บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วิธีการทดลอง

3.1.1 สัตว์ทดลองและแผนการทดลอง

ขุนกระบือเต็มวัยเพศผู้ (finishing mature buffalo) โดยนำกระบือปลักอายุเฉลี่ย 5 ปี เลี้ยงที่ศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์ อ.ลำพญากลาง จ.ลพบุรี จำนวน 20 ตัว โดยขังคอกละ 1 ตัว (ขนาดคอก กว้าง×ยาว เท่ากับ 3×4 เมตร) ด้วยเหตุที่กระบือชอบนอนและขับถ่ายบริเวณที่เปียกชื้นอีกทั้งเพื่อความสะอาดของคอกจึงแยกรางน้ำไว้บริเวณหลังคอกส่วนรางอาหารอยู่บริเวณหน้าคอก แบ่งเป็น 2 กลุ่มการทดลองตามสัดส่วนของอาหารหยาบต่ออาหารข้นที่แตกต่างกัน คือ

กระบือกลุ่มที่ 1 จำนวน 10 ตัว ได้รับอาหารหยาบ : อาหารข้น โดยน้ำหนักวัตถุแห้ง ร้อยละ 50:50 ขุนกระบือให้ได้น้ำหนักสุดท้ายเฉลี่ย 500 กิโลกรัม

กระบือกลุ่มที่ 2 จำนวน 10 ตัว ได้รับอาหารหยาบ : อาหารข้น โดยน้ำหนักวัตถุแห้ง ร้อยละ 30:70 ขุนกระบือให้ได้น้ำหนักสุดท้ายเฉลี่ย 500 กิโลกรัม

3.1.2 อาหารทดลอง

อาหารข้น

สูตรอาหารข้นที่ใช้เลี้ยงกระบือในโครงการวิจัยเพื่อพัฒนามาตรฐานการผลิตเนื้อกระบือคุณภาพดี แบ่งออกเป็น 3 ระยะตามน้ำหนักกระบือ ได้แก่ อาหารสำหรับกระบือน้ำหนัก 150-250, 251-350 และ 351-550 กิโลกรัม ซึ่งมีองค์ประกอบหลักดังตารางที่ 12 และองค์ประกอบทางเคมีดังตารางที่ 13 และ 14

อาหารหยาบ

แพงโกล่า (*Digitaria eriantha*) เป็นหญ้าชนิดหนึ่งที่กรมปศุสัตว์ โดยกองอาหารสัตว์ ได้ส่งเสริมให้เกษตรกรในหลายจังหวัดทางภาคเหนือปลูก ได้แก่ สุโขทัย กำแพงเพชร อุตรดิตถ์ พิษณุโลก แพร่ ลำปาง ลำพูน เชียงใหม่ เพื่อจำหน่ายและใช้เลี้ยงสัตว์ เป็นหญ้าที่ปลูกครั้งเดียว อยู่ได้หลายปีขยายพันธุ์โดยใช้ส่วนของลำต้น ขึ้นได้ในดินหลายชนิดโดยเฉพาะในดินนา ให้ผลผลิตสูงเมื่อตัดที่อายุ 40 วัน โดยให้ผลผลิตน้ำหนักแห้งประมาณ 800-1,200 กิโลกรัมต่อไร่ มีโปรตีน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เฉลี่ย 8 % ไขมัน 2.3 % เยื่อใย 29 % เถ้า 8.15 % คาร์โบไฮเดรต 46 % โภชนะย่อยได้ทั้งหมด (TDN) 59 % การปลูกโดยทำการเตรียมดิน เช่นเดียวกับการทำนาใช้ท่อนพันธุ์อายุ 40-60 วันหว่านอัตรา 200-300 กิโลกรัมต่อไร่ ใส่ปุ๋ยรองพื้นสูตร 16-20-0 ในอัตรา 60 กิโลกรัมต่อไร่ หลังจากหญ้าตั้งตัวได้ดีแล้วใส่ปุ๋ยไนโตรเจนในรูปของปุ๋ยยูเรียอัตรา 10 กิโลกรัมต่อไร่ จำนวน 3 ครั้ง พบว่าสามารถตัดหญ้านำมาทำเป็นหญ้าแห้งในช่วงฤดูแล้งได้ปีละ 4 ครั้ง (กรมปศุสัตว์, 2545)

Table 12 Feed formular of experimental diets in three periods

อาหารสูตร 7014 (น้ำหนัก 150 - 250 กิโลกรัม)		อาหารสูตร 7012 (น้ำหนัก 251 - 350 กิโลกรัม)		อาหารสูตร 7010 (น้ำหนัก 351 - 550 กิโลกรัม)	
วัตถุดิบ	**ปริมาณ (กก.)**	**วัตถุดิบ**	**ปริมาณ (กก.)**	**วัตถุดิบ**	**ปริมาณ (กก.)**
รำอ่อน	30.0	รำอ่อน	25.0	รำอ่อน	30.0
มันเส้น	30.0	มันเส้น	40.0	มันเส้น	40.0
กากถั่วเหลือง	4.0	กากถั่วเหลือง	10.0	กากถั่วเหลือง	5.0
กากปาล์ม	30.0	กากปาล์ม	20.0	กากปาล์ม	20.0
กากน้ำตาล	2.5	กากน้ำตาล	3.0	กากน้ำตาล	3.0
เกลือ	0.4	เกลือ	0.4	เกลือ	0.4
ไดแคลเซียม	1.0	ไดแคลเซียม	0.5	ไดแคลเซียม	0.5
ปุ๋ยยูเรีย	1.5	ผงฟู	0.5	ผงฟู	0.5
กำมะถัน	0.1	กำมะถัน	0.1	กำมะถัน	0.1
พรีมิกซ์	0.5	พรีมิกซ์	0.5	พรีมิกซ์	0.5
รวม	100.0	รวม	100.0	รวม	100.0

Table 13 Chemical composition of experimental diets in three periods and roughage (as fed basis)

chemical composition	**อาหารสูตร 7014 (น้ำหนัก 150 - 250 กิโลกรัม)**	**อาหารสูตร 7012 (น้ำหนัก 251 - 350 กิโลกรัม)**	**อาหารสูตร 7010 (น้ำหนัก 351 - 550 กิโลกรัม)**	**อาหารหยาบ หญ้าแพงโกล่า**
Moisture, %	9.27	10.88	10.80	9.86
Protein, %	15.88	10.30	9.43	9.46
Fat, %	8.35	5.12	6.35	1.51

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

Table 14 Fatty acid profile of experimental diets in three periods

Fatty acid	อาหารสูตร 7014	อาหารสูตร 7012	อาหารสูตร 7010
	น้ำหนัก 150 - 250 กิโลกรัม	น้ำหนัก 251 - 350 กิโลกรัม	น้ำหนัก 351 - 550 กิโลกรัม
C 8:0	0.345	0.173	0.086
C 10:0	0.734	0.367	0.183
C 12:0	14.457	7.229	3.614
C 14:0	4.496	2.248	1.124
C 15:0	0.010	0.005	0.003
C 16:0	18.844	9.422	4.711
C 16:1	0.147	0.073	0.037
C 17:0	0.046	0.023	0.012
C 17:1	0.012	0.006	0.003
C 18:0	2.076	1.038	0.519
C 18:1	31.017	15.509	7.754
C 18:2 n-6c	26.524	13.262	6.631
C 18:3 n-6	0.000	0.000	0.000
C 18:3n-3	0.196	0.098	0.049
C 20:0	0.360	0.180	0.090
C 20:1	0.718	0.359	0.179
C 20:3 n-6	0.018	0.009	0.004
Total SFA	41.368	20.684	10.342
Total MUFA	31.894	15.947	7.973
Total PUFA	26.738	13.369	6.685
PUFA : SFA	0.646	0.323	0.162
n-6 PUFA	26.542	13.271	6.635
n-3 PUFA	0.196	0.098	0.049
n-6 : n-3	135.133	67.567	33.783

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2 การวิเคราะห์ทางเคมีและบันทึกข้อมูล

3.2.1 การศึกษาคุณภาพซาก (carcass quality)

เมื่อขุนกระบือได้น้ำหนักตามที่ต้องการแล้ว กระบือที่นำมาเข้าฆ่ามีการอดอาหารก่อนฆ่าประมาณ 12 ชั่วโมง จากนั้นทำการฆ่าและตัดแต่งแบบไทยและสากลตามวิธีของ สัญชัย (2547) ภายหลังจากการฆ่าทำการบันทึกน้ำหนักซากอุ่น (hot carcass weight) ซึ่งไม่รวมน้ำหนักหัว เขา หนัง และไตของกระบือ จากนั้นแช่เย็นซากที่อุณหภูมิประมาณ 3 ± 1 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดความยาวซากเย็นและชั่งน้ำหนักซากเย็น จากนั้นทำการตัดแต่งซากแบบไทยในซีกซ้ายและแบบสากลในซีกขวา เพื่อวัดพื้นที่หน้าตัดเนื้อสัน (loin eye area) ความหนาของไขมันสันหลังตำแหน่งซี่โครงที่ 12 นำค่าบันทึกที่ได้มาคำนวณเปอร์เซ็นต์ซาก (dressing percentage) และเปอร์เซ็นต์เนื้อแดง (lean percentage)

3.2.2 การศึกษาคุณภาพเนื้อ (eating quality)

เก็บตัวอย่างกล้ามเนื้อ *Longissimus dorsi* (LD), *Infraspinatus* (IF), *Semitendinosus* (ST) และ *Semimembranosus* (SM) หลังจากนำซากแช่เย็นที่อุณหภูมิ 3 ± 1 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์คุณภาพเนื้อ ประกอบด้วย

1. วัดค่าการนำไฟฟ้าด้วยเครื่องวัดการนำไฟฟ้า (Model 197 WTW, Germany) และ pH ด้วยเครื่องวัด pH (Model 191, Knick, D-Berlin) ที่ 45 นาที และ 24 ชั่วโมงที่ตำแหน่งซี่โครงที่ 10 กับ 11 และ กล้ามเนื้อ *Semimembranosus* บันทึกผล จากนั้นนำไปแช่เย็นเป็นเวลา 24 ชั่วโมงหลังฆ่าเพื่อนำไปตัดแต่งตามลำดับ
2. วัดค่าสีด้วยเครื่อง Minolta Chorma Meter CR-300 (Osaka, Japan)
3. วัดความสามารถในการอุ้มน้ำของเนื้อ (Honikel and Hamn, 1999)
4. วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี (AOAC, 1997)
5. ปริมาณไตรกลีเซอไรด์ (Biggs *et al.,* 1975)
6. ปริมาณคอเรสเตอรอล (Jung *et al*., 1975)
7. การวิเคราะห์หาค่า thiobarbituric acid number (Rossel, 1994)
8. การวิเคราะห์หากรดไขมันอิสระ (Folch *et al*., 1957)
9. ปริมาณคอลลาเจน (Hill, 1969; AOAC, 1997)
10. การตรวจชิม (sensory evaluation) (ไพโรจน์, 2535)
    - กลิ่น รส (flavour)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- ความชุ่มฉ่ำ (juiciness)
- ความนุ่ม (tenderness)
- ความพอใจโดยรวม (overall acceptability)

3.2.2.1 การวัดค่าความเป็นกรดด่างของกล้ามเนื้อ (muscle pH measurement)

บันทึกค่า pH เวลา 45 นาที และ 24 ชั่วโมง หลังฆ่า ที่กล้ามเนื้อสันนอก (*Longissimus dorsi*) และกล้ามเนื้อสะโพก (*Semimembranosus*) ด้วยเครื่อง pH – meter (Model 191, Knick, D – Berlin)

3.2.2.2 การวัดค่าการนำไฟฟ้า (conductivity measurement)

บันทึกค่าการนำไฟฟ้า เวลา 45 นาที และ 24 ชั่วโมง หลังฆ่า ที่กล้ามเนื้อสันนอก (*Longissimus dorsi*) และกล้ามเนื้อสะโพก (*Semimembranosus*) ด้วยเครื่อง conductivity – meter (Model WTW)

3.2.2.3 การวัดค่าสีของเนื้อ (meat color measurement)

นำกล้ามเนื้อ *Longissimus dorsi* (LD), *Infraspinatus* (IF), *Semitendinosus (ST)* และ *Semimembranosus* (SM) ใส่ถุงพลาสติกผนึกปากถุงเก็บที่ 4 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำเนื้อออกจากถุงวางในภาชนะเปิดเก็บในตู้เย็น 1 ชั่วโมง ทำการวัดค่าสีด้วยเครื่อง Minolta Chroma Meter (CR – 300, Osaka) บันทึกค่าเฉลี่ย L (ความสว่าง), a* (แดง - เขียว) และ b* (เหลือง – น้ำเงิน)

3.2.2.4 วิธีการวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมี (chemical composition)

ใช้ตัวอย่างกล้ามเนื้อ *Longissimus dorsi* (LD), *Infraspinatus* (IF), *semitendinosus* และ *Semimembranosus* (SM) บดด้วยเครื่องเบลนเดอร์ (blender) ให้ละเอียด เพื่อนำไปวิเคราะห์หาคุณค่าทางโภชนะ ด้านเปอร์เซ็นต์โปรตีน ไขมันและความชื้น ด้วยวิธี Proximate Analysis (AOAC, 1997) ดังนี้

3.2.3.4.1 การวิเคราะห์หาความชื้น (moisture percentage)

1. นำถ้วยสำหรับใส่ตัวอย่างวิเคราะห์หาความชื้น (weighing bottle) ที่ล้างสะอาดและเช็ดให้แห้ง อบในตู้อบ ที่อุณหภูมิ 100 °C นาน 1 ชั่วโมง และนำออกมาใส่ในโถดูดความชื้นปล่อยให้เย็นและชั่งน้ำหนัก

2. ชั่งตัวอย่างเนื้อที่บดละเอียดแล้วจำนวน 2 กรัม ใส่ใน weighing bottle บันทึกน้ำหนักรวมทั้งหมด และอบที่อุณหภูมิ 100 °C 4 ชั่วโมง

3. นำถ้วยที่มีตัวอย่างออกจากตู้อบแห้ง ใส่ในโถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็นแล้วชั่งน้ำหนักที่หายไป คือ ปริมาณความชื้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สูตรการคำนวณหาปริมาณความชื้น

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

เมื่อ

A = น้ำหนักถ้วย + น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ

B = น้ำหนักถ้วย + น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ

C = น้ำหนักตัวอย่าง

3.2.3.4.2 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน (protein percentage)

1. ชั่งตัวอย่างเนื้อที่บดแล้ว 0.5 กรัม ใส่ในกระดาษชั่งตัวอย่าง แล้วนำใส่ใน Kjeldahl flask

2. เติมสารเร่งปฏิกิริยา 2 กรัม (K_2SO_4 : $CuSo_4$; 20 : 1) แล้วเติม conc. sulfuric acid 15 ml.

3. นำ Kjeldahl flask เข้าเครื่องย่อยที่อุณหภูมิ 420 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จนกระทั่งได้สาร ละลายสีเขียวใส 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

7. กลั่นจนได้ปริมาตรของสารละลายในขวด erlenmeyer flask ประมาณ 200 ml.

8. จากนั้นนำขวด erlenmeyer flask ที่มีแอมโมเนียที่เก็บในสารละลาย 4% boric acid มาไตเตรทกับสารละลายมาตรฐาน 0.1 *N* H_2SO_4 ไตรเตรทจนสีของสารละลายเปลี่ยนสีจากสีเขียวเป็นสีม่วงอมเทา

สูตรการคำนวณหาปริมาณโปรตีน

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

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

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)

3.2.3.4.3 การวิเคราะห์หาปริมาณไขมัน (fat percentage)

1. ชั่งน้ำหนักเนื้อที่บดแล้ว 2 กรัม อบที่ 100 °C 4 ชั่วโมง

2. นำบีกเกอร์สำหรับหาไขมันที่ผ่านการล้างสะอาด เช็ดให้แห้ง แล้วอบ 100 °C นาน 1 ชั่วโมง และใส่ในโถดูดความชื้น (dissicator) ปล่อยให้เย็น ทำการชั่งหาน้ำหนักที่ได้

3. นำตัวอย่างเนื้อที่ผ่านการอบ หรือผ่านการหาความชื้นแล้ว ใส่ใน thimble alundum ที่สะอาด และแห้ง

4. ใส่ thimble alundum ลงใน sample containers แล้วต่อเข้ากับ holding clips ของเครื่องสกัดไขมันแบบ Soxhlet extraction

5. ใส่ dichloromethane ลงในบีกเกอร์ 30 ml. แล้วนำต่อเข้ากับเครื่องให้สนิท

6. เปิดน้ำเย็นให้ไหลผ่าน condensor 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 30 นาที แล้วนำออกใส่ในโถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็น ชั่งน้ำหนัก น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นภายหลังการสกัดคือน้ำหนักของไขมัน

สูตรการคำนวณหาปริมาณไขมัน

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

เมื่อ

A = น้ำหนักบีกเกอร์ + น้ำหนักไขมันหลังอบแล้ว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

B = น้ำหนักบีกเกอร์

C = น้ำหนักตัวอย่าง

3.2.3.5 วิธีการวิเคราะห์หาค่าความสามารถในการอุ้มน้ำของเนื้อ และค่าแรงตัดผ่านเนื้อ

3.2.3.5.1 การสูญเสียน้ำขณะเก็บ (drip loss) (Honickel, 1987; อ้างโดย สัญชัย, 2543) โดยใช้กล้ามเนื้อกล้ามเนื้อ *Longissimus dorsi* (LD), *Infraspinatus* (IF), *Semitendinosus* (ST) และ *Semimembranosus* (SM) ทำการชั่งน้ำหนักเริ่มต้น (Wd_1) ห่อด้วยผ้าก๊อซ เก็บในถุงพลาสติกชนิดเย็น และให้ผ้าก๊อซห่างจากก้นถุงประมาณ 2 เซนติเมตร ผนึกปากถุงให้สนิท เก็บในตู้เย็นลักษณะแขวนที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำชิ้นเนื้อออกจากถุง ชั่งน้ำหนัก (Wd_2) คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำ (drip loss) จากสูตร

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

3.2.3.5.2 การสูญเสียน้ำจากการละลายน้ำแข็ง (thawing loss) **และการสูญเสียน้ำจากการต้ม** (cooking loss) โดยนำกล้ามเนื้อกล้ามเนื้อ *Longissimus dorsi* (LD), *Infraspinatus* (IF), *Semitendinosus* และ *Semimembranosus* (SM) ทำการชั่งน้ำหนัก (Wt_1) เก็บแบบสุญญากาศ (vacuum) ในถุงพลาสติกชนิดเย็นผนึกปากถุงให้สนิท เก็บในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ –20 °C รอการวิเคราะห์ต่อไป จากนั้นนำชิ้นเนื้อมาละลายน้ำแข็ง (thawing) ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำชิ้นเนื้อออกจากถุง ซับให้แห้งด้วยกระดาษทิชชู ชั่งน้ำหนัก (Wt_2) จากนั้นนำชิ้นเนื้อที่ได้เก็บในถุงร้อนแบบสุญญากาศ ต้มในหม้อต้มควบคุมอุณหภูมิ Korimat อุณหภูมิน้ำ เท่ากับ 85 °C จนได้อุณหภูมิใจกลางเนื้อ ประมาณ 70 °C ใช้เวลาประมาณ 15 – 16 นาที ผึ่งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นำชิ้นเนื้อออกจากถุง ซับน้ำให้แห้ง ชั่งน้ำหนัก (Wt_3) คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำขณะทำละลาย (thawing loss) และเปอร์เซ็นต์การสูญเสียจากการต้ม (cooking loss) จากสูตร

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

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การสูญเสียน้ำจากการต้ม (cooking loss)

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

นำเนื้อที่ต้มสุกจากการหาเปอร์เซ็นต์การสูญเสียจากการต้ม (cooking loss) เจาะตามแนวเส้นใยกล้ามเนื้อ ด้วยเหล็กกลวงชนิดกลม (core) ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 เซนติเมตร วัดค่าแรงตัดผ่านด้วยเครื่อง Instron 5565 หัววัดกำลัง 5 kN (Warner Bratzler Shear) ด้วยความเร็ว 200 มม./นาที

ค่าการสูญเสียขณะย่าง (grilling loss) โดยนำกล้ามเนื้อกล้ามเนื้อ *Longissimus dorsi* (LD), *Infraspinatus* (IF), *semitendinosus* และ *Semimembranosus* (SM) ทำการตัดแต่งไขมัน และพังผืดออก ทำการชั่งน้ำหนัก (Wg_1) จากนั้นนำชิ้นเนื้อที่ได้ย่างในหม้ออบให้ความร้อน (convection oven) ที่อุณหภูมิ 160 °C เวลา 15 นาที จนได้อุณหภูมิใจกลางเนื้อประมาณ 70 °C และนำออกจากเตาย่าง ทำการชั่งน้ำหนัก (Wg_2) คำนวณเปอร์เซ็นต์การสูญเสียจากการย่าง จากสูตร

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

3.2.3.6 แรงตัดผ่านเนื้อ (shear force value)

นำเนื้อที่ต้มสุกจากการหาเปอร์เซ็นต์การสูญเสียเนื่องจากการต้ม (cooking loss) เจาะตามแนวเส้นใยกล้ามเนื้อด้วยเหล็กกลวงชนิดกลม (core) ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.27 cm. วัดค่าแรงตัดผ่าน (Warner Bratzler Shear) ด้วยเครื่อง Instron 5565 (Instron Ltd., UK) หัววัดกำลัง 5 kN โดยแปรผลประกอบด้วยค่าแรงสูงสุด (maximum force, N) และค่างานซึ่งมีพื้นที่ใต้กราฟ (area, N.sec)

3.2.3.7 การตรวจชิม (panel test)

ใช้ตัวอย่างตัวอย่างกล้ามเนื้อ *Longissimus dorsi* (LD), *Infraspinatus* (IF), *Semitendinosus* (ST) ที่ผ่านการอบสุกตัดให้มีขนาดเท่ากันประมาณ 1×1×1 เซนติเมตร จากนั้นเสิร์ฟให้แก่ผู้ตรวจชิม ซึ่งได้ผ่านการฝึกฝนการตรวจชิม (ไพโรจน์, 2535) จำนวน 6 ท่าน ผู้ตรวจชิมจะได้รับแบบสอบถามการตรวจชิมเนื้อ (Appendix table 1) และฟังการบรรยายขั้นตอนการตรวจ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชิมโดยละเอียด ซึ่งการให้คะแนนจะพิจารณา 4 ลักษณะการตรวจชิม คือ ความนุ่ม (tenderness) กลิ่นและรสชาติ (flavor) ความชุ่มฉ่ำ (juiciness) และความพอใจโดยรวม (overall acceptability) โดยให้คะแนนซึ่งอยู่ในช่วง 1 – 9 คะแนน (1 = เหนียว, กลิ่นรสไม่ดี, แห้ง และไม่ชอบมาก; 5 = นุ่ม, มีกลิ่นและรสชาติดี, ชุ่มฉ่ำ และมีความพอใจ; 9 = นุ่มที่สุด, กลิ่นและรสชาติดีที่สุด, ชุ่มฉ่ำที่สุด และมีความชอบมากที่สุด) ผู้ทดสอบชิมจะได้รับน้ำ ขนมปังและผลไม้หลังจากทดสอบชิมเนื้อแต่ละชิ้น

3.2.3.8 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณคอลลาเจนที่ละลายได้และละลายไม่ได้ (soluble and insoluble collagen analysis)

ขั้นตอนการแยก (Hill, 1969)

1. ชั่งตัวอย่างกล้ามเนื้อกล้ามเนื้อ *Longissimus dorsi* (LD), *Infraspinatus* (IF), *Semitendinosus* (ST) และ *Semimembranosus* (SM) ที่บดแล้ว 4 กรัม ใส่ในหลอด homogenize ขนาด 30 ml.
2. ใส่ strength ringer solution 8 ml.
3. homogenize 10,000 rpm 1 นาที
4. ต้มใน water bath 77 °C 70 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น 1 ชั่วโมง
5. ปั่นเหวี่ยงที่ 5,200 *g* 26 นาที
6. แยกส่วน supernatant ใส่ erlenmeyer flask และส่วน residue ใส่ erlenmeyer flask เช่นเดียวกัน

ขั้นตอนการย่อย (AOAC, 1997)

1. เติมกรด sulfuric acid 7 *N* 30 ml. และปิดด้วยกระจกนาฬิกา
2. ใส่ตู้อบที่อุณหภูมิ 105 ± 1 °C 16 ชั่วโมง
3. นำตัวอย่างที่ได้จากการย่อยกรองผ่านกระดาษกรองใส่ใน volumetric flask ขนาด 500 ml. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ

ขั้นตอนการทำสี (AOAC, 1997)

1. ปิเปตสารละลายที่ได้ในขั้นตอนแรก 2 ml. ใส่ใน หลอดทดลอง ขนาด 10 ml. ตัวอย่างละ 2 หลอด และทำ blank โดยการเติมน้ำกลั่น 2 ml. ใส่ในหลอดทดลอง
2. เติม oxidant solution 1 ml. เขย่าให้เข้ากัน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 ± 2 นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. เติม color reagent หลอดละ 1 ml. เขย่าทันที และปิดฝาหลอดให้สนิท
4. ต้มใน water bath อุณหภูมิ 60 ± 0.5 °C 15 นาที
5. ทำหลอดให้เย็นโดยการเปิดน้ำให้ไหลผ่าน 3 นาที
6. ทำหลอดให้แห้งโดยการเช็ดหรือตั้งทิ้งไว้
7. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 558 ± 2 nm.

สูตรในการคำนวณหาปริมาณ hydroxyproline

H, mg/g = (h x 2.5 x 1000)/m

h = hydroxyproline, g/2 ml. อ่านค่าจาก standard curve

m = weight sample, g

นำเอาส่วน ที่ละลายได้ คูณด้วย 7.52 และส่วนที่ไม่ละลาย คูณด้วย 7.25

3.2.3.9 วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณกรดไขมัน (free fatty acid)

โดยใช้กล้ามเนื้อกล้ามเนื้อ *Longissimus dorsi* (LD), *Infraspinatus* (IF), *Semitendinosus* (ST) และ *Semimembranosus* (SM) บดด้วยเครื่อง blender ทำการสกัดไขมันจากกล้ามเนื้อตัวอย่าง (Folch *et al*., 1957) โดยมีวิธีการ ดังนี้

1. ชั่งตัวอย่างเนื้อที่บดแล้ว 5 กรัม ใส่ลงในขวดก้นกลม (round bottom flask) ปริมาตร 100 มล.
2. เติม chloroform : methanol (2 : 1) 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. เก็บชั้นล่างของสารละลายใน flask ที่ทราบน้ำหนัก แล้วนำไประเหยแห้งด้วย water bath ที่อุณหภูมิ 70 °C
7. ชั่งน้ำหนักไขมันหลังจากระเหยแห้ง แล้วละลายด้วย chloroform ให้ได้ความเข้มข้นประมาณ 30 มก./มล.

การเตรียม FAME (Morrison and Smith, 1964)

1. ดูดสารละลายที่สกัดได้ 1 มล. ใส่ลงในขวดก้นกลม (round bottom flask) ขนาด 250 มล.
2. ระเหยให้แห้งภายใต้กระแสไนโตรเจน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. เติม 0.5 M NaOH ใน methanol 4 มล. เขย่า 30 วินาที

4. reflux จนได้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เวลาประมาณ 5 นาที ทิ้งให้เย็น

5. เติม 20% boron – trifluoride ใน methanol 5 มล. เขย่า 30 วินาที

6. reflux ต่ออีก 2 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น

7. เติมสารละลาย NaCl อิ่มตัว 3 มล. เขย่าให้เข้ากัน

8. เติม iso – octane (2, 2, 4 – trimethylpentane) 1 มล. เขย่าให้เข้ากัน 30 วินาที ทิ้งไว้ให้ตกตะกอน

9. เก็บส่วนที่ละลายในชั้น iso – octane

10. นำสารละลายส่วนล่างเติมด้วยสารละลายเกลืออิ่มตัว (NaCl) 2 มล. เขย่าให้เข้ากัน

11. เติม iso – octane 1 มล. เขย่าให้เข้ากัน 30 วินาที ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน

12. รวมชั้น iso – octane ที่เก็บได้ แล้วเติม sodium sulfate anhydrous ปริมาณเท่าปลายช้อนตักสาร ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น

13. ดูดสารละลายส่วนใสใส่ใน vial แล้วปิดให้สนิท

14. ดูดสารละลายที่ได้ 1 ไมโครลิตร ฉีดเข้าเครื่อง Gas chromatography (Shimadzu, Japan)

3.2.3.10 การวิเคราะห์หาปริมาณคอเลสเตอรอล (cholesterol) (Jung *et al*., 1975)

1. ทำการสกัดไขมันจากกล้ามกล้ามเนื้อ *Longissimus dorsi* (LD), *Infraspinatus* (IF), *Semitendinosus* (ST) และ *Semimembranosus* (SM) ที่บดแล้ว เช่นเดียวกับการวิเคราะห์หากรดไขมัน (Folch *et al*., 1957)

2. ดูดไขมันที่สกัดได้ ความเข้มข้น 50 มก./มล. ปริมาตร 50 ไมโครลิตรใส่ในหลอดทดลองขนาด 25 มล.

3. เติม alcoholic KOH 10 มล.

4. ต้มใน water bath 45 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็น

5. เติม petroleum ether 5 มล. เขย่าให้เข้ากันด้วย vortex mixture

6. เทสารละลายทั้งหมดลงในกรวยแยก ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น

7. เก็บส่วนที่ละลายในชั้น petroleum ether แล้วนำไประเหยแห้งใน water bath 65 °C

8. เติม ferric acetate/uranyl acetate 5 มล. เขย่าอย่างแรงด้วยเครื่อง vortex mixture

9. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,700 รอบ/นาที นาน 5 นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

10. เตรียมหลอดอ่านขนาด 13 x 100 มิลลิเมตร ชุดใหม่ แล้วเติม sulfuric acid reagent หลอดละ 2 มล.

11. ดูด supernate จากหลอดเดิม 3 มล. 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 มล. และ sulfuric acid reagent 2 มล.

สูตรในการคำนวณหาปริมาณคอเลสเตอรอล

$$\textbf{Total cholesterol} = \left(\frac{\text{Au}}{\text{As}}\right) \times 250$$

เมื่อ

Au = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

As = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายคอเรสเตอรอลมาตรฐาน

3.2.2.11 การวิเคราะห์หาค่าการหืน (Thiobarbituric acid number, TBA) (Rossell, 1994)

1. ชั่งตัวอย่างกล้ามเนื้อกล้ามเนื้อ *Longissimus dorsi* (LD), *Infraspinatus* (IF), *Semitendinosus* และ *Semimembranosus* (SM) ที่บดแล้ว 10 กรัม เติมน้ำกลั่น 70 มล.

2. ปั่นผสมใน blender ประมาณ 15 นาที

3. เทใส่ใน distillation flask แล้วล้าง blender ด้วยน้ำกลั่น 30 มล.

4. เติม 4 M HCL 2.5 มล.

5. เติม anti – foaming agent 1 – 2 หยด

6. ต่อเข้ากับชุดกลั่น แล้วกลั่นจนได้ของเหลวประมาณ 50 มล.

7. ปิเปตสารละลายที่กลั่นได้ 5 มล. แล้วเติม TBA solution 5 มล.

8. ต้มในน้ำเดือด 35 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น 10 นาที

9. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 538 นาโนเมตร

10. คำนวณค่า TBA number จากสูตร

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

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สูตร

TBA number (mg maalonaldehyde/kg sample) = 7.8×O.D.

3.2.3.12 การวิเคราะห์หาปริมาณไตรกลีเซอไรด์ในกล้ามเนื้อ (Adapted from Biggs *et al*., 1975)

1. สกัดไขมันตามวิธีของ AOAC
2. เตรียมไขมันที่สกัดได้ให้มีความเข้มข้น 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 40 mM sulfuric acid จำนวน 1 มล.
7. ผสมเข้าด้วยกันด้วย vortex mixture 20 วินาที ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที จนแยกชั้น
8. เตรียมหลอดทดลองอีกชุด แล้วเติม sodium alkoxide 2 มล.
9. ดูดสารละลายที่แยกชั้นส่วนบนในข้อ 7. มา 0.2 มล. ใส่ในหลอดข้อ 8. ผสมให้เข้ากันด้วย voetex mixture นำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 5 นาที นำออกมาเติม sodium periodate อีก 1 มล.
10. เติม acetyl acetone reagent 1 มล. ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixture นำเข้าตู้อบ ที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 20 นาที
11. ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 420 นาโนเมตร

หมายเหตุ : คำนวณเปรียบเทียบกับสารละลายไตรกลีเซอไรด์มาตรฐาน แล้วคำนวณกลับเพื่อหาเป็นปริมาณไตรกลีเซอไรด์ใน 100 กรัมของเนื้อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.4 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

1. วางแผนการทดลองในการศึกษาคุณภาพการบริโภคแบบ 2 x 4 factorial in CRD โดยมีปัจจัยในการทดลอง คือ สัดส่วนอาหารหยาบ : อาหารข้น (50 : 50 และ 70 : 30) และชนิดกล้ามเนื้อ (*Longissimus dorsi*, *Infraspinatus*, *Semitendinosus* และ *Semimembranosus*)

2. วิเคราะห์หาความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Tukey's W-procedure ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SAS version 6.12 (SAS, 1996)

3.2.5 สถานที่ทำการวิจัยและรวบรวมข้อมูล

1. ศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์ จังหวัดตาก
2. ห้องปฏิบัติการภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
3. ห้องปฏิบัติการกลางคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
4. ห้องปฏิบัติการกลาง คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

3.2.6 ระยะเวลาในการดำเนินงานวิจัย

ประมาณ 18 เดือน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved