บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

2.1 การผลิตซอสถั่วเหลือง (Soy Sauce Process)

การผลิตซอสถั่วเหลืองของโรงงานอุตสาหกรรมในประเทศใช้วัตถุดิบหลักในการผลิตคือ ถั่วเหลืองทั้งเมล็ด แป้งข้าวสาลี หรือแป้งข้าวจ้าว เกลือ และน้ำ (สถาบันค้นคว้า และพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร, 2527) ขั้นตอนการผลิตซอสถั่วเหลืองแบ่งเป็น 3 ช่วง ช่วงแรกเป็นช่วงของการเตรียมหัวเชื้อบนลูกแป้ง และถั่วเหลือง เรียกว่าโคจิ (koji) จะใช้เวลาประมาณ 1 สัปดาห์ โดยนำถั่วเหลืองที่ผ่านการคัดเลือกแช่น้ำเพื่อให้พองตัว และนำมานึ่งแล้วปล่อยให้เย็น จากนั้นนำถั่วเหลืองที่ได้มาผสมกับข้าวสาลีที่คั่ว และบดแล้ว ในอัตราส่วน 1:1 แล้วนำมาผ่สมกับเชื้อในถาด เก็บที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความชื้น 100 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ช่วงที่ 2 เรียกว่าโมโรมิ (moromi) นำหัวเชื้อโคจิที่เตรียมได้มาหมักในน้ำเกลือที่มีความเข้มข้น 24-25 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วนโคจิ 20-25 กิโลกรัมต่อน้ำเกลือ 60 ลิตร บ่มเป็นเวลา 6-12 เดือน ช่วงสุดท้ายนำซอสถั่วเหลืองที่บ่มได้มาสกัดแยกส่วนที่เป็นของเหลวกับกากออกจากกัน ของเหลวที่ได้จากการสกัดคือน้ำซอสถั่วเหลืองดิบ ซึ่งต้องนำมาผ่านกรรมวิธีการต้ม กรอง และบรรจุขวดเป็นผลิตภัณฑ์ (วิเชียร, 2522) สำนักงานเศรษฐกิจการคลัง (2542) รายงานว่าในปี 2542 มีกากซอสถั่วเหลืองที่ได้จากอุตสาหกรรมการผลิตซอสถั่วเหลืองประมาณ 3,000 ตัน จากโรงงานผลิตในประเทศ 68 โรงงาน

กากซอสถั่วเหลืองเป็นผลพลอยได้จากการบีบแยกน้ำซอสถั่วเหลืองดิบของเหลวกับกากซอสถั่วเหลืองออกจากกัน ในอุตสาหกรรมการผลิตซอสถั่วเหลือง โดยเศษเหลือที่ได้ประกอบด้วยข้าวสาลีกับเมล็ดถั่วเหลือง ที่ผ่านการหมักกับจุลินทรีย์ น้ำเกลือ และผ่านกรรมวิธีต่างๆจนได้น้ำซอสถั่วเหลืองในขั้นสุดท้าย (ธีระ, 2541) กากซอสถั่วเหลืองที่ได้มีลักษณะทางกายภาพเป็นกากสีน้ำตาลเข้ม มีปริมาณไนโตรเจนค่อนข้างสูง ในไต้หวันได้มีการนำมาใช้เป็นปุ๋ยไนโตรเจนแก่พืช และใช้ในการเลี้ยงสัตว์ (วิเชียร, 2522)

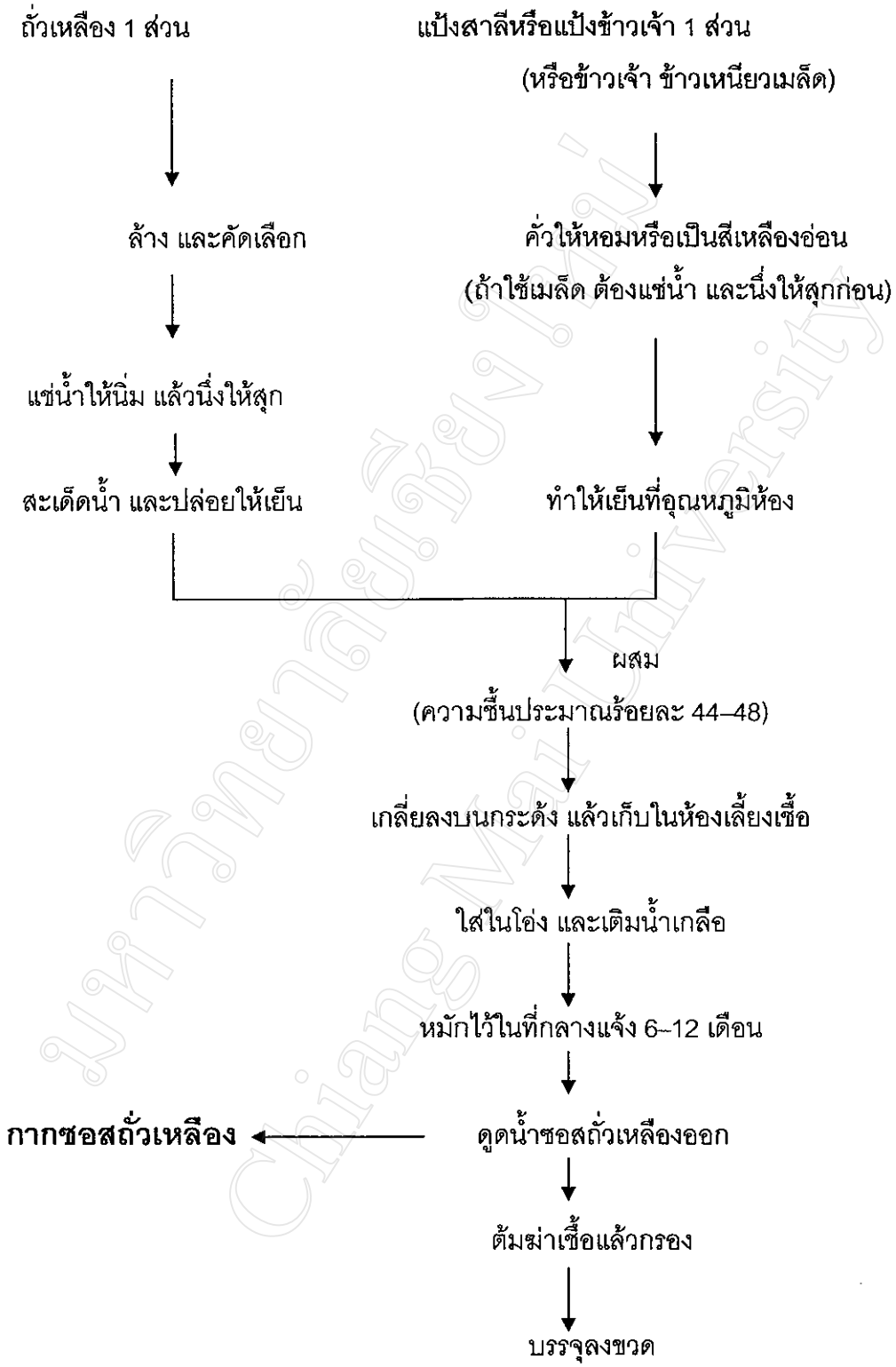
คุณค่าทางอาหารของกากซอสถั่วเหลืองผันแปรขึ้นกับสูตร และกรรมวิธีในการผลิตซอสถั่วเหลือง แต่โดยภาพรวมกากซอสถั่วเหลืองมีโปรตีนค่อนข้างสูง ประมาณ 21-23 เปอร์เซ็นต์ รวมทั้งมีไขมัน เยื่อใย และเกลือตกค้างค่อนข้างสูง ประมาณ 20 12 และ 9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ทำให้มีการ

นำกากซอสถั่วเหลืองมาใช้ในสูตรอาหารสัตว์ ปัจจุบันการใช้กากซอสถั่วเหลืองผสมในอาหารเลี้ยงโคนมใช้อยู่ระดับ 15-25 เปอร์เซ็นต์ ในสูตรอาหารข้น (ธีระ, 2541)

2.2 ขบวนการผลิตซอสถั่วเหลือง

วิเชียร (2522) กล่าวว่าซอสถั่วเหลืองเป็นของเหลวสีน้ำตาลเข้มมีรสเค็ม และมีกลิ่นหอมคล้ายน้ำซุบจากการต้มเนื้อ ซอสถั่วเหลืองได้จากการหมักถั่วเหลืองโดยเติมหรือไม่เติมแป้งสาลีหรือแป้งข้าวจ้าว ผู้ผลิตบางรายอาจผลิตซอสถั่วเหลือง โดยขบวนการทางเคมีโดยผสมกับกรดเกลือ (HCl) แล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิสูงภายใต้ความดันเป็นเวลา 2–3 ชั่วโมง จะได้ของเหลวสีน้ำตาลเข้มซึ่งจะนำไปผ่านขบวนการลดความเป็นกรด และเติมเกลือแล้วนำไปใช้เป็นซอสถั่วเหลืองได้ดังแสดงในภาพที่ 1 ซอสถั่วเหลืองที่ได้จากขบวนการทางเคมีดังกล่าวข้างต้นแม้จะมีราคาถูกกว่า แต่มีรส และกลิ่นด้อยกว่าซอสถั่วเหลืองที่ได้จากการหมัก

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University



ภาพ 1 ขั้นตอนการผลิตน้ำซอสถั่วเหลือง

ที่มา: สถาบันค้นคว้า และพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร (2527).

2.3 วัตถุดิบในการผลิตซอสถั่วเหลือง

การผลิตซอสถั่วเหลือง วัตถุดิบที่สำคัญที่สุดได้แก่ แหล่งโปรตีน (ถั่วเหลืองหรือถั่วปราศจากไขมัน) แหล่งคาร์โบไฮเดรต (ข้าวสาลีหรือรำข้าวสาลี) เกลือ และน้ำ

- ถั่วเหลือง กลิ่นหอมในซอสถั่วเหลืองนั้นได้มาจากการย่อยสลายถั่วเหลือง
- ข้าวสาลี กลิ่นหอมของซอสถั่วเหลืองขึ้นอยู่กับคุณภาพของข้าวสาลี
- เกลือ
- น้ำ ในซอสถั่วเหลืองมีน้ำเป็นส่วนประกอบประมาณ 60-70 เปอร์เซ็นต์

2.4 การเตรียมวัตถุดิบ

2.4.1. การคัดเลือกถั่วเหลือง

ใช้เครื่องหมุนรอบตัวเองซึ่งมีตะแกรงขนาดรูต่างๆ เพื่อแยกเอาดิน และเมล็ดหญ้าออกหรือใช้เครื่องสั่นสะเทือนในการคัดเลือก

2.4.2. การเตรียมถั่วเหลือง

การล้างและแช่ถั่วเหลือง ถั่วเหลืองที่ผ่านการคัดเลือกแล้วจะต้องล้างด้วยน้ำ แล้วค่อยแช่ไว้ในน้ำเพื่อทำให้ถั่วเหลืองพองตัว วิธีดังกล่าวจะทำให้ถั่วเหลืองอ่อนนุ่ม และช่วยลดเวลาที่ใช้ในการต้มให้สุก การล้างถั่วสามารถทำได้ในถังขนาดใหญ่ที่มีน้ำไหลเข้าถังอย่างช้าๆพร้อมกับชะล้างเอาแบคทีเรียออกไปด้วย หลังจากนั้นถั่วเหลืองจะถูกนำไปทำให้สุกทันที ทั้งนี้ก็เพื่อไม่เปิดโอกาสให้ จุลินทรีย์ที่ยังหลงคงเหลืออยู่มีโอกาสเจริญ และสะสมจนมีจำนวนมากได้

การนึ่งถั่วเหลือง แบ่งได้ 2 วิธี

- การนึ่งที่ความดันปกติ ใช้เวลา 3–4 ชั่วโมง
- การนึ่งโดยเพิ่มความดัน ใช้ระดับ 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที

2.4.3. การเตรียมข้าวสาลี

ตามปกตินิยมใช้คือ การคั่ว โดยใช้อุณหภูมิ 160–170 องศาเซลเซียส จะได้สีน้ำตาลเข้ม จุดประสงค์ในการคั่วคือ ทำให้แป้งในข้าวสาลีถูก gelatinized และโปรตีนจะถูกย่อยง่ายขึ้นทำให้การทำหัวเชื้อ และเอนไซม์ถูกผลิตเร็วขึ้น

2.4.4 การเตรียมน้ำเกลือ

โดยทั่วไปจะเตรียมน้ำเกลือให้มีความเข้มข้น 24–25 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งในไต้หวันนิยมใช้ความเข้มข้นระดับนี้ ความเข้มข้นของน้ำเกลือมีผลต่อคุณภาพของซอสถั่วเหลืองโดยตรง เกลือเป็นสารป้องกันการเสียของวัตถุดิบ ในการทำซอสถั่วเหลืองที่สำคัญปริมาณน้ำที่ใช้ไม่แน่นอน เช่น ความเข้มข้นต่ำซอสถั่วเหลืองจะเกิดการเสียได้ ทำให้เกิดกลิ่นผิดปกติ ถ้าความเข้มข้นสูงจะมีความสามารถในการป้องกันการเสียได้สูง จนทำให้การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ช้าลง ถ้าหากความเข้มข้นของน้ำเกลือไม่สม่ำเสมอ คุณภาพของซอสถั่วเหลืองที่ได้ก็ต่างกันไปด้วย ดังนั้นจะต้องควบคุมความเข้มข้นของน้ำเกลือให้คงที่ทุกครั้ง ตามปกติการผลิตซอสถั่วเหลืองใช้เกลือที่มีความเข้มข้นในระดับ 19.5-20.0 องศาบริด์ ซึ่งในไต้หวัน และญี่ปุ่นนิยมใช้ความเข้มข้นระดับนี้

ขั้นตอนการผลิตซอสถั่วเหลืองโดยทั่วไปเริ่มต้นด้วยการหมักโคจิ ในถาดก้นลึกที่วางเรียงอยู่บนชั้น วัตถุดิบในการหมักโคจิ คือ ถั่วเหลืองต้มสุกที่คลุกกับแป้งแล้ว สภาวะที่ใช้ในการหมักในขั้นตอนนี้ควรจะควบคุมให้เหมาะกับการเจริญเติบโตของเชื้อรามากกว่าเชื้อแบคทีเรีย และยีสต์ ซึ่งหมายความว่าเราต้องหมักในอาหารแข็งที่มีสภาพเป็นกรดปานกลาง มีความชื้น และอุณหภูมิปานกลาง (วิเชียร, 2522)

2.4.5 การเตรียมหัวเชื้อ (starter)

วิเชียร (2534) ได้อธิบายถึงการเตรียมหัวเชื้อโดยแบ่งออกเป็น 6 ขั้นตอนดังนี้

1. ถั่วเหลืองนึ่งแล้วปล่อยให้เย็น ผสมกับข้าวสาลีที่คั่วและบดแล้วในอัตราส่วน 1 : 1 การผสมแป้งลงไปมากหรือน้อยนั้นแตกต่างกันไปแล้วแต่ผู้ผลิต จุดประสงค์หลักเพื่อช่วยลดความชื้นของถั่วเหลือง ซึ่งจะทำให้ความชื้นของถั่วเหลืองอยู่ในระดับที่เหมาะแก่การเจริญเติบโตของเชื้อรามากกว่าแบคทีเรีย และยีสต์

2. การผึ่งเชื้อปกติใช้อุณหภูมิต่ำกว่า 40 องศาเซลเซียส

3. การบรรจุถาดหัวเชื้อ (starter) โดยนำถั่วเหลือง และข้าวสาลีที่ผสมกันแล้วมาผสมกับเชื้อในถาด แล้วนำไปเก็บไว้ในห้องเก็บที่มีการควบคุมอุณหภูมิ อุณหภูมิที่เหมาะที่สุดสำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อราในการผลิตซอสถั่วเหลืองคือ 30 องศาเซลเซียส และความชื้น 100 เปอร์เซ็นต์

4. การกลับหัวเชื้อครั้งแรกหลังจากเติมหัวเชื้อลงไป 20 ชั่วโมง เพื่อปรับอุณหภูมิ และลดความชื้น

5. การกลับหัวเชื้อครั้งที่สอง หลังจากกลับครั้งแรก 5–10 ชั่วโมง

6. หัวเชื้อสำเร็จ หลังการกลับหัวเชื้อครั้งที่สองเชื้อราจะเริ่มสร้างสปอร์ ดังนั้นไม่จำเป็นต้องกลับอีก เพียงแต่ปรับอุณหภูมิห้องให้เท่ากับอุณหภูมิหัวเชื้อ เมื่อส่วนผสมของถั่วเหลือง และแป้งมีเชื้อราขึ้นอยู่เต็มและเริ่มแห้งก็ถือว่าเป็นอันสิ้นสุดขั้นตอนการหมักโคจิ ระยะเวลานับตั้งแต่เตรียมหัวเชื้อจนถึงหัวเชื้อสำเร็จใช้เวลาประมาณ 5-7 วัน

2.4.6 การหมักซอสถั่วเหลือง

หลังจากเตรียมหัวเชื้อเรียบร้อยแล้วก็พร้อมที่จะนำมาผสมกับวัตถุดิบหลักที่จะใช้หมักในถังไม้หรือบ่อปูนซีเมนต์ การหมักครั้งที่สองนี้เรียกว่าการหมักโมโรมิ เป็นการหมักในน้ำเกลือเข้มข้นโดยทั่วไปจะใช้โคจิประมาณ 20-25 กิโลกรัมต่อน้ำเกลือ 60 ลิตร แล้วบ่มเป็นเวลา 3 เดือน ขั้นตอนนี้เรียกว่า การหมักโมโรมิซึ่งมีความสำคัญเท่าๆกับการหมักโคจิ เพื่อให้ได้ซอสถั่วเหลืองที่มีกลิ่น และรสดี ปัจจัยสำคัญในขั้นตอนนี้ คือ ความเข้มข้นของเกลือ และปริมาณออกซิเจนที่ใช้ในการหมัก เนื่องจากในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือ และปริมาณออกซิเจนที่ต่ำเหมาะสำหรับการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย และยีสต์มากกว่าเชื้อรา วิเชียร (2522) รายงานว่าที่ระดับความเข้มข้นของเกลือ 24-25 เปอร์เซ็นต์ จะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย และยีสต์ที่ไม่เป็นประโยชน์ได้ยกเว้นแบคทีเรีย และยีสต์ที่ทำให้ซอสถั่วเหลืองมีกลิ่น และรสดี จะเจริญได้ดี หากความเข้มข้นของเกลือสูงหรือต่ำกว่านี้จะทำให้จุลินทรีย์อื่นๆที่ทำให้บูดเน่าเจริญแทนที่

2.4.7 การคนหรือกวน

หลังจากผสมหัวเชื้อ และวัตถุดิบแล้วจะต้องมีการคนหรือกวน การกวนมีผลต่อการหมัก และความสุกของวัตถุดิบ ถ้าหากกวนไม่ตรงตามเวลาปล่อยทิ้งไว้หลายๆ สัปดาห์จะทำให้ผิวหน้าเป็นสีขาว เกิดกลิ่นผิดปกติ กลิ่นหอมของซอสถั่วเหลืองจะหายไป แต่ถ้ากวนมากไปจะทำให้เกิดลักษณะเหนียวหนืดมากเกินไปซึ่งเป็นผลเสียในการผลิตซอสถั่วเหลือง

2.5 การสกัดซอสถั่วเหลือง

2.5.1. การผสมซอสถั่วเหลืองที่ได้ก่อนการสกัด

เพื่อที่จะให้ได้คุณภาพของซอสถั่วเหลืองเป็นอย่างเดียว เช่น กลิ่นหอม รสชาต และสี ดังนั้น ก่อนการสกัดจำเป็นต้องผสมซอสถั่วเหลืองที่หมักในระยะเวลาต่างกัน ตามปกติซอสถั่วเหลืองหมัก 1 ปี มีกลิ่นหอมกว่าหมัก 2 ปี ส่วนการหมัก 2 ปีทำให้มีรสชาตดี และการหมัก 3 ปีทำให้มีสีดี ดังนั้นในกรรมวิธีการผลิตต้องใช้ซอสถั่วเหลืองใหม่ และเก่านำมาผสมกันในอัตราส่วนที่เหมาะสม

2.5.2 เครื่องมือที่ใช้ในการสกัด

ซอสถั่วเหลืองที่ผสมกันเรียบร้อยแล้วจะนำมาแยกส่วนที่เป็นของเหลวกับส่วนที่เป็นกากก่อนการสกัดมีความสำคัญต่อการผลิตซอสถั่วเหลืองมาก ดังนั้นนับได้ว่าการสกัดซอสถั่วเหลืองต้องใช้ความระมัดระวัง และเป็นขั้นตอนที่สำคัญตอนหนึ่ง ซอสถั่วเหลืองที่ได้จากการหมักจะมีความเหนียวมาก ไม่สามารถใช้วิธีการกรองอย่างง่าย ๆ ได้ เครื่องมือที่ใช้ในการสกัดมี 3 อย่างคือ

1. Lever press
2. Screw press
3. Water or Oil press

สำหรับเครื่องสกัดมือแบบ Lever press และ Screw press ที่ใช้แรงงานมนุษย์นั้นจะได้ผลน้อยที่สุด สำหรับโรงงานขนาดเล็ก ถ้าเป็นโรงงานขนาดกลางให้ใช้ซอสถั่วเหลืองหมัก 5 ลิตร ใช้ถุงผ้าขนาดกว้างยาว 1×1 เมตร 400 ใบ สกัดด้วย water press ที่มีความดันสูงจนกระทั่งกากที่ได้มีความชื้น 28–32 เปอร์เซ็นต์ จะได้ผลดีที่สุด แต่ต้นทุนก็สูงตามไปด้วย ตามธรรมดาอัตราการสกัดจะทำได้ 60–80 เปอร์เซ็นต์

การสกัดซอสถั่วเหลือง ถ้าหากแรงกดไม่พอจะทำให้เหลือกากมากถึง 25 เปอร์เซ็นต์ แต่ในปัจจุบันมีเครื่องมือที่ดี ดังนั้นในการสกัดซอสถั่วเหลืองจะมีกากเหลืออยู่ประมาณ 15 เปอร์เซ็นต์

กากซอสถั่วเหลืองแบ่งเป็น 2 ประเภท คือ กากครั้งแรก และกากครั้งที่สอง

1. กากครั้งแรก หมายถึง กากที่เหลือจากการสกัดครั้งแรก
2. กากครั้งที่สอง หมายถึง กากที่ได้จากการสกัดครั้งแรกเติมน้ำเกลือสกัดอีกครั้ง

ในปัจจุบันโรงงานขนาดใหญ่ มีเครื่องสกัดที่มีประสิทธิภาพสูงหลังจากสกัดครั้งแรก กากที่ได้จะมีความชื้น 28-32 เปอร์เซ็นต์ ถ้าหากจะเติมน้ำเกลือ หรือน้ำ แล้วสกัดอีกครั้งหนึ่งจะเป็นการไม่คุ้ม ดังนั้นจึงมีการสกัดเพียงครั้งเดียว

2.6 การใช้ประโยชน์ของกากซอสถั่วเหลือง

กากซอสถั่วเหลืองที่ได้จะมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดสูงมาก บางแห่งสามารถนำไปผลิตเป็นซอสถั่วเหลืองเกรดต่ำได้ ดังเช่นในญี่ปุ่นจะนำกากซอสถั่วเหลืองมาเติม กรดเกลือ (HCl) ที่มีความเข้มข้น 6-8 เปอร์เซ็นต์ ในปริมาณ 2.5–3 เท่า ของกากซอสถั่วเหลือง ให้ความร้อน 10 ชั่วโมง ปรับให้เป็นกลางแล้วเติมหัวเชื้อที่ทำจากรำข้าวสาลีหรือกากมะพร้าวที่ผ่านการคั้นกะทิไปใช้แล้วปล่อยให้หมักประมาณ 1 เดือน ก็จะได้ซอสถั่วเหลืองเกรดต่ำ หรือนำกากซอสถั่วเหลืองมาตีป่น ต้มแล้วทำให้เย็นทำหัวเชื้อ แล้วหมักอีก 2–3 เดือน จะได้ซอสถั่วเหลืองเกรดต่ำในไต้หวันไม่นิยมนำกากซอสถั่วเหลืองมาผลิตซอสถั่วเหลืองซ้ำอีก แต่จะนิยมนำไปเป็นอาหารสัตว์โดยโรงงานขนาดใหญ่จะขายให้แก่โรงงานอาหารสัตว์หลังอบแห้งแล้วจะผสมกับอาหารอื่นๆ สำหรับโรงงานขนาด เล็ก–กลาง อาจจะใช้เลี้ยงหมูเองหรือขายให้แก่ผู้เลี้ยงหมู หรือผู้เลี้ยงปลาในแถบนั้น ซึ่งได้ราคาดี กากซอสถั่วเหลืองจะประกอบไปด้วย ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโปตัสเซียม ซึ่งเป็นปุ๋ยอย่างดี (วิเชียร, 2522)

จากการวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของกากซอสถั่วเหลือง พบว่ากากซอสถั่วเหลืองมีปริมาณของวัตถุแห้ง 77.79 เปอร์เซ็นต์ โปรตีนรวม 22.30 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 22.95 เปอร์เซ็นต์ เยื่อใย 17.43 เปอร์เซ็นต์ เถ้า 7.49 เปอร์เซ็นต์ แคลเซียม 0.55 เปอร์เซ็นต์ ฟอสฟอรัส 0.07 เปอร์เซ็นต์ และโซเดียมคลอไรด์ 9 เปอร์เซ็นต์ (ธีระ, 2542)

2.6.1 การใช้เกลือในสูตรอาหารโค

Meyer *et al.* (1955) รายงานว่าสามารถใช้เกลือในสูตรอาหารโคได้ถึง 9.33 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงเป็นเวลา 84 วันโดยไม่มีผลกระทบต่อตัวสัตว์ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ NRC (1988) ที่รายงานว่าสามารถใช้เกลือในสูตรอาหารโคให้นมได้ถึง 4 เปอร์เซ็นต์ และไม่เกิน 9 เปอร์เซ็นต์ ของวัตถุแห้งในโคไม่ให้นม นอกจากนี้ Weeth *et al.* (1960) พบว่าสามารถใช้เกลือในน้ำดื่มโคได้ถึง 1 เปอร์เซ็นต์ โดยไม่มีผลกระทบต่อตัวสัตว์

กากซอสถั่วเหลืองมีข้อจำกัดในการใช้เลี้ยงสัตว์เนื่องจากมีองค์ประกอบของโซเดียมคลอไรด์สูง ทำให้มีผลกระทบต่อการกินได้ลดลง เพราะโซเดียมคลอไรด์จะมีผลต่อแรงดันในกระเพาะรูเมน

(osmotic pressure) ทำให้มีค่าสูงขึ้น ดังนั้นจึงส่งผลต่อแรงดันพลาสม่าในระบบหมุนเวียนโลหิตมีค่าสูงขึ้นตามไปด้วย (Ternouth, 1967) ก่อให้เกิดการเสียสมดุลของร่างกายทำให้ร่างกายพยายามปรับตัวกลับมาสู่สภาวะสมดุลดังเดิม (homeostasis) โดยลดการกินลงชั่วขณะหนึ่ง จนกระทั่งค่าแรงดันในกระเพาะรูเมนลดลง จึงสามารถกินอาหารเข้าไปได้อีก (Ternouth and Beattie, 1971) นอกจากนี้แรงดันในกระเพาะรูเมนยังมีผลทำให้มีการขับหลั่งน้ำลายลดลง (Tomas and Potter, 1975; Warner and Stacy, 1977) การขับหลั่งน้ำลายดังกล่าวมีผลต่อกิจกรรมของจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมน เนื่องจากระดับความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) มีค่าต่ำลง ทั้งนี้ด้วยเหตุว่า หากอาหารที่สัตว์ได้รับมีการย่อยสลายในกระเพาะรูเมนอย่างรวดเร็ว กรดไขมันระเหยได้ (volatile fatty acid) จะถูกผลิตมาก รวมทั้งก๊าซมีเทน และคาร์บอนไดออกไซด์ หากปริมาณน้ำลายไม่เพียงพอจะส่งผลให้เกิดการสะสมกรดในกระเพาะรูเมน และในกระแสโลหิต (rumen acidosis) ในสภาวะ hypertonicity สูง (สภาวะที่ภายในกระเพาะรูเมนเกิดแรงดันสูงมาก) มักเกิดร่วมกับ rumen acidosis (Carter and Grovum, 1990) อย่างไรก็ตามร่างกายของโคเองก็มีกลไกเพื่อลดระดับแรงดันดังกล่าวโดยการกินน้ำเข้าไป (Wilson, 1966) รวมทั้งระบบการไหลเวียนของโลหิตมายังกระเพาะรูเมนสูงขึ้น (Dobson *et al.*, 1976) ตลอดจนกลไกที่น้ำไหลคืนกลับสู่กระเพาะรูเมน (Carter and Grovum, 1990) ส่งผลให้กิจกรรมในกระเพาะรูเมนดำเนินไปโดยปกติ นอกจากนี้ร่างกายสัตว์เองยังสามารถขับเกลือออกทางไตไปกับปัสสาวะ สังเกตได้ว่าโคที่ได้รับอาหารที่ส่วนผสมของเกลือสูงจะปัสสาวะมากกว่าโคที่ได้รับอาหารที่ส่วนผสมของเกลือต่ำ และหากในสูตรอาหารมีเกลือมากเกินไปอาจทำให้น้ำหนักไตเพิ่มขึ้น (Meyer *et al.*, 1995)

สำหรับผลกระทบของเกลือที่มีต่อจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมน จากการศึกษาโดยวิธี *in vitro* โดยใช้จุลินทรีย์ *Sellomonas ruminantium* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีโซเดียม และโปตัสเซียมสูงพบว่าจุลินทรีย์ได้รับผลกระทบจากสภาวะ hypertonicity น้อยมาก อาจเป็นไปได้ว่าแรงดันภายในเซลล์จุลินทรีย์เองมีค่าสูงอยู่แล้ว นอกจากนี้สภาวะดังกล่าวไม่ได้เกิดเป็นระยะเวลานานเพราะร่างกายสัตว์มีการปรับตัวดังกล่าวข้างต้น ทำให้จุลินทรีย์ไม่ได้รับผลกระทบมากนักในช่วงเวลาสั้นๆ (Carter and Grovum, 1990)

2.7 การใช้ประโยชน์ของไนโตรเจนในสัตว์เคี้ยวเอื้อง

ในสัตว์เคี้ยวเอื้อง (ruminant) มีศักยภาพของการใช้ประโยชน์ของอาหารภายในกระเพาะ รูเมนได้สูงมาก จะเห็นได้ว่าแหล่งพลังงานจะได้มาจากแป้ง หรือเซลลูโลส และไนโตรเจนที่มาจากแอมโมเนียสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ โดยจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมนจะทำหน้าที่สร้างเป็นโปรตีนจุลินทรีย์ (microbial protein) ถูกย่อย และดูดซึมในระบบทางเดินอาหารถัดไป โปรตีนจุลินทรีย์นี้เป็นแหล่งที่ให้กรดอะมิโนที่สำคัญต่อร่างกาย

การเมตาโบลิสึมของไนโตรเจนโดยจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมน มีประสิทธิภาพไม่พอเพียงเสมอ ไนโตรเจนจะแตกตัวได้อย่างรวดเร็วกว่าการแตกตัวของสารอาหารที่ให้พลังงานที่มาจากสารเยื่อใย ก่อให้เกิดปริมาณการผลิตแอมโมเนียมากเกินไป มีผลทำให้คุณค่าในการนำไปใช้ประโยชน์ของไนโตรเจนลดลง (Wallace and Cotta, 1988) โปรตีนที่ใช้เป็นแหล่ง ไนโตรเจนในกระเพาะรูเมน ส่วนใหญ่จะถูกไฮโดรไลท์ได้รวดเร็วแต่ก็มีปัจจัยที่เข้ามาเกี่ยวข้องแสดงถึงคุณค่าการใช้ประโยชน์ของโปรตีนชนิดนั้นๆ อาทิเช่น คุณสมบัติในการละลายน้ำ ระดับโครงสร้างของโปรตีน แรงยึดเหนี่ยวของ disulphide bond ที่จะมีผลต่อการแตกตัวของอัลบูมิน (albumin) ตลอดจนแรงยึดเหนี่ยว (Cross-linked) ระหว่างโมเลกุล (Mahadevan *et al*, 1980; Siddons and Paradine, 1981)

ส่วนใหญ่กรดอะมิโนจะมีพบอยู่น้อยมากในกระเพาะรูเมน Liebholz (1969) พบว่าระดับของกรดอะมิโนอิสระจะลดต่ำลง ภายหลังจากได้รับอาหารไปแล้ว 1 ชั่วโมง แต่จะมีอัลฟาอะมิโนไนโตรเจนเพิ่มขึ้นมาทดแทน ซึ่งการเปลี่ยนแปลงจะช้าเร็วแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของกรดอะมิโนชนิดนั้นๆ ด้วย (Chalupa, 1976)

ไนโตรเจนที่ใช้ประโยชน์ในกระเพาะรูเมนมีด้วยกัน 3 แหล่งคือ อาหารที่กินเข้าไป น้ำลาย และจากการไหลซึมผ่านผนังกระเพาะรูเมน โดยที่ไนโตรเจนจากอาหารที่กินเข้าไปอยู่ในรูปของแอมโมเนียไนโตรเจน และอะมิโนไนโตรเจน ขณะที่ไนโตรเจนจากน้ำลายและการไหลผ่านเข้าผนังกระเพราะรูเมนนั้น จะเป็นแอมโมเนียไนโตรเจนในรูปของยูเรีย แตกตัวง่ายและรวดเร็วในขบวนการไฮโดรไลซีส (Hydrolysis) โดยยูรีเอส (urease) และปลดปล่อยแอมโมเนียออกมา (Roffler and Satter, 1979) แอมโมเนียจะเป็นแหล่งสำคัญในการผลิตโปรตีนจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมน ซึ่งพบว่าปริมาณแอมโมเนียอยู่ในระดับต่ำเมื่อให้อาหารเป็นอาหารหยาบที่มีโปรตีนต่ำ ขณะที่ปริมาณแอมโมเนียจะอยู่ในระดับสูงเมื่อให้อาหารที่โปรตีนสูง และย่อยสลายง่าย ซึ่งกลไกลการทำงานสำหรับแอมโมเนียที่จะถูกดูดซึม และเปลี่ยนแปลงไปเป็นกรดอะมิโนโปรตีนของจุลินทรีย์ แตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของอาหาร และความเข้มของแอมโมเนียในกระเพาะรูเมนเป็นสำคัญ (Wallace and Cotta, 1988)

กลไกการเปลี่ยนแปลงแอมโมเนียไปเป็นกรดอะมิโนภายในตัวจุลินทรีย์มีอยู่ 2 วิถี วิถีแรกคือ Gs-GOGAT หรือ glutamine synthetase-glutamate synthetase coupling จะเกิดขึ้นในสภาวะมีแอมโมเนียในกระเพาะรูเมนต่ำ (Erfle *et al.*, 1977) วิถีที่สองคือ NADP-glutamate dehydrogenase (NADP-GDH) หรือ NAD-glutamate dehydrogenase (NDA-GDH) จะเกิดในสภาวะมีแอมโมเนียในกระเพาะรูเมนระดับสูง ทั้งสองวิถีมีตัวกลาง 2 ตัว ที่มีผลต่อการดูดซึมและเปลี่ยนแปลงของแอมโมเนีย คือ กรดกลูตามิค (glutamic acid) และอัลฟาออกโซกลูตาเลต (α-oxoglutarate) เป็นศูนย์กลางในขบวนเมตตาโบลิสึมของไนโตรเจนภายในเซล แต่ในสภาวะไร้ออกซิเจน (anaerobic) ในกระเพาะรูเมน oxoglutarate ไม่สามารถผลิตได้จากสารตัวกลางที่ได้จากการเมตาโบลิสึมของพลังงานใน Tricarboxylic Acid Cycle (TCA) ได้ แต่ Miligan (1970) ชี้ให้เห็นว่า oxoglutarate สามารถถูกผลิตขึ้นมาโดยปฏิกิริยาไปข้างหน้า (forward) และปฏิกิริยาย้อนกลับ (reverse) ของขบวนการ Tricarboxylic Acid Cycle (TCA) โดยที่ปฏิกิริยาย้อนกลับนั้นเป็นกลไกขั้นพื้นฐานของการทำงานภายในเซลของจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมน

อย่างไรก็ตามความสามารถในการดูดซึม และการเปลี่ยนแปลงของแอมโมเนีย (uptake NH_3) ของจุลินทรีย์ขึ้นอยู่กับอัตราการย่อยสลายของแหล่งพลังงานในกระเพาะรูเมน เป็นสำคัญ (Mehrez *et al.*, 1977; Slyter *et al.*, 1979; Nikolic *et al.*, 1981)

2.7.1 การย่อยโปรตีนในลำไส้เล็ก

โปรตีนที่เข้าไปถึงลำไส้เล็กของสัตว์เคี้ยวเอื้อง ประกอบด้วยโปรตีนที่รอดพ้นจากการย่อยในกระเพาะรูเมน และกระเพาะแท้ โปรตีนจากจุลินทรีย์ และ Endogenous protein ซึ่งปริมาณ และสัดส่วนของแหล่งโปรตีนแต่ละชนิดแตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับชนิด และปริมาณของอาหารที่สัตว์กินเข้าไป (เทอดชัย, 2540; Garrett *et al.*, 1987) อัตราการย่อย และไหลผ่านกระเพาะรูเมนของอาหาร (Garrett *et al.*, 1987) ซึ่งถ้าหากเป็นอาหารที่มีโปรตีนซึ่งหลบเลี่ยงการย่อยได้ในกระเพาะรูเมนได้มากก็จะทำให้มีโปรตีนเข้าสู่ลำไส้เล็กได้มากขึ้น (Zinn *et al.*, 1981; Loerch *et al.*, 1983; Stern *et al.*, 1983; Santose *et al.*, 1984) และจะส่งผลให้มีการย่อยโปรตีนเพื่อได้เป็นกรดอะมิโน และดูดซึมในลำไส้เล็กได้มากขึ้นด้วย (Garrett *et al.*, 1987)นั่นคือ คุณสมบัติตามธรรมชาติของวัตถุดิบที่ใช้เป็นแหล่งโปรตีนแต่ละชนิดที่มีความสามารถหลบเลี่ยงการย่อยได้ในกระเพาะรูเมนแตกต่างกัน (Kaufmann and Lupping, 1982) นอกจากนี้ การปกป้องการย่อยได้ของโปรตีนในกระเพาะรูเมน โดยกรรมวิธีทางเคมี และกายภาพต่างๆ เช่น การใช้ฟอร์มาลดีไฮด์ (formaldehyde) 2 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม (Kaufmann and Lupping, 1982) การใช้ความร้อน โดยเฉพาะการใช้ความร้อนแบบหม้อนึ่ง

ความดัน (autoclave) (Danke *et al.*, 1966; Hudson *et al.*, 1970; Tagari *et al.*, 1986) ตลอดจนการใช้สารช่วยปกป้องชนิดอื่นๆ เช่นกรดแทนนิค และ อัลดีไฮด์ชนิดต่างๆ ก็ล้วนแล้วแต่มีผลทำให้โปรตีนหลบเลี่ยงการย่อยได้ในกระเพาะรูเมนเพิ่มมากขึ้น และมีโปรตีนเข้าถึงลำไส้เล็กได้มากขึ้น (Nishimuta *et al.*, 1974)

เมื่อพิจารณาถึงปริมาณโปรตีนที่สัตว์ได้รับต่อวันแล้วพบว่าประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ของโปรตีนที่สัตว์ได้รับเป็นโปรตีนจากอาหารที่ใช้เป็นแหล่งพลังงาน ในกรณีของการใช้แป้งจากวัตถุดิบที่แตกต่างกันเป็นแหล่งพลังงานในอาหาร เช่น ในการใช้ข้าวโพดเป็นแหล่งพลังงาน และเนื่องจากการย่อยได้ของแป้งข้าวโพดในกระเพาะรูเมนมีค่าประมาณ 52 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาณแป้งทั้งหมด ดังนั้นจึงทำให้มีแป้งจากข้าวโพดประมาณ 48 เปอร์เซ็นต์ ที่เข้าสู่ลำไส้เล็ก (เทอดชัย, 2530ข.) และเนื่องจากธรรมชาติของแป้งจากข้าวโพดนั้น มีเม็ดแป้งฝังตัวอยู่ใน Protein matrix ซึ่งมี Protein bodies ล้อมรอบ (เทอดชัย, 2540) จึงทำให้มีแป้งข้าวโพดหลบเลี่ยงการถูกย่อยจากจุลินทรีย์จากกระเพาะรูเมนตกลงสู่ลำไส้เล็กมากขึ้น

โปรตีนที่เข้าสู่ลำไส้เล็ก ถูกย่อยโดยเอนไซม์ที่ผลิตจากตับอ่อน ได้แก่ trypsin, chymotrypsin, elastase, carboxypeptidase A และ carboxy peptidase B (Smith and Zebrowska, 1989) ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้ผลิตจากตับอ่อนในรูปของ zymogen ที่ยังไม่สามารถทำการย่อยได้ คือตับอ่อนผลิต trypsinogen ออกมา และถูกกระตุ้นโดย enterokinase เพื่อให้ได้เป็น trypsin จากนั้น trypsin ก็จะกระตุ้น zymogen ชนิดอื่นคือ chymotrypsinogen, proelastase, procarboxzypeptidase A, procarboxzypeptidasev B เพื่อให้ได้เป็น chymotrypsin, elastase, carboxypeptidase A และ carboxypeptidase B ตามลำดับ และเอนไซม์จากตับอ่อนเหล่านี้ทำงานได้ดีก็ต่อเมื่อมีสภาพความเป็นกรดด่างสูงกว่า 7.5 ขึ้นไป (Smith and Zebrowska, 1989)

ส่วนเอนไซม์จากเซลล์ของผนังลำไส้เล็กเอง ได้แก่ dipeptidase และ tripeptidase นั้น พบได้มากที่สุดในส่วนของลำไส้เล็กส่วนปลาย (Ilium) (Richardson and Jouan, 1986) ซึ่งทั้งชนิด และปริมาณของเอนไซม์ที่พบในลำไส้เล็กของสัตว์กระเพาะรวมก็คล้ายๆกับที่พบในสัตว์กระเพาะเดี่ยว (Smith and Zebrowska, 1989) เอนไซม์ในลำไส้เล็กเหล่านี้ทำหน้าที่ย่อยโปรตีนเพื่อให้ได้เป็น เป็ปไทด์เพื่อให้เป็นกรดอะมิโนต่อไป ทั้งกรดอะมิโนอิสระ dipeptidase และ tripeptidase จะสามารถดูดซึมเข้าสู่เซลล์ของผนังลำไส้เล็กได้โดย dipeptidase และ tripeptidase นั้นจะถูกย่อยต่อในเซลล์ของผนังลำไส้เล็กเพื่อให้ได้กรดอะมิโนอิสระ ก่อนที่จะส่งเข้าสู่กระแสโลหิตต่อไป (Silk *et al.*, 1985)

2.7.2 การย่อยโปรตีนในลำไส้ใหญ่

สารประกอบที่เข้ามาถึงลำไส้ใหญ่ ได้แก่ อาหารโปรตีนที่ไม่ถูกย่อยในทางเดินอาหารส่วนหน้าและในลำไส้เล็ก โปรตีนจากจุลินทรีย์ โปรตีนของ endogenous protein ซึ่งได้แก่เยื่อบุผนังลำไส้เล็ก เอนไซม์ ตลอดจนโปรตีนที่หลั่งจากเซลล์ของเยื่อบุผนังลำไส้เล็ก (Hecker, 1973) โปรตีนเหล่านี้มีการย่อยและเปลี่ยนแปลง โดยกิจกรรมของจุลินทรีย์ที่อยู่ในลำไส้ใหญ่ การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นนั้นมีทั้งการสลายสารประกอบไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีน เช่น ยูเรีย (ureolytic activity) การสลายโปรตีน (proteolytic activity) ตลอดจนการแยกแอมโมเนียออกจากกรดอะมิโน (deamination) โดยเฉพาะในส่วนของไส้ติ่งของแกะ ที่พบมีการย่อยโปรตีนสูงกว่าการย่อยโปรตีนที่เกิดขึ้นในกระเพาะรูเมน ส่วนการสลายยูเรีย และแอมโมเนียออกจากกรดอะมิโนนั้นต่ำกว่าที่เกิดขึ้นในกระเพราะรูเมนเพียงเล็กน้อย (Hecker, 1971) ซึ่งปริมาณการย่อยได้ของโปรตีนในลำไส้ใหญ่เกิดขึ้นได้มากน้อยก็ขึ้นอยู่กับชนิดของอาหารด้วย (Ørskov *et al.*, 1970)

แอมโมเนียที่เกิดจากการย่อยและการหมักโปรตีนในลำไส้ใหญ่จะถูกดูดซึมเข้าสู่ลำไส้ใหญ่อย่างรวดเร็ว โดยแอมโมเนียจากแหล่งดังกล่าว เป็นแหล่งของแอมโมเนียที่จะถูกนำไปสร้างเป็นยูเรียและปลดปล่อยเข้าสู่กระแสโลหิต (Dixon and Nolan, 1983) เนื่องจากแอมโมเนียที่เกิดขึ้นในส่วนลำไส้ใหญ่นี้ จุลินทรีย์นำไปใช้ประโยชน์ได้น้อยมาก เพราะจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในบริเวณนี้เจริญอยู่ได้โดยอาศัยโปรตีน และเปปไทด์ จากซากของจุลินทรีย์ที่มาจากกระเพาะรูเมน ซึ่งโปรตีนจุลินทรีย์ ที่มาจากกระเพาะรูเมนส่วนหนึ่งถูกย่อยไปในลำไส้ใหญ่ และโดยเฉพาะในส่วนของไส้ติ่ง (Siddons *et al.*, 1981) ปริมาณของโปรตีนจุลินทรีย์ที่ถูกใช้ไป และโปรตีนจุลินทรีย์ ที่ถูกสร้างขึ้นมาใหม่ปริมาณใกล้เคียงกัน และหลังจากส่วนของไส้ติ่งลงไปแล้ว การเปลี่ยนแปลงของไนโตรเจนเกิดขึ้นน้อยมาก จึงพบว่า ปริมาณของไนโตรเจนในส่วนของหลังไส้ติ่งลงไปแล้ว กับปริมาณไนโตรเจนในอุจจาระใกล้เคียงกัน (Dixon and Nolan, 1983)

2.8 การใช้ประโยชน์ของแป้งในสัตว์เคี้ยวเอื้อง

แหล่งอาหารที่ให้พลังงานมีทั้งในพืชอาหารสัตว์ และ ธัญพืช แต่อาหารสัตว์ที่มาจากธัญพืชจะมีแป้งเป็นองค์ประกอบอยู่เป็นจำนวนมากที่ใช้เป็นแหล่งพลังงานของสัตว์เคี้ยวเอื้อง ทั้งนี้เนื่องจากสภาพทางสรีรวิทยาการย่อยอาหารของสัตว์เคี้ยวเอื้อง มีลักษณะค่อนข้างจะสลับซับซ้อนตลอดจนส่วนประกอบในธัญพืชแต่ละชนิด แต่ละสายพันธุ์ก็มีความแตกต่างกัน ทำให้มีผลต่อการย่อยแป้งในแต่ละส่วนของการเดินอาหาร (เทอดชัย, 2530ก)

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า พืชจะเก็บสะสมแป้งอยู่ในทุกส่วนของพืช เช่น ใบ ลำต้น และแหล่งสะสมอาหารของพืช เช่น ราก หัว และเมล็ด เพื่อสำรองนำมาใช้ประโยชน์เมื่อต้องการ นอกจากนี้ยังพบแป้งในจุลินทรีย์บางชนิด เชื้อรา และสาหร่าย โดยเฉพาะสาหร่ายสีเขียว สำหรับเมล็ดธัญพืชมีปริมาณแป้งแตกต่างกันประกอบด้วยหน่วยกลูโคสที่ต่อกันอยู่ในรูปของอะมัยโลส และอะมัยโลสเพคติน ซึ่งอัตราส่วนของทั้ง 2 ส่วนจะถูกควบคุมโดยพันธุกรรมของพืชนั้นๆ (Greenwood, 1970)

2.8.1 การย่อยแป้งในกระเพาะรูเมน (Rumen)

กระเพาะรูเมนไม่ได้มีหน้าที่ในการผลิตน้ำย่อยที่จะย่อยอาหารที่กินเข้าไป แต่มีจุลินทรีย์ปล่อยน้ำย่อยออกมาย่อยอาหาร (Morrison, 1979) ดังนั้นจุลินทรีย์จึงมีบทบาทต่อการย่อยแป้งโมเลกุลใหญ่เป็นโมเลกุลเล็ก สุดท้ายได้น้ำตาลกลูโคส ซึ่งจุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ทันที ดังนั้นจึงพบน้ำตาลเหล่านี้จำนวนน้อยมาก ผลจากการใช้ประโยชน์จากแป้งโดยจุลินทรีย์บริเวณนี้ได้ผลผลิตส่วนใหญ่เป็น กรดไขมันที่ระเหยได้ (volatile fatty acid; VFA) เช่น อะซิติก (acetic acid) โพรพิโอนิค (propionic acid) บิวทีริค (butyric acid) คาร์บอนไดออกไซด์ และก๊าซมีเทน โดยที่ความเข้มข้น และสัดส่วนของกรดไขมันที่ระเหยได้ที่เกิดขึ้นไม่คงที่ ขึ้นอยู่กับชนิดของอาหารและระยะเวลาภายหลังจากการกินอาหารอาหารของสัตว์เคี้ยวเอื้อง (เทอดชัย, 2530ก)

ในโคที่ให้กินหญ้าแห้ง และอาหารข้นๆ ทั่วไป ปริมาณกรดไขมันที่ระเหยได้ (volatile fatty acid; VFA) ที่วัดได้ในกระเพาะรูเมนมีค่าของ อะซิติก (acetic acid) โพรพิโอนิค (propionic acid) บิวทีริค (butyric acid) ในสัดส่วน 63 21 และ 16 ส่วนตามลำดับ ส่วน กรดไขมันที่ระเหยได้อื่นๆ พบในปริมาณน้อยมาก แต่ถ้าเป็นในกรณีการให้อาหารที่มีปริมาณแป้งมากๆ ผลของการหมักในกระเพาะรูเมนจะให้ปริมาณกรดไขมันที่ระเหยได้ในสัดส่วนที่ต่างไปจากนี้ได้ โดยพบว่ามีปริมาณของโพรพิโอนิค เพิ่มขึ้นเป็น 35-45 โมลต่อ 100 มิลลิลิตร ของกรดไขมันระเหยได้ (Ørskov, 1986) หรือในกรณีของการให้โคได้รับแป้งอย่างกะทันหันในปริมาณมากๆ มีผลทำให้กระบวนการเปลี่ยนแปลงเมตาโบลิสึม (metabolism) ของอาหารโดยจุลินทรีย์ผิดปกติไปได้ คือทำให้ได้สารตัวกลางที่เป็น lactic acid ในปริมาณที่มาก และเมื่อจุลินทรีย์ขับออกมาใน rumen fluid ก็ทำให้ความเป็นกรด-ด่างของกระเพาะรูเมนต่ำลง เกิดเป็นภาวะ rumen acidosis ได้ และเมื่อ lactic acid ถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสโลหิตในปริมาณมากๆ ก็ทำให้เกิดอันตรายแก่โคถึงตายได้ (Hungate, 1966)

ความสามารถในการย่อยได้ของแป้งในกระเพาะรูเมน ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการทั้งที่เป็นปัจจัยที่มาจากตัวสัตว์ ซึ่งได้แก่ ชนิดของสัตว์ที่ต่างกันก็มีผลทำให้การย่อยได้แตกต่างกัน (Theurer, 1986) หรือแม้แต่สัตว์ชนิดเดียวกัน พันธุ์เดียวกัน ก็ยังมีความสามารถในการย่อยได้แตกต่างกัน

(Ørskov *et al.*, 1971) หรือในกรณีที่ปัจจัยมาจากแป้งเอง ซึ่งได้แก่ แหล่งของแป้งที่ได้จากพืชที่ต่างชนิดกัน (Roony and Pflugfelder, 1986; Nalsen *et al.*, 1987) ความอ่อนแก่ของพืชที่เป็นแหล่งของแป้ง (เทอดชัย, 2530ก) ปริมาณการกินแป้งในแต่ละวัน (Kerr *et al.*, 1966) ขนาดของอนุภาคของแป้งที่ใช้เป็นอาหาร (Anzola *et al.*, 1988) รวมทั้งกรรมวิธีในการแปรรูป Roony and Pflugfelder, 1986; Hill *et al.*, 1988) ตลอดจนปฏิสัมพันธ์ร่วมกัน (interaction) ระหว่างแป้งและโปรตีนในอาหาร และสารยับยั้งการย่อยในชนิดต่างๆ เช่น tannin เป็นต้น (Roony and Pflufelder, 1986)

2.8.2 การย่อยแป้งในลำไส้เล็ก

แป้งที่เข้ามาในลำไส้เล็กส่วนใหญ่เป็นแป้งที่เหลือ หรือรอดพ้นจากการย่อยโดยจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมน ซึ่งถ้าการย่อยแป้งในกระเพาะรูเมนเป็นไปอย่างสมบูรณ์ ปริมาณแป้งที่ถูกย่อยในลำไส้เล็กจะมีน้อย แต่ในกรณีที่สัตว์ได้รับแป้งจำนวนมาก ก็จะมีแป้งหลงเหลือเข้าสู่ลำไส้เล็กมากขึ้น (เทอดชัย, 2540) นอกจากแป้งที่ได้รับโดยตรงจากอาหารแล้ว ยังพบว่า แป้งที่เข้ามาถึงลำไส้เล็กส่วนหนึ่งเป็นแป้งที่อยู่ในรูปของ polysaccharides ที่เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ (Hespell and Bryant, 1979) แป้งจากแหล่งดังกล่าวมีปริมาณ 6-10 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งปะปนอยู่กับแป้งจากอาหารไม่สามารถจะแยกออกเป็นส่วนๆ ได้ (Owens *et al.*, 1986) และเมื่อคิดรวมปริมาณแป้งทั้งหมดที่เข้ามาถึงลำไส้เล็ก Owens *et al*, (1986) ศึกษาการใช้แป้งจากข้าวโพดและข้าวฟ่างเป็นอาหารสัตว์ พบว่าแป้งจะถูกย่อยในลำไส้เล็ก 18-42 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งการย่อยแป้งในส่วนของลำไส้เล็กนี้ เกิดจากบทบาทของเอนไซม์ของตัวสัตว์เองได้แก่ amylase, maltase oligo 1, 6 ทั้งที่มาจากผนังเซลล์ของผนังลำไส้เล็ก และจากตับอ่อน เอนไซม์เหล่านี้ทำงานได้ดีเมื่อมีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม เช่น เอนไซม์ pancreatic amylase ทำงานได้ดีในสภาพความเป็นกรด-ด่างในลำไส้เล็กเท่ากับ 6.9 (เทอดชัย, 2540)

ผลจากการย่อยแป้งในลำไส้เล็กของโคได้เป็นน้ำตาลกลูโคส ซึ่งสามารถดูดซึมเข้าสู่ผนังลำไส้เล็กได้เลย แต่การดูดซึมกลูโคสของลำไส้เล็กในโคก็มีขีดจำกัด ทั้งนี้เพราะว่า โคแต่ละตัวสามารถดูดซึมกลูโคสได้ไม่เกิน 1.6 กิโลกรัมต่อวัน (Kaufmann and Dirksen, 1972 อ้างโดย เทอดชัย, 2535) นอกจากนี้ความสามารถในการดูดซึมกลูโคสในลำไส้เล็กยังถูกกำหนดโดยปัจจัยหลายๆ อย่าง เช่น ปริมาณแป้งที่ผ่านเข้าสู่ลำไส้เล็กซึ่งถ้าหากมีปริมาณแป้งมากเกินไปขณะที่ลำไส้เล็กมีขีดจำกัดในการผลิตเอ็นไซม์ ทำให้การย่อยแป้งได้ลดลง (Karr *et al.*, 1966) บทบาทของเอ็นไซม์อื่นที่เกี่ยวข้องกับการย่อยแป้ง ระยะเวลาที่แป้งอยู่ในลำไส้เล็กตลอดจนความยากง่ายในการใช้ประโยชน์ได้ของแป้งจากพืชแต่ละชนิดล้วนแล้วแต่มีผลต่อปริมาณการดูดซึมกลูโคสในลำไส้เล็กด้วย (Owens *et al.*, 1986)

จึงเห็นได้ว่าความสามารถในการย่อยได้ของแป้ง เป็นปัจจัยที่สำคัญในการกำหนดการดูดซึมกลูโคสในลำไส้เล็กของโค

2.8.3 การย่อยได้ของแป้งในลำไส้ใหญ่

แป้งที่รอดพ้นจากการย่อยในกระเพาะรูเมน และลำไส้เล็กจะถูกส่งต่อมายังลำไส้ใหญ่ ซึ่งภายในลำไส้ใหญ่นี้ก็มีการย่อยแป้งเช่นเดียวกัน โดยที่การย่อยแป้งในลำไส้ใหญ่เกิดจากกิจกรรมของจุลินทรีย์เช่นเดียวกับการย่อยในกระเพาะรูเมน ซึ่งกรดไขมันระเหยง่ายที่ได้จะถูกดูดซึมเข้าสู่ผนังของลำไส้ใหญ่ เพื่อใช้เป็นแหล่งของพลังงาน หรือใช้เป็นแหล่งของคาร์บอนสำหรับการสังเคราะห์โปรตีนจุลินทรีย์ ทั้งนี้เพราะจุลินทรีย์ในส่วนนี้สามารถใช้ประโยชน์จากโปรตีนที่เข้ามาถึงลำไส้ใหญ่ได้ ทั้งที่เป็นโปรตีนในรูปของยูเรีย หรือ endogenous protein อื่นๆ แต่โปรตีนจุลินทรีย์ที่สังเคราะห์ได้ในส่วนนี้สัตว์ไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ และถูกขับออกจากร่างกายปนมากับมูล (Ørskov *et al*., 1970)

ปริมาณการย่อยแป้งในลำไส้ใหญ่ มีสูงถึง 6 เปอร์เซ็นต์ ของแป้งที่ย่อยได้ทั้งหมดในร่างกายของแกะ (Ørskov *et al*, 1971) สำหรับในโคมีสูงถึง 15 เปอร์เซ็นต์ ของการย่อยในร่างกาย ขณะที่ 13 เปอร์เซ็นต์ เป็นการย่อยได้ของแป้งที่รับเข้ามาทั้งหมด (เทอดชัย, 2530ก) และการย่อยได้ของมันสำปะหลังเส้น ข้าวเปลือกเจ้าบด และปลายข้าว มีค่าเท่ากับ 1 2 และ 5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อคิดจากแป้งที่ย่อยได้ในร่างกายและแป้งที่รับเข้าไปทั้งหมด (เกรียงศักดิ์, 2533) Ørskov (1986) รายงานว่ามีการย่อยแป้งในบริเวณนี้อยู่ระหว่าง 33-62 เปอร์เซ็นต์ ของแป้งที่ผ่านเข้าไปในระบบทางเดินอาหารส่วนนี้ของโค

เมื่อพิจารณาถึงการย่อยแป้งในแต่ละส่วนของทางเดินอาหารแล้ว จะเห็นได้ว่าการย่อยแป้งในส่วนของกระเพาะรูเมน และลำไส้เล็กเท่านั้นที่มีประโยชน์ต่อตัวสัตว์สูงสุด ดังนั้นการนำธัญพืชมาให้สัตว์เคี้ยวเอื้อง ควรมีกรรมวิธีทำให้แป้งถูกย่อยได้มากที่สุด และสิ้นสุดขอบเขตในลำไส้เล็ก เป็นการใช้แป้งอย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด (เทอดชัย, 2530ก)

2.9 การศึกษาการย่อยได้ของโภชนะในโคนม

การศึกษาการย่อยได้ (digestibility studies) มีความหมายกว้างๆคือการวัดปริมาณโภชนะหรืออาหารที่สูญหายไปในทางเดินอาหารส่วนต่างๆของโคนม วัตถุประสงค์หลักของการศึกษาคือ เพื่อประเมินความสามารถ หรือประสิทธิภาพของโคนมในการนำเอาโภชนะหรืออาหารชนิดนั้นๆไปใช้ประโยชน์ และเพื่อศึกษาให้รู้ถึงปริมาณโภชนะที่ย่อยได้ในแต่ละส่วนของทางเดินอาหารว่ามีมากน้อยเพียงใด และนอกจากนี้ ยังอาจมีวัตถุประสงค์เพื่อที่จะใช้ในการศึกษาเกี่ยวกับผลของการเตรียมหรือ

แปรรูปอาหาร การใช้อาหารเสริม อัตราส่วนของวัตถุดิบที่ให้เป็นอาหาร อิทธิพลของอายุ ชนิด และพันธุ์สัตว์ ที่จะมีผลต่อการย่อยได้ของอาหารนั้นๆอีกด้วย (เทอดชัย, 2540)

การประเมินคุณค่าทางอาหารที่เป็นพื้นฐานคือ วิธีการวิเคราะห์แบบ proximate analysis (A.O.A.C., 2000) ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้กันมานานและสามารถบอกองค์ประกอบทางเคมีของอาหารได้ในระดับหนึ่ง แต่ยังมีข้อจำกัดในเรื่องของการวิเคราะห์องค์ประกอบส่วนที่เป็นเยื่อใย จึงมีการพัฒนาการวิเคราะห์เยื่อใยขึ้น เรียกว่า detergent method (Van Soest, 1982) อย่างไรก็ตาม การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีนี้ ยังไม่สามารถบอกปริมาณอาหารที่สัตว์กินได้ และโภชนะที่สัตว์จะได้รับ การย่อยได้ของโภชนะในตัวสัตว์ ตลอดจนการนำโภชนะต่างๆไปใช้ประโยชน์ได้จริง ดังนั้นจึงต้องมีการทดลองหาค่าการย่อยได้ทั้งจากห้องปฏิบัติการ *(In vitro)* ได้แก่ การศึกษาการสลายตัวของโภชนะในกระเพาะรูเมนโดยวิธีการใช้ถุงไนล่อน และการประเมินค่าการย่อยได้และพลังงานด้วยวิธีวัดปริมาณแก๊สที่เกิดขึ้น และการทดลองในตัวสัตว์โดยตรง *(In vivo)* ได้แก่ การศึกษาการย่อยได้โดยวิธีการดั้งเดิมเพื่อหาค่าการย่อยได้ปรากฏ และการใช้สารบ่งชี้

2.9.1 การศึกษาการย่อยสลายของโภชนะในกระเพาะรูเมนโดยวิธีใช้ถุงไนล่อน (*In situ/In sacco* rumen degradability technique)

วิธีการใช้ถุงไนล่อน (nylon bag method) เป็นวิธีการวัดค่าโภชนะ เช่น วัตถุแห้ง อินทรียวัตถุ หรือโปรตีนที่หายไปในชั่วโมงต่างๆ โดยมีหลักการว่า อาหารส่วนที่หายไป คือ ส่วนที่ย่อยสลายได้ (degraded fraction) และส่วนที่เหลืออยู่ในถุง คือ ส่วนที่ไม่ย่อยสลาย (undegraded fraction) ดังนั้น เมื่อนำปริมาณอาหารที่เหลือในถุงหลังจากแช่ไว้ที่ระยะเวลาใดเวลาหนึ่งมาหักลบจากปริมาณเริ่มต้น แล้วคิดเป็นร้อยละของปริมาณอาหารเริ่มต้น จะสามารถคำนวณค่าการย่อยสลาย (%) ที่ชั่วโมงนั้นๆได้

Mehrez and Ørskov (1977) ได้นำตัวอย่างอาหารบรรจุในถุงไนลอน นำไปแช่ในกระเพาะรูเมนที่ชั่วโมงต่างๆแล้ววัดค่าการย่อยสลายของวัตถุแห้ง ทำให้ทราบลักษณะการย่อยสลายของอาหารในกระเพาะรูเมน คือ

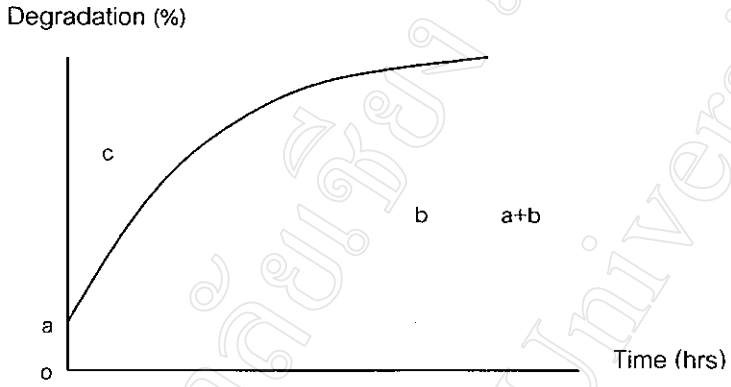
1. ส่วนที่ไม่ย่อยสลายในกระเพาะรูเมน (ruminal undegradable substance, RUS)

2. ส่วนที่ย่อยสลายในกระเพาะรูเมน (ruminal degradable substance, RDS) ซึ่งประกอบด้วย 2 ส่วน ได้แก่

2.1ส่วนที่ละลายได้ทันที (immediately soluble fraction, A) คือ ส่วนที่สามารถละลายได้ทันที เมื่ออาหารตกสู่กระเพาะรูเมน

2.2 ส่วนที่ไม่ละลายแต่สามารถเกิดกระบวนหมักย่อยได้ (insoluble but potentially fermentable fraction, B)

ต่อมา Ørskov and McDonald (1979) ได้นำค่าการย่อยสลายที่ชั่วโมงต่างๆมาเขียนเป็นรูปกราฟ พบว่าได้เป็นเส้นโค้ง ซึ่งเมื่อนำมาสร้างเป็นสมการ exponential, $P = a + b(1-e^{-ct})$ จะได้ค่าต่างๆดังแสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 การสลายตัวของโภชนะของอาหารข้นในกระเพาะรูเมน

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

เมื่อ P = การย่อยสลายของโภชนะที่เวลา t (degration at t time)

a = ส่วนที่ละลายได้ทันที (immediately soluble material)

b = ส่วนที่ไม่ละลายแต่สามารถหมักย่อยได้ (insoluble but potentially fermentable material)

l = ระยะเวลาที่รอให้จุลินทรีย์เข้าสัมผัสอาหาร และทำการย่อยสลาย (lag phase)

e = log ฐาน 10

c = อัตราการย่อยสลาย (degradation rate)

t = ช่วงระยะเวลาต่างๆ

จะเห็นได้ว่า วิธีการนี้นอกจากจะบอกค่าการละลาย (A) และค่าการสลายตัวสูงสุด (A+B) ซึ่งเป็นค่าที่บ่งบอกปริมาณการสลายตัวของอาหารในกระเพาะรูเมนแล้ว nylon bag technique ยังช่วยให้ทราบอัตราการสลายตัว (c) ซึ่งทำให้ทราบอัตราเร็วและปริมาณอาหารที่เคลื่อนที่จากกระเพาะรูเมนไปสู่ลำไส้เล็ก อย่างไรก็ตาม อาหารที่สัตว์กินเข้าไปจะไม่ถูกย่อยในกระเพาะรูเมนทั้งหมด แต่จะ

เคลื่อนที่ออกจากกระเพาะรูเมนในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน (rate of passage) ขึ้นกับปริมาณอาหารที่สัตว์กินเข้าไป ชนิดของอาหาร และปัจจัยอื่นๆ

วิธีการใช้ถุงไนล่อนอาจมีความไม่แน่นอนเมื่อใช้ประเมินค่าการย่อยได้ของอาหารหยาบที่มีการเสริมด้วยอาหารข้นหรือโปรตีน เพราะในวัตถุดิบเหล่านั้นมีค่าการละลายได้ (solubility) สูง จึงสามารถผ่านออกจากถุงก่อนเกิดการหมักได้ และไม่สามารถใช้ประเมินค่าในอาหารที่มีปริมาณของเยื่อใยที่ละลายในกรดสูงกว่า 25 เปอร์เซ็นต์ (Dewhuest *et al.*, 1995)

Ørskov *et al.* (1988) ได้รายงานว่าค่า A, B และ c ที่คำนวณได้จากสมการโดยวิธีการใช้ถุงไนล่อน มีความสัมพันธ์กับปริมาณวัตถุแห้งที่สัตว์กินได้ (DMI) วัตถุแห้งที่ย่อยได้ (DMD) ปริมาณวัตถุแห้งย่อยได้ที่สัตว์ได้รับ (DDMI) และอัตราการเจริญเติบโตในเกณฑ์ที่สูง (R^2 = 0.88 0.96 และ 0.95 ตามลำดับ)

Shem *et al.* (1995) ได้สร้างสมการสำหรับการทำนายค่าวัตถุแห้งที่กินได้ (dry matter intake, DMI) ปริมาณวัตถุแห้งย่อยได้ที่สัตว์ได้รับ (digestible dry matter intake, DDMI) และอัตราการเจริญเติบโตของสัตว์ (growth rate) จากลักษณะของการสลายตัวของอาหารหยาบเขตร้อน ซึ่งพบว่า ค่าสหสัมพันธ์ของการใช้ค่าพารามิเตอร์ A, B และ c ในสมการ multiple regression กับค่า DMI, DDMI อัตราการเจริญเติบโต และค่าดัชนีบ่งชี้ มีค่าสูง ทั้งนี้สมการที่ได้เสนอไว้คือ

DMI (kg/day) = - 8.286 + 0.266A + 0.102B + 17.696c (r = 0.09)

DDMI (kg/day) = - 7.609 + 0.219A + 0.080B + 24.191c (r = 0.93)

Growth rate (g/day) = - 0.649 + 0.017A + 0.006B + 3.870c (r = 0.93)

Index value = A + 0.38B + 66.5c

2.9.2 การประเมินค่าการย่อยได้ และพลังงานโดยวิธีวัดปริมาณแก๊ส (Gas production technique)

วิธีการนี้อาศัยหลักการที่ว่าเมื่ออาหารถูกหมักย่อย (incubate) ในกระเพาะรูเมนจะได้ผลผลิต คือ แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) แก๊สมีเทน (CH_4) และกรดไขมันที่ระเหยได้ (volatile fatty acids, VFA) ซึ่งมีสหสัมพันธ์กับการย่อยได้ของอาหารในโคนม Beuvink and Kogut (1993) ได้อธิบายถึงลักษณะการเกิดแก๊สในแต่ละช่วงเวลา โดยแบ่งออกเป็น 3 ช่วงเวลาดังต่อไปนี้

1. initial phase ระยะนี้เป็นระยะที่แก๊สเกิดขึ้นอย่างช้าๆ เนื่องจากอาหารส่วนที่ไม่ละลายในทันที แต่จะถูกจุลินทรีย์เข้าย่อยสลายอย่างช้าๆด้วยกระบวนการ hydration และ colonization
2. exponential phase แก๊สจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วในระยะนี้ เนื่องจากอาหารส่วนที่ละลายได้จะเกิดขบวนการหมักย่อยทันที และเกิดแก๊สขึ้นอย่างรวดเร็ว
3. asymptotic phase เป็นระยะซึ่งอาหารส่วนที่ไม่ละลายทันทีจะถูกหมักย่อย แต่จะหมักย่อยได้น้อย และกระบวนการเกิดขึ้นอย่างช้าๆ

Menke *et al.* (1979) ได้ทำการศึกษากับอาหารกว่า 200 ชนิด โดยหาการย่อยได้แบบ *in vitro* และวัดพลังงานใช้ประโยชน์ (metabolizable energy, ME) แล้วหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าดังกล่าวกับปริมาณแก๊สที่เกิดขึ้นในหลอดทดลอง พบว่าปริมาณแก๊สที่เกิดขึ้นกับปริมาณอาหารที่ย่อยได้มีความสัมพันธ์กันสูง จึงได้สร้างสมการ regression เพื่อนำปริมาตรแก๊สที่เกิดขึ้นไปทำนายค่าการย่อยได้ และพลังงาน

Menke and Steingass (1988) ได้พัฒนาวิธีการ *In vitro* gas production technique ขึ้นมาโดยยึดหลักการเดียวกับวิธีการที่เสนอโดย Tilley and Terry (1963) แต่ทั้งนี้มีความแตกต่างในรายละเอียดคือ เป็นการวัดปริมาณแก๊สที่เกิดขึ้นจากการบ่มอาหารตัวอย่างแทนที่การวัดปริมาณวัตถุแห้งและอินทรียวัตถุที่หายไป โดยนำค่าแก๊สที่วัดได้มาทำนายค่าการย่อยได้ของอินทรียวัตถุ (organic matter digestibility, OMD) และค่าพลังงานใช้ประโยชน์ได้ (metabolizable energy, ME) และค่าพลังงานสุทธิเพื่อการให้นม (net energy of lactation, NE_L) วิธีการนี้สามารถทำได้สะดวกรวดเร็ว สามารถทำได้ทีละหลายๆตัวอย่าง และให้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ต่อการศึกษามากกว่า สำหรับสมการที่ใช้ในการทำนายค่าการย่อยได้ของอินทรียวัตถุ และพลังงานใช้ประโยชน์ได้นั้น เป็นดังนี้คือ

$$OMD\ (\%) = 9.00+0.9991GP+0.0595XP+0.0181XA \qquad (r = 0.91)$$

$$ME\ (MJ/kg) = 1.06+0.157GP+0.0084XP+0.022XL-0.0081XA \qquad (r = 0.94)$$

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

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

XP = ปริมาณโปรตีน (g/kg DM)

XL = ปริมาณลิกนิน (g/kg DM)

XA = ปริมาณเถ้า (g/kg DM)

ต่อมา Blümmel and Ørskov (1993) ได้ปรับปรุงวิธีการหาค่าการย่อยได้โดยวิธีการวัดแก๊สด้วยการนำค่าแก๊สที่อ่านได้ที่ช่วงเวลาต่างๆ ใน 24 ชั่วโมงมา plot graph แล้วสร้างสมการ exponential; $P= a + b (1 - e^{-ct})$ เพื่อนำมาอธิบายค่าการย่อยได้ที่เกิดจากกระบวนการหมัก และยังพบว่า ปริมาณแก๊สที่เกิดขึ้นทั้งหมด (a+b) มีความสัมพันธ์กับปริมาณวัตถุแห้งที่กินได้ (DMI) วัตถุแห้งย่อยได้ที่สัตว์ได้รับ (DDMI) และอัตราการเจริญเติบโต (growth rate) โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความเชื่อมั่น (R^2) เท่ากับ 0.88, 0.93 และ 0.95 ที่ได้จากการคำนวณด้วยสมการที่เสนอโดย Shem *et al.* (1995)

DMI (kg/day) = 1.529+0.45a+0.0324b (r = 0.88)

DDMI (kg/day) = 0.933+0.301a+0.0496b (r = 0.93)

Growth rate (g/day) = -391+112.5a+6.37b (r = 0.95)

2.9.3 การศึกษาการย่อยได้ของโภชนะในตัวสัตว์ (*In vivo* digestibility) โดยวิธีการแบบดั้งเดิม (Conventional method)

การหาการย่อยได้โดยทดลองกับสัตว์โดยตรงแบบ conventional method เป็นวิธีที่นิยมใช้กันมานาน โดยศึกษาในโคทดลองที่มีอายุ ขนาด และน้ำหนักตัวที่ใกล้เคียงกัน มีสุขภาพดี ไม่ตื่นตกใจง่าย ควรใช้โคทดลองมากกว่า 1 ตัว ทั้งนี้แม้ว่าจะเป็นสัตว์ชนิดเดียวกัน อายุ และเพศเดียวกัน ก็อาจมีความสามารถในการย่อยได้แตกต่างกัน การมีจำนวนซ้ำมากจะทำให้ค่าที่ได้มีความแม่นยำมากขึ้น ยิ่งมีสัตว์ทดลองมากเท่าไรก็จะยิ่งให้ผลที่น่าเชื่อถือมากขึ้นเท่านั้น แต่อาจทำให้สิ้นเปลืองแรงงาน และค่าใช้จ่ายมาก อย่างไรก็ตามพบว่าควรใช้โคทดลองอย่างน้อย 4 ตัว (บุญล้อม, 2540) วิธีการศึกษาการย่อยได้แบบนี้แบ่งการทดลองออกเป็น 2 ระยะ คือ

1. ระยะก่อนการทดลอง (preliminary period) เป็นช่วงเวลาที่ให้สัตว์ และจุลินทรีย์ภายในกระเพาะรูเมนได้ปรับตัวให้เข้ากับอาหารที่ศึกษาและเพื่อขับอาหารเดิมที่สัตว์ได้รับออกจากทางเดินอาหารให้หมด โดยจะให้สัตว์กินอาหารอย่างเต็มที่เพื่อวัดปริมาณอาหารที่สัตว์กินได้ หลังจากนั้นจะให้สัตว์กินอาหารลดลงเหลือ 90 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาณที่สัตว์กินได้ สำหรับระยะนี้ใช้เวลาประมาณ 10-14 วัน
2. ระยะการทดลองจริง (collection period) เป็นช่วงเวลาสำหรับเก็บข้อมูล และบันทึกปริมาณอาหารที่สัตว์กิน และมูลที่ขับออกมา โดยวิธีการสุ่ม และเก็บตัวอย่างที่สุ่มมา

5-10 เปอร์เซ็นต์ไว้เพื่อการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีเพื่อนำไปคำนวณค่าการย่อยได้ต่อไป โดยทั่วไปใช้เวลาประมาณ 7-10 วัน หากจำกัดปริมาณอาหารที่ให้ (restricted feeding) และ 10-14 วันหากมีการให้อาหารแบบเต็มที่ (*ad libitum*)

หลังจากเสร็จขั้นตอนการเก็บตัวอย่างในช่วง collection period แล้ว นำตัวอย่างไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมี ปริมาณโภชนะที่มีในอาหารที่ศึกษา และในมูลที่โคนมขับออกมาเพื่อนำค่าที่ได้ไปคำนวณสัมประสิทธิ์การย่อยได้จากสมการ (บุญล้อม, 2540)

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

การศึกษาการย่อยได้ในตัวสัตว์โดยวิธีนี้จำเป็นต้องทราบปริมาณอาหารที่กินและมูลที่ขับออกที่แน่นอน ดังนั้นจึงควรเก็บตัวอย่างอาหารและมูลทั้งหมดไม่ให้สูญหาย รวมทั้งบันทึกปริมาณทุกวันตลอดช่วงเก็บตัวอย่างด้วย

2.9.4 การศึกษาการย่อยได้ของโภชนะในตัวสัตว์ (*In vivo*) โดยวิธีการใช้สารบ่งชี้ (Indicator method)

การหาค่าการย่อยได้ของโภชนะของอาหารที่โคนมได้รับในกรณีที่ขาดเครื่องมือที่เหมาะสม ในสภาพการทดลองที่ไม่ทราบปริมาณอาหารที่กิน มูลที่ขับ หรือต้องการทราบปริมาณโภชนะที่โคนมสามารถย่อยและใช้ประโยชน์ได้จริงที่ทางเดินอาหารส่วนต่างๆ โดยวิธีการแบบดั้งเดิมบางครั้งอาจทำได้ยากเนื่องจากต้องทราบปริมาณอาหารที่กิน และมูลที่โคนมขับออกมาทั้งหมด วิธีการใช้สารบ่งชี้ (indicator or marker) ผสมรวมกับอาหารที่ศึกษา และใช้ปริมาณสารบ่งชี้ดังกล่าวเป็นตัวแปรในการคำนวณหาการย่อยได้เป็นวิธีการที่จะช่วยแก้ปัญหาเหล่านี้ได้ วิธีการหาค่าการย่อยได้ด้วยการใช้สารบ่งชี้คล้ายคลึงกับการหาค่าการย่อยได้โดยวิธีดั้งเดิม

สารที่สามารถนำมาเป็นสารบ่งชี้ได้ต้องเป็นสารที่ไม่ถูกย่อยสลาย ไม่ถูกดูดซึมหรือมีผลต่อระบบทางเดินอาหาร อีกทั้งต้องไม่มีผลต่อประชากรจุลินทรีย์ภายในทางเดินอาหารของโคทดลอง และเมื่อผ่านทางเดินอาหารจะต้องเป็นเนื้อเดียวกับอาหารที่กำลังศึกษา มีอัตราการไหลผ่านที่ใกล้เคียงกัน โดยเฉพาะเมื่อไหลผ่านกระเพาะรูเมนซึ่งมีความแปรปรวนของอัตราการไหลผ่านของอาหารอย่างมาก นอกจากนี้จะต้องสามารถตรวจพบได้ง่ายเมื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณที่พบในอาหารหรือตัวอย่าง

ทดลอง (Marais, 2000) สารบ่งชี้ที่ใช้ในการศึกษาการย่อยได้เมื่อผสมอาหาร และให้โคทดลองกินแล้ว จะต้องขับออกมาทั้งหมด (Omed, 1986; อ้างโดย Rymer, 2000)

2.9.4.1 ประเภทของสารบ่งชี้ (Type of markers)

สารบ่งชี้ที่ใช้เพื่อการศึกษาการย่อยได้ในตัวสัตว์ แบ่งออกได้เป็น 2 ประเภทคือ

1. Internal indicator เป็นสารหรือสารประกอบที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ โดยอาจอยู่ในอาหารที่สัตว์กิน หรือเป็นส่วนหนึ่งของพืชอาหารสัตว์ สารบ่งชี้ประเภทนี้มีข้อดีคือมีราคาถูก และสะดวกในการใช้งานเพราะมีอยู่ตามธรรมชาติ เหมาะสำหรับการศึกษาในสัตว์ป่าหรือสัตว์ที่เลี้ยงปล่อยแปลง ซึ่งยากต่อการให้กินสารบ่งชี้ที่ผสมในอาหาร สารบ่งชี้ประเภทนี้ที่สำคัญได้แก่ ลิกนิน (lignin) โดยพบว่าสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมไม่มีเอนไซม์ที่สามารถสลายพันธะ polymerized phenolic compounds ของลิกนินได้ (Marais, 2000) การใช้ลิกนินเป็นสารบ่งชี้จะได้ผลดีถ้ามีลิกนินเป็นส่วนประกอบอยู่ในอาหารมากกว่า 6 เปอร์เซ็นต์ของวัตถุแห้ง (เทอดชัย, 2540) แต่อย่างไรก็ตาม เนื่องจากลิกนินเป็นสารประกอบที่มีโครงสร้างซับซ้อน องค์ประกอบทางเคมีอาจมีความหลากหลายทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ส่งผลให้ปริมาณที่กลับคืน (recovery rate) อาจไม่คงที่ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดของอาหาร สารสีในพืช (plant chromogen) พบว่าสารชนิดนี้ไม่ถูกย่อยโดยจุลินทรีย์ภายในกระเพาะรูเมน และเถ้าที่ไม่ละลายในกรด (acid insoluble ash, AIA) ส่วนใหญ่ได้แก่ซิลิก้า (silica) ซึ่งนิยมใช้เพื่อศึกษาหาค่าพลังงานใช้ประโยชน์ได้ (metabolizable energy) ในไก่ และการย่อยได้ในโคนม (Marais, 2000) การใช้เถ้าที่ไม่ละลายในกรดเป็นสารบ่งชี้อาจมีความคลาดเคลื่อนในกรณีที่อาหารที่ศึกษานั้นมีส่วนประกอบของดินหรือทรายปลอมปนมาด้วย

2. External indicator คือสารหรือสารเคมีที่เติมลงไปในอาหารทดลอง โดยปกติการให้สารบ่งชี้ชนิดนี้แก่สัตว์นิยมให้ทางปาก ช่องเปิดบริเวณทางเดินอาหารส่วนต่างๆ (Rumen fistula or intestine canulae) หรือให้โดยอุปกรณ์ควบคุมอัตโนมัติ (Marais, 2000) การใช้สารบ่งชี้ประเภทนี้อาจให้แบบเป็นครั้งๆเป็นจังหวะ (single pulse dose) หรือให้อย่างต่อเนื่องตลอดช่วงของการทดลอง ทั้งนี้เพื่อให้ปริมาณของสารบ่งชี้ใน digesta มีความสม่ำเสมอและเป็นเนื้อเดียวกัน ช่วงเวลาสำหรับสัตว์ได้ปรับตัวเพื่อสารบ่งชี้ถูกขับออกมากับมูลอย่างสม่ำเสมอขึ้นกับชนิดอาหาร และสัตว์ทดลอง โดยปกติใช้เวลา 6 และ 8 วันในแกะ และโคตามลำดับก่อนเริ่มเก็บตัวอย่าง (Marais, 2000) สารบ่งชี้ประเภทนี้ที่นิยมใช้ได้แก่ Chromium EDTA หรือ Polyethylene glycol ซึ่งเป็นสารบ่งชี้ชนิด soluble markers ที่นิยมใช้กันมาก สารประกอบประเภท metal oxides และ salts ซึ่งเป็นสารประกอบอนินทรีย์ที่ไม่ละลายน้ำ ได้แก่ โครเมียมออกไซด์ (Cr_2O_3) ไม่ละลายน้ำแต่ละลายได้เล็กน้อยในอัลคาไลน์ และกรด

นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายเพื่อวัดปริมาณมูลของสัตว์ทดลองที่ขับออกมา ให้โดยวิธีการผสมกับอาหาร ใส่ในแคปซูลเจลาติน หรืออุปกรณ์ควบคุมอัตโนมัติ สารบ่งชี้ประเภท external marker ซึ่งได้รับความนิยมอีกชนิดคือ ไททาเนียมออกไซด์ (TiO_2) มีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ และกรดเจือจาง ไม่ถูกดูดซึมโดยพืช ในแกะพบว่าไม่มีผลกระทบใดๆแม้ว่าจะได้รับไททาเนียมออกไซด์ปริมาณ 2-3 กรัมต่อวัน นอกจากนี้ยังถูกขับออกมากับมูลได้เกือบหมด (98 % recovery) วิธีตรวจหาไททาเนียมออกไซด์ทำโดยใช้ Spectrophotometer หลังจากเกิดปฏิกิริยา oxidation กับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) (Brandt *et al*., 1983)

การคำนวณค่าการย่อยได้ของโภชนะเมื่อศึกษาโดยวิธีการใช้สารบ่งชี้โดยสมการที่ได้แสดงไว้ดังนี้คือ (เทอดชัย, 2540)

$$\text{สัมประสิทธิ์การย่อยได้ (\%)} = 100 - 100\left|\frac{\text{\%สารบ่งชี้ในอาหาร}}{\text{\%สารบ่งชี้ใน digesta}} \times \frac{\text{\%โภชนะใน digesta}}{\text{\%โภชนะในอาหาร}}\right|$$

2.10 การเปิดทางเดินอาหารโคทดลองสำหรับใช้ในการศึกษาการย่อยได้ของโภชนะ (Rumen fistulation, Duodenal and Ileum cannulation for digestibility study in dairy cow)

ในการศึกษาเกี่ยวกับการย่อยได้ และขบวนการเมตาบอลิซึ่มของอาหารในโคนมให้ได้ผลการศึกษาที่ชัดเจนในทุกส่วนของทางเดินอาหาร จำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องใช้สัตว์ทดลองที่ได้รับการผ่าตัดสอดท่อเก็บตัวอย่าง (cannula) ในส่วนต่างๆของทางเดินอาหาร ได้แก่ กระเพาะรูเมน (rumen) ลำไส้เล็กส่วนต้น (proximal duodenum) ลำไส้เล็กส่วนปลาย (terminal ileum) ทั้งนี้เนื่องจากสรีรวิทยาการย่อยอาหาร และกายวิภาคของทางเดินอาหารของโคนมมีความซับซ้อนมากกว่าสัตว์ชนิดอื่นๆ ดังนั้นในการที่จะศึกษาให้บรรลุถึงวัตถุประสงค์ดังกล่าว จำเป็นจะต้องมีการเก็บตัวอย่างอาหาร (digesta) ที่เคลื่อนที่ผ่านทางเดินอาหารในแต่ละส่วน ตลอดจนน้ำในกระเพาะรูเมน (Rumen fluid) สำหรับนำมาวิเคราะห์โภชนะต่างๆ (เทอดชัย และทัศนีย์, 2531) รวมถึงการใช้โคทดลองเพื่อศึกษาการสลายตัวของโภชนะในกระเพาะรูเมนโดยวิธีใช้ถุงไนล่อน และประเมินค่าพลังงาน และการย่อยได้ของอินทรียวัตถุโดยวิธีวัดแก๊ส

วัสดุสำหรับทำอุปกรณ์ฝาปิดกระเพาะรูเมน และท่อเก็บตัวอย่างจากลำไส้เล็กมีอยู่หลายชนิด ทั้งที่เป็นวัสดุแข็งเช่น พีวีซี (P.V.C.) และวัสดุที่มีความอ่อนตัวเช่น ยาง ซิลิโคน ทั้งนี้พบว่าซิลิโคนซึ่งเป็นสารโพลิเมอร์ (polymer) ของสารประกอบอินทรีย์ (organic compound) ที่มีซิลิกอน (silicon) จับตัวอยู่ด้วย เมื่อนำมาผ่านความร้อนจะให้สารที่มีคุณสมบัติอ่อนตัวเหมือนยางแต่มีความเหนียวสูง

สามารถคงรูปได้ตลอด ทนต่ออุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลง และไม่ทำปฏิกิริยากับสารเคมีใดๆ (เทอดชัย และทัศนีย์, 2531)

การผ่าตัดเพื่อเปิดท่อทางเดินอาหารบริเวณกระเพาะรูเมน (Rumen fistulation) สามารถทำได้หลายวิธี ทั้งวิธีการผ่าตัดแบบครั้งเดียว (one-stage operation) ซึ่งจะเปิดผ่าผิวหนังพร้อมกับกระเพาะรูเมน แล้วสอดท่อ fistula ในคราวเดียวกัน หรือวิธีการผ่าตัดสองครั้ง (two stage operation) ซึ่งจะเปิดผ่าผิวหนังแล้วเย็บติดผิวหนังกับกระเพาะรูเมน รอจนกระทั่งแผลเชื่อมกันสนิท จึงเปิดแผลที่กระเพาะรูเมนเพื่อสอดท่อ Fistula ทั้งนี้ขึ้นกับอุปกรณ์ ชนิด และขนาดของสัตว์ทดลองเช่น แกะ นิยมใช้การผ่าตัดแบบครั้งเดียว ในขณะที่การผ่าตัดแบบสองครั้งนิยมนำมาใช้กับสัตว์ที่มีขนาดใหญ่เช่น โคเพื่อให้แน่ใจว่าจะไม่เกิดอาการช่องท้องอักเสบ (peritonitis) ถึงแม้ว่าจะต้องใช้เวลามากขึ้น แต่อย่างไรก็ตามพบว่าการผ่าตัดแบบครั้งเดียวในโคนมได้รับความนิยมมากขึ้น เนื่องจากมีความสะดวก และลดขั้นตอนการผ่าตัดลงได้ และป้องกันการเกิดอาการช่องท้องอักเสบได้มีประสิทธิภาพขึ้น (ทัศนีย์ และเทอดชัย, 2530) สำหรับการผ่าตัดเพื่อสอดท่อเก็บตัวอย่างที่ลำไส้เล็กนั้น มี 2 ตำแหน่งด้วยกันคือ ที่บริเวณลำไส้เล็กส่วนต้น (proximal duodenum) และลำไส้เล็กส่วนปลาย (terminal ileum) ท่อที่ใช้สอดมีลักษณะเป็นรูปตัวที (simple-T shaped cannula) ตำแหน่งที่เก็บตัวอย่างทั้งสองตำแหน่งถือเป็นตัวแทนของตัวอย่างอาหารที่เดินทางผ่านเข้าและออกบริเวณลำไส้เล็ก ผลจากการวิเคราะห์ตัวอย่างที่เก็บได้นี้จะสามารถนำไปคำนวณหาปริมาณโภชนะของอาหารทดลองที่ตัวโคนมใช้ประโยชน์ได้จริงโดยไม่ได้เกิด

จากจุลินทรีย์