หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

การทดลอง

3.1 การเตรียมเซลล์แบคทีเรียสังเคราะห์แสง

3.1.1 อาหารน้ำคั้นเปลือกและแกนสับปะรด เปลือกและแกนสับปะรดมาจากโรงงานสับปะรดกระป๋อง อำเภอบ้านบึง จังหวัดชลบุรี นำเปลือกและแกนมาผ่านเครื่องคั้น (hydraulic screw press) และกรองผ่านเครื่องกรอง (filter press) ที่สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี เก็บรักษาไว้ในตู้แช่แข็ง และนำมาทำให้ละลายเมื่อจะใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ วิเคราะห์หาความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด (total sugar) โดยวิธี Phenol-sulfuric acid method (40) แล้วจึงปรับความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดในอาหารน้ำคั้นเปลือกและแกนสับปะรดที่จะใช้เลี้ยงเชื้อด้วยน้ำตาลทราย ให้ได้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเริ่มต้นประมาณ 100 กรัมต่อลิตร เติมส่วนผสมตามสูตรของอาหารน้ำคั้นเปลือกและแกนสับปะรดปรุงแต่ง ดังนี้คือ

น้ำคั้นเปลือกและแกนสับปะรด	1	ลิตร
(ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นทั้งหมด 100 กรัมต่อลิตร)		
ไดแอมโมเนียมซัลเฟต	15.6	กรัม
ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	3.6	กรัม
กรดนิโคตินิค	4×10^{-3}	กรัม
ไธอามีน ไฮโดรคลอไรด์	7×10^{-3}	กรัม
ไบโอติน	6×10^{-5}	กรัม
pH	7	

3.1.2 การเลี้ยงเชื้อในถังหมัก โดยการเติมอาหารน้ำคั้นเปลือกและแกนสับปะรดปรุงแต่งลงในถังหมักปริมาณ 200 ลิตร ฆ่าเชื้อในถังหมักด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ทิ้งให้เย็นลงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสแล้วเติมเชื้อเริ่มต้นของเชื้อ Rhodopseudomonas sphaeroides P47 ที่มีอายุในอาหารน้ำคั้นเปลือกและแกนสับปะรดปรุงแต่งที่มีน้ำตาลทั้งหมด 30 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 20 ลิตร ควบคุมสภาวะการหมักในสภาพมีอากาศ ไม่มีแสง (microaerobic dark) โดยให้อากาศ 0.2 ลิตรอากาศต่อ 0.2 ลิตรอาหารต่อนาที อัตรากวน 500 รอบต่อนาที pH 6.5-7.5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา

นานประมาณ 72 ชั่วโมง

3.1.3 การเตรียมเซลล์แบคทีเรียสังเคราะห์แสง นำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากถังหมักไปเหวี่ยง (super speed refrigerated centrifuge model RB-18 IV) ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาทีอุณหภูมิ 10-15 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 15 นาที นำเซลล์ที่ได้ไปแช่แข็งเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

3.2 <u>ศึกษาผลของอาหารปลาผสมเซลล์แบคทีเรียสังเคราะห์แสงต่อปลาแฟนซีคาร์พ</u>

3.2.1 ปลาแฟนซีคาร์พที่ใช้ทดลอง ใช้ปลาที่คัดเลือกจากชากุระฟาร์ม โดยคัดเลือกปลาที่มีความยาว น้ำหนักและความเข้มสีผิวใกล้เคียงกันจำนวน 36 ตัว มาใช้ในการทดลอง

3.2.2 การเตรียมอาหารปลา โดยใช้เซลล์แบคทีเรียสังเคราะห์แสงปริมาณต่างกัน 2 ระดับคือ ร้อยละ 6.8 และ 13.6 (น้ำหนักแห้ง) ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 50 และ 100 ของปริมาณโปรตีนในปลาป่นที่ใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารปลา นำส่วนประกอบอาหารคือปลาป่น กากถั่วลิสง กากถั่วเหลือง รำละเอียด ปลายข้าว และเซลล์สดของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงมาผสมกันตามสูตร ดังแสดงในตารางที่ 3-1 สำหรับคุณค่าทางอาหารของปลาป่นและแบคทีเรียสังเคราะห์แสง แสดงไว้ในตารางที่ 4-1

นำส่วนประกอบทั้งหมดมาผสมให้เข้ากันดี โดยใช้ส่วนประกอบที่มีปริมาณมากที่สุดก่อนแล้วจึงค่อย ๆ ใส่ส่วนประกอบที่มีปริมาณน้อยลงไปผสมทีละส่วนจนครบทุกส่วนประกอบ แล้วจึงเติมน้ำปริมาณร้อยละ 30 (น้ำหนักอาหารแห้ง) ผสมให้เข้ากันอีกครั้ง นำไปเข้าเครื่องอัดเม็ด (extruder) ที่มีหัวแม่แบบขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร จะได้อาหารที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร แบบเม็ดเบียกที่มีความชื้นประมาณร้อยละ 30 โดยจะได้อาหารที่มีปริมาณปลาป่นและเซลล์แบคทีเรียสังเคราะห์แสงต่างกันดังนี้คือ

T 1 สูตรอาหารพื้นฐานเป็นสูตรอาหารสถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ (3)
T 2 สูตรอาหารพื้นฐานผสมเซลล์แบคทีเรียสังเคราะห์แสงร้อยละ 6.8
T 3 สูตรอาหารพื้นฐานผสมเซลล์แบคทีเรียสังเคราะห์แสงร้อยละ 13.6

ตารางที่ 3-1 ปริมาณและส่วนประกอบของสูตรอาหารปลาในขั้นตอนการทดลองที่ 2

ส่วนประกอบ	ร้อยละของส่วนประกอบในอาหารปลา		
	T1	T2	T3
ปลาป่น	16	8	-
เซลล์แบคทีเรียสังเคราะห์แสง	-	6.81	13.62
กากถั่วลิสง	24	24	24
กากถั่วเหลือง	14	14	14
รำข้าว	30	30	30
ปลายข้าว	15	15	15
วิตามินแร่ธาตุ	1	1	1
แกลบ	-	1.19	2.38

3.2.3 วางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (completely randomized design) (41) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's new multiple range test แบ่งออกเป็น 3 ชุดการทดลอง (treatment) ใช้ปลาชุดการทดลองละ 12 ตัว แบ่งเลี้ยงชุดการทดลองละ 2 ตู้ จำนวนปลา 6 ตัวต่อตู้ ตู้ปลาขนาด 2.0 x 1.5 x 1.5 ลูกบาศก์ฟุต ให้อาหารปลาวันละ 2 ครั้ง เวลาประมาณ 9.00 และ 16.00 น. โดยให้อาหารปลา 5 เปอร์เซนต์ของน้ำหนักตัวปลาต่อวัน

เริ่มการทดลองโดยให้อาหารสูตรที่ 1 (T 1) ซึ่งเป็นสูตรพื้นฐาน (ไม่มีเซลล์แบคทีเรียสังเคราะห์แสง) กับปลาทุกชุดการทดลอง เพื่อให้ปลาคุ้นเคยกับอาหารและเพื่อปรับสีผิวของปลาที่มีความเข้มเท่ากันก่อน ทำการบันทึกความเข้มสีผิว น้ำหนักและความยาวของปลาทุก 2 สัปดาห์

การทดลองแล้วจึงเปลี่ยนมาให้อาหารที่มีปริมาณเซลล์แบคทีเรียสังเคราะห์แสงต่างกัน (T1, T2, และ T3) บันทึกผลการทดลองทุก 2 สัปดาห์ เปรียบเทียบความเข้มสีผิวจนมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ 5 เปอร์เซนต์ ระหว่างชุดการทดลอง

การวัดความเข้มสีผิว โดยวิธีแถบสีที่ทำขึ้น แบ่งระดับความเข้มสีทั้งหมด 7 ระดับ และให้คะแนนที่ระดับความเข้มอ่อนสุดเป็น 1 คะแนนระดับความเข้มมากสุดเป็น 7 (แสดงแถบสีที่ใช้วัดความเข้มในรูปที่ 4-12 ข และแสดงการเทียบสีกับ Munsell ไว้ในภาคผนวก ง) โดยวัดความเข้มสีผิวบริเวณหัวปลาเป็นเกณฑ์ สำหรับการวัดความยาวของตัวปลาวัดจากปลายหัวถึงปลายหางตลอดลำตัว

3.3 ศึกษาส่วนผสมของอาหารผสมเซลล์แบคทีเรียสังเคราะห์แสงอัดเม็ด

ใช้แป้งอัลฟ่าแทนปลายข้าวในสูตรอาหารที่ผสมเซลล์แบคทีเรียสังเคราะห์แสงทั้ง 2 ระดับคือ ที่ร้อยละ 6.8 และ 13.6 แปรปริมาณของแป้งอัลฟ่าร้อยละ 0, 5.0, 7.5 และ 10.0 ดังแสดงในตารางที่ 3-2

A 1 สูตรอาหารผสมเซลล์แบคทีเรียสังเคราะห์แสงร้อยละ 6.8

A 2 สูตรอาหารผสมเซลล์แบคทีเรียสังเคราะห์แสงร้อยละ 6.8 ผสมแป้งอัลฟ่าร้อยละ 5.0

A 3 สูตรอาหารผสมเซลล์แบคทีเรียสังเคราะห์แสงร้อยละ 6.8 ผสมแป้งอัลฟ่าร้อยละ 7.5

A 4 สูตรอาหารผสมเซลล์แบคทีเรียสังเคราะห์แสงร้อยละ 6.8 ผสมแป้งอัลฟ่าร้อยละ 10.0

A 5 สูตรอาหารผสมเซลล์แบคทีเรียสังเคราะห์แสงร้อยละ 13.6

A 6 สูตรอาหารผสมเซลล์แบคทีเรียสังเคราะห์แสงร้อยละ 13.6 ผสมแป้งอัลฟ่าร้อยละ 5.0

A 7 สูตรอาหารผสมเซลล์แบคทีเรียสังเคราะห์แสงร้อยละ 13.6 ผสมแป้งอัลฟ่าร้อยละ 7.5

A 8 สูตรอาหารผสมเซลล์แบคทีเรียสังเคราะห์แสงร้อยละ 13.6
ผสมแป้งอัลฟ่าร้อยละ 10.0

ตารางที่ 3-2 ปริมาณและส่วนประกอบของสูตรอาหารที่ใช้ทดสอบความคงทนของอาหาร

ส่วนประกอบ	ร้อยละของส่วนประกอบในสูตรอาหาร							
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8
ปลาป่น	8	8	8	8	-	-	-	-
เซลล์แบคทีเรียสังเคราะห์แสง	10.8	6.8	6.8	6.8	13.6	13.6	13.6	13.6
กากถั่วลิสง	24	24	24	24	24	24	24	24
กากถั่วเหลือง	14	14	14	14	14	14	14	14
รำข้าว	30	30	30	30	30	30	30	30
ปลายข้าว	15	10	7.5	5.0	15	10	7.5	5.0
แป้งอัลฟ่า	-	5	7.5	10.0	-	5.0	7.5	10.0
วิตามินและแร่ธาตุ	1	1	1	1	1	1	1	1
แกลบ	1.2	1.2	1.2	1.2	2.4	2.4	2.4	2.4

3.3.1 การเตรียมอาหารทดสอบ

นำส่วนประกอบอาหารปลาตามตารางที่ 3-2 มาอัดเม็ดทำเช่นเดียวกับข้อ 2.1 จะได้อาหารปลาสำหรับทดสอบความคงทนในน้ำที่มีความชื้นประมาณร้อยละ 30

3.3.2 การศึกษาความคงทนของอาหารปลาในน้ำ

ตามวิธีการของ Hasting (42) โดยการชั่งอาหารปลาที่รู้ปริมาณความชื้นแน่นอนแล้ว คัดเอาเฉพาะขนาดความยาวประมาณ 1 เซนติเมตรมา 10 กรัม ใส่ตะแกรง

อลูมิเนียม 16 mesh ขนาด 6 x 9 ตารางเซนติเมตร ที่มีขอบยกสูง 1.5 เซนติเมตร พร้อมฝาปิด แล้วจุ่มลงไปในอ่างแก้วขนาด 2 x 2 x 2 ลูกบาศก์ฟุต ที่ระดับน้ำลึก 20 เซนติเมตร เป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงนำตะแกรงขึ้นมาทิ้งไว้สักครู่ นำไปอบในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105-110 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำค่าที่ได้ไปคำนวณในสูตรต่อไปนี้

$$\text{ความคงทนของอาหารในน้ำ (ร้อยละน้ำหนักแห้ง)} = \frac{\text{น้ำหนักอาหารที่เหลือบนตะแกรง} \times 100}{\text{น้ำหนักอาหารแห้งเริ่มต้น}}$$

สำหรับในน้ำไหลใช้หัวทรายสำหรับให้อากาศในตู้ปลา 4 หัว ใส่ลงในอ่างแก้วทั้ง 4 มุม โดยให้แต่ละหัวอยู่ในพื้นที่ 1 ใน 4 ของอ่างแก้ว

3.3.3 วางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในแต่ละระดับเซลล์แบคทีเรียสังเคราะห์แสงโดยใช้ Duncan's new multiple range test (41)

3.4 <u>การอบแห้งอาหารปลาผสมเซลล์แบคทีเรียสังเคราะห์แสงอัดเม็ด</u> ให้ได้ความชื้นร้อยละ 10-12 โดยใช้อุณหภูมิในการอบแห้งต่างกัน 5 ระดับคือ 60, 70, 80, 90 และ 100 องศาเซลเซียส

3.4.1 การเตรียมอาหารทดสอบ ทำเช่นเดียวกับข้อ 2.1 โดยใช้สูตรอาหารที่ได้จากผลการทดลองในข้อ 3 อาหารที่อบได้นำมาวิเคราะห์หาปริมาณคาโรทีนอยด์ที่เหลืออยู่ เพื่อเลือกสภาวะการทดลองในข้อ 5 อบแห้งที่จะทำให้มีการสูญเสียสารนี้น้อยและใช้เวลาสั้น

3.4.2 วางแผนการทดลอง วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (41) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยปริมาณคาโรทีนอยด์ที่วิเคราะห์ได้โดยใช้วิธีการสกัดด้วยสารละลายของ methanol-acetone ตามวิธีการของ Hirayama และคณะ (43) ดังแสดงในภาคผนวก ก ค่าที่ได้นำมาเปรียบเทียบโดยใช้ Duncan's new multiple

range test (41)

3.5 ศึกษาปริมาณเซลล์แบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่มีผลต่อการเพิ่มสีผิวของปลาแฟนซีคาร์พอายุ 3 เดือน

3.5.1 ปลาแฟนซีคาร์พที่ใช้ทดลอง คัดเลือกปลาที่ใช้เช่นเดียวกับในข้อ 3.2.1

3.5.2 การเตรียมอาหารทดสอบ ทำได้เช่นเดียวกับในข้อ 2.1 แต่แปรปริมาณเซลล์แบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่ใช้ร้อยละ 0, 3.4, 6.8, 10.2, และ 13.6 (น้ำหนักแห้ง) คิดเป็นปริมาณร้อยละของการแทนที่โปรตีนในปลาป่นคือ 0, 25, 50, 75 และ 100 เตรียมอาหารทดสอบโดยใช้ผลการทดลองที่ได้จากข้อ 3 และ 4

3.5.3 วางแผนการทดลอง เช่นเดียวกับในข้อ 2 โดยใช้ปริมาณและขนาดของปลาคาร์พเช่นเดียวกัน ทำการวัดผลความแข้มสีผิว น้ำหนักและความยาวของปลาทุก 2 สัปดาห์ เป็นเวลานาน 2 เดือน

3.6 วิเคราะห์คุณค่าทางอาหารของอาหารปลาผสมเซลล์แบคทีเรียอัดเม็ด

นำผลการทดลองที่ได้จากข้อ 3.2, 3.3, 3.4, 3.5 มาทำอาหารปลาอัดเม็ด จะได้อาหารปลาผสมเซลล์แบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่มีความชื้นปริมาณร้อยละ 10-12 ที่มีความคงทนในน้ำ และมีปริมาณรงควัตถุมากพอที่จะเร่งสีผิวของปลาได้ นำมาวิเคราะห์หาคุณค่าทางอาหารดังนี้คือ

3.6.1 ปริมาณโปรตีน โดยวิธี Kjeldahl Method (44)

3.6.2 ปริมาณไขมัน โดยวิธี Petroleum ether extract (44)

3.6.3 ปริมาณเส้นใย (44)

3.6.4 ปริมาณความชื้น (44)

3.6.5 ปริมาณคาโรทินอยด์ทั้งหมด (43)

3.7 ศึกษาอายุการเก็บของอาหารปลาอัดเม็ด

นำอาหารปลาอัดเม็ดที่ได้จากข้อ 3.6 มาบรรจุถุงพลาสติกชนิด low density polyethylene (LDPE) (45,46) ปริมาณถุงละ 100 กรัม สังเกตุการเปลี่ยนแปลงทุก ๆ 10 วัน จนเกิดการเปลี่ยนแปลงที่มองเห็นด้วยตาเปล่า หรือมีความผิดปกติทางด้านกลิ่นและเนื้อสัมผัสหรือในระยะเวลาการเก็บไม่เกิน 60 วัน โดยทำการวิเคราะห์หา ดังนี้คือ

3.7.1 ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด (total viable plate count) โดยใช้อาหาร PCA (plate count agar) ด้วยวิธีการ pour plate (47)

3.7.2 ปริมาณยีสต์และรา (total yeast and mold count) โดยใช้อาหาร PDA (potatoes dextrose agar) ด้วยวิธีการ spread plate (47)

3.7.3 ปริมาณคาโรทีนอยด์ทั้งหมด (total carotenoids) โดยวิธีของ Hirayama และคณะ (43)