บทที่ 3

อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

3.1 สารเคมี และอุปกรณ์

3.1.1 สารเคมี

ชื่อสารเคมี	เกรด	ยี่ห้อผลิตภัณฑ์
2 – Ethoxyethanol (Ethylene glycol monoethyl ether)	purified grade	Merk
2 - Ethylbutyric acid	analytical reagent	Merk
Acetone	analytical reagent	Merk
Alcohol	analytical reagent	J. T. Baker
Boric acid (H_3BO_4)	analytical reagent	Merk
Bromcresol green	analytical reagent	Merk
Bromothymal blue indicator	analytical reagent	Merk
Cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB)	technical grade	Merk
Copper sulphate ($CuSO_4$)	analytical reagent	Merk
Disodium ethylene diamine – tetra acetate (EDTA)	analytical reagent	Merk
Distilled water	deionized water	-
Hydrochloric acid (HCl)	analytical reagent	BDH
Hydrogen peroxide (H_2O_2)	medical extra grade 35%	Merk
Kieselgur	analytical reagent	Merk
Methyl red indicator	analytical reagent	BDH
Phosphoric acid (H_3PO_4)	analytical reagent	BDH
Potassium carbonate (K_2CO_3)	analytical reagent	Merk
Potassium hydroxide (KOH)	analytical reagent	Merk

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ชื่อสารเคมี	เกรด	ยี่ห้อผลิตภัณฑ์
Potassium sulphate (K_2SO_4)	analytical reagent	Merk
Pumice stone	analytical reagent	BDH
Sodium borate decahydrate ($Na_2B_4O_710H_2O$)	analytical reagent	Merk
Sodium hydroxide (NaOH)	analytical reagent	Merk
Sodium louryl sulphate	analytical reagent	Merk
Sulphuric acid (H_2SO_4)	analytical reagent	BDH
Tashiro indicator	analytical reagent	Riedel. De Haen
Titanium oxide (TiO_2)	analytical reagent	Riedel. De Haen

3.1.2 อุปกรณ์ และเครื่องมือ

ชื่ออุปกรณ์ และเครื่องมือ	รุ่น/โมเดล	บริษัท
Gas Chromatograph	GC – 14B	SHIMADZU
กระดาษกรอง	No. 40	Whatman®
กระดาษฟอยส์	DIAMOND®	RMC
กระบอกตวง 100 มล. (cylinder)	-	Witeg
ขวดก้นกลม (round bottom flask)	-	SCHOTT DURAN
ขวดกรองรูปชมพู่ 1000 มล. (suction flask)	No. 27060	Kimax
ขวดชมพู่ 250 มล. (erlenmeyer flask)	No. 26500	Kimax
เครื่องกลั่นโปรตีน	315	Buchi
เครื่องชั่งไฟฟ้า (ทศนิยม 3 ตำแหน่ง)	P 163	Mettler
เครื่องดูดสูญญากาศ (suction)	VDE 0530	W.Krannich
เครื่องไทเทรต	NW 25 mm	BRAND
เครื่องบดตัวอย่างอาหาร	4	Thomass-willey
เครื่องย่อยโปรตีน	12	Buchi
เครื่องย่อยเยื่อใย	-	LAB CON CO®
เครื่องสกัดไขมัน	EV 1	Gerhardt
ซอคเลท (soxhlet)	Ex 5/55	Quickfit

ชื่ออุปกรณ์และเครื่องมือ	รุ่น/โมเดล	บริษัท
ไซริงค์ 10 มล.	-	NIPRO®
ตู้อบ 100 °C (oven)	TV 30 U	Memmert
เตาเผา 550 °C (muffle furnace)	Mr 260E	Heraeus Hanau
ถ้วยกระเบื้องเคลือบ	109	Haldenwanger
ถ้วยกระเบื้องเคลือบ (porcelin crucible)	101 - 5	HCT
โถดูดความชื้น	GL 32	Glasswerk Werthein
ทิมเบิล (thimble)	No. 2800258	Whatman
บีกเกอร์ 600 มล.	-	PYREX
บุชเนอร์ฟันเนล (buchner funnel)	127 – 2a	Haldenwanger
หม้อปรับความดัน (autoclave)	No. 1925x	AllAMERICAN
หลอดย่อยโปรตีน (digestion tube)	-	Buchi

3.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี (Chemical composition analysis)

ศึกษาองค์ประกอบทางเคมี และคุณค่าทางโภชนะของกากซอสถั่วเหลือง และอาหารทดลองที่ผสมกากซอสถั่วเหลืองทั้ง 4 ระดับคือ 0 10 20 และ 30 เปอร์เซ็นต์ ระดับโปรตีนหยาบ (crude protein, CP) 16 เปอร์เซ็นต์ (ร้อยละของวัตถุแห้ง)

3.2.1 **วิธีวิเคราะห์แบบ Proximate** analysis นำตัวอย่างแห้งบดผ่านตะแกรงขนาด 1 มิลลิเมตร วิเคราะห์หาวัตถุแห้ง (dry matter, DM), โปรตีน (crude protein, CP), ไขมัน (ether extract, EE), เยื่อใยหยาบ (crude fiber, CF) และเถ้า (ash) (A.O.A.C., 2000)

3.2.2 **วิธีวิเคราะห์แบบ Detergent method** สำหรับการวิเคราะห์องค์ประกอบโครงสร้างของพืชได้แก่ เยื่อใยที่ละลายในด่าง (neutral detergent fiber, NDF), และเยื่อใยที่ละลายในกรด (acid detergent fiber, ADF) (Van Soest, 1982)

ส่วนประกอบของอาหารทดลองที่ผสมกากซอสถั่วเหลืองทั้ง 4 ระดับ ดังแสดงในตารางที่ 1 วัตถุดิบหลักที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือ ข้าวโพดบด มันเส้น กากถั่วเหลือง โดยให้กากซอสถั่วเหลืองเป็นแหล่งโปรตีนหยาบทดแทนกากถั่วเหลืองในสูตรอาหารระดับต่างๆ

ตาราง 1 ส่วนประกอบของวัตถุดิบ ต้นทุนต่อกิโลกรัม และร้อยละของโปรตีน จากการคำนวณของอาหารทดลองที่ผสมกากซอสถั่วเหลืองทั้ง 4 ระดับ

		Control	SSR 10%	SSR 20%	SSR30%
Corn	%	20.00	20.00	20.00	20.00
Cassava	%	47.89	43.20	38.01	32.83
Soybean meal	%	29.61	25.30	20.49	15.68
Soy sauce residue	%	0.00	10.00	20.00	30.00
Dicalcium-P	%	1.00	1.00	1.00	1.00
Salt	%	1.00	-	-	-
Premix	%	0.50	0.50	0.50	0.50
Price	฿/kg	6.15	5.59	5.00	4.40
CP	%	16.00	16.00	16.00	16.00

3.3 การศึกษาการสลายตัวของโภชนะภายในกระเพาะรูเมนโดยวิธีใช้ถุงไนล่อน (*In situ/In sacco* rumen degradability techniques)

ศึกษาการสลายตัวของกากซอสถั่วเหลือง และอาหารทดลองที่ผสมกากซอสถั่วเหลืองทั้ง 4 ระดับภายในกระเพาะหมักของโคนมด้วยวิธีการ *In situ / In sacco* techniques โดยการใช้ถุงไนล่อนตามวิธีการของ Ørskov and McDonald (1979)

3.3.1 วิธีการทดลอง

เตรียมตัวอย่างอาหารทดลองโดยบดผ่านตะแกรงขนาด 2 มิลลิเมตร ใช้ถุงไนล่อนที่มีขนาดรู (pore size) 40-60 ไมครอน (μm) และมีขนาดถุง 70×150 มิลลิเมตร ก่อนบรรจุตัวอย่างอาหารทดลองอบถุงไนล่อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งบันทึกน้ำหนักถุง (W_2) ชั่งตัวอย่างประมาณ 3 กรัม (W_1) ใส่ถุงไนล่อนมัดติดกับท่อยางที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1 เซนติเมตร ขนาดความยาวประมาณ 40 เซนติเมตร แล้วนำไปแช่ (incubate) ในกระเพาะรูเมนของโค ตามวิธีการ complete exchange method (เอกสิทธิ์, 2541) ที่ชั่วโมงต่างๆ คือ 0 2 4 8 16 24 36 และ 48 ชั่วโมง สำหรับถุงไนล่อนที่ 0 ชั่วโมง (washing loss) นั้นให้นำไปแช่น้ำอุ่นอุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส ประมาณ 30 นาที เมื่อครบกำหนดเวลานำถุงไนล่อนที่มี

ตัวอย่างออกจากกระเพาะรูเมนไปล้างในภาชนะที่มีน้ำไหลตลอดเวลาเพื่อชะเอาเศษอาหารที่ติดบริเวณภายนอกถุงออกให้หมด จากนั้นนำถุงไนล่อนที่มีตัวอย่างอาหารทั้งหมดไปล้างในเครื่องซักผ้าแกนนอนประมาณ 15 นาที และอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมงหรือจนน้ำหนักคงที่ และนำมาใส่โถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักที่ถุง และตัวอย่างที่เหลือ (W_3) โภชนะที่เหลือเป็นส่วนที่ไม่ย่อยสลาย (undegradation material) โภชนะส่วนที่หายไปเป็นส่วนที่ย่อยสลาย (degradation material) นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของวัตถุแห้ง และโปรตีนที่สลายตัว (% dry matter/crude protein disappearance) จากสมการ

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

เมื่อ W_1 =น้ำหนักตัวอย่างอาหารเริ่มต้น (กรัม)

W_2 =น้ำหนักถุง (กรัม)

W_3 =น้ำหนักถุงรวมกับน้ำหนักตัวอย่างอาหารหลังอบ (กรัม)

นำค่าเปอร์เซ็นต์ DM และ CP disappearance ที่ชั่วโมงบ่มต่างๆ ไปเข้าสมการที่เสนอโดย Ørskov and McDonald (1979) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป NEWAY

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

เมื่อ P = การย่อยสลายของโภชนะที่เวลา t (degration at t time)

a = ส่วนที่ละลายได้ทันที (immediately soluble material)

b = ส่วนที่ไม่ละลายแต่สามารถหมักย่อยได้ (insoluble but potentially fermentable material)

l = ระยะเวลาที่รอให้จุลินทรีย์เข้าสัมผัสอาหาร และทำการย่อยสลาย (lag phase)

e = log ฐาน 10

c = อัตราการย่อยสลาย (degradation rate)

t = ช่วงระยะเวลาต่างๆ

นำค่าพารามิเตอร์ A (Washing loss), B (a+b) และ c ที่คำนวณได้จากโปรแกรมมาทำนายค่าปริมาณวัตถุแห้งที่สัตว์กินได้ (dry matter intake, DMI) ปริมาณวัตถุแห้งย่อยได้ที่สัตว์ได้รับ

(digestible dry matter intake, DDMI) อัตราการเจริญเติบโตของสัตว์ (growth rate) และค่าดัชนีบ่งชี้ (index value) ตามสมการที่เสนอโดย Shem *et al.* (1995)

DMI (kg/day) = - 8.286 + 0.266A + 0.102B + 17.696c (r = 0.90)

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

Growth rate (g/day) = - 0.649 + 0.017A + 0.006B + 3.870c (r = 0.93)

Index value = A + 0.38B + 66.5c

3.3.2 สัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลองที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้คือโคนมระยะแห้งนม และไม่ให้ผลผลิต ลูกผสมพันธุ์พื้นเมือง × โฮลสไตน์ฟรีเซี่ยน เพศเมีย อายุ 4-7 ปี จำนวน 4 ตัว น้ำหนักตัว 380 ± 74 กิโลกรัม โคนมทุกตัวได้รับการผ่าตัดสำหรับใส่ท่อ บริเวณกระเพาะรูเมน (rumen fistula) (ทัศนีย์ และเทอดชัย, 2530) โคนมทุกตัวได้อยู่ในคอกทดลอง ผูกยืนโรงมีที่ให้น้ำแบบอัตโนมัติ และอาหารแยกเฉพาะตัว ได้รับอาหารวันละ 2 ครั้ง คือ 06.00 น. และ 18.00 น.

3.3.3 การวิเคราะห์ทางสถิติ

การศึกษาการสลายตัวของโภชนะภายในกระเพาะรูเมนโดยวิธีใช้ถุงไนล่อนของกากซอสถั่วเหลือง และอาหารทดลองใช้วิธีวิเคราะห์วาเรียนซ์ (analysis of variance, ANOVA) ตามแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design, CRD) และเปรียบเทียบความแตกต่างด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (Steel and Torrie, 1984) โดยการใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SAS Version 6.0 (SAS Institute, 1985)

3.4 การประเมินค่าการย่อยได้ และพลังงานโดยวิธีวัดปริมาณแก๊สที่เกิดขึ้น (Gas production technique)

ค่าการย่อยได้ของโภชนะในตัวสัตว์ มีความสัมพันธ์กับปริมาณแก๊สที่เกิดขึ้น ได้แก่ กรดไขมันระเหยได้ (volatile fatty acid, VFA) แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) และแก๊สมีเทน (CH_4) ซึ่งจะเกิดภายหลังเกิดกระบวนการหมักภายในกระเพาะรูเมนของโคนม จึงได้นำหลักการนี้มาประยุกต์ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ตามวิธีของ Menke and Steingass (1988)

3.4.1 วิธีการทดลอง

เก็บน้ำจากกระเพาะรูเมน (rumen fluid) ก่อนให้สัตว์กินอาหารมาผสมกับสารละลาย medium ที่เตรียมไว้ ดังตาราง 2 จากนั้นใช้ปีเปตอัตโนมัติปั๊มสารละลาย rumen liquor buffer ดังกล่าว 30 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดแบบพิเศษคล้ายเข็มฉีดยา (syringe) ขนาดใหญ่ ความจุ 100 มิลลิลิตร ที่ปลายหลอดมีสายยางสั้น ๆ และคลิ้ปสำหรับปิดเปิดได้ ภายในหลอดมีตัวอย่างอาหารที่ต้องการทดสอบซึ่งบดผ่านตะแกรงขนาด 1 มิลลิเมตร ประมาณ 220 มิลลิกรัม นำไปบ่ม (incubate) ในอ่างน้ำที่มีอุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส ซึ่งประกอบด้วยแกนหมุนเพื่อให้ตัวอย่างเคลื่อนไหวอยู่ตลอดเวลา เพื่อจำลองสภาพภายในกระเพาะรูเมน อ่านค่าแก๊สที่เกิดขึ้นในช่วงเวลา 2 4 6 8 12 และ 24 ชั่วโมง บันทึกปริมาณแก๊สที่เกิดขึ้น และนำไปคำนวณโดยใช้สมการคำนวณอัตราการสลายตัวเช่นเดียวกับวิธีการใช้ถุงไนล่อน สำหรับค่าแก๊สสุทธิที่ 24 ชั่วโมง คำนวณได้จากสมการที่เสนอโดย Menke and Steingass (1988) ดังนี้คือ

$$GP(ml/200mgDM,\ 24\ hr) = \frac{\left[\left(V_{24} - V_0 - GP_0\right) \times 200 \times \left(FH + FC\right)/2\right]}{W}$$

เมื่อ GP = ปริมาณแก๊ส (มิลลิลิตร) ที่เกิดขึ้นเมื่อ incubate 24 ชม.

V_{24} = ปริมาณแก๊สเมื่อ incubate ได้ 24 ชั่วโมง

V_0 = ปริมาตรส่วนผสมทั้งหมดที่อ่านก่อน incubate

GP_0 = ค่าเฉลี่ยของแก๊สที่เกิดในหลอด blank ที่ 24 ชม.

FH = 44.43 / (GP_h-GP_0) ค่าปรับอาหารหยาบ

FC = 65.18 / (GP_c-GP_0) ค่าปรับอาหารข้น

W = น้ำหนักตัวอย่าง (มิลลิกรัมวัตถุแห้ง)

ตาราง 2 ส่วนประกอบของ Rumen liquor buffer ที่ใช้ในการศึกษาด้วยวิธีการวัดแก๊ส

สารเคมี	ปริมาตร (มิลลิลิตร) ต่อ 1 หลอด
น้ำกลั่น	10.0
Buffer solution	5.0
Macro mineral solution	5.0
Resazurin solution	0.025
Micro mineral solution	0.0025
Reduction solution	1.0
Rumen fluid	10.0

ปริมาณแก๊สสุทธิที่อ่านได้ ณ ชั่วโมงต่าง ๆ นำไปเข้าสมการเพื่อคำนวณอัตราการเกิดแก๊ส เช่นเดียวกับการทดลองโดยใช้เทคนิคถุงไนล่อน นำค่าพารามิเตอร์ที่ได้ (A, B และ c) มาแทนค่าในสมการที่เสนอโดย Shem *et al.* (1995) เพื่อประเมินค่าปริมาณวัตถุแห้งที่สัตว์กินได้ (dry matter intake, DMI) ปริมาณวัตถุแห้งย่อยได้ที่สัตว์ได้รับ (digestible dry matter intake, DDMI) อัตราการเจริญเติบโตของสัตว์ (growth rate) Menke and Steingass (1988) ได้เสนอสมการเพื่อทำนายค่าการย่อยได้ของอินทรียวัตถุ (organic matter digestibility, OMD) พลังงานใช้ประโยชน์ (metabolizable energy, ME) และพลังงานสุทธิเพื่อการให้นม (net energy of lactation, NE_L) ดังนี้คือ

$$OMD\ (\%) = 9.00+0.9991GP+0.0595XP+0.0181XA \qquad (r = 0.91)$$

$$ME\ (MJ/kg) = 1.06+0.157GP+0.0084XP+0.022XL-0.0081XA \qquad (r = 0.94)$$

$$NE_L\ (MJ/kg) = -0.36+0.1149GP+0.0054XP+0.0139XL-0.0054XA \qquad (r = 0.93)$$

เมื่อ GP =ปริมาณแก๊ส (มิลลิลิตร) ที่เกิดเมื่อ incubated 24 ชม.

XP = ปริมาณโปรตีน (g/kg DM)

XL = ปริมาณลิกนิน (g/kg DM)

XA = ปริมาณเถ้า (g/kg DM)

3.4.2 สัตว์ทดลอง

สำหรับสัตว์ทดลองที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้คือ โคนมระยะแห้งนม และไม่ให้ผลผลิต ลูกผสมพันธุ์พื้นเมือง × โฮลสไตน์ฟรีเชี่ยน เพศเมีย อายุ 4-7 ปี จำนวน 4 ตัว น้ำหนักตัว 380±74 กิโลกรัม โคนมทุกตัวได้รับการผ่าตัดสำหรับใส่ท่อ บริเวณกระเพาะรูเมน (rumen fistula) (ทัศนีย์ และเทอดชัย, 2530) โคนมทุกตัวได้อยู่ในคอกทดลอง ผูกยืนโรงมีที่ให้น้ำแบบอัตโนมัติ และอาหารแยกเฉพาะตัว ได้รับอาหารวันละ 2 ครั้ง คือ 06.00 น. และ 18.00 น.

3.4.3 การวิเคราะห์ทางสถิติ

การประเมินค่าพลังงานและการย่อยได้โดยวิธีวัดปริมาณแก๊สของกากซอสถั่วเหลือง และอาหารทดลองใช้วิธีวิเคราะห์วาเรียนซ์ (analysis of variance, ANOVA) ตามแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design, CRD) และเปรียบเทียบความแตกต่างด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (Steel and Torrie, 1984) โดยโปรแกรมสำเร็จรูป SAS Version 6.0 (SAS Institute, 1985)

3.5 การศึกษาการย่อยได้ในตัวสัตว์ (*In vivo* digestibility)

การหาค่าการย่อยได้ของโภชนะของโคนมที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือ วิธีการหาค่าการย่อยได้แบบดั้งเดิม (conventional method) และการหาค่าการย่อยได้โดยตัวสัตว์ภายในลำไส้เล็กด้วยวิธีการใช้สารบ่งชี้ (indicator method) ดังมีวิธีการดังนี้

3.5.1 การหาค่าการย่อยได้วิธีดั้งเดิม (Conventional method)

ให้โคทดลองได้รับอาหารที่ผสมกากซอสถั่วเหลืองทั้ง 4 ระดับร่วมกับอาหารหยาบ คือหญ้ารูซี่แห้ง อัตราส่วนอาหารข้นต่ออาหารหยาบ (concentrates : roughages ratio) เท่ากับ 40 : 60 เมื่อคิดเป็นร้อยละของวัตถุแห้ง ในแต่ละคาบของการทดลอง (period) ใช้เวลาทั้งหมด 25 วัน โดย 21 วันแรกเพื่อให้โคทดลอง และจุลินทรีย์ภายในกระเพาะหมักได้ปรับตัวให้เข้ากับอาหารทดลองที่ได้รับ (preliminary period) และ 4 วันสุดท้ายสำหรับเก็บข้อมูล (collection period) บันทึกปริมาณอาหารที่กินและมูลที่ขับออกมา สุ่มเก็บตัวอย่างอาหารและมูล (5 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักสด) เพื่อเก็บไว้วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี นำค่าที่ได้จากการวิเคราะห์มาคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์การย่อยได้ปรากฏจากสมการ (บุญล้อม, 2540)

$$\text{สัมประสิทธิ์การย่อยได้ (\%)} = \frac{\text{โภชนะที่กิน} - \text{โภชนะที่ขับออก}}{\text{โภชนะที่กิน}} \times 100$$

ประเมินค่าโภชนะย่อยได้รวม (Total Digestible Nutrient, TDN) จากสมการ

$$TDN = DCP + DNDF + DNFC + 2.25 \times DEE$$

เมื่อ DCP =โปรตีนที่ย่อยได้

DNDF = เยื่อใยที่ละลายในด่างที่ย่อยได้

DNFC = คาร์โบไฮเดรตที่ไม่ใช่เยื่อใยที่ย่อยได้

DEE =ไขมันที่ย่อยได้

คำนวณค่าพลังงานรวม (gross energy, GE) พลังงานใช้ประโยชน์ (metabolizable energy, ME) และพลังสุทธิเพื่อการให้นม (net energy for lactation, NE_l) จากสมการที่เสนอโดย Kellner *et al.* (1984)

GE(MJ/kg) = 0.242CP + 0.0366EE + 0.0209CF + 0.0170NFE

ME(MJ/kg) = 0.0152DCP + 0.0342DEE + 0.0128DCF + 0.0159DNFE

NE_L(MJ/kg) =0.4632 + 0.0024q x ME

เมื่อ DNFE =ไนโตรเจนฟรีเอ็กซ์แทรกที่ย่อยได้

q = (ME/GE) x 100

3.5.2 การหาค่าการย่อยได้วิธีการใช้สารบ่งชี้ (Indicator method)

ในการศึกษาการย่อยได้จริงภายในลำไส้เล็กของโคนม ไม่สามารถวัดปริมาณอาหารที่เดินทางผ่านทางเดินอาหารบริเวณดังกล่าวได้อย่างชัดเจน ดังนั้นการใช้สารบ่งชี้ (marker) เพื่อเป็นค่าดัชนีวัดปริมาณอาหารที่เดินทางผ่านลำไส้เล็กน่าจะเป็นวิธีการที่เหมาะสม ในการทดลองจะใช้ไททาเนียมออกไซด์ (TiO_2) เป็นสารบ่งชี้

3.5.2.1 วิธีการทดลอง

การวัดค่าการย่อยได้ด้วยวิธีการใช้สารบ่งชี้จะดำเนินการต่อเนื่องภายหลังเสร็จกระบวนการเก็บตัวอย่างเพื่อหาค่าย่อยได้ปรากฏ โดยการเก็บตัวอย่างจากลำไส้เล็กส่วนต้นและส่วนปลายที่ได้สอดท่อรูปตัวที (T-shaped cannula) เก็บตัวอย่างเป็นระยะเวลา 4 วัน เพื่อให้ได้ตัวแทนของตัวอย่างทั้ง 24 ชั่วโมงโดยมีตารางเวลาเก็บตัวอย่างดังที่ได้แสดงไว้ในตาราง 3

ตาราง 3 ช่วงเวลาเก็บตัวอย่างจากลำไส้เล็กของการทดลองหาค่าการย่อยได้โดยวิธีใช้สารบ่งชี้

วัน	ช่วงเวลา (น.)					
1	06.00	10.00	14.00	18.00	22.00	02.00
2	07.00	11.00	15.00	19.00	23.00	03.00
3	08.00	12.00	16.00	20.00	24.00	04.00
4	09.00	13.00	17.00	21.00	01.00	05.00

ตัวอย่างที่เก็บในแต่ละครั้งให้ได้ปริมาณ 200-250 มิลลิลิตร หรือใช้เวลาในการเก็บประมาณ 45 นาทีต่อครั้ง และนำตัวอย่างมารวมกัน เก็บไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส (freezer) เพื่อรอการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและหาค่าความเข้มข้นของสารบ่งชี้ในตัวอย่างต่อไป นำค่าที่ได้จากการวิเคราะห์มาเข้าสมการเพื่อหาค่าการย่อยได้ (เทอดชัย, 2540) ดังนี้

$$\text{สัมประสิทธิ์การย่อยได้ (\%)} = 100 - 100\left|\frac{\text{\%สารบ่งชี้ใน duodenum}}{\text{\%สารบ่งชี้ใน ileum}} \times \frac{\text{\%โภชนะใน ileum}}{\text{\%โภชนะใน duodenum}}\right|$$

3.5.3 การศึกษาสภาพภายในกระเพาะรูเมน

เก็บตัวอย่างของเหลวภายในกระเพาะรูเมน (rumen fluid) ที่เวลา 05.00 07.00 08.00 และ 09.00 น. นำไปปั่นเหวี่ยงใส (centrifuge) ที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที จากนั้นใช้ปิเปตขนาด 1 มิลลิลิตร ดูดเอาเฉพาะส่วนน้ำใสๆข้างบน (supernatant) เพื่อวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจนที่เกิดขึ้นในกระเพาะรูเมนตามวิธี Conway method (Voigt und Steger, 1967) และวัดปริมาณกรดไขมันระเหยได้ (volatile fatty acid, VFA) ที่เกิดขึ้นภายในกระเพาะรูเมนโดยใช้เครื่องมือ gas chromatography

3.5.4 สัตว์ทดลอง

สำหรับสัตว์ทดลองที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้คือ โคนมระยะแห้งนม และไม่ให้ผลผลิต ลูกผสมพันธุ์พื้นเมือง × โฮลสไตน์ฟรีเชี่ยน เพศเมีย อายุ 4-7 ปี จำนวน 4 ตัว น้ำหนักตัว 380±74 กิโลกรัม โคนมทุกตัวได้รับการผ่าตัดสำหรับใส่ท่อ บริเวณกระเพาะรูเมน (rumen fistula) (ทัศนีย์ และเทอดชัย, 2530) และบริเวณลำไส้เล็กส่วนต้น และส่วนปลายของลำไส้เล็ก (proximal duodenum และ terminal ileum cannula) (ทัศนีย์ และเทอดชัย, 2532) โคนมทุกตัวได้อยู่ในคอกทดลอง ผูกยืนโรงมีที่ให้น้ำแบบอัตโนมัติ และอาหารแยกเฉพาะตัว ได้รับอาหารวันละ 2 ครั้ง คือ 06.00 น. และ 18.00 น.

3.5.5 การวิเคราะห์สถิติ

การศึกษาการย่อยได้ในตัวสัตว์ของอาหารทดลองใช้วิธีวิเคราะห์วาเรียนซ์ (analysis of variance, ANOVA) ตามแผนการทดลองแบบจัตุรัสละติน (Latin Square Design, LSD) และเปรียบเทียบความแตกต่างด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (Steel and Torrie, 1984) โดยการใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SAS Version 6.0 (SAS Institute, 1985)

3.6 สถานที่ทำการทดลอง

1. ห้องปฏิบัติการอาหารสัตว์ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
2. ห้องปฏิบัติการกลาง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
3. ฟาร์มทดลองหมวดโคนม สถานีวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรแม่เหียะ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

3.7 ระยะเวลาในการดำเนินงานทดลอง

ใช้เวลาในการทดลอง 12 เดือน ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2544–กันยายน 2545

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University