บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

อุปกรณ์และเครื่องมือ

ชื่ออุปกรณ์และเครื่องมือ	โมเดล	บริษัท	ประเทศ
1. ขวดก้นกลม 100 ml	-	Glaswerk Wertheim	Germany
2. ขวดก้นกลม 250 ml	-	Duran	-
3. เครื่อง Centrifuge	Megafuge1.0	Heraeus	Germany
4. เครื่อง Gas chromatography	GC-2010	Shimadzu	Japan
5. เครื่อง Spectrophotometer	DU 7500	Beckman	Germany
6. เครื่อง Vortex mixer	G-560E	Scientific Industries,Inc.	USA
7. เครื่องกลั่นโปรตีน	-	Gerhardt	Germany
8. เครื่องปั่น	-	Moulinex	France
9. เครื่องสกัดไขมัน	-	Gerhardt	Germany
10. คอลัมน์	DB-Wax	J&W	USA
11. โถดูดความชื้น	GL 32	Glaswerk Wertheim	Germany
12. ตู้อบ	DEV	Heraeus	Germany
13. หลอดทดลอง	-	Pyrex	Germany
14. Beaker 100 ml	No. 1000	Pyrex	USA
15. Beaker 250 ml	No. 1000	Pyrex	USA
16. Beaker 50 ml	No. 1000	Pyrex	USA
17. Beaker 500 ml	No. 1000	Pyrex	USA
18. Erlenmeyer flask	-	SCHOTT	Germany
19. Filter paper	No.1, 41	Whatman	UK
20. Instron	5565	Instron	England
21. Kjedahl flask	-	Gerhardt	Germany
22. Micropipette 100-1000µl	704180	Brand	Germany
23. Micropipette 10-100µl	cp65602 Genex	Beta	Germany

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

24. Minolta chromameter	CR 300	Minolta	Japan
25. pH meter	913	Knick	Germany
26. Separate flask	-	SCHOTT	Germany
27. Thimble	-	Whatman	England
28. Vacuum sealer	C15-HL	Food equipment	Germany
29. Volumetric flask 1,000 ml	-	SCHOTT	Germany
30. Volumetric flask 100 ml	-	SCHOTT	Germany
31. Volumetric flask 2,000 ml	-	SCHOTT	Germany
32. Volumetric flask 50 ml	-	SCHOTT	Germany
33. Water bath	-	W. Krannich	Germany

สารเคมี (เกรด Analytical reagents)

ชื่อสารเคมี	**บริษัท**
1. น้ำกลั่น	-
2. Acetic acid	Merck
3. Acetylacetone	Fluka
4. Ammonium acetate	BDH
5. anti-foaming agent	Fluka
6. Boric acid	Merck
7. 20% Boron trifluoride	Merck
8. Chloroform	Merck
9. Choramine-T-reagent	Merck
10. conc. Sulfuric acid	Merck
11. Dichloromethane	Merck
12. 4-dimethylaminobenzaldehyde	Merck
13. Ethanol	Lab-Scan
14. FAME standard	Supelco
15. Ferric chloride	Merck
16. *n*-Heptane	Lab-Scan
17. Hydrochloric acid	Merck

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

18. Magnesium chloride	Merck
19. Methanol	Lab-Scan
20. Perchloric acid	Merck
21. Petrolium ether	Lab-Scan
22. Potassium hydroxide	Merck
23. Propa-2-ol	Lab-Scan
24. Sodium chloride	Merck
25. Sodium hydroxide	Merck
26. Sodium methoxide	Fluka
27. Sodium periodate	Merck
28. Sodium sulfate anhydrous	J.T.Baker
29. Thiobarbituric acid	BDH
30. 2, 2, 4 trimethyl pentane	Lab-Scan
31. Uranyl acetate	Merck

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สัตว์ทดลองและแผนการทดลอง

ใช้กระบือปลักเพศผู้จำนวน 16 ตัว ที่มีน้ำหนักเริ่มต้นเฉลี่ย 200±30 กิโลกรัม แบ่งการทดลองออกเป็น 2 กลุ่ม ตามแผนการทดลองแบบ 2 x 4 แฟคทอเรียล ใน CRD (Completely Randomized Design) (จรัญ, 2540) โดยมีปัจจัยทดสอบจากชนิดของทุ่งหญ้า 2 ชนิด คือ กลุ่มที่ 1 เลี้ยงปล่อยให้แทะเล็มในแปลงหญ้ากินนีสีม่วง (*Panicum maximum* TD58) จำนวน 6 ตัว ส่วนกลุ่มที่ 2 เลี้ยงปล่อยให้แทะเล็มในแปลงหญ้ากินนีสีม่วงร่วมกับถั่วท่าพระสไตโล (*Stylosanthes guianensis* CIAT184) จำนวน 10 ตัว และปัจจัยจากชนิดของกล้ามเนื้อ 4 ชนิด คือ กล้ามเนื้อสันนอก (*Longissimus dorsi*) กล้ามเนื้อไหล่ (*Infraspinatus*) และกล้ามเนื้อสะโพกได้แก่ กล้ามเนื้อลูกดิ่ง (*Semitendinosus*) และกล้ามเนื้อใบพาย (*Biceps femoris*) โดยกระบือปลักถูกเลี้ยงปล่อยให้แทะเล็มในแปลงทดลอง จนกระทั่งมีน้ำหนัก 375±10 กิโลกรัม หลังจากนั้นจึงนำเข้าฆ่าเพื่อศึกษาคุณภาพซากและเนื้อ

การจัดการแปลงพืชอาหารสัตว์

ปล่อยกระบือปลักให้แทะเล็มในแปลงหญ้า หรือแปลงหญ้าร่วมกับถั่วแบบแปลงเดียวโดยแบ่งเป็นแปลงย่อยหมุนเวียนตลอดทั้งปี มีอัตราการปล่อยกระบือลงแทะเล็ม 1 ตัว/พื้นที่ 2 ไร่ โดยใช้พื้นที่ทั้งหมด 32 ไร่ในการเลี้ยงกระบือ 16 ตัว ซึ่งแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ใช้พื้นที่จำนวน 12 ไร่ ในการปลูกหญ้ากินนีสีม่วงโดยใช้เมล็ดพันธุ์ในการปลูก เพื่อเลี้ยงกระบือจำนวน 6 ตัว โดยแบ่งเป็น 4 แปลงย่อยเท่า ๆ กัน แปลงย่อยละ 3 ไร่ สำหรับกลุ่มที่ 2 ใช้พื้นที่จำนวน 20 ไร่ ในการปลูกหญ้ากินนีสีม่วงร่วมกับถั่วท่าพระสไตโลโดยใช้เมล็ดพันธุ์ในการปลูก เพื่อเลี้ยงกระบือจำนวน 10 ตัว โดยแบ่งเป็น 4 แปลงย่อยเท่า ๆ กัน แปลงย่อยละ 5 ไร่ มีอัตราการปลูกหญ้าต่อถั่วเท่ากับ 50:50 และให้กระบือเลือกกินเอง รวมทั้งสร้างคอกพักสัตว์ไว้ในแต่ละแปลงย่อย ซึ่งในคอกมีน้ำและแร่ธาตุก้อนให้เลียกินตลอด ปล่อยกระบือลงแทะเล็มในแต่ละแปลงย่อยนาน 1 อาทิตย์และหมุนเวียนไปยังแปลงย่อยอื่นต่อไป ซึ่งจะใส่ปุ๋ยยูเรียในอัตรา 10 กิโลกรัม/ไร่ ในแต่ละแปลงย่อยทุกครั้งหลังจากย้ายกระบือไปยังแปลงย่อยอีกแปลงหนึ่งและมีการให้น้ำแบบสปริงเกอร์หลังจากการใส่ปุ๋ยในฤดูแล้ง สำหรับฤดูฝนและฤดูหนาวให้น้ำตามธรรมชาติ ซึ่งในช่วงฤดูแล้งตั้งแต่ เดือนกุมภาพันธ์-เมษายน พบว่าหญ้าและถั่วที่ใช้เลี้ยงกระบือมีปริมาณไม่เพียงพอ ซึ่งได้แก้ไขโดย ผลิตหญ้ากินนีสีม่วงแห้งไว้สำรองโดยให้กระบือกินวันละ 1 ครั้ง โดยต้อนกระบือให้มากินหญ้าแห้งในคอกซึ่งให้กินแบบเต็มที่ หลังจากนั้นปล่อยกระบือลงแทะเล็มในแปลงหญ้า และแปลงหญ้าร่วมกับถั่วตามปกติ องค์ประกอบทางเคมีของหญ้ากินนีสีม่วงและถั่วท่าพระสไตโลแสดงใน Table 3

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Table 3 Chemical composition of dried Purple guinea grass and Thapra stylo as harvested from the experimental sites (average of samples obtained at the start, the middle and the end of the rainy season)

Forage type	**Purple guinea grass**	**Thapra stylo**
Dry matter (% air dry basis)	92.69	92.86
Proximate Analysis (%DM)		
Organic matter	89.48	90.88
Ash	10.52	9.12
Crude Protein	8.30	17.90
Crude Fiber	34.91	30.07
Ether Extract	1.67	2.14
Nitrogen Free Extract	37.29	33.63
Detergent Analysis (%DM)		
Neutral detergent fiber (NDF)	63.44	56.10
Acid detergent fiber (ADF)	46.59	43.05
Acid detergent lignin (ADL)	4.20	6.41
Hemicellulose[a]	16.85	13.05
Cellulose[b]	42.39	36.64
Gross energy (MJ/kg)	17.23	19.42
Fatty acid, % of total fatty acids		
C12:0	1.04	1.26
C14:0	0.81	0.77
C15:0	0.66	0.60
C16:0	21.02	22.23
C16:1	1.15	1.21
C18:0	3.03	3.16
C18:1 n-9	3.84	3.97
C18:2 n-6	16.73	19.50
C18:3 n-3	48.94	44.68
C20:0	0.47	0.50
n-3	48.94	44.68
n-6	16.73	19.50
n-6:n-3	0.34	0.44
Total fatty acids, mg/100g DM	157.57	189.58

[a]NDF minus ADF.

[b]ADF minus ADL.

n-3 = omega-3 fatty acids and n-6 = omega-6 fatty acids.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีการทดลอง

1. การศึกษาคุณภาพซาก (carcass quality)

กระบือที่นำมาฆ่า มีการอดอาหารก่อนฆ่าประมาณ 24 ชั่วโมง ทำการชั่ง และบันทึกน้ำหนักมีชีวิต จากนั้นทำการฆ่ากระบือแบบสากล ตามวิธีของ สัญชัย (2550) ภายหลังฆ่าทำการชั่ง และบันทึกน้ำหนักซากอุ่น (hot carcass weight) อวัยวะภายนอก และอวัยวะภายใน จากนั้นนำซากไปแช่เย็นที่อุณหภูมิประมาณ 3±1 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการชั่งพร้อมทั้งบันทึกน้ำหนักซากเย็น (cold carcass weight) และวัดความยาวซาก (carcass length) โดยวัดจากตำแหน่งซี่โครงซี่แรกถึงหัวกระดูก lumbar โดยใช้สายวัด จากนั้นทำการตัดแต่งซากกระบือแบบไทย และสากล (ซีกซ้ายตัดแต่งแบบสากล สำหรับซีกขวาตัดแต่งแบบไทย) ตามวิธีของ สัญชัย (2550) เพื่อวัดพื้นที่หน้าตัดเนื้อสัน และวัดความหนาไขมันสันหลังที่ระหว่างกระดูกซี่โครงซี่ที่ 12-13 พร้อมทั้งชั่งและบันทึกน้ำหนักชิ้นส่วนที่ได้จากการตัดแต่งทั้งแบบไทย และสากล นำค่าที่บันทึกได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ซาก (dressing percentage) เปอร์เซ็นต์อวัยวะภายนอก เปอร์เซ็นต์อวัยวะภายใน และเปอร์เซ็นต์ชิ้นส่วนตัดแต่งต่าง ๆ

$$\text{เปอร์เซ็นต์ซาก} = \frac{\text{(น้ำหนักซากเย็น)} \times 100}{\text{น้ำหนักมีชีวิต}}$$

$$\text{เปอร์เซ็นต์อวัยวะภายนอก} = \frac{\text{(น้ำหนักอวัยวะภายนอก)} \times 100}{\text{น้ำหนักมีชีวิต}}$$

$$\text{เปอร์เซ็นต์อวัยวะภายใน} = \frac{\text{(น้ำหนักอวัยวะภายใน)} \times 100}{\text{น้ำหนักมีชีวิต}}$$

$$\text{เปอร์เซ็นต์ชิ้นส่วนตัดแต่ง} = \frac{\text{(น้ำหนักชิ้นส่วนตัดแต่ง)} \times 100}{\text{น้ำหนักมีชีวิต}}$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

หลังจากทำการตัดแต่งทำการเก็บกล้ามเนื้อสันนอก (*Longissimus dorsi*) กล้ามเนื้อไหล่ (*Infraspinatus*) และกล้ามเนื้อสะโพกได้แก่ กล้ามเนื้อลูกดิ่ง (*Semitendinosus*) และกล้ามเนื้อใบพาย (*Biceps femoris*) บรรจุในถุงพลาสติกผนึกแบบสุญญากาศ (vacuum package) จากนั้นเก็บไว้ที่ -20 °C เพื่อรอการวิเคราะห์คุณภาพเนื้อต่อไป

2. การศึกษาคุณภาพเนื้อ (meat quality)

2.1 ค่าความเป็นกรดด่างของกล้ามเนื้อ (muscle pH)

วัดค่า pH ของกล้ามเนื้อสันนอก (*Longissimus dorsi*) ที่บริเวณระหว่างกระดูกซี่โครงซี่ที่ 12 กับ 13 และกล้ามเนื้อสะโพก (*Semimembranosus*) บริเวณเหนือกระดูก lumbar 2 นิ้ว โดยแทงลึกประมาณ 3-5 เซนติเมตร จากซากโคหลังฆ่าที่เวลา 45 นาที และ 24 ชั่วโมง ด้วยเครื่อง pH – meter (Model 191, Knick, D-Berlin, Germany) พร้อมทั้งบันทึกค่าที่วัดได้

2.2 สีเนื้อ (meat color)

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

2.3 องค์ประกอบทางเคมี (chemical composition)

นำตัวอย่างกล้ามเนื้อสันนอก ไหล่ และสะโพก บดให้ละเอียดเพื่อนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี 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

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความชื้น

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

A = น้ำหนักถ้วย + น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ
B = น้ำหนักถ้วย + น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ
C = น้ำหนักตัวอย่าง

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 ไตรเตรทจนสีของสารละลายเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีม่วงอมเทา บันทึกปริมาตรของสารละลายมาตรฐาน
8. หลอด blank แต่ใส่เพียงกระดาษชั่งตัวอย่าง แล้วทำทุกขั้นตอนเช่นเดียวกัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์โปรตีน

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

A = จำนวนปริมาตรของสารละลายมาตรฐาน 0.1 *N* H_2SO_4 ที่ใช้ในการไตรเตรทกับตัวอย่าง (มล.)

B = จำนวนปริมาตรของสารละลายมาตรฐาน 0.1 *N* H2SO4 ที่ใช้ในการไตรเตรทกับ blank (มล.)

C = ความเข้มข้น (*N*) ของสารละลายมาตรฐาน H_2SO_4

D = น้ำหนักตัวอย่าง

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 จะถูกกลั่น และเก็บไว้ใน reclaming tube ส่วนของไขมันที่ได้จะอยู่ในขวดสกัดไขมัน
9. นำขวดสกัดไขมันที่มีไขมันที่สกัดได้ อบที่อุณหภูมิ 100 °C นาน 30 นาที ก่อนนำใส่ในโถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็น ทำการชั่งน้ำหนัก ซึ่งน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นภายหลังการสกัดคือน้ำหนักของไขมัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ไขมัน

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

A = น้ำหนักขวดสกัดไขมัน + น้ำหนักไขมันหลังอบแล้ว

B = น้ำหนักขวดสกัดไขมัน

C = น้ำหนักตัวอย่าง

2.4 ค่าความสามารถในการอุ้มน้ำของเนื้อ (water holding capacity)

ค่าความสามารถในการอุ้มน้ำ ประกอบด้วยการค่าการสูญเสียน้ำขณะเก็บ (drip loss) การสูญเสียน้ำจากการละลายน้ำแข็ง (thawing loss) และการสูญเสียน้ำจากการต้ม (boiling loss) ค่าการสูญเสียขณะย่าง (grilling loss) (Honickel, 1987; อ้างโดย สัญชัย, 2543)

ทำการชั่งน้ำหนักเริ่มต้น (Wd_1) ของกล้ามเนื้อสันนอก ไหล่ และสะโพก แล้วห่อชิ้นเนื้อด้วยผ้าก็อต เก็บในถุงพลาสติกชนิดเย็น โดยให้ปลายห่อผ้าก็อตห่างจากก้นถุงประมาณ 2 เซนติเมตร ผนึกปากถุงให้สนิท เก็บในตู้เย็นในลักษณะแขวน ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำชิ้นเนื้อออกจากถุง ชั่งน้ำหนัก (Wd_2) คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำขณะเก็บ (drip loss) จากสูตร

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

การสูญเสียน้ำจากการละลายน้ำแข็ง (thawing loss) และการสูญเสียน้ำจากการต้ม (boiling loss) โดยนำกล้ามเนื้อสันนอก ไหล่ 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 80 °C จนได้อุณหภูมิใจกลางเนื้อประมาณ 75 °C วัดด้วย Thermocouple (T851, Consort, Belgium) ใช้เวลาประมาณ 15-16 นาที ผึ่งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นำชิ้นเนื้อออกจากถุง ซับน้ำให้แห้ง ชั่งน้ำหนัก (Wt_3) คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำขณะทำละลาย (thawing loss) และเปอร์เซ็นต์การสูญเสียจากการต้ม (boiling loss) จากสูตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

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

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

ค่าการสูญเสียขณะย่าง (grilling loss) โดยนำกล้ามเนื้อสันนอก ไหล่ และสะโพก ทำการตัดแต่งเอาพังผืดออก 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

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

2.5 ค่าแรงตัดผ่านเนื้อ (shear force value)

นำเนื้อที่ต้มสุกจากการหาเปอร์เซ็นต์การสูญเสียจากการต้ม (boiling loss) เจาะตามแนวเส้นใยกล้ามเนื้อด้วยเหล็กกลวงชนิดกลม (core) ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1.27 เซนติเมตร วัดค่าแรงตัดผ่านด้วยเครื่อง Instron 5565 หัววัดกำลัง 5 kN (Warner Bratzler Shear) ด้วยความเร็ว 200 มิลลิเมตรต่อนาที โดยอ่านเป็นค่าแรงสูงสุด (maximum force, N) และค่าพลังงาน (energy force, J)

2.6 การประเมินด้านการตรวจชิม (sensory evaluation)

นำตัวอย่างกล้ามเนื้อสันนอก ไหล่ และสะโพก ที่ผ่านการอบสุกแล้ว 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, ชุ่มฉ่ำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

มากที่สุด และมีความชอบมากที่สุด) ผู้ทดสอบชิมจะได้รับน้ำ และขนมปังหลังจากทดสอบชิมเนื้อแต่ละชิ้น

2.7 ค่าการหืน (thiobarbituric acid reactive substance, TBARS)

เก็บตัวอย่างกล้ามเนื้อสันนอก ไหล่ และสะโพก แบ่งเป็น 3 ส่วนในแต่ละชิ้นของกล้ามเนื้อ แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 0, 3, 6 และ 9 วัน จากนั้นนำมาวิเคราะห์ค่า TBARS โดยวิธีของ Rossell (1994) ดังนี้

1. ชั่งตัวอย่างกล้ามเนื้อสันนอก ไหล่ และสะโพก ที่บดแล้ว 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 TBARS จากสูตร

TBARS (mg malondialdehyde/kg sample) = 7.8 x O.D.

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

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

1. นำไขมันที่สกัดจากกล้ามเนื้อสันนอก ไหล่ และสะโพก 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 ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น
4. เติม petroleum ether 5 มล. เขย่าให้เข้ากันด้วย vortex mixture
5. เติมน้ำกลั่น 5 มล. เขย่าให้เข้ากันด้วย vortex mixture ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

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

สูตรในการคำนวณหาปริมาณคอเลสเตอรอล

$$\text{Cholesterol (mg/100g)} = \frac{\text{2-propanol (ml) x O.D. sample x con. standard (mg/ml) x 100}}{\text{O.D. standard x sample weight (g)}}$$

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

2.9 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.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

9. ดูดสารละลายที่แยกชั้นส่วนบนในข้อ 7 มา 0.2 มล.ใส่ในหลอดข้อ 8 ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixture นำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 5 นาที นำออกมาเติม sodium periodate อีก 1 มล.
10. เติม acetyl acetone reagent 1 มล. ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixture นำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 20 นาที
11. ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 420 นาโนเมตร

สูตรในการคำนวณหาปริมาณไตรกลีเซอไรด์

$$\text{Triglyceride (g/100g)} = \frac{\text{2-propanol (ml) x O.D. sample x con. standard (mg/ml) x 100}}{\text{O.D. standard x sample weight (g)}}$$

2.10 องค์ประกอบกรดไขมัน (fatty acid profile)

ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ได้แก่ การสกัดไขมัน การเตรียม fatty acid methyl ester (FAME) และการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Gas chromatography (GC) โดยบดกล้ามเนื้อสันนอก ไหล่ และสะโพก ทำการสกัดไขมันจากกล้ามเนื้อตัวอย่าง (Folch *et al*., 1957) โดยมีวิธีการ ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 การสกัดไขมันจากตัวอย่าง (Folch *et al*., 1957)

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 แล้วนำไประเหยแห้งด้วย water bath ที่อุณหภูมิ 70 °C
7. ชั่งน้ำหนักไขมันใน flask ที่ระเหยแห้งแล้ว จากนั้นละลายไขมันด้วย chloroform ให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 30 มก./มล.

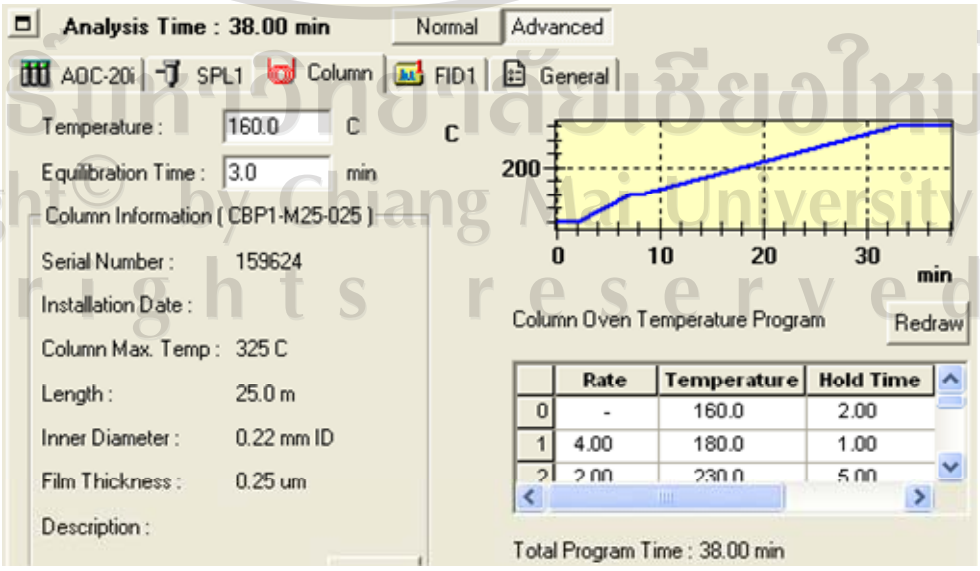
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ขั้นตอนที่ 2 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 ให้แยกชั้น
8. เก็บสารละลายชั้นบน 1 มล. ใส่ใน microcentrifuge tube ที่มี sodium sulfate anhydrous ปริมาณ 1 มิลลิกรัม ปิด microcentrifuge tube ให้สนิทเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นเพื่อรอการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Gas chromatography (GC)

ขั้นตอนที่ 3 การวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Gas chromatography (GC)

1. ดูดสารละลายที่ได้จากขั้นตอนที่ 2 ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ใส่ใน glass vial จากนั้นนำ glass vial ไปใส่ในช่องสำหรับฉีดที่อยู่ในเครื่อง Gas chromatography (GC-2010, Shimadzy, Japan) และเลือกคำสั่งให้เครื่อง GC ทำการวิเคราะห์หาองค์ประกอบของกรดไขมัน ซึ่งเครื่องจะทำการฉีดสารละลายโดยอัตโนมัติ โดยเครื่อง GC มี condition ดังนี้



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. คำนวณปริมาณกรดไขมันแต่ละตัวจากสมการ

Fatty acid (mg/100g of sample) = [(area of fatty acid in sample/area of fatty acid in standard) x concentration of fatty acid in standard (mg/ml) x Iso-octane (ml) x chloroform (ml) x 100]/sample weight (g)

2.11 การวิเคราะห์ปริมาณคอลลาเจน (collagen analysis) (Hill, 1966; AOAC, 1996)

วิธีการวิเคราะห์หาค่าคอลลาเจนที่ละลายได้ และละลายไม่ได้ (soluble and insoluble collagen analysis) มีดังนี้

ขั้นตอนการแยก (Hill, 1966)

1. ชั่งตัวอย่างกล้ามเนื้อสันนอก ไหล่ และสะโพกที่บดละเอียดแล้ว 4 กรัม ใส่ในหลอด homogenize ขนาด 30 มิลลิลิตร
2. ใส่ strength ringer solution 8 มิลลิลิตร
3. Homogenize ด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที
4. ต้มใน water bath อุณหภูมิ 77 °C นาน 70 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น 1 ชั่วโมง
5. ปั่นเหวี่ยงที่ 5,200 รอบต่อนาที นาน 26 นาที
6. แยกส่วน supernatant ใส่ Erlenmeyer flask ที่ 1 และส่วน residue ใส่ Erlenmeyer flask ที่ 2

ขั้นตอนการย่อย (AOAC, 1996)

1. เติมกรด sulfuric acid 7 *N* 30 มิลลิลิตร ลงใน Erlenmeyer flask ทั้ง 2 ที่เตรียมไว้ในข้อ 6 และปิดด้วยกระจกนาฬิกา
2. อบที่อุณหภูมิ 105±1 °C นาน 16 ชั่วโมง
3. นำตัวอย่างที่ได้จากการย่อยใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 500 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 500 มิลลิลิตร
4. กรองสารละลายผ่านกระดาษกรองลงใน Erlenmeyer flask
5. ปิเปตสารละลายจากข้อ 4 มาใส่ลงใน volume flask ขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ขั้นตอนการทำให้เกิดสี (AOAC, 1996)

1. ปิเปตสารละลายที่ได้ในขั้นตอนการย่อย 2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร ตัวอย่างละ 2 หลอด และทำ blank โดยการเติมน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง
2. เติม oxidant solution 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20±2 นาที
3. เติม color reagent หลอดละ 1 มิลลิลิตร เขย่าทันทีและปิดฝาหลอดให้สนิท
4. ต้มใน water bath อุณหภูมิ 60±0.5 °C นาน 15 นาที
5. ทำหลอดให้เย็นโดยการเปิดน้ำให้ไหลผ่าน 3 นาที
6. ทำหลอดให้แห้งโดยการเช็ดหรือตั้งทิ้งไว้
7. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 558 นาโนเมตร

สูตรในการคำนวณหาปริมาณคอลลาเจน

สมการ standard curve ดังนี้ h = (y+0.0719)/0.0457

$$H \text{ (กรัม/100 กรัม)} = (2.5 \times h)/mv$$

y = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

h = ความเข้มข้นของ hydroxyproline (ไมโครกรัม/2 มิลลิลิตร)

H = ปริมาณ hydroxyproline (กรัม/100 กรัม)

m = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

v = ปริมาตรสารละลายตัวอย่างที่ดูดมาทำละลาย (มิลลิลิตร)

ปริมาณคอลลาเจนที่ละลายได้ = H ของคอลลาเจนที่ละลายได้ x 7.52

ปริมาณคอลลาเจนที่ไม่ละลาย = H ของคอลลาเจนที่ไม่ละลาย x 7.25

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวนตามแผนการทดลองและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มด้วยวิธี Tukey's W-Procedure โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SAS for Windows version 6.12 (SAS, 1990)

4. สถานที่ทำการวิจัยและรวบรวมข้อมูล

1. สถานีพัฒนาอาหารสัตว์เลย อ. วังสะพุง จ. เลย
2. ศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์ตาก อ. เมือง จ. ตาก
3. ห้องปฏิบัติการภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
4. ห้องปฏิบัติการกลาง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
5. ห้องปฏิบัติการกลางคณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

5. ระยะเวลาในการทำวิจัย

ระยะเวลาประมาณ 18 เดือน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved