บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์การทดลอง

3.1.1 สารเคมี

ชื่อสารเคมี	บริษัท	เกรด
1. Acetic acid	Merck	AR
2. Ammonium acetate	Fisher Chemicals	AR
3. Ammonium sulphate	Fisher Chemicals	AR
4. Boric acid	Merck	AR
5. Citric acid	Merck	AR
6. Conc. Sulfuric acid (H_2SO_4)	Merck	AR
7. Disodium hydrogenphosphate ($Na_2HPO_4.12H_2O$)	Merck	AR
8. Ammonium molybdate tetrahydrate	Merck	AR
9. Sulfosalicylic acid dehydrate	Fluka	AR
10. Gelatin	Merck	AR
11. Methanol	Merck	AR
12. Hydrochloric acid (HCl)	Merck	AR
13. O-phenylen-diamine-HCl	Zymed Lab	AR
14. Potassium chloride (KCl)	Scharlau	AR
15. Potassium dihydrogenphosphate (KH_2PO_4)	Scharlau	AR
16. Potassium permanganate ($KMnO_4$)	Merck	AR
17. Sodium carbonate (Na_2CO_3)	Scharlau	AR
18. Sodium chloride (NaCl)	Merck	AR
19. Sodium hydrogencarbonate ($NaHCO_3$)	Merck	AR
20. Sodium hydroxide (NaOH)	Merck	AR
21. Selenium mixture	Merck	AR

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อสารเคมี	บริษัท	เกรด
22. 2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ)	Fisher Chimecals	AR
23. Trichloroacetic acid	Merck	AR
24. Thashiro indicator	Fluka	AR
25. Pumice stone	BDH	AR
26. Ethanol	Merck	AR
27. Kieselgur	Merck	AR
28. Acetone	Fluka	AR

3.1.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

ชื่อเครื่องมือ	โมเดล	บริษัท	ประเทศ
1. 3-way stopcock		Nipro Medical	Japan
2. Incubator shaker		Memmert	Germany
3. Atomic absorption Spectrophotometer	3900	Perkin Elmer	Germany
4. Centrifuge	Mistral300	MSE co.	UK
5. Electronic weight	2842	Sartorius	Germany
6. Muffle furnace	MR260E	Heraeus	Germany
7. Micropipette	Pipetman	Gilson	France
8. Microplate reader	2010	Anthos Labtech	Germany
9. Multichannel micropipette 200 -		Eppenddorf	Germany
10. Needle		Nippo	Thailand
11. Hot air oven	ULE 400	Memmert	Germany
12. Parafilm		American	USA.
13. Refrigerated centrifuge	6930	KUBOTA	Japan
14. Refrigerator (- 20C°)	WCF-95L	Whirlpool	Thailand
15. Spectrophotometer	DU7500	Beckman	Germany
16. Syringe		Nippo	Thailand
17. Vortex	K-500 GE	Labinco	USA.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2 วิธีการทดลอง

ก. สัตว์ทดลอง

ใช้สุกรลูกผสม ลาร์จไวท์ x แลนด์เรซ x ดูรอค (Large White x Landrace x Duroc) คละเพศจำนวนเท่ากันหย่านมอายุเฉลี่ย 21วัน น้ำหนักหย่านมเฉลี่ย 6.95 กิโลกรัมจำนวน 180 ตัว เลี้ยงเป็นระยะเวลา 42 วัน ทั้งหมดแบ่งเป็น 5 กลุ่มๆ ละ 36 ตัว แบ่งกลุ่มละ 9 ซ้ำ จัดขังซ้ำละ 4 ตัว

ข. ลักษณะคอกทดลอง

คอกทดลองเป็นกรงขังรวมอยู่ภายในห้องเรียงติดกันเป็นแถวยาว 6 กรง จำนวน 2 แถว มีประตูเข้า- ออก ระหว่างแถวมีระยะห่าง 1 เมตร ขนาดกรงแต่ละกรง กว้าง 1.30 เมตร ยาว 1.50 เมตร และสูง 0.70 เมตร พื้นคอกเป็นพื้นสแล็ทลวดเหล็กถัก รางอาหารจะติดตั้งด้านหน้าตามความกว้างของกรง โดยรางอาหารจะอยู่สูงจากพื้นคอกประมาณ 0.10 เมตร ทำจากแผ่นสเตนเลสพับเป็นรางรูปตัวยู และมีช่องกั้นป้องกันลูกสุกรลงไปนอนในรางอาหาร มีที่ให้น้ำแบบนิปเปิ้ลกรงละ 2 จุด ดังแสดงใน Figure 3.1

Figure 3.1 Experimental cage for 4 pigs (1 replicate per cage).

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
All rights reserved

ค. การวางแผนการทดลองและการจัดสัตว์เข้าทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (completely random design) สุ่มสุกรเข้ากรงๆละ 4 ตัวต่อซ้ำโดยให้มีน้ำหนักเริ่มต้นใกล้เคียงกัน ในแต่ละกรงจัดสุกรแบบคละเพศ จัดออกเป็น 5 กลุ่มๆละ 9 ซ้ำ แต่ละกลุ่มจะได้รับอาหารสูตรต่างๆดังนี้

อาหารสูตรที่ 1 (T 1) คือ อาหารสูตรฟาร์ม (กลุ่มควบคุม)

อาหารสูตรที่ 2 (T 2) คือ อาหารสูตรที่ 1 ปรับใช้กากถั่วเหลือง 10%

อาหารสูตรที่ 3 (T 3) คือ อาหารสูตรที่ 1 ปรับใช้กากถั่วเหลืองหมักนำเข้า 10%

อาหารสูตรที่ 4 (T 4) คือ อาหารสูตรที่ 1 ปรับใช้กากถั่วเหลืองหมัก 10%

อาหารสูตรที่ 5 (T 5) คือ อาหารสูตรที่ 1 ปรับใช้กากถั่วเหลืองหมัก 15%

ต่อจากนั้นทำการสุ่มสุกรเพื่อกำหนดสูตรอาหารในแต่ละซ้ำดังนี้

T1R1	T3R1
T3R2	T5R1
T1R2	T4R1
T5R2	T2R1
T4R2	T3R3
T2R2	T1R3

T5R3	T2R3
T1R4	T4R3
T3R4	T5R4
T4R4	T2R4
T1R5	T2R6
T2R5	T5R5

T3R5	T4R5
T1R6	T2R7
T5R6	T4R6
T2R8	T3R6
T1R7	T1R8
T4R7	T3R7

T4R8	T5R7
T3R8	T2R9
T5R8	T3R9
T5R9	T4R9
T1R9	

ง. การจัดการด้านอาหาร

อาหารทดลองที่ใช้ทั้งหมด 5 สูตร โดยแต่ละสูตรจะแบ่งออกเป็น 4 ระยะ โดยขั้นตอนในการให้อาหารในแต่ระยะ จะเริ่มต้นที่อาหารระยะ 1 กำหนดให้ลูกสุกรกินเฉลี่ย 5 กก. ต่อตัว อาหารระยะ 2 ให้กินอาหารเฉลี่ย 8 กก.ต่อตัว หลังจากนั้นจะตามด้วยอาหารระยะ 3 ให้กินปริมาณอาหารเฉลี่ย 8 กก.ต่อตัว หลังจากนั้นจะให้อาหารระยะ 4 ปริมาณอาหารเฉลี่ย 7.5 กก. จนสิ้นสุดการทดลอง ในแต่ละกรงจะได้รับอาหารตามสูตรเรียงตามลำดับตลอดระยะเวลาการทดลอง (Table 3.1-3.4) สุกรทุกตัวจะได้กินอาหารแบบไม่จำกัดโดยชั่งอาหารบรรจุในถังพลาสติกใบละ 7 กก. ที่มีฝาปิดมิดชิด และทำเครื่องหมายกำกับตรงตามสูตรอาหารที่ให้ เพื่อบันทึกปริมาณอาหารที่กินและที่เหลือ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อาหารสุกรทดลอง

Table 3.1 Experimental diets for weaned pigs in phase 1*

Ingredients (%)	Treatments**				
	T1	T2	T3	T4	T5
Broken rice	24.90	24.90	24.90	24.90	24.90
Wheat bran	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Fish meal 62% CP	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00
Full fat soybean 36% CP	30.00	20.00	20.00	20.00	15.00
M-Di calcium phosphate 21%P	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
Rock phosphate	1.10	1.10	1.10	1.10	1.10
Salt	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
Tallow	1.85	1.85	1.85	1.85	1.85
Sweet whey	12.50	12.50	12.5	12.50	12.50
Nuklospray K10	15.00	15.00	15.00	15.00	15.00
Premix and feed additive	6.26	6.26	6.26	6.26	6.26
SBM[1]	-	10	-	-	-
IFSBM[2]	-	-	10	-	-
FSBM[3]	-	-	-	10	15

[1]SBM = Soybean meal.

[2]IFSBM = Imported fermented soybean meal.

[3]FSBM= Fermented soybean meal.

*Phase feeding system; phase 1 = 5 kg/pig (about 11-13 days).

**T1 = Control.

T2 = Control which substituted with 10% SBM.

T3 = Control which substituted with 10% IFSBM.

T4 = Control which substituted with 10% FSBM.

T5 = Control which substituted with 15% FSBM.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Table 3.2 Experimental diets for weaned pigs in phase 2*

Ingredients (%)	Treatments**				
	T1	T2	T3	T4	T5
Broken rice	36.20	36.20	36.20	36.20	36.20
Ground cone	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
Wheat bran	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Fish meal 62% CP	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
Full fat soybean 36% CP	35.00	25.00	25.00	25.00	20.00
M-Di calcium phosphate 21% P	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90
Rock phosphate	1.20	1.20	1.20	1.20	1.20
Salt	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
Tallow	2.20	2.20	2.20	2.20	2.20
Molasses	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Sweet whey	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50
Nuklospray K10	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
Premix and feed additive	4.93	4.93	4.93	4.93	4.93
SBM[1]	-	10	-	-	-
IFSBM[2]	-	-	10	-	-
FSBM[3]	-	-	-	10	15

[1]SBM = Soybean meal.

[2]IFSBM = Imported fermented soybean meal.

[3]FSBM= Fermented soybean meal.

*Phase feeding system; phase 1 = 8 kg/pig (about 11-13 days).

**T1 = Control.

T2 = Control which substituted with 10% SBM.

T3 = Control which substituted with 10% IFSBM.

T4 = Control which substituted with 10% FSBM.

T5 = Control which substituted with 15% FSBM.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Table 3.3 Experimental diets for weaned pigs in phase3*

Ingredients (%)	Treatments**				
	T1	T2	T3	T4	T5
Broken rice	32.70	32.70	32.70	32.70	32.70
Ground cone	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
Cassava meal	3.10	3.10	3.10	3.10	3.10
Rice bran	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Wheat bran	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Fish meal 62% CP	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
Full fat soybean 36% CP	35.00	25.00	25.00	25.00	20.00
M-Di calcium phosphate 21% P	1.10	1.10	1.10	1.10	1.10
Rock phosphate	1.20	1.20	1.20	1.20	1.20
Salt	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
Tallow	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Molasses	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Premix and feed additives	3.80	3.80	3.80	3.80	3.80
SBM[1]	-	10.00	-	-	-
IFSBM[2]	-	-	10.00	-	-
FSBM[3]	-	-	-	10.00	15.00

[1]SBM = Soybean meal.

[2]IFSBM = Imported fermented soybean meal.

[3]FSBM= Fermented soybean meal.

*Phase feeding system; phase 1 = 8 kg/pig (about 11-13 days).

**T1 = Control.

T2 = Control which substituted with 10% SBM.

T3 = Control which substituted with 10% IFSBM.

T4 = Control which substituted with 10% FSBM.

T5 = Control which substituted with 15% FSBM.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Table 3.4 Experimental diets for weaned pigs in phase 4*

Ingredients (%)	Treatment**				
	T1	T2	T3	T4	T5
Broken rice	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
Ground cone	46.30	46.30	46.30	46.30	46.30
Cassava meal	3.58	3.58	3.58	3.58	3.58
Rice bran	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
Wheat bran	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
Fish meal 62% CP	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
Full fat soybean 36% CP	10.00	-	-	-	-
Soybean meal 44% CP	18.50	18.50	18.50	18.50	15.50
M-Di calcium phosphate 21% P	0.95	0.95	0.95	0.95	0.95
Rock phosphate	1.20	1.20	1.20	1.20	1.20
Salt	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Tallow	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Premix and feed additives	1.22	1.22	1.22	1.22	1.22
SBM[1]	-	10.00	-	-	-
IFSBM[2]	-	-	10.00	-	-
FSBM[3]	-	-	-	10.00	15.00

[1]SBM = Soybean meal.

[2]IFSBM = Imported fermented soybean meal.

[3]FSBM= Fermented soybean meal.

*Phase feeding system; phase 1 = 7.5 kg/pig (about 11-13 days).

**T1 = Control.

T2 = Control which substituted with 10% SBM.

T3 = Control which substituted with 10% IFSBM.

T4 = Control which substituted with 10% FSBM.

T5 = Control which substituted with 15% FSBM.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จ. ข้อมูลเกี่ยวกับกากถั่วเหลืองหมัก

กากถั่วเหลืองหมักนำเข้าผลิตเป็นการค้า ผลิตจากกากถั่วเหลืองกะเทาะเปลือก หมักด้วยเชื้อ *Lactobacillus* หลังจากนั้นจะผ่านกระบวนการทำให้แห้งเป็นผง

กากถั่วเหลืองหมักที่ผลิตเพื่อการทดลองนี้ ซึ่งต่อไปนี้จะเรียกว่า กากถั่วเหลืองหมัก ซึ่งผลิตจากกากถั่วเหลืองไม่กะเทาะเปลือก โดยมีขั้นตอนการผลิตดังนี้

1. นำกากถั่วเหลืองมาเติมน้ำในปริมาณเหมาะสม
2. นำ กากถั่วเหลืองที่ได้ไปนึ่งฆ่าเชื้อ แล้วทิ้งไว้ให้เย็น
3. หลังจากนั้น เติมเชื้อหมักลงไป (ใช้เชื้อ *Bacillus* ในการหมัก)

หลังจากการหมักแล้ว นำกากถั่วเหลืองหมักที่ได้มาอบให้แห้ง แล้วบดให้เป็นผงละเอียด เพื่อนำไปผสมในอาหารทดลองต่อไป

3.3 การเก็บตัวอย่างและการบันทึกข้อมูล

3.3.1 การเก็บตัวอย่างลำไส้เล็ก

การเก็บตัวอย่างลำไส้เล็ก (คณะผลิตกรรมการเกษตร, 2547 และสมมาตร์, 2544)

การเก็บตัวอย่างลำไส้เล็กเพื่อวัดความสูงของวิลไล กระทำกับลูกสุกรหย่านมที่อายุ 21 วัน ก่อนได้รับอาหารทดลอง โดยสุ่มสุกรหย่านม 3 ตัว หลังจากเริ่มการทดลองไปแล้วจะทำการสุ่มลูกสุกร Treatment ละ 1 ตัว เมื่อสิ้นสุดสัปดาห์ที่ 4 5 6 7 8 และ 9 เพื่อเก็บตัวอย่างลำไส้เล็ก มาวัดความสูงของวิลไล โดยมีขั้นตอนการเก็บตัวอย่างดังนี้

1. นำสุกรที่สุ่มมาชั่งน้ำหนัก
2. ทำให้สุกรตายอย่างสงบ (Euthanasia) โดยฉีดสารละลายแมกนีเซียมซัลเฟตอิ่มตัว 20-50 ซีซีเข้าทางเส้นเลือดดำใหญ่บริเวณลำคอ (jugular vein) ทิ้งไว้ประมาณ 5-15 นาทีจนกระทั่งสุกรตายอย่างสงบ
3. ทำการล้างลำตัวของสุกรด้วยน้ำสะอาด
4. เปิดผนังช่องท้องของสุกรออก และแยกตัดส่วนของลำไส้เล็กออกมา
5. วัดความยาวของลำไส้เล็กส่วนต้น ส่วนกลางและส่วนปลาย เมื่อทำการวัดความยาวเรียบร้อยแล้ว
6. ใช้ด้ายมัดส่วนต้นของลำไส้เล็กส่วนต้น โดยมัดห่างจากปลายกระเพาะอาหารประมาณ 10 cm. และใช้ด้ายอีกเส้นมัดลำไส้เล็กห่างจากจุดแรกประมาณ 3 cm. หลังจากนั้นฉีดสารละลาย fixation เข้าไปในส่วนของลำไส้เล็กที่อยู่ระหว่างด้ายทั้ง 2 เส้นจนกระทั่งลำไส้เล็กบวม เพื่อรักษาสภาพของเนื้อเยื่อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

7. ตัดส่วนของตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ได้แช่ลงในน้ำยารักษาสภาพอีกครั้ง เมื่อเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อตำแหน่งแรกเสร็จแล้ว ทำการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อตำแหน่งส่วนกลาง และส่วนปลายของลำไส้เล็กต่อไปด้วยวิธีเดิม โดยตำแหน่งที่เก็บจะวัดห่างจากส่วนต้นของลำไส้เล็กส่วนกลางและส่วนปลาย ประมาณ 10 cm. แล้วทำการมัดด้ายแต่ละจุด แล้วทำการฉีดน้ำยาเพื่อรักษาสภาพของเนื้อเยื่อ

แผนผังขั้นตอนการเก็บตัวอย่างลำไส้เล็ก

ทำให้ตายอย่างสงบ (Euthanasia)

↓

ล้างซากสุกรด้วยน้ำสะอาด

↓

เตรียมอุปกรณ์ในการผ่าซาก

↓

ทำการเปิดผ่าช่องท้อง

↓

ทำการพลิกเอาส่วนลำไส้หลบออกเพื่อหาส่วน Duodenum

↓

เก็บลำไส้เล็กส่วน Duodenum ฉีดน้ำยารักษาสภาพและทำเครื่องหมาย

↓

เก็บลำไส้เล็กส่วน Ileum ฉีดน้ำยารักษาสภาพและทำเครื่องหมาย

↓

เก็บลำไส้เล็กส่วน Jejunum ฉีดน้ำยารักษาสภาพและทำเครื่องหมาย

↓

เก็บลำไส้เล็กทั้ง 3 ส่วนไว้ในน้ำยาดงสภาพ

การเตรียมตัวอย่างลำไส้เล็กเพื่อใช้ในการวัดความยาวของวิลไล (สมมาตร์, 2544 และ Junqueira and Carneiro, 1980)

1. เตรียมชิ้นเนื้อที่ได้จากการเก็บตัวอย่างมาล้างด้วยน้ำกลั่นเพื่อกำจัดเศษอาหารออกให้สะอาด และตัดชิ้นส่วนชิ้นเนื้อให้เป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า ขนาด 1x2 ซม.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. เมื่อได้ชิ้นเนื้อแล้วต้อง fixed ให้เร็วที่สุด ด้วยน้ำยา Bouin's solution ใช้ปริมาณ 10 เท่าของเนื้อเยื่อ ทั้งนี้เพื่อรักษาสภาพของเนื้อเยื่อ

3. ล้างน้ำยารักษาสภาพออกด้วย 50% alcohol หลายๆครั้งนาน 4-6 ชั่วโมง

4. นำชิ้นเนื้อที่ได้มาผ่านขั้นตอนการดึงน้ำออก (dehydrating) เพื่อให้พาราฟินเข้าไปแทนที่น้ำได้ โดยแช่ชิ้นเนื้อนาน 1-2 ชั่วโมง ใน alcohol เข้มข้น 80% จากนั้นย้ายชิ้นเนื้อไปแช่ใน alcohol เข้มข้น 95% นาน 1-2 ชั่วโมง และสุดท้ายย้ายไปแช่ใน alcohol เข้มข้น 100% นาน 1-2 ชั่วโมง

5. ขั้นตอนการ clearing ชิ้นเนื้อ โดยเริ่มจาก นำชิ้นเนื้อตัวอย่างแช่ใน Xylol (clearing reagent) 3 ครั้งๆละ 1-2 ชั่วโมง โดยเปลี่ยนน้ำยาใหม่ทุกครั้ง

6. หลังจากนั้นจะดึงเอา clearing reagent ออก (impregnation) เพื่อให้พาราฟินซึมเข้าไปแทนที่ วิธีการทำโดยนำเอาชิ้นเนื้อไปแช่ในพาราฟินหลอมเหลวที่อุณหภูมิ 50-56 C° 3 ครั้งๆละ 1-2 ชั่วโมง ข้อควรระวังเนื่องจากพาราฟินที่ใช้มักจะมีจุดหลอมเหลว 50-56 C° หม้อต้มพาราฟินควรปรับอุณหภูมิให้ใกล้เคียงกับจุดหลอมเหลว ถ้าอุณหภูมิเกินจุดหลอมเหลว 5 C° จะทำให้เนื้อเยื่อหดตัวอย่างมาก และแข็งเกินไป ขั้นตอนนี้บางครั้งต้องใช้ตู้สุญญากาศช่วยด้วย เพื่อดูดเอาฟองอากาศในชิ้นเนื้อออก ทำให้พาราฟินซึมเข้าไปได้เต็มที่ทุกส่วนของชิ้นเนื้อ

7. นำชิ้นเนื้อที่ได้มาฝังในพาราฟิน (embedding) โดยจัดชิ้นเนื้อตัวอย่างให้อยู่ในตำแหน่งที่ต้องการภาย block แล้วเทพาราฟินทับชิ้นเนื้อให้มิด ปล่อยทิ้งไว้ให้เย็นเมื่อพาราฟินแข็งตัวแล้วจึงแกะออกจาก block

8. นำ block พาราฟินที่มีชิ้นเนื้อตัวอย่างมาแต่งหน้า block ให้เรียบ แล้วตัดหน้า block ให้เป็นรูปสี่เหลี่ยมคางหมูก่อน แล้วนำไปตัดด้วย microtome โดยใช้ใบมีดเหล็กกล้า ให้ section แต่ละแผ่นมีความหนา 1-20 μm (ขึ้นอยู่กันชนิดของตัวอย่าง)

9. นำ section ที่ได้มาลอยในหม้อน้ำที่ปรับอุณหภูมิไว้ต่ำกว่าจุดหลอมเหลวของพาราฟินเล็กน้อย (ประมาณ 45-50 C°) ปล่อยให้ section ยืดตัวเต็มที่ เอาสไลด์ที่ทาด้วย adhesive จุ่มลงไปในน้ำแล้วช้อน section ติดสไลด์ขึ้นมา จัดตำแหน่ง section ให้เหมาะสม ปล่อยทิ้งไว้ให้แห้ง หรืออาจจะผสม adhesive ลงไปในน้ำลอย section เลยก็ได้ adhesive ที่ใช้มีหลายชนิดเช่น Mayer's egg albumin โดยใช้ไข่ขาว 50 มล. ผสมกับ Glycerin 50 มล. แล้วกรองผ่านกระดาษกรองหยาบๆ เติม Thymol 2-3 เกร็ดเพื่อป้องกันรา น้ำยานี้ควรเก็บในตู้เย็น

10. การย้อมสี (staining) ในการย้อมสีนี้ จะใช้สีร่วมกันระหว่าง Hematoxylin และ Eosin โดยมีขั้นตอนดังนี้

a. จุ่มสไลด์เนื้อเยื่อลงในน้ำประปา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

b. จุ่มใน Sodium thiosulphate (Hypo) 3 นาที

c. ล้างด้วยน้ำประปา 10 นาที

d. จุ่มในสี Hematoxylin 5-15 นาที

e. ล้างด้วยน้ำประปาจนน้ำไม่เปลี่ยนสี

f. จุ่มใน acid alcohol 3-4 ครั้ง จนมีสีชมพู

g. ล้างด้วยน้ำประปา

h. จุ่มลงในแอมโมเนียจนมีสีน้ำเงินเกิดขึ้น

i. ล้างด้วยน้ำประปา

j. หลังจากนั้นนำสไลด์ที่ได้มาย้อมสี Eosin ซ้ำโดยจุ่มเนื้อเยื่อใน Eosin นาน 2-15 นาที

11. หลังจากนั้นดึงน้ำออกอีกครั้งเพื่อให้สไลด์มีความคงทน โดยแช่ใน alcohol 80% 1 ครั้ง 95% ครั้ง 100% 3 ครั้ง แต่ละครั้งนาน 2 นาที

12. นำเนื้อเยื่อที่ดึงน้ำออกแล้วมาแช่ใน clearing reagent อีก 3 ครั้งๆละ 2 นาที เพื่อทำให้เนื้อเยื่อใส

13. นำสไลด์เนื้อเยื่อที่ได้ มาหยดด้วย permount แล้วปิดด้วย cover slip (ระวังอย่าให้มีฟองอากาศอยู่ใต้ cover slip แล้วปล่อยให้แห้ง ดังแสดงใน Figure 3.3

แผนผังขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างและการทำสไลด์

ตัดแบ่งลำไส้แต่ละส่วนแล้วล้างทำความสะอาดภายในท่อลำไส้ด้วยน้ำกลั่น

ตัดแต่งลำไส้ให้เป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า ขนาดประมาณ 1*2 ซม.

เก็บตัวอย่างไว้ในน้ำยาคงสภาพ (Bouin's solution)

ล้างน้ำยารักษาสภาพออก และ dehydrate เนื้อเยื่อในตลับ ด้วยแอลกอฮอล์ความเข้มข้นต่างๆ นาน 12 ชั่วโมง

ตัดชิ้นส่วนเนื้อเยื่อให้มีขนาดประมาณ 1 x 2 x 0.5 ซม. แล้วนำใส่ในตลับ

ทำการ embedding ด้วยเครื่อง embedding

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

↓

เทเจลาตินลงในตลับ แล้วนำไปผ่านน้ำแข็งให้ตลับแข็ง

↓

ตัดทำ section ด้วยเครื่อง rotary microtome ให้มีความหนาประมาณ 5 ไมครอน

↓

นำเนื้อเยื่อที่ตัดได้ติดลงบนแผ่นสไลด์ นำไปวางลงบน hot plate (55-60 ^{o}C) 24 ชม.

↓

ย้อมสี Hematoxylene และ Eosin

↓

ทำการ mounting (หยด permount) และปิดด้วยแก้วปิดสไลด์ ทิ้งให้แห้ง 1 คืน

↓

นำไปหาค่าความยาวของวิลไลด้วยกล้องจุลทรรศน์

3.3.2 การวัดความสูงและพื้นที่ผิววิลไล

หลังจากที่เตรียมตัวอย่าง และย้อมสีเรียบร้อยแล้ว เตรียมเครื่องมือในการวัดโดยใช้ stage micrometer มาปรับค่าเริ่มต้นสำหรับอ้างอิงในการวัด ในการวัดจะใช้กล้องจุลทรรศน์ ชนิดเลนส์ประกอบ (compound light microscope) (Olympia CH-30) ซึ่งจะสามารถบันทึกภาพได้ เมื่อเก็บตัวอย่างภาพบันทึกของวิลไลแล้ว นำภาพวิลไลที่ได้มาวัดความสูง จากส่วนฐานเริ่มจาก crypte ไปยังยอดของวิลไล ทำการวัดความสูงของวิลไลในแต่ละส่วนของลำไส้ ส่วนต้น ส่วนกลาง และส่วนปลาย จำนวน 30 ตัวอย่างในแต่ละส่วน และพื้นที่ของวิลไลจะวัดโดยลากเส้นรอบวิลไลแต่ละอัน แล้ววัดค่าด้วยด้วยโปรแกรม Adobe Acrobat เวอร์ชั่น 6.0 ซึ่งจะใช้ ภาพของ stage micrometer ที่บันทึกที่กำลังขยายเท่ากับภาพบันทึกของวิลไล เป็นค่าอ้างอิงในการวัด ดังแสดงใน Figure 3.2

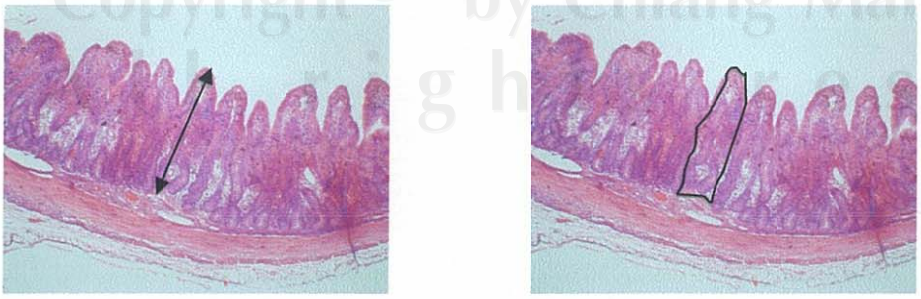

Figure 3.2 Determination of villi height and villi surface area.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3.3 การชั่งน้ำหนักสุกร

การชั่งน้ำหนักสุกรจะใช้กรงและเครื่องชั่งแบบสปริง ขนาด 60 กก. ทศนิยม 1 ตำแหน่ง ทำการชั่งรายตัวตั้งแต่เริ่มต้นการทดลองและทุกๆ ปลายสัปดาห์จนสิ้นสุดการทดลอง

3.3.4 การบันทึกอาหารที่กิน

ทำการบันทึกปริมาณอาหารที่ให้สุกรทุกกรงกินได้ในแต่ละวัน และชั่งอาหารที่เหลือจากถังพลาสติก โดยใช้เครื่องชั่งแบบสปริง ขนาด 7 กก. ทศนิยม 1 ตำแหน่ง สำหรับการคำนวณปริมาณอาหารที่กินในแต่ละวัน แสดงดังสูตรต่อไปนี้

ค่าเฉลี่ย กก. อาหารที่สุกรกิน/วัน/ตัว = (กก. อาหารที่ให้ต่อวัน – กก. อาหารที่เหลือต่อวัน) / จำนวนสุกรในกรง (4 ตัว)

3.3.5 การเก็บตัวอย่างอาหารเพื่อการวิเคราะห์

สุ่มเก็บตัวอย่างอาหารทุกครั้งที่มีการผสมอาหารใหม่โดยสุ่มจากถุงอาหารแต่ละสูตร นำอาหารที่เก็บได้แต่ละครั้งมาผสมรวมกันแล้วนำไปบดด้วยเครื่องบดอาหารผ่านตะแกรงขนาด 1 มม. จากนั้นนำตัวอย่างอาหารที่บดผ่านตะแกรงและไม่ผ่านตะแกรงมาผสมรวมกันเพื่อนำไปวิเคราะห์ทางเคมีหาปริมาณวัตถุแห้ง โปรตีนโดยรวม เยื่อใยโดยรวม ไขมันโดยรวม และ เถ้า

3.4 การวิเคราะห์ตัวอย่างกากถั่วเหลืองหมัก

3.4.1 การวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสโดยรวม (Kim, 1998; ไพโรจน์, 2550)

1. ชั่งตัวอย่าง 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 50 มล. ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง
2. ดูดสารละลายที่ได้ 250 µl เติมด้วย 250 µl 10% กรดอะซีติก
3. เติม color reagent 2 มล. (เตรียมจาก น้ำ : 6N H_2SO_4 : ammonium molybdate : 10% ascorbic acid ในสัดส่วน 2 : 1 : 1 : 1 และเตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนใช้)
4. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 C ° เป็นเวลา 30 นาที
5. หลังจากนั้น นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 820 นาโนเมตร
6. คำนวณหาปริมาณฟอสฟอรัสโดยรวม เทียบกับสารละลายฟอสฟอรัสมาตรฐาน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

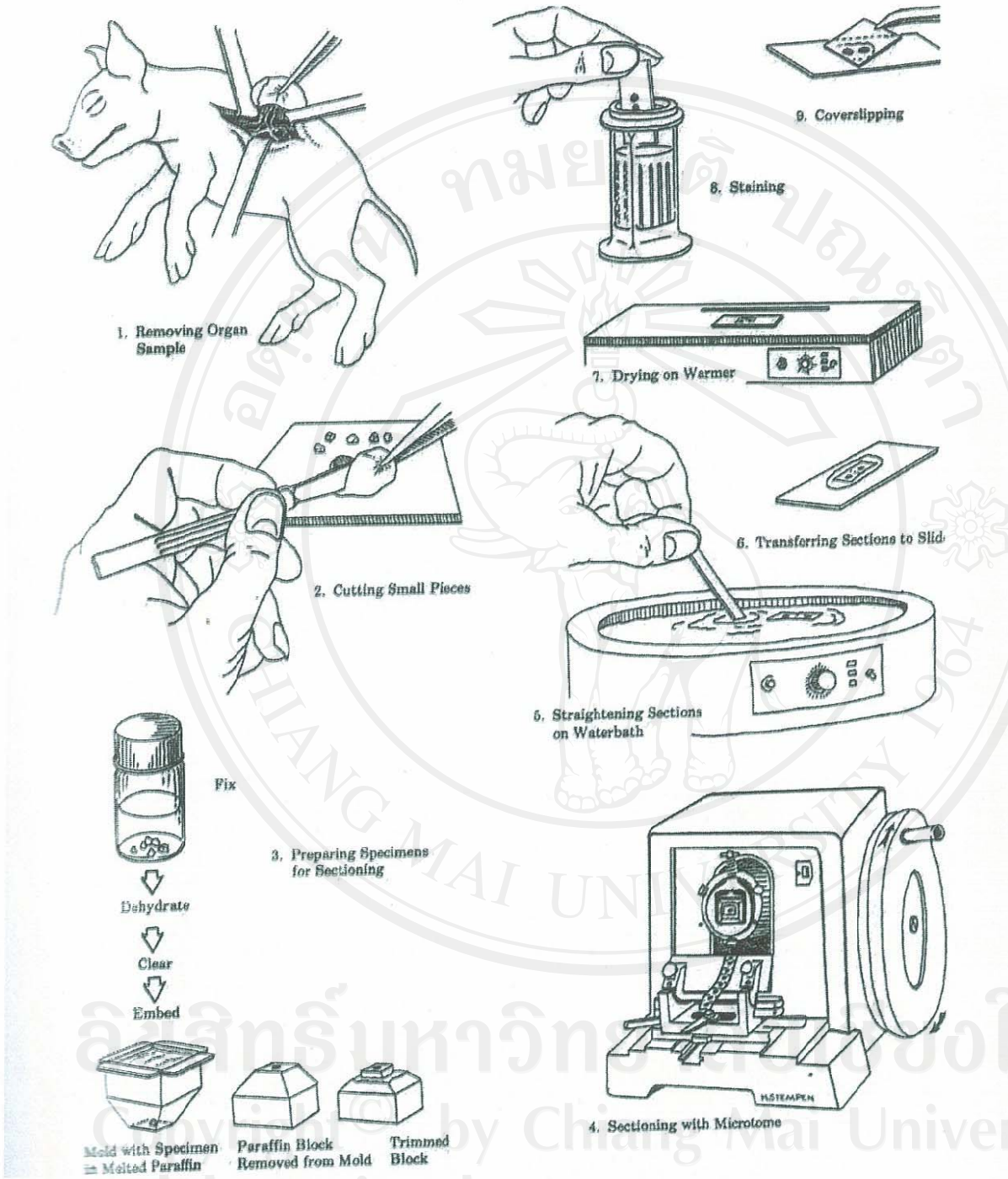

Figure 3.3 Preparation of section for light microscope (Junqueira and Carneiro, 1980).

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4.2 การวิเคราะห์กรดอะมิโนในตัวอย่างกากถั่วเหลืองหมัก (ส่งตัวอย่างวิเคราะห์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล)

การเตรียมตัวอย่าง (Hydrolysis and derivatization)

1. ชั่งตัวอย่างประมาณ 100 มิลลิกรัม ละลายใน กรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 6 N ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วตั้งในที่มีอุณหภูมิ 110 C° เป็นเวลา 22 ชั่วโมง
2. เติม Internal standard และเจือจางด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์
3. กรองสารตัวอย่างด้วย AccQ-fluor deriation buffer และ AccQ-fluor reagent
4. ให้ความร้อนตัวอย่างสารละลาย ที่อุณหภูมิ 55 C° เป็นเวลา 10 นาที

การวิเคราะห์ตัวอย่าง

HPLC System : Waters Alliance 2695 with heater
2475 Multi λ fluorescence Detector (EX:250, EM: 395 nm)

Column : AccQ-Tag column (3.9*150 mm particle size 4 μm)
Control Temp.37 ± 1C°

Sample volume : 5 ul

Eluents : AccQ-Tag eluent A 60 % acetonitrile

3.4.3 การวิเคราะห์หา Trypsin Inhibitor (Emily et al., 1998)

หลักการ

Trypsin inhibitor จะถูกสกัดออกจากตัวอย่างที่ pH 9.5 และทำปฏิกิริยากับ Bovine trypsin Trypsin ที่เหลือจะถูกวัดโดยให้ทำปฏิกิริยากับ BAPNA substrate ภายใต้สภาพที่กำหนด จะได้ p-nitroaniline หลังจากนั้นวัดปริมาณของ p-nitroaniline ที่เกิดขึ้น ด้วย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร หลังจากนั้นคำนวณหาค่า Pure trypsin inhibitor ต่อหน่วยน้ำหนักตัวอย่าง

วิธีการ

1. สารละลายสำหรับ Trypsin มาตรฐาน

ละลาย Crystalline bovine trypsin 4mg. ใน volumetric flask ขนาด 200 มิลลิลิตร เติม 1mM HCl ให้ครบ 200 มิลลิลิตร เก็บในตู้เย็นที่ 4 C° ใช้ให้หมดภายใน 2 สัปดาห์ เมื่อนำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารละลาย 2 มล. ไปวัดค่า absorbance จะได้ค่าการดูดกลืนแสง 0.410 ± 0.010 (หลังจากหักค่า Reagent blank ออกแล้ว)

2. เตรียม Tris buffer

ละลาย Tris (hydroxyl methyl methylamine 6.50 กรัม) และ $CaCl_2,2H_2O$ 2.94 กรัมในน้ำ 900 มล. (Deionized water) ปรับ pH ให้เป็น 8.2 ด้วย HCl เติมน้ำให้ครบ 1 ลิตร แล้วตรวจสอบ pH อีกครั้งให้ได้ pH 8.2

3. เตรียม BAPNA substrate

ละลาย 40 มก. Benzoyl-DL-arginine-p-nitroaniline HCl ใน 1 มล. Dimethyl sulphoxide (ละลายจนหมด) แล้วเติม 100 มล. Tris buffer ที่ได้อุ่นไว้แล้วที่อุณหภูมิ 37 C° รักษาอุณหภูมิของสารละลายนี้ไว้ที่ 37 C° ตลอดเวลาที่ใช้และต้องเตรียมใหม่ทุกวัน

4. การสกัด Trypsin ในตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ

4.1 บดตัวอย่างผ่านตะแกรง 100 mesh

4.2 ชั่งตัวอย่างมา 1 กรัม ละลายใน 10 mM NaOH 50 มล.

4.3 ปั่น 30 วินาที

4.4 ปรับ pH ให้อยู่ระหว่าง 9.4-9.6 ด้วย (1M NaOH หรือ 1M HCl)

4.5 ปั่น 2 นาที

4.6 ปิเปต Suspension ออกมา 1 มล.

4.7 เจือจางด้วยน้ำกลั่น 100 เท่า (กรณีที่เป็นถั่วเหลืองดิบ) 25 เท่า (กรณีที่เป็นถั่วเหลืองสุกปานกลาง) 5 เท่า (กรณีที่เป็นอาหารผสมถั่วเหลือง)

5. การวัดปริมาณ Trypsin

5.1 เตรียมสารต่อไปนี้

หลอด a reagent blank	: 2 มล.
หลอด b Trypsin standard	: 2 มล.หtandard + 2มล.น้ำกลั่น
หลอด c sample blank	:1 มล. ทiluted sample extract+ น้ำ 1 มล.
หลอด d sample	:2 มล. Extract + 1.0 มล. น้ำกลั่น + 2.0 มล. หtandard trypsin

5.2 ผสมสารละลายในแต่ละหลอดให้เข้ากัน อุ่นหลอดไว้ที่ 37 C° เป็นเวลา 10 นาที เติม 5.0 มล สารละลาย BAPNA ที่อุ่นไว้ที่ 37 C° ลงในทุกหลอด ผสมให้เข้ากันอุ่น 37 C° อีกครั้ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เมื่อครบ 10นาทีพอดี เติม 1.0 Acetic acid (30% w/v) เพื่อหยุดปฏิกิริยา เติม standard trypsin ลงในหลอด a และ c หลอดละ 2.0 มล.

5.3 ปรับ spectrophotometer ให้เป็น 0 (absorbance) ด้วยน้ำกลั่น อ่านค่าแต่ละหลอด (a-d) ที่ 410 นาโนเมตร

5.4 คำนวณ % TIA = $\frac{[(b-a)-(d-c)] \times 2.632 \times A}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}}$

A = ค่า dilution factor เช่น 100 25 หรือ 5

3.4.4 การวิเคราะห์หาสารพิษจากเชื้อรา (Aflatoxin) (Ridascreen®)

การวิเคราะห์หาปริมาณสารพิษ Aflatoxin อาศัยชุดทดสอบสำเร็จรูป ที่ใช้หลักการของ ELISA test kit (r-biopharm AG Darmstacdt Germeny)

การเตรียมตัวอย่าง

ตัวอย่างที่จะนำมาหาปริมาณสารพิษจะผ่านการบดด้วยตะแกรงขนาด 2 มม. ตัวอย่างจะถูกละลายใน 70% (v/v) methanol จำนวน 100 มล. และเขย่าอย่างแรงเป็นเวลา 2 นาที แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 สารละลายใสที่ได้ เก็บที่อุณหภูมิ 4 C° เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

การวิเคราะห์หาปริมาณ Aflatoxin ในตัวอย่างโดยวิธี ELISA test kit

1. เติมสารละลายตัวอย่าง 100 µl ต่อหลุม และสารละลายมาตรฐาน (0 2 5 10 และ 25 ppb) 100 µl ต่อหลุม ลงในplate ที่ผ่านการเคลือบด้วย antibody

2. เติม OTA conjugate enzyme 100 µlต่อหลุม แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที

3. หลังจากนั้นล้าง plate ด้วยน้ำกลั่น 150 µl ต่อหลุม 5 ครั้ง และเติม สารละลายsubstrate 100 µl ต่อหลุม ทิ้งไว้ในที่มืด และมีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที

4. เติมสารละลาย stopping 100 µl ต่อหลุม แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 nm ด้วย ELISA reader

5. นำค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานที่ได้มาเขียนกราฟ เพื่อใช้ในการคำนวณหาปริมาณของสารละลายตัวอย่าง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4.5 การวิเคราะห์หาการย่อยได้ของกากถั่วเหลืองหมักโดยวิธี *In vitro* digestibility

วิเคราะห์การย่อยได้โดยวิธี *In vitro* digestibility (Fuller, 1991) ของ dry matter crude protein crude fiber และ ether extract (AOAC. 1996) จากตัวอย่าง กากถั่วเหลืองปกติ กากถั่วเหลืองหมักนำเข้าและ กากถั่วเหลืองหมัก

สารเคมี

0.1 M HCL

0.1 M Phossphate buffer, pH 6.0

0.2 M Phosphate buffer, pH 6.8

0.6 M NaOH

1 M HCl

1 M NaOH

20% (w/v) sulphosalicylic acid

ละลาย sulphosalicylic acid 50 กรัม ในน้ำกลั่น 240 มล. แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 250 มล. ด้วย volumetric flask.

chloramphenicol solution (0.5 g/100 ml ethanol)

ละลาย choramphenicol 0.5 กรัมด้วย ethanol 80 มล. แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 มล. ด้วย volumetric flask.

pancreatin solution (50 mg/ml) (เตรียมก่อนใช้เสมอ)

ละลาย porcine pancreatin 2.5 กรัม ในน้ำกลั่น 45 มล. แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 50 มล. ด้วย volumetric flask.

pepsin solution (10 mg/ml)

ละลาย porcine pepsin 0.5 กรัมด้วยน้ำกลั่น 45 มล. แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 50 มล. ด้วย volumetric flask

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีการ

ขั้นตอนที่ 1

1. ชั่งตัวอย่างหนัก 1 กรัม (ตัวอย่างผ่านการบดผ่านตะแกรงขนาด 1มม.) ± 0.1 ม.ก. ใส่ลงใน conical flask

2. เตรียมแต่ละตัวอย่าง และblank จำนวน 3 ซ้ำ

3. เติม 0.1M. phosphate buffer, pH 6.0 จำนวน 25 มล. และค่อยๆเขย่าให้เข้ากัน

4. เติม 0.2 M HCl จำนวน 10 มล.แล้วปรับ pH ให้ได้ pH 2.0 ด้วย1M HCl (หรือ 1 N NaOH).

5. เติมสารละลาย porcine pepsin ที่มีความเข้มข้น 10 มก. ต่อ มล. 1 มล.

6. เติมสารละลาย chloramphenicol (0.5 กรัมต่อ ethanol 100 มล.) จำนวน 0.5 มล. เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

7. หลังจากนั้นปิด flask ด้วย cotton knob แล้วนำไปบ่มด้วย incubator shaker ที่ปรับอุณหภูมิที่ 39 C° ทิ้งไว้นาน 6 ชั่วโมง

ขั้นตอนที่ 2

1. เติม 0.2 M phosphate buffer, pH 6.8 จำนวน 10 มล. และ 0.6 M NaOH จำนวน 5 มล. เขย่าให้เข้ากัน

2. ปรับ pH ให้ได้ pH 6.8 ด้วย 1 M HCl หรือ1 N NaOH

3. เติมสารละลาย pancreatin ความเข้มข้น 50 มก.ต่อมล. จำนวน 1 มล. (เตรียมเมื่อใช้)

4. หลังจากนั้นปิด flask ด้วย cotton knop แล้วนำไปบ่มใน incubator shaker ที่ตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 39 C° ทิ้งไว้ข้ามคือ หรือ 18 ชั่วโมง

5. เติมสารละลาย sulphosalicylic acid ความเข้มข้น 20% w/v จำนวน 5 มล. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที

6.เก็บตัวอย่างอาหารที่ไม่ถูกย่อยโดยการกรองผ่านกระดาษกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 12.5 ซม. (ชั่งน้ำหนักกระดาษกรองเริ่มต้น)

7.นำกระดาษกรองที่ได้ อบที่อุณหภูมิ 80C° คำนวณหาการย่อยได้ของวัตถุแห้งจาก ผลต่างของน้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น และน้ำหนักส่วนที่ไม่ถูกย่อย

8.หลังจากนั้นนำกระดาษกรองที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณ โปรตีนโดยรวม ไขมันโดยรวม เถ้า ที่เหลืออยู่ เพื่อคำนวณหาค่าการย่อยได้ต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4.6 การวิเคราะห์การย้อมสี Orange G (Dye binding) (Moran, 1983)

หลักการ

Orange G มีความจำเพาะต่อสภาพกรด เพื่อจับกับ free amino groups, Imidazole group Histidine หรือ Guanidyl group ของ Arginine เมื่อถั่วเหลืองได้รับความร้อนเพิ่มขึ้นการจับของ Orange G จะลดลง เนื่องจาก epsilon amino group ของ lysine ไปจับกับ reducing sugars เมื่อนำสารละลายไปวัดการดูดกลืนแสง จะมีค่าสูงขึ้น

วิธีการ

บดถั่วเหลืองผ่านตะแกรงขนาด 24 mesh ชั่งตัวอย่าง 1 มก. ใส่ใน erlenmeyer flask 250 ml. ใส่สารละลายสี (1 มก.ของ Orange/ น้ำกลั่น 1 มล. เติม Buffer ให้ได้ pH 2.2) ลงใน flask ด้วย calibrated 50 ml. automatic buret ที่อัตรา 1 มล./10 มก. ของตัวอย่าง (นน.แห้ง) จนถึงที่ 10 มล. เขย่าส่วนผสมทุก 5 นาที เป็นเวลา 1 ชั่งโมง แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman no. 1 ปิเปตของเหลวที่กรองมาได้ 1 มล. เจือจางเป็น 1: 100 ใน volumetric flask แล้วนำไปวัด optical density ที่ ความยาวคลื่น 470 นาโมเมตร

วิธีคำนวณ จำนวนสีย้อมที่ไม่ถูกจับในสารละลายคำนวณได้จากสมการ

$y = 0.019 + 2.216x$

y= ความเข้มข้นของ orange G (มก/มล.)

x= optical density ที่ 470 นาโนเมตร

r= 0.994

3.4.7 การวิเคราะห์ความเป็นกรด-ด่าง (AOAC., 1998)

วิธีการ

ชั่งตัวอย่างที่บดผ่านตะแกรงขนาด 1ม.ม. 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นบริสุทธ์ 30 มล. แล้ววัดด้วย pH meter ที่มีการปรับความถูกต้องเรียบร้อยแล้ว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.5 การวัดสมรรถภาพการผลิต

3.5.1 ปริมาณอาหารที่กินทั้งหมด (total feed intake, TFI)

ปริมาณอาหารที่กินได้ทั้งหมดคำนวณจากการวัดปริมาณอาหารที่กินตั้งแต่เริ่มการทดลองจนวันสุดท้ายของการทดลองของสุกรแต่ละซ้ำในแต่ละวัน (ดังแสดงในหัวข้อ 3.3.3) แล้วนำมารวมกัน

3.5.2 ปริมาณอาหารที่กินได้เฉลี่ยต่อวัน (average daily feed intake, ADFI)

คำนวณจากนำปริมาณอาหารที่กินได้ทั้งหมดของสุกรทั้งหมดหารด้วยจำนวนวันที่เลี้ยงและจำนวนสุกรที่อยู่ในแต่ละซ้ำ ดังแสดงต่อไปนี้

$$\text{ปริมาณอาหารที่กินเฉลี่ย (กก./วัน)} = \frac{\text{ปริมาณอาหารที่กินได้ทั้งหมด (กก.)}}{\text{จำนวนวันที่เลี้ยง(วัน) x จำนวนสุกร (ตัว)}}$$

3.5.3 การเพิ่มน้ำหนักตัวทั้งหมด (total weight gain, TWG)

การเพิ่มน้ำหนักตัวทั้งหมดคำนวณจากน้ำหนักที่บันทึกไว้ครั้งสุดท้ายของสุกร ลบออกด้วยน้ำหนักที่บันทึกครั้งแรก ดังแสดงต่อไปนี้

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

3.5.4 อัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน (average daily gain, ADG)

นำน้ำหนักที่บันทึกไว้ในครั้งสุดท้ายของการทดลองลบออกด้วยน้ำหนักที่บันทึกครั้งแรก ซึ่งก็คือน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นแล้วหารด้วยจำนวนวันที่เลี้ยง ดังแสดงต่อไปนี้

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

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.5.5 อัตราการแลกเนื้อ (feed conversion ratio, FCR)

รวมปริมาณอาหารที่บันทึกไว้ตั้งแต่เริ่มต้นจนสิ้นสุดการทดลองแล้วหารด้วยน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นจากการนำน้ำหนักที่บันทึกไว้ในครั้งสุดท้ายของสุกรลบออกด้วยน้ำหนักที่บันทึกไว้ครั้งแรก ดังแสดงต่อไปนี้

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

3.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวนตามแผนการทดลองและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี ANOVA ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS for Window version 11.

3.7 สถานที่ทำการวิจัย

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

3.8 ระยะเวลาการดำเนินการวิจัย

ระยะเวลาในการวิจัยรวมประมาณ 12 เดือน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved