บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

งานทดลองครั้งนี้มี 3 การทดลองดังนี้

การทดลองที่ 1. องค์ประกอบทางเคมีและคุณภาพของข้าวโพดหมัก

1.1 วิเคราะห์ปริมาณวัตถุแห้ง โปรตีน ไขมัน อินทรียวัตถุ และเถ้า โดยวิธี Proximate analysis (A.O.A.C, 1984)

1.2 วิเคราะห์องค์ประกอบโครงสร้างของพืชโดยวิธี Detergent method (Goering and Van Soest, 1970 อ้างโดย บุญล้อม และสมคิด, 2539)

1.3 วิเคราะห์พลังงานในอาหารและมูลโดยใช้เครื่อง IKA C400 adiabatic bomb calorimeter

1.4 วัดค่าความเป็นกรด - ด่าง (pH) ตามวิธีการของ Bal *et al.* (1997) ดังแสดงไว้ในภาคผนวก

1.5 วัดปริมาณกรดอินทรีย์ (acetic, butyric และ lactic acid) ตามวิธีการของ Zimmer (1966 อ้างโดย บุญล้อม และบุญเสริม, 2525) ดังแสดงไว้ในภาคผนวก

การทดลองที่ 2. ศึกษาการย่อยได้และค่าพลังงานของข้าวโพดหมัก

2.1 การหาการย่อยได้และค่าพลังงานโดยทดลองกับตัวสัตว์ (*in vivo*)

2.1.1 สัตว์ทดลอง ใช้โคลูกผสมพื้นเมืองโฮลสไตน์ฟรีเชี่ยน ระดับสายเลือด 75% ที่อยู่ในระยะนมแห้ง แต่ไม่อุ้มท้อง จำนวน 4 ตัว น้ำหนักเริ่มต้นประมาณ 115 ± 69.64 กิโลกรัม เลี้ยงผูกยืนโรงในซองขังเดี่ยวมีรางน้ำและรางอาหารอยู่ด้านหน้าของตัวโค รางน้ำเป็นรางอัตโนมัติ ถ่ายพยาธิด้วยยา Ivomec® ในอัตรา 9 cc ต่อตัว และฉีดวิตามิน AD_3E ในอัตรา 5 cc ต่อน้ำหนักตัว 100 กิโลกรัม ให้กับโคก่อนทำการทดลอง ชั่งน้ำหนักสัตว์เมื่อเริ่มและสิ้นสุดการทดลอง เป็นเวลา 3 วันติดต่อกัน

2.1.2 อาหารทดลอง ข้าวโพดหมักที่นำมาใช้ในการทดลองหาค่าการย่อยได้และค่าพลังงานนี้ได้นำมาจากฟาร์มโคนมโชคชัย อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา ทั้งนี้เนื่องจากการปลูก

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ข้าวโพดเพื่อนำมาหมักสำหรับงานทดลองซึ่งได้ปลูกที่ศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์เชียงใหม่ประสบปัญหาภัยแล้ง ต้นข้าวโพดที่ปลูกเมื่อถึงกำหนดตัดมีขนาดแคระแกรน ไม่เหมาะสมที่จะนำมาหมัก ข้าวโพดหมักที่นำมาจากฟาร์มโคนมโชคชัยได้จากข้าวโพดพันธุ์สุวรรณ 5 ที่ทำการตัดเมื่อระยะเมล็ดเป็นแป้งประมาณ 50% ของเมล็ด หั่นเป็นชิ้นขนาดประมาณ 2-3 เซนติเมตร หมักในหลุมคอนกรีตแนวนอนที่ขุดลึกลงไปในดิน (Trench silo) หลังจากหมักแล้วประมาณ 30 วัน ได้เปิดหลุมนำข้าวโพดมาบรรจุในถุง 2 ชั้น ๆ นอกเป็นถุงใยสังเคราะห์ ส่วนชั้นในเป็นถุงพลาสติกสีดำขนาด 36x45 นิ้ว ดูดอากาศออกให้มากที่สุดและมัดปากถุงชั้นในให้แน่น ส่วนถุงด้านนอกเย็บปากถุงโดยใช้เครื่องเย็บกระสอบ ขนย้ายมาเลี้ยงโคนมที่คอกสัตว์ทดลองคณะเกษตรศาสตร์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

2.1.3 ระยะเวลาในการทดลอง

2.1.3.1 ระยะเริ่มแรก (preliminary period) ใช้เวลา 21 วัน โดย 14 วันแรกจะให้สัตว์กินอาหารอย่างเต็มที่ เพื่อวัดปริมาณอาหารที่สัตว์กินได้ (voluntary feed intake, VFI) หลังจากนั้นอีก 7 วัน ให้สัตว์กินอาหารในปริมาณ 90% ของปริมาณอาหารที่กินได้เต็มที่เพื่อหลีกเลี่ยงไม่ให้มีอาหารเหลือในช่วงระยะเก็บข้อมูล โดยให้โคกินข้าวโพดหมักเป็นอาหารเดี่ยวผสม sodium bicarbonate ($NaHCO_3$) ซึ่งเป็นบัพเฟอร์ในอัตรา 120 กรัม/ตัว/วัน เพื่อป้องกันไม่ให้กระเพาะรูเมนมีสภาพเป็นกรดมากเกินไป ให้อาหารวันละ 2 ครั้ง คือเวลา 8.00 น.และ16.00 น.

2.1.3.2 ระยะเก็บข้อมูล (collection period) ใช้เวลา 5 วัน ให้โคกินข้าวโพดหมักในปริมาณ 90% ของปริมาณอาหารที่กินได้เต็มที่ วิธีให้อาหารเช่นเดียวกับระยะเริ่มแรก เก็บตัวอย่างข้าวโพดหมักที่ให้ทุกวัน ๆ ละ 1 ครั้ง ส่วนอาหารเหลือจะเก็บทุกครั้งก่อนให้อาหารมื้อต่อไป บันทึกปริมาณมูลและปัสสาวะที่ขับออกมาวันละ 2 ครั้ง ก่อนให้อาหารเช้าและบ่าย เก็บมูลวันละ 5% และปัสสาวะวันละ 1% ของน้ำหนักที่ขับออกทั้งหมด เก็บมูลโดยใช้ถาดรองรับอยู่ด้านล่าง เก็บปัสสาวะโดยใช้กรวยครอบที่ช่องขับถ่ายปัสสาวะของตัวโค โดยมีสายยึดโยงติดกับลำตัวให้ปัสสาวะไหลตามท่อลงสู่ถุงเก็บที่มีกรดซัลฟูริก (H_2SO_4) เข้มข้น 50% ปริมาณ 200 มิลลิลิตร/วัน เพื่อป้องการระเหยของแอมโมเนีย นำตัวอย่างมูล, ปัสสาวะ, อาหารที่ให้ และอาหารเหลือของโคแต่ละตัวที่เก็บในแต่ละวันสะสมไส่ไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซียลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

2.1.4 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

นำตัวอย่างอาหาร มูล และปัสสาวะที่แช่แข็งมาทิ้งไว้ให้ละลายที่อุณหภูมิห้อง แบ่งตัวอย่างอาหารและมูลออกเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซียลเซียส เป็น

เวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปบดผ่านตะแกรงขนาด 1 มิลลิเมตร เพื่อนำไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีโดยวิธี proximate analysis วิเคราะห์เยื่อใยโดยวิธี detergent method และวิเคราะห์พลังงานในอาหารและมูลโดยใช้เครื่อง IKA C400 adiabatic bomb calorimeter อีกส่วนหนึ่งนำไปวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนจากตัวอย่างสด เพื่อนำไปคำนวณหาสมดุลไนโตรเจน (N-balance) ของโคทดลอง ดังสมการ

สมดุลไนโตรเจน (กรัม/วัน) = ไนโตรเจนที่กิน (กรัม/วัน) - ไนโตรเจนในมูล (กรัม/วัน) - ไนโตรเจนในปัสสาวะ (กรัม/วัน)

- คำนวณค่าการย่อยได้ของโภชนะแต่ละชนิดจากสมการ

$$\textbf{โภชนะที่ย่อยได้ (\%)} = \frac{\textbf{โภชนะที่กิน (กรัม) - โภชนะที่ขับออกในมูล (กรัม)}}{\textbf{โภชนะที่กิน (กรัม)}} \times 100$$

- คำนวณค่าโภชนะย่อยได้ทั้งหมด (total digestible nutrient, TDN) **โดยใช้สูตร**

$$\mathrm{TDN}(\%) = \mathrm{DCP} + \mathrm{DNDF} + \mathrm{DNFC} + (\mathrm{DEE} \times 2.25)$$

เมื่อ DCP, DNDF, DNFC และ DEE คือปริมาณโปรตีน, NDF, NFC และไขมันที่ย่อยได้ตามลำดับ (กรัม/100 กรัม)

สำหรับค่าพลังงานย่อยได้ (digestible energy, DE) พลังงานเมแทบอไลซ์ (metabolizable energy, ME) และพลังงานสุทธิ (net energy for lactation, NEL) คำนวณจาก TDN โดยใช้สูตรของ NRC (2001) และสูตรที่ดัดแปลงจาก NRC (2001) ดังนี้คือ

$$\mathrm{DE\ (Mcal/kg)} = 0.04409\ \mathrm{TDN}$$

$$\mathrm{ME\ (Mcal/kg)} = -0.45 + 0.04453\ \mathrm{TDN}\ *$$

$$\mathrm{NEL(Mcal/kg)} = 0.0245\ \mathrm{TDN} - 0.12$$

หรือคำนวณจาก DE โดยใช้สูตร

$$\mathrm{ME\ (Mcal/kg)} = -0.45 + 1.01\ \mathrm{DE}$$

$$\mathrm{NEL\ (Mcal/kg)} = 0.556\ \mathrm{DE} - 0.12\ *$$

หมายเหตุ : * คือสูตรที่ดัดแปลงจาก NRC (2001)

2.2 การหาค่าการย่อยสลายโดยใช้เทคนิคถุงไนลอน (nylon bag technique)

หาการย่อยสลายของข้าวโพดหมักโดยใช้เทคนิคถุงไนลอน ตามวิธีการของ Orskov *et al.* (1988)

2.2.1 การเตรียมตัวอย่าง นำข้าวโพดหมักมาอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซียลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นบดผ่านตะแกรงขนาด 2 มิลลิเมตร

2.2.2 สัตว์ทดลอง แม่โคนมแห้งไม่อุ้มท้อง พันธุ์ลูกผสมพื้นเมืองโฮลสไตน์ฟรีเซี่ยน ระดับสายเลือด 75% จำนวน 4 ตัว ซึ่งเป็นโคที่เจาะกระเพาะรูเมนไว้แล้ว เลี้ยงผูกยืนโรงในซองขังเดี่ยว มีรางอาหารและรางน้ำอยู่ด้านหน้า ได้รับอาหารเป็นข้าวโพดหมักอย่างเดียว ให้อาหารวันละ 2 ครั้ง คือ เวลา 8.00 น. และ 16.00 น.

2.2.3 วิธีการทดลอง ใช้ถุงไนลอนที่มีขนาด 7x15 เซนติเมตร มีขนาดรูผ้า (pore size) 40-60 μm ก่อนบรรจุอาหารลงถุงได้ทำการอบถุงที่อุณหภูมิ 60 องศาเซียลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วนำไปชั่งจดบันทึกน้ำหนักถุง (W_1) ชั่งตัวอย่างประมาณ 3 กรัม (W_2) ใส่ในถุงไนลอน ผูกถุงอาหารติดกับสายยางเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร ยาวประมาณ 40 เซนติเมตร แล้วจุ่มแช่ในกระเพาะรูเมนที่ช่วงเวลาต่าง ๆ กัน คือ 4, 8, 12, 24, 48,72 และ 96 ชั่วโมง จากนั้นนำถุงทั้งหมดออกจากกระเพาะรูเมนพร้อมกัน นำมาล้างน้ำสะอาดเพื่อเอาเศษอาหารที่ติดมาออก แล้วล้างในเครื่องซักผ้าเป็นเวลา 15 นาที นำถุงที่สะอาดแล้วไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซียลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาชั่งน้ำหนักเป็นน้ำหนักของถุงและตัวอย่างที่เหลือ (W_3) ส่วนค่า washing loss (A) หาโดยชั่งตัวอย่างใส่ถุงไนลอนอีก 2 ถุง นำไปแช่ในอ่างน้ำอุ่น (water bath) ที่อุณหภูมิ 39 องศาเซียลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยทำในช่วงเวลาใกล้เคียงกับที่จะนำถุงไนลอนออกจากกระเพาะรูเมน คำนวณเปอร์เซ็นต์วัตถุแห้งที่หายไป (% dry matter disappearance) ดังสมการ

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

เมื่อ W_1 = น้ำหนักถุง (กรัม)
W_2 = น้ำหนักตัวอย่างอาหารเริ่มต้น (กรัม)
W_3 = น้ำหนักถุง และตัวอย่างอาหารที่เหลือในถุงหลังอบ (กรัม)

นำค่า %DM disappearance ที่ชั่วโมงต่าง ๆ ไปเข้าโปรแกรมสำเร็จรูป NEWAY เพื่อคำนวณหาค่าการย่อยได้โดยใช้สมการ

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

เมื่อ P = การย่อยสลายของโภชนะที่เวลา t (degradation at time t)

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

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

$A + B$ = ค่าการย่อยได้สูงสุดของวัตถุแห้ง (potential degradability,%)

a = ค่าของเส้นกราฟที่ตัดแกน y

b = $(A + B) - a$

c = ค่าคงที่ของอัตราการย่อยสลาย (degradation rate constant, fraction/h)

e = ค่าคงที่ logarithm

t = ณ เวลาใดเวลาหนึ่ง

L = ระยะเวลาที่รอให้จุลินทรีย์เข้าสัมผัสอาหารและทำการย่อยสลาย (lage phase)

2.3 การหาค่าการย่อยสลายโดยวิธีวัดปริมาณแก๊ส (gas production technique)

หาการย่อยสลายของข้าวโพดหมักโดยวัดปริมาณแก๊ส (gas production technique) ตามวิธีการของ Menke and Steingass (1988)

2.3.1 การเตรียมตัวอย่าง โดยใช้ข้าวโพดหมักชุดเดียวกับที่ใช้ศึกษาการย่อยได้โดยวิธีถุงไนลอน นำมาอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซียลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง บดผ่านตะแกรงขนาด 1 มิลลิเมตร

2.3.2 การเตรียม rumen liquor buffer ให้เติมสารละลายตามลำดับ ดังนี้

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

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ผสมสารละลายหมายเลข 1-5 ก่อนที่จะเก็บน้ำรูเมน (rumen fluid) นำสารละลายใส่ขวดแช่ในอ่างน้ำอุ่นที่ปรับอุณหภูมิ 39 องศาเซียลเซียส คนด้วย magnetic stirrer ผ่านแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ลงไปตลอดเวลาเพื่อทำให้เกิดสภาพไร้ออกซิเจน จากนั้นเติมสารละลาย reduction solution ลงไป สีของสารละลายจะค่อย ๆ เปลี่ยนจากสีฟ้าเป็นสีชมพู และไม่มีสี ตามลำดับ ซึ่งแสดงว่าเกิด reduction อย่างสมบูรณ์ จึงเติม rumen fluid ที่ได้กรองเอาเศษอาหารออกแล้วลงไป

2.3.3 วิธีการทดลอง ชั่งตัวอย่างอาหารทดลองประมาณ 200 มิลลิกรัม ใส่ลงในหลอด glass-syringe ขนาด 100 มิลลิลิตร ปลายหลอดต่อกับท่อสายยางสั้น ๆ และมีคลิปหนีบอยู่ตรงปลายสายยาง สำหรับปิด-เปิด เพื่อให้ของเหลวและอากาศผ่านเข้า-ออก แต่ละตัวอย่างทำ 3 ซ้ำ ในการทดลองทุกครั้งต้องมีตัวอย่างมาตรฐานอย่างน้อย 2 ตัวอย่าง คือ อาหารหยาบและอาหารข้น ซึ่งทราบค่าแก๊สอยู่แล้วเพื่อตรวจสอบกิจกรรมของจุลินทรีย์ในน้ำรูเมนว่าเป็นปกติหรือไม่ และต้องมี blank (หลอดเปล่าไม่มีตัวอย่างอาหาร) สำหรับใช้เป็นค่าหักลบในการคำนวณค่าแก๊สสุทธิ (GP) ที่เกิดขึ้น นำหลอดแก้วที่บรรจุตัวอย่างแล้วไปอุ่นในตู้อบที่อุณหภูมิ 39 องศาเซียลเซียส หลังจากเตรียม rumen liquor buffer เสร็จแล้วให้นำหลอดแก้วที่อุ่นไว้มาเติม rumen liquor buffer หลอดละ 30 มิลลิลิตร อ่านปริมาตรทั้งหมดจากข้างหลอดบันทึกเป็นปริมาตรเริ่มต้น (V_0) นำไป incubate ในอ่างน้ำอุ่นที่มีอุณหภูมิ 39 $^{\circ}$C อ่านค่าแก๊สที่เกิดขึ้นในช่วงเวลา 4, 6, 8, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง บันทึกปริมาตรแก๊ส คำนวณค่าแก๊สสุทธิ (net gas production) ที่ 24 ชั่วโมง โดยนำค่าแก๊สที่เกิดขึ้นในหลอด blank (GP_0) ซึ่งปกติจะได้ประมาณ 6-12 มล./24 ชั่วโมง ไปหักออกจากค่าแก๊สของตัวอย่างมาตรฐาน และตัวอย่างที่ต้องการศึกษาที่ได้ปรับน้ำหนักวัตถุแห้งให้เท่ากับ 200 มิลลิกรัม พอดี จะได้ค่าสุทธิ (GP) ดังในสมการ

$$GP\ (ml/200\ mg\ DM\ ) = \frac{(V_t - V_0 - GP_t) \times 200 \times (F_H+F_C)/2}{W}$$

เมื่อ GP = ปริมาตรแก๊สสุทธิ (มล.) ที่เกิดจากการ incubate ตัวอย่างอาหาร 200 มิลลิกรัม (วัตถุแห้ง) ที่ เวลา t ชั่วโมง

V_0 = ปริมาตรแก๊สก่อนการ incubate (มล.)

V_t = ปริมาตรแก๊สเมื่อ incubate ได้ t ชั่วโมง (มล.)

GP_t = ปริมาตรแก๊สที่เกิดขึ้นในหลอด blank ที่เวลา t ชั่วโมง (มล.)

W = น้ำหนักตัวอย่าง (มิลลิกรัมน้ำหนักแห้ง)

F_H = roughage correction factor = $44.16/(Gb_H-GP_0)$

F_C = concentrate correction factor = $62.2/(Gb_C-GP_0)$

Gb_H = ปริมาตรแก๊สที่เกิดจากการ incubate ตัวอย่างอาหารหยาบมาตรฐาน (มล.)

Gb_C = ปริมาตรแก๊สที่เกิดจากการ incubate ตัวอย่างอาหารข้นมาตรฐาน (มล.)

นำค่าแก๊สที่อ่านเป็นระยะ ๆ ที่ชั่วโมงต่าง ๆ ไปเขียนกราฟ และเข้าสมการเพื่อหาปริมาณแก๊สสูงสุดที่ผลิตได้และอัตราการเกิดแก๊ส โดยใช้สมการเดียวกันกับ nylon bag technique ดังนี้

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

เมื่อ P = ปริมาตรแก๊สที่เกิดขึ้นที่เวลา t

A = ปริมาตรแก๊สที่เกิดขึ้นทันที

B = (a + b) - A

a = ปริมาตรแก๊สที่เกิดจากการลากเส้นกราฟตัดแกน y

a + b = ปริมาตรแก๊สทั้งหมดที่เกิดขึ้น

c = อัตราการเกิดแก๊ส

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

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

$$\text{ME (MJl/kgDM)} = 2.20 + 0.1357GP + 0.0057XP + 0.0002859(XL)^2$$

$$\text{NEL (MJ/kgDM)} = 0.54 + 0.0959GP + 0.00388XP + 0.0001733(XL)^2$$

เมื่อ GP = ปริมาตรแก๊สสุทธิที่เกิดจากการ incubate ตัวอย่างอาหาร 200มิลลิกรัมวัตถุแห้งเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

XP = ปริมาณโปรตีนในตัวอย่าง (กรัม/กิโลกรัมวัตถุแห้ง)

XA = ปริมาณเถ้าในตัวอย่าง (กรัม/กิโลกรัมวัตถุแห้ง)

XL = ปริมาณไขมันในตัวอย่าง (กรัม/กิโลกรัมวัตถุแห้ง)

การทดลองที่ 3. ศึกษาผลการใช้ข้าวโพดหมักเป็นอาหารหยาบหลักในอาหารผสมครบส่วนเลี้ยงโคให้นมสูง

3.1 สัตว์ทดลอง ใช้แม่โคนมลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเชี่ยน จำนวน 4 ตัว ระดับสายเลือด 87.5% น้ำหนักเริ่มต้นประมาณ 455 ± 17.06 กิโลกรัม อยู่ในช่วงหลังคลอดประมาณ 111 วัน ให้ผลผลิตน้ำนมประมาณ 18 กิโลกรัม/วัน

3.2 คอกทดลอง เป็นซองขังเดี่ยวมีราวเหล็กกั้นระหว่างโคแต่ละตัว มีรางน้ำและรางอาหารอยู่ด้านหน้า รางน้ำเป็นแบบอัตโนมัติ

3.3 อาหารทดลอง

ข้าวโพดหมักที่ใช้ในการทดลองนี้เป็นข้าวโพดหมักคนละหลุมกับที่ใช้ในงานทดลองที่ 2 เนื่องจากปริมาณข้าวโพดหมักที่ขนย้ายจากฟาร์มโคนมโชคชัยมาเพื่อใช้ในการทดลองที่ 2 มีปริมาณไม่เพียงพอสำหรับการทดลอง+ที่ 3 ดังนั้นจึงได้ทำการปลูกข้าวโพดชุดใหม่ขึ้นมาและนำมาหมักเพื่อใช้ในการทดลองนี้ โดยใช้ข้าวโพดพันธุ์สุวรรณ 5 ปลูกที่ศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์เชียงใหม่ ในเดือน กรกฎาคม 2543 ตัดทั้งต้นพร้อมฝักที่ระยะเมล็ดเป็นแป้งประมาณ 1/2 ของเมล็ด โดยใช้รถแทรกเตอร์ที่มีเครื่องตัดในตัวทำการหมักในหลุมคอนกรีตแบบ trench silo ซึ่งมีความจุประมาณ 200 ตัน ขนาดชิ้นส่วนของต้นข้าวโพดที่หั่นก่อนหมักมีขนาดประมาณ 2-3 เซนติเมตร ใช้รถแทรกเตอร์เหยียบกองข้าวโพดเพื่ออัดให้แน่นช่วยให้อยู่ในสภาพอับอากาศ ใช้เวลาบรรจุข้าวโพดลงในหลุม 5 วัน ปิดหลุมหมักโดยใช้ผ้าพลาสติกสีดำคลุมให้ทั่วและทับด้วยยางรถยนต์

หลังจากหมักแล้วประมาณ 21 วัน (เปิดหลุมประมาณวันที่ 10 ตุลาคม 2543) นำมาประกอบสูตรอาหาร TMR ปรับระดับพลังงานโดยใช้ข้าวโพดบดและน้ำมันถั่วเหลือง ปรับระดับโปรตีนด้วยกากถั่วเหลืองและเมล็ดฝ้ายเพื่อเพิ่มโภชนะให้ได้ตามต้องการ นอกจากนี้ยังมีหญ้ารูซี่แห้ง กระตุ้นการเคี้ยวเอื้องและหลั่งน้ำลาย เพื่อป้องกันไม่ให้กระเพาะรูเมนมีสภาพเป็นกรดมากเกินไป และมีการเสริมแร่ธาตุผสม การคำนวณสูตรอาหาร TMR ทำโดยใช้โปรแกรม Xration (สมคิด, 2542) ทำการปรับสูตรอาหารตามปริมาณน้ำนมที่โคผลิตได้ โดยคิดค่าเฉลี่ยทุกช่วงเวลา 5 วัน

สูตรอาหารที่ใช้มีทั้งหมด 4 สูตร แต่ละสูตรมีระดับ TDN และ CP เท่ากับความต้องการของโคตามที่ NRC (1988) แนะนำ หรือสูงกว่าที่ NRC (1988) แนะนำ 20% ตัวอย่างสูตรอาหารที่ใช้ทดลองแสดงในตาราง 5 ส่วนแร่ธาตุผสมที่ใช้ในสูตรอาหารจะทำการผสมเอง ซึ่งแต่ละ 1 กิโลกรัมประกอบด้วยแร่ธาตุต่างๆ ดังแสดงในตาราง 6

ตาราง 5. ส่วนประกอบของอาหารผสมครบส่วน

Component of Total Mixed Ration (TMR)

Item	Diet			
	T_1	T_2	T_3	T_4
TDN & CP	1.0 & 1.0	1.0 & 1.2	1.2 & 1.0	1.2 & 1.2
Ingredient (kg fresh/day)				
Corn silage	14.64	14.25	16.84	16.93
Ruzi hay	1.19	1.26	1.42	1.35
Whole cotton seed	1.53	1.59	1.83	1.82
Soybean meal	3.1	4.71	2.37	3.75
Ground corn	2.2	1.05	4.25	3.12
Soybean oil	0.64	0.65	0.75	0.77
$NaHCO_3$	0.12	0.13	0.14	0.14
$CaCO_3$	0.06	0.06	0.06	0.06
Mineral mix	0.16	0.17	0.11	0.11
Vitamin (g)	4.42	4.06	3.6	3.58

1.0 - TDN or CP was given according to the requirement followed NRC (1988) recommendation

1.2 - TDN or CP was given 20% higher than requirement which recommended by NRC (1988)

ตาราง 6. ส่วนประกอบของแร่ธาตุผสม (กรัม/กิโลกรัม)

Component of mineral mixture (g/kg)

แร่ธาตุ	กรัม	แร่ธาตุ	กรัม
NaCl	375	ZnO	2.5
$Ca_3(PO_4)_2$	351	MnO	2.5
$CaCO_3$	133	$CuSO_4$	1.0
MgO	75	KIO_3	0.11
S	34	$CoSO_4$	0.029
Na_2SO_4	26	Na_2SeO_3	0.029

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

เนื่องจากข้าวโพดหมักที่ใช้ในการทดลองนี้ไม่ได้หาค่าการย่อยได้ เนื่องมาจากข้อจำกัดหลายด้าน เป็นต้นว่า ระยะเวลาที่ต้องดำเนินการทดลองให้แล้วเสร็จ และจำนวนสัตว์ที่ใช้ในการหาการย่อยได้ ดังนั้นค่า TDN ของข้าวโพดหมักที่ใช้ในการทดลองนี้ จึงทำการประเมินจากสมการของ Kearl (1982) ซึ่งจะได้ค่า TDN อาหารผสมครบส่วนของแต่ละสูตร เมื่อนำสมการนี้มาใช้ประเมินค่า TDN ของข้าวโพดหมักที่ใช้ในการทดลองที่ 2 พบว่าได้ค่า TDN เท่ากับ 65.81% เมื่อเทียบกับค่า TDN ที่ได้จากการทดลองกับสัตว์ของการทดลองที่ 2 คือ 65.22% จะเห็นได้ว่ามีความใกล้เคียงกันมากระหว่างค่าที่ได้จากการประเมินโดยสมการกับค่าที่ได้จากการทดลองกับสัตว์ ประเมินค่า TDN ของวัตถุดิบอาหารสัตว์ในการทดลองที่ 3 นี้ได้ โดยใช้สมการดังต่อไปนี้

$$\text{TDN of silage (\%DM)} = -21.9391 + 1.0538(\%\text{CP}) + 0.9736(\%\text{NFE}) + 3.0016(\%\text{EE}) + 0.4590(\%\text{CF})$$

$$\text{TDN of dry roughage (\%DM)} = -17.2649 + 1.2120(\%\text{CP}) + 0.8352(\%\text{NFE}) + 2.4637(\%\text{EE}) + 0.4475(\%\text{CF})$$

$$\text{TDN of energy feed (\%DM)} = 40.2625 + 0.1969(\%\text{CP}) + 0.4228(\%\text{NFE}) + 1.1903(\%\text{EE}) - 0.1379(\%\text{CF})$$

$$\text{TDN of protein supplement (\%DM)} = 40.3227 + 0.5398(\%\text{CP}) + 0.4448(\%\text{NFE}) + 1.4218(\%\text{EE}) - 0.7007(\%\text{CF})$$

3.4 การให้อาหาร

ให้อาหารวันละ 2 ครั้ง คือ เวลา 8.00 น. และ 16.00 น. รีดนมโควันละ 2 ครั้ง คือเวลา 05.30 น. และ 15.30 น. โดยใช้เครื่องรีดนมแบบถัง

3.5 แผนและวิธีการทดลอง

ใช้แผนการทดลองแบบ 2x2 factorial arrangement in 4x4 Latin square โดยทำการศึกษา 2 ปัจจัย ๆ แรกคือ ระดับ TDN ส่วนปัจจัยที่ 2 คือ ระดับ CP แต่ละปัจจัยมี 2 ระดับ คือ ระดับตามความต้องการของโคตามที่ NRC (1988) แนะนำ และที่ระดับสูงกว่าความต้องการ 20% ให้โคแต่ละตัวได้รับอาหารทดองสูตรละ 1 คาบ (period) ทำการสับเปลี่ยนหมุนเวียนอาหารไปจนครบ 4 คาบ ๆ ละ 21 วันเมื่อเสร็จการทดลองคาบหนึ่ง จะเริ่มคาบใหม่โดยให้โคได้ปรับตัวกับอาหารทดลองใหม่ 5 วัน ส่วนอีก 15 วัน เป็นช่วงเก็บข้อมูล

3.6 การบันทึกข้อมูลและเก็บตัวอย่าง

3.6.1 บันทึกน้ำหนักสัตว์เมื่อเริ่มและสิ้นสุดการทดลองในแต่ละคาบ โดยใช้สายวัดชนิดพิเศษที่มีตัวเลขบอกความยาวรอบอก (นิ้ว) และน้ำหนักตัวสัตว์ (ปอนด์) แล้วแปลงค่าน้ำหนักตัวสัตว์เป็นกิโลกรัมโดยนำน้ำหนักตัวสัตว์ที่วัดได้เป็นปอนด์หารด้วย 2.2

3.6.2 บันทึกปริมาณอาหารที่ให้และอาหารเหลือ (ถ้ามี) เก็บตัวอย่างสะสมไว้เพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

3.6.3 เก็บตัวอย่างข้าวโพดหมักที่ให้ทุกวัน ๆ ละ 1 ครั้ง ส่วนตัวอย่างวัตถุดิบชนิดอื่นเก็บคาบละ 3 ครั้ง

3.6.4 บันทึกปริมาณน้ำนมที่เก็บในแต่ละวัน และสุ่มเก็บตัวอย่างน้ำนมทั้งตอนเช้าและตอนเย็นในอัตรา 1% โดยเก็บคาบละ 3 ครั้ง ในช่วงวันแรก, ช่วงกลาง และในวันสุดท้ายของแต่ละคาบ รักษาสภาพน้ำนมโดยใช้ sodium azide ในอัตรา 0.1% เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 8 องศาเซียลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

3.7 การวิเคราะห์ทางเคมี

3.7.1 นำตัวอย่างวัตถุดิบแต่ละชนิดได้แก่ ข้าวโพดหมัก ข้าวโพดบด กากถั่วเหลือง หญ้าแห้ง เมล็ดฝ้าย มาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีตามการทดลองที่ 2.1.6

3.7.2 วัดค่า pH ของข้าวโพดหมักตามการทดลองที่ 1.4

3.7.3 วิเคราะห์หาปริมาณกรดอินทรีย์ในข้าวโพดหมักตามการทดลองที่ 1.5

3.7.4 วิเคราะห์หาปริมาณแอมโมเนียในในข้าวโพดหมัก ตามวิธีการของ Chen *et al.* (1994)

3.7.5 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของตัวอย่างน้ำนม เช่น DM, EE, CP, solid not fat (SNF), total solid (TS) และ lactose โดยใช้เครื่อง Milkoscan 133 V 3.9 GB

3.7.6 วิเคราะห์หาปริมาณยูเรียไนโตรเจนในน้ำนม (Milk Urea Nitrogen, MUN) ตามวิธีการของ Roselor *et al.* (1993) ที่แสดงไว้ในภาคผนวก

3.8 การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ผลการทดลองโดยวิธีวิเคราะห์วาเรียนซ์ (Analysis of Variance) ตามแผนการทดลองแบบ 2x2 factorial arrangement in 4x4 Latin square นอกจากนี้ยังปรับให้เกิดความยุติธรรมด้วยตัวแปรร่วม อาทิเช่น จำนวนวันให้นม (day in milk), จำนวนครั้งที่ให้นม (lactation number) และอายุของโคแต่ละตัว เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มโดยวิธี Duncan's new multiple range test โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

สถานที่ทำการวิจัย

1. ห้องปฏิบัติการภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
2. ห้องปฏิบัติการศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์เชียงใหม่ ต. ยุหว่า อ. สันป่าตอง จ. เชียงใหม่
3. คอกสัตว์ทดลองภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
4. ฟาร์มโคนมของศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์เชียงใหม่ ต. ยุหว่า อ. สันป่าตอง จ. เชียงใหม่

ระยะเวลาในการทดลอง

มีนาคม 2543 ถึง เมษายน 2544 ใช้เวลาในการทำวิจัยทั้งหมดประมาณ 13 เดือน

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University