บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1. การหาการย่อยได้ของอาหารในโคและแกะ (*in vivo* digestibility)

3.1.1 สัตว์ทดลอง ใช้แม่โคลูกผสมพื้นเมือง x พันธุ์ Holstein Friesian ท้องว่างและไม่ให้นม จำนวน 4 ตัว น้ำหนักเฉลี่ย 477.3 ± 15.6 กิโลกรัม และแกะลูกผสมพื้นเมือง x German Merino เพศผู้ 6 ตัว น้ำหนักเฉลี่ย 34.2 ± 3.14 กิโลกรัม แม่โคและแกะทดลองได้รับการอาบน้ำทำความสะอาดตัว ในกรณีของแกะทำการตัดขนด้วย ถ่ายพยาธิ (Valbazen®) และฉีดวิตามิน AD_3E เข้ากล้ามให้สัตว์ทุกตัวก่อนทำการทดลอง การชั่งน้ำหนักทั้งโคและแกะดำเนินการในตอนเช้าก่อนให้อาหาร หลังจากงดน้ำและอาหารก่อนชั่งน้ำหนักอย่างน้อย 6 ชั่วโมง ในระยะเริ่มต้นและสิ้นสุดการทดลองจะชั่งติดต่อกัน 3 วัน เมื่อมีการเปลี่ยนสูตรอาหารจะชั่งน้ำหนักสัตว์ทดลองทุกครั้ง

3.1.2 คอกทดลอง (metabolism cage) คอกแกะเป็นคอกขังเดี่ยวยกพื้น มีขนาด 80x40x75 เซนติเมตร พื้นคอกเป็นตะแกรงเหล็กขนาด 2.5x2.5 เซนติเมตร แต่ละคอกมีรางอาหาร ที่ให้น้ำอัตโนมัติ ที่รองรับมูลและปัสสาวะแยกกันอยู่ใต้คอก ส่วนของโคเป็นคอกแบบยืนโรงขังเดี่ยว พื้นคอนกรีตขนาด 170x120 เซนติเมตร ทุกซองมีรางอาหารและถ้วยให้น้ำอัตโนมัติอยู่ด้านหน้า ขณะที่ด้านหลังมีถาดรองรับมูลและถุงเก็บปัสสาวะที่อยู่ต่ำกว่าพื้นคอก (ภาพที่ 4 และ 5)

3.1.3 อาหารทดลอง

3.1.3.1 ต้นอ้อยที่ใช้ในการศึกษาเป็นอ้อยพันธุ์อู่ทอง 2 ตัดที่อายุประมาณ 10-12 เดือน เก็บเกี่ยวโดยใช้เฉพาะลำต้นในลักษณะเดียวกับที่เกษตรกรเก็บส่งโรงงานน้ำตาล อ้อยทดลองเป็นอ้อยปลูกที่สถานีวิจัยแม่เหียะ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ในปี พ.ศ. 2540-41 นำต้นอ้อยมาหั่นด้วยเครื่องขนาดเล็ก ให้มีขนาดชิ้น 2.5-5.0 เซนติเมตร แล้วนำไปตากแดดบนผ้าใบจนแห้งสนิทใช้เวลา 3–5 วัน บรรจุใส่กระสอบป่านแล้วเก็บในโรงเก็บอาหาร เตรียมไว้ใช้ทดลองต่อไป

3.1.3.2 การให้อาหาร เนื่องจากต้นอ้อยแห้งมีโปรตีนเพียง 1.37% การหาค่าการย่อยได้จึงใช้วิธีรีเกรชชั่น (regression method) โดยให้ต้นอ้อยแห้งผสมกับอาหารข้นที่ระดับต่างๆ ดังนี้

สูตรที่ 1 ประกอบด้วยต้นอ้อยแห้ง 74 ส่วน กับอาหารข้น 26 ส่วน มี CP ประมาณ 10 %
สูตรที่ 2 ประกอบด้วยต้นอ้อยแห้ง 62 ส่วน กับอาหารข้น 38 ส่วน มี CP ประมาณ 13 %
สูตรที่ 3 ประกอบด้วยต้นอ้อยแห้ง 50 ส่วน กับอาหารข้น 50 ส่วน มี CP ประมาณ 16 %

อาหารข้นที่ใช้ ประกอบด้วยกากถั่วเหลืองและข้าวโพดบดในสัดส่วน 60:40 มี CP ประมาณ 29 % การใช้อาหารข้นร่วมกับต้นอ้อยแห้งให้สัตว์ได้รับ CP รวมในอาหารประมาณ 10-16 % ทั้งนี้เพื่อให้จุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมนได้รับโภชนะเพียงพอกับการเจริญเติบโตและการย่อยอาหาร

ให้สัตว์ได้รับต้นอ้อยแห้งไปพร้อมกับอาหารข้นโดยโรยอาหารข้นลงบนต้นอ้อยแห้งให้อาหารวันละ 2 ครั้ง เวลา 8.00 น. และ 16.00 น. มีน้ำให้ดื่มตลอดเวลาตามใจชอบ เสริมแร่ธาตุให้สัตว์ทดลองโดยโคได้รับ 100 กรัมต่อวัน และแกะได้รับ 10 กรัมต่อวัน แร่ธาตุ 1 กิโลกรัม ประกอบด้วย $Ca_3(PO_4)_2$ 750 กรัม, NaCl 160 กรัม, MgO 45 กรัม, S 35 กรัม, ZnO 5.5 กรัม, $CuSO_4$ 3.7 กรัม, MnO 0.7 กรัม, $CoCl_2.H_2O$ 0.04 กรัม, KI 0.02 กรัม และ Na_2SeO_3 0.04 กรัม

3.1.4 อุปกรณ์อื่นๆ

3.1.4.1 เครื่องชั่ง ในการทดลองนี้มี 4 ชนิดดังนี้

- เครื่องชั่งอาหาร เป็นเครื่องชั่งแบบจาน ชั่งได้สูงสุด 7 กิโลกรัม ชั่งละเอียด 20 กรัม
- เครื่องชั่งมูล เป็นเครื่องชั่งแบบจาน ชั่งได้สูงสุด 15 กิโลกรัม ชั่งละเอียด 100 กรัม
- เครื่องชั่งน้ำหนักตัวสัตว์ (สำหรับโค) ชั่งสูงสุด 1000 กิโลกรัม ชั่งละเอียด 200 กรัม
- เครื่องชั่งน้ำหนักตัวสัตว์ (สำหรับแกะ) ชั่งสูงสุด 200 กิโลกรัม ชั่งละเอียด 100 กรัม

3.1.4.2 เครื่องหั่นพืช เป็นเครื่องหั่นไฟฟ้าใช้มอเตอร์ขนาด 2 แรงม้า

3.1.5 แผนการทดลอง

3.1.5.1 การศึกษาการย่อยได้ในโค โคทดลองทั้ง 4 ตัว ให้ได้รับต้นอ้อยแห้ง 3 ระดับ คือมีต้นอ้อยแห้งในสูตรอาหารร้อยละ 74, 62 และ 50 ดังกล่าวมาแล้ว การทดลองเป็น 3 ระยะ (period) แต่ละระยะสัตว์ทดลองจะได้รับอาหารดังนี้

	ตัวที่ 1	ตัวที่ 2	ตัวที่ 3	ตัวที่ 4
ระยะที่ 1	74%	62%	50%	74%
ระยะที่ 2	50%	74%	62%	50%
ระยะที่ 3	62%	50%	74%	62%

3.1.5.2 การศึกษาการย่อยได้ในแกะใช้แกะทดลอง 6 ตัว ให้ได้รับอ้อยแห้ง 3 ระดับทำนองเดียวกับการทดลองในโคในระยะการทดลอง 3 ระยะ (period) วางแผนการทดลองแบบ 3x3 Latin square design โดยทดลอง 2 ชุด พร้อมกันดังนี้

	ตัวที่ 1	ตัวที่ 2	ตัวที่ 3	ตัวที่ 4	ตัวที่ 5	ตัวที่ 6
ระยะที่ 1	74%	74%	62%	62%	50%	50%
ระยะที่ 2	50%	50%	74%	74%	62%	62%
ระยะที่ 3	62%	62%	50%	50%	74%	74%

3.1.6 ระยะเวลาในการทดลอง

ระยะเวลาในการทดลองแบ่งออกเป็น 2 ระยะดังนี้

3.1.6.1 ระยะเตรียมการ (preliminary period) ใช้เวลา 21 วัน โดย 14 วันแรกให้สัตว์ทดลองได้ปรับตัวเข้ากับสูตรอาหารนาน 7 วัน และเพิ่มอาหารให้สัตว์กินอาหารตามความสมัครใจ (voluntary feed intake) เกณฑ์ในการกำหนดว่าสัตว์ทดลองกินอาหารได้เต็มที่ คือ ให้อาหารสัตว์อย่างเพียงพอตลอดวัน และมีอาหารเหลือในรางประมาณ 10% ของอาหารที่ให้ทั้งหมด อาหารที่เหลือต้องเป็นอาหารที่สัตว์สามารถกินได้ไม่ใช่ส่วนที่กินไม่ได้หรือสัตว์ไม่ชอบกิน เช่น เปลือกแข็ง หรือข้ออ้อย ส่วนในระยะ 7 วันสุดท้าย ให้สัตว์ได้กินอาหารเพียง 90% ของปริมาณที่สัตว์กินได้เต็มที่ เพื่อให้สัตว์กินอาหารได้หมดและป้องกันการเลือกกินอาหารของสัตว์สำหรับการทดลองการย่อยได้ต่อไป

3.1.6.2 ระยะทดลอง (collection period) เป็นระยะที่บันทึกข้อมูลและเก็บตัวอย่างเพื่อใช้ศึกษาการย่อยได้ ได้แก่ การบันทึกปริมาณอาหารที่ให้ อาหารเหลือ มูล และปัสสาวะ เก็บตัวอย่างอาหารที่ให้ อาหารเหลือ มูล และปัสสาวะ ในระยะทดลองนี้นาน 5 วัน

3.1.7 การบันทึกข้อมูล

- บันทึกน้ำหนักตัวสัตว์เมื่อเริ่มการทดลอง เมื่อเปลี่ยนอาหารทดลองแต่ละระยะและเมื่อสิ้นสุดการทดลอง
- บันทึกปริมาณอาหารที่ให้ และเหลือในแต่ละวันๆ ละ 2 ครั้ง เวลา 8.00 น. และ 16.00 น.
- บันทึกปริมาณมูลและปัสสาวะที่ขับออกมาทั้งหมดในแต่ละวันๆ ละ 2 ครั้ง

3.1.8 การเก็บตัวอย่างอาหาร มูล และปัสสาวะ

สุ่มเก็บตัวอย่างอาหารที่ให้ในวันที่ 1, 3 และ 5 ของระยะทดลอง ก่อนการให้อาหารสัตว์ทดลอง นำตัวอย่างอาหารมาผสมให้เข้ากันแล้วนำไปวิเคราะห์ ส่วนอาหารที่สัตว์กินเหลือในแต่ละมื้อเก็บรวบรวมทั้งหมด ตลอดระยะทดลอง แล้วนำไปวิเคราะห์ต่อไป

แยกเก็บมูลและปัสสาวะวันละ 2 ครั้ง ก่อนให้อาหารเช้าและเย็น ในการเก็บตัวอย่างมูลแต่ละครั้งคลุกเคล้าให้เข้ากันดีก่อนสุ่มเก็บตัวอย่าง ในโคจะเก็บปริมาณ 1% ของมูลสดทั้งหมด ในกรณีของแกะเก็บ 10%ของมูลสดทั้งหมด จากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°ซ เมื่อสิ้นสุดการทดลองนำมูลทั้งหมดที่เก็บมาคลุกรวมให้เข้ากันเพื่อนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ส่วนการเก็บปัสสาวะหลังจากบันทึกปริมาตรแล้ว ในโคเก็บตัวอย่าง 1% และแกะ 5% ของปัสสาวะทั้งหมด นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°ซ จนสิ้นสุดการทดลอง นำปัสสาวะทั้งหมดที่เก็บไว้มาผสมให้เข้ากันเพื่อนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

เนื่องจากโคนมที่ใช้ในการทดลองเป็นเพศเมีย ซึ่งมีช่องขับถ่ายมูลและปัสสาวะอยู่ใกล้กัน การเก็บมูลแยกจากปัสสาวะจึงต้องทำโดยใช้กรวยครอบที่ขับถ่ายปัสสาวะ โดยมีสายยึดโยงติดกับลำตัว ปลายกรวยติดกับสายพลาสติกซึ่งนำไปยังถุงเก็บปัสสาวะ ดังแสดงในภาพที่ 4 ภายในถุงใส่กรดซัลฟุริกความเข้มข้น 18 N จำนวน 100 มิลลิลิตร โดยแบ่งใส่ในช่วงเช้าและช่วงเย็นครั้งละ 50 มิลลิลิตร เพื่อป้องกันการเปลี่ยนแปลงอันเนื่องจากการทำปฏิกิริยาของจุลินทรีย์ และป้องกันมิให้แอมโมเนียระเหยไป ส่วนในแกะมีถาดรวมปัสสาวะลงในขวดที่รองรับอยู่ใต้กรง เติมกรดซัลฟุริกจำนวน 10 มิลลิลิตร ลงในขวดโดยแบ่งใส่ 2 ครั้ง เช่นเดียวกับในโค

3.1.9 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของอาหารและสิ่งขับถ่าย

ตัวอย่างอาหารและมูลสัตว์ เก็บรวบรวมไว้ที่อุณหภูมิ -20°ซ นำตัวอย่างที่รวบรวมไว้ในระยะทดลองทั้งหมดมาผสมแยกแต่ละชนิดให้เข้ากัน อบที่ 60°ซ จนแห้งในสภาพ air dry

หลังจากนั้นนำมาบดผ่านตะแกรงขนาด 1 มิลลิเมตร แล้วจึงนำมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีโดยวิธีการต่าง ๆ คือ

3.1.9.1 วิเคราะห์ปริมาณวัตถุแห้ง โปรตีนรวม ไขมัน อินทรีย์วัตถุ และเถ้า โดยวิธี Proximate analysis (AOAC,1984)

3.1.9.2 วิเคราะห์องค์ประกอบโครงสร้างของพืชโดยวิธี Detergent method (Goering and Van Soest , 1970 ; บุญล้อม และ สมคิด , 2539)

3.1.9.3 การวิเคราะห์พลังงานในอาหารและมูล โดยใช้ Adiabatic Bomb Calorimiter

3.1.9.4 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในต้นอ้อยแห้ง นำตัวอย่างต้นอ้อยแห้ง 5 กรัม ต้มในน้ำ 100 มล. กรองผ่านกระดาษ whatman เบอร์ 40 นำสารละลายที่ได้มาวัดปริมาณน้ำตาลโดยใช้เครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (Digital Refractometer Atago PR-101) อ่านค่าเป็น %Brix แล้วคำนวณเป็นปริมาณน้ำตาลซูโครส (ดัดแปลงจาก บุญล้อม และ บุญเสริม, 2525)

3.1.10 วิธีคำนวณค่าการย่อยได้ของโภชนะและพลังงาน

- การย่อยได้ของโภชนะแต่ละชนิดคำนวณจากสมการดังนี้

$$\text{การย่อยได้ของโภชนะ (\%)} = \frac{\text{โภชนะที่กิน (กรัม)} - \text{โภชนะในมูล (กรัม)}}{\text{โภชนะที่กิน (กรัม)}} \times 100$$

- การประเมินค่าการย่อยได้ของโภชนะและพลังงานย่อยได้ของต้นอ้อยแห้งโดยวิธีรีเกรซชั่นด้วยสมการ

$$Y = a + b X$$

Y = การย่อยได้ของโภชนะในอาหาร (%)

X = ปริมาณโภชนะนั้นที่ได้จากต้นอ้อยแห้งในอาหารแต่ละสูตร (%)

a = intercept

b = regression coefficient

- การคำนวณค่าโภชนะย่อยได้ทั้งหมด (total digestible nutrient , TDN) โดยใช้สูตร

$$TDN (\%) = DCP + DNDF + DNFC + (DEE \times 2.25)$$

เมื่อ DCP , DNDF , DNFC และ DEE คือ ปริมาณโภชนะที่ย่อยได้ของ CP, NDF, NFC และ EE ตามลำดับ (กรัม/100 กรัมอาหาร)

ค่า TDN ซึ่งหาได้จากการหาค่าการย่อยได้ในตัวสัตว์ สามารถนำไปคำนวณหาค่าพลังงาน DE (digestible energy) , ME (metabolizable energy) และ NEL (net energy for lactation) โดยใช้สูตรของ NRC (1988) และสูตรดัดแปลงจาก NRC (1988) ดังนี้คือ

DE (Mcal/kgDM) = 0.04409 x TDN (%)

ME* (Mcal/kgDM) = -0.45 + (0.04453 x TDN (%))

NEL (Mcal/kgDM) = (0.0245 x TDN (%)) – 0.12

ส่วนค่า DE ซึ่งได้โดยตรงจากการทดลองกับสัตว์ คือ DE = GE – FE ค่า DE ที่ได้นี้สามารถนำไปคำนวณหาค่า ME และ NEL ได้โดยใช้สูตร

ME (Mcal/kgDM) = -0.45 + (1.01 x DE)

NEL* (Mcal/kgDM) = (0.5557 x DE) – 0.12

หมายเหตุ : * คือ สูตรที่ดัดแปลงจาก NRC (1988)

3.2. การศึกษาคุณสมบัติการย่อยสลายในรูเมนโดยใช้ถุงไนล่อน (*in sacco* degradation characteristics)

3.2.1 วัสดุและอุปกรณ์

- ถุงไนล่อน มีขนาด 70 x 150 มิลลิเมตร มีรู (pore size) ขนาด 20-40 μm ก่อนใช้ในการทดลองนำถุงไนล่อนดังกล่าวมาอบที่อุณหภูมิ 60°ซ จนน้ำหนักคงที่
- ท่อพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 10 มิลลิเมตร ยาว 30 เซนติเมตร เจาะท่อให้เป็นช่องให้มีระยะห่างกันพอประมาณสำหรับร้อยถุงไนล่อน
- เชือกไนล่อน และยางรัด
- เครื่องชั่ง
- ตู้อบ และ โถดูดความชื้น
- เครื่องซักผ้า
- เครื่องบดอาหารที่มีตะแกรงขนาด 2 มิลลิเมตร

3.2.2 สัตว์ทดลอง

โคนมลูกผสมพื้นเมือง x พันธุ์ Holstein Friesian เพศเมีย อายุ 3-4 ปี จำนวน 4 ตัว แม่โคทดลองที่เจาะกระเพาะรูเมนไว้ (fistulated cows) โดยใช้ cannula ที่ทำด้วยซิลิโคน (silicone)

คอกเลี้ยงโคเป็นแบบผูกยืนโรงในซองขังเดี่ยว มีน้ำให้กินตลอดเวลา อาหารที่ใช้เลี้ยงประกอบด้วย ต้นอ้อยแห้งและอาหารข้นในสัดส่วน 65:35 อาหารทั้งสูตรมีโปรตีน 11 % แบ่งอาหารให้เวลา 8.00 น. และเวลา 16.00 น. สัตว์ทดลองได้รับอาหารเพื่อปรับตัวก่อนทดลอง 1 สัปดาห์ ให้อาหารข้นกับอาหารหยาบพร้อมกันคิดเป็นวัตถุแห้งประมาณ 6 กิโลกรัมต่อวัน และให้แร่ธาตุเสริมเช่นเดียวกับการทดลองแบบ *in vivo*

3.2.3 ตัวอย่างอาหารทดลอง

อาหารที่ใช้ทดลองคือ ต้นอ้อยแห้งชุดเดียวกับที่ใช้เลี้ยงโคนมในการทดลองแบบ *in vivo* นำมาบดผ่านตะแกรงขนาด 2 มิลลิเมตร

3.2.4 วิธีการ

3.2.4.1 ชั่งน้ำหนักถุงไนล่อน (W_1)

3.2.4.2 ชั่งตัวอย่างอาหารประมาณ 3 กรัม (W_2) ใส่ลงในถุงไนล่อน ร้อยถุงไนล่อนติดกับท่อพลาสติก

3.2.4.3 นำถุงไนล่อนที่ใส่อาหารแล้วไปแช่ในกระเพาะรูเมน ที่ช่วงเวลาต่างๆ คือ 4, 8, 12, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง

3.2.4.4 เตรียมถุงไนล่อนอีกชุด (2 ซ้ำ) แช่น้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 39°ซ นาน 1 ชั่วโมง แล้วนำมาล้างและอบพร้อมถุงอื่น ๆ เพื่อหาค่า washing loss

3.2.4.5 หลังจากครบกำหนดเวลาแล้ว นำถุงออกจากกระเพาะรูเมนพร้อมกันแล้วล้างในน้ำสะอาด 15 นาที ด้วยเครื่องซักผ้า

3.2.4.6 ถุงไนล่อนที่ล้างในน้ำสะอาดแล้วนำมาอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60°ซ นาน 48 ชั่วโมง

3.2.4.7 ชั่งน้ำหนักถุงและตัวอย่างอาหารที่เหลือ (W_3) คำนวณร้อยละวัตถุแห้งที่หายไป (% dry matter disappearance)

$$\% \text{ DM disappearance} = \frac{W_1 + W_2 - W_3}{W_2} \times 100$$

เมื่อ W_1 = น้ำหนักถุง

W_2 = น้ำหนักตัวอย่างอาหารเริ่มต้น

W_3 = น้ำหนักถุง + น้ำหนักตัวอย่างอาหารเหลือ

นำค่า % DM disappearance ที่ชั่วโมงต่างๆ ไปเข้าโปรแกรมสำเร็จรูป NEWAY เพื่อคำนวณหาค่าการย่อยสลายโดยใช้สมการ $P = A + B (1-e^{-ct})$

เมื่อ P = โภชนะที่หายไปที่เวลา t (degradation at time t)

A = ส่วนที่ละลายได้ (immediately soluble material)

B = ส่วนที่ไม่ละลายแต่สามารถหมักย่อยได้ (insoluble fermentable material)

c = อัตราการย่อยสลาย (degradation rate)

3.3. การศึกษาหาการย่อยได้แบบ *in vitro* โดยวิธีวัดปริมาณแก๊ส (gas production)

3.3.1 การเตรียมตัวอย่างอาหาร

อาหารที่ใช้ทดลองคือ ต้นอ้อยแห้งชุดเดียวกับที่ใช้เลี้ยงโคนมในการทดลองแบบ *in vivo* นำมาบดผ่านตะแกรงขนาด 1 มิลลิเมตร

3.3.2 การเก็บของเหลวจากกระเพาะรูเมน

ของเหลวในรูเมน (rumen fluid) ที่นำมาใช้ศึกษาการวัดปริมาณแก๊ส เก็บมาจากแม่โคเจาะกระเพาะรูเมน 4 ตัว ที่ได้รับอาหารประกอบด้วยต้นอ้อยแห้งและอาหารข้นในสัดส่วน 65 : 35 การเก็บของเหลวจากกระเพาะรูเมนกระทำตอนเช้าก่อนให้อาหารโค ขวดที่ใช้เก็บมีขนาด 1 ลิตร ลวกขวดด้วยน้ำอุ่นและเป่าด้วยแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ เพื่อให้มีสภาพไร้ออกซิเจน ดูดของเหลวจากรูเมนกรองผ่านผ้าขาวบางเก็บลงในขวดจนเต็มไม่ให้มีช่องอากาศเหลืออยู่ในขวด ปิดฝา เก็บขวดลงในกระติกที่รักษาอุณหภูมิที่ 39°ซ เพื่อนำไปยังห้องปฏิบัติการต่อไป

3.3.3 การวัดปริมาณและอัตราการเกิดแก๊ส

ใช้วิธีการของ Menke *et al.* (1979) และวิธีที่ดัดแปลงโดย Bluemmel and Orskov (1993) ชั่งตัวอย่างอาหารที่บดผ่านตะแกรงขนาด 1 มิลลิเมตร ใส่ในหลอดทดลองขนาดใหญ่ที่มีขีดวัดปริมาตรข้างหลอด (glass syringes) โดยใส่ตัวอย่างหลอดละ 200 มิลลิกรัม ทำ 3 ซ้ำ ใช้วาสลีนทาแกนหลอด (piston) ให้ทั่วแล้วสอดเข้าในหลอดแก้ว

อบหลอดทดลองที่ใส่ตัวอย่างไว้ในตู้อบที่อุณหภูมิ 39°ซ นาน 30 นาที ก่อนใส่สารละลายรูเมน-บัฟเฟอร์ 30 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย น้ำในกระเพาะรูเมน 10 มิลลิลิตร และสารละลายไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์-แร่ธาตุ 20 มิลลิลิตร เตรียม blank (หลอดที่ใส่เฉพาะสารละลายรูเมน-บัฟเฟอร์) 3 หลอด เมื่อเริ่มต้นและท้ายของตัวอย่างที่ต้องการศึกษา ตัวอย่างพืชมาตรฐานใช้หญ้าแห้งจากมหาวิทยาลัย Hohenheim ซึ่งทราบค่าการผลิตแก๊สแล้วจำนวน 3 หลอด เป็นตัวเปรียบเทียบ สำหรับตรวจสอบความถูกต้อง ค่าตัวอย่างมาตรฐานนี้ไม่ควรมีค่าเบี่ยงเบนเกิน 10 % ของค่าที่กำหนด นำหลอดทดลองที่เตรียมไว้เติมของเหลวจากกระเพาะรูเมนแล้วอ่านค่าปริมาณเริ่มต้นไปแช่ในอ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 39°ซ โดยสอดไว้ในแป้นหมุนเพื่อช่วยเขย่าตัวอย่างและของเหลวในหลอดให้เข้ากัน อ่านค่าปริมาณแก๊สที่เกิดขึ้นที่เวลา 4 , 8 , 12 , 24 , 48 , 72 และ 96 ชั่วโมง นำค่าแก๊สที่ได้ไปแทนในสมการ exponential $P = a + b (1 - e^{-ct})$ ตามที่ Bluemmel and Orskov (1993) ได้เสนอไว้อธิบายจลน์ศาสตร์ของการหมัก (kinetic of fermentation)

เมื่อ P = ค่าการผลิตแก๊สที่เวลา t (gas production at time t)
a = ค่า intercept ที่หมายถึงแก๊สที่ผลิตขึ้นทันที
b = ปริมาณแก๊สที่เกิดจากการบ่มหมัก
c = อัตราการเกิดแก๊ส (gas production rate)

3.3.4 การศึกษาหาค่าวัตถุแห้งที่ย่อยสลายได้อย่างแท้จริง (truly degraded dry matter :TDDM) และอินทรีย์วัตถุที่ย่อยสลายได้อย่างแท้จริง (truly degraded organic matter :TDOM) ในห้องปฏิบัติการ

ทำเช่นเดียวกับวิธี 3.3.3 แต่ใช้ตัวอย่างอาหาร 500 มิลลิกรัม และสารละลายรูเมน-บัฟเฟอร์ จำนวน 40 มิลลิลิตร อ่านค่าแก๊สที่ 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำส่วนที่เหลือในหลอดเทใส่บีกเกอร์ขนาด 600 มิลลิลิตร ล้างหลอดด้วย Neutral detergent solution (NDS) 3 ครั้ง ปริมาตร 70 มิลลิลิตร ทำการ reflux นาน 1 ชั่วโมง เพื่อล้างเอาส่วนของจุลินทรีย์ออก (Van Soest and Robertson, 1985 อ้างโดย Bluemmel *et al.*,1997) กรองเก็บตะกอนผ่าน filter crucible และล้างตะกอนด้วยน้ำร้อนหลายๆครั้ง นำไปอบให้แห้งหาส่วนตัวอย่างอาหารที่ไม่ถูกย่อย แล้วนำไปเผาหาเถ้า เพื่อคำนวณหาค่า TDDM และ TDOM มีสูตรคำนวณดังนี้

$$TDDM\ (\%) = \frac{\text{นน.DM อาหารเริ่มต้น–นน.DM อาหารเหลือที่ล้างด้วย NDF (mg)}}{\text{นน.DM ของอาหารเริ่มต้น (mg)}} \times 100$$

$$TDOM\ (\%) = \frac{\text{นน.OM อาหารเริ่มต้น–นน. OM อาหารเหลือที่ล้างด้วย NDF (mg)}}{\text{นน.OM ของอาหารเริ่มต้น (mg)}} \times 100$$

นำปริมาณวัตถุแห้งที่ย่อยสลายได้จริง และอินทรีย์วัตถุที่ย่อยสลายได้จริงมาหารด้วยปริมาณแก๊สที่ผลิตได้ใน 24 ชั่วโมง คำนวณหาค่า partitioning factor (PF) โดยแสดงในสูตร

$$PF_{DM} = \frac{TDDM\ (mg)}{\text{Volume of gas at 24 h (ml)}}$$

$$PF_{OM} = \frac{TDOM\ (mg)}{\text{Volume of gas at 24 h (ml)}}$$

3.3.5 การหาค่าการย่อยได้ของอินทรีย์วัตถุ ค่าพลังงานเมแทบอไลซ์ (ME) และพลังงานสุทธิเพื่อการให้นม (NEL)

การคำนวณปริมาณแก๊สที่เกิดขึ้นใน 24 ชั่วโมง ทำโดยนำค่าแก๊สที่ชั่วโมงที่ 24 หักลบจากปริมาณเริ่มต้นและค่าของ blank (Gb_0) ปรับด้วยค่าแก๊สของพืชมาตราฐาน (F_H) ดังสมการ

$$Gb\ (\text{ml/200 mg DM , 24 h}) = \frac{(V_{24} - V_0 - Gb_0) * 200 * (F_H + F_C)/2}{W}$$

เมื่อ Gb = ค่าแก๊สที่เกิดขึ้นของตัวอย่างอาหารที่เวลา 24 ชม.

V_0 = ปริมาณแก๊สเมื่อเริ่มต้นหมักบ่มตัวอย่าง

V_{24} = ปริมาณแก๊สเมื่อหมักบ่มแล้ว 24 ชั่วโมง

Gb_0 = ค่าเฉลี่ยการเกิดแก๊สใน 24 ชั่วโมง ของสารละลายรูเมน–บัฟเฟอร์

$F_H = 44.16 / (Gb_H - Gb_0)$; ค่าปรับสำหรับพืชอาหารหยาบ

$F_C = 61.10 / (Gb_C - Gb_0)$; ค่าปรับสำหรับพืชอาหารข้น

W = น้ำหนักของตัวอย่างอาหารที่ใช้ (มิลลิกรัมของวัตถุแห้ง)

สำหรับค่าแก๊สที่เกิดขึ้นในชั่วโมงอื่นๆ ก็ทำการคำนวณวิธีเดียวกัน จากนั้นนำค่าแก๊ส 24 ชั่วโมงมาคำนวณหาค่า OMD, ME และ NEL ตามสมการที่ Menke and Steingass (1988) เสนอไว้

OMD (%) = 15.38 + 0.8453 Gb + 0.0595 XP + 0.0675 XA

ME (MJ/kgDM) = 2.20 + 0.1357 Gb + 0.0057 XP + 0.0002859 XP^2

NEL (MJ/kgDM) = 0.54 + 0.0959 Gb +0.0038XP + 0.0001733XP^2

เมื่อ OMD = การย่อยได้ของอินทรีย์วัตถุ

ME = พลังงานเมแทบอไลซ์

NEL = พลังงานสุทธิเพื่อการให้น้ำนม

Gb = ค่าแก๊สที่เกิดขึ้นของตัวอย่างอาหารที่เวลา 24 ชม.

XP = ปริมาณโปรตีนในตัวอย่างอาหาร (กรัม/กิโลกรัมวัตถุแห้ง)

XA = ปริมาณเถ้าในตัวอย่างอาหาร (กรัม/กิโลกรัมวัตถุแห้ง)

1 Mcal = 4.184 MJ

3.4. การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ผลการทดลองโดยการวิเคราะห์วาเรียนซ์ (Analysis of Varience) ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design , CRD) ในกรณีโค ส่วนแกะใช้แผนการทดลองแบบ 3x3 Latin square design โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS นอกจากนี้ใช้สมการถดถอยในการทำนายค่าการย่อยได้ของโภชนะ ค่า TDN และ DE ของต้นอ้อยแห้งและเปรียบเทียบความแตกต่างผลการศึกษาที่ได้จากโคและแกะ

3.5. สถานที่ทำการวิจัย

1. คอกสัตว์ทดลองภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
2. ห้องปฏิบัติการภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
3. ห้องปฏิบัติการศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์เชียงใหม่ อ. สันป่าตอง จ. เชียงใหม่

3.6. ระยะเวลาทำการทดลอง

ดำเนินการวิจัยระหว่างเดือน สิงหาคม 2541 - พฤษภาคม 2542

ภาพที่ 4 คอกโคทดลองและอุปกรณ์ในการเก็บปัสสาวะ

Fig 4 Cattle metabolism cage and urine collector.

ภาพที่ 5 กรงแกะทดลอง

Fig 5 Sheep Metabolism cage.