บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

วิธีการทดลอง

สัตว์ทดลองและแผนการทดลอง

สุกรลูกผสม Duroc x (Large White x Landrace) จำนวน 600 ตัว แบ่งออกเป็น 4 กลุ่มการทดลอง แต่ละกลุ่มการทดลองมีทั้งหมด 6 คอก (เพศละ 3 คอก) จำนวนเฉลี่ยประมาณ 25 ตัวต่อคอก วางแผนการทดลองแบบ 2 x 4 แฟคทอเรียล ใน CRD (Completely Random Design) (จรัญ, 2540) ซึ่งมีปัจจัยทดสอบจากเพศ 2 กลุ่ม คือ เพศผู้ตอนและเพศเมีย และปัจจัยจากอาหาร 4 กลุ่ม โดยมีน้ำหนักเริ่มต้นเฉลี่ย 30.0 กิโลกรัม เลี้ยงด้วยอาหารทดลองน้ำมันปลาทูน่า ในระยะต่างๆ ซึ่งน้ำมันปลาทูน่าที่ใช้เป็นเกรด crude oil จากบริษัท T.C. Union Agrotech จำกัด ทั้งนี้อาหารของทุกกลุ่มการทดลองมีการปรับระดับพลังงานให้ใกล้เคียงกัน และสุกรได้รับปริมาณน้ำมันปลาทูน่าตลอดการทดลองเฉลี่ย 1.60 กก. ต่อตัว โดยคำนวณจากปริมาณอาหารที่กินต่อตัว ทำการเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อวัดปริมาณคอเลสเตอรอล ไตรกลีเซอไรด์ และไลโปโปรตีนชนิดต่างๆ ในแต่ละระยะเวลาทดลอง และวัดสมรรถภาพการผลิตของสุกร ได้แก่ ปริมาณอาหารที่กินต่อวัน (average daily feed intake, ADFI) ปริมาณอาหารที่กินทั้งหมด (total feed intake) การเจริญเติบโตต่อวัน (average daily gain, ADG) และประสิทธิภาพการใช้อาหาร (feed conversion ratio, FCR) เลี้ยงสุกรจนกระทั่งมีน้ำหนักตัวประมาณ 100 กิโลกรัม จึงทำการสุ่มสุกรเข้าฆ่าจำนวน 80 ตัว จากทั้ง4 กลุ่มการทดลอง (กลุ่มละ 20 ตัว; เพศเมีย 10 เพศผู้ 10 ตัว ตามลำดับ) ศึกษาคุณภาพซาก และเก็บตัวอย่างเนื้อและไขมันจากกล้ามเนื้อสันนอก (*Longissimus dorsi*) ตั้งแต่ซี่โครงซี่ที่ 6-14 นำไปวิเคราะห์ทางเคมี เพื่อเก็บข้อมูลด้านคุณภาพเนื้อและไขมัน

กลุ่มที่ 1 เลี้ยงตั้งแต่น้ำหนักตัว 30-100 กก. ด้วยอาหารควบคุม

กลุ่มที่ 2 เลี้ยงตั้งแต่น้ำหนักตัว 30-100 กก. ด้วยอาหารทดลองมีน้ำมันปลาทูน่า 1%

กลุ่มที่ 3 เลี้ยงตั้งแต่น้ำหนักตัว 30-60 กก. ด้วยอาหารทดลองมีน้ำมันปลาทูน่า 3% แล้วเลี้ยงต่อด้วยอาหารควบคุม

กลุ่มที่ 4 เลี้ยงตั้งแต่น้ำหนักตัว 30-80 กก. ด้วยอาหารควบคุม จากนั้นจึงเลี้ยงต่อด้วยอาหารทดลองที่มีน้ำมันปลาทูน่า 3% ตั้งแต่น้ำหนักตัว 80-100 กก.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

Figure 12 Twenty five of littermates per pen

อาหารทดลอง

อาหารทดลองแบ่งออกเป็น 3 ระยะ ได้แก่ อาหารสุกรรุ่น (เลี้ยงสุกรตั้งแต่น้ำหนัก 30-60 กก.) อาหารสุกรขุนช่วงต้น (เลี้ยงสุกรตั้งแต่น้ำหนัก 60-80 กก.) และอาหารสุกรขุนช่วงท้าย (เลี้ยงสุกรตั้งแต่น้ำหนัก 80-100 กก.) ซึ่งแต่ละระยะแบ่งออกเป็นอาหารควบคุม และอาหารทดลองซึ่งมีการแทนที่ด้วยน้ำมันปลาทูน่าในสูตรอาหาร 1 และ 3% ตามลำดับ อาหารที่ใช้ทดลองมีส่วนประกอบหลัก ได้แก่ ข้าวโพด ปลายข้าว รำอ่อนสด และกากถั่วเหลือง

Figure 13 Crude tuna oil for experimental diets in all feeding periods

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

Table 17 Analysis report of crude tuna oil from T.C. Union Agrotech co. Ltd.

Item	Values
Acid value, mg KOH/ g oil	5.93
Moisture content, %	0.72
Insoluble impurities, %	0.029
Free fatty acids, %	2.97

Table 18 Chemical composition of pelleted diets in three experimental periods (as fed basis)

Chemical composition	Growing period (30-60 kg)			Early finishing period (60-80 kg)			End finishing period (80-100 kg)		
	Control	1%TO	3%TO	Control	1%TO	3%TO	Control	1%TO	3%TO
ME, kcal/kg	3200	3200	3340	3150	3240	3290	3050	3010	3000
Moisture, %	10.40	10.04	9.58	10.39	9.59	8.79	10.08	10.75	10.30
Protein, %	20.74	21.04	21.00	19.07	21.07	21.36	19.46	19.27	19.10
Fat, %	5.59	6.33	9.10	5.77	8.02	9.28	5.78	4.83	4.78

TO = tuna oil.

Copyright University
All rights reserved

Figure 14 A pelleted diet prepared for all experimental feeding periods

Table 19 Fatty acid profile of tuna oil and pelleted diets in three experimental periods

Fatty acid (% of total fatty acid)	Tuna oil (TO)	Growing period (30-60 kg)			Early finishing period (60-80 kg)		End finishing period (80-100 kg)		
		Control	**1%TO**	**3%TO**	**Control**	**1%TO**	**Control**	**1%TO**	**3%TO**
C12:0	0.132	0.139	0.182	0.060	0.056	0.049	0.026	0.060	0.059
C13:0	0.060	-	-	-	-	-	-	-	-
C14:0	6.48	0.626	1.322	1.984	0.646	1.313	0.545	1.890	2.340
C14:1	0.070	-	-	-	-	-	-	-	-
C15:0	1.05	0.117	0.199	0.323	0.104	0.266	0.086	0.306	0.408
C16:0	24.1	19.1	20.3	22.3	19.4	20.3	20.1	22.2	21.6
C16:1	6.79	0.494	1.05	1.72	0.53	1.00	0.399	1.37	1.99
C17:0	1.12	0.151	0.298	0.318	0.157	0.229	0.117	0.337	0.403
C17:1	0.33	0.067	0.142	0.132	0.077	0.099	0.047	0.163	0.164
C18:0	6.20	2.91	3.46	3.62	2.89	3.55	2.64	3.59	4.24
C18:1 n-9	15.41	34.0	29.9	32.4	33.6	30.4	35.6	29.5	28. 7
C18:2 n-6	1.82	37.2	34.6	27.9	38.0	34.2	36.1	32.5	28.1
C18:3 n-6	0.143	0.061	0.112	0.138	0.087	0.102	0.044	0.138	0.166
C18:3 n-3	0.676	2.35	2.23	1.41	1.66	3.110	1.78	1.78	1.59
C20:0	0.452	0.627	0.490	0.540	0.524	0.502	0.597	0.431	0.484
C20:1	1.14	0.309	0.318	0.434	0.272	0.329	0.317	0.290	0.413
C20:2	0.283	0.029	0.098	0.113	0.042	0.023	0.047	0.079	0.110
C20:3 n-6	0.216	0.036	0.049	0.099	0.052	0.059	0.021	0.078	0.099
C20:3 n-3	0.136	0.034	0.041	0.069	0.030	0.022	0.013	0.038	0.036
C20:4 n-6	2.19	0.097	0.361	0.554	0.157	0.357	0.096	0.429	0.703
C20:5 n-3	8.00	0.231	0.994	1.354	0.284	0.872	0.180	1.177	2.049
C22:0	-	0.278	0.171	0.168	0.212	0.238	0.251	0.130	0.180
C22:1	1.31	0.058	0.208	0.314	0.039	0.069	0.040	0.107	0.192
C23:0	0.319	0.066	0.102	0.118	0.056	0.099	0.053	0.091	0.125
C24:0	1.41	0.468	0.543	0.666	0.034	0.548	0.411	0.460	0.706
C22:6 n-3	19.7	0.600	2.74	3.21	0.684	2.23	0.51	2.88	5.13
Total SFA	41.3	24.5	27.1	30.1	24.4	27.1	24.8	29.5	30.6
Total MUFA	25.0	34.9	31.7	35.0	34.6	31.9	36.4	31.4	31.4
Total PUFA	33.2	40.6	41.3	34.9	41.0	41.1	38.8	39.1	38.0
n-6 PUFA	4.38	37.3	35.2	28.7	38.3	34.7	36.3	33.1	29.1
n-3 PUFA	28.5	3.22	6.00	6.04	2.66	6.24	2.49	5.87	8.81
n-6 : *n*-3	0.154	11.61	5.86	4.75	14.4	5.57	14.57	5.67	3.30

- means not detected.

SFA means saturated fatty acid, MUFA means monounsaturated fatty acid, and PUFA means polyunsaturated fatty acid.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การวิเคราะห์ทางเคมีและบันทึกข้อมูล

1. การวิเคราะห์ไลปิดส์ในเลือด (blood lipid composition)

1.1 วิธีการวิเคราะห์คอเลสเตอรอล

ซีรัม (serum) ของสุกรที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงตัวอย่างเลือดด้วยความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที ด้วย microcentrifuge (Mikro20, Hettich) นำมาวัดปริมาณคอเลสเตอรอลด้วยวิธี enzymatic colorimetric method โดยชุดตรวจสำเร็จรูปของ BIOTECH reagent (RA. 119-05 Cholesterol Set, Biotech, Thailand) ซึ่งมีขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ดังนี้

Cholesterol ester ถูกไฮโดรไลซ์ (hydrolyze) ด้วยเอนไซม์ cholesterol esterase ได้เป็นคอเลสเตอรอล แล้วถูกออกซิไดซ์ (oxidize) ต่อด้วยเอนไซม์ cholesterol oxidase เกิดเป็น hydrogen peroxide (H_2O_2) ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับ aminoantipyrine ได้สาร quinoneimine มีสีชมพูแดง และความเข้มของสีเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณคอเลสเตอรอล ซึ่งวัดความเข้มของสีด้วยเครื่อง spectrophotometer (DU 7500, Beckman, Germany) ที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร

Figure 15 Blood collection from the external jugular vein for blood analysis

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

1.2 วิธีการวิเคราะห์ไตรกลีเซอไรด์

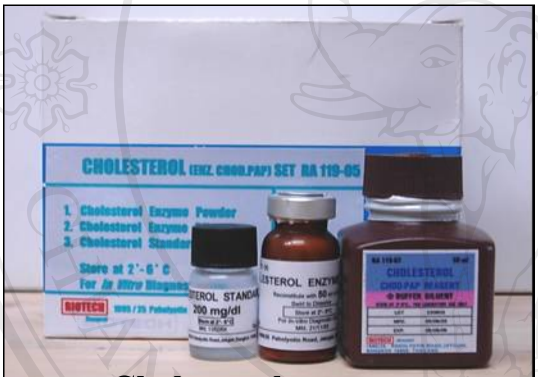
นำซีรัมของสุกรทดลองมาทดสอบหาปริมาณไตรกลีเซอไรด์ ด้วยวิธี enzymatic colorimetric method โดยชุดตรวจสำเร็จรูปของ BIOTECH reagent (RA. 130-05 Triglyceride GPO Set, Biotech, Thailand) ซึ่งมีขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ดังนี้

ไตรกลีเซอไรด์ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ lipase ได้ glycerol และ fatty acid จากนั้น glycerol ทำปฏิกิริยาใน 3 ขั้นตอน จนได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นสารประกอบสีชมพูแดงของ quinoneimine ดังสมการข้างล่าง วัดความเข้มของสีด้วยเครื่อง spectrophotometer (DU 7500, Beckman, Germany) ที่ความยาวคลื่น 505 นาโนเมตร

$$\text{Glycerol} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{Glycerol kinase}} \text{glycerol-3-phosphate} + \text{ADP}$$

$$\text{Glycerol-3-phosphate} + O_2 \xrightarrow{\text{Glycerophosphate oxidase}} \text{Dihydroxyacetone} + H_2O_2$$

$$2\,H_2O_2 + \text{a-aminoantipyrine} + \text{DHBS} \xrightarrow{\text{Horseradish peroxidase}} \text{Quinoneimine} + \text{HCI} + H_2O_2$$


Cholesterol test set

Triglycerides test set

Figure 16 Cholesterol and triglyceride test sets for enzyme-colorimetric method

1.3 การวิเคราะห์ไลโปโปรตีน

ไลโปโปรตีนประเภทความหนาแน่นสูง (high density lipoprotein, HDL)

นำซีรัมมาตกตะกอนไลโปโปรตีนด้วย สารละลายกรดฟอสโฟทังสติค (Phosphotungstic acid) และสารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ 15 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ด้วย microcentrifuge (Mikro20, Hettich) (ดัดแปลงจาก พรทิพย์, 2538) ที่ความเร็ว 2,700 รอบต่อนาที นาน 15 นาที จากนั้นดูดสารละลายส่วนใสที่ได้ นำไปทดสอบเช่นเดียวกับการวิเคราะห์คอเลสเตอรอล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

$$\text{HDL-cholesterol} = \frac{\text{Ab. sample} \times \text{C standard}}{\text{Ab. standard}} \times 1.125$$ เมื่อ

Ab. sample คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

Ab. standard คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายคอเลสเตอรอลมาตรฐาน

C standard คือ ค่าความเข้มข้นของสารละลายคอเลสเตอรอลมาตรฐาน (mg/dl)

ไลโปโปรตีนประเภทความหนาแน่นต่ำ (low density lipoprotein, LDL)

คำนวนได้จากสมการ

LDL-cholesterol = Total cholesterol – HDL-cholesterol – VLDL

เมื่อ $\text{VLDL} = \frac{\text{Triglyceride}}{5}$

2. การศึกษาคุณภาพซาก (carcass quality)

สุกรที่นำมาฆ่า มีการอดอาหารก่อนฆ่าประมาณ 12 ชั่วโมง จากนั้นทำการฆ่าและตัดแต่งแบบไทย ตามวิธีของ สัญชัย (2547) ประกอบด้วย ภายหลังจากการฆ่าทำการบันทึกน้ำหนักซากอุ่น (hot carcass weight) ซึ่งไม่รวมน้ำหนักหัวและไตของสุกร จากนั้นแช่เย็นซากที่อุณหภูมิประมาณ 3 ± 1 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดความยาวซากเย็น และความหนาไขมันสันหลัง 3 ตำแหน่ง ได้แก่ ตำแหน่งซี่โครงซี่แรก ซี่สุดท้าย และกระดูกสะโพกข้อสุดท้าย เพื่อคำนวณเป็นความหนาไขมันสันหลังเฉลี่ย (average back fat thickness) จากนั้นทำการตัดแต่งซากแบบไทย เพื่อวัดพื้นที่หน้าตัดเนื้อสัน (loin eye area) ความหนาไขมันสันหลังที่ตำแหน่ง P_2 ที่ระหว่างซี่โครงซี่ที่ 10 – 11 นำค่าบันทึกที่ได้มาคำนวณเปอร์เซ็นต์ซาก (dressing percentage) และเปอร์เซ็นต์เนื้อแดง (lean percentage) จากตารางประเมินเปอร์เซ็นต์เนื้อแดง

$$\text{Dressing percentage} = \frac{(\text{hot carcass weight} - 3\%\ \text{hot carcass weight}) \times 100}{\text{live weight}}$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3. การศึกษาคุณภาพเนื้อ (meat quality)

เก็บตัวอย่างกล้ามเนื้อสันนอก บริเวณตั้งแต่ซี่โครงที่ 6-14 เพื่อนำไปวิเคราะห์คุณภาพเนื้อ ประกอบด้วย

3.1 ค่าความเป็นกรดด่างของกล้ามเนื้อ (muscle pH)

วัดค่า pH จากกล้ามเนื้อสันนอก (*Longissimus dorsi*) และกล้ามเนื้อสะโพก (*Semimembranosus*) จากซากสุกรหลังฆ่าที่เวลา 45 นาที และ 24 ชั่วโมง ด้วยเครื่อง pH – meter (WTW pH340, Germany) บันทึกค่า pH

Figure 17 Muscle pH measurement: *Longissimus dorsi* (up) and *Semimembranosus* (down)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2 สีเนื้อ (meat color)

นำกล้ามเนื้อสันนอก จากซี่โครง ซี่ที่ 6 ใส่ถุงพลาสติกผนึกปากถุงเก็บที่ 4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเนื้อออกจากถุงวางในภาชนะเปิดเก็บในตู้เย็น 1 ชั่วโมง ทำการวัดค่าสีด้วยเครื่อง Minolta Chroma Meter (CR – 300, Japan) บันทึกค่าความสว่าง (lightness, L*) ค่าสีแดง (redness, a*) และค่าสีเหลือง (yellowness, b*)

3.3 องค์ประกอบทางเคมี (chemical composition)

นำตัวอย่างกล้ามเนื้อสันนอก จากซี่โครงซี่ที่ 7 บดให้ละเอียด เพื่อนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ เปอร์เซ็นต์ความชื้น โปรตีน และไขมัน ด้วยวิธี Proximate Analysis (Adapted from AOAC, 1995)

การวิเคราะห์หาความชื้น (moisture)

1. นำถ้วยสำหรับใส่ตัวอย่างวิเคราะห์หาความชื้น (weighing bottle) ที่ล้างสะอาดและเช็ดให้แห้ง อบในตู้อบ ที่อุณหภูมิ 100°C นาน 1 ชั่วโมง และนำออกมาใส่ในโถดูดความชื้น (desiccators) ปล่อยให้เย็นและชั่งน้ำหนัก
2. ชั่งตัวอย่างเนื้อที่บดละเอียดแล้วจำนวน 2 กรัม ใส่ใน weighing bottle บันทึกน้ำหนักรวมทั้งหมด และอบที่อุณหภูมิ 100°C นาน 4 ชั่วโมง
3. นำถ้วยที่มีตัวอย่างออกจากตู้อบแห้ง ใส่ในโถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็น แล้วชั่งน้ำหนักอีกครั้ง ส่วนที่หายไป คือ ปริมาณความชื้น

การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความชื้น

$$\text{Moisture percentage} = \left(\frac{(A - B)}{C}\right) \times 100$$

A = น้ำหนักถ้วย + น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ

B = น้ำหนักถ้วย + น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ

C = น้ำหนักตัวอย่าง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การวิเคราะห์หาโปรตีน (protein)

1. ชั่งตัวอย่างเนื้อที่บดแล้ว 0.5 กรัม ใส่ในกระดาษชั่งตัวอย่าง แล้วนำใส่ใน Kjeldahl flask
2. เติมสารเร่งปฏิกิริยา (Selenium reagent mixture) 2 กรัม แล้วเติม conc. sulfuric acid 15 มล.
3. นำ Kjeldahl flask เข้าเครื่องย่อยที่อุณหภูมิ 420°C เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง จนกระทั่งได้สารละลายสีเขียวใส แล้วทิ้งให้เย็น
4. ตวงสารละลาย 4% boric acid 25 มล. ใส่ Erlenmeyer flask ขนาด 250 มล. แล้วเติม screen methyl red indicator
5. นำ Kjeldahl flask ต่อเข้าเครื่องกลั่น แล้วนำขวด Erlenmeyer flask ที่ใส่สารละลาย 4% boric acid ต่อเข้ากับอีกปลายของ condenser ของเครื่องกลั่น โดยให้ปลายท่อจุ่มในสารละลายใน Erlenmeyer flask
6. เติมน้ำ ปริมาตร 15-20 มล. จากนั้นเติม 40% NaOH ใส่ขวด Kjeldahl flask ประมาณ 40-50 มล. เปิดน้ำให้ไหลผ่านตัว condenser แล้วจึงเปิดเครื่องกลั่น
7. กลั่นจนได้ปริมาตรของสารละลายในขวด Erlenmeyer flask ประมาณ 200 มล. จากนั้นนำขวด Erlenmeyer flask ที่มีแอมโมเนียซึ่งเก็บด้วยสารละลาย 4% boric acid มาไตเตรทกับสารละลายมาตรฐาน 0.1 N H_2SO_4 ไตรเตรทจนสีของสารละลายเปลี่ยนสีจากสีเขียวเป็นสีม่วงอมเทา บันทึกปริมาตรของสารละลายมาตรฐาน
8. หลอด blank แต่ใส่เพียงกระดาษชั่งตัวอย่าง แล้วทำทุกขั้นตอนเช่นเดียวกัน

การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์โปรตีน

$$\text{Protein percentage} = \frac{(A-B) \times C \times 6.25 \times 0.014}{D} \times 100$$

A = จำนวนปริมาตรของสารละลายมาตรฐาน 0.1 N H_2SO_4 ที่ใช้ในการไตรเตรทกับตัวอย่าง (มล.)

B = จำนวนปริมาตรของสารละลายมาตรฐาน 0.1 N H_2SO_4 ที่ใช้ในการไตรเตรทกับ blank (มล.)

C = ความเข้มข้น (N) ของสารละลายมาตรฐาน H_2SO_4

D = น้ำหนักตัวอย่าง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การวิเคราะห์หาไขมัน (fat)

1. ชั่งน้ำหนักเนื้อแห้งที่บดแล้ว 2 กรัม ซึ่งผ่านการอบที่ 100°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง
2. นำขวดสำหรับหาไขมัน (round bottom) ที่สะอาดและแห้ง นำไปอบที่ 100°C นาน 1 ชั่วโมง นำใส่ในโถดูดความชื้น (desiccators) ปล่อยให้เย็น ทำการชั่งน้ำหนัก
3. นำตัวอย่างเนื้อที่ผ่านการอบเพื่อหาความชื้นแล้ว ใส่ใน thimble alundum ที่สะอาดและแห้ง
4. ใส่ thimble alundum ลงใน sample containers แล้วต่อเข้ากับ holding clips ของเครื่องสกัดไขมันแบบ Soxhlet extraction
5. ใส่ dichloromethane ลงในขวดหาไขมันประมาณ 50-100 มล. แล้วนำต่อเข้ากับเครื่องสกัดไขมันให้สนิท
6. เปิดน้ำเย็นให้ไหลผ่าน condenser ตลอดเวลา
7. เปิดสวิทซ์ไฟ โดยใช้ความร้อนสกัดนาน 16 ชั่วโมง ด้วยอัตราการกลั่น 2-3 หยดต่อวินาที
8. นำ thimble alundum ออก แล้วกลั่นให้ความร้อนต่อ dichloromethane จะถูกกลั่นและเก็บไว้ใน reclaming tube ส่วนของไขมันที่ได้จะอยู่ในขวดสกัดไขมัน
9. นำขวดสกัดไขมันที่มีไขมันที่สกัดได้ อบที่อุณหภูมิ 100°C นาน 30 นาที ก่อนนำใส่ในโถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็น ทำการชั่งน้ำหนัก ซึ่งน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นภายหลังการสกัดคือน้ำหนักของไขมัน

การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ไขมัน

$$\text{Fat percentage} = \left(\frac{(A - B)}{C}\right) \times 100$$

A = น้ำหนักขวดสกัดไขมัน + น้ำหนักไขมันหลังอบแล้ว

B = น้ำหนักขวดสกัดไขมัน

C = น้ำหนักตัวอย่าง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4 ค่าความสามารถในการอุ้มน้ำของเนื้อ และค่าแรงตัดผ่านเนื้อ (water holding capacity and shear force value)

ค่าความสามารถในการอุ้มน้ำ ประกอบด้วยการค่าการสูญเสียน้ำขณะเก็บ (drip loss) การสูญเสียน้ำจากการละลายน้ำแข็ง (thawing loss) และการสูญเสียน้ำจากการต้ม (cooking loss) ค่าการสูญเสียขณะย่าง (grilling loss) ซึ่งแนะนำและดัดแปลงจาก สัญชัย (2547); Honikel and Hamm (1999)

ทำการชั่งน้ำหนักเริ่มต้น (Wd_1) ของกล้ามเนื้อสันนอก แล้วห่อชิ้นเนื้อด้วยผ้ากอซ เก็บในถุงพลาสติกชนิดเย็น โดยให้ปลายห่อผ้ากอซห่างจากก้นถุงประมาณ 2 เซนติเมตร ผนึกปากถุงให้สนิท เก็บในตู้เย็นในลักษณะแขวน ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำชิ้นเนื้อออกจากถุง ชั่งน้ำหนัก (Wd_2) คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำ (drip loss) จากสูตร

$$\text{Drip loss (\%)} = \left(\frac{Wd_1 - Wd_2}{Wd_1}\right) \times 100$$

การสูญเสียน้ำจากการละลายน้ำแข็ง (thawing loss) และการสูญเสียน้ำจากการต้ม (cooking loss) โดยนำกล้ามเนื้ออก และสะโพก ทำการชั่งน้ำหนัก (Wt_1) เก็บแบบสุญญากาศ (vacuum) ในถุงพลาสติกชนิดเย็นผนึกปากถุงให้สนิท เก็บในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ –20°C รอการวิเคราะห์ต่อไป จากนั้นนำชิ้นเนื้อมาละลายน้ำแข็ง (thawing) ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำชิ้นเนื้อออกจากถุง ซับน้ำให้แห้ง ชั่งน้ำหนัก (Wt_2) จากนั้นนำชิ้นเนื้อที่ได้เก็บในถุงร้อนแบบสุญญากาศ ต้มในหม้อต้มน้ำที่ควบคุมให้มีอุณหภูมิน้ำประมาณ 85°C จนได้อุณหภูมิใจกลางเนื้อประมาณ 70°C วัดด้วย Thermocouple (T851, Consort, Belgium) ใช้เวลาประมาณ 15-16 นาที ผึ่งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นำชิ้นเนื้อออกจากถุง ซับน้ำให้แห้ง ชั่งน้ำหนัก (Wt_3) คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำขณะทำละลาย (thawing loss) และเปอร์เซ็นต์การสูญเสียจากการต้ม (cooking loss) จากสูตร

$$\text{Thawing loss (\%)} = \left(\frac{Wt_1 - Wt_2}{Wt_1}\right) \times 100$$

$$\text{Cooking loss (\%)} = \left(\frac{Wt_2 - Wt_3}{Wt_2}\right) \times 100$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ค่าการสูญเสียขณะย่าง (grilling loss) โดยนำกล้ามเนื้อสันนอกทำการตัดแต่งเอาพังผืดออก ทำการชั่งน้ำหนัก (Wg_1) จากนั้นนำชิ้นเนื้อที่ได้ย่างในหม้ออบ (convection oven, Mara, Taiwan) ให้ความร้อน ที่อุณหภูมิประมาณ 160°C เป็นเวลา 15 นาที จนได้อุณหภูมิใจกลางเนื้อประมาณ 70°C วัดด้วย Thermocouple (306, Tecpel, Taiwan) และนำออกจากเตาย่าง ทำการชั่งน้ำหนัก (Wg_2) คำนวณเปอร์เซ็นต์การสูญเสียจากการย่าง จากสูตร

$$\text{Grilling loss (\%)} = \left(\frac{Wg_1 - Wg_2}{Wg_1}\right) \times 100$$

3.5 แรงตัดผ่านเนื้อ (shear force value)

นำเนื้อที่ต้มสุกจากการหาเปอร์เซ็นต์การสูญเสียจากการต้ม (cooking loss) เจาะตามแนวเส้นใยกล้ามเนื้อด้วยเหล็กกลวงชนิดกลม (core) ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1.27 cm. วัดค่าแรงตัดผ่านด้วยเครื่อง Texture Analyser (Texture Exponent 32, UK) โดยแปรผลประกอบด้วยค่าแรงสูงสุด (maximum force, N) และค่างานซึ่งเป็นค่าพื้นที่ใต้กราฟ (area, N.sec)

3.6 การประเมินด้านการตรวจชิม (sensory evaluation)

นำตัวอย่างกล้ามเนื้อสันนอกที่ผ่านการอบสุกแล้ว ตัดให้มีขนาดเท่ากันประมาณ 1 x 1 x 1 ซม. จากนั้นบริการแก่ผู้ตรวจชิม ซึ่งได้ผ่านการฝึกฝนการตรวจชิม (ไพโรจน์, 2535) จำนวน 6 ท่าน ผู้ตรวจชิมจะได้รับแบบสอบถามการตรวจชิมเนื้อ และฟังการบรรยายขั้นตอนการทดสอบชิมโดยละเอียด ซึ่งการให้คะแนนพิจารณา 4 ลักษณะการตรวจชิม ได้แก่ ความนุ่ม (tenderness) กลิ่นและรสชาติ (flavor) ความชุ่มฉ่ำ (juiciness) และความพอใจโดยรวม (overall acceptability) โดยให้คะแนนซึ่งอยู่ในช่วง 1 – 9 คะแนน (1 = เหนียว, กลิ่นรสไม่ดี, แห้ง และไม่ชอบมาก; 5 = นุ่ม, มีกลิ่นและรสชาติดี, ชุ่มฉ่ำ และมีความพอใจ; 9 = ยุ่ยเละ, กลิ่นและรสชาติดีที่สุด, ชุ่มฉ่ำมากที่สุด และมีความชอบมากที่สุด) ผู้ทดสอบชิมจะได้รับน้ำ ขนมปังและผลไม้หลังจากทดสอบชิมเนื้อแต่ละชิ้น

3.7 ค่าการหืน (thiobarbituric acid, TBA number)

เก็บตัวอย่างกล้ามเนื้อสันนอกแบ่งเป็น 4 ส่วนในแต่ละชิ้นของกล้ามเนื้อ แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 0, 3, 6 และ 9 วัน จากนั้นนำมาวิเคราะห์ค่า TBA number โดยวิธีของ Rossell (1994) ดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

1. ชั่งตัวอย่างกล้ามเนื้อสันนอกที่บดแล้ว 10 กรัม เติมน้ำกลั่น 70 มล.
2. ปั่นผสมใน blender ประมาณ 15 นาที
3. เทใส่ใน distillation flask แล้วล้าง blender ด้วยน้ำกลั่นอีก 30 มล.
4. เติม 4 M HCl 2.5 มล.
5. เติม anti-foaming agent 1-2 หยด
6. ต่อ distillation flask เข้ากับชุดกลั่น แล้วกลั่นจนได้ของเหลวประมาณ 50 มล.
7. ปิเปตสารละลายที่กลั่นได้ 5 มล. แล้วเติม TBA solution 5 มล.
8. ต้มในน้ำเดือด 35 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นเป็นเวลา 10 นาที
9. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 538 นาโนเมตร
10. คำนวณค่า TBA number จากสูตร

TBA number (mg malondialdehyde/kg sample) = 7.8 x absorbance

หมายเหตุ : หลอด blank เติมน้ำกลั่น 5 มล. และ TBA solution 5 มล.

3.8 การวิเคราะห์หาปริมาณคอเลสเตอรอล (Adapted from Jung *et al.*, 1975)

1. นำไขมันที่สกัดจากกล้ามเนื้อสันนอก โดยวิธีการของ AOAC (1995) มาละลายด้วย 2-propanol เตรียมให้มีความเข้มข้น 50 มก./มล.
2. ดูดสารละลายไขมัน ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาด 25 มล.
3. เติม alcoholic KOH 10 มล. แช่ใน water bath อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็น
4. เติม petroleum ether 5 มล. เขย่าให้เข้ากันด้วย vortex mixture
5. เติมน้ำกลั่น 5 มล. เขย่าให้เข้ากันด้วย vortex mixture ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น
6. เก็บส่วนที่ละลายในชั้น petroleum ether แล้วนำไประเหยแห้งใน water bath ที่อุณหภูมิ 65°C
7. เติม ferric acetate/uranyl acetate 5 มล. เขย่าอย่างแรงด้วยเครื่อง vortex mixture
8. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,700 รอบ/นาที นาน 5 นาที
9. เตรียมหลอดอ่านขนาด 13 x 100 มม. ชุดใหม่ แล้วเติม sulfuric acid reagent หลอดละ 2 มล.
10. ดูด supernatant จากหลอดในข้อ 8 มา 3 มล. ใส่ในหลอดอ่านที่เติม sulfuric reagent

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

11. ผสมให้เข้ากันทันทีด้วย vortex mixer อย่างน้อย 20 วินาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที
12. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร โดยใช้หลอด blank อ่านค่าเป็นศูนย์

สูตรในการคำนวณหาปริมาณคอเลสเตอรอล

$$\text{Total cholesterol} = \left(\frac{Au}{As}\right) \times Cs$$

เมื่อ Au คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

As คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายคอเลสเตอรอลมาตรฐาน

Cs คือ ค่าความเข้มข้นของสารละลายคอเลสเตอรอลมาตรฐาน

หมายเหตุ : 1. หลอด blank จะเติมเฉพาะ ferric acetate/uranyl acetate 3 มล. และ sulfuric acid reagent 2 มล.

2. นำค่าคอเลสเตอรอลที่ได้ คำนวณกลับเพื่อหาปริมาณคอเลสเตอรอลใน 100 กรัม ของเนื้อ

3.9 การวิเคราะห์หาปริมาณไตรกลีเซอไรด์ (Adapted from Biggs *et al.*, 1975)

1. สกัดไขมันตามวิธีของ AOAC (1995)
2. เตรียมไขมันที่สกัดได้ ให้มีความเข้มข้น 50 มก./มล. ด้วย 2-propanol เช่นเดียวกับการวิเคราะห์คอเลสเตอรอล
3. ดูดไขมันในข้อ 2 มา 50 ไมโครลิตร ใส่หลอดทดลองขนาด 25 มล.
4. เติม n-heptane 2 มล.
5. เติม 2-propanol 3.5 มล.
6. เติม 40mM sulfuric acid จำนวน 1 มล.
7. ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixture 20 วินาที ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที จนแยกชั้น
8. เตรียมหลอดทดลองอีกชุด แล้วเติม sodium alkoxide 2 มล.
9. ดูดสารละลายที่แยกชั้นส่วนบนในข้อ 7 มา 0.2 มล.ใส่ในหลอดข้อ 8 ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixture นำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 5 นาที นำออกมาเติม sodium periodate อีก 1 มล.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

10. เติม acetyl acetone reagent 1 มล. ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixture นำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 20 นาที
11. ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 420 นาโนเมตร

หมายเหตุ : คำนวณเปรียบเทียบกับสารละลายไตรกลีเซอไรด์มาตรฐาน แล้วคำนวณกลับเพื่อหาเป็นปริมาณไตรกลีเซอไรด์ใน 100 กรัมของเนื้อ

3.10 องค์ประกอบกรดไขมัน (fatty acid profile)

ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน ได้แก่ การสกัดไขมันและการเตรียม fatty acid methyl ester (FAME) โดยบดกล้ามเนื้อสันนอก ทำการสกัดไขมันจากกล้ามเนื้อตัวอย่าง (Folch *et al.*, 1957) โดยมีวิธีการ ดังนี้

1. ชั่งตัวอย่างเนื้อที่บดแล้ว 5 กรัม ใส่ลงในขวดก้นกลม (round bottom flask) ขนาด 100 มล.
2. เติม chloroform : methanol (2 : 1) ปริมาตร 60 มล. เขย่าอย่างแรงเพื่อให้เกิดการสกัดที่สมบูรณ์
3. กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No. 1 ลงใน flask
4. นำกากที่ได้มาสกัดต่อด้วย chloroform : methanol (2 : 1) อีกครั้ง แล้วรวมสารละลายที่กรองได้
5. เติมน้ำกลั่น 0.2 เท่า ของสารละลายที่กรองได้ ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น
6. เก็บชั้นล่างของสารละลายลงใน flask ที่ทราบน้ำหนัก แล้วนำไปประเหยแห้งด้วย water bath ที่อุณหภูมิ 70°C
7. ชั่งน้ำหนักไขมันใน flask ที่ระเหยแห้งแล้ว จากนั้นละลายไขมันด้วย chloroform ให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 30 มก./มล.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การเตรียม fatty acid methyl ester (FAME) (Morrison and Smith, 1964)

1. ดูดสารละลายที่สกัดได้ 1 มล. ใส่ลงในขวดก้นกลม (round bottom flask) ขนาด 250 มล.
2. เติม 0.5 M methanolic NaOH ปริมาตร 4 มล. เขย่า 30 วินาที
3. reflux จนได้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ใช้เวลาประมาณ 5 นาที ทิ้งให้เย็น
4. เติม 20% boron-trifluoride in methanol จำนวน 5 มล. เขย่า 30 วินาที
5. reflux ต่ออีก 2 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น
6. เติมสารละลาย NaCl อิ่มตัว 5 มล. เขย่าให้เข้ากัน

7. เติม Iso – octane (2, 2, 4 – trimethylpentane) 2 มล. เขย่าให้เข้ากัน 30 วินาที ทิ้งไว้ ให้ตกตะกอน
8. เก็บส่วนที่ละลายในชั้น Iso – octane
9. เติม sodium sulfate anhydrous ปริมาณเท่าปลายช้อนตักสาร ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น
10. ดูดสารละลายส่วนใสใส่ใน vial แล้วปิดให้สนิท
11. ดูดสารละลายที่ได้ 1 ไมโครลิตร ฉีดเข้าเครื่อง Gas chromatography (GC 14B, Shimadzu, Japan) เพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบกรดไขมัน

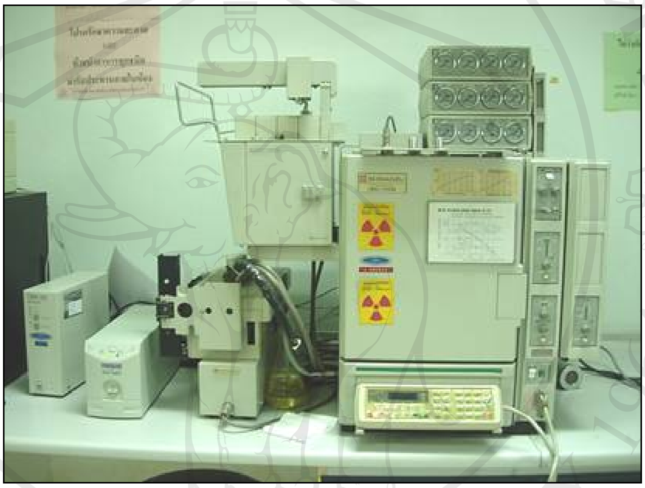


Figure 18 Gas chromatography apparatus (GC 14B, Shimadzu) for fatty acid analysis in meat and backfat

4. การศึกษาคุณภาพไขมัน (fat quality)

4.1 สีของไขมัน (backfat color)

นำไขมันสันหลังจากบริเวณซี่โครงซี่ที่ 6 ใส่ถุงพลาสติกผนึกปากถุงเก็บที่ 4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเนื้อออกจากถุงวางในภาชนะเปิดเก็บในตู้เย็น 1 ชั่วโมง แล้ววัดค่าสีด้วยเครื่อง Minolta Chroma meter (CR – 300, Japan) บันทึกผลเช่นเดียวกับการตรวจวัดในเนื้อสันนอก

4.2 ค่าความแข็งของไขมันสันหลัง (backfat hardness)

นำไขมันสันหลังจากซี่โครงซี่ที่ 7-8 หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วนำไปสกัดเอาน้ำมัน ด้วยเครื่องไมโครเวฟ (R-221, Sharp, Thailand) ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วใช้เข็มฉีดยาดูดน้ำมันที่ได้ ปริมาตร 10 มล.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ใส่ขวดกลมเล็ก ขนาด 15 มล. ให้มีความสูงของไขมันประมาณ 3 ซม. นำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนการวัด นำขวดไขมันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 45 นาที จากนั้นนำไปแช่เย็นต่อที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำเข้าเครื่อง Texture Analyser (Texture Exponent 32, UK) โดยเปลี่ยนหัววัดเป็นหัวตัน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มม. และกำหนดระยะทางของหัววัดจากผิวหน้าไขมัน ประมาณ 2 ซม. โดยให้ระยะที่หัวเจาะผ่านไขมันเท่ากับ 2.5 ซม. บันทึกค่าความแข็งของไขมัน (hardness) ประกอบด้วย ค่าแรงสูงสุด (maximum force) ค่างานของการเจาะ (work of penetration) และค่างานจากการถอน หรือค่างานที่เกิดขึ้นจากแรงต้านขณะถอนแท่งเจาะ (work of adhesion)

Figure 19 Backfat color measurement and Minolta Chroma meter

4.3 จุดหลอมเหลว (melting point)

หลอมไขมันจากไขมันสันหลังด้วยเครื่องไมโครเวฟ (R-221, Sharp, Thailand) ที่กำลังไฟฟ้า 350 วัตต์ ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที ดูดน้ำมันที่ได้ด้วยหลอดแก้วเล็ก (microhaematocrit tube) (Modulohm A/S, Denmark) ให้ความสูงของไขมันประมาณ 1 ซม. อุดปลายหลอดแก้วด้วยซิลิโคน นำหลอดแก้วแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนการวัด นำหลอดแก้ววางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25°C) เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำเข้าเครื่องวัดจุดหลอมเหลว (Melting Point SMP10, Bibby Sterilin Ltd., UK) บันทึกอุณหภูมิเริ่มต้นการหลอมเหลวเหลว และอุณหภูมิสุดท้ายเมื่อการหลอมเหลวเสร็จสมบูรณ์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

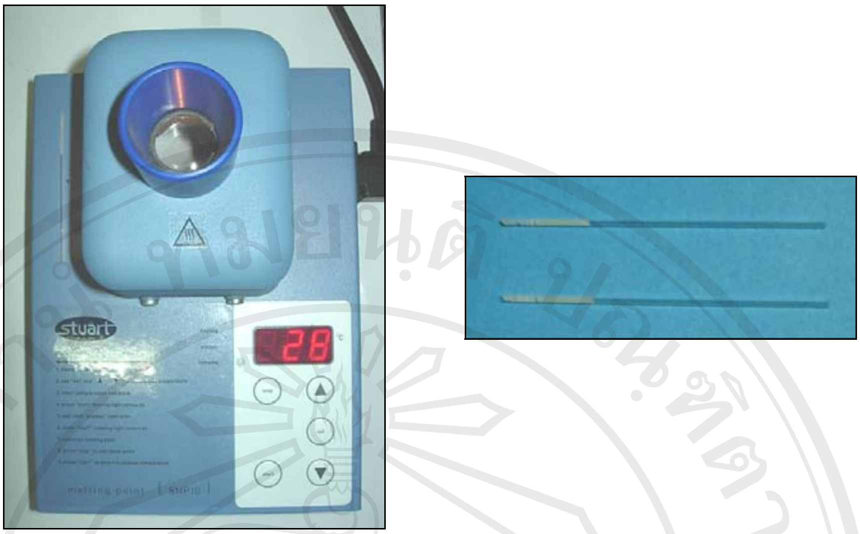


Figure 20 Melting point apparatus (left) and sample microhematocrit tubes (right)

4.4 ค่าการหืน (thiobarbituric acid, TBA number)

นำไขมันสันหลังจากซี่โครงซี่ที่ 9-12 แบ่งออกเป็น 4 ส่วนใส่ในถุงพลาสติก ปิดผนึกธรรมดา แล้วเก็บไว้ในอุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 0, 3, 6 และ 9 วัน จากนั้นนำมาวิเคราะห์ค่า TBA number โดยวิธีของ Rossell (1994) เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ในเนื้อสันนอก

4.5 ปริมาณคอเลสเตอรอล ไตรกลีเซอไรด์ และองค์ประกอบกรดไขมันในไขมันสันหลัง (cholesterol, triglyceride contents and fatty acid profile)

สกัดไขมันด้วยเครื่องไมโครเวฟ (R-221, Sharp, Thailand) นำไขมันที่ได้มาละลายด้วย 2-propanol ให้ได้สารละลายมีความเข้มข้น 50 มก./มล. เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณคอเลสเตอรอลและไตรกลีเซอไรด์ เช่นเดียวกับในเนื้อสันนอก และอีกส่วนนำมาละลาย chloroform ให้ได้สารละลายความเข้มข้น 30 มก./มล. แล้วนำไปเตรียม FAME ด้วยวิธีเดียวกันกับกล้ามเนื้อสันนอก นำ FAME ปริมาณ 1 ไมโครลิตร ฉีดเข้าเครื่องแกสโครมาโตกราฟฟี (gas chromatography, GC 14-B, Shimadzu, Japan) เพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบกรดไขมัน

5. การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ (statistic analysis)

วิเคราะห์ผลการทดลอง โดยวัดความแปรปรวน (analysis of variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่ม โดยวิธี Tukey's W-Procedure โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป SAS for window version 6.12 (SAS, 1990)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

6. สถานที่ทำการวิจัยและรวบรวมข้อมูล

1. ฟาร์มอะโกร-1 ในเครือ บจม. มิตรภาพโภคภัณฑ์ จังหวัดสระบุรี
2. โรงฆ่าสัตว์ ศูนย์วิจัยวิทยาศาสตร์เนื้อสัตว์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม
3. ห้องปฏิบัติการภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
4. ห้องปฏิบัติการกลางคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
5. ห้องปฏิบัติการคณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่

7. ระยะเวลาที่ใช้ดำเนินงานวิจัย ใช้ระยะเวลาประมาณ 18 เดือน

CHIANG MAI UNIVERSITY 1964
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved