

การใช้ผลิตภัณฑ์นํ้านมเป็นนํ้ายาเจือจางนํ้าเชื้อ สำหรับผลิตนํ้าเชื้อแช่แข็ง

Milk Extender Usage for Deep Frozen Semen

อุดม ช่างสุพรรณ^{1/} พรชัย สุวรรณภริรม^{2/}

Udom Changsuphan^{1/} Pornchai Suwannaphirom^{2/}

Abstract : Effect of milk extenders had been studied by compared with Egg yolk - tris - glycerol (ETG) which was the standard semen extender used in deep frozen semen process. Semen from three Holstein Friesian bulls were extended in four semen extenders which were Egg yolk - tris - glycerol (ETG), Skim milk - glycerol (SMG), Pasteurized whole milk - glycerol (PMG), and UHT whole milk - glycerol (UMG). Final extender in all semen contained 7% glycerol. Extended semen was placed in 0.25 ml. French mini straws and frozen. Post thaw motility (PTM) had been evaluated twice, immediately post thaw (0 h) and again after 5 h of 37°C incubation. At 0 h ETG and UMG ($36.76 \pm 1.69\%$ and $35.49 \pm 1.69\%$) were significant superior ($P < 0.05$) than SMG and PMG ($23.54 \pm 1.69\%$ and $24.85 \pm 1.69\%$). At 5 h evaluation ETG, SMG, PMG, and UMG were varied ($P < 0.05$) by which ETG was greatest ($13.62 \pm 1.38\%$) along with UMG ($9.26 \pm 1.38\%$) which were superior than SMG and PMG ($5.21 \pm 1.38\%$ and $2.07 \pm 1.38\%$) ($P < 0.05$). Results indicated that UMG could be used as good as of ETG in deep frozen semen process.

Cost of semen extender per dose (0.25 ml. straw) of ETG, SMG, PMG and UMG had been evaluated and were found that they were 0.093, 0.028, 0.030 and 0.034 Baht respectively. In order to use UMG in place of ETG the cost of frozen semen per dose could be 0.059 Baht reduced.

^{1/} ศูนย์วิจัยการผสมเทียมเชียงใหม่, สำนักงานปศุสัตว์เขต 5, กรมปศุสัตว์

^{2/} ศูนย์วิจัยการผสมเทียมสงขลา, สำนักงานปศุสัตว์เขต 9, กรมปศุสัตว์

^{1/} Chiang Mai Artificial Insemination Research Center, Livestock Office Region 5, Department of Livestock Development, Thailand.

^{2/} Songkhla Artificial Insemination Research Center, Livestock Office Region 9, Department of Livestock Development, Thailand.

บทคัดย่อ : ศึกษาถึงผลการใช้เน้าเยื่อจางน้ำเชื้อซึ่งทำมาจากผลิตภัณฑ์นม (Milk extender, ME) ชนิดต่างๆในการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งเปรียบเทียบกับการใช้เน้าเยื่อจางน้ำเชื้อชนิด Egg yolk- tris - glycerol (ETG) ที่เป็นเน้าเยื่อจางน้ำเชื้อมาตรฐาน โดยเน้าเยื่อ น้ำเชื้อซึ่งรีดเก็บได้จากพ่อโคพันธุ์โฮลสไตน์ ฟรีเซียนจำนวน 3 ตัว ไปเจือจางกับเน้าเยื่อจางน้ำเชื้อ 4 ชนิด คือ ETG, หางนมผง ละลายน้ำ + กลีเซอรอล (Skim milk - glycerol, SMG), นมสดพาสเจอร์ไรซ์ + กลีเซอรอล (Pasteurized whole milk - glycerol, PMG) และ นมสด UHT + กลีเซอรอล (UHT whole milk - glycerol, UMG) โดยให้มีระดับกลีเซอรอลเมื่อเจือจางขั้นสุดท้ายแล้วเป็น 7% ในทุกทริทเมนต์ นำน้ำเชื้อที่เจือจางแล้วไปบรรจุในหลอดพลาสติกขนาด 0.25 มล. แล้วนำไปแช่แข็ง ทำการตรวจดูอัตราการเคลื่อนไหว รยตัวหลังจากทำให้ละลาย (Post thaw motility, PTM) สองครั้งคือ หลังจาก ละลายทันที (0 ชั่วโมง) และหลังจาก เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 5 ชั่วโมง พบว่า ความแตกต่างของค่า PTM ที่ 0 ชั่วโมง ระหว่าง ETG และ UMG ไม่มีนัยสำคัญ ($36.76 \pm 1.69\%$ และ $35.49 \pm 1.69\%$) และดีกว่า SMG และ PMG ($23.54 \pm 1.69\%$ และ $24.85 \pm 1.69\%$) ($P < 0.05$) ส่วน PTM ที่ 5 ชั่วโมง ของ ETG มีค่าแตกต่างจาก SMG, PMG และ UMG ($P < 0.05$) โดย ETG ดีที่สุด ($13.62 \pm 1.38\%$) รองลงมาเป็น UMG ($9.26 \pm 1.38\%$) ดีกว่า SMG และ PMG ($5.21 \pm 1.38\%$ และ $2.07 \pm 1.38\%$) ($P < 0.05$) ผลจากการทดลองชี้ให้เห็นว่า UMG น่าจะนำมาใช้ทดแทน ETG ได้ในการผลิตน้ำเชื้อพ่อโคพันธุ์แช่แข็ง. จากการคำนวณราคาค่าต้นทุนสำหรับเน้าเยื่อจางน้ำเชื้อ แต่ละลิตร (0.25 มล.) ของ ETG, SMG, PMG และ UMG มีค่าเท่ากับ 0.093, 0.028, 0.030 และ 0.034 บาท ตามลำดับ ซึ่งถ้าหากจะใช้ UMG ทดแทน ETG ในการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็ง จะสามารถลดต้นทุนการผลิตได้ลิตรละ 0.059 บาท.

Index words : น้ำเชื้อแช่แข็ง, เน้าเยื่อจางน้ำเชื้อ, โฮลสไตน์ ฟรีเซียน,

Frozen semen, Semen extender, Milk extender, Holstein Friesian

คำนำ

เน้าเยื่อสำหรับเจือจางน้ำเชื้อ (Semen extender, SE) มีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งในการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็ง ซึ่ง SE ที่ดีจะทำหน้าที่ในการหล่อเลี้ยงตัวอสุจิ (Spermatozoa) และช่วยให้ตัวอสุจิมีชีวิตอยู่รอดได้เป็นจำนวนมากหลังผ่านขบวนการแช่แข็งแล้ว SE ที่นิยมใช้ในการผลิตน้ำเชื้อโคแช่แข็ง ได้แก่ Egg yolk-citrate-glycerol (ECG), Egg yolk-tris-glycerol (ETG) และ Whole milk-glycerol (WMG) (Foote and Arriola, 1987) ซึ่งใน SE ดังกล่าวนั้นจะมีส่วนผสมของไข่แดง (Egg yolk) หรือผลิตภัณฑ์ที่ได้จากน้ำนม เช่น นมผงหรือ นมสด อย่างใดอย่างหนึ่งเป็นส่วนประกอบอยู่ด้วยเสมอไป ทั้งนี้ เพราะมีสารที่ช่วย

ป้องกันตัวอสุจิไม่ให้ช็อคตายเนื่องจากการแช่เย็นได้ (Karabinus and Evenson, 1991)

การเตรียม SE ชนิดอื่นที่ไม่ได้ใช้น้ำนมเป็นส่วนประกอบหลักนั้นค่อนข้างยุ่งยากเพราะต้องใช้สารประกอบทางเคมีหลายชนิด เช่น ในการเตรียม ETG จะต้องใช้ Egg yolk 20%, Tris (hydroxymethyl aminomethane) 2.42 กรัมเปอร์เซ็นต์, Citric acid monohydrate 1.38 กรัมเปอร์เซ็นต์, D (-) Fructose 1.00 กรัมเปอร์เซ็นต์ และ Glycerine 7% แต่สำหรับ SE ที่ทำจากนมสดหรือผลิตภัณฑ์นม เช่น หางนมผง และนมพร้อมดื่ม นั้นสามารถเตรียมได้ง่ายๆ โดยเพียงแต่นำนมสดหรือหางนมผงละลายน้ำ แล้วนำมาต้มในน้ำเคือด (Double boiler) ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วกรอง

เอาตะกอนออก หลังจากนั้นจึงเติม Glycerine ลงไป ก็สามารถนำไปใช้ในการเจือจางน้ำเชื้อเพื่อผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งได้ดี เช่นเดียวกับ SE ชนิดอื่น ๆ (Taylor, 1991)

ปัจจุบันในประเทศแคนาดา น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อชนิดที่ทำมาจากน้ำมัน (Milk extender, ME) ได้ถูกนำมาใช้ทดแทน SE ชนิดอื่น ๆ ในการผลิตน้ำเชื้อเพื่อใช้ในการผสมเทียมทั่ว ๆ ไป เนื่องจากเตรียมได้ง่าย มีคุณสมบัติในการรักษาชีวิตและสมรรถนะของตัวอสุจิในการเข้าผสมกับไข่ได้ดีเยี่ยมและเป็นเวลานาน นอกจากนี้ ME ยังปลอดจากการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella pullorum* ซึ่งมักมีติดมากับเปลือกไข่ในกรณีที่ใช้ไข่แดงเป็นส่วนประกอบของ SE (Taylor, 1991)

การศึกษาทดลองนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาผลของการนำเอานมผงละลายน้ำหรือผลิตภัณฑ์นมพร้อมดื่มชนิดต่างๆมาทำเป็น SE เปรียบเทียบกับ Egg yolk tris - glycerol (ETG) โดยดูผลของการมีชีวิตรอดของตัวอสุจิและคุณภาพของน้ำเชื้อแช่แข็งจากเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวรายตัวภายหลังการทำให้ละลาย (Post thaw motility) ในทันทีและหลังจากการเก็บไว้ในอุณหภูมิต่ำ 37°C (Incubation) เป็นเวลา 5 ชั่วโมง และเพื่อเปรียบเทียบต้นทุนค่าใช้จ่ายในการเตรียม SE แต่ละชนิดที่ใช้ในการทดลอง

อุปกรณ์และวิธีการ

การเก็บน้ำเชื้อ

รีดเก็บน้ำเชื้อจากพ่อโคพันธุ์ดีจำนวน 3 ตัว (รีดเก็บ 8 ครั้งใน 8 สัปดาห์) โดยแบ่งน้ำเชื้อที่

รีดเก็บได้ในแต่ละครั้งเป็น 4 ส่วนนำแต่ละส่วนของน้ำเชื้อดังกล่าวไปเจือจางกับ SE ต่างกัน 4 ชนิด (ทรีทเมนต์) นำไปบรรจุหลอดน้ำเชื้อพลาสติกขนาด 0.25 มล. แล้วนำไปแช่แข็ง โดยทำเป็น 8 ซ้ำ

การเตรียม Egg yolk - tris - glycerol, ETG

น้ำยาเปรียบเทียบกับ (Control) มีส่วนประกอบของไข่แดง 20% และ Tris buffer 80% (การเตรียม Tris buffer ใช้ Demineralized water 92 มล. มาต้มให้ได้อุณหภูมิ 95°C แล้วเติม Tris 3.028 กรัม Citric acid 1.7 กรัม และ D(-)Fructose 1.25 กรัม คนให้ละลายจนทั่ว ตั้งทิ้งไว้จนอุณหภูมิเย็นลงประมาณ 35-40°C แล้วจึงเติม Glycerine (87% purity) 8 มล. ลงไป) นำ Buffer ที่ได้ไปผสมกับส่วนของไข่แดงตามสัดส่วนแล้วจึงเติมยาปฏิชีวนะ Streptomycin 1 มก/มล และ Penicillin 1000 iu/มล ก่อนนำไปใช้

การเตรียมหางนมผงละลายน้ำ (Skimmilk - glycerol, SMG) ทำเป็น 2 Fraction คือ A และ B

Fraction A : นำหางนมผง (Dry skim milk) มาละลายน้ำในอัตราส่วน 1 : 9 (w/v) จนเข้ากันดีแล้วบรรจุในภาชนะแก้วทนไฟ นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที (Double boiler) ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วกรองเอาตะกอนออกด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1

Fraction B : ประกอบด้วย Fraction A 84% (v/v) และ Glycerine (87% purity) 16% โดยเติม Glycerine ซึ่งอุ่นให้ร้อนลงไปแล้วเขย่าหรือคนให้เข้ากัน เติมยาปฏิชีวนะ Streptomycin 1 มก/มล และ Penicillin 1,000 iu/มล ลงใน SMG ทั้งสองส่วนก่อนนำไปใช้

การเตรียมนมสดพาสเจอร์ไรซ์ (Pasteurized whole milk glycerol, PMG)

ทำเป็น 2 Fraction คือ A และ B วิธีการเตรียมเป็นเช่นเดียวกับ SMG แต่ใช้นมสดพาสเจอร์ไรซ์ แทนหางนมผงละลายน้ำ

การเตรียมนมสด UHT (UHT whole milk glycerol)

ทำเป็น 2 Fraction คือ A และ B วิธีการเตรียมเป็นเช่นเดียวกับ SMG และ PMG แต่ใช้นมสด UHT แทนหางนมผงละลายน้ำหรือนมสดพาสเจอร์ไรซ์

การเจือจางน้ำเชื้อและการบรรจุหลอดน้ำเชื้อ

ตรวจคุณภาพของน้ำเชื้อที่รีดเก็บมาได้ โดยดูจากอัตราการเคลื่อนไหวรายตัว (Initial motility) จำนวนตัวอสุจิผิดปกติ (Abnormal sperm) และความเข้มข้นของตัวอสุจิ (Sperm concentration) โดย Colorimeter เพื่อคำนวณหาอัตราการเจือจาง จากนั้นแบ่งน้ำเชื้อไปเจือจางกับ SE แต่ละชนิด สำหรับการเจือจางด้วย ETG นั้นทำเป็นขั้นตอนเดียว (One step method) โดยเจือจางน้ำเชื้อให้มีปริมาณตัวอสุจิ 120×10^6 ตัว/มล. ในขณะที่เจือจางต้องอุ่น ETG ให้มีอุณหภูมิ 33°C นำหลอดบรรจุน้ำเชื้อที่เจือจางแล้ว แช่ในบีกเกอร์ที่มีน้ำอุ่น 33°C อยู่โดยให้ระดับน้ำในบีกเกอร์สูงท่วมระดับน้ำเชื้อในหลอดวางไว้ในตู้แช่ควบคุมอุณหภูมิที่ 5°C ทิ้งไว้ 2.5 ชั่วโมงจนอุณหภูมิลดลงเป็น 5°C

ส่วนการเจือจางน้ำเชื้อด้วย SMG, PMG และ UMG นั้นทำเป็น 2 ขั้นตอน (Two step method) เนื่องจากมี 2 Fraction โดยในขั้นตอนแรกทำการเจือจางกับ Fraction A ที่อุณหภูมิของสารละลาย 33°C ให้ได้ปริมาตรเป็นครึ่งหนึ่งของปริมาตร

ทั้งหมดที่ต้องการ ซึ่งจะมีจำนวนตัวอสุจิในน้ำเชื้อที่เจือจาง 240×10^6 ตัว นำหลอดน้ำเชื้อที่เจือจางแล้วไปแช่เย็นด้วยกรรมวิธีเดียวกันกับ ETG และหลังจากแช่เย็นจนครบ 2.5 ชั่วโมงหรืออุณหภูมิได้ 5°C แล้ว จึงทำการเติมส่วนของ Fraction B ซึ่งมีอุณหภูมิ 5°C เช่นเดียวกันลงไปเป็นปริมาตรเท่ากับน้ำเชื้อที่เจือจางไว้ก่อนในขั้นแรก ซึ่งจะทำให้ปริมาณตัวอสุจิ ในน้ำเชื้อหลังจากการเจือจางขึ้นสุดท้ายเป็น 120×10^6 ล้านตัว และมีระดับของ Glycerine เป็น 7% เท่ากับใน ETG น้ำเชื้อซึ่งเจือจางแล้วทิ้ง 4 ทริทเมนต์ หลังจากนั้นนำไปแช่เย็น 2.5 ชั่วโมงจนอุณหภูมิได้ 5°C แล้วจะเก็บไว้ในตู้แช่ต่อไปอีก 2.5 ชั่วโมงเพื่อ Equilibration หลังจากนั้นทำการบรรจุน้ำเชื้อลงหลอดน้ำเชื้อพลาสติกขนาด 0.25 มล. (French mini straw) อุดหลอดน้ำเชื้อด้วยผงสำหรับอุดหลอดน้ำเชื้อ (Polyvinyl alcohol) แช่ไว้ในน้ำเย็น 5°C นาน 30 นาที เพื่อให้ผงอุดแข็งตัวแล้วจึงนำไปแช่แข็ง

การแช่แข็งน้ำเชื้อ : นำหลอดน้ำเชื้อขึ้นจากน้ำแล้วเช็ดหลอดน้ำเชื้อทั้งหมด ให้แห้งสนิท นำหลอดน้ำเชื้อของแต่ละทริทเมนต์เรียงลงบน Freezing rack เดียวกันตามแนวนอน (ทริทเมนต์ละ 20 หลอด) นำไปแช่ในไอของไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -120°C นาน 10 นาที แล้วจึงบรรจุลงถึงเก็บน้ำเชื้อแช่แข็งไว้ได้ระดับในโตรเจนเหลวเก็บไว้สำหรับตรวจวิเคราะห์ผลต่อไป

การตรวจวิเคราะห์ผล : นำน้ำเชื้อที่ผ่านการแช่แข็งแล้ว และเก็บไว้ได้ในโตรเจนเหลว 24 ชั่วโมงขึ้นไป มาทำให้ละลาย (Thaw) ในน้ำอุ่น 35°C 30 วินาที โดยทำการสุ่มน้ำเชื้อจำนวน 3 หลอดจากแต่ละทริทเมนต์มาเทรวมกันในหลอดแก้วขนาดเล็กคนให้เข้ากันแล้วนำไปตรวจหาอัตรา

การเคลื่อนไหวยาวตัวหลังทำให้ละลาย (Post thaw motility) โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ Phase contrast microscope และผู้ตรวจคนเดียวกัน ตรวจดู 2 ครั้งคือ หลังจากทำให้ละลายทันทีและหลังจากเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 37°C (Incubation) 5 ชั่วโมง บันทึกค่าเปอร์เซ็นต์ Motility ของแต่ละทรีทเมนต์ นำมาวิเคราะห์โดยวิธี Analysis of variance และทดสอบค่าความแตกต่างโดยวิธี Duncan's new multiple range test (จริญ , 2527)

คำนวณหาต้นทุนค่าใช้จ่ายสำหรับ SE แต่ละชนิดที่ใช้ในการทดลองนำมาวิเคราะห์เปรียบเทียบค่าใช้จ่ายต่อหน่วยน้ำเชื้อ (ได้ส)

ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลการทดลองการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งโดยใช้ SE ต่างชนิดกัน 4 ชนิด โดยการตรวจคุณภาพของน้ำเชื้อหลังจากทำให้ละลาย (Post thaw motility, PTM) ที่ 0 ชั่วโมง และหลังจากเก็บไว้ที่ 37°C นาน 5 ชั่วโมง ได้แสดงไว้ในตารางที่ 1

Table 1 Effect of semen extender on post thaw motility (mean + SE) at 0 h and 5 h after 37°C incubated.

Treatment	0 h	5 h
Egg yolk-tris-glycerol (ETG)	36.76 ± 1.69 a	13.62 ± 1.38 a
Skim milk-glycerol (SMG)	23.54 ± 1.69 b	5.21 ± 1.38 c
Pasteurized whole milk-glycerol (PMG)	24.85 ± 1.69 b	2.07 ± 1.38 c
UHT. wholemilk-glycerol (UMG)	35.49 ± 1.69 a	9.26 ± 1.38 b

Note : Column means with different superscripts differ significantly at $p < 0.05$

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า ผลของ SE ต่อ PTM ที่ 0 ชั่วโมงนั้น ETG และ UMG มีค่าไม่ต่างกันและดีกว่า SMG และ PMG ($P < 0.05$) สำหรับ PTM ภายหลังเก็บไว้ที่ 37°C 5 ชั่วโมงนั้น ETG แตกต่างจาก SMG , PMG และ UMG ($P < 0.05$) โดยที่ ETG มีค่าสูงที่สุดรองลงมาเป็น UMG ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกัน ส่วน SMG และ PMG มีค่าต่ำกว่าและไม่แตกต่างกันเช่นเดียวกับ PTM ที่ 0 ชั่วโมง จากผลดังกล่าวชี้ให้เห็นว่า UMG มีคุณสมบัติในการรักษาอัตราการมีชีวิตรอดของตัว

อสุจิในน้ำเชื้อแช่แข็งหลังจากทำให้ละลายได้ดีเช่นเดียวกับ ETG ซึ่งเป็น SE ชนิดที่ใช้ในการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งของกองผสมเทียมกรมปศุสัตว์ในปัจจุบัน จึงน่าที่จะนำมาใช้ทดแทนกันได้ (ในกรณีที่น่ามาใช้ทดแทนกันควรจะพิจารณาผลของ PTM ที่ 5 ชั่วโมงประกอบด้วย) ผลจากการทดลองในครั้งนี้สอดคล้องกับการทดลองของ Chen *et al.* (1993) ; Senger *et al.* (1983) ซึ่งได้สรุปว่า PTM ในน้ำเชื้อซึ่งเจือจางด้วย SE ชนิด ETG นั้น จะมีคุณภาพเท่ากับหรือดีกว่าน้ำเชื้อซึ่งเจือจางด้วย

น้ำนมสด (Whole milk) หรือหางนมผง (Skim milk)

สำหรับ SE ซึ่งเตรียมมาจากน้ำนมชนิดต่างกันมีค่า PTM ต่างกันไปนั้นอาจจะเป็นผลสืบเนื่องมาจากวิธีการให้ความร้อนแก่น้ำนมก่อนนำไปใช้เป็น SE ดังเช่นที่ Salisbury and Van Demark (1961) ได้กล่าวไว้ว่าผลของ Milk extender ต่ออัตราการผสมติดในภาคปฏิบัติ ซึ่งแตกต่างกันไปนั้น มีผลเนื่องมาจากวิธีการให้ความร้อนแก่น้ำนมที่ 92 - 98°ซ ทำให้ไม่เหมาะสมในการทดลองครั้งนี้วิธีการให้ความร้อนแก่น้ำนมโดยการนำเอานมผงละลายน้ำ, นมสดพาสเจอร์ไรซ์ และนมสด UHT บรรจุลงในพลาสติก, ปิดฝาด้วยกระดาษฟอยล์ แล้วนำไปต้มในหม้อต้มน้ำจนน้ำในหม้อต้มน้ำเดือดเป็นเวลานาน 10 นาที สำหรับการให้ความร้อนแก่น้ำนมก่อนนำไปทำเป็น SE นั้นมีความสำคัญเป็นอย่างมากทั้งนี้เนื่องจากว่า

น้ำนมที่ได้รับความร้อนที่ 77 - 97°ซ เป็นเวลา 10 นาที จะทำให้โปรตีนในน้ำนมเกิดปฏิกิริยาปล่อย Sulfhydryl group (SH) ออกมา ซึ่ง SH นี้จะไปยับยั้งพิษ ของ lactenin ที่มีต่อตัวอสุจิได้โดยตรง (Johnson *et al.*, 1955) อนึ่งการผ่านความร้อนมาก่อน (Pre-heating) จากขบวนการผลิตก็น่าจะมีผลต่อ PTM ได้กล่าวคือ นมสดพาสเจอร์ไรซ์นั้นได้รับการผ่านความร้อน 72°ซ 15 นาที และนมสด UHT ได้รับการผ่านความร้อนที่ 140 - 150°ซ 2 วินาที (นรินทร์, 2528) ส่วนนมผงละลายน้ำนั้น ยังไม่ได้รับการผ่านความร้อนมาก่อน

สำหรับส่วนประกอบในน้ำนมซึ่งได้แก่ เเปอร์เซ็นต์ของไขมัน, โปรตีน, แลคโตส และของแข็งในน้ำนมตลอดจนระดับความเป็นกรด-ด่าง (pH) รวมทั้งความถ่วงจำเพาะ (SG) ของน้ำนมแต่ละชนิดซึ่งใช้ในการทดลองนำมาเปรียบเทียบกับ ETG ได้แสดงไว้ในตารางที่ 2

Table 2 Milk composition (%)¹⁾, pH and specific gravity (SG) of milk samples compared with ETG and whole milk.

Samples	Fat	Protein	Lactose	Total solid	pH	SG
Egg yolk-tris-glycerol	-	-	-	-	6.75	1.040
Skim milk	0.03	3.71	5.31	9.7	6.66	1.036
Pasteurized whole milk	4.03	3.08	4.20	12.01	6.75	1.027
UHT whole milk	3.82	3.36	4.72	12.61	6.56	1.030
Whole milk (Holstein Friesian) ²⁾	3.41	3.32	4.87	12.28	6.6	1.030

¹⁾ Milk analysis data of Chiang Mai A.I. Research Center (1995)

²⁾ Nitiya (1984)

ซึ่งเมื่อพิจารณาจากตารางดูแล้วส่วนประกอบของน้ำนม ไม่น่าจะมีผลต่อค่า PTM เนื่องจากเมื่อเปรียบเทียบระหว่างทางนมผงละลายน้ำ และนมสดพาสเจอร์ไรซ์ ซึ่งมี PTM ไม่แตกต่างกันทั้งที่ 0 ชั่วโมงและ 5 ชั่วโมง นั้นจะเห็นได้ว่ามีส่วนประกอบในน้ำนมแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด แต่เมื่อมาเปรียบเทียบระหว่างนมสดพาสเจอร์ไรซ์ และนมสด UHT ซึ่งมี PTM ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทั้งที่ 0 ชั่วโมง และ 5 ชั่วโมงนั้นกลับพบว่าส่วนประกอบของน้ำนมมีค่าใกล้เคียงกันมาก ส่วนระดับความเป็นกรด-ด่าง (pH) และความอวบน้ำ

จำเพาะ (SG) ของ Milk extender แต่ละชนิดนั้นมีค่าใกล้เคียงกัน จึงไม่น่าจะมีผลต่อค่า PTM เช่นเดียวกับที่ Foote (1970) ได้รายงานผลการทดลองใช้ SE หลายชนิดที่มี Osmolarity ต่างกันตั้งแต่ 300-332 mosmols และ pH ต่างกันตั้งแต่ 6.5-6.75 พบว่าอัตราการไม่กลับสัดภายใน 60-90 วันมีค่าไม่ต่างกัน

สำหรับต้นทุนค่าใช้จ่ายในการเตรียม SE แต่ละชนิดที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ได้ทำการคำนวณหาต้นทุนที่ 100 มล และ 0.25 มล (โคสต์) นำมาเปรียบเทียบกัน ดังแสดงไว้ในตารางที่ 3

Table 3 Cost of semen extenders.

Semen extender	Baht	
	100 ml	0.25 ml
Egg yolk-tris-glycerol (ETG)	37.34	0.093
Skim milk-glycerol (SMG)	11.26	0.028
Pasteurized whole milk-glycerol (PMG)	12.12	0.030
UHT whole milk-glycerol (UMG)	13.56	0.034

Note : When dry skim milk = 70 B/kg, pasteurized whole milk = 3.50 B/225ml, UHT whole milk = 7.50 B/250 ml, egg = 1.80 B/egg Tris = 2,700 B/500 gm, Citric acid = 870 B/kg, Fructose = 1,070 B/250 gm and Glycerine = 1,320 B/ltr

เมื่อพิจารณาจากต้นทุนของ SE แต่ละชนิดจะเห็นได้ว่า SE ที่นำมาจากน้ำมนั้นมีราคาใกล้เคียงกันมากแทบไม่มีความแตกต่างกันเลย ส่วน ETG มีราคาสูงที่สุด คือ 0.093 บาทต่อโคสต์ ดังนั้นถ้าหากจะใช้ UMG ทดแทน ETG ในการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งจะสามารถลดต้นทุนของ SE ในแต่ละโคสต์ ลงได้ 0.059 บาท

การทดลองในครั้งนี้มุ่งเน้นในการศึกษาถึงผลของ Milk extender เปรียบเทียบกับไข่แดง ทริส (ETG) โดยดูผลจาก PTM เป็นหลักโดยยังไม่ได้ทำการศึกษาในภาคสนาม ถึงอัตราการผสมติดของน้ำเชื้อที่เจือจางโดย Milk extender ชนิดต่างๆที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ จึงน่าที่จะได้มีการศึกษาทดลองในภาคสนามต่อไป

สรุปผลการทดลอง

การทดลองแช่แข็งน้ำเชื้อในหลอดพลาสติก ขนาด 0.25 มล. โดยใช้ SE ต่างกัน 4 ชนิด คือ ETG เปรียบเทียบกับการใช้ SE ซึ่งทำมาจากน้ำมัน ได้แก่ หางนมผงละลายน้ำ SMG, นมสด พาสเจอร์ไรซ์ PMG และนมสด UHT (UMG) พบว่า อัตราการเคลื่อนไหวรายตัวหลังจากทำให้ละลาย (PTM) ที่ 0 ชั่วโมง มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 36.76 ± 1.69 , 23.54 ± 1.69 , 24.85 ± 1.69 และ 35.49 ± 1.69 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ซึ่ง ETG และ UMG มีค่า ไม่แตกต่างกัน แต่แตกต่างจาก SMG และ PMG อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) สำหรับ PTM ภายหลัง เก็บไว้ที่ 37° ซ นาน 5 ชั่วโมง มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 13.62 ± 1.38 , 5.21 ± 1.38 , 2.07 ± 1.38 และ 9.26 ± 1.38 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่ง ETG แตกต่างจาก SMG, PMG และ UMG อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยที่ ETG มีค่าสูงที่สุดรองลงมาเป็น UMG ส่วน SMG และ PMG มีค่าไม่ต่างกันเช่นเดียวกับ PTM ที่ 0 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่า UMG สามารถนำมาใช้ ทดแทน ETG ได้ในการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็ง พ่อโคพันธุ์

จากการคำนวณต้นทุนของ SE แต่ละชนิด พบว่าราคาต่อโด๊ส (0.25 มล) ของ ETG, SMG, PMG, และ UMG เท่ากับ 0.093, 0.028, 0.030 และ 0.034 บาทตามลำดับ เมื่อพิจารณาแล้วถ้าหาก จะใช้ UMG ทดแทน ETG ในการผลิตน้ำเชื้อ แช่แข็งจะสามารถลดต้นทุนของ SE ในแต่ละโด๊ส ได้ 0.059 บาท

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้ดำเนินการทดลองขอขอบคุณท่าน ผู้เชี่ยวชาญฯ นสพ. สัมพันธ์ สิงห์จันทร์ ที่ได้ให้การ สนับสนุน และให้คำปรึกษาแนะนำในการทดลอง ครั้งนี้และขอขอบคุณ คุณนิคม พุ่มเพ็ช สัตวแพทย์ 5 และคุณอินทอน ไชยมาลา สัตวแพทย์ 5 ศูนย์ วิจัยการผสมเทียมเชียงใหม่ ที่ได้ช่วยเหลืองาน ในห้องทดลองจนการทดลองสำเร็จลุล่วงไปได้ ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- จรัญ จันทลักขณา. 2527. สถิติวิธีวิเคราะห์และวางแผน งานวิจัย, พิมพ์ครั้งที่ 5. บริษัทโรงพิมพ์ไทยวัฒนาพานิชจำกัด. กรุงเทพฯ. 468น.
- นิธิยา รัตนานนท์. 2527. เคมีนมและผลิตภัณฑ์นม. ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร. คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 160น.
- นรินทร์ ทองศิริ. 2528. เทคโนโลยีอาหารนม. ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร. คณะเกษตรศาสตร์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 181น.
- อุดม ช่างสุพรรณ. 2538. ส่วนประกอบของน้ำนมพร้อมดื่มชนิดต่างๆ. ศูนย์วิจัยการผสมเทียมเชียงใหม่, เชียงใหม่. (เอกสารไม่ได้เผยแพร่)
- Chen, Y., R.H. Foote, C. Tobback, L. Zhang and S. Hough. 1993. Survival of bull spermatozoa seeded and frozen at different rates in egg yolk-tris and whole milk extender. J. Dairy. Sci. 76 : 1028
- Foote, R.H. 1970. Influence of extender, extension rate, and glycerolating technique on fertility of frozen bull semen. J. Dairy Sci. 53:1478.

- Foote, R.H. and J. Arriola. 1987. Motility and fertility of bull sperm frozen-thawed differently in egg yolk and milk extenders containing detergent. J. Dairy. Sci. 70 : 2642.
- Foote, R.H., Y.Chen and C.C.Brockett.1993. Fertility of bull spermatozoa frozen in whole milk extender with Trehalose, Taurine or blood serum. J. Dairy. Sci. 76 : 1908.
- Johnson,P.E., R.J.Flipse and J.O.Almquist.1955. Diluter of bovine semen. VI. The effect of cystine hydrochloride on the livability of bull spermatozoa in unheated skim milk. J.Dairy Sci.38:53.
- Karabinus,D.S. and D.P.Evenson.1991. Effect of egg yolk citrate and milk extenders on chromatin structure and viability of cryopreserved bull sperm. J. Dairy. Sci. 74 : 3836.
- Salisbury,G.W. and N.L.Van Demark. 1961. Physiology of Reproduction and Artificial Insemination of Cattle. ed. W. H. Freeman & Co., Sanfrancisco. CA.
- Schenk, J.L., R.P. Amann and C.H. Allen. 1987. Effect of extender and insemination dose on postthaw quality and fertility of bovine sperm. J. Dairy. Sci. 70 : 1458.
- Senger,P.L.,J.R.Mitchell and J.O.Almquist.1983. Influence of cooling rates and post thaw viability of bovine spermatozoa packaged in .25 and .5 ml. French straws.J. Anim. Sci.56:1261
- Taylor,J.1991. Bovine Semen Collection and Processing Techniques. Revised 2nd. ed., Saskatchewan Agriculture Development Fund, Saskatchewan, Canada.