ผลของการใช้ความร้อนด้วยวิธีที่แตกต่างกันในกากถั่วดาวอินคาสำหรับอาหารปลานิลดำ (*Oreochromis niloticus*)

สุธินันท์ หมุ้ยจันทา

วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร
เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การประมง
ปีการศึกษา 2563
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยนเรศวร

ผลของการใช้ความร้อนด้วยวิธีที่แตกต่างกันในกากถั่วดาวอินคาสำหรับอาหารปลานิลดำ (*Oreochromis niloticus*)

สุธินันท์ หมุ้ยจันทา

วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร
เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การประมง
ปีการศึกษา 2563
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยนเรศวร

วิทยานิพนธ์ เรื่อง "ผลของการใช้ความร้อนด้วยวิธีที่แตกต่างกันในกากถั่วดาวอินคาสำหรับอาหารปลานิลดำ (*Oreochromis niloticus*)"

ของ สุธินันท์ หมุ้ยจันทา

ได้รับการพิจารณาให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การประมง

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุดาพร ตงศิริ)

..... ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อนุรักษ์ เขียวขจรเขต)

..... กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

(ดร.กุลยาภัสร์ วุฒิจารี)

..... กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายใน

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ น.สพ.ดร.นิรันดร์ เอกศิริ)

อนุมัติ

.....

(ศาสตราจารย์ ดร.ไพศาล มุณีสว่าง)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อเรื่อง ผลของการใช้ความร้อนด้วยวิธีที่แตกต่างกันในกากถั่วดาวอินคาสำหรับอาหารปลานิลดำ (*Oreochromis niloticus*)

ผู้วิจัย สุธินันท์ หมุ้ยจันทา

ประธานที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อนุรักษ์ เขียวขจรเขต

กรรมการที่ปรึกษา ดร.กุลยาภัสร์ วุฒิจารี

ประเภทสารนิพนธ์ วิทยานิพนธ์ วท.ม. สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การประมง, มหาวิทยาลัยนเรศวร, 2563

คำสำคัญ กากถั่วดาวอินคา, กระบวนการให้ความร้อน, ปลานิล, การเจริญเติบโต, โลหิตวิทยา, เนื้อเยื่อวิทยา

บทคัดย่อ

ปลาป่นถือเป็นแหล่งโปรตีนที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมการผลิตอาหารสัตว์ เนื่องจากมีกรดอะมิโนจำเป็น ดึงดูดการกิน และประสิทธิภาพการย่อยสูง แต่อย่างไรก็ตามกลับพบว่าปลาป่นมีความต้องการสูง แต่กลับมีปริมาณคงที่จึงทำให้ปลาป่นมีราคาสูง ดังนั้นจึงจำเป็นต้องค้นคว้าหาแหล่งโปรตีนทางเลือกใหม่เพื่อเป็นวัตถุดิบทดแทนในอาหารสัตว์น้ำ กากถั่วดาวอินคาเป็นวัสดุพลอยได้จากการสกัดน้ำมันถั่วดาวอินคาแต่ยังคงคุณค่าทางโภชนาการ ในขณะเดียวกันก็มีสารต้านโภชนาการที่มีผลต่อการเจริญเติบโตในปลา เช่น ทริปซินอินฮิบิเตอร์ (Trypsin inhibitor) ซาโปนิน (Saponin) และแทนนิน (Tannin) เป็นต้น กระบวนการให้ความร้อนจึงเป็นแนวทางหนึ่งที่สามารถลดสารต้านโภชนาการได้ และเป็นที่มาในการทดลองครั้งนี้คือเพื่อศึกษาผลของกระบวนการให้ความร้อนในรูปแบบต่างๆ ในกากถั่วดาวอินคาในอาหารปลานิล โดยประกอบด้วย 2 ชุดการทดลอง คือ ชุดการทดลองที่ 1 การให้ความร้อนกากถั่วดาวอินคาด้วยการอบลมร้อนที่อุณหภูมิแตกต่างกันจำนวน 4 ระดับ (80, 100, 120 และ 140 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง) ที่มีต่อการเจริญเติบโต และประสิทธิภาพการใช้อาหารในอาหารปลานิลที่มีขนาดเริ่มต้น 12.53±0.03 กรัม/ตัว เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ และชุดการทดลองที่ 2 การให้ความร้อนด้วยวิธีที่แตกต่างกันจำนวน 5 วิธี ประกอบด้วย การเอ็กซ์ทรูด (Extrusion, สูตรควบคุม), การนึ่ง (Steam), การอบลมร้อน (Air dry), การนึ่งฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำ (Autoclave), และไมโครเวฟ (Microwave) ที่มีต่อการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหาร องค์ประกอบทางเคมีของซาก สัมประสิทธิ์การย่อยได้ของสารอาหาร เนื้อเยื่อวิทยา และโลหิตวิทยาในอาหารปลานิลที่มีขนาดเริ่มต้น 10.58±0.01 กรัม/ตัว เป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์ กำหนดอาหารมีระดับของโปรตีน และไขมันที่ใกล้เคียงกัน (30 และ 8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) ผลการศึกษาของชุดการทดลองที่ 1 การอบอุณหภูมิที่แตกต่างกัน 4 ระดับ พบว่าไม่ส่งเสริมการเจริญเติบโต มีการ

ปฏิเสธการกินอาหาร ทำให้ตัวปลาผอม ลำตัวปลามีลักษณะลีบแบน อัตราการรอดตายสูงกว่า 85 เปอร์เซ็นต์ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) จึงยังดำเนินการทดลองต่อจนสิ้นสุดการทดลอง ให้ผลลัพธ์ที่คล้ายกับการทดลองที่ 2 ในปลาที่ได้รับอาหารที่อบลมร้อน และนึ่งฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำปลาปฏิเสธการกินอาหาร มีอัตราการรอดตายต่ำที่สุดเมื่อเทียบกับชุดการทดลองอื่น มีค่าน้อยกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ ในสัปดาห์ที่ 4 จึงจำเป็นต้องยุติการทดลองเลี้ยงด้วยอาหารสองสูตรนี้ ในขณะที่ปลาได้รับสูตรอาหารที่ผ่านกระบวนการเอ็กซ์ทรูด และนึ่ง มีการเจริญเติบโตสูงกว่า ปลาที่ได้รับอาหารสูตรไมโครเวฟ ในค่าน้ำหนักสุดท้าย น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น น้ำหนักเพิ่มต่อวัน และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) เช่นเดียวกันกับค่าโปรตีนที่นำไปใช้ประโยชน์มีค่าต่ำสุดในปลาที่ได้รับอาหารสูตรไมโครเวฟและมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับทุกชุดการทดลอง (P<0.05) องค์ประกอบทางเคมีของซากปลาทั้งตัวพบว่าอาหารสูตรไมโครเวฟส่งผลให้การเก็บรักษาโปรตีนและการเก็บรักษาไขมันมีค่าต่ำสุดและมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับทุกชุดการทดลอง (P<0.05) ประสิทธิภาพการย่อยของของแข็งและโปรตีนในปลาที่ได้รับอาหารสูตรนึ่งให้แนวโน้มค่าสูงที่สุด แต่ไม่มีความแตกต่างกันในทุกชุดการทดลอง (P>0.05) การเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อวิทยาในปลาที่ได้อาหารสูตรไมโครเวฟพบความผิดปกติในอวัยวะตับที่มี Vacuole ขนาดใหญ่ และในส่วนของลำไส้มีไมโครวิลไลที่หดสั้น แต่ไม่พบความผิดปกติในส่วนของไต ค่าโลหิตวิทยาพบว่าจำนวนเม็ดเลือดขาว จำนวนเม็ดเลือดแดง ความเข้มข้นของฮีโมโกลบิน และกลูโคส ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกชุดการทดลอง (P>0.05) และความเข้มข้นของฮีโมโกลบินในปลาที่ได้รับอาหารสูตรนึ่งมีแนวโน้มค่าสูงที่สุด มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับปลาที่ได้รับอาหารสูตรไมโครเวฟ (P>0.05) ผลของการแสดงของโปรตีน MMP-2 มีการแสดงออกสูงในปลาที่ได้อาหารสูตรเอ็กซ์ทรูดและนึ่ง และ MMP-9 มีการแสดงออกสูงในปลาที่ได้รับอาหารสูตรไมโครเวฟ การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าปลานิลที่ได้รับอาหารผสมกากถั่วดาวอินคาที่ผ่านกระบวนนึ่งมีการเจริญเติบโตที่ดี ในแง่ของน้ำหนักสุดท้าย น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ โปรตีนที่นำไปใช้ประโยชน์ การย่อยได้ของวัตถุแห้งและโปรตีน จำนวนเม็ดเลือดขาว จำนวนเม็ดเลือดแดง ความเข้มข้นของฮีโมโกลบิน และกลูโคสสูงที่สุด นอกจากนี้ยังเป็นวิธีการที่สะดวก และเพิ่มทางเลือกใหม่ที่ดีเพื่อลดต้นทุนค่าอาหารให้แก่เกษตรเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

Title EFFECT OF DIFFERENT HEATING PROCESSES IN SACHA INCHI FOR NILE TILAPIA DIETS (*OREOCHROMIS NILOTICUS*)

Author SUTINUN MUICHANTA

Advisor Assistant Professor Anurak Keawkajonket, Ph.D.

Co-Advisor Kunlayaphat Wuthijaree, Ph.D.

Academic Paper Thesis M.S. in Fisheries Science - (Type A 2), Naresuan University, 2020

Keywords sacha inchi, heating processes, Nile tilapia, growth performance, hematology, histological changes

ABSTRACT

Fish meal is considered as an important protein source in the aquafeed industry. Since, it has balanced amino acids, attractants, and high digestibility. Currently, fish meal has high demand which resulting in high price in the global market. It is, therefore, to investigate alternative protein sources to replace fishmeal in the aquafeed industry. Sacha inchi meal (SIM) is a by-product of sacha inchi seed oil extraction, however, this by-product still contains anti-nutritional factors (ANFs) which affects growth performance for such as trypsin inhibitor, saponin, and tannin. The heat-treatment process is one of several treated techniques that use to reduce ANFs. It is, therefore, to investigate the effects of several treat-treatment processes in dietary SIM inclusion for Nile tilapia. This experiment consisted of 2 experiments including; trial 1 is dietary inclusion of SIM treated with air-dried at 4 temperature levels (80, 100, 120, and 140°C for 4 h) on growth and feed utilization in diets for Tilapia. The initial body weight of Nile tilapia is approximately 12.53±0.03 g/fish for 8 weeks. Trial 2 is dietary inclusion on SIM treated with 5 heating – processes including extrusion (control), steaming, air-drying, autoclave, and microwave on growth performance, Histological changes, and hematology for Nile tilapia with initial body weight approximately 10.58±0.01 g/ fish for 10 weeks. All test diets were further formulated to contain isonitrogenous (30% crude protein) and isolipidic (8% crude fat) diets. The results showed that the survival of fish fed diets containing treated

with four different temperature was 30% with unaccepted diets. We decided to terminate the experiment. In line with these results, fish fed SIM treated with air-dried and autoclaved in trial 2 showed a lower survival rate than those of other diets. Fish fed dietary containing SIM treated with extrusion process and steaming process showed higher growth performance than fish fed SIM treated with microwave group. In addition, there was significant difference in final body weight, weight gain, average daily gain, and specific growth rate ($P<0.05$). Similar to these results, protein productive value of the fish fed SIM treated with the microwave method had significantly lower than those of other diets. Whole body composition of fish fed SIM treated with microwave showed significantly lower resulting in lower protein retention and lipid retention than those of other diets. Histological changes in the present study showed pathological changes in the liver. Large vacuole and intestinal microvilli showed shorter in the fish fed SIM treated with microwave. While kidney showed no pathological changes. White blood cells, red blood cells, haematocrit and glucose levels of all fish groups were no significant difference ($P>0.05$). Hemoglobin concentration of fish fed SIM treated stemming process showed higher than SIM treated with microwave group ($P<0.05$). MMP-2 expression was highly expressed in fish fed SIM treated extrusion process and stemming process. In addition, MMP-9 expression was highly expressed in fish fed SIM treated with microwave process. The results of the present study conclude that Nile tilapia fed with SIM treated with a steaming process has higher growth performance in terms of final body weight, weight gain, specific growth rate, protein utilization, ADC dry matter, ADC protein, white blood cells, red blood cells, hemoglobin and glucose level. In addition, the steaming method is an easy method and can be used as alternation method to reduce feeding costs aquafeeds.

ประกาศคุณูปการ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้โดยได้รับความช่วยเหลือเกื้อกูลจากบุลคลหลายฝ่าย บุคคลเหล่านั้นล้วนเป็นกัลยานิมิตรที่ควรกล่าวถึงด้วยความรู้สึกขอบคุณและยกย่องไว้ ณ ที่นี้

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อนุรักษ์ เขียวขจรเขต อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำแนวทางในระหว่างการทดลองวิจัยและแก้ไขข้อบกพร่องในการเขียนวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ ขอขอบพระคุณ ประธานกรรมการสอบ คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ และผู้เชี่ยวชาญทุกท่าน ที่ได้กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำตลอดจนตรวจสอบข้อแก้ไขงานวิจัยให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณห้องปฏิบัติการ สาขาวิทยาศาสตร์การประมง คณะเกษตรศาสตร์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม ที่ได้อนุเคราะห์อุปกรณ์ และเครื่องมือในการทำวิจัย

ท้ายที่สุดขอขอบพระคุณ สถาบันครอบครัวที่คอยให้กำลังใจ สนับสนุนในการทำวิจัยมาโดยตลอด

สุธินันท์ หมุ้ยจันทา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ
ประกาศคุณูปการ ..... ช
สารบัญ ..... ซ
สารบัญตาราง ..... ฎ
สารบัญภาพ ..... ฑ
บทที่ 1 บทนำ 1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1
จุดมุ่งหมายของการวิจัย 2
ขอบเขตการวิจัย 3
นิยามศัพท์เฉพาะ 4
สมมุติฐานของการวิจัย 5
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 6
ชีววิทยาของถั่วดาวอินคา 6
ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ 7
ประโยชน์ถั่วดาวอินคา 8
สรรพคุณถั่วดาวอินคา 8
ใบ และยอดอ่อน 9
โอเมก้า-3 ในถั่วดาวอินคา 11

เมล็ดของถั่วดาวอินคา.....11
ทริปซิน (Trypsin).....14
ชีววิทยาของปลานิล (Nile tilapia).....18
อนุกรมวิธานของปลานิล.....19
การสืบพันธุ์.....20
อาหารและการให้อาหาร.....21
ความต้องการสารอาหารของปลานิล.....22
การศึกษาการแสดงออกของโปรตีน Matrix Metalloproteinases (MMP-2 และ MMP-9).....23
Gelatin Zymography.....25
งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับวัถตุดิบจากพืชผ่านกระบวนการความร้อนในอาหารสัตว์น้ำ.....26
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....28
ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง.....28
ตัวแปรที่ใช้ในการวิจัย.....28
เครื่องมือและวัตถุดิบที่ใช้ในการทดลอง.....29
การเตรียมอุปกรณ์การทดลอง.....29
การเตรียมสัตว์ทดลอง.....29
การเตรียมสัตว์ทดลองก่อนการทดลอง.....29
การเตรียมและการการจัดการสัตว์ทดลองในระหว่างการทดลอง.....29
การเตรียมอาหารทดลอง.....30
การเตรียมวัตถุดิบอาหารทดลอง.....30
การเตรียมอาหารทดลอง.....31

การเก็บรวบรวมข้อมูล.....35
การศึกษาประสิทธิภาพการเจริญเติบโต (Growth performance).....36
การศึกษาประสิทธิภาพการใช้อาหาร (Feed utilization).....37
องค์ประกอบทางเคมีของซาก (Chemical compositon of carcass).....38
การศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา (Histological change).....38
ขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อ (Processing).....39
การศึกษาสัมประสิทธิการย่อยได้ของสารอาหาร (Apparent digestibility coefficient).....42
การศึกษาค่าโลหิตวิทยา (Hematology).....43
การศึกษาการแสดงออกของโปรตีน Matrix Metalloproteinases (MMP-2 และ.....46
MMP-9).....46
บทที่ 4 ผลการวิจัย.....29
4.1 ความผิดปกติและพฤติกรรมของปลานิลที่ได้รับอาหารทดลองสูตรต่างๆ.....29
4.2.1 ประสิทธิภาพการเจริญเติบโตและอัตราการรอดตาย.....49
1) น้ำหนักเฉลี่ย (กรัม/ตัว).....49
2) ประสิทธิภาพการเจริญเติบโต (Growth performance).....50
3) ประสิทธิภาพการใช้อาหาร (Feed utilization).....51
4.3 ผลการทดลองชุดการทดลองที่ 2.....51
4.3.1 ประสิทธิภาพการเจริญเติบโตและอัตราการรอดตาย.....52
1) น้ำหนักเฉลี่ย (กรัม/ตัว).....52
2) ประสิทธิภาพการเจริญเติบโต (Growth performance).....54
3) ประสิทธิภาพการใช้อาหาร (Feed utilization).....56

4) องค์ประกอบทางเคมี (Chemical composition).....57

5) การศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา (Histological change).....58

6) สัมประสิทธิการย่อยเสมือนของสารอาหาร (Apparent digestibility.....58

coefficient) 58

7) การศึกษาค่าโลหิตวิทยา (Hematology).....59

8) การศึกษาการแสดงออกของโปรตีน (Matrix Metalloproteinase; MMP-2 และ

MMP-9).....60

บทที่ 5 บทสรุป 62

บรรณานุกรม 74

ภาคผนวก.....91

ประวัติผู้วิจัย 109

สารบัญตาราง

หน้า

ตาราง 1 องค์ประกอบกรดไขมันของถั่วดาวอินคา 12

ตาราง 2 องค์ประกอบของกรดอะมิโนของถั่วดาวอินคา (mg/100 g).....13

ตาราง 3 สารต้านโภชนาการของถั่วดาวอินคา (g/100 g) 14

ตาราง 4 ผลของอุณหภูมิและความชื้นต่อปริมาณของทริปซินอินฮิบิเตอร์ (Trypsin inhibitor) ในกระบวนการเอ็กซ์ทรูด (Extrusion) ของถั่วเหลือง.....16

ตาราง 5 การให้อาหารปลานิลและปลานิลระยะปลาเล็ก – ปลารุ่น.....21

ตาราง 6 ความต้องการกรดอมิโนที่จำเป็นสำหรับปลานิล.....22

ตาราง 7 องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบ.....30

ตาราง 8 สูตรอาหารชุดการทดลองที่ 1 ที่ใช้กากถั่วดาวอินคาอบอุณหภูมิแตกต่างกัน 4 ระดับ (กรัม/กิโลกรัม).....31

ตาราง 9 องค์ประกอบทางเคมีของอาหารชุดการทดลองที่ 1 ใช้กากถั่วดาวอินคาอบอุณหภูมิแตกต่างกัน 4 ระดับ (กรัม/น้ำหนักแห้ง).....32

ตาราง 10 องค์ประกอบทางเคมีของกากถั่วดาวอินคาผ่านกระบวนการความร้อนรูปแบบแตกต่างกัน 5 วิธี 33

ตาราง 11 สูตรอาหารชุดการทดลองที่ 2 ที่ใช้กากถั่วดาวอินคาผ่านกระบวนการความร้อนแตกต่างกัน 5 วิธี (กรัม/กิโลกรัม).....34

ตาราง 12 องค์ประกอบทางเคมีของอาหารชุดการทดลองที่ 2 ใช้กากถั่วดาวอินคาผ่านกระบวนการความร้อนแตกต่างกัน 5 วิธี (กรัม/น้ำหนักแห้ง).....35

ตาราง 13 การเตรียมเนื้อเยื่อ.....40

ตาราง 14 การย้อมสีมีขั้นตอนต่าง ๆ โดยละเอียดดังนี้.....41

ตาราง 15 น้ำหนักเฉลี่ยของปลาของปลานิลที่ได้รับอาหารชุดการทดลองที่ 1 ระยะเวลา 8สัปดาห์ (กรัม/ตัว) 49

ตาราง 16 ประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของปลาของปลานิลที่ได้รับอาหารชุดการทดลองที่ 1 ตลอดระยะเวลา 8 สัปดาห์.....50

ตาราง 17 ประสิทธิภาพการใช้อาหาร ของปลาของปลานิลที่ได้รับอาหารชุดการทดลองที่ 1 ระยะเวลา 8 สัปดาห์.....51

ตาราง 18 น้ำหนักเฉลี่ยของปลาของปลานิลที่ได้รับอาหารชุดการทดลองที่ 2 ระยะเวลา 10 สัปดาห์ (กรัม/ตัว).....53

ตาราง 19 ประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของปลาของปลานิลที่ได้รับอาหารชุดการทดลองที่ 2 ตลอดระยะเวลา 10 สัปดาห์.....55

ตาราง 20 ประสิทธิภาพการใช้อาหาร ของปลาของปลานิลที่ได้รับอาหารชุดการทดลองที่ 2ระยะเวลา 10 สัปดาห์.....56

ตาราง 21 องค์ประกอบทางเคมี (Chemical composition) (เปอร์เซ็นต์).....57

ตาราง 22 สัมประสิทธิการย่อยเสมือนของสารอาหาร (Apparent digestibility coefficient) 59

ตาราง 23 การศึกษาค่าโลหิตวิทยาของปลานิลที่ได้รับอาหารการทดลองที่ 2 ระยะเวลา 10 สัปดาห์.....60

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพ 1 ลักษณะของถั่วดาวอินคา 6

ภาพ 2 กลไกการทำงานของเอมไซม์ทริปซิน 15

ภาพ 3 ลักษณะทั่วไปและแสดงส่วนต่างๆของปลานิลเพศผู้และเมียในปลานิล 19

ภาพ 4 แสดงพื้นที่การนับเม็ดเลือดขาว (W) และเม็ดเลือดแดง (R) 44

ภาพ 5 Microhaematocrit capillary tube ที่ผ่านการปั่นเหวี่ยง 46

ภาพ 6 ลักษณะปลาปกติ (ก) และลักษณะปลาที่มีความผิดปกติ (ข) 29

ภาพ 7 ลักษณะของเนื้อเยื่อตับ ลำไส้ส่วนต้น และไต ของปลาที่ได้รับอาหารสูตร T1 (Extrusion) T2 (Steam) T5 (Microwave) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ 40X 58

ภาพ 8 การแสดงออกของ matrix metalloproteinase MMP-2 ในซีรั่ม ด้วยเทคนิค gelatin zymography ของปลานิลที่ได้รับอาหารการทดลองที่ 2 ระยะเวลา 10 สัปดาห์ 61

ภาพ 9 การแสดงออกของ matrix metalloproteinase MMP-9 ในซีรั่ม ด้วยเทคนิค gelatin zymography ของปลานิลที่ได้รับอาหารการทดลองที่ 2 ระยะเวลา 10 สัปดาห์ 61

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปลาป่นซึ่งเป็นแหล่งโปรตีนที่สำคัญ ให้โปรตีนสูง มีกรดอะมิโนจำเป็นสำหรับสัตว์น้ำ ซึ่งทำมาจากปลาเป็ด เศษปลาเล็กปลาน้อย หรือหัวปลาที่เหลือจากโรงงานทำปลากระป๋อง ทำให้ปลาป่นที่ผลิตได้มีคุณภาพหลากหลาย จากสถานการณ์ปัจจุบันมีความต้องการโปรตีนของสัตว์น้ำมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น และปริมาณสัตว์น้ำที่จับได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติเพื่อนำมาเป็นวัตถุดิบปลาป่นมีปริมาณลดน้อยลง ซึ่งสวนทางกับความต้องการของเกษตรกรที่เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเพื่อค้าขายทางเศรษฐกิจ (Food, 2016) ดังมีข้อมูลความต้องการใช้ในช่วงปี พ.ศ. 2558-2561 อยู่ที่ 0.57, 0.51, 0.53 และ 0.55 ล้านตันต่อปี ตามลำดับ มีผลผลิต 0.38, 0.31, 0.32 และ 0.35 ล้านตันต่อปี ตามลำดับ และราคาที่มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นเป็น 8.97, 8.87, 8.65 และ 9.31 บาทต่อกิโลกรัม (Thai Fishmeal Producers Association, 2018) จึงมีความต้องการศึกษาแหล่งโปรตีนใหม่ๆ เข้ามาเพื่อเป็นแหล่งโปรตีนทดแทน

กากถั่วดาวอินคาที่เป็นเศษเหลือจากโรงงานสกัดน้ำมัน มีคุณค่าทางโภชนะและโปรตีนที่สูง มีค่าโปรตีนอยู่ที่ 56.61 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 4.13 เปอร์เซ็นต์ เถ้า 5.91 เปอร์เซ็นต์ ความชื้น 2.62 เปอร์เซ็นต์ และคาร์โบไฮเดรต 30.72 เปอร์เซ็นต์ (Rawdkuen et al., 2016) อย่างไรก็ตามพบว่ากากถั่วดาวอินคายังคงมีสารต้านโภชนาการ คือ แทนนิน (Tannin) 1.94 ± 0.27 ทริปซินอินฮิบิเตอร์ (Trypsin inhibitor) 0.16 ± 0.03 และ ซาโปนิน (Saponin) 0.27 ± 0.01 กรัม/100 กรัม นอกจากนี้ยังพบสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซิน (Trypsin inhibitor) ซึ่งเป็นเอมไซม์ช่วยย่อยโปรตีน ส่งผลให้การเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหารลดลง ดังนั้นหากมีการทำให้ปริมาณสารต้านโภชนาการลดลงลดลงก่อนการนำไปใช้ด้วยวิธีการต่างๆ ได้แก่ วิธีทางกล (Mechanical Modification) ชีวภาพ (Biological Modification) เคมี (Chemical Modification) ฟิสิกส์ (Physical Modification) หรือใช้หลายวิธีร่วมกัน โดยวิธีการให้ความร้อนเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว สามารถใช้กับวัตถุดิบอาหารได้ในปริมาณมาก ไม่เกิดการตกค้างของสารเคมี ซึ่งสามารถลดปริมาณและทำลายสารต้านโภชนาการได้ ประกอบด้วย การต้ม การนึ่งด้วยแรงดันไอน้ำ และคลื่นไมโครเวฟ เป็นต้น (Karun and Uthaiwan, 2012) โดยพบว่าการต้มและนึ่งด้วยความดันไอน้ำ

สามารถลดปริมาณแทนนิน (Tannin) กรดไฟติก (Phytic Acid) ซาโปนิน (Saponin) และสารยับยั้งการทำงานของทริปซิน (Trypsin inhibitor) ได้ (Arndt et al., 1999) คลื่นไมโครเวฟเป็นคลื่นของพลังงาน การใช้คลื่นไมโครเวฟเป็นวิธีการที่ช่วยเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของวัตถุดิบอาหารให้มีประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนที่ดีขึ้น ดังมีในรายงานวัตถุดิบต่างๆ เช่น Canola Meal (Sadeghi, & Shawrang, 2006), Moth Bean (Negi et al., 2001), Bengal Gram, Green Gram, Horse Gram (Palekar et al., 2004) และ Chick Pea (Alajaji and El-Adawy, 2006) การศึกษาผลของความร้อนต่อกากถั่วเหลืองด้วยการฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำ (Autoclave) ด้วยอุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส แรงดัน 22 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว และใช้เวลาต่างกันคือ 0, 5, 10, 20 และ 40 นาที ตามลำดับ พบว่า ปลากดอเมริกัน (*Ictalurus punctatus*) ที่ได้รับอาหารที่ผสมกากถั่วเหลืองผ่านความร้อนเป็นเวลา 40 นาที มีแนวโน้มประสิทธิภาพการเจริญเติบโตสูงที่สุด (Peres et al., 2003) ทำให้สัตว์น้ำสามารถใช้ประโยชน์จากวัตถุดิบได้อย่างเต็มประสิทธิภาพ นอกจากนี้ยังเป็นการนำวัตถุดิบเศษเหลือมาใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุด ดังนั้นการนำวัตถุดิบผ่านกระบวนการให้ความร้อนจึงเป็นทางเลือกหนึ่งในการปรับปรุงคุณภาพของวัตถุดิบอาหารให้ดีขึ้น ในขณะที่ปลานิลดำเป็นปลากินพืช และเป็นที่นิยมเพาะเลี้ยงมากที่สุดในเขตจังหวัดภาคเหนือตอนล่าง เนื่องจากเจริญเติบโตดี เหมาะสมต่อสภาพภูมิอากาศ เป็นที่ต้องการของตลาด มีตามแหล่งน้ำธรรมชาติ และบ่อเพาะเลี้ยงจำนวนมาก สามารถใช้แหล่งโปรตีนได้เป็นอย่างดี ดังนั้นจึงเป็นที่มาในการศึกษาในครั้งนี้

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงนำกากถั่วดาวอินคาที่ผ่านกระบวนการความร้อนมาเป็นส่วนผสมเพื่อทดแทนปลาป่นในการผลิตอาหารสัตว์น้ำ แบ่งออกเป็น 2 ชุดการทดลอง คือ กากถั่วดาวอินคาที่อบด้วยลมร้อนอุณหภูมิต่างกัน 4 ระดับ และกากถั่วดาวอินคาที่ผ่านกระบวนการความร้อนด้วยวิธีการต่างกัน 5 วิธี ประเมินผลค่าประสิทธิภาพการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหาร องค์ประกอบทางเคมีของซาก ความสามารถในการย่อยสารอาหาร เนื้อเยื่อวิทยา ค่าโลหิตวิทยาและชีวเคมีของโลหิตของปลานิลที่ได้รับอาหารผสมด้วยกากถั่วดาวอินคาที่ผ่านความร้อนด้วยวิธีแตกต่างกัน

จุดมุ่งหมายของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาการให้ความร้อนด้วยเครื่องอบลมร้อนอุณหภูมิที่แตกต่างกัน (80, 100, 120 และ 140 องศาเซลเซียส) ของกากถั่วดาวอินคาในอาหารปลานิลต่อของประสิทธิภาพการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหาร

2. เพื่อเปรียบเทียบวิธีการให้ความร้อนในรูปแบบแตกต่างกัน ประกอบด้วยเอ็กซ์ทรูด (Extrusion), นึ่ง (Steam), อบลมร้อน (Air dry), นึ่งฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำ (Autoclave) และไมโครเวฟ (Microwave) ในกากถั่วดาวอินคาสำหรับอาหารปลานิลต่อประสิทธิภาพการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหาร องค์ประกอบทางเคมีของซาก สัมประสิทธิ์การย่อยได้ของสารอาหาร เนื้อเยื่อวิทยา ค่าโลหิตวิทยาและชีวเคมีโลหิตของปลานิล

ขอบเขตการวิจัย

การวิจัยในครั้งนี้มุ่งที่จะศึกษาถึงการใช้ประโยชน์จากการนำกากถั่วดาวอินคาที่เป็นเศษเหลือจากโรงงานอุตสาหกรรมสกัดน้ำมัน การศึกษานี้ประกอบด้วย 2 ชุดการทดลอง คือ ชุดการทดลองที่ 1 ผลของการใช้กากถั่วดาวอินคาที่ผ่านความร้อนด้วยการอบที่อุณหภูมิแตกต่างกัน 4 ระดับ (80, 100, 120 และ 140 องศาเซลเซียส) ต่อประสิทธิภาพการเจริญเติบโต (Growth performance) และประสิทธิภาพการใช้อาหาร (Feed utilization) ในอาหารปลานิล และชุดการทดลองที่ 2 เป็นการศึกษาการใช้ความร้อนด้วยวิธีที่แตกต่างกันจำนวน 5 วิธี คือ เอ็กซ์ทรูด (Extrusion), นึ่ง (Steam), อบลมร้อน (Air dry), นึ่งฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำ (Autoclave) และไมโครเวฟ (Microwave) ที่มีต่อประสิทธิการเจริญเติบโต (Growth performance) ประสิทธิภาพการใช้อาหาร (Feed utilization) องค์ประกอบทางเคมีของซาก (Chemical compositon of carcass) สัมประสิทธิ์การย่อยได้ของสารอาหาร (Apparent digestibility coefficient) เนื้อเยื่อวิทยา (Histological change) ค่าโลหิตวิทยาและชีวเคมีของโลหิต (Hematology) ในอาหารปลานิล อาหารทุกชุดการทดลองกำหนดให้มีระดับของโปรตีน (Isonitrogenous) และไขมัน (Isolipidic) ที่ระดับ 30 และ 8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่ละชุดการทดลองแบ่งออกเป็น 4 ซ้ำ โดยใช้ปลาทดลองซ้ำละ 15 ตัว นำปลานิล มาจากศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดพิษณุโลกจำนวน 1000 ตัว ทำการเลี้ยงในถังไฟเบอร์กลาส เพื่อปรับสภาพก่อนการเลี้ยง กำหนดให้อาหารวันละ 2 มื้อ คือ เช้าและเย็น ทำการเปลี่ยนถ่ายน้ำวันละ 1 ครั้งทุกวัน จนได้ขนาดตามที่ต้องการ เลี้ยงปลานิลในตู้กระจกขนาด 49 x 90 x 46 เซนติเมตร ความจุน้ำประมาณ 150 ลิตร ให้อาหารทุกวัน วันละ 2 ครั้ง คือเวลา 08.00 น. และ 16.00 น. ทำการชั่งน้ำหนักปลานิล ทุกๆ 2 สัปดาห์ ระยะเวลาในการทดลอง 10 สัปดาห์ บันทึกผลการเจริญเติบโต (Growth performance) ประกอบด้วย น้ำหนักสุดท้าย (Final weight), น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (Weight gain), อัตราการเจริญเติบโตต่อวัน (Average daily gain; ADG), อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific growth rate; SGR), อัตราการรอด (Survival

rate), ค่าปัจจัยของน้ำหนักต่อความยาว (Condition factor, K), ดัชนีน้ำหนักปลาต่อน้ำหนักตับ (Hepatosomatic index) และดัชนีน้ำหนักปลาต่อน้ำหนักอวัยวะภายใน (Viscerosomatic index) ประสิทธิภาพการใช้อาหาร (Feed utilization) ประกอบด้วย ปริมาณอาหารที่ปลากิน (Feed intake), อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (Feed conversion ratio; FCR), อัตราการกินอาหาร (Rate of feed intake), ประสิทธิภาพการใช้อาหาร (Feed efficiency ratio; FER), สัมประสิทธิ์การย่อยได้ของวัตถุแห้ง (Apparent digestibility coefficient of dry matter, ADC) และโปรตีน (Apparent digestibility coefficient of protein, ADC protein), การเก็บสะสมโปรตีน (Protein retention; PR), การเก็บสะสมไขมัน (Lipid retention ; LR), ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน (Protein efficiency ratio, PER), ประสิทธิภาพการใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ (Protein productive value, PPV), ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของซาก (Chemical compositon of carcass), การเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อวิทยา (Histological change) ในอวัยวะต่างๆ ประกอบด้วย ตับ (Liver) และสำไส้ (Intestine) และคาโลหิตวิทยา (Hematology) ในปลานิลทำการทดลองที่โรงเพาะฟักของสาขาวิทยาศาสตร์การประมง คณะเกษตรศาสตร์ทรัพยากรธรรมชาติ และสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร

นิยามศัพท์เฉพาะ

1. กากถั่วดาวอินคา (Sacha inchi meal)
2. ปลานิล (Nile tilapia)
3. การทดแทน (Substitution)
4. กระบวนการให้ความร้อน (Heating process)
5. ปลาป่น (Fish meal)
6. ประสิทธิภาพการเจริญเติบโต (Growth performance)
7. ประสิทธิภาพการใช้อาหาร (Feed utilization)
8. ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน (Protein utilization)
9. องค์ประกอบทางเคมีของซาก (Chemical compositon of carcass)
10. สัมประสิทธิ์การย่อยได้ของสารอาหาร **(**Apparent digestibility coefficient)
11. เนื้อเยื่อวิทยา (Histological change)
12. โลหิตวิทยา **(**Hematology)

สมมุติฐานของการวิจัย

กากถั่วดาวอินคาที่ผ่านกระบวนการความร้อนด้วยวิธีการต่างๆ สามารถนำมาเป็นวัตถุดิบแหล่งโปรตีนในอาหารปลานิล เพื่อใช้สำหรับการเจริญเติบโตในอาหารปลานิล

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในปัจจุบันวัตถุดิบแหล่งโปรตีนทางเลือกใหม่ถูกนำมาใช้ทดแทนปลาป่นที่มีราคาเป็นจำนวนมากขึ้น เพื่อเป็นการลดค่าอาหารที่เป็นต้นทุนการผลิตสัตว์น้ำ กากถั่วดาวอินคาที่เป็นเศษเหลือจากโรงงานสกัดน้ำมันก็มีปริมาณมาก และยังมีคุณค่าสารอาหารประเภทโปรตีนสูงเช่นกัน จึงเล็งเห็นประโยชน์ที่จะนำใช้เป็นวัตถุดิบอาหารสัตว์น้ำ เพื่อช่วยลดต้นทุนราคาอาหารของเกษตรกรได้

ชีววิทยาของถั่วดาวอินคา

ภาพ 1 ลักษณะของถั่วดาวอินคา

ที่มา: อุสิธารา จันตาเวียง, 2563

วงศ์ : Euphorbiaceae

ชื่อสามัญ : Sacha inchi, Inca peanut, Sacha peanut, Mountain peanut, Supua peanut

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Plukenetia volubilis* L.

ชื่อท้องถิ่น : ถั่วดาวอินคา

ถั่วดาวอินคา หรือ Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* Linneo) จัดเป็นพืชที่ให้น้ำมันอยู่ในตระกูลของ Euphorbiaceae ขึ้นตามบริเวณลุ่มน้ำอเมซอนแถบประเทศเปรู (Chirinos et al., 2013) พืชชนิดนี้เติบโตในภูมิประเทศที่มีอากาศอบอุ่น ระดับ 1,500 เมตรจากระดับน้ำทะเล

ซึ่งสามารถปลูกได้ในประเทศไทย เมล็ดถั่วดาวอินคานั้นมีปริมาณน้ำมัน 35 - 60 เปอร์เซ็นต์ และโปรตีน 27 เปอร์เซ็นต์ เมล็ดประกอบด้วยกรดไขมันจำเป็นปริมาณมากได้แก่ โอเมก้า-3 และโอเมก้า-6 เป็นปริมาณ 82 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาณน้ำมันทั้งหมด ซึ่งอย่างที่ทราบกันดีว่ากรดไขมันโอเมก้า-3 มีผลส่งเสริมความสามารถของสติปัญญา ชะลอความเสื่อมและบำรุงสมอง เนื่องจากโอเมก้า-3 มีผลต่อการทำงานของทางผ่านของไอออน (Ion channels) และการส่งผ่าน สัญญาณของระบบประสาท มีผลต่อการทำงานของตัวรับสัญญาณสื่อประสาทในสมอง และเป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้ม เซลล์สมองซึ่งมีผลต่อการนำกระแสประสาท (อุสิธารา จันตาเวียง, 2563)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ลำต้นถั่วดาวอินคา มีลำต้นเป็นไม้เลื้อยที่มีอายุนาน 10-50 ปี ลำต้นแตกกิ่งเป็นเถาเลื้อยได้ยาวมากว่า 2 เมตร เถาอ่อนมีสีเขียว เถาแก่หรือโคนเถามีสีน้ำตาล แก่นเถาแข็ง และเหนียว

ใบถั่วดาวอินคาเป็นพืชใบเลี้ยงคู่ แตกใบเป็นใบเดี่ยว เรียงสลับเยื้องกันตามความยาวของเถา ใบมีรูปหัวใจ โคนใบกว้าง และเว้าตรงกลางเป็นฐานหัวใจ ส่วนปลายใบแหลม แผ่นใบมีสีเขียวสด และมีร่องตื้นๆตามเส้นแขนงใบ ส่วนขอบใบหยักเป็นฟันเลื่อย มีก้านใบยาวประมาณ 2-4 เซนติเมตร ส่วนแผ่นใบกว้างประมาณ 8-10 เซนติเมตร ยาวประมาณ 12-18 เซนติเมตร

ดอกถั่วดาวอินคาออกดอกเป็นช่อตามซอกใบบนเถา แต่ละช่อมีดอกขนาดเล็กจำนวนมาก ดอกมีลักษณะทรงกลม สีเขียวอมเหลือง เป็นดอกชนิดแยกเพศ แต่รวมอยู่ในช่อดอก และต้นเดียวกัน โดยดอกเพศเมียจะอยู่บริเวณโคนช่อดอก 2-4 ดอก ส่วนดอกเพศผู้มีจำนวนมากถัดจากดอกเพศเมียมาจนถึงปลายช่อดอก ทั้งนี้ ถั่วดาวอินคาจะติดดอกครั้งแรกเมื่ออายุประมาณ 5 เดือน หลังเมล็ดงอก และผลจะแก่ที่พร้อมเก็บได้ประมาณอีก 3-4 เดือน หลังออกดอก

ผลและเมล็ดถั่วดาวอินคา มีลักษณะเป็นแคปซูลที่แบ่งออกเป็นพูๆหรือแฉก 4 - 7 พู ขนาดฝักกว้าง 3 - 5 เซนติเมตร เปลือกผลอ่อนมีสีเขียวสด และมีประสีขาวกระจายทั่ว แล้วค่อยๆ เปลี่ยนเป็นสีดำเมื่อสุก และแก่จนแห้งเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล พร้อมกับเปลือกปริแตกจนมองเห็นเมล็ดด้านใน เมล็ดถั่วดาวอินคาใน 1 ผลหรือฝัก จะมีจำนวนเมล็ดตามพูหรือแฉก อาทิ ฝักมี 5 พู ก็จะมี 5 เมล็ด หากมี 7 พู ก็จะมี 7 เมล็ด โดยเมล็ดจะแทรกอยู่ในแต่ละพูในแนวตั้ง เมล็ดมีรูปทรงกลม และแบน ขอบเมล็ดบางแหลม ตรงกลางเมล็ดนูนเด่น ขนาดเมล็ดกว้าง 1.5 - 2.0 เซนติเมตร ยาว 1.8 - 2.2 เซนติเมตร น้ำหนักเมล็ดเฉลี่ย 1.5 กรัม/เมล็ด เปลือกเมล็ดเป็นแผ่นบาง มีสีน้ำตาลอมดำ ถัดมาจากเปลือกเป็นเนื้อเมล็ดที่มีสีขาว เนื้อเมล็ดเมื่อคั่วสุกจะกรอบ และมีรสมันอร่อย มีน้ำมันปริมาณมาก (อุสิธารา จันตาเวียง, 2563)

ประโยชน์ถั่วดาวอินคา

1. เมล็ดถั่วดาวอินคานำมาคั่วไฟร้อนให้สุกก่อนรับรับประทานเป็นอาหารขบเคี้ยว เนื้อเมล็ดหอม กรอบ และมีรสมันอร่อยคล้ายกับเมล็ดถั่ว

2. เมล็ดถั่วดาวอินคาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ขนมขบเคี้ยว อาทิ ถั่วคั่วเกลือ ถั่วทอด เป็นต้น

3. เมล็ดถั่วดาวอินคานำมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์อาหาร อาทิ ซอส ซีอิ้ว เต้าเจี้ยว เป็นต้น รวมถึงแปรรูปเป็นแป้งถั่วดาวอินคาสำหรับใช้ประกอบอาหาร และทำขนมหวาน

4. เมล็ดถั่วดาวอินคานำมาสกัดน้ำมัน ซึ่งนำไปใช้ประโยชน์ในหลายด้าน ได้แก่ ใช้เป็นน้ำมันรับประทานเพื่อเป็นอาหารเสริมให้แก่ร่างกาย โดยมักผลิตในรูปบรรจุขวดหรือบรรจุแคปซูลพร้อมรับประทาน ใช้เป็นน้ำมันทอดหรือประกอบอาหาร ใช้เป็นส่วนผสมของเครื่องสำอาง เช่น โฟมล้างหน้า สบู่ น้ำหอม และครีมบำรุงผิว น้ำมันที่สกัดได้ใช้สำหรับทานวดแก้ปวดเมื่อย รวมถึงใช้ชโลมผมให้ดกดำ และจัดทรงง่าย

5. ใบอ่อน และยอดอ่อนนำมาประกอบอาหาร เนื้อใบ และยอดอ่อนมีความนุ่ม และมีรสมันไม่มีกลิ่นเหม็นเขียว สามารถทำได้ในหลายเมนู อาทิ ยอดถั่วดาวอินคาผัดน้ำมันหอย แกงจืดยอดอ่อนถั่วดาวอินคา แกงเลียงหรือแกงอ่อมยอดอ่อนถั่วดาวอินคา เป็นต้น รวมถึงนำยอดอ่อนมาลวกหรือรับประทานสดคู่กับน้ำพริกหรืออาหารจำพวกลาบ ซุบหน่อไม้ เป็นต้น

6. ใบแก่ที่มีมีสีเขียวเข้มนำมาสับเป็นชิ้นเล็ก แล้วตากแดดให้แห้ง ก่อนใช้ชงเป็นชาดื่ม

7. ใบที่มีสีเขียวสดนำมาสกัดคลอโรฟิลล์หรือนำมาปั่นเป็นน้ำคลอโรฟิลล์ดื่ม

8. เปลือกฝัก และเปลือกเมล็ดใช้ทำปุ๋ยหมัก หรือนำไปอัดเป็นเชื้อเพลิงแท่งสำหรับหุงหาอาหาร (Nascimento et al., 2013)

สรรพคุณถั่วดาวอินคา

เมล็ดถั่วดาวอินคานำมาคั่วรับประทานหรือสกัดน้ำมันสำหรับประกอบอาหารหรือรับประทาน ซึ่งอุดมไปด้วยสารอาหารหลายชนิด ซึ่งในเมล็ดมีสรรพคุณหลายด้าน ได้แก่ ช่วยลดคอเลสเตอรอล ช่วยป้องกันการแข็งตัวของเลือด ช่วยลดความเสี่ยงการเกิดโรคหัวใจ ป้องกันโรคความดันโลหิตสูง ช่วยลดไขมันประเภทไตรกลีเซอไรด์ ป้องกันไขมันอุดตันในเส้นเลือด ช่วยควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด และป้องกันโรคเบาหวาน ช่วยลดน้ำหนัก ช่วยลดอาการซึมเศร้า กระตุ้นความจำ ช่วยส่งเสริมพัฒนาการของสมอง ป้องกันโรคสมองเสื่อม เสริมสร้างเซลล์ และรักษาความแข็งแรงของเซลล์ ป้องกันและลดการอักเสบของหลอดเลือด ป้องกันและลดอาการของโรคไขข้อ รักษาโรคผิวหนังป้องกัน และบรรเทาโรคหอบหืด รักษาโรคไมเกรน ป้องกันโรคต้อหิน ต้อกระจก ต้านอนุมูลอิสระ ป้องกันการเสื่อมของเซลล์ ช่วยให้ผิวเปล่งปลั่ง แลดูอ่อนวัย ควบคุมความดันในลูกตา และเส้นเลือด

กระตุ้นและส่งเสริมภูมิคุ้มกันของร่างกาย ตำรับยาสมุนไพรของชาวอเมซอนมีการใช้เมล็ดถั่วดาวอินคาเป็นยารักษาโรครูมาตอยด์ และลดอาการปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ (Nascimento et al., 2013)

ใบ และยอดอ่อน

ช่วยลดน้ำตาลในเลือด ช่วยลดไขมันในเส้นเลือด ป้องกันโรคหลอดเลือด และสมอง ป้องกันโรคเบาหวาน ใบของถั่วดาวอินคาใช้ปรุงอาหารและบริโภค ใบของถั่วดาวอินคามีสารเทอร์ฟีนอยด์ (Terpenoids) ซาโปนิน (Saponins) ฟีนอลิก (Phenolic) และสารอื่นๆที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) และต้านการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง (Antiproliferative activity) (Souza et al., 2013) ที่น่าสนใจคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระและต้านการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งนี้มีการศึกษาค้นพบในใบของถั่วดาวอินคา (Nascimento et al., 2013)

Rugchanok (2016) ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบ ความสามารถในการผลิตสารทุติยภูมิจากใบอ่อน ใบเพสลาดและใบแก่ของถั่วดาวอินคาเพื่อรองรับการผลิตใบชาเพื่อชุมชนของจังหวัดนราธิวาส พบว่า มีการพบสาร 5 ชนิดคือ 2-Propanone, 1hydroxy, 2-Pentanone, 4-hydroxy-4-methyl, 2,3-Dihydroxybenzofuran, 4-Vinyl-syringol และ 2-Hexadecen-1-ol,3,7,11,15 tetramethyl แต่ไม่พบ 2-Hexadecen-1-ol,3,7,11,15-tetramethyl ในใบแก่ พบสาร 4-Vinyl-syringol ในปริมาณที่สูงในใบอ่อน ในใบแก่พบสาร 2-Propanone,1-hydroxy, 2-Pentanone, 4-hydroxy4-menthyl และ 4-Vinyl-syringol ในปริมาณสูงในใบเพสลาด (ใบเพสลาด *คือ*ช่วงที่ใบจะเปลี่ยนจากใบอ่อนเป็นใบแก่) ส่วนในใบแก่พบสาร 2-Propanone, 1-hydroxy, 2-Propanone, 4hydroxy-4-methyl ในปริมาณสูง สารทุติยภูมิที่พบมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีประโยชน์ต่อมนุษย์ 2-Propanone, 1-hydroxy หรือ Acetol พบในปริมาณต่ำในใบอ่อนของถั่วดาวอินคา แต่พบในปริมาณสูงในใบเพสลาดและใบแก่ของถั่วดาวอินคา สารทุติยภูมิชนิดนี้เป็นสารที่ใช้ในวงการอุตสาหกรรมอาหารเพื่อให้กลิ่นแก่อาหาร ใช้เป็นส่วนผสมของเครื่องสำอางเป็นสารที่ช่วยละลายของสี (Mohamad et al., 2011; Yao et al., 2015)

ในทำนองเดียวกันสาร 2-Pentanone, 4-hydroxy-4-methyl พบในปริมาณต่ำในใบอ่อนของถั่วดาวอินคา และพบในปริมาณสูงในใบเพสลาดและใบแก่ของถั่วดาวอินคา สารดังกล่าวใช้เป็นตัวทำละลายในอุตสาหกรรม (Zheng et al., 2003) สาร Phyton หรือ 2-Hexadecan-1-ol,3,7,11,15-tetramethyl ซึ่งพบในปริมาณต่ำของใบถั่วดาวอินคาที่อ่อนและระยะเพสลาด แต่กลับไม่พบในใบแก่ของถั่วดาวอินคา เป็นสารที่มีบทบาทในขบวนการสังเคราะห์แสง (Photosynthesis) (W. Zhang et al., 2014) ใช้ในการผลิตวิตามิน E และวิตามิน K คุณสมบัติที่น่าสนใจคือ Phyton

มีคุณสมบัติเป็น Antimycobacterial (Rajab et al., 1998) ในใบทุกระยะของถั่วดาวอินคาพบสาร 2,3-Dihydrobenzofuran ในปริมาณต่ำ สารดังกล่าวมีคุณสมบัติในการรักษาโรคเบาหวานและโรคไขข้อ นอกจากนี้ยังพบว่าสาร 4-Vinyl-syringol หรือ Canolol ซึ่งพบในปริมาณสูงในใบถั่วดาวอินคาระยะอ่อนและใบเพสลาดแต่พบสารดังกล่าวในปริมาณต่ำในใบแก่ สาร 4-Vinyl-syringol เป็นสารประเภทฟีนอลิกมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Wang et al., 2014) Antifeedant, Attractants และมีคุณค่าทางอาหาร (สารประกอบที่พบในใบระยะต่างๆ ของถั่วดาวอินคาสามารถนำมาเป็นความรู้พื้นฐานเพื่อเลือกใช้ใบถั่วดาวอินคาในช่วงอายุที่เหมาะสมมาดัดแปลงเป็นชาจากใบถั่วดาวอินคา แต่พบสารที่มีประโยชน์ในปริมาณสูงในใบอ่อนและใบเพสลาดของถั่วดาวอินคาสามารถเลือกใบถั่วดาวอินคาช่วงอายุดังกล่าวมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตข้อมูลคุณสมบัติทางเคมีของใบถั่วดาวอินคาพบในงานวิจัยเรื่อง Antioxidant & Antiproliferative Activities of Leaf Extracts from *Plukenetia volubilis* Linneo (Euphorbiaceae) โดย Nascimento et al. (2013) จากประเทศบราซิลซึ่งพบว่าจากผลการสกัดสารจากใบดาวอินคาโดยใช้สารสกัดจากน้ำเมทานอล เอทานอล คลอโรฟอร์ม และเฮกเซน ซึ่งการวิเคราะห์โครมาโตกราฟีแบบผิวบาง พบว่ามีสารประกอบฟีนอล (เป็นสารที่พบตามธรรมชาติในพืชหลายชนิด ซึ่งถูกสร้างขึ้นเพื่อประโยชน์ในการเจริญเติบโต สารประกอบฟีนอลมีโภชนเภสัช ซึ่งสรรพคุณที่ดีต่อสุขภาพคือมีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) สามารถละลายได้ในน้ำ สเตียรอยด์ และ/หรือเทอร์พีนอยด์

นอกจากนี้จากการวิเคราะห์ปฏิกิริยาการต่อต้านอนุมูลอิสระพบว่าค่าความสามารถในการต่อต้านอนุมูลอิสระ หรือค่า Total Antioxidant capacity (TCA) เทียบเท่ากับวิตามินซี หรือ ascorbic acid (EEA/g) พบว่ามีค่าระหว่าง 59.31 ถึง 97.76 EAA/กรัม นอกจากนี้ยังพบค่าความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชั่นที่มีค่าระหว่างร้อยละ 62.8 ถึง 88.3 ส่วนการวิเคราะห์เซลล์ที่รอดชีวิต (survival) พบว่าสารสกัดจากใบดาวอินคาสามารถลดการรอดชีวิตของเซลมะเร็งได้โดยเฉพาะเซลล์ Hela และ A549 โดยสารสกัดใบดาวอินคาจากตัวทำละลายประเภทเมทานอลและเฮกเซน (250 µg/mL) สามารถลดการเพิ่มจำนวนเซลล์ของ HeLa cell ถึงร้อยละ 54.3 และ 48.5 ตามลำดับ ในทางตรงข้ามสารสกัดใบดาวอินคาจากตัวทำละลายเฮกเซนและสารสกัดจากน้ำยังสามารถชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนเซลล์ของเซลล์ 3T3 ไฟโบรบลาสต์ปกติได้

Kumar et al. (2014) ซึ่งใช้สารสกัดจากใบดาวอินคาเป็นสารลดความเป็นพิษที่ขนาด 4 - 25 นาโนเมตร การวิเคราะห์โครงสร้างด้วยสายตาและคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาจากการสังเคราะห์อนุภาคนาโนใช้การประเมินด้วยสายตา, UV-Vis เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง,

กล้องจุลทรรศน์ อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน และการวัดการกระเพื่อมของความเข้มแสง ซึ่งมีการพบค่าสารต่อต้านอนุมูลอิสระเปรียบเทียบกับสารสกัดจากใบดาวอินคา โดยผลการวิจัยเสนอว่าสารสกัดซิลเวอร์นาโนดังกล่าว สามารถนำมาใช้อย่างมีประสิทธิภาพในด้านพันธุวิศวกรรมในอนาคต

โอเมก้า-3 ในถั่วดาวอินคา

การศึกษาผลของน้ำมันจากถั่วดาวอินคาต่อการลดระดับไขมันในเลือดกับผู้ป่วย 24 คน ที่มีปัญหาคอเลสเตอรอลในเลือดสูง โดยให้ผู้ป่วยรับประทานน้ำมันที่สกัดจากถั่วดาวอินคา 5-10 มิลลิลิตร ความเข้มข้นของโอเมก้า-3 ขนาด 2 กรัม/5 ml และอีกกลุ่มรับประทานกรดไขมันโอเมก้า-3 จากน้ำมันปลานาน 4 เดือน พบว่าทั้ง 2 กลุ่มมีผลคอเลสเตอรอลทั้งหมดและไขมันที่ไม่จำเป็นในเลือดลดลง และพบว่าระดับไขมันเอชดีแอล (HDL) เพิ่มขึ้น ซึ่งแสดงให้เห็นถึงว่ากรดไขมันโอเมก้า-3 ในน้ำมันที่สกัดได้จากถั่วดาวอินคามีคุณสมบัติที่ดีต่อร่างกายคล้ายกับกรดไขมันโอเมก้า-3 จากน้ำมันปลา (Garmendia et al., 2011)

สำหรับความปลอดภัยในการรับประทานน้ำมันถั่วดาวอินคา Gonzales, & Gonzales (2014) ได้มีงานวิจัยให้ผู้เข้าร่วมการทดลองอายุระหว่าง 25 - 55 ปี จำนวน 30 คน เป็นเพศชาย 13 คน และเพศหญิง 17 คน รับประทานน้ำมันถั่วดาวอินคาวันละ 10 - 15 มิลลิลิตร โดยเปรียบเทียบกับน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันปริมาณเท่ากันเป็นระยะเวลา 4 เดือน พบว่าผลข้างเคียงที่พบเป็นหลักในกลุ่มที่รับประทานน้ำมันถั่วดาวอินคา ได้แก่อาการคลื่นไส้ เรอ ส่วนอาการอื่นๆ ที่พบบ้าง ได้แก่ ร้อนวูบวาบ ปวดศีรษะ ปวดท้อง ท้องผูก ส่วนผลข้างเคียงที่พบเป็นหลักในกลุ่มที่รับประทานน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน ได้แก่คลื่นไส้ท้องอืด ส่วนอาการอื่น ๆ ที่พบบ้าง ได้แก่ ปวดท้อง ในส่วนของค่าการทำงานของตับ ได้แก่ AST (aspartate transaminase), ALT (alanine aminotransferase), GGT (gammaglutamyl transferase), Alkaline Phosphatase, Total Bilirubin, Albumin, Total protein ค่าการทำงานของไต ได้แก่ Creatinine ค่าการอักเสบ ได้แก่ CRP และค่ากรดยูริค (uric acid) ทั้งหมดนี้ไม่พบว่ามีความผิดปกติ

เมล็ดของถั่วดาวอินคา

เมล็ดของถั่วดาวอินคาเป็นแหล่งของกรดไขมันไม่อิ่มตัว (Polyunsaturated fatty acid) โดยเฉพาะ α-linolenic acid และ linoleic acid (Chirinos et al., 2013; Hanssen, & Schmitz-Hübsch, 2011; Maurer et al., 2012) และกรดไขมันที่จำเป็น ดังแสดงในตาราง 1 กรดไขมันที่จำเป็นเป็นตัวกลางในการสังเคราะห์สารสำคัญในร่างกายมนุษย์ เช่น prostaglandin E1 และอนุพันธ์ (Fanali et al., 2011) ป้องกันโรคหลอดเลือดหัวใจตีบ (Cardiovascular disease) ต่อต้าน

rheumatoid arthritis มะเร็งและป้องกันไวรัส (Maurer et al., 2012) โทโคฟีรอล (tocopherols) (Souza et al., 2013) ไฟโตสเตอรอล (Phytosterol) (Hanssen and Schmitz-Hübsch, 2011) สารโทโคฟีรอลและฟลาโวนอยด์จากเมล็ดของถั่วดาวอินคาช่วยลดความเสี่ยงต่อโรคหัวใจและโรคมะเร็ง (Souza et al., 2013) สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compounds) และสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) (Chirinos et al., 2013) ในส่วนของเปลือกและเมล็ดถั่วดาวอินคายังพบกรดไขมันอิ่มตัวที่มีคุณสมบัติ anti-antherogenic, anti-thrombogenic และ hypercholesterolemic effect

ตาราง 1 องค์ประกอบกรดไขมันของถั่วดาวอินคา

ชนิด	ปริมาณ
Saturated fat (g/100 g)	0.59 ± 0.14
Palmitic acid (g/100 g)	0.37 ± 0.04
Stearic acid (g/100 g)	0.22 ± 0.05
Unsaturated fat (g/100 g)	5.68 ± 0.07
Monounsaturated fatty acid (g/100 g)	0.57 ± 0.07
Polyunsaturated fatty acid (g/100 g)	5.11 ± 0.07
Cis-9-Oleic acid (g/100 g)	0.55 ± 0.07
Cis-11-Eicosnoic acid(g/100 g)	0.02 ± 0.01
Cis-9,12-Linoleic acid (g/100 g)	2.45 ± 0.21
Omega-3 (mg/100 g)	2,656.13 ± 0.33
Omega-6 (mg/100 g)	2,439.64 ± 13.01
Omega-9 (mg/100 g)	552.61 ± 0.22

ที่มา: Rawdkuen et al., 2016

เมล็ดถั่วดาวอินคายังเป็นแหล่งของน้ำมัน (35 - 60 เปอร์เซ็นต์) และโปรตีน (27 เปอร์เซ็นต์) ในปริมาณสูง โดยเฉพาะโปรตีนชนิด albumin ที่ละลายน้ำได้ จะพบเป็น 1 ใน 3 ของโปรตีน ทั้งหมด (Hanssen and Schmitz-Hübsch, 2011) พบกรดอะมิโนประเภทซิสเตอีน (cysteine) ไทโรซีน

(Tyrosine) ทรีโอนิน (Threonon) และทริปโตเฟน (Tryptophan) (ตาราง 2) จากเมล็ดถั่วดาวอินคา (Maurer et al., 2012) นอกจากนี้ยังพบสาร Tocopherols, Carotenes, Polyphenolic compound, Phytosterol และ Cysteine (Chirinos et al., 2013; Fanali et al., 2011)

ตาราง 2 องค์ประกอบของกรดอะมิโนของถั่วดาวอินคา (mg/100 g)

ชนิด	ปริมาณ
กรดอะมิโนจำเป็น	
Phenylalanine	3,183.50 ± 17.68
Leucine	7,223.50 ± 177.48
Tryptophan	3,279.50 ± 13.44
Isoleucine	3,873.00 ± 147.80
Lysine	17,849.00 ± 883.88
Threonine	1,733.50 ± 95.46
Histidine	9,334.50 ± 523.97
Valine	3,361.00 ± 335.17
Methionine	624.21 ± 14.17
กรดอะมิโนที่ไม่จำเป็น	
Alanine	1,288.00 ± 18.38
Arginine	< 5.00 ± 0.00
Cystine	5,524.00 ± 106.07
Tyrosine	10,025.00 ± 87.68
Glycine	3,673.50 ± 24.75

ที่มา: Rawdkuen et al., 2016

ถั่วดาวอินคาเป็นวัตถุดิบที่ได้จากพืช ซึ่งส่วนใหญ่แล้วพืชจะมีสารต้านโภชนาการอยู่ ซึ่งบางชนิดอาจส่งผลรุนแรงและไม่รุนแรงต่อสัตว์น้ำ เช่นเดียวกันกับถั่วดาวอินคาที่มีสารต้านโภชนาการ ได้แก่ แทนนิน (Tannin) ทริปซินอินฮิตบิเตอร์ (Trypsin inhibitor) และซาโปนิน (Saponins)

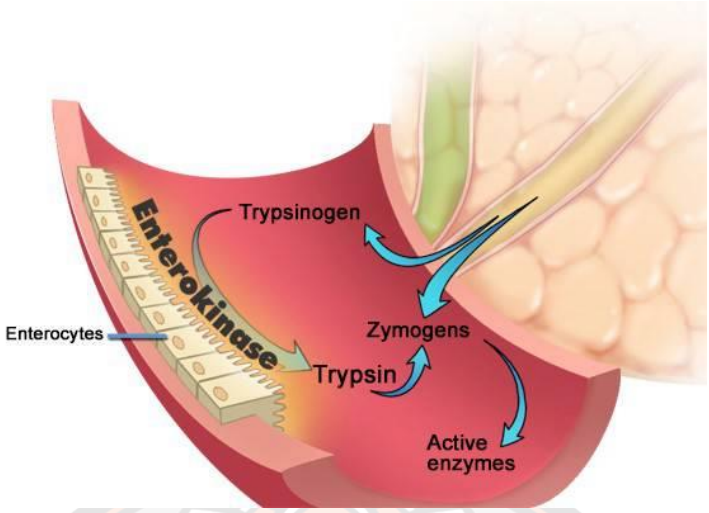
ตาราง 3 สารต้านโภชนาการของถั่วดาวอินคา (g/100 g)

ชนิดสารต้านโภชนาการ	ถั่วดาวอินคา
แทนนิน	1.94 ± 0.27
ทริปซินอินฮิตบิเตอร์	0.16 ± 0.03
ซาโปนิน	0.27 ± 0.01

ที่มา: Rawdkuen et al., 2016

ทริปซิน (Trypsin)

ทริปซิน (Trypsin) คือ เอนไซม์ย่อยโปรตีนให้เป็นกรดอะมิโนถูกผลิตมาจากตับอ่อนทำหน้าที่ย่อยโปรตีนและพอลิเพปไทด์ที่มาจากกระเพาะอาหารให้มีโมเลกุลเล็กลงจนเป็นไดเพปไทด์หรือกรดอะมิโน โดยเอนไซม์ทริปซิน (Trypsin) จะถูกหลั่งออกมาในรูปของ Trypsinogen ซึ่งเป็น Inactive proenzyme จากนั้น Trypsinogen จะถูกเปลี่ยนเป็น Trypsin (active enzyme) โดย Enzyme enteropeptidase (Enterokinase) ที่หลั่งจาก Brush border ของลำไส้เล็ก ทริปซิน (Trypsin) จะเปลี่ยน Chymotrypsinogen เป็น Chymotrypsin รวมทั้งเปลี่ยน Procarboxypeptidase เป็น Carboxypepitdase ซึ่งทั้ง Trypsin, Chymotrypsin และ Carboxypeptidase จะทำงานร่วมกันในการย่อยโปรตีนและเพปไทด์ ได้เพปไทด์ที่มีขนาดเล็กและกรดอะมิโน



ภาพ 2 กลไกการทำงานของเอมไซม์ทริปซิน

ที่มา: เก็จมาศ เรืองประกาย, 2530

ส่วนเอมไซม์ทริปซินอินฮิบิเตอร์ (Trypsin inhibitor) มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซิน (Trypsin) โดยเกาะรวมกับเอนไซม์ ทำให้ความสามารถในการทำงานของเอมไซม์ทริปซิน (Trypsin) ลดลง ส่งผลให้การเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหารลดลง การขาดเอนไซม์ย่อยโปรตีนในลำไส้เล็กส่วนต้นจะทำให้ตับอ่อนต้องหลั่งเอนไซม์มากขึ้น เพราะเอนไซม์ที่ผลิตออกมาจะถูกจับโดยสารยับยั้งและถูกขับออกนอกร่างกาย จึงทำให้ร่างกายขาดกรดอะมิโนซีสเตอีน (Cysteine) ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่มีมากในเอนไซม์ทริปซินและไคโมทริปซิน ร่างกายจึงต้องเปลี่ยนเมทไธโอนีนไปเป็นซีสเตอีน ทำให้การขาดเมทไธโอนีนเพิ่มขึ้นทำให้การเจริญเติบโตชะงักอย่างรุนแรง (Pond and Maner, 1984) ส่วนในสัตว์กระเพาะรวมการเลี้ยงด้วยถั่วเหลืองดิบไม่มีผลกระทบต่อการย่อยของสัตว์มากนัก เนื่องจากในกระเพาะมีจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการหมักย่อยและเปลี่ยนรูปให้เป็นกรดอะมิโนที่สามารถไปใช้ประโยชน์ได้

ปริมาณของทริปซินอินฮิบิเตอร์ (Trypsin inhibitor) ในถั่วเหลืองดิบมีสูงถึง ประมาณ 107 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน การนำถั่วเหลืองมาใช้ให้มีประสิทธิภาพจึงต้องทำลายสารยับยั้งการใช้ประโยชน์ในถั่วเหลืองดิบก่อน ซึ่งการปรับปรุงคุณค่าทางโภชนาการของถั่วเหลืองพบว่าสามารถทำได้โดยการให้ความร้อนแก่ถั่วเหลืองโดยวิธีการต่างๆ เพื่อทำให้ถั่วเหลืองสุก เช่น การต้มหรือนึ่งเมล็ดถั่วเหลือง การเอ็กซ์ทรูดแบบชื้น การคั่วเมล็ดถั่วเหลืองหรือการเอ็กซ์ทรูดแบบแห้ง ซึ่งการเพิ่มการใช้

ประโยชน์ได้ในถั่วเหลืองโดยการให้ความร้อนนั้นประสิทธิภาพจะขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ ระยะเวลา ความชื้น และขนาดของเมล็ดถั่วเหลือง

จากการศึกษาของ Roengpragai (1987) พบว่าการแช่เมล็ดถั่วเหลืองดิบในน้ำทิ้งไว้ค้างคืน จนถั่วเหลืองมีความชื้น 12-68 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำมาต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5-7 นาที จะทำลายสารยับยั้งการใช้ประโยชน์ได้ทั้งหมด แต่ถ้าถั่วเหลืองมีความชื้นเพียง 8 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำมาต้มในน้ำเดือดนานถึง 30 นาทีก็ยังไม่สามารถทำลายสารยับยั้งการใช้ประโยชน์ได้ทั้งหมดได้โดยถั่วเหลืองที่มีความสุกพอดีค่าทริปซินอินฮิบิเตอร์ (Trypsin inhibitor) ต้องไม่เกิน 3.00 มก./ กรัม

ตาราง 4 ผลของอุณหภูมิและความชื้นต่อปริมาณของทริปซินอินฮิบิเตอร์ (Trypsin inhibitor) ในกระบวนการเอ็กซ์ทรูด (Extrusion) ของถั่วเหลือง

อุณหภูมิ (°c)	ความชื้น (%)	ปริมาณทริปซินอินฮิบิเตอร์ (มก./ก)
70	36	23
90	27	15
110	15	8
130	4	4
150	4	3
160	4	3

ที่มา: Clarke & Wiseman, 1999

วัตถุดิบอาหารสัตว์จากพืช (Plant Feedstuffs) และผลพลอยได้ทางการเกษตร (Agricultural By-Products) หลายชนิดมีคุณค่าทางโภชนาการค่อนข้างต่ำ และมีองค์ประกอบที่สัตว์ย่อยได้ยาก การใช้วัตถุดิบดังกล่าวเพื่อเป็นองค์ประกอบในอาหารจะทำให้สัตว์มีการเจริญเติบโตช้า อัตราการเจริญพันธุ์ และการรอดชีวิตต่ำ นอกจากนี้วัตถุดิบดังกล่าวยังมีสารต้านโภชนาการ (Antinutritional Compounds) หลายชนิดที่ส่งผลกระทบต่อการดำรงชีวิตของสัตว์ เช่น สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (Enzyme Inhibitors) สารต้านการกินอาหาร (Antifeedants) เป็นต้น รวมถึงสารพิษ (Toxins) ที่มีอยู่ในวัตถุดิบอาหาร ซึ่งสารดังกล่าวทำให้สัตว์ใช้ประโยชน์จากวัตถุดิบอาหารได้ในปริมาณที่จำกัด

การศึกษาเพื่อพัฒนาวัตถุดิบอาหารสัตว์หลายชนิด พบว่าการดัดแปรงโครงสร้างของวัตถุดิบอาหารและผลพลอยได้ทางการเกษตร ให้เหมาะสมต่อการย่อยของเอนไซม์ จะทำให้สัตว์สามารถใช้ประโยชน์จากอาหารได้มากขึ้น กระบวนการดัดแปลงวัตถุดิบอาหารมีหลายวิธี ได้แก่ วิธีทางกล (Mechanical Modification), ชีวภาพ (Biological Modification), เคมี (Chemical Modification) และฟิสิกส์ (Physical Modification) หรือใช้หลายวิธีร่วมกัน สำหรับวิธีการดัดแปลงที่สะดวก รวดเร็ว สามารถใช้กับวัตถุดิบอาหารได้ในปริมาณมาก และไม่ต้องกำจัดสารเคมีตกค้าง คือการดัดแปลงด้วยวิธีทางฟิสิกส์ ได้แก่ การต้ม การนึ่งด้วยแรงดันไอน้ำ การใช้คลื่นความถี่สูง คลื่นไมโครเวฟ เป็นต้น ดังนั้นการดัดแปลง จึงเป็นทางเลือกหนึ่งในการปรับปรุงคุณภาพของวัตถุดิบอาหารให้ดีขึ้น และสัตว์สามารถใช้ประโยชน์จากวัตถุดิบได้อย่างเต็มประสิทธิภาพ (Kumar et al., 2009)

การดัดแปลงโครงสร้างด้วยวิธีทางฟิสิกส์ การดัดแปรวัตถุดิบอาหารหรือผลพลอยได้ทางการเกษตรโดยวิธีทางฟิสิกส์ที่นิยมใช้เพื่อปรับปรุงคุณภาพวัตถุดิบอาหารสัตว์ มีดังนี้

1. การต้ม (Boiling) และการนึ่งด้วยแรงดันไอน้ำ (Autoclaving) การต้มมีผลทำให้ประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนมีค่าสูงขึ้น ขณะที่การนึ่งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว พบว่าทำให้ประสิทธิภาพการย่อยโปรตีน และคาร์โบไฮเดรตสูงขึ้นเช่นกัน (Alajaji and El-Adawy, 2006) การศึกษาในวัตถุดิบอาหารพบว่าการต้มและนึ่งด้วยความดันไอน้ำสามารถลดปริมาณแทนนิน (Tannin) กรดไฟติก (Phytic Acid) ซาโปนิน (Saponin) และสารยับยั้งการทำงานของทริปซิน (Trypsin Inhibitor) ได้ (Rehman and Shah, 2005) ขณะเดียวกันกระบวนการดังกล่าวมีผลต่อการเกิดเจลาติไนเซชันของแป้งโดยเปลี่ยนแปลงปริมาณ แป้งที่ย่อยได้เร็ว (Rapidly Digestible Starch) แป้งที่ย่อยได้ช้า (Slowly Digestible Starch) และแป้งที่ทนต่อการย่อย (Resistant Starch) ซึ่งมีผลทำให้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสย่อยได้ดีขึ้น (Eyaru et al., 2009)

2. คลื่นเสียงความถี่สูง (Ultrasonic Wave) คลื่นเสียงความถี่สูงนิยมใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตและดัดแปลงอาหาร (Knorr et al., 2004) การศึกษาพบว่าคลื่นเสียงความถี่สูงทำให้เกิดการคืนตัวของแป้งสุก (Retrogradation) (Lionetto et al., 2006) การแตกหักของกากตะกอน (Sludge) ซึ่งมีผลทำให้มีกากระจายตัวและเกิดการย่อยทางเคมีและชีวภาพที่สูงขึ้น (Pilli et al., 2011) นอกจากนี้ คลื่นเสียงความถี่สูงยังใช้เพื่อทำลายผนังเซลล์ในการสกัดสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ (Albu et al., 2004) หรือทำลายผนังเซลล์เพื่อทำให้สัตว์สามารถใช้ประโยชน์จากสารประกอบภายในเซลล์ให้มากขึ้น อย่างไรก็ตามการใช้คลื่นเสียงความถี่สูงอาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างผลึก

ของโปรตีน (Crystallization) (Crespo et al., 2010) ซึ่งอาจส่งผลทำให้ประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนในวัตถุดิบมีค่าลดลง

3. คลื่นไมโครเวฟ (Microwave irradiation) คลื่นไมโครเวฟเป็นพลังงานที่ไม่มีการแตกตัวเป็นไอออน (Non-Ionizing Energy) สามารถทำให้เกิดความร้อนกับวัตถุจากการเปลี่ยนแปลงสนามแม่เหล็กไฟฟ้าคลื่นความร้อนดังกล่าวเกิดขึ้นในระยะเวลาอันสั้นและรวดเร็วทำให้เกิดความร้อนทั้งบริเวณผิว (Surface) และภายใน (Interior) ของตัวกลาง (Fakhouri and Ramaswamy, 1993) อย่างไรก็ตามปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการดัดแปลงโครงสร้างของวัตถุดิบอาหารโดยใช้คลื่นไมโครเวฟ คือ ความแรงของคลื่น ระยะเวลาที่ใช้ และความเข้มข้นของวัตถุดิบ (Guraya and Toledo, 1993) การใช้คลื่นไมโครเวฟเป็นวิธีการที่ช่วยเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของวัตถุดิบอาหารให้มีประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนใน Canola Meal (Sadeghi and Shawrang, 2006), Moth Bean (NegiBoora, & Khetarpaul, 2001), Bengal Gram, Green Gram, Horse Gram (Palekar et al., 2004) และ Chick Pea (Alajaji, & El-Adawy, 2006) และคาร์โบไฮเดรตใน Moth Bean (NegiBoora and Khetarpaul, 2001), Bengal Gram, Green Gram และ Horse Gram (Palekar et al., 2004) ที่ดีขึ้น เพิ่มประสิทธิภาพการสลายตัวให้สูงขึ้น (Mtui, 2009)

ชีววิทยาของปลานิล (Nile tilapia)

ปลานิลเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่มีความสำคัญมีความต้องการเพื่อการบริโภคสูง ประกอบกับในเขตพื้นที่ภาคเหนือตอนล่างซึ่งประกอบด้วยจังหวัดพิษณุโลก ตาก พิจิตร สุโขทัย กำแพงเพชร และอุตรดิษฐ์มีการเพาะเลี้ยงปลานิลเป็นจำนวนมาก และค่อนข้างหลากหลายรูปแบบอาธิเช่น บ่อดิน บ่อซีเมนต์ บ่อปูน กระชังในแม่น้ำ และเขื่อนกักเก็บน้ำ ทั้งนี้เนื่องจากปลานิลเป็นปลาที่นิยมบริโภคกันอย่างแพร่หลายในทุกภูมิภาคทั่วโลก สามารถนำมาประกอบอาหารได้หลากหลายรูปแบบ เลี้ยงง่าย ระยะเวลาเลี้ยงสั้น เจริญเติบโตเร็ว ราคาสูง อัตราการเปลี่ยนอาหารเนื้อต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับปลาชนิดอื่นๆ ทนทานและมีความเหมาะสมต่อสภาพภูมิอากาศในเขตภาคเหนือตอนล่างเป็นอย่างมาก ประกอบกับลักษณะภูมิประเทศของภาคเหนือตอนล่างเป็นภูมิประเทศที่เอื้ออำนวยสำหรับการเพาะเลี้ยงปลา มีน้ำสำหรับการเพาะเลี้ยงตลอดทั้งปี ปัจจัยดังกล่าวจึงส่งเสริมให้เกษตรกรหน้าใหม่ได้ให้ความสนใจในการเลี้ยงกันเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ในปี 2550 กรมประมงได้เล็งเห็นถึงความสำคัญของการควบคุมการผลิตตั้งแต่ต้นน้ำถึงปลายน้ำ เพื่อพัฒนาศักยภาพการผลิต และการส่งออกปลานิลอย่างเป็นรูปธรรม มีความเป็นมาตราฐานสากลที่ดี และสอดคล้องกับความต้องการในระดับนานาชาติ

จึงได้มีการส่งเสริม และสนับสนุนให้เกษตรกรผู้เลี้ยงปลานิลเข้าร่วมโครงการการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่ดีสำหรับการผลิตสัตว์น้ำจีเอพี (GAPs; good aquaculture practices) ปลานิลทั้งในรูปแบบมีชีวิต ปลาสด ปลาทั้งตัวแช่แข็ง ปลาแล่เนื้อเนื้อแช่แข็งเพื่อการส่งออกไปยังต่างประเทศได้แก่ สหภาพยุโรป ตะวันออกกลาง และสหรัฐอเมริกาเพื่อยกระดับและเพิ่มศักยภาพการผลิตปลานิลให้มีมูลค่าสูงมากขึ้นต่อไป การจำแนกทางอนุกรมวิธานของปลานิล อนุกรมวิธานของปลานิลจำแนกโดย Linnaeus (1758)

อนุกรมวิธานของปลานิล

Phylum Vertebrata

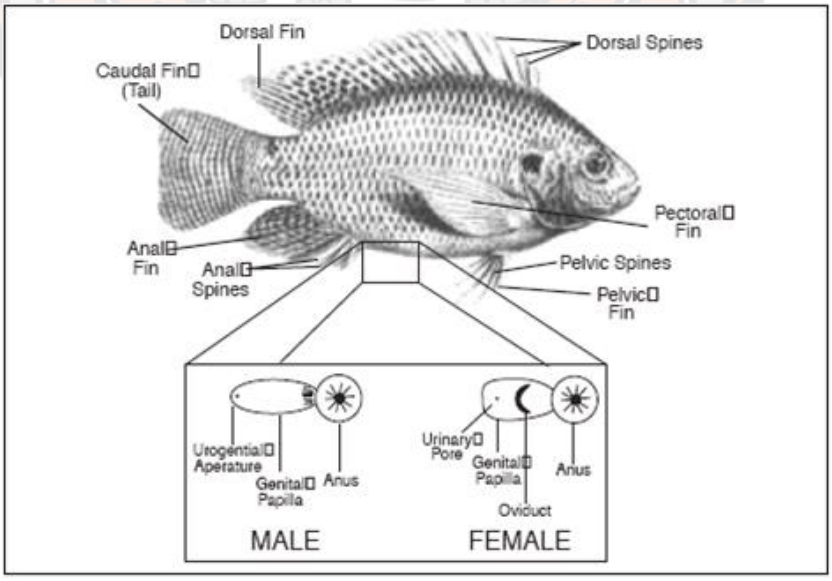
Class Osteichthyes

Order Perciformes

Family Cichlidae

Genus *Oreochromis*

Species *Oreochromis niloticus*



ภาพ 3 ลักษณะทั่วไปและแสดงส่วนต่างๆของปลานิลเพศผู้และเมียในปลานิล

ที่มา: Guerrero, 1973

ปลานิลเป็นปลาที่เจริญเติบโตเร็ว แข็งแรง อดทนต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมได้ดี สามารถทนอยู่ได้ในช่วงการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิตั้งแต่ 11- 42 องศาเซลเซียส ทนต่อความเป็นกรด - ด่างในช่วง 6.5-8.3 และทนต่อความเค็มของน้ำสูงถึง 20 พีพีที (PPT) ได้อย่างปลอดภัย ชอบอาศัยอยู่รวมกันเป็นฝูงตามแม่น้ำ ลำคลอง หนองบึง ทะเลสาบ

ปลานิลมีทางเดินอาหารยาวเป็น 5-7 เท่าของลำตัว ไม่มีกระเพาะแท้เหมือนปลากินเนื้อทั่วๆไป แต่มีเนื้อเยื่อที่มีโครงสร้างคล้ายกระเพาะที่สามารถหลั่งน้ำย่อย เพื่อลดความเป็นกรดเป็นด่างระหว่างการย่อยอาหารได้ ปลาในตระกูลปลานิลเป็นปลาที่กินอาหารได้ทุกชนิด จัดเป็นปลาที่กินทั้งพืชและสัตว์ (omnivorous) ชอบหากินในเวลากลางวันและหยุดหากินในเวลากลางคืนแต่การย่อยอาหารยังคงดำเนินการไปอย่างต่อเนื่องและช้า ๆ จะย่อยเสร็จสมบูรณ์ในเวลา 18-24 ชั่วโมง (เพ็ญพรรณ ศรีสกุลเตียว, 2543)

การสืบพันธุ์

ปลานิลสามารถผสมพันธุ์ได้ตลอดปี โดยใช้เวลา 2-3 เดือน/ครั้ง แต่ถ้าอาหารเพียงพอและเหมาะสม ในระยะเวลา 1 ปี จะผสมพันธุ์ได้ 5-6 ครั้ง โดยตัวผู้จะใช้บริเวณหน้าผากดุนที่ใต้ท้องของตัวเมีย เพื่อเป็นการกระตุ้นและเร่งเร้าให้ตัวเมียวางไข่ ปลาตัวเมียจะวางไข่ออกมาครั้งละ 10 หรือ 12 ฟอง ในขณะเดียวกันปลาตัวผู้ก็จะว่ายคลอคู่เคียงกันไป พร้อมกับปล่อยน้ำเชื้อผสมกับไข่นั้น ทำอยู่เช่นนี้จนกว่าการผสมพันธุ์จะแล้วเสร็จ

ไข่ที่ได้รับการผสมกับน้ำเชื้อแล้วปลาตัวเมียจะเก็บไว้ฟัก โดยวิธีอมไข่เข้าไว้ในปาก แล้วว่ายออกจากรังไปยังบริเวณก้นบ่อที่ลึกกว่า ส่วนตัวผู้ก็จะคอยหาโอกาสเวียนว่ายไปเคล้าเคลียกับตัวเมียอื่นๆ ต่อไป แม่ปลานิลจะอมไข่ไว้ในปากเป็นเวลา 4-5 วัน ไข่จะเริ่มฟักออกเป็นตัว ลูกปลาที่ฟักออกเป็นตัวใหม่ๆ จะอาศัยอาหารจากถุงอาหารธรรมชาติซึ่งติดอยู่ที่ท้อง ขณะเดียวกันแม่ปลายังคงต้องอมลูกปลาอยู่ต่อไป จนกระทั่งถุงอาหารธรรมชาติของลูกปลายุบหายไป

หลังจากฟักออกเป็นตัวแล้วประมาณ 3-4 วัน แม่ปลาก็จะคายลูกปลาให้ว่ายออกมาจากปาก ลูกปลาในระยะนี้สามารถกินอาหารจำพวกพืชและไรน้ำเล็ก ๆ ซึ่งมีอยู่ในน้ำ โดยจะว่ายวนเวียนอยู่ที่บริเวณหัวของแม่ปลา และจะเข้าไปหลบซ่อนอยู่ในช่องปากเมื่อต้องการหลบหลีกอันตราย โดยลูกปลาจะเข้าทางปากหรือช่องเหงือก หลังจากลูกปลามีอายุ 1 สัปดาห์ จึงจะเลิกหลบเข้าไปซ่อนในช่องปากของแม่ แต่แม่ปลาก็ยังคอยระวังศัตรูให้ โดยว่ายวนเวียนอยู่ใกล้บริเวณที่ลูกปลาหาอาหารกินอยู่ ปลานิลจะรู้จักวิธีหาอาหารกินได้เองเมื่อมีอายุได้ 3 สัปดาห์ และมักจะว่ายกินอาหารรวมกันเป็นฝูง (เพ็ญพรรณ ศรีสกุลเตียว, 2543)

อาหารและการให้อาหาร

อาหารเป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่งสำหรับการเลี้ยงปลานิลและปลานิล เพราะปลาอยู่ในที่จำกัด ไม่สามารถไปหาอาหารธรรมชาติกินเองได้อย่างเพียงพอ การเจริญเติบโตของปลาจึงขึ้นอยู่กับการจัดการด้านอาหารเป็นทั้งด้านคุณค่า และความต้องการสารอาหารในปลาแต่ละขนาด การให้อาหารที่เหมาะสมกับปลา ทำให้โตเร็ว ในเวลาเลี้ยงสั้น จะเป็นการประหยัดค่าการลงทุนได้มาก สิ่งสำคัญที่ควรพิจารณา เกี่ยวกับการให้อาหาร ได้แก่ ความต้องการสารอาหาร ในลูกปลาวัยอ่อนถึงปลานิ้ว ควรมีระดับโปรตีนในอาหารประมาณ 30-40 เปอร์เซ็นต์ ความต้องการโปรตีนจะลดลงเมื่อปลาโตขึ้น 25- 30 เปอร์เซ็นต์ ความถี่ในการให้อาหารควรให้อาหารครั้งละน้อยแต่บ่อยครั้ง คือ 2 - 5 ครั้งต่อวัน ปริมาณการให้อาหารปลาเล็กควรให้อาหารประมาณ 10 -15 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว ปลาขนาดวัยรุ่นควรให้อาหาร 7 -8 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว ปลาใหญ่อัตราการให้จะลดลงเหลือประมาณ 3-4 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว

ตาราง 5 การให้อาหารปลานิลและปลานิลระยะปลาเล็ก – ปลารุ่น

อายุ (วัน)	น้ำหนักตัว (กรัม)	อัตรารอด (%)	ปริมาณอาหาร (%/ น้ำหนักตัว/ วัน)	ความถี่ (ครั้ง/วัน)
1	0.35	100	15.00	4
5	0.53	95	10.00	4
10	0.94	90	9.00	4
15	2.04	85	8.00	4
20	4.14	80	8.00	4
25	7.04	75	8.00	4
30	10.84	70	7.00	3
35	15.44	70	7.00	3
40	20.74	65	6.00	3
45	27.74	65	6.00	3
50	37.04	60	5.50	3
55	48.04	60	5.00	3
60	60.14	60	4.50	3

ที่มา: Navarre & Halver, 1989

ความต้องการสารอาหารของปลานิล

1. โปรตีน ความต้องการโปรตีนของปลาโดยทั่วไปขึ้นกับปัจจัยสำคัญ ได้แก่ อายุของปลา คุณภาพของโปรตีนในอาหาร และระดับพลังงานในอาหาร สำหรับปลานิลเช่นเดียวกัน ปลานิลขนาดเล็กจะต้องการ โปรตีนสูงกว่าปลาขนาดใหญ่ ดังนั้นในระยะเริ่มต้นของการเลี้ยงควรให้อาหารที่มีโปรตีนสูง จากนั้นจึงค่อยๆลดระดับโปรตีนในอาหารลง เมื่อปลามีอายุมากขึ้น

ตาราง 6 ความต้องการกรดอมิโนที่จำเป็นสำหรับปลานิล

กรดอะมิโน	ความต้องการ (% ของโปรตีน)
อาร์จินีน	3.5-4.4
ฮิสติดิน	1.3-1.9
ไอโซลิวซีน	3.2
ลิวซีน	2.8-3.6
ไลซีน	4.6-5.6
เมไธโอนีน	3.2
ฟีนิลอะลานีน	5.0-6.1
ทรีโอนีน	3.6
ทริปโตเฟน	0.7-1.3
วาลีน	2.3-3.0

ที่มา: Navarre & Halver, 1989

2. คาร์โบไฮเดรต เนื่องจากปลานิลสามารถสร้างเอนไซม์อะไมเลสในท่อทางเดินอาหารจึงใช้ประโยชน์จากคาร์โบไฮเดรตได้ดี อาหารปลานิลอาจมีวัตถุดิบที่เป็น แหล่งของแป้ง เช่น ข้าวสาลี ข้าวโพด ปลายข้าว ร้าข้าว และมันสำปะหลังเป็นส่วนผสมได้สูงถึง 30-60 เปอร์เซ็นต์ อาหารปลาขนาดเล็กไม่ควร มีแป้งเกิน 35 เปอร์เซ็นต์ หากเกินจะมีผลเสียต่อการย่อยแล้วทำให้ปลาโตช้า และอัตราการแลกเนื้อลดลง

3. ไขมัน ปลานิลใช้ไขมันและคาร์โบไฮเดรต เป็นแหล่งพลังงานได้ดี แต่สำหรับไขมันปลานิลมีขีดจำกัดในการนำเอาไขมันที่ย่อยได้ไปใช้ ถ้าอาหารมีไขมันมากเกิน 5 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน

ส่วนเกินจะสะสมตามอวัยวะ ถ้าไขมันสูงเกินกว่า 12 เปอร์เซ็นต์ จะยับยั้งการเจริญเติบโต และถ้าได้รับอาหารที่มีไขมันสูงเป็นเวลานานๆ จะทำให้ปลาเครียด

4. วิตามิน การศึกษาความต้องการวิตามินในปลานิลมีค่อนข้างจ้ากัด อาจเนื่องจากเข้าใจกันว่าไม่จำเป็นต้องเติมวิตามินในอาหารปลานิล เพราะจุลินทรีย์ในลำไส้สามารถสังเคราะห์วิตามินบี 12 และอินโนซิทอลได้ นอกจากนั้นแพลงก์ตอนพืชซึ่งเป็นอาหารหลักของปลานิลยังเป็นแหล่งของวิตามินบี โดยเฉพาะบี 1 บี 2 และไบโอติน เนื่องจากมีปัจจัยหลายอย่างที่มีอิทธิพลต่อการสูญเสียของวิตามิน และ เพื่อป้องกันการขาดแคลนวิตามิน อาหารปลานิลควรมีวิตามินที่ปลานิล ต้องการครบถ้วนในปริมาณเพียงพอ

5) แร่ธาตุ ปลานิลขาดแคลเซียมเจริญเติบโตช้า ใช้ประโยชน์จากอาหารได้ไม่ดี และพบแคลเซียมและฟอสฟอรัสในกระดูกต่ำ การขาดฟอสฟอรัสก็ให้ผลเช่นเดียวกัน ปลานิลขนาด 0.4-1.4 กรัม ต้องการฟอสฟอรัสในอาหารประมาณ 0.46 เปอร์เซ็นต์ เพื่อการเจริญเติบโตและกระบวนการสร้างกระดูก **(Navarre and Halver, 1989)**

การศึกษาการแสดงออกของโปรตีน Matrix Metalloproteinases (MMP-2 และ MMP-9)

เมทริกเมทัลโลโปรติเอส (martrix metalloproteinases: MMPs) เป็นกลุ่มเอนไซม์ในร่างกายทั้งแบบหลั่งจากเซลล์และติดบนผิวเซลล์ มีทั้งหมดอย่างน้อย 21 ชนิด MMPs อาศัยอะตอมสังกะสีเป็นตัวร่วมในการทำงาน สร้างขึ้นทั้งในสภาวะปกติและสภาวะพยาธิสภาพ มีบทบาทเป็นตัวควบคุม (regulatory molecule) ที่สำคัญในขบวนการเคลื่อนย้ายเซลล์ในร่างกาย ด้วยการออกฤทธิ์ต่อกันตามลำดับขั้น (cascade) และขบวนการจัดการ (processing) สารต่างๆ เช่น โปรตีนเมทริกนอกเซลล์ (extracellular matrix: ECM), cytokines, growth factors และ adhesion molecules ให้ได้ชิ้นส่วนที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive fragments) มีคุณสมบัติต่อการเสริมหรือยับยั้งในขบวนการเคลื่อนย้ายเซลล์ ขบวนการจัดโครงร่างเนื้อเยื่อในภาวะต่างๆ โดยเปลี่ยนแปลงสภาวะรอบนอกเซลล์ด้วยการย่อยโปรตีนเมทริกนอกเซลล์ (Sahapat, 2007)

การเรียกชื่อ MMPs ในช่วงแรกๆจะสัมพันธ์กับชนิดของ สับสเตรทที่จำเพาะเนื่องจากขณะนั้นเชื่อว่า MMPs แต่ละชนิดจะจำเพาะกับสับสเตรทต่างกัน จึงเรียกชื่อตามชนิดของสับสเตรทที่จำเพาะ เช่น collagenases, gelatinase, stromelysin, matrilysin และ metalloelastase เป็นต้น แต่ปัจจุบันทราบว่า MMPs แต่ละชนิดสามารถจำเพาะกับหลายสับสเตรท และบางสับสเตรทก็ถูกจำเพาะได้ด้วย MMPs มากกว่าหนึ่งชนิด ทำให้การเรียกชื่อแบบเดิมมีข้อจำกัด จึงปรับการ

เรียกชื่อเป็นลำดับเลขแทน เช่น collagenases เปลี่ยนเป็น MMP-1 และ gelatinase A เปลี่ยนเป็น MMP-2 เป็นต้น อย่างไรก็ตามการจัดกลุ่ม MMPs ตามความเหมือนบางประการง่ายต่อการทำความเข้าใจจึงยังคงได้รับการยอมรับในปัจจุบัน (Werb, 1997)

กลุ่ม gelatinases เป็น MMPs ที่สามารถย่อย gelatin และ colagen ซึ่งเป็นโปรตีนเมทริกที่เป็นส่วนประกอบใน basement membrane

MMP-2 (gelatinase A, EC 3.4.24.24) สร้างมากขึ้นในระหว่างการซ่อมแซมบาดแผล, เสริมสร้างกล้ามเนื้อ การเจริญเติบโตของกล้ามเนื้อ และสรีรวิทยาการว่ายน้ำ อวัยวะต่างในร่างกาย การพัฒนาตัวอ่อน และพัฒนาอัณฑะ ในปลา zebra fish (*Danio rerio*) (Zhang et al., 2003), ปลา grass carp (*Ctenopharyngodon Idella*) (Xu et al., 2012), ปลา channel catfish (*ctalarus punctatus*) (Jiang et al., 2010), ปลา gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) (Chaves-Pozo et al., 2008) และปลา pacu (*Piaractus mesopotamicus*) (Michelin et al., 2009)

MMP-9 (gelatinase B, EC 3.4.24.35) สร้างมากขึ้นในระหว่างการซ่อมแซมบาดแผล การติดเชื้อแบคทีเรีย และพบมากขึ้นในเซลล์มะเร็งหลายชนิดเกี่ยวข้องกับการกระจายของเซลล์มะเร็งและการเจริญของก้อนมะเร็ง การสลายตัวของ ECM ในเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อการทำให้กล้ามเนื้อปลาอ่อนตัวหลังการตายระหว่างการเก็บในห้องเย็นในปลา atlantic cod (*Gadus morhua*), spotted wolfish (*Anarhichas minor*), atlantic salmon (*Salmo salar*) และปลา common carp (*Cyprinus carpio*) *(Lødemel and Olsen, 2003)* การอักเสบ การเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อในปลา common carp (*Cyprinus carpio* L.) และการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อแบคทีเรียในปลา zebra fish (*Danio rerio*) (Bai et al., 2005), ปลา grass carp (*Ctenopharyngodon Idella*) (Bai et al., 2005), ปลา gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) (Castillo-Briceño et al., 2010) และปลา channel catfish) (*Ictalarus punctatus*) (Volkman et al., 2010) การตอบสนองต่อการอักเสบในปลา atlantic salmon (*Salmo salar*) (Krasnov et al., 2012; Skugor *et al.*, 2008; Tadiso et al., 2011) และผลทางชีวภาพของการได้รับสารพิษในปลา zebra fish (*Danio rerio*) (Zhang et al., 2013)

Gelatin Zymography

เป็นเทคนิคที่ใช้วิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของพอลอเพปไทด์สายเดี่ยว โดยอาศัยการเชื่อมต่อของ Acrylamide monomer จนเป็นสายโซ่ประกอบกันเป็นแผ่นเจล ใช้เพื่อตรวจหา Gelatinase โดยเฉพาะ MMP-2 และ MMP-9 ทำการแยกโปรตีนโดย Polyacrylamide gel electrophoresis (Troeberg, 2003) ตัวอย่างเช่น เจลาตินที่ ฝังตัวใน โพลีอะคริลาไมด์เจล จะถูกย่อยโดยเจลาติเนสที่ ทำงานผ่านเจล หลังจาก การย้อมสี Coomassie พื้นที่ของการเสื่อมสภาพสามารถมองเห็นได้เป็นแถบที่ชัดเจนกับพื้นหลังสีเข้ม และใช้เทคนิคที่ใช้วิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเพปไทด์สายเดี่ยวและดูความบริสุทธิ์ของโปรตีน โดยอาศัยการเชื่อมต่อของ acrylamide monomer จนเป็นสายโซ่ยาวประกอบกันเป็นแผ่นเจล โดยมี TEMED เป็น catalyst และมี ammonium persulfate เป็น initiator โปรตีนอยู่ในบัฟเฟอร์ที่เป็นด่างและประกอบด้วย sodium dodecyl sulfate (SDS) ซึ่งเป็น anionic detergent โดย SDS จะจับพอลิเพปไทด์ด้วยอัตราส่วน 1.4 กรัม SDS/กรัมโปรตีน โดยมี -mercaptoethanol หรือ dithiotreithol เป็น reducing agent เพื่อใช้ทำลายพันธะ disulfide โปรตีนที่จับกับ SDS จะมีประจุลบ เมื่อให้กระแสไฟฟ้า โมเลกุลที่มีประจุลบจะเคลื่อนที่เข้าหาขั้วบวก ซึ่งอัตราการเคลื่อนที่ของโปรตีนจะเร็วหรือช้าขึ้นกับขนาดน้ำหนักโมเลกุลและขนาดของรูพรุนของเจล (โมเลกุลขนาดใหญ่เคลื่อนที่ช้ากว่าโมเลกุลขนาดเล็ก) โดยขนาดของรูพรุนสามารถปรับได้ตามความเข้นข้นของ acrylamide ความเข้มข้นของอะคริลาไมด์เพิ่มขึ้นขนาดของรูพรุนจะเล็กลง เมื่อสิ้นสุดการทดลองจึงนำผลที่ได้ไปวิเคราะห์ข้อมูล (Kupai et al., 2010) การแยกทางไฟฟ้าโดยใช้เจล (Gel Electrophoresis) มีหลายวิธี

ในงานวิจัยนี้จะใช้วิธี Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) เป็นเทคนิคที่ใช้วิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเพปไทด์สายเดี่ยวโดยอาศัยหลักว่าสารตัวอย่าง อยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มี pH เป็นด่างและประกอบด้วย sodium dodecyl sulfate (SDS) ซึ่งเป็น anionic detergent ที่มีประจุลบที่สามารถแยกพอลิเพปไทด์ที่อยู่รวมกันออกเป็นสายเดี่ยวมีโครงสร้างเป็นแท่งและทุกสายมีประจุลบจึงเคลื่อนที่เข้าหาขั้วบวก (SDS จับพอลิเพปไทด์คงที่ด้วยอัตราส่วน 1.4 กรัม SDS /กรัมโปรตีน โดยมี β-mercaptoethanol เป็น reducing agent ในสารตัวอย่างด้วยเพื่อใช้ทำลายพันธะ disulfide ในโปรตีนอัตราการเคลื่อนที่ของพอลิเพปไทด์จะเร็วหรือช้าขึ้นกับขนาดหรือน้ำหนักโมเลกุล ผลของการแยกโปรตีนสามารถมองเห็น band พอลิเพปไทด์เมื่อย้อมสีด้วย Coomassie blue และหาน้ำหนัก โมเลกุลของพอลิเพปไทด์แต่ละสายของสารตัวอย่างได้โดยสร้างกราฟความสัมพันธ์ ระหว่าง log ของน้ำหนักโมเลกุลกับอัตราเร็วของการ

เคลื่อนที่ของโปรตีนมาตรฐาน และเมื่อทราบอัตราเร็วของการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าของพอลิเพปไทด์ตัวอย่างก็สามารถคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลได้เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (Schägger and Von Jagow, 1987)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับวัตถุดิบจากพืชผ่านกระบวนการความร้อนในอาหารสัตว์น้ำ

Boonyaratpalin et al. (1998) ทำการศึกษาการทดแทนปลาป่นด้วยถั่วเหลืองในการเลี้ยงปลากระพงขาว ใช้อาหารทดลอง 5 ชุดการทดลอง แต่ละชุดการทดลองจะมีโปรตีนและพลังงานเท่ากัน โดยชุดการทดลองที่ 1 ใช้ถั่วเหลือง 0 เปอร์เซ็นต์ ชุดการทดลองที่ 2 ใช้ถั่วเหลืองสกัดน้ำมัน 21 เปอร์เซ็นต์ ชุดการทดลองที่ 3 ใช้ถั่วเหลืองเอ็กซ์ทรูด 27 เปอร์เซ็นต์ ชุดการทดลองที่ 4 ใช้ถั่วเหลืองนึ่ง 28.5 เปอร์เซ็นต์ และชุดการทดลองที่ 5 ใช้ถั่วเหลืองแช่น้ำ 27.5 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ระยะเวลาในการเลี้ยง 10 สัปดาห์ พบว่าปลากะพงขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารชุดที่ 1 มีการเจริญเติบโตดีที่สุด แต่ชุดการทดลองที่ 2 มีประสิทธิภาพการใช้อาหาร, ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน, อัตราการรอดตายต่ำกว่าทุกชุดการทดลอง และยังพบความผิดปกติของเซลล์ตับอ่อนและลำไส้ คือพบว่าไมโครวิลไลของเซลล์บุผิวผนังลำไส้หายไป และยังพบการเพิ่มจำนวนของเซลล์อย่างผิดปกติในบริเวณชั้นลามินาโพรเพรีย (Lamina propria) และเกิดเว็กคูโอล (Vacuoles) จำนวนมากที่ผนังลำไส้ชั้นมูโคซาทำให้ทราบว่ากากถั่วเหลืองที่ผ่านกระบวนความร้อนส่งผลต่อประสิทธิภาพการเจริญเติบโตการใช้อาหารสูงกว่ากากถั่วเหลือที่ไม่ผ่านกระบวนการความร้อน

Oliva-Teles et al. (1994) ประเมินผลของกากถั่วเหลืองผ่านกระบวนการความร้อนต่างวิธีกันในอาหารปลาเรนโบว์เทราท์ *(Oncorhynchus mykiss)* เป็นเวลา 12 สัปดาห์ โดยสูตรอาหารทดลอง คือ ชุดการทดลองที่ 1 สูตรควบคุม (ไม่ผสมกากถั่วเหลือง), ชุดการทดลอง ที่ 2 กากถั่วเหลืองที่ยังไม่สกัดไขมันผ่านการคั่ว (Full-fat soybean meal, toasted), ชุดการทดลองที่ 3 กากถั่วเหลืองที่ยังไม่สกัดไขมันผ่านการเอ็กซ์ทรูด (Full-fat soybean meal, extrusion), ชุดการทดลองที่ 4 กากถั่วเหลืองที่ใช้ตัวทำละลายสกัด (Soybean meal, solvent-extracted) และชุดการทดลองที่ 5 กากถั่วเหลืองที่ใช้ตัวทำละลายสกัดและนำไปผ่านคลื่นอินฟาเรด (Soybean meal, solvent-extracted, treated by infrared radiation) ผลการทดลองพบว่าน้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้นคือ 135.4, 151.1, 122.6, 151.8 และ 157.7 ตามลำดับ กากถั่วเหลืองที่ใช้ตัวทำละลายสกัดและนำไปผ่านคลื่นอินฟาเรดให้แนวโน้มการเจริญเติบโตสูงที่สุด

Helena et al. (2003) ทำการศึกษาผลของกากถั่วเหลืองที่ผ่านกระบวนการความร้อนในอาหารปลากดอเมริกัน (*Ictalurus punctatus*) ให้ความร้อนด้วยการฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำ (Autoclave) อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส แรงดัน 22 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว และใช้เวลาต่างกันคือ 0, 5, 10, 20 และ 40 นาที ตามลำดับ ผสมในอาหาร 45 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณเท่ากันทุกชุดการทดลอง ปลาสิ้นสุดการทดลองมีน้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นอยู่ที่ 31.8, 14.7, 12.1, 13.3, 18.4 และ 30.9 กรัม ตามลำดับ จึงพบว่าปลากดอเมริกัน (*Ictalurus punctatus*) ที่ได้รับอาหารที่ผสมกากถั่วเหลืองผ่านความร้อนเป็นเวลา 40 นาที มีแนวโน้มประสิทธิภาพการเจริญเติบโตสูงที่สุด

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

ชุดการทดลองที่ 1 การศึกษาการใช้กากถั่วดาวอินคาที่ผ่านความร้อนด้วยการอบที่อุณหภูมิแตกๆกัน 4 สูตร (80, 100, 120 และ 140 องศาเซลเซียส) ที่มีผลต่อประสิทธิภาพการเจริญเติบโต (Growth performance) และประสิทธิภาพการใช้อาหาร (Feed utilization) ในอาหารปลานิล จำนวน 240 ตัว

ชุดการทดลองที่ 2 การศึกษาการใช้ความร้อนด้วยวิธีที่แตกต่างกันจำนวน 5 วิธี คือ เอ็กซ์ทรูด (Extrusion), นึ่ง (Steam), อบลมร้อน (Air dry), นึ่งฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำ (Autoclave), ไมโครเวฟ (Microwave) ที่มีต่อประสิทธิการเจริญเติบโต (Growth performance) ประสิทธิภาพการใช้อาหาร (Feed utilization) องค์ประกอบทางเคมีของซาก (Chemical compositon of carcass) สัมประสิทธิ์การย่อยได้ของสารอาหาร (Apparent digestibility coefficient) เนื้อเยื่อวิทยา (Histological change) ค่าโลหิตวิทยาและชีวเคมีของโลหิต (Hematology) ในอาหารปลานิล จำนวน 300 ตัว

ตัวแปรที่ใช้ในการวิจัย

ชุดการทดลองที่ 1

ตัวแปรต้น : การอบด้วยลมร้อนอุณหภูมิที่แตกต่างกันของกากถั่วดาวอินคา (80, 100, 120 และ 140 องศาเซลเซียส)

ตัวแปรตาม : ประสิทธิภาพการเจริญเติบโต, ประสิทธิภาพการใช้อาหาร

ตัวแปรควบคุม : ระยะเวลาที่ใช้ในการเลี้ยงปลานิล 8 สัปดาห์

ชุดการทดลองที่ 2

ตัวแปรต้น : วิธีการให้ควานร้อนแก่ถั่วดาวอินคาที่แตกต่างกัน (เอ็กซ์ทรูด (extrusion), นึ่ง (Steam), อบลมร้อน (Air dry), นึ่งฆ่าเชื้อด้วยแรงดัน-ไอน้ำ (Autoclave), ไมโครเวฟ (Microwave)

ตัวแปรตาม : ประสิทธิภาพการเจริญเติบโต, ประสิทธิภาพการใช้อาหารและโปรตีน, องค์ประกอบทางเคมีของซาก เนื้อเยื่อวิทยา และโลหิตวิทยา

ตัวแปรควบคุม : ระยะเวลาที่ใช้ในการเลี้ยงปลานิล 10 สัปดาห์

เครื่องมือและวัตถุดิบที่ใช้ในการทดลอง

การเตรียมอุปกรณ์การทดลอง

1. ตู้กระจก กว้าง 40 ยาว 90 สูง 46 เซนติเมตร	36	ตู้
2. ถังไฟเบอร์กลาส ขนาด 500 ลิตร	4	ถัง
3. ถังเก็บน้ำ ขนาด 2,000 ลิตร	3	ถัง
4. เครื่องให้อากาศ	2	เครื่อง
5. หัวทราย	28	หัว
6. สายออกซิเจนยาว 80 เซนติเมตร	28	เส้น
7. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง	1	เครื่อง
8. เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง	1	เครื่อง
9. เตาอบ (JSR/เกาหลีใต้)	1	เครื่อง
10. เตาเผา (carbolite/อังกฤษ)	1	เครื่อง
11. เครื่องวิเคราะห์โปรตีน (Gerhardt/เยอรมัน)	1	เครื่อง
12. เครื่องวิเคราะห์ไขมัน (Gerhardt/เยอรมัน)	1	เครื่อง
13. เครื่องวิเคราะห์เยื่อใย	1	เครื่อง

การเตรียมสัตว์ทดลอง

การเตรียมสัตว์ทดลองก่อนการทดลอง

นำลูกปลานิลที่ได้มาจากฟาร์มจำหน่ายพันธุ์สัตว์น้ำจืด จำนวน 1,000 ตัว มาทำการอนุบาลในถังไฟเบอร์กลาสที่มีความจุน้ำ 500 ลิตร ให้อาหารเม็ดสำเร็จรูป วันละ 2 ครั้ง เวลา 08.00 น. และ 16.00 น. และเปลี่ยนถ่ายน้ำในทุกๆวัน จากนั้นทำการสุ่มชั่งวัดน้ำหนักตัวปลาที่อนุบาลไว้ (ในการทดลองนี้จะใช้ปลานิลที่มีน้ำหนักเฉลี่ย 8-10 กรัมต่อตัว)

การเตรียมและการการจัดการสัตว์ทดลองในระหว่างการทดลอง

เมื่อปลาที่อนุบาลไว้มีน้ำหนักเฉลี่ย 8-10 กรัมต่อตัว (จากการสุ่มชั่ง) คัดปลาที่มีขนาดใกล้เคียงกันลงในตู้ทดลองขนาด 95 × 40 × 46 เซนติเมตร ที่มีปริมาตรน้ำ 150 ลิตร จำนวนตู้ละ 15 ตัว ชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง (ก่อนชั่งน้ำหนักงดให้อาหารเป็นระยะเวลา 1 วัน) บันทึกข้อมูลน้ำหนักปลาเริ่มต้นเพื่อนำไปคำนวณการเจริญเติบโต โดยสุ่มเก็บตัวอย่างปลาที่เหลือจาก

การคัดลงตู้ประมาณ 6 ตัว ในวันที่เริ่มการทดลอง นำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในตัวปลา (chemical composition) เพื่อเป็นข้อมูลเริ่มต้นของปลาทดลอง

การเตรียมอาหารทดลอง

การเตรียมวัตถุดิบอาหารทดลอง

วัตถุดิบอาหารของการทดลองครั้งนี้ ประกอบด้วย ปลาป่น กากถั่วเหลือง กลูเตนข้าวโพด ข้าวโพดป่น รำละเอียด แป้งข้าวจ้าว วิตามิน แร่ธาตุ น้ำมันปลา กรดอะมิโนที่จำเป็น 2 ชนิดคือ เมธไทโอนีน กับไลซีน เนื่องจากวัตถุดิบพืชมีกรดอะมิโน 2 ชนิดนี้ในปริมาณน้อยและสัตว์น้ำไม่สามารถผลิตขึ้นเองได้ ดังนั้นจึงต้องเสริมให้เพียงพอกับความต้องการของปลา และกากถั่วดาวอินคาผ่านความร้อนด้วยวิธีแตกต่างกัน จากนั้นนำวัตถุดิบมาร่อนด้วยตะแกงร่อนขนาด 400 เมช เพื่อเป็นการคัดแยกกากหรือสิ่งปลอมปนในวัตถุดิบออก นำวัตถุดิบที่ร่อนเสร็จแล้วมาเก็บไว้ในตู้แช่ที่มีอุณหภูมิ -20 องศาเพื่อป้องกันวัตถุดิบที่มีองประกอบของไขมันเกิดการออกซิเดชั่นขึ้นทำให้เกิดการเหม็นหืน (เช่นปลาป่น รำ) จากนั้นทำการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของวัตถุดิบที่นำมาใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารในการทดลอง ตามวิธีของ (AOAC, 1990) ดังตาราง 7

ตาราง 7 องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบ

วัตถุดิบ	โปรตีน	ไขมัน	เถ้า	ความชื้น	เยื่อใย
ปลาป่น	64.83	8.22	18.60	5.59	0.25
กากถั่วเหลือง	42.05	0.77	6.88	9.65	6.88
กลูเตนข้าวโพด	20.42	0.41	2.93	9.60	11.50
ปลายข้าว	7.68	1.63	0.87	10.67	0.18
ข้าวโพดป่น	6.89	2.9	3.04	11.51	1.71
แป้งข้าวจ้าว	8.5	0.2	0.61	.9.87	0.61
ถั่วดาวอินคา (Extrusion)	41.88	10.34	-	-	-
ถั่วดาวอินคา (Steam)	43.21	23.14	-	-	-
ถั่วดาวอินคา (Air dry)	41.21	24.14	5.22	0.66	4.62
ถั่วดาวอินคา (Autoclave)	43.49	23.81	-	-	-
ถั่วดาวอินคา (Microwave)	42.95	24.57	-	-	-

การเตรียมอาหารทดลอง

ชุดการทดลองที่ 1 ใช้กากถั่วดาวอินคาที่อบด้วยเครื่องอบลมร้อนอุณหภูมิแตกต่างกัน แบ่งออกเป็น 80, 100, 120 และ 140 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง จากนั้นนำมาผสมรวมกับปลาป่น กากถั่วเหลือง กลูเตนข้าวโพด ข้าวโพดป่น รำละเอียด แป้งข้าวจ้าว วิตามิน แร่ธาตุ น้ำมันปลา กรดอะมิโนที่จำเป็น 2 ชนิดคือ เมธไทโอนีนกับไลซีน ในอัตราส่วนที่เท่ากัน ดังตาราง 8

ตาราง 8 สูตรอาหารชุดการทดลองที่ 1 ที่ใช้กากถั่วดาวอินคาอบอุณหภูมิแตกต่างกัน 4 ระดับ (กรัม/กิโลกรัม)

วัตถุดิบ	T1 (อบ 80 °C)	T2 (อบ 100 °C)	T3 (อบ 120 °C)	T4 (อบ 140 °C)
ปลาป่น	8	8	8	8
กากถั่วเหลือง	12	12	12	12
กากถั่วดาวอินคา	37	37	37	37
กลูเตนข้าวโพด	10	10	10	10
ปลายข้าว	9.3	9.3	9.3	9.3
ข้าวโพดป่น	10	10	10	10
แป้งข้าวจ้าว	11.2	11.2	11.2	11.2
วิตามิน	0.5	0.5	0.5	0.5
แร่ธาตุ	0.5	0.5	0.5	0.5
ไลซีน	0.5	0.5	0.5	0.5
เมธไทโอนีน	1	1	1	1
รวม	100	100	100	100

หมายเหตุ: T1 กากถั่วดาวอินคาที่ผ่านการอบด้วยอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง
T2 กากถั่วดาวอินคาที่ผ่านการอบด้วยอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง
T3 กากถั่วดาวอินคาที่ผ่านการอบด้วยอุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง
T4 กากถั่วดาวอินคาที่ผ่านการอบด้วยอุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

ตาราง 9 องค์ประกอบทางเคมีของอาหารชุดการทดลองที่ 1 ใช้กากถั่วดาวอินคาอบอุณหภูมิแตกต่างกัน 4 ระดับ (กรัม/น้ำหนักแห้ง)

สูตรอาหาร	โปรตีน	ไขมัน	เถ้า	ความชื้น	เยื่อใย
T1 (อบ 80 °C)	30.63	8.63	5.53	4.85	3.12
T2 (อบ 100 °C)	30.85	8.77	5.39	5.12	3.59
T3 (อบ 120 °C)	30.27	8.65	5.42	4.32	3.65
T4 (อบ 140 °C)	30.15	8.52	5.76	5.08	3.42

ชุดการทดลองที่ 2 ใช้กากถั่วดาวอินคาที่ผ่านกระบวนการความร้อนแตกต่างกัน 5 วิธี คือ เอ็กซ์ทรูด (extrusion), นึ่ง (Steam), อบลมร้อน (Air dry), นึ่งฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำ (Autoclave), ไมโครเวฟ (Microwave) ผสมรวมกับ ปลาป่น กากถั่วเหลือง กลูเตนข้าวโพด ข้าวโพดป่น รำละเอียด แป้งข้าวจ้าว วิตามิน แร่ธาตุ น้ำมันปลา และกรดอะมิโนที่จำเป็น 2 ชนิดคือ เมธไทโอนีนและไลซีนในอัตราส่วนที่เท่ากัน โดยกากถั่วดาวอินคาที่จะนำไปประกอบเป็นสูตรอาหารแต่ละสูตร จะนำมาผ่านกระบวนตามวิธี ดังต่อไปนี้

1. เอ็กซ์ทรูด (Extrusion) นำกากถั่วดาวอินคามาผ่านเครื่องเอ็กทรูด โดยกำหนดอุณหภูมิอยู่ที่ 80 องศาเซลเซียส อัตราการให้น้ำ (water stroke) 12 เปอร์เซ็นต์ อัตราการป้อน (Feed rate) 15 และความเร็วรอบของสกรู (screw speed) 200 rpm โดยเรียงสกรูตามลำดับ ดังนี้ 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 2, 4, 1, 1, 2, 3, 2, 3, 2, 1, 2, 2, 1, 2, 2, 2 และ 3 กำหนดรูพิมพ์ (die) ซึ่งอยู่ด้านทางออกของอาหารที่ออกมาจากเครื่องเอ็กซ์ทรูด ขนาด 10 มิลลิเมตร จากนั้นเมื่อได้ผลิตภัณฑ์ออกมานำไปอบที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงให้แห้งจากนั้นนำไปบดให้ละเอียด (ดัดแปลงจาก Fallahi et al. (2013) และ Oliva-Teles et al. (1994))

2. นึ่ง (Steam) นำกากถั่วดาวอินคามานึ่งด้วยหม้อนึ่ง กำหนดให้อุณหภูมิของหม้อนึ่งอยู่ที่ 100 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปอบที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงให้แห้ง จากนั้นนำไปบดให้ละเอียด (ดัดแปลงจาก Ratnayake, & Jackson (2006)

3. อบลมร้อน (Air dry) นำกากถั่วดาวอินคามาอบด้วยเครื่องอบลมร้อน ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

4. นึ่งฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำ (Autoclave) นำไปผ่านกระบวนการความร้อนด้วยการฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำ (Autoclave) เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส จากนั้นเมื่อได้

ผลิตภัณฑ์ออกมานำไปอบที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงให้แห้ง จากนั้นนำไปบดให้ละเอียด (ดัดแปลงจาก Rehman, & Shah (2005)

5. ไมโครเวฟ (Microwave) นำกากถั่วดาวอินคามาเข้าเครื่องไมโครเวฟ ที่ความแรงคลื่น 800 วัตต์ เป็นเวลา 4 นาที (ดัดแปลงจาก Thongprajukaew et al. (2015)

จากนั้นคำนวณสูตรอาหารให้มีระดับโปรตีน 30 เปอร์เซ็นต์และไขมัน 8 เปอร์เซ็นต์ ทุกชุดการทดลอง ดังตาราง 11

ตาราง 10 องค์ประกอบทางเคมีของกากถั่วดาวอินคาผ่านกระบวนการความร้อนรูปแบบแตกต่างกัน 5 วิธี

วัตถุดิบ	โปรตีน	ไขมัน	เถ้า	ความชื้น	เยื่อใย
ถั่วดาวอินคา (Extrusion)	41.88	10.34	-	-	-
ถั่วดาวอินคา (Steam)	43.21	23.14	-	-	-
ถั่วดาวอินคา (Air dry)	41.21	24.14	5.22	0.66	4.62
ถั่วดาวอินคา (Autoclave)	43.49	23.81	-	-	-
ถั่วดาวอินคา (Microwave)	42.95	24.57	-	-	-

ตาราง 11 สูตรอาหารชุดการทดลองที่ 2 ที่ใช้กากถั่วดาวอินคาผ่านกระบวนการความร้อนแตกต่างกัน 5 วิธี (กรัม/กิโลกรัม)

วัตถุดิบ	T1 (Extrusion)	T2 (Steam)	T3 (Air dry)	T4 (Autoclave)	T5 (Microwave)
ปลาป่น	7	7	7	7	7
กากถั่วเหลือง	23	23	23	23	23
กากถั่วดาวอินคา	29.5	29.5	29.5	29.5	29.5
กลูเตนข้าวโพด	7	7	7	7	7
ปลายข้าว	9.3	9.3	9.3	9.3	9.3
ข้าวโพดป่น	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5
แป้งข้าวจ้าว	11.3	14.3	14.7	14.7	14.7
น้ำมันปลา	4	1	0.6	0.6	0.6
วิตามิน	1	1	1	1	1
แร่ธาตุ	1	1	1	1	1
ไลซีน	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
เมธไทโอนีน	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9
รวม	100	100	100	100	100

หมายเหตุ: T1 กากถั่วดาวอินคาที่ผ่านการเอ็กซ์ทรูด (Extrusion)

T2 กากถั่วดาวอินคาที่ผ่านการนึ่ง (Steam)

T3 กากถั่วดาวอินคาที่ผ่านอบด้วยเครื่องอบลมร้อนลมร้อน (Air dry)

T4 กากถั่วดาวอินคาที่ผ่านความร้อนด้วยหม้อนึ่งแรงดันไอน้ำ (Autoclave)

T5 กากถั่วดาวอินคาที่ผ่านความร้อนด้วยเครื่องไมโครเวฟ (Microwave)

ตาราง 12 องค์ประกอบทางเคมีของอาหารชุดการทดลองที่ 2 ใช้กากถั่วดาวอินคาผ่านกระบวนการความร้อนแตกต่างกัน 5 วิธี (กรัม/น้ำหนักแห้ง)

สูตรอาหาร	โปรตีน	ไขมัน	เถ้า	ความชื้น	เยื่อใย
T1 (Extrusion)	31.44	8.37	5.70	4.06	3.72
T2 (Steam)	30.92	8.38	5.75	3.72	3.73
T3 (Air dry)	30.78	8.21	5.65	4.29	3.20
T4 (Autoclave)	30.50	8.38	5.98	4.94	3.59
T5 (Microwave)	30.77	8.11	5.70	3.70	3.54

วิธีการเตรียมอาหารทดลองโดยการชั่งวัตถุดิบที่เป็นส่วนผสมของอาหารแต่ละสูตรซึ่งได้แก่ ปลาป่น กากถั่วดาวอินคาที่ผ่านกระบวนการความร้อนแตกต่างกัน กากถั่วเหลือง กลูเตนข้าวโพด ข้าวโพดป่น รำละเอียด แป้งข้าวจ้าว น้ำมันปลา วิตามิน แร่ธาตุ เมทไธโอนีน และไลซีน ตามสูตรที่คำนวณไว้ จากนั้นนำวัตถุดิบแห้งมาผสมกันด้วยเครื่องผสมอาหาร เมื่อผสมกันได้เข้าที่แล้วเติมน้ำมันปลาในปริมาณที่คำนวณไว้ใส่ในวัตถุดิบแห้งที่ผสมไว้และผสมต่อจนวัตถุดิบเข้ากัน จากนั้นทำการเติมน้ำ 35 เปอร์เซ็นต์ แล้วผสมต่อให้เข้ากัน จึงนำเข้าเครื่องอัดเม็ดอาหารให้มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเท่ากับ 3 มิลลิเมตร นำไปอบด้วยอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสนาน 24 ชั่วโมงหรือจนกว่าอาหารจะแห้ง

เมื่อได้อาหารทดลองแล้ว ทำการตรวจสอบคุณค่าทางโภชนาการของอาหารที่ทำแต่ละสูตรการทดลองด้วยการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ โปรตีน ไขมัน ความชื้น เยื่อใย และเถ้าก่อนนำไปใช้ในการทดลอง จากนั้นนำไปบรรจุเข้าถุงพลาสติกแล้วนำเข้าตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะมีการนำมาใช้ในการทดลอง

การเก็บรวบรวมข้อมูล

ตลอดระยะเวลาทำการทดลองให้อาหารปลาวันละ 2 มื้อ จนอิ่ม เวลา 08.00 และ 17.00 น. ทุก 2 สัปดาห์จะทำการชั่งน้ำหนัก เพื่อทราบน้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้นเพื่อปรับปริมาณอาหารที่ให้ปลากิน ดูสุขภาพ ความผิดปกติ และการตอบสนองต่ออาหารของปลา โดยการชั่งน้ำหนักรวมของปลาแต่ละซ้ำการทดลอง ด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง (โดยก่อนการทำการชั่งวัดจะงดให้อาหารเป็นระยะเวลา 1 มื้อ) โดยทำการสลบปลาด้วยน้ำมันกานพลู ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร

ก่อนทำการชั่งวัด และนับจำนวนปลาที่เหลือ เมื่อสิ้นสุดการทดลองจะทำการชั่งน้ำหนัก และวัดความยาวของตัวปลา (Standard length) เพื่อมาคำนวณค่าปัจจัยของน้ำหนักต่อความยาว (Condition factor; K) จากนั้นทำการผ่าปลาตู้ละ 3 ตัว เก็บอวัยวะตับ และอวัยวะภายใน เพื่อมาคำนวณดัชนีน้ำหนักปลาต่อน้ำหนักตับ (Hepatosomatic index) และดัชนีน้ำหนักปลาต่อน้ำหนักอวัยวะภายใน (Viscerosomatic index) ต่อมาทำการเก็บตัวอย่างปลาไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของตัวปลา และนำข้อมูลที่ได้มาทำการคำนวณค่าต่างๆ ดังนี้

การศึกษาประสิทธิภาพการเจริญเติบโต (Growth performance)

น้ำหนักเฉลี่ย (Average weight) (กรัม)

$$\text{น้ำหนักเฉลี่ย} = \frac{\text{น้ำหนักปลารวม (กรัม)}}{\text{จำนวนปลาที่เหลือ (ตัว)}}$$

น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (Weight gain) (เปอร์เซ็นต์)

$$\text{น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น} = \frac{\text{น้ำหนักสุดท้าย (กรัม)} - \text{น้ำหนักเริ่มต้น (กรัม)} \times 100}{\text{น้ำหนักปลาเริ่มต้น (กรัม)}}$$

น้ำหนักเพิ่มต่อวัน (Average diary growth, ADG) (กรัม/วัน)

$$\text{น้ำหนักเพิ่มต่อวัน} = \frac{\text{น้ำหนักปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (กรัม)} - \text{น้ำหนักเริ่มต้น (กรัม)}}{\text{จำนวนวันที่เลี้ยง (วัน}}$$

อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific growth rate, SGR) (เปอร์เซ็นต์)

$$\text{อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ} = \frac{\ln \text{น้ำหนักสุดท้าย (กรัม)} - \text{In น้ำหนักเริ่มต้น (กรัม)} \times 100}{\text{น้ำหนักปลาเริ่มต้น (กรัม)}}$$

อัตราการรอดตาย (Survival rate) (เปอร์เซ็นต์)

$$\text{อัตราการรอดตาย} = \frac{\text{จำนวนปลาสุดท้าย (ตัว)} \times 100}{\text{จำนวนปลาเริ่มต้น (ตัว)}}$$

Condition factor (K; เปอร์เซ็นต์)

$$\text{Condition factor} = \frac{\text{น้ำหนักปลา(กรัม)} \times 100}{\text{ความยาวปลา (เซนติเมตร)}^3}$$

Hepatosomatic index (เปอร์เซ็นต์)

$$\text{Hepatosomatic index} = \frac{\text{น้ำหนักตัวปลา(กรัม)} \times 100}{\text{น้ำหนักตับ (กรัม)}}$$

Viscerosomatic index (เปอร์เซ็นต์)

$$\text{Viscerosomatic index} = \frac{\text{น้ำหนักตัวปลา(กรัม)} \times 100}{\text{น้ำหนักอวัยวะภายใน (กรัม)}}$$

การศึกษาประสิทธิภาพการใช้อาหาร (Feed utilization)

อัตราการกินอาหาร (rate of feed intake) (เปอร์เซ็นต์)

$$\text{Rate of feed intake} = \frac{\text{น้ำหนักอาหารแห้งที่ปลากิน (กรัม)} \times 100}{(\text{น้ำหนักปลาเริ่มต้น(กรัม)} - \text{น้ำหนักปลาสุดท้าย(กรัม)}) / 2 \times \text{จำนวนวันที่เลี้ยง(วัน)}}$$

อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (food conversion ratio, FCR)

$$\text{อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ} = \frac{\text{ปริมาณอาหารที่ปลากิน (กรัม)}}{\text{น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น (กรัม)}}$$

ประสิทธิภาพการใช้อาหาร (feed efficiency ratio)

$$\text{ประสิทธิภาพการใช้อาหาร} = \frac{\text{น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (กรัม)}}{\text{น้ำหนักอาหารที่ปลากินทั้งหมด (กรัม)}}$$

ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน (protein efficiency ratio, PER)

$$\text{ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน} = \frac{\text{น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (กรัม)}}{\text{ปริมาณโปรตีนที่ปลาได้รับ (กรัม)}}$$

ประสิทธิภาพการใช้ไขมัน (lipid efficiency ratio, LER)

$$\text{ประสิทธิภาพการใช้ไขมัน} = \frac{\text{น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (กรัม)}}{\text{ปริมาณไขมันที่ปลาได้รับ (กรัม)}}$$

โปรตีนที่นำไปใช้ประโยชน์ (protein productive value, PPV)(กรัม)

$$\text{โปรตีนที่นำไปใช้ประโยชน์} = \frac{\text{โปรตีนปลาสิ้นสุดการทดลอง(กรัม)} - \text{โปรตีนปลาเริ่มต้น(กรัม)} \times 100}{\text{ปริมาณโปรตีนทั้งหมดในอาหาร(กรัม)}}$$

องค์ประกอบทางเคมีของซาก (Chemical compositon of carcass)

สุ่มเก็บตัวอย่างปลาก่อนเริ่มการทดลองจำนวน 10 ตัว นำไปผ่านกระบวนการความร้อนโดยการอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมงไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ ไขมัน โปรตีน ความชื้น เถ้า และเยื่อใย ตามวิธีการของ AOAC (1990) และบันทึกองค์ประกอบทางเคมีของตัวปลาเริ่มต้น จากนั้นเมื่อสิ้นสุดการทดลองทำการสุ่มตัวอย่างปลาทดลองแต่ละตู้ทดลองจำนวนตู้ละ 5 ตัว แล้วทำการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีเช่นเดียวกับปลาเริ่มต้น บันทึกผลการทดลอง เพื่อคำนวณพารามิเตอร์ต่างๆ ดังต่อไปนี้ เมื่อได้ผลการวิเคราะห์แล้วจะนำผลการวิเคราะห์มาคำนวณหาค่าดังนี้

การเก็บรักษาโปรตีน (protein retention ; PR) (เปอร์เซ็นต์)

$$PR = \frac{\text{ปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้น(กรัม)} \times 100}{\text{ปริมาณโปรตีนเริ่มแรก(กรัม)}}$$

การเก็บรักษาไขมัน (lipid retention ; LR) (เปอร์เซ็นต์)

$$LR = \frac{\text{ปริมาณไขมันเพิ่มขึ้น(กรัม)} \times 100}{\text{ปริมาณไขมันนเริ่มแรก(กรัม)}}$$

การศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา (Histological change)

เมื่อสิ้นสุดการทดลองทำการเก็บตัวอย่างโดยสุ่มเก็บเนื้อเยื่อตับ ไต และลำไส้โดยจะใช้ลำไส้ส่วนต้น (Duodenum) จากตัวอย่างที่ทดลองตู้ละ 3 ตัวมาทำการสลบปลาด้วยน้ำมันกานพลู (Clove oil) 100ส่วนในล้านส่วน จากนั้นใช้กรรไกรผ่าตัด (อุปกรณ์ผ่าตัด) ไปตัดเปิดช่องท้องของปลาออกตัดตับ สำไส้ออกแล้วดองในฟอร์มาลิน (Formalin) ทันที แล้วจึงทำการเลาะไตที่บริเวณกระดูกสันหลังแล้วดองในฟอร์มาลิน (Formalin) ทันทีเช่นเดียวกัน จะทำการเก็บรักษาตัวอย่างในสารฟอร์มาลิน (Formalin) เป็นเวลา 1 สัปดาห์ แล้วจึงเปลี่ยนน้ำยาดองเป็นเอทธิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ และสามารถเก็บรักษาไว้ได้เป็นระยะเวลาต่อมาทำการตบแต่งตัวอย่าง (Trim) ที่ผ่านการดองแล้วให้มีขนาดพอเหมาะเพื่อสะดวกต่อการฝัง (Embed) และนำไปตัดชิ้นส่วน (Section) จากนั้นนำเข้าสู่กระบวนการเตรียมเนื้อเยื่อตามวิธีของ Humason (1962) ต่อไป

ขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อ (Processing)

การเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ภายในของเนื้อเยื้อจะต้องถูกแทรกซึมด้วยตัวกลาง (Medium) ที่จะทำให้เนื้อเยื่อมีความแข็งเพียงพอ และสามารถถูกตัดออกเป็นแผ่นบาง ๆ ที่มีความหนำประมาณ 5-7 ไมโครเมตร ตัวกลางที่ใช้กันโดยทั่วไปจะเป็นพาราฟิน แว็กส์ (Paraffin wax) ซึ่งมีคุณสมบัติคล้ายขี้ผึ้งหรือเทียนไข การเตรียมเนื้อเยื่อประกอบด้วย 3 ขั้นตอนที่สำคัญ

1. การดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ (Dehydration)

การดึงน้ำออก เป็นขั้นตอนแรกในการเตรียมเนื้อเยื่อ โดยมีจุดประสงค์ในการกำจัดน้ำทั้งหมดที่มีอยู่ในเนื้อเยื่อเพื่อที่พาราฟิน แว็กส์ จะสามารถแทรกซึมเข้าไปแทนที่ได้ การดึงน้ำออกจะใช้วิธีการแช่ในสารละลายแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นเริ่ม 50-70 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นจึงค่อย ๆ เริ่มปรับเพิ่มความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ และสุดท้ายจะเป็นการแช่เนื้อเยื่อในสารละลายแอลกอฮอล์ 100 เปอร์เซ็นต์ (Absolute alcohol) เพื่อให้การดึงน้ำออกเกิดขึ้นได้อย่างสมบรูณ์

2. การดึงแอลกอฮอล์ออกจากเนื้อเยื่อ (Clearing)

เนื่องจากแอลกอฮอล์ไม่สามารถรวมเป็นเนื้อเดียวกันได้กับพาราฟิน แว็กส์ ได้ จึงจำเป็นต้องแช่เนื้อเยื่อในสารละลายที่สามารถผสมเป็นเนื้อเดียวกับทั้งแอลกอฮอล์ และพาราฟิน แว็กส์ (Clearing agent) ก่อน เป็นขั้นตอนเพื่อดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ ก่อนที่จะให้พาราฟิน แว็กส์ แทรกซึมเข้าไป สารละลายมีหลายชนิด แต่ที่นิยมใช้ทั่วไปได้แก่ ไซลีน (Xylene), คลอโรฟอร์ม (Chloroform) และโทลูอีน (Toluene)

3. การแทรกซึมด้วย Paraffin wax (Wax penetration)

ขั้นตอนการให้พาราฟิน แว็กส์ แทรกซึมเข้าไปในเนื้อเยื่อมีวัตถุประสงค์เพื่อที่จะทำให้เนื้อเยื่อมีความแข็ง สามารถตัดออกเป็นแผ่นบาง ๆ ได้ ความแข็งของพาราฟิน แว็กส์ จะขึ้นอยู่กับจุดหลอมเหลว (Melting point) ยิ่งมีจุดหลอมเหลวสูงก็ยิ่งมีความแข็งมากพาราฟิน แว็กส์ ที่ใช้กันทั่วไปจะมีจุดหลอมเหลวอยู่ในช่วง 54-58 องศาเซลเซียส ซึ่งมีขั้นตอนดังตาราง 13

4. ขั้นตอนการฝังเนื้อเยื่อ และการตัด (Embedding and sectioning)

นำตัวอย่างที่ผ่านขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อแล้วไปฝังในแว็กส์ พาราฟิน (Wax paraffin) (โดยทั่วไปจะใช้ Paraplast) เรียกขั้นตอนนี้ว่าการตัดโดยวางชิ้นเนื้อเยื่อลงไปในเบ้า (Embedding mould) แล้วเติมพาราพลาส (Paraplast) เหลวลงไปจนเต็มเบ้า วางบนถาดเครื่องให้ความเย็น (cooling) ทิ้งไว้พาราพลาสแข็ง จะได้ชิ้นเนื้อเยื่อที่ฝังอยู่ในพาราพลาส (Tissue block) ถอดเบ้าออก นำบล็อกเนื้อเยื่อ (Tissue block) ที่ได้ไปผ่านขั้นตอนการตัด (Section) ต่อไป

ตบแต่ง (Trimming) บล็อกเนื้อเยื่อให้มีขนาดพอดีกับสไลด์ที่จะใช้วางแผ่นเนื้อเยื่อ แล้วนำไปตัดด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อ (Microtome) ให้มีขนาดความหนำประมาณ 5-7 ไมโครเมตร นำไปลอยในอ่างน้ำอุ่นที่มีอุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส (อาจเติมเจลาติน (gelatin) ลงไปในน้ำเล็กน้อย) แล้วใช้แผ่นสไลด์ช้อนแผ่นเนื้อเยื่อที่ลอยอยู่เหนือน้ำขึ้นมา นำสไลด์ไปอบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสข้ามคืนเพื่อให้แผ่นเนื้อเยื่อเกาะติดกับแผ่นสไลด์ดีขึ้น

ตาราง 13 การเตรียมเนื้อเยื่อ

ขั้นตอน	สารละลาย	เวลา (ชั่วโมง)
1	50 % alcohol	1
2	70 % alcohol	1
3	70 % alcohol	1
4	95 % alcohol	1
5	95 % alcohol	1
6	Absolute alcohol	1
7	Isopropyl alcohol	1
8	Isopropyl alcohol	1
9	Xylene	1
10	Xylene	1
11	Paraplast	1
12	Paraplast	1

5. ขั้นตอนการย้อมสี (Staining)

นำแผ่นสไลด์ไปผ่านการย้อมด้วยสีฮีมาท็อกซิลิน และอีโอซิน (Haematoxylin & Eosin ; H&E) ขั้นตอนการย้อมสีหลัก ๆ ประกอบด้วย การละลายพาราพลาส (De-wax) ในแผ่นเนื้อเยื่อด้วยไซลีน จากนั้นจึงนำไปแช่ในสารละลายแอลกอฮอล์ที่ค่อย ๆ ลดความเข้มข้นลง เช่น จาก 100 เปอร์เซ็นต์ เป็น 95 เปอร์เซ็นต์, 70 เปอร์เซ็นต์ และ 50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แล้วจึงผ่านการแช่ในสารละลายสีฮีมาท็อกซิลิน (Haematoxylin) และอีโอซิน (Eosin) ดังตาราง 14

6. การปิดผนึกเป็นสไลด์ถาวร

นำสไลด์ที่ผ่านการย้อมสีมาปิดผนึกเป็นสไลด์ถาวรโดยใช้น้ำยาเปอร์เมาท์ (Permout) หยดลงบนแผ่นเนื้อเยื่อแล้วปิดทับด้วยแผ่นปิดสไลด์ (Cover slip) ทิ้งไว้ให้แห้ง นำไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ต่อไป โดยที่นิวเคลียสจะย้อมติดสีน้ำเงินของฮีมาท็อกซิลิน (Haematoxylin) ส่วนไซโตพลาสซึม เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน เม็ดเลือดแดง และกล้ามเนื้อจะย้อมติดสีแดง หรือสีชมพูของอีโอซิน (Eosin)

ตาราง 14 การย้อมสีมีขั้นตอนต่าง ๆ โดยละเอียดดังนี้

ขั้นตอน	สารละลาย	เวลา (นาที)
1	Xylene	2
2	Xylene	2
3	Xylene	2
4	Isopropyl alcohol	2
5	Isopropyl alcohol	2
6	Absolute alcohol	2
7	95 % alcohol	2
8	95 % alcohol	2
9	70 % alcohol	2
10	70 % alcohol	2
11	50 % alcohol	2
12	Distilled water	2
13	Haematoxylin	5-20
14	Distilled water	1
15	50 % alcohol	2
16	Eosin	2-3
17	70 % alcohol	2
18	70 % alcohol	2
19	95 % alcohol	2
20	95 % alcohol	2

ขั้นตอน	สารละลาย	เวลา (นาที)
21	Absolute alcohol	2
22	Isopropyl alcohol	2
23	Isopropyl alcohol	2
24	Xylen	2
25	Xylen	2

การศึกษาสัมประสิทธิการย่อยได้ของสารอาหาร (Apparent digestibility coefficient)

ในการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนในอาหารปลานิล ด้วยการเติมโครมิกออกไซด์ (Cr_2O_3) 0.5 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักอาหารเพื่อเป็นอินดิเคเตอร์ จากนั้นนำอาหารที่ผสมโครมิกออกไซด์มาเลี้ยงปลานิลที่ทำการทดลองในสัปดาห์ที่ 8 โดยจะทำการเก็บมูลของปลานิลหลังจาก 1 ชั่วโมงที่ให้อาหารทุกวัน โดยการใช้สายยางพลาสติกขนาดเล็กดูด (siphon) มูลปลานิลออกจากตู้และใช้ผ้ากรอง จากนั้นนำมูลที่เก็บได้ไปแช่แข็ง โดยจะเก็บรวบรวมมูลตั้งแต่สัปดาห์ที่ 8 - 10 จนได้น้ำหนักที่ต้องการคือประมาณ 1 กรัม แล้วนำมูลปลาที่ได้มาทำการอบด้วยอุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวิเคราะห์องประกอบทางเคมี ได้แก่ โปรตีน บันทึกค่าที่ได้แล้วทำการวิเคราะห์ปริมาณโครมิกออกไซด์ในอาหารและมูลตามวิธีของ Furukawa, & Tsukahara (1996) บันทึกค่าที่ได้แล้วนำมาคำนวณประสิทธิภาพการย่อยดังต่อไปนี้

การย่อยได้ของของวัตถุแห้ง (Apparent digestibility coefficient of dry matter, ADC) (เปอร์เซ็นต์)

$$\text{การย่อยได้ของของแข็ง} = \frac{(\text{ปริมาณสารอาหารที่กิน} - \text{ปริมาณมูล}) \times 100}{\text{ปริมาณสารอาหารในอาหารที่กิน}}$$

การย่อยได้ของโปรตีน (Apparent digestibility coefficient of dry matter, ADC Protein) (เปอร์เซ็นต์)

$$\text{การย่อยได้ของของโปรตีน} = \frac{(\text{ปริมาณโปรตีนที่กิน} - \text{ปริมาณมูล}) \times 100}{\text{ปริมาณโปรตีนในอาหารที่กิน (เปอร์เซ็นต์)}}$$

การศึกษาค่าโลหิตวิทยา (Hematology)

เก็บตัวอย่างเลือดปลา ปริมาณ 3 มิลลิกรัมต่อ 1 ชุดการทดลอง โดยทำการสลบปลาด้วยน้ำมันกานพลู ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร ทำการเจาะเลือดบริเวณส่วนหาง (Caudal peduncle) ด้วยเข็มฉีดยาขนาด 25G จากนั้นนำไปวิเคราะห์ค่าโลหิตวิทยาโดย การนับจำนวนเม็ดเลือดขาว (WBC) การนับจำนวนเม็ดเลือดแดง (RBC) การวัดค่าฮีโมโกลบิน และการวัดปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น โดยมีวิธีการและขั้นตอนการวิเคราะห์ ดังนี้

1. WBC (White Blood cells count) นับจำนวนเม็ดเลือดขาวของปลานิล โดยการอาศัยหลักการ เจือจางเลือดดวยน้ำยาทำลายเม็ดเลือดแดง และรักษาสภาพเม็ดเลือดขาว โดยใชเครื่องมือที่ทราบอัตราสวนการเจือจางของเลือด แลวนำไปนับด้วย Hemocytometer หรือ Counting chamber โดยดูจากกลองจุลทรรศน์ ทำการเจือจางเม็ดเลือดด้วย WBC pipette

น้ำยาเจือจาง คือ 3 เปอร์เซ็นต์ acetic acid มีส่วนผสม ดังนี้

glacial acetic acid	3 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น (Distilled water)	100 มิลลิลิตร

ทำการดูดตัวอย่างเลือดเข้า WBC pipette ให้ถึงขีด 0.5 พอดี ทำการดูดน้ำยาเจือจางเลือดด้วยน้ำยานับเม็ดเลือดขาว (3 เปอร์เซ็นต์ acetic acid) ที่ได้ทำการเตรียมไว้ ตามสูตร Natt-Herrick’s stain ของ Edward (2000) ถึงขีดปริมาตร 11 จากนั้นใช้นิ้วหัวแม่มือกับนิ้วชี้ปิดปลายปิเปตทั้งสองเขย่าไปมาในแนวนอนประมาณ 2-3 นาที หยดตัวอย่างเลือดของปลาในหลอด Pipette ทิ้ง 3-4 หยดทิ้ง หลังจากนั้นนำตัวอย่างเลือดไปนับด้วย Haemocytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ นับในช่อง W ทั้ง 4 ช่อง ดังแสดงในภาพที่ 4 แล้วนำมาคำนวณจำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมดต่อ 1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร ด้วยสูตรคำนวณด้านล่างนี้

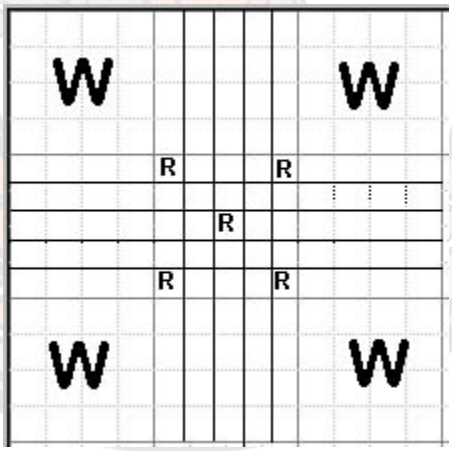
WBC = ค่าเฉลี่ยจำนวนเม็ดเลือดขาวที่นับได้ทั้งหมด 4 ช่องX20 (1:20 dilution) X2.5(1/0.4)

2. Red blood cells count (RBC) การนับจำนวนเม็ดเลือดแดง เจือจางเลือดดวยน้ำยารักษาสภาพเม็ดเลือดแดง ในเครื่องมือที่ทราบอัตราสวนแนนอนแลวนำไปนับ counting chamber โดยดูจากกลองจุลทรรศน น้ำยาที่ใช้ช่วยป้องกันไม่ไหเลือดแข็งตัว และเปน isotonic solution คือไม่ทำลายเม็ดเลือดแดง คือ Gower’s solution มีส่วนผสม ดังนี้

Sodium sulfate	12.5 กรัม
Glacial acetic acid	33.3 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น (Distilled water)	200 มิลลิลิตร

นำตัวอย่างเลือดมาทำการเจือจางด้วยน้ำยาเจือจาง Grower's solution โดยอาศัยหลักการทำลายเซลล์เม็ดเลือดขาวได้อย่างสมบูรณ์ ทำการเจือจางเลือด 1 ส่วน ต่อ Grower's solution 200 ส่วน คือ เติมเลือด 20 ไมโครลิตร ลงใน Grower's solution 4 มิลลิลิตร แล้วเขย่าส่วนผสมให้เข้ากัน หยดเลือดที่ผสมกับน้ำยาเจือจางลงใน Haemocytometer ให้เต็มทั้งสองด้าน แล้วนำมานับจำนวนเม็ดเลือดแดงด้วยกล้องจุลทรรศน์ นับในช่อง R ทั้ง 5 ช่อง ดังแสดงในภาพที่ 4 แล้วนำมาคำนวณจำนวนเม็ดเลือดแดงต่อ 1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร ด้วยสูตรคำนวนด้านล่างนี้

RBC = ค่าเฉลี่ยจำนวนเม็ดเลือดแดงที่ได้ทั้งหมด 5 ช่อง(R) X200 (1:200 dilution) X25 $X10^4$



ภาพ 4 แสดงพื้นที่การนับเม็ดเลือดขาว (W) และเม็ดเลือดแดง (R)

ที่มา: Pongpet, 2014

3. ฮีโมโกลบิน (Haemoglobin;Hb) ใช้ชุด Haemoglobin set (Cyanmethemoglobin Method) เติมน้ำยา Drabkin Reagent ลงในหลอดแก้ว 5 มิลลิลิตร ใส่ตัวอย่างเลือดที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (EDTA)) ลงในหลอด 20 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา

10 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่นแสง 540 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าดูดกลืนแสงไปคำนวณหาค่าฮีโมโกลบินจากสูตรด้านล่าง หรือจากกราฟมาตรฐานซึ่งอยู่ในชุด Hemoglobin set

$$\text{Hemoglobin (g/dl)} = \frac{\text{OD.T x C.S (g/dl)}}{\text{OD.S}}$$

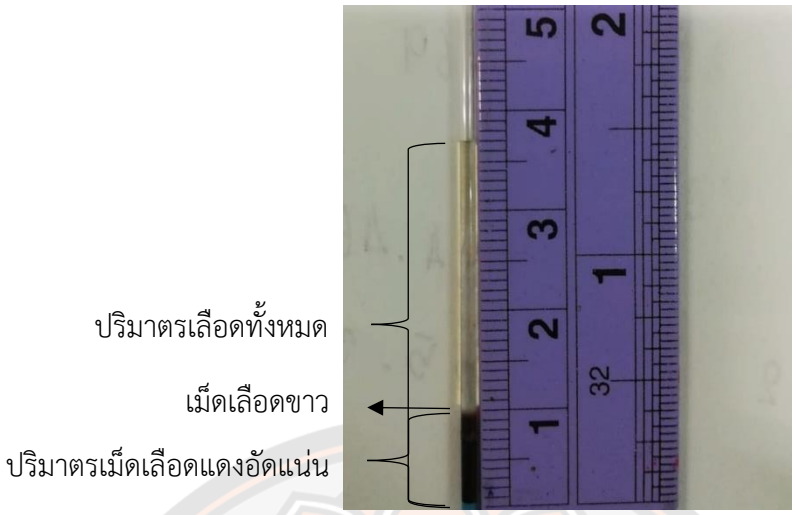
หมายเหตุ: OD.T = ค่าดูดกลืนแสงของตัวอย่างเลือดที่วัดได้

C.S = Hemoglobin Concentration = 18 (g/dl)

OD.S = ค่าดูดกลืนแสงของ standard ในชุด Hemoglobin set ที่วัดได้

4. ปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (Haematocrit;Hct) เขย่าเลือดในหลอดที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด จากนั้นนำปลายหลอด microhaematocrit capillary tube จุ่มลงในหลอดเก็บเลือดให้เลือดไหลเข้ามาใน capillary tube ประมาณ 4 ใน 5 ของความยาว tube แล้วอุดปลายด้วยดินน้ำมัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12000 rpm นาน 5 นาที วัดความยาวของการอัดตัวเม็ดเลือดและความยาวทั้งหมดของเม็ดเลือดแดง ดังภาพที่ 5 แล้วคำนวณจากสูตร

$$\text{ปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{ปริมาตรเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (เซนติเมตร)} \times 100}{\text{ปริมาตรเลือดทั้งหมด (เซนติเมตร)}}$$



ภาพ 5 Microhaematocrit capillary tube ที่ผ่านการปั่นเหวี่ยง

การศึกษาการแสดงออกของโปรตีน Matrix Metalloproteinases (MMP-2 และ MMP-9)

1. การแยกซีรั่มจากเลือดปลาทดลอง

นำเลือดใส่ Eppendorf centrifuge tube โดยไม่มีสารป้องกันเลือดแข็งตัว ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง เพื่อให้เลือดแข็งตัว จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ทำการเก็บส่วนใสด้านบน เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

2. การวัดความเข้มเข้นของโปรตีน

นำซีรั่มที่ได้ไปตรวจหาความเข้มข้นของโปรตีนด้วยเครื่อง Spectrophotometer ความยาวคลื่นที่ 595 นาโนเมตร เตรียมโปรตีนมาตรฐาน BSA 0,1,2,4,6,10,15 และ 20 µl ตามลำดับ ผสมกับ DDW 800,799,798,796,794,785 และ 780 µl ตามลำดับ และ Biored 200 µl ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดความยาวคลื่นที่ 595 นาโนเมตร และนำตัวอย่างซีรั่ม (sample 1 µl,DDW 799 µl, Biored 200 µl) ไปวัดค่าที่ความยาวคลื่น 595 นานโนเมตร ได้ค่าออกมานำไปสร้างกราฟมาตรฐาน และคำนวณตามสมการ จะได้ความเข้นข้นของโปรตีนออกมา

3. การทำ Gelatin Zymography

การเตรียมเจล polyacrylamide gel โดยใช้ Separating gel 8%, 15 ml สำหรับเจลชั้นล่าง และ Stacking gel 3%, 5 ml สำหรับเจลชั้นบน ทำความสะอาดกระจก (glass plates) ให้

สะอาดแล้วนำกระจกทั้งสองแผ่นมาประกบกัน นำกระจกที่ประกบกันแล้ววางลงใน Casting Frame กดล็อคกระจกให้แน่น และตรวจสอบปลายกระจกให้เรียบเสมอกันป้องกันการรั่วซึม

จากนั้นใส่ Separating gel 8 %, 15 ml สำหรับเจลชั้นล่างลงในช่องกระจก แล้วปรับระดับโดยการเติมน้ำกลั่นลงไปเพื่อให้เจลตรงสวยงาม ทิ้งไว้เป็นเวลา 15 นาที เมื่อครบเวลาเทน้ำที่ปรับระดับออกแล้วเติม Stacking gel 3 %, 5 ml สำหรับเจลชั้นบน นำ comb มาใส่ในช่องกระจกเพื่อสำหรับการโหลดตัวอย่างลงในแผ่นเจล ทิ้งไว้ 15 นาที

นำค่าโปรตีนที่ได้จากการวัดความเข้มมาคำนวณโดยจะใช้ความเข้มข้นในการโหลดตัวอย่างที่ 15 µg ผสมกับ Zymogram Buffer ในอัตราส่วน 1:1 จากนั้นนำมา Vortex และ Spring down ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที

นำแผ่นเจลลงในเครื่องรันเจล ทำการเท Running Buffer และโหลดตัวอย่างลงบนแผ่นเจล ทำการรันเจลที่ 85 โวลล์ สำหรับเจลชั้นบนเป็นเวลา15นาที และ 150 โวลล์ สำหรับเจลชั้นล่างเป็นเวลา 35 นาที

จากนั้นนำแผ่นเจลออกจากกระจก และล้างแผ่นด้วย Washing renaturation 2.5% v/v Triton X-100 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นบ่มเจลที่อุณภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วย Zymogram Development Buffer เป็นเวลา 19 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา นำเจลมาย้อมสีด้วย Coomassie Blue R-250 เป็นเวลา 30 นาที และล้างด้วย Destain เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 20 นาที สุดท้ายถ่ายภาพเจลที่ได้เป็นการเก็บผล

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 ความผิดปกติและพฤติกรรมของปลานิลที่ได้รับอาหารทดลองสูตรต่างๆ

ผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่า ปลานิลที่ได้รับอาหารชุดการทดลองที่ 1 มีด้วยกัน 4 สูตร พบว่ามีการปฏิเสธการกินอาหาร ทำให้ตัวปลาผอม มีลักษณะลำตัวลีบแบน ดังภาพที่ 6 ซึ่งอัตราการรอดตายสูงกว่า 85 เปอร์เซ็นต์ จึงยังดำเนินการทดลองต่อจนสิ้นสุดการทดลอง เช่นเดียวกันกับชุดการชุดลองที่ 2 พบว่าปลาที่ได้รับอาหารทดลองในสูตรที่ 3 (อบลมร้อน: Air dry) และ 4 (นึ่งฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำ: Autoclave) มีอัตราการรอดตายของปลาทดลองน้อยกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ ในสัปดาห์ที่ 4 จึงทำให้ต้องยุติการเลี้ยงด้วยอาหารสองสูตรนี้ ในขณะที่ปลานิลที่ได้รับอาหารสูตร 1 (เอ็กซ์ทรูด: Extrusion), 2 (นึ่ง: Steam) และ 5 (ไมโครเวฟ: Microwave) ยอมรับการให้อาหาร ไม่มีความผิดปกติเกี่ยวกับพฤติกรรมการว่ายน้ำ ลักษณะครีบกร่อน และเกิดแผลภาพนอกตามตัวของปลาในช่วงระหว่างการได้รับอาหารทดลอง

ภาพ 6 ลักษณะปลาปกติ (ก) และลักษณะปลาที่มีความผิดปกติ (ข)

4.2 ผลการทดลองชุดการทดลองที่ 1

การศึกษาของชุดการทดลองที่ 1 การให้ความร้อนด้วยเครื่องอบลมร้อนอุณหภูมิที่แตกต่างกัน คือ 80, 100, 120 และ 140 องศาเซลเซียส ในกากถั่วดาวอินคา โดยทดลองเลี้ยงในปลานิลที่มีน้ำหนักเริ่มต้นเฉลี่ย 12.52±0.02 กรัม เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ มีผลการทดลองดังนี้

4.2.1 ประสิทธิภาพการเจริญเติบโตและอัตราการรอดตาย

1) น้ำหนักเฉลี่ย (กรัม/ตัว)

น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวของปลานิลที่รับอาหารชุดการทดลองที่ 1 ทั้ง 4 สูตร ตลอดระยะเวลา การทดลอง 8 สัปดาห์ พบว่า ปลามีน้ำหนักลดลงจากน้ำหนักเริ่มต้น ดังตาราง 15 โดยที่น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวของปลานิลเมื่อเริ่มการทดลองในแต่ละหน่วยทดลองมีค่าอยู่ในช่วง 12.49±0.03 - 12.55±0.03 กรัม และไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวในสัปดาห์ที่ 2 มีค่าอยู่ที่ 11.92±0.37, 11.59±0.36, 12.00±0.17 และ 11.93±0.61 กรัม ตามลำดับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวของปลาที่ได้รับอาหารสูตร 4 ในสัปดาห์ที่ 4 และ 6 มีค่า 11.65±0.45 และ 11.66±0.44 กรัม ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าน้ำหนักเฉลี่ยของปลาที่ได้รับสูตรอาหารที่ 2 มีค่า 10.93±0.38 และ 10.72±0.44 กรัม ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) ในสัปดาห์ที่ 8 (สิ้นสุดการทดลอง) ปลาที่ได้รับอาหารทั้ง 4 สูตร มีน้ำหนักสุดท้ายน้อยกว่าเริ่มต้น มีค่า 11.59±0.45, 11.26±0.36, 11.03±0.30 และ 11.44±1.02 กรัม ตามลำดับ ซึ่งแต่ละชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตาราง 15 น้ำหนักเฉลี่ยของปลาของปลานิลที่ได้รับอาหารชุดการทดลองที่ 1 ระยะเวลา 8 สัปดาห์ (กรัม/ตัว)

ชุดการทดลอง	น้ำหนักเฉลี่ยของปลานิลในแต่ละสัปดาห์ (กรัม/ตัว)				
	0	2	4	6	8
T1 (80 °C)	12.54±0.05	11.92±0.37	11.36±0.35^{ab}	11.08±0.24^{ab}	11.59±0.45
T2 (100 °C)	12.49±0.03	11.59±0.36	10.93±0.38^{b}	10.72±0.44^{b}	11.26±0.36
T3 (120 °C)	12.53±0.03	12.00±0.17	11.48±0.32^{ab}	11.25±0.38^{ab}	11.03±0.30
T4 (140 °C)	12.55±0.03	11.93±0.61	11.65±0.45^{a}	11.66±0.44^{a}	11.44±1.02

หมายเหตุ: ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากข้อมูล 4 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรตัวเหมือนกันกำกับในแนวสดมภ์ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (P>0.05)

2) ประสิทธิภาพการเจริญเติบโต (Growth performance)

ประสิทธิภาพการเจริญเติบโต ของปลานิลที่ได้รับอาหารชุดการทดลองที่ 1 ดังตาราง 16 มีค่าใกล้เคียงกัน และไม่มีความแตกต่างในทางสถิติกัน (P>0.05) ประกอบด้วย น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น มีค่าอยู่ที่ -7.66±3.37, -9.92±2.85, -12.12±2.39 และ -8.85±8.29 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และน้ำหนักเพิ่มต่อวัน มีค่าอยู่ที่ 0.00 กรัมต่อตัว ในทุกหน่วยทดลอง อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ มีค่าอยู่ที่ -0.14±0.07, -0.19±0.06, -0.23±0.049 และ -0.17±0.163 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ค่าปัจจัยของน้ำหนักต่อความยาว มีค่าอยู่ที่ 1.18±0.10, 1.12±0.08, 1.21±0.02 และ1.17±0.08 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดัชนีน้ำหนักปลาต่อน้ำหนักตับ 1.06±0.04, 0.79±0.17, 0.87±0.31 และ1.07±0.42 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดัชนีน้ำหนักปลาต่อน้ำหนักอวัยวะภายใน 9.48±2.33, 11.06±0.36, 9.63±1.39 และ 10.79±0.58 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และอัตราการรอดตาย ปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 3 มีค่าสูงที่สุด มีค่า 90.00±4.08 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) กับสูตรที่ 1, 2 และ 4 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 87.50±6.45, 88.75±6.29, 90.00±4.08 และ 87.50±2.89 ตามลำดับ

ตาราง 16 ประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของปลาของปลานิลที่ได้รับอาหารชุดการทดลองที่ 1 ตลอดระยะเวลา 8 สัปดาห์

ตัวชี้วัด	T1 (80 °C)	T2 (100 °C)	T3 (120 °C)	T4 (140 °C)
น้ำหนักปลาเริ่มต้น (กรัม/ตัว)	12.54±0.05	12.49±0.03	12.53±0.03	12.55±0.03
น้ำหนักเฉลี่ย (กรัม/ตัว)	11.59±0.45	11.26±0.36	11.03±0.30	11.44±1.02
น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (%)	-7.66±3.37	-9.92±2.85	-12.12±2.39	-8.85±8.29
น้ำหนักเพิ่มต่อวัน (กรัม/ตัว)	0.00	0.00	0.00	0.00
อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (%)	-0.14±0.07	-0.19±0.06	-0.23±0.049	-0.17±0.163
ค่าปัจจัยของน้ำหนักต่อความยาว (%)	1.18±0.10	1.12±0.08	1.21±0.02	1.17±0.08
ดัชนีน้ำหนักปลาต่อน้ำหนักตับ (%)	1.06±0.04	0.79±0.17	0.87±0.31	1.07±0.42
ดัชนีน้ำหนักปลาต่อน้ำหนัก-อวัยวะภายใน (%)	9.48±2.33	11.06±0.36	9.63±1.39	10.79±0.58
อัตราการรอดตาย (%)	87.50±6.45	88.75±6.29	90.00±4.08	87.50±2.89

หมายเหตุ: ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากข้อมูล 4 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรต่างกันกำกับในแนวนอน มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (P<0.05)

3) ประสิทธิภาพการใช้อาหาร (Feed utilization)

ประสิทธิภาพการใช้อาหารของปลานิลที่ได้รับอาหารชุดการทดลองที่ 1 ดังตาราง 17 ประกอบด้วย ปริมาณอาหารที่ปลากิน มีค่า 9.09±0.67, 8.53±0.96, 8.90±0.84 และ 9.49±0.48 กรัมต่อตัว ตามลำดับ อัตราการกินอาหาร มีค่า 0.07±0.005, 0.06±0.006, 0.07±0.01 และ 0.07±0.01 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ มีค่า -8.53±2.84, -6.19±1.67, -6.21±0.80 และ -9.10±6.88 ตามลำดับ และประสิทธิภาพการใช้อาหาร มีค่า -0.10±0.04, -0.15±0.06, -0.17±0.02 และ -0.11±0.11 กรัม ตามลำดับ โดยตัวชี้วัดประสิทธิภาพการใช้อาหารของปลาที่ได้รับอาหารทั้ง 4 สูตร ไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติ (P>0.05)

ตาราง 17 ประสิทธิภาพการใช้อาหาร ของปลาของปลานิลที่ได้รับอาหารชุดการทดลองที่ 1 ระยะเวลา 8 สัปดาห์

ตัวชี้วัด	T1 (80 °C)	T2 (100 °C)	T3 (120 °C)	T4 (140 °C)
ปริมาณอาหารที่ปลากิน (กรัม/ตัว)	9.09±0.67	8.53±0.96	8.90±0.84	9.49±0.48
อัตราการกินอาหาร (%)	0.07±0.005	0.06±0.006	0.07±0.01	0.07±0.01
อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ	-8.53±2.84	-6.19±1.67	-6.21±0.80	-9.10±6.88
ประสิทธิภาพการใช้อาหาร	-0.10±0.04	-0.15±0.06	-0.17±0.02	-0.11±0.11

หมายเหตุ: ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากข้อมูล 4 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรต่างกันกำกับในแนวนอน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (P<0.05)

4.3 ผลการทดลองชุดการทดลองที่ 2

ชุดการทดลองที่ 2 ทำการศึกษาวิธีการให้ความร้อนในรูปแบบต่างกัน ประกอบด้วย เอ็กซ์ทรูด (Extrusion), นึ่ง (Steam), อบลมร้อน (Air dry), นึ่งฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำ (Autoclave), ไมโครเวฟ (Microwave) ในกากถั่วดาวอินคา โดยทดลองเลี้ยงในปลานิลที่มีน้ำหนักเริ่มต้นเฉลี่ย 10.57±0.01 กรัม เป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์ มีผลการทดลองดังนี้

4.3.1 ประสิทธิภาพการเจริญเติบโตและอัตราการรอดตาย

1) น้ำหนักเฉลี่ย (กรัม/ตัว)

น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวของปลานิลที่รับอาหารชุดการทดลองที่ 2 ทั้ง 5 สูตร ตลอดระยะเวลาการทดลอง 10 สัปดาห์ ดังตาราง 18 น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวของปลานิลเมื่อเริ่มการทดลองในแต่ละหน่วยทดลองมีค่าอยู่ในช่วง 10.56±0.01 -10.59±0.01 กรัม และไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวในสัปดาห์ที่ 2 ของปลาที่ได้รับอาหารสูตรอาหารที่ 1 และ 2 มีค่าอยู่ที่ 14.73±0.80 และ 14.43±0.25 กรัม ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) เป็นแนวโน้มของปลาที่มีนำหนักเฉลี่ยต่อตัวสูงที่สุด มีความแตกต่างทางสถิติ (P<0.05) ในปลาที่ได้อาหารทดลองสูตรที่ 3, 4 และ 5 มีค่าอยู่ที่ 10.08±0.22, 10.00±0.30 และ 12.54±0.35 กรัม ตามลำดับ สอดคล้องไปยังสัปดาห์ที่ 4 ปลาที่ได้รับอาหารสูตรอาหารที่ 1 และ 2 น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวมีค่าอยู่ที่ 22.88±1.48 และ 21.80±0.72 กรัม ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) แต่มีความแตกต่างทางสถิติ (P<0.05) ในปลาที่ได้อาหารทดลองสูตรที่ 3, 4 และ 5 มีค่าอยู่ที่ 10.17±0.36, 10.26±0.47 และ 15.80±0.33 กรัม ตามลำดับ เห็นได้ว่าปลาที่ได้อาหารทดลองสูตรที่ 3 และ 4 มีน้ำหนักที่ลดลงจากน้ำหนักเริ่มต้นการทดลอง และพบความผิดปกติของพฤติกรรม คือ มีการปฏิเสธการกินอาหาร ทำให้ตัวปลาผอม มีลักษณะลำตัวลีบแบน จนเริ่มมีการตายตามมา ส่งผลให้ต้องยุติการทดลองอาหารสูตรที่ 3 และ 4 น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวสัปดาห์ที่ 6 พบว่าปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 1 และ 2 มีค่า 28.67±1.04 และ 29.89±0.76 กรัม มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P<0.05) กับสูตรที่ 5 ที่มีค่า 16.37±0.85 กรัม น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวสัปดาห์ที่ 8 มีค่า 40.73±2.01, 44.50±1.84 และ 26.50±1.23 กรัม ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) และในสัปดาห์สุดท้ายของการทดลอง คือ สัปดาห์ที่ 10 ยังพบว่าปลาที่ได้รับอาหารสูตรอาหารที่ 1 และ 2 มีค่าอยู่ที่ 53.36 ±5.84 และ 54.47±2.47 กรัม เป็นแนวโน้มของปลาที่มีนำหนักเฉลี่ยต่อตัวสูงที่สุด มีความแตกต่างทางสถิติ (P<0.05) ในปลาที่ได้อาหารทดลองสูตรที่ 5 มีค่าอยู่ที่ 34.90±5.24 กรัม

ตาราง 18 น้ำหนักเฉลี่ยของปลาของปลานิลที่ได้รับอาหารชุดการทดลองที่ 2 ระยะเวลา 10 สัปดาห์ (กรัม/ตัว)

ชุดการทดลอง	น้ำหนักเฉลี่ยของปลานิลในแต่ละสัปดาห์ (กรัม/ตัว)					
	0	2	4	6	8	10
T1 (Extrusion)	10.58±0.02	14.73±0.80^{a}	22.88±1.48^{a}	28.67±1.04^{a}	40.73±2.01^{b}	53.36±5.84^{a}
T2 (Steam)	10.57±0.02	14.43±0.25^{a}	21.80±0.72^{a}	29.89±0.76^{a}	44.50±1.84^{a}	54.47±2.47^{a}
T3 (Air dry)	10.56±0.01	10.08±0.22^{c}	10.17±0.36^{c}	-	-	-
T4 (Autoclave)	10.59±0.01	10.00±0.30^{c}	10.26±0.47^{c}	-	-	-
T5 (Microwave)	10.58±0.00	12.54±0.35^{b}	15.80±0.33^{b}	16.37±0.85^{b}	26.50±1.23^{c}	34.90±5.24^{b}

หมายเหตุ: ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากข้อมูล 4 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรตัวเหมือนกันกำกับในแนวสดมภ์ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (P>0.05)

2) ประสิทธิภาพการเจริญเติบโต (Growth performance)

ประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของปลานิลที่ได้รับอาหารชุดการทดลองที่ 2 ปลาที่ได้รับอาหารสูตร 1 และ 2 ให้แนวโน้มประสิทธิภาพการเจริญเติบโตที่สูงกว่าสูตร 5 ดังตาราง 19 ประกอบด้วย น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของปลาที่รับอาหารสูตรที่ 1 และ 2 มีค่าอยู่ที่ 361.70±44.70 และ 381.18±40.11 เปอร์เซ็นต์ มีความแตกต่างทางสถิติ ($P<0.05$) กับสูตรที่ 5 ที่มีค่า 212.06±37.96 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักเพิ่มต่อวันของปลาที่รับอาหารสูตรที่ 1 และ 2 มีค่าอยู่ที่ 0.04±0.01 และ 0.04±0.00 กรัม มีความแตกต่างทางสถิติ ($P<0.05$) กับสูตรที่ 5 ที่มีค่า 0.02±0.01 กรัม อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของปลาที่รับอาหารสูตรที่ 1 และ 2 มีค่าอยู่ที่ 2.31±0.16 และ2.34±0.06 เปอร์เซ็นต์ มีความแตกต่างทางสถิติ ($P<0.05$) กับสูตรที่ 5 ที่มีค่า 1.69±0.23 เปอร์เซ็นต์ ค่าปัจจัยของน้ำหนักต่อความยาวของทั้ง 3 สูตร มีค่าอยู่ที่ 2.42±0.83, 2.75±0.75 และ 2.22±0.77 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) ดัชนีน้ำหนักปลาต่อน้ำหนักตับของปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 1 มีค่า 1.81±0.36 เปอร์เซ็นต์ มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$) กับสูตรที่ 2 ที่มีค่า 1.46±0.16 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) กับสูตรที่ 5 มีค่า 1.61±0.25 เปอร์เซ็นต์ ดัชนีน้ำหนักปลาต่อน้ำหนักอวัยวะภายใน มีค่าอยู่ที่ 7.39±0.76, 7.00±0.27 และ 6.72±0.43 ตามลำดับ และอัตราการรอดตาย มีค่าอยู่ที่ 91.67±3.33, 93.33±5.44 และ 95.00±3.33 ตามลำดับ พบว่าไม่ความแตกต่างกันทางสถิติในทุกหน่วยทดลอง ($P<0.05$)

ตาราง 19 ประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของปลาของปลานิลที่ได้รับอาหารชุดการทดลองที่ 2 ตลอดระยะเวลา 10 สัปดาห์

ตัวชี้วัด	T1 (Extrusion)	T2 (Steam)	T5 (Microwave)
น้ำหนักปลาเริ่มต้น (กรัม/ตัว)	10.58±0.02	10.57±0.02	10.58±0.00
น้ำหนักเฉลี่ย (กรัม/ตัว)	53.36±5.84[a]	54.47±2.47[a]	34.90±5.24[b]
น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (%)	361.70±44.70[a]	381.18±40.11[a]	212.06±37.96[b]
น้ำหนักเพิ่มต่อวัน (กรัม/ตัว)	0.04±0.01[a]	0.04±0.00[a]	0.02±0.01[b]
อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (%)	2.31±0.16[a]	2.34±0.06[a]	1.69±0.23[b]
ค่าปัจจัยของน้ำหนักต่อความยาว (%)	2.42±0.83	2.75±0.75	2.22±0.77
ดัชนีน้ำหนักปลาต่อน้ำหนักตับ (%)	1.81±0.36[a]	1.46±0.16[b]	1.61±0.25[ab]
ดัชนีน้ำหนักปลาต่อน้ำหนักอวัยวะภายใน (%)	7.39±0.76	7.00±0.27	6.72±0.43
อัตราการรอดตาย (%)	91.67±3.33	93.33±5.44	95.00±3.33

หมายเหตุ: ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากข้อมูล 4 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรตัวเหมือนกันกำกับในแนวนอน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (P>0.05)

3) ประสิทธิภาพการใช้อาหาร (Feed utilization)

ประสิทธิภาพการใช้อาหารของปลานิลที่ได้รับอาหารชุดการทดลองที่ 2 ดังตาราง 20 ประกอบด้วย ปริมาณอาหารที่ปลากินของปลาที่รับอาหารสูตร 1 และ 2 มีค่าอยู่ที่ 56.50±3.37 และ 61.10±2.73 กรัม มีค่าแตกต่างทางสถิติ ($P<0.05$) กับสูตร 5 ที่มีค่า 38.13±2.93 กรัม อัตราการกินอาหารของทุกสูตรอาหารมีค่าอยู่ที่ 2.42±0.19, 2.59±0.16 และ 2.35±0.18 เปอร์เซ็นต์ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) เช่นเดียวกับอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ ที่มีค่า 1.34±0.16, 1.40±0.14 และ 1.62±0.30 ตามลำดับ และประสิทธิภาพการใช้อาหารมีค่าอยู่ที่ 0.76±0.09, 0.72±0.07 และ 0.63±0.10 ตามลำดับ โปรตีนที่นำไปใช้ประโยชน์ มีค่า 42.14±1.58, 35.43±1.08 และ 40.14±0.76 ตามลำดับ พบความแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$) โปรตีนที่นำไปใช้ประโยชน์ มีค่า 2.74±0.07, 2.59±0.02 และ 2.27±0.02 ตามลำดับ มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$) ประสิทธิภาพการใช้ไขมัน มีค่า 5.82±0.79, 5.41±0.30 และ 4.71±1.01 ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$)

ตาราง 20 ประสิทธิภาพการใช้อาหาร ของปลาของปลานิลที่ได้รับอาหารชุดการทดลองที่ 2 ระยะเวลา 10 สัปดาห์

ตัวชี้วัด	T1 (extruded)	T2 (steam)	T5 (microwave)
ปริมาณอาหารที่ปลากิน (กรัม/ตัว)	56.50±3.37[a]	61.10±2.73[a]	38.13±2.93[b]
อัตราการกินอาหาร (%)	2.42±0.19	2.59±0.16	2.35±0.18
อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ	1.34±0.16	1.40±0.14	1.62±0.30
ประสิทธิภาพการใช้อาหาร	0.76±0.09	0.72±0.07	0.63±0.10
ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน	42.14±1.58[a]	35.43±1.08[c]	40.14±0.76[b]
โปรตีนที่นำไปใช้ประโยชน์	2.74±0.07[a]	2.59±0.02[b]	2.27±0.02[c]
ประสิทธิภาพการใช้ไขมัน	5.82±0.79	5.41±0.30	4.71±1.01

หมายเหตุ: ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากข้อมูล 4 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรตัวเหมือนกันกำกับในแนวนอน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($P>0.05$)

4) องค์ประกอบทางเคมี (Chemical composition)

องค์ประกอบทางเคมีของปลานิลที่ได้รับอาหารชุดการทดลองที่ 2 ดังตาราง 21 พบว่าโปรตีนในปลาสิ้นสุดการทดลอง ที่มีค่า 53.03±0.46, 54.65±0.94 และ 57.63±0.45 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P<0.05) มีค่าน้อยกว่าปลาเริ่มต้นการทดลอง ที่มีค่า 59.74±0.42 เปอร์เซ็นต์ ในทุกหน่วยทดลอง ไขมันในตัวปลาเริ่มต้น มีค่าอยู่ที่ 14.79±0.09 เปอร์เซ็นต์ ไขมันในปลาสิ้นสุดการทดลองของปลานิลที่ได้รับอาหารสูตร 1 และ 2 มีค่าอยู่ที่ 25.19±0.08 และ 25.37±0.46 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่าและมีความแตกต่างทางสถิติกับสูตร 5 ที่มีค่า 15.58±0.28 เปอร์เซ็นต์ เถ้ามีค่าอยู่ที่ 11.67±0.51, 11.77±1.39 และ 13.35±0.44 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ความชื้นมีค่าอยู่ที่ 71.69±1.12, 72.95±3.42 และ 71.37±1.53 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ การเก็บรักษาโปรตีน มีค่าติดลบเนื่องจากโปรตีนในปลาสิ้นสุดการมีค่าน้อยกว่าปลาเริ่มต้นการทดลอง ซึ่งมีค่าอยู่ที่ -11.23±0.785, -8.52±1.57 และ -3.76±0.76 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P<0.05) การเก็บรักษาไขมันของปลานิลที่ได้รับอาหารสูตร 1 และ 2 มีค่าอยู่ที่ 70.28±0.58, 71.55± 3.13 เปอร์เซ็นต์ มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P<0.05) กับสูตร 5 ที่มีค่า 5.34±1.90 เปอร์เซ็นต์

ตาราง 21 องค์ประกอบทางเคมี (Chemical composition) (เปอร์เซ็นต์)

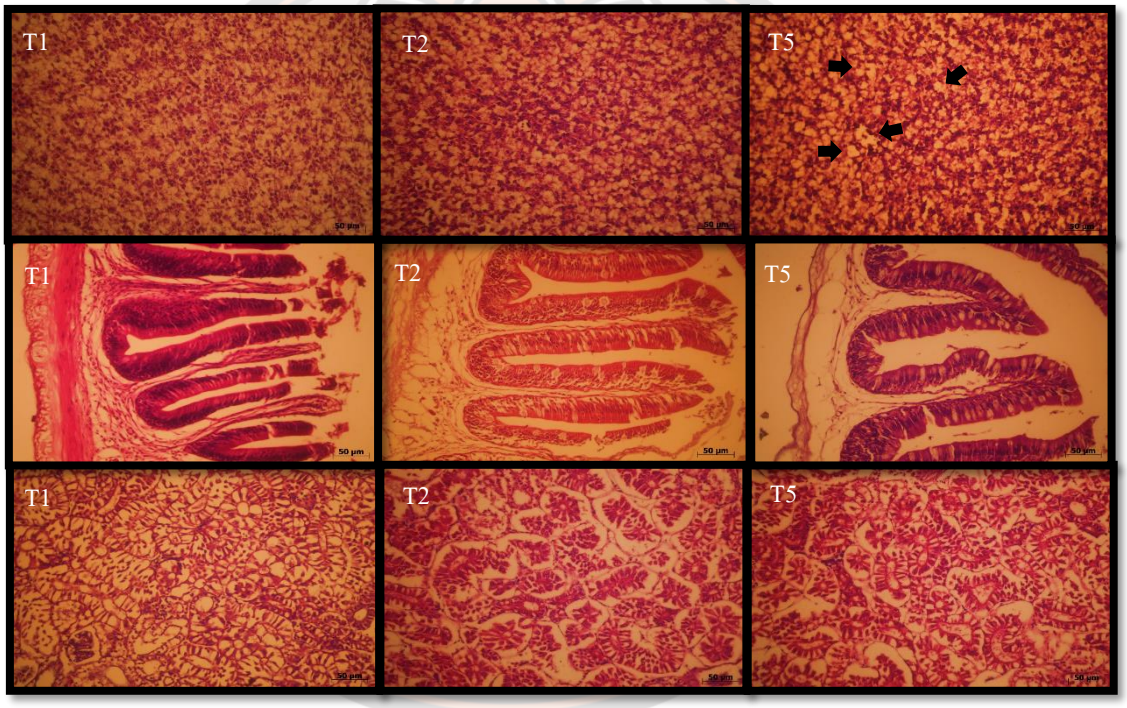
ตัวชี้วัด	T1 (Extrusion)	T2 (Steam)	T5 (Microwave)
โปรตีนปลาเริ่มต้น	59.74±0.42	59.74±0.42	59.74±0.42
โปรตีนปลาสิ้นสุด	53.03±0.46^{c}	54.65±0.94^{b}	57.63±0.45^{a}
ไขมันเริ่มต้น	14.79±0.09	14.79±0.09	14.79±0.09
ไขมันสิ้นสุด	25.19±0.08^{a}	25.37±0.46^{a}	15.58±0.28^{b}
เถ้า	11.67±0.51^{b}	11.77±1.39^{b}	13.35±0.44^{a}
ความชื้น	71.69±1.12	72.95±3.42	71.37±1.53
การเก็บรักษาโปรตีน(%)	-11.23±0.785^{a}	-8.52±1.57^{b}	-3.76±0.76^{c}
การเก็บรักษาไขมัน (%)	70.28±0.58^{a}	71.55± 3.13^{a}	5.34±1.90^{b}

หมายเหตุ: ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากข้อมูล 4 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรตัวเหมือนกันกำกับในแนวแนวสดมภ์ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (P>0.05)

5) การศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา (Histological change)

การศึกษาเนื้อเยื่อวิทยาของปลานิลที่ได้รับอาหารชุดการทดลองที่ 2 พบว่าเนื้อเยื่อตับมีแวคิวโอล (Vacuole) ในปลาที่ได้รับอาหารผ่านกระบวนการไมโครเวฟ (Microwave) ขนาดใหญ่กว่าปลาที่ได้รับอาหารผ่านกระบวนการเอ็กซ์ทรูด (Extrusion) และนึ่ง (Steam), พบความผิดปกติในส่วนของลำไส้ส่วนต้นของอาหารสูตรที่ 5 ไมโครวิลไลหดสั้นขึ้น มีการเพิ่มจำนวนของ goblet cells มากขึ้น และขนาดของ แวคิวโอล (Vacuole) ที่ใหญ่ขึ้น แต่ไม่พบความผิดปกติในเนื้อเยื่อส่วนของไต ดังแสดงในภาพ 7



ภาพ 7 ลักษณะของเนื้อเยื่อตับ ลำไส้ส่วนต้น และไต ของปลาที่ได้รับอาหารสูตร T1 (Extrusion) T2 (Steam) T5 (Microwave) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ 40X

6) สัมประสิทธิการย่อยเสมือนของสารอาหาร (Apparent digestibility coefficient)

สัมประสิทธิการย่อยเสมือนของสารอาหารในปลานิลที่ได้รับอาหารชุดการทดลองที่ 2 ดังตาราง 22 ประกอบด้วย การย่อยได้ของของแข็ง ที่มีค่า 70.37±1.48, 70.48±2.63 และ 67.77±5.23 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และการย่อยได้ของโปรตีน มีค่า 87.04±0.61, 87.31±0.75 และ

85.64±2.20 เปอร์เซ็นต์ สัมประสิทธิการย่อยเสมือนของสารอาหารทั้งสองตัวชี้วัดไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตาราง 22 สัมประสิทธิการย่อยเสมือนของสารอาหาร (Apparent digestibility coefficient)

ตัวชี้วัด	T1 (Extrusion)	T2 (Steam)	T5 (microwave)
การย่อยได้ของของแข็ง	70.37±1.48	70.48±2.63	67.77±5.23
การย่อยได้ของโปรตีน	87.04±0.61	87.31±0.75	85.64±2.20

หมายเหตุ: ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากข้อมูล 4 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรตัวเหมือนกันกำกับในแนวนอน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (P>0.05)

7) การศึกษาค่าโลหิตวิทยา (Hematology)

ค่าโลหิตวิทยาปลานิลที่ได้รับอาหารชุดการทดลองที่ 2 ดังตาราง 23 ประกอบด้วย จำนวนเม็ดเลือดขาวของปลาที่ได้รับอาหารทดลองสูตร 1 ,2 และ 5 มีค่า 2.01±0.25, 2.09±0.17 และ 1.77±0.15 ($x10^3$ เซลล์/ลบ.มม.) ตามลำดับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) จำนวนเม็ดเลือดแดงมีค่า 2.13±0.05, 2.46±0.32 และ 2.05±0.23 ($x10^6$ เซลล์/ลบ.มม.) ตามลำดับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) ความเข้มข้นของฮีโมโกลบินของปลาที่ได้รับอาหารทดลองสูตร 1 และ 2 มีค่า มีค่าอยู่ที่ 13.44±1.04 และ 13.66±0.64 กรัม/เดซิลิตร มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) กับสูตร 5 ที่มีค่า 11.9±1.295 กรัม/เดซิลิตร ปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่นมีค่า 38.02±0.90, 37.74±1.80 และ 38.54±1.983 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) กลุโคสในเลือด มีค่าอยู่ที่ 43.25±8.54, 46±5.60 และ 39±9.35 กรัม/เดซิลิตร ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตาราง 23 การศึกษาค่าโลหิตวิทยาของปลานิลที่ได้รับอาหารการทดลองที่ 2 ระยะเวลา 10 สัปดาห์

ตัวชี้วัด	T1 (Extrusion)	T2 (Steam)	T5 (Microwave)
จำนวนเม็ดเลือดขาว (*10^3 cell/µl)	2.01±0.25	2.09±0.17	1.77±0.15
จำนวนเม็ดเลือดแดง (*10^6 cell/µl)	2.13±0.05	2.46±0.32	2.05±0.23
ความเข้มข้นของฮีโมโกลบิน (g/dl)	13.44±1.04[a]	13.66±0.64[a]	11.9±1.295[b]
ปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (%)	38.02±0.90	37.74±1.80	38.54±1.98
กลูโคส (mg/dl)	43.25±8.54	46±5.60	39±9.35

หมายเหตุ: ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากข้อมูล 4 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรตัวเหมือนกันกำกับในแนวนอน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (P>0.05)

8) การศึกษาการแสดงออกของโปรตีน (Matrix Metalloproteinase; MMP-2 และ MMP-9)

จากการศึกษารูปแบบการแสดงออกของ matrix metalloproteinase MMP-2 และ MMP-9 พบว่าการแสดงออกของ MMP-2 มีการแสดงออกมากในปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 1 (Extrusion) และ 2 (Steam) ส่วนปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 5 (Microwave) มีการแสดงออกน้อยที่สุด สอดคล้องกับการเจริญเติบโตที่สุด ในขณะที่ผลการแสดงออกของ MMP-9 สวนทางกัน เนื่องจากเกี่ยวข้องกับการตอบตอบสนองการอักเสบ ปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 5 (Microwave) มีการแสดงออกมากเห็นได้ชัดที่สุด ดังแสดงในภาพ 8

Control (FBS) T1 Extrude T2 Steam T5 Microwave

ภาพ 8 การแสดงออกของ matrix metalloproteinase MMP-2 ในซีรั่ม ด้วยเทคนิค gelatin zymography ของปลานิลที่ได้รับอาหารการทดลองที่ 2 ระยะเวลา 10 สัปดาห์

Control (FBS) T1 Extrude T2 Steam T5 Microwave

ภาพ 9 การแสดงออกของ matrix metalloproteinase MMP-9 ในซีรั่ม ด้วยเทคนิค gelatin zymography ของปลานิลที่ได้รับอาหารการทดลองที่ 2 ระยะเวลา 10 สัปดาห์

บทที่ 5

บทสรุป

สรุปผลการวิจัย

การศึกษาการใช้ประโยชน์จากกากถั่วดาวอินคาที่ผ่านกระบวนการให้ความร้อนในรูปแบบต่างๆ โดยการทดลองนี้ประกอบด้วย 2 ชุดการทดลอง การทดลองที่ 1 เพื่อศึกษาการอบด้วยลมร้อนด้วยอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการใช้ประโยชน์ของกากถั่วดาวอินคาในอาหารปลานิล โดยกำหนดให้อบกากถั่วดาวอินคาที่อุณหภูมิต่างๆ กัน จำนวน 4 ระดับประกอบด้วย 80, 100, 120 และ 140 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง และการทดลองที่ 2 เพื่อศึกษากระบวนการให้ความร้อนด้วยวิธีการต่างๆ ในกากถั่วดาวอินคาที่เหมาะสมต่อการใช้ประโยชน์ในอาหารปลานิล โดยประกอบด้วยกระบวนการความร้อนต่างๆ จำนวน 5 วิธีประกอบด้วย (เอ็กซ์ทรูด (Extrusion), นึ่ง (Steam), อบลมร้อน (Air dry), ฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำ (Autoclave) และไมโครเวฟ (Microwave) เป็นระยะเวลาการทดลองทั้งหมด 8 และ 10 สัปดาห์ ตามลำดับ ผลจากการทดลองพบว่าชุดการทดลองที่ 1 ที่ใช้การอบอุณหภูมิแตกต่างกัน 4 ระดับ ไม่ได้ส่งเสริมประสิทธิภาพการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหาร เช่นเดียวกับการทดลองที่ 2 ในปลาที่ได้รับอาหารที่ผ่านกระบวนการอบลมร้อน (Air dry) และฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำ (Autoclave) อย่างไรก็ตามในชุดการทดลองที่ 2 พบว่าปลาที่ได้รับอาหารที่ผ่านกระบวนการนึ่ง (Steam) และกระบวนการเอ็กซ์ทรูด (Extrusion) มีประสิทธิภาพการเจริญเติบโต และประสิทธิภาพการใช้อาหารสูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารผ่านกระบวนการไมโครเวฟ (Microwave) สอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อ ผลการแสดงออกของโปรตีน MMP-2 และ MMP-9 และโลหิตวิทยาที่มีค่าน้อยที่สุด

อภิปรายผล

การทดลองนี้เป็นการศึกษาการใช้ประโยชน์จากกากถั่วดาวอินคาที่ผ่านกระบวนการให้ความร้อนในรูปแบบต่างๆ ในอาหารปลานิล เพื่อให้ทราบวิธีการที่เหมาะสมที่สุดต่อการเจริญเติบโตของปลา และให้สามารถลดต้นทุนด้านค่าอาหารต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่มีมูลค่าสูงสุดในด้านการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ โดยส่วนใหญ่ต้นทุนด้านค่าอาหารอยู่ที่ประมาณ 30 – 60 เปอร์เซ็นต์ของต้นทุน

ทั้งหมดของการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ (Riaz, 1997) โดยทั่วไปอาหารปลาพึ่งพาองค์ประกอบของแหล่งโปรตีนจากปลาป่นเป็นหลัก เนื่องจากเป็นแหล่งของโปรตีนที่มีคุณภาพ มีองค์ประกอบของกรดอะมิโนจำเป็นที่ครบถ้วน ย่อยได้ง่าย ดึงดูดการกิน และส่งเสริมการเจริญเติบโตในสัตว์น้ำได้อย่างดี แต่อย่างไรก็ตามก็พบว่าปริมาณของปลาป่นมีจำนวนลดลงอย่างมากในปัจจุบัน เนื่องจากเป็นแหล่งทรัพยากรที่ต้องพึ่งพาจากแหล่งน้ำธรรมชาติ ทำให้ได้ในปริมาณไม่คงที่ และมีความต้องการในปริมาณสูง จึงส่งผลทำให้ปลาป่นมีราคาสูง นอกจากนี้ยังถือเป็นการใช้ประโยชน์จากทรัพยากรธรรมชาติมากเกินขีดจำกัด (Overfishing) และไม่ยั่งยืน (Sustainable) ในช่วง 20 ปีที่ผ่านมาการศึกษาการใช้ประโยชน์จากวัตถุดิบพืชจึงเป็นที่สนใจต่อนักวิทยาศาสตร์เป็นอย่างมาก การเลือกใช้วัตถุดิบจากพืช เนื่องมีปริมาณมาก ราคาต่ำ เป็นการใช้เศษเหลือจากโรงงานอุตสาหกรรมให้เกิดประโยชน์ และยังคงมีคุณค่าทางโภชนาการสูง แต่ในทางตรงกันข้ามพบว่ามีสารต้านโภชนาการย่อยได้ยาก และมีกรดอะมิโนจำเป็นต่ำ ดังนั้นการผลิตอาหารจำเป็นต้องคำนึงถึงต้นทุน ส่วนผสมสารอาหาร และความสามารถในการย่อยได้ อันนำไปสู่การลดต้นทุนของค่าอาหารลงได้ การศึกษาหรือการใช้ประโยชน์ของวัตถุดิบแหล่งโปรตีนจากพืชในอาหารปลาพบว่าผลต่อทำให้ราคาอาหารต่ำลง นอกจากนี้ยังพบว่าวัตถุดิบแหล่งโปรตีนจากพืชยังมีในปริมาณที่เพียงพอต่อความต้องการสามารถตอบสนองต่อความต้องการด้านอุตสาหกรรมการผลิตอาหารสัตว์ได้ (Lovell, 1984; Siddiqui et al., 2014)

การศึกษานี้ใช้กากถั่วดาวอินคาซึ่งมีรายงานพบสารต้านโภชนาการประกอบด้วย แทนนิน 1.94 mg CCE/100 g DW, ซาโปนิน 0.27 mg saponins/g extract และทริปซินอินฮิบิเตอร์ 0.16 unit/mg extract (Rawdkuen et al., 2016) นำมาผ่านกระบวนความร้อนผสมในอาหารปลานิล พบว่าการเจริญเติบโตประกอบด้วยค่าน้ำหนักเฉลี่ย น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น น้ำหนักเพิ่มต่อวัน อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ค่าปัจจัยของน้ำหนักต่อความยาว ดัชนีน้ำหนักปลาต่อน้ำหนักตับ ดัชนีน้ำหนักปลาต่อน้ำหนักอวัยวะภายใน อัตราการรอดตาย และประสิทธิภาพการใช้อาหาร ค่าปริมาณอาหารที่ปลากิน อัตราการกินอาหาร อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ ประสิทธิภาพการใช้อาหาร ของชุดการทดลองที่ 1 ในอาหารทุกสูตร และชุดการทดลองที่ 2 ในสูตรอาหารที่ 3 อบลมร้อน (Air dry), สูตร 4 ฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำ (Autoclave) และสูตร 5 ไมโครเวฟ (Microwave) มีค่าลดลงซึ่งสอดคล้องกับรายงานที่ให้ความร้อนที่เพิ่มขึ้นของกากถั่วเหลือง กระบวนการให้ความร้อนที่สูงเกินไป ส่งผลให้เกิดการเสื่อมสภาพของโปรตีน มีกรดอะมิโนลดลง เนื่องจากปฏิกิริยา Maillard reaction (Hurrell, & Finot, 1985) มีความเป็นไปได้ในความร้อนที่สูงเกินไป จะไปลดทั้งสารต้านโภชนาการและ

สารอาหารในเวลาเดียวกัน (Olli et al., 1989) การศึกษาโดย Fowler (1980) ชี้ให้เห็นว่าการให้ความร้อนที่ระดับอุณหภูมิ 218 องศาเซลเซียส เป็นระดับที่สูงเกินไป ส่งผลให้ปลาปลาแซลมอนมีการเจริญเติบโตลดลง มีขนาดเล็ก และมีอัตราการตายเพิ่มมากขึ้นเมื่อเทียบกับสูตรอาหารอื่นๆ ที่ใช้อุณหภูมิต่ำ Araba, & Dale (1990) ได้รายงานการฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำ (Autoclave) กากถั่วเหลืองที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลาที่แตกต่าง 6 ช่วงเวลา ประกอบด้วย 0, 5, 10, 20, 40 และ 80 นาที พบว่ากากถั่วเหลืองผ่านการฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำ (Autoclave) เวลาที่ 20-80 นาที ส่งผลให้ประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของไก่นั้นลดลงตามลำดับ และมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$) กับช่วงเวลาที่ 0-10 นาที การศึกษาเหล่านี้แสดงให้เห็นถึงผลที่เกิดขึ้นจากกระบวนการให้ความร้อนสูงมากเกินไปที่มีผลต่อการเจริญเติบโต ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในครั้งนี้ในชุดการทดลองที่ 1 การอบด้วยลมร้อนอุณหภูมิต่างกัน 4 ระดับ เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง และชุดการทดลองที่ 2 คือ สูตรอาหารที่ 3 การอบด้วยลมร้อนที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง สูตรอาหารที่ 4 ฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำ (Autoclave) 20 นาที ที่มีผลกระทบต่อประสิทธิภาพการเจริญเติบโต และประสิทธิภาพการใช้อาหาร

กากถั่วเหลืองมีสารต้านโภชนาการที่เด่นชัด คือ สารยับยั้งทริปซินซึ่งอาจจะทำให้เกิดผลข้างเคียง เช่น ตับอ่อนมีการโตมากเกินไป เนื่องจากจำเป็นต้องมีการสังเคราะห์เอมไซม์ทริปซินที่เพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้การเจริญเติบโตลดลง (Dabrowski et al., 1989; Rackis, 1974) กากถั่วเหลืองยังส่งผลต่อการย่อยได้ยากเนื่องจากปัจจัยสารต้านโภชนาการ ที่มีชื่อว่าสารยับยั้งทริปซิน จะไปรบกวนการย่อยของโปรตีน (Olli et al., 1994) การศึกษาก่อนหน้า Jacobsen et al. (2018) และ Romarheim et al. (2005) ได้แสดงให้เห็นกระบวนการให้ความร้อนแก่กากถั่วเหลืองนั้นสามารถปรับปรุงการย่อยโปรตีนและกรดอะมิโน ซึ่งสัมพันธ์กับการลดลงของเอมไซม์ยับยั้งโปรติเอส (Protease inhibitors) และรายงานในปลากะพงลาย (*Morone saxatilis*) ใช้กากถั่วเหลืองที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยแรงดันนไอน้ำ (Autoclaved) ผสมในอาหารทดลอง พบว่ามีระดับของทริปซินอินฮิบิเตอร์ (Trypsin inhibitors) ในระดับที่ต่ำ (Small et al., 1999) เช่นเดียวกันกับการทดลองในปลาแซลมอน สูตรอาหารทดแทนปลาป่นด้วยกากถั่วเหลืองผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส หลังจากใช้เวลา 20 นาทีผ่านไป พบว่ามีสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินต่ำที่สุด (Trypsin inhibitor) จาก 181 TUI/mg เหลือ 1.8 TUI/mg และมีประสิทธิภาพการละลายได้ของโปรตีนต่ำ จาก 98 เปอร์เซ็นต์ เหลือ 70 เปอร์เซ็นต์ การให้ความร้อนที่นานเกินไปจะยิ่งลดการละลายได้ของโปรตีน ประสิทธิภาพการย่อยได้ของโปรตีนของปลาที่ได้

อาหารผสมกากถั่วเหลืองผ่านการฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำ (Autoclave) สูงมากกว่าในกลุ่มที่ไม่ผ่านการให้ความร้อน แต่มีค่าต่ำกว่าสูตรที่ควบคุมที่ใช้แหล่งโปรตีนจากปลาป่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Arndt et al., 1999) เนื่องจากกรดไฟติกซึ่งได้รับการพิสูจน์แล้วว่าจะไปลดการย่อยโปรตีนและจำกัดการดูดซึมของแร่ธาตุที่มีอยู่ในพืชตระกูลถั่ว เช่น กากถั่วเหลือง และยังพบว่ากากถั่วเหลืองที่ผ่านกระบวนการความร้อนทดแทนปลาป่นในระดับ 15 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลให้การเจริญเติบโตมีแนวโน้มที่สูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับระดับการทดแทนที่ 20 และ 25 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นถึงการเพิ่มขึ้นของระดับกากถั่วเหลืองที่ผ่านกระบวนให้การความร้อนในอาหารปลาแซลมอน มีผลต่อความอยากอาหารและการเจริญเติบโตลดน้อยลง (Riche and Brown, 1996) เนื่องจากข้อจำกัดหลายประการ เช่น การขาดกรดอะมิโนจำเป็นบางชนิด ความอยากกินอาหารลดลงและสารต้านโภชนาการ (Antinutritional factors) (Blaufuss and Trushenski, 2012) ดังนั้นการเพิ่มระดับของกากถั่วเหลืองในอาหารสัตว์น้ำจำเป็นต้องกำจัดหรือลดสารต้านโภชนาการออกก่อน การศึกษาที่ผ่านมามีหลายกระบวนการเพื่อกำจัดสารต้านโภชนาการ ปรับปรุงคุณสมบัติของวัตถุดิบ ทำให้การดูดซึมสารอาหารเพิ่มมากขึ้น เช่น การใช้ความร้อน กระบวนการทางกล การแช่น้ำ การหมัก เป็นต้น (Hotz, & Gibson, 2007)

กระบวนการให้ความร้อนรายงานโดย Osborne, & Mendel (1917) พบว่าการใช้กากถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านความร้อนในสูตรอาหารของหนู จะไปยับยั้งการเจริญเติบโต แต่การผ่านกระบวนความร้อนจะส่งผลต่อการเจริญเติบโตที่ดีกว่า เนื่องจากสารยับยั้งเอมไซม์ทริปซินสามารถกำจัดได้ด้วยความร้อนที่อุณหภูมิและความชื้นที่เหมาะสม ความชื้นหรือน้ำนั้นจะไปช่วยเป็นตัวกลางพาความร้อนไปยังวัตถุดิบได้ดีขึ้น (Smith, 1977) ในการศึกษานี้จะเห็นได้ว่าวิธีที่ให้ความร้อนเมื่อมีน้ำหรือความชื้นในกระบวนการทำให้การเจริญเติบโตนั้นดีขึ้น คือ การเอ็กซ์ทรูด (Extrusion) และการนึ่ง (Steam) ในขณะที่มีรายงานได้กล่าวไว้ว่ามีความเป็นไปได้เมื่อใช้ความร้อนที่สูงเกินไป จะไปลดทั้งสารต้านโภชนาการและสารอาหารในเวลาเดียวกัน (Olli et al., 1989 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษานี้ คือ การอบลมร้อน (Air dry) และการฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำ (Autoclave) ที่ใช้เวลานานกว่าสูตรอาหารอื่น การผ่านคลื่นไมโครเวฟ (microwave) เป็นระยะเวลาเพียง 4 นาที พบว่าการเจริญเติบโตมีแนวโน้มต่ำกว่ากากถั่วดาวอินคาที่มีความชื้นเข้ามาเกี่ยวข้องในกระบวนการให้ความร้อน ดังมีรายงานการศึกษาการใช้ถั่วพุ่ม (Cowpea: *Vigna unguiculate*) ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำเป็นเวลา 30 นาที เพื่อทำลายสารต้านโภชนาการ ตามวิธีการของ Udensi et al. (2007) นำมาเป็นส่วนผสมในอาหารปลาคู้ดำ (Tambaqui: *Colossoma macropomum*) พบว่าการเจริญเติบโตมีแนวโน้มที่ดีขึ้น

เมื่อเทียบกับสูตรควบคุม และไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างชุดการทดลอง (Dairiki et al., 2013) การศึกษานี้ไม่สอดคล้องกับการใช้กากถั่วลันเตา (*Pisum sativum*) ผ่านกระบวนการความร้อนวิธีการอบด้วยอุณหภูมิ 230±5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที และการฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำ (Autoclaved) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 psi เป็นเวลา 30 นาที สำหรับอาหารปลาปลาไน (Common carp) ที่พบว่าอัตราการเจริญเติบโตและการใช้ประสิทธิภาพจากอาหารสูง เมื่อเปรียบเทียบกับสูตรอาหารที่ใช้กากถั่วลันเตาไม่ผ่านกระบวนการ (Davies and Gouveia, 2010), Refstie et al. (1998) รายงานการเปรียบเทียบกากถั่วเหลืองที่ผ่านกระบวนการความร้อนและกากถั่วเหลืองที่ผ่านการลดปริมาณโอลิโกแซ็กคาไรด์ (Oligosaccharides) และสารต้านโภชนาการ (ทริปซินอินฮิบิเตอร์และเลคติน) จากการทดลองพบว่ากากถั่วเหลืองที่ผ่านกระบวนการความร้อนด้วยการคั่ว (Toasted) มีผลต่อปริมาณการกินอาหารของปลาที่ลดลง ทำให้มีประสิทธิภาพการเจริญเติบโตที่ต่ำกว่าอาหารสูตรที่ผสมกากถั่วเหลืองที่ผ่านการลดโอลิโกแซ็กคาไรด์ (Oligosaccharides) และสารต้านโภชนาการ และสูตรควบคุมที่ใช้แหล่งโปรตีนจากปลาป่นเป็นหลัก เห็นได้ชัดว่ากระบวนการความร้อนเพียงอย่างเดียวไม่สามารถปรับปรุงวัตถุดิบอาหารให้ดีขึ้น อาจมีปัจจัยอื่นๆเข้ามาเกี่ยวข้อง เช่น อุณหภูมิ ความชื้น เวลา และการลดสารอาหาร (Papadopoulos, 1989) ยิ่งโดยเฉพาะใช้เวลานานเพิ่มขึ้น (Arndt et al., 1999; Fontaine et al., 2007) ซึ่งไลซีนนั้นมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างสูงและเป็นตัวบ่งชี้ความเสียหายของโปรตีนในระหว่างการให้ความร้อน (Singh et al., 2007) การเปลี่ยนแปลงที่เกิดจากความร้อนในโครงสร้างโปรตีน อาจทำให้โปรตีนไวต่อการไฮโดรไลซิสน้อยลง โดยเฉพาะอย่างยิ่งเอมไซม์โปรติเอสในระบบทางเดินอาหาร (Phillips, 1989) และลดความสามารถของกรดอะมิโน ในการทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์โปรตีนในสัตว์ (Moughan, 2003) ปริมาณของกรดอะมิโนลดลงเกิดจากกระบวนการให้ความร้อน ดังเช่นรายการวิจัยก่อนหน้านี้ที่อาหารมีการฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 130 ถึง 135 องศาเซลเซียส การสูญเสียของกรดอะมิโนในอาหารจากการให้ความร้อนเป็นผลมาจากปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนและ Reducing compounds เช่น Maillard reaction (Papadopoulos, 1989) ซึ่งสารประกอบแอมาดอริ (Amadori compound) เป็นตัวกลางที่เกิดจากระยะแรกของปฏิกิริยา Maillard reaction และมักเกี่ยวข้องกับไลซีนหรืออาร์จินีน จะสามารถถูกสร้างใหม่ให้เป็นไลซีนในระหว่างการย่อยสลายด้วยกรด (Acid hydrolysis) เนื่องจากปฏิกิริยาการ Maillard reaction มีความเสถียรของกรดและอาจทำให้ปริมาณไลซีนลดลง (Moughan, 2003) มีผลอย่างมากต่อศักยภาพไฮโดรไลซิสของทริปซิน และลดปริมาณกรดอะมิโน ความไวของโปรตีนต่อการ

ไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) ด้วยเอนไซม์โปรตีเอสขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ความสามารถในการละลาย ความซับซ้อนของโครงสร้าง องค์ประกอบกรดอะมิโน และการผ่านกระบวนทางความร้อน (De Jonge et al., 2009; Sáenz de Rodrigáñez et al., 2011) รายงานของ Bhatt et al. (2011) แสดงให้เห็นถึงการใช้กระบวนการทางความร้อนต่อเมล็ดหนามปีศาจ (*Prosopis juliflora*) เป็นแหล่งโปรตีนจากพืชตระกูลถั่ว ช่วยเพิ่มการเจริญเติบโตของปลายี่สกเทศ *(Labeo rohita*) เมื่อเปรียบเทียบกับป่นเมล็ดที่ไม่ผ่านกระบวนการที่นำมาเป็นวัตถุดิบแหล่งโปรตีนจากพืชในอาหารปลา ดังจะเห็นชัดได้จากค่าทริปซินอินฮิบิเตอร์เมล็ดหนามปีศาจที่ผ่านการแช่น้ำและนำไปฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำ (Autoclave) ส่งผลให้มีค่าลด จาก 60.3 เหลือ 25.1 TIU g^{1} สอดคล้องกับ Hossain et al. (2001) และ Garg et al. (2002) ได้รายงานการปรับปรุงคุณภาพทางโภชนาการของเมล็ดพันธุ์พืชตระกูลถั่วโดยผ่านกระบวนการทางความร้อนนำมาเป็นส่วนผสมในอาหาร ส่งผลให้การเจริญเติบโตของปลาคาร์พ (Carps) ดีขึ้น เพราะการแช่น้ำ (Soaking) และการฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำ (Autoclave) ของเมล็ดพืชตระกูลถั่ว ช่วยลดสารต้านโภชนาการ เช่น แทนนิน, ทริปซินอินฮิบิเตอร์, กรดไฟติก, ฟีนอล และลิกนิน ในขณะเดียวกันเมล็ดหนามปีศาจ ที่ผ่านการแช่น้ำ (Soaking) และการฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำ (Autoclave) สามารถนำมาทนแทนปลาป่นได้ดีในระดับ 35 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใส่ในสูตรอาหารปริมาณมากขึ้นระดับ 50 เปอร์เซ็นต์ ทำให้การเจริญเติบโตที่ลดลง เนื่องจากมีสารต้านโภชนาการ และความไม่สมดุลของกรดอะมิโนในอาหารจากวัตถุดิบพืช ดังมีรายงานกล่าวไว้เป็นเพราะความแตกต่างในส่วนของสารอาหารและสารประกอบที่รบกวนกระบวนการย่อยอาหาร (Antinutrients) ระหว่างปลาป่นและกากถั่วเหลือง (Rumsey et al., 1995) เกี่ยวข้องกับกิจกรรมโปรติเอส และไลเปสลดลงเมื่อเพิ่มระดับของกากถั่วเหลืองในอาหาร (Rahimnejad et al., 2019) ในทำนองเดียวกับงานวิจัยก่อนหน้า พบว่าการลดลงอย่างมีนัยสำคัญของกิจกรรมโปรตีเอสไลเปสและอะไมเลสเมื่อ 50-75 เปอร์เซ็นต์ ของปลาป่นถูกแทนที่ด้วยกากถั่วเหลือง (Zhang et al., 2018) และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Y. Zhang et al. (2014) เปรียบเทียบกากถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านกระบวนการกากถั่วเหลืองผ่านการหมัก และกากถั่วเหลืองผ่านคลื่น แกรมมา พบว่ากากถั่วเหลืองผ่านคลื่นแกรมมาให้แนวโน้มการเจริญเติบโตที่สูงที่สุด ปัจจัยของน้ำหนักต่อความยาว (Condition factor:K) และดัชนีน้ำหนักปลาต่อน้ำหนักตับ (Hepatosomatic index: HIS) ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ซึ่งการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักปลาขึ้นอยู่กับการผ่านกระบวนการของกากถั่วเหลือง และระดับการทดแทนปลาป่น หรือระดับปลาป่นในสูตรอาหารนั่นเอง และมีรายงานการใช้ประโยชน์จากกระบวนการให้ความร้อนต่อวัตถุดิบพืชสำหรับอาหารปลา ตัวอย่างเช่น PeresLim, & Klesius (2003) แสดงให้เห็น

ว่ากากถั่วเหลืองที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำ (Autoclaved) เวลา 40 นาที ที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส ความดัน 22 psi ทำให้มีระดับทริปซินอินฮิบิเตอร์ที่ต่ำลงและส่งผลให้น้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ และช่วยให้ดัชนีตับและอวัยวะภายในของปลากดอเมริกันนั้นดีขึ้น และ Davies, & Gouveia (2008) รายงานว่ากากเมล็ดถั่วลันเตาภายใต้การให้ความร้อนส่งผลให้ ทริปซินอินฮิบิเตอร์ลดลง และเมื่อทำการศึกษาในอาหารปลาดุกแอฟริกันพบว่ามีทำให้มีน้ำหนักเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกากเมล็ดถั่วลันเตาที่ไม่ผ่านกระบวนการความร้อน นอกจากนี้ Adewumi (2006) รายงานผลในเชิงบวกของกากถั่วเหลืองผ่านการฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำที่มานำมาทดแทนปลาป่นบางส่วนในอาหารปลาดุกแอฟริกาและพบว่าผลของการเปลี่ยนแปลงที่ดีต่อกากถั่วเหลืองในรายงานนี้อยู่ที่อุณหภูมิ 116 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาที ซึ่ง Adewumi (2006) ได้แนะนำว่าควรให้ความสำคัญของกระบวนการใช้ความร้อนต้องให้เพียงพอกับวัตถุดิบพืชก่อนที่จะนำไปประกอบเป็นอาหารปลา และมีข้อสังเกตว่าปลาเขตน้ำอุ่น เช่น ปลานิล ปลากด และปลาคาร์พ มีการกินอาหารหลากหลายชนิด สามารถยอมรับโปรตีนจากพืชและแหล่งพลังงานในอาหารได้ดี อย่างไรก็ตามปลาบางชนิด เช่น ปลาคาร์พมีการพึ่งพาโปรตีนไฮโดรไลซิสที่ไม่ใช่เอมไซม์เพปซิน (Pepsin) โดยใช้เอมไซม์ทริปซินแทน (Trypsin) เนื่องจากมีบทบาทโดดเด่นในการย่อย (Davies, & Gouveia, 2010; Escaffre et al., 1997; Wilson, 2002) มีรายงานการใช้ประโยชน์อื่นๆของการประยุกต์ในการให้ความร้อนแก่ถั่วธัญพืชที่มีแป้งสูง เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของคาร์โบไฮเดรตและเพิ่มระดับพลังงานให้สามารถนำไปใช้ประโยชน์หรือย่อยได้ดีขึ้น โดยการกระบวนการเจลาติไนเซชันของแป้ง ซึ่งได้มีการบันทึกไว้หลายรายงานในสัตว์บกและปลาจำนวนมาก เนื่องด้วยความก้าวหน้าในเทคโนโลยีเอ็กซ์ทรูด (Extrusion) และการปรุงอาหารในการผลิตอาหารสัตว์ (Burel et al., 2000; Drew et al., 2007; Fontainhas-Fernandes et al., 1999; Gouveia et al., 1993; Ratnayake et al., 2002; Sørensen et al., 2009; Svihus et al., 2005) การเปรียบเทียบการประมวลผลการอัดขึ้นรูปหรือการเอ็กทรูด (Extrusion) ในการย่อยได้สารอาหารของถั่วลันเตา (Peas), ลูปีน (Lupins), คาโนลา (Canola) และกากถั่วเหลือง (Soybean meal) ในอาหารปลากะพงขาว (Silver perch) ได้รับการรายงานโดย Allan, & Booth (2004) ที่พบว่าถั่ว ที่อุดมไปด้วยแป้งทั้งการกะเทาะเปลือกและการอัดรีดหรือการเอ็กทรูด (Extrusion) ช่วยเพิ่มสัมประสิทธิการย่อยเสมือนของสารอาหาร (Apparent digestibility coefficients) และความพร้อมด้านพลังงานของอาหาร (Dietary energy availability) การศึกษาเหล่านี้อาจช่วยอธิบายผลของการย่อยได้ที่ดีขึ้นของส่วนประกอบอาหาร

องค์ประทางเคมีของซากในปลาจากการศึกษานี้พบว่าปริมาณไขมัน, การเก็บรักษาโปรตีน และการเก็บรักษาไขมันลดลงในสูตรอาหารกากถั่วอินคาที่ผ่านกระบวนการไมโครเวฟ (Microwave) อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในปลายี่สกเทศ โดยใช้เมล็ดหนามปีศาจ (*Prosopis juliflora*) ผ่านกระบวนการการแช่น้ำ (Soaking) แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำ (Autoclave) (BhattChovatiya, & Shah, 2011), ปลานิล (*Oreochromis niloticus*) โดยใช้เมล็ดถั่วพุ่มป่น (*Vigna catiang*) ทดแทนปลาป่นระดับ 66 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีค่าองค์ประทางเคมีของไขมันในซากปลาลดน้อยลง เปรียบเทียบกับระดับทดแทนที่ 20 เปอร์เซ็นต์ (Keembiyehetty, & De Silva, 1993) และปลาเรนโบว์เทราท์ (Rainbow trout) ที่ใช้เมล็ดเรพซีดและถั่วลันเตาผ่านกระบวนการเอ็กซ์ทรูด (co-extruded rapeseed and peas) ในระดับ 45 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลให้ค่าองค์ประทางเคมีของโปรตีนและไขมันในซากปลาลดน้อยลงกว่าสูตรอาหารที่ใช้แหล่งโปรตีนจากปลาป่นและกากถั่วเหลือง (Gomes et al., 1993) เช่นเดียวกับกิจกรรมการย่อยอาหารที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ การเพิ่มระดับของธัญพืชและพืชตระกูลถั่วในอาหารปลาปลายี่สกเทศ (*Labeo rohita*) (Saha, & Ray, 1998) อาจเป็นผลมาจากการขาดกรดอะมิโนที่จำเป็น (EAAs) และโพลีแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้ง (NSPs) เป็นสาเหตุของลดการสะสมโปรตีนและไขมัน รวมทั้งการเพิ่มขึ้นของเถ้าในซากปลายี่สกเทศตามปริมาณที่เพิ่มขึ้นของเมล็ดหนามปีศาจ (*Prosopis juliflora*) ในอาหารทดลอง (BhattChovatiya, & Shah, 2011) ปริมาณโปรตีน ปริมาณไขมัน และกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหารมีความสัมพันธ์กับรูปแบบการเจริญเติบโตของปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองต่างกัน ดังเช่นรายงานของ Dairiki et al. (2013) ใช้ถั่วพุ่ม (*Vigna unguiculata*) ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำ (Autoclave) ในอาหารปลาคู้ดำ (*Colossoma macropomum*) ระดับ 25 เปอร์เซ็นต์ ไม่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการผลิตปลาคู้ดำ และไม่พบความแตกต่างตัวชี้วัดองค์ประกอบทางเคมีในซากปลา ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ Azaza et al. (2009) ได้สรุปว่าถั่วปากอ้า (*Vicia faba* L.) สามารถใช้เป็นส่วนผสมในอาหารปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ระดับ 24 เปอร์เซ็นต์ และการศึกษานี้ได้ใช้กากถั่วดาวอินคาผ่านกระบวนการความร้อนด้วยวิธีการเอ็กซ์ทรูด (Extrusion), นึ่ง (Steam) และไมโครเวฟ (Microwave) ในระดับ 29.5 เปอร์เซ็นต์ ผลที่ได้รับนำไปเป็นแนวทางเลือกใหม่สำหรับการใช้ผลพลอยได้ของพืชตระกูลถั่ว เช่น กากถั่วดาวอินคา เป็นการปรับปรุงสูตรอาหารปลานิลให้เหมาะสมแก่การเพาะเลี้ยง และการศึกษานี้ในชุดทดลองที่ใช้กากถั่วดาวอินคาผ่านฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำ (Autoclave) สอดคล้องกับ Morken et al. (2012) ที่ใช้อาหารผ่านการผ่านฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 120-130 องศาเซลเซียส ($P < 0.05$) ส่งผลให้ปริมาณ

กรดอะมิโนในอาหารลดลง โดยเฉพาะอย่างยิ่ง อาร์จินีน, ไลซีน และเมไทโอนีน และมีการเพิ่มขึ้นสีน้ำตาลของอาหาร (P <0.001) ที่วัดโดยโมเดลสี CIE L*a*b* โดยสรุปการนึ่งด้วยความร้อนมีผลกระทบเชิงลบต่อประสิทธิภาพการย่อยอาหารทั้งหมด (Coefficient of total tract apparent digestibility: CTTAD) ของโปรตีนและการดูดซึมเข้าสู่ร่างกาย

การเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อวิทยาของปลานิลที่ได้รับอาหารทดลองผสมกากถั่วดาวอินคาผ่านกระบวนความร้อน พบว่าเนื้อเยื่อส่วนของตับและไตในสูตรอาหารกระบวนการเอ็กซ์ทรูด (Extrusion), นึ่ง (Steam) และไมโครเวฟ (Microwave) ไม่พบความผิดปกติและไม่มีแตกต่างกัน ในเนื้อเยื่อลำไส้ส่วนต้น พบว่าไมโครวิลไลมีการหดสั้นในสูตรอาหารกระบวนการไมโครเวฟ (Microwave) สอดคล้องกับการทดลองในปลาทรายแดง (*Sparus aurata* L.) โดยใช้โปรตีนถั่วเหลืองเข้มข้น (Soy protein concentrate) ทดแทนปลาป่น เมื่อเพิ่มระดับขึ้นสูงขึ้นที่ 60 เปอร์เซ็นต์ พบการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อวิทยาในลำไส้ คือ มีขนาดของ lamina propria (LP) ที่เพิ่มขึ้นการแทรกซึมของเม็ดเลือดขาว (Eosinophils) ที่เพิ่มขึ้นและจำนวนของ lipidic vacuoles (LV) ภายในเอนเทอโรไซต์ (EC) (Kokou et al.., 2017), ปลาเรนโบว์เทราต์ (Rainbow trout) ใช้กากถั่วเหลืองผ่านกระบวนการคั่ว (Toasted) ในอาหารทดลอง ไม่พบความผิดปกติบริเวณกระเพาะอาหารหรือเนื้อเยื่อตับในทุกชุดการทดลอง แต่พบความผิดปกติในส่วนของลำไส้ คือ ไมโครวิลไล (Microvilli) หดสั้น, การเพิ่มของเซลล์ในชั้นเยื่อเมือก (Submucosa), การเพิ่มของ vacuolation ในเยื่อบุผิว และเยื่อเมือกมีจำนวนนิวเคลียส pycnotic เพิ่มขึ้น เป็นการเกี่ยวข้องกับการตายของเนื้อเยื่อบุผิวอย่างรุนแรง เมื่อเปรียบกับชุดการทดลองสูตรอาหารที่ใช้ปลาป่น และโปรตีน กากถั่วเหลืองเข้มข้ม (Soy protein concentrate) เป็นแหล่งโปรตีน (Rumsey et al., 1995) Francis et al. (2001) สรุปว่าผลทางเนื้อเยื่อวิทยามีจำนวนของ goblet cells สูง เมื่อระดับการทดแทนกาก ถั่วเหลืองเพิ่มขึ้นในสูตรอาหาร ซึ่งอาจอธิบายได้ว่าสารต้านโภชนาการที่เพิ่มขึ้นจะไปกระตุ้นการผลิตเมือกเพื่อลดการระคายเคืองของลำไส้ และรายงานการให้อาหารปลาเรนโบว์เทราต์ปราศจากปลาป่นในสูตรอาหาร โดยใช้กากถั่วเหลืองที่สกัดไขมันแล้วผ่านกระบวนการความร้อนแทน พบว่าเกิดความผิดปกติทางสรีวิทยา เช่น การแตกตัวของไมโครวิลไล (Microvilli), การเพิ่มขึ้นของ vacuoles ขนาดใหญ่ขึ้นในบริเวณส่วนของต่อมผลิตเยื่อเมือกบริเวณลำไส้, การฝ่อของเซลล์ตับ รวมถึงการชะลอการเจริญเติบโต (Iwashita et al., 2008; Suzuki, & Yamamoto, 2005; Yamamoto et al., 2007), ปลาทรายแดง (*Sparus aurata* L.) ใช้ถั่วลันเตาผ่านการเอ็กซ์ทรูด (Extrusion peas) ร่วมกับแหล่งโปรตีนจากพืช คือ กลูเตนข้าวโพด (Corn gluten), กลูเตนข้าวสาลี (Wheat gluten), เมล็ดเรพซีด

ป่น (Rapeseed meal) และลูพิน (lupin) ทดแทนปลาป่นในสูตรอาหารระดับ 100 เปอร์เซ็นต์ พบว่าส่วนของเอนเทอโรไซต์ enterocytes ในลำไส้มี lipidic vacuoles เพิ่มขึ้น, ชั้นเยื่อเมือก (Submucosa) มีการขยายตัวโตผิดปกติ และถูกแทรกไปด้วยเม็ดเลือดขาวชนิดอีโอซิโนฟิล (Eosinophilic granular cells) (Sitjà-Bobadilla et al., 2005), ในปลาแซลมอน (*Salmo salar* L.) ทดลองให้อาหารที่ผสมกากถั่วเหลืองเหลืองผ่านกระบวนการคั่ว (Toasted) 30 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับสูตรอาหารที่ใช้แหล่งโปรตีนจากปลาป่นเพียงอย่างเดียว พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของเซลล์ของ monocytic lineage รวมถึง macrophages เช่นเดียวกับ neutrophilic granulocytes และ immunoglobulin ในชั้น Lamina propria เนื่องจากเซลล์ที่อักเสบ ลำไส้มีการตอบสนองต่ออาหารลดลง ชี้ให้เห็นว่าองค์ประกอบที่เป็นสารต้านโภชนาการในกากถั่วเหลือง มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เยื่อบุผิวในลำไส้ และความสามารถในการย่อยของสารอาหารที่ลดลง (Bakke-McKellep et al., 2000) เป็นที่ทราบกันดีว่ากากถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านกระบวนนั้นสามารถใช้ในสูตรอาหารสัตว์น้ำหรือทดแทนโปรตีนจากปลาป่นได้ค่อนข้างต่ำ เนื่องจากมีผลกระทบที่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อลักษณะของเนื้อเยื่อในลำไส้ (Krogdahl et al., 2010; Merrifield et al., 2011) ปลากะพงญี่ปุ่น (Japanese seabass) สูตรอาหารทดลองถูกแทนที่ปลาป่นด้วยกากถั่วเหลือง 75 เปอร์เซ็นต์ มีผลกระทบต่อการใช้อาหาร กิจกรรมเอนไซม์ย่อยอาหาร และสุขภาพของลำไส้มีความเสียหายรุนแรง (Zhang et al., 2018) การแทนที่ปลาป่นด้วยโปรตีนถั่วเหลืองไอโซเลต (Soy Protein Isolate) พบว่าเมื่อปลาป่นในสูตรอาหารน้อยกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ และระดับที่เพิ่มขึ้นของกากถั่วเหลืองส่งผลต่อการกินอาหาร มีอัตราการเจริญเติบโตลดลง เกิดจากการปรากฏตัวที่มากขึ้นของสารต้านโภชนาการ มีความสามารถในการย่อยพลังงานที่ต่ำ เนื่องมาจากคาร์โบไฮเดรตและสารต้านโภชนาการ ซึ่งลดการดูดซึมของสารอาหารในลำไส้ ทำให้ลำไส้หดตัวและกิจกรรมของเอนไซม์ลดลง (FrancisMakkar, & Becker, 2001) เนื่องจากสารต้านโภชนาการ เช่น ไฟเตต (Pytate) หรือ Phytic acid พบมากในพืชตระกูลถั่ว เมื่อปลาได้รับเข้าไป จะส่งผลต่อความสามารถในการย่อยได้ของโปรตีน เกิดความเสียหายของลำไส้ตามมา และลดการดูดซึมแร่ธาตุที่สำคัญ (ฟอสฟอรัส แคลเซียม แมกนีเซียมและสังกะสี) (Lanari et al., 1998) มีวิจัยการเสริมเอนไซม์ไฟเตส (Phytase) พบประสิทธิภาพการเจริญเติบโตลดลงในกลุ่มปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม กากถั่วเหลืองแทนที่ปลาป่น 30% ที่ไม่มีเสริมเอนไซม์ไฟเตส (Biswas et al., 2007) และซาโปนินเป็นอีกหนึ่งในสารต้านโภชนาการที่เป็นสาเหตุความเสียหายของเยื่อบุลำไส้และทำให้การกินอาหารลดลง ส่งผลการ

เจริญเติบโต (Lin et al., 2006) ทำให้เกิดการระคายเคืองต่อทางเดินอาหารส่งผลต่อการผลิตเมือก และลดการดูดซึมสารอาหาร (FrancisMakkar, & Becker, 2001)

การศึกษาโลหิตวิทยา (Hematology) จากการทดลองนี้พบว่าเซลล์เม็ดเลือดขาว และความเข้มข้นของฮีโมโกลบิน มีค่าลดลงในอาหารทดลองใช้กากถั่วดาวอินคาผ่านกระบวนการไมโครเวฟ (Microwave) สอดคล้องกับการทดลองในปลาเรนโบว์เทราต์ (Rainbow trout) ใช้กากถั่วเหลืองผ่านกระบวนการคั่ว (Toasted) ในอาหารทดลอง การแทนที่ทั้งหมดของปลาป่นด้วยกากถั่วเหลืองนำไปสู่การเพิ่มขึ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวและกิจกรรม Phagocytic ไม่พบผลกระทบกับระดับฮีมาโตคริตและกิจกรรมของเม็ดเลือดแดง (Rumsey et al., 1995) หลายงานวิจัยได้บอกถึงค่าโลหิตวิทยาที่เป็นประโยชน์ต่อการเลือกอาหารเพื่อสุขภาพสำหรับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ช่วยวินิจฉัยโรคก่อนที่จะกลายเป็นโรคระบาดในวงกว้าง และยังประเมินความเป็นพิษของสภาพแวดล้อมต่างๆเมื่อสารพิษนั้นอยู่ในความเข้มข้นที่เป็นอันตราย เกี่ยวข้องกับผลกระทบต่อมลพิษในสิ่งแวดล้อม ซึ่งสุขภาพของปลาจะขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมและโภชนาการสารอาหารที่ปลาได้รับ ฮีมาโตคริตเป็นตัวชี้วัดอัตราส่วนของเม็ดเลือดแดงต่อพลาสมาในเลือด หรือปริมาณเซลล์ที่บรรจุของเม็ดเลือดแดงที่มีอยู่ในเลือด (Wintrobe, 1934) ค่าฮีมาโตคริตลดลง เมื่อความอยากอาหารของปลาลดลง และเกิดโรคตามมาในที่สุด (Blaxhall, 1972) เซลล์เม็ดเลือดแดง (RBC), ฮีมาโตคริต (Hct) เป็นตัวแทนของการขนส่งออกซิเจน ความสามารถของเลือดขึ้นอยู่กับจำนวนเซลล์ที่มี (Han et al., 2012) มีรายงานที่ว่าระดับฮีมาโตคริตไม่ได้รับผลกระทบจากแหล่งโปรตีน เนื่องจากเป็นเรื่องผิดปกติที่จะพบความแตกต่างระหว่างกลุ่มของปลา ยกเว้นในกรณีของการขาดสารอาหารอย่างรุนแรงหรือโรคที่รุนแรง (Blaxhall, 1972; Council, 1981) และเม็ดเลือดขาวที่เพิ่มขึ้นมักบ่งบอกถึงจุดเริ่มต้นของการตอบสนองการอักเสบ เริ่มมีปฏิกิริยาตอบสนองต่อภูมิคุ้มกัน (Ellis, 1986; Goldstein et al., 1992) มีงานวิจัยเพียงไม่กี่ชิ้นที่ตรวจสอบการเพิ่มจำนวนของเม็ดเลือดขาว โดยเฉพาะเซลล์ย่อยที่เฉพาะเจาะจงของเซลล์ภูมิคุ้มกันหลังจากได้รับบาดเจ็บหรือสร้างภูมิคุ้มกันโรค

การแสดงออกโปรตีน Matrix Metalloproteinases MMP-2 และ MMP-9 พบว่า MMP-2 มีระดับการแสดงออกมากขึ้นในปลาที่ได้รับอาหารกากถั่วดาวอินคาผ่านกระบวนการเอ็กซ์ทรูด (Extrusion) และนึ่ง (Steam) ให้ผลไปในทางบวก เช่นเดียวกันกับการเจริญเติบโต สอดคล้องกับหลายรายงานในปลา Danio rerio (*zebra fish*) (Zhang et al., 2003), ปลา grass carp (*Ctenopharyngodon Idella*) (Xu et al., 2012), ปลา channel catfish (*ctalarus punctatus*) (Jiang et al., 2010), ปลา gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) (Chaves-Pozo et al.,

2008) และปลา pacu (*Piaractus mesopotamicus*) (Michelin et al., 2009) ในทางตรงกันข้าม การแสดงออกของ MMP-9 มีระดับการแสดงออกมากขึ้นในปลาที่ได้รับอาหารกากถั่วดาวอินคาผ่านกระบวนการไมโครเวฟ (Microwave) ในปลา atlantic cod (*Gadus morhua*), ปลา spotted wolfish (*Anarhichas minor*), ปลา atlantic salmon (*Salmo salar*) และปลา common carp (*Cyprinus carpio*) *(Lødemel and Olsen, 2003)*, ปลา common carp (*Cyprinus carpio* L.), ปลา zebra fish (*Danio rerio*) (Bai et al., 2005), ปลา grass carp (*Ctenopharyngodon Idella*) (Bai et al., 2005), ปลา gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) (Castillo-Briceño et al., 2010), ปลา channel catfish) (*Ictalarus punctatus*) (Volkman *et al.*, 2010), ปลา atlantic salmon (*Salmo salar*) (Krasnov et al., 2012; Skugor *et al.*, 2008; Tadiso et al., 2011) และปลา zebra fish (*Danio rerio*) (Zhang et al., 2013)

ควรมีการศึกษามากขึ้นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของกากถั่วดาวอินคาหรือผลพลอยได้ของพืชตระกูลถั่วชนิดอื่นๆ และเทคนิคกระบวนการผ่านความร้อนต่างๆ จะช่วยให้ประสิทธิภาพการใช้โปรตีนจากพืชได้ดีมากยิ่งขึ้น เห็นได้ชัดจากการศึกษานี้กากถั่วดาวอินคาผ่านกระบวนการความร้อนด้วยวิธีการเอ็กซ์ทรูด (Extrusion) และ นึ่ง (Steam) นำมาเป็นแหล่งโปรตีนหลักจากพืช ได้ดีกว่าการผ่านไมโครเวฟ (Microwave) จึงจำเป็นจะต้องได้รับข้อมูลเพิ่มเติมเพื่อนำไปใช้ประยุกต์ใช้กับการประกอบสูตรอาหารให้เหมาะสม โดยเฉพาะอย่างยิ่งผลพลอย เพื่อใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุด สามารถนำมาเป็นแหล่งโปรตีนทางเลือกใหม่ ช่วยลดต้นทุนของค่าอาหารของการผลิตสัตว์น้ำและไม่เกิดผลเสียต่อสัตว์น้ำ

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

เก็จมาศ เรืองประกาย. (2530). *การใช้ข้าวเปลือกเหนียวบดและถั่วเหลืองต้มเสริมด้วยกรดอะมิโนในอาหารสุกรรุ่น-ขุน* (วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต). กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เพ็ญพรรณ ศรีสกุลเตียว. (2543). สภาวะการเพาะเลี้ยงปลานิลในประเทศไทย. *ว.แก่นเกษตร, 28,* 173-181.

อุสิธารา จันตาเวียง. (2563). การพัฒนาผลิตภัณฑ์สบู่จากถั่วดาวอินคา. *วารสารวิจัยเทคโนโลยีนวัตกรรม*, *4*(2), 70-79.

Adewumi, A. (2006). The growth and gonadal maturation of the African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell) broodstock fed differently heated soybean-based diets. *Aquaculture nutrition, 12*(4), 267-274.

Alajaji, S. A., & El-Adawy, T. A. (2006). Nutritional composition of chickpea (*Cicer arietinum* L.) as affected by microwave cooking and other traditional cooking methods. *Journal of food composition and analysis, 19*(8), 806-812.

Albu, S., Joyce, E., Paniwnyk, L., Lorimer, J., & Mason, T. J. (2004). Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from Rosmarinus officinalis for the food and pharmaceutical industry. *Ultrasonics sonochemistry, 11*(3-4), 261-265.

Allan, G. L., & Booth, M. A. (2004). Effects of extrusion processing on digestibility of peas, lupins, canola meal and soybean meal in silver perch Bidyanus bidyanus (Mitchell) diets. *Aquaculture research, 35*(10), 981-991.

AOAC. (1990). *Official methods of analysis* (15th ed.). Association of Official Analytical Chemists, Washington DC, USA.

Araba, M., & Dale, N. (1990). Evaluation of protein solubility as an indicator of overprocessing soybean meal. *Poultry Science, 69*(1), 76-83.

Arndt, R. E., Hardy, R. W., Sugiura, S. H., & Dong, F. M. (1999). Effects of heat treatment and substitution level on palatability and nutritional value of soy defatted flour in feeds for Coho Salmon, *Oncorhynchus kisutch. Aquaculture, 180*(1-2), 129-145.

Azaza, M., Wassim, K., Mensi, F., Abdelmouleh, A., Brini, B., & Kraïem, M. (2009). Evaluation of faba beans (*Vicia faba* L. var. minuta) as a replacement for soybean meal in practical diets of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus. Aquaculture, 287*(1-2), 174-179.

Bai, S., Thummel, R., Godwin, A. R., Nagase, H., Itoh, Y., Li, L., Evans, R., McDermott, J., Seiki, M., & Sarras Jr, M. P. (2005). Matrix metalloproteinase expression and function during fin regeneration in zebrafish: analysis of MT1-MMP, MMP2 and TIMP2. *Matrix biology, 24*(4), 247-260.

Bakke-McKellep, A., Press, C. M., Baeverfjord, G., Krogdahl, Å., & Landsverk, T. (2000). Changes in immune and enzyme histochemical phenotypes of cells in the intestinal mucosa of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., with soybean meal-induced enteritis. *Journal of Fish Diseases, 23*(2), 115-127.

Bhatt, S., Chovatiya, S., & Shah, A. (2011). Evaluation of raw and hydrothermically processed Prosopis juliflora seed meal as supplementary feed for the growth of *Labeo rohita* fingerlings. *Aquaculture nutrition, 17*(2), e164-e173.

Biswas, A. K., Kaku, H., Ji, S. C., Seoka, M., & Takii, K. (2007). Use of soybean meal and phytase for partial replacement of fish meal in the diet of red sea bream, *Pagrus major. Aquaculture, 267*(1-4), 284-291.

Blaufuss, P., & Trushenski, J. (2012). Exploring soy-derived alternatives to fish meal: using soy protein concentrate and soy protein isolate in hybrid Striped Bass feeds. *North American Journal of Aquaculture, 74*(1), 8-19.

Blaxhall, P. C. (1972). The haematological assessment of the health of freshwater fish: a review of selected literature. *Journal of fish biology, 4*(4), 593-604.

Boonyaratpalin, M., Suraneiranat, P., & Tunpibal, T. (1998). Replacement of fish meal with various types of soybean products in diets for the Asian seabass, *Lates calcarifer*. *Aquaculture, 161*(1-4), 67-78.

Burel, C., Boujard, T., Tulli, F., & Kaushik, S. J. (2000). Digestibility of extruded peas, extruded lupin, and rapeseed meal in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and turbot (*Psetta maxima*). *Aquaculture, 188*(3-4), 285-298.

Castillo-Briceño, P., Arizcun-Arizcun, M., Meseguer, J., Mulero, V., & García-Ayala, A. (2010). Correlated expression profile of extracellular matrix-related molecules during the inflammatory response of the teleost fish gilthead seabream. *Developmental & Comparative Immunology, 34*(10), 1051-1058.

Chaves-Pozo, E., Castillo-Briceño, P., García-Alcázar, A., Meseguer, J., Mulero, V., & García-Ayala, A. (2008). A role for matrix metalloproteinases in granulocyte infiltration and testicular remodelation in a seasonal breeding teleost. *Molecular immunology, 45*(10), 2820-2830.

Chirinos, R., Zuloeta, G., Pedreschi, R., Mignolet, E., Larondelle, Y., & Campos, D. (2013). Sacha inchi (*Plukenetia volubilis*): A seed source of polyunsaturated fatty acids, tocopherols, phytosterols, phenolic compounds and antioxidant capacity. *Food chemistry, 141*(3), 1732-1739.

Clarke, E., & Wiseman, J. (1999). *Nutritional value of soya products for non-ruminant farm animals*: American Soybean Association.

Council, N. R. (1981). *Nutrient requirements of cold water fishes. National Research Council (US).* Nat. Acad. Sci., Washington, DC, 63.

Crespo, R., Martins, P. M., Gales, L., Rocha, F., & Damas, A. M. (2010). Potential use of ultrasound to promote protein crystallization. J*ournal of Applied Crystallography, 43*(6), 1419-1425.

Dabrowski, K., Poczyczynski, P., Köck, G., & Berger, B. (1989). Effect of partially or totally replacing fish meal protein by soybean meal protein on growth, food utilization and proteolytic enzyme activities in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). New in vivo test for exocrine pancreatic secretion. A*quaculture, 77*(1), 29-49.

Dairiki, J. K., Correa, R. B., Inoue, L., & Morais, I. d. S. (2013). Autoclaved cowpea in the nutrition of juvenile tambaqui. *Pesquisa Agropecuária Brasileira, 48*(4), 450-453.

Davies, S., & Gouveia, A. (2008). Enhancing the nutritional value of pea seed meals (*Pisum sativum*) by thermal treatment or specific isogenic selection with comparison to soybean meal for African catfish, *Clarias gariepinus. Aquaculture, 283*(1-4), 116-122.

Davies, S., & Gouveia, A. (2010). Response of common carp fry fed diets containing a pea seed meal (*Pisum sativum*) subjected to different thermal processing methods. *Aquaculture, 305*(1-4), 117-123.

De Jonge, L., Spek, J., Van Laar, H., & Dijkstra, J. (2009). Effects of pH, temperature and osmolality on the level and composition of soluble N in feedstuffs for ruminants. *Animal Feed Science and Technology, 153*(3-4), 249-262.

Drew, M., Borgeson, T., & Thiessen, D. (2007). A review of processing of feed ingredients to enhance diet digestibility in finfish. *Animal Feed Science and Technology, 138*(2), 118-136.

Edward, J. N. (2000). *Fish disease diagnosis and treatment.* State Avenue, Ames: Blackwell Publishing Professional.

Ellis, A. (1986). The function of teleost fish lymphocytes in relation to inflammation. *International journal of tissue reactions, 8*(4), 263-270.

Escaffre, A. M., Infante, J. Z., Cahu, C. L., Mambrini, M., Bergot, P., & Kaushik, S. J. (1997). Nutritional value of soy protein concentrate for larvae of common carp (*Cyprinus carpio*) based on growth performance and digestive enzyme activities. A*quaculture, 153*(1-2), 63-80.

Eyaru, R., Shrestha, A. K., & Arcot, J. (2009). Effect of various processing techniques on digestibility of starch in Red kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) and two varieties of peas (*Pisum sativum*). *Food Research International, 42*(8), 956-962.

Fakhouri, M., & Ramaswamy, H. (1993). Temperature uniformity of microwave heated foods as influenced by product type and composition. *Food Research International, 26*(2), 89-95.

Fallahi, P., Rosentrater, K. A., Muthukumarappan, K., & Tulbek, M. (2013). Effects of steam, moisture, and screw speed on physical properties of DDGS-based extrudates. *Cereal chemistry, 90*(3), 186-197.

Fanali, C., Dugo, L., Cacciola, F., Beccaria, M., Grasso, S., Dacha, M., Dugo, P., & Mondello, L. (2011). Chemical characterization of Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) oil. *Journal of agricultural and food chemistry, 59*(24), 13043-13049.

Fontaine, J., Zimmer, U., Moughan, P. J., & Rutherfurd, S. M. (2007). Effect of heat damage in an autoclave on the reactive lysine contents of soy products and corn distillers dried grains with solubles. Use of the results to check on lysine damage in common qualities of these ingredients. *Journal of agricultural and food chemistry, 55*(26), 10737-10743.

Fontainhas-Fernandes, A., Gomes, E., Reis-Henriques, M. A., & Coimbra, J. (1999). Replacement of fish meal by plant proteins in the diet of Nile tilapia: digestibility and growth performance. *Aquaculture international, 7*(1), 57-67.

Food, F. (2016). *Agriculture Organization of the United Nations. Fisheries and Aquaculture Department*. The State of World Fisheries and Aquaculture: contributing to food security and nutrition for all. Rome.

Fowler, L. (1980). Substitution of soybean and cottonseed products for fish meal in diets fed to chinook and coho salmon. *The Progressive Fish-Culturist, 42*(2), 87-91.

Francis, G., Makkar, H. P., & Becker, K. (2001). Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture, 199*(3-4), 197-227.

Furukawa, A., & Tsukahara, H. (1996). On the acid digestion method for the determination of chromic oxide as an index substance in the study of digestibility of fish feed. *The Japanese Society of Fisheries Science, 32*(6), 502-506.

Garg, S., Kalla, A., & Bhatnagar, A. (2002). Evaluation of raw and hydrothermically processed leguminous seeds as supplementary feed for the growth of two Indian major carp species. *Aquaculture research, 33*(3), 151-163.

Garmendia, F., Pando, R., & Ronceros, G. (2011). Effect of Sacha inchi oil (*Plukenetia volubilis* l) on the lipid profile of patients with hyperlipoproteinemia. *Revista peruana de medicina experimental y salud publica, 28*(4), 628-632.

Goldstein, I. M., Snyderman, R., & Gallin, J. I. (1992). *Inflammation: basic principles and clinical correlates:* Raven press.

Gomes, E. F., Corraze, G., & Kaushik, S. (1993). Effects of dietary incorporation of a co-extruded plant protein (rapeseed and peas) on growth, nutrient utilization and muscle fatty acid composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture, 113*(4), 339-353.

Gonzales, G. F., & Gonzales, C. (2014). A randomized, double-blind placebo-controlled study on acceptability, safety and efficacy of oral administration of sacha inchi oil (*Plukenetia volubilis* L.) in adult human subjects. *Food and chemical toxicology, 65,* 168-176.

Gouveia, A., Oliva-Teles, A., Gomes, E., & Rema, P. (1993). Effect of cooking/expansion of three legume seeds on growth and food utilization by rainbow trout. *COLLOQUES-INRA*, 933-933.

Guerrero, R. D. I. (1973.). 1973. Cage culture of male and female Tilapia mossambicus with and without supplementary feeding in a fertilized pond. *Central Luzon State University Science Journal(9),* 18-20.

Guraya, H., & Toledo, R. (1993). Determining gelatinized starch in a dry starchy product. *Journal of food science, 58*(4), 888-889.

Han, Y.-Z., Ren, T.-J., Jiang, Z.-Q., Jiang, B.-Q., Gao, J., Koshio, S., & Komilus, C.-F. (2012). Effects of palm oil blended with oxidized fish oil on growth performances, hematology, and several immune parameters in juvenile Japanese sea bass, Lateolabrax japonicas. *Fish physiology and biochemistry, 38*(6), 1785-1794.

Hanssen, H.-P., & Schmitz-Hübsch, M. (2011). *Sacha inchi (Plukenetia volubilis L.) nut oil and its therapeutic and nutritional uses Nuts and seeds in health and disease prevention* (pp. 991-994): Elsevier.

Helena, P., Chhorn, L., & Phillip, H. K. (2003). Nutritional value of heat-treated soybean meal for channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture, 225*(1-4), 67-82.

Hossain, M., Focken, U., & Becker, K. (2001). Evaluation of an unconventional legume seed, Sesbania aculeata, as a dietary protein source for common carp, *Cyprinus carpio* L. *Aquaculture, 198*(1-2), 129-140.

Hotz, C., & Gibson, R. S. (2007). Traditional food-processing and preparation practices to enhance the bioavailability of micronutrients in plant-based diets. *The Journal of nutrition, 137*(4), 1097-1100.

Humason, G. L. (1962). Animal tissue techniques. Animal tissue techniques.

Hurrell, R., & Finot, P. (1985). Effects of food processing on protein digestibility and amino acid availability. *Digestibility and amino acid availability in cereals and oilseeds,* 233-246.

Iwashita, Y., Suzuki, N., Yamamoto, T., Shibata, J.-i., Isokawa, K., Soon, A. H., Ikehata, Y., Furuita, H., Sugita, T., & Goto, T. (2008). Supplemental effect of cholyltaurine and soybean lecithin to a soybean meal-based fish meal-free diet on hepatic and intestinal morphology of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Fisheries Science, 74*(5), 1083-1095.

Jacobsen, H. J., Kousoulaki, K., Sandberg, A.-S., Carlsson, N.-G., Ahlstrøm, Ø., & Oterhals, Å. (2018). Enzyme pre-treatment of soybean meal: Effects on non-starch carbohydrates, protein, phytic acid, and saponin biotransformation and digestibility in mink (*Neovison vison*). *Animal Feed Science and Technology, 236*, 1-13.

Jiang, Y., Abernathy, J. W., Peatman, E., Liu, H., Wang, S., Xu, D.-H., Kucuktas, H., Klesius, P., & Liu, Z. (2010). Identification and characterization of matrix metalloproteinase-13 sequence structure and expression during embryogenesis and infection in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Developmental & Comparative Immunology, 34*(5), 590-597.

Karun, T., & Uthaiwan, K. (2012). Physical Modification of Raw Materials for Feed Production. *Journal of King Mongkut's University of Technology North Bangkok, 22*.

Keembiyehetty, C., & De Silva, S. (1993). Performance of juvenile *Oreochromis niloticus* (L.) reared on diets containing cowpea, *Vigna catiang,* and black gram, Phaseolus mungo, seeds. *Aquaculture, 112*(2-3), 207-215.

Knorr, D., Zenker, M., Heinz, V., & Lee, D.-U. (2004). Applications and potential of ultrasonics in food processing. *Trends in Food Science & Technology, 15*(5), 261-266.

Kokou, F., Sarropoulou, E., Cotou, E., Kentouri, M., Alexis, M., & Rigos, G. (2017). Effects of graded dietary levels of soy protein concentrate supplemented with methionine and phosphate on the immune and antioxidant responses of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Fish & shellfish immunology, 64,* 111-121.

Krasnov, A., Skugor, S., Todorcevic, M., Glover, K. A., & Nilsen, F. (2012). Gene expression in Atlantic salmon skin in response to infection with the parasitic copepod *Lepeophtheirus salmonis*, cortisol implant, and their combination. *BMC genomics, 13*(1), 130.

Krogdahl, Å., Penn, M., Thorsen, J., Refstie, S., & Bakke, A. M. (2010). Important antinutrients in plant feedstuffs for aquaculture: an update on recent findings regarding responses in salmonids. *Aquaculture research, 41*(3), 333-344.

Kumar, B., Smita, K., Cumbal, L., & Debut, A. (2014). Synthesis of silver nanoparticles using Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) leaf extracts. *Saudi journal of biological sciences, 21*(6), 605-609.

Kumar, P., Barrett, D. M., Delwiche, M. J., & Stroeve, P. (2009). Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Industrial & engineering chemistry research, 48*(8), 3713-3729.

Kupai, K., Szucs, G., Cseh, S., Hajdu, I., Csonka, C., Csont, T., & Ferdinandy, P. (2010). Matrix metalloproteinase activity assays: Importance of zymography. *Journal of pharmacological and toxicological methods, 61*(2), 205-209.

Lanari, D., D'agaro, E., & Turri, C. (1998). Use of nonlinear regression to evaluate the effects of phytase enzyme treatment of plant protein diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture, 161*(1-4), 345-356.

Lin, J., Krishnan, P. G., & Wang, C. (2006). Retention of isoflavones and saponins during the processing of soy protein isolates. *Journal of the American Oil Chemists' Society, 83*(1), 59-63.

Lionetto, F., Maffezzoli, A., Ottenhof, M.-A., Farhat, I. A., & Mitchell, J. R. (2006). Ultrasonic investigation of wheat starch retrogradation. *Journal of food engineering, 75*(2), 258-266.

Lødemel, J. B., & Olsen, R. L. (2003). Gelatinolytic activities in muscle of Atlantic cod (*Gadus morhua*), spotted wolffish (*Anarhichas minor*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Journal of the Science of Food and Agriculture, 83*(10), 1031-1036.

Lovell, R. (1984). Use of soybean products in diet for aquaculture species. A*nimal Nutrition Bulletin,* 1-6.

Maurer, N. E., Hatta-Sakoda, B., Pascual-Chagman, G., & Rodriguez-Saona, L. E. (2012). Characterization and authentication of a novel vegetable source of omega-3 fatty acids, sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) oil. *Food chemistry, 134*(2), 1173-1180.

Merrifield, D. L., Olsen, R. E., Myklebust, R., & Ringø, E. (2011). Dietary effect of soybean (Glycine max) products on gut histology and microbiota of fish. *Soybean and nutrition,* 231-250.

Michelin, A. C., Justulin Jr, L. A., Delella, F. K., Padovani, C. R., Felisbino, S. L., & Dal-Pai-Silva, M. (2009). Differential MMP-2 and MMP-9 activity and collagen distribution in skeletal muscle from pacu (*Piaractus mesopotamicus*) during juvenile and adult growth phases. The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology: *Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology, 292*(3), 387-395.

Mohamad, M. H., Awang, R., & Yunus, W. M. (2011). A review of acetol: application and production. *American Journal of Applied Sciences, 8*(11), 1135.

Morken, T., Moyano, F. J., Márquez, L., Sørensen, M., Mydland, L. T., & Øverland, M. (2012). Effects of autoclaving and sodium diformate supplementation to diets on amino acid composition, in vivo digestibility in mink (*Neovison vison*) and in vitro bioavailability using digestive enzymes from Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Animal Feed Science and Technology, 178*(1-2), 84-94.

Moughan, P. J. (2003). Amino acid availability: aspects of chemical analysis and bioassay methodology. *Nutrition Research Reviews, 16*(2), 127-141.

Mtui, G. Y. (2009). Recent advances in pretreatment of lignocellulosic wastes and production of value added products. *African Journal of Biotechnology,* 8(8).

Nascimento, A. K. L., Melo-Silveira, R. F., Dantas-Santos, N., Fernandes, J. M., Zucolotto, S. M., Rocha, H. A. O., & Scortecci, K. C. (2013). Antioxidant and antiproliferative activities of leaf extracts from *Plukenetia volubilis* Linneo (Euphorbiaceae). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine,* 2013.

Navarre, O., & Halver, J. E. (1989). Disease resistance and humoral antibody production in rainbow trout fed high levels of vitamin C. *Aquaculture, 79*(1-4), 207-221.

Negi, A., Boora, P., & Khetarpaul, N. (2001). Effect of microwave cooking on the starch and protein digestibility of some newly released moth bean (*Phaseolus aconitifolius* Jacq.) cultivars. *Journal of food composition and analysis, 14*(5), 541-546.

Oliva-Teles, A., Gouveia, A., Gomes, E., & Rema, P. (1994). The effect of different processing treatments on soybean meal utilization by rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture, 124*(1-4), 343-349.

Olli, J., Krogdahl, A., & Berg-Lea, T. (1989). *Effect of trypsin inhibitor activity on nutrient digestibility in salmonids fed practical diets containing various soybean meals. Third*. Integer. Feeding and Nutrition in Fish, Toba, Japan, 263-271.

Olli, J. J., Hjelmeland, K., & Krogdahl, Å. (1994). Soybean trypsin inhibitors in diets for Atlantic salmon (*Salmo salar,* L): effects on nutrient digestibilities and trypsin in pyloric caeca homogenate and intestinal content. C*omparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology, 109*(4), 923-928.

Osborne, T. B., & Mendel, L. B. (1917). The use of soy bean as food. J*ournal of Biological Chemistry, 32*(3), 369-387.

Palekar, M., Cabrera‐Diaz, E., Kalbasi‐Ashtari, A., Maxim, J. E., Miller, R., Cisneros‐Zevallos, L., & Castillo, A. (2004). Effect of electron beam irradiation on the bacterial load and sensorial quality of sliced cantaloupe. *Journal of food science, 69*(9), M267-M273.

Papadopoulos, M. C. (1989). Effect of processing on high-protein feedstuffs: a review. *Biological Wastes, 29*(2), 123-138.

Peres, H., Lim, C., & Klesius, P. H. (2003). Nutritional value of heat-treated soybean meal for channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture, 225*(1-4), 67-82.

Phillips, R. (1989). *Effects of extrusion cooking on the nutritional quality of plant proteins. Protein Quality and the Effects of Proceeding,* 219-246.

Pilli, S., Bhunia, P., Yan, S., LeBlanc, R., Tyagi, R., & Surampalli, R. (2011). Ultrasonic pretreatment of sludge: a review. *Ultrasonics sonochemistry, 18*(1), 1-18.

Pond, W. G., & Maner, J. H. (1984). *Swine production and nutrition*: AVI Publishing Co., Inc.

Pongpet, J. (2014). *THE REPLACEMENT OF FISHMEAL BY BREWER'S YEAST (Saccharomyces cerevisiae) IN DIETS OF THAI PANGA.* Degree Master of Science in Animal Production Technology, Suranaree University of Technology.

Rackis, J. J. (1974). Biological and physiological factors in soybeans. *Journal of the American Oil Chemists' Society, 51*(1Part2), 161A-174A.

Rahimnejad, S., Lu, K., Wang, L., Song, K., Mai, K., Davis, D. A., & Zhang, C. (2019). Replacement of fish meal with Bacillus pumillus SE5 and Pseudozyma aphidis ZR1 fermented soybean meal in diets for Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*). *Fish & shellfish immunology, 84*, 987-997.

Rajab, M. S., Cantrell, C. L., Franzblau, S. G., & Fischer, N. H. (1998). Antimycobacterial activity of (E)-phytol and derivatives: a preliminary structure-activity study. *Planta medica, 64*(01), 2-4.

Ratnayake, W. S., Hoover, R., & Warkentin, T. (2002). Pea starch: composition, structure and properties—a review. *Starch-Stärke, 54*(6), 217-234.

Ratnayake, W. S., & Jackson, D. S. (2006). Gelatinization and solubility of corn starch during heating in excess water: new insights. *Journal of agricultural and food chemistry, 54*(10), 3712-3716.

Rawdkuen, S., Murdayanti, D., Ketnawa, S., & Phongthai, S. (2016). Chemical properties and nutritional factors of pressed-cake from tea and sacha inchi seeds. *Food bioscience, 15,* 64-71.

Refstie, S., Storebakken, T., & Roem, A. J. (1998). Feed consumption and conversion in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets with fish meal, extracted soybean meal or soybean meal with reduced content of oligosaccharides, trypsin inhibitors, lectins and soya antigens. *Aquaculture, 162*(3-4), 301-312.

Rehman, Z.-u., & Shah, W. (2005). Thermal heat processing effects on antinutrients, protein and starch digestibility of food legumes. *Food chemistry, 91*(2), 327-331.

Riaz, M. (1997). Aquafeeds to optimise water quality. *Feed Int, 18*(3), 22-28.

Riche, M., & Brown, P. B. (1996). Availability of phosphorus from feedstuffs fed to rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture, 142*(3-4), 269-282.

Roengpragai, K. (1987). *Utilization of Ground Glutinous Rice and Cooked Full Fat Soybean Supplemented with Synthetic Amino Acids in Growing-Finishing Pig Rations.* Master of Science (Agriculture), Kasetsart University.

Romarheim, O. H., Aslaksen, M. A., Storebakken, T., Krogdahl, Å., & Skrede, A. (2005). Effect of extrusion on trypsin inhibitor activity and nutrient digestibility of diets based on fish meal, soybean meal and white flakes. *Archives of animal nutrition, 59*(6), 365-375.

Rugchanok, P. (2016). A Comparative Study of Ability of Secondary Metabolites Production from Sacha Inchi Young, Immature and Mature Leaves to Support Tea Leaves Production of Communities in Narathiwat. *Princess of Naradhiwas University Journal,* 125-133.

Rumsey, G., Endres, J., Bowser, P., Earnest-Koons, K., Anderson, D., & Siwicki, A. (1995). Soy protein in diets of rainbow trout: effects on growth, protein absorption, gastrointestinal histology, and nonspecific serologic and immune response. *Nutrition and utilization technology in aquaculture,* 166-188.

Sadeghi, A., & Shawrang, P. (2006). Effects of microwave irradiation on ruminal degradability and in vitro digestibility of canola meal. *Animal Feed Science and Technology, 127*(1-2), 45-54.

Sáenz de Rodrigáñez, M. Á., Medina, E., Moyano, F. J., & Alarcón, F. J. (2011). Evaluation of protein hydrolysis in raw sources by digestive proteases of Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) using a combination of an in vitro assay and sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis analysis of products. *Aquaculture research, 42*(11), 1639-1652.

Saha, A., & Ray, A. (1998). Evaluation of Chuni, a commercially available low‐cost cattle fodder, in the diet for rohu, *Labeo rohita* (Hamilton), fingerlings. *Aquaculture research, 29*(10), 761-768.

Sahapat. (2007). Role of Matrix Metalloproteinases and Its Expression in Cancers. *Journal of Health Research, 21*(3), 239-249.

Schägger, H., & Von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical biochemistry, 166*(2), 368-379.

Siddiqui, M. I., Khan, M. A., & Siddiqui, M. I. (2014). Effect of soybean diet: Growth and conversion efficiencies of fingerling of stinging cat fish, Heteropneustes fossilis (Bloch). *Journal of King Saud University-Science, 26*(2), 83-87.

Singh, S., Gamlath, S., & Wakeling, L. (2007). Nutritional aspects of food extrusion: a review. *International Journal of Food Science & Technology, 42*(8), 916-929.

Sitjà-Bobadilla, A., Peña-Llopis, S., Gómez-Requeni, P., Médale, F., Kaushik, S., & Pérez-Sánchez, J. (2005). Effect of fish meal replacement by plant protein sources on non-specific defence mechanisms and oxidative stress in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture, 249*(1-4), 387-400.

Skugor, S., Glover, K. A., Nilsen, F., & Krasnov, A. (2008). Local and systemic gene expression responses of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) to infection with the salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis*). *BMC genomics, 9*(1), 498.

Small, B. C., Austic, R. E., & Soares, J., Joseph H. (1999). Amino acid availability of four practical feed ingredients fed to striped bass Morone saxatilis. *Journal of the World Aquaculture Society, 30*(1), 58-64.

Smith, R. R. (1977). Recent research involving full-fat soybean meal in salmonid diets. *Salmonid, 1*(4), 8-11, 18.

Sørensen, M., Stjepanovic, N., Romarheim, O., Krekling, T., & Storebakken, T. (2009). Soybean meal improves the physical quality of extruded fish feed. *Animal Feed Science and Technology, 149*(1-2), 149-161.

Souza, A. H. P. d., Gohara, A. K., Rodrigues, Â. C., De Souza, N. E., Visentainer, J. V., & Matsushita, M. (2013). Sacha inchi as potential source of essential fatty acids and tocopherols: multivariate study of nut and shell. *Acta Scientiarum. Technology, 35*(4), 757-763.

Suzuki, N., & Yamamoto, T. (2005). Histological observation of intestinal degeneration of defatted soybean meal diet and supplemental effect of soybean lecithin for fingerling rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss. Journal of the School of Marine Science and Technology-Tokai University (Japan).*

Svihus, B., Uhlen, A. K., & Harstad, O. M. (2005). Effect of starch granule structure, associated components and processing on nutritive value of cereal starch: A review. *Animal Feed Science and Technology, 122*(3-4), 303-320.

Tadiso, T. M., Krasnov, A., Skugor, S., Afanasyev, S., Hordvik, I., & Nilsen, F. (2011). Gene expression analyses of immune responses in Atlantic salmon during early stages of infection by salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis*) revealed bi-phasic responses coinciding with the copepod-chalimus transition. *BMC genomics, 12*(1), 141.

Thai Fishmeal Producers Association. (2018). *The 20th Anniversary of the Thai Fishmeal Producers Association*. The Thai Fishmeal Producers Association, Bangkok, Thailand.

Thongprajukaew, K., Rodjaroen, S., Yoonram, K., Sornthong, P., Hutcha, N., Tantikitti, C., & Kovitvadhi, U. (2015). Effects of dietary modified palm kernel meal on growth, feed utilization, radical scavenging activity, carcass composition and muscle quality in sex reversed Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture, 439,* 45-52.

Udensi, E., Ekwu, F., & Isinguzo, J. (2007). Antinutrient factors of vegetable cowpea (*Sesquipedalis*) seeds during thermal processing. *Pakistan Journal of Nutrition, 6*(2), 194-197.

Volkman, H. E., Pozos, T. C., Zheng, J., Davis, J. M., Rawls, J. F., & Ramakrishnan, L. (2010). Tuberculous granuloma induction via interaction of a bacterial secreted protein with host epithelium. *Science, 327*(5964), 466-469.

Wang, X. Y., Yang, D., Zhang, H., Jia, C. H., Shin, J. A., Hong, S. T., Lee, Y. H., Jang, Y. S., & Lee, K. T. (2014). Antioxidant activity of soybean oil containing 4-vinylsyringol obtained from decarboxylated sinapic acid. *Journal of the American Oil Chemists' Society, 91*(9), 1543-1550.

Werb, Z. (1997). ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. *Cell, 91*(4), 439-442.

Wilson, J. (2002). Productivity, fisheries and aquaculture in temperate estuaries. *Estuarine, Coastal and Shelf Science, 55*(6), 953-967.

Wintrobe, M. M. (1934). Variations in the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. *Folia haematologica, 51*(32), 32-49.

Xu, X.-Y., Shen, Y.-B., Fu, J.-J., Liu, F., Guo, S.-Z., Yang, X.-M., & Li, J.-L. (2012). Matrix metalloproteinase 2 of grass carp *Ctenopharyngodon idella* (CiMMP2) is involved in the immune response against bacterial infection. *Fish & shellfish immunology, 33*(2), 251-257.

Yamamoto, T., Suzuki, N., Furuita, H., Sugita, T., Tanaka, N., & Goto, T. (2007). Supplemental effect of bile salts to soybean meal-based diet on growth and feed utilization of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss. Fisheries Science, 73*(1), 123-131.

Yao, R., Liu, Q., Hu, H., Wood, T. K., & Zhang, X. (2015). Metabolic engineering of Escherichia coli to enhance acetol production from glycerol. A*pplied microbiology and biotechnology, 99*(19), 7945-7952.

Zhang, C., Rahimnejad, S., Wang, Y.-r., Lu, K., Song, K., Wang, L., & Mai, K. (2018). Substituting fish meal with soybean meal in diets for Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*): Effects on growth, digestive enzymes activity, gut histology, and expression of gut inflammatory and transporter genes. *Aquaculture, 483,* 173-182.

Zhang, J., Bai, S., Zhang, X., Nagase, H., & Sarras, M. P. (2003). The expression of gelatinase A (MMP-2) is required for normal development of zebrafish embryos. *Development genes and evolution, 213*(9), 456-463.

Zhang, W., Liu, T., Ren, G., Hörtensteiner, S., Zhou, Y., Cahoon, E. B., & Zhang, C. (2014). Chlorophyll degradation: the tocopherol biosynthesis-related phytol hydrolase in Arabidopsis seeds is still missing. *Plant physiology, 166*(1), 70-79.

Zhang, Y., Huang, L., Wang, C., Gao, D., & Zuo, Z. (2013). Phenanthrene exposure produces cardiac defects during embryo development of zebrafish (*Danio rerio*) through activation of MMP-9. *Chemosphere, 93*(6), 1168-1175.

Zhang, Y., Wu, Y., Jiang, D., Qin, J., & Wang, Y. (2014). Gamma-irradiated soybean meal replaced more fish meal in the diets of Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*). *Animal Feed Science and Technology, 197,* 155-163.

Zheng, Y., Ng, F. T., & Rempel, G. L. (2003). Process analysis for the production of diacetone alcohol via catalytic distillation. *Industrial & engineering chemistry research, 42*(17), 3962-3972.

ภาคผนวก

ภาคผนวก วิธีการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

การวิเคราะห์ความชื้นและวัตถุแห้ง
(Moisture and Dry matter)
(วิธีการหาความชื้นโดยวิธีอบแห้ง)

หลักการ (วิธีวิเคราะห์ Ovendrying)

ความชื้นหรือน้ำเป็นองค์ประกอบอย่างหนึ่งในวัตถุดิบอาหารสัตว์ ซึ่งจะมีปริมาณผกผันกับปริมาณวัตถุแห้ง (Dry matter) โดยเกิดจากการระเหยของน้ำกลายเป็นไอออกจากอาหารสัตว์ ซึ่งวัตถุดิบอาหารสัตว์แต่ละชนิดมีปริมาณความชื้นแตกต่างกันทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดและปัจจัยต่างๆ และค่าที่ได้จากการหาความชื้นและวัตถุแห้งยังนำมาใช้ในการคำนวณปริมาณอาหารสัตว์ในการประกอบสูตรอาหารสัตว์

อุปกรณ์

1. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
2. ถ้วยหาความชื้นแบบฝาเปิด (weighing bottle) ที่ทำด้วยอลูมิเนียมหรือกระเบื้อง
3. ตู้อบแห้ง ชนิด Forced-air oven (Hot air oven)
4. โถดูดความชื้น หรือ ตู้ดูดความชื้น (desicator)
5. คีมคีบสาหรับจับถ้วยอบตัวอย่าง
6. ตัวอย่างอาหารที่บดละเอียดขนาดผ่านตะแกรง 1-2 มิลลิเมตร

วิธีการหาความชื้นโดยการอบแห้ง

1) บดตัวอย่างอาหารที่จะใช้วิเคราะห์ให้มีขนาด 1-2 มิลลิเมตร

2) เตรียมถ้วยสำหรับความชื้น ล้างให้สะอาดแล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 95-100 ºC นาน 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาพักในโถดูดความชื้นทิ้งไว้ให้เย็นนาน 30 นาที ชั่งน้ำหนัก จดบันทึกน้ำหนักที่แน่นอนของถ้วยเปล่า

3) ชั่งตัวอย่างอาหารประมาณ 2-5 กรัม ใส่ลงในถ้วยอบตัวอย่าง (ไม่ควรเกิน 1/3 ของถ้วย) จดบันทึกน้ำหนักที่แน่นอนของตัวอย่างอาหาร

4) นำถ้วยที่มีตัวอย่างอาหารเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 100 -105 ºC เป็นเวลา 24 ชั่วโมง 39

5) นำถ้วยตัวอย่างอาหารเข้าตู้อบแล้วมาใส่ในโถดูดความชื้นทิ้งไว้ให้เย็นนาน 30 นาที นำถ้วยตัวอย่างอาหารออกมาชั่งน้ำหนัก จดบันทึกน้ำหนัก

วิธีการคำนวณ

1. เปอร์เซ็นต์ความชื้น (moisture) = $\frac{(A - B)}{A} x100$

   A = น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ

   B = น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ

2. เปอร์เซ็นต์วัตถุแห้ง (dry matter) = 100 - % ความชื้น

   หรือ เปอร์เซ็นต์วัตถุแห้ง = $\frac{(X - Y)}{W} x100$

   X = น้ำหนักถ้วย + ตัวอย่างหลังอบ

   Y = น้ำหนักถ้วยเปล่าหลังอบ

   W = น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ

เถ้า
(Ash)

หลักการ (วิธีวิเคราะห์ Muffle furnace combustion)

เถ้า (Ash) คือ ส่วนประกอบของสารอนินทรีย์ในอาหารสัตว์ โดยการหาปริมาณเถ้าเป็นการเผาตัวอย่างด้วยอุณหภูมิที่สูงประมาณ 550 – 600 ºC ส่วนที่เป็นสารอินทรีย์จะสลายตัวกลายเป็นน้ำและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ส่วนที่เหลือคือเถ้า ซึ่งเป็นสารอนินทรีย์ประกอบด้วยแร่ธาตุหลายชนิด ระยะเวลาที่ใช้ในการเผาเถ้าขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณของตัวอย่าง ค่าของเถ้าสามารถบอกถึงคุณภาพอาหารสัตว์ได้ ถ้าพบว่าค่าของเถ้าสูงกว่าปกติอาจมีการปลอมปนของทราย เป็นต้น

อุปกรณ์

1. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
2. เตาเผา (muffle furnace)
3. ถ้วยสำหรับเผาเถ้า (porcelain dish หรือ silica crucible)
4. โถดูดความชื้น หรือ ตู้ดูดความชื้น (desicator)
5. คีมสำหรับจับถ้วยอบตัวอย่าง
6. ตัวอย่างอาหารที่บดละเอียดขนาดผ่านตะแกรง 1-2 มิลลิเมตร

วิธีการ

1) เตรียมถ้วยสำหรับเผาเถ้า ล้างให้สะอาดแล้วนำไปอบให้แห้งโดยนำไปเผาที่อุณหภูมิ 550 – 600 ºC นาน 1 ชั่วโมง หลักจากนั้นปิดเตาเผาอย่างน้อย 2 ชั่วโมง แล้วนำถ้วยเผามาพักในโถดูดความชื้นทิ้งไว้ให้เย็น ชั่งน้ำหนักจนได้น้ำหนักคงที่ จดบันทึกน้ำหนักที่แน่นอนของน้ำหนักถ้วยเปล่า

2) ชั่งตัวอย่าง 2-5 กรัม ใส่ลงในถ้วยเผา (ไม่ควรเกิน 2-3 ของถ้วยเผา) จดบันทึกน้ำหนักที่แน่นอน

3) นำถ้วยเผาที่มีตัวอย่าง เอาไปเข้าเตาเผาอุณหภูมิที่ 550 – 600 ºC เป็นเวลานาน 3-5 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งตัวอย่างเผาไหม้หมดสังเกตได้จากสีเถ้าเป็นสีเทา-ขาว ปิดเตาเผาทิ้งไว้อย่างน้อย 2 ชั่วโมง เพื่อให้ถ้วยเผาตัวอย่างเย็น จึงเปิดเตาเผาได้ หลังจากนั้นนามาพักในโถดูดความชื้นทิ้งไว้ให้เย็น ชั่งน้ำหนักจนได้น้ำหนักคงที่ จดบันทึกน้ำหนักที่แน่นอน

หมายเหตุ : ถ้ายังมีส่วนของสีเทา-ดำ ซึ่งยังมีคาร์บอนเหลืออยู่ ให้หยดแอมโมเนียมคาร์บอเนต 2-3 หยดลงบนเถ้าหรือจนเถ้าเปียก รอระเหยให้แห้งแล้วนำไปเผาต่อจนได้สีขาว-เทา

วิธีการคำนวณ

$$\text{หรือเปอร์เซ็นต์วัตถุแห้ง} = \frac{(B - A)}{W} x100$$

A = น้ำหนักถ้วยเผาเปล่า

B = น้ำหนักถ้วยเผา + ตัวอย่างหลังอบ

W = น้ำหนักตัวอย่าง

ปริมาณอินทรียวัตถุ (Organic matter, OM)

% OM = 100 – (%ความชื้น) – (เถ้า)

การวิเคราะห์หาปริมาณไขมัน
(Crude Fat, CF หรือ Ether Extract, EE)

หลักการ (ดัดแปลงตามวิธี AOAC (1990)

ไขมันสารอินทรีย์ (organic matter) ที่มีอยู่ในสัตว์และเนื้อเยื่อของพืช มีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ (water insoluble) แต่ละลายในสารอินทรีย์ (organic sovent) การวิเคราะห์หาปริมาณไขมันจึงสกัดด้วยสารละลายอินทรีย์ที่ระเหยง่าย เช่น petroleum ether, diethyl ether, acetone เป็นต้น ไขมันในอาหารสัตว์ที่ได้จากการสกัดสารละลายอินทรีย์ ประกอบไปด้วยไขมันแท้ (true fat) และสารคล้ายไขมัน (fat like substances) เช่น wax, carotenoid, volatile acid, pigments ต่างๆ เป็นต้น สารที่ถูกสกัดได้มีทั้งพวกไขมันและไม่ใช่ไขมัน เรียกว่า crude fat หรือ ether extract

อุปกรณ์

1. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
2. ชุดวิเคราะห์ไขมัน + เครื่องทำน้ำเย็น (cooling)
3. กระดาษกรองเบอร์ 40 – 42 หรือกระดาษกรองน้ำตาล
4. ทิมเบิลกระดาษ (cellulose thimble) และ thimble support
5. Extraction flask หรือ Gress cup (extraction cup)
6. ตู้อบ (hot air oven)
7. โถดูดความชื้น (desiccator)
8. ถุงมือยาง
9. คีมปากคีบ (forceps) หรือ กรรไกรปากคีบ (tong)
10. ตัวอย่างอาหารที่บดละเอียด

สารเคมี

Petroleum ether จุดเดือด 35 - 60 °C

วิธีการ

1) ชั่งน้ำหนักตัวอย่าง 2 กรัม ในกระดาษกรอง ห่อให้แน่นและมิดชิด เพื่อป้องกันไม่ให้ตัวอย่างออกมาในระหว่างที่สกัดไขมัน นำไปอบที่อุณหภูมิ 100 °C นาน 2 ชั่วโมง ทำให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนัก

2) นำห่อตัวอย่างใส่ใน ทิมเบิลกระดาษ (cellulose thimble) และใส่ทิมเบิลกระดาษที่มีห่อตัวอย่างใส่ใน soxhelt tube

3) เติม Petroleum ether ใน Extraction flask ประมาณ 2/3 ของ flask

4) เมื่อเตรียมข้อ 2 และ 3 เรียบร้อยแล้ว ให้นำ soxhlet tube ต่อเข้ากับ condenser และ Extraction flask

5) เปิดเตาให้ความร้อนใช้ไฟเบอร์ 3 ให้จับเวลาเมื่อมีจุดเดือดขึ้นครั้งแรก แล้วปรับลงมาที่ไฟอ่อนเบอร์ 1.5 ทำการสกัดไขมัน ควบคุมให้มีการควบแน่นของสารเคมี 5 - 6 หยดต่อนาที เป็นเวลา 10 -16 ชั่วโมง

6) นำห่อตัวอย่างออกจากทิมเบิลกระดาษ แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 100 ºC เป็นเวลา 30 นาที หรือจนกว่าตัวอย่างจะแห้ง

7) ทำให้เย็นโดยโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนัก โดยน้ำหนักที่หายไปเป็นน้ำหนักของ ether extract หรือ crude fat

วิธีการคำนวณ

$$\% \text{ Ether extract} = \frac{(A - B)}{W} x100$$

A = น้ำหนักกระดาษกรอง + ตัวอย่างอาหาร

B = น้ำหนักกระดาษกรอง + ตัวอย่างอาหารหลังสกัดไขมัน

W = น้ำหนักตัวอย่าง

การวิเคราะห์หาปริมาณเยื่อใย
(Total Crude Fiber, CF)

หลักการ (ดัดแปลงตามวิธี AOAC (1990))

การวิเคราะห์หาปริมาณเยื่อใย คือ การหาปริมาณของคาร์โบไฮเดรตที่ร่างกายของสัตว์ไม่สามารถทำการย่อยได้ด้วยเอ็นไซม์ รวมทั้งสารพวกลิกนิน หลักการวิเคราะห์เยื่อใยทั้งหมดในอาหารนั้น คือ ทำให้สารที่ไม่ใช่พวกผนังเซลล์ของพืช อยู่ในรูปของสารละลายโดยย่อยอาหารด้วยสารละลายกรดเจือจาง (Sulfuric acid) โปรตีน แป้ง และน้ำตาลจะถูกย่อยสลาย และย่อยด้วยด่างเจือจาง (Potassium hydroxide หรือ Sodium hydroxide) จะทำการย่อยแป้งที่เหลือจากการย่อยด้วยกรด ดังนั้น เมื่อย่อยเอาสารอินทรีย์ต่างๆที่ถูกย่อยได้ออกไป ส่วนของสารอินทรีย์ที่เหลืออยู่และไม่ถูกย่อย คือ เยื่อใย (Crude Fiber)

1. การวิเคราะห์เยื่อใยด้วยเครื่อง Gerhardt Fiber (ใช้ถุงไนล่อนสาหรับหาเยื่อใย)

อุปกรณ์

1. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
2. เครื่องวิเคราะห์เยื่อใย
3. ขวดสาหรับใส่กรดและด่าง
4. ถ้วยกรองเยื่อใย (glass filtering crucible)
5. ตู้อบ (Hot air oven)
6. เตาเผา (Muffle furnace)
7. โถดูดความชื้น
8. ปั๊มสุญญากาศ (vacunm) และชุดสำหรับการกรองเยื่อใย
9. ถุงไนล่อนสำหรับหาเยื่อใย
10. ขวดน้ำกลั่น
11. บีกเกอร์สแตนเลส หรือ บีกเกอร์แก้ว ขนาด 500 - 1000 มิลลิลิตร
12. บีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร

สารเคมีและการเตรียมสารละลาย

1) Sulfuric acid 1.25 % (H_2SO_4)

- ตวง H2SO4 มา 7.03 มิลลิลิตร ละลายน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร

2) Sodium hydroxide (NaOH) หรือ Potassium hydroxide 1.25 %

- ชั่ง NaOH 12.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

3) Acetone

4) น้ำกลั่น

วิธีการ

1) ชั่งน้ำหนักตัวอย่างที่บดละเอียดแล้วใส่ลงไปในถุงไนล่อนสำหรับหาเยื่อใยประมาณ 1 กรัม จดบันทึกน้ำหนัก (W) (ถ้าตัวอย่างมีปริมาณไขมันสูงกว่า 5 เปอร์เซ็นต์ ให้ทำการสกัดไขมันออกจากตัวอย่างก่อนนำมาวิเคราะห์หาปริมาณเยื่อใย)

2) นำ casule ใส่เข้าไปในถุงตัวอย่าง แล้วนำไปใส่ใน glass space ในหม้อต้มตัวอย่าง

3) เปิดเครื่องทำความเย็น (ตั้งอุณหภูมิไว้แล้วประมาณ 10 – 15 ºC) เพื่อให้น้ำเย็นไหลเข้าเครื่อง

4) นำหม้อต้มตัวอย่างวางบนเตา (hot pate) ที่เครื่องวิเคราะห์เยื่อใย

5) เปิดเครื่องวิเคราะห์เยื่อใย เลือก mode Service แล้วให้เลือกโปรแกรม 3 วิเคราะห์ CF ทำการ calibrate เครื่อง (กรณีใช้เครื่องวิเคราะห์เยื่อใยหา CF ครั้งแรก ถ้าทำงานต่อเนื่องไม่จำเป็นต้อง calibrate ใหม่)

6) สิ่งที่ควรสำรวจก่อนให้เครื่องวิเคราะห์ทำงาน

a. สำรวจปริมาณน้ำกลั่นในถังขนาด 100 ลิตร (ถังใส่น้ำสำหรับล้างตัวอย่าง)

b. สำรวจถังเก็บของเสีย

c. สำรวจถังหรือขวดใส่ Sulfuric acid 1.25 % และ Sodium hydroxide 1.25 %

7) เมื่อสำรวจเรียบร้อยแล้ว ให้เครื่องทำงานตามโปรแกรมที่ตั้งไว้จนครบทุกขั้นตอน

8) ระหว่างที่เครื่องวิเคราะห์ทำงาน ให้นำถ้วยกรองเยื่อใยไปอบอุณหภูมิ 100 ºC นาน 1 ชั่วโมง ทำให้เย็นในโถดูดความชื้นประมาณ 30 นาที ชั่งน้ำหนักจดบันทึกน้ำหนัก

9) เมื่อเครื่องวิเคราะห์ทำงานตามโปรแกรมที่ตั้งไว้เสร็จสิ้นแล้ว ให้นำถุงไนล่อนที่ย่อยตัวอย่างมาล้างด้วยน้ำกลั่น โดยชะล้างตัวอย่างออกจากถุงลงไปในถ้วยกรองเยื่อใยจนหมดถุง ทำการล้างตัวอย่างโดยใช้ปั๊มสุญญากาศ (vacuum)

10) ล้างด้วยน้ำกลั่นต้มอุ่นๆและล้างด้วย Acetone ประมาณ 10 – 15 มิลลิลิตร อีก 1 ครั้ง (ระหว่างที่ล้างตัวอย่างด้วยน้ากลั่นและ Acetone ให้เปิดปั๊มสุญญากาศเพื่อทำการ suction ตัวอย่างไปด้วย)

11) นำถ้วยกรองเยื่อใยไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 105 ºC นาน 1 ชั่วโมง ทำให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนัก จดบันทึกน้ำหนัก (X)

12) นำถ้วยกรองเยื่อใยไปเผาต่อที่อุณหภูมิ 550 ºC นาน 2 ชั่วโมง หรือ 500 ºC นาน 3 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนัก จดบันทึกน้ำหนัก (Y)

วิธีการหาเปอร์เซ็นต์เยื่อใย

$$\text{เปอร์เซ็นต์เยื่อใย} = \frac{(Y - X)}{W} x100$$

X = น้ำหนักของถ้วยกรองเยื่อใยที่มีตัวอย่างหลังต้มด้วยเครื่องและอบที่อุณหภูมิ 105 ºC

Y = น้ำหนักของถ้วยกรองเยื่อใย ที่มีตัวอย่างหลังเผาที่อุณหภูมิ 500 -550 ºC

W = น้ำหนักตัวอย่าง

2. การวิเคราะห์เยื่อใยแบบ Manual

อุปกรณ์

1. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
2. เครื่องวิเคราะห์เยื่อใยแบบ manual
3. ผ้าลินิน หรือ คอตตอน
4. ถ้วยกรองเยื่อ (glass filtering crucible)
5. ตู้อบ (Hot air oven)
6. เตาเผา (Muffle furnace)
7. โถดูดความชื้น
8. ชุดสำหรับการชักชั่น
9. ปั๊มสุญญากาศ (vacuum) และชุดสำหรับการกรองเยื่อใย
10. บีกเกอร์ขนาด 600 มิลลิลิตร
11. บีกเกอร์สแตนเลส หรือ บีกเกอร์แก้ว ขนาด 500 - 1000 มิลลิลิตร
12. Buchner Funnel
13. กระดาษลิตมัส

สารเคมีและการเตรียมสารละลาย

1) Sulfuric acid 1.25 % (H_2SO_4)

- ตวง H2SO4 มา 7.03 มิลลิลิตร ละลายน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร

2) Sodium hydroxide (NaOH) หรือ Potassium hydroxide 1.25 %

- ชั่ง NaOH 12.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

3) Acetone

4) น้ำกลั่น

วิธีการ

1) ชั่งตัวอย่างที่ทำการสกัดไขมันออก ใส่ลงในบีกเกอร์ ขนาด 600 มิลลิลิตร จดบันทึกน้ำหนักที่แน่นอน (W) ถ้าอาหารมีเปอร์เซ็นต์แป้งสูงให้ใส่ Asbestos 1 กรัม

2) เติม Sulfuric acid 1.25 % 200 มิลลิลิตร ที่ต้มจนเดือด

3) นำไปต้ม (reflux) โดยเครื่องวิเคราะห์ให้เดือด 30 นาที

4) นำออกมากรองด้วย Buchner Funnel ที่มีผ้าลิกนินขึงอยู่ และต่อกับ Filtering Flask โดยอาศัยชุดการกรองเยื่อใยและปั๊มสุญญากาศ (vacuum) ช่วยในการกรองตัวอย่าง เทตัวอย่างและชะล้างตะกอนที่ติดอยู่กับบีกเกอร์ให้หมด และล้างตะกอนด้วยน้ำร้อนจนกว่ากรดซัลฟูริคออกหมด (ทดสอบด้วยกระดาษลิตมัส)

5) ถ่ายตะกอนลงในบีกเกอร์เดิม เติมด่าง Sodium hydroxide 1.25 % 200 มิลลิลิตร ที่ต้มจนเดือนแล้วรีบนำเข้าเครื่องวิเคราะห์หาปริมาณเยื่อใยและต้ม (reflux) ให้เดือดเป็นเวลา 30 นาที

6) นำตัวอย่างที่ได้ออกจากเครื่องย่อยแล้วกรองเช่นเดียวกันกับข้อ 4 แต่จะใช้ถ้วยกรองเยื่อใย (glass filtering crucible) แทน Buchner Funnel และผ้าลิกนิน ให้เทตัวอย่างและชะล้างตะกอนที่ติดอยู่กับบีกเกอร์ให้หมด และล้างตะกอนด้วยน้ำร้อนจนกว่าด่างจะหมด แล้วล้างด้วย Acetone 15 – 20 มิลลิลิตร

7) นำถ้วยกรองเยื่อใยไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 105 °C นาน 1 ชั่วโมง ทำให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนัก จดบันทึกน้าหนัก (X)

8) นำถ้วยกรองเยื่อใยไปเผาต่อที่อุณหภูมิ 550 °C นาน 2 ชั่วโมง หรือ 500 °c นาน 3 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนัก จดบันทึกน้ำหนัก (Y)

วิธีการคำนวณ

$$\text{เปอร์เซ็นต์เยื่อใย} = \frac{(Y - X)}{W} x100$$

X = น้ำหนักของถ้วยกรองเยื่อใย ที่มีตัวอย่างหลังต้มด้วยเครื่องและอบที่อุณหภูมิ 105 °C

Y = น้ำหนักของถ้วยกรองเยื่อใย ที่มีตัวอย่างหลังเผาที่อุณหภูมิ 500 -550 °C

W = น้ำหนักตัวอย่าง

การวิเคราะห์หาโปรตีน

หลักการ (วิธีวิเคราะห์ Kjeldahl Method)

ไนโตรเจนส่วนใหญ่ในอาหารสัตว์ คือ โปรตีน ซึ่งโปรตีนเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ โดยปกติจะมีปริมาณของไนโตรเจนอยู่ประมาณ 16 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นเมื่อวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในอาหารจึงทาได้โดยวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด แล้วคูณกับด้วยแฟคเตอร์ (6.25) ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของอาหาร จะได้เปอร์เซ็นต์โปรตีนในตัวอย่าง ใช้วิธีการ Kjeldahl nitrogen analysis เป็นวิธีทั่วไปที่ใช้วิเคราะห์หาไนโตรเจนทั้งหมดที่มีอยู่ในอาหารมี 3 ขั้นตอน ดังนี้

1. การย่อย เป็นการเปลี่ยนแปลงสารไนโตรเจนให้อยู่ในรูปของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) โดยใช้กรดกำมะถันเข้มข้น ตัวอย่างถูกย่อยด้วยกำมะถันที่อุณหภูมิสูง กรดกำมะถันจะทำหน้าที่เป็นตัวออกซิไดซ์ (oxidizing agent) ปฏิกิริยาจะถูกเร่งโดยการเติม Catalyst เช่น Copper solfate และเติม Potassium sulfate เพื่อเพิ่มอุณหภูมิของปฏิกิริยา หลังการย่อยเสร็จแล้วไนโตรเจนจะถูกจับอยู่ในรูปของ $(NH_4)_2SO_4$ ส่วน Carbon dioxide น้ำ และ Sulfer dioxide จะเกิดจากการระเหยออกไป

2. การกลั่น เป็นการกลั่นเพื่อไล่แอมโมเนียออกไปโดยใช้ Sodium hydroxide (NaOH) ที่เข้มข้นมากพอลงในแอมโมเนียมซัลเฟตและให้ความร้อน ก๊าซแอมโมเนียม (NH_3) ถูกปล่อยออกมาในระหว่างการกลั่น ซึ่ง NH_3 จะถูกจับด้วยสารละลาย Boric acid

3. การไตเตรท เพื่อหาปริมาณสารละลาย Sulfuric acid ที่ทำปฏิกิริยากับแอมโมเนีย

อุปกรณ์

1. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
2. ชุดย่อยไนโตรเจน (เตาย่อยตัวอย่างพร้อมเครื่องดูดไอกรด) (degrestion unit)
3. เครื่องกลั่นไนโตรเจน (Distillation unit)
4. ชุดไตเตรต (Burette, Clamp holder, Stand)
5. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร
6. กระบอกตวง (Cylinder) ขนาด 50 มิลลิลิตร และ 25 มิลลิลิตร
7. ขวดน้ำกลั่น
8. บีกเกอร์ ขนาด 250 มิลลิลิตร
9. หลอดย่อยตัวอย่าง
10. ช้อนตักสาร

11. ถุงมือกันความร้อน

12. ปิเปต (Pipette)

สารเคมี

1) Catalyst mixture(ประกอบด้วย Potassium sulfate 100 กรัม+Copper sulfate 7 กรัม)

2) Sulfuric acid (H_2SO_4) conc.

3) สารละลาย Sodium hydroxide (NaOH) 40 %

4) สารละลาย Sodium hydroxide (NaOH) 20 %

5) สารละลายมาตรฐาน Sulfuric acid (H_2SO_4) 0.1 N

6) สารละลาย Boric acid 4 %

7) Mix indicator

8) น้ำกลั่น

การเตรียมสารละลาย

1) การเตรียม Mix indicator ชั่งเมทธิลเรด (methyl red) 0.2 กรัม และโบรโมครีซอลกรีน (bromocresol green) 0.1 กรัม ละลายในเอทิลแอลกอฮอล์เข้มข้น 96 % (96% ethyl alcohol) 100 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชาและเก็บในที่เย็นไม่ถูกแสง

2) สารละลาย Boric acid 4 % ชั่ง Boric acid 40 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นร้อน รอจนสารละลายเย็น ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร

3) สารละลาย Sodium hydroxide (NaOH) 40 % ชั่ง Sodium hydroxide 400 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร

4) สารละลาย Sodium hydroxide (NaOH) 20 % ชั่ง Sodium hydroxide 200 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร

5) สารละลายมาตรฐาน Sulfuric acid (H2SO4) 0.1 N ตวง Sulfuric acid เข้มข้น 95–98 % 2.25 มิลลิลิตร ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร

วิธีการ

1. การย่อยตัวอย่าง

1) ชั่งตัวอย่างอาหารประมาณ 0.5 -1.5 กรัม จดบันทึกน้ำหนักที่แน่นอน แล้วใส่ลงไปในหลอดย่อยตัวอย่าง (ในกรณีที่เป็นตัวอย่างที่มีความชื้นสูงจะชั่งลงบนกระดาษกรองปราศจาก

ไนโตรเจน แล้วห่อตัวอย่างใส่ลงไปในหลอดย่อยและพับกระดาษกรองใส่ลงในหลอดย่อยเพื่อทา Blank)

2) เติมสารเร่งปฏิกิริยา (catalyst mixture) ประมาณ 7 – 10 กรัม และเติมด้วยกรดซัลฟูริคเข้มข้นลงไปในหลอดย่อยประมาณ 15 – 20 มิลิลิตร (ขึ้นอยู่กับตัวอย่างที่ใช้) ทำในตู้ดูดควาน สำหรับการเติมกรดให้เอียงหลอดและค่อยๆ รินกรดลงด้านข้างโดยรอบเพื่อให้กรดชะล้างติดตัวอย่างที่ติดอยู่ทางด้านล่างออกให้หมด

3) สำหรับเครื่องดักจับไอกรด (scrubber unit) คือ ขวดสารละลาย 20% NaOH และขวดน้ำกลั่น ควรเติมใส่ลงไปในขวดก่อนใช้งานเครื่อง (สารละลาย 20% NaOH จะใช้ย่อยตัวอย่างได้ประมาณ 3 – 4 ครั้ง) เมื่อสิ้นสุดการทำงาน ให้นำไปเททิ้งลงในถังของเสียที่เตรียมไว้

4) นำหลอดย่อยที่บรรจุตัวอย่างใส่ลงในภาชนะบรรจุหลอด (rack) แล้วนำไปตั้งในหลุมหรือแท่นความร้อนของเครื่องย่อย และเปิดตู้ดูดควันให้ทำงาน เพื่อความปลอดภัยต่อผู้ปฏิบัติ

5) ปิดปากหลอดย่อยด้วย exhaust manifold เปิดระบบน้ำหล่อเย็น (เปิดก๊อกน้ำ) และเครื่องดักจับไอกรด (scrubber unit) เปิดสวิทซ์เครื่องย่อย (digestion unit) ที่อุณหภูมิ 350 – 400 °C ใช้เวลาประมาณ
1.5 – 2 ชั่วโมง หรือตัวอย่างย่อยสมบูรณ์ สังเกตได้จากสารละลายที่ได้เป็นสีเขียวอมฟ้าใส

6) ปิดเตาย่อยยก rack ขึ้นพักทิ้งไว้ให้เย็น ยังไม่ต้องเอา exhaust manifold ออกจากปากหลอด รอจนกว่าไอกรดหมด และหลอดย่อยเย็นลง อาจจะใช้เวลาประมาณ 15 – 20 นาที

2. การกลั่น

1) เปิดเครื่องทำความเย็น (กดปุ่มสีเขียว) จนได้อุณหภูมิที่ตั้งไว้คือ 15 °C และเปิดปั๊ม (กดปุ่มสีส้ม)

2) เปิดเครื่องกลั่นไนโตรเจน (Distillation unit) กดสวิทซ์สีดำด้านหลังเครื่อง และกดปุ่มสีเงินด้านหน้าเครื่อง

3) นำสายสาหรับดูดสารละลาย 40% NaOH ใส่ลงในขวดสารละลาย และเช็คถังน้ำกลั่นสำหรับการกลั่นให้อยู่ในระดับมากกว่าครึ่งถัง

4) ตวงสารละลาย 4% Boric acid ลงในขวดรูปชมพู่ 20 – 25 มิลลิลิตร หยด Mix indicator ประมาณ 2 – 3 หยด จะได้กลายเป็นสีชมพู นำขวดรูปชมพู่ตั้งบน platform ของเครื่องกลั่น เพื่อรองแอมโมเนียที่ได้จากการกลั่น ให้ปลายของคอนเดนเซอร์จุ่มอยู่ระดับต่ากว่าสารละลายกรดบอริค

5) ใส่หลอดตัวอย่างที่ผ่านการกรองย่อยแล้วเข้ากับเครื่องกลั่น

6) เลือกโปรแกรมกลั่น 06 FEED เมื่อเติมด่าง (40% NaOH) มากเกินพอ สารละลายที่ได้จะมีสีน้ำตาลหรือดำ ถ้าไม่เป็นสีน้ำตาลหรือดำจะต้องเติมด่างเพิ่ม (5 – 10 มิลลิลิตร) ก่อนการกลั่น

7) เมื่อกลั่นครบตามเวลาที่กำหนด เครื่องจะหยุดทางาน นำขวดรูปชมพู่และหลอดย่อยออกจากเครื่องกลั่น

8) นำขวดรูปชมพู่ที่ดักจับแอมโมเนียที่ถูกกลั่นออกไปไตเตรทหาไนโตรเจนด้วยสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก

3. ไตเตรท

นำสารละลายที่กลั่นได้ไปไตเตรทกับสารละลายมาตรฐานกรดเกลือ หรือกรดซัลฟูริก 0.1 N จนได้จุดยุติ (จะได้สารละลายในขวดรูปชมพู่เปลี่ยนสีเป็นสีเดิม คือ สีชมพูอ่อน – เข้ม)

หมายเหตุ : กรณีที่ใช้งานเสร็จแล้วหรือไม่ทำงานต่อเนื่องติดกันหลายวันให้ทำการล้างเครื่องกลั่น

วิธีการคำนวณ

$$\% \text{ ไนโตรเจน} = \frac{14.01x(V_1 - V_2)xN}{Wx10}$$

14.01 = น้ำหนักมวลโมเลกุลของไนโตรเจน

V1 = ปริมาตรของกรดที่ใช้ในการไตเตรทตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

V2 = ปริมาตรของกรดที่ใช้ไตเตรท Blank (มิลลิลิตร)

N = ความเข้มข้นของกรดที่ใช้ไตเตรท (N)

10 = ค่าคงที่ที่แปลงจากหน่วยกรัมเป็น % V_2

เปอร์เซ็นต์ Crude Protein = เปอร์เซ็นต์ไนโตรเจน × F

F = ค่าคงที่ในการเปลี่ยนค่าไนโตรเจนเป็นโปรตีน

F = 6.25 สำหรับตัวอย่างอาหาร อาหารสัตว์ หรือตัวอย่างอาหารอื่นๆที่ไม่ระบุเฉพาะ

F = 5.17 สำหรับกากถั่วเหลือง

วิธีการเตรียมสารละลายในการทำ Gelatin Zymography

การเตรียมเจล Gelatin Zymography

Separating gel 8%, 15 ml

1.) DDW	7150 µl
2.) 1.5 m. Tris-HCL (PH 8.8)	3800 µl
3.) 30% Acrylamide	3000 µl
4.) 1% Gelatin	750 µl
5.) 10% SDS	150 µl
6.) 10% APS	150 µl
7.) Temed	9 µl

Stacking gel 3%, 5 ml

1.) DDW	3560 µl
2.) 0.5 m. Tris-HCL (PH 6.8)	830 µl
3.) 30% Acrylamide	470 µl
4.) 10% SDS	50 µl
5.) 10% APS	50 µl
6.) Temed	5 µl

การเตรียมสารละลาย

เตรียม Running Buffer

1.) Glycine	14.4 g
2.) Tris	3 g
3.) น้ำกลั่น	990 ml
4.) 10% SDS	10 ml

เตรียม 1% Gelatin

1.) Gelatin	0.2 g
2.) น้ำกลั่น	20 ml

เตรียม Washing renaturation 2.5% v/v Triton X-100

1.) Triton X-100	25 ml
2.) น้ำกลั่น	975 ml

เตรียม Development Buffer 10X

1.) 50 mM Tris	12.1 g
2.) 0.2 M NaCl	117 g
3.) 5 mM $CaCl_2$	7.4 g
4.) Brig 35	6.7 ml
5.) น้ำกลั่น	1 L

เตรียม Incubation Buffer

1.) 10X Zymogram Development Buffer	40 ml
2.) น้ำกลั่น	400 ml

เตรียม Coomasie Gel Stain 1 Liter

1.) Coomassie Blue R-250	5 g
2.) methanol	500 ml
3.) น้ำกลั่น	400 ml
4.) glacial acetic acid	100 ml

เตรียม Coomasie Gel Destain 1 Liter

1.) methanol	100 ml
2.) น้ำกลั่น	800 ml
3.) glacial acetic acid	100 ml

เตรียม 10% SDS

1.) Sodiom dodecyl sulfat	10 g
2.) น้ำกลั่น	100 ml

เตรียม 10% APS

1.) Ammonium persulfate	1 g
1.) น้ำกลั่น	10 ml

ประวัติผู้วิจัย