วิทยานิพนธ์ งานวิจัย
สำนักวิทยบริการฯ มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

การทดลองจะดำเนินการเป็นไปตามที่วางแผนเอาไว้ดังนี้

3.1 วิธีดำเนินการทดลอง

1.ให้สัตว์ทดลองขังในคอกเดี่ยวและได้รับการเสริมแร่ธาตุก้อนเพื่อป้องกันการขาดแร่ธาตุด้วยวิธีให้สัตว์ได้ เลียอิสระ

2. มีน้ำสะอาดให้โคกินตลอดเวลา

3. สัตว์ทดลองทุกตัวได้รับอาหารตามทรีทเมนต์ที่กำหนดในระยะเวลา 90 วัน

3.2 กระบวนการผลิตมันสัมปะหลังหมักยีสต์ – มาเลท

การเพิ่มคุณภาพของโปรตีนในมันสัมปะหลังโดยใช้เชื้อยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae*) โดยนำเชื้อยีสต์นี้ไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว (liquid media) เป็นเวลา 60 ชั่วโมง และนำเชื้อยีสต์และมาเลท ที่เจริญเติบโตในอาหารเหลวในอัตราส่วนที่เหมาะสมนำมาหมักร่วมกับมันเส้นในอัตราส่วน 250 มิลลิกรัมต่อ 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อดำเนินกระบวนการหมักเรียบร้อยแล้วนำมันสำปะหลังหมักยีสต์ไปตากแดดเป็นเวลา 3 วัน เพื่อเก็บไว้ใช้เป็นแหล่งของโปรตีนและพลังงานต่อไป

3.3 กรรมวิธีการผลิตมันสำปะหลังหมักยีสต์

1. ทำการกระตุ้นเชื้อยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae*) เป็นจำนวน 20 กรัม ร่วมกับผสมกับน้ำตาล 20 กรัม และสารอินทรีย์โซเดี่ยมดีแอลมาเลท 5 กรัม ในขั้นตอนสุดท้ายผสมกับน้ำให้ครบ 100 มิลลิลตร หลังจากนั้นทำการผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันและตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

2. ทำการเตรียมอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อยีสต์ โดยใช้กากน้ำตาล 24 กรัม ร่วมกับยูเรีย 48 กรัม หลังจากนั้นเติมน้ำให้ครบ 100 มิลลิลิตร และทำการผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน

3. ทำการปรับ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อให้อยู่ในช่วง 3.5 – 4.5 โดยใช้กรด H_2SO_4 เข้มข้นหลังจากนั้นเมื่อเวลาผ่านไป 1 ชั่วโมง นำเชื้อยีสต์ไปเลี้ยงเพื่อเจริญเติบโตในอาหารเชื้อแบบเหลว (liquid media)เป็นเวลา 60 ชั่วโมง

4. ทำการให้ออกซิเจนปั้มตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษา

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY
109702

5. หลังจากนั้นนำของเหลวจากกระบวนการหมักที่หมักเป็นเวลา 60 ชั่วโมง มาดำเนินกระบวนการหมักร่วมกับมันสำปะหลังในลักษณะการหมักแบบกึ่งแห้ง (solid media) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ในสัดส่วนมันเส้น 1 กิโลกรัมต่อของเหลวจากกระบวนการหมัก 500 มิลลิลิตร (กฤษฎา และคณะ 2550)

3.4 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของมันเส้นหมักยีสต์-มาเลท ได้แก่ วัตถุแห้ง, อินทรียวัตถุ, ไขมัน, โปรตีนหยาบ ตามวิธีของ AOAC (1990) neutral detergent fiber (NDF), acid-detergent fiber (ADF) ตามวิธีการของ Van Soest *et al.* (1994)

3.5 สัตว์ทดลอง

1. โคพื้นเมือง จำนวน 4 ตัวน้ำหนักตัวเฉลี่ย 200±10 กิโลกรัม
2. สัตว์ทุกตัวได้รับการถ่ายพยาธิทั้งภายในและภายนอกก่อนเข้าการทดลอง
3. สัตว์ทุกตัวได้รับการฉีดวิตามินเอ, ดี และอี พร้อมทั้งฉีดวัคซีนป้องกันโรคปากเท้าเปื่อยและโรคคอบวมให้สัตว์ทุกตัวก่อนเข้าการทดลอง

3.6 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. ถังหมัก
2. air pump
3. pH – meter

3.7 แผนการทดลองและกลุ่มการทดลอง

ทำการเปรียบเทียบประชากรสองกลุ่มที่อิสระต่อกันโดยสุ่มสัตว์ทดลองแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม และมีจำนวน 2 ตัวต่อกลุ่ม ซึ่งมีทรีทเมนต์ (Treatment) ที่ทดสอบดังนี้

ทรีทเมนต์ที่ 1 : เสริมอาหารข้นโปรตีน 14 เปอร์เซ็นต์

ทรีทเมนต์ที่ 2 : เสริมมันเส้นหมักยีสต์-มาเลท

หมายเหตุ: สัตว์ทดลองทั้งสองกลุ่มได้รับการเสริมทรีทเมนต์ปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัวร่วมกับอาหารหยาบฟางข้าวกินเต็มที่ *(ad libitum)*

3.8 การเก็บข้อมูลและสุ่มเก็บตัวอย่าง

1. บันทึกปริมาณการกินได้อิสระของอาหารข้นและอาหารหยาบ ทำการบันทึกปริมาณการให้อาหารหยาบทุกครั้งที่ให้ โดยชั่งน้ำหนักก่อนให้และอาหยาบที่เหลือจะชั่งออกในตอนเช้าของวันถัดไปก่อนให้อาหารตอนเช้าและคำนวณปริมาณการกินได้ในแต่ละวัน

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

2.เก็บตัวอย่างอาหารและวิเคราะห์หาเถ้าที่ไม่ละลายในกรด (acid-insoluble ash; AIA) เพื่อประเมินความสามารถของการย่อยได้ของโภชนะของอาหาร

3.เก็บตัวอย่างเลือด หลังการให้อาหารในวันที่ 1, 15, 30, 60, 90 วันสุดท้ายของการทดลอง ซึ่งสุ่มเก็บจากเส้นเลือดใหญ่บริเวณคอ (jugular vein) นำมาปั่นเหวี่ยง (centrifuge) และเก็บส่วน plasma เพื่อนำมาวิเคราะห์หายูเรียในเลือด (blood urea nitrogen; BUN)

4.ทำการชั่งน้ำหนักสัตว์ทดลองโดยชั่งน้ำหนักช่วงปรับการทดลองและในวันแรกของการทดลอง และทุกๆ 30 วันของการทดลองเพื่อคำนวณหาปริมาณการกินได้โดยใช้หน่วยเป็นกิโลกรัม/ตัว/วัน

5.เก็บตัวอย่างของเหลวในกระเพาะหมัก (rumen fluid) ของสัตว์ทดลองทุกตัวหลังการให้อาหารในวันที่ 1, 30, 60, 90 วันสุดท้ายของการทดลอง โดยวิธีการใช้ stomach tube ร่วมกับ vacuum pump แล้วแบ่ง rumen fluid เป็น 2 ส่วน

ส่วนที่หนึ่ง ประมาณ 100 มิลลิลิตร นำมาวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH) โดยใช้เครื่อง pH meter (Orion Research Model SA 230) จากนั้นนำตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะหมักประมาณ 30 มิลลิลิตร แล้วปรับให้ค่า pH ประมาณ 2 ด้วยการเติม 1M H_2SO_4 ในสัดส่วน 1M H_2SO_4 ต่อของเหลวจากกระเพาะหมักคือ 1:2 เพื่อหยุดการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เก็บเอาส่วนใส แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาวิเคราะห์หาแอมโมเนียไนโตรเจน (NH_3-N) โดยใช้เครื่อง KJELTEC Auto 1030 Analyzer ตามวิธีของ Bromner and Keeney (1965) และนำมาวิเคราะห์หาความเข้มข้นของแอมโมเนียไนโตรเจนของเหลวในรูเมน

ส่วนที่สองนำ rumen content ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดที่บรรจุ 10% formaline in normol saline with methyl green ในปริมาณ 9 มิลลิลิตร เขย่าขวดเพื่อผสมให้เข้ากัน จากนั้นจึงนำไปนับภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยวิธีการนับตรง เพื่อวิเคราะหาจำนวณประชากรจุลินทรีย์ในกระเพาะหมักได้แก่ แบคทีเรีย โปรโตซัว และเชื้อรา

3.9 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้ทั้งหมดทำการวิเคราะห์ทางสถิติเปรียบเทียบประชากรสองกลุ่มโดย Proc TTEST (SAS, 1998)

มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

3.10 ระยะเวลาที่ทำการวิจัย สถานที่ทำการทดลองและเก็บข้อมูล

- โครงการวิจัยนี้จะทำการศึกษาเป็นระยะเวลา 1 ปี ตั้งแต่ ปี 2551-2552 ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

กิจกรรมต่างๆ ที่ปฏิบัติ	เดือนที่											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1.เตรียมวัตถุดิบอาหาร และอุปกรณ์เครื่องมือ	←	→										
2. ระยะเวลาปรับสัตว์ทดลอง			←	→								
3. ระยะเวลาทดลอง					←	→						
4. วิเคราะห์ตัวอย่าง							←			→		
5.สรุปผลและเขียนรายงานผล											←	→