค่อนข้างเล็กอาจจะมีปัญหากับการกินอาหารที่มีขนาดใหญ่เกินไป เมื่อให้อาหารไปแล้ว 2 ชั่วโมงจึงดูดเก็บอาหารที่เหลือและมูลกุ้งจาก จากการสังเกตพบว่าเมื่อให้อาหารไปแล้ว 2 ชั่วโมงจะเห็นว่ากุ้งมี อาหารเต็มท้องและมีการถ่ายมูลออกมาในบ่อแล้วเมื่อเก็บอาหารที่เหลือและมูลกุ้งเรียบร้อยแล้วจึงเปิดระบบกรองและหัวทราย

เมื่อทดลองเลี้ ยงกุ้งไปแล้วเป็นเวลา 1 เดือนจึงนับจำนวนกุ้งที่เหลืออยู่เพื่อนำมาคำนวณหาอัตราการรอดตายพบว่าเมื่อคำนวณทางสถิติแล้วอัตารอดของกุ้งในแต่ละชุดทดลองไม่มีความแตกต่างกันทาง อย่างมีนัยสำคัญทาง สถิติที่ความเชื่อมั่น 95% คาดว่าอัตารอดของกุ้งไม่น่าจะขึ้นอยู่กับอาหารเป็นปัจจัยหลัก สาเหตุที่กุ้งตายน่าจะมาจากเรื่องของคุณภาพน้ำและการที่กุ้งกินกันเองเนื่องจากเมื่อกุ้งมีการลอกคราบจะทำให้กุ้งตัวนั้นอ่อนแอจึงมีโอกาสที่จะถูกกุ้งตัวอื่นมากินได้

สำหรับในแง่ของการเจริญเติบโตพบว่ากุ้งที่กินอาหารสูตรควบคุมมีน้ำหนักเฉลี่ยมากที่สุดมากกว่ากุ้งที่กินอาหาร ชุดทดลองที่แทนที่ด้วยกากเมล็ดทานตะวันและ กุ้งที่กินอาหาร ชุดทดลองที่แทนที่ด้วยกากมอลต์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% จากข้อมูลดิบแม้ว่า น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งที่กินอาหาร ชุดทดลองที่แทนที่ด้ วยกากยีสต์จะน้อย กว่า น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้ง ที่กินอาหารชุดควบคุมแต่เมื่อ วิเคราะห์ทางสถิติแล้วพบว่า น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งที่กินอาหารชุดควบคุมและน้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งที่กินอาหารชุดทดลองที่แทนที่ด้วยกากยีสต์นั้นไม่มีความแตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% ซึ่งสอดคล้องกับผลความยาวเฉลี่ยข องกุ้งซึ่งพบว่ากุ้งที่กินอาหารสูตรควบคุมมีความยาวเฉลี่ยมากที่สุดมากกว่ากุ้งที่กินอาหารชุดทดลองที่แทนที่ด้วยกากเมล็ดทานตะวันและกุ้งที่กินอาหารชุดทดลองที่แทนที่ด้วยกากมอลต์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% เช่นเดียวกับน้ำหนักเฉลี่ย ความยาวเฉลี่ยของ กุ้งที่กินอาหารสูตรทดลองที่แทนที่ด้วยกากยีสต์แม้จะน้อยกว่าความยาวเฉลี่ยของกุ้งที่กินอาหารชุดควบคุมแต่เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติแล้วพบว่าความยาวเฉลี่ยของกุ้งที่กินอาหารชุดควบคุมและความยาวเฉลี่ยของกุ้งที่กินอาหารชุดทดลองที่แทนที่ด้วยกากยีสต์นั้นไม่แตกต่างกันอย่า งมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% จากข้อมูลดังกล่าว หมายความได้ ว่าอาหารที่แทนที่กากถั่วเหลืองด้วยกากยีสต์นั้นให้ค่า

น้ำหนักเฉลี่ยและความยาวเฉลี่ยไม่แตกต่างจากอาหารสูตรกากถั่วเหลืองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% จึงอาจกล่าวได้ว่า ในวัตถุดิบผลพลอยจากอุตสาหกรรมอาหารทั้งหมดที่นำมาทำการทดลองกากยีสต์มีความเป็นไปได้ มากที่สุดในการนำมาใช้แทนที่กากถั่วเหลืองในการผลิตอาหารกุ้งขาว

ในการทดลองครั้งนี้ได้ศึกษาค่า apparent protein digestibility ของอาหารแต่ละสูตรเพื่อบ่งบอกถึงความสามารถของกุ้งขาวที่จะย่อยและดูดซึมโปรตีนในอาหารแต่ละสูตรโดยคำนวณจากปริมาณโปรตีนในอาหารและปริมาณโปรตีนในมูลกุ้ง พบว่าอาหารสูตรควบคุมมีค่า apparent protein digestibility สูงสุดตามด้วยสูตรทดลองที่แทนที่ด้วยกากยีสต์ สูตรทดลองที่แทนที่ด้วยกากเมล็ดทานตะวัน และ สูตรทดลองที่แทนที่ด้วยกากมอลต์ ตามลำดับ ซึ่งข้อมูลดังกล่าวสอดคล้องกับการเจริญเติบโตของกุ้งทั้งในแง่ของน้ำหนักเฉลี่ยและความยาวเฉลี่ยจึงอาจกล่าวได้ว่าการเจริญเติบโตของกุ้งขาวนั้นขึ้นอยู่กับค่า apparent protein digestibility ของอาหารด้วยไม่ได้ขึ้นอยู่กับปริมาณโปรตีนในอาหารเพียงอย่างเดียว ในวัตถุดิบบางชนิดอาจมีปริมาณโปรตีนสูงแต่อาจจะมีค่า protein digestibility ที่ต่ำเช่น ขนไก่ป่น (Hasan และคณะ, 1997) ดังนั้นในการคัดเลือกวัตถุดิบแหล่งโปรตีนเพื่อนำมาผลิตอาหารสัตว์นอกจากปริมาณโปรตีนแล้วควรคำนึงถึงค่า protein digestibility ของวัตถุดิบนั้นด้วย

จากการทดลองพบว่าความสามารถในการทำ ปฏิกิริยาของเอนไซม์ต่อ 1 มิลลิกรัมโปรตีนที่สกัดจาก hepatopancreas ของกุ้งที่กินอาหารชุดควบคุมและชุดทดลองทั้งสามชุดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจึงแปลผลได้ว่าการที่กุ้งกินอาหารที่มีแหล่งโปรตีนต่างกัน จากทั้งกากถั่วเหลือง กากยีสต์ กากเมล็ดทานตะวัน และ กากมอลต์นั้นไม่ส่งผลต่อ ความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีนของกุ้ง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาสามารถสรุปผลการทดลองได้ดังนี้

1. วัตถุดิบผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมอาหารที่มีปริมาณโปรตีนสูงใกล้เคียงกับกากถั่วเหลือง ได้แก่ กากถั่วเขียว กากเมล็ดทานตะวัน และ กากยีสต์

2. องค์ประกอบของกรดอะมิโนที่จำเป็นในการผลิตอาหารกุ้งขาวใน กากยีสต์ และ กาก เมล็ดทานตะวันมีความใกล้เคียงกับ กากถั่วเหลือง

3. กากถั่วเหลือง กากเมล็ดทานตะวัน และ กากมอลต์ มีปริมาณสารต้านโภชนาการ phytate ใกล้เคียงกันแต่ไม่พบ phytate ในกากยีสต์ และ กากถั่วเขียว

4. กากยีสต์สามารถนำมาใช้แทนที่กากถั่วเหลืองในอาหารเลี้ยงกุ้งขาวได้โดยไม่ทำให้น้ำหนักเฉลี่ยและความยาวเฉลี่ยของกุ้งขาวลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95%

5. การเจริญเติ บโตของกุ้งขาวทั้งน้ำหนักและความ ยาวแปรผันตรงกับ apparent protein digestibility ของอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง

6. แหล่งโปรตีนที่แตกต่างกันในอาหารไม่มีผลต่อความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ protease ในกุ้งขาว

ข้อเสนอแนะ

1. ในการทดลองครั้งนี้กากยีสต์ และ กากเมล็ดทานตะวันถูกนำมาใช้แทนที่กากถั่วเหลือง ทั้งหมดในสูตร การใช้กากยีสต์ และ กากเมล็ดทานตะวันแทนที่กากถั่วเหลืองครึ่งห นึ่งหรือบางส่วนอาจให้ผลลัพธ์ที่ดีกว่า

2. ในการเพิ่มประสิทธิภาพของการใช้แหล่งโปรตีนที่มาจากพืชในการผลิตอาหารกุ้งนั้นควรมีการเติมกรดอะมิโนที่ขาดและเติม phytase เพื่อลดปริมาณสารต้านโภชนาการ phytate ในอาหารกุ้ง

3. หากสามารถนำอาหารกุ้งที่ผลิตไปทดลอง เลี้ยงในบ่อที่ใช้เลี้ยงจริงได้อาจให้ผลการทดลองที่ดีกว่า

เอกสารอ้างอิง

ภาษาไทย

กองอาหารสัตว์. 2549. **วัตถุดิบอาหารสัตว์[online]**. กรุงเทพฯ: กองอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. แหล่งที่มา: http://www.dld.go.th/nutrition/exhibision/feed_stuff/nutrition.htm[25 กันยายน 2552]

สำนักงานส่งเสริมการค้าสินค้าเกษตร. 2549. **ปริมาณและมูลค่าการส่งออก [online]**. กรุงเทพฯ: สำนักงานส่งเสริมการค้าสินค้าเกษตร กรมการค้าภายใน. แหล่งที่มา: http://agri.dit.go.th/web_dit_sec5/home/view_multi.aspx[25 กันยายน 2552]

อุทัย คันโธ. 2529. **อาหารและการผลิตอาหารเลี้ยงสุกรและสัตว์ปีก**. กรุงเทพฯ: ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาษาอังกฤษ

Akiyama, D.M., Coelho, S.R., Lawrence, A.L., and Robinson, E.H. 1989. Apparent digestibility of feedstuffs by the marine shrimp *Peneaus vannamei* BOONE. **Nippon Suisan Gakkaishi**. 55 : 91-98.

Akiyama, D. M., W.G. Dominy, and A.L. Lawrence. 1991. Penaeid shrimp nutrition for the commercial feed industry: Revised. Pages 80-98 *in* D.M. Akiyama and R.K.H. Tan,editors. **Proceedings of the Aquaculture and Feed Processing and Nutrition Workshop**. Singapore, Republic of Singapore.

Biswas, A.K., Kaku, H., Ji, S.C., Seoka, M., and Takii, K. 2007. Use of soybean meal and phytase for partial replacement of fish meal in the diet of red sea bream, *Pagrus major*. **Aquaculture**. 267 : 284–291.

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

Cao, L., Wang, W., Yang, C., Yang, Y., Diana, J., Yakupitiyage, A., Luo, Z., and Li, D. 2007. Application of microbial phytase in fish feed. **Enzyme and Microbial Technology**. 40 : 497–507.

Carter, C.G., and Hauler, R.C. 2000. Fish meal replacement by plant meals in extruded feeds for Atlantic salmon, *Salmo salar* L. **Aquaculture**. 185 : 299–311.

Davis, D.A.,Lawrence, A.L., and Gatlin, D.M. 2007. Evaluation of the dietary zinc requirement of *Penaeus vannamei* and effects of phytic acid on zinc and phosphorus bioavailability. **Journal of the World Aquaculture Society**. 24 : 40-47.

El-Saidy, D.M.S.D., and Gaber, M.M.A. 2003. Replacement of fish meal with a mixture of different plant protein sources in juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*(L.) diets. **Aquaculture Research**. 34 : 1119-1127.

Gabuadan, J. 1986. Functional morphology of the digestive system and bioenergetics in fish. **Nutrition in Marine Aquaculture**. Training Session, Lisbon. pp.20-30.

Garcia C.F.L., and Haard, N.F. 1993. Characterization of proteinase classes in langostilla (*Pleuroncodes planipes*) and crayfish *(Pacifastacus mtacus)* extracts. **Food Biochemistry**. 17 : 97-1 13.

Hason, M.R., Haq, M.S., Das, P.M., and Mowlah, G. 1997. Evaluation of poultry-feather meal as a dietary protein source for Indian major carp, *Labeo rohita* fry. **Aquaculture**. 151 : 47-54.

Hernández, M.D., Martínez, F.J., Jover, M., and García, G.M. 2007. Effects of partial replacement of fish meal by soybean meal in sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo*) diet. **Aquaculture**. 263 : 159–167.

Li, P., Wang, X., Murthy, S., Gatlin, D.M., Castille, F.L., and Lawrence, A.L. 2009. Effect of dietary supplementation of brewer's yeast and GroBiotic®-A on growth, iImmune responses, and low-salinity tolerance of Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei* cultured in recirculating systems. **Journal of Applied Aquaculture**. 21 : 110-119.

Lim, E.H., Lam, T.J., and Ding, J.L. 2004. Single-Cell Protein Diet of a Novel Recombinant Vitellogenin Yeast Enhances Growth and Survival of First-Feeding Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) Larvae1. **Nutrient Requirements**. 135 : 513-518.

Mohamed, A.I., Mebrahtu, T., and Rangappa, M. 1991. Nutrient composition and anti-nutritional factors in selected vegetable soybean *(Glycine Max* [L.] Merr.). **Plant Foods for Human Nutrition**. 41 : 89-100.

Ousterhout, L.E., Grauandb, D.R., and Lundholma, D. 1959. Biological availability of amino acids in fish meals and other protein sources. **Journal of Nutrition**. 89 : 65-73.

Rachanee K. 2008. Effects of three conventional cooking methods on vitamin C, tannin, myo-inositol phosphates contents in selected Thai vegetables. **Journal of Food Composition and Analysis**. 21 : 187–197.

Rizal, G.M., and Khajarern, J. 2008. Substitution of Soybean Meal by Mung Bean Protein Concentrate in the Broiler on Evaluation of Productive Performance. **The 4th Zoology Conference**. pp.200-202. 31 January 2008 at Faculty of Agriculture, Khonkaen University, Khonkaen, Thailand.

Sanz, A., Moralesa, A.E., de la Higueraa, M., and Gardenetea, G. 1994. Sunflower meal compared with soybean meals as partial substitutes for fish meal in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) diets: protein and energy utilization. **Aquaculture**. 128 : 287-300.

Teles, A.O., and Goncalves, P. 2001. Partial replacement of fishmeal by brewers yeast (*Saccaromyces cerevisae*) in diets for sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. **Aquaculture**. 202 : 269–278.

The Association of Official Analysis Chemists. 1990. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analysis Chemistry**. 15th edition. Arlington, Virginia.

The Association of Official Analysis Chemists. 1995. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analysis Chemistry**. 16th edition. Arlington, Virginia.

Tzachi, M., Samocha, D., Davis, A., Saoud, I.P., and DeBault, K. 2004. Substitution of fish meal by co-extruded soybean poultry by-product meal in practical diets for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**. 231 : 197–203.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Kjeldahl method ตามวิธี AOAC (1995)

<u>สารเคมี</u>

1. กรดซัลฟูริกเข้มข้น (A.R. grade)
2. สารละลายมาตรฐานกรดไฮโดรคลอริค (A.R. grade) ความเข้มข้น 0.1 N
3. สารละลายกรดบอริก (A.R. grade) ความเข้มข้น 4% (w/v)
4. Kjeldahl tablets
5. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (A.R. grade) ความเข้มข้น 35% (w/v)
6. สารละลายอินดิเคเตอร์ เตรียมโดยผสมสารละลาย methylene blue 0.2% ในแอลกอฮอล์ แล้วกรอง 25 มิลลิลิตร กับสารละลาย methyl red 0.2% ในแอลกอฮอล์ 50 มิลลิลิตร

<u>วิธีวิเคราะห์</u>

1. ช่างตัวอย่างให้มีน้ำหนักที่แน่นอนประมาณ 0.25 กรัม ใส่ใน Kjeldahl tube
2. เติม Kjeldahl tablets 1 เม็ดต่อหนึ่งหลอด และเติมกรดซัลฟูริคเข้มข้น 20 – 25 มิลลิลิตร
3. นำตัวอย่างไปย่อยด้วยเครื่อง Buchi Digestion Unit โดยใช้ความร้อนเบอร์ 8 และปิดฝาด้านบนที่ต่อเข้ากับเครื่องดูดไอกรด (scrubber) ย่อยตัวอย่างจนส่วนผสมในหลอดย่อยกลายเป็นสีเขียวใส และทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง
4. หยดสารละลายอินดิเคเตอร์ 2 – 3 หยดลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรที่เติมสารละลายกรดบอริกความเข้มข้น 4% ไว้ 50 มิลลิลิตร นำไปต่อเข้ากับปลาย condenser ของเครื่องกลั่น (distillation unit)
5. นำหลอดตัวอย่างที่ผ่านการย่อยต่อเข้ากับเครื่องกลั่น เลือกโปรแกรม distillation โดยตั้งโปรแกรม ดังนี้

NaOH	40 มิลลิลิตร
H_2O	50 มิลลิลิตร
Time	6 นาที

6. ในระหว่างการกลั่นจะเกิดแอมโมเนียขึ้น แอมโมเนียที่เกิดขึ้นจะถูกจับไว้ด้วยสารละลายกรดบอริก จะได้สารละลายสีเขียวเมื่อกลั่นครบตามกำหนดเวลา
7. ล้างส่วนปลายของ condenser ด้วยน้ำกลั่นใส่ลงในฟลาสก์ที่รองรับสิ่งที่กลั่นได้
8. นำสารละลายที่กลั่นได้ทั้งหมดในฟลาสก์ทั้งหมดมาไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานกรดไฮโดรคลอริค ความเข้มข้น 0.1 N จนถึงจุดยุติ (end point) เป็นสีม่วงแดง
9. ทำ blank โดยไม่ต้องใส่ตัวอย่าง แต่วิเคราะห์เช่นเดียวกับตัวอย่าง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

10. คำนวณหาปริมาณโปรตีนจากสูตร

$$\text{ปริมาณโปรตีน} = \frac{(Va - Vb) \times N \times 1.4 \times CF}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}}$$

เมื่อ Va คือ ปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริคที่ใช้ไตเตรทตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

Vb คือ ปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริคที่ใช้ไตเตรท blank (มิลลิลิตร)

N คือ ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริคที่ใช้ไตเตรท มีหน่วยเป็น Normal

CF คือ Conversion Factor สำหรับเปลี่ยนไนโตรเจนให้เป็นโปรตีน (ในการทดลองครั้งนี้ใช้ 6.25)

การเตรียม 1X Phosphate Buffered Saline (PBS Buffer)

<u>สารเคมี</u>

1. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)
2. โปแตสเซียมคลอไรด์ (KCl)
3. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4)
4. โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)

<u>วิธีทำ</u>

1. ละลายสารดังนี้ในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร

โซเดียมคลอไรด์	8 กรัม
โปแตสเซียมคลอไรด์	0.2 กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	1.44 กรัม
โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.24 กรัม

2. ปรับ pH ให้ได้ 7.4
3. ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น
4. ทำให้สารละลายปลอดเชื้อด้วยการนึ่งด้วยไอน้ำที่ความร้อนและอุณหภูมิสูง (autoclave)

การเตรียมสารละลายเพื่อใช้ในการวัดปริมาณโปรตีน (Lowry et al., 1951)

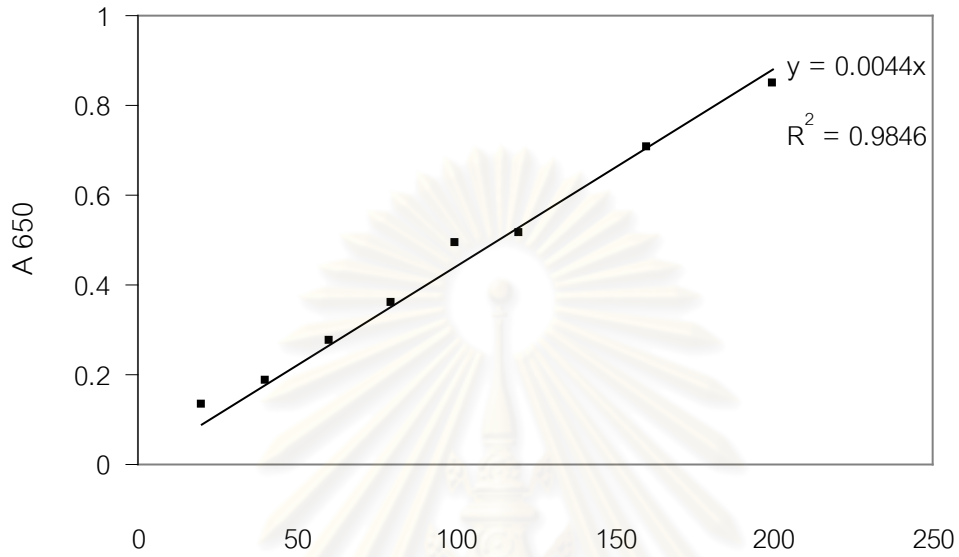
1. เตรียมสารละลาย BSA มาตรฐาน เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำไปละลายด้วยน้ำกลั่น
2. การเตรียมสารละลาย Lowry reagent I ปริมาตร 100 มิลลิลิตร
    2.1 เตรียม sodium potassium tartrate ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 10 มิลลิลิตร
    2.2 เตรียม copper sulphate ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 10 มิลลิลิตร
    2.3 เตรียม sodium carbonate ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ปริมาตร 400 มิลลิลิตร ละลายใน 0.1 N sodium hydroxide

    เติมสารละลาย 2.1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และเติมสารละลาย 2.2 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติมสารละลาย 2.3 ปริมาตร 98 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยสารละลาย Lowry reagent I จะต้องเตรียมใหม่ทุกครั้ง
3. การเตรียมสารละลาย Lowry reagent II ปริมาตร 100 มิลลิลิตรโดยนำ phenol reagent ปริมาตร 50 มิลลิลิตร มาผสมกับน้ำกลั่นในปริมาตร 50มิลลิลิตร

การทำกราฟมาตรฐานโปรตีน Bovine Serum Albumin (BSA)

1. เตรียมสารละลาย Bovine Serum Albumin (BSA) ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
2. ใส่ละลาย BSA ความเข้มข้นต่าง ๆ ลงในหลอดทดลอง หลอดละ 1 มิลลิลิตร ชุดควบคุมทำการเติมน้ำกลั่นแทนสารละลาย BSA ทำการทดลอง 3 ซ้ำ
3. เติมสารละลาย Lowry reagent I (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอดเขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 10 นาทีหลังจากนั้นเติมสารละลาย Lowry reagent II ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอด เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 30 นาที
4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร
5. นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและปริมาณโปรตีน

กราฟมาตรฐานของโปรตีน Bovine Serum Albumin (BSA)



รูปที่ 7 กราฟมาตรฐานของโปรตีน Bovine Serum Albumin (BSA)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายรณวิช สิงหสุรศักดิ์ เกิดเมื่อวันที่ 25 กันยายน พ.ศ.2527 จบการศึกษาชั้นประถมปีที่ 6 จากโรงเรียนอนุบาลนครราชสีมา และจบการศึกษาชั้นมัธยมต้นและมัธยมปลายจากโรงเรียนราชสีมาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2544 จบการศึกษาในระดับปริญญาตรี สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยในปีการศึกษา 2548 เข้าศึกษาต่อระดับปริญญาโท ในหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปี 2549

ส่วนหนึ่งของวิทยานิพนธ์นี้ได้มีโอกาสเข้าร่วมการนำเสนอผลงานแบบบรรยาย ที่งานประชุมวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีเพื่อเยาวชน ครั้งที่ 5 ในวันที่ 19 มีนาคม 2553 ณ ศูนย์ประชุมและนิทรรศการไบเทค บางนา กรุงเทพมหานคร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย