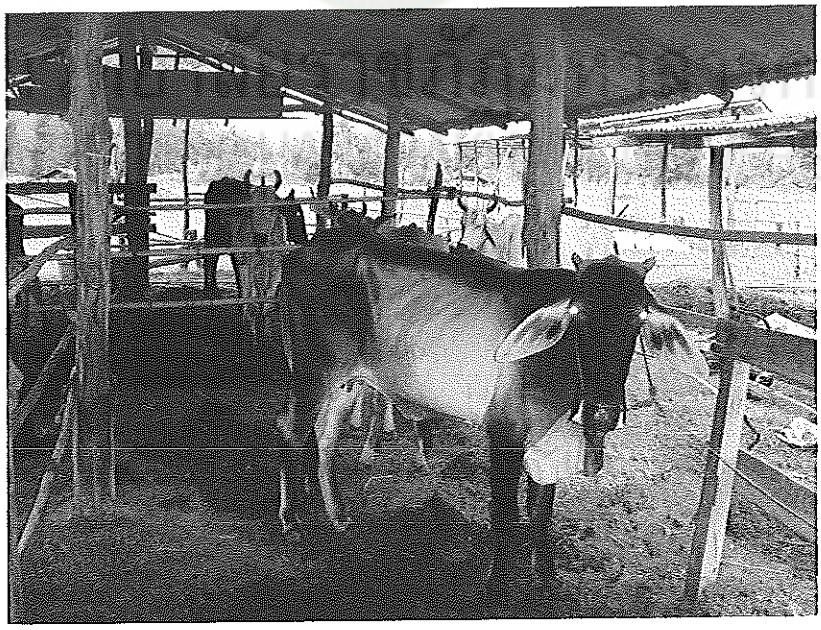
ภาคผนวก ก

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

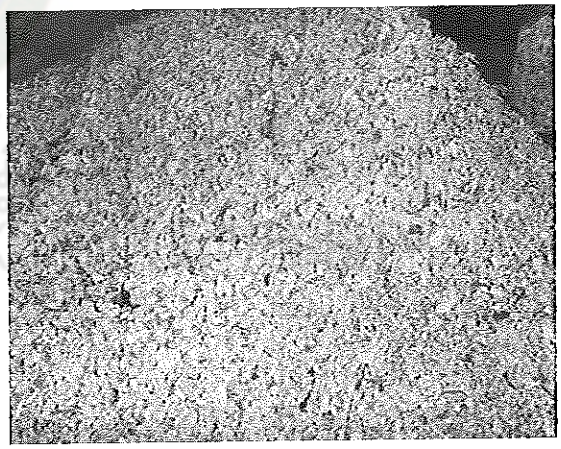


ภาพภาคผนวกที่ 1 แสดงสัตว์ทดลองที่ใช้ในการวิจัย

1. เปลือกทุเรียนที่ผ่านการบด

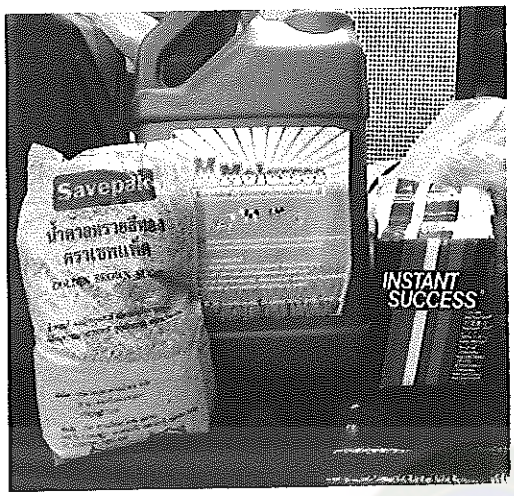
2. เปลือกล้างมันสำปะหลัง

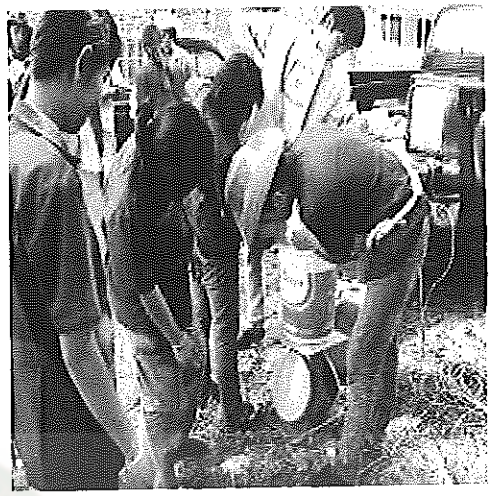
3. กากมันสำปะหลัง

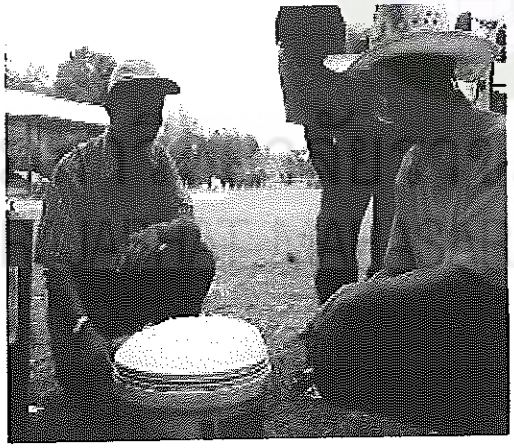


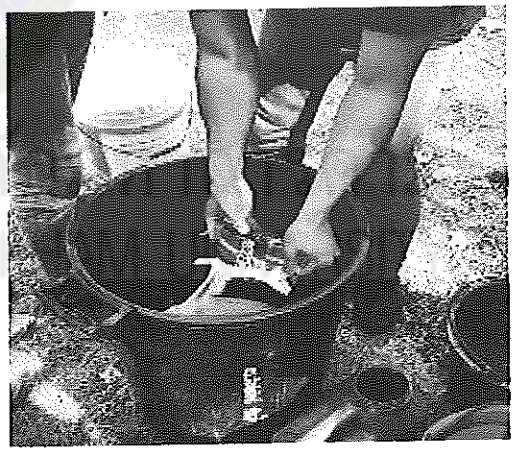
4. หัวมันสำปะหลังที่ผ่านการบด

ภาพภาคผนวกที่ 2 วัตถุดิบอาหารที่นำมาวิจัย

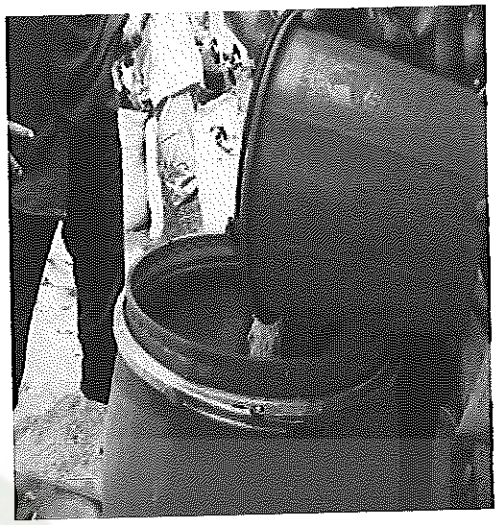


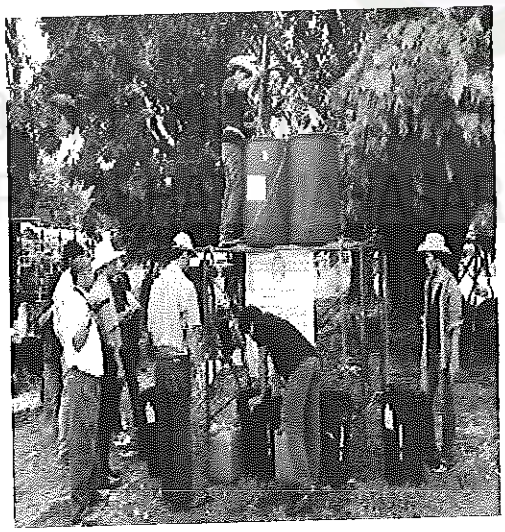




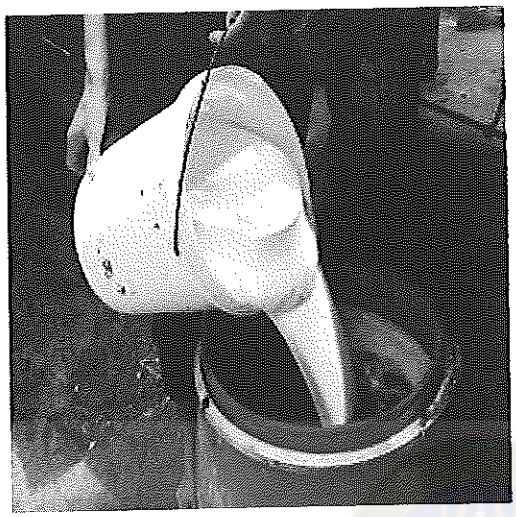
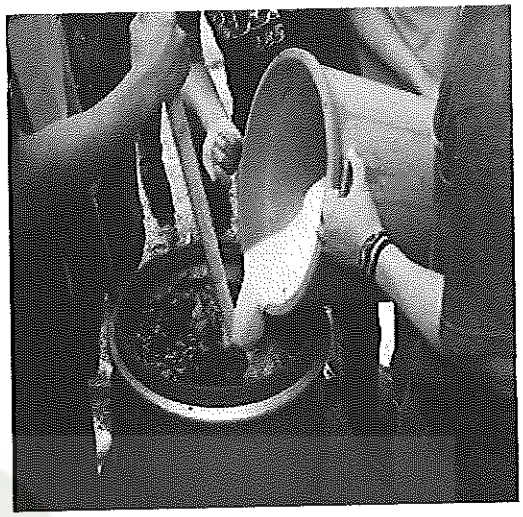


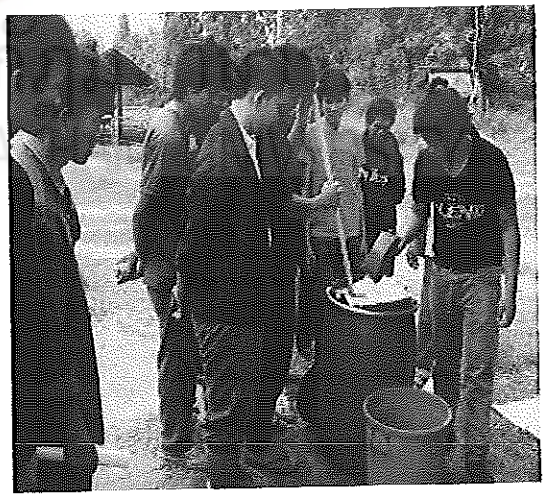
ภาพภาคผนวกที่ 3 กระบวนการกระตุ้นเชื้อยีสต์



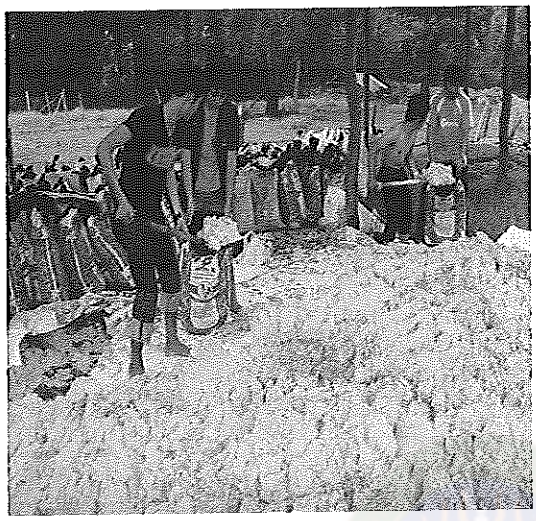
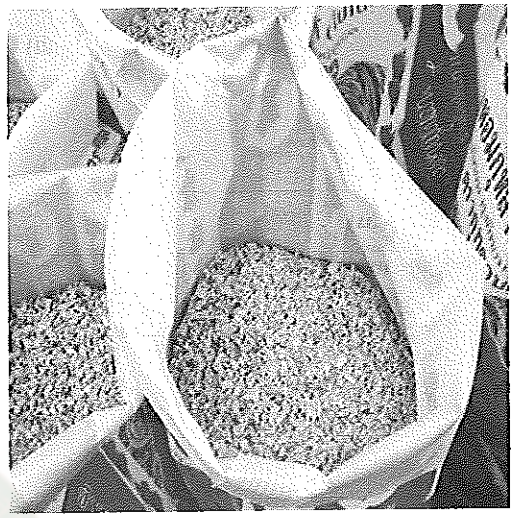
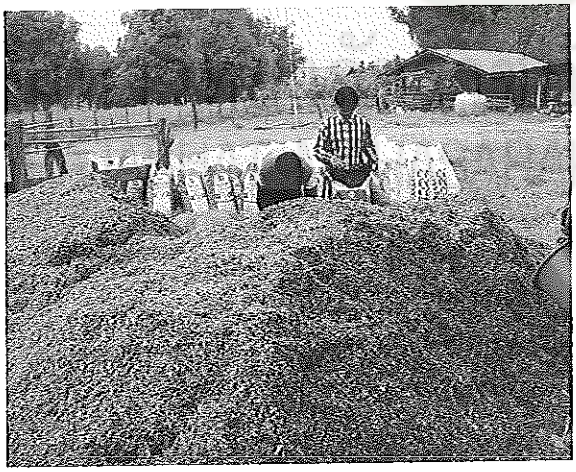
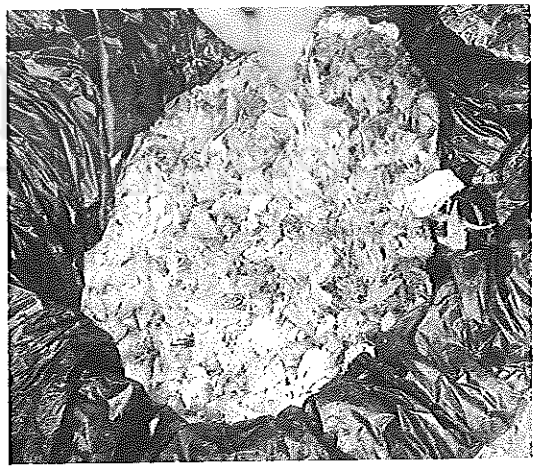


ภาพภาคผนวกที่ 4 กระบวนการเตรียมสารละลายกากน้ำตาลยูเรีย

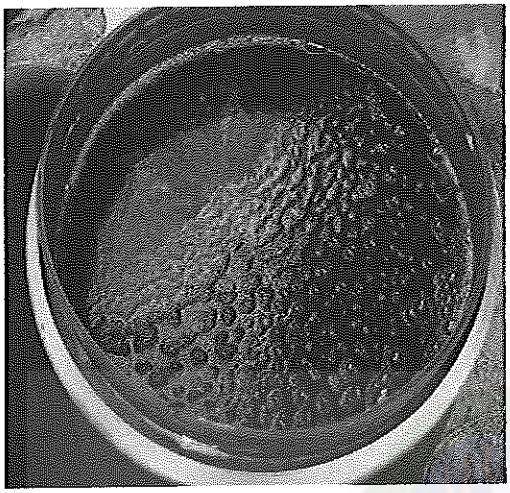
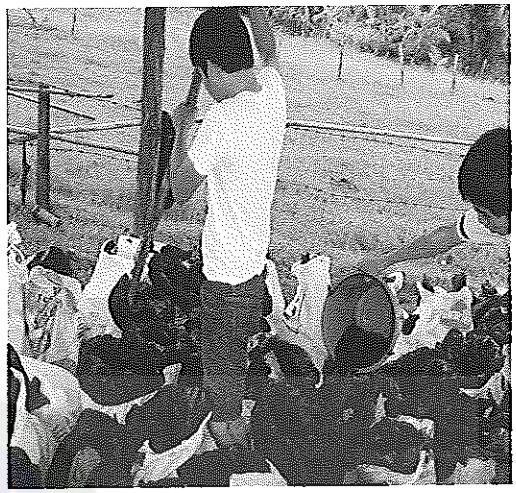
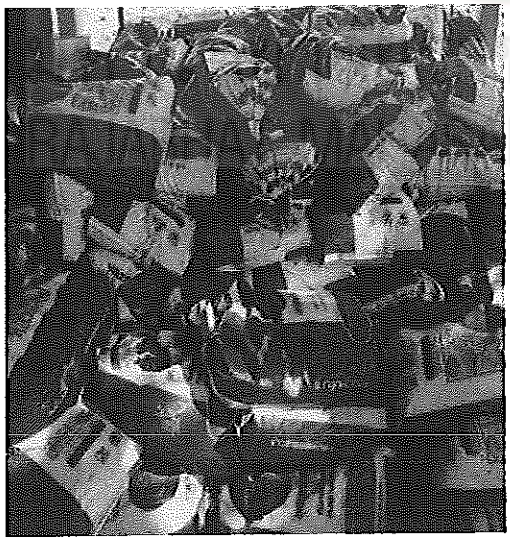
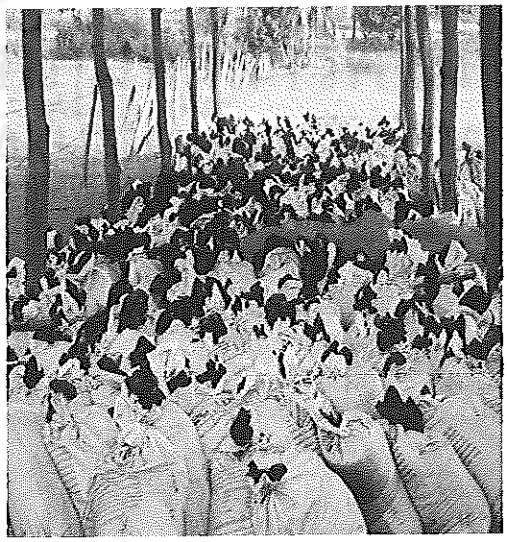





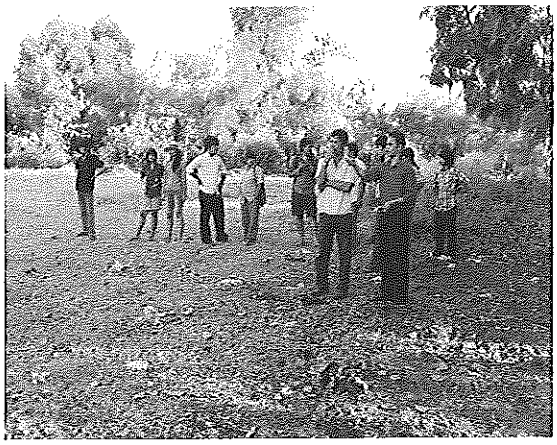
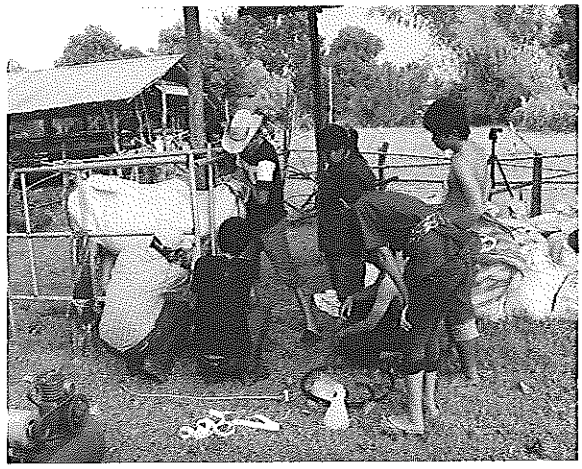
ภาพภาคผนวกที่ 5 กระบวนการเทน้ำยีสต์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

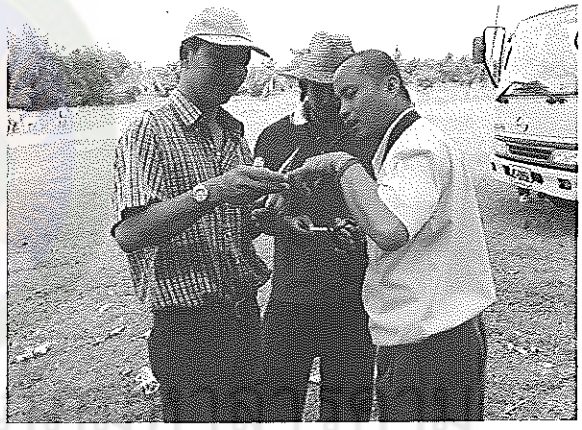





ภาพภาคผนวกที่ 6 กระบวนการบรรจุกากมันสำปะหลัง, มันสำปะหลัง, กากมันสำปะหลัง และเปลือกทุเรียน

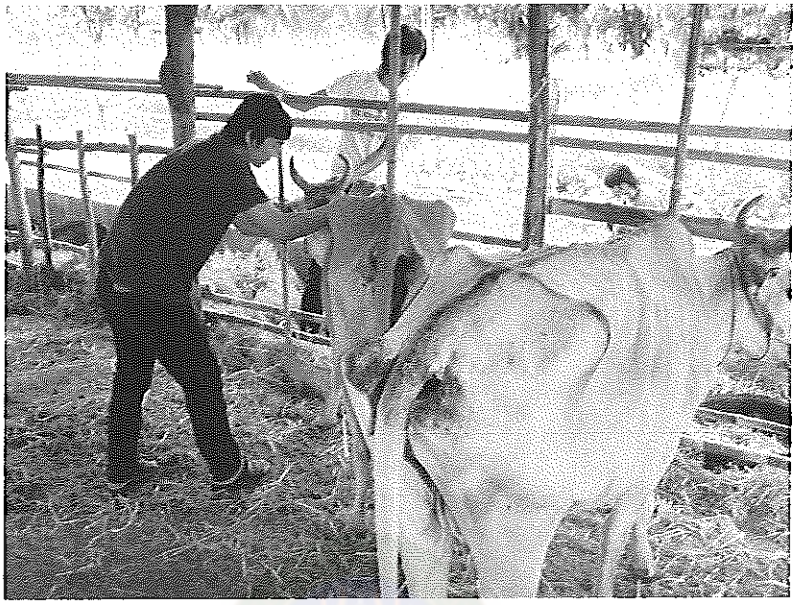
ภาพภาคผนวกที่ 7 กระบวนการเติมน้ำหมักยีสต์ลงในกากมันสำปะหลัง, มันสำปะหลัง, กากมันสำปะหลัง และเปลือกทุเรียน

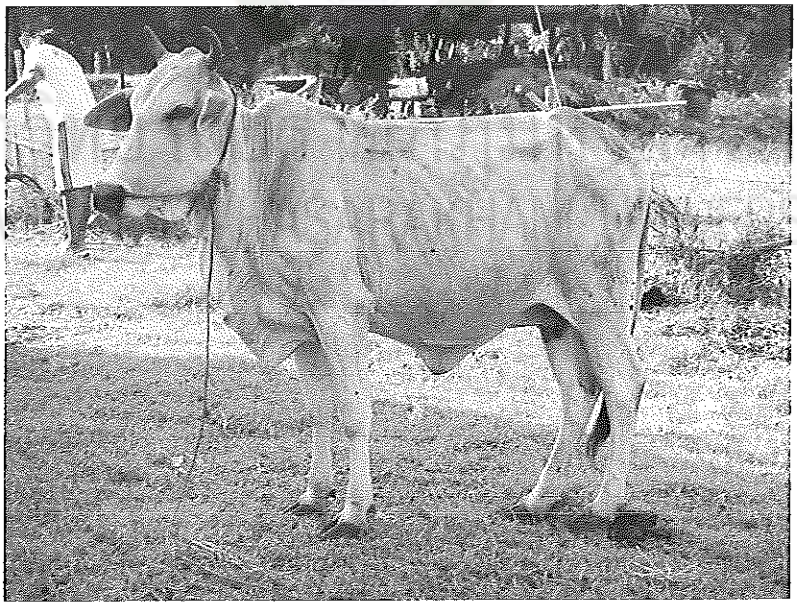


RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ภาพภาคผนวกที่ 8 แสดงการสุ่มตัวอย่างในโคเนื้อลูกผสมพันธุ์พื้นเมือง



1. โคเนื้อลูกผสมพันธุ์พื้นเมืองก่อนทำการทดลอง



2. โคเนื้อลูกผสมพันธุ์พื้นเมืองหลังการทดลอง

ภาพภาคผนวกที่ 9 โคเนื้อลูกผสมพันธุ์พื้นเมืองก่อนเข้าการทดลอง และหลังการทดลอง

ภาคผนวก ข

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ระบบการวิเคราะห์แบบประมาณ (Proximate Analysis System)

1. วัตถุแห้ง (Dry Matter, DM) โดยอบตัวอย่างที่อุณหภูมิ 100 °C

2. อีเธอร์เอกซ์แทรก (Ether Extract) หรือไขมันโดยการสกัดตัวอย่างด้วยสารละลายอีเธอร์

3. ปริมาณเยื่อใยหยาบ (Crude Fiber) โดยการต้มตัวอย่างด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น 1.25 % และตามด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.25 % ส่วนที่ไม่ละลายนั้นนำไปอบแห้ง ชั่งน้ำหนักและเผา ส่วนที่เป็นสารอินทรีย์วัตถุที่ไม่ละลายทั้งหมดคือเยื่อใยหยาบ

4. ปริมาณโปรตีนหยาบ (Crude Protein, CP) เป็นการวิเคราะห์ไนโตรเจน โดยการย่อยตัวอย่างด้วยกรดซัลฟูริก เสร็จแล้วนำไปกลั่นด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ และจับไนโตรเจนด้วยกรดบอริก และนำสารละลายไปไตเตรทด้วยกรดที่ทราบความเข้มข้น เช่น วิธี Kjeldhal ค่าที่ได้จะปรับให้เป็นค่าโปรตีนหยาบ โดยคูณด้วย 6.25

5. ปริมาณเถ้า (Ash) โดยการเผาตัวอย่างในเตาเผาที่อุณหภูมิ 475 °C เป็นเวลาอย่างน้อย 3-4 ชั่วโมง

6. ปริมาณค่าคาร์โบไฮเดรทหรือไนโตรเจนฟรีเอกซ์แทรก (Nitrogen Free Extract, NFE) NFE (%) = 100-[H2O + CF + EE +Ash + CP (N x 6.25)]

การวิเคราะห์หาวัตถุแห้ง (Dry Matter) (AOAC, 1985)

นำวัตถุดิบไปอบที่ 100–105 °C นาน 12 - 24 ชั่วโมง แล้วนำน้ำหนักก่อนและหลังอบมาลบกับปริมาณความชื้นจะถูกระเหยกลายเป็นไอน้ำออกนอกวัตถุดิบอาหาร ดังนั้น ส่วนที่เหลือก็เป็นส่วนของอาหารที่ถูกระเหยออกหรือเรียกว่าวัตถุแห้ง (Dry Matter)

อุปกรณ์

1. จานอะลูมิเนียม (Aluminum Pan)
2. โถดูดความชื้น (Desicator)
3. ตู้อบ 100 °C (Drying Oven)
4. คีมคีบสำหรับจับจานอลูมิเนียม (Tong)
5. เครื่องชั่งละเอียด (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง)

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

วิธีการ

จานอะลูมิเนียม (ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ)

อบที่ 100 °C 15 - 30 นาที

↓

ใส่ใน Desicator ทิ้งให้เย็น

ชั่งน้ำหนัก บันทึกไว้

↓

ชั่ง 2 - 5 กรัม (ตัวอย่างแห้ง) หรือ 20 - 25 กรัม (มูลเปียก) ใส่จาน บันทึกน้ำหนัก

↓

อบที่ 100 °C นาน 12 - 24 ชั่วโมง

↓

เอาออกใส่ Desicator ทิ้งไว้ให้เย็น

ชั่งน้ำหนักคืน

$$\text{การคำนวณ } \%DM = \frac{(\text{น้ำหนักจาน + Sample หลังอบ}) - \text{น้ำหนักจานก่อนอบ} \times 100}{\text{น้ำหนัก Sample ที่ใช้ในการวิเคราะห์}}$$

% ความชื้น = 100 - %DM

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

การวิเคราะห์หาเถ้า (Ash)

ปริมาณเถ้าทั้งหมด (Total Ash) คือ ส่วนที่เป็นสารอนินทรีย์ที่เหลืออยู่หลังจากสารอินทรีย์ถูกเผาไหม้หมด โดยเถ้าที่เหลืออยู่นี้ไม่จำเป็นเสมอที่จะอยู่ในลักษณะเดิม หรือในปริมาณเดิมที่พบในอาหารเพราะบางส่วนอาจแปรสภาพ โดยทำปฏิกิริยากับส่วนประกอบอื่นขณะเผา ซึ่งเถ้าทั้งหมดหาได้จากการเผาไหม้ที่อุณหภูมิ 550 - 600 °C

อุปกรณ์

1. ถ้วยกระเบื้องทนความร้อน (Porcelain Crucible)
2. เตาเผา (500 - 600°C)
3. โถดูดความชื้นโถดูดความชื้น (Desicator)
4. คีมคีบสำหรับจับจานอลูมิเนียม (Tong)
5. เครื่องชั่งละเอียด (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง)

วิธีการ

ถ้วยกระเบื้องทนความร้อน (ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ)

เผา 500 - 600 °C นาน 2 ชั่วโมง

↓

เอาออกใส่ desicator บันทึกน้ำหนัก

↓

ชั่งตัวอย่าง 2 - 5 กรัม ใส่ในถ้วยกระเบื้อง

↓

เผา 550 - 600 °C นาน 12 - 24 ชั่วโมง

↓

เอาออกใส่ desicator แล้วบันทึกน้ำหนัก

เก็บเถ้าไว้เพื่อหา AIA ต่อไป

การคำนวณ $\%Ash = \frac{(A - B) \times 100}{W}$

A = น้ำหนักถ้วยกระเบื้อง + น้ำหนัก Sample หลังเผา

B = น้ำหนักถ้วยกระเบื้อง

W = น้ำหนักตัวอย่าง ที่ใช้ในการวิเคราะห์

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

การคำนวณ %Organic Matter (OM)

อินทรีย์วัตถุ (Organic Matter) หมายถึง ส่วนของอาหารที่ไม่รวมน้ำและเถ้า % OM = 100 – Ash

การวิเคราะห์เถ้าที่ไม่ละลายในกรด (Acid-Insoluble Ash, AIA)

อุปกรณ์

1. ถ้วยกระเบื้อง (Porcelain Crucible)
2. โถดูดความชื้นโถดูดความชื้น (Desicator)
3. เตาเผา (Muffle Furnace)
4. ขวดก้นกลม
5. กรวยกรอง

สารเคมี

กรดเกลือ 2 นอร์มอล (2 N Hydrochloric Acid, HCL)

วิธีการเตรียม

เติมกรดเกลือเข้มข้น 37.4 % จำนวน 164 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรที่มีน้ำกลั่นจำนวน 836 มิลลิลิตร เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน

วิธีการ

นำเถ้าที่ได้จากการคำนวณหา Ash มาถ่ายลงในขวดก้นกลม

↓

เติมกรดเกลือเข้มข้น 2 นอร์มอล (2N HCL) 100 มิลลิลิตร

↓

นำไปต้มให้เดือดบนเครื่องย่อยนาน 5 นาที

↓

นำมากรองสารละลายที่ร้อนโดยใช้กระดาษกรอง Whatman No.41 และใช้น้ำร้อนล้างกรดออกให้หมด

↓

นำกระดาษกรองพร้อมด้วยเถ้าที่ไม่ละลายในกรดใส่ลงในเบ้ากระเบื้องอันเดิม และนำไปเผาที่อุณหภูมิ 475 - 500 °C ตลอดคืน

↓

นำออกจากเตาเผาแล้วปล่อยทิ้งไว้ให้เย็นในโถอบแห้ง และชั่งน้ำหนักคืน

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

การคำนวณ $\%AIA = \frac{(A - B) \times 100}{W}$

A = น้ำหนักเบ้ากระเบื้อง + น้ำหนักเถ้าที่ไม่ละลายในกรด

B = น้ำหนักเบ้ากระเบื้อง

W = น้ำหนักตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์

การวิเคราะห์หาเยื่อใยหยาบ (Crude Fiber, CF)

หลักการ

การวิเคราะห์หา Crude Fiber ในอาหารสัตว์ทำได้โดยนำอาหารมาต้มกับกรดและด่างอย่างอ่อน ซึ่งสารอินทรีย์จำพวกโปรตีน แป้ง น้ำตาล และคาร์โบไฮเดรทบางอย่างจะละลายในกรด-ด่าง ส่วนสารอินทรีย์ที่เหลือจากสารสกัดเรียกว่า Crude Fiber ซึ่งส่วนใหญ่ประกอบด้วย Cellulose นอกจากนี้ยังมี Hemicellulose และ Lignin รวมอยู่ด้วยเล็กน้อย แต่การวิเคราะห์หา เยื่อใยหยาบ (Crude Fiber) ไม่ได้บ่งบอกถึงองค์ประกอบของคาร์โบไฮเดรตที่ถูกต้องนัก เนื่องจากคาร์โบไฮเดรตที่เป็นโครงสร้าง (Structural Carbohydrate) เช่น Hemicellulose และ Lignin บางส่วนสามารถละลายได้ในขั้นตอนการวิเคราะห์

อุปกรณ์

1. เครื่องย่อยหาเยื่อใย
2. ขวดก้นกลม
3. Filtering Flask
4. Crucible
5. Buchner Funnel
6. ผ้าลินิน

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

สารเคมี

1. H_2SO_4 1.25%
2. NaOH 1.25 %

วิธีการ

ชั่งตัวอย่างประมาณ 1 กรัม (ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ) ใส่ขวดก้นกลม

แล้วเติม H_2SO_4 1.25% 200 มิลลิลิตร

↓

ขวดก้นกลมไปต่อกับเครื่องวิเคราะห์หาเยื่อใยที่มี Condenser ควบคุมความเข้มข้นของสารละลายให้คงที่เป็นเวลา 30 นาที

↓

นำสารละลายออกจากเครื่อง แล้วกรองตะกอนด้วยเครื่องบนผ้าลิกนินที่มี Buchner Funnel ที่ต่อกัน Filtering Flask โดยอาศัย Suction Pump

ช่วยล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นร้อน

↓

ขูดตะกอนออกจากผ้าลินินให้หมดและใส่ลง ขวดก้นกลมอันเดิม

เติมด่าง NaOH 1.25 % 200 มิลลิลิตร ลงในขวดก้นกลม และทำเช่นเดียวกับการเติม H_2SO_4 1.25%

↓

นำสารละลายมากรอง ล้างด้วยน้ำร้อนจนหมดด่างและล้างด้วย Ethanol ประมาณ 20 – 30 มิลลิลิตร

ขูดตะกอนออกจากผ้าลิกนินใส่ใน Crucible พยายามขูดตะกอนออกให้หมด

↓

นำ Crucible พร้อมตะกอนไปอบที่อุณหภูมิ 100 °C ทิ้งไว้ 1 คืน

↓

นำ Crucible ออกมาทิ้งให้เย็นและชั่งน้ำหนัก

↓

นำ Crucible พร้อมตะกอนไปเผาที่เตาเผาที่อุณหภูมิ 550 – 600 °C ประมาณ 2 - 3 ชั่วโมง จนตะกอนถูกเผาไปเป็นเถ้า

↓

นำ Crucible ออกมาทิ้งให้เย็นใน Desiccator แล้วชั่งน้ำหนัก

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

การคำนวณ % Crude Fiber $= \dfrac{(A - B) \times 100}{W}$

A = น้ำหนัก Crucible + น้ำหนักกากที่ย่อยแล้วหลังอบ

B = น้ำหนัก Crucible + น้ำหนักเถ้าหลังเผา

W = น้ำหนักตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์

การวิเคราะห์เยื่อใย NDF (Neutral – Detergent Fiber)

เป็นการต้มตัวอย่างในสารฟอกที่เป็นกลาง ซึ่งส่วนประกอบภายในเซลล์จะถูกละลายออกมาอยู่ในสารละลาย ขณะที่ส่วนที่เป็นเยื่อใย (Cell Wall) จะไม่ถูกย่อยสลายได้ ซึ่งเรียกส่วนนี้ว่า NDF ซึ่งประกอบด้วย Cellulose, Hemicellulose และ Lignin

อุปกรณ์

1. เครื่องย่อย (Heating Mantle Apparatus) เปิดเครื่องและเปิดน้ำให้ไหลเวียน
2. ขวดก้นกลม (Round Bottom Flask)
3. Gooch Crucible (อบที่ 100 °C 1 คืน ใส่ใน Desicator ชั่งน้ำหนักบันทึก)
4. เครื่องดูดสุญญากาศ (Vacuum Pump)

สารเคมี

สารละลาย neutral – detergent (neutral detergent solution) ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

1. Sodium Lauryl Sulphate
2. Disodium Ethylene Diamine-tatraacetate (EDTA) dehydrate crystal
3. Sodium Borate Decahydrate (borax) ($Na_2B_4O_7.10H_2O$)
4. Disodium Hydrogen Phosphate Anhydrous
5. Triethylene Glycol หรือ 2- Ethoxy ethanol

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

วิธีเตรียม

ใส่ EDTA (18.61 กรัม) และ $Na_2B_4O_7.10H_2O$ 6.81 กรัม ลงในบิกเกอร์ขนาดใหญ่ แล้วผสมน้ำกลั่นเล็กน้อยละลายสารเคมีโดยใช้ความร้อนจนกระทั่งสารเคมีละลายหมด แล้วเติม Sodium Lauryl Sulphate 30 กรัม และ Triethylene Glycol 10 มิลลิลิตร หรือ 2-Ethoxy Ethanol 10 กรัม หลังจากนั้นเติม Na_2HPO_4 4.56 กรัม ลงในบิกเกอร์แล้วเติมน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร ตามความต้องการละลายสารเคมีโดยใช้ความร้อนจนละลายหมดเสร็จแล้วตรวจสอบระดับสารละลายควรมี pH 6.8 - 7.1

วิธีการ

ชั่งตัวอย่างประมาณ 1 กรัม (ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ)

ใส่ขวดก้นกลม

↓

เติม NDF Solution ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

↓

ต้มให้เดือดภายใน 10 - 15 นาที

ลดความร้อนให้มีการเดือดเพียงเล็กน้อย

↓

ล้างเศษตัวอย่างที่ติดตามขอบขวดด้วยน้ำกลั่น แล้วต้มต่อนาน 1 ชั่วโมง

↓

เอาออกแล้วกรองด้วย Goosh Crucible โดยใช้เครื่อง Vacuums Pump

ขณะกรองล้างด้วยน้ำร้อนและล้างด้วย Acetone เป็นครั้งสุดท้ายในปริมาณจำจัด

↓

อบ Crucible + เศษที่เหลือที่ 100 $^{\circ}$C ตลอดคืน

↓

เอาออกใส่ Dedicator ชั่งน้ำหนัก

การคำนวณ

$$\%NDF = \frac{(\text{น้ำหนัก Crucible + เยื่อใย NDF}) - (\text{น้ำหนัก Crucible}) \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}}$$

การวิเคราะห์หาเยื่อใย ADF (Acid Detergent Fiber)

การย่อย NDF ออกโดย Hemicelluloses จะละลายอยู่ในสารฟอกที่เป็นกรด ส่วนที่เหลือที่ไม่ละลาย ได้แก่โปรตีน, Cellulose, Lignin และ Bound Nitrogen

อุปกรณ์

1. เครื่องย่อย (Heating Mantle Apparatus)
2. ขวดก้นกลม
3. Gooch Crucible
4. Vacuum Pump

สารเคมี

สารละลาย Acid Detergent (ADS) ประกอบด้วย

1. กรดกำมะถัน (H_2SO_4 Reagent Grade) 1N
2. Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB)

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

วิธีการเตรียม

การเตรียม Acid Detergent Solution (10 ลิตร)

1. ชั่ง CTAB น้ำหนัก 200 กรัม ลงในบิกเกอร์ แล้วเติมน้ำกลั่นปริมาตร 1.5 ลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วย Magnetic Stirrer
2. เติมน้ำกลั่น 1,725 มิลลิลิตร แล้วนำเข้าตู้ควันแล้วค่อย ๆ เติมกรดกำมะถัน 275 มิลลิลิตร (96 % H_2SO_4) ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยแท่งแก้ว
3. เติมน้ำกลั่น 6.7 ลิตร ลงในถังเก็บสาร แล้วจึงเติมสารในข้อ 1 และข้อ 2 ตามลำดับ ผสมให้เป็นเนื้อเดียว
4. Decalin (Decahydronapthalene; Reagent Grade)
5. Acetone

วิธีการ

เช่นเดียวกับ NDF แต่เปลี่ยนสารฟอกเป็น ADF และเก็บ Gooch Crucible พร้อมตัวอย่างที่เหลือไว้เพื่อหา ADL ต่อไป

การคำนวณ

$$\%ADF = \frac{(\text{น้ำหนัก Crucible} + \text{เยื่อใย ADF}) - (\text{น้ำหนัก Crucible}) \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}}$$

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

การวิเคราะห์หา ADL (Acid detergent lignin)

การหาปริมาณ Lignin ใน ADF โดยการใช้กรดซัลฟูริก (H_2SO_4) ละลาย Cellulose ออกจาก Lignin แต่อาจมี Cutin และ Bond Nitrogen (เกิดจาก Milard Reaction) รวมถึงปริมาณ Silica

อุปกรณ์

1. Crucible ที่มีตัวอย่าง จาก ADF
2. Vacuum Pump
3. แท่งแก้ว
4. บิกเกอร์
5. ถาดน้ำเย็น
6. เถาผา (500 องศาเซลเซียส)

สารเคมี

72 % Sulfuric Acid (H_2SO_4)

วิธีการ

เติมกรดเข้มข้น 72 % H_2SO_4 40 มิลลิลิตร ลงใน Gooch Crucible ที่มีบิกเกอร์

↓

ใช้แท่งแก้วคนเป็นครั้งคราวให้ทั่วตั้งทิ้งไว้ 3 - 4 ชั่วโมง

↓

นำมากรองใช้น้ำร้อนล้างและล้างครั้งสุดท้ายด้วย Acetone

↓

อบแห้งที่ 100 °C ตลอดคืน

↓

เอาออกเข้า Desicator ชั่งและบันทึกน้ำหนัก

↓

เผาที่ 500 °C ตลอดคืน

↓

เอาออกใส่ Desicator ชั่งน้ำหนัก

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

การคำนวณ

$$\% \text{ ADL} = \frac{(\text{น้ำหนัก Crucible + น้ำหนักแห้ง Lignin}) - (\text{น้ำหนัก Crucible + Ash}) \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}}$$

การวิเคราะห์โปรตีน (Crude Protein, CP) และไนโตรเจน (N)

การวิเคราะห์หาโปรตีนหยาบโดยวิธี Kjeldahl H_2SO_4 ย่อยสลายสารอินทรีย์ ในวัตถุดิบอาหารที่นำมาวิเคราะห์ ซึ่งแบ่งแยกขั้นตอนได้เป็น 3 ขั้นตอน คือ การย่อย (Digestion), การกลั่น (Distillation) และการไตรเตรท (Titration)

อุปกรณ์

1. หลอดกลั่นโปรตีน
2. เครื่องย่อยโปรตีน
3. เครื่องกลั่นโปรตีน
4. ขวดรูปชมพู่
5. กระบอกตวง

สารเคมีและวิธีการเตรียม

1. ตัวเร่งปฏิกิริยา (Catalyst) ใช้ K_2SO_4 น้ำหนัก 179.5 กรัม ร่วมกับ $CUSO_4$ น้ำหนัก 20.5 กรัม

2. ยูเรียมาตรฐาน (Urea Standard) เพื่อนำไปวิเคราะห์หา % Recovery ของปริมาณไนโตรเจนที่ได้จากยูเรีย

3. กรดซัลฟูริกเข้มข้น (Concentrate H_2SO_4 – reagent Grade)

4. โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น (40% NaOH) ทำการละลาย NaOH 4000 กรัม ต่อน้ำ 10 ลิตร

5. กรดไฮโดรคลอลิกมาตรฐาน (Standard 0.1N HCL)

6. สารละลายอินดิเคเตอร์ผสม (Mix Indicator) ละลาย Methyl Red น้ำหนัก 0.125 กรัม และ Methylene Blue น้ำหนัก 0.0825 กรัม ใน 95 % Ethanol ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน (ใช้เครื่อง Stirrer) นาน 24 ชั่วโมง

7. สารละลายบอริค (Boric Acid Solution) ละลายกรดบอริค น้ำหนัก 87 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 3 ลิตร แล้วเติมสารละลายสารละลายอินดิเคเตอร์ผสม (Mix Indicator) ปริมาตร 8.33 มิลลิลิตร แล้วทำการผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน (ใช้เครื่อง Stirrer) นาน 24 ชั่วโมง (จะได้สารละลายสีม่วง 3 ลิตร)

หลักการใช้เครื่องย่อย (Digestion) กรณีเครื่อง FOSS

การย่อยจะต้องอาศัยระบบดูดควัน (Exhaust) เข้ามาเกี่ยวข้องและที่สำคัญการติดตั้งจะต้องอยู่ใกล้ก๊อกน้ำเย็นและปลั๊กไฟ

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

การเตรียมตัวอย่างก่อนการย่อย

1. การเตรียมตัวอย่าง

1.1 ตัวอย่างแห้ง ชั่งน้ำหนักตัวอย่างประมาณ 1 กรัม ในกระดาษรองที่ไม่มีเถ้า เพื่อป้องกันไม่ให้ตัวอย่างหกหล่น

1.2 ตัวอย่างที่เป็นของเหลว ตวงปริมาณ 3 - 5 มิลลิลิตร ลงในหลอดย่อยแต่ละหลอด

1.3 เติมตัวเร่งปฏิกิริยา (Catalyst) โดยใช้ K_2SO_4 น้ำหนัก 10 กรัม ร่วมกับ $CuSO_4$ประมาณ 0.3 กรัม โดยใช้ 0.3 กรัมต่อหลอด

1.4 เติมกรดซัลฟูริก (H_2SO_4) เข้มข้น ลงในหลอดย่อยตัวอย่าง ตัวอย่างแห้ง (อาหาร, มูล) ใช้กรดปริมาตร 25 มิลลิลิตร ต่อตัวอย่าง 1 กรัม ในกรณีเป็นของเหลวเติมกรด 15 มิลลิลิตร ต่อตัวอย่าง 3 มิลลิลิตร

1.5 เตรียม Blank โดยการเติมสารเคมีตามขั้นตอนต่าง ๆ เหมือนการวิเคราะห์ตัวอย่างปกติแต่ไม่มีตัวอย่าง

2. การนำตัวอย่างเข้าย่อย

Reagent สำหรับ Scrubber Unit

Scrubber Unit จะทำงานด้วย Air Pump ซึ่งจะทำหน้าที่ดูดควันที่ระเหยผ่านไปยัง Flask ด้านซ้ายที่มีสารที่มีตัวจับกรดอยู่ สารนี้จะหน้าที่เป็นสารละลายที่เป็นกลางแล้วผ่านไปยัง Flask ด้านขวาซึ่งทำหน้าที่ดักจับน้ำถูกปล่อยออกไปด้านหลังของเครื่อง

สารละลายด้านขวา คือ น้ำให้เติมระดับต่ำสุด ส่วนทางด้านซ้ายจะเติมด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 40% ปริมาณ 0.4 ลิตรและน้ำ 0.8 ลิตรสารละลายนี้จะเพียงพอสำหรับการย่อย 100 ตัวอย่าง เช่น 5 ชุด เมื่อใช้หลอดขนาด 250 มิลลิลิตร จำนวน 20 หลอด

การตั้งอุณหภูมิของ Digester

1. เปิดสวิทซ์ของเครื่อง
2. ตั้งอุณหภูมิตามที่ต้องการ โดยกดปุ่ม "SET" ค้างไว้แล้วกดที่ △ หรือ ▽ เพื่อตั้งอุณหภูมิตามที่ต้องการ
3. อุณหภูมิที่ตั้งได้จะอยู่ในช่วง 5 °C ถึง 440 °C

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

การเตรียมตัวอย่างก่อนการย่อย

1. นำหลอดตัวอย่างที่เตรียมไว้แล้วใส่ใน Tube Rack แล้วนำไปวางไว้ข้างๆ Digestor
2. ตรวจสอบให้แน่ใจว่าอุณหภูมิของ Digestor พร้อมสำหรับการย่อยแล้ว
3. ใส่ Heat Shields ให้อยู่ตำแหน่งบน Rack
4. สวม Exhaust Manifold ลงบนหลอดย่อย
5. ยก Rack ลงไปใส่ใน Digestor
6. ปรับระดับของการดูดของ Exhaust Manifold ในส่วนของ Scrubber Unit โดยสวิทซ์ที่อยู่ด้านซ้ายของเครื่อง ถ้าต้องการให้มีการดูดมากให้กดสวิทซ์มาที่ตำแหน่ง 2 (ในขณะเริ่มต้นการย่อย 5 นาทีแรก) และหลังจากนั้นค่อยปรับระดับให้เบาลงโดยกดสวิทซ์ที่ตำแหน่ง 2 (ในขณะที่เริ่มการย่อย 5 นาทีแรก) และหลังจากนั้นค่อยปรับระดับให้เบาลงโดย กดสวิตซ์มาที่ตำแหน่ง 1 ทำการย่อยติดต่อกันนานประมาณ 1 ชั่วโมง หากปฏิกิริยาทางเคมี เสร็จสมบูรณ์จะสังเกตเห็นสารละลายในหลอดย่อยถูกย่อยหมด ซึ่งมีลักษณะไม่มีสีหรือสีเหลืองอ่อน
7. เมื่อทำย่อยเสร็จสมบูรณ์แล้วยก Tube Rack ออกโดยยังมี Exhaust สวมอยู่ ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น
8. เมื่อเย็นแล้วยก Exhaust Manifold ออกวางบนถาดรองรับเพื่อป้องกันการหยดของกรดจากนั้นปิดสวิตซ์ของเครื่อง

การกลั่นและการไตรเตรท

การเริ่มต้นการใช้งาน

1. การตรวจสอบระดับของด่างว่ามีพอใช้หรือไม่
2. เปิดเครื่อง
3. เปิดก๊อกน้ำ
4. ทำการอุ่นเครื่องโดยใส่ Digestion ที่บรรจุน้ำกลั่นครึ่งหลอด และ Flask เปล่า โดยเปิด Steam Value และกดปุ่มกลั่นและไอน้ำ จากนั้นรอให้เครื่องกลั่น ประมาณ 5 นาที เพื่ออุ่นเครื่อง
5. นำ Digestion Tube ที่ผ่านการย่อยแล้วมาเติมน้ำกลั่นปริมาตร 50 ml เพื่อทำการเจือจาง และ นำ Flask ที่บรรจุ 4 % Boric Acid 70 ml ใส่เข้าประจำใน Distillation

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

6. ตรวจสอบดูว่าหลอดทดลองและ Flask อยู่ในตำแหน่งที่ถูกต้องและปิด Safety Door

7. กดปุ่มวิเคราะห์ เพื่อเริ่มต้นการกลั่นตัวอย่างจนครบขั้นตอน

8. เมื่อกลั่นเสร็จแล้วให้ใช้น้ำกลั่นล้างที่ปลายท่อน้ำกลั่นให้ไหลลงไปใน Flask แล้วนำ Flask ดังกล่าวไปไตรเตรทกับสารละลายกรดมาตรฐาน 0.1N HCL ที่ผ่านการ Standardize มาแล้วและคำนวณหา %N

วิธีการ

การย่อย

เปิดเครื่องย่อยโปรตีน

↓

ชั่งตัวอย่างในหลอดย่อยโปรตีน 0.5 - 1 กรัม หรือ 3 - 5 มิลลิลิตร

(ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ)

ใส่ตัวคะตะไลท์ประมาณ 1 - 2 กรัม

↓

เติม H_2SO_4 98% 15 มิลลิลิตร

↓

นำหลอดย่อยโปรตีนเข้าย่อยใน Digestion Block เมื่ออุณหภูมิถึง 420°C

↓

ย่อยต่อประมาณ 1.5 - 2 ชั่วโมงหรือของเหลวใส

↓

ปิดเครื่องย่อย นำออกมา ปล่อยให้เย็นและรอการกลั่น

การกลั่นและการไตรเตรท

เปิดเครื่อง Warm เครื่องกลั่นโดยใช้น้ำกลั่น และตั้งค่าเครื่องตามวิธีที่ระบุ

ไว้ข้างเครื่องเติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ในหลอดกลั่นโปรตีน

↓

นำหลอดเข้ากลั่นประมาณ 5 นาที

แล้วมาไตรเตรทด้วย 0.1 N HCL จนถึงจุดยุติ

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

การคำนวณ

$$\%N = \frac{1.401 \times (\text{ml Tritant} - \text{ml Blank}) \times (\text{M(mol/L) ของกรดที่ใช้ไตรเตรท})}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}}$$

$$\%CP = 6.25 \times \%N$$

สำหรับการคำนวณหาปริมาณโปรตีนหลังจากทราบปริมาณของไนโตรเจนทั้งหมด เราจะใช้ค่าคงที่ 6.25 คูณ เนื่องจากในโปรตีนส่วนใหญ่จะมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบอยู่ประมาณ 16 % ซึ่งสามารถปรับค่าคงที่ได้จากการเทียบบัญญัติไตยางค์ 100/16

การตรวจเช็คมาตรฐานของเครื่องกลั่นโปรตีน

สารเคมีที่ต้องใช้ (ตัวใดตัวหนึ่ง)

1. Ammonium Sulphate, $(NH_4)_2SO_4$

   % Purity > 99.5

   Molecular Weight 132 .14

2. Ammonium Ferrous Sulphate Hexahydrate, $(NH_4)Fe(SO_4)2.6H_2O$

   % Purity > 99.5

   Molecular Weight 132 .14

วิธีการตรวจเช็ค

1. ทำการอุ่นเครื่องโดยใส่ Digestion Tube ที่บรรจุน้ำกลั่นครึ่งหลอด และ Flask เปล่าทำการกลั่นประมาณ 3 นาทีโดยกดปุ่ม Steam On

2. ชั่งมาประมาณ 0.15 กรัม อย่างละเอียด แต่ถ้าใช้ให้ชั่งมาประมาณ 0.50 กรัม อย่างละเอียดใส่ใน Digestion Tube

3. นำ Digestion Tube ดังกล่าวและ Flask เปล่าที่บรรจุ 4% Boric AciD ปริมาตร25.00 มิลลิลิตร ใส่เข้าประจำที่ใน Distillation Unit

4. กดปุ่มเพื่อตั้งค่าของด่างปริมาตร 50 มิลลิลิตร และตั้งค่าเวลาในการกลั่น 5 นาที

5. เลือกการทำงานแบบ Auto และปิด Safety Door

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

6. เมื่อกลั่นเสร็จแล้วให้นำ Flask ดังกล่าวไป Titrate กับสารละลายกรดมาตรฐาน 0.N HCL ซึ่งต้องผ่านการ Standardize มาแล้วและคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของไนโตรเจน

7. %N = 1.401 x [(Volume of Titrant with Sample - Volume of Titrant with blank) x ความเข้มข้นของกรดมาตรฐาน]/น้ำหนักของตัวอย่าง (กรัม)

8. คำนวณ % Recovery ดังนี้ (ใช้ในกรณี $(NH_4)_2SO_4$ และ $(NH_4)Fe(SO_4)2.6H_2O$)

$$\%\text{Recovery} = \frac{\text{Actual \% N x Molecular Weight of Test Substance}}{\text{0.2802 x \% Purity of Test Substance}}$$

9. ค่า Recovery ที่ได้ควรอยู่ในช่วง 98 – 102 %

หมายเหตุ

1. Ammonium Sulphate, $(NH_4)_2SO_4$ ที่จะใช้ต้องผ่านการอบที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส เป็นเวลา12 ชั่วโมง แล้วทิ้งไว้ให้เย็นก่อนนำมาใช้งาน

2. ในการกลั่นต้องทำ Blank ด้วยทุกครั้ง

การวิเคราะห์หาแอมโมเนีย – ไนโตรเจน (Ammonia Nitrogen, NH_3- N)

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

อุปกรณ์

1. หลอดย่อยโปรตีน
2. เครื่องกลั่นโปรตีน

วิธีการ

ทำการตวงของเหลวจากกระเพาะหมัก (Rumen Fluid) โดยต้องผ่านการ Centrifuging 5 – 15 นาที ปริมาตร 3 - 5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดกลั่น

↓

เติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร

↓

เข้ากลั่น

การคำนวณ

เช่นเดียวกับการหาปริมาณเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจน

การเตรียมตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะหมัก (Rumen Fluid) เพื่อนำไปวิเคราะห์หา กรดไขมันที่ระเหยได้ง่าย (VFA) และสารอนุพันธ์พิวรีน Purine Derivatives

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงที่ 300-10000 รอบ/นาที
2. กระบอกฉีดยาขนาด 10 มิลลิลิตร
3. หัวกรอง (ที่อยู่ห้อง HPLC Lap.) + คีมคีบ
4. กระดาษกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กรอง 0.45 μm (ที่อยู่ห้อง HPLC Lap.)
5. หลอดหรือขวดขนาดเล็กพร้อมฝาจุกที่ผ่านการทำความสะอาดและอบแห้งแล้ว
6. น้ำกลั่น หรือ น้ำ Milli Q (Deionized Water)

วิธีการ

นำกระดาษกรองใส่ในหัวกรองแล้วประกอบหมุนให้แน่น

↓

ใช้กระบอกฉีดยาดูดตัวอย่างประมาณ 2 - 3 มิลลิลิตร

↓

ประกอบชุดหัวกรองกับกระบอกฉีดยา

↓

ดันกระบอกฉีดยา (ไล่ตัวอย่างทิ้งก่อนเล็กน้อย) ให้ตัวอย่างไหลลงในหลอดเก็บ

↓

ปิดฝาจุกหลอดเก็บตัวอย่างให้แน่น

นำไปเก็บในตู้เย็นหรือตู้แช่รอวิเคราะห์

↓

หัวกรองที่ใช้แล้วล้างในน้ำ Milli Q ก่อนจะกรองตัวอย่างตัวไป

เสร็จแล้วล้างอุปกรณ์อบที่ 60 $^{\circ}$ C ส่งคืนห้อง HPLC Lap.

วิธีการคำนวณปริมาณการกินได้เป็น % BW และ g/BW$^{0.75}$

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

$$\text{ปริมาณการกินได้คิดเป็น \% BW} = \frac{\text{ปริมาณอาหารที่กินได้ (kg น้ำหนักแห้ง)}}{\text{น้ำหนักตัว}}$$

$$\text{ปริมาณการกินได้คิดเป็น \% BW}^{0.75} = \frac{\text{ปริมาณอาหารที่กิน (g น้ำหนักแห้ง)}}{\text{น้ำหนักตัว}^{0.75}}$$

AOAC. 1985. Official Methods of Analysis. Washington, DC: Association of Official Analysis Chemists.

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ
ที่อยู่ในฐานข้อมูล ISI

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

Pakistan Journal of Nutrition 10 (12): 1121-1125, 2011
ISSN 1680-5194
© Asian Network for Scientific Information, 2011

Supplementation of Cassava and Durian Hull Fermented Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) on Rumen Fermentation and Average Daily Gain in Crossbred Native Cattle

Kitsada Polsit[1], Sarunyu Chuelong[1], Teerawat Siriuthane[1], Sommas Ittarat[1], Uthai Koatedoke[1], Anusorn Cherdthong[2] and Sittisak Khampa[1]
[1]Program of Animal Science, Faculty of Agricultural Technology, Rajabhat Mahasarakham University, Maha Sarakham, P.O. Box 44000, Thailand
[2]Tropical Feed Resources Research and Development Center (TROFREC), Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand

Abstract: Ten, two-years old of crossbred native cattle weighing about at 250±20 kg were randomly divided into two groups according to receive two groups of supplemental dietary treatments by receiving YFCP1 + YFCP2 (T1) and YFCRR + YFDH (T2). The cows were offered the treatment diets at 2%BW and rice straw was fed *ad libitum*. Means were compared using pair t-test. All animals were kept in individual pens and received free access to water. The results have revealed that supplementation of dietary treatment on feed intake was non-significantly different, while average daily gain (ADG) and rumen microorganisms especially bacteria and fungi zoospores were significant different and cattle in heifer fed YFCRR + YFDH (T2) treatments and received YFCP1 + YFCP2 (T1) (646.4 and 533.2 g/d). In addition, the ruminal pH, ammonia-nitrogen and blood urea nitrogen concentration were non-significantly different. Supplementation of T2 could improve population of bacteria and fungal zoospore higher than those fed T1, but decreased populations of *Holotrich* and *Entodiniomorph* protozoa in rumen. The results indicate that supplementation of yeast fermented cassava and durian hull as supplement diets with rice straw as roughage source could improve ruminal fermentation efficiency, average daily gain in crossbred native cattle.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*, cassava, durian hull, rumen fermentation, crossbred native cattle

INTRODUCTION

The use of yeast products in dairy cattle nutrition has become widespread over the last 20 yr. However, most of the research has focused on yeast culture and less on Live Yeast (LY). Several benefits of yeast product supplementation to ruminant nutrition have been demonstrated: an increase in nutrient digestibility, alteration of the proportion of volatile fatty acids produced in the rumen, reduction in ruminal ammonia and increase of ruminal microorganism population (Chaucheyras-Durand *et al*., 2008). However, the mechanism of action of yeast products is not completely described. Yeast culture provides various growth factors, pro-vitamins and other stimulants to bacteria growth in the rumen (Miller-Webster *et al*., 2002).

The use of cultures such as *Saccharomyces cerevisiae* or its extracts can improve weight gain, as a result of the response to in creased dry matter intake. Especially, *Saccharomyces cerevisiae*, have been used in animal diets for several decades and are considered sources high quality proteins and B-complex vitamins, selenium and zince (Queiroz *et al*., 2004). In addition, dietary yeast can be used as a ruminant feed especially *Saccharomyces cerevisiae* because the yeast cell contained useful nutrients for ruminant feed especially with high lysine composition (8.0 g/100 g of protein) (Yamada and Sgarbieri, 2005). Previous study from Kumar *et al.* (1997) reported that when brewer's yeast or live yeast was included in calf diets at levels between 0.001% and 1.00%, DMI, Average Daily Gain (ADG), percentage of Days Scoured (DS), rumen ammonia, rumen lactic acid production and ruminal propionate were either decreased or not affected. However, yeast culture has increased Feed Efficiency (FE), rumen pH, total ruminal VFA concentration and ruminal butyrate and acetate production when included in calf diets. In addition, utilization of local feed especially fermentation of cassava peels by pure culture *S. cerevisiae* could increase its protein content from 2.4% in nonfermented cassava to 14.1% in fermented products (Antai and Mbongo, 1994). The fermented cassava flour with *S. cerevisiae* enhanced the protein level (from 4.4% to 10.9%) and decreased the amount of cyanide content (Oboh and Akindahunsi, 2003). Furthermore, Boonnop

Corresponding Author: Sittisak Khampa, Program of Animal Science, Faculty of Agricultural Technology, Rajabhat Mahasarakham University, Maha Sarakham, P.O. Box 44000, Thailand

et al. (2009) reported that cassava chip can be nutritionally improved with *S. cerevisiae* call yeast fermented-cassava chip (YEFECAP) and could be used for animal feeding.

However, the use of yeast fermenting with cassava and durian hull as diets not yet been investigated. Therefore, the objective of this experiment was to investigate the supplementation of yeast fermented cassava and durian hull with rice straw as basal roughage in crossbred native cattle.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of yeast fermented cassava and durian hull: This technique is based on the method developed by Oboh (2006), Boonnop *et al.* (2009) and Khampa *et al.* (2010) which enriching nutritive value of cassava and durian hull fermented by yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). The method for synthesis of yeast fermented cassava and durian hull are as follows:

I. Weighing of yeast at 20 g + sugar at 20 g + distill water at 100 ml into flask, then mixed and incubated at room temperature for 1 h. (A)
II. Preparation of medium by weigh at 20 g of molasses directly into a warring blender vessel flushed with O_2, add distill water at 100 ml and urea at 30 g then pour solution and incubated at room temperature for 10 min. (B)
III. Adjusting pH media solution by 70% of H_2SO_4 between 3.5-3.8 and continue mix with incubated for 1 h.
IV. Remove yeast media solution in a flask from (A) into a medium (B) and continue flush O_2 for 60 h.
V. After 60 h, then transfer yeast media solution about 50 ml mix with yeast fermented cassava peel (YFCP1), yeast fermented cassava pulp (YFCP2), yeast fermented cassava root raw (YFCRR) and Yeast Fermented Durian Hull (YFDH) at 100 g and then covered by plastic bag for a minimum at least 30 days before feeding to animals.

Animals, diets and experimental design: Ten, two-years old of crossbred native cattle weighing about at 250±20 kg were randomly divided into two groups according to receive two groups of supplemental feeds by receiving T1 = yeast fermented cassava peel (YFCP1) + yeast fermented cassava pulp (YFCP2) ratio at 50:50%; T2 = yeast fermented cassava root raw (YFCRR) + yeast fermented durian hull (YFDH) ratio at 50:50%, respectively. The composition of dietary treatments and Rice Straw (RS) used are shown in Table 1.

Cows were housed in individual pens and individually dietary treatments. All cows were fed *ad libitum* of rice straw with water and a mineral-salt block. Feed intake of dietary treatments and roughage were measured separately and refusals recorded. The experiment was run for 120 days, the first 15 days for treatment adaptation and for feed intake measurements whist the last 30 days were for sample collections of faeces and rumen fluid. Body weights were measured each 30 days during the sampling period prior to feeding.

Table 1: Chemical composition of treatments and Rice Straw (RS) used in the experiment

CC (%)	YFCP1	YFCP2	YFCRR	YFDH	RS
DM (%)	45.1	22.3	34.6	40.7	87.8
OM	83.2	88.2	89.5	86.5	88.9
CP	7.4	12.1	13.7	14.7	2.1
NDF	40.1	20.1	17.5	35.4	77.2
ADF	27.3	15.3	6.1	26.1	54.3
Ash	8.1	3.5	3.9	4.1	13.1

DM = Dry Matter, CP = Crude Protein, OM = Organic Matter, NDF = Neutral Detergent Fiber, ADF = Acid Detergent Fiber, RS = Rice Straw, CC = Chemical Composition (%). YFCP1 = Yeast fermented cassava peel, YFCP2 = Yeast fermented cassava pulp, YFCRR = Yeast fermented cassava root raw, YFDH = Yeast fermented durian hull

Data collection and sampling procedures: Rice Straw (RS) and concentrate diets were sampled each 30 days and were composted by period prior to analyses. Feed and fecal samples were collected by grab sampling during the last seven days of each period. Composites samples were dried at 60°C and ground (1 mm screen using Cyclotech Mill, Tecator, Sweden) and then analyzed for DM, ether extract, ash and CP content (AOAC, 1985), NDF, ADF and ADL (Van Soest *et al.*, 1991) and AIA.

Rumen fluid and blood samples were collected at 0, 2 and 4 h post-feeding on last period. Approximately 200 ml of rumen fluid was taken from the middle part of the rumen by a stomach tube connected with a vacuum pump at each time at the end of each period. Rumen fluid was immediately measured for pH and temperature using (HANNA instruments HI 8424 microcomputer) after withdrawal. Rumen fluid samples were then filtered through four layers of cheesecloth. Samples were divided into two portions. One portion was used for NH_3-N analyses where 5 ml of H_2SO_4 solution (1 M) was added to 50 ml of rumen fluid. The mixture was centrifuged at 5,000 g for 15 min and the supernatant stored at -20°C prior to NH_3-N analysis using the micro Kjeldahl methods (AOAC, 1985).

The total count of bacteria, protozoa and fungal zoospores were made using the methods of Galyean (1989) based on the use of a haematocytometer (Boeco). A blood sample (about 10 ml) was drawn from the jugular vein at the same time as rumen fluid sampling, separated by centrifugation at 5,000 g for 10 min and stored at -20°C until analysis of Blood Urea Nitrogen (BUN) according to the method of Crocker (1967).

Statistic analysis: The means of each parameter measured were analyzed by the analysis of variance procedure of SAS (1998) and means were compared using pair t-test.

Table 2: Effects of supplementation of cassava and durian hull fermented yeast as supplement diets on feed intake, Average Daily Gain (ADG) and rumen fermentation in crossbred native cattle

Item	T1	T2	p-value
DM intake (kg/day)			
Treatment	5.10	5.60	0.4019^{NS}
RS	1.50	1.60	0.3899^{NS}
Total	6.60	7.20	0.0413*
ADG (g/day)	533.20	646.40	0.0047**
Cost production (US$/kgBW)	0.78	1.01	0.0453*
Ruminal pH	6.70	6.80	0.0741^{NS}
NH_3-N (mg/dl)	15.80	16.30	0.0523^{NS}
BUN (mg/dl)	7.80	8.40	0.1374^{NS}

T1 = Supplementation of YFCP1 + YFCP2 ratio at 50:50%, T2 = Supplementation of YFCRR + YFDH ratio at 50:50%, NS = Non significant ($p>0.05$), * = Significant ($p<0.05$)

RESULTS AND DISCUSSION

Chemical composition of feeds: The chemical compositions of yeast fermented cassava peel (YFCP1) + yeast fermented cassava pulp (YFCP2) ratio at 50:50% (T1) and yeast fermented cassava root raw (YFCRR) + yeast fermented durian hull (YFDH) ratio at 50:50% (T2) and Rice Straw (RS) fed in crossbred native cattle are shown in Table 1. Crude proteins of dietary treatments such as YFCP1, YFCP2, YFCRR and YFDH RS were at 7.4, 12.1, 13.7 and 14.7%, respectively. Furthermore, the chemical composition of rice straw is presented in Table 1. Similar values for rice straw have been similar to those reported by Wanapat (2000).

Effect on feed intake, average daily gain and rumen fermentation: The effects of supplementation of cassava and durian hull fermented yeast as supplement diets on feed intake, average daily gain and rumen fermentation in crossbred native cattle are presented in Table 2. The dietary treatments intake was non-significant different among treatments and higher in cattle receiving T2 than those fed T1 diets (5.6 and 5.1 kgDM/day) as well as rice straw intake was non-significant different and higher in cattle receiving T2 than those fed T1 (1.6 and 1.5 kgDM/day). In contrast, the total intake was significantly differently among treatments and higher in cattle receiving T2 than those fed T1 (7.2 and 6.6 kgDM/day). Furthermore, the average daily gain was significantly different and had higher in crossbred native cattle receiving T2 was higher than those fed T1 (646.4 and 533.2 g/day), respectively. This data indicated that rate of digestion of carbohydrates was the major factor controlling the energy available for growth of rumen microbes. Furthermore, cassava root raw, cassava pulp and durian hull contain high soluble fractions of starch and sugar and can be to added in diets to increase utilization of ruminal ammonia-N for microbial protein synthesis. A possible explanation for this effect is that low DMI does not provide the microbial population with enough soluble growth factors, such as organic acids, B vitamins and AA. Callaway and Martin (1996) suggested that yeast culture provides soluble growth factors that stimulate growth of cellulolytic bacteria and cellulose digestion. In addition, supplementing diets with yeast (*S. cerevisiae*) increases milk production of dairy cows and weight gain of growing cattle (Brossard *et al*., 2006). Boonnop *et al.* (2009) reported that there was a remarkable increase in lysine content in the Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) fermented-cassava chip (YEFECAP) which provide enough soluble growth factors for rumen microbe which leading to increase fiber digestion, which could increase rate of passage and therefore improve feed intake and average daily gain. These results suggested that the addition of yeast increased fiber degradation. In the present study, the addition of yeast increased the degradability of forages.

Characteristics of ruminal fermentation and blood metabolism: Rumen ecology parameters were measured for pH, NH_3-N and BUN (Table 2). Especially, BUN was determined to investigate their relationships with rumen NH_3-N and protein utilization. Rumen pH at 0, 2 and 4 h post-feeding was changed by dietary treatments, however the values were quite stable at 6.7-6.8, but all treatment means were within the normal range which has been reported as optimal for microbial digestion of fiber and also digestion of protein (6.0-7.0) (Hoover, 1986). Furthermore, previous reports by Hoover (1986) have suggested that the reduced pH decrease digestion of fibers. In addition, higher degradation rates can result in a substantial decrease in ruminal pH and fiber digestibility thus reducing feed intake. Moreover, when ruminal pH was reduced below 6.3 in dairy cows, ADF digestion could be reduced at 3.6% unit per 0.1 pH and may result in depressed feed intake (Erdman, 1998). Other studies Melaku *et al.* (2004) demonstrated inhibitory effects of rumen pH on cellulolysis only at values below 6.1 while Mould and Orskov (1984) reported that lower pH have a major impact on fiber digestion. In addition, Cheng *et al.* (1984) reported that low ruminal pH appeared to prevent a strong attachment of bacteria to plant cell walls, resulting in lower fiber digestion. In addition, Williams *et al.* (1991) suggested that calf diet supplementation with yeast culture may increase rumen pH regulation via reduced lactic acid production.

Ruminal NH_3-N and BUN concentrations were altered by supplementation of cassava and durian hull fermented yeast as supplement diets which containing high cassava-based diets. In addition, the result obtained was closer to optimal ruminal NH_3-N between at 15-30 mg/dl (Wanapat and Pimpa, 1999) for increasing microbial protein synthesis, feed digestibility and voluntary feed intake in ruminant fed on low-quality roughage. The differences in NH_3-N and BUN concentrations among treatments may have been

Table 3: Effects of supplementation of cassava and durian hull fermented yeast as supplement diets on rumen microorganisms in crossbred native cattle

Item	T1	T2	p-value
Total direct counts (cell/ml)			
Bacteria ($x10^{10}$)	5.9	7.8	0.0473*
Protozoa			
Holotric ($x10^2$)	3.9	4.1	0.0843^{NS}
Entodiniomorph ($x10^5$)	5.2	4.1	0.0782^{NS}
Fungal zoospores ($x10^6$)	4.6	6.3	0.0498*

T1 = Supplementation of YFCP1 + YFCP2 ratio at 50:50%, T2 = Supplementation of YFCRR + YFDH ratio at 50:50%, NS = Non significant ($p>0.05$), * = Significant ($p<0.05$)

related directly to CP levels of concentrate. In addition, Preston *et al.* (1965) reported that concentrations of BUN were highly correlated with protein intake and reflected the level of ammonia production in the rumen. This study revealed that incorporation of concentrate has increased NH_3-N concentration with ammonia being the main nitrogen source for growth and protein synthesis by ruminal bacteria to achieve maximum fermentation (Satter and Slyter, 1974; Hoover, 1986; Wanapat, 2000). Similarly, Krebs and Leng (1984) suggested requirements for rumen NH_3-N of 20 mg/dl or more for sufficient voluntary intake of low quality roughage.

Rumen microorganisms populations: The Effects of supplementation of cassava and durian hull fermented yeast as supplement diets on rumen microorganisms in crossbred native cattle are summarized in Table 3. The supplementation of dietary treatments was significantly different among treatments ($p<0.05$).

The crossbred native cattle received yeast fermented cassava peel (YFCP1) + yeast fermented cassava pulp (YFCP2) ratio at 50:50% (T1) supplementation had highest increased population of bacteria and fungi while protozoal population was decreased than those crossbred native cattle fed yeast fermented cassava root raw (YFCRR) + yeast fermented durian hull (YFDH) ratio at 50:50% (T2) supplementation.

The yeast cells are known to be a source of vitamins, enzyme and some unidentified cofactors which are helpful in increasing the microbial activity in the rumen as well as the beneficial effects of yeast supplementation reported so far include better growth rate, feed conversation efficiency and milk yield (Dawson *et al.*, 1990).

In addition, yeast are usually related to stimulation of cellulolytic and lactate-utilizing bacteria in the rumen, increased fiber digestion and increased flow of microbial protein from the rumen which may be beneficial for feedlot cattle fed high-grain diets (Guedes *et al.*, 2007). These results agreement with Jouaney and Ushida (1999) reported that the number of protozoa per ml rumen fluid depended on the rate of soluble sugars and starch in the ration and also pH. The entodiniomorph protozoa are predators of rumen bacteria and engulf and digest them just as they engulf starch granules. This is why bacterial numbers are higher when animals are defaunated. Since protozoa tend to stay in the rumen and largely do not pass to the small intestine, they contribute little to the flow of protein and because they digest the bacteria, total protein flow to the small intestine is generally reduced in the presence of protozoa. This is supported by Nguyen *et al.* (2005) who reported the higher bacterial growth efficiency in the absence of the protozoa in the rumen is probably related to the fact that protozoa engulf and digest bacteria. Leng (1990) found that removal of protozoa or a decrease in protozoal density in the rumen can be expected to increase ruminant production under most feeding conditions pertaining to roughage fed ruminants.

Conclusion: Based on this experiment, it could be concluded that supplementation of yeast fermented cassava and durian hull as supplement diets with rice straw as roughage source could improved ruminal fermentation efficiency, average daily gain including increase populations of bacteria and fungi zoospores, but decreased protozoal populations in rumen of crossbred native cattle.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to express their most sincere gratitude and appreciation to The Project No. DBG5380035 by The Thailand Research Fund (TRF) and Office of The Higher Education Commission and Rajabhat Mahasarakham University for their financial support of research. The Tropical Feed Resources Research and Development Center (TROFREC), Khon Kaen University for their use of research facilities.

REFERENCES

Antai, S.P. and P.M. Mbongo, 1994. Utilization of cassava peels as substrate for crude protein formation. Plant Foods Human Nutr., 46: 345-351.

AOAC, 1985. Official Methods of Analysis. Association of Official Analysis Chemists, 15th Edn., Inc Arlington, Virginia. USA.

Boonnop, K., M. Wanapat, N. Ngamnit and S. Wanapat, 2009. Enriching Nutritive Value of Cassava Root by Yeast Fermentation. Proceedings of the graduate school congress x. Held at graduate school khon kaen university, Thailand, pp: 97-102.

Brossard, L., F. Chaucheyras-Durand, B. Michalet-Doreau and C. Martin, 2006. Dose effect of live yeasts on rumen microbial communities and fermentations during butyric latent acidosis in sheep: Newtype of interaction. J. Anim. Sci., 82: 1-11.

Callaway, T.R. and S.A. Martin, 1996. Effects of organic acid and monensin treatment on *in vitro* mixed ruminal microorganism fermentation of cracked corn. J. Anim. Sci., 74: 1982-1989.

Chaucheyras-Durand, F., N.D. Walker and A. Bach, 2008. Effects of active dry yeasts on the rumen microbial ecosystem: Past, present and future. Anim. Feed Sci. Technol., 145: 5-26.

Cheng, K.J., C.S. Stewart, D. Dinsdale and J.W. Costerton, 1984. Electron microscopy of bacteria involved in the digestion of plant cell walls. Anim. Feed Sci. Technol., 10: 93-120.

Crocker, C.L., 1967. Rapid determination of urea nitrogen in serum or plasma without deproteinzation. Am. J. Med. Technol., 33: 361-365.

Dawson, K.A., K.A. Newman and J.A. Boling, 1990. Effect of microbial supplements containing yeast and lactobacilli on roughage-fed ruminal microbial activities. J. Anim. Sci., 68: 3392-3398.

Erdman, R.A., 1998. Dietary buffering requirements of the lactating dairy cows. A review. J. Dairy Sci., 71: 3246-3266.

Galyean, M., 1989. Laboratory Procedure in Animal Nutrition Research. Department of Animal and Life Science. New Mexico states University, USA., pp: 162-167.

Guedes, C.M., D.M. Goncalves, A.M. Rodrigues and A. Dias-da-Silva, 2007. Effects of a *Saccharomyces cerevisiae* yeast on ruminal fermentation and fibre degradation of maize silages in cows. Anim. Feed Sci. Technol., 145: 27-40.

Hoover, W.H., 1986. Chemical factors involved in ruminal fiber digestion. J. Dairy Sci., 69: 2755-2766.

Jouany, J.P. and K. Ushida, 1999. The role of protozoa in feed digestion. Asian-Australasian J. Anim. Sci., 12: 113-126.

Khampa, S., S. Chuelong, S. Kosonkittiumporn and P. Khejornsart, 2010. Manipulation of yeast fermented cassava chip supplementation in dairy heifer raised under tropical condition. Pak. J. Nutr., 9: 950-954.

Krebs, G. and R.A. Leng, 1984. The effect of supplementation with molasses/urea blocks on ruminal digestion. Anim. Prod. Sci., 15: 704-711.

Kumar, U., V.K. Sareen and S. Singh, 1997. Effect of yeast culture supplementation on ruminal microbial populations and metabolism in buffalo calves fed a high roughage diet. J. Sci. Food Agric., 73: 231-236.

Leng, R.A., 1990. Forage utilisation by ruminants. Nutr. Res. Rev., 3: 277-303.

Melaku, S., K.J. Peters and A. Tegegne, 2004. Microbial nitrogen supply, nitrogen retention and rumen function in menz sheep supplemented with dried leaves of multipurpose trees, their mixtures or wheat bran. Small Ruminant Res., 52: 25-36.

Miller-Webster, T., W.H. Hoover, M. Holt and J.E. Nocek, 2002. Influence of yeast culture on ruminal microbial metabolism incontinuous culture. J. Dairy Sci., 85: 2009-2014.

Mould, F.L. and E.R. Ørskov, 1984. Manipulation of rumen fluid pH and its influence on cellulolysis in sacco, dry matter degradation and the rumen microflora of sheep offered either hay or concentrate. Anim. Feed Sci. Technol., 10: 1-14.

Nguyen, T.H.N., N.T. Ngu, N. Thiet, T.R. Preston and R.A. Leng, 2005. Determination of the optimum level of a soybean oil drench with respect to the rumen ecosystem, feed intake and digestibility in cattle. Proceedings of the 2005 MEKARN-CTU Workshop Seminar, 23-25 May, Cantho, Vietnam.

Oboh, G., 2006. Nutrient enrichment of cassava peels using a mixed culture of *Saccharomyces cerevisae* and *Lactobacillus sp* solid media fermentation techniques. Electrical J. Biol., 9: 46-49.

Oboh, G. and A.A. Akindahunsi, 2003. Biochemical changes in cassava products (flour and gari) subjected to *Saccharomyces cerevisae* solid media fermentation. Food Chem., 82: 599-602.

Preston, R.L., D.D. Schnakanberg and W.H. Pander, 1965. Protein utilization in ruminants. I. Blood urea nitrogen as affected by protein intake. J. Nutr., 86: 281-287.

Queiroz, R.C., A.F. Bergamaschine, J.F.P. Bastos, P.C. Santos and G.C. Lemos, 2004. Uso de produto a base de enzima e levedura na dieta de bovines: Digestibilidade dos nutrients e desempenho em confinamento. Rev. Brasil Zootech., 33: 1548-1556.

SAS, 1998. SAS/STAT User's Guide. Version 6.12. SAS Inst. Inc., Cary, NC.,

Satter, L.D. and L.L. Slyter, 1974. Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production *in vitro*. Br. J. Nutr., 32: 199-208.

Van Soest, P.J., J.B. Robertson and B.A. Lewis, 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. J. Dairy Sci., 74: 3583-3597.

Wanapat, M., 2000. Rumen manipulation to increase the efficient use of local feed resources and productivity of ruminants in the tropics. Asian-Aust. J. Anim. Sci., 13: 59-67.

Wanapat, M. and O. Pimpa, 1999. Effect of ruminal NH_3-N levels on ruminal fermentation, purine derivatives, digestibility and rice straw intake in swamp buffaloes. Asian-Aust. J. Anim. Sci., 12: 904-907.

Williams, P.E.V., C.A.G. Tait, G.M. Innes and C.J. Newbold, 1991. Effects of the inclusion of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae* plus growth medium) in the diet of dairy cows on milk yield and forage degradation and fermentation patterns in the rumen of steers. J. Anim. Sci., 69: 3016-3026.

Yamada, E.A. and V.C. Sgarbieri, 2005. Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) protein concentrate: Preparation, chemical composition and nutritional and functional properties. J. Agric. Food Chem., 53: 3931-3936.