# บทที่ 2
# วิธีดำเนินการวิจัย

## 2.1 แหล่งที่มาของข้อมูล

กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย นี้คือความสำคัญของยีสต์ *(Saccharomyces cerevisiae)* เป็นยีสต์ที่ทำหน้าที่ในเชิงบวก มีกลไกในการทำงานโดยทำให้เกิดกระบวนการหมักอาหาร การย่อยอาหารเยื่อใยได้ดีขึ้น โดยทำหน้าที่ส่งเสริมการทำงานของจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมน โดยเฉพาะเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียในกลุ่มของ cellulolytic bacteria มีผลในการลดปริมาณของแก๊สมีเทน ซึ่งเป็นบทบาทที่สำคัญในสัตว์เคี้ยวเอื้อง จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องประยุกต์ใช้ยีสต์ในกลุ่มนี้มาใช้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตแพะได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการวิจัยในครั้งนี้มีสมมุติฐานว่าการใช้ยีสต์ *(Saccharomyces cerevisiae)* ร่วมกับวัตถุดิบอาหารสัตว์ เช่น กากมันสำปะหลัง จะทำให้กากมันสำปะหลัง มีคุณค่าทางโภชนะเพิ่มขึ้นเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนะเทียบเท่ากับกากถั่วเหลืองที่มีราคาแพงในปัจจุบันได้ และเป็นการเพิ่มมูลค่าให้แก่กากมันสำปะหลังได้

พืชอาหารสัตว์เป็นอาหารที่มีความจำเป็นในการเลี้ยงสัตว์เคี้ยวเอื้อง และเป็นอาหารราคาถูก อีกทั้งยังพบว่าเป็นแหล่งของกรดไขมันไม่อิ่มตัวชนิดต่างๆ เช่น linoleic acid ($C_{18:2}$) และ linolenic acid ($C_{18:3}$) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ CLA พืชอาหารสัตว์แต่ละชนิดจะมีปริมาณของกรดไขมันเหล่านี้ที่แตกต่างกันออกไป ดังนั้น การศึกษาถึงปริมาณของกรดไขมันในพืชอาหารนั้นจะทำให้ได้ข้อมูลพื้นฐาน และสามารถนำข้อมูลเหล่านี้มาช่วยในการเลือกและส่งเสริมการปลูกพืชอาหารสัตว์แก่เกษตรกรเพื่อเพิ่มการสะสม CLA และเพิ่มมูลค่าให้แก่ผลิตภัณฑ์ของเกษตรกร

แหล่งโปรตีนที่มีคุณภาพสูงทั้งในแง่ปริมาณโปรตีนและคุณค่าทางโภชนะการสำหรับอาหารสัตว์ที่ใช้กันอยู่ภายในประเทศ เช่น ถั่วเหลือง หรือ ปลาป่น นับวันจะมีราคาสูงขึ้น และเริ่มขาดแคลนต้องมีการนำเข้าจากต่างประเทศ ดังนั้นจึงควรหาแหล่งโปรตีนที่มีคุณภาพสูงชนิดอื่น ๆ มาเสริมหรือทดแทนแหล่งโปรตีนที่ใช้อยู่เดิม ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพสำหรับใช้เป็นแหล่งโปรตีนคุณภาพสูง เนื่องจากมีโปรตีนทั้งหมดปริมาณสูงและมีกรดอะมิโนจำเป็นครบถ้วน โดยเฉพาะมีไลซีนปริมาณสูง ถึงแม้ว่ามีปริมาณเมทไธโอนีนค่อนข้างต่ำเช่นเดียวกับจุลินทรีย์อื่น นอกจากนั้นเซลล์ของยีสต์ยังประกอบด้วยเกลือแร่หลายชนิด เช่น โครเมียม ซีลีเนียม โมลิบดีนัม และสังกะสี รวมทั้งวิตามินหลายชนิดโดยเฉพาะวิตามินบีรวม ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อสัตว์ ยิ่งกว่านั้นยีสต์ยังมีกลิ่นรสดีช่วยเพิ่มความน่าบริโภคของอาหาร ปัญหาของการใช้ยีสต์เป็นแหล่งโปรตีนคือมีปริมาณเมทไธโอนีนค่อนข้างต่ำและมีกรดนิวคลีสูง ซึ่งอาจก่อให้เกิดปัญหากับสุขภาพของสัตว์ ดังนั้นยีสต์สายพันธุ์ที่จะนำมาใช้เป็นแหล่งโปรตีนควรเป็นสายพันธุ์ที่มีโปรตีนปริมาณสูง และมีกรดอะมิโนความเข้มข้นสูงด้วย เพื่อลดปริมาณยีสต์ที่สัตว์ต้องบริโภคเพื่อให้ได้โปรตีนปริมาณเท่ากัน กลุ่มยีสต์

(*Saccharomyces cerevisiae*) มีรายงานว่าผนังเซลล์ของยีสต์ประกอบด้วย mannanoligosaccharides (MOS) 45% สามารถสร้างสาร Cytokine และ Beta-glucan กระตุ้นให้สร้างสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะในลำไส้ได้ และในต่างประเทศได้ใช้เทคโนโลยีชีวภาพพัฒนาผลิตภัณฑ์โดยการหมักบ่มด้วยจุลินทรีย์ผสมทั้งแบคทีเรียและยีสต์ดังได้กล่าวข้างต้นได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นทั้ง Probiotics และ Prebiotics ทำให้เพิ่มอัตราการเจริญเติบโต เพิ่มการกินได้ เพิ่มการย่อยของอาหาร กระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกัน และลดอัตราการตาย ในสัตว์ไม่เคี้ยวเอื้อง Abd El-Ghani (2004) ทำการศึกษาในแพะนมโดยการเสริมยีสต์ ที่ระดับ 0, 3 และ 6 กรัมต่อตัวต่อวันพบว่าสามารถเสริมได้ที่ระดับ 3-6 กรัมต่อตัวต่อวัน ทำให้แพะให้ผลผลิตน้ำนมเพิ่มขึ้นแต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) ส่วน Fadel Elseed et al. (2007) รายงานว่าสามารถเสริมยีสต์ที่ระดับ 0, 2.5 และ 5 กรัมต่อตัวต่อวัน ในอาหารลูกแพะได้โดยระดับที่ทำให้ลูกแพะมีอัตราการเจริญเติบโตดีที่สุดคือที่ระดับ 2.5 กรัมต่อตัวต่อวัน ($p<0.05$)

## 2.2 วิธีการเก็บรวบรวมข้อมูล

### 2.2.1 การศึกษาความสามารถในการการย่อยได้และกระบวนการหมัก ของแหล่งอาหารหยาบ

การวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของกลุ่มอาหารหยาบและแหล่งวัตถุดิบอาหารโปรตีนไหลผ่าน ได้แก่ วัตถุแห้ง (dry matter, DM), เถ้า (ash), โปรตีนหยาบ (crude protein, CP) โดยวิธีการของ AOAC (1985), neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber (ADF) ตามวิธีการของ Goering and Van Soest (1970)

- ข้าวโพดหมัก
- ฟางหมักยูเรีย
- หญ้าสด
- หญ้าแห้ง

ลักษณะทางโภชนาการ ความสามารถในการย่อยได้ในรูเมน ของกลุ่มอาหารหยาบและแหล่งวัตถุดิบอาหารโปรตีนไหลผ่านใช้แพะเจาะกระเพาะแบบถาวร (permanent rumen fistulae) จำนวน 3 ตัว ชั่งน้ำหนักสัตว์ทุกตัวก่อนเข้างานทดลอง เลี้ยงในคอกขังเดี่ยว ปรับอาหารด้วยพื้นฐานอาหารหยาบด้วยหญ้าสดและเสริมอาหารข้น เป็นเวลา 2 สัปดาห์ และวัดความสามารถในการย่อยได้ของวัตถุดิบอาหารที่จะทดสอบ

แพะทุกตัวได้รับอาหารในระดับเพื่อการดำรงชีพ (maintenance) โดยให้อาหารหยาบ ได้แก่ ฟางข้าว 70 เปอร์เซ็นต์ และอาหารข้น 30 เปอร์เซ็นต์ โดยให้อาหารวันละ 2 เวลา (8.00 และ 16.00 น.) มีน้ำสะอาดให้ดื่มตลอดเวลา ปรับสัตว์ด้วยอาหารสัดส่วนดังข้างบนใช้เวลา 14 วัน ก่อนการนำถุง nylon และ mobile bag ลงบ่ม

**เทคนิค nylon bag**

ถุงที่ใช้ในการทดลองทำจาก polyester cloth โดยมีรูขนาด 45 ไมครอน และมีขนาด 6 x 12 cm ชั่งน้ำหนักอาหารตัวอย่างใส่ถุง ๆ ละประมาณ 5 กรัม ช่วงเวลาละ 2 ซ้ำต่อสัตว์ 1 ตัว มัดปากถุงให้แน่น และผูกถุงใส่เชือก นำลงบ่มในกระเพาะรูเมนพร้อมๆ กัน และทำการเก็บออก หลังการบ่มที่เวลา 2, 4, 8, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ยกเว้นถุงที่เวลา 0 ไม่ต้องบ่มในกระเพาะรูเมน แต่ทำการล้างเหมือนกับกลุ่มอื่น ถุงที่นำออกจากกระเพาะรูเมนทำการล้างด้วยเครื่องซักผ้าที่ความเร็วในการปั่นในระดับปกติเป็นเวลา 15 นาที ต่อจากนั้นอบที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี และ คำนวณตามสมการของ Ørskov and McDonald (1979) และนำมาคำนวณโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป (Chen, 1996);

$$P = A + B\,(1-e^{-ct})$$

เมื่อ P = degradation rate an time t (%),

A = the intercept of the degradation curve at time zero (%),

B = the fraction of DM and CP which will be degraded when given sufficient, time for digestion in the rumen (%),

c = a rate constant of disappearance of fraction B ($h^{-1}$), and

t = time of incubation (h).

ประสิทธิภาพในการย่อยได้ (the effective degradability, E) ของ DM, OM และ CP คำนวณได้จากสมการข้างล่าง ดังนี้

$$E = A + (B)\,(c) / (c + k)$$

เมื่อ k = the solid outflow rate from the rumen obtained from the previous experiment

**การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี**

1. ตัวอย่างอาหารก่อนการบ่ม และตัวอย่างอาหารที่ผ่านการย่อยในกระเพาะรูเมนและในลำไส้เล็ก วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ วัตถุแห้ง (dry matter, DM), เถ้า (ash) และ โปรตีน (Kjeldahl-N) ตามวิธีการของ AOAC (1985) เยื่อใยที่ไม่ละลายในสารละลายที่เป็นกลาง หรือผนังเซลล์ และเยื่อใยที่ไม่ละลายในสารละลายที่เป็นกรด ตามวิธีของ Georing and Van Soest (1970)

**2.2.2 ศึกษาการเสริม โปรไบโอติค ต่อศักยภาพการให้ผลผลิต การย่อยได้และกระบวนการหมักในอาหารแพะเนื้อ**

**สัตว์ทดลอง**

แพะพันธุ์ลูกผสมพื้นเมือง-แองโกลนูเบียนเพศผู้จำนวน 4 ตัว เพื่อทดสอบระดับของการใช้ *Saccharomyces cerevisiae* เสริมที่ระดับ 0, 2, 4 และ 6 กรัมต่อตัวต่อวัน แพะทดลองได้รับฟางข้าวเป็นแหล่งอาหารหยาบไม่จำกัด เสริมด้วยอาหารข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักตัว และวางแผนการทดลองแบบ 4x4 Latin square design

**อาหารที่ใช้ในการทดลอง**

อาหารที่ใช้ในการทดลอง ที่ 1 กลุ่มควบคุม ไม่มีการเสริม *S. cerevisiae*
อาหารที่ใช้ในการทดลอง ที่ 2 การเสริม *S. cerevisiae* ที่ระดับ 2 กรัมต่อตัวต่อวัน
อาหารที่ใช้ในการทดลอง ที่ 3 การเสริม *S. cerevisiae* ที่ระดับ 4 กรัมต่อตัวต่อวัน
อาหารที่ใช้ในการทดลอง ที่ 4 การเสริม *S. cerevisiae* ที่ระดับ 6 กรัมต่อตัวต่อวัน

**วิธีดำเนินการทดลองและเก็บข้อมูล**

1. ระยะก่อนดำเนินการทดลองทำการสุ่มคัดเลือกแพะเพศผู้จำนวน 4 ตัว นำมาขังคอกเดี่ยวให้แพะได้รับอาหารหยาบคือ ฟางข้าวอย่างเต็มที่ และได้รับอาหารข้นในสัดส่วน 1.5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัวต่อวัน เสริมด้วยยีสต์ที่บรรจุในแคปซูลตามทรีทเมนต์ เพื่อปรับสภาพร่างกายของสัตว์ และเพื่อให้สัตว์มีความคุ้นเคยกับสภาพอาหารตามรูปแบบของอาหารทดลองที่สัตว์ได้รับ เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ และชั่งน้ำหนักแพะ ก่อนทำการทดลอง

2. ระยะเวลาในการทดลองแบ่งช่วงการชั่งน้ำหนักทุก 15 วันจนสิ้นสุดการทดลอง โดยให้อาหารวันละ 2 ครั้ง คือช่วงเช้าให้อาหารเวลา 7.30 น. และช่วงบ่ายให้อาหารเวลา 15.30 น. บันทึกปริมาณอาหารที่ให้ และปริมาณอาหารที่เหลือแต่ละวัน โดยทำการชั่งอาหารออกทุกครั้งที่ให้อาหารใหม่ในช่วงเช้าของวันถัดมา เพื่อวัดปริมาณการกินได้อย่างอิสระในแต่ละวันตลอดช่วงเวลาของการทดลอง

3. ระยะ 10 วัน สุดท้ายก่อนสิ้นสุดการทดลอง ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างมูลและปัสสาวะโดยนำแพะมาเลี้ยงบนกรงเมแทบอลิซึม (metabolism crate) เพื่อทำการสุ่มเก็บตัวอย่างมูล และปัสสาวะ เพื่อทำการวัดการย่อยได้ของอาหารทดลอง โดยวิธีการเก็บตัวอย่างที่ขับออกมาทั้งหมด (total collection method) (Schneider and Flatt, 1975)

4. การสุ่มเก็บตัวอย่างมูล เริ่มสุ่มเก็บมูลในวันที่ 3 ของการขึ้นกรงเมแทบอลิซึม โดยมีถาด

รองรับมูลวางอยู่ใต้กรงเมแทบอลิซึม ทำการชั่งมูลทั้งหมดในถาดรองรับใต้กรงเมแทบอลิซึมจากแพะทุกตัวทุกวัน ในช่วง 7 วัน สุดท้ายในแต่ระยะทดลอง ทำการผสมคลุกเคล้ามูลในถาดรองรับให้ผสมกัน และทำการสุ่มเก็บมูล 10 เปอร์เซ็นต์ของที่ขับถ่าย ในแพะทดลองแต่ละตัว แบ่งมูลออกเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกสุ่มมาร้อยละ 40 นำไปอบที่ 100 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เพื่อนำไปคำนวณหาวัตถุแห้ง ส่วนที่สองสุ่มมาร้อยละ 40 นำไปอบที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง แล้วนำไปบดผ่านตะแกรงขนาด 1 มิลลิเมตร เพื่อนำไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีเช่นเดียวกับตัวอย่างอาหาร และนำไปคำนวณความสามารถในการย่อยได้ (digestibility) (เมธา, 2533)

5. การสุ่มเก็บตัวอย่างปัสสาวะ ทำการสุ่มเก็บในวันที่ 3 ของการขึ้นกรงเมแทบอลิซึม มีถังรองรับปัสสาวะวางอยู่ใต้กรงเมแทบอลิซึม เติมกรดซัลฟูริก เข้มข้น 97 เปอร์เซ็นต์ ในถังเก็บปัสสาวะเพื่อปรับให้ปัสสาวะมีค่าความเป็นกรด-ด่าง ต่ำกว่า 2 เพื่อป้องกันการสูญเสียของแอมโมเนีย ทำการวัดปริมาตรของปัสสาวะทั้งหมดในถังรองรับใต้กรงเมแทบอลิซึมจากแพะทุกตัวทุกวัน ในช่วง 7 วันสุดท้ายในแต่ระยะทดลอง และสุ่มเก็บปัสสาวะ 10 เปอร์เซ็นต์ของที่ขับถ่าย ในแพะทดลองแต่ละตัวนำมาเก็บไว้เพื่อรอให้ครบ 7 วัน ในตู้แช่ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เมื่อเก็บครบ 7 วัน นำปัสสาวะที่เก็บเอาไว้ในแต่ละวันมาผสมกัน สุ่มเก็บไว้ 50 เปอร์เซ็นต์ของปัสสาวะที่ทำการผสม นำมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำมาวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจน โดยวิธี Kjedahl method (AOAC, 1985)

6. การสุ่มเก็บตัวอย่างอาหารหยาบและอาหารข้น โดยทำการสุ่มเก็บในช่วงต้น และช่วงปลายของแต่ละช่วงการทดลอง อย่างละ 1 กิโลกรัม แบ่งตัวอย่างออกเป็น 2 ส่วน โดยส่วนแรกนำไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง หรือจนน้ำหนักตัวคงที่ เพื่อนำมาคำนวณหาค่าวัตถุแห้ง และนำค่าที่ได้มาปรับปริมาณการให้อาหารแพะในแต่ละวัน ส่วนที่ 2 นำตัวอย่างอาหารที่สุ่มมาไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง แล้วนำไปบดผ่านตะแกรงขนาด 1 มิลลิเมตร เพื่อนำไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ วัตถุแห้ง, เถ้า, โปรตีนหยาบ ตามวิธีของ AOAC (1985) เยื่อใยที่ไม่ละลายในสารละลายที่เป็นกลาง หรือผนังเซลล์ และเยื่อใยที่ไม่ละลายในสารละลายที่เป็นกรดตามวิธีของ Georing and Van Soest (1970)

7. สุ่มเก็บของเหลวจากกระเพาะรูเมน (rumen fluid) จากแพะแต่ละตัวช่วงสัปดาห์สุดท้ายของการทดลอง สุ่มผ่านทางทางหลอดอาหาร โดยทำการสุ่มที่เวลา 0, 2, 4 และ 6 ชั่วโมงหลังจากให้อาหารในช่วงเช้า การเก็บของเหลวจากกระเพาะรูเมนแต่ละครั้ง โดยการใช้ stomach tube ทำการสุ่มเก็บของเหลวจากระเพาะรูเมนประมาณ 50 มิลลิลิตรต่อตัว แล้วทำการวัดค่าความเป็นกรด-ด่างทันที โดยใช้เครื่อง pH meter สุ่มเก็บของเหลวจากกระเพาะรูเมนไว้ประมาณ 40 มิลลิลิตร เติมด้วยกรดซัลฟูริก (6 N $H_2SO_4$) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร เพื่อหยุดชะงักกิจกรรมของจุลินทรีย์ นำไปทำการเหวี่ยงใสที่ความเร็ว 3,000 x g ต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และเก็บส่วนที่เป็นของเหลวใสไว้ในตู้แช่แข็งที่

อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของแอมโมเนีย-ไนโตรเจน (ammonia-nitrogen, $NH_3$-N) ด้วยวิธีการกลั่น (Bremner and Keeney, 1965) โดยใช้เครื่อง Kjeltec Auto (AOAC, 1985)

**2.3 วิธีการวิเคราะห์ข้อมูล**

เปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยของลักษณะต่างๆ ในแต่ละกลุ่ม โดยทำการวิเคราะห์หาค่าความแปรปรวน (Analysis of variances: ANOVA) ตามแผนการทดลองแบบ 4x4 Latin square design และวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยในแต่ละปัจจัยการทดลองด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปตามวิธีการของ Steel and Torrie (1980)