บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์การทดลอง

3.1.1 สารเคมี

ชื่อสารเคมี	เกรด	ยี่ห้อ
กรดซัลฟุริค (H_2SO_4)	Analytical reagent	BDH
คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4$)	Analytical reagent	Merck
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4)	Analytical reagent	Riedel. de Haen
ไตรบิวทิล ซิเตรท (Tributyl citrate)	Analytical reagent	Merck
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	Analytical reagent	Merck
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	Analytical reagent	Merck
เซรามิค ไฟเบอร์ (Ceramic fiber)	Analytical reagent	Merck
ทาชิโร อินดิเคเตอร์ (Thashiro indicator)	Analytical reagent	Riedel. de Haen
ทิทาเนียมอ็อกไซด์ (TiO_2)	Analytical reagent	Riedel. de Haen
น้ำกลั่น (Disstilled water)	Deionized water	-
โบรโมไธมอลบลู อินดิเคเตอร์	Analytical reagent	Merck
โปแตสเซียมคลอไรด์ (KCl)	Analytical reagent	Riedel. de Haen
โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	Analytical reagent	Merck
โปแตสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4)	Analytical reagent	Riedel. de Haen
โปแตสเซียมไฮดร็อกไซด์ (KOH)	Analytical reagent	Merck
พูมิค สโตน (Pumic stone)	Analytical reagent	BDH
สารต้านการเกิดฟอง (anti-foaming agent)	Analytical reagent	Fluka
แอลกอฮอล์ (Alcohol)	Analytical reagent	J. T. Baker
ไฮโดรคลอริก (HCl)	Analytical reagent	BDH

ชื่อสารเคมี	เกรด	ยี่ห้อ
Boiling stone (Alundum)	Analytical reagent	BDH
Bumping chips / granule	Analytical reagent	BDH
EDTA	Analytical reagent	Fluka
Kieselgur	Analytical reagent	Merck
Methyl red indicator	Analytical reagent	BDH
Anhydrous ether	Analytical reagent	LAB-SCAN

3.1.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

ชื่อเครื่องมือ	รุ่น/โมเดล	บริษัท	ประเทศที่ผลิต
กล้องจุลทรรศน์	CK2	Olympus	ญี่ปุ่น
กระดาษกรอง	No.41	Whatman®	อังกฤษ
กระดาษฟอยส์	DIAMOND®	RMC	อเมริกา
กระบอกตวง 100 ml (cylinder)	-	Witeg	เยอรมนี
ขวดก้นกลม (round bottom flask)	-	SCHOTT DURAN	เยอรมนี
ขวดชมพู่ (erlenmeyer flask) 250 ml.	No.26500	Kimax	อเมริกา
ขวดกรองรูปชมพู่ (suction flask) 1000 ml.	No. 27060	Kimax	อเมริกา
เข็ม ขนาด 1.5 นิ้ว เบอร์ 18	-	NIPRO®	ไทย
เครื่องกลั่นโปรตีน	315	Buchi	เยอรมนี
เครื่องดูดสูญญากาศ (Suction)	VDE0530	W.Krannich	เยอรมนี
เครื่องไทเทรต	NW 25 mm	BRAND	เยอรมนี
เครื่องชั่งไฟฟ้า (ทศนิยม 3 ตำแหน่ง)	P163	Mettler	สวิสเซอร์แลนด์
เครื่องบดตัวอย่างอาหาร	4	Thomass-willey	อเมริกา
เครื่องปั่นแยกแบบปรับอุณหภูมิ	Mistral 3000	MSE CO.	อังกฤษ
เครื่องย่อยโปรตีน	12	Buchi	เยอรมนี
เครื่องย่อยเยื่อใย	-	LAB CON CO®	เยอรมนี
เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง	678 EP/KF	Metrohm	สวิตเซอร์แลนด์
เครื่องวัดพื้นที่ (Planimeter)	Li-3100	Li-cor,inc.	อเมริกา

ชื่อเครื่องมือ	รุ่น/โมเดล	บริษัท	ประเทศที่ผลิต
เครื่องวัดสี	CR –300	Minolta	ญี่ปุ่น
เครื่องสกัดไขมัน	EV1	Gerhardt	เยอรมนี
ซอคเลท (Soxhlet)	Ex5/55	Quickfit	เยอรมนี
ไซริงค์ 10 cc.	-	NIPRO®	ไทย
ตู้อบ 100 ° C (Oven)	TV 30U	Memmert	เยอรมนี
เตาเผา 550 ° C (Muffle furnace)	Mr 260E	Heraeus Hanau	เยอรมนี
ถ้วยกระเบื้องเคลือบ	109	Haldenwanger	เยอรมนี
ถ้วยกระเบื้องเคลือบ (Porcelin crucible)	101-5	HCT	เยอรมนี
โถดูดความชื้น	GL32	Glasswerk Werthein	เยอรมนี
ทิมเบิล (Thimble)	No. 2800258	Whatman	อังกฤษ
บีกเกอร์ 600 ml	-	PYREX	อเมริกา
บุชเนอร์ฟันเนล (buchner funnel)	127-2a	Haldenwanger	เยอรมนี
พาราฟิน	Prafin "M"	American National Can™	อเมริกา
สำลี	HI-VAN	NTT Marketing	ไทย
หม้อปรับความดัน (Autoclave)	No.1925x	AllAMERICAN	อเมริกา
หลอดแก้ว 10 cc.	No.9820	Pyrex	อเมริกา
หลอดทดลอง 50 ml.	NUNC	Nalge Nunc Internation	เดนมาร์ค
หลอดย่อยโปรตีน (digestion tube)	-	Buchi	สวิสเซอร์แลนด์
Backfat probe	NASCO	FORT ATKINSO	อเมริกา
Disposable tips 200, 1000 µl	1051-0006	USA/Scientific™	อเมริกา
Micropipette 200, 1000 µl	pipetman	GILSON	ฝรั่งเศส
Microtitration U-bottomed plastic plates	Nunc-Immuno™ plate	Nalge Nunc International	เดนมาร์ค
Microtube 1.5 cc.	SP-T331-20n	Simport plastic	แคนาดา
Multichannel pipett	pipetman	GILSON	ฝรั่งเศส
Pasteur pipette	-	Pyrex	อเมริกา
Water bath	W600	Memmert	เยอรมนี
Weighing bottle	-	BRAND	เยอรมนี

3.2 วิธีการทดลอง

จากการศึกษาแบ่งการทดลองเป็น 3 งานทดลอง คือ

การทดลองที่ 1 ศึกษาผลของการเสริมไวตามินอีและซีระดับสูงในอาหารต่อภูมิคุ้มกันและสมรรถนะการผลิตในสุกรรุ่น-ขุน

การทดลองที่ 2 เป็นการศึกษาหาแนวทางในเบื้องต้นโดยศึกษาผลของการถอนไวตามินในอาหารต่อภูมิคุ้มกันในสุกรขุน

การทดลองที่ 3 ศึกษาผลของการถอนไวตามินและแร่ธาตุปลีกย่อยในอาหารต่อภูมิคุ้มกันและสมรรถนะการผลิตในสุกรขุน

3.2.1 การทดลองที่ 1

ก. สัตว์ทดลอง

ใช้สุกรพันธุ์ลูกผสมลาร์จไวท์ x แลนด์เรซ (Large White x Landrace) โดยใช้สุกรจำนวน 60 ตัว น้ำหนักเริ่มต้นเฉลี่ย 40 กิโลกรัมเลี้ยงเป็นระยะเวลาประมาณ 84 วัน แยกขังเดี่ยวทั้งหมดแบ่งเป็น 3 กลุ่มๆละ 20 ตัว มีเพศผู้และเพศเมียอย่างละ 10 ตัว

ข. ลักษณะคอกทดลอง

คอกทดลองเป็นซองขังเดี่ยวเรียงติดกันเป็นแถวยาว 20 ซอง มีทั้งหมด 3 แถว แต่ละแถวมีระยะห่าง 1.00 ม. ขนาดของซองแต่ละซอง กว้าง 0.50 ม. ยาว 1.20 ม. และสูง 0.90 ม. พื้นคอกเป็นพื้นสแล็ทคอนกรีต รางอาหารจะติดตั้งด้านหน้าวางบนพื้นคอกตามความยาวของคอก ทำจากท่อน้ำ PVC ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 12 นิ้ว ผ่าครึ่งเป็น 2 ซีก โดยมีช่องกั้นแต่ละซองเพื่อแยกอาหารในแต่ละซอง (figure 10)

ค. การวางแผนการทดลองและการจัดสัตว์เข้าทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (completely random design) สุกรเข้าซองในแต่ละแถวๆละ 20 ตัว รวมทั้งหมด 60 ตัว ในแต่ละแถวแบ่งเป็นสุกรเพศผู้และเพศเมียเพศละ 10 ตัว (figure 7) ต่อจากนั้นทำการสุ่มเพื่อกำหนดสูตรอาหารในแต่ละแถวโดยให้แต่ละแถวคือ 1 สูตรอาหารมีอาหารทดลองทั้งหมด 3 สูตรดังนี้ :

อาหารสูตรที่ 1 (T1) คือ อาหารสูตรปกติ (กลุ่มควบคุม)

อาหารสูตรที่ 2 (T2) คือ อาหารสูตรที่ 1+ ไวตามินอี (E_{50}) 200 มก./กก.

อาหารสูตรที่ 3 (T3) คือ อาหารสูตรที่ 1+ ไวตามินอี (E_{50}) 100 มก./กก. + ไวตามินซี 500 มก./กก.

ง. การจัดการด้านอาหาร

อาหารทดลองที่ใช้มีทั้งหมด 3 สูตร (Table 2, 3) ในแต่ละแถว สุกรจะได้รับอาหารตามสูตรเรียงตามลำดับตลอดระยะเวลาการทดลอง สุกรทุกตัวจะได้กินอาหารแบบไม่จำกัด (*ad libitum*) เฉลี่ยแบ่งให้ 5 ครั้งใน 1 วัน คือ 9.00 น., 11.00 น., 13.00 น., 15.00 น. และ 17.00 น. โดยชั่งอาหารบรรจุถุงๆละ 1 กก. แต่ละสูตรจะใช้ถุงที่มีสีต่างกัน คือ สีฟ้าสูตร 1 สีขาวสูตร 2 สีเขียวสูตร 3 และทำเครื่องหมายกำกับในแต่ละถุงไว้เพื่อบันทึกอาหารที่กินและที่เหลือ

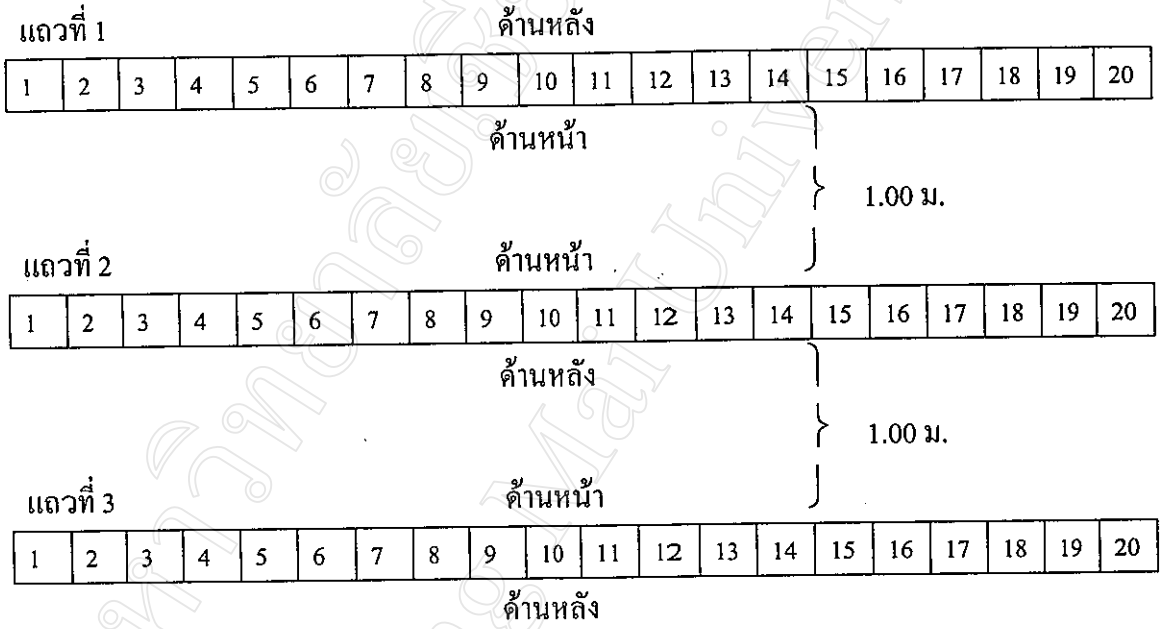

Figure 7 Model of individual cage for pigs in experiment 1

3.2.2 การทดลองที่ 2

ก. สัตว์ทดลอง

ใช้สุกรพันธุ์ลูกผสมลาร์จไวท์ x แลนด์เรซ จำนวน 160 ตัว เลี้ยงเป็นระยะเวลาประมาณ 59 วัน ที่น้ำหนักเริ่มต้นเฉลี่ย 60 กิโลกรัม ขังแยกเพศผู้และเพศเมียเพศละ 4 คอกๆละ 20 ตัว (รวมทั้งหมด 8 คอก)

ข. ลักษณะคอกทดลอง

เป็นคอกขังรวมก่อปูนซีเมนต์สูง ขนาดของคอก กว้าง 3.00 ม. ยาว 4.00 ม. สูง 0.75 ม. พื้นคอกลาดด้วยพื้นซีเมนต์ มีที่ให้น้ำอัตโนมัติแบบหัวจุ๊บ (nipple) 2 จุด ด้านหลังคอก

สูงจากพื้น 0.50 ม. มีที่ให้รางอาหารก่อซีเมนต์ด้านหน้าตามความยาวของคอก มีช่องกั้นเป็นช่องๆ ให้สุกรเข้ามากิน (figure 11)

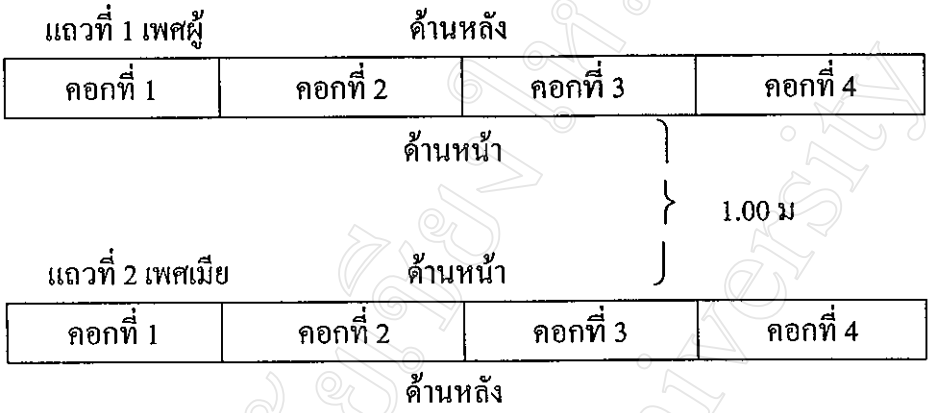

Figure 8 Model of pen for pigs in experiment 2

ค. การวางแผนการทดลองและการจัดสัตว์เข้าทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มภายในบล็อก (randomized complete block) สุ่มสุกรเข้าคอกๆละ 20 ตัว แยกเพศผู้และเพศเมียโดยให้แต่ละเพศอยู่ในโซนเดียวกันมีทั้งหมด 8 คอก รวม 160 ตัว (figure 8) จากนั้นทำการสุ่มเพื่อกำหนดสูตรอาหารโดยให้แต่ละคอกของทั้งเพศผู้และเพศเมียคือ 1 สูตรอาหารโดยมีสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงทั้งหมด 4 สูตรดังนี้ :

อาหารสูตรที่ 1 (T1) คือ อาหารสูตรปกติ (กลุ่มควบคุม)

อาหารสูตรที่ 2 (T2) คือ อาหารที่ถอนไวตามินพรีมิกซ์* ½ ของอาหารสูตรปกติในวันที่ 20 – 59 ของการทดลอง (ได้รับไวตามิน 50 % ของ T1 เป็นเวลา 40 วัน)

อาหารสูตรที่ 3 (T3) คือ อาหารที่ถอนไวตามินทั้งหมดจากอาหารสูตรปกติในวันที่ 33 - 59 ของการทดลอง (ได้รับอาหารที่ไม่เสริมไวตามินเป็นเวลา 27 วัน)

อาหารสูตรที่ 4 (T4) คือ อาหารที่ถอนไวตามินทั้งหมดจากอาหารสูตรปกติในวันที่ 27 - 59 ของการทดลอง (ได้รับอาหารที่ไม่เสริมไวตามินเป็นเวลา 33 วัน)

* ดูส่วนประกอบใน Table 4

ง. การจัดการด้านอาหาร

อาหารทดลองที่ใช้มีทั้งหมด 4 สูตร (Table 4, 5) โดยให้อาหารแต่ละสูตรตามคอกทั้งเพศผู้และเพศเมียเรียงตามลำดับ การให้อาหารในแต่ละวันจะให้ไม่เกิน 1 ถุงต่อ 1 คอก

โดย 1 ถุงมีน้ำหนัก 45 กก. เฉลี่ยแบ่งให้ 3 ครั้งใน 1 วัน คือ เวลา 9.00 น., 12.00 น. และ 15.00 น. ในแต่ละถุงจะทำเครื่องหมายแต่ละคอกไว้เพื่อบันทึกการให้อาหารและอาหารที่เหลือในแต่ละวัน

3.2.3 การทดลองที่ 3

ก. สัตว์ทดลอง

ใช้สุกรพันธุ์ลูกผสมลาร์จไวท์ x แลนด์เรซ จำนวน 30 ตัว น้ำหนักเริ่มต้นเฉลี่ย 75 กิโลกรัมเลี้ยงเป็นระยะเวลาประมาณ 27 วัน โดยแยกขังเดี่ยวทั้งหมดแบ่งเป็น 3 กลุ่มๆละ 10 ตัว มีเพศผู้และเพศเมียกลุ่มละ 5 ตัวเท่าๆกัน

ข. ลักษณะคอกทดลอง

คอกทดลองเป็นซองขังเดี่ยวเรียงติดกันเป็นแถวยาว 20 ซอง มีทั้งหมด 4 แถว แต่ละแถวมีระยะห่าง 1.00 ม. ขนาดของซองแต่ละซอง กว้าง 0.50 ม. ยาว 1.20 ม. และสูง 0.90 ม. พื้นคอกเป็นพื้นสแลทคอนกรีต รางอาหารจะติดตั้งด้านหน้าวางบนพื้นคอกตามความยาวของคอก ทำจากท่อน้ำ PVC ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 12 นิ้ว ผ่าครึ่งเป็น 2 ซีก โดยมีช่องกั้นแต่ละซองเพื่อแยกอาหารในแต่ละซอง (figure 11)

ค. การวางแผนการทดลองและการจัดสัตว์เข้าทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (completely random design) สุ่มสุกรเข้าซองในแต่ละแถวๆละ 10 ตัว รวมทั้งหมด 40 ตัว ในแต่ละแถวแบ่งเป็นสุกรเพศผู้และเพศเมียเพศละ 5 ตัว (figure 9) หลังจากนั้นทำการสุ่มเพื่อกำหนดสูตรอาหารในแต่ละแถวโดยให้แต่ละแถวคือ 1 สูตรอาหารโดยใช้สูตรอาหารทั้งหมด 4 สูตรดังนี้ :

อาหารสูตรที่ 1 (T1) คือ อาหารสูตรปกติ (กลุ่มควบคุม)

อาหารสูตรที่ 2 (T2) คือ อาหารที่ถอนไวตามินและแร่ธาตุปลีกย่อย * ออกทั้งหมดตั้งแต่เริ่มเลี้ยงจนสิ้นสุดของการทดลองเป็นระยะเวลา 30 วัน

อาหารสูตรที่ 3 (T3) คือ อาหารที่ถอนไวตามินและแร่ธาตุปลีกย่อยออกทั้งหมดตั้งแต่วันที่ 16-30 ของการทดลอง

อาหารสูตรที่ 4 (T4) คือ อาหารที่ถอนไวตามินและแร่ธาตุปลีกย่อยออกทั้งหมดตั้งแต่วันที่ 16-30 ของการทดลองและเสริมเอนไซม์ไฟเตสร่วมด้วย

* ดูส่วนประกอบใน Table 6

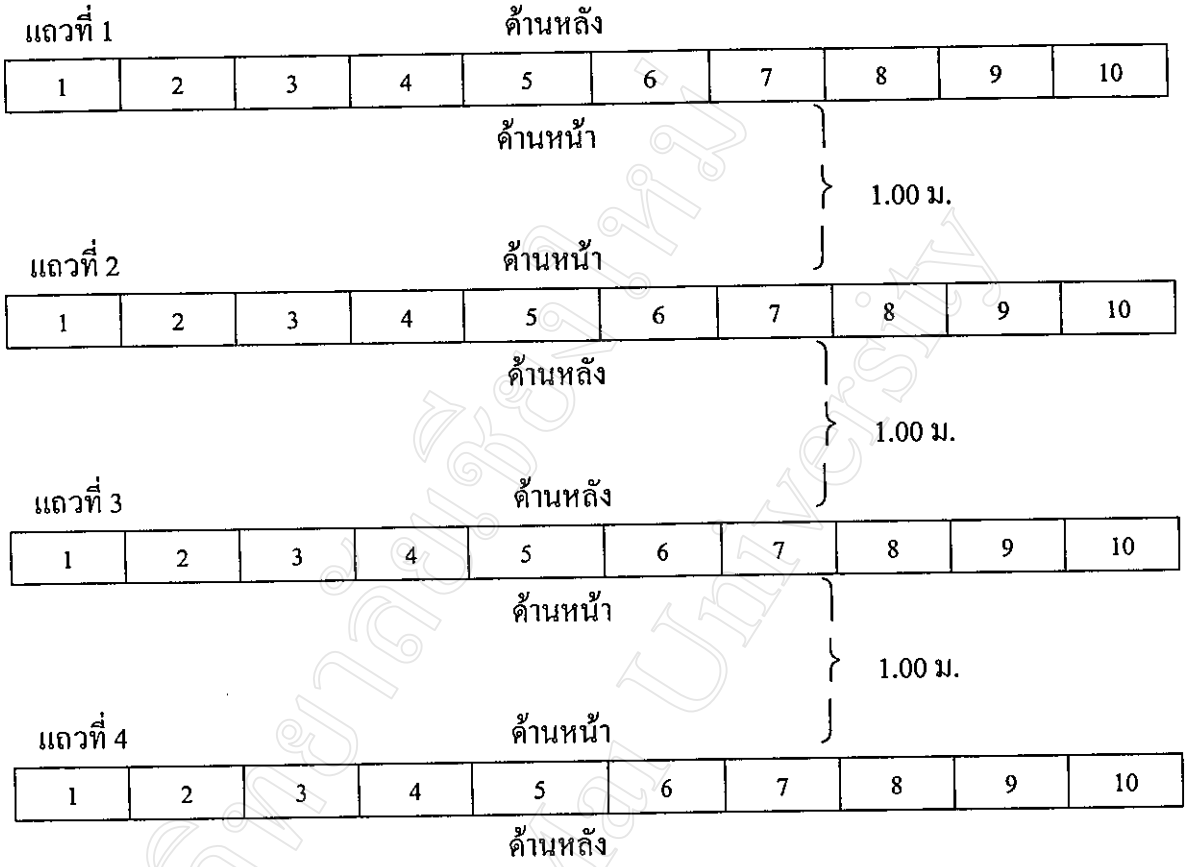

Figure 9 Model of individual cage for pigs in experiment 3

ง. การจัดการด้านอาหาร

อาหารทดลองที่ใช้มีทั้งหมด 4 สูตร (Table 6, 7) ในแต่ละแถว สุกรจะได้รับอาหารตามสูตรเรียงตามลำดับตลอดระยะเวลาการทดลอง สุกรทุกตัวจะได้กินอาหารไม่เกินวันละ 2.5 กก. เฉลี่ยแบ่งให้ 5 ครั้งใน 1 วัน คือ 8.00 น., 10.00 น., 12.00 น., 14.00 น. และ 16.00 น. โดยชั่งอาหารบรรจุถุงๆละ 1 กก. แต่ละสูตรจะใช้ถุงที่มีสีต่างกัน คือ สีเขียวสูตร 1 สีฟ้าสูตร 2 สีเหลืองสูตร 3 สีชมพูสูตร 4 และทำเครื่องหมายกำกับในแต่ละถุงไว้เพื่อบันทึกอาหารที่กินและที่เหลือ

Figure 10 Individual cages of pigs in experiment 1 and 3

Figure 11 Cages of pigs in experiment 2

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

Table 2 Composition of experimental diets in experiment 1 (as-fed basis)

Ingredients (%)	**T1**	**T2**	**T3**
Rice polish	20.30	20.30	20.30
Fish meal	4.00	4.00	4.00
Broken rice	7.85	7.80	7.75
Tallow	0.50	0.50	0.50
Limestone	0.40	0.40	0.40
Salt	0.40	0.40	0.40
D.C.O,P 18	1.50	1.50	1.50
Ethoxyquin	0.01	0.01	0.01
Microfix-plus	0.10	0.10	0.10
Drymold	0.05	0.05	0.05
Choline chloride	0.03	0.03	0.03
Lysine	0.27	0.27	0.27
Methionine	0.05	0.05	0.05
Threonine	0.01	0.01	0.01
Premix[a]	0.30	0.30	0.30
Add vitamin E[b]	0	0.04	0.02
Add vitamin C[b]	0	0	0.05

[a]Premix contained vitamins and mineral; vitamin E 33 mg.

[b]Form of vitamin E is tocophyrel acetate and vitamin C is adsorbyl phosphate which were obtained from Rovithai Ltd.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

Table 3 Chemical composition of experimental diets from calculation in experiment 1

Calculated composition (%)	T1	T2	T3
Crude protein	16.00	16.00	16.00
ME, kcal/kg	3063.18	3063.18	3063.18
Crude fat	5.86	5.86	5.86
Crude fiber	4.73	4.73	4.73
Calcium	0.97	0.97	0.97
Phosphorus	0.52	0.52	0.52
Lysine	1.03	1.03	1.03
Methionine + Cystine	0.66	0.66	0.66
Tryptophan	0.19	0.19	0.19
Threonine	0.64	0.64	0.64

Table 4 Composition of experimental diets in experiment 2 (as-fed basis)

Ingredients (%)	T1	T2	T3	T4
Corn meal	30.39	30.39	30.39	30.39
Cassava meal	25.0	25.0	25.0	25.0
Rice polish	9.33	9.33	9.33	9.33
Soy bean meal	28.52	28.52	28.52	28.52
L-Lysine	0.11	0.11	0.11	0.11
DL-Methionine	0.16	0.16	0.16	0.16
L-Threonine	0.03	0.03	0.03	0.03
Molasses	1.87	1.87	1.87	1.87
Bone meal (8%P)	3.99	3.99	3.99	3.99
Trace mineral premix	0.34	0.34	0.34	0.34
Vitamin premix[a]	0.25	0.125	0	0

[a] Vitamin AD_3 4 kg., B_1 0.15 kg., B_2 0.82 kg., B_6 0.3 kg., B_{12} (0.1 %) 3 kg., E_{50} 8 kg., K_3 0.406 kg., Nicotinamide 2.52 kg., Biotin (2 %) 0.4 kg., D-calcium - pantothinate 1.53 kg., Folic acid 0.1 kg., Pharoxide 0.02 kg., Choline ChIoride (60 %) 35 kg.

Table 5 Chemical composition of experimental diets from calculation in experiment 2

Calculated composition (%)	T1	T2	T3	T4
Crude protein	17.00	17.00	17.00	17.00
ME, kcal/kg	2950.00	2950.00	2950.00	2950.00
Crude fat	3.00	3.00	3.00	3.00
Crude fiber	4.56	4.56	4.56	4.56
Calcium	1.18	1.18	1.18	1.18
Total-phos	0.72	0.72	0.72	0.72
Av.phos	0.40	0.40	0.40	0.40
Salt	0.40	0.40	0.40	0.40
Lysine	1.00	1.00	1.00	1.00
Methionine + Cystine	0.66	0.66	0.66	0.66
Methionine	0.41	0.41	0.41	0.41
Threonine	0.66	0.66	0.66	0.66
Tryptophan	0.21	0.21	0.21	0.21

Table 6 Composition of experimental diets in experiment 3 (as-fed basis)

Ingredients (%)	T1	T2	T3	T4
Cassava chips	29.819	29.819	29.819	29.819
Broken rice	22.242	22.242	22.242	22.242
Rice polish	15.531	15.531	15.531	15.531
Soy bean meal	13.974	13.974	13.974	13.974
Full fat soy bean	9.058	9.058	9.058	9.058
Fish meal	3.976	3.976	3.976	3.976
Tallow	1.581	1.581	1.581	1.581
D.C.P., P21	1.006	1.006	1.006	1.006
B.H.T	0.0125	0.0125	0.0125	0.0125
Molasses	0.942	0.942	0.942	0.942
Limestone	0.807	0.807	0.807	0.807

Table 6 (continue)

Ingredients (%)	T1	T2	T3	T4
Mycosop	0.05	0.05	0.05	0.05
Feed curve	0.05	0.05	0.05	0.05
Lysine	0.136	0.136	0.136	0.136
Methionine	0.123	0.123	0.123	0.123
Threonine	0.04	0.04	0.04	0.04
Trace mineral premix[a]	0.377	0.377	0.377	0.377
Vitamin premix[b]	0.128	0	0.064	0.064
Phytase	0	0	0	0.1

[a] Zinc oxide (71 %) 0.125 kg., Ferrous Sulfate (20 %) 0.5 kg., Copper sulfate (25 %) 0.1 kg., Potassium Iodide (98 %) 0.0005 kg., Cobalt Sulfate (33 %) 0.0025 kg., Se (2 %) 0.0075 kg., Manganese Oxide (72 %) 0.015 kg.

[b] Vitamin (VM202BASF) 0.12 kg., AD_3 0.006 kg., E_{50} 0.0375 kg., B_{12}(1 %) 0.0005 kg., Biotin (2 %) 0.004 kg., Folic acid (98 %) 0.005 kg., Niacin (98 %) 0.01 kg., D-calcium – pantothinate (99 %) 0.01 kg., Choline Chloride 0.3 kg.

Table 7 Chemical composition of experimental diets from calculation in experiment 3

Calculated composition (%)	T1	T2	T3	T4
Crude protein	16.66	16.66	16.66	16.66
ME.,kcal/kg	3248.125	3248.125	3248.125	3248.125
Crude fat	6.00	6.00	6.00	6.00
Crude fiber	4.80	4.80	4.80	4.80
Calcium	1.00	1.00	1.00	1.00
Av.phos	0.50	0.50	0.50	0.50
Lysine	1.05	1.05	1.05	1.05
Methionine+Cystine	0.67	0.67	0.67	0.67
Tryptophan	0.20	0.20	0.20	0.20
Thronine	0.695	0.695	0.695	0.695

Table 7 (continue)

Calculated composition (%)	T1	T2	T3	T4
Corn meal	48.95	48.95	48.95	48.95
Soy bean meal	12.80	12.80	12.80	12.80
Full fat soy bean	2.50	2.50	2.50	2.50

3.3 การเก็บตัวอย่างและบันทึกข้อมูล

3.3.1 การเก็บตัวอย่างเลือดและชั่งน้ำหนักสุกร

<u>การทดลองที่ 1</u> : สุกรถูกเจาะเลือดที่เส้นเลือดดำใหญ่บริเวณลำคอ (jugular vein) โดยทำการสุ่มแถวละ 10 ตัวตัวละ 10 ซีซี และเจาะตัวเดิมทุกๆ 14 วัน (Figure 15) โดยใส่ EDTA ที่เตรียมไว้ในหลอดประมาณ 1 ซีซี ซึ่งเป็นสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด จากนั้นนำเลือดมาปั่นแยกเพื่อเก็บซีรั่มใส่ในหลอดบรรจุและนำเข้าตู้แช่แข็งที่ –20 °C เพื่อรอวิเคราะห์ต่อไป พร้อมกับชั่งน้ำหนักสุกรก่อนให้อาหาร เริ่มชั่งตั้งแต่เวลา 9.00 น. ใช้กรงและเครื่องชั่งแบบคาน ขนาด 200 กก. ทศนิยม 1 ตำแหน่ง ทำการชั่งตั้งแต่เริ่มต้นการทดลองจนสิ้นสุดการทดลอง (Figure 12)

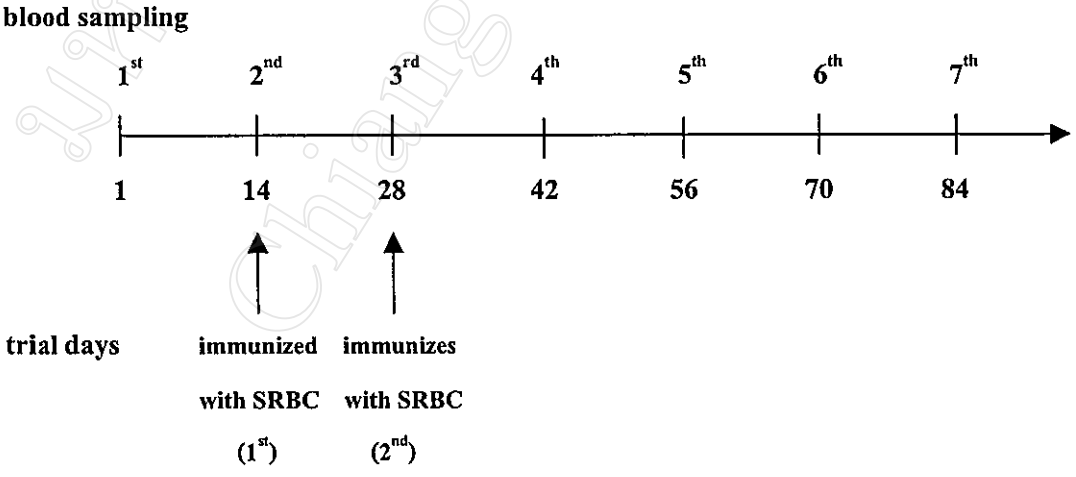

Figure 12 Time schedule of blood sampling and immunization in pigs with sheep red blood cell (SRBC) (Exp 1)

<u>การทดลองที่ 2</u> : สุกรถูกเจาะเลือดที่เส้นเลือดดำใหญ่บริเวณลำคอ (jugular vein) โดยทำการสุ่มคอกละ 4 ตัวๆละ 10 ซีซี และเจาะตัวเดิมทุกๆ 10 วัน (Figure 15) โดยใส่ EDTA

เตรียมไว้ในหลอดประมาณ 1 ซีซี ซึ่งเป็นสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด จากนั้นนำเลือดมาปั่นแยกเพื่อเก็บซีรั่มใส่ในหลอดบรรจุและนำเข้าตู้แช่แข็งที่ –20 °C เพื่อรอวิเคราะห์ต่อไป พร้อมกับชั่งน้ำหนักสุกรก่อนให้อาหาร เริ่มชั่งตั้งแต่เวลา 9.00 น. ใช้กรงและเครื่องชั่งแบบคาน ขนาด 200 กก. ทศนิยม 1 ตำแหน่ง ทำการชั่งตั้งแต่เริ่มต้นการทดลองจนสิ้นสุดการทดลอง (Figure 13)

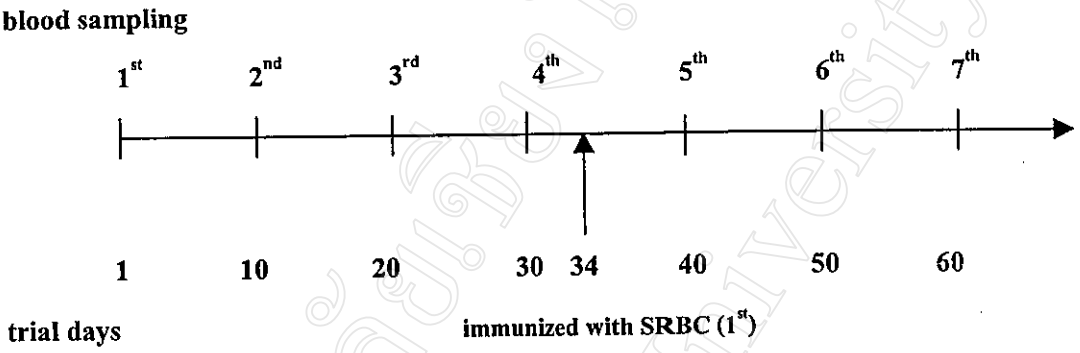

Figure 13 Time schedule of blood sampling and immunization in pigs with sheep red blood cell (SRBC) (Exp 2)

<u>การทดลองที่ 3</u> : สุกรถูกเจาะเลือดที่เส้นเลือดดำใหญ่บริเวณลำคอ (jugular vein) ทุกตัวๆละ 10 ซีซี และเจาะตัวเดิมทุกๆ 7 วัน (Figure 15) โดยใส่ EDTA เตรียมไว้ในหลอดประมาณ 1 ซีซี ซึ่งเป็นสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด จากนั้นนำเลือดมาปั่นแยกเพื่อเก็บซีรั่มใส่ในหลอดบรรจุและนำเข้าตู้แช่แข็งที่ –20 °C เพื่อรอวิเคราะห์ต่อไป พร้อมกับชั่งน้ำหนักสุกรก่อนให้อาหาร เริ่มชั่งตั้งแต่เวลา 9.00 น. ใช้กรงและเครื่องชั่งแบบคาน ขนาด 200 กก. ทศนิยม 1 ตำแหน่ง ทำการชั่งตั้งแต่เริ่มต้นการทดลองจนสิ้นสุดการทดลอง (Figure 14)

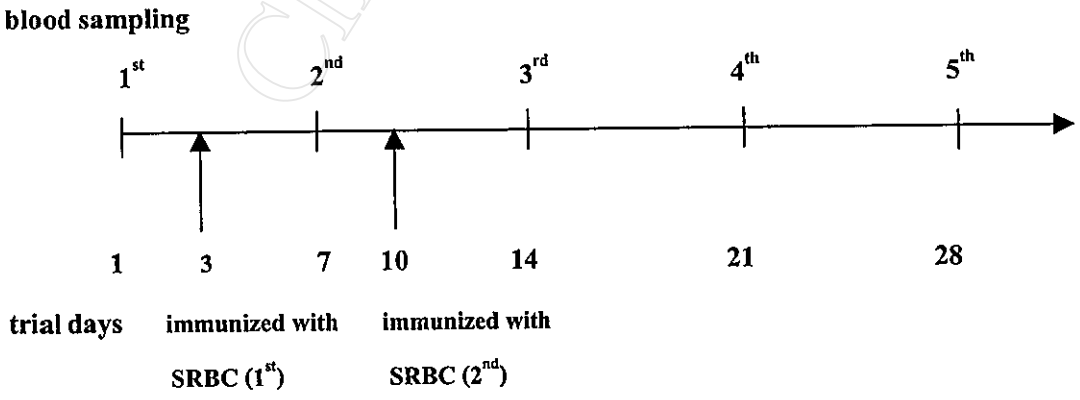

Figure 14 Time schedule of blood sampling times and immunization in pigs with sheep red blood cell (SRBC) (Exp 3)

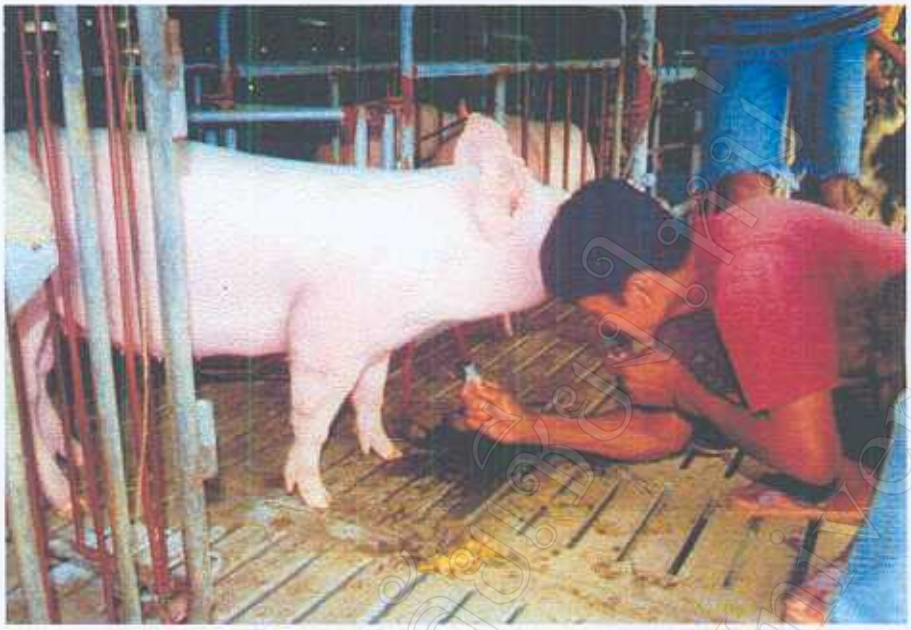

Figure 15 Blood sampling of pigs

3.3.2 การบันทึกอาหารที่กิน

ทำการบันทึกปริมาณอาหารที่สุกรทุกตัวกินในแต่ละวัน โดยชั่งอาหารที่เหลือจากรางอาหารและจากในถุง โดยใช้เครื่องชั่งแบบสปริง ขนาด 3 กก. ทศนิยม 1 ตำแหน่ง สำหรับการคำนวณปริมาณอาหารที่กินในแต่ละวัน แสดงดังสูตรต่อไปนี้

กก. อาหารที่สุกรกิน/วัน = กก. อาหารที่ให้ต่อวัน – กก. อาหารที่เหลือต่อวัน

3.3.3 การเก็บตัวอย่างอาหารเพื่อการวิเคราะห์

สุ่มเก็บตัวอย่างอาหารทุกครั้งที่มีการผสมอาหารใหม่โดยสุ่มจากถุงอาหารแต่ละสูตร นำอาหารที่เก็บได้แต่ละครั้งมาผสมรวมกันแล้วนำไปบดด้วยเครื่องบดอาหารผ่านตะแกรงขนาด 1 มม. จากนั้นนำตัวอย่างอาหารที่บดผ่านตะแกรงและไม่ผ่านตะแกรงมาผสมรวมกันเพื่อนำไปวิเคราะห์ทางเคมีต่อไป (AOAC, 1990)

3.3.3.1 การวิเคราะห์หาปริมาณวัตถุแห้ง (Dry matter) (A.O.A.C., 1990)

หลักการ :

นำตัวอย่างอาหารมาอบที่อุณหภูมิ $132 \pm 2\ ^{\circ}C$ น้ำหนักที่หาย คือ ความชื้น

วิธีการ :

1. นำถ้วยชั่งน้ำหนัก (Covered Al dish) มาอบแห้งที่อุณหภูมิ 132 $\pm$ 2 $^{\circ}$C ประมาณ 2 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น (Desiccator) แล้วนำมาชั่งน้ำหนักถ้วยเปล่า (W1)

2. ใส่ตัวอย่างอาหาร 2 กรัม ในถ้วยชั่งน้ำหนักปิดฝา เขย่าให้อาหารกระจายตัวสม่ำเสมอในถ้วยชั่ง เปิดฝาออก แล้วนำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 132 $\pm$ 2 $^{\circ}$C นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นปิดฝาให้เรียบร้อย

3. ทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนักอีกครั้ง (W2)

การคำนวณ :

$$\% \text{ วัตถุแห้ง} = \frac{\text{น้ำหนักตัวอย่างอาหารหลังอบ (W1)}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างอาหารก่อนอบ (W2)}} \times 100$$

3.3.3.2 การวิเคราะห์หาปริมาณเถ้า (Ash) (A.O.A.C., 1990)

หลักการ :

วัตถุแห้งที่มีอยู่ในอาหารสัตว์ประกอบด้วย 2 ส่วน คือ อินทรีย์วัตถุและอนินทรีย์วัตถุ เราสามารถหาอนินทรีย์วัตถุได้โดยการนำตัวอย่างไปเผาที่อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส สิ่งที่เหลือคือ อนินทรีย์วัตถุ

วิธีการ :

1. นำถ้วยกระเบื้องเคลือบ (porcelain crucible) อบที่อุณหภูมิ 100°C หรือเผาที่อุณหภูมิ 600°C นาน 2 ชั่วโมง ทำให้เย็นในโถดูดความชื้นชั่งน้ำหนักถ้วยเปล่า (W1)

2. ชั่งตัวอย่างอาหาร 2 กรัม (Ws) ใส่ในถ้วยกระเบื้อง จากนั้นนำมาตั้งเผาไฟบนแผ่นให้ความร้อน (hot plate) จนกระทั่งหมดควันภายในตู้ดูดควัน

3. นำไปเผาต่อในเตาเผาที่อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้นแล้วชั่งน้ำหนักอีกครั้ง (W2)

การคำนวณ :

$$\text{น้ำหนักเถ้าเมื่อคิดเป็น \% วัตถุแห้ง} = \frac{\text{น้ำหนักเถ้า (W2-W1)}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเมื่อคิดเป็นวัตถุแห้ง (Ws)}} \times 100$$

3.3.3.3 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนรวม (Crude protein) (A.O.A.C., 1990)

หลักการ :

ปริมาณโปรตีนรวม (Crude protein) ในอาหารคำนวณได้จากปริมาณโปรตีนรวม

(Crude protein) ในอาหารคำนวณได้จากปริมาณไนโตรเจน โดยวิเคราะห์แบบ Kjeldahl ตัวอย่างอาหารถูกย่อยด้วยกรดซัลฟุริคเข้มข้น จากนั้นกลั่นด้วยโซ เดียมไฮดรอกไซด์ โดยแอมโมเนียจะถูกปลดปล่อยออกมาและถูกจับด้วยกรดมาตรฐาน แล้วนำไปไตเตรทด้วยด่างมาตรฐานทำให้ทราบจำนวนกรดและด่างที่ทำปฏิกริยา ต่อจากนั้นคำนวณหาปริมาณไนโตรเจนโดยคูณด้วย 6.25 ก็จะได้ค่าโปรตีนรวม

สารเคมี :

1. กรดซัลฟุริคเข้มข้น (97-98% conc. H_2SO_4)
2. โซเดียมไฮดรอกไซด์ 45 % (NaOH)
3. ทิทาเนียมอ็อกไซด์ (TiO_2)
4. โปแตสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4)
5. คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4$)
6. Alundum granules (Boiling stones)
7. เมทิลเรด อินดิเคเตอร์ (Methyl red indicator)
8. ไฮโดรคลอริก (HCl 0.1 N)
9. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH 0.1 N)
10. พูมิซ สโตน (Pumice stones)
11. ไตรบิวทิลซิเตรท (Tributyl citrates)

วิธีการ :

1. ชั่งตัวอย่างอาหาร 0.25-1.0 กรัม ใส่ลงในหลอดย่อย (Kjeldahl flask) แล้วใส่โปแตสเซียมซัลเฟส (K_2SO_4) 16.7 กรัม คอปเปอร์ซัลเฟส ($CuSO_4$) 0.01 กรัม ไทโออ็อกไซด์ (TiO_2) 0.6 กรัม พูมิค สโตน 0.3 กรัม Alundum granules 0.5-1.0 กรัม และ H_2SO_4 20 มล. จากนั้นเขย่าหรือหมุนหลอดให้ H_2SO_4 ทำปฏิกิริยากับตัวอย่าง

2. นำหลอดไปตั้งบนเครื่องย่อย โดยใช้อุณหภูมิต่ำที่ 25 $^{\circ}C$ นาน 5 นาที แล้วจึงเร่งไฟให้มีความร้อนสูงขึ้น ต้มจนสารละลายใสไม่มีควัน (ประมาณ 10 นาที) จากนั้นต้มต่ออีก 40 นาที หลังจากนั้นปิดเครื่องตั้งทิ้งไว้ให้เย็น

3. เติมน้ำเย็น 250 มล. และทำให้เย็น (ถ้าเกิดฟองมากหรือเดือดรุนแรง อาจเติมน้ำเพิ่มเป็น 300 มล.) หยดอินดิเคเตอร์ 3-4 หยด ใส่ Alundum granules 0.5-1.0 กรัม เพื่อให้หลอดย่อยเย็น และหยด Tributyl citrates 2-3 หยด ช่วยลดการเกิดฟอง

4. เอียงหลอดย่อยช้าๆ แล้วเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ จากนั้นต่อเข้ากับเครื่องกลั่นและเกิดการผสมกันอย่างสมบูรณ์ จากนั้นกลั่นต่ออีก 7.5 นาที จนกระทั่งได้สารละ

ลายมากกว่าหรือเท่ากับ 150 มล.

5. นำสารละลายที่ได้ไปไตเตรทด้วย NaOH 0.1 N จนเป็นกลาง

การคำนวณ :

%ไนโตรเจน = [(มล. กรด HCl มาตรฐาน x ความเข้มข้นของ HCl) - (มล. ด่าง NaOH มาตรฐาน x ความเข้มข้นของ NaOH)] x 1.4007/ จำนวนกรัมของตัวอย่าง

% โปรตีนรวม (CP) = % ไนโตรเจน x 6.25

3.3.3.4 การวิเคราะห์หาปริมาณไขมัน (Ether extract) (A.O.A.C., 1990)

หลักการ :

วิเคราะห์หาปริมาณไขมันโดยการสกัดด้วยอีเธอร์

สารเคมี :

1. แอนไฮดรัส อีเธอร์ (Anhydrous ether)
2. พูมิค สโตน (Pumice stones)

วิธีการ :

1. นำขวดก้นแบนใส่ pumice stones 3-5 เม็ด เข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง นำมาทิ้งให้เย็นให้เย็นในโถดูดความชื้นแล้วชั่งน้ำหนัก

2. ชั่งตัวอย่างอาหาร 2 กรัม ห่อด้วยกระดาษกรอง ม้วนใส่ใน thimble จากนั้นนำ thimble ใส่ใน soxhlet เติมแอนไฮดรัส อีเธอร์ในขวดก้นแบนประมาณ 2/3 ของขวดก้นแบน

6. นำขวดก้นแบนมาตั้งบนเตาให้ความร้อน ต่อปลาย soxhlet เข้ากับขวดก้นแบนและต่อทั้งหมดเข้ากับเครื่องควบแน่นและเติมแอนไฮดรัส อีเธอร์ผ่านทางกรวยบนเครื่องควบแน่นประมาณ 1-2 syphon หรือ ประมาณเกินครึ่งของขวดก้นแบน

7. จากนั้นทำให้แห้ง โดยนำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้นแล้วนำมาชั่งน้ำหนัก น้ำหนักที่ชั่งได้ คือ น้ำหนักไขมันรวม

การคำนวณ :

$$\% \text{ ไขมัน} = \frac{\text{น้ำหนักไขมันรวม}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}} \times 100$$

3.3.3.5 การวิเคราะห์หาปริมาณเยื่อใย (Crude fiber) (A.O.A.C., 1990)

หลักการ :

ปริมาณเยื่อใย คือ ส่วนที่เหลือจากการย่อยตัวอย่างด้วยสารละลายกรดซัลฟุริค

(H_2SO_4) และด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

สารเคมี :

1. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 1.25 %
2. กรดซัลฟูริค (H_2SO_4) 1.25 %
3. Ceramic fiber
4. แอลกอฮอล์ 95 %
5. Antifoam
6. Pumice stones

วิธีการ :

1. ชั่งตัวอย่างอาหาร 2 กรัม (Ws) ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 600 มล. เติมสารละลายกรด H_2SO_4 200 มล. Ceramic fiber 1.5-2.0 กรัม หยด antifoam 1 หยด และใส่ Pumice stones 0.25-0.5 กรัม

2. นำบีกเกอร์ไปต่อเข้ากับเครื่องย่อยพร้อมกับต้ม (Reflux) บน hot plate นาน 30 นาที

3. นำตัวอย่างมากรองผ่านกระดาษกรอง (ต้องเคลือบด้วย ceramic fiber) ล้างตะกอนในบีกเกอร์ด้วยน้ำร้อน 50-70 มล. และล้าง buchner ด้วยน้ำ 50 มล. ซ้ำกัน 3 ครั้ง โดยระหว่างการกรองเปิดเครื่องดูดสูญญากาศตลอดเวลาและกรองจนแห้ง

4. จากนั้นถ่ายตะกอนลงในบีกเกอร์ เติมสารละลาย NaOH ที่เดือด 200 มล. แล้วนำไปต้มต่อบนเครื่องย่อยนาน 30 นาที แล้วนำมากรองดังวิธีข้างบน

5. จากนั้นล้างด้วยสารละลายด่าง NaOH ที่เดือด 25 มล. ตามด้วยน้ำ 50 มล. 3 ครั้ง และแอลกอฮอล์ 25 มล.

6. ถ่ายตะกอนลงในถ้วยกระเบื้องเคลือบ (Ashing dish) แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ $130 \pm 2\ ^{\circ}C$ นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้นแล้วนำไปชั่งน้ำหนัก (W1)

7. จากนั้นนำไปเข้าเตาเผาที่อุณหภูมิ $600 \pm 15^{\circ}C$ นาน 30 นาที แล้วทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้นและชั่งน้ำหนักอีกครั้ง (W2)

การคำนวณ :

$$\% \text{ เยื่อใยรวม} = \frac{\text{นน.ถ้วยและกากก่อนเผา (W1)} - \text{นน. ถ้วยและกากหลังเผา (W2)}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (Ws)}} \times 100$$

3.4 การวัดผลของสมรรถนะการผลิต

3.4.1 ปริมาณอาหารที่กินทั้งหมด (Total feed intake, TFI)

ปริมาณอาหารที่กินที่ทั้งหมดคำนวนจากการวัดปริมาณอาหารที่กินตั้งแต่เริ่มทดลองจนวันสุดท้ายของการทดลองของสุกรแต่ละตัวในแต่ละวัน (ดังแสดงในหัวข้อ 3.3.2) แล้วนำมารวมกัน

3.4.2 ปริมาณอาหารที่กินเฉลี่ยต่อวัน (Average daily feed intake, ADFI)

คำนวนจากนำปริมาณอาหารที่กินทั้งหมดของสุกรทั้งหมดหารด้วยจำนวนวันที่เลี้ยง ดังแสดงต่อไปนี้

$$\text{ปริมาณอาหารที่กินเฉลี่ย (กก./วัน)} = \frac{\text{ปริมาณอาหารที่กินทั้งหมด (กก.)}}{\text{จำนวนวันที่เลี้ยง (วัน)}}$$

3.4.3 การเพิ่มน้ำหนักตัวทั้งหมด (Total weight gain, TWG)

การเพิ่มน้ำหนักตัวทั้งหมดคำนวนจากน้ำหนักที่บันทึกไว้ในครั้งสุดท้ายของสุกรแต่ละตัวลบออกด้วยน้ำหนักที่บันทึกครั้งแรก

$$\text{การเพิ่มน้ำหนักตัวทั้งหมด (กก.)} = \text{น้ำหนักครั้งสุดท้าย} - \text{น้ำหนักเริ่มต้น}$$

3.4.4 อัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน (Average daily gain, ADG)

นำน้ำหนักที่บันทึกไว้ในครั้งสุดท้ายของสุกรแต่ละตัวลบออกด้วยน้ำหนักที่บันทึกครั้งแรก ซึ่งก็คือน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นแล้วหารด้วยจำนวนวันที่เลี้ยง ดังแสดงต่อไปนี้

$$\text{อัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ย (กก./วัน)} = \frac{\text{น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (กก.)}}{\text{จำนวนวันที่เลี้ยง (วัน)}}$$

3.4.5 อัตราการเปลี่ยนอาหาร (Feed conversion ratio, FCR)

รวมปริมาณอาหารที่บันทึกไว้ตั้งแต่เริ่มต้นจนสิ้นสุดการทดลองแล้วหารด้วยน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นจากการนำน้ำหนักที่บันทึกไว้ในครั้งสุดท้ายของสุกรแต่ละตัวลบออกด้วยน้ำหนักที่บันทึกไว้ครั้งแรก ดังแสดงต่อไปนี้

$$\text{อัตราการแลกเปลี่ยนอาหาร} = \frac{\text{น้ำหนักอาหารที่กิน (กก.)}}{\text{น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (กก.)}}$$

3.5 วิธีวัดผลการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกันของสุกรโดยดูค่าแอนติบอดีไตเตอร์ต่อเม็ดเลือดแดงแกะโดยวิธี Direct hemagglutination assay (Catty, 1989)

3.5.1 การเตรียมตัวอย่างซีรั่ม

1. นำตัวอย่างซีรั่มของสุกรที่เก็บไว้มาดูดใส่ใน microtube 200 µl ปิดฝาและพันด้วยพาราฟินให้เรียบร้อย ทำเครื่องหมายเพื่อระบุตัวอย่าง

2. จากนั้นบรรจุในโฟมเพื่อนำไปต้มใน water bath ที่อุณหภูมิ 56°C นาน 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็ว 3,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที จึงนำมาวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

3.5.2 การกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยเม็ดเลือดแดงแกะ (Sheep red blood cell)

1. นำเลือดแกะในไซริงค์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อและใส่ EDTA ซึ่งเป็นสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดมาถ่ายใส่ในหลอดทดลองขนาด 50 มล.

2. นำมาปั่นที่ความเร็วรอบ 1,500 รอบ/นาที นาน 20 นาที แล้วดูดเอาซีรั่มทิ้งไปให้เหลือแต่เซลล์เม็ดเลือดแดงที่ตกตะกอนอยู่

3. นำเซลล์มาล้างด้วยสารละลาย phosphate buffer saline (PBS) 2 ครั้ง โดยการดูดปล่อยเซลล์ (resuspended) แล้วนำไปปั่นให้ตกตะกอนดูดเอาน้ำใสๆ ส่วนข้างบนออก และ suspensionให้ได้ 10%(v/v) ใน PBS โดยให้มีเซลล์เท่ากับ 10^9 เซลล์/มล.

4. จากนั้นนำเซลล์เม็ดเลือดแดงแกะที่เตรียมจากข้อ 3 มาฉีดที่บริเวณลำคอสุกรประมาณ 1 มล. ของ 10% เซลล์/ 10 กิโลกรัมของน้ำหนักตัว (มีจำนวนเซลล์ประมาณ 10^9 เซลล์/มล.)

5. การเก็บรักษาเซลล์เม็ดเลือดแดงสามารถทำได้โดยนำเซลล์มาล้างด้วยสารละลาย PBS 4 ครั้ง โดยการดูดปล่อยเซลล์ (resuspended) แล้วนำไปปั่นให้ตกตะกอนดูดเอาน้ำใสๆ ส่วนข้างบนออก ทำจนครบซึ่งสามารถเก็บเซลล์เม็ดเลือดแดงแกะได้นาน 1 สัปดาห์ที่ 4°C

3.5.3 การวัดค่าแอนติบอดีไตเตอร์ต่อเม็ดเลือดแดงแกะ (Hemagglutinating antibody titer) ตามวิธีของ Ling and Catty, 1989

หลักการ :

Particulate antigen (SRBC) + antibody → Agglutination

ปฏิกิริยา agglutination เกิดจากการรวมกลุ่ม (clumping) ของแอนติเจนที่เป็นอนุภาค หรือเซลล์กับแอนติบอดีที่มีความจำเพาะ ซึ่งสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า

อุปกรณ์และสารเคมี :

1. Microtitration U-bottomed plastic plates
2. Micropipette 200 และ 1000 µl
3. Multichannel pipette
4. Disposable tips 200, 1000 µl
5. Normal pig serum
6. Pig-anti-SRBC
7. ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน pH 7.2 (Phosphate buffer saline, PBS) (Figure 16)

วิธีการ :

1. ล้าง SRBC 3 ครั้งด้วย PBS : เอา SRBC ปั่นที่ 1,500 r.p.m. 20 นาที เอาพลาสม่าและ buffy coat ออก เติม PBS แล้ว resuspended นำไปปั่นให้ตกตะกอนแล้วดูดเอาน้ำใสๆข้างบนทิ้ง เติม PBS ล้างอีก 2ครั้ง สุดท้ายเตรียม suspension ให้ได้ในช่วง 0.5%-2%(v/v)

2. ทำการ mark บน U-bottom plate ทั้งหมด 8 แถว (A-H)โดยให้แถว Aเป็นกลุ่มควบคุมคือซีรั่มปรกติไม่ถูกกระตุ้น ส่วนแถว H เป็น PBS control และแถวที่เหลือจับคู่กันเป็น 1 ตัวอย่าง (2ซ้ำ)

3. ไปเปต PBS จำนวน 50 ไมโครลิตรหรือ 100 ไมโครลิตร ในแต่ละหลุม(well) เติมซีรั่มที่เตรียมได้จาก 3.5.1 จำนวน 50ไมโครลิตรหรือ 100 ไมโครลิตร ทุกหลุม ยกเว้นแถว H

4. จากนั้นทำการเจือจางในแถว A (ซึ่งเป็นซีรั่มปรกติไม่ได้ถูกกระตุ้น) หลุมที่ 1 ถึงหลุมที่ 12โดยดูดเป่าจากหลุมที่ 1 แล้วนำมาถ่ายใส่หลุมที่ 2 ดูดเป่าถ่ายใส่ไปเรื่อยๆจนครบหลุมที่ 12

5. แถวที่เหลือเติม anti-serum (ซีรั่มที่ถูกกระตุ้น) แล้วเจือจางจนครบ จากนั้นเติม SRBC ทุกแถวจำนวน 50 ไมโครลิตรหรือ 100 ไมโครลิตร ปิดฝาแล้วเขย่าหมุนไปมาจนเข้ากัน นำไปเก็บไว้ที่ 4 $^{\circ}$C นานกว่า 2 ชั่วโมงหรือตลอดทั้งคืน (Figure 18)

การอ่านผล :

การอ่านค่าแอนติบอดีไตเตอร์จะดูจากการรวมกลุ่มหรือการตกตะกอนของเซลล์ที่เกิดขึ้น ซึ่งเกิดจากการจับต่อกันไปเรื่อยๆจนเกาะติดเป็นร่างแหเกิดเป็นก้อนใหญ่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า โดยดูจากค่าการเจือจางจากหลุมที่ 1 (well) จนถึงหลุมสุดท้าย (Figure 17) ก่อนถึงหลุมที่เซลล์ไม่ตกตะกอน จะเห็นเซลล์นอนก้นอัดตัวกันเหมือนเป็นปุ่มหรือรังดุมตรงกลางสีแดง นั่นคือ

แสดงผลเป็นลบ และค่าไตเตอร์คือ ค่าที่ได้อ่านจากส่วนกลับของอัตราส่วนที่เจือจางตรงหลุมสุดท้ายของการตกตะกอน

Figure 16 Instrument of hemagglutination assay

dilution	1	½	¼	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048
หลุมที่	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Normal serum (control) (A)	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
Test serum 1 (B)	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
(C)	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
Test serum 2 (D)	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
(E)	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
Test serum 3 (F)	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
(G)	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
PBS control (H) (negative)	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O

Figure 17 Measurement of hemagglutination assay

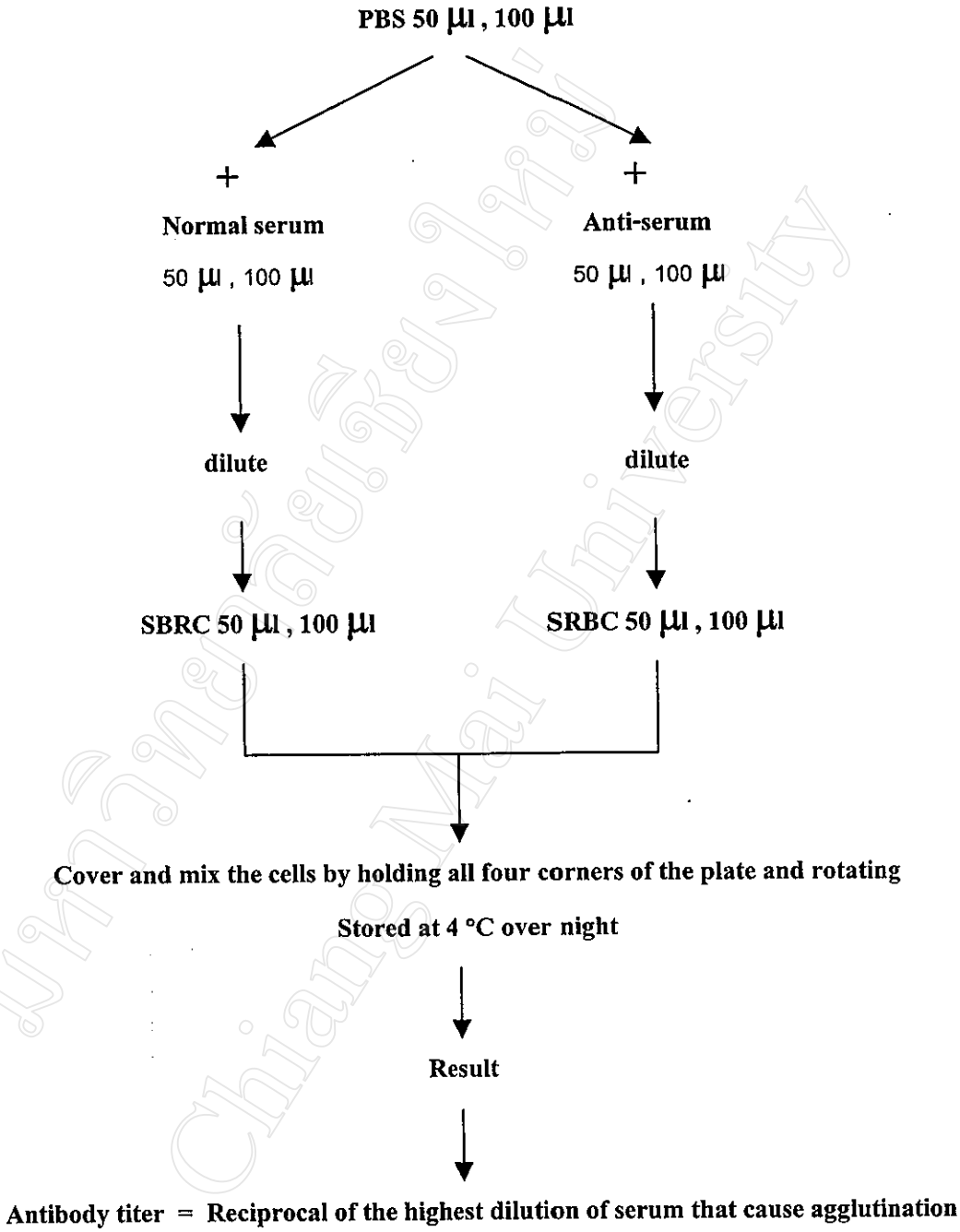

Figure 18 Hemagglutination assay chart

3.6 การศึกษาคุณภาพซากของสุกร (Carcass quality)

การศึกษาคุณภาพซากและคุณภาพเนื้อในสุกรทำได้โดยการนำสุกรที่มีน้ำหนักตามความต้องการของตลาดหรือเฉลี่ยที่ 90-100 กก. ต้องอดอาหารสุกรอย่างน้อย 12 ชม. แต่ต้องมีน้ำดื่มตลอดเวลา ทำการชั่งน้ำหนักก่อนส่งโรงฆ่า

แบ่งซากที่ชำแหละเป็น 5 ส่วน คือ ขา, ไหล่, สะโพก, สามชั้น และหน้าตั้ง แล้วบันทึกน้ำหนักของชิ้นส่วนต่างๆไว้ ส่วนของหน้าตั้งจะตัดส่วนด้านซ้ายของซี่โครงตำแหน่งที่ 7-14 เพื่อนำมาวัดคุณภาพต่อไป

3.6.1 การคำนวณเปอร์เซ็นต์ซาก (Dressing percentage) ของสุกร แนะนำโดย สัญชัย (2534)

การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ซากไม่สามารถนำซากทั้งหมดมาแช่เย็นได้ จึงใช้การการคำนวณจากน้ำหนักซากสดที่บันทึกลบด้วย 3% ของน้ำหนักซากสดหารด้วยน้ำหนักที่มีชีวิตก่อนฆ่าที่ชั่งไว้แล้วคูณด้วย 100 เพื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ดังต่อไปนี้

$$\text{Dressing percentage} = \frac{\text{(น้ำหนักซากสด – 3\% ของน้ำหนักซากสด)}}{\text{น้ำหนักมีชีวิต}} \times 100\%$$

น้ำหนักซากสด = ผลรวมของ (ขา + หัวไหล่ + สะโพก + สามชั้น + หน้าตั้ง + สันใน)

3.6.2 การวัดไขมันสันหลัง (Backfat) อ้างโดย สัญชัย (2543)

วิธีการ :

นำตัวอย่างหน้าตั้งบริเวณเนื้อสันนอกติดกับกระดูกสันหลังและซี่โครงที่เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 24 ชม. มาตัดแต่งแล้ววัดไขมันบนกล้ามเนื้อสันนอก (longissimus) ที่ตำแหน่งซี่โครงคู่ที่ 11-12 ที่ตำแหน่ง ¾ ของความยาวของกล้ามเนื้อค่อนไปทางลำตัวโดยใช้ backfat probe

3.6.3 การวัดพื้นที่หน้าตัดเนื้อสัน (Loin eye area) อ้างโดย สัญชัย (2543)

วิธีการ :

นำตัวอย่างเนื้อสันนอกที่เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 ° C เป็นเวลา 24 ชม. มาตัดแต่ง จากนั้นใช้กระดาษลอกลายลอกลายตามเส้นของพื้นที่หน้าตัดเนื้อสันบริเวณตำแหน่งซี่โครงคู่ที่ 10 และ 11 แล้วนำไปหาพื้นที่ด้วยเครื่องวัดพื้นที่ (planimeter)

3.7 การศึกษาคุณภาพเนื้อของสุกร (Meat quality)

3.7.1 การวัดค่าการสูญเสียน้ำ (Drip loss) (Honikel, 1987 อ้างโดย สัญชัย, 2543)

วิธีการ :

นำตัวอย่างเนื้อสันนอกที่เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 ° C เป็นเวลา 24 ชม. มาตัดแต่ง จากนั้นใช้ตัวอย่างกล้ามเนื้อสันนอกที่ตำแหน่งซี่โครงคู่ที่ 9 และ 10 หนา 2.5 ซม. ทำการตัดแต่งเนื้อเยื่อไขมันออก ชั่งน้ำหนักก่อน (W_1) แล้วนำผ้าขาวบางมาห่อแขวนในถุงพลาสติก อย่าให้ชิ้นเนื้อสัมผัสกับด้านล่างของถุงและปิดปากถุงให้สนิท ใช้เชือกหรือตะขอเกี่ยวแขวนไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Figure 19) จากนั้นจึงนำเนื้อสันออกจากถุงโดยซับของเหลวที่ติดมากับเนื้อสันด้วยกระดาษทิชชู แล้วชั่งน้ำหนักไว้ (W_2) การสูญเสียหาได้โดยคิดเป็นร้อยละเปอร์เซ็นต์จากการสูญเสียน้ำดังต่อไปนี้

การคำนวณ :

$$\% \text{ drip loss} = \left\{ \frac{W_1 - W_2}{W_1} \right\} \times 100$$

นำตัวอย่างกล้ามเนื้อสันที่เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 ° C เป็นเวลา 24 ชม.

มาตัดแต่ง หนา 2.5 ซม.

⇩

ทำการตัดแต่งเนื้อเยื่อไขมันออก ชั่งน้ำหนักก่อน (W_1)

⇩

นำผ้าขาวบางมาห่อแขวนในถุงพลาสติก อย่าให้ชิ้นเนื้อสัมผัสกับด้านล่างของถุง

และปิดปากถุงให้สนิท

⇩

ใช้เชือกหรือตะขอเกี่ยวแขวนไว้ในตู้เย็น ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

⇩

นำเนื้อสันออกจากถุงโดยซับของเหลวที่ติดมากับเนื้อสัน

แล้วชั่งน้ำหนักไว้ (W_2)

⇩

คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำ

Figure 19 Procedure for drip loss measurement

3.7.2 ค่าสีของเนื้อ (Color of meat) cited by Gerdemann (1996)

วิธีการ :

นำตัวอย่างเนื้อสันนอกที่เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 ° C เป็นเวลา 24 ชม. มาตัดแต่ง จากนั้นใช้ตัวอย่างกล้ามเนื้อสันนอกตำแหน่งซี่โครงคู่ที่ 11 และ 12 หนา 2.5 ซม. ทำการตัดแต่งเนื้อเยื่อไขมันออกแล้วบรรจุในถุงพลาสติก ปิดปากถุงให้แน่นกันลมเข้าออก (sealed) ตั้งทิ้งไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำเนื้อสันออกจากถุงตั้งทิ้งไว้อย่างน้อยประมาณ 30 นาที แล้วนำออกมาซับของเหลวที่ติดมากับเนื้อสันด้วยกระดาษทิชชู แล้วนำไปวัดค่าสีของเนื้อ ทำการวัดเนื้อตัวอย่างจำนวน 5-6 ตำแหน่ง ด้วยเครื่อง Chroma Meter (CR-300 MINOLTA, Japan) บันทึกค่าเฉลี่ย L * (ความสว่าง) , a * (แดง-เขียว) , b * (เหลือง – น้ำเงิน) (Figure 20)

นำตัวอย่างกล้ามเนื้อสันที่เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 ° C เป็นเวลา 24 ชม.
มาตัดแต่ง หนา 2.5 ซม. ทำการตัดแต่งเนื้อเยื่อไขมันออก

⇩

บรรจุในถุงพลาสติก ปิดปากถุงให้แน่นกันลมเข้าออก (sealed)
ตั้งทิ้งไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

⇩

จากนั้นจึงนำเนื้อสันออกจากถุงตั้งทิ้งไว้อย่างน้อยประมาณ 30 นาที
แล้วนำออกมาซับของเหลวที่ติดมากับเนื้อสันด้วยกระดาษทิชชู

⇩

นำไปวัดค่าสีของเนื้อ

Figure 20 Procedure for color of meat measurement

3.8 วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลที่ได้จากการบันทึกและการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการจะวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS for windows, version 7.5.2 (May 16, 1997)

3.9 สถานที่ทำการวิจัย

1. ผาแดงฟาร์ม อ. แม่แตง จ. เชียงใหม่
2. กิตติวัฒน์ฟาร์ม อ. สันทราย จ. เชียงใหม่
3. ห้องปฏิบัติการกลาง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
4. ห้องปฏิบัติการภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

3.10 ระยะเวลาการดำเนินการวิจัย

ระยะเวลาในการวิจัยรวมประมาณ 12 เดือน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University