

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

สัตว์ทดลอง

- ไก่พื้นเมือง: การศึกษาครั้งนี้ใช้ไก่แดง หรือไก่คนแดง ซึ่งเป็นไก่พื้นเมืองพันธุ์แท้ที่พัฒนาและปรับปรุงพันธุ์โดยสถานีบำรุงพันธุ์สุราษฎร์ธานี กองบำรุงพันธุ์ กรมปศุสัตว์ เพศละ 280 ตัว (รวมจำนวน 560 ตัว) กำหนดให้มาจากพ่อแม่พันธุ์มีลักษณะรูปร่างภายนอกที่มีรูปทรงแบบไก่ชน ขนาดตัวสีน้ำตาลแดง และยอมให้มีขนสีขาว เหลือง หรือเทาปนได้บ้าง และมีหงอนกุหลาบ หรือหงอนถั่ว (Figure 1 ภาคผนวก ข) โดยจัดลูกไก่เข้าศึกษาแบบ 2×10 แฟกตอเรียลตามแผนการทดลองแบบสุ่มตลอดในบล็อกที่สมบูรณ์ (2×10 factorial in randomized complete block design) กำหนดให้ปัจจัยแรก คือ ระบบการเลี้ยงไก่ ซึ่งมี 2 ระบบ คือ ระบบการเลี้ยงไก่แบบประณีต และระบบการเลี้ยงไก่แบบไม่ประณีต และปัจจัยที่ 2 คือ อายุของไก่ ซึ่งแบ่งออกเป็น 10 ระดับอายุ ได้แก่ 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 และ 24 สัปดาห์ โดยการศึกษาครั้งนี้ได้กำหนดให้เพศเป็นบล็อก

- ไก่กระທး: การศึกษาครั้งนี้ใช้ไก่กระທးสายพันธุ์ Cobb 500 เพศเมีย จำนวน 300 ตัว นำมาเลี้ยงแบบประณีต (Figure 4 ภาคผนวก ข) แล้วทำการสุ่มตัวอย่างที่ระดับอายุ 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 สัปดาห์ เพื่อนำผลมาวิเคราะห์และเปรียบเทียบกับข้อมูลไก่พื้นเมืองต่อไป

ระบบการเลี้ยงและการให้อาหาร

- ระบบการเลี้ยงแบบประณีต หมายถึง ระบบการเลี้ยงไก่ที่ควบคุมให้ไก่อยู่ภายในโรงเรือน มีการให้อาหารที่กำหนดให้มีโภชนะให้พอเพียงกับความต้องการของร่างกายในแต่ละช่วงวัย และมีการจัดการด้านสุขอนามัยของตัวสัตว์และภายในโรงเรือนเลี้ยงสัตว์เป็นอย่างดี (Figure 2 ภาคผนวก ข) สำหรับการเลี้ยงไก่พื้นเมืองในระบบนี้จะให้อาหารเม็ด (อาหารที่ผสมเพื่อการค้า หรือ commercial pellet) ตามเทคนิคของ Punja (1999) ที่พัฒนาโดย Jaturasitha และคณะ (2002) ในส่วนไก่กระທးที่เลี้ยงแบบประณีตจะใช้อาหารเม็ด (commercial pellet) จัดแบ่งคุณภาพของอาหารตามช่วงอายุของไก่ คือ อาหารไก่เล็ก (ช่วง 4 สัปดาห์แรก) มีโปรตีนประมาณ 21-22% อาหารไก่ระยะที่สอง (อายุ 31-60 วัน) มีโปรตีนประมาณ 19-20% และอาหารไก่ระยะที่ 3 มีโปรตีนประมาณ 16%

- ระบบการเลี้ยงแบบไม่ประณีต หรืออาจเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า “การเลี้ยงไก่แบบพื้นบ้าน” หมายถึง ระบบการเลี้ยงไก่ที่อนุญาตให้ไก่สามารถออกเดินคุ้ยเขี่ยอาหารในพื้นที่ที่กำหนดให้ช่วงกลางวันและนำไก่กลับเข้ามาเลี้ยงในโรงเรือนในช่วงเย็นจนถึงเช้าวันรุ่งขึ้นโดยให้อาหารเม็ดเพิ่มเติมสูตรเดียวกับไก่พื้นเมืองที่เลี้ยงแบบระบบประณีต (Figure 3 ภาคผนวก ข) หนึ่ง สำหรับลูกไก่อายุ 4 สัปดาห์แรก (30 วันแรก) จะเลี้ยง

ไว้ในโรงเรือนก่อน โดยให้อาหารไก่เล็กเช่นเดียวกับที่ใช้ในการเลี้ยงไก่พื้นเมืองแบบประณีต ภายหลังจากที่ถูกไก่มีอายุครบ 30 วัน จึงอนุญาตให้ไก่ออกก๊อปปี้ตามธรรมชาติที่ระบุไว้ในตอนต้น

การเก็บตัวอย่าง

ทำการสุ่มตัวอย่างไก่กลุ่มที่ทดลองทั้งสามชุดที่ระดับอายุที่กำหนดไว้ข้างต้น โดยสุ่มแบบคละเพศ ในจำนวนที่เท่ากัน จำนวนชุดละ 20 ตัว นำมาพักการให้อาหารเป็นเวลา 1 วัน ทำการฆ่าโดยวิธีของนิรันดร์ และ รัตนา (2538) ถอนขน นำอวัยวะภายในออก แล้วทำการแช่ซากที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 24 ชม. จากนั้นทำการผ่าซาก แยกออกเป็นกล้ามเนื้อส่วนอกส่วนนอก (*Pectoralis major*) ทำการแยกพังคืดและไขมันที่มองเห็น โดยรอบชั้นกล้ามเนื้อออก โดยกล้ามเนื้อจากซีกซ้ายนำมาสับละเอียดบรรจุในถุงพลาสติกแล้วทำการแช่แข็งและเก็บที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ค่าองค์ประกอบทางเคมี ส่วนกล้ามเนื้อซีกขวาบรรจุถุงพลาสติกเก็บที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อใช้วิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพและ โครงสร้างทางจุลภาคภายใน 48 ชม.

การวิเคราะห์ข้อมูลทางเคมี กายภาพ และโครงสร้างระดับจุลภาค

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

- ค่าความเป็นกรดและด่าง (pH)

ทำการตรวจวิเคราะห์ค่า pH ของกล้ามเนื้อ โดยนำเนื้อผสมน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:5 แล้วโซโม่-จีไนซ์ก่อนนำไปวัดค่า pH

- องค์ประกอบทางเคมี (proximate composition)

ทำการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน (crude protein, Kjeldahl method), ไขมัน (soxhlet apparatus method), เถ้า (โดยเผาในเตาเผาอุณหภูมิสูง 600°C) และค่าปริมาณความชื้น (oven method) ตามวิธี AOAC (1999)

- องค์ประกอบของโปรตีนกล้ามเนื้อ

ทำการวิเคราะห์หาองค์ประกอบของโปรตีน ทำการแยกองค์ประกอบโปรตีนกล้ามเนื้อชนิดต่างๆ ตามวิธีของ Hashimoto และ คณะ (1979) และตรวจสอบปริมาณไนโตรเจนของแต่ละแฟรกชันโดยวิธี Kjeldahl method (AOAC, 1999) โดยได้แฟรกชันต่างๆ คือ

- ไมโอไฟบริล (myofibril)
- ซาร์โคพลาสมิก (sarcomere)
- สารประกอบไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีน (non-protein nitrogen)
- โปรตีนที่ละลายในด่าง (alkaline soluble protein)
- สโตรมา (stroma)

- รูปแบบโปรตีน

ทำการตรวจสอบรูปแบบและน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนในกล้ามเนื้อชนิดต่างๆ โดยใช้ SDS-PAGE (10% running gel และ 4% stacking gel) (Laemmli, 1970)

- ปริมาณคอลลาเจน

ทำการตรวจหาปริมาณคอลลาเจนทั้งหมด (total collagen) โดยตรวจสอบในรูปของ hydroxyproline ตามวิธีของ Liu และ คณะ (1996) และปริมาณของ Heat soluble collagen ตามวิธีของ Liu และ คณะ (1996)

การวิเคราะห์ทางกายภาพ

- Cooking loss

ทำการตรวจสอบน้ำหนักที่สูญเสียภายหลังการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 °C เวลา 30 นาที ตามวิธีของ Palka และ Daun (1999) โดยกำหนดขนาดของชิ้นเนื้อที่เท่ากันทุกระดับอายุของตัวอย่าง (1.0 x 1.0 x 0.5 ซม.)

- ค่าสีของกล้ามเนื้อและหนัง

ทำการตรวจวัดค่าสี (L^* , a^* , b^*) ของกล้ามเนื้อและหนังหลังผ่านการบ่มที่ 4°C 24 ชม. โดยใช้เครื่องวัดสี HunterLab และรายงานค่าในระบบ CIE (complete International Commission on Illumination)

- ลักษณะเนื้อสัมผัสของกล้ามเนื้อ

ทำการวิเคราะห์ค่าแรงตัดผ่านเนื้อ โดยใช้เครื่อง Texture Analyser ติดตั้งอุปกรณ์วัดแรงตัดแบบ Warner-Bratzler โดยวิธีของ Dawson และคณะ (1991) กำหนดขนาดของชิ้นเนื้อที่เท่ากันทุกระดับอายุของตัวอย่าง (1.0 x 1.0 x 0.5 ซม.)

- คุณสมบัติการสูญเสียสภาพธรรมชาติโดยความร้อน

ทำการตรวจการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนกล้ามเนื้อ โดยใช้ Differential Scanning Calorimetry (DSC) โดยให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 30-100°C ที่อัตราการเพิ่มอุณหภูมิ 10°C/นาที แล้วตรวจสอบค่า T_{peak} , T_{onset} และ เอนทัลปี (ΔH) จากเทอร์โมแกรม

การวิเคราะห์โครงสร้างระดับจุลภาค

- ลักษณะโครงสร้างของกล้ามเนื้อ

ทำการตรวจวัดลักษณะโครงสร้างของกล้ามเนื้อโดยใช้วิธีของ Palka และ Daun (1999) โดยการตัดกล้ามเนื้อเป็นชิ้นขนาด 3 x 3 x 10 มิลลิเมตร แช่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 M (pH 7.3) ที่ประกอบด้วย glutaraldehyde เข้มข้นร้อยละ 2.5 เป็นเวลา 2 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง แล้วล้างชิ้นตัวอย่างด้วยน้ำกลั่น และกำจัดน้ำออกโดยการแช่ในเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 25, 50, 70, 95 และเอทานอลบริสุทธิ์ (สองครั้ง) ตามลำดับ ทำการตัดชิ้นเนื้อให้เป็นชิ้นขนาดเล็กในไนโตรเจนเหลว จากนั้นนำชิ้นส่วนแห้งของตัวอย่างมาดูลักษณะโครงสร้างของกล้ามเนื้อโดยใช้ Scanning electron microscope บันทึกภาพตัดขวาง (transverse sections) ที่ระดับ magnification x500 และภาพตามยาวของกล้ามเนื้อ (longitudinal section) ที่ระดับ

magnification x10,000 ทำการวัดขนาดเส้นใยกล้ามเนื้อ (fiber diameter) และ sarcomere length ของกล้ามเนื้อดิบจากภาพที่บันทึก

- ความหนาของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน

ทำการตรวจวัดความหนาของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันชั้น perimysium โดยใช้วิธี Picro-Sirius Red polarisation (PSRP) method / Transverse cryosection (Liu *et al.*, 1996)

การวางแผนการทดลองและการวิเคราะห์ทางสถิติ

ในการศึกษาอิทธิพลของอายุไก่ที่มีต่อองค์ประกอบทางเคมี คุณสมบัติและโครงสร้างทางจุลภาคของกล้ามเนื้อของไก่ที่เลี้ยงในแต่ละระบบการเลี้ยง สำหรับการทดลองที่ 1 จัดไก่พื้นเมืองเข้าศึกษาแบบ 2 x 10 แฟกตอเรียลตามแผนการทดลองแบบสุ่มตลอดในบล็อกที่สมบูรณ์ (2 x 10 factorial arrangements in randomized complete block design) กำหนดให้ปัจจัยแรก คือ ระบบการเลี้ยงไก่ (ได้แก่ ระบบการเลี้ยงไก่แบบประณีต และแบบไม่ประณีต) และปัจจัยที่ 2 คือ อายุของไก่ที่นำไปฆ่า (ได้แก่ 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 และ 24 สัปดาห์) โดยกำหนดให้เพศเป็นบล็อก แล้วทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (analysis of variance) และ เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของอายุโดยวิธี Duncan's new multiple range test (Steel and Torrie, 1980) สำหรับการทดลองที่ 2 ได้สุ่มไก่กระทงเข้าทดลองตามแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (completely randomized design) และสุ่มไก่กระทงเข้าฆ่าเพื่อศึกษาพารามิเตอร์ต่างๆ ทุกๆ 2 สัปดาห์ ตั้งแต่ไก่กระทงอายุ 2 สัปดาห์ จนถึงอายุ 12 สัปดาห์ ทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test (Steel and Torrie, 1980) และเปรียบเทียบความแตกต่างของพารามิเตอร์ต่างๆ ในไก่พื้นเมืองกับไก่กระทงโดยวิธี student t-Test (Steel and Torrie, 1980)