บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

การทดลองที่ 1 การผลิตหญ้ารูซี่หมักในถุง 20 กิโลกรัมโดยใช้สารช่วยหมักชนิดต่าง ๆ

1.1 พืชที่ใช้ในการหมัก

ใช้หญ้ารูซี่ในแปลงของศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์เชียงใหม่ที่ตัดอายุประมาณ 45 วัน ในช่วงเดือนสิงหาคม (2542) ด้วยเครื่องตัดหญ้าแบบสะพาย และหั่นให้มีความยาว 2 – 3 เซนติเมตร ด้วยเครื่องหั่นขนาดเล็กก่อนจะนำมาผสมร่วมกับสารช่วยหมักต่าง ๆ อาทิเช่น รำละเอียด มันเส้นบด และกากน้ำตาล

1.2 การวางแผนการทดลอง

จากการทดลองของ สมคิดและคณะ (2540) พบว่าการหมักหญ้ารูซี่ที่ไม่ใส่สารช่วยหมักมีคุณภาพไม่ดี ดังนั้นการทดลองในครั้งนี้จึงวางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design (CRD) โดยแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม ๆ ละ 5 ซ้ำ แต่ละกลุ่มใช้หญ้ารูซี่ 100 กิโลกรัมหมักร่วมกับสารช่วยหมักต่าง ๆ ดังนี้

กลุ่มที่ 1 รำละเอียด 16 กิโลกรัม พรมด้วยน้ำ 16 กิโลกรัม
กลุ่มที่ 2 มันเส้นบด 16 กิโลกรัม พรมด้วยน้ำ 16 กิโลกรัม
กลุ่มที่ 3 กากน้ำตาล 3 กิโลกรัมเจือจางด้วยน้ำ 3 กิโลกรัม
กลุ่มที่ 4 กากน้ำตาล 4 กิโลกรัมเจือจางด้วยน้ำ 4 กิโลกรัม
กลุ่มที่ 5 กากน้ำตาล 5 กิโลกรัมเจือจางด้วยน้ำ 5 กิโลกรัม

1.3 วิธีการหมัก

นำหญ้ารูซี่ที่หั่นให้มีขนาด 2 –3 เซนติเมตรมาผสมกับสารช่วยหมักต่าง ๆ ตามแผนการทดลอง แล้วบรรจุลงในถุง 2 ชั้น ชั้นนอกเป็นถุงใยสังเคราะห์ และชั้นในเป็นถุงพลาสติกสีดำ ขนาด 36 x 45 นิ้ว บรรจุหญ้าถุงละ 20 กิโลกรัม ใช้ปั๊มดูดอากาศภายในออกให้มากที่สุด เพื่อให้มีสภาพไร้ออกซิเจน แล้วใช้เชือกรวบมัดปากถุงทั้ง 2 ชั้นรวมกันให้แน่น หมักไว้เป็นระยะเวลา 1 เดือน

1.4 การสุ่ม และการวิเคราะห์ตัวอย่าง

สุ่มตัวอย่างหญ้ารูซี่หมักจากถุง ๆ ละ 4 จุด คือส่วนบน กลาง ข้าง และล่างของถุงหมัก นำตัวอย่างถุงเดียวกันมาผสมรวมกันเพื่อนำไปวิเคราะห์ค่าต่าง ๆ ดังนี้

- **การประเมินคุณภาพของพืชหมักในสภาพสด**

ก.) ประเมินคุณภาพด้วยวิธีประสาทสัมผัส (Gross, 1982 อ้างโดยบุญล้อมและคณะ (2543) รายละเอียดการวิเคราะห์ในภาคผนวก 1

ข.) วัดความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของพืชหมักโดยใช้พืชหมัก 50 กรัมผสมกับน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร นำไปปั่นในโถปั่น (blender jar) เป็นเวลานาน 30 วินาที แล้วกรองผ่านผ้าขาวบาง 2 ชั้น นำน้ำที่กรองได้ไปวัดความเป็นกรด-ด่างด้วย glass electrode pH meter (Bal *et al.*, 1997)

ค.) วิเคราะห์หาปริมาณกรดอินทรีย์โดยวิธีการกลั่น (Zimmer, 1966 อ้างโดยบุญล้อมและบุญเสริม, 2525) รายละเอียดการวิเคราะห์ในภาคผนวก 2

ง.) วิเคราะห์หาแอมโมเนีย (Chen *et al.*, 1994) รายละเอียดการวิเคราะห์ในภาคผนวก 3

- **การประเมินคุณภาพของพืชหมักในสภาพไร้ความชื้น**

ก.) วิเคราะห์เปอร์เซ็นต์วัตถุแห้งของหญ้าหมัก โดยนำหญ้ารูซี่หมักมาอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง (Nagel and Broderick, 1992) ทำการคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การสูญเสียวัตถุแห้งโดยเปรียบเทียบกับวัตถุแห้งของหญ้าสด ตามสูตร

$$\text{DM loss (\%)} = \frac{\{(\text{DM} \times \text{weight}/100)_{\text{before ensilage}} - (\text{DM} \times \text{weight}/100)_{\text{after ensilge}}\} \times 100}{(\text{DM} \times \text{weight}/100)_{\text{before ensilage}}}$$

ข.) นำหญ้าหมักที่อบแห้งแล้วมาวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีโดยวิธี Proximate analysis (AOAC, 1984) และวิเคราะห์เยื่อใยโดยวิธี Detergent method (Goering and Van Soest, 1970; อ้างโดย บุญล้อม และสมคิด, 2539)

ค.) นำหญ้าหมักที่บดแล้วจำนวนตัวอย่างละ 200 มิลลิกรัมมาวิเคราะห์หาค่าการย่อยได้และค่าพลังงานในรูป ME และNEL โดยวิธี gas production technique (Menke and Steingass, 1988) รายละเอียดแสดงดังภาคผนวก 4

1.5 วิเคราะห์ผลทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) ตามแผนการทดลองและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan' s new multiple range test ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS 10.0.1

การทดลองที่ 2 การผลิตหญ้ารูซี่หมักในหลุมหมักโดยใช้สารช่วยหมัก

2.1 พืชที่ใช้ในการหมัก

ใช้หญ้ารูซี่ที่ปลูกที่ศูนย์วิจัยและบำรุงสัตว์เชียงใหม่ ตัดเมื่ออายุประมาณ 45 วัน ด้วยเครื่องจักรให้มีขนาด 2 – 3 เซนติเมตรก่อนจะนำมาหมักร่วมกับสารช่วยหมักต่าง ๆ คือ สารละลายเกลือ หรือกากน้ำตาล

2.2 การวางแผนการทดลอง

ใช้แผนการทดลองแบบ CRD โดยแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้คือ

กลุ่มที่ 1 หมักโดยไม่เสริมสารช่วยหมักเป็นกลุ่มควบคุม

กลุ่มที่ 2 หมักร่วมกับสารละลายเกลือ 1% ของน้ำหนักหญ้าสด

กลุ่มที่ 3 หมักร่วมกับกากน้ำตาลในอัตรา 5% ของน้ำหนักหญ้าสด

2.3 วิธีการหมัก

นำกากน้ำตาลมาเจือจางด้วยน้ำในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 โดยปริมาตร แล้วบรรจุลงในถังสเปรย์ขนาด 500 ลิตร ซึ่งติดตั้งไว้ที่พื้นด้านท้ายของตัวรถแทรกเตอร์ มีท่อเอสล่อนที่ดัดแปลงให้มีหัวฉีดจำนวน 12 รู ดังภาพ 3.2 และเสียบติดกับตัวถังสเปรย์ตามแนวขวางของตัวรถ ฉีดพ่นสารละลายกากน้ำตาลลงในแปลงหญ้ารูซี่โดยคำนวณให้ได้กากน้ำตาลในอัตราประมาณ 5% ของน้ำหนักหญ้าสด จากนั้นใช้เครื่อง double chopper ตัดตามหลังให้ได้ความยาวประมาณ 2 –3 เซนติเมตร นำหญ้าที่ตัดแล้วบรรจุลงในหลุมหมักแบบ bunker silo ความจุ 200 ตัน ไล่อากาศออกโดยการอัดทับด้วยรถแทรกเตอร์จนแน่นและใช้เวลาบรรจุ 7 วันต่อหลุมโดยทำติดต่อกันทุกวัน จากนั้นปิดหลุมด้วยพลาสติกหนาสีดำ เก็บไว้เป็นเวลานาน 1 เดือน นอกจากนี้ยังได้ทำการหมักหญ้ารูซี่อีก 2 หลุม โดยไม่ใส่สารช่วยหมักเลยเป็นกลุ่มควบคุม ส่วนอีกหลุมหนึ่งฉีดพ่นหญ้าด้วยสารละลายเกลือ 1% ของน้ำหนักหญ้าสด ซึ่งสารละลายนี้เตรียมโดยใช้เกลือ 1 ส่วนละลายในน้ำ 10 ส่วน ฉีดพ่นลงแปลงและทำการหมักในทำนองเดียวกับการหมักร่วมกับกากน้ำตาล

2.4 การสุ่ม และการวิเคราะห์ตัวอย่าง

สุ่มเก็บตัวอย่างจากส่วนต่าง ๆ ของหลุมหมักจำนวน 20 จุด เพื่อนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี การสูญเสียวัตถุแห้ง ความเป็นกรด-ด่าง แอมโมเนียไนโตรเจน การย่อยได้ และพลังงาน ตามวิธีการเดียวกันกับการทดลองที่ 1

2.5 วิเคราะห์ผลทางสถิติ

ทำเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

การทดลองที่ 3 การหาการย่อยได้ และพลังงานของหญ้ารูซี่หมักโดยวิธี *in vivo* และ *in vitro* gas production

การทดลองที่ 3.1 การคำนวณค่าพลังงานจากการย่อยได้ในตัวสัตว์

3.1.1 อาหารทดลอง

หญ้ารูซี่ที่หมักร่วมกับกากน้ำตาล 5 % ของน้ำหนักหญ้าสดในครั้งนี้ไม่ใช้จากการทดลองที่ 2 เนื่องจากว่าในศูนย์วิจัยมีความจำเป็นต้องใช้หญ้าหมักสำหรับเลี้ยงโคนม ทำให้หญ้าหมักเหลือไม่เพียงพอสำหรับการทดลอง ดังนั้นจึงทำการหมักหญ้ารูซี่ใหม่อีกครั้ง ด้วยวิธีการเดียวกันกับการทดลองที่ 2 นำหญ้าหมักดังกล่าวมาเลี้ยงโคทดลองในช่วงเดือนเมษายน 2543 โดยให้กินแบบเต็มที่ มีแร่ธาตุก้อนให้โคเลียกินตามใจชอบ แร่ธาตุก้อนนี้มีองค์ประกอบใน 1 กิโลกรัมดังนี้คือ Ca, Na, P, K, Mg, S เท่ากับ 140, 136, 60, 25, 20, 12 กรัมตามลำดับ และ Fe, Zn, Mn, Cu, I, Co และ Se เท่ากับ 1000, 800, 350, 300, 245, 80 และ 20 มิลลิกรัมตามลำดับ

3.1.2 สัตว์ทดลอง

ใช้แม่โคลูกผสมพันธุ์ Holstein Friesian ระดับสายเลือด 87.5 %ของศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์เชียงใหม่ ซึ่งอยู่ในระยะพักรีดนมจำนวน 4 ตัว มีน้ำหนักตัวระหว่าง 465 - 502 กิโลกรัม เลี้ยงในซองขังเดี่ยวผูกยืนโรง มีรางอาหารอยู่ด้านหน้า และมีน้ำสะอาดให้ดื่มตลอดเวลา ก่อนการทดลองให้โคได้รับการถ่ายพยาธิ และฉีดวิตามินตามโปรแกรมสุขภาพของสัตวแพทย์ นอกจากนี้บันทึกน้ำหนักตัวทั้งก่อน และหลังการทดลองโดยใช้สายวัดรอบอกชนิดพิเศษซึ่งมีสเกลของความยาว และสเกลของน้ำหนักที่สามารถเทียบระหว่างกันได้

3.1.3 วิธีทดลอง

ให้โคได้รับหญ้ารูซี่หมัก กินเป็นอาหารเดี่ยวอย่างเต็มที่ ให้อาหารวันละ 2 เวลา คือ 07.00 น. และ 17.00 น. ใช้ระยะเวลาในการทดลองนาน 45 วัน โดยแบ่งเป็น 3 ระยะดังนี้คือ 33 วันแรกเป็นระยะ preliminary period โดยมีจุดประสงค์เพื่อให้โคปรับตัวเข้ากับอาหารทดลอง และเพื่อให้อาหารเก่าที่หลงเหลือในทางเดินอาหารถูกขับถ่ายออกจนหมด ตลอดจนเพื่อเก็บข้อมูลของปริมาณการกินได้

ในช่วงวันที่ 34-39 ลดปริมาณอาหารที่ให้ลงเหลือเพียง 90 เปอร์เซ็นต์ของการกินได้ เพื่อให้สัตว์กินอาหารทดลองได้หมด ป้องกันการเลือกกิน และเพื่อให้ทั้งปริมาณอาหารที่โคกินได้ และปริมาณมูลที่ขับถ่ายออกมาอยู่ในสัดส่วนที่คงที่ นอกจากนี้ได้ทดลองติดตั้งอุปกรณ์เก็บปัสสาวะให้กับตัวสัตว์เพื่อให้สัตว์เคยชิน ในกรณีของมูลจะใช้ถาดรองไว้ท้ายคอก

ในช่วงวันที่ 40-45 เป็นระยะ collection period ทำการบันทึกปริมาณอาหารที่โคกินได้ ปริมาณมูล และปัสสาวะทุกวัน ๆ ละ 2 ครั้ง (เช้า-เย็น) เพื่อนำไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมี การเก็บปัสสาวะทำโดยใช้กรวยครอบบริเวณช่องขับปัสสาวะ ปลายกรวยต่อกับท่อซึ่งมีถุงสำหรับเก็บปัสสาวะผูกติดอยู่ ดังภาพ 3.3 ภายในถุงใส่กรดกำมะถัน (H_2SO_4 18 N) ปริมาณ 100 มิลลิลิตร เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ นอกจากนี้กรดกำมะถันยังเป็นตัวช่วยจับแก๊สแอมโมเนียที่มีอยู่ในปัสสาวะด้วย ชั่งตัวอย่างมูล และปัสสาวะที่สัตว์ขับออกมาวันละ 2 ครั้ง ก่อนให้อาหารมื้อถัดไป พร้อมทั้งบันทึกปริมาณอาหารเหลือ สุ่มเก็บตัวอย่างมูล และปัสสาวะครั้งละ 1 % ของปริมาณที่ขับออกมาในแต่ละครั้ง นำไปเก็บสะสมไว้ในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส โดยแยกตัวอย่างจากโคแต่ละตัวไว้คนละส่วน เพื่อรอการวิเคราะห์ทางเคมีต่อไป

3.1.4 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

นำตัวอย่างอาหาร มูล และปัสสาวะที่แช่แข็งมาทิ้งไว้ให้ละลายที่อุณหภูมิห้อง สำหรับตัวอย่างอาหาร และมูลแบ่งออกเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปบดผ่านตะแกรงขนาด 1 มิลลิเมตร เพื่อวิเคราะห์หา

ก.) องค์ประกอบทางเคมีโดยวิธี Proximate analysis (AOAC, 1984) และวิเคราะห์เยื่อใยโดยวิธี Detergent method (Goering and Van Soest, 1970; อ้างโดย บุญล้อม และสมคิด, 2539)

ข.) พลังงานในอาหารและมูลโดยใช้ Adiabatic bomb calorimeter

ค.) โปรตีนในมูล และปัสสาวะ โดยใช้ตัวอย่างสดที่ไม่ผ่านการอบแห้งเพื่อหลีกเหลี่ยงการสูญเสียไนโตรเจนในระหว่างการอบ วิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจน (N) ในตัวอย่างดังกล่าว แล้วนำไปคำนวณหาสมดุลไนโตรเจน (N-balance) ของสัตว์ทดลอง ดังสมการ

สมดุลไนโตรเจน (กรัม/วัน) = ไนโตรเจนที่กิน (กรัม) - ไนโตรเจนในมูล (กรัม) - ไนโตรเจนในปัสสาวะ (กรัม)

- การคำนวณการย่อยได้ของโภชนะ ค่าการย่อยได้แบบปรากฏ (Apparent digestibility) หาได้จากสมการ

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

- การคำนวณค่าพลังงาน TDN, DE, ME และ NEL

- ค่าโภชนะที่ย่อยได้ทั้งหมด หรือยอดโภชนะย่อยได้ (Total digestible nutrient, TDN) ในอาหาร คำนวณได้จากผลรวมของปริมาณโภชนะที่ย่อยได้ทั้งหมดที่มีในอาหาร 100 ส่วนโดยอาศัยสมการดังนี้

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

เมื่อ DCP, DNDF, DNFC และ DEE คือปริมาณโภชนะที่ย่อยได้ดังต่อไปนี้ตามลำดับ คือ โปรตีนรวม, คาร์โบไฮเดรตที่เป็นโครงสร้าง, คาร์โบไฮเดรตที่ไม่ใช่โครงสร้าง และ ไขมันที่ย่อยได้ในอาหาร 100 ส่วน

- ค่าพลังงานย่อยได้ (Digestible energy, DE) ได้จากการนำอาหาร และมูลไปหาค่าพลังงานในเครื่อง Adiabatic bomb calorimeter แล้วคำนวณจากสูตร

$$DE\ (Mcal/\ kgDM) = GE\ intake\ (kg) - GE\ faecal\ (kg)$$

- คำนวณพลังงานในรูป ME และ NEL จากค่า DE ที่วัดโดยตรงจากสัตว์โดยอาศัยสมการ (NRC, 1989) ดังนี้ คือ

$$ME\ (Mcal/kgDM) = -0.45 + (1.01 \times DE)$$

$$NEL(Mcal\ /\ kgDM) = -0.12 + (0.556 \times DE)^{*}$$

- คำนวณพลังงานย่อยได้ (DE), พลังงานเมแทบอไลซ์ (ME) และพลังงานสุทธิสำหรับการให้นม (NEL) จากค่าพลังงาน TDN โดยอาศัยสมการของ NRC (1989) ดังนี้ คือ

$$DE\ (Mcal\ /\ kgDM) = 0.04409 \times TDN\ (\%)$$

$$ME^{*}\ (Mcal\ /\ kgDM) = -0.45 + (0.04453 \times TDN\ (\%))$$

$$NEL\ (Mcal\ /\ kgDM) = -0.12 + (0.0245 \times TDN\ (\%))$$

หมายเหตุ : * คือสูตรที่ดัดแปลงจาก NRC (1989)

การทดลองที่ 3.2 การคำนวณค่าพลังงานโดยวิธี *in vitro* gas production technique

นำหญ้ารูซี่หมักที่ใช้ศึกษาการย่อยได้มาอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง แล้วบดผ่านตะแกรงขนาด 1 มิลลิเมตร จากนั้นนำไปศึกษาหาค่าการย่อยได้ของอินทรียวัตถุ (OMD) ค่าพลังงาน ME และ NEL โดยการวัดปริมาณแก๊สตามวิธีของ Menke and

Steingass (1988) และศึกษาอัตราการเกิดแก๊สตามวิธีของ Bluemel and Ørskov (1993) รายละเอียดแสดงไว้ในภาคผนวกที่ 4

การทดลองที่ 4 การตอบสนองของโคนมลูกผสมขาว-ดำต่อระดับพลังงาน และโปรตีนในอาหารผสมครบส่วนที่มีหญ้ารูซี่หมักเป็นอาหารหลัก

4.1 สัตว์ทดลอง

ใช้แม่โคนมลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเซี่ยน ระดับสายเลือด 87.5% จำนวน 4 ตัว น้ำหนักเริ่มต้นประมาณ 468 ± 22.38 กิโลกรัม อยู่ในช่วงหลังคลอดประมาณ 120 วัน ให้นมประมาณ 14-16 กิโลกรัม/วัน

4.2 คอกทดลอง

เป็นซองขังเดี่ยวประกอบด้วยโซ่ผูกยืนโรง และมีราวเหล็กกั้นระหว่างโคแต่ละตัว ด้านหน้าเป็นรางอาหารและรางน้ำอัตโนมัติที่สามารถดื่มได้ตลอดเวลา ด้านบนติดตั้งพัดลมเพื่อระบายความร้อนให้กับสัตว์ทดลอง และมีท่อลมเป็นตัวปั๊มอากาศเพื่อใช้ในขณะรีดนมด้วยเครื่อง ส่วนบริเวณพื้นใช้ผ้ายางสีดำคลุมพื้นซีเมนต์เพื่อเป็นการป้องกันข้อเท้ามีรอยแผลถลอกขณะลุกนั่ง

4.3 อาหารทดลอง

ใช้หญ้ารูซี่หมัก ที่มีกระบวนการหมักเช่นเดียวกับการทดลองที่ 2 และทำการเปิดหลุมหมักในช่วงเดือนมีนาคม-เมษายน (2544) เพื่อเป็นแหล่งอาหารหยาบหลัก ทำการคำนวณสูตรอาหาร 4 สูตรโดยใช้โปรแกรม Xration (สมคิด, 2542) ให้มีพลังงาน และโปรตีนผันแปรเป็น 1.0 และ 1.2 เท่าของ NRC (1989) ดังนี้

สูตรที่ 1 (T_1) เป็น 1.0 CP และ 1.0 TDN
สูตรที่ 2 (T_2) เป็น 1.0 CP และ 1.2 TDN
สูตรที่ 3 (T_3) เป็น 1.2 CP และ 1.0 TDN
สูตรที่ 4 (T_4) เป็น 1.2 CP และ 1.2 TDN

การคำนวณสูตรอาหารเพื่อให้มีพลังงานและโปรตีนตามที่กำหนดนั้น ทำโดยใช้ข้าวโพดบดเป็นตัวปรับพลังงาน และใช้กากถั่วเหลือง และเมล็ดฝ้ายเป็นตัวปรับระดับโปรตีน และใช้หญ้ารูซี่แห้งเป็นตัวกระตุ้นการหลั่งน้ำลายเพื่อรักษาสภาพความเป็นกรด-ด่างในกระเพาะส่วนหน้าของโค นอกจากนี้ยังมีการปรับแร่ธาตุ และวิตามิน ให้ตรงกับที่ NRC (1989) ได้แนะนำไว้ สำหรับแร่ธาตุผสม (mineral mixture) ที่ใช้นั้นมีส่วนประกอบต่าง ๆ ในจำนวน 1 กิโลกรัม ดังตา

ราง 3.1 ตัวอย่างของสูตรอาหารผสมครบส่วนที่ใช้แสดงในตาราง 3.2 ซึ่งข้อมูลในตารางแสดงปริมาณที่ให้โคกินในแต่ละวัน สำหรับองค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบที่ใช้คำนวณสูตรอาหารแสดงไว้ในตารางที่ 3.3

อนึ่งสูตรอาหารที่ใช้ทดลองต้องทำการปรับทุกคาบเพื่อให้มีระดับพลังงานและโปรตีนตรงตามแผนการทดลองที่ระบุไว้ในข้อที่ 4.4 ซึ่งสูตรอาหารทั้งหมดที่ใช้และข้อมูลในการคำนวณแสดงไว้ในภาคผนวก

ตาราง 3.1 ส่วนประกอบของแร่ธาตุในแร่ธาตุผสม 1 กิโลกรัม

แร่ธาตุ	กรัม	แร่ธาตุ	กรัม
NaCl	375	ZnO	2.5
$Ca_3(PO_4)_2$	351	MnO	2.5
$CaCO_3$	133	$CuSO_4$	1.0
MgO	75	KIO_3	0.11
S	34	$CoSO_4$	0.029
Na_2SO_4	26	Na_2SeO_3	0.029

ตาราง 3.2 ตัวอย่างอาหารผสมครบส่วนซึ่งให้โคกินในแต่ละวัน ซึ่งมีระดับพลังงานและ/หรือโปรตีนต่างกัน 4 สูตร

TDN (E)	1.0		1.2	
Protein (P)	1.0	1.2	1.0	1.2
	← kg/day →			
Ruzi silage	17.66	17.68	19.16	19.95
Ruzi hay	1.17	1.19	1.34	1.32
Whole cotton seed	1.96	1.99	2.23	2.19
Soybean meal	2.3	3.35	1.33	2.34
Ground corn	3.41	2.50	5.52	5.02
$NaHCO_3$	0.12	0.12	0.14	0.13
$CaCO_3$	0.04	0.04	0.05	0.05
Mineral mixture	0.17	0.16	0.19	0.16
Vitamin ADE (g)	0.34	0.33	0.34	0.32

ตาราง 3.3 องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบที่ใช้ในการทดลอง

Composition (%)	Grass silage	Ruzi grass hay	Whole cotton seed	Soybean meal	Ground corn
DM	28.74	88.83	87.68	87.72	87.15
CP	6.59	5.38	22.55	47.34	8.33
EE	4.26	1.78	18.89	2.51	5.39
ADF	33.31	42.39	35.24	10.23	4.5
NDF	57.98	69.7	48.17	18.46	10.14
CF	-	31.37	25.87	6.63	2.22
ADL	4.91	7.51	10.69	1.46	0.8
Ash	10.10	7.18	4.18	7.17	1.52
Cellulose	28.40	34.88	24.55	8.77	3.70
Hemicellulose	24.67	27.31	12.93	8.23	5.64
NFC	21.16	15.97	6.21	24.52	74.62
NFE	-	54.29	28.51	36.35	82.54
TDN	57.69	53.02	73.91	80.97	82.91

[1/] TDN was calculated from the equations of Keari (1982) as follows :

TDN of dry roughage (%DM) = -17.2649 +1.2120 (%CP) + 0.8352 (%NFE) + 2.4637 (%EE) + 0.4475 (%CF)

TDN of energy feed (%DM) = 40.2625 + 0.1969 (%CP) + 0.4228 (%NFE) + 1.1 (%EE) – 0.1379 (%CF)

TDN of protein supplement (%DM) = 40.3227 + 0.5398 (%CP) + 0.4448 (%NFE) + 1.4218 (%EE) – 0.7007 (%CF)

4.4 แผนการทดลอง

การทดลองนี้เป็นการศึกษา 2 ปัจจัยโดยมีปัจจัยแรกเป็นระดับพลังงาน ส่วนปัจจัยที่สอง เป็นระดับโปรตีน แต่ละปัจจัยมี 2 ระดับคือ 1.0 และ 1.2 เท่าของ NRC แผนการทดลองเป็นแบบ 2x2 Factorial arrangement in 4x4 latin square and covariance ทำการทดลองทั้งหมด 4 คาบ ๆ ละ 20 วัน รวม 80 วัน โดยทำการหมุนเวียนให้โคทุกตัวได้รับโภชนะครบทั้ง 4 ระดับ ทำการคำนวณสูตรอาหารใหม่ทุกคาบตามปริมาณการให้นม เปอร์เซ็นต์ไขมันนม และน้ำหนักตัวของโคแต่ละตัว นอกจากนี้ยังปรับให้เกิดความยุติธรรมด้วยตัวแปรร่วม อาทิเช่น จำนวนวันให้นม (day in milk), ครั้งของการให้นม (lactation) และอายุ (age) เป็นต้น

แผนการทดลองแบบ 2X2 Factorial arrangement in 4x4 Latin square

	ตัวที่ 1	ตัวที่2	ตัวที่3	ตัวที่4
ระยะทดลองที่ 1	T1	T4	T3	T2
ระยะทดลองที่ 2	T2	T1	T4	T3
ระยะทดลองที่ 3	T3	T2	T1	T4
ระยะทดลองที่ 4	T4	T3	T2	T1

4.5 วิธีการศึกษา

ให้โคนมแต่ละตัวได้รับอาหารแต่ละสูตรตามแผนการทดลอง หมุนเวียนสลับกันในแต่ละคาบ จนครบ 4 คาบ ให้โคทุกได้รับอาหารวันละ 2 เวลา คือ 07:00 น. และ 16:00 น. เนื่องจากในการทดลองครั้งนี้ จำเป็นต้องทราบปริมาณอาหารแต่ละประเภทที่โคกินได้ เพื่อให้สามารถคำนวณปริมาณโภชนะที่โคได้รับอย่างถูกต้อง ดังนั้นจึงต้องแยกอาหารแห้ง และอาหารเปียกออกจากกัน เพื่อให้สะดวกในการบันทึกปริมาณอาหารเหลือ (ถ้ามี) ด้วยเหตุนี้จึงชั่งอาหารข้นผสมกับหญ้าแห้งให้กินก่อน แล้วจึงให้หญ้ารูซี่หมัก ทำการรีดนมด้วยเครื่องวันละ 2 เวลาเช่นกัน คือ 06:00 น. และ 15:30 น. แต่ละคาบใช้เวลา 20 วันโดย 5 วันแรกเป็นการปรับตัวสัตว์ให้คุ้นเคยกับสูตรอาหาร ส่วน 15 วันหลังเป็นช่วงของการบันทึกปริมาณน้ำนม และปริมาณอาหารที่กินได้ ทำการสุ่มตัวอย่างหญ้ารูซี่หมักทุกวันมาแช่แข็งสะสมไว้เพื่อรอการวิเคราะห์ทางเคมี สำหรับการหาวัตถุแห้งของหญ้ารูซี่หมักกระทำทุกวัน ส่วนวัตถุดิบอื่นๆ เช่น ข้าวโพดบด, กากถั่วเหลือง, เมล็ดฝ้าย และหญ้าแห้งนั้นทำการสุ่มวิเคราะห์คาบละ 3 ครั้ง จากนั้นนำตัวอย่างแต่ละวันมาผสมรวมกัน แล้วบดผ่านตะแกรงขนาด 1 มิลลิเมตรเพื่อวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีต่อไป นอกจากนี้ได้สุ่มตัวอย่างน้ำนมคาบละ 3 ครั้ง ในวันที่ 1, 7 และ 15 ของช่วงการบันทึกข้อมูล โดยสุ่มตอนเช้าและตอนเย็นในอัตรา 1%ของปริมาณน้ำนม (ภาพ 3.4) นำมารวมกัน ใส่ sodium azide ในอัตรา 0.1% เพื่อรักษาสภาพน้ำนม เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีต่อไป

4.6 การวิเคราะห์ทางเคมี

1. วิเคราะห์หา pH, ปริมาณกรดอินทรีย์ และแอมโมเนียไนโตรเจนของหญ้ารูซี่หมัก เช่นเดียวกันกับการทดลองที่ 1

2 นำตัวอย่างหญ้ารูซี่หมักภายหลังจากการอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสแล้ว และวัตถุดิบอื่น ๆ เช่นข้าวโพดบด กากถั่วเหลือง หญ้าแห้ง และเมล็ดฝ้าย มาบดผ่านตะแกรง 1 มิลลิเมตรเพื่อวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีเช่นเดียวกันกับการทดลองที่ 1

3. วิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำนม เช่น EE, CP, solid not fat, total solid และ lactose โดยใช้เครื่อง Milkoscan 133 V 3.9 GB ดังภาพ 3.5

4. วิเคราะห์หาปริมาณยูเรียไนโตรเจนในน้ำนม (Milk Urea Nitrogen, MUN) ด้วยวิธีของ Roseler *et al.* (1993) ดังภาพ 3.6 รายละเอียดแสดงไว้ในภาคผนวก 5

4.7 วิเคราะห์ผลทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Least Significant Difference Test (LSD) ระหว่างปัจจัยพลังงานและโปรตีน ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS 10.0.1 นอกจากนี้ยังนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวนตามการศึกษาแบบปัจจัยเดียวคือพลังงานร่วมกับโปรตีนจำนวน 4 กลุ่ม ภายใต้แผนการทดลองและการวิเคราะห์ความแตกต่างเช่นเดียวกับการศึกษา 2 ปัจจัย

สถานที่ทำการวิจัย

1. ห้องปฏิบัติการภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
2. ห้องปฏิบัติการศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์เชียงใหม่ ต. ยุหว่า อ. สันป่าตอง จ. เชียงใหม่
3. คอกสัตว์ทดลองของศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์เชียงใหม่ ต. ยุหว่า อ. สันป่าตอง จ. เชียงใหม่

ระยะเวลาในการทดลอง

ดำเนินการวิจัยระหว่างเดือนสิงหาคม 2542 ถึง เมษายน 2544 รวมเวลาประมาณ 21 เดือน

ภาพ 3.1 การกลั่นกรดอินทรีย์ระเหยได้

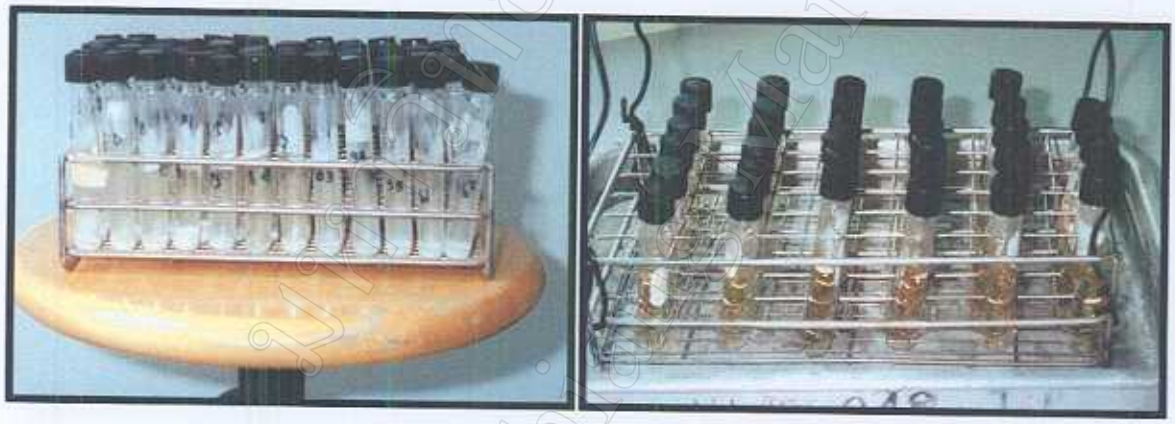
ภาพ 3.3 การหาการย่อยได้ในตัวสัตว์ (*in vivo*)

ภาพ 3.2 การพ่นกากน้ำตาล การตัดในแปลงหญ้ารูซี่ และการไล่อากาศในหลุมด้วยเครื่องจักรกล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ภาพ 3.4 การสุ่มตัวอย่างน้ำนม

ภาพ 3.5 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีนม ด้วยเครื่อง Milkoscan 133 V 3.9 GB



ภาพ 3.6 การวิเคราะห์หาปริมาณยูเรียไนโตรเจนในน้ำนม (Milk Urea Nitrogen, MUN)