บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การศึกษาเรื่องอัตราส่วนโปรตีนต่อพลังงานที่เหมาะสมในอาหารกุ้งกุลาดำวัยรุ่นครั้งนี้แบ่งการทดลองเป็น 2 การทดลองดังนี้

1. **การทดลองที่** 1 <u>การศึกษาระดับไขมันต่อคาร์โบไฮเดรตที่เหมาะสมในอาหารเพื่อการเจริญเติบโตและการรอดของกุ้งกุลาดำวัยรุ่น (optimal lipid and carbohydrate level for growth and survival)</u>

การทดลองนี้จัดทำเพื่อต้องการทราบระดับไขมันและคาร์โบไฮเดรตที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำวัยรุ่น โดยให้ระดับโปรตีนและพลังงานคงที่ในทุกสูตรอาหาร โดยปรับระดับไขมันและคาร์โบไฮเดรตตามความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของกุ้งดังที่มีการรายงานไว้ (มะลิ บุณยรัตผลิน, 2531; Sick and Andrews, 1973; Deshimaru and Kuroki, 1974; Tacon, 1990; Akiyama *et al.*, 1992 และ Cuzon, Guillaume and Cahu, 1994) ระดับโปรตีนที่ใช้คงที่ที่ระดับ 35 เปอร์เซนต์ ซึ่งเป็นระดับที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต (คณิต ไชยาคำ และ บุญส่ง สิริกุล, 2533; Colvin, 1976; New, 1976; Colvin and Brand, 1977 และ Lin *et al.*, 1982) ปรับระดับไขมันต่อคาร์โบไฮเดรตในอาหารด้วยปริมาณ 4:38.5, 7:31.75, 10:25, 13:18.25 และ 16:11.5 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 1) เพื่อให้มีระดับพลังงานในอาหารคงที่ที่ 330 kcal/100g ระยะเวลาทดลอง 30 วัน โดยแต่ละตู้ทดลองเลี้ยงกุ้ง 15 ตัวต่อตู้ วางแผนการทดลองในการเลี้ยงแบบ completely randomized design ทำการทดลอง 3 ซ้ำ จัดชุดการทดลองและซ้ำโดยการสุ่ม ระยะเวลาในการทดลอง 30 วัน บันทึกอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะและอัตรารอดทุก 2 สัปดาห์ เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

2. การทดลองที่ 2 <u>การศึกษาอัตราส่วนโปรตีนต่อพลังงานที่เหมาะสมเพื่อการเจริญเติบโตและการรอดของกุ้งกุลาดำวัยรุ่น (optimal protein energy ratio for growth and survival)</u>

การศึกษาครั้งนี้ต้องการทราบถึงอัตราส่วนโปรตีนต่อพลังงานที่เหมาะสมในอาหารกุ้งกุลาดำวัยรุ่นโดยการเปลี่ยนแปลงระดับโปรตีนและพลังงานในอาหาร ระดับโปรตีนที่ใช้ในอาหารมี 5 ระดับ คือ 25, 30, 35, 40 และ 45 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ ปรับระดับพลังงานและอัตราส่วนโปรตีนต่อพลังงานในอาหารให้แตกต่างกันโดยการใช้อัตราส่วนไขมันต่อคาร์โบไฮเดรต 1:4.5 (w/w) ซึ่งเป็นอัตราส่วนไขมันต่อคาร์โบไฮเดรตที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองที่ 1 โดยนำมาเปลี่ยนแปลงระดับไขมันต่อคาร์โบไฮเดรต 3 ระดับ คือ 3:13.6, 7:31.7 และ11:49.8 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 2) ระยะเวลาทดลอง 45 วัน บันทึกอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะและอัตรารอดทุก 2 สัปดาห์ การวางแผนการทดลอง วิธีการจัดชุดทดลอง การเปรียบเทียบความแตกต่าง รวมทั้งการเก็บบันทึกข้อมูล เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

อุปกรณ์และการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ

1. สถานที่ทดลอง

ทำการทดลองเลี้ยงกุ้ง ณ ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ผลิตอาหารและวิเคราะห์อาหารในห้องปฏิบัติเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล (biochemical nutrition lab) ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. สัตว์ทดลอง

การศึกษาครั้งนี้ใช้กุ้งกุลาดำวัยรุ่น น้ำหนักเฉลี่ย 0.4-0.5 กรัม ความยาวเฉลี่ย 4-5 เซนติเมตร ในการทดลองที่ 1 และใช้กุ้งน้ำหนักเฉลี่ย 0.4-0.8 กรัม ความยาวเฉลี่ย 4-5.5 เซนติเมตร ในการทดลองที่ 2 ก่อนการทดลองนำมาปรับสภาพความเค็มและ

ความคุ้นเคยต่ออาหารทดลองเป็นเวลา 15 วัน ในถังไฟเบอร์ขนาดความจุน้ำ 1000 ลิตร ที่ความเค็ม 23 ppt ให้อาหารวันละ 4 มื้อ (08.00, 12.00, 16.00 และ 20.00 น.)

3. วิธีการเลี้ยง

ทำการทดลองเลี้ยงที่ระดับความเค็ม 23-25 ppt อุณหภูมิน้ำระหว่าง 26.5-27.5 องศาเซลเซียส ในตู้ทดลอง (กระจก) ขนาด 30×60×30 ลูกบาศก์เซนติเมตร โดยจุน้ำที่ใช้เลี้ยง 30 ลิตร และเลี้ยงที่ความหนาแน่นประมาณ 15 ตัว/ตู้ (40 ตัว/ตารางเมตร) จัดระบบการเลี้ยงเป็นแบบกึ่งปิด (semi-closed recirculating water system) โดยใช้อากาศดันน้ำผ่านระบบกรองขนาดเล็กที่ติดตั้งไว้ภายในระบบเลี้ยง โดยดูดเศษตะกอนที่เหลือพร้อมเปลี่ยนน้ำประมาณ 50 เปอร์เซนต์ โดยปริมาตร (ถ่ายน้ำประมาณเวลา 10.00 น.) แล้วนำใยกรองสังเคราะห์มาล้างน้ำให้สะอาดผึ่งแดดให้แห้งแล้วจึงนำไปใช้ใหม่

น้ำทะเลที่ใช้ในการทดลองเป็นน้ำจากนาเกลือเข้มข้นที่ความเค็มประมาณ 90-100 ppt ผสมน้ำจืดเพื่อปรับความเค็มให้ได้ 23 ppt ซึ่งเป็นระดับความเค็มที่กุ้งมีการเจริญเติบโตดีที่สุด (Cheng and Laio, 1986) ทำการฆ่าเชื้อด้วย calcium hypochloride ($Ca(OCl)_2$) ที่ความเข้มข้น 20 ppm พักน้ำไว้ในบ่อประมาณ 1 คืน ให้อากาศตลอดเวลาเพื่อรักษาสมดุลของออกซิเจนที่ละลายในน้ำให้สูงแล้วจึงนำมากรองผ่านถุงกรองขนาดตาถี่ 5 ไมครอน เพื่อขจัดสิ่งแปลกปลอมขนาดใหญ่ก่อนนำไปใช้เลี้ยงกุ้ง

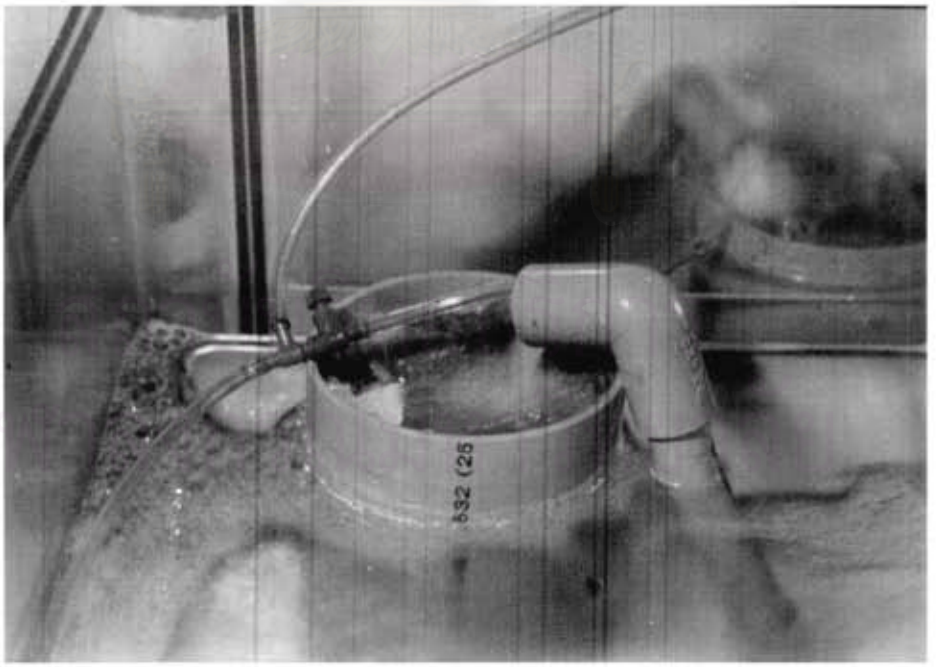
4. ระบบกรอง

ระบบกรองที่ใช้ดัดแปลงจากวิธีของ Spotte (1979) โดยใช้ท่อพีวีซีเส้นผ่าศูนย์กลาง 4 นิ้ว สูงประมาณ 20 เซนติเมตร ใช้ระบบ air lift โดยใช้อากาศดันน้ำเข้าสู่ระบบกรองผ่านท่อรูปตัวแอล ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 นิ้ว บริเวณท่อรูปตัวแอลเจาะรูขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.3 เซนติเมตร รอบท่อจำนวน 50-55 รู วางท่อรูปตัวแอลไปตามแนวทะแยงจนสุดมุมตู้ด้านตรงข้ามเพื่อจะดึงน้ำที่อยู่ในระยะไกลเข้าสู่ระบบกรองและทำให้มีการผสมของมวลน้ำภายในตู้เป็นมวลเดียวกันทำให้น้ำในตู้มีคุณภาพดีขึ้น ภายในระบบกรองประกอบด้วยวัสดุ ดังนี้ ทรายละเอียด กรวด หิน เปลือกหอยนางรม และใยกรองสังเคราะห์

(เรียงจากชั้นล่างสู่ชั้นบน, รูปที่ 2) ทำการล้างระบบกรองพร้อมเปลี่ยนใยกรองสังเคราะห์ใหม่ทุก 3 วัน

5. อาหารทดลองและวิธีการให้อาหาร

อาหารที่ใช้ในการทดลองเป็นอาหารแบบกึ่งบริสุทธิ์ (semi-purified diet) ดัดแปลงจากสูตรของ Kanazawa, Teshima and Tokiwa (1977) และ Shiau and Chou (1991) ส่วนประกอบในอาหารที่ใช้ในการทดลองที่ 1 และ 2 แสดงในตารางที่ 1 และ 2 ตามลำดับ ค่ามาตรฐานของคาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมันที่ใช้ในการคำนวณค่าพลังงานในอาหาร (standard physiological values) เท่ากับ 4, 4 และ 9 kcal/g ตามลำดับ (Halver, 1976) ให้อาหารกุ้งทดลองวันละ 4 เวลา (8.00, 12.00, 16.00 และ 20.00 น.) ทั้ง 3 การทดลองโดยให้แบบจำกัดอาหารที่ 5 เปอร์เซนต์ ของน้ำหนักตัวต่อวันทุกชุดการทดลอง



รูปที่ 2. ระบบกรองที่ใช้ในการทดลอง

6. วิธีการผลิตอาหาร

1) ผลิตอาหารก่อนเริ่มการทดลอง โดยชั่งน้ำหนักวัตถุดิบอาหารต่าง ๆ ตามปริมาณที่แสดงไว้ในตารางที่ 1 และ 2 และนำมาผสมให้เข้ากัน ยกเว้นน้ำมันปลาซึ่งนำมาผสมภายหลัง

2) นำน้ำมันปลาที่ชั่งไว้มาผสมกับวัตถุดิบที่เตรียมไว้ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมอาหาร (blender, National รุ่น MX-T2GN) เพื่อให้วัตถุดิบทุกอย่างผสมเป็นเนื้อเดียวกันเสร็จแล้วฉีดน้ำกลั่นเพื่อทำให้อาหารจับตัวกันดีขึ้น

3) นำอาหารผสมแล้วไปอบในตู้อบไอน้ำที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อทำให้แป้งแปรสภาพเป็นวุ้นซึ่งทำหน้าที่เป็นสารเหนียว (binder)

4) นำไปอัดเม็ดขนาด 0.1-0.2 มิลลิเมตร โดยใช้เครื่อง meat mincer porkert

5) นำอาหารอัดเม็ดที่ได้ไปอบในตู้อบความร้อน (oven) ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

6) ทำอาหารให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วเก็บอาหารไว้ในภาชนะที่ปิดสนิทภายใต้บรรยากาศก๊าซไนโตรเจน เก็บรักษาอาหารโดยแช่เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกระทั่งนำออกมาใช้เลี้ยงกุ้ง

7) วิเคราะห์คุณค่าทางอาหารได้แก่ ปริมาณโปรตีน ปริมาณไขมัน ปริมาณเถ้า ปริมาณเยื่อใย และปริมาณความชื้น ด้วยวิธีของ AOAC (1990) รายละเอียดการวิเคราะห์คุณค่าทางอาหารแสดงในภาคผนวก ค

7. การเก็บรวบรวมข้อมูล

บันทึกอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะโดยชั่งน้ำหนักกุ้ง (กรัม) ด้วยเครื่องชั่งแบบละเอียด (Precisa รุ่น 200A) และวัดความยาวเหยียด (เซนติเมตร) ทุก 2 สัปดาห์เพื่อที่จะนำค่ามาคำนวณตามสูตรที่ 1 และ 2 อัตรารอดของกุ้งกุลาดำวัยรุ่นเป็นเปอร์เซนต์ (สูตรที่ 3) ตรวจสอบคุณภาพน้ำในระหว่างการทดลองทุกสัปดาห์ โดยตรวจสอบปริมาณแอมโมเนียและปริมาณไนเตรทตามวิธีของ Strickland and Pearsons (1977) วัดความเค็มด้วยเครื่อง

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Refractometer (S/Mill ATAGO Co., Ltd. Japan) วัดความเป็นกรด-ด่าง ด้วยเครื่อง pH meter (pH Scan 3 Eutech Cybernetics Co., Ltd. Singapore) วัดอุณหภูมิ และปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (YSI รุ่น 57)

อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะโดยน้ำหนัก (%) = $\frac{Ln(Wt2) - Ln(Wt1)}{t2-t1} \times 100$ .....(1)

โดย Wt1 = น้ำหนักกุ้งเมื่อเริ่มทดลอง (กรัม)

Wt2 = น้ำหนักกุ้งเมื่อสิ้นสุดทดลอง (กรัม)

t1 = เวลาที่เริ่มทดลอง (วัน)

t2 = เวลาที่สิ้นสุดการทดลอง (วัน)

อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะโดยความยาวเหยียด (%) = $\frac{Ln(Lt2) - Ln(Lt1)}{t2-t1} \times 100$ .....(2)

โดย Lt1 = ความยาวเหยียดกุ้งเมื่อเริ่มทดลอง (เซนติเมตร)

Lt2 = ความยาวเหยียดกุ้งเมื่อสิ้นสุดทดลอง (เซนติเมตร)

t1 = เวลาที่เริ่มทดลอง (วัน)

t2 = เวลาที่สิ้นสุดการทดลอง (วัน)

อัตรารอด (%) = $\frac{N2}{N1} \times 100$ .....(3)

โดย N1 = จำนวนกุ้งเมื่อเริ่มการทดลอง (ตัว)

N2 = จำนวนกุ้งเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (ตัว)

8. การวิเคราะห์ข้อมูล

1. การทดลองที่ 1 วิเคราะห์ผลของระดับไขมันต่อคาร์โบไฮเดรตที่เหมาะสมในอาหารต่ออัตราการเจริญเติบโตจำเพาะโดยน้ำหนัก โดยความยาวเหยียด และอัตรารอด โดยวิธีวิเคราะห์ Analysis of variance และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับนัยสำคัญ 5 เปอร์เซนต์

2. การทดลองที่ 2 วิเคราะห์ผลของอัตราส่วนโปรตีนต่อพลังงานที่เหมาะสมในอาหารต่ออัตราการเจริญเติบโตจำเพาะโดยน้ำหนัก โดยความยาวเหยียด และอัตรารอด โดยวิธีวิเคราะห์ Analysis of variance และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับนัยสำคัญ 5 เปอร์เซนต์ หาอัตราส่วนโปรตีนต่อพลังงานที่เหมาะสมในอาหารต่อการเจริญเติบโตจำเพาะโดยน้ำหนัก โดยความยาวเหยียด และอัตรารอด โดยวิธี Regression analysis

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1. ส่วนประกอบ (%) ของอาหารกุ้งกุลาดำวัยรุ่นที่ใช้ในการทดลองที่ 1

ส่วนประกอบ	สูตร 1	สูตร 2	สูตร 3	สูตร 4	สูตร 5
ไขมัน:คาร์โบไฮเดรต	4:39	7:32	10:25	13:19	16:12
เคซีน[1]	35.00	35.00	35.00	35.00	35.00
แป้งข้าวโพด[2]	38.50	31.75	25.00	18.25	11.50
SRFO[3]	3.00	6.00	9.00	12.00	15.00
น้ำมันปลาหมึก	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
แร่ธาตุรวม[4]	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
วิตามินรวม[5]	1.73	1.73	1.73	1.73	1.73
วิตามินซี[6]	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
แอสต้าแซนทีน[7]	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
เลซิทีน[8]	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
คอเลสเทอรอล[9]	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Aquabind®[10]	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
เซลลูโลส[11]	16.23	19.98	23.73	27.48	31.23
รวม	100	100	100	100	100
พลังงานรวม (kcal/100g)	330.00	330.00	330.00	330.00	330.00

[1] Casein, Laboratory Grade ผลิตภัณฑ์ของ Sigma Co.,Ltd.

[2] Corn strach, Laboratory Grade ผลิตภัณฑ์ของ Sigma Co.,Ltd. [3] น้ำมันปลา (Semi refined fish oil)

[4] mineral mix 100 g ประกอบด้วย : K_2HPO_4, 2.0 g; $Ca_3(PO_4)_2$,2.720 g; $MgSO_4.7H_2O$,3.041 g; $NaH_2PO_4.2H_2O$,0.790 g.

[5] vitamin mix 100 g ประกอบด้วย : p-Aminobenzoic acid, 10.0 mg; Biotin, 0.40 mg; Inositol, 400.0 mg; Nicotinic acid, 40.0 mg; Ca-Pantothenate, 60.0 mg; Pyridoxine-HCl, 12.0 mg; Riboflavin, 8.0 mg; Thiamine-HCl, 4.0 mg; Menadione, 4.0 mg; α-Tocopherol, 20.0 mg; Cyanocobalamine, 0.08 mg; Calciferol, 1.20 mg; Folic acid, 0.80 mg; Choline chloride, 120.0 mg; รวม 2480.48 mg

[6] STAY C-25® (L-Ascorbylpolyphosphat-proparat) 25% active เท่ากับ 200 ppm ,ผลิตภัณฑ์ของ Roche Co.,Ltd.

[7] CHLOROPHYLL PINK® astaxanthin 8% เท่ากับ 200 ppm ,ผลิตภัณฑ์ของ Roche Co.,Ltd. [8] Feed Grade

[9] 95% Cholesterol, Laboratory Grade ผลิตภัณฑ์ของ Sigma Co.,Ltd.

[10] Aquabind® ผลิตภัณฑ์ของDupon Co.,Ltd. [11] α-Cellulose, Laboratory Grade ผลิตภัณฑ์ของ Sigma Co.,Ltd.

ตารางที่ 2. ส่วนประกอบ (%) ของอาหารกุ้งกุลาดำวัยรุ่นที่ใช้ในการทดลองที่ 2

	สูตรอาหาร								
ส่วนประกอบ[1]	6	7	8	9	10	11	12	13	14
โปรตีน/พลังงาน[2]	148	157	171	86	108	121	63	80	87
เคซีน	30.00	35.00	45.00	25.00	35.00	45.00	25.00	33.85	36.90
แป้งข้าวโพด	13.61	13.61	13.61	31.75	31.75	31.75	49.89	48.25	46.02
SRFO	2.00	2.00	2.00	6.00	6.00	6.00	10.00	9.64	9.15
น้ำมันปลาหมึก	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.97	0.92
แร่ธาตุรวม	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	1.93	1.85
วิตามินรวม	1.73	1.73	1.73	1.73	1.73	1.73	1.73	1.67	1.60
วิตามินซี	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
แอสต้าแซนทีน	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
เลซิทีน	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.48	0.46
คอเลสเทอรอล	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.48	0.46
Aquabind®	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.45	1.38
เซลลูโลส	47.12	42.12	32.12	29.98	19.98	9.98	7.84	1.24	1.22
รวม	100	100	100	100	100	100	100	100	100
พลังงานรวม (kcal/100g)	203	223	263	291	331	371	399	439	459

[1] ส่วนประกอบที่ใช้และแหล่งที่มาตามตารางที่ 1

[2] อัตราส่วนโปรตีนต่อพลังงาน (mg protein/kcal)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย