

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

วัสดุ

1. สัตว์ทดลอง

กุ้งขาวแปซิฟิก (*Penaeus vannamei*) อายุ 30-45 วัน น้ำหนักเริ่มต้น 2-3 กรัม

2. สารเคมี

2.1 สารเคมีสำหรับสกัดแคโรทีนอยด์จากแหล่งต่าง ๆ และวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์รวมจากอาหารและตัวอย่างกุ้งทดลอง (ภาคผนวก ก)

2.2 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ส่วนประกอบทางโภชนาการของอาหารและองค์ประกอบทางเคมีของตัวอย่างกุ้งทั้งตัว (ภาคผนวก ก)

2.3 สารเคมีสำหรับนับปริมาณเม็ดเลือด ได้แก่ทริปแฟนบลู (trypan blue) (ภาคผนวก ก)

2.4 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ความว่องไวของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (ภาคผนวก ก)

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการเลี้ยงกุ้งทดลอง

1.1 ถังไฟเบอร์กลาสกลม ปริมาตร 1 ลูกบาศก์เมตร

1.2 ถังไฟเบอร์กลาสขนาด ปริมาตร 250 ลิตร และขนาด 150 ลิตร ปิดทุกด้านด้วยแผ่นพลาสติกสีทึบเพื่อป้องกันการรบกวนจากด้านนอก

1.3 ตู้กระจกขนาด 100 x 50 x 47 เซนติเมตร ความจุน้ำ 235 ลิตร ปิดทุกด้านด้วยแผ่นพลาสติกสีทึบเพื่อป้องกันการถูกรบกวนจากภายนอก

1.4 อุปกรณ์ให้อากาศ ประกอบด้วย เครื่องให้อากาศ สายยาง และหัวทราย

1.5 ฮีทเตอร์ (heater) สำหรับควบคุมอุณหภูมิน้ำ

2. อุปกรณ์เตรียมอาหารทดลอง

- 2.1 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Satorius รุ่น Basic
- 2.2 เครื่องทำอาหาร ยี่ห้อ Hobart รุ่น Model A200T ประกอบด้วย ชุดเครื่องผสมอาหารแบบมีใบพัด และชุดเครื่องอัดเม็ดอาหาร

3. อุปกรณ์สกัดและวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์

- 3.1 เครื่องระเหยแห้งภายใต้สุญญากาศ ยี่ห้อ EYELA รุ่น Aspiartor A-35, rotary vacuum evaporator N-N series
- 3.2 เครื่องวัดสีคัลเลอร์มิเตอร์ (color meter) ยี่ห้อ Hunter รุ่น Colormeter
- 3.3 สเปกโตรโฟโตมิเตอร์แบบสแกน (scanning spectrophotometer) ยี่ห้อ Perkin Elmer รุ่น Lambda

4. อุปกรณ์วิเคราะห์ส่วนประกอบทางโภชนาการของอาหาร และองค์ประกอบทางเคมีของกึ่งทั้งตัว

- 4.1 อุปกรณ์วิเคราะห์ความชื้น ได้แก่ ถ้วยกระเบื้องเคลือบ (crucible) ตู้อบ (hot air oven) ยี่ห้อ Memmert โถอบแห้ง (desiccator) และเครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง
- 4.2 อุปกรณ์วิเคราะห์เถ้า ได้แก่ ถ้วยกระเบื้องเคลือบ (crucible) เตาเผา (muffle furnace) ยี่ห้อ Gallenkamp โถอบแห้ง และเครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง
- 4.3 อุปกรณ์วิเคราะห์โปรตีน ประกอบด้วย เครื่องย่อยโปรตีน (digestion apparatus) ยี่ห้อ Gerhardt รุ่น Kjeldatherm เครื่องกลั่น (distillation apparatus) ยี่ห้อ Gerhardt รุ่น Vapodest I หลอดย่อยโปรตีน (digestion tube) กระจกบด บีกเกอร์ บิวเรต ปิเปต หลอดหยด และขวดรูปชมพู่
- 4.4 อุปกรณ์วิเคราะห์ไขมัน ประกอบด้วย ชุดเครื่องมือวิเคราะห์ไขมัน ยี่ห้อ Soxtec รุ่น System HT6 ตู้อบ โถอบแห้ง และเครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง

5. อุปกรณ์นับเม็ดเลือดและวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส

- 5.1 อุปกรณ์เก็บเลือดกึ่งคือเข็มขนาด 20-25G ยาว 1 นิ้ว และกระบอกฉีดยาพลาสติกขนาด 1 และ 5 มิลลิลิตร หลอดพลาสติก (microtube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- 5.2 อุปกรณ์สำหรับเจือจางและเก็บเลือดคือหลอดพลาสติกขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปิเปตอัตโนมัติ ทิป เครื่องเขย่าผสมยี่ห้อ Vortex mixer
- 5.3 อุปกรณ์สำหรับนับเม็ดเลือด คือฮีมาไซโตมิเตอร์ (haemocytometer)

5.4 อุปกรณ์สำหรับหมุนเหวี่ยงแยกเม็ดเลือดคือเครื่องเซนตริฟิวจ์ที่ควบคุมอุณหภูมิได้ ยี่ห้อ Beckman รุ่น Avanti™ 30 centrifuge

5.5 อุปกรณ์สำหรับวัดกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสคือเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น UV 1201V

วิธีการทดลอง

1. การทดลองที่ 1: ศึกษาผลของแคโรทีนอยด์จากสาหร่ายสไปรูลินา (*Spirulina sp.*) พริกหวาน (*Capsicum annuum* L. var *grossum*) และปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis* Jacp.) เปรียบเทียบกับเบตาแคโรทีนสังเคราะห์ต่อการเจริญเติบโต อัตราการรอด และการเร่งสีตัวกุ้งขาว (*Penaeus vannamei*)

1.1 การเตรียมกุ้งทดลอง

กุ้งขาวขนาด 2-3 กรัม จากฟาร์มเลี้ยงของเกษตรกร ที่ไม่มีรายงานการระบาดของโรคติดเชื้อไวรัสมาก่อนจำนวน 1,000 ตัว นำมาเลี้ยงในบ่อซีเมนต์ที่บรรจุน้ำทะเล 5 ตัน เตรียมสีและคุณภาพน้ำโดยเติมปูนโดโลไมท์เพื่อปรับค่าความเป็นด่างให้มีค่าอยู่ในช่วง 8.0-8.5 พีพีเอ็ม และความเป็นกรด-ด่างช่วง 7.5-8.5 เลี้ยงกุ้งด้วยอาหารเม็ดสำเร็จรูป 2-3 วัน หลังจากนั้นจึงทำการคัดแยกกุ้งลงเลี้ยงในถังไฟเบอร์กลาสขนาดความจุ 250 ลิตร จำนวน 20 ตู้ๆ ละ 30 ตัว แล้วเลี้ยงกุ้งด้วยอาหารเม็ดสำเร็จรูปชุดควบคุมเป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ เพื่อให้กุ้งคุ้นเคยกับสภาพการเลี้ยงในตู้ทดลองจึงทำการชั่งน้ำหนักกุ้งทุกตู้ก่อนเริ่มให้อาหารทดลองชุดต่างๆ

1.2 การสกัดแคโรทีนอยด์

แหล่งของแคโรทีนอยด์ที่ใช้ในการทดลองได้แก่ สาหร่ายสไปรูลินา พริกหวาน และปาล์มน้ำมัน การสกัดสารสีจากวัตถุดิบข้างต้นดำเนินการโดยนำพริกหวานและปาล์มน้ำมัน ผ่าครึ่งแกะเม็ดออก นำไปอบที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และบดหยาบๆ นำตัวอย่างทั้งหมดมาสกัดแคโรทีนอยด์ โดยแช่วัตถุดิบแต่ละชนิดในอะซีโตน (acetone) ให้ท่วมในภาชนะปิดฝาสนิท ทึบแสง หรือหุ้มภาชนะด้วยกระดาษทึบแสง หลังทิ้งไว้ 3-5 วัน กรองแยกสารละลายออก ส่วนกากทำการสกัดซ้ำด้วยสารชนิดเดียวกันตามขั้นตอนข้างต้นจนกระทั่งไม่พบสารสีละลายออกมา ส่วนสารละลายที่กรองได้แต่ละครั้งนำไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งภายใต้สุญญากาศ (rotary vacuum evaporator) รวบรวมสารสกัดที่ระเหยแห้งทั้งหมดใส่กรวยแยก แล้วเติมเฮกเซน (hexane) กับน้ำจนกระทั่งสารละลายแยกชั้น จึงนำสารละลายส่วนบนมาระเหย

แห้งด้วยแก๊สไนโตรเจน สารสกัดแคโรทีนอยด์จากพริกหวานนำมาวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์รวมตามวิธีการของ Yamada และคณะ (1990) ส่วนสารสกัดแคโรทีนอยด์จากสาหร่ายสไปรูลีนาและปาล์มน้ำมันนำมาสaponification) เพื่อกำจัดคลอโรฟิลล์ (chlorophyll) ไขมัน (fat) และน้ำมัน (oil) ด้วยโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ที่เตรียมในเอทิลแอลกอฮอล์ 100 เปอร์เซ็นต์ ทิ้งไว้ 12 ชั่วโมง ในที่มืด หลังจากนั้นนำสารละลายมาแยกชั้นด้วยเฮกเซนและน้ำเช่นเดียวกับสารสกัดจากพริกหวาน นำสารละลายส่วนบนมาระเหยแห้งด้วยแก๊สไนโตรเจน จึงทำการวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์รวมตามวิธีการของ Yamada และคณะ (1990) ต่อไป

1.3 การเตรียมอาหารทดลอง

เตรียมอาหารทดลอง 5 สูตร ให้มีชนิดขององค์ประกอบอาหารตามรายละเอียดที่รายงานใน Boonyaratpalin และคณะ (2001) โดยอาหารมีปริมาณโปรตีน ไขมัน ถั่ว เยื่อใย และพลังงานในอาหารใกล้เคียงกันทุกสูตร โดยอาหารทดลองสูตรที่ 1 เป็นสูตรควบคุม อาหารสูตรที่ 2-5 มีระดับของสารสกัดแคโรทีนอยด์รวมที่แตกต่างกันจากแต่ละแหล่งคือ เบตาแคโรทีนสังเคราะห์ แคโรทีนอยด์สกัดจากสาหร่ายสไปรูลีนา พริกหวาน และปาล์มน้ำมัน ตามลำดับ รวมทั้งทำการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนะของอาหารสูตรต่างๆ ตามรายละเอียดในตารางที่ 1 (รายละเอียดวิธีการในภาคผนวก ข)

1.4 แผนการทดลองและการเก็บรวบรวมข้อมูล

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (completely randomized design; CRD) โดยแบ่งเป็น 5 ชุดการทดลอง แต่ละชุดการทดลองประกอบด้วยตู้ทดลอง 4 ตู้ เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยต่างๆ ด้วย Duncan's multiple range test (DMRT) (Zar, 1984) ให้อาหารแก่กึ่งทดลองวันละ 4 มื้อ โดยให้จนอิ่มตลอดระยะเวลาการเลี้ยงนาน 8 สัปดาห์ จะทำการเก็บรวบรวมข้อมูลดังนี้

1.4.1 ศึกษาการเจริญเติบโตและอัตราการตาย

ดำเนินการเก็บข้อมูลโดยชั่งน้ำหนักกุ้งขาวเริ่มต้นก่อนให้อาหารทดลองและหลังจากได้รับอาหารทดลองแต่ละสูตรทุกช่วง 2 สัปดาห์ บันทึกน้ำหนักอาหารที่ใช้ในแต่ละตู้แต่ละมื้อ จดบันทึกจำนวนกุ้งตาย จนสิ้นสุดการทดลองที่สัปดาห์ที่ 8 จึงนำข้อมูลที่ได้มาคำนวณค่าการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหาร และอัตราการตายโดยใช้สมการต่างๆ คือ

น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (weight gain, %)

$$= \frac{(\text{น้ำหนักกึ่งเมื่อสิ้นสุดการทดลอง} - \text{น้ำหนักกึ่งเมื่อเริ่มการทดลอง}) \times 100}{\text{จำนวนกึ่งเมื่อเริ่มการทดลอง}}$$

อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate: SGR, % ต่อวัน)

$$= \frac{(\ln \text{น้ำหนักกึ่งเมื่อสิ้นสุดการทดลอง} - \ln \text{น้ำหนักกึ่งเมื่อเริ่มการทดลอง}) \times 100}{\text{ระยะเวลา (วัน)}}$$

อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (feed conversion rate: FCR)

$$= \frac{\text{น้ำหนักอาหารที่กึ่งกินทั้งหมด (กรัม)}}{\text{น้ำหนักกึ่งที่เพิ่มขึ้นเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (กรัม)}}$$

อัตราการกินอาหาร (rate of feed intake, % น้ำหนักตัว/วัน)

$$= \frac{F \times 100}{\frac{(W_0 + W_t)}{2} \times \frac{(N_0 + N_t)}{2} \times t}$$

เมื่อ F = น้ำหนักอาหารแห้งที่กึ่งกินทั้งหมด (กรัม)

N_0 = จำนวนกึ่งเริ่มต้น (ตัว)

N_t = จำนวนกึ่งสุดท้าย (ตัว)

W_0 = น้ำหนักกึ่งเฉลี่ยเริ่มต้นการทดลอง (กรัม)

W_t = น้ำหนักกึ่งเฉลี่ยสุดท้ายเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (กรัม)

t = ระยะเวลา (วัน)

อัตราการรอดตาย (survival rate %)

$$= \frac{\text{จำนวนกึ่งเมื่อสิ้นสุดการทดลอง} \times 100}{\text{จำนวนกึ่งเมื่อเริ่มการทดลอง}}$$

ตารางที่ 1 อาหารทดลองผสมแคโรทีนอยด์จากแหล่งต่างๆ สำหรับเลี้ยงกุ้งขาว และผลการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาของอาหารทดลองสูตรต่างๆ

ส่วนประกอบอาหาร (กรัม/100 กรัม)	สูตรอาหาร				
	1	2	3	4	5
ปลาป่น	28	28	28	28	28
หมึกป่น	15	15	15	15	15
กากถั่วเหลือง	10	10	10	10	10
แป้งสาลี	20	20	20	20	20
แป้งข้าวเจ้า	9.93	9.83	9.541	9.586	1.581
วีทกลูเตน	6	6	6	6	6
เลซิทิน	2	2	2	2	2
น้ำมันปลา	2	2	2	2	2
วิตามินรวม*	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
วิตามินซี	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
แร่ธาตุรวม**	4	4	4	4	4
โคลีนคลอไรด์	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
โคเลสเตอรอล	1	1	1	1	1
ซีโอไลท์	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
BHT	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
แคโรทีนอยด์	0 ¹	0.1 ²	0.389 ³	0.344 ⁴	8.349 ⁵
รวม	100	100	100	100	100
คุณค่าทางโภชนาของอาหารทดลอง (% น้ำหนักแห้ง)					
โปรตีน	42.44 ± 0.90	42.53 ± 0.26	42.01 ± 1.74	42.85 ± 0.47	42.74 ± 1.04
ไขมัน	12.60 ± 0.90	12.07 ± 1.47	13.79 ± 0.63	11.97 ± 1.02	17.26 ± 0.88
เถ้า	8.02 ± 0.42	8.08 ± 0.20	8.83 ± 0.11	8.21 ± 0.05	9.01 ± 0.11
พลังงาน (กิโลแคลอรี/ อาหาร 100 กรัม)	350.33 ± 3.78	347.59 ± 9.18	355.94 ± 5.46	346.59 ± 5.78	371.89 ± 5.27
แคโรทีนอยด์รวม (มก./ กก.)	00.00 ± 0.00	91.15 ± 2.99	81.53 ± 1.56	97.98 ± 2.08	110.14 ± 1.45

- หมายเหตุ
- ¹ = ไม่เติมแคโรทีนอยด์
 - ² = เติมเบตาแคโรทีนสังเคราะห์
 - ³ = เติมแคโรทีนอยด์จากสารสกัดสำหรับใส่ไปรูไลนา
 - ⁴ = เติมแคโรทีนอยด์จากสารสกัดพริกหวาน
 - ⁵ = เติมแคโรทีนอยด์จากสารสกัดปาล์มน้ำมัน

* Vitamin/kg diet: Thiamine (B₁) 10 mg ; Riboflavin (B₂) 20 mg ; Pyridoxine (B₆) 10 mg; Cobalamin (B₁₂) 2 mg; Retinal (A) 4 mg; Cholecalciferol (D₃) 0.4 mg; Phylloquinone (K₁) 80 mg; Folic acid 5 mg; Calcium pantothenate 40 mg; Inositol 400 mg; Niacin 150 mg; Tocopherol (E) 60 mg; Choline 6,000 mg; Ascorbic acid (C) 500 mg

** Mineral/kg diet: NaCl 0.25 g; MgSO₄ 3.75 g; KH₂PO₄ 8 g; Ca(H₂PO₄)₂ 5 g; FeSO₄ 0.72 g; (CH₃COO)₂Ca·5H₂O 0.88 g; ZnSO₄·7H₂O 0.088 g; MnSO₄·4H₂O 0.040 g; CuSO₄·5H₂O 0.008 g; CoCl₂·6H₂O 0.00025 g; KIO₃·6H₂O 0.00075 g

1.4.2 การวิเคราะห์ความชื้นและองค์ประกอบทางโภชนาการในกึ่งทั้งตัว

นำตัวอย่างกึ่งทั้งตัวที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรต่างๆ ครบ 8 สัปดาห์ ชุตการทดลองละ 10 ตัว นำมาชั่งน้ำหนักเริ่มต้น แล้วนำมาอบให้แห้งด้วยตู้อบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส 1-3 วัน ชั่งน้ำหนักสุดท้ายจึงนำมาคำนวณหาความชื้นทั้งหมดในตัวอย่าง กึ่งตัวอย่างอีกส่วนหนึ่ง จำนวน 10 ตัว จากแต่ละสูตรทำให้แห้งภายใต้สภาวะแช่เยือกแข็ง (freeze dry) บดให้ละเอียด แล้วจึงนำมาคำนวณหาปริมาณโปรตีน ไขมัน และเยื่อใย ตามวิธีมาตรฐานของ AOAC (1990) (ภาคผนวก ข) แล้วนำค่าที่ได้มาวิเคราะห์ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน (protein efficiency ratio) โดยใช้สมการดังนี้

ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน

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

1.4.3 การวัดการเปลี่ยนแปลงของสีตัวกึ่งทั้งตัว

นำตัวอย่างกึ่งทั้งตัวที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรต่างๆ ครบ 8 สัปดาห์ ชุตการทดลองละ 10 ตัว มาถ่ายรูปรูปก่อนและหลังต้ม แล้วเปรียบเทียบสีด้วยพัดสี (color fan) และวัดสีด้วย

เครื่องคัลเลอร์มิเตอร์โดยรายงานค่าความสว่าง (L) ค่าสีแดง (a) และค่าสีเหลือง (b) ตามวิธีการของ Choubert และ Heirich (1993) นำตัวอย่างกุ้งอีก 10 ตัว จากแต่ละชุดการทดลองมาทำให้แห้งภายใต้สภาวะแช่เยือกแข็ง แล้วบดให้ละเอียดแล้วจึงนำมาวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์รวมตามวิธีการของ Chien และ Jeng (1992) (ภาคผนวก ข)

1.4.4 การศึกษาองค์ประกอบเลือด

เก็บตัวอย่างเลือดจากกุ้งตัวอย่างที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองสูตรต่างๆ ครบ 8 สัปดาห์ ชุดการทดลองละ 10 ตัว โดยใช้เข็มขนาด 20-25G ยาว 1 นิ้ว และกระบอกฉีดยาพลาสติก ขนาด 1 มิลลิลิตร เจาะเลือดจากบริเวณขาเดินคู่ที่ 3 ถ่ายเลือดทั้งหมดจากหลอดฉีดยาใส่หลอดพลาสติก ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่อบฆ่าเชื้อแล้ว ใช้ปิเปตปรับปริมาตรอัตโนมัติดูดเลือดมา 50 ไมโครลิตร เติมในสารละลายทริปแฟนบลู 0.45 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปนับจำนวนเม็ดเลือดโดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์และคำนวณผลตามวิธีการที่รายงานในกิจการ และ สิทธิ (2538) เลือดที่เหลือนำมาเติมสารละลาย K-199 พีเอช 7.4 (Itami *et al*, 1992) ที่มีส่วนผสมของสารป้องกันเลือดแข็งตัวเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ จนได้ปริมาตรครบ 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยกลับหลอดไปมาเบาๆ นำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์เม็ดเลือดที่ความเร็ว 8,497xg อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที ดูดสารละลายทิ้ง คงไว้เฉพาะเม็ดเลือดแล้วเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.4 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จึงเก็บตัวอย่างเม็ดเลือดในไนโตรเจนเหลว เพื่อทำการวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสตามวิธีการที่รายงานในกิจการและคณะ (2543) (ภาคผนวก ข)

2. การทดลองที่ 2: ศึกษาผลของความเค็มต่อการสะสมแคโรทีนอยด์ในกุ้งขาว

2.1 การเตรียมสัตว์ทดลอง

เตรียมกุ้งขาวจากแหล่งเดียวกันกับการทดลองที่ 1 นำมาเลี้ยงและคัดแยกกุ้งลงตู้กระจกขนาดความจุ 250 ลิตร ที่เติมน้ำทะเล 200 ลิตร จำนวน 24 ตู้ๆ ละ 30 ตัว แล้วเลี้ยงกุ้งด้วยอาหารเม็ดสำเร็จรูปชุดควบคุมเป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ เพื่อให้กุ้งคุ้นเคยกับสภาพการเลี้ยงในตู้ทดลอง จึงทำการชั่งน้ำหนักกุ้งทุกตู้ก่อนเริ่มให้อาหารทดลองชุดต่างๆ

2.2 การเตรียมอาหารทดลอง

เตรียมอาหารทดลอง 4 สูตร ให้มีชนิดขององค์ประกอบอาหารตามรายละเอียดที่รายงานใน Boonyaratpalin และคณะ (2001) โดยอาหารมีปริมาณโปรตีน ไขมัน ถั่ว เยื่อใย และพลังงานในอาหารใกล้เคียงกันทุกสูตร โดยให้อาหารสูตรที่ 1 และ 3 ไม่เติมเบตาแคโรทีน

ส่วนอาหารสูตรที่ 2 และ 4 เติมเบตาแคโรทีน ตามรายละเอียดในตารางที่ 2 เมื่อเตรียมอาหารเสร็จจึงทำการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาของอาหารสูตรต่างๆ ตามรายละเอียดใน ตารางที่ 2

2.3 แผนการทดลองและการเก็บรวบรวมข้อมูล

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (completely randomized design: CRD) 4 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองที่ 1 และ 2 เลี้ยงที่ความเค็ม 10 พีพีที ชุดการทดลองที่ 3 และ 4 เลี้ยงที่ความเค็ม 30 พีพีที แต่ละชุดการทดลองประกอบด้วยตู้ทดลอง 6 ตู้ เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's multiple range test (DMRT) (Zar, 1984) ให้อาหารแก่กึ่งทดลอง วันละ 4 มื้อ โดยให้อาหารตามระยะเวลาการเลี้ยง จะทำการเก็บรวบรวมข้อมูลต่างๆ ได้แก่ การเจริญเติบโต วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในกึ่งทดลองทั้งตัว วัดการเปลี่ยนแปลงของสีตัวกุ้งขาว และศึกษาองค์ประกอบเลือด โดยใช้วิธีการเดียวกับการทดลองที่ 1 และเมื่อเลี้ยงกึ่งทดลองดังกล่าวครบ 8 สัปดาห์ แบ่งกึ่งส่วนหนึ่งจากแต่ละชุดไปทดสอบความเครียดโดยวางแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียลแบบ 4x3x2 ซึ่งประกอบด้วย 24 หน่วยทดลอง ทำการวิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's multiple range test (DMRT)

ตารางที่ 2 อาหารทดลองผสมและไม่ผสมเบตาแคโรทีนสำหรับเลี้ยงกุ้งขาว และผลการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาของอาหารทดลองสูตรต่างๆ

ส่วนประกอบอาหาร (กรัม/100 กรัม)	สูตรอาหาร			
	1	2	3	4
ปลาป่น	28	28	28	28
หมึกป่น	15	15	15	15
กากถั่วเหลือง	10	10	10	10
แป้งสาลี	20	20	20	20
แป้งข้าวเจ้า	9.93	9.83	9.93	9.83
วีทกลูเตน	6	6	6	2
เลซิติน	2	2	2	2
น้ำมันปลา	2	2	2	0.15
วิตามินรวม*	0.15	0.15	0.15	0.15
วิตามินซี	0.1	0.1	0.1	0.1
แร่ธาตุรวม**	4	4	4	4
โคลีนคลอไรด์	0.3	0.3	0.3	0.3
โคเลสเตอรอล	1	1	1	1

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ส่วนประกอบอาหาร (กรัม/100 กรัม)	สูตรอาหาร			
	1	2	3	4
ซีโอไลท์	1.5	1.5	1.5	1.5
BHT	0.02	0.02	0.02	0.02
เบตาแคโรทีน	0 ¹	0.1 ²	0 ¹	0.1 ²
คุณค่าทางโภชนาของอาหารทดลอง (% น้ำหนักแห้ง)				
โปรตีน	42.01 ± 1.13	42.76 ± 4.59	42.01 ± 1.13	42.76 ± 4.59
ไขมัน	9.11 ± 1.22	9.45 ± 2.27	9.11 ± 1.22	9.45 ± 2.27
เถ้า	8.02 ± 0.42	8.08 ± 0.20	8.83 ± 0.11	8.21 ± 0.05
พลังงาน (กิโลแคลอรี/ อาหาร 100 กรัม)	325.99 ± 6.67	329.57 ± 4.30	325.99 ± 6.67	329.57 ± 4.30
แคโรทีนอยด์รวม (มิลลิกรัม/กิโลกรัม)	00.00 ± 0.00	81.86 ± 2.62	00.00 ± 0.00	81.86 ± 2.62

หมายเหตุ ¹ = ไม่เติมแคโรทีนอยด์

² = เติมเบตาแคโรทีน

* Vitamin/kg diet: Thiamine (B₁) 10 mg ; Riboflavin (B₂) 20 mg ; Pyridoxine (B₆) 10 mg; Cobalamin (B₁₂) 2 mg; Retinal (A) 4 mg; Cholecalciferol (D₃) 0.4 mg; Phylloquinone (K₁) 80 mg; Folic acid 5 mg; Calcium pantothenate 40 mg; Inositol 400 mg; Niacin 150 mg; Tocopherol (E) 60 mg; Choline 6,000 mg; Ascorbic acid (C) 500 mg

** Mineral/kg diet: NaCl 0.25 g; MgSO₄ 3.75 g; KH₂PO₄ 8 g; Ca(H₂PO₄) 5 g; FeSO₄ 0.72 g; (CH₃COO)₂Ca.5H₂O 0.88 g; ZnSO₄.7H₂O 0.088 g; MnSO₄.4H₂O 0.040 g; CuSO₄.5H₂O 0.008 g; CoCl₂.6H₂O 0.00025 g; KIO₃.6H₂O 0.00075 g

2.4 การทดสอบความต้านทานต่อความเครียด

นำตัวอย่างกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลอง 4 สูตร ครบ 8 สัปดาห์ มาชุดการทดลองละ 36 ตัว แบ่งกุ้งทดลองแต่ละชุดออกเป็น 6 ส่วนๆ ละ 6 ตัว เพื่อทดสอบความต้านทานต่อความเครียดในสภาวะที่มีการเปลี่ยนแปลงความเค็มและปริมาณออกซิเจนของน้ำที่ใช้เลี้ยง โดยกำหนดมีหน่วยทดลองจากแต่ละชุดการทดลองอยู่ในน้ำเลี้ยงสภาวะเดิมเป็นชุดควบคุม 3 ซ้ำ (12 หน่วยทดลอง) และหน่วยทดลองจากแต่ละชุดการทดลองที่ทำให้เกิด

ความเครียดชุดละ 3 ชั่วโมง (12 หน่วยทดลอง) โดยทำการเปลี่ยนแปลงระดับความเค็มของน้ำจาก 5 พีพีที เป็น 30 พีพีที สำหรับชุดที่เลี้ยงในน้ำความเค็ม 10 พีพีที และเปลี่ยนแปลงระดับความเค็มของน้ำจาก 30 พีพีที เป็น 5 พีพีที สำหรับชุดที่เลี้ยงในน้ำความเค็ม 30 พีพีที สลับกันวันเว้นวัน โดยน้ำที่ใช้เปลี่ยนในแต่ละวันมีค่าการละลายของออกซิเจน 0.5 ถึง 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และให้กุ้งอยู่ในสภาวะออกซิเจนต่ำ วันละ 5 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงเติมออกซิเจนให้เกินพอ บันทึกอัตราการตายทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน จึงเก็บตัวอย่างไปทำการวิเคราะห์แคโรทีนอยด์รวม โดยใช้วิธีการเดียวกับการทดลองที่ 1

3. การทดลองที่ 3: ศึกษาผลของเบตาแคโรทีนต่อการต้านทานความเครียดในกุ้งขาว

3.1 การเตรียมสัตว์ทดลอง

เตรียมกุ้งขาวจากแหล่งเดียวกันกับการทดลองที่ 1 นำมาเลี้ยงและคัดแยกกุ้งลงตู้กระจกขนาดความจุ 250 ลิตร ที่เติมน้ำทะเล 200 ลิตร จำนวน 24 ตู้ๆ ละ 30 ตัว แล้วเลี้ยงกุ้งด้วยอาหารเม็ดสำเร็จรูปชุดควบคุมเป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ เพื่อให้กุ้งคุ้นเคยกับสภาพการเลี้ยงในตู้ทดลอง จึงทำการชั่งน้ำหนักกุ้งทุกตู้ก่อนเริ่มให้อาหารทดลองชุดต่างๆ

3.2 การเตรียมอาหารทดลอง

เตรียมอาหารทดลอง 4 สูตร ให้มีชนิดขององค์ประกอบอาหารตามรายละเอียดที่รายงานใน Boonyaratpalin และคณะ (2001) โดยอาหารมีปริมาณโปรตีน ไขมัน เกล็ด เยื่อใย และพลังงานในอาหารใกล้เคียงกันทุกสูตร โดยให้อาหารสูตรที่ 1 ไม่เติมแคโรทีนอยด์เป็นสูตรควบคุม อาหารสูตรที่ 2,3 และ 4 เติมเบตาแคโรทีนสังเคราะห์ ตามรายละเอียดในตารางที่ 3 เมื่อเตรียมอาหารเสร็จจึงทำการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาของอาหารสูตรต่างๆ ตามรายละเอียดในตารางที่ 3

3.3 แผนการทดลองและการเก็บรวบรวมข้อมูล

วางแผนการทดลองแบบสุ่มทดลอง (complete randomize design: CRD) 4 ชุดการทดลอง แต่ละชุดการทดลองประกอบด้วยตู้ทดลอง 6 ตู้ เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's multiple range test (DMRT) (Zar, 1984) ให้อาหารแก่กุ้งทดลองวันละ 4 มื้อโดยให้จนอิ่มตลอดระยะเวลาการเลี้ยง หลังการเลี้ยงกุ้งแต่ละชุดการทดลองนาน 3, 5 และ 7 สัปดาห์ จะทำการเปลี่ยนแปลงระดับความเค็มของน้ำที่ใช้เลี้ยงจาก 30 พีพีที เป็น 10 พีพีที สลับกันทุกๆ วันเป็นเวลา 7 วัน เก็บรวบรวมข้อมูลต่างๆ ได้แก่ การเจริญเติบโต วัดการ

เปลี่ยนแปลงของสีตัวกุ้งขาว วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในกุ้งทดลองทั้งตัว วิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์รวม และศึกษาองค์ประกอบเลือดโดยวิธีการเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

ตารางที่ 3 อาหารทดลองของเบตาแคโรทีนต่อการต้านทานความเครียดในกุ้งขาว

ส่วนประกอบอาหาร (กรัม/100 กรัม)	สูตรอาหาร			
	1	2	3	4
ปลาป่น	28	28	28	28
หมึกป่น	15	15	15	15
กากถั่วเหลือง	10	10	10	10
แป้งสาลี	20	20	20	20
แป้งข้าวเจ้า	9.93	9.88	9.43	9.93
วีทกลูเตน	6	6	6	2
เลซิติิน	2	2	2	2
น้ำมันปลา	2	2	2	0.15
วิตามินรวม*	0.15	0.15	0.15	0.15
วิตามินซี	0.1	0.1	0.1	0.1
แร่ธาตุรวม**	4	4	4	4
โคลีนคลอไรด์	0.3	0.3	0.3	0.3
โคเลสเตอรอล	1	1	1	1
ซีโอไลท์	1.5	1.5	1.5	1.5
BHT	0.02	0.02	0.02	0.02
เบตาแคโรทีน	0 ¹	0.5 ²	5 ²	10 ²
รวม	100	100	100	100
คุณค่าทางโภชนาของอาหารทดลอง (% น้ำหนักแห้ง)				
โปรตีน	43.49 ± 0.36	43.20 ± 1.18	43.37 ± 1.71	43.75 ± 0.09
ไขมัน	10.07 ± 0.10	9.75 ± 1.48	9.49 ± 0.75	9.29 ± 1.26
ถั่ว	8.22 ± 0.03	8.20 ± 0.02	8.08 ± 0.03	8.21 ± 0.08
พลังงาน (กิโลแคลอรี/ อาหาร 100 กรัม)	333.34 ± 0.85	331.24 ± 8.10	329.52 ± 4.44	328.99 ± 7.80
แคโรทีนอยด์รวม (มิลลิกรัม/กิโลกรัม)	00.00 ± 0.00	43.49± 3.30	340.76± 4.85	340.76± 4.85

หมายเหตุ ¹ = ไม่เติมแคโรทีนอยด์

² = เติมเบตาแคโรทีน

* Vitamin/kg diet: Thiamine (B₁) 10 mg ; Riboflavin (B₂) 20 mg ; Pyridoxine (B₆) 10 mg; Cobalamin (B₁₂) 2 mg; Retinal (A) 4 mg; Cholecalciferol (D₃) 0.4 mg; Phylloquinone (K₁) 80 mg; Folic acid 5 mg; Calcium pantothenate 40 mg; Inositol 400 mg; Niacin 150 mg; Tocopherol (E) 60 mg; Choline 6,000 mg; Ascorbic acid (C) 500 mg

** Mineral/kg diet: NaCl 0.25 g; MgSO₄ 3.75 g; KH₂PO₄ 8 g; Ca(H₂PO₄)₂ 5 g; FeSO₄ 0.72 g; (CH₃COO)₂Ca.5H₂O 0.88 g; ZnSO₄.7H₂O 0.088 g; MnSO₄.4H₂O 0.040 g; CuSO₄.5H₂O 0.008 g; CoCl₂.6H₂O 0.00025 g; KIO₃.6H₂O 0.00075 g