เอกสารอ้างอิง

กรมปศุสัตว์. 2550. บทความ: ความรู้ด้านอาหารสัตว์, ฟางข้าว. กองอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์. http://www.dld.go.th/nutrition/Nutrition_Knowlage/nutrition_1.html.

เกียรติเกษตร กาญจนพิสุทธิ์, มโนธรรม สัจจ์ถาวร, อดุลย์ พงศ์สุวรรณ, บรรณ บูรณะ และลิขิต เอียดแก้ว. 2530. มังคุด. สหมิตรออฟเซท: กรุงเทพฯ.

เกรียงศักดิ์ สะอาดรักษ์. 2539. ผลของการเสริมอาหารเม็ดคุณภาพสูงต่อปริมาณการกินได้ รูปแบบกระบวนการหมักในรูเมน ผลผลิตและองค์ประกอบน้ำนมในโคนม. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาสัตวศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น.

ฉลอง วชิราภากร. 2541. โภชนะศาสตร์สัตว์เคี้ยวเอื้องเบื้องต้น. โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยขอนแก่น: ขอนแก่น.

ธีรวรรธน์ ขันทอง. 2543. ลิปิด. ใน ตำราชีวเคมี ภาควิชาเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.ขอนแก่น. หน้า 79-97.

นภา หลิมรัตน์. 2537. ชีวเคมีของลิปิด. ภาควิชาเคมี มหาวิทยาลัยขอนแก่น. หน้า 1-11.

บุญล้อม ชีวอิสระกุล. 2531. คุณค่าทางอาหารของฟางข้าวสาลีธรรมดาและฟางข้าวสาลีหมักยูเรียในการวางแผนวิจัยและพัฒนาธัญพืชเมืองหนาว ปี 2531/2532. ลำปาง.

บุญล้อม ชีวอิสระกุล. 2541. โภชนศาสตร์สัตว์เล่ม 1. พิมพ์ครั้งที่ 6. ธนบรรณการพิมพ์: เชียงใหม่.

บุญล้อม ชีวอิสระกุล. 2547. โภชนศาสตร์สัตว์เล่ม 1. พิมพ์ครั้งที่ 7. ธนบรรณการพิมพ์: เชียงใหม่.

บุญเสริม ชีวอิสระกุล และ บุญล้อม ชีวอิสระกุล. 2529. สมรรถภาพในการผลิตของโครุ่นที่ได้รับฟางข้าวเสริมกระถินและรำเปรียบเทียบกับฟางปรุงแต่งและรำ. วารสารเกษตร. 2(1): 1-16.

พจน์ ศรีบุญลือ โสพิศ วงศ์คำ และพัชรี บุญศิริ. 2543. ตำราชีวเคมี. พิมพ์ครั้งที่ 3. โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยขอนแก่น: ขอนแก่น.

ภานุทรรศน์ ความลำลึก . 2546. คู่มือการปลูกสมุนไพร. รุ่งแสงการพิมพ์: กรุงเทพฯ.

เมธา วรรณพัฒน์. 2528. ฟางข้าว: อาหารสัตว์เคี้ยวเอื้อง. ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น: ขอนแก่น.

เมธา วรรณพัฒน์. 2531. รายงานผลการวิจัยโครงการวิจัยการปรับปรุงสภาวะทางโภชนาการเพื่อเพิ่มสมรรถนะของกระบือในไร่นา. หจก. ฟันนี่พับบลิชชิ่ง. กรุงเทพฯ.

เมธา วรรณพัฒน์. 2533.โภชนศาสตร์สัตว์เคี้ยวเอื้อง. ฟันนี่พลับบลิชชิ่ง จำกัด. 473 น. กรุงเทพฯ.

เมธา วรรณพัฒน์. 2540. อาหารหยาบกับประสิทธิภาพการผลิตโคนม. เอกสารประกอบการบรรยายพิเศษใน: the FAO Training Course on Dairy Cattle Feeding and Nutrition. 22 พฤศจิกายน-4 ธันวาคม 2540. คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น.

เมธา วรรณพัฒน์ และ ฉลอง วชิราภากร. 2533. เทคนิคการให้อาหารโคเนื้อและโคนม. ฟันนี่พับลิชชิ่ง: กรุงเทพฯ.

เมธา วรรณพัฒน์ กฤตพล สมมาตย์ พยุงศักดิ์ อาจศึก ฉลอง วชิราภากร และเวชสิทธิ์ โทบุราณ. 2535. อิทธิพลของการเสริมอาหารก้อนคุณภาพสูง (high quality feed block; HQFB) ต่อปริมาณการกินได้ รูปแบบของกระบวนการหมักในรูเมน และการย่อยสลายของวัตถุดิบอาหารสัตว์ในสัตว์เคี้ยวเอื้องที่ได้รับฟางข้าวเป็นอาหารหยาบหลัก. การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่30 บางเขน กรุงเทพฯ.

เมธา วรรณพัฒน์ อนันต์ เพชรล้ำ โอภาส พิมพา กฤตพล สมมาตย์ ฉลอง วชิราภากร และอุดร บุญท้าว. 2540. การศึกษาสำรวจประชากรโคนมและสภาพการเลี้ยงโคนมในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ. ใน: เอกสารการปรุชุมสัมมนาวิชาการเรื่อง “กลยุทธ์และแนวทางการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตโคนม” ขอนแก่น: โครงการวิจัยปรับปรุงประสิทธิภาพการให้อาหารโคนมมหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ยุวดี จอมพิทักษ์. 2537. การปลูกสมุนไพรใช้เอง. ประพันธ์สาส์น: กรุงเทพฯ.

วิทย์ เที่ยงบูรณธรรม. 2542. พจนานุกรมสมุนไพรไทย. รวมสาส์น: กรุงเทพฯ.

วีณา จิรัจฉริยากูล. 2534. ยาและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ. ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. กรุงเทพฯ.

ศรีสุดา สุทธิมั่น. 2549. การเสริมพริกป่นและเปลือกมังคุดป่นในอาหารต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต คุณภาพซาก และการควบคุมโรคบิดในไก่เนื้อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาสัตวศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2553. ข้อมูลสถิติการเกษตรกระทรวงเกษตรและสหกรณ์. http://www.oae.go.th/main.php?filename=agri_production

สมคิด พรหมมา และบุญล้อม ชีวอิสระกุล. 2540. ความต้องการโภชนะของโคนมไทย: การประเมินเบื้องต้น. แก่นเกษตร. 25: 165-175.

สมชาย จันทร์ผ่องแสง. 2541. การเลี้ยงโคนม. โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย: กรุงเทพฯ.

สราวุธ เกาะขุนทด. 2545. ผลของมันสำปะหลังตากแห้งทั้งต้น(มันเฮย์)ในอาหารก้อนคุณภาพสูงต่อผลผลิตน้ำนมในโครีดนม. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาสัตวศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น.

สิทธิศักดิ์ คำผา พละ เชาวรัตน์ รังสรรค์ สิงหเลิศ และเมธา วรรณพัฒน์. 2551. ผลของระดับโปรตีนในอาหารข้นร่วมกับข้าวโพดหมักยูเรียต่อกระบวนการหมักในกระเพาะหมักและผลผลิตน้ำนมในโครีดนม. วารสารโคนม. 4: 42-53.

อาภัสสรา ชมิดท์. 2537. ชีวเคมี. สหมิตรออฟเซท. กรุงเทพฯ.

โอภาส พิมพา และทองสุข เจตนา. 2547. การประเมินจุลินทรีย์โปรตีนโดยใช้สารอนุพันธ์พิวรีนในปัสสาวะของสัตว์เคี้ยวเอื้อง. โฟกัสมาสเตอร์พรินต์: พิษณุโลก.

Aharoni, Y., H. Tagari, and R. C. Bosston. 1991. A new approaches to the quantitative estimation of nitrogen metabolic pathway in the rumen. Br. J. Nutr. 66: 407-422.

Akkada, A. R. A., and H. E. Sayed. 1967. The use of ruminal ammonia and blood urea as an index of the nutritive value of protein in some food-stuffs. J. Agric. Sci. (Camb.) 69(1): 25-31.

Aldrich, J. M., L. D. Muller, and G. A. Varga. 1993. Nonstructural carbohydrate and protein effects on rumen Fermentation, nutrients flow, and performance of dairy cows. J. Dairy Sci. 76: 1091-1105.

Ali, C. S., T. Khaliq, and M. Sarwar. 1997. Influence of various sources of non-protein nitrogenous sources on in vitro fermentation patterns of rumen microbes. Asian-Aus. J. Anim. Sci. 10: 357-363.

Al-Rabbat, M. F., R. L. Baldwin, and W. C. Weimer. 1971. Microbial growth dependence on ammonia nitrogen in the bovine rumen: a quantitative study. J. Dairy Sci. 54: 1162-1172.

AOAC. 1985. Official Methods of Analysis (15th Ed.). The Association of Official Analytical Chemistry, Washington, D.C., U.S.A.

Bach, A., S. Calsamiglia, and M. D. Stern. 2005. Nitrogen metabolism in the rumen. J. Dairy Sci. 88: 9-21.

Balcells, J., D. S. Parker, and C. J. Seal. 1992. Purine metabolite concenteations in portal and peripheral blood of steers, sheep and rats. Comp. Biochem. Physiol. 4: 633-636.

Barry, T. N. 1989. Condensed tannins: Their role in ruminant nutrition and carbohydrate digestion and possible effects upon rumen ecosystem. In: The Role of Protozoa and Fungi in Ruminant Digestion.(Eds. J. V. Nolan, R. A. Leng and D. I. Demeyer) Armidale, NSW, Australia.

Barry, T. N., and S. J. Duncan. 1984. The role of condensed tannins in the nutritional value of Lotus pedun- culatus for sheep. Voluntary intake. Br. J. Nutr. 51: 485-491.

Barry, T. N., and T. R. Manley. 1984. The role of condensed tannins in the nutritional value of Lotus pedun-culatus for sheep. Quantilative digestion of carbohydrate and protein. Br. J. Nutr. 51: 493-504.

Bauman, D. E., J. W. Perfield II, M. J. de Veth, and A. L. Lock. 2003. New perspectives on lipid digestion and metabolism in ruminants. Proc. Cornell. Nutr. Conf. pp. 175.

Bauman, D. E., L. H. Baumgard, B. A. Corl, and J. M. Griinari. 2000. Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants. Proceedings of the American Society of Animal Science. pp. 1.

Bromner, J. H., and D. R. Keeney. 1965. Steam distillation methods of determination of ammonium, nitrate and nitrite. Annual. Chem. Acta. 32: 485-495.

Bucholtz, H. F., and W. G. Bergen. 1973. Microbial phospholipid synthesis as a marker for microbial protein synthesis in the rumen. Appl. Microbiol. 25: 504-513.

Casper, D. P., D. J. Schingoethe, and W. A. Eisenbeiz. 1990. Reponse of early lactating dairy cows fed diets varying in source of non-structural carbohydrate and crude protein. J. Dairy Sci. 73: 1039-1050.

Castillo, A. R., E. Kebreab, D. E. Beeve, J. H. Barbi, J. D. Sutton, H. C. Kerby, and J. France. 2001. The effect of energy supplementation on nitrogen utilization in lactating dairy cows fed grass silage diets. J. Dairy Sci. 79: 240-246.

Chen, X. B., A. T. Mejia, D. J. Kyle, and E. R. Ørskov. 1995. Evaluation of the Use of Purine Derivative: Creatinine Ratio in Spot Urine and Samples as an Index of Microbial Protein Supply in Ruminants: Studies in Sheep. J. Agric. Sci. (Camb) 125: 137-143.

Chen, X. B., D. J. Kyle, C. C. Whyte, F. D. Hovell, and E. R. ϕrskov. 1989. Uric acid and allantoin in plasma and saliva of sheep. Prod. Nutr Sci. 48: 88A.

Chen, X. B., F. D. Hovell, E. R. Ørskov, and D. S. Brown. 1990. Excretion of purine derivatives by ruminants: effect of exogenous nucleic acid supply on purine derivative excretion by sheep. Br. J. Nutr. 63: 131-142.

Cheng, K. J., C. W. Forsberg, H. Minato, and J. W. Costerton. 1991. Microbial ecology and physiology of feed degradation with in the rumen. In: Physiological Aspects of Digestion and Metabolism in Ruminant, Tsuda, T., Y. Sasaki, and R. Kawashimal (eds.), Academic Press, Toronto, ON. pp. 264-595.

Cheva-Isarakul, B., and N. Potikanond. 1986. Performance of bulls fed diets containing untreated rice straw and leucaena leaves compare to urea-treated rice straw. Thai J. Agric. Sci. 19: 49-57.

Chikunya, S., C. J. Newborn, L. Rode, X. B. Chen, and R. J. Wallace. 1996. The influence of non protein nitrogen, pre form amino acids and protein in microbial activity in the rumen of sheep receiving diets containing rapidly and slowly degraded fiber sources. Anim. Feed Sci. Technol. 63: 333-340.

Chiquette, J., K. J. Cheng, L. M. Rode, and Miligan. 1989. Effect of tannin on the digestibility of two isosynthetic strains of birdsfoot trefoil (*Lotus coniculatus, L.*) on feed digestibility and rumen fluid composition in sheep. Can. J. Anim. Sci. 69: 1031-1039.

Chouinard, P. Y., L. Corneau, A. Saebo, and D. E. Bauman. 1999. Milk yield and composition during abomasal infusion of conjugated linoleic acid. J. Dairy Sci. 82: 2737-2745.

Coleman, G. S. 1975. Interrelationship between rumen ciliate protozoa and bacteria. In: Digestion and Metabolism in the Ruminant. McDonald, I.W. and A.C.I. Wamer. (Eds.), pp. 149-164. University of New England, Armidale, Australia.

Creighton, K. W., C. B. Wilson, T. J. Klopfenstein, and D. C. Adams. 2003. Undegradable intake protein supplementation of compensating spring-born steers and summer-born steers during summer grazing. J. Anim. Sci. 79: 1944-1953.

Dejajanegara, A., A. R. Ambar, and M. Rangkuti. 1983. Urea treatment during storage to increase utilization of rice straw. In: The Utilization of Fibrous Agricultural Residues, Pearce, G.R. (ed.), Waston Ferguson and Co., Brisbane. pp. 140-143.

Dinn, N. E., J. A. Shelford, and L. J. Fisher. 1998. Use of the cornel net carbohydrate and protein system and rumen-protected lysine and methionine to reduce nitrogen excretion from lactating dairy cows. J. Dairy Sci. 81: 224-237.

Emmanuel, B. 1978. The relative contribution of propionate, and long-chain odd-numbered fatty acids in rumen bacteria. Biochem. Biophys. Acta. 528: 239.

Erwin, J., and K. Bloch. 1963. Lipid metabolism of ciliated protozoa. J. Biol. Chem. 238: 1618.

Fox, I. H. 1978. Degradation of purine nucleotides. In: Uric acid, edited by Kelley, W. N. and Weiner, I.M., Sprimger- Verlag: Berlin, Heidelberg, New York 93-123.

Frank, B., and C. Swensson. 2002. Relationship between content of crude protein in rations for dairy cows and milk yield, concentration of urea in milk and ammonia emissions. J. Dairy Sci. 85: 1829-1838.

Fu, C. J., E. E. D. Felton, J. W. LehmKuhler, and M. S. Kerley. 2001. Ruminal peptide concentration required to optimize microbial growth and efficiency. J. Anim. Sci. 79: 1305-1312.

Fulco, A. J. 1983. Fatty acid metabolism in baceria. Prog. Lipid Res. 22: 133-160.

Galo, E., S. M. Emanuele., C. J. Sniffen., J. H.White, and J. R. Knapp. 2003. Effects of a polymer-coated urea product on nitrogen metabolism in lactating Holstein dairy cattle. J. Dairy Sci. 86: 2154-2162.

Galyean, M. 1989. Laboratory Procedure in Animal Nutrition Research. Department of Animal and Life Science. New Mexico State University, U.S.A.

Gerson, T., A. John, and A.S.D. King. 1985. The Effect of dietary stray starch and fiber on the in vitro rates of lipolysis and biohydrogenation by sheep rumen digesta. J. Agric. Sci. (Camb). 105: 27-30.

Giesecke, D., L. Ehrentreich, and M. Stangassinger. 1994. Mammary and renal excretion of purine metabolites in relation to energy intake and milk yield in dairy cows. J. Dairy Sci. 77: 2376–2381.

Goering, H. K., and P. J. Van Soest. 1970. Forage Fiber Analysis. Agriculture Hand book No. 379. United State Department of Agriculture, Washington, D.C., U.S.A.

Griswold, K. E., G. A. Apgar., J. Bouton, and J. L. Firkins. 2003. Effects of urea infusion and ruminal degradable protein concentration on microbial growth, digestibility and fermentation in continuous culture. J. Anim. Sci. 81: 329-336.

Gustafsson, A. H., and D. L. Palmquist. 1993. Diurnal variation of rumen ammonia, serum urea, and milk urea in dairy cows at high and low yield. J. Dairy Sci. 76: 475-484.

Gutierrez, J., R. E. Davis, and E. J. Warwick. 1960. The rumen ciliates and their relationship to the host. Proc Conf. on Radioactive Isotopes in Agriculture, Oklahoma, U.S. Atomic Energy Commission, p. 197.

Haig, P. A., T. Mutsvangwa, R. Spratt, and B. W. Mcbride. 2002. Effect of dietary protein solubility on nitrogen losses from lactating dairy cows and comparison with predictions from the Cornell Net Carbohydrate and Protein System. J. Dairy Sci. 85: 1208-1217.

Harfoot, C. G., M. L. Crouchman, R. C. Noble, and J. H. Moore. 1974. Competition between food particles and rumen bacteria in the uptake of long-chain fatty acids and triglycerides. J. Appl. Bacteriol. 37: 633-641.

Harfoot, C. G., R. C. Noble, and J. H. Moore. 1973. Food particle as a site for biohydrogenation of unsaturated fatty acids in the rumen. Biochem. J. 132: 829-832.

Harfoot, C. G., R. C. Noble, and J. H. Moore. 1975. The role of plant particles, bacteria and cell-free supernatant fractions of rumen contents in the hydrolysis of trilinolein and the subsequent hydrogenation of linoleic acid. Ant. Va Leewenhoek J. Microbiol. Serol. 41: 533-542.

Hart, F. J., and M. Wanapat. 1992. Physiology of digestion of urea-treated rice straw in swamp buffalo. Asian-Australasian J. Anim. Sci. 5: 617-626.

Hazlewood, G. P., P. Kemp, D. Lander, and R. M. C. Dawson. 1976. C18 unsaturated fatty acid hydrogenation patterns of some rumen bacteria and their ability to hydrolyse exogenous phospholipids. Br. J. Nutr. 35: 293-297.

Henderson, C. 1973. The effect of fatty acids on pure cultures of rumen bacteria. J. Appl. Bacteriol. 36: 187-188.

Henning, P. H., D. G. Steyn, and H. H. Meissner. 1993. Effect of synchronization of energy and nitrogen supply on ruminal characteristics and microbial growth. J. Anim. Sci. 71: 2516-2528.

Higginbotham, G. E., J. J. Huber, M. V. Wallentine, N. P. Johnston, and D. Andri. 1989. Influence of protein percentage and degradability on performance of lactating cows during moderate temperature. J. Dairy. Sci. 72: 1818-1825.

Hobson, P. N. 1969. Rumen bacteria. Meth Microbe. 3B: 53.

Hoover, W. H, and S. R. Stokes. 1991. Balancing carbohydrate and proteins for optimum rumen microbial yield. J. Dairy Sci. 74: 3630-3644.

Houseknecht, K. L., J. P. V. Heuvel, and S. Y. M. Camarena. 1998. Dietary conjugated linoleic acid normalizes impaired glucose tolerance in the Zucker diabetic fatty fa/fa rat. Biochem. Biophys. Res. Commum. 244: 678-682.

Huber, J. T., and L. Jr. Kung. 1981. Protein and non-protein nitrogen utilization in dairy cattle. J. Dairy Sci. 64: 1170-1195.

Hungate, R. E. 1969. A Roll Tube Method for Cultivation of strict Anaerobes. In: Methods in Microbiology. (Eds., J.R. Norris and D.W. Ribbons). New York. Academic. 313p.

Hwang, S. Y., M. J. Lee, and H. C. Peh. 2001. Dirnal vaiations in milk and blood urea nitrogen and whole blood ammonia antrogen in dairy cows. Asian-Aust. J. Anim. Sci. 14: 1683-1689.

Ikwuegbu, O. A., and J. D. Sutton. 1982. The effect of varying the amount of linseed oil supplementation on rumen metabolism in sheep. Br. J. Nutr. 48: 365-375.

Immig, V. I., S. J. Wirth, G. A. Wolf, and H. Abel. 1991. Quantifizierung der cellulaseaktivitat und nachweis von fettsaure-coating-effekten im pansen von schafen. J. Anim. Physiology. Anim. Nutr. 66: 45-52.

Jenkins, T. C. 1993. Lipid metabolism in the rumen. J. Dairy Sci. 76: 3851-3863.

Jenkins, T. C., and D. L. Palmquist. 1984. Effect of fatty acids or calcium salts on rumen and total nutrient digestibility of dairy rations. J. Dairy Sci. 67: 978-986.

Jenkins, T. C., and N. Fotouhi, 1990. Effects of lecithin and corn oil on site of digestion, ruminal fermentation and microbial protein synthesis in sheep. J. Anim. Sci. 68: 460-469.

Jetana, T., N. Abdullah, R. A. Halim, S. Jadaludin, and Y. W. Ho. 2003a. Measurement Method of Microbial Nitrogen in Rumen of Sheep Supplementated with Energy and Protein : A Comparative of Microbial Nitrogen with Direct Measurement Method and Using Allantoin Excretion in the Urine. The 41th Kasetsart University Annual Conference, 3-7 Febuary, 2003. Bangkok, Thailand.

Jetana, T., W. Suthikrai, S. Urawang, S. Kijsamraj, and S. Sophon. 2003b. The Use Urinary Purines for Prediction Microbial Protein Production in Rumen : Using Spot Sampling Times for Prediction Microbial Protein in the Rumen of Brahman Cattle. The 41th Kasetsart University Annual Conference, 3-7 Febuary, 2003, Kasetsart University, Bangkhen, Bangkok, Thailand pp.82-95.

Joblin, K. N. 1981. Isolation, enumeration and maintenance of rumen anaerobic fungi in roll tube. Appl. Environ. Microbiol. 42: 1119-1122.

Jones, G. A., T. A., McAllister, A. D. Muir, and K. J. Cheng. 1994. Effects of Sainfoin (Onobrychis viciifolia Scop.) Condensed Tannins on Growth and Proteolysis by Four Strains of Ruminal Bacteria. Appl Environ. Microbiol. 60: 1374–1378.

Jones,W. T., and J. L. Mangan. 1977. Complexes of the condensed tannins of sainfoin (Onobrychis viciifolia, Scop) with fraction 1 leaf protein and with submaxillary mucoprotein and their reversal by polyethyleneglycol and pH. J. Sci. Food. Agric. 28: 126-136.

Jonker, J. S., R. A. Kohn, and R. A. Erdman. 1998. Using milk urea nitrogen to predict nitrogen excretion and utilization in lactating dairy cows. J. Dairy Sci. 81: 2681-2692.

Jonker, J. S., R. A. Kohn, and R. A. Erdman. 1999. Milk urea nitrogen target concentration for lactating dairy cows fed according to national research council recommendations. J. Dairy Sci. 82: 1261-1273.

Kamio, Y., Y. Itoh, and Y. Terawaki. 1981. Chemical structure of peptidoglycan in Selenomonas ruminantium: Cadaverine links covalently to the D-glutamic acid residue of peptidoglycan. J. Bacteriol., 146: 49-53.

Kanpukdee, S., and M. Wanapat. 2007. Study on ruminal degradability of local plants by using nylon bag technique. MSc Thesis. Swedish University of Agricultural Sciences.

Kanpukdee, S., and M. Wanapat. 2008. Effects of mangosteen *(Garcinia mangostana)* peel and sunflower and coconut oil supplementation on rumen fermentation, milk yield and milk composition in lactating dairy cows. Livest Res Rural Devel. 20. (supplement). http://www.lrrd.org/lrrd20/supplement/such1.htm

Kemp, P., and D. J. Lander. 1984. Hydrogenation in vitro of alpha-linoleinic acid to steric acid by mixed cultures of pure strains of rumen bacteria. J. Gen. Microbiol. 130: 527-533.

Kemp, P., R. W. White, and D. J. Lander. 1975. The hydrogenation of unsaturated fatty acids by five bacterial isolates from the sheep rumen, including a new species. J. Gen. Microbiol. 90: 100-114.

Kepler, C. R., K. P. Hirons, J. J. McNeill, and S. B. Tove. 1966. Intermediates and products of the biohydrogenation of linoleic acid by Butyrivibrio fibrisolvens. J. Biol. Chem. 241: 1350-1354.

Khiaosa-Ard, R., S. F. Bryner, M. R. L. Scheeder, H.-R. Wettstein, F. Leiber, M. Kreuzer, and C. R. Soliva. 2009. Evidence for the inhibition of the terminal step of ruminal α-linolenic acid biohydrogenation by condensed tannins. J. Dairy Sci. 92: 177-188.

Kittiworawech, S., M. Wanapat, K. Sommart, D. S. Parker, P. Rowlinson, and W. Toburan. 1995. Effect of source and protein level on digestibility, ruminal fermentation and urinary purine excretion in swamp buffaloes. In: Proceedings of the international workshop on draft animal power to increase farming efficiency and sustainability. Khon Kaen University. Thailand.

Knaus, W. F., D. H. Beermann, P. J. Guiroy, M. L. Boehm, and D. G. Fox. 2001. Optimization of rate and efficiency of dietary nitrogen utilization through the use of animal by-products and (or) urea and their effects on nutrient digestion in Holstein steers. J. Anim. Sci. 79: 753-760.

Knight, R., J. D. Sutton, J. E. Story, and P. E. Brumby. 1979. Rumen microbial synthesis of long-chain fatty acids. Proc. Nutr. Soc. 38: 4A.

Koenig, K. M., K. A. Beuchemin, and L. M. Rode. 2003. Effect of grain processing and silage on microbial protein synthesis and nutrient digestibility in beef cattle fed barley-based diets. J. Anim. Sci. 80: 336-3346.

Kröber, T. F., D. R. Külling, H. Menzi, F. Sutter, and M. Kreuzer. 2000. Quantitative effects of feed protein reduction and methionine on nitrogen use by cows and nitrogen emission from slurry. J. Dairy. Sci . 83: 2941–2951.

Latham, M. J., J. E. Storry, and M. E. Sharpe. 1972. Effect of low-roughage diets on the microflora and lipid metabolism in the rumen. Appl. Microbiol. 24: 871-877.

Lennarz, W. J. 1966. Lipid metabolism in the bacteria. Adv. Lipid Res. 4: 175-225.

Lewis, D. 1957. Blood-urea concentration in relation to protein utilization in the ruminant. J. Agri. Sci. 48: 438-446.

Ling, J. R., and I. P. Armstead. 1995. The *in vitro* uptake and metabolism of peptides and amino acids by five species of rumen bacteria. J. Appl. Bacteriol. 78: 116-124.

Liu, Q., C. Wang, Y. X. Huang, K. H. Dong, W. Z. Yang, and H. Wang. 2008. Urinary purine derivatives. Effect of lanthanum on fermentation, urinary excretion of purine derivatives and digestibility in steers. Anim. Feed Sci. Technol. 142: 121-132.

Lowry, J. B., C. S. McSweeney and B. Palmer. 1996. Changing perceptions of the effect of plant phenolics on nutrient supply in the ruminant. Aust. J. Agric. Res. 47: 829-842.

Ludden, P. A., T. L. Wechter, and B. W. Hess. 2002. Effects of oscillating dietary protein on nutrient digestibility, nitrogen metabolism, and gastrointestinal organ mass in sheep. J. Anim Sci. 80: 3021-3026.

Maeng, W. J., C. J. Van Nevel, R. L. Baldwin, and J. G. Morris. 1976. Rumen microbial growth rates and yields: effect of amino acids and protein. J. Dairy Sci. 59: 68-79.

Makkar, H. P. S., M. Blummel, and K. Beckar. 1995. Effect of in vitro and interaction between tannins and saponins and take of tannins in rumen. J. Sci. Food. Agric. 69: 481-493.

Mansfield, H. R., M. I. Endres, and M. D. Stern. 1994. Infuence of Non-fibrous Carbohydrate and Degradable Intalte Protein on Fermentation by Ruminal Microorganisms in Continuous Culture. J. Anim. Sci. 72: 2464-2474.

Marini, J. C., and M. E. Van Amburgh. 2003. Nitrogen metabolism and recycling in Holstein heifers. J. Anim. Sci. 81: 545-552.

McAllan, A. B. 1980. The degradation of nucleic acid in, and the removal of breakdown products from the small intestines of steers. Br. J. Nutr. 44: 99-112.

McCarthy, R. D., T. H. Jr. Klusmeyer, J. L. Vicini., J. H. Clark, and D. R. Nellson. 1989. Effect of source of protein and carbohydrate on ruminal fermentation and passage of nutrients to the small intestine of lactating cows. J. Dairy Sci. 72: 2002-2016.

McLeod, M. N. 1974. Plant tannins- their role in forage quality. Nutr. Abst. & Reviews. 44: 803.

McNabb, W. C., G. C. Waghorn, T. N. Barry, and I. D. Shelton. 1993. The effect of condensed tanninin Lotus pedunculatus on the digestion and metabolism of merhionine, cystine and inorganic sulphur in sheep. Br. J. Nutr. 70: 674-661.

Morton, J. 1987. Mangosteen. In: Fruits of warm climates. Creative Resource Systems, Inc. Miami.

Murdiati, T. B., C. S. McSweeney, and J. B. Lowry. 1992. Metabolismin sheep of gallic acid, tannic acid and hydrolysable tannin from Terminalia oblongata. Aust. J. Agric. Res. 43: 1307-1319.

Murray, R. K., D. K. Granner, P. A. Mayes, and V. W. Rodwell. 1990. Harper's Biochemistry. 23rd ed. Connecticut: Appleton and Lange Company. 142-153.

Nakamura, K., and T. Fujihara. 1994. The effect of dietary energy levels on microbial yield in the rumen of sheep. Sustainable animal production and the environment. Proceedings of the 7th AAAP Animal Science Congress, Bali, Indonesia 3: 57-58.

Ngamsaeng, A., and M. Wanapat. 2006. Effect of mangosteen peel (*Garcinia mangostana)* supplementation on rumen ecology,microbial protein synthesis, digestibility and voluntary feed intake in beef steers. J. Nutr. 5: 445-452.

Ngamsang, A., M. Wanapat, and C. Wachirapakorn. 2000. A comparative study of 2 and 5% urea-treated rice straw on ruminal ecology, digestibility and dry matter intake in swamp buffaloes. In Proc. The 9th congress of the Asian-Australasian Association of Animal Production Society of Animal Production, University of New South Wales, Sydney, Australia, July 3-7. 13: 544-550.

Noble, R. C. 1978. Digestion, absorption and transport of lipids in ruminant animsls. Progress in Lipid Research. 17: 55-91.

Nocek, J. E., and Russell. 1988. Protein and energy as an integrated system. Relationship of ruminal protein and carbohydrate availability to microbial synthesis and milk production. J. Dairy Sci. 71: 2070-2107.

Norton, B. W. 1999. The significance of tannins in tropical animal production, Proceedings of "Tannin in Livestock and Human Nutrition". 31 May-2 June 1999. Adelaide, Australia. pp. 14-23.

Nousiainen, J., K. J. Shingfield, and P. Huntanen. 2004. Evaluation of milk urea nitrogen as a diagnostic of protein feeding. J. Dairy Sci. 87: 386-398.

NRC. 1988. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 6th ed. National Academic Press. U.S.A.: Washington. D.C.

NRC. 1989. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 6th rev. ed. National Academic Press. U.S.A.: Washington. D.C.

NRC. 2001. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 7th ed. National Academic Press. U.S.A.: Washington. D.C.

Oldham, J. D. 1984. Protein-Energy Interrelationship in Dairy Cows. J. Dairy Sci. 67: 1090-1114.

Oltner, R., and H. Wiktorsson. 1983. Urea concentrations in milk and blood as influenced by feeding varying amounts of protein and energy to dairy cows. Livest. Prod. Sci. 10: 457-467.

Onwuka, C. F. I. 1992. Tannin and saponin contents of some tropical browse species fed goats. Trop. Agric. 69: 176-182.

Orpin, C. G. 1975. Studies on the rumen flagellate Neocallimastix frontalis. J Gen. Microbiol. 91: 249-262.

Orpin, C. G. 1989. Ecology of rumen anaerobic fungi in relation to the nutrition of the host animal. In The Role of Protozoa and Fungi in Ruminant Digestion (OECD/UNE International Seminar), pp. 1-10. Edited by J.V. Nolan, R.A. Leng, and D.I. Demeyer. Armidale, New South Wales: Penambul.

Palmquist, D. L., M. R. Weisbjerg, and T. Hvelplund. 1993. Ruminal, intestinal, and total digestibilities of nutrients in cows fed diets high in fat and undegradable protein. J. Daily Sci. 76: 1353-1364.

Palmquist, D. L., and T. C. Jenkins. 1980. Fat in lactation rations. J. Dairy Sci. 63: 1-14.

Parker, D. S. 1995. The use of urinary purine excretion as a marker for microbial protein flow in buffaloes. In: Proceedings of the international workshop on draft animal power to increase farming efficiency and sustainability. Khon Kaen University. Thailand.

Patton, R. A., R. D. McCarthy, and L. C. Griel. 1970. Lipid synthesis by rumen microorganisms. II. Further characterization of the effects of methionine. J. Dairy Sci. 53: 460-465.

Perez, J. F., J. J. Balcells., H. L., Gonda, and C. Castrillo. 1996. Determination of rumen microbial-N production in sheep: A comparison of urinary purine excretion with method using 15-N and bases as markers of microbial-N entering the duodenum. Br. J. Nutr. 75: 699-705.

Peterson, A. B. 2006. Estimation of rumen microbial protein production and ruminal protein degradation. Dissertation submitted to the Faculty of the Graduate School of the University of Maryland-College Park in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy.

Pimpa, O. 2002. Urinary Purine derivatives Excretion as a method for estimation of rumen microbial protein production in swamp buffaloes and zebu cattle. PhD thesis, University Putra Malaysia, Malaysia.

Pimpa, O., J. B. Liang, J. Balcells, Z. A. Jelan, and N. Abdullah. 2001. Recovery rate of plasma purine derivatives in the urine of swamp buffaloes (*Bubalus bubales*) with special references to differences with zebu cattle. In: Proceedings of the Second Symposium on Sustainable Utilization of Agricultural Byproducts for Animal Production, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand, July 2001: 26-67.

Pimpa, O., J. B. Liang, Z. A. Jelan, and N. Abdullah. 2003. Response of urinary purine derivatives excretion to feed in take in swamp buffaloes and zebu cattle. Chiang Mai J. Sci. 2003; 30(1): 47-55.

Pimpa, O., M. Wanapat, K. Sommart, S. Uriyapongson, and D. Parker. 1996. Effect of level of NH_3-N on straw intake, digestibility and microbial protein synthesis in swamp buffaloes. In: Proceedings of The 8th AAAP Animal Science Congress, October 13-18 1996, Tokyo, Japan.

Preston, R. R., and R. A. Leng. 1987. Matching Ruminant Production System with Available Resources in the Tropic and Sub-tropics. Penabul Books: Armidale, New South Wales, Australia.

Promma, S., S. Tuikumpee, P. Jeenklum, and T. Indratula. 1993. Effect of varying dietary levels of total digestible nutrients, protein and fiber on the growth of crossbred Holstein heifer fed urea-treated rice straw diets under two feeding systems. Asian-Aust. J. Anim. Sci. 6: 91-97.

Punia, B. S., J. Leibhoiz, and G. J. Feedmey. 1992. Rate of production of protozoa in the rumen and flow of protozoal nitrogen to the duodenum in sheep and cattle given a pelleted diet of luceme hay and barley. J. Agric. Sci. Camb. 118: 229-236.

Puwastien, P., M. Raroengwichit, P. Sungpuag and K. Judprasong. 1999. Thai food composition tables. 1st ed. Nakhon Pathom (Thailand) : Institute of Nutrition, Mahidol University. Bankok.

Reed, J. D. 1995. Nutritional toxicology of tannin and related polyphenols in forage legumes. J. Anim. Sci. 73: 1516-1528.

Reed, J. D., E. McDowell, P. J. Van Soest, and P. J. Horvath. 1982. Condensed tannins: A factor limiting the use of cassava forage. J. Sci. Food Agri. 33: 213-220.

Resines. J. A., M. J. Arin, and M. T. Diez. 1992. Determination of creatinine and purinderivatives in ruminant urine by reverse phase high performance liquid chromatography. J. Liquid. Chomato. 607: 199.

Reynal, S. M., G. A. Broderick, and C. Bearzi. 2005. Comparison of four markers for quantifying microbial protein flow from the rumen of lactating dairy cows. J. Dairy Sci. 88: 4065–4082.

Roselers, D. K., J. D. Ferguson, C. J. Sniffen, and J. Herrema. 1993. Dietary protein degradability effects on plasma and milk urea nitrogen and milk nonprotein nitrogen in Holstein cows. J. Dairy Sci. 76: 525-534.

Russell, J. B., J. D. O'Connor, D. G. Fox, P. J. Van Soest, and C.J. Sniffen. 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets. I. ruminal fermentation. J. Anim. Sci. 70: 3551-3561.

Russell, J. B., R. E. Muck, and P. J. Weimer. 2009. Quantitative analysis of cellulose degradationand growth of cellulolytic bacteria in therumen. FEMS Microbiol. Ecol., 67: 183-197.

Saadullah, M., and M. Haque. 1983. Effect of chemical treatment of rice straw supplemented with concentrate on feed intake and weight gain in growing calves. In: The Utilization of Fibrous Agricultural Residues, Pearce, G.R. (ed.), Waston Ferguson and Co., Brisbane. pp. 129-136.

Sammaraweera, L. 1995. A study on Purine Derivatives Excretion in Buffalo. Master Thesis. University of Aberdeen United Kingdom.

Samuel, M., S. Sagathewan, J. Thomas, and G. Mathen. 1997. An HPLC method for estimation of volatile fatty acids of ruminant fluid. Indian. J. Anim. Sci. 67: 805-807.

Sannes, R. A., M. A. Messman, and A. Vagnoni. 2002. Form of rumen-degradable carbohydrate and nitrogen on microbial protein synthesis and protein efficiency of dairy cows. J. Dairy Sci. 85: 900-908.

Santos, F. A. P., J. E. P. Santos, and C. B. Vagnoni. 1998. Effects of rumen-undegradable protein on dairy cow performance. A 12-year literature review. J. Dairy Sci. 81: 3182-3213.

SAS, User's Guide: Statistic, Version 5th. Edition. 1996. SAS. Inst Cary, NC., U.S.A.

Satter, L. D., and L. L.Slyter. 1974. Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production in vitro. Brit. J. Nutr. 32: 199-208.

Schneider, B. H., and W. P. Flatt. 1975. The Evalution of Feed through Digestibility Experiment. Athens: The University of Georgia Press, Georia, U.S.A.

Smith, R. H., and A. B. McAllan. 1970. Nucleic acid metabolism in the ruminant. 2. Formation of microbial nucleic acids in the rumen in relation to the digestion of food nitrogen and the rate of dietary nucleic acids. Br. J. Nutr. 24: 545-556.

Song, M. K. 2000. Fatty acid metabolism by rumen microorganisms. Asian-Aust. J. Anim. Sci. 13: 137-143.

Stryer, L. 1995. Biosynthesis of nucleotides. Biochemistry 4th editions; W. H. freeman & Co., New York.

Sutton, J. D. 1985. Digestion and absorption of energy substrates in the lactating cow. J. Dairy Sci. 68: 3376-3393.

Tamminga, S. 1996. A review on envoronmental impacts of nutritional strategies in ruminants. J. Anim. Sci. 74: 3112-3124.

Theodorou, M. K., S. E. Lowe, and A. P. J. Trinci. 1991. Anaerobic fungi and the rumen ecosystem. In: The Fungal Community, pp. 43-71. Edited by G. C. Carroll & D. T. Wicklow. New York: Marcel Dekker.

Van Horn, H. H., D. R. Jacobson, and A. P. Graden. 1969. Influence of level and source of nitrogen on milk production and blood components. J. Dairy Sci. 52: 1395-1403.

Van Keulen, J., and B. A. Young. 1977. Evaluation of acid insoluble ash as a neutral markrin ruminant digestibility studies. J. Anim. Sci. 44: 282-292.

Van Soest, P. J. 1982. Nutritional ecology of the ruminant. O&B Books, Inc. Corvallis, Oregon, U.S.A.

Van Soest, P. J. 1994. Nutritional Ecology of the Ruminant. Second ed. Cornell University Press, Ithaca, NY. 476p.

Veen, W. A. G. 1986. The influence of slowly and rapidly degradable concentrate protein on a number rumen parameters in dairy cattle. Nether J. Agri. Sci. 34: 199-214.

Verbic, J., X. B. Chen, N. A. Macleod, and E. R. ϕrskov. 1990. Excretion of purine derivatives by ruminants. Effect of microbial nucleic acid infusion on purine derivative excretion by steers. J. Agric. Sci. (Camb). 144: 243-248.

Verhulst, A., G. Semjen, U. Meerts, G. Janssen, G. Parmentier, S. Asselberghs, H. Van Hespen, and H. Eyssen. 1985. Biohydrogenation of linoleic acid by *Clostridium sporogenes*, *Clostidium bifermentans*, *Clostidium sordellii* and *Bacteriodes* sp. FEMS Microbiol. Ecol. 31: 255-259.

Volden, H. 1999. Effects of level of feeding and ruminally undegraded protein on ruminal bacterial protein synthesis, escape of dietary protein, intestinal amino acid profile and performance of dairy cows. J. Anim. Sci. 77: 1905-1918.

Waghorn, G. C., M. J. Ulyatt, A. John, and M. T. Fisher. 1987. The effect of condensed tannins on the site of digestion of amino acid and other nutrients in sheep fed on *Lotus corniculatus*, L. Br. J. Nutr. 57: 115-126.

Wainman, F. W., and P. J. S. Dewey. 1987. The energy value to sheep of saturated fat fed singly or in combination. Anim. Prod. 44-227-232.

Wallace, R. J. 1997. Peptide metabolism and its efficiency in ruminant production. In Rumen Microbes and Digestive Physiology in Ruminants. Japan Sci. Soc. Press. Tokyo/S. Karger, Basel.

Wallace, R. J., and C. A. McPherson. 1987. Factors affecting the rate of breakdown of bacterial protein in rumen fluid. Br. J. Nutr. 58: 313-323.

Wanapat, M. 1983. Alkali treatments of crop residues in Norway. In: The utilization of fibrous agricultural residues as animal feed. P. T. Doyle (Editor), University of Melbourne Printing Services, Parkville.

Wanapat, M. 1990. Nutrition Aspects of Ruminant Production in Southeast Asia with Special References to Thailand. Dept. of Anim. Sci. Khon Kaen University, Khon Kaen.

Wanapat, M. 1999. Feeding of ruminants in the tropics based on local feed resources. Khon Kaen Publ. Comp. Ltd., Khon Kaen, Thailand. 236 pp.

Wanapat, M. 2000. Nutritional control to reduce nitrogen excretion from cattle. Paper presented at the International Conference on Public Health Issues in Animal Production/Animal Products, organized by Cooperation, Beijing, China, October 15-19.

Wanapat, M., and C. Wachirapakorn. 1990. Utilization of roughage and concentrate by feedlot swamp buffaloes (*B. bubalis*). Asian-Aust. J. Anim. Sci. 3: 195-204.

Wanapat, M., F. Sundstol, and T. M. Garmo. 1985. A comparison of alkali treatment methods to improve the nutritive value of straw. I. Digestibility and metabolizability. Anim. Feed Sci. Technol. 12: 295-309.

Wanapat, M., A. Petlum, and O. Pimpa. 1999. Strategic supplementation with a high-quality feed block on roughage intake, milk yield and composition and economic return in lactating dairy cows. Asian-Aus. J. Anim. Sci. 12: 901-903.

Wanapat, M., K. Sommart, O. Pimpa, and S. Boonsorn. 1996. Supplementation of high quality feed pellet to increase milk productivity at small holder farmers level. In : Proc. The 8th AAAP Animal Science Congress, Japanese Society of Zootechnical Science, Tokyo, VII : 158.

Wanapat, M., and C. Devendra. 1985. Relevance of Crop Residues as Animal Feed in Developing Countries. (Eds. M. Wanapat and C. Devendra). Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand.

Wanapat, M., and O. Pimpa, 1999. Effect of ruminant NH_3-N levels on ruminal fermentation, purine derivertive, digestibility and rice straw intake in swam buffalo. Asian – Aus. J. Anim. Sci. 12: 904-907.

Wanapat, M., S. Polyorach, K. Boonnop, C. Mapato, and A. Cherdthong. 2009. Effect of rice straw with urea or urea and calcium hydroxide upon intake, digestibility, rumen fermentation and milk yield of dairy cows. J. Liv. Sci. 125: 238-243.

Wanapat, M., T. Puramongkol, and W. Siphuak. 2000b. Feeding of cassava hay for in lactating dairy cows. Asian-Aus. J. Anim. Sci. 13: 478-482.

Wang, Y., G. C. Wagrhorn, T. N. Barry, and L. D. Shelton. 1994. The effect of condensed tannins in *Lotus coniculatus* on plasma methabolism of methionine, cystine and inorganic supply by sheep. Br. J. Nutr. 72: 923-935.

Wattiaux, M. A., and K. L. Karg. 2004. Protein level for alfalfa and corn silage-based diets : I. Lactational response and milk urea nitrogen. J. Dairy Sci. 87: 3480-3491.

Williams, A. G., and G. S. Coleman. 1992. The Rumen Protozoa. Springer-Verlag, New York.

William, M. 2005. The history of Sumatra. J. M'Creery, Black-Horse-Court : London.

Woodward, A., and J. D. Reed. 1997. Nitrogen metabolism of sheep and goats consuming brevisspica and Sesbenia sesban. J. Anim. Sci. 75: 1130-1139.

Wu, Z., and L. D. Satter. 2000. Milk production during the complete lactation of dairy cows fed diets containing different amounts of protein. J. Dairy Sci. 83: 1042-1051.

Yu, Z., and M. Morrison. 2004. Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. Biotechniques 36: 808-812.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
การเผยแพร่ผลงานวิทยานิพนธ์

การเผยแพร่ผลงานวิทยานิพนธ์

วารสารระดับชาติ

1. ฐิติมา นรโภค และเมธา วรรณพัฒน์. 2553. ผลของระดับโปรตีนและเปลือกมังคุดอัดเม็ดในสูตรอาหารข้นต่อความสามารถในการย่อยได้และนิเวศวิทยารูเมนในโครีดนม. แก่นเกษตร. 38: 30-34.

วารสารระดับนานาชาติ

1. Norrapoke, T., and M. Wanapat. 2011. Effect of protein level and mangosteen peel pellets (Mago-pel) in concentrate diets on rumen fermentation and milk production in lactating dairy cows. Journal of Zhejiang University-Science B. (Submitted). *(IF=1.6)*.

งานประชุมวิชาการระดับนานาชาติ

1. Norrapoke, T., M. Wanapat, and P. Pakdee. 2011. Effects of protein level and mangosteen peel pellets (Mago-pel) in concentrate diets on rumen fermentation and milk production in lactating dairy cows. In: Proceedings of The International Conference on Sustainable Community Development, Future Community: Foundation for Sustainable Development. January 27-29, 2011. Mongkutpet Room, Kosa Hotel, Khon Kaen, Thailand. pp. 14-18.

ภาคผนวก ข

การผลิตเปลือกมังคุดอัดเม็ด (Mago-Pel)

การผลิตเปลือกมังคุดอัดเม็ด (Mago-Pel)

1. ขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบและกรรมวิธีในการอัดเม็ดเปลือกมังคุด (Mago-Pel)

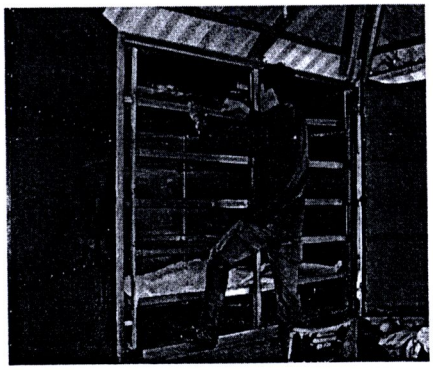
การเตรียม Mago-pel โดยใช้เปลือกมังคุดที่ปราศจากเมล็ดและจุกสีเขียว นำไปตากแดดให้แห้งประมาณ 2-3 วัน หลังจากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 2-3 วัน แล้วนำมาบดให้ละเอียดผ่านตะแกรงขนาด 0.1 มิลลิเมตรและหลังจากนั้นนำไปผสมคุกเคล้ากับแป้งมันสำปะหลังในอัตราส่วน 99.5:0.5 ตามลำดับ หลังจากนั้นนำส่วนผสมที่คลุกเคล้ากันดีแล้วมา 5 กิโลกรัม ผสมกับน้ำประมาณ 800 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วไปทำการอัดเม็ด หลังจากอัดเป็นเม็ดแล้วนำมาตากแดดประมาณ 1-2 วัน เพื่อง่ายต่อการเก็บรักษาต่อไป

องค์ประกอบทางเคมีของเปลือกมังคุดอัดเม็ด (Mago-pel)

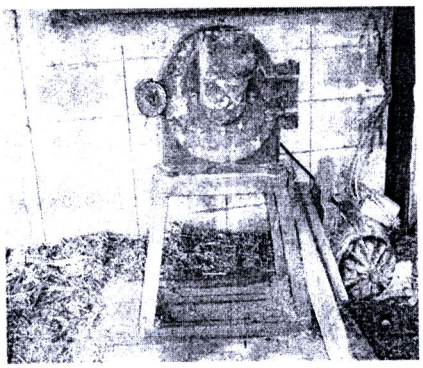
รายการ	DM	TDN	CP	CT	SP	EE	จำนวนที่ใช้
	----------%DM----------						
แป้งมัน	0.45	0.35	0.001	0	0	0.0002	0.5
MSP	94.82	69.65	21.39	17.72	11.75	0	99.5
รวม	95.27	70.00	21.39	17.72	11.75	0.0002	100

ภาพที่ 1. แสดงผลมังคุด

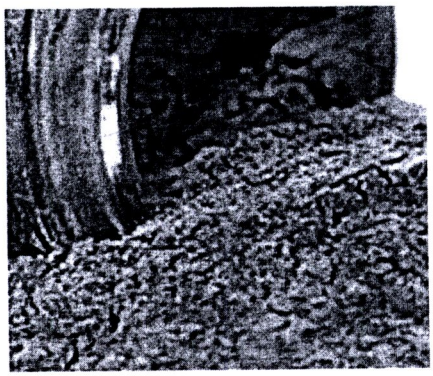
ภาพที่ 2. แสดงเปลือกมังคุดตากแดด



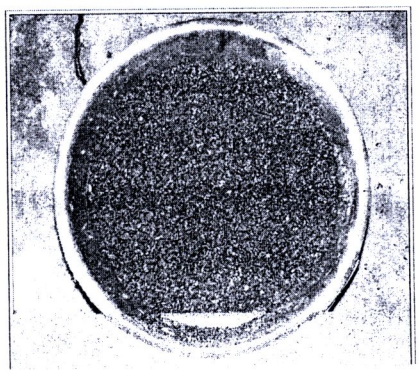
ภาพที่ 3. แสดงการอบเปลือกมังคุด



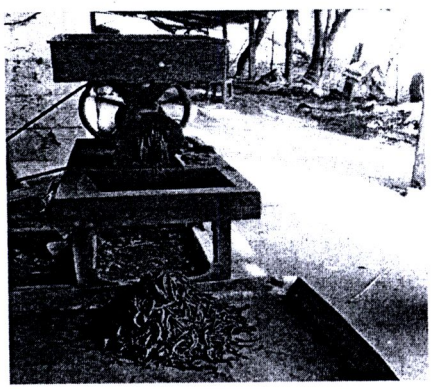
ภาพที่ 4. แสดงเครื่องบดเปลือกมังคุด



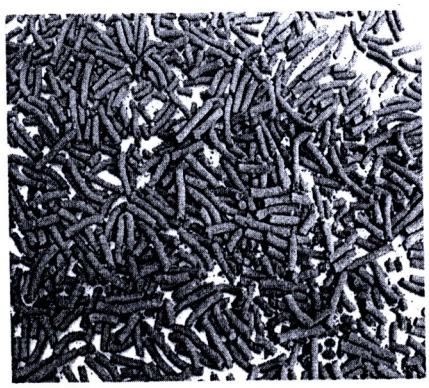
ภาพที่ 5. แสดงเปลือกมังคุดที่บดผ่านตะแกรง 0.1 มิลลิเมตรแล้ว



ภาพที่ 6. แสดงส่วนผสมที่คลุกเคล้าเสร็จพร้อมอัดเม็ด



ภาพที่ 7. แสดงการอัดเม็ดเปลือกมังคุด



ภาพที่ 8. แสดงการตากอาหารอัดเม็ดหลังจากอัดเสร็จ

ภาคผนวก ค

เทคนิคทางจุลชีววิทยาในการศึกษาจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมน

เทคนิคทางจุลชีววิทยาในการศึกษาจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมน

1. การศึกษาเกี่ยวกับ Microscopic direct count (Galyean, 1989) ได้แก่

Bacteria count

Protozoa count

Fungal zoospores count

1.1 วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษา

1.1.1 สารเคมี

- Normal saline (0.85% w/v)
- Formalin (10% v/v)
- น้ำกลั่น

1.1.2 อุปกรณ์

- Haemacytometer ขนาด กว้าง 1 มิลลิเมตร ยาว 1 มิลลิเมตร และลึก 0.1 มิลลิเมตร
- ขวดพลาสติกสำหรับเก็บตัวอย่าง ขนาด 30 มิลลิลิตร
- สไลด์พร้อม cover glass
- บีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร
- กระดาษทิชชู
- หลอดทดลองขนาด 20 มิลลิลิตร
- ปิเปต
- กล้องจุลทรรศน์ (Model Olympus BX50)

1.2 การเตรียม formalin 10% in normal saline (fixing solution)

1.2.1 เตรียม normal saline ให้มีความเข้มข้น 0.85% (w/v)

1.2.2 เตรียม formalin ให้มีความเข้มข้น 10% (v/v) โดยใช้ normal saline (0.85%) เป็นตัวทำละลาย

1.3 การเก็บตัวอย่างเพื่อใช้ในการศึกษา

1.3.1 ทำการสุ่มเก็บของเหลวจากกระเพาะรูเมน โดยสุ่มเก็บของเหลวจากกระเพาะรูเมนมา 1 มิลลิลิตร แล้วเติม formalin 10% 9 มิลลิลิตร ทันที หลังจากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอการนับจำนวนประชากรจุลินทรีย์ต่อไป

1.3.2 นำตัวอย่างที่เก็บได้มาทำการนับจำนวนของแบคทีเรีย, โปรโตซัว และเชื้อรา ด้วยกล้องจุลทรรศน์ ดังรายละเอียดดังนี้

แบคทีเรีย (bacteria count)

1. ทำการเจือจางความเข้มข้นของตัวอย่างอีกครั้ง จากเดิม 10 เท่า เป็น 100 เท่า โดยการดูดตัวอย่างมา 1 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ (autoclave 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที) 9 มิลลิลิตร

2. ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างจากหลอดหยดลงบน haematocytometer แล้วทำการนับ โดยนับจำนวน 20 ช่องเล็ก ใช้กำลังขยาย 400 เท่า ในแนวทแยงมุม โดยนับจำนวน 2 ซ้ำ และคำนวณหาค่าเฉลี่ยจำนวนประชากรแบคทีเรีย โดยใช้สูตร

$$Y + X \times F \times D$$

เมื่อ Y = จำนวนประชากรแบคทีเรีย

X = ค่าเฉลี่ยที่นับได้

D = dilution factor

F = square factor ซึ่งมีค่าเท่ากับ 4 x 106

โปรโตซัว (protozoa count)

ทำการนับจากตัวอย่างที่เก็บมาได้เลยโดยไม่ต้องทำการเจือจางอีก โดยใช้กำลังขยาย 100 เท่า โดยนับทั้งหมด 400 ช่องเล็ก (1 ช่องใหญ่) ทำการนับ 2 ซ้ำ หลังจากนั้นทำการคำนวณประชากรโปรโตซัวโดยใช้สูตร

$$Y + X \times F \times D$$

เมื่อ Y = จำนวนประชากรโปรโตซัว

X = ค่าเฉลี่ยที่นับได้

D = dilution factor

F = square factor ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1 x 104

เชื้อรา (fungal zoospores count)

ทำการนับเช่นเดียวกับโปรโตซัว แต่นับเพียง 25 ช่องกลาง ทำการนับ 2 ซ้ำ และคำนวณหาจำนวนประชากรเชื้อราดังนี้

$$Y + X \times F \times D$$

เมื่อ Y = จำนวนประชากรเชื้อรา

X = ค่าเฉลี่ยที่นับได้

D = dilution factor

F = square factor ซึ่งมีค่าเท่ากับ 2.5 x 105

2. การศึกษากลุ่มของแบคทีเรียที่สำคัญโดยวิธี Roll tube technique (Hungate, 1969)

กลุ่มของแบคทีเรียที่ศึกษามี 3 กลุ่มที่สำคัญ ได้แก่

Total viable bacteria

Cellulolytic bacteria

Proteolytic bacteria

Amylolytic bacteria

2.1 วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษา

2.1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. Total viable medium
2. Cellulolytic medium
3. Proteolytic medium
4. Amylolytic medium
5. Anaerobic dilution solution
6. HCl 0.1 N
7. $NaHCO_3$ 0.1 N

2.1.2 เครื่องแก้ว

1. ขวดพลาสติกเก็บตัวอย่างฝาเกลียวขนาด 60 มิลลิลิตร
2. ขวดปริมาตร 30 มิลลิลิตร พร้อมจุกยาง
3. ขวดปริมาตร 10 มิลลิลิตร พร้อมจุกยาง
4. บิกเกอร์ขนาด 30 และ 50 มิลลิลิตร
5. Erlenmeyer flask ปริมาตร 1 และ 2 ลิตร
6. จุกยางเจาะรู 2 รู ใช้ท่อแก้วต่อสายยางยาวให้มีขนาดพอกับรู

2.1.3 อุปกรณ์

1. เข็มฉีดยาปลอดเชื้อขนาด 0.55 x 25 มิลลิลิตร, 24G x 1 นิ้ว
2. กระบอกฉีดยาปลอดเชื้อ ปริมาตร 1 และ 100 มิลลิลิตร
3. ถาดสำหรับใส่น้ำและน้ำแข็ง
4. ถาดสำหรับน้ำร้อนอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส
5. กระดาษฟอล์ย

6. ยางรัดของ

7. rack วางขวด

8. ฟองน้ำเช็ดโต๊ะ พร้อมน้ำยาฆ่าเชื้อ

9. ผ้าเช็ดมือ

10. ตะกร้าวางขวด

2.1.4 เครื่องมือ

1. Autoclave

2. Incubator

3. Hot air oven

4. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง

5. ถังก๊าซ CO_2 ขนาดบรรจุ 25 กิโลกรัม

6. Hot plate พร้อม magnetic stirrer และ magnetic bar

7. Colony counters พร้อม marking-counter pen

8. pH meter

2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อและส่วนประกอบ

2.2.1 Anaerobic dilution solution

mineral solution A	54.0 ml
mineral solution B	45.0 ml
cysteine hydrochloride	0.05 g
Na_2CO3	0.30 g
resazurin	0.0001 g
distilled water	65.0 ml

2.2.2 Cellulose medium (Hobson, 1969)

mineral solution A	15.0 ml
mineral solution B	15.0 ml
clarified rumen fluid	20.0 ml
agar	2.0 g
resazurin	0.0001 g
bacto casitone	1.0 g
cellulose powder	1.0 g

$NaHCO_3$	0.4 g
cysteine hydrochloride	0.05 g
distilled water	to 100 ml
pH	6.8-7.0

2.2.3 Proteolytic medium (Casein medium; Hobson, 1969)

mineral solution A	15.0 ml
mineral solution B	15.0 ml
clarified rumen fluid	20.0 ml
agar	2.5 g
resazurin	0.0001 g
tryptose	0.3 g
casein	0.5 g
cystein hydrochloride	0.05 g
$NaHCO_3$	0.5 g
distilled water	to 100 ml
pH	6.8-7.0

2.2.4 Amylolytic medium (Starch medium; Hobson, 1969)

mineral solution A	15.0 ml
mineral solution B	15.0 ml
clarified rumen fluid	20.0 ml
agar	2.5 g
resazurin	0.0001 g
bacto casitone	1.0 g
soluble starch	(0.5 g ละลายในน้ำกลั่น 15 มิลลิลิตร)
cystein hydrochloride	0.05 g
$NaHCO_3$	0.5 g
distilled water	to 100 ml
pH	6.8-7.0

2.2.5 Total viable count medium (complete medium; Hobson, 1969)

mineral solution A	15.0 ml

mineral solution B	15.0 ml
clarified rumen fluid	20.0 ml
agar	2.0 g
resazurin	0.0001 g
bacto casitone	1 g
yeast extract	0.25 g
cellobiose	0.5 g
glucose	0.5 g
sodium lactate	0.2 g
cysteine hydrochloride	0.05 g
$NaHCO_3$	0.4 g
distilled water	to 100 ml
pH	6.8-7.0

การเตรียม mineral solution A

K_2HPO_4	3 g
distilled water	1000 ml

การเตรียม mineral solution B

KH_2PO_4	3.0 g
$(NH_4)_2SO_4$	6.0 g
NaCl	6.0 g
$MgSO_4.7H_2O$	0.6 g
$CaCl_2.2H_2O$	0.2 g
distilled water	1000 ml

การเตรียม clarified rumen fluid (CRF)

นำของเหลวจากกระเพาะรูเมนประมาณ 1 ลิตร ทำการกรองด้วยผ้ากรอส 4 ชั้น และนำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ด้วยความเร็ว 30100 x g นาน 30 นาที เก็บเอาเฉพาะส่วนที่เป็นของใส นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ได้นาน 30 วัน เพื่อใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย (หมายเหตุ: ควรมีการเตรียม CRF ของสัตว์ทุกตัวที่ได้รับอาหารแตกต่างกัน)

2.3 การเตรียม anaerobic dilution solution

2.3.1 ต้มน้ำกลั่นจนเดือดเพื่อไล่อากาศ แล้วทิ้งไว้ให้เย็นจนมีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง แล้วนำไปเตรียม mineral solution A และ B ดังที่กล่าวไปแล้ว

2.3.2 นำ erlenmeyer flask ขนาด 1000 มิลลิลิตร มาทำการตวงส่วนประกอบต่างๆ และเทลงใน flask ให้ครบตามหาปริมาตรที่เราต้องการเตรียม ยกเว้น cysteine HCl แล้วนำ flask ขึ้นตั้งบน hot plate ที่มี magnetic stirrer

2.3.3 ปิด flask ด้วยจุกยางที่มีท่อนำก๊าซ CO_2 เข้าและท่อนำสารละลายออก

2.3.4 เปิด hot plate ให้มีอุณหภูมิประมาณ 40-50 องศาเซลเซียส พร้อมทั้งเปิด สวิทซ์ magnetic stirrer ให้มีความเร็วรอบปานกลาง

2.3.5 ปล่อยก๊าซ CO_2 เข้าไปใน flask ที่บรรจุสารละลาย จนกระทั่งสีของ resazurin เปลี่ยนสีจากน้ำเงินเข้มเป็นสีชมพูอ่อนๆ จึงเติม cysteine HCl ลงไป

2.3.6 ปิดท่อระบายอากาศที่อยู่บน flask เพื่อให้สารละลายออกมาโดยที่ขณะนั้นยังผ่านก๊าซ CO_2 อยู่ นำบิกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร มารองรับสารละลายให้ได้ปริมาณ 30 มิลลิลิตร แล้วนำไปวัด pH ด้วย pH meter เพื่อให้ได้ pH 6.8 โดยทำการปรับ pH ด้วย HCl 0.1 N และ/หรือ $NaHCO_3$ 0.1 N จากนั้นทำการคำนวณปริมาตร HCl หรือ $NaHCO_3$ ที่ต้องใช้ในการปรับ pH สารละลายทั้งหมด

2.3.7 เมื่อปรับค่า pH ของสารละลายได้ตามที่ต้องการแล้ว จำขวดปริมาตร 10 มิลลิลิตร มารองรับสารละลายจาก flask ให้มีปริมาตรเท่ากับ 4.5 มิลลิลิตร โดยเทียบกับระดับของน้ำที่ตวงไว้ในขวดตัวอย่าง

2.3.8 นำขวดที่บรรจุสารละลายแล้วมาผ่านก๊าซ CO_2 อีกจนสังเกตได้ว่าไม่มีสี จึงปิดด้วยจุกยาง และใช้กระดาษฟอล์ยหุ้มอีกครั้งแล้วรัดด้วยยางให้แน่น

0.3.9 นำไป autoclavm ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อนำไปใช้ในการ dilute ตัวอย่างต่อไป

2.4 การเตียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.4.1 ชั่ง agar ใส่ขวดที่มีปริมาตร 30 มิลลิลิตร ขวดละ 0.1 กรัม สำหรับ Cellulolytic และ Amylolytic medium และ 0.25 กรัม สำหรับ Total viable และ casein medium

2.4.2 ทำการชั่งสารและเตรียมสารละลายต่างๆ ตามสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะของแต่ละกลุ่มแล้วทำเช่นเดียวกับการเตรียม anaerobic dilution solution

2.4.3 เมื่อทำการปรับ pH ได้แล้วให้นำขวดที่มี agar บรรจุอยู่ มารองรับสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อให้ได้ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

2.4.4 ผ่านก๊าซ CO_2 เข้าไปในขวดอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละขวดนาน 1 นาที หลังจากนั้นปิดด้วยจุกยาง และใช้กระดาษฟอล์ยหุ้มอีกชั้นแล้วรัดด้วยยางให้แน่น

2.4.5 นำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

2.4.6 นำขวดออกจาก autoclave ทำการเขย่าขวดเพื่อให้วุ้นที่ละลายกระจายไปทั่วขวด

2.4.7 นำขวดอาหารเลี้ยงเชื้อไปแช่ใน water bath ที่มีอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส โดยให้ระดับน้ำใน water bath มีระดับสูงกว่าระดับอาหารเลี้ยงเชื้อในขวด เพื่อรอการ inoculate เชื้อต่อไป

2.5 การเก็บตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์จากกระเพาะรูเมน (rumen fluid)

2.5.1 เก็บตัวอย่างผ่านท่อ fistular นำมากรองด้วยผ้าขาวบาง 4 ชั้น และรีบบรรจุในขวดเก็บตัวอย่างฝาเกรียว ขนาด 60 มิลลิลิตร จนเต็ม

2.5.2 นำมาเก็บในน้ำอุ่นอุณหภูมิประมาณ 39 องศาเซลเซียส และนำมาที่ห้องปฏิบัติการโดยเร็วที่สุด เพื่อทำการเลี้ยงเชื้อต่อไป

2.5.3 นำตัวอย่างมาผ่านก๊าซ CO_2 ทันที และทำการเจือจางด้วย tween 80 ในสัดส่วน tween 80 4 ส่วน ต่อ rumen fluid 1 ส่วน จากนั้นทำการเขย่าแรงๆ ทั้งนี้เพื่อให้จุลินทรีย์ที่เกาะอยู่กับชิ้นอาหารหลุดออกมา

2.6 การเจือจาง rumen fluid

ทำการเจือจาง rumen fluid ให้มีความเจือจางลดลงระดับละ 10 ตามลำดับ ตั้งแต่ 100, 10^{-1}, 10^{-2} ไปจนถึง 10^{-7} โดยใช้เทคนิคของ Macy et al. (1972)

2.6.1 เขียนระดับความเจือจางลงบนขวด anaerobic dilution solution แต่ละขวด

2.6.2 ใช้เข็มฉีดยาพร้อมกระบอกฉีดยาปลอดเชื้อเสียบลงในขวด rumen fluid ที่ผสมกับ tween 80 ดูดสารละลายมา 0.5 มิลลิลิตร โดยทำการไล่อากาศและเช็ดทำความสะอาดเข็มด้วยสำลีปลอดเชื้อ

2.6.3 ในไปฉีดลงในขวด anaerobic dilution solution ที่ 1 ซึ่งเป็นระดับ dilution เป็น 10-1 จากนั้นคว่ำขวดลงในแนวดิ่งเพื่อดูดสารละลายล้างเข็ม 1 ครั้ง เป็นการล้างเอา rumen fluid ที่ติดอยู่กับผิวของกระบอกฉีดยา เขย่าขวดให้ rumen fluid กระจายให้ทั่วหลอด

2.6.4 นำกระบอกฉีดยาพร้อมเข็มอันใหม่มาดูดสารละลายจากขวด anaerobic dilution solution ที่ 1 มา 0.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปฉีดลงขวด anaerobic dilution solution ที่ 2 ทำเช่นเดียวกันกับรายละเอียดในข้อ 2.6.3 จนกระทั่งถึงระดับการเจือจางที่ 10^{-7} หรือขวด anaerobic dilution solution ที่ 7 (หากพบว่าสีของสารละลายในขวดมีการเปลี่ยนแปลงจากไม่มีสีเป็นสีชมพูหรือม่วง

แสดงว่าภายในขวดมีก๊าซออกซิเจน ซึ่งจะมีผลกระทบต่อจุลินทรีย์ภายในขวดนั้นๆ ต้องทำการเตรียม anaerobic dilution solution ใหม่)

2.6.7 นำสารละลายไปทำการ inoculate ในอาหารเฉพาะ โดยใช้ roll-tube technique ตามวิธีการของ Hungate (1969)

2.7 การทำ roll tube technique (Hungate, 1969)

2.7.1 เลือกขวด dilution ที่เหมาะสมกับกลุ่มของแบคทีเรียที่ต้องการจะเลี้ยง เช่น total viable bacteria เลือกใช้ที่ระดับ 10^{-5}, 10^{-6} และ 10^{-7} cellulolytic bacteria เลือกใช้ที่ระดับ 10^{-6} และ 10^{-7} proteolytic และ amylolytic bacteria เลือกใช้ที่ระดับ 10^{-5} และ 10^{-6}

2.7.2 นำขวดที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อกลุ่มต่างๆ มาเขียนระดับความเจือจาง และปริมาตรตัวอย่างที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ โดยทุกกลุ่มแบคทีเรียจะใช้ปริมาตร 0.2 และ 0.5 มิลลิลิตร (ในการเลี้ยงเชื้อควรมีการเลี้ยงเชื้อทุก dilution และหลายปริมาตรก่อน เพราะงานทดลองแต่ละงานจะมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับปัจจัยที่ใช้ในการทดลอง ซึ่งจะทำให้ประชากรของแบคทีเรียแตกต่างกันไปด้วย)

2.7.3 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารลี้ยงเชื้อ ใช้กระบอกฉีดยาพร้อมเข็มฉีดยาปลอดเชื้อ ดูดสารละลายจากขวด dilution ที่เลือกไว้ ในปริมาตรที่เลือกไว้เช่นเดียวกัน (0.2 หรือ 0.5 มิลลิลิตร) แล้วนำไปฉีกลงในขวดอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละกลุ่ม โดยอาหารเลี้ยงเชื้อจะต้องต้มให้ละลายและรักษาอุณหภูมิที่ 50-55 องศาเซลเซียส ผสมตัวอย่างให้กระจายทั่วขวดอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำไปกลิ้งบนถาดน้ำแข็งอย่างรวดเร็ว เพื่อให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัวกระจายรอบๆ ขวด ใช้ผ้าซับน้ำรอบๆ ขวดให้แห้ง แล้วนำไปวางไว้บนตะกร้า โดยคว่ำปากขวดลงด้านล่าง จากนั้นนำไปบ่ม (incubate) ที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส โดยแบคทีเรียกลุ่ม total viable และ Proteolytic bacteria ทำการบ่มเป็นเวลา 5 วัน กลุ่ม amylolytic bacteria บ่มเป็นเวลา 3 วัน และกลุ่ม cellulolytic bacteria บ่มเป็นเวลา 21 วัน

2.8 การตรวจนับจำนวนแบคทีเรีย (colony forming unit, CFU)

2.8.1 นำขวดอาหารเลี้ยงเชื้อไปวางในแนวนอนบน colony counter แล้วจึงนับจำนวนโคโลนีโดยมองผ่านแว่นขยาย เลือกนับเฉพาะระดับความเจือจางที่มีจำนวนโคโลนีระหว่าง 20-50 โคโลนี โดยให้นับทุกซ้ำที่สามารถนับได้ แล้วจึงนำมาหาค่าเฉลี่ย โดยให้นับเฉพาะโคโลนีที่มีลักษณะดังนี้

total viable bacteria ให้นับทุกโคโลนี

cellulolytic และ Proteolytic bacteria ให้นับเฉพาะโคโลนีที่มี clear zone รอบๆ

amylolytic bacteria ให้ปิเปต 3% iodine solution ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดเลี้ยงเชื้อ แล้วกลิ้งขวดไปมาบนโต๊ะจน iodine solution ซึมเข้าไปในเนื้อวุ้น ทิ้งไว้สักครู่ iodine จะทำปฏิกิริยากับแป้งที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อปรากฏเป็นสีน้ำเงิน ให้เลือกนับเฉพาะโคโลนีที่ไม่เกิดสีน้ำเงินรอบๆโคโลนี

2.8.2 การคำนวณ colony forming unit (CFU) ต่อ rumen fluid 1 มิลลิลิตรทำได้จาก CFU/ml = (1 x จำนวนโคโลนีที่นับได้) / (ปริมาตร x dilution factor)

2.8.3 คำนวณหาค่า standard error of the means (SEM)

2.8.4 บันทึกจำนวนแบคทีเรียในรูปค่าเฉลี่ย ± SEM

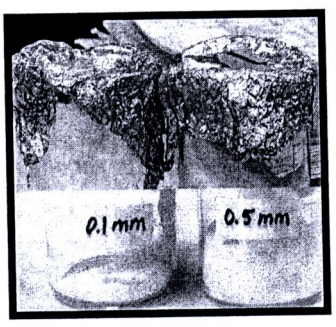
2.8.5 ทำการคำนวณแบคทีเรียทุกกลุ่มตามรายละเอียดในข้อ 2.8.2

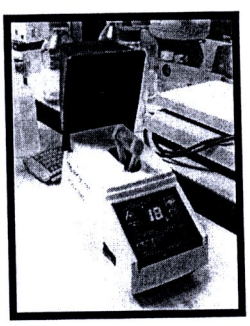
วิธีการสกัด DNA

(ปรับปรุงจาก Yu and Morrison, 2004)

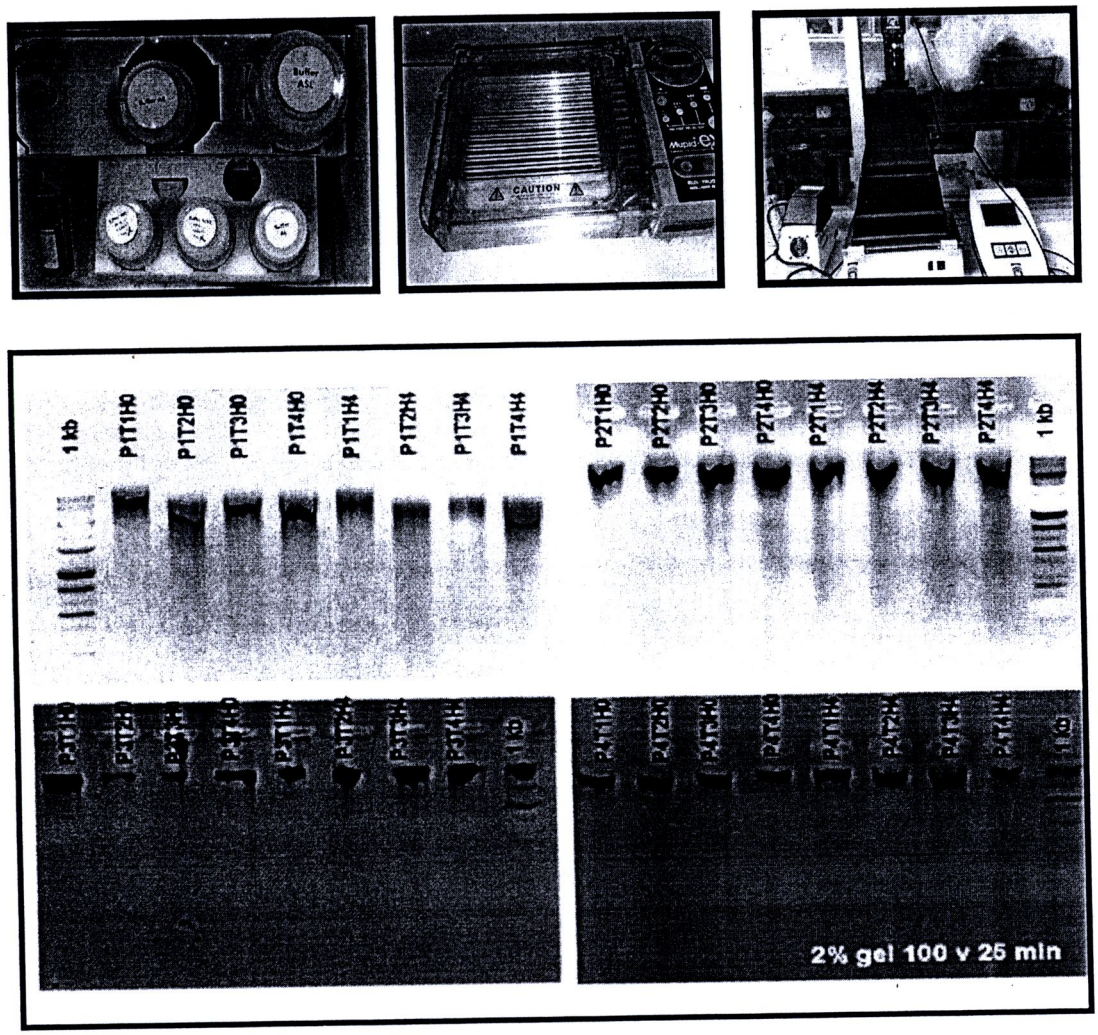
1) การแตกเซลล์

- เคลื่อนย้าย 0.25 g ของตัวอย่าง ใส่ในหลอด fresh 2-ml screw-cap แล้วเติม 1ml ของ lysis buffer [500mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM EDTA, and 4% sodium dodecyl sulfate (SDS)] และ 0.4 กรัมของ sterile zirconia beads (0.3g of 0.1 mm and 0.1g of 0.5 mm)
- ทำให้เป็นเนื้อเดียวกันประมาณ 3 นาที ที่ความเร็วสูงสุดตาม Mini-Beadbeater™ (Biospec Products, Bartlesville, OK, USA)
- บ่มที่ 70 °C เป็นเวลา 15 นาที โดยเขย่าด้วยมือทุกๆ 5 นาที
- ปั่นเหวี่ยงที่ 4 °C เป็นเวลา 5 นาที ที่ 16,000×g ย้ายส่วนใสใส่หลอดใหม่ 2 ml Eppendorb®
- เติม 300 µl ของ fresh lysis buffer to the lysis tube และทำซ้ำขั้นตอน 2-4





- เก็บสารละลายดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C

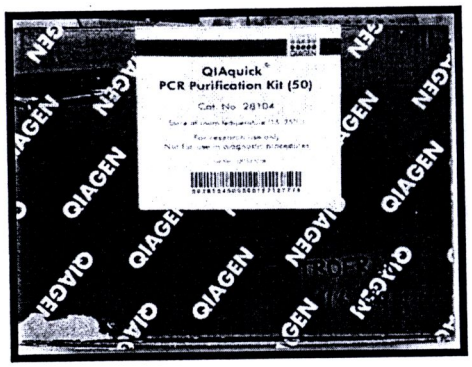


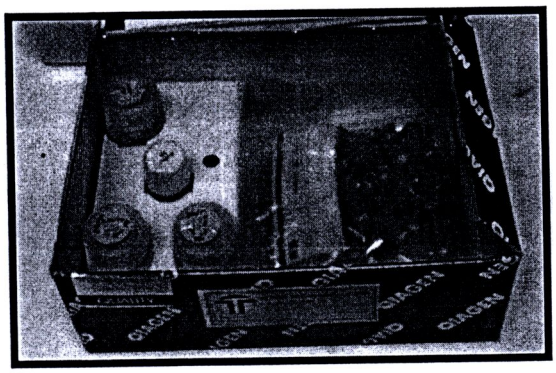
ภาพที่ 9. genomic DNA products after run in 2 % agarose gel 100 V 25 min.

การเตรียมมาตรฐานสำหรับ real-time PCR

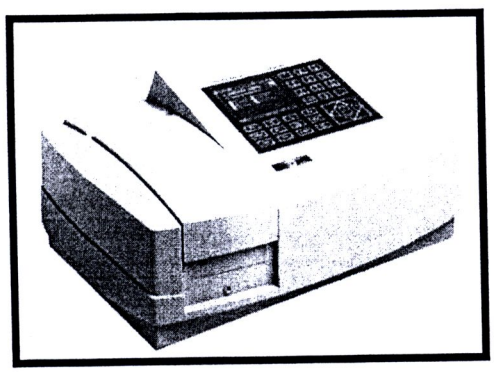
สามชนิดและสามกลุ่มของแบคทีเรียมาตรฐานในกระเพาะรูเมน (*R. albus, R. flavefaciens, F. succinogenes*, total bacteria, total fungi and total methanogens) ทำการเตรียมโดยใช้ผลผลิต PCR จากแต่ละชนิดหรือแต่ละกลุ่มโดยใช้ primer และ condition ซึ่งแสดงไว้ในขั้นตอนและวิธีการในเนื้อหา

Purificantion PCR-product by using QIAquick Gel Extraction





Quantification PCR product concentration by using spectrophotometer



PCR production concentration (ng/μl)

= 50 x (absorbance at 260 nm) x dilution factor

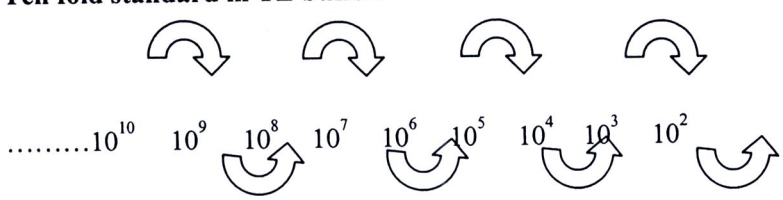
Calculation standard copies (copies/ μl)

= [6.023 x 10^{14} x (Conc. ng/ul)] / [(BP* x 607.4)+ 157.9]

(Conc. ng/ul) = PCR product concentration

*BP = Amonts of PCR Product base pair

Ten fold standard in TE buffer.



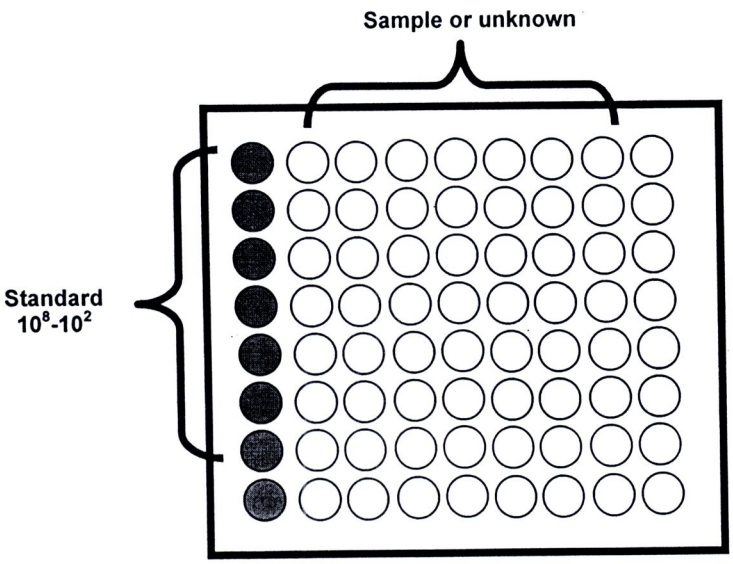
Real-time PCR

Master mixed preparing (1 reaction)

Quanti Mixed*	5.0	µl
Forward Primer (10 mM)	0.4	µl
Reverse Primer (10 mM)	0.4	µl
Water	2.2	µl
DNA template	2.0	µl
Total	10.0	µl

* Using FastStart SYBR Green Master (Roche)

Real time PCR plate set



List of primer and thermo cycle program

Target species	Primer sequence	Amplicon (bp)	References
Total bacteria	5'-CGG CAA CGA GCG CAA CCC-3' 5'-CCA TTG TAG CAC GTG TGT AGC C-3'	130	IAEA
F. succinogenes	5'-GTT CGG AAT TAC TGG GCG TAA A-3' 5'-CGC CTG CCC CTG AAC TAT C-3'	121	Makkar and McSweeney (2001)
R. flavefaciens	5'-CGA ACG GAG ATA ATT TGA GTT TAC TTA GG-3' 5'-CGG TCT CTG TAT GTT ATG AGG TAT TAC C-3'	132	Makkar and McSweeney (2001)
R. albus	5'-CCC TAA AAG CAG TCT TAG TTC G-3' (Ra 1281f) 5'-CCT CCT TGC GGT TAG AAC A-3' (Ra 1439r)	175	Koike and Kobayashi (2001)
Anaerobic fungi	5'-GAG GAA GTA AAA GTC GTA ACA AGG TTT C-3' 5'-CAA ATT CAC AAA GGG TAG GAT GAT T-3'	120	IAEA
Methanogens	5'-TTC GGT GGA TCD CAR AGR GC-3' 5'-GBA RGT CGW AWC CGT AGA ATC C-3'		IAEA
MN100	5'-TCC TAC CCT TTG TGA ATT TG-3' (ITS1)	250	Makkar and McSweeney (2001)
MNGM2	5'-CTG CGT TCT TCA TCG TTG CG-3' (5.8rRNA)		Makkar and McSweeney (2001)
GC-champ	CGC-CCG-CCG-CGC-GCG-GCG-GGC-GGG-GCG-GGG-GCA-CGG-GGG-G		Makkar and McSweeney (2001)

Thermo cycler program

Program FS-01

Step 1	94 °C for 9 min
Step 2	94 °C for 30 sec
Step 3	60 °C for 30 sec
Step 4	72 °C for 30 sec
**(Add plate read step for real time PCR only)*	
Step 5	go to step 2 for 48 cycles
Step 6	72 °C for 10 min
Step 7	4°C hold

Program RA-RF

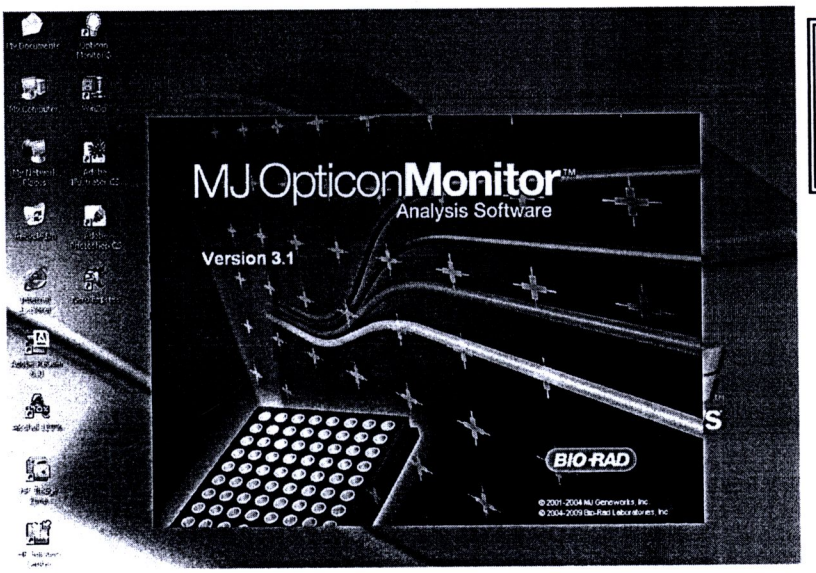
Step 1	94 °C for 9 min
Step 2	94 °C for 30 sec
Step 3	55 °C for 30 sec
Step 4	72 °C for 30 sec
**(Add plate read step for real time PCR only)*	
Step 5	go to step 2 for 48 cycles
Step 6	72 °C for 10 min
Step 7	4 °C hold

Program IAEA

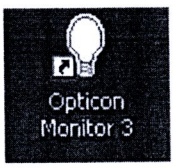
Step 1	50°C for 2 min
Step 2	plate read
Step 3	95°C for 2 min
Step 4	plate read
Step 5	95°C for 15 Sec
Step 6	plate read
Step 7	60°C for 1 min
Step 8	go to step 5 for 40 cycles
Step 9	95°C for 2 min
Step 10	60°C for 15 sec (plate read every 1°C increase)
Step 11	95°C for 15 sec
Step 12	4°C Hold

Setting up real-time PCR

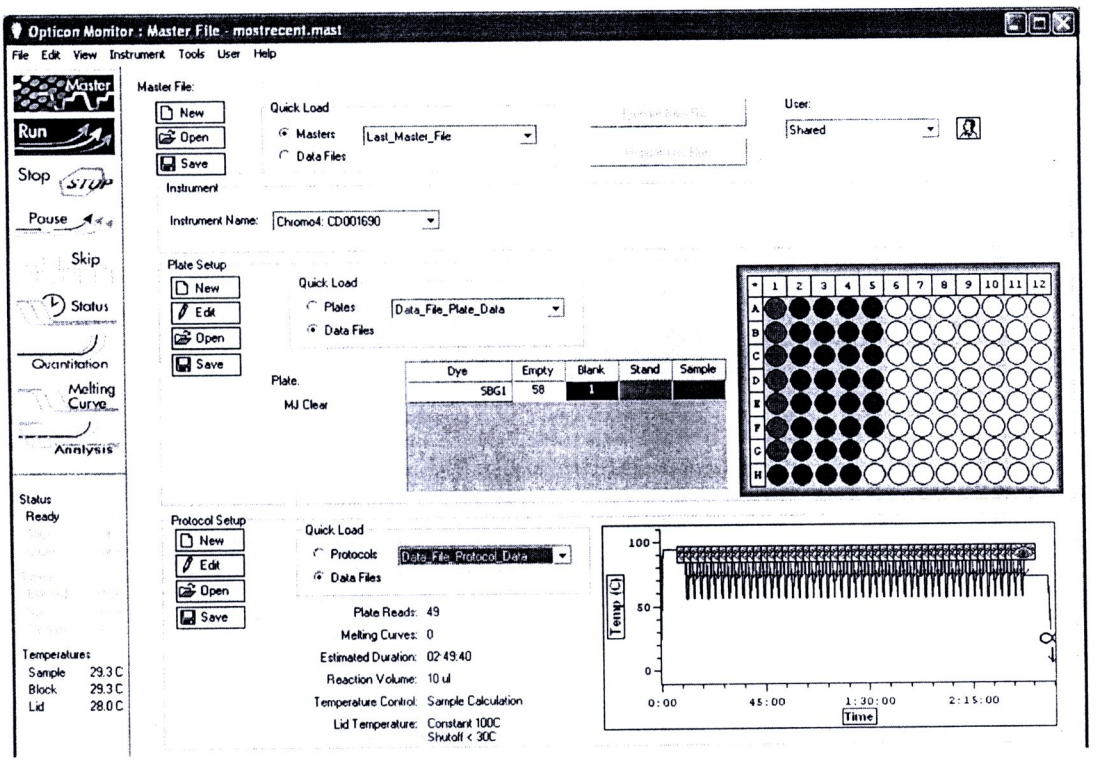
(Chromo 4 System, Bio-RAD)

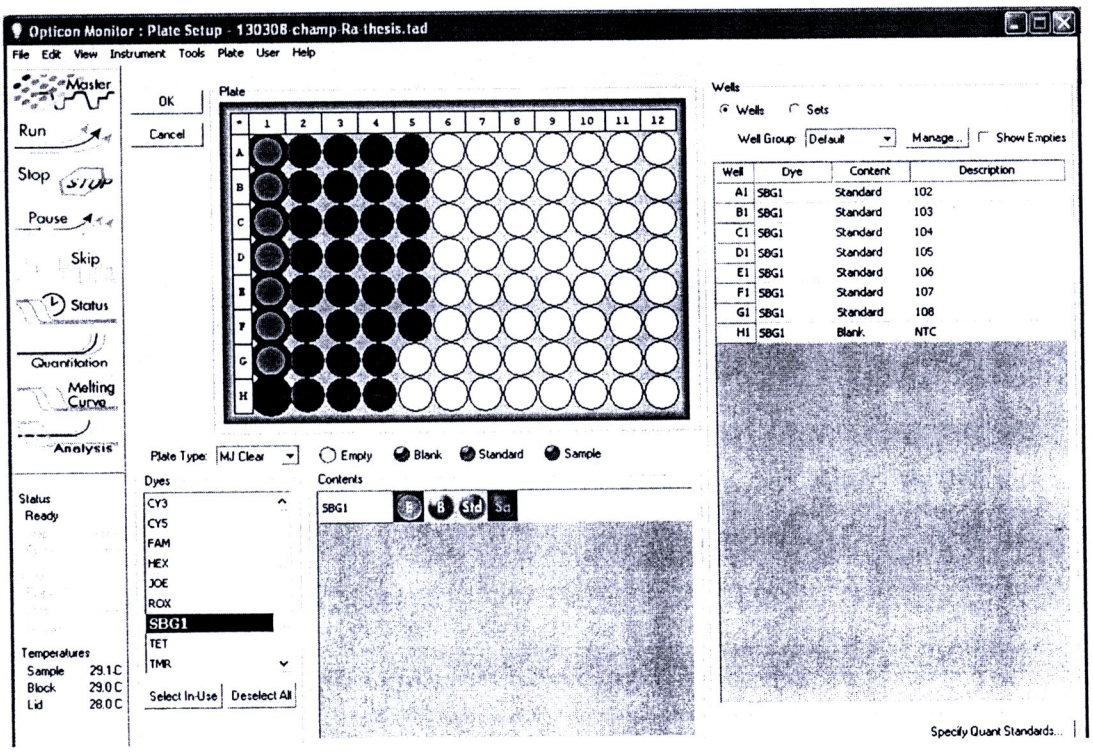


Click on this icon to start open Opticon Monitor 3



Master file page

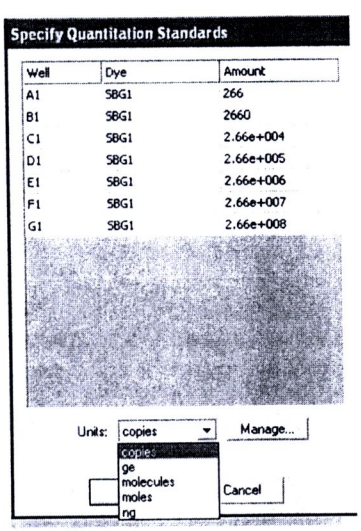




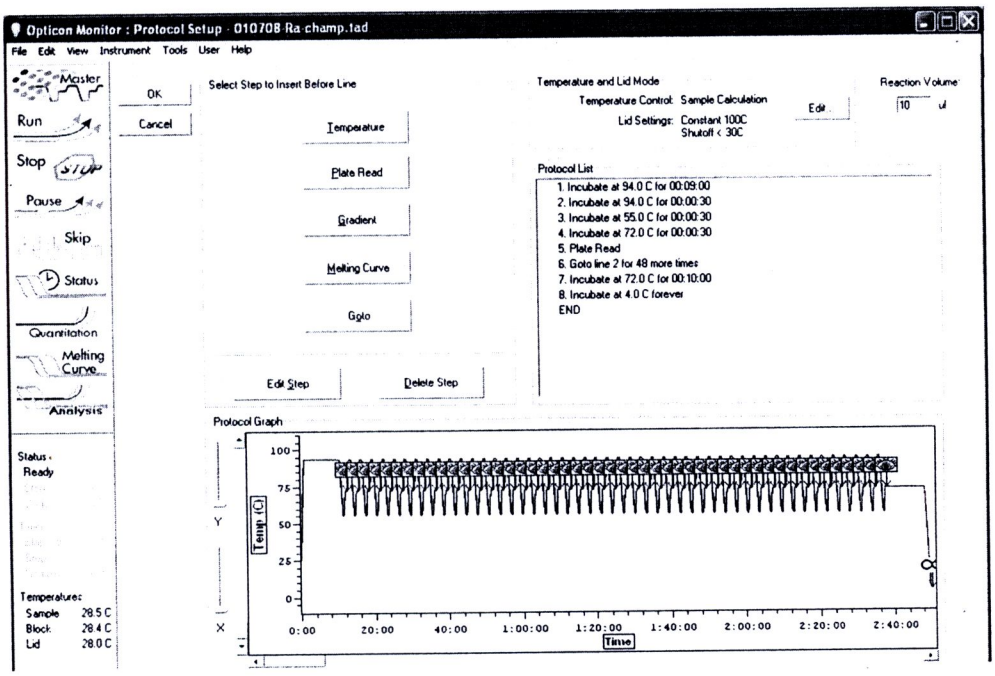
ตั้งค่า standard สีเขียว , blank สีน้ำเงิน และตัวอย่างสีแดง

ตั้งชื่อคำอธิบายตาราง

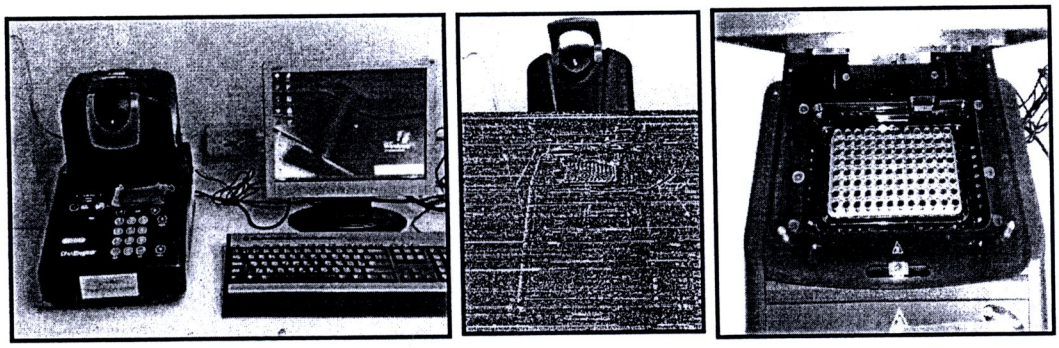
คลิกที่ "Specifying Quantitation Standards" then add standard amount.

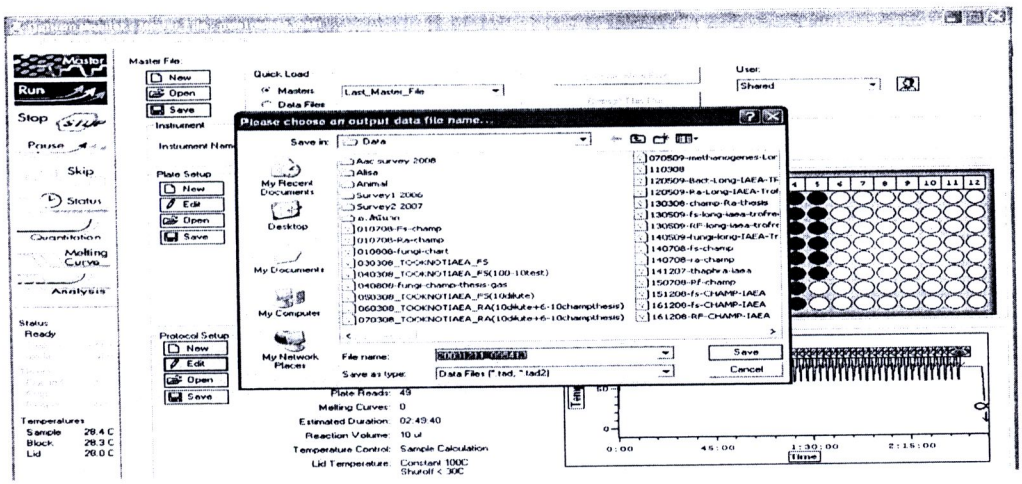


หลังจากตั้งค่า standard and unknown sample เสร็จกลับไปที่หน้าแรกแล้วคลิก "Protocol setup".

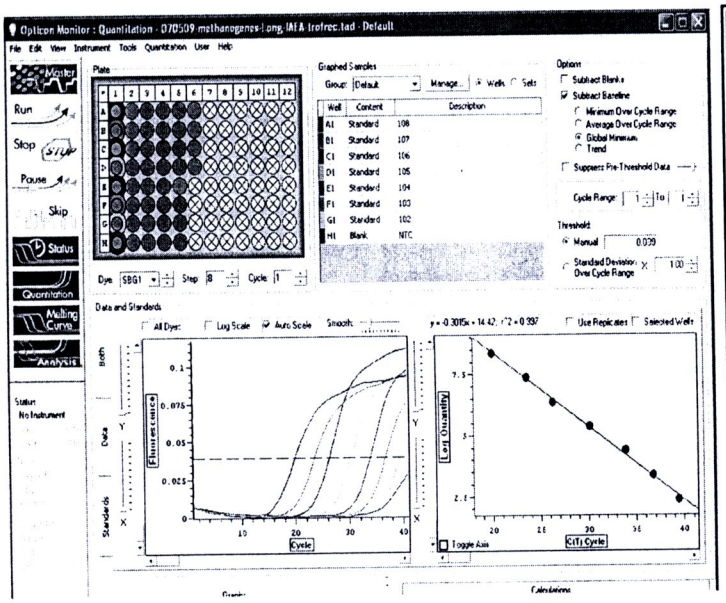


ตั้งค่า protocol แล้วกลับไปที่หน้าแรกหลังจากนั้นวางตัวอย่างและ standard ลงในเครื่อง (ดูตามสี).

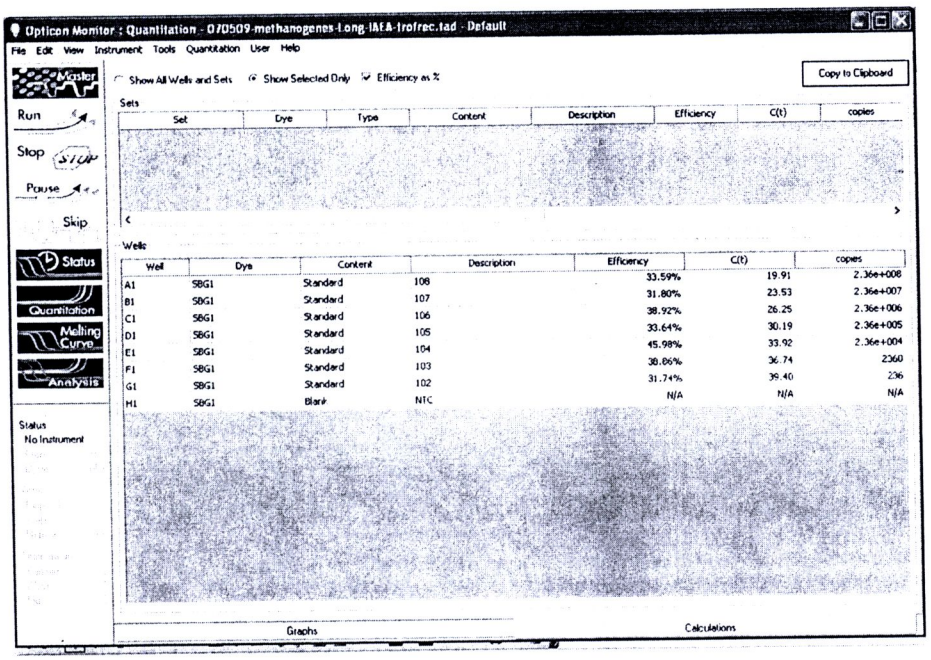




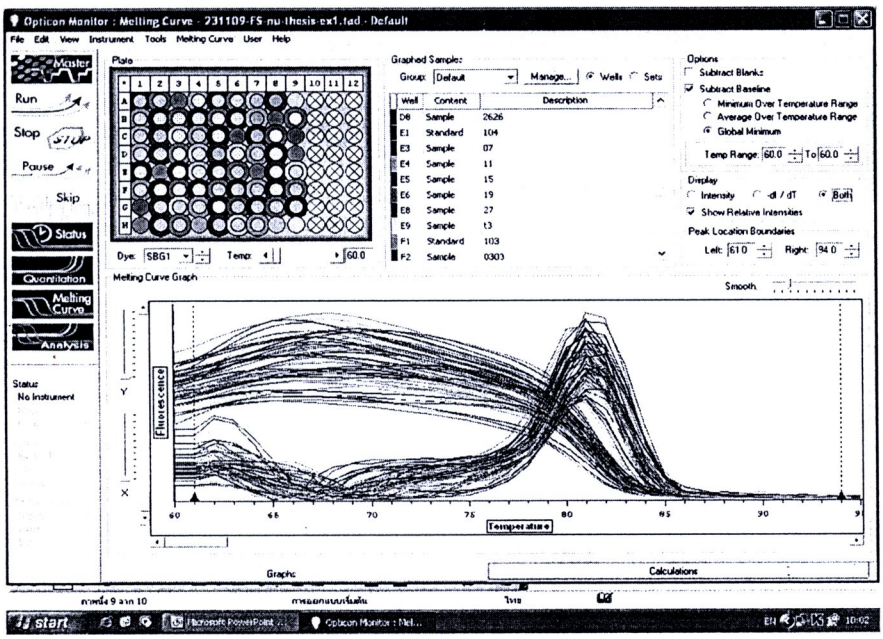
คลิก Run แล้วบันทึก และตั้งชื่อไฟล์ ข้อมูลจะถูกบันทึกโดยอัตโนมัติ



After finish running, click on "Quantification" the program will show graph and standard curve.



คลิกที่ “Calculation” ดูที่แท็ปการคำนวณผล



คลิกที่ “Melting Curve” ดูที่อุณหภูมิ

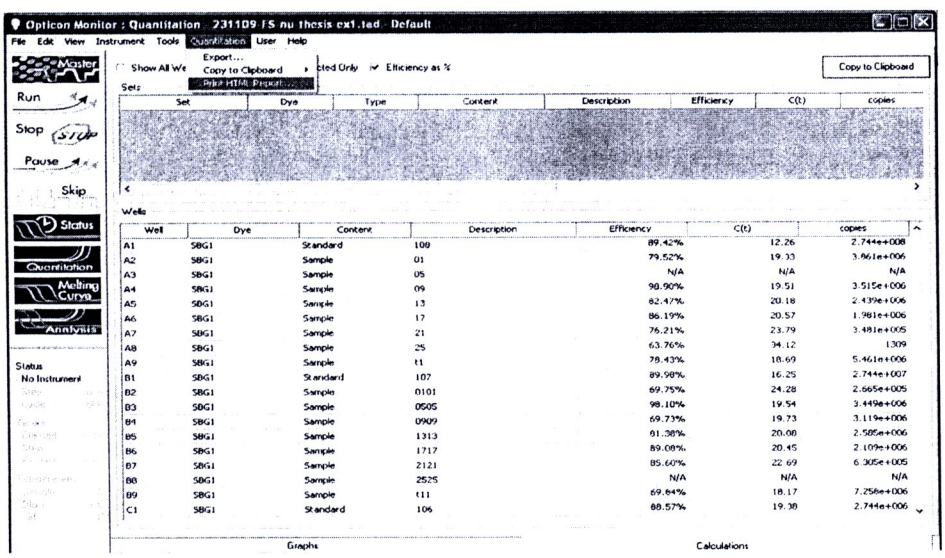
ปริ้นผลและกราฟ

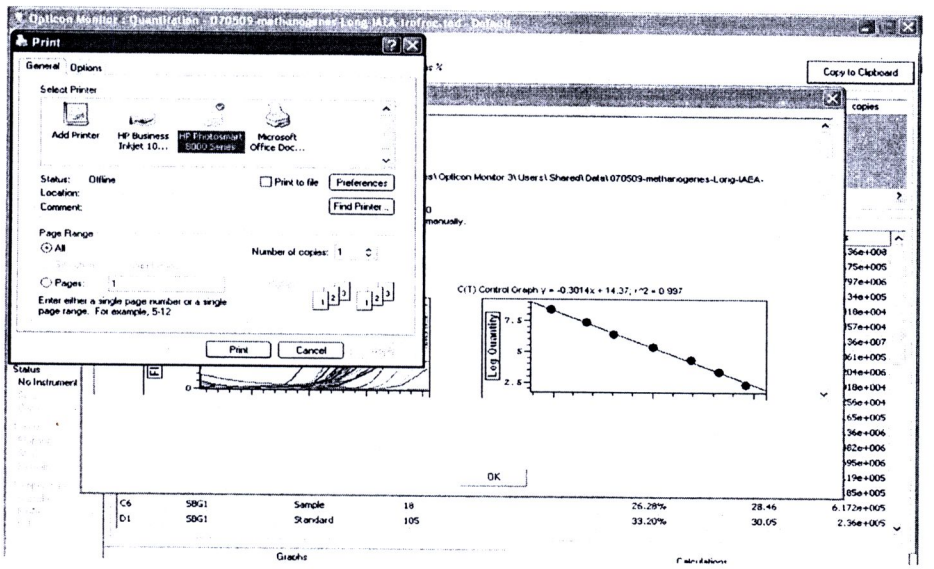
กลับไปที่หน้าหลัก

เลือกตัวอย่างทั้งหมดในถาด

คลิกแท็ป “Calculation”

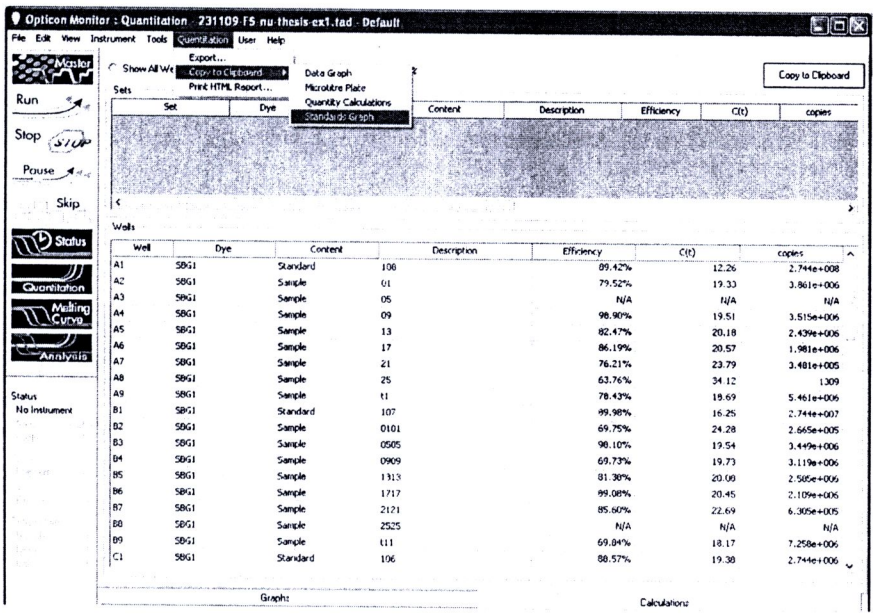
คลิก “ Quantitation” และ “Print HTML report” แล้วคลิกที่ปริ้น

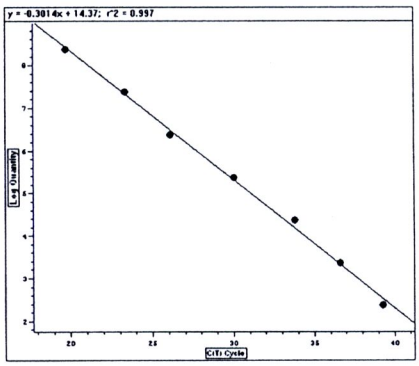


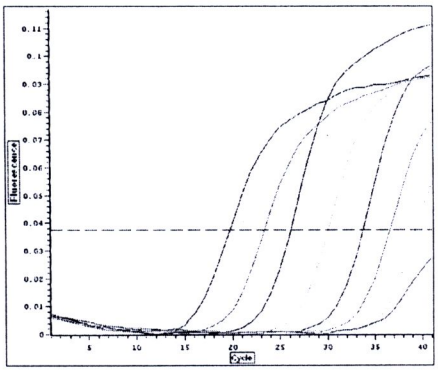


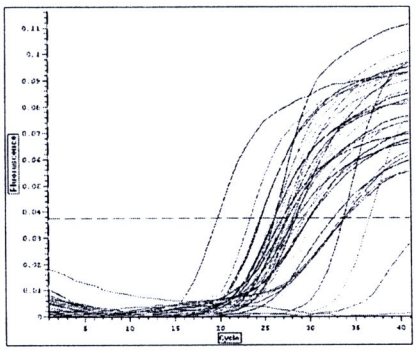
การนำข้อมูลมาสู่ไมโครซอฟออฟฟิด

คลิกที่ “Quantitation”, “Copy to Clipboard” แล้วเลือกข้อมูลเปิดไมโครซอฟแล้ววาง




y = -0.3014x + 14.37; r^2 = 0.997
Log Quantity
CtTi Cycle


Fluorescence
Cycle


Fluorescence
Cycle

ภาคผนวก ง
การวิเคราะห์คอนเดนซ์แทนนินส์

การวิเคราะห์คอนเดนซ์แทนนินส์

การวิเคราะห์คอนเดนซ์แทนนินส์ด้วยวิธีการ Acidified Vanillin โดยการสกัดตัวอย่างด้วย methanol และนำของเหลวที่สกัดได้มาเติมสารละลาย vanillin-HCL และวัดสีที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่มีความยาวคลื่น 500-525 mμ

สารเคมี

1. 8%HCL ใน methanol : ละลาย HCL 8 ml ใน methanol 100 ml
2. 4% vanillin methanol : vanillin 4 g ใน methanol 100 ml
3. นำสารละลายในข้อ 1 และข้อ 2 มาผสมกันในปริมาณที่เท่ากันก่อนใช้ (vanillin-HCL)

การทำ Standard curve

เตรียมสารละลาย catechin solution โดยการละลาย catechin 100 mg ใน methanol 50 ml (catechin 2 mg/ml) และทำ dilution ทั้ง 10 ระดับ ระดับละ 2 หลอดๆละ 1 ml จากนั้นเติม vanillin-HCL 5 ml ทันที ดังแสดงในตาราง และนำไปวัดค่า transmittance ที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร โดยใช้ vanillin-HCL เป็น blank จากนั้นทำการ plot curve ระหว่างค่า transmittance กับความเข้มข้นของ catechin

No.	Tubes	Catechin sol.(ml)	Methanol (ml)	Catechin (mg/ml)	Catechin (mg/50ml)	Vanillin-HCL (ml)
Blank	1-2	0	0	0	0	5
1	3-4	0.1	0.9	0.2	10	5
2	5-6	0.2	0.8	0.4	20	5
3	7-8	0.3	0.7	0.6	30	5
4	9-10	0.4	0.6	0.8	40	5
5	11-12	0.5	0.5	1.0	50	5
6	13-14	0.6	0.4	1.2	60	5
7	15-16	0.7	0.3	1.4	70	5
8	17-18	0.8	0.2	1.6	80	5
9	19-20	0.9	0.1	1.8	90	5
10	21-22	1.0	0	2.0	100	5

การวิเคราะห์ตัวอย่าง

1. ชั่งตัวอย่างที่บดละเอียดผ่านตะแกรงขนาด 20 mesh จำนวน 1 กรัม ใส่ลงใน flask ขนาด 125 ml
2. เติม Methanol 50 ml ปิดจุกและเขย่า ตั้งทิ้งไว้ 20 - 48 ชั่วโมง โดยใช้เวลาเท่ากันทุกตัวอย่าง
3. ปิเปต 1 ml supernatant ใส่ในหลอดทดลอง แล้วเติม vanillin-HCL 5 ml ผสมให้เข้ากันทุกตัวอย่างแล้วนำไปวัดค่า transmittance เช่นเดียวกับ standard
4. เปรียบเทียบความเข้มข้นของแทนนินส์ในตัวอย่างกับ standard curve

Old method

Tube	Catechin	V-HCL	Methanol	Cat. (mg/ml)	Cat. (mg/50ml)	%T
1	0	5	5	0	0	100
2	0.5	5	4.5	0.02	1	93
3	1	5	4	0.04	2	86
4	1.5	5	3.5	0.06	3	80
5	2	5	3	0.08	4	74
6	2.5	5	2.5	0.1	5	69
7	3	5	2	0.12	6	64
8	3.5	5	1.5	0.14	7	59
9	4	5	1	0.16	8	56
10	4.5	5	0.5	0.18	9	52
11	5	5	0	0.2	10	49

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นางสาวฐิติมา นรโภค เกิดเมื่อวันที่ 29 มิถุนายน พ.ศ. 2529 ณ.อำเภอเสลภูมิ จังหวัดร้อยเอ็ด บิดาชื่อ นายสงวน นรโภค มารดาชื่อ นางประยูร นรโภค มีพี่ชาย 1 คน และพี่สาว 2 คน สำเร็จการศึกษาระดับประถมศึกษาจากโรงเรียนบ้านกลางเสลภูมิ อำเภอเสลภูมิ จังหวัดร้อยเอ็ด มัธยมศึกษาตอนต้นและมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนเสลภูมิพิทยาคม อำเภอเสลภูมิ จังหวัดร้อยเอ็ด สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี วิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) สาขาวิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ในปี พ.ศ. 2551 และได้เข้าศึกษาต่อระดับปริญญาโทในสาขาวิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น เมื่อปี พ.ศ. 2552 มีความสนใจทางด้านโภชนศาสตร์สัตว์เคี้ยวเอื้อง โดยได้รับโอกาสจาก ศาสตราจารย์ ดร. เมธา วรรณพัฒน์ ในการให้คำปรึกษา คำแนะนำ ตลอดจนได้รับทุนการศึกษาในระดับปริญญาตรีและปริญญาโท ซึ่งมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

1. ทุนนักศึกษาผู้ช่วยวิจัยในระดับปริญญาตรี จากศูนย์วิจัยและพัฒนาทรัพยากรอาหารสัตว์เขตร้อน ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ปีการศึกษา 2550-2551

2. ทุนวิจัยมหาบัณฑิต สกว. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี-มหาวิทยาลัยขอนแก่น จากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ร่วมกับมหาวิทยาลัยขอนแก่น ภายใต้โครงการผลของระดับโปรตีนร่วมกับการเสริมเปลือกมังคุดอัดเม็ด(Mago-pel) ในสูตรอาหารข้นที่มีไขมันสูงต่อกระบวนการหมักในกระเพาะรูเมน ผลผลิตน้ำนมและคุณภาพน้ำนมในโครีดนม ปีการศึกษา 2552

3. ทุนสนับสนุนบัณฑิตศึกษา จากศูนย์วิจัยและพัฒนาทรัพยากรอาหารสัตว์เขตร้อน ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ปีการศึกษา 2553