ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การวิเคราะห์ค่าโปรตีนที่ถูกย่อยสลายในกระเพาะรูเมนในห้องปฏิบัติการโดยใช้เอนไซม์

(Degradability of Feed Protein by In Vitro Enzymatic Methods)

การวิเคราะห์ค่าโปรตีนที่ถูกย่อยสลายในกระเพาะรูเมนในห้องปฏิบัติการโดยใช้เอนไซม์
(Degradability of Feed Protein by In Vitro Enzymatic Methods)

โดยวิธีการของ Coblentz et al. (1999)

อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์

1. อ่างน้ำ (water-bath) ที่ควบคุมอุณหภูมิได้ หรือตู้บ่ม (incubator)
2. ขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร
3. กระดาษ Whatman No. 541 (Whatman Internatinal Ltd., Maidstone, England)

สารเคมี

1. borate-phosphate buffer (BPB) ค่า pH 8.0 สารละลาย BPB เตรียมโดยสารละลาย NaH2PO$_4$.H$_2$O 7.6 กรัม และ Na$_2$B$_4$O$_7$.10H$_2$O 13.17 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร
2. Stretomyces griceus Protease (SGP) (P-5147; Sigma Chemica Co., St. Louis, MO; 1 unit representr the quantity of enzyme that will hydrolyse casein to produce color with Folin-Ciocalteu reagent equivalent to 1 umol tyrosin/min at pH 7.5 and 36°C contained .5 enzyme activity units/mg of solid) สารละลายเอนไซม์ความเข้มข้น 0.33 units/ml เตรียมโดยสารละลายเอนไซม์ปริมาณ 6.0 มิลลิกรัม ในสารละลาย BPB จำนวน 100 มิลลิลิตร
3. sodium azide (1%, wt/vol) สารละลาย sodium azide เตรียมโดยละลาย sodium azide 11 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

วิธีการ

1. ชั่งน้ำหนักตัวอย่างที่มีไนโตรเจนประกอบอยู่ 15 มิลลิกรัม (total N) ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร
2. เทสารละลาย borate-phosphate buffer (BPB) ค่า pH 8.0 ปริมาณ 40 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ที่มีตัวอย่าง จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส
3. เติม 1 มิลลิลิตร ของ sodium azide (1% wt/vol) ใส่ในขวดรูปชมพู่ ซึ่ง sodium azide ทำหน้าที่ป้องกันจุลินทรีย์

4. หลังจากบ่มกับสารละลาย BPB เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วเติมสารละลายย่อยโปรตีน (protease solution) 10 มิลลิลิตร ที่มีความเข้มข้นของกิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 0.33 units/ml (คิดเป็นความเข้มข้นสุดท้ายทั้งหมด 0.066 units/ml)
5. หลังการเติมสารละลายน้ำย่อยโปรตีนทำการบ่มต่อไปอีก 48 ชั่วโมง (การหยุดกิจกรรมการย่อยโดยวางขวดรูปชมพู่ไว้บนน้ำแข็งหรือแช่ในตู่เย็น)
6. ทำการกรองสารละลายทันที โดยใช้กระดาษกรอง Whatman No. 541 แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น (deionised water) จำนวน 40 มิลลิลิตร (อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส)
7. นำไปทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส จนกระทั่งแห้งสนิท
8. ชั่งออกน้ำหนักตัวอย่างที่เหลือ
9. นำตัวอย่างที่เหลือไปวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนที่เหลืออยู่ (residue N) โดยวิธี Kjeldahl method

การคำนวณค่า UDP

RDP (%) = 100-[(residue N/total N) x 100]

UDP (%) = 100 - RDP (%)

ภาคผนวก ข

การศึกษาคุณค่าทางโภชนะ และจลนพลศาสตร์การย่อยสลายของสูตรอาหารผสมสำเร็จรูป (total mixed ration, TMR) ที่มีระดับอาหารหยาบ ซังข้าวโพด และฟางข้าวที่ระดับต่างกัน โดยวิธี in vitro gas production technique

การศึกษาคุณค่าทางโภชนะ และจลนพลศาสตร์การย่อยสลายของสูตรอาหารผสมสำเร็จรูป (total mixed ration, TMR) ที่มีระดับอาหารหยาบ ซังข้าวโพด และฟางข้าวที่ระดับต่างกัน โดยวิธี in vitro gas production technique

โดยวิธีการของ Menke and Steelgass (1988)

การเตรียมวัตถุดิบอาหารปัจจัยการทดลอง

นำตัวอย่างอาหารทดลองที่ผ่านการอบร้อนแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาบดขนาด 50 มิลลิลิตร พร้อมทำการปิดฝาให้สนิทด้วยจุกยางและครอบแน่นด้วยฝาอะลูมิเนียม แล้วทำการบ่มในตู่อบร้อนแห้งที่ 39 องศาเซลเซียส เพื่อรอการบรรจุสารละลายของเหลวจากกระเพาะรูเมนผสม

การเตรียมสารละลายของเหลวจากกระเพาะรูเมนผสม (rumen inoculum)

ทำการเตรียมสารละลายโดยใช้ของเหลวในกระเพาะรูเมนและสารละลาย ตามวิธีการของ Menke and Steingass. (1988) ดังนี้

1. สารละลายแร่ธาตุหลัก (macromineral solution)
- Na_2HPO_4 5.7 กรัม
- KH_2PO_4 6.2 กรัม
- $MgSO_4$ 0.6 กรัม
- เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร

2. สารละลายแร่ธาตุรอง (micromineral solution)
- $CaCl_2 2.H_2O$ 13.2 กรัม
- MnCl24.H2O 10.0 กรัม
- CoCl26.H20 1.0 กรัม
- เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร

3. สารละลายบัฟเฟอร์ (buffer solution)
- NaHCO3 35 กรัม
- (NH4) HCO3 4 กรัม
- เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร

4. สารละลายรีซาซูริน (resazurin aqueous)
- รีซาซูริน 100 มิลลิกรัม
- เติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร

5. สารละลายสำหรับไล่ออกซิเจน (เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้)

- น้ำกลั่น 47.5 มิลลิลิตร
- 1 M NaOH 2.0 มิลลิลิตร
- Na2S9.H2O 336 มิลลิลิตร

สารละลายน้ำลายเทียม (artificial saliva) 1000 มิลลิลิตร

1. น้ำกลั่น 475 มิลลิลิตร
2. สารละลายแร่ธาตุหลัก 240 มิลลิลิตร
3. สารละลายแร่ธาตุรอง 0.12 มิลลิลิตร
4. สารละลายบัฟเฟอร์ 240 มิลลิลิตร
5. รีซาซูริน 1.22 มิลลิลิตร
6. สารละลายไล่ออกซิเจน

วิธีการ

1. เตรียมสารละลายน้ำลายเทียม โดยเติมน้ำกลั่น สารละลายแร่ธาตุหลัก แร่ธาตุรอง สารละลายบัฟเฟอร์ และรีซาซูริน ตามสัดส่วนข้างต้นใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 2000 มิลลิลิตร ที่ต่อท่อแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เพื่อไล่ออกซิเจน แล้วนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส โดยใช้ magnetic stirrer กวนอยู่ตลอดเวลา จากนั้นเติมสารละลายสำหรับไล่ออกซิเจน จนเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีชมพู แสดงว่าสารละลายดังกล่าวอยู่ในสภาวะไร้ออกซิเจน

2. เก็บตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะรูเมนจากโคนมเจาะกระเพาะจำนวน 3 ตัว นำมาผสมรวมกันจากนั้นกรองผ่านผ้าขาวบาง เพื่อนำผสมกับน้ำลายเทียมในสัดส่วนของน้ำลายเทียมต่อของเหลวจากกระเพาะรูเมนเท่ากับ 2 ต่อ 1 ก็จะได้สารละลายของของเหลวจากกระเพาะรูเมนผสม

การบรรจุสารละลายของเหลวจากกระเพาะรูเมนและการบ่ม

ทำการบรรจุสารละลายของเหลวจากกระเพาะรูเมนผสม ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนในขวดที่บรรจุวัตถุดิบอาหารทดลองขวดละ 30 มิลลิลิตร จากนั้นนำเข้าบ่มในตู้อบร้อนแห้งที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส เพื่อทำการวัดปริมาณแก๊ส

การเก็บข้อมูล

ผลผลิตแก๊ส

ทำการจดบันทึกปริมาตรของแก๊สที่เกิดขึ้นโดยใน 12 ชั่วโมงแรกทำการบันทึกผลทุก ๆ 1 ชั่วโมง ต่อมาบันทึกทุก ๆ 3 ชั่วโมงจนถึงชั่วโมงที่ 24 จากนั้นบันทึกทุก ๆ 6 ชั่วโมงจนถึงชั่วโมงที่ 78 และสุดท้ายทำการบันทึกชั่วโมงที่ 96

นำค่าผลผลิตแก๊สที่ได้มาหาค่าคงที่ a, b และ c โดยการใช้แกรมสำเร็จรูป fit curve เพื่อการอธิบายจลนพลศาสตร์ของการผลิตแก๊สตามแบบหุ่นจำลองสมการของ Ørskov and McDonald (1979) ดังนี้

$$y = a + b[1 - Exp(ct)]$$

เมื่อ y = ผลผลิตแก๊สที่เกิดขึ้น ณ เวลา t

a = จุดตัดแกน y

b = ค่าปริมาณแก๊ส ณ จุดที่เส้นกราฟเรียบ (asymptote)

c = ค่าอัตราการผลิแก๊ส

ความสามารถในการย่อยได้ของวัตถุแห้ง (in vitro dry matter digestibility:IVDMD) และอินทรีย์วัตถุ (in vitro organic matter digestibility:IVOMD)

หลังการบ่มชั่วโมงที่ 24 และ 48 แต่ละครั้งทำการสุ่มขวดย่อยในแต่ละปัจจัยการทดลองออกมาปัจจัยการทดลองละ 2 ขวด นำเข้าแช่เย็นทันทีที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อหยุดกิจกรรมของจุลินทรีย์ และทำการวิเคราะห์ในภายหลัง เมื่อต้องการทำการวิเคราะห์ได้นำออกจากตู้แช่แข็งปล่อยให้ละลาย ทำการกรองของแข็งที่เหลือจากการย่อย นำไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และนำไปเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง เพื่อนำค่าวัตถุแห้ง และเถ้าที่เหลือจากการย่อยไปทำการคำนวณ ดังสมการ

$$IVDMD(\%) = \left[\frac{\text{น้ำหนักแห้งเริ่มต้น} - \text{น้ำหนักแห้งที่เหลือหลังการบ่ม}}{\text{น้ำหนักวัตถุแห้งเริ่มต้น}}\right] \times 100$$

$$IVOMD(\%) = \left[\frac{\text{น้ำหนักอินทรีย์วัตถุเริ่มต้น} - \text{น้ำหนักอินทรีย์วัตถุที่เหลือหลังการบ่ม}}{\text{น้ำหนักอินทรีย์วัตถุเริ่มต้น}}\right] \times 100$$

ภาคผนวก ค

การวิเคราะห์การย่อยได้ของวัตถุแห้งแบบ in vitro โดยใช้ pepsin-cellulase

(Pepsin-cellulase in vitro dry matter digestibility)

การวิเคราะห์การย่อยได้แบบ in vitro โดยใช้ pepsin-cellulase
(Pepsin-cellulase in vitro dry matter digestibility)

โดยวิธีการของ McLeod and Minson (1978)

อุปกรณ์

1. หลอดพลาสติก (polyethylene tube) และฝาเกลียว (screw cap)
2. ที่วางหลอด (tube rack)
3. กระบอกตวง (cylinder) ขนาด 50 มิลลิลิตร
4. Filter stick หรือ gas distribution
5. เครื่องดูดสุญญากาศ (vacuum pump)
6. Incubator
7. Oven
8. เตาเผา (muffle)
9. Sintered glass crucible หรือ Gooch crucible

สารเคมี

1. HCl 0.1 N
2. pepsin (1:1000)
3. Cellulase ONOZUKA 3S
4. Sodium acetate ($CH_3COONa._3H_2O$)
5. Choramphenicol tablet

การเตรียมสารเคมี

1. สารละลาย acid-pepsin:0.2%(w/v) pepsin (1:1000) 0.1 N. HCl

- Acid:0.1 N. HCl ตวง 8.5 ml. กรดเกลือ, specific gravity 1.18 ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น
- Acid-pepsin:ชั่ง 2 กรัม pepsin (1:10,000) ละลายใน 1 ลิตร 0.1 N. HCl

2. สารละลาย cellulose-acetate-buffer:1.25% (w/v)-ONOZUKA 3S cellulose ใน 0.05 M. acetate-buffer (pH 4.6) ที่มี chloramphecol 100 µg/ml

- acetate-buffer:ชั่ง 6.8 กรัม sodium acetate (CH_3COOH) ปรับปริมาณสุดท้ายให้เป็น 1 ลิตร และนำมาปรับค่า pH ให้ได้ 4.6 และเติม chloramphecol 1 เม็ด (250 mg) ต่อ acetate buffer 2.5 ลิตร

- Cellulase-acetate buffer ต่อหลอดชั่ง 0.625 กรัม cellulose (ONOZuKA. 3S) ละลายใน 50 ml. acetate buffer

ขั้นตอนการทำงาน

วันที่ 1

1. การเตรียมตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ประกอบด้วย ตัวอย่างมาตรฐาน (standard sample) ที่มีลักษณะส่วนประกอบเหมือนตัวอย่างที่วิเคราะห์หาการย่อยได้ ที่ทราบค่าเปอร์เซ็นต์การย่อยได้แล้ว และตัวอย่างที่จะวิเคราะห์และหลอดเปล่าสำหรับ blank โดยการชั่งตัวอย่างอาหารให้ได้น้ำหนักแน่นอนประมาณ 0.5 กรัม ลงในหลอดพลาสติกขนาด 2.5 เซนติเมตร พร้อมฝาเกลียว (screw cap)
2. นำหลอดตัวอย่างเติมสารละลาย acid-pepsin ที่เตรียมขึ้นใหม่ๆ และอุ่นให้มีอุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส หลอดละ 50 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน และเข้าอบไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ (incubator) ตั้งอุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

วันที่ 2

1. เขย่าวันละ 3 เวลา (เช้า เที่ยง เย็น)

วันที่ 3

1. เมื่อครบ 48 ชั่วโมง นำมาเหวี่ยงใส (centrifuge) นาน 10 นาที แล้วใช้ filter stick ดูดส่วนที่เป็นน้ำทิ้ง ล้างตะกอนในหลอดทดลองด้วยน้ำกลั่นประมาณ 75 มิลลิลิตร ปรับน้ำล้างในหลอดทดลองให้เท่ากันแล้วนำมาเหวี่ยงใสอีกครั้ง 10 นาที แล้วดูดส่วนที่เป็นน้ำออกด้วย filter stick และล้าง filter stick ด้วยน้ำกลั่นอย่างจำกัด
2. นำมาเติมสารละลาย cellulose-acetate-buffer ที่เตรียมขึ้นใหม่ๆ และอุ่นให้ได้อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส ลงในหลอดตัวอย่างหลอดละ 50 มิลลิลิตร เปิดฝาเกลียว
3. นำเข้าอบอีกครั้งในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง

วันที่ 4

1. การเตรียม sintered glass crucible โดยการอบแห้งและเข้าเผาที่อุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส ประมาณ 2 ชั่วโมง ให้เย็นในโถอบแห้ง และชั่งน้ำหนักแน่นอนไว้
2. เขย่าวันละ 3 เวลา (เช้า เที่ยง และเย็น)

วันที่ 5

1. เมื่อครบ 48 ชั่วโมง นำมากรองใน crucible ที่เตรียมไว้แล้ว โดยใช้เครื่องดูดสุญญากาศช่วยและล้างตะกอนให้ทั่วด้วยน้ำกลั่น
2. นำเข้าอบแห้งที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

วันที่ 6

1. นำตัวอย่างออกจากตู้อบแห้ง ทำให้เย็นในโถอบแห้งและชั่งน้ำหนักคืน
2. นำเข้าเผาในเตาเผาที่อุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และทำให้เย็นในโถอบแห้ง และชั่งน้ำหนักคืน ถ้าต้องการหาเปอร์เซ็นต์ organic matter digestibility (OMD)

การคำนวณ

$$\text{IVDMD} = 100 \times \frac{(\text{น้ำหนักตัวอย่าง \%DM}) - (\text{น้ำหนักสิ่งตกค้างตัวอย่าง} - \text{น้ำหนักเฉลี่ยสิ่งตกค้าง(blank)})}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง \%DM}}$$

ข้อควรระวัง

สารละลาย acid-pepsin และ cellulose-acetate-buffer ต้องเตรียมขึ้นใหม่ก่อนใช้ และควรมีอุณหภูมิอยู่ที่ 39 องศาเซลเซียส ก่อนที่จะนำมาผสมกับตัวอย่าง