

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การวิจัยแบ่งออกเป็น 2 การทดลอง การทดลองที่ 1 ศึกษาการย่อยสลายของวัตถุแห้งและโปรตีนของแหล่งอาหารหยาบและแหล่งอาหารข้นในกระเพาะรูเมน การทดลองที่ 2 ศึกษาการใช้ฟางหมักยูเรียร่วมกับคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ใช่เชื้อใยและโปรตีนที่สลายตัวในกระเพาะรูเมนจากแหล่งพลังงานและโปรตีนต่างชนิดต่อผลผลิตของแม่โครีดนม

การทดลองที่ 1 ศึกษาการย่อยสลายของวัตถุแห้งและโปรตีนในอาหารหยาบและแหล่งอาหารข้นในกระเพาะรูเมนโดยวิธีใช้ถุงในลอน

1ก. ศึกษาการย่อยสลายของวัตถุแห้งและโปรตีนในอาหารหยาบ

ก. สัตว์ทดลองและคอกทดลอง

ใช้โคลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเซียน ระดับสายเลือด 87.5% ระยะเวลาเลี้ยง ไม่อุ้มท้อง อายุ 3-4 ปี น้ำหนักเฉลี่ย 400-470 กก. จำนวน 3 ตัว ที่ได้เจาะกระเพาะรูเมนไว้แล้ว (fistulated cow) โดยตัว cannula และฝาสำหรับปิด - เปิดทำด้วยซิลิโคน (silicone) ทำการเลี้ยงโคที่คอกสัตว์ทดลองของศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์เชียงใหม่ ในแบบช่องขังเดี่ยวผูกยืนโรง ด้านหน้ามีรางอาหารและที่ให้น้ำอัตโนมัติ พื้นคอกบริเวณที่โคยืนรองด้วยแผ่นยาง เพื่อป้องกันปัญหาที่บวมทั้งบริเวณขาและข้อเข่าอักเสบ

การให้อาหารหยาบให้แบบเต็มทีโดยให้กินหญ้าชูสด ส่วนอาหารข้นเป็นอาหารผสมสำเร็จรูปชนิดเม็ดที่มีโปรตีน 20% ให้กินตัวละ 2 กก.ต่อวันๆละ 2 ครั้ง เวลา 07.00 และ 16.00 น.

ข. การเตรียมอาหารทดลอง

เตรียมอาหารหยาบ 2 ชนิดคือ ฟางข้าวและฟางหมักยูเรีย ซึ่งฟางหมักยูเรียทำโดยนำฟางข้าวมาอัดฟ่อนโดยใช้เครื่องอัดหญ้าแห้ง น้ำหนักประมาณฟ่อนละ 15 กก. นำมากองเป็นชั้นๆบนแผ่นพีวีซีสีดำ รดด้วยน้ำที่ละลายยูเรีย โดยใช้น้ำ ½ ส่วนของน้ำหนักฟางและยูเรีย 6% ของน้ำหนักฟาง รดทีละชั้นจนได้ปริมาณที่ต้องการ กองละประมาณ 500 กก. แล้วคลุมด้วยแผ่นพีวีซีสีดำให้มิดชิด ทิ้งไว้ในร่มเป็นเวลา 21 วันขึ้นไป เก็บตัวอย่างฟางหมักยูเรียสดแช่แข็งไว้ที่ -10 °C แล้วนำมา

ตัดเป็นชิ้นขนาดไม่เกิน 2 มม. โดยใช้กรรไกรตัดในสภาพเย็นจัด เพื่อป้องกันการระเหยของ ก๊าซแอมโมเนีย วิธีนี้ตัดแปลงจากวิธีการของ Orskov *et al.* (1988) ที่ใช้ตัวอย่างอาหารที่ผ่านการอบ ที่อุณหภูมิ 60 °C นาน 48 ชั่วโมง นำมาบดผ่านตะแกรงขนาด 2 มม. ซึ่งไม่สามารถทำได้กับ ฟางหมักยูเรียเนื่องจากเหตุผลที่กล่าวข้างต้น ชั่งตัวอย่างปริมาณ 3 กรัม บรรจุในถุงไนลอน ขนาด 70 x 150 มม. ซึ่งมีขนาดรูประมาณ 40 ไมครอนโดยทันที แล้วใช้เชือกไนลอนขนาดเล็กยาว 15 ซม. วางบนปากถุง พับปากถุงรัดด้วยยางรัด แล้วนำไปผูกติดกับเชือกที่ทิ่มทำห้วงไว้ ยาวประมาณ 1.50 เมตร พร้อมถ่วงน้ำหนักด้วยน็อตตัวเมียให้มีน้ำหนักพอประมาณ เพื่อให้อาหารจมลงในน้ำ กระเพาะรูเมน

ค. วิธีการทดลอง

นำตัวอย่างที่เตรียมไว้แล้ว ไปแช่ในกระเพาะรูเมน ที่ช่วงเวลาต่าง ๆ คือ 2, 6, 12, 24, 36, 48 และ 72 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาแล้ว นำถุงไนลอนไปล้างน้ำเป็นเวลา 15 นาที บีบน้ำออก จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำถุงไนลอนใส่ลงในโถดูดความชื้นทิ้งไว้ ให้เย็น แล้วนำมาชั่งน้ำหนักถุงและตัวอย่างอาหารที่เหลือ เพื่อคำนวณหาเปอร์เซ็นต์วัตถุแห้งที่ ย่อยสลายได้ (% Dry matter degradation)

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

เมื่อ

$$W_1 = \text{น้ำหนักถุง}$$

$$W_2 = \text{น้ำหนักตัวอย่างอาหารเริ่มต้น}$$

$$W_3 = \text{น้ำหนักถุง} + \text{ตัวอย่างอาหารหลังอบ}$$

จากนั้นนำตัวอย่างที่เหลือในแต่ละช่วงเวลา ไปวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์โปรตีน เพื่อหา ปริมาณโปรตีนที่เหลือในแต่ละช่วงเวลา และนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์โปรตีนที่ย่อยสลาย ได้ (% Degraded intake protein, DIP)

$$\% \text{ Degraded intake protein} = \frac{(P_1 - P_2)}{P_1} \times 100$$

เมื่อ

$$P_1 = \text{น้ำหนักโปรตีนของตัวอย่างอาหารเริ่มต้น}$$

$$P_2 = \text{น้ำหนักโปรตีนของตัวอย่างอาหารหลังอบ}$$

ง. การวิเคราะห์ส่วนประกอบทางเคมี

วิเคราะห์ส่วนประกอบทางเคมีของอาหารทดลองโดยวิธี Proximate (AOAC, 1984) และ Detergent (Goering and Van Soest, 1970) โดยใช้ตัวอย่างของฟางหมักยูเรียสคในสภาพแห้งเย็นในการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนหยาบด้วยเครื่อง Kjeltach รุ่น 2200

จ. การหาสมการที่เหมาะสมและการวิเคราะห์ผลการทดลอง

นำค่า % Dry matter degradation และ % Degraded intake protein ที่ชั่วโมงต่าง ๆ ไป plot กราฟโดยใช้โปรแกรม SPSS เพื่อหาชนิดของสมการทำนายที่เหมาะสมที่สุดในการทำนายวัตถุแห้งและโปรตีนสลายตัวได้ที่ชั่วโมงที่เหมาะสม โดยมีรูปแบบโมเดล คือ

Linear $y = a + bx$

Quadratic $y = a + b_1x + b_2x^2$

Exponential $y = a * e^{bx/T1}$ (T1 คือ ค่าคงที่ของเวลา = 2)

แล้ววิเคราะห์รูปแบบการสลายตัวด้วยโปรแกรม NEWAY (Orskov, 1988)

เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการสลายตัวที่ชั่วโมงต่างๆ โดยวิธี Independent - t test โดยใช้โปรแกรม SPSS version 14

1ข. ศึกษาการย่อยสลายของวัตถุแห้งและโปรตีนในอาหารชั้นและวัตถุดิบอาหารชั้น

ก. สัตว์ทดลองและคอกทดลอง

เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1ก.

ข. การเตรียมอาหารทดลอง

เตรียมวัสดุอาหาร 6 ชนิดคือ ข้าวโพดบด มันเส้น รำละเอียด กากถั่วเหลือง ใบกระถินและอาหารชั้นชนิดเม็ด นำมาทดสอบโดยวิธีเดียวกับการทดลองที่ 1ก. การเตรียมตัวอย่างใช้วิธีบดตัวอย่างอาหารแห้งให้มีขนาดไม่เกิน 2 มม. ด้วยเครื่องบดตามวิธีการที่แนะนำโดย Orskov *et al.* (1988)

ค. การวิเคราะห์ผลการทดลอง

นำข้อมูลที่บันทึกไว้ไปหาค่าการย่อยสลายของวัตถุแห้ง และโปรตีนของอาหารชั้นและวัตถุดิบอาหารชั้นที่ระยะเวลาต่าง ๆ กัน โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป NEWAY (Orskov *et al.*, 1988) เพื่อหาอัตราการไหลผ่าน (out flow rate) ต่าง ๆ กัน จากนั้นนำค่า % Dry matter degradation

และ % Degraded intake protein ที่ชั่วโมงต่าง ๆ ไป plot กราฟโดยใช้โปรแกรม SPSS เพื่อหาชนิดของสมการและสมการทำนายที่เหมาะสมที่สุด ในการทำนายโปรตีนสลายตัวได้ที่ชั่วโมงที่เหมาะสม

เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการสลายตัวที่ชั่วโมงต่างๆ วิเคราะห์ทางสถิติแบบ One-way ANOVA โดยใช้โปรแกรม SPSS version 14

การทดลองที่ 2 ผลผลิตของโคนม เลี้ยงด้วยอาหารที่มีแหล่งคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนสลายตัวได้ต่างกัน

ก. สัตว์ทดลองและคอกทดลอง

ใช้แม่โคนมลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเซียนระดับสายเลือด 87.5% จำนวน 6 ตัว น้ำหนักเฉลี่ย 500 กก. จำนวนวันที่ให้นมมาแล้ว 180 วัน ให้น้ำนมประมาณ 14 กก. ระยะการให้นมที่ 3 อายุ 4-6 ปี เลี้ยงที่คอกสัตว์ทดลองของศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์เชียงใหม่ แบบช่องขังเดี่ยวผูกยื่นโรง ด้านหน้าเป็นรางน้ำอัดโนมัตี พื้นคอกที่ให้โคยืนปูด้วยแผ่นยางหนาประมาณ 1 เซนติเมตร เพื่อป้องกันปัญหาที่รวมทั้งการถลอกบริเวณขาและข้อเข่าของโคเวลาลุกขึ้นหรือนอน

ข. อาหารทดลอง

ในการทดลองครั้งนี้ใช้ฟางหมักยูเรีย 6% และกากน้ำตาลเป็นอาหารฐาน ซึ่งฟางหมักยูเรียเตรียมโดยใช้วิธีเดียวกับการทดลองที่ 1ก. เปิดกองฟางหมักนำมาหั่นเป็นท่อนยาวประมาณ 2 นิ้ว ด้วยเครื่องสับพืชอาหารสัตว์ก่อนเสริมกากน้ำตาลและนำไปทำเป็นอาหารหยาบผสม 3 สูตร (Treatment) โดยเสริมแหล่งโปรตีนและพลังงานต่างชนิดกันดังนี้คือ

สูตรที่ 1 เสริมด้วยข้าวโพดบด รำละเอียด กากถั่วเหลือง

สูตรที่ 2 เสริมด้วยข้าวโพดบด ใบกระถิน

สูตรที่ 3 เสริมด้วยมันเส้น รำละเอียด กากถั่วเหลือง

สัดส่วนของอาหารหยาบผสมและอาหารข้นในแต่ละทริทเมนต์ใช้การคำนวณโดยโปรแกรม MRATION (สมคิด, 2549) โดยกำหนดให้มีความแตกต่างไม่เกิน 5% จากความต้องการโภชนะของโคนมที่มีน้ำหนักประมาณ 500 กก. และให้ผลผลิตน้ำนมประมาณ 14 กิโลกรัมต่อวัน ตามคำแนะนำโดย NRC (1988)

วิธีการผสมอาหารหยาบกับแหล่งเสริมโปรตีนและพลังงานเพื่อผลิตอาหารหยาบผสมทำโดยการนำ ฟางหมักยูเรียสับมากองลงบนพื้นโรยด้วยกากน้ำตาล แล้วตามด้วยแหล่งโปรตีนและพลังงานต่างๆตามทริทเมนต์ที่กำหนดไว้ แล้วใช้ส้อมหรือพลั่วคลุกเคล้าให้เข้ากัน

อาหารชั้นที่ใช้ในการทดลอง เป็นอาหารสำเร็จรูปชนิดอัดเม็ดที่ผลิตเชิงพาณิชย์ มีโปรตีน 20 เปอร์เซ็นต์ โดยให้ตามปริมาณน้ำนมที่รีดในอัตราส่วน อาหารชั้น 1 กิโลกรัม ต่อน้ำนม 2 กิโลกรัม ซึ่งส่วนผสมและสัดส่วนอาหารหยาบผสมแต่ละทริทเมนต์ แสดงในตาราง 3.1

ตาราง 3.1 ส่วนประกอบของอาหารหยาบผสม และปริมาณที่โคได้รับในแต่ละวัน

Table 3.1 Composition of mixed roughages and amount of daily total feed offered to cows

	T1		T2		T3	
	kg/day ¹	(%)	kg/day ¹	(%)	kg/day ¹	(%)
Urea-treated straw	9.0	75.00	9.0	75.00	9.0	75.00
Molasses	0.8	6.67	0.8	6.67	0.8	6.67
Ground corn	1.2	10.00	1.2	10.00	-	-
Rice bran	0.8	6.67	-	-	0.6	5.00
Soybean meal	0.2	1.67	-	-	0.4	3.33
Leucaena leaves	-	-	1.0	8.33	-	-
Cassava chips	-	-	-	-	1.2	10.00
Total	12.0	100	12.0	100	12.0	100
Concentrate	7.0		7.0		7.0	

¹ as fed basis

ค. แผนการทดลอง

จัดแม่โคเข้าทดลองโดยให้ได้รับอาหารตามแผนการทดลองแบบสลับ Change over design เนื่องจากไม่สามารถจัดระยะพักระหว่างทริทเมนต์ได้ เพราะต้องรีดนมแม่โคอย่างต่อเนื่อง จึงได้วางแผนสำรวจผลตกค้าง (residual effect) โดยวางทริทเมนต์สลับกันใน 2 สแควร์ (Balanced design) (จริญ, 2540) ใช้โคทดลองสแควร์ละ 3 ตัว รวม 6 ตัว แบ่งการทดลองออกเป็น 3 ระยะๆ ละ 15 วัน การจัดกลุ่มโคทดลองแสดงในตาราง 3.2

ตาราง 3.2 การจัดกลุ่มโคทดลอง

Table 3.2 Experimental cow arrangement

	Cow no. 1	Cow no. 2	Cow no. 3	Cow no. 4	Cow no.5	Cow no. 6
Period 1	T1	T2	T3	T1	T2	T3
Period 2	T2	T3	T1	T3	T1	T2
Period 3	T3	T1	T2	T2	T3	T1

ให้อาหารโคนมตามแผนการทดลอง โดยให้อาหารชั้น 3 เวลา คือ 6.00, 12.00 และ 17.00 น. โดยให้โคกินหมดก่อนแล้วจึงให้อาหารหยาบผสมตาม ทำการรีดนมโดยใช้เครื่องรีดแบบ bucket วันละ 2 เวลา คือ 5.00 และ 15.00 น. ให้สัตว์มีช่วงเวลาในการปรับตัวเข้ากับอาหาร 7 วัน ส่วนอีก 8 วันเป็นช่วงเก็บข้อมูล ทำการบันทึกปริมาณอาหารที่กินได้ ปริมาณน้ำนม สุ่มเก็บตัวอย่างอาหารเหลือมาหาวัตถุแห้งและสุ่มเก็บวัตถุดิบแต่ละชนิด เพื่อรอการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี โดยวิธี Proximate analysis (AOAC, 1984) และวิเคราะห์เยื่อใยโดยวิธี Detergent method (Goering and Van Soest, 1970) ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างน้ำนมในแต่ละระยะๆละ 5 วัน โดยสุ่มเก็บช่วงเช้าและเย็นมารวมกันในอัตรา 1% ของปริมาณน้ำนมที่รีดได้ ใส่ sodium azide เพื่อรักษาสภาพนม เก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำนม โดยใช้เครื่อง Milkoscan 133 V 3.9 GB

ง. การวิเคราะห์ผลการทดลอง

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) ตามแผนการทดลองแบบ Balanced design และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยวิธี Scheffe's Multiple Contrast

นำข้อมูลผลผลิตน้ำนม ส่วนประกอบน้ำนม ปริมาณโภชนะในน้ำนม ปริมาณอาหารและโภชนะที่กิน ของโคนมแต่ละตัวไปวิเคราะห์สหสัมพันธ์ (correlation) แบบ Pearson โดยใช้โปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 14 เพื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการให้ผลผลิต

สถานที่ทำการวิจัย

1. ห้องปฏิบัติการศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์เชียงใหม่ อ.สันป่าตอง จ.เชียงใหม่
2. ห้องปฏิบัติการภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
3. คอกสัตว์ทดลองของศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์เชียงใหม่

ระยะเวลาในการทดลอง

มีนาคม 2549 ถึง พฤศจิกายน 2549 ระยะเวลาในการวิจัยประมาณ 8 เดือน