



<https://li01.tci-thaijo.org/index.php/pajrmu/index>

บทความวิจัย

การวิเคราะห์ความเข้มข้นกรดไขมันที่ระเหยได้ทั้งหมด และค่าความเป็นกรด-ด่าง จากของเหลวในกระเพาะหมักของโคนมเจาะกระเพาะ ด้วยวิธีเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรสโกปี

ธีระกุล นิลนนท์^{1*} ฤทธิชัย พิลาไชย¹ กษมา ชารีโคตร² และ ศรัญญา วอชวา²

¹สาขาวิชาเทคนิคการสัตวแพทย์ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี อำเภอเมือง จังหวัดอุดรธานี 41000

²สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี อำเภอเมือง จังหวัดอุดรธานี 41000

ข้อมูลบทความ	บทคัดย่อ
Article history	
รับ: 21 พฤษภาคม 2564	<p>การวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) และความเข้มข้นของกรดไขมันระเหยได้ (volatile fatty acid; VFA) ในของเหลวจากกระเพาะหมัก (rumen fluid) เป็นวิธีมาตรฐานทางห้องปฏิบัติการที่ใช้วินิจฉัยภาวะความเป็นกรดในกระเพาะหมักในโคนม การศึกษาที่ผ่านมาบ่งชี้ว่าการตรวจระดับ VFA จากตัวอย่างต่างๆ โดยใช้เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรสโกปี (Near-infrared spectroscopy; NIRS) ให้ผลการศึกษาน่าเชื่อถือนำไปใช้เพื่อการวิเคราะห์ได้ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ VFA ทั้งหมด (Total VFA) และ pH จากของเหลวในกระเพาะหมักจากการตรวจทางห้องปฏิบัติการ กับความเข้มข้นของ VFA และ pH จากการประยุกต์ใช้เทคนิค NIRS ตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะหมักโคนมพันธุ์ผสมโฮลสไตน์ฟรีเซียนเปิดผ่ากระเพาะหมักและเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะกระเพาะหมักเป็นกรด จำนวน 128 ตัวอย่าง โดยเก็บทุกๆ 2 ชั่วโมงหลังให้อาหารชั้น จำนวน 7 ครั้ง/วัน ตลอดระยะเวลาการศึกษา 16 วัน ตรวจทางห้องปฏิบัติการหาความเข้มข้น Total VFA และค่า pH โดยใช้เครื่อง Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) และ pH meter แบบภาคสนาม ตามลำดับ และวัดค่าด้วยเทคนิค NIRS เพื่อสร้างสมการทำนายค่า ผลการศึกษาพบว่า ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของ Total VFA และค่า pH การตรวจทางห้องปฏิบัติการ เท่ากับ 105.82 mM/L (105.82±39.74) และ 5.4±0.44 ตามลำดับ การวิเคราะห์ทางสถิติทำนายความเข้มข้นของ VFA และค่า pH ด้วยเทคนิค NIRS มีค่าสหสัมพันธ์ (R) เท่ากับ 0.93 และ 0.85 ตามลำดับ การประยุกต์ใช้เทคนิค NIRS วิเคราะห์ความเข้มข้นของ Total VFA และค่า pH จากตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะหมัก ถือว่าเป็นเทคนิคที่มีความน่าเชื่อถือระดับปานกลางในการนำไปใช้ประโยชน์ด้านการวิจัย ซึ่งจำเป็นต้องมีการเก็บข้อมูลเพิ่มเติมเพื่อให้มีความถูกต้องแม่นยำมากยิ่งขึ้น</p>
แก้ไข: 27 พฤษภาคม 2564	
ตอบรับการตีพิมพ์: 30 พฤษภาคม 2564	
ตีพิมพ์ออนไลน์: 28 มิถุนายน 2564	
คำสำคัญ	
กรดไขมันระเหยได้	
ค่าความเป็นกรดด่าง	
เนียร์อินฟราเรดสเปกโตรสโกปี	

บทนำ

โคนมที่ให้ผลผลิตสูงมักจะเกิดโรคหรือความผิดปกติทางเมแทบอลิซึม (metabolic disorder) ที่ส่งผลกระทบต่อการผลิต เช่น โรคน้ำนม (milk fever) โรคคีโตซิส (ketosis) ภาวะกระเพาะแต่เคลื่อนผิดปกติ (displace abomasum)

ภาวะไขมันแทรกในตับ (fatty liver) และภาวะความเป็นกรดในกระเพาะหมัก (rumen acidosis) ซึ่งสาเหตุหลักๆ เกิดจากระดับการให้ผลผลิตและการให้อาหารไม่สอดคล้องกันและไม่เหมาะสม (Mulligan & Doherty, 2008) ภาวะความเป็นกรดในกระเพาะหมักแบบกึ่งเฉียบพลัน (SARA) เป็นหนึ่งในโรคหรือความผิดปกติ

* Corresponding author
E-mail address: theerakul_nil@yahoo.com (K. Thancharoen)
Online print: 28 June 2021. Copyright © 2021. This is an open access article, production and hosting by Faculty of Agricultural Technology, Rajabhat Maha Sarakham University.

ทางเมแทบอลิซึมที่พบได้บ่อยและก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจในการเลี้ยงโคนม ส่วนมากถูกตรวจพบในโคนมหลังคลอดที่อยู่ในช่วงต้นของระยะการให้นม (early lactation) เนื่องจากเป็นระยะที่มีการเปลี่ยนแปลงการให้อาหารจากระยะพักรีดนม (อาหารพลังงานต่ำ) มาเป็นอาหารระยะคลอดหรือให้นม (อาหารพลังงานสูง) และโคนมมีการกินอาหารมากขึ้นเพื่อให้พอเพียงกับความต้องการในการให้ผลผลิตน้ำนม ส่งผลให้ภาวะหมักปรับตัวไม่ทันและเกิดการสะสมกรดตามมา (Plaizier et al., 2008) ในประเทศไทยมีรายงานความชุกของภาวะความเป็นกรดในกระเพาะหมักแบบกึ่งเฉียบพลันในโคนมหลังคลอด 30 และ 50 วัน ร้อยละ 42.6 และ 42.0 ตามลำดับในพื้นที่ฟาร์มโคนมอำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น (Jarassaeng et al., 2006) และพบความชุกในโคนมหลังคลอดระหว่าง 3 ถึง 6 สัปดาห์ ร้อยละ 20 ถึง 25 ในพื้นที่ฟาร์มโคนมจังหวัดนครปฐม (Inchaisri et al., 2013, Inchaisri et al., 2014)

ภาวะความเป็นกรดในกระเพาะหมัก เกิดจากการสะสมของกรดอินทรีย์ (organic acid) เช่น กรดไขมันที่ระเหยได้ (volatile fatty acid; VFA) ได้แก่ กรดอะซิติก (acetic acid; C2) กรดโพรพิโอนิก (propionic acid; C3) และ กรดบิวทริก (butyric acid; C4) โดยมีสัดส่วนการสร้างประมาณร้อยละ 70:20:10 ตามลำดับ ซึ่งอาจเปลี่ยนแปลงไปตามลักษณะของอาหารที่ให้ (Seymour et al., 2005) และกรดแลคติก (lactic acid) ที่เกิดจากการย่อยคาร์โบไฮเดรตโดยจุลินทรีย์ในกระเพาะหมัก โดยการสะสมของกรดเกิดจากความไม่สมดุลระหว่างการสร้างกรดจากกระบวนการหมักที่มากเกินไป และการกำจัดกรดโดยการนำไปใช้ของจุลินทรีย์และการดูดซึมกรดจากกระเพาะหมักที่ลดลง (Nagaraja and Titgemeyer, 2007) โดยการสร้างกรดที่มากขึ้นเกิดจากการกินแหล่งวัตถุดิบคาร์โบไฮเดรตที่ย่อยได้ง่าย เช่น แป้ง ธัญพืช ในปริมาณมาก ส่งผลให้จุลินทรีย์ย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตมีการเปลี่ยนแปลงเพิ่มจำนวนขึ้น เช่น แบคทีเรียกลุ่ม amylolytic amylodextrin และ maltose - utilizing (Kotarski et al., 1992) ร่วมกับการได้รับอาหารหยาบ (roughage) หรือปริมาณเยื่อใยในอาหารไม่เพียงพอ ซึ่งส่งผลต่อการเคี้ยวเอื้อง (mastication) และปริมาณการหลั่งน้ำลายซึ่งเป็นบัฟเฟอร์ (ไบคาร์บอเนต; HCO_3^-) ที่สำคัญของการลดความเป็นกรดในกระเพาะหมัก (Owens et al., 1998) ร่วมกับการเพิ่มขึ้นของแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติก (lactic producing bacteria) เช่น *Streptococcus bovis* ทำให้มีการสะสมของกรดเพิ่มขึ้น (Nagaraja & Titgemeyer, 2007) ส่งผลให้เกิดภาวะความเป็นกรดในกระเพาะหมัก ทั้งแบบเฉียบพลัน (acute rumen acidosis) และแบบกึ่งเฉียบพลัน (sub-acute rumen acidosis;

SARA) (Gäbel et al., 2002; Kleen et al., 2003; Plaizier et al., 2008) ภาวะหมักกรดการบีบตัว และกรดแลคติกจะถูกดูดซึมเข้ากระแสเลือดเกิดภาวะร่างกายเป็นกรด (metabolic acidosis) (Nocek, 1997)

การตรวจวินิจฉัยอาการทางคลินิกของภาวะกรดในกระเพาะหมัก (rumen acidosis) มีหลายวิธี ได้แก่ การตรวจวินิจฉัยโดยการประเมินอาการผิดปกติ (clinical sign) ของโครายตัวหรือระดับฟาร์ม และการตรวจทางห้องปฏิบัติการ วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของของเหลวในกระเพาะหมัก (rumen fluid) และการวัดระดับความเข้มข้นของกรดไขมันระเหยได้ (Danscher et al., 2015, Stefanska et al., 2017, Mizuguchi et al., 2020) ซึ่งวิธีการนี้จำเป็นต้องทำการเก็บตัวอย่างของเหลวในกระเพาะหมักโคเพื่อการตรวจวินิจฉัย โดยการเก็บตัวอย่างของเหลวในกระเพาะหมัก สามารถทำได้ 2 วิธี คือ การเจาะและดูดเก็บผ่านผนังช่องท้อง (rumenocentesis) การผ่าตัดสร้างรูเปิดกระเพาะหมักถาวร (ruminal fistula) ซึ่งมักพบในการศึกษาวิจัย และการดูดเก็บผ่านท่อสอดหลอดอาหาร (stomach tube) โดยเทคนิคการดูดเก็บของเหลวในกระเพาะหมักผ่านผนังช่องท้อง (rumenocentesis) เป็นวิธีการเก็บตัวอย่างของเหลวในกระเพาะหมักในส่วนล่าง (ventral sac) มีข้อดี คือ สามารถลดการปนเปื้อนของน้ำลายทำให้ได้ค่า pH ที่แม่นยำ ส่วนการเก็บตัวอย่างโดยใช้ท่อสอดกระเพาะอาหาร (stomach tube) เป็นวิธีการที่สะดวกและง่าย แต่เนื่องจากวิธีการนี้เป็นการสอดท่อผ่านช่องปากหลอดอาหาร ดังนั้นของเหลวที่ดูดเก็บได้มีการปนเปื้อนกับน้ำลายซึ่งมีค่า pH สูง ทำให้ค่า pH ที่วัดได้จากตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะหมักที่เก็บด้วยวิธีนี้มีค่าคลาดเคลื่อนที่สูงขึ้นได้ (Duffield et al., 2004) และมีการศึกษาการตรวจระดับกรดไขมันที่ระเหยได้จากตัวอย่างต่างๆ ซึ่งให้ผลการศึกษาที่น่าเชื่อถือได้ในการนำไปใช้ประโยชน์ (Jacobi et al., 2009, Ward et al., 2011, Lean et al., 2013, Stockl and Lichti, 2018, Lee et al., 2019)

มีการศึกษาการใช้เทคนิคสเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ (Near-infrared spectroscopy; NIRS) วิเคราะห์องค์ประกอบของพืชอาหารสัตว์และองค์ประกอบด้านโภชนาการของพืชอาหารสัตว์ เช่น ระดับโปรตีน เยื่อใย ระดับไขมัน ระดับพลังงานในวัตถุดิบอาหารสัตว์ รวมทั้งค่า pH ในอาหารหมัก ซึ่งให้ผลการวิเคราะห์ที่มีความน่าเชื่อถือ (Corson et al., 1999) ใช้ตรวจหาโรคคิตโตซิสแบบไม่แสดงอาการจากการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำนม (De Roos et al., 2007) ใช้ตรวจวิเคราะห์ระดับสารคีโตนในเลือดเปรียบเทียบกับสัดส่วนไขมันต่อโปรตีนในน้ำนม เพื่อสร้างสมการทำนายระดับของสารคีโตนในแม่โครีดนมหลัง

คลอด (Van Kneusel et al., 2010) ข้อดีของการวิเคราะห์ตัวอย่างโดยใช้เทคนิค NIRS คือ ง่ายต่อการเตรียมตัวอย่าง มีความรวดเร็วในการวัดค่า ได้ผลที่แม่นยำและถูกต้อง การตรวจสอบเป็นแบบไม่ทำลายตัวอย่าง ไม่ก่อให้เกิดมลภาวะ และสะดวกต่อการใช้งาน (Stermer et al., 1994)

ดังนั้น การตรวจคัดกรองภาวะความเป็นกรดในกระเพาะหมักในโคนมโดยใช้เทคนิคหรือเครื่องมือที่มีความแม่นยำและรวดเร็วในการตรวจ เช่นการใช้เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรสโกปี (Near-infrared spectroscopy; NIRS) ตรวจหาระดับความเข้มข้นของกรดไขมันที่ระเหยได้และค่า pH จากตัวอย่างของเหลวในกระเพาะหมัก เป็นแนวทางที่น่าสนใจในการช่วยตรวจคัดกรองภาวะความเป็นกรดในกระเพาะหมักและโรคทางเมแทบอลิก (metabolic disease) ในโคนม การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประยุกต์ใช้เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรสโกปีในการตรวจวัดค่าความเข้มข้นของกรดไขมันที่ระเหยได้ และค่าความเป็นกรด-ด่าง จากตัวอย่างของเหลวในกระเพาะหมัก โดยการหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของกรดไขมันที่ระเหยได้ และค่าความเป็นกรด-ด่าง จากการตรวจทางห้องปฏิบัติการกับค่าความเข้มข้นของกรดไขมันที่ระเหยได้ และค่าความเป็นกรด-ด่าง จากการสร้างสมการทำนายจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรสโกปี และเพื่อเป็นข้อมูลสำหรับการพัฒนาเครื่องมือที่ใช้ตรวจวิเคราะห์และคัดกรองภาวะความเป็นกรดในกระเพาะหมักและโรคทางเมแทบอลิกในฟาร์มต่อไป

วัสดุ/วิธีการวิจัย

สัตว์ทดลอง

โคนมเพศผู้พันธุ์โฮลสไตน์ฟรีเซียนลูกผสม มีน้ำหนักตัว (body weight) ประมาณ 250 กิโลกรัม อายุประมาณ 14 เดือน สุขภาพแข็งแรง ทำการผ่าตัดเพื่อเปิดกระเพาะหมักแบบถาวร (permanent rumen fistulation) บริเวณสวาปด้านซ้าย เพื่อทำการเก็บตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะหมัก (rumen fluid) ซึ่งในช่วงดำเนินการทดลองโคจะถูกเลี้ยงในโรงเรือนเปิด ณ ศูนย์วิจัยและพัฒนาท้องถิ่นบ้านตาด มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี โดยเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิสิ่งแวดล้อม โดยแยกเลี้ยงในคอกทดลองเดี่ยวพื้นคอนกรีตและดิน มีพื้นที่ขนาด 3×5 ตารางเมตร มีรางอาหารและบ่อน้ำดื่มแยกในคอกเลี้ยง

การศึกษานี้ได้รับการพิจารณาเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยธรรมและมาตรฐานการเลี้ยงและการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี หมายเลขโครงการที่ได้รับการพิจารณา ศธ 0543.7/358 โดยปฏิบัติตามหลัก

จริยธรรมการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ของสภาวิจัยแห่งชาติ ประเทศไทย

อาหารที่ใช้ทดลองเพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะความเป็นกรดในกระเพาะหมักแบบกึ่งเฉียบพลัน (subacute ruminal acidosis; SARA)

ระยะก่อนการทดลอง (pre-experimental period) (17 วัน) เป็นระยะเวลาที่ให้โคนมปรับตัวต่อคอกทดลองและการให้อาหาร ในระยะนี้มีการเตรียมตัวโคก่อนเข้าสู่ระยะทดลอง ดังนี้ โคนมในระยะก่อนการทดลองได้รับการให้อาหารแบบแยกให้อาหารชั้นกับอาหารหยาบ (separate feeding) โดยในระยะนี้โคทดลองได้รับอาหารชั้น (concentrate) ซึ่งเป็นอาหารชั้นที่ประกอบขึ้นในฟาร์ม ปริมาณ 1.1 กิโลกรัมของวัตถุดิบแห้ง (dry matter) ต่อตัวต่อครั้ง แบ่งจ่ายให้ 2 ครั้ง (เช้าและเย็น) รวมเป็นปริมาณ 2.2 กิโลกรัมของวัตถุดิบแห้ง ต่อตัวต่อวัน โดยมีส่วนประกอบวัตถุดิบและองค์ประกอบทางเคมีแสดงดัง Table 1 และ Table 2 โคทดลองได้รับอาหารหยาบเป็นฟางข้าวแบบไม่จำกัด (ad libitum) ร่วมกับมีน้ำดื่มให้ตลอดเวลา

ระยะการทดลอง (experimental period) (16 วัน) เป็นระยะเวลาที่ทำการทดลองและเก็บตัวอย่างจากโคทดลอง ซึ่งโคทดลองถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะความเป็นกรดในกระเพาะหมักแบบกึ่งเฉียบพลัน โดยวิธีการให้อาหารชั้นแยกกับอาหารหยาบ ที่มีสัดส่วนของอาหารชั้นที่สูงรวมกับการจำกัดปริมาณอาหารหยาบ (สัดส่วนอาหารหยาบต่ออาหารชั้น 20:80) ซึ่งโคได้รับอาหารชั้นที่ประกอบขึ้นจากการคำนวณโดยใช้องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบที่รายงานโดย National Research Council (NRC) (2001) ปริมาณ 4 กิโลกรัมของวัตถุดิบแห้ง ต่อตัวต่อครั้ง แบ่งจ่ายให้ 2 ครั้ง (เช้า 6.00 นาฬิกา และตอนเย็น 16.00 นาฬิกา) รวมปริมาณ 8 กิโลกรัมของวัตถุดิบแห้งต่อตัวต่อวัน และใช้ฟางข้าวเป็นแหล่งอาหารหยาบ ปริมาณ 2 กิโลกรัมของวัตถุดิบแห้งต่อตัวต่อวัน โดยโคได้รับแหล่งอาหารหยาบหลังจากกินอาหารชั้นประมาณ 30 นาที (Pilachai et al., 2012) ส่วนประกอบวัตถุดิบและองค์ประกอบทางเคมี แสดงใน Table 1

การเก็บตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะหมักโคทดลอง

ในช่วงระยะการทดลอง ทำการเก็บของเหลวจากกระเพาะหมักของโคทดลองทุกวัน ด้วยความถี่จำนวน 8 ครั้งต่อวัน ตลอดระยะเวลา 16 วัน ของช่วงระยะการทดลอง โดยเก็บตัวอย่างก่อนการให้อาหารชั้นโคช่วงเช้า (ชั่วโมงที่ 0) และหลังจากให้อาหารชั้นช่วงเช้า ชั่วโมงที่ 2, 4, 6, 8, 10, 12 และ 14 ตามลำดับ หลังกินอาหารชั้น วิธีการเก็บตัวอย่างทำตามวิธีของ Wang et al. (2016) โดยการบังคับโคในช่องบังคับสัตว์ ทำการเปิดฝา

Table 1 Ingredient composition (%dry matter; %DM) and chemical composition of the dietary feed ingredient.

Ingredient/Chemical composition	%DM
Cassava ship	46.3*
Soybean meal	35.2*
Rice bran	17.1*
Premix ¹	1.4*
Dry matter	89.37**
TDN	81.24**
ME (Mcal/kgDM)	2.94**
Crude protein (CP)	20.39**
Fat	5.20**
NDF	11.92**
ADF	9.56**

*The ratios of feed ingredient (Pilachai et al., 2012),

**Calculated using measured DMI, composition and feed analyses (NRC, 2001);

TDN = Total Digestible Nutrients, ME = Metabolizable Energy,

NDF = Neutral Detergent Fiber,

ADF = Acidic Detergent Fiber

rumen fistular ใช้อุปกรณ์ท่อ สายยาง และไซริงค์ ปริมาตร 60 มิลลิลิตร ตูดของเหลวจากกระเพาะหมักบริเวณ กระพุ้งด้านล่าง (ventral sac) ปริมาตร 30 มิลลิลิตร จากนั้นเท ตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะหมักใส่ถ้วยพลาสติก และทำการ วัดค่าความเป็นกรด-ด่างทันที โดยตัวอย่างของเหลวจาก กระเพาะหมักแต่ละตัวอย่างจะทำการวัดซ้ำ 3 ครั้ง ด้วยเครื่องมือ วัดค่าความเป็นกรด-ด่างแบบพกพาที่ใช้อิเล็กโทรดเปียก (portable pH meter SevenGo FK2, Mettler Toledo, Switzerland) ซึ่งก่อนการวัดในแต่ละครั้งจะทำการ calibrate 2 ระดับ ด้วยน้ำยามาตรฐานที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 7 และ 4 โดยค่าความเป็นกรด-ด่างที่กำหนดเป็นค่าขีดเริ่มเปลี่ยน (threshold value) ของภาวะความเป็นกรดในกระเพาะหมัก แบบกึ่งเฉียบพลัน กำหนดไว้ที่ pH น้อยกว่า 5.5 (Plaizier, 2008, Danscher et al., 2015, Stefanska et al., 2017) หลังจากทำการวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ของเหลวจากกระเพาะ หมักถูกรองผ่านผ้าก๊อซจำนวน 4 ชั้น จากนั้นนำของเหลวจาก กระเพาะหมักที่ผ่านการกรองปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำมาเติม ด้วยกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) ความเข้มข้น 1 โมล ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร และเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการ วิเคราะห์หาความเข้มข้นของกรดไขมันที่ระเหยได้ทาง ห้องปฏิบัติการ ส่วนของเหลวจากกระเพาะหมักที่ผ่านการกรอง ส่วนที่เหลือ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จะทำการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง ปั่นเหวี่ยง ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที ใช้เวลา 15 นาที เพื่อ แยกตะกอนและเก็บของเหลวส่วนที่ใสที่อุณหภูมิ -20 องศา เซลเซียสโดยไม่เติมกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) เพื่อการตรวจ วิเคราะห์ด้วยเทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรสโกปี

การตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะหมักทาง ห้องปฏิบัติการ

ตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะหมักที่เติมกรดซัลฟิวริก และเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ถูกทำให้ละลายที่ อุณหภูมิห้องและปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็ว 10,000 รอบ ต่อนาที นาน 30 นาที ของเหลวส่วนใส (supernatant) ถูกดูด และกรองผ่าน disposable filter ที่มีขนาด 0.45 และ 0.22 ไมครอน ตามลำดับ นำของเหลวที่ผ่านการกรองแล้ว ปริมาตร 1 มิลลิลิตรเก็บในหลอดเก็บตัวอย่างสำหรับการตรวจวิเคราะห์ ความเข้มข้นของกรดไขมันที่ระเหยได้ทั้งหมด (total volatile fatty acids; Total VFA) ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี (Gas Chromatography-Mass Spectrometry; GC-MS) (Variance CP-3800, USA) (Mathew et al., 1997, Hall et al., 2014, Xue et al., 2018) โดยมี คุณสมบัติของการวิเคราะห์ (analytical condition) ดังนี้ ตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะหมักที่ใสจะถูกเติมสารละลาย มาตรฐานสำหรับตรวจวิเคราะห์กรดไขมันที่ระเหยได้ (Fatty Acid Methyl Ester; FAMES) ปริมาตร 10 μ l จากนั้นทำการฉีด ตัวอย่างเข้าสู่เครื่อง GC ที่บริเวณฉีดสาร (injector port) ที่ อุณหภูมิ 50 $^{\circ}$ C สู่คอลัมน์ขนาดเล็ก (capillary column) ซึ่งเป็น เฟสคงที่ (stationary phase) ที่เคลือบด้วย 5% diphenyl cross-linked 95% dimethylpolysiloxane มีความยาว 300 mm. มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 250 μ m และมีความ หนาของแผ่นเคลือบเท่ากับ 0.25 μ m (J&W Scientific, Folsom, CA, USA) โดยใช้แก๊สฮีเลียม (Helium; He) เป็นแก๊ส ตัวพาสาร (carrier gas) เพื่อการแยกองค์ประกอบทางเคมี ซึ่งเป็นเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) โดยมีอัตราการไหลของสาร ภายในคอลัมน์สูงสุด เท่ากับ 3 มิลลิลิตรต่อนาที และมีอัตราการ ไหลของแก๊สตัวพาผ่านคอลัมน์ เท่ากับ 20 มิลลิลิตรต่อนาที โดย ปริมาณของสารที่ตรวจวัดในตัวอย่างถูกวัดด้วยเครื่องสเปกโตร มิเตอร์ชนิดมวล (Mass Spectrometry; MS) โดยมีหลักการคือ สารที่ออกมาจากคอลัมน์ขนาดเล็ก (capillary column) ซึ่งเป็น เฟสคงที่ (stationary phase) จะถูกทำให้แตกตัวเป็นไอออนด้วย อิเล็กตรอน (electron impact mode) จากนั้น ไอออนของสาร จะถูกตรวจจับด้วยส่วนตรวจจับไอออน (ion detector) และ แสดงผลเป็นสเปกตรัม (spectrum) ของการดูดกลืนแสงของแต่ละ ตัวอย่าง ความเข้มข้นของสารที่ตรวจวัดได้คำนวณจากการใช้ พื้นที่ใต้กราฟคำนวณกับสมการของกราฟสารมาตรฐาน (standard reagent, Sigma-Aldrich, USA)

การวิเคราะห์ตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะหมักด้วยเทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปคโตรสโกปี

นำตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะหมักที่ไม่ได้เติมกรดซัลฟิวริก มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปคโตรสโกปี เพื่อวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของสเปกตรัมและค่าความเป็นกรด-ด่าง และค่ากรดไขมันที่ระเหยได้ โดยทำการตรวจวิเคราะห์ ณ คณะวิศวกรรมศาสตร์และสถาปัตยกรรมศาสตร์ สาขาวิศวกรรมหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูป มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี วิทยาเขตขอนแก่น โดยวิเคราะห์ตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะหมักที่ผ่านการกรองและไม่เติมกรดซัลฟิวริกเพื่อหลีกเลี่ยงการรบกวนการวิเคราะห์จากโมเลกุลของกรดที่เติม วิเคราะห์ตัวอย่างด้วยเครื่องเนียร์อินฟราเรดสเปคโตรสโกปี ได้แก่ เครื่อง Fourier transform near infrared spectroscopy (FT-NIR) มีคุณสมบัติวัดค่าการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 1,000-2,500 nm โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงแต่ละตัวอย่างจะทำการปิดด้วยวัสดุกันสะท้อน (path length) และวัดค่าการดูดกลืนแสงซ้ำ 3 ครั้ง เพื่อหาค่าประกอบในตัวอย่างและทำการทำนายความเข้มข้นของค่าความเป็นกรด-ด่าง และค่ากรดไขมันที่ระเหยได้

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

กำหนดให้ตัวแปรอิสระ (independence variable) และตัวแปรตาม (dependence variable) คือผลการวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงจากตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะหมักด้วยเครื่องเนียร์อินฟราเรดสเปคโตรสโกปีแต่ละเครื่องและผลการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการตรวจหาค่าความเป็นกรด-ด่าง และค่ากรดไขมันที่ระเหยได้ตามลำดับ นำข้อมูลสเปกตรัมจากการวิเคราะห์ตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะหมัก มาสร้างสมการทำนายค่าความเป็นกรด-ด่าง และค่ากรดไขมันที่ระเหยได้ จากสเปกตรัมการดูดกลืนแสง ด้วยวิธีการวิเคราะห์การถดถอยกำลังน้อยที่สุดบางส่วน (partial least squares regression ;PLSR) เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าสเปกตรัมการดูดกลืนแสง (ตัวแปรอิสระ) กับค่าความเป็นกรด-ด่าง และค่ากรดไขมันที่ระเหยได้ที่วิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ (ตัวแปรตาม) โดยใช้ค่า Root Mean Square Error of Cross Validation (RMSECV) และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (coefficient; R) ระหว่างค่าที่ได้จากการตรวจทางห้องปฏิบัติการ กับค่าที่ได้จากการทำนายด้วยเครื่องเนียร์อินฟราเรดสเปคโตรสโกปี เป็นเกณฑ์ในการคัดเลือกสมการทำนาย (William, 2007; Sukhontarad and Yawongsa, 2020) ทำการปรับแต่งข้อมูลสเปกตรัมเพื่อลดความแปรปรวนของข้อมูลโดยใช้โปรแกรม Unscramble version 9.7

ผลการวิจัย

จากการเก็บตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะหมักจากโคนมพันธุ์โฮลสไตน์ฟรีเซียนลูกผสมที่เปิดฝากระเพาะหมัก และตรวจทางห้องปฏิบัติการโดยใช้เครื่อง GC-MS ผลการศึกษาพบว่า ภาพรวมของการเก็บตัวอย่างหลังจากกินอาหารชั้น (ชั่วโมงที่ 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 และ 14) ตลอดระยะเวลาการศึกษา 16 วัน มีค่าเฉลี่ยกรดไขมันที่ระเหยได้ทั้งหมด (Total VFA) ของตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะหมัก เท่ากับ 105.82 mM/L (105.82 ± 39.74) มีค่าต่ำสุด เท่ากับ 46.68 mM/L และมีค่าสูงสุด เท่ากับ 255.03 mM/L (Figure 1 A) ค่าเฉลี่ยความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของตัวอย่างของเหลวในกระเพาะหมัก มีค่าเท่ากับ 5.4 ± 0.44 โดยมีค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำที่สุด เท่ากับ 4.77 และมีค่าความเป็นกรด-ด่างสูงที่สุด เท่ากับ 6.83 (Figure 1 B) เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย pH ของตัวอย่างของเหลวในกระเพาะหมัก และค่าเฉลี่ย Total VFA จากของเหลวในกระเพาะหมักในระยะเวลา 16 วันของการศึกษา พบว่า วันที่ที่มีค่าเฉลี่ย pH ของตัวอย่างของเหลวในกระเพาะหมัก น้อยกว่าหรือเท่ากับ 5.5 ($\text{pH} \leq 5.5$) คือวันที่ วันที่ 7 8 12 13 (ชั่วโมงที่ 0-8 หลังกินอาหารชั้น) วันที่ 15 (ชั่วโมงที่ 0-6 หลังกินอาหารชั้น) และวันที่ 16 ซึ่งค่าเฉลี่ย Total VFA มีแนวโน้มสูงขึ้นในวันที่ 7, 9, 13 และ 16 (Figure 2) ผลการวิเคราะห์การถดถอยกำลังน้อยที่สุดบางส่วน (partial least squares regression; PLSR) เพื่อสร้างสมการทำนายความเข้มข้นของกรดไขมันที่ระเหยได้ และค่า pH ในตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะหมัก ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของค่าสเปกตรัมการดูดกลืนแสงด้วยเทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปคโตรสโกปี และค่าความเข้มข้นของกรดไขมันที่ระเหยได้ และค่าความเป็นกรด-ด่าง ในตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะหมัก จากการวิเคราะห์ตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะหมักตัวอย่างจำนวน 128 ตัวอย่าง ด้วยเครื่อง FT-NIR โดยมีความยาวคลื่น 1,000-2,500 และ 901.54-1,101.37 ตามลำดับ ทำการวิเคราะห์การดูดกลืนแสงในตัวอย่างตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะหมักแต่ละตัวอย่าง จำนวน 2 ครั้ง (2 ซ้ำ) ได้ข้อมูลค่าสเปกตรัมการดูดกลืนแสงจากเครื่องเนียร์อินฟราเรดสเปคโตรสโกปีแต่ละเครื่อง จำนวน 256 ตัวอย่าง การสร้างกราฟสอบเทียบความถูกต้องของสมการ (calibration curve) ซึ่งเป็นกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างแกน Y ที่กำหนดให้ตัวแปรอิสระ (independence variable) คือโดยผลการวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงตัวอย่างตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะหมักด้วยเครื่องเนียร์อินฟราเรดสเปคโตรสโกปีแต่ละเครื่อง และแกน X

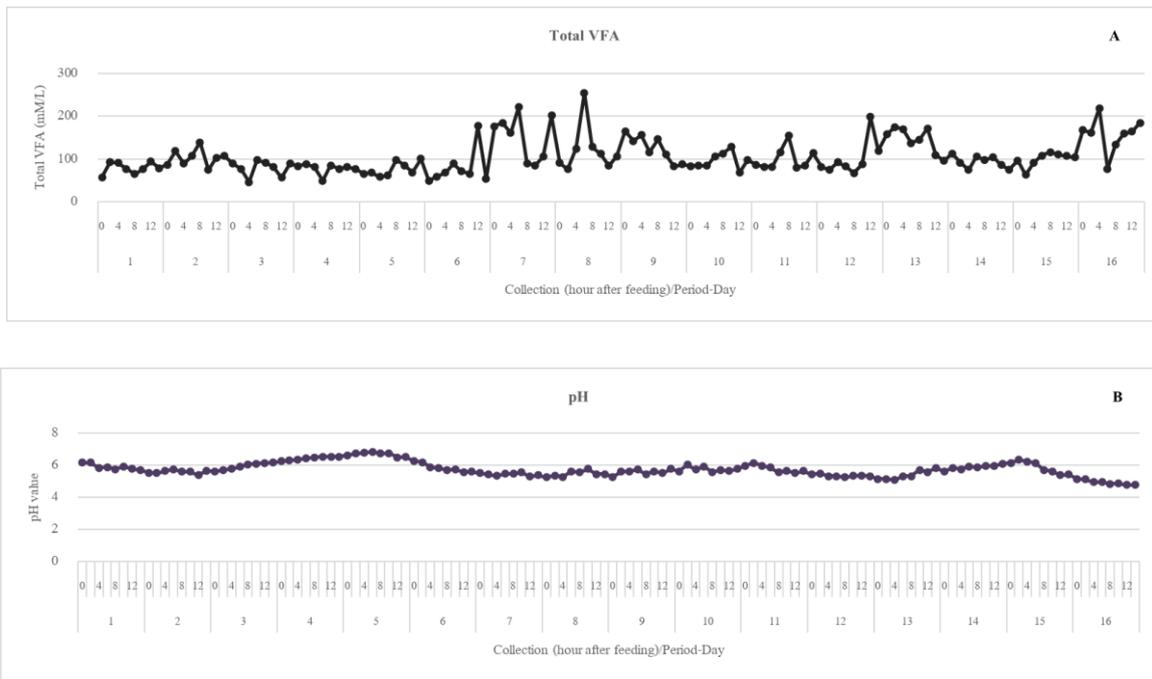


Figure 1 The overall distribution of rumen fluid Total VFA (A) and rumen fluid pH (B) of 128 Holstein Friesian dairy cow rumen fluid samples taken by 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 and 14 hrs. after fed for 16 days period.

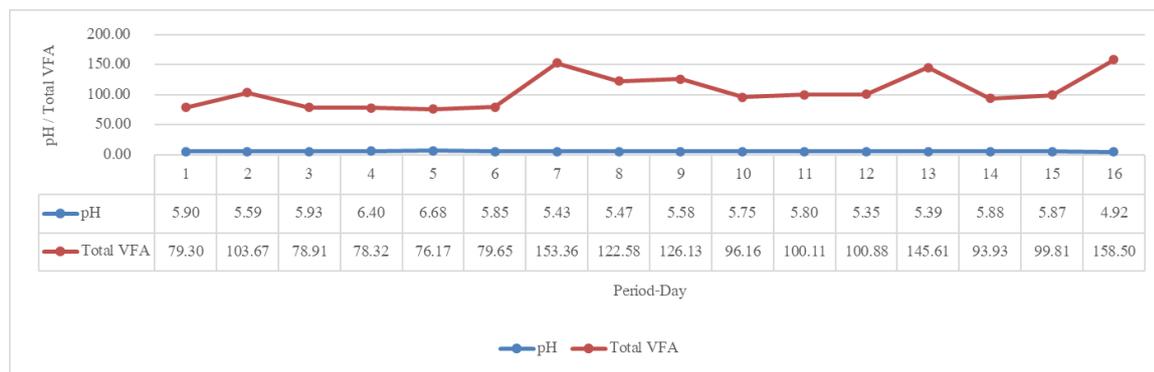


Figure 2 The comparison of rumen fluid pH values (mean) and Total VFA (mean) in 16 days period of the study.

ที่กำหนดให้เป็นตัวแปรตาม (dependence variable) คือผลการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการตรวจหาค่าความเข้มข้นของกรดไขมันที่ระเหยได้ และค่าความเป็นกรด-ด่าง ในตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะหมัก โดยพบว่า วิธีการวิเคราะห์ PLSR ให้กราฟของสมการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสเปกตรัมการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง FT-NIR กับค่าความเข้มข้นของกรดไขมันที่ระเหยได้ทั้งหมด (Total VFA) และค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะหมัก ที่เหมาะสมที่สุด ดังแสดงใน Figure 3 และ Figure 4 ตามลำดับจากนั้นนำข้อมูลตัวแปรอิสระและตัวแปรตามมาวิเคราะห์การถดถอยกำลังน้อยที่สุดบางส่วน (partial least squares regression; PLSR) เพื่อสร้างสมการทำนายความเข้มข้นของกรดไขมันที่ระเหยได้ และค่าความเป็นกรด-ด่าง

ในตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะหมักโดยพิจารณาความสัมพันธ์ของการวิเคราะห์ทั้ง 2 วิธี จากค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient; R) และค่าผิดพลาดมาตรฐานในกลุ่มสร้างสมการ (root mean standard error of calibration; RMSECV) ผลการศึกษานี้พบว่า สเปกตรัมที่ผ่านการปรับแก้ด้วยวิธี 2nd Derivative มีความเหมาะสมสำหรับการทำนายความเข้มข้นของกรดไขมันที่ระเหยได้ และค่าความเป็นกรด-ด่าง โดยสมการที่ใช้ทำนายความเข้มข้นของกรดไขมันที่ระเหยได้ และค่าความเป็นกรด-ด่าง ในของเหลวจากกระเพาะหมัก ที่วิเคราะห์จากเครื่อง FT-NIR มีค่า R เท่ากับ 0.93 และ 0.85 ตามลำดับ และมีค่า RMSECV เท่ากับ 0.43 และ 0.35, ตามลำดับ (Table 2)

Table 2 The statistical analysis of rumen fluid Total VFA and pH values using FT-NIR analyzed by partial least squares

Spectrum modulation	Total VFA		pH values	
	R	RMSECV	R	RMSECV
None	0.89	0.73	0.76	0.43
Smoothing method	0.81	2.04	0.72	0.43
1 st derivative method	0.87	0.38	0.88	0.11
2 nd derivative method	0.93	0.43	0.85	0.35
SNV method	0.88	1.01	0.88	0.03
MSC method	0.89	1.05	0.85	0.34

regression (PLSR)

สรุป และอภิปรายผล

ภาวะความเป็นกรดในกระเพาะหมักแบบกึ่งเฉียบพลันเกิดจากการสะสมของกรดไขมันระเหยได้ซึ่งส่งผลให้ค่าความเป็นกรด-ด่างในกระเพาะหมักลดลง (Owens et al., 1998) วิธีการบ่งชี้ภาวะความเป็นกรดในกระเพาะหมักแบบกึ่งเฉียบพลันที่ยอมรับ คือการวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะหมัก (ruminal fluid) ซึ่งมีวิธีการเก็บตัวอย่างและการกำหนดค่าขีดเริ่มเปลี่ยน (threshold value) ของค่าความเป็นกรด-ด่าง ในการกำหนดภาวะเป็นกรดแบบกึ่งเฉียบพลันที่แตกต่างกัน เช่น ค่าความเป็นกรด-ด่างของของเหลวในกระเพาะหมักที่เก็บโดยการเจาะกระเพาะหมักผ่านทางผนังช่องท้องบริเวณสวาป (rumenocentesis) ที่ระดับ pH 5.5 (Krause and Oetzel, 2006, Stefanska et al., 2016) กำหนดที่ระดับ pH 5.8 ในวิธีการเก็บจากถุงส่วนล่าง (ventral sac) ของกระเพาะหมักโดยตรง (Beauchemin et al., 2003; Krause and Oetzel, 2006) ส่วน Fleming et al. (2020) กล่าวว่า ค่า pH ที่บ่งชี้ภาวะ SARA ในโคนม คือน้อยกว่าหรือเท่ากับ 5.5 ($\text{pH} \leq 5.5$) เป็นระยะเวลาอย่างน้อย 4 ชั่วโมง (240 นาที) (Fleming et al., 2020) โดยในการศึกษานี้ พบว่า ค่า pH ในของเหลวจากกระเพาะหมัก ที่มีค่า ≤ 5.5 พบในระยะการศึกษาวันที่ 7 8 12 และ 13 (ชั่วโมงที่ 0-8 หลังกินอาหารชั้น) วันที่ 15 (ชั่วโมงที่ 0-6 หลังกินอาหารชั้น) และวันที่ 16 ซึ่งสอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของ total VFA ที่เพิ่มขึ้นในช่วงวันเดียวกัน โดยค่า Total VFA มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในวันที่ 6-7, 12-13 และวันที่ 16 ของระยะเวลาการศึกษา ซึ่งรูปแบบของการเพิ่มขึ้นของ VFA ใกล้เคียงและสอดคล้องกับการศึกษาของ Fleming et al. (2020) ซึ่งมีค่ากรดไขมันระเหยได้ทั้งหมดจะเพิ่มขึ้นในวันที่

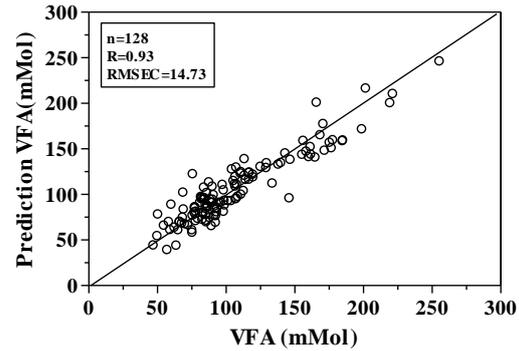


Figure 3 The calibration curve of rumen fluid Total VFA analyzed by partial least squares regression (PLSR)

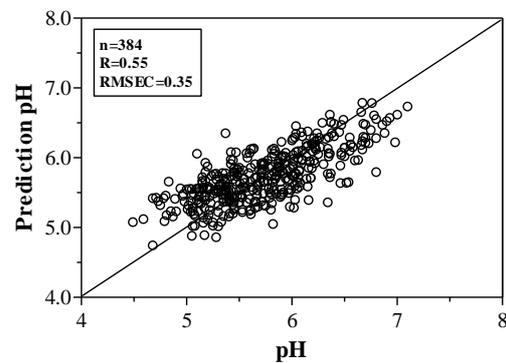


Figure 4 The calibration curve of rumen fluid pH values analyzed by partial least squares regression (PLSR)

11-12 และ 16-18 ของระยะการศึกษา 20 วัน (Fleming et al., 2020)

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาความสัมพันธ์ของการตรวจวัดระดับความเข้มข้นของกรดไขมันที่ระเหยได้ และค่าความเป็นกรด-ด่าง ในตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะหมัก โดยเป็นการสร้างสมการทำนายความเข้มข้นของกรดไขมันที่ระเหยได้ และค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วยเทคนิค NIRS หาความสัมพันธ์กับวิธีการตรวจมาตรฐานทางห้องปฏิบัติการ ซึ่งผลการสร้างสมการทำนายความเข้มข้นของกรดไขมันที่ระเหยได้ และค่าความเป็นกรด-ด่าง ในตัวอย่างตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะหมัก พบว่า สเปกตรัมที่ผ่านการปรับแต่ง (modulation) โดยการลดความแปรปรวนของข้อมูลสเปกตรัมการดูดกลืนแสงด้วยการสร้างสมการแบบ PLSR โดยวิธี 2nd Derivative เป็นวิธีที่มีความเหมาะสมสำหรับการทำนายความเข้มข้นกรดไขมันที่ระเหยได้ และค่าความเป็นกรด-ด่าง ซึ่งวิธีการปรับแต่งข้อมูลสเปกตรัม มีข้อดีคือสามารถนำค่าองค์ประกอบทางเคมีมาคิดรวมกับข้อมูลสเปกตรัมการดูดกลืนแสง และสามารถประเมินค่าทางเคมี ทำให้สามารถอธิบายความแปรปรวนของข้อมูลประเมินค่าทางเคมีได้

ในเวลาเดียวกัน ส่งผลให้สมการทำนายค่า (Calibration) ที่ได้ จากวิธี PLSR ประเมินค่าทางเคมีได้ถูกต้องมากขึ้น เนื่องจาก สมการที่ใช้ทำนายความเข้มข้นกรดไขมันที่ระเหยได้ และค่า ความเป็นกรด-ด่าง ในตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะหมักที่ วิเคราะห์ด้วยเทคนิค NIRS โดยใช้เครื่อง FT-NIR มีค่าสหสัมพันธ์ (R) เท่ากับ 0.93 และ 0.85 ตามลำดับ และมีค่า RMSECV เท่ากับ 0.43 และ 0.35 ตามลำดับ เมื่อพิจารณาค่าสหสัมพันธ์ (R) ซึ่งใช้เป็นเกณฑ์ในการทำนายความสัมพันธ์ของสมการที่สร้างขึ้น จากการวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยเทคนิค NIRS กับวิธีการตรวจ ทางห้องปฏิบัติการมาตรฐาน พบว่า ค่า R ของความเข้มข้นกรด ไขมันที่ระเหยได้ และค่าความเป็นกรด-ด่าง ในตัวอย่างของเหลว จากกระเพาะหมักที่วิเคราะห์จากเครื่อง FT-NIR สามารถนำไปใช้ เพื่อการตรวจคัดกรอง (screening) ใช้สร้างสมการทำนาย (calibration) และใช้เพื่อสร้างสมการทำนายในการศึกษาวิจัยได้ โดยค่า R ที่มีค่าเข้าใกล้ 1 หรือเท่ากับ 1 และค่าความผิดพลาด มาตรฐาน (RMSECV) ของความแตกต่างระหว่างค่าที่ได้จากการ วิเคราะห์ทางเคมีกับค่าที่ได้จากการทำนายด้วย NIRS (calibration) ที่มีค่าน้อย บ่งชี้ว่าสมการทำนายค่า (Calibration) ที่สร้างขึ้นสามารถนำมาใช้ในการอธิบายค่าทำนายที่เกิดจาก อิทธิพลของตัวแปรอิสระ (X) กับค่าแปรตาม (Y) ที่มีความสัมพันธ์ กันมาก (William, 2007)

การศึกษาค้นคว้าสอดคล้องกับการศึกษาของ Lean et al. (2012) ในการใช้เทคนิค NIRS เพื่อทำนายค่ากรดไขมันที่ระเหย ได้ในตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะหมักโคนม ซึ่งเทคนิค NIRS ให้ค่า R เท่ากับ 0.73 มีความเหมาะสมในการใช้ทำนายค่ากรด ไขมันที่ระเหยได้ในโคที่เกิดภาวะกระเพาะหมักเป็นกรด Jacobi et al. (2009) และ Stockl and Lichti (2018) ศึกษา การใช้เทคนิค NIRS ในการสร้างสมการทำนายปริมาณกรด กรดไขมันที่ระเหยได้ในหลอดทดลอง ซึ่งพบว่าให้ค่า R ที่เท่ากัน คือเท่ากับ 0.94 และมีค่าคลาดเคลื่อน 4.0 อย่างไรก็ตาม Ward et al. (2011) พบว่า การใช้เทคนิคอิน NIRS มีความ เหมาะสมในการใช้เป็นเครื่องมือสร้างสมการทำนายปริมาณกรด ไขมันที่ระเหยได้ในหลอดทดลองแต่จากปัจจัยด้านจำนวนข้อมูล ที่นำมาวิเคราะห์ยังไม่มากพอเนื่องจากเป็นการศึกษานำร่อง (pilot scale) ทำให้ยังมีค่าความคลาดเคลื่อนสูงเมื่อเทียบกับวิธี มาตรฐานทางห้องปฏิบัติการ ทั้งนี้ยังพบว่ามีการศึกษาการ ประยุกต์ใช้เทคนิค NIRS ในการตรวจวิเคราะห์และทำนายความ เข้มข้นของสารชีวเคมีในเลือดเพื่อเป็นเครื่องมือในการตรวจคัด กรองโรคทางเมแทบอลิก (metabolic disease) ในโคนม เช่น การวิเคราะห์ความเข้มข้นของสารเบต้าไฮดรอกซีบิวทีเรต (BHB) และ สารอะซีโตน (acetone) ในซีรัมโคนมด้วยเทคนิค

NIRS เป็นต้น (De Roos et al., 2007, .Sukhontarad and Yawongsa, 2020)

จากผลการศึกษาศึกษาสามารถสรุปได้ว่า การใช้เทคนิค NIRS ในการตรวจวิเคราะห์หาความเข้มข้นของกรดไขมันระเหยได้ ทั้งหมด (Total VFA) และค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH value) จากตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะหมักโคนม มีความน่าเชื่อถือ ในระดับปานกลาง ซึ่งถือว่าเป็นเครื่องมือที่สามารถนำมา ประยุกต์ใช้ในการศึกษาวิจัยได้ โดยการศึกษาวิจัยต่อไปจะต้อง ทำความเข้าใจอย่างลึกซึ้งซึ่งและต้องการการเก็บข้อมูลเพิ่มเติม เพื่อให้เกิดความแม่นยำเทียบเท่ากับการตรวจทางห้องปฏิบัติการ เพิ่มความถูกต้องและแม่นยำของการประยุกต์ใช้เทคนิค NIRS ใน การทำนายค่าเคมีต่างๆ ในเลือดและค่าดัชนีการผลิตโคนมด้าน ต่างๆ และเพื่อสามารถพัฒนาเครื่อง NIRS แบบเคลื่อนที่หรือ แบบพกพาในการตรวจวิเคราะห์หรือตรวจคัดกรองภาวะ กระเพาะหมักเป็นกรดในโคนมต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ คณะอาจารย์รวมทั้งเจ้าหน้าที่และนักศึกษา สาขาวิศวกรรมหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูป คณะ วิศวกรรมศาสตร์และสถาปัตยกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัย เทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี วิทยาเขตขอนแก่น ที่ให้ความ อนุเคราะห์และคำแนะนำในการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างส่งตรวจ ด้วยเทคนิคเนียร์อินฟาเรดสเปกโตรสโกปี งานวิจัยนี้ได้รับทุน งบประมาณสนับสนุนจากสำนักงานการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปีงบประมาณ 2561

References

- Corson D.C., Waghorn G.C., Ulyatt M.J. & Lee J. (1999). NIRS: Forage analysis and livestock feeding. *Proceedings of the New Zealand Grassland Association*, 61, 127-132.
- Dansch AM, Li S, Andersen PH, Khafipour E, Kristensen NB, & Plaizier JC. (2015). Indicators of induced subacute ruminal acidosis (SARA) in Danish Holstein cows. *Acta Vet Scand*, 17;57(1), 39.
- De Roos A.P.W., van den Bijgaart H.J.C.M, Horlyk, J. & De Jong, (2007). Screening for subclinical ketosis in dairy cattle by Fourier transform infrared spectrometry. *Journal of Dairy Science*, 90, 1761-1766.
- Duffield T, Plaizier J.C., Fairfield, A., Bagg, R., Vessie, G., Dick, P., Wilson, J., Aramini, J. & McBride B. (2004).

- Comparison of techniques for measurement of rumen pH in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 87(1), 59-66.
- Fleming, A., Garrett, K., Froehlich, K., Beck, M., Bryant, R.H., Edwards, G. & Gregorini, P. (2020). Supplementation of spring pasture with harvested fodder beet bulb alters rumen fermentation and increases risk of subacute ruminal acidosis during early lactation. *Animals (Basel)*, 30:10(8), 1307.
- Gäbel, G., Aschenbach, J. R., & Müller, F. (2002). Transfer of energy substrates across the ruminal epithelium: implications and limitations. *Animal Health Research Reviews*, 3(1), 15-30.
- Inchaisri, C., Chanpongsang, S., Noordhuizen, J. & Hogeveen, H. (2013). The association of ruminal pH and some metabolic parameters with conception rate at first artificial insemination in Thai dairy cows. *Tropical Animal Health Production*, 45(5), 1183-1190.
- Inchaisri, C., Chanpongsang, S., Noordhuizen, J. & Hogeveen, H. (2014). A cow-level association of ruminal pH on body condition score, serum beta-hydroxybutyrate and postpartum disorders in Thai dairy cattle. *Animal Science Journal*, 85(9), 861-867.
- Jacobi, H.F., Moschner, C.R. & Hartung, E. (2009). Use of near infrared spectroscopy in monitoring of volatile fatty acids in anaerobic digestion. *Water Science and Technology*, 60(2), 339-46.
- Jarassaeng, C., Aiumlamai, S., Wachirapakorn, C., Techakumphu, M., Noordhuizen, J. P., Beynen, A. C., & Suadsong, S. (2012). Risk factors of subclinical mastitis in small holder dairy cows in Khon Kaen province. *Thai Journal of Veterinary Medicine*, 42(2), 143-151.
- Khafipour, E., Plaizier, J. C., Aikman, P. C., & Krause, D. O. (2011). Population structure of rumen *Escherichia coli* associated with subacute ruminal acidosis (SARA) in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 94(1), 351-360.
- Kleen, J. L., Hooijer, G. A., Rehage, J. & Noordhuizen, J. P. T. M. (2003). Subacute ruminal acidosis (SARA): A review. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, 50(8), 406-414.
- Kotarski, S.F., Thurn, K.K., Toure, A., Miller, F.R. & Waniska, R.D. (1992). *Grain sorghum digestion by ruminal microflora*. Texas Tech Sorghum Research Initiative.
- Krause, K. M. & Oetzel, G. R. (2006). Understanding and preventing subacute ruminal acidosis in dairy herds: A review. *Animal Feed Science Technology*, 126(3-4), 215-236.
- Lean I.J., Golder H.M., Black J.L., King R. & Rabiee A.R. (2013). *In vivo* indices for predicting acidosis risk of grains in cattle: Comparison with *in vitro* methods. *Journal of Animal Science*, 91(6), 2823-35.
- Lee M.R.F, Fleming H.R., Cogan T, Hodgson C & Davies D.R. (2019). Assessing the ability of silage lactic acid bacteria to incorporate and transform inorganic selenium within laboratory scale silos. *Animal Feed Science Technology*, 253, 125-134.
- Mathew A.G., Robbins C.M., Chattin S.E., & Quigley J.D. (1997). Influence of galactosyl lactose on energy and protein digestibility, enteric microflora, and performance of weanling pigs, *Journal of Animal Science*, 75(4), 1009-1016.
- Mizuguchi, H., Kim, Y.H., Kanazawa, T., Ikuta, K. & Sato S. (2020). Effects of short-term fasting on ruminal pH and volatile fatty acids in cattle fed high-roughage versus high-concentrate diets. *Journal of Veterinary Medicinal Science*. 82(10), 1415-1420.
- Mulligan, F.J. & Doherty, M.L. (2008). Production diseases of the transition cow. *The Veterinary Journal*, 176, 3-9.
- Nagaraja T.G. & Titgemeyer E.C. (2007). Ruminal acidosis in beef cattle: the current microbiological and nutritional outlook. *Journal of Dairy Science*, 90(Suppl 1), 17-38.

- National Research Council. (2001). *Nutrient Requirements of Dairy Cattle* (7th edition), National Academic Press, Washington, DC.
- Nocek, J. E. (1997). Bovine acidosis: Implications on laminitis. *Journal of Dairy Science*, 80(5), 1005-1028.
- Owens, F.N., Secrist, D.S., Hill, W.J. & Gill, D.R. (1998). Acidosis in cattle: a review. *Journal of Animal Science*, 76, 275-286.
- Pilachai, R., Schonewille, J. T., Thamrongyoswittayakul, C., Aiumlamai, S., Wachirapakorn, C., Everts, H. & Hendriks, W. H. (2012). Starch source in high concentrate rations does not affect rumen pH, histamine and lipopolysaccharide concentrations in dairy cows. *Livestock Science*, 150(1-3), 135-142.
- Plaizier J.C., Krause D.O., Gozho G.N., McBride B.W. (2008). Subacute ruminal acidosis in dairy cows: the physiological causes, incidence and consequences. *Vet J.* 176(1), 21-31.
- Stermer, B.A., Bianchini, G.M. & Korth, K.L., (1994). Regulation of HMG-CoA reductase activity in plants. *Journal of Lipid Research*. 35, 1133-1140.
- Sukhontarad, P. & Yawongsa, A. (2020). The measurement of serum beta-hydroxybutyrate concentrations in dairy cows by near infrared spectroscopy. *Journal of Kasetsart Veterinary*, 30(2), 61-78.
- Van Knegsel A.T.M., van der Drift S.G.A., Horneman M., de Roos A.P.W., Kemp B. & Graat E.A.M. (2010). Ketone body concentration in milk determined by Fourier transform infrared spectroscopy: Value for the detection of hyperketonemia in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 93, 3065-3069.
- Xue, F., Pan, X. & Jiang, L. (2018). GC-MS analysis of the ruminal metabolome response to thiamine supplementation during high grain feeding in dairy cows. *Metabolomics*, 14, 67.
- Stefanska, B., Nowak, W., Komisarek, J., Taciak, M., Barszcz, M., Skomiał, J. (2017). Prevalence and consequence of subacute ruminal acidosis in Polish dairy herds. *Journal of Animal Physiology Animal Nutrition*, 101(4), 694-702.
- Stockl A & Lichti F. (2018). Near-infrared spectroscopy (NIRS) for a real time monitoring of the biogas process. *Bioresource Technology*. 247, 1249-1252.
- Ward A.J., Bruni E, Lykkegaard M.K., Feilberg A, Adamsen A.P., Jensen A.P. & Poulsen A.K. (2011). Real time monitoring of a biogas digester with gas chromatography, near-infrared spectroscopy, and membrane-inlet mass spectrometry. *Bioresource Technology*, 102(5), 4098-103.
- Williams, P., Antoniszyn, J., Manley, M. (2019). *Near infrared technology: getting the best out of light. African Sun Media: Stellenbosch*, South Africa. http://scholar.sun.ac.za/bitstream/handle/10019.1/108695/williams_near_2019.pdf.

The measurement of total volatile fatty acid concentration and pH value in rumen fluid of rumen-fistulated dairy cow by near-infrared spectroscopy

Theerakul Nilnont^{1*}, Rittichai Pilachai¹, Kasama Chareekhot² and Saranya Workhwa²

¹Department of Veterinary Technology, Faculty of Technology, Udon Thani Rajabhat University, Mueang, Udon Thani, 41000, Thailand

²Department of Food Science and Technology, Faculty of Technology, Udon Thani Rajabhat University, Mueang, Udon Thani, 41000, Thailand

ARTICLE INFO

Article history

Received: 24 May 2021

Revised: 29 May 2021

Accepted: 30 May 2021

Online published: 26 June 2021

Keyword

volatile fatty acid

pH

NIRS

ABSTRACT

pH value and volatile fatty acid (VFA) measurement in ruminal fluid samples are the standard markers to diagnose rumen acidosis in dairy cow. The previous studies showed that VFA measurement in various samples by using Near-infrared spectroscopy (NIRS) technique is a reliable to implement as analytical instrument. The objectives of this study were to assess the relationship between laboratory Total VFA concentration and pH value in ruminal fluid samples of dairy cow compared to Total VFA concentration and pH value in ruminal fluid samples of rumen-fistulated dairy cow by applied NIRS for generating the calibration equation. One-hundred and twenty-eight ruminal fluid samples from rumen-fistulated crossbred (Holstein Friesian×native) dairy cow with ruminal acidosis induced and were collected by every 2 hours after fed concentrate ration with seven times per day of 16 days period. All samples were analyzed for Total VFA concentration and pH value by using Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) and portable pH meter, respectively. NIRS was used for analyzed and generated calibration equation. The results demonstrated that the mean concentration of Total VFA and pH were 105.82 ± 39.74 mM/L and 5.4 ± 0.44 , respectively. The statistical analysis to predict Total VFA concentration and pH value demonstrated the coefficient (R) value were 0.93 and 0.85, respectively. The application of NIRS to analyze Total VFA concentration and pH value in this study reveal the moderate reliable for study and research scale, thus more data collections are required for higher accuracy of the analysis.

*Corresponding author

E-mail address: theerakul_nil@yahoo.com (T. Nilnont)

Online print: 28 June 2021. Copyright © 2021. This is an open access article, production and hosting by Faculty of Agricultural Technology, Rajabhat Maha Sarakham University.