

חברות

ภาคผนวก ก

วิธีวิเคราะห์หาแซนโทฟิลล์จากสาหร่ายสไปรูลีนา

การวิเคราะห์หาแซนโทฟิลล์จากสาหร่ายสไปรูลีนาดัดแปลงจากวิธีการของ AOAC Method (1980) ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้

1. การสกัด (extration) และ saponification
2. การแยกส่วน (separation) โดย column chromatography
3. การวัดปริมาณแซนโทฟิลล์โดย spectrophotometer

1. การสกัดและ Saponification

สารเคมี

1. Extractant ประกอบด้วย hexane-acetone-absolute alcohol-toluene (10+7+6+7)
2. Methanolic potassium hydroxide 40% เตรียมโดยใส่ KOH 40 กรัม ลงใน methanol คนให้ละลายทิ้งไว้เย็นแล้วเจือจางให้ถึง 100 มิลลิลิตร ด้วย methanol
3. Hexane
4. sodium sulfate solution 10% เตรียมโดยละลาย Na_2SO_4 10 กรัมใน น้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร.

อุปกรณ์

1. Volumatic flask ขนาด 100 มิลลิลิตร.
2. Pipet
3. Water bath

วิธีการ

1. นำสำหรับรายสไปรูไลนามาบดใน micro-hammer mill เพื่อให้ละเอียด
2. ชั่งสำหรับรายสไปรูไลนา 1 กรัมใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 100

มิลลิลิตร

3. ตูดสารละลาย extractant 30 มิลลิลิตร ใส่ลงใน flask ทำการเขย่า 1 นาที
4. ตูดสารละลาย 40% methanolic KOH ใส่ลงใน flask ทำการเขย่า 1 นาที
5. นำ flask ใส่ลงใน water bath ที่อุณหภูมิ 56 °C นาน 20 นาที และป้องกันการระเหยของสารละลายใน flask โดยพันด้วยผ้าเปียกไว้รอบคอของ flask
6. นำ flask ขึ้นมาตั้งในที่มืด 1 ชั่วโมง
7. ตูดสารละลาย hexane 30 มิลลิลิตร ใส่ลงใน flask ทำการเขย่า 1 นาที จากนั้นทำการเจือจางให้ถึง 100 มิลลิลิตร ด้วยสารละลาย 10% Na_2SO_4 ทำการเขย่า 1 นาที นำไปตั้งในที่มืด 1 ชั่วโมง (สารละลายแยกออกเป็นสองส่วน คือ ส่วนตกตะกอนและส่วนสารละลายด้านบนซึ่งมีปริมาตรประมาณ 50 มิลลิลิตร)

2. การแยกส่วน (separation) โดย column chromatography

สารเคมี

1. Adsorbent เตรียมโดยผสม magnesium oxide กับ hyflo supercal ในอัตราส่วน 1: 1 (โดยน้ำหนัก) ด้วยเครื่องผสมนาน 1 ชั่วโมง
2. สารละลายที่ใช้แยกแซนโทฟิลล์รวมประกอบด้วย hexane-acetone-methanol (80+10+10)
3. Na_2SO_4

อุปกรณ์

1. column ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 12.5 มิลลิเมตร
2. ใยแก้วหรือสำลี

3. Water vacuum pump
4. Suction flask
5. Volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร

วิธีการ

: การเตรียม column

1. ติด column เข้ากับ suction flask แล้วเปิด water vacuum pump ให้เกิดสุญญากาศ

2. ใส่ใยแก้วหรือสำลีชิ้นเล็กๆ ลงในส่วนล่างของ column

3. ตัก adsorbent ใส่ลงใน column ให้สูง 7 เซนติเมตร พยายามอัดให้แน่น และสม่ำเสมอ

4. ตักสาร Na_2SO_4 ใส่ลงในส่วนบนของ adsorbent ให้สูง 2 เซนติเมตร

: การแยกสารแซนโทฟิลล์รวม (total xanthophyll)

1. ตูดสารละลายส่วนบนของตัวอย่างที่สกัดได้ลงใน column ประมาณ 10 มิลลิลิตร แล้วปล่อยให้สารละลายไหลผ่าน adsorbent จนเกือบหมด ซึ่งจะเห็นแถบสีเหลืองของแคโรทีน และสีส้มของแซนโทฟิลล์

2. เติมน้ำละลายที่ใช้แยกแซนโทฟิลล์รวมลงใน column ประมาณ 25 มิลลิลิตร เพื่อเก็บสารละลายสีเหลืองและสีส้มออกมาทั้งหมด (สังเกตสารละลายจะมีสีขาวใส)

3. เทสารละลายสีเหลืองส้มที่แยกได้ลงใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร ทำการเจือจางให้ถึงปริมาณด้วยสารละลายที่ใช้แยกแซนโทฟิลล์รวม

3. วัดปริมาณสารแซนโทฟิลล์รวมโดย spectrophotometer

อุปกรณ์

1. Spectrophotometer-Bausch and Lomb Spectronic 21

วิธีการ

ทำการวัดค่าความเข้มข้นของสารแซนโทฟิลล์รวมจากสารละลายโปรตีนโดยวัด ที่ ความยาวคลื่น 474 นาโนเมตร

การคำนวณหาค่าแซนโทฟิลล์รวม

$$\text{แซนโทฟิลล์รวม (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)} = 2.38 A_{474}/fbd$$

2.38 = มิลลิกรัมของแซนโทฟิลล์ต่อ working soln 1000 มิลลิลิตรที่ 474 นาโนเมตร

A_{474} = ค่า O.D. ที่อ่านได้ของสารละลายที่แยกได้

f = instrument deviation factor = $0.561/\text{observed } A_{474}$

b = เส้นผ่าศูนย์กลางของ Spectrophotometer tube

d = dilution factor

d = นน. ตัวอย่าง (กรัม) X ปริมาตรของสารละลายของตัวอย่างที่ใส่ใน column
 ปริมาตรของสารละลายของตัวอย่างที่สกัดได้ X ปริมาตรของสารละลายที่แยกได้

ค่า observed A_{474} ได้จากการอ่านค่าความเข้มข้นของแสงของ working soln โดย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 474 นาโนเมตร

ค่า working soln ได้จาก:

1. stock soln (1.0 mM) เตรียมโดยละลาย 1-(phenylazo)-2-naphthol (Sudan I) 0.1241 กรัม ใน 500 มิลลิลิตร ของ acetone-isopropanol (1+1)
2. working soln. (0.04 mM) โดยเจือจาง stock soln. 20 มิลลิลิตรใน 500 มิลลิลิตร acetone-isopropanol (1+1) แล้วเก็บในที่มืด

ตารางภาคผนวกที่ 1 ก ส่วนประกอบทางเคมีของวัตถุดิบที่ใช้ผสมอาหารไก่เนื้อและนกกระทาไข่

วัตถุดิบ								
ส่วนประกอบทางเคมี								
(เปอร์เซ็นต์ ^{1/})	มันสำปะหลังเส้น	ปลายข้าว	กากคั่วเหลือง	ปลายมัน	สาหร่ายสีน้ำตาล ^{3/}	รำละเอียด	ดินแคลเซียม	โซว
	(DCP-18)							
โปรตีน	1.87	8.00	44.00	55.00	52.25	12.50	-	0.90
ไขมัน	0.75	0.90	3.80	8.00	2.00	18.00	-	99.10
แคลเซียม	0.12	0.03	0.25	7.70	1.00	0.02	24.00	-
ฟอสฟอรัสทั้งหมด	0.05	3.13	0.54	3.80	2.30	0.47	18.00	-
ฟอสฟอรัสที่ใช้ประโยชน์ได้	0.05	0.04	0.20	3.00	-	0.20	18.00	-
พลังงานที่ใช้ประโยชน์ได้								
(กิโลแคลอรี/กก.)	3,150.00	3,150.00	2,450.00	2,900.00	2,498.00 ^{2/}	3,090.00	-	8,000.00
ไลซีน	0.09	0.30	2.50	4.20	1.61 ^{2/}	0.80	-	-
เมทไทโอนีน	0.04	0.32	0.60	1.40	0.87 ^{2/}	0.22	-	-
เมทไทโอนีน+ซิสทีน	0.06	0.32	1.26	1.80	0.87 ^{2/}	0.48	-	-
ทรีโตนีน	0.02	0.10	0.59	0.50	-	0.10	-	-
ฟีนิลอะลานีน	0.07	0.36	1.72	2.24	1.72 ^{2/}	0.40	-	-
ฮิสทีดีน	-	0.32	1.10	1.15	0.53 ^{2/}	0.32	-	-
อาร์จินีน	0.12	0.36	3.18	3.22	2.51 ^{2/}	0.95	-	-
ราคา (บาท/กก.)	2.50	3.80	11.00	17.00	210.00 ^{4/}	4.30	7.00	10.00

หมายเหตุ: ^{1/} Khajarern (1987)

^{2/} Sauveur และคณะ (1979)

^{3/} ผลการวิเคราะห์ทางเคมี

^{4/} ราคาของสถาบันพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ข

ข้อมูลการทดลอง

ตารางภาคผนวกที่ 1 ข ค่าคะแนนสีเข้ม*ของไก่เนื้อที่ได้รับสารรำสไปรูไลนาระดับต่างๆ
ในช่วงเวลา 4 สัปดาห์

สัปดาห์	ระดับสารรำสไปรูไลนา (เปอร์เซ็นต์ในอาหาร)				
	0	0.5	1.0	1.5	2.0
3	1.25	2.28	2.95	3.88	4.16
4	1.26	2.91	3.34	4.44	6.11
5	1.30	2.98	3.43	4.45	6.03
6	1.27	2.99	3.42	4.51	6.07
X	1.27	2.80	3.28	4.35	5.59
S.D.	0.04	0.34	0.23	0.28	0.95

หมายเหตุ: * สีเข้มวัดเปรียบเทียบกับพัคส์โรซ (1-15 คะแนน)

ตารางภาคผนวกที่ 2 ข ค่าคะแนนสิ่งจอยปาก*ของไก่เนื้อที่ได้รับสารฆ่าสไปรูโลนา
ระดับต่างๆในช่วงเวลา 4 สัปดาห์

สัปดาห์	ระดับสารฆ่าสไปรูโลนา (เปอร์เซ็นต์ในอาหาร)				
	0	0.5	1.0	1.5	2.0
3	1.10	2.12	2.45	3.18	3.56
4	1.10	2.64	2.99	3.95	5.26
5	1.00	1.99	2.55	3.66	5.09
6	1.03	2.19	2.72	3.73	5.26
X	1.06	2.23	2.68	3.63	4.79
S.D.	0.05	0.28	0.24	0.32	0.83

หมายเหตุ: * สิ่งจอยปากวัดเปรียบเทียบกับพัคส์โรซ (1-15 คะแนน)

ตารางภาคผนวกที่ 3 ข ค่าคะแนนสีไข่แดง*ของนกกระทาที่ได้รับสารรายสัปดาห์
ระดับต่างๆในช่วงเวลา 4 สัปดาห์

สัปดาห์	ระดับสารรายสัปดาห์ (เปอร์เซ็นต์ในอาหาร)				
	0	0.5	1.0	1.5	2.0
8	2.74	4.16	5.07	6.57	7.90
9	2.47	4.64	5.83	7.49	9.90
10	2.50	4.67	5.77	7.44	10.08
11	2.40	4.66	5.75	7.50	10.03
X	2.53	4.53	5.60	7.25	9.50
S.D.	0.16	0.27	0.39	0.50	1.15

หมายเหตุ: * สีไข่แดงวัดเปรียบเทียบกับพัคสีของโรท (1-15 คะแนน)

ภาคผนวก ค

การวิเคราะห์ข้อมูล

ตารางภาคผนวกที่ 1 ค การวิเคราะห์ผลทางสถิติสีเข้มของไก่เนื้อที่อายุ 3 สัปดาห์

SOV	df	SS	MS	F
Treatment	4	11.342	2.836	612.496 **
Error	5	0.023	0.005	
Total	9	11.365		

หมายเหตุ: ** มีความแตกต่างทางสถิติมีนัยสำคัญยิ่ง ($p < .01$)

C.V = 2.34 %

ตารางภาคผนวกที่ 2 ค การวิเคราะห์ผลทางสถิติสีเข้มของไก่เนื้อที่อายุ 4 สัปดาห์

SOV	df	SS	MS	F
Treatment	4	26.613	6.653	893.153 **
Error	5	0.037	0.007	
Total	9	26.650		

หมายเหตุ: ** มีความแตกต่างทางสถิติมีนัยสำคัญยิ่ง ($P < .01$)

C.V = 2.40 %

ตารางภาคผนวกที่ 3 ค การวิเคราะห์ผลทางสถิติสีน้ำตาลของไก่เนื้อที่อายุ 5 สัปดาห์

SOV	df	SS	MS	F
Treatment	4	24.980	6.245	192.748 **
Error	5	0.162	0.032	
Total	9	25.143		

หมายเหตุ: ** มีความแตกต่างทางสถิติมีนัยสำคัญ (P<.01)

C.V = 5.00 %

ตารางภาคผนวกที่ 4 ค การวิเคราะห์ผลทางสถิติสีน้ำตาลของไก่เนื้อที่อายุ 6 สัปดาห์

SOV	df	SS	MS	F
Treatment	4	24.705	6.182	883.142 **
Error	5	0.023	0.007	
Total	9	24.728		

หมายเหตุ: ** มีความแตกต่างทางสถิติมีนัยสำคัญ (P<.01)

C.V = 2.60 %

ตารางภาคผนวกที่ 5 ค การวิเคราะห์ผลทางสถิติของไก่เนื้อที่อายุ 4-6 สัปดาห์

SOV	df	SS	MS	F
Treatment	4	24.802	6.200	692.81 **
Linear	1	24.068	24.068	2,406.80 **
Quadratic	1	0.006	0.006	0.60
Cubic	1	0.584	0.584	58.40
Quatic	1	0.143	0.143	14.30
Error	5	0.085	0.010	
Total	9	24.887		

หมายเหตุ: ** มีความแตกต่างทางสถิติมีนัยสำคัญยิ่ง ($P < .01$)

$$C.V = 4.33 \%$$

$$R^2 = 0.99$$

ตารางภาคผนวกที่ 6 ค การวิเคราะห์ผลทางสถิติของไก่เนื้อที่อายุ 3 สัปดาห์

SOV	df	SS	MS	F
Treatment	4	7.417	1.854	186.350 **
Error	5	0.049	0.010	
Total	9	7.467		

หมายเหตุ: ** มีความแตกต่างทางสถิติมีนัยสำคัญยิ่ง ($P < .01$)

$$C.V = 4.02\%$$

ตารางภาคผนวกที่ 7 ค การวิเคราะห์ผลทางสถิติสิ่งจอยบากของไก่เนื้อที่อายุ 4 สัปดาห์

SOV	df	SS	MS	F
Treatment	4	19.215	4.804	301.805 **
Error	5	0.079	0.016	
Total	9	19.294		

หมายเหตุ:** มีความแตกต่างทางสถิติมีนัยสำคัญยิ่ง ($P < .01$)

$$C.V = 3.95\%$$

ตารางภาคผนวกที่ 8 ค การวิเคราะห์ผลทางสถิติสิ่งจอยบากของไก่เนื้อที่อายุ 5 สัปดาห์

SOV	df	SS	MS	F
Treatment	4	20.942	5.235	150.877 **
Error	5	0.174	0.035	
Total	9	21.115		

หมายเหตุ:** มีความแตกต่างทางสถิติมีนัยสำคัญยิ่ง ($P < .01$)

$$C.V = 6.39\%$$

ตารางภาคผนวกที่ 9 ค การวิเคราะห์ผลทางสถิติสิ่งจอยปากของไก่เนื้อที่อายุ 6 สัปดาห์

SOV	df	SS	MS	F
Treatment	4	19.826	4.957	447.805 **
Error	5	0.055	0.011	
Total	9	19.882		

หมายเหตุ: ** มีความแตกต่างทางสถิติมีนัยสำคัญยิ่ง ($P < .01$)

$$C.V = 3.54\%$$

ตารางภาคผนวกที่ 10 ค การวิเคราะห์ผลทางสถิติสิ่งจอยปากของไก่เนื้อ
ที่อายุ 4-6 สัปดาห์

SOV	df	SS	MS	F
Treatment	4	19.905	4.976	318.78 **
Linear	1	19.542	19.542	1,251.93 **
Quadratic	1	0.090	0.090	5.78
Cubic	1	0.173	0.173	11.08
Quatic	1	0.099	0.099	6.33
Error	5	0.078	0.011	
Total	9	19.982		

หมายเหตุ: ** มีความแตกต่างทางสถิติมีนัยสำคัญยิ่ง ($P < .01$)

$$C.V = 4.13\%$$

$$R^2 = 0.99$$

ตารางภาคผนวกที่ 11 ค การวิเคราะห์ผลทางสถิติสีไข่แดงของนกกระทาอายุ 8 สัปดาห์

SOV	df	SS	MS	F
Treatment	4	48.672	12.168	111.633 **
Error	10	1.091	0.109	
Total	14	49.763		

หมายเหตุ: ** มีความแตกต่างทางสถิติมีนัยสำคัญยิ่ง ($P < .01$)

$$C.V = 6.24\%$$

ตารางภาคผนวกที่ 12 ค การวิเคราะห์ผลทางสถิติสีไข่แดงของนกกระทา
ที่อายุ 9 สัปดาห์

SOV	df	SS	MS	F
Treatment	4	95.363	23.841	701.776 **
Error	10	0.340	0.0340	
Total	14	95.703		

หมายเหตุ: ** มีความแตกต่างทางสถิติมีนัยสำคัญยิ่ง ($P < .01$)

$$C.V = 3.04\%$$

ตารางภาคผนวกที่ 13 ค การวิเคราะห์ผลทางสถิติสีไข่แดงนกกระทาที่อายุ 10 สัปดาห์

SOV	df	SS	MS	F
Treatment	4	98.537	24.634	1,837.095 **
Error	10	0.134	0.013	
Total	14	98.672		

หมายเหตุ: ** มีความแตกต่างทางสถิติมีนัยสำคัญ (P<.01)

$$C.V = 1.90\%$$

ตารางภาคผนวกที่ 14 ค การวิเคราะห์ผลทางสถิติสีไข่แดงนกกระทาที่อายุ 11 สัปดาห์

SOV	df	SS	MS	F
Treatment	4	100.190	25.047	2,741.344 **
Error	10	0.091	0.009	
Total	14	100.282		

หมายเหตุ: ** มีความแตกต่างทางสถิติมีนัยสำคัญ (P<.01)

$$C.V = 1.58\%$$

ตารางภาคผนวกที่ 15 ค การวิเคราะห์ผลทางสถิติสัปดาห์ไข่แดงนกกะทาอายุ 9-11 สัปดาห์

SOV	df	SS	MS	F
Treatment	4	99.620	24.905	2,210.52 **
Linear	1	97.885	97.885	8,688.04 **
Quadratic	1	0.382	0.382	33.94
Cubic	1	1.268	1.268	112.63 **
Quatic	1	0.084	0.084	7.42
Error	10	0.113	0.011	
Total	14	99.733		

หมายเหตุ: ** มีความแตกต่างทางสถิติมีนัยสำคัญยิ่ง ($P < .01$)

$$C.V = 1.75\%$$

$$R^2 = 0.99$$



หอสมุดกลาง
มหาวิทยาลัยขอนแก่น