

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การศึกษาแบ่งออกเป็น 3 การทดลอง คือ

1. ผลผลิตและระยะเวลาเจริญเติบโตของต้นถั่วเหลืองที่เหมาะสมสำหรับทำพืชแห้ง
2. ปริมาณการกิน การย่อยได้ และค่าพลังงานของต้นถั่วเหลืองแห้งและเปลือกฝักถั่วเหลืองในโคและแกะ
3. ประเมินคุณค่าทางอาหารของต้นถั่วเหลืองแห้งและเปลือกฝักถั่วเหลืองโดย nylon bag method และ gas production technique

การทดลองที่ 1: ผลผลิตและระยะเวลาเจริญเติบโตของต้นถั่วเหลืองที่เหมาะสมสำหรับทำพืชแห้ง

1.1 แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ Split plot มี 3 ซ้ำ ให้พันธุ์ถั่วเหลืองเป็น main plot มี 2 สายพันธุ์ คือ ถั่วเหลืองสายพันธุ์ CM-60 และ CM-001 ระยะเวลาเจริญเติบโตเป็น sub plot มี 5 ระยะ ประกอบด้วย ระยะ reproductive 1 (R1) เป็นระยะดอกบานหนึ่งดอกที่ข้อใดข้อหนึ่งบนต้นหลัก (beginning bloom), ระยะ reproductive 3 (R3) เป็นระยะฝักมีขนาด 0.5 ซม. ที่ข้อใดข้อหนึ่งในสี่ข้อบนสุดที่ใบคลี่เต็มที่ (beginning pods), ระยะ reproductive 5 (R5) เป็นระยะฝักที่ข้อใดข้อหนึ่งในสี่ข้อบนสุดมีขนาดเมล็ดประมาณ 0.3 ซม. (beginning seeds), ระยะ reproductive 7 (R7) เป็นระยะฝักเริ่มเป็นสีเหลือง ใบเหลืองประมาณครึ่งต้น (beginning maturity) และระยะ reproductive 8 (R8) เป็นระยะที่มีฝักประมาณ 95% เป็นสีน้ำตาล (full maturity)

1.2 การปลูกและดูแลต้นถั่วเหลือง

การเตรียมดิน ใช้ไถผาน 3 ไถเตรียมดิน 1 ครั้ง และไถผาน 7 ไถ 2 ครั้ง ปรับหน้าดินด้วยไถผาน 18 จากนั้นแบ่งแปลงออกเป็นแปลงย่อยขนาด 3 x 4 ม. จำนวน 30 แปลง ใส่ปุ๋ยรองพื้นสูตร 15-15-15 อัตรา 20 กก./ไร่

การปลูก ใช้วิธีหยอดเมล็ดหุลุมละ 3-5 เมล็ด (อัตราเมล็ดพันธุ์ 18-30 กก./ไร่) ระยะปลูก 20 x 20 ซม. ถอนแยกให้เหลือ 1 ต้น/หลุมเมื่อเมล็ดงอกได้ 5 วันและใส่ปุ๋ยสูตร 12-24-12 อัตรา 25 กก./ไร่ โรยระหว่างแถวต้นถั่ว และดูแลรักษาตามความจำเป็น

1.3 การเก็บตัวอย่างและบันทึกข้อมูล

ผลผลิตน้ำหนักรวมซึ่งนำหนักสดที่ตัดได้ของแต่ละระยะการเจริญเติบโต (R1 - R8) ในพื้นที่ 2x2 ม.ของแต่ละแปลงย่อย สุ่มตัวอย่างประมาณ 500 ก. อบที่อุณหภูมิ 60 °c เป็นเวลา 72 ชม. ซึ่งนำหนักแห้งของแต่ละสายพันธุ์ในแต่ละระยะการเจริญเติบโต คำนวณเป็นผลผลิตน้ำหนักรวม/ไร่

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี นำตัวอย่างพืชแห้งบดผ่านตะแกรงขนาด 1 มม. วิเคราะห์หาวัตถุแห้ง(dry matter, DM), โปรตีน(crude protein, CP), ไขมัน(ether extract, EE) และเถ้า(ash) โดยวิธี Proximate analysis (AOAC.,1984) และวิเคราะห์องค์ประกอบโครงสร้างของพืช ได้แก่ ผนังเซลล์ (neutal detergent fiber, NDF), เยื่อใยที่ไม่ละลายในกรด (acid detergent fiber, ADF) และ ADL (acid detergent lignin) โดยวิธี Detergent method (Goering and Van Soest,1970)

ปริมาณแก๊ส ทำการประเมินปริมาณวัตถุแห้งที่ย่อยได้และค่าพลังงานของต้นถั่วเหลืองแห้งโดยการวัดปริมาณแก๊สที่เกิดขึ้นตามวิธีของ Menke and Steingass (1988) โดยมีรายละเอียดเช่นเดียวกับการทดลองที่ 3.2

การวิเคราะห์ทางสถิติ การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติใช้โปรแกรมสำเร็จรูปSAS (statistical analysis system) (มนต์ชัย,2537) วิเคราะห์วาเรียนซ์ (analysis of variance) ตรวจสอบความแตกต่างค่าเฉลี่ยของสิ่งทดลอง โดยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT)

1.4 ระยะเวลาทำการทดลอง เดือนกรกฎาคม 2540 ถึงเดือนมกราคม 2541 รวม 7 เดือน

1.5 สถานที่ทดลอง ศูนย์วิจัยอาหารสัตว์ลำปาง อ.ห้างฉัตร จ.ลำปาง และภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ.เชียงใหม่

การทดลองที่ 2 : ปริมาณการกิน การย่อยได้และค่าพลังงานของต้นถั่วเหลืองแห้ง และเปลือกฝักถั่วเหลือง ในโคและแกะ

2.1 แผนการทดลอง

สัตว์ทดลอง ใช้โคลูกผสม Holstein Friesian ท้องว่างและไม่ให้น้ำนม จำนวน 4 ตัว น้ำหนักเฉลี่ย 473±10.5 กก. และแกะลูกผสม Merino พศผู้ จำนวน 6 ตัว น้ำหนักเฉลี่ย 30.0±2.9 กก.

กรงสัตว์ทดลอง (metabolism cage) สำหรับแกะเป็นกรงขังเดี่ยวขนาด (ก.ขย.ขส.) 40 x 80 x 75 ซม. พื้นเป็นตะแกรงเหล็ก มีภาชนะรองรับมูล และปัสสาวะแยกออกจากกัน ใส่กรดซัลฟิวริก 18 N จำนวน 20 มล.ในภาชนะรองรับปัสสาวะ ด้านหน้ากรงมีรางน้ำและรางอาหาร

สำหรับโคทดลองเลี้ยงแบบผูกยืนโรงแยกจึงเป็นรายตัวในช่องขนาด 110 x 200 x 150 ซม. พื้นคอกเป็นคอนกรีตลาดเทมาทางด้านท้าย มีรางน้ำและรางอาหารอยู่ด้านหน้าของ ถาดรองรับมูลอยู่ส่วนท้าย และมีกรวยครอบอวัยวะขับถ่ายปัสสาวะ เพื่อรองรับปัสสาวะให้ไหลตามท่อไปยังถุงพลาสติกที่มีกรดซัลฟูริก 18 N จำนวน 80 มล.

อาหารทดลอง การศึกษาการกิน การย่อยได้ และค่าพลังงานของต้นถั่วเหลืองแห้งใช้ต้นถั่วเหลืองตัดที่ระยะฝักเริ่มแก่ (R7) เนื่องจากต้นถั่วเหลืองมีโปรตีนสูงถึง 17 % จึงใช้หาการย่อยได้ในลักษณะอาหารเดี่ยว นำมาใช้เลี้ยงสัตว์ทดลองโดยหั่นด้วยเครื่องหั่นไฟฟ้า ให้มีขนาดท่อนยาวประมาณ 5 ซม.

การให้อาหารทดลอง ทั้งโคและแกะจะได้รับอาหารวันละ 2 ครั้ง เวลา 08.00 และ 16.00 น. พร้อมเสริมด้วยอาหารแร่ธาตุ ดังรายละเอียดในตารางที่ 5 อัตราวันละ 80 และ 12 มก./ตัวในโคและแกะตามลำดับ

ตารางที่ 5 สูตรอาหารแร่ธาตุที่ใช้เลี้ยงสัตว์ทดลอง

แร่ธาตุ	น้ำหนัก(ก.)	แร่ธาตุ	น้ำหนัก(ก.)
กระดูกป่น	750	CuSO ₄	3.7
NaCl	160	MnO	0.7
MgO	45	CoCl ₂ ·H ₂ O	0.04
S	35	Na ₂ Se	0.04
ZnO	5.5	KI	0.02

สำหรับเปลือกฝักถั่วเหลืองที่ใช้ทดลองรวบรวมจากการสีต้นถั่วเหลืองเพื่อเอาเมล็ดจากแปลงเกษตรกร โดยมีลำต้นป่นมาด้วยประมาณ 13 % เนื่องจากเปลือกฝักถั่วเหลืองมีคุณค่าทางอาหารต่ำ โดยเฉพาะ โปรตีนมีประมาณ 4 % ในการศึกษาการย่อยได้จึงไม่ให้สัตว์กินเป็นอาหารเดี่ยว แต่จะให้ร่วมกับอาหารข้น อาหารข้นที่ใช้ประกอบด้วยกากถั่วเหลืองและข้าวโพดบดในอัตรา 60 : 40 ให้สัตว์ทดลองได้รับเปลือกฝักถั่วเหลืองและอาหารข้นในสัดส่วนที่แตกต่างกัน 3 ระดับ คือ 80 : 20, 65 : 35 และ 50 : 50 ซึ่งสูตรอาหารดังกล่าวมีโปรตีนเท่ากับ 10.31, 14.50 และ 18.68 % ตามลำดับ เพื่อนำค่าการย่อยได้ของโภชนะในสูตรอาหารไปหาความสัมพันธ์กับสัดส่วนของโภชนะแต่ละชนิดที่ได้มาจากเปลือกฝักถั่วเหลือง แล้วสร้างสมการเพื่อทำนายค่าการย่อยได้ของโภชนะ ในเปลือกฝักถั่วเหลืองตามวิธี regression

ในแถววางแผนการทดลองแบบ 3x3 Latin square มี 2 ซ้ำ แถวทดลองแต่ละซัามีจำนวน 3 ตัว ให้แกะได้รับอาหาร 3 สูตร ซึ่งมีอัตราส่วนเปลือกฝักถั่วเหลือง : อาหารขี้ 3 ระดับ ดังได้กล่าวข้างต้น ดังนั้นอาหารแต่ละสูตรจึงมีจำนวน 6 ซ้ำ ส่วนโคทดลองซึ่งมีอยู่ 4 ตัวนั้น แต่ละตัวได้รับอาหาร 3 สูตรในระยะเวลาต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 6 อาหารแต่ละสูตรได้ข้อมูล 4 ซ้ำ

ตารางที่ 6 แผนผังการทดลองการกินและการย่อยได้ในโค

ระยะที่	โคตัวที่ 1	โคตัวที่ 2	โคตัวที่ 3	โคตัวที่ 4
1	อาหารสูตร 1	อาหารสูตร 2	อาหารสูตร 3	อาหารสูตร 1
2	อาหารสูตร 3	อาหารสูตร 1	อาหารสูตร 2	อาหารสูตร 2
3	อาหารสูตร 2	อาหารสูตร 3	อาหารสูตร 1	อาหารสูตร 3

การทดลองแต่ละระยะใช้เวลา 26 วัน โดย 7 วันแรกให้สัตว์ทดลองปรับตัวคุ้นเคยกับอาหารทดลองโดยให้สัตว์กินอาหารแบบเต็มที 7 วันต่อมาบันทึกปริมาณการกินได้ ส่วนอีก 12 วันสุดท้ายลดอาหารลงเหลือเพียง 90 % ของปริมาณที่กินได้ปกติเพื่อป้องกันอาหารเหลือ บันทึกปริมาณอาหารที่กินและเก็บตัวอย่างอาหารที่ให้ อาหารเหลือ มูลและปัสสาวะในช่วง 5 วันสุดท้าย

2.2 การเก็บตัวอย่างและบันทึกข้อมูล

บันทึกน้ำหนักสัตว์ทดลองโดยชั่งติดต่อกัน 3 วันก่อนเริ่มคั้นและเมื่อสิ้นสุดการทดลอง นำค่าที่ได้มาเฉลี่ยเป็นน้ำหนักสัตว์ทดลอง สุ่มเก็บตัวอย่างอาหารที่ให้ในวันแรกและวันที่ 3 ของช่วง 5 วันสุดท้ายในแต่ละระยะการทดลอง บันทึกปริมาณอาหารที่ให้ อาหารเหลือ มูลและปัสสาวะ วันละ 2 ครั้ง ก่อนให้อาหาร มูลที่ได้หลังจากชั่งน้ำหนักแล้วนำมาคลุกเคล้าให้เข้ากัน แล้วจึงสุ่มเก็บตัวอย่าง ในกรณีของโคเก็บ 1 % สำหรับแกะเก็บ 10 % และเก็บปัสสาวะในอัตราส่วนดังกล่าวเช่นกัน นำตัวอย่างมูลและปัสสาวะเก็บไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20°C เพื่อนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ตามวิธี Proximate analysis (AOAC.,1984) และ Detergent method (Goering and Van Soest,1970) และวัดค่าพลังงานด้วยเครื่อง Adiabatic Bomb Calorimeter IKA C400

2.3 การวิเคราะห์ข้อมูล

คำนวณค่าการย่อยได้ของโภชนะ และค่าพลังงานในรูปแบบ TDN, DE, ME และ NEL ตลอดจนสมดุลไนโตรเจน โดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{การย่อยได้ของโภชนะ (\%)} = \frac{\text{โภชนะที่สัตว์กิน(ก.)} - \text{โภชนะที่ขับออกในมูล(ก.)} \times 100}{\text{โภชนะที่สัตว์กิน(ก.)}}$$

ในกรณีของต้นถั่วเหลืองแห้งซึ่งทำการศึกษาโดยให้สัตว์กินเป็นอาหารเดี่ยว สามารถคำนวณการย่อยได้ของโภชนะ โดยใช้สูตรข้างบนนี้โดยตรง แต่ในกรณีของเปลือกฝักถั่วเหลืองซึ่งให้สัตว์กินร่วมกับอาหารชั้นในสัดส่วนต่างๆ 3 ระดับนั้น ต้องคำนวณค่าการย่อยได้ของโภชนะในอาหารแต่ละสูตรเสียก่อน โดยใช้สูตรข้างต้น แล้วจึงนำค่าการย่อยได้ของโภชนะในสูตรอาหารนั้นมาหาค่าสหสัมพันธ์กับสัดส่วนของโภชนะที่มาจากเปลือกฝักถั่วเหลือง จากนั้นทำการสร้างสมการถดถอย (linear regression) ; $y = a + bx$ เมื่อ $y =$ ค่าการย่อยได้ของอาหารทั้งสูตร (%) และ $x =$ สัดส่วนของโภชนะในสูตรอาหารที่ได้รับจากเปลือกฝักถั่วเหลือง (%) ทำการทำนายค่าการย่อยได้ของโภชนะในเปลือกฝักถั่วเหลือง โดยการแทนค่า x ด้วย 100 ในสมการ

สำหรับค่าโภชนะย่อยได้ทั้งหมด (Total digestible nutrient, TDN) สามารถคำนวณได้จากปริมาณโภชนะย่อยได้ที่สัตว์ได้รับในแต่ละวันหารด้วยปริมาณวัตถุดิบที่สัตว์กิน/วัน ดังสมการ

$$\text{TDN (\%)} = \frac{\text{DCP} + (\text{DEE} \times 2.25) + \text{DNDF} + \text{DNFC(ก./วัน)} \times 100}{\text{วัตถุดิบที่สัตว์กิน(ก./วัน)}}$$

จากนั้นจึงนำค่า TDN มาคำนวณค่าพลังงาน DE, ME และ NEL โดยใช้สูตร ดังนี้

$$\begin{aligned} \text{DE (Mcal/kgDM)} &= 0.04409 \text{ TDN(\%)} \\ \text{ME (Mcal/kgDM)} &= -0.45 + 0.04453 \text{ TDN(\%)}^* \\ \text{NEL (Mcal/kgDM)} &= 0.0245 \text{ TDN(\%)} - 0.12 \end{aligned}$$

และนำค่า DE จากการทดลองกับสัตว์โดยตรงมาคำนวณค่าพลังงาน ME และ NEL จากสูตร ดังต่อไปนี้

$$\begin{aligned} \text{ME(Mcal/kgDM)} &= -0.45 + 1.01 \text{ DE} \\ \text{NEL(Mcal/kgDM)} &= 0.556 \text{ DE} - 0.12^* \end{aligned}$$

หมายเหตุ * คือ สูตรที่ดัดแปลงจาก NRC(1988)

นอกจากนี้ทำการคำนวณค่าสมดุลไนโตรเจนโดยอาศัยสูตร

สมดุลไนโตรเจน (ก./วัน) = ปริมาณไนโตรเจนที่กิน - ปริมาณไนโตรเจนที่ขับออกในมูลและปัสสาวะ

2.4 ระยะเวลาทำการทดลอง เดือนสิงหาคม 2541 ถึง เดือนมกราคม 2542 รวม 6 เดือน

2.5 สถานที่ทดลอง ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ.เชียงใหม่ และ ศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์เชียงใหม่ อ.สันป่าตอง จ.เชียงใหม่

การทดลองที่ 3 : ประเมินคุณค่าทางอาหารของต้นถั่วเหลืองแห้งและเปลือกฝักถั่วเหลืองโดย nylon bag method และ gas production technique

3.1 : ประเมินคุณค่าทางอาหารของต้นถั่วเหลืองแห้งและเปลือกฝักถั่วเหลืองโดย nylon bag method

3.1.1 แผนการทดลอง

โคที่ใช้ในการทดลองเป็นโคที่ได้เจาะกระเพาะรูเมนไว้แล้วซึ่งเป็น โคลูกผสม Holstein Friesian 75 % อายุประมาณ 4 ปี ท้องว่างและไม่ให้น้ำนมจำนวน 4 ตัว นำอาหารที่ต้องการศึกษา คือ ต้นถั่วเหลืองแห้งและเปลือกฝักถั่วเหลือง ซึ่งมีที่มาเช่นเดียวกับตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองที่ 2 อาหารแต่ละชนิดนำมาบดผ่านตะแกรงขนาด 2 มม. ชั่งตัวอย่างอาหารประมาณ 3 ก. แล้วบรรจุลงในถุงไนลอนขนาด 70 x 150 มม. ซึ่งมีขนาดรูช่อง (pore size) ประมาณ 40 μ รวบปากถุงสอดเข้ากับรอยเจาะในสายยางพลาสติก สายยางเส้นหนึ่งสอดไว้เพียง 2 ถุง ขนาดความยาวของสายยางประมาณ 30 ซม. ใช้ยางรัดปากถุงและให้ยึดติดกับสายยางพลาสติกให้แน่นนำไปหย่อนลงในกระเพาะรูเมนของโค สำหรับอาหารที่สัตว์ทดลองได้รับเป็นต้นถั่วเหลืองแห้ง ในขณะที่อาหารทดลองหย่อนในกระเพาะรูเมนเป็นต้นถั่วเหลืองแห้ง แต่ในขณะที่อาหารทดลองเป็นเปลือกฝักถั่วเหลือง โคได้รับอาหารที่ประกอบด้วยเปลือกฝักถั่วเหลือง : อาหารขุ่นในอัตราส่วน 65 : 35 และมีการเสริมแร่ธาตุให้แก่โคตามปกติเช่นเดียวกับการทดลองที่ 2

อาหารทดลองถูกหย่อนลงในกระเพาะรูเมนเป็นระยะๆ อาหารทดลองแต่ละชนิดแช่อยู่เป็นระยะเวลาต่างกัน 7 ระยะ คือ 4, 8, 12, 24, 48, 72 และ 96 ชม. โดยกำหนดระยะเวลาที่นำออกจากกระเพาะรูเมนเป็นเวลาเดียวกัน อาหารทดลองแต่ละชนิดมีจำนวน 14 ถุง/ตัว แต่ละระยะจึงมี 2 ถุง (2 ซ้ำ)

เมื่อครบกำหนดเวลา นำถุงออกจากกระเพาะรูเมนแล้วนำไปแช่ในกระดิกน้ำแข็งทันที จากนั้นนำไปซักล้างในเครื่องซักผ้าอัตโนมัติ นาน 15 นาที แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 °c นาน 48 ชม. นำน้ำหนักที่เหลือไปคำนวณหาส่วนที่ถูกย่อยสลายตามวิธีของ Ørskov et al. (1980) ส่วนค่าการละลายของตัวอย่างอาหารหาโดยนำถุงบรรจุตัวอย่างมาแช่ในน้ำอุ่นอุณหภูมิ 39 °c นาน

1 ชม. แล้วนำไปชั่งล้างและอบแห้งเช่นเดียวกับตัวอย่างอื่นเพื่อคำนวณหาส่วนที่ละลายได้หรือส่วนที่หายไปเนื่องจากการล้าง (washing loss, A) ต่อไป

3.1.2 การวิเคราะห์ข้อมูล

นำค่าการย่อยสลายของวัตถุแห้งที่ระยะเวลาต่างๆ กันไปเข้าโปรแกรมสำเร็จรูป NEWAY (Ørskov and Mc. Donald, 1979) จะได้สมการ exponential , $P = a + b(1 - e^{-ct})$ เมื่อ P = ค่าการย่อยสลายของโภชนาที่เวลา t , a = ค่าของเส้นกราฟที่ตัดแกน y , $b = (A+B) - a$ และ c = อัตราการย่อยสลาย ในโปรแกรมสำเร็จรูปดังกล่าวจะแสดงค่าอื่นด้วย คือ A = ส่วนที่ละลายได้ทันที (immediately soluble fraction), B = ส่วนที่ไม่ละลายแต่สามารถหมักย่อยได้ (insoluble but potentially fermentable fraction), $A + B$ = ค่าการย่อยสลายสูงสุด และ L = ระยะเวลาที่รอให้จุลินทรีย์เข้าย่อยสลาย

3.1.3 ระยะเวลาทำการทดลอง เดือนพฤศจิกายน 2541 - เดือนกุมภาพันธ์ 2542 รวม 4 เดือน

3.1.4 สถานที่ทดลอง ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ.เชียงใหม่

3.2 : ประเมินคุณค่าทางอาหารของต้นถั่วเหลืองแห้งและเปลือกฝักถั่วเหลืองโดย gas production technique

3.2.1 แผนการทดลอง

อาหารทดลองที่ใช้ศึกษามี 2 ชนิดคือ ต้นถั่วเหลืองแห้ง และเปลือกฝักถั่วเหลือง มีที่มาเช่นเดียวกับการทดลองที่ 3.1 นำมาบดผ่านตะแกรงขนาด 1 มม. ซึ่งตัวอย่างอาหารประมาณ 200 มก. บรรจุลงใน syringe ซึ่งเป็นกระบอกแก้วมีขีดบอกรีมาตรข้างหลอดและมีแกนซึ่งมีลักษณะคล้ายกระบอกฉีดยา

ใช้โคลูกผสม Holstein Friesian 75 % อายุประมาณ 4 ปี ท้องว่างและไม่ให้นม จำนวน 4 ตัว ซึ่งเจาะกระเพาะรูเมน(fistulated cow)ไว้แล้ว เก็บของเหลวจากกระเพาะรูเมน (rumen fluid) ขณะที่ตัวอย่างอาหารทดลองเป็นต้นถั่วเหลืองแห้ง ของเหลวจากกระเพาะรูเมนที่ใช้เก็บจากโคที่ได้รับต้นถั่วเหลืองแห้งเป็นอาหาร ในทำนองเดียวกันเมื่อตัวอย่างอาหารทดลองเป็นเปลือกฝักถั่วเหลืองของเหลวจากกระเพาะรูเมนได้จากโคที่ได้รับอาหารผสมมีอัตราของเปลือกฝักถั่วเหลือง : อาหารชั้น เท่ากับ 65 : 35 โดยโคทดลองได้รับอาหารวันละ 2 ครั้ง คือ เวลา 08.00 และ 16.00 น.

การเก็บของเหลวจากกระเพาะรูเมน (rumen fluid) ทำในตอนเช้า ก่อนให้สัตว์กินอาหาร ขวดสำหรับเก็บของเหลวจากกระเพาะรูเมนมีสภาพไร้ออกซิเจน โดยใช้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ เป่าลงไป ปิดปากขวดด้วยจุกยาง แห่ขวดในกระติกที่บรรจุน้ำอุ่นอุณหภูมิ 39 °c เปิด fistula ใช้มือ ถูวงสูมตัวอย่างอาหารหมักในกระเพาะรูเมนนำมาบีบและกรองเอาส่วนที่เป็นน้ำให้ไหลผ่านผ้ากรอง อย่างรวดเร็วลงในขวดที่เตรียมไว้ให้เต็ม แล้วแห่ขวดไว้ในกระติกน้ำอุ่น เก็บของเหลวจากโคทั้ง 4 ตัว จากนั้นนำของเหลวจากกระเพาะรูเมนมากรองอีกครั้งด้วยผ้ากรองเพื่อแยกอาหารหยาบออก ทิ้งไป แล้วนำมาเติมแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ให้อิ่มตัว นำไปผสมกับสารละลายบัพเฟอร์ โดยใช้ อัตราส่วนของเหลวจากกระเพาะรูเมน 1 ส่วนต่อสารละลายบัพเฟอร์ 2 ส่วน เติมของเหลวจาก กระเพาะรูเมนพร้อมสารละลาย 30 มล.ลงใน syringe นำไปบ่มในอ่างน้ำอุ่นอุณหภูมิ 39 °c อ่านค่า ปริมาตรแก๊สที่เกิดขึ้นตามวิธีของ Menke and Steingass (1988) ที่เวลา 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72 และ 96 ชม. รวม 9 ช่วงเวลา

3.2.2 การวิเคราะห์ข้อมูล

นำปริมาตรแก๊สที่เกิดขึ้นใน syringe ที่เวลา 24 ชม.ของตัวอย่างมาตรฐานคือหญ้าแห้งและ อาหารข้น และของตัวอย่างที่ศึกษาคือต้นกล้วยแห้งและเปลือกฝักกล้วยแห้ง มาปรับให้มีวัตถุแห้ง เท่ากับ 200 มก.และคำนวณค่าปริมาตรแก๊สสุทธิ (GP) โดยใช้สูตรดังนี้

$$GP \text{ (ml/200mgDM,24h)} = \frac{(V_{24} - V_0 - GP_0) \times 200 \times (F_h + F_c)/2}{W}$$

- เมื่อ V_0 = ปริมาตรส่วนผสมทั้งหมดที่อ่านได้จาก syringe ก่อน incubate
 V_{24} = ปริมาตรแก๊สที่อ่านได้จาก syringe เมื่อ incubate ได้ 24 ชม.
 GP_0 = ปริมาตรเฉลี่ยแก๊สที่เกิดใน syringe ของ blank อ่านที่ 24 ชม.
 F_h = $44.43 / (GPh - GP_0)$: roughage correction factor
 F_c = $65.18 / (GPc - GP_0)$: concentrate correction factor
 W = น้ำหนักตัวอย่างเป็น mgDM

นำค่า GP มาคำนวณค่าการย่อยได้ของอินทรีย์วัตถุ (OMD), พลังงานเมแทบอลิก (ME) และ พลังงานสุทธิสำหรับการสร้างน้ำนม (NEL) โดยสมการของ Menke and Steingass (1988) ดังนี้

OMD (%)	=	$15.38 + 0.8453 GP + 0.0595 XP + 0.0675 XA$
ME (MJ/kgDM)	=	$2.20 + 0.1357 GP + 0.0057 XP + 0.0002859 XL^2$
NEL(MJ/kgDM)	=	$0.54 + 0.0959 GP + 0.0038 XP + 0.0001733 XL^2$
เมื่อ OMD	=	ค่าการย่อยได้ของอินทรีย์วัตถุ (%)
ME	=	พลังงานเมแทบอลิก (MJ/kgDM)
NEL	=	พลังงานสุทธิสำหรับการสร้างน้ำนม (MJ/kgDM)
GP	=	ปริมาณแก๊สสุทธิ (ml/200 mgDM,24h)
XP	=	ปริมาณโปรตีนในตัวอย่างอาหาร (g/kgDM)
XA	=	ปริมาณเถ้าในตัวอย่างอาหาร (g/kg DM)
XL	=	ปริมาณไขมันในตัวอย่างอาหาร(g/kg DM)
1KJ	=	0.239Kcal

นำค่าปริมาณแก๊สที่ชั่วโมงต่างๆของต้นถั่วเหลืองแห้งและเปลือกฝักถั่วเหลืองไปเข้าโปรแกรมสำเร็จรูป Graph Pad InPlot (GPIP) Universitaet Hohenheim (1990) จะได้สมการ exponential ; $P = a + b(1 - e^{-ct})$ เมื่อ P = ปริมาณแก๊สที่เกิดขึ้นที่เวลา t, a = ค่าของเส้นกราฟที่ตัดแกน y, a+b = ปริมาณแก๊สที่เกิดขึ้นสูงสุด และ c = อัตราการเกิดแก๊ส

3.2.3 ระยะเวลาทำการทดลอง เดือนพฤศจิกายน 2541 - เดือนกุมภาพันธ์ 2542 รวม 4 เดือน

3.2.4 สถานที่ทดลอง ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ.เชียงใหม่