บทที่ 2

วัสดุและวิธีการทดลอง

2.1 ครุภัณฑ์และวัสดุ

2.1.1 ครุภัณฑ์ในการศึกษาแอคติวิตีของเอ็นไซม์

ชนิดเครื่องมือ	แบบ-รุ่น	บริษัทผู้ผลิต
1. เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์	1. Shimadzu UV-visible Recording Uv-240	Shimadzu, Japan
	2. Unicam SP. 500 Series 2 Ultraviolet & visible	Phillip, Germany
2. เครื่องเซนตริฟิวส์	1. Kokusan Enshinki	OGAWA SEIKI, Japan
3. ตู้เย็น	1. Kokusan - 30 c	OGAWA SEIKI, Japan
	2. MORTA BIO FRTER-70 c	MORTA Scientific, USA
4. อ่างควบคุมอุณหภูมิ	1. Thelco Model 83 Water-bath	Precision Scientific Co; USA
5. เครื่องวัด pH	1. KENT EIL 7005	Electronic instrument standard & chertey surrey, England
6. ออโตปิเปต	1. Gilson Pipettman	Gilson medical electronic France
7. เครื่องบดเนื้อเยื่อ	1. Glass homogenizer	-

2.1.2 ครุภัณฑ์สำหรับการเพาะเลี้ยง

ชนิดเครื่องมือ	แบบ-รุ่น	บริษัทผู้ผลิต
1. อ๊อกซิเจนมิเตอร์	-	-
2. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง	2. Shimadzu LIBROR AEL-160-11	OGAWA, Japan
3. เทอร์โมมิเตอร์	-	-
4. เครื่องวัดความเค็ม	Reflective - salinometer	

2.2 <u>เคมีภัณฑ์</u>

2.2.1 เคมีภัณฑ์ในการศึกษาแอคติวิตีของเอ็นไซม์

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
1. ไดเมทิล อะซีเตอล 95 % (Dimethyl acetal 95 %)	Sigma Chemical Co, USA.
2. ไตรเอทธาโนลามัน (free base) 98 % (Triethanolamine (free base) 98 %)	Sigma Chemical Co, USA.
3. ไตรเอทธาโนลามีน (ไฮโดรคลอไรด์) 99 % (Triethanolamine (Hydrochloride) 99 %)	Sigma Chemical Co, USA.
4. เอ็น-เบ็นโซอิล-ดีแอล-อาร์จีนีน-พี-ไนโตรอานิไลด์ (N-Benzoeyl-DL-arginine-p-nitroanilide	Sigma Chemical Co, USA.
5. แป้งชนิดละลายน้ำได้ (Starch potato soluble)	Sigma Chemical Co, USA.
6. ไคติน พิวริไฟด์ เพาเดอร์ (Chitin purified powder)	Sigma Chemical Co, USA.
7. ไดเมทธิลอะมิโน เบ็นซาล ดีไฮด์ (Dimethylamino benzaldehyde)	Sigma Chemical Co, USA.
8. โปแตสเซียมเตตราบอเรต (Potassium tetraborate, Pott biborate)	Sigma Chemical Co, USA.
9. ซิตริค แอซิด (Citric acid)	Sigma Chemical Co, USA.

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
10. เบต้า-กลูโคซิเดส (β -glucosidase)	Sigma Chemical Co, USA.
11. เอ็น-อะเซทธิลกลูโคซามัน (N-Acethyl-D-glucosamine)	Sigma Chemical Co, USA.
12. ทริส-ไฮดรอกซีเมทธิล อะมิโนมีแธน (Tris-hydroxymethyl) Aminomethane	E.MERK, Germany
13. แคลเซียมคลอไรด์ (Calcium chloride)	E.MERK, Germany
14. กรดอะซิติค (Glacial aectic)	E.MERK, Germany
15. กรดเกลือ (Hydrochloric acid)	E.MERK, Germany
16. ไกลซีน (Glycine)	E.MERK, Germany
17. 3,5-ไดไนโตรซาลิไซลิค แอซิด (3.5-Dinitrosalicyclic acid)	E.MERK, Germany
18. โซเดียม โปแตสเซี่ยม ตาร์เตรท (Sodium potassium tartrate)	FLUKA, Swisszerland
19. สารละลายไอโอดีนหรือลูกอล (Iodine solution, Lugol)	E.MERK, Swisszerland
20. เคซีน ไฮโดรไลเสต (Casein hydrolysate)	E.MERK, Swisszerland

หมายเหตุ สารเคมีอื่นๆ นอกเหนือจากนี้สั่งซื้อจากบริษัท Sigma Chemical Co; ประเทศสหรัฐอเมริกา บริษัท BDH Chemical Ltd. ประเทศอังกฤษ, บริษัท Fluka ประเทศสวิสเซอร์แลนด์; บริษัท E.MERK ประเทศเยอรมัน และบริษัท May & Baker เป็นต้น

2.2.2 เคมีภัณฑ์ในการเพาะเลี้ยง

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
1. โคลีน คลอไรด์ (Choline chloride)	Fluka, Swisszerland
2. เมโซอินโนซิทอล (meso-inositol)	Fluka, Swisszerland
3. วิตามินอี (Vitamin E.acetate)	Fluka, Swisszerland
4. แคลเซียมเพนโธธิเนต (Calcium-panthcthenate)	BDH, England
5. ไบโอติน (Biotin)	BDH, England
6. เคซีนไฮโดรไลเซท (Caseinhydrolysate vitamin free)	E.MERK, Germany
7. ไธอามีน (Thiamine); ไรโบฟลาวิน (Riboflavin); ไพริดอกซีน (Pyridoxine) โฟลิค แอซิด (Folic acid); วิตามินบี 12; วิตามินเค	องค์การเภสัชกรรม ประเทศไทย
8. คาร์บอกซี เมทธิล เซลลูโลส (Carboxymethyl cellulose,C.M.C)	เคมีวิทยาศาสตร์อุตสาหภัณฑ์ ประเทศไทย
9. นิโคตินิค แอซิด (Nicotinic acid)	เคมีวิทยาศาสตร์อุตสาหภัณฑ์ ประเทศไทย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.3 สัตว์ทดลองและการเตรียมวัสดุอุปกรณ์

2.3.1 เตรียมพ่อพันธุ์แม่พันธุ์ปลากะพงขาว (Brood stock)

พ่อแม่พันธุ์ปลาได้จากสถานีประมงน้ำกร่อยระยอง อายุระหว่าง 5-7 ปี เลี้ยงในบ่อดินกลางแจ้งร่วมกับปลาหมอเทศ (Orechromis mosambica) และปลานวลจันทร์ (Chanos chanos) ความเค็มน้ำอยู่ระหว่าง 30-32 ส่วนในพันส่วน ระดับน้ำในบ่อจะเปลี่ยนแปลงตามการขึ้นลงของน้ำทะเลเพราะมีทางระบายน้ำติดต่อถึงกัน ฉะนั้นการหมุนเวียนของน้ำจึงค่อนข้างจะเป็นการถ่ายเทแบบธรรมชาติสภาพภายในบ่อเลี้ยงนี้จะไม่มีการให้อาหารเสริม

ก่อนที่จะทำการผสมพันธุ์ปลา ต้องมีการคัดขนาดพ่อพันธุ์แม่พันธุ์เสียก่อนเพื่อให้ได้พ่อพันธุ์แม่พันธุ์ที่มีความสมบูรณ์เพศเต็มที่แล้วจึงทำการฉีดฮอร์โมนเร่งการวางไข่ ในปลาเพศเมียใช้ฮอร์โมนพิวเบอร์โรเจน (puberogen) ร่วมกับฮอร์โมนเอช.ซี.จี (chorionic gonadotropin) ส่วนในเพศผู้ใช้ฮอร์โมน เอช.ซี.จี. อย่างเดียว ตำแหน่งที่ฉีดฮอร์โมนคือใต้ครีบหลัง เมื่อฉีดฮอร์-โมนเรียบร้อยแล้วลำเลียงพ่อพันธุ์แม่พันธุ์ปลาไปใส่ในบ่อเลี้ยงขุนและใช้บ่อเดียวกันนี้เป็นบ่อผสมพันธุ์ไปในตัวด้วย (อัตราส่วนเพศผู้ : เพศเมีย 3:1) เสร็จแล้วเปิดน้ำทะเลใส่ให้เต็มบ่อ ในขณะที่ปลายังผสมพันธุ์กันเปิดให้น้ำถ่ายเทอยู่ตลอดเวลาจนกระทั่งปลาผสมพันธุ์และเริ่มวางไข่ ซึ่งจะเริ่มตั้งแต่เวลาประมาณ 19.00 น. เป็นต้นไป จนพระจันทร์ขึ้นหรือมีแสงของดวงจันทร์ปลาจะหยุดผสมพันธุ์และเลิกวางไข่

2.3.2 ไข่ปลา, การรวบรวมไข่และการฟักไข่

เมื่อแม่ปลาเริ่มวางไข่ซึ่งเชื่อว่าไข่ปลาได้รับการผสมจากเชื้อตัวผู้เป็นไข่ที่ถูกผสมแล้ว (fertilized eggs) แล้วประมาณ 12 ชั่วโมง จะสังเกตุเห็นไข่สีเหลืองอ่อนจะลอยอยู่ใต้ผิวน้ำเล็กน้อย) ทำการรวบรวมโดยใช้ผ้าอวนเบอร์ 120? นำไข่ที่ได้มาทำความสะอาดด้วยน้ำทะเลแล้วนำไปใส่ในถังฟักไข่ขนาด 1 ตัน เพื่อทำการฟักไข่ต่อไป

การฟักไข่ปลา อัตราการใส่ไข่ปลาลงในถังฟักไข่ (hatching tank) ประมาณ 500,000 ฟอง/น้ำทะเล 1 ตัน ไข่ปลาที่นำไปฟักต้องพ่นอากาศตลอดเวลา เพื่อป้องกันไข่ปลาลงไปกองที่พื้นเพราะจะกลายเป็นไข่เสีย เมื่อแน่ใจว่าไข่ฟักออกเป็นตัวหมดแล้วหยุดพ่นอากาศเปลือกไข่และไข่เสียรวมทั้งสิ่งเจือปนอื่น ๆ จะตกตะกอน รีบดูดตะกอนทิ้งทันทีหลังจากนั้นปรับระดับน้ำให้มีความสูงเท่าเดิมและแยกลูกปลา ที่ฟักออกจากไข่ใหม่ ๆ นี้ไปใส่ในบ่ออนุบาลบ่อใหม่เพื่อไม่ให้ลูกปลาอยู่อย่างหนาแน่นเกินไป

2.3.3 บ่อและการเตรียมบ่ออนุบาล

ขนาดบ่อ ที่ใช้เป็นบ่ออนุบาล เป็นบ่อซีเมนต์กลมขนาดบรรจุน้ำ 1 ตัน ภายในบ่อทาสีขาว อยู่ในร่มที่มีหลังคาบังแดดและฝน ตอนเช้าและเย็นได้รับแสงสว่างพอสมควร กลางคืนได้รับแสงไฟฟลูออเรสเซนต์ที่ติดไว้อยู่สูงจากบ่อประมาณ 3 เมตร เปิดไฟตั้งแต่เวลา 18.00-6.00 น.ของวันรุ่งขึ้น ภายในบ่อให้อากาศ 1 จุดตรงกลางบ่อ

ก่อนเริ่มทำการทดลอง ทุกบ่อจะล้างทำความสะอาดเพื่อฆ่าเชื้อโดยการใช้ฟอร์มาลินเช็ดบ่อให้แห้งทิ้งไว้ 1 สัปดาห์ หลังจากนั้นจึงเติมน้ำทะเลความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วนตั้งทิ้งไว้ 1 วัน

2.3.1 อาหารและการเตรียมอาหาร

อาหารที่ใช้เลี้ยงลูกปลากะพงขาวเพื่อการทดลองแบ่งออกเป็น 2 ชนิดคือ อาหารมีชีวิต (living diets) และอาหารสูตรสำเร็จ (compound diets)

2.3.4.1 อาหารมีชีวิต ประกอบด้วยโรติเฟอร์ (Rotifer), อาร์ทีเมีย (Artemia) ที่ฟักออกเป็นตัวแล้ว, เคอย (Mesopodopsis spp; Acetes spp.),และเนื้อปลาข้างเหลือง (Caranx leptolepsis) สับละเอียด

2.3.4.1.1 การเตรียมโรติเฟอร์

ใช้ถุงกรองขนาด 69 ไมครอนกรองโรติเฟอร์จากบ่อเลี้ยงขนาด 15 ตัน นำไปล้างทำความสะอาดโดยปล่อยให้น้ำทะเลไหลผ่านถุงกรองนานประมาณ 15 นาที แล้วนำไปใส่ในถังน้ำทะเลสะอาดเพื่อใช้เลี้ยงลูกปลาต่อไป โรติเฟอร์นี้ต้องเตรียมทุกวันและให้เป็นอาหารปลาหมดภายในวันเดียว

2.3.4.1.2 การเตรียมอาร์ทีเมีย เนื่องจากอาร์ทีเมียที่ใช้ปกติอยู่ในสภาพไข่แห้งบรรจุกระป๋อง เวลานำมาใช้เลี้ยงต้องนำมาเพาะให้ออกเป็นไรน้ำเค็มตัวเล็กๆ เสียก่อน วิธีการเพาะตามคำแนะนำของผู้ผลิตดังนี้ ไข่อาร์ทีเมียที่ใช้ทดลองเป็นของบริษัทซานฟรานซิสโกเบ San Francisco Bay (California U.S.A.) ยี่ห้อ Red jungle ทำการเพาะไข่อาร์ทีเมียในน้ำทะเลหรือน้ำเกลือที่มีความเค็ม 28-30 ส่วนในพันส่วนใช้อัตราส่วนไข่อาร์ทีเมีย 10 กรัมต่อน้ำทะเล 10 ลิตร ขณะฟักไข่อาร์ทีเมียต้องเป่าอากาศลงไปแรง ๆ เพื่อให้เกิดการหมุนเวียนของน้ำในอ่างป้องกันไม่ให้ไข่ตกตะกอนซึ่งจะเป็นไข่เสียไป ไข่จะฟักเป็นตัวอ่อน ภายใน 24-33 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 26-28° ซ. เวลานำมาเลี้ยงลูกปลาต้องแยกเอาตัวอ่อนของอาร์ทีเมียและเปลือกไข่ออกจากกันและล้างทำความสะอาดตัวอ่อนด้วยน้ำทะเลอีกครั้งนำไปใส่ถังบรรจุน้ำทะเลสะอาดเป่าอากาศต่อนข้างแรงเพื่อนำไปใช้เลี้ยงปลาต่อไป การเตรียมอาร์ทีเมียนี้ต้องเตรียมทุกวันและให้มีปริมาณเพียงพอต่อความต้องการของปลาด้วย

2.3.4.1.3 การเตรียมเคอย, กุ้งฝอย ใช้กระชอนด้ามยาวช้อนจากบ่อน้ำทิ้งของสถานีประมงน้ำกร่อยระยองในเวลาเช้าหรือเย็นจะได้ทั้งเคอยตาดำ เคอยตาแดง และกุ้งฝอย ในการทดลองนี้จะไม่มีการแยกชนิดจะให้ทั้งเคอยและกุ้งฝอยรวมกัน

2.3.4.2 อาหารสูตรสำเร็จที่เตรียมขึ้นเองใช้ตามวิธีของเพียรศิริ ปิยะธีระธิติวรกุล (2524) ได้จากการผสมระหว่างเคซีนไฮโดรไลเสท (casein hydrolysate), ซี.เอ็ม.ซี (C.M.C.; carboxy methyl cellulose), เนื้อปลาช้างเหลืองอบ, น้ำมันตับปลา, น้ำมันพืช ปราศจากโคเลสเตอรอล เกลือแร่และวิตามินรวม (ตารางที่ 2, 3, 4)

2.3.4.2.1 การเตรียมอาหารสูตรสำเร็จ

ก. อบเคซีนและเนื้อปลาช้างเหลืองนาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 80° ซ. แล้วนำมาปั่นให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่น (blender)

ข. ละลายวุ้น (agar) ด้วยน้ำปริมาตรตามที่กำหนดไว้แล้วที่อุณหภูมิ 90° ซ.

ค. เติมส่วนผสมของอาหารต่าง ๆ ตามลำดับดังนี้ คือ เคซีนผสมเนื้อปลาที่ปั่นจนเป็นเนื้อเดียวกันแล้ว, ซี.เอ็ม.ซี, เกลือแร่, น้ำมัน คนส่วนผสมต่าง ๆ เหล่านี้อย่างเร็วและแรงเพื่อให้ผสมเข้ากับวุ้นจนเป็นเนื้อเดียวกัน ผสมสีแดงลงไปเล็กน้อยเพื่อให้อาหารมีสีคล้ายอาร์ทีเมีย

ง. ปล่อยให้อุณหภูมิลดลงเหลือประมาณ 60°ซ. เติมวิตามินรวมลงไป แล้วคนต่อไปให้วิตามินรวมเข้ากับส่วนผสมของอาหารต่าง ๆ จนเป็นเนื้อเดียวกัน

จ. นำส่วนผสมของอาหารที่ผสมเสร็จแล้ว เทลงบนแผ่นอลูมิเนียม (aluminum foil) ใช้ช้อนเกลี่ยอาหารออกเป็นชิ้นบาง ๆ นำเข้าแช่ในตู้เย็นจนวุ้นจับตัวแข็ง จึงแกะออกบรรจุในภาชนะสะอาดปิดฝาสนิทเก็บในตู้เย็น 0°ซ.

ตารางที่ 8 ส่วนประกอบและคำนวณคุณค่าทางอาหารของอาหารสูตรสำเร็จ

ส่วนประกอบ	คุณค่าทางอาหาร (คำนวณ)					
	กรัมต่อกิโลกรัม	%โปรตีน	%ไขมัน	%คาร์โบไฮเดรท	%วิตามิน	เกลือแร่
Casein hydrolysate	666.2	66.92	-	-	-	-
ปลาข้างเหลือง (อบนาน 24 ชม. ด้วยความร้อน 80 ซ)	180.8	18.08	-	-	-	-
Cod liver oil	37.0	-	2.3	-	-	-
Corn oil	23.0	-	1.7	-	-	-
C.M.C.	17.0	-	-	1.3	-	-
Agar	13.0	-	-	3.7	-	-
Mineral mix*	52.85*	-	-	-	-	5.285
Vitamin mix**	9.6102	-	-	-	0.961	-
รวม	1,000	85	4	4	0.961	5.285
น้ำ	3,500cc	-	-	-	-	-

* Mineral mix จากสูตร H 440. Western Fish Nutrition Laboratory ตารางที่ 3

** Vitamin mix ตารางที่ 4

ตารางที่ 9 ชนิดและปริมาณของแร่ธาตุรวม (mineral mix) ที่ใช้ในอาหารสูตรสำเร็จ

ชนิด	ปริมาณเป็นกรัมต่ออาหารแห้ง 100 กรัม
$HaHPO_4$ 2H2O	2.07
$CaCO_3$	1.48
KH_2 PO_4	1.00
NaCl	0.60
$MnSO_4$	0.035
$FeSO_4$ $7H_2O$	0.05
$MgSO_4$	0.30
KIO_3	0.001
$CuSO_4$ $5H_2O$	0.003
$ZnCO_3$	0.015
$CoCl_2$	0.00017
$NaMoO_4$ $2H_2O$	0.00083
Na_2 SeO_3	0.00002

ตารางที่ 10 ชนิดและปริมาณของวิตามินรวม (vitamin mix) สูตร H 440 ของ Western Fish Nutrition Laboratory

ชนิด	ปริมาณเป็นกรัมต่ออาหาร 100 กรัม
Choline chloride	0.500
Inositol	0.200
Ascorbic acid	0.100
Niacin	0.075
Ca-pantothenate	0.050
Riboflavin	0.020
Menadione	0.004
Pyridoxine. HCL	0.005
Thiamine. HCL	0.005
Folic acid	0.0015
Biotin	0.0005
Vitamin 12(1)	0.00001

(1) Vitamin B_{12} จะเท่ากับ 0.5 มล. ถ้าใช้ B_{12} 10 มก. ละลายในน้ำ 500 ซี.ซี.

2.3.5 การเตรียมน้ำและระบบน้ำในการอนุบาล

ใช้ระบบถ่ายเทน้ำเช้า-เย็น เวลา 7.00 น. และ 15.00 น. โดยถ่ายเทน้ำประมาณ 80 % ของปริมาตรน้ำทั้งหมด

2.4 วิธีดำเนินการทดลอง

แบ่งการเลี้ยงและการอนุบาลลูกปลาเป็น 2 ระยะคือ ระยะแรกเป็นการเตรียมลูกปลาสำหรับทดลอง (0-15 วัน) ระยะที่ 2 เริ่มการทดลองเพื่อศึกษาแอคติวิตี้ของเอ็นไซม์ (อายุ 15-120 วัน)

2.4.1 การอนุบาลลูกปลาอายุ 0-15 วัน

ลูกปลาที่ฟักออกจากไข่สองวันแรก ไม่มีการให้อาหารและถ่ายน้ำแต่จะมีการดูด - ตะกอนออกบ้างเพื่อทำความสะอาดก้นถัง เมื่อลูกปลาย่างเข้าสู่วันที่ 3 จึงให้โรติเฟอร์เป็นอาหารบ้างเล็กน้อย พอถึงวันที่ 4 จึงให้โรติเฟอร์เต็มที่และเพิ่มจำนวนโรติเฟอร์ขึ้นเรื่อย ๆ เพื่อให้เพียงพอกับความต้องการของปลา แต่ต้องไม่ให้จนมากเกินไปเพราะจะทำให้น้ำเสีย ระยะ ตั้งแต่ 3 วันเป็นต้นไป (คือเริ่มตั้งแต่ให้อาหารปลา) มีการถ่ายเทน้ำทุกวัน วันละประมาณ 1/3 ของปริมาตรน้ำในบ่อ ทำการเลี้ยงลูกปลาในบ่ออนุบาลจนถึงอายุ 14 วัน จึงเริ่มทำการคัดขนาดให้ได้ขนาดเท่า ๆ กัน แล้วนำมาแยกเลี้ยงตามกลุ่ม (treatment) ต่าง ๆ ตามกำหนดต่อไป

2.4.2 การอนุบาลลูกปลาอายุ 15-120 วัน

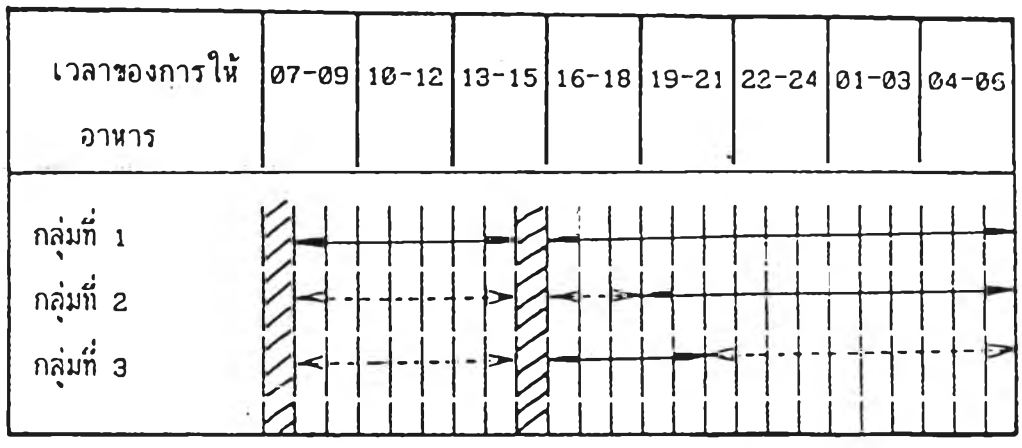
พยายามคัดลูกปลาที่มีขนาดใกล้เคียงกันทั้งหมด นำมาลงในบ่อเลี้ยงที่มีการจัดบ่อแบบ Randomized Complete Block (RB) ด้วยความหนาแน่นบ่อละ 4,000 ตัว/ตัน แบ่งการทดลองเป็น 3 กลุ่ม (treatment) กลุ่มทดลองละ 3 ซ้ำ (replicate)

กลุ่มที่ 1 การเลี้ยงด้วยอาหารมีชีวิตคือ โรติเฟอร์, อาร์ทีเมีย, กุ้งเคอย, เนื้อปลาสับ

กลุ่มที่ 2 การเลี้ยงด้วยอาหารมีชีวิต ตอนกลางคืนและเลี้ยงด้วยอาหารสูตรสำเร็จตอนกลางวัน ตลอดการทดลองนาน 120 วัน

กลุ่มที่ 3 การเลี้ยงด้วยอาหารสูตรสำเร็จตลอดทั้งกลางวันและกลางคืน นอกจากให้อาหารสูตรสำเร็จแล้วจำเป็นต้องเสริมด้วยอาหารมีชีวิต คือ โรติเฟอร์, อาร์ทีเมีย กุ้งเคอย เนื้อปลาสับ ตามลำดับ วันเว้นวัน โดยที่ภายใน 1 สัปดาห์ จะให้อาหารมีชีวิต 3 ครั้ง ช่วงเวลา 16.00-20.00 น. หลังจากนั้นจึงเปลี่ยนไปให้อาหารสูตรสำเร็จและเมื่อเลี้ยงจนถึงวันที่ 106 จึงเปลี่ยนไปให้อาหารเป็นอาร์ทีเมียผสมกับเนื้อปลาข้างเหลืองสับตลอดจนครบ 120 วัน

ตารางที่ 11 ลักษณะการให้อาหารลูกปลากะพงขาวในแต่ละวันตลอดการการทดลอง



– – – อาหารสูตรสำเร็จ

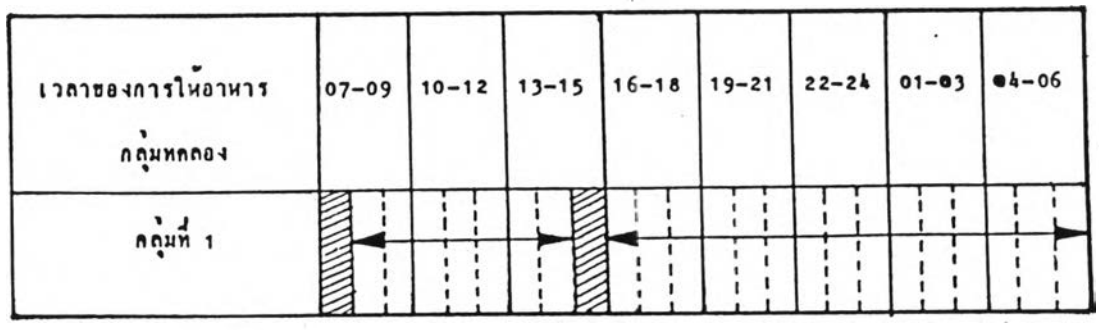
——— อาหารมีชีวิต

ZZZZZ ช่วงการถ่ายน้ำ

2.4.3 การเก็บตัวอย่างปลาเพื่อนำมาศึกษาแอคติวิตี้ของเอ็นไซม์และอัตราการเจริญเติบโต ทำการเก็บตัวอย่างเมื่อปลาอายุ 15, 22, 29, 25, 56, 71, 88, 104 และ 120 วันตามลำดับ ซึ่งช่วงเวลาที่เก็บตัวอย่างนี้จะเป็นช่วงก่อนและหลังการเปลี่ยนชนิดอาหารแต่ละชนิด

การเก็บตัวอย่าง ทำการเก็บตัวอย่างภายหลังจากที่ให้อาหารแล้ว 1 ชั่วโมง ตามวันเวลาที่กำหนด จำนวนตัวอย่างที่เก็บ 300 ตัว/ครั้ง/บ่อ ทำได้โดยใช้กระชอนตาถี่ช้อนลูกปลาขึ้นมานับจำนวนจนครบตามจำนวนที่ต้องการนำลูกปลามาชั่งน้ำหนักวัดความยาว จึงผ่าตัดตัดเอา

ตารางที่ 12 ลักษณะการให้อาหารลูกปลากะพงขาวกลุ่มที่ 1 ในแต่ละวันตลอดการทดลองนาน 120 วัน



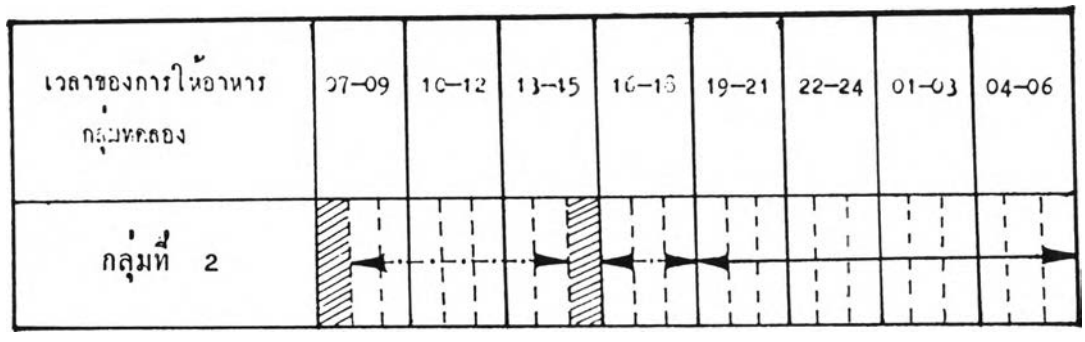
เปลี่ยนน้ำ

อาหารมีชีวิต

ตารางที่ 13 ชนิดของอาหารและช่วงอายุของลูกปลากะพงขาวกลุ่มที่ 1 ที่ทำการเก็บตัวอย่างตลอดระยะเวลาของการเลี้ยงนาน 120 วัน

ครั้งที่	อายุ (วัน)		ชนิดของอาหารที่กิน	ระยะเวลาของการให้อาหาร (วัน)
	เก็บตัวอย่าง	เปลี่ยนอาหาร		
1	15	16	โรติเฟอร์ - อาทีเมีย	3
2	22		อาร์ทีเมีย	34
3	29	40	อาร์ทีเมีย	
		41		
4	45		อาร์ทีเมีย - กุ้งเคอย	
5	56	63	อาร์ทีเมีย - กุ้งเคอย	22
6	71	64	กุ้งเคอย	
7	88	88	กุ้งเคอย	24
		89	กุ้งเคอย - ปลาสับ	3
8	104	92	ปลาสับ	
9	120	120	ปลาสับ	38

ตารางที่ 14 ลักษณะการให้อาหารลูกปลากะพงขาวกลุ่มที่ 2 ในแต่ละขั้นตลอดการทดลองนาน 120 วัน



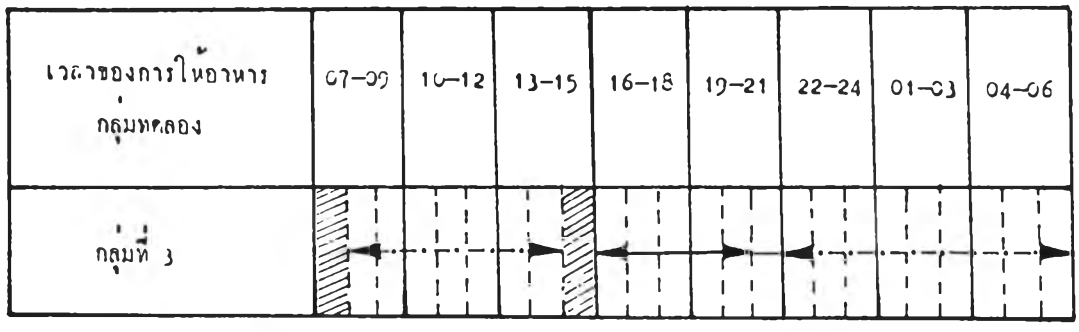
เปลี่ยนน้ำ .—.—.— อาหารสูตรสำเร็จ

——— อาหารมีชีวิต

ตารางที่ 15 ชนิดของอาหารและช่วงอายุของลูกปลากะพงขาวกลุ่มที่ 2 ที่ทำการเก็บตัวอย่าง ตลอดระยะเวลาของการเลี้ยงนาน 120 วัน

ครั้งที่	อายุ		ชนิดของอาหารที่กิน	ระยะเวลาของการให้อาหาร (วัน)
	เก็บตัวอย่าง	เปลี่ยนอาหาร		
1	15	16	โรติเฟอร์ + อาร์ทีเมีย	3
2	22		อาร์ทีเมีย + อาหารสูตรสำเร็จ	34
3	29		อาร์ทีเมีย + อาหารสูตรสำเร็จ	
4	45	40	อาร์ทีเมีย + กุ้งเคอย + อาหารสูตรสำเร็จ	22
		41		
5	56		อาร์ทีเมีย + กุ้งเคอย + อาหารสูตรสำเร็จ	
6	71	63	กุ้งเคอย + อาหารสูตรสำเร็จ	
		64		
7	88	88	กุ้งเคอย + อาหารสูตรสำเร็จ	24
		89	กุ้งเคอย + ปลาสับ + อาหารสูตรสำเร็จ	3
8	104	106	ปลาสับ + อาหารสูตรสำเร็จ	14
9	120	120	อาร์ทีเมีย + ปลาสับ + อาหารสูตรสำเร็จ	14

ตารางที่ 16 ลักษณะการให้อาหารลูกปลากะพงขาวกลุ่มที่ 3 ในแต่ละวันตลอดการทดลองนาน 120 วัน



ตารางที่ 17 ชนิดของอาหารและช่วงอายุของลูกปลากะพงขาวกลุ่มที่ 3 ในแต่ละวันที่ทำการเก็บตัวอย่างตลอดระยะเวลาของการเลี้ยงนาน 120 วัน

ครั้งที่	อายุ (วัน)		ชนิดของอาหารที่กิน	ระยะเวลาของการให้อาหาร
	เก็บตัวอย่าง	เปลี่ยนอาหาร		
1	15	16	โรติเฟอร์ + อาร์ทีเมีย	3
2	22		อาหารสูตรสำเร็จเสริมด้วยอาร์ทีเมีย	34
3	29		อาหารสูตรสำเร็จเสริมด้วยอาร์ทีเมีย	
		40		
4	45	41	อาหารสูตรสำเร็จเสริมด้วยกุ้งเคอย, อาร์ทีเมีย	22
5	56		อาหารสูตรสำเร็จเสริมด้วยกุ้งเคอย, อาร์ทีเมีย	
		63		
6	71	64	อาหารสูตรสำเร็จเสริมด้วยกุ้งเคอย	
7	88	88	อาหารสูตรสำเร็จเสริมด้วยกุ้งเคอย	24
		89	อาหารสูตรสำเร็จเสริมด้วยกุ้งเคอย, ปลาสับ	3
8	104	92	อาหารสูตรสำเร็จเสริมด้วยกุ้งเคอย, ปลาสับ	14
		100		
9	120	120	อาหารสูตรสำเร็จเสริมด้วยปลาสับ, อาร์ทีเมีย	14

ทางเดินอาหารออกมาแยกเป็นส่วนกระเพาะอาหาร, ส่วนทางเดินอาหารทั้งหมด และส่วนของลำไส้ (รูปที่ 1) เสร็จแล้วนำไปแช่ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -25°ซ. ทันทีเพื่อใช้แหล่งของเอ็นไซม์ในการศึกษาต่อไป ในการผ่าตัดจะเริ่มผ่าตัดจากกลุ่มที่ 1 เป็นอันดับแรกตามด้วยกลุ่มที่ 2 และ 3 ตามลำดับ โดยการผ่าตัดนี้เริ่มจากปลาขนาดใหญ่ก่อน

2.4.4 การวัดขนาดและการชั่งน้ำหนัก

การวัดขนาดปลา จะวัดเป็นความยาวลำตัว (body length) โดยวัดจากปลายจงอยปาก (snout) จนถึงปลายลำตัวที่ติดกับครีบหาง

การชั่งน้ำหนัก ทำการชั่งน้ำหนักโดยใช้เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง ด้วยวิธีการชั่งน้ำหนักปลารวมกับน้ำที่มีอยู่ในภาชนะซึ่งทราบน้ำหนักล่วงหน้าแล้ว

2.4.5 การเตรียมสารละลายเพื่อศึกษาแอคติวิตี้ของเอ็นไซม์

2.4.5.1 สารละลายสำหรับหาปริมาณโปรตีน

2.4.5.1.1 สารละลายอัลคาไลน์คอปเปอร์สำหรับหาปริมาณโปรตีน (alkali copper)

ก. สารละลาย ก. ละลายโซเดียมโปแตสเซียมตาร์เตรท ($NaKC_4H_4O_6.6H_2O$) 3.3 กรัมในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร (3.3 % $NaKC_4H_4.6H_2O$)

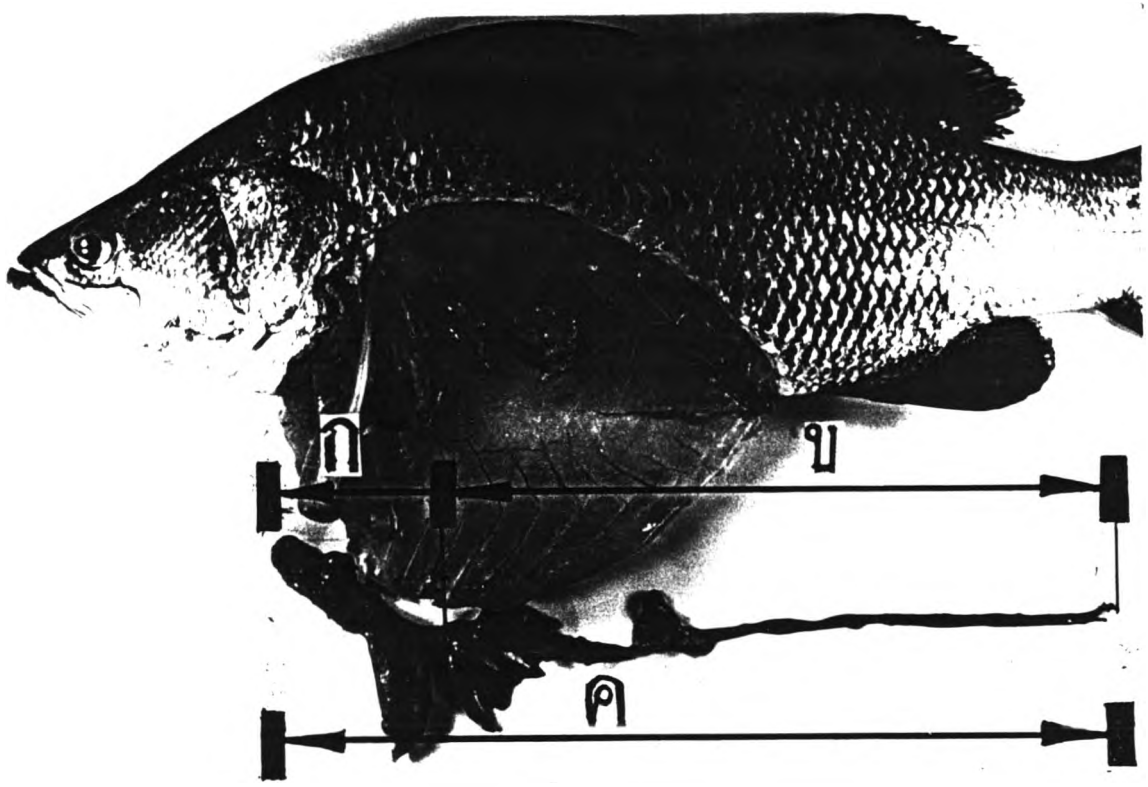
ข. สารละลาย ข ละลายคอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.H_2O$) 1.25 กรัมในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร (1.25% $CuSo_4.H_2O$)

ค. สารละลาย ค ละลายโซเดียมคาร์บอร์เนต ($NaCO_3$) 25 กรัมในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร (25% Na_2CO_3)

ผสมสารละลาย ก 1 มิลลิลิตร สารละลาย ข 1 มิลลิลิตร และสารละลาย ค 100 มิลลิลิตรก่อนนำไปใช้

2.4.5.1.2 สารละลายฟีนอล (phenol reagent)

ผสมโซเดียมทังสเตท (sodium tungstate) 50 กรัม โซเดียมโมลิบเดต (Sodium molybdate) 12.5 กรัม, น้ำกลั่น 350 มิลลิลิตร, 85% กรดฟอสฟอริค 25 มิลลิลิตร กรดไฮโดรคลอริคเข้มข้น 50 มิลลิลิตร รีฟลักซ์ (reflux) ด้วยความร้อนต่ำ ๆ นาน 10 ชั่วโมง แล้วเติมลิเซียมซัลเฟต (lithium sulphate) 75 กรัม น้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร และน้ำโปรมีน 2-3 หยด ต้มไล่โปรมีนที่มากเกินพอประมาณ 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นเก็บไว้ในขวดสีชา สารละลายนี้สามารถเก็บไว้ได้นาน 3-6 เดือนในตู้เย็น ก่อนใช้เติมน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร



ก : กระเพาะอาหาร (หลอดอาหาร - กระเพาะ)

ข : ลำไส้ (ไส้ติ่ง - ทวารหนัก)

ค : ทางเดินอาหาร (หลอดอาหาร - ทวารหนัก)

รูปที่ 2 แสดงการผ่าตัดทางเดินอาหารแยกออกเป็นส่วนต่าง ๆ

2.4.5.1.3 สารละลายโปรตีนมาตราฐาน

ละลาย BSA (เกรด A) 2 มิลลิกรัม/1 มิลลิลิตร น้ำกลั่น

2.4.5.2 สารละลายสำหรับวัดแอคติวิตี้ของทริปซิน

2.4.5.2.1 เตรียม 0.25 โมลาร์ ทริส - ไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ พีเอช 7, 8, 9 ละลายทริสไฮดรอกซีอะมิโนมีเธน Tris. (hydroxymethyl) aminomethane) 30.25 กรัมในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร, ปรับพี.เอช ให้ได้ตามต้องการด้วย 2 นอร์มาลกรดไฮโดรคลอริค หรือ 2 นอร์มาลโซเดียมไฮดรอกไซด์ แล้วเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรทั้งหมดเป็น 1 ลิตร

2.4.5.2.2 เตรียม 0.25 โมลาร์ ทริส-ไกลซีนบัฟเฟอร์ - พี.เอช. 8, 9, 10

ละลายไกลซีน 18.75 กรัมและทริส.ไฮดรอกซีอะมิโนมีเธน 30.25 กรัมในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับ พี.เอช.ให้ได้ความต้องการด้วย 2 นอร์มาลโซเดียม-ไฮดรอกไซด์ แล้วเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรทั้งหมดเป็น 1 ลิตร

2.4.5.2.3 เตรียม 0.25 โมลาร์.ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ - พี.เอช. 6, 7, 8

ละลายโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2Po_4) 34 กรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร ละลายไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) 43.5 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร นำสารละลายทั้งสองมาไตเตรทกัน (titrate) ให้ได้ พี.เอช.ตามต้องการ

2.4.5.2.4 เตรียม 0.25 โมลาร์.ซีเตรต.บัฟเฟอร์ - พี.เอช. 5.0 5.5 6.0

ละลายกรดซิตริค 48 กรัม ในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับ พี.เอช. ให้ได้ความต้องการด้วย 2 นอร์มาลกรดไฮโดรคลอริค แล้วเติมน้ำจนได้ปริมาตรครบ 1 ลิตร

2.4.5.2.5 สารละลายเกลือ (salt solution)

ละลายโซเดียมคลอไรด์ 1 กรัม และแคลเซียมคลอไรด์ 0.3 กรัม ในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร

2.4.5.2.6 สารละลายสับสเตรทสังเคราะห์ (Artificial substrate solution)

ละลายเป็นโซอิล-ดีแอล-อาร์จีนีน-พี-ไนโตรอะนิไลด์ (BAPNA) ในไดเมทธิลฟอร์มอาไมด์ (D.M.F., dimethylformamide) 1 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร นำไปเก็บในตู้เย็นทันที ไม่ควรเตรียมเกิน 1 สัปดาห์

i17438379

2.4.5.3 สารละลายสำหรับวัดแอคติวิตี้ของไคติเนส

2.4.5.3.1 สารแขวนลอยไคติน (Native chitin suspension)

ละลายเนทีฟ-ไคติน-เพาเดอร์ (native chitin powder) จำนวน 5 มิลลิกรัมในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร

2.4.5.3.2 สารละลายไคโตไบเอส (chitobiase solution)

ละลายเบต้า-กลูโคซิเดส (β-glucosidase) จำนวน 0.3 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

2.4.5.3.3 0.8 โมลาร์ สารละลายโปแตสเซียมเตตร้าบอร์เรต (0.8 M. potassium tetraborate)

ละลายโปแตสเซียมเตตร้าบอเรต ($K_2B_4O_7$) 169.28 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2.4.5.3.4 ซิเตรตฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Citrate phosphate buffer) พี.เอช.5.1

ก. สารละลายกรดซิตริค 115.2 กรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร จะได้สารละลายกรดซิตริคความเข้มข้น 0.6 โมลาร์

ข. ละลายไดโซเดียมฟอสเฟต 181.2 กรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร จะได้สารละลายโซเดียมฟอสเฟตความเข้มข้น 1.2 โมลาร์

นำสารละลายในข้อ ก. และข้อ ข มาไตเตรทกันจนได้ พี.เอช 5.1 ตามต้องการ

2.4.5.3.5 สารละลาย ดี.เอ็ม.เอ.บี (DMAB solution)

ก. เตรียมสารละลายกรดไฮโดรคลอริค 10 นอร์มาล ผสมกรดไฮโดรคลอริคเข้มข้น 82.9 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร

ข. เตรียมสารละลายกรดอะซิติค 1.25 % (V/V) 10 N. HCl. ตวง 10 นอร์มาลกรดไฮโดรคลอริค 1.25 มิลลิลิตร ผสมด้วยกรดอะซิติค 98.75 มิลลิลิตร

ค. ละลายไดเมทธิลอะมิโนเบ็นซอลดีไฮด์ (DMAB) 1 กรัม ในสารละลายข้อ ข.

2.4.5.4 สารละลายสำหรับวัดแอคติวิตีของเป็ปซิน

2.4.5.4.1 เคซีนสับสเตรต (Casein substrate)

ก. เตรียมไดโซเดียมฟอสเฟต 0.05 โมลาร์ (0.05 M. Na_2HPO_4) ละลายไดโซเดียม 7.1 กรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร

ข. เตรียม 0.1 นอร์มาลกรดไฮโดรคลอริค (0.1 N HCl) ละลายกรดไฮโดคลอริคเข้มข้น 8.25 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 1 ลิตร

ค. เตรียม 0.1 นอร์มาลโซเดียมไฮดรอกไซด์ (0.1 N. NaOH) ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 4 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร ,

ละลายเคซีน 0.6 กรัม ใน 80 มิลลิตร ของไดโซเดียมฟอสเฟตความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ปรับ พี.เอช. ให้ได้ 7.0 ด้วย 0.1 นอร์มาลโซเดียมไฮโดรคลอริค เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร สับสเตรตนี้ต้องเตรียมใหม่ทุกวัน

2.4.5.4.2 สารละลายกระตุ้นเอ็นไซม์ (enzyme activated solution)

ก. เตรียม 0.03 โมลาร์ซีสเตอีน (0.03 โมลาร์ L-cysteine) ละลายซีสเตอีน 3.6348 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร

ข. เตรียม 0.006 โมลาร์ EDTA ละลาย EDTA 2.0172 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร

นำสารละลายในข้อ ก และ ข ผสมกันปรับ พี.เอช. ให้ได้ 4.5 ด้วย 0.1 นอร์มาลกรดไฮโดรคลอริค หรือ 0.1 นอร์มาลโซเดียมไฮดรอกไซด์ สารละลายนี้ต้องเตรียมใหม่ทุกวัน

2.4.5.4.3 สารละลาย กรดไตรคลอโรอะซิติก เพื่อตกตะกอนโปรตีน

ก. เตรียม 0.11 โมลาร์กรดไตรคลอโรอะซิติค (CCl_3COOH) ละลายกรดไตรคลอโรอะซิติค 8.987 กรัม ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร

ข. เตรียม 0.22 โมลาร์ (CH_3COONa)ละลาย CH_3COONa 9.0244 กรัม ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร

ค. เตรียม 0.33 โมลาร์กรดอะซิติค สารละลายกรดเกลเซียลอะซิติค 9.5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 500 มิลลิลิตร

ผสมสารละลายในข้อ ก. และข้อ ข. จำนวน 490.17 มิลลิลิตร เสร็จแล้วเติมด้วย 0.33 โมลาร์กรดอะซิติค 9.5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 500 มิลลิลิตร

2.4.5.4.4 สารละลายมาตรฐาน กรดอะมิโนไทโรซิน (standard solution)

ชั่งไทโรซิน (L-tyrosine)500 ไมโครกรัมละลายใน 0.1 นอร์มาลกรดไฮโดรคลอริค

2.4.5.5 สารละลายสำหรับวัดแอคติวิตีของอมายเลส

2.4.5.5.1 ไตรเอทธาโนลามีน บัฟเฟอร์ (TEA.buffer) พี.เอช.7.5

ชั่งสารละลายไตรเอทธาโนลามีนในหลอดปิดฝาขนาดเล็ก (microtube) หนัก 1.49 กรัม ผสมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร ปรับ พี.เอช. ด้วย 10 นอร์มาล กรดไฮโดรคลอริคจนได้ พี.เอช. 7.5 เติมโซเดียมคลอไรด์ 2 กรัม แช่ในตู้เย็น

2.4.5.5.2 สารละลายลูกอล (Lugol solution)

ผสมกรดไฮโดรคลอริค 1 มิลลิลิตร ด้วยสารละลายไอโอดีน 250 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 50 มิลลิลิตร เตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนทำการทดลอง

2.4.5.5.3 สารละลายน้ำแป้ง (Starch substrate)

ละลายแป้ง (soluble starch) 4 กรัมในไตรเอทธาโนลามีน บัฟเฟอร์ พี.เอช. 7.5 (4 % ใน TEA buffer; w/v) ใช้เพียง 0.5 มิลลิลิตรต่อ 1 การทดลอง เตรียมเสร็จแล้วต้องแช่เย็น (deep freeze) ทันทีเพื่อป้องกันการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย โดยแบ่งบรรจุในหลอดไมโคร หลอดละ 0.50 มิลลิลิตร

2.4.5.5.4 สารละลายเกลือ (salt solution)

ละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 10 กรัม และแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) 3 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร ใช้สำหรับเป็นสารละลายเจือจางเอ็นไซม์ รักษาไว้ในตู้เย็น

2.4.5.6 การเตรียมสารละลายเอ็นไซม์ (enzyme preparation)

นำตัวอย่างไข่ปลาและลำไส้ที่แช่ในตู้เย็น ณ อุณหภูมิ -25 องศาเซลเซียส ไปทำการบด (homogenized) ด้วยแท่งแก้ว (glass stick) ในเครื่องบด (homogenizer) พอให้ผนังลำไส้ปลาแตกเท่านั้น แล้วนำไปปั่น (centrifuged) นาน 20 นาที ด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์แรงเหวี่ยง 5,000 รอบ/วินาที อุณหภูมิ -25 องศาเซลเซียส ส่วนที่เป็นน้ำใส (supernatant) นำไปศึกษาแอคติวิตีของเอ็นไซม์ดังต่อไปนี้

2.4.6 วิธีการวิเคราะห์แอคติวิตีของเอ็นไซม์

2.4.6.1 ปริมาณโปรตีน (Protein determi nation)

วัดตามวิธีการของ Lowry และคณะ (1951) ใช้สารละลายตัวอย่างที่ต้องการวัดปริมาณโปรตีน 0.5 มิลลิลิตร เติมด้วยสารละลายอัลคาไลคอปเปอร์ ซึ่งเตรียมตามข้อ 2.4.5.1 ปริมาตร 5 มิลลิเมตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที เติมสารละลายฟินอลรีเอเจนต์ 0.5 มิลลิลิตร เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนเกิดสีนาน 30 นาที นำไปวัดการดูดแสงของสารละลายสี ซึ่งเกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร อ่านค่าปริมาณโปรตีนเทียบกับสารละลายสีที่เกิดขึ้นจากสารละลายโปรตีนมาตราฐาน BSA ที่มีปริมาณโปรตีนในช่วงตั้งแต่ 0-200 ไมโครกรัม

2.4.6.2 แอคติวิตีของทริปซิน (Trypsin activity)

วัดตามวิธีการของ Hofer (1984) เตรียมสารละลายในข้อ 2.4.6.2 ทำการวัดแอคติวิตีของเอ็นไซม์โดยใช้สับสเตรทสังเคราะห์คือ BAPNA เตรียมสารละลายปฏิกิริยา

(incubation mixture) ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย 2.5 มิลลิโมลาร์ของสับสเตรท, 0.25 โมลาร์ของทริส ไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ พี.เอช. 8.2 เอ็นไซม์ปริมาตรที่เหมาะสมเติมน้ำลงในสารละลายที่จะทำให้ปริมาตรของสารละลายปฏิกริยาทั้งหมดได้เท่ากับ 2.5 มิลลิลิตร อุ่น (incubated) ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส ตามระยะเวลาที่ต้องการเสร็จแล้วนำสารละลายที่ได้ไปวัดสีที่เกิดขึ้นด้วยสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่นแสน 405 นาโนเมตร

กำหนดให้ 1 หน่วยของทริปซินแอคติวิตีมีค่าเท่ากับไมโครโมลของ p-nitroanilide ที่เกิดขึ้นใน 1 นาทีในสภาวะที่ใช้ทดลอง

การศึกษา พี.เอช. ที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกริยาของทริปซิน ทำได้โดยการวัดแอคติวิตีของเอ็นไซม์ในช่วง พี.เอช. ระหว่าง 5 ถึง 10 โดยใช้บัฟเฟอร์ต่างชนิดกัน คือ พี.เอช. ระหว่าง 3-6 (ซิเตรตบัฟเฟอร์), พี.เอช. 6-8 (ฟอสเฟตบัฟเฟอร์), พี.เอช. ระหว่าง 7-9 (ทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์) และพี.เอช. ระหว่าง 8-10 (ทริส-ไกลซีนบัฟเฟอร์)

2.4.6.3 แอคติวิตีของไคติเนส (Chitinase activity)

วัดตามวิธีการของ Jeuniaux (1966) เตรียมสารละลายในข้อ 2.4.6.3 โดยการวัดปริมาณของ N-acetyl-D-glucosamine (NAG) ที่ถูกปล่อยออกมาในสารละลายปฏิกริยาทั้งหมด 4 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย 100 ไมโครลิตรของ toluol, 1 มิลลิลิตรของสารละลายไคไตไบเอส, 1 มิลลิลิตร ของซิเตรตบัฟเฟอร์ พี.เอช. 5.5 ; 1 มิลลิลิตร ของสารแขวนลอยไคติน; 500 ไมโครลิตรของสารละลายเอ็นไซม์ และปริมาตรของน้ำกลั่นจนครบ 4 มิลลิลิตรหลังจากอุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมงครึ่ง แล้ววัดปริมาณ N-acetyl-D-glucosamine (NAG) ที่เกิดขึ้นโดยดัดแปลงวิธีการของ Reissig และคณะ (1955) นำ 1.0 มิลลิลิตรของสารละลายผลิตภัณฑ์จากปฏิกริยารวมกับ 0.1 มิลลิลิตร ของโปตัสเซี่ยมเตตราบอเรต นำไปทำปฏิกริยากับ 3.0 มิลลิลิตรของของสารละลาย DMAB นาน 10 นาที วัดผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่นแรง 585 นาโนเมตร คำนวณปริมาณ N-acetyl-D-glucosamine ที่เกิดจากการย่อยของเอ็นไซม์โดยใช้กราฟมาตรฐาน

กำหนดให้ 1 หน่วยของไคติเนสแอคติวิตีมีค่าเท่ากับความสามารถในการย่อยไคตินได้ผลิตภัณฑ์เป็น N-acetyl-D-glucosamine 1 ไมโครกรัมในเวลา 1 นาที

2.4.6.4 แอคติวิตีของเป็ปซิน (Pepsin activity)

วัดตามวิธีการของ Juff (1973); Richardson and Tewhait, 1978 เตรียมสารละลายในข้อ 2.4.5.4 เขย่าสารละลายกระตุ้นเอ็นไซม์จำนวน 1 มิลลิลิตร และสารละลายเคซีน 5 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองให้เข้ากัน นำไปอุ่นในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที หยุดปฏิกริยา โดยเติมสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติค 5 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรงตั้งทิ้งไว้ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ต่อไปอีก 30 นาที กรองด้วยกระดาษกรอง Toyo. No.1 เส้นผ่าศูนย์กลาง 11 เซ็นติเมตร หรือเซ็นตริฟิวจ์ด้วยเครื่องเซ็นตริฟิวจ์แบบตั้ง

โต๊ะนาน 5 นาที สารละลายน้ำใสที่ได้นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance)ที่ 275 นาโนเมตร

ในการทดลองต้องทำสารละลายควบคุม (blank) ซึ่งประกอบด้วยเอ็นไซม์ 1.00 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลายไตรคลอโรอะซิติค 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปอุ่นในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เติม 5.0 มิลลิลิตรของเคซีนที่อุ่นเอาไว้ล่วงหน้าแล้ว เขย่าอย่างแรง แล้วปฏิบัติเช่นเดียวกับวิธีการข้างต้น ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากสารละลายนี้นำไปใช้เป็นค่า blank ในการคำนวณแอคติวิตีของเอ็นไซม์เทียบการสารละลายมาตราฐานกรดอะมิโนไทโรซีน

กำหนดให้ 1 หน่วยแอคติวิตีของเป็ปซินคือปริมาณเอ็นไซม์ที่สามารถย่อยสลายสับเสตรท-เคซีน ให้เกิดกรดอะมิโนไทโรซีน 1 ไมโครโมล ต่อ 1 นาที ในสภาวะที่ใช้ทดลอง

2.4.6.5 แอคติวิตีของอมายเลส (Amylase activity)

วัดตามวิธีการของ Hofer (1984 b) เตรียมสารละลายในข้อ 2.4.5.5 โดยใช้สารละลายเอ็นไซม์ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ทำปฏิกริยากับ 500 ไมโครลิตรของสารละลายน้ำแป้ง ซึ่งใช้เป็นสับเสตรท ปล่อยให้สารละลายเอ็นไซม์ทำปฏิกริยากับสับเสตรทตามช่วงเวลาที่เหมาะสมจนปฏิกริยาเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ เสร็จแล้วดูดสารละลายของผลิตภัณฑ์ที่ได้จำนวน 50 ไมโครลิตร ใส่ลงใน 4 มิลลิลิตรของสารละลายกรดลูกอล เขย่าแล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ความยาวคลื่นแสง 580 นาโนเมตร

กำหนดให้ 1 หน่วยของเอ็นไซม์แอคติวิตีมีค่าเท่ากับความสามารถในการย่อยแป้ง 1 มิลลิกรัม ใน 1 นาที (มิลลิกรัมแป้ง/นาที)

2.4.7 การตรวจสอบคุณภาพน้ำ

ทำการตรวจสอบอุณหภูมิ ความเค็ม พี.เอช. ปริมาณออกซิเจนที่ละลายอยู่ในน้ำโดยการใช้เทอร์โมมิเตอร์ Reflective salinometer กระดาษวัด พี.เอช. และ Oxygen-meter ตามลำดับ ค่าความเค็ม อุณหภูมิ และ พี.เอช. ทำการวัดทุกวัน เวลา 7.30 น. และ 14.00 น. ส่วนปริมาณออกซิเจน ซึ่งละลายอยู่ในน้ำวัดวันเว้นวันโดยวัดด้วยค่าเป็นมิลลิกรัมออกซิเจน/ลิตร

2.5 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ข้อมูลการเจริญเติบโตและเปอร์เซนต์การรอดของลูกปลากะพงขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารต่างชนิด วิเคราะห์ด้วยวิธี Analysis of Variance เพื่อหานัยสำคัญของข้อมูลและวิธี T-Test เพื่อหาความแตกต่างและนัยสำคัญของข้อมูลแต่ละคู่ (ภาคผนวก)