ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
การศึกษาคุณค่าทางโภชนะ และจลนพลศาสตร์การย่อยสลาย ของสูตรอาหาร ทดลองโดยวิธี *in vitro* gas production technique

การศึกษาคุณค่าทางโภชนะ และจลนพลศาสตร์การย่อยสลาย ของสูตรอาหารทดลอง โดยวิธี *in vitro* gas production technique

วิธี *in vitro* gas production technique พัฒนาโดย Menke and Steingass (1988) เป็นการวัดปริมาตรแก๊สที่เกิดขึ้นระหว่างการบ่ม (incubation) อาหารด้วยของเหลวจากกระเพาะรูเมนในระบบปิด เนื่องจากในกระบวนการหมักของจุลินทรีย์ภายในกระเพาะรูเมนจะเกิดแก๊สขึ้น และแก๊สส่วนใหญ่เป็นแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) และแก๊สเมธเทน (CH_4) ปริมาตรแก๊สที่วัดได้มีความสัมพันธ์กับความสามารถในการย่อยได้ของอาหาร และค่าพลังงานของอาหาร ดังนั้น วิธี *in vitro* gas production technique จึงเป็นข้อมูลพื้นฐานที่ใช้ประเมินคุณภาพอาหารได้

อุปกรณ์

1. ถังบรรจุ และแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์
2. สายนำแก๊ส และอุปกรณ์แยกทางแก๊ส (three way)
3. ขวดวัคซีนขนาด 50 มิลลิลิตร พร้อมจุกยาง และฝาครอบอะลูมิเนียม
4. กระบอกฉีดยาพลาสติกขนาด 60 มิลลิลิตร (สำหรับถ่ายเทของเหลว)
5. กระบอกฉีดยาแก้วขนาด 10 มิลลิลิตร (สำหรับวัดปริมาตรแก๊ส)
6. เข็มฉีดยาเบอร์ 18 ความยาว 1 และ 2.5 นิ้ว (สำหรับถ่ายเทของเหลว และถ่ายเทอากาศ)
7. เข็มฉีดยาเบอร์ 24 ความยาว 1 นิ้ว (สำหรับวัดปริมาตรแก๊ส)
8. เครื่องกวนสารให้ความร้อน (hot plate stirrer)
9. ขวดรูปชมพู่ที่มีท่อดูด (suction flask) ขนาด 2 ลิตร พร้อมจุกยางที่มีท่อแยกแก๊ส
10. ตู้อบ (hot air oven)

วิธีการ

1. เตรียมวัตถุดิบอาหารปัจจัยการทดลอง

นำตัวอย่างอาหารทดลอง ที่ผ่านการอบร้อนแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาบดผ่านตะแกรงขนาด 1 มิลลิเมตร จากนั้นทำการบรรจุตัวอย่างอาหารน้ำหนัก 0.2 กรัม ในขวดขนาด 50 มิลลิลิตร พร้อมทำการปิดฝาให้สนิทด้วยจุกยาง และครอบแน่นด้วยฝาอะลูมิเนียม (ภาพที่ 1) แล้วทำการบ่มในตู้อบแห้งที่ 39 องศาเซลเซียส เพื่อรอการบรรจุสารละลายของเหลวจากกระเพาะรูเมนผสม

2. **เตรียมของเหลวจากกระเพาะรูเมน (rumen fluid)**

การทดลองครั้งนี้ได้เก็บของเหลวจากกระเพาะรูเมนของโคทดลองที่ได้รับสูตรอาหารผสมสำเร็จโดยใช้ stomach tube สอดผ่านหลอดอาหารแล้วดูดของเหลวจากกระเพาะรูเมนโดยใช้ vacuum pump จากนั้นนำมากรองผ่านผ้าขาวบาง แล้วอุ่นที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส พร้อมต่อกับท่อแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ (สร้างสภาพให้คล้ายกับในกระเพาะรูเมนมากที่สุด) เพื่อรอนำมาผสมกับน้ำลายเทียม

3. **เตรียมสารละลายของเหลวจากกระเพาะรูเมนผสม (rumen inoculum)**

ทำการเตรียมสารละลายโดยใช้ของเหลวในกระเพาะรูเมน และสารละลาย ดังนี้

3.1 สารละลายแร่ธาตุหลัก (macromineral solution)

1) Na_2HPO_4 5.7 กรัม
2) KH_2PO_4 6.2 กรัม
3) $MgSO_4$ 0.6 กรัม
4) เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร

3.2 สารละลายแร่ธาตุรอง (micromineral solution)

1) $CaCl_2.2H_2O$ 13.2 กรัม
2) $MnCl_2.4H_2O$ 10.0 กรัม
3) $CoCl_2.6H_2O$ 1.0 กรัม
4) $FeCl_2.6H_2O$ 8.0 กรัม
5) เติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร

3.3 สารละลายบัฟเฟอร์ (buffer solution)

1) $NaHCO_3$ 35 กรัม
2) NH_4HCO_3 4 กรัม
3) เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร

3.4 สารละลาย รีซาซูริน (resazurin aqueous)

1) Resazurin 0.1 กรัม
2) เติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร

3.5 สารละลายสำหรับไล่ออกซิเจน (เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้)

1) น้ำกลั่น 71.3 มิลลิลิตร
2) 1 M NaOH 3.0 มิลลิลิตร
3) $Na_2S_9.H_2O$ 504 มิลลิกรัม

3.6 สารละลายน้ำลายเทียม (artificial saliva) 1,500 มิลลิลิตร

1) น้ำกลั่น 712.5 มิลลิลิตร
2) สารละลายแร่ธาตุหลัก 360.0 มิลลิลิตร

3) สารละลายแร่ธาตุรอง	0.12	มิลลิลิตร
4) สารละลายบัฟเฟอร์	360.0	มิลลิลิตร
5) รีซาซูริน	1.83	มิลลิลิตร
6) สารละลายไล่ออกซิเจน		

4. เตรียมสารละลายน้ำลายเทียม

โดยเติมน้ำกลั่น สารละลายแร่ธาตุหลัก แร่ธาตุรอง สารละลายบัฟเฟอร์ และรีซาซูรีน ตามสัดส่วนข้างต้น ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 2,000 มิลลิลิตร ที่ต่อกับท่อแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เพื่อไล่ออกซิเจน แล้วนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส โดยใช้ magnetic stirrer กวนอยู่ตลอดเวลา เป็นเวลาประมาณ 2-3 นาที (ภาพที่ 3) จากนั้นเติมสารละลายสำหรับไล่ออกซิเจน อุ่นที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส ต่อเป็นเวลา 1 ชั่วโมง สังเกตเห็นว่าสารละลายเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีชมพู (ภาพที่ 3) แสดงว่าสารละลายดังกล่าวอยู่ในสภาวะไร้ออกซิเจน จากนั้นจึงเติมของเหลวจากกระเพาะรูเมนในสัดส่วนของน้ำลายเทียมต่อของเหลวจากกระเพาะรูเมนเท่ากับ 2 ต่อ 1 ก็จะได้สารละลายของเหลวจากกระเพาะรูเมนผสม (ภาพที่ 4)

5. การบรรจุสารละลายของเหลวจากกระเพาะรูเมนผสมและการบ่ม

ทำการบรรจุสารละลายของเหลวจากกระเพาะรูเมนผสม ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนในขวดที่บรรจุวัตถุดิบอาหารทดลอง ขวดละ 30 มิลลิลิตร (ภาพที่ 5-7) จากนั้นนำเข้าบ่มที่ตู้อบร้อนแห้งที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 8) เพื่อทำการวัดปริมาณแก๊ส

6. การเก็บข้อมูล

6.1 ผลผลิตแก๊ส

ทำการจดบันทึกปริมาตรของแก๊สที่เกิดขึ้น โดยใน 12 ชั่วโมงแรก ทำการบันทึกผลทุก ๆ 1 ชั่วโมง ต่อมาบันทึกทุก ๆ 3 ชั่วโมง จนถึงชั่วโมงที่ 24 จากนั้นบันทึกทุก ๆ 6 ชั่วโมง จนถึงชั่วโมงที่ 78 และสุดท้ายทำการบันทึกชั่วโมงที่ 96

นำค่าผลผลิตแก๊สที่ได้มาหาค่าคงที่ a, b และ c โดยการใช้โปรแกรมสำเร็จรูป fit curve เพื่อการอธิบายจลนพลศาสตร์ของการผลิตแก๊ส ตามโมเดลหรือแบบจำลองสมการของ Ørskov and McDonald (1979) ดังนี้

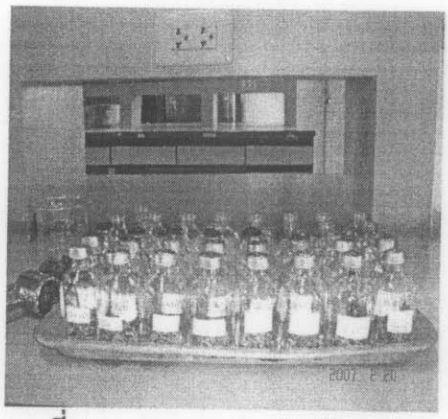
$$y = a + b\ [1-Exp^{(-ct)}]$$

เมื่อ y = ผลผลิตแก๊สที่เกิดขึ้น ณ เวลา t

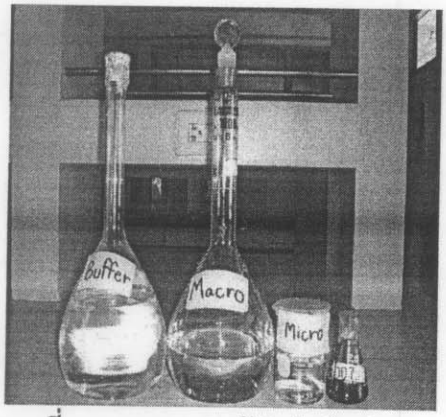
a = จัดตัดแกน y

b = ค่าปริมาณแก๊ส ณ จุดที่เส้นกราฟราบเรียบ (asymptole)

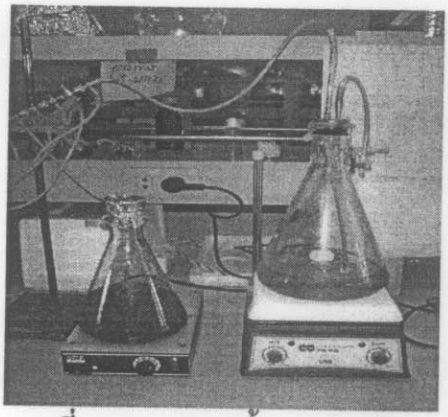
c = ค่าอัตราการผลิตแก๊ส



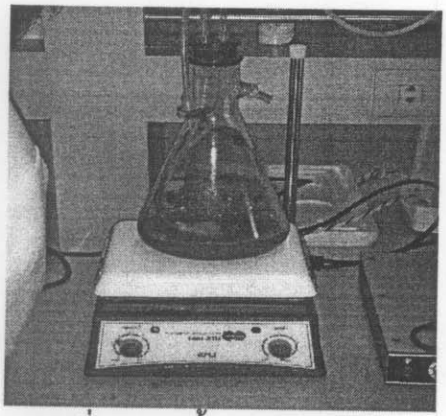
ภาพที่ 1 ขวดขนาด 50 มิลลิลิตร บรรจุอาหารทดลอง พร้อมจุกยางและฝาครอบอะลูมิเนียม



ภาพที่ 2 สารละลาย บัฟเฟอร์ แร่ธาตุหลัก แร่ธาตุรอง และรีซาซูริน

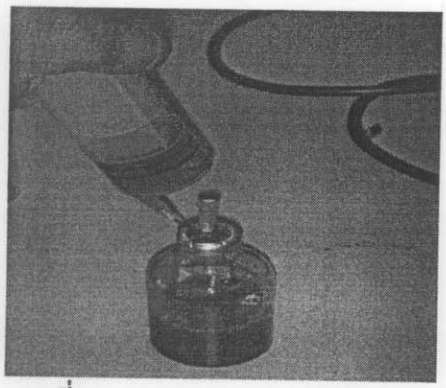


ภาพที่ 3 สารละลายน้ำลายเทียมในสภาวะมีออกซิเจน (น้ำเงิน) และสารละลายน้ำลายเทียมในสภาวะไร้ออกซิเจน (ชมพู)

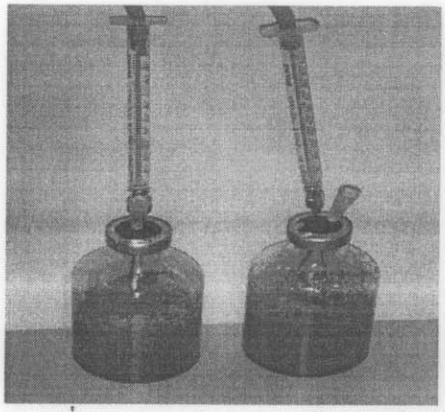


ภาพที่ 4 ผสมน้ำลายเทียมและของเหลวจากกระเพาะรูเมน (2:1)

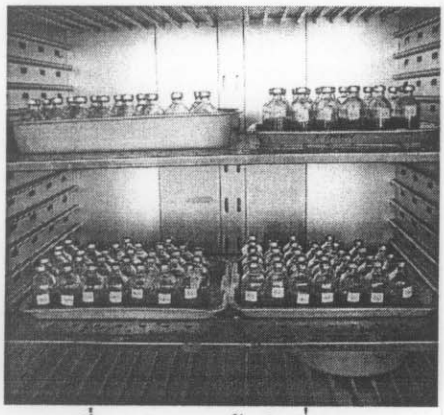
ภาพที่ 5 ดูดสารละลายจากกระเพาะรูเมนเข้าสู่กระบอกฉีดยา



ภาพที่ 6 บรรจุสารละลายจากกระเพาะรูเมนผสมลงในขวดที่มีอาหาร



ภาพที่ 7 เติมแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ลงในขวด ก่อนนำเข้าตู้อบ



ภาพที่ 8 นำขวดเข้าบ่มที่ 39 องศาเซลเซียส เพื่อรอวัดแก๊ส

6.2 ความสามารถในการย่อยได้ของวัตถุแห้ง (*in vitro* dry matter digestibility : IVDMD) และอินทรียวัตถุ (*in vitro* organic matter digestibility: IVOMD)

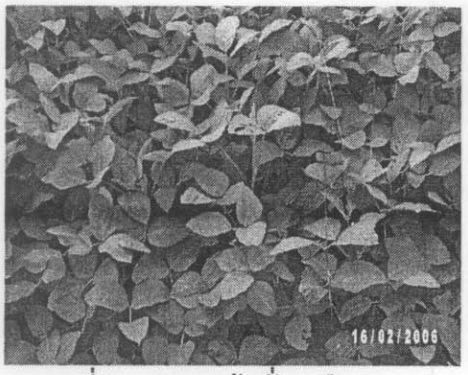
หลังการบ่มชั่วโมงที่ 24 และ 48 แต่ละครั้ง ทำการสุ่มขวดย่อยในแต่ละปัจจัยการทดลองออกมาปัจจัยการทดลองละ 2 ขวด นำเข้าแช่เย็นทันทีที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อหยุดกิจกรรมของจุลินทรีย์ และรอการวิเคราะห์ภายหลัง เมื่อทำการวิเคราะห์ให้นำออกจากตู้แช่แข็งปล่อยให้ละลาย ทำการกรองเอาของแข็งที่เหลือจากการย่อย นำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และนำไปเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 3 ชั่วโมง เพื่อนำค่าวัตถุแห้งและเถ้าที่เหลือจากการย่อยไปทำการคำนวณ ดังสมการ

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

$$\text{IVOMD (\%)} = \frac{[\text{น้ำหนักอินทรียวัตถุเริ่มต้น} - \text{น้ำหนักอินทรียวัตถุที่เหลือหลังการบ่ม}]}{\text{น้ำหนักอินทรียวัตถุเริ่มต้น}} \times 100$$

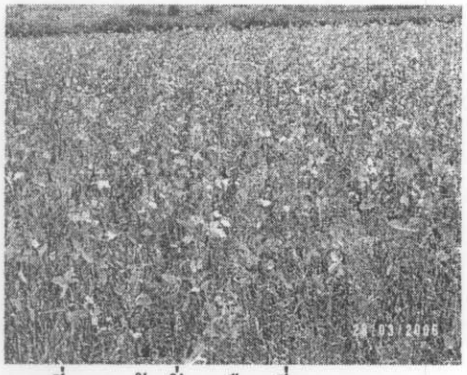
ภาคผนวก ข
แสดงลำดับการได้ส่วนของเปลือกฝักถั่วเหลือง (โดยสรุป)

ภาพที่ 9 แสดงถั่วเหลืองในแปลงนา
ของเกษตรกร



ภาพที่ 10 แสดงต้นถั่วเหลือง

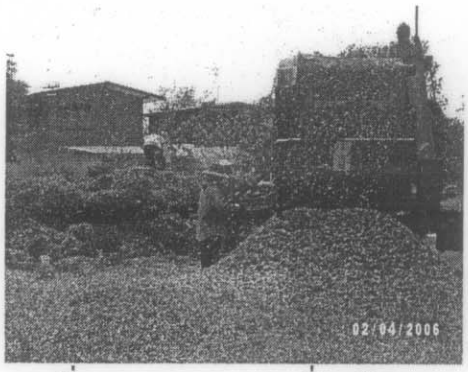
ภาพที่ 11 ต้นถั่วเหลืองใกล้เก็บเกี่ยว
(ใบมีสีเหลือง)



ภาพที่ 12 ต้นถั่วเหลืองที่สามารถ
เก็บเกี่ยวผลผลิตได้

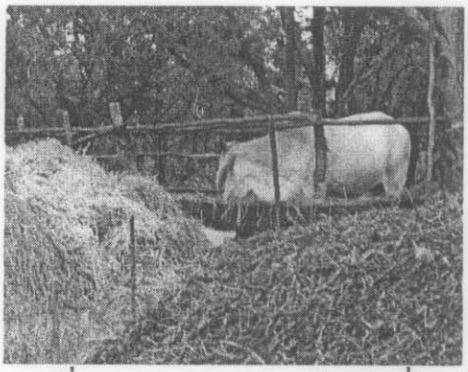
ภาพที่ 13 การเก็บเกี่ยวต้นถั่วเหลือง
ของเกษตรกร

ภาพที่ 14 นำต้นถั่วเหลืองมามัดรวมกัน
และตากแดดจนแห้งสนิท

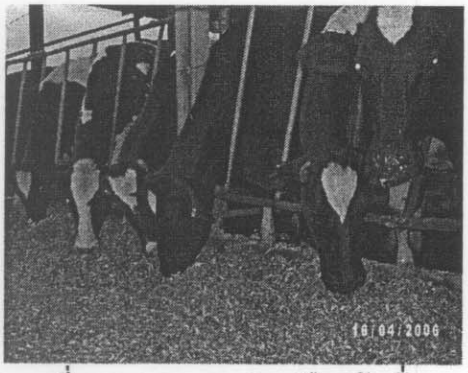


ภาพที่ 15 แสดงการนวดถั่วเหลือง
โดยใช้เครื่องนวด

ภาพที่ 16 แสดงเปลือกฝักถั่วเหลืองที่
ได้หลังจากการนวดแล้ว

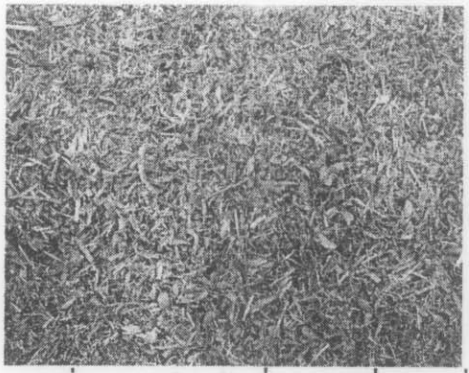


ภาพที่ 17 เกษตรกรนำเปลือกฝักถั่วเหลือง
มาใช้เลี้ยงโคเนื้อ

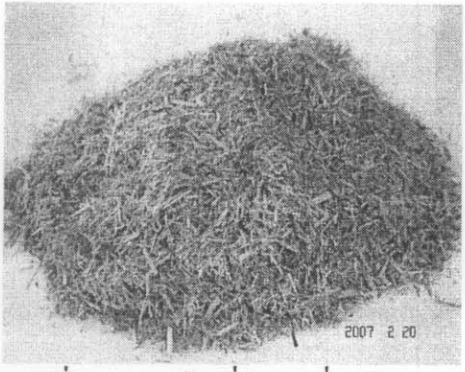


ภาพที่ 18 เกษตรกรนำเปลือกฝักถั่ว
เหลืองมาใช้เลี้ยงโคนม

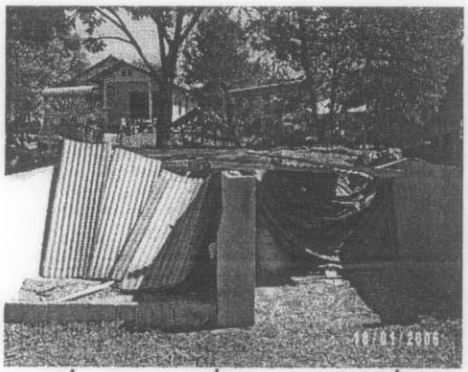
ภาคผนวก ค
แสดงการนำเปลือกฝักถั่วเหลืองมาใช้เลี้ยงโคทดลอง



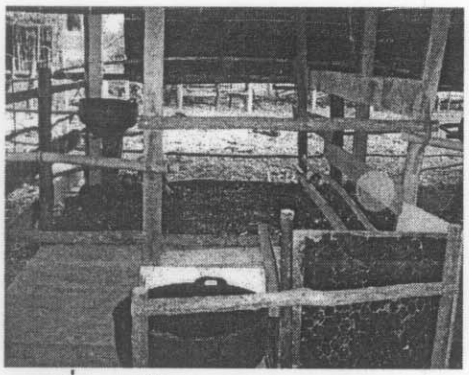
ภาพที่ 19 เปลือกฝักถั่วเหลืองที่ผ่านเครื่องสับตะแกรงขนาด 1 เซนติเมตร



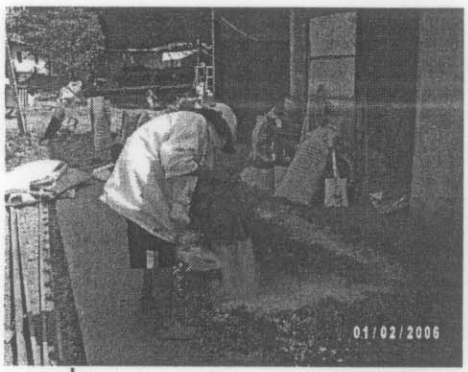
ภาพที่ 20 ฟางข้าวที่ผ่านเครื่องสับตะแกรงขนาด 1 เซนติเมตร



ภาพที่ 21 แสดงที่เก็บเปลือกฝักถั่วเหลืองและฟางข้าวที่บดแล้วในฟาร์มเกษตรกร

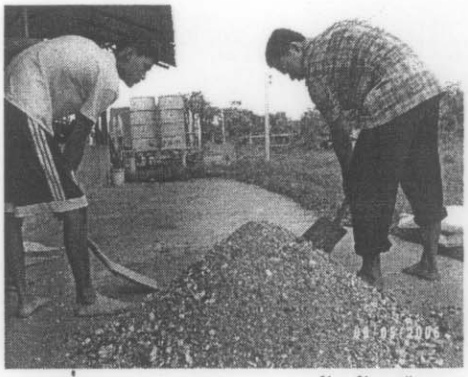


ภาพที่ 22 ลักษณะคอกทดลอง



ภาพที่ 23 การผสมอาหาร TMR ด้วยมือ

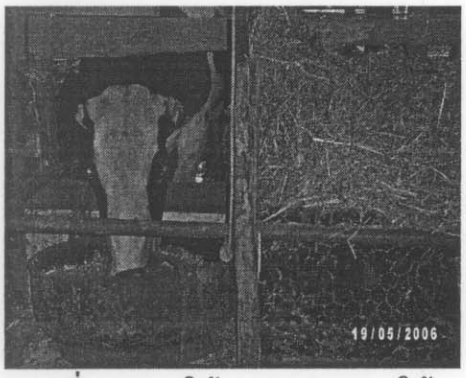
ภาพที่ 24 การผสมอาหาร TMR



ภาพที่ 25 การผสมอาหารข้นด้วยมือ

ภาพที่ 26 ชั่งน้ำหนักอาหารก่อนให้โค

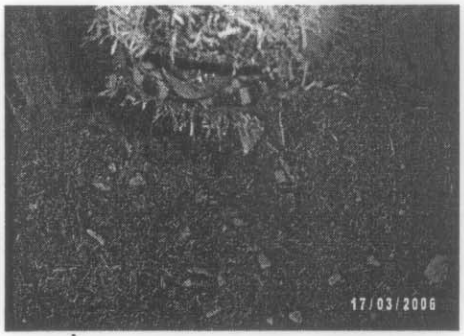
ภาพที่ 27 อาหารข้นของโคทดลอง



ภาพที่ 28 การให้อาหารแบบแยกให้

ภาพที่ 29 อาหาร TMR1

ภาพที่ 30 อาหาร TMR2



ภาพที่ 31 อาหาร TMR3

ภาพที่ 32 เปลือกฝักถั่วเหลืองที่เหลือ