นิพนธ์ต้นฉบับ

ผลของเอนไซม์ไฟเตสต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการใช้ฟอสฟอรัสจากวัตถุดิบพืชในปลาดุกพันธุ์ผสม [*Clarias macrocephalus* (Günther) × *Clarias gariepinus* (Burchell)]

วุฒิพร พรหมขุนทอง[1] อัจฉริยา มูสโกภาศ[2] และ ดุสิต นาคะชาต[3]

Abstract

Phromkunthong, W., Musakopat, A. and Nakachart, D.

Effects of phytase on enhancement of phosphorus utilization from plant materials in hybrid catfish [*Clarias macrocephalus* (Günther) × *Clarias gariepinus* (Burchell)]

Songklanakarin J. Sci. Technol., 2005, 27(Suppl. 1) : 171-185

Hybrid catfish of initial weight 5.57-5.72 g were studied in 235-l glass tanks filled with 180 l water and closed-recirculation system with 0.8 l/m flow rate was attached. Complete randomized design was employed in which there were three replications (20 fingerlings each) in each of nine treatments. The experimental period was 10 weeks. Formula 1 feed was the control in which fishmeal and soybean meal were used as protein source and was nutritionally suitable for catfish. In formulae 2-6 feeds, only plant materials were used as feed components and sprayed phytase was applied at 0, 250, 500, 750 and 1,000 unit/kg feed. For formula 7-9 feeds, phosphorus from dicalcium phosphate (DCP) at 0.1, 0.2 and 0.3% was supplemented. The results showed that the supplementation of 500 unit/kg feed as well as of 0.2% phosphorus were the most effective in improving the weight gain, specific growth rate and feed efficiency (FCR, PER and ANPU). The supplementation of phytase as well as of DCP elevated the phosphorus content in the bone as well as in the whole body while the blood parameters were not markedly affected.

Key words : phytase, inorganic phosphate, dicalcium phosphate, phosphorus, hybrid catfish, *Clarias macrocephalus* (Günther) × *Clarias gariepinus* (Burchell)

Department of Aquatic Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112 Thailand

[1]Dr. rer. nat. (Aquatic Animal Nutrition) รองศาสตราจารย์ [2]วท.ม. (วาริชศาสตร์) [3]กศ.บ.(ชีววิทยา) ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112

Corresponding e-mail : yh27394@yahoo.com

รับต้นฉบับ 26 มีนาคม 2547 รับลงพิมพ์ 21 มิถุนายน 2547

บทคัดย่อ

วุฒิพร พรหมขุนทอง อัจฉริยา มูสโกภาศ และ ดุสิต นาคะชาต

ผลของเอนไซม์ไฟเตสต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการใช้ฟอสฟอรัสจากวัตถุดิบพืชในปลาดุกพันธุ์ผสม [(*Clarias macrocephalus* × (*Clarias gariepinus* (Burchell)]

ว.สงขลานครินทร์ วทท. 2548 27(ฉบับพิเศษ 1) : 171-185

ศึกษาผลของเอนไซม์ไฟเตสต่อการใช้ฟอสฟอรัสจากวัตถุดิบพืชในปลาดุกพันธุ์ผสม โดยทำการทดลองในตู้กระจกความจุน้ำ 235 ลิตร ระบบน้ำเป็นแบบไหลเวียนแบบปิด มีอัตราการไหลของน้ำ 0.8 ลิตร/นาที วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด แบ่งเป็น 9 ชุดการทดลอง ๆ ละ 3 ซ้ำ ใช้ปลาที่มีน้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้น 5.57-5.72 กรัม จำนวน 20 ตัว/ซ้ำ อาหารสูตรที่ 1 เป็นชุดควบคุมที่มีปลาป่นและกากถั่วเหลืองเป็นแหล่งโปรตีน อาหารสูตรที่ 2-6 เป็นอาหารที่ใช้วัตถุดิบจากพืชทั้งหมด โดยเสริมเอนไซม์ไฟเตสในระดับ 0, 250, 500, 750 และ 1,000 ยูนิต/อาหาร 1 กก. อาหารสูตรที่ 7-9 เสริมฟอสฟอรัสในรูปไดแคลเซียมฟอสเฟต (dicalcium phosphate, DCP) 0.1%, 0.2% และ 0.3% ตามลำดับ หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 10 สัปดาห์ พบว่า การเสริมไฟเตส 500 ยูนิต/อาหาร 1 กก. ทำให้น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ และประสิทธิภาพการใช้อาหาร (อัตราการเปลี่ยนอาหารเนื้อ และประสิทธิภาพการใช้โปรตีน) ดีกว่าการเสริมเอนไซม์ไฟเตสที่ระดับอื่น ๆ ($p<0.05$) โดยให้ผลเช่นเดียวกับการเสริมฟอสฟอรัสในรูป DCP 0.2% นอกจากนี้ยังพบว่าการเสริมเอนไซม์ไฟเตสและ DCP มีผลทำให้ปริมาณฟอสฟอรัสในตัวปลาและกระดูกมีค่าสูงขึ้น แต่ไม่พบความแตกต่างขององค์ประกอบเลือด ได้แก่ ค่าฮีมาโตคริต ฮีโมโกลบิน และโปรตีนในพลาสมาของปลาที่ได้รับอาหารดังกล่าว

ฟอสฟอรัสเป็นแร่ธาตุชนิดหนึ่งที่สัตว์น้ำต้องการในปริมาณมาก โดยทำหน้าที่เป็นโครงสร้างของร่างกายร่วมกับแคลเซียม เช่น เป็นส่วนประกอบของกระดูกและเกล็ด นอกจากนี้ยังทำหน้าที่เป็นองค์ประกอบต่างๆ ในรูปอินทรีย์ฟอสเฟต ได้แก่ อะดีโนซีน ไตรฟอสเฟต (adenosine triphosphate, ATP) ฟอสฟอลิปิด (phospholipids) ดีออกซีไรโบนิวคลีอิกแอสิด (deoxyribonucleic acid, DNA) และมีส่วนสำคัญในกระบวนการเมแทโบลิซึมของคาร์โบไฮเดรต ไขมันและกรดอะมิโน (Lovell, 1978; Davis and Gatlin, 1991; NRC, 1993; Ciofalo *et al*., 2003) ฟอสฟอรัสในน้ำอยู่ในรูปที่สัตว์น้ำนำไปใช้ประโยชน์ได้จำกัด โดยมีในปริมาณต่ำกว่า 0.1 มก./ลิตร (ppm) ทำให้สัตว์น้ำได้รับฟอสฟอรัสจากน้ำน้อยคือต่ำกว่า 1% ของฟอสฟอรัสที่ได้รับจากอาหาร (NRC, 1993) จึงต้องอาศัยฟอสฟอรัสจากอาหารเป็นหลัก ซึ่งได้มาจากวัตถุดิบอาหารจำพวกพืชและสัตว์รวมทั้งจากฟอสฟอรัสสังเคราะห์ โดยเฉพาะเกลือฟอสเฟตรูปต่างๆ แหล่งวัตถุดิบเหล่านี้แม้จะมีฟอสฟอรัสอยู่ในปริมาณสูงแต่อยู่ในรูปที่สัตว์น้ำสามารถนำมาใช้ได้น้อย เช่น ปลาป่น ซึ่งมักพบฟอสฟอรัสอยู่ในรูปสารประกอบไฮดรอกซีอะพาไทต์ (hydroxyapatite) หรือไตรแคลเซียมฟอสเฟต (tricalcium phosphate) โดยเป็นองค์ประกอบอยู่ในกระดูกและเกล็ดปลา (Jobling, 1994) ส่วนฟอสฟอรัสจากพืชประมาณ 2 ใน 3 ส่วนของฟอสฟอรัสทั้งหมดจะอยู่ในรูปของกรดไฟติก (phytic acid) หรือไมโออินโนซิทอลเพ็นตะคิสฟอสเฟต (myo-inositol pentakisphosphate) ซึ่งมักรวมอยู่กับเกลือของแคลเซียม แมกนีเซียม โพแตสเซียม (Dey and Harborne, 1990) เรียกว่า ไฟติน (phytin) ส่วนเกลือของกรดไฟติกที่ประกอบด้วยอินโนซิทอลกับฟอสเฟตจะเรียกว่า ไฟเตท (phytate) (Uhlig, 1998) Hendricks และ Bailey (1989) กล่าวถึงกรดไฟติกว่าเป็นพิษชนิดหนึ่งที่เกิดจากพืช ซึ่งสัตว์กระเพาะเดี่ยว (monogastric animals) และปลาไม่สามารถนำฟอสฟอรัสในรูปนี้มาใช้ได้

ดังนั้นอาหารปลาที่ใช้วัตถุดิบพืชเป็นหลักจึงจำเป็นต้องมีการเพิ่มปริมาณฟอสฟอรัสที่ใช้ได้ให้มากขึ้นเพื่อให้ปลามีการเจริญเติบโตและดำรงชีวิตอย่างปกติ ซึ่งแนวทางการแก้ไขปัญหาปลาขาดฟอสฟอรัสที่นิยมทำ คือ การเสริมฟอสฟอรัสสังเคราะห์ลงในรูปอนินทรีย์ฟอสเฟตในอาหาร (วุฒิพร และคณะ, 2547; Eya and Lovell, 1997) แต่ก็

เท่ากับเป็นการเพิ่มปริมาณของเสียที่ต้องขับทิ้งมากขึ้น เพราะฟอสฟอรัสส่วนที่สัตว์น้ำไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้จะถูกขับออกมาในรูปของมูล ทำให้มีการสะสมในแหล่งน้ำ ซึ่งหากมากเกินไปจะส่งผลให้แพลงก์ตอนพืชและสัตว์เจริญเติบโตจนเกินสมดุลและเกิดน้ำเสียในเวลาต่อมา

ไฟเตสเป็นเอนไซม์ที่จัดอยู่ในกลุ่มฟอสฟาเตส ซึ่งมีหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสทำให้ฟอสเฟตหลุดจากโมเลกุลของไฟเตทและปลานำไปใช้ประโยชน์ได้ ส่งผลให้ปริมาณฟอสฟอรัสขับทิ้งลดลง จึงช่วยลดปัญหามลภาวะอันเนื่องจากฟอสฟอรัส นอกจากนี้การเสริมเอนไซม์ไฟเตสยังช่วยลดต้นทุนการผลิตโดยลดรายจ่ายจากการเสริมอนินทรีย์ฟอสเฟต เนื่องจากปลามีฟอสฟอรัสที่สามารถใช้ได้เพิ่มขึ้น และช่วยให้สามารถนำวัตถุดิบพืชมาใช้ประโยชน์ได้มากขึ้น จากการทดลองของวุฒิพร และคณะ (2547) พบว่า การเสริมเอนไซม์ไฟเตส 4,000 ยูนิต/อาหาร 1 กก. ทำให้ปลานิลดำแปลงเพศมีการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหารดีที่สุด ขณะที่การเสริมไฟเตส 1,000 ยูนิต/อาหาร 1 กก. เพียงพอที่ทำให้ประสิทธิภาพการย่อยฟอสฟอรัส องค์ประกอบเลือด และฟอสฟอรัสในกระดูกปลาอยู่ในเกณฑ์ดี นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถใช้ไฟเตสเสริมในอาหารสำหรับเลี้ยงปลานิลแทนการใช้อนินทรีย์ฟอสเฟตทั้ง 3 รูปแบบ โดยการเสริมไฟเตส 2,000 หรือ 4,000 ยูนิต/อาหาร 1 กก. ช่วยลดการสะสมฟอสฟอรัสในมูลปลา นอกจากนี้ Phromkunthong และคณะ (2004) พบว่า การเสริมเอนไซม์ไฟเตส 1,000 ยูนิต/อาหาร 1 กก. มีผลทำให้สัมประสิทธิ์การย่อยฟอสฟอรัสในปลานิลแดงแปลงเพศดีขึ้น และไม่ต่างจากการเสริม DCP 0.3% และทำให้ค่าองค์ประกอบเลือด ได้แก่ ฮีมาโตคริต และฮีโมโกลบินมีแนวโน้มสูงขึ้น

การศึกษาครั้งนี้จึงเป็นการทดสอบผลของเอนไซม์ไฟเตสเปรียบเทียบกับอนินทรีย์ฟอสเฟตในรูปไดแคลเซียมฟอสเฟตต่อประสิทธิภาพการใช้ฟอสฟอรัสในปลาดุกพันธุ์ผสม การที่เลือกปลานี้เป็นปลาทดลองเนื่องจากปลาดุกพันธุ์ผสมเป็นตัวแทนของปลาในกลุ่มไม่มีเกล็ดและเป็นปลาเศรษฐกิจที่มีความสำคัญของประเทศไทย โดยจากข้อมูลล่าสุดในปี พ.ศ. 2543 พบว่า ปริมาณการผลิตปลาดุกทั้งจากการจับและการเพาะเลี้ยงสูงถึง 95,600 ตัน โดยคิดเป็นมูลค่า 2,895.9 ล้านบาท (กรมประมง, 2546)

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมอุปกรณ์การทดลอง

ใช้ตู้กระจกขนาด 100 x 50 x 47 ซม. ความจุน้ำ 235 ลิตร ทำความสะอาด และติดตั้งอุปกรณ์ให้อากาศให้พร้อมสมบูรณ์แล้วเติมน้ำประปาที่ปราศจากคลอรีน ให้ได้ปริมาตร 180 ลิตร ปิดตู้ด้วยผ้าพลาสติกสีทึบ 3 ด้านเพื่อป้องกันการถูกรบกวนขณะทำการทดลอง โดยระบบทดลองเป็นระบบหมุนเวียนน้ำแบบปิด ระบบกรอง ประกอบด้วยถังไฟเบอร์กลาสที่บรรจุถ่าน ทราย เปลือกหอยและใยแก้วบ่อคอนกรีตสำหรับพักน้ำ ประกอบด้วย ถ่าน เปลือกหอย อวน เครื่องให้อากาศ และเครื่องปั๊มน้ำ ปรับอัตราการไหลของน้ำในตู้ทดลองให้เป็น 0.8 ลิตร/นาที

2. การเตรียมปลาทดลอง

นำลูกปลาดุกพันธุ์ผสมที่มีน้ำหนักตัวเฉลี่ย 1.5-2.5 กรัม/ตัว จำนวน 3,000 ตัว จากศูนย์พัฒนาประมงน้ำจืดปัตตานี มาอนุบาลในถังไฟเบอร์กลาสกลมขนาดความจุน้ำ 2 ลบ.เมตร โดยให้อาหารอาหารเม็ดสำเร็จรูปยี่ห้อไฮ-เกร็ดเบอร์ 9961 ซึ่งมีคุณค่าทางโภชนาการคือ ความชื้น 12% โปรตีน 40% ไขมัน 6% และเยื่อใย 5% วันละ 2 ครั้ง คือ 9.00 น. และ 16.00 น. เป็นเวลา 1 เดือน นำลูกปลาไปตรวจสอบการติดเชื้อแบคทีเรียและปรสิตภายนอก เมื่อไม่มีโรคใดๆ จึงนำไปใช้ในการทดลอง

3. การเตรียมอาหารทดลอง

อาหารทดลองมี 9 สูตรแบ่งเป็นสองกลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 เสริมด้วยเอนไซม์ไฟเตสในระดับที่แตกต่างกัน 5 ระดับ คือ 0, 250, 500, 750 และ 1,000 ยูนิต/อาหาร 1 กก. (สูตรที่ 2-6 ตามลำดับ) และกลุ่มที่ 2 เสริมด้วย DCP 3 ระดับ คือ 0.1%, 0.2% และ 0.3% (สูตรที่ 7-9 ตามลำดับ) อาหารสูตรที่ 2-9 ไม่ใส่ปลาป่น โดยมีสูตรที่ 1 เป็นชุดควบคุมซึ่งเป็นสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงปลาดุกโดยใช้ปลาป่นและกากถั่วเหลืองเป็นโปรตีนหลัก

อาหารทดลองที่ใช้เป็นอาหารเม็ดแบบชื้น จัดเตรียมขึ้นมาเอง โดยนำวัตถุดิบที่ใช้ไปวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการ ได้แก่ ความชื้น โปรตีน ไขมัน เถ้า เยื่อใย และฟอสฟอรัส (Table 1) โดยวิธี AOAC (1990) จากนั้นชั่ง

วัตถุดิบอาหาร ได้แก่ ปลาป่น กากถั่วเหลือง กากเนื้อเมล็ดในปาล์มน้ำมัน ข้าวโพด น้ำมันพืช วิตามิน แร่ธาตุรวม (ยกเว้นฟอสฟอรัส) และ DCP (เป็น rock phosphate เกรดห้องปฏิบัติการ, lab grade) ตามสูตรที่คำนวณไว้ (Table 2) นำส่วนผสมทั้งหมด ยกเว้นน้ำมัน และเอนไซม์ไฟเตส (สูตร 2-6) มาผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมอาหาร เติมน้ำมันและน้ำกลั่นลงไประหว่างการผสมอาหาร เมื่อส่วนประกอบวัสดุอาหารเข้ากันดี นำไปเข้าเครื่องอัดเม็ดผ่านหน้าแว่นขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 มม. (สำหรับเลี้ยงปลาในสัปดาห์ที่ 0-4) และหน้าแว่นขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 มม. (สำหรับเลี้ยงปลาในสัปดาห์ที่ 5-10) โดยตัดเม็ดอาหารให้มีขนาดใกล้เคียงกัน อบอาหารที่อุณหภูมิ 60ºC นาน 24 ชั่วโมง นำอาหารสูตรที่ 2-6 ซึ่งอบแห้งแล้ว มาฉีดพ่นเอนไซม์ที่ระดับความเข้มข้น 0, 250, 500, 750 และ 1,000 ยูนิต/อาหาร 1 กก. โดยชั่งเอนไซม์ไฟเตสที่มีลักษณะเป็นผงสีขาว 0.05, 0.10, 0.15 และ 0.20 กรัม ตามลำดับ ผสมกับน้ำกลั่นที่ปราศจากไอออน (deionized water) 40 มล./อาหาร 1 กก. ฉีดพ่นเอนไซม์ไฟเตสบนเม็ดอาหาร สำหรับสูตรที่ไม่มีการเสริมด้วยเอนไซม์ไฟเตสจะทำการฉีดพ่นเม็ดอาหารด้วยน้ำที่ปราศจากไอออนปริมาณ 40 มล./อาหาร 1 กก. เช่นกัน เพื่อให้ทุกสูตรมีความชื้นใกล้เคียงกัน ผึ่งอาหารให้แห้งแล้วบรรจุในถุงพลาสติกเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4ºC (วุฒิพรและคณะ, 2540) เอนไซม์ไฟเตสที่ใช้เป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัทบีเอเอสเอฟ (BASF) ประเทศเยอรมนี โดยเป็นผลผลิตจากเชื้อรา *Aspergillus niger* มีชื่อทางการค้าว่า นาทูฟอส (Natuphos 5,000 G) มี ไฟเตสแอคติวิตี 5,000 เอฟทียู/กรัม [เอฟทียู (FTU) เป็นหน่วยของเอนไซม์ไฟเตส โดย 1 เอฟทียู หมายถึง การปลดปล่อยหรือย่อย 1 ไมโครโมลของอนินทรีย์ฟอสฟอรัส/นาที จากโซเดียมไฟเตท (sodium phytate) ที่อุณหภูมิ 37ºC และพีเอช 5.5) (Soares and Hughes, 1995) ส่วน DCP มีเนื้อแคลเซียม 32.76% และฟอสฟอรัส 17.48% นำอาหารทดลอง ไปวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการ (ความชื้น โปรตีน ไขมัน เยื่อใย เถ้า ฟอสฟอรัสและแคลเซียม) ตามวิธีมาตรฐาน ของ AOAC (1990) ส่วนปริมาณไนโตรเจนฟรีเอกซ์แทรกซ์ (nitrogen free extract, NFE) คำนวณได้จากสูตร 100 - (ความชื้น+โปรตีน+ ไขมัน+เถ้า+เยื่อใย) ดังแสดงใน Table 3

Table 1. Proximate analysis of feed ingredients (% as fed basis)[1]

Feed ingredients	Moisture	Protein	Fat	Ash	Fiber	NFE	Phosphorus
Fish meal	6.77±0.02	69.77±0.33	13.17±0.53	16.40±0.14	0.15±0.07	1.86±2.77	2.67±0.02
Soybean meal	9.38±0.02	45.61±0.64	3.85±0.52	7.87±0.94	4.15±0.07	38.53±2.00	0.85±0.02
Palm kernel cake	5.05±0.02	15.16±0.12	13.29±0.51	3.90±0.00	18.39±0.31	49.26±0.61	0.33±0.01
Broken rice	8.29±0.11	6.77±0.21	1.62±0.05	0.75±0.03	0.30±0.14	82.77±0.18	0.13±0.02
Rice bran	6.15±0.09	11.54±0.21	18.88±1.44	13.42±0.24	13.85±0.21	42.31±1.37	0.50±0.69
Corn	11.64±0.02	7.38±0.24	6.63±0.18	1.61±0.03	1.85±0.21	82.53±0.30	0.32±0.04
Rice flour	7.43±0.19	7.05±0.59	0.87±0.01	0.47±0.02	0.30±0.00	91.31±0.60	0.08±0.01
Dicalcium phosphate	-	-	-	-	-	-	17.48±0.03

[1]Mean (standard deviation of three replications)
NFE: nitrogen free extract

Table 2. Composition of experimental diets (%)

Ingredients	Diet formulae								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Fish meal	23	-	-	-	-	-	-	-	-
Soybean meal	25	60	60	60	60	60	60	60	60
Corn	14.5	13	13	13	13	13	13	13	13
Palm kernel cake	0	15	15	15	15	15	15	15	15
Broken rice	7	-	-	-	-	-	-	-	-
Rice bran	3.8	-	-	-	-	-	-	-	-
Rice flour	12	-	-	-	-	-	-	-	-
Soybean oil	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Vitamin mixtures[1]	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Mineral mixtures[2]	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Vitamin C	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Choline chloride	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Rice hull	11.4	8.7	8.7	8.7	8.7	8.7	8.14	7.57	7.01
Enzyme phytase	-	-	0.005	0.010	0.0150	0.020	-	-	-
Dicalcium phosphate	-	-	-	-	-	-	0.56	1.13	1.69

[1] Vitamin mixtures (g/kg feed): Retinal (A) 1.20 mg; (4,000 IU); Cholecalciferol (D3) 0.51 mg; (2,000 IU); Tocopherol (E) 50 mg; Menadione sodium bisulfite 10 mg; Thiamine (B_1) 10 mg; Riboflavin (B_2) 20 mg; Pyridoxine (B_6) 20 mg; Cyanocobalamin 0.2 mg; Calcium pantothenate 200 mg; Niacin 150 mg; Folic acid 5 mg; Biotin 2 mg; Inositol 400 mg

[2] Mineral mixtures (g/kg feed): $MnSO_4..H_2O$ 25 mg; $ZnSO_4..7H_2O$ 20 mg; $FeSO_4.7H_2O$ 30 mg; KIO_3 5 mg; $CuSO_4.5H_2O$ 5 mg; $CoCl_2.6H_2O$ 0.05 mg; Na_2SeO_3 0.3 mg

4. แผนการทดลองและการเก็บรวบรวมข้อมูล

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (completely randomized design: CRD) โดยจัดให้แต่ละชุดการทดลองมี 3 ซ้ำ เมื่อเริ่มต้นการทดลอง ปรับปริมาตรน้ำในตู้ทดลองทุกตู้ให้ได้ 180 ลิตร และเพื่อให้ลูกปลาปรับสภาพให้คุ้นเคยกับสภาพแวดล้อมของตู้และอาหารทดลองจึงฝึกให้กินอาหารทดลอง (สูตรที่ 1) เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ปล่อยปลาในตู้ทดลอง ตู้ละ 20 ตัว ใช้ลูกปลาดุกพันธุ์ผสมทั้งหมด 480 ตัว โดยสุ่มปลาที่มีน้ำหนักเฉลี่ย 5-6 กรัม/ตัว ให้อาหารวันละ 2 ครั้ง คือ เช้าเวลา 9.00 น. และเย็นเวลา 16.00 น. โดยให้ปลากินจนอิ่ม บันทึกน้ำหนักอาหารที่ให้ทุกสัปดาห์ตลอดการทดลอง ก่อนให้อาหารช่วงเย็นจะดูดตะกอนทำความสะอาดตู้ปลาโดยวิธีกาลักน้ำแล้วเติมน้ำใหม่ให้เท่าเดิมทุกครั้ง เพื่อควบคุมคุณภาพน้ำให้เหมาะสมตลอดการทดลอง และตรวจสอบคุณภาพน้ำจากบ่อพักน้ำ บ่อบำบัด และตู้ทดลองโดยสุ่มชุดการทดลองละ 2 ตู้ ทุกๆ 2 สัปดาห์ตลอดการทดลอง ตามวิธีของ Boyd และ Tucker (1992) ได้แก่ ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ออกซิเจนละลายน้ำ (dissolved oxygen, DO) อุณหภูมิ ความเป็นด่าง (total alkalinity) ความกระด้าง (total hardness) ปริมาณแอมโมเนีย (ammonia) ไนไตรท์ (nitrite) ไนเตรท (nitrate) ปริมาณฟอสฟอรัส (total phosphorus)

5. การเก็บข้อมูลและวิเคราะห์ข้อมูล

5.1 การตรวจสอบพฤติกรรมและลักษณะที่แสดงออกภายนอก

ระหว่างการทดลองสังเกตพฤติกรรมของปลาทุกชุดการทดลอง ได้แก่ การว่ายน้ำ การยอมรับอาหาร และสังเกตลักษณะภายนอก ได้แก่ สีของลำตัว การตกเลือด และการเกิดบาดแผลที่ครีบ ผิวหนัง และอวัยวะภายนอกอื่นๆ ใช้ยาและสารเคมีเพื่อป้องกันโรค ตามสภาพของปลา

5.2 การตรวจสอบการเจริญเติบโตของปลา

ชั่งน้ำหนักปลาทุก 2 สัปดาห์ เพื่อคำนวณน้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้นโดยการชั่งน้ำหนักรวมของปลาแต่ละซ้ำด้วย

Table 3. Proximate analysis of 9 experimental diets (% as fed basis)[1]

Treatment	Phytase (unit/kg diet)	Moisture	Protein	Fat	Ash	Fiber	NFE	Phosphorus
1	Control	3.60 ± 0.16	30.30 ± 0.01	10.51 ± 0.12	10.61 ± 0.02	8.11 ± 0.04	36.82 ± 0.08	1.11 ± 0.06
2	0	5.27 ± 0.27	30.56 ± 0.10	7.19 ± 0.13	8.11 ± 0.03	8.63 ± 0.09	40.14 ± 0.23	0.59 ± 0.05
3	250	6.26 ± 0.07	30.72 ± 0.04	7.12 ± 0.30	8.02 ± 0.01	8.80 ± 0.05	39.19 ± 0.16	0.58 ± 0.02
4	500	6.18 ± 0.22	30.59 ± 0.19	7.10 ± 0.32	8.02 ± 0.04	8.81 ± 0.06	39.54 ± 0.19	0.60 ± 0.03
5	750	6.67 ± 0.12	30.55 ± 0.16	7.00 ± 0.33	7.88 ± 0.21	8.68 ± 0.01	39.26 ± 0.69	0.60 ± 0.01
6	1,000	6.19 ± 0.24	30.55 ± 0.22	7.27 ± 0.39	8.01 ± 0.06	8.73 ± 0.07	38.87 ± 0.32	0.60 ± 0.02
7	0.1% DCP	1.98 ± 0.19	31.85 ± 0.16	7.31 ± 0.41	8.69 ± 0.13	8.19 ± 0.01	42.20 ± 1.06	0.62 ± 0.04
8	0.2% DCP	3.41 ± 0.12	31.54 ± 0.22	7.45 ± 0.30	8.91 ± 0.03	8.08 ± 0.14	40.35 ± 0.34	0.69 ± 0.04
9	0.3% DCP	5.10 ± 0.13	30.82 ± 0.20	7.39 ± 0.20	9.13 ± 0.07	7.73 ± 0.07	39.93 ± 0.16	0.85 ± 0.02

[1]Mean ± standard deviation of three replications
NFE: nitrogen free extract

เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง (ในวันที่ชั่งน้ำหนักงดให้อาหารเป็นเวลา 1 วัน) นับจำนวนปลาที่เหลืออยู่ จนสิ้นสุดการทดลอง นำข้อมูลที่ได้มาคำนวณอัตราการรอด (survival rate) การเจริญเติบโตของปลา (Jantrarotai *et al*., 1994) อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (Dupree and Sneed, 1966) อัตราการกินอาหาร (Yone and Fujii, 1975)

5.3 การคำนวณค่าดัชนีตับต่อตัว (Hepatosomatic Index)

เมื่อสิ้นสุดการทดลอง สุ่มปลาจากทุกชุดการทดลองๆ ละ 6 ตัว นำปลาแต่ละตัวไปชั่งน้ำหนักตัวและน้ำหนักตับ นำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่าดัชนีตับ/ตัว (Anwar and Jafri, 1995)

5.4 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของปลา

สุ่มตัวอย่างปลาก่อนเริ่มการทดลองจำนวน 30 ตัว นำไปวิเคราะห์ความชื้นในร่างกายทันทีและนำตัวอย่างปลาไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของตัวปลาได้แก่ ปริมาณโปรตีน ไขมัน เถ้า และฟอสฟอรัสตามวิธีการของ AOAC (1990) บันทึกเป็นองค์ประกอบทางเคมีของตัวปลาเริ่มต้น เมื่อสิ้นสุดการทดลองสุ่มตัวอย่างปลาจากแต่ละตู้ทดลองๆ ละ 2 ตัว ไปวิเคราะห์ความชื้น โปรตีน ไขมัน เถ้า และฟอสฟอรัส ตามวิธีการของ AOAC (1990) และนำค่าโปรตีนในตัวปลาเมื่อเริ่มต้นและสิ้นสุดการทดลองไปคำนวณประสิทธิภาพการใช้โปรตีน (Zeitoun *et al*., 1973) และการใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ (Robinson and Wilson, 1985)

5.5 การวิเคราะห์ฟอสฟอรัสและแคลเซียมในกระดูก

เมื่อสิ้นสุดการทดลองสุ่มปลาตู้ละ 5 ตัว แล่เอาเฉพาะกระดูกบริเวณกะโหลก กระดูกสันหลังและหาง ไปอบที่อุณหภูมิ 60ºC นาน 48 ชั่วโมง นำตัวอย่างนั้นไปวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสและแคลเซียม ตามวิธีการของ AOAC (1990)

5.6 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อวิทยา

เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ทำการเก็บตัวอย่างโดยสุ่มเก็บเนื้อเยื่อตับ จากตัวอย่างปลาตู้ทดลองๆ ละ 2 ตัวมาแช่ในฟอร์มาลีน 10% (formalin) 1 สัปดาห์ แล้วเปลี่ยนน้ำยาดองเป็นแอลกอฮอล์ 70% ก่อนนำไปผ่านกรรมวิธีเตรียมเนื้อเยื่อของ Humason (1972) ตัดเนื้อเยื่อให้มีความหนา 3-4 ไมโครเมตร แล้วย้อมด้วยสี hematoxylin และ eosin (H&E) (Bancroft, 1967) จากนั้นนำเนื้อเยื่อ

ไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์

5.7 การศึกษาองค์ประกอบเลือด

เมื่อสิ้นสุดการทดลอง สุ่มปลาจากทุกชุดการทดลองๆ ละ 6 ตัว มาสลบด้วยควินาลดีน เจาะเลือดจากบริเวณโคนหางโดยใช้กรดเอทีลินไดอะมีนเตตราอะซีติก 1% (ethylenediaminetetraacetic acid : EDTA) เป็นสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด เพื่อศึกษาองค์ประกอบของเลือด คือ

- Hemoglobin โดยใช้วิธี Cyanmet-haemoglobin ของ Larsen และ Snieszko (1961)
- Hematocrit โดยวิธีดัดแปลงจาก Blaxhall และ Daisley (1973)
- Plasma protein โดยวิธีดัดแปลงจาก Lowry และคณะ (1951)

6. การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวน ANOVA แบบ CRD และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (Steel and Torrie, 1980)

ผลการทดลอง

1. การตรวจสอบพฤติกรรมและลักษณะที่แสดงออกภายนอกของปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารสูตรต่าง ๆ

จากการศึกษาครั้งนี้ไม่พบความผิดปกติของรูปร่างลักษณะภายนอกของปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารจากแหล่งวัตถุดิบพืชทั้งในกลุ่มที่มีการเสริมด้วยเอนไซม์ไฟเตสและกลุ่มที่มีการเสริมด้วย DCP เมื่อเปรียบเทียบกับปลาที่ได้รับอาหารชุดควบคุม (สูตรที่ 1) ตลอดจนสิ้นสุดการทดลอง

2. การเจริญเติบโตและอัตรารอด

2.1 น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัว

น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวของปลาของปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง 9 สูตร เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่เลี้ยงตลอด 10 สัปดาห์ ดังแสดงใน Table 4 โดยพบว่าปลาในชุดควบคุมเริ่มมีน้ำหนักเฉลี่ยแตกต่างจากสูตรอื่นๆ ทุกสูตร ($p<0.05$) ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 จนกระทั่งสิ้นสุดการทดลองโดยมีค่าสูงที่สุด และเมื่อพิจารณาปลาในกลุ่มได้รับอาหารเสริม เอนไซม์ไฟเตส (ชุดการทดลองที่ 2-6) พบว่าเริ่มมีความแตกต่างกันตั้งแต่สัปดาห์ที่ 6 เป็นต้นไป โดยปลาที่ได้รับอาหารเสริมเอนไซม์ไฟเตสที่ระดับ 500 ยูนิต/อาหาร 1 กก. มีน้ำหนักเฉลี่ย แตกต่างกับชุดการทดลองที่เสริมเอนไซม์ไฟเตสที่ระดับ 0 และ 250 ยูนิต/อาหาร 1 กก. ($p<0.05$) แต่ไม่แตกต่างจากชุดการทดลองที่เสริมเอนไซม์ไฟเตสที่ระดับ 750 และ 1,000 ยูนิต/อาหาร 1 กก. ($p>0.05$) เมื่อพิจารณาการเสริม DCP ในชุดการทดลองที่ 7-9 พบว่า น้ำหนักเฉลี่ยของปลาในชุดดังกล่าวไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$) โดยปลาที่ได้รับฟอสฟอรัส 0.1% มีน้ำหนักเฉลี่ยต่ำกว่าและแตกต่างกับปลาที่ได้รับอาหารที่เสริมเอนไซม์ไฟเตสที่ระดับ 500 ยูนิต/อาหาร 1 กก. ($p<0.05$) แต่ไม่แตกต่างกับปลาที่ได้รับอาหารที่เสริมเอนไซม์ไฟเตสที่ระดับ 750 และ 1,000 ยูนิต/อาหาร 1 กก. ($p>0.05$) ขณะที่ปลาที่ได้รับอาหารเสริม DCP 0.2% และ 0.3% มีน้ำหนักเฉลี่ยไม่แตกต่างกัน และไม่แตกต่างกับปลาที่ได้รับอาหารเสริมเอนไซม์ไฟเตสทุกระดับ ($p>0.05$)

2.2 น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ อัตราการกินอาหาร และอัตราการรอดตาย

น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ อัตราการกินอาหารและอัตราการรอดตายของปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารทั้ง 9 สูตร เป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์ แสดงใน Table 5 พบว่า น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของปลาดุกพันธุ์ผสมทั้ง 9 ชุดการทดลอง เป็นไปในแนวทางเดียวกับน้ำหนักเฉลี่ยของปลา กล่าวคือ ปลาที่ได้รับอาหารสูตร 1 (มีปลาป่นเป็นแหล่งโปรตีน) มีน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นสูงที่สุดและแตกต่างกับชุดการทดลองอื่นๆ ($p<0.05$) เมื่อพิจารณาในกลุ่มที่เสริมเอนไซม์ไฟเตสและ DCP พบว่า ปลาที่ได้รับอาหารเสริมเอนไซม์ไฟเตสที่ระดับ 500 ยูนิต/อาหาร 1 กก. มีน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นสูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารไม่เสริมเอนไซม์ (สูตรที่ 2) และที่เสริมเอนไซม์ไฟเตส 250 ยูนิต/อาหาร 1 กก. ($p<0.05$) แต่ไม่ต่างจากปลาที่ได้รับอาหารเสริมเอนไซม์ไฟเตส 750 และ 1,000 ยูนิต/อาหาร 1 กก. และไม่ต่างกับปลาที่ได้รับอาหารเสริม DCP ทั้ง 3 ระดับ ($p>0.05$) (Table 5) สำหรับอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ พบว่า ปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 1 ซึ่งมีปลาป่นเป็นแหล่งโปรตีนมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงที่สุด ($p>0.05$) เมื่อพิจารณาในกลุ่มที่เสริมเอนไซม์ไฟเตส พบว่า ปลาที่ได้รับ

Table 4. Average body weight of hybrid catfish fed 9 experimental diets for a 10-week period [1]

Treatment	Phytase (unit/kg diet)	week					
		0	2	4	6	8	10
1	Control	5.72 ± 0.08^{a}	8.68 ± 0.26^{b}	13.83 ± 0.61^{b}	21.76 ± 0.60^{d}	28.21 ± 1.05^{d}	32.82 ± 3.60^{d}
2	0	5.57 ± 0.03^{a}	6.48 ± 0.05^{a}	7.30 ± 0.07^{a}	8.58 ± 0.12^{ab}	9.90 ± 0.31^{ab}	11.45 ± 0.13^{ab}
3	250	5.66 ± 0.05^{a}	6.50 ± 0.17^{a}	7.37 ± 0.14^{a}	8.26 ± 0.44^{a}	9.26 ± 0.50^{a}	10.91 ± 0.65^{a}
4	500	5.70 ± 0.09^{a}	6.70 ± 0.18^{a}	7.56 ± 0.67^{a}	9.44 ± 0.27^{c}	11.26 ± 0.43^{c}	14.02 ± 0.12^{c}
5	750	5.59 ± 0.04^{a}	6.52 ± 0.12^{a}	7.36 ± 0.30^{a}	9.14 ± 0.25^{bc}	10.83 ± 0.04^{bc}	12.42 ± 0.29^{abc}
6	1,000	5.66 ± 0.07^{a}	6.65 ± 0.27^{a}	7.72 ± 0.32^{a}	9.14 ± 0.37^{bc}	10.71 ± 0.61^{bc}	13.45 ± 0.31^{bc}
7	0.1% DCP	5.69 ± 0.06^{a}	6.55 ± 0.12^{a}	7.27 ± 0.16^{a}	8.55 ± 0.27^{ab}	9.81 ± 0.61^{ab}	11.50 ± 0.53^{ab}
8	0.2% DCP	5.60 ± 0.04^{a}	6.73 ± 0.31^{a}	7.64 ± 0.07^{a}	8.83 ± 0.04^{abc}	10.19 ± 0.39^{abc}	11.98 ± 0.79^{abc}
9	0.3% DCP	5.58 ± 0.08^{a}	6.55 ± 0.18^{a}	8.10 ± 1.13^{a}	9.09 ± 0.57^{bc}	10.30 ± 1.00^{abc}	12.84 ± 0.29^{abc}

[1] **Mean ± standard deviation of three replications**
Means within each column not sharing a common superscript are significantly different (p<0.05)

อาหารเสริมเอนไซม์ไฟเตสที่ระดับ 500 ยูนิต/อาหาร 1 กก. มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารเสริมเอนไซม์ไฟเตสสูตรอื่นๆ ($p<0.05$) ยกเว้นชุดการทดลองที่เสริมเอนไซม์ไฟเตส 1,000 ยูนิต/อาหาร 1 กก. และปลาที่ได้รับอาหารเสริม DCP 0.3% มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงกว่าที่ระดับ 0.1% ($p<0.05$) แต่ไม่แตกต่างกับปลากลุ่มที่ได้รับฟอสฟอรัส 0.2% ($p>0.05$) (Table 5) อัตราการกินอาหารของปลาที่ได้รับอาหารเสริมเอนไซม์ไฟเตสหรือ DCP ในระดับต่างๆ พบว่าไม่มีความแตกต่างกับชุดการทดลองที่ 2 (ไม่เสริมเอนไซม์ไฟเตส) ($p>0.05$) แต่มีความแตกต่างกับปลาในชุดการทดลองที่ 1 ($p<0.05$) โดยปลาในชุดการทดลองที่ 1 มีอัตราการกินอาหารสูงที่สุด และอัตราการรอดตายของปลาที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง 9 สูตรไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) (Table 5)

3. อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน และการใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ

อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (feed conversion rate, FCR) ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน (protein efficiency ratio, PER) และการใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ (apparent net protein utilization) ของปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง 9 สูตร แสดงใน Table 6 พบว่าอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อมีความแตกต่างกันระหว่างชุดการทดลอง ($p<0.05$) โดยปลาที่ได้รับอาหารสูตรควบคุมมีอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อดีที่สุด สำหรับการเสริมเอนไซม์ไฟเตส พบว่าที่ระดับ 500 และ 1,000 ยูนิต/อาหาร 1 กก. (สูตรที่ 4 และ 6 ตามลำดับ) ปลามีอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อดีที่สุด และไม่แตกต่างจากกลุ่มที่เสริม DCP ทั้ง 3 ระดับ (สูตรที่ 7-9) (Table 6) ประสิทธิภาพการใช้โปรตีนของปลาดุกพันธุ์ผสม พบว่าปลาที่ได้รับอาหารสูตรควบคุมมีประสิทธิภาพการใช้โปรตีนสูงสุด และพบว่าการเสริมเอนไซม์ไฟเตสและ DCP ไม่มีผลทำให้ประสิทธิภาพการใช้โปรตีนแตกต่างกัน ยกเว้นการเสริมเอนไซม์ไฟเตสที่ระดับ 500 ยูนิต/อาหาร 1 กก. และ DCP 0.3% ที่ทำให้ประสิทธิภาพการใช้โปรตีนดีกว่ากลุ่มที่ไม่เสริมเอนไซม์ไฟเตส (Table 6)

สำหรับการใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ พบว่า ปลาในชุดควบคุม มีการใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิดีที่สุดโดย

Table 5. Weight gain, specific growth rate, rate of feed intake and survival rate of hybrid catfish fed 9 experimental diets for a 10-week period [1]

Treatment	Phytase (unit/kg diet)	Weight gain (%)	Specific growth rate (% /fish/day)	Rate of feed intake (% /fish/day)	Survival rate (%)
1	Control	474.90 ± 71.66[c]	2.46 ± 0.17[d]	2.83 ± 0.27[c]	88.33 ± 16.07[a]
2	0	105.51 ± 3.23[a]	1.01 ± 0.02[a]	2.38 ± 0.11[ab]	96.67 ± 2.89[a]
3	250	92.77 ± 11.24[a]	0.92 ± 0.08[a]	2.20 ± 0.17[a]	91.67 ± 2.89[a]
4	500	146.12 ± 4.54[b]	1.27 ± 0.03[c]	2.38 ± 0.24[ab]	96.67 ± 5.77[a]
5	750	112.38 ± 15.95[ab]	1.06 ± 0.11[ab]	2.53 ± 0.03[b]	95.00 ± 5.00[a]
6	1,000	137.48 ± 2.80[ab]	1.22 ± 0.02[bc]	2.43 ± 0.06[ab]	93.33 ± 7.64[a]
7	0.1% DCP	101.96 ± 8.08[ab]	0.99 ± 0.06[a]	2.25 ± 0.02[ab]	96.97 ± 5.77[a]
8	0.2% DCP	113.91 ± 17.22[ab]	1.07 ± 0.11[ab]	2.30 ± 0.02[ab]	98.33 ± 2.89[a]
9	0.3% DCP	130.16 ± 4.21[ab]	1.17 ± 0.03[bc]	2.23 ± 0.28[ab]	98.33 ± 2.89[a]

[1]Mean ± standard deviation of three replications

Table 6. FCR, PER, ANPU of hybrid catfish fed 9 experimental diets for a 10-week period[1]

Treatment	Phytase (unit/kg diet)	FCR	PER	ANPU (%)
1	Control	1.36 ± 0.08[a]	2.50 ± 0.14[d]	36.56 ± 2.08[c]
2	0	2.22 ± 0.04[cd]	1.53 ± 0.08[ab]	24.84 ± 1.22[a]
3	250	2.47 ± 0.16[d]	1.47 ± 0.03[a]	29.76 ± 0.83[b]
4	500	1.79 ± 0.04[b]	1.88 ± 0.13[c]	28.13 ± 1.91[ab]
5	750	2.22 ± 0.17[cd]	1.48 ± 0.12[a]	27.61 ± 1.72[ab]
6	1,000	2.01 ± 0.25[bc]	1.74 ± 0.10[bc]	30.68 ± 1.76[b]
7	0.1% DCP	1.96 ± 0.02[bc]	1.52 ± 0.13[ab]	28.43 ± 2.23[ab]
8	0.2% DCP	2.00 ± 0.23[bc]	1.62 ± 0.17[ab]	28.66 ± 2.50[ab]
9	0.3% DCP	1.97 ± 0.20[b]	1.88 ± 0.23[c]	34.31 ± 4.33[c]

[1] Mean±standard deviation of three replications
Means within each column not sharing a common superscript are significantly different (p<0.05)

ไม่แตกต่างจากปลา ที่ได้รับอาหารเสริม DCP 0.3% และการเสริมเอนไซม์ไฟเตสตั้งแต่ 250 ยูนิต/อาหาร 1 กก. ขึ้นไป และการเสริม DCP ทุกระดับส่งผลให้ปลามีการใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิดีกว่ากลุ่มที่ไม่เสริมเอนไซม์ไฟเตส (สูตรที่ 2) (Table 6)

4. ส่วนประกอบทางโภชนาการของปลาทั้งตัว

องค์ประกอบทางเคมีของปลาเมื่อเริ่มต้นทดลอง และผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของปลาทั้งตัวเมื่อสิ้นสุดการทดลอง แสดงไว้ดัง Table 7 โดยพบว่าการเสริมเอนไซม์ไฟเตสที่ระดับมากกว่า 500 ยูนิต/อาหาร 1 กก. ขึ้นไป และที่ทุกระดับของ DCP ตั้งแต่ 0.1-0.3% ส่งผลให้ค่าโปรตีน ไขมัน เถ้า และฟอสฟอรัสในตัวปลามีแนวโน้มสูงกว่ากลุ่มที่ไม่เสริมเอนไซม์ (Table 7)

5. องค์ประกอบเลือดและดัชนีตับต่อตัว

การวิเคราะห์องค์ประกอบเลือด ได้แก่ ค่าฮีมาโตคริต ฮีโมโกลบิน และโปรตีนในพลาสมาของปลาที่ได้รับอาหารทั้ง 9 สูตร แสดงใน Table 8 พบว่าค่าฮีมาโตคริตของปลาทดลองทั้ง 9 สูตร ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (p>0.05) ค่าฮีโมโกลบินของปลาที่ได้รับอาหารเสริมเอนไซม์ไฟเตสและการเสริม DCP ให้ผลไม่แตกต่างกับกลุ่มที่ไม่เสริม

Table 7. Whole body composition of hybrid catfish fed 9 experimental diets for a 10-week period[1]

Treatment	Phytase	Moisture	Protein	Fat	Ash	Phosphorus
I^0		76.02 ± 1.52	57.66 ± 0.19	23.38 ± 0.23	11.65 ± 0.02	1.90 ± 0.23
1	Control	74.12 ± 1.21^{a}	55.88 ± 0.24^{a}	24.16 ± 0.18^{a}	12.61 ± 0.02^{c}	2.01 ± 0.30^{c}
2	0	75.40 ± 0.65^{a}	61.22 ± 0.38^{a}	22.65 ± 0.14^{a}	8.98 ± 0.18^{a}	1.56 ± 0.07^{b}
3	250	75.63 ± 1.14^{a}	59.59 ± 0.27^{a}	24.27 ± 0.36^{bc}	9.99 ± 0.03^{a}	1.55 ± 0.22^{b}
4	500	75.63 ± 1.48^{a}	69.41 ± 0.11^{f}	24.36 ± 0.24^{bc}	9.44 ± 0.34^{a}	1.69 ± 0.02^{bc}
5	750	74.60 ± 0.91^{a}	64.50 ± 0.07^{de}	24.92 ± 0.08^{c}	10.36 ± 0.12^{b}	1.80 ± 0.06^{c}
6	1,000	74.71 ± 1.42^{a}	63.43 ± 0.39^{b}	23.42 ± 0.37^{a}	10.42 ± 0.48^{b}	1.97 ± 0.09^{c}
7	0.1% DCP	74.61 ± 0.18^{a}	64.16 ± 0.25^{cd}	26.58 ± 0.26^{d}	10.42 ± 0.06^{b}	1.82 ± 0.03^{c}
8	0.2% DCP	75.45 ± 0.53^{a}	64.65 ± 0.22^{e}	23.97 ± 0.25^{b}	11.07 ± 0.02^{c}	1.80 ± 0.17^{c}
9	0.3% DCP	74.46 ± 0.51^{a}	63.82 ± 0.12^{bc}	24.16 ± 0.18^{b}	11.29 ± 0.19^{c}	1.90 ± 0.04^{c}

[1]Mean ± standard deviation of three replications
Means within each column not sharing a common superscript are significantly different (p<0.05)
I^0 = fish at initial

Table 8. Blood components and Hepatosomatic index of hybrid catfish fed 9 experimental diets for a 10-week period [1]

Treatment	Phytase (unit/kg diet)	Hematocrit (%)	Hemoglobin (g/dl)	Plasma protein (mg%)	Hepatosomatic index (%)
1	Control	32.64 ± 2.30	4.96 ± 0.53^{c}	28.33 ± 1.50^{abc}	1.00 ± 0.02
2	0	29.11 ± 1.39	3.76 ± 0.08^{ab}	29.22 ± 4.04^{bc}	0.92 ± 0.07
3	250	27.08 ± 3.13	3.89 ± 0.44^{ab}	31.73 ± 5.78^{c}	0.85 ± 0.12
4	500	28.83 ± 1.89	4.32 ± 0.76^{abc}	26.82 ± 1.71^{abc}	0.97 ± 0.13
5	750	28.97 ± 2.76	4.75 ± 0.36^{bc}	26.39 ± 2.00^{ab}	0.81 ± 0.15
6	1,000	29.31 ± 2.71	3.80 ± 0.54^{ab}	28.57 ± 1.52^{abc}	0.86 ± 0.02
7	0.1% DCP	29.56 ± 0.29	3.31 ± 0.83^{a}	23.37 ± 1.60^{a}	0.81 ± 0.14
8	0.2% DCP	28.15 ± 2.66	3.84 ± 0.63^{ab}	27.34 ± 0.85^{abc}	0.77 ± 0.14
9	0.3% DCP	29.02 ± 1.34	3.87 ± 0.11^{ab}	23.95 ± 1.58^{ab}	0.73 ± 0.14

[1]Mean ± standard deviation of three replications
Means within each column not sharing a common superscript are significantly different (p<0.05)

เอนไซม์ทั้งนี้พบว่าการเสริมเอนไซม์ไฟเตสที่ระดับ 500-750 ยูนิต/อาหาร 1 กก. มีแนวโน้มสูงกว่ากลุ่มที่ไม่เสริมเอนไซม์ (Table 8) สำหรับโปรตีนในพลาสมา พบว่าเมื่อพิจารณาในกลุ่มเดียวกัน คือกลุ่มที่เสริมด้วยเอนไซม์ไฟเตส หรือกลุ่มที่เสริมด้วย DCP ที่ระดับต่างๆ ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างชุดการทดลอง (p>0.05) (Table 8)

ดัชนีตับต่อตัวของปลาดุกพันธุ์ผสมไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ 0.73-1% (p>0.05)

6. ฟอสฟอรัสในกระดูก

จากการวิเคราะห์ฟอสฟอรัสในกระดูกของปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง 9 สูตร ตลอดระยะเวลา 10 สัปดาห์ พบว่า การเสริมเอนไซม์ไฟเตสในอาหารทำให้ปลาดุกพันธุ์ผสมมีการสะสมฟอสฟอรัสในกระดูกสูงไม่แตกต่างกับกลุ่มที่ไม่เสริมเอนไซม์ไฟเตส (Table 9) อย่างไรก็ตามพบว่าการเสริมเอนไซม์ไฟเตสที่ระดับตั้งแต่ 500 ยูนิต/อาหาร 1 กก. มีแนวโน้มการสะสมฟอสฟอรัสในกระดูกเพิ่มขึ้น และเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนที่ระดับการเสริมเอนไซม์ 1,000 ยูนิต/อาหาร 1 กก. เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่เสริมเอนไซม์ไฟเตส

Table 9. Phosphorus in bone of hybrid catfish fed 9 experimental diets for a 10-week period[1]

Treatment	Phytase (unit/kg diet)	Bone phosphorus (%)	Bone calcium (%)
1	Control	3.70 ± 0.32[c]	6.28 ± 0.20[a]
2	0	2.77 ± 0.63[a]	7.90 ± 0.97[b]
3	250	2.85 ± 0.28[a]	8.16 ± 1.09[b]
4	500	3.01 ± 0.14[ab]	8.94 ± 0.65[b]
5	750	3.10 ± 0.06[ab]	10.71 ± 0.19[c]
6	1,000	3.55 ± 0.04[bc]	8.56 ± 0.59[b]
7	0.1% DCP	2.87 ± 0.39[a]	7.88 ± 0.57[b]
8	0.2% DCP	2.92 ± 0.33[a]	9.09 ± 0.70[b]
9	0.3% DCP	3.02 ± 0.09[ab]	13.12 ± 0.22[d]

[1]Mean ± standard deviation of three replications
Means within each column not sharing a common superscript are significantly different (p<0.05)

7. การศึกษาเนื้อเยื่อวิทยาของตับและไตปลาดุกพันธุ์ผสม

จากผลการศึกษาเนื้อเยื่อตับและไตของปลาดุกพันธุ์ผสม พบว่าปลาที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง 9 สูตร ตลอดระยะเวลา 10 สัปดาห์มีโครงสร้างทางเนื้อเยื่อของตับและไตปกติ

วิจารณ์

จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่า ปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารซึ่งมีปลาป่นเป็นส่วนผสม (สูตรที่ 1) มีน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น และประสิทธิภาพการใช้อาหารสูงกว่าชุดการทดลองอื่นๆ ที่มีวัตถุดิบพืชเป็นแหล่งโปรตีนทั้งหมด (สูตรที่ 2-9) ($p<0.05$) สอดคล้องกับการทดลองอื่นๆ อีกหลายการทดลองที่ใช้วัตถุดิบอาหารจากพืชเป็นส่วนใหญ่หรือทั้งหมด เช่น การทดลองของ Wee และ Shu (1989); Viola และคณะ (1994); Dato-Cajegas และ Yakupitiyage (1996) และ วุฒิพร และคณะ (2547) พบว่า เมื่อปลาได้รับอาหารที่ไม่มีปลาป่นเป็นส่วนผสมทำให้มีการเจริญเติบโตต่ำ อย่างไรก็ตาม หากมีการเสริมด้วยสารอาหารบางชนิด เช่น เมไทโอนีน (methionine) ก็สามารถทดแทนการใช้ปลาป่นและทำให้การเจริญเติบโตของปลาเพิ่มขึ้นได้ (Viola *et al*., 1988) ในการทดลองนี้มีการใช้กากถั่วเหลืองเป็นส่วนผสมในสูตรอาหารถึง 60% และวัตถุดิบพืชอื่นๆ ร่วมด้วยอีก 28% ทำให้ปลาไม่สามารถดึงฟอสฟอรัสจากวัตถุดิบพืชไปใช้ได้เพียงพอ จากการวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสรวม (total phosphate) ในอาหารสูตรที่ 1 (Table 3) มีค่า 1.11% ซึ่งคิดเป็นฟอสฟอรัสที่ปลาสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ (available phosphorus) เท่ากับ 0.37% โดยคำนวณจากปริมาณฟอสฟอรัส 1 ใน 3 ที่อยู่ในวัตถุดิบพืชซึ่งปลาสามารถย่อยและนำไปใช้ได้ (Pointillart *et al*., 1987) โดยเป็นปริมาณที่ใกล้เคียงกับระดับฟอสฟอรัสที่ปลากลุ่มไม่มีเกล็ด (catfish) อื่นๆ เช่น ปลากดอเมริกัน (channel catfish, *Ictalurus punctatus*) ต้องการ ซึ่งอยู่ในช่วง 0.40-0.45% (Lovell, 1978; Wilson *et al*., 1982) และจากการวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสรวมในอาหารสูตรที่ 2-6 (กลุ่มที่ใช้วัตถุดิบพืชเป็นส่วนประกอบของอาหารทั้งหมด) พบว่าอยู่ในช่วง 0.58-0.60% โดยคิดเป็นปริมาณฟอสฟอรัสที่ปลาสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ประมาณ 0.2% ส่วนที่เหลืออีกประมาณ 0.4% จะอยู่ในรูปกรดไฟติกหรือไฟเตท ซึ่งปลาไม่สามารถใช้ได้ การเสริมไฟเตสจะทำให้ปลาสามารถดึงฟอสฟอรัสออกจากโมเลกุลของไฟเตท ทำให้ปลาสามารถใช้ฟอสฟอรัสจากพืชได้เพิ่มขึ้น โดยไม่ต้องเพิ่มฟอสฟอรัสเข้าไปในอาหาร (Reddy *et al*., 1982)

จากผลการทดลองครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการเสริมไฟเตสที่ระดับ 500 ยูนิต/อาหาร 1 กก. ขึ้นไป ในอาหาร

ปลาดุกพันธุ์ผสมช่วยทำให้การเจริญเติบโต (น้ำหนักเฉลี่ย, น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นและการเจริญเติบโตจำเพาะ) และประสิทธิภาพการใช้อาหาร (อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อประสิทธิภาพการใช้โปรตีนและการใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ) ของปลาดีขึ้น สอดคล้องกับที่เคยมีการศึกษาและรายงานในปลาอื่นๆ ได้แก่ ปลากดอเมริกัน (Jackson *et al*., 1996; Li and Robinson, 1997; Eya and Lovell, 1997) ปลาเรนโบว์เทราท์ (Rodehutscord and Pfeffer, 1995) และปลาคาร์พ (Schafer *et al*., 1995) ซึ่งอยู่ในช่วง 250-1,000 ยูนิต/อาหาร 1 กก. แต่เป็นที่น่าสังเกตว่าระดับของไฟเตสยังให้ผลที่ผันแปรกับค่าอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน และการใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเกิดจากการยอมรับอาหารของปลาที่ไม่ค่อยดีนัก จึงมีผลทำให้อาหารเหลือ

สำหรับองค์ประกอบทางเคมีของตัวปลา พบว่าโปรตีนและไขมันของปลาในกลุ่มที่ได้รับอาหารเสริมเอนไซม์ไฟเตสมีค่าสูงกว่าปลาที่ไม่ได้รับการเสริมเอนไซม์ไฟเตส ทั้งนี้เนื่องจากไฟเตทมักจับรวมตัวอยู่กับโปรตีนและกรดอะมิโน ส่งผลให้โปรตีนเกิดการเปลี่ยนรูป (Singh and Krikorian, 1982; Spinelli *et al*., 1983; Robaina *et al*., 1998; Forster *et al*., 1999) อีกทั้งไฟเตทยังขัดขวางการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส (protease) อะไมเลส (amylase) และไลเพส (lipase) (Liener, 1994) จึงทำให้ปลานำโปรตีนและไขมันไปใช้ประโยชน์ได้ลดลง ดังนั้นการเสริมไฟเตสเพื่อย่อยสลายไฟเตท ทำให้โปรตีนที่จับตัวอยู่หลุดออกมาและเอนไซม์ต่างๆ สามารถทำงานได้ดีขึ้น ปลาที่ได้รับการเสริมเอนไซม์ไฟเตสจึงมีโปรตีนและไขมันสะสมในร่างกายสูงขึ้น นอกจากนี้ปริมาณเถ้าและฟอสฟอรัสในตัวปลาที่ได้รับอาหารเสริมไฟเตสมีแนวโน้มสูงขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับปลาในกลุ่มที่ได้รับอาหารที่ไม่เสริมไฟเตส โดยปลาที่ได้รับอาหารที่เสริมไฟเตสระดับมากกว่า 500 ยูนิต/อาหาร 1 กก. ไม่ต่างกับปลาที่ได้รับอาหารเสริม DCP ทั้ง 3 ระดับ แสดงให้เห็นว่าการเสริมไฟเตสสามารถทดแทนการใช้อนินทรีย์ฟอสเฟตได้โดยมีผลทำให้องค์ประกอบซากไม่ต่างกัน

สำหรับองค์ประกอบของเลือดปลา ได้แก่ ค่าฮีมาโตคริต ฮีโมโกลบิน โปรตีนในพลาสมา พบว่ามีค่าอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานของปลาปกติและไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีค่าใกล้เคียงกับผลการศึกษาของกิจการและวัชรินทร์ (2530); นิรุทธิ์ (2544); Li และ Robinson (1997); Boonyaratpalin และ Phromkhunthong (2000) อย่างไรก็ตามพบว่าค่าฮีโมโกลบินของปลาที่ได้รับอาหารเสริมเอนไซม์ไฟเตสมีแนวโน้มสูงขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับปลาที่ได้รับอาหารที่ไม่เสริมไฟเตสสอดคล้องกับการทดลองของ Li และ Robinson (1997) ซึ่งทดลองในปลากดอเมริกัน และ Phromkhunthong และคณะ (2004) ที่ทดลองในปลานิลแดงแปลงเพศ กล่าวได้ว่าไฟเตสจะช่วยปลดปล่อย Fe^{2+} ที่จับตัวอยู่กับโปรตีนเพื่อช่วยในการสังเคราะห์ฮีโมโกลบิน (Ensminger *et al*., 1994; Vielma *et al*., 2002) สอดคล้องกับอีกหลายการทดลองที่พบว่า การเสริมไฟเตสในอาหารปลาเทราท์และปลาอื่นๆ ช่วยในการปลดปล่อยฟอสฟอรัสและแร่ธาตุอื่นๆ ออกมาด้วย (Cain and Garling, 1995; Lanari *et al*., 1998; Oliva *et al*., 1998; Vielma *et al*., 2000; Cheng and Hardy, 2003) ซึ่งการที่ค่าฮีโมโกลบินสูงขึ้นนี้อาจทำให้ปลาทนทานต่อสภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ โดยที่อาจพบได้เสมอในระบบการเลี้ยงปลาแบบหนาแน่น การเสริมไฟเตสในอาหารทำให้ฟอสฟอรัสในกระดูกปลาที่วิเคราะห์ได้มีแนวโน้มสูงขึ้นด้วย เช่นเดียวกับเมื่อเสริม DCP ในอาหารมากขึ้น ทำให้แนวโน้มของฟอสฟอรัสที่สะสมในกระดูกสูงขึ้นตามไปด้วย สอดคล้องกับการทดลองของ วุฒิพร และคณะ (2547) และ Jackson และคณะ (1996) ซึ่งรายงานว่า ระดับไฟเตสที่เสริมในอาหารและเหมาะสมสำหรับการสร้างกระดูกในสัตว์ทั่วไปอยู่ในช่วง 500-1,000 ยูนิต/อาหาร 1 กก.

สรุปผลการทดลอง

1. การเสริมเอนไซม์ไฟเตสมีผลให้การเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหาร องค์ประกอบทางเคมีของตัวปลา องค์ประกอบเลือด และการสะสมของฟอสฟอรัสในกระดูกดีกว่ากลุ่มที่ไม่เสริมเอนไซม์ และระดับการเสริมที่เหมาะสมคือ 500 ยูนิต/อาหาร 1 กก.

2. การเสริมเอนไซม์ไฟเตสที่ระดับตั้งแต่ 500 ยูนิต/อาหาร 1 กก. มีผลให้การเจริญเติบโต, ประสิทธิภาพการใช้อาหาร ประสิทธิภาพการใช้โปรตีนและองค์ประกอบทางเคมีในตัวปลาใกล้เคียงกับการเสริม DCP ที่ระดับ 0.2-0.3%

จึงสามารถใช้เอนไซม์ไฟเตสทดแทนการเสริม DCP ได้

เอกสารอ้างอิง

กรมประมง. 2546. สถิติการประมงแห่งประเทศไทย พ.ศ. 2543. เอกสารฉบับที่ 4/2546. กรุงเทพฯ: ศูนย์สารสนเทศกรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

กิจการ ศุภมาตย์ และ วัชรินทร์ รัตนชู. 2530. ผลการเปลี่ยนแปลงความเค็มของน้ำต่อองค์ประกอบเลือดในปลานิล (*Sarotherodon niloticus*). ว.สงขลานครินทร์ วทท. 9:471-477.

นิรุทธิ์ สุขเกษม. 2544. ผลของระดับกากเนื้อเมล็ดในปาล์มน้ำมันต่อการเจริญเติบโตของปลานิล (*Oreochromis niloticus Linn.*). วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

วุฒิพร พรหมขุนทอง วิมล จันทรโรทัย นรินทร์ สงสีจันทร์ และ นพพร มานะจิตต์. 2540. ระดับโปรตีนในอาหารที่เหมาะสมต่อปลากดเหลืองขนาดปลานิ้ว. ว.สงขลานครินทร์ วทท. 19: 327-335.

วุฒิพร พรหมขุนทอง มนต์สรวง ยางทอง กิจการ ศุภมาตย์ และ ดุสิต นาคะชาต. 2547. ผลของเอนไซม์ไฟเตสและอนินทรีย์ฟอสเฟตต่อการใช้ฟอสฟอรัสในปลานิลแปลงเพศ (*Oreochromis niloticus* Linn.). ว.สงขลานครินทร์ วทท. 26(2):181-195.

Anwar, M.F. and Jafri, A.K. 1995. Effect of varying dietary lipid levels on growth, feed conversion, nutrient retention and carcass composition of fingerling catfish, *Heteropneustes fossilis*. Asian Fish. Sci. 8: 55-62.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 1990. Official Methods of Analysis. Washington, D.C.

Bancroft, J.D. 1967. Histochemical Techniques. London: Butterworths.

Blaxhall, P.C. and Daisley, K.W. 1973. Routine hematological methods for use with fish blood. J. fish Biol. 5: 771-781.

Boonyaratpalin, M. and Phromkunthong, W. 2000. Effects of Ronozyme VP treated rice bran and oil palm meal on growth of sex reversed *Tilapia nilotica*. The 6th Roche Aquaculture Conference Asia Pacific, Bangkok, Thailand, September 29, 2000. pp. 50-63.

Boyd, C.E. and Tucker, C.S. 1992. Water Quality and Pond Soil Analysis for Aquaculture. Alabama: Auburn University.

Cain, K. D. and Garling, D. L. 1995. Pretreatment of soybean meal with phytase for salmonid diets to reduce phosphorus concentrations in hatchery effluents. Prog.Fish-Cult. 57:114-119.

Cheng, Z.J. and Hardy, R.W. 2003. Effects of extrusion and expelling processing, and microbial phytase supplementation on apparent digestibility coefficients of nutrients in full-fat soybeans for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquacult. 218: 501-514.

Ciofalo, V., Barton, N., Kretz, K., Baird, J., Cook, M. and Shanahan, D. 2003. Safety evaluation of a phytase, expressed in *Schizosaccharomyces pombe*, intended for use in animal feed. Regulatory Toxicol. and Pharmacol. 37: 286-292.

Dato-Cajegas, C.R.S. and Yakupityage, A. 1996. The need for dietary mineral supplementation for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* cultured in a semi-intensive system. Aquacult. 144: 227-237.

Davis, D.A. and Gatlin III, D.M. 1991. Dietary mineral requirements of fish and shrimp. **In**: D.M. Akiyama and Tan, R.K.H. (Eds.), Proceedings of the Aquaculture Feed Processing and Nutrition Workshop. Singapore:American Soybean Association.

Dey, P. M. and Harborne, J. B. 1990. Methods in Plant Biochemistry. Vol 2. Carbohydrates. London: Academic Press.

Dupree, H.K. and Sneed, K.P. 1966. Response of channel catfish fingerling to different levels of major nutrients in purified diets. U.S. Bureau of Sports Fish and Wildlifte Tech. Pap. No.9.

Ensminger, A.H., Ensminger, M.R., Knolande, J.E. and Robson, J.R.K. 1994. Food Nutrition Encyclopedia VII. London: CRC Press.

Eya, J.C. and Lovell, R.T. 1997. Net absorption of dietary phosphorus from various inorganic sources and effect of fungal phytase on net absorption of plant phosphorus by channel catfish (*Ictalurus punctatus*). J. World Aqua. Soc. 28(4): 386-391.

Forster, I., Higgs, D.A., Dosanjh, B.S., Rowshandeli, M. and Parr, J. 1999. Potential for dietary phytase to improve the nutritive value of canola protein concentrate and decrease phosphorus output in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* held in 11ºC fresh water. Aquacult. 179: 109-125.

Hendricks, J.D. and Bailey, G.S. 1989. Adventitious toxins. **In**: Halver, J. E. (Ed). Fish Nutrition, 2nd. ed, New York: Academic Press.

Humason, G.L. 1972. Animal Tissue Technique, 4th.ed. San Francisco. CA: W.H. Freeman and Company Jackson, L,S., Li, M.H. and Robinson, E.H. 1996. Use of microbial phytase in channel catfish. *Ictalurus punctatus*. J. World Aqua. Soc. 27: 309-313.

Jackson, L,S., Li, M.H. and Robinson, E.H. 1996. Use of microbial phytase in channel catfish. *Ictalurus punctatus*. J. World Aqua. Soc. 27:309-313.

Jantrarotai, W., Sitasit, P. and Rajchapakdee, S. 1994. The optimum carbohydrate to lipid ratio in hybrid Clarias catfish (*Clarias macrocephalus* X *C. gariepinus*) diets containing raw broken rice. Aquacult. 127: 61-68.

Jobling, M. 1994. Fish Bioenergetics. New York: Chapman and Hall.

Lanari, D., Agaro, E.D. and Turri, C. 1998. Use of nonlinear regression to evaluate the effects of phytase enzyme treatment of plant protein diets for rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Aquacult. 161: 345-356.

Larsen, H.N. and Snieszko, S.F. 1961. Modification of microhematocrit technique with trout blood. Trans. Amer. Fish. Soc. 90: 139-142.

Li, M.N. and Robinson, E.H. 1997. Microbial phytase can replce inorganic phosphorus supplements in channel catfish *Ictalurus punctatus*. J. World Aqua. Soc. 28: 402-406.

Liener, I.E. 1994. Implications of antinutritional components in soybean foods. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 34: 31-67.

Lovell, R.T. 1978. Dietary phosphorus requirement of channel catfish. Trans. Am. Fish. Soc. 107: 617-621.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.

NRC. 1993. Nutrient Requirement of Fish. Washington, D.C.: National Academy Press.

Oliva, T.A., Pereira, J.P., Gounvies, A. and Gromes, E. 1998. Utilization of diets supplemented with microbial phytase by seabass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. Aquat. Living-Resour. 11: 255-259

Pointillart, A., Fourdin, A. and Fontaine, N. 1987. Importance of cereal phytase activity of phytate phosphorus utilization by growing pigs fed diets containing triticale or corn. J. Nutr. 29: 907-912.

Phromkunthong, W., Musakopat, A., Chittiwan, V., Supamattaya, K and Gabaudan, J. 2004. Used of microbial phytase replace inorganic phosphorus in sex-reversed red tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus X *Oreochromis mossambicus* Peters). Department of Aquatic Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai, Thailand.

Reddy, N.R., Sathe, S.K. and Salunkhe, D.K. 1982. Phytase in legumes and cereals. p.1-92. **In**. Advances in Food Research. Academic Press, New York, USA.

Robaina, L. Izquierd. M.S. Moyana, F.J. Socorro. J.,Vergara. J.M. Montero, D. 1998. Increase of the dietary n-3/n-6 fatty acid ration and addition of phosphorus improves live histological alterations induced by feeding diets containing soybean meal to gilthead seabream (*Sparus aurata*). Aquacult. 161: 281-293.

Robinson, E.H. and Wilson, R.P. 1985. Nutrition and feeding. **In**: Tucker, C.S. (ed.), Channel Catfish Culture. Development in Aquaculture and Fisheries Science 15: 323 - 404.

Rodehutscord, M. and Pfeffer, E. 1995. Effects of supplemental microbial phytase on phosphorus digestibility and utilization in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Wat Sci. Techn. 31: 143-147.

Schafer, A. Koppe, W.M., Meyer-Burgdorff, K.H. and Gunther, K.D. 1995. Effects off a microbial phytase

on the utilization of native phosphorus by carp in a diet based on soybean meal. Wat. Sci. Techn. 31: 149-155.

Singh, M. and Krikorian, A.D. 1982. Inhibition of trypsin actibity in vitro by phytate. J. Agr. Food Chem 30: 799-800.

Soares, J.H. Jr. and Hughes, K.P. 1995. Efficacy of phytase on phosphorus utilization. *In*. Proceedings of the 1995 Maryland Nutrition Conference for Feed Manufacturers. March 23-24. pp.76-79.

Spinelli, J., Houle, C.R., Wekeli, J.C. 1983. The effect of phytase on growth of rainbow trout *Salmo gairdneri* fed purified diets containing varying quantities of calcium and magnesium. Aquacult. 30: 71-83.

Steel, R.G.D. and Torrie, J.H. 1980. Principle and Procedures of Statistics, 2nd edition. New York: McGraw Hill.

Uhlig, H. 1998. Industrial Enzyme and their Application. New York: John Wiley & Sons, Inc..

Wee, K.L.and shu, S.W. 1989. The nutritive value of boiled full-fat soybean in pelleted feed for Nile tilapia. Aquacult. 81:303-314.

Wilson, R.P., Robinson, E.H. Gatlin III, D.M. and Poe, W.E. 1982. Dietary phosphorus requirement of channel catfish. J. Nutr. 112: 1197-1202.

Vielma, J., Makinen, T., Ekholm, P. and Koskela, J. 2000. Influence of dietary soy and phytase levels on performance and body composition of large rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and algal availability of phosphorus load. Aquacult. 183: 349-362.

Vielma, J., Ruohonen, K. and Peisker, M. 2002. Dephytinization of two soy proteins increases phosphorus and protein utilization by rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Aquacult. 204: 145-156.

Viola, S., Arieli, Y. and Zohar, G. 1988. Animal protein free feeds for hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O.aureus*) in intensive culture. Aquacult. 75: 115-125.

Viola, S., Angeoni, H. and Lahav, E. 1994. Present limits of protein sparing by amino acid supplementation of practical carp and tilapia feeds. Isr. J. Aquacult. Bamidgeh 46: 2103-211.

Yone, Y. and Fujii, M. 1975. Studies on Nutrition of red sea bream-XI: Effect of ω 3 fatty acid supplement in a corn oil diet on growth rate and feed efficiency. Bull. Jpn. Soc. Fish. 41: 73-77.

Zeitoun, I.H., Tack, P.I., Halver, I.E. and Ullrey. D.E. 1973. Influence of salinity on protein requirements of rainbow trout, *Salmo gairdneri* fingerling. J. Fish. Res. Board Can. 30: 1867 - 1873.