บทที่ 3
วิธีดำเนินการทดลอง

3.1 แผนการทดลอง และอาหารทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design, CRD) ที่มีการจัดทรีทเมนต์แบบแฟคทอเรียล (factorial experiment) ประกอบด้วยปัจจัยที่ต้องการศึกษา 2 ปัจจัย คือ

ปัจจัย A คือ วิธีการปรับปรุงสิ่งเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมกรดซิตริค ได้แก่ เอนไซม์และการอัดพอง

ปัจจัย B คือ ระดับของสิ่งเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมกรดซิตริค (citric acid waste, CW) ที่ใช้เป็นแหล่งพลังงานในสูตรอาหารผสมสำเร็จที่ระดับ 0, 10, 20 และ 40 เปอร์เซ็นต์

สูตรอาหารผสมสำเร็จ (total mixed ration, TMR) ที่ใช้ในการทดลองนี้ มีสัดส่วนอาหารข้นต่ออาหารหยาบที่ 60:40 ประกอบด้วยสูตรอาหารทดลอง (dietary treatment) ดังนี้

สูตรอาหารทดลอง 1 (T1) – สูตรอาหารผสมสำเร็จมีระดับสิ่งเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมกรดซิตริค 0 เปอร์เซ็นต์ (Control)

สูตรอาหารทดลอง 2 (T2) - สูตรอาหารผสมสำเร็จมีระดับสิ่งเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมกรดซิตริคผสมเอนไซม์ 10 เปอร์เซ็นต์ (CWenz10)

สูตรอาหารทดลอง 3 (T3) - สูตรอาหารผสมสำเร็จมีระดับสิ่งเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมกรดซิตริคผสมเอนไซม์ 20 เปอร์เซ็นต์ (CWenz20)

สูตรอาหารทดลอง 4 (T4) – สูตรอาหารผสมสำเร็จมีระดับสิ่งเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมกรดซิตริคผสมเอนไซม์ 40 เปอร์เซ็นต์ (CWenz40)

สูตรอาหารทดลอง 5 (T5) - สูตรอาหารผสมสำเร็จมีระดับสิ่งเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมกรดซิตริคอัดพอง 10 เปอร์เซ็นต์ (CWext10)

สูตรอาหารทดลอง 6 (T6) - สูตรอาหารผสมสำเร็จมีระดับสิ่งเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมกรดซิตริคอัดพอง 20 เปอร์เซ็นต์ (CWext20)

สูตรอาหารทดลอง 7 (T7) - สูตรอาหารผสมสำเร็จมีระดับสิ่งเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมกรดซิตริคอัดพอง 40 เปอร์เซ็นต์ (CWext40)

โดยสูตรอาหารผสมสำเร็จ (ตารางที่ 3.1) คำนวณให้มีโภชนะ มีระดับโปรตีนหยาบ 14 เปอร์เซ็นต์ และพลังงาน 2.4 McalME/kgDM ตามความต้องการของโคเนื้อ

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 17 ต.ค. 2555
เลขทะเบียน 248978
เลขเรียกหนังสือ

ตารางที่ 3.1 วัตถุดิบของสูตรอาหารผสมสำเร็จที่ใช้ในการทดลอง

Ingredients	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
Rice straw	40.00	40.00	40.00	40.00	40.00	40.00	40.00
Cassava chip	40.00	30.00	20.00	0.00	30.00	20.00	0.00
Rice bran	0.80	0.50	0.20	0.10	0.30	0.50	0.60
Palm kernel cake	4.00	1.50	0.20	0.10	2.50	2.70	2.80
Soybean meal	13.10	16.10	15.80	10.60	15.20	14.80	13.70
CWenz	0.00	10.00	20.00	40.00	0.00	0.00	0.00
CWext	0.00	0.00	0.00	0.00	10.00	20.00	40.00
Urea	1.70	1.30	1.40	2.00	1.40	1.20	1.00
Oil	0.00	0.10	1.80	6.30	0.10	0.20	1.00
Molasses	0.00	0.10	0.20	0.50	0.10	0.20	0.50
Dicalcium phosphate	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Salt	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Sulfur	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Mineral premix	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Total	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.00

CWenz = สิ่งเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมกรดซิตริคที่ปรับปรุงด้วยเอนไซม์
CWext = สิ่งเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมกรดซิตริคที่ปรับปรุงด้วยการอัดพอง

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

3.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษา

อาหารทดลอง

การจัดทำสิ่งเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมกรดซิตริค

นำสิ่งเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมกรดซิตริค จากโรงงานผลิตกรดซิตริค จังหวัดสมุทรสาคร นำมาทำให้แห้งโดยการตากแดดเป็นเวลาไม่น้อยกว่า 2 วัน หรือจนกว่าจะแห้ง แล้วรวบรวมใส่ในกระสอบ เพื่อผสมในสูตรอาหารต่อไป

การจัดทำสิ่งเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมกรดซิตริคปรับปรุงด้วยเอนไซม์

นำสิ่งเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมกรดซิตริคที่แห้งแล้วมาผสมกับเอนไซม์ย่อยเยื่อใย ที่มีเป็นเอนไซม์ที่ได้จากเชื้อ *Bacillus lentus* และ *Trichoderma longibrachiatum.* มีเอนไซม์ไซแลนเนส $440x10^6$ ยูนิตต่อกิโลกรัม และเอนไซ์กลูคาเนส $170x10^6$ ยูนิตต่อกิโลกรัม ในสัดส่วนของเอนไซม์ต่อสิ่งเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมกรดซิตริค ที่ระดับ 350 กรัม/1000 กรัม แล้วนำไปผสมใสสูตรอาหารผสมสำเร็จทันที

การจัดทำสิ่งเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมกรดซิตริคปรับปรุงด้วยการอัดพอง

นำสิ่งเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมกรดซิตริคมาทำการอัดพอง โดยใช้ปลายข้าวเป็นสื่อ มีสัดส่วนของสิ่งเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมกรดซิตริคต่อปลายข้าว 30:70 เตรียมปลายข้าวและสิ่งเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมการผลิตกรดซิตริคที่บดละเอียดแล้ว นำไปร่อนผ่านตะแกรงขนาด 70 เมช (mesh) นำ

ตัวอย่างทั้งสองมาผสมให้ได้ตามสัดส่วน และปรับความชื้นเริ่มต้นที่ 16 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำตัวอย่างที่ผ่านการผสมเสร็จเรียบร้อยแล้วเข้าเครื่องเอ็กซ์ทรูด (extruder)

การจัดทำสูตรอาหารผสมสำเร็จ

นำแหล่งอาหารหยาบ ได้แก่ ฟางข้าวมาบดผ่านตะแกรงขนาด 1 ซม. มาผสมรวมกับแหล่งวัตถุดิบอาหารข้นมาผสมกันในสัดส่วนที่แสดงไว้ในตารางที่ 3.1 โดยใช้เครื่องผสมแบบแนวนอน ให้เข้ากันดีทั้งแหล่งอาหารหยาบและแหล่งอาหารข้นเป็นเวลาไม่น้อยกว่า 15 นาที

การจัดเตรียมตัวอย่างอาหารทดลอง

ทำการสุ่มตัวอย่างสูตรอาหารผสมเร็จทดลอง เพื่อใช้เป็นตัวแทนของสูตรอาหารทดลองแต่ละสูตรในการศึกษาการวัดผลผลิตแก๊ส หลังจากนั้น นำเอาตัวอย่างของสูตรอาหารผสมสำเร็จทดลองมาบดผ่านตะแกรงขนาด 1 มิลลิเมตร เพื่อนำไปทดลองและวิเคราะห์ทางเคมีต่อไป

3.3 การศึกษาการวัดการผลิตแก๊สในหลอดทดลอง

3.3.1 สารเคมี และการเตรียม

1. การเตรียมสารละลายของเหลวจากกระเพาะรูเมนผสม (rumen inoculum)

ทำการเตรียมสารละลายโดยใช้ของเหลวในกระเพาะรูเมนและสารละลาย ตามวิธีการของ Menke and Steingass (1988) ดังนี้

1.1 สารละลายบัฟเฟอร์ (Buffer solution) 730 มิลลิลิตร เตรียมจาก
- โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต ($NaHCO_3$) 35.0 กรัม
- แอมโมเนียมไฮโดรคาร์บอเนต ([$NH_4]_2HCO_3$)4.0 กรัม

ทำละลาย และปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น

1.2 สารละลายแร่ธาตุอาหารหลัก (Macro mineral solution) 365 มิลลิลิตร เตรียมจาก
- โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟส (K_2HPO_4) 6.2 กรัม
- ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟส (Na_2HPO_4) 5.7 กรัม
- โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 2.22 กรัม
- แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) 0.6 กรัม

ทำละลาย และปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น

1.3 สารละลายแร่ธาตุอาหาร (Micro mineral solution) 0.23 มิลลิลิตร เตรียมจาก
- แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MnCl_2.4H_2O$) 10.0 กรัม
- แคลเซียมไดคลอไรด์ ($CaCl_2.2H_2O$) 13.2 กรัม
- โคบอลต์ไดคลอไรด์ ($CoCl_2.6H_2O$) 1.0 กรัม
- เฟอร์รัสไตรคลอไรด์ ($FeCl_3.6H_2O$) 8.0 กรัม

ทำละลาย และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

1.4 สารละลายรีซาซูริน (Resazurine solution) 1.0 มิลลิลิตร เตรียมจาก
- รีซาซูริน (Resazurine solution) 1.0 กรัม

ทำละลาย และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

2. สารละลายที่ใช้ในการไล่ออกซิเจน (Reduction solution) 60.0 มิลลิลิตร ต้องใช้หลังเตรียมทันที เตรียมจาก

- ไดโซเดียมซัลไฟล์ ($Na_2S.9H_2O$) 580.0 มิลลิกรัม
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 1 M 60.0 มิลลิลิตร

3. สารละลายน้ำลายเทียม (Artificial Saliva) 1000 มิลลิลิตร

- น้ำกลั่น	475	มิลลิลิตร
- สารละลายแร่ธาตุหลัก	240	มิลลิลิตร
- สารละลายแร่ธาตุรอง	0.12	มิลลิลิตร
- สารละลายบัฟเฟอร์	240	มิลลิลิตร
- รีซาซูริน	1.22	มิลลิลิตร

อุปกรณ์

1. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง (digital analytic balance)
2. ถังบรรจุ และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์
3. สายนำก๊าซและอุปกรณ์แยกทางก๊าซ
4. เครื่องดูดสูญญากาศ (suction flask)
5. สายยางดูด rumen fluid
6. ขวดรูปชมพู่ที่มีท่อดูด (suction flask) ขนาด 2 ลิตร พร้อมจุกยางที่มีท่อแยกก๊าซ
7. กระติกน้ำร้อน (thermos)
8. กรวยกรอง
9. ผ้าขาวบาง
10. กระบอกตวง (cylinder) ขนาด 100, 500 และ 1000 มิลลิลิตร
11. ปิเปต (pipet) ขนาด 0.5, 1.0 และ 5.0 มิลลิลิตร
12. เทอร์โมมิเตอร์ (thermometer) สเกล 50 องศาเซลเซียส
13. เครื่องกวนสารให้ความร้อน (hot plate stirrer)
14. กระบอกฉีดยาพลาสติกขนาด 60 มิลลิลิตร (สำหรับถ่ายเทของเหลว)
15. กระบอกฉีดยาแก้ว ขนาด 10 มิลลิลิตร (สำหรับวัดปริมาตรก๊าซ)
16. เข็มฉีดยา 18G x 1'' (สำหรับถ่ายเทของเหลว)
17. เข็มฉีดยาขนาด 25G x 1'' (สำหรับวัดปริมาณก๊าซ)
18. ขวดวัคซีนขนาด 50 มิลลิลิตร พร้อมจุกยาและฝาครอบอลูมิเนียม
19. ตู้อบ (Hot air oven)

3.3.2 วิธีการทดลอง

3.3.1 การเตรียมขวดที่บรรจุสูตรอาหารทดลอง

นำตัวอย่างที่ทำการบดเตรียมไว้แล้ว ทำการบรรจุตัวอย่าง 0.2 กรัม ลงในขวดวัคซีนขนาด 50 มิลลิลิตร พร้อมทั้งปิดจุกยางและฝาครอบอลูมิเนียมให้สนิท แล้วนำเข้าบ่มรักษาที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส โดยแต่ละสูตรอาหารผสมสำเร็จทดลองมีจำนวน 6 ซ้ำ โดยจำนวน 3 ซ้ำ ในชการวัดผลผลิตแก๊ส และอีกจำนวน 3 ซ้ำ ในการวัดค่าการย่อยได้และปริมาณกรดไขมันที่ระเหยได้ ที่ 24 และ 48 ชั่วโมงหลังการบ่ม

3.3.2 การเตรียมของเหลวจากกระเพาะรูเมนผสม (Rumen mixed inoculum)

- การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์และแร่ธาตุอาหาร

นำสารละลายบัฟเฟอร์และแร่ธาตุที่เตรียมไว้ล่วงหน้าผสม และทำการบรรจุลงในขวดชมพูโดยปล่อย แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ลงไปในสารละลาย (flushing) เพื่อไล่แก๊สออกซิเจนออกตลอดเวลา (ทำการเติมสารละลายที่ใช้ในการออกซิเจนประมาณ 1 ชั่วโมง ก่อนการเติม rumen fluid สังเกตสภาวะไร้ออกซิเจนจากการเปลี่ยนสีของรีซาซูรินในสารละลายจากสีฟ้าเป็นสีชมพูอ่อน) พร้อมทั้งรักษาอุณหภูมิที่ 39 องศาเซลเซียส บน Hot plate stirrer ในระหว่างรอการเก็บ rumen fluid จากตัวสัตว์มาผสมในขั้นตอนต่อไป

- การเก็บตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะรูเมน (rumen fluid)

ใช้โคเนื้อเจาะกระเพาะรูเมน จำนวน 4 ตัว เป็นสัตว์ทดลอง และเลี้ยงด้วยสูตรอาหารข้นวันละ 1% ของน้ำหนักตัว ที่มีสิ่งเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมกรดซิตริคปรุงแต่งด้วยเอ็นไซม์หรือการอัดพอง 20% ในสูตรอาหารข้น และฟางข้าวเพื่อเป็นแหล่งอาหารหยาบหลัก มีการสุ่มของเหลว (rumen fluid) ในโคเนื้อกระเพาะ เพื่อทำการศึกษาโดยใช้เทคนิคผลผลิตก๊าซ (in vitro gas production technique) นำมาผสมรวมกันจากนั้นกรองผ่านผ้าขาวบาง เพื่อนำมาผสมกับน้ำลายเทียมที่เตรียมไว้ ในสัดส่วนของน้ำลายเทียมต่อของเหลวจากกระเพาะรูเมนเท่ากับ 1:2 ได้สารละลายของของเหลวจากกระเพาะรูเมนผสม (rumen fluid mixture)

3.3.3 การบรรจุสารละลายของเหลวจากกระเพาะรูเมนผสมและการบ่ม

- ทำการบรรจุสารละลายของเหลวจากกระเพาะรูเมนผสม ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนในขวดที่บรรจุวัตถุดิบอาหารทดลองขวดละ 30 มิลลิลิตร จากนั้นนำเข้าบ่มในตู้อบร้อนแห้งที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส เพื่อทำการวัดปริมาณแก๊สต่อไป

3.3.3 การเก็บข้อมูล

3.3.3.1 ผลผลิตแก๊ส

ทำการจดบันทึกปริมาณแก๊สที่เกิดขึ้น โดยใน 12 ชั่วโมงแรกทำการทำการบันทึกผลทุก ๆ 1 ชั่วโมง ต่อมาบันทึกผลทุก ๆ 3 ชั่วโมงไปจนถึงชั่วโมงที่ 24 จากนั้นทำการจดบันทึกทุกๆ 6 ชั่วโมงไปจนถึงชั่วโมงที่ 78 และทำการบันทึกผลครั้งสุดท้ายในชั่วโมงที่ 96

นำค่าผลผลิตแก๊สที่ได้มาหาค่าคงที่ a, b และ c โดยใช้โปรแกรมทางสถิติ เพื่ออธิบายจลนพลศาสตร์ (kinetics) ของการผลิตแก๊สตามโมเดลหรือแบบจำลองสมการของ ϕrskov and McDonald (1979) ดังนี้

$$y = a + b\,[1\text{-}Exp\,(-\,ct)]$$

เมื่อ y = ผลผลิตแก๊สที่เกิดขึ้น ณ เวลา t

a = จุดตัดแกน y หรือ ปริมาณแก๊สที่ผลิตได้จากส่วนที่ละลายน้ำได้ง่าย (มิลลิลิตร)

b = จุดที่เส้นกราฟราบเรียบ (asymptote) หรือปริมาณผลผลิตแก๊สที่ผลิตได้จากส่วนที่ละลายน้ำได้ยาก (มิลลิลิตร)

c = ค่าอัตราการผลิตแก๊ส (มิลลิลิตรต่อชั่วโมง)

ถ้าค่า a เป็นลบ ให้คำนวณเป็นระระยะการปรับตัวของจุลินทรีย์ (lag time) ตามสมการของ McDonald (1981) ดังนี้

$$\text{Lag time} = (1/c)\ \ln[b/(a+b)]$$

3.3.3.2 ความสามารถในการย่อยได้ของวัตถุแห้ง (In vitro dry matter digestibility, IVDMD)

หลังการบ่มชั่วโมงที่ 24 และ 48 แต่ละครั้ง ทำการสุ่มขวดย่อยในแต่ละสูตรอาหารทดลองออกมา สูตรอาหารทดลองละ 2 ขวด นำเข้าแช่เย็นทันที ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อหยุดกิจกรรมของจุลินทรีย์ และรอการวิเคราะห์ภายหลัง เมื่อทำการวิเคราะห์ นำออกจากตู้แช่แข็งปล่อยให้ละลาย ทำการกรองเอาของแข็งที่เหลือจากการย่อย นำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เพื่อนำค่าวัตถุแห้งที่เหลือจากการย่อยไปทำการคำนวณ ค่าการย่อยได้ของวัตถุแห้งในหลอดทดลอง (in vitro dry matter digestibility, IVDMD) (สุภาพร, 2549) ดังสมการ

$$\text{IVDMD (\%)} = \frac{[\text{น้ำหนักวัตถุแห้งเริ่มต้น} - \text{น้ำหนักวัตถุแห้งที่เหลือหลังการบ่ม}]}{\text{น้ำหนักวัตถุแห้งเริ่มต้น}} \times 100$$

3.3.3.3 การวิเคราะห์กรดไขมันที่ระเหยได้ทั้งหมดและแอมโมเนีย-ไนโตรเจน

หลังการบ่มชั่วโมงที่ 24 และ 48 แต่ละครั้ง ทำการสุ่มขวดย่อยในแต่ละสูตรอาหารทดลองออกมา สูตรอาหารทดลองละ 2 ขวด นำเข้าแช่เย็นทันที ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อหยุดกิจกรรมของจุลินทรีย์ และรอการวิเคราะห์ภายหลัง เมื่อทำการวิเคราะห์นำออกจากตู้แช่แข็งปล่อยให้ละลาย เสร็จแล้วทำการปั่นเหวี่ยงเก็บเฉพาะส่วนที่เป็นของเหลว เพื่อการวิเคราะห์กรดไขมันที่ระเหยได้ทั้งหมด ตามวิธีการของ Getachew et al. (2004) และแอมโมเนีย-ไนโตรเจน ด้วยวิธีการกลั่น ตามวิธีของ Bremner and Keeney (1965)

3.3.3.4 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

นำตัวอย่างของสูตรอาหารทดลองแต่ละสูตรไปบดผ่านตะแกรงขนาด 1 มิลลิเมตร เพื่อวิเคราะห์หาส่วนประกอบทางเคมีของโภชนะต่างๆ ได้แก่ วัตถุแห้ง (dry matter, DM), เถ้า (ash) โปรตีนหยาบ (crude protein, CP) และไขมัน (ether extract, EE) ตามวิธีของ AOAC (1985) วิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของเยื่อใย ได้แก่ neutral detergent fiber (NDF) และเยื่อใย acid detergent fiber (ADF) ตามวิธีของ Goering and Van Soest (1970)

3.4 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้จากการ มาวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบ analysis of variance (ANOVA) ตามแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ ที่จัดสูตรอาหารผสมสำเร็จทดลองและวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างสูตรอาหารทดลองโดย Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ตามวิธีการของ Steel and Torrie (1980) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของสูตรอาหารผสมสำเร็จทดลองโดยวิธี Orthogonal contrast โดยการใช้ Proc GLM ของ SAS (SAS, 1985)

3.5 สถานที่ในการวิจัย

3.5.1 หมวดโคเนื้อ ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

3.5.2 ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์อาหารสัตว์เคี้ยวเอื้อง ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

3.5.3 ศูนย์วิจัยและพัฒนาทรัพยากรอาหารสัตว์เขตร้อน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น