

### บทที่ 3

#### อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

#### 3.1 ศึกษาการเสริมซาร์ซาโปนินต่อกระบวนการหมัก และการย่อยได้ในกระเพาะหมักของโคนม

##### 3.1.1 การหาค่าประกอบทางเคมี และคุณค่าทางโภชนาของอาหารทดลอง

วิเคราะห์หาค่าประกอบทางเคมีในหญ้าแพงโกล่าและอาหารชั้นที่เสริมด้วยซาร์ซาโปนิน ที่มีชื่อทางการค้าว่า DK sarsaponin 30<sup>®</sup> ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท อินเทล โนวาชั่น จำกัด ซึ่งอาหารทดลอง แบ่งเป็น 3 กลุ่ม (treatments) ดังนี้ คือ

- |   |      |
|---|------|
| กลุ่มที่ 1 เสริมซาร์ซาโปนิน 5 กรัม/ตัว/วัน  | (T1) |
| กลุ่มที่ 2 เสริมซาร์ซาโปนิน 10 กรัม/ตัว/วัน | (T2) |
| กลุ่มที่ 3 เสริมซาร์ซาโปนิน 15 กรัม/ตัว/วัน | (T3) |

โดย :

- วิเคราะห์หาโภชนาซึ่งประกอบด้วยวัตถุแห้ง (DM) อินทรีย์วัตถุ (OM) โปรตีนหยาบ (CP) ไขมัน (EE) เถ้า (Ash) ใช้การวิเคราะห์แบบ Proximate analysis (AOAC., 2000)
- วิเคราะห์องค์ประกอบส่วนที่เป็นโครงสร้างของพืชได้แก่ เยื่อใยหยาบ (CF) เยื่อใยที่ละลายได้ในด่าง (NDF) เยื่อใยที่ละลายได้ในกรด (ADF) และลิกนิน (ADL) ด้วยวิธี detergent method (Van Soest, 1982)

- คำนวณหาค่าคาร์โบไฮเดรตที่ย่อยได้ง่าย (NFE) จากสมการ 1

$$\%NFE = 100 - \%CP - \%EE - \%CF - \%Ash \quad (1)$$

- และคำนวณหาค่าคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ใช่เยื่อใย (NFC) จากสมการ 2

$$\%NFC = 100 - \%CP - \%EE - \%NDF - \%Ash \quad (2)$$

### 3.1.2 การหาค่าการย่อยได้ของโภชนะของโคนม

#### 3.1.2.1 สัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลองที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้คือ โคนมลูกผสมพันธุ์พื้นเมือง × โฮลสไตน์ฟรีเซียน โดยมีสายเลือดของโคพันธุ์โฮลสไตน์ฟรีเซียน 82.125-96.875 เปอร์เซ็นต์ อายุประมาณ 5-6 ปี จำนวน 3 ตัว ที่ทำการผ่าตัดเปิดช่องทางเดินอาหารบริเวณกระเพาะหมักสอดท่อ rumen fistula (ทัศนีย์ และเทอดชัย, 2530) และผ่าตัดเปิดทางเดินอาหารบริเวณ ลำไส้เล็กส่วนต้น (proximal duodenum) เพื่อทำการสอดท่อ T-shaped cannula (ทัศนีย์ และเทอดชัย, 2532)

#### 3.1.2.2 อาหารและการให้อาหาร

อาหารชั้น แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มการทดลอง (treatments) ตามข้อ 3.1.1 ทำการผสมอาหารชั้นเอง โดยให้มีความเข้มข้นของโภชนะ คือ โปรตีน 16 เปอร์เซ็นต์

อาหารหยาบ ให้โคได้รับหญ้าแพงโกล่าสดเต็มที่

ให้อาหารหยาบและอาหารชั้นแยกกัน โดยโคได้รับอาหารชั้นวันละ 2 ครั้ง คือ เวลา 8.30 น. และ 16.30 น. โดยได้รับอาหารชั้นตัวละ 2.0 กิโลกรัมต่อวัน โคทุกตัวอยู่ในคอกผูกขึ้นโรงที่มีรางน้ำแบบอัตโนมัติ และรางอาหารแยกเฉพาะตัว มีน้ำสะอาดกินตลอดเวลา

#### 3.1.2.3 วิธีการทดลอง

การหาค่าการย่อยได้ของโภชนะของโคนมที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือ วิธีการหาค่าการย่อยได้แบบดั้งเดิม (convention method) เพื่อหาค่าการย่อยได้ปรากฏ (apparent digestibility) และการวัดปริมาณอาหารที่เข้าสู่บริเวณลำไส้เล็กด้วยการใช้สารบ่งชี้ (indicator method) มีวิธีการดังนี้

##### 3.1.2.3.1 การหาค่าการย่อยได้แบบดั้งเดิม (Conventional method)

ในแต่ละคาบของการทดลอง (period) ใช้เวลาทั้งหมด 23 วัน โดย 14 วันแรกเป็นช่วงเวลาสำหรับให้โคและจุลินทรีย์ปรับตัวให้คุ้นเคยกับอาหาร (preliminary period) และช่วง 9 วันหลังเป็นช่วงเวลาเก็บข้อมูล (collection period) โดยวันที่ 15-19 เป็นช่วงเวลาสำหรับเก็บมูลเพื่อหาค่าการย่อยได้ปรากฏ (apparent digestibility) บันทึกปริมาณอาหารที่กินและมูลที่ขับออกมา สุ่มเก็บตัวอย่างอาหารและมูล (5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักสด) โดยทำการเก็บมูลทุกครั้งที่โคถ่ายออกมานจนครบ 24 ชั่วโมงทำการชั่งน้ำหนักแล้วสุ่มเก็บตัวอย่าง 10 เปอร์เซ็นต์ นำมาแช่แข็งเพื่อเก็บไว้

วิเคราะห์หึ่งค์ประกอบทางเคมี นำค่าที่ได้จากการวิเคราะห์มาคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์การย่อยได้ปรากฏจากสมการ (บุญล้อม, 2540) ดังสมการ 3 และวันที่ 20-23 เป็นช่วงเวลาสำหรับเก็บตัวอย่างบริเวณลำไส้เล็กส่วนต้น

$$\text{สัมประสิทธิ์การย่อยได้ (\%)} = \frac{\text{โภชนะที่กิน} - \text{โภชนะที่ขับออก}}{\text{โภชนะที่กิน}} \times 100 \quad (3)$$

ประเมินค่าโภชนะรวมที่ย่อยได้ (Total Digestible Nutrient; TDN) จากสมการ 4

$$\begin{aligned} \text{TDN} &= \text{DCP} + \text{DNDF} + \text{DNFC} + 2.25 \times \text{DEE} \quad (4) \\ \text{เมื่อ DCP} &= \text{โปรตีนที่ย่อยได้} \\ \text{DNDF} &= \text{เยื่อใยที่ละลายในค่างที่ย่อยได้} \\ \text{DNFC} &= \text{คาร์โบไฮเดรตที่ไม่ใช่เยื่อใยที่ย่อยได้} \\ \text{DEE} &= \text{ไขมันที่ย่อยได้} \end{aligned}$$

คำนวณค่าพลังงานรวม (gross energy, GE) พลังงานใช้ประโยชน์ได้ (metabolizable energy, ME) และพลังงานสุทธิเพื่อการให้นม (net energy for lactation,  $NE_L$ ) จากสมการที่เสนอโดย Kellner *et al.* (1984)

$$\text{GE (MJ/kg)} = 0.242\text{CP} + 0.0366\text{EE} + 0.0209\text{CF} + 0.0170\text{NFE} \quad (5)$$

$$\text{ME (MJ/kg)} = 0.0152\text{DCP} + 0.0342\text{DEE} + 0.0128\text{DCF} + 0.0159\text{DNFE} \quad (6)$$

$$\text{NE}_L \text{ (MJ/kg)} = 0.4632 + 0.0024q \times \text{ME} \quad (7)$$

$$q = (\text{ME/GE}) \times 100$$

### 3.1.2.3.2 การวัดปริมาณอาหารที่เข้าสู่บริเวณลำไส้เล็กโดยวิธีการใช้สารบ่งชี้ (Indicator method)

ในการศึกษาการย่อยได้จริงภายในลำไส้เล็กของโค ไม่สามารถวัดปริมาณอาหารที่เดินทางผ่านทางเดินอาหารบริเวณดังกล่าวได้อย่างชัดเจน ดังนั้นการใช้สารบ่งชี้ (marker) เพื่อเป็นค่าดัชนีวัดปริมาณอาหารที่เดินทางผ่านลำไส้เล็ก จึงเป็นวิธีการที่เหมาะสม สำหรับสารบ่งชี้ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้คือ ไททาเนียมไดออกไซด์ ( $\text{TiO}_2$ ) ซึ่งมีคุณสมบัติทางกายภาพคือ มีสีขาว ไม่มีกลิ่นและรส คุณสมบัติทางเคมี คือ ไม่ละลายน้ำ และไม่สลายตัวเมื่อถูกย่อยในระบบทางเดินอาหารของสัตว์

การวัดปริมาณอาหารที่เดินทางผ่านลำไส้เล็กด้วยวิธีการใช้สารบ่งชี้จะดำเนินการต่อเนื่อง ภายหลังจากเสร็จกระบวนการเก็บตัวอย่างเพื่อหาค่าการย่อยได้ปรากฏ โดยการเก็บตัวอย่างจากลำไส้เล็กส่วนต้นที่สอดท่อ T-shaped cannula ไว้เรียบร้อยแล้ว เก็บตัวอย่างเป็นระยะเวลา 4 วัน คือ ตั้งแต่ วันที่ 20-23 เพื่อให้ได้ตัวแทนของตัวอย่างทั้ง 24 ชั่วโมง โดยมีตารางเก็บตัวดังที่ได้แสดงไว้ใน ตาราง 5

ตาราง 5 ช่วงเวลาเก็บตัวอย่างจากลำไส้เล็กเพื่อวัดปริมาณอาหารที่เข้าสู่บริเวณลำไส้เล็กโดยวิธีใช้สารบ่งชี้

Day	Collection Time					
1	0900	1300	1700	2100	0100	0500
2	1000	1400	1800	2200	0200	0600
3	1100	1500	1900	2300	0300	0700
4	1200	1600	2000	2400	0400	0800

ตัวอย่างที่เก็บในแต่ละครั้งให้ได้ปริมาณ 200 – 250 มิลลิลิตร หรือใช้เวลาในการเก็บประมาณ 45 นาทีต่อครั้ง และนำตัวอย่างมารวมกัน เก็บไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (Freezer) เพื่อรอการวิเคราะห์หองค์ประกอบทางเคมีและหาค่าความเข้มข้นของสารบ่งชี้ในตัวอย่างต่อไป

วัดค่าความเป็นกรด – ด่าง ในกระเพาะหมักของโค (ruminal pH) ซึ่งทำการวัดก่อนที่โคจะกินอาหาร 1 ชั่วโมง และวัดหลังจากโคกินอาหารแล้ว 1, 2, 3, และ 4 ชั่วโมง โดยสอดท่อลงไปเก็บของเหลวจากกระเพาะหมัก (rumen fluid) ในส่วนล่างของกระเพาะหมัก (ventral sac) ประมาณ 250 มิลลิลิตร ใส่ลงในภาชนะเพื่อวัดค่าความเป็นกรด – ด่าง (pH) ในกระเพาะหมักของโค (ruminal pH) ด้วยเครื่องวัด pH ยี่ห้อ Schott Gerate ปรับความเที่ยงตรงด้วยบัฟเฟอร์ 4 และ 7

วิเคราะห์หาค่าแอมโมเนียในโตรเจนที่เกิดขึ้นภายในกระเพาะหมักด้วยวิธี Conway method (Voigt und Steger, 1967) โดยเก็บของเหลวจากกระเพาะหมัก (rumen fluid) เพื่อทำการวัด ซึ่งจะทำการวัดก่อนที่โคจะกินอาหาร 1 ชั่วโมง และวัดหลังจากโคกินอาหารแล้ว 1, 2, 3, และ 4 ชั่วโมง

วิเคราะห์หากรดไขมันระเหยได้ โดยเก็บตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะหมัก (rumen fluid) หลังจากโคกินอาหารขึ้น 3 ชั่วโมง ประมาณ 250 มิลลิลิตร ลงในขวดที่ปิดสนิท เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น (conc.H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 1 มิลลิลิตร เพื่อหยุดการทำงานของจุลินทรีย์ที่อยู่ในของเหลวจากกระเพาะ

หมัก เก็บไว้ในตู้แช่แข็ง อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (freezer) เพื่อรอการวิเคราะห์หากรดไขมันที่ระเหยได้ด้วยเครื่อง Shimudshu Gas chromatography (Ishler, 1996)

### 3.1.3 การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ผลการทดลองโดยวิธีการวิเคราะห์หว่าเรียนซ์ (Analysis of variance) ตามแผนการทดลองแบบ Crossover Designs (Robert, 1994) จำนวน 3 ช่วงการทดลอง และเปรียบเทียบความแตกต่างด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป

## 3.2 ศึกษาผลการเสริมซาร์ซาโปนินต่ออัตราการเจริญเติบโตของโคนมรุ่นเพศเมีย

### 3.2.1 สัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลองที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือ โคนมรุ่นเพศเมียลูกผสมพันธุ์พื้นเมือง×โฮลสไตน์ฟรีเซียน จำนวน 12 ตัว น้ำหนักเฉลี่ย 163.50 กิโลกรัม อายุเฉลี่ย 1.5 ปี

### 3.2.2 วิธีการทดลอง

วิธีการทดลอง ใช้โคทดลองจำนวน 12 ตัว แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มๆ ละ 6 ตัว ตามชนิดของอาหารทดลอง

กลุ่มที่ 1 เสริมซาร์ซาโปนินตัวละ 0 กรัม ต่อวัน (T1)

กลุ่มที่ 2 เสริมซาร์ซาโปนินในระดับที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองที่ 1 (T2)

- ก่อนเริ่มการทดลอง ทำการชั่งน้ำหนักโค ถ่ายพยาธิภายในและภายนอก เลี้ยงโคโดยปล่อยให้แทะเล็มในแปลงพืชอาหารสัตว์ แยกโคทดลองทั้งสองกลุ่มออกจากกัน โดยการใช้ลวดไฟฟ้ากั้น

- ในการทดลองใช้เวลาทั้งหมด 104 วัน โดยแบ่งเป็น 2 ระยะ คือ ระยะเตรียมการ 14 วัน เพื่อให้สัตว์คุ้นเคยกับอาหาร ส่วนระยะ 90 วันหลังจะเป็นระยะที่ทำการเก็บข้อมูล

- โคทดลองแต่ละกลุ่มจะได้รับอาหารข้นเสริมที่มีโปรตีนที่ระดับ 16 เปอร์เซ็นต์ โดยโคทดลองได้รับอาหารข้นวันละ 1 ครั้ง เวลา 08.30 น. ตัวละ 1.0 กิโลกรัมต่อวัน

- บันทึกน้ำหนักโคก่อนการทดลองและหลังจากนั้นซึ่งในสัปดาห์สุดท้ายของทุกๆ เดือน รวมทั้งหมด 3 เดือน และสุ่มเก็บตัวอย่างอาหารชั้นและหญ้าในแปลงเดือนละ 1 ครั้ง นำไปอบให้แห้ง บันทึกค่าน้ำหนักแห้ง เก็บรวบรวมไว้เพื่อรอการวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีต่อไป

### 3.2.3 การวิเคราะห์ทางสถิติ

แบ่งโคนมออกเป็น 2 กลุ่มๆละ 6 ตัวตามชนิดของอาหารทดลอง หลังจากนั้นนำข้อมูลมาวิเคราะห์และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Student's t-test และเปรียบเทียบความแตกต่างด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test ตามวิธีการของ Steel and Torrie (1980) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป

### 3.2.4 สถานที่ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัยและรวบรวมข้อมูล

1. ฟาร์มทดลองหมวดโคนม ภาควิชาสัตวศาสตร์และสัตว์น้ำ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
2. ห้องปฏิบัติการอาหารสัตว์ ภาควิชาสัตวศาสตร์และสัตว์น้ำ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
3. ห้องปฏิบัติการกลาง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

### 3.2.5 ระยะเวลาดำเนินการวิจัย

ประมาณ 12 เดือน ตั้งแต่เดือน สิงหาคม 2552 ถึงเดือน สิงหาคม 2553