บทที่ 3

วิธีการทดลอง

ขั้นตอนในการดำเนินการวิจัย

การวิจัยแบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอน คือ

3.1 การเก็บตัวอย่างสาหร่ายทะเลสีน้ำตาล

3.2 ศึกษาการสกัดแอลจิเนต

3.3 ศึกษาการนำแอลจิเนตที่สกัดได้ไปใช้เป็นสารเหนียวในการทำอาหารกุ้งกุลาดำ

3.1 การเก็บตัวอย่างสาหร่ายทะเลสีน้ำตาล

ตัวอย่างที่ใช้ทดลองสกัดแอลจิเนตมี 5 สกุล คือ Chnoospora, Hydroclathrus Padina, Sargassum และ Turbinaria

สถานที่เก็บตัวอย่าง บริเวณชายฝั่งทะเลจังหวัดชลบุรี ระยอง ตราด ประจวบคีรีขันธ์ นครศรีธรรมราช พังงา และภูเก็ต

การเก็บตัวอย่างเริ่มตั้งแต่วันที่ 23 ตุลาคม 2530 ถึงวันที่ 2 พฤษภาคม 2531 ตัวอย่างสาหร่ายทะเลสีน้ำตาลที่เก็บได้จะนำมาล้างน้ำจืด ให้สะอาดแล้วตากแดดให้แห้ง เก็บรวบรวมเพื่อใช้ในการทดลองสกัดในขั้นตอนต่อไป

3.2 การสกัดแอลจิเนต

สถานที่ทดลองสกัดและวิเคราะห์คุณภาพแอลจิเนต คือ ห้องปฏิบัติการ หน่วยวิจัยไบโอพอลิเมอร์ (Biopolymer Research Unit, BRU) ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร การวิเคราะห์คุณภาพของแอลจิเนตบางส่วนมาทำที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อุปกรณ์ในการทดลอง

อุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดแอลจิเนต

- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ
- เครื่องกรองอัดความดัน
- ผ้ากรอง
- ตู้อบ

อุปกรณ์วิเคราะห์คุณภาพกรดแอลจิเนต

- เครื่องกวนสารละลายระบบแม่เหล็ก
- เครื่องวัดความหนืด Brookfield รุ่น RVTD
- เครื่องบดอาหาร
- เตาเผาอุณหภูมิสูง
- ตู้อบ

การทดลองสกัดเริ่มตั้งแต่วันที่ 18 พฤษภาคม 2530 โดยเริ่มต้นทดลองหาวิธีสกัดแอลจิเนตที่เหมาะสมสำหรับงานวิจัยนี้ โดยใช้ตัวอย่างสาหร่ายทะเลสีน้ำตาลที่ทางหน่วยวิจัยไบโอพอลิเมอร์เก็บเอาไว้

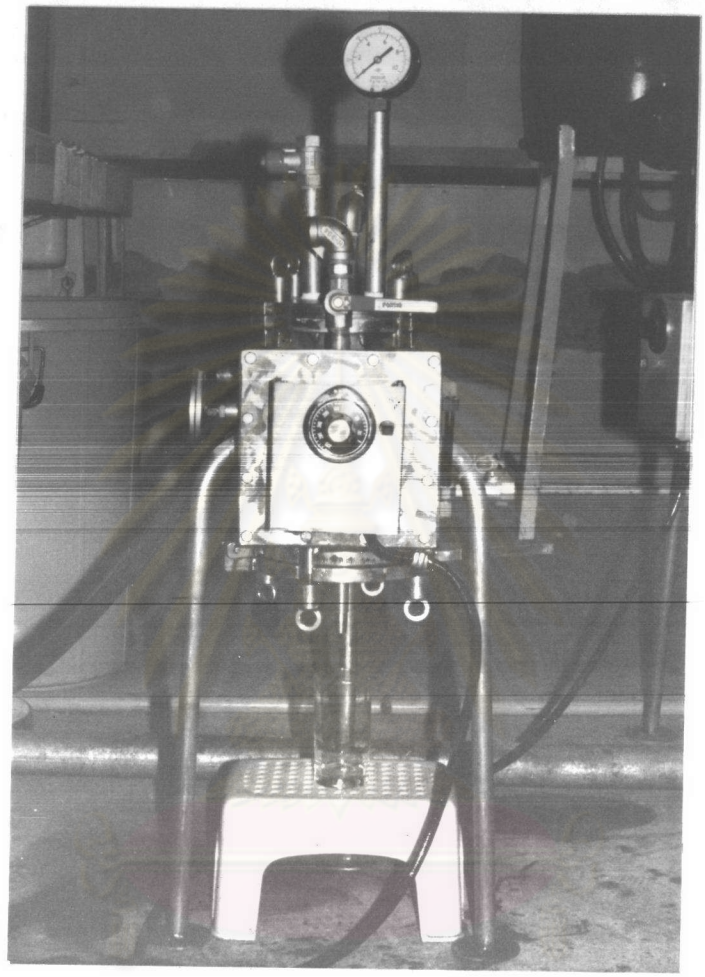
3.2.1 ศึกษาหาวิธีการสกัดที่เหมาะสมจากเอกสาร และทำการทดลองสกัดเบื้องต้นจนได้วิธีการสกัดที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการทดลองในขั้นตอนต่อไป

3.2.2 ศึกษาหาอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัดแอลจิเนตจากสาหร่ายทะเลสีน้ำตาลแต่ละสกุลด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตเข้มข้นร้อยละ 1.5 โดยตัวแปรที่จะศึกษา คือ

3.2.2.1 อุณหภูมิในการสกัด ได้แก่ อุณหภูมิห้อง, 50, 70 และ 90 องศาเซลเซียส

3.2.2.2 ระยะเวลาในการสกัด ได้แก่ 60, 90, 120 และ 150 นาที

วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลแบบ factorial completely randomized ขนาด 4^2 ทดลอง 2 ซ้ำทุก treatment combination ประเมินผลโดยการใช้ปริมาณกรดแอลจินิกที่สกัดได้ในการเปรียบเทียบ



รูปที่ 3.1 เครื่องกรองอัดความดัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2.3 ศึกษาความเข้มข้นของโซเดียมคาร์บอเนตที่เหมาะสมในการสกัดแอลจิเนตภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจากตอนที่ 3.2.2 ทดลองโดยใช้แผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design 4 ระดับ ทำ 2 ซ้ำโดยแปรความเข้มข้นของโซเดียมคาร์บอเนตในการสกัดเป็นร้อยละ 0.75 1.5, 3.0 และ 6.0 ประเมินผลโดยใช้ปริมาณกรดแอลจินิกที่สกัดได้ในการเปรียบเทียบ

3.2.4 ศึกษาผลของการใช้สารเคมีในการแช่สาหร่ายแห้งก่อนการสกัดด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองตอนที่ 3.2.3 โดยใช้สาหร่ายสกุลที่ให้ปริมาณกรดแอลจินิกมากที่สุดมาทดลอง สารเคมีที่จะศึกษา คือ

3.2.4.1 กรดเกลือและกรดกำมะถัน ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

3.2.4.2 สารละลายฟอร์มาดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.0 และ 0.4

วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลแบบ Asymmetric Factorial Design ขนาด 3x2 ทดลอง 2 ซ้ำทุก treatment combination ประเมินผลโดยใช้ปริมาณกรดแอลจินิกที่สกัดได้ในการเปรียบเทียบ

3.2.5 การวิเคราะห์คุณภาพของกรดแอลจินิกที่สกัดภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของสาหร่ายสกุลที่เหมาะสมตอนที่ 3.2.4 โดยวิเคราะห์สิ่งต่อไปนี้

3.2.5.1 ค่าความหนืด (7)

3.2.5.2 ค่าความเป็นกรด (acid value) (25)

3.2.5.3 ปริมาณเถ้า (26)

3.2.5.4 น้ำหนักที่สูญเสียขณะอบแห้งของกรดแอลจินิก (26)

3.2.5.5 ทดสอบเอกลักษณ์ (identification test) (26)

ผลจากการวิเคราะห์ทำให้ได้ข้อมูลเกี่ยวกับความบริสุทธิ์และสามารถนำไปพิจารณาคุณภาพของกรดแอลจินิกที่สกัดได้เปรียบเทียบกับระดับคุณภาพที่กำหนดทางการค้า

3.3 ศึกษาการนำแอลจิเนตที่สกัดได้ไปใช้เป็นสารเหนียวในการทำอาหารกุ้งกุลาดำ

สถานที่เตรียมอาหารกุ้งกุลาดำ คือห้องปฏิบัติการของภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และห้องปฏิบัติการของงานอาหารสัตว์น้ำ สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ การทดลองเลี้ยงกุ้งกุลาดำและทดสอบความคงตัวของอาหารกุ้งในน้ำทำที่โรงเพาะ-เลี้ยงสัตว์น้ำ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การทดลองเตรียมอาหารกุ้งกุลาดำเริ่มวันที่ 16 พฤษภาคม 2531 โดยนำวันถุดิบที่หาซื้อมาได้ผสมทำอาหารกุ้งกุลาดำ โดยใช้โซเดียมแอลจิเนตที่มีจำหน่ายในท้องตลาดมาทดลองใช้แล้วหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมส่วนผสมของอาหารกุ้งก่อนเข้าเครื่องผสมและอัดเม็ดอาหารกุ้งเพื่ออัดเป็นอาหารกุ้งชนิดเม็ดจมน้ำ การทดลองเลี้ยงกุ้งกุลาดำ เริ่มวันที่ 24 มิถุนายน 2531 ถึงวันที่ 16 กันยายน 2531 รวมเวลาทดลองเลี้ยง 12 สัปดาห์

อุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมอาหารกุ้งกุลาดำ

- เครื่องบดอาหารชนิดมีตะแกรง (pin mill)
- เครื่องร่อนอาหาร
- เครื่องบดอาหาร (blender)
- เครื่องผสมอาหาร (Kenwood)
- เครื่องกวนสารละลายระบบแม่เหล็ก (magnetic strirer)
- เครื่องผสมและอัดเม็ดอาหารกุ้ง รูปที่ 3.2
- ตู้อบ

อุปกรณ์ที่ใช้ในการเลี้ยงกุ้งและทดสอบความคงตัวของอาหารในน้ำ (34)

- บ่อเลี้ยงขนาด Ø.83 x 3.4 x Ø.47 ลูกบาศก์เมตร จำนวน 3 บ่อ แต่ละบ่อแบ่งออกเป็น 2 ส่วน โดยใช้ตาข่ายไนล่อนที่ยึดกับโครงไม้กั้นกลางบ่อ ดังรูปที่ 3.3
- หินให้อากาศ (air stone) พร้อมสายยาง
- เวอร์เนีย
- เครื่องชั่งแบบละเอียดทศนิยม 2 ตำแหน่ง
- เทอร์โมมิเตอร์
- เครื่องวัดความเค็ม
- เครื่องวัดคุณภาพน้ำ HORIBA รุ่น U-7
- สวิงสำหรับช้อนกุ้ง
- ตะแกรงอลูมิเนียม 16 ช่องต่อตารางเซนติเมตร ขนาด 6.Øx9.Øx1.5 ลูกบาศก์เซนติเมตรพร้อมฝาปิด
- ตู้อบ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 3.2 เครื่องผสมและอัดเม็ดอาหารกุ้ง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 3.3 บ่อทดลองเลี้ยงกุ้งกุลาดำ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3.1 ทดลองเตรียมอาหารกุ้งกุลาดำ โดยให้มีปริมาณโปรตีนใกล้เคียงกับปริมาณโปรตีนในอาหารกุ้งกุลาดำของบริษัทซีพีผลิตภัณฑ์อาหารจำกัดที่ได้จากการวิเคราะห์ จากนั้นคำนวณหาสูตรอาหารกุ้งกุลาดำให้มีปริมาณโปรตีนที่ต้องการจากวัตถุดิบที่มีอยู่ได้ดังที่แสดงในตารางที่ 3.1 จากนั้นนำวัตถุดิบที่จะใช้มาบดและร่อนให้มีขนาดใกล้เคียงกันก่อนที่จะนำมาผสมให้เข้ากันตามอัตราส่วนโดยเครื่องผสมอาหาร นำโซเดียมแอลจิเนตที่จำหน่ายในท้องตลาดมาละลายน้ำในอัตราส่วนร้อยละ 1.5 ของอาหารที่ต้องการแล้วนำไปผสมในส่วนผสมอื่นที่เตรียมไว้แล้วให้เข้ากันดีจากนั้นนำไปเข้าเครื่องอัดเม็ดอาหาร อัดเป็นเม็ดอาหาร ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.2 มิลลิเมตร ยาวประมาณ 0.5 ถึง 1.5 มิลลิเมตร แล้วนำไปอบที่ 55 องศาเซลเซียส นานประมาณ 8 ชั่วโมง เก็บในภาชนะที่ปิดสนิทไว้ในที่เย็น อุณหภูมิไม่ควรสูงกว่า 35 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 3.1 อัตราส่วนของส่วนประกอบอาหารกุ้งกุลาดำ 2 สูตร ที่ใช้ในการทดลอง

ส่วนประกอบอาหารคิดเป็นร้อยละ	สูตร 1 (AF)	สูตร 2 (GG)
ปลาป่นอย่างดี	27.5	27.5
ปลาหมึกป่น	10.0	10.0
หัวกุ้งแห้ง	10.0	10.0
กากถั่วเหลืองปน	20.0	20.0
รำละเอียด	25.0	26.5
น้ำมันตับปลา	3.0	3.0
เกลือแร่ - วิตามิน	2.0	2.0
โซเดียมแอลจิเนต	1.5	-
โซเดียมเฮกซาเมตาฟอสเฟต	1.0	-
กัวกัม	-	1.0
รวม	100.0	100.0

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3.2 ศึกษาหาปริมาณโซเดียมแอลจิเนตที่เหมาะสมในการเป็นสารเหนียวในอาหารกุ้งกุลาดำ ทดลองโดยใช้แผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design 4 ระดับ ทำ 2 ซ้ำโดยแปรปริมาณโซเดียมแอลจิเนตเป็น ร้อยละ 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 ประเมินผลโดยใช้ร้อยละของน้ำหนักอาหารกุ้งที่สูญเสียไปหลังจากการแช่น้ำทะเลในการเปรียบเทียบ

3.3.3 ศึกษาผลของขนาดของส่วนประกอบต่างๆในอาหารกุ้งกุลาดำต่อความคงตัวของอาหารกุ้งในน้ำทะเลทดลองโดยใช้แผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design 2 ระดับ ทำ 2 ซ้ำ โดยแปรขนาดขององค์ประกอบของอาหารที่มีขนาดใหญ่กว่า 425 μm และขนาดเล็กกว่า 425 μm ประเมินผลโดยใช้ร้อยละของน้ำหนักอาหารกุ้งที่สูญเสียไปหลังจากการแช่น้ำทะเลในการเปรียบเทียบ

3.3.4 ศึกษาผลของสารเหนียวชนิดต่างๆต่อความคงตัวของอาหารในน้ำทะเล ทดลองโดยใช้แผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design 3 ระดับ ทำ 2 ซ้ำ โดยแปรชนิดของสารเหนียวคือ โซเดียมแอลจิเนตร้อยละ 1.5 กัวกัมร้อยละ 1.0 และอาหารกุ้งของบริษัทซีพี-ผลิตภัณฑ์อาหาร จำกัด ประเมินผลโดยใช้ร้อยละของน้ำหนักอาหารกุ้งที่สูญเสียไปหลังจากการแช่น้ำทะเลในการเปรียบเทียบ

3.3.5 ศึกษาหาผลของแอลจิเนตที่ใช้เป็นสารเหนียวในอาหารกุ้งกุลาดำสูตร 1 ว่าจะมีผลต่อการเจริญของกุ้งกุลาดำอย่างไร โดยเปรียบเทียบกับอาหารกุ้งกุลาดำของบริษัทซีพีผลิตภัณฑ์อาหาร จำกัด ทดลองโดยใช้แผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design 2 ระดับ ทำ 2 ซ้ำ โดยแปรชนิดของอาหารคือ อาหารกุ้งกุลาดำสูตร 1 และอาหารกุ้งของบริษัทซีพีผลิตภัณฑ์อาหาร จำกัด ประเมินผลโดยคิดจากน้ำหนักและความยาวของกุ้งหลังจากการเลี้ยงครบ 12 สัปดาห์

เตรียมบ่อทดลอง 2 บ่อ แต่ละบ่อแบ่งออกเป็น 2 ส่วนโดยใช้ตาข่ายไนล่อนที่ยึดติดกับโครงไม้กั้นกลางบ่อเพื่อให้คุณภาพน้ำในบ่อเดียวกันเหมือนกันทั้ง 2 ส่วน ความเค็มของน้ำในบ่อเริ่มต้นเลี้ยงประมาณ 25 ส่วนในพันส่วน จากนั้นค่อย ๆ ลดความเค็มลงเรื่อย ๆ จนเหลือประมาณ 10 ส่วนในพันส่วนในสัปดาห์สุดท้ายของการเลี้ยง จากนั้นคัดขนาดของกุ้งกุลาดำที่มีขนาดใกล้เคียงกันใส่ลงในบ่อทดลองส่วนละ 100 ตัว จากนั้นจัดการให้อาหารกุ้งสูตร 1 ในส่วนที่ 1 ของทั้ง 2 บ่อ และให้อาหารของบริษัทซีพีผลิตภัณฑ์อาหาร จำกัด ในส่วนที่เหลือของทั้ง 2 บ่อ การให้อาหารวันละ 4 เวลา คือ 7.00, 11.00, 15.00 และ 19.00 น. บันทึกปริมาณอาหารที่ให้ทุกครั้งก่อนให้อาหารแต่ละครั้งสังเกตดูอาหารที่เหลืออยู่ เพื่อปรับปริมาณอาหารให้พอเหมาะไม่ให้อาหารขาดหรือเหลือมากเกินไป

การเก็บข้อมูลทุก 2 สัปดาห์ รวมระยะเวลาของการทดลองเลี้ยง 12 สัปดาห์ โดยสุ่มตัวอย่างกุ้งเพื่อวัดความยาวและชั่งน้ำหนัก ครั้งละ 20 ตัว

จากนั้นคำนวณหาอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (Food Conversion Ratio) หาจากสูตร

$$\text{Food Conversion Ratio} = \frac{F}{W_t - W}$$

F = ปริมาณอาหารที่ให้กุ้งทั้งหมดตลอดการทดลอง (กรัม)

W = น้ำหนักกุ้งรวมเมื่อเริ่มการทดลอง (กรัม)

W_t = น้ำหนักกุ้งรวมเมื่อเสร็จสิ้นการทดลอง (กรัม)

หลังจากที่จัดเตรียมกุ้งสำหรับการทดลองข้างต้นแล้วพบว่ายังมีกุ้งกุลาดำเหลืออยู่อีกประมาณ 300 ตัว ซึ่งมีขนาดแตกต่างกันมาก จึงเตรียมบ่อเพิ่มอีก 1 บ่อแล้วแบ่งออกเป็น 2 ส่วนเช่นเดียวกัน จากนั้นแบ่งกุ้งออกเป็น 2 ขนาด คือขนาดใหญ่และขนาดเล็ก ขนาดละ 150 ตัว ใส่ในแต่ละส่วนของบ่อ แล้วทดลองเลี้ยงด้วยอาหารกุ้งกุลาดำสูตร 2 ทั้ง 2 ส่วน และทำการทดลองเช่นเดียวกับอาหารกุ้งสูตร 1 และอาหารของบริษัทซีพีผลิตภัณฑ์อาหาร จำกัด ผลที่ได้จะนำมาวิเคราะห์เปรียบเทียบทางสถิติกับอาหารสูตรที่ 1 และอาหารของบริษัทซีพีผลิตภัณฑ์อาหาร จำกัด ทางด้านน้ำหนักและความยาวของกุ้งกุลาดำโดยวิธีการวิเคราะห์แบบโควาเรียนซ์ (analysis of covariance) และวิเคราะห์เปรียบเทียบอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อและอัตราการตายของอาหารกุ้งกุลาดำทั้ง 3 ชนิด โดยวิธี Completely Randomized Design

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย