บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 ขอบเขตและวิธีการทดลอง

3.1.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

3.1.1.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเปลือกเสาวรสหมักโดยวิธี Proximate Analysis (A.O.A.C., 1975) และ วิธี Detergent (Van Soest, 1982)

3.1.1.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบโครงสร้างของพืช โดยวิธีDetergent method ของ Van Soest (1982)

3.1.1.3 การวิเคราะห์หาค่าพลังงานในอาหารและในมูล โดยใช้ Bomb Calorimeter

3.1.2 วิธีการหมักเปลือกเสาวรสโดยใช้ และไม่ใช้สารเสริม หรือ วัตถุอื่นใด

3.1.2.1 นำเปลือกเสาวรส ที่เป็นวัสดุเศษเหลือจากโรงงานอุตสาหกรรม ผลิตน้ำผลไม้กระป๋องมา หมักในสภาพสุญญากาศ โดยจะทำการหมักเปลือกเสาวรสในถังพลาสติกที่มีขนาดความจุ 120 ลิตร อัดให้แน่นแล้วปิดฝาให้สนิท โดยใช้เข็มขัดรัด สำหรับฝาปิดถังหมักจะเจาะรูตรงกลางแล้วติดตั้งท่อระบายแก๊สชนิด Air lock เพื่อระบายแก๊สที่เกิดขึ้นภายในถังหมัก

ตัวอย่างเปลือกเสาวรสที่ใช้ทำการทดลอง แบ่งออกเป็น 5 Treatments ต่อไปนี้

Treatment 1 เปลือกเสาวรสหมัก (Control)
Treatment 2 เปลือกเสาวรสหมักร่วมกับยูเรีย 3 % และ ฟางข้าว 10 % โดยน้ำหนัก
Treatment 3 เปลือกเสาวรสหมักร่วมกับรำข้าว 4 % โดยน้ำหนัก
Treatment 4 เปลือกเสาวรสหมักร่วมกับข้าวโพดบด 4 % โดยน้ำหนัก
Treatment 5 เปลือกเสาวรสหมักร่วมกับกรดฟอร์มิก 1% และ ฟางข้าว 10% โดยน้ำหนัก

หลังจากที่หมักครบกำหนดเวลาที่กำหนดไว้แล้ว นำมาประเมินคุณค่าทางประสาทสัมผัส เช่น ดมกลิ่น ดูสี และ พิจารณาลักษณะทางกายภาพของเปลือกเสาวรสหมัก

ภาพที่ 2 ลักษณะของถังหมักที่ติดตั้งท่อระบายแก๊สแบบ Air lock และ เข็มขัดรัดปากถัง

ภาพที่ 3 วัตถุดิบจากโรงงานหลวงอาหารสำเร็จรูป บริษัทดอยคำผลิตภัณฑ์อาหารจำกัด

3.2 การวางแผนการทดลอง

3.2.1 การศึกษาแนวโน้มของปริมาณน้ำนมของโคนมที่เลี้ยงโดยใช้ และไม่ใช้ เปลือกเสาวรสเปรียบเทียบกับ การให้กินหญ้าสด และ วัสดุเศษเหลือทางการเกษตรชนิดอื่นๆ ภายใต้สภาพการเลี้ยงของเกษตรกร อ. ไชยปราการ จ. เชียงใหม่

3.2.1.1 วิธีการศึกษา

- กลุ่มประชากรที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือ เกษตรกรผู้เลี้ยงโคนม อ.ไชยปราการ จ. เชียงใหม่ จำนวน 20 ราย โดยแบ่งเป็น A. ฟาร์มที่ใช้เปลือกเสาวรสเลี้ยง จำนวน 10 ฟาร์ม และ B. ฟาร์มที่ใช้วัสดุเศษเหลือทางการเกษตรชนิดอื่นๆจำนวน 10 ฟาร์ม

3.2.1.2 การเก็บรวบรวมข้อมูล

- โดยวิธีสัมภาษณ์ เกษตรกรผู้เลี้ยงโคนม จากฟาร์มที่มีแม่โครีดนม ที่มีอายุ , ระยะการให้นม และ ปริมาณน้ำนมต่อตัวต่อวัน ใกล้เคียงกัน
- เก็บรวบรวมข้อมูลทางสถิติของปริมาณน้ำนมระหว่าง เดือนมีนาคม42 -พฤษภาคม 43 และ ส่วนประกอบทางเคมีของน้ำนมที่ผลิตได้/ตัว/วัน จากฟาร์มที่ใช้ศึกษา ในระหว่าง เดือน กันยายน พ.ศ. 2542 - พฤษภาคม พ.ศ. 2543

3.2.1.3 การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) ของปริมาณน้ำนม และ ส่วนประกอบน้ำนม ระหว่างฟาร์มที่ใช้ และไม่ใช้ เปลือกเสาวรสร่วมกับ วัสดุเศษเหลือทางการเกษตรชนิดอื่นๆ ภายใต้สภาพการเลี้ยงของเกษตรกร โดยวิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวน ตามแผนการทดลองแบบ Completely Ramdomized Design (CRD) และ เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test. (Steel and Torrie, 1980)

3.2.2 การหาการย่อยได้ของโภชนะโดยวิธีใช้เทคนิคถุงไนล่อน

(*in sacco* / *in situ* Techniques)

3.2.2.1 สัตว์ทดลอง ที่ใช้ประกอบด้วย โคนมลูกผสมโฮลสไตล์ฟรีเชี่ยนเพศเมีย ที่ผ่าตัดเจาะ กระเพาะฝัง Rumen fistula จำนวน 4 ตัว อายุ 7-8 ปี

3.2.2.2 ตัวอย่างอาหาร ที่ใช้ในการทดลอง คือ เปลือกเสาวรสหมักทั้ง 5 Treatments

3.2.2.3 วิธีทดลอง

ใช้โคทดลองจำนวน 4 ตัว เพื่อทำการวัดค่าการย่อยสลายได้ของเปลือกเสาวรสหมักทั้ง 5 Treatments ในกระเพาะรูเมน โดยนำตัวอย่างอาหารทั้งหมดมาอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งน้ำหนักคงที่ ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นทำการชั่งและบดผ่านตะแกรงขนาด 2 มิลลิเมตร ชั่งตัวอย่างอาหารประมาณ 3 กรัม(W_1) ใส่ในถุงไนล่อนที่ชั่งน้ำหนักแล้ว(W_2) นำไป incubate ไว้ในกระเพาะรูเมนที่ชั่วโมงบ่มต่างๆกัน คือ 4, 8, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา นำถุงไนล่อนออกจากกระเพาะรูเมนพร้อมกัน แล้วนำมาล้างด้วยน้ำก๊อก ใช้เวลาล้างประมาณ 15 นาที สำหรับที่ 0 ชั่วโมงจะนำไปแช่น้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส ประมาณ 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้าง และ อบที่อุณหภูมิ60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งน้ำหนักคงที่พร้อมถุงอื่นๆ แล้วจึงชั่งน้ำหนักถุง และ ตัวอย่างอาหารที่เหลือ(W_3) คำนวณวัตถุแห้งที่หายไปจากสูตร

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

เมื่อ W_1 = น้ำหนักถุง

W_2 = น้ำหนักตัวอย่างอาหารที่เริ่มต้น

W_3 = น้ำหนักถุง + ตัวอย่างอาหารหลังอบ

ต่อจากนั้น เราสามารถคำนวณค่าการย่อยสลายได้โดยใช้ โปรแกรมสำเร็จรูป NEWAY จากสมการ ที่เสนอโดย Ørskov & McDonald (1979) ดังต่อไปนี้

$$P = a + b(1 - e^{-ct})$$

เมื่อ p = ค่าการย่อยสลายที่ช่วงเวลาต่างๆกัน (%)

a = ส่วนที่ละลายได้ทันที (%)

b = ส่วนที่ไม่ละลายแต่สามารถเกิดขบวนการหมักได้(%)

c = อัตราการย่อยสลายของ b

t = ช่วงระยะเวลาต่าง ๆ

นำค่า A , B และ c ที่คำนวณได้จากการใช้โปรแกรม NEWAY มาทำนายค่า DMI ,DDMI และ Growth rate โดยใช้สมการที่ Shem *et al.* (1995) เสนอไว้ดังต่อไปนี้

DMI (kg/d) = - 8.283 + 0.266A + 0.102B + 17.696 c (r = 0.90)

DDMI (kg/d) = - 7.609 + 0.219A + 0.080B + 24.191 c (r = 0.93)

Growth rate(kg/d) = - 0.649 + 0.019A + 0.006B + 3.870 c (r = 0.93)

3.2.2.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) ของอัตราการย่อยสลายได้ ของตัวอย่างอาหาร 5 Treatments คุณค่าทางอาหาร และ วัตถุแห้งที่กินได้ โดยวิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว ตามแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด Completely Randomized Design (CRD) (Steel and Torrie, 1980) และ เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test.

ภาพที่ 4 โคทดลองที่ผ่าตัดฝังท่อเก็บตัวอย่าง (Rumen fistula)

3.2.3 การใช้เทคนิคการวัดแก๊ส

(*in vitro* Gas Production Technique)

3.2.3.1 สัตว์ทดลอง ประกอบด้วย โคนมลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเซียนเพศเมีย ที่ผ่าตัดเจาะกระเพาะฝัง rumen fistula จำนวน 4 ตัว อายุ 7-8 ปี

3.2.3.2 ตัวอย่างอาหารที่ใช้ทดลอง คือ เปลือกเสาวรสหมักทั้ง 5 Treatments

3.2.3.3 วิธีการทดลอง

การเตรียมตัวอย่างอาหาร

นำตัวอย่างอาหารมาอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งน้ำหนักคงที่ ชั่งน้ำหนัก และ ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นำตัวอย่างมาบด ผ่านตะแกรง ขนาด 1 มิลลิเมตร(30 mash) จากนั้นทำการชั่งตัวอย่างประมาณ 500 มิลลิกรัม ใส่ลงในไซริงก์แก้ว (glass syringes) ขนาด 100 มิลลิลิตร ควรทำเครื่องหมายในแต่ละไซริงก์อย่างเป็นระบบ เพื่อความสะดวกในการอ่านค่าแก๊สที่ผลิตขึ้น ใช้วาสลีนเพียงเล็กน้อยทาแกนดัน (piston) แล้วสอดเข้าไปในไซริงก์ (การทาวาสลีนที่ piston เพื่อป้องกันการรั่วไหลออกของแก๊สที่เกิดขึ้นระหว่างการ incubate และเพื่อกันไม่ให้แกนฝืด) อย่างไรก็ตาม ก่อนใส่ตัวอย่างอาหารควรมีการทดสอบไซริงก์ และ แกนดันแต่ละคู่ให้มีขนาดพอดีกัน ระวังอย่าให้แน่น หรือ หลวมเกินไป เพราะจะทำให้หลอดไซริงก์ฝืดดึงแกนออกไม่ได้ ใช้ตัวอย่างละ3ซ้ำ(Replication)จากนั้นนำไซริงก์ที่บรรจุตัวอย่างอาหาร และ ดันแกน(piston)ไปที่ 40 มิลลิลิตร ปิดคลิบในบริเวณสายยางสั้นๆที่ต่อเข้ากับปลายหลอด (syring) นำไซริงก์ที่ใส่ตัวอย่างอาหารไว้แล้วมาเก็บไว้ในตู้อบ ที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

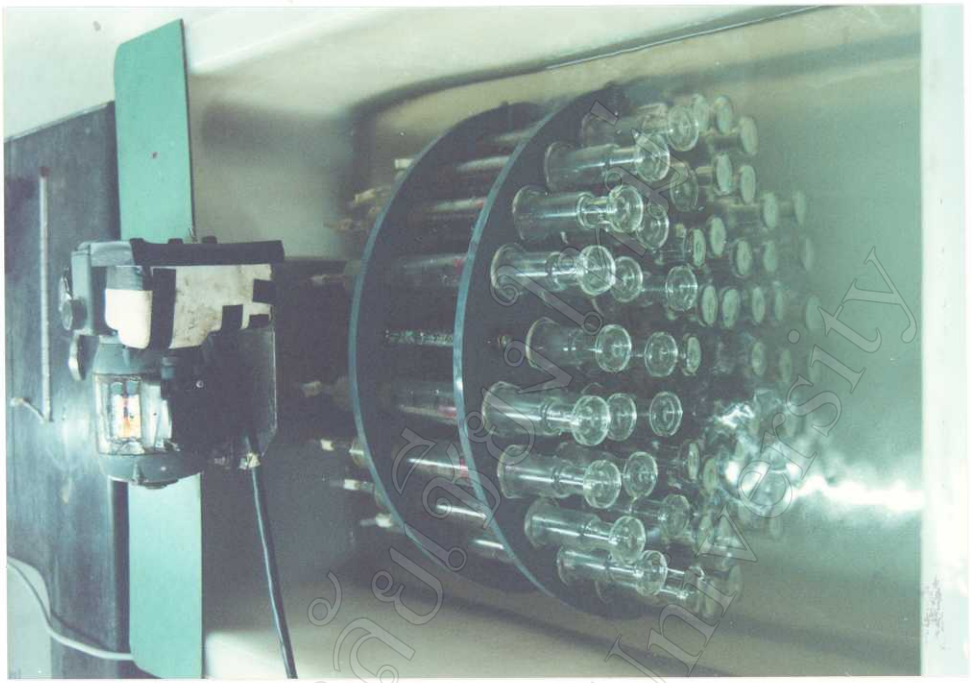
เตรียม หลอด Syringe หลอดที่ 1 - 3 สำหรับทำ Blank

หลอด Syringe หลอดที่ 4 - 6 สำหรับตัวอย่างอาหารหยาบมาตรฐาน(standard hay)

หลอด Syringe หลอดที่ 7 - 9 สำหรับตัวอย่างอาหารข้นมาตรฐาน(standard concentrate)

หลอดที่เหลือ เป็นหลอดที่บรรจุตัวอย่างที่ต้องการศึกษา โดยทำตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

หลอด Syringe 3 หลอดสุดท้าย สำหรับทำ Blank



ภาพที่ 5 ไซริงก์ที่ใช้วัดปริมาณแก๊สขณะทำงานในอ่างน้ำอุ่นปรับอุณหภูมิ(Water bath)

ภาพที่ 6 ลักษณะของเปลือกเสาวรสหมักที่มีคุณภาพดี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University

ภาพที่ 7 สารละลายที่ใช้ incubate ตัวอย่างอาหาร

การเตรียม rumen liquor buffer

ทำการผสมสารละลายลำดับที่ 1 – 5 ใส่ลงใน Woufle bottle ขนาด 2 ลิตรตามสัดส่วนที่แสดงไว้ในตารางที่ 7 โดยจะเตรียมสารละลายก่อนที่จะเก็บของเหลวจากกระเพาะรูเมน นำสารละลาย (medium) ที่เตรียมไว้ มาวางไว้ในอ่างน้ำอุ่นที่ปรับอุณหภูมิไว้ที่ 39 องศาเซลเซียส คนสารละลายให้เข้ากันด้วย magnetic stirrer ตลอดเวลา ในขณะเดียวกันต้องผ่านแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ตลอดเวลาเช่นกัน โดยใช้สายยางจุ่มลงในสารละลาย เพื่อรักษาสภาพไร้ออกซิเจน(anaerobic) เนื่องจากแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ที่เกิดขึ้นภายในหลอดทดลองจะถูกนำไปใช้ใน ขบวนการ reduction จากนั้นเติม reduction solution ลงไป สีของสารละลายที่เตรียมไว้จะค่อยๆเปลี่ยนจากสีฟ้าเข้มเป็นสีชมพู และไม่มีสีตามลำดับ แสดงว่าเกิดขบวนการ reduction อย่างสมบูรณ์ แล้วจึงค่อยเติม rumen liquor ที่กรองไว้แล้วใส่ลงไป อย่างไรก็ตาม ก่อนที่จะเติม rumen liquor ลงในสารละลายที่เตรียมไว้ ควรตรวจดูอุณหภูมิอีกครั้งว่าได้ 39 องศาเซลเซียสหรือไม่ และควรวัดค่า pH ให้อยู่ในช่วง 6.9 – 7.1 ถ้า ระดับ pH ไม่อยู่ในช่วงนี้จะส่งผลกระทบต่อการทำงานของจุลินทรีย์ ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ปริมาณสารละลาย และ การเตรียม medium สำหรับเตรียมใส่ในไซริงก์ที่มีตัวอย่าง

	ปริมาณ (ml.) ต่อจำนวนไซริงก์		
	1 ไซริงก์	30 ไซริงก์	60 ไซริงก์
1. น้ำกลั่น	14	450	900
2. Buffer solution	10	300	600
3. Macromineral solution	5	150	300
4. Micromineral solution	0.0025	0.075	0.15
5. Resazurine solution	0.025	0.75	1.5
6. Reduction solution	1	30	60
7. Rumen fluid	10	300	600

การเก็บของเหลวจากกระเพาะรูเมน และ การ incubate กับตัวอย่างอาหาร

การเก็บของเหลวจากกระเพาะรูเมน ควรเก็บในเวลาเช้าตรู่ คือ ประมาณ 6.00 น.ก่อนให้สัตว์กินอาหารเช้าโดยนำขวด(flask) ขนาด 1,000 มิลลิลิตร มาฝัดด้วยแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เพื่อให้มีสภาพไร้ออกซิเจน จากนั้นปิดฝาด้วยจุกยางที่เตรียมไว้ให้แน่น นำไปเก็บไว้ในกระติกน้ำอุ่นเพื่อช่วยรักษาอุณหภูมิ ปั๊มของเหลวจากกระเพาะรูเมน หรือ อาจใช้วิธีการสุ่มเก็บของเหลวจากกระเพาะรูเมน บริเวณส่วนบน ส่วนกลาง และ ส่วนล่างของกระเพาะรูเมน โดยใช้วิธีบีบจาก digesta ผ่านผ้ากรองตาห่าง 2 ชั้น ลงไปในขวดก็ได้ ควรเก็บของเหลวจากกระเพาะรูเมนให้เต็มขวด เพื่อไม่ให้เหลือพื้นที่สำหรับออกซิเจน ปิดจุกยางให้แน่น และ เพื่อลดความแปรปรวนที่อาจเกิดขึ้นได้ ควรเก็บของเหลวจากโคนมเจาะกระเพาะทั้ง 4 ตัวรวมกัน หลังจากที่เก็บของเหลวจากกระเพาะรูเมนเรียบร้อยแล้วให้รีบนำขวดมา incubate ในอ่างน้ำอุ่นที่ได้ปรับอุณหภูมิไว้ที่ 39 องศาเซลเซียส จากนั้นผ่านแก๊ส CO_2 เพื่อไล่ O_2 ออกตลอดเวลา ทำการตวงของเหลวที่เก็บมา 1 ส่วน ผสมกับสารละลาย (medium) ที่เตรียมไว้ 2 ส่วนโดยปริมาตร ดึงสายยางที่ผ่านแก๊ส CO_2ขึ้นมาอยู่บนสารละลายทั้งหมดแล้วใช้ปิเปตอัตโนมัติปั๊มสารละลาย rumen liquor buffer จำนวน 30 มิลลิลิตร ใส่ลงในไซริงก์ที่มีตัวอย่างอาหาร 200 มิลลิกรัม อ่านปริมาตรของส่วนผสมทั้งหมดบันทึกไว้เป็นค่า V_0 นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียสที่เวลา 0, 3, 6, 8, 12, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง บันทึกปริมาณแก๊สที่เกิดขึ้น หลังจากที่ incubate ไปแล้วประมาณ 6 หรือ 8 ชั่วโมงถ้ามีแก๊สเกิดขึ้นมาก โดยสังเกตจาก แกนไซริงก์จะถูกแก๊สดันออกมาเกิน 60 มิลลิลิตรให้บันทึกค่า

นั้นไว้ แล้วเปิดคลิบหนีบปลายไซริงก์ออก จากนั้นไล่อากาศออก โดยดันแกนไซริงก์กลับไปที่ 30 มิลลิลิตร ควรทำเครื่องหมายสัญลักษณ์ ที่เข้าใจง่ายไว้ในตารางข้อมูล เพื่อบอกให้ทราบว่าได้ทำการปรับปริมาตรแล้ว อ่านค่าแก๊สเป็นระยะๆ การอ่านค่าแก๊สต้องทำอย่างรวดเร็ว เพื่อป้องกันการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิของไซริงก์ตัวอย่างอาหาร ที่มีผลต่อระบบการทำงานของจุลินทรีย์

การทดสอบ Standardization ควรทำทุกครั้งที่ทำการทดลอง ดังนี้

Blank ทำได้โดยการ incubate rumen liqour buffer กับ medium mixture โดยไม่มีตัวอย่างอาหารในไซริงก์ (บันทึกค่าแก๊สที่เกิดขึ้น = GP_0)

หาค่า Standard โดยการ incubate ตัวอย่างอาหารมาตรฐานที่ทราบค่าการเกิดแก๊สแล้วที่ 24 ชั่วโมง ทำตัวอย่างละ 3 ไซริงก์ ค่าแก๊สมาตรฐานที่ได้เมื่อครบ 24 ชั่วโมงของตัวอย่างอาหารมาตรฐานเป็นดังนี้

Standard Hay	200 mg.DM	44.43 ml (GPh)
Standard Concentrates	200 mg.DM	65.18 ml (GPh)

ต้องมีการตรวจสอบการทำงานของจุลินทรีย์ และ / หรือ ความผิดพลาดที่อาจเกิดขึ้นในการทดลองโดยคำนวณ Factor ได้ไม่เกิน 0.9 – 1.1 ดังนี้

FH (Hay Factor) = $44.43 / (GPH - GP_0)$

FH (Concentrat Factor) = $65.18 / (GPC - GP_0)$

กำหนดให้ GP คือ ปริมาณแก๊สที่เกิดขึ้นจากตัวอย่างอาหารมาตรฐาน และ Blank ถ้า Factor ที่ได้อยู่นอกเหนือจากค่า 0.9 – 1.1 ต้องทำซ้ำใหม่

การที่เรามี Standard จะช่วยทำให้ทราบสาเหตุของความแปรปรวน เช่น ถ้าค่า FH สูงเกิน 1.0 หรือ FC อยู่ต่ำกว่า 0.9 แสดงว่ามี Cellulolytic activity น้อย จะต้องปรับปรุงโดยเพิ่มสัดส่วนของหญ้าแห้งในอาหารสัตว์เจาะกระเพาะ โดยที่ :-

Standard Hay	ใช้ตรวจสอบกิจกรรมของแบคทีเรียพวก Cellulolytic
Standard Concentrates	ใช้ตรวจสอบกิจกรรมของแบคทีเรียพวก Amylolytic

การคำนวณผล

นำค่าแก๊สสุทธิ (net gas production) ที่เกิดขึ้นในไซริงก์ที่เป็น Blank (GP_0)(ปกติจะได้ประมาณ 6 – 12 มิลลิลิตร) ที่ 24 ชั่วโมง ไปหักออกจากค่าแก๊สที่เกิดขึ้นจากตัวอย่างมาตรฐานและตัวอย่างที่ต้องการศึกษา ที่ได้ปรับให้มีปริมาณวัตถุแห้งเท่ากับ 200 มิลลิกรัม จะได้ค่าแก๊สสุทธิ(GP) ที่คำนวณได้จากสมการที่เสนอโดย Menke and Steingass (1988) ดังต่อไปนี้

$$GP(ml./200mgDM, 24\ hr) = [(V_{24} - V_0 - GP_0) \times 200 \times (FH + FC)] / w$$

เมื่อ V_0 = ปริมาตรส่วนผสมทั้งหมดที่อ่านได้ข้างไซริงก์ก่อน incubate

V_{24} = ค่าแก๊สที่อ่านได้เมื่อ incubate ได้ 24 ชั่วโมง

GP_0 = ค่าเฉลี่ยของแก๊สที่ผลิตขึ้นในไซริงก์ที่เป็น Blank อ่านที่ 24 ชั่วโมง

FH = $44.43 / (GPh - GP_0)$; roughage correction factor

FC = $65.18 / (GPh - GP_0)$; concentrate correction factor

w = น้ำหนักตัวอย่างเป็นมิลลิกรัม วัตถุแห้ง (mg.DM)

ค่าแก๊สสุทธิที่เกิดขึ้น ที่อ่านเป็นระยะๆที่ชั่วโมงบ่มต่างๆกัน สามารถนำไปเขียนกราฟและ เข้าสมการเพื่อคำนวณค่าอัตราการเกิดแก๊ส เช่นเดียวกับ การทดลองโดยใช้เทคนิคถุงไนล่อน (In sacco) ที่เสนอโดย Ørskov & McDonald (1979) ดังต่อไปนี้

$$P = a + b(1 - e^{-ct})$$

เมื่อ p = ปริมาตรแก๊สที่เกิดขึ้นที่ช่วงเวลาต่างๆกัน

a = ส่วนที่ละลายได้ทันที

b = ส่วนที่ไม่ละลายทันทีแต่ถูกหมักย่อยได้เมื่อเวลาผ่านไป

(a + b) = อัตราการย่อยสลายของ b

c = อัตราการเกิดแก๊ส

ค่าอัตราการย่อยสลายได้ของตัวอย่างอาหารที่ได้จาก การอ่านค่าแก๊สที่เกิดขึ้น สามารถนำมาทำนายค่า ปริมาณวัตถุแห้งที่กิน(DMI) ปริมาณวัตถุแห้งย่อยได้ที่สัตว์ได้รับ (DDMI) และอัตราการเจริญเติบโต (Growth rate) ได้เช่นเดียวกับวิธี In sacco โดยนำค่า a , b และ c ที่คำนวณได้จากโปรแกรมสำเร็จรูป NEWAY ที่เสนอสมการโดย Ørskov & McDonald (1979) มาแทนค่าในสมการที่เสนอโดย Shem *et al.* (1995) ดังต่อไปนี้

DMI (kg/d) = - 8.283 + 0.266A + 0.102B + 17.696 c (r = 0.90)

DDMI (kg/d) = - 7.609 + 0.219A + 0.080B + 24.191 c (r = 0.93)

Growth rate(kg/d) = - 0.649 + 0.019A + 0.006B + 3.870 c (r = 0.93)

สำหรับค่าแก๊สสุทธิที่อ่านได้ที่ 24 ชั่วโมง (net gas production) สามารถนำไปแทนค่าในสมการ ที่เสนอโดย Menke and Steingass (1988) เพื่อทำนายค่าการย่อยได้ของอินทรีย์วัตถุ (OMD, %) ค่าพลังงานใช้ประโยชน์(ME, Mcal / kg) และ ค่าพลังงานสุทธิเพื่อการให้นม(NEL, Mcal / kg) ดังสมการต่อไปนี้

OMD(%) = 15.38 + 0.8453 GP + 0.0595 XP + 0.0675 XA (R^2= 0.91)

ME (Mcal/kg) = 2.20 + 0.1357 GP + 0.0057 XP + 0.0002859 $(XP)^2$(R^2= 0.94)

NEL (Mcal/kg) = 0.54 + 0.0959 GP + 0.0038 XP + 0.0001733 $(XP)^2$(R^2= 0.93)

เมื่อ GP = ปริมาณ gas (ml) ที่เกิดขึ้นเมื่อ incubated 24 ชั่วโมง

XP = ปริมาณโปรตีน (g / kgDM)

XA = ปริมาณเถ้า (g / kgDM)

สำหรับการคำนวณค่า Partition Factor ที่ได้พัฒนาวิธีการทดลอง และ วิธีการคำนวณโดย Blümmel and Ørskov (1993) ซึ่งมีหลักการทั่วไปคล้ายกับวิธีการที่เสนอโดย Menke and Steingass (1988) ดังนี้ ชั่งตัวอย่างอาหารที่บดผ่านตะแกรง 1 มิลลิเมตร ประมาณ 500 กรัมนำไป incubate กับสารละลาย rumen liquor buffer ปริมาตร 40 มิลลิลิตร นาน 24 ชั่วโมง อ่านค่าแก๊สที่เกิดขึ้นที่ 24 ชั่วโมง แล้วทำการถ่ายสารละลายในไซริงก์ที่มีตัวอย่างอาหารที่ผ่านการ incubate ทั้งหมดลงใน Beaker ขนาด 500 มิลลิลิตร เพื่อวิเคราะห์ NDF โดยใช้สารละลาย Neutral detergent solution (NDS) จำนวน 60 มิลลิลิตร และทำการวิเคราะห์ตามวิธีการหาค่าของ NDF การทำเช่นนี้เนื่องจากต้องการแยกจุลินทรีย์ออกจาก ส่วนของวัตถุแห้งที่เหลือ ที่ไม่สามารถถูกย่อยได้อย่างแท้จริง (true undegraded dry matter) หลังจากนั้นนำตะกอนที่กรองได้มาอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส และ เผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส ปริมาณที่เหลือ คือ ค่า true undegraded organic matter อย่างไรก็ตาม เมื่อนำค่าเหล่านี้มาหักลบจากค่าเดิมจะเป็นค่าโภชนะที่ย่อยได้จริง สามารถนำมาคำนวณค่า Partition Factor (PF) โดยใช้สูตร

$$PF_{DM} = \frac{\text{True degraded dry matter (TDDM, g)}}{\text{Gas (ml.), 24 hrs}}$$

$$PF_{OM} = \frac{\text{True degraded organic matter (TDOM, g)}}{\text{Gas (ml.), 24 hrs}}$$

3.2.3.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) ของอัตราการเกิดแก๊สที่เวลาต่างๆ คุณค่าทางโภชนะ และ วัตถุแห้งที่กินได้ ของตัวอย่างอาหาร 5 Treatments โดยวิธีวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว ตามแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด Completely Randomized Design (CRD) และ เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยวิธีวิธี Duncan's New Multiple Range Test. (Steel and Torrie, 1980)

3.2.4 การศึกษาค่าการย่อยได้ในตัวสัตว์ (*in vivo* digestibility)

3.2.4.1 สัตว์ที่ใช้ทดลอง ประกอบด้วย แกะลูกผสมพื้นเมือง x Merino เพศผู้จำนวน 15 ตัว ที่มีน้ำหนัก เฉลี่ย 25 กิโลกรัม อายุ 8 เดือน

3.2.4.2 ตัวอย่างอาหารที่ใช้ทดลอง คือ เปลือกเสาวรสหมัก 5 Treatment

3.2.4.3 วิธีการทดลอง

วิธีการหาการย่อยได้โดยตรงกับตัวสัตว์ แบบ Conventional method ทำได้โดยบังคับหรือเลี้ยงสัตว์ทดลองให้อยู่ในคอกที่สามารถวัดปริมาณอาหารที่สัตว์กิน ปริมาณมูล และ ปัสสาวะที่ขับออกมา ซึ่งคอกที่ใช้เลี้ยงสัตว์ทดลองนี้ เรียกว่า Metabolism cages ให้สัตว์ได้กินอาหารทดลองโดยตรง และ แบ่งการทดลองออกเป็น 2 ช่วงเวลา คือ

1. Preliminary period เป็นช่วงที่สัตว์ และ จุลินทรีย์ปรับตัวให้คุ้นเคยกับอาหาร เพื่อขับอาหารเดิมออกจากทางเดินอาหาร เนื่องจากอาหารที่ทดลองเป็นอาหารแปลกใหม่ จึงใช้ระยะเวลาในการทดลอง 21 วัน

2. Collection period เป็นช่วงที่วัดปริมาณอาหารที่สัตว์กินได้จริง และ มูลที่ขับออกมา ช่วงนี้จะให้อาหารกับสัตว์ทดลองในระดับคงที่ ใช้ระยะเวลาในการทดลอง และ เก็บตัวอย่าง 7 วัน ควรมีการสุ่มเก็บตัวอย่างอาหาร และ มูล เพื่อนำไปวิเคราะห์ทางเคมี แล้วนำค่าต่างๆมาคำนวณหาค่าการย่อยได้จากสูตร

$$\text{การย่อยได้ของโภชนะแบบปรากฏ (\%) (Apparent digestibility)} = \frac{\text{โภชนะที่กิน} - \text{โภชนะที่ขับออก}}{\text{โภชนะที่กิน}} \times 100$$

3.2.4.4 แผนการทดลอง

สุ่มแกะทดลองออกเป็น 5 กลุ่มๆ ละ 3 ตัว จัดเข้ากรงขังเดี่ยว ให้แกะแต่ละกลุ่มกินอาหารทดลองแตกต่างกัน 5 Treatments

3.2.4.5 การบันทึกข้อมูล และ เก็บตัวอย่าง

ทำการชั่งน้ำหนักแกะเมื่อเริ่มต้น และ สิ้นสุดการทดลองในตอนเช้า โดยอดน้ำและอาหารอย่างน้อย 6 ชั่วโมงในวัน ก่อนเริ่มการทดลอง และ สิ้นสุดการทดลองต้องมีการบันทึกปริมาณอาหารที่ให้ และ อาหารที่เหลือในแต่ละวัน ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างอาหารมาวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมี รวมทั้งเก็บตัวอย่างมูล ปัสสาวะ อย่างละ 10 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณทั้งหมดวันละ 2 ครั้ง ก่อนให้อาหารเช้า และ อาหารเย็น จากนั้นนำมาสะสมไว้ในตู้แช่แข็งจนกว่าจะสิ้นสุดการทดลอง

3.2.4.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance)ของอัตราการย่อยสลายคุณค่าทางโภชนะ และ วัตถุแห้งที่กินได้ ของตัวอย่างอาหาร 5 Treatments โดยวิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียวตามแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด Completely Ramdomized Design (CRD) และ เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan' s New Multiple Range Test. (Steel and Torrie, 1980)

3.2.5 สถานที่ทำการวิจัย

1. ฟาร์มโคนมของเกษตรกร อ.ไชยปราการ จ.เชียงใหม่
2. คอกสัตว์ทดลอง ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัย เชียงใหม่ ต. สุเทพ อ.เมือง จ.เชียงใหม่
3. การวิเคราะห์หาคุณค่าทางโภชนะ วิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการอาหารสัตว์ ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะ เกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ต. สุเทพ อ. เมือง จ. เชียงใหม่

ระยะเวลาทำการทดลอง

ระยะเวลาในการทดลอง ประมาณ 1 ปี