บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

เพื่อให้การศึกษาในครั้งนี้บรรลุตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้ จึงได้กำหนดแนวทางและวิธีการศึกษา ดังนี้คือ

1. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและคุณค่าทางโภชนะของกากข้าวมอลต์สด และอาหารที่ผสมกากข้าวมอลต์สดที่ระดับโปรตีน 16 เปอร์เซ็นต์ (ร้อยละของวัตถุแห้ง) โดยมีอาหารกลุ่มทดลองดังนี้ คือ

   อาหารทดลองที่ 1 เสริมด้วยกากข้าวมอลต์สดระดับ 0 เปอร์เซ็นต์ (0% WMR-control)

   อาหารทดลองที่ 2 เสริมด้วยกากข้าวมอลต์สดระดับ 10 เปอร์เซ็นต์ (10% WMR)

   อาหารทดลองที่ 3 เสริมด้วยกากข้าวมอลต์สดระดับ 20 เปอร์เซ็นต์ (20% WMR)

   อาหารทดลองที่ 4 เสริมด้วยกากข้าวมอลต์สดระดับ 30 เปอร์เซ็นต์ (30% WMR)

2. การศึกษาการย่อยได้ของโภชนะ (nutrient digestibility) ของกากข้าวมอลต์สดที่เสริมในอาหารโคนม โดยการทดลองในตัวสัตว์ (*in vivo*)

3. การศึกษาหาผลผลิตน้ำนมและวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำนม

   - การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน แลคโตส ของแข็งทั้งหมด ของแข็งไม่รวมไขมัน โดยใช้เครื่อง Milko-scan 133 V. 39 GB

   - การวิเคราะห์หาปริมาณเปอร์เซ็นต์ไขมันนม โดยวิธีเกอร์เบอร์ (Gerber method) ตามวิธีการของ Davide (1977)

การทดลองที่ 1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี (Chemical composition analysis)

ศึกษาองค์ประกอบทางเคมี และคุณค่าทางโภชนะของกากข้าวมอลต์สดและอาหารทดลองผสมกากข้าวมอลต์สดทั้ง 4 ระดับ คือ 0 10 20 และ 30 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับโปรตีนหยาบ (CP) 16 เปอร์เซ็นต์ (ร้อยละของวัตถุแห้ง) โดย :

- วิเคราะห์ปริมาณวัตถุแห้ง อินทรียวัตถุ โปรตีนหยาบ ไขมัน และเถ้า ด้วยวิธี proximate analysis (AOAC., 2000)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- วิเคราะห์องค์ประกอบส่วนที่เป็นโครงสร้างของพืชด้วยวิธี detergent method (Van Soest, 1982)

ส่วนประกอบของอาหารทดลองที่ผสมกากข้าวมอลต์สดทั้ง 4 ระดับ แสดงไว้ในตาราง 5 วัตถุดิบหลักที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้คือ รำละเอียด ข้าวโพดบด กากถั่วเหลือง และกากข้าวมอลต์สด

ตาราง 5 ส่วนประกอบของวัตถุดิบ ราคาอาหารต่อกิโลกรัม ร้อยละของโปรตีนหยาบ และโภชนะย่อยได้รวมจากการคำนวณของอาหารทดลองที่ผสมกากข้าวมอลต์สดทั้ง 4 ระดับ

Item	0% WMR	10% WMR	20% WMR	30% WMR
Rice bran (%)	15	15	15	15
Ground corn (%)	60.16	54.95	49.75	44.55
Soybean meal (%)	21.34	16.55	11.75	6.95
Wet malt residue (%)	-	10	20	30
Dicalcium-P14 (%)	2	2	2	2
Salt (%)	1	1	1	1
Premix (%)	0.5	0.5	0.5	0.5
Total (kg)	100	100	100	100
(Price ฿/kg)	6.17	4.89	4.15	3.66
Calculated CP (%)	16.00	16.00	16.00	16.00
Calculated TDN (%)	74.67	73.48	72.29	71.09

การทดลองที่ 2 การศึกษาการย่อยได้ในตัวสัตว์ ของโภชนะ (*in vivo* digestibility)

การหาค่าการย่อยได้ของโภชนะของโคนมที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือ วิธีการหาค่าการย่อยได้แบบดั้งเดิม (Convention method) เพื่อหาค่าการย่อยได้ปรากฏ (Apparent digestibility) และการหาค่าการย่อยได้โดยตัวสัตว์ภายในลำไส้เล็กด้วยการใช้สารบ่งชี้ (Indicator method) มีวิธีการดังนี้

2.1 การหาค่าการย่อยได้วิธีดั้งเดิม (Convention method)

ให้โคทดลองได้รับอาหารที่ผสมกากข้าวมอลต์สดทั้ง 4 ระดับ ร่วมกับอาหารหยาบ คือ หญ้ารูซี่แห้ง ในแต่ละคาบของการทดลอง (period) ใช้เวลาทั้งหมด 28 วัน โดย 14 วันแรกเป็น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ช่วงเวลาสำหรับให้สัตว์และจุลินทรีย์ปรับตัวให้คุ้นเคยกับอาหาร (Preliminary period) และช่วง 14 วันหลังเป็นช่วงเวลาเก็บข้อมูล (Collection period) โดยวันที่ 15-21 เป็นช่วงเวลาสำหรับเก็บมูล เพื่อหาค่าการย่อยได้ปรากฏ (Apparent digestibility) บันทึกปริมาณอาหารที่กินและมูลที่ขับออกมา สุ่มเก็บตัวอย่างอาหารและมูล (5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักสด) โดยทำการเก็บมูลทุกครั้งที่โคถ่ายออกมาจนครบ 24 ชั่วโมงทำการชั่งน้ำหนักแล้วสุ่มเก็บตัวอย่างแช่แข็งเพื่อเก็บไว้วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี นำค่าที่ได้จากการวิเคราะห์มาคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์การย่อยได้ปรากฏจากสมการ (บุญล้อม, 2540) และวันที่ 22-28 เป็นช่วงเวลาสำหรับเก็บตัวอย่างบริเวณลำไส้เล็กทั้งสองตำแหน่ง

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

ประเมินค่าโภชนะรวมที่ย่อยได้ (Total Digestible Nutrient; TDN) จากสมการ

$$TDN = DCP + DNDF + DNFC + 2.25 \times DEE$$

เมื่อ DCP = โปรตีนที่ย่อยได้
DNDF = เยื่อใยที่ละลายในด่างที่ย่อยได้
DNFC = คาร์โบไฮเดรตที่ไม่ใช่เยื่อใยที่ย่อยได้
DEE = ไขมันที่ย่อยได้

คำนวณค่าพลังงานรวม (gross energy, GE) พลังงานใช้ประโยชน์ได้ (metabolizable energy, ME) และพลังงานสุทธิเพื่อการให้นม (net energy for lactation, NE_L) จากสมการที่เสนอโดย Kellner *et al.* (1984)

$$GE\ (MJ/kg) = 0.242CP + 0.0366EE + 0.0209CF + 0.0170NFE$$

$$ME\ (MJ/kg) = 0.0152DCP + 0.0342DEE + 0.0128DCF + 0.0159DNFE$$

$$NE_L\ (MJ/kg) = 0.4632 + 0.0024q \times ME$$

$$q = (ME/GE) \times 100$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2 การหาค่าการย่อยได้โดยวิธีการใช้สารบ่งชี้ (Indicator method)

ในการศึกษาการย่อยได้จริงภายในลำไส้เล็กของโคนม ไม่สามารถวัดปริมาณอาหารที่เดินทางผ่านทางเดินอาหารบริเวณดังกล่าวได้อย่างชัดเจน ดังนั้นการใช้สารบ่งชี้ (marker) เพื่อเป็นค่าดัชนีวัดปริมาณอาหารที่เดินทางผ่านลำไส้เล็กน่าจะเป็นวิธีการที่เหมาะสม สำหรับสารบ่งชี้ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้คือ ไททาเนียมไดออกไซด์ (TiO_2) ซึ่งมีคุณสมบัติทางกายภาพคือ มีสีขาว ไม่มีกลิ่นและรส คุณสมบัติทางเคมี คือ ไม่ละลายน้ำ และไม่สลายตัวเมื่อถูกย่อยในระบบทางเดินอาหารของสัตว์

2.2.1 วิธีการทดลอง

การวัดค่าการย่อยได้ด้วยวิธีการใช้สารบ่งชี้จะดำเนินการต่อเนื่องภายหลงเสร็จกระบวนการเก็บตัวอย่างเพื่อหาค่าการย่อยได้ปรากฏ โดยการเก็บตัวอย่างจากลำไส้เล็กส่วนต้นและส่วนปลายที่สอดท่อ T-shape cannula ไว้เรียบร้อยแล้ว เก็บตัวอย่างเป็นระยะเวลา 4 วัน เพื่อให้ได้ตัวแทนของตัวอย่างทั้ง 24 ชั่วโมง โดยมีตารางเก็บตัวดังที่ได้แสดงไว้ในตาราง 6

ตาราง 6 ช่วงเวลาเก็บตัวอย่างจากลำไส้เล็กของการทดลองหาค่าการย่อยได้โดยวิธีใช้สารบ่งชี้

Day	Collection Time					
1	0600	1000	1400	1800	2200	0200
2	0700	1100	1500	1900	2300	0300
3	0800	1200	1600	2000	2400	0400
4	0900	1300	1700	2100	0100	0500

ตัวอย่างที่เก็บในแต่ละครั้งให้ได้ปริมาณ 200 – 250 มล. หรือใช้เวลาในการเก็บประมาณ 45 นาทีต่อครั้ง และนำตัวอย่างมารวมกัน เก็บไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20° ซ. (Freezer) เพื่อรอการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและหาค่าความเข้มข้นของสารบ่งชี้ในตัวอย่างต่อไป นำค่าที่ได้จากการวิเคราะห์มาเข้าสมการเพื่อหาค่าการย่อยได้ (เทอดชัย, 2540) ดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

$$\text{สัมประสิทธิ์การย่อยได้ (\%)} = 100 - 100 \left| \frac{\text{\% ind. D.}}{\text{\% ind. I.}} \times \frac{\text{\% nutr. I.}}{\text{\%nutr.D.}} \right|$$

เมื่อ % ind. D. = เปอร์เซ็นต์สารบ่งชี้ในลำไส้เล็กส่วนต้น

% ind. I. = เปอร์เซ็นต์สารบ่งชี้ในลำไส้เล็กส่วนปลาย

%nutr.D. = เปอร์เซ็นต์โภชนะในลำไส้เล็กส่วนต้น

% nutr. I. = เปอร์เซ็นต์โภชนะในลำไส้เล็กส่วนปลาย

2.2.2 การศึกษาสภาพภายในกระเพาะหมัก

2.2.2.1 วัดค่าวามเป็นกรด – ด่าง ในกระเพาะหมักของโค (ruminal pH) ซึ่งทำการวัดก่อนที่โคจะกินอาหาร 1 ชั่วโมง และวัดหลังจากโคกินอาหารแล้ว 1 2 3 และ 4 ชั่วโมง โดยสอดท่อลงไปเก็บของเหลวจากกระเพาะหมัก (rumen fluid) ในส่วนล่างของกระเพาะหมัก (ventral sac) ประมาณ 250 มิลลิลิตร ใส่ลงในภาชนะเพื่อวัดค่าความเป็นกรด – ด่าง ในกระเพาะหมักของโค (ruminal pH) ด้วยเครื่องวัด pH แบบพกพายี่ห้อ pH scan BNC™ ซึ่งมีค่าความถูกต้อง ± 0.1 ปรับความเที่ยงตรงด้วยบัฟเฟอร์ 4 และ 7

2.2.2.2 วิเคราะห์หาค่าแอมโมเนียไนโตรเจนที่เกิดขึ้นภายในกระเพาะหมักด้วยวิธี Conway method (Voigt und Steger, 1967)โดยเก็บของเหลวจากกระเพาะหมัก (rumen fluid) เพื่อทำการวัด ซึ่งจะทำการวัดก่อนที่โคจะกินอาหาร 1 ชั่วโมง และวัดหลังจากโคกินอาหารแล้ว 1 2 3 และ 4 ชั่วโมง

2.2.2.3 วิเคราะห์หากรดไขมันละเหยได้ โดยเก็บตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะหมัก (rumen fluid) ประมาณ 250 มิลลิลิตร ลงในขวดที่ปิดสนิท เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น (conc.H_2SO_4) 1 มิลลิลิตร เพื่อหยุดการทำงานของจุลินทรีย์ที่อยู่ในของเหลวจากกระเพาะหมัก เก็บไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (freezer) เพื่อรอการวิเคราะห์หากรดไขมันที่ระเหยได้ด้วยเครื่อง Shimudshu Gas chromatography (Ishler, 1996)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2.3 สัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลองที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้คือ โคนมลูกผสมพันธุ์พื้นเมือง × โฮลสไตน์ฟรีเซี่ยน อายุประมาณ 2-3 ปี จำนวน 4 ตัว ที่ทำการผ่าตัดเปิดท่อทางเดินอาหารบริเวณกระเพาะรูเมนสอดท่อ rumen fistula (ทัศนีย์ และเทอดชัย, 2530) และผ่าตัดเปิดทางเดินอาหารบริเวณ ลำไส้เล็กส่วนต้น (proximal duodenum) และส่วนปลาย (terminal ileum) เพื่อทำการสอดท่อ T-shaped cannula (ทัศนีย์ และเทอดชัย, 2532) โดยให้โคทุกตัวอยู่ในคอกผูกยืนโรงที่มีรางน้ำแบบอัตโนมัติ และราง อาหารแยกเฉพาะตัว โคได้รับอาหารวันละ 2 เวลา คือ 08.00 น. และ 16.00 น. มีน้ำสะอาดกิน ตลอดเวลา

2.3 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

ทำการวิเคราะห์ผลการทดลองโดยวิธีการวิเคราะห์วาเรียนซ์ (Analysis of variance) ตาม แผนการทดลองแบบ 4X4 Latin square design (Steel and Torrie, 1980) และเปรียบเทียบความ แตกต่างด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SAS 6.2 (มนต์ชัย, 2537)

การทดลองที่ 3 ศึกษาหาผลผลิตน้ำนมและวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำนม

3.1 สัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลองที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้คือ โคนมลูกผสมพันธุ์พื้นเมือง × โฮลสไตน์ฟรีเซี่ยน จำนวน 12 ตัว ที่ระยะการให้นม 2-3 เดือนหลังคลอด และมีปริมาณน้ำนมเฉลี่ย (4 เปอร์เซ็นต์ FCM) ก่อนการทดลองใกล้เคียงกัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2 วิธีการทดลอง

ใช้โคทดลองจำนวน 12 ตัว แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มๆ ละ 6 ตัว ตามชนิดของอาหารทดลอง (ตาราง 7) โดยทำการสุ่มให้

กลุ่มที่ 1 ได้รับอาหารที่ใช้เลี้ยงในฟาร์มปกติ (0% WMR - control)

กลุ่มที่ 2 ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของกากข้าวมอลต์สด 20 เปอร์เซ็นต์ (วัตถุแห้ง) (20% WMR)

โคทั้ง 2 กลุ่มจะได้รับอาหารข้นที่มีระดับโปรตีนหยาบที่ระดับ 16 เปอร์เซ็นต์ โคทุกตัวได้รับอาหารข้นคิดตามน้ำหนักตัวและปริมาณน้ำนมที่ให้ โดยแบ่งให้วันละ 2 ครั้ง ในช่วงรีดนมเช้า-เย็น เวลา 05.00 น. และ 15.00 น. โดยทำการแบ่งระยะเวลาในการทดลองเป็น 2 ระยะดังนี้

1) ระยะการปรับตัว (preliminary period) คือเป็นช่วงที่ปล่อยให้ตัวโคและจุลินทรีย์ปรับตัวเข้ากับอาหารทดลอง และขับถ่ายอาหารเดิมในทางเดินอาหารออกให้หมด โดยระยะนี้ใช้เวลา 14 วัน

2) ระยะการเก็บข้อมูล (collection period) ใช้เวลา 90 วัน ทำการชั่งน้ำนมทุกครั้งที่รีดนมเช้า – เย็น สุ่มเก็บตัวอย่างน้ำนมทุกๆ 7 วัน โดยเก็บตัวอย่างน้ำนมในช่วงรีดนมตอนเช้าแล้วนำน้ำนมไปแช่ตู้เย็น และเก็บน้ำนมในช่วงรีดนมตอนเย็นแล้วนำมาผสมให้เข้ากัน เพื่อรอนำไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีต่อไป

ตาราง 7 ส่วนประกอบของวัตถุดิบ ราคาอาหารต่อกิโลกรัม ร้อยละของโปรตีนหยาบ และโภชนะย่อยได้รวม จากการคำนวณของอาหารทดลองที่ผสมกากข้าวมอลต์สดทั้ง 2 สูตร(โภชนะทั้งหมดคิดเป็นร้อยละของวัตถุแห้ง)

Item	0% WMR	20% WMR
Rice bran (%)	15	15
Ground corn (%)	60.16	49.75
Soybean meal (%)	21.34	11.75
Wet malt residue (%)	-	20
Dicalcium-P14 (%)	2	2
Salt (%)	1	1
Premix (%)	0.5	0.5
Total (kg)	100	100
(Price ฿/kg)	6.17	4.15
Calculated CP (%)	16.00	16.00
Calculated TDN (%)	74.67	72.29

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3 การวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำนม

3.3.1 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน แลคโตส ของแข็งทั้งหมด ของแข็งไม่รวมไขมันโดยใช้เครื่อง Milko-scan 133 V. 39 GB

3.3.2 การวิเคราะห์หาปริมาณเปอร์เซ็นต์ไขมันนม โดยวิธีเกอร์เบอร์ (Gerber method) ตามวิธีการของ Davide (1977)

3.4 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

ทำการวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด โดยการสุ่มโคนมเข้าทดลองตามวิธี Group Comparison โดยแบ่งโคนมออกเป็น 2 กลุ่มๆละ 6 ตัวตามชนิดของอาหารทดลอง หลังจากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Student 's t-test แบบ Group Comparison ตามวิธีการของ Steel and Torrie (1980) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SAS 6.2 (มนต์ชัย, 2537)

3.5 สถานที่ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัยและรวบรวมข้อมูล

1. ฟาร์มทดลองหมวดโคนม ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
2. ห้องปฏิบัติการอาหารสัตว์ ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
3. ห้องปฏิบัติการกลาง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
4. ห้องปฏิบัติการ กลุ่มวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์นมเชียงใหม่ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ถ.ห้วยแก้ว อ.เมือง จ.เชียงใหม่

3.6 ระยะเวลาดำเนินการวิจัย

ประมาณ 12 เดือน ตั้งแต่เดือนกันยายน 2548 – เดือนกันยายน 2549

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved