# บทที่ 3

# อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

## 3.1 สารเคมีและอุปกรณ์

### 3.1.1 สารเคมี

| ชื่อสารเคมี | เกรด | ยี่ห้อผลิตภัณฑ์ |
|---|---|---|
| 2 – Ethoxyethanol (Ethylene glycol monoethyl ether) | purified grade | Merk |
| 2 - Ethylbutyric acid | analytical reagent | Merk |
| Acetone | analytical reagent | Merk |
| Alcohol | analytical reagent | J. T. Baker |
| Boric acid ($H_3BO_4$) | analytical reagent | Merk |
| Bromcresol green | analytical reagent | Merk |
| Bromothymal blue indicator | analytical reagent | Merk |
| Cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) | technical grade | Merk |
| Copper sulphate ($CuSO_4$) | analytical reagent | Merk |
| Disodium ethylene diamine – tetra acetate (EDTA) | analytical reagent | Merk |
| Distilled water | deionized water | - |
| Hydrochloric acid (HCl) | analytical reagent | BDH |
| Hydrogen peroxide ($H_2O_2$) | medical extra grade 35% | Merk |
| Kieselgur | analytical reagent | Merk |
| Methyl red indicator | analytical reagent | BDH |
| Phosphoric acid ($H_3PO_4$) | analytical reagent | BDH |
| Potassium carbonate ($K_2CO_3$) | analytical reagent | Merk |
| Potassium hydroxide (KOH) | analytical reagent | Merk |

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

| ชื่อสารเคมี | เกรด | ยี่ห้อผลิตภัณฑ์ |
|---|---|---|
| Potassium sulphate ($K_2SO_4$) | analytical reagent | Merk |
| Pumice stone | analytical reagent | BDH |
| Sodium borate decahydrate ($Na_2B_4O_710H_2O$) | analytical reagent | Merk |
| Sodium hydroxide (NaOH) | analytical reagent | Merk |
| Sodium louryl sulphate | analytical reagent | Merk |
| Sulphuric acid ($H_2SO_4$) | analytical reagent | BDH |
| Tashiro indicator | analytical reagent | Riedel. De Haen |
| Titanium oxide ($TiO_2$) | analytical reagent | Riedel. De Haen |

### 3.1.2 อุปกรณ์ และเครื่องมือ

| ชื่ออุปกรณ์และเครื่องมือ | รุ่น/โมเดล | บริษัท |
|---|---|---|
| Gas Chromatograph | GC – 14B | SHIMADZU |
| กระดาษกรอง | No. 40 | Whatman® |
| กระดาษฟอยส์ | DIAMOND® | RMC |
| กระบอกตวง 100 มล. (cylinder) | - | Witeg |
| ขวดก้นกลม (round bottom flask) | - | SCHOTT DURAN |
| ขวดกรองรูปชมพู่ 1000 มล. (suction flask) | No. 27060 | Kimax |
| ขวดชมพู่ 250 มล. (erlenmeyer flask) | No. 26500 | Kimax |
| เครื่องกลั่นโปรตีน | 315 | Buchi |
| เครื่องชั่งไฟฟ้า (ทศนิยม 3 ตำแหน่ง) | P 163 | Mettler |
| เครื่องดูดสูญญากาศ (suction) | VDE 0530 | W.Krannich |
| เครื่องไทเทรต | NW 25 mm | BRAND |
| เครื่องบดตัวอย่างอาหาร | 4 | Thomass-willey |
| เครื่องย่อยโปรตีน | 12 | Buchi |
| เครื่องย่อยเยื่อใย | - | LAB CON CO® |
| เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง | 678 EP/KF | Metrohm |
| เครื่องสกัดไขมัน | EV 1 | Gerhardt |
| ซอคเลท (soxhlet) | Ex 5/55 | Quickfit |

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

| ชื่ออุปกรณ์และเครื่องมือ | รุ่น/โมเดล | บริษัท |
|---|---|---|
| ไซริงค์ 10 มล. | - | NIPRO® |
| ตู้อบ 100 °C (oven) | TV 30 U | Memmert |
| เตาเผา 550 °C (muffle furnace) | Mr 260E | Heraeus Hanau |
| ถ้วยกระเบื้องเคลือบ | 109 | Haldenwanger |
| ถ้วยกระเบื้องเคลือบ (porcelin crucible) | 101 - 5 | HCT |
| โถดูดความชื้น | GL 32 | Glasswerk Werthein |
| ทิมเบิล (thimble) | No. 2800258 | Whatman |
| บีกเกอร์ 600 มล. | - | PYREX |
| บุชเนอร์ฟันเนล (buchner funnel) | 127 – 2a | Haldenwanger |
| หม้อปรับความดัน (autoclave) | No. 1925x | AllAMERICAN |
| หลอดย่อยโปรตีน (digestion tube) | - | Buchi |

## 3.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี (Chemical composition analysis)

ศึกษาองค์ประกอบทางเคมี และคุณค่าทางโภชนะของกากข้าวมอลต์แห้งและอาหารทดลองที่ผสมกากข้าวมอลต์แห้งทั้ง 4 ระดับคือ 0 20 30 และ 40 เปอร์เซ็นต์ ระดับโปรตีนหยาบ (CP) 14 เปอร์เซ็นต์ (ร้อยละของวัตถุแห้ง)

3.2.1 **วิธีวิเคราะห์แบบ Proximate analysis** สำหรับการวิเคราะห์โภชนะซึ่งประกอบด้วย วัตถุแห้ง (DM) อินทรียวัตถุ (OM) โปรตีนหยาบ (CP) ไขมัน (EE) และเถ้า (ash) (A.O.A.C., 2000)

3.2.2 **วิธีวิเคราะห์แบบ Detergent method** สำหรับการวิเคราะห์องค์ประกอบที่เป็นโครงสร้างของพืชได้แก่ เยื่อใยที่ละลายในด่าง (NDF) เยื่อใยที่ละลายในกรด (ADF) และลิกนิน (ADL) (Van Soest, 1982)

ส่วนประกอบของอาหารทดลองที่ผสมกากข้าวมอลต์แห้งทั้ง 4 ระดับ ดังแสดงในตาราง วัตถุดิบหลักที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือ ข้าวโพดบด มันเส้น กากถั่วเหลือง โดยให้กากข้าวมอลต์แห้งเป็นแหล่งโปรตีนหยาบทดแทนกากถั่วเหลืองในสูตรอาหาร

**ตาราง 5** ส่วนประกอบของวัตถุดิบ ต้นทุนต่อกิโลกรัม ร้อยละของโปรตีนหยาบ และโภชนะย่อยได้รวม (total digestible nutrients, TDN) จากการคำนวณของอาหารทดลองที่ผสมกากข้าวมอลต์แห้งทั้ง 4 ระดับ

| | 0% DMR | 20% DMR | 30% DMR | 40% DMR |
|---|---|---|---|---|
| Corn (%) | 15.00 | 15.00 | 15.00 | 15.00 |
| Cassava (%) | 50.49 | 39.79 | 34.43 | 29.08 |
| Soybean Meal (%) | 31.01 | 21.71 | 17.07 | 12.42 |
| Dried malt residue (%) | 0.00 | 20.00 | 30.00 | 40.00 |
| Dicalcium-P (%) | 2.00 | 2.00 | 2.00 | 2.00 |
| Salt (%) | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 |
| Premix (%) | 0.50 | 0.50 | 0.50 | 0.50 |
| Price (Baht/kg) | 5.78 | 5.18 | 4.89 | 4.59 |
| Calculated CP (%) | 16.00 | 16.00 | 16.00 | 16.00 |
| TDN (%) | 78.09 | 75.36 | 73.99 | 72.62 |

### 3.3 การศึกษาการสลายตัวของโภชนะภายในกระเพาะหมักโดยวิธีใช้ถุงไนล่อน (*In situ/In sacco* rumen degradability techniques)

ศึกษาการสลายตัวของกากข้าวมอลต์แห้ง และอาหารทดลองที่ผสมกากข้าวมอลต์แห้งทั้ง 4 ระดับภายในกระเพาะหมักของโคนมด้วยวิธีการ *In situ / In sacco* techniques โดยการใช้ถุงไนล่อนตามวิธีการของ Ørskov and McDonald (1979)

#### 3.3.1 วิธีการทดลอง

เตรียมตัวอย่างอาหารทดลองโดยบดผ่านตะแกรงขนาด 2 มิลลิเมตร ใช้ถุงไนล่อนที่มีขนาดรู (pore size) 40-60 ไมครอน (µm) และมีขนาดถุง 70x150 มิลลิเมตร (ภาพ 8) ก่อนบรรจุตัวอย่างอาหารทดลองอบถุงไนล่อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น จดบันทึกน้ำหนักถุง ($W_1$) ชั่งตัวอย่างประมาณ 3 กรัม ($W_2$) ใส่ถุงไนล่อนมัดติดกับท่อยางที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1 เซนติเมตร ขนาดความยาวประมาณ 40 เซนติเมตร แล้วนำไปบ่ม (incubate) ในกระเพาะหมักของโคนม (ภาพ 9) ตามวิธีการ complete exchange method (เอกสิทธิ์, 2541) ที่ชั่วโมงต่าง ๆ คือ 0 2 4 8 16 24 36 และ 48 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลานำถุงไนล่อนที่มีตัวอย่างออกจากกระเพาะหมักไปล้างในภาชนะที่มีน้ำไหลตลอดเวลาเพื่อชะเอาเศษอาหารที่ติด

บริเวณภายนอกถุงออกให้หมด สำหรับถุงไนล่อนที่ 0 ชั่วโมง (washing loss) นั้น ให้นำไปแช่น้ำอุ่นอุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส ประมาณ 30 นาที จากนั้นนำถุงไนล่อนที่มีตัวอย่างอาหารทั้งหมดไปล้างด้วยเครื่องซักผ้าแกนนอนประมาณ 15 นาที แล้วจึงนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง และนำมาใส่โถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักที่เหลือ ($W_3$) นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของวัตถุแห้งและโปรตีนที่สลายตัวในกระเพาะหมักโคนม (% dry matter/crude protein disappearance)

$$\%DM/CP\ disappearance = \frac{(W_1+W_2+W_3)}{W_2} X\ 100$$

เมื่อ $W_1$ = น้ำหนักถุง (กรัม)

$W_2$ = น้ำหนักตัวอย่างอาหารเริ่มต้น (กรัม)

$W_3$ = น้ำหนักถุง และอาหารตัวอย่างหลังบ่ม (กรัม)

นำค่า % DM และ CP disappearance ที่ชั่วโมงบ่มต่างๆ ไปเข้าสมการที่เสนอโดย Ørskov and McDonald, (1979) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป NEWAY

$$P = a + b\ (1 - e^{-ct})$$

เมื่อ P = ค่าการสลายตัวได้ที่ช่วงเวลาต่างกัน (%)

a = ส่วนที่ละลายได้ทันที (%)

b = ส่วนที่ไม่ละลายแต่สามารถเกิดการหมักย่อยได้ (%)

e = $\log_{10}$

c = อัตราการสลายตัวของ b

t = ช่วงระยะเวลาต่างๆ

นำค่าพารามิเตอร์ (A, B และ c) ที่คำนวณได้จากโปรแกรมมาทำนายค่าปริมาณวัตถุแห้งที่สัตว์กินได้ (dry matter intake, DMI) วัตถุแห้งย่อยได้ที่สัตว์ได้รับ (digestible dry matter intake, DDMI) และอัตราการเจริญเติบโต (growth rate) และค่าดัชนีบ่งชี้ (index value) ตามสมการที่เสนอโดย Shem *et al.* (1995)

DMI (kg/d) = - 8.286 + 0.266A + 0.102B + 17.696c

DDMI (kg/d) = - 7.609 + 0.219A + 0.080B + 24.191c

Growth rate = - 0.649 + 0.017A + 0.006B + 3.870c

Index value = A + 0.38B + 66.5c

**ภาพ 8** การเตรียมถุงไนล่อนสำหรับวัดการสลายตัวของโภชนะในกระเพาะหมักโคนม

**ภาพ 9** วิธีการหย่อนถุงไนล่อนเพื่อบ่ม (incubate) ในกระเพาะหมักโคนม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

### 3.3.2 สัตว์ทดลอง

สำหรับสัตว์ทดลองที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้คือโคนมระยะแห้งนม (dry cow) และไม่ให้ผลผลิต ลูกผสมพันธุ์พื้นเมือง x โฮลสไตน์ฟรีเซี่ยน เพศเมีย อายุ 4-7 ปี จำนวน 4 ตัว น้ำหนักตัว 380 ± 74 กิโลกรัม ที่ได้รับการเปิดท่อทางเดินอาหารบริเวณกระเพาะหมักโดยการเจาะกระเพาะฝัง Rumen fistula บริเวณสวาป (swap) ด้านซ้ายของตัวโค (ทัศนีย์ และเทอดชัย, 2530) โคทุกตัวได้อยู่ในคอกผูกยืนโรงที่มีรางน้ำและอาหารแยกเฉพาะตัว ได้รับอาหารวันละ 2 ครั้ง คือ 6.00 น. และ 18.00 น. มีน้ำให้กินตลอดเวลา

### 3.3.3 การวิเคราะห์สถิติ

การศึกษาการสลายตัวของโภชนะภายในกระเพาะหมักโดยวิธีใช้ถุงไนล่อนของกากข้าวมอลต์แห้งและอาหารทดลองใช้วิธีวิเคราะห์วาเรียนซ์ (analysis of variance, ANOVA) ตามแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (completely Randomized Design, CRD) และเปรียบเทียบความแตกต่างด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range test (Steel and Torrie, 1984) โดยการใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SAS (มนต์ชัย, 2537)

## 3.4 การประเมินค่าการย่อยได้และพลังงานโดยวิธีวัดปริมาณแก๊สที่เกิดขึ้น (Gas production techniques)

ค่าการย่อยได้ของโภชนะในตัวสัตว์ มีความสัมพันธ์กับปริมาณแก๊สที่เกิดขึ้น ได้แก่ กรดไขมันระเหยได้ (volatile fatty acid, VFA) แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ($CO_2$) และแก๊สมีเทน ($CH_4$) ซึ่งจะเกิดภายหลังเกิดกระบวนการหมักภายในกระเพาะหมักของโคนม จึงได้นำหลักการนี้มาประยุกต์ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ตามวิธีของ Menke and Steingass (1988)

### 3.4.1 วิธีการทดลอง

เก็บของเหลวจากกระเพาะหมักมาผสมกับสารละลาย ที่เตรียมไว้ (ภาพ 10) ดังตาราง 6 จากนั้นใช้ปิเปตอัตโนมัติดูดสารละลาย Rumen medium buffer ดังกล่าว 30 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดแบบพิเศษคล้ายเข็มฉีดยา (syringe) ขนาดใหญ่ ความจุ 100 มิลลิลิตร ที่ปลายหลอดมีสายยางสั้น ๆ และคลิ้ปสำหรับปิดเปิดได้ ภายในหลอดมีตัวอย่างอาหารที่ต้องการทดสอบซึ่งบดผ่านตะแกรงขนาด 1 มิลลิเมตร ประมาณ 220 มิลลิกรัม นำไปบ่มในอ่างน้ำที่มีอุณหภูมิ 39 °C ซึ่งประกอบด้วยแกนหมุนเพื่อให้ตัวอย่างเคลื่อนไหวอยู่ตลอดเวลา เพื่อจำลองสภาพภายในกระเพาะหมัก (ภาพ 11) อ่านค่าแก๊สที่เกิดขึ้นที่ 2 4 6 8 12 และ 24 ชั่วโมง บันทึกปริมาณแก๊สที่เกิดขึ้นและนำไปคำนวณโดยใช้สมการ

คำนวณอัตราการสลายตัวเช่นเดียวกับวิธีการใช้ถุงไนล่อน สำหรับค่าแก๊สสุทธิที่ 24 ชั่วโมง คำนวณได้จากสมการที่เสนอโดย Menke and Steingass (1988) ดังนี้คือ

$$GP(ml/200mgDM,\ 24\ hr) = \frac{[(V_{24}-V_0-GP_0)\ x200x\ (FH+FC)/2]}{W}$$

เมื่อ GP = ปริมาณแก๊ส (มิลลิลิตร) ที่เกิดขึ้นเมื่อ incubate 24 ชั่วโมง

$V_{24}$ = ปริมาณแก๊สเมื่อ incubate ได้ 24 ชั่วโมง

$V_0$ = ปริมาตรส่วนผสมทั้งหมดที่อ่านก่อน incubate

$GP_0$ = ค่าเฉลี่ยของแก๊สที่เกิดในหลอด Blank ที่ 24 ชม.

FH = $44.43 / (GP_h-GP_0)$ ค่าปรับอาหารหยาบ

FC = $65.18 / (GP_c-GP_0)$ ค่าปรับอาหารข้น

W = น้ำหนักตัวอย่าง (มิลลิกรัมของวัตถุแห้ง)

**ตาราง 6** ส่วนประกอบของ Rumen medium buffer ที่ใช้ในการศึกษาด้วยวิธีการวัดแก๊ส

| สารเคมี | ปริมาตร (มิลลิลิตร) ต่อ 1 หลอด |
|---|---|
| น้ำกลั่น | 10.0 |
| Buffer solution | 5.0 |
| Macro mineral solution | 5.0 |
| Resazurin solution | 0.025 |
| Micro mineral solution | 0.0025 |
| Reduction solution | 1.0 |
| Rumen fluid | 10.0 |

ปริมาณแก๊สสุทธิที่อ่านได้ ณ ชั่วโมงต่าง ๆ นำไปเข้าสมการเพื่อคำนวณอัตราการเกิดแก๊สเช่นเดียวกับการทดลองโดยใช้เทคนิคถุงไนล่อน นำค่าพารามิเตอร์ที่ได้ (A, B และ c) มาแทนค่าในสมการที่เสนอโดย Shem *et al.* (1995) เพื่อประเมินค่าวัตถุแห้งกินได้ วัตถุแห้งย่อยได้ที่สัตว์ได้รับ และอัตราการเจริญเติบโตเช่นเดียวกัน Menke and Steingass (1988) ได้เสนอสมการเพื่อทำนายค่าการย่อยได้ของอินทรียวัตถุ (organic matter digestibility, OMD) พลังงานใช้ประโยชน์ (metabolizable energy, ME) และพลังงานสุทธิเพื่อการให้นม (net energy of lactation, $NE_L$) ดังนี้คือ

$$OMD\ (\%) = 9.00 + 0.9991GP + 0.0595XP + 0.0181XA$$

$$ME\ (MJ/kg) = 1.06 + 0.157GP + 0.0084XP + 0.022XL - 0.0081XA$$

$$NE_L\ (MJ/kg) = -0.36 + 0.1149GP + 0.0054XP + 0.0139XL - 0.0054XA$$

เมื่อ GP = ปริมาณแก๊ส (มิลลิลิตร) ที่เกิดเมื่อ incubated 24 ชั่วโมง

XP = ปริมาณโปรตีน (กรัมต่อกิโลกรัมวัตถุแห้ง)

XL = ปริมาณลิกนิน (กรัมต่อกิโลกรัมวัตถุแห้ง)

XA = ปริมาณเถ้า (กรัมต่อกิโลกรัมวัตถุแห้ง)

### 3.4.2 สัตว์ทดลอง

สำหรับสัตว์ทดลองที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้คือ โคนมระยะแห้งนม และไม่ให้ผลผลิต ลูกผสมพันธุ์พื้นเมือง x โฮลสไตน์ฟรีเซี่ยน เพศเมีย อายุ 4-7 ปี จำนวน 4 ตัว น้ำหนักตัว 380 ± 74 กิโลกรัม ที่ได้รับการเปิดท่อทางเดินอาหารบริเวณกระเพาะหมักโดยการเจาะกระเพาะฝัง Rumen fistula บริเวณสวาปด้ายซ้ายของตัวโค (ทัศนีย์ และเทอดชัย, 2530) โคทุกตัวได้อยู่ในคอกผูกยืนโรงที่มีรางน้ำและอาหารแยกเฉพาะตัว ได้รับอาหารวันละ 2 ครั้ง คือ 6.00 น. และ 18.00 น. มีน้ำให้กินตลอดเวลา

### 3.4.3 การวิเคราะห์สถิติ

การประเมินค่าพลังงานและการย่อยได้โดยวิธีวัดปริมาณแก๊สของกากข้าวมอลต์แห้งและอาหารทดลองใช้วิธีวิเคราะห์วาเรียนซ์ (analysis of variance, ANOVA) ตามแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (completely Randomized Design, CRD) และเปรียบเทียบความแตกต่างด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range test (Steel and Torrie, 1984) โดยโปรแกรมสำเร็จรูป SAS (มนต์ชัย, 2537)

**ภาพ** 10 อุปกรณ์สำหรับฉีดสารละลาย Rumen medium buffer เข้าหลอดวัดปริมาณแก๊ส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

**ภาพ 11** หลอดวัดปริมาณแก๊สขณะทำงานในอ่างน้ำปรับอุณหภูมิ

### 3.5 การศึกษาการย่อยได้ในตัวสัตว์ (*In vivo* digestibility)

การหาค่าการย่อยได้ของโภชนะของโคนมที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือ วิธีการหาค่าการย่อยได้แบบดั้งเดิม (conventional method) และการหาค่าการย่อยได้โดยตัวสัตว์ภายในลำไส้เล็กด้วยวิธีการใช้สารบ่งชี้ (indicator method) ดังมีวิธีการดังนี้

#### 3.5.1 การหาค่าการย่อยได้วิธีดั้งเดิม (Conventional method)

ให้โคทดลองได้รับอาหารที่ผสมกากข้าวมอลต์แห้งทั้ง 4 ระดับร่วมกับอาหารหยาบ คือหญ้ารูซี่ อัตราส่วนอาหารข้นต่ออาหารหยาบ (concentrates : roughages ratio) เท่ากับ 45 : 55 เมื่อคิดเป็นร้อยละของวัตถุแห้ง ในแต่ละคาบของการทดลอง (period) ใช้เวลาทั้งหมด 25 วัน โดย 21 วันแรกเพื่อให้โคทดลองและจุลินทรีย์ภายในกระเพาะหมักได้ปรับตัวให้เข้ากับอาหารทดลองที่ได้รับ (preliminary period) และ 4 วันสุดท้ายสำหรับเก็บข้อมูล (collection period) บันทึกปริมาณอาหารที่กินและมูลที่ขับออกมา สุ่มเก็บตัวอย่างอาหารและมูล (5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักสด) เพื่อเก็บไว้วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี นำค่าที่ได้จากการวิเคราะห์มาคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์การย่อยได้ปรากฏจากสมการ (บุญล้อม, 2540)

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

ประเมินค่าโภชนะย่อยได้รวม (Total Digestible Nutrient, TDN) จากสมการ

$$TDN = DCP + DNDF + DNFC + 2.25xDEE$$

เมื่อ DCP = ไนโตรเจนฟรีเอ็กซ์แทรกที่ย่อยได้
DNDF = เยื่อใยที่ละลายในด่างที่ย่อยได้
DNFC = คาร์โบไฮเดรตที่ไม่ใช่เยื่อใยที่ย่อยได้
DEE = ไขมันที่ย่อยได้

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

$$GE(MJ/kg) = 0.242CP + 0.0366EE + 0.0209CF + 0.0170NFE$$
$$ME(MJ/kg) = 0.0152DCP + 0.0342DEE + 0.0128DCF + 0.0159DNFE$$
$$NE_L(MJ/kg) = 0.4632 + 0.0024q \times ME$$

เมื่อ DNFE = ไนโตรเจนฟรีเอ็กซ์แทรกที่ย่อยได้
q = (ME/GE) x 100

### 3.5.2 การหาค่าการย่อยได้วิธีการใช้สารบ่งชี้ (Indicator method)

ในการศึกษาการย่อยได้จริงภายในลำไส้เล็กของโคนม ไม่สามารถวัดปริมาณอาหารที่เดินทางผ่านทางเดินอาหารบริเวณดังกล่าวได้อย่างชัดเจน ดังนั้นการใช้สารบ่งชี้ (marker) เพื่อเป็นค่าดัชนีวัดปริมาณอาหารที่เดินทางผ่านลำไส้เล็กน่าจะเป็นวิธีการที่เหมาะสม

#### 3.5.2.1 วิธีการทดลอง

การวัดค่าการย่อยได้ด้วยวิธีการใช้สารบ่งชี้จะดำเนินการต่อเนื่องภายหลังเสร็จกระบวนการเก็บตัวอย่างเพื่อหาค่าย่อยได้ปรากฏ โดยการเก็บตัวอย่างจากลำไส้เล็กส่วนต้นและส่วนปลายที่ได้สอดท่อรูปตัวที (T-shaped cannula) เก็บตัวอย่างเป็นระยะเวลา 4 วัน เพื่อให้ได้ตัวแทนของตัวอย่างทั้ง 24 ชั่วโมงโดยมีตารางเวลาเก็บตัวอย่างดังที่ได้แสดงไว้ในตาราง 7

**ตาราง 7** ช่วงเวลาเก็บตัวอย่างจากลำไส้เล็กของการทดลองหาค่าการย่อยได้โดยวิธีใช้สารบ่งชี้

| วัน | ช่วงเวลา (น.) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 06.00 | 10.00 | 14.00 | 18.00 | 22.00 | 02.00 |
| 2 | 07.00 | 11.00 | 15.00 | 19.00 | 23.00 | 03.00 |
| 3 | 08.00 | 12.00 | 16.00 | 20.00 | 24.00 | 04.00 |
| 4 | 09.00 | 13.00 | 17.00 | 21.00 | 01.00 | 05.00 |

ตัวอย่างที่เก็บในแต่ละครั้งให้ได้ปริมาณ 200 - 250 มิลลิลิตร หรือใช้เวลาในการเก็บประมาณ 45 นาทีต่อครั้ง และนำตัวอย่างมารวมกัน เก็บไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ –20 °C (freezer) เพื่อรอการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและหาค่าความเข้มข้นของสารบ่งชี้ในตัวอย่างต่อไป นำค่าที่ได้จากการวิเคราะห์มาเข้าสมการเพื่อหาค่าการย่อยได้ (เทอดชัย, 2540) ดังนี้

$$\text{สัมประสิทธิ์การย่อยได้ (\%)} = 100\text{-}100\frac{\text{\% สารบ่งชี้ใน duodenum}}{\text{\% สารบ่งชี้ใน ileum}} \times \frac{\text{\% โภชนะใน ileum}}{\text{\% โภชนะใน duodenum}}$$

### 3.5.3 การศึกษาสภาพภายในกระเพาะหมัก

เก็บตัวอย่างของเหลวภายในกระเพาะหมัก (Rumen fluid) ที่เวลา 05.00 07.00 08.00 09.00 และ 11.00 น. นำไปปั่นเหวี่ยงใส (centrifuge) ที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที จากนั้นใช้ปิเปตขนาด 1 มิลลิลิตรดูดเอาเฉพาะส่วนน้ำใสๆข้างบน (supernatant) เพื่อวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจนที่เกิดขึ้นในกระเพาะหมักตามวิธี conway method (Voigt und Steger, 1967) (ภาพ 12) วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ภายในกระเพาะหมักด้วย pH meter และวัดปริมาณกรดไขมันระเหยได้ (volatile fatty acid, VFA) ที่เกิดขึ้นภายในกระเพาะหมักโดยใช้เครื่องมือ gas chromatography

### 3.5.4 สัตว์ทดลอง

สำหรับสัตว์ทดลองที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้คือ โคนมระยะแห้งนม และไม่ให้ผลผลิต ลูกผสมพันธุ์พื้นเมือง x โฮลสไตน์ฟรีเซี่ยน เพศเมีย อายุ 4-7 ปี จำนวน 4 ตัว น้ำหนักตัว 380 ± 74 กิโลกรัม ที่ได้รับการเปิดท่อทางเดินอาหารบริเวณกระเพาะหมักโดยการเจาะกระเพาะฝัง Rumen fistula บริเวณสวาบด้ายซ้ายของตัวโค (ทัศนีย์ และเทอดชัย, 2530) และเปิดทางเดินอาหารบริเวณลำไส้เล็กส่วนต้นและส่วนปลาย (ทัศนีย์ และเทอดชัย, 2532) โคทุกตัวได้อยู่ในคอกผูกยืนโรงที่มีรางน้ำและอาหารแยกเฉพาะตัว ได้รับอาหารวันละ 2 ครั้ง คือ 6.00 น. และ 18.00 น. มีน้ำให้กินตลอดเวลา

### 3.5.5 การวิเคราะห์สถิติ

การศึกษาการย่อยได้ในตัวสัตว์ของกากข้าวมอลต์แห้งและอาหารทดลองใช้วิธีวิเคราะห์วาเรียนซ์ (analysis of variance, ANOVA) ตามแผนการทดลองแบบจัตุรัสละติน (latin Square Design, LSD) และเปรียบเทียบความแตกต่างด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range test (Steel and Torrie, 1984) โดยการใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SAS (มนต์ชัย, 2537)

**ภาพ 12** การวัดปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจนด้วยวิธีการ conway method.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

## 3.6 สถานที่ทำการทดลอง

1. ฟาร์มทดลองหมวดโคนม สถานีวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรแม่เหียะ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
2. ห้องปฏิบัติการอาหารสัตว์ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
3. ห้องปฏิบัติการกลาง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

## 3.7 ระยะเวลาในการทดลอง

ใช้เวลาในการทดลอง 12 เดือน ตั้งแต่เดือนพฤษภาคม 2544 - เมษายน 2545

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University