บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

วัสดุ

- เครื่องในรวมปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง (Yellowfin tuna : *Thunnus albacares*) ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัททรอปิคคอลแคนนิ่ง จำกัด เครื่องในรวมประกอบด้วยกระเพาะ ม้าม ตับ ตับอ่อน ลำไส้ และถุงน้ำดี นำเครื่องในมาล้างทำความสะอาด ทำให้สะเด็ดน้ำ บรรจุเครื่องในรวมปลาทูน่าใส่ในถุงโพลีเอทิลีนถุงละ 1 กิโลกรัม นำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส จนกระทั่งนำมาใช้ในการทดลอง

- หัวกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัทห้องเย็นโชติวัฒน์หาดใหญ่ จำกัด นำหัวกุ้งมาล้างทำความสะอาด ทำให้สะเด็ดน้ำ บรรจุในถุงโพลิเอทิลีนถุงละ 1 กิโลกรัม เก็บรักษาที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

- น้ำนึ่งปลาทูน่า (tuna condensate) ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัททรอปิคคอลแคนนิ่ง จำกัด นำมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

- เอนไซม์อัลคาเลส 2.4 L (Novo Industry , Denmark)

- เอนไซม์สกัดจากเครื่องในรวมปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง

- ปลากดเหลือง (*Mystus nemurus* Cuv. &Val.) จากสถานีประมงน้ำจืด จังหวัดสงขลา

- อาหารอนุบาลลูกปลาวัยอ่อน ดัดแปลงจากวุฒิพร พรหมขุนทองและคณะ (2540)

- สารเคมีเกรดวิเคราะห์ (analytical grade) ใช้ในการสกัดเอนไซม์จากเครื่องในรวมปลา ทูน่า และใช้ในการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส รวมทั้งสารเคมีสำหรับวิเคราะห์ องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบ โปรตีนไฮโดรไลเสต สารสกัดจากปลาและอาหารปลา ได้แก่ โปรตีน ไขมัน เถ้า และความชื้น

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสต

- เครื่องบดผสม รุ่น SP099 ของบริษัท International จำกัด
- เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ รุ่น U-2000 ของบริษัท Hitachi จำกัด
- เครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ รุ่น SCR 20 B ของบริษัท Hitachi Koki จำกัด
- เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ รุ่น Model G25-KLG ของบริษัท Scientific Promotion จำกัด
- เครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง รุ่น Maxi Dry Lyo ของบริษัท Heto จำกัด

2. อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบ โปรตีนไฮโดรไลเสตและอาหารปลา

- ตู้อบฆ่าเชื้อ รุ่น ULM 500 ของบริษัท Memmert จำกัด
- ชุดเครื่องมือสกัดไขมัน ของบริษัท Electrothermal จำกัด
- ชุดเครื่องมือกลั่นโปรตีน รุ่น 2200 Kjeltec Auto ของบริษัท Foss Tecator จำกัด
- เตาเผา รุ่น 550-14 ของบริษัท Fisher Scientific จำกัด
- เครื่องวิเคราะห์เยื่อใย รุ่น VELP
- เครื่องวิเคราะห์พลังงาน รุ่น Model C5000 ของบริษัท IKA Labortechnik จำกัด

3. อุปกรณ์ที่ใช้ในการเลี้ยงปลา

- ถังไฟเบอร์กลาสปริมาตร 1.2 ลูกบาศก์เมตรจำนวน 2 ลูก
- ตู้กระจกทดลองขนาด 40 x 60 x 50 เซนติเมตร ปิดด้านข้างและด้านหลังตู้กระจกทดลองด้วยแผ่นพลาสติกสีทึบ 3 ด้านเพื่อลดการรบกวนปลาทดลองจากสิ่งแวดล้อมภายนอก
- อุปกรณ์ระบบให้อากาศ ประกอบด้วยเครื่องให้อากาศ สายยาง หัวทราย
- กล้องถ่ายวีดีโอ

การวิเคราะห์

1. กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส

วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Hagihara และคณะ (1958) ดังนี้

นำเอนไซม์ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตรที่เจือจางอย่างเหมาะสมใน 50 มิลลิโมลาร์ของสารละลายคาร์บอเนต-ไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ พีเอช 10.0 (หรือพีเอชที่ต้องการศึกษา) ผสมกับสารละลายสับสเตรต 1 มิลลิลิตร (เคซีนร้อยละ 1) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เติมบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ (stop buffer) (ภาคผนวก ข) 2 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 3500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร นำค่าดูดกลืนแสงที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของไทโรซีน (ภาคผนวก ก)

หลอดควบคุม เตรียมโดยเติมบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการหยุดปฏิกิริยา 2 มิลลิลิตร ลงในสับสเตรต 1 มิลลิลิตรแล้วเติมเอนไซม์ 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 15 นาทีเช่นเดียวกับเอนไซม์

ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส 1 ยูนิต หมายถึง ความสามารถของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสับสเตรตได้ กรดอะมิโนในรูปของไทโรซีน 1 ไมโครโมลในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ (specific activity) ของเอนไซม์โปรติเอส มีค่าเท่ากับ ยูนิตของเอนไซม์ต่อมิลลิกรัมโปรตีน

การคำนวณ

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)} = \frac{\text{มิลลิกรัมของไทโรซีน} \times 1000 \times \text{จำนวนเท่าการเจือจางสารละลายเอนไซม์}}{\text{น้ำหนักโมเลกุลของไทโรซีน (กรัมต่อโมล)} \times \text{ระยะเวลาที่บ่ม (นาที)} \times \text{ปริมาตรสารละลายเอนไซม์ (มิลลิลิตร)}}$$

$$\text{กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิกรัม)} = \frac{\text{กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)}}{\text{ความเข้มข้นของโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)}}$$

2. ค่าปริมาณไนโตรเจนที่ผลิตได้ (nitrogen recovery)

การหาค่าปริมาณไนโตรเจนที่ผลิตได้ (nitrogen recovery) โดยวิธีของ Shahidi และคณะ (1995) โดยหาปริมาณไนโตรเจนในวัตถุดิบเริ่มต้นและปริมาณไนโตรเจนที่ละลายในส่วนใสของไฮโดรไลเสต แล้วคำนวณจาก

$$\text{ค่าปริมาณไนโตรเจนที่ผลิตได้ (ร้อยละ)} = \frac{\text{ปริมาณไนโตรเจนที่ละลายในส่วนใส x 100}}{\text{ปริมาณไนโตรเจนในวัตถุดิบเริ่มต้น}}$$

3. ค่าระดับการย่อยสลาย (degree of hydrolysis)

การหาค่าระดับการย่อยสลาย (degree of hydrolysis) โดยวิธีของ Hoyle และ Merritt (1994) โดยนำโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผลิตได้ ผสมกับกรดไตรคลอโรอะซิติกความเข้มข้น 20% (โดยน้ำหนัก) ในอัตราส่วน 1:1 เขย่าให้เข้ากัน นำเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 10000 รอบต่อนาที แล้วนำส่วนของเหลวใสที่ได้ไปหาปริมาณไนโตรเจน แล้วคำนวณจาก

$$\text{ค่าระดับการย่อยสลาย (ร้อยละ)} = \frac{\text{ปริมาณไนโตรเจนที่ละลายในกรดไตรคลอโรอะซิติก (10\% TCA soluble nitrogen) x 100}}{\text{ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในวัตถุดิบ}}$$

วิธีการทดลอง

1. ผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากเครื่องในรวมปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง

1.1 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบ

วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบเริ่มต้น ได้แก่ ความชื้น โปรตีน ไขมัน และเถ้า (AOAC, 1990) วัตถุดิบที่ใช้มี 3 ชนิด คือ เครื่องในรวมปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง, หัวกุ้งกุลาดำ และน้ำนึ่งปลาทูน่า

1.2 ผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากเครื่องในรวมปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง

นำเครื่องในรวมปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลืองที่บดละเอียดมาเติมสารละลายบัฟเฟอร์คือ 50 มิลลิโมลาร์ คาร์บอเนตไบคาร์บอเนต พีเอช 10 โดยใช้ความเข้มข้นของโปรตีนของเครื่องในรวมปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลืองเริ่มต้น 10% ปรับพีเอชให้เท่ากับ 10 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความ เข้มข้น

6 โมลาร์ หรือสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 6 โมลาร์ หลังจากนั้นนำไปย่อยสลายที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง พร้อมทั้งเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที แล้วยับยั้งการย่อยสลายโดยให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที (วิภาวรรณ ไตรรัตนานุกูล, 2544) นำสารละลายส่วนใสไปวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนที่ผลิตได้ (Nitrogen recovery: NR) (Shahidi *et al*., 1995), ระดับการย่อยสลาย (Degree of hydrolysis: DH) (Hoyle and Merritt, 1994), องค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ ความชื้น โปรตีน เถ้า และไขมัน (AOAC, 1990)

2. ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์จากหัวกุ้งกุลาดำและน้ำนึ่งปลาทูน่า

2.1 เตรียมเอนไซม์สกัด

นำเครื่องในรวมปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง ล้างทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว หลังจากนั้นสกัดเอนไซม์จากเครื่องในรวมปลาทูน่าด้วยสารละลายบัฟเฟอร์คาร์บอเนต-ไบคาร์บอเนต ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 10 ในการสกัดมีการเติม Tween 80 ความเข้มข้น 0.1% ใช้อัตราส่วนเครื่องในปลาทูน่าต่อบัฟเฟอร์เท่ากับ 1:2 (น้ำหนัก/ปริมาตร) นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นผสมความเร็วสูงประมาณ 1-2 นาที กรองด้วยผ้าขาวบาง นำสารละลายที่ได้เข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที สารละลายส่วนใสที่ได้คือ สารละลายเอนไซม์สกัด วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน และกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส

2.2 ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากหัวกุ้งกุลาดำ

นำหัวกุ้งกุลาดำบดละเอียดมาเติมสารละลายละลายบัฟเฟอร์คือ 50 มิลลิโมลาร์คาร์บอเนต-ไบคาร์บอเนต ในอัตราส่วน 1:1 (น้ำหนัก/ปริมาตร) ผสมให้เข้ากัน ปรับพีเอชให้เท่ากับ 10 (สำหรับเอนไซม์สกัด) ส่วนเอนไซม์อัลคาเลส 2.4 L จะใช้สารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ พีเอช 8 ปรับพีเอชโดยใช้สารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 6 โมลาร์ หรือสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 6 โมลาร์ แล้วเติมเอนไซม์แต่ละชนิด (เอนไซม์สกัดและเอนไซม์อัลคาเลส 2.4 L) ลงไปที่ระดับ 0, 100, 200, 300, 400 และ 500 ยูนิต ส่วนชุดควบคุมจะไม่มีการเติมเอนไซม์ หลังจากนั้นนำไปย่อยสลายที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (สำหรับเอนไซม์สกัด) และ 60 องศาเซลเซียส (สำหรับเอนไซม์อัลคาเลส 2.4 L) เป็นเวลา 4 ชั่วโมงพร้อมทั้งเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที แล้วยับยั้งการย่อยสลายโดยให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำไป

หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที (อัจฉริยา เชื้อช่วยชู, 2542) นำสารละลายส่วนใสไปวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนที่ผลิตได้ และระดับการย่อยสลาย คัดเลือกชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมต่อการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากหัวกุ้งกุลาดำ โดยพิจารณาจากชุดการทดลองที่ให้ระดับการย่อยสลายและมีปริมาณไนโตรเจนที่ผลิตได้สูงสุด นำตัวอย่างของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ ความชื้น โปรตีน เถ้า และไขมัน

2.3 ศึกษาชนิดของเอนไซม์ต่อการผลิตสารสกัดจากปลาโดยใช้น้ำนึ่งปลาทูน่า

นำน้ำนึ่งปลาทูน่ามาปรับพีเอชให้เท่ากับ 8 แล้วเติมเอนไซม์ 2 ชนิด (เอนไซม์สกัดและเอนไซม์อัลคาเลส 2.4 L) ลงไปให้มีกิจกรรมของเอนไซม์เท่าๆกันคือ 300 ยูนิต นำไปย่อยสลายที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมงพร้อมทั้งเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาการย่อยสลายโดยให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมงแล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำสารสกัดจากปลาที่ได้บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน และทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้องและตั้งทิ้งไว้เพื่อให้ตกตะกอนเป็นเวลา 2 วัน หลังจากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงอีกครั้งและทำให้เข้มข้นโดยการบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน (Jantaro, 2000) นำสารละลายส่วนใสไปวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนที่ผลิตได้, ระดับการย่อยสลาย, องค์ประกอบทางเคมีได้แก่ ความชื้น โปรตีน เถ้า และไขมัน

2.4 องค์ประกอบของกรดอะมิโนในโปรตีนไฮโดรไลเสตและสารสกัดจากปลา

นำโปรตีนไฮโดรไลเสตและสารสกัดจากปลาที่ผลิตได้ บางส่วนไปทำแห้งโดยวิธี freeze dry และนำตัวอย่างไปวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดอะมิโนด้วย HPLC ที่ศูนย์เครื่องมือกลาง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

3. ศึกษาการใช้โปรตีนไฮโดรไลเสตและสารสกัดจากปลาเป็นสารดึงดูดการกินอาหารของปลากดเหลือง

3.1 การเตรียมปลากดเหลือง

นำปลากดเหลืองน้ำหนักประมาณ 1 กรัม มาอนุบาลในถังไฟเบอร์กลาสขนาด 1.2 ลูกบาศก์เมตร โดยใส่น้ำในถัง 0.3 ลูกบาศก์เมตรเมื่อลูกปลามีน้ำหนักประมาณ 8 กรัม ทำการคัดขนาดใส่ตู้ทดลองขนาด 40 x 60 x 50 เซนติเมตร ปริมาตรน้ำ 80 ลิตร จำนวน 15 ตัวต่อตู้ ปรับสภาพปลาให้คุ้นเคยกับสภาพแวดล้อมเป็นเวลา 2 สัปดาห์

3.2 การเตรียมอาหารทดลองที่มีโปรตีนไฮโดรไลเสตความเข้มข้นต่างๆ

อาหารทดลองที่ใช้ในการศึกษาความสามารถในการดึงดูดการกินอาหารของปลากดเหลือง มีทั้งหมด 10 สูตร ประกอบด้วย ดังนี้

อาหารสูตรที่ 1: อาหารชุดควบคุม (ไม่มีการเคลือบด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสต)

อาหารสูตรที่ 2: อาหารที่เคลือบด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากเครื่องในรวมปลาทูน่า 5%

อาหารสูตรที่ 3: อาหารที่เคลือบด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากเครื่องในรวมปลาทูน่า 10%

อาหารสูตรที่ 4: อาหารที่เคลือบด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากเครื่องในรวมปลาทูน่า 15%

อาหารสูตรที่ 5: อาหารที่เคลือบด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากหัวกุ้งกุลาดำ 5%

อาหารสูตรที่ 6: อาหารที่เคลือบด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากหัวกุ้งกุลาดำ 10%

อาหารสูตรที่ 7: อาหารที่เคลือบด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากหัวกุ้งกุลาดำ 15%

อาหารสูตรที่ 8: อาหารที่เคลือบด้วยสารสกัดจากปลาจากน้ำนึ่งปลาทูน่า 5%

อาหารสูตรที่ 9: อาหารที่เคลือบด้วยสารสกัดจากปลาจากน้ำนึ่งปลาทูน่า 10%

อาหารสูตรที่ 10: อาหารที่เคลือบด้วยสารสกัดจากปลาจากน้ำนึ่งปลาทูน่า 15%

การเตรียมอาหารทดลอง ทำโดยการชั่งวัสดุอาหารตามสูตรต่างๆ แล้วผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมอาหาร อัดเม็ดอาหารให้มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร ทำให้แห้งโดยการอบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส การปรับระดับโปรตีนในอาหารโดยการลดปริมาณเคซีนตามปริมาณโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ใช้เคลือบเม็ดอาหาร โดยอาหารทดลองทั้ง 10 สูตร มีถั่วเหลืองป่นและเคซีนเป็นแหล่งโปรตีนและมีการเคลือบด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากเครื่องในปลาทูน่า (จากข้อ 1) พร้อมด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากหัวกุ้งกุลาดำและสารสกัดจากปลาที่เตรียมไว้ (จากข้อ 2) ในอาหารที่ระดับความเข้มข้น 0%, 5%, 10% และ 15% (w/w) (ตารางที่ 2, 3, 4 ตามลำดับ) สำหรับอาหารสูตร ควบคุม (ที่ระดับ 0%) ใช้ถั่วเหลืองป่นและเคซีนเป็นแหล่งโปรตีนแต่ไม่มีการเคลือบด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสต การเคลือบกระทำโดยการสเปรย์โปรตีนไฮโดรไลเสตและสารสกัดจากปลาบนเม็ดอาหารและคลุกเคล้าให้ทั่ว ทำให้แห้งอีกครั้งโดยการอบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และบรรจุในถุงพลาสติกโพลีเอทธิลีนและเก็บในถุงดำเพื่อป้องกันแสง นำไปแช่แข็งเพื่อเก็บรักษาระหว่างรอการใช้งานและนำอาหารทุกสูตรวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ ความชื้น โปรตีน เถ้า ไขมันและค่าพลังงานของอาหาร

3.3 ศึกษาผลของโปรตีนไฮโดรไลเสตและสารสกัดจากปลาต่อการเจริญเติบโตและพฤติกรรมการกินอาหารของปลา

วางแผนการทดลองแบบเฟกเตอร์เรียล (Factorial design; Completely Randomized Design: CRD) เป็นแบบ 3 x 4 โดยแบ่งชุดการทดลองเป็น 3 ชุดการทดลอง ได้แก่ ชุดการทดลองที่ 1 ปลาที่ได้รับอาหารที่เคลือบด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากเครื่องในรวมปลาทูน่า ชุดการทดลองที่ 2 ปลาที่ได้รับ

อาหารที่เคลือบด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากหัวกุ้งกุลาดำ ชุดการทดลองที่ 3 ปลาที่ได้รับอาหารที่เคลือบด้วยสารสกัดจากปลาจากน้ำนึ่งปลาทูน่าและใช้ระดับความเข้มข้นของโปรตีนไฮโดรไลเสตและสารสกัดจากปลา 4 ระดับ (0, 5, 10 และ 15%) แต่ละระดับมี 3 ซ้ำ โดยใช้ปลากดเหลืองที่มีน้ำหนักเฉลี่ยประมาณ 8-9 กรัม จำนวน 15 ตัวต่อตู้ และแต่ละตู้ทดลองบรรจุน้ำปริมาตร 80 ลิตร มีการให้อากาศตลอดเวลา

3.3.1 การกินอาหารและการเจริญเติบโตของปลา

ให้ปลากินอาหารทดลองจนอิ่มโดยให้อาหารวันละ 2 ครั้งคือช่วงเช้า 09.00 น. และช่วงเย็น 16.00 น. บันทึกน้ำหนักอาหารที่ให้ปลาในแต่ละวันเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ ทำการดูดตะกอนและเปลี่ยนถ่ายน้ำทุกๆวัน และชั่งน้ำหนักปลาทุก 2 สัปดาห์โดยการชั่งน้ำหนักรวมของปลาแต่ละตู้ จากนั้นนำไปคำนวณ น้ำหนักเฉลี่ยของปลาแต่ละตัว และบันทึกจำนวนปลาที่เหลือในแต่ละตู้

ตารางที่ 2 องค์ประกอบของอาหารปลาที่เคลือบด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากเครื่องในรวมปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง (*Thunnus albacares*) ที่ความเข้มข้นต่างๆ

Table 2 Composition of diet coated with different levels of protein hydrolysate from viscera of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*)

Ingredient (g/kg of diet)	Level of protein hydrolysate			
	0%	5%	10%	15%
Casein	297	290	285	280
Soybean meal	200	200	200	200
Protein hydrolysate	-	7.31	14.62	21.93
Corn starch	300	300	300	300
Mineral mix[1]	65	65	65	65
Vitamin mix[2]	8	8	8	8
Vitamin C	1	1	1	1
Choline chloride	2	2	2	2
Fish oil	45	45	45	45
Corn oil	45	45	45	45
Cellulose	7	6.69	4.38	2.07
Carboxymethyl cellulose	30	30	30	30

[1] Mineral mix (mg/kg of diet) : calcium carbonate (40.04%Ca) 20,701.8 ; calcium phosphate (39.89%Ca, 18.50%P) 24,324.3; sodium chloride 1,800; potassium sulfate (45%K) 9,577.8; magnesium sulfate (20.20%Mg) 3,465.3; ferrous sulfate (36.77%Fe) 298.5; manganous sulfate (36.38%Mn) 14.8; zinc sulfate

(40.5%Zn) 175.8; cupric sulfate (39.81%Cu) 19.6; cobalt chloride (45.39%Co) 1.9; potassium iodide (76.45%I) 2.6; sodium selenite (45.65%Se) 17.0 (NRC, 1993)

[2] Vitamin mix (mg/kg of diet) : vitamin A (retinyl acetate) 1.89; vitamin D_3(cholecalciferol) 0.0625; vitamin E (α-tocopherol) 181.82; vitamin K_3 (menadione sodium bisulfate) 10; thiamine (thiamine HCl) 40; riboflavin 40; pyridoxine (pyridoxol HCl) 30; pantothenic acid (calcium-d-pantothenate) 120; nicotinic acid 300; biotin 0.3; folic acid 5.0; B_{12} (cyanocobalamin) 0.2; choline chloride 2,000; inositol 500 (NRC, 1993)

ตารางที่ 3 องค์ประกอบของอาหารปลาที่เคลือบด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากหัวกุ้งกุลาดำที่ความเข้มข้นต่างๆ

Table 3 Composition of diet coated with different levels of protein hydrolysate from shrimp head

Ingredient (g/kg of diet)	Level of protein hydrolysate			
	0%	5%	10%	15%
Casein	297	295	292	290
Soybean meal	200	200	200	200
Protein hydrolysate	-	3.22	6.44	9.66
Corn starch	300	300	300	300
Mineral mix[1]	65	65	65	65
Vitamin mix[2]	8	8	8	8
Vitamin C	1	1	1	1
Choline chloride	2	2	2	2
Fish oil	45	45	45	45
Corn oil	45	45	45	45
Cellulose	7	5.78	5.56	4.34
Carboxymethyl cellulose	30	30	30	30

[1] same as those in Table 2

[2] same as those in Table 2

ตารางที่ 4 องค์ประกอบของอาหารปลาที่เคลือบด้วยสารสกัดจากปลาที่ความเข้มข้นต่างๆ

Table 4 Composition of diet coated with different levels of fish extract

Ingredient (g/kg of diet)	Level of fish extract			
	0%	5%	10%	15%
Casein	297	294	292	289
Soybean meal	200	200	200	200
Protein hydrolysate	-	3.21	6.42	9.63
Corn starch	300	300	300	300
Mineral mix[1]	65	65	65	65
Vitamin mix[2]	8	8	8	8
Vitamin C	1	1	1	1
Choline chloride	2	2	2	2
Fish oil	45	45	45	45
Corn oil	45	45	45	45
Cellulose	7	6.79	5.58	5.37
Carboxymethyl cellulose	30	30	30	30

[1] same as those in Table 2

[2] same as those in Table 2

นำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณค่าต่างๆได้แก่ อัตราการรอดตาย (survival rate) เปอร์เซ็นต์น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น (% weight gain) (Halver, 1972) โดยใช้สูตร

$$\text{ปริมาณอาหารที่กิน (g/fish)} = \frac{\text{น้ำหนักอาหารที่ปลากิน (กรัม)}}{\text{จำนวนปลาที่เหลือ (ตัว)}}$$

$$\text{อัตราการรอดตาย (\%)} = \frac{\text{จำนวนปลาที่เหลือ (ตัว) X 100}}{\text{จำนวนปลาเริ่มต้น (ตัว)}}$$

$$\text{เปอร์เซ็นต์น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น} = \frac{\text{(น้ำหนักสุดท้าย (กรัม)-น้ำหนักเริ่มต้น(กรัม) X 100}}{\text{น้ำหนักปลาเริ่มต้น (กรัม)}}$$

อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate) ประสิทธิภาพการใช้อาหาร (feed efficiency ratio) ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน (protein efficiency ratio) (Ng *et al*., 2000) โดยใช้สูตร

$$\text{อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (\%/วัน)} = \frac{\text{In น้ำหนักสุดท้าย (กรัม)} - \text{In น้ำหนักเริ่มต้น (กรัม) X 100}}{\text{จำนวนวัน}}$$

$$\text{ประสิทธิภาพการใช้อาหาร} = \frac{\text{น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น (กรัม)}}{\text{น้ำหนักอาหารที่ปลากิน (กรัม)}}$$

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

อัตราการเปลี่ยนอาหารไปเป็นเนื้อ (feed conversion ratio) และโปรตีนสะสม (protein retention) (วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2536) นำข้อมูลที่ได้วิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างอาหารแต่ละสูตรโดย Duncan's multiple range test

$$\text{อัตราการเปลี่ยนอาหารไปเป็นเนื้อ} = \frac{\text{ปริมาณอาหารที่กิน (กรัม)}}{\text{น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น (กรัม)}}$$

$$\text{โปรตีนสะสมต่อวัน} = \frac{\text{โปรตีนของตัวปลาที่เพิ่มขึ้น (กรัมโปรตีนต่อกิโลกรัม)}}{\text{น้ำหนักปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (กิโลกรัม) x จำนวนวันที่ทำการทดลอง}}$$

3.3.2 การตรวจสอบความผิดปกติ

ในระหว่างการทดลองทุกวัน สังเกตลักษณะผิดปกติภายนอกได้แก่ สีของผิวหนัง ลำตัว การตกเลือด และการเกิดบาดแผลที่ผิวหนัง ครีบ อวัยวะภายนอกอื่นๆบันทึกช่วงเวลาที่สังเกตเห็นความผิดปกติ ลักษณะอาการผิดปกติ และจำนวนปลาที่มีลักษณะผิดปกติในแต่ละตู้