# บทที่ 3

## วิธีการทดลอง

**การทดลองที่ 1 ศึกษาถึงปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเมล็ดข้าวโพดบีบแตก**

**วิธีการทดลอง**

นำเมล็ดข้าวโพดไร่ที่ผ่านการสีเอาซังออกแล้วและมีความชื้นไม่เกิน 13% มาผ่านกรรมวิธีต่างๆ ตามแผนการทดลองแบบ 3 x 2 Factorial arrangement in CRD โดยศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยสลายในกระเพาะรูเมน คือ

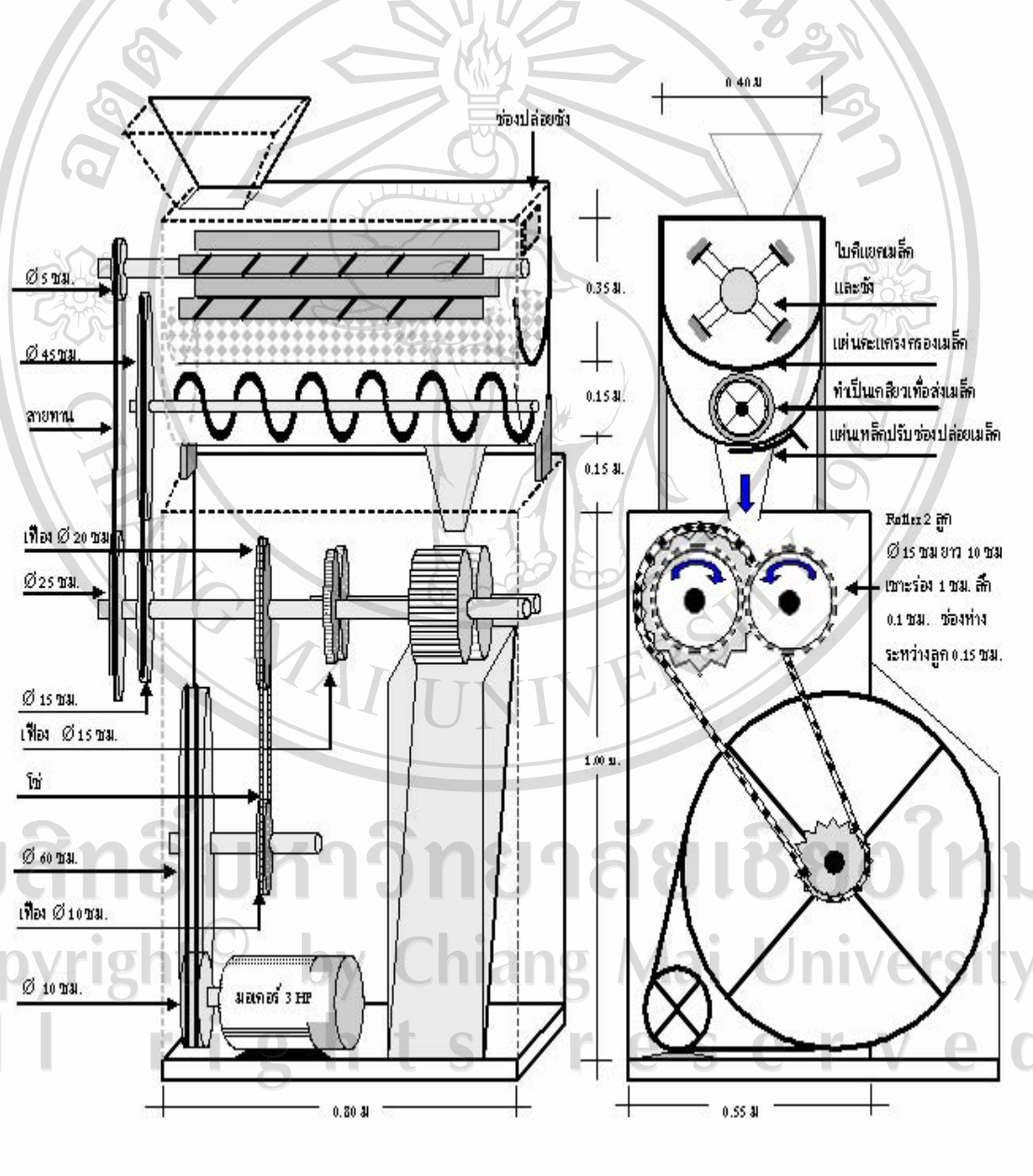
1. วิธีการให้ความร้อน มี 3 แบบ
   ก. ไม่ให้ความร้อน (C)
   ข. ให้ความร้อนด้วยการนึ่ง (S) เป็นเวลา 15 นาที นับจากที่เห็นไอน้ำพุ่งขึ้นจากขอบฝาปิด
   ค. ให้ความร้อนด้วยการต้ม (B) โดยต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที
2. การเพิ่มความชื้นของเมล็ด มี 2 ระดับ
   ก. ไม่แช่น้ำ (D)
   ข. แช่น้ำ (W) เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปผึ่งในร่มนานประมาณ 5 นาทีให้พอหมาดๆ

จากปัจจัยดังกล่าวทำให้ได้กลุ่มทดลอง (treatment) 6 กลุ่ม

1. ไม่แช่น้ำและไม่ให้ความร้อน (DC)
2. แช่น้ำแต่ไม่ให้ความร้อน (WC)
3. ไม่แช่น้ำแต่นำไปนึ่ง (DS)
4. แช่น้ำและนำไปนึ่ง (WS)
5. ไม่แช่น้ำแต่นำไปต้ม (DB)
6. แช่น้ำและนำไปต้ม (WB)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

นำเมล็ดข้าวโพดที่เตรียมตามกรรมวิธีของแต่ละ treatment จำนวนกลุ่มละ 10 กิโลกรัม ไปผ่านการบีบให้แตกด้วยเครื่องบดแบบ roller mill ที่พัฒนาขึ้นเองดังภาพที่ 3.1 ซึ่งเป็นลูกกลิ้ง 2 ลูก มีผิวแบบ Ross Flaking Cut ที่ตั้งระยะห่างของลูกกลิ้งทั้ง 2 ลูก เท่ากับ 0.15 เซนติเมตร มีร่องลึก 0.1 เซนติเมตร และสันร่องกว้าง 1 เซนติเมตร โดยลูกกลิ้งทั้ง 2 ลูกหมุนด้วยความเร็วที่เท่ากัน จากนั้นนำไปตากให้แห้ง ทำการทดลองกลุ่มละ 3 ซ้ำ




**ภาพ 3.1** รูปแบบและขนาดของเครื่องบีบเมล็ดข้าวโพด

**Figure 3.1** Design and measurement of cracking machine

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**การเก็บข้อมูล**

ทำการวัดขนาดของผลิตภัณฑ์แต่ละวิธีการโดยร่อนผ่านตะแกรงขนาด 1, 0.5 และ 0.2 เซนติเมตร นำส่วนที่เหลือค้างอยู่บนตะแกรงไปชั่ง แล้วคำนวณเป็นร้อยละของตัวอย่างที่ใช้ นอกจากนี้ทำการวัดความหนาแน่นของแต่ละตัวอย่างโดยใช้กระบอกตวงที่มีปริมาตร 1 ลิตร แล้วนำไปชั่ง คำนวณค่าความหนาแน่นตามสูตร :

$$\text{ความหนาแน่น (D)} = \frac{\text{น้ำหนัก (M)}}{\text{ปริมาตร (V)}}$$

**การวิเคราะห์ผลการทดลอง**

ตรวจสอบความแตกต่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ตามแผนการทดลองแบบ 2 × 3 Factorial ในแผน CRD ทดสอบปฏิสัมพันธ์ปัจจัยด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS 10 (กัลยา, 2542) เพื่อหาวิธีการทำ cracked corn ที่เหมาะสมที่สุด

## การทดลองที่ 2 ทดสอบการย่อยสลายในกระเพาะรูเมนด้วยวิธีการใช้ถุงไนล่อน และย่อยต่อด้วยเอนไซม์อะไมเลส

**สัตว์ทดลอง**

ใช้แม่โคลูกผสมสายเลือดโฮลสไตน์ฟรีเชี่ยน 75% ขึ้นไป ที่เจาะกระเพาะรูเมนไว้แล้ว จำนวน 4 ตัว เลี้ยงในซองขังเดี่ยวผูกยืนโรง มีที่ให้น้ำอัตโนมัติและมีรางอาหารอยู่ด้านหน้าตัวโค

**การเตรียมอาหารทดลอง** แบ่งออกเป็น 2 ส่วน

ส่วนที่ 1 ใช้ตัวอย่างเมล็ดข้าวโพดจากการทดลองที่ 1

ส่วนที่ 2 ใช้ตัวอย่างเมล็ดข้าวโพด WS จากการทดลองที่ 1 และเมล็ดข้าวโพดที่เตรียมโดยวิธีการที่คล้ายกัน แต่เพิ่มระยะเวลาในการแช่น้ำเป็นเวลา 12 ชั่วโมง (WSon) ก่อนนำมาบีบให้แตก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**วิธีการทดลอง**

นำเมล็ดข้าวโพดที่ผ่านกรรมวิธีการแปรรูปต่างๆ ไปศึกษาการย่อยได้ในกระเพาะรูเมน โดยใช้ถุงไนล่อน ตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Ørskov (1985; อ้างโดยดำรัส, 2545) แต่ไม่บดตัวอย่างให้มีขนาด 2 มิลลิเมตร ตามข้อกำหนด เพื่อให้เห็นอิทธิพลของ treatment ชัดเจนยิ่งขึ้น ทำการชั่งตัวอย่างปริมาณ 3 กรัม ใส่ในถุงขนาด 7 x 150 มม. ซึ่งมีขนาดรูประมาณ 40 ไมครอน แล้วใช้เชือกไนล่อน

ขนาดเล็กยาว 15 ซม. คล้องปากถุงแล้วพับปากถุงรัดด้วยยางรัด นำไปผูกติดกับเชือกร่มที่ทำห่วงไว้ยาวประมาณ 1.50 เมตร พร้อมถ่วงน้ำหนักด้วยน๊อตตัวเมียเพื่อให้ถุงบรรจุอาหารจมลงในน้ำกระเพาะรูเมน นำถุงไปแช่ในกระเพาะรูเมนเป็นเวลา 2, 6, 12, 24 และ 36 ชั่วโมง และใช้ข้าวโพดบดที่มีขายตามท้องตลาด (GC) เป็นตัวเปรียบเทียบ

นำค่า % DM degradation ที่ชั่วโมงต่างๆ ไปเข้าโปรแกรมสำเร็จรูป NEWAY เพื่อคำนวณหาค่าการย่อยสลาย โดยใช้สมการ $P = a+b\ (1-e^{-ct})$

เมื่อ P = โภชนะที่หายไปที่เวลา t (degradation at time, t)

A = ส่วนที่ละลายได้ (immediately soluble material, %)

B = ส่วนที่ไม่ละลายแต่สามารถหมักย่อยได้ (insoluble but potentially fermentable material, %)

a = เส้นกราฟที่ลากตัดแกน y

b = (A+B) –a

c = อัตราการย่อยสลาย (degradation rate, %h)

L = ระยะเวลาที่รอให้จุลินทรีย์เข้าย่อยสลายโภชนะส่วนที่ไม่ละลาย

จากนั้นนำส่วนที่เหลือจากการย่อยสลายในกระเพาะรูเมนที่ 24 ชั่วโมง ไปทำการย่อยต่อด้วยเอนไซม์อะไมเลสที่ความเข้มข้น 420 U/ml. (Swanson *et al*., 2004) ในหลอดทดลองเป็นเวลา 12 ชั่วโมง กรองนำส่วนที่เหลือไปอบที่อุณหภูมิ 60 $^{o}$C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วคำนวณค่าวัตถุแห้งที่หายไปโดยใช้สูตร

$$\frac{(\text{ส่วนที่เหลือจากการย่อยสลายในรูเมน} - \text{ส่วนที่เหลือจากการย่อยด้วยอะไมเลส})}{\text{ส่วนที่เหลือจากการย่อยสลายในรูเมน}} \times 100$$

ซึ่งค่าที่ได้นี้ถือเป็นตัวแทนการย่อยได้ของแป้งในลำไส้เล็ก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**การวิเคราะห์ผลการทดลอง**

นำค่าการย่อยสลายที่ 24 ชั่วโมง มาหาค่าเฉลี่ยแต่ละ treatment และวิเคราะห์ variance แบบแจกแจงหลายทาง (multiple analysis) ตามแผนการทดลองแบบ RCBD กำหนดให้โคเป็น block เปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ย โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ในกรณีของการย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลสก็ทำการวิเคราะห์ผลโดยวิธีเดียวกัน

**การทดลองที่ 3 หาค่าอินทรีย์วัตถุย่อยได้และพลังงานของเมล็ดข้าวโพดบีบแตกโดยวิธี *In Vitro* Gas Production Technique**

ประเมินการย่อยได้และพลังงานตามวิธีของ Menke and Steingass (1988) โดยวิธีวัดปริมาตรแก๊ส ซึ่งเกิดจากการนำตัวอย่างอาหารแห้ง (air dry) ที่บดผ่านตะแกรงขนาด 1 มม. ประมาณ 230 มก. ใส่หลอดแก้ว (glass syringe) ขนาดใหญ่ที่มีขีดบอกปริมาตรข้างหลอด

**สัตว์ทดลอง**

ใช้แม่โคนมไม่อุ้มท้องที่ได้เจาะกระเพาะไว้แล้ว (fistulated cow) จำนวน 2 ตัว เป็น donor เพื่อเก็บน้ำกระเพาะรูเมน โดยนำมาผสมในอัตราส่วนเท่ากันก่อนนำมาใช้

**อาหารทดลอง**

เป็นตัวอย่างเมล็ดข้าวโพดกลุ่ม DC (คือไม่แช่น้ำและไม่ให้ความร้อน) และWSon (คือแช่น้ำ 12 ชั่วโมง และนึ่งก่อนบีบให้แตก) ซึ่งเป็นตัวอย่างเดียวกันกับการทดลองที่ 2 ที่บดผ่านตะแกรงขนาด 1 มม. แล้ว

**วิธีการทดลอง**

ทำการเก็บ rumen fluid จากกระเพาะรูเมนของโคทั้ง 2 ตัว นำมาผสมกัน โดยกรองเอาส่วนของอาหารข้นและหยาบออก นำของเหลวที่ได้มาผสมกับสารละลายแร่ธาตุและบัฟเฟอร์ ภายใต้สภาพไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 39 °C เพื่อเป็น rumen-buffer-micronutrient solution จากนั้นใช้ปิเปตอัตโนมัติดูดสารละลายปริมาณ 30 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดแก้วที่ได้ใส่ตัวอย่างอาหารไว้แล้ว ไล่อากาศออกจากหลอดให้หมด บันทึกปริมาตรของเหลวตอนเริ่มต้น แล้วนำหลอดใส่ในช่องของแกนหมุน บ่มในอ่างน้ำอุ่นอุณหภูมิ 39°ซ. อ่านค่าแก๊สที่เกิดขึ้นในชั่วโมงที่ 2, 4, 6, 8, 12, 24, 36 และ 48 แต่ละตัวอย่างทำ 3 ซ้ำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

นำค่าปริมาตรแก๊สสุทธิที่ชั่วโมงที่ 24 (หลังจากคำนวณปรับค่าโดยเปรียบเทียบกับตัวอย่างมาตรฐานแล้ว) รวมทั้งองค์ประกอบทางเคมีของอาหารที่ได้วิเคราะห์ไว้ มาคำนวณค่าการย่อยได้ของอินทรีย์วัตถุ (OMD) พลังงานใช้ประโยชน์ได้ (ME) และพลังงานสุทธิเพื่อการให้นม (NEL) โดยใช้สมการที่เสนอโดย Menke and Steingass (1988) ดังนี้

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

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

$$NEL\ (MJ/kgDM) = 0.54 + 0.0959GP + 0.0038XP + 0.0001733XL^2$$

เมื่อ GP คือ ปริมาตรแก๊สสุทธิที่ 24 ชั่วโมง หน่วย ml / 200 mgDM

XP, XL และ XA คือ ปริมาณของโปรตีน(CP), ไขมัน(EE) และเถ้า (Ash) หน่วยเป็น g/ kgDM

นำค่า ME ที่ได้จากการคำนวณมาคำนวณกลับหาค่า DE และ TDN โดยใช้สมการของ NRC (1988) คือ

$$ME\ (Mcal/kgDM) = -0.45 + 1.01\ DE \qquad DE(Mcal/kgDM) = 0.04409 \times \%TDN$$

**การทดลองที่ 4 ศึกษาผลของการใช้เมล็ดข้าวโพดบีบแตกต่อสมรรถภาพการผลิต และการย่อยได้ในโคนม**

**สัตว์ทดลอง**

ใช้แม่โคนมลูกผสมที่มีระดับเลือดโฮลสไตน์ฟรีเชี่ยน เกินกว่า 87.5% จำนวน 6 ตัว น้ำหนักประมาณ 500 ± 20 กิโลกรัม อายุประมาณ 4-6 ปี อยู่ในระยะให้นมที่ 2-3 ให้นมมาแล้วประมาณ 90 วัน และให้นมประมาณวันละ 20 กิโลกรัม นำมาเลี้ยงในซองขังเดี่ยวผูกยืนโรง มีที่ให้น้ำอัตโนมัติ และมีรางอาหารอยู่ด้านหน้าตัวโค ใช้แผนการทดลองแบบ Balanced design มี 2 สแควร์ๆ ละ 3 ตัว และทดลอง 3 ระยะๆ ละ 2 สัปดาห์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**อาหารทดลอง**

ปริมาณอาหารหยาบและอาหารข้น ใช้ข้อมูลของโคนมดังกล่าวข้างต้นมาคำนวณเป็นรายตัว โดยจัดสัดส่วนให้ได้โภชนะตามความต้องการของโคที่แนะนำโดย NRC (1988) โดยใช้โปรแกรม MRATION (สมคิด, 2549) แบ่งอาหารโคทดลองออกเป็น 3 กลุ่ม (treatment)

ให้โคทุกกลุ่มได้รับอาหารหยาบเหมือนกันคือเป็นหญ้ารูซี่แห้งผสมกากน้ำตาล 5% โดยให้กินวันละ 8 กิโลกรัม สำหรับอาหารข้นจะแบ่งให้ 3 เวลา คือ 7.00, 12.00 และ 17.00 น โดยทุกกลุ่ม

ได้รับอาหารข้นที่มีจำหน่ายเสริมด้วยข้าวโพด ถั่วเหลืองไขมันเต็ม และแร่ธาตุ – วิตามิน ในปริมาณที่เท่ากัน ต่างกันที่ชนิดของข้าวโพด ดังแสดงในตารางที่ 3.1 คือ

กลุ่ม 1 ประกอบด้วยข้าวโพดแห้งไม่ผ่านความร้อนบีบแตก (DC)

กลุ่ม 2 ประกอบด้วยข้าวโพดแช่น้ำ 12 ชั่วโมง – นึ่งแล้วบีบให้แตก (WSon)

กลุ่ม 3 ประกอบด้วยข้าวโพดบดที่มีขายโดยทั่วไป

**ตาราง 3.1** ส่วนประกอบของอาหารทดลองที่ให้โคแต่ละกลุ่ม

**Table 3.1** Composition of experimental diets

| Feed (kg as fed/d) | Treatment1 | Treatment 2 | Treatment 3 |
|---|---|---|---|
| Ruzi hay | 7.5 | 7.5 | 7.5 |
| Molasses | 0.5 | 0.5 | 0.5 |
| Commercial concentrate | 6.67 | 6.67 | 6.67 |
| Form of corn | | | |
| - dry cracked (DC) | 2.61 | - | - |
| - overnight soaked-streamed (WSon) | - | 2.61 | - |
| - ground (GC) | - | - | 2.61 |
| Full fat soybean | 2.67 | 2.67 | 2.67 |
| Mineral-vitamin mix | 0.05 | 0.05 | 0.05 |

**แผนการทดลอง**

จัดแม่โคเข้าทดลองโดยให้ได้รับอาหารตามแผนการทดลองแบบสลับ Change over design เนื่องจากไม่สามารถจัดระยะพักระหว่างทรีตเมนต์ได้ เพราะต้องรีดนมแม่โคอย่างต่อเนื่อง จึงได้วางแผนสำรวจผลตกค้าง (residual effect) โดยวางทรีตเมนต์สลับกันใน 2 สแควร์ (Balanced design) (จรัญ, 2540) ใช้โคทดลองสแควร์ละ 3 ตัว รวม 6 ตัว แบ่งการทดลองออกเป็น 3 ระยะๆ ละ 2 สัปดาห์ การจัดกลุ่มโคทดลองแสดงในตาราง 3.2

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**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 |

**การเก็บข้อมูลและการวิเคราะห์**

ในการทดลองแต่ละระยะทำการบันทึกข้อมูลปริมาณอาหารที่กินได้ ปริมาณน้ำนมที่รีดเป็นรายวันตลอดการทดลอง ส่วนปริมาณมูลทุกระยะนั้นทำการบันทึกแต่ละวันในระยะ 3 วันสุดท้ายของแต่ละระยะก่อนการเปลี่ยนเป็นทรีตเมนต์ใหม่

ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างต่างๆ เพื่อนำมาวิเคราะห์ดังนี้

ก. อาหารที่ให้และเหลือทุกวัน นำไปหาวัตถุแห้งเพื่อคำนวณหาปริมาณวัตถุแห้งที่กินได้ และสุ่มเก็บตัวอย่างอาหารที่ใช้ โดยแยกเก็บเป็นวัตถุดิบรายตัว ได้แก่ หญ้ารูซี่แห้ง กากน้ำตาล อาหารอัดเม็ด ถั่วเหลืองอบไขมันเต็ม และข้าวโพดทุกครั้งที่ทำการผสมอาหาร นำมาเก็บสะสมไว้ในตู้เย็นเพื่อผสมกันและสุ่มมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีโดยวิธี Proximate analysis (AOAC., 1984) และ Detergent method (Goering and Van Soest, 1970)

ข. น้ำนม ทำการสุ่มเก็บตัวอย่าง ระยะละ 3 วัน โดยสุ่มเก็บช่วงเช้าและเย็นในอัตรา 1% ของปริมาณน้ำนม ใส่ sodium azide เพื่อรักษาสภาพน้ำนมและเก็บไว้ในตู้เย็นที่มีอุณหภูมิ 8 $^{o}$C เพื่อรอการวิเคราะห์ส่วนประกอบของน้ำนม โดยใช้เครื่อง Milkoscan 133 V 3.9 GB

ค. มูล ทำการเก็บมูลที่โคแต่ละตัวถ่ายออกมาทันทีเพื่อป้องกันไม่ให้ปะปนกับปัสสาวะ แล้วสุ่มเก็บตัวอย่างประมาณ 10% ของมูลทั้งหมดที่ขับถ่ายนำไปเก็บสะสมไว้ในตู้แช่แข็ง ก่อนการวิเคราะห์จะนำมูลออกจากตู้แช่แข็ง มาทิ้งไว้ในสภาพอุณหภูมิห้องแล้วผสมให้เข้ากัน จากนั้นสุ่มมาอบที่อุณหภูมิ 60 $^{o}$C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้ววิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีเช่นเดียวกับอาหาร

จากนั้นนำไปคำนวณหาค่าการย่อยได้ โดยใช้สูตร

$$\% \text{ การย่อยได้ของโภชนะ} = \frac{(\text{ปริมาณโภชนะที่กิน} - \text{ปริมาณโภชนะที่ขับออกในมูล}) \times 100}{\text{ปริมาณโภชนะที่กิน}}$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

**การวิเคราะห์ทางสถิติ**

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) ตามแผนการทดลองแบบ Balanced design และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธีของ Duncan's New Multiple Range Test

**สถานที่ทำการวิจัย**

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

**ระยะเวลาในการทดลอง**

กันยายน 2549 ถึง กุมภาพันธ์ 2551 ใช้ระยะเวลาในการวิจัยประมาณ 18 เดือน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved