



<https://li01.tci-thaijo.org/index.php/pajrnu/index>

บทความวิจัย

ผลของไข่แดงฟงต่อคุณภาพและลักษณะการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อโคหลังการแช่แข็ง

วิสูตร ไมตรีจิตต์¹ ประเสริฐศักดิ์ รักดีวงศ์² ทวี เหล่าดี¹ ทวีพร เรืองพริ้ม¹ อาทิตย์ ปัญญาศักดิ์¹

สุกัญญา รัตนทับทิมทอง¹ และ สุธิชา มาเจริญ^{1*}

¹ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 73140

²ภาควิชาวิศวกรรมเกษตร คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 73140

ข้อมูลบทความ

Article history

รับ: 30 เมษายน 2567

แก้ไข: 10 มิถุนายน 2567

ตอบรับการตีพิมพ์: 11 มิถุนายน 2567

ตีพิมพ์ออนไลน์: 27 มิถุนายน 2567

คำสำคัญ

สารละลายไข่แดงฟอส

สารละลายน้ำเชื้อ

น้ำเชื้อโคแช่แข็ง

ไข่แดงฟง

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งฟอสฟอรัสโคหลังทำการละลาย จากการเจือจางด้วยสารละลายน้ำเชื้อโคแช่แข็งสูตร egg yolk tris glycerol (ETG) ที่มีไข่แดงสด และไข่แดงฟงทั้ง 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์เป็นส่วนประกอบ จากนั้นทำการรีดเก็บน้ำเชื้อจากฟอสฟอรัสโคเนื้อจำนวน 4 ตัว ตัวละ 4 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 1 สัปดาห์ แบ่งน้ำเชื้อออกเป็น 3 ส่วน เพื่อเจือจางตามสูตรสารละลายที่ต่างกันตามชนิดของไข่แดง กลุ่มที่ 1 สารละลายน้ำเชื้อที่มีไข่แดงสด (EG) กลุ่มที่ 2 สารละลายน้ำเชื้อที่มีไข่แดงฟง 10 เปอร์เซ็นต์ (10EP) และกลุ่มที่ 3 สารละลายน้ำเชื้อที่มีไข่แดงฟง 15 เปอร์เซ็นต์ (15EP) ทำการบรรจุน้ำเชื้อที่ทำการเจือจางด้วยสารละลายทั้ง 3 สูตร ในหลอดน้ำเชื้อขนาด 0.25 ml และทำการปิดผนึก นำตัวอย่างน้ำเชื้อโคที่ทำการแช่แข็งมาทำการละลายที่หลังแช่แข็ง 24 ชั่วโมง เพื่อประเมินคุณภาพน้ำเชื้อทำการวิเคราะห์ด้วย เครื่อง CASA จากผลการทดลองพบว่า ในด้านเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหว (motile) น้ำเชื้อแช่แข็งฟอสฟอรัสโคที่เจือจางด้วยสารละลายน้ำเชื้อกลุ่ม EG ไข่แดงฟง 10EP และ 15EP มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) แต่พบว่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (progressive) ของกลุ่ม EG สูงกว่ากลุ่มไข่แดงฟงทั้ง 2 กลุ่ม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) โดยมีค่าอยู่ที่ 9.47 4.48 และ 4.36 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และในด้าน sperm velocity ค่าความเร็วเฉลี่ยในการเคลื่อนที่ของอสุจิ (VAP) ความเร็วในการเคลื่อนที่เป็นเส้นตรงของตัวอสุจิ (VSL) และความเร็วในการเคลื่อนที่เป็นเส้นโค้งของตัวอสุจิ (VCL) ของกลุ่ม EG สูงกว่า กลุ่มไข่แดงฟงทั้ง 2 กลุ่ม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) ไม่พบความแตกต่างทางสถิติในด้านเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหว และตัวอสุจิที่ผิดปกติที่แช่แข็งในสารละลาย EG 10EP และ 15EP ($P > 0.05$) จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า สารละลายน้ำเชื้อแช่แข็งที่มีส่วนประกอบของไข่แดงฟงที่ระดับ 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์ ไม่ส่งผลต่อการปรับปรุงคุณภาพน้ำเชื้อโคแช่แข็งในด้านเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าและความเร็วในการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ

บทนำ

การผสมเทียมได้เข้ามามีบทบาทสำคัญในการผลิตโคเนื้อ โดยเฉพาะในเรื่องของการปรับปรุงพันธุ์กรรมและผลผลิต เพื่อเป็นการขยายพันธุ์สัตว์ที่มีพันธุ์กรรมที่ดีจำนวนเพิ่มมากขึ้นในเวลาอันรวดเร็ว การเก็บรักษาน้ำเชื้อโคมีความสำคัญในการรักษาคุณภาพของน้ำเชื้อไว้เพื่อการเก็บรักษาที่ยาวนานและมีปริมาณอสุจิ (spermatozoa) ที่มีชีวิตมากเพียงพอต่อการผสมติด น้ำเชื้อโคนิยมทำการจัดเก็บน้ำเชื้อโคในรูปแบบแช่แข็ง (frozen semen) โดยเก็บที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส ในไนโตรเจนเหลว กระบวนการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งมีขั้นตอนการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว จนทำให้เกิดความเสียหายต่อตัวอสุจิ ดังนั้นจึงต้องมีการใช้สารปกป้องการทำอันตรายตัวอสุจิจากการแช่แข็ง (cryoprotectants) เพื่อช่วยป้องกันความเสียหายนี้ ซึ่งสาร cryoprotectants ที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย คือ การใช้ไข่แดงร่วมกับกลีเซอรอล (egg yolk tris glycerol, egg yolk citrate glycerol) ซึ่งในส่วนประกอบของสารละลายน้ำเชื้อโคแช่แข็ง ไข่แดงมีความสำคัญในการป้องกันเซลล์อสุจิ เพราะไข่แดงมีส่วนประกอบของ

phospholipid และ cholesterol ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการป้องกันเซลล์อสุจิจากการเกิดปฏิกิริยา cold shock (Mukul et al., 2015; Singh et al., 2015) อีกทั้งไข่แดงยังมีองค์ประกอบของสารในกลุ่ม low-density lipoprotein (LDL) ที่สามารถป้องกันเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิจากการเกิดความเสียหายในกระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อได้ (Manjunath et al., 2002) ความสำคัญในการเก็บรักษาคุณภาพน้ำเชื้อก็เพื่อรักษาน้ำเชื้อให้มีคุณภาพดีในระยะเวลาที่ยาวนาน ทำให้เพิ่มประสิทธิภาพในการผสมเทียมให้มีอัตราการผสมติดที่เพิ่มขึ้น แต่จากการใช้ไข่แดงสด (fresh egg yolk) มีข้อจำกัดคือ อาจไม่พบ LDL ในส่วนประกอบของไข่แดง หรือมีอยู่ในปริมาณที่ต่ำ ซึ่งอาจส่งผลต่อความเสียหายต่อตัวอสุจิของโคในระหว่างลดอุณหภูมิในการแช่แข็งน้ำเชื้อ (Amirat et al., 2005) การแยกไข่แดงจากไข่ไก่ ไข่เป็ดเพื่อใช้ในการทำสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ ต้องมีการแยกส่วนที่เป็นพิษต่อตัวอสุจิออก โดยการแยกเปลือกนอก (outer shell) และเยื่อหุ้มชั้นใน (inner membrane) เพื่อแยกไข่แดงออกจาก albumin และ chalazae (Ansari et al., 2010) อีกทั้งไข่แดงสดที่ใช้ในสารละลาย

*Corresponding author

E-mail address: sutisa.ma@ku.th (S. Majarune)

Online print: 27 June 2024 Copyright © 2024. This is an open access article, production, and hosting by Faculty of Agricultural Technology, Rajabhat Maha Sarakham University. <https://doi.org/10.14456/paj.2024.28>

เจี๊จางน้ำเชื้อแช่แข็งอาจมีความเสี่ยงที่อาจเกิดการปนเปื้อนจุลินทรีย์ ซึ่งอาจส่งผลเสียต่อความสามารถในการปฏิสนธิ และการติดเชื้อมากจากการผสมเทียม (Bousseau et al., 1998) จากเหตุผลดังกล่าวจึงได้มีการศึกษาการใช้สารทดแทนไข่แดง เช่น การใช้ lecithin จากถั่วเหลืองในสารละลายน้ำเชื้อโคแช่แข็ง พบว่าสามารถใช้ lecithin ในสูตรสารละลายเพื่อทดแทนไข่แดงได้ แต่ไม่สามารถช่วยปรับปรุงคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งให้มีคุณภาพหลังทำการละลายได้ดีกว่าสารละลายน้ำเชื้อที่มีส่วนผสมของไข่แดง (Forouzanfar et al., 2010; Papa et al., 2011) แต่อย่างไรก็ตามหากไข่แดงได้ผ่านการกระบวนการฆ่าเชื้อและควบคุมคุณภาพในด้านองค์ประกอบที่สำคัญของไข่แดง อาจแก้ปัญหาคุณภาพที่ไม่สม่ำเสมอและการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์จากไข่แดงสดได้ ซึ่งในกระบวนการผลิตไข่แดงผงจากไข่ไก่ (egg yolk powder) ได้มีการฆ่าเชื้อด้วย sterilization และ pasteurization รวมทั้งมีการ homogenization ทำให้ไข่แดงผงที่ได้มีความสม่ำเสมอในด้านองค์ประกอบ ทราบองค์ประกอบที่สำคัญ และปราศจากเชื้อ (Wei et al., 2019) จากการศึกษาครั้งนี้โดย García et al. (2017) ทำการศึกษาการใช้ไข่แดงผงจากไข่ไก่ที่ระดับ 15 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลายสูตร tris (hydroxymethyl-aminoethane)-citric acid-glucose ซึ่งมี glycerol 5 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลให้คุณภาพน้ำเชื้อแพะหลังทำการละลายมีคุณภาพดีขึ้น ดังนั้นในการศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบคุณภาพของน้ำเชื้อโคที่ผ่านการแช่แข็งโดยใช้สารละลายเจี๊จางน้ำเชื้อ egg yolk tris glycerol ที่มีส่วนผสมของไข่แดงสดและไข่แดงผง

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

สัตว์ทดลอง

การทดลองใช้พ่อพันธุ์โคกำแพงแสน อายุเฉลี่ย 2-5 ปี จำนวน 4 ตัว โดยรีดน้ำเชื้อจากพ่อพันธุ์แต่ละตัวและทำการแบ่งน้ำเชื้อออกเป็น 3 ส่วนเท่า ๆ กัน เพื่อเติมสารละลายน้ำเชื้อที่แตกต่างกันทั้ง 3 ชนิด ทำการรีดน้ำเชื้อพ่อพันธุ์ทั้งหมด 4 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 1 สัปดาห์ เพื่อทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง โดยกลุ่มการทดลองมีทั้งหมด 3 กลุ่ม ตามสูตรสารละลายน้ำเชื้อ ดังนี้

กลุ่มที่ 1 สารละลายน้ำเชื้อ egg yolk tris glycerol ที่มีไข่แดงสดจากไข่ไก่ 20 เปอร์เซ็นต์ ในสูตร (EG)

กลุ่มที่ 2 สารละลายน้ำเชื้อ egg yolk tris glycerol ที่มีไข่แดงผงจากไข่ไก่ 10 เปอร์เซ็นต์ (10EP)

กลุ่มที่ 3 สารละลายน้ำเชื้อ egg yolk tris glycerol ที่มีไข่แดงผงจากไข่ไก่ 15 เปอร์เซ็นต์ (15EP)

การทดลองนี้ได้รับอนุญาตใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ ตามเอกสารอนุญาตเลขที่ ACKU65-AGK-022

การเตรียมสารละลายน้ำเชื้อ

การเตรียมสารละลาย fructose-tris-glycerol และอัตราส่วนไข่แดงในสารละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง egg yolk tris glycerol ซึ่งมีส่วนผสมของสารเคมี สารละลาย และไข่แดง ดังแสดงใน Table 1

การเตรียมไข่แดงสดจากไข่ไก่ ทำได้โดยนำไข่ไก่มาแช่ดัก

ความสะอาดบริเวณเปลือกไข่ด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 75 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นทำการแยกไข่แดงออกจากไข่ขาว นำส่วนของไข่แดงวางบนกระดาษกรองเบอร์ 3 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 125 มิลลิเมตร (filter papers 3, Whatman™) เพื่อซับไข่ขาวที่ติดกับไข่แดงออกจนหมด จากนั้นแยกเยื่อหุ้มไข่แดงออกและนำส่วนของไข่แดงใส่บีกเกอร์เพื่อนำไปผสมกับสารละลาย fructose-tris-glycerol ในอัตราส่วนไข่แดง 20 เปอร์เซ็นต์

การเตรียมไข่แดงผง ใช้ไข่แดงผงสำเร็จรูปที่ผลิตจากไข่ไก่ (Himedia®, Himedia Laboratories Pvt. Ltd., India) เกรดคุณภาพสำหรับใช้ในห้องปฏิบัติการ ผ่านขบวนการ pasteurized spray dried โดยมีโปรตีนเป็นส่วนประกอบ ≥ 30 เปอร์เซ็นต์ และมีไขมันเป็นส่วนประกอบ ≥ 57 เปอร์เซ็นต์ นำไข่แดงผงผสมกับน้ำที่ผ่านการ sterile (sterile water) ในอัตราส่วน 1:1 เพื่อนำไปผสมกับสารละลาย fructose-tris-glycerol ในอัตราส่วนไข่แดงผง 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์

การทำน้ำเชื้อแช่แข็ง (frozen semen)

เก็บตัวอย่างน้ำเชื้อจากพ่อพันธุ์โคกำแพงแสน เพื่อศึกษาการใช้สารละลายน้ำเชื้อแช่แข็งที่มีไข่แดงสด และไข่แดงผงเป็นส่วนประกอบ โดยคุณภาพน้ำเชื้อที่สามารถใช้ทำน้ำเชื้อแช่แข็งได้ในการศึกษานี้ น้ำเชื้อสดต้องมีลักษณะเป็นสีครีม หรือขาวขุ่น ปราศจากสิ่งปนเปื้อน มีปริมาณตัวอสุจิมากกว่า 800 ล้านตัวต่อมิลลิลิตร มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่มากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ และมีตัวอสุจิที่มีลักษณะปกติมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นคำนวณเพื่อเจี๊จางให้ตัวอสุจิมีความเข้มข้น 120×10^6 ตัว/มิลลิลิตร โดยแบ่งน้ำเชื้อเป็น 3 ส่วน เพื่อเจี๊จางตามสูตรของสารละลายที่ใช้ทำการศึกษานี้

นำน้ำเชื้อที่เติมสารละลายทั้ง 3 สูตรตามกลุ่มทดลอง มาทำให้เย็นตัวลงโดยการเก็บไว้ในตู้ทำความเย็น (cold cabinet) เพื่อทำให้อุณหภูมิลดลงจาก 37 องศาเซลเซียส จนกระทั่งอุณหภูมิลดลงมาอยู่ที่ 4 องศาเซลเซียส ซึ่งใช้เวลาประมาณ 3-4 ชั่วโมง จากนั้นทำการเตรียมหลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 0.25 มิลลิลิตร (French straw) ทำการพิมพ์ข้อมูลบนหลอดน้ำเชื้อเพื่อระบุสูตรสารละลายน้ำเชื้อชื่อพ่อโค หมายเลข และวันเดือนปีที่ทำการผลิต จากนั้นนำมาเรียงไว้เป็นชุดที่ถาดวางหลอดบรรจุน้ำเชื้อ (clamp) จากนั้นนำไปเก็บในตู้ทำความเย็นเช่นเดียวกับน้ำเชื้อที่เติมสารละลายเจี๊จางน้ำเชื้อแล้ว เพื่อให้อุณหภูมิของหลอดกับน้ำเชื้อที่เตรียมไว้นั้นเท่ากัน หลังจากทิ้งครบ 4 ชั่วโมงโดยนับตั้งแต่การเติมสารละลายเจี๊จางน้ำเชื้อ เพื่อให้สารละลายทำงานจนสมบูรณ์ (equilibration time) จึงทำการบรรจุใส่หลอดด้วยเครื่องดูด (suction pump) โดยทำการดูดน้ำเชื้อเข้าไปจนถึงส่วนกลางของจุดปิดผนึก (sealing) ที่ทำหน้าที่เป็นจุดปิดไม่ให้น้ำเชื้อไหล ทำการผนึกหลอดโดยเครื่อง ultrasonic sealing machine แล้วจึงนำหลอดน้ำเชื้อที่ถูกบรรจุแล้วมาเรียงไว้บนชั้นสำหรับเรียงหลอดน้ำเชื้อ (rack) ซึ่งหลอดน้ำเชื้อแต่ละหลอดจะแยกออกจากกัน ทำให้เมื่อนำไปแช่แข็งในโอของ

ไนโตรเจนเหลว จะทำให้ทุกด้านของหลอดได้รับความเย็นที่ทั่วถึงเท่ากันหมด จากนั้นจึงนำน้ำเชื้อที่อยู่บนชั้นสำหรับเรียงหลอดน้ำเชื้อ (rack) ไปวางบนกล่องลดอุณหภูมิด้วยไอไนโตรเจนเหลวจนหลอดน้ำเชื้อมีอุณหภูมิ -120 องศาเซลเซียส จึงนำหลอดน้ำเชื้อนั้นลงไปแช่ไว้ในไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen) ที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส เพื่อรอการตรวจประเมินคุณภาพหลังแช่แข็งต่อไป

การเก็บข้อมูลและการวิเคราะห์ผล

โดยจะนำเอาข้อมูลคุณภาพน้ำเชื้อมาวิเคราะห์หาความแตกต่างทางสถิติของผลของการใช้สารละลายน้ำเชื้อที่ต่างกันต่อคุณภาพน้ำเชื้อหลังการแช่แข็งนาน 24 ชั่วโมง เพื่อทำการศึกษาคูณภาพน้ำเชื้อเปรียบเทียบคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งโดยเครื่อง CASA (Computer Assisted Sperm Analyzer; HTCasa II Motility Analyzer version, Hamilton-Thorne, Biosciences, MA, USA) ตามคู่มือคำแนะนำการใช้งานของเครื่อง เพื่อนำผลมาเปรียบเทียบคุณภาพของสารเจือจาง ในด้านเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหว (motility) เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (progressive) ความเร็ว (velocity) รูปแบบในการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ (kinetic movement) และความผิดปกติของอสุจิที่บริเวณส่วนหาง (sperm abnormality)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลโดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) วิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของสูตรสารละลายน้ำเชื้อโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ SAS OnDemand for Academics: SAS Studio (Student Edition)

ผลและวิจารณ์ผลการวิจัย

ผลของไข่แดงในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ (Motility) และการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิ (progressive) ของน้ำเชื้อโคหลังทำละลาย

จากการศึกษาสารละลายน้ำเชื้อ egg yolk tris glycerol ที่มีส่วนประกอบของไข่แดง ต่อการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อโคแช่แข็งหลังทำละลาย พบว่า เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ ของน้ำเชื้อโคแช่แข็งทั้ง 3 กลุ่ม ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P=0.16$) การศึกษาในด้านเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิของน้ำเชื้อโคแช่แข็งหลังทำละลาย พบว่า เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิ กลุ่มที่มีส่วนประกอบของไข่แดงสด EG มีค่าสูงกว่ากลุ่มไข่แดงผง 10EP และ 15EP อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.01$) โดยน้ำเชื้อโคแช่แข็งกลุ่ม EG 10EP และ 15EP มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิหลังทำละลาย เท่ากับ 9.47 4.48 และ 4.36 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Table 2)

ผลของไข่แดงในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อต่อความเร็ว (velocity) รูปแบบในการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ (kinetic movement) ของน้ำเชื้อโคหลังทำละลาย

จากการศึกษาสารละลายน้ำเชื้อ egg yolk tris glycerol ที่มีส่วนประกอบของไข่แดง ต่อความเร็วและรูปแบบการเคลื่อนที่ของ

ตัวอสุจิโคแช่แข็งหลังทำละลาย พบว่าความเร็วในการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ ในด้านความเร็วเฉลี่ยในการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ (VAP) ความเร็วในการเคลื่อนที่เป็นเส้นตรงของตัวอสุจิ (VSL) และความเร็วในการเคลื่อนที่เป็นเส้นโค้งของตัวอสุจิ (VCL) ของกลุ่ม EG มากกว่ากลุ่มไข่แดงผง 10EP และ 15EP อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.01$) แต่เมื่อประเมินในด้านรูปแบบการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิหลังทำละลาย ไม่พบความแตกต่างทางสถิติของสารละลายน้ำเชื้อต่อเปอร์เซ็นต์ของการเคลื่อนที่เป็นเส้นตรงของอสุจิ (LIN, $P=0.89$) และความตรงในการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ (STR, $P=0.56$) ดังแสดงใน Table 3

ผลของไข่แดงในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อต่อตัวอสุจิที่ผิดปกติ (sperm abnormality) ของน้ำเชื้อโคหลังทำละลาย

จากการศึกษาสารละลายน้ำเชื้อ egg yolk tris glycerol ที่มีส่วนประกอบของไข่แดงต่อตัวอสุจิที่ผิดปกติบริเวณส่วนหาง พบว่า ในด้านเปอร์เซ็นต์ตัวอสุจิหางงอ (bent tail) และหางม้วน (coiled tail) ของกลุ่มสารละลายน้ำเชื้อไข่แดงผง 10EP และ 15EP มีเปอร์เซ็นต์สูงกว่ากลุ่ม EG อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.01$) ซึ่งทำให้เปอร์เซ็นต์ตัวอสุจิที่ปกติในกลุ่ม 10EP และ 15EP มีค่าต่ำกว่ากลุ่ม EG อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.01$) ในด้านเปอร์เซ็นต์ตัวอสุจิที่มีหยดน้ำที่ส่วนหาง (Distal droplet) ในกลุ่ม 10EP พบความผิดปกติสูงสุด ($P<0.01$) จากการประเมินในด้านเปอร์เซ็นต์ตัวอสุจิที่มีลำตัวคด (DMR) และเปอร์เซ็นต์ตัวอสุจิที่มีหยดน้ำที่ส่วนคอ (Proximal droplet) ไม่พบความแตกต่างทางสถิติของสารละลายน้ำเชื้อต่อ DMR ($P=0.08$) และเปอร์เซ็นต์ตัวอสุจิที่มีหยดน้ำที่ส่วนคอ ($P=0.14$) ดังแสดงใน Table 4

ในส่วนประกอบของสารละลายน้ำเชื้อโคแช่แข็ง ไข่แดงมีความสำคัญในการป้องกันเซลล์อสุจิ ไข่แดงมีส่วนประกอบของ phospholipid และ cholesterol ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการป้องกันเซลล์อสุจิจากการเกิดปฏิกิริยา cold shock (Mukul et al., 2015; Bergeron & Manjunath, 2006) อีกทั้งไข่แดงยังมีองค์ประกอบของสารในกลุ่ม LDL ที่สามารถป้องกันเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิจากการเกิดความเสียหายในกระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อได้ (Manjunath et al., 2002) จากการศึกษาผลของการใช้สารละลายเจือจางน้ำเชื้อโคแช่แข็ง egg yolk tris glycerol ที่มีไข่แดงเป็นส่วนประกอบ หลังทำการแช่แข็งที่ 24 ชั่วโมง ต่อการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อหลังทำละลายในครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่าสารละลายน้ำเชื้อที่มีไข่แดงสดมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิ ความเร็วในการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ ดีกว่าสารละลายน้ำเชื้อที่มีไข่แดงผงเป็นส่วนประกอบ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในก่อนหน้านี้ โดย Kumar et al. (2022) ซึ่งทำการศึกษการใช้ไข่แดงผงที่ระดับ 2.5 5.0 และ 7.5 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลายน้ำเชื้อ egg yolk tris glycerol ต่อคุณภาพน้ำเชื้อ โค Hariana แช่แข็ง จากการศึกษาพบว่าระดับของไข่แดงผงที่สูงขึ้นมากกว่า 5.0 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลให้คุณภาพน้ำเชื้อโคหลังทำละลายมีคุณภาพที่แย่ลง แต่จากการศึกษาพบว่าการใช้ไข่แดงผงที่ 5.0 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลช่วยปรับปรุงคุณภาพน้ำเชื้อหลังการแช่แข็งในด้านเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหว การมีชีวิต และความสมบูรณ์ของ acrosome เมื่อเทียบกับสารละลายที่ใช้ไข่แดงสด และไข่แดงผงระดับ 2.5 และ 7.5 เปอร์เซ็นต์ จากการศึกษาในครั้งนี้สารละลายเจือจางน้ำเชื้อมีไข่แดงผง 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์ เป็นส่วนประกอบที่มากเกินไป จึงอาจส่งผล

ในทางลบต่อคุณภาพของน้ำเชื้อโคในกระบวนการลดอุณหภูมิและทำละลายหลังการแช่แข็ง เพราะความสำคัญของไข่แดงในสารละลายน้ำเชื้อแช่แข็งช่วยป้องกันการถูกทำลายของผนังเยื่อหุ้มเซลล์ (coating of the cell membrane) ในระหว่างกระบวนการแช่แข็ง (Rakha et al., 2018) ช่วยฟื้นฟูพลาสมาเมมเบรนที่เสียหาย และเพิ่มความทนทานต่อกระบวนการแช่แข็ง (Aires et al., 2003; Moussa et al., 2002) การใช้ไข่แดงผงในระดับที่เหมาะสมในสารละลายน้ำเชื้อแช่แข็งส่งผลดีต่อกระบวนการปฏิสนธิ การศึกษาในครั้งนี้ใช้ไข่แดงผงที่ระดับ 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากการศึกษาก่อนหน้านี้ของ García et al. (2017) ได้ใช้ไข่แดงผงที่ระดับ 15 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลายสูตร Tris (hydroxymethyl-aminoethane)-citric acid-glucose ซึ่งมี glycerol 5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งส่งผลให้คุณภาพน้ำเชื้อแพะหลังทำละลายมีคุณภาพดี แต่ในการศึกษาในครั้งนี้ใช้สารละลายเจือจางน้ำเชื้อ Tris (hydroxymethyl-aminoethane)-citric acid-fructose (TCF) ซึ่งมี glycerol 8 เปอร์เซ็นต์ จากความแตกต่างทั้ง species ชนิดน้ำตาล และระดับของ glycerol จึงอาจทำให้ผลลัพธ์ที่แตกต่างกัน ซึ่งโดยทั่วไปสารละลายน้ำเชื้อแช่แข็งที่มีส่วนประกอบของไข่แดงสด ที่ 20 เปอร์เซ็นต์ในสูตร สามารถช่วยปรับปรุงคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งหลังทำละลายให้ดีขึ้นในโค (Tarig et al., 2017) และไก่ (Mehdipour et al., 2018) แต่การใช้ไข่แดงผงนั้นไม่สามารถใช้ในระดับที่ 20 เปอร์เซ็นต์ในสูตรสารละลายน้ำเชื้อแช่แข็งได้ จากการศึกษาในครั้งนี้ การใช้ไข่แดงผงมีข้อจำกัดในด้านการละลายของเม็ดไข่แดง ซึ่งถ้าหากใช้เยอะเกินไปอาจมีผลรบกวนการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อด้วยเครื่อง CASA ที่อาจจับเม็ดไข่แดงเป็นหัวตัวสุจิที่ไม่เคลื่อนที่ และมีรูปร่างที่ผิดปกติ และจากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการใช้ไข่แดงผงในระดับ 15 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลให้คุณภาพน้ำเชื้อโคแช่แข็งหลังทำละลายมีคุณภาพแย่ลง อย่างไรก็ตาม อาจต้องมีการศึกษาการใช้ระดับของไข่แดงผงในสัดส่วนที่ลดลง ในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ egg yolk tris glycerol ต่อไป รวมทั้งการทำให้ไข่แดงผงละลายและปลดปล่อยสารสำคัญออกมาช่วยในการปกป้องตัวสุจิจากกระบวนการลดอุณหภูมิ และทำละลายหลังจากการแช่แข็งต่อไป เพราะการศึกษานี้มีข้อจำกัดของ

ผงไข่แดงในสารละลายน้ำเชื้ออาจเป็นอุปสรรคหนึ่งในการวิเคราะห์คุณภาพน้ำเชื้อโดยใช้เครื่อง CASA เนื่องจากเซนเซอร์ของเครื่องอาจตรวจจับอนุภาคผงไข่แดงเป็นส่วนหัวของตัวสุจิที่ไม่เคลื่อนที่ ดังนั้นควรศึกษาวิธีทำให้ผงไข่แดงละลายอย่างสมบูรณ์ โดยการใช้การความร้อนที่เหมาะสม เพื่อช่วยให้ไข่แดงผงเกิดการละลายโดยสมบูรณ์ แต่ต้องไม่ทำให้โปรตีนหรือสารสำคัญอื่น ๆ ของไข่แดงเกิดการเสียสภาพจากความร้อน

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาคุณภาพน้ำเชื้อโคแช่แข็งที่สารละลาย egg yolk tris glycerol ที่มีส่วนประกอบของไข่แดงสด 20 เปอร์เซ็นต์ และน้ำเชื้อโคแช่แข็งที่สารละลายที่มีส่วนประกอบของไข่แดงผง 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าการใช้สารละลายที่มีส่วนประกอบของไข่แดงสดที่ 20 เปอร์เซ็นต์ มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหว การเคลื่อนที่ไปข้างหน้า และในด้านความเร็วในการเคลื่อนที่ของตัวสุจิ ทั้งค่า VAP VSL และ VCL ที่ดีกว่าสารละลาย egg yolk tris glycerol ที่มีส่วนประกอบของไข่แดงผงที่ 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์ จากการประเมินในด้านความผิดปกติที่ส่วนหาง แสดงให้เห็นว่าการใช้สารละลายที่มีส่วนประกอบของไข่แดงผงที่ 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์ มีตัวสุจิที่มีความผิดปกติที่ส่วนหางที่มากกว่าสารละลาย egg yolk tris glycerol ที่มีส่วนประกอบของไข่แดงสด 20 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น การใช้ไข่แดงผงที่ระดับ 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์ในสารละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง egg yolk tris glycerol ไม่ส่งผลต่อการปรับปรุงคุณภาพน้ำเชื้อโคแช่แข็ง

กิตติกรรมประกาศ

ฟาร์มโคเนื้อและกระบือ ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ ตัวสัตว์ทดลอง และบุคลากร ซึ่งเป็นผลให้การศึกษาครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

Table 1 Chemical and egg yolk compositions in cryoprotectants for frozen semen extenders

Compositions	EG	10EP	15EP
Portion 1 (fructose-tris-glycerol extender)			
Tris (hydroxymethyl) aminomethane, g	3.028	3.028	3.028
Citric acid monohydrate, g	1.700	1.700	1.700
Fructose, g	1.250	1.250	1.250
Sterile water, ml (up to)	92	92	92
Glycerol, ml	8	8	8
Portion 2 (egg yolk)			
Fresh egg yolk, ml	20	-	-
Diluted egg yolk powder, ml	-	10	15
Dilution ratio			
Fructose-tris-glycerol extender, ml	80	90	85
Egg yolk, ml	20	10	15

Table 2 Effect of egg yolk powder on the motility and progressive movement of post thawed cryopreserved bull semen

Parameters	Bull semen extender ¹			SEM ²	P-value
	EG	10EP	15EP		
Motility (%)	32.15	26.86	26.60	1.36	0.16
Progressive ** (%)	9.47 ^A	4.48 ^B	4.36 ^B	0.62	<0.01

¹/Bull semen extender based egg yolk-tris-glycerol with fresh egg yolk 20 % (EG); egg yolk powder 10 % (10EP) and egg yolk powder 15 % (15EP), ²/standard error of mean, ** ^{A, B} superscripts indicate bull semen extender differences (P<0.01).

Table 3 Effect of egg yolk powder on velocity and kinetic movement of post thawed cryopreserved bull semen

		Bull semen extender ¹				
	Parameters ³	EG	10EP	15EP	SEM ²	P-value
Velocity						
	VAP** (µm/s)	79.78 ^A	56.94 ^B	63.04 ^B	2.82	<0.01
	VSL** (µm/s)	56.25 ^A	37.92 ^B	42.89 ^B	1.92	<0.01
	VCL** (µm/s)	165.13 ^A	113.31 ^B	123.26 ^B	6.37	<0.01
Kinetic movement						
	LIN (%)	37.41	38.73	37.51	1.19	0.89
	STR (%)	71.17	69.07	68.56	1.03	0.56

¹/Bull semen extender based egg yolk-tris-glycerol with fresh egg yolk 20 % (EG); egg yolk powder 10 % (10EP) and egg yolk powder 15 % (15EP), ²/standard error of mean, ³/VAP: average path velocity; VSL: straight liner velocity; VCL: curvilinear velocity; LIN: linearly motile spermatozoa; STR: straightness, ** ^{A, B} superscripts indicate bull semen extender differences (P<0.01).

Table 4 Effect of egg yolk powder on sperm abnormality of post thawed cryopreserved bull semen

Parameters	Bull semen extender ¹			SEM ²	P-value
	EG	10EP	15EP		
Normal** (%)	63.34 ^A	50.70 ^B	47.99 ^B	2.17	<0.01
Bent tail** (%)	18.12 ^B	36.53 ^A	35.03 ^A	2.06	<0.01
Coiled tail** (%)	2.65 ^B	5.88 ^A	6.44 ^A	0.45	<0.01
DMR ³ (%)	2.08	2.41	2.78	0.13	0.08
Distal droplet** (%)	8.32 ^B	11.64 ^A	9.74 ^B	0.44	<0.01
Proximal droplet (%)	12.16	10.48	8.77	0.71	0.14

¹/Bull semen extender based egg yolk-tris-glycerol with fresh egg yolk 20 % (EG); egg yolk powder 10 % (10EP) and egg yolk powder 15 % (15EP), ²/standard error of mean, ³/distal midpiece reflex, ** ^{A, B} superscripts indicate bull semen extender differences (P<0.01).

References

- Aires, V. A., Hinsch, K. D., Mueller-Schloesser, F., Bogner, K., Mueller-Schloesser, S., & Hinsch, E. (2003). In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. *Theriogenology*, 60(2), 269-279. doi: 10.1016/s0093-691x(02)01369-9
- Amirat, L., Anton, M., Tainturier, D., Chatagnon, G., Battut, I., & Courtens, J. L. (2005). Modifications of bull spermatozoa induced by three extenders: Biociphos, low density lipoprotein and Triladyl, before, during and after freezing and thawing. *Reproduction*, 129(4), 535-543. doi: 10.1530/rep.1.00011
- Ansari, M. S., Rakha, B. A., Andrabi, S. M. H., & Akhter, S. (2010). Usefulness of powdered and fresh egg yolk for cryopreservation of Zebu bull spermatozoa. *Reproductive Biology*, 10(3), 235-240. doi: 10.1016/S1642-431X(12)60043-6
- Bergeron, A., & Manjunath, P. (2006). New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Molecular Reproduction and Development*, 73(10), 1338-1344. doi: 10.1002/mrd.20565
- Bousseau, S., Brillard, J. P., Guienne, B. M. L., Guerin, B., Camus, A., & Lechat, M. (1998). Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the *in vitro* and *in vivo* fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. *Theriogenology*, 50(5), 699-706. doi: 10.1016/S0093-691X(98)00175-7
- Forouzanfar, M., Sharafi, M., Hosseini, S. M., Ostadhosseini, S., Hajian, M., Hosseini, L., Abedi, P., Nili, N., Rahmani, H. R., & Nasr-Esfahani, M. H. (2010). *In vitro* comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for

- cryopreservation of ram semen. *Theriogenology*, 73(4), 480-487. doi: 10.1016/j.theriogenology.2009.10.005
- García, W., Tabarez, A., & Palomo, M. J. (2017). Effect of the type of egg yolk, removal of seminal plasma and donor age on ram sperm cryopreservation. *Animal Reproduction*, 14(4), 1124-1132. doi: 10.21451/1984-3143-AR916
- Kumar, A., Kumar, A., Sachan, V., Agrawal, J. K., & Saxena, A. (2022). Effect of egg yolk powder on seminal attributes during cryopreservation of Haryana bull semen. *Veterinary Clinical Science*, 7(4), 50-52.
- Manjunath, P., Nauc, V., Bergeron, A., & Menard, M. (2002). Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. *Biology of Reproduction*, 67(4), 1250-1258. doi: 10.1095/biolreprod67.4.1250
- Mehdipour, M., Kia, H. D., Moghaddam, G., & Hamishehkar, H. (2018). Effect of egg yolk plasma and soybean lecithin on rooster frozen-thawed sperm quality and fertility. *Theriogenology*, 116, 89-94. doi: 10.1016/j.theriogenology.2018.05.013
- Moussa, M., Martinet, V., Trimeche, A., Tainturier, D., & Anton, M. (2002). Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*, 57(6), 1695-1706. doi: 10.1016/S0093-691X(02)00682-9
- Mukul, A., Sarvajeet, Y., Shalini, V., & Shukla, P. K. (2015). Low density lipoprotein (LDL) as cryoprotectant in semen extender: A new approach. *The Asian Journal of Animal Science*, 10, 206-214.
- Papa, F. O., Felício, G. B., Melo-Oña, C. M., Alvarenga, M. A., De Vita, B., Trínque, C., Puoli-Filho, J. N., & Dell'Aqua Jr, J. A. (2011). Replacing egg yolk with soybean lecithin in the cryopreservation of stallion semen. *Animal Reproductive Science*, 129(1-2), 73-77. doi: 10.1016/j.anireprosci.2011.10.006
- Rakha, B. A., Ansari, M. S., Akhter, S., Santiago-Moreno, J., & Blesbois, E. (2018). Cryoprotectant effects of egg yolk on Indian red jungle fowl (*Gallus gallus murghi*) sperm. *Theriogenology*, 119, 150-155. doi: 10.1016/j.theriogenology.2018.06.015
- Singh, M., Barik, N. C., Ghosh, S. K., Prasad, J. K., Rajoria, J. S., Soni, Y. K., Kumar, A., Chaudhary, J. K., & Srivastava, N. (2015). Egg yolk powders an alternative to fresh-egg yolk for buffalo semen cryopreservation. *The Indian Journal of Animal Sciences*, 85(1), 40-42. doi: 10.56093/ijans.v85i1.46163
- Tarig, A. A., Wahid, H., Rosnina, Y., Yimer, N., Goh, Y. M., Baiee, F. H., Khumran, A. M., Salman, H., & Ebrahimi, M. (2017). Effect of different concentrations of egg yolk and virgin coconut oil in Tris-based extenders on chilled and frozen-thawed bull semen. *Animal Reproduction Science*, 182(3), 21-27. doi: 10.1016/j.anireprosci.2017.03.024
- Wei, L. J., Alkarkhi, A. F. M., & Huda, N. (2019). Physicochemical properties of egg yolk powder from eggs of different types of bird. *International Journal on Advanced Science, Engineering and Information Technology*, 9 (1), 373-378. doi:10.18517/ijaseit.9.1.3046

Research article

Effect of egg yolk powder on the quality and motility characteristics of post thawed cryopreserved bull semen

Wisut Maitreejet¹ Prasertsak Pukdeewong² Thawee Laodim¹ Taweeporn Raungprim¹
Arthit Panyasak¹ Sukanya Rattanatabtimtong¹ and Sutisa Majarune^{1*}

¹ Department of Animal Science, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen campus, Kamphaeng Saen district, Nakhon Pathom Province, 73140

² Department of Agricultural Engineering of Kasetsart University at Kamphaeng Saen Campus, Kamphaeng Saen district, Nakhon Pathom Province, 73140

ARTICLE INFO**Article history**

Received: 30 April 2024

Revised: 10 June 2024

Accepted: 11 June 2024

Online published: 27 June 2024

Keyword

egg yolk tris extender

semen extender

bull frozen semen

egg yolk powder

ABSTRACT

This study was carried out to evaluate the quality and motility characteristics of post-thawed cryopreserved bull semen in an extender containing egg-yolk tris glycerol with either fresh egg yolk or egg yolk powder (EP). Bull semen from four bulls was collected four times, once a week, and divided into three portions for three extenders. Group 1: semen was cryopreserved in egg-yolk tris glycerol (ETG) with 20 % fresh egg yolk (FEY); Group 2: semen was cryopreserved in ETG extender containing 10 % egg yolk powder (10EP); Group 3: semen was cryopreserved in ETG extender containing 15 % egg yolk powder (15EP). The diluted semen was filled and sealed into 0.25 ml French straws. Thereafter, the frozen semen straws were placed in liquid nitrogen. Thawed semen samples, after being kept for 24 hours, were analyzed for motility, progressiveness, sperm kinetics, and abnormal sperm using CASA. The results showed that the percentage of progressive motility from ETG was higher than that from 10EP and 15EP (9.47 %, 4.48 %, and 4.36 %, respectively; $P < 0.01$). Average path velocity (VAP), straight line velocity (VSL), and curvilinear velocity (VCL) from ETG were higher than those from 10EP and 15EP ($P < 0.01$). There was no significant difference in motility and abnormal sperm of bull semen cryopreserved in ETG, 10EP, and 15EP ($P > 0.05$). These results indicate that 10 % and 15 % egg yolk powder in egg-yolk tris extender do not improve semen quality, specifically the percentage of progressive motility and velocity, of frozen-thawed bull semen.

*Corresponding author

E-mail address: sutisa.ma@ku.th (S. Majarune)

Online print: 27 June 2024 Copyright © 2024. This is an open access article, production, and hosting by Faculty of Agricultural Technology, Rajabhat Maha Sarakham University. <https://doi.org/10.14456/paj.2024.28>