บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลอง

การทดลองที่ 1 การเปลี่ยนแปลงทางเคมีและกายภาพของปลาป่นที่เก็บรักษาในสภาพที่ต่างกัน

1.1 การเปลี่ยนแปลงทางเคมี

จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของปลาป่นที่เก็บรักษาโดยเติมและไม่เติมสารกันหืนและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°ซ และ 27-32°ซ เป็นระยะเวลานาน 1.5, 3 และ 4.5 เดือนตามลำดับ โดยที่อุณหภูมิห้อง (27-32°ซ) มีค่าความชื้นสัมพัทธ์ต่ำสุดและสูงสุดอยู่ระหว่าง 65-84% (ตารางภาคผนวกที่ ค. 1) พบว่าไม่มีอิทธิพลร่วมระหว่างการเติมสารกันหืนอีทอกซิควิน อุณหภูมิและระยะเวลาในการเก็บรักษา ต่อปริมาณโปรตีน ไขมัน และเถ้าของปลาป่น อย่างไรก็ตามสำหรับปริมาณโปรตีนพบว่าตัวอย่างที่ไม่เติมสารกันหืนและเก็บที่อุณหภูมิห้องมีปริมาณโปรตีนลดลงตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของอังคณา หาญบรรจงและคณะ (2544) พบว่าหลังจากเก็บรักษาปลาป่นไว้ในอุณหภูมิ 23.55-33.59°ซ และความชื้นสัมพัทธ์ 46.80-86.00% นาน 3 เดือน ปลาป่นมีเปอร์เซ็นต์โปรตีนลดลง 2-4% ตลอดการเก็บรักษา โดยอาจเกิดเนื่องจากการสลายของกลุ่มอะมิโน (deamination) ในเนื้อปลา การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันจะมีบทบาทสำคัญต่อการสูญเสียสภาพธรรมชาติ (denature) ของโปรตีน (Shenouda, 1980; Rafsgaard *et al*., 2000) โดยเฉพาะเมื่อเก็บในระยะเวลานานขึ้น และที่อุณหภูมิสูง (March *et al*., 1961) ทั้งนี้เนื่องจากสารที่เกิดจากการออกซิไดซ์ของไขมันเช่น มาลอนอัลดีไฮด์ (MAD) 4-hydroxynonenal (HNE) และ 4-hydroxyhexenal (HHE) สามารถเกิดอันตกิริยากับหมู่ที่มีความจำเพาะต่อกันเช่น หมู่ซัลฟ์ไฮดริลของกรดอะมิโนซีสเตอีน (cysteine-SH) หมู่อะมิโนของไลซีน (lysine-NH_2) และปลายด้านอะมิโนของกรดแอสปาร์ติก (aspartic acid) ไทโรซีน (tyrosine) เมทไทโอนีน (methionine) อาร์จีนีน (argenine) และกลุ่มอิมิดาโซลของฮีสติดีน (histidine imidazole group) (Esterbauer *et al*., 1991; Takiguchi, 1992) ทำให้โปรตีนมีการจับตัวกันเป็นโมเลกุลใหญ่ขึ้น (Luo and Hultin, 1986) มีน้ำหนักโมเลกุลมากขึ้น (Liu and Wang, 2005) ส่งผลให้ความไม่ชอบน้ำบนผิวหน้าโมเลกุลโปรตีนเพิ่มมากขึ้น และมีผลให้ความสามารถในการละลายของโปรตีนลดน้อยลง (Castell, 1971; Kussi *et al*., 1975; Esterbauer *et al*.,1991)

ปริมาณไขมันรวมของปลาป่นมีความแตกต่างเนื่องจากปัจจัยร่วมระหว่างการเติมสารกันหืนและระยะเวลา โดยมีปริมาณไขมันรวมลดลงตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา อย่างไรก็ตาม อัตราการลดลงของไขมันแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสภาพการเก็บรักษา การลดลงของปริมาณไขมันรวมอาจเกิด เนื่องจากการสลายพันธะเอสเทอร์เป็นกรดไขมันอิสระ แล้วทำปฏิกิริยากับออกซิเจนได้เป็นสารไฮโดรเปอร์ออกไซด์ ซึ่งจะแตกตัวเป็นโมเลกุลสั้นๆและสามารถระเหยออกไปได้ (Labuza, 1971; Gray, 1978) ตัวอย่างที่มีปริมาณไขมันลดลงต่ำสุดคือตัวอย่างที่เติมสารกันหืนและเก็บที่อุณหภูมิห้องนาน 3 เดือน ทั้งนี้เนื่องจากในช่วงระยะเวลาดังกล่าวมีฝนตกตลอดทั้งเดือน อากาศมีความชื้นสูงถึง 80-84% สอดคล้องกับค่าความชื้นที่เพิ่มสูงที่สุดในตัวอย่างที่เก็บที่อุณหภูมิห้องทั้งเติมและไม่เติมสารกันหืน เป็นเหตุให้ตัวอย่างที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องมีเชื้อราเกิดขึ้นเล็กน้อย โดยตัวอย่างที่เติมสารกันหืนจะมีเชื้อราเกิดขึ้นมากกว่าในตัวอย่างที่ไม่เติมสารกันหืน เพราะการเติมสารกันหืนอีทอกซิควิน ซึ่งมีลักษณะเป็นของเหลวมีความหนืดทำให้ปลาป่นจับตัวกันเป็นก้อนมากกว่าปลาป่นที่ไม่เติมสารกันหืน เชื้อราที่เกิดขึ้นสามารถสร้างเอนไซม์ไลเปส (lipase) ออกมาย่อยพันธะเอสเทอร์ของไขมันเพื่อนำไปใช้ในการเจริญเติบโต (Brady *et al*., 1988; Commenil *et al*., 1995; Kamlangdee, 1998) อีกทั้งความชื้นสูงในอากาศเป็นตัวเร่งให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้มากขึ้น (Aurand and Woods, 1973) ส่งผลให้ปริมาณไขมันในตัวอย่างที่เก็บรักษาโดยการเติมสารกันหืนที่อุณหภูมิห้องที่ระยะเวลานาน 3 เดือน ลดลงต่ำสุดและสอดคล้องกับปริมาณกรดไขมันอิสระ (FFA) ที่เพิ่มสูงขึ้นมากที่สุดในตัวอย่างเดียวกัน

สำหรับปริมาณเถ้าในตัวอย่างมีปริมาณขึ้นลงไม่แน่นอนตลอดระยะเวลาเก็บรักษาไม่ขึ้นอยู่กับการเติมสารกันหืนและอุณหภูมิในการเก็บรักษา ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความไม่สม่ำเสมอของตัวอย่าง โดยเฉพาะการกระจายตัวของกระดูกหรือเกล็ด ซึ่งเป็นแหล่งของสารอนินทรีย์ที่สำคัญ

การเปลี่ยนแปลงค่าเปอร์ออกไซด์ในปลาป่นที่เก็บรักษาในสภาพต่างๆ กันสามารถจัดเป็น 2 กลุ่มอย่างชัดเจน คือกลุ่มที่ไม่เติมสารกันหืนมีค่าเปอร์ออกไซด์เพิ่มขึ้นตลอดการเก็บรักษา ในขณะที่กลุ่มตัวอย่างที่เติมสารกันหืนมีค่าเปอร์ออกไซด์เพิ่มขึ้นในช่วง 1.5 เดือน หลังจากนั้นจะลดลงและคงที่เมื่อเก็บรักษานานขึ้น ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับค่าอะนิซิดีน ซึ่งเป็นค่าที่ใช้วัดปริมาณสารประกอบคาร์บอนิลที่มีน้ำหนักโมเลกุลมาก เช่น 2-alkenals และ 2,4-alkadienals ซึ่งไม่สามารถระเหยได้ (Shahidi and Wanasundara, 1998; Hamilton and Kristein, 2003) แสดงว่าสารกันหืนอีทอกซิควินมีบทบาทในการลดอัตราการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Nash and Ackman, 1977; Poulter and Disney, 1978; Mai and Kinsella, 1981; Younathan *et al*., 1983) อย่างไรก็ตามสารกันหืนไม่สามารถหยุดการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้สมบูรณ์ สำหรับการเปลี่ยนแปลงของค่าเปอร์ออกไซด์

ของตัวอย่างที่ไม่เติมสารกันหืนเพิ่มขึ้นสูงในช่วง 1.5 เดือน และค่อนข้างคงที่ในเดือนที่ 3 และเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วที่ 4.5 เดือน ค่าเปอร์ออกไซด์เป็นค่าที่วัดปริมาณสารไฮโดรเปอร์ออกไซด์ ซึ่งเป็นผลผลิตที่ได้จากกระบวนการออกซิเดชันในระยะเหนี่ยวนำและระยะขยายตัว เป็นสารตัวกลางที่ไม่มีความคงตัวและสามารถสลายตัวเป็นสารโมเลกุลต่ำระเหยได้ง่าย ดังนั้นการลดลงของค่าเปอร์ออกไซด์ในตัวอย่างที่เก็บรักษาในสภาพที่เติมสารกันหืนในช่วงเดือนที่ 3 อาจมีสาเหตุจากการระเหยของสารตัวกลางหรือการเปลี่ยนแปลงเป็นสารระเหยได้ ส่งผลให้การเปลี่ยนแปลงค่าเปอร์ออกไซด์ของปลาป่นมีค่าเพิ่มขึ้นและลดลงได้ตลอดเวลาการเก็บรักษา จากผลการทดลองในครั้งนี้พบว่าค่าเปอร์ออกไซด์มีความแปรปรวนอยู่ระหว่าง 1.84-6.43 meq/kg oil โดยตัวอย่างที่ไม่เติมสารกันหืนเก็บที่อุณหภูมิห้องนาน 4.5 เดือนมีค่าเปอร์ออกไซด์สูงที่สุดเท่ากับ 6.43±0.53 meq/kg oil ซึ่งยังคงเป็นค่าต่ำ เนื่องจากระดับของค่าเปอร์ออกไซด์ในอาหารกุ้งกุลาดำที่สามารถรับได้อยู่ในช่วง 20-40 meq/kg oil (Shetty *et al.,*1991)

ส่วนระดับ TBARS มีการเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในการเก็บรักษาโดยกลุ่มตัวอย่างที่ไม่เติมสารกันหืนมีระดับ TBARS เพิ่มขึ้นมากกว่าในกลุ่มตัวอย่างที่เติมสารกันหืน แต่พบว่าตัวอย่างที่เก็บรักษาในอุณหภูมิ 4°ซ ที่ระยะเวลา 4.5 เดือนมีระดับสูงที่สุด และสูงกว่าในตัวอย่างที่เก็บที่อุณหภูมิห้องทั้งกลุ่มที่เติมและไม่เติมสารกันหืน ทั้งนี้เนื่องจากมาลอนอัลดีไฮด์ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันในปลาป่นอาจทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโน และน้ำตาลในโปรตีน (maillard reaction) ได้ดีในสภาพที่มีอุณหภูมิสูง (Gomez-Sanchez *et al*., 1990) เป็นเหตุให้ปริมาณสารมาลอนอัลดีไฮด์ในตัวอย่างที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องลดลง (Gardner, 1979; Melton, 1983) โดย Huang และ Greene (1978) พบว่าค่า TBARS ในเนื้อวัวที่เก็บที่อุณหภูมิสูงเป็นเวลานานมีค่าต่ำกว่าตัวอย่างที่เก็บที่อุณหภูมิต่ำและเวลาน้อยกว่า ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Lubis และ Buckle (1990) ที่พบว่าค่า TBARS ในปลาซาร์ดีนเค็มตากแห้งที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิต่ำ (5°ซ) เป็นระยะเวลานาน 24 สัปดาห์ มีค่า TBARS สูงกว่าในตัวอย่างที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิสูง (20°ซ) นอกจากนี้จากการรายงานของ Sinnhuber และ Yu (1958) พบว่าการอบปลาที่อุณหภูมิ 121°ซ จะทำให้ค่า TBARS ลดลงอย่างรวดเร็ว และ Maleki (1974) กล่าวว่าอุณหภูมิที่สูงขึ้น (62°ซ) มีผลให้ค่า TBARS ลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อเทียบกับอุณหภูมิห้อง นอกจากนี้เนื่องจากสารมาลอนอัลดีไฮด์ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาเป็นสารที่มีโมเลกุลต่ำสามารถระเหยได้ ดังนั้นการเก็บรักษาตัวอย่างในตู้เย็นที่มีอุณหภูมิต่ำเป็นเหตุให้สารระเหยได้น้อยลง ประกอบกับตัวอย่างถูกเก็บไว้ในภาชนะที่มีฝาปิดมิดชิดจึงทำให้ความสามารถในการระเหยเป็นไปได้น้อยมาก แต่ปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันยังคงสามารถดำเนินต่อไปได้ แม้จะอยู่ในที่มีอุณหภูมิต่ำก็ตาม (Allen and Hamilton, 1994) จึงเกิดการสะสมของสารมาลอนอัลดีไฮด์ในปลาป่นได้มากขึ้น ขณะที่ตัวอย่างที่เก็บที่อุณหภูมิห้องมีสภาพ

เป็นที่โล่งมีอากาศถ่ายเทตลอดเวลา ประกอบกับในสภาพที่มีอุณหภูมิที่สูงกว่าจึงเป็นปัจจัยเร่งให้การระเหยของสารมาลอนอัลดีไฮด์เกิดได้ดีขึ้น ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับปริมาณด่างที่ระเหยได้ทั้งหมด โดยพบว่าตัวอย่างที่เก็บรักษาในอุณหภูมิ 4°ซ มีปริมาณเพิ่มขึ้นสูงกว่าที่เก็บในอุณหภูมิห้องเช่นกัน นอกจากนี้การเก็บรักษาตัวอย่างที่อุณหภูมิต่ำมีผลต่อปริมาณการละลายของก๊าซเพิ่มสูงขึ้นและเมมเบรนมีคุณสมบัติยอมให้สารซึมผ่านได้มากขึ้น ส่งผลให้เกิดการผสมกันขององค์ประกอบต่างๆ ในปฏิกิริยาได้สูงและรวดเร็วยิ่งขึ้น (สุทธวัฒน์ เบญจกุล, 2548) และเนื่องจากกระบวนการในการผลิตปลาป่นต้องอาศัยความร้อนสูง ทำให้มีการปลดปล่อยสารโปร ออกซิแดนท์ เช่น เหล็ก (Fe) ในฮีม ออกมา (Erickson, 1998) อีกทั้งไขมันจากปลาประกอบด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัวปริมาณสูงส่งผลให้เกิดการออกซิเดชันได้ง่ายขึ้น (Harris and Tall, 1994) Lunberg (1966) พบว่าในสภาพที่มีเหล็กและทองแดงอยู่จะเป็นตัวเร่งให้เกิดกลิ่นและรสของการออกซิไดซ์ได้ดีเมื่ออยู่ในที่มีอุณหภูมิต่ำ

สำหรับปริมาณกรดไขมันอิสระ (FFA) ในปลาป่น เป็นกรดไขมันที่เกิดจากการย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ของไตรกลีเซอร์ไรด์ โดยจะเกิดได้ดีที่อุณหภูมิสูงและไม่มีความแตกต่างระหว่างกรดไขมันชนิดอิ่มตัวหรือชนิดไม่อิ่มตัว (Hardy *et al.,* 1983) ซึ่งบางครั้งอาจใช้เป็นตัวบ่งชี้ถึงการเสื่อมคุณภาพของน้ำมันเนื่องจากปริมาณกรดไขมันอิสระที่เพิ่มมากขึ้นนำไปสู่การเกิดออกซิเดชันของกรดไขมันเพิ่มขึ้น (Rosas-Romeo and Morton, 1977) แต่ Opstvedt (1985) รายงานว่าปริมาณกรดไขมันอิสระในอาหารสัตว์ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสัตว์แต่อย่างใด จากผลการทดลองพบว่าตัวอย่างที่เติมสารกันหืนทั้งที่เก็บที่อุณหภูมิห้องและอุณหภูมิ 4°ซ มีปริมาณกรดไขมันอิสระเพิ่มขึ้นมากที่สุดในช่วง 3 เดือน โดยตัวอย่างที่เก็บที่อุณหภูมิห้องมีอัตราการเพิ่มขึ้นมากกว่าและมีค่าสูงสุด ขณะที่ตัวอย่างที่ไม่เติมสารกันหืนทั้งที่เก็บที่อุณหภูมิห้องและอุณหภูมิ 4°ซ มีปริมาณกรดไขมันอิสระเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยในช่วง 3 เดือน และเพิ่มมากขึ้นในตัวอย่างที่เก็บที่อุณหภูมิห้องเมื่อเก็บรักษานาน 4.5 เดือน แสดงให้เห็นว่าปริมาณกรดไขมันอิสระจะเกิดได้มากขึ้นที่อุณหภูมิสูง ซึ่งอาจเป็นผลจากกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส อีกทั้งอัตราการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในตัวอย่างที่ไม่เติมสารกันหืนมีมากกว่าในตัวอย่างที่เติมสารกันหืนจึงทำให้ปริมาณกรดไขมันอิสระถูกออกซิ ไดซ์ไปมากกว่า ขณะที่ตัวอย่างที่เติมสารกันหืนมีอัตราการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้น้อยกว่า จึงคงเหลือปริมาณกรดไขมันอิสระอยู่ในตัวอย่างที่เติมสารกันหืนมากกว่า อย่างไรก็ตามกรดไขมันอิสระในตัวอย่างที่ไม่เติมสารกันหืนมีปริมาณเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่เก็บรักษา โดยเฉพาะตัวอย่างที่เก็บที่อุณหภูมิห้อง

สำหรับปริมาณไนโตรเจนที่ระเหยได้ทั้งหมด ซึ่งสามารถใช้ในการชี้วัดความเน่าเสียและเสื่อมสภาพ (decomposition) ของวัตถุดิบได้ดี (Arason, 1994) จากผลการทดลองพบว่าใน

ตัวอย่างที่เก็บที่อุณหภูมิ 4°ซ ทั้งที่เติมและไม่เติมสารกันหืนมีปริมาณไนโตรเจนที่ระเหยได้ทั้งหมดเพิ่มสูงขึ้นแต่มีปริมาณไม่มากนัก ในขณะที่ตัวอย่างที่เก็บที่อุณหภูมิห้องทั้งที่เติมและไม่เติมสารกันหืนมีปริมาณไนโตรเจนที่ระเหยได้ทั้งหมดลดลงตลอดการเก็บรักษา เนื่องจากปริมาณไนโตรเจนที่ระเหยได้ทั้งหมดที่เกิดขึ้นมีสาเหตุจากการย่อยสลายโปรตีนและกรดอะมิโนในกล้ามเนื้อปลา โดยจุลินทรีย์หรือการออโตไลซีส (autolysis) ของเนื้อปลาเองก่อนการแปรรูปเป็นปลาป่น แต่อย่างไรก็ตามหลังจากแปรรูปเป็นปลาป่นแล้วจุลินทรีย์บางชนิดยังคงสามารถย่อยโปรตีนต่อไปได้ แม้ว่าอัตราการย่อยจะต่ำกว่าก็ตาม ซึ่งผลผลิตที่ได้จะอยู่ในรูปของแอมโมเนีย สารประกอบเอมีน (trimethylamine และ dimethylamine) หรือไนโตรเจนทุกชนิดที่สามารถระเหยได้ ดังนั้นในตัวอย่างที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องซึ่งเปิดโล่งและมีการถ่ายเทอากาศดี จึงเป็นเหตุให้สารประกอบของไนโตรเจนที่ระเหยได้ระเหยออกไปในอัตราที่มากกว่าอัตราที่เกิดขึ้นใหม่ส่งผลให้ปริมาณไนโตรเจนที่ระเหยได้ลดลงจนต่ำสุดที่ระยะเวลา 4.5 เดือน ขณะที่ตัวอย่างที่เก็บที่อุณหภูมิ 4°ซ แม้ว่าจะมีปริมาณไนโตรเจนที่ระเหยได้เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย แต่อัตราการระเหยได้จะต่ำมาก ทำให้เกิดการสะสมของปริมาณไนโตรเจนที่ระเหยได้อยู่ในตัวอย่างมากกว่าในตัวอย่างที่เก็บที่อุณหภูมิห้องอย่างมีนัยสำคัญ และตัวอย่างที่มีปริมาณไนโตรเจนที่ระเหยได้ทั้งหมดสูงที่สุด คือปลาป่นที่ไม่เติมสารกันหืนและเก็บที่อุณหภูมิ 4°ซ นาน 4.5 เดือน มีค่าเท่ากับ 94.52±0.21 mgN/ 100g sample ซึ่งเป็นค่าที่ค่อนข้างสูงแต่ยังอยู่ในระดับที่ยอมรับได้ โดยอังคณา หาญบรรจง (2544) พบว่าปลาป่นเกรดกุ้งมีค่าไนโตรเจนที่ระเหยได้ทั้งหมดแปรปรวนอยู่ในช่วง 14-96 mgN/100g sample นอกจากนี้สารกันหืนชนิดฟีนอลลิกมีบทบาทในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ (พรพล รมย์นุกูล, 2545) ดังนั้นการเติมสารอีทอกซิควินลงในปลาป่นอาจมีผลต่อการชะลอการเสื่อมสลายของปลาป่นเนื่องจากจุลินทรีย์ส่งผลให้ปริมาณด่างที่ระเหยได้ทั้งหมดมีปริมาณต่ำกว่าชุดการทดลองที่ไม่มีการเติมสารอีทอกซิควิน

1.2 การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ

จากผลการเปลี่ยนแปลงสีของปลาป่นที่เก็บรักษาในสภาพต่างๆ กัน ค่า L^* เป็นค่าแสดงความสว่างของวัตถุ โดยค่า L^* ของตัวอย่างที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องทั้งที่เติมและไม่เติมสารกันหืนมีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อยตลอดระยะเวลาที่เก็บรักษา ขณะที่ตัวอย่างที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°ซ มีค่าค่อนข้างคงที่ การเพิ่มขึ้นของค่า L^* บ่งบอกถึงความสว่างของปลาป่นซึ่งความสว่างที่เพิ่มขึ้นอาจมีสาเหตุจากความชื้นที่เพิ่มขึ้นระหว่างการเก็บรักษา ส่งผลให้ผิวหน้าของปลาป่นมีการสะท้อนแสงได้มากขึ้น จากผลการทดลอง แม้ว่าระดับ TBARS ของตัวอย่างที่ไม่เติมสารกันหืนมีค่าสูงกว่าตัวอย่างที่เติมสารกันหืนแต่การเปลี่ยนแปลงค่า L^*, a^* และ b^* ไม่แตกต่างกันมากนัก Maruf และคณะ (1990) พบว่าปลาแมคเคอเรลดองเค็ม 0% และ 5% ตากแห้งเก็บที่อุณหภูมิ 30°ซ ซึ่งมีค่า TBARS

ต่ำกว่า แต่กลับมีสีคล้ำกว่าในตัวอย่างดองเค็ม 15% ที่มีค่า TBARS สูงกว่า ดังนั้นการเกิดสีดำคล้ำของตัวอย่างอาจไม่ใช่ตัวบ่งชี้ที่ชัดเจนของการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน และไม่ใช่สาเหตุจากการทำปฏิกิริยาระหว่างไขมันที่ถูกออกซิไดซ์กับโปรตีนเพียงสาเหตุเดียว ทั้งนี้เนื่องจากปฏิกิริยาเมลลาร์ด (maillard reaction) อาจเกิดจากน้ำตาลไรโบส (ribose) หรือน้ำตาลกลูโคส (glucose) กับกลุ่มอะมิโน (amino group) ซึ่ง Choi และคณะ (1983) พบว่าปฏิกิริยาเมลลาร์ดไม่มีบทบาทสำคัญในเนื้อปลาที่ทำให้แห้งแล้ว และ Ranken (1994) กล่าวว่าการเกิดสีคล้ำเนื่องจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันในเนื้อสัตว์ที่ผ่านการเก็บรักษาหรือทำให้สุกแล้วไม่มีผลมากเมื่อเทียบกับเกิดสีคล้ำในเนื้อสัตว์ที่ยังไม่ผ่านการเก็บรักษา เนื่องจากการออกซิเดชันของไมโอโกลบินเป็นเมทไมโอโกลบิน ส่วน Lubis และ Buckle (1990) รายงานว่าการเกิดสีเข้มในปลาซาร์ดีนดองเค็มตากแห้งเกิดเนื่องจากการเปลี่ยนสีของน้ำมันในช่วงการทำให้แห้งมากกว่าเกิดจาก non-enzymic browning (NEB)

สำหรับค่า a^* และค่า b^* ในตัวอย่างที่เก็บที่อุณหภูมิห้องทั้งที่เติมและไม่เติมสารกันหืนมีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อยตามระยะเวลาที่เก็บรักษา ส่วนตัวอย่างที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°ซ ค่า a^* ค่อนข้างคงที่ ขณะที่ b^* มีค่าลดลง ชี้ให้เห็นว่าตัวอย่างที่เก็บที่อุณหภูมิห้องมีการเปลี่ยนแปลงเป็นสีแดงและสีเหลืองมากขึ้นเมื่อระยะเวลานานขึ้น ขณะที่ตัวอย่างที่เก็บที่อุณหภูมิ 4°ซ ไม่มีการเปลี่ยนแปลง ส่วนค่า ΔE^*_{ab} ของตัวอย่างที่เก็บที่อุณหภูมิห้องทั้งที่เติมและไม่เติมสารกันหืนมีค่าเพิ่มขึ้นสูงถึง 3.05 และ 2.63 ตามลำดับ แสดงว่าสีของตัวอย่างมีการเปลี่ยนแปลงไปจากเดิมมาก อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงสีทั้งหมด (ΔE^*_{ab}) ในทุกตัวอย่างยังคงอยู่ในช่วงที่รับได้ เพราะค่าการเปลี่ยนแปลงสีทั้งหมดของปลาป่นที่สามารถรับได้ ไม่ควรมากกว่า 4-5 (Bragadottir et al., 2004) ในขณะที่ตัวอย่างที่เก็บไว้ในอุณหภูมิ 4°ซ ทั้งที่เติมและไม่เติมสารกันหืนมีการเปลี่ยนแปลงไปจากเดิมน้อยมาก คือมีค่าอยู่ระหว่าง 0.22-0.99 และค่า ΔE^*_{ab} ที่น้อยกว่า 0.4 เป็นค่าที่มนุษย์ไม่สามารถแยกแยะความแตกต่างได้ (Parkers, 1994) อย่างไรก็ตามสำหรับตัวอย่างที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°ซ เป็นเวลา 4.5 เดือน มีค่า ΔE^*_{ab} ของตัวอย่างที่เติมสารกันหืน (0.47±0.00) น้อยกว่าตัวอย่างที่ไม่เติมสารกันหืน (0.99±0.20) อย่างชัดเจน ทั้งนี้อาจเป็นผลจากการสะสมสารประกอบอัลดีไฮด์ที่อุณหภูมิต่ำในตัวอย่างที่ไม่เติมสารกันหืน ส่งผลให้ปฏิกิริยาเมลลาร์ดเกิดมากขึ้น

1.3 ปริมาณสารกันหืนอีทอกซิควิน

อีทอกซิควินเป็นสารกันหืนที่นิยมใช้ใส่ในปลาป่นมากที่สุด เนื่องจากมีประสิทธิภาพและราคาถูก แต่ในสหรัฐอเมริกาห้ามใช้เป็นสารกันหืนในอาหารคน และให้ตกค้างในเนื้อสัตว์และเนื้อปลาที่ได้รับอาหารที่เติมสารกันหืนได้ไม่เกิน 0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และสามารถเติมในอาหารสัตว์ได้ไม่เกิน 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (Barlow, 1994) จากผลการทดลองพบว่าปริมาณอีทอกซิควินในปลาป่นที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องและอุณหภูมิ 4°ซ เป็นระยะเวลาต่างๆ กัน มีปริมาณลดลงตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา โดยตัวอย่างที่เก็บที่อุณหภูมิห้องมีอัตราการลดลงมากกว่าในตัวอย่างที่เก็บที่อุณหภูมิ 4°ซ และตัวอย่างที่มีปริมาณอีทอกซิควินลดลงต่ำสุดคือตัวอย่างที่เก็บที่อุณหภูมิห้องนาน 4.5 เดือน เนื่องจากสารกันหืนจะทำหน้าที่ขัดขวางปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น โดยให้ไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระ (peroxy radical) ก่อนที่อนุมูลอิสระจะจับกับกรดไขมันไม่อิ่มตัวตัวต่อไป ซึ่งจะส่งผลให้เกิดสารไฮโดรเปอร์ออกไซด์และได้สารที่ทำให้เกิดกลิ่นหืน (Allen and Hamilton, 1994) ดังนั้นตัวอย่างที่เก็บที่อุณหภูมิห้องซึ่งมีอัตราการเกิดออกซิเดชันสูงจึงมีการสลายตัวของสารกันหืนมากขึ้นตามไปด้วย สอดคล้องกับการทดลองของอังคณา หาญบรรจง และคณะ (2544) พบว่าสารกันหืนอีทอกซิควินในปลาป่นที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 23.55-33.59°ซ มีปริมาณลดลง 16.81%, 28.12% และ 42.82% เมื่อเก็บรักษาไว้นาน 1 เดือน, 2 เดือน และ 3 เดือน ตามลำดับ

1.4 การตรวจสอบทางด้านเทคนิคทางด้านกล้องจุลทรรศน์

จากผลการตรวจสอบทางด้านเทคนิคทางด้านกล้องจุลทรรศน์ พบว่าปลาป่นที่นำมาใช้ในการทดลองครั้งนี้ไม่มีการปลอมปนของขนไก่ไฮโดรไลซ์ ไม่มีการปลอมปนของสารประกอบไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีน และจากการตรวจสอบการเสื่อมสลาย (decomposition) ในปลาป่นที่เก็บรักษาในสภาพและระยะเวลาต่างๆ กัน ไม่พบการเสื่อมสลายของปลาป่นในทุกตัวอย่าง หรืออาจเกิดการเสื่อมสลาย แต่มีเพียงปริมาณน้อยมาก จึงไม่สามารถเห็นผลได้ชัดเจนจากวิธีการตรวจสอบทางเคมีอย่างง่าย อีกทั้งวิธีนี้เป็นการตรวจสอบปริมาณสารประกอบซัลไฟด์ที่เกิดขึ้นเนื่องจากการย่อยสลายโปรตีนและกรดอะมิโนในกล้ามเนื้อปลาป่น โดยเฉพาะกรดอะมิโนที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบ ได้แก่ ซีสตีนและเมทไธโอนีนเท่านั้น ซึ่งจะถูกย่อยสลายโดยจุลินทรีย์บางชนิด โดยเฉพาะแบคทีเรีย *Salmonella* sp. (เยาวมาลย์ ค้าเจริญ, 2546) แสดงว่าปลาป่นที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ ไม่มีการปนเปื้อนของแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าว

การทดลองที่ 2 ผลของปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันในปลาป่นต่อการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหาร และพยาธิสภาพเนื้อเยื่อตับในกุ้งกุลาดำ

ปลาป่นเป็นวัตถุดิบโปรตีนที่สำคัญในการผลิตอาหารกุ้ง โดยเฉพาะกุ้งกุลาดำเนื่องจากประกอบด้วยกรดอะมิโนที่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของกุ้งอย่างครบถ้วนและสมดุล อีกทั้งยังประกอบไปด้วยกรดไขมันที่จำเป็นที่สัตว์น้ำย่อยและนำไปใช้ได้ง่าย โดยเฉพาะอย่างยิ่งกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวสูง (PUFA) ทั้ง n-3 และ n-6 จึงเป็นเหตุให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันได้ง่ายหากมีการเก็บรักษาปลาป่นที่ไม่ถูกต้องเป็นระยะเวลานาน ซึ่งผลผลิตที่เกิดขึ้นจากการออกซิเดชันของไขมันในปลาป่นจะส่งผลให้ปลาป่นเสื่อมสภาพ (Pike *et al*., 1990) โดยอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยากับโปรตีน วิตามิน และไขมันในปลาป่นส่งผลให้เกิดกลิ่นเหม็นหืน เกิดสารพิษ และโปรตีนเสื่อมสภาพซึ่งมีผลต่อประสิทธิภาพการย่อยในสัตว์ด้วย โดยสารอัลดีไฮด์ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาออกซิเดชันจะทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนในโปรตีน โดยเฉพาะ ไลซีน เมทไธโอนีน ฮีสติดีน และซีสเตอีน เป็นต้น (Esterbauer *et al*., 1991; Takiguchi, 1992) นอกจากนี้ยังก่อให้เกิดการสลายตัวของวิตามินที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตของกุ้งเช่น วิตามินอีและวิตามินซี เป็นต้น (Hung and Slinger, 1980; Hung *et al.,* 1981) จากการทดลองครั้งนี้พบว่ากุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารสูตรที่ 5 ซึ่งใช้ปลาป่นที่ไม่เติมสารกันหืนเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4.5 เดือน มีความหืนมากที่สุด (TBARS = 62.31 mgMAD/kg sample) เป็นแหล่งโปรตีนหลัก มีน้ำหนักสุดท้ายเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะน้อยกว่ากุ้งที่ได้รับอาหารสูตรอื่นๆ ยกเว้นกุ้งที่ได้รับอาหารสูตรที่ 3 ซึ่งเป็นสูตรที่ใช้ปลาป่นที่เติมสารกันหืนเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องนาน 4.5 เดือน มีความหืนในระดับปานกลาง (TBARS = 22.52 mgMAD/kg sample) แสดงว่าในสภาพอากาศร้อนชื้นโดยเฉพาะในภาคใต้ของประเทศไทย ไม่ควรเก็บปลาป่นไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 4.5 เดือน และไม่ควรเติมสารกันหืน เนื่องจากการสังเกตพฤติกรรมการกินอาหารพบว่ากุ้งกุลาดำไม่ค่อยชอบกินอาหารที่เติมสารกันหืนอีทอกซิควิน อาจเป็นเพราะสารกันหืนอีทอกซิควินในปลาป่นส่งผลต่อกลิ่น และรสชาติของอาหาร ซึ่งในการผลิตอาหารทดลองไม่มีการเติมสารดึงดูด (attractant) ในอาหาร นอกจากนี้สารกันหืนอีทอกซิควินยังมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงผิดปกติของเซลล์เนื้อเยื่อตับ ซึ่งตรวจพบความผิดปกติมากที่สุดในกุ้งที่ได้รับอาหารสูตรที่ 3 ที่มีการเติมสารกันหืนอีทอกซิควิน เป็นเหตุให้กุ้งมีการเจริญเติบโตและน้ำหนักสุดท้ายต่ำที่สุด ($p<0.05$) สอดคล้องกับการศึกษาของ Bautista และคณะ (1992) ได้ทดลองเลี้ยงกุ้งกุลาดำด้วยอาหารที่มีการเติมสารกันหืน พบว่ากุ้งที่ได้รับอาหารที่เติมสาร propyl gallate (PG) และ ethoxyquin (ETHQ) มีเนื้อเยื่อตับผิดปกติ คือเซลล์ตับลีบฝ่อ R-cell มีปริมาณน้อย มีการแทรกตัวของเม็ดเลือดระหว่างท่อตับและพบการ

ห้อมล้อมของเม็ดเลือดรอบท่อตับปริมาณมาก แต่ไม่มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของกุ้ง กุ้งที่ได้รับอาหารสูตรที่ 1 (ชุดควบคุม:TBARS = 7.87 mgMAD/kg sample) สูตรที่ 2 ซึ่งใช้ปลาป่นที่ไม่เติมสารกันหืนเก็บที่อุณหภูมิ 4 °ซ มีความหืนน้อย (TBARS = 15.02 mgMAD/kg sample) และสูตรที่ 4 ซึ่งใช้ปลาป่นที่ไม่เติมสารกันหืนเก็บที่อุณหภูมิห้องนาน 3 เดือน มีความหืนมาก (TBARS = 25.67 mgMAD/kg sample) มีน้ำหนักสุดท้ายเฉลี่ย เปอร์เซ็นต์น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะไม่แตกต่างกันทางสถิติ แสดงว่าการเก็บรักษาปลาป่นที่อุณหภูมิห้องโดยไม่เติมสารกันหืนเป็นระยะเวลานาน 3 เดือน เมื่อนำไปผลิตอาหารและเลี้ยงกุ้งกุลาดำนาน 60 วัน ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโต ในขณะที่กุ้งที่ได้รับอาหารสูตรที่ 5 มีการเจริญเติบโตต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญ แต่ไม่พบความแตกต่างของอัตราการรอดตาย สอดคล้องกับการทดลองของ Monato-Aguillar และคณะ (1998) ใช้ปลาป่นที่มีระดับความหืนต่างกันเลี้ยงกุ้งขาว (*Penaeus vannamei*) พบว่ากุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่ใช้ปลาป่นที่มีความหืนมากที่สุด (TBARS = 10.32 mgMAD/kg sample) ให้ผลการเจริญเติบโตต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญกับกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่ใช้ปลาป่นมีความหืนในระดับปานกลาง (TBARS = 8.00 mgMAD/kg sample) และระดับต่ำกว่า (TBARS = 6.39 mgMAD/kg sample) ขณะที่ไม่พบความแตกต่างของอัตราการรอดตายของกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารทั้ง 4 สูตรการทดลอง จากการทดลองครั้งนี้ พบว่ากุ้งที่ได้รับอาหารสูตรที่ 2 มีผลการเจริญเติบโตดีกว่ากุ้งที่ได้รับอาหารสูตรที่ 1 และสูตรที่ 4 เล็กน้อย ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณไขมันรวมในอาหารสูตรที่ 2 (8.28%) สูงกว่าในอาหารสูตรที่ 1 (8.01%) และในอาหารสูตรที่ 4 (8.08%) ซึ่งกุ้งที่ได้รับพลังงานจากแหล่งไขมันเพียงพอจะใช้พลังงานจากแหล่งโปรตีนน้อยลง ส่งผลให้กุ้งสามารถนำโปรตีนไปใช้เพื่อการเจริญเติบโตได้มากกว่า ซึ่งเห็นได้จากค่าโปรตีนที่นำไปใช้ประโยชน์ของกุ้งในสูตรที่ 2 (37.49±3.23%) มีค่าสูงกว่ากุ้งที่ได้รับอาหารสูตรที่ 1 (35.02±3.07%) และสูตรที่ 4 (36.11±3.17%)

ในส่วนของกรดไขมันที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำ เนื่องจากกุ้งกุลาดำไม่สามารถสังเคราะห์กรดไขมันที่จำเป็นได้ด้วยตัวเอง (D'Abramo, 1997) ต้องได้รับจากอาหารเท่านั้น ซึ่งชนิดของกรดไขมันที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำได้แก่ Linoleic acid (LOA, 18:2n-6), Linolenic acid (LNA, 18:3n-3), Arachidonic acid (20:4n-6), Eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5n-3) และ Docosahexaenoic acid (DHA, 22:6n-3) (Merican and Shim, 1996; D'Abramo, 1997; Glencross and Smith, 1999, 2001) จากผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของไขมันในอาหารทดลองในครั้งนี้ พบว่าสัดส่วนระหว่างกรดไขมันชนิด n-3:n-6 ในอาหารทุกสูตรมีค่าใกล้เคียงกันคืออยู่ระหว่าง 0.8-0.85 จัดอยู่ในระดับต่ำกว่าระดับที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำซึ่งควรมีค่าอยู่ระหว่าง 1-2.5 (Glencross and Smith, 2002) นอกจากนั้น Glencross และ Smith (2002) รายงานว่ากรดไขมันชนิด n-3 ควรมีอยู่ในอาหารประมาณ 35% ของกรดไขมันทั้ง

หมด หากเกินไปกว่านี้จะส่งผลให้การเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำลดลง ขณะที่ปริมาณ n-6 ควรอยู่ในสัดส่วนที่เหมาะสมกับปริมาณ n-3 ซึ่งหากมีมากไปกว่านั้นจะส่งผลต่อการเจริญเติบโตลดลงเช่นกัน

สำหรับอัตราการแลกเนื้อ (feed conversion rate) ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน (protein efficiency ratio) และโปรตีนที่นำไปใช้ประโยชน์ (productive protein value) ในกุ้งที่ได้รับอาหารสูตรที่ 3 และสูตรที่ 5 ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ และสูตรที่ 3 ไม่มีความแตกต่างกับสูตรที่ 1 และสูตรที่ 4 โดยกุ้งที่ได้รับอาหารสูตรที่ 2 มีค่าอัตราการแลกเนื้อ ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน และโปรตีนที่นำไปใช้ประโยชน์สูงที่สุดคือ 1.95±0.20, 0.94±0.08 และ 37.49±3.23 ตามลำดับ เห็นได้ว่ากุ้งที่ได้รับอาหารสูตรที่ 3 ซึ่งเก็บรักษาโดยการเติมสารกันหืนที่อุณหภูมิห้องนาน 4.5 เดือน มีการเจริญเติบโตต่ำที่สุดแต่กลับมีอัตราการแลกเนื้อ ประสิทธิภาพการใช้โปรตีนและโปรตีนที่นำไปใช้ประโยชน์ไม่แตกต่างจากกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรที่ 1 และสูตรที่ 4 ซึ่งให้ผลการเจริญ เติบโตดีกว่า อีกทั้งกุ้งได้รับปริมาณอาหารในสัดส่วนน้อยกว่าสูตรอื่นๆ ประมาณ 50% (ตารางที่ 13) ซึ่งอาจเกิดจากสารอีทอกซิควินที่เติมลงในปลาป่นมีผลต่อกลิ่นและรสชาติของอาหาร ดังนั้นหากกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรที่ 3 สามารถกินอาหารได้มากกว่านี้อาจส่งผลให้กุ้งมีการเจริญเติบโตดีขึ้น

สำหรับผลของอัตราการรอดไม่มีความแตกต่างในทุกชุดการทดลอง แสดงว่าความหืนที่เกิดขึ้นในปลาป่นที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องโดยไม่เติมสารกันหืนนาน 4.5 เดือนมีความหืนในระดับสูงที่สุด (TBARS = 62.31 mgMAD/kg sample) ไม่มีผลรุนแรงจนเป็นเหตุให้กุ้งกุลาดำตาย แม้ว่าจะส่งผลต่ออัตราการเจริญเติบโตและความผิดปกติทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตับก็ตาม และการตายของกุ้งในทุกชุดการทดลองมีสาเหตุมาจากพฤติกรรมการกินกันเองในระหว่างการลอกคราบ และกระโดดออกมาตายนอกตู้หรือถูกดูดออกมาในระหว่างการดูดตะกอนถ่ายเปลี่ยนน้ำ ไม่พบกุ้งตายเนื่องจากการเป็นโรคหรือสุขภาพอ่อนแอ จากการรายงานของ Bautista และ Subosa (1997) พบว่ากุ้งกุลาดำมีการเจริญเติบโตได้ดีแม้ได้รับอาหารที่ค่าความหืนในระดับ TBARS 828 mgMAD/kg fat แต่อัตราการเจริญเติบโตลดลงเมื่อได้รับอาหารที่มีความหืนสูงกว่า (TBARS = 913 และ 1262 mgMAD/kg fat ตามลำดับ) แต่อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างของอัตราการรอดของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีค่า TBARS ตั้งแต่ 205-1262 mgMAD/kg fat

จากผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของกุ้งที่ได้รับอาหารทั้ง 5 สูตรเป็นระยะเวลานาน 60 วัน โดยมีน้ำหนักเริ่มต้น 0.25 กรัมต่อตัว พบว่าค่าโปรตีน และปริมาณไขมัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติในทุกชุดการทดลอง ในขณะที่ปริมาณเถ้าในกุ้งที่ได้รับอาหารสูตรที่ 5 มีค่าต่ำเล็กน้อย แต่ไม่แตกต่างกับกุ้งที่ได้รับอาหารสูตรที่ 2 และสูตรที่ 3 และกุ้งที่ได้รับอาหารสูตรที่ 1 สูตรที่ 2 สูตรที่ 3 และสูตรที่ 4 มีปริมาณเถ้าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ทั้งนี้ อาจเกิดระดับวิตามินดีใน

ปลาป่นของอาหารสูตรที่ 5 ลดน้อยลง เนื่องจากการออกซิเดชันของไขมัน ส่งผลให้การดูดซึมแคลเซียมไปใช้ประโยชน์ลดน้อยลงไปด้วย แต่อย่างไรก็ตามจากผลทางด้านการเจริญเติบโต อัตราการแลกเนื้อ ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน และโปรตีนที่นำไปใช้ประโยชน์ พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งนี้แสดงว่าอาจมีผลเนื่องมาจากคุณภาพขององค์ประกอบแต่ละตัว เช่นการวิเคราะห์หาสัดส่วนระหว่างกรดไขมันชนิดที่จำเป็นย่อยได้ง่ายและกุ้งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ เช่น n-3 และ n-6 (PUFA) พบว่าในอาหารสูตรที่มีสัดส่วนระหว่าง PUFA: Total fatty acid น้อยกว่าสูตรอื่นๆ อยู่เล็กน้อย ซึ่งอาจมีผลต่อการนำอาหารไปใช้ประโยชน์ด้วย ในขณะเดียวกันจากผลประสิทธิภาพการใช้โปรตีนและโปรตีนที่นำไปใช้ประโยชน์ ปรากฏว่ากุ้งที่ได้รับอาหารสูตรที่ 5 มีค่าต่ำกว่าสูตรอื่นๆ แม้ว่าจะไม่มีความแตกต่างทางสถิติก็ตามซึ่งอาจจะประเมินได้ว่าโปรตีนในปลาป่นที่มีความหืนมากที่สุดเกิดการเสื่อมคุณภาพไปเนื่องจากสารอัลดีไฮด์ที่เกิดจากการออกซิเดชันของไขมันในปลาป่นทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนบางตัวเกิดการจับตัวกันแน่น (cross-link) โปรตีนมีขนาดและน้ำหนักโมเลกุลเพิ่มขึ้น ส่งผลให้ความสามารถในการละลายได้ลดน้อยลง (Kussi *et al*., 1975; Esterbauer *et al*.,1991) เป็นเหตุให้กุ้งไม่สามารถย่อยได้และใช้ประโยชน์จากโปรตีนในปลาป่นได้น้อยลง ซึ่งสอดคล้องกับผลการเจริญเติบโตต่ำด้วย

สำหรับผลการตรวจสอบทางด้านพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตับของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารทั้ง 5 สูตร เป็นระยะเวลานาน 60 วัน โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบ light microscope พบว่าเนื้อเยื่อตับอ่อนของกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรที่ 3 (ปลาป่นความหืนปานกลางและเติมสารกันหืนอีทอกซิควิน) สูตรที่ 4 (ปลาป่นหืนมาก) และสูตรที่ 5 (ปลาป่นหืนมากที่สุด) มีลักษณะผิดปกติ โดยในกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรที่ 3 มีความผิดปกติมากที่สุดคือมีการแทรกตัวของเม็ดเลือดระหว่างท่อตับ 30% เซลล์ตับมีลักษณะลีบฝ่อ 10% และ สร้างโนดูล 10% ขณะที่กุ้งที่ได้รับอาหารสูตรที่ 4 และสูตรที่ 5 ซึ่งอาหารทั้ง 2 สูตรใช้ปลาป่นที่มีความหืนมากกว่าในอาหารสูตรที่ 3 กลับพบความผิดปกติของเนื้อเยื่อตับน้อยกว่า คือกุ้งที่ได้รับอาหารสูตรที่ 4 มีเม็ดเลือดแทรกตัวระหว่างท่อตับ 20% แต่ไม่มีการลีบฝ่อ ส่วนกุ้งที่ได้รับอาหารสูตรที่ 5 มีการแทรกตัวของเม็ดเลือด 20% มีลักษณะลีบฝ่อ 10% และมีการสร้างโนดูล 10% โดยลักษณะการลีบฝ่อของ R-cell และ B-cell ในกุ้งที่ได้รับอาหารสูตรที่ 3 มีลักษณะลีบฝ่อแบบไม่มีการสะสมอาหารแต่ไม่มีลักษณะของเซลที่ถูกทำลายหรือสลายตัว ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณการกินอาหารของกุ้ง ขณะที่การลีบฝ่อของ R-cell และ B-cell ในกุ้งที่ได้รับอาหารสูตรที่ 5 มีลักษณะการถูกทำลายและสลายตัวของเซล ซึ่งอาจเกิดจากสารพิษที่เกิดจากการออกซิเดชันของไขมันในปลาป่น เนื่องจาก R-cell เป็นเซลล์หลักที่ทำหน้าที่เก็บสะสมอาหาร (Johnson, 1980) ดังนั้นหากเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงผิดปกติก็จะส่งผลต่อการนำอาหารไปใช้และการเจริญเติบโตของกุ้งด้วย (Vote *et al*., 1985) ขณะที่ R-cell ในตับของกุ้งที่ได้รับอาหารสูตรที่ 4

ไม่ลีบฝ่อ จึงให้ผลการเจริญเติบโตปกติ ส่วนการแทรกตัวของเม็ดเลือดที่เกิดในกุ้งทั้งสูตรที่ 3 และสูตรที่ 5 เนื่องจากเซลล์ตับมีลักษณะผิดปกติโดยเฉพาะมีการลีบฝ่อ เซลล์อาจเกิดการหลุดลอกเป็นเหตุให้เม็ดเลือดเคลื่อนตัวเข้ามาห้อมล้อมสิ่งแปลกปลอมที่เกิดขึ้น ซึ่งหากมีปริมาณมากจะกลายเป็นโนดูล หรือการออกซิเดชันของไขมันในปลาป่นอาจก่อให้เกิดสารประกอบที่เป็นพิษ (Kinsella, 1987; Sanders, 1987) ทำให้เกิดบาดแผลและมีการสร้างโนดูลหุ้มบาดแผลในเนื้อเยื่อตับ (Lightner and Redman, 1985) ดังในกุ้งที่ได้รับอาหารสูตรที่ 5 ทั้งนี้ได้ตรวจสอบดูการติดเชื้อแบคทีเรียโดยการย้อมสีแล้ว ปรากฏว่าไม่มีการติดเชื้อแบคทีเรียในโนดูลที่เกิดขึ้นทั้งในกุ้งที่กินอาหารสูตรที่ 3 และสูตรที่ 5 ส่วนการแทรกตัวของเม็ดเลือดระหว่างท่อตับของกุ้งที่ได้รับอาหารสูตรที่ 4 อาจเกิดการระคายเคืองเนื่องจากสารพิษที่เกิดจากการออกซิเดชันได้ แต่มีเพียงปริมาณน้อย จึงส่งผลในระดับน้อยกว่า จึงไม่เห็นการลีบฝ่อหรือการสลายตัวของ R-cell และ B-cell และไม่มีการสร้างโนดูล แสดงว่าความหืนของปลาป่นในระดับ TBARS = 25.67 mgMAD/kg sample ไม่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตกุ้งกุลาดำ ส่วนกุ้งที่ได้รับอาหารสูตรที่ 3 ซึ่งมีความหืนในระดับปานกลางแต่มีการเติมอีทอกซิควินในปลาป่น พบว่าเนื้อเยื่อตับของกุ้งกุลาดำมีความผิดปกติมากที่สุด ซึ่งอาจเกิดจากอีทอกซิควินทำให้กลิ่นและรสชาติของอาหารเปลี่ยนไปส่งผลให้กุ้งกินอาหารได้น้อยลง และอาจมีผลให้เกิดการระคายเคืองจนเกิดเป็นบาดแผลในเนื้อเยื่อตับได้ ซึ่งให้ผลการทดลองเหมือนกับ Bautista และคณะ (1992) ที่พบว่ากุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีการเติมสารกันหืน propyl gallate และ ethoxyquin ให้ผลความผิดปกติของเนื้อเยื่อตับ คือเซลล์ลีบฝ่อ เกิดการแทรกตัวของเม็ดเลือดและสร้างโนดูล ในขณะที่กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารที่เติมสารกันหืน BHA และ BHT ไม่พบความผิดปกติดังกล่าว