

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 การทดลองที่ 1 การคำนวณค่าพลังงานจากการย่อยได้ในตัวสัตว์ (*in vivo digestibility*)

อาหารและสัตว์ทดลอง

เปลือกและซังข้าวโพดหวานหมัก นำมาจากฟาร์มของ บริษัท เชียงใหม่เฟรชมิลค์ จำกัด ซึ่งทางฟาร์มได้รับซื้อเปลือกและซังข้าวโพด จาก บริษัท ชันสวีท จำกัด ตั้งอยู่ที่ 9 หมู่ 1 ต. ท่งสะโตก อ. สันป่าตอง จังหวัดเชียงใหม่ ทำการหมักลงในถุงพลาสติกขนาดใหญ่ น้ำหนักประมาณ 700 กิโลกรัม โดยไม่หั่นและไม่ใส่สารเสริมมีการปิดปากถุงอย่างสนิทเก็บไว้เป็นเวลาไม่น้อยกว่า 30 วัน จึงนำมาใช้เลี้ยงโค

ก่อนจะนำมาทดลองหาการย่อยได้ในตัวสัตว์ได้นำเปลือกและซังข้าวโพดหวานหมักมาใส่ลงในถังทรงกระบอกความจุประมาณ 200 ลิตร ที่มีฝาปิดสนิทมีสายเข็มขัดรัดอย่างดีจำนวน 24 ถัง ได้น้ำหนักประมาณถึงละ 80 - 85 กิโลกรัม แล้วขนมาทำการทดลองที่ ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

โคที่ใช้ทดลองเป็นโคพื้นเมืองชาวลำพูน จำนวน 5 ตัว น้ำหนักเฉลี่ย 159.40 ± 19.05 กิโลกรัม ให้โคแต่ละตัวอยู่ในชองขังเดี่ยวที่มีรางอาหารอยู่ด้านหน้า มีน้ำและก้อนแร่ธาตุให้กินตลอดเวลา ก่อนทดลองทำการถ่ายพยาธิด้วยยา Ivomec ในอัตรา 4 cc ต่อตัว

วิธีการทดลอง

ให้โคได้รับเปลือกและซังข้าวโพดหวานหมักกินเป็นอาหารเดี่ยวอย่างเต็มที่โดยให้อาหารวันละ 2 ครั้ง คือ 8.00 น. และ 16.00 น. การทดลองแบ่งออกเป็น 2 ระยะ คือ preliminary period เป็นช่วงให้สัตว์ได้ปรับตัวเข้ากับอาหารทดลอง โดยค่อย ๆ เพิ่มปริมาณพืชหมักและลดอาหารชนิดเดิม (หญ้าสด) ที่สัตว์เคยได้รับหลังจากปรับตัวเป็นเวลา 4 วัน ให้สัตว์กินพืชหมักอย่างเดิบบแบบเต็มที่ (*ad libitum*) บันทึกปริมาณอาหารที่สัตว์กินได้ตามใจชอบ (Voluntary feed intake, VFI) ในแต่ละมือและแต่ละวัน เป็นเวลา 14 วัน ช่วงวันที่ 15 - 17 ลดปริมาณอาหารที่ให้ลงเหลือเพียง 90 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณที่กินได้เต็มที่ (90 % VFI) เพื่อให้สัตว์กินอาหารทดลองได้หมด ป้องกันการกินเหลือ และเพื่อให้ปริมาณอาหารที่โคกินได้อยู่ในระดับคงที่

ระยะที่สองเป็นระยะเก็บมูลที่ขับออกมา (Collection period) ซึ่งใช้เวลา 6 วัน ทำการบันทึกปริมาณอาหารที่กิน และมูลที่ขับออกมาในแต่ละวัน การเก็บมูลจะใส่ถุงที่ก้นของโคโดยมีสายรัดถุงยึดติดกับลำตัว และทำพื้นกั้นระหว่างที่ถ่ายปัสสาวะกับมูลเพื่อป้องกันไม่ให้ปัสสาวะกับมูลที่ขับออกมาปนกัน

การสุ่มเก็บตัวอย่าง

สุ่มเก็บตัวอย่างพืชหมักจากทุกถังที่ใช้เลี้ยงในช่วง Collection period โดยสุ่มถึงละ 3 จุด คือ ส่วนบน กลาง และล่างของถังทุกวัน นอกจากนี้ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างมูลคิดเป็น 1 เปอร์เซ็นต์ของมูลที่รวบรวมได้ในแต่ละครั้ง นำตัวอย่างอาหาร และมูล ที่สุ่มเก็บมาในแต่ละวันไปสะสมไว้ในตู้แช่แข็ง (freezer) ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส โดยแยกเก็บตัวอย่างมูลของแต่ละตัวไว้คนละส่วน เพื่อรอที่จะนำไปวิเคราะห์ทางเคมีต่อไป



ภาพ 2 เปลือกและซังข้าวโพดหวานหมักในถุงพลาสติกขนาดใหญ่



ภาพ 3 โคททดลองและอุปกรณ์ในการเก็บมูล ที่คอกสัตว์ทดลอง ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

การวิเคราะห์ห่อค้ประกอบทางเคมี

นำตัวอย่างอาหาร และ มูล ที่แช่แข็งมาทิ้งไว้ให้ละลายที่อุณหภูมิห้อง โดยแบ่งตัวอย่างมูล ออกเป็น 2 ส่วน นำตัวอย่างอาหาร และมูลส่วนแรกไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปบดผ่านตะแกรงขนาด 1 มิลลิเมตร เพื่อนำไปวิเคราะห์ห่อค้ประกอบทางเคมี โดยวิธี Proximate analysis (AOAC, 1990) และวิเคราะห์เชื้อใยโดยวิธี Detergent method (Goering and Van Soest, 1970) นอกจากนี้ทำการวิเคราะห์ค่าพลังงานรวมโดยใช้ Bomb calorimeter แบบ adiabatic ตัวอย่างมูลอีกส่วนหนึ่งนำไปวิเคราะห์หาโปรตีนโดยไม่ผ่านการอบแห้งเพื่อหลีกเลี่ยงการ สูญเสียไนโตรเจนในระหว่างการอบ

การคำนวณค่าการย่อยได้ของโภชนะ

ทำการคำนวณค่าการย่อยได้แบบปรากฏ (Apparent digestibility) โดยใช้สมการ

$$\text{การย่อยได้ของโภชนะ (\%)} = \frac{\text{โภชนะที่กิน (กรัม)} - \text{โภชนะในมูล (กรัม)}}{\text{โภชนะที่กิน (กรัม)}} \times 100$$

การประเมินค่าพลังงาน TDN และ DE

นำค่าการย่อยได้ของโภชนะมาคูณกับปริมาณ โภชนะชนิดนั้นๆ ในอาหาร จะได้ปริมาณ โภชนะย่อยได้แต่ละชนิด แล้วนำมาคำนวณหาค่าโภชนะที่ย่อยได้ทั้งหมด หรือ ยอดโภชนะย่อยได้ (Total Digestible Nutrient, TDN) โดยใช้สูตร

$$\% \text{ TDN} = \text{DCP} + \text{DNDFa} + \text{DNFC} + (\text{DEE} \times 2.25)$$

เมื่อ	DCP	=	digestible crude protein
	DNFC	=	digestible non fiber carbohydrate
	DNDFa	=	digestible neutral detergent fiber (ash free)
	DEE	=	digestible ether extract
	NFC %	=	100 - %CP - %ash - %EE - %NDFa
	NDFa (%)	=	%NDF - %ash

ค่าพลังงานย่อยได้ (Digestible Energy, DE) ทำโดยนำตัวอย่างอาหารและมูลไปวิเคราะห์หาปริมาณพลังงานรวม (GE) โดยใช้ Bomb calorimeter แบบ adiabatic แล้วนำมาคูณกับปริมาณ วัตถุแห้งที่กิน (DMI) หรือปริมาณมูลที่ขับออกเมื่อคิดเป็นวัตถุแห้งเฉลี่ยต่อวัน (DME) จะได้ ปริมาณพลังงานรวมที่กิน (GE_i) และปริมาณพลังงานรวมที่ขับออกในมูล (GE_e) แล้วนำมาคำนวณ ค่า DE โดยใช้สูตร

$$\text{DE (Mcal/kg DM)} = \frac{\text{GE of feed (Mcal/kg DM)} \times \text{DMI (g/d)} - \text{GE of feces (Mcal/kgDM)} \times \text{DME (g/d)}}{\text{DMI (g/d)}}$$

$$= \frac{\text{GE}_i - \text{GE}_e}{\text{DMI}}$$

การคำนวณค่า TDN จากองค์ประกอบทางเคมี โดยอาศัยสมการของ Kearn (1982)

- วัตถุดิบอาหารชั้นที่เป็นแหล่งโปรตีน (Protein supplements)

$$\text{TDN}(\%) = 40.3227 + 0.5398(\% \text{CP}) + 0.4448(\% \text{NFE}) + 1.4218(\% \text{EE}) - 0.7007(\% \text{CF})$$

-วัตถุดิบอาหารชั้นที่เป็นแหล่งพลังงาน (Energy feeds)

$$\text{TDN}(\%) = 40.2625 + 0.1969(\% \text{CP}) + 0.4228(\% \text{NFE}) + 1.1903(\% \text{EE}) - 0.1379(\% \text{CF})$$

แปลงค่า TDN ให้เป็น DE โดยอาศัยสมการของ NRC (1996)

$$\text{TDN}(\%) = 0.044 \times \text{DE}$$

การคำนวณค่า ME, NEm และ NEg จากค่า DE โดยอาศัยสมการที่ NRC (1996) แนะนำไว้ดังนี้

$$\text{ME (Mcal/kg DM)} = 0.82 \times \text{DE}$$

$$\text{NEm (Mcal/kg DM)} = 1.37 \text{ ME} - 0.138 \text{ ME}^2 + 0.0105 \text{ ME}^3 - 1.12$$

$$\text{NEg (Mcal/kg DM)} = 1.42 \text{ ME} - 0.174 \text{ ME}^2 + 0.0122 \text{ ME}^3 - 1.65$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2 การทดลองที่ 2 การประเมินค่าพลังงานและการย่อยได้โดยวิธี *in vitro* gas production

- การเตรียมตัวอย่างอาหาร ตัวอย่างอาหารทดลองเป็นชุดเดียวกับที่ใช้ศึกษาการย่อยได้แบบ *in vivo* นำมาอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วบดผ่านตะแกรงขนาด 1 มิลลิเมตร
- การเตรียม rumen liquor buffer ให้เต็มสารละลายต่อไปนี้ตามลำดับ ดังนี้

ส่วนผสม	ปริมาณ (มล.) ต่อ 1 หลอด
1. น้ำกลั่น	14
2. Buffer solution	10
3. Macro mineral solution	5
4. Resazurine solution	0.025
5. Micro mineral solution	0.0025
6. Reduction solution	1
7. Rumen fluid	10

ผสมสารละลายหมายเลข 1-5 ก่อนที่จะเก็บน้ำรูเมน (rumen fluid) แซ่สารละลายในอ่างน้ำอุ่นควบคุมอุณหภูมิที่ 39 องศาเซลเซียส คนด้วย magnetic stirrer ทำให้มีสภาพไร้ออกซิเจน โดยผ่านก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ลงไปตลอดเวลา จากนั้นเติมสารละลาย reduction solution ลงไปสีของสารละลายจะค่อยๆ เปลี่ยนจากสีฟ้าเป็นสีชมพู และไม่มีสี ตามลำดับ ซึ่งแสดงว่าเกิด reduction อย่างสมบูรณ์แล้วจึงค่อยเติม rumen fluid ที่ได้กรองเอาเศษอาหารออกแล้วลงไป

- วิธีการทดลอง ชั่งตัวอย่างอาหารให้ได้น้ำหนักแห้ง 200 มิลลิกรัม ใส่ลงในหลอดแก้ว glass syringe ขนาดใหญ่ที่มีขีดบอกปริมาตรข้างหลอด แต่ละตัวอย่างทำ 3 ซ้ำ ใช้วาสลินทาแกน (piston) แล้วสอดเข้าไปในหลอดแก้ว ในการทดลองทุกครั้งจะต้องมีตัวอย่างมาตรฐานอย่างน้อย 2 ตัวอย่าง คือ อาหารหยาบและอาหารข้น ซึ่งทราบค่าแก๊สอยู่แล้ว เพื่อใช้ตรวจสอบกิจกรรมของจุลินทรีย์ในน้ำรูเมนว่าเป็นปกติหรือไม่ และต้องมี blank (หลอดเปล่าไม่มีตัวอย่างอาหาร) สำหรับใช้เป็นค่าหักลบเพื่อคำนวณปริมาตรแก๊สสุทธิ (GP) ที่เกิดขึ้น นำหลอดแก้วที่ใช้ไปอุ่นไว้ในตู้อบที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ หลังจากเตรียม rumen liquor buffer เรียบร้อยแล้ว นำหลอดแก้วที่ได้อุ่นไว้เติม rumen liquor buffer ลงไป 30 มิลลิลิตรต่อหลอด จากนั้นอ่านปริมาตรของส่วนผสมทั้งหมดในหลอดจากข้างหลอด บันทึกเป็นปริมาตรเริ่มต้น (V_0) แล้วนำไป incubate ในอ่างน้ำอุ่นอุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นอ่านค่าแก๊สที่เกิดขึ้นในหลอดตามระยะเวลา

4, 6, 8, 12, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง บันทึกปริมาณแก๊สเป็นค่า $V_4, V_6, V_8, V_{12}, V_{24}, V_{48}, V_{72}$ และ V_{96} ตามลำดับ คำนวณค่าแก๊สสุทธิที่เกิดขึ้นที่ระยะเวลาต่าง ๆ ดังสูตร

$$GP \text{ (ml/200 mg DM)} = \frac{(V_t - V_0 - GP_0)}{W}$$

เมื่อ GP = ปริมาณแก๊สสุทธิที่เกิดจากการ incubate ตัวอย่างอาหาร 200 มิลลิกรัม (วัตถุแห้ง) เป็นเวลา t ชั่วโมง

V_t = ปริมาณที่อ่านได้ข้างหลอด ณ เวลา t ชั่วโมง

V_0 = ปริมาณเริ่มต้น

GP_0 = ค่าเฉลี่ยของแก๊สที่เกิดขึ้นในหลอด blank ณ เวลา t ชั่วโมง

W = น้ำหนักของตัวอย่างอาหารทดลองเป็น มิลลิกรัมวัตถุแห้ง

จากนั้นนำค่าแก๊ส (GP) ที่ 24 ชั่วโมง มาคำนวณค่าแก๊สสุทธิจากสูตร

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

เมื่อ GP = ปริมาณแก๊สสุทธิที่ 24 ชั่วโมง

V_{24} = ปริมาณแก๊สที่เกิดขึ้นที่ 24 ชั่วโมง

V_0 = ปริมาณแก๊สเริ่มต้น

GP_0 = ค่าเฉลี่ยของแก๊สที่เกิดขึ้นในหลอด blank ณ เวลา 24 ชั่วโมง

W = น้ำหนักของตัวอย่างอาหารทดลองเป็น มิลลิกรัมวัตถุแห้ง

Fh = ค่า factor ของตัวอย่างอาหารหยาบมาตรฐาน ที่คำนวณจากค่าแก๊สสุทธิที่ระบุไว้คือ 44.16/ค่าแก๊สสุทธิที่เกิดขึ้นที่ 24 ชั่วโมง

Fc = ค่า factor ของตัวอย่างอาหารข้นมาตรฐาน ที่คำนวณจากค่าแก๊สสุทธิที่ระบุไว้คือ 61.10/ค่าแก๊สสุทธิที่เกิดขึ้นที่ 24 ชั่วโมง

คำนวณหาการย่อยได้ของอินทรีย์วัตถุ (OMD) พลังงาน ME และ NE ตามสมการของ Menke and Steingass (1988) ดังนี้ :-

อาหารหยาบ

$$\text{OMD (\%)} = 15.38 + 0.8453\text{GP} + 0.0595\text{XP} + 0.0675\text{XA}$$

$$\text{ME (MJ/kgDM)} = 2.20 + 0.1357\text{GP} + 0.0057\text{XP} + 0.0002859 (\text{XL})^2$$

อาหารข้น

$$\text{OMD (\%)} = 9.00 + 0.9991\text{GP} + 0.0595\text{XP} + 0.0181\text{XA}$$

$$\text{ME (MJ/kgDM)} = 1.06 + 0.1570\text{GP} + 0.0084\text{XP} + 0.0220\text{XL} - 0.0081\text{XA}$$

เมื่อ GP = ปริมาตรแก๊สสุทธิที่เวลา 24 ชั่วโมง (ml/200 mg DM)

XP = ปริมาณโปรตีนในตัวอย่างอาหาร (กรัมต่อกิโลกรัมวัตถุแห้ง)

XA = ปริมาณเถ้าในตัวอย่างอาหาร (กรัมต่อกิโลกรัมวัตถุแห้ง)

XL = ปริมาณไขมันในตัวอย่างอาหาร (กรัมต่อกิโลกรัมวัตถุแห้ง)



ภาพ 4 การทดลอง *in vitro* gas production ในห้องปฏิบัติการอาหารสัตว์ ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

3.3 การทดลองที่ 3 การศึกษาระดับโปรตีนและพลังงานที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของโคเนื้อที่ได้รับเปลือกและซังข้าวโพดหวานหมักเป็นอาหารหยาบหลัก

ใช้โคลูกผสม Brahman x Charolais ของบริษัทเชียงใหม่เฟรชมิลค์ จำนวน 20 ตัว น้ำหนักตัวเฉลี่ย 211.76 ± 38.91 กิโลกรัม เลี้ยงในคอกขังเดี่ยวที่มีรางอาหารอยู่ด้านหน้า มีน้ำและก้อนแร่ธาตุให้โคได้กินตลอดเวลา แบ่งโคออกเป็น 4 กลุ่ม ให้ได้รับอาหารที่มีโปรตีนและพลังงานต่างกัน โดยโคทุกกลุ่มได้รับเปลือกและซังข้าวโพดหวานหมักเป็นอาหารหยาบอย่างเต็มที่ ส่วนอาหารชั้นประกอบด้วยมันเส้น กากซีอิ๊ว และหินปูนบด นำค่าโปรตีนและพลังงานที่ได้จากการทดลองที่ 1 และ 2 มาคำนวณสูตรอาหารและปริมาณการให้ด้วยโปรแกรม BRATION49 (สมคิด, 2549) วางแผนการทดลองแบบ 2×2 Factorial in RCBD โดยมีน้ำหนักโคเริ่มต้นเป็นตัวแปรร่วม วิเคราะห์ข้อมูลโดยวิธี General Linear Model (Steel and Torrie, 1980) แต่ละปัจจัยที่ศึกษามี 2 ระดับ ดังนี้

- ปัจจัยด้านพลังงาน (NEg) ทำโดยคำนวณสัดส่วนของอาหารให้มีโภชนะเพื่อการเจริญเติบโตของโคในอัตรา 0.7 กก./ตัว/วัน แบ่งเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่ได้รับระดับพลังงานตรงตามที่ NRC (1996) แนะนำ (1.0 เท่า) และกลุ่มที่ได้รับพลังงานมากกว่าที่ NRC (1996) แนะนำ 20% (1.2 เท่า) ซึ่งทำโดยการเพิ่มมันเส้นเสริมตามสัดส่วนของน้ำหนักตัว ให้มีระดับพลังงานใกล้เคียงกับที่โปรแกรม BRATION49 คำนวณได้

- ปัจจัยด้านโปรตีน (CP) ทำโดยคำนวณสัดส่วนของอาหารให้มีโภชนะเพื่อการเจริญเติบโตของโคในอัตรา 0.7 กก./ตัว/วัน แบ่งเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่ได้รับระดับโปรตีนตรงตามที่ NRC (1996) แนะนำ (1.0 เท่า) และกลุ่มที่ได้รับโปรตีนมากกว่าที่ NRC (1996) แนะนำ 20% (1.2 เท่า) ซึ่งทำโดยการเพิ่มกากซีอิ๊วเสริมตามสัดส่วนของน้ำหนักตัว ให้มีระดับโปรตีนใกล้เคียงกับที่โปรแกรม BRATION49 คำนวณได้

จากแผนการให้อาหารดังกล่าวทำให้เกิดกลุ่มทดลอง 4 กลุ่ม ดังนี้ คือ

กลุ่มที่ 1 (T1) = 1.0 CP และ 1.0 NE

กลุ่มที่ 2 (T2) = 1.0 CP และ 1.2 NE

กลุ่มที่ 3 (T3) = 1.2 CP และ 1.0 NE

กลุ่มที่ 4 (T4) = 1.2 CP และ 1.2 NE

ตัวอย่างอาหารที่ให้ของแต่ละกลุ่มแสดงในตาราง 3

ทำการทดลองเป็นเวลา 100 วัน ให้อาหารเช้าและเย็นในเวลา 8 น. และ 16 น. บันทึกข้อมูลอาหารที่ให้ อาหารเหลือทุกวัน ชั่งน้ำหนักโคทุกๆ 2 สัปดาห์ โดยในระยะเริ่มต้น และสิ้นสุดการทดลองทำการชั่งน้ำหนักโคเป็นเวลา 3 วันติดต่อกันเพื่อนำมาหาค่าเฉลี่ย

นำข้อมูลปริมาณอาหารที่กิน และการเจริญเติบโต เพื่อนำไปวิเคราะห์ Variance โดยใช้ น้ำหนักโคเป็นตัวแปรร่วมและทดสอบความแตกต่างโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

ตาราง 3 ตัวอย่างอาหารที่ให้ของแต่ละกลุ่ม จำนวนจากน้ำหนักโค 250 กิโลกรัม

CP : NE	1.0 : 1.0	1.0 : 1.2	1.2 : 1.0	1.2 : 1.2
เปลือกและซังข้าวโพดหวาน (kg)	9.00	9.00	9.00	9.00
มันเส้น (kg)	0.85	1.85	0.30	1.30
อาหารข้นผสมเอง* (kg)	4.00	3.85	5.10	4.95

* อาหารข้นผสมเอง = มันเส้น 50% + กากซีอิ้ว 49% + หินปูนบด 1%

ตาราง 4 องค์ประกอบทางเคมีของก้อนแร่ธาตุ (1 kg).

Mineral	Unit	Mineral	Unit
Ca	37 g	Fe	1,600 mg
P	3.50 g	Cu	300 mg
Mg	4,950 mg	Se	12 mg
Co	45 mg	Na	362 g
I	125 mg	Cl	590 g
Zn	320 mg	Mn	210 mg



ลิขสิทธิ์ภาพถ่ายโดยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพ 5 คอกโคทดลองในฟาร์มของบริษัท เชียงใหม่เฟรชมิลค์ จำกัด ที่ อ.สันป่าตอง จ.เชียงใหม่