บทที่ 3

อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

3.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี (chemical composition analysis)

ศึกษาองค์ประกอบทางเคมี และคุณค่าทางโภชนะของเปลือกเมล็ดถั่วเหลืองและอาหารทดลองที่ผสมเปลือกเมล็ดถั่วเหลืองทั้ง 4 ระดับ โดยคือ 0, 20, 40 และ 60 เปอร์เซ็นต์ ระดับโปรตีนรวม (CP) 16 เปอร์เซ็นต์ (ร้อยละของวัตถุแห้ง)

- วิธีวิเคราะห์แบบ proximate analysis สำหรับการวิเคราะห์โภชนะซึ่งประกอบด้วยปริมาณวัตถุแห้ง (dry matter) อินทรียวัตถุ (organic matter) โปรตีนรวม (crude protein) ไขมัน (ether extract) และเถ้า (ash) ด้วยวิธี proximate analysis (AOAC., 2000)

- วิธีวิเคราะห์แบบ detergent method สำหรับการวิเคราะห์องค์ประกอบที่เป็นโครงสร้างของพืชได้แก่ เยื่อใยที่ละลายได้ในด่าง (neutral detergent fiber) เยื่อใยที่ละลายได้ในกรด (acid detergent fiber) และลิกนิน (acid detergent lignin) (Van Soest, 1982)

ส่วนประกอบของอาหารทดลองที่ผสมเปลือกเมล็ดถั่วเหลืองทั้ง 4 ระดับ แสดงไว้ในตาราง 6 วัตถุดิบหลักที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือ ข้าวโพดบด มันเส้น กากถั่วเหลือง และเปลือกเมล็ดถั่วเหลืองซึ่งเป็นแหล่งพลังงานทดแทนข้าวโพดในสูตรอาหาร

ภาพ 6: เปลือกเมล็ดถั่วเหลือง (soybean hulls)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 6: ส่วนประกอบของวัตถุดิบ ต้นทุนต่อกิโลกรัม ร้อยละของโปรตีนรวม (% CP) จากการคำนวณของอาหารทดลองที่ผสมเปลือกเมล็ดถั่วเหลืองทั้ง 4 ระดับ

		Treatment 1	Treatment 2	Treatment 3	Treatment 4
Corn	%	57.07	38.61	20.15	1.69
Casava	%	15	15	15	15
Soybean Meal	%	24.43	22.89	21.35	19.81
Soybean hulls	%	0	20	40	60
Dicalcium-P14	%	2	2	2	2
Salt	%	1	1	1	1
Premix	%	0.5	0.5	0.5	0.5
Price	฿/kg	6.22	5.65	5.09	4.52
CP	%	16.0	16.0	16.0	16.0

3.2 การศึกษาสลายตัวของโภชนะภายในกระเพาะหมักโดยวิธีใช้ถุงไนล่อน (*in situ/ in sacco*)

ประเมินค่าการสลายตัวของเปลือกเมล็ดถั่วเหลือง และอาหารทดลองที่ผสมเปลือกเมล็ดถั่วเหลืองทั้ง 4 ระดับ ภายในกระเพาะหมักของโคนมด้วยวิธีการ *in situ/in sacco* โดยใช้ถุงไนล่อน (Ørskov and McDonald, 1979) ดังนี้

3.2.1 วิธีการทดลอง

1. การเตรียมถุงไนล่อน

ถุงไนล่อนที่มีขนาดรู (pore size) 40-60 ไมครอน (μm) และขนาดถุง 70 x 150 มิลลิเมตร ก่อนบรรจุตัวอย่างอาหารทดลอง อบถุงไนล่อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เพื่อให้น้ำหนักคงที่ จากนั้นนำมาใส่ในโถดูดความชื้น รอจนเย็นแล้วนำมาชั่ง จดบันทึกน้ำหนักของแต่ละถุง (W_1)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2. การเตรียมตัวอย่างอาหารที่ใช้

นำตัวอย่างอาหารทดลองมาบดผ่านตะแกรงขนาด 2 มิลลิเมตร ชั่งตัวอย่าง 3 กรัม (W_2) นำถุงไนล่อนที่มีตัวอย่างมัดติดกับท่อยางที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1 เซนติเมตร ขนาดความยาว 30 เซนติเมตร แล้วนำไปบ่มในกระเพาะหมักของโคนมตามวิธีการ complete exchange method

(เอกสิทธิ์, 2541) ที่ชั่วโมงต่างๆ คือ 0, 2, 4, 8, 16, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง ตำแหน่งที่เหมาะสมของการใส่ถุงไนล่อนในกระเพาะหมักคือ 50 เซนติเมตร จากฝา cannula โดยให้อยู่ในส่วนล่างของกระเพาะหมัก (ventral sac of the rumen) เพราะเป็นตำแหน่งที่ถุงสามารถเคลื่อนที่ได้อย่างอิสระทั้งในส่วนที่เป็นของแข็ง (solid phase) และของเหลว (liquid phase)

3. การหาค่า washing loss

นำตัวอย่างที่เตรียมไว้ สำหรับ 0 ชั่วโมงคือไม่ต้องแช่ในกระเพาะหมัก นำไปแช่น้ำอุ่นอุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส ประมาณ 1 ชั่วโมงโดยทำในช่วงเวลาที่ใกล้เคียงกันกับการนำถุงไนล่อนทั้งหมดออกจากกระเพาะหมัก เพื่อนำไปล้างด้วยเครื่องซักผ้าพร้อมกัน ค่าของตัวอย่างที่สูญหายไปจากถุงไนล่อนชุดนี้ถือเป็น washing loss

4. การเตรียมตัวอย่างหลังจากนำออกจากกระเพาะหมัก

เมื่อนำถุงตัวอย่างออกจากกระเพาะหมักแล้ว ต้องรีบนำไปใส่ในกระติกน้ำแข็ง เพื่อลดอุณหภูมิเป็นการป้องกันกระบวนการหมักที่จะเกิดขึ้นนอกกระเพาะหมัก จากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำสะอาด เพื่อเอาเศษอาหารชิ้นใหญ่ออก จากนั้นนำถุงไนล่อนที่มีตัวอย่างอาหารทดลองทั้งหมดไปล้างด้วยเครื่องซักผ้าแกนนอนประมาณ 15 นาที แล้วจึงนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง และนำมาทิ้งในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักถุงไนล่อนที่เหลือ (W_3)

5. การคำนวณค่าการย่อยสลาย

นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณของวัตถุแห้ง โปรตีนรวมและอินทรียวัตถุที่สลายตัวในกระเพาะหมัก (% dry matter/crude protein/ organic matter disappearance) ตามสมการที่ (11)

$$\text{\% DM/CP/OM disappearance} = \frac{(W_1 + W_2) - W_3}{W_1} \times 100 \qquad (11)$$

เมื่อ W_1 = น้ำหนักถุง (กรัม)

W_2 = น้ำหนักตัวอย่างอาหารที่เริ่มต้น (กรัม)

W_3 = น้ำหนักถุง และอาหารตัวอย่างที่เหลือในถุงหลังอบ (กรัม)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

นำค่าเปอร์เซ็นต์ของวัตถุแห้ง โปรตีนและอินทรียวัตถุที่สลายตัวในกระเพาะหมักโคนมที่ชั่วโมงบ่มต่างๆ ไปเข้าสมการที่ (1) ที่เสนอโดย Ørskov and McDonald (1979) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป NEWAY

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

เมื่อ P = ค่าการย่อยสลายได้ที่ช่วงเวลาต่างกัน (%)

a = ส่วนที่ละลายได้ทันที (%)

b = ส่วนที่ไม่ละลายแต่สามารถเกิดการหมักย่อยได้ (%)

l = ระยะเวลาที่รอให้จุลินทรีย์เข้าสัมผัสอาหารและทำการย่อยสลาย (lag phase)

e = ค่าคงที่ของ $\log_{10}$

c = อัตราการย่อยสลายของ b

t = ช่วงระยะเวลาต่างๆ

นำค่าพารามิเตอร์ (A, B และ c) ที่คำนวณได้จากโปรแกรมมาทำนายค่าวัตถุแห้งที่กินได้ (dry matter intake, DMI) วัตถุแห้งย่อยได้ที่สัตว์ได้รับ (digestible dry matter intake, DDMI) และอัตราการเจริญเติบโต (growth rate) และค่าดัชนีบ่งชี้ (index value) ตามสมการที่ {2, 3, 4, 5} เสนอโดย Shem *et al*. (1995)

$$\text{DMI (kg/d)} = -8.286 + 0.266A + 0.102B + 17.696c \quad (2)$$

$$\text{DDMI (kg/d)} = -7.609 + 0.219A + 0.080B + 24.19c \quad (3)$$

$$\text{Growth rate} = -0.649 + 0.017A + 0.006B + 3.870c \quad (4)$$

$$\text{Index value} = A + 0.38B + 66.5c \quad (5)$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.2 สัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลองที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือ โคนมระยะแห้งนม (dry cow) และไม่ให้ผลผลิต ลูกผสมพันธุ์พื้นเมือง x โฮลสไตน์ฟรีเชี่ยน เพศเมีย อายุ 4-7 ปี จำนวน 4 ตัว น้ำหนัก 416 $\pm$ 54 กิโลกรัม ที่ได้รับการเปิดท่อทางเดินอาหารบริเวณกระเพาะหมักโดยการเจาะกระเพาะฝัง rumen

fistula บริเวณสวาปด้านซ้ายของโค (ทัศนีย์ และเทอดชัย, 2530) โดยโคทุกตัวได้อยู่ในคอกผูกยืน โรงที่ให้น้ำอัตโนมัติ และรางอาหารแยกเฉพาะตัว โคได้รับอาหารวันละ 2 ครั้ง คือ 6.00 น. และ 18.00 น. มีน้ำให้กินตลอดเวลา

3.2.3 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ผลการทดลองโดยวิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวน ตามแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (completely randomized design, CRD) และเปรียบเทียบความแตกต่างด้วยวิธี duncan's new multiple range test (Steel and Torrie, 1984) โดยการใช้โปรแกรม SAS (มนต์ชัย, 2537)

ภาพ 7: ถุงไนล่อนที่ใช้ในการศึกษาการสลายตัวของโภชนะในกระเพาะหมักโคนม

3.3 การประเมินค่าการย่อยได้และพลังงานโดยวิธีการวัดปริมาณแก๊สที่เกิดขึ้น (gas production technique)

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

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3.1 **อุปกรณ์และสารเคมี**

อุปกรณ์

1. ตู้อบ (oven) หรืออ่างน้ำร้อน (water bath) ที่สามารถปรับอุณหภูมิได้คงที่ 39 ± 0.5 องศาเซลเซียส และใหญ่พอที่จะติดตั้งเครื่องหมุน (rotator) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 50 เซนติเมตร ที่ได้เจาะรูไว้สำหรับหลอดใส่ตัวอย่างได้
2. จานหมุนหรือล้อหมุน (rotator) ประกอบด้วยจานกลมหรือล้อทำด้วยแผ่นพลาสติกแข็ง 2 จาน เส้นผ่าศูนย์กลาง 50 เซนติเมตร จานหรือล้อนี้เจาะรูไว้ 55-60 รู แต่ละรูมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 38 มิลลิเมตร เป็นช่องสำหรับเสียบหลอดตัวอย่างอาหาร (piston-pipettes) ที่ฐานหรือแกนจานมีสายพานติดมอเตอร์ไฟฟ้าให้จานหมุนได้ด้วยความเร็ว 1-2 รอบต่อนาที
3. หลอดตัวอย่างอาหาร (piston-pipettes หรือ glass syringes) มีเส้นผ่าศูนย์กลางภายนอก 36 มิลลิเมตร ภายใน 32 มิลลิเมตร ยาว 200 มิลลิเมตร และมีความจุ 150 มิลลิเมตร มีขีดบอกปริมาตรถึง 100 มิลลิเมตร อ่านได้ละเอียด 1 มิลลิเมตร (ลักษณะคล้ายหลอดฉีดยาขนาดใหญ่) ปลายหลอดติดกับสายยาง (silicone tube) เส้นผ่าศูนย์กลาง ภายใน 5 มิลลิเมตร ยาวประมาณ 40 มิลลิเมตร และมีคลิปหนีบพลาสติก ปิดเปิดให้แก๊สออกได้
4. อุปกรณ์สำหรับเก็บน้ำจากกระเพาะหมักของสัตว์ที่ได้เจาะกระเพาะไว้แล้ว ภาชนะสำหรับใส่น้ำจากกระเพาะหมัก ควรมีความจุประมาณ 1 ลิตร
5. อุปกรณ์ปลีกย่อยอื่นๆ เช่น
   - ปิเปตอัตโนมัติ ขนาด 50 มิลลิเมตร อ่านละเอียด 1 มิลลิเมตร ตั้งปริมาตรไว้ที่ 30 มิลลิเมตร
   - ขวดขนาดจุประมาณ 2-3 ลิตร
   - เครื่องกวนสารละลายระบบแม่เหล็ก (magnetic stirrer)
   - ถังแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์

สารเคมี

1. micromineral solution ประกอบด้วย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

13.2 g $CaCL_2$.$2H_2O$ + 10.0 g $MnCl_2$.$4H_2O$ + 1.0 g $CoCl_2$.$6H_2O$ + 8.0 g $FeCl_2$.$6H_2O$ ละลายทั้งหมดเข้าด้วยกันด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร

2. buffer solution ประกอบด้วย

   4 g NH_4HCO_3 + 35 g $NaHCO_3$ ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

3. macromineral solution ประกอบด้วย

   5.7 g NHa_2HPO_4 (anhydrous) + 6.2 g KH_2PO_4(anhydrous) + 0.6 g $MgSO_4$ $7H_2O$ ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

4. resazurin solution 0.1 % (W/ V)

   ชั่ง 100 mg resazurin ละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร

6. reduction solution (ต้องเตรียมใหม่ๆ ทุกครั้งที่ทำและเตรียมก่อนเก็บ rumen fluid เพียงเล็กน้อย ประกอบด้วย 2ml 1NnaOH + 312 mgNa_2S9H_2O ใส่ลงในน้ำ 47.5 มิลลิลิตร

3.3.2 วิธีการทดลอง

1. การเตรียมตัวอย่างอาหาร บดอาหารผ่านตะแกรงขนาด 1 มิลลิลิตร อาหารที่เปียกหรืออาหารมีความชื้นสูงให้ทำการอบแห้งที่อุณหภูมิไม่เกิน 60 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาบด ทดสอบหลอดแก้ว (glass syringe) และแกนตัน (piston) แต่ละคู่ให้ใส่ได้พอดีระวังอย่าให้คับ หรือหลวมมากเกินไปเพราะจะมีปัญหาเรื่องหลอดฝืด แกนดันออกไม่ได้หรือหลอดหลวม น้ำไหลออกทำให้ค่าผิด ชั่งตัวอย่างประมาณ 200 มิลลิกรัม ใส่ลงในหลอดแก้ว (glass syringe) ใช้วาสลีนทาแกนตัน (piston) แล้วสอดเข้าในหลอดแก้ว อุ่นหลอดที่ได้ใส่ตัวอย่างไว้แล้วในตู้อบที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้
2. การเตรียม midium ให้เติมสารละลายต่อไปนี้ ตามตาราง 7 ดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 7: ส่วนประกอบของ rumen medium buffer ที่ใช้ในการศึกษาด้วยวิธีการวัดปริมาณแก๊ส

สารเคมี	ปริมาตร (มิลลิลิตร) ต่อ 1 หลอด
1. น้ำกลั่น	10.0
2. Buffer solution	5.0
3. Macro mineral solution	5.0
4. Resazurin solution	0.025

5. Micro mineral solution	0.0025
6. Reduction solution	1.0
7. Rumen fluid	10.0

การเตรียมสารละลายให้เตรียมเผื่อปริมาณที่ต้องการไว้อีก 10 หลอด ทั้งนี้เพื่อสะดวกในการปิเปต ผสมสารละลายหมายเลข 1-5 ก่อนที่จะเก็บน้ำจากกระเพาะหมัก แช่สารละลายในอ่างน้ำอุ่น 39 องศาเซลเซียส ทำให้มีสภาพไร้ออกซิเจนโดยผ่านแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ลงไปตลอดเวลา คนด้วย magnetic stirrer

ก่อนเติม rumen liquor ให้ตรวจสอบอุณหภูมิอีกครั้งว่าเป็น 39 องศาเซลเซียส แน่หรือไม่ จากนั้นเติม reduction solution (สารละลายหมายเลข 6) ลงไป สีของสารละลายจะค่อยๆ เปลี่ยนจากสีฟ้าเป็นสีชมพู และไม่มีสีตามลำดับ แสดงว่าเกิด reduction อย่างสมบูรณ์ แล้วจึงค่อยเติม rumen liquor มิฉะนั้นค่าที่ได้จะไม่ถูกต้อง เพราะแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นในหลอดจะถูกนำไปใช้ในการ reduction

3. การเก็บน้ำจากกระเพาะหมัก และการ incubate กับตัวอย่าง เก็บน้ำจากกระเพาะหมักก่อนให้สัตว์อาหารมื้อเช้า ขวดที่ใช้เก็บควรมีขนาด 1 ลิตร ทำขวดให้เป็นสภาพไร้ออกซิเจนโดยใช้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เป่าลงไป และลวกขวดด้วยน้ำอุ่น ควรเก็บให้เต็มขวดเพื่อไม่ให้มีออกซิเจน ปิดฝาอย่าให้ออกซิเจนเข้าได้ ถ้าสัตว์เจาะกระเพาะอยู่ไกลห้อง lab มาก ควรใช้กระติกเพื่อช่วยรักษาอุณหภูมิ

ตวงน้ำจากกระเพาะหมักตามปริมาณที่ต้องการใช้ผสมกับสารละลายหมายเลข 1-6 ในขวดที่วางในอ่างอุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส คนให้เข้ากันตลอดเวลาด้วย magnetic stirrer ขณะเดียวกันผ่านแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ลงในสารละลายโดยจุ่มสายยางลงในขวด

ใช้ปิเปตอัตโนมัติปั๊มสารละลาย rumen liquor buffer mixture ผ่านท่อยางเข้าในหลอดตัวอย่าง จับหลอดตัวอย่างชูด้านปลายขึ้นให้อยู่ในแนวดิ่งในระดับสายตา ไล่ฟองแก๊สที่มีในหลอดออกให้หมด ปิดท่อยางปลายหลอดด้วยคลิปหนีบ อ่านปริมาตรของหลอดตัวอย่าง บันทึกไว้ (V_0)

4. การบันทึกปริมาณแก๊สที่เกิดขึ้นและนำไปคำนวณ โดยใช้สมการคำนวณอัตราการสลายตัวเช่นเดียวกับวิธีการใช้ถุงไนล่อน สำหรับค่าแก๊สสุทธิที่ 24 ชั่วโมง คำนวณได้จากสมการที่ (12) เสนอโดย Menke and Steigass (1988) ดังนี้คือ

$$GP\ (ml/200\ mg\ DM,\ 24\ hr) = \frac{[V_{24} - V_0 - GP_0 \times 200 \times (FH + FC)/2]}{W} \qquad (12)$$

เมื่อ GP = ปริมาณแก๊ส (มิลลิลิตร) ที่เกิดขึ้นเมื่อ incubate 24 ชั่วโมง

V_{24} = ปริมาณแก๊สเมื่อ incubate ได้ 24 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

V_0 = ปริมาตรส่วนผสมทั้งหมดที่อ่านก่อน incubate

GP_0 = ค่าเฉลี่ยของแก๊สที่เกิดในหลอด blankที่ 24 ชม.

FH = 44.16 / (GP_h-GP_0) ค่าปรับอาหารหยาบ

FC = 61.1 / (GP_c-GP_0) ค่าปรับอาหารข้น

W = น้ำหนักตัวอย่าง (มิลลิกรัมของวัตถุแห้ง)

ปริมาณแก๊สสุทธิที่อ่านได้ ณ ชั่วโมงต่างๆ นำไปเข้าสมการเพื่อคำนวณอัตราการเกิดแก๊สเช่นเดียวกับการทดลองโดยใช้เทคนิคถุงไนล่อน (*in sacco*) นำค่าพารามิเตอร์ที่ได้ (A, B และ c) มาแทนค่าในสมการที่เสนอโดย Shem *et al.* (1995) เพื่อประเมินค่าวัตถุแห้งกินได้ วัตถุแห้งกินได้ที่ย่อยได้และอัตราการเจริญเติบโตเช่นเดียวกัน เพื่อทำนายค่าการย่อยได้ของสารอินทรียวัตถุ (organic matter digestibility, OMD) ค่าพลังงานใช้ประโยชน์ (metabolizable energy, ME) และค่าพลังงานสุทธิเพื่อการให้นม (net energy of lactation, NE_L) ตามสมการที่ {6, 7, 8} เสนอโดย Menke and Steingass (1988) ดังนี้คือ

OMD (%) = 9.00 + 0.9991GP + 0.0595XP + 0.0181XA (6)

ME (MJ/kg) = 1.06 + 0.157GP + 0.0084XP + 0.022XL – 0.0081XA (7)

NE_L (MJ/kg) = -0.36 + 0.1149GP + 0.0054XP + 0.0139XL – 0.0054XA (8)

เมื่อ GP = ปริมาณแก๊ส (มิลลิลิตร) ที่เกิดเมื่อ incubated 24 ชั่วโมง

XP = ปริมาณโปรตีน (กรัมต่อกิโลกรัมวัตถุแห้ง)

XL = ปริมาณลิกนิน (กรัมต่อกิโลกรัมวัตถุแห้ง)

XA = ปริมาณเถ้า (กรัมต่อกิโลกรัมวัตถุแห้ง)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3.3 สัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลองที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือ โคนมระยะแห้งนม (dry cow) และไม่ให้ผลผลิต ลูกผสมพันธุ์พื้นเมือง X โฮลสไตน์ฟรีเชี่ยน เพศเมีย อายุ 4-7 ปี จำนวน 4 ตัว น้ำหนัก 416 ± 54 กิโลกรัม ที่ได้รับการเปิดท่อทางเดินอาหารบริเวณกระเพาะหมักโดยการเจาะกระเพาะฝัง rumen fistula (ทัศนีย์ และเทอดชัย, 2530) โดยโคทุกตัวได้อยู่ในคอกผูกยืนโรงที่มีที่ให้น้ำอัตโนมัติ และรางอาหารแยกเฉพาะตัว โคได้รับอาหารวันละ 2 ครั้ง คือ 6.00 น. และ 18.00 น. มีน้ำให้กินตลอดเวลา

เพื่อป้องกันความแปรปรวนระหว่างวัน ควรพยายามให้อาหารที่เลี้ยงสัตว์เจาะกระเพาะคงที่อยู่เสมอ ทั้งในแง่สูตรอาหาร ปริมาณ และเวลาที่กิน นอกจากนี้ควรเก็บน้ำจากกระเพาะสัตว์อย่างน้อย 2 ตัว ผสมกันจะช่วยลดความแปรปรวนต่างๆ ได้มาก

3.3.4 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ผลการทดลองโดยวิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวน ตามแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (completely randomized design, CRD) และเปรียบเทียบความแตกต่างด้วยวิธี duncan's new multiple range test (Steel and Torrie, 1984) โดยการใช้โปรแกรม SAS (มนต์ชัย, 2537)

ภาพ 8: อุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาการย่อยได้และพลังงานโดยวิธีการวัดปริมาณแก๊สที่เกิดขึ้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4 การศึกษาการย่อยได้ในตัวสัตว์ (*in vivo* digestibility)

การหาค่าการย่อยได้ของโภชนะของโคนมที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือ วิธีการหาค่าการย่อยได้แบบดั้งเดิม (conventional method) เพื่อหาค่าการย่อยได้ปรากฏ (apparent digestibility) และการหาค่าการย่อยได้โดยตัวสัตว์ภายในลำไส้เล็กด้วยวิธีการใช้สารบ่งชี้ (indicator method) มีวิธีการดังนี้

3.4.1 **การหาค่าการย่อยได้วิธีดั้งเดิม** (conventional method)

ให้โคทดลองได้รับอาหารที่ผสมเปลือกเมล็ดถั่วเหลืองทั้ง 4 ระดับร่วมกับอาหารหยาบ คือ หญ้าแห้งรูซี่ อัตราส่วนอาหารข้นต่ออาหารหยาบ (concentrates : roughages ratio) เท่ากับ 50 : 50 เมื่อคิดเป็นร้อยละของวัตถุแห้ง

- ระยะเวลาในการทดลอง มี 4 ช่วงการทดลองแต่ละช่วงใช้เวลา 22 วันโดยแบ่งออกเป็น 2 ระยะ คือ

1. ระยะการปรับตัว (preliminary period) คือเป็นช่วงที่ปล่อยให้โคและจุลินทรีย์ปรับตัวเข้ากับอาหารและขับถ่ายอาหารเดิมในทางเดินอาหารออกให้หมด โดยในระยะนี้ใช้เวลา 14 วันซึ่งจะให้สัตว์กินอาหารอย่างเต็มที่เพื่อวัดปริมาณอาหารที่สัตว์กินได้ หลังจากนั้นจะให้สัตว์กินอาหารลดลงเหลือ 90 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณที่สัตว์กินได้
2. ระยะการเก็บข้อมูล (collection period) ใช้เวลา 8 วัน แบ่งออกเป็น 2 ช่วง
   - ช่วงแรกเป็นการเก็บมูล (faces) เพื่อหาค่าการย่อยได้ปรากฏ (apparent digestibility) ทำการบันทึกปริมาณอาหารที่กิน และมูลทั้งหมดในแต่ละวัน สุ่มเก็บตัวอย่างอาหารและมูล 10 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณที่ขับออกมาทั้งหมดในแต่ละวัน นำไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีแล้วนำค่าต่างๆ มาคำนวณหาการย่อยได้ปรากฏโดยใช้สมการที่ (9) ที่เสนอโดย บุญล้อม (2540)

$$\text{สัมประสิทธิ์การย่อยได้ (\%)} = \frac{\text{โภชนะที่กิน} - \text{โภชนะที่ขับออก}}{\text{โภชนะที่กิน}} \times 100 \qquad (9)$$

ประเมินค่าโภชนะย่อยได้รวม (total digestible nutrient; TDN) จากสมการที่ (13)

$$TDN = DCP + DNDF + DNFC + 2.25 \times DEE \qquad (13)$$

เมื่อ DCP = ไนโตรเจนฟรีเอ็กซ์แทรกที่ย่อยได้

DNDF = เยื่อใยที่ละลายในด่างที่ย่อยได้

DNFC = คาร์โบไฮเดรทที่ไม่ใช่เยื่อใยที่ย่อยได้

DEE = ไขมันที่ย่อยได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

คำนวณค่าพลังงานรวม (gross energy, GE) พลังงานใช้ประโยชน์ได้ (metabolizable energy, ME) และพลังสุทธิเพื่อการให้นม (net energy for lactation, NE_L) จากสมการที่ {14, 15, 16} เสนอโดย Kellner *et al.* (1984)

$$GE\ (MJ/kg) = 0.242CP + 0.0366EE + 0.0209CF + 0.0170NFE \quad (14)$$

$$ME\ (MJ/kg) = 0.0152DCP + 0.0342DEE + 0.0128DCF + 0.0159DNFE \quad (15)$$

$$NE_L\ (MJ/kg) = 0.4632 + 0.0024q \times ME \quad (16)$$

เมื่อ DNFE = ไนโตรเจนฟรีเอ็กซ์แทรกที่ย่อยได้

q = (ME/GE) x 100

3.4.2 **การหาค่าการย่อยได้วิธีการใช้สารบ่งชี้** (indicator method)

ในการศึกษาการย่อยได้จริงภายในลำไส้เล็กของโคนม ไม่สามารถวัดปริมาณอาหารที่เดินทางผ่านทางเดินอาหารบริเวณดังกล่าวได้อย่างชัดเจน ดังนั้นการใช้สารบ่งชี้ (marker) เพื่อเป็นค่าดัชนีวัดปริมาณอาหารที่เดินทางผ่านลำไส้เล็กน่าจะเป็นวิธีการที่เหมาะสมที่สุด

วิธีการทดลอง

การวัดค่าการย่อยได้ด้วยวิธีการใช้สารบ่งชี้จะดำเนินการต่อเนื่องภายหลังเสร็จกระบวนการเก็บตัวอย่างเพื่อหาค่าย่อยได้ปรากฏ โดยการเก็บตัวอย่างจากลำไส้เล็กส่วนต้นและส่วนปลายที่ได้สอดท่อ (t-shape cannula) ไว้เรียบร้อยแล้ว เก็บตัวอย่างเป็นระยะเวลา 5 วัน เพื่อให้ได้ตัวแทนของตัวอย่างทั้ง 24 ชั่วโมงโดยมีตารางเวลาเก็บตัวอย่างดังที่ได้แสดงไว้ในตาราง 8

ตาราง 8: ช่วงเวลาเก็บตัวอย่างจากลำไส้เล็กของการทดลองหาค่าการย่อยได้โดยวิธีใช้สารบ่งชี้

วัน	ช่วงเวลา (นาฬิกา)				
1	06.00	11.00	16.00	21.00	02.00
2	07.00	12.00	17.00	22.00	03.00
3	08.00	13.00	18.00	23.00	04.00
4	09.00	14.00	19.00	24.00	05.00
5	10.00	15.00	20.00	01.00	-

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตัวอย่างที่เก็บในแต่ละครั้งให้ได้ปริมาณ 200-250 มิลลิลิตร หรือใช้เวลาในการเก็บประมาณ 45 นาทีต่อครั้ง และนำตัวอย่างมารวมกัน เก็บไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (freezer) เพื่อรอการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและหาค่าความเข้มข้นของสารบ่งชี้ในตัวอย่างต่อไป และนำค่าที่ได้จากการวิเคราะห์มาคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์การย่อยได้จากสมการที่ (10) ที่เสนอโดย เทอดชัย (2540)

$$\textbf{ประสิทธิ์การย่อยได้ (\%)} = 100 - 100 \times \frac{\textbf{\% สารบ่งชี้ในอาหาร}}{\textbf{\%สารบ่งชี้ในมูล}} \times \frac{\textbf{\% โภชนะในมูล}}{\textbf{\% โภชนะในอาหาร}} \quad (10)$$

3.4.3 การศึกษาสภาพภายในกระเพาะหมัก

เก็บตัวอย่างของเหลวภายในกระเพาะหมัก (rumen fluid) ที่เวลา 05.00, 07.00, 08.00 และ 09.00 น. นำไปปั่นเหวี่ยงใส (centrifuge) ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที จากนั้นใช้ปิเปตขนาด 1 มิลลิลิตร ดูดเอาเฉพาะส่วนน้ำใสๆ ข้างบน (supernatant) เพื่อวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจนที่เกิดขึ้นในกระเพาะหมักตามวิธี Conway method (Voigt und Steger, 1967) รวมทั้งวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ภายในกระเพาะหมัก ด้วยเครื่อง pH meter และปริมาณกรดไขมันระเหยได้ (volatile fatty acid, VFA) ที่เกิดขึ้นภายในกระเพาะหมักจากตัวอย่างของเหลวหลังให้อาหารโคนมในตอนเช้า 3 ชั่วโมง โดยใช้เครื่อง gas chromatography (Ishler *et al.*, 1996)

3.4.4 สัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลองที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือ โคนมระยะแห้งนม (dry cow) และไม่ให้ผลผลิต ลูกผสมพันธุ์พื้นเมือง X โฮลสไตน์ฟรีเชี่ยน เพศเมีย อายุ 4-7 ปี จำนวน 4 ตัว น้ำหนัก 416 $\pm$ 54 กิโลกรัม ที่ได้รับการเปิดท่อทางเดินอาหารบริเวณกระเพาะหมักโดยการเจาะกระเพาะเจาะฝัง rumen fistula (ทัศนีย์ และเทอดชัย, 2530) โดยโคทุกตัวได้อยู่ในคอกผูกยืนโรงที่มีที่ให้น้ำอัตโนมัติ และรางอาหารแยกเฉพาะตัว โคได้รับอาหารวันละ 2 ครั้ง คือ 6.00 น. และ 18.00 น. มีน้ำให้กินตลอดเวลา

3.4.5 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ผลการทดลองโดยวิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวน ตามแผนการทดลองแบบจัตุรัสละติน (latin square design, LSD) และเปรียบเทียบความแตกต่างด้วยวิธี duncan's new multiple range test (Steel and Torrie, 1984) โดยการใช้โปรแกรม SAS (มนต์ชัย, 2537)

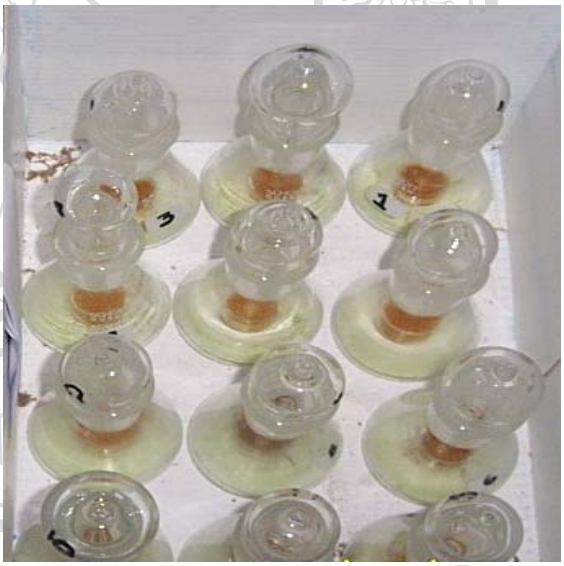
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.5 สถานที่ในการดำเนินการศึกษาวิจัย

- ฟาร์มทดลองหมวดโคนม สถานีวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรแม่เหียะ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
- ห้องปฏิบัติการอาหารสัตว์ ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
- ห้องปฏิบัติการกลาง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

3.6 ระยะเวลาในการดำเนินงานวิจัย

ใช้เวลาในการทดลองประมาณ 12 เดือน ช่วงระหว่างเดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2545 ถึงเดือนเมษายน พ.ศ. 2546



ภาพ 9: การวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ภายในกระเพาะหมักโคนม และการวัดปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจนด้วยวิธีการ Conway method

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพ 10: สัตว์ทดลองที่ใช้ในการศึกษาการย่อยได้ในตัวสัตว์โดยวิธีดั้งเดิมและการใช้สารบ่งชี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved