บทที่ 3
วิธีการวิจัย

ระยะเวลาที่ทำการวิจัย

เวลา เริ่มดำเนินการ เดือน กรกฎาคม 2548
เสร็จสิ้น เดือน พฤษภาคม 2549

สถานที่ทำการวิจัย

สถานที่ 1. ฟาร์มโคนม สาขาโคนม-โคเนื้อ ภาควิชาเทคโนโลยีทางสัตว์ คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้
2. ห้องปฏิบัติการอาหารสัตว์ ภาควิชาเทคโนโลยีทางสัตว์ คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้

อุปกรณ์การดำเนินงาน

1. โคนมเพศผู้ตอน พันธุ์ลูกผสม (โฮลสไตน์ฟรีเชียน x พื้นเมือง) ที่ผ่าตัดเจาะกระเพาะรูเมนแล้ว อายุ 4.5 ปี น้ำหนัก 360±30 กิโลกรัม จำนวน 4 ตัว
2. โรงเรือนแบบผูกยืนโรงซึ่งมีบริเวณให้อาหารและน้ำแยกอิสระต่อกัน
3. เครื่องชั่งน้ำหนักขนาด 7 กิโลกรัม และ 500 กิโลกรัม
4. ถุงไนลอน ขนาด 9 x 14 เซนติเมตร มีความห่างถุง 40 μ (micron mesh size)
5. สายยางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร ยาว 1 ฟุต จำนวน 28 เส้น
6. เชือกขนาด 2 มิลลิเมตร ยาวประมาณ 1 เมตร
7. อุปกรณ์ทำความสะอาดถุงไนลอน
8. อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำความสะอาดคอกโคทดลอง
9. อุปกรณ์ที่ใช้ในการให้อาหารโคทดลอง
10. อุปกรณ์และชุดวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนะในห้องปฏิบัติการอาหารสัตว์
11. เครื่องมือวัดค่า pH

12. อุปกรณ์สำหรับเก็บตัวอย่างอาหารและมูล
13. อุปกรณ์สำหรับการทดลองโดยใช้ชุดหมักเทียม (ANKOM Daisy^{II}) ตามวิธี *in vitro* true digestibility (IVTD)
14. ถุงโพลีเอสเตอร์ (filter bags) ขนาด 5x5.5 เซนติเมตร
15. กระบอกเก็บตัวอย่างของเหลวจากกระพาะรูเมน
16. ถังก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์
17. อุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของกรดไขมันที่ระเหยได้ง่ายด้วยเครื่อง HPLC
18. อาหารทดลอง ดังตารางที่ 13

วิธีการดำเนินการวิจัย

การศึกษาการย่อยได้ของโภชนะในอาหารผสมเสร็จที่มีเปลือกสับปะรดหมัก และฟางข้าวในระดับต่างๆ แบ่งการทดลองเป็น 3 การทดลองคือ

การทดลองที่ 1 การศึกษาการสลายตัวของโภชนะของอาหารผสมเสร็จที่มีเปลือกสับปะรดหมัก และฟางข้าวในระดับต่าง ๆ ในกระเพาะรูเมนโดยวิธีใช้ถุงไนลอน (nylon bag technique)

การทดลองที่ 2 การศึกษาการสลายตัวของโภชนะของอาหารผสมเสร็จที่มีเปลือกสับปะรดหมัก และฟางข้าวในระดับต่างๆ โดยใช้ชุดกระเพาะหมักเทียม (ANKOM Daisy^{II}) ตามวิธี *in vitro* true digestibility (IVTD)

การทดลองที่ 3 การศึกษาการย่อยได้ของโภชนะของอาหารผสมเสร็จที่มีเปลือกสับปะรดหมัก และฟางข้าวในระดับต่าง ๆ โดยวิธีการใช้สารบ่งชี้ (indicator method) คือ เถ้าที่ไม่ละลายในกรด (acid insoluble ash ;AIA)

ในแต่ละการทดลองวางแผนการทดลองเป็นแบบ 4x4 Latin Squares Design (LSD) โดยใช้อาหารทดลอง 4 สูตรดังนี้

สูตรที่ 1 อาหารผสมเสร็จที่มีเปลือกสับปะรดหมัก 50 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งอาหารหยาบ

สูตรที่ 2 อาหารผสมเสร็จที่มีเปลือกสับปะรดหมัก 45 เปอร์เซ็นต์ และฟางข้าว 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งอาหารหยาบ

สูตรที่ 3 อาหารผสมเสร็จที่มีเปลือกสับปะรดหมัก 40 เปอร์เซ็นต์ และฟางข้าว 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งอาหารหยาบ

สูตรที่ 4 อาหารผสมเสร็จที่มีเปลือกสับปะรดหมัก 35 เปอร์เซ็นต์ และฟางข้าว 15 เปอร์-เซ็นต์ เป็นแหล่งอาหารหยาบ

การเตรียมอาหารทดลอง

การหมักเปลือกสับปะรด

เปลือกสับปะรดที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ ได้จากโรงงานสับปะรดกระป๋อง อำเภอเมือง จังหวัดลำปาง นำมากองไว้บนพื้นซีเมนต์ โดยผึ่งกองทิ้งไว้เป็นเวลา 3 วันก่อนทำการหมัก การหมักเปลือกสับปะรดในถุงพลาสติก โดยใช้ถุงพลาสติกชนิดเหนียว ขนาด 25 x 30 นิ้ว บรรจุถุงละ 30 กิโลกรัม หลังจากใส่เปลือกสับปะรด อัดให้แน่น และไล่อากาศออกให้มากที่สุดก่อนมัดด้วยเชือกให้แน่นแล้วสวมทับด้วยถุงอาหารสัตว์ แล้วมัดด้วยเชือกให้แน่นอีกครั้งหมักไว้ 2 สัปดาห์ก่อนนำมาใช้

ฟางข้าวที่ใช้ทดลอง ใช้ฟางข้าวที่สับโดยใช้เครื่องสับ ขนาดฟางข้าวยาวประมาณ 4 ซม. สุ่มตัวอย่างเปลือกสับปะรดหมัก และฟางข้าวเพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีจากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเปลือกสับปะรดหมักและฟางข้าว ด้วยวิธี Proximate analysis ในห้องปฏิบัติการ ภาควิชาเทคโนโลยีทางสัตว์ คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ผลการวิเคราะห์ ดังแสดงใน ตาราง 12

ตาราง 12 แสดงคุณค่าของโภชนะในเปลือกสับปะรดหมักและฟางข้าว

ส่วนประกอบ	เปลือกสับปะรดหมัก	ฟางข้าว
วัตถุแห้ง (%)	10.51	96.08
อินทรียวัตถุ (%DM)	92.83	84.41
โปรตีน (%DM)	8.25	3.02
เยื่อใย NDF (%DM)	70.29	82.53
เยื่อใย ADF (%DM)	38.77	45.71

ในทุกการทดลอง ใช้เปลือกสับปะรดหมักผสมกับวัตถุดิบตามสูตรที่ได้คำนวณไว้ในตารางที่ 13 เพื่อนำอาหารผสมเสร็จใช้เลี้ยงทันทีโดยการผสมอาหารเป็นวันต่อวัน สำหรับในการทดลองที่ 1 และ 2 มีการเตรียมอาหารทดลอง ดังนี้

อาหารทดลองสูตรที่ 1 อาหารผสมเสร็จที่มีเปลือกสับปะรดหมัก และฟางข้าวสัดส่วน 50:0 (TMR1) แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมงแล้วบดผ่านตะแกรงขนาด 1 มิลลิเมตร

อาหารทดลองสูตรที่ 2 อาหารผสมเสร็จที่มีเปลือกสับปะรดหมัก และฟางข้าวสัดส่วน 45:5 (TMR2) เป็นแหล่งอาหารหยาบ แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วบดผ่านตะแกรงบดขนาด 1 มิลลิเมตร

อาหารทดลองสูตรที่ 3 อาหารผสมเสร็จที่มีเปลือกสับปะรดหมัก และฟางข้าวสัดส่วน 40:10 (TMR3) เป็นแหล่งอาหารหยาบ แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วบดผ่านตะแกรงบดขนาด 1 มิลลิเมตร

อาหารทดลองสูตรที่ 4 อาหารผสมเสร็จที่มีเปลือกสับปะรดหมัก และฟางข้าวสัดส่วน 35:15 (TMR4) เป็นแหล่งอาหารหยาบ แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วบดผ่านตะแกรงบดขนาด 1 มิลลิเมตร

สูตรอาหารทดลอง

ทำการคำนวณสูตรอาหารผสมเสร็จที่ใช้เปลือกสับปะรด เป็นแหล่งอาหารหยาบโดยให้มีโภชนะตามความต้องการของโค เพศผู้มีน้ำหนักตัว 400 กก.โดยอาศัยโปรแกรมสำเร็จรูป KCF 2000 รุ่นภาษาไทย (มนต์ชัย และ วิโรจน์, 2545) ได้อาหารผสมเสร็จที่มีส่วนประกอบดังแสดงในตาราง 13

ตาราง 13 ส่วนประกอบของอาหารผสมเสร็จ (TMR)

ส่วนประกอบ (% วัตถุแห้ง)	ราคา/กก.	อาหารผสมเสร็จ (TMR) TMR1	TMR2	TMR3	TMR4
เปลือกสับปะรด[1]/	4.00	50.00	45.00	40.00	35.00
ฟางข้าว	2.00	-	5.00	10.00	15.00
มันเส้น	4.00	18.80	18.10	22.50	24.20
รำละเอียด	5.00	20.00	20.00	13.50	10.30
กากถั่วเหลือง	13.30	5.50	6.20	8.50	9.90
ยูเรีย	9.00	1.50	1.50	1.50	1.50
กระดูกป่น	4.40	1.70	1.70	1.50	1.50
เกลือ	3.00	1.50	1.50	1.50	1.50
ปูนขาว	1.50	1.00	1.00	1.00	1.10
รวม		100	100	100	100
ราคา (บาท/กก.)		4.75	4.71	4.76	4.76
องค์ประกอบทางเคมี (จากการวิเคราะห์)					
วัตถุแห้ง (%)		18.82	19.58	21.47	23.52
อินทรียวัตถุ (%DM)		89.60	88.85	89.11	88.98
พลังงานรวม (GE, Mcal/kgDM)		3.98	4.01	3.92	3.90
โปรตีนหยาบ (%DM)		14.78	15.51	15.02	14.59
เยื่อใย ADF (%DM)		22.52	23.81	23.13	23.83
เยื่อใย NDF(%DM)		45.18	45.10	42.64	45.09

[1]/ ส่วนประกอบคิดเป็นน้ำหนักสดของอาหาร สูตรที่ 1, 2, 3 และ 4 เท่ากับ 476, 428.5, 381 และ 333 ตามลำดับ ทำให้น้ำหนักรวมของอาหารทั้ง 4 สูตร เท่ากับ 531, 489, 447 และ 405 กก. ตามลำดับ

การทดลองที่ 1 การศึกษาการสลายตัวของโภชนะ ในอาหารผสมเสร็จที่ใช้เปลือกสับปะรดหมักและฟางข้าวเป็นแหล่งอาหารหยาบ ในกระเพาะรูเมนโดยวิธีใช้ถุงไนลอน (nylon bag technique) ศึกษาการสลายตัวของอาหารผสมเสร็จที่ใช้เปลือกสับปะรดหมักและฟางข้าว เป็นแหล่งอาหารหยาบ ภายในกระเพาะรูเมนโดยวิธีใช้ถุงไนลอนตามวิธีการของ Ørskov and McDonald (1979)

วิธีการทดลอง

ใช้ถุงไนลอนที่ใช้ทดลองมีขนาดรูถุง 45 ไมโครเมตร มีขนาดถุง 9 x 14 เซนติเมตร สุ่มตัวอย่างอาหารทดลองทั้ง 4 สูตรที่เตรียมไว้ นำมาอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสและบดผ่านตะแกรงบดขนาด 1 มิลลิเมตร นำตัวอย่างอาหารประมาณ 5 กรัม ใส่ในถุงไนลอนที่ผ่านการอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง และทราบน้ำหนักถุงที่แน่นอน มัดปากถุงให้แน่น แล้วมัดถุงไนลอนติดกับสายยางแล้วนำไปร้อยใส่เชือก จากนั้นนำไปแช่บ่มในกระเพาะรูเมนตามช่วงเวลาดังนี้ 0, 4, 8, 12 , 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง แต่ละช่วงเวลาใช้ถุงไนลอน 3 ซ้ำต่อโคทดลอง 1 ตัว เมื่อครบกำหนดเวลา นำถุงไนลอนออกจากกระเพาะรูเมน โดยนำถุงออกมาพร้อมกับตัวอย่างถุงที่เวลา 0 ชั่วโมง (ที่เวลา 0 ชั่วโมง นำตัวอย่างทดลองไปแช่ในน้ำอุ่น อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที) ในการล้างถุงไนลอนจะนำถุงทั้งหมดล้างในภาชนะที่มีน้ำไหลตลอดเวลาเพื่อขจัดเศษอาหารที่ติดอยู่ตามนอกถุงออกให้หมดจนกว่าน้ำจะใส จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง แล้วนำไปใส่โถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักที่เหลือ หลังจากนั้นนำกากอาหารไปอบที่ อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เพื่อคำนวณค่าวัตถุแห้ง นำกากอาหารไปเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อหาปริมาณอินทรียวัตถุ และนำกากอาหารที่เหลือไปวิเคราะห์หาปริมาณเยื่อใย โปรตีน และเยื่อใยที่ไม่ละลายในสารละลายที่เป็นกลาง (NDF) จากนั้นคำนวณหาปริมาณโภชนะที่สลายตัว (disappearance) ในกระเพาะรูเมนที่เวลาการแช่บ่มต่าง ๆ จากสมการดังต่อไปนี้

$$\% \text{ DM disappearance} = \left[\frac{(W1+W2) - W3}{W2} \right] X \ 100$$

เมื่อ W1 = น้ำหนักถุง

W2 = น้ำหนักตัวอย่าง

W3 = น้ำหนักถุง + ตัวอย่างหลังการแช่ในกระเพาะรูเมน

ค่าการสลายตัวของโภชนะที่ชั่วโมงต่าง ๆ ที่ได้นำมาคำนวณหาค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ของการสลายตัวของโภชนะ โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป NEWAY (Chen, 2003) โดยใช้สมการจาก Ørskov and McDonald (1979) ดังนี้

$$P = a + b\,(1 - e^{-ct})$$

เมื่อ P = ค่าการย่อยสลายที่ช่วงเวลาต่าง ๆ (%)

a = ส่วนที่ละลายได้ทันที (%)

b = ส่วนที่ไม่ละลายแต่สามารถเกิดขบวนการหมักได้ (%)

e = log ฐาน 10

c = อัตราการย่อยสลายของ b (h^{-1})

t = ช่วงระยะเวลาต่าง ๆ

หลังจากคำนวณค่าการสลายตัวโดยโปรแกรมสำเร็จรูป NEWAY จะได้ค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ของการสลายตัวในกระเพาะรูเมนได้แก่ค่า a คือส่วนที่ละลายได้ทันที (immediately soluble fraction) ค่า b คือส่วนที่ไม่ละลายแต่สามารถถูกย่อยสลายได้โดยจุลินทรีย์ (degradability of insoluble fraction) ค่า a+b คือศักยภาพในการย่อยสลายได้ (potential degradability) ค่า c คืออัตราการย่อยสลาย (degradation rate) ค่า L คือช่วงเวลาที่เริ่มถูกย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ (lag time) และค่า $ED_{0.02}$ $ED_{0.05}$ และ $ED_{0.08}$ คือประสิทธิภาพการย่อยสลาย (effective degradation) ที่อัตรา 0.02, 0.05 และ 0.08 ส่วนต่อชั่วโมง ตามลำดับ

สัตว์ทดลองและการให้อาหาร

ใช้โคนมเพศผู้ตอน พันธุ์ลูกผสม (โฮลสไตน์ฟรีเชี่ยน x พื้นเมือง) อายุ 4.5 ปี จำนวน 4 ตัว น้ำหนักเฉลี่ย 360 ± 30 กิโลกรัม แต่ละตัวถูกเจาะกระเพาะแบบถาวร (permanent rumen fistulation) โคทุกตัวอยู่ในคอกผูกยืนโรงที่มีบริเวณที่ให้อาหารและน้ำกินอย่างอิสระตลอดเวลา วางแผนการทดลองแบบลาตินสแควร์ (Latin Square Design) กลุ่มการทดลอง 4 กลุ่มตามชนิดของอาหาร คือ อาหารผสมเสร็จที่มีเปลือกสับปะรดหมัก และฟางข้าวสัดส่วน 50:0 (TMR1) อาหารผสมเสร็จที่มีเปลือกสับปะรดหมัก และฟางข้าวสัดส่วน 45:5 (TMR2) อาหารผสมเสร็จที่มีเปลือกสับปะรดหมักและฟางข้าวสัดส่วน 40:10 (TMR3) และอาหารผสมเสร็จที่มีเปลือกสับปะรดหมัก และฟางข้าวสัดส่วน 35:15 (TMR4) โดยให้กิน 2.5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว ประมาณ 7.5 – 8 กิโลกรัมต่อตัวต่อวัน โดยให้อาหารวันละ 2 เวลา คือ 7.00 น. และ 18.00 น. ก่อนทำการทดลองแช่ถุงไนลอนในกระเพาะรูเมน ให้อาหารทดลองในระยะก่อนการทดลองเป็นเวลา 14 วัน เพื่อให้ตัวสัตว์ทดลองและจุลินทรีย์ภายในกระเพาะรูเมนได้ปรับสภาพกับอาหารที่จะใช้ทดลอง

การวิเคราะห์ทางสถิติ

เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการสลายตัวของโภชนะในอาหารผสมเสร็จที่ใช้เปลือกสับปะรดหมักและฟางข้าว เป็นแหล่งอาหารหยาบ ใช้วิธีวิเคราะห์วาเรียนซ์ (analysis of variance ; ANOVA) ตามแผนการทดลองแบบ Latin Square Design (LSD) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มการทดลองด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (Steel and Torrie, 1984) โดยการใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SAS (1996)

การทดลองที่ 2 การศึกษาการย่อยได้ของโภชนะในอาหารผสมเสร็จที่ใช้เปลือกสับปะรดหมัก และฟางข้าว เป็นแหล่งอาหารหยาบโดยใช้ชุดกระเพาะหมักเทียมตามวิธี *in vitro* true digestibility (IVTD)

ศึกษาการย่อยได้ของโภชนะในอาหารผสมเสร็จที่ใช้เปลือกสับปะรดหมัก และฟางข้าว เป็นแหล่งอาหารหยาบ โดยวิธี *in vitro* true digestibility (IVTD) ซึ่งวิธีนี้ได้รับการปรับปรุงมาจาก 2 วิธีการของ Tilly and Terry (1963) เพื่อให้ผลการทดลองที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น และลดแรงงานในการทดลอง เนื่องจากเป็นการใช้เครื่องมือแทนสัตว์ทดลอง ผลการทดลองที่ได้มีค่าใกล้เคียงกับการทดลองด้วยวิธีการอื่น ๆ ในการทดลองด้วยวิธีนี้ใช้เครื่องมือชุดกระเพาะหมักเทียม (ANKOM Daisy^{II}) (Holden, 1999)

วิธีการทดลอง

เตรียมสารละลายที่ใช้ในการทดลอง ส่วนประกอบของสารละลายแสดงในตารางที่ 14 เตรียมสารละลาย A โดยการผสมสารเคมี KH_2PO_4 จำนวน 10 กรัม สาร $MgSO_47H_2O$ จำนวน 0.5 กรัม สาร NaCl จำนวน 0.5 กรัม สาร $CaCl_2.2H_2O$ จำนวน 0.1 กรัม และยูเรีย จำนวน 0.5 กรัม ลงในน้ำกลั่นปราศจากไอออน (deionized water) จำนวน 1 ลิตร เตรียมสารละลาย B โดยการผสมสารเคมี Na_2CO_3 จำนวน 15 กรัม และสาร $Na_2S.9H_2O$ จำนวน 1.0 กรัม ลงในน้ำกลั่นปราศจากไอออน (deionized water) จำนวน 1 ลิตร

ตารางที่ 14 ส่วนประกอบของสารละลายที่ใช้ในการทดลอง

สารเคมี		กรัม/ลิตร
Buffer Solution A		
Potassium dihydrogen phosphate	(KH_2PO_4)	10.0
Magnesiumsulfate-Heptahydrate	($MgSO_47H_2O$)	0.5
Sodium chloride	(NaCl)	0.5
Calciumchlorid-Dihydrate	($CaCl_2.2H_2O$)	0.1
Urea (reagent grade)		0.5
Buffer Solution B		
Sodium Carbonate anhydrous	(Na_2CO_3)	15.0
Sodium sulphide nonahydrate	($Na_2S.9H_2O$)	1.0

ที่มา : Holden (1999)

เตรียมตัวอย่างอาหารทดลองทั้ง 4 ชนิดใส่ในถุงที่ชั่งน้ำหนักและเขียนหมายเลขแล้ว โดยสุ่มตัวอย่างอาหารทดลองทั้ง 4 สูตร นำมาอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสและบดผ่านตะแกรงบดขนาด 1 มิลลิเมตร จากนั้นชั่งตัวอย่างอาหาร 0.5 กรัมลงในถุงแล้วปิดปากถุงให้สนิทด้วยเครื่องทำความร้อน จากนั้นนำถุงที่มีอาหารทดลองใส่ลงในโถที่ใช้กับชุดการทดลองโดยใช้เครื่องมือชุดกระเพาะหมักเทียม ANKOM Daisy^{II} ในหนึ่งโถสามารถใส่ได้ 25 ถุง เติมสารละลาย A จำนวน 1,330 มิลลิลิตร และ สารละลาย B จำนวน 266 มิลลิลิตร ลงในโถ แล้วนำไปแช่บ่มที่อุณหภูมิ 39.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

เตรียมของเหลวจากกระเพาะรูเมน โดยเก็บตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะรูเมนพร้อมด้วยอาหารที่อยู่ในกระเพาะรูเมน ซึ่งเป็นอาหารชนิดเดียวกับอาหารที่ใช้ทดลอง ใส่ลงในกระบอกสุญญากาศจนเต็ม จากนั้นนำมาปั่นด้วยเครื่องปั่นแล้วกรองด้วยผ้าขาวบาง ตวงให้ได้ปริมาตร 400 มิลลิลิตร แล้วนำลงใส่ในโถ พร้อมทั้งเติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ จากนั้นนำโถเข้าแช่บ่มในเครื่องมือชุดกระเพาะหมักเทียม ANKOM DAISY^{II} ที่อุณหภูมิ 39.5 องศาเซลเซียส เมื่อครบกำหนดเวลานำออกมาล้างด้วยน้ำจนสะอาด แล้วนำถุงเข้าอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส จน

น้ำหนักคงที่ ชั่งน้ำหนักที่เหลือและสุ่มตัวอย่างอาหารเพื่อวิเคราะห์คุณค่าทางอาหารคือ วัตถุแห้ง ความชื้น เถ้า โปรตีน เยื่อใย และ NDF นำค่าเฉลี่ยที่ได้ไปคำนวณค่าการย่อยได้ของโภชนะจากสูตร

$$\%IVTD = 100 - \left[\frac{(w3 - (w1 \times w4)) \times 100}{w2} \right]$$

โดย w1 = น้ำหนักถุงเปล่า w2 = น้ำหนักอาหารทดลอง w3 = น้ำหนักถุงพร้อมอาหารทดลอง
w4 = น้ำหนัก blank (น้ำหนัก blank หลังการแช่บ่ม / น้ำหนัก blank)

การวิเคราะห์ทางสถิติ

เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการย่อยได้ของโภชนะในอาหารผสมเสร็จที่ใช้เปลือกสับปะรดหมักและฟางข้าว เป็นแหล่งอาหารหยาบ ใช้วิธีวิเคราะห์วาเรียนซ์ (analysis of variance ; ANOVA) ตามแผนการทดลองแบบ Latin Square Design (LSD) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มการทดลองด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (Steel and Torrie, 1984) โดยการใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SAS (1996)

การทดลองที่ 3 การศึกษาการย่อยได้ของโภชนะในอาหารผสมเสร็จที่ใช้เปลือกสับปะรดหมัก และฟางข้าว เป็นแหล่งอาหารหยาบด้วยวิธีใช้สารบ่งชี้ (indicator method)

สารบ่งชี้ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้คือ เถ้าที่ไม่ละลายในกรด (acid insoluble ash ; AIA) ซึ่งเป็นสารที่มีอยู่แล้วในอาหารทดลอง

วิธีการทดลอง

ให้โคทดลองได้รับอาหารผสมเสร็จที่ใช้เปลือกสับปะรดหมัก และฟางข้าว เป็นแหล่งอาหารหยาบทั้ง 4 สูตร โดยให้ 2.5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว ประมาณ 7.5 – 8 กิโลกรัมวัตถุแห้งต่อตัวต่อวัน ในแต่ละระยะของการทดลอง (period) ใช้เวลาทั้งหมด 20 วัน โดย 14 วันแรก เพื่อให้โคทดลอง และจุลินทรีย์ภายในกระเพาะรูเมนได้ปรับตัวให้เข้ากับอาหารทดลองที่ได้รับ (preliminary period) และ 6 วันสุดท้ายสำหรับเก็บข้อมูล (collection period) บันทึกปริมาณอาหารที่กินและมูล สุ่มเก็บตัวอย่างอาหารที่สัตว์กิน และ มูลในช่วง 6 วันสุดท้ายโดยสุ่มรายตัว และเก็บทุก ๆ วันติดต่อกัน สุ่มเก็บตัวอย่าง 3 ครั้งต่อวัน คือเวลา 7.00 น. 12.00 น. และ 18.00 น. ในแต่ละเวลาสุ่มเก็บตัวอย่างจำนวน 500 กรัม นำมูลที่ได้จากตัวสัตว์ในแต่ละวันมาผสมกันแล้วสุ่มมาประมาณ

500 กรัม นำมาอบที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสจนแห้ง หลังจากนั้นนำมาวิเคราะห์หา AIA รวมทั้งโภชนะที่เหลืออยู่ในมูลเพื่อหาการย่อยได้ของโภชนะ ดังนี้

$$\text{สัมประสิทธิ์การย่อยได้ของสิ่งแห้ง (\%)} = 100 - 100 \times \left[\frac{\%\text{AIA ในอาหาร}}{\%\text{AIA ในมูล}} \right]$$

$$\text{สัมประสิทธิ์การย่อยได้ของโภชนะ (\%)} = 100 - 100 \times \left[\frac{\%\text{AIA ในอาหาร} \times \%\text{ โภชนะในมูล}}{\%\text{AIA ในมูล} \times \%\text{ โภชนะในอาหาร}} \right]$$

การวิเคราะห์ทางสถิติ

เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการย่อยได้ของโภชนะในอาหารข้นที่มีกากส่าเหล้าและอาหารข้นที่มีกากส่าเหล้าร่วมกับวัตถุดิบอาหารสัตว์ชนิดอื่น ใช้วิธีวิเคราะห์วาเรียนซ์ (analysis of variance ; ANOVA) ตามแผนการทดลองแบบ Latin Square Design (LSD) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มการทดลองด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (Steel and Torrie, 1984) โดยการใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SAS (1996)

การทดลองที่ 4 การศึกษาผลของอาหารผสมเสร็จที่ใช้เปลือกสับปะรดหมัก และฟางข้าวเป็นแหล่งอาหารหยาบ ต่อการเปลี่ยนแปลงของกรดไขมันระเหยง่ายในกระเพาะรูเมน

วิธีการทดลอง

ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design) เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงค่ากรดไขมันระเหยง่าย และค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารผสมเสร็จที่มีสัดส่วนของเปลือกสับปะรดหมักและฟางข้าวเป็นแหล่งอาหารหยาบหรือเยื่อใย ใช้โคนมเพศผู้ตอน ลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเซียน x พื้นเมือง ที่ถูกเจาะกระเพาะใส่ท่อเก็บตัวอย่างอาหารแบบถาวร (permanent rumen fistulation) จำนวน 4 ตัว ให้โคกินอาหารแห้ง 2.5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัวเป็นเวลา 21 วัน เพื่อให้ปรับตัวเข้ากับสภาพการทดลอง ก่อนเก็บตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะรูเมน เพื่อวิเคราะห์หาความเข้มข้นของกรดไขมันที่ระเหยได้ง่ายในชั่วโมงต่าง ๆ คือ ก่อนกินอาหาร (ชั่วโมงที่ 0) และหลังจากกินอาหาร 2, 4 และ 8 ชั่วโมงตามลำดับ ก่อนเก็บตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะรูเมน สุ่มตัวอย่างของเหลวในกระเพาะรูเมนจากโคทดลองตัวละประมาณ 100 มล.ต่อครั้ง แล้วนำมา

วัดค่า pH ทันที ด้วยเครื่องวัด pH แบบ Hand pH meter รุ่น HI 98107 แบ่งตัวอย่างประมาณ 50 มล. สำหรับวัดค่ากรดไขมันระเหยง่าย การเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันที่ระเหยง่ายใช้วิธีการที่ประยุกต์จากวิธีของ Doane *et al.* (1997) โดยทำการเก็บตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะรูเมนนำมาเหวี่ยงที่ 200 x g เป็นเวลา 3 นาที แล้วนำส่วนที่เป็นของเหลวใสจำนวน 1.5 ml เหวี่ยงที่ 200 x g เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนที่เป็นของเหลวใสแช่แข็งไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมงจากนั้นนำตัวอย่างมาละลายและผสมให้เข้ากัน ดูดตัวอย่าง 350 ไมโครลิตร ใส่ลงใน centrifuge tube ที่มีกรดซัลฟูริกเข้มข้น 50 มิลลิโมล จำนวน 40 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที และทำการปั่นอีกครั้งที่ 4,000 x g เป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงนำส่วนที่ใสไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของกรดไขมันที่ระเหยได้ง่ายด้วยเครื่อง HPLC (Shimadzu Corporation, Chiyoda-ku, Japan) โดยใช้คอลัมน์ ODS-3 (4.6 x 150 mm) (GL Science Inc. Shinjuku-ku, Japan) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดยใช้ กรดซัลฟูริก 50 มิลลิโมล เป็นวัฏภาคไหล และใช้ UV-Vis detector เป็นเครื่องตรวจวัดให้

การวิเคราะห์ทางสถิติ

เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการย่อยได้ของโภชนะในอาหารอาหารผสมเสร็จที่มีเปลือกสับปะรดหมักและฟางข้าวเป็นแหล่งอาหารหยาบระดับต่างๆ ใช้วิธีวิเคราะห์วาเรียนซ์ (analysis of variance ; ANOVA) ตามแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มการทดลองด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (Steel and Torrie, 1984) โดยการใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SAS (1996)