



| คู่มือ

การประเมินค่าการย่อยได้
และค่าพลังงานใช้ประโยชน์ได้
ในสัตว์เคี้ยวเอื้อง



วรรณา อ่างทอง
สำนักพัฒนาอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์
กระทรวงเกษตรและสหกรณ์



คู่มือ
การประเมินค่าการย่อยได้และ
ค่าพลังงานใช้ประโยชน์ได้ในสัตว์เคี้ยวเอื้อง

วรรณ อ่างทอง
สำนักพัฒนาอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์
กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

เลขทะเบียนผลงานวิชาการ 67(2)-0214-031
ISBN 978-616-608-961-5

คู่มือการประเมินค่าการย่อยได้และค่าพลังงานใช้ประโยชน์ได้ในสัตว์เคี้ยวเอื้อง

เลขทะเบียนผลงานวิชาการ 67(2)-0214-031

ISBN 978-616-608-961-5

จัดทำโดย นางสาววรรณ อ่างทอง

สำนักพัฒนาอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

91 หมู่ 4 ถนนติวานนท์ ตำบลบางกะดี อำเภอเมือง จังหวัดปทุมธานี 12000

โทรศัพท์ 0-2501-1148

ปีที่พิมพ์ 2567

พิมพ์ครั้งที่ 1

จำนวน 30 เล่ม

พิมพ์ที่ โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด

145, 147 ถนนเลี้ยวเมืองนนทบุรี ตำบลตลาดขวัญ อำเภอเมืองนนทบุรี

จังหวัดนนทบุรี 11000

โทรศัพท์ 0-2525-4809

คำนำ

การประกอบสูตรอาหารสัตว์ให้มีส่วนประกอบทางเคมี (Chemical composition) และคุณค่าทางโภชนา (Nutritive value) ที่ครบถ้วนจะส่งผลให้สูตรอาหารสัตว์นั้นมีความแม่นยำและตรงต่อความต้องการของสัตว์ ส่งผลให้สัตว์มีการเจริญเติบโต ให้ผลผลิตได้อย่างมีประสิทธิภาพและสามารถควบคุมต้นทุนค่าอาหารได้ ซึ่งส่วนประกอบทางเคมีในอาหารสัตว์สามารถวิเคราะห์ได้ในห้องปฏิบัติการ แต่คุณค่าทางโภชนาที่นั้นไม่สามารถวิเคราะห์ทางเคมีได้ แต่จะต้องใช้วิธีการประเมินเพื่อให้ทราบถึงค่าการย่อยได้และค่าพลังงานใช้ประโยชน์ได้ด้วยวิธีการวัดโดยตรงจากตัวสัตว์ หรือวิธีทางห้องปฏิบัติการ ซึ่งที่ผ่านมายังไม่เคยมีการจัดทำเป็นเอกสารสำหรับใช้เป็นคู่มือในการปฏิบัติงานมาก่อน ดังนั้นจึงได้จัดทำคู่มือการประเมินค่าการย่อยได้และค่าพลังงานใช้ประโยชน์ได้ในสัตว์เคี้ยวเอื้อง นับเป็นฉบับแรกของกรมปศุสัตว์ คู่มือฉบับนี้ ประกอบด้วย การประเมินค่าโภชนาที่ย่อยได้ของอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้องโดยวิธีการเก็บรวบรวมทั้งหมด การประเมินค่าพลังงานใช้ประโยชน์ได้ของอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้องโดยเครื่อง Ventilated hood-type respiration calorimeters การประเมินค่าการย่อยสลายของอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้องโดยวิธีใช้ถุงไนลอน การประเมินค่าโภชนาที่ย่อยได้ของอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้องโดยเครื่อง Daisy[®] และการประเมินคุณค่าทางโภชนาของอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้องโดยการวัดผลผลิตก๊าซในห้องปฏิบัติการ ซึ่งเนื้อหาทั้งหมดได้จากการรวบรวมข้อมูลเอกสารทางวิชาการต่างๆ และประสบการณ์โดยตรงที่ได้จากการเป็นผู้ปฏิบัติงานในการประเมิน รวมทั้งจากการศึกษาวิจัยทางด้านนี้มาไม่น้อยกว่า 25 ปี ด้วยหวังว่า นักวิทยาศาสตร์ นักวิชาการ นักวิจัยด้านอาหารสัตว์ นักศึกษา ตลอดจนผู้ที่สนใจงานด้านโภชนาศาสตร์สัตว์เคี้ยวเอื้องได้ใช้เป็นคู่มือในการปฏิบัติงานด้านการประเมินค่าการย่อยได้และค่าพลังงานใช้ประโยชน์ได้ในสัตว์เคี้ยวเอื้อง อันก่อให้เกิดประโยชน์ต่อการผลิตปศุสัตว์ต่อไป คุณประโยชน์ใดๆ ที่ได้จากคู่มือฉบับนี้ขอมอบให้แก่บิดา-มารดา ครูบา อาจารย์ พี่ๆ น้องๆ เพื่อนร่วมงานทุกท่านที่ได้แลกเปลี่ยนเรียนรู้และให้คำปรึกษาด้วยดีเสมอมาและขออุทิศส่วนกุศลบุญให้แก่สรรพสัตว์ทดลองทุกชีวิต แต่หากมีข้อบกพร่องประการใดจากคู่มือฉบับนี้ ข้าพเจ้ายินดีขอน้อมรับไว้แก้ไขในโอกาสต่อไป

วรรณ อ่างทอง

มกราคม 2567

สารบัญ

	หน้า
คำนำ	ก
สารบัญ	ข
สารบัญตาราง	ค
สารบัญภาพ	ง
ตัวย่อและสัญลักษณ์	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 การประเมินค่าโภชนะที่ย่อยของอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้องโดยวิธีการเก็บรวบรวมทั้งหมด	4
บทที่ 3 การประเมินค่าพลังงานใช้ประโยชน์ได้ของอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้องโดยเครื่อง Ventilated hood-type respiration calorimeters	21
บทที่ 4 การประเมินค่าการย่อยสลายของอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้องโดยวิธีการใช้ถุงไนล่อน	34
บทที่ 5 การประเมินค่าโภชนะที่ย่อยได้ของอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้องโดยเครื่อง Daisy ^{II}	44
บทที่ 6 การประเมินคุณค่าทางโภชนะของอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้องโดยการวัดผลผลิตก๊าซในห้องปฏิบัติการ	54
บรรณานุกรม	65

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 2.1 ส่วนประกอบทางเคมีของเปลือกฝักข้าวโพดหวานหมัก และมูล	16
ตารางที่ 2.2 ปริมาณโภชนะที่กิน ที่ขับถ่าย และปริมาณโภชนะที่ย่อยได้ (%)	16
ตารางที่ 2.3 ส่วนประกอบทางเคมีของกากถั่วเหลืองไขมันเต็ม หย้าแพงโกลาแห้ง และมูล	18
ตารางที่ 2.4 ปริมาณโภชนะในอาหารและมูล (กรัม) และการย่อยได้ของอาหาร (เปอร์เซ็นต์)	18
ตารางที่ 2.5 ค่าโภชนะที่ย่อยได้ของอาหารที่กิน สมการทำนายค่าการย่อยได้ของกากถั่วเหลือง (x) และหย้าแพงโกลา (y)	20
ตารางที่ 3.1 ปริมาตรก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ปล่อยจากถังที่วัดได้จากระบบ และค่า Recovery	31
ตารางที่ 4.1 ส่วนประกอบทางเคมีของพืชอาหารสัตว์	40
ตารางที่ 4.2 ข้อมูลพืชอาหารสัตว์ก่อนและหลังการย่อยสลายที่ 48 ชั่วโมง	40
ตารางที่ 4.3 ค่าวัตถุแห้งที่ไม่ถูกย่อยสลาย และที่ถูกย่อยสลายของหย้าแพงโกลาที่ชั่วโมงต่างๆ	42
ตารางที่ 5.1 ข้อมูลหย้าแพงโกลา ก่อนและหลังการย่อยที่ 48 ชั่วโมง และค่าโภชนะที่ย่อยได้	52
ตารางที่ 6.1 ส่วนประกอบทางเคมีของหย้าแพงโกลา และเมล็ดข้าวโพดบด	61
ตารางที่ 6.2 ปริมาตรก๊าซที่ชั่วโมงที่ 0 8 และ 24 และผลผลิตก๊าซสุทธิที่ 24 ชั่วโมงของ Blank หย้าแพงโกลา และเมล็ดข้าวโพดบด	62

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1.1 ส่วนประกอบทางเคมีของอาหารสัตว์	1
ภาพที่ 2.1 ขั้นตอนการประเมินค่าโภชนะที่ย่อยได้โดยวิธี Total collection	5
ภาพที่ 2.2 อุปกรณ์สำหรับเก็บมูล และปัสสาวะ	9
ภาพที่ 2.3 อุปกรณ์สำหรับแยกเก็บปัสสาวะของโคเพศเมีย	9
ภาพที่ 3.1 ขั้นตอนการวัดค่าพลังงานในแต่ละลำดับขั้น	22
ภาพที่ 3.2 ส่วนประกอบของ Ventilated hood-type respiration calorimeters	23
ภาพที่ 3.3 ส่วนของ Hood ที่อยู่ด้านหน้ากรง	24
ภาพที่ 3.4 การยึดส่วนของหัวสัตว์กับ Hood	24
ภาพที่ 3.5 ขั้นตอนการประเมินค่าพลังงานใช้ประโยชน์ได้ของอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้องโดย เครื่อง Ventilated hood-type respiration calorimeters	26
ภาพที่ 3.6 คอกสัตว์ พร้อมตู้ และ Hood สำหรับวัดค่าการหายใจของสัตว์	27
ภาพที่ 3.7 เครื่องวัดก๊าซ Oxygen analyzer Carbon dioxide analyzer Methane analyzer และชุดควบคุมการไหลของอากาศ	27
ภาพที่ 3.8 การทำ Recovery check โดยใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์	30
ภาพที่ 4.1 ขั้นตอนการประเมินค่าการย่อยสลายของอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้องโดยวิธีใช้ วิธีการใช้ถุงไนล่อน	36
ภาพที่ 4.2 ข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Neway	43
ภาพที่ 5.1 เครื่อง Daisy ^{II}	45
ภาพที่ 5.2 ขั้นตอนการประเมินค่าโภชนะที่ย่อยได้ของอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้องโดย เครื่อง Daisy ^{II}	46
ภาพที่ 5.3 การเก็บของเหลวจากกระเพาะรูเมนผ่านท่อที่ผ่าตัดฝังไว้บริเวณกระเพาะรูเมน	49
ภาพที่ 5.4 การเก็บของเหลวจากกระเพาะรูเมนโดยวิธีการสอดท่อผ่านทางปาก	49

สารบัญภาพ (ต่อ)

	หน้า
ภาพที่ 6.1 ขั้นตอนการประเมินคุณค่าทางโภชนาของอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้องโดยการ วัดผลผลิตก๊าซในห้องปฏิบัติการ	55
ภาพที่ 6.2 การทาวาสลินรอบแกนต้น	60
ภาพที่ 6.3 ชั่งตัวอย่างใส่ในกระบอกสวม	60
ภาพที่ 6.4 การเติมสารละลาย Medium เข้าสู่หลอดทดลอง	60
ภาพที่ 6.5 เขย่าให้ตัวอย่างผสมกับสารละลาย และไล่อากาศในหลอดทดลอง	60

ตัวย่อและสัญลักษณ์

อักษรย่อ	คำเต็ม
ADF	Acid detergent fiber
ADFD	Acid detergent fiber digestibility
ADL	Acid detergent lignin
cal	Calorie
CF	Crude fiber
CP	Crude protein
CPD	Crude protein digestibility
DE	Digestible energy
DM	Dry matter
DMD	Dry matter degradability (ประเมินด้วย <i>In situ</i> method)
DMD	Dry matter digestibility
dNDF	Digestible neutral detergent fiber
EE	Ether extract
EED	Ether extract digestibility
GE	Gross energy
GEI	Gross energy intake
HPLC	High performance liquid chromatography
ICP	Inductively coupled plasma
iNDF	Indigestible neutral detergent fiber
IVTDMD	<i>In vitro</i> true dry matter digestibility
J	Joule
kcal	Kilocalories
kg	Kilogram
kgDM	Kilogram of dry matter

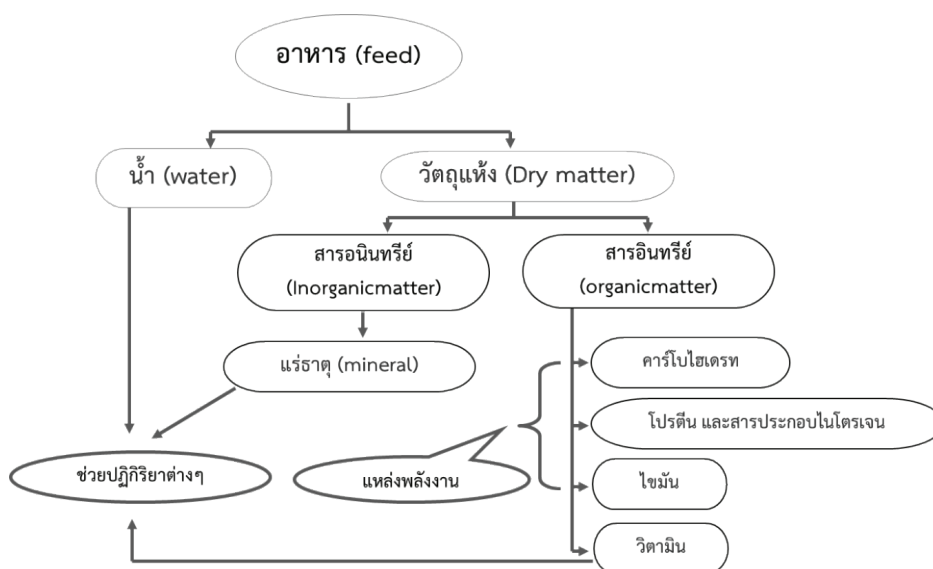
ตัวย่อและสัญลักษณ์ (ต่อ)

ตัวย่อ	คำเต็ม
Mcal	Megacalories
ME	Metabolisable energy หรือ Metabolizable energy
N	Nitrogen
NDF	Neutral detergent fiber
NDFD	Neutral detergent fiber degradability (ประเมินด้วย <i>In situ</i> method)
NDFD	Neutral detergent fiber digestibility
NDS	Neutral detergent solution
NE	Net energy
NE _l	Net energy lactation
NFC	Non-fiber carbohydrate
NFCD	Non-fiber carbohydrate digestibility
NFE	Nitrogen-free extract
OM	Organic matter
OMD	Organic matter digestibility
RDP	Rumen degradable protein
STP	Standard temperature and pressure
TDN	Total digestible nutrients

บทที่ 1

บทนำ

โภชนะ (Nutrient) ในอาหารสัตว์ (Feed) ประกอบด้วย 6 หมวดหมู่ ได้แก่ น้ำ โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต แร่ธาตุ และวิตามิน โดยโปรตีน ไขมัน และคาร์โบไฮเดรต เป็นสารอาหารที่ให้พลังงาน ดังในภาพที่ 1.1



ภาพที่ 1.1 ส่วนประกอบทางเคมีของอาหารสัตว์ (ดัดแปลงจาก บุญล้อม, 2546)

โดยอาหารสัตว์ สามารถวิเคราะห์หาส่วนประกอบทางเคมี (Chemical composition) เพื่อจำแนกตามหมวดหมู่ของโภชนะได้ในห้องปฏิบัติการ ด้วยวิธีการตามมาตรฐานสากล ได้แก่ การวิเคราะห์แบบประมาณ (Proximate analysis หรือ Weende method) เป็นการวิเคราะห์หา

- ปริมาณของน้ำ หรือความชื้น (Moisture)
- ไนโตรเจน (Nitrogen, N) สำหรับคำนวณเป็นค่าโปรตีนหยาบ (Crude protein, CP) ด้วยการนำค่า N คูณด้วยค่าแฟกเตอร์ 6.25
- ไขมัน (Ether extract, EE)
- เถ้า (Ash)

- เยื่อใยหยาบ (Crude fiber, CF) ซึ่งปัจจุบันในอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้องไม่นิยมนำค่า CF มาใช้เนื่องจากมีบางส่วนของเฮมิเซลลูโลสและลิกนินที่ละลายหายไปจากกระบวนการวิเคราะห์

- ค่าคาร์โบไฮเดรตที่ไม่มีไนโตรเจน (Nitrogen free extract, NFE) ที่คำนวณได้จาก
$$100 - (CP + EE + Ash + CF)$$

การวิเคราะห์โครงสร้างของเยื่อใยชนิดต่างๆ (Detergent fiber analysis) สำหรับวิเคราะห์ตัวอย่างพืชอาหารสัตว์หรือวัตถุดิบอาหารที่มาจากพืช ได้แก่

- การวิเคราะห์ผนังเซลล์ (Neutral detergent fiber, NDF)
- ลิกโนเซลลูโลส (Acid detergent fiber, ADF)
- เฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose)
- เซลลูโลส (Cellulose)
- ลิกนิน (Lignin หรือ Acid detergent lignin, ADL) และ
- คาร์โบไฮเดรตที่ไม่ใช่เยื่อใย (Non fiber carbohydrate, NFC) ที่คำนวณได้จาก

$$100 - (CP + EE + Ash + NDF)$$

วิธีวิเคราะห์นี้จะทำให้ส่วนของเพกติน (Pectin) ละลายหายไป แต่จุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมนสามารถย่อยสลายได้

การวิเคราะห์หาปริมาณแร่ธาตุสามารถวิเคราะห์ได้ด้วยวิธีการของเครื่อง ICP (Inductively coupled plasma)

การวิเคราะห์หาปริมาณวิตามิน ด้วยวิธีการของเครื่องมือต่างๆ เช่น เครื่อง HPLC (High performance liquid chromatography) หรือ เครื่อง UV-Vis spectrophotometer เป็นต้น

ส่วนคุณค่าทางโภชนาของอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้องจะใช้วิธีการประเมินค่าการย่อยได้ของโภชนาและค่าพลังงานต่างๆ ด้วยวิธีวัดโดยตรงจากตัวสัตว์ (*In vivo*) วิธีการใช้ถุงไนลอน หรือวิธีทางห้องปฏิบัติการ (*In vitro*) ปัจจุบันได้มีการนำค่าโภชนาที่ย่อยได้ต่างๆ เช่น ค่าวัตถุแห้งที่ย่อยได้ (Dry matter digestibility, DMD) ค่าอินทรีย์วัตถุที่ย่อยได้ (Organic matter digestibility, OMD) ค่าการย่อยสลายของโปรตีนในกระเพาะรูเมน (Rumen degradable protein, RDP) ค่าการย่อยได้ของผนังเซลล์ (Neutral detergent fiber digestibility, NDFD) ค่าโภชนาที่ย่อยได้ทั้งหมด (Total digestible nutrients, TDN) ค่าพลังงานย่อยได้ (Digestible energy, DE) ค่าพลังงานใช้ประโยชน์ได้ (Metabolisable energy, ME) และค่าพลังงานสุทธิ (Net energy, NE) มาใช้ในการคำนวณสูตรอาหารสัตว์ (NRC, 2001; Hoffman and Combs, 2004)

การประเมินค่าการย่อยได้ของโภชนะด้วยวิธี *In vivo* เช่น การประเมินโดยวิธีเก็บรวบรวมทั้งหมด (Total collection method) และการประเมินค่าพลังงานใช้ประโยชน์ได้โดยตรงจากตัวสัตว์ ทำให้ได้ค่า DMD OMD โปรตีนที่ย่อยได้ (Crude protein digestibility, CPD), ไขมันที่ย่อยได้ (Ether extract digestibility, EED), NDFD, ลิกโนเซลลูโลสที่ย่อยได้ (Acid detergent fiber digestibility, ADFD) คาร์โบไฮเดรตที่ไม่ใช่เยื่อใยที่ย่อยได้ (Non-fiber carbohydrate digestibility, NCFD), DE และ ME การประเมินด้วยวิธี *In vivo* เป็นการประเมินค่าการย่อยได้ของอาหารที่ผ่านการกิน การย่อยภายในระบบทางเดินอาหารของตัวสัตว์โดยตรง สามารถวัดพลังงานที่สูญเสียจากกระบวนการเมตาบอลิซึมที่อยู่ในรูปของก๊าซมีเทน และไนโตรเจนในปัสสาวะ ดังนั้น ค่าที่ได้จึงมีความแม่นยำและถูกต้องมากที่สุด แต่ข้อด้อยคือ ใช้เวลานาน สิ้นเปลืองแรงงาน ใช้ตัวอย่างในปริมาณมาก มีเครื่องมือและอุปกรณ์ที่มีความจำเพาะและมีค่าใช้จ่ายสูง

ดังนั้น จึงอาจเลือกใช้การประเมินด้วยวิธีที่มีค่าใช้จ่ายที่ประหยัดกว่า ใช้เวลาน้อย และใช้ตัวอย่างปริมาณน้อย เช่น การประเมินค่าการย่อยสลายโดยวิธีใช้ถุงไนลอน (*In situ* หรือ *In sacco* หรือ Nylon bag) จัดเป็นวิธี *Semi in vivo* เนื่องจากการวัดค่าการย่อยสลายของโภชนะภายในกระเพาะรูเมน (Rumen) ของสัตว์โดยตรง วิธีการนี้ทำให้ได้ค่า DMD OMD RDP และ NDFD และสามารถใช้ศึกษาอัตราการย่อยสลายของโภชนะที่แต่ละชั่วโมง (Nutrients degradation of time)

การประเมินค่าโภชนะที่ย่อยได้ด้วยวิธี *In vitro* เป็นวิธีที่สามารถกระทำได้ครั้งละหลายตัวอย่าง สามารถควบคุมปัจจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้องได้ง่าย ในคู่มือฉบับนี้ได้กล่าวไว้เพียง 2 วิธี คือ การประเมินค่าโภชนะที่ย่อยได้โดยเครื่อง Daisy^{II} ทำให้ได้ค่าการย่อยได้ที่แท้จริงของวัตถุแห้ง (*In vitro* true dry matter digestibility, IVTDMD) และสามารถประเมินค่า NDFD และ ADFD ได้ และการประเมินคุณค่าทางโภชนะโดยการวัดปริมาณการผลิตก๊าซ ทำให้ได้ค่า OMD ME และค่าพลังงานสุทธิเพื่อการให้น้ำนม (Net energy lactation, NE_L)

วิธีการต่างๆ ที่ได้กล่าวมานั้นจะมีเทคนิครายละเอียดในกระบวนการปฏิบัติงานที่อาจมีการปรับตามความเหมาะสมของกาลเวลา สถานที่ หรือประยุกต์ตามอุปกรณ์เครื่องมือที่ใช้กัน แต่ยังคงหลักการเดิมเพื่อให้ได้ข้อมูลที่ถูกต้องตามวัตถุประสงค์ของแต่ละวิธีการ

บทที่ 2

การประเมินค่าโภชนะที่ย่อยของอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้องโดยวิธีการเก็บรวบรวมทั้งหมด

วิธีการเก็บรวบรวมทั้งหมด (Total collection method) หรือ เรียกว่าวิธีดั้งเดิม (Conventional method) เป็นการประเมินค่าโภชนะที่ย่อยได้โดยตรงจากตัวสัตว์ (*In vivo*) ที่ถือว่ามีความถูกต้องและแม่นยำมากที่สุด มีการศึกษาและทำการทดลองครั้งแรกในปี ค.ศ. 1860 โดย Henneberg and Stohmann ที่สถานีทดลอง Weende มหาวิทยาลัย Göttingen ประเทศเยอรมนี (Schneider and Flatt, 1975) จากการสืบค้นเอกสารที่มีการเผยแพร่ในปัจจุบันแม้จะมีการปรับปรุงแก้ไขหลายครั้งโดยนักวิจัยจากหน่วยงานต่างๆ ก็ยังคงใช้ตามวิธีการของ Schneider and Flatt (1975) แต่อาจมีการศึกษาเพิ่มเติมในบางขั้นตอน เพื่อให้เหมาะสมกับสถานการณ์และอุปกรณ์ให้ทำงานได้สะดวกมากยิ่งขึ้น

หลักการ

หลักการของวิธี Total collection คือ การเก็บรวบรวมปริมาณอาหารที่สัตว์กิน และปริมาณมูลที่ขับออกมาทั้งหมด เนื่องจากส่วนของโภชนะที่สัตว์ย่อยไม่ได้จะถูกขับออกมากับมูล ดังนั้น เมื่อนำโภชนะในอาหารที่สัตว์กินหักลบกับค่าโภชนะที่เหลืออยู่ในมูล ส่วนของโภชนะที่หายไปคือส่วนที่สัตว์สามารถย่อยและดูดซึมไปใช้ ถ้าไม่ได้นำค่าโภชนะที่เป็นส่วนของน้ำย่อย เอนไซม์รวมทั้งเซลล์ที่หลุดลอกจากทางเดินอาหารของตัวสัตว์เอง (Endogenous fecal substance หรือ Metabolic fecal substance) มาหักลบด้วย ค่าที่ได้เรียกว่าค่าสัมประสิทธิ์การย่อยได้แบบปรากฏ (Apparent digestibility coefficient) ไม่ใช่ค่าสัมประสิทธิ์การย่อยได้ที่แท้จริง (True digestibility coefficient) ซึ่งการจำแนกค่าโภชนะที่หลุดลอกจากทางเดินอาหารของตัวสัตว์ออกจากส่วนของอาหารที่ไม่ได้ถูกย่อยนั้นกระทำได้ยาก และอาหารที่กินแต่ละชนิดมีค่าการหลุดลอกที่ไม่คงที่ หากต้องการค่าการย่อยได้ที่แท้จริง จำเป็นต้องให้สัตว์อดอาหารเพื่อไม่ให้มีเศษอาหารเหลือในทางเดินอาหารเลยแล้วเก็บส่วนของมูลที่สัตว์ขับถ่ายออกมา แต่การอดอาหารอาจเป็นการทรมานสัตว์ซึ่งเสี่ยงต่อจริยธรรมการปฏิบัติต่อสัตว์ ดังนั้นค่าการย่อยได้แบบปรากฏ (Apparent digestibility) หรือค่าการย่อยได้ (Digestibility) เป็นที่ยอมรับและนิยมใช้กันทั่วไป (บุญล้อม, 2541) ค่าโภชนะที่ย่อยได้จากวิธีการนี้ ได้แก่ DMD OMD CPD ไขมันที่ย่อยได้ (Ether extract digestibility, EED) NDFD ลิกโนเซลลูโลสที่ย่อยได้ (Acid detergent fiber digestibility, ADFD) TDN และ DE แต่วิธีการนี้ไม่เหมาะสมต่อการหาปริมาณการดูดซึมของ

แร่ธาตุเนื่องจากมีปริมาณแร่ธาตุ ได้แก่ แคลเซียม ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม และเหล็ก ที่สะสมในร่างกายจะมีการขับออกมากับมูลด้วย

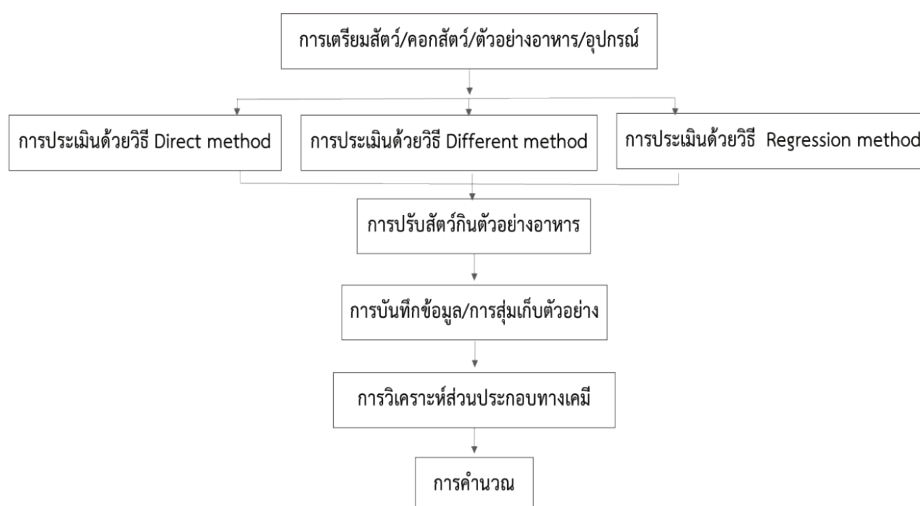
ข้อดี และข้อด้อย

ข้อดีของวิธีการนี้ ค่าโภชนะที่ย่อยได้เป็นค่าที่มีความถูกต้องและแม่นยำ เนื่องจากอาหารที่สัตว์กินนั้นผ่านกระบวนการย่อยสลายของจุลินทรีย์ เอนไซม์และน้ำย่อยภายในระบบทางเดินอาหารจากตัวสัตว์โดยตรง

ข้อด้อยของวิธีการนี้ มีค่าใช้จ่ายสูง สิ้นเปลืองแรงงาน ใช้เวลานาน ใช้ตัวอย่างปริมาณมากและได้ข้อมูลจำนวนน้อยในแต่ละรอบของการทดลอง

ขั้นตอนการดำเนินงาน

การประเมินค่าโภชนะที่ย่อยของอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้องโดยวิธี Total collection มีขั้นตอนการดำเนินงาน ดังในภาพที่ 2.1



ภาพที่ 2.1 ขั้นตอนการประเมินค่าโภชนะที่ย่อยได้ของอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้องโดยวิธี

Total collection

1. การเตรียมสัตว์ คอกสัตว์ ตัวอย่างอาหาร และอุปกรณ์

มีรายละเอียดของการเตรียม ดังนี้

1.1 การเตรียมสัตว์

สัตว์ควรมีอายุ ขนาดร่างกาย เพศ และสายพันธุ์เดียวกันเพื่อลดปัจจัยที่อาจส่งผลกระทบต่อค่าโภชนะที่ย่อยได้ ควรเป็นสัตว์ที่เชื่องไม่ตกใจหรือเครียดง่าย มีสุขภาพที่แข็งแรง และหาก

เป็นสัตว์ที่เคยเลี้ยงแบบปล่อยหะเล็มในทุ่งหญ้าต้องมีการถ่ายพยาธิก่อนนำสัตว์เหล่านั้นมาใช้ สัตว์ทุกตัวมีการบันทึกน้ำหนักก่อนและหลังการใช้งานทุกครั้ง หรืออาจมีการชั่งน้ำหนักในระหว่างช่วงปรับอาหารเมื่ออาหารนั้นแตกต่างไปจากที่สัตว์เคยกิน เพื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักตัวและปรับปริมาณการกินอาหารให้มีปริมาณคงที่

จำนวนสัตว์ที่ใช้ต้องมีไม่น้อยกว่า 3 ตัว (Schneider and Flatt, 1975) แต่ในงานศึกษาทั่วไปมักใช้สัตว์จำนวนไม่น้อยกว่า 4 ตัว การใช้สัตว์จำนวนมากยิ่งดีเนื่องจากสัตว์แต่ละตัวอาจมีระบบการย่อยอาหารที่แตกต่างกันแต่จะมีค่าใช้จ่ายที่เพิ่มขึ้น มีคำแนะนำของ Cottyn *et al.* (1989) ถ้าทดสอบค่าการย่อยได้โดยวิธีให้กินอาหารชนิดเดียว (Direct method) ใช้สัตว์จำนวน 3 ตัว ก็เพียงพอ แต่ กรณีให้กินอาหารทดสอบร่วมกับอาหารชนิดอื่น ในสัดส่วน 50 25 หรือน้อยกว่า 25 เปอร์เซ็นต์ ควรใช้สัตว์จำนวน 4 6 หรือ 8 ตัว ตามลำดับ

เพศของสัตว์เป็นสิ่งที่จำเป็นต้องพิจารณา เพราะการศึกษาค่าการย่อยได้ด้วยวิธีเก็บรวบรวมทั้งหมด ต้องแยกเก็บมูลไม่ให้ปนเปื้อนกับปัสสาวะ ดังนั้นหากเป็นสัตว์เพศเมียจึงต้องมีอุปกรณ์สำหรับแยกเก็บปัสสาวะ (ภาพที่ 2.2) เนื่องจากช่องขับถ่ายปัสสาวะกับมูลอยู่ในตำแหน่งใกล้เคียงกันอาจมีการปนเปื้อนจุลินทรีย์ เช่น หากมีการปนเปื้อนของมูลในปัสสาวะก็มีผลให้ไนโตรเจนถูกย่อยสลายได้ หรือหากปัสสาวะปนเปื้อนในมูลก็อาจส่งผลให้มีปริมาณไนโตรเจนในมูลสูงกว่าปกติ เนื่องจากสัตว์เคี้ยวเอื้องขับถ่ายไนโตรเจนส่วนที่ใช้ประโยชน์ไม่ได้ออกมาทางปัสสาวะในรูปของยูเรีย

ข้อควรระวัง

การใช้สัตว์เคี้ยวเอื้องขนาดเล็ก เช่น แพะ แกะ มาทดลองแทนโค เพื่อลดค่าใช้จ่ายในการเตรียมปริมาณวัตถุดิบอาหารสัตว์ และสะดวกต่อการเก็บมูลเนื่องจากมีลักษณะเป็นเม็ดและแห้งนั้นต้องคำนึงถึงคุณภาพของอาหารที่ใช้ กรณีอาหารที่มีเมล็ดธัญพืชเป็นส่วนประกอบแกะจะมีค่าการย่อยได้ดีกว่าโค เนื่องจากแกะสามารถเคี้ยวส่วนของเมล็ดธัญพืชได้จึงทำให้ย่อยได้ดีกว่า และแกะจะมีค่าการย่อยได้ของโปรตีนสูงกว่าโค แต่กรณีอาหารหยาบคุณภาพต่ำโคจะย่อยได้ดีกว่าแกะ เนื่องจากโคมีขนาดของกระเพาะรูเมนที่ใหญ่กว่าจึงมีจำนวนของประชากรจุลินทรีย์มากกว่า (Schneider and Flatt, 1975; Terada *et al.*, 1987; Wood *et al.*, 1999)

อย่างไรก็ตาม Schneider and Flatt (1975) ได้รายงานไว้ว่าสัตว์ต่างสปีชีส์ (Species) กันอาจส่งผลให้ค่าการย่อยได้ของโภชนาบบางค่าแตกต่างกัน ดังนั้นอาหารของสัตว์แต่ละชนิดควร

มีการศึกษาค่าการย่อยได้ตามชนิดและสายพันธุ์ของสัตว์นั้นๆ ย่อมได้ค่าที่มีความถูกต้องและแม่นยำ

1.2 การเตรียมคอกสัตว์

คอกสัตว์ควรมีการแยกพื้นที่ออกเป็น 2 ส่วน ดังนี้

ส่วนที่ 1 เป็นพื้นที่สำหรับสัตว์ช่วงพักการทดลอง บริเวณนี้อาจเป็นคอกเดี่ยวรายตัวที่มีขนาดกว้าง x ยาว x สูง ไม่น้อยกว่า $1.2 \times 3.0 \times 1.0$ เมตร หรือเป็นคอกรวมหรือคอกย่อยสำหรับแยกปล่อยคอกละ 2 - 3 ตัว เพื่อลดการแย่งกินอาหาร หรือแยกสัตว์บางตัวที่มีพฤติกรรมก้าวร้าวออกจากกันเพื่อป้องกันอาการบาดเจ็บที่เกิดจากการต่อสู้โดยเฉพาะสัตว์เพศผู้ที่ไม่ได้ตอน โดยพื้นที่ส่วนนี้ ต้องการให้สัตว์สามารถพักผ่อนได้อย่างอิสระ มีบริเวณที่ได้รับแสงแดดและบริเวณที่มีหลังคาป้องกันน้ำฝน และมีพื้นที่สำหรับให้อาหารและน้ำ

ส่วนที่ 2 เป็นคอกสำหรับใช้ในการทดลอง (Metabolism crate or stall) เป็นบริเวณที่สัตว์จะถูกเลี้ยงแบบขังเดี่ยว มีบริเวณพื้นที่จำกัด ขนาดพื้นที่สำหรับโค จะมีขนาดกว้าง 0.8 - 1.0 เมตร ยาว 2.5 - 3.0 เมตร และมีเหล็กกั้นระหว่างคอกสูงประมาณ 0.6 - 1.0 เมตร โดยความยาวของคอกขึ้นอยู่กับขนาดของตัวสัตว์ สามารถใช้เหล็กกั้นเพื่อลดขนาดพื้นที่ที่เหมาะสมได้ คอกทดลองจะยกสูงจากพื้นประมาณ 0.3 - 0.5 เมตร เพื่ออำนวยความสะดวกและปัสสาวะด้านหน้าของคอกมีโซ่สำหรับคล้องคอ เพื่อไม่ให้สัตว์สามารถกลับตัวได้ และป้องกันไม่ให้สัตว์เดินถอยหลังมากเกินไป มีรางให้อาหารและอ่างน้ำด้านหน้า หากเป็นสัตว์ที่ยังไม่คุ้นเคยกับงานทดลองมาก่อน ควรมีการนำมาฝึกในคอกส่วนที่ 2 เพื่อให้คุ้นเคยกับการคล้องโซ่ คุ้นเคยกับรูปแบบการให้อาหาร และคนเลี้ยง หากเป็นสัตว์เพศเมียจะมีการฝึกใส่อุปกรณ์สำหรับแยกเก็บปัสสาวะ เทคนิคที่ทำให้สัตว์คุ้นเคยกับคนเลี้ยงได้รวดเร็วคือการอาบน้ำให้สัตว์เพื่อให้สัตว์รู้สึกผ่อนคลายและคนเลี้ยงสามารถสัมผัสตัวสัตว์ได้ อย่างไรก็ตามสัตว์ที่คัดเลือกเข้ามาเพื่อใช้ในการทดลองสามารถสังเกตพฤติกรรมว่ามีความเหมาะสมต่อการใช้ทดลองหรือไม่ก็สังเกตได้ในช่วงการฝึกในคอกส่วนที่ 2 นี้

1.3 การเตรียมตัวอย่างอาหาร

ตัวอย่างอาหารที่ใช้ประเมินค่าการย่อยได้ต้องมีปริมาณเพียงพอต่อการทดลอง จึงควรคำนวณเกินไว้อีกประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณที่ต้องใช้ทั้งหมด บางครั้งอาจเกิดเหตุการณ์ที่คาดไม่ถึงในระหว่างการทดลอง เช่น กระแสไฟฟ้าขัดข้อง เครื่องมือหรืออุปกรณ์เกิด

การชำรุดเสียหายจำเป็นต้องแก้ไข สามารถเพิ่มเวลาต่อไปได้โดยที่สัตว์ยังคงกินตัวอย่างอาหารเดิมอยู่

การคำนวณปริมาณตัวอย่างอาหารที่ใช้ควรคำนวณในรูปของน้ำหนักแห้ง และให้กินในปริมาณใกล้เคียงการดำรงชีพถ้าเป็นสัตว์ที่ไม่ได้ให้ผลผลิตจะกินไม่เกิน 3 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว ปริมาณตัวอย่างอาหารที่เตรียม เท่ากับ

ปริมาณตัวอย่างอาหารที่กิน x จำนวนสัตว์ x จำนวนวันที่กินตลอดการประเมิน

(*ให้คำนวณเกินไว้อีกประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาณตัวอย่างที่ต้องใช้ทั้งหมด)

ตัวอย่างอาหารที่ใช้ต้องอยู่ในสภาพที่เหมาะสมต่อการนำมาใช้เป็นอาหารสัตว์ ควรผลิตมาจากแหล่งเดียวกัน มีการจัดการที่เหมือนกัน มีลักษณะทางกายภาพที่เหมือนกัน และมีองค์ประกอบทางเคมีที่สม่ำเสมอ เพื่อให้สัตว์ทุกตัวได้กินเหมือนกันในทุกมื้อตลอดระยะเวลาการประเมิน กรณีเป็นพืชแห้ง หรือพืชหมัก ส่วนมากจะมีการจัดการที่เหมือนกันในครั้งเดียวกันจึงค่อนข้างที่จะมีความสม่ำเสมอของส่วนประกอบทางเคมี แต่กรณีพืชสด จำเป็นต้องควบคุมให้พืชที่ใช้ในการประเมินมีอายุการตัดที่ใกล้เคียงกันให้มากที่สุด จากประสบการณ์ที่ได้เคยทำการประเมินค่าการย่อยได้ของหญ้ากินีสีม่วงสด หลังจากคำนวณปริมาณที่ต้องตัดให้เพียงพอตลอดการดำเนินงานในแต่ละวันแล้ว วางแผนปลูกหญ้าในพื้นที่เดียวกันมีการจัดการเหมือนกันหลังจากหญ้าอายุครบ 60 วัน จะทำการตัดปรับเพื่อให้หญ้ามีการเจริญเติบโตที่สม่ำเสมอ จะทำการทยอยตัดปรับหญ้าตามจำนวนแถวที่กำหนดไว้ทุกวันจนครบตามจำนวนวันที่ใช้ในการประเมิน และเมื่อหญ้าที่ทยอยเจริญเติบโตขึ้นมาใหม่มีอายุครบ 45 วัน ก็ทยอยไล่ตัดตามจำนวนแถวเดิมที่ทยอยตัดปรับ ดังนั้น จะได้หญ้าที่อายุ 45 วัน เท่ากันตลอดการประเมิน

ตัวอย่างอาหารที่เป็นพืชแห้งหรือพืชสด ก่อนนำไปให้สัตว์กินต้องสับให้มีขนาดขึ้นประมาณ 2 - 3 เซนติเมตร เพื่อลดการเลือกกิน ยกเว้นพืชบางชนิด เช่น ถั่วพลูหรือเกรซแห้ง อายุการตัด 45 วัน พบว่ามีลำต้นเล็กแตกหักง่ายสามารถแกะจากฟ่อนแล้วซึ่งให้สัตว์กินได้เลย หากสับจะทำให้ส่วนของลำต้นและใบปนละเอียดสัตว์ไม่สามารถกินได้ทั้งหมดเนื่องจากมีลักษณะเป็นฝุ่น ดังนั้น การสับพืชก่อนหรือไม่ขึ้นกับดุลยพินิจของผู้วิจัย หากสัตว์สามารถกินได้ทั้งหมดโดยไม่มีการเลือกกิน ก็ไม่จำเป็นต้องมีการสับ

1.4 การเตรียมอุปกรณ์

อุปกรณ์อื่นๆ ที่จำเป็นสำหรับใช้ในการประเมินค่าการย่อยได้ ได้แก่

1.4.1 เครื่องชั่ง สำหรับชั่งอาหาร มูล ปัสสาวะ ควรมีพิกัดไม่น้อยกว่า 30 กิโลกรัม

1.4.2 เครื่องชั่งน้ำหนักสัตว์

1.4.3 ตู้อบตัวอย่าง

1.4.4 ตู้เย็น

1.4.5 กล่องพลาสติก หรือภาชนะที่มีฝาปิดสำหรับเก็บมูลของสัตว์แต่ละตัว (ภาพที่ 2.2)



ภาพที่ 2.2 อุปกรณ์เก็บมูลและปัสสาวะ



ภาพที่ 2.3 อุปกรณ์สำหรับแยกเก็บปัสสาวะของโคเพศเมีย

1.4.6 ภาชนะสำหรับเก็บปัสสาวะ เช่น ถัง หรือถุงพลาสติก (ถ้าเก็บ) และถ้าเป็นสัตว์เพศเมีย ต้องมีอุปกรณ์แยกเก็บปัสสาวะ (ภาพที่ 2.3)

1.4.7 แผ่นยางปูพื้น ป้องกันการลื่นล้มของสัตว์ทดลอง

1.4.8 กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ (v/v) สำหรับใส่ในภาชนะที่รองรับปัสสาวะเพื่อรักษาสภาวะความเป็นกรดให้มีค่า pH ไม่เกิน 3 ป้องกันการสูญเสียไนโตรเจนของปัสสาวะ

1.4.9 กระดาษวัด pH หรือ pH meter

1.4.10 พลาสติกสำหรับเก็บมูลจากพื้น

1.4.11 ถุงพลาสติกที่สามารถแช่เย็นได้ สำหรับเก็บตัวอย่างอาหาร และมูล

1.4.12 ขวดพลาสติก สำหรับเก็บตัวอย่างปัสสาวะ (หากต้องเก็บตัวอย่างปัสสาวะ)

2. การประเมินค่าโภชนาที่ย่อยได้ของอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้องโดยวิธี Total collection

แบ่งเป็น 3 วิธี ตามวิธีการให้กินตัวอย่างอาหาร ดังนี้

2.1 Direct method เป็นวิธีการให้สัตว์กินตัวอย่างอาหารเพียงชนิดเดียว หรือให้กินเป็นอาหารเดียว (Single feed หรือ Sole diet) ตัวอย่างประเภทนี้ ถ้าเป็นอาหารหยาบหรือพืชอาหารสัตว์ควรมีปริมาณโปรตีนไม่น้อยกว่า 7 เปอร์เซ็นต์ของวัตถุดิบแห้ง เพื่อให้มีแหล่งของไนโตรเจนเพียงพอต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ภายในกระเพาะรูเมน (Bowman and Sowell, 1998) หรือตัวอย่างอาหารอาหารนั้นต้องมีขนาดชิ้นที่เหมาะสมในการช่วยกระตุ้นให้สัตว์มีการเคี้ยวเอื้อง ดังนั้น ขนาดของชิ้นวัตถุดิบอาหารควรมีขนาดไม่เล็ก 1.2 มิลลิเมตร (Martz and Belyea, 1986) นอกจากนี้อาหารที่สามารถให้กินเดี่ยวได้นั้นมีเกณฑ์การพิจารณาของ Cottyn *et al.* (1989) ควรมีค่าการย่อยได้ของอินทรีย์วัตถุในช่วง 55 - 75 เปอร์เซ็นต์ มีชิ้นส่วนของพืชอาหารสัตว์ไม่น้อยกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ มีไขมันชนิดไม่อิ่มตัว (Unsaturated fats) ไม่เกิน 5 เปอร์เซ็นต์ของวัตถุดิบแห้ง มีไขมันชนิดอิ่มตัว (Saturated fats) ไม่เกิน 10 เปอร์เซ็นต์ของวัตถุดิบแห้ง มีโปรตีนในช่วง 12 - 20 เปอร์เซ็นต์ของวัตถุดิบแห้ง มีแป้งไม่เกิน 40 เปอร์เซ็นต์ของวัตถุดิบแห้ง และมีน้ำตาลไม่เกิน 20 เปอร์เซ็นต์ของวัตถุดิบแห้ง

2.2 Difference method หรือ Digestibility by difference เป็นวิธีการที่ใช้เมื่อตัวอย่างอาหารที่ต้องการทดสอบ (Test feed) นั้นไม่สามารถให้กินเป็นอาหารเดียวได้ เช่น วัตถุดิบอาหารชั้นทุกประเภท หรือวัตถุดิบที่มีโปรตีนต่ำ หรือวัตถุดิบที่มีขนาดชิ้นเล็กกว่า 1.2 มิลลิเมตร จึงต้องให้กินตัวอย่างที่ต้องการทดสอบร่วมกับตัวอย่างอื่น เรียกว่าอาหารฐาน (Basal feed) ซึ่งทราบค่าการย่อยได้ของโภชนาต่างๆ แล้ว โดยการประเมินค่าโภชนาที่ย่อยได้ของอาหารฐานนั้น

ต้องมาจากสัตว์ชุดเดียวกับที่ให้กินอาหารทดสอบร่วมกับอาหารฐาน จากนั้นจึงนำค่าโภชนะที่ย่อยได้ของอาหารที่กินร่วมกันทั้งหมดมาหักลบด้วยค่าโภชนะที่ย่อยได้ของอาหารฐาน จึงจะได้ค่าโภชนะที่ย่อยได้ของตัวอย่างทดสอบ

2.3 Regression method เป็นวิธีการทำนายค่าโภชนะที่ย่อยได้ด้วยการให้กินตัวอย่างอาหารร่วมกัน 2 ชนิด โดยตัวอย่างอาหารทั้งสองชนิดให้กินในสัดส่วนที่แตกต่างกันอย่างน้อย 3 ระดับ เพื่อให้ได้ค่าโภชนะที่ย่อยได้มีค่าที่แตกต่างกันในเชิงเส้นตรงสำหรับนำมาสร้างเป็นสมการเชิงเส้นตรงอย่างง่าย (Simple linear regression) เพื่อใช้ทำนายค่าการย่อยได้ของอาหารทั้งสองชนิดที่ระดับ 100 เปอร์เซ็นต์ เป็นการทำนายค่าการย่อยได้นอกช่วง (Extrapolated digestibility)

โดยวิธี Difference method หรือ วิธี Regression method เป็นวิธีที่ให้กินอาหารร่วมกันจึงอาจทำให้เกิดปฏิกริยาร่วมกัน (Associate effect) ซึ่งสามารถส่งเสริมให้ค่าโภชนะบางชนิดมีการย่อยได้เพิ่มขึ้นหรืออาจไปขัดขวางให้มีการย่อยได้ลดลง (Schneider and Flatt, 1975)

3. การปรับสัตว์กินตัวอย่างอาหาร

การประเมินค่าโภชนะที่ย่อยได้ของอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้องโดยวิธี Total collection แบ่งช่วงเวลาการให้กินตัวอย่างอาหารที่ใช้ในการประเมิน ออกเป็น 2 ช่วง ดังนี้

3.1 ช่วงปรับให้สัตว์กินตัวอย่างอาหาร (Preliminary periods หรือ Adjustment periods หรือ Adaptation periods) เป็นการไล่อาหารเก่าออกจากทางเดินอาหารออกให้หมด และเป็นการปรับให้สัตว์คุ้นเคยกับตัวอย่างอาหารที่ใช้ประเมิน ซึ่งปริมาณและเวลาการให้อาหารต้องคงที่เหมือนกันตลอดการทดลอง เพื่อให้อาหารมีอัตราการไหลผ่านคงที่ นอกจากนี้ยังเป็นการช่วยปรับประชากรของสิ่งมีชีวิตภายในกระเพาะรูเมน (Rumen microorganism) ใช้เวลาไม่น้อยกว่า 10 วัน แต่ถ้าอาหารที่ต้องการใช้ทดลองมีสัดส่วนของอาหารหยาบและอาหารชั้นที่แตกต่างไปจากอาหารเดิมที่สัตว์เคยกินอย่างมากอาจใช้เวลานานขึ้น เพื่อให้เพียงพอต่อการปรับตัวของประชากรจุลินทรีย์ภายในกระเพาะหมักโดยปกติใช้เวลา 14 วัน หรือนานกว่านั้นขึ้นกับวัตถุประสงค์ของการศึกษา (Schneider and Flatt, 1975; Khan *et al.*, 2003; Galyean, 2010; Grant *et al.*, 2015)

อาหารที่ให้กินส่วนมากแบ่งให้กิน 2 มื้อๆ ละเท่าๆ กัน แยกซึ่งเป็นรายมือ และรายตัวสัตว์ โดยบรรจุลงในภาชนะที่มีฝาปิด หรือในถุงที่ปิดปากถุงแบบมิดชิด ให้อาหารมือเช้าและมือบ่ายห่างกันประมาณ 8 ชั่วโมง และควรให้กินที่เวลาเดิมทุกวันตลอดการประเมิน ปริมาณที่ให้กิน

ควรอยู่ในระดับใกล้เคียงกับการดำรงชีพ ไม่ควรให้อาหารแบบเต็มที่ (*Ad libitum*) ควรจำกัดปริมาณการกินเพื่อให้อาหารมีอัตราการไหลผ่านในทางเดินอาหารคงที่และสารอาหารส่วนที่ไม่ได้ถูกย่อยที่ขับออกมาจะมีปริมาณคงที่ และหลีกเลี่ยงการกินเหลือซึ่งอาจมีผลต่อความแม่นยำของค่าการย่อยได้ของโภชนะต่างๆ การให้อาหารในปริมาณสูงกว่าระดับดำรงชีพจะส่งผลให้ค่าการย่อยได้ของโภชนะต่างๆ มีค่าต่ำกว่าการให้อาหารในปริมาณใกล้เคียงกับการดำรงชีพ เนื่องจากการกินอาหารในปริมาณสูงจะมีอัตราการไหลผ่านได้เร็วขึ้นทำให้ประสิทธิภาพการย่อยของจุลินทรีย์ลดลงจึงส่งผลให้มีค่าการย่อยได้ลดลง (Schneider and Flatt, 1975; Woods *et al.*, 1999; Rymer, 2000; Mesgaran *et al.*, 2020)

3.2 ช่วงเก็บข้อมูล (Collection periods) จะเก็บข้อมูลปริมาณอาหารที่กิน อาหารเหลือ (ถ้ามี) ปริมาณมูล หรือปัสสาวะ (ถ้าเก็บ) เพื่อนำไปวิเคราะห์หาค่าโภชนะต่างๆ ระยะเวลาการเก็บข้อมูลสามารถกระทำได้ตั้งแต่ 6 ไปจนถึง 24 วัน ซึ่งค่าความผิดพลาดจะลดลงเมื่อใช้ระยะเวลาการเก็บข้อมูลนานขึ้น (King *et al.*, 1959; Terada *et al.*, 1982; Galyean, 2010) แต่ระยะเวลาที่ใช้ควรคำนึงถึงค่าใช้จ่ายที่เพิ่มขึ้นเมื่อใช้เวลานานขึ้นและอาจมีผลต่อความเครียดและการเจ็บป่วยของสัตว์หากต้องถูกจำกัดพื้นที่ในระยะเวลาที่นานขึ้น (Schneider and Flatt, 1975) ในคู่มือฉบับนี้ใช้เวลาในการเก็บข้อมูลเป็นเวลา 6 วัน ในช่วงเก็บข้อมูลนี้ปริมาณตัวอย่างอาหารและเวลาที่ให้กินต้องปฏิบัติเช่นเดียวกับช่วงปรับให้สัตว์กินตัวอย่างอาหาร

4. การบันทึกข้อมูล และการสุ่มเก็บตัวอย่าง

4.1 การบันทึกข้อมูล

ข้อมูลที่ต้องการจดบันทึก ได้แก่

4.1.1 น้ำหนักโครายตัวก่อนและหลังการประเมินค่าการย่อยได้

4.1.2 เวลาที่เริ่มต้นของการให้อาหารมื้อแรก

4.1.3 ปริมาณตัวอย่างอาหารที่ให้อาหาร

4.1.4 น้ำหนักภาชนะสำหรับเก็บมูล หรือปัสสาวะ (ตัวอย่างปัสสาวะมักจะมีการเก็บควบคู่กันไปเพื่อนำไปใช้ประเมินค่าความสมดุลของโปรตีนที่สัตว์กินได้จากอาหาร หรือ ต้องการประเมินค่าพลังงานใช้ประโยชน์ได้ เนื่องจากไนโตรเจนที่ขับออกมาทางปัสสาวะนั้นไม่เกี่ยวข้องกับค่าการย่อยได้ของโปรตีน แต่เป็นส่วนที่เกิดขึ้นหลังการย่อยและดูดซึมเข้าสู่ร่างกายแล้วนำไปใช้ในกระบวนการเมตาบอลิซึม (Metabolized) ส่วนไนโตรเจนที่ไม่ถูกใช้ประโยชน์จะขับออกมาทางปัสสาวะ)

4.1.5 ปริมาณอาหารเหลือ (ถ้ามี)

4.1.6 ปริมาณมูล และปัสสาวะ (ถ้าเก็บ)

4.2 การสุ่มเก็บตัวอย่าง

ตัวอย่างที่ต้องสุ่มเก็บ และจัดเตรียมเพื่อนำไปวิเคราะห์ส่วนประกอบทางเคมี ได้แก่ ตัวอย่างอาหารที่ใช้ในการประเมิน อาหารเหลือ (ถ้ามี) มูล และปัสสาวะ (ถ้าเก็บ) มีวิธีการ ดังนี้

4.2.1 ตัวอย่างอาหารอาหารชั้น สามารถสุ่มเก็บจากภาชนะบรรจุที่เป็นกระสอบสานได้โดยการใช้หลาวเจาะผ่านกระสอบ โดยทำการสุ่มจากตำแหน่งด้านบน ด้านล่างและด้านข้างของกระสอบ ซึ่งโดยปกติในการศึกษาแต่ละครั้งจะใช้ไม่เกิน 10 กระสอบ (น้อยกว่า 1 ตัน) ให้สุ่มเก็บทุกกระสอบแล้วนำมาผสมรวมกัน ถ้าเป็นพืชแห้งสามารถสุ่มเก็บจากกองที่สับไว้สำหรับเตรียมให้สัตว์กิน โดยจะสุ่มเก็บหลังจากสับเรียบร้อยแล้วสุ่มเก็บให้ทั่วทั้งกอง ให้ได้ตัวอย่างทั้งหมดประมาณ 1 กิโลกรัม หากการประเมินใช้เวลานานจะมีการทยอยสุ่มเก็บตัวอย่างทุกครั้งที่มีการนำมาสับ ให้สุ่มเก็บทั่วกองและสุ่มเก็บแต่ละครั้งประมาณ 100 - 200 กรัม จนสิ้นสุดการทดลอง แล้วจึงนำตัวอย่างพืชแห้งที่สุ่มเก็บทั้งหมดมารวมเป็น 1 ตัวอย่าง

4.2.2 ตัวอย่างอาหารหมัก สุ่มเก็บตัวอย่างจากภาชนะบรรจุในระหว่างการซึ่งให้สัตว์กินในแต่ละวัน ทำการสุ่มบริเวณส่วนบน กลาง และด้านล่างของภาชนะบรรจุ ทยอยสุ่มทุกภาชนะที่บรรจุตลอดช่วงเก็บข้อมูล เพื่อให้เป็นตัวแทนของตัวอย่างที่ใช้ทดลอง การสุ่มแต่ละครั้งจะเก็บในถุงพลาสติกชนิดแช่เย็นได้ บีบไล่อากาศออกจากตัวอย่างแล้วนำไปแช่แข็งเมื่อสิ้นสุดการทดลองจึงนำตัวอย่างมารวมกันเป็น 1 ตัวอย่าง (หากทำการทดลองหลาย Period แยกสุ่มตัวอย่างละ 1 Period) หลังนำออกจากตู้แช่แข็งรอให้ตัวอย่างคลายตัวจนสามารถนำมาคลุกเคล้าให้เข้ากันในขณะที่ตัวอย่างยังมีความเย็นอยู่ สุ่มตัวอย่างพืชหมักส่วนหนึ่งประมาณ 100 กรัม สำหรับนำไปวิเคราะห์ค่า pH ตัวอย่างส่วนที่เหลือรอให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ชั่งบันทึกน้ำหนักก่อนนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 - 60 ชั่วโมง หรือจนกว่าจะแห้ง บันทึกน้ำหนักหลังการอบแห้ง หลังจากนั้นนำตัวอย่างไปบดให้มีขนาดชิ้น 1 มิลลิเมตร สำหรับนำไปวิเคราะห์ส่วนประกอบทางเคมี

4.2.3 ตัวอย่างพืชสด จะใช้วิธีให้กินเป็นอาหารเดียวและให้สัตว์ทุกตัวกินพร้อมกันใน 1 รอบของการประเมินเนื่องจากสะดวกต่อการเตรียมตัวอย่าง ให้สุ่มเก็บตัวอย่างทุกวันในช่วงเก็บข้อมูล สุ่มตัวอย่างหลังการสับประมาณ 500 กรัม นำมาบันทึกน้ำหนักก่อนนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการชั่งบันทึกน้ำหนัก นำตัวอย่างหลังอบแห้งที่ได้ของแต่ละวันมารวมกันเป็น 1 ตัวอย่าง น้ำหนักประมาณ 1 กิโลกรัม เพื่อนำไปบดให้มีขนาดชิ้น 1 มิลลิเมตร สำหรับนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

4.2.4 อาหารเหลือ (ถ้ามี) เก็บอาหารเหลือทั้งหมดและทำความสะอาดรางอาหารก่อนให้อาหาร มื้อเช้าของวันถัดไป ถ้าเหลือในปริมาณต่ำกว่า 500 กรัม เก็บทั้งหมดนำไปแช่ในตู้เย็น เมื่อสิ้นสุดการ ทดลองนำอาหารเหลือของแต่ละตัวมาชั่งน้ำหนักรวมทั้งหมดเพื่อบันทึกน้ำหนัก นำไปอบแห้งที่ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แต่หากมีอาหารเหลือในปริมาณมากและอยู่ในลักษณะที่เหมือนกับตอนให้ กินสามารถสุมเก็บตัวอย่างไว้ในปริมาณ 500 กรัม เช่นเดียวกับที่กล่าวมาแล้ว ตัวอย่างอาหารเหลือ หลังอบแห้ง นำไปบดให้มีขนาดชิ้น 1 มิลลิเมตร สำหรับนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

4.2.5 มูล การสุมเก็บตัวอย่างมูลในแต่ละวัน แยกเก็บเป็นรายตัว หลังจากชั่งบันทึกน้ำหนัก ผสมคลุกเคล้าให้เป็นเนื้อเดียวกัน สุ่มตัวอย่างมูลตัวละประมาณ 1 กิโลกรัม หรือ 5 - 10 เปอร์เซ็นต์ ของมูลที่ขับถ่ายออกมาทั้งหมดในแต่ละวันใส่ในถุงพลาสติก (ชนิดแช่เย็นได้) ที่บันทึกข้อมูลข้างถุง ได้แก่ เบอร์สัตว์ และวันที่เก็บ ก่อนนำไปแช่ตู้เย็นที่อุณหภูมิประมาณ 7 องศาเซลเซียส (เก็บไม่เกิน 6 วัน หากเก็บนานกว่านั้นควรเก็บแบบแช่แข็ง) เมื่อสิ้นสุดการเก็บข้อมูล นำตัวอย่างมูลทั้งหมดออกจาก ตู้เย็นปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นำน้ำหนักมูลสัตว์แต่ละตัวมาคำนวณเพื่อสุมเก็บตัวอย่างของแต่ละ วัน ดังนี้ (ปริมาณตัวอย่างมูลที่ต้องการ $\times$ ปริมาณมูลแต่ละวัน) / ปริมาณมูลรวมทั้งหมด

เช่น สัตว์ตัวที่ 1 ต้องการตัวอย่างมูล 3 กิโลกรัม มีผลรวมของมูล 6 วัน เท่ากับ 50 กิโลกรัม และถ้ามูลวันที่ 1 เท่ากับ 6 กิโลกรัม ดังนั้น

น้ำหนักมูลวันที่ 1 จะสุม เท่ากับ $(3 \times 6 / 50)$ เท่ากับ 0.36 กิโลกรัม หรือเท่ากับ 360 กรัม

ใช้วิธีการคำนวณเช่นเดียวกันจนครบ 6 วัน จะได้น้ำหนักรวมสุดท้ายของตัวอย่างมูลเท่ากับ 3 กิโลกรัม หรือ 3,000 กรัม นำมูลที่ได้ไปผสมให้เข้ากันอีกครั้ง แล้วสุมตัวอย่างส่วนที่หนึ่งประมาณ 50 กรัม สำหรับนำไปวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนในรูปสัด ส่วนที่เหลือสุมใส่ภาชนะที่บันทึกน้ำหนักไว้แล้ว จำนวน 2 ภาชนะ ละประมาณ 1 กิโลกรัม (ขึ้นอยู่กับความชื้นของมูล ซึ่งสุดท้ายน้ำหนักมูลหลังอบควรมี ปริมาณไม่น้อยกว่า 500 กรัม เพื่อให้เพียงพอต่อการนำไปวิเคราะห์ส่วนประกอบทางเคมี) จากนั้น ชั่ง บันทึกน้ำหนักตัวอย่างมูลก่อนนำเข้าอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 - 60 ชั่วโมง หรือ จนแห้ง นำออกจากตู้อบปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ชั่งเพื่อบันทึกน้ำหนักอีกครั้ง ก่อนนำไปบดให้มีขนาด 1 มิลลิเมตร เพื่อนำไปวิเคราะห์ส่วนประกอบทางเคมี

4.2.6 ปัสสาวะ การเก็บตัวอย่างปัสสาวะของสัตว์แต่ละตัวในแต่ละวัน ให้นำไปตรวจสอบค่า pH ไม่ควรเกิน 3 หากเกินให้เติมปริมาณกรดซัลฟิวริกในภาชนะที่จะใช้เก็บในวันถัดไป บันทึกปริมาณกรด ซัลฟิวริกที่ใช้ในแต่ละวัน จากนั้นนำปัสสาวะมาชั่งบันทึกน้ำหนักทั้งหมด กวนผสมให้เข้ากัน สุ่ม ตัวอย่างลงในขวดพลาสติกขนาดบรรจุ 300 - 500 มิลลิลิตร ที่มีการบันทึกข้อมูลรายละเอียดข้างขวด ได้แก่ เบอร์สัตว์ และวันที่เก็บ ก่อนนำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิประมาณ 7 องศาเซลเซียส เมื่อสิ้นสุดการ

เก็บข้อมูล นำตัวอย่างปัสสาวะของสัตว์แต่ละตัวที่เก็บไว้ในแต่ละวันออกจากตู้เย็นและปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นำน้ำหนักรูปปัสสาวะมาคำนวณเพื่อหาค่าของตัวอย่างของแต่ละวันด้วยวิธีการคำนวณเช่นเดียวกับตัวอย่างมูล แต่ปริมาณตัวอย่างของปัสสาวะของสัตว์แต่ละตัวต้องการ 1 กิโลกรัม แยกชั้นรายวันของสัตว์แต่ละตัวเช่นเดียวกัน ทำการกวนผสมตัวอย่างของแต่ละวันให้เข้ากัน จากนั้นสุ่มเก็บตัวอย่างใส่ในขวดปริมาณ 200 - 300 มิลลิลิตร ก็เพียงพอ สำหรับนำไปวิเคราะห์หาค่าไนโตรเจน (กรณีที่ไม่ได้ต้องการศึกษาสมดุลไนโตรเจน หรือพลังงานใช้ประโยชน์ได้ ก็ไม่จำเป็นต้องเก็บปัสสาวะ ดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น)

5. การวิเคราะห์ส่วนประกอบทางเคมี

ตัวอย่างอาหาร และมูล วิเคราะห์หาปริมาณของความชื้น (Moisture) ตามวิธีการ (930.15; AOAC, 2016) เมื่อนำ 100 ลบด้วยความชื้นทำให้ได้ค่าของวัตถุแห้ง (Dry matter, DM) ไขมัน (Ether extract) ตามวิธีการ (11085; ISO, 2015) เถ้า (Ash) ตามวิธีการ (942.0; AOAC, 2016) โปรตีน (Crude protein) ได้จากการวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจน (Nitrogen, N) แล้วนำไปคูณด้วย 6.25 โดยวิเคราะห์ไนโตรเจน ตามวิธีการ (984.1; AOAC, 2016) ส่วนประกอบของเยื่อใย ได้แก่ ผนังเซลล์ (Neutral detergent fiber, NDF) ตามวิธีการ (2002.04; AOAC, 2016) ลิกโนเซลลูโลส (Acid detergent fiber, ADF) และลิกนิน ตามวิธีการ (973.18; AOAC, 2016) ค่าพลังงานรวม (Gross energy, GE) ตามวิธีการของเครื่อง Automatic isoperibol calorimeter

ตัวอย่างมูลสด และปัสสาวะ(ถ้าเก็บ) นำไปวิเคราะห์ค่าไนโตรเจน ตามวิธีการ In house method base on 5983-2 (ISO, 2009)

6. การคำนวณค่าโภชนาที่ย่อยได้

6.1 การคำนวณตามวิธี Direct method

- ค่าโภชนาที่ย่อยได้ (Nutrient digestibility, %) คำนวณได้ ดังนี้

$$= (\text{ปริมาณโภชนาที่กิน} - \text{ปริมาณโภชนาที่ขับออกในมูล}) \times 100 / \text{ปริมาณโภชนาที่กิน}$$

โดยที่ปริมาณโภชนาที่มีหน่วยเดียวกัน เป็น กรัม หรือ กิโลกรัม ของน้ำหนักแห้ง

- ค่าโภชนาที่ย่อยได้ทั้งหมด (Total digestible nutrients; TDN, %)

$$= \text{OMD} + (\text{EED} \times 1.25) \text{ (McDonald et al., 2010)}$$

โดยที่ OMD และ EED คือ ปริมาณการย่อยได้ของอินทรีย์วัตถุ และปริมาณการย่อยได้ของไขมัน ในอาหาร 100 กรัม หรือกิโลกรัมของน้ำหนักแห้ง

หรือ $TDN = CPD + (EED \times 2.25) + NDFD + NFCD$ (ดัดแปลงจาก Schneider and Flatt, 1975) โดยที่ CPD EED NDFD และ NFCD คือ ปริมาณการย่อยได้ของโปรตีน ไขมัน พืชเซลล์ และส่วนของคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ใช่เยื่อใย มีหน่วยเดียวกัน เป็น กรัม หรือกิโลกรัมของน้ำหนักแห้ง

- ค่าพลังงานที่ย่อยได้ (Digestible energy, DE),

สามารถคำนวณเป็น ค่าสัมประสิทธิ์การย่อยได้ของพลังงาน (%) ดังนี้

$$= (\text{พลังงานในอาหารที่กิน} - \text{พลังงานในมูล}) \times 100 / \text{พลังงานในอาหารที่กิน}$$

หรือ คำนวณเป็นความเข้มข้นของพลังงานที่ย่อยได้ในอาหาร (Mcal/kgDM) ดังนี้

$$= (\text{พลังงานในอาหารที่กิน} - \text{พลังงานในมูล}) / \text{ปริมาณอาหารที่กิน}$$

ตัวอย่างการคำนวณ

การประเมินค่าการย่อยได้ของเปลือกฝักข้าวโพดหวาน ที่ให้โคกินเป็นอาหารเดี่ยว มีปริมาณการกินได้เฉลี่ยเท่ากับ 18.2 กิโลกรัมน้ำหนักสด/ตัว/วัน และมีปริมาณมูลที่ขับถ่ายเฉลี่ยเท่ากับ 9.5 กิโลกรัมน้ำหนักสด/ตัว/วัน และมีส่วนประกอบทางเคมี ดังในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ส่วนประกอบทางเคมีของเปลือกฝักข้าวโพดหวาน และมูล

	DM	OM	CP	EE	NDF	ADF	NFC	GE
	%	<----- %DM ----->						Mcal/kgDM
เปลือกฝักข้าวโพดฯ	19.60	95.15	10.45	7.09	67.23	31.25	10.38	4.75
มูล	14.88	93.96	9.23	0.8	77.71	38.82	6.22	4.52

เมื่อนำข้อมูลปริมาณการกินเปลือกฝักข้าวโพดหวาน (อาหาร) และปริมาณมูลที่ขับถ่ายมาคำนวณร่วมกับข้อมูลส่วนประกอบทางเคมี (ตารางที่ 2.1) ได้ค่าต่างๆ ดังในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 ปริมาณโภชนะที่กิน ที่ขับถ่าย และปริมาณโภชนะที่ย่อยได้ (%)

	DM	OM	CP	EE	NDF	ADF	NFC	GE*
โภชนะในอาหารที่กิน (กรัม)	5,490	5,220	570	390	3,690	1,720	570	26.07
โภชนะในมูล (กรัม)	2,460	2,310	230	20	1,910	950	150	11.11
ปริมาณโภชนะที่ย่อยได้ (กรัม)	3,030	2,910	340	370	1,780	770	420	14.96
สัมประสิทธิ์การย่อยได้ (%)	55.19	55.77	60.44	94.95	48.23	44.36	73.16	57.38

* GE มีหน่วยเป็น Mcal/kgDM

จากข้อมูลในตารางที่ 2.2 คำนวณได้ ดังนี้ เช่น ค่าการย่อยได้ของวัตถุดิบ (DMD)

$$\begin{aligned} \text{- คำนวณปริมาณอาหารที่กินให้อยู่ในรูปน้ำหนักแห้ง} &= \text{ปริมาณอาหารที่กิน} \times \text{DM} (\%) / 100 \\ &= 18.20 \times 19.60 / 100 = 5.49 \text{ กิโลกรัมแห้ง} \end{aligned}$$

$$\text{ปริมาณวัตถุแห้งในมูล} = 9.50 \times 14.88 / 100 = 2.46 \text{ กิโลกรัมแห้ง}$$

$$\text{ปริมาณวัตถุแห้งที่ย่อยได้} = 5.49 - 2.46 = 3.03 \text{ กิโลกรัมแห้ง}$$

$$\text{ค่าสัมประสิทธิ์การย่อยได้} = 3.03 \times 100 / 5.49 = 55.19 \text{ เปอร์เซ็นต์}$$

- วิธีการคำนวณค่าการย่อยได้ของโปรตีน มีรายละเอียด ดังนี้

$$\text{ปริมาณโปรตีนในอาหารที่กิน} = 5.49 \times 10.45 / 100 = 0.57 \text{ กิโลกรัม}$$

$$\text{ปริมาณโปรตีนในมูล} = 2.46 \times 9.23 / 100 = 0.22 \text{ กิโลกรัม}$$

$$\text{ปริมาณโปรตีนที่ย่อยได้} = 0.57 - 0.22 = 0.35 \text{ กิโลกรัม}$$

$$\text{ค่าสัมประสิทธิ์การย่อยได้} = 0.35 \times 100 / 0.57 = 61.41 \text{ เปอร์เซ็นต์}$$

จากการประเมินค่าโภชนะที่ย่อยได้โดยวิธี Total collection สามารถนำ ส่วนประกอบทางเคมี (ตารางที่ 2.1) และค่าโภชนะที่ย่อยได้ (ตารางที่ 2.1) ของเปลือกฝักข้าวโพดหวาน มาคำนวณค่า TDN และความเข้มข้นของค่าพลังงานย่อยได้ ดังนี้

- คำนวณค่า TDN สามารถคำนวณได้ 2 วิธี ดังนี้

$$\text{วิธีที่ 1 TDN} = \text{OMD} + (\text{EED} \times 1.25)$$

$$= 53.06 + (6.73 \times 1.25) = 61.47 \text{ เปอร์เซ็นต์}$$

$$\text{วิธีที่ 2 TDN} = \text{CPD} + (\text{EED} \times 2.25) + \text{NDFD} + \text{NFCD}$$

$$= 6.31 + (6.73 \times 2.25) + 32.42 + 7.59 = 61.46 \text{ เปอร์เซ็นต์}$$

- คำนวณค่า DE ดังนี้

$$\text{DE} = (\text{GE ในอาหาร} \times \text{สัมประสิทธิ์การย่อยได้ของพลังงาน}) / 100$$

$$= 4.75 \times 57.38 / 100 = 2.73 \text{ Mcal/kgDM}$$

$$\text{หรือ DE} = 14.96 / 5.490 = 2.73 \text{ Mcal/kgDM}$$

6.2 การคำนวณตามวิธี Difference method คำนวณได้ดังนี้

ค่าโภชนะที่ย่อยได้ของอาหารทดสอบ (%) = {ค่าโภชนะที่ย่อยได้ของอาหารทั้งหมด - (ค่าโภชนะที่ย่อยได้ของอาหารฐาน × สัดส่วนของอาหารฐาน) × 100} / สัดส่วนของอาหารทดสอบ

ตัวอย่างการคำนวณ

ศึกษาค่าการย่อยได้ของกากถั่วเหลืองไขมันเต็ม (อาหารทดสอบ) ให้กินร่วมกับหญ้าแพงโกลาแห้ง (อาหารฐาน) มีส่วนประกอบทางเคมี ดังในตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 ส่วนประกอบทางเคมีของกากถั่วเหลืองไขมันเต็ม หญ้าแพงโกลาแห้ง และมูล

	DM	OM	CP	EE	NDF	ADF	NFC	GE
	%	<----- %DM ----->						Mcal/kgDM
กากถั่วเหลืองไขมันเต็ม	84.35	94.48	6.46	1.31	65.45	44.51	21.26	4.34
หญ้าแพงโกลาแห้ง	93.24	94.39	39.75	20.61	18.91	10.90	15.12	5.67
มูล	19.40	86.93	11.34	2.29	58.25	33.82	15.05	4.28

เมื่อนำข้อมูลปริมาณการกินอาหารทดสอบ อาหารฐาน ปริมาณมูลที่ขับถ่าย ในแต่ละวัน (คำนวณเช่นเดียวกับวิธี Direct method) เมื่อได้ปริมาณอาหารที่กินทั้ง 2 ชนิด ปริมาณมูล และค่าการย่อยได้ของหญ้าแพงโกลา เมื่อนำมาคำนวณค่าการย่อยได้ของถั่วเหลืองไขมันเต็ม ได้ข้อมูลต่างๆ ดังในตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 ปริมาณโภชนะในอาหารและมูล (กรัม) และการย่อยได้ของอาหาร (เปอร์เซ็นต์)

	DM	OM	CP	EE	NDF	ADF	NFC	GE*
หญ้าแพงโกลาแห้ง (A)	4,547	4,296	294	60	2,976	2,024	967	19,723
ถั่วเหลืองไขมันเต็ม (B)	2,203	2,080	876	454	417	240	333	12,501
อาหารรวม	6,750	6,376	1,170	514	3,392	2,264	1,300	32,224
มูล	2,536	2,205	288	58	1,478	858	382	11,841
ปริมาณที่ย่อยได้	4,213	4,171	882	456	1,915	1,406	918	20,382
ค่าการย่อยได้ A (%)	62.8	65.6	47.4	39.8	64.1	67.1	77.0	60.8
ปริมาณการย่อยได้ A	2,855	2,816	139	24	1,908	1,357	744	11,985
ปริมาณการย่อยได้ B	1359	1355	743	432	6	49	174	8397
ค่าการย่อยได้ B (%)	61.7	65.1	84.8	95.1	1.5	20.4	52.1	67.2

* GE มีหน่วยเป็น kcal

ค่าโภชนะที่ย่อยได้ของอาหารทดสอบ เช่น ค่า DMD มีรายละเอียดการคำนวณ ดังนี้

$$\begin{aligned}
 \text{ปริมาณวัตถุดิบของอาหารรวมที่ย่อยได้} &= 4,213 \text{ กรัม} \\
 \text{อาหารฐาน (A) มี สัมประสิทธิ์การย่อยได้} &= 62.8 \text{ เปอร์เซ็นต์} \\
 \text{ปริมาณวัตถุดิบของอาหาร A ที่ย่อยได้} &= 4213 \times 62.8 / 100 \\
 &= 2,855 \text{ กรัม}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{ปริมาณวัตถุแห้งของอาหาร B ที่ย่อยได้} &= 4,213 - 2,855 \\
 \text{ดังนั้น สัมประสิทธิ์การย่อยได้ของอาหาร B} &= 1,359 \times 100 / 2,203 \\
 &= 61.7 \text{ เปอร์เซ็นต์}
 \end{aligned}$$

6.3 การคำนวณตามวิธี Regression method มีรูปแบบสมการ ดังนี้

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X \quad \text{โดยที่ } Y \text{ คือ ค่าโภชนะที่ย่อยได้ของอาหารทดสอบ (\%)}$$

β_0 คือ ค่า Intercept หรือค่าคงที่ซึ่งจะเป็นค่าที่ส่งผลต่อตัวแปร Y เมื่อตัวแปร X เป็น 0 หรือ จุดตัดแกน Y

β_1 คือ ค่าสัมประสิทธิ์ที่จะทำให้ตัวแปร Y เปลี่ยนแปลง β_1 หน่วยเมื่อตัวแปร X มีค่าเท่ากับ 1

X คือ ปริมาณของอาหารทดสอบที่กิน ซึ่งจะเป็นตัวแปรที่เป็นตัวกำหนดค่าหรือเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อตัวแปร Y

ตัวอย่างการคำนวณ

ศึกษาค่าการย่อยได้ของหญ้าแพงโกลาแห้ง ที่กินร่วมกับกากถั่วเหลือง ที่สัดส่วน 85:15, 80:20, 75:25 และ 70:30 เปอร์เซ็นต์ วางแผนการทดลองแบบ 4x4 Latin square มีการคำนวณค่าโภชนะที่ย่อยได้เช่นเดียวกับวิธี Direction method เมื่อได้ค่าการย่อยได้ของโภชนะต่างๆ ของอาหารที่กินทั้งหมดนำมาทดสอบหาค่าความสัมพันธ์ระหว่าง ค่าโภชนะที่ย่อยได้ (แกน Y) ระดับสัดส่วนของหญ้าแพงโกลาและกากถั่วเหลือง (แกน X) ด้วยโปรแกรมสถิติสำเร็จรูป เพื่อทดสอบค่าความสัมพันธ์ระหว่าง X และ Y โดยค่าความชันต้องไม่เท่ากับ ศูนย์ และค่า r^2 ควรใกล้ 1 เพื่อสามารถใช้สร้างสมการทำนายค่าอย่างง่าย (Simple linear regression) ในการทำนายค่าโภชนะที่ย่อยได้ของหญ้าแพงโกลาและกากถั่วเหลือง ได้อย่างแม่นยำ ดังในตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.5 ค่าโภชนะที่ย่อยได้ของอาหารที่กิน สมการทำนายค่าการย่อยได้ของกากถั่วเหลือง (x) และหญ้าแพงโกลา (y)

ค่าการย่อยได้ (%)	ระดับกากถั่วเหลืองที่เสริม (%)				สมการทำนาย	r ²	x	y
	15	20	25	30				
วัตถุดิบแห้ง	63.7	65.1	68	69.5	$y = 0.406x + 57.44$	0.98	98.0	57.4
อินทรีย์วัตถุ	66.8	68.2	70.9	72.1	$y = 0.372x + 61.13$	0.98	98.3	61.1
โปรตีน	50.3	53.1	55.8	58.6	$y = 0.406x + 41.24$	0.99	81.8	41.2
ไขมัน	44.1	46.2	48.3	50.2	$y = 0.408x + 38.02$	0.99	78.8	38.0
ผนังเซลล์	63.2	65.5	67	68.1	$y = 0.324x + 58.66$	0.97	91.1	58.7
ลิกโนเซลลูโลส	58.1	59.9	60.3	63	$y = 0.302x + 53.53$	0.93	83.7	53.5
TDN	57	59.1	61.9	62.3	$y = 0.374x + 51.66$	0.94	89.1	51.7
DE (Mcal/kg)	2.5	2.7	2.8	2.9	$y = 0.026x + 2.14$	0.97	4.7	2.1

จากข้อมูลในตารางที่ 2.5 เช่น ต้องการทราบค่า DMD ของหญ้าแพงโกลา ที่ระดับการกิน 100 เปอร์เซ็นต์ สัดส่วนของกากถั่วเหลืองจะมีค่าเท่ากับ ศูนย์ (0) ค่าตัวแปร x เท่ากับ 0 เมื่อแทนค่า x ในสมการ ได้ดังนี้ $y = (0.406 \times 0) + 57.44$

ดังนั้น หญ้าแพงโกลา มีค่า DMD = 57.4 เปอร์เซ็นต์
 และถ้าต้องการทราบค่า DMD ของกากถั่วเหลือง เท่ากับกินกากถั่วเหลือง 100 เปอร์เซ็นต์ ค่าตัวแปร x เท่ากับ 100 เมื่อแทนค่า x ในสมการ $y = (0.406 \times 100) + 57.44$
 $= 98.0$ เปอร์เซ็นต์

บทที่ 3

การประเมินค่าพลังงานใช้ประโยชน์ได้ของอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้องโดยเครื่อง Ventilated hood-type respiration calorimeters

พลังงาน (Energy) เป็นคำที่มาจากภาษากรีก 2 คำ คือ En แปลว่า In และ Ergon แปลว่า Work เมื่อรวมกันจึงมีความหมายว่า ความสามารถในการทำงาน (บุญล้อม, 2541) พลังงานไม่สามารถตรวจวัดได้โดยตรงแต่วัดได้ในรูปของความร้อน (Heat) โดยพลังงาน 1 Cal (Calorie) หมายถึง พลังงานความร้อนที่ทำให้ น้ำจำนวน 1 กรัม มีอุณหภูมิเพิ่มขึ้นจาก 14.5 องศาเซลเซียส เป็น 15.5 องศาเซลเซียส ซึ่งหน่วยของพลังงานคือ J (Joules) แต่หน่วยที่ใช้วัดความร้อน คือ cal แต่ในปัจจุบันพบมีการรายงานหน่วยของพลังงานทั้งในรูปของ cal และ J ซึ่ง 1 cal มีค่าเท่ากับ 4.184 J และการปรับหน่วย จาก 1 cal เป็น 1 kcal เท่ากับ $1 \text{ cal} \times 1000$ และ 1 Mcal เท่ากับ $1 \text{ kcal} \times 1000$

การศึกษาเพื่อวัดค่าพลังงานพบว่าเริ่มมีขึ้นในปี ค.ศ. 1783 โดย Antoine Lavoisier และ Pierre Laplace ประเทศฝรั่งเศส ได้นำหนู Guinea pig เข้าในตู้ที่ออกแบบเป็นพิเศษ ซึ่งภายในตู้มีน้ำแข็งเมื่อนำหนูใส่เข้าไปจะวัดความร้อนที่เกิดขึ้นจากการละลายของน้ำแข็ง การทดลองครั้งนี้นับว่ามีความสำคัญเป็นอย่างมากเพราะทำให้ทราบว่าความร้อนเกิดจากก๊าซออกซิเจนที่หายใจเข้าไปแล้วถูกเปลี่ยนเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ขับออกมา (McLean and Tobin, 1987; Blaxter, 1989)

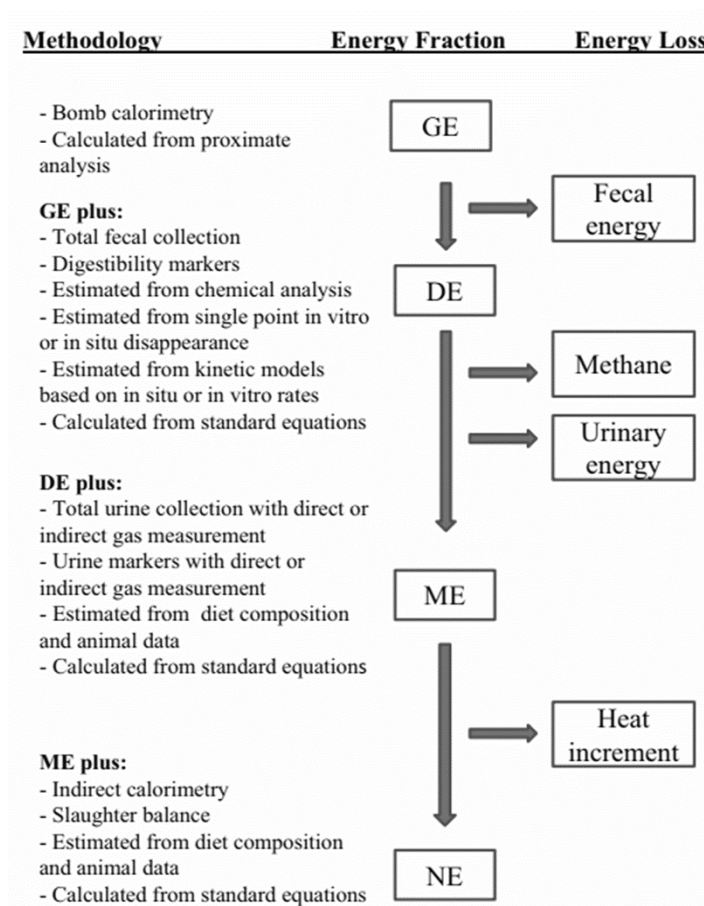
หลักการ

พลังงานไม่สามารถวัดได้โดยตรงแต่วัดได้ในรูปของความร้อน สามารถวัดได้โดยเครื่อง Bomb calorimeter มีหลักการดังนี้ นำตัวอย่างไปเผาภายใต้สภาวะที่มีปริมาณก๊าซออกซิเจนที่เพียงพอตัวอย่างจะถูกเผาไหม้อย่างสมบูรณ์เกิดเป็นความร้อน เรียกว่า ความร้อนจากการเผาไหม้ (Heat of combustion) หรือค่าพลังงานรวม (Gross energy, GE) ดังนั้นวัตถุดิบอาหารสัตว์หรืออาหารสัตว์เมื่อนำไปเผาด้วยเครื่อง Bomb calorimeter จะได้เพียงค่า GE ซึ่งเป็นความร้อนที่เกิดจากการเผาไหม้ไม่สามารถบ่งชี้ถึงพลังงานที่สัตว์สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้

พลังงานจากอาหารที่สัตว์กินเข้าไปจะเกิดกระบวนการเมตาบอลิซึมภายในร่างกายเพื่อเปลี่ยนไปเป็นพลังงานในรูปแบบต่างๆ สำหรับใช้ในการดำรงชีพ การเจริญเติบโต การทำงาน

และการให้ผลผลิตต่างๆ พลังงานที่สูญเสียออกมานั้นจะอยู่ในรูปของความร้อน สามารถวัดได้โดยตรง (Direct calorimetry) หรือวัดทางอ้อมจากสิ่งที่สัตว์ขับออกมาจากร่างกาย (Indirect calorimetry) เช่น มูล ปัสสาวะ หรือก๊าซมีเทน ดังนั้นเมื่อนำค่าพลังงานที่สูญเสียในรูปแบบต่างๆ มาหักออกจากพลังงานในอาหารที่สัตว์กิน (Gross energy intake, GEI) สามารถจัดลำดับขั้นของพลังงานได้ดังในภาพที่ 3.1

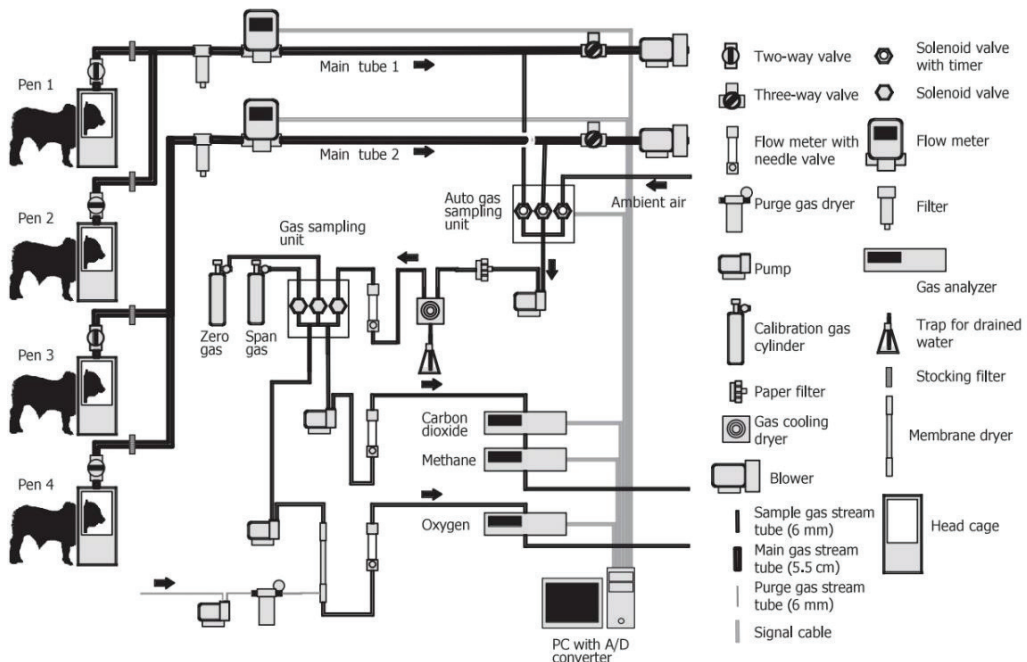
จากภาพที่ 3.1 ค่า (Digestible energy, DE) ได้จากการนำพลังงานของอาหาร (Gross energy intake, GEI) หักกลับด้วยพลังงานจากมูล (Fecal energy) และเมื่อนำค่า DE หักกลับด้วยพลังงานที่ขับออกทางปัสสาวะ (Urinary energy) และค่าพลังงานในรูปของก๊าซมีเทนที่สัตว์หายใจออกมา (ก๊าซมีเทน 1 ลิตร มีพลังงาน 9.45 kcal; Brouwer, 1965) จะได้ค่าพลังงานใช้ประโยชน์ได้ (Metabolisable energy หรือ Metabolizable energy, ME)



ภาพที่ 3.1 ขั้นตอนการวัดค่าพลังงานในแต่ละลำดับขั้น (Weiss and Tebbe, 2019)

การหาปริมาณก๊าซมีเทนที่สัตว์หายใจออกมานั้น กรมปศุสัตว์ เคยมีเครื่องมือที่ใช้ศึกษาครั้งแรกด้วยวิธีการใช้หน้ากาก (Face mask technique) ซึ่งได้รับการสนับสนุนจาก Japan International Research Center for Agricultural Sciences (JIRCAS) เมื่อปี พ.ศ. 2537 ที่ศูนย์วิจัยและพัฒนามาตรฐานอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้อง ตำบลท่าพระ อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น (Kawashima *et al.*, 2001) ปัจจุบันได้ยกเลิกการใช้วิธีนี้ เนื่องจากไม่สามารถวัดการหายใจของสัตว์ได้อย่างต่อเนื่อง

ต่อมาในปี พ.ศ. 2548 ได้พัฒนาเป็นแบบ Ventilated hood-type respiration calorimeters (Suzuki *et al.*, 2007; Suzuki *et al.*, 2008) ชุดเครื่องมือนี้มีส่วนประกอบต่างๆ ดังในภาพที่ 3.2 ด้านหน้าของกรงมีตู้สี่เหลี่ยมโครงทำด้วยสแตนเลสและมีแผ่นอะคริลิกใส เป็นส่วนประกอบ เพื่อให้สามารถมองเห็นภายในตู้เป็นการช่วยลดความเครียดของสัตว์ การยึดสัตว์กับตัวตู้นั้นจะมีผ้าใบสวมบริเวณลำคอเพื่อยึดส่วนหน้าของสัตว์ให้อยู่ภายในตู้จึงมีลักษณะคล้าย Hood ดังในภาพที่ 3.3 ด้านในตู้มีรางอาหาร และอ่างน้ำกินแบบอัตโนมัติ ดังในภาพที่ 3.4 ส่วนด้านท้ายของกรงเป็นบริเวณโล่งที่สัตว์สามารถยืน หรือนอนได้อย่างปกติ



ภาพที่ 3.2 ส่วนประกอบของ Ventilated hood-type respiration calorimeters (Suzuki *et al.*, 2008)



ภาพที่ 3.3 ส่วนของ Hood ที่อยู่ด้านหน้ากรง



ภาพที่ 3.4 การยึดส่วนของหัวสัตว์กับ Hood

หลักการทำงานของชุดเครื่องมือ Ventilated hood-type respiration calorimeters (ภาพที่ 3.2) เป็นแบบระบบเปิด (Open circuit system) คือ อากาศจากภายนอกสามารถไหลผ่านจากส่วนของ Hood เข้าสู่ภายในตู้ได้ทางเดียวโดยไม่มีการไหลย้อนกลับออกมาเนื่องจากถูกควบคุมอัตราการไหลด้วยปั๊มดูดอากาศ (Blower) ซึ่งถูกติดตั้งไว้ที่ปลายหางของระบบ ทำหน้าที่ดูดอากาศผ่านจากตู้ที่สัตว์อยู่เข้าสู่ท่ออากาศด้านบนและเข้าสู่ระบบท่ออากาศหลัก (Main tube) แล้วไปเป่าออกอีกช่องหนึ่งของ Blower ซึ่งมีอัตราการดูดอากาศได้ตั้งแต่ 100 - 700 ลิตรต่อ นาที ภายในระบบมีชุดวัดอัตราการไหลอากาศ (Flow meter) เมื่ออากาศไหลเข้าสู่ท่อหลักแล้วจะมีปั๊ม (Pump) ขนาดเล็กสำหรับดูดอากาศจากท่อหลักให้อากาศไหลผ่านเข้าเครื่องวัดก๊าซ (Gas analyzer) ได้แก่ Oxygen analyzer Carbon dioxide analyzer และ Methane analyzer โดยเครื่องวัดก๊าซแต่ละเครื่องจะมีปั๊มแยกเป็นรายเครื่อง ค่าที่วัดได้จากเครื่องวัดอัตราการไหลอากาศ และเครื่องวัดก๊าซนั้นเป็นสัญญาณกระแสไฟฟ้า (Analog) ซึ่งจะถูกส่งไปยังเครื่องรับและแปลงสัญญาณ (A/D converter) ให้เป็นตัวเลข (Digital) จากนั้นจึงส่งไปเก็บบันทึกด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปที่เครื่องคอมพิวเตอร์

ข้อควรระวัง

การตั้งอัตราการดูดอากาศของ Blower ต้องสัมพันธ์กับปริมาตรก๊าซมีเทน หรือก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่สัตว์หายใจออกมา ในการวัดปริมาตรก๊าซทุกครั้งจะทำการวัดปริมาตรก๊าซออกซิเจน คาร์บอนไดออกไซด์ และมีเทน เพื่อตรวจสอบสถานะที่เหมาะสมของสัตว์ภายในตู้ และชุดเครื่องมือควบคู่กันไป ดังนั้น ปริมาตรก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่สัตว์หายใจออกมาไม่ควรมีความเข้มข้นมากกว่า 1.00 เปอร์เซ็นต์ เพราะจะทำให้สัตว์หายใจไม่สะดวกต้องเพิ่มอัตราการไหลของอากาศ หรือหากมีค่าต่ำเกินไปจะต้องปรับให้มีอัตราการไหลที่ลดลง โดยการตรวจสอบหลังจากสัตว์กินอาหารไปแล้วประมาณ 1-2 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงที่อาหารจะมีเริ่มมีการเผาผลาญภายในร่างกาย อย่างไรก็ตามอัตราการไหลของอากาศควรมีค่าคงที่ตลอดทั้งวัน

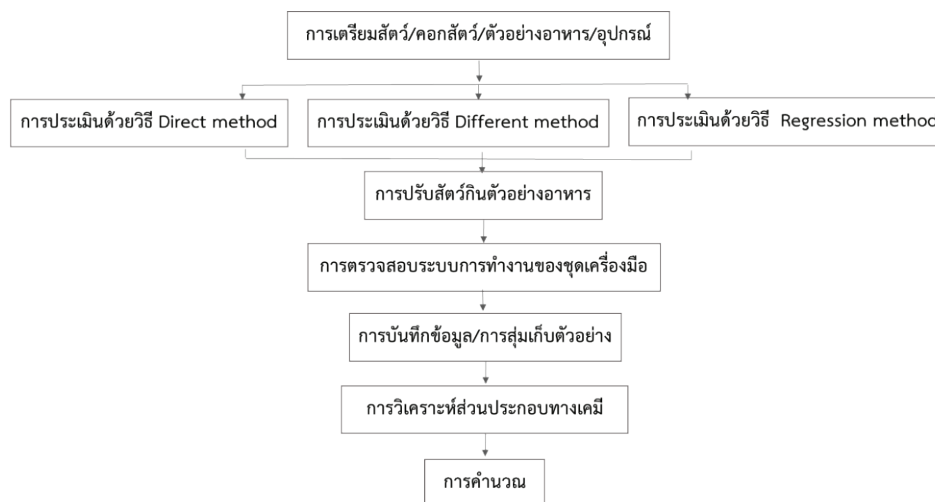
ข้อดี และข้อด้อย

ข้อดีของวิธีการนี้ เป็นการวัดค่าพลังงานในอาหารที่สัตว์กินเข้าไป และพลังงานที่สัตว์ขับถ่ายออกมาทางมูล ปัสสาวะ และก๊าซมีเทนโดยตรง ทำให้ได้ค่าพลังงานใช้ประโยชน์ได้ที่มีความถูกต้องและแม่นยำ เนื่องจากอาหารที่สัตว์กินนั้นจะผ่านกระบวนการย่อย ดูดซึม และกระบวนการเมตาบอลิซึมภายในตัวสัตว์โดยตรง

ข้อด้อยของวิธีการนี้ ใช้เครื่องมือที่มีความจำเพาะ นักวิจัยต้องมีความรู้ประสบการณ์อย่างสูงในการดำเนินงาน มีค่าใช้จ่ายสูง สิ้นเปลืองแรงงาน ใช้เวลานาน ใช้ตัวอย่างปริมาณมาก และได้ข้อมูลจำนวนน้อยในแต่ละรอบของการประเมิน

ขั้นตอนการดำเนินงาน

การประเมินค่าพลังงานใช้ประโยชน์ได้ของอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้องโดยเครื่อง Ventilated hood-type respiration calorimeters มีขั้นตอนการดำเนินงาน ดังในภาพที่ 3.5



ภาพที่ 3.5 ขั้นตอนการประเมินค่าพลังงานใช้ประโยชน์ได้ของอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้องโดยเครื่อง Ventilated hood-type respiration calorimeters

1. การเตรียมสัตว์ คอกสัตว์ ตัวอย่างอาหาร และอุปกรณ์

มีรายละเอียดการเตรียม ดังนี้

1.1 การเตรียมสัตว์

การเตรียมสัตว์ดำเนินการเช่นเดียวกับวิธีการประเมินค่าการย่อยได้โดยวิธี Total collection ซึ่งกล่าวมาแล้วใน บทที่ 2 เนื่องจากการวัดค่าพลังงานใช้ประโยชน์ได้โดยตรงจากตัวสัตว์ด้วยเครื่องวัดค่าการหายใจ จะดำเนินการควบคุมไปกับการประเมินค่าการย่อยได้ เพื่อเก็บข้อมูลปริมาณอาหารที่กิน ปริมาณสิ่งขับถ่าย ได้แก่ มูล ปัสสาวะ และปริมาณรูก๊าซมีเทนที่สัตว์ขับออกมาทางลมหายใจ

1.2 การเตรียมคอกสัตว์

คอกสัตว์มีลักษณะคล้ายกับคอกที่ใช้ในการประเมินค่าการย่อยได้ แต่จะมีการติดตั้งเครื่องมือ Ventilated hood-type respiration calorimeters สำหรับวัดปริมาตรก๊าซจากการหายใจของสัตว์ ตามวิธีการของ Suzuki *et al.* (2008) ดังแสดงในภาพที่ 3.6 และภาพที่ 3.7



ภาพที่ 3.6 คอกสัตว์ พร้อมตู้ และ Hood สำหรับวัดค่าการหายใจของสัตว์



ภาพที่ 3.7 เครื่องวัดก๊าซ Oxygen analyzer Carbon dioxide analyzer Methane analyzer และชุดควบคุมการไหลของอากาศ

1.3 การเตรียมตัวอย่างอาหาร

การเตรียมตัวอย่างอาหารดำเนินการเช่นเดียวกับใน บทที่ 2 โดยตัวอย่างอาหารที่ใช้ต้องอยู่ในสภาพที่เหมาะสมต่อการนำมาใช้เป็นอาหารสัตว์ ควรผลิตมาจากแหล่งเดียวกัน มีการจัดการที่เหมือนกัน มีลักษณะทางกายภาพที่เหมือนกัน มีองค์ประกอบทางเคมีที่สม่ำเสมอ และมีปริมาณที่เพียงพอต่อการทดลอง

1.4 การเตรียมอุปกรณ์

นอกเหนือจากชุดเครื่องมือสำหรับวัดปริมาตรการหายใจแล้ว อุปกรณ์อื่นๆ ดำเนินการเช่นเดียวกับวิธีการประเมินค่าการย่อยได้ ดังที่ได้กล่าวมาแล้วใน บทที่ 2

2. การประเมินค่าพลังงานใช้ประโยชน์ได้

การประเมินค่าพลังงานใช้ประโยชน์ได้ของอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้องโดยเครื่อง Ventilated hood-type respiration calorimeters ใช้วิธีการเดียวกับการประเมินค่าโภชนะที่ย่อยได้ (บทที่ 2) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดตัวอย่างอาหารว่าสัตว์สามารถกินเป็นอาหารเดียว หรือต้องกินร่วมกับตัวอย่างอาหารชนิดอื่น

3. การปรับสัตว์กินตัวอย่างอาหาร

แบ่งให้สัตว์กินตัวอย่างอาหาร 2 ช่วง คือช่วงปรับให้กิน 10 วัน และช่วงเก็บข้อมูล 6 วัน เช่นเดียวกับวิธีการประเมินค่าโภชนะที่ย่อยได้ใน บทที่ 2

4. การตรวจสอบระบบการทำงานของชุดเครื่องมือ

ก่อนการประเมินค่าพลังงานใช้ประโยชน์ได้ ต้องมีการตรวจสอบระบบการทำงานของชุดเครื่องมือ (Whole system check) ด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์บริสุทธิ์ (Recovery of carbon dioxide) เพื่อตรวจสอบการรั่วไหลของก๊าซทั้งระบบ ต้องมีค่า Recovery check ในช่วง 95 – 105 เปอร์เซ็นต์ (Suzuki *et al.*, 2008) มีวิธีการ ดังนี้

4.1 เปิดคอมพิวเตอร์เพื่อเปิดโปรแกรมสำเร็จรูป (GASMET พัฒนาโดย Dr. Tomoyuki Suzuki) สำหรับบันทึกข้อมูล ได้แก่ ปริมาตรก๊าซออกซิเจน ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ก๊าซมีเทน และอัตราการไหลของอากาศ

4.2 ทำการอุ่น (Warm) เครื่องมือทั้งระบบไม่น้อยกว่า 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นปรับสอบเทียบ (Calibrate) เครื่องวัดก๊าซทั้ง 3 ชนิด คือ Oxygen analyzer Carbon dioxide analyzer และ

Methane analyzer ด้วยก๊าซมาตรฐานแยกตามรายชนิดของก๊าซในระดับสูงสุด (Span gas) และ ระดับต่ำสุด (Zero gas) ต้องมีค่าที่ถูกต้องตามใบรับรองมาตรฐานกำกับที่ระบุไว้ข้างถึงก๊าซแต่ละถัง

4.3 ทำการตรวจสอบครั้งละ 1 ตู้ ปิดประตูตู้ที่ต้องการตรวจสอบ เปิดวาล์วท่ออากาศด้านบนของตู้และเปิดวาล์วท่ออากาศด้านบนของตู้ที่เหลือทั้งหมด จากนั้นเปิด Blower และปรับแรงดูดของ Blower ให้มีอัตราการไหลของอากาศใกล้เคียงกับขนาดของสัตว์ที่จะใช้ในการประเมิน

4.4 เปิดวาล์วควบคุมการไหลของอากาศ (Gas select controller) ในส่วนของอากาศจากภายนอก (Natural air) กับตู้ที่ต้องการทดสอบ และปิดนาฬิกาตั้งเวลา (Timer) ของตู้อื่นยกเว้นตู้ที่ต้องการทดสอบ

4.5 เริ่มบันทึกปริมาตรก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ รองนปริมาตรก๊าซภายในตู้ กับภายนอกมีค่าเท่ากัน โดยไม่ต้องหยุดการบันทึกปริมาตรก๊าซ

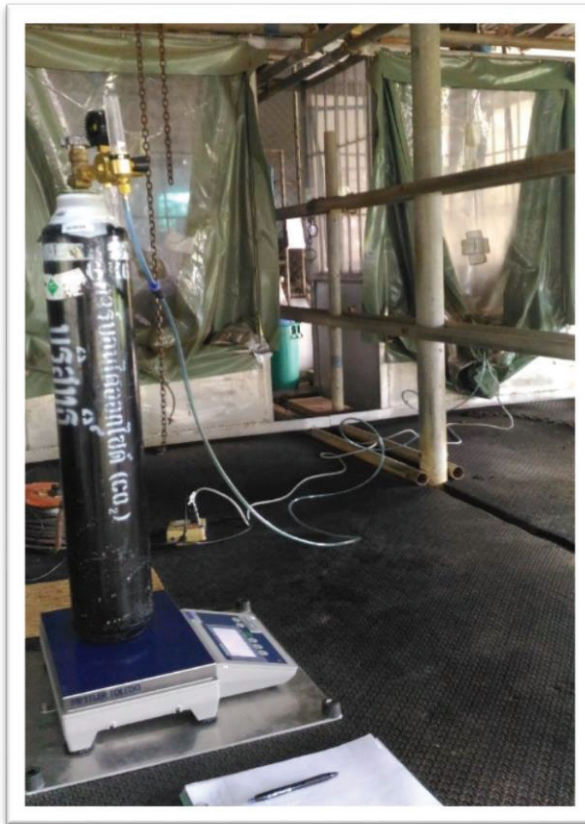
4.6 สอดปลายท่อก๊าซด้านหนึ่งผ่านช่อง Hood เข้าในตู้ที่ต้องการทดสอบ ดังในภาพที่ 3.8

4.7 ชั่งน้ำหนักถังบรรจุก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เพื่อบันทึกน้ำหนักก่อนเริ่มทำการทดสอบ

4.8 เสียบปลายท่อก๊าซอีกด้านหนึ่งเข้ากับถังก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เปิดวาล์วเพื่อปล่อยก๊าซเข้าตู้ปรับให้มีอัตราการไหล 200 กรัมต่อ 20 นาที หรือ 10 กรัมต่อ 1 นาที หรือ 5 กรัมต่อ 30 วินาที เมื่ออัตราการไหลคงที่ ปล่อยไว้ประมาณ 20 นาที บันทึกเวลาที่เริ่มปล่อยก๊าซ เมื่อครบ 20 นาที ปิดถังก๊าซ รองนไอน้ำที่เกาะบริเวณวาล์วแห้งให้ถอดสายยางออก ชั่งบันทึกน้ำหนักถังก๊าซเพื่อคำนวณน้ำหนักก๊าซที่ปล่อยเข้าตู้ไป

4.9 บันทึกปริมาตรก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ไปจนกว่าปริมาตรก๊าซภายในตู้จะมีค่าเท่ากับอากาศภายนอกตู้ แสดงว่าก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ภายในตู้ถูกดูดออกจนหมดแล้วหยุดการบันทึก

4.10 ทำการตรวจสอบตู้ลำดับถัดไปจนครบทั้ง 4 ตู้ และควรทำซ้ำในวันถัดไป เพื่อให้ได้ข้อมูลอย่างน้อย 2 ซ้ำ



ภาพที่ 3.8 การทำ Recovery check โดยใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

วิธีการคำนวณค่า Recovery

1. ปริมาตรก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ปล่อยเข้าไป (กรัม) = น้ำหนักถังก่อนทดสอบ (กรัม) – น้ำหนักถังก๊าซหลังทดสอบ (กรัม)

2. ปริมาตรก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เครื่องวัดได้จะมีหน่วยเป็นปริมาตร (ลิตร) ปรับปริมาตรก๊าซให้เป็นน้ำหนักกรัม โดยก๊าซในอุดมคติจำนวน 1 โมล ที่ STP (Standard temperature and pressure) มีปริมาตรเท่ากับ 22.4 ลูกบาศก์เมตร ดังนั้น ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) มีน้ำหนักโมเลกุล เท่ากับ 44.0095 กรัมต่อโมล ปรับให้เป็นลิตรด้วยการนำน้ำหนักโมเลกุลหารด้วย 22.4 จะ เท่ากับ 1.9647 กรัมต่อลิตร นำไปคูณกับปริมาตรก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่วัดได้เพื่อให้มีหน่วยเป็นกรัม นำไป คำนวณ ค่า Recovery ดังนี้

$$\text{Recovery (\%)} = \frac{(\text{น้ำหนักก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่วัดได้ (กรัม)} \times 100) / \text{น้ำหนักก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ปล่อยจากถัง (กรัม)}}{}$$

โดยค่า % Recovery ควรมีค่าในช่วง 95 – 105 เปอร์เซนต์ (Suzuki *et al.*, 2008)

ตัวอย่างการคำนวณ

เช่น ตรวจสอบเปอร์เซ็นต์ Recovery ของชุดเครื่องมือและตู้วัดค่าการหายใจ ลำดับที่ 1 ด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์บริสุทธิ์ (99.9%) ได้ค่าต่างๆ ดังในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ปริมาตรก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ปล่อยจากถัง ที่วัดได้จากระบบ และค่า Recovery

รายละเอียด	ข้อมูลก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์
น้ำหนักก๊าซ CO ₂ ที่ปล่อยเข้าสู่ (กรัม)	200
Carbon dioxide ที่เครื่องมือวัดได้ (ลิตร)	101.2346
Recovery (เปอร์เซ็นต์)	99.45

จากข้อมูลในตารางที่ 3.1 ปริมาตรก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เครื่องมือวัดได้มีหน่วยเป็นลิตร ปรับให้มีหน่วยเป็นกรัม โดยก๊าซในอุดมคติจำนวน 1 โมล ที่ STP มีปริมาตรเท่ากับ 22.4 ลูกบาศก์เมตร นำน้ำหนักโมเลกุลก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (44.0095 โมล)หารด้วย 22.4 มีค่าคงที่เท่ากับ 1.9647 ดังนั้น

น้ำหนักก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เครื่องมือวัดได้ = $101.2346 \times 1.9647 = 198.896$ กรัม

ค่า Recovery ของตู้ที่ 1 = $(198.896 \times 100) / 200 = 99.45$ เปอร์เซ็นต์

มีค่า Recovery อยู่ในช่วง 95–105 เปอร์เซ็นต์ ตามคำแนะนำของ Suzuki *et al.* (2008) แสดงว่าระบบของเครื่องมือใช้งานได้ปกติ และตู้วัดการหายใจ ลำดับที่ 1 ไม่มีการรั่วไหลของอากาศสามารถใช้ในการทดลองได้ตามปกติ

5. การบันทึกข้อมูล และการสุ่มเก็บตัวอย่าง

5.1 การบันทึกข้อมูล

ข้อมูลที่ต้องจดบันทึก นอกจากปริมาณตัวอย่างอาหารที่ให้กิน มูล ปัสสาวะ ภาชนะที่ใช้ในการเก็บมูลและปัสสาวะแล้ว ต้องบันทึกปริมาณก๊าซจากการหายใจของสัตว์ โดยสัตว์แต่ละตัวจะวัดปริมาณก๊าซจากการหายใจเป็นเวลา 3 วัน เพื่อให้ค่าก๊าซที่ได้มีความแปรปรวนน้อยที่สุด มีวิธีการ ดังนี้

วิธีการวัดปริมาตรก๊าซจากการหายใจ

1. เปิดคอมพิวเตอร์เพื่อเปิดโปรแกรม GASMET สำหรับบันทึกข้อมูล ได้แก่ ปริมาตรก๊าซจากเครื่องวัดก๊าซออกซิเจน ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ก๊าซมีเทน และอัตราการไหลของอากาศ
2. หลังจากอุ่นเครื่องมือทั้งระบบไม่น้อยกว่า 1 ชั่วโมง ปรับสอบเทียบเครื่องวัดก๊าซทั้ง 3 ชนิด และกดบันทึกข้อมูล เช่นเดียวกับการทำ Recovery check และจะทำการ Calibrate เครื่องวัดก๊าซทั้ง 3 ชนิด ทุกวันๆ ละ 1 ครั้ง ประมาณ 30 นาที ก่อนให้อาหารในมือเช้าของวันถัดไป
3. เปิดวาล์วท่ออากาศเหนือตู้ เฉพาะตู้ที่ต้องการวัด เนื่องจากชุดเครื่องมือที่ใช้ มีท่ออากาศหลักเพียง 2 ท่อ เท่านั้น ซึ่ง 1 ท่อหลักจะเชื่อมต่อกับตู้ที่ใช้วัด 2 ตู้ (ภาพที่ 3.2) ดังนั้น ในแต่ละวัน สามารถวัดอากาศได้เพียง 2 ท่อหลัก จึงวัดได้พร้อมกันครั้งละ 2 ตู้ต่อวัน
4. เปิดเครื่อง Flow meter
5. เปิดวาล์วบนตู้ที่จะวัด และเปิด Blower ปรับให้อัตราการไหลของอากาศใกล้เคียงกับน้ำหนักตัวของสัตว์ที่ใช้ในการประเมิน
6. หลังจากให้อาหารในมือเช้าแล้ว ปิดประตูตู้ แล้วจึงเปิดวาล์ว Gas select controller ของอากาศจากภายนอกตู้ และภายในตู้ที่วัดปริมาตรก๊าซจากการหายใจของสัตว์
7. บันทึกปริมาตรก๊าซตลอดเวลาของการวัด ข้อมูลที่บันทึกประกอบด้วยปริมาตรก๊าซที่อยู่นอกตู้ และก๊าซภายในตู้ ประกอบด้วยก๊าซออกซิเจนที่สัตว์หายใจเข้าไป ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และ ก๊าซมีเทนที่สัตว์ขับออกมากับลมหายใจ อัตราการไหลของอากาศ และจะหยุดการบันทึกในวันถัดไปก่อนให้อาหารมือเช้า
8. หลังจากสิ้นสุดการประเมิน ซึ่งจะเสร็จสิ้นพร้อมกับการประเมินค่าการย่อยได้ของโภชนะ ให้ดำเนินการตามลำดับ ดังนี้ หยุดการบันทึกปริมาตรก๊าซ (ข้อ 1.) ด้วยการปิดโปรแกรมการบันทึกที่คอมพิวเตอร์ ปิดวาล์ว Gas select controller (ข้อ 6.) ปิดเครื่อง Flow meter (ข้อ 4.) แต่ยังคงเปิดเครื่อง Blower (ข้อ 5.) เพื่อดูดไล่อากาศภายในท่อหลัก และกำจัดความชื้นที่เกิดจากกระบวนการหายใจของสัตว์ เป็นเวลาประมาณ 2 ชั่วโมง แล้วจึงปิดเครื่อง Blower

5.2 การสุ่มเก็บตัวอย่าง

สุ่มเก็บตัวอย่างอาหารที่ให้ อาหารเหลือ (ถ้ามี) มูล และปัสสาวะ ดำเนินการเช่นเดียวกับวิธีการประเมินค่าการย่อยได้ ในบทที่ 2

6. การวิเคราะห์ส่วนประกอบทางเคมี

เนื่องจากการประเมินควบคู่ไปกับการประเมินค่าการย่อยได้โดยวิธี Total collection (บทที่ 2) จึงมีการวิเคราะห์ส่วนประกอบทางเคมีเช่นเดียวกัน แต่มีเพิ่มเติมในส่วนของการวิเคราะห์หาค่าพลังงานในตัวอย่างปัสสาวะ ดังนี้

ซึ่งตัวอย่างปัสสาวะใส่ในถุงพลาสติกชนิดทนร้อนขนาดประมาณ 5 x 7 เซนติเมตร ที่ทราบน้ำหนักแล้ว ซึ่งตัวอย่างประมาณ 20 กรัม นำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หรือจนแห้ง นำตัวอย่างไปหาค่าพลังงาน GE ตามวิธีการของเครื่อง Automatic isoperibol calorimeter

7. การคำนวณค่าพลังงานใช้ประโยชน์ได้

7.1 ปริมาตรก๊าซมีเทนที่เกิดจากกระบวนการหมักในกระเพาะรูเมน คำนวณจากส่วนต่างของปริมาตรก๊าซภายในและภายนอกตู้ โดยก๊าซมีเทน 1 ลิตร มีน้ำหนัก 0.719 กรัม และมีพลังงานเท่ากับ 39.54 kJ หรือ 9.45 kcal (Brouwer, 1965)

7.2 ค่าพลังงานใช้ประโยชน์ได้ (Metabolizable energy; ME, Mcal/kgDM)

= (พลังงานในอาหารที่กิน - พลังงานในมูล - พลังงานในปัสสาวะ - พลังงานที่ขับออกในรูปของก๊าซมีเทน) / ปริมาณอาหารที่กิน

โดยที่พลังงาน มีหน่วย Mcal/kgDM และปริมาณอาหาร มีหน่วย กิโลกรัมน้ำหนักแห้ง

ตัวอย่างการคำนวณ

จากตัวอย่างการคำนวณเปลือกฝักข้าวโพดหวาน ตัวอย่าง บทที่ 2 (6.1) ได้ค่า DE เท่ากับ 2.73 Mcal/kgDM โคกินอาหารเฉลี่ย 5.49 กิโลกรัมแห้ง มีปริมาณปัสสาวะที่ขับถ่ายเฉลี่ย 12.28 กิโลกรัม และปัสสาวะมีค่าพลังงานเท่ากับ 54.21 kcal/kg และมีปริมาตรก๊าซมีเทนที่หายใจออกมาเฉลี่ยเท่ากับ 118.6 ลิตร เมื่อนำมาคำนวณหาค่า ME มีรายละเอียด ดังนี้

คำนวณค่าพลังงาน DE ของอาหารที่กิน = $2.73 \times 5.49 = 14.99$ Mcal

คำนวณค่าพลังงานของปัสสาวะ = $(12.28 \times 54.21) / 1000 = 0.67$ Mcal

คำนวณค่าพลังงานของก๊าซมีเทน = $(118.6 \times 9.45) / 1000 = 1.12$ Mcal

คำนวณค่าพลังงาน ME = $(14.99 - 0.67 - 1.12) / 5.49$

เปลือกฝักข้าวโพดหวานมีค่า ME = 2.40 Mcal/kgDM

บทที่ 4

การประเมินค่าการย่อยสลายของอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้องโดยวิธีการใช้ถุงในล่อน

การประเมินค่าการย่อยสลายโดยวิธีใช้ถุงในล่อน (*In situ* หรือ *In sacco* หรือ Nylon bag) เป็นวิธีทดลองในสัตว์ หรือกึ่งในสัตว์ (*Semi In vivo*) เนื่องจากต้องนำถุงตัวอย่างเข้าไปแช่ในกระเพาะรูเมนโดยไม่ผ่านการเคี้ยว หรือการย่อยในทางเดินอาหารส่วนต่างๆ ของสัตว์ วิธีการนี้มีการศึกษาครั้งแรกในปี ค.ศ. 1938 โดย Quin และทีมงาน ด้วยการนำตัวอย่างบรรจุในถุงทรงกระบอก (Cylindrical) ที่ทำจากเส้นไหมธรรมชาติ ไปแช่ในกระเพาะรูเมนของแกะ แต่ถุงมีขนาดรูพรุนที่ละเอียดเกินไปทำให้จุลินทรีย์บางชนิดไม่สามารถผ่านเข้าไปย่อยตัวอย่างได้ จึงได้มีการผลิตถุงที่ทำจากเส้นใยเทียม เช่น Dacron bag Nylon bag และ Rumen bag ขึ้นมาใช้แทน (Ørskov *et al.*, 1980; Ørskov, 2000)

หลักการ

วิธีใช้ถุงในล่อนมีหลักการ คือ นำตัวอย่างอาหารสัตว์ที่ทราบน้ำหนักบรรจุในถุงในล่อนที่มีขนาดรูพรุน 35 - 50 ไมครอน นำไปแช่ไว้ในกระเพาะรูเมนของสัตว์ที่ทำการผ่าตัดฝังท่อแบบถาวรที่บริเวณกระเพาะรูเมน (Rumen cannula) เพื่อให้จุลินทรีย์เข้าย่อยสลายตัวอย่างที่อยู่ในถุงในล่อน หลังจากแช่ไว้ตามเวลาที่กำหนด นำถุงในล่อนออกจากกระเพาะ รูเมนล้างเศษอาหารที่ติดอยู่ภายนอกถุงด้วยน้ำเปล่าจนสะอาด นำถุงในล่อนไปอบแห้งเพื่อชั่งน้ำหนัก ส่วนที่หายไปคือส่วนของอาหารที่ถูกย่อยสลาย (Dry matter degradability, DMD)

การประเมินโดยวิธีการใช้ถุงในล่อนแช่ในกระเพาะรูเมน แบ่ง เป็น 2 กรณี ดังนี้

กรณีที่ 1 ประเมินค่าการย่อยสลายของโภชนะที่เวลาเดียว สำหรับใช้ประเมินการย่อยสลายของอาหารหลายๆ ชนิด ที่เวลาเดียวกันมักนิยมใช้ในการเปรียบเทียบเบื้องต้นสำหรับคัดเลือกตัวอย่างเพื่อนำไปใช้ศึกษาต่อไป เช่น การคัดเลือกตัวอย่างอาหารเพื่อนำไปทดสอบการเลี้ยงสัตว์เคี้ยวเอื้อง หรือนำไปประเมินค่าการย่อยได้โดยวัดจากตัวสัตว์โดยตรง หรือใช้ในการคัดเลือกพันธุ์พืชอาหารสัตว์ เป็นต้น โดยทั่วไปถ้าเป็นตัวอย่างพืชอาหารสัตว์จะใช้เวลาในการแช่ 48 ชั่วโมง ทั้งนี้สามารถแช่ตามคุณภาพของตัวอย่างอาหารได้ดังนี้ อาหารหยาบคุณภาพต่ำใช้เวลา 48 - 72 ชั่วโมง อาหารหยาบคุณภาพดีใช้เวลา 24 - 60 ชั่วโมง และอาหารข้นใช้เวลา 12 - 36 ชั่วโมง ในคู่มือฉบับนี้แนะนำให้เวลาการแช่หากเป็นการประเมินค่าการย่อยสลายของตัวอย่างพืชอาหารสัตว์คุณภาพดีถึงปานกลางจะใช้เวลา 48 ชั่วโมง เพื่อให้สอดคล้องกับระยะเวลาของ

อาหารหยาบคุณภาพดีถึงปานกลางมักจะถูกหมักย่อยในกระเพาะรูเมนประมาณ 48 ชั่วโมง (Ørskov *et al.*, 1980)

กรณีที่ 2 ประเมินค่าการย่อยสลายของโภชนาที่ชั่วโมงต่างๆ (Degradation at time) มักใช้ในการศึกษาอัตราการย่อยสลายของโปรตีนภายในกระเพาะรูเมน และค่าการย่อยสลายของผนังเซลล์ที่เวลาต่างๆ (Stern *et al.*, 1997; Oba and Allen, 1999; Hoffman *et al.*, 2001; Ørskov, 2000; NRC, 2001)

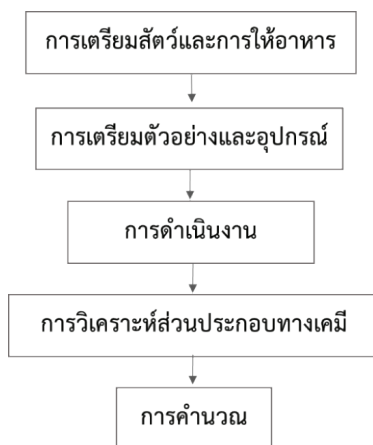
ข้อดี และข้อด้อย

ข้อดี ค่าที่ได้จากวิธีการใช้ฝูงในล่อนสามารถทำนายค่าการย่อยได้โดยวิธีวัดโดยตรงจากตัวสัตว์ได้อย่างแม่นยำเพราะอาหารถูกย่อยสลายภายในกระเพาะสัตว์โดยตรง (Kitessa *et al.*, 1999) จึงมักใช้ในการคัดกรองเพื่อประเมินค่าการย่อยได้ของอาหารสัตว์ในเบื้องต้น หรือใช้ในการคัดเลือกพันธุ์พืชอาหารสัตว์ที่ต้องการปรับปรุงให้ได้ค่าการย่อยได้สูงในเบื้องต้น เนื่องจากใช้ตัวอย่างเพียงเล็กน้อย และสามารถทำได้หลายซ้ำและทำการทดสอบได้บ่อยครั้ง (Susmel and Filacorda, 1996; Foster *et al.*, 2023)

ข้อด้อย ต้องมีสัตว์ผ่าตัดฝังท่อบริเวณกระเพาะรูเมน (เกี่ยวข้องกับการขอใช้สัตว์เพื่อนงานทางวิทยาศาสตร์) สำหรับใช้แช่ตัวอย่างที่ต้องการประเมิน การหลั่งร่วของตัวอย่างออกมานอกฝูงซึ่งไม่สามารถยืนยันได้ว่าส่วนของอาหารที่หลั่งร่วออกมานั้นจะสามารถถูกย่อยสลายได้หรือไม่ (Kitessa *et al.*, 1999) ตัวอย่างที่มีสารยับยั้งการใช้ได้ของโภชนา (Antinutritional factors) เมื่อประเมินด้วยวิธีนี้อาจไม่ส่งผลต่อการใช้ประโยชน์ของสารอาหารแต่อย่างใด เนื่องจากใช้ตัวอย่างในปริมาณน้อยสารเหล่านั้นจึงไม่ส่งผลแต่อย่างใด และตัวอย่างอาหารบางชนิด เช่น กากน้ำตาล วัตถุดิบที่ละลายได้ง่าย หรือที่มีขนาดชิ้นเล็กกว่าขนาดรูพุนไม่เหมาะต่อการประเมินด้วยวิธีนี้ (Ørskov *et al.*, 1980) นอกจากนี้พบว่าวิธีการนี้ไม่มีวิธีที่เป็นมาตรฐานมีเพียงคำแนะนำ และข้อระวังในแต่ละขั้นตอน (Stern *et al.*, 1997; Kitessa *et al.*, 1999; Ørskov, 2000)

ขั้นตอนการดำเนินงาน

การประเมินค่าการย่อยสลายของอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้องโดยวิธีการใช้ฝูงในล่อน มีขั้นตอนการดำเนินงานดังในภาพที่ 4.1



ภาพที่ 4.1 ขั้นตอนการประเมินค่าการย่อยสลายของอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้องโดยวิธีการใช้ถุงไนลอน

1. การเตรียมสัตว์และการให้อาหาร

สัตว์ที่ใช้สำหรับวิธีการใช้ถุงไนลอน ต้องมีการผ่าตัดฝังท่อถาวรบริเวณกระเพาะรูเมนแล้ว การประเมินค่าการย่อยสลายของโภชนะใช้สัตว์อย่างน้อย 2 ตัว แต่ถ้าต้องการประเมินอัตราการย่อยสลายของโภชนะต้องใช้สัตว์อย่างน้อย 3 ตัว เพื่อลดความแปรปรวนของการย่อยสลายที่เกิดจากตัวสัตว์เอง (Susmel and Filacorda, 1996; Ørskov, 2000; Ali *et al.*, 2016) ชนิดของสัตว์ที่ใช้ในการแช่ถุงไนลอน ไม่ว่าจะเป็นแพะ แกะ หรือ โค พบว่าให้ผลการประเมินที่ไม่แตกต่างกัน แต่สัตว์ที่มีขนาดกระเพาะรูเมนเล็กจะใช้ถุงไนลอนที่มีขนาดเล็กและใส่จำนวนถุงได้น้อย จากประสบการณ์ที่ได้เคยปฏิบัติมาหากสัตว์ทดลองเป็นโคที่มีน้ำหนักตัวตั้งแต่ 400 กิโลกรัมขึ้นไปสามารถใส่ถุงไนลอนขนาด 8 x 20 เซนติเมตร ได้จำนวนไม่เกิน 50 ถุงต่อตัว

อาหารที่ใช้เลี้ยงสัตว์ทดลอง ควรมีปริมาณโปรตีน 9 - 10 เปอร์เซ็นต์ และความเป็นกรด-ด่าง ภายในกระเพาะรูเมนต้องไม่น้อยกว่า 6.0 และอาหารควรมีสัดส่วนของอาหารหยาบเท่ากับ 60 - 70 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณโภชนะที่เพียงพอต่อการดำรงชีพของตัวสัตว์ และให้กินอาหารในระดับใกล้เคียงกับการดำรงชีพ เพื่อควบคุมความสมดุลของประชากรของจุลินทรีย์ให้มีปริมาณคงที่ แบ่งการให้อาหารไม่น้อยกว่า 2 มื้อๆ ละเท่าๆ กัน โดยให้อาหารมื้อเช้าและมื้อบ่ายห่างกันประมาณ 8 ชั่วโมง ทำการปรับให้อาหารสัตว์ก่อนการทดลองไม่น้อยกว่า 10 วัน (Susmel and Filacorda, 1996; Vanzant *et al.*, 1998; Lopez, 2005)

2. การเตรียมตัวอย่างและอุปกรณ์

2.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการประเมินค่าการย่อยสลาย ต้องมีปริมาณที่มากพอต่อการนำมาใช้ในการประเมิน ให้แบ่งตัวอย่างออกเป็น 2 ส่วน ส่วนที่ 1 ประมาณ 500 กรัม บดให้มีขนาดชิ้น 1 มิลลิเมตร สำหรับนำไปวิเคราะห์ส่วนประกอบทางเคมี และตัวอย่าง ส่วนที่ 2 บดให้มีขนาดชิ้น 2 มิลลิเมตร เพื่อใช้ในการประเมินค่าการย่อยสลาย ส่วนตัวอย่างประเภทวัตถุดิบอาหารชั้นที่มีขนาดชิ้นเล็กกว่า 2 มิลลิเมตร ไม่จำเป็นต้องบดสามารถนำไปใช้ได้เลย

2.2 ถังไนลอนที่มีขนาดรูพรุน 30 - 50 ไมครอน มีขนาดของถัง (กว้าง x ยาว) 8 x 20 เซนติเมตร ก้นถังเป็นทรงมนไม่มีมุม มีหมายเลขกำกับที่ถังอย่างชัดเจน

2.3 เครื่องชั่งทศนิยมไม่น้อยกว่า 2 ตำแหน่ง

2.4 ตู้อบ (Hot air oven)

2.5 อ่างน้ำอุ่น (Water bath)

2.6 เครื่องซักผ้าแบบ 2 ถัง (ถังซัก และถังปั่นแห้ง)

2.7 ถูตาข่ายตาห่างทำจากไนลอนหรือถุงสำหรับใช้ซักผ้า มีขนาด (กว้าง x ยาว) ประมาณ 25 x 40 เซนติเมตร ก้นถังเป็นทรงมน

2.8 หนังยาง (Rubber band)

2.9 น้ำยาล้างจาน

3. การดำเนินงาน

3.1 กรณีที่ 1 หาค่าการย่อยสลายของโภชนะที่เวลา 48 ชั่วโมง

3.1.1 ก่อนทดลองนำถังไนลอนมาซักทำความสะอาดด้วยน้ำยาล้างจาน ซักล้างให้สะอาดนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ประมาณ 1 - 2 ชั่วโมง หรือจนแห้งสนิท

3.1.2 นำถังไนลอนออกจากตู้อบ (ไม่ต้องใส่ในโถดูดความชื้น) ปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้องประมาณ 2 ชั่วโมง หรือจนน้ำหนักคงที่ ชั่งถังไนลอนพร้อมบันทึกน้ำหนัก (W_1) และหมายเลขถัง

3.1.3 ชั่งตัวอย่างประมาณ 2-3 กรัม (W_2) (อาหารหยาบชั่ง 2 กรัม อาหารชั้นชั่ง 3 กรัม) ใส่ลงในถังไนลอน ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ (2 ถัง) ต่อสัตว์ 1 ตัว หากต้องการนำเศษเหลือของอาหารไปวิเคราะห์หาค่าโภชนะอื่นๆ เช่น โปรตีน ผนังเซลล์ จำเป็นต้องเพิ่มจำนวนซ้ำ หรืออาจเพิ่มจำนวนครั้งของการทดลอง เพื่อให้ได้จำนวนตัวอย่างที่เพียงพอต่อการนำไปวิเคราะห์

3.1.4 มัดปากถุงในลอนที่มีตัวอย่างด้วยหนึ่งยาง

3.1.5 นำถุงในลอน ข้อ 3.1.3. ของสัตว์แต่ละตัว แยกใส่ในถุงตาข่าย และจำนวนถุงในลอนไม่ควรเกิน 50 ถุงต่อโค 1 ตัว

3.1.6 นำถุงตาข่ายไปแช่ในกระเพาะรูเมนเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3.1.7 หลังครบ 48 ชั่วโมง นำถุงตาข่ายออกจากกระเพาะรูเมนแล้วนำไปล้างเศษอาหารที่ติดอยู่ภายนอกถุงด้วยน้ำเปล่า จากนั้นนำถุงในลอนออกจากถุงตาข่ายใส่รวมกันในภาชนะ เพื่อล้างเศษอาหารที่ติดภายนอกถุงอีกครั้ง ขั้นตอนนี้ให้รับนำมาซักล้างทันทีด้วยน้ำเปล่าเพื่อลดเวลาการย่อยสลายต่อของจุลินทรีย์

3.1.8 นำถุงในลอนทั้งหมดใส่เครื่องซักผ้าเพื่อปั่นแห้ง 1 นาฬิกา จากนั้นนำไปใส่ในถังซักเปิดน้ำทิ้งไว้ตลอดเวลาขณะซักเพื่อให้น้ำไหลผ่าน ปั่นซักล้างในโหมดที่เบาสุดเป็นเวลา 3 นาฬิกา แล้วนำไปปั่นแห้ง 1 นาฬิกา ทำการซักถุงในลอนซ้ำจำนวน 3 รอบ

3.1.9 นำถุงในลอนที่ปั่นแห้งครั้งสุดท้ายเข้าอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำออกมาแกะหนึ่งยางออกและปิดเศษตัวอย่างที่ติดบริเวณปากถุงด้านนอกออกให้หมด แล้วนำไปอบต่ออีก 24 ชั่วโมง หรือจนแห้ง

3.1.10 นำถุงในลอนออกจากตู้อบ โดยไม่ใส่ในโถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาไม่น้อยกว่า 4 ชั่วโมง หรือทิ้งไว้ข้ามคืน (Overnight) แล้วจึงชั่งถุงในลอนพร้อมบันทึกน้ำหนัก (W_3) และหมายเลขถุง

3.1.11 แยกเก็บกากอาหารของตัวอย่างแต่ละชนิดโดยนำกากที่เหลือจากสัตว์แต่ละตัวมารวมกัน เพื่อนำไปวิเคราะห์หาค่าโภชนะที่ต้องการ

3.2 กรณีที่ 2 หาค่าการย่อยสลายของโภชนะที่เวลาต่างๆ

3.2.1 ดำเนินการเช่นเดียวกับวิธีการในข้อ 3.1.1 ถึง 3.1.5

3.2.2 เวลาสำหรับการแช่ถุงในลอนขึ้นอยู่กับชนิดของตัวอย่าง โดยทั่วไปกำหนด ดังนี้

- อาหารชั้น ประเมินค่าการย่อยสลายที่ 0 3 6 12 และ 24 ชั่วโมง
- อาหารหยาบคุณภาพดี ประเมินค่าการย่อยสลายที่ 0 6 12 24 และ 48 ชั่วโมง
- อาหารหยาบคุณภาพต่ำ ประเมินค่าการย่อยสลายที่ 0 6 12 24 48 และ 72

ชั่วโมง

โดยที่ 0 ชั่วโมง คือ ส่วนที่ละลายได้ทันทีก่อนที่จะถูกย่อยสลายด้วยจุลินทรีย์ (Washing loss) โดยนำถุงในลอนที่มีตัวอย่างแช่ในน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส นาน

30 นาที แล้วนำมาชั่งล้างพร้อมตัวอย่าง นำไปบดเช่นเดียวกับตัวอย่าง ดังนั้น การหาค่า 0 ชั่วโมง จะทำในวันสุดท้ายที่นำถุงในล่อนออกจากกระเพาะรูเมน

3.2.3 นำถุงในล่อนไปทยอยแช่ในกระเพาะรูเมนตามเวลา (1.2.2) เพื่อให้ได้ออกมาล้างพร้อมกัน ดังนั้น ถุงที่นำเข้าครั้งแรกจะเป็นเวลานานที่สุดก่อน จากนั้น จะทยอยใส่ไปจนครบ เช่น หากต้องการศึกษาที่เวลา 6 12 24 48 และ 72 ชั่วโมง จะนำถุงในล่อนที่ 72 ชั่วโมง ใส่ในถุงตาข่ายเข้าไปแช่ในกระเพาะก่อน จากประสบการณ์ที่เคยปฏิบัติจะเริ่มแช่ในช่วงเย็นที่เวลาประมาณ 17.00 น. เพื่อให้ชั่วโมงการแช่ในรอบเช้าประมาณ 05.00 น. และวันสุดท้ายที่นำถุงตัวอย่างออกสามารถล้างและนำเข้าบดได้โดยไม่ต้องเก็บแช่เย็น หลังจากนั้นทยอยหย่อนตัวอย่างที่เวลา 48 24 12 ชั่วโมง ใส่ในถุงตาข่ายเดิม และหย่อนตัวอย่างที่เวลา 6 ชั่วโมง ใส่ในถุงตาข่ายใบใหม่เพื่อไม่ให้กระทบการย่อยของตัวอย่างที่แช่ไว้ก่อนหน้านี้

3.2.4 เมื่อแช่ไว้ครบตามเวลาที่กำหนดสุดท้าย เช่น ที่ 72 ชั่วโมง นำถุงตาข่ายที่มีถุงในล่อนทั้งหมดออกจากกระเพาะรูเมน กับถุงในล่อนที่ 0 ชั่วโมง ทำการชั่งล้าง และดำเนินการเช่นเดียวกับวิธีการในข้อ 3.1.7 ถึง 3.1.11

4. การวิเคราะห์ส่วนประกอบทางเคมี

ข้อมูลส่วนประกอบทางเคมีของตัวอย่าง เป็นข้อมูลเบื้องต้นที่ควรต้องแสดงไว้ ได้แก่ ความชื้น ไขมัน เถ้า โปรตีน ส่วนประกอบของเยื่อใย ดังมีวิธีการวิเคราะห์ตามมาตรฐาน ดังได้กล่าวมาแล้วใน บทที่ 2

5. การคำนวณ

5.1 กรณีที่ 1 หาค่าการย่อยสลายของโภชนะที่เวลา 48 ชั่วโมง

- ค่าการย่อยสลายของวัตถุแห้ง (Dry matter degradability, DMD)

$$DMD (\%) = \{(W_2 - (W_3 - W_1) \times 100\} / W_2$$

W_1 คือ น้ำหนักถุงในล่อน (กรัม)

W_2 คือ น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น (กรัม)

W_3 คือ น้ำหนักถุงในล่อนรวมตัวอย่างหลังย่อย (กรัม)

- ค่าการย่อยสลายของโภชนะโปรตีน (Rumen degradable protein, RDP)

$$RDP (\%) = \{(\text{โปรตีนในอาหารก่อนย่อย} - \text{โปรตีนในอาหารหลังย่อย}) \times 100\} / \text{โปรตีนในอาหารก่อนย่อย}$$

- ค่าผนังเซลล์ที่ย่อยสลายได้ (Neutral detergent fiber degradability, NDFD)

$$\text{NDFD (\%)} = \{(\text{ผนังเซลล์ในอาหารก่อนย่อย} - \text{ผนังเซลล์ในอาหารหลังย่อย}) \times 100\} / \text{ผนังเซลล์ในอาหารก่อนย่อย}$$

ตัวอย่างการคำนวณ

ตัวอย่างการศึกษาค่าการย่อยสลายของวัตถุแห้ง โปรตีน และ NDF ของหญ้าแพงโกลาที่ 48 ชั่วโมง มีค่าส่วนประกอบทางเคมี ดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ส่วนประกอบทางเคมีของหญ้าแพงโกลา

	DM	CP	EE	Ash	NDF	ADF	ADL
	<----- %DM ----->						
หญ้าแพงโกลาก่อนย่อย	89.30	6.96	1.80	8.90	65.73	37.82	4.12
หญ้าแพงโกลาหลังย่อย	90.56	7.14	NA	NA	50.00	NA	NA

NA (Not analysis) ไม่ได้วิเคราะห์

ข้อมูลน้ำหนักตัวอย่างหญ้าแพงโกลาก่อนและหลังการย่อยสลายที่ 48 ชั่วโมง เมื่อนำมาคำนวณร่วมกับข้อมูลส่วนประกอบทางเคมี (ตารางที่ 4.1) ได้ค่าการย่อยสลายของวัตถุแห้ง โปรตีน และ NDF ดังในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ข้อมูลหญ้าแพงโกลาก่อนและหลังการย่อยสลายที่ 48 ชั่วโมง

รายละเอียด	ข้อมูล
น้ำหนักถุงในลอน (W ₁), กรัม	2.1953
น้ำหนักตัวอย่าง (W ₂), กรัม	3.0154
น้ำหนักตัวอย่างรวมถุงหลังย่อย (W ₃), กรัม	2.8051
ค่า DMD, เปอร์เซ็นต์	77.35
ค่า RDP เปอร์เซ็นต์	76.79
ค่า NDFD เปอร์เซ็นต์	82.77

มีรายละเอียดการคำนวณค่า DMD (%) ดังนี้

- ปรับน้ำหนักตัวอย่าง (W₂) ก่อนการย่อยให้เป็นน้ำหนักแห้ง ดังนี้

$$= \text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนย่อย (กรัม)} \times \text{DM} / 100$$

$$= 3.0154 \times 89.30 / 100 = 2.6928 \text{ กรัมแห้ง}$$

$$\text{- น้ำหนักตัวอย่างหลังย่อย (กรัม)} = \text{น้ำหนักตัวอย่างรวมถุง (W}_3\text{)} - \text{น้ำหนักถุงในลอน (W}_1\text{)}$$

$$= 2.8051 - 2.1953 = 0.6098 \text{ กรัม}$$

$$\text{DMD (\%)} = \{(2.6928 - 0.6098) \times 100\} / 2.6928$$

$$= 77.35 \text{ เปอร์เซ็นต์}$$

รายละเอียดการคำนวณค่า RDP ดังนี้

$$\text{RDP (\%)} = \{(\text{โปรตีนในอาหารก่อนย่อย} - \text{โปรตีนในอาหารหลังย่อย}) \times 100\} /$$

$$\text{โปรตีนในอาหารก่อนย่อย}$$

$$= \{(2.6928 \times 6.96 / 100) - (0.6098 \times 7.14 / 100)\} \times 100 /$$

$$(2.6928 \times 6.96 / 100)$$

$$= 76.79 \text{ เปอร์เซ็นต์}$$

รายละเอียดการคำนวณค่า NDFD ดังนี้

$$\text{NDFD (\%)} = \{(\text{ผนังเซลล์ในอาหารก่อนย่อย} - \text{ผนังเซลล์ในอาหารหลังย่อย}) \times 100\}$$

$$/ \text{ผนังเซลล์ในอาหารก่อนย่อย}$$

$$= \{(2.6928 \times 65.73 / 100) - (0.6098 \times 50.00 / 100)\} \times 100$$

$$/ (2.6928 \times 65.73 / 100) = 82.77 \text{ เปอร์เซ็นต์}$$

5.2 กรณีที่ 2 หาค่าการย่อยสลายของโภชนะ ที่แต่ละชั่วโมง

นำค่าการย่อยสลายของโภชนะที่ชั่วโมงต่างๆ ไปคำนวณด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Neway (Chen, n.d.) หรือ โปรแกรมสถิติในการทดสอบคำนวณค่าการย่อยสลายตามรูปแบบของสมการ Exponential (Ørskov and McDonald, 1979) ดังนี้

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

P คือ ค่าโภชนะที่ย่อยสลายไปที่เวลา t (Degradation at time t)

a คือ ส่วนที่ละลายได้ (Immediately soluble material)

b คือ ส่วนที่ไม่ละลายแต่สามารถหมักย่อยได้ (Insoluble fermentable material)

c คือ อัตราการย่อยสลาย (Degradation rate) ของ b

e คือ log ฐาน 10

คำนวณค่า Effective degradability (ED) ดังนี้

$$ED = a + \{bc/(c + k)\}$$

ค่า k คือ อัตราการไหลผ่านของโภชนะ (Fractional outflow rate) ขึ้นอยู่กับระดับการกินอาหารของสัตว์ ถ้าสัตว์กินอาหารหยาบร่วมกับอาหารข้น และกินในระดับดำรงชีพ ค่า k ควรเท่ากับ 0.046 ต่อชั่วโมง (วิศิษฐ์พร, 2541)

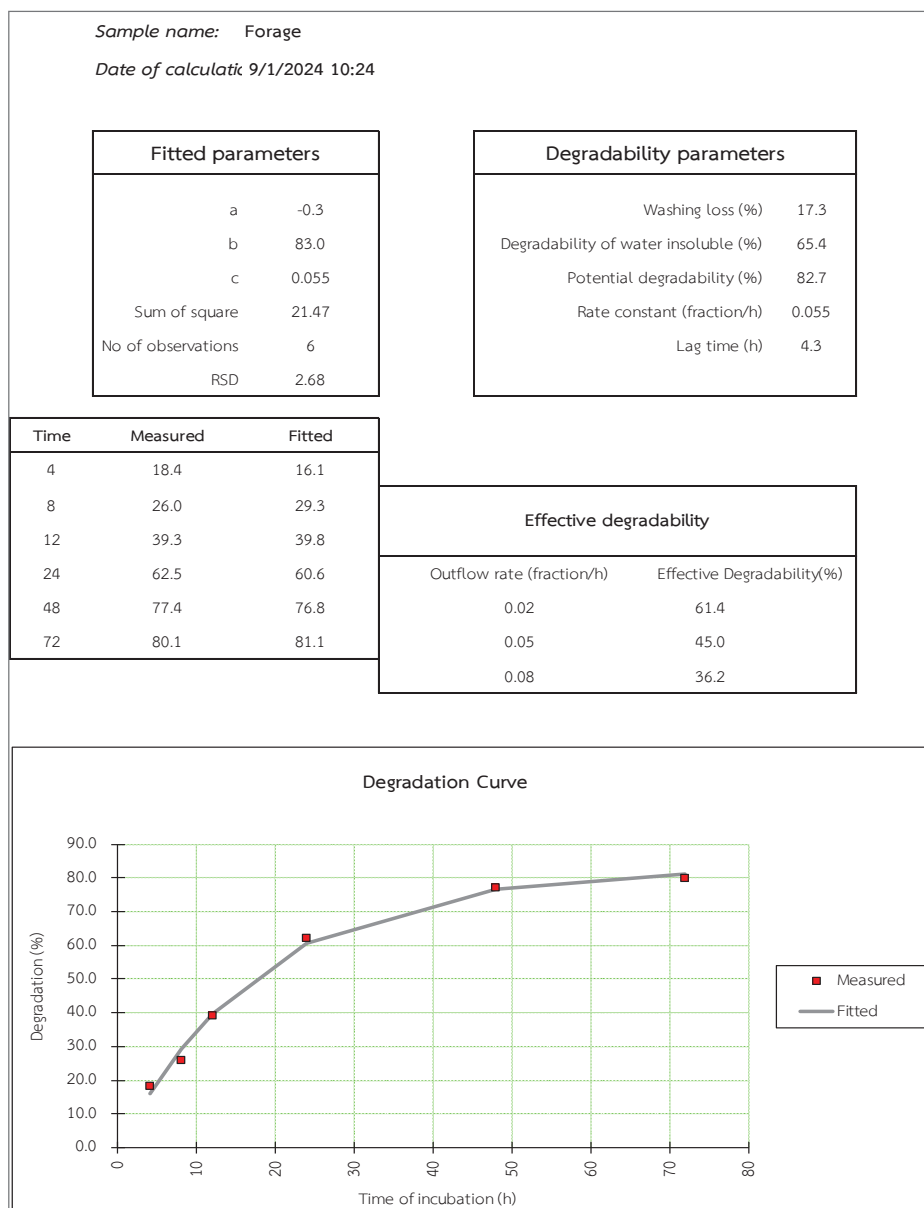
ตัวอย่างการคำนวณ

ตัวอย่างการหาอัตราการย่อยสลายของวัตถุแห้งของหญ้าแพงโกลา ที่แช่ลงในน้ำในกระเพาะรูเมนของโคจำนวน 3 ตัว ที่เวลา 4 8 12 24 48 และ 72 ชั่วโมง และค่า Washing loss (0 ชั่วโมง) จำนวน 1 ซ้ำ มีข้อมูลดังในตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ค่าวัตถุแห้งที่ไม่ถูกย่อยสลายและที่ถูกย่อยสลายของหญ้าแพงโกลา ที่ชั่วโมงต่างๆ

Bag No.	Cattle No.	ชั่วโมง	Initial wt. of Sample	Final wt. of Sample	Undegrade	Degrade
		ที่	g DM	g DM	%	%
1	1	4	2.68	2.15	80.26	19.74
2		8	2.68	2.04	75.89	24.11
3		12	2.69	1.45	54.05	45.95
4		24	2.69	1.22	45.35	54.65
5		48	2.69	0.60	22.36	77.64
6		72	2.69	0.51	19.04	80.96
7	2	4	2.69	2.24	83.21	16.79
8		8	2.68	2.02	75.14	24.86
9		12	2.73	1.81	66.30	33.70
10		24	2.69	0.90	33.40	66.60
11		48	2.68	0.58	21.52	78.48
12		72	2.70	0.54	19.88	80.12
13	3	4	2.69	2.18	81.19	18.81
14		8	2.72	1.93	71.06	28.94
15		12	2.69	1.66	61.64	38.36
16		24	2.68	0.91	33.89	66.11
17		48	2.71	0.65	24.05	75.95
18		72	2.70	0.56	20.65	79.35
Washing loss		0	2.68	2.22	82.72	17.28

เมื่อนำข้อมูลจากตารางที่ 4.3 ไปคำนวณโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Neway ดังในภาพที่ 4.2 พบว่า มีค่า P เท่ากับ 82.7 เปอร์เซ็นต์ ค่า a เท่ากับ - 0.3 เปอร์เซ็นต์ ค่า b เท่ากับ 83.0 เปอร์เซ็นต์ ค่า c เท่ากับ 0.055 ต่อชั่วโมง และ ค่า ED กรณีของหญ้าแพงโกลา ดูอัตราการย่อยต่อชั่วโมงที่ 0.05 มีค่าการย่อยสลายเท่ากับ 45 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 4.2 ข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Neway (Chen, n.d.)

บทที่ 5

การประเมินค่าโภชนะที่ย่อยได้ของอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้องโดยเครื่อง Daisy¹

จากการที่วิธีประเมินค่าการย่อยได้ของโภชนะด้วยวิธี *In vivo* มีค่าใช้จ่ายสูง ต้องเตรียมอาหารในปริมาณมาก ใช้จำนวนแรงงานมาก และใช้เวลานาน จึงได้มีการพัฒนาการประเมินค่าการย่อยได้ของโภชนะด้วยวิธีทางห้องปฏิบัติการ (*In vitro*) เพื่อช่วยให้ประหยัดเวลา แรงงาน และค่าใช้จ่ายที่ลดลง แม้วิธี *In vitro* จะให้ค่าที่ไม่เท่ากับวิธี *In vivo* ก็ตามแต่เป็นวิธีที่ใช้ประเมินคุณภาพอาหารได้รวดเร็วจึงเหมาะกับการนำมาใช้ในการคัดเลือกเบื้องต้น (Screening test) ก่อนที่จะนำไปทดสอบกับสัตว์ด้วยวิธี *In vivo* ต่อไป การทดสอบค่าการย่อยได้ด้วยวิธี *In vitro* เริ่มมีขึ้นในปี 1963 โดย Tilley and Terry เรียกว่า วิธีการ 2 ขั้นตอน (Two stages method) หรือวิธี Tilley and Terry ด้วยการนำตัวอย่างใส่ในหลอดทดลองแล้วย่อยด้วยของเหลวจากกระเพาะรูเมนในขั้นตอนแรก และขั้นตอนที่สองย่อยด้วยเอนไซม์เพปซิน (Pepsin) แทนการวัดด้วยวิธี *In vivo* ซึ่งมีความยุ่งยาก ซับซ้อนน้อยกว่า สามารถควบคุมปัจจัยต่างๆ ได้ง่าย สะดวก รวดเร็ว ใช้ตัวอย่างในปริมาณน้อย สามารถทำได้ครั้งละหลายตัวอย่างและทำได้บ่อยครั้ง แต่ต่อมามีนักวิจัยหลายท่านให้ข้อเสนอว่าวิธีการนี้มีความแม่นยำสำหรับตัวอย่างหญ้าสดเท่านั้น ไม่เหมาะสำหรับหญ้าหมักหรือฟาง จึงได้ปรับปรุงวิธี Two stages ในปี 1970 โดย Goering and Van Soest โดยเปลี่ยนขั้นตอนจากการย่อยด้วยเอนไซม์เพปซินเป็นการย่อยด้วยสารละลายที่เป็นกลาง (Neutral detergent solution, NDS) ซึ่งทำได้รวดเร็วและแม่นยำกว่าวิธีการเดิม และสามารถทำนายค่าการย่อยได้จริง (*In vitro* true digestibility) โดยนำส่วนของผนังเซลล์ที่ไม่ถูกย่อยมาใช้ทำนายร่วมด้วยแต่เนื่องจากวิธีการนี้ยังคงใช้การย่อยตัวอย่างในหลอดทดลองแต่ละหลอดและต้องใช้มือเขย่าที่หลอดตามเวลาการย่อยที่ 0 2 4 20 และ 24 ชั่วโมง ต่อมาในปี ค.ศ. 1994 บริษัท Ankom Technology Fairport (New York, USA) ได้ออกแบบเครื่องมือเรียกว่า Ankom Daisy¹ หรือเรียกว่า Daisy¹ (Holden, 1999) ดังในภาพที่ 5.1 เครื่องมือนี้สามารถใช้ทดแทนวิธีการเดิมได้และใช้ศึกษาในตัวอย่างที่มีความหลากหลาย เช่น พืชแห้ง พืชหมัก อาหารผสมครบส่วน และธัญพืช โดยบรรจุตัวอย่างลงในถุงไนลอนแต่ละถุง แล้วนำถุงไนลอนทั้งหมดใส่ลงไปบ่มย่อยในโถเดียวกัน หรือบ่มแยกโถกัน พบว่าไม่ส่งผลต่อค่าการย่อยได้ของตัวอย่างแต่ละชนิด และเครื่อง Daisy¹ นี้ถูกออกแบบมาให้สามารถใส่โถบ่มตัวอย่างได้จำนวน 4 โถ แต่ละโถสามารถใส่ถุงไนลอนได้สูงสุดจำนวน 25 ถุง จึงสามารถหาค่าการย่อยได้ครั้งละ 100 ถุง เครื่องนี้มี

แกนหมุนสำหรับวางโถที่ช่วยให้ถุงตัวอย่างมีการเคลื่อนไหวได้ตลอดเวลาจึงไม่ต้องใช้คนเขย่าเป็นการช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของคนได้ (Mabjeesh *et al.*, 2000)



ภาพที่ 5.1 เครื่อง Daisy¹

หลักการ

หลักการทำงานของเครื่อง Daisy¹ มีดังนี้ ซึ่งตัวอย่างใส่ในถุงในลอนแล้วนำไปแช่ในโถแก้วที่มีสารละลายบัฟเฟอร์ผสมกับของเหลวจากกระเพาะรูเมน โดยสามารถใส่ถุงตัวอย่างได้สูงสุด 25 ถุงต่อโถ นำโถเข้าบ่มภายในตู้ซึ่งมีช่องสำหรับวางโถได้จำนวน 4 ใบ และมีแกนหมุนเพื่อให้ตัวอย่างภายในโถมีการเคลื่อนไหวตลอดเวลา (ภาพที่ 5.1) ซึ่งมีอัตราความเร็ว 0.95 นาทีต่อรอบ คล้ายกับการเคลื่อนไหวของกระเพาะสัตว์ และภายในตู้มีชุดทำความร้อนเพื่อให้มีอุณหภูมิภายในตู้ 39 ± 0.5 องศาเซลเซียส ระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการหาค่า IVTDMD (*in vitro* true dry matter digestibility) และค่า NDFD คือ 48 ชั่วโมง เพื่อให้สอดคล้องกับวิธีการของ Two stage (Spanghero *et al.*, 2010) จากนั้นนำถุงในลอนที่มีกากส่วนที่เหลือไปย่อยต่อด้วยสารละลายที่เป็นกลาง เมื่อนำถุงในลอนกลับมาชั่งน้ำหนักอีกครั้ง ส่วนที่ถูกย่อยสลายไปคือส่วนของ IVTDMD และยังสามารถนำไปใช้คำนวณหาค่า NDFD ตามวิธีการคำนวณของ Mertens (2002) และ Muttoni *et al.* (2013)

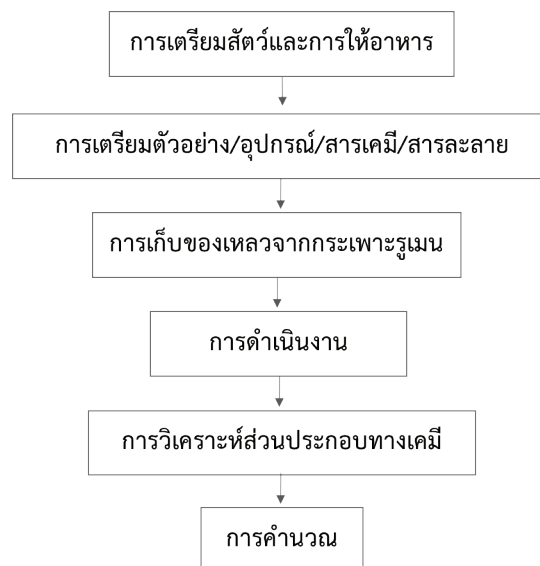
ข้อดี และข้อด้อย

ข้อดี ของการประเมินโดยวิธีทางห้องปฏิบัติการด้วยเครื่อง Daisy[®] สามารถทำได้ครั้งละหลายตัวอย่าง ประหยัดเวลา สะดวก สามารถควบคุมปัจจัยแวดล้อมได้ง่าย

ข้อด้อย จำเป็นต้องมีสัตว์เพื่อเก็บของเหลวจากกระเพาะรูเมน (Donor)

ขั้นตอนการดำเนินงาน

การประเมินค่าการย่อยได้โดยวิธีทางห้องปฏิบัติการด้วยเครื่อง Daisy[®] มีขั้นตอนการดำเนินงานดังในภาพที่ 5.2



ภาพที่ 5.2 ขั้นตอนการประเมินค่าโภชนะที่ย่อยของอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้องโดยเครื่อง Daisy[®]

1. การเตรียมสัตว์และการให้อาหาร

วิธีการนี้จำเป็นต้องมีสัตว์สำหรับใช้เก็บของเหลวจากกระเพาะรูเมน (สามารถเก็บได้จากสัตว์ที่ผ่าตัดฝังท่อบริเวณกระเพาะรูเมน หรือไม่เจาะกระเพาะรูเมนก็ได้ ดังมีรายละเอียดในหัวข้อต่อไป) สำหรับใช้ในขั้นตอนการบ่มย่อยตัวอย่าง โดยของเหลวจากกระเพาะรูเมนของสัตว์เคี้ยวเอื้อง เช่น โคเนื้อ โคนม แพะ และแกะ พบว่า ไม่มีผลต่อการนำมาทดสอบค่าการย่อยได้ (Mabjeesh *et al.*, 2000; Ammar *et al.*, 2004; King and Plizier, 2006) และสัตว์ที่นำมาใช้ทดลองต้องมีสุขภาพดี ไม่เครียดง่าย และไม่ควรรอยู่ในช่วงการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะ (Belanche *et al.*, 2018) จำนวนสัตว์ที่ใช้อย่างน้อย 2 ตัว (Susmel and Filacorda, 1996; Palmonari *et al.*, 2016)

อาหารที่ใช้ไม่ควรให้สัตว์กินอาหารหยาบเพียงอย่างเดียว โดยอาหารควรมีปริมาณโปรตีน 9 - 10 เปอร์เซ็นต์ และควรมีสัดส่วนของอาหารหยาบ 50 - 70 เปอร์เซ็นต์ เพื่อให้ค่า pH ภายในกระเพาะรูเมนไม่น้อยกว่า 6.0 หรือมีปริมาณโภชนะที่เพียงพอต่อการดำรงชีพของสัตว์ และปริมาณอาหารที่ให้กินอยู่ในระดับใกล้เคียงกับการดำรงชีพ เพื่อควบคุมความสมดุลของประชากรจุลินทรีย์ให้มีปริมาณคงที่ แบ่งการให้อาหารไม่น้อยกว่า 2 มื้อๆ ละเท่าๆ กัน โดยให้อาหารมือเช้าและมือบ่ายห่างกันประมาณ 8 ชั่วโมง ทำการปรับให้อาหารสัตว์ก่อนการทดลองไม่น้อยกว่า 10 วัน เช่นเดียวกับการเตรียมสัตว์ทดลองในบทที่ 3

2. การเตรียมตัวอย่าง อุปกรณ์ สารเคมีและสารละลาย

มีรายละเอียดการเตรียมตัวอย่าง อุปกรณ์ สารเคมีและสารละลาย ดังนี้

2.1 การเตรียมตัวอย่างและอุปกรณ์

2.1.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการประเมิน ต้องอยู่ในสภาพแห้ง และบดให้มีขนาดชิ้น 1 มิลลิเมตร

2.1.2 ของเหลวจากกระเพาะรูเมน

2.1.3 เครื่อง Daisy^{ll}

2.1.4 โถแก้วสำหรับบ่มตัวอย่าง (Digestion jar หรือ Digestion vessel)

2.1.5 ถุงไนลอน (Ankom filter bag, RF57) มีขนาดรูพรุน 25 μm

2.1.6 เครื่องซีลปากถุงไนลอน (Impulse bag sealer)

2.1.7 เครื่องวิเคราะห์เยื่อใย (Fiber analyzer)

2.1.8 เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง

2.1.9 ถังบรรจุก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์พร้อมวาล์วปิด-เปิด และท่อสายยางสำหรับปล่อยก๊าซ

2.1.10 pH meter

2.1.11 กระบอกตวงขนาด 1000 มิลลิลิตร (Cylinder)

2.1.12 อุปกรณ์เก็บของเหลวจากกระเพาะรูเมน เช่น ขวด ถังน้ำอุ่น ผ้ากรอง ถุงมือ เทอร์โมมิเตอร์

2.2 การเตรียมสารเคมีและสารละลาย

2.2.1 สารละลายบัฟเฟอร์ A ประกอบด้วย

2.2.1.1 Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) 20.0 กรัม

2.2.1.2 Magnesium sulfate heptahydrate ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 1.0 กรัม

2.2.1.3 Sodium chloride (NaCl) 1.0 กรัม

2.2.1.4 Calcium chloride dihydrate ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0.2 กรัม

2.2.1.5 Urea (Reagent grade) 1.0 กรัม

สารละลายบัฟเฟอร์ A เตรียมได้ ดังนี้ ละลายสารลำดับที่ 2.2.1.1.1 – 2.2.1.5 ในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 2 ลิตร

2.2.2 สารละลายบัฟเฟอร์ B ประกอบด้วย

2.2.2.1 Sodium bicarbonate (NaCO_3) 30.0 กรัม

2.2.2.2 Sodium sulfide nonahydrate ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) 2.0 กรัมต่อลิตร (ควรเตรียมก่อนใช้งานไม่เกิน 1 ชั่วโมง)

สารละลายบัฟเฟอร์ B เตรียมสารได้ ดังนี้ ละลายสารลำดับที่ 2.2.2.1 และ 2.2.2.2 ในน้ำกลั่นอุ่น หลังจากปล่อยให้สารละลายเย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 2 ลิตร

2.2.3 สารผสมต่อ 1 โกล (25 ลูกบาศก์นิ้ว) สำหรับใช้ทดลองประกอบด้วยสารบัฟเฟอร์ A ปริมาตร 1330 มิลลิลิตร สารบัฟเฟอร์ B ปริมาตร 266 มิลลิลิตร และของเหลวจากกระเพาะรูเมน 400 มิลลิลิตร

2.2.4 สารละลายที่เป็นกลาง (Neutral detergent solution, NDS) ประกอบด้วย

2.2.4.1 Sodium lauryl sulfate ($\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$) 60.0 กรัม

2.2.4.2 Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt, dehydrate ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 37.22 กรัม

2.2.4.3 Sodium tetraborate decahydrate ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) 13.62 กรัม

2.2.4.4 Sodium phosphate dibasic, anhydrous (Na_2HPO_4) 9.2 กรัม

2.2.4.5 Triethylene glycol 20 มิลลิลิตร

เตรียมสารละลาย NDS ดังนี้ ละลายสารลำดับที่ 2.2.4.1 ด้วยน้ำกลั่นต้มเดือด ในปิกเกอร์ขนาด 2 ลิตร หลังจากปล่อยให้สารละลายอุ่นลง เติมสารลำดับที่ 2.2.4.2 – 2.2.4.4 ลงไปละลายในปิกเกอร์เดียวกัน หลังจากปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เทสารละลายลงใน Volumetric flask ขนาด 2 ลิตร และเติมสารลำดับที่ 2.2.4.5 ลงไป และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 2 ลิตร

3. การเก็บของเหลวจากกระเพาะรูเมน

การเก็บของเหลวจากกระเพาะรูเมน สามารถเก็บก่อนให้อาหารมื้อเช้า ควรมีระยะเวลาห่างจากให้อาหารมื้อเย็น 8 – 12 ชั่วโมง แต่ไม่ควรเกิน 16 ชั่วโมง (Menke and Steingass, 1988; Kiteessa *et al.*, 1999) หรือเก็บหลังจากกินอาหารแล้ว 2 - 3 ชั่วโมง (DePeters and George, 2015) เนื่องจากเป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลต่อค่าการย่อยได้ที่ทดลองด้วยวิธีทางห้องปฏิบัติการ

วิธีเก็บของเหลวจากกระเพาะรูเมนสำหรับใช้ในการทดลองในวิธีทางห้องปฏิบัติการ สามารถเก็บผ่านท่อที่ผ่าตัดติดกับผนังกระเพาะรูเมน ได้โดยตรง ซึ่งถูกพิจารณาให้เป็นวิธีมาตรฐาน (Fortina *et al.*, 2022) ดังภาพที่ 5.3



ภาพที่ 5.3 การเก็บของเหลวจากกระเพาะรูเมนผ่านท่อที่ผ่าตัดฝังไว้บริเวณกระเพาะรูเมน



ภาพที่ 5.4 การเก็บของเหลวจากกระเพาะรูเมนโดยวิธีการสอดท่อผ่านทางปาก

ข้อควรระวัง

ของเหลวจากกระเพาะรูเมนสามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส ด้วยการเติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ตลอดเวลาเก็บไว้ใช้ได้ไม่เกิน 6 ชั่วโมง และถ้าต้องการเก็บไว้นานควรเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สามารถเก็บได้นาน 30 วัน และหากนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส หรือเก็บโดยทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze-drying) อาจทำให้ค่าการย่อยได้ลดลง (Spanghero *et al.*, 2019)

4. การดำเนินงาน

4.1 แช่วุ้นในลอนก่อนการใช้งานด้วย Acetone เป็นเวลา 5 นาที เพื่อกำจัดสารเคลือบต่างๆ ที่อาจไปยับยั้งการย่อยสลายของจุลินทรีย์ หลังจากนั้นนำฉนวนลอนออกผึ่ง หรืออบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนแห้ง (สามารถเตรียมล่วงหน้าไว้ได้)

4.2 เขียนหมายเลขข้างฉนวนลอนด้วยดินสอดำ หรือปากกาเคมีที่ทนต่อการถูกชะล้าง

4.3 ชั่งบันทึกน้ำหนักฉนวนลอน (W_1) พร้อมบันทึกหมายเลขฉนวน การทดลองแต่ละรอบต้องมีฉนวนเปล่าที่ไม่ใส่ตัวอย่างสำหรับทำ Blank จำนวนอย่างน้อย 1 ฉนวน

4.4 ชั่งตัวอย่างใส่ลงในฉนวนลอนที่บันทึกน้ำหนักแล้ว ถ้าเป็นอาหารหยาบชั่ง 0.25 กรัม หรือตัวอย่างอาหารอาหารข้นชั่ง 0.35 กรัม บันทึกน้ำหนัก (W_2)

4.5 นำฉนวนลอน Blank และฉนวนลอนที่มีตัวอย่างมาทำการปิดปากฉนวนด้วยเครื่องซีลที่ใช้ความร้อนปานกลาง

4.6 นำฉนวนลอน Blank และฉนวนที่มีตัวอย่าง ไม่เกิน 25 ฉนวนต่อโถ ใส่ลงในโถแก้วที่มีส่วนผสมของสารละลายบัฟเฟอร์ A ปริมาณ 266 มิลลิลิตร และ สารละลายบัฟเฟอร์ B ปริมาณ 1330 มิลลิลิตร นำโถแก้วไปอุ่นในตู้อบ Daisy[®] ซึ่งตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 39 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 30 นาที เพื่อรอมสกับของเหลวจากกระเพาะหมักในขั้นตอนต่อไป

4.7 นำของเหลวจากกระเพาะรูเมน (การประเมินค่าการย่อยได้ 1 ครั้ง สามารถทำพร้อมกันได้ครั้งละ 4 โถๆ ละ 25 ฉนวนลอน รวมทั้งสิ้นจำนวน 100 ฉนวนลอน ต้องใช้ของเหลวจากกระเพาะรูเมนทั้งสิ้น 1,600 มิลลิลิตร) มาผสมให้เข้ากันในภาชนะภายใน 1 - 2 นาที เติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และแช่ภาชนะลงในน้ำอุ่นที่มีอุณหภูมิประมาณ 39 องศาเซลเซียส

4.8 เทของเหลวจากกระเพาะรูเมนด้วยกระบอกตวง 400 มิลลิลิตร ลงในโถแก้วที่เตรียมไว้ (4.6) ใส่อากาศภายในโถแก้วด้วยการปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่บริเวณเหนือสารละลายเป็นเวลา 30 วินาที ดังในภาพที่ 5.5 เขย่าโถแก้วเบาๆ ให้สารละลายผสมเข้ากันประมาณ 30 วินาที

แล้วนำกลับไปบ่มในเครื่อง Daisy[®] เปิดสวิตช์แกนหมุนโถแก้วเพื่อให้ถุงตัวอย่างได้สัมผัสกับสารละลายได้อย่างสม่ำเสมอ ทำการบ่มย่อยตัวอย่างเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

4.9 หลังครบ 48 ชั่วโมง เทถุงตัวอย่างออกล้างด้วยน้ำสะอาดโดยปล่อยให้ น้ำไหลผ่านตลอดเวลา ทำการซีก้างถุงในลอนด้วยมือ และบีบน้ำออกจากถุงอย่างเบามือทำให้ล้างได้สะอาดเร็วขึ้น ล้างจนสะอาดสังเกตจากน้ำที่ไหลผ่านถุงตัวอย่างจะใส ควรล้างให้เสร็จภายใน 20 นาที เพื่อหลีกเลี่ยงการย่อยต่อของจุลินทรีย์

4.10 นำถุงตัวอย่างไปเรียงในภาดอลูมิเนียมไม่ให้ถุงทับซ้อนกัน นำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เพื่อลดปริมาณน้ำในตัวอย่างก่อนจะนำไปวิเคราะห์หา NDF หากไม่นำไปวิเคราะห์ต่อเนื่องให้เก็บไว้ในตู้แช่แข็ง (Freezer) เพื่อป้องกันตัวอย่างถูกทำลายจากจุลินทรีย์

4.11 นำถุงตัวอย่างไปย่อยด้วยสารละลาย NDS ด้วยเครื่องย่อยเยื่อใย (Fiber analyzer) เพื่อวิเคราะห์หาค่า NDF ตามวิธีการของ Osborne (2004) มีขั้นตอนการย่อย ดังนี้

4.11.1 นำถุงตัวอย่างวางในภาดที่มีช่องใส่ถุงตัวอย่าง ภาดละ 3 ถุง จำนวน 9 ภาด ซึ่งแต่ละภาดจะมีช่องตรงกลางสำหรับเสียบเข้ากับแกนสแตนเลสและภาดชั้นบนสุดไม่วางถุงตัวอย่าง แต่จะมีตุ้มน้ำหนักสำหรับถ่วงไม่ให้ภาดลอยออกจากแกนกลาง จากนั้นเติมสารละลาย ND ปริมาณ 2000 มิลลิลิตร ปิดฝาเครื่องให้แน่นปรับความร้อนที่เครื่องเพื่อต้มสารละลายที่อุณหภูมิ 85 – 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 75 นาที เมื่อครบเวลา

4.11.2 เมื่อย่อยตามเวลาที่กำหนดปล่อยสารละลาย ND ทั้ง ล้างถุงตัวอย่างด้วยน้ำร้อนเป็นเวลา 3 นาที ปล่อยน้ำทิ้ง ทำการล้างด้วยน้ำร้อนจำนวน 3 รอบ และล้างด้วยน้ำอุณหภูมิธรรมดา 1 รอบ จากนั้นจึงนำถุงตัวอย่างออกจากเครื่องมาทำการแช่ใน Acetone เป็นเวลา 3 นาที

4.11.3 นำถุงตัวอย่างไปอบ ในตู้อบ อุณหภูมิ 103 ± 3.0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง หรือข้ามคืน (Overnight) นำถุงตัวอย่างออกจากตู้อบมาปล่อยให้เย็นในตู้ดูดความชื้นที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 3 ชั่วโมง แล้วจึงชั่งบันทึกน้ำหนัก (W_3)

5. การวิเคราะห์ส่วนประกอบทางเคมี

ข้อมูลส่วนประกอบทางเคมีของตัวอย่าง เป็นข้อมูลเบื้องต้นที่ควรต้องแสดงไว้ ได้แก่ ความชื้น ไขมัน เถ้า โปรตีน ส่วนประกอบของเยื่อใย ดังมีวิธีการวิเคราะห์ตามมาตรฐาน เช่นเดียวกับ บทที่ 2

6. การคำนวณ

6.1 ค่าการย่อยได้ของวัตถุแห้งที่แท้จริง (*In vitro* true digestibility, IVTDMD, %DM)

$$\text{IVTDMD (\% DM)} = (100 - (W_3 - (W_1 \times C)) \times 100 / (W_2 \times \text{DM})$$

โดยที่ C คือ ค่า Blank bag correction ใช้สำหรับปรับน้ำหนักของถุงไนลอนหลังการย่อย

คำนวณได้ ดังนี้ = น้ำหนักถุงไนลอนเปล่า (Blank) หลังอบแห้ง / น้ำหนักถุงเปล่าเริ่มต้น

W_1 = น้ำหนักถุงไนลอน (กรัม)

W_2 = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

W_3 = น้ำหนักถุงไนลอนและตัวอย่างหลังการย่อยด้วย ND (กรัม)

ตัวอย่างการคำนวณ

ประเมินค่าการย่อยได้ของหญ้าแพงโกลาแห้งโดยเครื่อง Dasy^{II} เพื่อหาค่า IVTDMD และ NDFD โดยหญ้าแพงโกลาแห้งมี DM 94.86 เปอร์เซ็นต์ และมี NDF เท่ากับ 65.30 เปอร์เซ็นต์ วัตถุแห้ง และมีรายละเอียดของตัวอย่างก่อนและหลังย่อยที่ 48 ชั่วโมง มีค่า IVTDMD และค่า NDFD ดังในตารางที่ 5.1

ตารางที่ 5.1 ข้อมูลหญ้าแพงโกลา ก่อนและหลังการย่อยที่ 48 ชั่วโมง และค่าโภชนาที่ย่อยได้

รายละเอียด	ข้อมูล
น้ำหนักถุงไนลอน, กรัม	
- ถุงไนลอนใส่ตัวอย่าง (W_1)	0.5110
- ถุงไนลอนเปล่า (Blank)	0.5137
น้ำหนักตัวอย่าง (W_2), กรัม	0.2515
น้ำหนักตัวอย่างรวมถุงหลังย่อย NDS (W_3), กรัม	0.6118
น้ำหนักถุง Blank หลังย่อย NDS, กรัม	0.5127
ค่า IVTDMD, เปอร์เซ็นต์	57.27
ค่าของผนังเซลล์ที่ไม่ถูกย่อย (iNDF), เปอร์เซ็นต์ของวัตถุแห้ง	42.73
ค่าผนังเซลล์ที่ถูกย่อย (dNDF) เปอร์เซ็นต์ของวัตถุแห้ง	22.57
ค่า NDFD, เปอร์เซ็นต์ของ NDF	34.56

วิธีการคำนวณค่า IVTDMD มีรายละเอียด ดังนี้

- คำนวณหาค่า C = น้ำหนักถ่วงเปล่าหลังย่อยด้วย NDS / น้ำหนักถ่วงเปล่าเริ่มต้น
= $0.5127 / 0.5137 = 0.9980$
- ปรับน้ำหนักตัวอย่างให้อยู่ในรูปของน้ำหนักแห้ง
= น้ำหนักตัวอย่าง (W_2) X ค่าวัตถุแห้ง (DM) / 100
= $0.2515 \times 94.86 / 100 = 0.2385$ กรัม
- คำนวณหาน้ำหนักตัวอย่างหลังย่อยด้วยสารละลาย NDS
= น้ำหนักตัวอย่างรวมถ่วงหลังย่อย NDS (W_3) - (ถ่วงในหลอดใส่ตัวอย่าง (W_1) x ค่า C)
= $0.6118 - (0.5110 \times 0.9980) = 0.1019$ กรัม
- คำนวณค่า IVTDMD = $(0.2385 - 0.1019) \times 100 / 0.2385$
= 57.27 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง

6.2 ค่าการย่อยได้ของผนังเซลล์ (Neutral detergent fiber digestibility) คำนวณได้ ดังนี้

iNDF (Indigestible neutral detergent fiber, %DM)

$$= 100 - \text{IVTDMD (\%DM)}$$

dNDF (Digestible neutral detergent fiber, %DM)

$$= \text{NDF}_0 \text{ (NDF ของตัวอย่างเริ่มต้น, \%DM)} - \text{iNDF (\%DM)}$$

$$\text{NDFD (\%NDF)} = \text{dNDF} \times 100 / \text{NDF}_0$$

ตัวอย่างการคำนวณ

ใช้ตัวอย่างและข้อมูลเดียวกับตัวอย่างที่คำนวณค่า

มีรายละเอียดดังนี้

- คำนวณค่า iNDF (Indigestible neutral detergent fiber) = $100 - \text{IVTDMD}$
= $100 - 57.27 = 42.73$ เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง
- คำนวณค่า dNDF = NDF (%DM) ของตัวอย่างเริ่มต้น - iNDF (%DM)
= $65.30 - 42.73 = 22.57$ เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง
- คำนวณค่า NDFD = $\text{dNDF} \times 100 / \text{NDF ของตัวอย่างเริ่มต้น}$
= $22.57 \times 100 / 65.30 = 34.56$ เปอร์เซ็นต์ของ NDF

บทที่ 6

การประเมินคุณค่าทางโภชนาของอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้องโดยการวัดผลผลิตก๊าซ ในห้องปฏิบัติการ

วิธีการวัดผลผลิตก๊าซในห้องปฏิบัติการ (*In vitro* gas production method) มีการทดลองครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ. 1974 โดย Menke and Ehrensverd ประเทศเยอรมัน ด้วยการนำตัวอย่างหมักกับของเหลวจากกระเพาะรูเมนในหลอดฉีดยา (Syringe) แล้ววัดผลผลิตก๊าซที่เกิดขึ้นจากการนำตัวอย่างชนิดเดิมที่มีน้ำหนักเท่าเดิมทำการวัดหลายๆ ครั้ง พบว่ามีปริมาตรก๊าซเกิดขึ้นคงที่ หลังจากนั้นจึงทดลองด้วยการใช้ตัวอย่างเศษไม้บด และวัตถุดิบที่มีคาร์โบไฮเดรตที่ย่อยง่าย ในปริมาณที่เท่ากันหลังการย่อยในหลอดฉีดยาเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า มีปริมาตรก๊าซเกิดขึ้นเท่ากับ 20 และ 70 มิลลิลิตร ทำให้ทราบว่าปริมาตรก๊าซที่เกิดขึ้นมีความสัมพันธ์โดยตรงกับการย่อยได้ของคาร์โบไฮเดรตในตัวอย่าง จึงได้พัฒนาวิธีการจากงานที่ทดลองประเมินค่าการย่อยได้ในแกะโดยตรงจำนวน 84 การทดลอง แล้วนำผลผลิตก๊าซที่เกิดขึ้นไปประเมินร่วมกับส่วนประกอบทางเคมีให้ได้ค่าที่มีความแม่นยำมากกว่าวิธีการ Two stages และวิธีการดั้งเดิมอื่นๆ ที่ใช้เพียงส่วนประกอบทางเคมีในการทำนายค่าการย่อยได้ จึงได้ตีพิมพ์เผยแพร่วิธีการครั้งแรกโดย Menke *et al.* (1979) และได้ตีพิมพ์เผยแพร่วิธีการนี้อย่างละเอียดอีกครั้งโดย Menke and Steingass (1988) ซึ่งในรายงานดังกล่าวได้แสดงสมการที่มีการใช้ส่วนประกอบทางเคมีเป็นตัวแปรร่วมในสมการ ได้แก่ CP EE CF NFE Ash และ ADF ในการทำนายค่า OMD ค่า ME และค่าพลังงานสุทธิเพื่อการผลิตน้ำนม (Net energy for lactation, NE_L) แยกสมการตามประเภทของวัตถุดิบ ได้แก่ Mixed feeds Compound feeds Dry roughages Succulent feeds Roughage feeds และ All feedstuffs ซึ่งมีสมการให้เลือกใช้ได้ไม่น้อยกว่า 100 สมการ

หลักการ

วิธีการวัดผลผลิตก๊าซในห้องปฏิบัติการ มีหลักการ คือ นำตัวอย่างที่บดให้มีขนาดขึ้น 1 มิลลิเมตร ปริมาณ 0.2 กรัม หมักร่วมกับสารละลายบัฟเฟอร์ผสมด้วยของเหลวจากกระเพาะรูเมน (Rumen liquor- medium) ภายในหลอดทดลอง ซึ่งเป็นหลอดฉีดยาชนิดพิเศษ (Piston pipette) ขนาด 100 มิลลิลิตร ที่สามารถอ่านปริมาตรได้ละเอียด 1 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส ภายในมีแกนหมุนเพื่อให้หลอดทดลองมีการเคลื่อนไหวคล้ายกับกระเพาะ

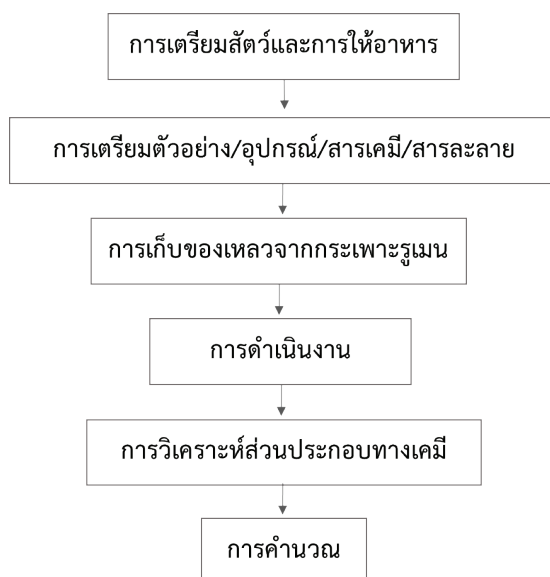
รูเมนของสัตว์ บ่มนาน 24 ชั่วโมง นำผลผลิตก๊าซที่ได้และองค์ประกอบทางเคมีมาคำนวณร่วมกัน โดยเลือกใช้สมการที่เหมาะสมสำหรับทำนายค่า OMD ME และ NE_L

ข้อดี และข้อด้อย

ข้อดีของวิธีการนี้ สามารถประเมินได้ถึงระดับของพลังงานใช้ประโยชน์ได้ และพลังงานสุทธิ ในขณะที่วิธีทางห้องปฏิบัติการอื่นๆ ประเมินได้เพียงค่าการย่อยได้ของโภชนาเท่านั้น อีกทั้งวิธีการนี้ไม่มีขั้นตอนของการล้าง การกรอง และการถ่ายตัวอย่าง ทำให้ตัวอย่างที่ใช้ในการประเมินไม่มีการสูญหายและวิธีการนี้สามารถทำได้ครั้งละหลายตัวอย่าง ค่าที่วัดได้มีความแม่นยำ และสามารถควบคุมปัจจัยต่างๆ ได้สะดวก (Kitessa *et al.*, 1999; Sallam *et al.*, 2007)

ข้อด้อย จำเป็นต้องใช้ของเหลวจากกระเพาะรูเมนของสัตว์ และหลอดทดลองเป็นหลอดชนิดพิเศษจึงมีราคาแพง ตัวอย่างที่มีลักษณะแข็งบางชนิด เช่น ตัวอย่างกากปาล์มจะมีส่วนของเปลือกแข็งปะปนมาหลังการบ่มย่อยเมื่อเกิดก๊าซแกนจะถูกดันออกมาและจะมีส่วนของเศษแข็งที่แทรกอยู่ระหว่างแกนดันติดออกมาด้วยทำให้เกิดช่องว่างระหว่างแกนดันกับกระบอกสวมทำให้ของเหลวและก๊าซรั่วไหลออกมาได้

วิธีการประเมินคุณค่าทางโภชนาของอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้องโดยการวัดผลผลิตก๊าซในห้องปฏิบัติการ มีขั้นตอนการดำเนินงานดังในภาพที่ 6.1



ภาพที่ 6.1 ขั้นตอนการประเมินคุณค่าทางโภชนาของอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้องโดยการวัดผลผลิตก๊าซในห้องปฏิบัติการ

1. การเตรียมสัตว์และการให้อาหาร

วิธีการนี้จำเป็นต้องใช้ของเหลวจากกระเพาะรูเมนเช่นเดียวกับวิธีการบ่มตัวอย่างด้วยเครื่อง Daisy¹ (บทที่ 5) ใช้สัตว์ทดลองสำหรับเก็บของเหลวจากกระเพาะรูเมน ถ้าเป็นโคใช้จำนวน 1 หรือ 2 ตัว หากเป็นแกะใช้จำนวน 2 ถึง 4 ตัว ที่อยู่ในระยะโตเต็มวัยแล้ว เพื่อให้ได้ปริมาณของเหลวที่เพียงพอ และไม่มีผลกระทบต่อสัตว์ (Menke and Steingass, 1988)

อาหารเลี้ยงสัตว์ควรมีสัดส่วนของอาหารหยาบ 50 - 60 เปอร์เซ็นต์ และมีอาหารข้น 40 - 50 เปอร์เซ็นต์ แบ่งให้กิน 2 มื้อในปริมาณที่เท่ากัน และระยะห่างระหว่างมื้อประมาณ 8 ชั่วโมง ระดับปริมาณอาหารที่ให้กินต้องเพียงพอต่อการดำรงชีพ (ดำเนินการเช่นเดียวกับ บทที่ 5)

2. การเตรียมตัวอย่างและอุปกรณ์

2.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการประเมินอยู่ในสภาพแห้งและบดให้มีขนาดชิ้น 1 มิลลิเมตร

2.2 ปัจจุบันไม่ใช่ตัวอย่างมาตรฐานของอาหารหยาบและอาหารข้นในการปรับปริมาตรก๊าซ เนื่องจากค่า Factor ที่ได้จากปริมาตรก๊าซของตัวอย่างอาหารหยาบและอาหารข้นมาตรฐานต้องมีค่าในช่วง 0.9 - 1.1 เพื่อนำไปคูณกับปริมาตรก๊าซของตัวอย่างที่ใช้ในการประเมินซึ่งมีผลน้อยมาก และจากการทำงานที่ผ่านมา หากควบคุมสัดส่วนของอาหารหยาบและอาหารข้นที่เหมาะสม ค่า Factor ที่ได้จะอยู่ประมาณ 1.0 ดังนั้นจึงยกเลิกการใช้ตัวอย่างมาตรฐานในการปรับปริมาตรก๊าซ แต่พิจารณาการทำงานของจุลินทรีย์โดยดูปริมาตรก๊าซของ Blank ที่ 24 ชั่วโมง ต้องอยู่ในช่วง 12 - 16 มิลลิลิตร และใช้ตัวอย่างที่ทราบปริมาตรก๊าซมาประเมินร่วมด้วยทุกครั้ง

2.3 ของเหลวจากกระเพาะรูเมน

2.4 ตู้บ่ม (Incubator) หรืออ่างน้ำอุ่น จะมีแป้นวงกลมสำหรับใส่ Piston pipet จำนวน 58 ช่อง แต่ละช่องมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 38 มิลลิเมตร โดยแป้นจะยึดติดกับแกนหมุน (Rotator) ที่มีความเร็วรอบ 1 ถึง 2 รอบต่อนาที และสามารถควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 39 องศาเซลเซียส

2.5 อ่างน้ำอุ่น (Water bath) ที่สามารถควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 39 องศาเซลเซียส สำหรับแช่สารละลายที่ใช้ในระหว่างการทดลอง

2.6 เครื่องชั่งไฟฟ้าสามารถชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง

2.7 แท่นกวนสารละลายที่ให้ความร้อน (Hot plate stirrer)

2.8 pH meter

2.9 ถังบรรจุก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ พร้อมวาล์วปิด - เปิด

2.10 หลอดทดลอง (Piston pipette) ขนาดบรรจุ 100 มิลลิลิตร มีขีดบอกปริมาตรอย่างละเอียด สามารถอ่านได้ 0.1 มิลลิลิตร มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางรอบนอก 36 มิลลิเมตร ยาว 200 มิลลิเมตร

2.11 สายยางที่ทำจากซิลิโคน (Silicone) มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางที่สามารถใส่กับปลายหลอดทดลอง ยาวประมาณ 5 เซนติเมตร พร้อมคลิปทำจากพลาสติกอย่างดี สวมติดกับสายยางสำหรับการปิด - เปิด เติมน้ำละลาย และไล่ก๊าซออกจากหลอดทดลอง

2.12 ขวดที่มีช่องเติมน้ำ 3 ทาง (Woulff flask) ขนาด 2 ลิตร

2.13 Dispenser ขนาด 100 มิลลิลิตร

2.13 อุปกรณ์สำหรับเก็บของเหลวจากกระเพาะรูเมน เช่น ขวดบรรจุพร้อมฝาปิด กระจกใส น้ำอุ่น เทอร์โมมิเตอร์ ผ้ากรอง กรวยกรอง ถังมือ

3. การเตรียมสารเคมีและสารละลาย

3.1 สารละลายแร่ธาตุหลัก (Main element solution) ประกอบด้วย

3.1.1 Disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4) 5.7 กรัมต่อลิตร

3.1.2 Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) 6.2 กรัมต่อลิตร

3.1.3 Magnesium sulfate heptahydrate ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0.6 กรัมต่อลิตร

เตรียมสารละลายดังนี้ ละลายสารลำดับที่ 3.1.1 – 3.1.3 ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร

3.2 สารละลายแร่ธาตุรอง (Trace element solution) ประกอบด้วย

3.2.1 Calcium chloride dihydrate ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 13.2 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร

3.2.2 Manganese dichloride tetrahydrate ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 10.0 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร

3.2.3 Cobalt chloride hexahydrate ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 1.0 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร

3.2.4 Ferric chloride hexahydrate ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 8.0 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร

เตรียมสารละลายดังนี้ ละลายสารลำดับที่ 3.2.1 – 3.2.4 ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร

3.3 สารละลายบัฟเฟอร์ (Buffer solution) ประกอบด้วย

3.3.1 Ammonium bicarbonate (NH_4HCO_3) 4.0 กรัมต่อลิตร

3.3.2 Sodium bicarbonate (NaHCO_3) 35.0 กรัมต่อลิตร

เตรียมสารละลายดังนี้ ละลายสารลำดับที่ 3.3.1 และ 3.3.2 ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร

3.4 สารละลายรีซาซูริน (Rezasurin solution)

เตรียมโดย ละลาย Rezasurin 100 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร

3.5 สารละลายรีดักชัน (Reduction solution) ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนทดลอง

3.5.1 Sodium sulfide heptahydrate $\text{Na}_2\text{S} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 285 มิลลิกรัม

3.5.2 สารละลาย Sodium hydroxide (NaOH) เข้มข้น 1 นอร์มอล

เตรียมสารละลายดังนี้ ละลายสารลำดับที่ 3.5.1 ในน้ำกลั่น เติมสารลำดับที่ 3.5.2 ในปริมาตร 2 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 50 มิลลิลิตร

3.6 สารละลาย Medium ปริมาตร 2 ลิตร (สำหรับหลอดทดลองจำนวน 58 หลอด) ประกอบด้วย

3.6.1 สารละลายแร่ธาตุหลัก 316 มิลลิลิตร

3.6.2 สารละลายแร่ธาตุรอง 0.15 มิลลิลิตร

3.6.3 สารละลาย Buffer 316 มิลลิลิตร

3.6.4 สารละลาย Rezasurin 1.60 มิลลิลิตร

3.6.5 น้ำกลั่น 632 มิลลิลิตร

3.6.6 สารละลาย Reduction 63 มิลลิลิตร

3.6.7 ของเหลวจากกระเพาะรูเมน 665 มิลลิลิตร

4. การเก็บของเหลวจากกระเพาะรูเมน

ดำเนินการเช่นเดียวกับการเก็บของเหลวจากกระเพาะรูเมน ในบทที่ 5

5. ขั้นตอนการดำเนินงาน

5.1 เตรียมหลอดทดลอง ที่มีแกนต้นและกระบอกสวมเข้ากันได้พอดี (ไม่แน่น หรือหลวมเกินไป) และขีดอ่านปริมาตรของแกนต้นในตรงกับขีดอ่านปริมาตรของกระบอกสวม สวมท่อยางซิลิโคนที่มีคลิปที่ปลายกระบอกสวม และเขียนหมายเลขที่ส่วนท้ายของแกนต้นและด้านนอกของกระบอกสวม

5.2 ทาวาสลีน (Vaseline) ที่บริเวณรอบของแกนต้นให้ทั่ว ดังในภาพที่ 6.2 ยกเว้นส่วนของปลายแกนต้นเพื่อไม่ให้ตัวอย่างสัมผัสกับวาสลีน

5.3 ชั่งตัวอย่างประมาณ 200 มิลลิกรัม ในกระบอกสวม ดังในภาพที่ 6.3 ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ดันแกนเบาๆ ระวังไม่ให้ตัวอย่างฟุ้งกระจายและไม่ให้แกนดันสัมผัสตัวอย่าง ดังในภาพที่ 6.4

5.4 เตรียมหลอดทดลองเปล่า (Blank) ไม่ใส่ตัวอย่าง ทาवासลินรอบแกนดันให้ทั่ว เช่นเดียวกับหลอดทดลองที่ใส่ตัวอย่าง จำนวน 3 ซ้ำ

5.5 นำหลอดทดลองของ Blank และตัวอย่างเรียงในตู้บ่มโดยลำดับที่ 1 29 และลำดับสุดท้าย เป็น Blank เพื่อให้ Blank มีช่วงเวลาการหมักบ่มตั้งแต่เวลาเริ่มต้น ระหว่างกลาง และเวลา สุดท้าย ที่เหลือเป็นตัวอย่าง บ่มหลอดทดลองทั้งหมดไว้ที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส ข้ามคืน หรืออย่างน้อย 3 ชั่วโมง ก่อนการเติมสารละลาย Medium (ข้อ 3.6)

5.6 นำสารละลาย ข้อ 3.6.1 – 3.6.5 ใส่ใน Woulff flask แล้วนำไปแช่ในอ่างน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส และพ่นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ลงในสารละลายประมาณ 5 นาที จากนั้นเติม สารละลายรีดักชัน (ข้อ 3.6.6) ลงไป รอจนสีของสารละลายเปลี่ยนจากสีชมพูเป็นใสไม่มีสี

5.7 นำของเหลวจากกระเพาะรูเมนที่เก็บมาแช่ในอ่างน้ำอุ่นนำมาเขย่าเบาๆ ให้เข้ากันก่อน กรองผ่านกรวยกรองอีกครั้ง จากนั้นตวงปริมาตร 665 มิลลิลิตร (สัดส่วนของเหลวจากกระเพาะ รูเมน 1 ส่วน ต่อ สารละลาย (ข้อ 5.6) 5 ส่วน) เติมลงในสารละลาย ข้อ 5.6 ได้ส่วนผสมของ สารละลาย Medium กวนให้เข้ากันด้วยแท่งกวนแม่เหล็กพร้อมปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ลงใน สารละลาย Medium ประมาณ 5 นาที เพื่อให้อยู่ในสภาวะไร้ออกซิเจน

5.8 นำหลอดทดลองที่เตรียมไว้มาใส่สารละลาย Medium หลอดละ 30 มิลลิลิตร ดังในภาพที่ 6.5 ไล่อากาศออกจากหลอดทดลองให้หมด บันทึกปริมาตรก๊าซเริ่มต้น (V_0) แล้วนำหลอดทดลองไป ใส่ในช่องตามตำแหน่งเดิม อ่านปริมาตรก๊าซที่เกิดขึ้น ณ ชั่วโมงที่ 8 หากมีปริมาตรก๊าซเกิดขึ้น 50 มิลลิลิตร ให้ทำการไล่ก๊าซออกแล้วปรับกลับมาที่ตำแหน่งเริ่มต้น (30 หรือ 35 มิลลิลิตร ขึ้นอยู่กับ ปริมาตรสารละลายที่เติมเข้าไป) บันทึกปริมาตรก๊าซครั้งสุดท้ายที่ 24 ชั่วโมง



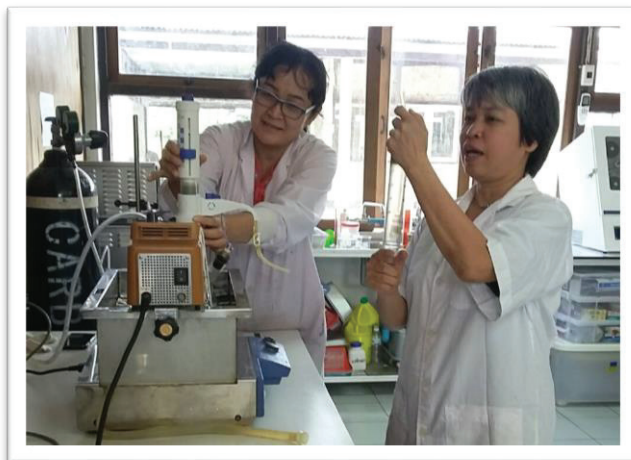
ภาพที่ 6.2 ทาวาสลีนรอบแกนต้น



ภาพที่ 6.3 ชั่งตัวอย่างใสในกระบอกสวม



ภาพที่ 6.4 การเติมสารละลาย Medium เข้าสู่หลอดทดลอง



ภาพที่ 6.5 เขย่าให้ตัวอย่างผสมกับสารละลาย และไล่อากาศในหลอดทดลอง

ข้อควรระวัง

ตัวอย่างที่มีส่วนของคาร์โบไฮเดรตสูงอาจมีการเกิดปริมาตรก๊าซสูงหลังจากที่ได้ปรับปริมาตรหลังการอ่านที่ 8 ชั่วโมง ไปแล้วก็ตาม ประตูดั้มไม่ควรปิดล็อกสนิท เพราะหากตัวอย่างมีปริมาตรก๊าซเกิดขึ้นสูงเกินกว่า 70 มิลลิลิตร แกนดันจะดันประตูดั้ม อาจทำให้หลอดทดลองแตก หรือแกนหมุนที่เชื่อมต่อกับมอเตอร์แตกหักได้ แนะนำให้ใช้หนังยางคล้องที่มีอับประตูดั้มแทน หรือเพิ่มชั่วโมงในการอ่าน และปรับปริมาตรเพิ่มขึ้นอีกครั้ง เช่น ที่เวลา 12 ชั่วโมง

6. การวิเคราะห์ส่วนประกอบทางเคมี

ข้อมูลส่วนประกอบทางเคมีของตัวอย่าง เป็นข้อมูลเบื้องต้นที่ควรต้องแสดงไว้ รายการวิเคราะห์ ได้แก่ ความชื้น ไขมัน เถ้า โปรตีน และส่วนประกอบของเยื่อใย วิธีการ เช่นเดียวกับบทที่ 2

7. การคำนวณ

7.1 คำนวณหาผลผลิตก๊าซสุทธิที่ 24 ชั่วโมง ดังนี้

$$GP \text{ (ml/200 mgDM)} = (V_{24} - V_0 - GP_0) / \text{Sample weight in mg DM}$$

เมื่อ GP คือ ผลผลิตก๊าซสุทธิที่ 24 ชั่วโมง

V_{24} คือ ปริมาตรก๊าซที่เกิดขึ้นที่ 24 ชั่วโมง

V_0 คือ ปริมาตรก๊าซเริ่มต้น

GP_0 คือ ปริมาตรก๊าซที่ 24 ชั่วโมงของ blank ที่ได้เฉลี่ยแล้ว

ตัวอย่างการคำนวณ

ประเมินค่า OMD ME และ NE_L ของหญ้าแพงโกลาแห้ง และเมล็ดข้าวโพดบด มีส่วนประกอบทางเคมี ดังในตารางที่ 6.1

ตารางที่ 6.1 ส่วนประกอบทางเคมีของหญ้าแพงโกลา และเมล็ดข้าวโพดบด

	DM	CP	EE	Ash	NDF	ADF
	<----- %DM ----->					
หญ้าแพงโกลา	92.60	9.05	1.58	8.03	65.37	41.12
เมล็ดข้าวโพดบด	88.50	10.20	7.00	2.30	12.50	4.10

มีปริมาตรก๊าซที่เกิดขึ้นที่ชั่วโมงที่ 0 8 และ 24 และผลผลิตก๊าซสุทธิที่ 24 ดังในตารางที่ 6.2

ตารางที่ 6.2 ปริมาตรก๊าซที่ชั่วโมงที่ 0 8 และ 24 และผลผลิตก๊าซสุทธิที่ 24 ชั่วโมง ของ Blank หย้าแพงโกลา และเมล็ดข้าวโพดบด

	Sample wt.	V_{0h}	V_{8h}^*	V_{24h}	GP_{24h}	GP_{24h}
	g	< ----- ml----->			ml/200mg	
Blank	-	0	6.3	6.5	13.0	-
หย้าแพงโกลา	0.2077	0	30	24.5	41.5	43.15
เมล็ดข้าวโพดบด	0.2059	0	40	36.5	63.5	69.70

* หลังจากอ่านค่าก๊าซที่เกิดขึ้นที่ 8 ชั่วโมง ทำการปรับปริมาตรกลับมาเริ่มต้นที่ 35 มิลลิลิตร ยกเว้น Blank

มีรายละเอียดของการคำนวณปริมาตรก๊าซ ดังนี้

- ปริมาตรก๊าซสุทธิของตัวอย่างอาหารที่ 24 ชั่วโมง = $V_{8h} + V_{24h} - V_{Blank}$
- คำนวณปริมาณการผลิตก๊าซสุทธิของหย้าแพงโกลาที่ 24 ชั่วโมง

$$= 30 + 24.5 - 13.0 = 41.5 \text{ มิลลิลิตร}$$
- คำนวณปริมาณการผลิตก๊าซสุทธิของเมล็ดข้าวโพดบดที่ 24 ชั่วโมง

$$= 40 + 36.5 - 13.0 = 63.5 \text{ มิลลิลิตร}$$
- คำนวณเพื่อปรับปริมาตรก๊าซสุทธิที่ 24 ชั่วโมง ให้มีหน่วยเป็น มิลลิลิตร ต่อ 200 มิลลิกรัม
- คำนวณเพื่อปรับน้ำจาก กรัม เป็น มิลลิกรัม ดังนี้

$$= \text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)} \times 1000$$

$$= \text{น้ำหนักตัวอย่าง (มิลลิกรัม)}$$
- คำนวณเพื่อปรับเป็นน้ำหนักแห้ง ดังนี้ $= \text{น้ำหนักตัวอย่าง (มิลลิกรัม)} \times DM (\%) / 100$
- คำนวณน้ำหนักแห้งของหย้าแพงโกลา $= 0.2077 \times 1000 / (0.2077 \times 92.60 / 100)$

$$= 192.33 \text{ มิลลิกรัมแห้ง}$$
- คำนวณน้ำหนักแห้งของเมล็ดข้าวโพดบด $= 0.2059 \times 1000 / (0.2059 \times 88.50 / 100)$

$$= 182.22 \text{ มิลลิกรัมแห้ง}$$
- คำนวณปริมาตรก๊าซของหย้าแพงโกลาที่ 24 ชั่วโมง $= 41.5 \times 200 / 192.33$

$$= 43.25 \text{ มิลลิลิตร/200 มิลลิกรัมแห้ง}$$
- คำนวณปริมาตรก๊าซของเมล็ดข้าวโพดบดที่ 24 ชั่วโมง $= 63.5 \times 200 / 182.22$

$$= 69.70 \text{ มิลลิลิตร/200 มิลลิกรัมแห้ง}$$

7.2 นำค่าก๊าซสุทธิที่ 24 ชั่วโมง และค่าส่วนประกอบทางเคมี มาคำนวณหาค่า OMD ME และ NE_L ตามสมการ ที่เสนอไว้โดย Menke and Steingass (1988)

อาหารหยาบ

$$\text{OMD (\%)} = 15.38 + 0.8453\text{GP} + 0.0595\text{XP} + 0.0675\text{XA}$$

$$\text{ME (MJ/kgDM)} = 2.20 + 0.1357\text{GP} + 0.0057\text{XP} + 0.0002859\text{XL}^2$$

$$\text{NE}_L \text{ (MJ/kgDM)} = 0.54 + 0.0959\text{GP} + 0.0038\text{XP} + 0.0001733\text{XL}^2$$

อาหารข้น

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

$$\text{ME (MJ/kgDM)} = 1.06 + 0.1570\text{GP} + 0.0084\text{XP} + 0.0220\text{XL} - 0.0081\text{XA}$$

$$\text{NE}_L \text{ (MJ/kgDM)} = -0.36 + 0.1149\text{GP} + 0.0054\text{XP} + 0.0139\text{XL} - 0.0054\text{XA}$$

เมื่อ GP คือ ปริมาณก๊าซสุทธิที่ 24 ชั่วโมง (mL/200mgDM)

XP XL และ XA คือ โปรตีน ไขมัน และ เถ้า (g/kg DM)

ตัวอย่างการคำนวณ

ค่า OMD ME และ NE_L ของหญ้าแพงโกลา และเมล็ดข้าวโพดบด มีรายละเอียด ดังนี้

นำปริมาณการผลิตก๊าซสุทธิที่ 24 ชั่วโมง จากตัวอย่าง ข้อ 7.1 ของหญ้าแพงโกลา และเมล็ดข้าวโพดบดไปคำนวณร่วมกับส่วนประกอบทางเคมี (ตาราง 6.1) ที่ปรับจากหน่วยเปอร์เซ็นต์วัตถุดิบ เป็น กรัม ต่อ 1000 กรัมแห้ง ด้วยการหารข้อมูลเดิมด้วย 10 จากนั้นจึงนำไปใช้ประเมินค่า OMD ME และ NE_L ดังนี้

$$\begin{aligned} \text{หญ้าแพงโกลา มีค่า OMD} &= 15.38 + (0.8453 \times 43.25) + (0.0595 \times 0.905) + \\ &\quad (0.0675 \times 0.803) \end{aligned}$$

$$= 52.05 \text{ เปอร์เซ็นต์}$$

$$\begin{aligned} \text{ME} &= 2.20 + (0.1357 \times 43.25) + (0.0057 \times 0.905) + \\ &\quad (0.0002859 \times 0.158^2) \end{aligned}$$

$$= 8.074 \text{ MJ/kgDM}$$

$$\text{ปรับหน่วยพลังงานจาก J เป็น cal} = 8.074 / 4.184 = 1.930 \text{ Mcal/kgDM}$$

$$\begin{aligned} \text{NE}_L &= 0.54 + (0.0959 \times 43.25) + (0.0057 \times 0.905) + \\ &\quad (0.0001733 \times 0.158^2) \end{aligned}$$

$$= 4.693 \text{ MJ/kgDM หรือ } 1.122 \text{ Mcal/kgDM}$$

เมล็ดข้าวโพดบด มีค่า

$$\begin{aligned}
 \text{OMD} &= 9.00 + (0.9991 \times 63.5) + (0.0595 \times 1.02) + \\
 &\quad (0.0181 \times 0.23) \\
 &= 72.51 \text{ เปอร์เซ็นต์} \\
 \text{ME} &= 1.06 + (0.1570 \times 63.5) + (0.0084 \times 1.02) + \\
 &\quad (0.0220 \times 0.70) - (0.0081 \times 0.23) \\
 &= 11.052 \text{ MJ/kgDM หรือ } 2.64 \text{ Mcal/kgDM} \\
 \text{NE}_l &= -0.36 + (0.1149 \times 63.5) + (0.0054 \times 1.02) + \\
 &\quad (0.0139 \times 0.70) - (0.0054 \times 0.23) \\
 &= 6.950 \text{ MJ/kgDM หรือ } 1.66 \text{ Mcal/kgDM}
 \end{aligned}$$

บรรณานุกรม

- บุญล้อม ชีวะอิสระกุล. 2541. โภชนศาสตร์สัตว์. เล่ม 1. พิมพ์ครั้งที่ 6. ธนบรรณการพิมพ์, เชียงใหม่.
- บุญล้อม ชีวะอิสระกุล. 2546. ชีวเคมีทางสัตวศาสตร์. ปรับปรุงครั้งที่ 2. พิมพ์ครั้งที่ 1. ห้างหุ้นส่วนจำกัด. ธนบรรณการพิมพ์, เชียงใหม่.
- วิศิษฐ์พร สุขสมบัติ. 2541. การประเมินค่าการย่อยสลายโปรตีนในกระเพาะหมักของสัตว์เคี้ยวเอื้องโดยวิธีการใช้ถุงไนลอน. วารสารเทคโนโลยีสุรนารี. 5 (1): 38-50.
- Ali, M., J.W. Cone, G. van Duinkerken, A. Klop, M.C. Blok, M. Bruinenberg, N.A. Khan, and W.H. Hendriks. 2016. Variation between individual cows in *in situ* rumen degradation characteristics of maize and grass silages. NJAS - Wageningen Journal of Life Sciences. 78: 167–173.
- Ammar, H., M.J. Ranilla, M.L. Tejido, F.J. Ovejero, J.S. González, and S. López. 2004. Effect of inoculum source (sheep or goat rumen fluid) on *in vitro* digestibility and gas production kinetics of the foliage of some Spanish browse plants. Available source: <https://om.ciheam.org/om/pdf/a59/04600017.pdf>. November 11, 2023.
- AOAC. 2016. Official Methods of Analysis of AOAC International, 20th Editions. AOAC International, Rockville, Maryland.
- Belanche, A., J.M. Palma-Hidalgo, I. Nejjam, R. Serrano, E. Jiménez, I. Martín-García, and D.R. Yáñez-Ruiz. 2018. *In vitro* assessment of the factors that determine the activity of the rumen microbiota for further applications as inoculum: Factors affecting rumen microbial activity in vitro. Journal of the Science of Food and Agriculture. Available source: <https://www.researchgate.net/publication/325468682>. November 2, 2022.
- Blaxter, K. 1989. Energy Metabolism in Animals and Man. 1st. Cambridge University Press, Cambridge.

- Bowman, J. and B. Sowell. 1998. Feeding the beef cow herd. pp. 243-261. In: Kellems R.O. and D.C. Church eds. *Livestock Feed and Feeding*. 4th edit. Prentice Hall, New Jersey.
- Brouwer, E. 1965. Report of sub-committee on constants and factors. pp. 302-304. In: Blaxter K.L. ed. *Energy Metabolism*. Proceedings of the 3rd Symposium, Academic press, London.
- Chen, X.B. no date. Neway excel: A utility for processing data of feed degradability and *In vitro* gas production. Version 6 (for office XP) International Feed Resources Unit, Macaulay Land Use Research Institute (MLURI), Aberdeen.
- Cottyn, B.G., J.L. De Boever, and J.M. Vanacker. 1989. *In vivo* digestibility measurement of straws. pp. 36-46. In: Chenost, M. and P. Reiniger. eds. *Evaluation of Straws in Ruminant Feeding* Elsevier Applied Science, London, UK.
- DePeters, E.J. and L.W. George. 2015. Collection of rumen fluid. Available source: <https://www.agproud.com/articles/21026-collection-of-rumen-fluid>. December 22, 2023.
- Fortina, R., S.G. Patrucco, S. Barbera, and S. Tassone. 2022. Rumen fluid from slaughtered animals: a standardized procedure for sampling, storage and use in digestibility trials. *Methods Protocol* 5 (59). Available source: <https://doi.org/10.3390/mps5040059>. October 12, 2022.
- Foster, J.L., W.B. Smith, F. M. Rouquette, and L.O. Tedeschi. 2023. Forages and pastures symposium: an update on in vitro and in situ experimental techniques for approximation of ruminal fiber degradation. *Journal of Animal Science*. 101: 1-14.
- Galyean, M.L. 2010. *Laboratory Procedures in Animal Nutrition Research*. 14th Revised. Department of Animal and Food Sciences, Texas Technology University, Lubbock. 189 p.
- Grant, R.J., H.M. Dann, M.E. Woolpert, and W.H. Miner. 2015. Time required for adaptation of behavior, feed intake, and dietary digestibility in cattle. Abstract. *Journal of Animal Science*. 93, Supply s3. 312.

- Hoffman, P.C., R.D. Shaver, D.K. Combs, D.J. Undersander, L.M. Bauman, and T. K. Seeger. 2001. Understanding NDF digestibility of forages. Focus on Forage. 3 (10). Available source: <https://fyi.extension.wisc.edu/forage/files/2016/10/NDFDig-2.pdf>
- Hoffman, P.C. and D.K. Combs. 2004. Using NDF digestibility in ration formulation. Focus on Forage. 3 (3). Available source: <https://fyi.extension.wisc.edu/forage/files/2014/01/NDFD04-FOF.pdf>
- Holden, L. A. 1999. Comparison of methods of in vitro dry matter digestibility for ten feeds. Journal of Dairy Science. 82: 1791–1794.
- ISO. 2009. International Standard (ISO 5983-2: 2009). 2nd Edition. Animal feeding stuffs- Determination of nitrogen content and calculation of crude protein content- Part 2: Block digestion and steam distillation method. International Standard Organization, Geneva.
- ISO. 2015. International Standard (ISO 11085: 2015(E)). Cereals, cereals-based products and animal feeding stuffs – Determination of crude fat and total fat content by the Randall extraction method. International Standard Organization, Geneva.
- Kawashima, T., W. Sumamal, F. Terada, and M. Shibata. 2001. Respiration trial system using ventilated flow-through method with a face mask. JIRCAS Journal. 9: 53-74.
- Khan, M.A., Mahr-un-Nisa, and M. Sawar. 2003. Review: Techniques measuring digestibility for the nutritional evaluation of feeds. International Journal of Agriculture and Biology. 5 (1) 91–94. Available source: <http://www.ijab.org>. September 16, 2023.
- King, W.A., J. Lee, J Webb, and D.B. Boderick. 1959. Comparison of 6- and 10- day collection periods for digestion trials with dairy heifers. Technical contribution No. 320, South Carolina Agricultural Experiment Station, Clemson College, Clemson.

- King, J. and J. C. Plaizier. 2006. Effects of source of rumen fluid on *in vitro* dry matter digestibility of feeds determined using the DAISYII incubator. Canadian Journal of Animal Science, 86: 439-441. Available source: <https://cdnsiencepub.com/doi/pdf/10.4141/A06-013>. November 1, 2023.
- Kitessa, S., P.C. Flinn, and G.G. Irish. 1999. Comparison of methods to predict the *in vivo* digestibility of feeds in ruminants. Australian Journal of Agricultural Research. 50: 825-841.
- Lopez, S. 2005. *In vitro* and *in situ* techniques for estimating digestibility. pp.87-121. In: Dijkstra J., J.M. Forbes, and J. France. eds. Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism. 2nd edit. CABI Publishing, Wallingford.
- Mabjeesh, S.J., M. Cohen, and A. Arieli. 2000. *In vitro* methods for measuring the dry matter digestibility of ruminant feedstuffs: Comparison of methods and inoculum source. Journal of Dairy Science. 83: 2289–2294.
- Martz, F.A. and Belyea L.R. 1986. Role of particle size and forage quality in digestion and passage by cattle and sheep. Symposium: Forage utilization by the lactating cow. Journal of Dairy Science. 69 (7): 1996-2008.
- McDonald, P., R.A. Edwards, J.F.D. Greenhalgh, C.A. Morgan, L.A. Sinclair, and R.G. Wikinson. 2010. Animal Nutrition. 7th Edition. Pearson.
- McLean, J.A. and G. Tebbin. 1987. Animal and Human Calorimetry. 1st. Cambridge University Press, Cambridge.
- Menke, K. H., L. Raab, A. Salewski, H. Steingass, D. Fritz, and W. Schneider. 1979. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. Journal of agricultural science, Cambridge. 93, 217-222.
- Menke, H.H. and Steingass, H. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. Animal Research and Development. 28: 7-55.

- Mertens, D.R. 2002. Measuring DM and NDF digestibility and defining their importance. Available source: https://www.ars.usda.gov/ARSTUserFiles/50901500/pdfs/02_NIRSC_Mertens_Measuring%20Dig.pdf. November 1, 2023.
- Mesgaran, S.D., B. Kuhla, R. Baumont, G. Cantalapiedra-Hijar, P. Nozière, P. Lund, D. Humphries, and J. Dijkstra. 2020. Nutrient digestibility and balance studies. Available source: <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0>. November 1, 2023.
- Muttoni, G., N. Palacios-Rojas, L. Galicia, A. Rosales, K.V. Pixley, N. de Leon. 2013. Cell wall composition and biomass digestibility diversity in Mexican maize (*Zea mays* L.) landraces and CIMMYT inbred lines. Available source: <https://journals-crea.4science.it/index.php/maydica/article/view/893>. May 3, 2019.
- NRC. 2001. Nutrient requirements of dairy cattle. 7th Revised Edition, Subcommittee on Dairy Cattle Nutrition, Committee on Animal Nutrition, Board on Agriculture and Natural Resources, National Research Council, National Academy Press, Washington, D.C.
- Oba, M. and M.S. Allen. 1999. Evaluation of the importance of the digestibility of neutral detergent fiber from forage: effects on dry matter intake and milk yield of dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 82: 589–596.
- Ørskov, E.R. and McDonald I. 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *Journal of agricultural science, Cambridge*. 92: 499-503.
- Ørskov, E.R., F.D. DeB Hovell, and F. Mould. 1980. The use of the nylon bag technique for the evaluation of feedstuffs. *Tropical Animal Health and Production*. 5 (3): 195-213.
- Ørskov, E.R. 2000. The in situ technique for the estimation of forage degradability in ruminants, pp. 175-188. In: Givens D.I., E. Owen, R.F.E. Axford, and H.M. Omed J. agric. Sci eds. *Forage Evaluation in Ruminant Nutrition*. CAB International Publishing, Wallingford.

- Osborne, V.R. 2004. Improving environmental sustainability of beef farms in Ontario by measuring neutral detergent fiber digestibility. Final report, ICAR Registration No. 33331681.
- Palmonari, A., G. Canestrari, M. Fustini, E. Bonfante, L. Mammi, and A. Formigoni. 2016. Using single or multiple liquor-donor cows for in vitro digestibility of amylase and sodium sulfite-treated neutral detergent fiber with ash correction. *Journal of Dairy Science*. 99: 9754–9758. Available source: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2016-11198>. November 1, 2023.
- Rymer, C. 2000. The measurement of forage digestibility *in vivo*, pp. 113-154. In: Givens D.I., E. Owen, R.F.E. Axford, and H.M. Omed eds. *Forage Evaluation in Ruminant Nutrition*. CAB International Publishing, Wallingford.
- Sallam, S.M.A., M.E.A. Nasser, A.M. El-Waziry, I.C.S. Bueno and A.L. Abdalla. 2007. Use of an *in vitro* rumen gas production technique to evaluate some ruminant feedstuffs. *Journal of Applied Sciences Research*. 3(1): 34-41.
- Schneider, B.H. and W.P. Flatt. 1975. *The Evaluation of Feeds through Digestibility Experiments*. The University of Georgia Press, Athens.
- Spanghero, M., P. Berzaghi, R. Fortina, F. Masoero, L. Rapetti, C. Zanfi, S. Tassone, A. Gallo, S. Colombini, and J.C. Ferlito. 2010. Precision and accuracy of in vitro digestion of neutral detergent fiber and predicted net energy of lactation content of fibrous feeds. *Journal of Dairy Science*. 93: 4855–4859.
- Spanghero, M., M. Chiaravalli, S. Colombini, C. Fabro, F. Frolidi, F. Mason, M. Moschini, C. Sarnataro, S. Schiavon, and F. Tagliapietra. 2019. Rumen inoculum collected from cows at slaughter or from a continuous fermenter and preserved in warm, refrigerated, chilled or freeze-dried environments for *in vitro* tests. *Animals*. 9 (815). doi:10.3390/ani9100815. Available source: <https://www.mdpi.com/journal/animals>. March 1, 2023.
- Stern, M. D., A. Bach and S. Calsamiglia. 1997. Alternative techniques for measuring nutrient digestion in ruminants. *Journal of Animal Science*. 75:2256-2276.

- Susmel, P. and S. Filacorda. 1996. Biological methods to predict the nutritive value of tropical and Mediterranean feedstuffs: a critical review. *Annales de zootechnie, INRA/EDP Sciences*. 45 (Suppl1): 39-51.
- Suzuki, T., G.J. McCrabb, T. Nishida, S. Indramanee, M. Kurihara, H.P.S. Makkar, and P.E. Vercoe. 2007. Construction and Operation of Ventilated Hood-Type Respiration Calorimeters for *In Vivo* Measurement of Methane Production and Energy Partition in Ruminants Measuring Methane Production from Ruminants, Springer Netherlands. pp. 125-135.
- Suzuki, T., I. Phaowphaisal, P. Pholsen, R. Narmsilee, S. Indramanee, P. Nitipot, A. Chaokaur, K. Sommart, N. Khotprom, V. Panichpol, and T. Nishida. 2008. *In vivo* nutritive value of Pangola grass (*Digitaria eriantha*) hay by a novel indirect calorimeter with a ventilated hood in Thailand. *Japan Agriculture Research Quarterly*. 42(2): 123–129.
- Terada, F., R. Tano, K. Iwasaki, and T. Haryu. 1982. The influence of the length of preliminary and collection periods on the variation of digestibilities in goats. *Japanese Journal of Zootechnical Science*. 53(1): 29-32.
- Terada, F., R. Tano, K. Iwasaki, and T. Haryu. 1987. Comparison of nutritive values among cattle, sheep and goats fed the same diets. *Japanese Journal of Zootechnical Science*. 58(2): 131-137.
- Vanzant, E.S., R.C. Cochran, and E.C. Titgemeyer. 1998. Standardization of in situ techniques for ruminant feedstuff evaluation. *Journal of Animal Science*. 76: 2717-2729.
- Weiss, W.P. and A.W. Tebbe. 2019. Estimating digestible energy values of feeds and diets and integrating those values into net energy systems. *Translational Animal Science*. 3 (3): 953–961.
- Woods, V.B., A.P. Moloney, F.J. Mulligan, M.J. Kenny, and F.P. O'Mara. 1999. The effect of animal species (cattle or sheep) and level of intake by cattle on in vivo digestibility of concentrate ingredients. *Animal Feed Science and Technology*. 80: 135-150.

