บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การทดลองที่ 1 การประเมินคุณภาพของต้นข้าวโพดฝักอ่อนหมัก

1.1 พืชที่ใช้ในการหมัก

ต้นข้าวโพดฝักอ่อนที่ใช้หมักได้นำมาหั่นให้มีขนาด 2 – 3 เซนติเมตรด้วยเครื่องหั่น แล้วทำการหมัก 2 สูตร คือ 1) ต้นข้าวโพดฝักอ่อนหมัก และ 2) ต้นข้าวโพดฝักอ่อนหมักร่วมกับกากน้ำตาล 5%

1.2 วิธีการหมัก

นำต้นข้าวโพดฝักอ่อนที่หั่นให้มีขนาด 2 – 3 เซนติเมตร และส่วนที่ผสมกับกากน้ำตาลแล้วอัดลงในถังพลาสติกขนาดความจุ 120 ลิตรที่มีฝาปิดและเข็มขัดล็อคด้วยแรงงานคน ปิดทับด้านบนด้วยพลาสติกหนาสีดำก่อนทำการปิดฝาและล็อคเข็มขัดที่ฝาถังให้แน่น หมักไว้เป็นเวลาอย่างน้อย 1 เดือน

1.3 การสุ่มและการวิเคราะห์ตัวอย่าง

สุ่มตัวอย่างต้นข้าวโพดฝักอ่อนจากถังหมัก ถังละ 4 จุด คือ ส่วนบน กลาง ข้าง และส่วนล่าง นำตัวอย่างจากถังเดียวกันผสมรวมกันเพื่อนำไปวิเคราะห์ค่าต่างๆ ดังนี้

1.3.1 การประเมินคุณภาพพืชหมักในสภาพสด

1. ทำการประเมินคุณภาพพืชหมักโดยใช้ประสาทสัมผัส (Gross, 1982 อ้างโดยบุญล้อมและคณะ, 2543) รายละเอียดการวิเคราะห์ในภาคผนวก 1
2. วัดความเป็นกรด – ด่าง (pH) ของพืชหมัก โดยใช้พืชหมัก 50 กรัมผสมกับน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร นำไปปั่นในโถปั่น (blender jar) นาน 30 วินาทีแล้วกรองผ่านผ้าขาวบาง 2 ชั้น นำน้ำที่กรองได้ไปวัดความเป็นกรด – ด่าง (pH) ด้วยเครื่อง pH meter (Bal *et al.,* 1997)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. วิเคราะห์หาปริมาณกรดอินทรีย์โดยการกลั่น (บุญล้อมและบุญเสริม, 2525) รายละเอียดการวิเคราะห์ในภาคผนวก 2
4. วิเคราะห์หาแอมโมเนียในพืชหมัก (Chen *et al.,* 1994) รายละเอียดการวิเคราะห์ในภาคผนวก 3

1.3.2 การประเมินคุณภาพพืชหมักในสภาพไร้ความชื้น

วิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์วัตถุแห้งของพืชหมัก โดยนำต้นข้าวโพดฝักอ่อนหมักทั้ง 2 สูตรมาอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง แล้วคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การสูญเสียวัตถุแห้งตามสมการ (9) เสนอโดย Nagel and Broderick (1992)

$$\text{DM loss (\%)} = \frac{\left\{(\text{DM} \times \text{weight} / 100)_{\text{before ensilage}} - (\text{DM} \times \text{weight} / 100)_{\text{after ensilage}}\right\}}{(\text{DM} \times \text{weight} / 100)_{\text{before}}} \times 100 \quad (9)$$

การทดลองที่ 2 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี (Chemical composition analysis) และการศึกษาการย่อยได้ของโภชนะในตัวสัตว์ (*in vivo* digestibility)

2.1 ศึกษาองค์ประกอบทางเคมี และคุณค่าทางโภชนะของอาหารทดลอง

ซึ่งมีอาหารทดลอง (Dietary treatments) 4 treatments ดังนี้คือ

Treatment 1 หญ้าเนเปียร์ (T1)
Treatment 2 ต้นข้าวโพดฝักอ่อนสด (T2)
Treatment 3 ต้นข้าวโพดฝักอ่อนหมัก (T3)
Treatment 4 ต้นข้าวโพดฝักอ่อนหมักร่วมกับกากน้ำตาล 5% (T4)

โดย :

- วิเคราะห์หาโภชนะซึ่งประกอบด้วยวัตถุแห้ง (DM) อินทรียวัตถุ (OM) โปรตีนหยาบ (CP) ไขมัน (EE) เถ้า (Ash) ใช้การวิเคราะห์แบบ Proximate analysis (AOAC., 2000)

- วิเคราะห์องค์ประกอบส่วนที่เป็นโครงสร้างของพืชได้แก่ เยื่อใยหยาบ (CF) เยื่อใยที่ไม่ละลายในสารละลายที่เป็นกลาง (NDF) เยื่อใยที่ไม่ละลายในสารละลายที่เป็นกรด (ADF) และลิกนิน (ADL) ด้วยวิธี detergent method (Van Soest, 1982)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- คำนวณหาค่าคาร์โบไฮเดรตที่ย่อยได้ง่าย (NFE) จากสมการ

%NFE = 100 - %CP - %EE - %CF - %Ash

และคำนวณหาค่าคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ใช่เยื่อใย (NFC) จากสมการ

%NFC = 100 - %CP - %EE - %NDF - %Ash

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

2.2 การหาค่าการย่อยได้วิธีดั้งเดิม (Conventional method) ของสัตว์ทดลองเมื่อได้รับอาหารทดลอง ทั้ง 4 treatments

การศึกษาครั้งนี้ให้โคทดลองได้รับอาหารหยาบทั้ง 4 treatments ร่วมกับอาหารข้น 16 % CP สูตรที่มีเปลือกเมล็ดถั่วเหลือง (Soybean hulls, 40%) เป็นหลัก (สุกัญญา, 2546) ในแต่ละคาบของการทดลอง (period) ใช้เวลาทั้งหมด 28 วัน โดย 14 วันแรกเป็นช่วงเวลาสำหรับให้โคและจุลินทรีย์ปรับตัวให้คุ้นเคยกับอาหาร (Preliminary period) และช่วง 14 วันหลังเป็นช่วงเวลาเก็บข้อมูล (Collection period) โดยวันที่ 15-21 เป็นช่วงเวลาสำหรับเก็บมูล เพื่อหาค่าการย่อยได้ปรากฏ (Apparent digestibility) บันทึกปริมาณอาหารที่กินและมูลที่ขับออกมา สุ่มเก็บตัวอย่างอาหารและมูล (5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักสด) โดยทำการเก็บมูลทุกครั้งที่โคถ่ายออกมาจนครบ 24 ชั่วโมงทำการชั่งน้ำหนักแล้วสุ่มเก็บตัวอย่าง 10% นำมาแช่แข็งเพื่อเก็บไว้วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี นำค่าที่ได้จากการวิเคราะห์มาคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์การย่อยได้ปรากฏจากสมการ (บุญล้อม, 2540) และวันที่ 22-28 เป็นช่วงเวลาสำหรับเก็บตัวอย่างบริเวณลำไส้เล็กทั้งสองตำแหน่ง

$$\text{สัมประสิทธิ์การย่อยได้ (\%)} = \frac{\text{โภชนะที่กิน} - \text{โภชนะที่ขับออก}}{\text{โภชนะที่กิน}} \times 100 \quad (10)$$

ประเมินค่าโภชนะรวมที่ย่อยได้ (Total Digestible Nutrient; TDN) จากสมการ

$$\text{TDN} = \text{DCP} + \text{DNDF} + \text{DNFC} + 2.25 \times \text{DEE}$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

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)

$$GE\ (MJ/kg) = 0.242CP + 0.0366EE + 0.0209CF + 0.0170NFE \quad (11)$$

$$ME\ (MJ/kg) = 0.0152DCP + 0.0342DEE + 0.0128DCF + 0.0159DNFE \quad (12)$$

$$NE_L(MJ/kg) = 0.4632 + 0.0024q \times ME \quad (13)$$

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

2.3 การหาค่าการย่อยได้โดยวิธีการใช้สารบ่งชี้ (Indicator method)

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

2.3.1 วิธีการทดลอง

การวัดค่าการย่อยได้ด้วยวิธีการใช้สารบ่งชี้จะดำเนินการต่อเนื่องภายหลังเสร็จกระบวนการเก็บตัวอย่างเพื่อหาค่าการย่อยได้ปรากฏ โดยการเก็บตัวอย่างจากลำไส้เล็กส่วนต้นและส่วนปลายที่สอดท่อ T-shaped cannula ไว้เรียบร้อยแล้ว เก็บตัวอย่างเป็นระยะเวลา 4 วัน เพื่อให้ได้ตัวแทนของตัวอย่างทั้ง 24 ชั่วโมง โดยมีตารางเก็บตัวดังที่ได้แสดงไว้ในตาราง 25

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 25 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

$$\text{สัมประสิทธิ์การย่อยได้ (\%)} = 100 - 100 \times \left\{ \frac{\text{\% สารบ่งชี้ใน duodenum}}{\text{\% สารบ่งชี้ใน ileum}} \times \frac{\text{\% โภชนะใน ileum}}{\text{\% โภชนะใน duodenum}} \right\}$$

2.3.2 การศึกษาสภาพภายในกระเพาะหมัก

2.3.2.1 วัดค่าความเป็นกรด – 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

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

2.3.2.3 วิเคราะห์หากรดไขมันระเหยได้ โดยเก็บตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะหมัก (rumen fluid) ประมาณ 250 มิลลิลิตร ลงในขวดที่ปิดสนิท เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น (conc.H_2SO_4)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1 มิลลิลิตร เพื่อหยุดการทำงานของจุลินทรีย์ที่อยู่ในของเหลวจากกระเพาะหมัก เก็บไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (freezer) เพื่อรอการวิเคราะห์หากรดไขมันที่ระเหยได้ด้วยเครื่อง Shimudshu Gas chromatography (Ishler, 1996)

2.3.3 สัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลองที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้คือ โคนมลูกผสมพันธุ์พื้นเมือง × โฮลสไตน์ฟรีเชี่ยน โดยมีสายเลือดของโคพันธุ์โฮลสไตน์ฟรีเชี่ยน 82.125 - 96.875% อายุประมาณ 2-3 ปี จำนวน 4 ตัว ที่ทำการผ่าตัดเปิดท่อทางเดินอาหารบริเวณกระเพาะรูเมนสอดท่อ rumen fistula (ทัศนีย์และเทอดชัย, 2530) และผ่าตัดเปิดทางเดินอาหารบริเวณ ลำไส้เล็กส่วนต้น (proximal duodenum) และส่วนปลาย (terminal ileum) เพื่อทำการสอดท่อ T- shaped cannula (ทัศนีย์และเทอดชัย, 2532) โดยให้โคทุกตัวอยู่ในคอกผูกยืนโรงที่มีรางน้ำแบบอัตโนมัติ และรางอาหารแยกเฉพาะตัว โคได้รับอาหารวันละ 2 เวลา คือ 08.00 น. และ 20.00 น. มีน้ำสะอาดกินตลอดเวลา

2.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ผลการทดลองโดยวิธีการวิเคราะห์วาเรียนซ์ (Analysis of variance) ตามแผนการทดลองแบบ Crossover Designs (Robert, 1994) จำนวน 4 ช่วงการทดลอง และเปรียบเทียบความแตกต่างด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป

การทดลองที่ 3 ศึกษาหาผลผลิตน้ำนมและวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำนม

3.1 สัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลองที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือโคนมลูกผสมพันธุ์พื้นเมือง×โฮลสไตน์ฟรีเชี่ยน จำนวน 12 ตัว ที่ระยะการให้นมใกล้เคียงกัน และมีปริมาณน้ำนมเฉลี่ยก่อนการทดลองใกล้เคียงกัน

3.2 วิธีการทดลอง

วิธีการทดลอง ใช้โคทดลองจำนวน 12 ตัว แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มๆ ละ 6 ตัว ตามชนิดของอาหารทดลอง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กลุ่มที่ 1 ได้รับอาหารหยาบเป็นหญ้าเนเปียร์

กลุ่มที่ 2 ได้รับอาหารหยาบเป็นต้นข้าวโพดฝักอ่อนสด

โคแต่ละกลุ่มทดลองจะได้รับอาหารข้นเสริมที่มีโปรตีนที่ระดับ 16% โดยโคจะได้รับอาหารข้นวันละ 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

3.3 การวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำนม

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

3.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ทำการวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด โดยการสุ่มโคนมเข้าทดลองตามวิธี Group Comparison โดยแบ่งโคนมออกเป็น 2 กลุ่มๆละ 6 ตัวตามชนิดของอาหารทดลอง หลังจากนั้นนำข้อมูลมาวิเคราะห์และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Student' s t-test แบบ Group Comparison ตามวิธีการของ Steel and Torrie (1980) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป

3.5 สถานที่ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัยและรวบรวมข้อมูล

1. ฟาร์มทดลองหมวดโคนม ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
2. ห้องปฏิบัติการอาหารสัตว์ ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
3. ห้องปฏิบัติการกลาง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. ห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์นมเชียงใหม่ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ถ.ห้วยแก้ว อ.เมือง จ.เชียงใหม่

3.6 ระยะเวลาดำเนินการวิจัย

ประมาณ 12 เดือน ตั้งแต่เดือน พฤษภาคม 2550 ถึงเดือน เมษายน 2551

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved