

ผลของการฉีด L-arginine และ selenium nanoparticles ผ่านเปลือกไข่ ต่อการ
พัฒนาของกล้ามเนื้อ การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างกล้ามเนื้อ
และคุณภาพเนื้อของไก่โคราช



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
ปีการศึกษา 2562

**EFFECT OF IN OVO INJECTION OF L-ARGININE AND
SELENIUM NANOPARTICLES ON MYOGENESIS,
MYOGENIC GENE EXPRESSION AND MEAT
QUALITY OF KORAT CHICKEN**

Thanidtha Morawong



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the

Degree Master of Science in Animal Production Technology

Suranaree University of Technology

Academic Year 2019

ผลของการฉีด L-arginine และ selenium nanoparticles ผ่านเปลือกไข่ ต่อการพัฒนา
ของกล้ามเนื้อ การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างกล้ามเนื้อ
และคุณภาพเนื้อของไก่โคราช

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อนุมัติให้นักวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์



(รศ. ดร.ปราโมทย์ แพ่งคำ)

ประธานกรรมการ



(ผศ. ดร.วิฑรวัช โมพี)

กรรมการ (อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์)



(รศ. ดร.อมรรัตน์ โมพี)

กรรมการ



(ผศ. ดร.อัญญาณี คำแก้ว)

กรรมการ



(ผศ. นสพ. ดร.ภคนิช คุปพิทยานันท์)

กรรมการ



(รศ. ร.อ. ดร.กนัธร ชำนิประศาสน์)

รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการและพัฒนาความเป็นสากล



(ศ. ดร.หนึ่ง เตียอำรุง)

คณบดีสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

ธนัญญา โมรวางษ์ : ผลของการฉีด L-arginine และ selenium nanoparticles ผ่านเปลือกไข่
ต่อการพัฒนาของกล้ามเนื้อ การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างกล้ามเนื้อ และ
คุณภาพเนื้อของไก่โคราช (EFFECT OF IN OVO INJECTION OF L-ARGININE AND
SELENIUM NANOPARTICLES ON MYOGENESIS, MYOGENIC GENE
EXPRESSION AND MEAT QUALITY OF KORAT CHICKEN) อาจารย์ที่ปรึกษา :
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิทวัส โมพี, 101 หน้า.

การทดลองครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการฉีด L-arginine (L-arg) และ selenium nanoparticles (SeNPs) ผ่านเปลือกไข่ ต่อการพัฒนาของกล้ามเนื้อ การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างกล้ามเนื้อ และคุณภาพเนื้อของไก่โคราช โดยการนำไข่ไก่โคราชมีเชื้ออายุ 18 วันของระยะฟัก จำนวน 960 ฟอง ที่มีน้ำหนักไข่เฉลี่ย 48.75 ± 0.12 กรัม จัดแบ่งตามน้ำหนักของไข่เป็น 4 กลุ่มๆ ละ 4 ซ้ำๆ ละ 60 ฟอง ตามแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ดังนี้ กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม (Non-injection, NC) กลุ่มที่ 2 ไข่ที่ได้รับการฉีด L-arg 1.0% (IOF-1), กลุ่มที่ 3 ไข่ที่ได้รับการฉีด SeNPs 0.3 $\mu\text{g}/\text{egg}$ (IOF-2) และกลุ่มที่ 4 ไข่ที่ได้รับการฉีด L-arg 1.0%+SeNPs 0.3 $\mu\text{g}/\text{egg}$ (IOF-3) โดยฉีดสารที่บริเวณถุงน้ำคร่ำในปริมาณ 0.5 ml/egg จากนั้นนำไข่ทุกฟองเข้าสู่ตู้ฟักจนถึงวันฟัก หลังจากการฟักออกนำลูกไก่มาเลี้ยงโดยใช้อาหารทางการค้า ให้อาหารแบบเต็มที และมีน้ำสะอาดให้กินตลอดเวลา จนกระทั่งสิ้นสุดการทดลองที่อายุ 63 วัน ผลการทดลองพบว่า การฉีด L-arg และ SeNPs ผ่านเปลือกไข่ (IOF-3) ไม่ส่งผลกระทบต่อน้ำหนักตัวเฉลี่ยสุดท้าย องค์ประกอบซาก คุณภาพเนื้อ ค่าชีวเคมีในเลือด และค่าการตกค้างของ SeNPs ในเนื้อเยื่อ ($P > 0.05$) แต่อย่างไรก็ตามพบว่าสามารถลดอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนักตัว (FCR) การสูญเสียน้ำระหว่างการเก็บ และเพิ่มการสะสมโปรตีนในเนื้ออกของไก่โคราชอายุ 63 วัน ($P < 0.01$) อีกทั้งยังเพิ่มจำนวนเซลล์กล้ามเนื้อ การทำงานของเอนไซม์ GSH-Px และการแสดงออกของยีนในวันแรกของการฟักเท่านั้น ($P < 0.01$) จากการทดลองครั้งนี้สรุปได้ว่าการฉีด L-arg และ SeNPs ผ่านเปลือกไข่ในวันที่ 18 ของระยะฟักไม่ได้ส่งผลกับการสร้างกล้ามเนื้อของไก่โคราชในระยะยาวจึงไม่สามารถเพิ่มน้ำหนักซากได้ แต่อย่างไรก็ตามควรต้องคำนึงถึงการเพิ่มระดับและช่วงเวลาในการฉีดสารให้เพียงพอต่อการสร้างกล้ามเนื้อในระยะยาวของไก่โคราช ซึ่งสามารถใช้เป็นอีกหนึ่งทางเลือกในการให้สารอาหารแก่สัตว์ปีกในช่วงแรกได้

สาขาวิชาเทคโนโลยีและนวัตกรรมทางสัตว์
ปีการศึกษา 2562

ลายมือชื่อนักศึกษา ธนัญญา โมรวางษ์
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา วิ.ส.
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม วิ.ส.
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม วิ.ส.

THANIDTHA MORAWONG : EFFECT OF IN OVO INJECTION OF L-
ARGININE AND SELENIUM NANOPARTICLES ON MYOGENESIS,
MYOGENIC GENE EXPRESSION AND MEAT QUALITY OF KORAT
CHICKEN. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. WITTAWAT MOLEE,
Ph.D., 101 PP.

L-ARGININE/SELENIUM NANOPARTICLES/IN OVO INJECTION/
MYOGENESIS/KORAT CHICKEN

This study was conducted to investigate the effects of in ovo injection of L-arginine (L-arg) and selenium nanoparticles (SeNPs) on myogenesis, myogenic gene expression and meat quality of Korat chicken. On day 18 of incubation, a total of 960 fertilized Korat chicken eggs with similar weights (48.75 ± 0.12 g) were distributed in a Completely Randomized Design (CRD) with 4 treatment groups. Each treatment contained 4 replicates of 60 eggs each. The fertilized eggs were divided into 4 groups: non-injected control group (NC) and 3 groups of L-arg 1.0% solution (IOF-1) SeNPs 0.3 $\mu\text{g}/\text{egg}$ solution (IOF-2) and L-arg 1.0%+SeNPs 0.3 $\mu\text{g}/\text{egg}$ solution (IOF-3) injection. The IOF groups were identified by candling and 0.5 ml solution was injected into the amnion. After injection, the eggs were returned to the incubator. In the post-hatching period, chicks were provided *ad libitum* access to commercial feed until 63 days of age. The results showed that there was no effect of IOF-3 injection on final body weight, carcass traits, meat quality, serum biochemical profile, and selenium deposition ($P > 0.05$). However, the IOF-3 injection decreased feed conversion ratio (FCR), drip loss, and increased protein content in breast meat of 63-day-old chickens ($P < 0.01$). Moreover, the IOF-3 increased muscle cell, GSH-Px

activity, and *MSTN* expression in breast meat on the day of hatch ($P < 0.01$). In conclusion, in ovo injection of L-arg and SeNPs on day 18 of incubation had no long-term effect on myogenesis of Korat chickens. However, further study is needed to find the optimum level of in ovo L-arg and SeNPs and embryogenic stage of Korat chicken to provide sufficient nutrients to chicken in an early period of life.



School of Animal Technology and Innovation

Academic Year 2019

Student's Signature Thanidtha Moramong

Advisor's Signature W. Mokee

Co-advisor's Signature A.

Co-advisor's Signature Dh

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี เนื่องจากได้รับความช่วยเหลืออย่างยิ่ง ทั้งด้านวิชาการ และด้านการดำเนินงานวิจัย จากบุคคลและกลุ่มบุคคลต่างๆ ดังนี้

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิฑูรย์ โมพี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้โอกาสทางการศึกษา ให้คำแนะนำปรึกษา ช่วยแก้ปัญหาในทุกด้าน และให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยมาโดยตลอด รวมทั้งช่วยตรวจทานและแก้ไขวิทยานิพนธ์เล่มนี้จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อัญญาณี คำแก้ว และรองศาสตราจารย์ ดร.อมรรัตน์ โมพี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้คำปรึกษาด้านวิชาการ ให้คำแนะนำปรึกษาในการดำเนินงานวิจัยและให้กำลังใจมาโดยตลอด

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ปราโมทย์ พงศ์คำ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.ภคนิจ คุปพิทยานันท์ อาจารย์ประจำสาขาวิชาเทคโนโลยีและนวัตกรรมทางสัตว์ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่สละเวลาเป็นประธานกรรมการ และกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ตลอดจนให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์

ขอขอบพระคุณศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีและนวัตกรรมเพื่อการพัฒนาธุรกิจไก่โคราช และสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.) ที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัยในการดำเนินงานวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และเจ้าหน้าที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ที่อำนวยความสะดวกทางด้านเครื่องมือ อุปกรณ์ และสถานที่ในการทำงานวิจัย

ขอขอบพระคุณเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ที่เรียนระดับปริญญาตรี และระดับบัณฑิตศึกษา สาขาวิชาเทคโนโลยีและนวัตกรรมทางสัตว์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ช่วยเหลือและให้กำลังใจตลอดระยะเวลาการทำงานวิจัย

สำหรับคุณงามความดีอันใดที่เกิดจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ผู้วิจัยขอมอบให้กับบิดา มารดา และครอบครัว ซึ่งเป็นที่รักและเคารพยิ่ง ตลอดจนครูอาจารย์ที่เคารพทุกท่าน ที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ และถ่ายทอดประสบการณ์ที่ดีให้แก่ผู้วิจัยตลอดมา จนทำให้ประสบความสำเร็จในชีวิต การเรียนระดับบัณฑิตศึกษา

ธนัชฐา โมราชวัช

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ (ภาษาไทย).....	ก
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ).....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ง
สารบัญ.....	จ
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญภาพ.....	ฎ

บทที่

1 บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	3
1.3 สมมติฐานของงานวิจัย.....	3
1.4 ขอบเขตของการวิจัย.....	4
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4

2 ปรีทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 การเร่งการเจริญเติบโตต่อการพัฒนากล้ามเนื้อของไก่.....	5
2.2 กระบวนการสร้างกล้ามเนื้อ และอิทธิพลที่มีผลต่อการควบคุมการสร้างเซลล์กล้ามเนื้อตัวอ่อนของสัตว์ปีก.....	6
2.3 L-arginine (L-arg).....	11
2.3.1 ผลของการเสริม L-arginine ในอาหารต่อกระบวนการสร้างกล้ามเนื้อของสัตว์ปีก.....	12
2.3.2 ผลของการฉีด L-arginine ผ่านเปลือกไข่ต่อการเพิ่มจำนวนและการเปลี่ยนแปลงของเซลล์กล้ามเนื้อในระหว่างการพัฒนาของกล้ามเนื้อของตัวอ่อน.....	14
2.3.3 ผลของ L-arginine ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างกล้ามเนื้อในสัตว์ปีก.....	15

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.3.4	ผลของการเสริม L-arginine ต่อการแสดงการแสดงออกของยีน <i>MSTN</i>	18
2.3.5	ผลของการฉีด L-arginine ผ่านเปลือกไข่ต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต ในไก่เนื้อ.....	19
2.3.6	ผลของ L-arginine ต่อระบบภูมิคุ้มกันในไก่เนื้อ	19
2.3.7	ผลของการเสริม L-arginine ในอาหาร ต่อคุณภาพเนื้อของสัตว์ปีก	20
2.4	นาโนซีลีเนียม (Selenium nanoparticles: SeNPs).....	22
2.4.1	ผลของการเสริม SeNPs ในอาหาร ต่อการทำงานของ Antioxidant enzyme และประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของสัตว์ปีก	24
2.4.2	ผลของการฉีด Selenium และ SeNPs ในอาหารต่อสมรรถนะการ เจริญเติบโตของสัตว์ปีก	25
2.4.3	ผลของการเสริม Selenium และ SeNPs ในอาหาร ต่อคุณภาพเนื้อ ของไก่เนื้อ	27
2.5	เทคนิคการฉีดสารผ่านเปลือกไข่ (In ovo injection technique: In ovo feeding: IOF)	28
2.6	การศึกษาด้านพิษวิทยาของอนุภาคนาโน (Toxicology Study)	32
3	วิธีการดำเนินการวิจัย และการเก็บข้อมูล	
3.1	สิ่งทดลอง และแผนการทดลอง	34
3.1.1	สิ่งทดลอง	34
3.1.2	แผนการทดลอง	34
3.2	การเตรียมสารละลาย และอาหารทดลอง.....	35
3.2.1	การเตรียมสารละลายในการฉีดไข่.....	35
3.2.2	อาหารสำหรับเลี้ยงสัตว์ทดลอง	35
3.3	การเก็บข้อมูล และการวิเคราะห์ทางเคมี.....	36
3.3.1	การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสูตรอาหาร	36
3.3.2	การศึกษาด้านสมรรถนะการเจริญเติบโต.....	36
3.3.3	การเก็บข้อมูลองค์ประกอบซาก และการเก็บตัวอย่าง	37
3.3.4	การวัดคุณภาพเนื้อ.....	37

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.3.5	การวิเคราะห์สัณฐานวิทยา	39
3.3.6	การวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ Glutathione peroxidase ในเนื้อไก่.....	39
3.3.7	การศึกษาระดับการแสดงออกของยีน	40
3.3.8	การวิเคราะห์ค่าชีวเคมีในซีรัม	40
3.3.9	การวัดค่าความเป็นพิษของอนุภาคนาโนซีลีเนียม	40
3.4	การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	41
3.5	สถานที่ทำการทดลอง.....	41
3.6	ระยะเวลาในการทำการทดลอง.....	41
4	ผลการทดลองและอภิปรายผล	
4.1	ผลการตรวจสอบความถูกต้องของข้อมูล	42
4.2	ผลของการสังเคราะห์นาโนซีลีเนียม	42
4.3	ผลของการฉีด L-arginine และ SeNPs ต่อประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของไก่ประกอบซาก และคุณภาพเนื้อของไก่โคราช.....	44
4.4	ผลของการฉีด L-arginine และ SeNPs ต่อการวิเคราะห์สัณฐานวิทยาของกล้ามเนื้อในไก่โคราช	51
4.5	ผลของการฉีด L-arginine และ SeNPs ต่อการทำงานของเอนไซม์ Glutathione peroxidase (GSH-Px) ในเนื้อไก่	55
4.6	ผลของการฉีด L-arginine และ SeNPs ต่อระดับการแสดงออกของยีน <i>MSTN</i> ในกล้ามเนื้อของไก่โคราช.....	56
4.7	ความสัมพันธ์ระหว่างระดับการแสดงออกของยีน <i>MSTN</i> การทำงานของเอนไซม์ Glutathione peroxidase (GSH-Px) สัณฐานวิทยาของกล้ามเนื้อ และน้ำหนักตัวของไก่โคราชในแต่ละช่วงอายุ.....	58
4.8	ผลของการฉีด L-arginine และ SeNPs ต่อสุขภาพและสารตกค้างในไก่โคราช.....	59
4.8.1	ผลของการฉีด L-arginine และ SeNPs ต่อค่าชีวเคมีของซีรัมในไก่โคราช	59

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.8.2 ผลของการฉีด L-arginine และ SeNPs ต่อการสะสมของอนุภาคนาโน ซีลีเนียมในอวัยวะของไก่โคราช	61
5 สรุปและข้อเสนอแนะ.....	63
รายการอ้างอิง.....	65
ภาคผนวก.....	79
ภาคผนวก ก ภาพประกอบการดำเนินการทดลอง.....	79
ภาคผนวก ข วิธีการดำเนินงานในห้องปฏิบัติการ	88
ประวัติผู้เขียน.....	101



สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1	Growth factors ที่มีผลต่อการสร้าง Myoblast และ Satellite cell โดยกระบวนการ Proliferation และ Differentiation 8
2.2	ผลของการเสริม L-arginine ในอาหารไก่เนื้อระยะแรก ต่อการพัฒนาของกล้ามเนื้อ การทำงานของ Satellite cells และกระบวนการเกิดเส้นใยกล้ามเนื้อ (Myofibrillar protein) 13
2.3	ผลของการเสริม L-arginine ในอาหารไก่เนื้อ ต่อส่วนประกอบซาก..... 14
2.4	ผลของการฉีด L-arginine ผ่านเปลือกไข่ ต่อการพัฒนาการกล้ามเนื้อของตัวอ่อน สัตว์ปีก..... 16
2.5	ผลของ L-Arginine ในอาหาร ต่อค่าซีรั่ม การหมุนเวียนของโปรตีนทั้งในตับและ ในลำไส้เล็กส่วน Jejunum ของไก่..... 17
2.6	ผลของการฉีด L-arginine ผ่านเปลือกไข่ ต่อประสิทธิภาพการเจริญเติบโตหลังการฟัก 22
2.7	ผลของการเสริม SeNPS ในอาหารต่อการทำงานของ Antioxidant enzyme ของ สัตว์ปีก..... 25
2.8	ผลของการเสริม SeNPs ในอาหารต่อสมรรถนะการเจริญเติบโตของสัตว์ปีก..... 26
2.9	ผลของการฉีด Selenium และ SeNPs ในอาหาร ต่อสมรรถนะการเจริญเติบโตของ สัตว์ปีก..... 27
2.10	ผลของการเสริม Seleniem และ SeNPs ในอาหารต่อคุณภาพเนื้อไก่ 29
2.11	ผลของการศึกษาการฉีดสารผ่านเปลือกไข่ 30
2.12	การศึกษาความเป็นพิษของ SeNPs ในสัตว์ 33
3.1	โปรแกรมการให้วัคซีน 35
3.2	องค์ประกอบทางเคมีและโภชนะในอาหารไก่ทางการค้า..... 36
4.1	ผลของการฉีด L-arginine และ SeNPs ต่อประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของไก่โคราช อายุ 9 สัปดาห์ 45
4.2	ผลของการฉีด L-arginine และ SeNPs ต่อส่วนประกอบซากของไก่โคราช อายุ 9 สัปดาห์ 48

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
4.3 ผลของการฉีด L-arginine และ SeNPs ต่อคุณภาพเนื้ออก (<i>Pectoralis major</i>) ของไก่โคราช อายุ 9 สัปดาห์.....	50
4.4 ผลของการฉีด L-arginine และ SeNPs ต่อองค์ประกอบทางโภชนาการเนื้ออก (<i>Pectoralis major</i>) ของไก่โคราช อายุ 9 สัปดาห์.....	51
4.5 ผลของการฉีด L-arginine และ SeNPs ต่อน้ำหนักของเนื้ออก (<i>Pectoralis major</i>) ในแต่ละช่วงอายุของไก่โคราช	52
4.6 ผลของการฉีด L-arginine และ SeNPs ต่อระดับการทำงานของเอนไซม์ GSH-Px (units/g) ในกล้ามเนื้ออกของไก่โคราชในแต่ละช่วงอายุ.....	56
4.7 ความสัมพันธ์ระหว่างระดับการแสดงออกของยีน <i>MSTN</i> การทำงานของเอนไซม์ Glutathione peroxidase (GSH-Px) สัมฐานวิทยาของกล้ามเนื้ออก และน้ำหนักตัวของไก่โคราชในแต่ละช่วงอายุ.....	60
4.8 ผลของการฉีด L-arginine และ SeNPs ต่อค่าชีวเคมีของซีรัมในไก่โคราช.....	61

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1	ลักษณะทางกายภาพกล้ามเนื้อของไก่ (A) เนื้ออกของ Arbor Acres broiler, (B) เนื้ออกของ Thai native chicken, (C) เนื้อสะโพกของ Arbor Acres broiler and (D) เนื้อสะโพกของ Thai native chicken 6
2.2	กระบวนการสร้างกล้ามเนื้อ (Myogenesis)..... 7
2.3	บทบาทและหน้าที่เกี่ยวกับกระบวนการสร้างกล้ามเนื้อ..... 9
2.4	การแสดงออกของยีน และลักษณะทางกายภาพกล้ามเนื้อของปักกิ่ง 10
2.5	ผลของ L-arginine ต่อการแสดงออกของยีนบริเวณกล้ามเนื้อ 19
2.6	กระบวนการดูดซึม Selenium ในรูปแบบที่ต่างกัน 22
2.7	กลไกการทำงานของ Antioxidant enzyme..... 24
2.8	กระบวนการทำงานของสารอาหารต่อกระบวนการสร้างกล้ามเนื้อ 31
4.1	ปฏิกิริยาการเกิดอนุภาค BSA-SeNPs..... 43
4.2	ลักษณะทางกายภาพของ SeNPs วัดขนาดและรูปร่างของอนุภาคด้วย Scanning Electron Microscopic และวัดองค์ประกอบของธาตุด้วย Energy Dispersive Spectroscopy (EDS) 44
4.3	ผลของการฉีดสารผ่านเปลือกไข่ต่อค่าน้ำหนักของไก่โคราช..... 47
4.4	ผลของการฉีด L-arginine และ SeNPs ต่อความหนาแน่นของเซลล์ (A) และเส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์ (B) ในเนื้ออก (Pectoralis major) ของไก่โคราชในแต่ละช่วงอายุ..... 53
4.5	ผลของการฉีด L-arginine และ SeNPs ผ่านเปลือกไข่ต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์กล้ามเนื้อ 54
4.6	ผลของการฉีด L-arginine และ SeNPs ต่อระดับการแสดงออกของยีน <i>MSTN</i> ในกล้ามเนื้ออกของไก่โคราชในแต่ละช่วงอายุ..... 58
4.7	ผลของการฉีด L-arginine และ SeNPs ต่อค่าความเป็นพิษของอนุภาคนาโนซีลีเนียม ในตับ ไต และเนื้ออกของไก่โคราช อายุ 9 สัปดาห์..... 62

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

ไก่โคราชเป็นไก่ลูกผสมระหว่างแม่พันธุ์ไก่ มทส. และพ่อพันธุ์ไก่พื้นเมืองเหลืองหางขาว ซึ่งให้เนื้อที่นุ่มแน่น รสชาติดี เป็นที่ขอมรับของผู้บริโภค โดยในเนื้อของไก่โคราชมีปริมาณโปรตีน คอลลาเจน และค่าการอุ้มน้ำในเนื้อสูง นอกจากนี้ยังมีไขมัน และคอเลสเตอรอลต่ำ อย่างไรก็ตาม เนื่องจากไก่โคราชเป็นไก่ลูกผสมพื้นเมืองจึงมีปริมาณซากน้อย ทำให้ไม่เหมาะกับการตัดแต่งซาก เพื่อขายแยกชิ้นส่วน ด้วยเหตุนี้จึงนำมาสู่โจทย์ในงานวิจัยครั้งนี้คือ การเพิ่มน้ำหนักซากโดยยังคง ความเป็นเอกลักษณ์คุณภาพเนื้อของไก่โคราช ซึ่งการเพิ่มน้ำหนักซากจะขึ้นอยู่กับปริมาณของ กล้ามเนื้อในขณะที่สัตว์มีชีวิต โดยพบว่าการสร้างกล้ามเนื้อหรือการเพิ่มปริมาณกล้ามเนื้อมีการ สร้าง 2 แบบ คือ การเพิ่มจำนวนเซลล์ (Hyperplasia) และการเพิ่มขนาดเซลล์ (Hypertrophy) (Berri et al., 2007) แต่อย่างไรก็ตามในปัจจุบันมีการศึกษาในไก่เนื้อสายพันธุ์ทางการค้าจำนวนมากที่พบว่าการเพิ่มขนาดเซลล์ของกล้ามเนื้อส่งผลทำให้เนื้อมีคุณภาพต่ำ (Petracci et al., 2013; Koomkrong et al., 2016) จากสาเหตุดังกล่าวจึงเล็งเห็นถึงโอกาสในการเพิ่มปริมาณเนื้อโดยที่ยังคงความเป็น เอกลักษณ์ของเนื้อไก่โคราช หากแต่การเพิ่มขนาดของเซลล์กล้ามเนื้ออาจจะประสบปัญหา เช่นเดียวกับเนื้อไก่สายพันธุ์ทางการค้า จึงควรต้องศึกษาการเพิ่มกล้ามเนื้อด้วยวิธีการเพิ่มจำนวน เซลล์ ซึ่งเป็นอีกหนึ่งแนวทางที่จะสามารถเพิ่มปริมาณกล้ามเนื้อ และเพิ่มน้ำหนักซากของไก่โคราช ได้ โดยการเพิ่มจำนวนเซลล์ของกล้ามเนื้อในสัตว์ปีกนั้นจะมีการเริ่มพัฒนาและการสร้างในวันที่ 12 ในระยะเอ็มบริโอที่อยู่ในฟองไข่จนถึงวันที่ฟักออก ส่วนหลังจากฟักออกมาเป็นตัวจะเป็นการเพิ่ม ขนาดเซลล์กล้ามเนื้อเป็นส่วนใหญ่ (Azhar et al., 2016; Li et al., 2016; Griffin et al., 2017) ดังนั้น โอกาสที่จะเพิ่มจำนวนเซลล์กล้ามเนื้อจะต้องกระตุ้นการสร้างเซลล์ตั้งแต่วัยที่เป็นเอ็มบริโอ เท่านั้น (Liu et al., 2017) ถ้ามีการกระตุ้นการทำงานของการสร้างเซลล์กล้ามเนื้อให้มากขึ้นก็จะมี โอกาสสร้างจำนวนเซลล์ได้มากขึ้นด้วยเช่นกัน

ในศาสตร์ทางด้านอาหารหากต้องการเสริมอาหารในระยะเอ็มบริโอจำเป็นต้องใช้เทคนิค ในการฉีดสารผ่านเปลือกไข่ (In ovo injection) เพื่อนำสารอาหารไปสู่ตัวอ่อนได้โดยตรง ซึ่งเป็น สารอาหารที่ตัวอ่อนสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ทันที หรือมีอนุภาคขนาดเล็กสามารถผ่านเข้าสู่ ผนังเซลล์ของตัวอ่อนโดยตรง จากการค้นคว้าเอกสารงานวิจัย พบว่า L-arginine (L-arg) สามารถ

กระตุ้นการแสดงออกของยีนในกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างกล้ามเนื้อ โดยเข้าไปจับตรง Binding side ของ CASTOR1 แล้วไปรวมตัวกับ mTOR เป็น complex 1 (mTORC1) ให้อยู่ในรูปที่สามารถทำงานเกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนเซลล์กล้ามเนื้อ (Saxton et al., 2016) ซึ่งจากงานวิจัยพบว่ากรด L-arg ผ่านเปลือกไข่ในวันที่ 10, 16 และ 18 ของระยะฟัก ในปริมาณ 0.4-0.6 ml ที่บริเวณ Amniotic fluid พบว่าเส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์กล้ามเนื้อของตัวอ่อน และน้ำหนักสุดท้ายเพิ่มขึ้น อีกทั้งมีผลต่อการเพิ่มความยาวของวิลโลในลำไส้เล็กส่วนต้น จึงทำให้ประสิทธิภาพการใช้ อาหารสูงขึ้น (Azhar et al., 2016; Li et al., 2016; Gao et al., 2017a; Gao et al., 2017b) ซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกับการเสริม L-arg ในอาหาร โดยพบว่ามีผลในการเพิ่มขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ เซลล์กล้ามเนื้อออก และทำให้เปอร์เซ็นต์ซากของไก่เนื้อเพิ่มขึ้นด้วย (Fernandes et al., 2009; Hazim and Atta, 2012)

อย่างไรก็ตามในปัจจุบันมีการศึกษาการทำงานของยีนที่เป็นปลายน้ำของวิถี mTOR คือยีน *MSTN* (Myostatin) ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งกระบวนการสร้างกล้ามเนื้อ โดยจะมีการแสดงออกระหว่างการพัฒนาตัวอ่อนของไก่ในทุกสายพันธุ์ โดยการแสดงออกของยีนค่อนข้างสูง ในช่วงตัวอ่อนที่อายุ 10 วัน จนถึง 15 วัน หลังจากนั้นจะมีแนวโน้มการแสดงออกของยีนลดลง เพราะมีกระบวนการสร้างของกล้ามเนื้อมากขึ้น อีกทั้งยังมีการศึกษาการยับยั้งการทำงาน (Gene knock-out) ของ *MSTN* ในหนู พบว่ามีกล้ามเนื้อโตขึ้น 2-3 เท่า เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Dushyanth et al., 2016) ดังนั้นยีนนี้จึงเป็นยีนหลักที่สามารถนำมาศึกษาเพื่อใช้เป็นส่วนหนึ่งในการตอบคำถาม โจทย์ของงานวิจัยได้ โดยจากการศึกษาของ Li et al. (2016) พบว่าการฉีด L-arg ผ่านเปลือกไข่ในวันที่ 16 ของตัวอ่อนสามารถเพิ่มการแสดงออกของยีน *MSTN* และ *NOS* แต่ไก่อมีน้ำหนักตัวในวันที่ 21 ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ซึ่งไม่เป็นไปตามทฤษฎีการทำงานของยีนที่ว่า ยีน *MSTN* ควรมีการแสดงออกน้อยลงหรือมีการแสดงออกไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ทั้งนี้อาจมีสาเหตุมาจาก ระยะเวลาในการฉีดสาร อีกทั้งจะเห็นว่ามีการแสดงออกของยีน *NOS* มากขึ้น นั่นอาจหมายความว่า ภายในของเซลล์กล้ามเนื้อมีการทำงานของ Neuronal nitric oxide synthase (nNOS) ที่เป็นเอนไซม์ที่ เปลี่ยน L-arg ไปเป็น nitric oxide (NO) มากขึ้น โดยถ้าร่างกายมี NO ในปริมาณที่มากเกินไปจน จำเป็นจะส่งผลกระทบต่อการทำงานของกระบวนการสร้างเซลล์กล้ามเนื้อจึงทำให้ไก่อมีน้ำหนักตัว ไม่แตกต่างกัน ซึ่ง NO จะเป็นสารอนุมูลอิสระ และจะถูกเอนไซม์ Glutathione peroxidase (GPx: GPx1) เปลี่ยนให้เป็น Nitrite (NO₂) แล้วขับออกในรูปของปัสสาวะ ซึ่งถ้าเพิ่มการทำงานของ เอนไซม์ก็อาจจะลดการเกิดสารอนุมูลอิสระด้วยเช่นกัน โดยหลักการทำงานของเอนไซม์นี้จะมี Selenium (Se) เป็นตัว Active site แรกเริ่ม ซึ่งจัดเป็น Selenoenzyme และสามารถยับยั้งการทำงานของ NOS (Nitric oxide synthase) ได้อีกด้วย (Alizadeh et al., 2012) Se จึงเป็นอีกหนึ่งแร่ธาตุสำคัญ ที่อาจเป็นส่วนหนึ่งที่จะสามารถเพิ่มการสร้างกล้ามเนื้อในไก่โคราชได้ โดยรูปของ Se ที่นำมาศึกษา

ในครั้งนี้จะอยู่ในรูปที่มีขนาดนาโน เนื่องจากมีความเป็นพิษต่ำเมื่อเทียบกับ Se รูปแบบอื่น (Gulyas et al., 2017) โดยมีการศึกษาการเสริม Selenium nanoparticles (SeNPs) ขนาด 30-100 nm ในอาหารไก่เนื้อ พบว่า การเสริม SeNPs ที่ระดับ 0.1125 ppm ในอาหาร ช่วยเพิ่มการทำงานของ Antioxidant enzyme (GPx1, Catalase; CAT และ Super oxide dismutase; SOD) ในซีรัมมากขึ้น (Mohapatra et al., 2014; Aparna and Karunakaran, 2018) ด้วยอนุภาคที่มีขนาดเล็กจึงสามารถผ่านเข้าเซลล์ได้อย่างรวดเร็ว อีกทั้งอาจเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของ L-arg ได้อีกด้วย ทั้งนี้ SeNPs จึงเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่จำเป็นในการศึกษาร่วมกับ L-arg เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการกระตุ้นการทำงานของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเซลล์กล้ามเนื้อได้ดีขึ้น

เนื่องจากการศึกษาการฉีด L-arg และ SeNPs ผ่านเปลือกไข่ต่อการพัฒนาของกล้ามเนื้อยังมีงานวิจัยอยู่น้อยมาก ดังนั้นจึงเป็นสาเหตุที่จะทำการวิจัยในครั้งนี้ เพื่อเพิ่มโอกาสในการสร้างจำนวนเซลล์กล้ามเนื้อของตัวอ่อนของไก่โคราชให้มากขึ้น และอาจจะมีผลต่อน้ำหนักตัวไก่ในระยะยาวด้วยเช่นกัน โดยในการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการฉีด L-arg และ SeNPs ผ่านเปลือกไข่ ต่อการพัฒนากล้ามเนื้อ การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างกล้ามเนื้อ และคุณภาพเนื้อของไก่โคราช ซึ่งเป็นหนึ่งแนวทางในการเพิ่มน้ำหนักซาก และเข้าสู่กระบวนการตัดแต่งซากเพื่อเพิ่มมูลค่าของไก่โคราชได้ในอนาคต อีกทั้งการให้อาหารผ่านเปลือกไข่ยังสามารถเป็นแนวทางของการพัฒนาอุตสาหกรรมการใช้อาหารในช่วงแรกก่อนการฟัก (Early feed) ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในโรงฟักของการผลิตสัตว์ปีกได้อีกด้วย

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาการฉีด L-arginine และ SeNPs ผ่านเปลือกไข่ ต่อการพัฒนาของกล้ามเนื้อ โดยไม่ส่งผลกระทบต่อคุณภาพเนื้อไก่โคราช

1.2.2 เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างกล้ามเนื้อ เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการอธิบายถึงเหตุของกระบวนการสร้างกล้ามเนื้อของไก่โคราช

1.3 สมมติฐานของงานวิจัย

1.3.1 การฉีด L-arginine และ SeNPs ผ่านเปลือกไข่ จะส่งผลให้เพิ่มการพัฒนาของกล้ามเนื้อ แต่ไม่ส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพการเจริญเติบโตและคุณภาพเนื้อของไก่โคราช

1.3.2 การฉีด L-arginine และ SeNPs ผ่านเปลือกไข่ จะลดการแสดงออกของยีน *MSTN* ที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งกระบวนการสร้างกล้ามเนื้อ ทำให้มีการพัฒนาของกล้ามเนื้อเพิ่มขึ้น

1.4 ขอบเขตของงานวิจัย

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นศึกษาในไก่โคราช โดยการฉีด L-arginine และ SeNPs ผ่านเปลือกไข่ ปริมาณ 0.5 ml/egg ในวันที่ 18 ของระยะฟักไข่ ในบริเวณถุงน้ำคร่ำ เพื่อศึกษาการพัฒนาของกล้ามเนื้อ การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างกล้ามเนื้อ และคุณภาพเนื้อ ซึ่งเริ่มตั้งแต่แรกเกิดจนถึงช่วงอายุ 9 สัปดาห์ ของไก่โคราช

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

เพื่อนำการฉีด L-arginine และ SeNPs ผ่านเปลือกไข่ ไปใช้ในโรงฟักไข่ เป็นการให้อาหาร ด้วยวิธีใหม่ที่สามารถสร้างพัฒนาการตั้งแต่ตัวอ่อนและสามารถส่งผลในระยะยาวได้ โดยจะเพิ่มมวลกล้ามเนื้อของไก่โคราช โดยไม่ส่งผลกระทบต่อทางด้านลบต่อคุณภาพเนื้อ ซึ่งทำให้มีปริมาณซากของไก่โคราชเพิ่มมากขึ้น ตรงตามความต้องการของตลาดที่แบ่งขายชิ้นส่วนเนื้อไก่ และเพิ่มความสะดวกสบายแก่ผู้บริโภค ซึ่งเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับเนื้อไก่โคราช เพื่อเป็นเครื่องมือในการประกอบอาชีพให้แก่เกษตรกรต่อไป

บทที่ 2

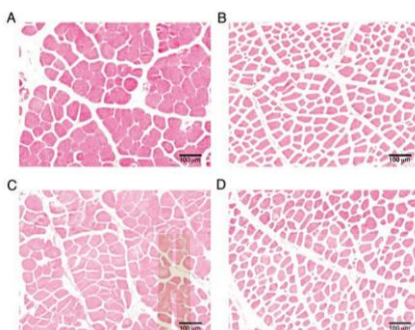
ปรัทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 การเร่งการเจริญเติบโตต่อการพัฒนากล้ามเนื้อของไก่

ในระยะเวลา 50 ปีที่ผ่านมา ได้มีการปรับปรุงสายพันธุ์ไก่เนื้อให้มีอัตราการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว โดยมีอัตราการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นถึง 300% และมีอัตราการแลกเนื้อ (FCR) ลดลงเฉลี่ย 2.55% (Zuidhof et al., 2014) ผลที่ตามมาคือเกิดโรคกระดูกอักเสบ (Osteomyelitis) โรคเกาต์ในไก่ (Avian urolithiasis, gout) และ เพิ่มการสะสมไขมันช่องท้อง (Wang et al., 2017) อีกทั้งยังเกิดการพัฒนากล้ามเนื้อที่ผิดปกติ อาทิเช่น Deep pectoral myopathy (DPM); Pale soft and exudative (PSE); White striping (WS) และ Wooden breast (WB) เป็นต้น จากการศึกษาโครงสร้างของกล้ามเนื้อระหว่างไก่เนื้อสายพันธุ์ทางการค้าที่ถูกปรับปรุงพันธุ์ให้มีการเจริญเติบโตที่รวดเร็ว (Fast growing chicken) ที่อายุ 42 วัน และไก่พื้นเมืองซึ่งมีการเจริญเติบโตที่ช้า (Slow growing chicken) ที่อายุ 112 วัน พบว่า ลักษณะของกล้ามเนื้อมีความเป็นเอกลักษณ์ของไก่แต่ละสายพันธุ์ โดยในไก่สายพันธุ์ที่มีการเจริญเติบโตเร็วแสดงให้เห็นถึงการเพิ่มขึ้นของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์กล้ามเนื้อจึงทำให้มีน้ำหนักตัวเพิ่มมากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับไก่ที่มีการเจริญเติบโตช้า (ภาพที่ 2.1) (Koomkrong et al., 2015) ด้วยเหตุนี้จึงทำให้คุณภาพเนื้อของไก่ทั้งสองสายพันธุ์แตกต่างกัน ซึ่งเนื้อของไก่พื้นเมืองมีค่าการอุ้มน้ำ (Water holding capacity: WHC) สูงกว่าไก่เนื้อสายพันธุ์ทางการค้า โดยค่า WHC มีความสัมพันธ์กับขนาดของเซลล์กล้ามเนื้อด้วย อีกทั้งยังขึ้นอยู่กับการเก็บรักษาหลังการฆ่า และชนิดของเส้นใยกล้ามเนื้อ ซึ่งไก่ที่มีการเจริญเติบโตเร็วพบว่ามีกล้ามเนื้อชนิด Type IIB เป็นจำนวนมาก โดยกล้ามเนื้อชนิดนี้จะมี Receptor ที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งน้ำ จึงอาจเป็นอีกหนึ่งสาเหตุที่เกี่ยวข้องกับค่าการอุ้มน้ำ (Listrat et al., 2016)

โดยการเปรียบเทียบลักษณะของเส้นใยกล้ามเนื้อระหว่างไก่ 2 สายพันธุ์ พบว่าไก่ที่มีการเจริญเติบโตเร็วมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์กล้ามเนื้อใหญ่ จึงทำให้เยื่อหุ้มของเซลล์กล้ามเนื้อ (Endomysium) ที่เป็นส่วนของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันมีลักษณะบางกว่าในเยื่อหุ้มเซลล์กล้ามเนื้อของไก่ที่มีการเจริญเติบโตช้า จึงเป็นอีกหนึ่งสาเหตุที่ทำให้เนื้อของไก่พื้นเมืองมีลักษณะเหนียว เพราะในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันจะมีองค์ประกอบของเส้นใย ได้แก่ เส้นใยคอลลาเจน (Collagen fiber) เส้นใยอีลาสติก (Elastic fiber) และเส้นใยร่างแห (Reticular fiber) เป็นต้น อย่างไรก็ตาม นอกจากปัจจัยในเรื่องสายพันธุ์แล้ว ยังมีปัจจัยทางด้านอายุ เพศ และชนิดของเส้นใยกล้ามเนื้อ โดยพบว่าสัตว์ที่มีอายุมากมีพื้นที่หน้าตัดและความหนาของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน Perimysium และ Endomysium ที่หนา

กว่าสัตว์ที่มีอายุน้อย (Zchowska et al., 2005) ดังนั้นสายพันธุ์จึงเป็นเพียงหนึ่งปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการสร้างกล้ามเนื้อ ซึ่งปัจจัยทั้งหมดนี้จะถูกควบคุมโดยการทำงานของยีน และการรับส่งสัญญาณของสารต่างๆ เข้าสู่เซลล์



ภาพที่ 2.1 ลักษณะทางกายภาพกล้ามเนื้อของไก่ (A) เนื้ออกของ Arbor Acres broiler, (B) เนื้ออกของ Thai native chicken, (C) เนื้อสะโพกของ Arbor Acres broiler และ (D) เนื้อสะโพกของ Thai native chicken

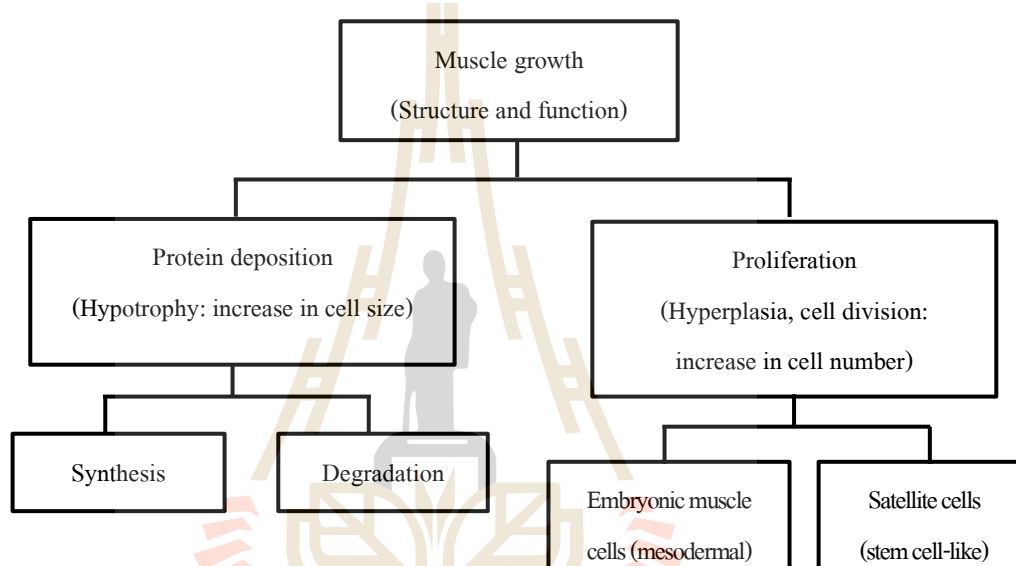
ที่มา: Koomkrong et al. (2015)

2.2 กระบวนการสร้างกล้ามเนื้อและอิทธิพลที่มีผลต่อการควบคุมการสร้างเซลล์กล้ามเนื้อของตัวอ่อนสัตว์ปีก

กระบวนการสร้างกล้ามเนื้อ (ภาพที่ 2.2) ที่มีการเพิ่มจำนวนเซลล์กล้ามเนื้อ (Hyperplasia) ของสัตว์ปีกจะเกิดขึ้นเฉพาะช่วงที่เป็นระยะฟักไข่ (Embryonic development) จนถึงช่วงต้นของระยะฟัก (Guo-song et al., 2012 ; Grodzik et al., 2013) หลังจากนั้นจำนวนเซลล์จะไม่มีการเปลี่ยนแปลง แต่จะมีการสร้างเซลล์กล้ามเนื้อโดยการขยายขนาดของเซลล์ (Hypotrophy) แทน โดยมีระดับของฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต (Growth hormone) ในระยะตัวอ่อน (Embryonic phase) เป็นตัวกำหนดกระบวนการทำงานของการเพิ่มจำนวนเซลล์ (Cell proliferation) (Fernandes et al., 2009; De Carvalho, 2012) ซึ่งสามารถปรับระดับของฮอร์โมนให้ทำงานได้ดีขึ้นโดยการเพิ่มสารอาหารให้แก่ตัวอ่อนโดยตรง อย่างไรก็ตามด้วยเหตุที่กล่าวมาทั้งหมดถ้าจะเพิ่มการสร้างจำนวนเซลล์กล้ามเนื้อ พบว่ามีหลายปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนากล้ามเนื้อของตัวอ่อน จึงต้องศึกษาถึงอิทธิพลที่มีผลต่อการควบคุมการพัฒนาของตัวอ่อน จึงจะมีโอกาสเพิ่มการสร้างจำนวนเซลล์ได้มากขึ้นในสัตว์ปีก

โดยไก่เป็นสัตว์ปีกที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก จึงมีการพัฒนาและปรับปรุงสายพันธุ์ให้เจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว แต่เมื่อพบว่าการเร่งการเจริญเติบโตที่รวดเร็วนั้นส่งผลกระทบต่อ

ต่อคุณภาพเนื้อ ในปัจจุบันจึงมีการศึกษาการพัฒนากล้ามเนื้อของตัวอ่อนมากขึ้น โดยมีการศึกษาถึงรูปแบบฟีโนไทป์ทั้งใน Fast และ Slow-growing chickens ซึ่งพบว่ากระบวนการสร้างกล้ามเนื้อในตัวอ่อนมี 3 ระยะ (ED = ระยะตัวอ่อน, D = หลังฟัก) ดังนี้ เริ่มจาก ED12 - ED17 เป็นระยะที่ตัวอ่อนมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว และมีการเพิ่มจำนวนเซลล์แบบ Hyperplasia, ED17 - D1 เป็นระยะที่ตัวอ่อนมีการเพิ่มจำนวนเซลล์เพื่อเตรียมที่จะฟักเป็นตัว และระยะสุดท้าย คือ D1 - D14 เป็นระยะหลังการฟัก ที่มีการเปลี่ยนรูปแบบการเจริญเติบโตแบบ Myoblast-mediated growth เป็น Satellite cell-mediated growth



ภาพที่ 2.2 กระบวนการสร้างกล้ามเนื้อ (Myogenesis)

โดยเป็นการขยายขนาดแบบ Hypertrophy (Liu et al., 2017) ซึ่งในขณะที่ไข่ได้รับการปฏิสนธิจะเกิดการสร้าง Primary germ layers ขึ้น และมีการพัฒนาต่อไปเป็นรูปของ Myotome ซึ่งเป็นบริเวณตรงกลางของ Somite โดยสร้างมาจากในส่วนของ Paraxial mesoderm และมีกระบวนการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ให้ไปเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่สร้างเซลล์กล้ามเนื้อที่เรียกว่า Precursor cell หรือ Presumptive myoblasts หลังจากนั้นจะแบ่งเป็นระยะต่างๆ คือระยะ First myoblast เป็นระยะที่มีการเพิ่มจำนวนเซลล์ของ Myoblasts, ระยะ Primary myotubes เป็นระยะที่ตัวอ่อนมีการเปลี่ยนแปลงจาก Myoblasts เป็น Myotubes และระยะ Second myotubes มีการเปลี่ยนแปลงเหมือนระยะ Primary myotubes แต่เป็นเวลายาวไปถึงหลังการฟักซึ่งจะมีการพัฒนาต่อจากเซลล์ Myoblasts ที่โตเต็มที่หรือที่เรียกว่า Satellite cell ซึ่งในตัวอ่อนของไก่จะมีการเริ่มการเปลี่ยนแปลงที่ระยะแรกประมาณวันที่ 12 ซึ่งในสัตว์แต่ละชนิดก็จะมีพัฒนาที่แตกต่างกัน (John

et al., 2003) โดยในไก่อังจะมีการพัฒนาชนิดของกล้ามเนื้อ โดยเริ่มตั้งแต่วันที่ 20 ของตัวอ่อน (Velleman, 2007) ซึ่งการที่จะรู้ถึงลักษณะการทำงาน โครงสร้างของเซลล์ภายในตัวอ่อนที่จำเพาะกับสัตว์แต่ละชนิดนั้นหมายความว่ามียีนที่เกี่ยวข้องในการควบคุมการทำงานที่แตกต่างกันด้วยเช่นกัน โดยกระบวนการหลักของการสร้างเซลล์กล้ามเนื้อคือ การเพิ่มจำนวนของเซลล์ (Proliferating cells) และการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง (Differentiation) ของเซลล์ ซึ่งจะถูควบคุมการทำงานด้วย Growth factor, nutrition, receptor, signaling pathway และ transcription factors ที่มีความจำเพาะ (Franzini-Armstrong and Engel, 2012) ดังตารางที่ 2.1

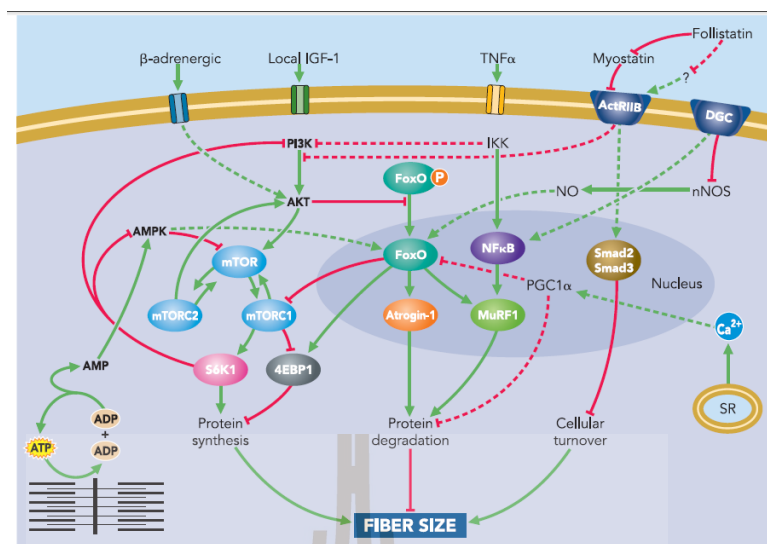
ตารางที่ 2.1 Growth factors ที่มีผลต่อการสร้าง Myoblast และ Satellite cell โดยกระบวนการ Proliferation และ Differentiation

Growth factor	Proliferation	Differentiation	Signaling control
Hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF)	Stimulates	Inhibits	-
Fibroblast growth factor 2 (FGF2)	Stimulates	Inhibits	-
Insulin-like growth factor 1 (IGF-1)	Stimulates	Stimulates	IGFs
Transforming growth factor-beta (TGF- β)	Inhibits	Inhibits	-
Myostatin (GDF-8)	Inhibits	Inhibits	-
Myogenic differentiation (MyoD)	Stimulates	Stimulates	Wnt
Myogenic factor 5 (Myf-5)	Stimulates	Stimulates	Shh, Notch
Myogenin (MyoG)	Inhibits	Stimulates	-
Myogenic factor 6 (MYF6; herculin: MRF4)	-	Stimulates	-
Protein paired-box transcription factor-7 (Pax-7)	Stimulates	Inhibits	-

หมายเหตุ: (-) หมายถึง ข้อมูลยังไม่ชัดเจน

ที่มา: ดัดแปลงจาก Chen and Goldhamer (2003) และ Velleman (2007)

จากข้อมูลข้างต้นจะเห็นได้ว่ามีกลไกหรือวิธีการส่งสัญญาณที่ควบคุมการสร้างกล้ามเนื้อ โดยการเพิ่มจำนวนของเซลล์กล้ามเนื้อ และการเปลี่ยนแปลงของเซลล์กล้ามเนื้อ แต่อย่างไรก็ตาม กระบวนการสร้างกล้ามเนื้อ หรือการได้มาซึ่งมวลของกล้ามเนื้อ ไม่ได้ขึ้นอยู่กับกระบวนการสร้างกล้ามเนื้อ อย่างเดียว เนื่องจากกล้ามเนื้อเป็นลักษณะเชิงปริมาณที่ถูกควบคุมด้วยยีนหลายตำแหน่ง ซึ่งมีการควบคุมกระบวนการสร้างและสลายของกล้ามเนื้อ ซึ่งข้อมูลงานวิจัยบางส่วนมีการศึกษาบทบาทและหน้าที่เกี่ยวกับกระบวนการสร้างกล้ามเนื้อ ดังภาพที่ 2.3



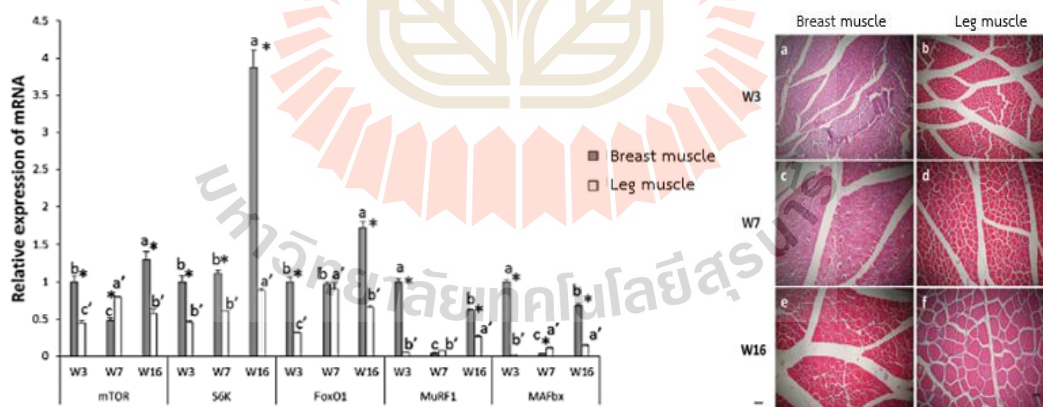
ภาพที่ 2.3 บทบาทและหน้าที่เกี่ยวกับกระบวนการสร้างกล้ามเนื้อ

ที่มา: Sandri (2008)

จากภาพที่ 2.3 สามารถอธิบายได้ว่า การเพิ่มขนาดของเส้นใยกล้ามเนื้อเป็นการหมุนเวียนของโปรตีน (Protein turnover) ภายในเซลล์ กระบวนการนี้จะถูกควบคุมด้วยยีนหลายยีนที่ทำหน้าที่แตกต่างกันไป โดยมี Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) ที่มีบทบาทเป็นทั้ง Autocrine และ Paracrine ที่ทำหน้าที่ผลิตฮอร์โมน ซึ่งจะถูกรับควบคุมด้วย Growth hormone (GH) ที่จะส่งเสริมการเจริญของกล้ามเนื้อ โดยจะไปกระตุ้นการทำงานของ Akt/Protein kinase B (PKB) ที่จัดเป็น Downstream effector ของ Phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K) และมีการถ่ายทอดสัญญาณของเซลล์ โดยส่งผ่าน Kinase ซึ่งเป็นการเติมหมู่ฟอสเฟตบนโมเลกุลของโปรตีนต่าง ๆ เรียกกระบวนการนี้ว่า Phosphorylation จากนั้น Akt จะไปกระตุ้นการทำงานของ mTOR ให้เกิดกระบวนการสังเคราะห์โปรตีน (Protein synthesis) และยับยั้งการทำงานของยีน Forkhead box O (FoxO) ซึ่งลดการสลายโปรตีน (Protein degradation) ซึ่งการทำงานในเบื้องต้นนี้ เกี่ยวข้องกับการเพิ่มขนาดของกล้ามเนื้อ (Hypertrophy) ซึ่งมีการทำงานที่หมุนเวียนของโปรตีนภายในเซลล์จะมีการทำงานอย่างสม่ำเสมอ เพื่อเกิดสภาวะที่สมดุลภายในเซลล์ โดยการเพิ่มขนาดของกล้ามเนื้อจะต้องเกิดกระบวนการสังเคราะห์มากกว่าการสลายโปรตีน แต่อย่างไรก็ตามยังมีสารจำพวก NO (Nitric oxide) เป็นสารออกซิเดชั่น ดังนั้นการกระตุ้นการทำงานของ mTOR จึงมีบทบาททั้งในการเพิ่มจำนวนเซลล์ (Hyperplasia) และการเพิ่มขนาดเซลล์ (Hypertrophy) (Sandri, 2008; Yang et al., 2008) ซึ่งโดยปกติโปรตีน mTOR เพียงตัวเดียวจะอยู่ในรูปที่ไม่สามารถทำงานได้ จะต้องทำงานรวมกันเป็น Complex ซึ่งส่วนมากการสร้างกล้ามเนื้อ mTOR complex 1 (mTORC1) มีบทบาทในการกระตุ้นการแปลโปรตีน (Translation) เพื่อให้เซลล์เติบโตและขยายตัวได้ ซึ่งการผลิต

โปรตีนมากขึ้นภายในเซลล์จะต้องมีพลังงานที่เพียงพอด้วยจึงจะทำงานได้อย่างสมบูรณ์ ซึ่งจะไปยังยังการทำงานของวิธีการทำงานของ 4E-BP1 และกระตุ้นการทำงานของวิธีการทำงานของ S6K1 ซึ่งมีหน้าที่ในการควบคุมอัตราการเคลื่อนที่ของเซลล์ โดยเข้าไปกระตุ้นวัฏจักรเซลล์ (Cell cycle) ในระยะของ G₁ (gap phase 1)/S (DNA synthesis phase) ตรงบริเวณของ Cyclin E (Cuyas et al., 2014) จึงส่งผลทำให้เซลล์มีการเพิ่มจำนวน ส่วนการเพิ่มขนาดเซลล์จะเป็นการเพิ่มของโปรตีนที่ไปสะสมภายในเซลล์

จากการศึกษาของ Zhang et al. (2014) ถึงกลไกการทำงานของยีนที่มีผลสอดคล้องต่อการทำงานของกระบวนการสร้างกล้ามเนื้อในเปิดปีกกึ่ง ที่มีการศึกษาถึงรูปแบบการแสดงออกของยีน และกระบวนการเผาผลาญโปรตีนภายในเนื้ออกและสะโพก พบว่า การที่กล้ามเนื้ออกของเปิดปีกกึ่งมีปริมาณเนื้อที่มากขึ้น สอดคล้องกับการแสดงออกที่มากขึ้นของยีนในกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีน คือ mTOR และ S6K ส่วนยีนในกลุ่มของการสลายโปรตีน คือ FoxO1 มีการแสดงออกสูงด้วยเช่นกัน (ภาพที่ 2.4) ซึ่งสามารถอธิบายได้ว่า การที่กล้ามเนื้ออกมีปริมาณเพิ่มขึ้นในเปิดปีกกึ่งที่มีอายุนั้นจะมียีนในกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีนแสดงออกมากกว่ายีนในกลุ่มสลายโปรตีน ในช่วงที่เปิดมีอายุน้อยการแสดงออกของยีนทั้ง 2 กลุ่มยังไม่ต่างกัน จึงมีปริมาณกล้ามเนื้อที่ยังน้อย โดยในกล้ามเนื้ออกจะมีการแสดงออกของยีนสูงกว่าในกล้ามเนื้อขาเนื่องจากในกล้ามเนื้ออกมีการเผาผลาญของโปรตีนที่ดีกว่า อีกทั้งยังมีปริมาณของนิวเคลียสซึ่งหมายความว่า จะมีปริมาณของเซลล์กล้ามเนื้อที่มากขึ้นอีกด้วย



ภาพที่ 2.4 การแสดงออกของยีน และลักษณะทางกายภาพกล้ามเนื้อของเปิดปีกกึ่ง

หมายเหตุ: Means within a column sharing different letters (superscripts a-c) differ ($P < 0.05$).

ที่มา: Zhang et al. (2014)

การเพิ่มขึ้นของปริมาณกล้ามเนื้อเป็นผลเนื่องมาจากการเพิ่มขึ้นของจำนวนเซลล์ และขนาดของเซลล์ โดยภายในเซลล์จะมีการหมุนเวียนของโปรตีนซึ่งพบมากในระยะหลังคลอด เพราะในระยะที่ยังเป็นตัวอ่อนจะมีการถูกจำกัดด้วยขนาดของเซลล์ ตัวควบคุมการทำงานของ การหมุนเวียนโปรตีนที่เป็นหลักก็คือยีน Akt เป็นการส่งสัญญาณที่สำคัญต่อการควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์กล้ามเนื้อ จะมีปลายทางการทำงานคือ เส้นทางการทำงานของยีน mTOR ไปจนถึงการเปลี่ยนแปลงของกล้ามเนื้อ หากแต่ยังมีปัจจัยอื่นด้วยที่เป็นตัวควบคุมการทำงานของยีน เช่น การเจริญเติบโต สารอาหาร และสถานะพลังงานภายในเซลล์ (Hay and Sonenberg, 2004; Zhang et al., 2014) ด้วยหลายปัจจัยที่เกี่ยวข้องในการเปลี่ยนแปลงของกล้ามเนื้อจึงเป็นสาเหตุให้ต้องศึกษาการทำงานร่วมกันระหว่างปัจจัยทางอาหารและการแสดงออกของยีน

ปัจจัยทางด้านอาหารที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาขนาดของเส้นใยกล้ามเนื้อที่มีผลกระทบต่อคุณภาพเนื้อที่มีการศึกษาคือ การเสริม Lysine พบว่า การเพิ่มระดับ Lysine ในสูตรอาหารของไก่เนื้อที่สูงขึ้นทำให้ปริมาณเนื้อของไก่เพิ่มขึ้น และอาจทำให้เกิดความผิดปกติของกล้ามเนื้อ อาทิเช่น White striping (WS) และ Wooden breast (WB) สูงขึ้นเช่นกัน (Cruz et al., 2017) สอดคล้องกับการศึกษาอื่นๆ ที่แสดงให้เห็นถึงอิทธิพลของอัตราการเจริญเติบโตและน้ำหนักของไก่ที่สูงขึ้น จะส่งผลให้เกิดภาวะ WS และ WB รุนแรงขึ้นด้วย (Kuttappan et al., 2012; Kuttappan et al., 2013; Petracci et al., 2013; Trocino et al., 2015) อันเนื่องจาก Lysine เป็น Second limiting amino acid ที่จำเป็นต่อร่างกายของสัตว์ปีก แต่เมื่อเสริมในปริมาณที่มากขึ้นทำให้เกิดการสร้างกล้ามเนื้อแบบการขยายขนาดเซลล์ (Hypertrophy) จึงมีผลทำให้ Fiber diameter เพิ่มขึ้นด้วย ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อคุณภาพเนื้ออย่างมาก โดยส่วนใหญ่จะเกิดกับ Fast growing chicken (Sandra et al., 2015) หากแต่จะปรับปรุงสายพันธุ์จาก Slow growing chicken เป็น Fast growing chicken ก็จะทำให้ประสบปัญหาเรื่องคุณภาพเนื้อเช่นกัน ซึ่งเป็นที่ทราบว่ากลไกในการเร่งการเจริญเติบโตสามารถเพิ่มผลผลิตซากได้ แต่จะมีผลกระทบต่อพัฒนาการของกล้ามเนื้อและคุณภาพเนื้อ โดยมวลกล้ามเนื้อหรือปริมาณของกล้ามเนื้อที่มากขึ้นจะเป็นตัวบ่งชี้ถึงน้ำหนักตัวของสัตว์ที่มากขึ้นด้วย (Fernandes et al., 2009; Fouad et al., 2012) งานศึกษานี้จึงมุ่งเน้นศึกษา L-arginine ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่เกี่ยวข้องโดยตรงต่อกระบวนการสร้างกล้ามเนื้อ (Saxton et al., 2016) และเป็นกรดอะมิโนที่สำคัญในการจับกับโปรตีน CATOR1 แล้วไปรวมตัวกับ mTOR เป็น Complex ให้อยู่ในรูปที่สามารถทำงานได้ (Moro et al., 2016)

2.3 L-arginine (L-arg)

L-arginine (L-arg) หรือ 2-Amino-5-guanidinopentanoic acid เป็นกรดอะมิโนมีโซ่ข้างที่มีขั้ว เป็นประจุบวก มีประจุที่ pH 7 ดังนั้นจึงถูกจัดเรียงตัวอยู่ที่ด้านนอกของโครงสร้างโปรตีน เป็นส่วนที่

สัมผัสกับสารละลาย (Aqueous) มีสูตรทางเคมีคือ $C_6H_{14}N_4O_2$ มีมวลโมเลกุล 174.2 และเป็นกรดอะมิโนที่ใช้ในการสังเคราะห์โปรตีน โดยเข้ารหัส codons CGU, CGC, CGA, CGG, AGA และ AGG ในทางอาหารสัตว์ L-arg เป็นกรดอะมิโนพื้นฐาน และเป็น The fifth limiting amino acid (Alice et al., 2012) จำเป็นสำหรับสัตว์ปีกมาก เพราะเป็นกรดอะมิโนที่สัตว์ปีกไม่สามารถสังเคราะห์เองได้ (Yuan et al., 2015a) โดยที่กลไกการทำงานเมื่อไก่ได้รับ L-arg เข้าสู่ร่างกาย แต่ไม่สามารถถูกดูดซึมผ่าน Epithelium cell ของลำไส้เล็กได้โดยตรง จึงจำเป็นต้องมีโปรตีนตัวพา (Amino acid transporters) โดยจะจำเพาะกับกรดอะมิโนแต่ละตัวซึ่ง L-arg จะมีโปรตีนตัวพาที่ชื่อว่า Subfamily of cationic amino acid transporters (CAT1–3, i.e., SLC7A1–3) โปรตีน CAT เป็นตัวขับเคลื่อนหลักในการรับ Arginine ในเซลล์ โดย CAT-1 จะแสดงออกในเนื้อเยื่อส่วนใหญ่ ยกเว้นที่ตับ ในขณะที่ CAT-2B จะเป็น Cytokine-inducible และ CAT-2A แสดงออกอย่างเด่นชัดในตับ แต่เมื่อศึกษาการพัฒนาตัวอ่อนจะพบว่า CAT-3 แสดงออกอย่างมากในระบบประสาทส่วนกลาง และไข้มัสในผู้ใหญ่ (Rath et al., 2014; Yuan et al., 2016) โดยจากการศึกษาของ Yuan et al. (2015b) ที่ได้ทำการศึกษาในลูกไก่ถึงผลของการเสริม L-arg มีการแสดงออกของ CAT-1 และ iNOS levels ที่สูงขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการเจริญเติบโตของลูกไก่อีกด้วย เมื่อผ่านกระบวนการขนส่งสารอาหารเข้าสู่เซลล์แล้ว กรดอะมิโนจะถูกนำมาใช้สำหรับการสังเคราะห์โปรตีน และกระบวนการเผาผลาญ โดย L-arg จะเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์เอนไซม์หลักๆ อาทิเช่น Arginine: glycine amidinotransferase (AGAT), Nitric oxide synthases (NOS; 3 isozymes) Arginases (2 isozymes) และ Arginine decarboxylase ซึ่งจะถูกลดเปลี่ยนเป็นรูปของ Citrulline, creatine, ornithine, polyamines และ proline เป็นต้น

จากกลไกที่กล่าวมาข้างต้น จะเห็นได้ว่า L-arg เป็นประโยชน์ต่อเซลล์เป็นอย่างมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งผลต่อกระบวนการสร้างเซลล์ของกล้ามเนื้อ แต่อย่างไรก็ตาม งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการเสริม L-arg ในระยะตัวอ่อนของสัตว์ปีกเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ยังมีงานวิจัยที่น้อยอยู่ในปัจจุบัน ดังนั้นในการทบทวนเอกสารจึงได้เพิ่มข้อมูลเกี่ยวกับการเสริม L-arg ในอาหารต่อกระบวนการสร้างกล้ามเนื้อของสัตว์ปีกด้วย

2.3.1 ผลของการเสริม L-arginine ในอาหารต่อกระบวนการสร้างกล้ามเนื้อของสัตว์ปีก

ปริมาณเนื้อของสัตว์ปีกที่มากหรือน้อย มาจากกระบวนการสร้างกล้ามเนื้อของสัตว์ในขณะที่ยังมีชีวิตอยู่ โดยงานวิจัยในปัจจุบันได้มุ่งเน้นถึงการศึกษาการพัฒนากล้ามเนื้อและคุณภาพซากควบคู่กันไป ซึ่งพบว่าการเสริม L-arg ในอาหารไก่เนื้อเพศผู้ Cobb 500 ที่เสริมในอาหารระยะแรก (อายุ 1-21 วัน) ที่ระดับ 1.39 1.49 1.59 1.69 และ 1.79% มีความสัมพันธ์ต่อน้ำหนักของเนื้ออก ความหนาของเนื้ออก และขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยกล้ามเนื้อ ดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 ผลของการเสริม L-arginine ในอาหารไก่เนื้อระยะแรก ต่อการพัฒนาของกล้ามเนื้อ การทำงานของ Satellite cells และกระบวนการเกิดเส้นใยกล้ามเนื้อ (Myofibrillar protein)

Item	Day			
	7	14	21	42
Effect				
Breast weight (g)	Linear	NS	Cubic	NS
Breast fillet weight (g)	Linear	Quadratic	Linear	NS
Breast fillet thickness (mm)	Linear	NS	Linear	NS
Breast fillet length (cm)	NS	NS	NS	NS
Breast fillet width (cm)	NS	NS	NS	NS
Myofiber diameter (μm)	NS	Quadratic	Quadratic	NS
Protein : DNA ratio	NS	NS	NS	NS

หมายเหตุ: $P < 0.05$

ที่มา: ดัดแปลงจาก Fernandes et al. (2009)

จากตารางพบว่าไก่ที่มีอายุ 7 วันที่ได้รับการเสริมด้วย L-arg ในระดับสูงขึ้น มีน้ำหนักและความหนาของเนื้ออกเพิ่มขึ้น ซึ่งมีความสัมพันธ์ในรูปแบบของเส้นตรง (Linear) ไก่ที่มีอายุ 14 วันที่ได้รับการเสริมด้วย L-arg ที่ระดับ 1.49 และ 1.59% จะมีน้ำหนักของเนื้ออกมาก แต่ถ้าเสริมในปริมาณที่มากหรือน้อยกว่าระดับ L-arg ดังกล่าว จะทำให้เนื้ออกมีน้ำหนักน้อย แต่ถ้าเสริม L-arg ที่ระดับสูงกว่า 1.59% ทำให้ขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยกล้ามเนื้อเพิ่มสูงขึ้น โดยมีความสัมพันธ์ในรูปแบบของ Quadratic แต่เมื่อไก่มีอายุ 42 วัน กลับไม่พบความแตกต่างกันทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Hazim and Atta (2012) ได้ทำการศึกษาในไก่เนื้อสายพันธุ์ Ross 308 โดยทำการเสริม L-arg ในอาหารที่ระดับ 1.407 1.427 และ 1.447% เพื่อศึกษาลักษณะของซาก โดยให้อาหาร 2 ระยะ คือ อายุ 1-20 วัน และอายุ 21 วันขึ้นไปจนถึงระยะส่งตลาด พบว่า ไก่เนื้อที่ได้รับการเสริมด้วย L-arg ในระดับที่สูงขึ้น ทำให้มีเปอร์เซ็นต์ของเนื้ออก (*M. pectoralis*), เนื้อสะโพก (*M. iliotibialis*, *M. satorius*, *M. semitendinosus*, *M. adductor longus* และ *M. quadriceps femoris*) และเนื้อน่อง (*M. gastrocnemius* และ *M. tibialis anterior*) มีปริมาณเพิ่มขึ้น ดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 ผลของการเสริม L-arginine ในอาหารไก่เนื้อ ต่อส่วนประกอบซาก

Treatments	Breast (%)	Thigh (%)	Drumstick (%)	Back (%)	Wing (%)	Neck (%)
Control	26.95 ± 0.65 ^c	25.61 ± 0.40 ^c	11.76 ± 1.24 ^c	20.99 ± 0.68 ^a	11.16 ± 0.44 ^a	2.34 ± 0.85
L-arg 1.407%	28.36 ± 0.75 ^b	26.6 ± 0.98 ^b	11.83 ± 0.92 ^b	19.17 ± 0.45 ^b	11.10 ± 0.33 ^b	1.98 ± 0.48
L-arg 1.427%	30.6 ± 0.59 ^a	27.45 ± 0.92 ^a	12.58 ± 0.79 ^a	17.39 ± 0.43 ^c	9.74 ± 0.47 ^c	2.21 ± 0.72
L-arg 1.447%	31.75 ± 0.51 ^a	28.56 ± 0.72 ^a	13.12 ± 0.86 ^a	16.75 ± 0.52 ^c	8.47 ± 0.38 ^c	2.22 ± 0.71

หมายเหตุ: ^{a-c} Means with differing superscripts in the same column are significantly different (P<0.05)

ที่มา: Hazim and Atta (2012)

จากผลของการเสริม L-arg ในอาหารสัตว์ปีกที่ระดับสูงขึ้นไป ทำให้เปอร์เซ็นต์ซากสูงขึ้นด้วยเช่นกัน โดยมีผลต่อการเพิ่มขนาดของเส้นใยกล้ามเนื้อ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัยที่เกี่ยวข้อง เช่น สายพันธุ์ของไก่ การจัดการเลี้ยง ระยะของการให้อาหาร ความสมดุลของกรดอะมิโน และระดับของการเสริม L-arg เป็นต้น โดยปัจจัยเหล่านี้จะส่งผลให้กระบวนการเพิ่มกล้ามเนื้อหรือการเพิ่มเปอร์เซ็นต์ซากที่แตกต่างกัน ซึ่งการเพิ่มมวลของกล้ามเนื้อในระยะหลังฟักนั้นจะทำให้เปอร์เซ็นต์ซากเพิ่มขึ้นด้วยเช่นกัน หากเพิ่มกระบวนการสร้างกล้ามเนื้อตั้งแต่ในระยะก่อนการฟักก็อาจเป็นอีกหนึ่งแนวทางในการเพิ่มเปอร์เซ็นต์ซากหลังการฟักได้เช่นกัน

2.3.2 ผลของการฉีด L-arginine ผ่านเปลือกไข่ต่อการเพิ่มจำนวนและการเปลี่ยนแปลงของเซลล์กล้ามเนื้อในระหว่างการพัฒนาของตัวอ่อน

การพัฒนาของกล้ามเนื้อเริ่มขึ้นตั้งแต่ที่ยังเป็นตัวอ่อน โดยจะมีการพัฒนาต่อไปถึงการฟักออก จนถึงได้น้ำหนักที่จับขาย ในการผลิตไก่โคราชให้ได้น้ำหนักประมาณ 1.2 กิโลกรัม (น้ำหนักส่งตลาด) ต้องใช้เวลานานกว่าเมื่อเทียบกับไก่เนื้อสายพันธุ์การค้า ทั้งนี้มีสาเหตุมาจากไก่เนื้อสายพันธุ์ทางการค้ามีการเพิ่มปริมาณเนื้ออย่างรวดเร็วหลังการฟัก แต่ในระยะตัวอ่อนยังคงไม่มีความแตกต่าง (Liu et al., 2017) ดังนั้นถ้ามีการเร่งหรือกระตุ้นการสร้างกล้ามเนื้อตั้งแต่อายุในไข่ของไก่โคราช ก็อาจไม่มีผลกระทบต่อกระบวนการสร้างกล้ามเนื้อเหมือนกับไก่เนื้อสายพันธุ์การค้า ด้วยเหตุนี้จึงศึกษาถึงระดับของตัวอ่อน โดยพบว่าการฉีด L-arg ในวันที่ 10 ของระยะฟัก มีผลต่อการเพิ่มน้ำหนักของตัวอ่อน ความหนาของอก รวมถึงการเพิ่มน้ำหนักสุดท้าย และลด FCR ด้วย (Azhar et al., 2016) อีกทั้งมีการศึกษาการฉีด L-arg ในวันที่ 16 ของระยะฟัก พบว่าน้ำหนักของตัวอ่อนของไก่

มีผลไม่แตกต่างกันจากกลุ่มควบคุม (Li et al., 2016) ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากวันที่ทำการฉีดผ่านเปลือกไข่ไม่ได้เป็นช่วงเวลาที่เริ่มการสร้างเซลล์ของกล้ามเนื้อ จึงอาจมีผลทำให้จำนวนของ Myofibers ไม่มีการเปลี่ยนแปลง ดังแสดงผลในตารางที่ 2.4

2.3.3 ผลของ L-arginine ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างกล้ามเนื้อในสัตว์ปีก

จากผลที่กล่าวมาในข้างต้นเป็นเพียงการศึกษาการให้อาหารและศึกษาลักษณะที่ปรากฏ แต่อย่างไรก็ตามกลไกภายในร่างกายยังมียีนที่เป็นตัวควบคุมการทำงานด้วย การศึกษาถึงระดับของยีนไม่ใช่เป็นเพียงแค่การยืนยันขั้นตอนการเสริมอาหารต่อลักษณะปรากฏเท่านั้น แต่จะสามารถทราบถึงการเพิ่มประสิทธิภาพของการทำงานให้สามารถทำงานได้มากกว่านี้ได้หรือไม่ โดยมีงานวิจัยที่ศึกษาการแสดงออกของยีนกลุ่มหนึ่งที่เกี่ยวข้องต่อกระบวนการสร้างกล้ามเนื้อ โดยมีการศึกษาการใช้ L-arg ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อดูการแสดงออกของยีน พบว่าช่วยเพิ่มการแสดงออกของ mTOR และการกระตุ้นการสังเคราะห์โปรตีนที่เซลล์เยื่อบุผิวที่ผนังลำไส้เล็กของไก่ โดยการนำเซลล์เนื้อเยื่อในลำไส้เล็กของไก่ (IEC) มาเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี L-arg ที่ระดับ 10 100 200 และ 400 ไมครอน (Yuan et al., 2015c) ซึ่งสามารถสรุปผลได้ว่า การเพิ่มความเข้มข้นของ L-arg ในอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการเพิ่มการเจริญเติบโตของเซลล์ mTOR จะไปกระตุ้นการทำงานใน ระยะ G0/G1 ที่มีการแสดงออกของโปรตีนสูงสุด อีกทั้งยังมีผลสอดคล้องในเพิ่มการแสดงออกของยีน mTOR, S6K1 และ 4E-BP1 ที่มีผลทำให้เกิดการเพิ่มกระบวนการหมุนเวียนของโปรตีนภายในเซลล์ที่เซลล์เยื่อบุผิวที่ผนังลำไส้เล็กของไก่เป็นอย่างมาก ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Miao et al. (2017) ที่พบว่า เมื่อเสริมระดับ L-arg ในอาหารไก่ไข่สูงขึ้น ส่งผลทำให้เกิดกระบวนการหมุนเวียนของโปรตีนในลำไส้เล็กในส่วนของ Jejunum มากขึ้น แต่ไม่ปรากฏในลำไส้เล็กส่วน Duodenum และ Ileum โดยกระบวนการข้างต้นมีความสอดคล้องกับการแสดงออกของยีนทั้งในกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับการสร้างโปรตีน (mTOR, S6K1, and 4E-BP1) และกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับการสลายโปรตีน (MuRF1, Atrogin-1 (MAFbx), 20S และ cathepsin B) เมื่อทำการศึกษาในตับ ก็ให้ผลเช่นเดียวกับการศึกษาในเซลล์ลำไส้เล็กของไก่ หากแต่มีการศึกษาเพิ่มเกี่ยวกับซีรัมที่ระดับเดียวกันพบว่า โปรตีนรวม และอัลบูมิน (Albumen) มีค่าสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับซีรัมของไก่ที่ถูกเสริมด้วย L-arg ระดับอื่น (Yuan et al., 2016) ดังตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.4 ผลของการฉีด L-arginine ผ่านเปลือกไข่ ต่อการพัฒนากล้ามเนื้อของตัวอ่อนสัตว์ปีก

Item	In-ovo feeding					References
	Negative control	Positive control	L-arg 0.5%	L-arg 1.0%	L-arg 1.5%	
On day 18 of incubation period						
Embryo weight (g)	14.13 ± 0.35 ^a	15.03 ± 2.75 ^a	19.56 ± 0.43 ^b	18.58 ± 2.49 ^b	18.78 ± 0.87 ^b	Azhar et al. (2016)
Embryo length (cm)	7.42 ± 0.02 ^a	7.65 ± 0.45 ^{ab}	8.22 ± 0.15 ^c	8.23 ± 0.38 ^{bc}	7.83 ± 0.54 ^{bc}	
Pectoral circumference (cm)	5.00 ± 0.30 ^a	5.20 ± 0.20 ^{ab}	5.64 ± 0.05 ^c	5.53 ± 0.09 ^{bc}	5.52 ± 0.06 ^{bc}	
At the age of 42 days of broiler						
Feed intake (g/bird)	1127.16 ± 37.40	1118.73 ± 7.80	1140.98 ± 14.20	1137.52 ± 2.10	1131.80 ± 7.20	Li et al. (2016)
Body weight gain (g/bird)	515.46 ± 16.40 ^a	511.47 ± 17.20 ^a	565.15 ± 15.50 ^b	617.44 ± 11.50 ^c	604.51 ± 12.60 ^c	
Feed conversion	2.19 ± 0.08 ^c	2.17 ± 0.07 ^c	2.02 ± 0.08 ^b	1.84 ± 0.04 ^a	1.87 ± 0.02 ^a	
Body weight (BW) and pectoralis major (PM) weight of broiler chickens						
	NI group	Saline group	6.25 mg/kg arg group	25 mg/kg arg group	100 mg/kg arg group	
Initial egg weight (g)	62.3 ± 0.6	62.1 ± 0.7	61.8 ± 0.6	61.3 ± 0.8	62.0 ± 0.5	Li et al. (2016)
Hatched chick weight (g)	47.4 ± 0.5	47.4 ± 0.8	47.4 ± 0.5	46.9 ± 0.7	47.3 ± 0.5	
Relative chick weight/Egg weight (%)	76.1 ± 0.3 ^a	77.3 ± 0.5 ^{ab}	76.7 ± 0.3 ^{ab}	76.4 ± 0.3 ^b	76.7 ± 0.2 ^{ab}	
BW on Day 7 (g)	176 ± 2 ^a	172 ± 2 ^a	173 ± 2 ^a	167 ± 3 ^b	172 ± 4 ^a	
BW on Day 14 (g)	464 ± 9 ^a	464 ± 7 ^a	461 ± 5 ^a	441 ± 6 ^b	469 ± 10 ^a	
BW on Day 21 (g)	1017 ± 16 ^a	1010 ± 13 ^a	983 ± 13 ^a	944 ± 13 ^b	979 ± 14 ^{ab}	
Left PM weight on Day 21 (g)	79.1 ± 2.3 ^a	81.2 ± 2.6 ^a	78.8 ± 1.2 ^a	72.3 ± 1.9 ^b	81.0 ± 2.6 ^a	

หมายเหตุ: Means with differing superscripts in the same row are significantly different (P<0.01)

ตารางที่ 2.5 ผลของ L-arginine ในอาหาร ต่อค่าซีรัม การหมุนเวียนของโปรตีนทั้งในตับและในลำไส้เล็กส่วน Jejunum ของไก่

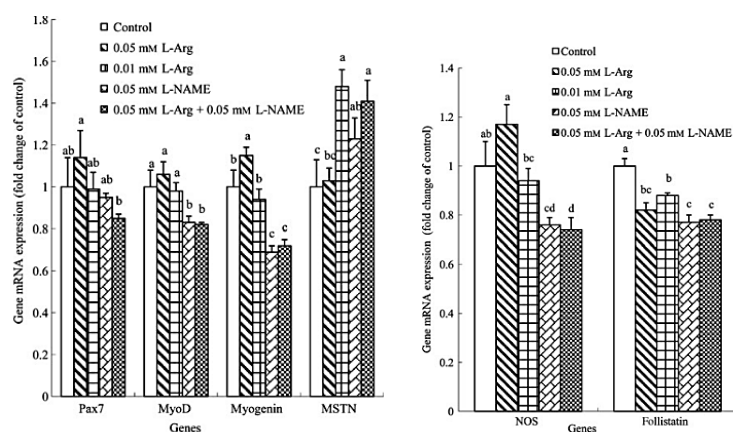
Item	Supplement L-arginine (%)						References
	0.64	0.86	1.03	1.27	1.42	1.66	
Blood serum							
TP (g/L)	35.83 ± 2.56 ^b	34.65 ± 1.71 ^b	38.54 ± 2.67 ^b	54.68 ± 4.64 ^a	41.14 ± 3.79 ^{a,b}	47.23 ± 4.44 ^{a,b}	Miao et al. (2017)
ALB (g/L)	7.81 ± 0.16 ^b	8.21 ± 0.16 ^b	6.35 ± 0.53 ^{b,c}	10.24 ± 0.57 ^a	5.54 ± 0.34 ^c	6.39 ± 0.29 ^{b,c}	
UA (mg/L)	66.03 ± 2.85 ^{a,b,c}	64.16 ± 2.76 ^{b,c}	74.78 ± 2.35 ^{a,b}	60.56 ± 3.89 ^c	70.81 ± 2.02 ^{a,b,c}	76.91 ± 1.64 ^a	
GOT (U/mg protein)	78.15 ± 1.76	79.15 ± 0.92	77.40 ± 1.73	78.62 ± 1.51	79.67 ± 1.66	77.95 ± 1.83	
GPT (U/mg protein)	36.77 ± 3.93	32.34 ± 3.33	40.39 ± 2.37	35.11 ± 2.46	35.80 ± 1.43	43.11 ± 2.38	
Protein turnover in liver							
Protein deposition (g/d)	0.25 ± 0.02	0.29 ± 0.03	0.40 ± 0.06	0.40 ± 0.02	0.42 ± 0.05	0.38 ± 0.04	Yuan et al. (2016)
FSR (%/d)	11.35 ± 0.74 ^b	11.99 ± 0.36 ^b	12.02 ± 0.13 ^b	15.67 ± 0.44 ^a	13.99 ± 0.33 ^{a,b}	11.57 ± 1.28 ^b	
FGR (%/d)	2.42 ± 0.22 ^b	2.79 ± 0.23 ^{a,b}	4.37 ± 0.79 ^{a,b}	5.38 ± 0.43 ^a	4.44 ± 0.45 ^{a,b}	3.75 ± 0.49 ^{a,b}	
FBR (%/d)	5.53 ± 0.61	5.60 ± 0.30	4.04 ± 0.43	5.58 ± 0.35	5.35 ± 0.15	4.34 ± 0.81	
Protein turnover in Jejunum							
Protein deposition (g/d)	0.065 ± 0.008	0.066 ± 0.025	0.076 ± 0.013	0.092 ± 0.011	0.065 ± 0.008	0.052 ± 0.009	Yuan et al. (2016)
FSR (%/d)	6.87 ± 0.52 ^b	7.55 ± 0.49 ^{a,b}	8.01 ± 0.76 ^{a,b}	8.39 ± 0.70 ^a	7.71 ± 0.37 ^{a,b}	7.10 ± 0.65 ^{a,b}	
FGR (%/d)	3.21 ± 0.25 ^{a,b}	3.39 ± 0.10 ^{a,b}	3.16 ± 0.06 ^{a,b}	3.80 ± 0.06 ^a	3.02 ± 0.08 ^b	3.56 ± 0.22 ^{a,b}	
FBR (%/d)	3.66 ± 0.58	4.16 ± 0.44	4.85 ± 0.78	4.59 ± 0.76	4.69 ± 0.37	3.55 ± 0.47	

หมายเหตุ: ^{a-c} Means with differing superscripts in the same row are significantly different (P<0.05). TP = total protein; ALB = albumen; UA = urea acid; GOT= glutamic oxalacetic transaminase; GPT = glutamic pyruvic transaminase. FSR = fraction liver protein synthesis rate; FGR = fraction liver protein gain rate; FBR = fraction liver protein breakdown rate.

โดยจากผลการศึกษาพบว่าในการเสริม L-arg ในไก่ไข่ที่ระดับสูงขึ้นไป มีค่าความเข้มข้นของอัลบูมินในซีรัมมากขึ้น ทำให้มีแนวโน้มในการขนส่งโปรตีนที่ได้จากการดูดซึมในลำไส้เล็กส่วนต้น ขนส่งผ่านกระแสเลือดเพื่อไปยังส่วนต่างๆ ของร่างกายสัตว์มากขึ้น จึงมีผลทำให้โปรตีนเหล่านั้นไปเป็นสารตั้งต้นที่เกี่ยวกับกระบวนการสร้างกล้ามเนื้อได้ ซึ่ง L-arg มีผลต่อการแสดงออกของ mTOR ได้ในทุกช่วงอายุในไก่ซึ่งจะไม่ตอบโจทยงานวิจัยโดยตรง แต่อย่างไรก็ตามในปัจจุบันมีการศึกษาการทำงานของยีนที่เป็นปลายน้ำของวิถีของ mTOR คือยีน *MSTN* (Myostatin) เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการสร้างกล้ามเนื้อ ซึ่งสามารถแสดงออกกะหว่างการพัฒนาตัวอ่อนของไก่ในทุกสายพันธุ์ โดยรวมแล้วการแสดงออกดังกล่าวมีค่อนข้างสูงในช่วงตัวอ่อนที่อายุ 10 วัน จนถึง 15 วัน หลังจากนั้นแนวโน้มการแสดงออกมีทิศทางลดลง (Dushyanth et al., 2016) ซึ่งถ้าจะศึกษาในระยะของตัวอ่อน ยีนนี้จึงมีบทบาทสำคัญอย่างยิ่ง

2.3.4 ผลของการเสริม L-arginine ต่อการแสดงการแสดงออกของยีน *MSTN*

ยีน Myostatin (*MSTN*) เป็นยีนที่สร้างโปรตีน Myostatin ซึ่งโปรตีนนี้เป็นส่วนหนึ่งของ Transforming growth factor beta ($TGF-\beta$) เป็นกลุ่มของโปรตีนที่ช่วยควบคุมการเจริญเติบโตและการพัฒนาเนื้อเยื่อทั่วร่างกาย โดยจะพบ *MSTN* เฉพาะในกล้ามเนื้อที่ใช้ในการเคลื่อนไหว (กล้ามเนื้อโครงร่าง) ซึ่งมีการเคลื่อนไหวทั้งก่อนและหลังฟัก โดยโปรตีนนี้ปกติยับยั้งการเจริญเติบโตของกล้ามเนื้อเพื่อให้มั่นใจว่ากล้ามเนื้อไม่เติบโตมากเกินไป แต่จะลดระดับลงอย่างรวดเร็วเมื่อใกล้เวลาฟัก หรือหลังวันที่ 20 ของระยะฟัก ซึ่งยีนนี้จากที่กล่าวมาในข้างต้นจะยับยั้งการทำงานของกระบวนการสร้างกล้ามเนื้อในไก่ โดยมีรายงานว่าได้มีการศึกษา Gene knock-out ในหนู พบว่ามีกล้ามเนื้อโตขึ้น 2-3 เท่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Dushyanth et al., 2016) ยีนนี้จึงเป็นยีนหลักที่สามารถตอบโจทยของงานวิจัยได้ โดยมีศึกษาเกี่ยวกับการฉีด L-arg ผ่านเปลือกไข่ในวันที่ 16 ของตัวอ่อน ช่วยเพิ่มการแสดงออกของยีน *MSTN* และ *NOS* (ภาพที่ 2.5) ซึ่งมีผลทำให้น้ำหนักไก่ที่อายุ 21 วันไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (Li et al., 2016) ซึ่งเป็นไปตามทฤษฎีการทำงานของยีน แต่ไม่สอดคล้องกับการเสริม L-arg ที่จะต้องมีน้ำหนักไก่อมากขึ้น ซึ่งอาจเป็นสาเหตุมาจากระยะเวลาการฉีดสาร อีกทั้งจะเห็นว่าการแสดงออกของยีน *NOS* มากขึ้น นั้นหมายความว่า ในกล้ามเนื้อมีการทำงานของ nNOS ที่เป็นเอนไซม์ที่เปลี่ยนจาก L-arg เป็น NO มากด้วยเช่นกัน โดย NO มีผลต่อการยับยั้งการทำงานของกระบวนการสร้างเซลล์กล้ามเนื้อจึงทำให้ไก่อมีน้ำหนักไม่แตกต่างกัน



ภาพที่ 2.5 ผลของ L-arginine ต่อการแสดงออกของยีนบริเวณกล้ามเนื้อ
ที่มา: Li et al. (2016)

2.3.5 ผลของการฉีด L-arginine ผ่านเปลือกไข่ต่อสมรรถนะการเจริญเติบโตในไก่เนื้อ

สมรรถนะการเจริญเติบโต เป็นลักษณะปรากฏที่เป็นตัวแปรสำคัญในการผลิตสัตว์ ซึ่งเป็นพารามิเตอร์ที่ควรทำการศึกษาในงานทดลองเพื่อตอบโจทย์ของกระบวนการพัฒนาปริมาณเนื้อร่วมกับคุณภาพเนื้อ ในส่วนนี้จะเป็นการศึกษาผลต่อสมรรถนะการเจริญเติบโตในไก่เนื้อ จากการศึกษาวิจัยในการเสริม L-arg ต่อสมรรถนะการเจริญเติบโตในไก่เนื้อ พบว่าลูกไก่ที่ได้รับการฉีด L-arg เพิ่มน้ำหนักในช่วงอายุ 7 วัน อาจเนื่องมาจากมีน้ำหนักอวัยวะภายในเพิ่มขึ้นด้วย จึงทำให้มีผลต่อน้ำหนักตัวของลูกไก่ (Gao et al., 2017b) และการฉีด L-arg 1% มีผลในการลดอัตราการฟักออก มีน้ำหนักตัวและปริมาณอาหารที่กินต่อวันลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในไก่ที่มีอายุ 21 วัน (Gao et al., 2017b) แต่ได้มีงานวิจัยในนกกระทา พบว่าเมื่อทำการเสริม L-arg ที่ระดับ 2 และ 3% ทำให้อัตราการฟักออก และน้ำหนักตัวสุดท้ายเพิ่มสูงขึ้น รวมไปถึงการเพิ่มประสิทธิภาพการใช้อาหารอีกด้วย ซึ่งสามารถอธิบายได้ว่า Arginine hormone กระตุ้นให้เกิดการหลั่งฮอร์โมน Arginine กระตุ้นการเจริญเติบโตของฮอร์โมนจากต่อมใต้สมอง การหลั่งฮอร์โมนที่เพิ่มขึ้นจากการฉีด L-arg นี้มีสาเหตุมาจากการยับยั้งการหลั่ง Somatostatin ภายในร่างกาย (Hazim et al., 2011) จึงมีผลต่อการเพิ่มของน้ำหนักตัวนั่นเอง ดังแสดงในตารางที่ 2.6

2.3.6 ผลของ L-arginine ต่อระบบภูมิคุ้มกันในไก่เนื้อ

ระบบภูมิคุ้มกันเป็นอีกหนึ่งพารามิเตอร์ที่มีผลต่ออุตสาหกรรมการผลิตสัตว์ปีก จึงมีการศึกษาถึงการเสริม L-arg ต่อระบบภูมิคุ้มกัน โดยพบว่าเมื่อเสริม L-arg เพิ่มขึ้น มีผลต่อการทำงานของ T cell ซึ่งเป็น Lymphocyte ที่ทำหน้าที่ด้านการตอบสนองทางด้านเซลล์ เพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอมหรือจุลชีพ ส่งผลให้ต่อต้านการเกิดมะเร็งได้ ซึ่งอาจเนื่องมาจากการรวมกันของการ

เปลี่ยนแปลงฟีโนไทป์ รวมทั้งความสามารถในการอยู่รอดของเซลล์ที่ดีขึ้นจึงทำให้ L-arg สามารถต้านมะเร็งได้ (Geiger et al., 2016) อีกทั้งมีการศึกษาถึงการเสริม L-arg ในอาหารของไก่เนื้อ และเลี้ยงเชื้อเพื่อศึกษาการตอบสนองของเอ็มบริโอตัวอ่อนของไก่พบว่าช่วยป้องกัน และบรรเทา Infectious bursal disease (IBD) ในไก่ได้ (Tayade et al., 2006; Tan et al., 2015) ทั้งนี้เมื่อทราบถึง L-arg มีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันในไก่ แต่งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการฉีดผ่านตัวอ่อนที่กำลังพัฒนา จึงอาจมีโอกาที่จะก่อเป็นเซลล์อื่นที่ไม่ต้องการ หรืออาจก่อโทษต่อระบบภูมิคุ้มกันได้ จึงเป็นสิ่งจำเป็นในการวัดค่าพารามิเตอร์นี้ เพื่อยืนยันว่าศาสตร์ของการให้อาหารผ่านเปลือกไข่สามารถประยุกต์ใช้ในวงการปศุสัตว์ได้

2.3.7 ผลของการเสริม L-arginine ในอาหาร ต่อคุณภาพเนื้อของสัตว์ปีก

คุณภาพเนื้อเป็นอีกหนึ่งพารามิเตอร์ที่มีความสำคัญมากในการเลี้ยงไก่เพื่อให้ตรงตามความต้องการของผู้บริโภค โดยพบว่าไก่ Arbor Acres เพศผู้ ที่ได้รับการเสริม L-arg ที่ระดับสูงขึ้นในอาหารไก่เนื้อ จะเพิ่มค่าความสว่างของสีเนื้อ (L* lightness) และค่าความเหนียวนุ่มของเนื้อ (Tenderness) ในเนื้ออกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้เสริม (Jiao et al., 2010) เนื่องจากการเสริม L-arg ในอาหารจะเกิดการสะสม NO ภายในเซลล์มากขึ้น จึงไปแย่งการขนส่งออกซิเจนไปยังส่วนต่างๆ ของเซลล์ ทำให้มีสีเนื้อที่สว่างเพราะขาดออกซิเจน (Dennis, 2004) แต่อย่างไรก็ตามยังมีปัจจัยอื่นที่มีผลต่อคุณภาพของเนื้ออีกด้วย อาทิเช่น องค์ประกอบทางเคมีของเนื้อ ชนิดของกล้ามเนื้อ ความเครียดก่อนการฆ่า และรวมไปถึงกระบวนการในการเก็บรักษา เป็นต้น

จากบทบาทการทำงานของ L-arg ในข้างต้น จะเห็นได้ว่ามีความสามารถในการกระตุ้นการสร้างเซลล์กล้ามเนื้อของตัวอ่อนของไก่ได้ แต่อย่างไรก็ตามยังมีช่องว่างในการทำงานวิจัยอยู่ว่า การที่ฉีดสารผ่านเปลือกไข่ในวันที่ 16 ของระยะฟัก มีผลทำให้ยีน NOS ที่มีผลต่อการสร้างเอนไซม์ nNOS เพิ่มขึ้นด้วย จึงทำให้มีผลต่อน้ำหนักสุดท้ายของไก่ ซึ่งจุดนี้จึงเป็นที่มาของการหาสารอีกตัวเพื่อไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์นี้ไม่ให้เปลี่ยนไปเป็น NO ได้ โดยการเสริม SeNPs ลงในอาหารสามารถลดสารอนุมูลอิสระได้โดยมีการทำงานอย่างรวดเร็ว (Mohapatra et al., 2014; Aparna and Karunakaran, 2016; Skalickova et al., 2017)

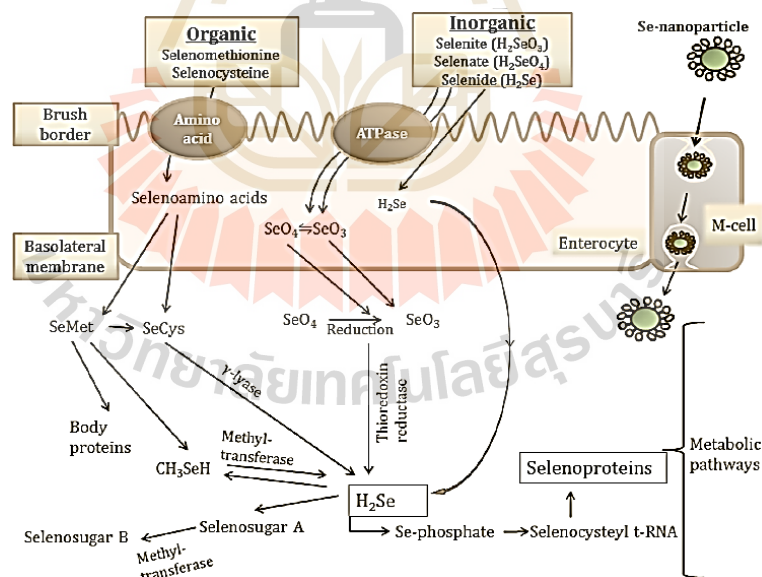
ตารางที่ 2.6 ผลของการฉีด L-arginine ผ่านเปลือกไข่ ต่อประสิทธิภาพการเจริญเติบโตหลังการฟัก

Item	Treatment						P-value	References
	NC	DG	Concentrations of L-Arginine solution (%)					
			0.5	1	2	3		
SEW (g)	70.23	70.31	-	70.25	-	-	0.988	Gao et al. (2017b)
EW (g)	35.10 ^b	34.67 ^b	-	36.63 ^a	-	-	0.023	
EW/SEW (%)	49.79 ^b	49.32 ^b	-	52.14 ^a	-	-	0.033	
Growth performance (1- 7 D)								
FI (g)	124.76	126.87	-	131.07	-	-	0.339	
BWG (g)	99.04 ^b	98.38 ^b	-	105.99 ^a	-	-	0.026	
F/G (g/g)	1.26	1.29	-	1.24	-	-	0.290	
Hatchability (%)	-	81.31 ± 2.23 ^c	-	86.93 ± 1.65 ^b	90.24 ± 3.31 ^a	91.45 ± 2.77 ^a	<0.05	Hazim et al. (2011)
Initial body weight (7 days) (g)	-	19.08 ± 0.80 ^c	-	20.92 ± 0.76 ^b	22.61 ± 0.23 ^a	23.09 ± 0.27 ^a	<0.05	
Final body weight (42 days) (g)	-	221.32 ± 13.50 ^c	-	233.61 ± 11.25 ^b	240.92 ± 16.25 ^a	246.33 ± 19.33 ^a	<0.05	
Feed intake (g)	-	790.12 ± 55.20	-	792.32 ± 60.02	795.01 ± 67.13	799.01 ± 71.38	<0.05	
Body weight gain (g)	-	195.26 ± 22.19 ^c	-	200.41 ± 30.11 ^b	210.91 ± 29.91 ^a	217.87 ± 20.92 ^a	<0.05	
Feed conversion ratio	-	4.04 ± 0.09 ^a	-	3.95 ± 0.04 ^b	3.76 ± 0.06 ^c	3.66 ± 0.02 ^d	<0.05	
Hatchability (%)	90.62 ^a	88.13 ^a	89.37 ^a	89.37 ^a	88.13 ^a	81.25 ^b	0.021	Gao et al. (2017a)
BW (g)								
1 D	42.49	42.20	43.19	43.19	43.64	43.29	0.786	
7 D	147.75 ^b	147.60 ^b	152.87 ^a	152.87 ^a	156.13 ^a	153.50 ^a	0.002	
21 D	777.31	773.39 ^c	820.12 ^a	820.12 ^a	826.93 ^a	798.60 ^b	<0.001	
D 1 to 21								
ADG (g)	34.9 ^b	34.7 ^b	36.8 ^a	36.8 ^a	37.3 ^a	35.9 ^{ab}	<0.001	
ADFI (g)	49.4 ^c	49.2 ^c	52.4 ^a	52.4 ^a	52.9 ^a	50.9 ^b	<0.001	
G:F (g)	0.707	0.707	0.705	0.705	0.704	0.70 ⁶	0.968	

หมายเหตุ: NC, non- injected control group; DG, diluent- injected group (0.75% NaCl solution, wt/vol); Arg, 1% L- arginine solution- injected group (10 g Arg dissolved in 1 litre diluent, wt/vol); SEW, initial set egg weight; EW/SEW, the percentage of EW relative to SEW; FI, feed intake; BWG, body weight gain; F/G, the ratio of FI to BWG. ^{a-c} Means within a row without a common superscript differ significantly (P<0.05).(-) Not show data.

2.4 นาโนซีลีเนียม (Selenium nanoparticles: SeNPs)

ซีลีเนียม (Selenium, Se) จัดอยู่ในกลุ่มแร่ธาตุที่มีคุณสมบัติเป็นโลหะหนัก เป็นแร่ธาตุที่ต้องการในปริมาณน้อย (Trace minerals)) แต่มีบทบาทสำคัญต่อการทำงานของร่างกายเป็นอย่างมากซึ่งช่วยในการทำงานของเซลล์และของเนื้อเยื่อในทุกระบบของร่างกาย โดยเฉพาะระบบหัวใจและหลอดเลือด อีกทั้งยังเป็นสารต้านอนุมูลอิสระโดยเป็นส่วนประกอบของ Glutathione peroxidase (GSH-Px) ที่เป็น Antioxidant enzyme โดย Se เป็นแร่ธาตุรองที่สัตว์ต้องการในปริมาณน้อย แต่หากสัตว์ได้รับในปริมาณที่ไม่เพียงพอต่อความต้องการ ก็อาจส่งผลต่อการเจริญเติบโตและเกิดโรคได้ โดยความต้องการ Se ของ NRC (1994) ระบุว่าไก่ไข่ต้องการ Se 0.06 ppm, เป็ดและไก่กวางต้องการ Se 0.2 ppm ในขณะที่ Leeson and Summer (2005) ระบุว่าความต้องการ Se ของไก่เนื้ออยู่ที่ 0.30 ppm ของอาหาร ซึ่งโดยทั่วไป Se ที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์มีอยู่ 2 ชนิด คือ ซีลีเนียมอินทรีย์ (Organic selenium) ได้แก่ ซีลีเนียมยีสต์ (Selenium yeast) และซีลีเนียมเมทาไธโอนีน (Selenium methionine) เป็นต้น และซีลีเนียมอนินทรีย์ (Inorganic selenium) ได้แก่ ซีลีไนต์ (Selenite) เป็นต้น ในอุตสาหกรรมการผลิตสัตว์ปีกนิยมเสริม Se ในรูปของสารอินทรีย์ เพราะสัตว์สามารถย่อยและเก็บสะสมในเนื้อเยื่อและอวัยวะต่างๆ ได้ดีกว่าในรูปของอนินทรีย์ ดังภาพที่ 2.6

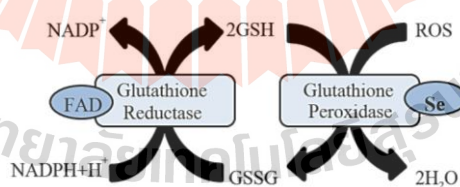


ภาพที่ 2.6 กระบวนการดูดซึม Selenium ในรูปแบบที่ต่างกัน

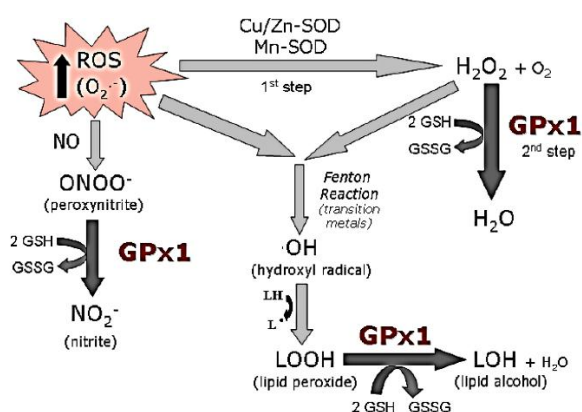
ที่มา: Oropeza-Moe et al. (2015)

จากภาพที่ 2.6 พบว่า SeNPs สามารถดูดซึมได้ง่าย และสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างรวดเร็ว โดย SeNPs ที่มีขนาดนาโน (100-500 นาโนเมตร) มีความสามารถในการใช้ประโยชน์ได้สูง และความเป็นพิษต่ำกว่าเมื่อเทียบกับรูปแบบซีลีเนียมอื่นๆ (Gulyas et al., 2017) โดยพบว่าไก่ที่ได้รับ SeNPs ในปริมาณ 0.15 mg/kg มีความเข้มข้น Se ในซีรัม กล้ามเนื้อ และตับสูงขึ้น อีกทั้งยังสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการต้าน Oxidant capacity ได้อีกด้วย (Hu et al., 2012) แต่อย่างไรก็ตามตามรูปแบบการดูดซึมของอนุภาคยังขึ้นอยู่กับรูปแบบของการสังเคราะห์อีกด้วย เพราะการนำสารเข้าสู่เซลล์จะต้องอาศัยตัวพา (Carrier) โดยชนิดของตัวพาจะขึ้นอยู่กับวิธีการสังเคราะห์ด้วย ซึ่งการสังเคราะห์แบ่งเป็น 3 กระบวนการ คือ Physical methods, Chemical synthesis และ Biological synthesis โดยวิธีการ Biological synthesis จะนิยมสังเคราะห์เนื่องจากแหล่งที่มาใช้ได้ง่าย มีความเป็นพิษน้อย และมีความสำคัญทางเภสัชวิทยา โดยใช้จุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรียและเชื้อรา ที่มีต้นกำเนิดจากพืชเพียงเล็กน้อยเท่านั้น โดยแต่ละชนิดก็จะสังเคราะห์ได้ขนาดของอนุภาคแตกต่างกันไป

นอกจาก Se จะมีบทบาทต่อเซลล์แล้ว ยังมีบทบาทเป็นสารต้านอนุมูลอิสระอีกด้วย โดยรายงานของ Alizadeh et al. (2012) พบว่าการเสริม Se สามารถยับยั้งการทำงานของ NOS (Nitric oxide synthase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เปลี่ยน L-arg เป็น NO จึงส่งผลให้มี NO ลดลงด้วย โดยเมื่อ NO เกิดการรวมตัวกับน้ำ (H_2O) จะเกิดเป็น Peroxynitrite ($ONOO^-$) ซึ่งสารนี้จะไปทำลายโครงสร้างของ DNA ทำให้เกิดการเสื่อมสลายของเซลล์ โดยหลักการทำงานของ Se จะเป็นตัว Active site แรกเริ่มของเอนไซม์ Glutathione peroxidase (GPx: GPx1) ซึ่งเป็น Antioxidant enzyme ซึ่งจัดเป็น Selenoenzyme โดยจะพบที่บริเวณ Cytoplasm และใน Mitochondria ดังสมการ



ซึ่งในแรกเริ่มเอนไซม์ GPX จะอยู่ในรูปของ Enzyme + Selenol (E-SeH) จะทำให้ตัวเอนไซม์เปลี่ยนรูปเป็น Enzyme + Selenic acid (E-SeOH) ในขั้นถัดไปต้องอาศัยการทำงานของสาร Glutathione (GSH) เข้ามาช่วยเพื่อเปลี่ยน Enzyme + Selenenyl sulfide (E-SeSG) อยู่ในรูปที่พร้อมทำงาน โดยได้ผลิตภัณฑ์คือ Glutathione disulfide (GSSG) และทำการเปลี่ยนสาร Hydroxy peroxide (H_2O_2) ให้เป็น H_2O ดังภาพที่ 2.7



ภาพที่ 2.7 กลไกการทำงานของ Antioxidant enzyme

ที่มา: Haan (2011)

จากข้างต้นที่กล่าวไว้ว่า Se มีบทบาทกับร่างกายเป็นอย่างมาก ซึ่งในการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยสนใจที่จะศึกษารผ่านเปลือกไข่โดยใช้ L-arg เป็นตัวกระตุ้นการสร้างกล้ามเนื้อ ซึ่งโดยปกติภายในไข่จะมีกระบวนการการเผาผลาญในร่างกายให้ได้พลังงานแต่มีผลิตภัณฑ์ที่เป็นอนุมูลอิสระคือ Nitric oxide (NO) ซึ่งถ้ามีในปริมาณมากจะเกิดผลเสียต่อร่างกายของสัตว์ได้ จึงเป็นอีกหนึ่งเหตุผลที่เมื่อมีมากเกินไปความต้องการของเซลล์จะเกิดผลเสียต่อกล้ามเนื้อ จึงจำเป็นต้องใช้ Se มาเสริมในรูปแบบของ SeNPs เพื่อช่วยให้เกิดประสิทธิภาพในการสร้างกล้ามเนื้อของไก่โคราชให้ได้สูงขึ้น แต่อย่างไรก็ตาม การศึกษาการเสริม SeNPs ต่อการต้านอนุมูลอิสระโดยการฉีดผ่านเปลือกไข่ยังมีงานวิจัยน้อยมาก จึงได้ทำการทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้องกับการเสริมในอาหารสัตว์เป็นข้อมูลเบื้องต้น ดังที่ได้กล่าวในหัวข้อถัดไป

2.4.1 ผลของการเสริม SeNPs ในอาหาร ต่อการทำงานของ Antioxidant enzyme และประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของสัตว์ปีก

ในปัจจุบันการศึกษาด้านอนุมูลอิสระมีความจำเป็นอย่างยิ่ง เนื่องจากจากปัจจัยของสภาพอากาศที่มีความร้อนสูงทำให้สัตว์เกิดความเครียดจึงทำให้มีการเจริญเติบโตที่ลดลง ซึ่งจากกลไกการทำงานของ Se ที่กล่าวไว้ข้างต้น จึงเป็นที่มาของการเสริม SeNPs เพื่อศึกษาคุณค่าการต้านอนุมูลอิสระ โดยพบว่า การเสริม SeNPs ขนาด 30-100 nm ที่ระดับ 0.1125 ppm ในอาหาร ช่วยเพิ่มการทำงานของ Catalase (CAT), Glutathione peroxidase (GSH-Px) และ SOD (Super oxide dismutase) มากขึ้น โดยทำให้เกิดการเสื่อมสภาพของลิพิดอันเนื่องมาจากกระบวนการออกซิเดชัน (Lipid Peroxidation) ลดลง ดังตารางที่ 2.7

ตารางที่ 2.7 ผลของการเสริม SeNPs ในอาหารต่อการทำงานของ Antioxidant enzyme ของสัตว์ปีก

Treatment (mg/kg)	Enzyme				References
	CAT ¹	GSH-Px ²	SOD ³	LP ⁴	
Control	213.00 ± 5.0 ^d	2,013.94 ± 11.38 ^d	7.35 ± 0.15 ^e	-	Mohapatra
Sodium selenite 0.3	279.91 ± 2.68 ^c	2,193.26 ± 60.57 ^d	11.70 ± 0.84 ^e	-	et al. (2014)
SeNPs 0.075	326.15 ± 6.07 ^c	4,622.50 ± 135.66 ^c	26.06 ± 1.83 ^d	-	
SeNPs 0.15	367.91 ± 10.38 ^b	6,407.83 ± 174.98 ^b	67.67 ± 2.35 ^a	-	
SeNPs 0.3	351.89 ± 10.39 ^b	6,756.28 ± 129.00 ^{ab}	41.44 ± 1.42 ^c	-	
SeNPs 0.6	381.19 ± 10.69 ^a	7,084.25 ± 151.33 ^a	57.22 ± 1.63 ^b	-	
Se-CP 0.15	-	1,096.33 ± 0.17 ^b	41.73 ± 0.88 ^b	3.64 ± 0.05 ^b	Aparna and
SeNPs 0.075	-	1,130.00 ± 0.25 ^b	43.91 ± 1.26 ^b	3.64 ± 0.17 ^b	Karunakaran
SeNPs 0.1125	-	1,209.67 ± 0.18 ^c	43.43 ± 0.98 ^b	3.62 ± 0.03 ^b	(2018)
SeNPs 0.1875	-	1,283.33 ± 0.27 ^d	48.11 ± 1.00 ^c	3.10 ± 0.09 ^a	
SeNPs 0.225	-	1,096.33 ± 0.13 ^{ab}	37.76 ± 1.16 ^a	4.09 ± 0.11 ^c	

หมายเหตุ: ^{a-d} Means in the same column with different letters are significantly different (P<0.05). ¹CAT (Catalase) moles of H₂O₂/moles of Heme/min, ²GSH-Px (Glutathione peroxidase) moles of NADPH₂/moles of Heme/min Units/ml, ³SOD (Super oxide dismutase) ¹ Unite/moles of Heme inhibition rate%, ⁴LP(Lipid Peroxidation (Malondialdehyde)) Nmole/ µl, (-) Not show data.

จากข้อมูลในข้างต้นสอดคล้องกับการศึกษาการเสริม SeNPs ขนาดตั้งแต่ 60-220 nm ที่พบว่า การเสริมสารที่ระดับสูงขึ้นไปมีผลต่อการส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ที่บริเวณเซลล์ตับแลซึ่มมากขึ้น (Zhou and Wang, 2011) โดยที่ภายในร่างกายของสัตว์ทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพและจะแสดงลักษณะที่ปรากฏออกมาคือประสิทธิภาพการเจริญเติบโต ซึ่งสอดคล้องกันโดยเมื่อเพิ่มระดับการเสริม SeNPs มากขึ้น ส่งผลให้น้ำหนักสุดท้าย ประสิทธิภาพการใช้อาหาร และอัตราการรอดชีวิตสูงขึ้นด้วย ดังตารางที่ 2.8

2.4.2 ผลของการเสริม Selenium และ SeNPs ในอาหาร ต่อสมรรถนะการเจริญเติบโตของสัตว์ปีก

จากการศึกษาการเสริม SeNPs ในอาหารสัตว์ปีกนั้นสามารถปรับปรุงประสิทธิภาพการเจริญเติบโตได้ โดยจากการศึกษาพบว่าในปัจจุบันยังมีงานวิจัยที่ศึกษาการฉีด SeNPs ผ่านเปลือกไข่น้อยมาก แต่อย่างไรก็ตามมีงานวิจัยที่ฉีดด้วย Se ที่มีขนาดอนุภาคทั่วไป ทำการฉีดในวันที่ 18 ของระยะฟักที่บริเวณ Amniotic cavity มีผลต่อการเพิ่มระบบภูมิคุ้มกัน และการทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระในไก่หลังการฟักออก อีกทั้งการฉีดด้วย SeNPs ไม่เป็นอันตรายต่อตัวอ่อน และเพิ่ม

สมรรถนะการเจริญเติบโตหลังจากการฟักของไก่ได้ดังรายงานผลในตารางที่ 2.9

ตารางที่ 2.8 ผลของการเสริม SeNPs ในอาหารต่อสมรรถนะการเจริญเติบโตของสัตว์ปีก

Treatment (mg/kg)	Performance				References
	Initial BW (g)	Final BW (g)	FCR	Survival rate (%)	
Broiler					Zhou and Wang (2011)
Control	31.1 ± 1.4 ^a	740 ± 31 ^a	3.31 ± 0.08 ^a	56.67 ± 3.34 ^a	
SeNPs 0.1	30.8 ± 2.4 ^a	869 ± 31 ^b	3.11 ± 0.09 ^b	93.33 ± 3.34 ^b	
SeNPs 0.3	31.0 ± 1.6 ^a	1,169 ± 53 ^c	2.89 ± 0.07 ^c	95.56 ± 1.93 ^b	
SeNPs 0.5	31.0 ± 1.9 ^a	1,170 ± 56 ^c	2.90 ± 0.07 ^c	96.67 ± 0.00 ^b	
Layer grower					Mohapatra et al. (2014)
Control	565.33 ± 6.97 ^c	1,208.00 ± 6.64 ^c	6.49 ± 0.08 ^a	-	
Sodium selenite 0.3	599.00 ± 4.80 ^c	1,310.00 ± 8.40 ^d	5.52 ± 0.30 ^c	-	
SeNPs 0.075	596.00 ± 3.56 ^b	1,421.58 ± 7.20 ^c	5.23 ± 0.05 ^d	-	
SeNPs 0.15	634.66 ± 6.51 ^a	1,515.41 ± 7.17 ^a	4.73 ± 0.08 ^c	-	
SeNPs 0.3	593.40 ± 8.30 ^b	1,468.41 ± 10.91 ^b	4.69 ± 0.10 ^c	-	
SeNPs 0.6	572.83 ± 7.27 ^c	1,298.38 ± 14.91 ^d	6.04 ± 0.08 ^b	-	

หมายเหตุ: ^{a-c} Means in the same column with different letters are significantly different (P<0.05). DWG = daily BW gain; FCR = feed conversion ratio. Results are presented as means ± SD of triplicate observations.
(-) Not show data.

ตารางที่ 2.9 ผลของการเสริม Selenium และ SeNPs ในอาหาร ต่อสมรรถนะการเจริญเติบโตของสัตว์ปีก

Treatment	Doses	Stage	Key finding	References
Non-nanoparticle				
Control (SSO): Phosphate-buffered saline (PBS) SS10: Na ₂ SeO ₃ 10 µg SS20: Na ₂ SeO ₃ 20 µg	100 µL	18 th into amniotic cavity	-The SS10 and SS20 groups also showed increased serum antibody levels. Se into the amniotic cavity of developing eggs may be beneficial for enhancing immune and antioxidant responses in the hatched chickens (p<0.05).	Lee et al. (2014b)
Control (BTO): PBS BT20: B-Traxim Se (BT) 20 µg BT40: BT 40 µg	100 µL	18 th into amniotic cavity	-Se-containing protein hydrolysate enhanced protection against experimental NE possibly by altering the expression of proinflammatory and anti-oxidant genes (P<0.05).	Lee et al. (2014a)
Nanoparticle				
Normal saline (control) SeNPs 0.075 µg/egg SeNPs 0.15 µg/egg SeNPs 0.225 µg/egg SeNPs 0.3 µg/egg	500 µL	18 th into amniotic cavity	-In ovo feeding of SeNPs through amniotic route does not harm the developing embryo, does not affect hatchability. Can be used to improve the post-hatch performance of broiler chicken (P<0.05).	Joshua et al. (2016)

2.4.3 ผลของการเสริม Selenium และ SeNPs ในอาหาร ต่อคุณภาพเนื้อของไก่เนื้อ

จากการศึกษาผลของการเสริม Se และ SeNPs ต่อประสิทธิภาพการผลิต พบว่าการฉีดสารอาหารไปในวันที่ 18 ของระยะฟักจะมีผลต่อสัตว์ในระยะยาว ซึ่งเป็นผลมาจากร่างกายสัตว์สามารถเก็บสะสมไว้ภายในเซลล์เพื่อเป็นสารตั้งต้นในการใช้ดำรงชีวิต คุณภาพเนื้อจึงเป็นอีกพารามิเตอร์ในการบ่งบอกถึงการใช้ประโยชน์ได้ของ Se และ SeNPs โดยการศึกษาการเสริม SeNPs ขนาด 10-80 nm ในอาหารไก่ต่อคุณภาพเนื้อ พบว่า การเสริม SeNPs ที่ระดับเพิ่มขึ้นตั้งแต่ 0.1-2.0 ppm ของอาหารทั้งหมดสามารถลดค่าการสูญเสียเนื่องจาก การเก็บ (Drip loss) (Zhou and Wang, 2011; Cai et al., 2012) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก Se มีความสำคัญในการต้านการเกิดอนุมูลอิสระ เมื่อร่างกายของสัตว์เกิดออกซิเดชันมากขึ้นจะมีผลทำให้โปรตีนภายในเซลล์เกิดการเสียหาย รวมไปถึงเยื่อหุ้มเซลล์ด้วย โดย Se จะเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่พบได้ทั้งภายในและนอกเซลล์ จึงเป็นตัวช่วยในการลดการเสียหายของเซลล์ จึงลดการสูญเสียของเนื้อได้ (Huff-Lonergan and Lonergan,

2005) ซึ่งยังสอดคล้องกับการเสริม Se-yeast ในอาหารที่เป็น Se อินทรีย์ (Markovic et al., 2018b)

อีกทั้งยังมีการศึกษาถึงการเพิ่มขึ้นของ Inosine monophosphate (IMP) ซึ่งเป็นนิวคลีโอไทด์องค์ประกอบหลักที่แสดงถึงความอโรยหรือรสชาติของเนื้อ (Chen et al., 2002) ซึ่งพบว่าการเสริม SeNPs ที่สูงขึ้นส่งผลทำให้ IMP ในเนื้อไก่เพิ่มสูงขึ้น (Cai et al., 2012) เนื่องจาก SeNPs สามารถดูดซึมได้ง่าย และไปทำงานร่วมกับเอนไซม์ GSH-Px โดยเปลี่ยนสาร Hydro peroxide (H_2O_2) ให้เป็น H_2O (Gulyas et al., 2017) ซึ่งออกซิเจนที่ได้จากน้ำจะนำไปใช้ในกระบวนการสังเคราะห์ IMP การเสริม SeNPs จึงมีผลทำให้ IMP เพิ่มขึ้น โดยที่ไม่มีผลต่อคุณภาพเนื้ออื่นๆ (ตารางที่ 2.10) การศึกษาข้างต้นพบว่าการใช้เทคนิคนี้จึงเหมาะสมในการที่จะนำสารอาหารไปให้โดยตรงต่อการพัฒนาของกล้ามเนื้อตัวอ่อน

2.5 เทคนิคการฉีดสารผ่านเปลือกไข่ (In Ovo injection technique, In Ovo feeding, IOF)

วิธีการฉีดสารผ่านเปลือกไข่ เริ่มมาภายในปี ค.ศ. 1982 ได้มีการนำเทคนิคนี้มาใช้ในวงการปศุสัตว์ โดยใช้ในการฉีดวัคซีนโรคมาร์กซ์ (MD) ซึ่งทำการฉีดวัคซีนผ่านเปลือกไข่ในวันที่ 18 ของระยะฟัก ซึ่งสามารถป้องกันและต้านความรุนแรงของโรคมาร์กซ์ได้ดีเมื่อเทียบกับการฉีดเมื่ออายุ 7 วันหลังการฟัก โดยการฉีดนั้นจะต้องคำนึงถึงตำแหน่งในการฉีดด้วย ในปัจจุบันเทคนิคนี้ได้ถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมสัตว์ปีก โดยสามารถพัฒนาเครื่องฉีดสารผ่านเปลือกไข่ได้ 70,000 ฟองต่อชั่วโมง สามารถฉีดวัคซีนไปยังบริเวณต่างๆ ของไข่ที่เกี่ยวกับการพัฒนาการของตัวอ่อน ได้แก่ เซลล์อากาศ (Air sac), แอนแดนทอยส์ (Allantois), ถุงน้ำคร่ำ (Amniotic sac), ตัวอ่อน (Embryo) และถุงไข่แดง (Yolk sac) โดยมีการศึกษาพบว่าการฉีดวัคซีนผ่านเปลือกไข่นั้นจะฉีดผ่านเซลล์อากาศของเปลือกไข่ (Pore) ด้วยหัวเข็มฉีดปลายทื่อ (เส้นผ่านศูนย์กลาง 1.27 mm) หัวเข็มจะเจาะไปจนถึงไข่ขาว ถุงน้ำคร่ำ หรือถุงไข่แดง ปริมาณ 0.1-1.0 ml/egg เมื่อให้สารถูกส่งไปในบริเวณถุงน้ำคร่ำซึ่งหุ้มตัวอ่อนไว้ ดังนั้นตัวอ่อนจึงสามารถได้รับสารอาหารโดยตรงก่อนที่จะฟักภายหลังจากการฉีดประมาณวันที่ 19 ของระยะฟัก (Fabio, 2008; Zhai et al., 2011) แต่อย่างไรก็ตามยังมีปัจจัยอื่นที่ควรพิจารณาเพิ่มเติม เช่น สารอาหารตำแหน่งการฉีดและวันในการฉีด เป็นต้น ซึ่งจะเห็นได้ว่าการฉีดสารอาหารจำพวกวิตามินจะถูกฉีดผ่านถุงไข่แดงในวันที่ 11-17 ของตัวอ่อน และการฉีดอนุภาคนาโนจะฉีดผ่านช่องอากาศในวันที่ 1 ของตัวอ่อน (ดังตารางที่ 2.11) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการฉีดสารผ่านเปลือกไข่ไม่ได้จำเพาะต่อตำแหน่ง และเวลาในการฉีด แต่ขึ้นอยู่กับปัจจัยภายในตัวอ่อนมากกว่า อาทิเช่น ยีนที่มีผลต่อการควบคุมกลไกการทำงานในช่วงของตัวอ่อน ซึ่งวิธีนี้อาจเป็นการเพิ่มระดับความสามารถการแสดงออกของยีน โดยอาศัยช่องว่างผ่านการควบคุมด้วยกระบวนการเหนือพันธุกรรมที่เรียกว่า Epigenetics นั่นเอง

ตารางที่ 2.10 ผลของการเสริม Selenium และ SeNPs ในอาหารต่อคุณภาพเนื้อไก่

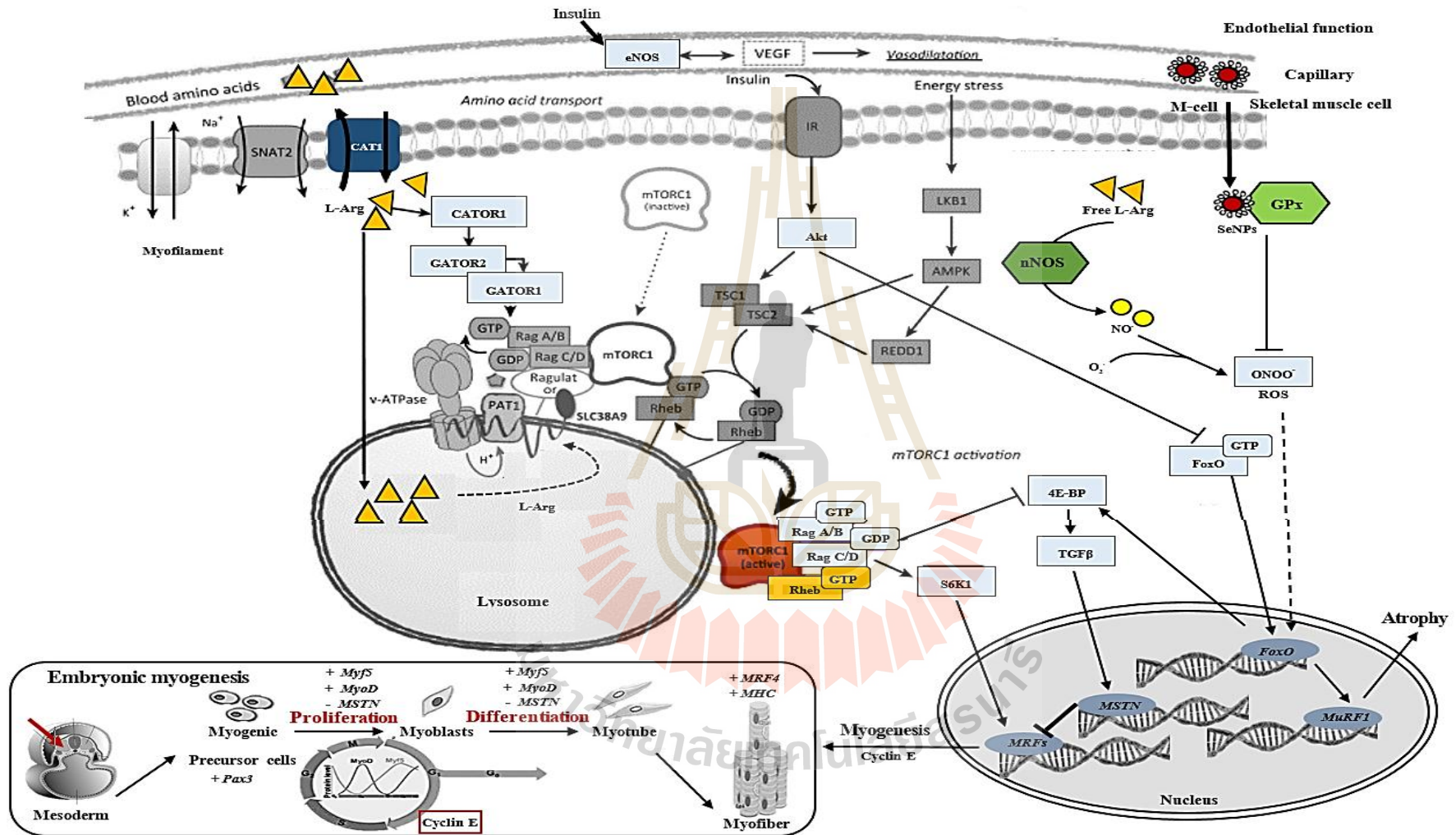
Breed	Source	Treat ment	Size (nm)	Meat quality					Reference
				Drip loss	Inosine 5'-monophosphate (IMP) content	Meat color			
						L* (lightness)	a* (redness)	b* (yellowness)	
Commercial Native (Guangxi Yellow)	SeNPs	Control 0.1 mg/kg 0.3 mg/kg 0.5 mg/kg	20-60		-	-	-	Zhou and Wang (2011)	
Arbor Acres (male)	SeNPs	0.0 mg/kg 0.3 mg/kg 0.5 mg/kg 1.0 mg/kg 2.0 mg/kg	80	3.42 ^a 3.22 ^b 3.10 ^b 3.08 ^b 3.06 ^b	-	38.60 38.73 38.81 38.72 38.91	9.30 9.55 9.25 9.26 9.35	13.33 13.45 13.42 13.03 13.10	Cai et al. (2012)
Cobb 500 (Mixed sex)	Se-yeast	Control 0.3 mg/kg 0.6 mg/kg 0.9 mg/kg	-	64.80 ^A 64.11 ^A 66.54 ^B 66.14 ^B	-	-	-	-	Markovic et al. (2018a)

หมายเหตุ: ^{A-B} Means within a row without a common superscript differ significantly (P<0.01). ^{a-c} Means within a row without a common superscript differ significantly (P<0.05).(-) Not show data.

ตารางที่ 2.11 ผลของการศึกษาการฉีดสารผ่านเปลือกไข่

Embryonic stage	Substances	Concentration	Type of exposure	References
1	Nanoparticles: hydrocolloids Ag hydrocolloids Au	50 mg/kg	Air sac	Pineda et al. (2012)
3	Hormone: IGF-I	100 µg	Albumen	Kocamis et al. (1998)
7	Amino acid composition	53 mg/0.5 ml	Air sac	Ohta et al. (2001)
11	Folic acid	150 µg	Yolk sac	Shizhao et al. (2016)
14	Vitamins: A, E, C, B1, B6	A (100UI), E (0.5 UI), C (50 mg), B1 (100g), B6 (100g)	Yolk sac	Goel et al. (2013)
	Vitamin: E	E (15 mg and 30 mg)		Salary et al. (2014)
17.5	Probiotics: Enterococcus faecium Bacillus subtilis	5×10 ⁹ cfu/egg 5×10 ¹² cfu/egg	Amniotic	Oliveira et al. (2014)
18	Antibiotics	-	Amnion	McReynolds et al. (2000)
	Carbohydrates: glucose, fructose, sucrose, maltose and dextrin	0.25 mg	Amnion	Zhai et al. (2011)

หมายเหตุ: (-) หมายถึง ข้อมูลยังไม่ชัดเจน



ภาพที่ 2.8 กระบวนการทำงานของสารอาหารต่อกระบวนการสร้างกล้ามเนื้อ

จากที่กล่าวมาข้างต้นแสดงให้เห็นถึงผลของสารอาหารที่มีต่อการเพิ่มการทำงานของกระบวนการสร้างกล้ามเนื้อในร่างกายสัตว์ สรุปรูปการทำงานดังภาพที่ 2.8 ซึ่งการจะกระตุ้นการสร้างเซลล์กล้ามเนื้อในระยะก่อนฟักมีปัจจัยหลายปัจจัยที่ควบคุม โดยปัจจัยทางด้านอาหารมีความจำเป็นอย่างยิ่งต่อการกระตุ้นการพัฒนาของกล้ามเนื้อในช่วงระยะเวลาสั้น L-arg เป็นกรดอะมิโนที่มีความจำเป็นต่อสัตว์ปีก และสามารถกระตุ้นการสร้างกล้ามเนื้อในตัวอ่อนได้ แต่อย่างไรก็ตามการที่ได้รับในปริมาณที่มากเกินไปจะทำให้เกิดผลเสียต่อร่างกายของสัตว์ได้เช่นกัน จึงควรเสริมร่วมกับ SeNPs ที่มีอนุภาคขนาดเล็ก สามารถผ่านเข้าไปในเซลล์ได้อย่างรวดเร็ว และมีบทบาทในการต้านอนุมูลอิสระในร่างกายที่เกิดจากกระบวนการเผาผลาญพลังงาน จึงเป็นเหตุที่ต้องเสริมร่วมกันเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการสร้างกล้ามเนื้อ อีกทั้งยังมีการศึกษาใน *MSTN* ที่เป็นตัวหลักในกระบวนการสร้างกล้ามเนื้อด้วย และรวมไปถึงการศึกษาการทำงานของ GSH-Px เป็น Antioxidant enzyme ที่มี Se เป็นตัวกระตุ้นการทำงาน ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะศึกษาผลของการฉีด L-arg และ SeNPs ผ่านเปลือกไข่ ศึกษาการสร้างกล้ามเนื้อในระยะก่อนและหลังฟัก รวมไปถึงการแสดงผลออกของยีน *MSTN* บริเวณเนื้ออก และสะโพก เพื่อศึกษาถึงคุณภาพเนื้อ สมรรถภาพการเจริญเติบโต และการต้านอนุมูลอิสระของไก่โคราช แต่อย่างไรก็ตามในปัจจุบันมีข้อกำหนดเกี่ยวกับการใช้นาโนในอาหารสัตว์สู่อาหารมนุษย์อันเป็นสาเหตุก่อให้เกิดโทษได้ จึงต้องศึกษาความเป็นพิษในระดับเซลล์ด้วย

2.6 การศึกษาด้านพิษวิทยาของอนุภาคนาโน (Toxicology study)

ปัจจุบันการศึกษาถึงอันตรายของอนุภาคนาโนข้อมูลส่วนใหญ่ได้จากการศึกษาในเซลล์สิ่งมีชีวิตและสัตว์ทดลอง โดยอนุภาคนาโนสามารถเข้าสู่ร่างกายได้ 3 ทางคือ ทางการหายใจ (Inhalation) ทางผิวหนัง (Dermal contact) และการกิน (Oral) ซึ่งความเป็นพิษและความเป็นอันตรายของอนุภาคนาโนที่สังเคราะห์ (Engineered nanoparticles: ENP) ขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของนาโนนั้นๆ เป็นหลัก โดยความเป็นพิษของอนุภาคนาโนจะสูงกว่าอนุภาคที่มีขนาดใหญ่ที่เป็นสารเดียวกัน ทั้งนี้เนื่องจากอนุภาคนาโนมีพื้นที่ผิวมากสามารถเข้าสู่เซลล์และอวัยวะต่างๆ ได้มากและลึกกว่า จึงส่งผลให้อันตรายมากกว่าด้วย ดังนั้นสหภาพยุโรปในปัจจุบันได้ออกกฎระเบียบเกี่ยวข้องกับอาหารที่ผลิตขึ้นด้วยนวัตกรรมใหม่ (Novel food) ฉบับใหม่ เมื่อวันที่ 11 ธันวาคม 2558 ภายใต้การดูแลของ European Food Safety Authority (EFSA) ระบุว่า อาหารที่มีส่วนประกอบของวัสดุนาโน (Nanomaterial) จะต้องไม่มีความเสี่ยงต่อสุขภาพของผู้บริโภค โดยจะต้องมีหลักฐานยืนยันทางวิทยาศาสตร์ด้านความปลอดภัย (Hardy et al., 2018) ในปัจจุบันมีงานวิจัยจำนวนหนึ่งที่ศึกษาความเป็นพิษเกี่ยวกับการใช้ SeNPs ในสัตว์ พบว่ามีความสามารถในการใช้ประโยชน์ได้สูงและความเป็น

พิษต่ำกว่าเมื่อเทียบกับรูปแบบ Selenomethionine (Organic form) (Wang et al., 2007; Gulyas et al., 2017) ดังตารางที่ 2.12

ตารางที่ 2.12 การศึกษาความเป็นพิษของ SeNPs ในสัตว์

Animal study	Size (nm)	Key finding	References
Male Kunming mice (body weight 22-24 g)	20 - 60	- SeNPs can serve as an antioxidant with reduced risk of selenium toxicity, when comparison with selenomethionine.	Wang et al. (2007)
Male NMRI mice (body weight 22 ± 2 g)	80 - 220	-The biogenic SeNPs were less toxic than synthetic SeNPs and much less (26-fold) toxic than the SeO_2 , which demonstrates the important role of <i>Bacillus sp.</i> MSh-1 in conversion of a highly toxic Se compound to the less toxic SeNPs.	Shakibaie et al. (2013)
Female Wistar Hannover Galas rats (4 weeks, weight 132 ± 15 g)	10 - 80	-Elemental selenium nanoparticles and selenite, both forms of Se were equally absorbed, distributed, metabolized and excreted, but the detailed mechanism of the fate of the administered elemental Se or selenite in the gastro-intestinal tract of rats remains unclear.	Loeschner et al. (2014)
Female Wistar rats	10 - 80	-Putative identified metabolites included increased decenedioic acid and hydroxydecenedioic acid for both Se formulations whereas dipeptides were only increased for selenite. These effects could reflect altered fatty acid and protein metabolism, respectively.	Hadrup et al. (2016)
Cobb 500 broiler (42 days)	100 - 500	-Selenium supplementation may influence the metabolism of fatty acids and carbohydrates and antioxidant system, and increase the quantity of cytoskeletal actin and the expression of actin regulatory protein as well.	Gulyas et al. (2017)
Fish (<i>P.hypophthalmus</i>) (weight 3.95 ± 0.75 g)	206.6	-Essential trace element in both forms (inorganic and nano) at higher concentration in acute exposure of Se and Se-NPs led to pronounced deleterious alteration on histopathology and cellular and metabolic activities of <i>Pangasius hypophthalmu</i> .	Kumar et al. (2018)

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย และการเก็บข้อมูล

3.1 สิ่งทดลอง และแผนการทดลอง

3.1.1 สิ่งทดลอง

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ไข่ไก่โคราช ที่ได้จากผสมพันธุ์ระหว่างไก่พ่อพันธุ์เหลืองหางขาว (อายุตั้งแต่ 35 สัปดาห์ขึ้นไป) กับไก่แม่พันธุ์ มทส. (อายุตั้งแต่ 28 สัปดาห์ขึ้นไป) ในอัตราส่วนการผสมพันธุ์ 1:5 ไข่ทุกฟองมีน้ำหนักไข่เฉลี่ย 48.75 ± 0.12 กรัม หลังจากนั้นทำการเก็บไข่ไว้ในห้องเย็นอุณหภูมิประมาณ $12-14^{\circ}\text{C}$ จนได้จำนวนตามที่ต้องการ จากนั้นนำไข่ทุกฟองเข้าสู่ฟักไข่ (Model: Petersime nv, Centrumstraat 125-9870 Zulte (Olsene), Belgium) อุณหภูมิ $37.67 \pm 0.20^{\circ}\text{C}$ ความชื้นสัมพัทธ์ 62-65% ในวันที่ 18 ของการฟัก นำไข่ออกมาส่องเพื่อทำการแยกไข่มีเชื้อจำนวน 960 ฟอง (คิดจากอัตราการฟักออก 80%) จากนั้นเริ่มจัดเข้างานทดลองเพื่อฉีดสารอาหารผ่านเปลือก (In ovo feeding technique: IOF) เริ่มจากการเจาะรูเปลือกไข่ด้วยเข็มเบอร์ 22-gauge จากนั้นใช้เข็มเบอร์ 27-gauge ฉีดสารผ่านเปลือกไข่ ใช้ไฟฉายส่องตำแหน่งไปยังบริเวณถุงน้ำคร่ำ (Amnion) จากเปลือกไข่ประมาณ 10 mm (Azhar et al., 2016) โดยฉีดปริมาณ 0.5 ml/egg (ขึ้นอยู่กับน้ำหนักไข่) หลังจากนั้นทำการปิดรูเปลือกไข่โดยเช็ดด้วยแอลกอฮอล์เพื่อฆ่าเชื้อ แล้วปิดรูที่ไข่ด้วยพาราฟิน (ภาคผนวก ก.2, 3) จากนั้นนำไข่ทั้งหมดที่ผ่านการฉีดสารกลับเข้าสู่ตู้ฟัก (กระบวนการฉีดไข่ทั้งหมดเสร็จสิ้นภายใน 2 ชั่วโมง รวมทั้งไข่ควบคุมที่ไม่มีการฉีด) ที่อุณหภูมิ $37.67 \pm 0.20^{\circ}\text{C}$ ความชื้นสัมพัทธ์ 62-65% จนถึงอายุ 21 วัน ทำการฟักเป็นลูกไก่ โดยลูกไก่ที่เกิดจะต้องถูกชั่งน้ำหนักทุกตัวแล้วแบ่งเป็น 16 หน่วยทดลองโดยมีน้ำหนักเฉลี่ยเท่ากัน

3.1.2 แผนการทดลอง

ใช้แผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) โดยจัดแบ่งตามน้ำหนักของไข่เป็น 4 กลุ่มๆ ละ 4 ซ้ำๆ ละ 60 ฟอง ดังนี้

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม Non-injection (NC)

กลุ่มที่ 2 ไข่ที่ได้รับการฉีด L-arg 1.00% (5 mg/egg) ผ่านเปลือกไข่ (IOF-1)

กลุ่มที่ 3 ไข่ที่ได้รับการฉีด SeNPs 0.3 $\mu\text{g}/\text{egg}$ ผ่านเปลือกไข่ (IOF-2)

กลุ่มที่ 4 ไข่ที่ได้รับการฉีด L-arg 1.0%+SeNPs 0.3 $\mu\text{g}/\text{egg}$ ผ่านเปลือกไข่ (IOF-3)

หมายเหตุ: กลุ่มที่ 2-4 ต้องผสมกับ 0.75% NaCl

3.2 การเตรียมสารละลาย และอาหารทดลอง

3.2.1 การเตรียมสารละลายในการฉีดไข่

ทำการเตรียม L-arg 1.0% โดยใช้ L-arg (L-arginine, A5006 reagent grade, $\geq 98\%$: Sigma-Aldrich) 10 กรัม ต่อ 0.75% NaCl* diluent 1 ลิตร (*7.5 g NaCl dissolved in 1 liter sterile distilled water) (Gao et al., 2017a, b)

ทำการเตรียม SeNPs ให้มีขนาด 20-30 nm โดยการสังเคราะห์แบบ A novel one-pot green synthesis จาก Bovine serum albumin (BSA) โดยวัดขนาดและรูปร่างของอนุภาคด้วย Scanning Electron Microscopic (SEM: JEOL JSM 7800F (Carl zeiss Auriga, Germany) และ Energy Dispersive Spectroscopy (EDS: United Kingdom) (Zhanga et al., 2001; Zhou and Wang, 2011; Kalishwaralal et al., 2014; Mohapatra et al., 2014) ดังอธิบายในภาคผนวก ก.1

3.2.2 อาหารสำหรับเลี้ยงสัตว์ทดลอง

ใช้อาหารทดลองทางการค้าบริษัท ซีพี (ประเทศไทย) จำกัด (มหาชน) ที่มีระดับพลังงาน โปรตีนเท่ากัน และมีองค์ประกอบของโภชนาเพียงพอกับความต้องการของไก่โคราชแต่ละช่วงอายุ ดังนี้ ไก่อายุ 0-3 สัปดาห์ โปรตีนไม่ต่ำกว่า 21% (ไฮโปรไวท์510), ไก่อายุ 3-6 สัปดาห์ โปรตีนไม่ต่ำกว่า 19% (ซีพี911) และไก่อายุ 6-9 สัปดาห์ โปรตีนไม่ต่ำกว่า 17% (ซีพี913) โดยในแต่ละ Treatment แบ่งออกเป็น 4 ซ้ำๆ ละ 40 ตัว รวมทั้งหมด 640 ตัว ในแต่ละคอกใช้ความหนาแน่น 6 ตัวต่อตารางเมตร ใช้แกลบเป็นวัสดุรองพื้น ให้อาหารแบบเต็มที (*ad libitum*) มีน้ำสะอาดให้กินตลอดเวลา (ภาคผนวก ก.4) และได้รับวัคซีนตามเวลาที่กำหนด (ตารางที่ 3.1) จนกระทั่งสิ้นสุดการทดลองที่อายุ 9 สัปดาห์

ตารางที่ 3.1 โปรแกรมการให้วัคซีน

อายุไก่ (วัน)	วัคซีน	วิธีการให้
Hatch day	โรคมาร์เร็กซ์ (Marek's Disease)	ฉีดใต้ ผิวหนัง
Day 7	โรคนิวคาสเซิลและโรคหลอดลมอักเสบติดเชื้อ (Newcastle disease and infections bronchitis: LS-H120)	หยอดตา
Day 14	โรคกัมโบโร (Gumboro; Infections bursal disease: IBD)	ละลายน้ำ
Day 21	โรคนิวคาสเซิลและโรคหลอดลมอักเสบติดเชื้อ (Newcastle disease and infections bronchitis: ND-IB)	หยอดตา
Day 35	โรคฝีดาษ (Smallpox)	แทงปีก

3.3 การเก็บข้อมูล และการวิเคราะห์ทางเคมี

3.3.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสูตรอาหาร

ทำการวิเคราะห์ความชื้น เถ้า โปรตีน เยื่อใย ไขมัน ตามวิธีของ AOAC (1990) รวมถึงระดับ L-arg โดยใช้เครื่อง Amino acid analyses รุ่น Biochrom 30+ (Amino acid standard solution by sigma; Stock No. AA-S-18) ดังอธิบายในภาคผนวก ข.1 และซีลีเนียม โดยใช้เครื่อง ICP-MS รุ่น 7500CE ผลดังแสดงในตารางที่ 3.2

3.3.2 การศึกษาด้านสมรรถนะการเจริญเติบโต (Growth performance)

ในทุกสัปดาห์ของการเลี้ยง ทำการชั่งน้ำหนักตัวไก่ และบันทึกปริมาณอาหารที่กิน เพื่อคำนวณอัตราการเจริญเติบโต (ADG) และอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนักตัว (FCR) ของแต่ละกลุ่มทดลอง รวมทั้งจำนวนการตายของไก่ทุกครั้งที่พบ จากนั้นเมื่อถึงอายุ 9 สัปดาห์ ทำการชั่งน้ำหนักไก่ครั้งสุดท้ายก่อนนำเข้าโรงเชือด

ตารางที่ 3.2 องค์ประกอบทางเคมีและโภชนะในอาหารไก่ทางการค้า

Analyzed compositions	0-3 week	3-6 week	6-9 week
Dry matter, %	93.84	93.51	94.21
GE, kcal/kg	3,946.28	4,081.03	4,111.77
Crude protein, %	22.72	20.46	18.65
Crude fat, %	5.20	6.74	6.66
Crude fiber,%	3.44	3.45	3.55
Ash, %	4.70	4.58	4.19
L-lysine, %	1.78	1.43	0.92
L-arginine, %	1.58	1.13	0.55
L-methionine, %	0.34	0.25	0.28
L-threonine, %	1.01	0.85	0.73
L-valine, %	1.32	1.05	0.72
Selenium (mg/kg)	0.60	0.33	0.18

3.3.3 การเก็บข้อมูลองค์ประกอบซาก และการเก็บตัวอย่าง (Carcass composition and sample collection)

เมื่อไก่อายุครบ 9 สัปดาห์ ทำการสุ่มไก่ฆ่าละ 4 ตัว (ตัวผู้ 2 ตัว และตัวเมีย 2 ตัว) เพื่อวัดองค์ประกอบซาก และคุณภาพเนื้อ โดยขั้นตอนในการดำเนินงานคือ อุดอาหารแต่ให้ไก่กินน้ำสะอาดเป็นเวลา 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการชั่งน้ำหนักมีชีวิต ฆ่าด้วยวิธี Electric stunning จากนั้น Exsanguination โดยใช้มีดเขี่ยคอตรง Jugular vein ปล่อยให้เลือดไหลออก ทำการลวกน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 58°C และทำการถอนขน เอาอวัยวะเครื่องในออก และนำซากไปแช่ที่ห้องเย็นอุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการตัดแต่งและแยกชิ้นส่วนของซากไก่ ทำการชั่งน้ำหนักของชิ้นส่วนไก่เพื่อนำมาคำนวณข้อมูลองค์ประกอบซาก และทำการเก็บตัวอย่างเนื้ออกและเนื้อสะโพก โดยยกด้านซ้าย ใช้สำหรับการทำ Drip loss Cooking loss และ Shear force ส่วนอกด้านขวาจะนำมาใช้ในการวัด pH (ภาคผนวก ก.5)

3.3.4 การวัดคุณภาพเนื้อ (Meat quality)

1) Technological quality

การวัดค่าความเป็นกรดเป็นด่าง (pH measurement)

ในการวัดค่า pH จะใช้เนื้ออกด้านซ้าย โดยจะทำการวัดหลังเขี่ย 45 นาที หลังจากนั้นเก็บเนื้อแต่ละส่วนไว้ในถุงพลาสติกและนำไป Chilling ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และวัด pH ซ้ำอีกครั้ง โดยใช้เครื่องมือวัด HI-99163 Handheld Meat pH Meter ซึ่งต้องวัดตัวอย่างที่จุดเดียวกัน และในแต่ละตัวอย่างจะทำการวัดทั้งหมด 3 ครั้ง จากนั้นนำมาหาค่าเฉลี่ย

การวัดค่าการสูญเสียน้ำระหว่างการเก็บ (Drip loss)

เนื้อส่วนอกข้างซ้ายซับให้แห้ง ทำการตัดให้มีขนาดกว้าง×ยาว×หนา เท่ากับ 1.5×3.0×0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร (cm³) ชั่งน้ำหนักของเนื้อประมาณ 7 กรัม ห่อด้วยผ้าก๊อช 2 ชั้น พันอีกครั้งด้วยถุงพลาสติก นำไปแชวนในห้องเย็นอุณหภูมิ 4°C เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง นำมาชั่งน้ำหนัก และนำค่าที่ได้มาคำนวณตามสูตร

$$\% \text{ การสูญเสียน้ำในระหว่างการเก็บ} = \frac{\text{น้ำหนักก่อนแช่เย็น} - \text{น้ำหนักหลังแช่เย็น}}{\text{น้ำหนักก่อนแช่เย็น}} \times 100$$

การวิเคราะห์ค่าการสูญเสียน้ำหลังการปรุงสุก (Cooking loss)

ตัดเนื้ออกข้างขวาหลังการเขี่ยที่ 24 ชั่วโมง ให้มีขนาดกว้าง×ยาว×หนา เท่ากับ 1.5×3.0×0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร (cm³) ชั่งน้ำหนักโดยมีน้ำหนักประมาณ 25 กรัม บรรจุลงในถุง

สูญญากาศ จากนั้นนำไปต้มในน้ำที่มีอุณหภูมิ 80°C จนกระทั่งอุณหภูมิภายในตัวอย่างมีอุณหภูมิ 71°C หลังจากนั้นนำตัวอย่างมาวางให้เย็นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมงและชั่งน้ำหนักอีกครั้ง (Kim et al., 2011)

$$\% \text{ การสูญเสียน้ำหลังการปรุงสุก} = \frac{\text{น้ำหนักก่อนปรุงสุก} - \text{น้ำหนักหลังการปรุงสุก}}{\text{น้ำหนักก่อนปรุงสุก}} \times 100$$

2) Sensory quality

การวัดค่าสีเนื้อ (Meat color)

ทำการเปรียบเทียบสีของเนื้อส่วนอก ด้วยเครื่อง Minolta colorimeter (Chroma Meter CR-300, Minolta, Japan) ทำการวัดที่ตำแหน่งเดิมทุกครั้งในการวัดแต่ละตัวอย่าง โดยในแต่ละตัวอย่างทำการวัดซ้ำ 3 จุด โดยค่าที่วัดจะจำแนกออกมาเป็นค่า L* (lightness) (Janisch et al., 2011)

การวิเคราะห์ค่าแรงตัดผ่านเนื้อ (Shear force)

นำตัวอย่างเนื้อออกด้านขวาที่ผ่านการปรุงสุกตัดให้มีขนาดกว้าง×ยาว×หนา เท่ากับ 1.0×2.0×0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร (cm³) หลังจากนั้นเก็บไว้ในตู้เย็น 4°C เพื่อรอการวิเคราะห์ นำไปวัดค่าแรงตัดผ่านด้วยเครื่อง Texture analysis รุ่น TA-TXplus (Stable Micro system Ltd., Surrey, UK) โดยกำหนดอัตราการเคลื่อนที่ของใบมีด 2 mm/sec (Wattanachant et al., 2004)

3) Nutritional quality

การวิเคราะห์โภชนาในเนื้อ

บดตัวอย่างของเนื้อไก่ในส่วนอก เพื่อนำมาวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนา ได้แก่ ความชื้น โปรตีน ไขมัน และเถ้า (AOAC, 1990)

การวิเคราะห์คอลลาเจน

การวิเคราะห์หาปริมาณคอลลาเจนทั้งหมดด้วยวิธี Hydroxyproline assay kit โดยการนำตัวอย่างเนื้อออกมา 50 mg เติมสาร 7M Sodium hydroxide ปริมาตร 5 ml ทำการย่อยโดยใช้ Microwave SPD ที่ อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 40 นาที (สังเกตว่าสารจะเป็นสีใสและเป็นเนื้อเดียวกัน) ปรับ pH ด้วย 3.5 M H₂SO₄ (ประมาณ 5 ml) โดยจดบันทึกปริมาตรสุทธิ (ใช้ DI เป็นตัวปรับ) แล้วกรองสารด้วยกระดาษกรอง Whatman No.4 ส่วนใส (Supernatant) ที่ได้จากการกรองนำมาเก็บไว้ได้ที่อุณหภูมิ 4°C ไม่เกิน 24 ชั่วโมง หลังจากปรับ pH เตรียม Hydroxyproline (Hyp) (Stock 10 µg/ml) ให้มีปริมาตรสุดท้าย 200 mL นำไปวัดการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ระดับ 560

nm ด้วยเครื่อง Spectrophotometer เพื่อหา Hyp ในมาตรฐาน โดย Hydrolysate จะถูกอนุมานจากเส้นโค้งมาตรฐาน และแปลงเป็นเนื้อหาของคอลลาเจนโดยใช้สูตรต่อไปนี้

$$\text{Collagen (mg/g sample)} = \text{Hydroxyproline (mg/g sample)} \times 7.25$$

ปริมาณของคอลลาเจนทั้งหมดจะเป็นผลรวมของปริมาณคอลลาเจนในตะกอนและที่มีอยู่ในพื้นผิว (Chumngoen et al., 2016) อธิบายเพิ่มเติมในภาคผนวก ข.2

3.3.5 การวิเคราะห์สัณฐานวิทยา (Morphological analysis)

เมื่อไปถ่าย E18, D0, D7, D14, D21, D42 และ D63 สุ่มเก็บตัวอย่างเนื้ออก

นำตัวอย่างเนื้ออกแช่ไว้ในฟอรัมาลิน 10% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อรักษาโครงสร้างและเป็นการเอาน้ำออกจากเซลล์โดยเติมสารละลายแอลกอฮอล์ แล้วเติม Xylene (tissue (Processing) จากนั้นนำไปแช่ไว้ใน Paraffin โดยตัดแบ่งตัวอย่างออกเป็น 4-6 ชิ้น ประมาณ 3 μm เมื่อแช่แล้วนำขึ้นมาวางลงบนสไลด์แก้วที่แห้ง แล้วนำไปย้อมสีด้วย Hematoxylin & Eosin (H&E) ทำเป็นสไลด์ถาวร แล้วจึงส่องภายใต้กล้อง Light microscope (Olympus CX21, United States) โดยใช้โปรแกรม ZEN (Axis Cam ERc5s-Zen lite, 2012) เพื่อบันทึก TNF (Total number of fibres) และ Fibre diameter (μm) วิเคราะห์ภาพด้วยโปรแกรม Image-J software โดยคำนวณจากพื้นผิวของเนื้อเยื่อขนาด $100 \mu\text{m}^2$ ในการบันทึกปริมาณเซลล์กล้ามเนื้อ (Zhang et al., 2014) อธิบายเพิ่มเติมในภาคผนวก ข.3

3.3.6 การวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ Glutathione peroxidase (GSH-Px) ในเนื้อไก่ (Glutathione peroxidase activity)

หลังจากเชือดไก่แล้วนำตัวอย่างชิ้นเนื้อในส่วนของเนื้ออกข้างขวาตัดแบ่งเป็นชิ้นเล็กใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 ml แช่ลงในไนโตรเจน แล้วเก็บตัวอย่างไว้ที่ -80°C จนกว่าจะนำตัวอย่างชิ้นเนื้อมาวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ จากนั้นนำตัวอย่างเนื้ออกประมาณ 0.30 กรัม ทำการ Homogenized แล้วทำการเก็บสารละลายในสไลด์ยูเรเนียมที่อุณหภูมิ -20°C โดยการวัดค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ GSH-Px จากเนื้อด้วยวิธี Enzymatic assay of glutathione peroxidase (EC 1.11.1.9) ของบริษัท Sigma (Aparna and Karunakaran, 2016) โดยวัดค่าดูดกลืนแสงในปฏิกิริยาจากการลดลงของ NADPH ที่ความยาวคลื่น 340 nm เครื่อง Spectrophotometer ซึ่งจะทำการวัดค่าทุกๆ 1 นาที จนครบ 10 นาที (Kinetic) และนำค่าดูดกลืนแสงที่ได้คำนวณหาค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ GSH-Px ในเนื้อ ดังสมการดังนี้

$$\text{Glutathione peroxidase activity (nmol/min/ml)} = \frac{\Delta A_{340}/\text{min.}}{0.00373 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}} \times \frac{20 \text{ ml}}{0.18 \text{ ml}} \times \frac{1}{10}$$

* ที่ความยาวคลื่น 340 nm ของ NADPH จะมีสัมประสิทธิ์คงที่ เท่ากับ $0.00373 \mu\text{M}^{-1}$

โดยจะต้องวิเคราะห์หาค่าโปรตีนทั้งหมดในเนื้อ วิเคราะห์หาความเข้มข้น โปรตีนด้วยวิธี Bradford protein concentration assay เพื่อใช้คำนวณผลให้อยู่ในรูป U/mg protein อธิบายเพิ่มเติมในภาคผนวก ข.4

3.3.7 การศึกษาระดับการแสดงออกของยีน (Gene expression)

เมื่อไก่อายุ E18, D0, D7, D14, D21, D42 และ D63 สุ่มเก็บตัวอย่างออกมา Treatment ละ 8 ตัว (คอกละ 2 ตัว) เพื่อใช้ในการวัดการแสดงออกของยีน ในการเก็บตัวอย่างจะใช้วิธีการมกลอโรฟอร์ม จากนั้นใช้วิธี Exsanguination โดยใช้มีดเข็ชดสอดตรง Jugular vein ปล่อยให้เลือดไหลออก ในส่วนของการวัดการแสดงออกของยีนนั้นเก็บตัวอย่างบริเวณกล้ามเนื้ออกข้างซ้าย โดยรีบเก็บอวัยวะต่างๆ ไว้ในถังไนโตรเจนเหลวทันทีเพื่อป้องกันการเสื่อมสภาพของ RNA ในเนื้อเยื่อ จากนั้นนำไปแช่แข็งในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -80°C เพื่อนำไปวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *MSTN* (Li et al., 2016) อธิบายเพิ่มเติมในภาคผนวก ก.7-11 และ ข.5

3.3.8 การวิเคราะห์ค่าชีวเคมีในซีรัม (Serum Chemistry)

การตรวจสอบหาค่าชีวเคมีในซีรัม โดยเก็บตัวอย่างเลือดประมาณ 3 ml นำมาแยกซีรัมโดยการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge เป็นเวลา 30 นาที ความถี่ 3,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C และตัวอย่างซีรัมสามารถเก็บที่อุณหภูมิ -15°C จนกว่าจะนำไปหา Total protein, Albumin, Globulins และ Uric acid

3.3.9 การวัดค่าความเป็นพิษของอนุภาคนาโนซีลีเนียม (Toxicity of selenium nanoparticles)

นำตัวอย่างตับ ไต และเนื้ออกของไก่โคราช โดยชั่งตัวอย่าง 0.5 g เติม 1 ml Hydrogen peroxide (30% H_2O_2 pro-analysis, Merck, Darmstadt, Germany) และ 4 ml Nitric acid (65% HNO_3 suprapur, Merck, Darmstadt, Germany) ย่อยตัวอย่างด้วย Microwave (Automated Microwave Digestion System Discover® SP-D 80) โดยขั้นตอนการย่อยตัดแปลงจาก Gerber et al. (2008) (หมายเหตุ: ทุกครั้งที่ย่อยสารต้องมีสารมาตรฐาน Selenium ที่ระบุความเข้มข้นอย่างชัดเจน) เมื่อย่อยตัวอย่างเรียบร้อยแล้ว นำมาปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI ให้มีปริมาตรสุทธิ 25 ml (จะได้สารสีเหลือง) จากนั้นเตรียมสารเพื่อทำการวิเคราะห์หา Se โดยใช้เครื่อง ICP-MS (7500CE) เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ธาตุ (Elemental analysis) โดยอาศัยหลักการของ Atomic spectroscopy ตัดแปลงจาก Loeschner et al. (2014) อธิบายเพิ่มเติมในภาคผนวก ข.6

3.4 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำผลการทดลองที่ได้ทั้งหมดไปวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้ General Linear Models (GLM) โดยใช้โปรแกรม SPSS Modeler (v18.1.1) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่าง treatment ด้วยวิธี Tukey's multiple tests โดยทดสอบที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

3.5 สถานที่ทำการทดลอง

1. งานสัตวปีก ฟาร์มมหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
2. ห้องปฏิบัติการโภชนศาสตร์สัตว์กระเพาะเดี่ยว อาคารเครื่องมือ 10
3. ห้องปฏิบัติการโภชนศาสตร์สัตว์กระเพาะเดี่ยว อาคารเครื่องมือ 14
4. ห้องปฏิบัติการทางเคมี อาคารเครื่องมือ 3 (ภาคผนวก ก.12)

3.6 ระยะเวลาในการทำการทดลอง

เริ่มทำการทดลอง เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2561

สิ้นสุดการทดลอง เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2562

บทที่ 4

ผลการทดลองและอภิปรายผล

วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อศึกษาการนิตสารอาหารที่สามารถกระตุ้นกระบวนการสร้างกล้ามเนื้อ การแสดงออกของยีนและการทำงานของเอนไซม์ของไก่โคราชตั้งแต่ในไขฟักจนถึงไก่ที่มีน้ำหนักส่งตลาด เพื่อใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาและเพิ่มประสิทธิภาพการใช้สารอาหารอย่างมีความจำเพาะต่อการเพิ่มปริมาณซาก โดยไม่ให้มีผลกระทบต่อภาวะเจริญเติบโตและคุณภาพเนื้อของไก่โคราช ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้มีสมมติฐานงานวิจัยอยู่สองข้อคือ

ข้อที่หนึ่ง การนิต L-arg และ SeNPs จะส่งผลให้เพิ่มการพัฒนาของกล้ามเนื้อ แต่ไม่ส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพการเจริญเติบโตและคุณภาพเนื้อของไก่โคราช

ข้อที่สอง การนิต L-arg และ SeNPs ผ่านเปลือกไข่จะลดการแสดงออกของยีน *MSTN* ที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งกระบวนการสร้างกล้ามเนื้อ ทำให้มีการพัฒนาของกล้ามเนื้อเพิ่มขึ้น

ซึ่งผลการศึกษาในแต่ละประเด็นดังที่กล่าวมาในข้างต้นมีรายละเอียดของข้อมูลและผลการศึกษาดังนี้

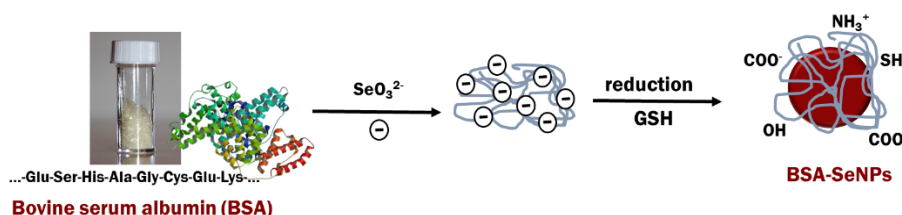
4.1 ผลการตรวจสอบความถูกต้องของข้อมูล

จากการตรวจสอบความถูกต้องของข้อมูลพบว่าอยู่ในการกระจายตัวแบบปกติ โดยค่าเฉลี่ย (mean) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation; SD) สัมประสิทธิ์ความผันแปร (coefficient of Variation; CV) ค่าต่ำสุด (minimum; min) ค่าสูงสุด (maximum; max) ไม่ปรากฏถึงความผิดปกติของข้อมูลและในตาราง Test of Normality พบว่า $P > 0.05$ แสดงถึงมีการแจกแจงข้อมูลแบบปกติ โดยมีค่าความเบ้ (skewness) อยู่ในช่วง -0.8 ถึง 0.8 และค่าความโค้ง (kurtosis) อยู่ในช่วง -3 ถึง 3

4.2 ผลของการสังเคราะห์นาโนซีลีเนียม

จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าการสังเคราะห์นาโนซีลีเนียมด้วยวิธีการ Biological synthesis (ภาพภาคผนวกที่ ก.1) โดยใช้ Sodium selenite (Na_2SeO_3) เป็นสารตั้งต้น และใช้ Bovine serum albumin (BSA) เป็นโปรตีนตัวพา (carrier proteins) ร่วมกับ Glutathione (GSH) ที่ทำหน้าที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอนที่เรียกว่า ตัวรีดิวซ์ (reducing agent) จากการทำปฏิกิริยาของ Na_2SeO_3 ได้ผลผลิตสุดท้ายเป็น Elemental Se (Se^0) โดยจะมีการรวมตัวกับ BSA ที่ตำแหน่ง Domain I, B subdomain

(DIA) บริเวณ Cysteine (C34) ในรูป Se-Cys (Zhang et al., 2001; Sand et al., 2014) ซึ่งเกิดการรวมตัวกันเป็นโปรตีนก้อนกลม ดังภาพที่ 4.1

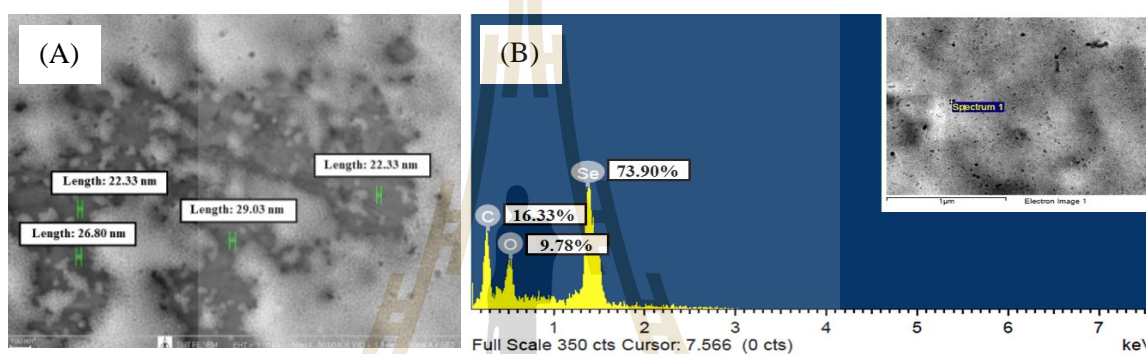


ภาพที่ 4.1 ปฏิกริยาการเกิดอนุภาค BSA-SeNPs

ที่มา: Cao et al. (2019)

จากภาพข้างต้นสามารถอธิบายได้ว่าการเกิดปฏิกริยาที่สมบูรณ์ระหว่างการรวมตัวของ BSA และ Se^0 ที่อุณหภูมิห้อง (25°C) จะได้สารสีแดงที่มีค่า pH 7.2 เนื่องจากเป็น pH เหมาะสมที่ BSA จะสามารถทำปฏิกริยาได้ดี (Masuelli, 2013) ซึ่งจะได้นาโนซีลีเนียมที่อยู่ในรูป BSA-SeNPs โดยจากการวัดขนาดอนุภาคของ BSA-SeNPs ด้วยเครื่อง Scanning Electron Microscopic (SEM) และองค์ประกอบของธาตุด้วย Energy Dispersive Spectroscopy (EDS) จากการศึกษาพบว่าการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมด้วยวิธี Biological synthesis โดยใช้ BSA เป็นโปรตีนตัวพาจะมีขนาดอนุภาคเฉลี่ย 25.52 ± 3.35 นาโนเมตร (ภาพที่ 4.2 A) ซึ่งวิธีการสังเคราะห์สารสอดคล้องกับงานวิจัยของ Zhang et al. (2001) และ Zhou and Wang (2011) ที่มีการใช้ BSA เป็นโปรตีนตัวพาเช่นกัน แต่จะมีขนาดอนุภาคที่มีความแปรปรวนมาก ซึ่งอยู่ในช่วงตั้งแต่ 10-80 นาโนเมตร ทั้งนี้อาจสามารถอธิบายได้ว่าขนาดของอนุภาคนาโนที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับอุณหภูมิและระยะเวลาในขณะที่สังเคราะห์สาร จึงทำให้ค่าพลังงานพื้นผิว (Surface energy) และค่าแรงดึงผิว (Surface stress, strain energy) แตกต่างกัน ซึ่งพบว่าอนุภาคนาโนขนาดเล็กจะมีค่าพลังงานพื้นผิวที่น้อยและมีค่าแรงดึงผิวที่สูงเมื่อเปรียบเทียบกับอนุภาคนาโนที่มีขนาดใหญ่กว่า (Vollath et al., 2018; Reichenberger et al., 2019) จึงอาจเป็นไปได้ว่าอุณหภูมิและระยะเวลาในการสังเคราะห์สารจึงเป็นอีกปัจจัยที่ควรคำนึงถึง และเมื่อศึกษาถึงปริมาณองค์ประกอบของธาตุในการสังเคราะห์ผลการทดลองในครั้งนี้พบว่ามีองค์ประกอบของ Selenium 73.90%, Carbon 16.33% และ Oxygen 9.78% (ภาพที่ 4.2 B) โดยสามารถอธิบายได้ว่าการสังเคราะห์ SeNPs ในงานทดลองนี้มีอาจมีพลังงานพื้นผิวที่น้อยและมีค่าแรงดึงผิวที่สูง ส่วนค่าความบริสุทธิ์ของธาตุจะเห็นได้ว่าองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็น Se จึงมีความบริสุทธิ์ของธาตุมากและไม่มีแร่ธาตุอื่นเจือปน จึงสามารถนำการสังเคราะห์ในครั้งนี้มาใช้สำหรับเป็นสารอาหารแก่ตัวอ่อนของไก่ได้ โดยการนำสารผ่านเข้าสู่เซลล์ของ SeNPs จะเป็นไปตามรูปแบบ

การเข้าสู่เซลล์ของ BSA ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีอะมิโนเป็นองค์ประกอบ 583 อะมิโนเรียงต่อกันและมีโครงสร้างเป็นเกลียว ซึ่งมีส่วนประกอบของอะมิโนที่มีขั้วบวกจัดเรียงตัวอยู่ด้านนอกของโครงสร้างโปรตีนเนื่องจากเป็นส่วนที่สามารถละลายน้ำได้ (Aqueous) โดยการผ่านเข้าเซลล์จะเป็นแบบ Receptor-mediated endocytosis (RME) หรือ Clathrin-mediated endocytosis ที่มี Receptor จำเพาะคือ The neonatal Fc receptor (FcRn) เป็นตัวกลางในการขนส่ง BSA และ IgG เข้าสู่เซลล์ จากนั้นเซลล์จะมีการสร้างถุง (vesicles) โอบล้อมจนนำไปสู่การส่งผ่านไปยังระบบเลือด (Sand et al., 2014) ซึ่งงานทดลองในครั้งนี้อาจใช้กลไกในเบื้องต้นอธิบายถึงการเข้าสู่เซลล์ของอนุภาคนาโน แล้วจะขนส่งไปทางระบบหมุนเวียนเลือดไปยังอวัยวะอื่นๆ ซึ่งจะอธิบายในหัวข้อต่อไป



ภาพที่ 4.2 ลักษณะทางกายภาพของ SeNPs วัดขนาดและรูปร่างของอนุภาคด้วย Scanning Electron Microscopic (SEM: JEOL JSM 7800F (Carl zeiss Auriga, Germany) (5,000× magnification) โดยขนาดประมาณ 25.52 ± 3.35 นาโนเมตร (A) และวัดองค์ประกอบของธาตุด้วย Energy Dispersive Spectroscopy (EDS) (United Kingdom) (B)

4.3 ผลของการฉีด L-arginine และ SeNPs ต่อประสิทธิภาพการเจริญเติบโต องค์ประกอบซากและคุณภาพเนื้อของไก่โคราช

ในการศึกษาผลของการฉีด L-arg และ SeNPs ต่อประสิทธิภาพการเจริญเติบโต องค์ประกอบซาก และคุณภาพเนื้อของไก่โคราช มีวัตถุประสงค์เพื่อให้ทราบถึงการฉีดสารอาหารผ่านเปลือกไข่ไม่มีผลกระทบต่อลักษณะดังกล่าวและนำไปใช้เป็นข้อมูลในการอภิปรายผลการทดสอบสมมติฐานข้อที่หนึ่งที่กล่าวว่าการฉีด L-arg และ SeNPs ผ่านเปลือกไข่ของไก่โคราชในวันที่ 18 ของระยะฟัก จะส่งผลให้เพิ่มการพัฒนาของกล้ามเนื้อ แต่ไม่ส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพการเจริญเติบโตและคุณภาพเนื้อของไก่โคราช ซึ่งผลการทดลองในครั้งนี้เป็นไปตามสมมติฐานที่คาดไว้ดังอธิบายต่อไปนี้

ประสิทธิภาพการเจริญเติบโต: การวิเคราะห์ค่าประสิทธิภาพการเจริญเติบโตพบว่าการฉีด L-arg และ SeNPs ผ่านเปลือกไข่ของไก่โคราชที่อายุ 18 วันของระยะฟักไม่ส่งผลกระทบต่ออัตราการฟักออก น้ำหนักแรกเกิด น้ำหนักสุดท้าย น้ำหนักตัวเฉลี่ยต่อวัน ($P>0.05$) ซึ่งเป็นไปตามสมมติฐานที่คาดไว้ แต่เมื่อพิจารณาผลของการฉีดสารผ่านเปลือกไข่ต่อน้ำหนักเฉลี่ยของไก่โคราชในแต่ละสัปดาห์ (ภาพที่ 4.3) พบว่าไก่โคราชในกลุ่มที่ได้รับการฉีด L-arg ร่วมกับ SeNPs (IOF-3) มีน้ำหนักตัวเฉลี่ยต่ำกว่าที่อายุ 7 วัน และน้ำหนักตัวเฉลี่ยไม่แตกต่างที่อายุ 14 วันจากเมื่อเทียบกับไก่โคราชในกลุ่มที่ไม่ได้รับการฉีดสารอาหาร (NC) แต่จะมีน้ำหนักตัวเฉลี่ยสูงกว่าไก่ในกลุ่มที่ได้รับการฉีด L-arg (IOF-1) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.01$ และ $P<0.05$ ตามลำดับ) และเมื่อพิจารณาประสิทธิภาพการใช้อาหารในไก่โคราชพบว่าการฉีดสารอาหารสามารถลดอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนักตัวของไก่โคราชในกลุ่มที่ได้รับการฉีด SeNPs (IOF-2) และกลุ่มที่ได้รับการฉีด L-arg ร่วมกับ SeNPs (IOF-3) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (NC) อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.01$) ดังตารางที่ 4.1

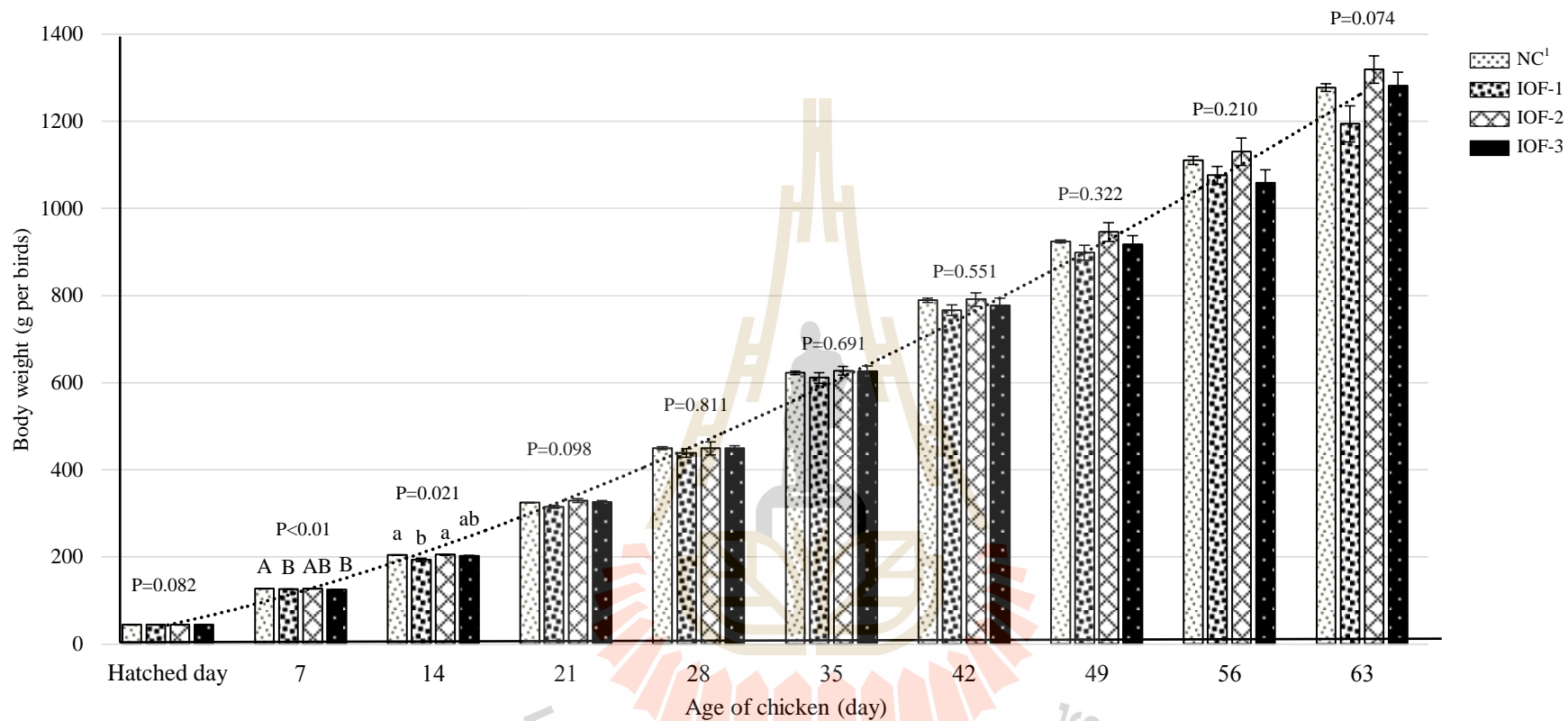
ตารางที่ 4.1 ผลของการฉีด L-arginine และ SeNPs ต่อการฟักออก และประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของไก่โคราช อายุ 9 สัปดาห์

Items ³	Treatment ¹				SEM ²	P-value
	NC	IOF-1	IOF-2	IOF-3		
Hatchability, %	86.25	87.08	88.33	89.16	0.996	0.777
Hatched weight, g	44.52	43.99	43.89	44.67	0.121	0.082
BW, g	1,277.12	1,193.56	1,318.45	1,280.88	18.042	0.074
ADG, g/d/b	20.27	19.49	20.93	20.34	0.232	0.228
ADFI, g/d/b	2,858.11	2,723.27	2,782.20	2,739.09	31.120	0.458
FCR	2.24 ^B	2.28 ^B	2.11 ^A	2.14 ^A	0.020	<0.001

หมายเหตุ ^{A,B} Means within column carrying no common superscripts are significantly different at $P<0.01$. ¹ NC, Non-injected control group; IOF-1, 1% L-arg; IOF-2, 0.3 μ g SeNPs; IOF-3, 1% L-arg+0.3 μ g SeNPs. ²Standard error of the mean., ³BW, body weight; ADG, average daily gain; ADFI, average daily feed intake; FCR, feed conversion ratio. Values are means \pm SEM (n = 208 per group).

โดยในปัจจุบันยังไม่พบข้อมูลการศึกษาเรื่องการฉีด L-arg ร่วมกับ SeNPs ผ่านเปลือกไข่สู่ตัวอ่อน มีเพียงแต่การศึกษาศาสตร์ใดสารหนึ่งเท่านั้นจึงไม่สามารถทราบความสัมพันธ์ของกลไกการทำงานของสารอาหารได้อย่างชัดเจน จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า การฉีด L-arg ไม่ส่งผลกระทบต่ออัตราการฟักออกและสามารถเพิ่มน้ำหนักของไก่เนื้อที่อายุแรกเกิดจนถึงอายุ 21 วันได้ (Sanami et al., 2014; Lu et al., 2018; Gao et al., 2017a,b; Subramaniyan et al., 2019) ซึ่งผลการทดลองในครั้งนี้สอดคล้องในเรื่องอัตราการฟักออก และมีผลขัดแย้งในส่วนของน้ำหนักตัว แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษาของ Omid et al. (2019) พบว่าไก่เนื้อที่ได้รับการฉีด L-arg ปริมาณ 5 mg/egg ผ่านเปลือกไข่อายุ 14 วันของตัวอ่อนตรงบริเวณถุงน้ำคร่ำ (Amniotic fluid) ไม่มีผลกระทบต่อน้ำหนักของของไก่อายุ 1 10 24 และ 30 วัน สอดคล้องกับงานทดลองในครั้งนี้ อีกทั้งยังพบว่าไก่เนื้อที่ได้รับการฉีด L-arg ผ่านเปลือกไข่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการใช้อาหารได้ ซึ่งจะไม่สอดคล้องกับงานทดลองในครั้งนี้ที่พบว่าไก่โคราชในกลุ่มที่ได้รับการฉีด L-arg (IOF-1) ผ่านเปลือกไข่อายุ 18 วันของตัวอ่อนตรงบริเวณถุงน้ำคร่ำมีค่า FCR ต่ำกว่าไก่ที่ได้รับการฉีด SeNPs (IOF-2) และไก่กลุ่มที่ได้รับการฉีด L-arg+SeNPs (IOF-3) ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าค่าอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนักตัวของไก่โคราชในงานทดลองครั้งนี้อาจมีสาเหตุเนื่องมาจากผลของการฉีด SeNPs โดยจากการศึกษาของ Joshua et al. (2016) และ Hassan (2018) พบว่าไก่เนื้อที่ได้รับการฉีด SeNPs ผ่านเปลือกไข่สามารถเพิ่มน้ำหนักตัวสุดท้าย และลดอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนักตัวได้

สาเหตุที่ผลเป็นเช่นนี้อาจสามารถอธิบายได้ว่าเกิดการรวมตัวกันระหว่าง L-arg และ SeNPs ในรูปของ L-arg-SeO-L-Arg ซึ่งอาจทำงานร่วมกันได้อย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น (Prabhu et al., 2013; Chomchan et al., 2018) โดยพบว่าทั้ง L-arg และ SeNPs สามารถช่วยเพิ่มความยาวของ Villi, สัดส่วนของ Villi high/crypt depth อีกทั้งยังมีฤทธิ์ด้านการอักเสบของลำไส้เล็กในส่วนของ Jejunum ได้ (Gao et al., 2017a; Alkudhayri et al., 2018) จึงอาจเป็นเหตุที่สามารถลดอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนักตัวของไก่โคราชได้ ส่วนประเด็นที่การฉีด L-arg ร่วมกับ SeNPs ไม่มีผลต่อน้ำหนักตัวในวันสุดท้าย แต่มีน้ำหนักตัวในวันที่ 7 ของไก่โคราชต่ำกว่าในกลุ่มที่ไม่ได้รับการฉีดสารนั้น อาจเนื่องมาจากระดับการฉีดสารในครั้งนี้ไม่เพียงพอต่อการสร้างกล้ามเนื้อของไก่โคราชจึงไม่ทำให้น้ำหนักตัวของไก่โคราชเพิ่มขึ้น ซึ่งในช่วงระยะแรกของการฟักไข่ร่างกายของสัตว์อาจจะนำสารอาหารไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ เช่น การสร้างเซลล์ในระบบย่อยอาหารและการต้านการเกิด Oxidation ภายในเซลล์ เป็นต้น จึงอาจมีส่วนทำให้น้ำหนักของไก่โคราชในวันที่ 7 มีน้ำหนักลดลง แต่อย่างไรก็ตามการเพิ่มน้ำหนักของไก่ไม่ได้มีสาเหตุมาจากสารอาหารภายในไข่แต่เพียงเท่านั้น แต่ยังมีปัจจัยอื่นที่มีอิทธิพลต่อค่าพารามิเตอร์ดังกล่าว อาทิเช่น สายพันธุ์ของไก่ ปริมาณของสารอาหารที่ฉีด วันที่ทำการฉีดสาร คุณภาพของไข่ การจัดการตู้ฟักและยังรวมไปถึงระบบการเลี้ยงอีกด้วย (Ebrahimi et al., 2017) จึงอาจจะต้องนำมาใช้พิจารณาในประเด็นของงานวิจัยถัดไป



ภาพที่ 4.3 ผลของการฉีดสารผ่านเปลือกไข่ต่อน้ำหนักตัวของไก่โคราชในแต่ละสัปดาห์

หมายเหตุ ^{A,B} Means within column carrying no common superscripts are significantly different at $P < 0.01$. ^{a,b} Means within column carrying no common superscripts are significantly different at $P < 0.05$. Values are means \pm SEM (n = 208/group). ¹ NC, Non-injected control group; IOF-1, 1% L-arg; IOF-2, 0.3 μ g SeNPs; IOF-3, 1% L-arg+0.3 μ g SeNPs.

ส่วนประกอบซาก: โดยเมื่อพิจารณาถึงส่วนประกอบของซากในไก่โคราช จากตารางที่ 4.2 พบว่าการฉีด L-arg ร่วมกับ SeNPs ผ่านเปลือกไข่สู่ตัวอ่อนไม่มีผลกระทบต่อส่วนประกอบของน้ำหนักซาก ($P>0.05$) ซึ่งผลการทดลองนี้เป็นไปตามผลของน้ำหนักตัวเฉลี่ยสุดท้ายของไก่โคราชในข้างต้นที่ไม่พบความแตกต่าง แต่อย่างไรก็ตามมีการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าระดับการเสริม L-arg ที่สูงขึ้นในอาหารไก่เนื้อและไก่ไข่สามารถเพิ่มองค์ประกอบของซากได้ (Fernandes et al., 2009; Hazim and Atta, 2012; Yang et al., 2016) จึงอาจเป็นไปได้ว่าการทดลองในครั้งนี้มีปริมาณของสารในการฉีดไม่เพียงพอต่อการเพิ่มปริมาณซากของไก่ในกลุ่มที่โตช้า

ตารางที่ 4.2 ผลของการฉีด L-arginine และ SeNPs ต่อส่วนประกอบซากของไก่โคราช อายุ 9 สัปดาห์

Carcass traits	Treatment ¹				SEM ⁴	P-value
	NC	IOF-1	IOF-2	IOF-3		
Live weight (g)	1,277.12	1,193.56	1,318.45	1,280.88	18.042	0.074
Eviscerated carcass yield ² (%)	64.65	65.70	66.14	65.28	0.251	0.188
Abdominal fat ³	1.27	1.14	1.20	1.00	0.125	0.916
Gizzard	2.63	2.46	2.41	2.52	0.095	0.892
Liver	1.96	1.81	1.80	1.82	0.033	0.287
Breast outer fillet	11.24	11.64	11.64	11.08	0.188	0.676
Breast inner fillet	3.47	3.45	3.55	3.45	0.052	0.913
Thigh	11.14	11.25	11.50	11.02	0.119	0.486
Drumstick	9.71	10.01	9.98	9.91	0.115	0.830
Wing	8.77	8.90	8.80	8.53	0.080	0.446

หมายเหตุ ¹ NC, Non-injected control group; IOF-1, 1% L-arg; IOF-2, 0.3 µg SeNPs; IOF-3, 1% L-arg+0.3 µg SeNPs. ² Without viscera, head, neck, feet, and shank (Hot carcass). ³ Considered the fat extending within the ischium, surrounding the cloaca, and adjacent to the abdominal muscle. ⁴ Standard error of the mean. (n = 8 per group).

คุณภาพเนื้อ: คุณภาพเนื้อของสัตว์เป็นหนึ่งในคุณสมบัติที่สำคัญสำหรับผู้ผลิตและผู้บริโภค ซึ่งในไก่โคราชจะมีคุณภาพเนื้อที่เป็นเอกลักษณ์ โดยการศึกษาครั้งนี้ไม่ส่งผลกระทบต่อความเป็นเอกลักษณ์ของเนื้อไก่โคราช จากผลการทดลองพบว่าเนื้ออกของไก่โคราชที่ได้รับการฉีด L-arg ร่วมกับ SeNPs (IOF-3) ในวันที่ 18 ของตัวอ่อนผ่านเปลือกไข่ไม่มีผลต่อค่าความสว่างของสีเนื้อ (Lightness) ค่า Ultimate pH ค่าการสูญเสียน้ำหลังการปรุงสุก (Cooking loss) และค่าแรงตัดผ่านเนื้อ (Shear force) แต่สามารถลดการสูญเสียน้ำระหว่างการเก็บ (Drip loss) เมื่อเปรียบเทียบกับเนื้ออกของไก่โคราชในกลุ่มที่ไม่ได้รับการฉีดสารอาหาร (NC) ($P < 0.01$) ดังตารางที่ 4.3 โดยการศึกษาก่อนหน้านี้มีการเสริม L-arg ในอาหารไก่เนื้อจะเพิ่มค่าความสว่างของสีเนื้อ (Lightness) และค่าความเหนียวนุ่มของเนื้อ (Tenderness) ในเนื้ออก แต่ไม่ได้ส่งผลกระทบต่อค่าคุณภาพเนื้ออื่นๆ (Jiao et al., 2010; Zampiga et al., 2019) ซึ่งพารามิเตอร์ของคุณภาพเนื้อของสัตว์นั้นขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น พันธุ์ อายุ ขั้นตอนการปรุงสุก ฯลฯ (Rizzi et al., 2007; Varol Avcilar et al., 2019) ดังนั้นจึงอาจทำให้การวัดคุณภาพเนื้อมีความแตกต่างตามปัจจัยดังกล่าว แต่อย่างไรก็ตามในประเด็นของการฉีด L-arg ร่วมกับ SeNPs (IOF-3) ในวันที่ 18 ของตัวอ่อนในไก่โคราชที่สามารถลดการสูญเสียน้ำของเนื้ออก โดยผลการทดลองไม่สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ ที่ผลเป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากในงานทดลองครั้งนี้ได้ทำการศึกษาในไก่ในกลุ่มที่โตช้า ซึ่งจะมีความสามารถในการทนความร้อนได้สูง (Lu et al., 2007) จึงอาจมีผลทำให้เกิดการเสื่อมสภาพ (Protein denaturation) ของโปรตีนลดลง (Garcia et al., 2010; Mir et al., 2017) เมื่อสารอาหารทั้งสองเกิดการทำงานร่วมกัน โดยอาจเป็นเหตุเนื่องมาจากการทำงานของ SeNPs เป็นหลัก เพราะจากการศึกษาของ Zhou and Wang (2011) และ Cai et al. (2012) พบว่าการเสริม SeNPs ขนาด 10-80 nm ในอาหารไก่เนื้อจะสามารถลดค่าการสูญเสียน้ำระหว่างการเก็บ (Drip loss) ซึ่งอาจเนื่องมาจากค่าการสูญเสียน้ำมีผลโดยตรงต่อค่าการเสื่อมสภาพของโปรตีนจากการเกิดอนุมูลอิสระภายในเซลล์ ซึ่ง Se จะช่วยเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ GSH-Px ที่เป็นสารต้านการเกิดอนุมูลอิสระ ดังนั้นจึงช่วยลดการสูญเสียน้ำของเนื้อไก่ได้ (Huff-Lonergan and Lonergan, 2005)

องค์ประกอบทางโภชนา: จากผลการศึกษาขององค์ประกอบทางโภชนาของเนื้ออก (ตารางที่ 4.3) พบว่าเนื้ออกของไก่โคราชที่ได้รับการฉีดสาร (IOF-1 IOF-2 และ IOF-3) ในวันที่ 18 ของตัวอ่อนผ่านเปลือกไข่ไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าความชื้น (Dry matter) ค่าอนินทรีย์วัตถุ (Crude ash) ค่าไขมันรวม (Crude fat) และค่าคอลลาเจนรวม (Total collagen) แต่จะสามารถเพิ่มการสะสมของโปรตีนรวมได้ ($P < 0.01$) ซึ่งอาจอธิบายได้ว่าการที่มีปริมาณโปรตีนรวมมากในเนื้อเกิดจากกระบวนการสังเคราะห์โปรตีน (Protein synthesis) ภายในเซลล์ โดยกระบวนการดังกล่าวถูกควบคุมด้วยยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างกล้ามเนื้อโดย L-arg เป็นหนึ่งในกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อกระบวนการสร้างโปรตีน (Saxton et al., 2016) ซึ่งอีกหนึ่งประเด็นที่เนื้ออกของไก่โคราชในกลุ่ม

ที่ได้รับการฉีด SeNPs (IOF-2) ผ่านเปลือกไข่สามารถเพิ่มการสะสมโปรตีนด้วยเช่นกัน เพราะเนื่องจาก Se สามารถลดกระบวนการเกิด β -oxidation ซึ่งกระบวนการนี้จะยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์โปรตีน (Jia et al., 1989; He et al., 2016; Garza-Lombó et al., 2018) ดังนั้นเมื่อปฏิกิริยาดังกล่าวลดลง จึงอาจมีผลต่อการเพิ่มกระบวนการสร้างโปรตีนภายในเซลล์ได้

ตารางที่ 4.3 ผลของการฉีด L-arginine และ SeNPs ต่อคุณภาพเนื้ออก (*Pectoralis major*) ของไก่โคราชอายุ 9 สัปดาห์

Items	Treatment ¹				SEM ²	P-value
	NC	IOF-1	IOF-2	IOF-3		
Lightness (L*)	51.70	51.09	52.31	51.89	0.545	0.906
Ultimate pH (pHu)	5.76	5.80	5.73	5.77	0.016	0.493
Drip loss during storage (%total)	12.42 ^A	10.27 ^B	10.60 ^{AB}	9.52 ^B	0.355	0.009
Cooking loss (%total)	24.47	25.16	23.76	23.36	0.317	0.231
Shear force after cooking (kg/g)	2.03 ^b	2.38 ^a	2.31 ^{ab}	2.10 ^{ab}	0.050	0.018

หมายเหตุ ^{A,B} Means within column carrying no common superscripts are significantly different at $P < 0.01$. ^{a,b,c} Means within column carrying no common superscripts are significantly different at $P < 0.05$. ¹ NC, Non-injected control group; IOF-1, 1% L-arg; IOF-2, 0.3 μ g SeNPs; IOF-3, 1% L-arg+0.3 μ g SeNPs. ² Standard error of the mean. (n = 8 per group).

จากผลการทดลองนี้สามารถอธิบายเพิ่มเติมว่าการฉีด L-arg ร่วมกับ SeNPs สามารถเพิ่มการสร้างโปรตีนภายในเซลล์กล้ามเนื้ออก ซึ่งเมื่อมีการสะสมของโปรตีนในเนื้ออกที่มากขึ้นร่วมกับสายพันธุ์ไก่ในงานทดลองในครั้งนี้เป็นไก่ในกลุ่มโตช้าที่มีความสามารถในการทนความเครียดอันเนื่องมาจากความร้อน (Heat stress) ที่สูง จึงทำให้คงสภาพโปรตีนภายในเซลล์ได้ อีกทั้งยังมีระบบเผาผลาญที่ดี ส่งผลให้ลดอัตราเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนักร่างกาย อย่างไรก็ตามในการทดลองครั้งนี้ไม่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณซากและน้ำหนักร่างกายเฉลี่ยสุดท้ายของไก่โคราช แต่เมื่อกล่าวถึงประเด็นการประยุกต์เทคนิคการฉีดสารผ่านเปลือกไข่ของไก่โคราชจะสามารถใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาการให้สารอาหารในรูปแบบใหม่ในอุตสาหกรรมสัตว์ปีก ซึ่งอาจจะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงประเด็น

เรื่องปริมาณสารที่เหมาะสมที่จะทำให้กล้ามเนื้อของไก่โคราชเกิดการพัฒนาและนำไปสู่การเพิ่มปริมาณซากของไก่โคราชได้

ตารางที่ 4.4 ผลของการฉีด L-arginine และ SeNPs ต่อองค์ประกอบทางโภชนาการเนื้ออก (*Pectoralis major*) ของไก่โคราช อายุ 9 สัปดาห์

Chemical compositions, %	Treatment ¹				SEM ²	P-value
	NC	IOF-1	IOF-2	IOF-3		
Dry matter	26.19 ^b	28.06 ^{ab}	28.45 ^a	28.37 ^{ab}	0.346	0.029
Crude ash	6.12	5.58	5.88	5.12	0.186	0.254
Crude fat	1.57	1.36	1.35	1.49	0.067	0.662
Crude protein	24.26 ^D	25.72 ^C	26.44 ^B	27.29 ^A	0.295	<0.0001
Total collagen (mg/g)	1.51	1.64	1.39	1.62	0.042	0.136

หมายเหตุ ^{A,B} Means within column carrying no common superscripts are significantly different at $P < 0.01$. ^{a,b,c} Means within column carrying no common superscripts are significantly different at $P < 0.05$. ¹ NC, Non-injected control group; IOF-1, 1% L-arg; IOF-2, 0.3 μ g SeNPs; IOF-3, 1% L-arg+0.3 μ g SeNPs. ² Standard error of the mean. (n = 8 per group).

4.4 ผลของการฉีด L-arginine และ SeNPs ต่อสัดส่วนน้ำหนักของกล้ามเนื้อในไก่โคราช

ในการศึกษาผลของการฉีด L-arg และ SeNPs ต่อการวิเคราะห์สัดส่วนน้ำหนักของกล้ามเนื้อในไก่โคราช มีวัตถุประสงค์เพื่อให้ทราบถึงการฉีดสารอาหารผ่านเปลือกไข่จะสามารถเพิ่มกระบวนการสร้างเซลล์กล้ามเนื้อและนำไปใช้เป็นข้อมูลในการอธิบายผลการทดสอบสมมติฐานข้อที่หนึ่งที่ว่า การฉีด L-arg และ SeNPs ผ่านเปลือกไข่ของไก่โคราชในวันที่ 18 ของระยะฟักจะส่งผลให้เพิ่มการพัฒนาของกล้ามเนื้อในไก่โคราชได้ โดยจากผลการศึกษาในครั้งนี้ไม่ได้เป็นไปตามสมมติฐานทั้งหมด ซึ่งได้อธิบายดังต่อไปนี้

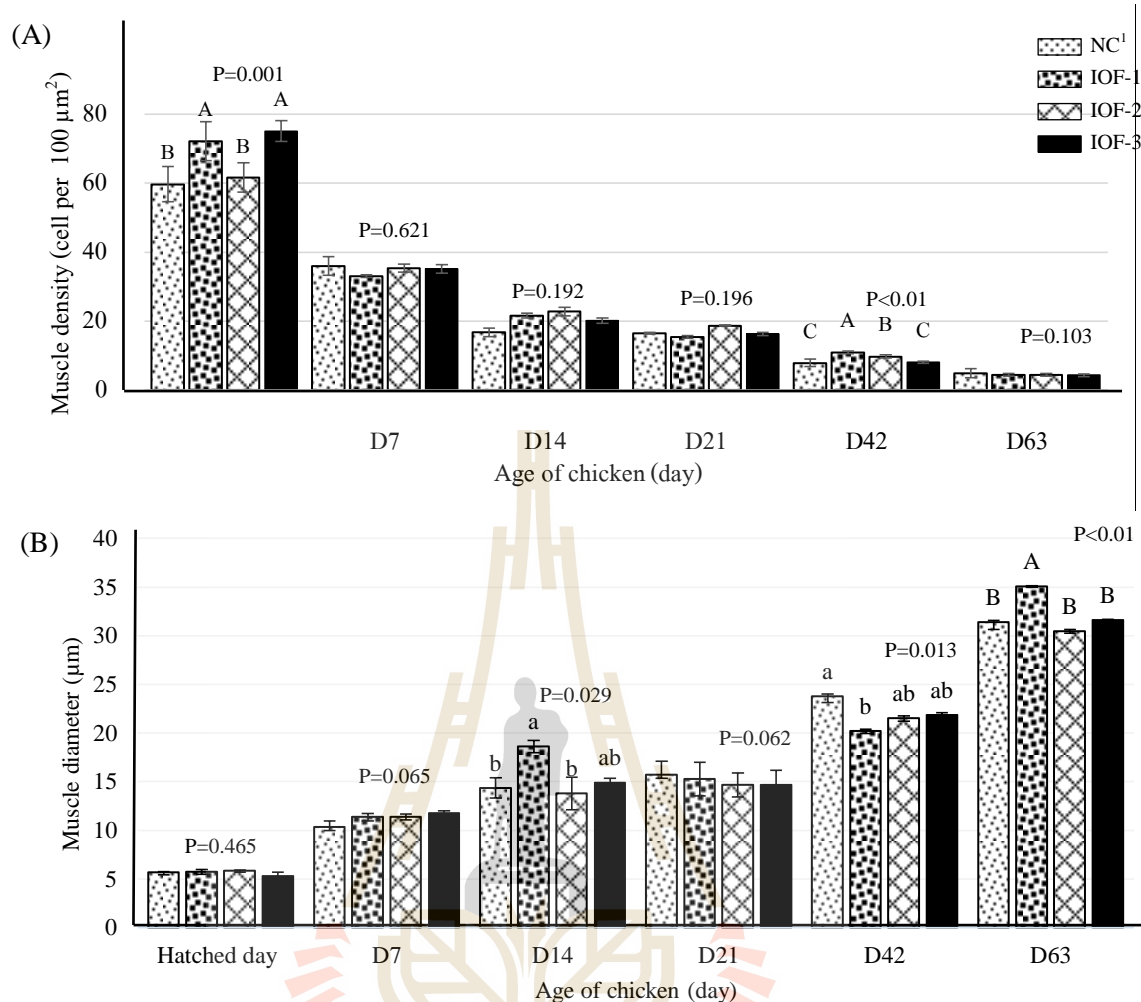
น้ำหนักของเนื้ออก: เมื่อพิจารณาถึงน้ำหนักเนื้ออกของไก่โคราชพบว่าไก่โคราชที่ได้รับการฉีดสาร (IOF-1, IOF-2 และ IOF-3) ในวันที่ 18 ของตัวอ่อนผ่านเปลือกไข่ไม่มีผลต่อน้ำหนักของเนื้ออกเฉลี่ยในแต่ละช่วงอายุ (ตารางที่ 4.5) ซึ่งไม่ได้เป็นไปตามสมมติฐาน แต่สอดคล้องกับผลจากองค์ประกอบของซากที่ได้อธิบายในหัวข้อก่อนหน้าซึ่งไม่พบความแตกต่างเช่นกัน

ตารางที่ 4.5 ผลของการฉีด L-arginine และ SeNPs ต่อน้ำหนักของเนื้ออก (*Pectoralis major*) ในแต่ละช่วงอายุของไก่โคราช

Weight of muscles (g)	Treatment ¹				SEM ²	P-value
	NC	IOF-1	IOF-2	IOF-3		
Hatch day	0.23	0.29	0.27	0.29	0.011	0.283
Day 7	3.85	3.77	3.69	4.10	0.071	0.188
Day 14	7.71	7.19	7.37	7.34	0.147	0.697
Day 21	13.45	12.47	12.10	14.22	0.329	0.097
Day 42	35.80	35.81	37.34	37.56	0.860	0.851
Day 63	148.91	152.95	154.90	151.92	2.640	0.902

หมายเหตุ TNF; total number of fiber, ^{a,b} Means within column carrying no common superscripts are significantly different at $P < 0.05$. ¹ Treatments consisted of Non-injected control group (NC), 1% L-arg (IOF-1), 0.3 μ g SeNPs (IOF-2), 1% L-arg+0.3 μ g SeNPs (IOF-3). ² Standard error of the mean. (n = 8/group).

ถัณฐานวิทยาของกล้ามเนื้อ: เมื่อพิจารณาถึงลักษณะทางสัณฐานวิทยากล้ามเนื้ออกของไก่โคราชเพื่อศึกษาถึงผลของการฉีด L-arg และ SeNPs ผ่านเปลือกไข่ต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์กล้ามเนื้อในช่วงระยะแรกของการเจริญเติบโตและอาจจะมีผลในระยะยาว จากผลการทดลองในครั้งนี้ไม่ได้เป็นไปตามสมมติฐานที่ตั้งไว้ทั้งหมด ซึ่งพบว่าไก่โคราชที่ได้รับการฉีด L-arg และ SeNPs ผ่านเปลือกไข่ไม่มีผลต่อการเพิ่มขนาดของเซลล์กล้ามเนื้อทุกช่วงอายุและไม่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์กล้ามเนื้ออกของไก่โคราชที่อายุ 7 14 21 42 และ 63 วัน ($P > 0.05$) แต่สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์กล้ามเนื้ออกของไก่โคราชในวันแรกของการฟักได้ ($P < 0.01$) ดังภาพที่ 4.4 (ภาคผนวก ก.6) ซึ่งไม่ได้เป็นไปตามสมมติฐานที่ว่าจะส่งผลในระยะยาว แต่มีการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าไก่เนื้อที่ได้รับการฉีด L-arg ในวันที่ 10 ผ่านเปลือกไข่ของระยะฟักสามารถเพิ่มน้ำหนักของตัวอ่อน ความหนาของเนื้ออกและน้ำหนักเฉลี่ยของไก่วันสุดท้ายได้ (Azhar et al., 2016) อีกทั้งยังมีการศึกษาในเชิงลึก พบว่า L-arg กระตุ้นการทำงานของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างเซลล์กล้ามเนื้อ (mTOR S6K1, and 4E-BP1) ให้มีการแสดงออกที่สูงขึ้นได้ (Yuan et al., 2015c; Yuan et al., 2016; Miao et al., 2017) แต่ไม่มีผลการศึกษายืนยันว่าสามารถเพิ่มจำนวนเซลล์กล้ามเนื้อได้หรือไม่ เพราะกระบวนการสร้างกล้ามเนื้อมีการทำงานที่สมดุลกันระหว่างกระบวนการสร้างและกระบวนการยับยั้งการสร้างของเซลล์ (Yang et al., 2008)

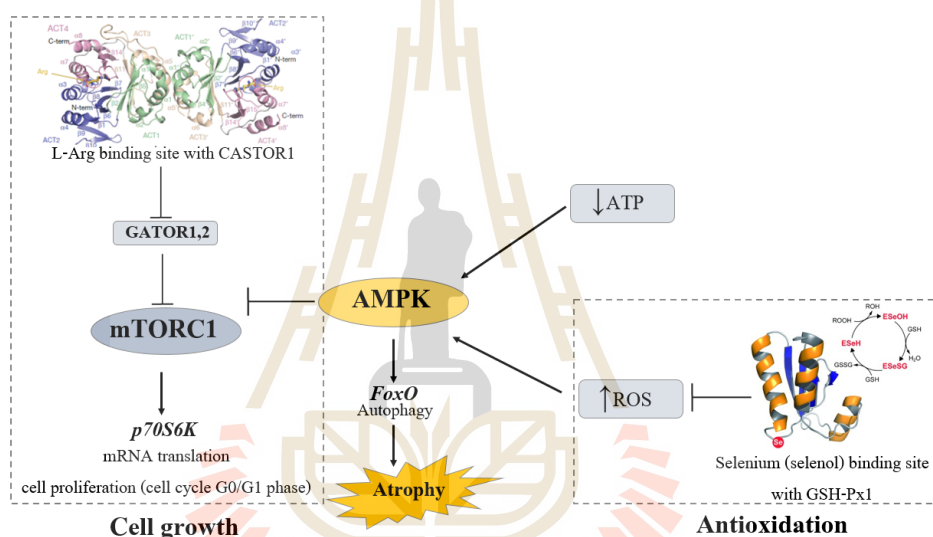


ภาพที่ 4.4 ผลของการฉีด L-arginine และ SeNPs ต่อความหนาแน่นของเซลล์ (A) และเส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์ (B) ในเนื้ออก (*Pectoralis major*) ของไก่โคราชในแต่ละช่วงอายุ

หมายเหตุ ^{A,B} Means within column carrying no common superscripts are significantly different at $P < 0.01$. ^{a,b} Means within column carrying no common superscripts are significantly different at $P < 0.05$. ¹ NC, Non-injected control group; IOF-1, 1% L-arg; IOF-2, 0.3 μg SeNPs; IOF-3, 1% L-arg+0.3 μg SeNPs. ² Standard error of the mean. (n = 8 per group).

อีกทั้งยังไม่มีการศึกษาอย่างแน่ชัดถึงกลไกของสารอาหารที่สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์กล้ามเนื้อได้โดยตรง แต่ผลจากการศึกษาก่อนหน้าและผลจากการศึกษาในครั้งนี้อาจสามารถนำมาอธิบายซึ่งกันและกันได้ว่าในไก่เนื้อที่มีปริมาณความหนาแน่นของเนื้ออกเพิ่มขึ้นอาจเนื่องมาจาก L-arg อาจไปกระตุ้นการสร้างกล้ามเนื้อแบบเพิ่มจำนวนเซลล์อย่างเดียว เพราะในช่วงเวลาที่ทำการฉีดสาร

ผ่านเปลือกไข่เป็นระยะเวลาเริ่มต้นของการพัฒนาการกล้ามเนื้อโครงร่าง (Liu et al., 2017) แต่หลังจากการฟักนั้นอาจมีการเพิ่มขนาดเซลล์อย่างรวดเร็วด้วยสายพันธุ์ร่วมกับสารอาหารที่ได้รับ หลังการฟัก ดังนั้นไก่ต่างสายพันธุ์ก็มีความจำกัดจำเพาะในการสร้างเซลล์กล้ามเนื้อที่ต่างกัน (Fernandes et al., 2009; De Carvalho, 2012; Ismail and Joo, 2017) อีกทั้งในงานทดลองครั้งนี้ได้ทำการฉีดสารอาหารในช่วงเวลาที่เซลล์กล้ามเนื้อมีการพัฒนาใกล้จะสมบูรณ์แล้ว จึงอาจเป็นไปได้ว่าการฉีดสารไม่มีผลในระยะยาวอันเนื่องมาจากช่วงเวลาการฉีดที่ไม่เหมาะสม จึงเป็นเหตุให้การทดลองครั้งนี้ไม่สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์กล้ามเนื้อ ขนาดของเซลล์ ไปจนถึงการเพิ่มปริมาณซากได้ จึงทำให้ไม่มีผลต่อน้ำหนักของไก่โคราชในระยะยาว



ภาพที่ 4.5 ผลของการฉีด L-arginine และ SeNPs ผ่านเปลือกไข่ต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์กล้ามเนื้อ

ส่วนในประเด็นที่การฉีด L-arg และ SeNPs ผ่านเปลือกไข่สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์กล้ามเนื้อของไก่โคราชในวันแรกของการฟักได้นั้น อาจเนื่องมาจากปริมาณของสารที่ฉีดในครั้งนี้อาจมีระดับของสารอาหารเพียงพอต่อการกระตุ้นการสร้างเซลล์กล้ามเนื้อเมื่อทำการฉีดในวันที่ 18 ของตัวอ่อน ดังนั้นอาจอธิบายได้ว่า L-arg เป็นตัวหลักในการกระตุ้นการสร้างเซลล์กล้ามเนื้อช่วงแรกของการฟักในไก่โคราช ซึ่งจะเห็นได้ว่าในไก่โคราชในกลุ่มที่ได้รับการฉีด L-arg (IOF-1) สามารถเพิ่มการสร้างเซลล์กล้ามเนื้อได้เช่นเดียวกับไก่โคราชกลุ่มที่ได้รับการฉีด L-arg และ SeNPs (IOF-3) ผ่านเปลือกไข่ โดย L-arg จะทำงานร่วมกับ Cellular Arginine Sensor for mTORC1 (CASTOR1) ที่สามารถเพิ่มกระบวนการทำงานของ mTORC1 โดยจะไปกระตุ้นยีน *p70S6K* ที่ควบคุมเกี่ยวกับการเพิ่มจำนวนเซลล์ (Cuyas et al., 2014) ส่วน SeNPs อาจเป็นสารอาหารที่ไม่ได้ทำการสร้างเซลล์กล้ามเนื้อโดยตรง แต่จะทำงานร่วมกับเอนไซม์ที่ต้านอนุมูลอิสระทำให้ไม่ไปยับยั้ง

กระบวนการสร้างเซลล์กล้ามเนื้อ (ภาพที่ 4.5) ซึ่งในการทดลองครั้งนี้มีการศึกษาการทำงานของ เอนไซม์ *GSH-Px* เพื่อเป็นพารามิเตอร์ที่ใช้ในการอธิบายเพิ่มเติมต่อการทำงานของ SeNPs ภายใน เซลล์กล้ามเนื้อของไก่โคราช

4.5 ผลของการฉีด L-arginine และ SeNPs ต่อการทำงานของเอนไซม์ Glutathione peroxidase (GSH-Px) ในเนื้อไก่

จากการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ Glutathione peroxidase (GSH-Px) ในเนื้ออกของไก่โคราชพบว่าไก่ที่ได้รับการฉีดสาร (IOF-1 IOF-2 และ IOF-3) ผ่านเปลือกไข่ในวันที่ 18 ของระยะฟักสามารถเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ *GSH-Px* ในกล้ามเนื้ออกของไก่ในวันแรกของการฟักได้ ($P < 0.01$) ซึ่งผลการทำงานของเอนไซม์สอดคล้องกับผลของลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่มีการเพิ่มจำนวนเซลล์กล้ามเนื้ออกของไก่โคราชในวันแรกของการฟักและสามารถอธิบายได้ว่าการฉีด SeNPs ผ่านเปลือกไข่สามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ *GSH-Px* ให้ทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพจึงส่งผลให้มีการสร้างจำนวนเซลล์เพิ่มมากขึ้น แต่อย่างไรก็ตามการทดลองในครั้งนี้ไม่ได้เป็นไปตามสมมติฐานที่ตั้งไว้เพราะไม่สามารถเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ในระยะยาวได้ อีกทั้งยังพบว่าไก่โคราชที่ได้รับการฉีด L-arg และ SeNPs ผ่านเปลือกไข่ (IOF-3) มีการทำงานของเอนไซม์ *GSH-Px* ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับไก่โคราชกลุ่มที่ไม่ได้รับการฉีดสารผ่านเปลือกไข่ (NC) ที่อายุ 14 และ 63 วัน ($P < 0.01$) โดยจากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าการเสริม SeNPs ในอาหารไก่เนื้อจะช่วยเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ Glutathione peroxidase (*GSH-Px*) ที่อายุโตเต็มวัย โดยทำให้เกิดการเสื่อมสภาพของลิพิดเนื่องจากกระบวนการออกซิเดชัน (Lipid Peroxidation) ลดลง (Zhou and Wang, 2011; Mohapatra et al., 2014; Wenhui et al., 2017; Aparna and Karunakaran, 2018) ไม่ว่าจะ เป็นในรูปแบบการฉีด SeNPs หรือในรูปแบบการให้อาหารในไก่ก็จะสามารถเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ *GSH-Px* ได้ อย่างไรก็ตามการทำงานของเอนไซม์ไม่ได้ขึ้นอยู่กับสารอาหารเพียงอย่างเดียว แต่ยังมีปัจจัยของการเกิดออกซิเดชันภายในเซลล์ รวมไปถึงตำแหน่งเนื้อเยื่อที่ทำการวัดค่าการทำงานของเอนไซม์ด้วย (Markovic et al., 2018) โดยเซลล์เนื้อเยื่อนำมาใช้เป็นตัวชี้วัดการทำงานก็จะมีวัตถุประสงค์แตกต่างกัน เช่นในกรณีการวัดการทำงานของเอนไซม์ *GSH-Px* ในตับและไตเป็นตัวชี้วัดค่าความเป็นพิษของสารแบบกึ่งเฉียบพลัน (Subacute toxicity) ถ้ามีความเป็นพิษมาการทำงานของเอนไซม์จะลดลง (Liu et al., 2016) ส่วนในกรณีที่วัดในพลาสมาจะใช้เป็นตัวชี้วัดของความเครียดที่เกิดจากกระบวนการออกซิเดชันและความสามารถของเซลล์ตับในการผลิตสารต้านอนุมูลอิสระ (Jacobson et al., 2012) และในกรณีที่ทำการวัดในเซลล์กล้ามเนื้อสามารถเป็นตัวชี้วัดในเชิงปริมาณของชนิดกล้ามเนื้อ (I,IIA, IIX และ IIB) อีกด้วย ซึ่งการทำงานของเอนไซม์ *GSH-Px* ยังขึ้นอยู่กับค่า pH ด้วย โดยจะทำงานได้ดีที่ค่า pH 8.0 และทำงานได้ดีที่ค่า pH 6.0 (Cichoski et al.,

2012) ดังนั้นการทำงานของเอนไซม์ GSH-Px ที่ลดลงในเซลล์เนื้อออกของไก่โคราชที่ได้รับการฉีด L-arg และ SeNPs ผ่านเปลือกไข่ (IOF-3) อาจเนื่องมาจากปัจจัยอื่นที่ได้ระบุไว้ข้างต้นนอกเหนือจาก ปัจจัยในการฉีดสารผ่านเปลือกไข่

ตารางที่ 4.6 ผลของการฉีด L-arginine และ SeNPs ต่อระดับการทำงานของเอนไซม์ GSH-Px (units/g) ในกล้ามเนื้อออกของไก่โคราชในแต่ละช่วงอายุ

Age of chicken (day)	Treatment ¹				SEM ²	P-value
	NC	IOF-1	IOF-2	IOF-3		
Hatch day	0.005 ^C	0.007 ^B	0.007 ^B	0.010 ^A	0.001	0.001
Day 7	0.404 ^{ab}	0.318 ^b	0.297 ^b	0.397 ^a	0.015	0.015
Day 14	0.703 ^B	0.742 ^A	0.641 ^{AB}	0.412 ^C	0.035	0.001
Day 21	0.411 ^B	0.524 ^{AB}	0.610 ^A	0.466 ^{AB}	0.026	0.009
Day 42	0.640 ^{ab}	0.561 ^b	0.748 ^a	0.653 ^{ab}	0.025	0.023
Day 63	0.515 ^A	0.424 ^B	0.579 ^A	0.409 ^B	0.020	0.001

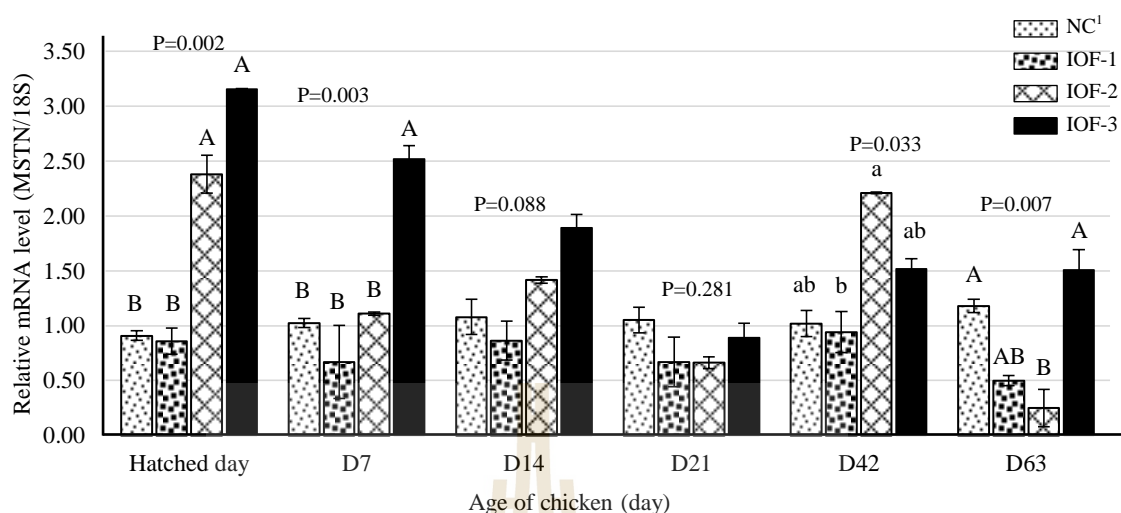
หมายเหตุ ^{A,B,C,D} Means within column carrying no common superscripts are significantly different at P<0.01. ^{a,b,c} Means within column carrying no common superscripts are significantly different at P<0.05. ¹ NC, Non-injected control group; IOF-1, 1% L-arg; IOF-2, 0.3 µg SeNPs; IOF-3, 1% L-arg+0.3 µg SeNPs. ² Standard error of the mean. (n = 8 per group).

4.6 ผลของการฉีด L-arginine และ SeNPs ต่อระดับการแสดงออกของยีน *MSTN* ในกล้ามเนื้อออกของไก่โคราช

ยีน Myostatin (*MSTN*) เป็นอีกหนึ่งยีนที่มีบทบาทสำคัญในกล้ามเนื้อโครงร่างนอกจากกลุ่มยีนที่สร้างกล้ามเนื้อ (mTORC1) โดยยีน *MSTN* ทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งการเพิ่มจำนวน (Proliferation) และความแตกต่าง (Differentiation) ของ Myoblasts (Tripathi et al., 2012) จะเพิ่มการย่อยสลายโปรตีนโดยการเปิดใช้งานของ Catabolism proteasomal-mediated ของโปรตีนภายในเซลล์ให้ไปยับยั้งกระบวนการสร้างเซลล์กล้ามเนื้อ (Sriram et al., 2011) จึงนำยีนนี้มาใช้เป็นตัวชี้วัดเพื่อเป็นส่วนหนึ่งในการอธิบายกระบวนการสร้างเซลล์กล้ามเนื้อของไก่โคราช และเพื่อนำไปใช้เป็นข้อมูลในการอธิบายผลการทดสอบสมมติฐานข้อที่สองที่กล่าวว่าการฉีด L-arg และ SeNPs ผ่านเปลือกไข่จะสามารถลดการแสดงออกของยีน *MSTN* อาจจะทำให้มีการสร้างเซลล์กล้ามเนื้อเพิ่มขึ้น ซึ่งผล

การทดลองในครั้งนี้ไม่เป็นไปตามสมมติฐานที่ตั้งไว้ โดยพบว่าโกโคราซกลุ่มที่ได้รับการฉีด SeNPs (IOF-2) และโกโคราซในกลุ่มที่ได้รับการฉีด L-arg ร่วมกับ SeNPs (IOF-3) มีการแสดงออกของยีน *MSTN* เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับโกโคราซกลุ่มที่ไม่ได้รับการฉีดสารผ่านเปลือกไข่ (NC) ที่วันแรกของการฟัก และที่อายุ 7 วัน ($P < 0.01$) แต่ไม่ส่งผลกระทบต่อการแสดงออกของยีน *MSTN* หลังจากโกโคราซอายุ 14 วัน (ภาพที่ 4.6) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Dushyanth et al. (2016) ที่รายงานว่า การแสดงออกระหว่างการพัฒนาตัวอ่อนของไก่ในทุกสายพันธุ์และมีการแสดงออกของยีน *MSTN* ค่อนข้างสูงในช่วงตัวอ่อนที่อายุ 10 วัน จนถึง 15 วัน หลังจากนั้นจะมีแนวโน้มการแสดงออกของยีนลดลง

ในประเด็นของโกโคราซกลุ่มที่ได้รับการฉีด SeNPs (IOF-2) และโกโคราซในกลุ่มที่ได้รับการฉีด L-arg ร่วมกับ SeNPs (IOF-3) สามารถเพิ่มการแสดงออกของยีน *MSTN* ซึ่งการทดลองในครั้งนี้ไม่มีผลสอดคล้องกับการศึกษาของ Li et al. (2016) ที่พบว่าการฉีด L-arg ผ่านเปลือกไข่ของไก่เนื้อจะเพิ่มการทำงานของยีน *MSTN* ซึ่งในงานทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าโกโคราซกลุ่มที่ได้รับการฉีด L-arg (IOF-2) ผ่านเปลือกไข่ไม่สามารถเพิ่มการแสดงออกของยีนได้ จึงอาจสรุปได้ว่าสารอาหารที่กระตุ้นการแสดงออกของยีน *MSTN* ในเนื้ออกของโกโคราซในวันแรกของการฟักคือ SeNPs จากที่ผลเป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากภายในเซลล์มี $TNF-\alpha$ และ NADPH oxidase เป็นจำนวนมากซึ่งเกิดจากกระบวนการเกิดออกซิเดชัน โดยสารเหล่านั้นจะเป็นตัวกระตุ้นการแสดงออกของยีน *MSTN* (Sriram et al., 2011) โดยในไก่กลุ่มที่ได้รับการฉีด SeNPs (IOF-2, 3) อาจจะมีการเกิดออกซิเดชันที่สูงจึงมีผลสอดคล้องกับผลการทดลองในหัวข้อก่อนหน้านี้ที่สามารถเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ GSH-Px ด้วยเช่นกัน ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ไม่ได้ทำการศึกษาระบวนการเกิดออกซิเดชันภายในเซลล์จึงไม่สามารถอธิบายถึงประเด็นนี้ได้อย่างชัดเจน แต่อย่างไรก็ตามมีการศึกษาเพิ่มเติมของ Amthor et al. (2007) และ Babcock et al. (2015) ที่พบว่าชนิดของกล้ามเนื้อก็เป็นอีกหนึ่งปัจจัยในการกระตุ้นการแสดงออกของยีนได้ด้วยเช่นกัน เนื่องจากยีน *MSTN* จะมีตัวรับที่มีความจำเพาะกับกล้ามเนื้อสรีษานิค IIB (Glycolytic) คือ Activin receptor (ActRIIB) อีกทั้งยังพบว่าในไก่เพศผู้จะมีการแสดงออกของยีนที่สูงกว่าเพศเมียเนื่องจากมีกล้ามเนื้อชนิด IIB มากกว่าถึง 12% (Ismail and Joo, 2017) แต่อย่างไรก็ตามผลการทดลองครั้งนี้สามารถเพิ่มการแสดงออกของยีน *MSTN* ในไก่กลุ่มที่ได้รับการฉีด L-arg ร่วมกับ SeNPs แต่ไม่ได้ส่งผลกระทบต่อค่าพารามิเตอร์อื่นๆ และยังไม่สามารถสรุปได้ว่าเหตุใดจึงไม่มีผลกระทบทางด้านลบของน้ำหนักเฉลี่ยของโกโคราซในระยะยาวจึงต้องมีการศึกษาถึงความสัมพันธ์ซึ่งได้อธิบายในหัวข้อถัดไป



ภาพที่ 4.6 ผลของการฉีด L-arginine และ SeNPs ต่อระดับการแสดงออกของยีน *MSTN* ในกล้ามเนื้ออกของไก่โคราชในแต่ละช่วงอายุ

หมายเหตุ ^{A,B} Means within column carrying no common superscripts are significantly different at $P < 0.01$. ^{a,b} Means within column carrying no common superscripts are significantly different at $P < 0.05$. ¹ NC, Non-injected control group; IOF-1, 1% L-arg; IOF-2, 0.3 μg SeNPs; IOF-3, 1% L-arg+0.3 μg SeNPs. ² Standard error of the mean. (n = 8 per group).

4.7 ความสัมพันธ์ระหว่างระดับการแสดงออกของยีน *MSTN* การทำงานของเอนไซม์ Glutathione peroxidase (GSH-Px) สัณฐานวิทยาของกล้ามเนื้ออกและน้ำหนักตัวของไก่โคราชในแต่ละช่วงอายุ

เพื่อทดสอบสมมุติฐานข้อที่ 2 ที่ว่าการแสดงออกของยีน *MSTN* ที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งกระบวนการสร้างกล้ามเนื้อ เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการอธิบายถึงเหตุของกระบวนการสร้างกล้ามเนื้อของไก่โคราช ซึ่งจากผลการศึกษาไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างระดับการแสดงออกของยีน *MSTN* การทำงานของ GSH-Px สัณฐานวิทยาของกล้ามเนื้ออก และน้ำหนักตัวของไก่โคราชในกลุ่มที่ได้รับการฉีด L-arg และ SeNPs ผ่านเปลือกไข่ของไก่โคราช แสดงดังตารางที่ 4.7

แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษาในครั้งนี้ น้ำหนักตัวของไก่โคราชมีความสัมพันธ์กับสัณฐานวิทยาของกล้ามเนื้ออก โดยที่มีความสัมพันธ์ในเชิงลบกับความหนาแน่นของเซลล์กล้ามเนื้อและความสัมพันธ์ในเชิงบวกกับขนาดของเซลล์กล้ามเนื้อ ($P < 0.01$) ซึ่งเป็นไปตามการศึกษาของ Chen et

al. (2007) กล่าวว่าน้ำหนักตัวและอัตราการเจริญเติบโตเป็นปัจจัยที่สำคัญที่สุดในการกำหนดขนาดเส้นใยกล้ามเนื้อ อีกทั้งยังพบว่าการทำงานของ GSH-Px ก็เป็นอีกหนึ่งปัจจัยหลักที่มีความสัมพันธ์กับสัญญาณวิทยาของกล้ามเนื้อออกซึ่งมีผลเป็นไปในทิศทางเดียวกับน้ำหนักตัวที่ได้อธิบายไว้ก่อนหน้านี้ ($P < 0.01$)

ซึ่งอาจอธิบายได้ว่าจากการศึกษาในครั้งนี้ไม่สามารถนำการแสดงออกของยีน *MSTN* เป็นข้อมูลที่จะนำมาใช้ในการอธิบายถึงเหตุของกระบวนการสร้างกล้ามเนื้อของไก่โคราชได้ อาจเนื่องมาจากในวันที่ทำการฉีดสารอาหารผ่านเปลือกไข่เป็นระยะที่เซลล์หรือยีนถูกจำกัดการทำงาน ซึ่งถูกควบคุมด้วยยีนเป็นจำนวนมาก (Hay and Sonenberg, 2004; Zhang et al., 2014) จึงเป็นเหตุทำให้ในการศึกษาครั้งนี้ไม่สามารถนำยีนเพียงตัวเดียวมาใช้อธิบายกระบวนการสร้างกล้ามเนื้อของไก่โคราชได้ แต่อย่างไรก็ตามเพื่อให้ทราบถึงความสัมพันธ์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างกล้ามเนื้อต่อการฉีดสารอาหารผ่านเปลือกไข่อาจจะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงผลการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องทั้งหมดต่อกระบวนการสร้างกล้ามเนื้อ โดยการแสดงออกของยีนในกลุ่มที่สร้างกล้ามเนื้อจะต้องมีความสัมพันธ์ในเชิงบวก และกลุ่มที่ยับยั้งการสร้างจะต้องมีความสัมพันธ์ในเชิงลบกับน้ำหนักตัว จึงสามารถใช้ข้อมูลชุดนั้นมาใช้อธิบายถึงเหตุของกระบวนการที่จะเพิ่มปริมาณเนื้อในไก่โคราชได้

4.8 ผลของการฉีด L-arginine และ SeNPs ต่อสุขภาพและสารตกค้างในไก่โคราช

4.8.1 ผลของการฉีด L-arginine และ SeNPs ต่อค่าชีวเคมีของซีรัมในไก่โคราช

จากการศึกษาความเป็นพิษของการฉีด L-arg และ SeNPs ผ่านเปลือกไข่ในรูปแบบกึ่งเฉียบพลัน โดยใช้ค่าชีวเคมีของซีรัมเป็นตัวชี้วัดทางด้านสุขภาพของสัตว์ ซึ่งผลการทดลองนี้เป็นไปตามสมมติฐานที่ตั้งไว้ โดยพบว่าไก่โคราชที่ได้รับการฉีด L-arg และ SeNPs ผ่านเปลือกไข่ที่อายุ 18 วันของระยะฟักไม่มีผลต่อค่า โปรตีนรวม (Total protein) อัลบูมิน (Albumin:A) โกลบูลิน (Globulins:G) สัดส่วน A/G และกรดยูริก (Uric acid) ($P > 0.05$) ดังตารางที่ 4.7 ซึ่งเป็นไปตามการศึกษาก่อนหน้านี้ (Gao et al., 2000; Bai et al., 2017; Zhang et al., 2019) โดยอัลบูมิน และ โกลบูลินสามารถเป็นตัวชี้วัดความสามารถในการสังเคราะห์สารภายในเซลล์ของตับ (Pan et al. 2009) ถ้าในกรณีที่สัตว์ได้รับสารพิษเข้าสู่ร่างกาย เซลล์ตับจะเกิดความเสียหายจะทำให้มีค่าอัลบูมินลดลงและค่าโกลบูลินสูงขึ้น จึงทำให้มีสัดส่วน A/G ลดลง (Santhosh et al., 2007) และทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนไปเป็นกรดยูริกมากขึ้น (Barbosa et al., 2016)

ตารางที่ 4.7 ความสัมพันธ์ระหว่างระดับการแสดงออกของยีน *MSTN* การทำงานของเอนไซม์ Glutathione peroxidase (GSH-Px) สัตว์ฐานวิทยาของกล้ามเนื้อ และน้ำหนักตัวของไก่โคราชในแต่ละช่วงอายุ

Item		Treatment ¹							
		NC		IOF-1		IOF-2		IOF-3	
		R ²	P-value	R ²	P-value	R ²	P-value	R ²	P-value
Body weight	Muscle density	-0.734 ^{**}	<0.01	-0.695 ^{**}	<0.01	-0.769 ^{**}	<0.01	-0.695 ^{**}	<0.01
	Muscle diameter	0.963 ^{**}	<0.01	0.919 ^{**}	<0.01	0.963 ^{**}	<0.01	0.965 ^{**}	<0.01
	<i>MSTN</i> expression	-0.524 ^{**}	<0.01	-0.346	0.098	0.042	0.845	-0.305	0.147
	GSH-Px activity	0.387	0.062	0.436 [*]	0.033	0.482 [*]	0.017	0.382	0.065
Muscle density	Muscle diameter	-0.846 ^{**}	<0.01	-0.818 ^{**}	<0.01	-0.871 ^{**}	<0.01	-0.831 ^{**}	<0.01
	<i>MSTN</i> expression	0.531 ^{**}	<0.01	0.556 ^{**}	<0.01	0.209	0.326	0.256	0.228
	GSH-Px activity	-0.807 ^{**}	<0.01	-0.879 ^{**}	<0.01	-0.876 ^{**}	<0.01	-0.857 ^{**}	<0.01
Muscle diameter	<i>MSTN</i> expression	-0.563 ^{**}	<0.01	-0.562 ^{**}	<0.01	-0.061	0.777	-0.397	0.055
	GSH-Px activity	0.555 ^{**}	<0.01	0.587 ^{**}	<0.01	0.628 ^{**}	<0.01	0.538 ^{**}	<0.01
<i>MSTN</i> expression	GSH-Px activity	-0.270	0.201	-0.417 [*]	0.042	-0.248	0.242	0.032	0.883

หมายเหตุ^{**} Means within column carrying no common superscripts are significantly different at P<0.01.

^{*} Means within column carrying no common superscripts are significantly different at P<0.05.

¹ Treatments consisted of Non-injected control group (NC) 1% L-arg (IOF-1) 0.3 µg SeNPs (IOF-2) 1% L-arg+0.3 µg SeNPs (IOF-3).

ตารางที่ 4.8 ผลของการฉีด L-arginine และ SeNPs ต่อค่าชีวเคมีของซีรัมในไก่โคราช

Items	Treatment ¹				SEM ²	P-value
	NC	IOF-1	IOF-2	IOF-3		
Total protein (g/L)	3.29	3.27	3.16	3.15	0.080	0.597
Albumin (g/L)	1.13	1.11	1.10	1.12	0.027	0.977
Globulins (g/L)	2.16	2.16	2.06	2.03	0.060	0.827
A/G ratio ³	0.52	0.48	0.50	0.52	0.014	0.454
Uric acid (mmol/L)	3.04	3.61	3.30	3.21	0.218	0.853

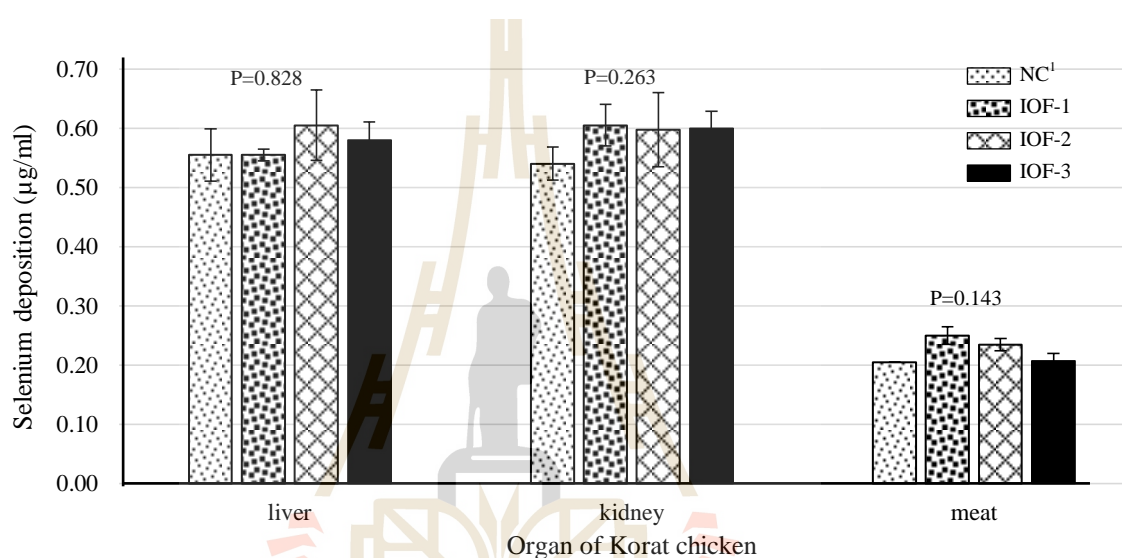
หมายเหตุ^{A,B} Means within column carrying no common superscripts are significantly different at $P < 0.01$. ^{a,b} Means within column carrying no common superscripts are significantly different at $P < 0.05$. ¹ NC, Non-injected control group; IOF-1, 1% L-arg; IOF-2, 0.3 μg SeNPs; IOF-3, 1% L-arg+0.3 μg SeNPs. ² Standard error of the mean. (n = 8 per group). ³ A/G ratio = Albumin/Globulin ratio

4.8.2 ผลของการฉีด L-arginine และ SeNPs ต่อการสะสมของอนุภาคนาโนซีลีเนียมในอวัยวะของไก่โคราช

ในการศึกษาผลของการฉีด L-arg และ SeNPs ผ่านเปลือกไข่ต่อการสะสมของอนุภาคนาโนซีลีเนียมในแต่ละอวัยวะของไก่โคราช มีวัตถุประสงค์เพื่อให้ทราบถึงการฉีดสารอาหารที่มีขนาดอนุภาคเล็กจะมีสารตกค้างในอวัยวะของสัตว์รวมไปถึงผู้บริโภคหรือไม่ โดยการศึกษาในครั้งนี้มีการทดลอง SeNPs ตกค้างในเซลล์ตับ (ตัวกลางการเผาผลาญพลังงาน) ไต (กำจัดของเสีย) และเนื้ออก (การสะสม) จากผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่าเป็นไปตามสมมติฐานที่ตั้งไว้ คือ ไก่โคราชในกลุ่มที่ได้รับการฉีดสาร (IOF-1, IOF-2 และ IOF-3) ผ่านเปลือกไข่ในวันที่ 18 ของระยะฟัก เมื่อทำการวัดสารตกค้างโดยวัดจากปริมาณซีลีเนียมในเนื้อเยื่อตับ, ไต และเนื้ออกในไก่โคราชอายุ 63 วัน ไม่พบความแตกต่างของปริมาณซีลีเนียมทั้งหมด ($P > 0.05$) ดังภาพที่ 4.7 ซึ่งการวิเคราะห์ในครั้งนี้ไม่ได้จำเพาะรูปของซีลีเนียมแต่เป็นการวิเคราะห์สารประกอบที่มีซีลีเนียมเป็นองค์ประกอบทั้งในรูปอนินทรีย์ (S^0 , SeO_3^{2-} , SeO_4^{2-} , H_2Se) และในรูปอินทรีย์ (Se-Met, Se-Cys) อย่างไม่ทราบชนิดที่ไม่พบสารตกค้างอาจเนื่องมาจากการทดลองครั้งนี้สังเคราะห์ SeNPs ขนาดประมาณ 25 นาโนเมตร และมีความเสถียรของการจับกับกับ BSA จึงทำให้ไม่สามารถส่งผ่านไปที่ตับและไตได้โดยตรงเมื่อเปรียบเทียบกับซีลีเนียมแบบอนินทรีย์และอินทรีย์ ซึ่งจะมียุ่ที่เล็กกว่าอยู่ที่ประมาณ 0.2 นาโนเมตร โดยพบว่าถ้ามีขนาดเล็กกว่า 5 นาโนเมตรจะสามารถผ่านเข้าสู่เซลล์ไตได้โดยตรง และถ้ามีขนาดเล็กกว่า 20 นาโนเมตรจะสามารถผ่านเข้าสู่เซลล์ตับโดยตรง

(Bose et al., 2014) ซึ่งจะส่งผลให้เข้าไปทำลายหรือไปสะสมภายในเซลล์มากเกินไป ด้วยเหตุนี้ SeNPs จึงมีพิษต่ำกว่าเมื่อเทียบกับรูปแบบซีลีเนียมอื่นๆ (Gulyas et al., 2017) ส่วนกรณีที่ SeNPs ไม่ไปสะสมในเซลล์ของกล้ามเนื้อออกอาจเนื่องมาจาก SeNPs เข้าไปทำงานร่วมกับ GSH-Ps โดยไม่ทำให้เกิด Se^0 จึงส่งผลให้ไม่มีการสะสมในเซลล์กล้ามเนื้อของไก่โคราช

ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้จึงไม่สามารถสรุปได้ว่าไก่โคราชที่ได้รับการฉีด L-arg และ SeNPs ผ่านเปลือกไข่ไม่ส่งผลกระทบต่อทางด้านสุขภาพของไก่โคราช และไม่มีการตกค้างของอันเนื่องมาจากซีลีเนียมภายในอวัยวะของไก่โคราชซึ่งมีผลทำให้ไม่ส่งผลกระทบต่อผู้บริโภค



ภาพที่ 4.7 ผลของการฉีด L-arginine และ SeNPs ต่อค่าความเป็นพิษของอนุภาคนาโนซีลีเนียมในตับ ไต และเนื้ออกของไก่โคราช อายุ 9 สัปดาห์

หมายเหตุ ¹ NC, Non-injected control group; IOF-1, 1% L-arg; IOF-2, 0.3 µg SeNPs; IOF-3, 1% L-arg+0.3 µg SeNPs. ² Standard error of the mean. (n = 8 per group).

บทที่ 5

สรุปและข้อเสนอแนะ

จากผลการทดลองศึกษาผลของการฉีด L-arginine และ SeNPs ผ่านเปลือกไข่ ต่อการพัฒนาของกล้ามเนื้อ การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างกล้ามเนื้อ และคุณภาพเนื้อของไก่โคราช สามารถสรุปประเด็นต่างๆ ดังนี้

1) การศึกษาการสังเคราะห์ SeNPs โดยใช้ BSA พบว่าสามารถสังเคราะห์สารให้มีขนาดอนุภาค 25.52 ± 3.35 นาโนเมตร และสามารถนำ BSA-SeNPs มาใช้ในรูปแบบของการฉีดสารผ่านเปลือกไข่โดยไม่ส่งผลกระทบต่อตัวอ่อน แต่การสังเคราะห์ในรูปแบบนี้ไม่ได้มีความจำเพาะต่อเซลล์กล้ามเนื้อของไก่โคราช จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในเรื่องดังต่อไปนี้

- ศึกษาถึงการสังเคราะห์สารในรูปของ L-Arg-SeNPs ที่มีความจำเพาะต่อเซลล์กล้ามเนื้อ โดยการเพิ่มตัวจับโมเลกุลที่เป็นกลาง (Neutral molecule) หรือที่เรียกว่าลิแกนด์ (Ligand) ที่เฉพาะกับเซลล์กล้ามเนื้อลายของไก่โคราช

- ศึกษาถึงการนำส่งสารอาหารจากอวัยวะเริ่มต้นไปสู่อวัยวะเป้าหมาย และช่วงเวลาที่เหมาะสมในตัวอ่อนต่อการสร้างกล้ามเนื้อ เพื่อรู้ถึงระดับสารที่เหมาะสมต่อการสร้างเซลล์กล้ามเนื้อของไก่โคราช

2) การศึกษาการฉีด L-arginine และ SeNPs เปลือกไข่ไม่ส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพการเจริญเติบโต และองค์ประกอบซาก แต่สามารถเพิ่มการสะสมของโปรตีนและลดการสูญเสียไขมันเนื้ออก อีกทั้งยังสามารถลดอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนักตัว ของไก่โคราชที่อายุ 63 วัน ซึ่งไม่สามารถเพิ่มน้ำหนักซากในระยะยาวได้ จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในเรื่องดังต่อไปนี้

- ศึกษาถึงช่วงอายุของตัวอ่อน และระดับสารอาหารที่เหมาะสมในนิตสารผ่านเปลือกไข่ เพื่อสามารถสร้างเซลล์กล้ามเนื้อทั้งในระยะก่อนฟักและหลังฟัก จึงนำไปสู่การเพิ่มน้ำหนักในระยะยาว

- ศึกษาเปรียบเทียบรูปแบบการให้สารอาหารระหว่างการผสมในอาหารแม่ไก่ มทส. กับการฉีดสารผ่านเปลือกไข่ต่อองค์ประกอบสารอาหารภายในไข่ไก่โคราช

3) การศึกษาการฉีด L-arginine และ SeNPs เปลือกไข่ไม่ส่งผลกระทบต่อน้ำหนักเฉลี่ยของเนื้อ และขนาดเส้นใยกล้ามเนื้ออก แต่สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์กล้ามเนื้อในวันแรกของการฟัก โดยที่ไม่สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์เนื้ออกของไก่โคราชในระยะยาวได้ จึงควรมีการศึกษาถึงการเปรียบเทียบ

รูปแบบการให้สารอาหารระหว่างการฉีดสารกับการผสมอาหารต่อสัณฐานวิทยาของกล้ามเนื้ออกของไก่โคราช

4) การศึกษาการฉีด L-arginine และ SeNPs เปลือกไข่ สามารถการทำงานของเอนไซม์ GSH-Px ในวันแรกของการฟักของไก่โคราชได้ แต่อย่างไรก็ตามมีปัจจัยหลายประการที่มีผลต่อการดำเนินงานของเอนไซม์ GSH-Px จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในเรื่องดังต่อไปนี้คือ ศึกษาถึงการเกิดกระบวนการ Lipid oxidation (Malondialdehyde: MAD, lipoxygenase activity: LOX, conjugate dienes: CD), Protein oxidation (Protein carbonyl content: PC, ischemia modified albumin: IMA) และค่าการรั่วไหลของอิเล็กตรอนภายในเซลล์ (Electrolyte leakage: EL) รวมไปถึงชนิดของกล้ามเนื้อ (I, IIA, IIX และ IIB) เพื่อเป็นตัวบ่งชี้ของกระบวนการเกิดออกซิเดชันภายในเซลล์ของไก่โคราชที่ได้รับการฉีดสารอาหารผ่านเปลือกไข่

5) การศึกษาของการฉีด L-arginine และ SeNPs ผ่านเปลือกไข่ สามารถเพิ่มการแสดงออกของยีน *MSTN* ในวันแรกของการฟัก โดยที่ไม่สามารถเพิ่มการแสดงออกของยีนในเนื้ออวัยวะยาวได้ แต่ก็ไม่ส่งผลต่อการเพิ่มของน้ำหนักตัวเฉลี่ยของไก่โคราช ซึ่งยังไม่เป็นที่แน่ชัดในการอธิบายกระบวนการสร้างกล้ามเนื้อ จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงการแสดงออกของกลุ่มยีนที่กระตุ้นการสร้างกล้ามเนื้อเช่น mTOR, MyoD, MyoG, Pax7, p70S6K1 ฯลฯ เพื่อเป็นตัวชี้วัดในการอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างการกระตุ้นและการยับยั้งที่มีความสมดุลกันจึงเกิดเป็นการสร้างกล้ามเนื้อของไก่โคราช

6) การศึกษาผลของการฉีด L-arginine และ SeNPs ผ่านเปลือกไข่ ไม่มีผลต่อค่าโปรตีนรวม, อัลบูมิน, โกลบูลิน, สัดส่วน A/G และกรดยูริก ซึ่งทำให้ไม่เป็นอันตรายต่อสุขภาพของไก่โคราช และไม่มีการตกค้างของซีลีเนียมภายในเซลล์ จึงทำให้ไม่ส่งผลกระทบต่อผู้บริโภค

ดังนั้นจากการศึกษาในครั้งนี้สามารถแสดงให้เห็นว่าการฉีดสารอาหารผ่านเปลือกไข่สามารถนำมาประยุกต์ใช้จริงได้ในโรงฟัก ซึ่งเป็นการให้สารอาหารระยะแรกของการฟัก อีกทั้งยังพบว่าสามารถนำสารอาหารที่มีขนาดอนุภาคนาโนมาใช้ในการฉีดสารอาหาร หรือประกอบในสูตรอาหารไก่ได้โดยที่ไม่ส่งผลกระทบต่อผู้บริโภค แต่อย่างไรก็ตามควรต้องมีการศึกษาถึงระดับและระยะเวลาการฉีดสารที่เหมาะสมกับจึงจะสามารถเพิ่มปริมาณของซากเพื่อตัดแต่งชิ้นส่วนจนนำไปสู่การเพิ่มมูลค่าของเนื้อไก่ให้แก่เกษตรกรผู้เลี้ยงไก่โคราชได้

รายการอ้างอิง

- Alizadeh, M., A. Safaeiyan, A. Ostadrahimi, R. Estakhri, S. Daneghian, A. Ghaffari, and B. P. Gargari. 2012. Effect of L-arginine and selenium added to a hypocaloric diet enriched with legumes on cardiovascular disease risk factors in women with central obesity: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Annals of Nutrition & Metabolism**. 60: 157-168.
- Alkhudhayri, A. A., M. A. Dkhil, and S. Al-Quraishy. 2018. Nanoselenium prevents eimeriosis-induced inflammation and regulates mucin gene expression in mice jejunum. **International Journal of Nanomedicine**. 13: 1993-2003.
- Amthor, H., R. Macharia, R. Navarrete, M. Schuelke, S. C. Brown, A. Otto, T. Voit, F. Muntoni, G. V. va, T. Partridge, P. Zammit, L. Bungler, and K. Patel. 2007. Lack of myostatin results in excessive muscle growth but impaired force generation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 104: 1835-1840.
- AOAC. 1990. Official of methods of analysis of Association of Official Analytical Chemists. Arlington VA
- Aparna, N., and R. Karunakaran. 2018. Effect of Selenium Nanoparticles Supplementation on Oxidation Resistance of Broiler Chicken. **Indian Journal of Science and Technology**. 9: 0974-5645.
- Azhar, M., D. P. Rahardja, and W. Pakiding. 2016. Embryo Development and Post-Hatch Performances of Kampung Chicken by in Ovo Feeding of L-Arginine. **Media Peternakan**. 39: 168-172.
- Babcock, L. W., M. Knoblauch, and M. S. Clarke. 2015. The role of myostatin and activin receptor IIB in the regulation of unloading-induced myofiber type-specific skeletal muscle atrophy. **Journal of Applied Physiology**. 119: 633-642.
- Bai, K., B. Hong, J. He, Z. Hong, and R. Tan. 2017. Preparation and antioxidant properties of selenium nanoparticles-loaded chitosan microspheres. **International Journal of Nanomedicine**. 12: 4527-4539.

- Barbosa, H. M., J. N. Nascimento, T. A. Araujo, F. S. Duarte, U. P. Albuquerque, J. R. Vieira, E. R. Santana, R. Yara, C. S. Lima, D. A. Gomes, and E. C. Lira. 2016. Acute Toxicity and Cytotoxicity Effect of Ethanolic Extract of *Spondias tuberosa* Arruda Bark: Hematological, Biochemical and Histopathological Evaluation. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**. 88: 1993-2004.
- Berri, C., E. Le Bihan-Duval, M. Debut, V. Sante-Lhoutellier, E. Baeza, V. Gigaud, Y. Jego, and M. J. Duclos. 2007. Consequence of muscle hypertrophy on characteristics of Pectoralis major muscle and breast meat quality of broiler chickens. **Journal of Animal Science**. 85: 2005-2011.
- Bose, T., D. Latawiec, P. P. Mondal, and S. Mandal. 2014. Overview of nano-drugs characteristics for clinical application: the journey from the entry to the exit point. **Journal of Nanoparticle Research**. 16: 2527-2534.
- Cai, S. J., C. X. Wu, L. M. Gong, T. Song, H. Wu, and L. Y. Zhang. 2012. Effects of nano-selenium on performance, meat quality, immune function, oxidation resistance, and tissue selenium content in broilers. **Poultry Science**. 91: 2532-2539.
- Cao, H., J. Xiao, and H. Liu. 2019. Enhanced oxidase-like activity of selenium nanoparticles stabilized by chitosan and application in a facile colorimetric assay for mercury (II). **Biochemical Engineering Journal**. 152: 1369-1379.
- Chen, G. H., H. F. Li, X. S. Wu, B. C. Li, K. Z. Xie, G. J. Dai, K. W. Chen, X. Y. Zhang, and K. H. Wang. 2002. Factors Affecting the Inosine Monophosphate Content of Muscles in Taihe Silkies Chickens. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**. 15: 1539-1363.
- Chen, J. C., and D. J. Goldhamer. 2003. Skeletal muscle stem cells. **Reproductive Biology and Endocrinology**. 1: 101-107.
- Chen, X.D., Q.G. Ma, M.Y. Tang, C. Ji. 2007. Development of breast muscle and meat quality in Arbor Acres broilers, Jingxing 100 crossbred chickens and Beijing fatty chickens. **Meat Sciences**. 77: 220-227.
- Chumngoen, W., H. Y. Chen, and F. J. Tan. 2016. Validation of feasibility and quality of chicken breast meat cooked under various water-cooking conditions. **Animal Science Journal**. 87: 1536-1544.

- Cichoski, A. J., R. B. Rotta, G. Scheuermann, A. Cunha Junior, and J. S. Barin. 2012. Investigation of glutathione peroxidase activity in chicken meat under different experimental conditions. **Journal of Food Science and Technology**. 32: 661-667.
- Cruz, R. F., S. L. Vieira, L. Kindlein, M. Kipper, H. S. Cemin, and S. M. Rauber. 2017. Occurrence of white striping and wooden breast in broilers fed grower and finisher diets with increasing lysine levels. **Poultry Science**. 96: 501-510.
- Cuyas, E., B. Corominas Faja, J. Joven, and J. Menendez. 2014. Cell Cycle Regulation by the Nutrient-Sensing Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Pathway. **Methods in Molecular Biology**. 1170: 113-44.
- De Carvalho, F. B., J. H. Stringhini, M. S. Matos, R. M. J. Filho, M. B. Café, N. S. M. Leandro, and M. A. Andrade. 2012. Performance and nitrogen balance of laying hens fed increasing levels of digestible lysine and arginine. **Revista Brasileira de Zootecnia**. 41: 2183-2188.
- Dennis, J. S. 2004. Enzymes of the L-Arginine to Nitric Oxide Pathway. **Nutritional Sciences**. 13: 2748-2751.
- Dushyanth, K., T. K. Bhattacharya, R. Shukla, R. N. Chatterjee, T. Sitaramamma, C. Paswan, and P. Guru Vishnu. 2016. Gene Expression and Polymorphism of Myostatin Gene and its Association with Growth Traits in Chicken. **Animal Biotechnology**. 27: 269-277.
- Ebrahimi, M., H. Janmohammadi, H. D. Kia, G. Moghaddam, Z. Rajabi, S.A. Rafat , and A. Javanmard. 2017. The effect of L-lysine in ovo-feeding on body weight characteristics and small intestine morphology in a day-old Ross broiler chicks. **Revue de médecine vétérinaire**. 68: 116-125.
- Fabio. 2008. Basic aspects of in ovo injection in commercial hatcheries. **Journal of Animal Health and Production**. 26: 134-149.
- Fernandes, J. I., A. E. Murakami, E. N. Martins, M. I. Sakamoto, and E. R. Garcia. 2009. Effect of arginine on the development of the pectoralis muscle and the diameter and the protein:deoxyribonucleic acid rate of its skeletal myofibers in broilers. **Poultry Science**. 88: 1399-1406.
- Fouad, A. A., H. K. El-Senousey, X. J. Yang, and J. H. Yao. 2012. Role of dietary l- arginine in poultry production. **Poultry Science**. 11: 718-729.
- Franzini-Armstrong, C., and A. G. Engel. 2012. Skeletal Muscle Development, Muscle. 763-774.

- Gao, T., M. M. Zhao, Y. J. Li, L. Zhang, J. L. Li, L. L. Yu, F. Gao, and G. H. Zhou. 2017a. Effects of in ovo feeding of L-arginine on the development of digestive organs, intestinal function and post-hatch performance of broiler embryos and hatchlings. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**. 102: 166-175.
- Gao, T., M. Zhao, L. Zhang, J. Li, L. Yu, P. Lv, F. Gao, and G. Zhou. 2017b. Effect of in ovo feeding of -arginine on the hatchability, growth performance, gastrointestinal hormones, and jejunal digestive and absorptive capacity of posthatch broilers. **Journal of Animal Science**. 90: 1467-1477.
- Gao, X., J. Zhang, and L. Zhang. 2000. Acute toxicity and bioavailability of nano red elemental selenium. *Wei sheng yan jiu*. **Journal of Hygiene Research**. 29: 57-58.
- Garcia, R.G., L.W. Freitas, A.W. Schwingel, R.M. Farias, F.R. Caldara, A.M.A Gabriel, J.D. Graciano, C.M. Komiyama and I.C.L Almeida Paz. 2010. Incidence and Physical Properties of PSE Chicken Meat in a Commercial Processing Plant. **The Journal of Poultry Science**. 12: 233-237.
- Garza-Lombó, C., A. Schroder, E.M. Reyes-Reyes, and R. Franco. 2018. mTOR/AMPK signaling in the brain: Cell metabolism, proteostasis and survival. **Current Opinion in Toxicology**. 8: 102-110.
- Geiger, R., J. C. Rieckmann, T. Wolf, C. Basso, Y. Feng, T. Fuhrer, M. Kogadeeva, P. Picotti, F. Meissner, M. Mann, N. Zamboni, F. Sallusto, and A. Lanzavecchia. 2016. L-Arginine Modulates T Cell Metabolism and Enhances Survival and Anti-tumor Activity. **Cell**. 167: 829-842.
- Goel, A., S. Bhanja, V. Pande, M. Mehra, and A. B. Mandal. 2013. Effects of in ovo administration of vitamins on post hatch-growth, immunocompetence and blood biochemical profiles of broiler chickens. **Indian Journal of Animal Sciences**. 83: 916-921.
- Griffin, J., N. St-Pierre, M. S. Lilburn, and M. Wick. 2017. Transcriptional comparison of myogenesis in leghorn and low score normal embryos. **Poultry Science**. 96: 1531-1543.
- Grodzik, M., F. Sawosz, E. Sawosz, A. Hotowy, M. Wierzbicki, M. Kutwin, S. Jaworski, and A. Chwalibog. 2013. Nanonutrition of chicken embryos. The effect of in-ovo administration of diamond nanoparticles and l-glutamine on molecular responses in chicken embryo pectoral muscles. **International Journal of Molecular Sciences**. 14: 23033-23044.

- Gulyas, G., E. Csoz, J. Prokisch, A. Javor, M. Mezes, M. Erdelyi, K. Balogh, T. Janaky, Z. Szabo, A. Simon, and L. Czeglédi. 2017. Effect of nano-sized, elemental selenium supplement on the proteome of chicken liver. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**. 101: 502-510.
- Guo-song, W., L. He-he, L. Lin-seng, and W. Ji-wen. 2012. Influence of ovo injecting igf-1 on weights of embryo, heart and liver of duck during hatching stages. **Poultry Science**. 11: 756-760.
- Haan, J., and M. Cooper. 2011. Targeted antioxidant therapies in hyperglycemia-mediated endothelial dysfunction. **Frontiers in Bioscience**. S3: 709-729.
- Hadrup, N., K. Loeschner, K. Skov, G. Ravn-Haren, E. H. Larsen, A. Mortensen, H. R. Lam, and H. L. Frandsen. 2016. Effects of 14-day oral low dose selenium nanoparticles and selenite in rat-as determined by metabolite pattern determination. **PeerJ**. 4: 2601-2615.
- Hardy, A., D. Benford, T. Halldorsson, M. J. Jeger, H. K. Knutsen, S. More, H. Naegeli, H. Noteborn, C. Ockleford, A. Ricci, G. Rychen, J. R. Schlatter, V. Silano, R. Solecki, D. Turck, M. Younes, Q. Chaudhry, F. Cubadda, D. Gott, A. Oomen, S. Weigel, M. Karamitrou, R. Schoonjans, and A. Mortensen. 2018. Guidance on risk assessment of the application of nanoscience and nanotechnologies in the food and feed chain: Part 1, human and animal health. **European Food Safety Authority**. 16: 5327-5332.
- Hassan, A. M. 2018. Effect of in Ovo injection with Nano- Selenium or Nano- Zinc on Post-Hatch Growth Performance and Physiological Traits of Broiler Chicks. **Agricultural**. 3: 350-357.
- Hay, N., and N. Sonenberg. 2004. Upstream and downstream of mTOR. **Genes & Development**. 18: 1926-1945.
- Hazim, J. A. D., A. A. Al-Mashadani, W. K. Al-Hayani, A. S. Al-Hassani, and H. A. Mirza. 2011. Influence of in ovo injection of L-arginine on productive and physiological performance of quail. **Remotely Operated Aerial Vehicles**. 1: 463-467.
- Hazim, J. A.-D., and M. S. Atta. 2012. Effect of dietary L-arginine on carcass traits of broilers. **Research opinions in animal & veterinary sciences**. 2: 40-44.
- He, S., X. Guo, W. Tan, X. Su, J. Li, W. Pan, and H. Qiu. 2016. Effect of Selenium Deficiency on Phosphorylation of the AMPK Pathway in Rats. **Biological Trace Element Research**. 169: 254-60.

- Hu, C. H., L. Y., Xiong L, Zhang H. M., and X. M. Song. 2012. Comparative effects of nano elemental selenium and sodium selenite on selenium retention in broiler chickens. **Animal Feed Science and Technology**. 177: 204-210.
- Huff-Loneragan, E., and S. M. Lonergan. 2005. Mechanisms of water-holding capacity of meat: The role of postmortem biochemical and structural changes. **Meat Science**. 71: 194-204.
- Ismail, I., and S.T. Joo. 2017. Poultry Meat Quality in Relation to Muscle Growth and Muscle Fiber Characteristics. **Korean Journal for Food Science of Animal Resources**. 37: 873-883.
- Jacobson, G. A., S. J. Ives, C. Narkowicz, and G. Jones. 2012. Plasma glutathione peroxidase (GSH-Px) concentration is elevated in rheumatoid arthritis: a case-control study. **Clinical Rheumatology**. 31: 1543-1547.
- Janisch, S., C. Krschek, and M. Wicke. 2011. Color values and other meat quality characteristics of breast muscles collected from 3 broiler genetic lines slaughtered at 2 ages. **Poultry Science**. 90: 1774-1781.
- Jia, X.A., L.H. Zhou, Y.N. Wu, W.L. Xia, R.H. Xiang, J.G. Yang, Z.S. Ji, P. Wang, and Y.L. Zhang. 1989. Relationship between selenium and protein synthesis in cells and subcellular fractions in rat liver. **Journal of trace elements and electrolytes in health and disease**. 3: 29-34.
- Jiao, P., Y Guo, X. Yang, and F. Long. 2010. Effects of dietary arginine and methionine levels on broiler carcass traits and meat quality. **Journal of Animal and Veterinary Advances**. 9: 1546-1551.
- John, M. B., J. F. Angela, C. L.E. Simon, and P. J. Buttery. 2003. Nutritional and hormonal control of muscle growth and fat deposition. **Archiv fur Tierzucht**. 46: 143-156.
- Joshua, P. P., C. Valli, and V. Balakrishnan. 2016. Effect of in ovo supplementation of nano forms of zinc, copper, and selenium on post-hatch performance of broiler chicken. **Veterinary World**. 9: 287-294.
- Kalishwaralal, K., S. Jeyabharathi, K. Sundar, and A. Muthukumar. 2014. A novel one-pot green synthesis of selenium nanoparticles and evaluation of its toxicity in zebrafish embryos. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**. 44: 471-477.

- Kim, G. B., Y. M. Seo, C. H. Kim, and I. K. Paik. 2011. Effect of dietary prebiotic supplementation on the performance, intestinal microflora, and immune response of broilers. **Poultry Science**. 90: 75-82.
- Kocamis, H., D. C. Kirkpatrick-Krller, H. Klandorf, and J. Killefer. 1998. In ovo administration of recombinant human insulin-like growth factor-I alters postnatal growth and development of the broiler chicken. **Poultry Science**. 77: 1913-1919.
- Koomkrong, N., S. Theerawatanasirikul, C. Boonkaewwan, S. Jaturasitha, and A. Kayan. 2015. Breed-Related Number and Size of Muscle Fibres and Their Response to Carcass Quality in Chickens. **Italian Journal of Animal Science**. 14: 4145-4150.
- Kumar, N., K. K. Krishnani, and N. P. Singh. 2018. Comparative study of selenium and selenium nanoparticles with reference to acute toxicity, biochemical attributes, and histopathological response in fish. **Environmental Science and Pollution Research**. 25: 8914-8927.
- Kim, G. B., Y. M. Seo, C. H. Kim, and I. K. Paik. 2011. Effect of dietary prebiotic supplementation on the performance, intestinal microflora, and immune response of broilers. **Poultry Science**. 90: 75-82.
- Kocamis, H., D. C. Kirkpatrick-Krller, H. Klandorf, and J. Killefer. 1998. In ovo administration of recombinant human insulin-like growth factor-I alters postnatal growth and development of the broiler chicken. **Poultry Science**. 77: 1913-1919.
- Koomkrong, N., S. Theerawatanasirikul, C. Boonkaewwan, S. Jaturasitha, and A. Kayan. 2015. Breed-Related Number and Size of Muscle Fibres and Their Response to Carcass Quality in Chickens. **Italian Journal of Animal Science**. 14: 4145-4150.
- Kumar, N., K. K. Krishnani, and N. P. Singh. 2018. Comparative study of selenium and selenium nanoparticles with reference to acute toxicity, biochemical attributes, and histopathological response in fish. **Environmental Science and Pollution Research**. 25: 8914-8927.
- Kuttappan, V. A., V. B. Brewer, A. Mauromoustakos, S. R. McKee, J. L. Emmert, J. F. Meullenet, and C. M. Owens. 2013. Estimation of factors associated with the occurrence of white striping in broiler breast fillets. **Poultry Science**. 92: 811-819.
- Kuttappan, V. A., V. B. Brewer, J. K. Apple, P. W. Waldroup, and C. M. Owens. 2012. Influence of growth rate on the occurrence of white striping in broiler breast fillet. **Poultry Science**. 91: 2677-2685.

- Lu, Q., J. Wen and H. Zhang. 2007. Effect of chronic heat exposure on fat deposition and meat quality in two genetic types of chicken. **Poultry Science**. 86: 1059-1064.
- Lee, S. H., H. S. Lillehoj, S. I. Jang, M. Jeong, D. K. Kim, S. Xu, S. K. Lee, J. B. Kim, H. J. Park, H. R. Kim, and D. M. Bravo. 2014a. Immune and anti-oxidant effects of in ovo selenium proteinate on post-hatch experimental avian necrotic enteritis. **Veterinary Parasitology**. 206: 115-122.
- Lee, S. H., H. S. Lillehoj, S. I. Jang, M. S. Jeong, S. Z. Xu, J. B. Kim, H. J. Park, H. R. Kim, E. P. Lillehoj, and D. M. Bravo. 2014b. Effects of in ovo injection with selenium on immune and antioxidant responses during experimental necrotic enteritis in broiler chickens. **Poultry Science**. 93: 1113-1121.
- Leeson S, and J. Summer. 2005. Commercial poultry nutrition. 3rd ed. Guelph: University Books. 411p.
- Li, Y., Y. Wang, E. Willems, H. Willemsen, L. Franssens, J. Buyse, E. Decuypere, and N. Everaert. 2016. In ovo L-arginine supplementation stimulates myoblast differentiation but negatively affects muscle development of broiler chicken after hatching. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**. 100: 167-177.
- Listrat, A., B. Lebret, I. Louveau, T. Astruc, M. Bonnet, L. Lefaucheur, B. Picard, and J. Bugeon. 2016. How Muscle Structure and Composition Influence Meat and Flesh Quality. **The Scientific World Journal**. 14.
- Liu, R., H. Wang, J. Liu, J. Wang, M. Zheng, X. Tan, S. Xing, H. Cui, Q. Li, G. Zhao, and J. Wen. 2017. Uncovering the embryonic development-related proteome and metabolome signatures in breast muscle and intramuscular fat of fast-and slow-growing chickens. **BMC Genomics**. 18: 816-830.
- Liu, X., L. Zheng, R. Zhang, G. Liu, S. Xiao, X. Qiao, Y. Wu, and Z. Gong. 2016. Toxicological evaluation of advanced glycation end product N ϵ -(carboxymethyl) lysine: Acute and subacute oral toxicity studies. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**. 77: 65-74.
- Loeschner, K., N. Hadrup, M. Hansen, S. A. Pereira, B. Gammelgaard, L. H. Møller, A. Mortensen, H. R. Lam, and E. H. Larsen. 2014. Absorption, distribution, metabolism and excretion of selenium following oral administration of elemental selenium nanoparticles or selenite in rats. **Metallomics**. 6: 330-337.

- Loeschner, K., N. Hadrup, M. Hansen, S. A. Pereira, B. Gammelgaard, L. H. Møller, A. Mortensen, H. R. Lam, and E. H. Larsen. 2014. Absorption, distribution, metabolism and excretion of selenium following oral administration of elemental selenium nanoparticles or selenite in rats. **Metallomics**. 6: 330-337.
- Lu, P., W. Y. Xue, X. L. Zhang, D. W. Wu, L. R. Ding, C. Wen, and Y. M. Zhou. 2018. Heat-induced protein oxidation of soybean meal impairs growth performance and antioxidant status of broilers. **Poultry Science**. 98: 276-286.
- Markovic, R., J. Ciric, A. Drljacic, D. Sefer, I. Jovanovic, D. Jovanovic, D. Trbovic, S. Radulovic, M. Z. Baltic, and M. Starcevic. 2018. The effects of dietary Selenium-yeast level on glutathione peroxidase activity, tissue Selenium content, growth performance, and carcass and meat quality of broilers. **Poultry Science**. 97: 2861-2870.
- Markovic, R., J. Ciric, M. Starcevic, D. Sefer, and M. Z. Baltic. 2018. Effects of selenium source and level in diet on glutathione peroxidase activity, tissue selenium distribution, and growth performance in poultry. **Animal Health Research Reviews**. 19: 166-176.
- Masuelli, M. A. 2013. Study of Bovine Serum Albumin Solubility in Aqueous Solutions by Intrinsic Viscosity Measurements. **Advances in Physical Chemistry**. 1-8.
- McReynolds, J. L., D. Y. Caldwell, E. T. Barnhart, J. R. Deloach, A. P. McElroy, R. W. Moore, B. M. Hargis, and D. J. Caldwell. 2000. The Effect of In Ovo or Day-of-Hatch Subcutaneous Antibiotic Administration on Competitive Exclusion Culture (PREEMPT) Establishment in Neonatal Chickens. **Poultry Science**. 79: 1524-1530.
- Miao, L. P., C. Yuan, X. Y. Dong, X. Y. Zhang, M. Y. Zhou, and X. T. Zou. 2017. Effects of dietary L-arginine levels on small intestine protein turnover and the expression of genes related to protein synthesis and proteolysis of layers. **Poultry Science**. 96: 1800-1808.
- Mir, N. A., A. Rafiq, F. Kumar, V. Singh, and V. Shukla. 2017. Determinants of broiler chicken meat quality and factors affecting them: a review. **Journal of Food Science and Technology**. 54: 2997-3009.
- Mohapatra, P., R. K. Swain, Mishra.S.K, Behera.T, P. Swain, N. C. Behura, G. Sahoo, K. Sethy, B. P. Bhol, and K. Dhama. 2014. Effects of Dietary Nano-Selenium Supplementation on the Performance of Layer Grower Birds. **Asian Journal of Animal and Veterinary Advances**. 10: 641-652.

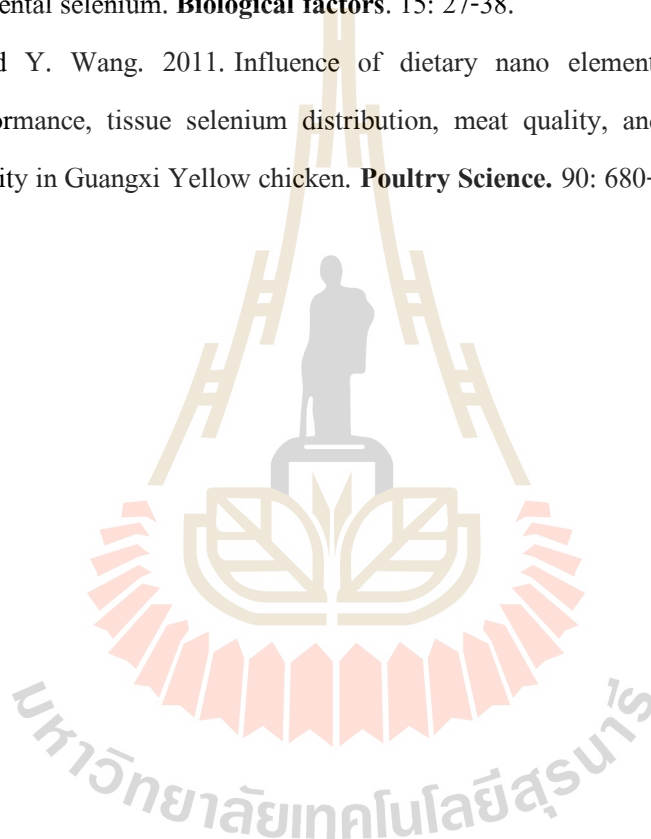
- Moro, T., S. M. Ebert, C. M. Adams, and B. B. Rasmussen. 2016. Amino Acid Sensing in Skeletal Muscle. **Trends in Endocrinology & Metabolism**. 27: 796-806.
- NRC. 1994. Nutrient requirements of poultry. Ninth Revised Edition. 1994, National Academy Press, Washington D.C.
- Ohta, Y., M.T. Kidd, and T. Ishibashi. 2001. Embryo growth and amino acid concentration profiles of broiler breeder eggs, embryos, and chicks after in ovo administration of amino acids. **Poultry Science**. 80: 1430-1436.
- Oliveira, J., E. Hoeven-Hangoor, I.B. Linde, R.C. Montijn, and J.M. Vossen. 2014. In ovo inoculation of chicken embryos with probiotic bacteria and its effect on posthatch Salmonella susceptibility. **Poultry Science**. 93: 818-829.
- Omidi, S., M. Ebrahimi, H. Janmohammadi, G. Moghaddam, Z. Rajabi, and B. Hosseintabar-Ghasemabad. 2019. The impact of in ovo injection of l-arginine on hatchability, immune system and caecum microflora of broiler chickens. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**. 104: 178-185.
- Oropeza-Moe, M., H. Wisloff, and A. Bernhoft. 2015. Selenium deficiency associated porcine and human cardiomyopathies. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**. 31: 148-156.
- Pan X, F. Chang, Y. Liu, A. Xu, Y. Shen, and Z. Huang. 2009. Mouse toxicity of *Anabaena flos-aquae* from Lake Dianchi. **Environmental Toxicology and Chemistry**. 24: 10-18.
- Petracci, M., S.Mudalal, A. Bonfiglio, and C. Cavani. 2013. Occurrence of white striping under commercial conditions and its impact on breast meat quality in broiler chickens. **Poultry Science**. 92: 1670-1675.
- Pineda, L., E. Sawosz, A. Hotowy, J. Elnif, F. Sawosz, A. Ali, and A. Chwalibog. 2012. Effect of nanoparticles of silver and gold on metabolic rate and development of broiler and layer embryos. **Comparative biochemistry and physiology**. 161: 315-319.
- Rizzi, C., A. Marangon, and G.M. Chiericato. 2007. Effect of genotype on slaughtering performance and meat physical and sensory characteristics of organic laying hens. **Poultry Science**. 86: 128-135.
- Rath, M., I. Muller, P. Kropf, E. I. Closs, and M. Munder. 2014. Metabolism via Arginase or Nitric Oxide Synthase: Two Competing Arginine Pathways in Macrophages. **Frontiers in Immunology**. 5: 532.

- Reichenberger, S., G. Marzun, M. Muhler, and S. Barcikowski. 2019. Perspective of Surfactant-Free Colloidal Nanoparticles in Heterogeneous Catalysis. **Chemical Catalysis Catalytical Chemistry**. 11: 4489-4518.
- Salary, J., F. Sahebi-Ala, M. Kalantar, and H. Matin. 2014. In ovo injection of vitamin E on post-hatch immunological parameters and broiler chicken performance. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. 4: 616-619.
- Sanami Nouri, M., B. Ghaedi, J. Salary, and H.R. Hemati Matin. 2014. In ovo injection of L-arginine on performance and bone mineralization in broiler chicken. **Animal and Veterinary Sciences**. 4: 394-397.
- Sand, K. M., M. Bern, J. Nilsen, H. T. Noordzij, I. Sandlie, and J. T. Andersen. 2014. Unraveling the Interaction between FcRn and Albumin: Opportunities for Design of Albumin-Based Therapeutics. **Frontiers in Immunology**. 5: 682-702.
- Sandra, G., A. Velleman, and D. L. Clark. 2015. Histopathologic and Myogenic Gene Expression Changes Associated with Wooden Breast in Broiler Breast Muscles. **Avian Diseases**. 59: 410-418.
- Sandri, M. 2008. Signaling in muscle atrophy and hypertrophy. **Physiology (Bethesda)**. 23: 160-170.
- Santhosh, S., T.K. Sini, R. Anandan and P.T. Mathew. 2007. Hepatoprotective activity of chitosan against isoniazid and rifampicin-induced toxicity in experimental rats. **European Journal of Pharmacology**. 15: 69-73.
- Saxton, R. A., L. Chantranupong, K. E. Knockenhauer, T. U. Schwartz, and D. M. Sabatini. 2016. Mechanism of arginine sensing by CASTOR1 upstream of mTORC1. **Nature**. 536: 229-233.
- Shakibaie, M., A. R. Shahverdi, M. A. Faramarzi, G. R. Hassanzadeh, H. R. Rahimi, and O. Sabzevari. 2013. Acute and subacute toxicity of novel biogenic selenium nanoparticles in mice. **Pharmaceutical Biology**. 51: 58-63.
- Shizhao, L., L. Zhi, Yanli Liu, Jing Shen, Lei Liu, J. Yao, and X. Yang. 2016. Effect of in ovo feeding of folic acid on the folate metabolism, immune function and epigenetic modification of immune effector molecules of broiler. **British Journal of Nutrition**. 115: 411-421.

- Skalickova, S., V. Milosavljevic, K. Cihalova, P. Horoky, L. Richtera, and V. Adam. 2017. Selenium nanoparticles as a nutritional supplement. **Nutrition**. 33: 83-90.
- Sriram, S., S. Subramanian, D. Sathiakumar, R. Venkatesh, M. S. Salerno, C. D. McFarlane, R. Kambadur, and M. Sharma. 2011. Modulation of reactive oxygen species in skeletal muscle by myostatin is mediated through NF- κ B. **Aging Cell**. 10: 931-948.
- Subramaniyan, S. A., D. R. Kang, J. R. Park, S. H. Siddiqui, P. Ravichandiran, D. J. Yoo, C. S. Na, and K. S. Shim. 2019. Effect of In Ovo Injection of L-Arginine in Different Chicken Embryonic Development Stages on Post-Hatchability, Immune Response, and Myo-D and Myogenin Proteins. **Animals. (Basel)**. 9: 357-374.
- Tan, J., Y. Guo, T. J. E. D. Applegate, and Z. Xu. 2015. L-Arginine Regulates Immune Functions in Chickens Immunized with Intermediate Strain of Infectious Bursal Disease Vaccine. **The Journal of Poultry Science**. 52: 101-108.
- Tayade, C., T. N. Jaiswal, S. C. Mishra, and M. Koti. 2006. L-arginine stimulates immune response in chickens immunized with intermediate plus strain of infectious bursal disease vaccine. **Vaccines**. 24: 552-560.
- Tripathi, A. K., M. K. Aparnathi, S. S. Vyavahare, U. V. Ramani, D. N. Rank, and C. G. Joshi. 2012. Myostatin gene silencing by RNA interference in chicken embryo fibroblast cells. **Electronic Journal of Biotechnology**. 160: 140-145.
- Trocino, A., A., M. B. Piccirillo, G., D. B. Radaelli, M. P. E. Filiou, and G. Xiccato. 2015. Effect of genotype, gender and feed restriction on growth, meat quality and the occurrence of white striping and wooden breast in broiler chickens. **Poultry Science**. 94: 996-3004.
- Varol Avçilar, O., S. Yalcin, E. E. Onbasilar, and M. S. Ramay. 2019. Comparison of slaughter yields and some meat quality parameters in broilers reared on sepiolite-supplemented wood shavings and rice hulls. **Poultry Science**. 98: 1678-1683.
- Velleman, S. G. 2007. Muscle Development in the Embryo and Hatchling. **Poultry Science**. 86: 1050-1054.
- Vollath, D., F. D. Fischer, and D. Holec. 2018. Surface energy of nanoparticles - influence of particle size and structure. **Beilstein Journal of Nanotechnology**. 9: 2265-2276.
- Wang, G., W. K. Kim, M. A. Cline, and E. R. Gilbert. 2017. Factors affecting adipose tissue development in chickens: A review. **Poultry Science**. 96: 3687-3699.

- Wang, H., J. Zhang, and H. Yu. 2007. Elemental selenium at nano size possesses lower toxicity without compromising the fundamental effect on selenoenzymes: comparison with selenomethionine in mice. **Free Radical Biology and Medicine**. 42: 1524-1533.
- Wattanachant, S., S. Benjakul, and D. A. Ledward. 2004. Composition, Color, and Texture of Thai Indigenous and Broiler Chicken Muscles. **Poultry Science**. 83: 123-128.
- Yang, H., X. Ju, Z. Wang, Z. Yang, J. Lu, and W. Wang. 2016. Effects of arginine supplementation on organ development, egg quality, serum biochemical parameters, and immune status of laying hens. **Brazilian Journal of Poultry Science**. 18: 181-186.
- Yang, X., C. Yang, A. Farberman, T. C. Rideout, C. F. de Lange, J. France, and M. Z. Fan. 2008. The mammalian target of rapamycin-signaling pathway in regulating metabolism and growth. **Journal of Animal Science**. 86: E36-50.
- Yuan, C., J. M. Li, Y. Ding, Q. He, H. X. Yan, J. J. Lu, and X. T. Zou. 2015a. Estimation of L-arginine requirement for Xinyang Black laying hens from 33 to 45 weeks of age. **Journal of Applied Poultry Research**. 24: 463-469.
- Yuan, C., X. C. Bu, H. X. Yan, J. J. Lu, and X. T. Zou. 2016. Dietary L-arginine levels affect the liver protein turnover and alter the expression of genes related to protein synthesis and proteolysis of laying hens. **Poultry Science**. 95: 261-267.
- Yuan, C., X. Zhang, Q. He, J. Li, J. Lu, and X. Zou. 2015b. L-arginine stimulates CAT-1-mediated arginine uptake and regulation of inducible nitric oxide synthase for the growth of chick intestinal epithelial cells. **Molecular and Cellular Biochemistry**. 399: 299-236.
- Yuan, C., Y. Ding, Q. He, M. M. Azzam, J. J. Lu, and X. T. Zou. 2015c. L-arginine upregulates the gene expression of target of rapamycin signaling pathway and stimulates protein synthesis in chicken intestinal epithelial cells. **Poultry Science**. 94: 1043-1051.
- Zampiga, M., F. Soglia, M. Petracci, A. Meluzzi, and F. Sirri. 2019. Effect of different arginine-to-lysine ratios in broiler chicken diets on the occurrence of breast myopathies and meat quality attributes. **Poultry Science**. 98: 2691-2697.
- Zchowska, J., K. Lachowicz, L. Gajowiecki, M. Sobczak, M. Kotowicz, and A. Zych. 2005. Effects of carcass weight and muscle on texture, structure and myofibre characteristics of wild boar meat. **Meat Science**. 71: 244-248.
- Zhai, W., D. Rowe, and E. D. Peebles. 2011. Effects of commercial in ovo injection of carbohydrates on broiler embryogenesis. **Poultry Science**. 90: 1295-1301.

- Zhang, R. P., H. H. Liu, Q. Q. Li, Y. Wang, J. Y. Liu, J. W. Hu, X. P. Yan, H. Gou, L. Li, and J. W. Wang. 2014. Gene expression patterns, and protein metabolic and histological analyses for muscle development in Peking duck. **Poultry Science**. 93: 3104-3111.
- Zhang, Z., Y. Du, T. Liu, K. H. Wong, and T. Chen. 2019. Systematic acute and subchronic toxicity evaluation of polysaccharide-protein complex-functionalized selenium nanoparticles with anticancer potency. **Biomaterials Science**. 7: 5112-5123.
- Zhanga, J.-S., X.-Y. Gaoa, Z. Li-De, and Y.-P. Baob. 2001. Biological effects of a nano red elemental selenium. **Biological factors**. 15: 27-38.
- Zhou, X., and Y. Wang. 2011. Influence of dietary nano elemental selenium on growth performance, tissue selenium distribution, meat quality, and glutathione peroxidase activity in Guangxi Yellow chicken. **Poultry Science**. 90: 680-686.





ภาคผนวก ก

ภาพประกอบการดำเนินการทดลอง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาพประกอบการวิเคราะห์อนุภาคของนาโนซีลีเนียม

(A)



pH about 10

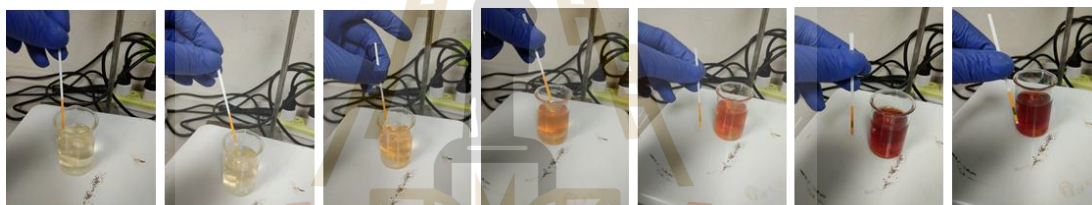
5 ml Distilled water

25mM sodium selenite (NaSeO_3)

20 ml Distilled water

25mM reduced GSH+Bovine serum albumen
(BSA)

(B)



25 ml Distilled water

Adjust pH about 7.2 (red solution) (Adjust by 1.0 M sodium hydroxide: NaOH)

(C)



Dialyzed against double distilled water for 96h

At 4°C in ice (water changing every 24h)

(D)



Measurement: Analysis via Scanning Electron Microscopy / Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy (SEM/EDS)

ภาพที่ ก.1 การสังเคราะห์นาโนซิลิเนียม ดังนี้ 1. สารตั้งต้นในการสังเคราะห์ (A) 2. ปรับ pH ของสารละลาย (B) 3. การแยกสารของตัวถูกละลายผ่านเยื่อเลือกผ่านจากบริเวณที่มีความเข้มข้นของสารมากไปยังบริเวณที่มีความเข้มข้นของสารน้อย (C) 4. การวิเคราะห์วัดขนาดและรูปร่างของอนุภาค SeNPs (D)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาพประกอบขั้นตอนการฉีดสารผ่านเปลือกไข่



Fertilized Korat chicken eggs



Needle 20 mm, 27 mm



Needle 20 mm, 22 mm



Hot plate



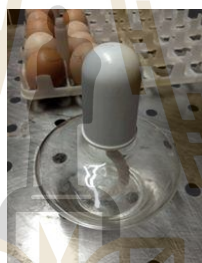
Paraffin



Candling Egg



Candling

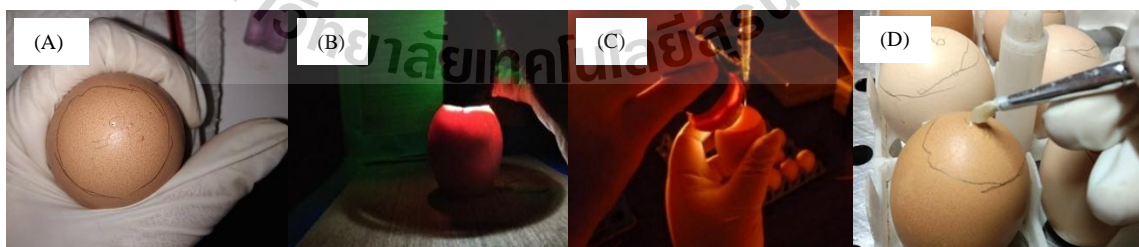


Alcohol Burner



Alcohol 70%

ภาพที่ ก.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการฉีดสารผ่านเปลือกไข่



ภาพที่ ก.3 ขั้นตอนการฉีดสารผ่านเปลือกไข่ เจาะเปลือกไข่ด้วยเข็มขนาด 22 mm (A), ส่องไฟผ่านเปลือกไข่เพื่อหาตำแหน่ง Amnion (B), ฉีดสารผ่านเปลือกไข่โดยใช้เข็มขนาด 27 mm ปริมาณ 0.5 ml (C) และปิดรูที่เปลือกไข่โดยใช้พาราฟิน (D)

ภาพประกอบ การเลี้ยงสัตว์ และวิเคราะห์ตัวอย่าง



เตรียมโรงเรือนเลี้ยงไก่



แยกลูกไก่เข้ากลุ่มทดลอง



ชั่งน้ำหนักลูกไก่แรกเกิด



กกไก่ตั้งแต่เกิดจนถึงไก่อายุ 14 วัน



เลี้ยงไก่จำนวน 40 ตัวต่อกรง (พื้นที่ 4 cm²)



ฆ่าด้วยวิธี Electric stunning เอาเลือดออกโดยใช้มีดตัดเส้นเลือดตรงบริเวณ Jugular vein

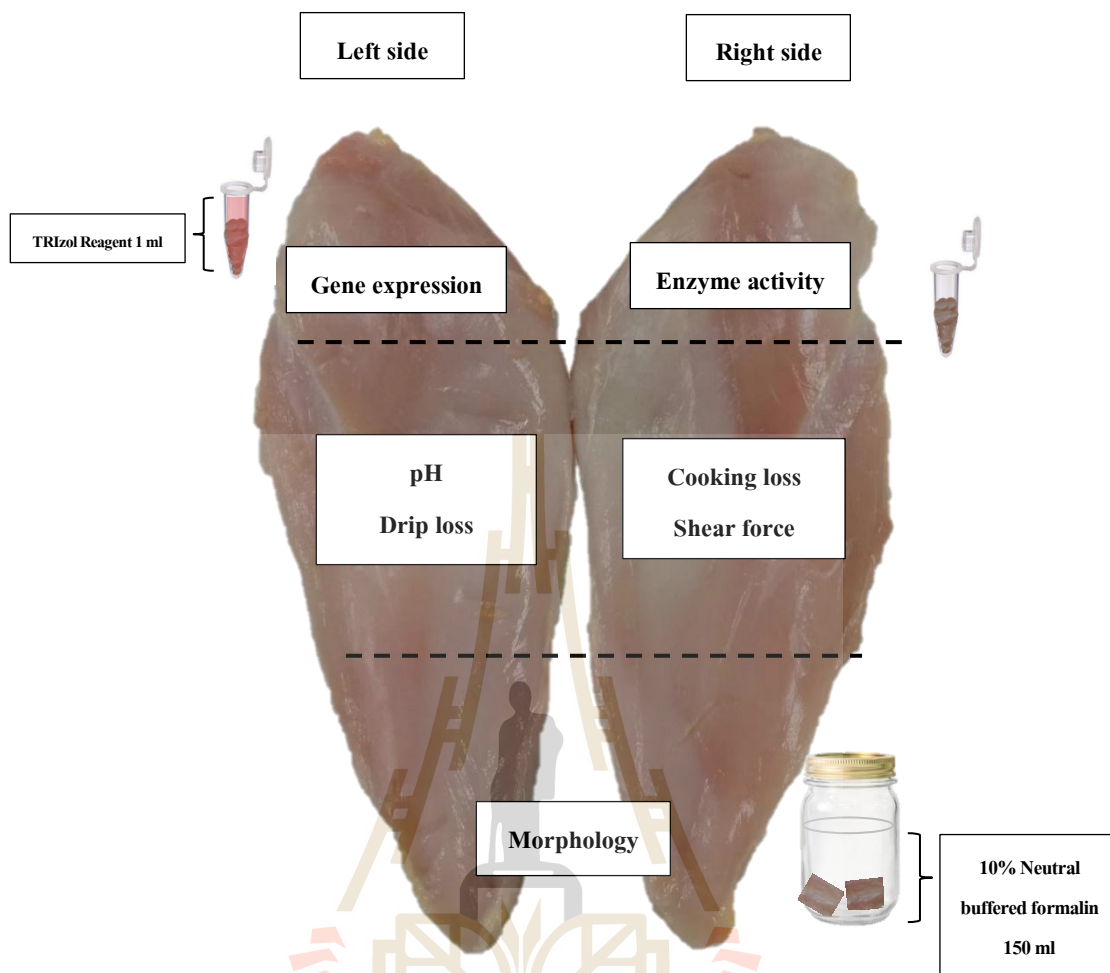


เก็บตัวอย่างเนื้อเพื่อทำการวิเคราะห์ผล



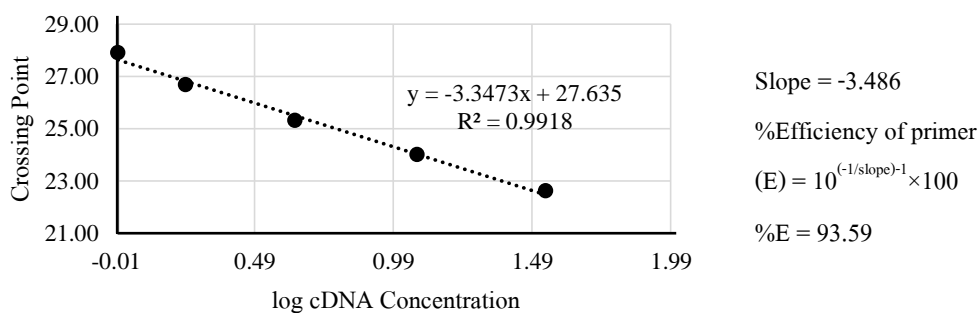
ตัดแต่งซากไก่เพื่อคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ซาก

ภาพที่ ก.4 ขั้นตอนการเลี้ยงสัตว์ทดลอง และการเก็บตัวอย่าง

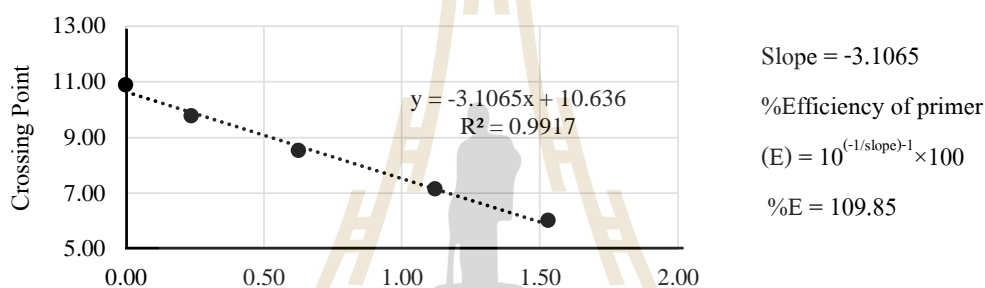


ภาพที่ ก.5 การเก็บตัวอย่างเนื้ออก (*Pectoralis major*) ของไก่โคราช

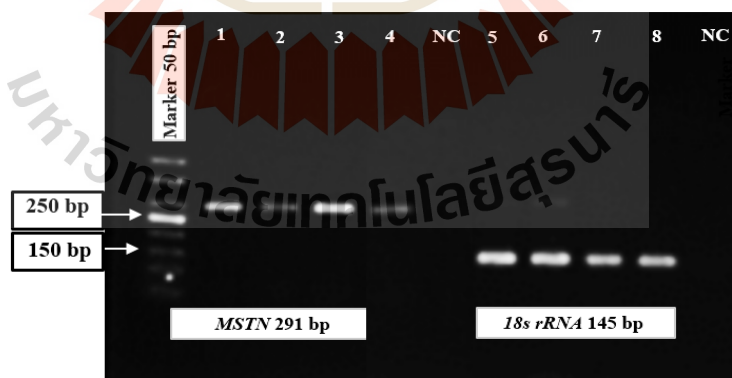
ภาพประกอบการศึกษาเพื่อดูระดับการแสดงออกของยีน *MSTN*



ภาพที่ ก.7 Standard curve ของการทดสอบ Primer efficiency ยีน *MSTN* ในเนื้ออก

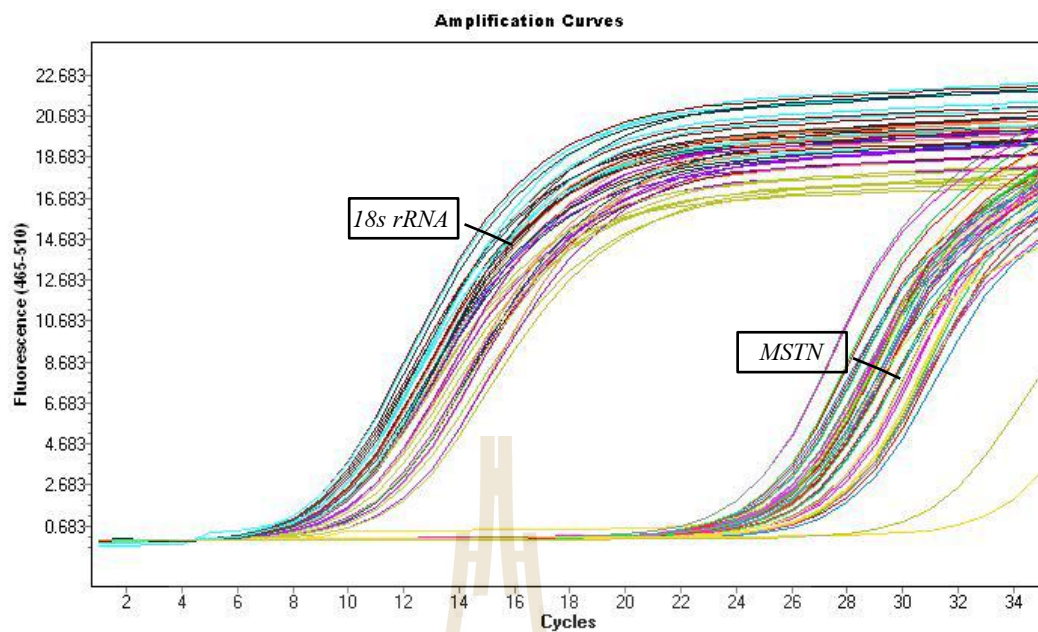


ภาพที่ ก.8 Standard curve ของการทดสอบ Primer efficiency ยีน *18s rRNA* ในเนื้ออก

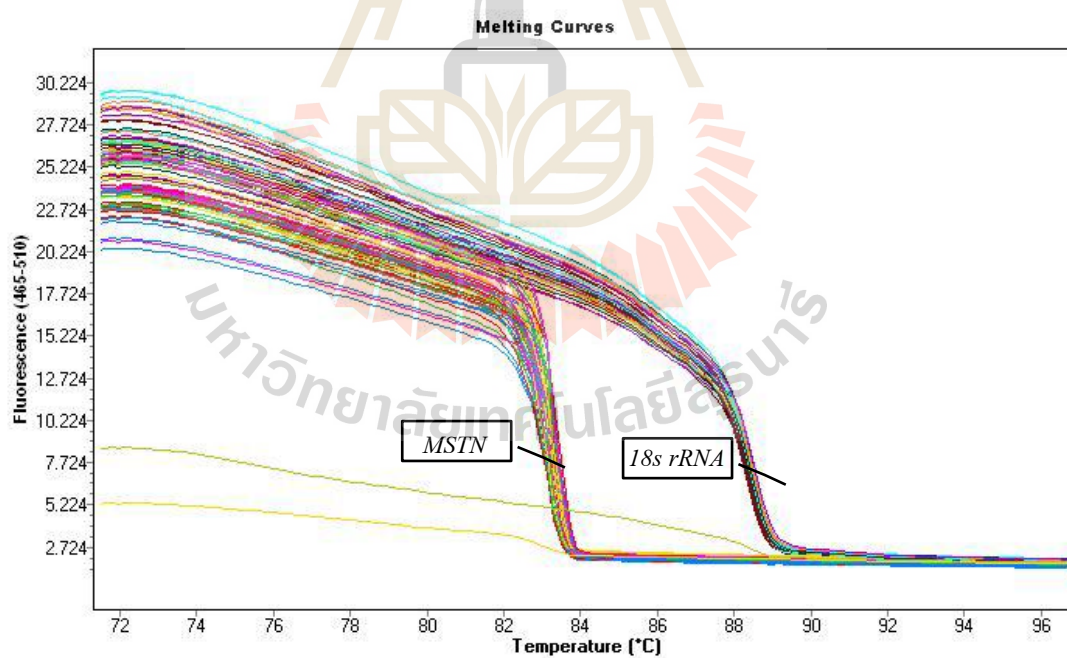


ภาพที่ ก.9 ขนาดของยีนที่พบในเนื้ออกไก่โคราช อายุ D0, D7, D14, D21, D42 และ D63 ด้วยเทคนิค Real time PCR โดยแถบที่ 1 (นับจากซ้ายมือ) คือ DNA marker 50 bp แถบที่ 1-4 คือ ยีน *MSTN* (291 bp) และแถบที่ 5-8 คือ ยีน *18s rRNA* (145 bp)

หมายเหตุ: 1,5=Non-injected control group; 2,6= IOF 1% L-arg; 3, 7= IOF 0.3 μg SeNPs; 4, 8=IOF 1% L-arg+0.3 μg SeNPs และ NC=Negative control



ภาพที่ ก.10 Amplification Curve กราฟการแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Fluorescence กับ Cycles



ภาพที่ ก.11 Melting Curve กราฟการแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Fluorescence กับ อุณหภูมิ โดยใช้ SYBR green ด้วยเครื่อง Real-time PCR



Microwave รุ่น SP-D



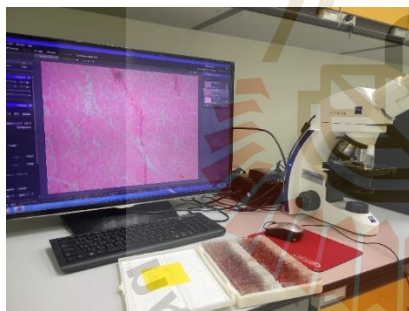
Amino acid analyses รุ่น Biochrom 30+



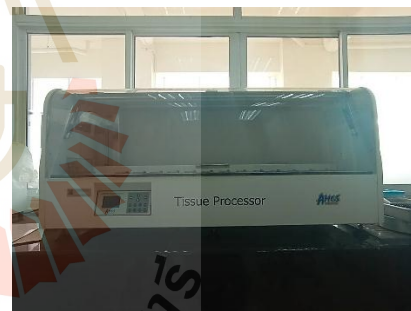
ICP-MS รุ่น 7500CE



Scanning Electron Microscopic (SEM: JEOL JSM 7800F) และ Energy Dispersive Spectroscopy (EDS)



Light microscope (Olympus CX21, United States)



ATP 140 tissue processor



Real time PCR (Roche480, Germany)



Thermo Scientific Multiskan GO Microplate Spectrophotometer

ภาพที่ ก.12 เครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์ผลในงานทดลอง



ภาคผนวก ข

วิธีการดำเนินงานในห้องปฏิบัติการ

1. การวิเคราะห์ปริมาณ L-arginine ในอาหาร โดยวิธีการวิเคราะห์ Amino acid

ใช้เครื่อง Amino acid analyses รุ่น Biochrom 30+ โดยใช้หลักการแรงกระทำทางประจุไฟฟ้า (Ionic interaction), อันตรกิริยาไฮโดรโฟบิก (Hydrophobic interaction) และ OH มีผลลดแรงกระทำไฮโดรโฟบิก ระหว่างกรดอะมิโนกับเรซิน

วิธีการทดสอบ

วัสดุและอุปกรณ์

1. Vial tube 1 ml
2. Test tube 15 ml
3. กระดาษกรอง (Whatman No. 4)
4. Dry Bath Incubator BOEDEL
5. Amino acid analyzer (Biochrom 30+)

สารเคมี

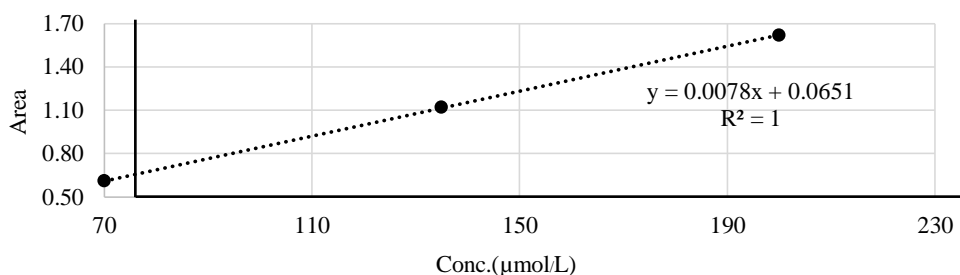
1. Deionize Water (DI)
2. 6M HCl
3. 6M NaOH
4. Sodium Citrate Loading Buffer
5. Amino Acid Standard
6. Ultrasolve Plus
7. Ultra Ninhydrin Solution
8. L(+)-Norleucine, 99% (Nle)
9. Sodium Oxidized Buffer 1, pH 3.35
10. Sodium Hydro/Oxid Buffer 2, pH 4.25
11. Sodium Oxidized Buffer 3, pH 2.65
12. Sodium Oxidized Buffer 4, pH 8.60
13. Sodium Regeneration Buffer 6

ขั้นตอนการเตรียมสาร

1. การเตรียม Internal standard ปริมาณ 2 L โดยใช้ Ultra Ninhydrin Solution 250 ml และ Ultrasolve Plus 1,750 ml (ปริมาณสารที่ใช้คำนวณมาจากระยะเวลาการทำงานของเครื่อง โดยจะใช้ 20 ml/hr)

2. การเตรียม External standard ที่ 3 ความเข้มข้น คือ 70 135 และ 200 $\mu\text{mol/L}$ (ปรับปริมาตรเป็น 1 ml ก่อนฉีดเข้าเครื่อง) ดังภาพที่ ข.1

ตัวอย่าง เตรียมความเข้มข้นที่ 70 $\mu\text{mol/L}$ โดยใช้ L(+)-Norleucine 40 μl + Sodium Citrate Loading Buffer 932 μl + Amino Acid Standard 28 μl



ภาพที่ ข.1 กราฟมาตรฐานของ L-arginine

ขั้นตอนการวิเคราะห์ตัวอย่าง

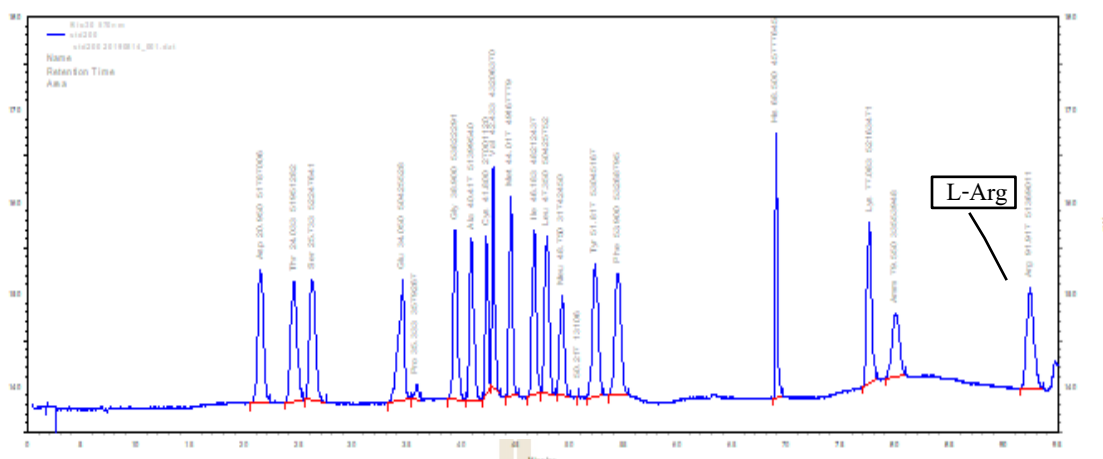
1. ทำการชั่งตัวอย่าง 20 mg ทำการ Hydrolysis ด้วย 6M HCl at 110°C 24 ชั่วโมงโดยใช้เครื่อง Dry Bath Incubator BOEKEL หรือใช้เครื่องย่อยและสกัดตัวอย่างด้วยคลื่นไมโครเวฟ (Microwave) 20 นาที (ปรับ pH=7 ด้วย 6M NaOH) ให้มีปริมาตรสุทธิเท่ากับ 5 ml. (Rutherford and Gilani, 2009)

2. เตรียมสารละลายตัวอย่างละ 500 μl ร่วมกับ L (+)-Norleucine 40 μl + Sodium Citrate Loading Buffer 460 μl รวม 1,000 μl

3. จากนั้นวิเคราะห์กรดอะมิโนด้วย Amino acid analyzer (Biochrom 30+) โดยใช้โปรแกรม Biochrom Alias Manager ชุดคำสั่ง Sodium Oxidized Hydrolysate HR031061 โดยจะใช้เวลาอ่านค่า 110 นาทีต่อตัวอย่าง ซึ่งการวิเคราะห์ L-arg จะขึ้น peak ที่เวลาประมาณนาทีที่ 91

เมื่อได้พื้นที่ใต้กราฟแล้วจะต้องนำมาคำนวณหาปริมาณกรดอะมิโนในตัวอย่างตามสูตรของ Adeyeye et al. (2012) จากภาพที่ ข.1 ดังสมการ โดยหลักการทำงานเบื้องต้นดังภาพที่ ข.2

$$\text{สมการ: } y = \frac{\text{Area of L-arg}}{\text{Area of Nle}}$$



ภาพที่ ข.2 Biochrom 30+ Amino Acid Analyzer

2. การวิเคราะห์คอลลาเจนทั้งหมด (Total collagen): Hydroxyproline assay

เป็นการวิเคราะห์การหาปริมาณคอลลาเจนทั้งหมดในเนื้อ โดยวิเคราะห์จากปริมาณ Hydroxyproline (Hyp) ซึ่งเป็นกรดอะมิโน Nonproteinogenic ที่พบในคอลลาเจนที่มีปริมาณประมาณ 12-14% โดยมวล ซึ่ง Hyp เป็น Tissue hydrolysates (ผลผลิตจากการย่อยสลาย) ของกระบวนการสังเคราะห์คอลลาเจน จึงใช้เป็นตัวชี้วัดโดยตรงของปริมาณคอลลาเจนที่มีอยู่

วิธีการทดสอบ

วัสดุและอุปกรณ์

1. Vial tube 1 ml
2. Test tube 15 ml
3. กระดาษกรอง (Whatman No. 4)
4. 96 well plate
5. Spectrophotometer

สารเคมี

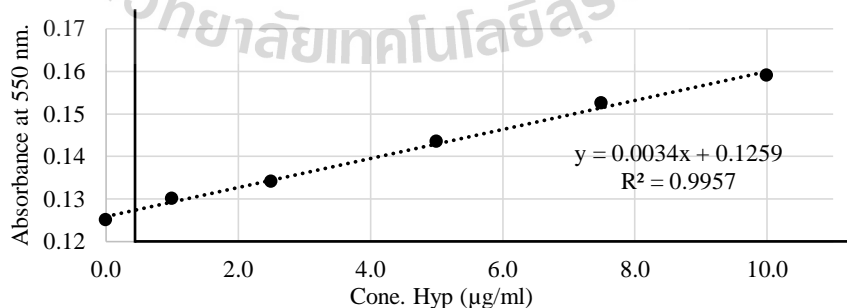
1. Deionize Water (DI)
2. 50% 2-propanol
3. 2-propanol: Perchloric acid (2:1)
4. 7.0 M Sodium hydroxide (7.0 M NaOH)
5. 3.5 M Sulfuric acid (3.5 M H₂SO₄)
6. Acetate-citrate buffer (pH 6.5)

7. 0.056 M Chloramine-T reagent
8. 1.0 M Ehrlich's reagent
9. Hydroxyproline (Hyp) (Stock 10 µg/ml)

ตารางที่ ข.1 การเตรียมสารละลายกราฟมาตรฐาน Hydroxyproline

Tube	1	2	3	4	5	6
Conc. Hyp (µg/ml)	0.0	1.0	2.5	5.0	7.5	10.0
DI (µl)	10.0	9.0	7.5	5.0	2.5	0.0
Std. Hyp (µl)	0.0	1.0	2.5	5.0	7.5	10.0
Samples (µl)	-	-	-	-	-	10.0

1. เติม 0.056 M Chloramine-T reagent ปริมาตร 90 µl ปั่นเหวี่ยงโดยใช้ Vortex หลังจาก
นั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มีด 25 นาที
2. เติม 1.0 M Ehrlich's reagent ปริมาตร 100 µl นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 20
นาที
3. นำใส่ 96 well ปริมาตรทั้งหมด 200 µl/sample โดยวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 550
nm
4. เมื่อได้ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง นำมาหาปริมาณความเข้มข้นของ
Hydroxyproline จากสมการ $y = ax + b$ โดยวิเคราะห์ปริมาณ Total Collagen (mg/g sample) มาจาก
Hydroxyproline (mg/g sample) $\times 7.25$



ภาพที่ ข.3 กราฟมาตรฐานของ Hydroxyproline

3. การวิเคราะห์ทางสัณฐานวิทยา (Morphological analysis)

วัสดุและอุปกรณ์

1. Tissue Processor (Model: ATP140 Amos scientific)
2. TEC2800 Embedding Center
3. TEC2800 Cryo Console
4. Tissue cassettes
5. TEC2601 Water Bath
6. ASP220 Slide Dryer
7. Erma Microtome blades
8. Microscope slides
9. Cover glass
10. Light microscope (Olympus CX21, United States)

สารเคมี

1. 10% Neutral buffered formalin (05-011005Q; Bio-Optica. Italy)
2. Alcohol 95% (Antiseptic Solution-A)
3. Alcohol 100% (Dehyol assolute: REF 06-10077E)
4. Xylene, mix RPE of isomers
5. Eosina Y solution aquosa
6. Mayer's hematoxylin
7. Bio Mount HM

การเก็บ (Fixation) คงสภาพตัวอย่าง (Tissue processing)

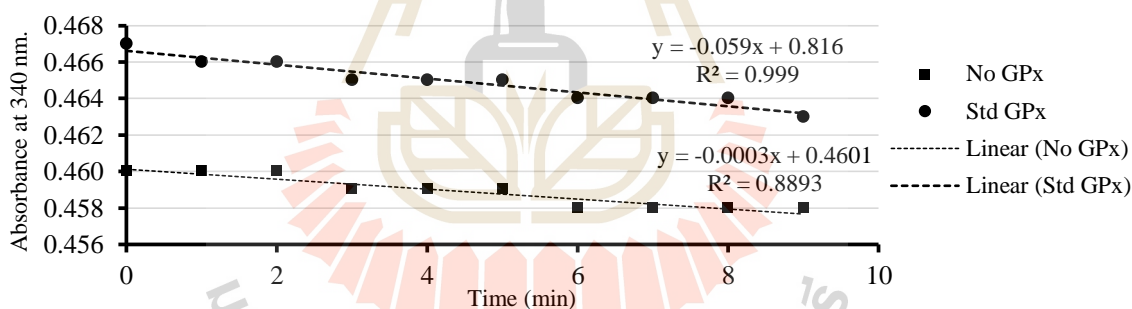
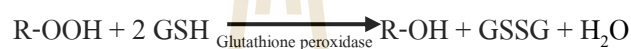
เก็บตัวอย่างเนื้ออกของไก่โคราชโดยตัดเนื้อแนวขวางกับเส้นไขกล้ามเนื้อเป็นรูปทรงสี่เหลี่ยม กว้าง×ยาว×สูง ขนาด $1 \times 2 \times 0.5$ cm ทำความสะอาดเนื้อด้วยน้ำเกลือเพื่อล้างสิ่งปนเปื้อน และเลือดออกจากตัวอย่าง ก่อนนำไปใส่โหลแก้วที่บรรจุด้วย 10% Formalin ทำการแช่ตัวอย่างเป็นเวลาอย่างน้อย 24 ชั่วโมง เพื่อคงสภาพเนื้อ หลังจากนั้นนำน้ำออกด้วยกระบวนการนำน้ำออกจากเซลล์ด้วยเครื่อง Tissue Processor โดยการแช่ Alcohol 95% 2 ครั้ง ครั้งละ 90 นาที Alcohol 100% 3 ครั้ง ครั้งละ 60 นาที เมื่อแช่แอลกอฮอล์จนครบจึงนำมาแช่ Xylene เพื่อทำให้เนื้อเยื่อใสอีก 3 ครั้ง ครั้งละ 60 นาที เสร็จแล้วจึงนำไปแช่ในพาราฟินหลอมเหลว 4 ครั้ง ครั้งละ 60 นาที หลังจากนั้นนำมาหล่อในบล็อกเพื่อทำการฝังพาราฟิน (Embedding)

การตัดเนื้อเยื่อ (Sectioning) และการย้อมสีตัวอย่าง (Staining)

นำเนื้อที่ถูกฝังในพาราฟินมาตัดด้วยเครื่อง Microtome ให้มีความหนา 3 μm จากนั้นนำไปติดบนสไลด์ แล้วย้อมสีด้วยวิธี Hematoxylin and eosin และทำการหยด Bio Mount HM เพื่อรักษาสภาพเนื้อเยื่อ แล้วปิดสไลด์ด้วย Cover glass แล้วทำการวิเคราะห์ภาพส่องภายใต้กล้อง Light microscope ต่อไป

4. การวัดค่า Glutathione peroxidase enzyme (GSH-Px)

การวัดค่า Glutathione peroxidase enzyme (GSH-Px) เป็นการหาปฏิกิริยากำจัดไฮโดรเปอร์ออกไซด์ (ROOH) ดังสมการ

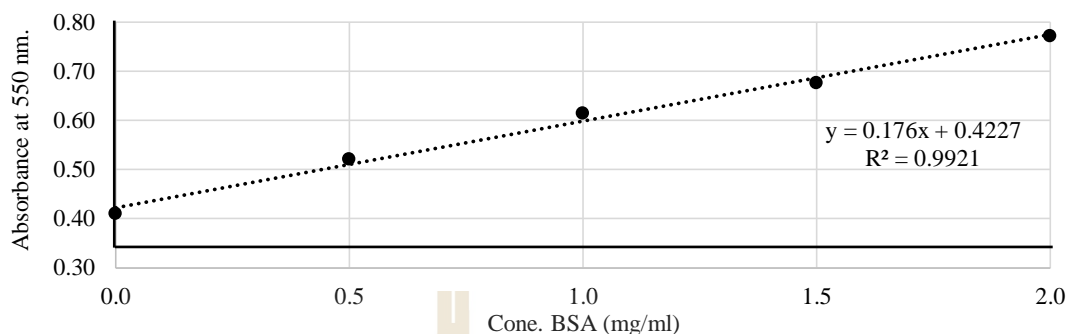


ภาพที่ ข.4 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของ NADPH decrease

โดยจะต้องวิเคราะห์หาค่าโปรตีนทั้งหมดในเนื้อวิเคราะห์หาความเข้มข้น โปรตีนด้วยวิธี Bradford Protein Concentration Assay เพื่อใช้คำนวณผลให้อยู่ในรูป U/mg protein ขั้นตอนดังนี้

- นำตัวอย่างเนื้อออกประมาณ 0.03 g ทำการ Homogenized (1:9, wt/vol) 0.9 % Sodium chloride buffer แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ $4,550 \times g$ ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 15 นาที
- ปิเปตตัวอย่างเฉพาะส่วนใสจำนวน 10 μl ใส่ใน 96 well plate หลังจากนั้น เติมสารละลาย Bradford Reagent 200 μl
- เตรียมสารมาตรฐาน BSA (Bovine serum albumin) ดังภาพที่ ข.3

4. นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ช่วงแสง 550 nm สร้างกราฟมาตรฐานจากค่าดูดกลืนแสงสารมาตรฐาน BSA และคำนวณหาค่าความเข้มข้นของโปรตีน ในตัวอย่าง



ภาพที่ ข.5 กราฟมาตรฐานของ BSA

5. การวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีน *MSTN* (Gene expression)

การสกัด Total RNA

1. การสกัด Total RNA จากกล้ามเนื้อออกเพื่อระดับการแสดงออกของยีน *MSTN* อธิบายเป็นขั้นตอนอย่างละเอียดได้ดังนี้ (หมายเหตุ: ทำในตู้ดูดควันสารเคมี เนื่องจากสารเคมีที่ใช้ในการสกัดส่งผลต่อระบบทางเดินหายใจ)

2. ชั่งตัวอย่างชิ้นเนื้อออก ประมาณ 50 mg ใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml ที่มีเม็ดบีดประมาณ 10 เม็ด จากนั้นค่อยๆ ใส่ไตรซอล 1,000 μ l บดตัวอย่างให้ละเอียดจนเห็นเป็นลักษณะใส ไม่มีตะกอน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25°C) เป็นเวลา 5 นาที

3. ใส่คลอโรฟอร์ม 200 μ l นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอน ที่ 4°C ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที

4. จากนั้นดูดสารละลายส่วนใสที่ได้ในหลอดตัวอย่างมาประมาณ 300-500 μ l ใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml หลอดใหม่ และเติมไอโซโพรพานอล 500 μ l พลิกหลอดไปมา (Inverse) ตัวอย่างให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25°C) เป็นเวลา 20 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอน ที่ 4°C ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที

5. ดูดสารละลายในหลอดทั้งหมดออก ยกเว้นตะกอนสีขาวขุ่นที่ติดข้างหลอด เดิมเอทานอล 1,000 μ l Inverse ตัวอย่างให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอน ที่ 4°C ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที

6. จากนั้นดูดเอทานอลในหลอดออก ยกเว้นตะกอนสีขาวขุ่นที่ติดข้างหลอดและ Air dry เป็นเวลา 2-5 นาที เพื่อฝั่งตะกอนให้แห้ง (สังเกต: ตะกอนจะใส)

7. เติม diethyl pyrocarbonate (DEPC) 10-30 μl (ขึ้นอยู่กับปริมาณตะกอนที่ได้ เพราะจะมีผลต่อค่าปริมาณความเข้มข้นของ Total RNA) จะได้ Total RNA ของกล้ามเนื้อ จากนั้นดูด Total RNA ออกมา 1 μl เพื่อนำวัดคุณภาพของ Total RNA โดยวัดจากค่าการดูดกลืนแสง 340 nm ด้วยเครื่องมือ spectrophotometer (Nanodrop 2000, Thermo Scientific, U.S.A) ซึ่งจะได้ค่า 260/280 ที่ 1.8-2.0 และค่า 260/230 ที่ 2.0-2.3 จากนั้นนำมาตรวจสอบปริมาณความเข้มข้นของ Total RNA ที่ได้ด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis

การสังเคราะห์ first strand cDNA

การสังเคราะห์ First strand cDNA จาก Total RNA ด้วยชุดสังเคราะห์ First Strand cDNA สำเร็จรูป (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit; Roche, Germany ซึ่งประกอบไปด้วย 10 \times Transcriptor RT Reaction Buffer 1 μl , 10 \times RT Random Primers 1 μl , Deoxynucleotide mix 0.4 μl , MultiScriber Reverse Transcriptase mix 0.5 μl และ Nuclease-Free Water 2.1 μl โดยปริมาตรทั้งหมดคือ 5 μl ต่อ 1 ตัวอย่าง cDNA) หลังจากนั้นเตรียมสารละลายสำหรับสังเคราะห์ first strand cDNA มีดังนี้

ตารางที่ ข.2 สารละลายสำหรับสังเคราะห์ first strand cDNA

Item	Volume
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	5 μl
Nuclease-Free Water	4 μl
Total RNA (ปรับความเข้มข้นที่ 1,000 ng/ μl เท่ากันทุกตัวอย่าง)	1 μl
ปริมาตรสุทธิ	10 μl

โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นทำลายเอนไซม์โดยการบ่มที่อุณหภูมิ 85°C เป็นเวลา 5 นาที และเก็บ First Strand cDNA ที่อุณหภูมิ -20°C หลังจากนั้นนำ cDNA มาใส่หลอดตามด้วย First Strand cDNA และน้ำ Deionized จากนั้นนำมาเข้าเครื่อง Real time PCR (Roche480, Germany) เพื่อดูระดับการแสดงออกของยีน

ตารางที่ ข.3 สารละลายสำหรับวัดปริมาณการแสดงออกของยีน

Item	Volume
LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche Diagnostics GmbH).	10 µl
Nuclease-Free Water	6 µl
F' (5 pmol/µl)	1 µl
R' (5 pmol/µl)	1 µl
cDNA (ปรับความเข้มข้นที่ 100 ng/µl เท่ากันทุกตัวอย่าง)	2 µl
ปริมาตรสุทธิ	20 µl

การศึกษาระดับปริมาณการแสดงออกของยีน *MSTN*

จากตารางที่ ข.3 เป็นขั้นตอนการเตรียมสารเพื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณการแสดงออกของยีน ซึ่งไพรเมอร์ของยีนที่ใช้ได้นั้นได้จากการ Alignment ของ *Gallus gallus* ด้วยโปรแกรม NCBI Primer BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) ดังตารางที่ ข.4 แล้วนำมาวัดปริมาณการแสดงออกของทั้งสองยีน โดยเทียบกับยีนเจ้าบ้าน หรือ housekeeping gene (18S rRNA) จากนั้นนำมาเข้าเครื่อง Real time PCR รุ่น Roche480 ของประเทศเยอรมัน (Germany) เพื่อดูระดับปริมาณการแสดงออกของยีนในแต่ละกลุ่มการทดลอง

หลังจากนั้นนำ cDNA (RT product) มาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Real time PCR (Roche480, Germany) จากนั้นนำมาตรวจสอบปริมาณความเข้มข้นของ cDNA (RT product) ที่ได้ด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis แล้วมาคำนวณหาปริมาณการแสดงออกของยีน ดังสมการ $\Delta CT = CT (MSTN) - CT (Housekeeping gene)$

ตารางที่ ข.4 Primer ที่ใช้สำหรับวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Real time-PCR (RT-PCR) ของยีน

Name	5' sequence 3' forward primer 3' sequence 5' reverse primer	Annealing temperature	PCR Size (bp)	Accession no.
<i>MSTN</i> (Myostatin)	5'- GCT CTG GAT GGC AGT AGT CA -3'	60°C	291	AF019621
<i>18S rRNA</i> (Housekeeping Gene)	5'- AAT CGT CTC GGT TGT GGC -3' 5'-G TTCAGCCACCCGAGATTGA-3' 5'-CCCATCACGAATGGGGTTCA-3'	60°C	145	XR_0030780 44.1

5. การวัดค่าความเป็นพิษของอนุภาคนาโนซีลีเนียม

การวิเคราะห์หาธาตุ Se โดยใช้เครื่อง ICP-MS (7500CE) เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ธาตุ (Elemental analysis) โดยอาศัยหลักการของ Atomic spectroscopy ซึ่ง Se ที่วัดปริมาณได้จะอยู่ในรูปแบบบราวน์ (Organic: selenomethionine, selenocysteinine; inorganic: elemental , selenide , selenite และ selenite) โดยเครื่องจะสามารถปริมาณสารได้ไม่เกิน 500 ppb

วิธีการทดสอบ

วัสดุและอุปกรณ์

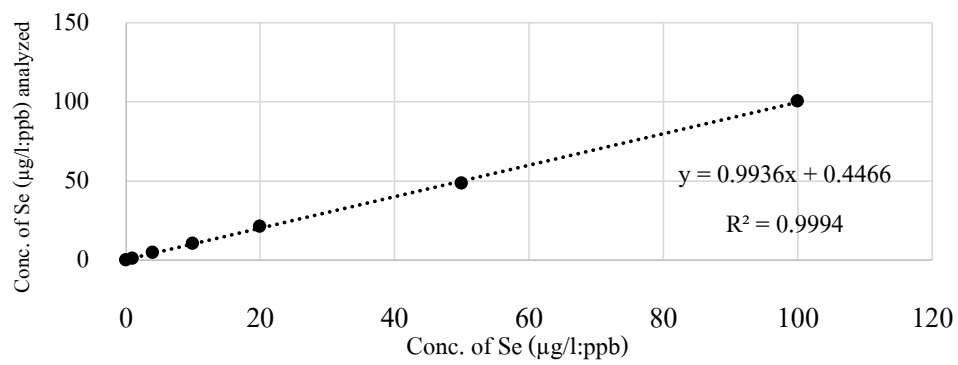
1. Test tube 50 ml (บรรจุสารละลายตัวอย่าง 25 ml)
2. บีกเกอร์ขนาด 100 ml

สารเคมี

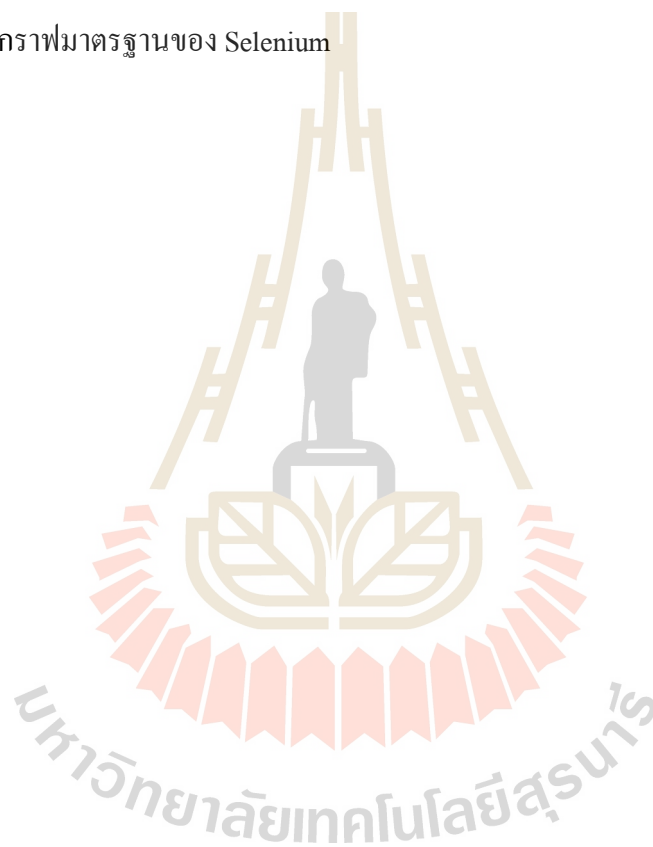
1. Deionize Water (DI)
2. 2% Nitric acid (65% HNO₃ suprapur, Merck, Darmstadt, Germany)
3. Selenium standard (1,000 µl/ml) in 4% HNO₃

วิธีการทำ

1. เปิดเครื่อง ICP-MS เปิด pump และเปิด plasma ไว้รอประมาณ 1 ชั่วโมง เพื่อให้เครื่องมีการทำงานอย่างสมบูรณ์
2. เปิดวาล์วแก๊ส He และ H เพราะการวิเคราะห์ Se จะต้องใช้แก๊สทั้ง 2 ชนิดนี้เป็นตัวกลางในการพาแร่ธาตุ (บางธาตุอาจไม่จำเป็นต้องใช้แก๊ส เช่น Zn และ As เป็นต้น)
3. เตรียมสารมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้น 0 1 4 10 20 50 และ 100 ppb ทำการปรับปริมาตรด้วย 2% Nitric acid แล้วเทใส่หลอดขนาด 5 ml (หลอดที่ใช้เฉพาะกับเครื่อง ICP-MS) ประมาณ 3 ml นำเข้าเครื่องเพื่อวิเคราะห์ผล โดยการวิเคราะห์ต่อครั้งสามารถใส่ตัวอย่างได้ 80 ตัวอย่าง โดยมีกราฟมาตรฐานดังภาพที่ ข.6
4. นำสารละลายตัวอย่างวางไว้ที่อุณหภูมิห้องสักประมาณ 10 นาที แล้วเทตัวอย่างใส่ในหลอด ประมาณ 3 ml นำไปใส่ในเครื่องตามหมายเลขที่ตั้งค่า
5. ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยโปรแกรม ICP-MSTOP เมื่อแสดงผลออกมา จะต้องคำนวณเทียบเป็นหน่วย ppm และเทียบกับน้ำหนักของตัวอย่างก่อนย่อยจึงสามารถใช้ในการแสดงผลได้



ภาพที่ ข.6 กราฟมาตรฐานของ Selenium



ประวัติผู้เขียน

นางสาวธนัชญา โมรารวงษ์ เกิดวันที่ 11 พฤษภาคม พ.ศ. 2536 ที่จังหวัดลพบุรี เริ่มศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนต้นที่โรงเรียนวินิตศึกษา ในพระราชูปถัมภ์ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี และระดับมัธยมศึกษาตอนปลายที่โรงเรียนพิบูลวิทยาลัย อำเภอเมือง จังหวัดลพบุรี เข้าศึกษาระดับปริญญาตรี สาขาสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตสารสนเทศเพชรบุรี จังหวัดเพชรบุรี สำเร็จการศึกษาเมื่อ พ.ศ. 2559 และเข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโท สาขาวิชาเทคโนโลยีและนวัตกรรมทางสัตว์ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา ในปีการศึกษา 2559 ภายใต้อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิฑูรย์ โมพี โดยรับทุนวิจัยจากแหล่งทุนภายนอกจากกองทุนสนับสนุนการวิจัยและพัฒนา (ทุน OROG) และได้มีโอกาสนำเสนองานหัวข้อเรื่อง ผลของการฉีด L-arginine และ Selenium nanoparticles ผ่านเปลือกไข่ ต่อการพัฒนาของกล้ามเนื้อ การแสดงออกของยีน *MSTN* และคุณภาพเนื้อของไก่โคราช ในงานวิทยาศาสตร์สัตว์ปีกโลก สาขาประเทศไทย ประจำปี 2562

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี