บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

2.1 การทดลองที่ 1 การศึกษาระดับการย่อยสลายโปรตีนในผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองชนิดต่างๆ ด้วยเอนไซม์โปรติเอสที่สกัดจากกระเพาะอาหารปลากดเหลือง

วัสดุ

1) สัตว์ทดลอง

ปลากดเหลืองขนาดน้ำหนักประมาณ 250–300 กรัมต่อตัว จำนวน 42 ตัว โดย 12 ตัว ใช้สำหรับการศึกษาระดับการใช้ตะกอนโปรตีนไฮโดรไลเสต และระยะเวลาการใช้ที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นความอยากกินอาหาร ส่วนที่เหลือ 20 ตัว สำหรับการศึกษาระดับ pH ในกระเพาะอาหาร และ 10 ตัว เพื่อผ่าท้องนำกระเพาะอาหารมาสกัดเอนไซม์โปรติเอส ซึ่งพันธุ์ปลาทดลองของทุกการทดลองได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดสงขลา กรมประมง

2) วัตถุดิบอาหาร

2.1) กากถั่วเหลืองสกัดน้ำมัน

2.2) เมล็ดถั่วเหลืองดิบ

2.3) เมล็ดถั่วเหลืองที่ผ่านการต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

2.4) ปลาป่น (ชุดควบคุม)

3) เครื่องแก้ว

3.1) ไปเปตขนาด 0.5,1.0, 5.0 และ 10 มิลลิลิตร

3.2) หลอดทดลองขนาด 25 มิลลิลิตร

3.3) บีกเกอร์ขนาด 250, 500 และ1,000 มิลลิลิตร

3.4) ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร

4) วัสดุสำหรับสกัด และเก็บเอนไซม์ ได้แก่ ขวดเก็บเอนไซม์ขนาด 60 มิลลิลิตร จำนวน 2 ขวด และผ้าขาวบาง

5) สารเคมี

5.1) สารเคมีสำหรับสกัดเอนไซม์ และ วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ ได้แก่ ไฮโดรคลอไรด์ ไกลซีน กรดไตรคลอโรอะซิติก (Trichloroacetic acid,TCA) สารละลายที่ช่วยลดแรงตึงน้ำ (Tween 80) ฮีโมโกลบิน ไนโตรเจนเหลว ไทโรซีน

5.2) สารเคมีสำหรับศึกษาระดับการย่อยโปรตีนโดยใช้เอนไซม์สกัดจากกระเพาะอาหารปลากดเหลือง และสำหรับวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบดังใน ภาคผนวก ก

5.3) ยาสลบ (2 - phenoxyethanol)

6) วัสดุอื่น ๆ ได้แก่ ถุงพลาสติกสำหรับใส่ตัวอย่างวัตถุดิบ ช้อนตักสาร

อุปกรณ์

1) อุปกรณ์สำหรับสกัดเอนไซม์ และวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

1.1) เครื่องบดผสม ของ National รุ่น MX – T2GN

1.2) เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ของ Shimadzu รุ่น UV 1700

1.3) เครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิของ Heraeus รุ่น Premo R

1.4) อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิของ Heto รุ่น HMT 100

1.5) อุปกรณ์วัด pH ได้แก่เครื่อง pH meter ของ HACH รุ่น Sension 378

1.6) ไมโครไปเปต

1.7) เครื่องกวนสารละลาย ของ CAT รุ่น M6

2) อุปกรณ์วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบ

2.1) อุปกรณ์วิเคราะห์ความชื้นได้แก่ถ้วยกระเบื้องเคลือบ (crucible) ตู้อบ (hot air oven) ของ Memmert โถอบแห้ง (desiccator) เครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง

2.2) อุปกรณ์วิเคราะห์โปรตีน ได้แก่ เครื่องย่อย (digestion apparatus) ของ Gerhardt รุ่น Kjeldatherm เครื่องกลั่น (distillation apparatus) ของ Gerhardt รุ่น Vapodest I หลอดย่อยโปรตีน (digestion tube) กระบอกตวง บีกเกอร์ บิวเรต ขวดรูปชมพู่ เครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง

2.3) อุปกรณ์วิเคราะห์เถ้า ได้แก่ ถ้วยกระเบื้องเคลือบ (crucible) เตาเผา (muffle furnace) ของ Gallenkamp โถอบแห้ง (desiccator) เครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง

2.4) อุปกรณ์วิเคราะห์ไขมัน ได้แก่ ชุดเครื่องมือวิเคราะห์ไขมันรุ่น Soxtec System HT6 ไส้กรองสาร ถ้วยสกัดสาร ตู้อบ โถอบแห้ง เครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง

3) อุปกรณ์สำหรับการเตรียมวัตถุดิบที่นำมาทดสอบ

3.1) เครื่องบดวัตถุดิบของ Retsch รุ่น SK 100

3.2) เตาแก๊ส

3.3) ตะแกรงร่อนวัตถุดิบขนาด 30 เมช

3.4) เทอร์โมมิเตอร์

3.5) หม้อนึ่ง

3.6) ตู้อบ (hot air oven) ของ Memmert

3.7) เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่งของ AND รุ่น GF 3000

4) อุปกรณ์สำหรับการทดสอบระดับการย่อยโปรตีน

4.1) เครื่องเขย่า (Shaker) ของ Lab - Line รุ่น 3521

4.2) ตู้บ่มเชื้อ ของ Binder รุ่น KB

4.3) อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์โปรตีน เช่นเดียวกับข้อ 2.2

วิธีการทดลอง

1. การหาระดับ pH ในกระเพาะอาหารของปลากดเหลือง

การทดสอบระดับการย่อยสลายโปรตีนในผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองชนิดต่างๆ ด้วยเอนไซม์โปรติเอสที่สกัดจากกระเพาะอาหารของปลากดเหลืองนั้นมีความจำเป็นที่จะต้องทราบถึงระดับ pH ที่อยู่ในอวัยวะย่อยอาหารนั้น เพื่อใช้ในการเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ให้มีระดับ pH ที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ในการย่อยสลายโปรตีน โดยการทดสอบระดับ pH ในกระเพาะอาหารของปลากดเหลืองในครั้งนี้ใช้ตะกอนโปรตีนไฮโดรไลเสตจากเครื่องในปลาทูน่าเป็นสารกระตุ้นให้ปลามีความอยากกินอาหารเพื่อให้ปลามีการหลั่งกรดและเอนไซม์ย่อยอาหารออกมาจากนั้นจึงวัดระดับ pH ในกระเพาะอาหารโดยใช้เครื่องวัด pH แบบไมโครโพรบ (micro probe) ซึ่งมีวิธีการดังนี้

1.1 การเตรียมปลากดเหลือง

นำปลากดเหลืองขนาด 250-300 กรัม จากศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดสงขลา อำเภอคลองหอยโข่ง จังหวัดสงขลาจำนวน 32 ตัว พักในถังไฟเบอร์ขนาดความจุน้ำ 1,000 ลิตร จำนวน 2 ถังเป็นเวลา 3 วัน และงดให้อาหารเป็นเวลา 1 วัน เพื่อใช้ศึกษาระดับโปรตีนไฮโดรไลเสต และระยะเวลาการใช้ที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นความอยากกินอาหาร และหาระดับ pH ในกระเพาะอาหารต่อไป

1.2 การเตรียมตะกอนโปรตีนไฮโดรไลเสต

นำเครื่องในปลาทูน่า มาล้างทำความสะอาด และทำให้สะเด็ดน้ำ แล้วนำมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดเนื้อ นำมาผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์ในอัตราส่วน 1 : 1 (ใช้ ทริส–ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์เข้มข้น 0.2 โมลาร์) ปรับ pH ให้เท่ากับ 8.0 เติมเอนไซม์อัลคาเลสร้อยละ 1.5 ของปริมาณโปรตีนในตัวอย่าง นำตัวอย่างไปย่อยสลาย ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วยับยั้งการย่อยสลายที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำตะกอนของตัวอย่างที่เหลือจากการหมุนเหวี่ยงผสมกับน้ำกลั่นและเก็บใส่ถุงพลาสติกโพลีเอทธีลีนแล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอการนำมาใช้ในการทดลองโดยการนำมาทดสอบกับปลากดเหลืองถึงประสิทธิภาพในการกระตุ้นการกินอาหาร โดยการสังเกตพฤติกรรมการตอบสนองต่อไป

1.3 การวัดระดับ pH ในกระเพาะอาหารปลากดเหลือง

ในการหาระดับ pH ในกระเพาะอาหารแบ่งการศึกษาออกเป็น 2 ขั้นตอนได้แก่ การสังเกตพฤติกรรมของปลาเมื่อได้รับตะกอนโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ระดับและระยะเวลาต่าง ๆกัน และการวัดระดับ pH ของกระเพาะอาหารปลาหลังจากปลาได้รับตะกอนโปรตีนไฮโดรไลเสตในระดับที่เหมาะสม และในระยะเวลาต่าง ๆ (จากผลการศึกษาในขั้นตอนที่ 1) โดยมีวิธีการทดลองดังนี้

<u>ขั้นตอนที่</u> 1 แบ่งการทดลองออกเป็น 4 ชุดการทดลองๆ ละ 3 ซ้ำ ทำการทดลองในตู้ทดลองขนาด 45x48x45เซนติเมตร จำนวน 12 ตู้บรรจุน้ำ 20 ลิตร นำปลากดเหลืองขนาด 250 – 300 กรัมต่อตัว หลังงดอาหารเป็นเวลา 1 วัน ใส่ในตู้ทดลองตู้ละ 1 ตัว โดยทุกตู้ทดลองมีการให้ออกซิเจนตลอดเวลา หลังจากนั้นจึงดำเนินการทดลองดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 (ชุดควบคุม) ไม่ใช้ตะกอนโปรตีนไฮโดรไลเสตละลายในน้ำ ทิ้งไว้เป็นเวลา 10, 20 และ 30 นาที

ชุดการทดลองที่ 2 ใส่ตะกอนโปรตีนไฮโดรไลเสต 200 มิลลิลิตร (ตะกอนโปรตีนไฮโดรไลเสต 1 มิลลิลิตร/ น้ำ100 มิลลิลิตร) ทิ้งไว้เป็น เวลา 10, 20 และ 30 นาที

ชุดการทดลองที่ 3 ใส่ตะกอนโปรตีนไฮโดรไลเสต 400 มิลลิลิตร (ตะกอนโปรตีนไฮโดรไลเสต 2 มิลลิลิตร/ น้ำ 100 มิลลิลิตร) ทิ้งไว้เป็นเวลา 10, 20 และ 30 นาที

ชุดการทดลองที่ 4 ใส่ตะกอนโปรตีนไฮโดรไลเสต 600 มิลลิลิตร (ตะกอนโปรตีนไฮโดรไลเสต 3 มิลลิลิตร/ น้ำ 100 มิลลิลิตร) ทิ้งไว้เป็นเวลา 10, 20 และ 30 นาที

สังเกตพฤติกรรมการตอบสนองของปลาในทุกระดับการใช้ตะกอนโปรตีนไฮโดรไลเสตภายในระยะเวลาที่กำหนด จดบันทึกพฤติกรรมการตอบสนองของปลาเพื่อนำไปใช้ในการทดลองขั้นตอนที่ 2 ต่อไป

ขั้นตอนที่ 2 แบ่งการทดลองออกเป็น 4 ชุดการทดลองๆ ละ 5 ซ้ำ ทำการทดลองในตู้ทดลองขนาดเดียวกันกับขั้นตอนที่ 1 จำนวน 20 ตู้ แต่ละตู้บรรจุน้ำ 20 ลิตร นำปลากดเหลืองขนาด 250–300 กรัมต่อตัว หลังงดอาหารเป็นเวลา 1 วัน ใส่ตู้ละ 1 ตัว ให้ออกซิเจนตลอดเวลาและดำเนินการทดลองดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 (ชุดควบคุม) ไม่ใส่ตะกอนโปรตีนไฮโดรไลเสต

ชุดการทดลองที่ 2 ใส่ตะกอนโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ความเข้มข้นที่เหมาะสม (จากผลการทดลองขั้นตอนที่ 1) ทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที

ชุดการทดลองที่ 3 ใส่ตะกอนโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ความเข้มข้นระดับเดียวกับชุดการทดลองที่ 2 ทิ้งไว้เป็นเวลา 20 นาที

ชุดการทดลองที่ 4 ใส่ตะกอนโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ความเข้มข้นระดับเดียวกับชุดการทดลองที่ 2 ทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที

เมื่อครบกำหนดเวลานำปลามาผ่าท้องนำส่วนของกระเพาะอาหารมาวัดระดับ pH โดยใช้เครื่องวัด pH แบบไมโครโพรบ จดบันทึกระดับ pH ของทุกชุดการทดลอง

2. การสกัดและวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสจากกระเพาะอาหารของปลากดเหลือง

2.1 การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์

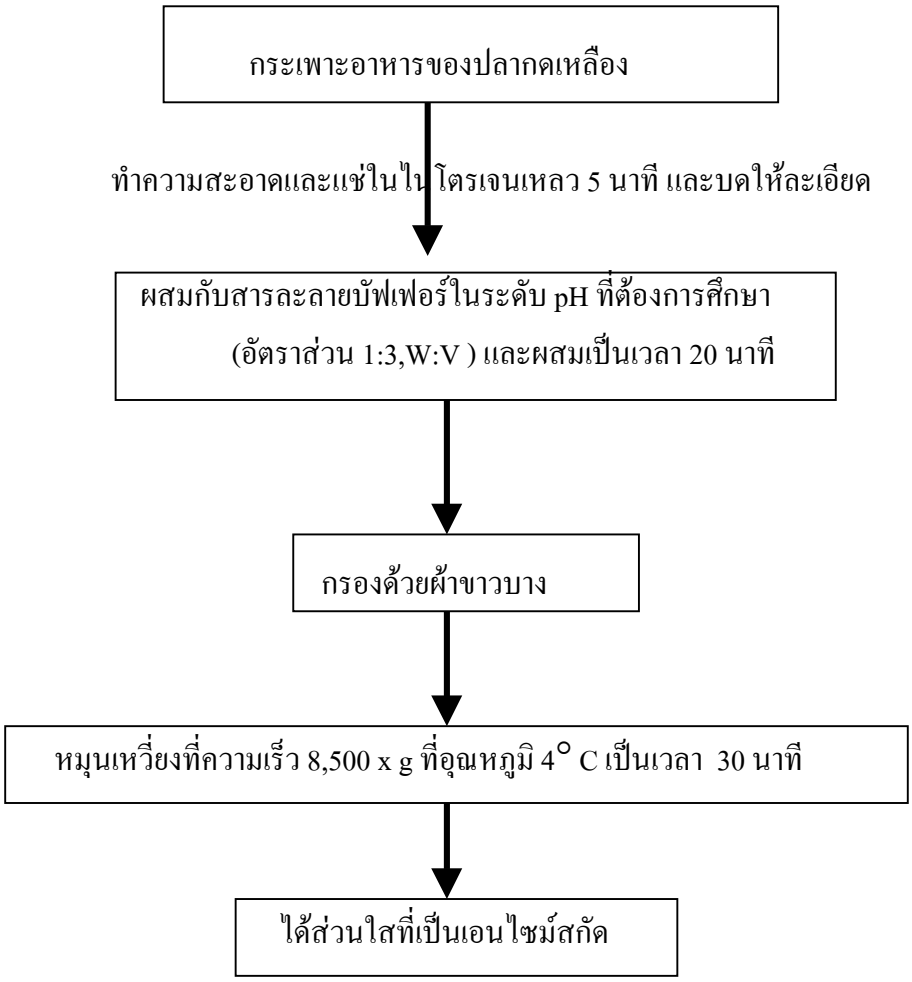
เตรียมสารละลายไฮโดรคลอไรด์-ไกลซีน (HCl-glycine) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (Francisco *et al.,*1999) ให้มีระดับ pH เท่ากับระดับ pH ที่ต้องการศึกษา (จากผลการทดลองข้อ 1.3) เติมสารละลาย Tween 80 ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 (วิภาวรรณ, 2544)

2.2 การสกัดเอนไซม์โปรติเอสจากกระเพาะอาหารปลากดเหลือง

ขั้นตอนการสกัดเอนไซม์ดังแสดงในภาพที่ 4 โดยนำปลากดเหลืองน้ำหนักประมาณ 250 – 300 กรัม จำนวน 10 ตัว แบ่งออกเป็น 2 ชุด ๆ ละ 5 ตัว หลังงดอาหารเป็นเวลา 1 วัน นำมาผ่าท้องและนำส่วนของกระเพาะอาหาร มาชั่งน้ำหนักพร้อมจดบันทึก จากนั้นทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่นแล้วใส่ในอลูมิเนียมฟรอยด์ และนำมาแช่ในไนโตรเจนเหลวประมาณ 5 นาที จากนั้นนำมาบดด้วยเครื่องปั่นผสม นำกระเพาะอาหารที่บดละเอียดผสมกับสารละลายไฮโดรคลอไรด์-ไกล

ซีน (HCl- glycine) ที่ระดับ pH ที่ต้องการศึกษา โดยใช้อัตราส่วนกระเพาะอาหารต่อสารละลายไฮโดรคลอไรด์-ไกลซีนเท่ากับ 1 : 3 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ผสมตัวอย่างและสารละลายให้เข้ากันเป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำมากรองด้วยผ้าขาวบาง นำสารละลายที่ได้ไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบเท่ากับ 8,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที (ดัดแปลงจาก Francisco *et al.,* 1999) สารละลายส่วนใสที่ได้คือเอนไซม์สกัด นำไปเก็บไว้ที่

อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำมาทดสอบหากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสต่อไป



ภาพที่ 4 ขั้นตอนการสกัดเอนไซม์จากกระเพาะอาหารของปลากดเหลือง

2.3 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส (เปบซิน)

นำเอนไซม์ที่สกัดจากกระเพาะอาหารของปลาแต่ละซ้ำมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส ดังนี้

2.3.1 การเตรียมเอนไซม์สกัดก่อนการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส

นำเอนไซม์ 0.1 มิลลิลิตรจากกระเพาะอาหารปลากดเหลือง ผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์ในระดับ pH ที่ต้องการศึกษา ในปริมาตร 9.9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน และนำมาเจือจางอีกครั้ง

ให้ได้ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 100 - 400 เท่า ตามลำดับ โดยใช้สูตร

$$N_1 V_1 = N_2 V_2$$

N_1 = ความเข้มข้นของสารเริ่มต้น 100 เท่า

V_1 = ปริมาณที่ต้องการจากสารที่เริ่มต้น (มิลลิลิตร)

N_2 = ความเข้มข้นที่ต้องการ

V_2 = ปริมาตรรวมของเอนไซม์ที่เจือจางและบัฟเฟอร์ที่ต้องการ (มิลลิลิตร)

2.3.2 วิธีหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส

นำเอนไซม์ที่ได้จากการเจือจางแล้วที่ระดับความเข้มข้น 100 - 400 เท่า มาอย่างละ 1 มิลลิลิตรจากนั้นเติมสารละลายสับสเตรท 1 มิลลิลิตร (ฮีโมโกลบินร้อยละ 0.5 สำหรับหาค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสในกระเพาะอาหาร) นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที เติม TCA 40 % ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที (ดัดแปลงจาก Francisco *et al.,* 1999) นำส่วนใสไปกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ส่วนใสที่ปราศจากตะกอนนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร นำค่าดูดกลืนแสงที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของไทโรซีน ซึ่งขั้นตอนการหากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส ดังแสดงในภาพที่ 5

2.4 การคำนวณ

ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส 1 ยูนิตหมายถึง ความสามารถของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสับสเตรทได้กรดอะมิโนในรูปของไทโรซีน 1 ไมโครโมลในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด ซึ่งสามารถคำนวณได้ดังสมการต่อไปนี้

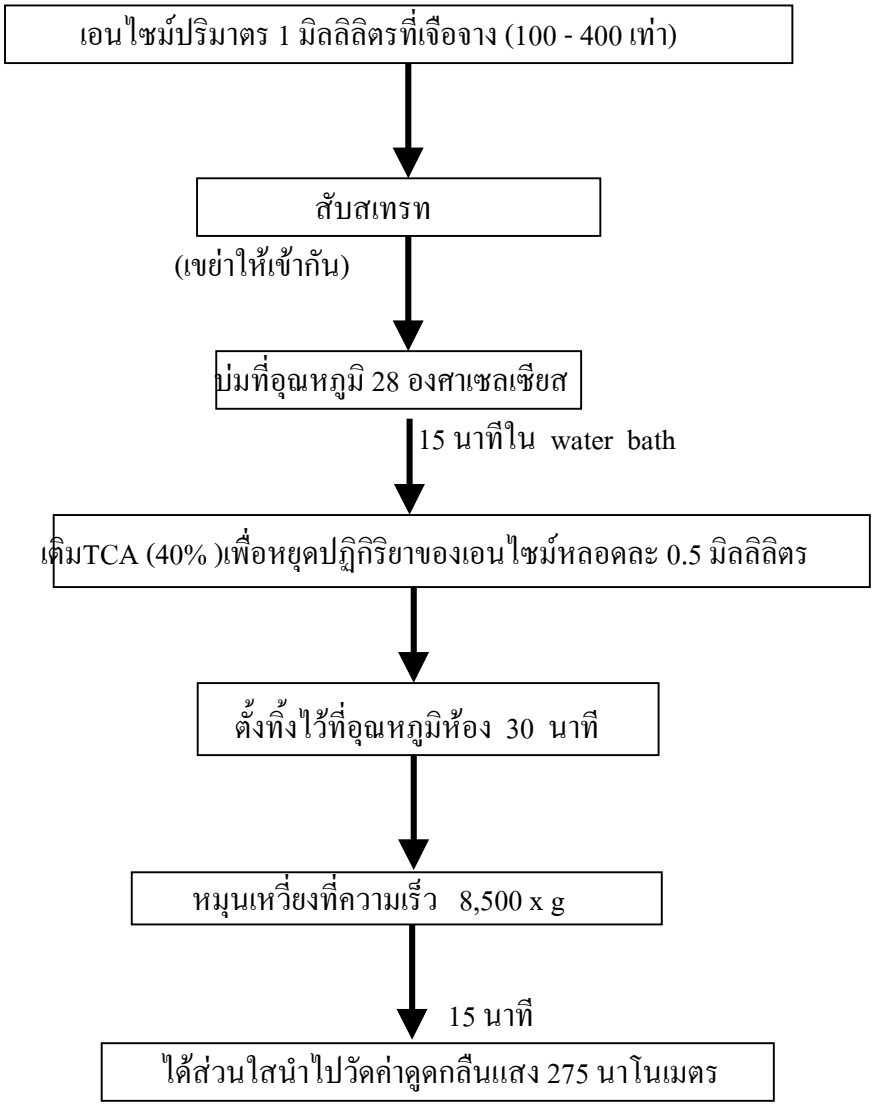
กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส = มิลลิกรัมโปรตีนของไทโรซีน x (ปริมาณเอนไซม์ + สับสเตรท + TCA) x จำนวนเท่าของสารละลายเอนไซม์

(ยูนิตต่อมิลลิลิตร) น้ำหนักโมเลกุลของไทโรซีน x ระยะเวลาที่บ่ม x ปริมาตรสารละลายเอนไซม์

(กรัมต่อโมล) (นาที) (มิลลิลิตร)

ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิกรัม) = ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)

ความเข้มข้นของโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)



ภาพที่ 5 ขั้นตอนการหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส

3. การเตรียมผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองสำหรับการทดสอบการย่อยในหลอดทดลอง

ผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองที่ใช้ทดสอบได้แก่ เมล็ดถั่วเหลืองที่ผ่านการต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที กากถั่วเหลืองสกัดน้ำมัน และเมล็ดถั่วเหลืองดิบ โดยมีปลาป่นเป็นชุดควบคุม เตรียมวัตถุดิบแต่ละชนิดสำหรับการทดสอบดังนี้

3.1 บดวัตถุดิบแต่ละชนิดให้ละเอียดอย่างน้อย 2 ครั้ง แล้วนำมาร่อนผ่านตะแกรงขนาดตาความถี่ 30 เมช ยกเว้นเมล็ดถั่วเหลืองที่ผ่านการต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีต้องผ่านกระบวนการอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เมื่อแห้งแล้วจึงนำมาบดให้ละเอียดและร่อนเพื่อคัดสิ่งปลอมปนเช่น เศษหิน กรวด และเปลือกถั่วออกไป

3.2 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบแต่ละชนิดได้แก่ โปรตีน ความชื้น ไขมัน เถ้า และเยื่อใยตามวิธีมาตรฐานของ AOAC (1985) สำหรับ NFE (Nitrogen Free Extract)หาได้จากการคำนวณตามสูตร

NFE (%)= 100 – (%ความชื้น + %โปรตีน + %ไขมัน + %เถ้า + %เยื่อใย)

นำวัตถุดิบแต่ละชนิดบรรจุในถุงพลาสติกแล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอการนำไปใช้ในการทดสอบระดับการย่อยสลายโปรตีนต่อไป

4. การทดสอบระดับการย่อยสลายโปรตีนในวัตถุดิบ

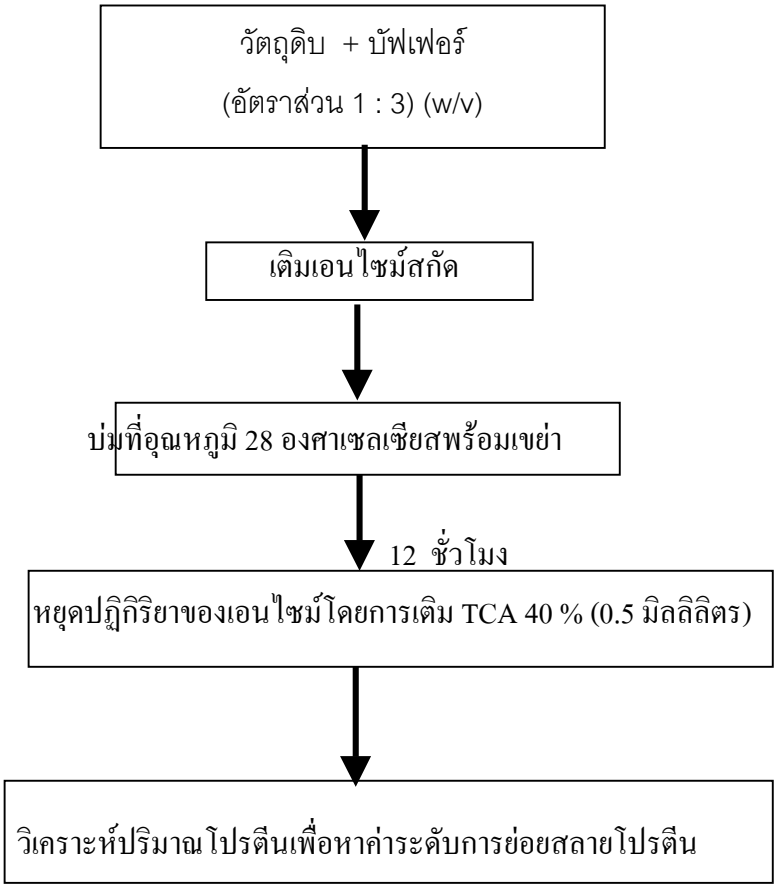
4.1 การวางแผนการศึกษา

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design, CRD) โดยมีชุดการทดลองทั้งสิ้น 4 ชุดการทดลอง ๆ ละ 2 ซ้ำ (เอนไซม์ 2 ตัวอย่าง) ตัวอย่างวัตถุดิบที่ต้องการทดสอบได้แก่ ปลาป่น (ชุดควบคุม) เมล็ดถั่วเหลืองที่ผ่านการต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที กากถั่วเหลืองสกัดน้ำมัน และเมล็ดถั่วเหลืองดิบ

4.2 การทดสอบระดับการย่อยสลายโปรตีน

นำวัตถุดิบที่ต้องการทดสอบมาชั่งน้ำหนักให้ได้น้ำหนักโปรตีนเท่ากับ 1.3 กรัม นำตัวอย่างผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์ที่ระดับ pH 3.0 ในอัตราส่วนวัตถุดิบต่อบัฟเฟอร์เท่ากับ 1 : 3 (W/V) ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยวัตถุดิบแต่ละชนิดแบ่งออกเป็น 2 ชุด (ชุดละ 3 ซ้ำ) ชุดที่ 1 ไม่เติมเอนไซม์ และชุดที่ 2 เติมเอนไซม์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำตัวอย่างไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสพร้อมเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที โดยใช้ระยะเวลาในการบ่ม 12 ชั่วโมง โดยนพวรรณ (2543) พบว่าเมื่อให้อาหารแก่ปลากดเหลืองแล้วอาหารจะถูกย่อยในกระเพาะอาหารก่อนเดินทางมาถึงลำไส้จะใช้เวลาประมาณ 12 ชั่วโมง หลังจากบ่มเสร็จแล้วนำตัวอย่างมา

หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยการเติม TCA 40 % ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นจึงหาค่าระดับการย่อยสลายโปรตีน โดยขั้นตอนการศึกษาดังแสดงในภาพที่ 6



ภาพที่ 6 การทดสอบระดับการย่อยสลายโปรตีนในวัตถุดิบที่เป็นแหล่งโปรตีนโดยใช้เอนไซม์สกัดจากกระเพาะอาหารปลากดเหลือง

4.3 การหาค่าระดับการย่อยสลายโปรตีนในวัตถุดิบโดยเอนไซม์สกัด

นำวัตถุดิบแต่ละชนิดที่ผ่านกระบวนการย่อยสลายโปรตีนทั้งที่ไม่เติมเอนไซม์และเติมเอนไซม์ มาหาปริมาณโปรตีนที่เหลือ และระดับการย่อยโปรตีน ตามวิธีที่ดัดแปลงจาก AOAC (1999) โดยนำตัวอย่างที่บ่มแล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 (เศษเหลือค้างในขวดใช้อะซิโตนล้างตัวอย่างออกให้หมดจนไม่เหลือตัวอย่างอยู่ในขวด) จากนั้นนำตัวอย่างบนกระดาษกรองไปทำให้แห้งโดยวิธีการดูดความชื้นด้วยเครื่องดูดความชื้นแบบสูญญากาศ (suction) เมื่อตัวอย่างแห้งแล้วจึงนำไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนตามวิธีการของ AOAC (1999) เพื่อหาปริมาณโปรตีนที่เหลือ เปอร์เซ็นต์โปรตีนที่เหลือ เปอร์เซ็นต์โปรตีนที่ละลายน้ำและระดับการย่อยโปรตีนโดยใช้สูตรดังนี้

ปริมาณโปรตีนที่เหลือ $= \frac{1.4 \times (V_1 - V_2) \times N \times 6.25}{W}$

เมื่อ V_1 = ปริมาตรของกรดมาตรฐานที่ใช้ไตเตรทตัวอย่าง

V_2 = ปริมาตรของกรดมาตรฐานที่ใช้ไตเตรทตัวอย่างที่ใช้ตรวจสอบ

N = เป็นความเข้มข้นของกรดเกลือเป็นนอร์มอล

W = น้ำหนักตัวอย่างวัตถุดิบ (กรัม)

เปอร์เซ็นต์โปรตีนที่เหลือ

$= \frac{\text{ปริมาณโปรตีนที่เหลือ} \times 100}{\text{โปรตีนในวัตถุดิบเมื่อเริ่มต้น}}$

เปอร์เซ็นต์โปรตีนที่ละลายน้ำ

= 100 – เปอร์เซ็นต์โปรตีนที่เหลือในชุดควบคุมที่ไม่เติมเอนไซม์

ระดับการย่อยโปรตีนโดยเอนไซม์ (%)

= (เปอร์เซ็นต์โปรตีนที่เหลือในชุดควบคุมที่ไม่เติมเอนไซม์) - (เปอร์เซ็นต์โปรตีนที่เหลือในชุดที่เติมเอนไซม์)

5. การวิเคราะห์ทางสถิติ

นำผลการทดสอบระดับการย่อยโปรตีนจากวัตถุดิบ มาวิเคราะห์ผลทางสถิติ โดยใช้ Analysis of Variance และวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างชุดการทดลองโดยใช้ Tukey's HSD ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

2.2 การทดลองที่ 2 การศึกษาการนำผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองเป็นแหล่งโปรตีนทดแทนปลาป่นที่ระดับต่างๆ ในอาหารปลากดเหลือง

วัสดุ

1) สัตว์ทดลอง

ปลากดเหลือง ขนาดน้ำหนักประมาณ 0.7 กรัมต่อตัว จากศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดสงขลา กรมประมง

2) วัตถุดิบสำหรับผลิตอาหารทดลองดังในตารางที่ 7

3) เครื่องแก้วสำหรับวิเคราะห์คุณภาพน้ำ ได้แก่ ขวดเก็บตัวอย่างน้ำ ไปเปตขนาด 1 และ 2 มิลลิลิตร ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร บีกเกอร์

4) สารเคมี

สารเคมีสำหรับวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบอาหารทดลองและส่วนประกอบทางเคมีของปลา วิเคราะห์คุณภาพน้ำ วิเคราะห์โครมิกออกไซด์ ดังในภาคผนวก ก และสารเคมีสำหรับการรักษาโรคปลาได้แก่ ฟอร์มาลิน (formalin) และยาเหลือง

5) ถุงพลาสติก และกล่องสำหรับใส่อาหารทดลอง

อุปกรณ์

1) อุปกรณ์สำหรับการเตรียมอาหารทดลอง

1.1) เครื่องผสมและอัดเม็ดอาหาร ของ Hobart Model A 200 T ประกอบด้วยชุดเครื่องผสมอาหารแบบมีใบพัด และชุดเครื่องอัดเม็ดอาหาร

1.2) ตะแกรงร่อนวัตถุดิบขนาด 30 เมช

1.3) เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง ของ Sartorius รุ่น Basic

1.4) ตู้อบ (hot air oven) ของ Memmert

1.5) เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อภายใต้แรงดัน ของ Sturdy รุ่น SA 300 VL

1.6) ตู้แช่แข็ง เพื่อใช้เก็บอาหารทดลองระหว่างรอการนำมาใช้

2) อุปกรณ์วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของอาหารทดลอง และซากปลา เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

3) อุปกรณ์สำหรับการเลี้ยงปลา

3.1) ถังไฟเบอร์กลาสขนาดความจุ 1 ลูกบาศก์เมตร จำนวน 2 ใบ

3.2) ตู้ทดลองขนาด 40x60x50 เซนติเมตรความจุน้ำประมาณ 128 ลิตร

3.3) ระบบน้ำไหล และระบบน้ำทิ้งโดยใช้ท่อน้ำล้นเป็นตัวควบคุมระดับน้ำ

3.4) สายยางดูดตะกอน และเปลี่ยนถ่ายน้ำ

3.5) สวิงสำหรับตักปลา

3.6) อุปกรณ์เก็บมูลปลา ได้แก่ สายยาง ผ้าขาวบาง

4) อุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

4.1) อุปกรณ์วัด pH ได้แก่เครื่อง pH meter ของ HACH รุ่น Sension 378

4.2) อุปกรณ์วัดอุณหภูมิน้ำ ได้แก่ เทอร์โมมิเตอร์

4.3) อุปกรณ์วิเคราะห์ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ (dissolved oxygen, DO) ได้แก่ เครื่อง DO meter ของ HACH รุ่น Sension 378

4.4) อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์ค่าแอมโมเนีย ไนไตรท์ ไนเตรท ได้แก่ เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ของ Shimadzu รุ่น UV 1700

5) อุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์โครมิคออกไซด์ในอาหารและมูลปลา

5.1) อุปกรณ์วิเคราะห์โปรตีน เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 (ข้อ 2.2)

5.2) เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ของ Shimadzu รุ่น UV-1200

วิธีการทดลอง

1. การวางแผนการทดลอง

จัดการทดลองแบบ 2 x 7 แฟกทอเรียล ในแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (CRD) จำนวน 3 ซ้ำ โดยปัจจัย A คือชนิดผลิตภัณฑ์ถั่วเหลือง 2 ชนิด จากผลการทดลองที่ 1 ที่มีค่าระดับการย่อยโปรตีนสูงอันดับ 1 (a_0) และ 2 (a_1) ตามลำดับ และ ปัจจัย B คือระดับการใช้ผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองเป็นแหล่งโปรตีนทดแทนโปรตีนจากปลาป่นในสูตรอาหาร 7 ระดับ คือ 0 (b_0), 10 (b_1), 20 (b_2), 30 (b_3), 40 (b_4), 50 (b_5) และ 60 (b_6) เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนในปลาป่น โดยมีทั้งหมด 14 ชุดการทดลองดังนี้

$\mathbf{T_1 = a_0 b_0}$ $\mathbf{T_8 = a_1 b_0}$

$\mathbf{T_2 = a_0 b_1}$ $\mathbf{T_9 = a_1 b_1}$

$\mathbf{T_3 = a_0 b_2}$ $\mathbf{T_{10} = a_1 b_2}$

$\mathbf{T_4 = a_0 b_3}$ $\mathbf{T_{11} = a_1 b_3}$

$\mathbf{T_5 = a_0 b_4}$ $\mathbf{T_{12} = a_1 b_4}$

$\mathbf{T_6 = a_0 b_5}$ $\mathbf{T_{13} = a_1 b_5}$

$\mathbf{T_7 = a_0 b_6}$ $\mathbf{T_{14} = a_1 b_6}$

เมื่อ T= ชุดการทดลอง

a_0 = ผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองที่มีค่าระดับการย่อยโปรตีนสูงอันดับที่ 1

a_1 = ผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองที่มีค่าระดับการย่อยโปรตีนสูงอันดับที่ 2

b_0 = การทดแทนที่ 0 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนจากปลาป่น

b_1 = การทดแทนที่ 10 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนจากปลาป่น

b_2 = การทดแทนที่ 20 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนจากปลาป่น

b_3 = การทดแทนที่ 30 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนจากปลาป่น

b_4 = การทดแทนที่ 40 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนจากปลาป่น

b_5 = การทดแทนที่ 50 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนจากปลาป่น

b_6 = การทดแทนที่ 60 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนจากปลาป่น

2. การเตรียมการทดลอง

2.1 การเตรียมปลา

นำลูกปลากดเหลืองขนาดความยาว 2.5 เซนติเมตร น้ำหนักเฉลี่ยประมาณ 0.7 กรัม มาอนุบาลในถังไฟเบอร์กลาสขนาดความจุ 1 ตัน จำนวน 2 ใบ โดยปล่อยปลาจำนวน 1,000 ตัวต่อถัง เลี้ยงในน้ำจืด และให้ออกซิเจนตลอดเวลา โดยให้อาหารผงสำเร็จรูป วันละ 2 มื้อ (เช้า – เย็น) เป็นเวลาประมาณ 3 สัปดาห์ จากนั้นเมื่อลูกปลามีขนาดโตขึ้นจึงค่อย ๆ เปลี่ยนมาให้อาหารเม็ดสำเร็จรูปที่มีระดับโปรตีน 35 เปอร์เซ็นต์ วันละ 2 มื้อ เพื่อฝึกให้ปลาชินกับอาหารเม็ดสำเร็จรูป และมีการเปลี่ยนถ่ายน้ำทุกวัน ๆ ละ 1 ครั้ง เมื่อลูกปลามีขนาดประมาณ 3-4 กรัม/ตัว จึงคัดลูกปลาที่มีขนาดใกล้เคียงกันจำนวน 25 ตัว มาใส่ตู้ทดลองที่มีความจุประมาณ 80 ลิตร จำนวน 42 ตู้ แล้วเริ่มฝึกให้ปลาคุ้นเคยกับสภาพแวดล้อม และอาหารทดลอง โดยให้อาหารวันละ 2 มื้อ จนปลาอิ่ม เลี้ยงจนกระทั่งปลายอมรับอาหารทุกชุดการทดลองเป็นเวลาประมาณ 7 วัน จากนั้นจึงคัดปลาที่มีน้ำหนักใกล้เคียงกันให้เหลือ จำนวน 12 ตัวต่อตู้ โดยชั่งน้ำหนักปลาทุกตัว ก่อนชั่งสลบปลาด้วย 2-phenoxyethanol ความเข้มข้น 0.5 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร และเก็บตัวอย่างปลาจำนวน 30 ตัว เพื่อนำมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของปลาเมื่อเริ่มต้นการทดลอง ตามวิธีการของ AOAC (1985)

2.2 การเตรียมอาหารทดลอง

โดยนำผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองที่มีระดับการย่อยโปรตีนสูงอันดับที่ 1 และ 2 จากการทดลองที่ 1 มาแทนที่ปลาป่นในอาหารที่ระดับต่าง ๆ ตามแผนการทดลองในข้อ 1 (การทดลองที่ 2) โดยมีอาหารทดลองทั้งหมด 14 สูตร มีระดับโปรตีนเท่ากับ 35 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 10 เปอร์เซ็นต์ และพลังงานรวมประมาณ 410 แคลอรีต่ออาหาร 100 กรัมเท่ากันทุกสูตร โดยอาหารสูตรควบคุมมีปลาป่นเป็นแหล่งโปรตีนหลัก องค์ประกอบของอาหารสูตรควบคุม และอาหารทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 7 เตรียมอาหารโดยชั่ง และบรรจุวัตถุดิบอาหารแต่ละชนิดของแต่ละสูตรในถุงพลาสติกโพลีเอทธีลีน นำวัตถุดิบอาหารของแต่ละสูตรผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมอาหาร อัดเม็ดอาหารที่ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร ทำให้แห้งโดยการอบที่อุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส ประมาณ 4 ชั่วโมง จากนั้นนำอาหารไปบรรจุในถุงพลาสติกโพลีเอทธีลีนและเก็บในถุงดำเพื่อป้องกันแสง นำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อรอการใช้งาน นำอาหารทุกสูตรวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ตามวิธีการของ AOAC (1985) และหาปริมาณโครมิกออกไซด์ ตามวิธีการของ Furukawa และ Tsukahara (1966)

ตารางที่ 7 องค์ประกอบของอาหารทดลอง (% as fed basis)

วัสดุอาหาร	สูตรอาหาร (กรัม / อาหาร 1 กิโลกรัม)												
	1 และ 8	2	3	4	5	6	7	9	10	11	12	13	14
ปลาป่น (โปรตีน 65.49%)	522	470	417	365	315	260	207	470	417	365	315	260	207
ถั่วเหลืองต้ม (โปรตีน 44.56%)	0	76	155	230	310	385	465	0	0	0	0	0	0
กากถั่วเหลืองสกัดน้ำมัน (โปรตีน 39.62%)	0	0	0	0	0	0	0	86	173	260	347	434.3	522
รำ	53	53	53	53	53	53	53	53	53	53	53	53	53
แป้งข้าวเจ้า	232	215	197	182	160	147	123	200	177	145	113	80	48
น้ำมันถั่วเหลือง	34	28	22	16	10	4	0	39	40	45	50	55	60
วิตามินรวม[1]	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
แร่ธาตุรวม[2]	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
แป้งมัน	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
BHT	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
แกลบ	103.8	102.8	100.8	98.8	96.8	95.8	96.8	96.8	84.8	76.8	69.8	62.5	54.8
โครมิคออกไซด์	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

[1]วิตามินรวม (มิลลิกรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม) ประกอบด้วย Thiamine (B_1) 10 ; Riboflavin (B_2) 20; Pyridoxine (B_6) 10; Cobalamin (B_{12}) 2; Retinal (A) 4; Cholecalciferol (D_3) 0.4; Phylloquinone (K_1) 80; Folic acid 5; Calcium pantothenate 40; Inositol 400 ; Niacin 150; Tocopherol (E) 60; Choline 6000; Ascorbic acid (C) 500

[2]แร่ธาตุรวม (กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม) ประกอบด้วย NaCl 0.25 ; MgO 1.10 ; KCl 4 ; $Ca(H_2PO_4)_2$ 9 ; $FeSO_4$ 0.72; Calcium lactate 0.88 ; $ZnSO_4\ 7H_2O$ 0.088 ; $MnSO_4\ 7H_2O$ 0.040 ; $CuSO_4\ 5H_2O$ 0.008; $CoSO_4$ 0.0025; KI 0.0008

2.3 การศึกษาการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหาร

ติดป้ายทุกชุดการทดลอง และซ้ำที่ได้สุ่มตัวอย่างไว้ ตามแผนการทดลองข้อ 1 และให้อาหารตามชุดการทดลอง โดยให้อาหารแบบให้ปลากินจนอิ่ม (satiation) วันละ 2 มื้อ (เช้า-เย็น) บันทึกน้ำหนักอาหารที่ปลากินในแต่ละวัน เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ ภายในตู้ทดลองมีการให้อากาศและจัดให้มีน้ำไหลเวียนตลอดเวลาและทำการดูดตะกอนทุกวันจนเสร็จสิ้นการทดลอง สุ่มตัวอย่างปลาจำนวน 30 ตัว / หรือ 100 กรัม เพื่อนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของปลาเมื่อเริ่มต้นศึกษา ในระหว่างการเลี้ยงชั่งน้ำหนักปลาในแต่ละชุดการทดลองทุก 2 สัปดาห์ โดยก่อนชั่งน้ำหนักแต่ละครั้งจะสลบปลาด้วยยาสลบ 2-phenoxyethanol ความเข้มข้น 0.5 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร และชั่งปลาแต่ละตัวในแต่ละตู้ ด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง สังเกตอาการผิดปกติ และการตายของปลาทุกวัน หากมีอาการผิดปกติจะนำไปตรวจเชื้อ แบคทีเรีย และปรสิต

เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ชั่งน้ำหนักปลาทุกตัวในแต่ละตู้ทดลอง นับจำนวนปลาที่เหลือ และสังเกตอาการพร้อมทั้งบันทึกและเก็บตัวอย่างปลาจากทุกตู้ทดลองเพื่อนำมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของปลาตามวิธีมาตรฐานของ AOAC (1985) และนำข้อมูลที่ได้มาคำนวณค่าต่าง ๆ ได้แก่ น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น (weight gain) อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate) การรอดตาย (survival rate) ประสิทธิภาพการใช้อาหาร (feed efficiency)ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน (protein efficiency ratio) โปรตีนที่นำไปใช้ประโยชน์ (productive protein value) (Halver, 1989) ของปลาในแต่ละชุดการทดลอง จากสูตรดังนี้

$$\text{การรอดตาย (survival rate,\%)} = \frac{\text{จำนวนปลาที่เหลือ}}{\text{จำนวนปลาเริ่มต้น}} \times 100$$

น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น (weight gain)

= น้ำหนักปลาสุดท้าย (กรัม/ตัว) - น้ำหนักปลาเริ่มต้น (กรัม/ตัว)

ประสิทธิภาพการใช้อาหาร (feed efficiency)

$$= \frac{\text{น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น (กรัม)}}{\text{น้ำหนักอาหารที่ปลากินทั้งหมด (กรัม)}}$$

อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate, % ต่อวัน)

$$= \frac{\ln W_2 - \ln W_1 \times 100}{t_2 - t_1}$$

W_1 = น้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้น

W_2 = น้ำหนักเฉลี่ยสุดท้าย

t_1 = วันเริ่มต้นทำการทดลอง

t_2 = วันที่สิ้นสุดการทดลอง

ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน (protein efficiency ratio)

$$= \frac{\text{น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น (กรัม)}}{\text{น้ำหนักโปรตีนที่ปลากิน (กรัม)}}$$

โปรตีนที่นำไปใช้ประโยชน์ (productive protein value)

$$= \frac{\text{โปรตีนของตัวปลาที่เพิ่มขึ้น (กรัม)} \times 100}{\text{น้ำหนักโปรตีนที่ปลากินตลอดการทดลอง (กรัม)}}$$

2.4 การศึกษาประสิทธิภาพการย่อยโปรตีน

ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนในตัวปลา ด้วยวิธีทางอ้อมที่มีโครมิกออกไซด์ (Cr_2O_3) เป็นอินดิเคเตอร์ (indicator) ในอาหารโดยให้ปลาทดลองกินอาหารที่มีส่วนผสมของโครมิกออกไซด์ 50% ร้อยละ 0.5 ของน้ำหนักอาหาร หลังปลายอมรับอาหารที่มีส่วนผสมของโครมิกออกไซด์แล้วเป็นเวลา 15 วัน จึงเริ่มเก็บมูลปลา โดยวิธีกาลักน้ำลงสู่ถุงกรอง เก็บมูลหลังจากให้อาหารเป็นเวลา 15 ชั่วโมง ทั้งนี้เนื่องจากผลการศึกษาของ นพวรรณ (2543) พบว่าเมื่อให้อาหารแก่ปลากดเหลืองแล้วอาหารเดินทางมาถึงลำไส้จะใช้เวลาประมาณ 12 ชั่วโมง และ 15 ชั่วโมงหลังจากให้อาหารปลาจะขับมูลออกมา เมื่อเก็บรวบรวมมูลปลาได้แล้วจึงนำไปแช่แข็ง ระยะเวลาในการเก็บมูลปลาประมาณ 30 วัน เพื่อให้ได้ตัวอย่างเพียงพอสำหรับการวิเคราะห์ จากนั้นนำมูลปลาที่เก็บได้ไปทำแห้ง โดยวิธี lyophilization บดมูลปลาที่แห้งแล้วและเก็บไว้ในตู้แช่แข็งจนกว่าจะวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในมูลปลาตามวิธีการของ AOAC (1985) หาปริมาณ โครมิกออกไซด์ในอาหารและมูลปลา ตามวิธีการของ Furukawa และ Tsukahara (1966)

คำนวณประสิทธิภาพการย่อยโปรตีน เมื่อใช้โครมิกออกไซด์เป็นอินดิเคเตอร์ (De Silva and Anderson, 1995) โดยใช้สมการ

ประสิทธิภาพการย่อย = [1–(a' / a) x (b / b')] x 100

a = เปอร์เซ็นต์สารอาหารในอาหารแห้ง

a' = เปอร์เซ็นต์สารอาหารในมูลแห้ง

b = เปอร์เซ็นต์โครมิกออกไซด์ในอาหารแห้ง

b' = เปอร์เซ็นต์โครมิกออกไซด์ในมูลแห้ง

2.5 การศึกษาต้นทุนการผลิต

คำนวณต้นทุนค่าอาหารต่อผลผลิตปลากดเหลือง

$$\text{ต้นทุนค่าอาหารต่อผลผลิต} = \frac{\text{น้ำหนักอาหารที่ปลากินทั้งหมด (ก.ก) x ราคาอาหาร (บาท)}}{\text{น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น (ก.ก)}}$$

2.6 การวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

วิเคราะห์คุณภาพน้ำของทุกซ้ำในทุกชุดการทดลองทุก 2 สัปดาห์ โดยนำตัวอย่างน้ำก่อนการเปลี่ยนถ่ายน้ำมาวิเคราะห์พารามิเตอร์ต่าง ๆ ได้แก่ อุณหภูมิของน้ำโดยใช้เทอร์โมมิเตอร์ ค่า pH ด้วย pH meter ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ ด้วย DO meter และวิเคราะห์หาแอมโมเนียรวม ตามวิธีการของ Boyd และ Tucker (1992) ไนไตรท์ ไนเตรท ตามวิธีการของ Clesceri และคณะ (1989)

2.7 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหาร และประสิทธิภาพการย่อยโปรตีน นำมาหาค่าเฉลี่ย และวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล (Analysis of Variance) และเปรียบเทียบหาความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย Tukey's HSD ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95