บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 การศึกษาค่าการย่อยได้ของวัตถุดิบอาหาร เพื่อวัดการย่อยได้จากตัวสัตว์จริง (*in vivo* method)

3.1.1 วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

- เครื่องบดตัวอย่างอาหาร โดยใช้ขนาดของรูตะแกรง 1 มิลลิเมตร
- เครื่องชั่งน้ำหนักไฟฟ้า ความละเอียดอ่านได้ 2 และ 4 ตำแหน่ง
- เครื่องแช่แข็ง สำหรับเก็บมูล และเก็บของเหลวจากปลายลำไส้เล็ก (ileal digesta)
- ตู้อบไฟฟ้า (hot air oven) สำหรับอบแห้งตัวอย่างอาหาร ของเหลวจากปลายลำไส้เล็ก และมูลของสุกร
- เครื่อง spectrophotometer model UV-1601, SHIMADZU โดยใช้ความยาวคลื่นที่ 405 nm สำหรับวิเคราะห์หาปริมาณของไทเทเนียมไดออกไซด์ (TiO_2)
- เครื่องระเหิดแห้ง (freeze dryer)
- HPLC ยี่ห้อ SHIMAZU, Pump : LC-10ADAP, Detector : SPD-M10AVP (UV), Control : SCL-10AVP and Software SHIMAZU class VP
- เครื่องย่อย (digestion apparatus) และ เครื่องกลั่น (distillation apparatus) ใช้สำหรับวิเคราะห์หาค่าโปรตีน
- เครื่องสกัดไขมัน (soxhlet apparatus) ใช้สำหรับวิเคราะห์หาค่าไขมัน
- เตาเผา (muffle furnace) ใช้สำหรับวิเคราะห์หาเถ้า (ash)
- เครื่องมือหาเยื่อใย (crude fiber apparatus) และปั๊มสูญญากาศ (vacuum pump) ใช้สำหรับวิเคราะห์หาค่าเยื่อใย
- วัสดุอุปกรณ์สำหรับทำท่อเก็บตัวอย่างอาหาร คือ ซิลิโคน (ชื่อทางการค้า HTV silicone rubber R 401/150, L 2B, Wacker-chemie Gmblt, 8000 Munchen 22, West-Germany) และแบบพิมพ์ท่อเก็บตัวอย่างอาหาร
- วัสดุอุปกรณ์สำหรับทำความสะอาดคอกและกรงสุกร เช่น แปรงขัดพื้น และไม้กวาด เป็นต้น
- เครื่องชั่งน้ำหนักสุกร และเครื่องชั่งอาหารทดลอง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

- อุปกรณ์ช่วยในการเลี้ยงสุกร เช่น ช้อนตักอาหาร และถังเก็บน้ำ เป็นต้น
- เครื่องผสมอาหารสุกรถังนอน มีความจุ 100 กิโลกรัม
- ถังเก็บอาหารขนาดความจุ 20 และ 50 กิโลกรัม และถุงพลาสติกขนาด 10 x 14 นิ้ว สำหรับเก็บอาหารทดลอง
- อุปกรณ์ที่ใช้เกี่ยวกับการผ่าตัด เช่น มีดผ่าตัด คีมห้ามเลือด ไหม (silk) เบอร์ 1 ไหมละลาย (catgut) เบอร์ 2/0 และ 4/0 มีดโกนสำหรับโกนขนสุกร ไม้บรรทัดสำหรับวัด เพื่อกำหนดตำแหน่งสำหรับการผ่าตัด
- สารบ่งชี้ (marker) ที่ใช้สำหรับคำนวณปริมาณอาหารที่ถูกดูดซึม และที่ถูกขับออกทางมูลและของเหลวจากปลายลำไส้เล็ก คือ ไทเทเนียมไดออกไซด์ (TiO_2)
- สมุด ดินสอ ปากกา สำหรับบันทึกน้ำหนักสุกร

3.1.2 สัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลองใช้สุกรลูกผสม 3 สายพันธุ์ (พันธุ์ลาร์จไวท์ x แลนด์เรซ x ดูรอค) เพศผู้ตอน จำนวน 4 ตัว มีน้ำหนักเริ่มต้นเฉลี่ย 40 กิโลกรัม ซึ่งสุกรทุกตัวจะได้รับการผ่าตัดสอดท่อที่บริเวณลำไส้เล็กส่วนปลาย และเลี้ยงบนกรงทดลองเป็นลักษณะแยกขังเดี่ยว ซึ่งมีขนาด กว้าง ยาว และสูง เท่ากับ 45, 100 และ 55 เซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งบริเวณฝากรงด้านข้างขวาจะสามารถถอดเหล็กเข้าและออกได้ เพื่อป้องกันการเสียดสีระหว่างปลายท่อกับซี่กรง และมีที่ให้น้ำแบบอัตโนมัติ

3.1.3 อาหารทดลอง

อาหารทดลองที่ใช้เป็นอาหารผสม 2 สูตร คือ ปลายข้าว-กากถั่วเหลือง และข้าวโพด-กากถั่วเหลือง และสูตรอาหารกึ่งบริสุทธิ์ 2 สูตร โดยมีแหล่งของกากถั่วเหลือง และกากทานตะวันเป็นแหล่งของโปรตีนที่ต้องการหาค่าการย่อยได้ของโปรตีนและกรดอะมิโน โดยแบ่งเป็น 4 สูตร คือ

สูตรที่ 1 คืออาหารผสม ประกอบด้วย ปลายข้าว – กากถั่วเหลือง เป็นวัตถุดิบหลัก
สูตรที่ 2 คืออาหารผสม ประกอบด้วย ข้าวโพด – กากถั่วเหลือง เป็นวัตถุดิบหลัก
สูตรที่ 3 คืออาหารกึ่งบริสุทธิ์ ประกอบด้วย กากถั่วเหลือง เป็นวัตถุดิบหลัก
สูตรที่ 4 คืออาหารกึ่งบริสุทธิ์ ประกอบด้วย กากทานตะวัน เป็นวัตถุดิบหลัก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การเตรียมอาหารทดลองสูตรอาหารกึ่งบริสุทธิ์ โดยการนำกากถั่วเหลืองหรือกากทานตะวัน นำมาคลุกเคล้ากับน้ำมันถั่วเหลืองทีละน้อยจนกระจายตัวทั่ว ทำการคลุกเคล้าเซลลูโลสกับแป้งมันสำปะหลัง คลุกเคล้าสารบ่งชี้ (marker) คือ ไทเทเนียม ไดออกไซด์ (TiO_2) กับแป้งมันสำปะหลังจนกระจายตัวทั่ว จากนั้นนำวัตถุดิบอาหารที่เป็นแหล่งพลังงาน คือ แป้งมันสำปะหลัง นำมาผสมในเครื่องผสมอาหารแบบถังนอน (horizontal mixer) และใส่วัตถุดิบดังกล่าวและพรีมิกซ์ ตามลำดับ และปรับระดับความต้องการของพลังงานใช้ประโยชน์ได้ โปรตีน และกรดอะมิโน ตามความต้องการของสุกรที่แสดงไว้ใน NRC (1998)

การให้อาหารสุกร สุกรจะได้รับอาหารทดลอง 2 ครั้งต่อวัน ที่เวลา 06.00 น. และ 18.00 น. ของทุกวัน ให้อาหารสูตรที่ 1-4 แก่สุกร ปริมาณตัวละ 800 กรัมต่อมื้อ ซึ่งผสมกับน้ำในอัตราส่วนโดยประมาณ 1 ต่อ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 6 ส่วนประกอบและคุณค่าทางโภชนาการของอาหารผสม และอาหารกึ่งบริสุทธิ์

	ปลายข้าว-กากถั่วเหลือง	ข้าวโพด-กากถั่วเหลือง	กากถั่วเหลือง	กากทานตะวัน-กากถั่วเหลือง
ชนิดวัตถุดิบอาหารสัตว์				
ข้าวโพด	-	74.7	-	-
ปลายข้าว	70.61	-	-	-
กากถั่วเหลือง	22.70	21.30	34.30	17.20
กากทานตะวัน	-	-	-	22.30
แป้งมันสำปะหลัง	-	-	57.20	49.60
น้ำตาลทราย (sucrose)	-	-	3.50	3.50
เซลลูโลส (cellulose)*	1.20	-	-	-
น้ำมันถั่วเหลือง	2.30	0.60	1.90	5.00
ไดแคลเซียมฟอสเฟต (P18)	1.30	1.20	1.50	0.85
แคลเซียมคาร์บอนเนต ($CaCO_3$)	0.79	1.10	0.50	0.50
เกลือ	0.35	0.35	0.35	0.30
สารผสมล่วงหน้า(premix)**	0.25	0.25	0.25	0.25
ไททาเนียมไดออกไซม์ (TiO_2)	0.50	0.50	0.50	0.50
รวม	**100.00**	**100.00**	**100.00**	**100.00**
คุณค่าทางโภชนะ (เปอร์เซ็นต์ วัตถุแห้ง)				
โปรตีน	15.34	15.32	15.32	15.28
พลังงานที่ใช้ประโยชน์ได้ (Kcal/kg)	3280.50	3279.30	3279.00	3153.96
เยื่อใย	3.46	3.32	3.79	7.50
ไขมัน	3.41	3.89	2.80	6.14

* α-cellulose, Sigma Chemical CO., St. Louis, USA.

** แสดงในตารางภาคผนวกที่ ก-1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.1.4 วิธีการทดลอง

3.1.4.1 การผลิตท่อเก็บตัวอย่างอาหารและการผ่าตัดสุกร การผลิตท่อเก็บตัวอย่างอาหารรูปตัวที จาก silicone rubber โดยดัดแปลงจากวิธีการของ เทอดชัยและทัศนีย์ (2531) และการผ่าตัดสอดท่อแบบ simple T-cannulation โดยดัดแปลงจากวิธีการของ ทัศนีย์และเทอดชัย (2532)

3.1.4.2 การเก็บตัวอย่างจากปลายลำไส้เล็ก และจากมูล

สุ่มเก็บตัวอย่างอาหารผสมและวัตถุดิบอาหารสัตว์ที่ต้องการศึกษา สุ่มเก็บตัวอย่างของเหลวจากปลายลำไส้เล็กและสุ่มเก็บมูล ซึ่งแบ่งการทดลองเป็น 2 ช่วง คือ

1. ช่วงปรับตัว (preliminary period) ใช้เวลาประมาณ 5 วัน ซึ่งมีวัตถุประสงค์ เพื่อให้อาหารที่สุกรกินเข้าไปก่อนหน้าการทดลองถูกขับถ่ายออกนอกร่างกายจนหมด และเพื่อให้สัตว์ทดลองได้ปรับตัวให้เคยชินกับอาหารและเคยชินกับสภาพแวดล้อมของการทดลอง โดยเริ่มหลังจากชั่งน้ำหนักสุกรแล้วจึงปรับให้สุกรคุ้นเคยกับอาหารทดลอง โดยลดปริมาณอาหารของอาหารเก่าและค่อยๆ เพิ่มปริมาณอาหารทดลองสูตรใหม่เพิ่มขึ้นเป็น 25, 50, 75 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยวันที่ 4-5 สุกรจะได้รับอาหารทดลองสูตรใหม่ 100 เปอร์เซ็นต์ พร้อมทั้งบันทึกปริมาณอาหารที่สุกรกินในแต่ละวัน เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการใช้อาหารในช่วงการเก็บข้อมูลต่อไป

2. ช่วงเก็บข้อมูล (collection period) ทำการบันทึกปริมาณอาหารที่ให้ และอาหารเหลือในแต่ละช่วงการให้อาหารทุกครั้ง ซึ่งการเก็บมูลใช้เวลา 3 วัน โดยเก็บมูลจากสุกรทุกตัวทุกวัน เก็บใส่ถุงพลาสติก และเก็บในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เพื่อหยุดการทำงานของจุลินทรีย์ เมื่อครบ 3 วัน นำมูลมาคลุกเคล้าให้เข้ากัน แล้วสุ่มเก็บไว้ประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ของมูลที่ขับออกมาทั้งหมด และนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปวิเคราะห์ทางเคมีต่อไป ส่วนการเก็บของเหลวจากลำไส้เล็กส่วนปลาย ซึ่งเก็บเป็นเวลา 2 วัน ของแต่ละช่วงการทดลอง ทำการเก็บตัวอย่างอาหารจากปลายลำไส้เล็กตลอด 48 ชั่วโมง เริ่มเก็บหลังจากให้อาหารสุกร ที่เวลา 06.00 น. และ 18.00 น. โดยอาหารจะไหลผ่านท่อยางที่เชื่อมต่อปลายเปิดของท่อซิลิโคนที่ติดกับตัวสุกรลงสู่ขวดพลาสติกที่แช่อยู่ในถังโฟมที่บรรจุน้ำแข็งผสมเกลือเม็ดชั่วคราว และนำไปเก็บทันทีอีกครั้งที่ในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส หรือใช้วิธีการเก็บของเหลวจากปลายลำไส้เล็ก โดยการใช้ถุงพลาสติกผูกติดกับท่อปลายเปิดของท่อซิลิโคน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.1.4.3 การศึกษาและการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

นำตัวอย่างอาหารมาอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง ส่วนของเหลวจากปลายลำไส้เล็ก และมูลที่เก็บได้ ทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหิดแห้ง (freeze dryer) เพื่อป้องกันการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน หลังจากนั้นนำไปบดผ่านตะแกรงขนาด 1 มิลลิเมตร และคลุกเคล้าตัวอย่างที่ได้ให้เข้ากัน นำไปเก็บในขวดพลาสติกที่มีฝาปิดมิดชิดเพื่อใช้วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน โดยวิธี Proximate Analysis ตามวิธีการของ AOAC (1990) วิเคราะห์หาปริมาณของไทเทเนียม ไดออกไซด์ โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Brandt *et al*. (1983) และวิเคราะห์กรดอะมิโนจำเป็น ด้วยเครื่อง HPLC ต่อไป

การวิเคราะห์กรดอะมิโน

1. การไฮโดรไลซิสตัวอย่างอาหาร โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Tartrakoon *et al.* (2001)

1.1 ผสมตัวอย่างจากอาหาร หรือของเหลวจากปลายลำไส้เล็ก หรือมูล ปริมาณ 5 มิลลิกรัม กับ สารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 6 N ปริมาณ 1000 ไมโครลิตร ในหลอดทดลองขนาด 5 มิลลิลิตร

1.2 อบในตู้อบ โดยใช้อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดย 30 นาทีแรก เปิดฝาหลอดทดลองทิ้งไว้ เมื่อครบเวลาตามที่ต้องการแล้วจึงปิดฝา

1.3 นำไปทำให้แห้งโดยวิธีระเหิดแห้ง (freeze dry) จนแห้งสนิท

1.4 เติมสารละลายไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.02 M ปริมาณ 500 ไมโครลิตร และกรองสารละลายด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครมิลลิเมตร เก็บของเหลวที่กรองได้ สำหรับวิเคราะห์กรดอะมิโนด้วยเครื่อง HPLC ต่อไป

2. การวิเคราะห์กรดอะมิโน

2.1 คอลัมน์ (column); GROMSIL-FMOC amino acid (250x4.0 mm)

2.2 อัตราการไหล (flow rate); 1.0 ml/min

2.3 อุณหภูมิ (temperature); 40 C°

2.4 Detection; excitation, 263 nm/emission, 310 nm

2.5 Eluent A; Sodium acetate 80 %, Acetonitrile 20 %

Eluent B; Sodium acetate 20 %, Acetonitrile 80 %

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2.6 Gradient

time (min)	%A	%B
0	90	10
35	60	40
45	30	70
50	0	100
55	0	100
60	0	100
65	0	100
70	0	100

2.7 ทำ derivatization

2.7.1 ดูดกรดอะมิโนที่เป็นมาตรฐาน (standard amino acids) ผสมกัน 17 ตัว หรือตัวอย่าง ปริมาณ 40 ไมโครลิตร

2.7.2 เติม borate buffer (pH 7.7) ปริมาณ 40 ไมโครลิตร

2.7.3 เติม FMOC ปริมาณ 80 ไมโครลิตร และตั้งทิ้งไว้ 45 วินาที

2.7.4 เติม ADAM ปริมาณ 100 ไมโครลิตร และตั้งทิ้งไว้ 45 วินาที

2.7.5 เติม Eluent A ปริมาณ 140 ไมโครลิตร และตั้งทิ้งไว้ 5 นาที

2.8 ดูดสารที่ทำ derivatization เรียบร้อยแล้ว ปริมาณ 20 ไมโครลิตร ฉีดเข้าเครื่อง HPLC เพื่อวิเคราะห์กรดอะมิโน ต่อไป

3.1.4.4 การบันทึกข้อมูล

(1) บันทึกน้ำหนักสุกรเริ่มต้นก่อนและหลังการให้อาหารแต่ละสูตรทุกครั้ง

(2) บันทึกปริมาณอาหารที่ให้ และปริมาณอาหารที่เหลือในแต่ละช่วงเวลาการให้อาหารทุกครั้งและนำอาหารดังกล่าวไปวิเคราะห์หาส่วนประกอบทางเคมีต่อไป

(3) บันทึกน้ำหนักมูลทุกครั้งที่มีการเก็บมูลสุกร และนำไปเก็บใส่ถุงพลาสติก รักษาไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เพื่อหยุดการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์

(4) ทำการเก็บตัวอย่างของเหลวจากปลายลำไส้เล็กของแต่ละช่วงการทดลอง ตลอด 24 ชั่วโมง บันทึกน้ำหนัก และนำไปเก็บใส่ถุงพลาสติก รักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อหยุดการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 7 แสดงช่วงเวลาในการเก็บตัวอย่างชนิดต่าง ๆ ของแต่ละช่วงการทดลอง

การทดลองในวันที่	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ระยะทดลอง	← Preliminary peroid →				← Collection period →					
						← มูล →		← ปลาย ลำไส้เล็ก →		

3.1.4.5 การคำนวณผลการทดลอง

(1) การย่อยได้ของโปรตีน และกรดอะมิโน สิ้นสุดที่ปลายลำไส้เล็ก หรือทั้งระบบทางเดินอาหาร หรือบริเวณลำไส้ใหญ่ โดยอนุมานว่า recovery rate ของสุกร มีค่าเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ คำนวณจากสมการที่ 1 (เทอดชัย, 2542) คือ

- การย่อยได้ (Apparent digestibility)

$$= 100 - [100 \times \frac{\%TiO_2 \text{ ในอาหาร}}{\%\ TiO_2 \text{ ในมูล}} \times \frac{\%\text{โปรตีนหรือกรดอะมิโนในมูล}}{\%\text{โปรตีนหรือกรดอะมิโนอาหาร}}] \quad \ldots\ldots\ldots (1)$$

หมายเหตุ % TiO_2 ในมูล หมายถึง เปอร์เซ็นต์ TiO_2 ในมูลหรือในตัวอย่างจากปลายลำไส้เล็ก

% โปรตีนหรือกรดอะมิโนในมูล หมายถึง เปอร์เซ็นต์โปรตีนหรือกรดอะมิโนในมูลหรือตัวอย่างจากปลายลำไส้เล็ก

(2) การย่อยได้ของวัตถุแห้ง โปรตีน และกรดอะมิโน ในวัตถุดิบอาหารสัตว์ ปลายข้าว ข้าวโพด กากถั่วเหลือง และกากทานตะวัน เป็นการหาค่าเปอร์เซ็นต์การย่อยได้โดยวิธีเปรียบเทียบสัดส่วนดัดแปลง จากวิธีการของ Tartrakoon (2000) สามารถคำนวณได้จากสมการที่ 2 ถึง 5 ดังต่อไปนี้ คือ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

- ค่าเปอร์เซ็นต์การย่อยได้ (Apparent digestibility) ของวัตถุแห้ง โปรตีน และกรดอะมิโนในกากถั่วเหลือง

DSb = (A-B)/C .....(2)

โดยที่ A = (DCsSb x AA* content in CsSb diet)

B = (DCs x AA* content of Cs in CsSb diet)

C = (AA* content in CsSb diet)

- ค่าเปอร์เซ็นต์การย่อยได้ (Apparent digestibility) ของวัตถุแห้ง โปรตีน และกรดอะมิโนในกากทานตะวัน

DSf = (D-E-F)/I ……..……(3)

โดยที่ D = (DSfCsSb x AA* content in SfCsSb diet)

E = (DCs x AA* content of Cs in SfCsSb diet)

F = (DSb x AA* content of Sb in SfCsSb diet)

I = (AA* content of Sf in SfCsSb diet)

- ค่าเปอร์เซ็นต์การย่อยได้ (Apparent digestibility) ของวัตถุแห้ง โปรตีน และกรดอะมิโนในปลายข้าว

DBr = (J-K)/L ……..(4)

โดยที่ J = (DBrSb x AA* content in BrCsSb diet)

K = (DSb x AA* content of Sb in BrCsSb diet)

L = (AA* content of Br in BrSb diet)

- ค่าเปอร์เซ็นต์การย่อยได้ (Apparent digestibility) ของวัตถุแห้ง โปรตีน และกรดอะมิโนในข้าวโพด

DCn = (M-N)/O ……..(5)

โดยที่ N = (DCnCsSb x AA* content in CnCsSb diet)

P = (DSb x AA* content of Sb in CnSb diet)

Q = (AA* content of Cn in CnSb diet)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

หมายเหตุ :

AA* = Amino acid

D = Digestibility

Cs = Cassava

Br = Broken rice

Cn = Corn

Sb = Soybean meal

Sf = Sunflower meal

DCs = Digestibility of AA* in Cassava

DBr = Digestibility of AA* in Broken rice

DCn = Digestibility of AA* in Corn

DSf = Digestibility of AA* in Sunflower

DCsSb = Digestibility of AA* in Cassava-Soybean meal diet

DBrCsSb = Digestibility of AA* in Broken rice-Cassava-Soybean meal diet

DCnCsSb = Digestibility of AA* in Corn-Cassava-Soybean meal diet

DSfCsSb = Digestibility of AA* in Sunflower-Cassava-Soybean meal diet

3.1.5 การวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิเคราะห์ความแปรปรวน โดยวิธี One–Way Analysis of Variance แล้วเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี T-test โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS.

3.2 การศึกษาค่าการย่อยได้ของวัตถุดิบอาหาร เพื่อวัดการย่อยได้ในห้องปฏิบัติการ (*in vitro* method)

3.2.1 วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ต่อกับเครื่องเขย่า โดยเขย่า 80 รอบต่อนาที
- ตู้อบไฟฟ้า (hot air oven) สำหรับอบแห้งตัวอย่างอาหาร
- เครื่องเหวี่ยง (centrifuge) สำหรับปั่นแยกของเหลวและของแข็ง จากของเหลวที่เก็บจากลำไส้เล็กส่วนต้น (duodenal digesta)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

- ตู้แช่แข็งสำหรับเก็บของเหลวจากลำไส้เล็ก (intestinal fluid) ของสุกรที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส
- เครื่อง spectrophotometer model UV – 1601, SHIMADZU
- เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการหาการย่อยได้ในห้องปฏิบัติการ ตามการทดลองที่ 1
- เครื่องมือและอุปกรณ์สำหรับการผ่าตัด เก็บตัวอย่างอาหารและของเหลวจากลำไส้เล็กสุกร ตามการทดลองที่ 1
- เครื่องระเหิดแห้ง (freeze dryer)
- เครื่อง HPLC (High Performance Liquid Chromatography) ยี่ห้อ SHIMAZU, Pump : LC-10ADAP, Detector : SPD-M10AVP (UV), Control : SCL-10AVP and Software SHIMAZU class VP
- หลอดทดลองขนาด 5 มิลลิลิตร
- ขวดชมพู่ขนาด 50 มิลลิลิตร พร้อมจุกสำหรับปิดฝา
- กระดาษกรอง เบอร์ 42
- กรดไฮโดรคลอริก (HCl) มีความเข้มข้น 6 N และ 0.02 M
- เอนไซม์เปปซินสังเคราะห์ (EC 3.4.23.1) เอนไซม์ไคโมทริปซินสังเคราะห์ (EC 3.4.21.1) และเอนไซม์ทริปซินสังเคราะห์ (EC 3.4.21.4) (Sigma Chemical Co, Saint Louis, UST)

3.2.2 สัตว์ทดลอง

ใช้สุกรทดลองลูกผสม 3 สายพันธุ์ (พันธุ์ลาร์จไวท์ x แลนด์เรซ x ดูรอค) เพศผู้ตอน น้ำหนักเริ่มต้นเฉลี่ย 40 กิโลกรัม จำนวน 1 ตัว ทำการผ่าตัดสอดท่อแบบ simple T-cannula บริเวณลำไส้เล็กส่วนต้น (duodenum) เพื่อเก็บน้ำย่อยจากลำไส้เล็กมาใช้ในห้องปฏิบัติการ ตามวิธีการของ Graham *et al*. (1989) และเลี้ยงสุกรบนกรงทดลอง ขนาดกว้าง ยาว และสูง เท่ากับ 45, 100 และ 55 เซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งบริเวณฝากรงด้านข้างขวาจะสามารถถอดเหล็กเข้าและออกได้ เพื่อป้องกันการเสียดสีระหว่างปลายท่อกับซี่กรง และมีที่ให้น้ำแบบอัตโนมัติ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.3 อาหารทดลอง

อาหารผสม 2 สูตร และอาหารกึ่งบริสุทธิ์ 2 สูตร ซึ่งสูตรอาหารเป็นสูตรเดียวกับที่ใช้ในการทดลองการย่อยได้ของวัตถุดิบอาหาร เพื่อวัดการย่อยได้จากตัวสัตว์ (การทดลอง ที่ 1) ดังแสดงในตารางที่ 6

การให้อาหารสูตรพื้นฐานกับสุกร วันละ 1 ครั้ง ปริมาณ 500 กรัม ที่เวลา 08.30 น. (Furuya *et al.*, 1979) ซึ่งผสมกับน้ำในอัตราส่วนโดยประมาณ 1 ต่อ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร)

3.2.4 วิธีการทดลอง

3.2.4.1 การผ่าตัดสุกร

การผ่าตัดสุกร โดยผ่าตัดสอดท่อเก็บตัวอย่างอาหารรูปตัวที (simple T-cannula) บริเวณลำไส้เล็กส่วนต้น (duodenum) ซึ่งตำแหน่งที่อยู่เหนือจากลำไส้เล็กตอนกลาง (jejunum) โดยประมาณ 50 เซนติเมตร และเป็นตำแหน่งส่วนปลายของท่อน้ำดีที่เปิดสู่บริเวณลำไส้เล็กส่วนต้น (Furuya *et al.*, 1979)

3.2.4.2 การเก็บตัวอย่าง จากลำไส้เล็กส่วนต้นของสุกร

เก็บของเหลวจากลำไส้เล็กส่วนต้น ช่วง 10.00-11.00 น. สัปดาห์ละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 6 สัปดาห์ (Furuya *et al.*, 1979) และนำของเหลวจากลำไส้เล็กส่วนต้นที่ได้ ประมาณ 500 กรัม นำไปปั่นแยกของเหลวและของแข็งออกจากกัน ที่ความเร็ว 1250 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 10 นาที ดูดเฉพาะของเหลวที่อยู่ด้านบน (intestinal fluid) และนำไปกรองด้วยผ้าขาวบางที่หนา 2 ชั้น และเก็บของเหลวที่ได้ ไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส ซึ่งสามารถเก็บไว้ได้นาน 60–120 วัน (Furuya *et al.*, 1979; Low, 1982a)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.4.3 การวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

(1) การวิเคราะห์การย่อยได้ในห้องปฏิบัติการ โดยใช้น้ำย่อยจากลำไส้เล็กส่วนต้นของสุกร โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Furuya *et al.* (1979) ซึ่งมีรายละเอียดการวิเคราะห์ดังต่อไปนี้ (แสดงในแผนภาพที่ 1)

(1.1)สุ่มอาหารทดสอบที่บดแล้ว โดยมีขนาดความละเอียด 1 มิลลิเมตร ปริมาณ 0.5 กรัม ใส่ในขวด Erlenmeyer flask ขนาด 100 มิลลิลิตร

(1.2) เติมเอนไซม์เปปซินสังเคราะห์ 20 มิลลิกรัม และกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.075 M (มีค่า pH ≈ 2) และแช่ขวดย่อยใน water bath ควบคุมอุณหภูมิให้ได้ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ซึ่ง water bath ต่อกับเครื่องเขย่า โดยเขย่า 80 รอบต่อนาที

(1.3)เมื่อครบกำหนดระยะเวลาตามที่ต้องการ เติมสารโซเดียม ไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.2 M เพื่อปรับสภาพให้สารอยู่ในสภาพความเป็นกลาง (pH ≈ 7)

(1.4) เติมน้ำย่อยที่ได้จากลำไส้เล็กส่วนต้นของสุกร ปริมาณ 10 มิลลิลิตร และ แช่ขวดย่อยใน water bath ควบคุมอุณหภูมิให้ได้ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ซึ่ง water bath จะต่อกับเครื่องเขย่า โดยเขย่า 80 รอบต่อนาที

(1.5) เมื่อครบกำหนดระยะเวลาตามที่ต้องการ แล้วนำเข้าเครื่อง centrifuge เพื่อปั่นแยกของเหลวและของแข็งออกจากกัน ที่ความเร็ว 1250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

(1.6)ดูดของเหลวที่อยู่ส่วนบนทิ้ง ซึ่งจะเหลือส่วนที่ตกตะกอน เติมน้ำกลั่นปริมาณ 50 มิลลิลิตร เพื่อทำให้เกิดการแขวนลอย นำเข้าเครื่อง centrifuge เพื่อปั่นแยกของเหลวและของแข็งออกจากกัน ที่ความเร็ว 1250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

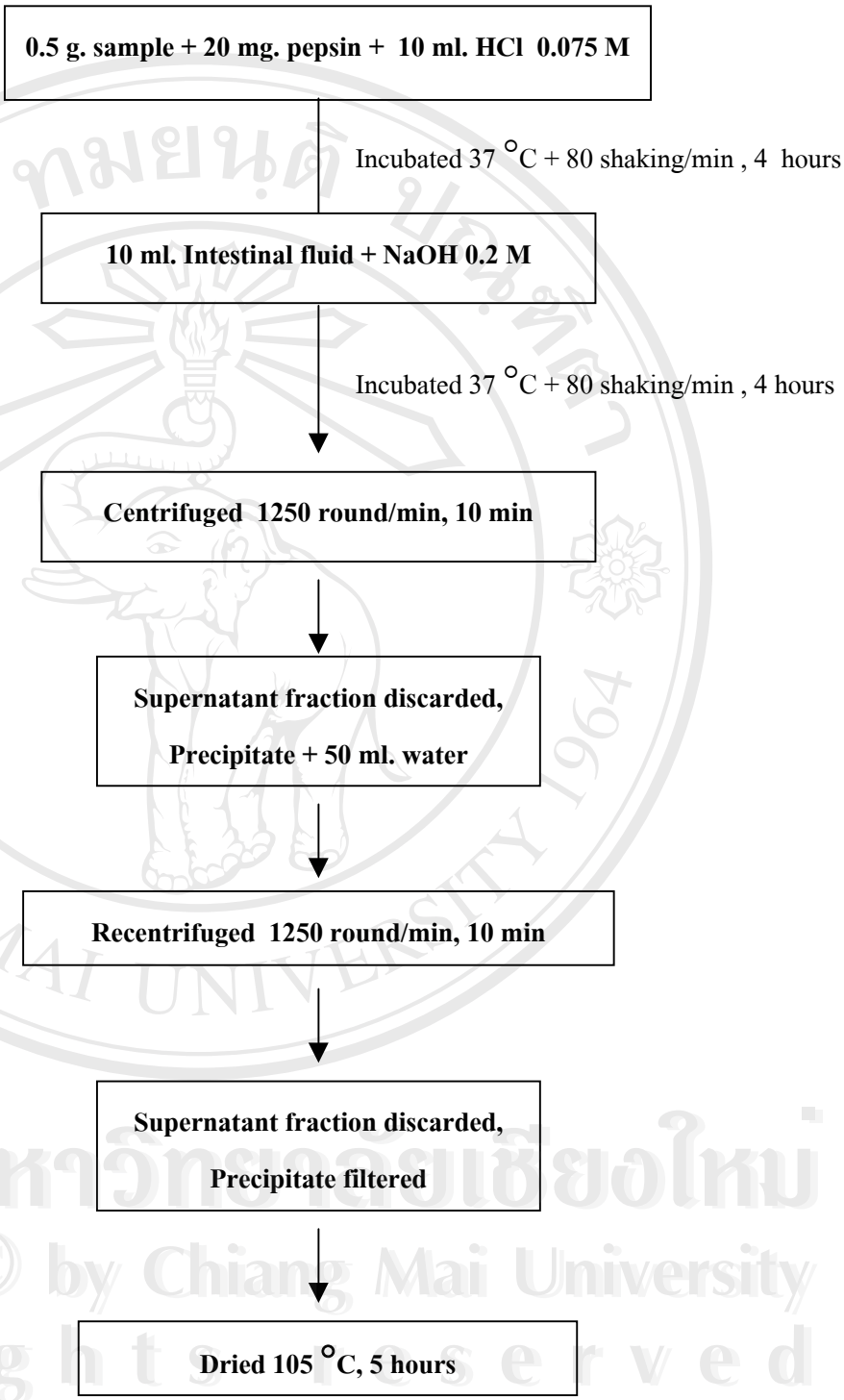
(1.7) ดูดของเหลวที่อยู่ส่วนบนทิ้ง ส่วนของตะกอน เติมน้ำเล็กน้อยและผสมให้เข้ากัน และกรองเอาของเหลวออกด้วยกระดาษกรอง เบอร์ 42 ที่ทราบน้ำหนักแล้ว

(1.8) ล้างสารที่กรองได้ด้วยน้ำเย็น 3 ครั้ง และล้างด้วย acetone 2 ครั้ง และ ปล่อยให้แห้ง แล้วนำไปอบในตู้อบ ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง

(1.9) ชั่งน้ำหนักกระดาษกรอง พร้อมด้วยอาหารที่เหลือ

(1.10) นำกากที่ได้ หาค่าโปรตีน และวัตถุแห้ง ต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved



แผนภาพที่ 1 แสดงขั้นตอนวิธีการย่อยได้ในห้องปฏิบัติการ โดยใช้น้ำย่อยจากลำไส้เล็กส่วนต้นของสุกร (ดัดแปลงจาก Furuya *et al.*, 1979)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

(2) การวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์ในตัวอย่างของเหลวที่เก็บจากลำไส้เล็กส่วนต้นของสุกร

(2.1) **การศึกษาปริมาณของเอนไซม์เปปซิน** ในตัวอย่างของเหลวที่เก็บจากลำไส้เล็กส่วนต้น โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Anson (1938) อ้างโดย Low (1982a)

(1) เตรียมกรดไฮโดรคลอริก ที่ความเข้มข้น pH 2

(2) ชั่ง Haemoglobin (Worthington Biochemical Corporation, Freehold,New Jersey, USA.) 25 กรัม ละลายด้วยกรดไฮโดรคลอริก ปริมาณ 1000 มิลลิลิตร คนสารละลายให้เข้ากัน

(3) ผสมสารละลาย Haemoglobin ที่ได้จากข้อที่ 2 กับน้ำย่อยจากลำไส้เล็กส่วนต้น ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร และแช่สารผสมดังกล่าวใน water bath ที่ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

(4) เติม trichloroacetic acid ซึ่งมีความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร ปริมาณ 10 มิลลิลิตร เพื่อยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาระหว่างน้ำย่อย และสารละลาย Haemoglobin

(5) กรองตะกอนที่เกิดขึ้น ด้วยกระดาษกรอง เบอร์ 42

(6) นำของเหลวที่ได้จากการกรอง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 nm ด้วยเครื่อง spectrophotometer model 1601 UV/VIS, SHIMADZU ด้วยคิวเวท ขนาด 1 มิลลิลิตร

(7) ทำการทดลองเช่นเดียวการทดลองข้างต้น โดยเปลี่ยนน้ำย่อยจากลำไส้เล็กส่วนต้น เป็นเอนไซม์สังเคราะห์เปปซิน 551 units/mg. solid

(8) ทำกราฟเทียบค่าการดูดกลืนแสงของน้ำย่อยจากลำไส้เล็กส่วนต้น กับเอนไซม์สังเคราะห์เปปซิน เพื่อหาปริมาณของเอนไซม์ในน้ำย่อยที่จากลำไส้เล็กส่วนต้น

(2.2) **การศึกษาปริมาณของเอนไซม์ไคโมทริปซิน** ในตัวอย่างของเหลวที่เก็บจากลำไส้เล็กส่วนต้น โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Hummel (1959) อ้างโดย Low (1982a)

(2.2.1) ทำการเจือจาง น้ำย่อยที่เก็บจากลำไส้เล็กส่วนต้นด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.001 M ในอัตราส่วน 1 ต่อ 9

(2.2.2) ผสมน้ำกับเมธานอล ในอัตราส่วน 50 ต่อ 50 โดยน้ำหนัก

(2.2.3) เตรียมสารละลาย 0.001 M ของ BTEE (n-benzoyl-L-tryosine ethyl ester) โดยผสม BTEE กับ สารละลายที่ได้จากข้อที่ 2.2.2

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

(2.2.4) เตรียม Tris buffer 0.08 M (มีส่วนประกอบของ 0.1 M Calcium choride) ซึ่งมีขั้นตอนการเตรียม ดังนี้

(1) ชั่ง Tris (hydroxy methyl) methyl lamine 14.70 กรัม

(2) ชั่ง $CaCl_2(H_2O)_2$ 9.70 กรัม

(3) เติมน้ำกลั่นปริมาณ 900 มล.

(4) ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง pH 7.8 โดยใช้กรดไฮโดรคลอริก

(5) ปรับปริมาตร ให้ได้ 1000 มล.

(2.2.5) ผสมสารละลาย 0.001 M BTEE ปริมาณ 1.4 มิลลิลิตร สารละลาย Tris buffer 0.08 M ปริมาณ 1.5 มิลลิลิตร และน้ำย่อยเจือจางที่ได้จากข้อ 2.2.1 ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร

(2.2.6) นำสารละลายที่ได้จากข้อ 6 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 256 nm ด้วยเครื่อง spectrophotometer model 1601 UV/VIS, SHIMADZU ด้วยคิวเวท ขนาด 1 มิลลิลิตร โดยบันทึกค่าการดูดกลืนแสงทุก ๆ 30 วินาที เป็นเวลา 3 นาที

(2.2.7) ทำเอนไซม์มาตรฐานเทียบ โดยใช้เอนไซม์สังเคราะห์ไคโมทริปซิน 40 units/mg. solid

(2.2.8) ทำกราฟมาตรฐาน โดยใช้ค่าความแตกต่างของการดูดกลืนแสงที่เวลา 1 นาที หรือ 3 นาที กับค่าการทำงานของเอนไซม์มาตรฐาน เพื่อหาค่าปริมาณการทำงานของเอนไซม์ในน้ำย่อยจากลำไส้เล็กส่วนต้น

(2.3) **การศึกษาปริมาณของเอนไซม์ทริปซิน** ในตัวอย่างของเหลวที่เก็บจากลำไส้เล็กส่วนต้น โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Erlanger *et al.* (1961) อ้างโดย รัตนา (2544)

(2.3.1) เตรียม Tris buffer 0.05 M (มีส่วนประกอบของ 0.02 M Calcium choride) ซึ่งมีขั้นตอนการเตรียม ดังนี้

(1) ชั่ง Tris (hydroxy methyl) methyl lamine 2.94 กรัม

(2) ชั่ง $CaCl_2(H_2O)_2$ 6.10 กรัม

(3) เติมน้ำกลั่นปริมาณ 900 มล.

(4) ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง pH 8.1 โดยใช้กรดไฮโดรคลอริก

(5) ปรับปริมาตร ให้ได้ 1000 มล.

(2.3.2) ผสม DL-BAPA (n-benzoayl-DL-p-nitroanilide) 43.5 มิลลิกรัม กับ dimethylsulfoxide ปริมาณ 1 มิลลิลิตร

(2.3.3) ปรับปริมาตรสารละลายจากข้อ 2 ด้วย Tris buffer 0.05 M

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

(2.3.4) ผสมสารละลายจากข้อ 3 ปริมาณ 5 มิลลิลิตร กับน้ำกลั่น 0.9 มิลลิลิตร แล้วแช่ไว้ใน water bath ปรับอุณหภูมิ ที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

(2.3.5) ใส่น้ำย่อยจากลำไส้เล็กส่วนต้น ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร ปล่อยทิ้งไว้ 10 นาที

(2.3.6) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 nm ด้วยเครื่อง spectrophotometer model 1601 UV/VIS, SHIMADZU ด้วยคิวเวท ขนาด 1 มิลลิลิตร

(2.3.7) ทำเอนไซม์มาตรฐานเทียบ โดยใช้เอนไซม์สังเคราะห์ทริปซิน 9000 units/mg. Solid

(2.3.8) ทำกราฟมาตรฐานเปรียบเทียบ โดยใช้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ต่าง ๆ เพื่อหาค่าปริมาณการทำงานของเอนไซม์ในน้ำย่อยจากลำไส้เล็กส่วนต้น

3.2.4.4 การคำนวณผลการทดลอง

(1) การคำนวณการย่อยได้ในห้องปฏิบัติการ โดยใช้สมการที่ 6 (Furuya *et al*., 1979)

$$\text{เปอร์เซ็นต์การย่อยได้} = (1 - \frac{R}{S}) \text{ X } 100 \quad \ldots\ldots\ldots\ldots (6)$$

โดยที่ R หมายถึง น้ำหนักของโปรตีนของส่วนที่เหลือ และ S หมายถึง น้ำหนักโปรตีนที่ใช้ทดลอง (0.50 กรัม)

(2) การสร้างสมการทำนายความสัมพันธ์ในลักษณะเส้นตรง ของการย่อยได้ของโปรตีนและกรดอะมิโนสิ้นสุดที่ปลายลำไส้เล็กจากตัวสัตว์ กับการย่อยได้ในห้องปฏิบัติการ โดยใช้น้ำย่อยจากลำไส้เล็กส่วนต้นของสุกร มีวัตถุประสงค์ เพื่อที่จะคาดคะเนค่าของตัวแปรสุ่มตัวหนึ่งในขณะที่ทราบค่าของตัวแปรอีกตัวหนึ่ง ซึ่งสามารถคำนวณได้จากสมการที่ 7 ดังต่อไปนี้ คือ

$$\text{สมการ} \quad Y = a + bX \quad \ldots\ldots\ldots\ldots (7)$$

$$\text{โดยที่} \quad b = \sum_{i=1}^{n} X_i Y_i - n\overline{X}\overline{Y} \Big/ \sum_{i=1}^{n} X_i^2 - n\overline{X}^2$$

$$a = \overline{X} - b\overline{X}$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

(3) การวิเคราะห์สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ เป็นการคาดคะเนว่า สมการทำนายความสัมพันธ์ จะแม่นยำมากน้อยเพียงใด โดยคำนวณได้จากสมการที่ 8 ดังต่อไปนี้ คือ

$$r = \frac{\sum_{i=1}^{n} X_i Y_i - n\overline{X}\overline{Y}}{\sqrt{\left[\sum_{i=1}^{n} X_i^2 - n\overline{X}^2\right]\left[\sum_{i=1}^{n} Y_i^2 - n\overline{Y}^2\right]}} \quad \text{.....8)}$$

3.2.4.5 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

(1) วิเคราะห์ผลการทดลอง โดยวิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่ม โดยวิธี T-test โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป SPSS.

(2) หาความสัมพันธ์ทางสถิติ ของค่าการย่อยได้ของโปรตีนและการย่อยได้ของกรดอะมิโนจากสูตรอาหารผสม และสูตรอาหารกึ่งบริสุทธิ์ ในห้องปฏิบัติการ โดยหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (coefficient of correlation; r) และสมการคาดคะเนสหสัมพันธ์หรือการวิเคราะห์สมการถดถอย (regression) เพื่อประมาณค่าการย่อยได้ในตัวสัตว์

3.3 สถานที่ทำการวิจัย

ฟาร์มเลี้ยงสัตว์ทดลอง ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ต.แม่เหียะ อ.เมือง จ.เชียงใหม่

วิเคราะห์ทางเคมีที่ห้องปฏิบัติการอาหารสัตว์ ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และห้องปฏิบัติการกลาง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

3.4 ระยะเวลาดำเนินงานวิจัย

เดือนพฤศจิกายน 2546 – มีนาคม 2548

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved