บทที่ 3

อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

3.1. การศึกษารูปแบบการปลูกและผลผลิตของมันสำปะหลังเพื่อผลิตมันเฮย์ (Cassava hay : CH)

วิธีดำเนินการวิจัย

1. เตรียมแปลงทดลองจำนวน 6 แปลง แปลงละ 1ไร่
2. เตรียมดินเพื่อปลูกมันสำปะหลังโดยการไถด้วยผานสาม 1 ครั้ง ลึก 20 - 30 เซนติเมตร ตากดินไว้ 7 - 10 วัน พรวนด้วยผานเจ็ด 1 ครั้ง แล้วคราดเก็บเศษซาก ราก เหง้า หัว และไหลของวัชพืชข้ามปี ออกจากแปลงจากนั้นใส่ปุ๋ยคอกเพื่อปรับปรุงดิน (500 กก./ไร่)
3. ปลูกมันสำปะหลัง โดยใช้ท่อนพันธุ์มันสำปะหลังพันธุ์เกษตร 50 ขนาดความยาวท่อนพันธุ์ 15 ซม. โดยมี ระยะปลูก (ระหว่างแถว x ระหว่างต้น) คือ
   - ระยะปลูก 40 x 30 จำนวน 2 แปลง
   - ระยะปลูก 70 x 30 จำนวน 2 แปลง
   - ระยะปลูก 100 x 40 จำนวน 2 แปลง
4. ทำการเก็บเกี่ยวต้นมันสำปะหลังครั้งแรกเมื่ออายุครบ 3 เดือน บันทึกน้ำหนักสดทุกครั้งและนำมาคำนวณหาผลผลิตน้ำหนักแห้ง
5. จากนั้นนำมันเฮย์ที่เก็บสดมาสับให้มีขนาด 1 - 2 ซม. แล้วนำไปผึ่งแดด ประมาณ 2 - 3 วันหรือจนกว่าใบมันจะแห้งกรอบและส่วนของก้านและลำต้นเริ่มเหี่ยว จากนั้นก็เก็บใส่ถุงเพื่อนำมาใช้ในการประกอบสูตรอาหารต่อไป
6. สุ่มเก็บตัวอย่างมันเฮย์ทั้งสดและแห้งนำมาวิเคราะห์หาโภชนะและองค์ประกอบทางเคมี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2 สัตว์ทดลองและอาหารทดลอง (Experimental animals and experimental diets)

3.2.1 สัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลองที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้คือ โคลูกผสมพื้นเมือง xโฮสไตน์ฟรีเซี่ยน เพศผู้ 2 ตัว เพศเมีย 2 ตัว อายุ 4 - 7 ปีน้ำหนักเฉลี่ย 321 กิโลกรัม โคทุกตัวได้รับการผ่าตัดสำหรับใส่ท่อ บริเวณกระเพาะรูเมน (rumen fistula) (ทัศนีย์ และเทอดชัย, 2530) และ

บริเวณลำไส้เล็กส่วนต้น และส่วนปลายของลำไส้เล็ก (proximal duodenum และ terminal ileum cannula) (ทัศนีย์ และเทอดชัย, 2532) โคทดลองทุกตัวเลี้ยงอยู่ในคอกทดลอง ผูกยืนโรงมีที่ให้น้ำแบบอัตโนมัติ และมีรางอาหารแยกเฉพาะตัว ได้รับอาหารวันละ 2 ครั้ง เวลา 07.00 น. และ 17.00 น.

3.2.2 อาหารทดลอง

ส่วนประกอบของอาหารทดลองที่ผสมมันเฮย์ทั้ง 4 ระดับ (ตาราง 6) ประกอบด้วยวัตถุดิบหลักที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้คือ ข้าวโพดบด รำละเอียด กากถั่วเหลือง โดยให้มันเฮย์เป็นแหล่งโปรตีนหยาบทดแทนกากถั่วเหลืองในสูตรอาหารระดับต่างๆ ดังนี้

Treatment 1 (T 1) อาหารทดลองที่ผสมด้วยมันเฮย์ที่ระดับ 0 % (Control)
Treatment 2 (T 2) อาหารทดลองที่ผสมด้วยมันเฮย์ที่ระดับ 10 % (CH 10 %)
Treatment 3 (T 3) อาหารทดลองที่ผสมด้วยมันเฮย์ที่ระดับ 20 % (CH 20 %)
Treatment 4 (T 4) อาหารทดลองที่ผสมด้วยมันเฮย์ที่ระดับ 30 % (CH 30 %)

ตาราง 6. ส่วนประกอบของวัตถุดิบ ต้นทุนของอาหารทดลองต่อกิโลกรัม และร้อยละของโปรตีนจากการคำนวณ ของอาหารทดลองที่ผสมมันเฮย์ทั้ง 4 ระดับ

		Treatment 1	Treatment 2	Treatment 3	Treatment 4
Corn	%	62.40	56.37	50.35	44.32
Rice bran	%	20.00	20.00	20.00	20.00
Soybean meal	%	15.10	11.13	7.15	3.18
Cassava hay (CH)	%	0.00	10.00	20.00	30.00
Dicalcium-P	%	1.00	1.00	1.00	1.00
Salt	%	1.00	1.00	1.00	1.00
Premix	%	0.50	0.50	0.50	0.50
Price	฿/kg	5.94	5.32	4.70	4.08
Crude Protein	%	16.00	16.00	16.00	16.00

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี (Chemical composition analysis)

ศึกษาองค์ประกอบทางเคมี และคุณค่าทางโภชนะของมันเฮย์ และอาหารทดลองที่ผสมมันเฮย์ทั้ง 4 ระดับคือ 0 10 20 และ 30 เปอร์เซ็นต์ ในระดับโปรตีนหยาบ (crude protein, CP) 16 เปอร์เซ็นต์ (ร้อยละของวัตถุแห้ง)

3.3.1 วิธีวิเคราะห์แบบ Proximate analysis นำตัวอย่างอาหารทดลองแห้งบดผ่านตะแกรงขนาด 1 มิลลิเมตร วิเคราะห์หาวัตถุแห้ง (dry matter, DM) โปรตีน (crude protein, CP) เยื่อใยหยาบ (crude fiber, CF) (A.O.A.C., 2000)

3.4 การประเมินค่าการย่อยได้ และพลังงานโดยวิธีวัดปริมาณแก๊สที่เกิดขึ้น (Gas production technique)

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

3.4. 1 วิธีการทดลอง (Methods)

เก็บน้ำจากกระเพาะรูเมน (rumen fluid) จากสัตว์ทดลอง (3.2.1) ก่อนให้สัตว์กินอาหาร มาผสมกับสารละลาย medium ที่เตรียมไว้ (ตาราง 7) จากนั้นใช้ปิเปตอัตโนมัติปั้มสารละลาย rumen liquor buffer ดังกล่าว 30 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดแบบพิเศษคล้ายเข็มฉีดยา (syringe) ขนาดใหญ่ ความจุ 100 มิลลิลิตร ที่ปลายหลอดมีสายยางสั้น ๆ และคลิปหนีบสำหรับปิดเปิดได้ ภายในหลอดมีตัวอย่างอาหารที่ต้องการทดสอบที่บดผ่านตะแกรงขนาด 1 มิลลิเมตร ประมาณ 200 มิลลิกรัม นำไป incubate ในอ่างน้ำ (water bath) ที่ปรับอุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส โดยหลอดตัวอย่างอาหารจะสอดใส่ไว้ในช่องบนแท่นวงกลม ซึ่งประกอบด้วยแกนหมุนด้วยแรงขับจากมอเตอร์ไฟฟ้า เพื่อให้ตัวอย่างเคลื่อนไหวอยู่ตลอดเวลา เป็นการจำลองสภาพภายในกระเพาะรูเมน อ่านค่าแก๊สที่เกิดขึ้นในช่วงเวลา 2 4 6 8 12 และ 24 ชั่วโมง บันทึกปริมาณแก๊สที่เกิดขึ้น และนำไปคำนวณโดยใช้ค่าแก๊สสุทธิที่ 24 ชั่วโมง คำนวณได้จากสมการที่เสนอโดย Menke and Steingass (1988) ดังนี้คือ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

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

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 7. 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

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 (r = 0.91)

ME (MJ/kg) = 1.06+0.157GP+0.0084XP+0.022XL–0.0081XA (r = 0.94)

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

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

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

XP = ปริมาณโปรตีน (g/kg DM)

XL = ปริมาณไขมัน (g/kg DM)

XA = ปริมาณเถ้า (g/kg DM)

3.4.2 การวิเคราะห์ทางสถิติ (Statistical analyis)

การประเมินค่าพลังงานและการย่อยได้โดยวิธีวัดปริมาณแก๊สของมันเฮย์ และอาหารทดลองใช้วิธีวิเคราะห์วาเรียนซ์ (analysis of variance, ANOVA) ตามแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design, CRD) และเปรียบเทียบความแตกต่างด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (Steel and Torrie, 1980) โดยโปรแกรมสำเร็จรูป SAS Version 6.0 (SAS Institute, 1985)

3.5 การศึกษาการย่อยได้ในตัวสัตว์ (*In vivo* digestibility)

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

3.5.1. การหาค่าการย่อยได้โดยวิธีดั้งเดิม (Conventional method)

โคทดลองจะได้รับอาหารที่ผสมมันเฮย์ทั้ง 4 ระดับร่วมกับอาหารหยาบ คือหญ้ารูซี่สด ในแต่ละคาบของการทดลอง (period) ใช้เวลาทั้งหมด 18 วัน ใน 14 วันแรกให้โคทดลองและจุลินทรีย์ภายในกระเพาะหมักได้ปรับตัวให้เข้ากับอาหารทดลองที่ได้รับ (preliminary period) และ 4 วันสุดท้ายสำหรับเก็บข้อมูล (collection period) บันทึกปริมาณอาหารที่กินและมูลที่ขับออกมา สุ่มเก็บตัวอย่างอาหารและมูล (5 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักสด) เพื่อเก็บไว้วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี นำค่าที่ได้จากการวิเคราะห์มาคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์การย่อยได้ปรากฏจากสมการ (บุญล้อม, 2540)

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

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ประเมินค่าโภชนะย่อยได้รวม (total digestible nutrient, TDN) จากสมการ

$$TDN = DCP + DCF + DNFE + 2.25 \times DEE$$

เมื่อ DCP = โปรตีนที่ย่อยได้ (g/kg DM)

DCF = เยื่อใยที่ย่อยได้ (g/kg DM)

DNFE = ไนโตรเจนฟรีเอ็กซ์แทรกที่ย่อยได้ (g/kg DM)

DEE = ไขมันที่ย่อยได้ (g/kg DM)

ทำการคำนวณค่าพลังงานรวม (gross energy, GE) พลังงานใช้ประโยชน์ (metabolizable energy, ME) จากสมการที่เสนอโดย GfE (2001) และพลังสุทธิเพื่อการให้นม (net energy for lactation, NE_L) จากสมการที่เสนอโดย Kellner *et al*. (1984)

$$GE(MJ/kg) = 0.0239 \times g\ CP + 0.0398 \times g\ EE + 0.0201 \times g\ CF + 0.0175 \times g\ NFE$$

$$ME(MJ/kg) = 0.0312 \times g\ DEE + 0.0136 \times g\ DCF + 0.0147 \times g\ (DOM\text{-}DEE\text{-}DCF) + 0.00234 \times g\ CP$$

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

เมื่อ $q = (ME/GE) \times 100$

3.5.2 การหาค่าการย่อยได้วิธีการใช้สารบ่งชี้ (Indicator method)

ในการศึกษาการย่อยได้จริงภายในระบบทางเดินอาหารและลำไส้เล็กของโคไม่สามารถวัดปริมาณอาหารที่เดินทางผ่านทางเดินอาหารบริเวณดังกล่าวได้โดยตรง ดังนั้นการใช้สารบ่งชี้ (marker) เพื่อเป็นค่าดัชนีวัดปริมาณอาหารในระบบทางเดินอาหารและผ่านลำไส้เล็กน่าจะเป็นวิธีการที่เหมาะสม ในการทดลองใช้สารไททาเนียมไดออกไซด์ (TiO_2) เป็นสารบ่งชี้

วิธีการทดลอง

การวัดค่าการย่อยได้ด้วยวิธีการใช้สารบ่งชี้จะดำเนินการต่อเนื่องพร้อมกับกระบวนการเก็บตัวอย่างเพื่อหาค่าย่อยได้ปรากฏ (ตามหลักการแล้วปริมาณสารบ่งชี้ในอาหารที่สัตว์กินเข้าไปจะมีปริมาณเท่าเดิมตลอดไม่สูญหายหรือตกค้างในทางเดินอาหารแต่ปริมาณโภชนะต่างๆ จะสูญหายไปตามทางเดินอาหารในแต่ละส่วน ทำให้สัดส่วนหรือความเข้มข้นของสารบ่งชี้ต่อโภชนะจะเพิ่มขึ้น ดังที่ได้อธิบายใน 2.10.3 เรื่อง การศึกษาการย่อยได้โดยใช้สารบ่งชี้) โดยการเก็บตัวอย่าง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

จากลำไส้เล็กส่วนต้นและส่วนปลายที่ได้สอดท่อรูปตัวที (T-shaped cannula) เก็บตัวอย่างเป็นระยะเวลา 4 วัน เพื่อให้ได้ตัวแทนของตัวอย่างทั้ง 24 ชั่วโมงโดยมีตารางเวลาเก็บตัวอย่างดังที่ได้แสดงไว้ (ตาราง 8)

ตาราง 8 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

ปริมาณของตัวอย่างที่เก็บในแต่ละครั้ง คือ 200 - 250 มิลลิลิตร หรือใช้เวลาในการเก็บประมาณ 45 นาทีต่อครั้ง และนำตัวอย่างมารวมกัน เก็บไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส (freezer) เพื่อรอการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและหาค่าความเข้มข้นของสารบ่งชี้ในตัวอย่างต่อไป นำค่าที่ได้จากการวิเคราะห์มาเข้าสมการเพื่อหาค่าสัมประสิทธิ์การย่อยได้ (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 (rumen parameters)

3.5.3.1 วิเคราะห์แอมโมเนียไนโตรเจนที่เกิดขึ้นภายในกระเพาะ ด้วยวิธีการ Conway method (Voigt und Steger, 1967) ทำการเก็บของเหลวจากกระเพาะรูเมน (rumen fluid) เพื่อทำการวัด ซึ่งจะทำการวัดก่อนที่โคจะกินอาหาร 1 ชั่วโมงและหลังจากโคกินอาหารไปแล้ว 1 2 3 และ 5 ชั่วโมง

3.5.3.2 วัดค่าความเป็นกรด – ด่างในกระเพาะรูเมน (rumen pH) ด้วยเครื่องวัด pH แบบพกพา ยี่ห้อ pH scan BNC™ ซึ่งมีค่าความถูกต้อง ± 0.1 ปรับความเที่ยงตรงด้วย บัฟเฟอร์ 4 และ 7 โดยการสอดแท่ง electrode ลงไปทำการวัดในบริเวณส่วนล่างของกระเพาะรูเมน (Ventral

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

sac) (เทอดชัย, 2530) ซึ่งทำการวัดก่อนที่โคจะกินอาหาร 1 ชั่วโมง และวัดหลังจากโคกินอาหารแล้ว 1 2 3 4 และ 5 ชั่วโมง

3.5.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ (Statistical analysis)

การศึกษาการย่อยได้ในตัวสัตว์ของอาหารทดลองใช้วิธีวิเคราะห์แบบวาเรียนซ์ (analysis of variance, ANOVA) ตามแผนการทดลองแบบจัตุรัสละติน (Latin Square Design, LSD) และเปรียบเทียบความแตกต่างด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (Steel and Torrie, 1980) โดยการใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SAS Version 6.0 (SAS Institute, 1985)

3.6 สถานที่ทำการทดลอง

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

3.7 ระยะเวลาในการดำเนินงานทดลอง

เดือนสิงหาคม 2547 – กรกฎาคม 2548 รวม 12 เดือน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved