

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

1. ราที่ใช้ในงานวิจัยนี้ได้มาจากการคัดแยกจากตัวอย่างวัสดุเหลือทิ้งจำพวกลิกโนเซลลูโลสที่ย่อยสลายตามธรรมชาติที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดี (high cellulase producing fungi) คือ *Aspergillus* sp. BC19 (Pimpa, 2005) ส่วนยีสต์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้เป็น *Saccharomyce cerevisiae* ได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยา ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยนเรศวร ทำการเลี้ยงราและยีสต์บนวุ้นเลี้ยงที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 5 วัน เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อใช้เป็น stock สำหรับการถ่ายสปอร์ทุก 2 เดือน

2. สับสเตรท (substrate) เป็นชานอ้อยที่ได้รับความอนุเคราะห์จากโรงงานน้ำตาลพิษณุโลก ทำการขนย้ายจากโรงงานน้ำตาลในถุงกระสอบบรรจุน้ำตาลถ่วงละประมาณ 10 กก. นำมาบดและอบแห้งเพื่อใช้ในกระบวนการหมักโดยไม่ผ่านการจัดการเบื้องต้น (pretreatment) ส่วนชานอ้อยที่ยังไม่ได้ใช้งานจะถูกนำไปเก็บในห้องเย็นอุณหภูมิ 4°C

3. สภาวะของกระบวนการหมักแบบสภาพอาหารแห้ง โดยใช้ 10 กรัมของชานอ้อยบดอบแห้งผสมกับน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปนิ่งมาเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที ทำให้อุณหภูมิห้อง ถ่ายสารละลายสปอร์ของ *A. niger* BC19 และ *S. cerevisiae* ลงในสับสเตรทโดยให้มีจำนวนสปอร์เริ่มต้นเท่ากับ 1×10^7 สปอร์ จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน ติดตามการเปลี่ยนแปลงของการสูญเสียน้ำหนัก ปริมาณเยื่อใย (crude fiber) ปริมาณโปรตีน (crude protein) และ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ ตลอดระยะเวลาการหมัก เปรียบเทียบกับกระบวนการหมักที่ใช้รา *A. niger* BC19 เพียงอย่างเดียว

4. องค์ประกอบทางโภชนาการของการเปลี่ยนแปลงของสับสเตรทชานอ้อยในระหว่างกระบวนการหมักและผลิตภัณฑ์สุดท้ายหลังผ่านการหมักโดยนำมาอบแห้งเพื่อนำมาวิเคราะห์โดยประมาณ (proximate analysis) ตามวิธีการมาตรฐานของ Association of Official Analytical Chemists (1990) ดังนี้

- 4.1 วัตถุแห้ง (dry matter) ใช้วิธีการอบแห้งที่ 80°C จนกว่าจะได้น้ำหนักคงที่
- 4.2 โปรตีน (crude protein) ใช้วิธีการ Kjeldahl method โดยใช้เครื่องวิเคราะห์โปรตีนของ BUCHI-KJEDAHL-SYSTEM และนำค่าไนโตรเจนที่ได้มาคูณด้วย 6.25 เพื่อเปลี่ยนเป็นปริมาณโปรตีน (เมื่อกำหนดให้โปรตีนประกอบด้วยไนโตรเจนร้อยละ 16)
- 4.3 ไขมัน (crude lipid) ใช้วิธีการ Soxhlet method โดยสกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์
- 4.4 เถ้า (ash) ใช้วิธีเผาในเตาเผาที่อุณหภูมิสูงเป็นเวลา 6 ชั่วโมง
- 4.5 เยื่อใย (crude fiber) ใช้วิธีการย่อยสลายด้วยกรด โดยใช้เครื่องวิเคราะห์หาเยื่อใยของ FIBERTEC System M

5. การเตรียมชานอ้อยหมักอบแห้งเพื่อใช้ในการเตรียมอาหารทดลองสูตรทดแทนอาหารไก่สำเร็จรูปด้วยชานอ้อยหมักอบแห้งในสัดส่วนแตกต่างกันโดยใช้สภาวะเช่นเดียวกับที่ระบุในข้อ 3 แต่ขยายขนาดโดยทำการหมักในภาชนะเหลี่ยมขนาดใหญ่ เมื่อครบกำหนดเวลา 7 วัน เก็บชานอ้อยหมักและนำไปทำให้ปลอดเชื้อและอบที่ 80 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้องและนำไปใช้ทันทีเพื่อเตรียมอาหารทดลองสูตรทดแทนด้วยชานอ้อยหมักอบแห้งในอาหารสำเร็จรูปสำหรับเลี้ยงไก่เนื้อในระดับร้อยละ 0, 5, 10 และ 20 โดยน้ำหนัก โดยประมาณให้อาหารที่ผสมแต่ละสูตรใช้หมดภายใน 1 สัปดาห์ จึงต้องผสมอาหารสัปดาห์ละครั้ง เพื่อให้ได้อาหารที่ใหม่เสมอ

6. การเตรียมโรงเรือนสำหรับเลี้ยงไก่ทดลอง โรงเรือนที่ใช้เลี้ยงไก่ทดลองในงานวิจัยนี้เป็นโรงเรือนทดลองที่สร้างขึ้นเอง เป็นโรงเรือนแบบหลังคาจั่วมุงสังกะสี ตัวฝาเป็นอิฐบล็อก และแบ่งแต่ละคอกด้วยมู่ลี่ตาข่าย มีมู่ลี่ตาข่ายกันลมโกรกและปิดครอบทั้งหมดจนถึงพื้นเพื่อให้การเลี้ยงเป็นระบบปิด พื้นดินอัดแน่น แบ่งพื้นที่เพื่อใช้ในการทดลองออกเป็นคอกขนาดพื้นที่ 1 ตารางเมตรจำนวน 12 คอก (4 สูตรอาหาร ๆ ละ 3 ซ้ำ) ทำความสะอาดโรงเรือนและทำการฆ่าเชื้อโรคด้วยปูนขาว และฉีดพ่นด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อรอบโรงเรือน รองพื้นโรงเรือนด้วยแกลบมีความหนาประมาณ 5-8 เซนติเมตร ไม่มีการเปลี่ยนวัสดุรองพื้นตลอดการทดลอง เตรียมอุปกรณ์การให้น้ำให้อาหาร โดยทำการฆ่าเชื้อก่อนใช้เป็นเวลา 1 วัน ติดป้ายกำหนดสูตรอาหารสำหรับแต่ละคอกไก่ ติดตั้งหลอดไฟขนาด 100 วัตต์ในแต่ละคอกเพื่อใช้ในระยะเวลา 1 สัปดาห์แรกและเปลี่ยนเป็น 20 วัตต์ตลอดการทดลอง

7. การเตรียมไก่ทดลอง ไก่พันธุ์เนื้อที่ใช้ในการทดลองจากบริษัทเจริญโภคภัณฑ์ จำกัด การวางแผนการทดลองเป็นแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design, CRD) ที่มีปัจจัยเดียว ชนิดอิทธิพลกำหนด (Fixed Effect Model) มี 4 สิ่งทดลอง (treatment) โดยใช้อาหารสัตว์ชานอ้อยหมักอบแห้งที่ผ่านการหมักด้วยจุลินทรีย์ผสมของรา *A. niger* BC19 และยีสต์ *S. cerevisiae* แต่ทดแทนด้วยสัดส่วนที่แตกต่างกัน 4 ระดับ ทำได้โดยสุ่มไก่จำนวนทั้งหมด 84 ตัวที่มีอายุเริ่มต้น 1 วัน และมีน้ำหนักใกล้เคียงโดยเฉลี่ยต่อตัว 0.04 กิโลกรัม เข้าคอกจำนวน 4 กลุ่ม ๆ ละ 3 ซ้ำ ๆ ละ 7 ตัว ทำการเลี้ยงลูกไก่เป็นเวลา 35 วัน (พร้อมจำหน่าย) โดยเริ่มให้อาหารทดลองเมื่อไก่มีอายุ 8 วัน (พื้นระยะกก) ไก่ทดลองแต่ละคอกจะเลี้ยงแบบปล่อยพื้นในกรงขนาด 1 ตารางเมตร ได้รับอาหารแบบให้กินกินพอ (ad libitum) มีน้ำให้ตลอดเวลา ตรวจสอบปริมาณอาหาร การเพิ่มอาหารช่วงเวลาเช้าและเย็น เปลี่ยนน้ำในตอนเช้าและเย็นทุกวันและเพิ่มให้เพียงพออยู่เสมอ บันทึกปริมาณอาหารที่กินกินทุก 3 วัน ชั่งน้ำหนักอาหารที่เหลือในถัง และชั่งน้ำหนักไก่ มีการให้แสงสว่างตลอด 24 ชั่วโมง และมีพัดลมระบายอากาศในช่วงกลางวันเพื่อลดอุณหภูมิภายในโรงเรือนทดลอง

8. การเลี้ยงไก่ทดลองทั้งหมดเป็นระยะเวลา 35 วัน ซึ่งเป็นระยะเวลาที่พร้อมจำหน่าย ไก่ทดลองทั้งหมดได้รับวัคซีนป้องกันโรคต่าง ๆ ครอบคลุมโปรแกรมการทำวัคซีนไก่ตามคำแนะนำของสัตวแพทย์ของบริษัทเจริญโภคภัณฑ์ จำกัด สาขาพิษณุโลก ได้แก่ วัคซีนแก่โรคหลอดลมอักเสบ (อายุไก่ทดลอง 7 วัน) และวัคซีนป้องกันโรคคัมโบโร (อายุไก่ทดลอง 14 วัน) และทำการชั่งน้ำหนักของซาก และอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับการย่อย (digestive organs) ได้แก่ ตับ ตับอ่อน ลำไส้ และ mucosal tissue โดยตรวจวัดภายหลังจากเลี้ยงไก่เป็นเวลา 35 วัน เพื่อดูผลของการใช้ชานอ้อยหมักต่อการทำงานของอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับการย่อย ภายหลังจากเสร็จสิ้นการทดลองในชุดแรก ทำความสะอาดคอกและพักเป็นเวลาอย่างน้อย 2 สัปดาห์

9. ทำการทดลองซ้ำเพื่อยืนยันผลการทดลองโดยใช้อาหารทดแทนด้วยชานอ้อยที่ผ่านการหมักด้วยรา *A. niger* BC19 เพียงอย่างเดียว เปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้กับการใช้อาหารทดแทนด้วยชานอ้อยที่ผ่านการหมักด้วยจุลินทรีย์ผสมของรา *A. niger* BC19 และยีสต์ *S. cerevisiae*

10. การเก็บรวบรวมข้อมูล

- 10.1 บันทึกน้ำหนักไก่เฉลี่ย/ตัว ก่อนเริ่มต้นการทดลอง โดยชั่งน้ำหนักไก่ 7 ตัว/คอก ก่อนนำเข้าคอก
- 10.2 บันทึกปริมาณอาหารที่ไก่ทดลองกินตลอดการทดลอง โดยชั่งน้ำหนักอาหารทุกครั้งที่ให้อาหาร และชั่งน้ำหนักอาหารที่เหลือในถังให้อาหารทุก 3 วัน
- 10.3 บันทึกการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักตัว โดยชั่งน้ำหนักไก่ทดลองรวมในแต่ละคอกของไกรุ่นเล็ก และชั่งน้ำหนักเป็นรายตัวในแต่ละหน่วยทดลองของไกรุ่นใหญ่ ทุก 4 วัน ตั้งแต่วันที่ 8-35 วัน
- 10.4 บันทึกอุณหภูมิภายในโรงเรือนในแต่ละวันตลอดการทดลอง
- 10.5 บันทึกรายละเอียดอื่น ๆ ที่สังเกตพบในระหว่างดำเนินการทดลอง

11. การคำนวณประสิทธิภาพการผลิตไก่

- 11.2 น้ำหนักเพิ่มขึ้นของไก่ (weight gain; WWG) (กรัม/3 วัน)

$$WWG = \frac{W_2 - W_1}{T_2 - T_1}$$

เมื่อ W_1 และ W_2 = น้ำหนักเฉลี่ยของไก่ (กรัม) ที่เวลา T_1 (วัน) และ T_2 (วัน) ตามลำดับ

- 11.2 อัตราแลกเปลี่ยนอาหาร (food conversion ratio; FCR)

$$FCR = \frac{\text{Total dry food fed (Kg)}}{\text{Total wet weight gain (Kg)}}$$

12. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ การวิเคราะห์หาอัตราการเจริญเติบโต ปริมาณการกินอาหารได้ และอัตราการแลกเปลี่ยนอาหาร โดยใช้วิธีการแปรปรวนทางเดียว (One way analysis of variance) โดยวิเคราะห์เป็นช่วง ๆ ละ 4 วันตลอดการทดลอง ในกรณีที่ผลทดสอบทางสถิติพบนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 จะใช้การเปรียบเทียบความแตกต่างรายคู่ด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test สำหรับกรณีที่มีจำนวนซ้ำกัน

