บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

1. วัสดุ

1.1 ปลาทดลองในการทดลองที่ 1

1.1.1 ปลานิลแดงแปลงเพศ

ลูกปลานิลแดงแปลงเพศ น้ำหนักเฉลี่ย 5-10 กรัม จากฟาร์มปลาเอกชนจังหวัดพัทลุง นำมาเลี้ยงจนได้ขนาด 225.4 ± 10.5 กรัม

1.2 ปลาทดลองในการทดลองที่ 2

1.1.2 ปลานิลแดงแปลงเพศ

ลูกปลานิลแดงแปลงเพศ น้ำหนักเฉลี่ย 2-5 กรัม จากฟาร์มปลาเอกชน จังหวัดพัทลุง นำมาเลี้ยงจนได้ขนาดประมาณ 14.72±0.08 กรัม

1.3 สารเคมี

1.3.1 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของร่างกายปลาทดลอง และวิเคราะห์องค์ประกอบทางโภชนาการอาหารทดลอง (ภาคผนวก ก.)

1.3.2 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ฟอสฟอรัสของร่างกายปลา กระดูกปลา มูลปลา และอาหารทดลอง (ภาคผนวก ก.1)

1.3.3 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์องค์ประกอบเลือดของปลาทดลอง (ภาคผนวก ก.)

1.3.4 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์โครมิคออกไซด์ในมูลปลา และ อาหารทดลอง (ภาคผนวก ก.)

1.3.5 สารเคมีสำหรับทำให้ปลาสลบ คือ ควินาลดีน (quinaldine, 2 - Methylquinoline)

1.4 อาหารสำหรับอนุบาลลูกปลาก่อนเริ่มต้นทดลอง

อาหารสำหรับอนุบาลลูกปลานิลแดงแปลงเพศก่อนเริ่มการทดลอง ใช้อาหารเม็ดสำเร็จรูปยี่ห้อไฮ-เกรด ของบริษัทเอส ดับบลิว ที เบอร์ 9961 ซึ่งมีคุณค่าทางโภชนาการ คือ ความชื้น 12 เปอร์เซ็นต์ โปรตีน 40 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 6 เปอร์เซ็นต์ และเยื่อใย 5 เปอร์เซ็นต์

2. อุปกรณ์

2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเลี้ยงปลา

2.1.1 ถังไฟเบอร์กลาสกลม ขนาดความจุ 2 ลูกบาศก์เมตร

2.1.2 ตู้กระจกขนาด 100 x 50 x 47 เซนติเมตร ความจุน้ำ 235 ลิตร ปิดด้านข้างและด้านหลังตู้ด้วยแผ่นพลาสติกสีเขียวทึบทั้ง 3 ด้าน เพื่อป้องกันการถูกรบกวนจากภายนอก

2.1.3 อุปกรณ์ระบบให้อากาศ ประกอบด้วยเครื่องให้อากาศ สายยาง หัวทราย

2.1.4 อุปกรณ์เปลี่ยนถ่ายน้ำได้แก่ สายยาง เครื่องปั๊มน้ำชนิดจุ่ม

2.1.5 อุปกรณ์ขนย้ายปลา ได้แก่ สวิงช้อนปลา ขันพลาสติก ถังพลาสติก

2.2 อุปกรณ์เตรียมอาหาร

2.2.1 เครื่องมือเตรียมอาหาร ของ Hobart Model A 200 T ประกอบด้วยชุดเครื่องผสมอาหารแบบมีใบพัด ชุดเครื่องอัดเม็ดอาหาร และขวดสำหรับฉีดพ่นเอนไซม์

2.2.2 อุปกรณ์ชั่งตวงวัสดุอาหาร ได้แก่ เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง ของ Sartorius รุ่น Basic เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง ของ Sartorius รุ่น Research กระบอกตวง บีกเกอร์ ถาดเตรียมอาหาร

2.2.3 ตู้เย็น ใช้เพื่อเก็บอาหารทดลองระหว่างรอนำไปใช้

2.3 อุปกรณ์วิเคราะห์คุณภาพน้ำ

2.3.1 อุปกรณ์วัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH) คือ เครื่อง pH meter ของ Mettler Delta รุ่น 340

2.3.2 อุปกรณ์และเครื่องแก้วสำหรับวิเคราะห์ค่าความเป็นด่าง (alkalinity) ได้แก่ ขวดรูปชมพู่ บีกเกอร์ กระบอกตวง ปิเปต ลูกยาง ขวดเก็บตัวอย่างน้ำ บิวเรทและชุดจับบิวเรท

2.4 อุปกรณ์วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของอาหารทดลองและตัวปลา

2.4.1 อุปกรณ์วิเคราะห์ความชื้น ได้แก่ ขวดชั่ง (weighing bottle) ตู้อบ (hot air oven) ของ Memmert โถดูดความชื้น (desiccator) เครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง

2.4.2 อุปกรณ์วิเคราะห์โปรตีน ได้แก่ เครื่องย่อย (digestion apparatus) ของ Gerhardt รุ่น Kjeldatherm เครื่องกลั่น (distillation apparatus) ของ Gerhardt รุ่น Vapodest I หลอดย่อยโปรตีน (digestion tube) กระบอกตวง บีกเกอร์ บิวเรต และขวดรูปชมพู่

2.4.3 อุปกรณ์วิเคราะห์เถ้า ได้แก่ ถ้วยกระเบื้องเคลือบ (crucible) เตาเผา (muffle furnace) ของ Gallenkamp โถดูดความชื้น เครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง

2.4.4 อุปกรณ์วิเคราะห์ไขมัน ได้แก่ ชุดเครื่องมือวิเคราะห์ไขมัน รุ่น Soxtec System HT6 ไส้กรองสาร ถ้วยสกัดสาร ตู้อบ โถดูดความชื้น เครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง

2.4.5 อุปกรณ์วิเคราะห์เยื่อใย ได้แก่ ชุดเครื่องมือวิเคราะห์เยื่อใย รุ่น Fibertec System ถ้วยแก้ว (glass crucible) เบอร์ 1 ตู้อบ เตาเผา โถดูดความชื้น เครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง

2.4.6 อุปกรณ์วิเคราะห์ฟอสฟอรัส ได้แก่ ตู้อบ โถอบแห้ง เครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง แผ่นให้ความร้อน (0-300 องศาเซลเซียส) เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง ขวดรูปชมพู่ ขวดปรับปริมาตร ขนาด 25 มิลลิลิตร ขวดพลาสติก และหลอดแก้ว

2.5 อุปกรณ์วิเคราะห์องค์ประกอบเลือด

2.5.1 อุปกรณ์เจาะเลือดปลา ได้แก่ เข็มขนาด 25G และหลอดฉีดยา ขนาด 1 มิลลิลิตร

2.5.2 อุปกรณ์แยกพลาสมา ได้แก่ ไมโครปิเปต เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ของ Beckman รุ่น Avanti™

2.5.3 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ของบริษัท Shimada รุ่น UV 1201 V

2.6 อุปกรณ์วิเคราะห์โครมิคออกไซด์ในอาหารทดลองและมูลปลาทดลอง

2.6.1 อุปกรณ์เก็บมูลปลา ประกอบด้วย สายยางเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 เซนติเมตร และถุงกรองแพลงก์ตอน ขนาดช่องตา 50 ไมครอน

2.6.2 อุปกรณ์วิเคราะห์โครมิคออกไซด์ ได้แก่ ตู้อบ โถอบแห้ง โกร่งบดตัวอย่าง เครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง แผ่นให้ความร้อน (0-300 องศาเซลเซียส) ขวดรูปชมพู่ ขวดปรับปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 25 มิลลิลิตร และขวดพลาสติก

2.6.3 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV-vis spectrophotometer) ของบริษัท Shimazu รุ่น UV mini 1240

2.7 อุปกรณ์สำหรับตรวจสอบการเจริญเติบโตของปลา

ประกอบด้วย เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Sartorius รุ่น B 3100 S ถังน้ำบรรจุ 20 ลิตร ถังพลาสติกขนาด 3 ลิตร ขันพลาสติก และสวิงช้อนปลา

3. วิธีการทดลอง

การทดลองแบ่งออกเป็น 2 การทดลอง

3.1 การทดลองที่ 1: ผลของเอนไซม์ไฟเตสต่อประสิทธิภาพการย่อยวัตถุดิบจากพืช 5 ชนิดในปลานิลแดงแปลงเพศ

การทดลองที่ 1 เป็นการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยวัตถุดิบพืช 5 ชนิด ระหว่างชุดการทดลองที่ไม่เสริมเอนไซม์ไฟเตส และที่เสริมเอนไซม์ไฟเตสที่ระดับ 750 FYT / อาหาร 1 กิโลกรัม โดยศึกษาค่าสัมประสิทธิ์การย่อยวัสดุแห้ง โปรตีน ฟอสฟอรัส และพลังงานของวัตถุดิบพืชแต่ละชนิด โดยวางแผนการทดลองแบบแฟคตอเรียล (Factorial design) มีปัจจัย 2 x 5 ปัจจัย คือ วัตถุดิบจากพืช 5 ชนิด และการเสริมเอนไซม์ไฟเตส ที่ระดับ 0 และ 750 FYT /อาหาร 1 กิโลกรัม มีชุดการทดลองทั้งหมด 12 ชุดการทดลองโดยเพิ่มชุดการทดลองที่เป็นอาหารสูตรอ้างอิง 2 ชุดการทดลอง และแต่ละชุดการทดลองมี 3 ซ้ำ

3.1.1 การเตรียมอุปกรณ์การทดลอง

ใช้ตู้กระจกขนาด 100 x 50 x 47 เซนติเมตรความจุน้ำ 235 ลิตร (ต่อหน่วยทดลอง) ทำความสะอาด และติดตั้งอุปกรณ์ให้อากาศให้พร้อมสมบูรณ์แล้วเติมน้ำประปาที่ปราศจากคลอรีน ให้ได้ปริมาตร 180 ลิตร ปิดตู้ด้วยผ้าพลาสติกสีเขียวทึบ 3 ด้านเพื่อป้องกันการถูกรบกวนขณะทำการทดลอง ในระหว่างการทดลองจะมีการทำความสะอาดตู้ และทำการเปลี่ยนถ่ายน้ำทุกวัน ในช่วงเวลา 13.00 น.-15.30 น. โดยใช้น้ำประปาที่พักทิ้งไว้จนปราศจากคลอรีน เป็นเวลา 1-2 วัน และทำการตรวจวัด และปรับปริมาณความเป็นด่างโดยการเติมโซเดียมไบ-คาร์บอเนต (Na_2CO_3) ให้ได้ประมาณ 80 มิลลิกรัม/ลิตร

3.1.2 การเตรียมปลาทดลอง

นำลูกปลานิลที่มีสุขภาพแข็งแรงน้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้น 5-10 กรัม จำนวน 3,000 ตัว มาอนุบาลในบ่อปูนขนาดความจุน้ำ 16 ลูกบาศก์เมตร อนุบาลต่อไปโดยให้อาหารเม็ดสำเร็จ

รูปยี่ห้อไฮ-เกรด เบอร์ 9961 วันละ 2 ครั้ง คือ 9.00 น. และ 16.00 น. จนกระทั่งปลามีน้ำหนักเฉลี่ยประมาณ 225 กรัม จากนั้นจึงนำปลามาตรวจโรค เมื่อไม่พบเชื้อจึงทำการคัดปลาใส่ตู้ทดลองจำนวน 20 ตัวต่อตู้ ปรับปริมาตรน้ำในตู้ทดลองเป็น 200 ลิตร ปรับสภาพปลาให้คุ้นเคยกับสภาพแวดล้อมของตู้และฝึกให้กินอาหารทดลอง (สูตรอ้างอิง) เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นจึงเริ่มให้กินอาหารทดลองแต่ละสูตร และทำการสุ่มชั่งหาน้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้นของปลาจำนวน 30 ตัว โดยสลบปลาด้วยควินาลดีน มาชั่งด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Sartorius รุ่น B 3100 S

3.1.3 การเตรียมอาหารทดลอง

อาหารทดลองมี 6 สูตร คือ อาหารสูตรอ้างอิง (สูตรที่ 1) และอาหารสูตรผสมวัตถุดิบทดสอบ (สูตรที่ 2-6) โดยอาหารผสมวัตถุดิบพืชที่ใช้ทดสอบมีส่วนผสมของอาหารสูตรอ้างอิง 70 เปอร์เซ็นต์ และวัตถุดิบพืชที่ทดสอบ 30 เปอร์เซ็นต์ อาหารสูตรอ้างอิงใช้ส่วนประกอบที่อ้างอิงมาจาก วุฒิพร พรหมขุนทองและอัจฉริยา มูลสโกภาส (2548) วัตถุดิบ 5 ชนิดที่ทดสอบคือ กากถั่วเหลืองสกัดน้ำมัน กากเนื้อเมล็ดในปาล์มน้ำมัน รำละเอียด ข้าวโพด และมันสำปะหลัง ดำเนินการโดยเตรียมอาหารแต่ละสูตร 10 กิโลกรัม จากนั้นจึง แบ่งอาหารแต่ละสูตรเป็นสองส่วน คือ ส่วนที่ 1 ไม่เสริมเอนไซม์ไฟเตส และส่วนที่ 2 เสริมเอนไซม์ไฟเตส ความเข้มข้น 750 FYT/อาหาร 1 กิโลกรัม (Liebert and Portz, 2005) โดยที่อาหารกลุ่มที่ไม่เสริมเอนไซม์จะทำการสเปรย์ด้วยน้ำกลั่นแทนเพื่อให้มีลักษณะใกล้เคียงกัน อาหารทดลองที่ใช้เป็นอาหารเม็ดแบบจมมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร รายละเอียดของอาหารทดลองดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10 รายละเอียดของอาหารทดลองสูตรต่างๆ ในการทดลองที่ 1

สูตรที่	ชนิดของอาหาร	เอนไซม์ไฟเตส 750 FYT/ อาหาร 1 กิโลกรัม
1	อาหารสูตรอ้างอิง	ไม่เสริม
2	อาหารสูตรอ้างอิง	เสริม
3	อาหารสูตรอ้างอิง 70 เปอร์เซ็นต์ กากถั่วเหลือง 30 เปอร์เซ็นต์	ไม่เสริม
4	อาหารสูตรอ้างอิง 70 เปอร์เซ็นต์ กากถั่วเหลือง 30 เปอร์เซ็นต์	เสริม
5	อาหารสูตรอ้างอิง 70 เปอร์เซ็นต์ กากเนื้อเมล็ดในปาล์มน้ำมัน 30 เปอร์เซ็นต์	ไม่เสริม
6	อาหารสูตรอ้างอิง 70 เปอร์เซ็นต์ กากเนื้อเมล็ดในปาล์มน้ำมัน 30 เปอร์เซ็นต์	เสริม
7	อาหารสูตรอ้างอิง 70 เปอร์เซ็นต์ รำละเอียด 30 เปอร์เซ็นต์	ไม่เสริม
8	อาหารสูตรอ้างอิง 70 เปอร์เซ็นต์ รำละเอียด 30 เปอร์เซ็นต์	เสริม
9	อาหารสูตรอ้างอิง 70 เปอร์เซ็นต์ ข้าวโพด 30 เปอร์เซ็นต์	ไม่เสริม
10	อาหารสูตรอ้างอิง 70 เปอร์เซ็นต์ ข้าวโพด 30 เปอร์เซ็นต์	เสริม
11	อาหารสูตรอ้างอิง 70 เปอร์เซ็นต์ มันสำปะหลัง 30 เปอร์เซ็นต์	ไม่เสริม
12	อาหารสูตรอ้างอิง 70 เปอร์เซ็นต์ มันสำปะหลัง 30 เปอร์เซ็นต์	เสริม

3.1.4. ขั้นตอนในการเตรียมอาหารทดลองมีดังต่อไปนี้

3.1.4.1นำวัตถุดิบที่ใช้ไปวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการตามวิธีการของ AOAC (1990) ส่งตัวอย่างวัตถุดิบวิเคราะห์ปริมาณไฟเตท (โดยส่งวิเคราะห์ที่ BIOPRACT GmbH) (ตารางที่ 12) แล้วนำมาคำนวณปริมาณไฟเตทฟอสฟอรัสดังแสดงในตารางที่ 14 และสร้างสูตรอาหารโดยคำนวณให้สูตรอาหารอ้างอิงมีระดับโปรตีน ไขมันและระดับพลังงานตามความต้องการของปลานิลแดง คือโปรตีนประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ ไขมันประมาณ 7 เปอร์เซ็นต์ และพลังงานประมาณ 18 เมกะจูล/อาหาร 1 กิโลกรัม โดยมีส่วนประกอบของวัตถุดิบ รวมถึงปริมาณของฟอสฟอรัสของวัตถุดิบดังตารางที่ 12 ส่วนสูตรอาหารอื่นๆ เตรียมโดยการลดส่วนของสูตรอ้างอิงลง 30 เปอร์เซ็นต์ แล้วแทนที่โดยวัตถุดิบจากพืชที่ต้องการศึกษาดังที่กล่าวมาแล้ว โดยปริมาณคุณค่าทางโภชนาการของอาหารทดลองแสดงไว้ในตารางที่ 13

3.1.4.2 ชั่งวัตถุดิบอาหารที่ผ่านการร่อนด้วยตะแกรง ขนาด 30 เมช (mesh) แยกใส่ถุงไว้สำหรับเตรียมอาหารทดลองแต่ละสูตร

3.1.4.3 นำส่วนผสมทั้งหมด ยกเว้นน้ำมัน มาผสมรวมกันและคลุกเคล้าให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมอาหารประมาณ 6 นาที จึงเติมน้ำมันลงไป เมื่อส่วนผสมเข้ากันดีนาน 15 นาทีเติมน้ำสะอาดประมาณ 35 เปอร์เซ็นต์ ผสมต่อไปอีก 10 นาที

3.1.4.4 นำวัตถุดิบอาหารที่ผสมกันดีแล้วเข้าเครื่องอัดเม็ดอาหาร ผ่านหน้าแว่นขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร โดยตัดเม็ดอาหารให้มีความยาวใกล้เคียงกันประมาณ1-2 เซนติเมตร

3.1.4.5 นำอาหารที่อัดเม็ดเรียบร้อยแล้วมาอบที่อุณหภูมิ 60-80 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

3.1.4.6 แบ่งอาหารแต่ละสูตรเป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งที่ต้องเสริมเอนไซม์ไฟเตส นำมาฉีดพ่นเอนไซม์ ที่ระดับความเข้มข้น 750 FYT /อาหาร 1 กิโลกรัม โดยชั่งเอนไซม์ไฟเตส 0.15 กรัม(ใช้เอนไซม์ไฟเตสชนิดเหลว ความเข้มข้น 5,000 FYT/กรัม) ผสมกับน้ำที่ปราศจากไอออน (deionized water) 40 มิลลิลิตร/อาหาร 1กิโลกรัม ฉีดพ่นเอนไซม์ไฟเตสบนเม็ดอาหาร สำหรับสูตรที่ไม่มีการเสริมด้วยเอนไซม์ไฟเตสจะทำการฉีดพ่นเม็ดอาหารด้วยน้ำที่ปราศจากไอออนปริมาณ 40 มิลลิลิตรต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เช่นกัน เพื่อให้ทุกสูตรมีความชื้นใกล้เคียงกัน ผึ่งอาหารในที่ร่มให้แห้งแล้วบรรจุในถุงพลาสติก เก็บรักษาไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (วุฒิพร และ อัจฉริยา, 2548) เอนไซม์ไฟเตสที่ใช้เป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัทดีเอสเอ็ม (DSM) โดยเป็นผลผลิตจากเชื้อรา *Aspergillus oryzae* มีชื่อทางการค้า RONOZYME® P (L) มีไฟเตสแอคติวิตี 5,000 FYT/กรัม

3.1.4.7 นำอาหารทดลอง ที่ทำเสร็จแล้วไปวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการ (ความชื้น โปรตีน ไขมัน เยื่อใย เถ้า และฟอสฟอรัส) ตามวิธีมาตรฐานของ AOAC (1990) ดังแสดงไว้ในตารางที่ 11 และนำค่าวิเคราะห์ปริมาณไฟเตทในวัตถุดิบที่ใช้ในอาหารมาคำนวณปริมาณฟอสฟอรัสที่ใช้ประโยชน์ได้ของสูตรอาหาร ดังตารางที่ 14 โดยผลการส่งวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์ในอาหารแสดงในตารางที่ 15

ตารางที่ 11 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางโภชนาการของวัตถุดิบอาหารทดลองที่ 1 (% as fed basis)[1]

วัตถุดิบ	ความชื้น	โปรตีน	ไขมัน	เถ้า	เยื่อใย	ฟอสฟอรัส	ไฟเตทฟอสฟอรัส	พลังงาน (MJ/kg feed)
กากถั่วเหลือง	9.83±0.04	44.95±1.11	2.33±0.09	7.10±0.10	6.54±0.20	0.77±0.06	0.403±0.05	18.39±0.20
การเนื้อเมล็ดในปาล์มน้ำมัน	8.39±0.12	15.87±0.64	8.21±0.05	4.16±0.17	13.06±0.13	0.55±0.04	0.417±0.01	20.35±0.11
รำละเอียด	8.90±0.02	13.46±0.12	14.60±0.41	10.09±0.03	7.32±0.33	2.04±0.07	1.292±0.02	21.90±0.45
ข้าวโพด	8.77±0.03	6.92±0.02	4.85±0.19	6.49±0.13	3.00±0.67	0.25±0.01	0.195±0.01	17.60±0.29
มันสำปะหลัง	9.26±0.17	2.72±0.11	0.93±0.18	4.75±0.05	2.92±0.06	0.07±0.03	0.017±0.01	16.39±0.10
ปลายข้าว	9.21±0.03	7.42±0.16	1.13±0.11	5.63±0.10	0.25±0.04	0.14±0.03	0.099±0.01	15.65±0.10
ไดแคลเซียมฟอสเฟต[2]	-	-	-	-	-	19.43±0.55	-	-

[1]ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากข้อมูล 3 ซ้ำ

สัญลักษณ์ (-) หมายถึงไม่ได้วิเคราะห์

ตารางที่ 12 องค์ประกอบของอาหารสูตรอ้างอิง (RD)

วัตถุดิบ	(%)	ฟอสฟอรัสรวม (%)
กากถั่วเหลือง	67	0.52
ปลายข้าว	10	0.01
รำละเอียด	14	0.29
น้ำมันปลา	1	0
เมทไทโอนีน	0.7	0
วิตามินผสม[1]	1	0
โคลีนคลอไรด์	0.6	0
แร่ธาตุผสม[2]	3	0.296
ไดแคลเซียมฟอสเฟต(DCP)	1.17	0.23
โครมิคออกไซด์(Cr_2O_3)	0.5051	0
แกลบ	1.625	0
รวม	100	1.346

[1] วิตามินผสมประกอบด้วย (ปริมาณต่อ 1 กิโลกรัมอาหาร): Thiamine (B_1) 10 mg; Riboflavin (B_2) 20 mg; Pyridoxine (B_6) 10 mg; Cobalamin (B_{12}) 2 mg; Retinal (A) 4,000 IU; Cholecalciferol (D_3) 2,000 IU; Menadione sodium bisulfite (K_3) 80 mg; Folic acid 5 mg; Calcium pantothenate 40 mg; Inositol 400 mg; Niacin 150 mg; Tocopherol (E) 50 IU); Ascorbic acid (C) 500 mg; Biotin 3 mg

[2] แร่ธาตุผสมประกอบด้วย (ปริมาณต่อ 1 กิโลกรัมอาหาร): NaCl 0.25 g; $MgSO_4$ 3.75 g; KH_2PO_4 8 g; $CaHPO_4$. 5 g; $FeSO_4$ 0.72 g; $ZnSO_4.7H_2O$ 0.088 g; $MnSO_{4.}.4H_2O$ 0.040 g; $CuSO_4.5H_2O$ 0.008 g; $CoCl_2.6H_2O$ 0.00025 g; $KIO_3.6H_2O$ 0.00075 g

ตารางที่ 13 คุณค่าทางโภชนาการของอาหารทดลอง (%as fed basis)[1]

อาหารทดลอง	ความชื้น	โปรตีน	ไขมัน	เถ้า	เยื่อใย	ฟอสฟอรัส	โครมิกออกไซด์	พลังงาน (MJ/kg feed)
สูตรที่ 1 อ้างอิง	8.96±0.04	32.29±0.17	5.28±0.82	9.70±0.17	5.75±0.26	1.31±0.01	0.51±0.02	18.87±0.10
สูตรที่ 2 กากถั่วเหลือง	7.18±0.06	38.89±0.02	3.88±0.74	8.82±0.08	5.66±0.42	1.13±0.02	0.53±0.02	19.91±0.13
สูตรที่ 3 กากเนื้อเมล็ดในปาล์มน้ำมัน	6.98±0.09	29.08±0.02	6.03±0.28	8.10±0.03	7.63±0.18	1.10±0.00	0.50±0.02	20.56±0.02
สูตรที่ 4 รำละเอียด	5.32±0.01	29.00±0.04	8.43±0.41	9.80±0.04	5.10±0.33	1.48±0.02	0.50±0.01	24.33±1.85
สูตรที่ 5 ข้าวโพด	7.11±0.17	27.49±1.68	4.95±0.31	8.57±0.10	4.46±0.21	1.00±0.03	0.54±0.01	20.94±2.12
สูตรที่ 6 มันสำปะหลัง	6.10±0.08	26.15±0.03	4.21±0.10	8.29±0.01	4.58±0.19	1.02±0.02	0.54±0.01	19.53±0.34

[1]ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากข้อมูล 3 ซ้ำ

ตารางที่ 14 ปริมาณของฟอสฟอรัสที่ใช้ประโยชน์ได้ (ฟอสฟอรัสที่ไม่ใช่ไฟเตทฟอสฟอรัส) (%)

อาหารทดลอง	ฟอสฟอรัสรวม	ไฟเตทฟอสฟอรัสรวม [1]	ฟอสฟอรัสที่ไม่ใช่ไฟเตทฟอสฟอรัส [2]
1. สูตรอ้างอิง (RD) 100 %	1.31	0.461	0.849
2. สูตรอ้างอิง 70%+ กากถั่วเหลือง 30%	1.13	0.444	0.686
3. สูตรอ้างอิง 70%+การเนื้อเมล็ดในปาล์มน้ำมัน 30%	1.10	0.448	0.652
4. สูตรอ้างอิง70%+รำละเอียด 30%	1.48	0.710	0.770
5. สูตรอ้างอิง 70%+ข้าวโพด 30%	1.00	0.381	0.619
6. สูตรอ้างอิง 70%+มันสำปะหลัง 30%	1.02	0.328	0.692

[1]ไฟเตทฟอสฟอรัสรวม = คำนวณจากปริมาณของไฟเตทฟอสฟอรัสในแต่ละวัตถุดิบ

[2]ฟอสฟอรัสที่ใช้ประโยชน์ได้ (ฟอสฟอรัสที่ไม่ใช่ไฟเตทฟอสฟอรัส) (%) =ฟอสฟอรัสรวม (%)-ไฟเตทฟอสฟอรัสรวม (%)

ตารางที่ 15 ปริมาณของเอนไซม์ไฟเตสในอาหารทดลอง [1]

อาหารทดลอง	การเสริมเอนไซม์ไฟเตส (FYT/kg diet)	ปริมาณเอนไซม์ไฟเตส [2] (mg phytase equiv./kg feed)
สูตรที่ 1 สูตรอ้างอิง	0	NA
สูตรที่ 1 สูตรอ้างอิง	750	981±77
สูตรที่ 2 กากถั่วเหลือง	0	NA
สูตรที่ 2 กากถั่วเหลือง	750	932±16
สูตรที่ 3 กากเนื้อเมล็ดในปาล์มน้ำมัน	0	NA
สูตรที่ 3กากเนื้อเมล็ดในปาล์มน้ำมัน	750	1,081±27
สูตรที่ 4 รำละเอียด	0	NA
สูตรที่ 4 รำละเอียด	750	1,030±95
สูตรที่ 5 ข้าวโพด	0	NA
สูตรที่ 5 ข้าวโพด	750	998±4
สูตรที่ 6 มันสำปะหลัง	0	NA
สูตรที่ 6 มันสำปะหลัง	750	1,030±95

[1]ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากข้อมูล 2 ซ้ำ

[2] NA = ไม่ได้ทำการวิเคราะห์

3.1.5 แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียล (factorial design) แบบ 5X2 โดยศึกษา 2 ปัจจัย คือ วัตถุดิบพืช 5 ชนิด และการเสริมเอนไซม์ไฟเตส ที่ระดับ 0 และ 750 FYT/อาหาร 1 กิโลกรัม ดังนั้นจึงมีชุดการทดลองทั้งหมด 10 ชุด แต่ในการหาค่าสัมประสิทธิ์การย่อยสารอาหารจะต้องใช้ค่าสัมประสิทธิ์การย่อยจากอาหารสูตรอ้างอิงในการคำนวณค่าสัมประสิทธิ์การย่อยสารอาหารของวัตถุดิบจึงมีชุดการทดลองเพิ่มอีก 2 ชุดการทดลองคือ สูตรอาหารอ้างอิงที่ไม่เสริมเอนไซม์ไฟเตส และเสริมเอนไซม์ไฟเตส รวมเป็น 12 ชุดการทดลอง การทดลองแต่ละชุดการทดลองมีจำนวน 3 ซ้ำ รวมเป็น 36 ตู้และใช้ปลาทดลองจำนวน 20 ตัวต่อตู้ ให้อาหารวันละ 2 ครั้ง คือ ช่วงเช้าเวลา 9.00 น. และช่วงเย็นเวลา 16.00 น. โดยให้ปลากินจนอิ่ม เริ่มทำความสะอาดตู้ทดลองโดยจะดูดตะกอน และทำความสะอาดตู้ปลาโดยวิธีกาลักน้ำ และเปลี่ยนถ่ายน้ำใหม่ ในเวลา13.00 น.

การศึกษาค่าสัมประสิทธิ์การย่อยอาหาร (apparent digestibility coefficient) จะเริ่มเก็บมูลปลาสำหรับการวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์การย่อยฟอสฟอรัส ในสัปดาห์ที่ 2 ของการทดลอง ภายหลังจากที่ให้อาหารที่มีส่วนผสมของโครมิคออกไซด์ (Cr_2O_3) 0.5 เปอร์เซ็นต์ (โครมิคออกไซด์มีความเข้มข้น 98 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นอาหาร 100 กรัม ต้องใช้โครมิคออกไซด์ 0.5051 กรัม) เป็นเวลา 1 สัปดาห์ จึงทำการเก็บมูลปลาที่มีโครมิคออกไซด์ โดยมีวิธีการจัดการดังนี้คือ หลังจากให้อาหารช่วงเช้า และช่วงเย็นเสร็จเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำความสะอาดตู้ด้วยวิธีกาลักน้ำ (siphoning) เพื่อดูดเศษอาหารและมูลปลาที่ตกค้าง จากนั้นทิ้งระยะเวลา 1-2 ชั่วโมง จึงเก็บมูลปลาโดยวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Boonyaratpalin และ Phromkunthong (2000) โดยการใช้ถุงกรองตาละเอียดรองรับน้ำจากปลายสายยางข้างหนึ่งโดยวิธีกาลักน้ำ รวบรวมมูลนำไปเก็บไว้ในช่องแช่แข็ง (freezer) และอบมูลปลาให้แห้งด้วยอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์โปรตีน ฟอสฟอรัส และพลังงาน ตามวิธีมาตรฐานของ AOAC (1990) วิเคราะห์ปริมาณโครมิกออกไซด์ในอาหารและมูลตามวิธีของ Furukawa และ Tsukahara (1966)

3.1.6 การเก็บรวบรวมข้อมูล

3.1.6.1 ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยอาหาร

การศึกษาประสิทธิภาพการย่อยอาหารโดยทำการเปรียบเทียบปริมาณโครมิกออกไซด์ และสารอาหารที่ต้องการศึกษาที่มีในอาหารกับที่มีอยู่ในมูลปลา (Forster, 1999) คำนวณได้จากสูตรที่อ้างอิงมาจากสมการ

ประสิทธิภาพในการย่อยวัสดุแห้ง (dry matter digestibility or total digestibility (%))

$$= 100 - 100 \times \left(\frac{\%\ \text{โครมิกออกไซด์ในอาหาร}}{\%\ \text{โครมิกออกไซด์ในมูล}} \right)$$

สัมประสิทธิ์ในการย่อยสารอาหาร (apparent digestibility coefficient , ADC)

$$\text{ADC ของอาหาร} = 1 - \left(\frac{\%\text{โครมิกออกไซด์ในอาหาร}}{\%\text{โครมิกออกไซด์ในมูล}} \right) \times \left(\frac{\%\text{สารอาหารในมูล}}{\%\text{สารอาหารในอาหาร}} \right)$$

สัมประสิทธิ์ในการย่อยสารอาหารของวัตถุดิบ (%)

$$\text{ADC ของวัตถุดิบ} = 100 \times \left(\frac{(\%N_{test} \times ADC_{test}) - (0.7 \times \%N_{ref} \times ADC_{ref})}{0.3 \times \%N_{ing}} \right)$$

ซึ่ง $\%N_{test} = 0.7 \times \%N_{ref} + 0.3 \times \%N_{ing}$

โดยที่ $\%N_{ref}$ = สารอาหารในอาหารอ้างอิง (เปอร์เซ็นต์)

$\%N_{ing}$ = สารอาหารในวัตถุดิบ (เปอร์เซ็นต์)

$\%N_{test}$ = สารอาหารในอาหารทดสอบ (เปอร์เซ็นต์)

ADC_{test} = สัมประสิทธิ์การย่อยของอาหารทดสอบ (เปอร์เซ็นต์)

ADC_{ref} = สัมประสิทธิ์การย่อยของอาหารอ้างอิง (เปอร์เซ็นต์)

0.3 = สัดส่วนของวัตถุดิบทดสอบที่ใช้ในสูตรอาหารทดลอง 30 เปอร์เซ็นต์

0.7= สัดส่วนของอาหารสูตรอ้างอิงที่ใช้ในสูตรอาหารทดลอง 70 เปอร์เซ็นต์

3.1.6.2 การศึกษาองค์ประกอบเลือด

เมื่อสิ้นสุดการทดลอง สุ่มปลาจากทุกชุดการทดลองๆ ละ 6 ตัว นำมาสลบด้วยควินาลดีน เจาะเลือดจากบริเวณโคนหาง เพื่อศึกษาองค์ประกอบของเลือด ได้แก่

- ฮีโมโกลบิน โดยวิธี Cyanmet-haemoglobin ของ Larsen และ Snieszko (1961)
- ฮีมาโตคริต โดยวิธีดัดแปลงจาก Blaxhall และ Daisley (1973)

3.1.7. การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และทำการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของแต่ละปัจจัยคือ ชนิดของวัตถุดิบพืช 5 ชนิด และผลการเสริมเอนไซม์ไฟเตสที่ระดับ 0 และ 750 FYT/อาหาร 1 กิโลกรัม นอกจากนั้นยังวิเคราะห์ปฏิสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยคือชนิดของวัตถุดิบพืชกับการเสริมเอนไซม์ไฟเตส ด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนจำแนกสองทาง (two way analysis of variances) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's multiple range test (Duncan, 1955) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS (11.0)

3.1.8 การตรวจสอบคุณภาพน้ำ

ตรวจสอบคุณภาพน้ำในบ่อพักน้ำ ด้วยการวิเคราะห์ว่ามีคลอรีนตกค้าง โดยการทดสอบการเกิดสีกับ โพแทสเซียมไอโอไดด์ (KI) และวิเคราะห์ความเป็นกรดด่างด้วย pH meter และความเป็นด่างตามวิธีการของ Boyd และ Tucker (1992) ทุกสัปดาห์ (ภาคผนวก ก) โดยวิเคราะห์ตัวอย่างละ 3 ซ้ำเพื่อปรับความเป็นด่างให้ได้ 80 มิลลิกรัม/ลิตร ด้วยการเติมโซเดียมไบ-คาร์บอเนต

3.2 การทดลองที่ 2: ผลของเอนไซม์ไฟเตสและอนินทรีย์ฟอสเฟตต่อการเจริญเติบโต และประสิทธิภาพการย่อยฟอสฟอรัสในปลานิลแดงแปลงเพศ

การทดลองที่ 2 เป็นการนำค่าสัมประสิทธิ์การย่อยฟอสฟอรัส ของวัตถุดิบจากพืชทั้ง 5 ชนิดจากการทดลองที่ 1 ไปคำนวณเพื่อสร้างสูตรอาหารเพื่อทำการเปรียบเทียบการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการย่อยอาหาร และประสิทธิภาพการย่อยฟอสฟอรัสของอาหารแต่ละสูตรที่ไม่เสริมอนินทรีย์ฟอสเฟต และเสริมอนินทรีย์ฟอสเฟต โดยใช้เอนไซม์ไฟเตสเป็นตัวทดแทนการใช้อนินทรีย์ฟอสเฟต โดยสูตรอาหารทุกสูตรจะมีคุณค่าทางโภชนาการ และใช้วัตถุดิบที่ใกล้เคียงกันกับ

อาหารปลานิลสำเร็จรูป และมีจำหน่ายเพื่อการค้า โดยสูตรที่ 1 มีปริมาณฟอสฟอรัสที่ใช้ประโยชน์ได้ต่ำกว่าความต้องการของปลานิล (0.35 เปอร์เซ็นต์) สูตรที่ 2 เสริม ไดแคลเซียมฟอสเฟตให้มีระดับฟอสฟอรัสให้ใกล้เคียงกับความต้องการของปลานิล (0.54เปอร์เซ็นต์) สูตรที่ 3 เสริมเอนไซม์ไฟเตส 750 FYT/ อาหาร 1 กิโลกรัม ลงในอาหารสูตรที่ 1 และสูตรที่ 4 เสริมเอนไซม์ไฟเตส 750 FYT/ อาหาร 1 กิโลกรัม ลงในอาหารสูตรที่ 2 และลดปริมาณ ไดแคลเซียมฟอสเฟตลง 66.6 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 17)

3.2.1 การเตรียมอุปกรณ์การทดลอง

ดำเนินการเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 (ข้อ 3.1.1)

3.2.2 การเตรียมปลาทดลอง

ใช้ลูกปลานิลแดงแปลงเพศ ที่มีน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวอยู่ในช่วง 2- 5 กรัม จำนวน 1,000 ตัว มาอนุบาลในถังไฟเบอร์กลมขนาดความจุน้ำ 2 ลูกบาศก์เมตร ด้วยอาหารเม็ดสำเร็จรูปยี่ห้อไฮ-เกรด เบอร์ 9961 เป็นเวลา 1 เดือน โดยดำเนินการเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 จนปลาได้ขนาดประมาณ 14 กรัม จึงใช้สำหรับทำการทดลอง

3.2.3 การเตรียมอาหารทดลอง

การเตรียมอาหารทดลองดำเนินการเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 โดยวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการรวมทั้งฟอสฟอรัสของวัสดุอาหารที่นำมาใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารทดลอง ดังแสดงไว้ในตารางที่ 16 จากนั้นสร้างสูตรอาหารทดลอง 4 สูตรให้มีปริมาณโปรตีนเท่ากันคือ 30 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 6 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์การย่อยฟอสฟอรัสของวัตถุดิบแต่ละชนิดที่ได้จากการทดลองที่ 1 มาประยุกต์ในการสร้างสูตรอาหารสำหรับการทดลองโดยการคำนวณปริมาณของฟอสฟอรัสที่ใช่ประโยชน์ได้จากวัตถุดิบแต่ละชนิด ดังนี้

สูตรที่ 1 เป็นชุดควบคุมไม่มีการเสริมอนินทรีย์ฟอสเฟต และไม่เอนไซม์ไฟเตส ซึ่งจะมีฟอสฟอรัสที่ใช่ประโยชน์ได้ 0.3 เปอร์เซ็นต์

สูตรที่ 2 เสริมอนินทรีย์ฟอสเฟต ให้มีปริมาณฟอสฟอรัสที่ใช้ประโยชน์ได้ประมาณ 0.5 เปอร์เซ็นต์

สูตรที่ 3 เป็นชุดควบคุมที่เสริมเอนไซม์ไฟเตส 750 FYT/อาหาร 1 กิโลกรัม และมีปริมาณฟอสฟอรัสที่ใช้ประโยชน์ได้ ประมาณ 0.5 เปอร์เซ็นต์

สูตรที่ 4 ใช้สูตรเดียวกับสูตรที่ 2 แต่ลดปริมาณอนินทรีย์ฟอสเฟตลง และเสริมเอนไซม์ไฟเตส 750 FYT/อาหาร 1 กิโลกรัม โดยปริมาณฟอสฟอรัสที่ใช้ประโยชน์ได้ ประมาณ 0.5 เปอร์เซ็นต์ โดยมีส่วนประกอบของวัตถุดิบดังตารางที่ 17 และมีปริมาณของฟอสฟอรัสทั้งหมด ไฟเตทฟอสฟอรัส ฟอสฟอรัสที่ไม่ใช่ไฟเตท และฟอสฟอรัสที่ใช้ประโยชน์ได้ดังตารางที่ 19

นำอาหารทดลองไปวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการ ได้แก่ โปรตีน ไขมัน เยื่อใย เถ้า ฟอสฟอรัส โดยวิธีการของ AOAC (1990) (ตารางที่ 16) ในสัปดาห์ที่ 8 ของการทดลอง จะเติมโครมิกออกไซด์ (Cr_2O_3) 0.5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักอาหารในอาหารทุกสูตรเพื่อใช้เป็นตัวบ่งชี้ในการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยอาหารโดยดำเนินการเช่นเดียวกับวิธีการในข้อ 3.1.5 ส่วนผลการส่งวิเคราะห์ปริมาณของเอนไซม์ไฟเตสที่มีอยู่อาหารแต่ละสูตรแสดงในตารางที่ 20

ตารางที่ 16 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางโภชนาการของวัตถุดิบอาหารทดลองที่ 2 (% as fed basis)[1]

วัตถุดิบ	ความชื้น	โปรตีน	ไขมัน	เถ้า	เยื่อใย	ฟอสฟอรัส	ไฟเตทฟอสฟอรัส[3]
ปลาป่น	9.40±0.04	70.30±0.10	7.51±0.01	10.77±0.34	0.16±0.13	1.91±0.09	-
กากถั่วเหลือง	9.80±0.00	45.50±0.51	1.65±0.01	6.93±0.02	6.54±0.20	0.67±0.04	0.403±0.05
รำละเอียด	9.40±0.15	13.09±0.03	14.66±0.01	17.53±0.11	6.46±0.16	1.60±0.09	1.292±0.02
มันสำปะหลัง	9.48±0.17	2.70±0.03	0.25±0.01	4.12±0.06	3.14±0.10	0.03±0.01	0.017±0.01

[1]ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากข้อมูล 3 ซ้ำ

[2] สัญลักษณ์ (-) หมายถึงไม่ได้วิเคราะห์

[3]เป็นค่าประมาณที่ได้จากการทดลองที่ 1

ตารางที่ 17 ส่วนประกอบของอาหารทดลองที่ 2 (%)

วัตถุดิบ	สูตรที่1	สูตรที่ 2	สูตรที่ 3	สูตรที่ 4
ปลาป่น	10	10	10	10
กากถั่วเหลือง	45	45	45	45
รำละเอียด	18	18	18	18
มันสำปะหลัง	20.90	19.40	20.88	20.39
น้ำมันปลา	1.5	1.5	1.5	1.5
วิตามินผสม[1]	1	1	1	1
โคลีนคลอไรด์	0.6	0.6	0.6	0.6
แร่ธาตุผสม[2]	3	3	3	3
RONO P 5000	0	0	0.015	0.015
ไดแคลเซียมฟอสเฟต	0	1.5	0	0.5
รวม	100	100	100	100

[1] วิตามินผสมประกอบด้วย (ปริมาณต่อ 1 กิโลกรัมอาหาร): Thiamine (B_1) 10 mg; Riboflavin (B_2) 20 mg; Pyridoxine (B_6) 10 mg; Cobalamin (B_{12}) 2 mg; Retinal (A) 4,000 IU; Cholecalciferol (D_3) 2,000 IU; Menadione sodium bisulfite (K_3) 80 mg; Folic acid 5 mg; Calcium pantothenate 40 mg; Inositol 400 mg; Niacin 150 mg; Tocopherol (E) 50 IU; Ascorbic acid (C) 500 mg; Biotin 3 mg

[2] แร่ธาตุผสมประกอบด้วย (ปริมาณต่อ 1 กิโลกรัมอาหาร): Na 0.098 ; Mg 0.758; K 2.298; Ca 1.473; Fe 0.145; Zn 0.02; Mn 0.13; Cu 2.07mg; Co 0.59 mg; I 0.45 mg

ตารางที่ 18 คุณค่าทางโภชนาการของอาหารทดลองที่ 2 (% as fed basis)[1]

อาหารทดลอง	เสริมไดแคลเซียมฟอสเฟต[2]	เสริมไฟเตส 750 FYT/ อาหาร 1 กก.	วัตถุแห้ง	โปรตีน	ไขมัน	เถ้า	เยื่อใย	ฟอสฟอรัส	โครมิกออกไซด์
สูตรที่ 1	-	-	94.66±0.20	30.59±0.57	5.69±0.03	10.78±0.18	5.10±0.70	0.79±0.03	0.50±0.002
สูตรที่ 2	+	-	93.66±0.26	31.72±0.09	5.60±0.01	12.01±0.13	4.78±0.29	1.11±0.05	0.50±0.007
สูตรที่ 3	-	+	91.85±0.04	30.39±0.40	5.70±0.11	10.56±0.09	4.70±0.15	0.82±0.06	0.50±0.003
สูตรที่ 4	+	+	91.73±0.10	30.53±0.15	5.74±0.03	11.00±0.04	4.98±0.58	0.88±0.05	0.51±0.010

[1]ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากข้อมูล 3 ซ้ำ

[2]สัญลักษณ์ (+) แทนการเสริมลงในอาหาร และ (-) แทนการไม่เสริมลงในอาหาร

ตารางที่ 19 ปริมาณของฟอสฟอรัสรวม ไฟเตทฟอสฟอรัส ฟอสฟอรัสที่ไม่ใช้ไฟเตทฟอสฟอรัส และฟอสฟอรัสที่ใช้ประโยชน์ได้ในอาหารของการทดลองที่ 2

อาหารทดลอง	ฟอสฟอรัสรวม (%)	ไฟเตทฟอสฟอรัสรวม (%)[1]	ฟอสฟอรัสที่ไม่ใช่ไฟเตทฟอสฟอรัส (%)[2]	ฟอสฟอรัสที่ใช้ประโยชน์ได้(%)[3]
สูตรที่ 1 สูตรพื้นฐาน	0.79	0.417	0.373	0.30
สูตรที่ 2 เสริมไดแคลเซียมฟอสเฟต	1.11	0.417	0.693	0.52
สูตรที่ 3 เสริมเอนไซม์ไฟเตส	0.82	0.417	0.403	0.46
สูตรที่ 4 เสริมเอนไซม์ไฟเตส+ไดแคลเซียมฟอสเฟต	0.88	0.417	0.463	0.53

[1] ไฟเตทฟอสฟอรัสรวม = คำนวณจากปริมาณของไฟเตทฟอสฟอรัสในแต่ละวัตถุดิบปริมาณฟอสฟอรัสที่ใช้ประโยชน์ได้มี ประมาณ 0.6 เปอร์เซ็นต์

[2] ฟอสฟอรัสที่สามารถใช้ประโยชน์ (%) =ฟอสฟอรัสรวม (%)-ไฟเตทฟอสฟอรัสรวม (%)

[3] ฟอสฟอรัสที่ใช้ประโยชน์ได้ (%) =คำนวณจากค่าสัมประสิทธิ์การย่อยฟอสฟอรัสของวัตถุดิบแต่ละชนิด โดยค่าสัมประสิทธิ์การย่อยฟอสฟอรัสของปลาป่น 27.15 เปอร์เซ็นต์ ไดแคลเซียมฟอสเฟต 74.23 เปอร์เซ็นต์ (Miranda *et al*., 2000) ส่วนค่าสัมประสิทธิ์การย่อยฟอสฟอรัสของวัตถุดิบพืชใช้เป็นค่าที่ได้จากการทดลองที่ 1

ตารางที่ 20 ปริมาณของเอนไซม์ไฟเตสในอาหารทดลองของการทดลองที่ 2[1]

อาหารทดลอง	ปริมาณเอนไซม์ไฟเตส (mg phytase equiv./kg feed)
สูตรที่ 1 สูตรพื้นฐาน	93 ± 0
สูตรที่ 2 เสริมไดแคลเซียมฟอสเฟต	72 ± 4
สูตรที่ 3 เสริมเอนไซม์ไฟเตส	914 ± 5
สูตรที่ 4 เสริมเอนไซม์ไฟเตส+ไดแคลเซียมฟอสเฟต	949 ± 2

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากข้อมูล 2 ซ้ำ

3.2.4 แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely randomized design, CRD) โดยการทดลองมี 4 ชุดการทดลอง แต่ละชุดการทดลองมีจำนวน 3 ซ้ำ ใช้ปลาทดลองน้ำหนักเริ่มต้นเฉลี่ยตัวละประมาณ 14 กรัม จำนวน 20 ตัวต่อตู้ ทำการทดลองในตู้กระจกที่มีบรรจุน้ำ 200 ลิตร ให้อาหารวันละ 2 ครั้ง คือ ช่วงเช้าเวลา 9.00 น. และช่วงเย็นเวลา 16.00 น. โดยให้ปลากินจนอิ่ม ใช้เวลาทดลอง 8 สัปดาห์เพื่อศึกษาการเจริญเติบโต ได้แก่ น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ประสิทธิภาพการใช้อาหารได้แก่ อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน การใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ โปรตีนที่นำไปใช้ประโยชน์ได้ การใช้ประโยชน์จากฟอสฟอรัสได้แก่ การเก็บสะสมของฟอสฟอรัสในตัว และฟอสฟอรัสที่ถูกขับทิ้ง ภายหลังจากสัปดาห์ที่ 8 ปลาจะได้รับอาหารที่มีโครมิคออกไซด์เป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์จากนั้นจึงเก็บมูลเพื่อศึกษาสัมประสิทธิ์การย่อยอาหารโดยใช้วิธีเดียวกันกับการทดลองที่ 1

3.2.5 การเก็บรวบรวมข้อมูล

3.2.5.1 การเจริญเติบโต

ตรวจสอบพฤติกรรมและลักษณะภายนอก ในระหว่างการทดลองสังเกตพฤติกรรมของปลาทุกชุดการทดลอง ได้แก่ การว่ายน้ำ การยอมรับอาหาร และสังเกตลักษณะภายนอกได้แก่ สีของลำตัว การตกเลือด และการเกิดบาดแผลที่ครีบ ผิวหนัง และอวัยวะภายนอกอื่นๆ ใช้ยาและสารเคมีเพื่อป้องกันโรค ตามสภาพของปลา

ตรวจสอบการเจริญเติบโตของปลา โดยชั่งน้ำหนักและนับจำนวนปลาที่เหลือทุก 2 สัปดาห์ เพื่อทราบน้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้นโดยชั่งน้ำหนักรวมของปลาแต่ละตู้ด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง (ก่อนชั่งน้ำหนักงดให้อาหารเป็นเวลา 1 วัน) จนสิ้นสุดการทดลอง

- คำนวณอัตราการรอด (survival rate) ตามสมการ

$$\text{อัตรารอดตาย (\%)} = \frac{\text{จำนวนปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง}}{\text{จำนวนปลาเมื่อเริ่มต้น}} \times 100$$

- น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น คำนวณตามวิธีการ จากสมการ

น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (% weight gain)

$$= \frac{[\text{น.น.ปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (กรัม)} - \text{น.น.ปลาเมื่อเริ่มต้นการทดลอง (กรัม)}]}{\text{น.น. ปลาเมื่อเริ่มต้น (กรัม)}} \times 100$$

- อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ คำนวณตามวิธีการ จากสมการ

อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate, SGR)(เปอร์เซ็นต์/วัน)

$$= \frac{(\ln \text{น.น.ปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง} - \ln \text{น.น.ปลาเมื่อเริ่มต้นการทดลอง})}{\text{เวลา (วัน)}} \times 100$$

3.2.5.2 ประสิทธิภาพของอาหาร

ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของปลาโดยสุ่มตัวอย่างปลาก่อนการทดลองจำนวน 30 ตัว นำไปวิเคราะห์ความชื้นในร่างกายทันทีและนำตัวอย่างปลาไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของตัวปลาได้แก่ ปริมาณโปรตีน ไขมัน เถ้าและฟอสฟอรัส ตามวิธีการของ AOAC (1990) เมื่อสิ้นสุดการทดลอง สุ่มตัวอย่างปลาจากแต่ละตู้ทดลองๆ ละ 2 ตัว ไปวิเคราะห์ความชื้น โปรตีน ไขมัน เถ้า และฟอสฟอรัส ตามวิธีการของ AOAC (1990) จากนั้นจึงนำไปคำนวณประสิทธิภาพการใช้โปรตีน การใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ

- อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (feed conversion rate) คำนวณตามวิธีการของ Dupree และ Sneed (1966) จากสมการ

$$\text{อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (FCR)} = \frac{\text{น.น.อาหารที่ปลากินทั้งหมด (กรัม)}}{\text{น.น.ปลาที่เพิ่มขึ้นตลอดการทดลอง (กรัม)}}$$

- อัตราการกินอาหาร (rate of feed intake) คำนวณตามวิธีการของ Yone และ Fujii (1975) จากสมการ

$$\text{อัตราการกินอาหาร (เปอร์เซ็นต์ต่อตัวต่อวัน)} = \frac{F \times 100}{\frac{W_o + W_t}{2} \times \frac{N_0 + N_t}{2} \times t}$$

โดย

F = น.น. อาหารแห้งที่ปลากิน (กรัม) N_o = จำนวนปลาเริ่มต้น (ตัว)

W_o = น.น.ปลาเฉลี่ยเริ่มต้น (กรัม) N_t = จำนวนปลาสุดท้าย (ตัว)

W_t = น.น.ปลาเฉลี่ยสุดท้าย (กรัม) t = ระยะเวลาที่ปลาได้รับอาหารทดลอง (วัน)

- ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน (protein efficiency ratio, PER) คำนวณตามวิธีการของ Zeitoun และคณะ (1973)

$$\text{ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน} = \frac{\text{น.น.ปลาที่เพิ่มขึ้น (กรัม)}}{\text{น.น.โปรตีนที่ปลากิน (กรัม)}}$$

- การใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ (apparent net protein utilization, ANPU) ตามวิธีของ Robinson และ Wilson (1985) จากสมการ

$$\text{การใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ (\%)} = \frac{(\%\text{โปรตีนในตัวปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง} - \%\text{โปรตีนในตัวปลาเมื่อเริ่มต้น})}{\text{น.น.โปรตีนที่ปลากินตลอดการทดลอง (กรัม)}} \times 100$$

3.2.5.3 การใช้ประโยชน์จากฟอสฟอรัสในอาหาร

การคำนวณหาค่าการเก็บสะสมฟอสฟอรัสในร่างกาย (Storebakken *et al*., 1998) โดยคำนวณค่าการสะสมปรากฏ (Apparent retention (P retention) (%))

$$\text{- การเก็บสะสมฟอสฟอรัสในร่างกาย} = 100 \times \left(\frac{\text{FICN} - \text{INCN}}{\text{Nutrient intake}} \right)$$

โดยที่

FICN = ปริมาณของฟอสฟอรัสที่คงเหลือในซากหลังการทดลอง (กรัม)

INCN = ปริมาณของฟอสฟอรัสที่คงเหลือในซากก่อนการทดลอง (กรัม)

Nutrient intake = ปริมาณของฟอสฟอรัส (หรือสารอาหาร) ที่ใช้ได้ทั้งหมด (กรัม)

3.2.5.4 ฟอสฟอรัสที่ถูกขับทิ้ง (Phosphorus load) คำนวณตามสมการ (Vielma *et al*., 2002)

- ฟอสฟอรัสที่ถูกขับทิ้ง

$$= \frac{\text{ปริมาณฟอสฟอรัสที่ปลาได้รับ(กรัม)} - \text{ปริมาณฟอสฟอรัสที่คงเหลือในตัวปลา (กรัม)}}{\text{น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (กิโลกรัม)}}$$

3.2.5.5 การวิเคราะห์ฟอสฟอรัสในกระดูก และเถ้าในกระดูก

เมื่อสิ้นสุดการทดลองสุ่มปลาตู้ละ 5 ตัว แล่เอาเฉพาะกระดูกบริเวณกะโหลก กระดูกสันหลัง และหาง นำไปต้มแล้วล้างด้วยน้ำกลั่นให้สะอาด จึงนำไปทำให้แห้งโดย อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง นำตัวอย่างนั้นไปวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัส และเถ้าตามวิธีการของ AOAC (1990)

3.2.5.6 การศึกษาปริมาณฟอสฟอรัส และค่าอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในซีรัม

เมื่อสิ้นสุดการทดลองสุ่มปลาตู้ละ 2 ตัว เจาะเลือดจากบริเวณโคนหางประมาณ 3 มิลลิลิตร ใส่หลอดไมโครทิว ทิ้งไว้ 30 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 3,000 รอบ/ นาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำตัวอย่างซีรัมจากเลือดปลาทดลองส่งวิเคราะห์ที่ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ โดยมีวิธีการวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสด้วยวิธี molybdate UV และวิเคราะห์ค่าอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสด้วยเครื่อง automated analyzer (Boerhinger Manheim Automated Analysis, Hitachi 717)

3.2.6 การวิเคราะห์ข้อมูล

การทดลองที่ 2 วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวน ANOVA แบบจำแนกทางเดียว (one way Analysis of Variances) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's multiple range test (Duncan, 1955) โดยทำการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS (11.0)

3.2.7 การตรวจสอบคุณภาพน้ำ

เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 ในหัวข้อ 3.1.8