บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

งานวิจัยเรื่องการย่อยได้ปรากฏของเปลือกเมล็ดและคัพภะข้าวโพดและการใช้เสริมในอาหารต่อสมรรถภาพการผลิตแพะรุ่น แบ่งการศึกษาวิจัยออกเป็น 4 ส่วน ดังนี้

1. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี (Chemical composition analysis)
2. การใช้เปลือกเมล็ดและคัพภะข้าวโพดต่อการย่อยได้และประสิทธิภาพการผลิตของแพะรุ่น
3. การประเมินค่าการย่อยได้และพลังงานโดยวิธีการวัดปริมาณแก๊สที่เกิดขึ้น (Gas production techniques)
4. การศึกษาการย่อยได้โดยวิธี Nylon bag technique

3.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี (Chemical composition analysis)

ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและคุณค่าทางโภชนะของเปลือกเมล็ดและคัพภะข้าวโพดและอาหารทดลองทั้งหมด

1.วิธีวิเคราะห์แบบ Proximate analysis นำตัวอย่างแห้งบดผ่านตะแกรงขนาด 1 มิลลิเมตร วิเคราะห์หาวัตถุแห้ง (dry matter, DM) โปรตีน (crude protein, CP) ไขมัน (ether extract, EE) เยื่อใยหยาบ (crude fiber, CF) และเถ้า (ash) (AOAC., 2000)

โดยเปอร์เซ็นต์วัตถุแห้ง (DM), อินทรียวัตถุ (organic matter, OM) คาร์โบไฮเดรตประเภทที่ย่อยง่าย (nitrogen free tract, NFE) ไม่ได้ทำการวิเคราะห์โดยตรง แต่ใช้วิธีคำนวณโดยใช้สูตร (บุญล้อม, 2541) ดังนี้

DM = 100 - เปอร์เซ็นต์ความชื้น (%moisture)

OM = %DM - %Ash

NFE = %DM - %CP - %EE - %CF -%Ash

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. วิธีวิเคราะห์แบบ Detergent method สำหรับวิเคราะห์องค์ประกอบโครงสร้างของพืชได้แก่ เยื่อใยที่ละลายในด่าง (neutral detergent fiber, NDF) และเยื่อใยที่ละลายในกรด (acid detergent fiber, ADF) (Van Soest, 1982)

3.2 ศึกษาการใช้เปลือกเมล็ดและคัพภะข้าวโพดต่อการย่อยได้และประสิทธิภาพการผลิตของแพะรุ่น

3.2.1 สัตว์ทดลอง

ในการศึกษานี้ใช้แพะพันธุ์ซาเนน เพศผู้ จำนวน 12 ตัว น้ำหนักเฉลี่ย 15 กิโลกรัม อายุเฉลี่ย 3 เดือน จากสถานีเกษตรหลวงอ่างขาง มูลนิธิโครงการหลวง อ.ฝาง จ.เชียงใหม่ ทำการสุ่มแพะให้กินอาหารตามกลุ่มการทดลอง กลุ่มละ 4 ตัว

3.2.2 อาหารทดลอง

อาหารที่ใช้ในการทดลองมี 2 ชนิดคืออาหารหยาบและอาหารข้น

1. อาหารหยาบ แพะแต่ละกลุ่มการทดลองได้รับอาหารหยาบคือเศษผักจากโรงงานคัดบรรจุ มูลนิธิโครงการหลวง ต.แม่เหียะ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ โดยขนเศษผักช่วงเย็น ให้แพะกินในช่วงเช้าและเย็นของอีกวันหนึ่ง

2. อาหารข้น ทำการผสมเองโดยมีส่วนผสมของวัตถุดิบดังตาราง 3.1 และมีความเข้มข้นของโภชนะจากการคำนวณ คือ โปรตีน 18 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณอาหารข้นที่ได้รับแตกต่างกันตามน้ำหนักตัว โดยให้ปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 3.1 ส่วนผสมของวัตถุดิบอาหารข้นของแพะรุ่น

Table 3.1 Composition of experimental diets

Ingredient (kg)	0% SCG	20% SCG	40% SCG
Corn	61	41	21
Rice bran	12	12	12
Soy bean meal	25	25	25
Dicalciumphosphate	1	1	1
Salt	0.5	0.5	0.5
Seed coat and germ of corn	0	20	40
Vitamim-mineral mix	0.5	0.5	0.5
Price (Bath/kg)	11.1	9.2	7.3

3.2.3 อุปกรณ์อื่นๆ

1. เครื่องชั่งน้ำหนักสัตว์ ขนาดชั่งได้สูงสุด 200 กิโลกรัม ชั่งได้ละเอียด 100 กรัม
2. เครื่องชั่งน้ำหนักแบบจานชั่ง สำหรับชั่งอาหาร ขนาดชั่งได้สูงสุด 6 กิโลกรัม
3. เครื่องชั่งน้ำหนัก ขนาด 2000 กรัม ความละเอียด 0.01 กรัม
4. กรงทดลองการย่อยได้ (metabolism cage) แบบขังเดี่ยว
5. ตู้แช่แข็ง (freezer) ใช้สำหรับเก็บตัวอย่างมูลแพะ

3.2.4 วิธีการทดลอง

1. ก่อนเริ่มการทดลองทำการถ่ายพยาธิด้วยยาไอโวเมกซ์และนำแพะไปเลี้ยงบนกรงทดลองแบบขังเดี่ยว

2. แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (completely randomized design, CRD) (Steel and Torrie, 1980) เพื่อเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตและการใช้ประโยชน์ได้ของโภชนะในแพะที่ได้รับการเสริมเปลือกเมล็ดและคัพภะข้าวโพดในอาหารข้นที่ระดับแตกต่างกัน โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 3 กลุ่มการทดลอง (treatments) ดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กลุ่มการทดลองที่ 1 ได้รับอาหารข้นระดับโปรตีน 18 เปอร์เซ็นต์ เป็นกลุ่มควบคุม (control)

กลุ่มการทดลองที่ 2 ได้รับอาหารข้นระดับโปรตีน 18 เปอร์เซ็นต์ ที่เสริมเปลือกเมล็ดและคัพภะข้าวโพดในระดับ 20 เปอร์เซ็นต์ของข้าวโพดทั้งหมด

กลุ่มการทดลองที่ 3 ได้รับอาหารข้นระดับโปรตีน 18 เปอร์เซ็นต์ ที่เสริมเปลือกเมล็ดและคัพภะข้าวโพดในระดับ 40 เปอร์เซ็นต์ของข้าวโพดทั้งหมด

ระยะการทดลองแบ่งเป็น 2 ช่วง ดังนี้

ช่วงที่ 1 ช่วงปรับตัว (preliminary period) เป็นช่วงฝึกสัตว์ให้มีความคุ้นเคยกับสภาพการทดลอง ใช้ระยะเวลา 10 วัน โดยให้อาหารหยาบกินแบบเต็มที่ (*ad libitum*) วันละ 2 ครั้ง เวลา 8.30 น. และ 16.30 น. มีน้ำให้กินตลอดเวลา

ช่วงที่ 2 ช่วงทดลองจริง (experimental period) ใช้ระยะเวลา 80 วัน โดยให้อาหารหยาบกินแบบเต็มที่เหมือนช่วงปรับตัว อาหารข้นจะคำนวณและปรับปริมาณตามความต้องการของแพะแต่ละตัวโดยให้อาหารข้นปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว วันละ 2 ครั้ง คือ เวลา 08.00 น. และ 16.00 น.

ช่วงเก็บข้อมูล (collection period) ประกอบด้วย

- หาค่าประสิทธิภาพผลิตของแพะที่ได้รับอาหารทดลอง ได้แก่ อัตราการเจริญเติบโตต่อวันและปริมาณการกินได้ โดยให้แพะกินอาหารทดลองตามกลุ่มทดลอง ชั่งน้ำหนักสัตว์ก่อนและหลังการทดลอง และชั่งทุก 2 สัปดาห์ (period) ตลอดระยะเวลาการทดลอง ซึ่งใช้เวลาทั้งสิ้น 5 ช่วงการทดลอง ด้วยการชั่งในเวลาเช้าก่อนให้อาหารติดต่อกัน 3 วันเพื่อความแม่นยำของน้ำหนัก เริ่มชั่งน้ำหนักก่อนเริ่มทดลอง 1 วัน (day -1) วันที่เริ่มทดลอง (day 0) และหลังจากเริ่มทดลอง 1 วัน (day 1) แล้วนำค่าน้ำหนักมาหาค่าเฉลี่ยเป็นน้ำหนักเริ่มการทดลอง นอกจากนี้หลังการทดลองทำการชั่งน้ำหนัก 3 วันติดต่อกันคือ ก่อนเสร็จการทดลอง 1 วัน (day 13) วันที่เสร็จสิ้นการทดลอง (day 14) และหลังจากทดลองเสร็จ ไปแล้ว 1 วัน (day 15) นำค่าน้ำหนักมาหาค่าเฉลี่ยเป็นน้ำหนักหลังการทดลอง

$$\text{Initial weight (IW)} = \frac{(\text{day } -1) + (\text{day } 0) + (\text{day } 1)}{3}$$

$$\text{Final weight (FW)} = \frac{(\text{day}13) + (\text{day}14) + (\text{day}15)}{3}$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- ในช่วงนี้ให้กินอาหารหยาบและอาหารข้นพร้อมบันทึกน้ำหนักอาหารที่ให้และที่เหลือระหว่างทดลองทำการสุ่มเก็บตัวอย่างอาหารที่ให้และที่เหลือในแต่ละวันนำไปอบที่อุณหภูมิ 65-70 องศาเซลเซียสจนน้ำหนักคงที่ คำนวณหาปริมาณการกินได้ คิดเป็นน้ำหนักของ วัตถุแห้ง

- หาการย่อยได้ของโภชนะของเปลือกเมล็ดและคัพภะข้าวโพดด้วยวิธีดั้งเดิม (conventional method) โดยเก็บมูลในสัปดาห์สุดท้ายของช่วงทดลองจริง ใช้ระยะเวลา 7 วัน ด้วยการใช้ตาข่ายขึงบริเวณใต้กรงขังรองรับมูลที่ตกจากตัวสัตว์ตลอดเวลา ชั่งน้ำหนักมูลของสัตว์แต่ละตัวทุกวัน คลุกเคล้าผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยแยกปฏิบัติเป็นรายตัว สุ่มเก็บตัวอย่างมูลสัตว์แต่ละตัวๆ ละ 10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักมูล เก็บใส่ภาชนะปิดสนิทนำเข้าตู้แช่แข็ง (-20 องศาเซลเซียส) เพื่อรอการวิเคราะห์หลังจากเสร็จการทดลอง

3.2.5 การบันทึกข้อมูลการทดลอง

1. บันทึกน้ำหนักแพะก่อนและหลังการทดลอง
2. บันทึกน้ำหนักแพะทุก 2 สัปดาห์ ตลอดระยะเวลาการทดลอง
3. บันทึกน้ำหนักอาหารที่ให้และอาหารที่เหลือทุกครั้ง ก่อนที่จะให้อาหารครั้งต่อไป สุ่มเก็บตัวอย่างอาหารที่ให้และอาหารที่เหลือของสัตว์แต่ละตัวทุกวันนำไปอบให้แห้ง บันทึกค่าน้ำหนักแห้งและเก็บรวบรวมไว้เพื่อรอการวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีต่อไป
4. บันทึกน้ำหนักมูลที่เก็บในแต่ละวัน โดยแยกปฏิบัติเป็นรายตัว

3.2.6 การวิเคราะห์ทางเคมีเพื่อหาการย่อยได้

ทำการวิเคราะห์หาส่วนประกอบทางเคมีในตัวอย่างอาหารที่ให้และมูลโดยใช้วิธีการ Proximate Analysis (AOAC, 2000) และวิธี Detergent method (Van Soest, 1982) นำค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ทางเคมีมาคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์การย่อยได้ปรากฏจากสมการ (บุญล้อม, 2541)

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

ประเมินค่าโภชนะย่อยได้รวม (total digestible nutrient, TDN)

$$TDN = DCP + DCF + DNFE + (2.25xDEE)$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เมื่อ DCP = โปรตีนที่ย่อยได้ (กก./ 100 กก.วัตถุแห้ง)

DCF = เยื่อใยที่ย่อยได้ (กก./ 100 กก.วัตถุแห้ง)

DNFE = คาร์โบไฮเดรตประเภทที่ย่อยได้ง่ายที่ย่อยได้ (กก./ 100 กก.วัตถุแห้ง)

DEE = ไขมันที่ย่อยได้ (กก./ 100 กก.วัตถุแห้ง)

คำนวณค่าพลังงานรวม (gross energy, GE) พลังงานใช้ประโยชน์ (metabolizable energy, ME) จากสมการที่เสนอโดย Drochner *et al*. (2003)

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

เมื่อ CP = โปรตีนหยาบ (g/kg)

EE = ไขมัน (g/kg)

CF = เยื่อใยหยาบ (g/kg)

NFE = คาร์โบไฮเดรตประเภทที่ย่อยได้ง่าย (g/kg)

$$ME\ (MJ/kg\ DM) = [0.0312(MJ/g) \times DEE] + [0.0136(MJ/g) \times DCF] + [0.0147(MJ/g) \times (DOM - DEE - DCF)] + [0.00234(MJ/g) \times DCP]$$

เมื่อ DEE = ไขมันที่ย่อยได้ (g/kg)

DCF = เยื่อใยหยาบที่ย่อยได้ (g/kg)

DOM = อินทรียวัตถุที่ย่อยได้ (g/kg)

DCP = โปรตีนหยาบที่ย่อยได้ (g/kg)

3.2.7 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

- วิเคราะห์ผลการทดลองโดยวิธีการวิเคราะห์วาเรียนซ์ (Analysis of variance) ตามแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (completely randomized design, CRD) (Steel and Torrie, 1980) และเปรียบเทียบความแตกต่างด้วยวิธี least significant different (LSD) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองด้านอัตราการเจริญเติบโต มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of covariance, ANOVA) และวิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของกลุ่มทดลอง ตามวิธี least significant different (LSD) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ

3.3 การประเมินค่าการย่อยได้และพลังงานโดยวิธีการวัดปริมาณแก๊สที่เกิดขึ้น (Gass production techniques)

3.3.1 สัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลองที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้คือ โคนมลูกผสมพันธุ์โฮสไตน์ฟรีเซียน x พันธุ์พื้นเมือง อายุประมาณ 2-3 ปี จำนวน 3 ตัว ได้รับการผ่าตัดใส่ท่อเก็บตัวอย่างอาหารที่กระเพาะรูเมน (rumen fistula) (ทัศนีย์และเทอดชัย, 2530) ได้รับอาหารทดลองทั้ง 3 สูตร

3.3.2 อุปกรณ์

1. อ่างน้ำอุ่น (Water bath) ที่สามารถปรับอุณหภูมิให้คงที่ได้ที่ 39 $\pm$ 0.5 องศาเซลเซียส ขนาด 63 X 87 X 59 เซนติเมตร ติดตั้งเครื่องหมุน (Rotator) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 50 เซนติเมตร ที่เจาะรูไว้สำหรับใส่หลอดตัวอย่าง

2. จานหมุนหรือล้อหมุน (Rotator) ประกอบด้วยจานกลมหรือล้อทำด้วยแผ่นพลาสติกแข็ง 2 จาน เส้นผ่าศูนย์กลาง 50 เซนติเมตร วางห่างกัน 12 เซนติเมตร จานหรือล้อนี้เจาะรูไว้ 57 รู แต่ละรูมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 38 มิลลิเมตร เป็นช่องสำหรับเสียบหลอดตัวอย่าง (glass syringes) ที่ฐานหรือจานมีสายพานติดมอเตอร์ไฟฟ้า (Groshopp & Co, 4060 Viersen l., Germany) ให้จานหมุนได้ด้วยความเร็ว 1-2 รอบต่อนาที

3. หลอดใส่ตัวอย่างอาหารหรือไซริงก์ (Glass Syringes) มีเส้นผ่าศูนย์กลางภายนอก 36 มิลลิเมตร ภายใน 32 มิลลิเมตร ยาว 200 มิลลิเมตร และมีความจุ 150 มิลลิลิตร มีขีดบอกปริมาตรถึง 100 มิลลิลิตร ปลายหลอดติดกับสายยาง (silicone tube) เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 5 มิลลิเมตร ยาวประมาณ 40 มิลลิเมตรและมีคลิปหนีบ (clip) เป็นพลาสติกที่สามารถเปิดปิดให้แก๊สออกได้

4. อุปกรณ์สำหรับเก็บน้ำจากกระเพาะรูเมนของโคนม ที่ได้รับการเจาะกระเพาะไว้แล้ว โดยดัดแปลงจากสูบลมจักรยาน ภาชนะสำหรับใส่น้ำจากกระเพาะรูเมน (flask) มีความจุ 2 ลิตร มีจุกยางสำหรับปิด หรือใช้กรวยขนาดใหญ่และผ้าขาวบาง 2 ชั้นสำหรับกรองในกรณีที่ไม่ใช้สูบลมจักรยาน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

5. อุปกรณ์ปลีกย่อยอื่น ๆ

- ปิเปตกึ่งอัตโนมัติ (semi-autopipette) ขนาด 50 มิลลิลิตร ที่อ่านได้ละเอียด 1 มิลลิลิตร
- ขวดแก้วขนาดความจุประมาณ 2 ลิตร สำหรับใส่สารละลายบัฟเฟอร์
- เครื่องกวนสารละลายระบบแม่เหล็ก (magnetic stirrer)
- อ่างน้ำอุ่น (water bath) ปรับอุณหภูมิได้ที่ 39 องศาเซลเซียส
- เทอร์โมมิเตอร์
- พีเอชมิเตอร์ (pH meter)
- ถังบรรจุแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์

3.3.3 สารเคมี

1. Micromineral solution ประกอบด้วย

$CaCl_2 . 2H_2O$	13.2	กรัม
$MnCl_2 . 4H_2O$	10.0	กรัม
$CoCl_2 . 6H_2O$	1.0	กรัม
$FeCl_3 . 6H_2O$	0.8	กรัม

ละลายสารเคมีทั้งหมดเข้าด้วยกันด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร

2. Buffer solution ประกอบด้วย

NH_4HCO_3	4.0	กรัม
$NaHCO_3$	35.0	กรัม

ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่นและปรับให้มี pH 8.1 ด้วย HCl 1 N.

3. Macromineral solution ประกอบด้วย

Na_2HPO_4 (anhydrous)	5.7	กรัม
KH_2PO_4 (anhydrous)	6.2	กรัม
$MnSO_4 . 7H_2O$	0.6	กรัม

ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่นและปรับให้มี pH 6.8

4. Resazurine solution 0.1% (W/V)

เตรียมโดย ชั่ง Resazurine 100 mg. ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5. Reduction solution

NaOH 1 N	2.0	มิลลิลิตร
$Na_2S.\ 9H_2O$	312.0	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	47.5	มิลลิลิตร

สำหรับ Reduction solution ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ทำและเตรียมก่อนเก็บ rumen fluid เพียงเล็กน้อย ส่วนสารละลายอื่นๆ สามารถเตรียมไว้ในขวดสีชาและเก็บเอาไว้ในตู้เย็นได้ โดยระยะเวลาในการเก็บไม่ควรเกิน 3 เดือน

หมายเหตุ ค่า pH Buffer mixture solution (Macromineral solution + Buffer solution + Rezasurine solution + Micromineral solution + Reduction solution) ควรมีค่าประมาณ 7.1 $\pm$ 0.15

3.3.4 วิธีการทดลอง

นำตัวอย่างอาหารทดลองมาศึกษาการย่อยได้โดยการวัดปริมาณแก๊สที่เกิดขึ้นโดยชั่งตัวอย่างอาหารที่บดผ่านตะแกรงขนาด 1 มิลลิเมตร ประมาณ 500 มิลลิกรัม ลงในหลอดแก้วขนาดใหญ่ลักษณะคล้ายเข็มฉีดยา (syringe) ที่มีขีดบอกปริมาตรอยู่ข้างหลอด ปลายหลอดมีสายยางสั้นพร้อมคลิปเปิดปิด ใช้วาสลีนทาให้ทั่วแล้วสอดเข้าในหลอดแก้ว อุ่นหลอดทดลองที่ได้ใส่ตัวอย่างไว้แล้วในตู้อบที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาใช้

เตรียมหลอด syringe ที่ 1-3 สำหรับทำ blank

หลอด syringe ที่ 4-6 สำหรับตัวอย่างอาหารหยาบมาตรฐาน

หลอด syringe ที่ 7-9 สำหรับตัวอย่างอาหารข้นมาตรฐาน

หลอดที่เหลือเป็นตัวอย่างที่ต้องการศึกษา โดยทำตัวอย่างละ 6 ซ้ำ

การเตรียม rumen buffer medium ให้เติมสารละลายต่อไปนี้ตามลำดับ

	ปริมาตร (มล.) ต่อ 1 หลอด
1. น้ำ	10
2. Buffer solution	5
3. Macromineral solution	5
4. Resazurine solution	0.025
5. Micromineral solution	0.0025
6. Reduction solution	1
7. Rumen fluid	10

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ในการทำการทดสอบทุกครั้งจะต้องมีการทดสอบ standardization ดังนี้

1. Blank โดยการ incubate rumen liquor กับ medium mixture โดยไม่มีตัวอย่างอาหาร ในไซริงก์ (บันทึกค่าแก๊สที่เกิดขึ้น = GP_0)

2. หาค่า Standard โดยการ incubate ตัวอย่างอาหารมาตรฐานที่ทราบค่าการเกิดแก๊สแล้วที่ 24 ชั่วโมง ทำอย่างละ 3 ไซริงก์ ค่าแก๊สมาตรฐานที่ได้เมื่อครบ 24 ชั่วโมงของตัวอย่างอาหารมาตรฐานเป็นดังนี้

	น้ำหนัก	GP มาตรฐานที่ 24 ชั่วโมง
Standard Hay	200 mg. DM	44.43 ml (GPh)
Standard Concentrates	200 mg. DM	65.18 ml (GPh)

คำนวณปริมาณแก๊สให้ได้เป็น มิลลิลิตร / 200 mg. DM พอดี

3. ตรวจสอบกิจกรรมของจุลินทรีย์ และหรือความผิดพลาดที่อาจเกิดขึ้นในการทำการทดลอง โดยคำนวณ Factor ซึ่งจะได้ไม่เกิน 0.9-1.1 ดังนี้

FH (Hay Factor) = 44.43 / (GPH – GPo)

FC (Concentrate Factor) = 65.18 / (GPC – GPo)

เมื่อ GP คือค่าของแก๊สที่เกิดขึ้นจากการวัดตัวอย่างมาตรฐานและ Blank จริงๆ ถ้า Factor ที่ได้อยู่นอกเหนือจากค่า 0.9-1.1 ต้องทำซ้ำใหม่ การมี Standard จะช่วยทำให้ทราบสาเหตุของความแปรปรวน เช่น ถ้าค่า FH สูงเกิน 1.0 หรือ FC อยู่ต่ำกว่า 0.9 แสดงว่ามี cellulolytic activity น้อย จะต้องปรับปรุงโดยเพิ่มสัดส่วนของหญ้าแห้งในอาหารสัตว์เจาะกระเพาะ โดยที่

Standard Hay ใช้ตรวจสอบกิจกรรมของแบคทีเรียพวก Cellulolytic

Standard Concentrate ใช้ตรวจสอบกิจกรรมของแบคทีเรียพวก Amylolytic

การเตรียมสารละลายให้เตรียมเผื่อปริมาณที่ต้องการไว้อีก 10 หลอด เพื่อให้สะดวกในการปิเปต ผสมสารละลาย 1-5 ก่อนที่จะเก็บน้ำจากรูเมน แช่สารละลายในอ่างน้ำอุ่น 39 องศาเซลเซียส ทำให้มีสภาพไร้ออกซิเจนโดยผ่านแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ลงไปตลอดเวลา คนด้วย magnetic stirrer

ก่อนเติม rumen liquor ให้ตรวจดูอุณหภูมิอีกครั้งว่าเป็น 39 องศาเซลเซียส แน่หรือไม่ จากนั้นเติม reduction solution ลงไป สีของสารละลายจะค่อยๆเปลี่ยนจากสีฟ้าเป็นสีชมพู และไม่มีสีตามลำดับ แสดงว่าเกิด reduction อย่างสมบูรณ์ แล้วจึงค่อยเติม rumen liquor มิฉะนั้นค่าที่ได้จะไม่ถูกต้องเพราะแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นในหลอดจะถูกนำไปใช้ในการ reduction

เก็บน้ำจากรูเมนโคทั้ง 3 ตัว ก่อนที่สัตว์กินอาหารมื้อเช้า โดยล้วงเอาหญ้าในกระเพาะรูเมนทีละตัว บีบผ่านผ้ากรองเอาน้ำลงไปในภาชนะ แล้วนำน้ำรูเมนมาผสมรวมกันโดยใช้ขวดขนาด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1 ลิตร ทำให้เป็นสภาพไร้ออกซิเจนโดยเทให้เต็มขวดจนล้นเพื่อไม่ให้มีออกซิเจน พยายามปิดฝาโดยอย่าให้ออกซิเจนเข้าได้ นำขวดที่บรรจุน้ำรูเมนไปแช่ในกระติกน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส เพื่อรักษาอุณหภูมิ และนำไปยังห้องปฏิบัติการในทันที

ตวงน้ำจากรูเมนตามปริมาณที่ต้องการผสมกับสารละลายหมายเลข 1-6 ในขวดที่วางในอ่างน้ำอุ่นอุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส คนให้เข้ากันตลอดเวลาด้วย magnetic stirrer ขณะเดียวกันผ่านแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ลงในสารละลายโดยจุ่มสายยางลงในขวด ใช้ปิเปตปั้มสารละลาย rumen liquor buffer mixture ผ่านท่อสายยางเข้าในหลอดตัวอย่าง จับหลอดตัวอย่างชูด้านปลายขึ้นให้อยู่ในแนวดิ่งระดับสายตา ไล่ฟองแก๊สที่มีในหลอดออกให้หมดปิดท่อยางด้วยคลิปหนีบ อ่านปริมาตรของส่วนผสมทั้งหมดในหลอดตัวอย่างด้วยทศนิยม 1 ตำแหน่ง บันทึกค่าไว้ (V_0)

อ่านค่าแก๊สที่ 2, 4, 6, 8, 16, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง บันทึกปริมาณแก๊สที่เกิดขึ้นและนำไปคำนวณอัตราแก๊สที่เกิดขึ้นเพื่อประเมินค่าวัตถุแห้งที่กินได้ และหาค่าพลังงานด้วยวิธีวัดปริมาณแก๊ส (gas production technique) ตามวิธีการของ Menke and Steingass (1988) คำนวณค่าแก๊สสุทธิที่ 24 ชั่วโมง จากสมการ

$$GP\ (ml/200\ mg\ DM, 24\ h) = \frac{(V_{24}-V_0-GP_0) \times 200 \times (Fh + Fc)/2}{W}$$

เมื่อ GP คือ ปริมาตรแก๊สสุทธิ (มิลลิลิตร) ที่เกิดจากการ incubate ตัวอย่างอาหาร 200 มิลลิกรัม (วัตถุแห้ง) เป็นเวลา t ชั่วโมง

V_{24} คือ คือ ปริมาตรที่อ่านได้ข้างหลอดเมื่อ incubate ได้ 24 ชั่วโมง

V_0 คือ ปริมาตรส่วนผสมทั้งหมดที่อ่านได้ข้างหลอดก่อน incubate

GP_0 คือ ค่าเฉลี่ยของแก๊สที่เกิดขึ้นในหลอด blank อ่านได้ที่ 24 ชั่วโมง

Fh คือ 44.16/ ($GPh - GP_0$); roughage correction factor

Fc คือ 62.6/ ($GPc - GP_0$); concentrate correction factor

W คือ น้ำหนักตัวอย่าง เป็นมิลลิกรัมวัตถุแห้ง

GPh คือ ปริมาตรที่เกิดจากการ incubate ตัวอย่างอาหารหยาบมาตรฐาน (มิลลิลิตร)

GPc คือ ปริมาตรที่เกิดจากการ incubate ตัวอย่างอาหารข้นมาตรฐาน (มิลลิลิตร)

นำค่าที่ได้มาแทนในสมการเพื่อคำนวณหาการย่อยได้ของอินทรียวัตถุ (organic matter digestibility, OMD) และพลังงานใช้ประโยชน์ได้ (metabolizable energy, ME) (Menke and Steingass, 1988)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

OMD (%) = 9.00 + 0.9991GP + 0.0595CP + 0.0181Ash

ME (MJ/kg DM) = 1.06 + 0.157GP + 0.0084CP + 0.022EE – 0.0081Ash

NE_L (MJ/kg DM) = -0.36 + 0.1149GP + 0.0054CP + 0.0139EE – 0.0054Ash

3.3.5 การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ผลการทดลองโดยวิธีการวิเคราะห์วาเรียนซ์ (Analysis of variance) ตามแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (completely randomized design, CRD) (Steel and Torrie, 1980) และเปรียบเทียบความแตกต่างด้วยวิธี least significant different (LSD) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ

3.4 การศึกษาการย่อยได้โดยวิธีใช้ถุงไนล่อน (Nylon bag technique)

3.4.1 สัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลองที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้คือ โคนมลูกผสมพันธุ์โฮสไตน์ฟรีเซียน x พันธุ์พื้นเมือง อายุประมาณ 2-3 ปี จำนวน 3 ตัว ได้รับการผ่าตัดใส่ท่อเก็บตัวอย่างอาหารที่กระเพาะรูเมน (rumen fistula) (ทัศนีย์และเทอดชัย, 2530) ได้รับอาหารทดลองทั้ง 3 สูตร

3.4.2 วิธีการทดลอง

ศึกษาการย่อยได้ของวัตถุแห้งและอินทรียวัตถุของอาหารข้นที่ใช้ในการทดลองโดยวิธี Nylon bag technique ตามวิธีการของ Ørskov and McDonald (1979)

โดยนำตัวอย่างอาหารมาบดผ่านตะแกรงขนาด 2 มิลลิเมตร ใช้ถุงไนล่อนขนาด 7 x 15 เซนติเมตร ที่มีขนาดถุงของรู 40 ไมโครเมตร ชั่งตัวอย่างอาหาร 3 กรัม ใส่ลงในถุงไนล่อนที่ทราบน้ำหนักคงที่ และนำไปหมักย่อยในส่วนล่างของกระเพาะรูเมนโดยต้องแช่ถุงไนล่อนในน้ำอุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียสก่อนทุกครั้ง ใช้เวลาในการหมักย่อย 8 เวลาคือ 0 , 2 , 4 , 8 , 16 , 24 , 48 และ 72 ชั่วโมง แต่ละระยะจะทำซ้ำ 2 ถุง เมื่อครบกำหนดเวลาเอาถุงออกจากกระเพาะรูเมน จากนั้นนำถุงทั้งหมดมาซักทำความสะอาดด้วยเครื่อง ซักผ้านาน 15 นาที นำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เอากากอาหารที่เหลือไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เพื่อหาปริมาณวัตถุแห้ง นำกากอาหารส่วนหนึ่งไปเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง เพื่อหาปริมาณอินทรียวัตถุ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การคำนวณเปอร์เซ็นต์วัตถุแห้งที่หายไป (% Dry matter disappearance)

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

เมื่อ W_1 = น้ำหนักถุง

W_2 = น้ำหนักตัวอย่างอาหารเริ่มต้น

W_3= น้ำหนักถุง+ตัวอย่างอาหารหลังอบ

คำนวณหาการย่อยสลาย และค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ของการย่อยสลายของโภชนะโดยโปรแกรมสำเร็จรูป NEWAY (Chen, 1997) โดยใช้สมการ Ørskov and McDonald (1979) ดังนี้

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

เมื่อ P = โภชนะที่หายไปเวลา t (degradation at time t)

a = ส่วนที่ละลายได้ (immediately soluble material)

b = ส่วนที่ไม่ละลายแต่สามารถย่อยได้ (immediately soluble material)

e = $\log_{10}$

c = อัตราการสลายตัวของ b

3.4.3 การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ผลการทดลองโดยวิธีการวิเคราะห์วาเรียนซ์ (Analysis of variance) ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอดสุ่มตลอด (completely randomized design, CRD) (Steel and Torrie, 1980) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี least significant different (LSD) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ

สถานที่ในการทดลอง

1. ฟาร์มโคนม ภาควิชาสัตวศาสตร์และสัตว์น้ำ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

2. ห้องปฏิบัติการอาหารสัตว์ ภาควิชาสัตวศาสตร์และสัตว์น้ำ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ระยะเวลาดำเนินการวิจัย

ประมาณ 9 เดือน ตั้งแต่เดือนมีนาคมถึงพฤศจิกายน 2553

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved