บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. อุปกรณ์และเครื่องมือ

เครื่องมือ	โมเดล	บริษัท	ประเทศ
1. Balance (4 decimal)	2842	Sartorius GmBh	Germany
2. Beaker 50 ml.	No. 1000	Pyrex	USA.
3. Beaker 100 ml.	No. 1000	Pyrex	USA.
4. Beaker 500 ml.	No. 1005	Pyrex	USA.
5. Bucher Funnels	-	Haldewanger	
6. Centrifuge	Megafuge 1.0	Heraeus	Germany
7. Column	DB – Wax	J & W	USA.
8. Conduct – meter	WTW	-	Germany
9. Cylinder No. 10, 25 ml.	In 20 C	Witeg	Germany
10. Cylinder No. 50, 100 ml.	No. 3022	Pyrex	USA.
11. Desicator	GL 32	Glaswerk Wertheim	Germany
12. Distillation flask	-	Duran	-
13. Fat extraction thimble	No. 2800258	Whatman	England
14. Freezer	FC – 27	Sharp	Thailand
15. Gas chromatography	GC – 14 B	Shimadzu	Japan
16. Hot plate thermolyne	Cimarec 3	Northern chemical	Thailand
17. Instron	5565	-	England
18. Kjeldahl extraction	-	Gerhardt	Germany
19. Kjeldahl flask	-	Gerharde	Germany
20. Minolta chroma meter	CR – 300	-	Japan
21. Oven DEV	Heraeus	-	Germany

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

22. Polysealer	210E	Muster Mfg Co. Ltd.	Thailand
23. pH meter	191	Knick	Germany
24. Round bottom 100 ml.	-	Glaswerk Wertheim	Germany
25. Round bottom 250 ml.	-	Duran	Germany
26. Soxhlet extraction	–	Gerhardt	Germany
27. Spectrophotometer	DU 7500	Beckman	Germany
28. Suction pump	VDEO 530	W. Krannich	Germany
29. Titration	NW 2.5 mm	Brand	Germany
30. Tube No. 13 x 100 mm.	–	Pyrex	Germany
31. Volumetric flask 50 ml.	–	SCHOTT	Germany
32. Volumetric flask 100 ml.	–	SCHOTT	Germany
33. Volumetric flask 1,000 ml	–	SCHOTT	Germany
34. Vortex mixer	G – 560 E	Scientific industries, Inc	USA.
35. Water bath	–	W. Krannich	Germany
36. Webomatic	C 15 – HL	Food equipment	Germany
37. Whatman No. 1, 41	–	Whatman	England

2. สารเคมี

ชื่อสารเคมี	เกรด	ยี่ห้อ
1. Acetic monohydrate	Analytical Reagent	Merck
2. Anti – foaming agent	Analytical Reagent	Fluka
3. 20% Boron trifluoride in methanol	Analytical Reagent	Lab – scan
4. Calcium chloride	Analytical Reagent	Merck
5. Chloramine – T – reagent	Analytical Reagent	Merck
6. Chloroform	Analytical Reagent	Merck
7. Conc. Sulfuric acid	Analytical Reagent	Lab – scan
8. Dichloromethane	Analytical Reagent	Merck
9. 4 – dimethylaminobenzaldehyde	Analytical Reagent	Merck
10. Distillation water	Analytical Reagent	–
11. Ferric chloride	Analytical Reagent	Merck

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

12. Glacial acetic acid	Analytical Reagent	J.T. Baker
13. Hydrochloric acid	Analytical Reagent	Merck
14. Methanol	Analytical Reagent	Merck
15. Perchloric acid	Analytical Reagent	Merck
16. Petroleum ether	Analytical Reagent	Lab – scan
17. Potassium chloride	Analytical Reagent	Merck
18. 2 – Propanal	Analytical Reagent	Merck
19. Pure dry cholesterol	Analytical Reagent	Sigma
20. Sodium chloride	Analytical Reagent	Merck
21. Sodium hydroxide	Analytical Reagent	Merck
22. Sodium sulfate anhydrous	Analytical Reagent	J.T.Baker
23. Thiobarbituric acid	Analytical Reagent	BDH

3. สัตว์ทดลอง

ใช้ลูกโคนมเพศผู้ลูกผสมโฮลสไตน์ ที่มีสายเลือดของโฮลสไตน์ไม่ต่ำกว่าร้อยละ 75 อายุ 3 – 10 วัน น้ำหนักเฉลี่ย 37.25 kg จำนวน 20 ตัว ลูกโคทุกกลุ่มการทดลองได้รับนมน้ำเหลืองเป็นเวลา 3 – 7 วัน ก่อนทำการทดลองนำลูกโคเข้าคอกทดลองเพื่อให้ปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมเป็นเวลา 7 วัน ซึ่งในช่วงนี้ลูกโคทุกกลุ่มจะได้รับนมเทียมชนิดเดียวกัน จากนั้นจึงเริ่มให้อาหารทดลอง สำหรับลูกโคในกลุ่มที่ได้รับนมเทียมที่มีแป้งถั่วเหลือง 15% ในสัปดาห์ที่ 4, 6 และ 8 ของการทดลอง ก่อนที่จะเปลี่ยนอาหารจะได้รับนมเทียมเป็นเวลา 2, 4 และ 6 สัปดาห์ตามลำดับและลูกโคจะได้รับนมเทียมในรูปอาหารเหลวประมาณ 12% ของน้ำหนักตัวและน้ำสะอาดที่มีให้กินตลอดเวลา

4. อาหารทดลอง

4.1 นมเทียม (milk replacer) เป็นกลุ่มเปรียบเทียบ (control)

4.2 นมเทียมที่มีแป้งถั่วเหลือง 15%

4.3 นมเทียมในเชิงพาณิชย์ตรา Mamamate

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6. การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ Completely Random Design (CRD) (จรัญ, 2540) โดยใช้ลูกโคนมเพศผู้ลูกผสมโฮลสไตน์ ที่มีสายเลือดของโฮลสไตน์ไม่ต่ำกว่าร้อยละ 75 อายุประมาณ 7 วัน น้ำหนักเฉลี่ย 37.25 กิโลกรัม จำนวน 20 ตัว สุ่มแบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม ๆ ละ 4 ตัว เลี้ยงในกรงลูกโคแบบขังเดี่ยวและได้รับอาหารทดลองดังนี้

กลุ่มที่ 1 ได้รับนมเทียม (milk replacer) เป็นกลุ่มเปรียบเทียบ (control)

กลุ่มที่ 2 ได้รับนมเทียมที่มีแป้งถั่วเหลือง 15% ในสัปดาห์ที่ 4 ของการทดลอง

กลุ่มที่ 3 ได้รับนมเทียมที่มีแป้งถั่วเหลือง 15% ในสัปดาห์ที่ 6 ของการทดลอง

กลุ่มที่ 4 ได้รับนมเทียมที่มีแป้งถั่วเหลือง 15% ในสัปดาห์ที่ 8 ของการทดลอง

กลุ่มที่ 5 ได้รับนมเทียมในเชิงพาณิชย์ตรา Mamamate

7. การศึกษาด้านสมรรถภาพการผลิต

ทำการบันทึกน้ำหนักเริ่มต้น ชั่งน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นทุก 2 สัปดาห์ จนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง ข้อมูลที่ได้นำไปคำนวณหาปริมาณอาหารที่กินต่อวัน น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน อัตราการแลกน้ำหนัก ประสิทธิภาพการใช้อาหาร นำลูกโคเข้าฆ่าเพื่อศึกษาคุณภาพซากเมื่อลูกโคอายุได้ 120 วัน และสุ่มเก็บตัวอย่างนมมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

$$\text{อัตราการเจริญเติบโต (kg/d)} = \frac{\text{น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (kg)}}{\text{จำนวนวัน}}$$

$$\text{อัตราการแลกน้ำหนัก} = \frac{\text{น้ำหนักอาหารที่กิน (kg)}}{\text{น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น (kg)}}$$

$$\text{ประสิทธิภาพการใช้อาหาร (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักตัวที่เพิ่ม (kg)} \times 100}{\text{น้ำหนักอาหารที่กิน (kg)}}$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

8. การศึกษาด้านคุณภาพซาก

8.1 การนำลูกโคเข้าฆ่า

- นำลูกโคในแต่ละกลุ่มเข้าฆ่าที่ลูกโคอายุ 120 วัน
- ชั่งน้ำหนักมีชีวิต (live weight) โดยลูกโคอดอาหารมาแล้วอย่างน้อย 12 - 24 ชั่งโมง
- การคำนวณเปอร์เซ็นต์ซาก (dressing percentage) (สัญชัย, 2534)

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

$$\text{หรือเปอร์เซ็นต์ซาก} = \frac{\text{น้ำหนักซากเย็น} \times 100}{\text{น้ำหนักชีวิต}}$$

8.2 ศึกษาลักษณะซากบางประการ

- ชั่งน้ำหนักมีชีวิต น้ำหนักซากสดและน้ำหนักซากเย็น
- วัดความยาวซาก (carcass length) โดยวัดจากตำแหน่งซี่โครงซี่แรกถึงหัวกระดูก lumbar โดยใช้สายวัด
- วัดพื้นที่หน้าตัดเนื้อสัน (loin eye area) จากเนื้อสันนอกบริเวณตำแหน่งซี่โครงที่ 12 และ 13 โดยใช้กระดาษลอกลาย
- ชั่งน้ำหนักหัว หนัง แข้งหน้า แข้งหลัง หาง อวัยวะเพศ อวัยวะภายใน และเลือด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

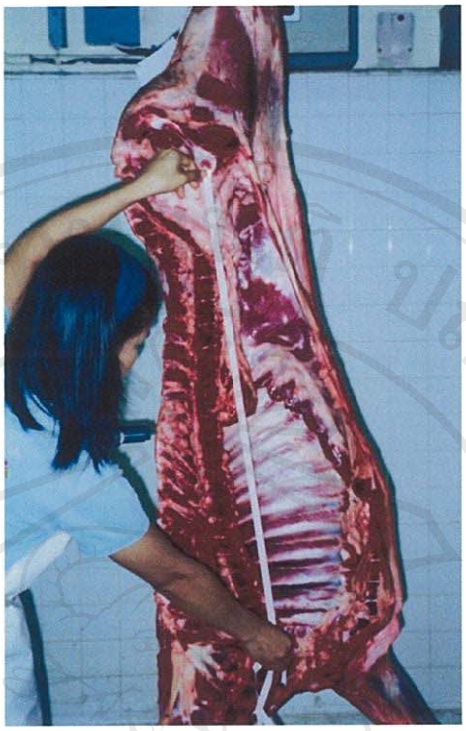

Figure 2 Carcass length measurement

Figure 3 Loin eye area measurement

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

8.3 ตัดแต่งซากลูกโคแบบไทย (thai style cutting) จากซากลูกโค (สัญชัย, 2534)

- แยกเนื้อสันในออก
- ตัดแยกขาหน้าออกจากลำตัว โดยเลาะตามรอยพับของขาหน้าออกจากซาก แล้วจึงเลาะเอาเนื้อต่าง ๆ ออกจากขาหน้า โดยค่อย ๆ เซาะเอาเนื้อน่องออกจากกระดูก radius ulna และกระดูก humerus และเนื้อแดงส่วนอื่นออกจากกระดูก scapula และเลาะเอาเนื้อเสือร้องไห้ออกมา
- ตัดแยกขาหลังออกจากลำตัวตามแนวกระดูก lumbar vertebrae ข้อสุดท้ายและปาดตามรอยพับของขาหลัง จากนั้นเซาะเอาเนื้อสะโพกออกจากกระดูก pelvis และกระดูก femur และเซาะเอาเนื้อน่องออกจากกระดูก tibia fimula
- เซาะเนื้อสันนอกออกจากใต้กระดูกสันหลัง แล้วค่อย ๆ เลาะเอากระดูกซี่โครงออกทีละซี่จนหมด แล้วตัดเนื้อใต้ซี่โครงออก
- จากนั้นทำการตัดแต่งเนื้อที่ได้เป็นเนื้อแดง เศษเนื้อ เอ็นพังผืด และไขมัน

8.4 ตัดแต่งซากลูกโคแบบสากลจากซากลูกโค (สัญชัย, 2534)

- เลาะไตและไขมันหุ้มไตออก
- ตัดผ่าระหว่างซี่โครงที่ 12 และ 13 ได้เป็นส่วนหน้า (fore quarter) และส่วนหลัง (hind quarter)
- การตัดแต่งชิ้นส่วนหน้า (fore quarter) แบ่งออกเป็น 4 ชิ้นส่วนย่อยคือ พื้นอก (breast) ขาหน้า (shank) ไหล่ (chuck) และสันหลัง (rack) โดยใช้เลื่อยตัดห่างจากกระดูกสันหลังประมาณ 6 นิ้ว ขนานไปกับแนวกระดูกสันหลังจะได้ส่วนพื้นอกติดกับส่วนของขาหน้า ส่วนของไหล่ติดกับส่วนของสันหลัง ในส่วนของพื้นอกที่ติดกับส่วนของขาหน้าใช้มีดเลาะตามแนวของขาหน้า ส่วนของไหล่ติดกับส่วนของสันหลังตัดแบ่งระหว่างซี่โครงที่ 5 และ 6
- การตัดแต่งชิ้นส่วนหลัง (hind quarter) แบ่งออกได้เป็น 3 ชิ้นส่วนย่อย คือ ขาสะโพก (long leg) พื้นท้อง (flank) และสันสะเอว (short loin) โดยใช้มีดปาดข้างขาสะโพกขนานไปกับแนวกระดูกสันหลังจนพบกระดูกซี่โครงที่ 13 จากนั้นใช้เลื่อยตัดจะได้ส่วนของพื้นท้อง ในส่วนของขาสะโพกกับสันสะเอว ใช้เลื่อยตัดให้ห่างจากหัวกระดูก lumbar ประมาณ 1.5 - 2 นิ้ว ตั้งฉากกับส่วนของขาหลัง จะได้ส่วนของขาสะโพกกับสันสะเอว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

9. การศึกษาด้านคุณภาพเนื้อ

9.1 การวัดค่าความเป็นกรดด่างของกล้ามเนื้อ (muscle pH measurement)

วัดค่าความเป็นกรดเป็นด่างด้วยเครื่อง pH – meter (Model 191, Knick, D – Berlin) ที่ 45 นาที และ 24 ชั่วโมงหลังฆ่า 2 ตำแหน่ง ได้แก่ กล้ามเนื้อสันนอก (*longissimus dorsi*) ระหว่างซี่โครงที่ 12 และ 13 และบริเวณสะโพก (semimembranosus) โดยแทงลึกลงเหนือกระดูก lumbar 2 นิ้ว ลึกประมาณ 3 - 5 เซนติเมตร

Figure 4 pH measurement at semimembranosus

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Figure 5 Conductivity measurement at *longissimus dorsi*

9.2 การวัดค่าการนำไฟฟ้า (conductivity measurement)

วัดค่าการนำไฟฟ้าด้วยเครื่อง conductivity – meter (Model WTW) ที่ 45 นาที และ 24 ชั่วโมงหลังฆ่า 2 ตำแหน่ง ได้แก่ กล้ามเนื้อสันนอก (*longissimus dorsi*) ระหว่างซี่โครงที่ 12 และ 13 และบริเวณสะโพก (semimembranosus) เช่นเดียวกับการวัดค่าความเป็นกรดเป็นด่าง

9.3 การวัดค่าความสามารถในการอุ้มน้ำของเนื้อ (water holding capacity)

9.3.1 การสูญเสียน้ำขณะเก็บ (drip loss)

โดยการเก็บตัวอย่างจากเนื้อสันนอกขนาด 2.5 เซนติเมตร ทำการตัดแต่งเนื้อเยื่อไขมันออก ชั่งน้ำหนักก่อน (W_1) แล้วบรรจุในถุงพลาสติก ปิดปากถุงให้สนิทกันอากาศเข้าออก (sealed) แล้วใช้ขอเกี่ยวไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4^0C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำเนื้อออกจากถุง ซับของเหลวที่ติดมากับเนื้อออก แล้วชั่งน้ำหนัก (W_2) และคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การสูญเสียก่อนและหลังการแช่เย็น (สัญชัย, 2543)

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

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

9.3.2 ค่าการสูญเสียน้ำเนื่องจากการทำละลาย (thawing loss)

โดยการนำเนื้อสันนอกที่ผ่านการแช่แข็งที่ –18^{0}C มาไว้ในตู้เย็น ที่มีอุณหภูมิ 4^{0}C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักก่อนแช่แข็ง (W_1) และภายหลังการแช่แข็ง (W_2) แล้วคิดเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์การสูญเสีย

$$\% \text{ thawing loss} = \frac{W_1 - W_2}{W_1} \times 100$$

9.3.3 ค่าการสูญเสียน้ำเนื่องจากการปรุงอาหาร (cooking loss)

นำเนื้อตัวอย่างจากการทำ thawing loss มาชั่งน้ำหนักก่อน (W_1) แล้วนำเนื้อตัวอย่างไปวัดอุณหภูมิเนื้อ โดยใช้เข็มวัดอุณหภูมิเริ่มต้น แล้วบรรจุในถุง vacuum ก่อนที่จะนำไปต้ม ใช้แท่งเหล็กที่วัดอุณหภูมิเนื้อเสียบไว้กับเนื้อ นำไปต้มในเครื่องอบไอน้ำความดัน ตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 80^{0}C จับเวลาในการทำให้เนื้อมีอุณหภูมิใจกลาง 72^{0}C จากนั้นนำเนื้อออก ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วชั่งน้ำหนัก (W_2) คิดเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์การสูญเสีย ส่วนเนื้อตัวอย่างนำบรรจุถุงพลาสติก เพื่อนำไปใช้ในการวัดค่าแรงตัดผ่าน (shear values) ต่อไป

$$\% \text{ cooking loss} = \frac{W_1 - W_2}{W_1} \times 100$$

9.4 ค่าแรงตัดผ่านเนื้อ (shear values)

นำเนื้อตัวอย่างที่ผ่านการทำ cooking loss มาเจาะด้วยหัวเจาะ (core) ตามแนวเส้นใยกล้ามเนื้อด้วยเหล็กกลวงชนิดกลม (core) ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1 เซนติเมตร แล้ววัดค่าแรงตัดผ่านเนื้อด้วยเครื่อง TA.XT.plus Texture Analyser ด้วยใบมีด หัววัดกำลัง 5KN (Warner Bratzler Shear) ด้วยความเร็ว 10 mm./sec (สัญชัย, 2543)

9.5 การวัดค่าสีของเนื้อ (color measurement)

ใช้เนื้อตัวอย่างจากเนื้อสันนอก ใส่ถุงพลาสติกผนึกปากถุงเก็บที่ 4^{0}C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำเนื้อออกจากถุงวางในภาชนะเปิดเก็บในตู้เย็น 1 ชั่วโมง ทำการวัดค่าสีด้วยเครื่อง Minolta Chroma Meter (CR – 300, Osaka) บันทึกค่าเฉลี่ย L* (ความสว่าง), a* (แดง - เขียว) และ b* (เหลือง – น้ำเงิน)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

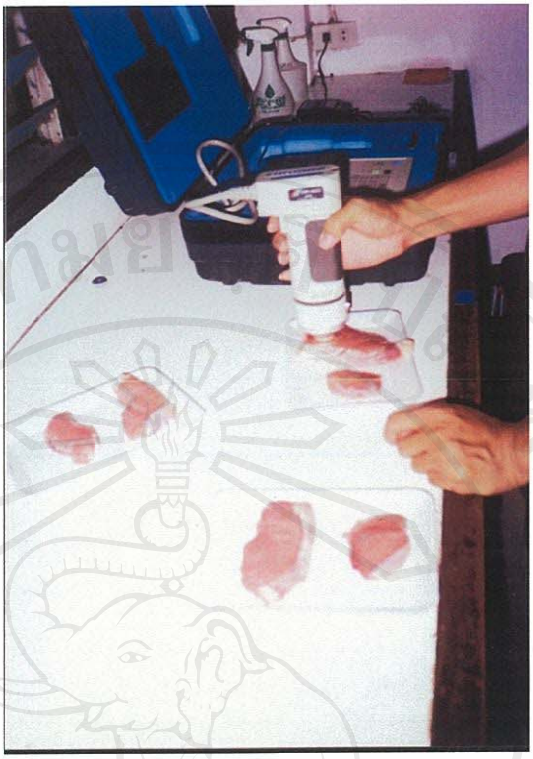

Figure 6 Colour measurement of veal chop

9.6 การทดสอบทางประสาทสัมผัส (panel test)

ใช้เนื้อสันนอกขนาด 2.5 เซนติเมตร ทำการตัดแต่งเนื้อเยื่อไขมันออก ชั่งน้ำหนัก (W_1) แล้วนำไปอบด้วยเตาอบไฟฟ้า (convection oven) ที่อุณหภูมิ 250^{0}C กำลังไฟ 400 W วัดอุณหภูมิก่อนและหลังอบ เมื่ออุณหภูมิใจกลางเนื้อได้ 72^0 C แล้วนำมาชั่งน้ำหนักอีกครั้ง (W_2) เพื่อหาเปอร์เซ็นต์การสูญเสียระหว่างการย่าง (grilling loss)

$$\% \text{ grilling loss} = \frac{W_1 - W_2}{W_1} \times 100$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากนั้นนำเนื้อที่ได้มาตัดให้มีขนาด 1.5 x 1.5 เซนติเมตร นำใส่ในจานพลาสติกสำหรับการตรวจชิม ซึ่งมีขั้นตอน ดังนี้

1. ในการทดสอบชิมแต่ละครั้งจะต้องเตรียมความพร้อมทั้งพื้นที่ในการตรวจชิมวางแผนการจัดห้อง ที่นั่งแต่ละท่าน แสงไฟในห้องตรวจชิม อุปกรณ์ในการทดสอบชิม น้ำดื่มและช่วงเวลาในการชิมควรจะเป็นเวลาเดียวกัน
2. ผู้ทดสอบชิมจะได้รับแบบฟอร์มในการให้คะแนนสำหรับการตรวจชิม ซึ่งประกอบด้วย ความนุ่ม ความชุ่มฉ่ำ รสชาติ และการยอมรับโดยรวม โดยมีคะแนนตั้งแต่ 1 – 9 ขึ้นอยู่กับความพอใจของผู้ทดสอบชิม
3. ก่อนทดสอบชิม ผู้ชิมจะต้องดื่มน้ำก่อน เพื่อเป็นการล้างปากทุกครั้งก่อนที่จะชิมตัวอย่างถัดไป จากนั้นจึงเริ่มให้คะแนนในแต่ละลักษณะ
4. ภายหลังการตรวจชิม ควรที่จะเตรียมน้ำดื่มและส้มเขียวหวานแก่ผู้ทดสอบชิม เพื่อเป็นการลดกลิ่นและล้างปากด้วย

9.7 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี (chemical composition)

นำเนื้อตัวอย่างบดด้วยเครื่อง blender เพื่อวิเคราะห์หาคุณค่าทางโภชนะด้านเปอร์เซ็นต์โปรตีน ไขมันและความชื้น ด้วยวิธี proximate analysis (AOAC, 1995) ดังนี้

9.7.1 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน (protein percentage)

1. ชั่งตัวอย่างเนื้อที่บดแล้ว 0.5 g ใส่ในกระดาษชั่งตัวอย่าง แล้วนำใส่ใน kjeldahl flask
2. เติมสารเร่งปฏิกิริยา 2 g (K_2SO_4 : $CuSo_4$; 20 : 1) แล้วเติม conc. sulfuric acid 15 ml.
3. นำ kjeldahl flask เข้าเครื่องย่อยที่อุณหภูมิ 420^{0}C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จนกระทั่งได้สารละลายสีเขียวใส แล้วทิ้งให้เย็น แล้วเติมน้ำกลั่น 50 ml. เขย่าให้เข้ากัน
4. ตวงสารละลาย 4% boric acid 25 ml. ใส่ erlenmeyer flask No. 250 ml. แล้วเติม screen methylred indicator
5. นำ kjeldahl flask เข้าเครื่องกลั่น แล้วนำขวด erlenmeyer flask ที่ใส่สารละลาย 4% boric acid ต่อเข้ากับอีกปลายของ condenser ของเครื่องกลั่น โดยให้ปลายท่อจุ่มในสารละลาย
6. เติม 40% sodium hydroxide ใส่ขวด kjeldahl flask 50 ml. แล้วเปิดน้ำให้ไหลผ่านตัว condensor แล้วจึงเปิดเครื่องกลั่น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

7. กลั่นจนได้ปริมาตรของสารละลายในขวด erlenmeyer flask ประมาณ 200 ml.
8. จากนั้นนำขวด erlenmeyer flask ที่มีแอมโมเนียที่เก็บในสารละลาย 4% boric acid มาไตเตรทกับสารละลายมาตรฐาน 0.1 *N* H_2SO_4 ไตรเตรทจนสีของสารละลายเปลี่ยนสีจากสีเขียวเป็นสีม่วงอมเทา

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

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

B = จำนวนปริมาตรของสารละลายมาตรฐาน H_2SO_4 0.1 *N* ที่ใช้ในการไตรเตรทกับ blank (ml.)

C = ความเข้มข้น (*N*) ของสารละลายมาตรฐาน H_2SO_4

D = น้ำหนักตัวอย่าง

E = kjeldahl factor (6.25)

9.7.2 การวิเคราะห์หาความชื้น (moisture percentage)

1. นำถ้วยสำหรับใส่ตัวอย่างวิเคราะห์หาความชื้น (weighting bottle) ที่ล้างสะอาดและเช็ดให้แห้ง อบในตู้อบ ที่อุณหภูมิ 100^{0}C นาน 1 ชั่วโมง และนำออกมาใส่ในโถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็นและชั่งน้ำหนัก
2. ชั่งตัวอย่างเนื้อที่บดละเอียดแล้วจำนวน 2 g ใส่ใน weighting bottle บันทึกน้ำหนักรวมทั้งหมด และอบที่อุณหภูมิ 100^{0}C 4 ชั่วโมง
3. นำถ้วยที่มีตัวอย่างออกจากตู้อบแห้ง ใส่ในโถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็น ชั่งน้ำหนักที่หายไป คือ ปริมาณความชื้น

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

A = น้ำหนักถ้วย + น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ

B = น้ำหนักถ้วย + น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ

C = น้ำหนักตัวอย่าง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

9.7.3 การวิเคราะห์หาปริมาณไขมัน (fat percentage)

1. ชั่งน้ำหนักเนื้อที่บดแล้ว 2 g อบที่ 100°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง
2. นำบีกเกอร์สำหรับหาไขมันที่ผ่านการล้างสะอาด เช็ดให้แห้ง แล้วอบ 100°C นาน 1 ชั่วโมง และใส่ในโถดูดความชื้น (desicator) ปล่อยให้เย็น ทำการชั่งหาน้ำหนักที่ได้
3. นำตัวอย่างเนื้อที่ผ่านการอบ หรือผ่านการหาความชื้นแล้วใส่ใน thimble alundum ที่สะอาดและแห้ง
4. ใส่ thimble alundum ลงใน sample containers แล้วต่อเข้ากับ holding clips ของเครื่องสกัดไขมันแบบ soxhlet extraction
5. ใส่ dichloromethane ลงในบีกเกอร์ 30 ml. แล้วนำต่อเข้ากับเครื่องให้สนิท
6. เปิดน้ำเย็นให้ไหลผ่าน condenser ตลอดเวลา
7. เปิดสวิทซ์ไฟโดยใช้ความร้อนสกัด 3 ชั่วโมง
8. นำ sample containers ออก แล้วนำ reclaming tube ใส่แทนที่ ให้ความร้อน dichloromethane จะถูกกลั่น และถูกเก็บใน reclaming tube ส่วนไขมันที่ได้จะอยู่ในบีกเกอร์
9. นำบีกเกอร์ที่มีไขมันอบที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำออกใส่ในโถดูดความชื้นปล่อยให้เย็น ชั่งน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นภายหลังการสกัดคือน้ำหนักของไขมัน

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

A = น้ำหนักบีกเกอร์ + น้ำหนักไขมันหลังอบแล้ว

B = น้ำหนักบีกเกอร์

C = น้ำหนัก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

10. การศึกษาคุณภาพไขมันในเนื้อ

10.1 ปริมาณกรดไขมัน (fatty acid profile; GC) (Folch *et al.*, 1957)

นำเนื้อตัวอย่างบดด้วยเครื่อง blender ทำการสกัดไขมันจากกล้ามเนื้อตัวอย่าง (Folch *et al.*, 1957) โดยมีวิธีการ ดังนี้

1. ชั่งตัวอย่างเนื้อที่บดแล้ว 5 g ใส่ลงในขวดก้นกลม (round bottom flask) ปริมาตร 100 ml.
2. เติม chloroform : methanol (2 : 1) 60 ml. 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. เก็บชั้นล่างของสารละลายใน flask ที่ทราบน้ำหนัก แล้วนำไประเหยแห้งด้วย water bath ที่อุณหภูมิ 70^{0}C
7. ชั่งน้ำหนักไขมันหลังจากระเหยแห้ง แล้วละลายด้วย chloroform ให้ได้ความเข้มข้นประมาณ 30 mg/ml.

การเตรียม FAME (Morrison and Smith, 1964)

1. ดูดสารละลายที่สกัดได้ 1 ml. ใส่ลงในขวดก้นกลม (round bottom flask) ขนาด 250 ml.
2. ระเหยให้แห้งภายใต้กระแสไนโตรเจน
3. เติม 0.5 M NaOH ใน methanol 4 ml. เขย่า 30 วินาที
4. Reflux จนได้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เวลาประมาณ 5 นาที ทิ้งให้เย็น
5. เติม 20% boron – trifluoride ใน methanol 5 ml. เขย่า 30 วินาที
6. Reflux ต่ออีก 2 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น
7. เติมสารละลาย NaCl อิ่มตัว 3 ml. เขย่าให้เข้ากัน
8. เติม Iso – octane (2, 2, 4 – trimethylpentane) 1 ml. เขย่าให้เข้ากัน 30 วินาที ทิ้งไว้ให้ตกตะกอน
9. เก็บส่วนที่ละลายในชั้น Iso – octane
10. นำสารละลายส่วนล่างเติมด้วยสารละลายเกลืออิ่มตัว (NaCl) 2 ml. เขย่าให้เข้ากัน
11. เติม Iso – octane 1 ml. เขย่าให้เข้ากัน 30 วินาที ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน
12. รวมชั้น Iso – octane ที่เก็บได้ แล้วเติม sodium sulfate anhydrous ปริมาณเท่าปลายช้อนตักสาร ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

13. ดูดสารละลายส่วนใสใส่ใน vial แล้วปิดให้สนิท
14. ดูดสารละลายที่ได้ 1 ไมโครลิตร ฉีดเข้าเครื่อง Gas chromatography (GC)

10.2 การวิเคราะห์หาปริมาณคอลเลสเตอรอล (Jung *et al.*, 1975)

1. ทำการสกัดไขมันจากกล้ามสันนอกที่บดแล้ว เช่นเดียวกับการวิเคราะห์หากรดไขมัน (Folch *et al.*, 1957)
2. ดูดไขมันที่สกัดได้ ความเข้มข้น 50 mg/ml. ปริมาตร 50 ไมโครลิตรใส่ในหลอดทดลองขนาด 25 ml.
3. เติม alcoholic KOH 10 ml.
4. ต้มใน water bath 45^{0}C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็น
5. เติม petroleum ether 5 ml. เขย่าให้เข้ากันด้วย vortex mixer
6. เทสารละลายทั้งหมดลงในกรวยแยก ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น
7. เก็บส่วนที่ละลายในชั้น petroleum ether แล้วนำไประเหยแห้งใน water bath 65^{0}C
8. เติม ferric acetate/uranyl acetate 5 ml. เขย่าอย่างแรงด้วยเครื่อง vortex mixer
9. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,700 รอบ/นาที นาน 5 นาที
10. เตรียมหลอดอ่านขนาด 13 x 100 mm. ชุดใหม่ แล้วเติม sulfuric acid reagent หลอดละ 2 ml.
11. ดูด supernate จากหลอดเดิม 3 ml. ใส่ในหลอดอ่านที่เติม sulfuric reagent
12. ผสมให้เข้ากันทันทีด้วย vortex mixer อย่างน้อย 20 วินาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที
13. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร โดยใช้หลอด blank อ่านค่าเป็นศูนย์

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

สูตรในการคำนวณหาปริมาณคอลเลสเตอรอล

$$\text{Total cholesterol} = \frac{Au}{As} \times 250$$

เมื่อ Au คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

As คือ ค่าดูดกลืนแสงของสารละลายคอลเลสเตอรอล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

10.3 การวิเคราะห์หาปริมาณไตรกลีเซอร์ไรด์ (Jung *et al.*, 1975)

1. สกัดไขมันตามวิธีของ Folch *et al.* (1957)
2. ทำไขมันที่สกัดได้ให้มีความเข้มข้น 50 mg/ml ด้วย Iso - propanal
3. ดูดไขมันในข้อ 2 มา 50 ul ใส่หลอดทดลองขนาด 25 ml
4. เติม N - Heptane 2 ml
5. เติม Iso - propanal 3.5 ml
6. เติม Sulfuric acid 40 mM จำนวน 1 ml
7. ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer 20 วินาที ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที จนแยกชั้น
8. เตรียมหลอดทดลองอีกชุด แล้วเติม sodium alkoxide 2 ml
9. ดูดสารละลายที่แยกชั้นส่วนบนในข้อ 7 มา 0.2 ml ใส่ในหลอดข้อ 8
10. ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer นำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 60^{0}C เป็นเวลา 5 นาที
11. นำออกมาเติม sodium periodate 1 ml
12. เติม acetyl acetone reagent 1 ml ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer นำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 60^{0}C เป็นเวลา 20 นาที
13. ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 420 nm

10.4 การวัดค่าการวิเคราะห์หาค่าการหืน thiobarbituric acid (TBA) (Rossel, 1994)

1. ชั่งตัวอย่างกล้ามสันนอกที่บดแล้ว 10 g เติมน้ำกลั่น 70 ml.
2. ปั่นใน Waring blender ประมาณ 15 นาที
3. เทใส่ใน distillation flask แล้วล้าง blender ด้วยน้ำกลั่น 30 ml.
4. เติม 4 M HCL 2.5 ml.
5. เติม anti – foaming agent 1 – 2 หยด
6. ต่อเข้ากับชุดกลั่น แล้วกลั่นจนได้ของเหลวประมาณ 50 ml.
7. ปิเปตสารละลายที่กลั่นได้ 5 ml. แล้วเติม TBA solution 5 ml.
8. ต้มในน้ำเดือด 35 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น 10 นาที
9. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 538 นาโนเมตร
10. คำนวณค่า TBA number จากสูตร

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

TBA number (mg malonaldehyde/kg sample) = 7.8 x O.D.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

11. การวิเคราะห์ทางสถิติ

เปรียบเทียบความแตกต่าง (Analysis of Variance) โดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test (จรัญ, 2540) โดยใช้โปรแกรม SAS/ for Windows 6.12 (SAS, 1996) และ adjusted ข้อมูลสมรรถภาพการผลิตและคุณภาพซากด้วยน้ำหนักเริ่มต้น

12. สถานที่ทำการวิจัย และรวบรวมข้อมูล

1. ฟาร์มโคนม สาขาโคนม-โคเนื้อ ภาควิชาเทคโนโลยีทางสัตว์ คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ตำบลหนองหาร อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่
2. ศูนย์ฝึกอบรมเทคโนโลยีเนื้อสัตว์แห่งชาติ (National Meat Technology and Training Center) ถนน ห้วยแก้ว ตำบลสุเทพ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่
3. ห้องปฏิบัติการภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
4. ห้องปฏิบัติการกลางคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
5. ห้องปฏิบัติการสถาบันราชภัฏเชียงใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved