บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

อาหารทดลอง

วัตถุดิบและส่วนประกอบที่ใช้ในอาหารทดลองแสดงในตารางที่ 1 การผสมและผลิตอาหารทดลองทำขึ้น ณ ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีอาหารสัตว์น้ำ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยนำส่วนประกอบของแหล่งวัตถุดิบมาบดและร่อนผ่านตะแกรงขนาดประมาณ 250 ไมครอน จากนั้นคลุกเคล้าส่วนประกอบทั้งหมดให้เข้ากัน แล้วนำไปเข้าเครื่องอัดเม็ดอาหารให้มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2 มิลลิเมตร ยาวประมาณ 3 มิลลิเมตร อาหารที่ได้มีลักษณะเป็นเม็ดกึ่งชื้น หลังจากนั้นนำไปอบไอน้ำที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง การทำอาหารใช้วัตถุดิบและส่วนประกอบชนิดเดียวกันตลอดการทดลอง ส่วนประกอบหลักที่ใช้ได้แก่ ปลาป่นที่มีระดับโปรตีน 66 เปอร์เซนต์เป็นแหล่งโปรตีน ใช้น้ำมันตับปลาหมึกและน้ำมันข้าวโพดในอัตราส่วน 3 ต่อ 1 เป็นแหล่งไขมัน ใช้แป้งสาลีเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรต นอกจากนั้นใช้ wheat gluten และ aquabind เป็นสารเหนียวในเม็ดอาหาร ใช้วิตามินซีในรูป L-Ascorbylpolyphosphate-proparat และใช้เกลือแร่ปริมาณน้อยและวิตามินอื่น ๆ ในรูป premixture สำหรับ Cr_2O_3 เป็นตัวชี้บอกที่ใช้ผสมในอาหารเพื่อทำการคำนวณหาอัตราการย่อยอาหาร ทำการทดลองแบบ factorial (3 x 4) รวมอาหารทดลองทั้งสิ้น 12 สูตร โดยใช้โปรตีน 3 ระดับคือระดับต่ำ (35 เปอร์เซ็นต์) ระดับกลาง (40 เปอร์เซ็นต์) และระดับสูง (45 เปอร์เซ็นต์) และไขมัน 3 ระดับ คือระดับต่ำ (10 เปอร์เซ็นต์) ระดับกลาง (15 เปอร์เซ็นต์) และระดับสูง (20 และ 25 เปอร์เซ็นต์)

ตารางที่ 1. ส่วนประกอบของอาหารที่ใช้ในการทดลอง (เปอร์เซ็นต์)

ส่วนประกอบ	สูตรอาหาร (โปรตีน/ไขมัน)											
(%)	35/10	35/15	35/20	35/25	40/10	40/15	40/20	40/25	45/10	45/15	45/20	45/25
ปลาป่น[*1]	46.00	47.20	48.70	50.30	55.50	56.90	58.50	59.90	65.00	66.60	66.00	66.00
รำป่น	30.00	23.80	17.30	10.70	21.00	14.60	8.00	1.60	12.00	5.40	1.00	1.00
น้ำมันตับปลาหมึก	4.50	8.25	12.00	15.75	4.13	7.88	11.63	15.38	3.75	7.50	11.25	15.00
น้ำมันข้าวโพด	1.50	2.75	4.00	5.25	1.37	2.62	3.87	5.12	1.25	2.50	3.75	5.00
แป้งสาลี	9.50	9.50	9.50	9.50	9.50	9.50	9.50	9.50	9.50	9.50	9.50	9.50
wheat gluten	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
aquabind[*2]	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
premixture[*3]	1.90	1.90	1.90	1.90	1.90	1.90	1.90	1.90	1.90	1.90	1.90	1.90
วิตามินซี[*4]	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Cr_2O_3	0.50	0.50	0.50	0.25	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50

[*1] ผลิตภัณฑ์จากบริษัท Unicord Feed Co., Ltd. ประกอบด้วยโปรตีน 66 เปอร์เซนต์

[*2] ผลิตภัณฑ์จากบริษัท Dupon Co., Ltd.

[*3] ผลิตภัณฑ์จากบริษัท Rovithai Co., Ltd. : แร่ธาตุรวม 100 g ประกอบด้วย calcium lactate, 32.70 g; K_2HPO_4, 23.98 g; $CaHPO_4.2H_2O$, 13.58 g; $MgSO_4.7H_2O$, 13.20 g; $Na_2HPO_4.2H_2O$, 8.72 g; NaCl, 4.35 g; ferric citrate, 2.97 g; $ZnSO_4.7H_2O$, 0.3 g; $CoCl_2.6H_2O$, 100 mg; $MnSO_4.H_2O$, 80 mg; KI, 15 mg; $AlCl_3.6H_2O$, 15 mg; $CuCl_2$, 10 mg

วิตามินรวม 100 g ประกอบด้วย thiamine HCl, 5 mg; riboflavin, 20 mg; choline chloride, 500 mg; nicotinic acid, 75 mg; Ca-pantothenate, 50 mg; inositol, 200 mg; biotin, 0.5 mg; folic acid, 1.5 mg; vitamin B12, 0.1 mg; menadione, 4.0 mg; alpha-tocopherol acetate, 40 mg; vitamin A(IU), 1,000 mg; vitamin D3(IU), 200 mg; B.H.T., 1 mg

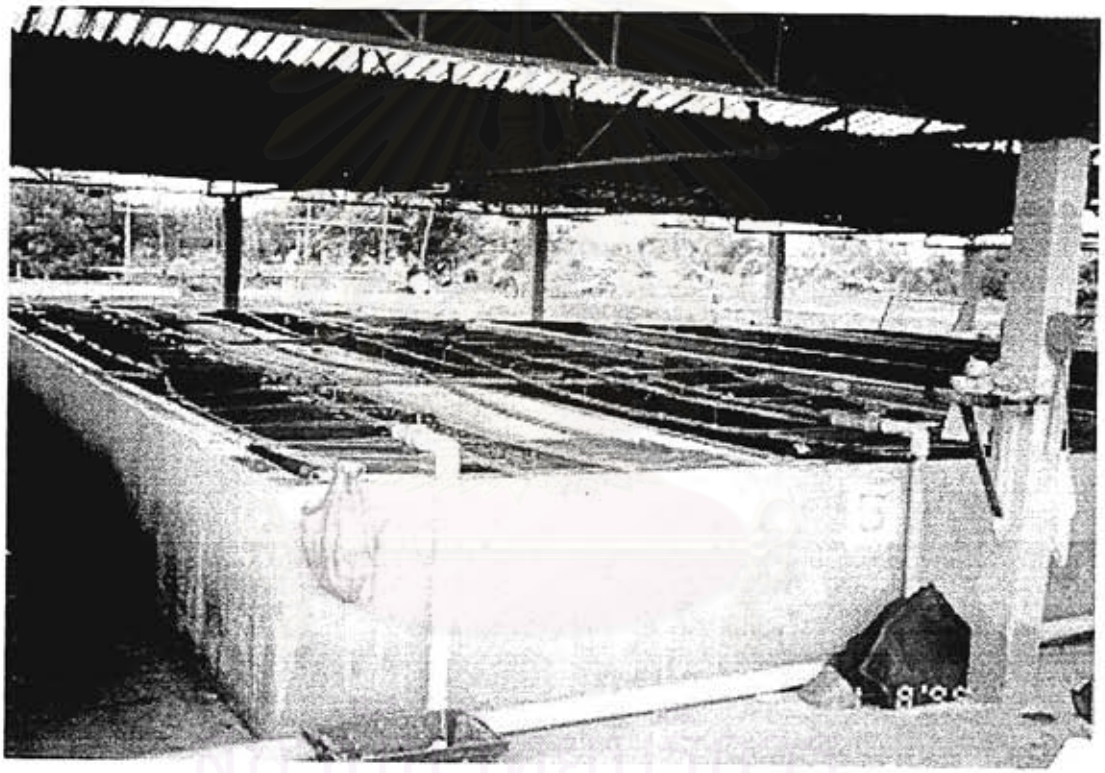
[*4] Stay C-25 (L-Ascorbylpolyphosphat-proparat) 25 % Active Vitamin C ผลิตภัณฑ์จากบริษัท Roche Co., Ltd.

ปลาทดลอง และภาวะการเลี้ยง

การศึกษาครั้งนี้ใช้ปลากะพงขาววัยรุ่นอายุ 30 วัน จำนวน 3,000 ตัว จากสถานีเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งสิชล อำเภอสิชล จังหวัดนครศรีธรรมราช โดยนำมาอนุบาลในบ่อซีเมนต์เส้นผ่าศูนย์กลาง 2.5 เมตร ที่ศูนย์พัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งสุราษฎร์ธานี ตำบลตะเคียนทอง อำเภอกาญจนดิษฐ์ จังหวัดสุราษฎร์ธานี ในช่วงแรกอนุบาลด้วยอาร์ทีเมีย *Artemia salina* และเมื่อลูกปลามีขนาดประมาณ 1 เซนติเมตร จึงเริ่มอนุบาลด้วยเนื้อปลาโอบดเป็นเวลาประมาณ 2 สัปดาห์ ภายหลังจากทำการฝึกให้ปลากินอาหารทดลองสูตร 45/15 เป็นเวลา 2 สัปดาห์ แล้วจึงทำการสุ่มคัดขนาดปลาที่มีร่างกายแข็งแรงสมบูรณ์เพื่อนำไปใช้ในการทดลอง

การทดลองเริ่มตั้งแต่วันที่ 3 ตุลาคม 2538 ถึงวันที่ 28 มกราคม 2539 รวมทั้งหมด 117 วัน แบ่งการทดลองออกเป็น 2 ระยะ ดังนี้

ระยะที่ 1 ศึกษาการเติบโตของอาหารทดลองที่แตกต่างกันในระดับโปรตีนและไขมันรวม 12 ชนิด โดยทำการทดลองในกระชังขนาด 0.5 x 0.5 x 0.8 ลูกบาศก์เมตร ที่อยู่ในบ่อปูนขนาด 2 x 10 x 1 ลูกบาศก์เมตร จำนวน 2 บ่อ (รูปที่ 1) เริ่มการทดลองตั้งแต่วันที่ 3 ตุลาคม 2538 จนถึงวันที่ 28 พฤศจิกายน 2538 รวมทั้งสิ้น 8 สัปดาห์ (เป็นเวลาที่ให้อาหาร 51 วัน) สุ่มปลาที่เตรียมการทดลองด้วยอาหารทดลองสูตร 45/15 เป็นเวลา 2 สัปดาห์ลงเลี้ยงในกระชัง กระชังละ 20 ตัว ชั่งน้ำหนักแบบรวมแต่ละกระชังรวมทั้งหมด 36 กระชัง (อาหารทั้งหมด 12 ชนิดชนิดละ 3 ซ้ำ) ซึ่งน้ำหนักเฉลี่ยของปลาในแต่ละสูตรอาหารมีค่า 1.1-1.2 กรัม ตรวจสอบการเติบโตโดยการชั่งน้ำหนักรวมทุก 2 สัปดาห์ ให้อาหารแบบกินจนอิ่มวันละ 2 ครั้ง เวลา 08.00 น. และ 16.00 น. เช่นเดียวกับการเลี้ยงของเกษตรกรโดยทั่วไป บันทึกปริมาณอาหารที่ให้ทุกสัปดาห์ ทำการดูดตะกอนในกระชังเวลา 12.00 นาฬิกาทุกวัน เปลี่ยนน้ำในบ่อซีเมนต์ประมาณ 30 เปอร์เซนต์ วันเว้นวัน โดยใช้น้ำที่ผ่านซื้อด้วยคลอรีนแล้ว ระหว่างการเลี้ยงบันทึกผลคุณภาพน้ำได้แก่ อุณหภูมิ ความเป็นกรดเป็นด่าง ออกซิเจน และความเค็ม ทำการเก็บตัวอย่างปลากระชังละ 7 ตัว เมื่อสิ้นสุดการทดลอง เพื่อนำไปใช้ในการวิเคราะห์คุณภาพของเนื้อและตับ



รูปที่ 1. กระชังขนาด 0.5 x 0.5 x 0.8 ลูกบาศก์เมตรในบ่อซีเมนต์ขนาด 2 x 10 x1 ลูกบาศก์เมตร (การทดลองระยะที่ 1)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ระยะที่ 2 ศึกษาการย่อยของอาหารทั้ง 12 ชนิดที่ใช้ในการทดลองระยะที่ 1 ของปลากะพงขาว ทำการทดลองในตู้กระจกขนาด 0.3 x 0.6 x 0.3 ลูกบาศก์เมตร (รูปที่ 2) ใช้ระบบถ่ายเทน้ำตลอดเวลา เริ่มทดลองตั้งแต่วันที่ 29 พฤศจิกายน 2538 ถึงวันที่ 28 มกราคม 2539 รวมระยะเวลาทั้งสิ้นประมาณ 8 สัปดาห์ โดยสุ่มปลาที่ได้จากการศึกษาในระยะที่ 1 มาทำการทดลองต่อ ซึ่งปลาจากการทดลองในชุดการทดลองเดียวกันรวมไว้ 1 ตู้ ตู้ละ 10 ตัว รวมทั้งหมด 12 ตู้ ให้อาหารวันละ 1 ครั้ง เวลา 08.00 น. ทำการดูดตะกอนภายหลังจากให้อาหารแล้ว 30 นาที เพื่อไม่ให้มีตะกอนและเศษอาหารหลงเหลืออยู่ ทำการเก็บอุจจาระจากการถ่ายตามธรรมชาติของปลา ภายหลังจากให้อาหารทุก 3 และ 6 ชั่วโมง โดยเก็บแยกกันแต่ละครั้ง และแต่ละวัน การเก็บใช้สายยางดูดเอาอุจจาระผ่านลงสู่ขวดพลาสติก ปล่อยให้ตกตะกอนแล้วเก็บเฉพาะอุจจาระเพื่อนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้วิเคราะห์โปรตีนและพลังงาน

การประเมินผล

1. ประเมินผลการเลี้ยง

1.1 อัตราการเติบโตสัมพัทธ์ต่อวัน (daily relative growth rate)

$$= \frac{\text{น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (กรัม)}}{\text{น้ำหนักเริ่มต้น (กรัม) x จำนวนวันที่ให้อาหาร (วัน)}}$$

1.2 condition factor

$$= \frac{\text{น้ำหนักปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (กรัม)}}{(\text{ความยาวปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง})^3 \text{ (ซม.}^3\text{)}}$$

รูปที่ 2. ตู้กระจกทดลองขนาด 0.3 x 0.6 x0.3 ลูกบาศก์เมตรพร้อมระบบถ่ายเทน้ำ
(การทดลองระยะที่ 2)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.3 อัตราการแลกเนื้อ (feed conversion ratio)

$$= \frac{\text{อาหารที่ได้รับทั้งหมด (กรัม)}}{\text{น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (กรัม)}}$$

1.4 อัตราการบริโภคอาหารเฉลี่ยต่อกรัมน้ำหนักปลาต่อวัน
(daily feed intake ; เปอร์เซ็นต์)

$$= \frac{\text{อาหารที่ได้รับทั้งหมด (กรัม)} \times 100}{\text{จำนวนวันที่ให้อาหาร (วัน)} \times \frac{\text{น้ำหนักสุดท้าย (กรัม)} + \text{น้ำหนักเริ่มต้น (กรัม)}}{2}}$$

1.5 อัตราการบริโภคโปรตีนเฉลี่ยต่อกรัมน้ำหนักปลาต่อวัน
(daily protein intake ; เปอร์เซ็นต์)

$$= \frac{\text{โปรตีนที่ได้รับทั้งหมด (กรัม)} \times 100}{\text{จำนวนวันที่ให้อาหาร (วัน)} \times \frac{\text{น้ำหนักสุดท้าย (กรัม)} + \text{น้ำหนักเริ่มต้น (กรัม)}}{2}}$$

1.6 อัตราการบริโภคพลังงานต่อวัน
(daily energy intake ; กิโลแคลอรี/100 กรัมของน้ำหนักตัว)

$$= \frac{\text{พลังงานที่ได้รับทั้งหมด (กิโลแคลอรี)} \times 100}{\text{จำนวนวันที่ให้อาหาร (วัน)} \times \frac{\text{น้ำหนักสุดท้าย (กรัม)} + \text{น้ำหนักเริ่มต้น (กรัม)}}{2}}$$

2. ประเมินคุณค่าทางโภชนาการ

2.1 การใช้โปรตีนสุทธิ (net protein utilization)

$$= \frac{\text{ปริมาณโปรตีนในตัวปลาที่เพิ่มขึ้น (กรัม)} \times 100}{\text{ปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่ปลาบริโภค (กรัม)}}$$

2.2 ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน (protein efficiency ratio)

$$= \frac{\text{น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (กรัม)}}{\text{โปรตีนที่ได้รับทั้งหมด (กรัม)}}$$

2.3 ประสิทธิภาพการใช้พลังงาน (energy efficiency ratio ; กรัม/กิโลแคลอรี)

$$= \frac{\text{น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (กรัม)}}{\text{พลังงานที่ได้รับทั้งหมด (กิโลแคลอรี)}}$$

การวิเคราะห์อาหาร เนื้อ ตับ และอุจจาระ

นำตัวอย่าง (อาหาร เนื้อ ตับ และอุจจาระ)ทั้งหมดมาบดด้วยใกร่งให้ละเอียดเป็นเนื้อเดียวกันก่อนการวิเคราะห์ สำหรับอุจจาระนำมาอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงก่อนนำมาวิเคราะห์ ตัวอย่างทั้งหมดวิเคราะห์ ณ ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์อาหารสัตว์น้ำ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ยกเว้นการวิเคราะห์ Cr_2O_3 ในอาหารและอุจจาระทำ ณ ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์อาหารสัตว์น้ำของสถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง จังหวัดสงขลา กรมประมง

การวิเคราะห์คุณภาพอาหารโดยวิเคราะห์หาค่า proximate composition พลังงาน และกรดไขมัน เนื้อนำมาวิเคราะห์หาค่า proximate composition และพลังงาน ตับนำมาวิเคราะห์หาปริมาณไขมันและกรดไขมัน และอุจจาระนำมาวิเคราะห์หาโปรตีนและพลังงาน นอกจากนั้นวิเคราะห์ Cr_2O_3 ในอาหารและอุจจาระเพื่อทำการคำนวณค่าอัตราการย่อยของโปรตีนและพลังงาน โดยมีรายละเอียดวิธีวิเคราะห์ดังนี้

1. การวิเคราะห์ proximate composition แบ่งเป็น โปรตีน ไขมัน เถ้า และความชื้น รายละเอียดการวิเคราะห์แสดงในภาคผนวก ก ตามวิธีของ AOAC (1990)

- การวิเคราะห์โปรตีนใช้วิธี Semimicro-Kjeldahl โดยใช้เครื่อง Kjeldatherm
- การวิเคราะห์ไขมันใช้วิธี Ether Extraction Method โดยใช้เครื่อง Soxtherm
- การวิเคราะห์เถ้าใช้เครื่อง Electric Muffle Furnace
- การวิเคราะห์ความชื้นใช้เครื่อง Drying Oven

2. การวัดพลังงานใช้เครื่อง Bomb calorimeter ของ Gallenkamp Ballistic Model

3. การวัด Cr_2O_3 ใช้วิธีของ Furukawa and Tsukahara (1966) อ้างถึงโดย Watanabe (1988) และนำมาคำนวณกับตัวชี้บอกโดยวิธีทางอ้อม โดยที่ค่าอัตราการย่อยของธาตุอาหารหาได้จากสมการต่อไปนี้

อัตราการย่อยธาตุอาหาร (%)

$$= 100 - \left[\frac{100 \times Cr_2O_3 \text{ ในอาหาร (\%)} \times \text{ธาตุอาหารในอุจจาระ (\%)}}{Cr_2O_3 \text{ ในอุจจาระ (\%)} \times \text{ธาตุอาหารในอาหาร (\%)}} \right]$$

และค่าความสามารถในการย่อยธาตุอาหารหาได้จาก

= อัตราการย่อยธาตุอาหาร (%) x ธาตุอาหารที่ได้รับ (โปรตีน, กรัม ; พลังงาน, กิโลแคลอรี)

4. ทำการวิเคราะห์กรดไขมัน (ภาคผนวก ข) ในอาหารและตับด้วยเครื่อง Gas Chromatography (GC) ซึ่งเงื่อนไขในการวิเคราะห์ของเครื่อง GC แสดงในตาราง ข-1 (ภาคผนวก ข) ส่วนกรดไขมันมาตรฐานใช้ของ Internal Standard GLC Methylester แสดงในตาราง ข-2 (ภาคผนวก ข)

การวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

ระหว่างการทดลองทำการตรวจสอบคุณภาพน้ำดังนี้

1. ตรวจสอบอุณหภูมิ โดยใช้เทอร์โมมิเตอร์ วันละ 2 ครั้ง ตอนเช้าและบ่าย
2. ตรวจสอบความเป็นกรดเป็นด่าง โดยใช้ pH meter ยี่ห้อ SUNTEX รุ่น SP-701 วันเว้นวัน (ภายหลังจากการเปลี่ยนถ่ายน้ำ)
3. ตรวจสอบออกซิเจนละลายในน้ำ โดยใช้วิธีการไตเตรท วันเว้นวัน (ภายหลังจากการเปลี่ยนถ่ายน้ำ)
4. ตรวจสอบความเค็ม โดยใช้ salinometer วันเว้นวัน (ภายหลังจากการเปลี่ยนถ่ายน้ำ)

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติโดยการทดสอบความแปรปรวนของผลการทดลองโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Statistical Analysis System (SAS) โดยวิเคราะห์ดังนี้

1. วิเคราะห์หาปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนและไขมัน โดยวิธี Analysis of Variance แบบ Factorial design (3 x 4)
2. วิเคราะห์หาความแตกต่างระหว่างชุดการทดลองทั้ง 12 ชุด โดยวิธี Analysis of Variance แบบ Completely Randomized Design
3. วิเคราะห์หาความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของสองตัวอย่าง โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test