ผลของการเสริมวิตามินอี ซีลีเนียม และโอเมก้า-3 ในอาหาร ต่อการผสมติด และการฟักออกในไก่แม่พันธุ์ มทส

นางสาวทับทิม สำแดงไชย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ปีการศึกษา 2559

EFFECTS OF DIETARY VITAMIN E, SELENIUM AND OMEGA-3 SUPPLEMENTATION ON FERTILITY AND HATCHABILITY OF SUT FEMALE BREEDERS

Thabtim Samdangchai

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Animal Production Technology

Suranaree University of Technology

Academic Year 2016

ผลของการเสริมวิตามินอี ซีลีเนียม และโอเมก้า-3 ในอาหาร ต่อการผสมติด และการฟักออกในไก่แม่พันธุ์ มทส

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

(รศ. ดร.ปราโมทย์ แพงคำ)
ประธานกรรมการ

(ผศ. ดร.สุทิศา เข็มผะกา)
กรรมการ (อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์)

(อ. ดร.วิทธวัช โมพี)
กรรมการ

(รศ. ดร.อมรรัตน์ โมพี)
กรรมการ

(ผศ. น.สพ. ดร.บัญชร ลิขิตเดชาโรจน์)
กรรมการ

(ศ. ดร.ชูกิจ ลิมปิจำนงค์)
รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการและนวัตกรรม

(ศ. ดร.หนึ่ง เตียอำรุง)
คณบดีสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ทับทิม สำแดงไชย : ผลของการเสริมวิตามินอี ซีลีเนียม และโอเมก้า-3 ในอาหาร ต่อการผสมติด และการฟักออกในไก่แม่พันธุ์ มทส (EFFECTS OF DIETARY VITAMIN E, SELENIUM AND OMEGA-3 SUPPLEMENTATION ON FERTILITY AND HATCHABILITY OF SUT FEMALE BREEDERS) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุทิศา เข็มผะกา, 80 หน้า.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการเสริมวิตามินอี ซีลีเนียม และโอเมก้า-3 ในอาหารไก่แม่พันธุ์ มทส ต่อการให้ผลผลิตไข่ การผสมติด การฟักออก ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ และการตอบสนองการสร้างภูมิคุ้มกันต่อโรคนิวคาสเซิล (NDV) โดยใช้ไก่แม่พันธุ์ มทส อายุ 28 สัปดาห์ จำนวน 195 ตัว และไก่พ่อพันธุ์เหลืองหางขาว อายุ 28 สัปดาห์ จำนวน 39 ตัว ทำการแบ่งไก่ออกเป็น 13 กลุ่ม ๆ ละ 3 ซ้ำ ๆ ละ 5 ตัว ใช้พ่อพันธุ์ไก่เหลืองหางขาว 1 ตัว ต่อแม่ไก่ มทส 5 ตัว (1 : 5) อาหารทดลองแบ่งออกเป็น 13 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุม 1 กลุ่ม และกลุ่มการทดลอง 12 กลุ่ม มีการเสริมวิตามินอี (75 และ 150 มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหาร) ซีลีเนียม (0.1 0.3 และ 0.5 มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหาร) และโอเมก้า-3 จากน้ำมันปลาทูน่า (0.75 และ 1.5%)

ผลการทดลองพบว่าการเสริมวิตามินอี ซีลีเนียม และโอเมก้า-3 ในอาหารแม่ไก่ มทส ไม่มีผลต่อปริมาณอาหารที่กิน ผลผลิตไข่ และการฟักออก ($p<0.05$) ในทุกระยะการทดลอง (อายุ 28-32 32-36 36-40 และ 28-40 สัปดาห์) อย่างไรก็ตามพบว่าอัตราการผสมติดในช่วงอายุ 32-36 สัปดาห์ มีค่าสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p<0.05$) โดยกลุ่มการทดลองที่มีการเสริมวิตามินอี 150 มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหาร ซีลีเนียม 0.3 มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหาร และน้ำมันปลา 0.75 % มีจำนวนลูกไก่สะสมสูงสุด และมีต้นทุนค่าอาหารในการผลิตลูกไก่ 1 ตัว ต่ำสุด สำหรับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระซึ่งวัดในรูปแบบของ DPPH TBARS และการทำงานของเอนไซม์กลูตาไธโอน-เปอร์ออกซิเดส (GSH-Px) พบว่าวิตามินอีสามารถเพิ่มค่า DPPH ทั้งในไข่แดง และในพลาสมา ($p<0.05$) แต่ไม่พบความแตกต่างดังกล่าวในกลุ่มที่เสริมซีลีเนียมและน้ำมันปลา ($p>0.05$) วิตามินอีและซีลีเนียมมีอิทธิพลร่วมกัน (interaction) ต่อค่า TABRS ในไก่อายุ 32 สัปดาห์ โดยการเสริมวิตามินอี 150 และซีลีเนียม 0.5 มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหาร สามารถยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด อีกทั้งวิตามินอีและซีลีเนียมสามารถเพิ่มค่าเอนไซม์กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดสทั้งในพลาสมาและไข่แดงของแม่ไก่อายุ 32 สัปดาห์ ($p<0.05$) ได้ แต่อย่างไรก็ตามวิตามินอี ซีลีเนียม และน้ำมันปลา ไม่มีผลต่อระดับภูมิคุ้มกันที่ตอบสนองต่อโรคนิวคาสเซิล ทั้งในไก่แม่พันธุ์ มทส และไก่โคราช ($p>0.05$)

จากการทดลองครั้งนี้สรุปได้ว่า การเสริมวิตามินอี ซีลีเนียม และน้ำมันปลาไม่มีผลต่อการให้ผลผลิตไข่ การผสมติด การฟักออก และการตอบสนองภูมิคุ้มกันต่อโรคนิวคาสเซิล ตลอดช่วง

การทดลอง (28-40 สัปดาห์) ยกเว้นในช่วงอายุ 32-38 สัปดาห์ที่พบว่าการเสริมวิตามินอี ซีลีเนียม และน้ำมันปลา สามารถเพิ่มอัตราการผสมติดในไก่แม่พันธุ์ มทส นอกจากนี้วิตามินอีและซีลีเนียม สามารถเพิ่มกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระทั้งในพลาสามาและไข่แดงได้

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ ลายมือชื่อนักศึกษา____________

ปีการศึกษา 2559 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา____________

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม____________

THABTIM SAMDANGCHAI : EFFECTS OF DIETARY VITAMIN E, SELENIUM AND OMEGA-3 SUPPLEMENTATION ON FERTILITY AND HATCHABILITY OF SUT FEMALE BREEDERS. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. SUTISA KHEMPAKA, Ph.D., 80 PP.

VITAMIN E/SELENIUM/OMEGA-3/ANTIOXIDANT/FERTILITY/ HATCHABILITY/BREEDER

This study aimed to evaluate the effects of dietary vitamin E, selenium (Se) and omega-3 in SUT female breeders on egg production, fertility, hatchability, antioxidant capacity and immune response to NDV (Newcastle disease virus). A total of 195 SUT female breeders aged 28 weeks and 39 Lueng Hang Khao male breeders aged 28 weeks were allocated to 13 dietary treatments with 3 replicates of 5 females and 1 male (1 : 5). Thirteen experimental diets composed of 1 control group and 12 dietary treatments supplemented with combinations of vitamin E (75 and 150 mg/kg diet), Se (0.1, 0.3 and 0.5 mg/kg diet) and tuna omega-3 oil (0.75 and 1.50%) for 12 weeks.

The results showed that dietary vitamin E, Se and fish oil did not have any significant effects on feed intake, egg production and hatchability of SUT female breeders ($p>0.05$) in all periods (28-32, 32-36, 36-40 and 28-40 weeks of age). However, the fertility rate of the hens in period 32-36 weeks of age were higher than the control group ($p<0.05$). In addition, the supplementation of 150 mg/kg diet of vitamin E, 0.3 mg/kg diet of Se and 0.75% fish oil provided the highest number of 1-day old Korat chicks and with lowest feed cost per chick. The antioxidant capacity

was evaluated using the DPPH, TBARS and glutathione peroxidase activity (GSH-Px) assays. It was found that vitamin E can increase DPPH values in both egg yolk and plasma ($p<0.05$), while no significant effect of Se and fish oil ($p>0.05$). There was an interaction between vitamin E and Se on the TBARS value in hens aged 32 weeks, with the supplementation of 150 mg/kg diet of vitamin E and 0.5 mg/kg diet of Se, showed the best result on antioxidant activity. Vitamin E and Se can improve glutathione peroxidase activity in both plasma and egg yolk of hens at 32 weeks of age ($p<0.05$). However, vitamin E, Se and fish oil did not alter antibody titer to NDV in both SUT female breeders and Korat chickens ($p>0.05$).

This study indicates that dietary vitamin E, Se and fish oil had no effects on egg production, fertility, hatchability and immune response to NDV throughout the experimental period (28-40 weeks). Except in a period of 32-38 weeks of age, vitamin E, Se and fish oil can increase fertility rate in SUT female breeders. In addition, vitamin E and Se can increase the antioxidant capacity in both egg yolk and plasma.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

School of Animal Production Technology — Student's Signature Thabtim Samdangchai

Academic Year 2016 — Advisor's Signature Sutisa Khempaka

Co-advisor's Signature W. Molee

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุทิศา เข็มผะกา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และอาจารย์ ดร.วิทธวัช โมพี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำ และช่วยสนับสนุนงานด้านการทดลองตลอดระยะเวลาของการศึกษา รวมทั้งกรุณาแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ และช่วยทำให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้เสร็จสมบูรณ์ นอกจากนี้ขอขอบพระคุณอาจารย์ประจำสาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ ตลอดจนอาจารย์ผู้สอนทุกท่าน ที่อบรมสั่งสอนและให้ความรู้ทางด้านวิชาที่เป็นประโยชน์จนสำเร็จการศึกษา

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่งานสัตว์ปีก และเจ้าหน้าที่ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีทุกท่านที่ให้คำแนะนำ และช่วยเหลือในการเลี้ยงไก่แม่พันธุ์ ขอบคุณศูนย์เครื่องมือวิทยาศาตร์และเทคโนโลยี รวมทั้งเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ เครื่องมือ อุปกรณ์ และสิ่งอำนวยความสะดวกต่าง ๆ สำหรับการดำเนินงานวิจัย

ขอบคุณพี่ ๆ เพื่อน ๆ น้อง ๆ สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ ที่ให้ความช่วยเหลือระหว่างการดำเนินงานวิจัยให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

และสุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณบิดา มารดา และญาติพี่น้องทุกท่านที่คอยให้กำลังใจ ให้การสนับสนุน และช่วยเหลือจนประสบความสำเร็จในการศึกษา

ทับทิม สำแดงไชย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ (ภาษาไทย) .... ก
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ) .... ค
กิตติกรรมประกาศ .... จ
สารบัญ .... ฉ
สารบัญตาราง .... ฌ
สารบัญภาพ .... ฎ
บทที่
1 **บทนำ** 1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาในการทำวิจัย 1
1.2 วัตถุประสงค์งานวิจัย 3
1.3 สมมุติฐานงานวิจัย 3
1.4 ขอบเขตงานวิจัย 3
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 3
2 **วรรณกรรมและเอกสารที่เกี่ยวข้อง** 4
2.1 ความเครียดจากความร้อนและการเลี้ยงไก่พ่อแม่พันธุ์ 4
2.2 ปัจจัยที่ส่งผลต่อการผสมติดและการฟักในไก่พ่อแม่พันธุ์ 4
2.2.1 ปัจจัยทางด้านอาหาร 6
2.2.2 ปัจจัยจากพันธุกรรม 6
2.2.3 ปัจจัยจากสิ่งแวดล้อม 7
2.3 การเกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) 8
2.4 ผลกระทบของภาวะเครียดออกซิเดชันที่เกิดจากความร้อนในสัตว์ปีก 10
2.5 สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) 12
2.6 วิตามินอี (Vitamin E) 16
2.6.1 การย่อยและการดูดซึมวิตามินอี 18
2.6.2 ความต้องการวิตามินอีในสัตว์ปีก 19

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.6.3 การขาดวิตามินอีในสัตว์ปีก 19
2.6.4 ผลของการเสริมวิตามินอีในอาหารไก่ต่อสมรรถนะการผลิต การผสมติด การฟักออกและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ 21
2.7 ซีลีเนียม (Selenium, Se) 24
2.7.1 การย่อยและการดูดซึมซีลีเนียม 26
2.7.2 ความต้องการซีลีเนียมในสัตว์ปีก 26
2.7.3 การขาดซีลีเนียมในสัตว์ปีก 27
2.7.4 ผลของการเสริมซีลีเนียมในอาหารไก่ต่อสมรรถนะการให้ผลผลิต การผสมติด การฟักออก และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ 27
2.8 น้ำมันปลา (Fish oil) 30
3 วิธีดำเนินการวิจัย 34
3.1 สัตว์และการจัดกลุ่มทดลอง 34
3.2 อาหารทดลอง 34
3.3 การเก็บข้อมูล 35
3.3.1 สมรรถนะการให้ผลผลิต 35
3.3.2 การผสมติดและฟักออก 36
3.4 การวิเคราะห์ทางเคมี 36
3.4.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสูตรอาหาร 36
3.4.2 การวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระ 37
3.4.2.1 การวัด Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) 37
3.4.2.2 การวัด 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 37
3.4.2.3 การวัดค่า glutathione peroxidase enzyme (GSH-Px) 38
3.4.3 การศึกษาระบบภูมิคุ้มกัน 38
3.5 การวิเคราะห์ทางสถิติ 39
3.6 สถานที่ทำการทดลอง 39
3.7 ระยะเวลาในการทำการทดลอง 39

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง 40
4.1 ผลของการเสริมวิตามินอี ซีลีเนียม และโอเมก้า-3 ในอาหารไก่แม่พันธุ์ มทส ต่ออัตราการให้ผลผลิต การผสมติด และการฟักออก 40
4.2 ผลของการเสริมวิตามินอี ซีลีเนียม และโอเมก้า -3 ในอาหารไก่แม่พันธุ์ มทส ต่อการต้านอนุมูลอิสระ 49
4.3 ผลของการเสริมวิตามินอี ซีลีเนียม และโอเมก้า -3 ในอาหารไก่แม่พันธุ์ มทส ต่อการสร้างภูมิคุ้มกัน 54
5 บทสรุปและข้อเสนอแนะ 56
5.1 บทสรุป 56
5.2 ข้อเสนอแนะ 56
รายการอ้างอิง 58
ภาคผนวก 70
ประวัติผู้เขียน 80

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 ความต้องการพลังงานและโปรตีนในไก่สายพันธุ์การค้า 6
2.2 การให้ผลิตไข่ และการฟักออกของแม่พันธุ์ไก่เนื้อทางการค้า 6
2.3 ปัจจัยภายนอกและภายในของการเกิดอนุมูลอิสระ 10
2.4 รูปแบบของเอนไซม์ glutathione peroxidase และหน้าที่ต่าง ๆ ภายในเซลล์ 15
2.5 โรคและอาการของโรคในสัตว์ที่ขาดวิตามินอีมากเกินไป 20
2.6 ผลของการเสริมวิตามินอีในอาหารไก่ต่อสมรรถระการให้ผลผลิต 21
2.7 ผลของการเสริมวิตามินอีในอาหารต่ออัตราการผสมติดและฟักออก 22
2.8 ผลของการเสริมวิตามินอีต่อการต้านอนุมูลอิสระ 23
2.9 แหล่งที่พบซีลีเนียม 25
2.10 ผลของการเสริมซีลีเนียมในอาหารไก่ต่ออัตราการให้ผลผลิตและน้ำหนักไข่ 28
2.11 ผลของการเสริมซีลีเนียมในอาหารไก่ต่ออัตราการผสมติดและฟักออก 29
2.12 ผลของการเสริมซีลีเนียมต่อการทำงานของเอนไซม์กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส 30
2.13 ผลของการเสริมน้ำมันปลาต่อสมรรถณะการให้ผลผลิตไข่ 32
3.1 สูตรอาหารทดลองที่มีการเสริมวิตามินอี ซีลีเนียม และน้ำมันปลา ที่ระดับแตกต่างกัน 35
3.2 องค์ประกอบทางเคมีและโภชนะในอาหารไก่ทางการค้า 36
4.1 ผลของการเสริมวิตามินอี ซีลีเนียม และโอเมก้า -3 ในอาหารไก่แม่พันธุ์ มทส ต่อการกินได้ (28-32 32-36 36-40 28-40 สัปดาห์) 44
4.2 ผลของการเสริมวิตามินอี ซีลีเนียม และโอเมก้า -3 ในอาหารไก่แม่พันธุ์ มทส ต่อการให้ผลผลิตไข่ (28-32 32-36 36-40 28-40 สัปดาห์) 45
4.3 ผลของการเสริมวิตามินอี ซีลีเนียม และโอเมก้า -3 ในอาหารไก่แม่พันธุ์ มทส ต่อการผสมติด (28-32 32-36 36-40 28-40 สัปดาห์) 46
4.4 ผลของการเสริมวิตามินอี ซีลีเนียม และโอเมก้า -3 ในอาหารไก่แม่พันธุ์ มทส ต่อการฟักออก (28-32 32-36 36-40 28-40 สัปดาห์) 47

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

4.5 ผลของการเสริมวิตามินอี ซีลีเนียม และโอเมก้า-3 ในอาหารไก่แม่พันธุ์ มทส ต่อจำนวนลูกไก่และต้นทุนการผลิตลูกไก่ 48
4.6 ผลของการเสริมวิตามินอี ซีลีเนียม และโอเมก้า-3 ในอาหารไก่แม่พันธุ์ มทส ต่อความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (DPPH)........ 51
4.7 ผลของการเสริมวิตามินอี ซีลีเนียม และโอเมก้า-3 ในอาหารไก่แม่พันธุ์ มทส ต่อการเกิดอนุมูลอิสระ (TBARS)........ 52
4.8 ผลของการเสริมวิตามินอี ซีลีเนียม และโอเมก้า-3 ในอาหารไก่แม่พันธุ์ มทส ต่อการทำงานของเอนไซม์กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส (GSH-Px) 53
4.9 ผลของการเสริมวิตามินอี ซีลีเนียม และโอเมก้า-3 ในอาหารไก่แม่พันธุ์ มทส ต่อระบบภูมิคุ้มกันที่ตอบสนองต่อโรคนิวคาสเซิล 55
ก1 วิธีการเตรียมสาร MDA Standard 72

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

2.1 เปอร์เซ็นต์การผสมติดและการฟักออกไก่แม่พันธุ์ มทส 5

2.2 โครงสร้างของ Malondialdehyde (MDA) 7

2.3 ช่วงอุณหภูมิที่มีผลกระทบต่อสัตว์ 11

2.4 กลไกการทำลายเซลล์ของอนุมูลอิสระ 13

2.5 การทำงานของเอนไซม์กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดสในการกำจัด
ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 15

2.6 โครงสร้างของวิตามินอี 16

2.7 ตำแหน่งของวิตามินอีในเยื่อหุ้มเซลล์ 17

2.8 กลไกการทำงานของวิตามินอีในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน 18

2.9 กระบวนการดูดซึมวิตามินอีบริเวณลำไส้เล็ก 19

2.10 กลไกการทำงานร่วมกันของวิตามินอีและซีลีเนียมในการป้องกันอนุมูลอิสระ 25

ก1 กราฟมาตรฐาน MDA 73

ก2 กราฟมาตรฐาน GSH-Px 79

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาในการทำวิจัย

การเลี้ยงไก่พื้นเมืองในประเทศไทยเป็นที่นิยมและมีการเลี้ยงมายาวนาน ตั้งแต่การเลี้ยงตามบ้านและอุตสาหกรรมขนาดเล็ก เนื่องจากเนื้อไก่เป็นอาหารโปรตีนที่มีราคาถูก อีกทั้งเนื้อของไก่พื้นเมืองมีความเหนียวนุ่ม และอร่อยกว่าไก่เนื้อพันธุ์การค้าทั่วไป แต่เป็นที่ทราบกันดีว่าการเลี้ยงไก่พื้นเมืองมักประสบปัญหาการเจริญเติบโตช้า ระยะเวลาการเลี้ยงนานกว่าจะให้ผลผลิตในแต่ละรุ่นและให้ผลผลิตต่ำ ปัจจุบันจึงมีการปรับปรุงและพัฒนาสายพันธุ์ไก่พื้นเมืองให้มีความสามารถในการให้ผลผลิตที่มากขึ้นเพื่อให้เพียงพอต่อความต้องการของตลาด รวมทั้งยังมีการพัฒนาพันธุ์ไก่ในรูปแบบของไก่พื้นเมืองลูกผสม เช่น ไก่โคราช ซึ่งเกิดจากการนำไก่พ่อพันธุ์เหลืองหางขาวมาผสมกับไก่แม่พันธุ์ มทส ซึ่งไก่โคราชมีลักษณะโดดเด่นกว่าไก่พื้นเมืองทั่วไป ใช้ระยะเวลาการเลี้ยงน้อยกว่าไก่พื้นเมือง สามารถนำมาใช้เป็นเครื่องมือในการประกอบอาชีพสำหรับเกษตรกรได้

ไก่แม่พันธุ์ มทส เป็นไก่สายพันธุ์สังเคราะห์ (synthetic breed) ที่ปรับปรุงและพัฒนาโดยมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี มีวัตถุประสงค์เพื่อใช้เป็นแม่พันธุ์ไก่โคราช แต่ในไก่แม่พันธุ์ มทส รุ่นที่ 1-3 ประสบปัญหาการให้ผลผลิตไข่และการผสมติดต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับแม่พันธุ์ไก่เนื้อทางการค้า ซึ่งอาจเกิดได้จากหลายปัจจัย เช่น ตัวสัตว์ อาหาร การจัดการ และสิ่งแวดล้อม เป็นต้น จากการศึกษาข้อมูลของไก่แม่พันธุ์ มทส พบว่าปัจจัยหลักที่ส่งผลต่ออัตราการผสมติดน่าจะมาจากสภาพแวดล้อม โดยสภาพอากาศที่ร้อนเกินไปจะส่งผลให้สัตว์เกิดความเครียด ซึ่งความเครียดเป็นปัจจัยภายนอกอย่างหนึ่งที่ส่งผลต่อการกำจัดสารอนุมูลอิสระที่เกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์ และถ้าสัตว์ได้รับความร้อนเป็นเวลานาน (chronic heat stress) จะส่งผลให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) ซึ่งเป็นภาวะที่อนุมูลอิสระมากจนสารต้านอนุมูลอิสระมีไม่เพียงพอ ส่งผลต่อการทำลายดีเอ็นเอ โปรตีน ไขมัน และโมเลกุลขนาดเล็กอื่น ๆ และยังส่งผลให้การกินได้ อัตราการเจริญเติบโต การให้ผลผลิตไข่ คุณภาพไข่ การผสมติดและการฟักออกลดลง อัตราการตายมากขึ้น (Bolukbasi et al., 2007; Scheideler et al., 2010) นอกจากนี้ยังส่งผลกระทบต่อระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย (Mahood and Ghazi, 2014) การเสริมสารที่มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระในอาหารเพิ่มเติมจากที่ร่างกายสัตว์สร้างขึ้น น่าจะสามารถช่วยรักษาสมดุลต่าง ๆ ในร่างกายให้ดำเนินต่อไปได้อย่างปกติ

สารต้านอนุมูลอิสระที่พบในธรรมชาติ เช่น วิตามินอี และซีลีเนียม ซึ่งทำงานเสริมฤทธิ์กัน (synergism) ในการป้องกันการเกิดออกซิเดชันของเซลล์ หรือปกป้องเซลล์จากการถูกออกซิไดส์โดยอนุมูลอิสระ วิตามินอีมีบทบาทสำคัญในการหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ที่เกิดจากอนุมูลอิสระ ส่วนซีลีเนียมเป็นองค์ประกอบของเอนไซม์กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส (glutathione peroxidase, GSH-Px) ทำหน้าที่กำจัดสารอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นให้หมดไป (Surai, 2000) การเสริมวิตามินอีและซีลีเนียมพบว่ามีผลกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส (Lin et al., 2005; An et al., 2010; Wang et al., 2010; Keshavamurthy et al., 2013) รวมทั้งการต้านอนุมูลอิสระในพลาสมา และในไข่แดง (An et al., 2010; Wang et al., 2010; Keshavamurthy et al., 2013; Nyquist et al., 2013; Wang et al., 2010) ช่วยปรับปรุงประสิทธิภาพการให้ผลผลิตไข่ การผสมติดและการฟักออก (Tsai et al., 2008; Lesson et al., 2008; Biwas et al., 2010; Osma et al., 2010) และยังสามารถเพิ่มน้ำหนักไข่ได้ (Radwan et al., 2008; Urso et al., 2015) วิตามินอีและซีลีเนียมนอกจากจะมีบทบาทต่อประสิทธิภาพการให้ผลิตแล้ว ยังสามารถกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันโรคได้ โดยมีผลในการเพิ่มน้ำหนักม้าม และไทมัส ซึ่งเป็นอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับการสร้างภูมิคุ้มกัน (Lin and Chang, 2006; Mohmood and Ghazi, 2014) รวมถึงยังสามารถเพิ่มระดับการสร้างภูมิคุ้มกันโรคต่อเชื้อ SRBC (sheep red blood cell) และ กัมโบโร (infectious bursal diseases, IBD) (Kidd, 2004; Lin and Chang, 2006; Mohapatra et al., 2014)

นอกจากนี้จากการรวบรวมเอกสารพบว่า โอเมก้า-3 ซึ่งเป็นแหล่งของ EPA และ DHA ที่พบมากในน้ำมันปลาทะเล มีบทบาทสำคัญในการพัฒนาเอ็มบริโอในฟองไข่ เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ฮอร์โมน ecosanoid เช่น prostaglandins (PG) และ leukotrienes (Hall et al., 2007) ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างภูมิคุ้มกันของร่างกาย (Khatibjoo et al., 2011; Hosseini-Mansoub and Bahrami, 2011) การเสริมโอเมก้า-3 ในอาหารสัตว์ปีก พบว่าสามารถเพิ่มน้ำหนักของม้าม ไทมัส และเบอร์ซ่า (Wang et al., 2000) ส่งผลให้การสร้างภูมิคุ้มกันโรคมีประสิทธิภาพมากขึ้น (Lin and Chang, 2006) เพิ่มอัตราการผสมติด การฟักออก (Bozkurt et al., 2008) ปริมาณการกินอาหาร การให้ผลผลิตไข่ และน้ำหนักไข่ (Basmarcioglu et al., 2003; Ebeid et al., 2008) แต่เนื่องจากโอเมก้า-3 เป็นกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวที่ง่ายต่อการถูกออกซิไดส์ (Ebeid et al., 2008) โดยเฉพาะในช่วงการฟักไข่ ลูกไก่มีการสัมผัสกับออกซิเจนในอากาศและเปลี่ยนการหายใจผ่าน chorioallantoic membrane ขณะอยู่ในไข่มาหายใจโดยใช้ปอด ทำให้มีการใช้ออกซิเจนมากขึ้น ส่งผลให้เกิดอนุมูลอิสระสูงขึ้นตามมา ดังนั้นความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของลูกไก่จำเป็นที่จะต้องได้รับการส่งต่อจากแม่ไก่ เพราะถ้าลูกไก่มีการสะสมวิตามินอีและซีลีเนียมในเนื้อเยื่อมากพอ จะส่งผลให้ร่างกายสามารถนำไปสังเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระได้ (Mezes et al., 1997) ดังนั้นการใช้โอเมก้า-3 ร่วมกับสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น วิตามินอี และซีลีเนียมน่าจะมีประสิทธิภาพที่ดี

ยิ่งขึ้น แต่อย่างไรก็ตามการใช้วิตามินอี ซีลีเนียม และโอเมก้า-3 ร่วมกันยังขาดข้อมูลการศึกษา อีกทั้งหากมีการใช้สารดังกล่าวเสริมในอาหารไก่แม่พันธุ์ มทส อาจเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยเพิ่มอัตราการผสมติดและการฟักออก และส่งเสริมให้ลูกไก่โคราชมีสุขภาพดีขึ้นได้ ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการเสริมวิตามินอี ซีลิเนียม และโอเมก้า-3 ต่ออัตราการผสมติด การฟักออก การกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันโรคต่อเชื้อนิวคาสเซิลในไก่แม่พันธุ์ มทส และลูกไก่โคราช

1.2 วัตถุประสงค์งานวิจัย

เพื่อศึกษาผลของการเสริมวิตามินอี ซีลีเนียม และโอเมก้า-3 ในอาหารไก่แม่พันธุ์ มทส ต่ออัตราการผสมติด การฟักออก การต้านอนุมูลอิสระ และการตอบสนองต่อการสร้างภูมิคุ้มกันโรค

1.3 สมมุติฐานงานวิจัย

การเสริมวิตามินอี ซีลีเนียม และโอเมก้า-3 ในอาหารไก่แม่พันธุ์ มทส น่าจะสามารถเพิ่มอัตราการผสมติด การฟักออก การต้านอนุมูลอิสระทั้งในไข่แดงและพลาสมา รวมทั้งสามารถกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันต่อโรคนิวคาสเซิลในแม่ไก่ มทส และลูกไก่โคราช

1.4 ขอบเขตงานวิจัย

การวิจัยครั้งนี้มุ่งเน้นศึกษาผลของวิตามินอี ซีลีเนียม และโอเมก้า-3 ที่ระดับต่าง ๆ ในอาหารไก่แม่พันธุ์ มทส ต่ออัตราการผสมติด การฟักออก ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ และการสร้างภูมิคุ้มกันต่อโรคนิวคาสเซิล โดยคาดหวังว่าความรู้ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้จะสามารถนำมาใช้ในการเลี้ยงไก่แม่พันธุ์ มทส ภายใต้โรงเรือนระบบเปิด (open housing system) ได้

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 ไก่แม่พันธุ์ มทส มีอัตราการผสมติดและการฟักออกดีขึ้น ได้ลูกไก่ต่อแม่จำนวนเพิ่มมากขึ้น สามารถลดต้นทุนในการผลิตลูกไก่

1.5.2 สามารถผลิตลูกไก่ที่มีสุขภาพดีให้แก่เกษตรกรได้

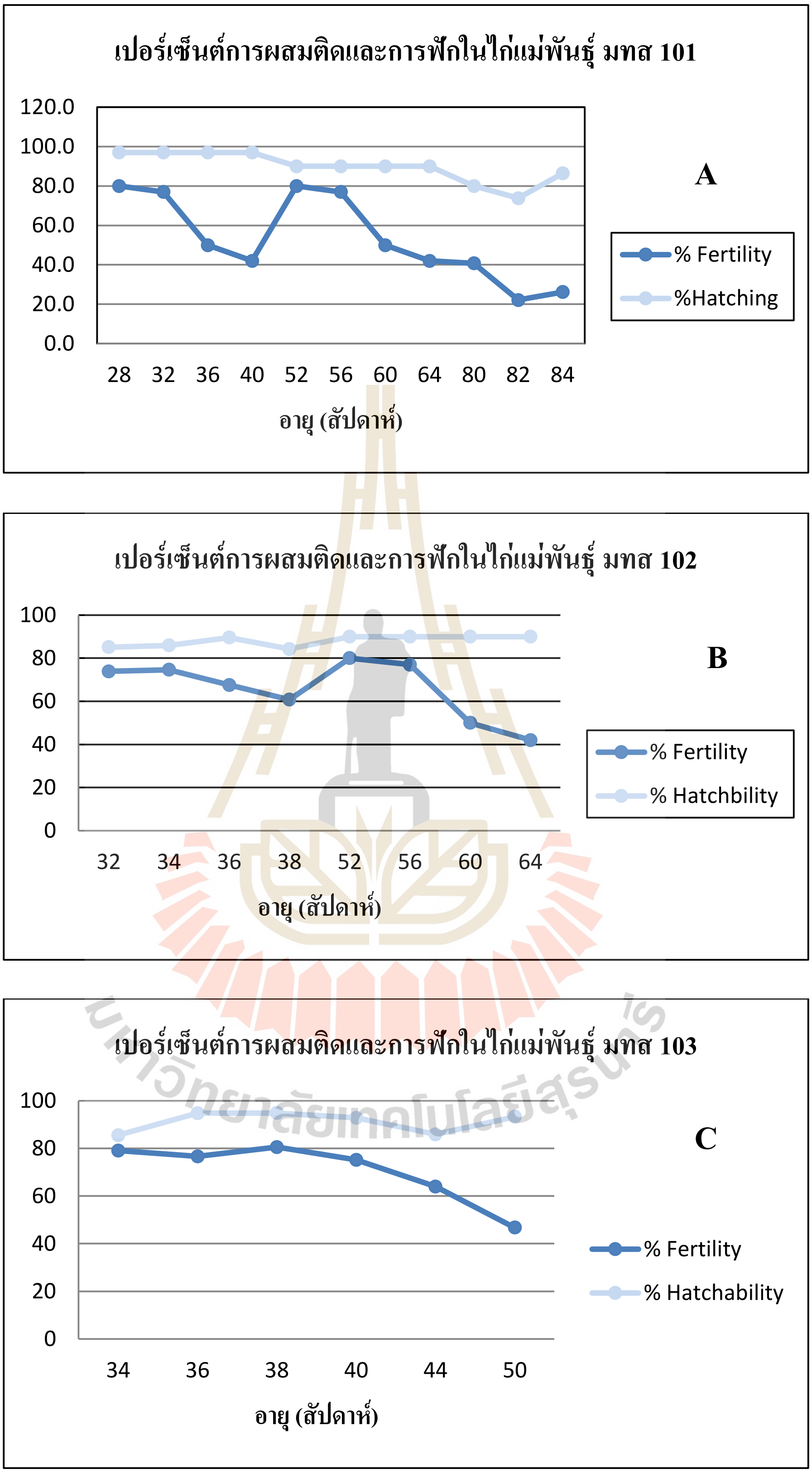
1.5.3 สามารถนำผลที่ได้มาประยุกต์ใช้ในการเลี้ยงไก่แม่พันธุ์ มทส ให้กับเกษตรกรที่เลี้ยงไก่ในโรงเรือนระบบเปิดได้

บทที่ 2
วรรณกรรมและเอกสารที่เกี่ยวข้อง

2.1 ความเครียดจากความร้อนและการเลี้ยงไก่พ่อแม่พันธุ์

อุตสาหกรรมการผลิตไก่ไม่ว่าจะเป็นอุตสาหกรรมขนาดเล็กหรือขนาดใหญ่ล้วนเกี่ยวข้องกับจำนวนลูกไก่อายุ 1 วันที่สามารถผลิตได้ในแต่ละรอบ ดังนั้นการจัดการเพื่อเพิ่มอัตราการผสมติดและการฟักออกในแม่ไก่จึงเป็นประเด็นที่มีการศึกษามากขึ้น เพื่อให้สามารถผลิตไก่เนื้อให้เพียงพอกับความต้องการของผู้บริโภค นอกจากนี้การเพิ่มจำนวนลูกไก่ที่มีคุณภาพในแต่ละรอบการผลิตยังสามารถช่วยลดต้นทุนในการผลิตลูกไก่ได้ด้วย

ความนิยมในการบริโภคไก่พื้นเมืองมีแนวโน้มมากขึ้นเนื่องจากข้อได้เปรียบทางด้านคุณภาพของเนื้อซึ่งมีความเหนียวนุ่มกว่าไก่เนื้อการค้าตามท้องตลาด แต่อุตสาหกรรมการผลิตไก่พื้นเมืองยังมีข้อจำกัดในเรื่องของการให้ผลผลิตต่ำ ตั้งแต่แม่พันธุ์ไก่ที่ให้ผลผลิตไข่น้อย รวมถึงการเจริญเติบโตของไก่เนื้อพื้นเมืองที่ช้ากว่า ใช้ระยะเวลาในการเลี้ยงนานกว่าไก่เนื้อการค้า โดยปัจจัยดังกล่าวได้รับอิทธิพลมาจากทั้งพันธุกรรมและผลกระทบจากสิ่งแวดล้อม จากการสำรวจข้อมูลการให้ผลผลิตในแม่ไก่พันธุ์ มทส 101-103 พบว่าปัจจัยที่ส่งผลต่อการผสมติดและฟักออกลดลงเกิดจากอุณหภูมิที่เพิ่มมากขึ้น เพราะลักษณะการเลี้ยงไก่แม่พันธุ์ มทส เป็นการเลี้ยงบนกรง สภาพโรงเรือนแบบเปิด ไม่มีการควบคุมอุณหภูมิที่เหมาะสม จะเห็นได้ว่าในไก่แม่พันธุ์ มทส 101 ที่อายุ 40 สัปดาห์มีการผสมติด 42% (ภาพที่ 2.1 A) ไก่แม่พันธุ์ มทส 102 ที่อายุ 38 สัปดาห์มีการผสมติด 60.75% (ภาพที่ 2.1B) และ ไก่แม่พันธุ์ มทส 103 เริ่มมีการผสมติดลดลงอย่างรวดเร็วตั้งแต่อายุ 40 สัปดาห์ (ภาพที่ 2.1C) ทั้งนี้เนื่องจากสภาพแวดล้อมภายนอกที่ไม่เหมาะสม ทำให้สัตว์เกิดความเครียด เมื่อสัตว์ได้รับความเครียดเป็นระยะนาน ๆ จะก่อให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) เกิดการสร้างสารอนุมูลอิสระในร่างกายมากขึ้น จนสารอนุมูลอิสระเหล่านั้นเข้าไปทำลายเซลล์เนื้อเยื่อต่าง ๆ ในร่างกายให้สูญเสียการทำงานเป็นสาเหตุของการเกิดโรคต่าง ๆ และยังส่งผลกระทบต่อระบบสืบพันธุ์ อัตราการเจริญเติบโต การให้ผลิตไข่ คุณภาพไข่ การฟักออกลดลง และอัตราการตายสูงขึ้น นอกจากนี้ยังส่งผลกระทบต่อการสร้างภูมิคุ้มกันภายในของร่างกายทำให้ร่างกายติดเชื้อโรคได้ง่าย (Habibian et al., 2015) ดังนั้นการจัดการด้านสภาพแวดล้อมและการจัดการอาหารที่ดีน่าจะช่วยลดผลกระทบจากสภาวะความเครียดจากสิ่งแวดล้อมได้



ภาพที่ 2.1 เปอร์เซ็นต์การผสมติดและการฟักออกไก่แม่พันธุ์ มทส

2.2 ปัจจัยที่ส่งผลต่อการผสมติดและการฟักในไก่พ่อแม่พันธุ์

2.2.1 ปัจจัยทางด้านอาหาร

อาหารที่ใช้เลี้ยงไก่พ่อแม่พันธุ์ต้องมีคุณค่าทางโภชนะที่เพียงพอต่อความต้องการ โดยความต้องการพลังงานและโปรตีนของไก่แต่ละสายพันธุ์มีความแตกต่างกัน ดังแสดงไว้ในตารางที่ 2.1 (Leeson and Summer, 2001) นอกจากนี้การจัดการอาหารสำหรับไก่เขตร้อนควรคำนึงถึงระดับพลังงานในอาหารและการกินได้ เนื่องจากสภาพอากาศร้อนไก่จะกินอาหารได้ลดลง ทำให้ได้รับสารอาหารไม่เพียงพอต่อความต้องการ การเพิ่มความเข้มข้นของสารอาหารตามระดับพลังงานที่เปลี่ยนแปลงไปจะช่วยให้สัตว์ได้รับสารอาหารที่เพียงพอ

ตารางที่ 2.1 ความต้องการพลังงานและโปรตีนในไก่สายพันธุ์การค้า

Breed	**Hubbard**	**Cobb**	**Ross 308**
ME (MJ/kg)	12	11.97	11.5
ME (kcal/kg)	2,865	2,860	2,750
Crude protein (g/kg)	155	160	170-175
Feed intake (g/bird)	160	161	174

2.2.2 ปัจจัยจากพันธุกรรม

ในไก่พันธุ์เบา (White Leghorn) จะมีอัตราการผสมติดที่สูงกว่าไก่พันธุ์หนัก (Barred Plymouth Rock และ Rhode Island Red) (Islam et al., 2002) ดังแสดงไว้ในตารางที่ 2.2 อายุไก่ที่มากขึ้นส่งผลต่อการผสมติดลดลง และยังพบว่าไก่พื้นเมืองและไก่ลูกผสมมีอัตราการผสมติดและฟักออกที่ต่ำกว่าไก่ทางการค้า

ตารางที่ 2.2 การให้ผลิตไข่ และการฟักออกของแม่พันธุ์ไก่เนื้อทางการค้า

พันธุ์ทางการค้า	**น้ำหนักเมื่ออายุ 20 สัปดาห์ (กรัม)**	**ผลผลิตไข่ (ฟอง)**	**การฟักออก (%)**	**อายุเมื่อให้ผลผลิตไข่สูงสุด (วัน)**	**เอกสารอ้างอิง**
Ross 308	2,195	180	84.8	217	www.rossbreeders.com
Cobb500	2,150-2,250	179.9	83.5	210	www.cobbvantress.com
Arbor Acres	2,190	185	85	224	www.aviagen.com
Hubbard	2,100-2,200	184	84.0	-	www.hubbardbreeders.com

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

2.2.3 ปัจจัยจากสิ่งแวดล้อม

ประเทศไทยอยู่ในเขตร้อนชื้นที่มีอุณหภูมิเฉลี่ยรายปีและรายเดือนสูงกว่าค่าปกติ โดยเฉพาะเดือนเมษายน-พฤษภาคม จากสถิติอุณภูมิสูงอยู่ระหว่าง 40.5-44.5°C (กรมอุตุนิยมวิทยา, 2558) สภาพอากาศร้อนเป็นปัญหาสำคัญทำให้สัตว์เกิดความเครียด โดยความเครียดจากความร้อน (heat stress) มีผลกระทบต่อสมรรถณะการเจริญเติบโตและการให้ผลผลิตในสัตว์ปีก (Kadim et al., 2008; Lucas and Marcos, 2013) โดยผลกระทบของความเครียดที่เกิดจากความร้อนในไก่เนื้อและไก่ไข่มีตั้งแต่การกินได้ การเจริญเติบโตและผลผลิตไข่ลดลง ในไก่พ่อแม่พันธุ์พบว่าความเครียดจากความร้อนส่งผลต่ออัตราการผสมติดและฟักออกลดลง ทำให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจ (St-Pierre et al., 2003) ดังนั้นในการผลิตสัตว์ปีกจึงเป็นต้องมีการทำความเข้าใจและควบคุมสภาวะแวดล้อมให้เหมาะสมต่อการเลี้ยงสัตว์เพื่อให้สัตว์ได้แสดงสมรรถนะการให้ผลผลิตได้สูงสุด โดยทั่วไปสัตว์แต่ละชนิดจะมีช่วงอุณหภูมิที่สามารถให้ผลผลิตได้ดีแตกต่างกันไป ซึ่งช่วงอุณหภูมิที่สัตว์อยู่อย่างสบาย (comfort zone) หรือช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต ในไก่ไข่และไก่พ่อแม่พันธุ์อุณหภูมิที่เหมาะสมควรอยู่ระหว่าง 20-25°C เมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 35°C สัตว์มีการเจริญเติบโตและการให้ผลผลิตที่ลดลง เนื่องจากอุณหภูมิที่สูงมากเกินไปสัตว์จะสูญเสียพลังงานเพื่อนำไปใช้ในการระบายความร้อนออกจากร่างกาย และหากสัตว์ไม่สามารถรักษาสมดุลระหว่างการผลิตความร้อนในร่างกายและการระบายความร้อนออกจากร่างกายได้ จะส่งผลให้ สัตว์เกิดความเครียด หากได้รับความร้อนเป็นเวลานานจะก่อให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน ซึ่งเป็นภาวะที่อนุมูลอิสระมากจนสารต้านอนุมูลอิสระมีไม่เพียงพอ เป็นผลให้การให้ผลผลิตที่ลดลง ยังส่งผลถึงระบบสืบพันธุ์อีกด้วย (Mashaly et al., 2004; Quinteiro-Filho et al., 2010) ดังนั้นการทำวิจัยครั้งนี้จึงมุ่งเน้นการตรวจเอกสารที่เกี่ยวข้องกับการจัดการด้านอาหารเพื่อช่วยลดการเกิด ภาวะเครียดออกซิเดชันที่เกิดจากสภาพอากาศร้อนในไก่แม่พันธุ์ โดยพบว่า วิตามินอี และซีลีเนียมเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ มีส่วนช่วยในการปรับปรุงอัตราการผสมติดและการฟักออก และโอเมก้า-3 พบว่ามีบทบาทสำคัญต่อการเจริญเติบโต และช่วยในการพัฒนาสมองรวมถึงระบบภูมิคุ้มกันในไก่ โดยคาดหวังว่า วิตามินอี ซีลิเนียม และโอเมก้า-3 จะช่วยรักษาสภาพการทำงานต่าง ๆ ในร่างกาย รวมถึงการต้านอนุมูลอิสระ ให้เป็นไปตามปกติภายใต้สภาพอากาศร้อน และสามารถสะสมในไข่แดงเพื่อใช้ในการพัฒนาและเจริญเติบโตของเอ็มบริโอ และช่วยป้องกันการออกซิเดชันของไขมันในไข่แดงตลอดจนสามารถส่งต่อไปยังลูกไก่มีชีวิต เพื่อช่วยพัฒนาระบบภูมิคุ้มกันให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น

2.3 การเกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (Oxidative stress)

ภาวะเครียดออกซิเดชัน คือ ภาวะถูกออกซิไดซ์เกินสมดุล หรือ ภาวะของความไม่สมดุลระหว่างการเกิดอนุมูลอิสระกับกระบวนการต้านสารอนุมูลอิสระในร่างกาย ความเครียดเกิดจากการตอบสนองของร่างกายต่อสภาพแวดล้อม ซึ่งเมื่อเกิดอนุมูลอิสระที่มากเกินสารต้านอนุมูลอิสระในร่างกายจะกำจัดออกได้หมด อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจะเข้าไปทำลายโปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมันรวมไปถึงโครงสร้างต่าง ๆ ของเซลล์ ทำให้เซลล์เหล่านั้นมีโครงสร้างและการทำงานเสียหาย สัตว์ที่อยู่ในภาวะความเครียดออกซิเดชันจะมีปริมาณของสารมาลอนไดอัลดีไฮด์ (malondialdehyde) เพิ่มมากขึ้น โดยสารนี้เกิดขึ้นจากกระบวนการลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน (lipid peroxidation) ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 3 ระยะ คือ

1. ระยะเหนี่ยวนำ (initiation) เป็นระยะที่กรดไขมันมีการแตกตัวเป็นอนุมูลอิสระ

$$RH \longrightarrow R^{\cdot} + H^{\cdot}$$

2. ระยะเพิ่มจำนวน (propagation) เป็นระยะที่อนุมูลอิสระทำปฏิกิริยากับออกซิเจนเกิดเป็นอนุมูลเปอร์ออกซี (peroxy radical) ซึ่งจะทำปฏิกิริยาต่อกับกรดไขมันเกิดเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydroperoxide) และอนุมูลอิสระซึ่งเมื่อมีแสงและความร้อนเป็นตัวเร่งก็จะเกิดปฏิกิริยาต่อทำให้อนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น และอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นก็สามารถทำปฏิกิริยากับออกซิเจนใหม่ได้ไปเรื่อย ๆ

$$R^{\cdot} + O_2 \longrightarrow ROO^{\cdot}$$

$$ROO^{\cdot} + RH \longrightarrow ROOH + R^{\cdot}$$

3. ระยะสิ้นสุด (termination) เป็นระยะที่อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นอาจรวมตัวกันในรูปแบบต่าง ๆ

$$R^{\cdot} + R^{\cdot} \longrightarrow RR$$

$$ROO^{\cdot} + ROO^{\cdot} \longrightarrow ROOR + O_2$$

ในภาวะเครียดออกซิเดชันจะมีการสร้างอนุมูลอิสระ (free radical) มากขึ้น โดยเฉพาะบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งมีไขมันเป็นองค์ประกอบทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เกิดความเสียหาย โดยผลผลิตที่ได้จากกระบวนการออกซิเดชันของไขมันไม่อิ่มตัวสายยาว (polyunsaturated fatty acid) คือ มาลอนไดอัลดีไฮด์ หรือ MDA (malondialdehyde, $C_3H_4O_2$) ซึ่งเป็นสารที่มีคาร์บอนและอัลดีไฮด์เป็น

องค์ประกอบดังโครงสร้างที่แสดงไว้ในภาพที่ 2.2 โดยการวัดปริมาณ MDA สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ถึงระดับของอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นได้

ภาพที่ 2.2 โครงสร้างของ Malondialdehyde (MDA)

ที่มา : Nair et al. (2008)

อนุมูลอิสระสามารถกระตุ้นได้ทั้งจากภายในร่างกาย (endogenous reactive species) ที่เกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึมในไมโทคอนเดรีย และอนุมูลอิสระที่เกิดจากการกระตุ้นภายนอกร่างกาย (exogenous reactive species) เช่น รังสีแกมม่า เป็นต้น สารอนุมูลอิสระสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ reactive oxygen species (ROS) และ reactive nitrogen species (RNS) ดังแสดงในตารางที่ 2.3 ซึ่งอนุมูลอิสระเหล่านี้สามารถเกิดขึ้นได้เองจากกระบวนเมแทบอลิซึมที่เกิดขึ้นในร่างกาย เมื่อเกิดอนุมูลอิสระร่างกายจะมีกลไกในการกำจัดอนุมูลอิสระดังกล่าว เพื่อให้เกิดภาวะสมดุลระหว่างอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ โดยอนุมูลอิสระที่สำคัญต่อร่างกายได้แก่

1. อนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์ ($O_2^{\bullet-}$) เป็นอนุมูลอิสระทั่วไปที่พบในเซลล์ ส่วนใหญ่เกิดขึ้นระหว่างการขนส่งอิเล็คตรอนจากโมเลกุลของออกซิเจนไปยังโมเลกุลของน้ำภายในไมโตคอนเดรีย อนุมูลนี้จะไม่เข้าไปทำลายเซลล์โดยตรง แต่เมื่อทำปฏิกิริยากับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) จะได้เป็นอนุมูลไฮดรอกซิล ($OH^{\bullet}$) ซึ่งเป็นสารออกซิไดซ์ที่มีความว่องไวสูง

2. อนุมูลไฮดรอกซิล ($OH^{\bullet}$) จัดเป็นสารออกซิไดซ์แรงสูงที่มีความว่องไวสูงสุด สร้างขึ้นจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ที่มีโลหะทรานสิชันอยู่ในระบบ โดยเหล็ก (Fe^{2+}) จะทำลายพันธะที่ยึดเหนี่ยวระหว่างออกซิเจนของสารเปอร์ออออกไซด์ได้เป็นอนุมูลไฮดรอกซิล และไฮโดรเจนไอออน (hydrogen ion, H^{-})

3. อนุมูลไนตริก ($NO^{\bullet}$) เป็นอนุมูลอิสระขนาดเล็กโดยอนุมูลไนตริกออกไซด์สามารถเข้าจับฮีโมโกลบินได้เร็วกว่าโมเลกุลของออกซิเจนจนเกิดกระบวนการขัดขวางการขนส่งก๊าซออกซิเจน นอกจากนี้ยังทำปฏิกิริยากับอนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์ได้อย่างรวดเร็ว เกิดเป็นอนุมูล peroxynitite ($ONOO^{\bullet}$) ที่มีความว่องไวสูง ในสภาวะที่มีออกซิเจน อนุมูลไนตริกจะถูกออกซิไดซ์เป็นไนโตรเจนไดออกไซด์ (Nitrogen Oxide, NO_2) ซึ่งเป็นสารมลพิษสามารถทำลายเซลล์ของถุงลมและผนังหลอดเลือด

ตารางที่ 2.3 ปัจจัยภายนอกและภายในของการเกิดอนุมูลอิสระ

Internally generated	**External sources**
Mitochondria	Cigarette smoke
Phagocytes	Radiation
Xanthine oxidase	UV light
Reactions with Fe and with other transition metals	Pollution
Arachidonate pathways	Certain drugs
Peroxisomes	Chemical reagents
Exercise	Industrial solvents
Inflammation	
Ischemia and reperfusion	

ที่มา : Surai et al. (2002)

2.4 ผลกระทบของภาวะเครียดออกซิเดชันที่เกิดจากความร้อนในสัตว์ปีก

โดยทั่วไปเมื่ออากาศร้อนสัตว์ชนิดอื่นจะมีการควบคุมอุณหภูมิในร่างกายให้คงที่โดยการระบายความร้อนออกทางผิวหนังผ่านทางต่อมเหงื่อ แต่เนื่องจากในสัตว์ปีกไม่มีต่อมเหงื่อ การกำจัดความร้อนออกจากร่างกายจึงต้องอาศัยวิธีการต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

1. การแผ่รังสีความร้อน (radiation) จะส่งผ่านความร้อนในรูปของคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าโดยที่พื้นผิวทั้งสองชนิดไม่ต้องสัมผัสกัน

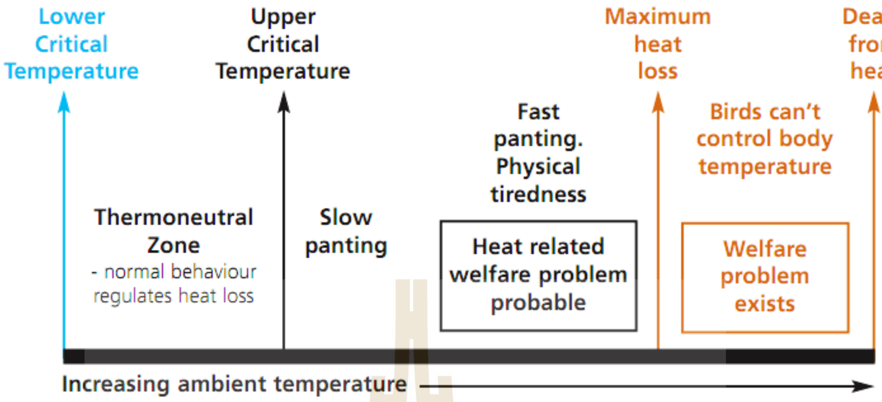
2. การนำความร้อน (conduction) เป็นการนำความร้อนจากพื้นผิวหนึ่งไปอีกพื้นผิวหนึ่งโดยการสัมผัสกันโดยตรง เช่น การที่ตัวไก่นอนสัมผัสกับพื้นวัตถุหรือพื้นโรงเรือน

3. การพาความร้อน (convention) เป็นการระบายความร้อนโดยอาศัยการเคลื่อนไหวของอากาศรอบตัวเพื่อพาความร้อนออกจากร่างกาย

4. การระบายความร้อนออกจากร่างกายทางระบบทางเดินหายใจโดยการอ้าปากหายใจ (evaporation)

เมื่ออุณหภูมิสูงมากขึ้น ไก่มีการระบายเอาความร้อนออกจากร่างกายเพิ่มมากขึ้นจนถึงภาวะร้อนเฉียบพลัน (acute heat stress) หรือภาวะที่ไก่อยู่ในสภาพอากาศร้อนเป็นเวลานาน ๆ (chronic heat stress) ส่งผลให้ไก่ตายได้ โดยช่วงอุณหภูมิที่มีผลกระทบต่อสัตว์ได้แสดงไว้ในภาพที่ 2.3 ซึ่งโดยปกติแล้วไก่จะมีอุณหภูมิภายในร่างกายประมาณ 41 $^{\circ}$C แต่เมื่อใดก็ตามที่อุณหภูมิภายนอก

ร่างกายสูงขึ้นมากกว่า 4°C จาก comfort zone ร่างกายไม่สามารถที่จะระบายความร้อนในร่างกายออกไปได้ ไก่จะเริ่มซึมและตายในที่สุด



ภาพที่ 2.3 ช่วงอุณหภูมิที่มีผลกระทบต่อสัตว์

ที่มา : www.defra.gov.uk

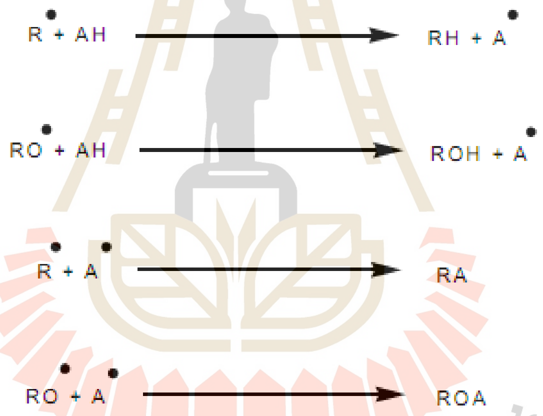
เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิแวดล้อมสูงขึ้นจะส่งผลให้อุณหภูมิภายในร่างกายสูงขึ้นตามไปด้วย โดยพบว่าไก่เนื้อเพศผู้มีอัตราการเกิดภาวะความเครียดจากความร้อนได้มากกว่าในไก่เพศเมีย ในสภาวะดังกล่าวไก่จะมีการย่อยได้ของโภชนะต่าง ๆ ลดลง ส่งผลทำให้สมรรถนะการเจริญเติบโตลดลง โดยไก่เนื้อที่เลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 32°C มีปริมาณการกินได้ลดลง 24% (Geraert et al., 1996; Deng et al., 2012) และมีการทำงานของเอนไซม์ทริปซิน (trypin) ไคโมทริปซิน (chymotrypsin) และอะไมเลส (amylase) ลดลง (Seven and Seven, 2008) การย่อยได้ของโปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไขมันลดลง สัตว์กินน้ำเพิ่มมากขึ้น ถ่ายเหลว และมีการขับแร่ธาตุต่าง ๆ ออกจากร่างกายมากขึ้น ทำให้การสะสมของวิตามิน แร่ธาตุ ในร่างกายลดลง โดยเฉพาะวิตามิน และแร่ธาตุที่มีบทบาทในการต้านอนุมูลอิสระจะถูกขับออกมาด้วย (Deng et al., 2012; Mashaly et al., 2004) นอกจากนี้ในไก่ไข่ยังพบปัญหาเปลือกไข่บาง (Mohmoud et al., 1996; Bonnet et al., 1997; Lin et al., 2004; Mashaly et al., 2004) เนื่องจากในสภาพอากาศร้อน ไก่หอบหายใจเพื่อระบายความร้อนออกจากร่างกาย ทำให้คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ที่ละลายอยู่ในเลือดลดลง เพราะมีการระเหยออกจากปอดไปพร้อมกับการหอบในอัตราที่สูงขึ้น ส่งผลให้ระดับของไฮโดรเจนไอออน (H^+) ในเลือดลดลง เลือดมีค่า pH สูงขึ้น สภาวะนี้เรียกว่า เลือดเป็นด่าง (alkalosis) เพราะคาร์บอนไดออกไซด์หากละลายอยู่ในน้ำจะอยู่ในรูปของกรดคาร์บอนิก เมื่อเลือดเป็นด่างมีผลให้คาร์บอเนตจากแคลเซียมคาร์บอเนตที่ใส่ในอาหารเปลี่ยนเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และถูกขับออกจากร่างกายโดยการหายใจ ส่งผลให้ไก่มีแคลเซียมไม่เพียงพอในการนำไปสร้างเปลือกไข่

ความเครียดจากความร้อนนอกจากจะทำให้เปลือกไข่บางและไม่แข็งแรงแล้วยังมีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันอีกด้วย โดยไก่ที่ถูกเลี้ยงภายใต้สภาพแวดล้อมที่มีอุณหภูมิสูงตั้งแต่ 32.2-43 °C จะส่งผลถึงอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับการสร้างภูมิคุ้มกัน เช่น ม้าม ไทมัส และเบอร์ซ่า มีขนาดเล็กลง และกดการหลั่งฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์ (Oguntunji and Alabi, 2010)

2.5 สารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระ คือ สารที่ทำหน้าที่ในการกำจัดอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นภายในร่างกาย สามารถให้อิเล็กตรอนกับอนุมูลอิสระ โดยมีกลไกการทำงานดังนี้

1. การดักจับอนุมูลอิสระ (radical scavenging) สารต้านอนุมูลอิสระสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ โดยการทำให้โมเลกุลของอนุมูลอิสระมีความเสถียรขึ้นซึ่งกลไกของปฏิกิริยาเกิดโดยการให้ไฮโดรเจนหรืออิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ (Valacchi et al., 2004; เจนจิรา และประสงค์, 2554) ดังสมการ



2. ยับยั้งการทำงานของซิงเกล็ทออกซิเจน (singlet oxygen quenching, $^1O_2^•$) สารต้านอนุมูลอิสระในกลุ่มนี้ ได้แก่ แคโรทีนอยด์ โดยการเปลี่ยน $^1O_2^•$ ให้อยู่ในรูปของ $^3O_2$ และปล่อยพลังงานในรูปความร้อน โดยแคโรทีนอยด์ จำนวน 1 โมเลกุล สามารถทำปฏิกิริยากับซิงเกล็ทออกซิเจนได้ถึง 1,000 โมเลกุล (เจนจิรา และประสงค์, 2554)

3. จับกับโลหะที่สามารถเร่งสารกลุ่มนี้ได้ (metal chelation) โลหะที่มีผลต่อการเกิดอนุมูลอิสระ คือ Fe^{2+} และ Cu^{2+} ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) กรดฟอสฟอริก (phosphoric acid) และกรดซิตริก (citric acid) เป็นต้น

4. หยุดปฏิกิริยาการสร้างอนุมูลอิสระ (chain breaking) วิตามินอี (α-tocopherol) สามารถป้องกันเยื่อหุ้มเซลล์ไม่ให้ถูกทำลายจากปฏิกิริยาลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน โดยทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอน (electron-acceptor antioxidant) จากอนุมูล peroxyl (ROO•) (Burtan, 1994)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

5. เสริมฤทธิ์ (synergism) สารในกลุ่มนี้จะช่วยสนับสนุนให้สารต้านอนุมูลอิสระทำงานได้ดีขึ้น เช่น การทำงานร่วมกันระหว่างวิตามินอีกับวิตามินซี และการทำงานร่วมกันระหว่างวิตามินอีและซีลีเนียม โดยที่วิตามินซีไม่สามารถทำงานในสภาวะไม่มีขั้ว (hydrophobic condition) ได้เหมือนวิตามินอี แต่จะให้ไฮโดรเจนอะตอมแก่อนุมูล α-tocopherol peroxyl ที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่าง α-tocopherol กับอนุมูลเปอร์ออกซิล ($ROO^{\cdot}$) เพื่อให้กลับมาอยู่ในรูปของ α-tocopherol ที่สามารถทำงานได้

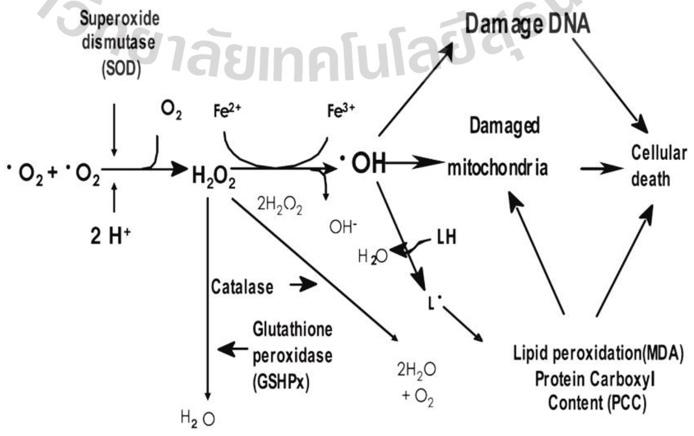
6. ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ (enzyme inhibition) สารประกอบฟีนอลิกบางชนิด เช่น กรดฟีนอลิก (phenolic acid) และแกลเลต (gallate) สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลโพออกซีจีเนส (lipooxygenase) โดยสามารถเข้าจับกับไอออนของเหล็กซึ่งเป็นโคแฟกเตอร์ (cofactor) ส่งผลให้เอนไซม์ดังกล่าวไม่สามารถทำงานได้

สารต้านอนุมูลอิสระสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิดด้วยกันคือ

1. สารต้านอนุมูลอิสระชนิดเอนไซม์ จะถูกสังเคราะห์ขึ้นภายในร่างกาย โดยอาศัยโลหะต่าง ๆ เป็นโคแฟกเอตร์ (co factor) เอนไซม์ที่มีความสำคัญในการต้านอนุมูลอิสระได้แก่

1.1 Superoxide dimustase (SOD) ทำหน้าที่ขจัดอนุมูลอิสระเริ่มต้นที่เกิดขึ้นในร่างกายคืออนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์ (O_2^-) โดยมี SOD เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา dismutase ในการเปลี่ยนอนุมูล O_2^- ให้เป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และออกซิเจน (ภาพที่ 2.4)

เอนไซม์ SOD พบในไซโตซอลและไมโทคอนเดรีย โดยในไซโตซอลจะมีทองแดงและสังกะสีเป็นแฟกเตอร์ (CuZn-SOD) โดยการเชื่อมต่อของกรดอะมิโนฮีสตามีน ส่วน SOD ที่พบในไมโทคอนเดรียจะมีแมงกานีสเป็นโคแฟกเตอร์ (Mn-SOD) ทำหน้าที่กำจัดอนุมูลอิสระออกซิเจนที่เกิดจากกระบวนการหายใจในร่างกาย



ภาพที่ 2.4 กลไกการทำลายเซลล์ของอนุมูลอิสระ

ที่มา : Nordberq and Armer (2001)

1.2 Catalase (CAT) เป็นเอนไซม์ที่พบในเซลล์ทำหน้าที่ในการเปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นโมเลกุลของน้ำและออกซิเจน มี Fe^{2+} เป็นเป็นโคแฟกเตอร์ ซึ่งไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นสารอันตรายที่ถูกสร้างขึ้นจากกระบวนการเมแทบอลิซึมในร่างกาย โดยคาตาเลสจะทำหน้าที่ช่วยลดการเกิดปฏิกิริยาในการที่ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะถูกเปลี่ยนไปเป็น OH^- ผ่านปฏิกริยา Fenton ที่จะถูกเร่งปฏิกิริยาด้วยเหล็กหรือทองแดง (วีรพล, 2557)

$$2\,H_2O_2 + 2H^+ \longrightarrow O_2 \;+\; 2\,H_2O$$

1.3 Glutathione peroxidase (GSH-Px) เป็นเอนไซม์ที่สามารถสร้างขึ้นเองได้จากกรดอะมิโน 3 ตัว คือ ซีสเตอีน ไกลซีน และกลูตามิก กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดสเป็นเอนไซม์ที่พบมากในไซโตพลาสซึมและไมโตคอนเดรีย มีซีลีเนียมเป็นองค์ประกอบสำคัญอยู่ในโครงสร้าง เนื่องจากเอนไซม์ชนิดนี้ต้องการไอออนของซีลีเนียมเป็นโคแฟกเตอร์ในรูปของซีลีโนซีสเตอีน (selenocysteine) ทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยารีดักชันของสารประกอบ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งได้แก่ ลิพิดเปอร์ออกไซด์ (ROOH) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ในการเปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จำเป็นต้องอาศัยกลูตาไธโอน (GSH) เป็นสารตั้งต้น ในการทำงานและจะเปลี่ยนกลูตาไธโอนให้อยู่ในรูปออกซิไดซ์ (GSSG) การทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้จะตรงข้ามกับเอนไซม์กลูตาไธโอนรีดักเตส (Glutathione reductase, GR) ซึ่งจะเปลี่ยนกลูตาไธโอนในรูปออกซิไดซ์ให้กลับไปเป็นกลูตาไธโอนรีดิวส์อีกครั้ง (ทินกร และคณะ, 2556)

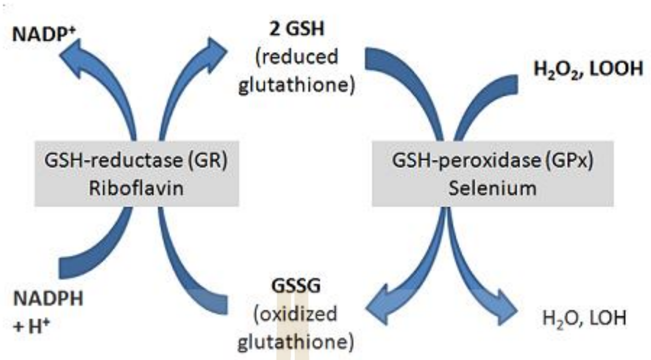
$$2GSH \;+\; H_2O_2 \xrightarrow{GPx} GSSG \;+\; 2H_2O$$

$$GSSG + \beta\text{-NADPH} \xrightarrow{GR} \beta\text{-NADP} + 2GSH$$

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

เอนไซม์กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดสมีบทบาทสำคัญในการป้องกันอันตรายจากออกซิเดชัน โดยสามารถรีดิวซ์ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และลิปิดไฮโดรเปอร์ออกไซด์ (lipid hydroperoxide) ได้น้ำหรือแอลกอฮอล์ของลิปิด นอกจากนี้เอนไซม์กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดสยังทำหน้าที่ร่วมกับเอนไซม์กลูตาไธ-โอนรีดักเตส แม้ว่าเอนไซม์กลูตาไธโอนรีดักเตสจะไม่มีฤทธิ์ในการเป็นในการต้านอนุมูลอิสระโดยตรงแต่ทำหน้าที่รีดิวซ์ GSSG ได้เป็น GSH เพื่อนำกลับมาใช้เป็น co-substrate กับเอนไซม์กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิ-เดสและเอนไซม์อื่น ๆ ดังแสดงในภาพที่ 2.4 เอนไซม์กลูตาไธโอนรีดักเตสอาศัย NADPH เป็น co-substrate โดย NADPH เป็น reducing equivalence ได้จากปฏิกิริยาในวิถี pentose phosphate pathway (PPP) โดยกระบวนการ เมแทบอ-ลิซึมของกลูโคส ความผิดปกติในกระบวนการสร้าง NADPH ใน PPP จะมีผลให้เอนไซม์ต้านออกซิเดชันที่อยู่ปลายทางไม่สามารถทำงาน อาจชักนำภาวะเครียดออกซิเดชันได้ (วีรพล, 2557)

อย่างไรก็ตามเอนไซม์กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดสในร่างกายแต่ละส่วนจะหน้าที่แตกต่างกันออกไป ขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์นั้น ๆ และอวัยวะเป้าหมาย แสดงในตารางที่ 2.4



ภาพที่ 2.5 การทำงานของเอนไซม์กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดสในการกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

ที่มา : วีรพล (2557)

ตารางที่ 2.4 รูปแบบของเอนไซม์ glutathione peroxidase และหน้าที่ต่าง ๆ ภายในเซลล์

Selenoprotein	Function
GSHPx1 Classical (or intracellular) glutathione peroxidase	Act as antioxidant enzymes, removing hydrogen peroxide and lipid and phospholipid hydroperoxides
GSHPx2 Gastrointestinal glutathione peroxidase	
GSHPx3 Plasma glutathione peroxidase	
GSHPx4 Phospholipod hydroperoxide glutathione peroxidase	
Sperm capsule selenoprotein	Protects developing sperm cells from oxidative damage, structural role in mature sperm
	Thyroid hormone metabolism
Iodothyronine 5’-deiodinase- Type I, II, III	DNA synthesis, antioxidant activity
Thioredoxin reductase (TR1, TR2, TR3)	Appears to protect endothelial cells from peroxidative damage
Selenoprotein P	
	Muscle function
Selenoprotein W	Selenoprotein synthesis
Selenoprotein synthetase (SPS2)	

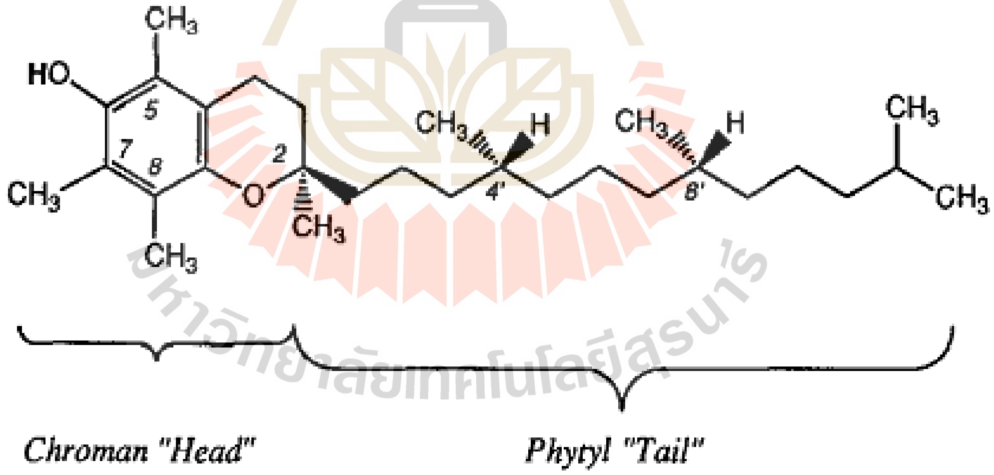
ที่มา : Surai (2006)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

2. สารต้านอนุมูลอิสระชนิดที่ไม่ใช่เอนไซม์ ได้แก่ วิตามินอี และซีลีเนียม เป็นต้น สารต้านอนุมูลอิสระในกลุ่มนี้ร่างกายไม่สามารถสังเคราะห์ขึ้นเองได้ ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องได้รับจากอาหาร

2.6 วิตามินอี (Vitamin E)

วิตามินอี หรือสารโทโคเฟอรอล (tocopherol) ประกอบไปด้วย α- β- γ- δ-tocopherol และ α- β- γ- δ-tocotrienol รวมทั้งหมด 8 ชนิด ซึ่งแต่ละชนิดจะแตกต่างกันที่จำนวนและตำแหน่งของ methyl group (CH-3) ในวงแหวน โดย 6-hydroxy group ของ chromanol ring จะเป็น active site สำหรับการดักจับอนุมูลอิสระ ไอโซเมอร์ของวิตามินอีทั้งหมด 8 ไอโซเมอร์ เกี่ยวข้องกับการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ แต่อย่างไรก็ตามพบว่าวิตามินอีในรูป RRR-α-tocopherol มีฤทธิ์ของวิตามินอีสูงกว่าไอโซเมอร์อื่น ๆ (Raederstorff et al., 2015) แสดงในภาพที่ 2.6 บริเวณส่วนหัวหรือส่วนวงแหวน (chroman head group) จะทำหน้าที่ในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิตามินอีจะรับอนุมูลอิสระมาเก็บในโครงสร้างที่ประกอบไปด้วยวงแหวนอะโรมาติก ทำให้โมเลกุลดังกล่าวเสถียร ส่วนของ phytyl tail จะไม่มีผลในการต้านอนุมูลอิสระ

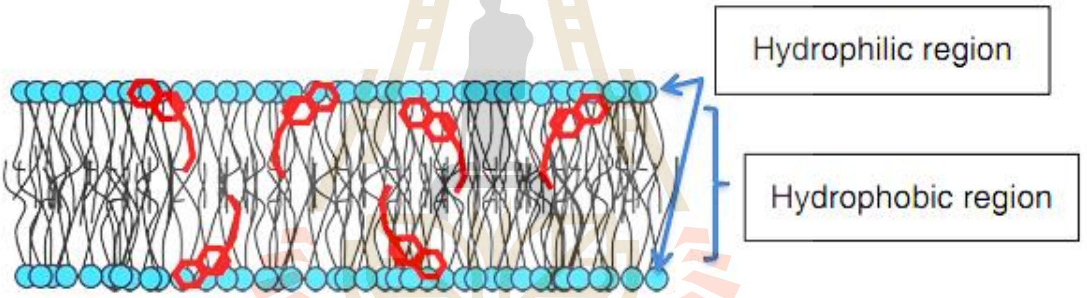


ภาพที่ 2.6 โครงสร้างของวิตามินอี

ที่มา : Burton and Traber (1990)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

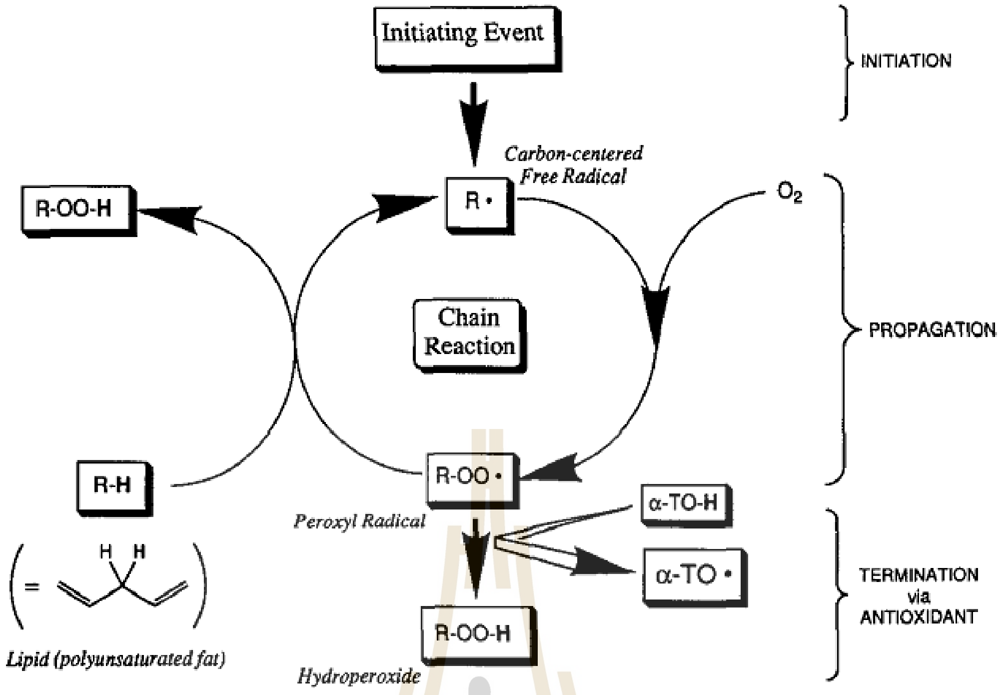
วิตามินอีจัดเป็นวิตามินในกลุ่มที่ละลายในไขมัน สะสมมากในเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งมีฟอสโฟลิปิดเป็นองค์ประกอบ เยื่อหุ้มเซลล์ประกอบไปด้วยไขมัน 2 ชั้นที่เรียกว่า phospholipid bilayer โดยประกอบไปด้วยส่วนที่ชอบน้ำหรือที่เรียกว่า hydrophobic region และส่วนที่ไม่ชอบน้ำหรือไม่รวมตัวกับน้ำ ที่เรียกว่า hydrophilic region (Raederstorff et al., 2015) วิตามินอีจะสะสมในเยื่อหุ้มเซลล์ส่วนที่เป็น hydrophilic region (ภาพที่ 2.7) ซึ่งอยู่บริเวณผิวของเยื่อหุ้มเซลล์โดยผนังเซลล์จะประกอบด้วยกลุ่มของไขมันไม่อิ่มตัวสายยาว หรือ polyunsaturated fatty acid (PUFA) สามารถถูกออกซิเดชันได้ง่ายเนื่องจากเป็นไขมันชนิดไม่อิ่มตัว (Scheideler et al., 2010) ในขณะที่วิตามินที่ละลายในน้ำชนิดอื่น ๆ เช่น วิตามินซี จะสะสมในส่วนที่เป็น hydrophilic หรือ hydrophobic interphase นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณของ α-tocopherol เพียงเล็กน้อยสามารถปกป้องไขมันไม่อิ่มตัวสายยาวจำนวนมากได้ ซึ่งความเข้มข้นของ α-tocopherol ในเนื้อเยื่อมีประมาณ 1 : 1000 lipid molecules



ภาพที่ 2.7 ตำแหน่งของวิตามินอีในเยื่อหุ้มเซลล์
ที่มา : Raederstorff et al.(2015)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

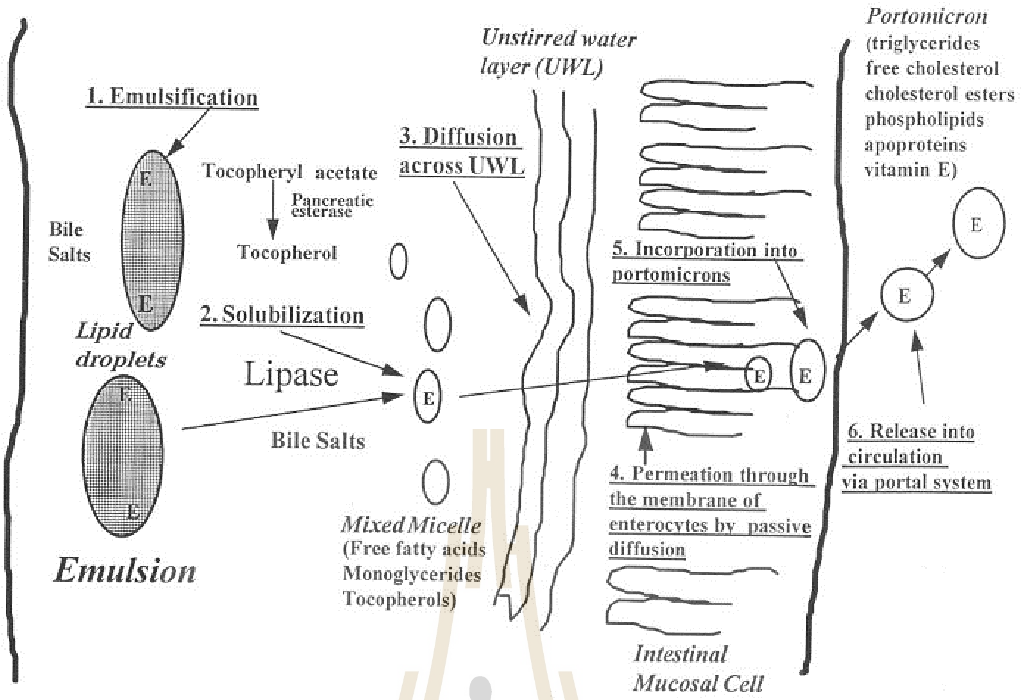
บทบาทของวิตามินอีในการต้านอนุมูลอิสระ วิตามินอีมีหน้าที่สำคัญในการหยุดปฏิกิริยาการสร้างอนุมูลอิสระ (chain breaking) โดยทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็คตรอน (electron-acceptor antioxidant) จากอนุมูล peroxyl ($ROO^{\cdot}$) (Burtan, 1994) ดังแสดงในภาพที่ 2.8 และทำให้ผลผลิตที่ได้อยู่ในรูปที่ไม่สามารถทำงานได้และไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์



ภาพที่ 2.8 กลไกการทำงานของวิตามินอีในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน
ที่มา : Burton and Traber (1990)

2.6.1 การย่อยและการดูดซึมวิตามินอี

วิตามินอีจะถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายผ่านเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้เล็ก โดยวิตามินอีจะถูกอิมัลซิไฟด์ (emulsified) โดยอาศัยน้ำดีเป็นตัว emulsifying agents และดูดซึมผ่าน brush border membrane เข้าสู่ท่อน้ำเหลืองในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม หรือ portal system ในสัตว์ปีก (Surai, 1999) โดยสัตว์ปีกมีการดูดซึมวิตามินอีที่ลำไส้เล็ก ดังแสดงในภาพที่ 2.9 เนื่องจากวิตามินอีเป็นวิตามินที่ละลายในไขมัน การดูดซึมของวิตามินประเภทนี้จึงต้องอาศัยไขมันจากอาหารเป็นตัวทำละลาย การขนส่งวิตามินอีไปยังส่วนต่าง ๆ ของร่างกายผ่านทางพลาสมาไลโปโปรตีน (plasma lipoprotein) และส่งผ่าน portal vein ไปยังตับในรูปไคโลไมครอน (chylomicron) วิตามินอีสะสมในตับในรูปของ α-tocopherol และถูกส่งออกจากตับพร้อมกับไลโปโปรตีนไปยังอวัยวะอื่น ๆ ไลโปโปรตีนชนิด low density lipoprotein (LDL) เป็นไลโปโปรตีนที่มีความสำคัญในการขนส่งวิตามินอี โดยปกติไลโปโปรตีน 1 โมเลกุลประกอบด้วยวิตามินอีในรูป α-tocopherol จำนวน 6-12 โมเลกุล (Wang and Peter, 1990)



ภาพที่ 2.9 กระบวนการดูดซึมวิตามินอีบริเวณลำไส้เล็ก

ที่มา : Surai (1999)

2.6.2 ความต้องการวิตามินอีในสัตว์ปีก

เนื่องจากสัตว์ปีกไม่สามารถสังเคราะห์วิตามินอีได้ จึงจำเป็นต้องเสริมวิตามินอีสังเคราะห์เพิ่มเติมในอาหารเพื่อให้เพียงพอต่อความต้องการ ในธรรมชาติยังสามารถพบวิตามินอีได้ในเมล็ดธัญพืช น้ำมันที่สกัดได้จากพืช และพืชสีเขียวชนิดต่าง ๆ (Surai, 1999) ในไก่สายพันธุ์ Arbor Acres Hubbard Cobb 500 และ Ross 308 มีความต้องการวิตามินอีประมาณ 40-100 ppm และต้องการมากขึ้นถึง 250 ppm เมื่ออยู่ในสภาวะความเครียด (Bollengier-Lee, 1999) วิตามินอีที่เสริมในอาหารสัตว์นิยมใช้ในรูปของ α-tocopherol ซึ่งเป็นไอโซเมอร์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดของวิตามินอี (Raederstorff et al., 2015) แต่อย่างไรก็ตาม วิตามินอีในรูปของ α-tocopherol ไม่เสถียรและถูกออกซิไดซ์ได้ง่าย ดังนั้นวิตามินอีที่ใช้ในอาหารจะอยู่ในรูปของเอสเทอร์ (esterified form) เช่น tocophyrol acetate มีความเสถียรระหว่างการเก็บรักษา เมื่อถูกย่อยที่ลำไส้จะเปลี่ยนไปอยู่ในรูป active α-tocopherol (Surai, 2002)

2.6.3 การขาดวิตามินอีในสัตว์ปีก

อาการขาดวิตามินอีในสัตว์ปีกจะมีผลกระทบต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต และเป็นสาเหตุของการเกิดโรคต่าง ๆ (ตารางที่ 2.5) เช่น โรคทางระบบประสาท (encephalomalacia) เป็นโรคที่พบ

ในลูกไก่อายุ 2-3 สัปดาห์ สาเหตุของโรคเกิดจากความผิดปกติของระบบต้านอนุมูลอิสระ (peroxidative dysfunction) หรือการได้รับวิตามินอีไม่เพียงพอ ซึ่งสมองจะผิดปกติ เนื่องจากสมองเป็นส่วนที่มีการสะสมวิตามินอีน้อย ปริมาณของวิตามินอีที่สะสมในสมองจะขึ้นอยู่กับปริมาณที่แม่ไก่ได้รับจากอาหาร (Surai et al., 1996; Lin et al., 2005) โรคทางระบบเลือด เช่น เกิดผิวหนังบวมเป็นตุ่มน้ำเหลือง (exudative diathesis) โรคทางระบบกล้ามเนื้อ เช่น กล้ามเนื้อลีบ (muscular dystrophy) มักพบในไก่ที่ขาดกรดอะมิโนซัลเฟอร์ (sulfur amino acid) และวิตามินอี เนื่องจากกรดอะมิโนซัลเฟอร์ จำเป็นต่อการเจริญเติบโต เมื่อไก่ได้รับไม่เพียงพอจะทำให้กล้ามเนื้อเจริญผิดปกติ พบได้ในไก่อายุประมาณ 4 สัปดาห์ นอกจากการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน ในเยื่อหุ้มเซลล์แล้ว ยังส่งผลกระทบต่อตับ ไมโทคอนเดีย และไมโครโซม แม้ว่าซีลิเนียมไม่มีส่วนช่วยในการป้องกันโรคกล้ามเนื้อลีบ แต่หากในอาหารมีซีลิเนียมอยู่น้อยจำเป็นต้องเสริมวิตามินอีเพื่อช่วยป้องกันโรคดังกล่าว

ตารางที่ 2.5 โรคและอาการของโรคในสัตว์ที่ขาดวิตามินอีมากเกินไป

Syndrome	Affected organ or tissue	Species
Encephalomalacia	Cerebellum	Chick
Exudative diathesis	Vascular	Turkey
Microcytic anaemia	Blood, bone marrow	Chick
Macrocytic anaemia	Blood, bone marrow	Monkey
Pancreatic fibrosis	Pancreas	Chick, mouse
Liver necrosis	Liver	Pig, rat
Muscular degeneration	Skeletal muscle	Pig, rat, mouse
Microangiophathy	Heart muscle	Pig, lamb, calf
Kidney degeneration	Kidney tubules	Monkey, rat
Steatitis	Adipose tissue	Pig, chick
Testicular degeneration	Testes	Pig, calf, chick
Malignant hyperthermia	Skeletal muscle	Pig

ที่มา : Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) (2011)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

2.6.4 ผลของการเสริมวิตามินอีในอาหารไก่ต่อสมรรถนะการผลิต การผสมติด การฟักออก และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ

ผลของการเสริมวิตามินอีต่อสมรรถนะการผลิต ได้แสดงไว้ในตารางที่ 2.6 โดย Bolukbasi et al. (2007) รายงานว่าการเสริมวิตามินอี ระดับ 45 มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหาร สามารถเพิ่มการกินได้ในไก่ที่เลี้ยงในอุณหภูมิปกติ ($p<0.01$) แต่ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงการกินได้ในไก่ที่ถูกเลี้ยงภายใต้สภาวะความเครียด สอดคล้องกับงานทดลองของ Hossain et al. (1998); Radwan et al. (2008); Zaghari et al. (2013) พบว่าการเสริมวิตามินอีไม่มีผลต่อน้ำหนักไข่ (Hossain et al., 1998; Bolukbasi et al., 2007; Radwan et al., 2008; Biwas et al., 2010; Zaghari et al., 2013) อย่างไรก็ตามการเสริมวิตามินอีในอาหารที่ระดับ 45-150 มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหาร สามารถเพิ่มอัตราการให้ผลผลิตไข่ (Bolukbasi et al., 2007; Biwas et al., 2010) ในขณะที่การทดลองของ Hossain et al. (1998) และ Zaghari et al. (2013) ไม่พบถึงความแตกต่างดังกล่าว

การเสริมวิตามินอีต่ออัตราการผสมติดและฟักออก ได้แสดงไว้ในตารางที่ 2.7 พบว่าการเสริม วิตามินอีที่ระดับ 40-150 มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหาร สามารถปรับปรุงประสิทธิภาพอัตราการผสมติดและฟักออกสูงขึ้นได้ (Tsai et al., 2008; Biwas et al., 2009) ขณะเดียวกัน Hossain et al. (1998) พบว่าวิตามินอีไม่มีผลต่อทั้งการผสมติดและฟักออก ($p<0.05$)

ตารางที่ 2.6 ผลของการเสริมวิตามินอีในอาหารไก่ต่อสมรรถนะการให้ผลผลิต

Treatment	**Feed intake (g/d)**	**Egg production (%)**	**Egg weight (g)**	**References**
0 mg/kg VE	148	39.7	70.1	Zaghari et al. (2013)
200 mg/kg VE	149	41.2	70.1	
400 mg/kg VE	154	48.5	69.8	
25 mg/kg VE	-	69.7	62.1	Hossain et al. (1998)
50 mg/kg VE	-	70.6	62.4	
75 mg/kg VE	-	68.2	62.0	
mg/kg VE 100	-	69.1	62.6	
Heat stress				Bolukbasi et al. (2007)
0 mg/kg VE	99.4	68.00^{b}	-	
45 mg/kg VE	100.3	67.80^{b}	-	
65 mg/kg VE	99.5	68.70^{b}	-	
85 mg/kg VE	99.5	78.40^{a}	-	

ตารางที่ 2.6 ผลของการเสริมวิตามินอีในอาหารไก่ต่อสมรรถนะการให้ผลผลิต (ต่อ)

Treatment	Feed intake (g/d)	Egg production (%)	Egg weight (g)	References
Normal Condition				Bolukbasi et al.
0 mg/kg VE	114.60[c]	82.00[d]	-	(2007)
45 mg/kg VE	119.30[a]	83.70[c]	-	
65 mg/kg VE	116.30[b]	88.10[a]	-	
85 mg/kg VE	116.50[b]	85.40[b]	-	
N-control	95.41	52.00[c]	49.08[c]	Radwan et al.
Control	96.69	53.85[bc]	49.71[b]	(2008)
100 mg/kg VE	97.84	54.04[bc]	49.79[ab]	
200 mg/kg VE	97.17	54.22[bc]	49.89[ab]	
0 IU/kg VE	-	19.50 ± 1.44[a]	41.84 ± 1.23	Biwas et al. (2009)
150 IU/kg VE	-	25.40 ± 0.85[b]	42.97 ± 0.95	
300 IU/kg VE	-	20.50 ± 1.50[a]	41.15 ± 1.15	

หมายเหตุ : [a b c] Means with different superscripts in a colum are significantly different ($p<0.01$).

VE = vitamin E

ตารางที่ 2.7 ผลของการเสริมวิตามินอีในอาหารต่ออัตราการผสมติดและฟักออก

Treatment	Fertility (%)	Hatchability (%)		References
		32 weeks	52 weeks	Hossain et al. (1998)
25 mg/kg VE	95.5	86.9	75.0	
50 mg/kg VE	93.3	86.3	84.9	
75 mg/kg VE	94.5	90.0	81.5	
100 mg/kg VE	96.6	88.6	81.6	

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 2.7 ผลของการเสริมวิตามินอีในอาหารต่ออัตราการผสมติดและฟักออก (ต่อ)

Treatment	Fertility (%)	Hatchability (%)		References
		Fertile eggs	Total eggs	
0 mg/kg VE	78.4 ± 5.1[b]	85.7 ± 3.6	67.2 ± 5.0[b]	Tsai et al. (2008)
40 mg/kg VE	93.8 ± 2.2[a]	91.9 ± 1.9	86.2 ± 2.7[a]	
80 mg/kg VE	91.9 ± 2.0[a]	94.4 ± 3.0	87.0 ± 3.6[a]	
120 mg/kg VE	91.8 ± 2.3[a]	90.0 ± 3.0	82.6 ± 3.4[a]	
160 mg/kg VE	86.8 ± 3.2[ab]	87.4 ± 4.0	76.0 ± 4.6[ab]	
0 IU/kg VE	83.14 ± 3.25[a]	80.24 ± 2.35	-	Biwas et al. (2009)
150 IU/kg VE	91.227 ± 2.16[b]	86.15 ± 3.89	-	
300 IU/kg VE	86.39 ± 3.76[a]	82.27 ± 2.75	-	

หมายเหตุ : [a b c] Means with different superscripts in a colum are significantly different ($p<0.05$).

VE = vitamin E

การเสริมวิตามินอีต่อการต้านอนุมูลอิสระ โดยศึกษาจากค่า MDA (malondialdehyde) และเอนไซม์กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส ได้แสดงไว้ในตารางที่ 2.8 พบว่าการเสริมวิตามินอี 40-160 มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหาร สามารถลดปริมาณของ MDA ในสมองและพลาสมาได้ (Lin et al., 2005; Tsai et al., 2008) นอกจากนี้ยังพบว่าการเสริมวิตามินอีสูงถึง 120 มิลลกรัม/กิโลกกรัมอาหาร สามารถเพิ่มการทำงานของเอนไซม์กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดสได้ (Lin et al., 2005) แต่อย่างไรก็ตามในบางงานทดลองแม้จะมีการเสริมวิตามินอีในระดับที่สูงขึ้นแต่พบว่าไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าวิตามินอีจะเข้าไปยับยั้งปฏิกิริยาลูกโซ่ของกระบวนการออกซิเดชัน จึงส่งผลให้การทำงานของเอนไซม์กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดสไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม

ตารางที่ 2.8 ผลของการเสริมวิตามินอีต่อการต้านอนุมูลอิสระ

Treatment	Sample	MDA[3]	GSH-Px	References
0 mg/kg VE		3.64 ± 0.36[a]	1343 ± 464[a]	Lin et al.
40 mg/kg VE		3.63 ± 0.41[a]	1394 ± 308[a]	(2005)
80 mg/kg VE	Plasma[1]	3.72 ± 0.41[a]	1214 ± 254[ab]	
120 mg/kg VE		3.44 ± 0.39[ab]	1027 ± 195[b]	
160 mg/kg VE		3.20 ± 0.37[b]	1110 ± 323[ab]	

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 2.8 ผลของการเสริมวิตามินอีต่อการต้านอนุมูลอิสระ (ต่อ)

Treatment	Sample	MDA[3]	GSH-Px	References
0 mg/kg VE		7.27 ± 0.55^{A}	15.2 ± 1.4	Tsai et al. (2008)
40 mg/kg VE		4.95 ± 0.17^{B}	17.5 ± 1.2	
80 mg/kg VE	Brain[2]	4.21 ± 0.19^{B}	15.8 ± 2.1	
120 mg/kg VE		1.98 ± 0.12^{C}	16.2 ± 1.5	
160 mg/kg VE		1.78 ± 0.05^{C}	17.1 ± 1.6	

หมายเหตุ: [a b c] Means with different superscripts in a colum are significantly different (p<0.05).

[A B C] Means with different superscripts in a colum are significantly different (p<0.01).

[1] Enzyme activity expressed as U/ml plasma

[2] Enzyme activity expressed as U/mg sample

[3] MDA values expressed in nmol/g

VE = vitamin E

2.7 ซีลีเนียม (Selenium, Se)

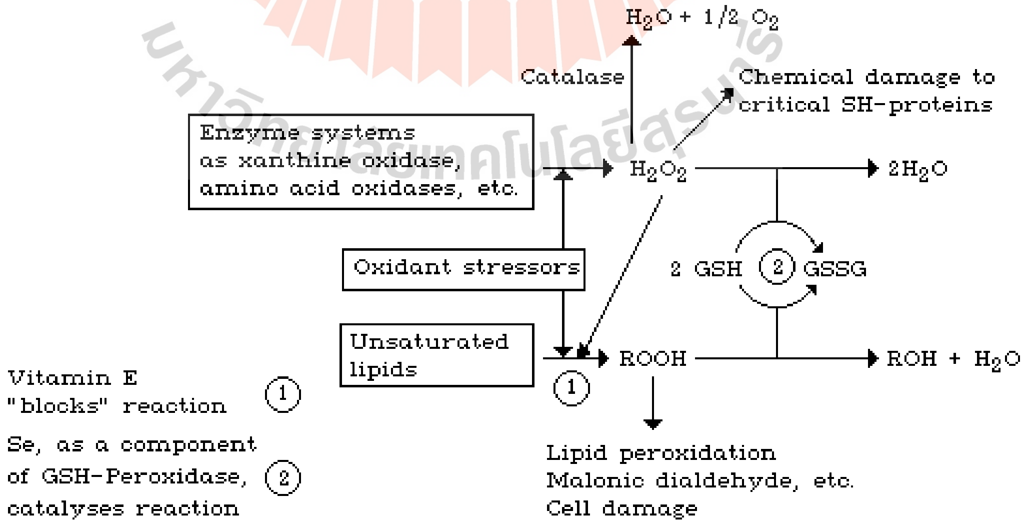
ซีลีเนียม เป็นแร่ธาตุที่มีบทบาทสำคัญและเกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึมต่าง ๆ ในร่างกาย มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโต และความสมบูรณ์พันธุ์ในสัตว์ ถึงแม้ว่าสัตว์ปีกต้องการซีลีเนียมปริมาณน้อย แต่หากได้รับในปริมาณที่ไม่เพียงพอก็อาจส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโตและเป็นสาเหตุให้เกิดโรคได้ โดยทั่วไปซีลีเนียมที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์มีอยู่ 2 ชนิด คือ ซีลีเนียมอินทรีย์ (organic selenium) ซึ่งเป็นซีลีเนียมอินทรีย์ที่พบได้ในวัตถุดิบอาหารสัตว์ต่าง ๆ เช่น เมล็ดธัญพืช และน้ำมันจากเมล็ดพืชต่าง ๆ และซีลีเนียมอนินทรีย์ (inorganic selenium) เช่น ซีลีไนต์ เป็นต้น โดยชนิดและแหล่งของซีลีเนียมได้แสดงไว้ในตารางที่ 2.9 ในอุตสาหกรรมการผลิตสัตว์ปีกนิยมเสริมซีลีเนียมในรูปของซีลีเนียมอินทรีย์ ได้แก่ ซีลีเนียมยีสต์ (selenium yeast) และซีลีเนียมเมทไธโอนีน (selenium methionine) เพราะสัตว์สามารถย่อยและเก็บสะสมในเนื้อเยื่อและอวัยวะต่าง ๆ ได้ดีกว่าซีลีเนียมอนินทรีย์ (Cantor, 1997; Utterback et al., 2005; Mohiti-Asli et al., 2008)

ตารางที่ 2.9 แหล่งที่พบซีลิเนียม

Form	**Name**	**Main Source**
Organic forms	Selenomethionine	Cereals, nuts, dietary supplements,
	Selenocysteine	Animal products
Inorganic forms	Selenite	Dietary supplements/ food fortificants
	Selenate	Dietary supplement/food fortificants and some plants

ที่มา : Surai (2006)

วิตามินอีและซีลีเนียมมีการทำงานร่วมกัน เนื่องจากทั้งวิตามินอีและซีลีเนียมจัดเป็นสารต้านอนุมูลอิสระทั้งคู่ และมีหน้าที่ในการทำงานเสริมฤทธิ์กัน (synergism)ในการป้องกันการเกิดออกซิเดชันของเซลล์ หรือป้องกันการถูกทำลายของเซลล์จากการออกซิไดส์ของอนุมูลอิสระ (ภาพที่ 2.10) โดยซีลิเนียเป็นส่วนประกอบสำคัญของเอนไซม์กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดสจะกระตุ้นการกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และออแกนิคเปอร์ออกไซด์ ที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของกรดไขมันต่าง ๆ ให้อยู่ในรูปที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ (Surai, 2000) ขณะที่วิตามินอีทำหน้าที่ป้องกันการเกิดออกซิเดชันโดยการกำจัดสารอนุมูลอิสระเพื่อยับยั้งปฏิกิริยาลูกโซ่ ป้องกันการเกิดสารเปอร์ออกไซด์



ภาพที่ 2.10 กลไกการทำงานร่วมกันของวิตามินอีและซีลีเนียมในการต้านอนุมูลอิสระ

ที่มา : Erin and Brumaghim (2009)

2.7.1 การย่อยและการดูดซึมซีลีเนียม

ซีลีเนียมถูกดูดซึมที่บริเวณลำไส้เล็ก ซีลีเนียมอินทรีย์มีการดูดซึมได้ดีกว่าซีลีเนียมอนิน-ทรีย์ โดยซีลีโนเมทไธโอนีน สามารถดูดซึมได้มากถึง 90% ขณะที่ซีลีไนด์ (selenite, Na_2SeO_3) สามารถดูดซึมได้เพียง 60% เท่านั้น ซีลีเนียมอนินทรีย์จะถูกดูดซึมที่บริเวณลำไส้เล็ก (Wright and Bell, 1996) และถูกนำไปใช้ในการสังเคราะห์ซีลีโนโปรตีนต่อไป ส่วนที่เหลือจะถูกขับออกทางปัสสาวะ ซีลีไนด์จะถูกสลายไปเป็นไฮโดนเจนซีลีไนด์ (hydrogen selenide, H_2Se) ซึ่งจะถูกเปลี่ยนรูปไปเป็นซีลีโนฟอสเฟตเพื่อสังเคราะห์ซีลีโน-โปรตีน P และ W (Turner et al., 1998) ขณะที่ซีลีเนียมอินทรีย์จะถูกดูดซึมแบบเดียวกับ เมทไธโอนีน เนื่องจากองค์ประกอบของซีลีโนเมทไธโอนีนจะเหมือนกับเมทไธโอนีน ยกเว้นซีลีเนียมจะเข้าไปแทนตำแหน่งของซัลเฟอร์อะตอม โดยซีลีเนียมเมทไธโอนีนจะถูกนำไปสังเคราะห์ซีลีโนโปรตีนเช่นเดียวกับซีลี-ไนด์

ซีลีเนียมอินทรีย์นอกจากสามารถดูดซึมในร่างกายได้สูงแล้วยังพบว่าการใช้ประโยชน์ได้ของซีลีเนียมอินทรีย์ดีกว่าซีลีเนียมอนินทรีย์ เนื่องจากในกระบวนการเมแทบอลิซึมลำดับสุดท้าย สารอนินทรีย์ส่วนใหญ่จะถูกขับออกมาทางปัสสาวะ แต่ซีลีนียมอินทรีย์จะถูกดูดซึมกลับเข้าตับเพื่อเข้าสู่กลไกอื่น ๆ อีกต่อไป การสะสมซีลีเนียมในร่างกายจะถูกสะสมในรูปของซีลีโนเมทไธโอนีนซึ่งจะถูกเปลี่ยนไปเป็นซีลีโน-ซีสเตอีน (selenocysteine, SeCys) ต่อไป ร่างกายสัตว์จะสะสมซีลีเนียมในรูปของซีลีโนเมทไธโอนีน เมื่ออยู่ในสภาวะเครียดออกซิเดชันซีลีโนเมทไธโอนีนและ ซีลีไน-ซีสเตอีนจะถูกนำไปใช้เป็นแหล่งของซีลีเนียมในการสังเคราะห์ซีลีโนโปรตีนตัวอื่น ๆ เช่น กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส ไธโอรีดอกซิน รีดักเตส (thioredoxin reductase) และเมทไธโอนีนซัลฟอกไซด์ รีดักเตส (methionine sulphoxide reductase) โดยเอนไซม์เหล่านี้มีหน้าที่กำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของกรดไขมันต่าง ๆ ซึ่งหากมีการสะสมของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในปริมาณมากจะก่อให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน ทำให้เกิดความเสียหายต่อเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เซลล์เสียการทำงาน ส่งผลต่อกระบวนการทำงานของระบบต่าง ๆ ในร่างกาย

2.7.2 ความต้องการซีลีเนียมในสัตว์ปีก

ซีลีเนียมเป็นแร่ธาตุรอง (trace mineral) สัตว์ต้องการในปริมาณน้อย แต่หากสัตว์ได้รับในปริมาณที่ไม่เพียงพอต่อความต้องการ ก็อาจส่งผลต่อการเจริญเติบโตและเกิดโรคได้ ความต้องการซีลีเนียมของ NRC (1994) ระบุว่าไก่ไข่ต้องการซีลีเนียม 0.06 ppm เป็ดและไก่งวงต้องการ 0.2 ppm ขณะที่ Bollengier-Lee (1999); Leeson and Summers (2001); Surai (2006) ระบุว่าไก่พ่อแม่พันธุ์ต้องการซีลีเนียมอยู่ในช่วง 0.2-0.3 ppm แต่อย่างไรก็ตามในสภาวะการเลี้ยงโดยทั่วไปสัตว์มีโอกาสเกิดความเครียดได้จากปัจจัยต่าง ๆ ดังนั้นความต้องการซีลีเนียมจึงมากขึ้นตามไปด้วย ในสัตว์ปีกการได้รับซีลีเนียมที่ไม่เพียงพอจะส่งผลทำให้ผลผลิตลดลงรวมไปถึงปัญหาเกี่ยวกับความสมบูรณ์พันธุ์อีกด้วย

2.7.3 การขาดซีลีเนียมในสัตว์ปีก

ในสัตว์ปีกการขาดซีลีเนียมจะเกี่ยวข้องกับการขาดวิตามินอี ซึ่งส่งให้เกิดความผิดปกติของสมอง กล้ามเนื้อ รวมไปถึงระบบภูมิคุ้มกันและระบบสืบพันธุ์ในสัตว์ โรคที่พบได้ทั่วไปในสัตว์ปีกเมื่อขาดซีลีเนียม เช่น โรคทางระบบประสาท โรคทางระบบกล้ามเนื้อ และโรคทางระบบเลือด เป็นต้น (Surai, 2006) ดังนั้นเมื่อร่างกายได้รับซีลีเนียมที่เพียงพอ ร่างกายสัตว์จะสามารถสังเคราะห์เอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระได้ ในขณะเดียวกันหากร่างกายขาดแร่ธาตุเหล่านี้จะส่งผลให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน ซึ่งส่งผลให้เนื้อเยื่อและสารชีวโมเลกุลต่าง ๆ ถูกทำลาย อย่างไรก็ตามหากได้รับซีลีเนียมในปริมาณระหว่าง 10-20 ppm หรือมากกว่าความต้องการเกิน 100 เท่า จะเป็นพิษต่อสัตว์ นอกจากนี้การได้รับซีลีเนียมมากเกินไป ซีลีเนียมจะไปแทนกำมะถันในโครงสร้างของกรดอะมิโน เมทไธโอนีน ซีสตีน และซีสเตอีน ทำให้ร่างกายใช้กรดอะมิโน 3 ตัวนี้ไม่ได้ ในสัตว์ปีกหากได้รับซีลีเนียมมากเกินไปจะส่งผลให้การเจริญเติบโต การให้ผลผลิตไข่ และการฟักออกลดลง (Ort and Latshaw, 1978)

2.7.4 ผลของการเสริมซีลีเนียมในอาหารไก่ต่อสมรรถนะการให้ผลผลิต การผสมติด การฟักออก และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ

ผลของการเสริมซีลีเนียมต่อการให้อัตราการให้ไข่ น้ำหนักไข่ การผสมติด และการฟักออก ได้แสดงไว้ในตารางที่ 2.11 และ 2.12 พบว่าการเสริมซีลีเนียม (0.3 มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหาร) สามารถเพิ่มอัตราการให้ไข่ ได้ (Lesson et al., 2008) และพบว่าการเสริมน้ำมันปลาร่วมกับซีลีเนียมมีผลทำให้น้ำหนักไข่เพิ่มขึ้น (Pappas et al., 2006) นอกจากนี้ยังพบว่าการเสริมซีลีเนียมที่ระดับ 0.1-0.2 มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหาร สามารถปรับปรุงประสิทธิภาพการผสมติดได้ (Osama et al., 2010) แต่ซีลีเนียมไม่มีผลต่ออัตราการฟักออกในไก่ (Pappas et al., 2006; Lesson et al., 2008; Osama et al., 2010)

ผลของซีลีเนียมต่อการทำงานของเอนไซม์กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส ได้แสดงไว้ในตารางที่ 2.13 พบว่าการเสริมซีลีเนียมที่ระดับ 0.025-0.30 มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหาร สามารถเพิ่มการทำงานของเอนไซม์กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดสได้ (Stanley and Tappel, 1974; Wang et al., 2010) ขณะที่บางงานทดลองไม่พบความแตกต่างดังกล่าว (Toshiro et al., 1994; Cichoski et al., 2012) อย่างไรก็ตามการศึกษาการเสริมซีลีเนียมในอาหารยังต้องคำนึงถึงระดับที่เสริม เนื่องจากระดับการเสริมที่เหมาะสมยังไม่ชัดเจน ทั้งนี้ยังขึ้นกับปัจจัยอื่น ๆ ร่วมด้วย เช่น สายพันธุ์ไก่ สภาพแวดล้อมการเลี้ยง รวมไปถึงช่วงอายุของไก่ด้วย

ตารางที่ 2.10 ผลของการเสริมซีลีเนียมในอาหารไก่ต่ออัตราการให้ผลผลิตและน้ำหนักไข่

Treatment	Egg production (%)	Egg weight (g)	References
0.1 mg/kg sodium selenite	68.3	69.8	Lesson et al. (2008)
0.3 mg/kg sodium selenite	69.5	68.5	
0.1 mg/kg Se yeast	63.5	68.1	
0.3 mg/kg Se yeast	74.0	65.9	
0.1 mg/kg B-Traxim Se	63.0	69.1	
0.3 mg/kg B-Traxim Se	73.5	69.3	
Se level, mg/kg			
0.1	64.9^{A}	68.9	
0.3	72.3^{B}	67.9	
Se source	NS	NS	
Se level	**	NS	
Source × level	NS	NS	
23 wk (pre-peak)			Pappas et al. (2006)
55 g/kg soybean oil	-	51.3 ± 1.2^{a}	
55 g/kg fish oil	-	47.1 ± 0.9^{b}	
0.16 g/kg soybean oile + Se	-	49.5 ± 1.0^{a}	
0.16 g/kg fish oil + Se	-	46.5 ± 1.5^{b}	
27 wk (peak)			
55 g/kg soybean oil	-	55.5 ± 1.5^{c}	
55 g/kg fish oil	-	52.0 ± 0.8^{d}	
0.16 g/kg soybean oile + Se	-	54.3 ± 1.4^{c}	
0.16 g/kg fish oil + Se	-	50.8 ± 0.5^{d}	

หมายเหตุ : $^{a\text{-}d}$ Means with different superscripts in a colum are significantly different ($p<0.05$).

$^{A, B}$ Means with different superscripts in a colum are significantly different ($p<0.01$).

** $p<0.01$, NS = Not significant

Se = Selenium; Se yeast = Selenium yeast

ตารางที่ 2.11 ผลของการเสริมซีลีเนียมในอาหารไก่ต่ออัตราการผสมติดและฟักออก

Treatment	**Fertility (%)**	**Hatchability (%)**	**References**
0.1 mg/kg sodium selenite	96.4	-	Lesson et al. (2008)
0.3 mg/kg sodium selenite	82.5	-	
0.1 mg/kg Se yeast	74.3	-	
0.3 mg/kg Se yeast	87.4	-	
0.1 mg/kg B-Traxim Se	95.9	-	
0.3 mg/kg B-Traxim Se	80.2	-	
Se level, mg/kg			
0.1	-	88.6	
0.3	-	83.4	
Se source	NS		
Se level	NS		
Source × level	*		
23 wk (pre-peak)			Pappas et al. (2006)
55 g/kg soybean oil	95.36 ± 1.40	74.63 ± 1.33	
55 g/kg fish oil	69.62 ± 17.67	57.26 ± 7.15^{A}	
0.16 g/kg soybean oile + Se	78.85 ± 10.46	72.57 ± 3.27	
0.16 g/kg fish oil + Se	82.31 ± 6.95	64.55 ± 4.47	
27 wk (peak)			
55 g/kg soybean oil	96.50 ± 1.71	91.28 ± 2.20**	
55 g/kg fish oil	99.00 ± 0.58^{A}	85.87 ± 1.41^{A}	
0.16 g/kg soybean oile + Se	98 ± 1.15	93.9 ± 2.23^{A}	
0.16 g/kg fish oil + Se	95.50 ± 1.50	84.39 ± 2.79^{A}	
0 mg/kg Sel-Plex	92.2^{a}	75.83	Osama et al. (2010)
0.1 mg/kg Sel-Plex	93.93^{b}	79.29	
0.2 mg/kg Sel-Plex	95.14^{c}	79.37	

หมายเหตุ : ^{A} Means with different superscripts in a colum are significantly different (p<0.01).

$^{a\ b\ c}$ Means with different superscripts in a colum are significantly different (p<0.05).

*p<0.1; **p<0.001; NS = Not significant

Se = Selenium; Se yeast = Selenium yeast

ตารางที่ 2.12 ผลการเสริมซีลีเนียมต่อการทำงานของเอนไซม์กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส

Treatment	Sample	GSH-Px	References
Control		22.28 ± 5.89^{b}	Wang et al. (2010)
0.3 mg Se yeast	Yolk[1]	25.28 ± 9.84^{a}	
0.6 mg Se yeast		19.15 ± 6.78^{c}	
Control	Plasma[2]	29.2 ± 6.0^{a}	Toshiro et al. (1994)
0.3 ppm Se		35.7 ± 2.9^{a}	
Control		1.2 ± 0.2^{a}	Stanley and Tappel (1974)
0.025 ppm Se		5.4 ± 3.3	
0.050 ppm Se	Plasma[2]	7.5 ± 1.7	
0.100 ppm Se		10.4 ± 1.5	
0.140 ppm Se		11.0 ± 2.0	
Control		0.051 ± 0.031	Cichoski et al. (2012)
0.15 mg/kg inorganic Se		0.083 ± 0.14	
0.35 mg/kg inorganic Se	Thigh meat[3]	0.045 ± 0.003	
0.15 mg/kg organic Se		0.077 ± 0.015	
0.35 mg/kg organic Se		0.085 ± 0.019	

หมายเหตุ : $^{a\text{-}c}$ Means with different superscripts in a colum are significantly different ($p<0.05$).

Se = Selenium; Se yeast = Selenium yeast; GSH-Px = Glutathione peroxidase

[1] Enzyme activity expressed as U/mg protein

[2] Enzyme activity expressed as U/ml

[3] Enzyme activity expressed as U/mg sample

2.8 น้ำมันปลา

น้ำมันปลา เป็นแหล่งสำคัญของโอเมก้า-3 (omega-3) ซึ่งเป็นกลุ่มของกรดไขมันชนิดที่ไม่อิ่มตัวสูง จัดเป็นกรดไขมันจำเป็น (essential fatty acid) เนื่องจากร่างกายไม่สามารถสร้างได้เองต้องได้รับจากการบริโภคอาหารเท่านั้น โดยมีสารสำคัญ 2 ชนิด คือ eicosopentaenoic (EPA) และ docosahexaenoic (DHA) โอเมก้า-3 พบได้ทั้งในน้ำมันจากพืช ได้แก่ linseed oil และ rapseed oil ซึ่งเป็นกรดไขมันชนิด α-linoleic acid (ALA) เนื่องจากสัตว์มีความสามารถในการเปลี่ยน ALA ไปเป็น EPA และ DHA ได้น้อย โดยมีประสิทธิภาพการเปลี่ยน ALA เป็น EPA ได้ 0.2% และเปลี่ยน

จาก EPA เป็น DHA ได้เพียงแค่ 0.05% (Burdge and Calder, 2005) ดังนั้นการเสริมน้ำมันปลาเพื่อใช้เป็นแหล่งของโอเมก้า-3 มีผลเพิ่มปริมาณ EPA และ DHA ในอาหารมากขึ้น โดยน้ำมันปลาทูน่ามีกรดไขมันชนิดโอเมก้า-3 เป็นองค์ประกอบสูงถึง 61.74% ซึ่งประกอบไปด้วย α-linolenic acid (ALA, C18 : 3n-3) 0.56% ecosapentaenoic acid (EPA, C20 : 5n-3) 6.02% และ docosahexaenoic acid (DHA, C22 : 6n-3) 55.16% ซึ่งองค์ประกอบเหล่านี้มีบทบาทสำคัญต่อโครงสร้างและการทำงานของสมอง ตับ และระบบประสาทนอกจากนี้ยังเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ eicosanoid ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์คล้ายฮอร์โมน ทำหน้าที่ในการสร้างภูมิคุ้มกันของร่างกาย กลุ่มฮอร์โมนที่ถูกสังเคราะห์โดย eicosanoid ได้แก่ prostaglandins (PG) และ leukotrienes (Khatibjoo et al., 2011)

ปัจจุบันมีการศึกษาการใช้อาหารที่เป็นแหล่งโอเมก้า-3 เพื่อเสริมในอาหารสัตว์ปีกเพื่อปรับปรุงสมรรถนะการผลิต (ตารางที่ 2.14) จากการทดลองของ Baucells et al. (2000); Basmarcioglu et al. (2003) และ Lawlor et al. (2010) พบว่าการเสริมน้ำมันปลาในอาหารไม่ส่งผลต่อการกินได้ อัตราการให้ผลผลิต และน้ำหนักไข่ ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากในสูตรอาหารที่มีการเสริมน้ำมันปลาและสูตรอาหารควบคุมมีการปรับระดับพลังงานและโปรตีนในสูตรอาหารให้ใกล้เคียงกัน จึงทำให้ปริมาณการกินได้ไม่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามการกินได้ลดลงเมื่อมีการเสริมน้ำมันปลาในรูป Deodorized Menhaden Oil (DMO) 4% ซึ่งอาจเป็นผลมาจากน้ำมันปลาในรูป DMO มีค่า ME สูงกว่าน้ำมันปลาปกติ (Regular Menhaden Oil, RMO) และสูงกว่าน้ำมันที่มาจากพืชเล็กน้อย (Gonzalez-Esquerra and Leeson, 2000) ขณะที่ Ebeid et al. (2008) รายงานว่าการเสริมน้ำมันปลา 1.25-5% สามารถเพิ่มการกินได้ในไก่ไข่ นอกจากนี้การเสริมน้ำมันปลา 1.5% และ 5% (Basmarcioglu et al., 2003; Ebeid et al., 2008) ส่งผลให้อัตราการให้ผลผลิตเพิ่มขึ้น ($p<0.05$) แต่มีผลทำให้น้ำหนักไข่ลดลง ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการใช้กรดไขมัน PUFA ในอาหารมากเกินไปจะรบกวนกระบวนการสังเคราะห์ไตรกลีเซอร์ไรด์ โดยไตรกลีเซอร์ไรด์เป็นสารตั้งต้นสำคัญในการสร้างไข่แดง กระบวนการนี้ส่งผลให้น้ำหนักลดลงเมื่อเทียบกลับกลุ่มควบคุม

ตารางที่ 2.13 ผลของการเสริมน้ำมันปลาต่อสมรรถนะการให้ผลผลิตไข่

Treatment	Feed intake (g)	Egg production (%)	Egg Weight (g)	References
Control	96.09	-	59.36	Baucells et al. (2000)
1% FO	96.77	-	57.93	
2% FO	94.25	-	57.61	
3% FO	95.33	-	57.98	
4% FO	97.73	-	59.15	
0%	109.00^{ab}	92.00	63.50^{ab}	Gonzalez-Esquerra and Leeson (2000)
2% RMO	107.00^{abc}	90.00	63.90^{a}	
4% RMO	100.00^{bc}	86.00	62.00^{bc}	
6% RMO	105.00^{abc}	89.00	62.10^{bc}	
2% DMO	110.00^{a}	90.00	62.80^{ab}	
4% DMO	99.00^{c}	88.00	62.80^{ab}	
6% DMO	101.00^{abc}	87.00	62.40^{ab}	
Control	110.11	84.75^{bc}	-	Basmarcioglu et al. (2003)
1.5% FO	110.49	87.35^{ab}	-	
4.32% FS	110.50	89.28^{a}	-	
2.5% FO + 4.32% FS	114.95	84.21^{bc}	-	
8.64% FS	111.23	82.44^{c}	-	
Control	98.00	93.80	60.00	Lawlor et al. (2010)
2% MCFO	97.00	93.10	57.90	
4% MCFO	101.00	98.60	57.60	
6% MCFO	99.00	96.90	58.90	
0% FO	102.94±12.4^{a}	83.31±9.37^{b}	53.71±5.05^{a}	Ebeid et al. (2008)
1.25% FO	98.97±12.20^{b}	82.39±9.81^{b}	53.16±6.54^{ab}	
2.5% FO	99.78±12.10^{b}	84.42±11.53^{ab}	52.97±5.41^{ab}	
3.5% FO	98.60±11.60^{b}	81.39±12.05^{b}	52.54±4.71^{b}	
5% FO	98.96±11.20^{b}	86.85±8.30^{a}	52.07±4.70^{b}	

หมายเหตุ : $^{a\ b\ c}$ Means with different superscripts in a colum are significantly different ($p<0.05$).

FO = Fish Oil; RMO = Regular Menhaden oil; DMO= Deodorized Menhaden Oil; FS= Flaxseed; MFO= Marine Fish Oil

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

การเสริมโอเมก้า-3 ต่อระบบภูมิคุ้มกัน

ในการเลี้ยงสัตว์ หากสัตว์มีระบบภูมิคุ้มกันดี จะส่งผลให้สัตว์มีอัตราการเจริญเติบโตดี และให้ผลผลิตได้อย่างเต็มศักยภาพของพันธุกรรม โดยเฉพาะอย่างยิ่งในไก่แม่พันธุ์หากมีระบบภูมิคุ้มกันที่ดีแล้วก็จะสามารถส่งต่อไปยังลูกไก่ได้ น้ำมันปลาซึ่งเป็นแหล่งของโอเมก้า-3 นอกจากนี้มีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันแล้ว สาร EPA และ DHA ซึ่งสะสมในไข่แดง ยังช่วยพัฒนาเอ็มบริโอในกระบวนการ embryogenesis (Hall et al., 2007) เนื่องจากทั้ง EPA และ DHA มีบทบาทสำคัญต่อการทำงานของสมอง ระบบประสาท รวมถึงระบบภูมิคุ้มกัน โดยในลูกไก่อายุ 1 วัน ระบบภูมิคุ้มกันยังทำงานไม่สมบูรณ์ ดังนั้นภูมิคุ้มกันที่ได้รับจากแม่ไก่จึงเป็นภูมิคุ้มกันหลักที่ช่วยในการต้านเชื้อโรคต่าง ๆ จากการศึกษาของ Wang et al. (2000) พบว่าการเสริมน้ำมันปลาในอาหารไก่แม่พันธุ์ สามารถเพิ่มน้ำหนักของอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน เช่น ไทมัส ม้าม เบอร์ซ่า ของลูกไก่ได้ จึงเป็นผลให้ระบบภูมิคุ้มกันทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น (Fritsche et al.,1991; Ebeid et al., 2008) จากการทดลอง Hosseini-Mansoub and Bahrami (2011) พบว่าการเสริมน้ำมันปลา 1-4% สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในไก่เนื้ออายุ 21 และ 42 วันได้ นอกจากนี้ยังสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการต้านเชื้อ IBD หรือโรคกัมโบโร (infectious bursal disease) (Maroufyan et al., 2012) อย่างไรก็ตามการเสริมน้ำมันปลาในอาหารมีโอกาสเกิดการเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการออกซิเดชัน ดังนั้นการเสริมสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น วิตามินอี และซีลีเนียม ร่วมกับการเสริมน้ำมันปลา เป็นอีกแนวทางที่จะช่วยป้องกันการเกิดออกซิเดชันของไขมันเพื่อไม่ให้กรดไขมันถูกทำลาย (Ebeid et al., 2008)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 3
วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 สัตว์และการจัดกลุ่มทดลอง

ใช้ไก่แม่พันธุ์ มทส 104 อายุ 28 สัปดาห์ จำนวน 195 ตัว และทำการแบ่งไก่ออกเป็น 13 กลุ่ม ๆ ละ 3 ซ้ำ ๆ ละ 5 ตัว และใช้พ่อพันธุ์ไก่เหลืองหางขาว จำนวน 39 ตัว เลี้ยงบนพื้นแบบคุมฝูง ในโรงเรือนแบบเปิดที่มีการควบคุมแสง (ให้แสง 16 ชั่วโมง)โดยใช้พ่อพันธุ์ไก่เหลืองหางขาว 1 ตัว ต่อแม่ไก่ มทส 5 ตัว (1 : 5) โดยก่อนการทดลองมีคัดเลือกไก่พ่อพันธุ์เหลืองหางขาวโดยการทดสอบคุณภาพน้ำเชื้อ ในไก่แม่พันธุ์ มทส คัดเลือกโดยดูจากอัตราการให้ไข่ และนอกจากนี้ยังมีการปรับอาหารทดลองโดยปรับการให้อาหารในไก่พ่อพันธุ์เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ และในไก่แม่พันธุ์ 1 สัปดาห์ก่อนเริ่มงานทดลอง โดยมีระยะการทดลอง 12 สัปดาห์ ตามแผนการทดลองแบบ Agrumented Factorial in CRD แบบ (2×3×2)+1 โดยไก่ในแต่ละหน่วยการทดลอง มีน้ำหนักตัวและอัตราการให้ไข่ใกล้เคียงกัน มีการให้อาหาร 120 กรัม/ตัว/วัน และให้น้ำอย่างเต็มที่ มีการปรับการให้อาหารในไก่เหลืองหางขาวเป็นเวลา 2 สัปดาห์ และในไก่แม่พันธุ์ มทส 1 สัปดาห์ ก่อนเริ่มงานทดลอง มีการทำวัคซีนนิวคาสเซิลในไก่เหลืองหางขาว และแม่ไก่ มทส ทุก ๆ 2 เดือน สำหรับลูกไก่โคราช มีการทำวัคซีนป้องกันโรคบิดที่อายุ 1 วัน และทำวัคซีนป้องกันโรคนิวคาสเซิล และโรคหลอดลมอักเสบที่อายุ 1 สัปดาห์

3.2 อาหารทดลอง

ใช้อาหารทดลองทางการค้าของบริษัทเจริญโภคภัณฑ์ (หมายเลข 534) ซึ่งมีระดับพลังงานโปรตีนเท่ากัน และมีองค์ประกอบของโภชนะเพียงพอกับความต้องการของไก่แม่พันธุ์ ตามคำแนะนำของ NRC (1994) ร่วมกับวิตามินอีในรูป DL-alpha tocopherol acetate เสริมซีลีเนียมในรูปของซีลีเนียมยีสต์ (selenium yeast) และน้ำมันปลาทูน่า ซึ่งในการทดลองนี้ได้วิเคราะห์หาระดับของวิตามินอีและซีลีเนียมในอาหารทางการค้า พบว่ามีวิตามินอี 0.86 มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหาร และซีลีเนียม 25.5 มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหาร โดยอาหารทดลองแบ่งออกเป็น 13 กลุ่ม ดังแสดงไว้ในตารางที่ 3.1

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 3.1 สูตรอาหารทดลองที่มีการเสริมวิตามินอี ซีลีเนียม และน้ำมันปลาที่ระดับแตกต่างกัน

อาหารควบคุม (control)		**(T1)**
75 mg Vitamin E/kg diet	0.1 mg Se/kg diet	0.75% fish oil (T2)
		1.5% fish oil (T3)
	0.3 mg Se/kg diet	0.75% fish oil (T4)
		1.5% fish oil (T5)
	0.5 mg Se/kg diet	0.75% fish oil (T6)
		1.5% fish oil (T7)
		1.5% fish oil (T13)
150 mg Vitamin E/kg diet	0.1 mg Se/kg diet	0.75% fish oil (T8)
		1.5% fish oil (T9)
	0.3 mg Se/kg diet	0.75% fish oil (T10)
		1.5% fish oil (T11)
	0.5 mg Se/kg diet	0.75% fish oil (T12)
		1.5% fish oil (T13)

3.3 การเก็บข้อมูล

3.3.1 สมรรถณะการให้ผลผลิต

ทำการเก็บข้อมูลโดยบันทึกการกินอาหารของแม่ไก่ทุก ๆ สัปดาห์ และบันทึกผลผลิตไข่ไก่ในแต่ละวันเพื่อใช้ในการคำนวณเปอร์เซนต์การให้ไข่ นอกจากนี้มีการบันทึกข้อมูลอื่น ๆ คือ อุณหภูมิโรงเรือนตลอดการทดลอง (เช้า-บ่าย) และบันทึกอัตราการตายทุกครั้งที่มีไก่ตาย

1) ปริมาณอาหารที่กินต่อตัว (feed intake; FI)

$$= \frac{\text{ปริมาณอาหารที่กินในช่วงการทดลอง}}{\text{จำนวนไก่ทั้งหมด}}$$

2) ผลผลิตไข่ (hen day egg production)

$$= \frac{\text{จำนวนไข่ในการทดลอง} \times 100}{\text{จำนวนวัน} \times \text{จำนวนไก่}}$$

3.3.2 การผสมติดและฟักออก

ทำการบันทึกไข่ที่เข้าตู้ฟักทุกสัปดาห์ หลังจากนำเข้าตู้ฟัก วันที่ 7 และ 18 จะส่องหาเชื้อตายและไข่ที่ไม่มีเชื้อ เพื่อใช้ในการคำนวณอัตราการผสมติด จากนั้นย้ายไข่มีเชื้ออายุ 18 วัน ไปตู้เกิดจนไข่มีอายุครบ 21 วัน ชั่งน้ำหนักลูกไก่อายุ 1 วัน และบันทึกข้อมูลการฟักออก หลังจากนั้นเลี้ยงลูกไก่จนถึงอายุ 14 วัน แล้วเจาะเลือดเพื่อวัดระดับภูมิคุ้มกันที่ตอบสนองต่อโรคนิวคาสเซิลและสารต้านอนุมูลอิสระ

1) อัตราการผสมติด (fertility)

$$= \frac{\text{จำนวนไข่ที่ผสมติด} \times 100}{\text{จำนวนไข่ทั้งหมด}}$$

2) อัตราการฟักออก (hatchability)

$$= \frac{\text{จำนวนไข่ฟักออก} \times 100}{\text{จำนวนไข่เข้าฟัก}}$$

3.4 การวิเคราะห์ทางเคมี

3.4.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสูตรอาหาร

วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสูตรอาหารทดลอง (commercial diet) ได้แก่ ความชื้น เถ้า โปรตีน เยื่อใย ไขมัน (AOAC, 1990) รวมถึงระดับวิตามินอี และซีลิเนียม โดยใช้วิธี HPLC และ ICP-MS/OES ดังแสดงไว้ในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 องค์ประกอบทางเคมีและโภชนะในอาหารไก่ทางการค้า

Nutrients	%
Dry Matter	89.00
Crude protein	15.32
Crude fiber	3.55
Ether extract	4.50
Ash	1.13
Vitamin E (mg/kg)	25.50
Selenium (mg/kg)	0.86

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.4.2 การวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระ

วิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระทั้งในไข่แดง และในพลาสมา โดยในไข่แดงจะทำการสุ่มไข่จากแต่ละซ้ำ ๆ ละ 2 ฟอง ทุก ๆ 4 สัปดาห์ โดยเก็บไข่แดงที่อุณหภูมิ -80°C ส่วนพลาสมาจะทำการสุ่มเจาะเลือดแม่ไก่ มทส เมื่อสิ้นสุดการทดลอง (ระยะเวลา 12 สัปดาห์) บริเวณใต้ปีก (wing vein) โดยใช้เข็มเบอร์ 23 ความยาว ½ นิ้ว ในหลอดที่มีสารป้องกันการแข็งตัวชนิด heparin นำเลือดที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,500 rpm เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสเก็บที่อุณหภูมิ -80°C เพื่อรอการวิเคราะห์ต่อไป ซึ่งในงานทดลองนี้จะวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระดังต่อไปนี้

3.4.2.1 การวัด Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)

การวัดค่า TBARS ในไข่แดง และในพลาสมาโดยทำการดัดแปลงจากวิธีของ Premanand et al. (2007) ซึ่งเป็นการทดสอบฤทธิ์การต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยดูจากปริมาณสารประกอบอัลดีไฮด์ในรูป MDA ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน (lipid oxidation) โดยการนำตัวอย่างมาทำปฏิกิริยากับสาร TBA (thiobarbituric acid) และใช้ความร้อนในการเร่งปฏิกิริยาจะได้สารสีชมพูใส คือ TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร แล้วนำมาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน โดยใช้ malonaldehydebis (dimethyl acetal) (MDA) ที่มีความเข้มข้นจาก 0-40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3.4.2.2 การวัด 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)

การวัดค่า DPPH ในไข่แดง ทำการดัดแปลงจากวิธีของ Gherraf et al. (2011) และในพลาสมาโดยทำการดัดแปลงจากวิธีของ Martinez et al. (2006) เป็นการทดสอบฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยให้สารเร่งทำปฏิกิริยากับ DDPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่มีสีม่วง เมื่อ DPPH ได้รับอิเล็กตรอนหรืออนุมูลอิสระไฮโดรเจนจะเปลี่ยนเป็น DPPH : H ซึ่งไม่มีสี ติดตามผลการทดลองโดยวัดการดูดกลืนแสงของสารละลายด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระตามสมการ

$$\%\text{inhibition} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}})/A_{\text{control}}] \times 100$$

หมายเหตุ : A_{control} คือค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH

A_{sample} คือค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง + สารละลาย DPPH

3.4.2.3 การวัดค่า glutathione peroxidase enzyme (GSH-Px)

การวัดค่าการทำงานของเอนไซม์กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดสในพลาสมาและไข่แดง ใช้วิธีการของ enzymatic assay of glutathione peroxidase (EC 1.11.1.9) ของบริษัท Sigma โดยใช้หลักการดังนี้

$$2GSH + H_2O_2 \xrightarrow{\text{Glutathione Peroxidase}} GSSG + 2H_2O$$

$$GSSG + \beta\text{-NDAPH} \xrightarrow{\text{Glutathione Reductase}} \beta\text{-NADP} + 2GSH$$

การวัดค่าการทำงานของเอนไซม์กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส เป็นการวัดความสามารถในการยับยั้งสารอนุมูลอิสระ โดยใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ซึ่งเป็นสารอนุมูลอิสระทำปฏิกิริยากับตัวอย่าง จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 314 นาโนเมตร เพื่อวัดค่า NADPH ที่ลดลงในระยะเวลา 0-10 นาที นำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานของเอนไซม์กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส เพื่อคำนวณความสามารถในการทำงานของเอนไซม์กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดสในไข่แดงซึ่งจะแสดงในรูป U/ mg protein และในพลาสมาจะรายงานผลในรูป U/ ml

3.4.3 การศึกษาระบบภูมิคุ้มกัน

การศึกษาระบบภูมิคุ้มกันในลูกไก่ โดยนำลูกไก่ที่ฟักออกไปเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ แล้วเจาะเลือดที่คอ โดยใช้เข็มขนาด 23 ความยาว ½ นิ้ว ในหลอดที่ไม่มีสารป้องกันการแข็งตัว นำเลือดที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,500 rpm เป็นเวลา 10 นาที นอกจากนี้ยังทำการศึกษาระบบภูมิคุ้มกันในแม่ไก่ มทส โดยเมื่อสิ้นสุดการทดลอง สุ่มแม่ไก่ซ้ำละ 1 ตัว โดยวิธีการเก็บตัวอย่างเลือดเหมือนในลูกไก่ เก็บส่วนที่เป็นซีรั่มไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อรอการวิเคราะห์ระดับภูมิคุ้มกันที่ตอบสนองต่อโรคนิวคาสเซิล ในงานทดลองครั้งนี้ได้ส่งตัวอย่างซีรั่มเพื่อตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสนิวคาสเซิล ที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่าง จังหวัดสุรินทร์ โดยใช้วิธี Haemagglutination inhibition test (HI-test) ซึ่งเป็นการวัดปริมาณภูมิคุ้มกัน (antibody) ที่สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดได้ โดยจะทำการวัดปริมาณ antibody ต่อ antigen virus ในซีรั่ม

3.5 การวิเคราะห์ทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ทางสถิติด้วยแผนการทดลองแบบ Augmented Factorial in CRD แบบ (2×3×2)+1 วิเคราะห์สถิติด้วยการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนหรือ analysis of variance (ANOVA) ใช้ตัวสถิติ F ในการทดสอบสมมติฐาน และการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของกลุ่มการทดลอง โดยใช้ Orthogonal contrast และ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

3.6 สถานที่ทำการทดลอง

1. ห้องปฏิบัติการโภชนศาสตร์สัตว์กระเพาะเดี่ยว อาคารเครื่องมือ 10
2. ห้องปฏิบัติการโภชนศาสตร์สัตว์กระเพาะเดี่ยว อาคารเครื่องมือ 14
3. งานสัตว์ปีก ฟาร์มมหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.7 ระยะเวลาในการทำการทดลอง

เริ่มการทดลองในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ – พฤษภาคม 2557

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 4
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ผลของการเสริมวิตามินอี ซีลีเนียม และโอเมก้า-3 ในอาหารไก่แม่พันธุ์ มทส ต่ออัตราการให้ผลผลิต การผสมติด และการฟักออก

ผลการเสริมวิตามินอี ซีลีเนียมและโอเมก้า-3 ในอาหารไก่แม่พันธุ์ มทส อายุ 28-40 สัปดาห์ต่อสมรรถนะการผลิต การผสมติด และการฟักออก ได้แสดงไว้ในตารางที่ 4.1 4.2 4.3 และ 4.4 โดยผลการทดลองแบ่งเป็นระยะดังนี้ คือ ไก่แม่พันธุ์ มทส ช่วงอายุ 28-32 32-36 36-40 และ 28-40 สัปดาห์ จากผลการทดลองพบว่าการสริมวิตามินอี (75 และ 150 มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหาร) ซีลีเนียม (0.1 0.3 และ 0.5 มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหาร) และน้ำมันปลา (0.75 และ 1.5%) ไม่มีผลต่ออัตราการให้ผลผลิตไข่ ปริมาณอาหารที่กิน และอัตราการฟักออก ($p>0.05$) ในทุกระยะการทดลอง อย่างไรก็ตามพบว่าอัตราการผสมติดในช่วงอายุ 32-36 สัปดาห์ของกลุ่มการทดลองที่ 4 (วิตามินอี 75 มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหาร ซีลีเนียม 0.3 มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหาร และน้ำมันปลา 0.75%) กลุ่มการทดลองที่ 7 (วิตามินอี 75 มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหาร ซีลีเนียม 0.5 มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหาร และน้ำมันปลา 1.5%) กลุ่มการทดลองที่ 9 (วิตามินอี 150 มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหาร ซีลีเนียม 0.1 มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหาร และน้ำมันปลา 1.5%) และกลุ่มการทดลองที่ 10 (วิตามินอี 150 มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหาร ซีลีเนียม 0.3 มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหาร และน้ำมันปลา 0.75%) มีค่าสูงขึ้นเป็น 91.3 90.4 91.4 และ 90.8% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p<0.05$) แต่ไม่พบความแตกต่างในช่วงอายุอื่น คือ 28-32 36-40 และ 28-40 สัปดาห์

การที่วิตามินอี ซีลีเนียม และโอเมก้า-3 สามารถเพิ่มอัตราการผสมติดในช่วงอายุ 32-36 สัปดาห์ อาจเป็นไปได้ว่า ในระยะเวลาการทดลองดังกล่าวเป็นช่วงฤดูร้อน (เดือนมีนาคม – เมษายน) ซึ่งเป็นช่วงที่มีอุณหภูมิสูงกว่าช่วงอื่น ๆ ของการทดลอง โดยบางวันมีอุณภูมิสูงถึง 39°C จึงอาจทำให้วิตามินอี ซีลีเนียม และโอเมก้า-3 แสดงผลในการต้านอนุมูลอิสระที่เกิดจากความเครียดจากความร้อน (heat stress) ได้ชัดเจนกว่าระยะอื่น ๆ จากการรวบรวมเอกสารพบว่าความเครียดจากความร้อนเป็นปัญหาสำคัญที่ส่งผลกระทบต่อสัตว์ปีก เพราะจะส่งผลให้อัตราการเจริญเติบโต การให้ผลผลิต และการผสมติดลดลง นอกจากนี้ยังทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการทำงานของฮอร์โมน กระบวนการเมแทบอลิซึม และกดการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย (Rozenboim et al. 2007; Kanchana and Jeyanthi, 2010; Oguntunji and Alabi, 2010) ถึงแม้ว่าใน

ปัจจุบันอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ปีกจะนิยมเลี้ยงในโรงเรือนที่ควบคุมอุณหภูมิได้ (evaporation cooling system) แต่ค่าใช้จ่ายก็ค่อนข้างสูง รวมถึงการลดอุณหภูมิในโรงเรือนก็ยังทำได้ในระดับที่จำกัดหากสภาพแวดล้อมภายนอกร้อนเกินไป โดยโรงเรือนแบบควบคุมอุณหภูมิสามารถลดอุณหภูมิภายในโรเรือนได้ประมาณ 8-12°C จากอุณหภูมิภายนอก (Levent and Portier, 2005) การเลี้ยงไก่ภายใต้สภาวะอุณหภูมิที่สูงขึ้นจะส่งผลให้ไก่กินอาหารลดลง ในไก่เนื้ออายุ 4 และ 6 สัปดาห์ที่เลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 30-32°C พบว่ามีการกินได้ลดลง 14 และ 24% ตามลำดับ (Geraert et al., 1996; Bolukbasi et al., 2007; Scheideler et al., 2010) โดยปริมาณการกินได้ที่ลดลงจะส่งผลต่อเนื่องทำให้สัตว์ได้รับสารอาหารไม่เพียงพอต่อความต้องการนำไปใช้เพื่อสร้างผลผลิต และเป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ระบบสืบพันธุ์ด้อยประสิทธิภาพ การผสมติดลดลง อีกทั้งไก่จะกินน้ำเพิ่มมากขึ้นเพื่อระบายความร้อนในร่างกายและถ่ายเหลวทำให้วิตามินและแร่ธาตุบางส่วนถูกขับออกมาด้วยเป็นผลให้ไก่ได้รับวิตามินและแร่ธาตุไม่เพียงพอ ดังนั้นการเสริมวิตามินและแร่ธาตุในอาหารมากขึ้นเมื่ออยู่ในสภาวะความเครียดจึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่จะช่วยลดผลกระทบที่มีต่อสมรรถนะการผลิตได้

ในการทดลองนี้ อาหารทดลองที่ใช้เป็นอาหารทางการค้า (commercial diet) ซึ่งมีวิตามินอีและซีลีเนียม 25.5 และ 0.86 มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหาร ตามลำดับ หลังจากเสริมวิตามินอีในรูป DL-α- tocophorol acetate ที่ระดับ 75 และ 150 มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหาร และซีลีเนียมในรูปซีลีเนียมยีสต์ที่ระดับ 0.1 0.3 และ 0.5 มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหารแล้ว พบว่ามีวิตามินอี 100.5 และ 175.5 มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหาร และซีลีเนียมเป็น 0.96 1.16 และ 1.36 มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหาร ตามลำดับ โดยปริมาณวิตามินอี และซีลีเนียมในอาหารทดลองมีค่าสูงกว่าความต้องการไก่แต่ละสายพันธุ์ ตามมาตรฐานที่ไก่พันธุ์ Arbor Acres Hubbard Cobb 500 และ Ross 308 แนะนำให้มีวิตามินอีและซีลีเนียมในอาหารที่ระดับ 40-100 มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหาร และซีลีเนียม 0.3 มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหาร โดยความต้องการวิตามินอีจะสูงขึ้นถึง 250 มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหาร เมื่อสัตว์อยู่ในสภาวะความเครียด (Bollengier-Lee, 1999) ขณะที่ Leeson and Summers (2001) แนะนำให้ในอาหารไก่พันธุ์ควรมีวิตามินอีและซีลีเนียมที่ระดับ 25 และ 0.3 มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหาร

ปัญหาการผสมติดต่ำที่มีสาเหตุจากสภาพอากาศร้อน ส่วนหนึ่งอาจมีสาเหตุจากอัตราการมีชีวิตรอดของสเปิร์มในท่อนำไข่ของไก่เพศเมียที่ลดลง (Franchini et al., 2002) โดยปกติน้ำหล่อเลี้ยงสเปิร์ม (seminal plasma) จะมีสารต้านอนุมูลอิสระอยู่แล้ว เพื่อช่วยป้องกันไม่ให้เยื่อหุ้มเซลล์ของสเปิร์มถูกทำลาย หลังการผสมพันธุ์สเปิร์มจะถูกกักเก็บไว้ในท่อนำไข่บริเวณ sperm storage tubules (SST) ของไก่เพศเมีย โดยแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ utero vaginal junction (UVJ) และ infundibular SST (Breque et al., 2003) สเปิร์มที่อยู่ในท่อนำไข่เป็นเวลานานสารต้านอนุมูลอิสระจะค่อย ๆ หมดไป แต่จะได้รับสารต้านอนุมูลอิสระภายในท่อนำไข่เพื่อใช้ในรักษาสภาพของสเปิร์ม

ไม่ให้ถูกทำลาย และเพื่อให้สามารถปฏิสนธิกับไข่ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยพบว่าสภาวะทางชีวเคมีภายในท่อนำไข่มีบทบาทสำคัญในการยืดอายุการมีชีวิตรอดของสเปิร์ม โดยเป็นแหล่งของสารอาหาร ช่วยปรับ pH ให้เหมาะสม ช่วยกำจัดของเสียที่เกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของสเปิร์ม และมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ จากการศึกษาของ Breque et al. (2006) รายงานว่ามีการทำงานของเอนไซม์กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส และซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตสในท่อนำไข่สูงกว่าบริเวณอื่น ๆ ซึ่งสารเหล่านี้จัดเป็นสารต้านอนุมูลอิสระสำคัญที่สามารถช่วยป้องกันการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชันของเยื่อหุ้มเซลล์สเปิร์ม (sperm membrane) ที่อยู่ในท่อนำไข่ได้ ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ว่าอัตราการผสมติดในช่วงอายุ 32-36 สัปดาห์ ที่เพิ่มขึ้นอาจเป็นผลของวิตามินอีและซีลีเนียมในการปรับเปลี่ยนค่าทางชีวเคมีใน uterine fluid (Breque and Brillard, 2002) โดย Breque et al. (2003) รายงานว่าวิตามินอี และซีลีเนียมเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีบทบาทสำคัญในการรักษาสภาพทางชีวเคมี และการต้านอนุมูลอิสระในท่อนำไข่ นอกจากนี้ยังช่วยปรับปรุงค่าสารต้านอนุมูลอิสระในท่อนำไข่ ส่งผลให้มีการผสมติดดีขึ้น

ถึงแม้ว่าวิตามินอี ซีลีเนียม และโอเมก้า-3 ไม่มีผลต่อต่อสมรรถนะการผลิต การผสมติด และการฟักออกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ตลอดระยะเวลาการทดลอง (28-40 สัปดาห์) โดยไก่แม่พันธุ์ มทส จากงานทดลองนี้เลี้ยงในโรงเรือนแบบเปิดภายใต้สภาพอากาศร้อน มีผลผลิตไข่ อัตราการผสมติด และอัตราการฟักออกเฉลี่ยเป็น 57.4-72.5% 83.4-92.9% และ 76.5-89.4% ตามลำดับ หากเปรียบเทียบกับแม่พันธุ์ไก่เนื้อทางการค้าในช่วงอายุดังกล่าว ควรมีอัตราการให้ไข่ การผสมติด และการฟักออกเฉลี่ย 71% 85% และ 88% ตามลำดับ (Leeson and Summers, 2001) ซึ่งจะเห็นได้ว่าสมรรถนะการผลิต การผสมติด และการฟักออกในงานทดลองนี้มีความแปรปรวนสูง จากการรวบรวมผลการทดลองที่มีลักษณะคล้ายคลึงกันพบว่าการเสริมวิตามินอี ซีลีเนียมมีทั้งที่ให้ผลดี และไม่แสดงผลใด ๆ เช่น Hossain et al. (1998); Puthpongsiriporn et al. (2001); Andi et al. (2006); Scheideler et al. (2010); Yuan et al. (2010) และ Zaghari et al. (2013) รายงานว่าการเสริมวิตามินอีและซีลีเนียมในอาหารไม่ส่งผลต่ออัตราการให้ไข่ การผสมติด และการฟักออก นอกจากนี้ยังทำให้น้ำหนักไข่ลดลงอีกด้วย (Bolukbasi et al., 2007; Robenboin et al., 2007) แต่อย่างไรก็ตามในงานทดลองของ Bollengier-Lee et al. (1998); Bollengier-Lee et al. (1999); Sahin et al. (2002); Ciftct et al. (2005) และ Bolukbasi et al. (2007) พบว่าการเสริมวิตามินอีในอาหารสามารถเพิ่มผลผลิตไข่ และยังสามารถช่วยปรับปรุงประสิทธิภาพอัตราการผสมติดและฟักออกได้สูงขึ้น (Tsai et al., 2008; Biwas et al., 2010) นอกจากนี้ยังสามารถช่วยเพิ่มน้ำหนักไข่ได้ (Bollengier-Lee et al. 1998; Radwan et al., 2008; Urso et al., 2015) จากความแตกต่างของผลการทดลองดังกล่าวอาจเป็นผลมาจากการตอบสนองของไก่ต่อวิตามินและแร่ธาตุที่ต่างกัน เนื่องจากความสามารถในการย่อย

การดูดซึม และนำไปใช้ประโยชน์ได้แตกต่างกัน โดยไก่แม่พันธุ์ มทส 104 ยังมีความแปรปรวนของสายพันธุ์ค่อนข้างสูง ทำให้การตอบสนองต่ออาหารมีความแตกต่างกันสูงด้วย

อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาจากจำนวนลูกไก่สะสมที่ได้รับ พบว่ากลุ่มการทดลองที่ 10 (วิตามินอี 150 มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหาร ซีลีเนียม 0.3 มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหาร และน้ำมันปลา 0.75%) มีจำนวนลูกไก่สะสมทั้งหมด 213 ตัว สูงกว่ากลุ่มควบคุมที่มีจำนวนลูกไก่สะสมเพียง 154 ตัว นอกจากนี้เมื่อคำนวณต้นทุนค่าอาหารในการผลิตลูกไก่ 1 ตัว (feed cost/chick) กลุ่มการทดลองที่ 10 มีต้นทุนค่าอาหารในการผลิตลูกไก่ต่ำสุด คือ 4.39 บาท/ตัว เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีราคา 5.83 บาท/ตัว ดังแสดงไว้ในตารางที่ 4.5 ทั้งนี้โดยภาพรวมกลุ่มการทดลองดังกล่าวมีผลผลิตไข่ อัตราการผสมติด และการฟักออกที่สูงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มการทดลองอื่น ๆ ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากวิตามินอี ซีลีเนียม และน้ำมันปลา มีการสะสมในไข่แดงสูงขึ้น ทำให้เอ็มบริโอมีแหล่งของสารอาหารเพื่อพัฒนาเป็นลูกไก่ได้ดีขึ้น (Bolukbasi et a., 2007) นอกจากนี้วิตามินอี และซีลีเนียมยังมีบทบาทสำคัญในการป้องกันเอ็มบริโอจากการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชันภายหลังจากการปฏิสนธิ เพื่อให้เอ็มบริโอสามารถพัฒนาจนฟักออกได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Surai, 2000; Bolukbasi et al. 2007; Tsai et al., 2008)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.1 ผลของการเสริมวิตามินอี ซีลีเนียม และโอเมก้า-3 ในอาหารไก่แม่พันธุ์ มทส ต่อการกินได้ (28-32 32-36 36-40 28-40 สัปดาห์)

Vitamin E (mg/kg diet)	Selenium (mg/kg diet)	Fish oil (%)	Feed intake (g/day)			
			28-32 wk	32-36 wk	36-40 wk	28-40 wk
Control			116.6	116.4	108.4	113.2
75	0.1	0.75	117.3	116.2	109	113.5
		1.5	112.9	113.7	103.5	109.4
	0.3	0.75	115.4	117.4	109.1	113.7
		1.5	116.2	116.7	112.1	114.7
	0.5	0.75	118.1	118.4	108.9	114.6
		1.5	117.4	118.1	102.3	111.7
150	0.1	0.75	112.8	112.4	101.6	108.1
		1.5	113.6	115.7	111.9	113.8
	0.3	0.75	118.3	118.9	105.6	113.4
		1.5	116.8	118.2	108.7	114.1
	0.5	0.75	119.3	119.0	112.4	116.4
		1.5	108.1	111.8	100.7	106.6
SEM [1]			2.067	2.186	4.471	3.126
Source of variance			P-value			
Control vs. Others			0.122	0.877	0.838	0.505
Controlvs. VE			NS	NS	NS	NS
Control vs. Se			NS	NS	NS	NS
Control vs. FO			NS	NS	NS	NS
VE × Se			NS	NS	NS	NS
VE × FO			NS	NS	NS	NS
Se × FO			NS	NS	NS	NS
VE × Se × FO			NS	NS	NS	NS

หมายเหตุ : [1] Standard error of mean

VE = Vitamin E; Se = Selenium; FO = Fish Oil

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.2 ผลของการเสริมวิตามินอี ซีลีเนียม และโอเมก้า-3 ในอาหารไก่แม่พันธุ์ มทส ต่อการให้ผลผลิตไข่ (28-32 32-36 36-40 28-40 สัปดาห์)

Vitamin E (mg/kg diet)	**Selenium (mg/kg diet)**	**Fish oil (%)**	**Egg production (%)**			
			28-32 wk	**32-36 wk**	**36-40 wk**	**28-40 wk**
Control			84.5	59.9	41.7	62.0
75	0.1	0.75	75.6	56.9	42.0	58.2
		1.5	77.3	59.4	43.8	60.2
	0.3	0.75	88.1	70.7	56.5	71.8
		1.5	77.4	58.6	43.6	61.3
	0.5	0.75	88.8	64.3	57.0	70.0
		1.5	85.7	72.7	59.1	72.5
150	0.1	0.75	83.6	49.9	38.7	57.4
		1.5	77.1	64.3	51.8	64.4
	0.3	0.75	86.3	70.9	56.2	71.3
		1.5	81.2	68.6	61.5	70.5
	0.5	0.75	82.8	62.6	43.2	62.9
		1.5	81.7	56.0	35.5	57.8
SEM [1]			6.032	7.945	9.072	6.212
Source of variance			P-value			
Control vs. Others			0.868	0.716	0.568	0.625
Control vs. VE			NS	NS	NS	NS
Control vs. Se			NS	NS	NS	NS
Control vs. FO			NS	NS	NS	NS
VE × Se			NS	NS	NS	NS
VE × FO			NS	NS	NS	NS
Se × FO			NS	NS	NS	NS
VE × Se × FO			NS	NS	NS	NS

หมายเหตุ : [1] Standard error of mean

VE = Vitamin E; Se = Selenium; FO = Fish Oil

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.3 ผลของการเสริมวิตามินอี ซีลีเนียม และโอเมก้า-3 ในอาหารไก่แม่พันธุ์ มทส ต่อการผสมติด (28-32 32-36 36-40 28-40 สัปดาห์)

Vitamin E (mg/kg diet)	Selenium (mg/kg diet)	Fish oil (%)	Fertility (%)			
			28-32wk	32-36 wk	36-40 wk	28-40 wk
Control			92.1	83.3[bc]	82.7	86.0
75	0.1	0.75	94.5	82.1[c]	86.1	87.6
		1.5	95.4	88.1[abc]	90.7	91.4
	0.3	0.75	97.9	91.3[a]	89.5	92.9
		1.5	85.1	88.6[abc]	77.5	84.8
	0.5	0.75	95.7	86.5[abc]	70.4	84.2
		1.5	97.3	90.4[a]	83.1	90.3
150	0.1	0.75	89.9	84.6[abc]	75.8	83.4
		1.5	95.2	91.4[a]	85.2	90.6
	0.3	0.75	92.9	90.8[a]	87.4	90.4
		1.5	95.9	89.7[ab]	81.8	89.1
	0.5	0.75	94.4	88.2[abc]	88.1	90.3
		1.5	92.6	89.3[ab]	91.6	91.3
SEM [1]			1.939	2.003	3.972	1.821
Source of variance			P-value			
Control vs. Others			0.433	0.020	0.263	0.181
Control vs. VE			NS	0.024	NS	NS
Control vs. Se			NS	NS	NS	NS
Control vs. FO			NS	NS	NS	NS
VE × Se			NS	NS	NS	NS
VE × FO			NS	NS	NS	NS
Se × FO			NS	NS	NS	NS
VE × Se × FO			NS	NS	NS	NS

หมายเหตุ : [a b c] Means with different superscripts in a row are significantly different (P<0.05).

VE = Vitamin E; Se = Selenium; FO = Fish Oil

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.4 ผลของการเสริมวิตามินอี ซีลีเนียม และโอเมก้า-3 ในอาหารไก่แม่พันธุ์ มทส ต่อการฟักออก (28-32 32-36 36-40 28-40 สัปดาห์)

Vitamin E (mg/kg diet)	**Selenium (mg/kg diet)**	**Fish oil (%)**	**Hatchability (%)**			
			28-32 wk	**32-36 wk**	**36-40 wk**	**28-40 wk**
Control			82.7	81	86.6	83.4
75	0.1	0.75	76.4	70.8	82.4	76.5
		1.5	84.9	75.2	79.6	79.9
	0.3	0.75	78.2	85.6	83.1	84.42
		1.5	68	75.9	83.4	76.7
	0.5	0.75	81.7	83.6	85.5	83.7
		1.5	85.4	81.3	96.1	87.6
150	0.1	0.75	77.4	75.5	92	81.6
		1.5	86.8	75.7	92.2	84.9
	0.3	0.75	85.4	79.6	96.5	87.2
		1.5	76.8	80	89.8	82.5
	0.5	0.75	86.7	88.9	92.7	89.4
		1.5	80.4	79.5	97.1	84.3
SEM [1]			3.977	3.512	2.907	2.445
Source of variance			P-value			
Control vs. Others			0.087	0.814	0.286	0.474
Control vs. VE			NS	NS	NS	NS
Control vs. Se			NS	NS	NS	NS
Control vs. FO			NS	NS	NS	NS
VE × Se			NS	NS	NS	NS
VE × FO			NS	NS	NS	NS
Se × FO			NS	NS	NS	NS
VE × Se × FO			NS	NS	NS	NS

หมายเหตุ : [1] Standard error of mean

VE = Vitamin E; Se = Selenium; FO = Fish Oil

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนาร

ตารางที่ 4.5 ผลของการเสริมวิตามินอี ซีลีเนียม และโอเมก้า-3 ในอาหารไก่แม่พันธุ์ มทส ต่อจำนวนลูกไก่และต้นทุนการผลิตลูกไก่

Vitamin E (mg/kg diet)	Selenium (mg/kg diet)	Fish oil (%)	Total chicks	Feed cost (Baht/chick)
Control			154	5.83
75	0.1	0.75	99	8.41
		1.5	154	5.77
	0.3	0.75	196	5.86
		1.5	150	7.59
	0.5	0.75	185	4.76
		1.5	187	5.08
150	0.1	0.75	138	6.29
		1.5	178	5.81
	0.3	0.75	213	4.39
		1.5	182	5.24
	0.5	0.75	191	5.22
		1.5	137	6.50
SEM [1]			2.430	-
Source of variance			P-value	
Control vs. Others			0.087	-
Control vs. VE			NS	-
Control vs. Se			NS	-
Control vs. FO			NS	-
VE × Se			NS	-
VE × FO			NS	-
Se × FO			NS	-
VE × Se × FO			NS	-

หมายเหตุ : [1] Standard error of mean

VE = Vitamin E; Se = Selenium; FO = Fish Oil

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4.2 ผลของการเสริมวิตามินอี ซีลีเนียม และโอเมก้า-3 ในอาหารไก่แม่พันธุ์ มทส ต่อการต้านอนุมูลอิสระ

ผลของการเสริมวิตามินอี ซีลีเนียม และ โอเมก้า-3 ต่อคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เมื่อวัดในรูปแบบของ DPPH TBARS และการทำงานของเอนไซม์กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดสได้แสดงไว้ในตารางที่ 4.6 4.7 และ 4.8 โดยทำการวัดคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระในไข่แดงที่ได้จากแม่ไก่อายุ 32 36 และ 40 สัปดาห์ ส่วนพลาสมาวัดในแม่ไก่อายุ 40 สัปดาห์เพียงระยะเดียว เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มการทดลองแบบ orthogonal contrast พบว่าการเสริมวิตามินอีมีผลทำให้ค่า DPPH ในไข่แดงจากแม่ไก่ทุกช่วงอายุ (32 36 และ 40 สัปดาห์) และในพลาสมาของแม่ไก่อายุ 40 สัปดาห์ มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุม ($p<0.05$) แต่ไม่พบความแตกต่างดังกล่าวในกลุ่มที่เสริมซีลีเนียม และน้ำมันปลา ($p>0.05$) (ตารางที่ 4.6)

สำหรับค่า TBARS ได้แสดงไว้ในตารางที่ 4.7 เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มการทดลองแบบ orthogonal contrast พบว่าการเสริมวิตามินอีและซีลีเนียมมีอิทธิพลร่วมกัน (interaction) ต่อการต้านอนุมูลอิสระในแม่ไก่ มทส อายุ 32 สัปดาห์ โดยการเสริมวิตามินอี 150 และซีลีเนียม 0.5 มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหาร สามารถยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด ส่วนในแม่ไก่อายุ 36 สัปดาห์ พบว่าวิตามินอีมีบทบาทในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่ากลุ่มควบคุม ($p<0.05$) แต่ไม่พบคุณสมบัติดังกล่าวในซีลีเนียมและน้ำมันปลา ($p>0.05$) อย่างไรก็ตามวิตามินอี ซีลีเนียม และน้ำมันปลา ไม่มีผลในการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระทั้งในไข่แดงและในพลาสมาของแม่ไก่อายุ 40 สัปดาห์ ($p>0.05$)

จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าวิตามินอีมีบทบาทสำคัญในการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระทั้งในรูปของ DPPH และ TBARS ในแม่ไก่ มทส ช่วงอายุ 32 และ 36 สัปดาห์ โดย DPPH จะบ่งชี้ถึงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ส่วน TBARS เป็นการวัดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน (lipid peroxidation) โดยวัดปริมาณอัลดีไฮด์ (aldehyde) ในรูปของมาโลนาลอัลดีไฮด์ (MDA) จากการรวบรวมผลการทดลองอื่น ๆ ที่คล้ายคลึงกันพบว่าการเสริมวิตามินอีเพียงอย่างเดียว (Florou et al., 2005; Cherian et al., 1996; Marashiello et al., 1999; Surai, 1999; Grune et al., 2001; Puthpongsiriporn et al., 2001; Franchini et al., 2002; Sahin et al., 2002; Lin et al., 2005; Bolukbasi et al., 2007; Radwan et al., 2008; An et al., 2010; Wang et al., 2010) หรือการเสริมวิตามินอีร่วมกับซีลีเนียม (Mohiti-Asli et al., 2008; Wang et al., 2010; Keshavamurthy et al., 2013; Nyquist et al., 2013) สามารถยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระได้

การที่วิตามินอี ไม่แสดงผลในการต้านอนุมูลอิสระทั้งในรูปของ DPPH และ TBARS ในพลาสมาของไก่อายุ 40 สัปดาห์ ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากการกินได้เฉลี่ยในแม่ไก่ลดลง 116.30 กรัม/ตัว/วัน เมื่อเปรียบเทียบไก่สายพันธุ์การค้า (Ross 308) ที่กินได้ ประมาณ 150 กรัม/ตัว/วัน แต่ในขณะเดียวกันร่างกายยังต้องการพลังงานมากขึ้นเพื่อใช้สำหรับระบายความร้อน ดังนั้นจึงอาจมีการ

สลายไขมันที่สะสมในร่างกายเพื่อให้ได้พลังงานเพียงพอ กระบวนการดังกล่าวทำให้เกิดอนุมูลอิสระสูงขึ้นส่งผลให้ค่า TBARS สูงขึ้นตามไปด้วย อีกทั้งเมื่อแม่ไก่มีอายุมากขึ้นความต้องการวิตามินและแร่ธาตุก็จะมากขึ้น เนื่องจากความสามารถในการสะสมวิตามินและแร่ธาตุต่าง ๆใน ร่างกายลดลง รวมถึงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจะลดลงเรื่อย ๆ และไม่เพียงพอต่อการต้านอนุมูลอิสระที่อาจเกิดขึ้นมากกว่าปกติโดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วงที่ไก่อยู่ในสภาวะความเครียดหรือถูกเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิที่สูงขึ้น (Teeter and Belay, 1996; Sahin et al., 2002; Hasret and Yurkay, 2008)

ผลของการเสริมวิตามินอี ซีลีเนียม และโอเมก้า-3 ในอาหารไก่แม่พันธุ์ มทส ต่อการทำงานของเอนไซม์กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส ได้แสดงไว้ในตารางที่ 4.8 จากการทดลองเมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มการทดลองแบบ orthogonal contrast พบว่าการเสริมวิตามินอีและซีลีเนียมมีผลทำให้ค่าเอนไซม์กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดสในไข่แดงจากแม่ไก่อายุ 32 สัปดาห์ และในพลาสมามีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุม ($p<0.05$) โดยกลุ่มการทดลองที่เอนไซม์กลู-ตาไธโอนเปอร์ออกซิเดสทำงานได้มากสุดทั้งในไข่แดงและพลาสมาคือกลุ่มที่มีการเสริมวิตามินอี 150 มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหาร และซีลีเนียม 0.3 มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหาร ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากวิตามินอีและซีลีเนียมที่ไก่แม่พันธุ์ มทส ได้รับในอาหารถูกเก็บสะสมไว้ในไข่แดง ส่งผลให้เอนไซม์กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดสสามารถทำงานได้ดีขึ้น ซึ่งระดับที่สะสมจะแปรผันตามปริมาณวิตามินอีและซีลีเนียมในอาหาร (Cherian et al., 1996; Cherian and Sim, 1997; Surai et al., 2000; Grobas et al., 2001; Lin et al., 2005; Tsai et al., 2008) การที่ซีลีเนียมมีความสัมพันธ์กับการทำงานของเอนไซม์กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส (Valcic et al., 2011) เนื่องจากซีลีเนียมเป็นส่วนประกอบหลักของเอนไซม์กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส เมื่อซีลีเนียมมีการสะสมในเลือดและไข่แดงมากขึ้น ส่งผลให้ร่างกายสามารถต้านอนุมูลอิสระ ได้ดีขึ้น สอดคล้องกับงานทดลองหลาย ๆ งานด้วยกันที่รายงานว่า การเสริมวิตามินอีและซีลีเนียมในอาหารสามารถเพิ่มการทำงานของเอนไซม์กลูตาไธโอเปอร์ออกซิเดส (Stanley and Tappel, 1973; Arai et al., 1994; Surai et al., 2000; El-Demerdash, 2004; Skrivan et al., 2008; Wang and Xu, 2008; Leeson et al., 2008; Milinkovic-Tur et al., 2009; Invernizzi et al., 2013; Milad et al., 2001; Lasota et al., 2004; Lin et al., 2005; Mohiti-Asli et al., 2008; Cai et al., 2012; Keshavamurthy et al., 2013) อย่างไรก็ตามการเสริมวิตามินอี ซีลีเนียมและโอเมก้า-3 ไม่มีผลในการเปลี่ยนแปลงค่าการทำงานของเอนไซม์กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดสในไข่แดงที่ได้จากแม่ไก่อายุ 36 และ 40 สัปดาห์ ($p<0.05$) ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าแม่ไก่กินอาหารลดลงส่งผลให้ได้รับวิตามินอีและซีลีเนียมน้อยลง ทำให้มีการสะสมวิตามินอีและซีลีเนียมในไข่แดงลดลงไปด้วย (Surai et al., 2000) อีกทั้งเมื่อแม่ไก่มีอายุมากขึ้นความสามารถในการสะสมวิตามินและแร่ธาตุต่าง ๆ ในร่างกายลดลง เป็นผลให้ร่างกายไม่มีสารตั้งต้นที่เพียงพอในการสร้างเอนไซม์กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดสเพื่อใช้ในการยับยั้งอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในร่างกาย

ตารางที่ 4.6 ผลของการเสริมวิตามินอี ซีลีเนียม และโอเมก้า-3 ในอาหารไก่แม่พันธุ์ มทส ต่อความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (DPPH)

Vitamin E (mg/kg diet)	Selenium (mg/kg diet)	Fish oil (%)	DPPH radical scavenging (%)			
			Egg yolk			Plasma
			32 wk	36 wk	40 wk	40 wk
Control			63.42^{c}	66.18^{c}	65.44^{c}	52.34^{ef}
75	0.1	0.75	69.23^{abc}	69.70^{bc}	72.70^{b}	60.78^{ab}
		1.5	70.14^{abc}	72.32^{abc}	74.49^{b}	56.05^{cde}
	0.3	0.75	66.90^{bc}	70.97^{abc}	77.00^{ab}	52.97^{ef}
		1.5	72.85^{ab}	74.68^{ab}	75.21^{ab}	63.74^{a}
	0.5	0.75	74.86^{ab}	78.10^{ab}	74.30^{b}	53.27^{def}
		1.5	71.96^{ab}	76.77^{ab}	73.84^{b}	50.17^{f}
150	0.1	0.75	77.67^{a}	77.70^{ab}	73.24^{b}	57.88^{bcd}
		1.5	76.16^{a}	78.00^{ab}	77.49^{ab}	54.04^{def}
	0.3	0.75	76.15^{a}	77.49^{ab}	78.03^{ab}	55.12^{de}
		1.5	77.09^{a}	78.14^{ab}	76.75^{ab}	60.47^{abc}
	0.5	0.75	76.67^{a}	79.46^{a}	77.51^{ab}	56.89^{bcde}
		1.5	76.50^{a}	79.68^{a}	80.27^{a}	57.70^{bcd}
SEM [1]			3.264	3.676	2.342	4.739
Source of variance			P-value			
Control vs. Others			0.0008	0.0005	0.0001	0.0001
Control vs. VE			0.0004	0.0034	0.0106	0.0377
Control vs. Se			NS	NS	NS	NS
Control vs. FO			NS	NS	NS	NS
VE × Se			NS	NS	NS	NS
VE × FO			NS	NS	NS	NS
Se × FO			NS	NS	NS	NS
VE × Se × FO			NS	NS	NS	NS

หมายเหตุ : $^{a\ b\ c\ d\ e\ f}$ Means with different superscripts in a colum are significantly different ($p<0.05$).

NS = Non significant different; [1]Standard error of mean

VE = Vitamin E; Se = Selenium; FO = Fish Oil

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.7 ผลของการเสริมวิตามินอี ซีลีเนียม และโอเมก้า-3 ในอาหารไก่แม่พันธุ์ มทส ต่อการเกิดอนุมูลอิสระ (TBARS)

Vitamin E (mg/kg diet)	Selenium (mg/kg diet)	Fish oil (%)	TBARS			
			Egg yolk[1]			Plasma[2]
			32 wk	36 wk	40 wk	40 wk
Control			0.80^{a}	1.33^{a}	0.89	5.92
75	0.1	0.75	0.74^{ab}	1.08^{ab}	0.88	5.99
		1.5	0.74^{ab}	0.68^{bc}	0.88	5.47
	0.3	0.75	0.74^{ab}	0.63^{bc}	0.85	5.93
		1.5	0.72^{b}	0.64^{bc}	0.85	6.50
	0.5	0.75	0.73^{b}	0.60^{bc}	0.85	5.48
		1.5	0.69^{abc}	0.61^{bc}	0.84	5.81
150	0.1	0.75	0.70^{abc}	0.56^{bc}	0.84	5.96
		1.5	0.64^{c}	0.51^{bc}	0.84	5.63
	0.3	0.75	0.60^{c}	0.47^{c}	0.83	5.50
		1.5	0.59^{cd}	0.47^{c}	0.83	6.16
	0.5	0.75	0.47^{ed}	0.45^{c}	0.83	5.86
		1.5	0.44^{e}	0.37^{c}	0.83	5.99
SEM[3]			0.382	0.889	1.141	0.477
Source of variance			P-value			
Control vs. Others			0.0028	0.0005	0.651	0.564
Control vs. VE			0.0001	0.0346	NS	NS
Control vs. Se			0.0007	NS	NS	NS
Control vs. FO			NS	NS	NS	NS
VE × Se			0.0109	NS	NS	NS
VE × FO			NS	NS	NS	NS
Se × FO			NS	NS	NS	NS
VE × Se × FO			NS	NS	NS	NS

หมายเหตุ : $^{a\ b\ c}$ Means with different superscripts in a colum are significantly different ($p<0.05$).
[1]TBARS value expressed as nmol/ g; [2]TBARS value expressed as nmol/ ml; [3]Standard error of mean; VE = Vitamin E; Se = Selenium; FO = Fish Oil

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.8 ผลของการเสริมวิตามินอี ซีลีเนียม และโอเมก้า-3 ในอาหารไก่แม่พันธุ์ มทส ต่อการทำงานของเอนไซม์กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส (GSH-Px)

Vitamin E (mg/kg diet)	Selenium (mg/kg diet)	Fish oil (%)	GSH-Px Egg yolk[1] 32 wk	36 wk	40 wk	Plasma[2] 40 wk
Control			24.92^{c}	25.50	26.08	146.26^{d}
75	0.1	0.75	24.96^{c}	25.42	26.05	147.37^{cd}
		1.5	24.98^{bc}	25.68	26.16	146.24^{d}
	0.3	0.75	25.26^{abc}	25.29	26.26	148.00^{bcd}
		1.5	25.64^{abc}	25.67	26.74	149.65^{abcd}
	0.5	0.75	25.53^{abc}	25.48	26.57	149.92^{abcd}
		1.5	25.81^{a}	25.58	26.50	149.04^{abcd}
150	0.1	0.75	25.62^{abc}	25.50	26.39	148.98^{abcd}
		1.5	25.55^{abc}	25.56	26.41	149.70^{abcd}
	0.3	0.75	25.61^{abc}	25.68	26.76	150.53^{abc}
		1.5	25.88^{a}	25.71	26.70	151.25^{ab}
	0.5	0.75	25.94^{a}	25.60	26.65	152.20^{a}
		1.5	25.74^{ab}	25.73	26.62	149.64^{abcd}
SEM[3]			0.155	1.923	2.018	0.842
Source of variance			P-value			
Control vs. Others			0.0167	0.9802	0.5483	0.0117
Control vs. VE			0.0129	NS	NS	0.0040
Control vs. Se			0.0224	NS	NS	0.0242
Control vs. FO			NS	NS	NS	NS
VE × Se			NS	NS	NS	NS
VE × FO			NS	NS	NS	NS
Se × FO			NS	NS	NS	NS
VE × Se × FO			NS	NS	NS	NS

หมายเหตุ : $^{a\,b\,c\,d}$ Means with different superscripts in a colum are significantly different ($p<0.05$)

[1]Enzyme activity expressed as U/mg protein; [2]Enzyme acticity expressed as U/ml; [3]Standard error of mean; VE = Vitamin E; Se = Selenium; FO = Fish Oil

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4.3 ผลของการเสริมวิตามินอี ซีลีเนียม และโอเมก้า-3 ในอาหารไก่แม่พันธุ์ มทส ต่อการสร้างภูมิคุ้มกันโรค

ผลการเสริมวิตามินอี ซีลีเนียมและโอเมก้า-3 ในอาหารไก่แม่พันธุ์ มทส ต่อการสร้างภูมิคุ้มกันที่ตอบสนองต่อโรคนิวคาสเซิล (Newcastle Diease, ND) ในไก่แม่พันธุ์ มทส อายุ 40 สัปดาห์ และไก่โคราชอายุ 2 สัปดาห์ ได้แสดงไว้ในตารางที่ 4.9 จากการทดลองพบว่า การเสริมวิตามินอี ซีลีเนียม และโอเมก้า-3 ทุกระดับไม่มีผลต่อระดับภูมิคุ้มกันที่ตอบสนองต่อโรคนิวคาสเซิล ทั้งในไก่แม่พันธุ์ มทส และไก่โคราชอายุ 2 สัปดาห์ ($p<0.05$)

ถึงแม้ว่าในงานทดลองนี้จะมีสมมุติฐานว่า การเสริมวิตามินอี ซีลีเนียม และน้ำมันปลาน่าจะช่วยส่งเสริมการสร้างคุ้มกันโรคในไก่ มทส และลูกไก่โคราชได้ เนื่องจากโอเมก้า –3 ในน้ำมันปลา เป็นแหล่งของ EPA และ DHA มีบทบาทสำคัญต่อการทำงานของสมอง ตับ และระบบประสาท และกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันโรค เพราะเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ ecosanoid เช่น prostaglandins (PG) และ leukotrienes (Hall et al., 2007) ส่วนวิตามินอีและซีลีเนียมต่างก็มีบทบาทในการกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันโรคได้เช่นกัน โดยใช้คุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ เนื่องจากในกระบวนการสร้างภูมิคุ้มกันโรคจะมีการสร้างสารอนุมูลอิสระขึ้น และอนุมูลอิสระเหล่านี้จะทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ภูมิคุ้มกันทำให้เสียการทำงานหรือทำงานได้ไม่เต็มประสิทธิภาพ (Lin and Chang, 2006; Cai et al. 2012; Mohapatra et al., 2014) ในงานทดลองนี้ได้ทำการวัดระดับการสร้างภูมิคุ้มกันโรคในแม่ไก่ มทส ที่อายุ 40 สัปดาห์ โดยการวัด antibody titer ต่อเชื้อ NDV (Newcascle diease virus) แต่ไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลอง ($p>0.05$) ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าโรคนิวคาสเซิลเป็นแอนติเจนที่จำเพาะกับ T-cell independent ในขณะที่วิตามินอีและซีลีเนียมมีบทบาทในเพิ่มการทำงานของ T-cell dependent (Erf et al., 1998; Lin and chang, 2006) จึงทำให้ไม่พบความแตกต่างของระบบภูมิคุ้มกัน นอกจากนี้เมื่อวัดระดับภูมิคุ้มกันในลูกไก่โคราชที่อายุ 2 สัปดาห์ ก็ไม่พบความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมเช่นกัน ($p>0.05$) ซึ่งอาจเป็นผลมาจากภูมิคุ้มกันที่ถ่ายทอดไปยังลูกไก่มีความผันแปรไปตามระดับภูมิคุ้มกันในตัวแม่ไก่ (Hamal et al., 2006) จึงอาจเป็นสาเหตุที่ไม่พบความแตกต่างของระดับภูมิคุ้มกันโรคในลูกไก่โคราชอายุ 2 สัปดาห์ อีกทั้งจำนวนลูกไก่โคราชที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์หาระดับภูมิคุ้มกันมีน้อย เนื่องจากจำนวนลูกไก่ที่ฟักออกบางกลุ่มทดลองมีไม่มาก จึงอาจเป็นผลให้ไม่พบความแตกต่างของภูมิคุ้มกัน

ตารางที่ 4.9 ผลของการเสริมวิตามินอี ซีลีเนียม และโอเมก้า-3 ในอาหารไก่แม่พันธุ์ มทส ต่อระบบภูมิคุ้มกันที่ตอบสนองต่อโรคนิวคาสเซิล

Vitamin E (mg/kg diet)	**Selenium (mg/kg diet)**	**Fish oil (%)**	**Antibody titer (HI test, log 2)**	
			SUT female	**Korat chicken (2 wk)**
Control			2.72	1.17
75	0.1	0.75	2.3	0.87
		1.5	2.73	0.98
	0.3	0.75	2.65	1.03
		1.5	2.65	0.95
	0.5	0.75	2.93	1.1
		1.5	2.57	1.11
150	0.1	0.75	2.8	0.72
		1.5	2.41	1.07
	0.3	0.75	2.57	1.26
		1.5	2.69	1.12
	0.5	0.75	2.49	1.13
		1.5	2.3	0.91
SEM [1]			2.918	1.936
Source of variance			P-value	
Control vs. Others			0.229	0.328
Control vs. VE			NS	NS
Control vs. Se			NS	NS
Control vs. FO			NS	NS
VE × Se			NS	NS
VE × FO			NS	NS
Se × FO			NS	NS
VE × Se × FO			NS	NS

หมายเหตุ : VE = Vitamin E; Se = Selenium; FO = Fish Oil; [1]Standard error of mean

บทที่ 5
บทสรุปและข้อเสนอแนะ

5.1 บทสรุป

จากการศึกษาผลของการเสริมวิตามินอี ซีลีเนียม และโอเมก้า-3 ในอาหารไก่แม่พันธุ์ มทส ต่อผลผลิตไข่ การผสมติด การฟักออก ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ และการสร้างภูมิคุ้มกันต่อโรคนิวคาสเซิล (NDV) โดยภาพรวมสรุปได้ดังนี้

5.1.1 การใช้วิตามินอี สามารถเพิ่มอัตราการผสมติดของแม่ไก่ มทส ในช่วงอายุ 32-36 สัปดาห์ ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่มีอุณหภูมิสูง อีกทั้งยังเป็นช่วงที่แม่ไก่ มทส มีอัตราการให้ผลผลิตสูง (peak production) ส่งผลให้วิตามินอีที่เสริมในอาหารแสดงผลในการช่วยเพิ่มอัตราการผสมติดได้กว่าระยะ ๆ อื่นของการทดลอง

5.1.2 วิตามินอีและซีลีเนียมมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ลดการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน และเพิ่มการทำงานของเอนไซม์กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดสได้ทั้งในพลาสมาและในไข่แดง

5.1.3 ถึงแม้ว่าวิตามินอี ซีลีเนียม และโอเมก้า-3 ไม่มีผลต่อการให้ผลผลิตไข่ การผสมติด และการฟักออก รวมถึงระบบภูมิคุ้มกันทั้งในแม่ไก่ มทส และลูกไก่โคราช แต่เมื่อพิจารณาจากจำนวนลูกไก่สะสมที่ได้รับ พบว่าการเสริมวิตามินอี 150 มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหาร ซีลีเนียม 0.3 มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหาร และน้ำมันปลา 0.75% มีจำนวนลูกไก่สูงสุด และมีต้นทุนค่าอาหารต่อการผลิตลูกไก่ 1 ตัว (feed cost/chick) ต่ำสุด

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ในการทดลองนี้ เมื่อเลี้ยงไก่แม่พันธุ์ มทส ภายใต้สภาวะความเครียดจากความร้อน ไก่กินอาหารลดลงเมื่อเทียบกับไก่ทางการค้าสายพันธุ์อื่น ๆ การกินได้ที่ลดลงมีผลทำให้ไก่ได้รับสารอาหารต่าง ๆ ไม่เพียงพอต่อความต้องการ รวมถึงวิตามินอี ซีลีเนียม และโอเมก้า-3 ที่เสริมในอาหารด้วย ดังนั้นจึงควรปรับเปลี่ยนระดับความเข้มข้นของพลังงานและโภชนะต่าง ๆ ในอาหารเพื่อให้สอดคล้องกับปริมาณการกินได้ที่เปลี่ยนแปลงไป

5.2.2 เนื่องจากในงานทดลองนี้ เป็นการเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์โดยใช้ระบบผสมจริง ซึ่งใช้ไก่พ่อพันธุ์เหลืองหางขาว 1 ตัว เลี้ยงรวมกับแม่ไก่ มทส 5 ตัว แบบคุมฝูง ซึ่งจะพบปัญหาที่ตัวผู้บางตัว

ขาดความสามารถในการคุมฝูง เช่น ไก่แม่ มทส ทำร้ายไก่เหลืองหางขาว ไก่ตัวผู้ไม่ยอมขึ้นผสม หรือขึ้นผสมเฉพาะกับแม่ไก่บางตัวเท่านั้น ดังนั้นเพื่อป้องกันผลการทดลองที่อาจคาดเคลื่อน การใช้วิธีการผสมเทียมน่าจะช่วยลดปัญหาดังกล่าวได้

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

รายการอ้างอิง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

รายการอ้างอิง

กรมอุตุนิยมวิทยา. (2558). **ความผันแปรและการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศ.** [ออนไลน์]. ได้จาก: https://www.tmd.go.th

เจนจิรา จิรัมย์ และประสงค์ สีหานาม. (2554). อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ: แหล่งที่มาและกลไกการเกิดปฏิกิริยา. **ว.วิชาการมหาวิทยาลัยราชภัฏกาฬสินธุ์.** 1(1)1 59-70.

ทินกร เหล่าออง กนกวรรณ จารุกำจร และวรัญญา จตุพรประเสริฐ. (2556). ผลกระทบของระบบต้านอนุมูลอิสระและภาวะเครียดออกซิเดชั่นต่อพัฒนาการของภาวะเบาหวาน. **ว. เภสัชศาสตร์อีสาน.** 9(1): 1-14.

วีรพล คู่คงวิริยพันธุ์. (2557). บทบาทสำคัญของเครือข่ายต้านออกซิเดชันของวิตามินและเอนไซม์. **ศรีนครินทร์เวชสาร.** 29(1): 59-70.

An, S.Y., Guo, Y.M., Ma, S.D., Yuan, J.M., and Liu, G.Z. (2010). Effects of different oil source and vitamin E in breeder diet on geese quality, hatchability and development of the neonatal offspring. **Asian-Aust. J. Anim. Sci.** 23(2): 234-239.

Andi, A.M., Shivazad, M., Pourbaakhsh, S.A., Afshar, M., Rokni, H., Shiri, N.E., Mohammadi, A., and Salahi, Z. (2006). Effect of vitamin E in broiler breeder diet on hatchability, egg quality and day old chick immunity. **Pak. J. Biol. Sci.** 9(5):789-794.

Arai, T., Sugawara, M., Sako, T., Motoyoshi, S., Shimura, T., Tsutsui, N., and Konno, T. (1994). Glutathione peroxidase activity in tissues of chickens supplemented with dietary selenium. **Comp. Biochem. Physiol. Part A Physiology.** 107A(1): 245-248.

Basmacioglu, H., Cabuk, M., Unal, K., Ozkan, K., Akkan, S., and Yalcın, H. (2003). Effects of dietary fish oil and flax seed on cholesterol and fatty acid composition of egg yolk and blood parameters of laying hens. **South Afri. J. Anim. Sci.** 33(4): 266-273.

Baucells, M. D., Crespo, N., Barroeta, A. C., Lopez-Ferrer, S., and Grashorn, M. A. (2000). Incorporation of different polyunsaturated fatty acids into eggs. **Poult. Sci.** 79: 51-59.

Biwas A., Mohan, J., and Sastry, K.V.H. (2010). Effect of vitamin E on production performance and egg quality traits in Indian Native Kadaknath Hen. **Asian-Aust. J. Anim. Sci.** 23(3): 396-400.

Bollengier-Lee, S. (1999). Optimal dietary concentration of vitamin E for alleviating the effect of heat stress on egg production in laying hens. **Br. Poult. Sci.** 40: 102-107.

Bollengier-Lee, S., Mitchell, M.A., Utomo, D.B., Williams, P.E., and Whitehead, C.C. (1998). Influence of high dietary vitamin E supplementation on egg production and plasma characteristics in hens subjected to heat stress. **Br. Poult. Sci.** 39: 106-112.

Bollengier-Lee, S., Williams, P.E.V., and Whitehead, C.C. (1999). Determination of optimal concentration of dietary vitamin E to alleviate the effect of heat stress on egg production in laying hens. **Br. Poult. Sci.** 40: 102-107.

Bolukbasi, S.C., Erhan, M.K., Keles, M.S., and Kocyigit, R. (2007). Effect of dietary vitamin E on the performance, plasma and egg yolk vitamin E levels and lipid oxidation of egg in heat stressed layers. **J. Appl. Environ. Biol. Sci.** 3: 19-23.

Bonnet, S., Geraert, P.A., Lessire, M., Carre, B., and Guillaumin, S. (1997). Effect of high ambient temperature on feed digestibility in broilers. **Poult. Sci.** 76: 857-863.

Bozkurt, M., Cabuk, M., and Alcicek, A. (2008). Effect of dietary fat type on broiler breeder performance and hatching egg characteristic. **J. Appl. Poult. Res.** 17(1): 47-53

Breque, C., and Brillard, J.P. (2002). Sperm storage in the avian oviduct: baselines for a complex antioxidant system in the sperm storage tubules. **Archiv. Geflugelkunde.** 66: 83.

Breque, C., Surai, P., and Brillard, J.P. (2003). Role of antioxidant on prolonged storage of avian spermatozoa in vivo and in vitro. **Mol. Reprod. Dev.** 66: 314-323.

Breque, C., Surai, P., and Brillard, J.P. (2006). Antioxidant status of the lower oviduct in the chicken varies with age and dietary vitamin E supplementation. **Mol. Reprod. Dev.** 73: 1045-1051.

Burdge, G.C., and Calder, P.C. (2005). Conversation of α-linolenic acid to longer-chain polyunsaturated fatty acids in human adults. **Reprod. Nutr. Dev.** 45: 581-597.

Burtan, G.W. (1994). Vitamin E: molecular and biology function. **Proc. Nutrit. Soc.** 53: 251-262.

Burton, G. W., and Traber, M.G. (1990). Vitamin E: antioxidant activity, biokinetics and bioavailabity. **Annu. Rev. Nutr.** 10: 357-82.

Cai, S.J., Wu, C.X., Gong, L.M., Song, T., Wu, H., and Zhang, L.Y. (2012). Effects of nano-selenium on performance, meat quality, immune function, oxidation resistance, and tissue selenium content in broilers. **Poult. Sci.** 91(10): 2532-2539.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Cantor, A.H. (1997). The role of selenium in poultry nutrition: biotechonlogy in feed industry. **Nottingham University Press, Nottingham,** UK, 155-164.

Cherian, G.. and Sim, J.S. (1997). Egg yolk polyunsaturated fatty acids and vitamin E content alters the tocopherol status of hatched chicks. **Poult. Sci.** 76: 1753-1759.

Cherian, G., Wolfe, F.W., and Sim, J.S. (1996). Dietary oils with added tocopherol: effects on egg or tissue tocopherols, fatty acids, and oxidative stability. **Poult. Sci.** 75: 423-431.

Cichoski, A. J., Rotta, R. B., Scheuermann, G., Cunha Junior, A., and Barin, J.S. (2012). Investigation of glutathione peroxidase activity in chicken meat under different experimental conditions. **Cienc. Tecnol. Aliment.** 32(4): 661-667.

Ciftci, M., Ertas, O.N., and Guler, T. (2005). Effects of vitamin E and vitamin C dietary supplementation on egg production and egg quality of laying hens exposed to a chronic heat stress. **Revue. de Medecine Veterinaire.** 156(2): 107-111.

Deng, W., Dong, X.F., Tong, J.M., and Zhang, Q. (2012). The probiotic Bacillus *licheniformis* ameliorates heat stress-induced impairment of egg production, gut morphology, and intestinal mucosal immunity in laying hens. **Poult. Sci.** 91: 575-582.

Ebeid, T., Eid, Y., Saleh, A., and El-Hamid, H.A. (2008). Ovarian follicular development, lipid peroxidation, antioxidative status and immune response in laying hens fed fish oil-supplemented diets to produce n-3-enriched eggs. **Animal.** 2(1): 84-91.

El-Demerdash, F.M. (2004). Antioxidant effect of vitamin E and selenium on lipid peroxidation, enzyme activities and biochemical parameters in rat exposed to aluminium. **J. Trace. Elem. Med. Biol.** 18: 113-121.

Erf, G. F., Bottje, W. G., Bersi, T. K., Headrick, M. D., and Fritts, C. A. (1998). Effects of dietary vitamin E on the immune system in broilers: altered proportions of CD4 T cells in the thymus and spleen. **Poult. Sci.** 77: 529-537.

Erin, E. B., and Brumaghim. J. L. (2009). Antioxidant activity of sulfur and selenium: a review of reactive oxygen species scavenging, glutathione peroxidase, and metal-binding antioxidant mechanisms. **Cell Biochem. Biophys.** 55: 1-23.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2011). **Human vitamin and mineral requirements.** Chapter 9: 121-129.

Florou, P.P., Nikolakakis, I., Giannenas, I., Koidis, A., Botsoglou, E., Dotas, V., and Mitsopoulos, I. (2005). Hen performance and egg quality as affected by dietary oregano essential oil and tocopheryl acetate supplementation. **Int. J. Poult. Sci.** 4(7): 499-454.

Franchini, A., Sirri, F., Tallarico, N., Minelli, G., Iaffaldano, N., and Meluzzi, A. (2002). Oxidative stability and sensory and functional properties of eggs from laying hens fed supranutritional doses of vitamins E and C. **Poult. Sci.** 81: 1744-1750.

Fritsche, K.L., Cassity, N.A., and Huang, S.C. (1991). Effect of dietary fat source on antibody production and lymphocyte proliferation in chickens. **Poult. Sci.** 70: 611-617.

Geraert, P.A., Padilha, J.C.F., and Guillaumin, S. (1996). Metabolic and endocrine changes induced by chronic heat exposure in broiler chickens: growth performance, body composition and energy retention. **Br. Poult. Sci.** 75: 195-204.

Gherraf, N., Ladjei, S., Labed, B., and Hameurlaine, S. (2011). Evaluation of antioxidant potential of various extracts of Traganum Nudatum Del. **Plant Sci.** 1(9): 155-159.

Gonzalez-Esquerra, R., and Leeson, S. (2000). Effect of feeding hens regular or deodorized menhaden oil on production parameters, yolk fatty acid profile, and sensory quality of eggs. **Poult. Sci.** 79: 1597-1602.

Grobas, S., Mendez, J., Lopez, B. C., De, B. C., and Mateos, G. G. (2001). Effect of vitamin E and A supplementation on egg yolk alpha-tocopherol concentration. **Poult. Sci.** 81: 376-381.

Grune, T., Kramer, K., Hope, P. P., and Siems, W. (2001). Enriched of eggs with n-3 polyunsaturated fatty acids: effect of vitamin E supplementation. **Lipids.** 36: 833-838.

Habibian, M., Sadeghi, G., Ghazi, S., and Moeini, M. M. (2015). Selenium as a feed supplement for heat-stressed poultry: a review. **Biol. Trace Elem. Res.** 165: 183-193.

Hall, J.A., Jha, S., Skinner, M. M., and Cherian, G. (2007). Maternal dietary n-3 fatty acid alter immune cell fatty acid composition and leukotriene production in growing chicks. **Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.** 76: 19-28.

Hamal, K.R., Burgess, S.C., Pevzner, I.Y., and Erf, G.F. (2006). Maternal antibody transfer from dams to their egg yolks, egg whites and chicks in meat lines of chickens. **Poult. Sci.** 85: 1364-1372.

Hasret, Y., and Yurkay, G. (2008). The effect of vitamin E on the antioxidant system, egg production and egg quality in heat stressed laying hens. **Turk. J. Vet. Anim. Sci.** 32(5): 319-325.

Hossain, S.M., Barretoa, S.L., Bertechinib, A.G., Riosa, A.M., and Silvaa, C.G. (1998). Influence of dietary vitamin E level on egg production of broiler breeders, and on the growth and immune response of progeny in comparison with the progeny from eggs injected with vitamin E. **Anim. Feed Sci. Technol.** 73: 307- 317.

Hosseini- Mansoub, N., and Bahrami, Y. (2011). Influence of dietary fish oil supplementation on humoral immune response and some selected biochemical parameters of broiler chickens. **J. Agrobiol.** 28(1): 67-77.

Invernizzi, G., Agazzi, A., Ferroni, M., Rebucci, R., Fanelli, A., Baldi, A., Orto, V. D., and Savoini, G. (2013). Effect of inclusion of selenium-enriched yeast in the diet of laying hens on performance, eggshell quality, and selenium tissue deposition. **Ital. J. Anim. Sci.** 12(1).

Islam, M. S., Howlider, M. A. R., Kabir, F.,, and Alam, J. (2002). Comparative assessment of fertility and hatchability of Barred Plymouth Rock, White Leghorn, Rhode Island Red and White Rock Hen. **Int. J. Poult. Sci.** 1(4): 85-90.

Kadim, I.T., Al-Qamshui, B. H. A., Mahgoub, O., Al-Maarzooqi, W., and Johnson, E.H. (2008). Effect of seasonal temperatures and ascorbic acid supplementation on performance of broiler chickens maintained in closed and open-sided houses. **Int. J. Poult. Sci.** 7(7): 655-660.

Kanchana, G., and Jeyanthi, G.P. (2010). Influence of vitamin E and selenium supplementation on the growth performance and antibody responses of layer chicks. **Int. J. pharma Bio. Sci.**

Keshavamurthy, S.R., Kumar, S., Manohar, C.B., and Sharadamma, K.C. (2013). Effect of antioxidant formulation supplementation through water on antioxidant status of broiler chicken. **Int. J. of Adv. Biotec. and Res.** 3(3): 470-474.

Khatibjoo, A., Kermanshahi, H., Golian, A., and Zaghari, M. (2011). The effect of dietary n6:n3 ration and sex on broiler breeder immunity. **Poult. Sci.** 90: 2209-2216.

Kidd, M.T. (2004). Nutritional modulation of immune function in broilers. **Poult. Sci.** 83: 650-657.

Lasota, B., Blaszczyk, B., Seremak, B., and Udala, J. (2004). Selenium status and GSH-Px activity in semen and blood of boars at different ages used for artificial insemination. **Reprod. Domest. Anim.** 39: 309-314.

Lawlor, J. B., Gaudette, N., Dickson, T., and House, J. D. (2010). Fatty acid profile and sensory characteristics of table eggs from laying hens fed diets containing microencapsulated fish oil. **Anim. Feed Sci. Technol.** 156: 97-103.

Leeson, S., Namkung, H., Caston, L., Durosoy, S., and Schlegel, P. (2008). Comparison of selenium levels and sources and dietary fat quality in diets for broiler breeder and layer hens. **Poult. Sci.** 87: 2605-2612.

Leeson, S., and Summer, J. D. (2001). **Commercial Poultry Nutrition.** Nottingham, UK: Nottingham University Press.

Levent, G., and Portier, K.M. (2005). Sensible and latent heat productions from broilers in laboratory conditions. **Turk. J. Vet. Anim. Sci.** 29(3): 635-643.

Lin, H., Mertens, K., Kemps, B., Govaerts, T., Ketelaere, B. D., Baerdemaeker, J. D., Decuypere E., and Buyse, J. (2004). New approach of testing the effect of heat stress on eggshell quality: mechanical and material properties of eggshell and membrane. **Br. Poult. Sci.** 45: 476-482.

Lin, Y.F., Tsai, H.L., Lee, Y.C., and Chang, S.J. (2005). Maternal vitamin E supplementation affect the antioxidant capability and oxidative status of hatching chicks. **J. Nutr.** 135: 2457-2461.

Lin, Y.F., and Chang, S.J. (2006). Effect of dietary vitamin E on growth performance and immune response of breeder chickens. **Asisn-Aust. J. Anim. Sci,** 19(6): 884-891.

Lucas, J.L., and Marcos, H.R. (2013). Impact of heat stress on poultry production. **Animal.** 3: 356-369.

Mahmoud, K.Z., Beck, M.M., Scheideler, S.E., Forman, M.F., Anderson, K.P., and Kachman, S.D. (1996). Acute high environmental temperature and calcium-estrogen relationship in the hen. **Poult. Sci.** 75: 1555–1562.

Mahmood, H., and Ghazi, S. (2014). Effects of dietary selenium and vitamin E on immune response and biological blood parameters of broilers reared under thermoneutral or heat stress conditions. **Int. J. Biometeorol.** 58: 741-752.

Maraschiello, C., Sarraga, C., and Garcia Regueiro, J.A. (1999). Glutathione peroxidase activity, TBARS and α-tocopherol in meat from chickens fed different diets. **J. Agric. Food Chem.** 47: 867-872.

Maroufyan, E., Kasim, A., Ebrahimi,A., Loh, T. C., Bejo, M. H., Zerihun, H., Hosseni, F., Goh, Y. M. and Farjam, A. S. (2012). Omega-3 polyunsaturated fatty acids enrichment alters performance and immune response in infectious bursal disease challenged broilers. **Lipids Health Dis.** 11:15.

Martinez, S., Valek, L., Resetic, J., and Ferenec Ruzic, D. (2006). Cyclic voltammetry study of plasma antioxidant capacity comparison with the DPPH and TAS spectrophotometric methods. **J. Electroanal. Chem.** 588: 68-73.

Mashaly, M.M., Hendricks, G.L., Kalama, M.A., Gehad, A.E., Abbas, A.O., and Patterson, P.H. (2004). Effect of heat stress on production parameters and immune responses of commercial laying hens. **Poult. Sci.** 83: 889-894.

Mezes, M., Surai, P., Salyi, G., Speake, B.K., Gaal T., and Maldjian, A. (1997). Nutritional metabolic diseases of poultry and disorders of the biological antioxidant defense system. **Acta Vet. Hung.** 45(3): 349-360.

Milad, K., Racz, O., Sipulova, A., Bajova V., and Kovac, G. (2001). Effect of vitamin E and selenium on blood glutathione peroxidase activity and some immunological parameters in sheep. **Vet. Med-Czech**. 46(1): 1-5.

Milinkovic-Tur, S., Aladrovic, J., Ljubie, B. B., and Poljicak-Milas, N. (2009). Age-related antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in heart muscles of broiler chickens fed with supplementary organic selenium. **Veterinar ski. Arhiv.** 75(5): 481-489.

Mohapatra, P., Swain, R.K., Mishra, S.K., Behera, T., Swain, P., Mishra, S.S., Behura, N.C., Sabat, S.C., Sethy, K., Dhama, K., and Jayasankar, P. (2014). Effects of dietary nano selenium on tissue selenium deposition, antioxidant status and immune functions in layer chicks. **Int. J. Pharmacol.** 10: 160-167.

Mohiti-Asli, M., Shariatmadari, F., Lotfollahian, H., and Mazuji, M.T. (2008). Effect of supplementing layer hen diets with selenium and vitamin E on egg quality, lipid oxidation and fatty acid composition during storage. **Can. J. Anim. Sci.** 88(3): 475-483**.**

Nair, V., O-Neil, C.L., and Wang, P.G. (2008). Malondialdehyde encyclopedia for organic synthesis, **Jhon wiley and Sons**, New York.

National Research Council, (1994). **Nutrient Requirements of Poultry.** National Academy Press, Washington, DC.

Nordberq, J., and Arner, E. S. (2001). Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radic. Biol. Med.** 30: 1287-1312.

Nyquist, N.F., Rodbotten, R., Thomassen, M., and Haug, A. (2013). Chicken meat nutritional value when feeding red palm oil, palm oil or rendered animal fat in combinations with linseed oil, rapeseed oil and two levels of selenium. **Lipids Health Dis.** 12: 69.

Oguntunji, O.M., and Alabi, O.M. (2010). Influence of high environmental temperature on egg production and shell quality, a review. **Worlds Poult. Sci. J.** 66: 739-774.

Ort, J.F., and Latshaw, J.D. (1978). The toxic level of sodium selenite in the diet of laying chickens. **J. Nutr.** 108(7): 1114-1120.

Osama, A. M. R., Wahed, H. M. A., and Ragab, M. S. (2010). Effects of supplementing laying hens diets with organic selenium on egg production, egg quality, fertility and hatchability. **Egyp. Poult. Sci.** 30(3): 893-915.

Pappas, A.C., Acamovic, T., Sparks, N. H. C., Surai, P.F., and McDevitt, R.M. (2006). Effect of supplementing broiler breeder diets with organoselenium compounds and polyunsaturated fatty acid on hatchability. **Poult. Sci.** 85: 1584-1593.

Pappas, A.C., Karadas, F., Surai, P.F., and Speake, B.K. (2005). The selenium intake of the female chicken influences the selenium status of her progeny. **Comp. Biochem. Physiol.** 142: 465-474.

Premanand, R., Kumar, P. H. S., and Mohan, A. (2007). Study of thiobarbituric reactive substances and total reduced glutathione as indices of oxidative stress in chronic smokers with and without chronic obstructive pulmonary disease. **Indian J. Chest Dis. Allied Sci.** 49: 9-12.

Puthpongsiriporn, U., Scheideler, S.E., Sell, J.L., and Beck, M.M. (2001). Effect of vitamin E and C supplementation on performance, in vitro lymphocyte proliferation, and antioxidant status of laying hens during heat stress. **Poult. Sci.** 80: 1190-1200.

Quinteiro-Filho, W.M., Ribeiro, A., Ferraz-de-Paula, V., Pinheiro, M.L., Sakai, M., Sa, L.R.M., Ferreira, A.J.P., and Palermo-Neto, J. (2010). Heat stress impairs performance parameters,

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

induces intestinal injury, and decreases macrophage activity in broiler chickens. **Poult. Sci.** 89: 1905-1914.

Radwan, N.L., Hassan, R.A., Qota, E.M., and Fayek, H.M. (2008). Effect of natural antioxidant on oxidative stability of eggs and productive and reproductive performance of laying hens. **Int. J. Poult. Sci.** 7(2): 134-150.

Raederstorff, D., Wyss, A., Calder, P. C., Weber, P., and Eggersdorfer, M. (2015). Vitamin E function and requirements in relation to PUFA. **Br. Poult. Sci.** 144: 1113-1122.

Rozenboin, I., Tako, E., Gal Garbert, O., Proudman, J.A., and Uni, Z. (2007). The effect of heat stress on ovarian function of laying hens. **Poult. Sci.** 86: 1760-1765.

Sahin, K., Sahin, N., and Yaralioglu, S. (2002). Effect of vitamin E and vitamin C on lipid peroxidation, blood serum metabolites and mineral concentrations of laying hens reared at high ambient temperature. **Biol. Trace Elem. Res**. 85: 35-45.

Scheideler, S.E., Weber, P., and Monsalve, D. (2010). Supplemental vitamin E and selenium effects on egg production, egg quality and egg deposition of α-tocopherol and selenium. **J. Appl. Poult. Res**. 19: 354-360.

Seven, P.T., and Seven, L. (2008). Effect of dietary Turkish propolis as alternative to antibiotic on performance and digestibility in broiler exposed to heat stress. **J. Appl Animal Res**. 34: 193-196.

Skrivan, M., Dlouha, G., Masata, O., and Sevcikova, S. (2008). Effect of dietary selenium on lipid oxidation, selenium and vitamin E content in the meat of broiler chicken. **Czech J. Anim. Sci.** 53(7): 306-311.

St-Pierre, N.R., Cobonov, B., and Schnitkey, G. (2003). Economic losses from heat stress by US livestock industries. **J. Dairy Sci.** 86(E. Suppl.): 52-77.

Stanley, T., and Tappel, A.S. (1974). Effect of dietary selenium on glutathione peroxidase in chicks. **J. Nutr.** 104: 747-753.

Surai, P.F., Nonle, R.C., and Speake, B.K. (1996). Tissue-specific differences in antioxidant distribution and susceptibility to lipid peroxidation during development of the chick embryo. **Biochim. Biophys. Acta.** 1304: 1-10.

Surai, P. F. (1999). Vitamin E in avian reproduction. **Avian Poul. Biol. Rev.** 10(1): 1-60.

Surai, P.F. (2000). Effect of selenium and vitamin E content of the maternal diet on the antioxidant system of the yolk and the developing chick. **Br. Poult. Sci.** 41: 235-243.

Surai, P.F. (2002). **Natural antioxidants in avian nutrition and reproduction.** Nottingham University Press.

Surai, P.F. (2006). **Selenium in nutrition and health.** Nottingham University Press, Nottingham.

Surai, P.F., and Dvorska, J.E. (2002). Effect of selenium and vitamin E content of the diet on lipid peroxidation in breast muscle tissue of broiler breeder hens during storage. **Proceedings of Australian Poultry Science Symposium, Sydney:** 187-192.

Teeter, R.G., and Belay, T. (1996). Broiler management during acute heat stress. **Anim. Feed Sci. Technol.** 58: 127- 142.

Toshiro, A., Sugawara, M., Sako, T., Motoyoshi, S., Shimura, T., Tsutsui, N., and Konmo, T. (1994). Glutathione peroxidase activity in tissue of chicken supplemented with dietary selenium. **Comp. Biochem. Phystol.** 107A(1): 245-248.

Tsai, H.L., Sam Chang, K.C., Lin, Y.F., and Chang, S.J. (2008). Beneficial effects of maternal vitamin E supplementation on the antioxidant system of the neonate chick brain. **Asian-Aust. J. Anim. Sci.** 21(2): 225-231

Turner, R.J., Weiner, J.H., and Taylor, D.E. (1998). Selenium metabolism in *Escherichia coli*. **Biometals.** 11:223-227.

Urso, U.R.A., Dahlke, F., Maiorka, A., Bueno, I.J.M., Schneider, A.F., Surek, D., and Rocha, C. (2015). Vitamin E and selenium in broiler breeder diets: Effect on live performance, hatching process, and chick quality. **Poult. Sci.** 94: 976-983.

Utterback, P.L., Parsons, C.M., Yoon, I., and Butler, J. (2005). Effect of supplementing selenium yeast in diet of laying hen on egg selenium content. **Poult. Sci.** 84: 1900-1901.

Valacchi, G., Pagnin, E., Corbacho, A. M., Olano, E., Davis, P. A., Packer, L., and Cross, C. E. (2004). In vivo ozone exposure induces antioxidant/stress-related responses in murine lung and skin. **Free Radic Biol Med.** 36(5): 673-681.

Valcic, O., Jovanovic, I.B., and Milanovic, S. (2011). Selenium, thiobarbituric acid reactive substances and thyroid hormone activation in broilers supplemented with selenium as selenized yeast or sodium selenite. **Jpn. J. Vet. Res.** 59: 69-77.

Wang, X., and Peter, J.Q. (1990). Vitamin E and its function in membranes. **Prog. Lipid Res.** 38: 309-336.

Wang, Y.B., and Xu, B.H. (2008). Effect of different selenium source (sodium selenite and selenium yeast) on broiler chickens. **Anim. Feed Sci. Technol.** 144: 306-314.

Wang, Y.W., Field, C.J., and Sim, J.S. (2000). Dietary polyunsaturated rated fatty acids alter lymphocyte subset proportion and proliferation, serum immunoglobulin G concentration and immune tissue development in chicks. **Poult. Sci.** 79: 1741-1748.

Wang, Z.G., Pan, X.J., Zhang, W.Q., Peng, Z.Q., Zhao, R.Q., and Zhou, G.H. (2010). Methionine and selenium yeast supplementation of the maternal diets affects antioxidant activity of breeding eggs. **Poult. Sci.** 89: 931-937.

Wright, P.L., and Bell, M.C. (1996). Comparative metabolism of selenium and tellurium in sheep and swine. **Am J Physiol.** 211: 6-10.

Yuan, D., Zhan, X. A., and Wang, Y. X. (2010). Effect of selenium sources and levels on reproductive performance and selenium retention in broiler breeder, egg, developing embryo, and 1-day-old chick. **Biol. Trace Elem. Res.** 144: 705-714.

Zaghari, M., Sedaghat, V., and Shivazad, M. (2013). Effect of vitamin E on reproductive performance of heavy broiler breeder hens. **J. Appl Animal Res**. 22(4): 808-813.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาคผนวก

วิธีการดำเนินงานในห้องปฏิบัติการ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

วิธีการดำเนินงานในห้องปฏิบัติการ

1. การวัดค่า Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)

เป็นการทดสอบฤทธิ์การต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยดูจากปริมาณสารประกอบอัลดีไฮด์ในรูปของ MDA ที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน โดยการนำตัวอย่างมาทำปฏิกิริยากับสาร TBA (thiobarbituric acid) จะได้สารสีชมพูใส

1.1 การวัดค่า TBARS ในพลาสมา (Premanand et al., 2007)

ทำการเก็บตัวอย่างเลือดในหลอดเก็บเลือดที่มีสารป้องกันการแข็งตัวชนิดเฮพาริน (heparin) แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,500 rpm เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นดูดส่วนใสที่เป็นส่วนพลาสมา (plasma) เพื่อนำมาวิเคราะห์

วัสดุและอุปกรณ์

1. Eppendorf tube
2. Vortex
3. Spectrophotometer
4. Water bath
5. Centrifuge
6. 96 well plate
7. Micropipette

สารเคมี

1. Trichloroacetic acid (TCA)
2. Thiobarbuturic acid (TBA)
3. Acetic acid
4. Deionized water (DI water) type I
5. Normal saline
6. N-butanol
7. Malondialdehyde bis (dimethyl acetate) (MDA)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

วิธีการทดสอบ

1. นำตัวอย่างพลาสมา 200 ไมโครลิตร ใส่ eppendorf tube เติมสาร normal saline 200 ไมโครลิตร, 20% TCA 400 ไมโครลิตร และ TBA reagent 100 ไมโครลิตร (ประกอบด้วย TBA 200 มิลลิกรัม, น้ำ DI 30 มิลลิลิตร และ acetic acid 30 มิลลิลิตร) ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง vortex

2. นำหลอดทดลองแช่ไว้ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิ 90°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

3. นำหลอดทดลองไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที

4. ดูดสารละลายส่วนใส 300 ไมโครลิตรใส่ใน eppendorf tube และเติม N-butanol ในอัตราส่วน 1:1 แล้วเขย่าด้วยเครื่อง vortex

5. ปั่นเหวี่ยงหลอดทดลองด้วยความเร็ว 10,000 g เป็นเวลา 5 นาที

6. ดูดส่วนใสใส่ใน 96 well plate นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร

การเตรียมสารสะลายมาตรฐาน MDA

สารละลาย MDA มาตรฐานความเข้มข้น 100 นาโนโมล/มิลลิลิตร โดยเตรียมจาก Malondialdehyde bis (dimethyl acetate) หรือ MDA ปริมาณ 17 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำ DI เก็บในที่มืด หรือห่อด้วยฟรอด์ยเพื่อไม่ให้โดนแสง จากนั้นนำมาปรับระดับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานตามตารางที่ 1 เพื่อให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-40 นาโนโมล แล้วนำไปอ่านค่าด้วยเครื่อง สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร และนำมาสร้างกราฟมาตรฐานเพื่อใช้คำนวณหาค่า TBARS ในตัวอย่างโดยคำนวณจากสมการที่ได้จากกราฟมาตรฐาน ดังแสดงในภาพที่ 1

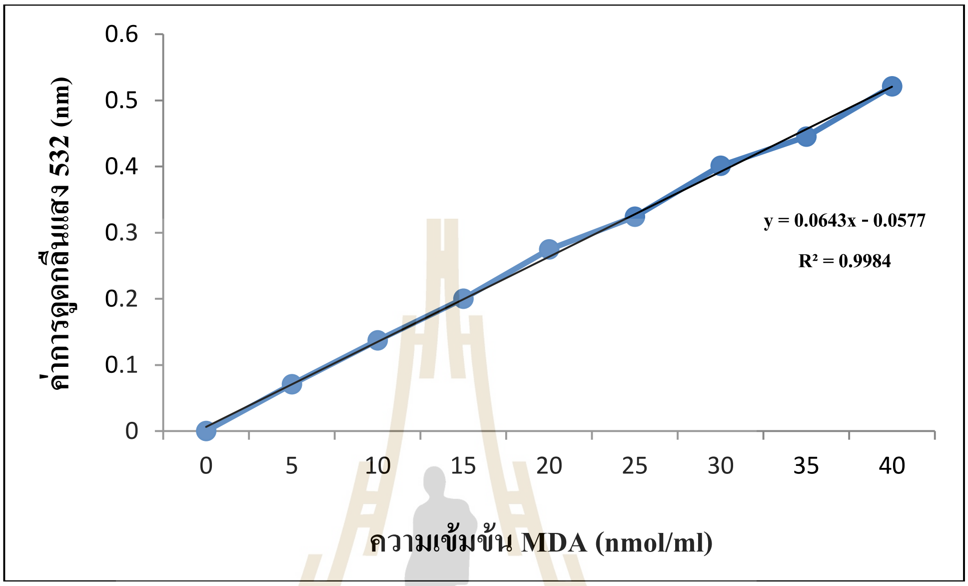
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ ก1 วิธีการเตรียมสาร MDA Standard

Concentration (nmol)	MDA Standard (µl)	DI water (µl)
0	0	1000
5	50	950
10	100	900
15	150	850
20	200	800
25	250	750
30	300	700
35	350	650
40	400	600

วิธีการคำนวณ

ทำการอ่านค่าความเข้มข้นจากกราฟมาตรฐานของ Malondialdehyde bis (dimethyl acetate)



ภาพที่ ก1 กราฟมาตรฐาน MDA

1.2 การวัดค่า TBARS ในไข่แดง

เก็บตัวอย่างไข่แดงในแต่ละกลุ่มการทดลองจากแม่ไก่อายุ 32 36 และ 40 สัปดาห์ เพื่อทดสอบฤทธิ์การต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยวัดจากปริมาณแอลดีไฮด์ในรูปมาลอนอัลดีไฮด์ (malonalaldehyde, MDA)

วัสดุและอุปกรณ์

1. Test Tube ขนาด 15 มิลลิลิตร
2. Vortex
3. Spectrophotometer
4. Water bath
5. Centrifuge
6. 96 well plate
7. Micropipette
8. Homogenizer: IKA ULTRA-TURRAX T25 digital

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารเคมี

1. Trichloroacetic acid (TCA)
2. Thiobarbuturic acid (TBA)
3. Butylhydroxytoluene (BHT)
4. Deionized water (DI water)
5. Malondialdehyde bis (dimethyl acetate) (MDA)

วิธีการทดสอบ

1. นำตัวอย่างไข่แดง 2 กรัม ใส่หลอดทดลอง เติมสาร BHT 7.2% ปริมาตร 34 ไมโครลิตร และน้ำ DI 6 มิลลิลิตร นำไปปั่นผสมโดยใช้เครื่องโฮโมจีไนส์เซอร์ (homogenizer) ให้เข้ากัน

2. นำตัวอย่างที่โฮโมจิไนส์แล้วปริมาณ 2 มิลลิตร ทำปฏิกิริยากับสารสะลาย TBA-TCA (TBA 20 มิลลิโมลาร์ ละลายใน TCA 15%) จำนวน 4 มิลลิลิตร ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่ 90°C เป็นเวลา 20 นาที และทิ้งไว้ให้เย็นในอ่างน้ำแข็ง

3. นำตัวอย่างที่ได้กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 ดูดตัวอย่างใส่ 96 well plate เพื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ โดยวัดที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร

การเตรียมสารสะลาย MDA standard

การเตรียมสารละลายมาตรฐานและวิธีการคำนวณเหมือนในการวัด TBARS ในพลาสมา

2. การวัดค่า DDPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)

2.1 การวัดค่า DPPH ในพลาสมา

เตรียมตัวอย่างเลือดเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ DPPH โดยใช้ตัวอย่างเดียวกับหัวข้อ 1.1

วัสดุและอุปกรณ์

1. Eppendorf tube
2. Vortex
3. Spectrophotometer
4. 96 well plate
5. Micropipette

สารเคมี

1. Methanol
2. DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)

วิธีการทดสอบค่า DPPH (Martinez et al., 2006)

1. นำตัวอย่างพลาสมา 200 ไมโครลิตร ใส่ eppendorf tube แล้วเติมเมทานอล 300 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสาร (vortex mixer)

2. นำตัวอย่างมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 30 นาที

3. ดูดส่วนใส (supernatant) จำนวน 100 ไมโครลิตร แล้วเติม DPPH ความเข้มข้น 0.115 นาโนโมล/ลิตร (ละลายในเมทานอล) จำนวน 400 ไมโครลิตร เตรียม Control โดยใช้เมทานอล 100 ไมโครลิตร และ DPPH 400 ไมโครลิตร ส่วน Blank เตรียมโดยใช้ตัวอย่าง 100 ไมโครลิตร และ เมทานอล 400 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน

5. นำตัวอย่าง Blank และ Control เก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง (หรือเก็บไว้จนปฏิกิริยาเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ โดยสังเกตจากการเปลี่ยนสี จากสีม่วงเป็นสีเหลือง)

6. ปิเปตตัวอย่าง Blank และ Control จำนวน 200 ไมโครลิตร ใส่ 96 well plate เพื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร (ต้องทำอย่างรวดเร็วที่สุด)

วิธีการคำนวณ

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ โดยดูจากความสามารถในการเปลี่ยนสาร DPPH ที่มีสีม่วงและเปลี่ยนเป็นสีเหลือง ซึ่งคำนวณได้จากสมการ (Gherraf et al., 2011)

$$\text{Inhibition } \% = \frac{(A_{control} - A_{sample}) \times 100}{A_{control}}$$

$A_{control}$ = ค่าการดูดกลืนแสงของ control

A_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

2.2 การวัดค่า DPPH ในไข่แดง

เตรียมตัวอย่างไข่แดงเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ DPPH ตามหัวข้อ 1.2

วัสดุและอุปกรณ์

1. Eppendorf tube
2. Vortex
3. Spectrophotometer
4. 96 well plate
5. Micropipette
6. Homogenizer: IKA ULTRA-TURRAX T25 digital

สารเคมี

1. Methanol
2. DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)

วิธีการทดสอบค่า DPPH

1. นำตัวอย่างไข่แดง 2.5 กรัม ใส่หลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร ผสมกับเมทานอล 10 มิลลิลิตร โฮโมจิไนส์ให้เข้ากันแล้วนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที

2. กรองตัวอย่างด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 1 นำส่วนที่กรองได้ 400 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยากับ DPPH ความเข้มข้น 0.1 นาโนโมล จำนวน 400 ไมโครลิตร (อัตราส่วน 1 : 1) ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมงไม่ให้โดนแสง (ห่อหลอดทดลองด้วยกระดาษฟอล์ยและเก็บในที่มืด) ส่วน Control เตรียมโดยใช้เมทานอล 400 ไมโครลิตร ผสมกับ DPPH 400 ไมโครลิตร และ Blank เตรียมโดยใช้ตัวอย่าง 400 ไมโครลิตรผสมกับเมทานอล 400 ไมโครลิตร เก็บไว้ในที่มืด 1 ชั่วโมง

3. ปิเปตตัวอย่าง Control และ Blank จำนวน 200 ไมโครลิตร ใส่ 96 well plate เพื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 517 nm (แต่ละตัวอย่างทำ 2 ซ้ำ)

วิธีการคำนวณ

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระคำนวณได้จากสมการที่แสดงไว้ในหัวข้อ 2.1

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3. การวัดค่า glutathione peroxidase enzyme (GSH-Px)

3.1 การวัดค่าการทำงานของเอนไซม์ GSH-Px ในพลาสมา ใช้วิธีการของ enzymatic assay of glutathione peroxidase (EC 1.11.1.9) โดยใช้หลักการ

$$2GSH + H_2O_2 \xrightarrow{\text{Glutathione Peroxidase}} GSSG + 2H_2O$$

$$GSSG + \beta\text{-NDAPH} \xrightarrow{\text{Glutathione Reductase}} \beta\text{-NADP} + 2GSH$$

วัสดุและอุปกรณ์

1. Homogenizer: IKA ULTRA-TURRAX T25 digital
2. Test tube (15, 50 ml)
3. Centrifuge
4. กระดาษกรอง (Whatman No. 1)
5. 96 well plate
6. Spectrophotometer

สารเคมี

1. β-Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (β-NADPH)
2. Deionize Water (DI)
3. Dithiothreitol (DTT)
4. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)
5. Glutathione peroxidase standard
6. Glutathione reduced (GSH)
7. Glutathione reductase (GR)
8. Hydrogen peroxide (H_2O_2)
9. Sodium azide
10. Sodium hydroxide (NaOH)
11. Sodium phosphate
12. Tris-HCL

วิธีการเตรียมสาร

1. เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ (A) โดยเตรียม sodium phosphate buffer ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ร่วมกับ EDTA 0.40 มิลลิโมลาร์ ละลายในน้ำ DI 100 มิลลิลิตร ปรับ pH = 7.0 ที่อุณหภูมิ 25°C (ปรับ pH ด้วย NaOH 1 โมลาร์)

2. เตรียมสารละลาย sodium azide 1.0 มิลลิโมลาร์ โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ (A) ในข้อที่ 1 เป็นตัวทำละลาย

3. เตรียมสารละลาย glutathione reduced (GSH) ความเข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์ ในน้ำ DI

4. เตรียมเอนไซม์ glutathione reductase (GR) โดยใช้ glutathione reductase enzyme solution 100 unit/ml ละลายด้วยน้ำ DI (เตรียมทันทีก่อนใช้)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

5. เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ (B) sodium phosphate 10.0 มิลลิโมลาร์ ร่วมกับ Dithiothreitol 1.0 มิลลิโมลาร์ ในน้ำ DI ปรับ pH = 7.0 ที่อุณหภูมิ 25°C (ปรับ pH ด้วย NaOH 1 โมลาร์)

6. เตรียมสารละลาย hydrogen peroxide 0.042% (w/w) (เตรียมทันทีก่อนใช้)

7. เตรียมสารผสมเพื่อใช้เป็น reaction cocktail โดยใช้ β-NADPH 1 มิลลิกรัม ใส่หลอดทดลอง 15 มิลลิลิตร จากนั้นปิเปตสารละลายที่เตรียมไว้ในข้อที่ 2 3 และ 4 ผสมให้เข้ากัน ปรับ pH = 7.0 โดยใช้ 1 โมลาร์ HCl หรือ NaOH จากนั้นเก็บในที่มืดและเย็น

วิธีการทดสอบ

1. นำตัวอย่างพลาสมา 200 ไมโครลิตร ผสมกับ phosphate buffer ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ จำนวน 200 ไมโครลิตร จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C

2. ดูดส่วนใสข้อ 1 จำนวน 20 ไมโครลิตร ทำปฏิกิยากับ reaction cocktail ที่เตรียมไว้ในข้อที่ 7 จำนวน 20 ไมโครลิตร และสารละลายในข้อ 5 (สารละลายบัพเฟอร์ B) จำนวน 140 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

3. ดูดสารละลายที่ได้ 180 ไมโครลิตร ใส่ 96 well plate และใส่สารละลาย hydrogen peroxide ที่เตรียมไว้ในข้อ 6 ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วนำเข้าเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ เพื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 314 นาโนเมตร ทันที และทำการวัดซ้ำทุก 1 นาที เป็นเวลา 10 นาที

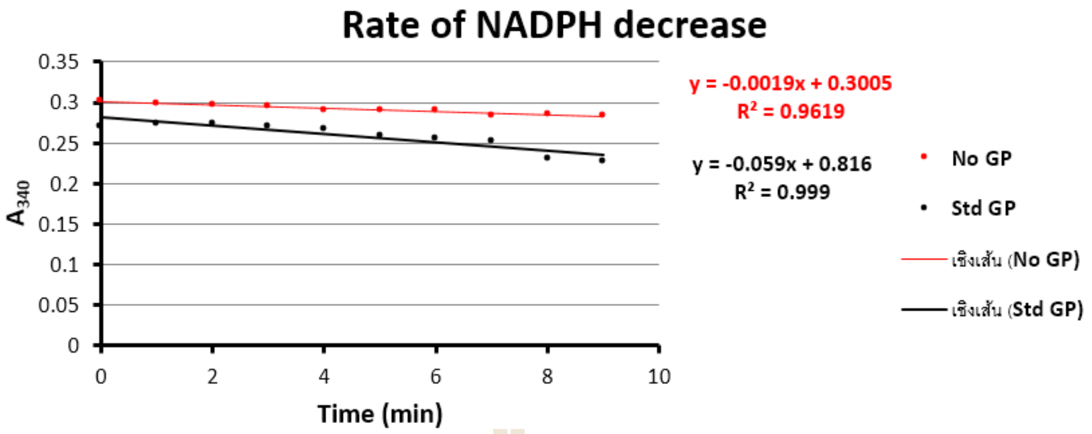
4. นำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานของเอนไซม์ GSH-Px เพื่อคำนวณค่าความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ GSH-Px โดยแสดงผลเป็น unit/ml

การเตรียมสารละลาย GSH-Px standard

1. เตรียมเอนไซม์ glutathione peroxidase (GSH-Px) โดยใช้ glutathione peroxidase enzyme solution 100 unit/ml เจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ (B) ในข้อที่ 5 (สารละลายบัพเฟอร์ B) ให้ได้เท่ากับ 3 unit/ml (เตรียมทันทีก่อนใช้)

2. ปิเปตสารละลายจากการเตรียมสารข้อที่ 5 ปริมาตร 140 ไมโครลิตร และข้อที่ 7 (reaction cocktail) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เพื่อทำปฏิกิริยากับ glutathione peroxidase enzyme solution 3 unit/ml ปริมาตร 20 ไมโครลิตร จากนั้นนำเข้าเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ เพื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 314 นาโนเมตร ทันที และทำการวัดซ้ำทุก 1 นาที เป็นเวลา 10 นาที

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



ภาพที่ ก2 กราฟมาตรฐาน GSH-Px

3.2 การวัดค่าการทำงานของเอนไซม์ GSH-Px ในไข่แดง

ใช้วิธีการเดียวกันกับการวัด GSH-Px ในพลาสมา

วิธีการทดสอบ

1. นำตัวอย่างไข่แดงจำนวน 2 กรัม ทำปฏิกิริยากับสาร Tris-HCL 0.05 โมลาร์จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C

2. นำตัวอย่างที่ได้มากรองเฉพาะส่วนใสด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 1

3. นำส่วนใสที่ได้ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยากับสารละลายในข้อ 5 (สารละลายบัพเฟอร์ B) ปริมาตร 280 ไมโครลิตร และ 7 (reaction cocktail) ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

4. จากนั้นปิเปตตัวอย่างที่ได้ 180 ไมโครลิตร ใส่ 96 well plate และเติม hydrogen peroxide ที่เตรียมไว้ในข้อ 6 ปริมาตร 20 ไมโครลิตร แล้วนำเข้าเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ เพื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 314 นาโนเมตร ทันที และทำการวัดซ้ำทุก 1 นาที เป็นเวลา 10 นาที

5. นำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานของเอนไซม์ GSH-Px เพื่อคำนวณค่าความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ GSH-Px โดยแสดงผลเป็น unit/mg protein

การเตรียมสารสะลาย GSH-Px standard

การเตรียม GSH-Px standard สำหรับวิเคราะห์ในไข่แดงทำหมือนกันกับในพลาสมา

ประวัติผู้เขียน

นางสาวทับทิม สำแดงไชย เกิดวันที่ 26 พฤศจิกายน พ.ศ. 2531 ที่จังหวัดอุดรธานี สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาจากโรงเรียนสตรีราชินูทิศ อำเภอเมือง จังหวัดอุดรธานี และเข้าศึกษาปริญญาตรีใน สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร สำเร็จการศึกษาเมื่อ พ.ศ. 2553 นั้นเข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโท สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร ในปีการศึกษา 2555

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี