

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษาการใช้ประโยชน์กากเนื้อเมล็ดในปาล์มน้ำมันที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ในอาหารปลาโอมง ได้ดำเนินการทดลอง และศึกษาวิจัย ดังต่อไปนี้

#### 3.1. อุปกรณ์และสารเคมี

##### 3.1.1. อุปกรณ์/ วัสดุ

1. สัตว์ทดลอง ปลาโอมง (*Pangasius bocourti*) ขนาด 2 นิ้ว นำมาจากสถานีเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืด จังหวัดพะเยา จำนวน 1,000 ตัว
2. วัตถุดิบอาหารปลา ได้แก่ ข้าวโพดป่น, มันเส้น, กากถั่วเหลือง, ปลาป่น, กากเนื้อเมล็ดในปาล์มน้ำมัน, Dicalcium phosphate, ฟอสฟอรัส, น้ำมันปาล์ม, Novozyme VP (1.2 g/kg)

##### 3.1.2. อุปกรณ์/เครื่องมือ

1. อุปกรณ์การเลี้ยง
  - กระชังปลาชั้นนอก 2 x 2 x 1.5 เมตร
  - กระชังปลาชั้นใน 1.5 x 1.5 x 1.0 เมตร
  - กะละมัง และ สวิงตักปลา
2. อุปกรณ์ในการเตรียมอาหาร
  - เครื่องอัดเม็ดอาหารแบบมินเซอร์ (Mincer)
  - เครื่องชั่งน้ำหนัก 12 กิโลกรัม
  - เครื่องบดวัตถุดิบอาหาร (Harmers mill)
  - เครื่องชั่งไฟฟ้าจุดทศนิยม 3 ตำแหน่ง
  - ตู้อบอาหาร ถาดใส่อาหารสำหรับอบ และตะแกรงติดมุ้งฟ้าสำหรับผึ่งอาหารกลางแจ้ง
  - กะละมัง โหลใส่อาหาร และช้อนตักวัตถุดิบ
3. อุปกรณ์ตรวจวัดการเจริญเติบโต
  - เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 3 ตำแหน่ง
  - ไม้บรรทัด กะละมัง และสวิงตักปลา
4. เครื่องมือในห้องปฏิบัติการ
  - ชุดเครื่องมือผ่าตัดปลา

- เครื่องชั่งแบบจุดทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Analytical balance)
  - เครื่องมือวิเคราะห์โปรตีนในอาหาร
  - เครื่องมือวิเคราะห์ความชื้น (Moisture)
  - เครื่องมือวิเคราะห์เถ้า (Ash)
  - เครื่องมือวิเคราะห์ไขมัน (% Fat)
  - เครื่องมือวิเคราะห์ค่าพลังงานรวมในอาหาร (Bomb calorimeter)
  - เครื่องวิเคราะห์หาปริมาณเยื่อใย
  - ตู้อบความร้อน (Drying oven)
  - เตาเผาความร้อนสูง (Muffle furnace)
  - Crucible ที่มีขนาด filter ประมาณ 40 – 90 microns
5. เครื่องมือการตรวจวัดคุณภาพน้ำ
- เครื่องมือตรวจสอบคุณภาพน้ำ เช่น pH meter ตรวจวัดค่า pH, อุณหภูมิ, ความขุ่น และการนำไฟฟ้า

### 3.1.3. สารเคมี

1. กรดซัลฟูริก ( $H_2SO_4$ ) เข้มข้น 1.25 %
2. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เข้มข้น 1.25 %
3. Antifoam agents (n - Otanal)
4. Acetone
5. Acetic acid
6. Sodium acetate
7. ยาปฏิชีวนะ Ketoconazole และ Amoxicillin
8. เอนไซม์เซลลูเลส

## 3.2. วิธีการศึกษาวิจัย

### 3.2.1. แผนการทดลอง

การศึกษาประสิทธิภาพการเจริญเติบโตและอัตราการรอดตายของปลาโมงที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมเอนไซม์ย่อยเยื่อใยในระดับที่ต่างกัน วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD) แบ่งออกเป็น 5 ชุดการทดลอง (treatments) ตามสูตรอาหารทดลอง (ตารางที่ 3) ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ (replications) รวม 15 หน่วยการทดลอง (experimental units) กำหนดให้

- ชุดการทดลองที่ 1 อาหารผสมกากเนื้อเมล็ดในปาล์มน้ำมันที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ 0%
- ชุดการทดลองที่ 2 อาหารผสมกากเนื้อเมล็ดในปาล์มน้ำมันที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ 10%
- ชุดการทดลองที่ 3 อาหารผสมกากเนื้อเมล็ดในปาล์มน้ำมันที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ 20%
- ชุดการทดลองที่ 4 อาหารผสมกากเนื้อเมล็ดในปาล์มน้ำมันที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ 30%
- ชุดการทดลองที่ 5 อาหารผสมกากเนื้อเมล็ดในปาล์มน้ำมันที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ 40%

ตารางที่ 3 สูตรอาหารที่ใช้ในการทดลอง

วัตถุดิบอาหารสัตว์	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>4</sub>	T <sub>5</sub>
	0%	10%	20%	30%	40%
ข้าวโพด	0.90	0.68	0.50	0.20	0.10
มันสำปะหลัง	1.23	0.94	0.61	0.54	0.24
กากถั่วเหลือง	1.16	1.08	1.00	0.59	0.30
ปลาป่น	1.56	1.54	1.51	1.73	1.84
กากปาล์ม	0.00	0.50	1.00	1.50	2.00
Dicalcium phosphate	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
พรีมิกซ์*	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
น้ำมันปาล์ม	0.05	0.17	0.28	0.34	0.42
Ronozyme VP (1.2 g/kg palm) (g)	0.00	0.60	1.20	1.80	2.40
รวม (kg)	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
<b>คุณค่าทางโภชนา (คำนวณ)</b>					
โปรตีนรวม (ร้อยละ)	32.00	32.00	32.01	32.00	32.00
พลังงานรวม (kcal/kg.)	3000.54	3000.64	3000.83	3000.55	2999.04

\* ส่วนประกอบต่ออาหาร 100 กิโลกรัม: vitamin A 1,500,000 IU; vitamin D<sub>3</sub> 300,000 IU; vitamin E 2,500 IU ; vitamin K<sub>3</sub> 50 g; vitamin B<sub>1</sub> 0.25 g; vitamin B<sub>2</sub> 0.7 g; vitamin B<sub>6</sub> 0.45 g; vitamin B<sub>12</sub> 2.5 mg; pantothenic acid 3.5 g; nicotinic acid 3.5 g; choline chloride 25 g; biotin 2.5 mg; Cu 0.16 g; folic acid 50 mg; Mn 6 g; Se 15 mg; Fe 8 g; I 40 mg และ Zn 4.5g.

### 3.2.2. การเตรียมการทดลอง

#### 1. การเตรียมอุปกรณ์การทดลอง

กระชังที่ใช้ ขนาด  $2 \times 2 \times 1.5$  เมตร เป็นกระชังตาใหญ่สำหรับกันปลาขนาดใหญ่ชนิดอื่นเข้ามารบกวน และมีกระชังขนาด  $1.5 \times 1.5 \times 1.2$  เมตร ที่ทำด้วยตาข่ายมุ้งฟ้ามาครอบสวมทับอีกชั้นหนึ่ง จำนวน 15 กระชัง ที่มีระดับน้ำลึก 1.4 เมตร

#### 2. การเตรียมปลาทดลอง

นำปลาโมงจำนวน 1,000 ตัว มาเลี้ยงในกระชังขนาด  $2.5 \times 2.5 \times 1.2$  เมตร สำหรับพักปลาเป็นเวลา 3 สัปดาห์ (ในระหว่างการเตรียมอุปกรณ์) ให้ลูกปลาได้ปรับตัวกับสภาพแวดล้อม และให้กินอาหารปลาคูกเม็ดจมน้ำขนาดเล็ก วันละ 2 ครั้ง คือเวลา 08.00 น. และ 17.00 น. และให้อาหารกึ่งเม็ดเล็ก เพื่อฝึกให้ปลากินอาหารเม็ดจมน้ำก่อนเริ่มการทดลอง 3 วัน (ศิริณี และธีระชัย, 2548)

#### ขั้นตอนการทำอาหาร (เวียง, 2543)

2.1. นำวัตถุดิบต่างๆ มาบดให้ละเอียด

2.2. ชั่งวัตถุดิบตามสูตรที่ได้จากการคำนวณ

2.3. นำวัตถุดิบที่มีปริมาณมากเทใส่กะละมัง ตามด้วยวัตถุดิบปริมาณน้อยตามลำดับ จากนั้นผสมให้เข้ากัน

2.4. แล้วปรับความชื้น 1.75 กิโลกรัม และ 2.00 กิโลกรัม โดยใส่น้ำลงในวัตถุดิบที่ผสมเข้ากันดีแล้ว แล้วคลุกเคล้าให้เข้ากัน

2.5. นำไปบดด้วยเครื่องบดอาหารเม็ดจมน้ำแบบมินเซอร์ (Mincer)

2.6. นำอาหารที่ผ่านการบดเข้าเครื่องอบอาหาร หรือนำไปผึ่งแดดให้แห้งโดยใช้เวลาประมาณ 2 วัน

2.7. บรรจุใส่ถุง ปิดปากถุงให้สนิท เก็บไว้ในที่แห้งและไม่โดนแสง

#### 3. การทดลอง

3.1. ทำการทดลองในบ่อดินขนาด 1 ไร่

3.2. นำกระชังขนาด  $1.5 \times 1.5 \times 1.2$  เมตร สวมครอบกระชังตาใหญ่ภายในแพโครงเหล็ก แล้วทำให้กันกระชังจมน้ำ

3.3. คัดปลาโมงจำนวน 300 ตัว มาเลี้ยงในกระชังขนาด  $1.5 \times 1.5 \times 1.2$  เมตร จำนวน 15 ใบ เป็นเวลา 1 สัปดาห์ เพื่อให้ลูกปลาได้ปรับตัวกับสภาพแวดล้อมพร้อมทั้งฝึกให้กินอาหารเม็ดจมน้ำตามสูตรอาหารที่ 1-5 ในชุดการทดลอง (Treatments) วันละ 2 ครั้ง คือเวลา 08.00 น. และ 17.00 น. โดย

เริ่มต้นจากการชั่งน้ำหนักปลาเฉลี่ย 80-81 กรัม ให้ได้จำนวน 20 ตัว/กระชัง พร้อมทั้งสุ่มวัดขนาดไซค์ปลา แล้วนำไปปล่อยในแต่ละหน่วยการทดลอง (ศิริณี และธีระชัย, 2548)

3.4. ให้อาหารที่เตรียมไว้ 3 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักตัว วันละ 2 ครั้ง คือ 8.00 น. และ 17.00 น.

3.5. ตรวจสอบคุณภาพน้ำสัปดาห์ละครั้ง และชั่งวัดตัวปลา ทุก 2 สัปดาห์ (ธีระชัย และคณะ, 2551)

#### 4. การรวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูล

##### 4.1 การเก็บรวบรวมข้อมูลค่าประสิทธิภาพการเจริญเติบโต (ธีระชัย และคณะ, 2551)

###### 4.1.1 น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น

$$= \text{น้ำหนักปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง} - \text{น้ำหนักปลาเริ่มต้น}$$

###### 4.1.2 ความยาวที่เพิ่มขึ้น

$$= \text{ความยาวปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง} - \text{ความยาวปลาเริ่มต้น}$$

###### 4.1.3 อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Average daily weight gain, ADG; กรัม/วัน)

$$= \frac{\text{น้ำหนักปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง} - \text{น้ำหนักปลาเริ่มต้น}}{\text{ระยะเวลาทดลอง}}$$

###### 4.1.4 ประสิทธิภาพของอาหาร (feed efficiency ratio, FER)

$$= \frac{\text{น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น}}{\text{น้ำหนักอาหารที่ปลากิน}}$$

###### 4.1.5 อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (feed conversion ratio, FCR)

$$= \frac{\text{ปริมาณอาหารที่ปลากิน}}{\text{น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น}}$$

4.1.6 อัตราการรอดตาย (survival rate) หน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์

$$= \frac{\text{จำนวนปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง}}{\text{จำนวนปลาเริ่มต้น}} \times 100$$

4.1.7 ประสิทธิภาพของโปรตีนในอาหาร (protein efficiency ratio, PER)

$$= \frac{\text{น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น}}{\text{น้ำหนักโปรตีนที่ปลากิน}}$$

4.2 การวิเคราะห์ทางด้านคุณภาพซาก (Carcass quality)

4.2.1 ค่าดัชนีความสัมพันธ์ของตับ (hepatosomatic index, HIS) (ณัฐพงษ์ และคณะ, 2546)

$$= \frac{\text{น้ำหนักตับ}}{\text{น้ำหนักปลา}} \times 100$$

4.2.2 สัดส่วนของไขมันในช่องท้อง (intraperitoneal fat ratio: %) (Yang *et al.*, 2002)

$$= \frac{\text{น้ำหนักของไขมันในช่องท้อง}}{\text{น้ำหนักปลาทั้งตัว}} \times 100$$

4.2.3 ค่าสัดส่วนร้อยละของซาก (% Yield) (Mireille *et al.*, 2001)

$$= \frac{\text{น้ำหนักของปลาทั้งตัว} - \text{น้ำหนักเนื้อปลา}}{\text{น้ำหนักปลาทั้งตัว}} \times 100$$

4.2.4 ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของความยาวลำไส้ (Relative gut length) (Yang *et al.*, 2002)

$$= \frac{\text{ความยาวของระบบทางเดินอาหาร (digestive tract length)}}{\text{ความยาวทั้งหมดของปลา (total body length)}}$$

### 4.3 การวิเคราะห์ทางองค์ประกอบทางเคมี

#### 4.3.1 การวิเคราะห์ความชื้น (moisture)

$$= \frac{a - b}{w} \times 100$$

เมื่อ a คือน้ำหนักขวดชั่งและตัวอย่างก่อนการอบ  
b คือน้ำหนักขวดชั่งและตัวอย่างหลังการอบ  
w คือน้ำหนักตัวอย่างอาหารที่ใช้ในการวิเคราะห์

#### 4.3.2 การวิเคราะห์เถ้า (Ash)

$$= \frac{b - a}{w} \times 100$$

เมื่อ a คือน้ำหนักของถ้วยกระเบื้อง  
B คือน้ำหนักของถ้วยกระเบื้องกับน้ำหนักเถ้าหลังการเผา  
W คือน้ำหนักของตัวอย่างอาหารที่ใช้ในการวิเคราะห์

#### 4.3.3 การวิเคราะห์ไขมัน (% fat)

$$= \frac{b - a}{W} \times 100$$

เมื่อ a คือน้ำหนักของ beaker  
b คือน้ำหนักของ beaker และไขมันหลังการอบ  
w คือน้ำหนักของตัวอย่างอาหาร

#### 4.3.4 การวิเคราะห์โปรตีน (% protein)

$$= \frac{1.4 (v_1 - v_2) N \times 6.25}{w}$$

เมื่อ N คือความเข้มข้นเป็น normal ของ NaOH  
V1 คือปริมาณของกรดซัลฟูริกก่อนใช้  
V2 คือปริมาณของกรดซัลฟูริกที่ใช้  
w คือน้ำหนักของตัวอย่างอาหาร a คือน้ำหนักของ beaker



## 4.3.5 การวิเคราะห์กากเยื่อใย (% fiber)

$$= \frac{(W2 - W3) \times 100}{W1}$$

เมื่อ  $W1 =$  น้ำหนักตัวอย่างอาหาร

$W2 =$  น้ำหนัก crucible + น้ำหนักตัวอย่างหลังการอบ

$W3 =$  น้ำหนัก crucible + น้ำหนักตัวอย่างหลังการเผา

## 4.3.6 การวิเคราะห์พลังงานรวม

## 4.4 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลจากการตรวจวัดและวิเคราะห์ทั้งหมดมาเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของตัวแปรปรวน (Analysis of variance: ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan' New Multiple Rang Test: DMRT ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ

## 5. สถานที่ทำการทดลอง

หมวดงานประมง, ห้องปฏิบัติการเคมี และห้องปฏิบัติการสาขาวิทยาศาสตร์การประมง สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง วิทยาเขตชุมพร

## 6. ระยะเวลาการศึกษาวิจัย

1 ปี ( ตุลาคม 2553 - กันยายน 2554)