บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

การทดลองที่ 1 การศึกษาการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันในปลาป่นเกรดกุ้งที่เก็บรักษาภายใต้สภาพที่แตกต่างกัน

1.1 ตัวอย่างปลาป่น และสารเคมี

1.1.1 ตัวอย่างปลาป่น เป็นปลาป่นเกรดกุ้งจากบริษัทกระบี่อุตสาหกรรมปลาป่น จำกัด ซึ่งใช้ปลาหลังเขียวในการผลิตปลาป่น และผลิตด้วยระบบน้ำมันร้อน (hot oil) ที่อุณหภูมิประมาณ 220 °ซ

1.1.2 สารเคมี

1.1.2.1 สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ได้แก่ อีทอกซิควิน (ethoxyquin)

1.1.2.2 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของปลาป่น ได้แก่ โปรตีน ไขมันรวม เถ้า และความชื้น (ภาคผนวก ก)

1.1.2.3 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี ได้แก่ เกลือปริมาณไนโตรเจนที่ระเหยได้ทั้งหมด (total volatile nitrogen base) กรดไขมันอิสระ (free fatty acid) ค่าเปอร์ออกไซด์ (peroxide value) ค่าอะนิซิดีน (anisidine value) Thiobarbituric acid reaction substances (ภาคผนวก ก)

1.1.2.4 สารเคมีที่ใช้สำหรับวิเคราะห์ปริมาณอีทอกซิควิน (ใช้กับเครื่อง High performance liquid chromatography; HPLC) (ภาคผนวก ก)

1.1.2.5 สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบโดย Feed microscopic technique ได้แก่ การปลอมปนขนไก่ไฮโดรไลซ์ หนังสัตว์ไฮโดรไลซ์ เปลือกปู ไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีน (non-protein nitrogen) และ การเสื่อมสภาพ (decomposition) ในปลาป่น (ภาคผนวก ก)

1.2 อุปกรณ์

1.2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของปลาป่น

1.2.1.1 อุปกรณ์วิเคราะห์โปรตีน ได้แก่

- เครื่องย่อย (digestion apparatus) ของบริษัท Gerhardt รุ่น Kjeldatherm
- เครื่องกลั่น (distillation apparatus) ของบริษัท Gerhardt รุ่น Vapodest I
- หลอดย่อยโปรตีน (Digestion tube)
- เครื่องชั่งทศนิยม 5 ตำแหน่ง ของบริษัท Mettler-Toledo รุ่น AG 245

1.2.1.2 อุปกรณ์วิเคราะห์ไขมัน ได้แก่

- เครื่องวิเคราะห์ไขมัน ของบริษัท Tecator รุ่น Soxtec system HT

1.2.1.3 อุปกรณ์วิเคราะห์เถ้า ได้แก่

- ถ้วยกระเบื้องเคลือบ (crucible)
- เตาเผา (muffle furnace) ของบริษัท Termolyne รุ่น F 6010

1.2.1.4 อุปกรณ์วิเคราะห์ความชื้น ได้แก่

- ขวดชั่ง หรือถ้วยกระเบื้องเคลือบ
- ตู้อบ (oven) ของบริษัท Memert รุ่น UL 60

1.2.2 อุปกรณ์ในการวิเคราะห์คุณภาพทางเคมีของปลาป่น

1.2.2.1 อุปกรณ์วิเคราะห์เกลือ ได้แก่ เตาไฟฟ้า (hot plate) ตู้ดูดควัน

1.2.2.2 อุปกรณ์วิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนที่ระเหยได้ทั้งหมด (TVN) ได้แก่ เครื่องกลั่น ขวดย่อยโปรตีน ขวดรูปชมพู่ บิวเรต

1.2.2.3 อุปกรณ์วิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันอิสระ (FFA) ได้แก่ เครื่องระเหย (rotary evaporator) ของบริษัท Heidolph

รุ่น VV 2000 เครื่องโฮโมจีไนเซอร์ ขวดรูปชมพู่ บิวเรต ไปเปต

1.2.2.4 อุปกรณ์วิเคราะห์ค่าเปอร์ออกไซด์ (PV) ได้แก่ เครื่องระเหย เครื่องโฮโมจีไนเซอร์ ขวดรูปชมพู่ บิวเรต ไปเปต

1.2.2.5 อุปกรณ์วิเคราะห์ค่าอะนิซิดีน(AnV) ได้แก่ เครื่องระเหย เครื่องโฮโมจีไนเซอร์ ขวดรูปชมพู่ บิวเรต

1.2.2.6 อุปกรณ์วิเคราะห์ Thiobarbituric acid reaction substances (TBARS) ได้แก่ เตาไฟฟ้า หลอดฝาเกลียว บีกเกอร์ เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ไมโครไปเปต อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometre) ของบริษัท Shimazda รุ่น UV 1201 V

1.2.3 อุปกรณ์ในการตรวจสอบสมบัติทางกายภาพ ได้แก่ เครื่องมือวัดสี Hunter system (CIELAB 10° / D65) ของบริษัท Hunter Associates Laboratory, Inc รุ่น Color Flex

1.2.4 อุปกรณ์ในการวิเคราะห์ปริมาณอีทอกซิควิน ได้แก่ เครื่อง HPLC ของบริษัท Algilent รุ่น 1100

1.2.5 อุปกรณ์ที่ใช้ในการตรวจสอบโดย Feed microscopic technique

1.2.5.1 อุปกรณ์ตรวจสอบการปลอมปนยูเรีย ขนไก่ไฮโดรไลซ์ หนังสัตว์ไฮโดรไลซ์ ได้แก่ จานเลี้ยงเชื้อ (petri dish) ไปเปต แท่งแก้ว หลอดหยด

1.2.5.2 อุปกรณ์ตรวจสอบการปลอมปนเปลือกปู ได้แก่ บีกเกอร์ แท่งแก้ว ปากคีบ กล้องจุลทรรศน์ (light microscope)

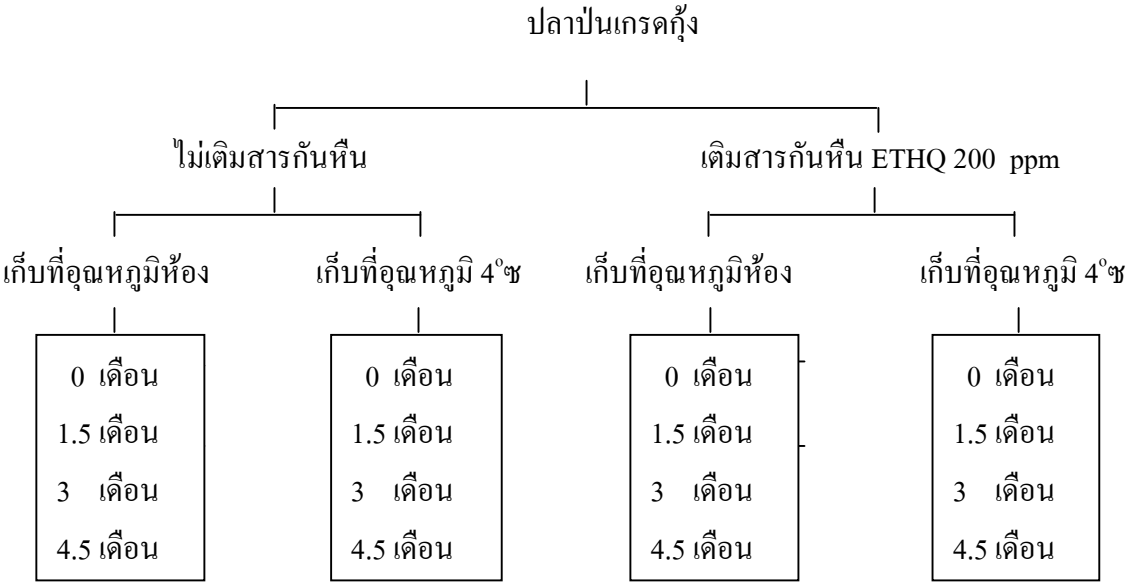
1.2.5.3 อุปกรณ์ตรวจสอบไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีน (NPN) ได้แก่ จานหลุม หลอดหยด บีกเกอร์

1.2.5.4 อุปกรณ์ตรวจสอบการเสื่อมสลาย (decomposition) ได้แก่ ขวดรูปชมพู่พร้อมจุกปิด ตู้อบ

1.3 วิธีการทดลอง

1.3.1 แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด โดยจัดชุดการทดลองแบบแฟคทอเรียล (2 x 2 x 4) มีชุดการทดลองทั้งหมด 16 ชุดการทดลอง ชุดละ 2 ซ้ำ ดังแสดงในภาพที่ 5



ภาพที่ 5 แผนการทดลองเก็บรักษาปลาป่น

1.3.2 การเตรียมปลาป่นเพื่อการเก็บรักษา

1.3.2.1 ปลาป่นที่ใช้ในการศึกษาเป็นปลาป่นเกรดกุ้งมีโปรตีน 72.21% จากบริษัทกระบี่อุตสาหกรรมปลาป่น จำกัด ซึ่งเป็นปลาป่นที่ผลิตใหม่ไม่เกิน 3 วัน และไม่มีการเติมสารกันหืน ปริมาณ 40 กิโลกรัม

1.3.2.2 แบ่งปลาป่นปริมาณ 4 กิโลกรัม เป็นตัวอย่างชุดควบคุม (ที่ระยะเวลา 0 เดือน) และสุ่มตัวอย่างไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี คุณภาพทางเคมี สมบัติทางกายภาพ และตรวจสอบโดยวิธีทางเคมีอย่างง่าย

1.3.2.3 แบ่งปลาป่นที่เหลือออกเป็น 2 ส่วนๆ ละ 18 กิโลกรัม ส่วนที่ 1 เติมสารกันหืนอีทอกซิควิน 200 มิลลิกรัมต่อปลาป่น 1 กิโลกรัม (200 ppm) ส่วนที่ 2 ไม่เติมสารกันหืน

1.3.2.4 นำปลาป่นแต่ละส่วน บรรจุใส่ถุงที่เย็บจากกระสอบอาหารสัตว์เพื่อให้มีสภาพเหมือนกับที่เก็บในสภาพจริงกระสอบละ 1.5 กิโลกรัม จำนวน 24 กระสอบ โดยแบ่งเป็น 2 ชุด คือ เติมสารกันหืน 12 กระสอบ และไม่เติมสารกันหืน 12 กระสอบ

1.3.2.5 บรรจุปลาป่นที่เติมสารกันหืน และไม่เติมสารกันหืน อย่างละ 6 กระสอบ ลงในกล่องโฟมปิดฝาให้สนิท นำไปเก็บในตู้เย็น (อุณหภูมิ 4 °ซ) ส่วนปลาป่นที่เหลือนำไปเก็บที่อุณหภูมิห้อง

1.3.3 การวิเคราะห์ตัวอย่างและเก็บข้อมูล

1.3.3.1 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี (AOAC, 1990) คุณภาพทางเคมี (AOAC, 1990; Buege and Aust, 1978; IUPAC, 1979; Uchiyama, 1973) สมบัติทางกายภาพ (Hunter system) และตรวจสอบโดยวิธีทางเคมีอย่างง่าย (การปลอมปนขนไก่ไฮโดรไลซ์ NPN และการเสื่อมสภาพ) (เยาวมาลย์ ค้าเจริญ, 2546) ของปลาป่นที่ 0 เดือน (ชุดควบคุม)

1.3.3.2 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี คุณภาพทางเคมี (ยกเว้นเกลือ) สมบัติทางกายภาพ และตรวจสอบการเสื่อมสภาพของปลาป่น ที่ระยะเวลา 1.5 เดือน 3 เดือน และ 4.5 เดือน ตามลำดับ

1.3.3.3 วัดอุณหภูมิห้องและวัดความชื้นในห้องที่เก็บรักษาตัวอย่างในสภาพอุณหภูมิห้องปกติด้วยเทอร์โมมิเตอร์และไฮโกรมิเตอร์ทุกวันตลอดระยะเวลาการทดลอง

1.3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลที่ได้ไปหาค่าเฉลี่ยและวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติโดยวิธี Analysis of Variance (ANOVA) และการตรวจสอบความแตกต่างทางสถิติระหว่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan’s New Multiple Range Test (Duncan, 1995) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

การทดลองที่ 2 การศึกษาผลของปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันในปลาป่น ต่อการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหาร และพยาธิสภาพเนื้อเยื่อตับในกุ้งกุลาดำ

2.1 วัสดุ

2.1.1 กุ้งกุลาดำ จากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งสตูล ซึ่งเป็นลูกกุ้งที่ศูนย์ฯ เพาะฟักและอนุบาลเอง โดยนำมาอนุบาลต่อในบ่อซีเมนต์ที่สถานีวิจัยวาริชศาสตร์ เป็นเวลา 1 เดือน จนลูกกุ้งมีขนาด 0.25 กรัม/ตัว

2.1.2 อาหารทดลอง เป็นอาหารที่ผลิตโดยคัดเลือกปลาป่นจากการทดลองที่ 1 เป็นแหล่งโปรตีน

2.1.3 วัสดุและสารเคมีสำหรับวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของอาหารทดลองและซากกุ้ง (ดังการทดลองที่ 1)

2.1.4 วัสดุสำหรับเตรียมอาหารกุ้งกุลาดำ (ตารางที่ 3)

2.1.5 วัสดุและสารเคมีสำหรับการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อตับกุ้งกุลาดำ ได้แก่ สารเคมี Davidson's fixative สีย้อมฮีมาทอกซิลิน (haematoxylin) สีย้อมอีโอซิน (eosin) เข็มฉีดยาพร้อมเข็ม ขวดดองตัวอย่าง (ภาคผนวก ก)

2.2 อุปกรณ์

2.2.1 อุปกรณ์ในการเลี้ยงกุ้ง

2.2.1.1 ตู้กระจก ขนาด 18 x 18 x 46 นิ้ว บรรจุน้ำ 200 ลิตร พร้อมฝาปิดกันกุ้งกระโดดออก จำนวน 30 ตู้

2.2.1.2 หลอดแก้วสำหรับควบคุมระดับน้ำในตู้กระจก

2.2.1.3 สายยางสำหรับดูดอาหารเหลือและตะกอนในตู้กระจก

2.2.1.4 ระบบกรองน้ำ ได้แก่ บ่อซีเมนต์ขนาด 10.2 x 6 x 1.4 m^3 ความจุ 85.68 ตัน ที่รับน้ำจากถังกรองน้ำขนาด 200 ลิตร จำนวน 4 ถัง ภายในบรรจุหิน ทรายหยาบ ทรายละเอียด และ ถ่าน

2.2.1.5 ระบบน้ำไหลเวียน ประกอบด้วย ถังเก็บน้ำ มอเตอร์ปั๊มน้ำและท่อพีวีซี

2.2.1.6 ระบบให้อากาศ ประกอบด้วย เครื่องปั๊มอากาศ สายยาง และหัวทราย

2.2.2 อุปกรณ์สำหรับการให้อาหารและเก็บอาหารเหลือ

2.2.2.1 กล่องใส่อาหาร จำนวน 30 กล่อง

2.2.2.2 ถุงสำหรับเก็บรวบรวมอาหารเหลือ

2.2.2.3 เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง สำหรับชั่งอาหาร

2.2.2.4 ตู้อบ

2.2.3 อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของอาหารทดลองและซากกุ้ง (ดังการทดลองที่ 1)

2.2.4 อุปกรณ์สำหรับเตรียมอาหาร

2.2.4.1 เครื่องเตรียมอาหารทดลองของ Hobart Model A 200 T ประกอบด้วย ชุดเครื่องผสมอาหาร ชุดเครื่องอัดอาหารให้เป็นเม็ด

2.2.4.2 อุปกรณ์ ชั่ง ตวงวัสดุอาหารได้แก่ เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Sartorius รุ่น Basic) เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Sartorius รุ่น Research) กระบอกตวง บีกเกอร์ ถาดเตรียมอาหาร ตู้อบอาหาร

2.2.4.3 ตู้แช่แข็ง เพื่อเก็บอาหารทดลอง

2.2.5 อุปกรณ์สำหรับศึกษาพยาธิสภาพเนื้อเยื่อตับของกุ้งกุลาดำ

2.2.5.1 ชุดอุปกรณ์ผ่าตัด เช่น มีดผ่าตัด กรรไกรผ่าตัด ปากคีบ

2.2.5.2 เครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติ (automatic tissue processor) ของ Technicon Corporation รุ่น Autotechnicon Mono MOD. 2A

2.2.5.3 อุปกรณ์ตัดชิ้นเนื่อเยื่อ เช่น เครื่องตัดชิ้นเนื้อเยื่อแบบสไลด์ (slide microtome) ของ Jung AG Heidelberg อ่างน้ำอุ่น ตู้อบ แผ่นสไลด์

2.2.5.4 อุปกรณ์ย้อมสีเนื้อเยื่อ กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo microscope

2.2.5.5 กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบของ Olympus รุ่น C-35 AD พร้อมกล้องถ่ายภาพของ Olympus รุ่น AX 70

2.3 วิธีการทดลอง

2.3.1 แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (completely randomized design, CRD) มีชุดการทดลองจำนวน 5 ชุด (อาหารทดลอง 5 สูตร) แต่ละชุดมีจำนวนซ้ำ 6 ซ้ำ ทั้งหมด 30 ตู้ทดลอง ใช้กุ้งกุลาดำขนาด 0.25 กรัม จำนวน 25 ตัวต่อตู้ ระยะเวลาเลี้ยง 60 วัน ในระบบน้ำไหลกึ่งปิด

2.3.2 การคัดเลือกปลาป่น

คัดเลือกปลาป่นจากการเก็บรักษาในการทดลองที่ 1 โดยพิจารณาจากสภาพการเก็บรักษา และตัวบ่งชี้การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันในปลาป่น โดยใช้ค่า TBARS เป็นตัวกำหนด เนื่องจากเป็นค่าที่วัดปริมาณสารอัลดีไฮด์ ซึ่งเป็นผลผลิตสุดท้ายของการเกิดออกซิเดชัน ส่วนค่าเปอร์ออกไซด์เป็นค่าที่วัดปริมาณสารไฮโดรเปอร์ออกไซด์ ซึ่งเป็นสารที่ไม่เสถียรมีการแตกตัวต่อไปได้ จึงเป็นค่าที่มีความผันแปรได้ตลอดการเกิดออกซิเดชัน พิจารณามาจำนวน 5 ตัวอย่าง ซึ่งมีระดับการเกิดออกซิเดชัน/ความหืน 5 ระดับ ได้แก่ น้อยมาก (ปลาป่นผลิตใหม่) ระดับน้อย ระดับปานกลาง ระดับมาก และระดับมากที่สุด ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ปลาป่นที่ใช้เป็นวัตถุดิบหลักในการผลิตอาหารทดลองเลี้ยงกุ้งกุลาดำสูตรต่างๆ

สูตรอาหาร	สภาพการเก็บรักษา	ระดับการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน
		TBARS (mgMAD/kg sample)
1 (ชุดควบคุม)	ปลาป่นผลิตใหม่	7.87
2 (ความหืนน้อย)	ไม่เติมสารกันหืน เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 1.5 เดือน	15.02
3 (ความหืนปานกลาง)	เติมสารกันหืน เก็บที่อุณหภูมิห้อง นาน 4.5 เดือน	22.5
4 (ความหืนมาก)	ไม่เติมสารกันหืน เก็บที่อุณหภูมิห้อง นาน 3 เดือน	25.67
5 (ความหืนมากที่สุด)	ไม่เติมสารกันหืน เก็บที่อุณหภูมิห้อง นาน 4.5 เดือน	62.31

2.3.3 การเตรียมอาหารทดลอง

เนื่องจากปลาป่นที่ใช้ในการผลิตอาหารเป็นปลาป่นที่เก็บรักษาในสภาพต่างๆ กันในการทดลองที่ 1 ซึ่งมีระยะเวลาเป็นตัวกำหนด (0, 1.5, 3 และ 4 เดือน) ดังนั้นเมื่อครบกำหนดการเก็บรักษาจะต้องนำปลาป่นมาผลิตอาหารทันที โดยสร้างสูตรอาหารให้ทุกสูตรมีระดับโปรตีน ไขมัน และพลังงานใกล้เคียงกัน คือ ปริมาณโปรตีน 45% ปริมาณไขมัน 8.0% และพลังงาน 3,700–3,800 กิโลแคลอรีต่ออาหาร 1 กิโลกรัม อาหารทุกสูตรมีส่วนประกอบของวัตถุดิบเหมือนกัน ยกเว้นปลาป่น (ตารางที่ 3) ส่วนปลาป่นที่เก็บรักษาในอุณหภูมิห้องทั้งเติมและไม่เติมสารกันหืนที่ระยะ เวลา 3 เดือน และ 4.5 เดือน มีการเติมสารจับสารพิษ (toxin binder) ที่คาดว่าจะเกิดเนื่องจากเชื้อราในอัตรา 1.5 มิลลิกรัมต่อปลาป่น 1 กิโลกรัม ทุกตัวอย่าง สำหรับวิธีการผลิตอาหารมีดังนี้ นำวัตถุดิบที่ผ่านการร่อนด้วยตะแกรงขนาด 30 เมช และวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีแล้ว (ตารางภาคผนวกที่ ค. 2) มาชั่งให้ได้น้ำหนักตามที่คำนวณไว้ในแต่ละสูตร รวมทั้งวัตถุดิบที่เป็นของเหลว เช่น เลซิติน โดยนำวัตถุดิบแห้งทั้งหมดมาผสมและคลุกเคล้าให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมอาหาร (hobart mixer) นาน 10 นาที จึงค่อยๆ เติมเลซิตินลงไปทีละน้อยและเปิดเครื่องตีกวนอาหารนาน 5 นาที หลังจากนั้นค่อยๆ เติมน้ำสะอาดในปริมาตร 35% ของน้ำหนักอาหารทั้งหมด เปิดเครื่องตีกวนอีกครั้งนาน 10 นาที เมื่อวัตถุดิบอาหารทั้งหมดผสมเข้ากันเป็นอย่างดี แล้วนำเข้าเครื่องอัดเม็ดอาหารให้ผ่านหน้าแว่นที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร โดยให้ผ่านการอัดเม็ด 2 รอบ เพื่อให้เม็ดอาหารมีความแน่นและคงทนอยู่ในน้ำได้นาน ใช้มีดขนาดเล็กตัดเม็ดอาหารให้มีขนาดต่างกัน 2 ขนาด เพื่อความเหมาะสมต่อขนาดของกุ้งที่เลี้ยง (ขนาดเล็กสำหรับกุ้งเริ่มต้นจนถึง 1 เดือน และขนาดใหญ่สำหรับกุ้งโต 1–2 เดือน) จากนั้นนำอาหารที่อัดเม็ดและตัดตามขนาดที่ต้องการไปอบที่อุณหภูมิ 60 °ซ นาน 24 ชั่วโมง นำอาหารที่อบแห้งแล้ววางให้เย็น ร่อนด้วยตะแกรงเพื่อแยกเม็ดอาหารออกเป็น 2 ขนาด บรรจุใส่ถุงพลาสติกสวมทับด้วยกระสอบเก็บไว้ในตู้แช่แข็งเพื่อนำไปเลี้ยงกุ้งต่อไป นอกจากนี้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบของอาหาร ได้สุ่มตัวอย่างอาหารประมาณ 100 กรัม บดละเอียด นำไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีตามวิธีมาตรฐานของ AOAC (1990) และส่งไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบของกรดไขมัน (fatty acid profile) ที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยโดยวิธี Gas Chromatography

ตารางที่ 3 ส่วนประกอบของอาหารทดลอง (ดัดแปลงจาก Boonyaratpalin *et al.,* 2001)

วัตถุดิบอาหาร	กรัม/กิโลกรัม (as fed basis)
ปลาป่น[1]	420.0
หมึกป่น	80.0
หวีท กลูเท่น	60.0
แป้งสาลี	225.0
แป้งข้าวเจ้า	119.0
น้ำมันปลา	0
เลซิทิน	20.0
Vitamin mix[2]	3.3
Vitamin C	1.0
Vitamin E	1.5
Cholesterol	5.0
Zeolite	15.0
Mineral mix[3]	40.0
Carboxymethyl cellulose	10.0
BHT	0.2

[1]ปลาป่นในแต่ละสูตรใช้ปลาป่นจากการทดลองที่ 1 ที่มีระดับความหืนแตกต่างกัน (ดังตารางที่ 2) โดยมีปริมาณดังนี้ สูตรที่ 1 (ชุดควบคุม) = 420 กรัม/กิโลกรัม, สูตรที่ 2 (ความหืนน้อย) = 420 กรัม/กิโลกรัม สูตรที่ 3 (ความหืนปานกลาง) = 425 กรัม/กิโลกรัม, สูตรที่ 4 (ความหืนมาก) = 440 กรัม/กิโลกรัม, สูตรที่ 5 (ความหืนมากที่สุด) = 450 กรัม/กิโลกรัม

[2] Vitamin mix (ใน 1 กิโลกรัมของวิตามินผสม) = วิตามินA, 3500,000 IU; วิตามิน D, 800,000 IU; วิตามิน E, 40 กรัม; วิตามิน K, 15 กรัม; วิตามิน B_1, 20 กรัม; วิตามิน B_2, 15 กรัม; วิตามิน B_6 20 กรัม; วิตามิน B_{12}, 10 มิลลิกรัม; niacin 40 กรัม; panthothenic acid, 40 กรัม; folic acid, 4 กรัม; biotin, 400 มิลลิกรัม; inosital, 150 กรัม

[3]Mineral mix (กรัม/กิโลกรัมแร่ธาตุ) = K_2HPO_4, 40; $Ca_3(PO_4)_2$, 5.5; $MgSO_4 7H_2O$, 6.1; NaH_2PO_4 $2H_2O$, 16; cellulose 828

2.3.4 การเตรียมระบบเลี้ยง

ใช้ตู้กระจกขนาด 18 นิ้ว x 18 นิ้ว x 46 นิ้ว บรรจุน้ำ 200 ลิตร จำนวน 30 ตู้ ในการเลี้ยงกุ้ง โดยระบบน้ำที่ใช้เป็นระบบน้ำไหลกึ่งปิด ใช้น้ำทะเลจากบ่อพักน้ำ อัตราการไหลประมาณ 0.8 ลิตร/นาที ตรวจวัดคุณภาพน้ำทุกวันตลอดช่วงระยะเวลาทดลอง ได้แก่ อุณหภูมิ (25–32 องศาเซลเซียส) (ภาคผนวกที่ ค. 3) ความเค็ม (27–34 ส่วนในพันส่วน) pH 6.5-8.0 ส่วนปริมาณไนไตรท์ และแอมโมเนีย ส่งวิเคราะห์ที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง สตูล 2 สัปดาห์ต่อครั้ง (ภาคผนวกที่ ค. 4) น้ำที่ผ่านการใช้แล้วไหลลงสู่บ่อบำบัดน้ำซึ่งเป็นบ่อซีเมนต์ขนาด 10.2 x 6 x 1.4 m^3 ความจุ 85.68 ตัน ประกอบด้วยถังกรองน้ำขนาด 200 ลิตร จำนวน 4 ถัง ภายในถังบรรจุหิน ทรายหยาบ ทรายละเอียด และ ถ่าน มีการให้อากาศในตู้ทดลองตลอดเวลา โดยเครื่องปั๊มลมขนาดใหญ่

2.3.5 การเตรียมสัตว์ทดลอง

ลูกกุ้งกุลาดำขนาด P15 นำมาอนุบาลในบ่อซีเมนต์จำนวน 5,000 ตัว โดยให้อาร์ทีเมียเป็นอาหารในช่วง 2 สัปดาห์แรก จากนั้นทำการปรับพฤติกรรมการกินให้กินอาหารกุ้งสำเร็จรูป (โปรตีน 45%) โดยการเสริมให้กินทีละน้อยพร้อมกับค่อยๆ ลดปริมาณอาร์ทีเมียลง จนกระทั่ง ลูกกุ้งเกิดความเคยชินกับอาหารเม็ด ให้อาหารวันละ 3–4 ครั้ง อนุบาลลูกกุ้งประมาณ 1 เดือน เปลี่ยนถ่ายน้ำทุกวัน หลังจากนั้นสุ่มกุ้งไปเลี้ยงในตู้ทดลอง จำนวน 40 ตัว/ตู้ จำนวน 30 ตู้ เลี้ยงกุ้งด้วยอาหารทดลองชุดควบคุม เป็นเวลา 10 วัน เพื่อปรับพฤติกรรมกุ้งให้คุ้นกับอาหารทดลองและตู้กระจก

2.3.6 การศึกษาการเจริญเติบโต

คัดเลือกลูกกุ้งที่มีสุขภาพสมบูรณ์แข็งแรงและมีขนาดใกล้เคียงกันมากที่สุด มีน้ำหนักเฉลี่ยประมาณ 0.25 กรัมต่อตัว ในแต่ละตู้ทดลองจำนวน 25 ตัวต่อตู้ ทั้งหมด 30 ตู้ (อาหาร 5 สูตรๆ ละ 6 ซ้ำ) ชั่งน้ำหนักรวมของกุ้งในแต่ซ้ำ และสุ่มกุ้งที่เหลือไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของกุ้งเมื่อเริ่มทดลองจำนวน 100 กรัม ให้อาหารวันละ 4 ครั้ง คือ 7.00, 12.00, 17.00 และ 23.00 น. ทุกวัน เป็นเวลา 60 วัน บันทึกข้อมูลปริมาณอาหารที่ให้ในแต่ละวัน และเก็บอาหารที่เหลือบริเวณพื้นตู้โดยใช้สายยางขนาดเล็กดูด (siphon) และกรองโดยถุงผ้าโอล่อนแก้ว ทำความสะอาดตู้ (ดูดตะกอน เก็บกุ้งที่ตายและคราบกุ้งออก) และเปลี่ยนถ่ายน้ำครั้งละประมาณ 30–50% ของน้ำในตู้ นำอาหารเหลือไปอบให้แห้งเพื่อกำจัดความชื้นออกในตู้อบที่มีอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักอาหารเหลือในแต่ละวัน คำนวณปริมาณอาหารที่กุ้งกินโดยเอา

อาหารที่เหลือหักออกจากอาหารที่ให้ในแต่ละวันโดยปรับระดับอาหารให้กินจนอิ่มในแต่ละมื้อตามขนาดและการลอกคราบของกุ้ง ในระหว่างการทดลอง สังเกตพฤติกรรมการกินอาหาร การลอกคราบ และความผิดปกติของกุ้งในแต่ละชุดการทดลอง เก็บคราบกุ้งและกุ้งตายออกจากตู้ให้เร็วที่สุด เพื่อป้องกันกุ้งกินคราบและกินกันเอง พร้อมทั้งจดบันทึกจำนวนกุ้งที่ผิดปกติหรือตาย

2.3.7 การเก็บข้อมูลและตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

สุ่มตัวอย่างกุ้งก่อนเริ่มต้นทดลองประมาณ 100 กรัม (น้ำหนักเปียก) อบให้แห้งด้วยตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เพื่อหาความชื้นในตัวกุ้งสดเริ่มต้น หลังจากนั้นบดกุ้งที่แห้งแล้วให้ละเอียดด้วยเครื่องบดความเร็วสูง นำไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ โปรตีน ไขมัน เถ้าและความชื้น ตามวิธีของ AOAC (1990) และเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (60 วัน) ชั่งน้ำหนักกุ้งทีละตัว นำไปคำนวณอัตราการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน อัตราการแลกเนื้อ เปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น โปรตีนที่นำไปใช้ประโยชน์ และอัตราการรอด ตามสูตรต่อไปนี้

อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate, % ต่อวัน) = $\frac{\ln(W_2 - W_1) \times 100}{t_2 - t_1}$

W_1 = น้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้น

W_2 = น้ำหนักเฉลี่ยสุดท้าย

t_1 = วันเริ่มต้นการทดลอง

t_2 = วันสิ้นสุดการทดลอง

% น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น (% weight gain) = $\frac{(\text{น้ำหนักสุดท้าย} - \text{น้ำหนักเริ่มต้น}) \times 100}{\text{น้ำหนักเริ่มต้น}}$

อัตราการแลกเนื้อ (feed conversion rate) = $\frac{\text{น้ำหนักอาหารที่กุ้งกินทั้งหมด (กรัม)}}{\text{น้ำหนักกุ้งที่เพิ่มขึ้น (กรัม)}}$

ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน (protein efficiency ratio) = $\frac{\text{น้ำหนักกุ้งที่เพิ่มขึ้น (กรัม)}}{\text{โปรตีนที่กุ้งกินตลอดการทดลอง (กรัม)}}$

$$\text{โปรตีนที่นำไปใช้ประโยชน์ (productive protein value)} = \frac{\text{โปรตีนของตัวกุ้งที่เพิ่มขึ้น (กรัม)} \times 100}{\text{โปรตีนที่กุ้งกินตลอดการทดลอง (กรัม)}}$$

$$\text{อัตราการรอด (survival rate, \%)} = \frac{\text{จำนวนกุ้งที่เหลือ} \times 100}{\text{จำนวนกุ้งเริ่มต้น}}$$

จากนั้นสุ่มตัวอย่างกุ้งจำนวน10 ตัวต่อตู้ ทั้งหมด 30 ตู้ นำไปอบให้แห้งด้วยตู้อบที่อุณหภูมิ 60°ซ บันทึกน้ำหนักที่หายไปเพื่อนำไปคำนวณหาความชื้นในตัวกุ้ง บดกุ้งที่อบแห้งแล้วให้ละเอียดด้วยเครื่องบดละเอียดความเร็วสูง ก่อนนำไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ โปรตีน ไขมัน เถ้า และความชื้น ตามวิธีของ AOAC (1990)

2.3.8 การตรวจสอบพยาธิสภาพเนื้อเยื่อตับกุ้ง

สุ่มตัวอย่างกุ้ง 5 ตัวต่อตู้ เพื่อนำมาตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อตับของกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรต่างๆ โดยการฉีดน้ำยา Davidson เข้าในส่วนหัวและส่วนตับให้มากที่สุดเพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อ (autolysis) ตัดส่วนหัวของกุ้งดองโดยวิธี Davidson's fixation แล้วนำไป embed ใน paraffin จากนั้นตัดเนื้อเยื่อตับให้มีความหนา 3-4 ไมครอน นำไปย้อมสีด้วย haematoxylin และ eosin (Humason, 1972) และตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ (light microscope) เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของตับอ่อนตาม Johnson (1980); Vogt และคณะ (1985) และ Bell และ Lightner (1988)

2.3.9 การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลที่ได้ไปหาค่าเฉลี่ยและวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติโดยวิธี Analysis of Variance (ANOVA) และการตรวจสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multliple Range Test (Duncan, 1995) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%