บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การศึกษาครั้งนี้แบ่งออกเป็น 3 การทดลองต่อเนื่องกัน การทดลองที่ 1 ศึกษาการปรับวัตถุแห้งและการใช้สารเสริมปรุงแต่งที่เหมาะสมในการหมักเปลือกและซังข้าวโพดหวาน การทดลองที่ 2 เปรียบเทียบการใช้มันเส้นและรำข้าวสกัดน้ำมันปรับวัตถุแห้งในการหมักเปลือกและซังข้าวโพดหวาน โดยไม่ใช้และใช้ฟอร์มาลินปรุงแต่ง และการทดลองที่ 3 ศึกษาปริมาณการกิน การย่อยได้ และพลังงานของเปลือกและซังข้าวโพดหวานหมักในโคนม

3.1 การทดลองที่ 1 ศึกษาการปรับวัตถุแห้งและการใช้สารเสริมปรุงแต่งที่เหมาะสมในการหมักเปลือกและซังข้าวโพดหวาน

3.1.1 แผนการทดลอง

ทำการศึกษาถึงผลของการปรับวัตถุแห้งและหรือการใช้สารเสริมปรุงแต่งเปลือกและซังข้าวโพดหวานต่อกระบวนการหมัก โดยวางแผนการทดลองแบบ 6x5 Factorial design มี 6 ซ้ำ ประกอบด้วย 2 ปัจจัย (factor) ด้วยกัน ดังนี้

ปัจจัยที่ 1 คือ การปรับวัตถุแห้งของเปลือกและซังข้าวโพดหวานที่นำมาหมักให้ได้วัตถุแห้งประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธีการต่าง ๆ แบ่งออกเป็น 6 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ใช้เปลือกและซังข้าวโพดหวานโดยไม่มีการปรับวัตถุแห้ง (HC+0) กลุ่มที่ 2-4 ปรับวัตถุแห้งของเปลือกและซังข้าวโพดหวานโดยผสมกับฟางข้าว หรือฟางถั่วเหลือง หรือมันเส้น ในอัตรา 14 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักสด (HC+RS, HC+SBS และ HC+Cass ตามลำดับ) กลุ่มที่ 5 คั้นน้ำออกจากเปลือกและซังข้าวโพดหวาน (HC+Press) และกลุ่มที่ 6 ใช้วิธีการเหมือนกลุ่มที่ 5 แต่มีการผสมมันเส้นในอัตรา 3 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักสด (HC+Press+Cass)

ปัจจัยที่ 2 คือ การเติมสารเสริมชนิดต่าง ๆ ลงในเปลือกและซังข้าวโพดหวานที่ได้ปรับวัตถุแห้งดังกล่าวมาแล้วก่อนทำการหมัก การใช้สารเสริมปรุงแต่งแบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม ดังนี้ 1) กลุ่มควบคุม (Control) ไม่ใช้สารปรุงแต่ง 2) ใช้กรดฟอร์มิก 85% (Formic acid) ในอัตรา 2.8 กรัมต่อกิโลกรัมพืชสด 3) ใช้ฟอร์มาลิน 37% (Formalin) ในอัตรา 6.7 กรัมต่อกิโลกรัมพืชสด

4) ใช้สารผสมระหว่างสารฟอร์มาลินและกรดฟอร์มิก (3:1 โดยน้ำหนัก) ในอัตรา 10 กรัมต่อกิโลกรัมพืชสด และกลุ่มสุดท้าย 5) ผสมยูเรีย (Urea) ในอัตรา 10 กรัมต่อกิโลกรัมพืชสด

สรุปการจัดสิ่งทดลอง (treatment) แสดงดังในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 การจัดสิ่งทดลอง (treatment) เพื่อหมักเปลือกและซังข้าวโพดหวานโดยใช้การปรับวัตถุแห้งและสารเสริมปรุงแต่งต่าง ๆ กัน

การปรับวัตถุแห้ง	การใช้สารเสริมปรุงแต่ง				
	ควบคุม	กรดฟอร์มิก	ฟอร์มาลิน	ฟอร์มาลินและกรดฟอร์มิก	ยูเรีย
HC+0	T_1	T_2	T_3	T_4	T_5
HC+RS	T_6	T_7	T_8	T_9	T_{10}
HC+SBS	T_{11}	T_{12}	T_{13}	T_{14}	T_{15}
HC+Cass	T_{16}	T_{17}	T_{18}	T_{19}	T_{20}
HC+Press	T_{21}	T_{22}	T_{23}	T_{24}	T_{25}
HC+Press+Cass	T_{26}	T_{27}	T_{28}	T_{29}	T_{30}

หมายเหตุ : HC คือ เปลือกและซังข้าวโพดหวาน, RS คือ ฟางข้าว, SBS คือ ฟางถั่วเหลือง, Cass คือ มันเส้น และ Press คือ การคั้นน้ำออกจากเปลือกและซังข้าวโพดหวาน

3.1.2 วิธีการหมัก

เปลือกและซังข้าวโพดหวานที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้จากโรงงานแปรรูปข้าวโพดหวานบรรจุกระป๋องของบริษัทเชียงใหม่ฟู้ดแคนนิ่ง จำกัด จ.เชียงใหม่ นำมาหั่นด้วยเครื่องให้ได้ขนาดชิ้นประมาณ 3 เซนติเมตร (ภาพที่ 1 และ 2) แบ่งออกเป็น 30 กลุ่ม ตามแผนการทดลอง (ตารางที่ 6) แล้วนำมาหมักโดยบรรจุลงในถุงพลาสติกใสขนาด 50 x 87 เซนติเมตร น้ำหนักถุงละ 12 กิโลกรัม ใช้ปั๊มสุญญากาศดูดอากาศภายในถุงเพื่อให้มีสภาพไร้อากาศ มัดปากถุงให้แน่นป้องกันไม่ให้อากาศเข้าไปได้ หมักเป็นเวลา 45 วัน แล้วสุ่มเก็บตัวอย่างนำไปวิเคราะห์

3.1.3 การเก็บและวิเคราะห์ตัวอย่าง

สุ่มเก็บตัวอย่างเปลือกและซังข้าวโพดหวานของแต่ละกลุ่มที่ปรับวัตถุแห้งต่างกันก่อนทำการหมักนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีโดยวิธี proximate analysis (AOAC, 1984) และวิเคราะห์เยื่อใยโดยวิธี detergent method (Goering and Van Soest, 1970; อ้างโดย บุญล้อม และสมคิด, 2539)

หลังจากหมักเป็นเวลา 45 วัน เก็บตัวอย่างพืชหมัก โดยสุ่มเก็บจากถุงหมัก 4 จุด คือ ส่วนบน กลาง ข้าง และล่างของถุงหมัก นำไปวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์วัตถุแห้ง โดยอบพืชหมักที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (Nagel and Broderick, 1992) เพื่อนำไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การสูญเสียวัตถุแห้ง (% dry matter loss) จากกระบวนการหมัก วัดความเป็นกรด-ด่าง (pH) โดยนำพืชหมัก 50 กรัม เติมน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่น (blender jar) เป็นเวลา 30 วินาที แล้วกรองผ่านผ้าขาวบาง 2 ชั้น นำน้ำที่กรองได้ไปวัดความเป็นกรด-ด่าง ด้วย glass electrode pH meter (Bal *et al.*, 1997) วิเคราะห์หาแอมโมเนีย โดยนำพืชหมักไปปั่นด้วยเครื่องปั่นกับสารละลายกรดกำมะถันเข้มข้น 0.1N (0.1N H_2SO_4) ในสัดส่วน พืชหมัก 10 กรัม ต่อ H_2SO_4 (0.1N) จำนวน 100 มิลลิลิตร นำสารละลายที่สกัดได้ไปวิเคราะห์หาแอมโมเนียโดยวิธีการกลั่นด้วยเครื่อง Tecator Auto-Kjeldahl analyzer (Chen *et al.*, 1994)

ภาพที่ 1 การนำเปลือกและซังข้าวโพดหวานมาหั่นด้วยเครื่อง

ภาพที่ 2 เปลือกและซังข้าวโพดหวานที่ผ่านการหั่นแล้ว

3.1.4 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้จากการบันทึกไปวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) ตามแผนการทดลองแบบ 6x5 factorial design ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS

3.2 การทดลองที่ 2 เปรียบเทียบการใช้มันเส้นและรำข้าวสกัดน้ำมันปรับวัตถุแห้งในการหมักเปลือกและซังข้าวโพดหวาน โดยไม่ใช้และใช้ฟอร์มาลินปรุงแต่ง

3..2.1 แผนการทดลอง

เลือกวิธีปรับวัตถุแห้งและการใช้สารเสริมปรุงแต่งในการหมักเปลือกและซังข้าวโพดหวานที่ได้ทดสอบแล้วจากการทดลองที่ 1 มา 2 วิธี คือ การปรับวัตถุแห้งของเปลือกและซังข้าวโพดหวานด้วยมันเส้นโดยไม่ใช้และใช้เสริมฟอร์มาลินปรุงแต่งนำมาทดลองหมัก

เปรียบเทียบกับการปรับวัตถุแห้งของเปลือกและซังข้าวโพดหวานด้วยรำข้าวสกัดน้ำมันโดยไม่ใช้และใช้ฟอร์มาลินปรุงแต่ง วางแผนการทดลองแบบ 2x2 factorial design มี 7 ซ้ำ โดยศึกษาถึงปัจจัย 2 ปัจจัยด้วยกัน คือ ปัจจัยที่ 1 เป็นการปรับวัตถุแห้งของเปลือกและซังข้าวโพดหวานให้ได้ประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้มันเส้น หรือ รำข้าวสกัดน้ำมันในอัตรา 14 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักสด และปัจจัยที่ 2 เป็นการไม่ใช้ หรือ ใช้ฟอร์มาลินปรุงแต่งในอัตรา 4.38 กรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักสด แผนการทดลองแสดงไว้ในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 การจัดสิ่งทดลอง (treatment) โดยใช้มันเส้นและรำข้าวสกัดน้ำมันปรับวัตถุแห้ง และใช้ฟอร์มาลินเป็นสารปรุงแต่งในการหมักเปลือกและซังข้าวโพดหวาน

วัตถุดิบที่ใช้ปรับวัตถุแห้ง	สารฟอร์มาลิน	
(% น้ำหนักสด)	0	(4.38 ก./กก.น้ำหนักสด)[1]
มันเส้น (14%)	T_1	T_2
รำข้าวสกัดน้ำมัน (14%)	T_3	T_4

หมายเหตุ : [1] คำนวณจากปริมาณโปรตีนรวมของเปลือกและซังข้าวโพดหวานที่ผสมรำข้าวสกัดน้ำมัน (14%) ซึ่งคิดเป็นสารฟอร์มัลดีไฮด์เท่ากับ 50 กรัม/กิโลกรัมโปรตีนรวม

3.2.2 วิธีการหมัก

นำเปลือกและซังข้าวโพดหวานที่ได้จากโรงงานมาหั่นด้วยเครื่องให้มีขนาดประมาณ 3 เซนติเมตร (เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1) จัดสิ่งทดลองเป็น 4 กลุ่ม ตามแผนการทดลอง (ตารางที่ 7) คือ กลุ่มแรก (T_1) ปรับวัตถุแห้งของเปลือกและซังข้าวโพดหวานด้วยมันเส้นโดยไม่ใช้ฟอร์มาลินปรุงแต่ง (Cass+0) กลุ่มสอง (T_2) ปรับวัตถุแห้งเช่นเดียวกับกลุ่มแรกแต่ใช้ฟอร์มาลินปรุงแต่ง (Cass+F) กลุ่มสาม (T_3) ปรับวัตถุแห้งของเปลือกและซังข้าวโพดหวานด้วยรำข้าวสกัดน้ำมันแต่ไม่ใช้ฟอร์มาลินปรุงแต่ง (DRB+0) และกลุ่มสุดท้าย (T_4) ปรับวัตถุแห้งเช่นเดียวกับ T_3 แต่ใช้ฟอร์มาลินปรุงแต่ง (DRB+F) นำสิ่งทดลองมาหมักในถุงพลาสติกตำแล้วสวมลงในถุงไยสังเคราะห์อีกชั้นหนึ่ง ปริมาณบรรจุถุงละ 20 กิโลกรัม ดูดอากาศออกจากถุงด้วยปั๊มสุญญากาศ เพื่อให้ภายในถุงมีสภาพอับอากาศ แล้วรวบปากถุงมัดให้แน่น เก็บไว้เป็นเวลา 30 วัน

3.2.3 การเก็บและวิเคราะห์ตัวอย่าง

สุ่มเก็บตัวอย่างสิ่งทดลองก่อนและหลังการหมัก นำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี วิเคราะห์หาวัตถุแห้ง ความเป็นกรด-ด่าง และแอมโมเนียไนโตรเจน ตามวิธีการเดียวกับการทดลองที่ 1

วัดปริมาณกรดอินทรีย์ ได้แก่ กรดอะซิติก บิวทีริก และแลคติก โดยวิธีการกลั่นโดยนำตัวอย่างพืชหมัก 30 กรัม เติมน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร ปั่นในเครื่องปั่น (blender jar) เป็นเวลา 2 นาที กรองเอาส่วนที่เป็นน้ำมา 240 มิลลิลิตร เติมน้ำปูน 24 มิลลิลิตร และสารละลาย $CuSO_4$ 12 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรเท่ากับ 300 มิลลิลิตร นำไปปั่นด้วย magnetic stirrer คนให้เข้ากันเป็นเวลา 5 นาที นำไปกรองแล้วนำส่วนของเหลวที่ผ่านการกรองจำนวน 200 มิลลิลิตร ใส่ในขวดก้นกลม เติมสารละลายกรดกำมะถันเจือจางลงไป 5 มิลลิลิตร และใส่เกล็ดหิน (pumic stone) 3-4 ก้อน นำขวดก้นกลมต่อเข้ากับเครื่องกลั่น สารละลายที่กลั่นออกมาได้ 100 มิลลิลิตรแรก เป็นค่า (A) แล้วกลั่นต่อไปอีก สารละลายที่กลั่นออกมาได้อีก 50 มิลลิลิตร เป็นค่า (B) จากนั้นนำขวดก้นกลมดังกล่าวมาเติมสารละลาย chromic oxide 55 มิลลิลิตร ทำการ reflux เป็นเวลา 5 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร นำไปต่อเข้ากับเครื่องกลั่นอีกครั้ง กลั่นต่อไปให้ได้สารละลายอีก 50 มิลลิลิตร เป็นค่า (C) จากนั้นนำสารละลายที่กลั่นได้ทั้ง 3 ส่วน ไปไตเตรทกับ NaOH 0.05 N โดยมี phenolphthalein เป็น indicator นำค่าที่ไตเตรทได้ (A, B และ C) ไปคำนวณตามสมการเพื่อหาปริมาณกรดอะซิติก บิวทีริก และแลคติก ตามลำดับ (Zimmer, 1966 ; อ้างโดย บุญล้อม และบุญเสริม, 2525)

3.2.4 การหาปริมาณการกินพืชหมักของแกะทดลอง

- อาหารทดลอง ได้มาจากพืชหมัก 4 กลุ่ม ได้แก่ เปลือกและซังข้าวโพดหวานหมักปรับวัตถุแห้งด้วยมันเส้น ไม่ปรุงแต่ง (Cass+0) และปรุงแต่งด้วยฟอร์มาลิน (Cass+F) เปลือกและซังข้าวโพดหวานหมักปรับวัตถุแห้งด้วยรำข้าวสกัดน้ำมันไม่ปรุงแต่ง (DRB+0) และปรุงแต่งด้วยฟอร์มาลิน (DRB+F)

- สัตว์ทดลอง แกะลูกผสมเมอริโนเพศผู้ จำนวน 12 ตัว น้ำหนัก 29.52 ± 6.51 กิโลกรัม เลี้ยงขังเดี่ยวในกรง มีรางอาหาร และน้ำสะอาดให้กินตลอดเวลา แบ่งกลุ่มแกะกลุ่มละ 3 ตัว สุ่มให้กับอาหารทดลองรวมเป็น 4 กลุ่ม บันทึกน้ำหนักตัวของสัตว์ก่อนและหลังทำการทดลอง 3 วันติดต่อกัน เพื่อคำนวณหาน้ำหนักตัวเฉลี่ยของสัตว์ทดลอง ชั่งน้ำหนักในตอนเช้าก่อนให้อาหาร โดยจะงดอาหารมื้อเย็น (16.00 น.) ในวันก่อนที่จะทำการชั่งน้ำหนัก

- การให้อาหาร และบันทึกข้อมูล แกะทดลองได้รับอาหารวันละ 2 เวลา คือ 8.00 และ 16.00 น. การทดลองแบ่งออกเป็น 2 ระยะ คือ ช่วง 13 วันแรกของการทดลองเป็นช่วงให้สัตว์ได้ปรับตัวเข้ากับสถานที่และอาหารทดลอง โดยค่อย ๆ เพิ่มปริมาณพืชหมักและลดอาหารชนิดเดิม (หญ้าสด, ต้นข้าวโพดหมัก และกากถั่วเหลือง) ที่สัตว์เคยได้รับเพื่อให้สัตว์ได้คุ้นเคยกับอาหารทดลอง หลังจากสัตว์ได้ปรับตัวเป็นเวลา 13 วันแล้วให้สัตว์ได้รับพืชหมักอย่างเดียว โดยให้กิน

แบบเต็มที่ (*ad libitum*) บันทึกปริมาณอาหารที่สัตว์กินได้ในแต่ละมื้อและแต่ละวัน เป็นเวลา 11 วัน สุ่มเก็บตัวอย่างอาหารนำไปวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์วัตถุแห้ง เพื่อนำไปคำนวณปริมาณวัตถุแห้งที่สัตว์กินได้ (DMI)

3.2.5 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

นำข้อมูลที่รวบรวมได้ทั้งหมดไปวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) ตามแผนการทดลองแบบ 2x2 factorial design ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS

3.3 การทดลองที่ 3 ปริมาณการกิน การย่อยได้ และพลังงานของเปลือกและซังข้าวโพดหวานหมักในโคนม

ทำการหมักเปลือกและซังข้าวโพดหวานโดยใช้วิธีที่ผ่านการคัดเลือกแล้วจากการทดลองที่ 2 คือ ปรับวัตถุแห้งด้วยรำข้าวสกัดน้ำมันในอัตรา 14 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักสด และปรุงแต่งด้วยฟอร์มาลินในอัตรา 4.38 กรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักสด แต่ทั้งนี้เนื่องจากรำข้าวสกัดน้ำมันเป็นวัตถุดิบที่หาได้ค่อนข้างลำบากในท้องตลาด ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้จึงได้เปลี่ยนมาใช้รำละเอียดที่ไม่ผ่านการสกัดน้ำมันแทน ดำเนินการศึกษาการย่อยได้โดยทดลองกับโค (*in vivo* digestibility) ศึกษาลักษณะการย่อยสลายในกระเพาะรูเมนโดยใช้ถุงไนลอน (*in sacco*) ตามวิธีการของ Orskov *et al.* (1988) และหาการย่อยได้แบบ *in vitro* โดยวิธี Gas production ตามวิธีการของ Menke and Steingass (1988) และวิธีที่ดัดแปลงโดย Bluemmel and Orskov (1993) นำผลที่ได้จากการทดลองมาประเมินค่าพลังงาน DE, ME และ NEL โดยใช้สมการของ NRC (1988)

3.3.1 การหาการย่อยได้ของเปลือกและซังข้าวโพดหวานหมักปรับวัตถุแห้งด้วยรำข้าวและปรุงแต่งด้วยฟอร์มาลิน โดยทดลองกับโค

- **อาหารทดลอง** คือ พืชหมัก HC+RB ที่ได้จากการนำเปลือกและซังข้าวโพดหวาน 86 ส่วน ผสมกับรำละเอียด 14 ส่วนโดยน้ำหนัก ปรุงแต่งด้วยฟอร์มาลินในอัตรา 4.38 กรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักสด หมักเป็นระยะเวลา 40 วัน วิธีหมักดำเนินการเช่นเดียวกับการทดลองที่ 2 โดยบรรจุถุงละ 30 กิโลกรัม เสริมแร่ธาตุให้แก่โคทดลองโดยให้โคได้รับแร่ธาตุผสมวันละ 100 กรัม สูตรแร่ธาตุที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ 1 กิโลกรัมประกอบด้วย $Ca_3(PO_4)_2$ 750 กรัม, NaCl 160 กรัม, MgO 45 กรัม, S 35 กรัม, ZnO 5.5 กรัม, $CuSO_4$ 3.7 กรัม, MnO 0.7 กรัม, $CoCl_2$ H_2O 0.04 กรัม, KI 0.02 กรัม และ Na_2SeO_3 0.04 กรัม

- **สัตว์ทดลอง** ใช้แม่โคลูกผสม Holstein Friesian สายเลือดไม่ต่ำกว่า 75% จำนวน 4 ตัว ซึ่งเป็นโคท้องว่างนมแห้ง น้ำหนัก 454.9 ± 42.2 กิโลกรัม เลี้ยงในซองขังเดี่ยวผูกยืนโรง มีราง

อาหารอยู่ด้านหน้าและมีน้ำสะอาดให้ดื่มตลอดเวลา ถ่ายพยาธิด้วยยา Valbazen และฉีดวิตามิน AD_3E ให้กับโคก่อนทำการทดลอง ทำการบันทึกน้ำหนักตัว 3 วันติดต่อกันทั้งก่อนและหลังการทดลองเพื่อบันทึกเป็นน้ำหนักตัวเฉลี่ย

- **วิธีการศึกษา** ให้โคได้รับอาหารทดลองวันละ 2 เวลา คือ 8.00 และ 16.00 น. แบ่งระยะการทดลองเป็น 2 ระยะ คือ preliminary period เป็นระยะให้โคปรับตัวคุ้นเคยกับอาหารทดลอง ใช้เวลาทั้งสิ้น 33 วัน ช่วง 14 วันแรกให้โคปรับตัวกับอาหารทดลอง โดยค่อย ๆ เพิ่มอาหารทดลองและลดอาหารเก่าที่โคเคยได้รับ และเพื่อให้อาหารเก่าที่หลงเหลือในทางเดินอาหารถูกขับถ่ายออกมาจนหมด ช่วงวันที่ 15-28 ให้โคได้รับอาหารทดลองเพียงอย่างเดียว โดยให้กินแบบเต็มที่ (*ad libitum*) ทำการบันทึกปริมาณอาหารที่โคกินได้ตามใจชอบ (voluntary feed intake,VFI) ต่อมาช่วงวันที่ 29-33 ลดปริมาณอาหารที่ให้ลงเหลือเพียง 90 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณที่กินได้เต็มที่ (90% VFI) เพื่อให้สัตว์กินอาหารทดลองได้หมด ป้องกันการเลือกกิน และเพื่อให้ปริมาณอาหารที่โคกินได้และปริมาณมูลที่ขับถ่ายออกมาอยู่ในสัดส่วนที่คงที่ ในช่วงนี้ได้ติดตั้งอุปกรณ์เก็บมูลและปัสสาวะให้กับตัวสัตว์ เพื่อให้สัตว์เกิดความเคยชิน ระยะที่สองเป็นระยะเก็บมูลและปัสสาวะ (collection period) ซึ่งใช้เวลา 6 วัน โดยบันทึกปริมาณอาหารที่กิน มูล และปัสสาวะที่ขับออกมาในแต่ละวัน ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างอาหาร มูล และปัสสาวะทุกวันวันละสองครั้ง เช้า-เย็น เพื่อนำไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมี การเก็บปัสสาวะใช้กรวยครอบบริเวณช่องขับปัสสาวะปลายกรวยต่อกับท่อซึ่งจะมีถุงสำหรับเก็บปัสสาวะผูกติดอยู่ ภายในถุงใส่กรดกำมะถัน (H_2SO_4 18 N) ปริมาณ 100 มิลลิลิตร เพื่อยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ นอกจากนี้กรดกำมะถันยังเป็นตัวช่วยจับก๊าซแอมโมเนียที่มีอยู่ในปัสสาวะด้วย ปริมาณตัวอย่างมูลที่เก็บคิดเป็น 1 เปอร์เซ็นต์ของมูลที่รวบรวมได้ในแต่ละครั้ง สำหรับปัสสาวะเก็บตัวอย่างเป็นปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ของตัวอย่างที่เก็บรวบรวมในแต่ละครั้ง ตัวอย่างอาหาร มูล และปัสสาวะที่สุ่มเก็บมาในแต่ละวันนำไปเก็บสะสมไว้ในตู้แช่แข็ง (freezer) ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เพื่อรอที่จะนำไปวิเคราะห์ทางเคมีต่อไป

- **การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี** นำตัวอย่างอาหาร มูล และปัสสาวะที่แช่แข็งมาทิ้งไว้ให้ละลาย ณ อุณหภูมิห้อง สำหรับตัวอย่างอาหารและมูลแบ่งออกเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปบดผ่านตะแกรงขนาด 1 มิลลิเมตร เพื่อนำไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีโดยวิธี proximate analysis (AOAC, 1984) วิเคราะห์เยื่อใยโดยวิธี detergent method (Goering and Van Soest, 1970; อ้างโดย บุญล้อม และสมคิด, 2539) และวิเคราะห์พลังงานในอาหารและมูลโดยใช้ adiabatic bomb calorimeter อีกส่วนหนึ่งนำไปวิเคราะห์หาโปรตีนโดยไม่ผ่านการอบแห้งเพื่อหลีกเลี่ยงการสูญเสียไนโตรเจนในระหว่างการอบแห้ง

ส่วนปัสสาวะนำไปวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจน (N) เพื่อนำไปคำนวณหาสมดุลไนโตรเจน (N-balance) ของสัตว์ทดลอง ดังสมการ

สมดุลไนโตรเจน (กรัม) = ไนโตรเจนที่กิน (กรัม) – ไนโตรเจนในมูล (กรัม) – ไนโตรเจนในปัสสาวะ (กรัม)

- การคำนวณการย่อยได้ของโภชนะ ค่าการย่อยได้แบบปรากฏ (apparent digestibility) หาได้จากสมการ

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

- การประเมินค่าพลังงาน TDN, DE, ME และ NEL

- ค่าโภชนะที่ย่อยได้ทั้งหมด หรือ ยอดโภชนะย่อยได้ (Total Digestible Nutrient, TDN) ในอาหาร คำนวณได้จากผลรวมของปริมาณโภชนะที่ย่อยได้ทั้งหมด ที่มีในอาหาร 100 ส่วน ดังนี้

$$\%TDN = DCP + DNDF + DNFC + (DEEx2.25)$$

เมื่อ DCP, DNDF, DNFC และ DEE คือ ปริมาณโปรตีนรวม, neutral detergent fiber, คาร์โบไฮเดรตที่ไม่ใช่เยื่อใย และไขมันที่ย่อยได้ในอาหาร 100 ส่วน

- ค่าพลังงานย่อยได้ (Digestible Energy, DE) หาได้จาก

พลังงานย่อยได้ = พลังงานรวมที่กิน – พลังงานรวมที่ขับออกในมูล

- การคำนวณค่าพลังงานย่อยได้ (DE) พลังงานเมแทบอไลท์ (ME) และ พลังงานสุทธิสำหรับการให้นม (NEL) จากค่าพลังงาน TDN ที่คำนวณได้จากสัตว์โดยตรง โดยใช้สูตรที่เสนอโดย NRC (1988) ดังต่อไปนี้

DE (Mcal/Kg of DM) = **0.04409 x TDN (%)**

ME* (Mcal/Kg of DM) = **-0.45 + 0.0445309 x TDN (%)**

NEL (Mcal/Kg of DM) = **0.0245 x TDN (%) – 0.12**

หรือ คำนวณจากค่าพลังงาน DE ที่คำนวณได้จากสัตว์โดยตรง โดยใช้สูตร

$$\textbf{ME(Mcal/Kg of DM)} = \textbf{-0.45 + 1.01 DE}$$

$$\textbf{NEL*(Mcal/Kg of DM)} = \textbf{0.5557 x DE – 0.12}$$

หมายเหตุ : * คือ สูตรที่ดัดแปลงจาก NRC (1988)

3.3.2 การหาการย่อยสลายในกระเพาะรูเมนโดยใช้ถุงไนลอน (*in sacco*)

- ตัวอย่างอาหารทดลอง ได้แก่ เปลือก ซัง เปลือกปนซังข้าวโพดหวานผสมรำ และพืชหมัก HC+RB นำมาอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วบดผ่านตะแกรงขนาด 2 มิลลิเมตร

- สัตว์ทดลอง แม่โคลูกผสมพันธุ์ Holstein Friesian สายเลือดไม่ต่ำกว่า 75% จำนวน 4 ตัว ซึ่งเป็นโคที่ไม่อุ้มท้องนมแห้งและเจาะกระเพาะรูเมน (fistulated cow) ไว้แล้ว เลี้ยงในซองขังเดี่ยว ผูกยืนโรง มีรางอาหารอยู่ด้านหน้า และน้ำสะอาดให้ดื่มตลอดเวลา ได้รับอาหารวันละ 2 เวลา ห่างกันเป็นระยะเวลา 8 ชั่วโมง คือ 8.00 และ 16.00 น. โดยโคได้รับอาหารทดลองวันละ 5 กิโลกรัม หญ้าสดคิดเป็นน้ำหนักแห้งวันละ 2 กิโลกรัม อ้อยตากแห้งวันละ 3 กิโลกรัม และอาหารข้นที่มีโปรตีนรวมในสูตรอาหารเท่ากับ 18 เปอร์เซ็นต์วันละ 1 กิโลกรัม

- วิธีการทดลอง ถุงไนลอนที่ใช้มีขนาด 7 x 15 เซนติเมตร ขนาดรู (pore size) 40-60 ไมครอน ก่อนบรรจุอาหารทดลองอบถุงที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วนำไปชั่งจดบันทึกน้ำหนักถุง (W_1) ชั่งตัวอย่างอาหารทดลองที่ได้เตรียมไว้แล้วประมาณ 3 กรัม (W_2) ใส่ลงในถุงไนลอน แล้วนำมาร้อยติดกับสายพลาสติกยาวประมาณ 30 เซนติเมตร นำไปหย่อนในกระเพาะรูเมนแช่ตามระยะเวลาที่ได้กำหนด คือ 4, 8, 12, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำถุงทั้งหมดออกจากกระเพาะพร้อมกันใส่ในกระติกแช่น้ำแข็งเพื่อหยุดการทำงานของจุลินทรีย์ แล้วนำมาล้างน้ำสะอาด เพื่อเอาเศษอาหารที่ติดมาออก แล้วล้างในเครื่องซักผ้าเป็นเวลา 15 นาที นำถุงที่ล้างสะอาดแล้วไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาชั่งน้ำหนักบันทึกเป็นน้ำหนักของถุงและตัวอย่างที่เหลือ (W_3) สำหรับค่า washing loss หาได้โดยชั่งตัวอย่างอาหารอีก 2 ซ้ำ ใส่ลงในถุงไนลอน นำไปแช่ในอ่างน้ำอุ่น (water bath) อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยทำในช่วงเวลาใกล้เคียงกับที่จะนำถุงไนลอนออกจากกระเพาะรูเมน

- การย่อยสลายวัตถุแห้ง (% DM degradation or disappearance) ที่ระยะเวลาต่าง ๆ หาได้จากการคำนวณดังนี้

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

เมื่อ W_1 = น้ำหนักของถุงไนลอน

W_2 = น้ำหนักของตัวอย่าง (น้ำหนักแห้ง)

W_3 = น้ำหนักของถุงไนลอนและตัวอย่างที่เหลืออยู่ในถุง

นำค่าที่คำนวณได้ไปเข้าโปรแกรมสำเร็จรูป NEWAY เพื่อคำนวณหาค่าการย่อยสลายที่เวลาต่าง ๆ โดยใช้สมการ

$$P = A + B(1 - e^{-ct})$$

เมื่อ P = ร้อยละของวัตถุแห้งที่หายไปที่เวลา t (degradation at time t)

A = ส่วนที่ละลายได้ทันที (immediately soluble material or washing loss, %)

B = ส่วนที่ไม่ละลายแต่สามารถหมักย่อยได้ (insoluble but potential fermentable material, %)

c = อัตราการย่อยสลายของส่วน B (degradation rate, fraction/h.)

A + B = การย่อยได้สูงสุด (potential degradability, %)

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

3.3.3 การหาการย่อยได้แบบ *in vitro* โดยวิธี Gas production

- การเตรียมตัวอย่างอาหาร ตัวอย่างอาหารทดลองเป็นชุดเดียวกับที่ใช้ศึกษาการย่อยได้โดยวิธีใช้ถุงไนลอน นำมาอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วบดผ่านตะแกรงขนาด 1 มิลลิเมตร

- การเตรียม rumen liquor buffer ให้เติมสารละลายต่อไปนี้ตามลำดับ ดังนี้ :-

ส่วนผสม	ปริมาตร (มล.) ต่อ 1 หลอด
1. น้ำกลั่น	14
2. **Buffer solution**	10
3. **Macro mineral solution**	5
4. **Resazurine solution**	0.025
5. **Micromineral solution**	0.0025
6. **Reduction solution**	1
7. **Rumen fluid**	10

ผสมสารละลายหมายเลข 1-5 ก่อนที่จะเก็บน้ำรูเมน (rumen fluid) แช่สารละลายในอ่างน้ำอุ่นควบคุมอุณหภูมิที่ 39 องศาเซลเซียส คนด้วย magnetic stirrer ทำให้มีสภาพไร้ออกซิเจนโดยผ่านก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ลงไปตลอดเวลาจากนั้นเติมสารละลาย Reduction solution ลงไป สีของสารละลายจะค่อย ๆ เปลี่ยนจากสีฟ้า เป็น สีชมพู และไม่มีสี ตามลำดับ ซึ่งแสดงว่าเกิด reduction อย่างสมบูรณ์แล้วจึงค่อยเติม rumen fluid ที่ได้กรองเอาเศษอาหารออกแล้วลงไป

- วิธีการทดลอง ชั่งตัวอย่างอาหารให้ได้น้ำหนักแห้ง 200 มิลลิกรัม ใส่ลงในหลอดแก้ว glass syringe ขนาดใหญ่ที่มีขีดบอกปริมาตรข้างหลอด แต่ละตัวอย่างทำ 3 ซ้ำ ใช้วาสลีนทาแกน (piston) แล้วสอดเข้าในหลอดแก้ว ในการทดลองทุกครั้งจะต้องมีตัวอย่างมาตรฐานอย่างน้อย 2 ตัวอย่าง คือ อาหารหยาบและอาหารข้นซึ่งทราบค่าก๊าซอยู่แล้ว เพื่อใช้ตรวจสอบกิจกรรมของจุลินทรีย์ในน้ำรูเมนว่าเป็นปกติดีหรือไม่ และต้องมี blank (หลอดเปล่าไม่มีตัวอย่างอาหาร) สำหรับใช้เป็นค่าหักลบเพื่อคำนวณปริมาตรก๊าซสุทธิ (GP) ที่เกิดขึ้น นำหลอดแก้วที่ใช้ไปอุ่นไว้ในตู้อบที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ หลังจากเตรียม rumen liquor buffer เรียบร้อยแล้ว นำหลอดแก้วที่ได้อุ่นไว้เติม rumen liquor buffer ลงไป 30 มิลลิลิตรต่อหลอด จากนั้นอ่านปริมาตรของส่วนผสมทั้งหมดในหลอดจากข้างหลอด บันทึกเป็นปริมาตรเริ่มต้น (V_0) แล้วนำไป incubate ในอ่างน้ำอุ่นอุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นอ่านค่าก๊าซที่เกิดขึ้นในหลอดตามระยะเวลา

4, 6, 8, 12, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง บันทึกปริมาตรก๊าซเป็นค่า V_4, V_6, V_8, V_{12}, V_{24}, V_{48}, V_{72} และ V_{96} ตามลำดับ คำนวณค่าก๊าซสุทธิที่เกิดขึ้นที่ระยะเวลาต่าง ๆ ดังสูตร

$$\mathbf{GP\ (ml/200\ mgDM)} = \frac{\mathbf{(V_t - V_0 - GP_t)\ x\ 200}}{\mathbf{W}}$$

เมื่อ GP = ปริมาตรก๊าซสุทธิที่เกิดจากการ incubate ตัวอย่างอาหาร 200 มิลลิกรัม (วัตถุแห้ง) เป็นเวลา t ชั่วโมง

V_t = ปริมาตรที่อ่านได้ข้างหลอด ณ เวลา t ชั่วโมง

V_0 = ปริมาตรเริ่มต้น

GP_t = ค่าเฉลี่ยของก๊าซที่เกิดขึ้นในหลอด blank ณ เวลา t ชั่วโมง

W = น้ำหนักแห้งของตัวอย่างอาหารทดลอง

นำค่าปริมาตรก๊าซสุทธิที่เกิดขึ้นที่ระยะเวลาต่าง ๆ ไปเข้าสมการ exponential ที่เสนอโดย Bluemmel and Orskov (1993) เพื่อคำนวณอัตราการเกิดก๊าซ ดังสมการ

$$\mathbf{P = A + B\ (1 - e^{-ct})}$$

เมื่อ P = ค่าการเกิดก๊าซที่เวลา t (gas production at time t)

A = ค่า intercept หรือ ก๊าซที่เกิดขึ้นทันที

B = ปริมาตรก๊าซที่เกิดจากการบ่มหมัก

c = อัตราการเกิดก๊าซ (gas production rate)

นำค่าก๊าซ (GP) ที่ 24 ชั่วโมง มาคำนวณการย่อยได้ของอินทรียวัตถุ (OMD) พลังงาน ME และ NEL ตามสมการของ Menke and Steingass (1988)

$$\mathbf{OMD\ (\%) = 15.38 + 0.8453GP + 0.0595XP + 0.0675XA}$$

$$\mathbf{ME\ (MJ/kgDM) = 2.20 + 0.1357GP + 0.0057XP + 0.0002859(XP)^2}$$

$$\mathbf{NEL\ (MJ/kgDM) = 0.54 + 0.0959GP + 0.0038XP + 0.0001733(XP)^2}$$

เมื่อ GP = ปริมาตรก๊าซสุทธิที่เกิดจากการบ่มหมักตัวอย่างอาหาร 200 มิลลิกรัมวัตถุแห้ง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

XP = ปริมาณโปรตีนในตัวอย่าง (กรัมต่อกิโลกรัมวัตถุแห้ง)

XA = ปริมาณเถ้าในตัวอย่าง (กรัมต่อกิโลกรัมวัตถุแห้ง)

สถานที่ทำการวิจัย

1. ศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์ อ.สันป่าตอง จ.เชียงใหม่
2. ห้องปฏิบัติการภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
3. คอกสัตว์ทดลองภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ระยะเวลาทำการทดลอง

ดำเนินการวิจัยระหว่างเดือน ตุลาคม 2541 ถึง กุมภาพันธ์ 2543

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University