บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

ในการศึกษาครั้งนี้มีรายละเอียดเกี่ยวกับอุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย ดังนี้

อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง ประกอบด้วย

1.1 วัสดุ

1.1.1 เครื่องแมกเนติกสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (Magnetic Spectrophotometer)

1.1.2 เครื่องเหวี่ยงตกตะกอนควบคุมอุณหภูมิ (Centrifuge)

1.1.3 ตู้แช่แข็ง –80 องศาเซลเซียส (Refrigerator)

1.1.4 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH Meter)

1.1.5 ออโตปิเปต (Autopipette)

1.1.6 เครื่องบดเนื้อ (Glass Homogenizer)

1.1.7 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath)

1.1.8 Eppendorf Tube

1.1.9 ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (Incubator)

1.2 สารเคมี

1.2.1 Tris-HCl ($NH_2C(CH_2OH)_3$ HCl)

1.2.2 Sodiumchloride (NaCl)

1.2.3 Nα-Benzoyl-DL-Arginine 4-Nitroanilide Hydrochloride ($C_{19}H_{22}N_6O_4$ · HCl)

1.2.4 N, N-Dimethylformamide ($HCON(CH_3)_2$)

1.2.5 N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-p-Nitroanilide ($C_{30}H_{36}N_6O_9$)

1.2.6 p-Nitroaniline ($O_2NC_6H_4NH_2$)

1.2.7 Sodium Phosphate Monobasic ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$)

1.2.8 Sodium Phosphate Dibasic ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$)

1.2.9 Ethanol (CH_3CH_2OH)

1.2.10 Chloramphenicol ($Cl_2CHCONHCH(CH_2OH)CH(OH)C_6H_4NO_2$)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

1.2.11 D,L Alanine ($CH_3CH(NH_2)COOH$)

1.2.12 TNBS (Trinitrobenzene Sulphonic Acid) ($C_6H_3N_3O_9S$)

วิธีการทดลอง

ในการที่จะหาวัตถุดิบที่เหมาะสมที่จะนำมาทดแทนโปรตีนแทนปลาป่นนั้นมีการศึกษาโดยในเบื้องต้นมีการเตรียมตัวอย่างปลากะพงขาวโดยการเลี้ยงไว้ในถังทดลอง ต่อจากนั้นก็นำตัวอย่างปลากะพงขาวที่มีอายุ 20 และ 30 วัน และที่อายุ 2 และ 3 เดือน มาผ่าตัดเพื่อเอากระเพาะอาหารและลำไส้ออกมาเพื่อที่จะนำไปสกัดเอนไซม์ย่อยอาหาร (Crude Digestive Enzyme) เมื่อได้เอนไซม์ย่อยอาหารเสร็จแล้ว จะนำเอนไซม์ย่อยอาหารไปวัดหาค่าแอคติวิตีของทริปซินและไคโมทริปซิน ที่ระดับอุณหภูมิต่างกันเพื่อที่จะได้ทราบอุณหภูมิที่เหมาะสมในการที่จะวัดประสิทธิภาพการย่อยอาหารในหลอดทดลอง ในการวัดประสิทธิภาพย่อยอาหารในหลอดทดลองได้ทำการสกัดเอนไซม์ย่อยอาหารจากปลากะพงขาวที่มีอายุ 7 เดือน แล้วนำมาหาประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนโดยใช้วัตถุดิบที่มีแหล่งโปรตีนจากชนิดต่าง ๆ กัน เมื่อได้แหล่งโปรตีนที่เหมาะสมในการย่อยอาหารในหลอดทดลองแล้วนำวัตถุดิบชนิดนั้นไปผสมลงในอาหารเพื่อทดลองเลี้ยงปลากะพงขาวในเปอร์เซ็นต์ที่แตกต่างกันเพื่อที่จะได้ทราบว่าสัดส่วนของวัตถุดิบที่ใช้สามารถนำมาผสมลงในอาหารเลี้ยงปลากะพงขาวกี่เปอร์เซ็นต์จึงจะมีความเหมาะสมในการนำวัตถุดิบมาทดแทนปลาป่นในการเลี้ยงปลากะพงขาวต่อไป ซึ่งขั้นตอนในการทดลองดังกล่าวสามารถแบ่งออกดังต่อไปนี้

1. การสกัดเอนไซม์ย่อยอาหารจากปลากะพงขาว

1.1 การรวบรวมกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กของปลากะพงขาว

นำปลากะพงขาวที่มีอายุตั้งแต่ 20 และ 30 วันและที่อายุ 2 และ 3 เดือนโดยเลี้ยงที่ความเค็ม 28 ส่วนในพัน จากโรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ภาควิชาวาริชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา มาสกัดเอาเอนไซม์ย่อยอาหารออกมาโดยปลาตัวเล็ก (อายุ 20 และ 30 วัน) ให้นำมาบดทั้งตัว ส่วนปลาตัวโตขึ้นมาก็นำมาทำการผ่าตัดเอากระเพาะอาหารและลำไส้เล็กออกมา โดยทำการผ่าหลังจากการให้อาหารไปได้ 2 ชั่วโมงเพราะบริเวณนี้จะมีการหลั่งและมีการทำงานของเอนไซม์ย่อยอาหาร หลังจากนั้นนำมาสกัดเอาเอนไซม์ย่อยอาหารออกมา ในกรณีที่ยังไม่สกัดเอาเอนไซม์ออกมาก็ให้นำกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ –80 องศาเซลเซียสเพื่อที่จะรักษาสภาพของเอนไซม์ย่อยอาหารก่อนที่จะนำไปสกัดหาเอนไซม์อีกต่อไป (Rungruangsak-Torrisen et al., 2002)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

1.2 การสกัดเอนไซม์ย่อยอาหาร

1.2.1 นำกระเพาะอาหารและลำไส้ของปลากะพงขาวที่ทำการผ่าไว้แล้วมาบดใน Glass Homogenizer ด้วย 50 mM Tris Buffer pH 8.0 ที่มี 200 mM NaCl ในอัตราส่วน 1: 3 (น้ำหนัก/ ปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.2.2 เมื่อทำการบดละเอียดแล้วให้นำไปเข้าเครื่องเหวี่ยงที่ 15000 x g เป็นเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.2.3 ดูดเอาส่วนที่เป็นของเหลวออกมาโดยระวังไม่ให้ดูดเอาส่วนที่เป็นไขมันที่ลอยอยู่ข้างบนออกไปด้วย

1.2.4 นำเอนไซม์สกัดจากข้อ 1.2.3 ไปทำการไดอะไลซิส (Dialysis) ใน Phosphate Buffer pH 7.0 ด้วยการใช้ถุงไดอะไลซิสขนาด 10 kDa

1.2.5 นำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ –80 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำไปใช้ในการหาแอคติวิตีของทริปซินและไคโมทริปซิน และประสิทธิภาพการย่อยวัตถุดิบในหลอดทดลองต่อไป (Rungruangsak-Torrisen et al., 2002)

2. การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยอาหาร

2.1 การวัดแอคติวิตีของทริปซิน

ในการวัดแอคติวิตีของทริปซินนั้นจะวัดจากการเกิดปฏิกิริยาระหว่างทริปซินสับสเตรต 2000 µL (1.25 mM Benzoyl-L-Arginine-p-Nitroanilide ละลายใน 0.2 M Tris-HCl Buffer pH 8.4 โดยมี 5% Dimethylformamind) และเอนไซม์ที่สกัดไว้แล้ว 20 µL ทริปซินแอคติวิตี (แสดงผลเป็น µmol p-Nitroaniline h^{-1} mg Protein $^{-1}$) โดยพิจารณาจากอัตราของการผลิตของ p-Nitroaniline ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตรต่อความเข้มข้นของโปรตีนในเอนไซม์ย่อยอาหาร โดยความเข้มข้นของโปรตีนในเอนไซม์ย่อยอาหารที่สกัดจากทางเดินอาหารของปลากะพงขาวใช้วิธี Bio-Rad DC (Detergent-Compatible) Protein Assay (Rungruangsak-Torrisen et al., 2002) ในการวัดแอคติวิตีของทริปซินจะวัดแอคติวิตีที่อุณหภูมิ 30-70 องศาเซลเซียส โดยมีระยะห่างช่วงละ 5 องศา เพื่อที่จะหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิดแอคติวิตีของทริปซินโดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

2.2 การวัดแอคติวิตีของไคโมทริปซิน

แอคติวิตีของไคโมทริปซินสามารถศึกษาได้โดยปฏิกิริยาระหว่างสับสเตรต 2000 µL (0.1 mM N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-p-Nitroanilide ใน 0.2 M Tris-Buffer pH 8.4 โดยมี 5% Dimethylformamind) และเอนไซม์ที่สกัดไว้แล้ว 20 µL ทริปซินแอคติวิตี (แสดงผลเป็น µmol

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

p-Nitroaniline h^{-1} mg Protein $^{-1}$) โดยพิจารณาจากอัตราของการผลิตของ p-Nitroaniline ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตรต่อความเข้มข้นของโปรตีนในเอนไซม์ย่อยอาหาร ส่วนความเข้มข้นของโปรตีนในเอนไซม์ย่อยอาหารทำโดยวิธีเดียวกับทริปซิน (Rungruangsak-Torrisen et al., 2002) ในการวัดแอคติวิตีของไคโมทริปซินจะวัดแอคติวิตีที่อุณหภูมิ 20 - 60 องศาเซลเซียส โดยมีระยะห่างช่วงละ 5 องศา เพื่อที่จะหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิดแอคติวิตีของไคโมทริปซิน โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

2.3 การวัดปริมาณโปรตีนในเอนไซม์ย่อยอาหารโดยวิธี Bio-Rad DC Assay

2.3.1 นำเอนไซม์ที่สกัดจากกระเพาะและลำไส้มาเจือจางในอัตราส่วน 1/ 50 ด้วย 50 mM Tris-HCl Buffer, pH 8.0 โดยมี 200 mM NaCl ละลายอยู่ด้วย

2.3.2 ปิเปตสารละลายจากข้อ 2.3.1 มา 50 µL มาผสมลงใน 250 µL Reagent A เขย่าให้เข้ากัน

2.3.3 นำสารละลายจากข้อ 2.3.2 มาผสมลงใน 2 ml Reagent B เขย่าให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที

2.3.4 นำสารละลายจากข้อ 2.3.3 ไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร แล้วนำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของโปรตีนโดยใช้ BSA เป็นกราฟมาตรฐานโดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3. ประสิทธิภาพการย่อยอาหารในหลอดทดลอง

3.1 การหาวัตถุดิบอาหารสัตว์ที่เหมาะสมในการทดแทนปลาป่น

เพื่อที่จะทราบว่าแหล่งวัตถุดิบที่เป็นโปรตีนชนิดใดจะถูกย่อยได้ดีนั้นจะต้องมีการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยในหลอดทดลอง ในการทดลองการหาประสิทธิภาพการย่อยในหลอดทดลองนั้นจะทำการทดลองโดยนำวัตถุดิบอาหารสัตว์มาย่อยด้วยเอนไซม์สกัดจากกระเพาะและลำไส้ของปลากะพงขาวที่อุณหภูมิห้อง โดยวัตถุดิบที่จะนำมาทดลองย่อยคือปลาป่น, เนื้อป่น, เนื้อและกระดูกป่น, เลือดป่น, ถั่วเหลืองป่น และถั่วลิสงป่น

3.1.1 นำตัวอย่างวัตถุดิบมา 20 มิลลิกรัมมาผสมกับ 50 mM Phosphate Buffer (pH 8.2) ปริมาตร 40 มิลลิลิตรและ 0.2 มิลลิลิตรของคลอแรมฟีนิคอล (0.5 w/ v % ใน 96 % Ethanol) ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร

3.1.2 เขย่าสารที่ได้จากข้อ 3.1.1 เบา ๆ เป็นเวลา 22 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส โดยใช้เครื่อง Shaking Water Bath

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3.1.3 ก่อนที่จะทำการย่อยวัตถุดิบอาหารสัตว์ในหลอดทดลองให้ดูดสารผสมวัตถุดิบอาหารสัตว์จากข้อ 3.1.2 ออกมา 0.5 มิลลิลิตรเพื่อที่จะทำเป็นชุดควบคุมมาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาทีแล้วนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสเพื่อเก็บไว้รอการวิเคราะห์กลุ่มอะมิโนอิสระต่อไป

3.1.4 นำส่วนสารผสมวัตถุดิบอาหารสัตว์ที่เหลือจากข้อ 3.1.3 ทั้งหมดมาเติมเอนไซม์ย่อยอาหารที่สกัดออกมาจากกระเพาะและลำไส้ของปลากะพงขาวปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร

3.1.5 นำสารที่ได้จากข้อ 3.1.4 ไปเขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง (25 °C) แล้วนำมาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาทีแล้วนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสเพื่อเก็บไว้รอการวิเคราะห์กลุ่มอะมิโนอิสระต่อไป (Rungruangsak-Torrisen et al., 2002) โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.2 การทดสอบประสิทธิภาพการย่อยอาหารเม็ดที่มีการทดแทนปลาป่น

เมื่อได้วัตถุดิบอาหารสัตว์ที่เหมาะสมแล้ว นำมาทดลองทำสูตรอาหารทดแทนปลาป่น โดยอาหารที่เป็นชุดควบคุม (Control Diet) จะเป็นอาหารที่ใช้ปลาป่นเป็นวัตถุดิบหลัก ส่วนอาหารที่จะทำการทดลองจะมีการทดแทนปลาป่นด้วยวัตถุดิบอาหารสัตว์ที่เหมาะสมโดยมีการทดแทนปลาป่นในอัตราส่วน 30, 45 และ 60 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนของการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยอาหารในหลอดทดลองให้กระทำเหมือนข้อ 2.3.1 ดังนี้

3.2.1 นำสูตรอาหารจำนวน 3 สูตรที่มีการทดแทนปลาป่นและชุดควบคุม (ตารางที่ 3) ในแต่ละอัตราส่วนมา 20 มิลลิกรัมมาผสมกับ 50 mM Phosphate Buffer (pH 8.2) ปริมาตร 40 มิลลิลิตรและ 0.2 มิลลิลิตรของคลอแรมฟินิคอล (0.5 w/ v % ใน 96 % Ethanol) ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร

3.2.2 เขย่าสารที่ได้จากข้อ 2.3.2.1 เบา ๆ เป็นเวลา 22 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส โดยใช้เครื่อง Shaking Water Bath

3.2.3 ก่อนที่จะทำการย่อยสูตรอาหารที่มีการทดแทนปลาป่นในหลอดทดลองให้ดูดสารผสมอาหารที่มีการทดแทนปลาป่นจากข้อ 3.2.2 ออกมา 0.5 มิลลิลิตรเพื่อที่จะทำเป็นชุดควบคุมมาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาทีแล้วนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อเก็บไว้รอการวิเคราะห์กลุ่มอะมิโนอิสระต่อไป

3.2.4 นำส่วนสารผสมสูตรอาหารที่มีการทดแทนปลาป่นที่เหลือเติมเอนไซม์ย่อยอาหารที่สกัดออกมาจากกระเพาะและลำไส้ของปลากะพงขาวปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3.2.5 นำสารที่ได้จากข้อ 3.2.4 ไปเขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้องแล้วนำมาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาทีแล้วนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสเพื่อเก็บไว้รอการวิเคราะห์กลุ่มอะมิโนอิสระต่อไป (Rungruangsak-Torrisen et al., 2002) โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

4. การวัดกลุ่มอะมิโนอิสระ

ผลิตผลของกลุ่มอะมิโนอิสระสามารถทำได้โดยวิธีการใช้ TNBS (Trinizobenzene Sulphonic Acid)

4.1 นำ 50 mM Phosphate Buffer (pH 8.2) ปริมาตร 2,000 µL มาผสมกับสารตัวอย่างที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์สกัดและหยุดปฏิกิริยาปริมาตร 200 µL ในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร

4.2 เติม 0.1 % TNBS ใน 50 mM Phosphate Buffer (pH 8.2) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

4.3 เมื่อผสมกันเสร็จแล้วให้นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมงโดยทำในที่ที่ไม่มีแสงสว่าง

4.4 หยุดปฏิกิริยาโดยการเติม 1 N HCl ปริมาตร 1,000 µL และนำมาทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

4.5 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความเข้มแสง 420 นาโนเมตร โดยนำ D, L Alanine มาทำเป็นกราฟมาตรฐาน (Rungruangsak-Torrisen et al., 2002) (ดูภาคผนวก ข ภาพที่ 11) โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

การจัดเตรียมวัตถุดิบ

1. จัดซื้อปลาป่น แป้งมันสำปะหลัง หัวกุ้งป่น หวีดกลูเท่น (Wheat Gluten) แป้งสาลี แป้งข้าวจ้าว น้ำมันปลาและวิตามินแร่ธาตุรวมจากจากร้านท้ายตลาดการเกษตร ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี

2. กากถั่วเหลืองสกัดน้ำมัน กากถั่วลิสงป่น เลือดป่น เนื้อและกระดูกป่น ที่ผ่านการบดเรียบร้อยแล้ว ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัทกรุงเทพโปรดิวซ์ จำกัด (มหาชน) เขตบางรัก กรุงเทพมหานคร

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สูตรอาหารที่ใช้ในการทดลองการประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนในหลอดทดลอง

เมื่อทราบวัตถุดิบอาหารที่เหมาะสมที่สามารถนำมาใช้ทดแทนปลาป่น ก็นำมาทดแทนปลาป่นโดยไม่ได้อิงปริมาณโปรตีนลงในสูตรอาหารในปริมาณ 30, 45 และ 60 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับโดยใช้ปลาป่นเป็นชุดควบคุมดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ส่วนประกอบของสูตรอาหารต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดลอง

วัตถุดิบอาหาร	ปริมาณของวัตถุดิบในสูตรอาหาร (%)			
	ชุดควบคุม	ทดแทนปลาป่น 30 %	ทดแทนปลาป่น 45 %	ทดแทนปลาป่น 60 %
-ปลาป่น	40	28	22	16
-วัตถุดิบทดแทนปลาป่น	-	12	18	24
-หัวกุ้งป่น	10	10	10	10
-หวีดกลูเท่น	8	8	8	8
-แป้งสาลี	16	16	16	16
-แป้งข้าวข้าว	13	13	13	13
-น้ำมันปลา	8	8	8	8
-วิตามิน + แร่ธาตุรวม	5	5	5	5

เมื่อทดลองได้สูตรอาหารที่มีการทดแทนปลาป่นที่เหมาะสมแล้ว ก็สามารถนำไปใช้เป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเลี้ยงปลากะพงขาว เพื่อให้มีความคุ้มค่าทางเศรษฐกิจต่อไป

การวิเคราะห์ทางสถิติ

นำข้อมูลของการวัดแอคติวิตีของทริปซินและไคโมทริปซินของปลากะพงขาวมาทำการทดสอบความแตกต่างระหว่างการทดลองด้วย Two-Way Analysis of Variance (ANOVA) เมื่อมีความแตกต่างระหว่างกลุ่มจึงนำไปวิเคราะห์หาความแตกต่างระหว่างการทำลองด้วย Duncan's Multiple Range Test โดยใช้โปรแกรม SPSS ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University