นิพนธ์ต้นฉบับ

ผลของเอนไซม์ไฟเตสและอนินทรีย์ฟอสเฟตต่อการใช้ฟอสฟอรัสในปลานิลแปลงเพศ (*Oreochromis niloticus* Linn.)

วุฒิพร พรหมขุนทอง[1] มนต์สรวง ยางทอง[2] กิจการ ศุภมาตย์[3] และ ดุสิต นาคะชาต[4]

Abstract

Phromkunthong, W., Yangthong, M., Supamattaya, K. and Nakachart, D.

Effects of phytase enzyme and inorganic phosphate on the utilization of phosphorus in sex reversed tilapia (*Oreochromis niloticus* Linn.)

Songklanakarin J. Sci. Technol., 2004, 26(2) : 181-195

The effects of feed-supplemented phytase were studied in 3.39-6.49 g sex-reversed tilapia. A total of eight formulated feeds were given to the fish, among which formulae 1-5 were phytase-supplemented at 0, 500, 1,000, 2,000 and 4,000 FTU / kg diet while in formulae 6-8, 0.46% inorganic phosphate from one of three sources, namely mono-calcium phosphate, di-calcium phosphate and tri-calcium phosphate, was supplemented. A 60-d period feeding trial was carried out in 200-l glass tanks. The best growth performance and feed utilization were recorded in tilapia given the feed with 4,000 FTU supplemented phytase / kg diet. It was further noted that the supplementation of 1,000 FTU / kg diet was sufficient to achieve satisfactory

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]Dr. Rer. Nat. (Aquatic Animal Pathology) รองศาสตราจารย์ [4]กศ.บ. (ชีววิทยา) ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112

Corresponding e-mail: pwutipor@ratree.psu.ac.th

รับต้นฉบับ 19 สิงหาคม 2546 รับลงพิมพ์ 2 ธันวาคม 2546

phosphorus digestibility, blood parameters and bone phosphorus contents. The phosphorus content in the feces could be reduced by replacing the inorganic phosphate from three sources with 2,000 or 4,000 FTU supplemented phytase / kg diet. The supplementation of phosphate from three sources made no significant differences in growth, feed efficiency or fecal phosphorus.

Key word : phytase, inorganic phosphate, phosphorus, nile tilapia, *Oreochromis niloticus* Linn.

บทคัดย่อ

วุฒิพร พรหมขุนทอง มนต์สรวง ยางทอง กิจการ ศุภมาตย์ และ ดุสิต นาคะชาต

ผลของเอนไซม์ไฟเตสและอนินทรีย์ฟอสเฟตต่อการใช้ฟอสฟอรัสในปลานิลแปลงเพศ (*Oreochromis niloticus* Linn.)

ว. สงขลานครินทร์ วทท. 2547 26(2) : 181-195

ทดลองเลี้ยงปลานิลแปลงเพศที่มีน้ำหนักอยู่ในช่วง 3.39 - 3.49 กรัม โดยการเสริมเอนไซม์ไฟเตสในระดับ 0 500 1,000 2,000 และ 4,000 ยูนิต (FTU) /อาหาร 1 กก. ในอาหารทดลองสูตรที่ 1 - 5 และเสริมอนินทรีย์ฟอสเฟตในปริมาณ 0.46% จาก 3 แหล่งคือ โมโนแคลเซียมฟอสเฟต ไดแคลเซียมฟอสเฟต และ ไตรแคลเซียมฟอสเฟตในอาหารสูตรที่ 6 - 8 ตามลำดับ โดยทำการทดลองในตู้กระจกซึ่งมีปริมาตรน้ำ 120 ลิตร ระยะเวลาในการทดลอง 60 วัน ผลจากการทดลองพบว่า ปลาที่ได้รับการเสริมไฟเตสในระดับ 4,000 ยูนิต/อาหาร 1 กก. มีการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหารดีที่สุด ขณะที่การเสริมไฟเตส 1,000 ยูนิต/อาหาร 1 กก. เพียงพอที่ทำให้ประสิทธิภาพการย่อยฟอสฟอรัส องค์ประกอบเลือด และฟอสฟอรัสในกระดูกของปลาอยู่ในเกณฑ์ดี นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถใช้ไฟเตสเสริมในอาหารสำหรับเลี้ยงปลานิลแทนการใช้อนินทรีย์ฟอสเฟตทั้ง 3 รูปแบบ โดยการเสริมไฟเตส 2,000 หรือ 4,000 ยูนิต/อาหาร 1 กก. ช่วยลดการสะสมฟอสฟอรัสในมูลปลา และยังพบว่าการเสริมโมโนแคลเซียมฟอสเฟต-ไดแคลเซียมฟอสเฟต และไตรแคลเซียมฟอสเฟตในอาหารปลานิลไม่มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจนสำหรับการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพอาหารและการขับฟอสฟอรัสในมูล

ฟอสฟอรัสเป็นแร่ธาตุชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญต่อปลาโดยเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของสารอินทรีย์ฟอสเฟต (organic phosphate) ได้แก่ อะดีโนซีน ไตรฟอสเฟต (adenosine triphosphate, ATP), ดีออกซีริโบนิวคลีอิกแอสิด (deoxyribonucleic acid, DNA), ริโบนิวคลีอิกแอสิด (ribonucleic acid, RNA) และฟอสฟอลิปิด (phospholipid) ในเซลล์และเซลล์เมมเบรน (membranes) นอกจากนี้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer) ยังทำหน้าที่รักษาระดับของความเป็นกรดด่าง (pH) ของของเหลวภายในร่างกายด้วย (Lovell, 1989) ปลามีความต้องการฟอสฟอรัสในปริมาณมาก แต่มีความสามารถดูดซึมฟอสฟอรัสจากน้ำได้น้อยเมื่อเทียบกับแร่ธาตุชนิดอื่น เช่น แคลเซียม ประกอบกับฟอสฟอรัสในน้ำมีอยู่น้อยมาก โดยอยู่ในช่วง 0.005 - 0.05 มก/ล (Lall, 1979 อ้างโดย Halver, 1989) ดังนั้นแหล่งฟอสฟอรัสที่สำคัญของปลาจึงมาจากอาหาร โดยอาหารที่ใช้เลี้ยงสัตว์น้ำโดยทั่วไปมีแหล่งวัตถุดิบที่สำคัญ 2 แหล่ง คือ จากพืชและสัตว์ แหล่งวัตถุดิบเหล่านี้มักมีฟอสฟอรัสอยู่ในปริมาณสูง แต่อยู่ในรูปแบบที่สัตว์น้ำสามารถนำมาใช้ได้น้อย เช่น ปลาป่น โดยฟอสฟอรัสที่พบอยู่ในรูปสารประกอบไฮดร๊อกซีอะพาไทต์ (hydroxyapatite) หรือไตรแคลเซียมฟอสเฟต (tricalcium phosphate) ซึ่งอยู่ในกระดูกและเกล็ดของปลา (Jobling, 1994) ส่วนฟอสฟอรัสจากพืชประมาณ 2 ใน 3 ส่วนของฟอสฟอรัสทั้งหมดจะอยู่ในรูปของกรดไฟติก

(phytic acid) ไฟเตท (phytate) หรือไฟติน (phytin) (Pointillart *et al*., 1987) ซึ่งสัตว์กระเพาะเดี่ยว (monogastric animals) และปลาไม่สามารถนำฟอสฟอรัสในรูปดังกล่าวมาใช้ได้ จึงต้องมีการเพิ่มปริมาณฟอสฟอรัสที่สามารถใช้ได้ในอาหาร ซึ่งก็เท่ากับเป็นการเพิ่มปริมาณของเสียที่ต้องขับทิ้งมากขึ้น

ปัจจุบันทุกฝ่ายให้ความสำคัญต่อสิ่งแวดล้อมมากขึ้น กิจกรรมที่ก่อให้เกิดผลเสียและเป็นการทำลายสิ่งแวดล้อมจะถูกต่อต้าน โดยมีการนำมาตรฐานการจัดการสิ่งแวดล้อมมาใช้เป็นเกณฑ์ในการตัดสินใจซื้อสินค้า เช่น ISO 14000 (Internation Organization for Standization) เป็นมาตรฐานที่ใช้กำหนดคุณภาพสินค้า โดยเน้นในด้านสิ่งแวดล้อม สินค้าที่ไม่ได้รับการรับรองว่ากระบวนการผลิตและการจัดการไม่มีส่วนในการทำลายสิ่งแวดล้อมก็จะถูกปฏิเสธหรือกีดกันทางการค้า โดยเฉพาะในแถบยุโรป อเมริกาและญี่ปุ่น การทำฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำถูกตั้งข้อสังเกตว่าเป็นสาเหตุหนึ่งของการทำลายสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะการปล่อยน้ำทิ้งจากการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ ซึ่งมลสารหลักของการทำฟาร์มเลี้ยงสัตว์น้ำได้แก่ คาร์บอน ฟอสฟอรัส ไนโตรเจน และฟอสฟอรัสเป็นตัวการสำคัญที่ทำให้เกิด ปรากฏการณ์ ยูโทรฟิเคชัน (eutrophication) โดยของเสียที่ขับออกมาในรูปที่ไม่ละลายน้ำจะสะสมอยู่ในดินตะกอน และปล่อยฟอสฟอรัสออกมาอย่างช้าๆ ขณะรูปที่ละลายน้ำ ได้แก่ อนินทรีย์ฟอสเฟตเป็นรูปที่มีผลต่อคุณภาพน้ำโดยตรง (Anderson and De Silva, 1996) หากมีการนำมาตรฐาน ISO 14000 มาใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ อาจจะมีผลกระทบต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและระบบเศรษฐกิจของประเทศ ดังนั้นจึงควรมีแนวทางสำหรับการจัดการป้องกันปัญหานี้ การเสริมเอนไซม์ไฟเตสในอาหารปลาเป็นแนวทางหนึ่งที่น่าสนใจ เนื่องจากเอนไซม์ชนิดนี้จัดอยู่ในกลุ่มฟอสฟาเตส (phosphatase) ซึ่งมีหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสทำให้ฟอสเฟตหลุดจากโมเลกุลของไฟเตทและนำไปใช้ประโยชน์ได้ การเสริมไฟเตสจึงช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการใช้ฟอสฟอรัสจากพืช ลดรายจ่ายจากการเสริมอนินทรีย์ฟอสเฟต เนื่องจากปลามีฟอสฟอรัสที่สามารถใช้ได้เพิ่มขึ้น ส่งผลให้ปริมาณฟอสฟอรัสขับทิ้งลดลง จึงช่วยลดปัญหามลภาวะอันเนื่องจากฟอสฟอรัส ระดับของไฟเตสที่เหมาะสมต่อการเสริมในอาหารสัตว์แต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน นอกจากนี้วัตถุดิบที่แตกต่างกันในการประกอบอาหารสัตว์ก็จะมีผลต่อระดับเอนไซม์ที่เหมาะสมต่อการเสริมด้วยเช่นกัน สำหรับในปลานิลมีรายงานว่าการเสริมไฟเตสในอาหารส่งผลในเชิงบวก (Gur, 1998) แต่ยังไม่มีการศึกษาถึงระดับที่เหมาะสม ส่วนอีกแนวทางหนึ่งที่จะสามารถช่วยบรรเทาปัญหานี้ลงได้และควรศึกษาควบคู่กันไปคือ การศึกษาถึงรูปแบบอนินทรีย์ที่มีความเหมาะสมต่อการเสริมในอาหารสัตว์แต่ละชนิด เพื่อสามารถใช้ฟอสฟอรัสได้คุ้มค่าที่สุด ดังนั้น การศึกษาถึงระดับเอนไซม์ไฟเตสและการศึกษาอนินทรีย์ฟอสเฟตรูปแบบที่เหมาะสมต่อการเสริมในอาหารปลานิลจึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งสำหรับการป้องกันปัญหานี้ได้

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมอุปกรณ์การทดลอง

ใช้ตู้กระจกขนาด 50 × 100 × 47 ซม. ความจุน้ำ 235 ลิตร (หน่วยทดลอง) โดยทำความสะอาด และติดตั้งอุปกรณ์ให้อากาศให้พร้อมแล้วเติมน้ำประปาที่ปราศจากคลอรีน ให้ได้ปริมาตร 120 ลิตร ปิดตู้ด้วยผ้าพลาสติกสีทึบ 3 ด้านเพื่อป้องกันการถูกรบกวนขณะทำการทดลอง

2. การเตรียมสัตว์ทดลอง

นำลูกปลานิลจำนวน 2,000 ตัว จากสถานีประมงน้ำจืดจังหวัดนครศรีธรรมราช มาอนุบาลในถังไฟเบอร์กลาสกลม ขนาดความจุ 2 ลบ.ม. เป็นเวลา 1 สัปดาห์ เพื่อให้ลูกปลาปรับสภาพให้เข้ากับสภาพแวดล้อมของการวิจัย โดยฝึกหัดให้กินอาหารทดลอง (อาหารทดลองสูตรที่ 1) วันละ 2 ครั้ง คือ เวลา 8.30 น. และ 16.30 น. สังเกตพฤติกรรมการยอมรับอาหาร ก่อนเริ่มการทดลองนำลูกปลาไปตรวจสอบการติดเชื้อแบคทีเรียและปรสิตภายนอก ลูกปลาที่ใช้ทดลองต้องมีสุขภาพดี ไม่มีโรคใดๆ ทำการคัดปลาใส่ตู้ทดลอง จำนวน 30 ตัว/ตู้ ปรับสภาพปลาให้คุ้นเคยกับสภาพแวดล้อมของตู้และอาหารทดลองเป็นเวลา 7 วัน

3. การเตรียมอาหารทดลอง

อาหารทดลองทั้งหมดมี 8 สูตรโดยแบ่งเป็นสองกลุ่ม คือ กลุ่มที่เสริมด้วยเอนไซม์ไฟเตสในระดับที่แตกต่างกัน

5 ระดับคือ 0, 500, 1,000, 2,000 และ 4,000 ยูนิต/อาหาร 1 กก. (สูตรที่ 1 - 5) และกลุ่มที่เสริมด้วยอนินทรีย์ฟอสเฟตต่างกันซึ่งมี 3 รูปแบบ คือ โมโนแคลเซียมฟอสเฟต ไดแคลเซียมฟอสเฟต และไตรแคลเซียมฟอสเฟต (สูตรที่ 6 - 8) โดยเสริมรูปแบบละ 0.46% คำนวณสูตรอาหารให้มีระดับโปรตีน ไขมันและระดับพลังงานเท่ากันทุกชุดการทดลอง คือ โปรตีน 30% ไขมัน 10-11% และพลังงานที่ย่อยได้ 3,900 กิโลคาลอรี/อาหาร 1 กก.

วิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการรวมทั้งฟอสฟอรัสและแคลเซียมของวัสดุอาหารที่นำมาใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารทดลอง โดยวิธี AOAC (1990) ดังแสดงไว้ใน Table 1

วิธีการเตรียมอาหารทดลองโดยชั่งวัสดุอาหารแต่ละอย่าง ได้แก่ กากถั่วเหลือง รำข้าว ปลายข้าว แกลบ วิตามินแร่ธาตุผสมยกเว้นไฟเตส และอนินทรีย์ฟอสเฟต [เป็น rock phosphate เกรดห้องปฏิบัติการ (lab grade) ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัทบีเอเอสเอฟ (BASF) ประเทศไทย] ตามสูตรที่คำนวณไว้ (Table 2) สำหรับน้ำมันข้าวโพดใส่ลงไปในระหว่างการผสมอาหาร เมื่อผสมส่วนประกอบวัสดุอาหารให้เข้ากันดีด้วยเครื่องผสมอาหาร นำไปเข้าเครื่อง

Table 1. Proximate analysis of feed ingredients (% on dry matter basis)[1]

Feed ingredients	Protein	Fat	Ash	Fiber	NFE	Phosphorus	Calcium
Soybean meal	48.37±0.36	7.30±0.20	7.85±0.03	4.84±0.06	30.21±0.70	0.69±0.02	34.00±1.51
Broken rice	8.15±0.08	1.39±0.13	0.79±0.00	0.40±0.02	86.77±0.12	0.14±0.00	-*
Rice bran	13.50±0.12	21.95±0.57	8.61±0.01	8.30±0.26	45.14±1.05	1.63±0.05	-*
Monocalcium phosphate	-	-	-	-	-	20.07±0.52	21.72±1.45
Dicalcium phosphate	-	-	-	-	-	17.67±0.41	62.56±0.45
Tricalcium phosphate	-	-	-	-	-	16.47±0.25	66.94±0.84

[1]Mean ± standard deviation of three replications ; NFE : Nitrogen-free extract ; * not detectable

Table 2. Composition of experimental diets (%)

Ingredients	Diet fomulae							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Soybean meal	54	54	54	54	54	54	54	54
Broken rice	21	21	21	21	21	21	21	21
Rice bran	19	19	19	19	19	19	19	19
Corn oil	1	1	1	1	1	1	1	1
Vitamin and mineral mixtures*	3	3	3	3	3	3	3	3
Enzyme phytase	0	0.01	0.02	0.04	0.08	0	0	0
Monocalcium phosphate	0	0	0	0	0	0.46	0	0
Dicalcium phosphate	0	0	0	0	0	0	0.46	0
Tricalcium phosphate	0	0	0	0	0	0	0	0.46
Chromic oxide	1	1	1	1	1	1	1	1
Rice hull	0.50	0.49	0.48	0.46	0.42	0.04	0.04	0.04

*** Vitamin and mineral mixture supplemented (g/kg feed): Thiamine (B_1) 10 mg; Riboflavin (B_2) 20 mg; Pyridoxine (B_6) 10 mg; Cyanocobalamin (B_{12}) 2 mg; Retinol(A) 4 mg; Cholecalciferol (D_3) 0.4 mg; 2-methyl-3-phytyl-1,4 naphthoquinone (K_1) 80 mg; Folic acid 5 mg; Calcium pantothenate 40 mg; Inositol 400 mg; Niacin 150 mg; DL-alpha-tocopherol (E) 60 mg; Choline chloride 6,000 mg; Ascorbic acid (C) 500 mg; Anticaking (SiO_2) 200 mg; Antioxidant(BHT) 2 mg; NaCl 0.25 g; $MgCO_3$ 3.75 g; $FeSO_4$ 0.72 g; $(CH_3COO)_2$ $Ca.5H_2O$ 0.88 g; $ZnSO_4.7H_2O$ 0.088 g; $MnSO_4.4H_2O$ 0.040 g; $CuSO_4.5H_2O$ 0.008 g; $CoCl_2.6H_2O$ 0.00025 g; $KIO_3.6H_2O$ 0.00075 g**

อัดเม็ดอาหารผ่านหน้าแว่นขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 มม. นำอาหารที่เตรียมเสร็จแล้วอบที่อุณหภูมิ 60° C นาน 24 ชั่วโมง ชั่งเอนไซม์ไฟเตสตามปริมาณที่คำนวณไว้ในแต่ละสูตร หน่วยของไฟเตส คือ เอฟทียู (FTU) โดย 1 เอฟทียู หมายถึง การปลดปล่อยหรือย่อย 1 ไมโครโมล ของอนินทรีย์ฟอสฟอรัส/นาที จากโซเดียมไฟเตท (sodium phytate) ที่อุณหภูมิ 37° C และพีเอช (pH) 5.5 (Soares and Hughes, 1995) ไฟเตสที่ใช้เป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัทบีเอเอสเอฟ (BASF) ประเทศเยอรมนี ซึ่งเป็นผลผลิตจากเชื้อรา *Aspergillus niger* มีชื่อทางการค้าว่านาทูฟอส (Natuphos 5,000 G) มีไฟเตสแอคติวิตี 5,000 เอฟทียู/กรัม นำเอนไซม์มาละลายในน้ำที่ปราศจากไอออน (deionized water) โดยใช้น้ำที่ปราศจากไอออนปริมาณ 50 มก./อาหาร 1 กก. ฉีดพ่นเอนไซม์ไฟเตสบนเม็ดอาหาร สำหรับสูตรที่ไม่มีการเสริมด้วยเอนไซม์ไฟเตสจะทำการฉีดพ่นเม็ดอาหารด้วยน้ำปริมาณ 50 มล./อาหาร 1 กก. เช่นกัน เพื่อให้ทุกสูตรมีความชื้นใกล้เคียงกัน ผึ่งอาหารให้แห้งแล้วบรรจุในถุงพลาสติกแล้วเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4° C (วุฒิพรและคณะ, 2540) และตรวจสอบคุณค่าทางโภชนาการของอาหารที่เตรียมเสร็จแล้ว (โปรตีน ไขมัน เยื่อใย ความชื้น เถ้า ฟอสฟอรัสและแคลเซียม) ตามวิธีมาตรฐานของ AOAC (1990) ส่วนปริมาณคาร์โบไฮเดรต (ไนโตรเจนฟรีเอกซ์แทรก, nitrogen free extract) หาได้จากการคำนวณตามสูตร 100 - (ความชื้น+โปรตีน+ไขมัน+เถ้า+เยื่อใย) ก่อนนำไปใช้ในการทดลองเลี้ยง (Table3)

4. แผนการทดลองและการเก็บรวบรวมข้อมูล

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (completely randomized design: CRD) โดยจัดให้แต่ละชุดการทดลองมี 3 ซ้ำ ทำการสุ่มโดยวิธีจับฉลาก โดยจับหน่วยทดลองทั้งหมด 24 หน่วย เมื่อเริ่มต้นการทดลองสุ่มปลาจากถังอนุบาลมาชั่งน้ำหนัก และปล่อยปลาในตู้ทดลอง ตู้ละ 30 ตัว ใช้ลูกปลาทั้งหมด 720 ตัวโดยสุ่มปลาที่มีน้ำหนักเฉลี่ย 3.39 - 3.49 กรัม/ตัว ให้อาหารวันละ 2 ครั้ง คือช่วงเช้าเวลา 8.30 น. และช่วงเย็นเวลา 16.30 น. โดยให้ปลากินอาหารจนอิ่ม บันทึกน้ำหนักอาหารที่ให้ทุกสัปดาห์ตลอดการทดลอง และตรวจวัดคุณภาพน้ำทุกๆ 2 สัปดาห์ตลอดการทดลองตามวิธีของ Boyd และ Tucker (1992) เพื่อควบคุมคุณภาพน้ำให้เหมาะสมกับการดำรงชีพของปลา ได้แก่ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ออกซิเจน (dissolved oxygen, DO) อุณหภูมิ ความเป็นด่าง (total alkalinity) ความกระด้าง (total hardness) ปริมาณฟอสฟอรัส (total phosphorus)

ในการศึกษาความสามารถของการย่อย (digestibility) โดยเลี้ยงปลาด้วยอาหารสูตรเดิมและเสริมโครมิ-คออกไซด์ (Cr_2O_3) 1% ในสัปดาห์ที่ 5 และเก็บมูลในสัปดาห์ที่ 6-8 โดยใช้วิธีกาลักน้ำ (Siphoning) ดำเนินการเก็บมูลหลังจากให้อาหาร 1 ชั่วโมง (Shiau and Liang, 1994) ทุกๆ วัน รวบรวมมูลนำไปเก็บไว้ในช่องแช่แข็ง (freezer) เพื่อนำไปวิเคราะห์โปรตีน ไขมัน เยื่อใย เถ้า ฟอสฟอรัสและแคลเซียม ตามวิธีมาตรฐานของ AOAC (1990)

Table 3. Proximate analysis of 8 experimental diets (on % dry mater basis)[1]

Treatment	Phytase (unit/kg diet)	Protein	Fat	Ash	Fiber	NFE	Phosphorus
1	0	30.28±0.23	11.18±0.22	6.66±0.01	5.54±0.12	42.59±0.17	0.77±0.03
2	500	30.22±0.27	11.39±0.08	6.68±0.01	5.78±0.15	41.97±0.26	0.75±0.01
3	1,000	30.35±0.30	11.12±0.08	6.71±0.02	6.29±0.07	42.02±0.39	0.79±0.02
4	2,000	30.80±0.13	10.46±0.32	6.85±0.00	5.66±0.18	42.56±0.30	0.79±0.02
5	4,000	30.64±0.17	11.38±0.33	6.83±0.01	5.28±0.52	42.63±0.72	0.80±0.01
6	Monocalcium phosphate	30.46±0.35	10.84±0.20	6.95±0.13	5.55±0.22	42.84±0.26	0.92±0.03
7	Dicalcium phosphate	30.61±0.12	11.30±0.06	6.92±0.08	5.70±0.26	42.50±0.37	0.89±0.01
8	Tricalcium phosphate	30.67±0.25	11.26±0.75	7.02±0.04	5.36±0.19	42.73±0.62	0.87±0.04

[1]Mean ± standard deviation of three replications ; NFE : Nitrogen-free extract

5. การเก็บข้อมูลและวิเคราะห์ข้อมูล

5.1 การตรวจสอบพฤติกรรมและลักษณะที่แสดงออกภายนอก

ในระหว่างการทดลองสังเกตลักษณะภายนอกทั่วไปของปลาทุกชุดการทดลอง ได้แก่ สีของลำตัว การตกเลือด และการเกิดบาดแผลที่ครีบ ผิวหนัง และอวัยวะภายนอกอื่นๆ ใช้ยาและสารเคมีเพื่อป้องกันโรค ตามสภาพของปลา ทำการดูดตะกอน ทำความสะอาดตู้ปลาทุกๆ 2 วัน เปลี่ยนถ่ายน้ำ เพื่อควบคุมคุณภาพน้ำให้เหมาะสมตลอดการทดลอง

5.2 การตรวจสอบการเจริญเติบโตของปลา

การชั่งน้ำหนักปลาดำเนินการทุก 2 สัปดาห์ เพื่อทราบน้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้นโดยการชั่งน้ำหนักรวมของปลาแต่ละซ้ำด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง (ในวันที่ชั่งน้ำหนักงดให้อาหารเป็นเวลา 1 วัน) นับจำนวนปลาที่เหลืออยู่ สังเกตลักษณะอาการปลาตลอดการทดลอง พร้อมทั้งจดบันทึกไว้ จนสิ้นสุดการทดลอง 8 สัปดาห์ นำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาค่าอัตรารอดตาย อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ และอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ ตามวิธีของ Dupree และ Sneed (1966) อัตราการกินอาหาร ตามวิธีของ Yone และ Fujii (1975)

5.3 การหาค่าดัชนีตับต่อตัว (Hepatosomatic Index)

เมื่อสิ้นสุดการทดลอง สุ่มปลาจากทุกชุดการทดลองๆ ละ 6 ตัว นำปลาแต่ละตัวไปชั่งน้ำหนักตัวและน้ำหนักตับ นำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่าดัชนีตับต่อตัว ตามวิธีของ Anwar และ Jafri (1995)

5.4 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของปลา

สุ่มตัวอย่างปลาก่อนเริ่มการทดลองจำนวน 30 ตัว นำไปวิเคราะห์ความชื้นในร่างกายทันทีและนำตัวอย่างปลาไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของตัวปลาได้แก่ ปริมาณโปรตีน ไขมัน เถ้า ฟอสฟอรัสและแคลเซียมตามวิธีการของ AOAC (1990) บันทึกเป็นองค์ประกอบทางเคมีของตัวปลาเริ่มต้น เมื่อสิ้นสุดการทดลองสุ่มตัวอย่างปลาจากแต่ละตู้ทดลองๆ ละ 6 ตัว ไปวิเคราะห์หาความชื้นของตัวปลาตามวิธีมาตรฐานของ AOAC (1990) และนำปลา 10 ตัวจากแต่ละตู้ทดลอง ไปผ่านกระบวนการทำให้แห้งโดยอบที่อุณหภูมิ 60° C นาน 48 ชั่วโมง นำตัวอย่างนั้นไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของตัวปลาได้แก่ ปริมาณโปรตีน ไขมัน เยื่อใย เถ้า ฟอสฟอรัสและแคลเซียมตามวิธีการของ AOAC (1990) และแล่เอาเฉพาะกระดูกปลาทั้งตัวไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60° C จากนั้นจึงนำไปวิเคราะห์ปริมาณเถ้าและฟอสฟอรัสตามวิธีการของ AOAC (1990) คำนวณค่าประสิทธิภาพการใช้โปรตีน ตามวิธีการของ Zeitoun และคณะ (1973) การใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ (apparent net protein utilization, ANPU) ตามวิธีของ Robinson และ Wilson (1985)

5.5 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อวิทยา

เมื่อสิ้นสุดการทดลองทำการเก็บตัวอย่างโดยสุ่มเก็บเนื้อเยื่อตับและไต จากตัวอย่างปลาตู้ทดลองๆ ละ 2 ตัวมาแช่ในสารละลายบูแอง (Bouin's fluid) 1 สัปดาห์ แล้วเปลี่ยนน้ำยาดองเป็นแอลกอฮอล์ 70% ก่อนนำไปผ่านกรรมวิธีเตรียมเนื้อเยื่อของ Humason (1972) ตัดเนื้อเยื่อให้มีความหนา 3-4 ไมโครเมตร แล้วย้อมด้วยสี hematoxylin และ eosin (HE) (Bancroft, 1967) จากนั้นนำเนื้อเยื่อไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์

5.6 การศึกษาองค์ประกอบเลือด

สุ่มปลาจากทุกชุดการทดลองๆ ละ 6 ตัว มาสลบด้วยควินาลดิน (quinaldine) เจาะเลือดจากบริเวณโคนหางโดยใช้ เอทีลินไดอะมีนเตตราอะซีติก (ethylenediaminetetraacetic acid : EDTA) 1 % เป็นสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด เพื่อศึกษาองค์ประกอบของเลือด คือ

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

5.7 การศึกษาสัมประสิทธิ์การย่อยอาหาร

ในการศึกษาสัมประสิทธิ์การย่อยอาหารของปลานิลโดยเติมโครมิคออกไซด์ (Cr_2O_3) 1% (มีเนื้อ Cr2O3 0.5%) ของน้ำหนักอาหารเพื่อเป็นตัวบ่งชี้ และใช้แกลบป่นเป็นตัวปรับสูตรอาหารให้เท่ากันทุกสูตร ทำการเก็บรวบรวมมูลปลาใช้วิธีที่ดัดแปลงมาจาก Boonyaratpalin และ Phromkunthong (2000) โดยเก็บรวบรวมมูลปลาหลังจากให้อาหาร 1 ชั่วโมง เพราะปลานิลจะขับมูลออกมาเมื่อมีการกินอาหารเข้าไปใหม่ ทำการเก็บรวบรวมมูลใน

น้ำด้วยการใช้สายพลาสติกขนาดเล็กดูดมูลปลาออกจากตู้ แล้วกรองด้วยถุงกรองที่ผูกติดไว้กับสายยางอีกด้าน และนำไปแช่แข็ง เก็บรวบรวมมูลในสัปดาห์ที่ 6-8 เป็นเวลา 14 วัน เพื่อให้ได้ตัวอย่างเพียงพอสำหรับการวิเคราะห์ อบมูลปลาให้แห้งด้วยอุณหภูมิ 60° C นาน 48 ชั่วโมง นำตัวอย่างนั้นไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีได้แก่ ปริมาณโปรตีน ไขมัน เยื่อใย เถ้า ฟอสฟอรัสและแคลเซียมตามวิธีการ AOAC (1990) วิเคราะห์ปริมาณโครมิคออกไซด์ในอาหารและในมูลตามวิธีของ Furukawa และ Tsukahara (1966)

6. การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวน ANOVA แบบ CRD และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan Multiple Range Test (Duncan, 1955)

ผลการทดลอง

1. ความผิดปกติและพฤติกรรมของปลานิลที่ได้รับอาหารสูตรต่าง ๆ

ผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่าปลานิลที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมเป็นวัตถุดิบพืชทั้งหมดในกลุ่มที่มีการเสริมเอนไซม์ไฟเตสและอนินทรีย์ฟอสเฟตทั้ง 3 รูปแบบ ไม่พบความผิดปกติของรูปร่างลักษณะภายนอก ปลาทุกตัวมีสุขภาพแข็งแรง พฤติกรรมปกติ

2. การเจริญเติบโตและอัตรารอด

2.1 น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัว

น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวของปลานิลที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง 8 สูตรตลอดระยะเวลาการทดลอง 8 สัปดาห์ เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่เลี้ยง ดังแสดงใน Table 4 โดยที่น้ำหนักปลาเมื่อเริ่มทดลองจนถึงสัปดาห์ที่ 4 ของแต่ละชุดการทดลอง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) น้ำหนักของปลาเริ่มมีความแตกต่างกันตั้งแต่สัปดาห์ที่ 6 จนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง โดยพบว่าปลาที่ได้รับอาหารเสริมไฟเตส 4,000 ยูนิต/อาหาร 1 กก. (สูตรที่ 5) มีน้ำหนักเฉลี่ยสูงกว่ากลุ่มที่เสริมไฟเตสที่ระดับ 500 และ 1,000 ยูนิต/อาหาร 1 กก. ($p<0.05$) แต่ไม่ต่างจากปลาที่ได้รับอาหารเสริมไฟเตสที่ 2,000 ยูนิต/อาหาร 1 กก. และปลาที่ได้รับอาหารเสริมอนินทรีย์ฟอสเฟตทั้ง 3 รูปแบบ ($p>0.05$) ปลาที่ได้รับอาหารเสริมไดแคลเซียมฟอสเฟต มีน้ำหนักเฉลี่ยต่ำกว่าปลาที่ได้รับอาหารเสริมอนินทรีย์ฟอสเฟตอีก 2 รูปแบบ ($p<0.05$)

3. น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ อัตราการกินอาหาร และอัตราการรอดตาย

น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ และอัตราการรอดตายของปลานิลที่ได้รับอาหารทั้ง 8 สูตรเป็น

Table 4. Average body weight of sex-reversed tilapia fed 8 experimental diets for 8-week period

Treatment	Phytase (unit/kg diet)	week				
		0	2	4	6	8
1	0	3.49±0.06[a]	4.16±0.26[a]	5.65±0.37[a]	6.73±0.11[a]	7.76±0.06[a]
2	500	3.39±0.10[a]	4.01±0.1[a]	5.34±0.35[a]	6.71±0.32[a]	8.11±0.35[a]
3	1,000	3.47±0.01[a]	4.02±0.09[a]	5.32±0.15[a]	6.60±0.12[a]	8.09±0.23[a]
4	2,000	3.47±0.03[a]	4.12±0.06[a]	5.48±0.06[a]	6.90±0.12[ab]	8.51±0.28[ab]
5	4,000	3.42±0.12[a]	4.34±0.18[a]	5.95±0.49[a]	7.63±0.60[bc]	9.76±0.82[bc]
6	Monocalcium phosphate	3.45±0.07[a]	4.24±0.18[a]	5.97±0.48[a]	7.76±0.73[bc]	10.20±1.09[c]
7	Dicalcium phosphate	3.48±0.06[a]	4.20±0.21[a]	5.79±0.47[a]	7.22±0.64[abc]	8.80±1.21[ab]
8	Tricalcium phosphate	3.47±0.05[a]	4.32±0.11[a]	6.07±0.22[a]	7.98±0.52[c]	10.35±0.67[c]

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

ระยะเวลา 8 สัปดาห์ แสดงใน Table 5 พบว่าน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นและอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของปลาที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง 8 สูตร มีแนวโน้มในแนวทางเดียวกับน้ำหนักเฉลี่ยของปลา โดยปลาที่ได้รับอาหารเสริมไฟเตส 4,000 ยูนิต/อาหาร 1 กก. (สูตรที่ 5) มีค่าสูงกว่ากลุ่มที่ได้รับอาหารเสริมไฟเตสระดับต่ำกว่า (สูตรที่ 2-4) และกลุ่มที่ไม่เสริม (สูตรที่ 1) แต่ไม่แตกต่างกับปลาที่ได้รับอาหารเสริมอนินทรีย์ฟอสเฟตทั้ง 3 รูปแบบ (สูตรที่ 6-8) ($p>0.05$) ปลาที่ได้รับอาหารเสริมไดแคลเซียมฟอสเฟตมีค่าดังกล่าวต่ำกว่าปลาที่ได้รับอาหารเสริมอนินทรีย์ฟอสเฟตอีก 2 รูปแบบ ($p<0.05$) อัตราการกินอาหารและอัตราการรอดตายของปลาที่ได้รับอาหารทั้ง 8 สูตร ไม่มีความแตกต่างกัน ($p>0.05$) (Table 5)

4. อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (feed conversion rate, FCR) ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน (protein efficiency ratio, PER) และการใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ (apparent net protein utilization, ANPU)

อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน และการใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิของปลานิลที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง 8 สูตร แสดงใน Table 6 โดยพบว่าอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อของปลาที่ได้รับอาหาร

Table 5. Weight gain, specific growth rate, rate of feed intake and survival rate of sex-reversed tilapia fed 8 experimental diets for a 8-week period[1]

Treatment	Phytase (unit/kg diet)	Weight gain (%)	Specific growth rate (% /fish/day)	Rate of feed intake (% /fish/day)	Survival rate (%)
1	0	122.18±4.07[a]	1.43±0.03[a]	3.38±0.10[a]	100[a]
2	500	139.28±9.86[a]	1.56±0.07[a]	3.56±0.10[a]	98.33±2.89[a]
3	1,000	133.07±7.82[a]	1.51±0.06[a]	3.31±0.07[a]	98.33±2.89[a]
4	2,000	145.08±8.52[a]	1.60±0.06[a]	3.38±0.11[a]	100[a]
5	4,000	185.77±29.50[bc]	1.87±0.19[bc]	3.50±0.28[a]	100[a]
6	Monocalcium phosphate	195.55±28.17[c]	1.93±0.18[c]	3.53±0.11[a]	96.67±2.89[a]
7	Dicalcium phosphate	153.18±33.24[ab]	1.65±0.23[ab]	3.24±0.44[a]	100[a]
8	Tricalcium phosphate	198.61±15.30[c]	1.95±0.09[c]	3.64±0.45[a]	98.33±2.89[a]

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

Table 6. FCR, PER, ANPU of sex-reversed tilapia fed 8 experimental diets for 8-week period[1]

Treatment	Phytase (unit/kg diet)	FCR	PER	ANPU(%)
1	0	2.50±0.12[c]	1.32±0.06[a]	23.36±1.36[a]
2	500	2.48±0.13[c]	1.33±0.07[a]	23.31±0.45[a]
3	1,000	2.37±0.08[bc]	1.39±0.05[a]	23.32±0.38[a]
4	2,000	2.26±0.17[ab]	1.44±0.11[ab]	25.21±1.04[ab]
5	4,000	2.04±0.08[a]	1.60±0.07[c]	27.63±1.40[b]
6	Monocalcium phosphate	2.08±0.12[a]	1.58±0.09[bc]	26.21±2.66[ab]
7	Dicalcium phosphate	2.24±0.11[ab]	1.46±0.07[abc]	24.69±3.24[ab]
8	Tricalcium phosphate	2.07±0.11[a]	1.58±0.08[bc]	29.92±0.60[b]

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

เสริมไฟเตส 2,000 (สูตรที่ 4) และ 4,000 ยูนิต/อาหาร 1 กก. (สูตรที่ 5) มีค่าต่ำกว่า (ดีกว่า) ปลาที่ได้รับอาหารเสริมไฟเตส 500 ยูนิต/อาหาร 1 กก. (สูตรที่ 2) และที่ไม่เสริม (สูตรที่ 1) ($p<0.05$) แต่ไม่ต่างจากปลาที่ได้รับอาหารเสริมไฟเตส 1,000 ยูนิต/อาหาร 1 กก. (สูตรที่ 3) ($p>0.05$) ปลาที่ได้รับอาหารเสริมอนินทรีย์ฟอสเฟตทั้ง 3 รูปแบบ มีค่าอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) และไม่ต่างจากปลาที่ได้รับอาหารเสริมไฟเตส 2,000 และ 4,000 ยูนิต/อาหาร 1 กก. ประสิทธิภาพการใช้โปรตีนของปลาที่ได้รับอาหารเสริมไฟเตส 4,000 ยูนิต/อาหาร 1 กก. (สูตรที่ 5) สูงกว่า (ดีกว่า) ปลาที่ได้รับอาหารเสริมไฟเตสที่ระดับต่ำกว่า (สูตรที่ 2-4) การใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิของปลาที่ได้รับอาหารเสริม 4,000 ยูนิต/อาหาร 1 กก. สูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารเสริมไฟเตสที่ระดับ 500 และ 1,000 ยูนิต/ อาหาร 1 กก. และที่ไม่เสริม ($p<0.05$) แต่ไม่ต่างจากที่เสริมไฟเตส 2,000 ยูนิต/อาหาร 1 กก. ($p>0.05$) ปลาที่ได้รับอาหารเสริมอนินทรีย์ฟอสเฟตทั้ง 3 รูปแบบมีค่าการใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิไม่แตกต่างกัน และไม่ต่างจากปลาที่ได้รับอาหารเสริม ไฟเตส 4,000 ยูนิต/อาหาร 1 กก. ($p>0.05$)

5. สัมประสิทธิ์การย่อยอาหารของปลานิล

สัมประสิทธิ์การย่อยสารอาหาร ได้แก่ วัตถุแห้ง โปรตีน ไขมัน ฟอสฟอรัส และการดูดซึมฟอสฟอรัสของปลานิลที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง 8 สูตร เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ แสดงใน Table 7 โดยพบว่า สัมประสิทธิ์การย่อยอาหาร (วัตถุแห้งและโปรตีน) ของปลาที่ได้รับอาหารเสริมไฟเตส มีค่าสูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารที่ไม่เสริมไฟเตส ($p<0.05$) ปลาที่ได้รับอาหารเสริมไฟเตส 1,000-4,000 ยูนิต/อาหาร 1 กก. มีค่าดังกล่าวไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) แต่ปลาที่ได้รับอาหารเสริมไฟเตส 2,000 ยูนิต/อาหาร 1 กก. มีค่าสูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารเสริมไฟเตส 500 ยูนิต/อาหาร 1 กก. ($p<0.05$) ปลาที่ได้รับอาหารเสริมโมโนแคลเซียมฟอสเฟตและไตรแคลเซียมฟอสเฟตมีค่าดังกล่าวไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) แต่สูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารเสริมไดแคลเซียมฟอสเฟต ($p<0.05$) สัมประสิทธิ์การย่อยไขมันของปลาที่ได้รับอาหารเสริมไฟเตส 500-4,000 ยูนิต/อาหาร 1 กก. สูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารที่ไม่เสริมไฟเตส ($p<0.05$) แต่ไม่แตกต่างกันในกลุ่มที่เสริมไฟเตสต่างระดับ และไม่ต่างจากปลาที่ได้รับอาหารเสริมไตรแคลเซียมฟอสเฟต ($p> 0.05$) ปลาที่ได้รับอาหารเสริมโมโนแคลเซียมฟอสเฟตและไดแคลเซียมฟอสเฟต มีค่าดังกล่าวต่ำกว่าปลาที่ได้รับอาหารเสริมไตรแคลเซียมฟอสเฟตและต่ำกว่าปลาที่ได้รับอาหารเสริมไฟเตสทุกระดับ ($p<0.05$) สัมประสิทธิ์การย่อยฟอสฟอรัสของปลาที่ได้รับอาหารไม่เสริมไฟเตสมีค่าต่ำที่สุด และไม่แตกต่างจากปลาที่ได้รับอาหารเสริมไฟเตส 500 ยูนิต/อาหาร 1 กก. ส่วนปลาที่ได้รับอาหารเสริมไฟเตส 4,000 ยูนิต/อาหาร 1 กก. มีค่าดังกล่าวสูงที่สุดแต่ไม่ต่างจากปลาที่ได้

Table 7. Digestibility coefficient of phosphorus in tilapia fed the 8 experimental diets for 8-week period[1]

Treatment	Phytase (unit/kg diet)	Digestibility coefficient(%)			
		Dry matter	Protein	Fat	Phosphorus
1	0	32.43±3.03 [ab]	54.49±1.30 [a]	48.43±0.77 [a]	11.10±7.39 [a]
2	500	43.27±3.30 [c]	75.19±3.44 [c]	59.08±1.66 [b]	20.91±7.61 [ab]
3	1,000	47.26±1.10 [cd]	79.31±0.56 [cd]	63.23±1.28 [b]	31.46±4.90 [bcd]
4	2,000	53.34±1.89 [d]	81.60±0.64 [d]	64.32±1.20 [b]	34.09±1.76 [cd]
5	4,000	46.29±6.54 [cd]	78.68±2.63 [cd]	63.30±3.65 [b]	37.00±6.62 [d]
6	Monocalcium phosphate	38.97±3.70 [bc]	76.31±1.19 [c]	49.22±4.47 [a]	22.98±9.16 [abc]
7	Dicalcium phosphate	29.42±7.91 [a]	67.18±3.79 [b]	46.69±3.85 [a]	24.26±2.31 [bc]
8	Tricalcium phosphate	42.06±4.11 [c]	77.33±1.06 [c]	60.09±2.68 [b]	25.24±8.55 [bcd]

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

รับอาหารเสริมไฟเตส 1,000 และ 2,000 ยูนิต/อาหาร 1 กก. (p>0.05) และไม่ต่างจากปลาที่ได้รับอาหารเสริมไตรแคลเซียมฟอสเฟต (p>0.05) ปลาที่ได้รับอาหารเสริมอนินทรีย์ฟอสเฟตทั้ง 3 รูปแบบ มีค่าดังกล่าวไม่แตกต่างกัน (p>0.05) (Table7)

6. องค์ประกอบทางโภชนาการของปลาทั้งตัว

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางโภชนาการของปลาทั้งตัว เมื่อสิ้นสุดการทดลองของปลาที่ได้รับอาหารทั้ง 8 สูตร แสดงไว้ใน Table 8 โดยพบว่าค่าต่างๆ มีความแตกต่างกันทางสถิติ (p<0.05)

7. องค์ประกอบเลือดและดัชนีตับต่อตัว

องค์ประกอบเลือดและดัชนีตับต่อตัวของปลาที่ได้รับอาหารทดลอง 8 สูตร แสดงไว้ใน Table 9 โดยพบว่าฮีมาโตคริตและฮีโมโกลบินของปลาที่ได้รับอาหารเสริมไฟเตส 1,000 ยูนิต/อาหาร 1 กก. สูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารไม่เสริมไฟเตส (p<0.05) ส่วนปลาที่ได้รับอาหารเสริม อนินทรีย์ฟอสเฟตทั้ง 3 รูปแบบ มีค่าดังกล่าวสูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารเสริมไฟเตสทุกระดับ (p<0.05) ค่าโปรตีนในพลาสมาของปลาที่ได้รับอาหารในสูตรต่างกัน แตกต่างกัน แต่ไม่แสดงถึงความสัมพันธ์ของการเสริมไฟเตสและอนินทรีย์ฟอสเฟต ค่าดัชนีตับต่อตัวของปลาที่ได้รับอาหารสูตรต่างๆ ไม่มีความแตกต่างกัน (p>0.05)

8. การศึกษาเนื้อเยื่อวิทยาของตับและไตปลานิล

จากผลการศึกษาเนื้อเยื่อตับและไตของปลานิลพบว่าปลาที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง 8 สูตร ตลอดระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าปลาที่ได้รับอาหารทุกสูตรมีโครงสร้างของเนื้อเยื่อตับและไตปกติ

9. การสะสมเถ้า ฟอสฟอรัส ในกระดูก

ปริมาณเถ้าของกระดูก ฟอสฟอรัสในกระดูกและฟอสฟอรัสในมูลมีความแตกต่างกัน (p<0.05) ดังแสดงไว้ใน Table 10 โดยพบว่า ปริมาณเถ้าของกระดูกและฟอสฟอรัสในกระดูกของปลาที่ได้รับอาหารที่ไม่เสริมไฟเตสมีค่าต่ำที่สุด (p<0.05) ส่วนปลาที่ได้รับอาหารเสริม ไฟเตสที่ระดับ 500, 1,000 และ 4,000 ยูนิต/อาหาร 1 กก. มีค่าดังกล่าวไม่แตกต่างกัน (p>0.05) และสูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารเสริมไฟเตสที่ 2,000 ยูนิต/อาหาร 1 กก. ส่วนปลาที่ได้รับอาหารเสริมอนินทรีย์ฟอสเฟตทั้ง 3 รูปแบบ มีค่าดังกล่าวสูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารที่ไม่เสริมไฟเตส (p<0.05) แต่ไม่แตกต่างกันระหว่างชุดทดลอง (p>0.05) ปริมาณฟอสฟอรัสในมูลของปลาที่ได้รับอาหารที่ไม่เสริมไฟเตสมีค่าสูงที่สุด (p<0.05) และไม่แตกต่างจากปลาที่ได้รับอาหารเสริมอนินทรีย์ฟอสเฟตทั้ง 3 รูปแบบ แต่แตกต่างจากปลา

Table 8. Whole body composition of sex-reversed tilapia fed 8 experimental diets for 8 weeks[1]

Treatment	Phytase (unit/kg diet)	Moisture	Protein	Fat	Ash	Phosphorus
I[2]		74.65±0.47	54.99±0.30	30.72±0.62	14.61±0.06	2.48±0.09
1	0	74.80±0.51[a]	63.36±0.23[c]	30.47±0.89[cd]	13.24±0.22[c]	2.01±0.05[b]
2	500	74.34±0.52[a]	62.23±0.09[b]	28.62±0.88[ab]	12.19±0.39[ab]	1.98±0.04[b]
3	1,000	74.44±0.24[a]	60.81±0.96[a]	30.41±0.64[cd]	11.96±0.18[a]	1.76±0.20[a]
4	2,000	73.77±0.77[a]	61.14±0.16[a]	30.91±0.97[d]	12.21±0.37[ab]	2.05±0.05[b]
5	4,000	74.29±0.39[a]	62.59±0.35[bc]	31.43±1.04[d]	12.43±0.33[b]	1.81±0.09[a]
6	Monocalcium phosphate	75.07±0.87[a]	62.76±0.46[bc]	29.05±0.66[abc]	13.31±0.13[c]	2.12±0.02[b]
7	Dicalcium phosphate	74.82±1.60[a]	62.44±0.41[b]	29.98±0.44[bcd]	13.10±0.13[c]	2.09±0.06[b]
8	Tricalcium phosphate	75.10±0.76[a]	64.37±0.24[d]	27.92±0.64[a]	13.46±0.04[c]	2.11±0.04[b]

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

Table 9. Blood components of sex-reversed tilapia fed 8 experimental diets for 8-weeks[1]

Treatment	Phytase (unit/kg diet)	Hematocrit (%)	Hemoglobin (g/dl)	Plasma protein (mg%)	Hepatosomatic index (%)
1	0	22.78±1.73[a]	2.93±0.71[a]	12.74±2.47[ab]	1.62±0.69[a]
2	500	24.36±2.23[ab]	4.08±0.92[ab]	12.02±1.04[a]	2.39±0.46[a]
3	1,000	25.97±1.96[b]	4.91±0.94[bc]	11.70±1.23[a]	2.07±0.77[a]
4	2,000	23.77±2.11[ab]	3.36±1.24[a]	12.74±0.46[ab]	2.13±0.24[a]
5	4,000	23.76±1.77[a]	3.47±0.85[a]	11.65±1.32[a]	1.92±0.28[a]
6	Monocalcium phosphate	30.99±1.29[c]	5.66±0.86[c]	14.17±1.42[b]	1.80±0.36[a]
7	Dicalcium phosphate	30.73±2.07[c]	5.29±0.84[c]	11.70±1.82[a]	2.04±0.39[a]
8	Tricalcium phosphate	32.46±2.05[c]	5.06±1.54[bc]	11.24±1.20[a]	2.01±0.37[a]

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

Table 10. Phosphorus in ash, bone and feces of sex-reversed tilapia fed 8 experimental diets for 8-weeks period[1]

Treatment	Phytase (unit/kg diet)	Bone ash (%)	Bone phosphorus (%)	Feces phosphorus (%)
1	0	21.13±0.11[a]	3.34±0.37[a]	1.12±0.05[cd]
2	500	24.62±0.35[d]	3.95±0.19[bc]	1.05±0.08[bcd]
3	1,000	24.34±1.02[d]	4.21±0.21[c]	1.03±0.08[bc]
4	2,000	22.37±0.20[b]	3.83±0.20[bc]	0.86±0.03[a]
5	4,000	23.67±0.65[cd]	3.79±0.31[bc]	0.94±0.03[ab]
6	Monocalcium phosphate	23.01±0.24[bc]	3.74±0.21[ab]	1.15±0.08[d]
7	Dicalcium phosphate	22.65±0.35[b]	3.78±0.18[bc]	1.12±0.07[cd]
8	Tricalcium phosphate	22.58±0.71[b]	3.85±0.98[bc]	1.12±0.02[cd]

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

ที่ได้รับอาหารเสริมไฟเตส 2,000 และ 4,000 ยูนิต/อาหาร 1 กก. (p<0.05)

10. คุณภาพน้ำ

ผลการวิเคราะห์คุณภาพน้ำเฉลี่ยตลอดการทดลองพบว่า อุณหภูมิมีค่าอยู่ระหว่าง 26.37-26.62^{o}C ความเป็นกรดด่าง (pH) 6.86-7.07 ค่าความกระด้าง (hardness) 49.86-54.56 มก./ล. ค่าความเป็นด่าง (alkalinity) 37.01-42.37 มก./ล. ค่าออกซิเจนละลายน้ำ 4.98-5.63 มก./ล. และค่าฟอสฟอรัสละลายน้ำ 0.0008-0.0033 มก./ล. ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วงที่ปลานิลสามารถดำรงชีวิตได้อย่างปกติ

วิจารณ์

การเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหารของปลานิลแปลงเพศจากการทดลองนี้ค่อนข้างต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองของนิรุทธิ์ (2544) และ Boonyaratpalin และ Phromkunthong (2000) ซึ่งใช้ปลาและระบบการทดลองที่เหมือนกัน ทั้งนี้เนื่องจากการทดลองดังกล่าวใช้อาหารที่มีส่วนประกอบของปลาป่น ในขณะที่สูตรอาหารของการทดลองนี้ไม่ได้ใช้เลย ทั้งนี้เนื่องจากปลาป่นเป็นแหล่งโปรตีนที่มีความสมดุลของกรดอะมิโนและธาตุอาหารอื่นๆ ครบถ้วนต่อการเจริญเติบโตของ

ปลา (NRC, 1993) อาหารที่มีวัตถุดิบพืชเป็นส่วนผสมสูงมีผลทำให้ปลาลดความอยากกินอาหาร และยอมรับอาหารได้น้อยลง ส่งผลให้ปลามีการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้โปรตีนต่ำ แต่หากเปรียบเทียบการทดลองนี้กับการทดลองของ Viola และคณะ (1994) และ Dato-Cajegas และ Yakupitiyage (1996) ซึ่งใช้วัตถุดิบพืชเป็นส่วนประกอบของอาหารทั้งหมด พบว่าให้ผลใกล้เคียงกัน มีรายงานว่าแม้การใช้วัตถุดิบจากพืชเป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงปลาให้ผลการเจริญเติบโตต่ำกว่า การใช้วัตถุดิบจากสัตว์ แต่หากมีการเสริมด้วยสารอาหารบางชนิดก็สามารถทดแทนการใช้วัตถุดิบจากสัตว์ได้ (Viola *et al*., 1988) Ballestrazzi และคณะ (1994) รายงานว่า ปลาไม่สามารถใช้ฟอสฟอรัสจากถั่วเหลืองได้อย่างเพียงพอ เนื่องจาก 2 ใน 3 ของฟอสฟอรัสทั้งหมดจากพืชอยู่ในรูปกรดไฟติกหรือไฟเตท ซึ่งสัตว์กระเพาะเดี่ยวไม่สามารถใช้ได้ การเสริมไฟเตสเป็นแนวทางหนึ่งที่น่าจะได้ผลดี เนื่องจากไฟเตสทำหน้าที่เร่ง ปฏิกิริยาไฮโดรไลซีส โดยดึงฟอสฟอรัสออกจากโมเลกุลของไฟเตท (Reddy *et al*., 1982) ทำให้ปลาสามารถใช้ฟอสฟอรัสจากสารอาหารจากพืชได้เพิ่มขึ้นโดยไม่ต้องเพิ่มฟอสฟอรัสเข้าไปในอาหาร ซึ่งจะสามารถช่วยลดมลภาวะทางน้ำที่มีสาเหตุจากฟอสฟอรัสลงได้ จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าการเสริมไฟเตส 4,000 ยูนิต/อาหาร 1 กก. ช่วยในการเพิ่มการเจริญเติบโต (น้ำหนักเฉลี่ย น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ) และเพิ่มประสิทธิภาพการใช้อาหาร (อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ ประสิทธิภาพการใช้โปรตีนและการใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ) ของปลานิลแปลงเพศ โดยระดับดังกล่าวสูงกว่าที่มีการรายงานในปลาอื่นๆ ได้แก่ ปลากดอเมริกัน (Jackson *et al*., 1996; Li and Robinson, 1997; Eya and Lovell, 1997) ปลาเรนโบว์ เทราท์ และปลาคาร์พ (Rodehutscord and Pfeffer, 1995; Schafer *et al*., 1995) ซึ่งอยู่ในช่วง 250-1,000 ยูนิต/อาหาร 1 กก. ดังผลการศึกษาของ Jongbloed และคณะ (1993) ที่รายงานว่าการเสริมไฟเตสในอาหารมีผลในการไฮโดรไลซ์ (hydrolyze) กรดไมโออิโนซิทอล เฮกซาฟอสฟอริก (moinositol hexaphosphoric acid) เป็นออโธฟอสเฟต (orthophosphate) ซึ่งปลานิลสามารถดูดซึมนำไปใช้ได้ โดยเมื่อพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์การย่อยอาหาร การดูดซึมฟอสฟอรัสและองค์ประกอบเลือด (ฮีมาโตคริตและฮีโมโกลบิน) เถ้าในกระดูก และฟอสฟอรัสในกระดูก การเสริมไฟเตสเพียง 1,000 ยูนิต/อาหาร 1 กก. ทำให้ค่าต่างๆ เหล่านี้อยู่ในเกณฑ์ดี Robinson และคณะ (1984) รายงานว่าระดับไฟเตสที่เสริมในอาหารและเหมาะสมสำหรับการสร้างกระดูกในสัตว์ทั่วไปอยู่ในช่วง 500-1,000 ยูนิต/อาหาร 1 กก. ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองครั้งนี้

จากผลการศึกษาในครั้งนี้เมื่อพิจารณาจากค่าต่างๆ ได้แก่ น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น สัมประสิทธิ์การย่อยฟอสฟอรัส การดูดซึมฟอสฟอรัสและฟอสฟอรัสในกระดูก พบว่าสามารถใช้ไฟเตสแทนอนินทรีย์ฟอสเฟต ทั้ง 3 รูปแบบ เสริมในอาหารสำหรับเลี้ยงปลาได้ สอดคล้องกับการทดลองของ Li และ Robinson (1997) ซึ่งทดลองในปลากดอเมริกัน แม้ว่ายังไม่ได้มีการศึกษาถึงต้นทุนในการผลิตอาหารปลาเมื่อมีการใช้ไฟเตสแทนอนินทรีย์ฟอสเฟต แต่การใช้ไฟเตสจะเป็นการช่วยลดมลภาวะทางน้ำที่เกิดจากการสะสมของฟอสฟอรัสที่มาจากอาหารปลา โดยจะเห็นได้ว่าฟอสฟอรัสในมูลปลาลดลงเมื่อมีการเสริมไฟเตสในระดับ 2,000 หรือ 4,000 ยูนิต/อาหาร 1 กก. เมื่อเปรียบเทียบกับปลาที่ได้รับอาหารไม่เสริมไฟเตส และเสริมอนินทรีย์ฟอสเฟตทั้ง 3 รูปแบบ สอดคล้องกับการทดลองของ Li และ Robinson (1997) ที่พบว่าฟอสฟอรัสในมูลของปลากดอเมริกันลดลง 78% ในปลาที่ได้รับอาหารเสริมไฟเตส เมื่อเปรียบเทียบกับปลาที่ได้รับอาหาร เสริมไดแคลเซียมฟอสเฟต การลดลงของฟอสฟอรัสในมูลดังกล่าว เกิดเนื่องจากการเพิ่มความสามารถในการย่อยไฟเตทฟอสฟอรัส ซึ่งจะเห็นได้จากค่าที่เพิ่มขึ้นของสัมประสิทธิ์การย่อยอาหารและดูดซึมฟอสฟอรัสในปลาที่ได้รับอาหารเสริมไฟเตส

เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการใช้อนินทรีย์ฟอสเฟตทั้ง 3 รูปแบบของปลานิลแปลงเพศจากการทดลองนี้พบว่า แม้ว่าโมโนแคลเซียมฟอสเฟต และไตรแคลเซียมฟอสเฟตให้ผลในเชิงบวกต่อการเจริญเติบโต แต่ค่า FCR, PER และ ANPU และฟอสฟอรัสในมูลไม่แตกต่างกัน ซึ่งจากผลการทดลองที่รายงานโดย Ogino และคณะ (1979) Watanabe และคณะ (1980) Eya และ Lovell (1997), Kim และคณะ (1998) พบว่า สัตว์ทั่วไปและปลาสามารถใช้โมโนฟอสเฟตได้ดีกว่าไดฟอสเฟตและไตรฟอสเฟต เนื่องจากโมโนฟอสเฟตเป็นรูปที่ละลายน้ำได้ดีที่สุด การที่

ผลจากการทดลองครั้งนี้ไม่สอดคล้องกับการทดลองดังกล่าว อาจเนื่องมาจากการกินอาหารที่มากกว่า (feed intake สูงกว่า) ของปลาที่ได้รับอาหารเสริมโมโนแคลเซียมฟอสเฟตและไตรแคลเซียมฟอสเฟต เมื่อเปรียบเทียบกับปลาที่ได้รับไดแคลเซียมฟอสเฟต จึงทำให้ค่าประสิทธิภาพอาหาร ได้แก่ FCR, PER, ANPU และการย่อยฟอสฟอรัสไม่แตกต่างกันทางสถิติ

สรุปผลการทดลอง

1. การเสริมไฟเตส 4,000 ยูนิต/อาหาร 1 กก. ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพในการย่อยอาหารของปลานิลแปลงเพศ ขณะที่ไฟเตสเพียง 1,000 ยูนิต/อาหาร 1 กก. เพียงพอที่ทำให้สัมประสิทธิ์การย่อยอาหาร การดูดซึมฟอสฟอรัส องค์ประกอบเลือด เถ้าในกระดูกและฟอสฟอรัสในกระดูกของปลาอยู่ในเกณฑ์ดี
2. สามารถเสริมไฟเตสแทนอนินทรีย์ฟอสเฟตทั้ง 3 รูปแบบได้ โดยไฟเตสที่ระดับ 2,000 หรือ 4,000 ยูนิต/อาหาร 1 กก. มีผลทำให้ฟอสฟอรัสในมูลปลามีค่าต่ำกว่าปลาที่ได้รับอาหารที่ไม่เสริมไฟเตสและที่เสริมอนินทรีย์ฟอสเฟตทั้ง 3 รูปแบบ
3. การเสริมอนินทรีย์ฟอสเฟตในรูปโมโนแคลเซียมฟอสเฟตและไตรแคลเซียมฟอสเฟตให้ผลในเชิงบวกต่อปลานิลมากกว่าไดแคลเซียมฟอสเฟต แต่ไม่ส่งผลต่อประสิทธิภาพอาหารและฟอสฟอรัสในมูล

เอกสารอ้างอิง

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.

Anderson, T.A. and De Silva, S.S., 1996 . Scope for low pollution aquafeeds and feeding strategies in Asia, pp.45- 56. **In** Victam Asia Conference 1996. Feed Production on the threshold of the Next-Age. Bangkok, Thailand.

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, DC: AOAC.

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

Ballestrazzi, R., Lanari, D., Agaro, E. and Mion, A. 1994. The effect of dietary protein level and source on growth, body composition, total ammonia and reactive phosphorus excretion of growing sea bass *Dicentrarchus labrax*. Aquaculture. 127: 197-206.

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 treated rice bran and oil palm meal on growth of sex reversed *Tilapia niloticus*. The Sixth Roche Aquaculture Conference Asia Pacific (ed. B. Hunter) Bangkok, Thailand, September 29 2000, pp. 50-63.

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

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. Aquaculture 144: 227-237.

Duncan, D.B. 1955. Multiple-range and multiple F tests. Biometrics 11: 1-42.

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.

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: 386-391.

Furukawa, A. and Tsukahara, H. 1966. On the acid digestion method for the determination of chromic oxides as an index substance in the study of digestibility of fish feed. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 32: 502-506.

Gur, N. 1998. Enzymatic supplements in aquafeeds. Fish Fishbreed-Isr. 31: 78-86.

Halver, J. E. 1989. Fish Nutrition. 2nd. edn, 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.

Jobling, M. 1994. Fish Bioenergetics. New York. Chapman & Hall.

Jongbloed, A.W., Kemme, P.A. and Mroz, Z. 1993. The role of microbial phytase in pig production, **In** Wenk. C. and Booessinger, M. (Editiors), pp.173-180. Proceedding of the 1st Symposium. Enzymes in Animal Nutrition. Switzerland.

Kim, J.D., Kim, K.S., Song, J.S., Lee, J.Y. and Jeong, K.S. 1998. Optimum level of dietary monocalcium phosphorus based on growth and phosphorus excretion of minor carp (*Cyprinus carpio*) Aquaculture 161: 334-337.

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

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

Lovell, T. 1989. Nutrition and feeding of fish. Van Nostrand Reinhold. New York. 260 pp.

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 (National Research Council). 1993. Nutrient Requirement of Fish. Washington D.C.: National Academy Press.

Ogino, C., Takeuchi, L., Takeda, H. and Watanabe, T. 1979. Availability of dietary phosphorus in carp and rainbow trout. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 45: 1538-1553.

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.

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.

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

Robinson, E.H., Rawles. S.D., Yette, H.B. and Green, L.W. 1984. An estimate of dietary requirements of fingerling *Tilapia aurata* reared in calcium-free water. Aquaculture 41: 389-393.

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

Shiau, S.Y. and Liang, H.S. 1994. Nutrient digestibility and growth of hybrid tilapia. *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*, as influenced by agar supplementation at two dietary protein levels. Aquaculture 127: 41-48.

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.

Viola, S., Arieli, Y. and Zohar, G. 1988. Animal protein free feeds for hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*) in intensive culture. Aquaculture 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.

Watanabe, T., Takeuchi, T., Murakami, A., Nose, T. and Ogino, C. 1980. Requirement of chum salmon held in freshwater for dietary phosphorus. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 46: 361-367.

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

Zeitoun, I.H., Tack, P.I. , Halver, J.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.