



## Research Article

ผลของเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามกับโซเดียมไนเตรทในการลดการผลิตแก๊สมีเทน  
ในกระบวนการหมักในกระเพาะรูเมน : การศึกษาในหลอดทดลอง

Effect of Tamarind Seed Husk and Sodium Nitrate for Reducing Methane Production  
in Rumen Fermentation: *In vitro* studies

ธัชเมธ เตียรวิชัยกุล มณิสร์ ศรีสุภา โสภิตา บัวบาน อัญชลี คงประดิษฐ์ และ สุริยะ สะวานนท์ \*

Tuchchameth Tianwithkul, Manison Srisupha, Sopita Buaban, Anchalee Khongpradit and Suriya Sawanon \*

ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 73140

Department of Animal Science, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Kamphaeng Saen,

Nakhon Pathom 73140, Thailand.

## ABSTRACT

## Article history:

Received: 2024-05-23

Revised: 2024-09-18

Accepted: 2024-11-08

## Keywords:

tamarind seed husk;

nitrate;

rumen fermentation;

methane

The global warming crisis is partially caused by ruminants through greenhouse gas production when they ferment their feed. The objective of this study was to evaluate tamarind seed husk (TSH) and sodium nitrate (SN) as alternative raw materials in a concentrate diet to reduce methane production in rumen fermentation. The experimental I, concentrate diets were formulated in four types, including no TSH in the diet (0TSH), and diet including 7.5%, 15.0% and 22.5% of TSH (7.5TSH, 15.0TSH and 22.5TSH), respectively. In experimental II, diet types included 10% of TSH (10TSH), 0% of TSH with 1% SN (0TSH&1SN) and 10% of TSH with 1% SN (10TSH&1SN). These concentrates were added in Hungate tubes with rice straw in a 50:50 ratio. Rumen fluid was collected from two rumen-fistulated crossbred Brahman steers and mixed with artificial saliva in a 1:1 ratio. Inoculums were incubated at 39 °C for 24 hours under anaerobic conditions. Gas and fluid were analyzed after incubation. The results of experiment I showed that pH was not different among the diets. However, ammonia nitrogen, microbial protein (MCP), volatile fatty acids, acetate/propionate ratio, dry matter digestibility, total gas, methane, and carbon dioxide production were significantly decreased as the level of tamarind seed husk increased. The results of experiment II found that 10TSH&1SN group had the lowest NH<sub>3</sub>-N, MCP, total gas, methane and carbon dioxide production. The pH, total SCFA, and A/P ratio did not differ among all diets. In conclusion, TSH could be used in the concentrate diet up to 15% which reducing methane production ability. Using 10% TSH in the concentrate with 1% SN could reduce methane production better than using 10% TSH or 1% SN alone.

\* Corresponding author.

E-mail address: [agrsusa@ku.ac.th](mailto:agrsusa@ku.ac.th)

## Cite this article as:

Tianwithkul, T., Srisupha, M., Buaban, S., Khongpradit, A. and Sawanon, S. 2025. Effect of Tamarind Seed Husk and Sodium Nitrate for Reducing Methane Production in Rumen Fermentation: *In vitro* studies. **Recent Science and Technology** 17(3): 263451.

## บทคัดย่อ

วิกฤติการณ์ภาวะโลกร้อนในปัจจุบันส่วนหนึ่งมีสาเหตุมาจากแก๊สเรือนกระจกที่เกิดจากกระบวนการหมักอาหารในกระเพาะรูเมนของสัตว์เคี้ยวเอื้อง การทดลองนี้เป็นการใช้เปลือกหุ้มเมล็ดมะขามและโซเดียมไนเตรทเป็นวัตถุติดทางเลือกในอาหารชั้นเพื่อลดการปลดปล่อยแก๊สมีเทนจากกระบวนการหมักในกระเพาะรูเมนของสัตว์เคี้ยวเอื้อง โดยการทดลองที่ 1 มีอาหารทดลอง 4 สูตร คือ อาหารชั้นที่ไม่มีเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม (OTSH) และอาหารชั้นที่มีเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามระดับ 7.5%, 15.0% และ 22.5% (7.5TSH, 15.0TSH และ 22.5TSH ตามลำดับ) การทดลองที่ 2 ประกอบไปด้วยอาหารทดลอง 3 สูตร คือ 1) อาหารชั้นที่มีเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม 10% (10TSH) 2) อาหารชั้นที่ไม่มีเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามและเสริมโซเดียมไนเตรท 1% (OTSH&1SN) และ 3) สูตรอาหารชั้นที่มีเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม 10% และเสริมโซเดียมไนเตรท 1% (10TSH&1SN) ใช้อาหารชั้นและฟางข้าวในสัดส่วน 50:50 ในหลอดทดลอง ที่มีส่วนผสมของเหลวจากกระเพาะรูเมนของโคลูกผสมบราห์มันเพศผู้ตอน 2 ตัว กับสารละลายน้ำลายเทียมในสัดส่วน 1:1 ในสภาวะไร้ออกซิเจนและบ่มที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างแก๊สและของเหลวมาวิเคราะห์ภายหลังการบ่ม ผลการทดลองที่ 1 พบว่า pH แต่ละกลุ่มทดลองไม่แตกต่างกัน ในขณะที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียไนโตรเจน ปริมาณโปรตีนจากจุลินทรีย์ กรดไขมันระเหยง่าย สัดส่วน acetate/propionate การย่อยได้ของวัตถุแห้ง ปริมาตรแก๊สรวม ปริมาตรแก๊สมีเทน และปริมาตรแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ มีค่าลดลงตามระดับของเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามที่เพิ่มขึ้น ผลจากการทดลองที่ 2 พบว่า ค่าแอมโมเนียไนโตรเจน ปริมาณโปรตีนจากจุลินทรีย์ ปริมาตรแก๊สรวม ปริมาตรแก๊สมีเทน และปริมาตรแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ มีค่าต่ำที่สุดในกลุ่ม 10TSH&1SN ส่วนค่า pH กรดไขมันระเหยง่ายรวม และสัดส่วน acetate/propionate ไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลอง จากทั้งสองการทดลองสรุปได้ว่า เปลือกหุ้มเมล็ดมะขามสามารถใช้เป็นวัตถุติดทางเลือกในสูตรอาหารชั้นได้ถึง 15% โดยสามารถลดการผลิตแก๊สมีเทน และการใช้เปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม 10% ในอาหารชั้นร่วมกับไนเตรท 1% สามารถลดการผลิตแก๊สมีเทนได้ดีกว่าการใช้เปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม 10% หรือการใช้ไนเตรท 1% เพียงอย่างเดียว

**คำสำคัญ:** เปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม, ไนเตรท, การหมักในกระเพาะรูเมน, มีเทน

## 1. บทนำ

อาหารสัตว์เป็นต้นทุนที่สำคัญในการผลิตสัตว์เศรษฐกิจ จากวิกฤติราคาวัตถุดิบอาหารสัตว์ที่สูงขึ้นในช่วงปี พ.ศ. 2564 จนถึงปัจจุบัน (Thai Feed Mill Association, 2024) การนำเข้าวัตถุดิบอาหารสัตว์จากต่างประเทศทำให้มีการใช้พลังงานเชื้อเพลิงจำนวนมากในกระบวนการขนส่งและทำให้มีการปล่อยคาร์บอนฟุตพริ้นท์สูง การใช้วัตถุดิบทางเลือกภายในประเทศจึงเป็นทางเลือกที่ดูอย่างหนึ่งในการแก้ปัญหาดังกล่าว โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้ผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมการแปรรูปสินค้าเกษตร เช่น เปลือกหุ้มเมล็ดมะขามที่เป็นผลพลอยได้จากกระบวนการสกัดเนื้อใน (seed kernel) ของเมล็ดมะขามเพื่อนำไปใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง (Thongngok *et al.*, 2020) เปลือกหุ้มเมล็ดมะขามมีโปรตีนและเยื่อใยซึ่งสัตว์เคี้ยวเอื้องสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ (Thanomwongwatana, 2018; Mansingh *et al.*, 2021) นอกจากนี้เปลือกหุ้มเมล็ดมะขามยังมีองค์ประกอบของคอนเดนซ์แทนนินอยู่มากกว่า 14% (Bhatta *et al.*, 2001) เป็นสารอินทรีย์ที่มีอยู่ตามธรรมชาติ คอนเดนซ์แทนนินมีคุณสมบัติในการลดการผลิตแก๊สมีเทนในกระเพาะรูเมนของสัตว์เคี้ยวเอื้องได้อย่างมีประสิทธิภาพ (15-20 %) (Malik *et al.*, 2017; Poomachandra *et al.*, 2019) จากคุณสมบัติดังกล่าวเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามน่าจะเป็นวัตถุดิบทางเลือกที่ดีที่นำมาใช้ในการประกอบสูตรอาหารสัตว์เพื่อลดการปลดปล่อยแก๊สมีเทนจากการหมักในกระเพาะรูเมนของสัตว์เคี้ยวเอื้อง

แก๊สมีเทนที่ผลิตจากสัตว์เคี้ยวเอื้องเกิดจากกระบวนการหมักสารอาหารของจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมนและคิดเป็นสัดส่วน

95 เปอร์เซ็นต์ของมีเทนทั้งหมดที่ปล่อยจากสัตว์เคี้ยวเอื้อง แก๊สมีเทนในกระเพาะรูเมนเกิดจากการเปลี่ยนแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์และแก๊สไฮโดรเจน โดยจุลินทรีย์กลุ่ม methanogen (archaea) แก๊สมีเทนจะถูกขับออกจากกระเพาะรูเมนด้วยกระบวนการเรอออกมาทางปาก แก๊สมีเทนที่ถูกปลดปล่อยออกมามากเกินไปก่อให้เกิดปัญหาภาวะเรือนกระจก (Greenhouse effect) ซึ่งส่งผลให้อุณหภูมิของโลกเพิ่มสูงขึ้น (Beauchemin *et al.*, 2020; Glasson *et al.*, 2022) ปัจจุบันได้มีงานศึกษาวิจัยอย่างกว้างขวางเพื่อลดการปลดปล่อยแก๊สมีเทนจากกระบวนการหมักของสัตว์เคี้ยวเอื้อง โดยเฉพาะการใช้สารเสริมในอาหารสัตว์ จากงานวิจัยของ Kebreab and Feng (2021) พบว่า สารเสริมสารบางชนิดในอาหารสัตว์สามารถลดการผลิตแก๊สมีเทนได้อย่างมีประสิทธิภาพ ได้แก่ bromochloromethane (BCM), 3-nitrooxypropanol (3NOP), แทนนิน และไนเตรท โดยเฉพาะอย่างยิ่งไนเตรทเป็นสารประกอบไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีนแท้ ซึ่งสามารถใช้เป็นแหล่งของไนโตรเจนเช่นเดียวกับยูเรียในอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้องเพื่อให้จุลินทรีย์นำไปใช้ในไนโตรเจนจากไนเตรทไปใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์กรดอะมิโนหรือเป็นองค์ประกอบของโปรตีนในเซลล์จุลินทรีย์ และยังมีฤทธิ์ยับยั้งการผลิตมีเทนในสัตว์เคี้ยวเอื้องได้ด้วย จากการศึกษาของ Abdelbagi *et al.* (2023) รายงานไว้ว่าการใช้ไนเตรทในอาหารโค (140 กรัม/วัน) สามารถลดการปล่อยแก๊สมีเทนจากระบบย่อยอาหารได้มากถึง 22% และ 16% (กรัม/วัน และ กรัม/กิโลกรัมอาหารที่กินได้) ตามลำดับ อย่างไรก็ตามไนเตรทมีข้อจำกัดในการใช้ผสมในอาหารสัตว์ คือ ถ้าสัตว์ได้รับไนเตรทปริมาณมากกว่า 2.9 เปอร์เซ็นต์ในอาหารจะทำให้เกิดความเป็นพิษ โดยทำให้เกิดภาวะ

ขาดออกซิเจนในกระแสเลือดจากการเกิด methemoglobinemia (Lee and Beauchemin, 2014; EFSA *et al.*, 2020) อย่างไรก็ตาม การใช้แทนนินหรือไนเตรทเพียงชนิดใดชนิดหนึ่งสามารถลดการปลดปล่อยแก๊สมีเทนได้เพียงระดับหนึ่งเท่านั้น ดังนั้นการเสริมแทนนินร่วมกับไนเตรทในอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้องน่าจะมีศักยภาพในการลดการปลดปล่อยแก๊สมีเทนได้เพิ่มมากขึ้น งานทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการใช้เปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม (แหล่งของแทนนินจากธรรมชาติ) ที่ระดับต่าง ๆ และการใช้เปลือกหุ้มเมล็ดมะขามร่วมกับโซเดียมไนเตรทในอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้องเพื่อลดการปลดปล่อยแก๊สเรือนกระจกและประสิทธิภาพการหมักในหลอดทดลอง

2. วิธีดำเนินการวิจัย

สัตว์ทดลองในการศึกษานี้ขึ้นอยู่กับอายุภายใต้การอนุญาตและกำกับดูแลของคณะกรรมการกำกับดูแลการดำเนินการต่อสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (หมายเลขการอนุญาต ACKU66-AGK-013) ซึ่งเป็นไปตามแนวทางของ

คณะกรรมการกำกับและส่งเสริมการดำเนินการต่อสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ ที่ให้การรับรองโดยสำนักงานการวิจัยแห่งชาติ (วช.)

2.1 การเตรียมน้ำย่อยและจุลินทรีย์

โคลูกผสมพื้นเมืองบราห์มันจะกระเพาะรูเมน จำนวน 2 ตัว น้ำหนัก 413.5±21.92 กิโลกรัม ถูกใช้เป็นแหล่งเก็บน้ำย่อยและจุลินทรีย์จากกระเพาะรูเมน โคถูกเลี้ยงในคอกขังเดี่ยว ณ หน่วยวิจัยสัตว์เคี้ยวเอื้อง ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน โดยมีการให้อาหารชั้น 1.5% และ อาหารหยาบ 1.5% ของน้ำหนักตัวต่อวัน ตามลำดับ อาหารชั้นโปรตีน 16% และอาหารหยาบ คือ ฟางข้าว โดยให้ในสัดส่วน 50:50 แบ่งจ่ายอาหาร 2 มื้อ เวลา 7.00 และ 16.00 น.โคสามารถเข้ากินน้ำได้ตลอดเวลา โคจะถูกปรับสภาพการเลี้ยงและการให้อาหารเป็นเวลา 14 วัน จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะรูเมน ก่อนให้อาหารมื้อเช้าในวันที่ 15 ของการทดลอง ทำการกรองออกด้วยผ้าขาวบาง 2 ชั้นก่อนนำส่งห้องปฏิบัติการทันที

Table 1 Feed ingredients and chemical composition of the experimental diet.

| Item                              | 0TSH  | 7.5TSH | 15.0TSH | 22.5TSH | RS    | TSH   |
|-----------------------------------|-------|--------|---------|---------|-------|-------|
| <b>Feed ingredients (g/kg)</b>    |       |        |         |         |       |       |
| Cassava chips                     | 300   | 300    | 300     | 300     | –     | –     |
| Tamarind seed husk                | 0     | 75     | 150     | 225     | –     | –     |
| Palm kernel meal                  | 200   | 200    | 200     | 200     | –     | –     |
| Soybean meal                      | 195   | 195    | 195     | 195     | –     | –     |
| Rice bran coarse                  | 300   | 225    | 150     | 75      | –     | –     |
| Premix <sup>1</sup>               | 5     | 5      | 5       | 5       | –     | –     |
| <b>Chemical composition (%DM)</b> |       |        |         |         |       |       |
| Crude protein                     | 13.42 | 13.63  | 13.84   | 14.37   | 6.51  | 8.52  |
| Ether extract                     | 2.48  | 2.34   | 2.16    | 1.92    | 1.20  | 0.79  |
| Ash                               | 7.17  | 6.16   | 5.41    | 4.86    | 11.22 | 1.53  |
| Neutral detergent fiber           | 36.92 | 33.66  | 31.70   | 30.08   | 72.87 | 36.11 |
| Acid detergent fiber              | 31.66 | 29.72  | 28.40   | 26.65   | 49.54 | 30.00 |
| Acid detergent lignin             | 10.10 | 9.79   | 9.74    | 9.50    | 5.41  | 12.70 |
| Condensed tannin                  | 0.00  | 2.73   | 5.47    | 8.20    | 0.00  | 36.45 |

TSH = tamarind seed husk; RS = rice straw; DM = dry matter

<sup>1</sup>Agromix beef No. 46: vitamin A = 2,160,000 IU, vitamin B3 = 100,000 IU, vitamin E = 5,000 IU, Mn = 8.5 g, Zn = 6.4 g, Cu = 1.6 g, Mg = 16 g, Co = 320 mg, I = 800 mg, Se = 32 mg (Agromix beef No.46: A.I.P. Co. LTD, Nakhon Pathom, Thailand)

## 2.2 อาหารทดลอง แบ่งออกเป็น 2 การทดลอง

### การทดลองที่ 1 ระดับของเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม (TSH)

ใช้เปลือกหุ้มเมล็ดมะขามทดแทนรำหยาบในอาหารชั้นที่ระดับ 0, 7.5, 15.0 และ 22.5% (Table 1) เพื่อให้เห็นผลการการลดแก๊สมีเทนอย่างชัดเจน (Malik *et al.*, 2017) เปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเป็นผลพลอยได้จากโรงงานสกัดแป้งจากเนื้อในเมล็ดมะขามของบริษัท ยี.เอ็ม. อีชีฮาร่า จำกัด (ปทุมธานี) และทำการคัดแยกเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามโดย บริษัท พงศ์สมิต จำกัด (นนทบุรี) อาหารทดลองแต่ละสูตร และฟางข้าวถูกนำมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดวัตถุดิบ (RT-04A; Rong Tsong Precision Technology Co, Taiwan) ให้ผ่านตะแกรงขนาด 1 มิลลิเมตร

### การทดลองที่ 2 การใช้ TSH ร่วมกับ SN

ใช้เปลือกหุ้มเมล็ดมะขามร่วมกับโซเดียมไนเตรทในอาหารชั้น ประกอบด้วย 3 กลุ่มทดลอง (Table 1) คือ (1) อาหารชั้นที่มีเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม 10% (10TSH) มีส่วนประกอบของวัตถุดิบ (รำหยาบ 20%) และคุณค่าทางโภชนาคล้ายกับการทดลองที่ 1, (2) อาหารชั้นที่ไม่มีเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามและเสริมโซเดียมไนเตรท (Elago Enterprises Pty Ltd., Australia) 1% (0TSH&1SN) และ (3) อาหารชั้นที่มีเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม 10% และเสริมโซเดียมไนเตรท 1% (10TSH&1SN) เป็นระดับของไนเตรทที่สามารถลดการผลิตแก๊สมีเทนในกระเพาะรูเมนของโคและมีความปลอดภัยต่อตัวสัตว์ (Lee and Beauchemin, 2014; EFSA *et al.*, 2020)

## 2.3 การทดลองและเก็บข้อมูล

ใส่อาหารทดลอง (อาหารชั้น 0.1 กรัม และฟางข้าว 0.1 กรัม) ใน Hungate tube ความจุ 30 mL ผสมสารละลายน้ำลายเทียม (McDougall, 1948) ร่วมกับของเหลวจากกระเพาะรูเมนในสัดส่วน 50:50 ทำในสภาวะไร้ออกซิเจนภายใต้สภาวะที่มีแก๊สไนโตรเจนบริสุทธิ์ นำสารละลาย (ยูเรียหรือโซเดียมไนเตรท) ผสมใส่ในหลอด Hungate tube หลอดละ 20 mL ปิดฝาด้วยจุกยางและฝาเกลียวพลาสติก จากนั้นนำใส่ในตูบ่ม อุณหภูมิ 39 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการหยุดกระบวนการหมักในหลอดโดยการนำหลอดทดลองใส่ในน้ำแข็งอุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการวัดแรงดันแก๊สและเก็บตัวอย่างแก๊สดำเนินเพื่อวิเคราะห์ปริมาณแก๊สและองค์ประกอบแก๊ส (แก๊สมีเทนกับคาร์บอนไดออกไซด์) ของเหลวส่วนที่เหลือหลังการบ่ม 3 mL ถูกเก็บเพื่อวิเคราะห์แอมโมเนียไนโตรเจน (NH<sub>3</sub>-N) โปรตีนจากจุลินทรีย์ (MCP) และกรดไขมันสายสั้น (SCFA) ส่วนที่เหลือจะถูกนำไปหาการย่อยได้ของวัตถุดิบในหลอดทดลอง (IVDMD) โดยทำกลุ่มทดลองละ 6 หลอด (ซ้ำ) และมี blank จำนวน 4 หลอด (ไม่ใส่อาหารในหลอดทดลอง)

## 2.4 การวิเคราะห์ทางเคมี

อาหารสัตว์และเปลือกเมล็ดมะขามนำไปวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการอาหารสัตว์ ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม โดยวัตถุแห้ง (dry matter) โปรตีนหยาบ (crude protein) ไขมัน (ether extract) และเถ้า (ash) ถูกวิเคราะห์ตามมาตรฐาน AOAC (2019) และ ISO/IEC 17025 ส่วนเยื่อใยที่ไม่ละลายในสารละลายที่เป็นกลาง เยื่อใยที่ไม่ละลายในสารละลายที่เป็นกรด และลิกนินถูกวิเคราะห์ตามมาตรฐาน AOAC (2016) และ ISO/IEC 17025 การวิเคราะห์ปริมาณแทนนินได้ดัดแปลงวิธีการของ Sun *et al.* (1998) และ Butler *et al.* (1982) โดยทำการสกัดสารละลายแทนนินจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามที่ถูกบดละเอียด (< 1 mm) ปริมาณ 1 กรัม ใส่ในสารละลาย Ethanol:H<sub>2</sub>O (3:2) ปริมาตร 50 mL ที่อุณหภูมิ 50 °C นาน 24 ชั่วโมง (SSeriker II VS-8480SFN; Vision Scientific Co Ltd, Daejeon-Si, Korea) จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนที่ 4000 rpm นาน 20 นาที นำสารละลายใสที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณแทนนิน โดยใช้ catechin เป็นสารละลายมาตรฐานของ condensed tannin (CT) เตรียมสารละลาย vanillin-70%H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> โดยใช้ vanillin 1 กรัม ในสารละลาย 70% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 100 mL (ในน้ำกลั่น) เตรียม catechin ที่ความเข้มข้น 0.1-1.0 mg/mL (ละลายใน Ethanol:H<sub>2</sub>O (3:2) จำนวน 10 ระดับความเข้มข้น) และตัวอย่างสารสกัด 1 mL เติมสารละลาย vanillin 5 mL ในสารละลายมาตรฐานและตัวอย่าง ผสมให้เข้ากัน หลังจาก 30 นาทีนำไปวัดความเข้มของสีด้วยเครื่อง spectrophotometry (Helios Zeta; Thermo Fisher Scientific, Singapore) ที่ความยาวคลื่นแสง 650 nm

## 2.5 การวัดแรงดันแก๊สและการวิเคราะห์ปริมาณแก๊สมีเทน

นำหลอดทดลองที่แช่ในน้ำแข็งหลังการบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาวัดแรงดันแก๊สด้วยเกจวัดแรงดัน (AΦ60B, GL Science, Tokyo, Japan) จากนั้นทำการเก็บแก๊สปริมาตร 0.2 mL ด้วยไซริงค์ล็อกแก๊ส (TRAJAN® #SGE Syringe, Trajan Scientific Australia Pty Ltd., Australia) และฉีดเข้าเครื่อง Gas chromatograph (GC-8A; Shimadzu, Kyoto, Japan) ซึ่งบรรจุคอลัมน์ (3 mm i.d. × 3 m length, mesh range 80/100; GL Science, Tokyo, Japan) โดยทำการเปรียบเทียบความเข้มข้นแก๊สจากตัวอย่างที่ฉีดกับแก๊สมาตรฐานได้แก่ คาร์บอนไดออกไซด์ 10% และแก๊สมีเทน 1% (บจ. แมสเซอร์ สเตเบิลส์ ก๊าซ จังหวัดนครปฐม) ทำการวิเคราะห์ที่ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

## 2.6 การวิเคราะห์ของเหลวที่เหลือภายหลังการบ่ม

ของเหลวที่เหลือภายหลังการบ่มถูกเก็บใส่ไมโครทิวป์ ขนาด 1.5 mL ปริมาตร 1 mL จำนวน 3 หลอดและเก็บที่อุณหภูมิ  $-20^{\circ}\text{C}$  เพื่อนำไปวิเคราะห์  $\text{NH}_3\text{-N}$ , MCP และ SCFA ต่อไป วัดค่า pH จากของเหลวที่เหลือด้วย pH meter (CyberScan pH510; Eutech Instruments Pte Ltd, Singapore) จากนั้นทำการอบที่อุณหภูมิ  $100^{\circ}\text{C}$  และนำไปชั่งน้ำหนักเพื่อคำนวณหาปริมาณแห้ง ส่วนที่เหลือเพื่อประเมินค่า *in vitro* dry matter digestibility (IVDMD) ตามวิธีของ Adetunji *et al.* (2020)

ค่า  $\text{NH}_3\text{-N}$  ถูกวิเคราะห์โดยเทคนิค phenol-hypochlorite ด้วย UV-Vis spectrophotometer (Multiskan SkyHigh Microplate Reader; Thermo Fisher Scientific, Singapore) โดยใช้ความยาวคลื่นแสงที่ 660 nm (Khongpradit *et al.*, 2020)

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนจากจุลินทรีย์ คัดแปลงจากวิธีของ Makkar *et al.* (1982) นำตัวอย่างมาทำการปั่นเหวี่ยงที่  $400 \times g$  นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ  $4^{\circ}\text{C}$  เก็บตัวอย่างของเหลวและปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่  $25,000 \times g$  นาน 25 นาที ที่อุณหภูมิ  $4^{\circ}\text{C}$  เพื่อเก็บตะกอนเซลล์ของจุลินทรีย์ และล้างเซลล์อีกครั้งด้วยการเติมสารละลายบัฟเฟอร์ (McDougall, 1948) ปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่  $25,000 \times g$  นาน 25 นาที ที่อุณหภูมิ  $4^{\circ}\text{C}$  และทิ้งส่วนใส เมื่อได้ส่วนเซลล์ที่ตกตะกอนแล้วทำให้เซลล์แตกด้วยการเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์  $0.25 \text{ N}$  1 mL และให้ความร้อนที่  $80^{\circ}\text{C}$  นาน 10 นาที ด้วย digital dry bath (AccuBlock; Labnet, China) ปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่  $25,000 \times g$  นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ  $4^{\circ}\text{C}$  เก็บส่วนใสเพื่อทำการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนจากจุลินทรีย์ โดยวัดด้วย microplate spectrophotometer (Multiskan SkyHigh; Thermo Fisher Scientific, Singapore) คำนวณหาปริมาณโปรตีนโดยใช้ bovine serum albumin เป็นสารมาตรฐาน (Quick Start Bradford Protein Assay Kit2; Bio-rad, California, USA) เตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐาน 7 ความเข้มข้นตั้งแต่  $0.125 - 20 \text{ mg/ml}$  นำตัวอย่างที่เตรียมแล้วหรือสารมาตรฐาน  $5 \mu\text{L}$  ผสมด้วย Quick Start™ Bradford dye reagent  $250 \mu\text{L}$  (Quick Start Bradford Protein Assay Kit2; Bio-rad, California, USA) ย้ายสารละลายไปภาตหลุมใหม่ไปเขย่านาน 2 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 nm

การวิเคราะห์ SCFA ทำตามวิธีของ Khongpradit *et al.* (2020) โดยผสมตัวอย่าง  $100 \mu\text{L}$  กับ  $5 \text{ N}$   $\text{H}_2\text{SO}_4$  ใน metaphosphoric acid  $20 \mu\text{L}$  แช่เย็นที่  $4^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่  $16,000 \times g$  นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ  $4^{\circ}\text{C}$  จากนั้นดูดสายละลายตัวอย่าง  $50 \mu\text{L}$  ผสมกับ crotonic acid ที่มีความเข้มข้น  $3 \text{ mmol/dL}$  เป็นสารมาตรฐานภายใน (internal standard) ปริมาตร  $50 \mu\text{L}$  และใช้กรดไขมันระเหยง่ายที่ทราบความเข้มข้นเป็นสารมาตรฐานภายนอก (external standard) ทำการฉีดตัวอย่างที่เตรียมแล้วจำนวน  $1 \mu\text{L}$  เข้าเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ

(CP9001; Chrompack, Shimadzu, Japan) แปลผลจากพื้นที่ใต้กราฟของตัวอย่างเทียบกับสารมาตรฐาน

## 2.7 การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (analysis of variance; ANOVA) ตามแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี orthogonal contrast (Tukey's comparison) และวิเคราะห์การถดถอยเพื่อหาผลการตอบสนองแบบ linear, quadratic และ cubic โดยใช้โปรแกรม R version 4.3.3 (R Core Team, 2024) โดยกำหนดนัยสำคัญทางสถิติที่  $P < 0.05$  เพื่อประเมินผลของกลุ่มทดลอง โดยค่าเฉลี่ยและความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (SEM) จะถูกคำนวณในแต่ละตัวแปรโดยใช้โมเดล ดังนี้

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \epsilon_{ij}$$

กำหนด  $Y_{ij}$  = ค่าผลทดสอบ,  $\mu$  = ค่าเฉลี่ยของแต่ละกลุ่มทดลอง,  $\alpha_i$  = ระดับ TSH ( $i = 0, 7.5, 15.0$ , และ  $22.5$ ) หรือ การใช้ TSH ร่วมกับ SN ( $10\text{TSH}$ ,  $0\text{TSN}+1\text{SN}$  และ  $10\text{TSH}+1\text{SN}$ ),  $\epsilon_{ij}$  = ค่าความคลาดเคลื่อน

## 3. ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

### 3.1 การทดลองที่ 1 ระดับของเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามในอาหารชั้น

ผลการหมักในหลอดทดลองจากการใช้เปลือกหุ้มเมล็ดมะขามในอาหารชั้นแสดงใน Table 2 ค่า pH มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามระดับเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามที่เพิ่มขึ้น (ที่ระดับ 15.0 และ 22.5 เปอร์เซ็นต์) ในขณะที่  $\text{NH}_3\text{-N}$  และ MCP มีความเข้มข้นที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ปริมาณ total SCFA มีระดับลดลงที่ 15.0TSH และ 22.5TSH (แบบ quadratic) แม้จะไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P > 0.05$ ) โดยพบว่ากลุ่ม 7.5TSH มีค่าเฉลี่ยสูงสุด สัดส่วนกรดไขมันระเหยง่ายพบว่า โพรไฟโอเนตมีสัดส่วนที่สูงขึ้น ในขณะที่เปอร์เซ็นต์กรดไขมันสายสั้นอื่น ๆ มีระดับลดลงตามปริมาณเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามที่สูงขึ้น สัดส่วน acetate/propionate (A/P ratio) มีค่าลดลงแบบเส้นตรง เมื่อระดับเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามสูงขึ้น การใช้เปลือกหุ้มเมล็ดมะขามในปริมาณเพิ่มมากขึ้นในอาหารชั้น มีแนวโน้มทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างในกระเพาะรูเมนเพิ่มสูงขึ้น เนื่องจากการใช้เปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเพิ่มขึ้นส่งผลทำให้การย่อยได้ การผลผลิตกรดไขมันระเหยง่ายสายสั้น ความเข้มข้นของแอมโมเนีย-ไนโตรเจน และปริมาณโปรตีนจากจุลินทรีย์มีค่าลดลง ทั้งนี้เป็นผลมาจากคุณสมบัติของแทนนินที่เป็นองค์ประกอบหลักในเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม (36.45 %) ซึ่งแทนนินนี้สามารถจับกับโปรตีนในอาหารและทำให้โปรตีนถูกย่อยได้ลดลง โดยเฉพาะอย่างยิ่งโปรตีนแท้ที่มีคุณภาพดีถ้าอยู่ในกระเพาะรูเมนของสัตว์โปรตีนเหล่านี้จะ

ถูกไหลผ่านไปยังทางเดินอาหารส่วนท้าย (ลำไส้เล็ก) ที่มีสภาพความเป็นด่างสูงจะทำให้โปรตีนแยกหรือแตกตัวจากการจับของแทนนินและโปรตีนจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ที่หลั่งออกมาจากตัวสัตว์ทำให้ได้เป็นกรดอะมิโนและถูกดูดไปใช้ประโยชน์ได้โดยตรงซึ่งจะเป็นผลดีต่อตัวสัตว์ (Bhatta *et al.*, 2000; Sawanon, 2018) ดังนั้นอาหารชั้นที่มีเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเป็นส่วนผสมอยู่มากเมื่อสัตว์กินเข้าไปจุลินทรีย์จะเข้ามาย่อยโปรตีนได้น้อยจึงส่งผลทำให้ความเข้มข้นของแอมโมเนีย-ไนโตรเจนในกระเพาะรูเมนลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (อาหารชั้นที่ไม่มีเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม) ทำให้มีสารตั้งต้นเพื่อให้จุลินทรีย์นำไปใช้ในการสังเคราะห์กรดอะมิโนเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์น้อยลง สัดส่วนของเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามในอาหารชั้นที่เพิ่มมากขึ้นยังส่งผลให้ความเข้มข้นของกรดไขมันระเหยง่ายสายสั้นลดลง โดยเฉพาะอย่างยิ่งความเข้มข้นของกรดอะซิติกและบิวทิริก อย่างไรก็ตามการใช้เปลือกหุ้มเมล็ดมะขามที่ระดับ 7.5 เปอร์เซ็นต์ในอาหารชั้น (7.5 TSH) มีค่าการย่อยได้และความเข้มข้นของกรดไขมันสายสั้นทั้งหมดสูงที่สุด ในขณะที่สัดส่วนของกรดอะซิติก โพรพิโอนิก บิวทิริก และกรดไขมันระเหยง่ายชนิดอื่น พบว่าการใช้เปลือกหุ้มเมล็ดมะขามในอาหารชั้นปริมาณมากขึ้นทำให้สัดส่วนของกรดโพรพิโอนิกเพิ่มขึ้น และส่งผลให้สัดส่วนกรดอะซิติกต่อโพรพิโอนิกน้อยลง สอดคล้องกับงานวิจัยของ Malik *et al.* (2017) การใช้เปลือกหุ้มเมล็ดมะขามในอาหารชั้นเพิ่มมากขึ้นทำให้ผลผลิตแก๊สมีเทนลดลง อาจเป็นผลมาจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามไปส่งเสริมการทำงานของจุลินทรีย์กลุ่มที่หมักย่อยแล้วได้ผลผลิตสุดท้าย คือโพรพิโอนेटเป็นหลัก ในกระบวนการหมักของจุลินทรีย์เพื่อให้ได้โพรพิโอนेटจะมีการสูญเสียคาร์บอนหรือไฮโดรเจนอย่างมาก ทำให้มีสารตั้งต้นในการสังเคราะห์แก๊สมีเทนลดลง จึงทำให้ปริมาณการผลิตแก๊สมีเทนลดลง (Naumann *et al.*, 2017) ส่วนกรดไขมันระเหยง่ายสายสั้นชนิดอื่น เช่น isobutyrate, valerate และ isovalerate ส่วนใหญ่ได้มาจากการย่อยสลายกรดอะมิโน valine, leucine และ isoleucine (France and Dijkstra, 2005)

ผลการย่อยได้และผลผลิตแก๊สในหลอดทดลองจากการใช้เปลือกหุ้มมะขามในอาหารชั้นแสดงใน Table 3 โดยค่าการย่อยได้มีค่าลดลงตามระดับเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามที่อยู่ในอาหาร โดยมีการย่อยได้ดีที่สุดในกลุ่ม 7.5TSH ย่อยได้ถึง 37.38% ปริมาตรแก๊สรวม ปริมาตรแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ และปริมาตรแก๊สมีเทนลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) โดยกลุ่ม 22.5TSH มีปริมาตรแก๊สทั้งหมดน้อยที่สุด และสัดส่วนระหว่าง  $\text{CO}_2/\text{CH}_4$  เพิ่มขึ้นตามระดับของ TSH ที่เพิ่มมากขึ้นเป็นแบบเส้นตรง แม้ไม่พบความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบระหว่าง 0TSH และ 7.5TSH การผลิตแก๊สมีเทนต่อปริมาณอาหารที่ถูกย่อยได้ ( $\text{CH}_4/\text{digestible dry matter}$ :  $\text{CH}_4/\text{dDM}$ ) มีค่าลดลงเป็นแบบเส้นตรงตามระดับของ TSH ที่เพิ่ม

มากขึ้น การทดแทนรำหยาบด้วยเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามจะลดการย่อยได้ของอาหารสัตว์ เนื่องจากรำหยาบมีปริมาณเยื่อใยในรูปของ NDF และ ADF (59.1 และ 44.1 % ตามลำดับ จาก Bureau of Animal Nutrition Development (2016) สูงกว่าเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม (36.1 และ 30.0 % ตามลำดับ ดังแสดงใน Table 1) แต่เอมิเซลลูโลส (NDF – ADF) ซึ่งเป็นเยื่อใยที่ย่อยได้ง่ายในรำข้าว (Javier-Astete *et al.*, 2021) มีปริมาณมากกว่าเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม ลิกนิน (ADL) ในเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามมีปริมาณมากกว่ารำหยาบจึงทำให้แบคทีเรียเข้าย่อยเยื่อใยในเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามได้ไม่ดี (Bureau of Animal Nutrition Development, 2016) เมื่อมีการเพิ่มปริมาณการใช้เปลือกหุ้มเมล็ดมะขามในอาหารจะทำให้ค่าการย่อยได้มีแนวโน้มลดลง (Table 3) นอกจากนี้พบว่าระดับของแทนนินในเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม (7.5TSH) ทำให้การย่อยได้ในรูปวัตถุแห้งใกล้เคียงกับอาหารที่ไม่มีเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเป็นองค์ประกอบ เป็นระดับที่เหมาะสมต่อทำงานของจุลินทรีย์ในการย่อยสารอาหาร คล้ายกับการศึกษาของ Wanapat *et al.* (2021) ที่รายงานว่าแทนนิน และซาโปนิน (saponin) ในเปลือกมังคุด เปลือกเงาะ และหัวปลีในระดับที่เหมาะสมสามารถส่งเสริมการย่อยได้ของอาหาร แต่ถ้าใช้ในระดับที่สูงขึ้นกลับพบว่าการย่อยได้ของวัตถุแห้งลดลง ซึ่งน่าจะเป็นผลจากความสามารถในการจับของแทนนินกับเยื่อใย โปรตีน และแร่ธาตุที่จำเป็น ทำให้จุลินทรีย์เข้าไปยึดจับและย่อยโครงสร้างขนาดใหญ่ (polysachcharide และ polyamide) ได้น้อยลง ตลอดจนอาจจะไปขัดขวางการนำแร่ธาตุสำคัญ (Al, Ca, Co, Cu, Fe, Mg, Mn, P และ Zn) เข้าสู่เซลล์ทำให้มีผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียกลุ่มที่ย่อยเยื่อใย (Fibrolitic bacteria) เช่น *F. succinogenes* ลดลง (Naumann *et al.*, 2017; Vasta *et al.*, 2019) นอกจากนี้จากการศึกษาของ Huang *et al.* (2018) ซึ่งศึกษาคุณสมบัติด้านสารต้านจุลินทรีย์ของแทนนินพบว่าคอนเดนซ์แทนนินมีผลทำลายเยื่อเซลล์และเพิ่มการซึมผ่านของสารเข้าออกเซลล์เชื้อก่อโรคด้วย การลดลงของปริมาตรแก๊สรวม แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ และแก๊สมีเทนเป็นผลจากคุณสมบัติของแทนนินในการยับยั้งการผลิตแก๊สมีเทน ซึ่งยังไม่มีการทำงานที่ชัด แต่มีสมมติฐานด้วยกัน 3 ข้อตามการศึกษาของ Naumann *et al.* (2017) คือ 1. การจับการโปรตีนที่ fimbria และเยื่อหุ้มเซลล์มีผลลดการจับกันของ methanogen และ protozoa ลดการส่งผ่านแก๊ส  $\text{H}_2$  ระหว่าง 2 สปีชีส์ นอกจากนี้ยังมีผลให้จำนวน ciliated protozoa ลดลงด้วย 2. การลดการย่อยได้ของสารอาหาร ซึ่งได้กล่าวไปแล้วข้างต้น และ 3. โครงสร้างของแทนนินมีคุณสมบัติในการจับโมเลกุล  $\text{H}_2$  เช่นกัน ทั้งนี้  $\text{H}_2$  และ  $\text{CO}_2$  เป็นสารตั้งต้นในการผลิต  $\text{CH}_4$  (Vearaslip, 2005) การลด  $\text{H}_2$  อิสระในระบบ จึงช่วยลดการสังเคราะห์  $\text{CH}_4$  ได้

**Table 2** Fermentation characteristics of tamarind seed husk with increasing levels at 0, 7.5, 15.0 and 22.5% in concentrate diets

| Parameter                  | 0TSH                | 7.5TSH              | 15.0TSH             | 22.5TSH             | SEM    | P-value |           |       |
|----------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|--------|---------|-----------|-------|
|                            |                     |                     |                     |                     |        | linear  | quadratic | cubic |
| pH                         | 6.54                | 6.51                | 6.64                | 6.60                | 0.09   | 0.06    | 0.94      | 0.50  |
| NH <sub>3</sub> -N (mgN/L) | 34.53 <sup>a</sup>  | 31.78 <sup>ab</sup> | 30.00 <sup>ab</sup> | 28.49 <sup>b</sup>  | 2.92   | <0.01   | 0.68      | 0.91  |
| MCP (μg/ml)                | 137.71 <sup>a</sup> | 98.84 <sup>ab</sup> | 85.94 <sup>b</sup>  | 85.59 <sup>b</sup>  | 321.43 | <0.01   | 0.06      | 0.79  |
| Total SCFA (mmol/L)        | 338.22              | 349.54              | 278.87              | 275.11              | 56.17  | 0.18    | 0.03      | 0.75  |
| Acetate (mmol/L)           | 256.91 <sup>a</sup> | 263.71 <sup>a</sup> | 210.34 <sup>b</sup> | 208.26 <sup>b</sup> | 42.79  | 0.03    | 0.72      | 0.22  |
| Propionate (mmol/L)        | 39.98               | 43.85               | 35.28               | 35.09               | 6.62   | 0.11    | 0.42      | 0.15  |
| Butyrate (mmol/L)          | 25.99 <sup>a</sup>  | 26.56 <sup>a</sup>  | 21.35 <sup>b</sup>  | 20.86 <sup>b</sup>  | 4.58   | 0.03    | 0.66      | 0.27  |
| Other SCFAs (mmol/L)       | 15.34 <sup>a</sup>  | 15.42 <sup>a</sup>  | 11.90 <sup>ab</sup> | 10.90 <sup>b</sup>  | 2.52   | <0.01   | 0.52      | 0.60  |
| Acetate (%)                | 75.94               | 75.42               | 75.42               | 75.73               | 0.70   | 0.60    | 0.20      | 0.88  |
| Propionate (%)             | 11.85 <sup>b</sup>  | 12.56 <sup>ab</sup> | 12.69 <sup>ab</sup> | 12.76 <sup>a</sup>  | 0.50   | 0.01    | 0.16      | 0.63  |
| Butyrate (%)               | 7.67                | 7.61                | 7.64                | 7.55                | 0.25   | 0.47    | 0.90      | 0.68  |
| Other SCFAs (%)            | 4.53 <sup>a</sup>   | 4.41 <sup>a</sup>   | 4.25 <sup>ab</sup>  | 3.97 <sup>b</sup>   | 0.19   | <0.01   | 0.34      | 0.85  |
| Acetate/Propionate ratio   | 6.41                | 6.02                | 5.95                | 5.94                | 0.29   | 0.02    | 0.15      | 0.67  |

TSH = tamarind seed husk; NH<sub>3</sub>-N = ammonia nitrogen; MCP = microbial crude protein; Other SCFAs = iso-butyrate + valerate + isovalerate

<sup>ab</sup> Means in a row superscripted with different lowercase letters are significantly different ( $p < 0.05$ ). SEM = standard error of means

**Table 3** Digestibility and gas production of tamarind seed husk with increasing levels at 0, 7.5, 15.0 and 22.5% in concentrate diets

| Parameter                        | 0TSH               | 7.5TSH              | 15.0TSH             | 22.5TSH            | SEM   | P-value |           |       |
|----------------------------------|--------------------|---------------------|---------------------|--------------------|-------|---------|-----------|-------|
|                                  |                    |                     |                     |                    |       | linear  | quadratic | cubic |
| IVDMD                            | 36.56 <sup>a</sup> | 37.38 <sup>a</sup>  | 31.65 <sup>ab</sup> | 29.79 <sup>b</sup> | 3.31  | <0.01   | 0.35      | 0.16  |
| Total gas (mL)                   | 36.73 <sup>a</sup> | 35.77 <sup>a</sup>  | 35.41 <sup>ab</sup> | 34.22 <sup>b</sup> | 0.84  | <0.01   | 0.66      | 0.37  |
| CO <sub>2</sub> (mL)             | 22.17 <sup>a</sup> | 21.52 <sup>ab</sup> | 20.76 <sup>ab</sup> | 19.81 <sup>b</sup> | 1.57  | 0.40    | 0.96      | 0.01  |
| CH <sub>4</sub> (mL)             | 5.26 <sup>a</sup>  | 5.11 <sup>a</sup>   | 4.47 <sup>b</sup>   | 3.97 <sup>b</sup>  | 0.37  | <0.01   | 0.32      | <0.01 |
| CO <sub>2</sub> /CH <sub>4</sub> | 4.21 <sup>b</sup>  | 4.21 <sup>b</sup>   | 4.65 <sup>a</sup>   | 5.01 <sup>a</sup>  | 0.25  | <0.01   | 0.10      | 0.24  |
| CH <sub>4</sub> /dDM (mL/g)      | 78.67              | 74.07               | 77.72               | 71.51              | 10.98 | 0.34    | 0.96      | 0.52  |

TSH = tamarind seed husk; IVDMD = *in vitro* dry matter digestibility; CH<sub>4</sub> = methane; CO<sub>2</sub> = carbon dioxide; CH<sub>4</sub>/dDM, methane/digested dry matter

<sup>ab</sup> Means in a row superscripted with different lowercase letters are significantly different ( $P < 0.05$ ). SEM = standard error of means

### 3.2 การทดลองที่ 2 TSH ร่วมกับ SN

การใช้เปลือกหุ้มเมล็ดมะขามที่ 10% มีผลทำให้ความเป็นกรด-ด่างเพิ่มขึ้น และถ้าใช้ทั้งเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามร่วมกับไนเตรทจะทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) เพิ่มขึ้นแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากงานศึกษาก่อนหน้าพบว่าการทดแทนยูเรียด้วยไนเตรทมีผลเพิ่มค่าความเป็นกรด-ด่างในกระเพาะรูเมนเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Villar *et al.*, 2020; Abdelbagi *et al.*, 2021) ค่าแอมโมเนีย-ไนโตรเจน พบว่ากลุ่ม 0TSH&1SN มีค่ามากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่กลุ่ม 10TSH&1SN มีค่าน้อยที่สุด ปริมาณ MCP มีค่ามากที่สุดในกลุ่ม

10TSH และน้อยที่สุดในกลุ่ม 10TSH&1SN ความเข้มข้นของแอมโมเนีย-ไนโตรเจนมีค่าลดลงในกลุ่มที่ใช้เปลือกหุ้มเมล็ดมะขามร่วมกับไนเตรท (10TSH&1SN) สันนิษฐานว่าน่าจะเป็นผลจากการที่โคเจาะกระเพาะไม่ได้รับการปรับตัวจากการได้รับไนเตรทมาก่อน ทำให้ความสามารถในการปรับตัวของจุลินทรีย์ต่อการใช้ประโยชน์จากไนเตรทลดลง (Nolan *et al.*, 2016) รวมถึงไนเตรทมีผลทำให้การย่อยได้ของของเยื่อใยในรูป NDF ลดลง (Newbold *et al.*, 2014) และทำให้การสังเคราะห์โปรตีนเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ของจุลินทรีย์ลดลง และจากงานศึกษาของ Abdelbagi *et al.* (2021) ได้ทำการวิเคราะห์ข้อมูลย้อนหลังแบบ meta-analysis (10 งานวิจัย)

พบว่าไนเตรทมีผลทำให้ปริมาณแอมโมเนีย-ไนโตรเจนเพิ่มขึ้นหลังการบ่มในหลอดทดลอง

ความเข้มข้นกรดไขมันระเหยง่ายทั้งหมด และกรดไขมันระเหยง่ายชนิดต่างๆ ในหน่วย mmol/L พบว่าไม่มีความแตกต่างกันในแต่ละกลุ่มทดลอง เช่นเดียวกับงานศึกษาของ Abdelbagi *et al.* (2021) จากทั้ง 3 กลุ่มทดลอง พบว่าสัดส่วนของกรดอะซิติกสูงที่สุดเมื่อใช้เปลือกหุ้มเมล็ดมะขามร่วมกับไนเตรท และมีสัดส่วนของกรดบิวทริกและกรดไขมันระเหยง่ายสายสั้นชนิดอื่นต่ำที่สุด ทั้งนี้จากหลายงานศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าสัดส่วนของกรดไขมันระเหยง่ายค่อนข้างแตกต่างกันไปในแต่ละการทดลอง โดยขึ้นกับหลายปัจจัย เช่น ชนิดสัตว์ การให้อาหาร ปริมาณ และชนิดของไนเตรทที่ใช้ (Duthie *et al.*, 2018; van Wyngaard *et al.*, 2019; Welty *et al.*, 2019; Adejoro *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2023)

ปริมาณแก๊สรวม คาร์บอนไดออกไซด์ และมีเทนมีผลลดลงต่ำสุด ในกลุ่มทดลองที่ใช้ทั้งเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามร่วมกับไนเตรท สาเหตุมาจากการย่อยได้ที่ลดลงจากผลของแทนนินในเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม และผลของไนเตรทต่อการยับยั้งการทำงานของจุลินทรีย์ผลิตแก๊สมีเทนและคาร์บอนไดออกไซด์ (Yang *et al.*, 2016) นอกจากนี้แบคทีเรียยังสามารถเปลี่ยนไนเตรทให้เป็นไนไตรต์ และแอมโมเนียได้ตามลำดับ ในกระบวนการเปลี่ยนแปลงไนเตรทไปเป็นแอมโมเนียนี้จะมีการใช้อิโตรเจน ( $H_2$ ) ซึ่งจะทำให้มีปริมาณไฮโดรเจนที่นำไปใช้ในกระบวนการสังเคราะห์มีเทนและการเพิ่มจำนวนเซลล์ของจุลินทรีย์กลุ่มที่ผลิตแก๊สมีเทนลดลง ดังแสดงในการศึกษาของ Bowen *et al.* (2020) ที่ชี้ให้เห็นว่าการใช้ calcium nitrate 2.5% ในอาหารโคเพศผู้ตอน ส่งผลให้จำนวน Methanospaera และ Methanobrevibacter ลดลง

**Table 4** Fermentation characteristics of tamarind seed husk, sodium nitrate and their combination in concentrate diets

| Parameter                  | 10TSH               | 0TSH&1SN            | 10TSH&1SN          | SEM   | P-value |
|----------------------------|---------------------|---------------------|--------------------|-------|---------|
| pH                         | 6.54                | 6.51                | 6.59               | 0.08  | 0.25    |
| NH <sub>3</sub> -N (mgN/L) | 37.90 <sup>ab</sup> | 40.70 <sup>a</sup>  | 34.50 <sup>b</sup> | 2.33  | <0.01   |
| MCP (μg/ml)                | 119.19 <sup>a</sup> | 88.89 <sup>ab</sup> | 77.17 <sup>b</sup> | 22.68 | 0.03    |
| Total SCFA (mmol/L)        | 271.28              | 263.13              | 261.88             | 17.66 | 0.65    |
| Acetate (mmol/L)           | 205.14              | 195.63              | 199.63             | 14.91 | 0.59    |
| Propionate (mmol/L)        | 35.00               | 34.72               | 33.45              | 2.06  | 0.43    |
| Butyrate (mmol/L)          | 20.62               | 21.07               | 18.85              | 1.79  | 0.12    |
| Other SCFAs (mmol/L)       | 10.48 <sup>ab</sup> | 11.68 <sup>a</sup>  | 9.90 <sup>b</sup>  | 0.94  | 0.02    |
| Acetate (%)                | 75.59 <sup>ab</sup> | 74.34 <sup>b</sup>  | 76.18 <sup>a</sup> | 1.12  | 0.04    |
| Propionate (%)             | 12.93               | 13.20               | 12.80              | 0.71  | 0.62    |
| Butyrate (%)               | 7.59 <sup>ab</sup>  | 8.01 <sup>a</sup>   | 7.20 <sup>b</sup>  | 0.44  | 0.03    |
| Other SCFAs (%)            | 3.87 <sup>b</sup>   | 4.44 <sup>a</sup>   | 3.79 <sup>b</sup>  | 0.33  | 0.01    |
| Acetate/Propionate ratio   | 2.16                | 2.15                | 2.28               | 0.14  | 0.28    |

TSH = tamarind seed husk; SN = sodium nitrate; NH<sub>3</sub>-N = ammonia nitrogen; MCP = microbial crude protein; Other SCFAs = iso-butyrate + valerate + isovalerate

<sup>ab</sup> Means in a row superscripted with different lowercase letters are significantly different ( $p < 0.05$ ). SEM = standard error of means

**Table 5** Gas production of tamarind seed husk, sodium nitrate and their combination in concentrate diets

| Parameter                        | 10TSH              | 0TSH&1SN            | 10TSH&1SN          | SEM  | P-value |
|----------------------------------|--------------------|---------------------|--------------------|------|---------|
| Total gas (mL)                   | 29.56 <sup>a</sup> | 28.23 <sup>ab</sup> | 27.78 <sup>b</sup> | 1.13 | <0.05   |
| CO <sub>2</sub> (mL)             | 11.80 <sup>a</sup> | 10.72 <sup>ab</sup> | 10.38 <sup>b</sup> | 0.91 | <0.05   |
| CH <sub>4</sub> (mL)             | 4.72 <sup>a</sup>  | 4.63 <sup>a</sup>   | 4.25 <sup>b</sup>  | 0.20 | <0.01   |
| CO <sub>2</sub> /CH <sub>4</sub> | 2.50               | 2.31                | 2.44               | 0.12 | 0.05    |

TSH = tamarind seed husk; SN = sodium nitrate; CH<sub>4</sub> = methane; CO<sub>2</sub> = carbon dioxide

<sup>ab</sup> Means in a row superscripted with different lowercase letters are significantly different ( $P < 0.05$ ). SEM = standard error of means

จากผลการทดลองพบว่าเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามและโซเดียมไนเตรทสามารถใช้ร่วมกันได้โดยไม่กระทบต่อค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ อย่างชัดเจน แม้ในงานทดลองก่อนหน้านี้ของ Adejoro *et al.* (2020) ที่ใช้สารสกัด acacia tannin ร่วมกับไนเตรทในแกะ พบว่าไนเตรทส่งเสริมให้แกะมีสมรรถภาพการเจริญเติบโตที่ดีและลดการผลิตแก๊สมีเทน แต่การใช้สารสกัดจาก acacia tannin เพียงอย่างเดียวไม่มีผลในการปรับปรุงสมรรถภาพการเจริญเติบโตของแกะและลดการผลิตแก๊สมีเทนลงได้

#### 4. สรุป

เปลือกหุ้มเมล็ดมะขามสามารถใช้เป็นวัตถุดิบในอาหารชั้นสามารถใช้ได้สูงสุดไม่เกิน 15 เปอร์เซ็นต์ โดยไม่ส่งผลเสียต่อการย่อยได้ของวัตถุดิบ แต่สามารถลดการผลิตแก๊สมีเทนจากกระบวนการหมักในกระเพาะได้ หากใช้เปลือกหุ้มเมล็ดมะขามในระดับ 10 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับโซเดียมไนเตรทที่ระดับ 1 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารชั้นจะทำให้ประสิทธิภาพในการลดการผลิตแก๊สมีเทนได้ดีกว่าการใช้เปลือกหุ้มเมล็ดมะขามหรือโซเดียมไนเตรทเพียงอย่างเดียว

#### 5. เอกสารอ้างอิง

- Abdelbagi, M., Ridwan, R., Fitri, A. and Jayanegara, A. 2023. Performance, methane emission, nutrient utilization, and the nitrate toxicity of ruminants with dietary nitrate addition: A meta-analysis from in vivo trials. **Tropical Animal Science Journal** 46(1): 74-84.
- Abdelbagi, M., Ridwan, R. and Jayanegara, A. 2021. The potential of nitrate supplementation for modulating the fermentation pattern and mitigating methane emission in ruminants: A meta-analysis from *in vitro* experiments. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science** 902(1): 012023.
- Adejoro, F.A., Hassen, A., Akanmu, A.M. and Morgavi, D.P. 2020. Replacing urea with nitrate as a non-protein nitrogen source increases lambs' growth and reduces methane production, whereas acacia tannin has no effect. **Animal Feed Science and Technology** 259: 114360.
- Adetunji, A.P., Aderinboye, R.Y., Adebayo, K.O., Ojo, V.O., Idowu, P.A. and Mtileni, B. 2020. Effect of cashew nut shell liquid at varying inclusion levels on rumen fermentation and methane production *in vitro*. **Journal of Animal Behaviour and Biometeorology** 8(2): 82-87.
- AOAC. 2016. **Official Methods of Analysis**. Association of Official Analysis Chemists. Maryland, USA.
- AOAC. 2019. **Official Methods of Analysis**. Association of Official Analysis Chemists. Maryland, USA.
- Beauchemin, K.A., Ungerfeld, E.M., Eckard, R.J. and Wang, M. 2020. Fifty years of research on rumen methanogenesis: Lessons learned and future challenges for mitigation. **Animal** 14(S1): s2-s16.
- Bhatta, R., Krishnamoorthy, U. and Mohammed, F. 2000. Effect of feeding tamarind (*Tamarindus indica*) seed husk as a source of tannin on dry matter intake, digestibility of nutrients and production performance of crossbred dairy cows in mid-lactation. **Animal Feed Science and Technology** 83(1): 67-74.
- Bhatta, R., Krishnamoorthy, U. and Mohammed, F. 2001. Effect of tamarind (*Tamarindus indica*) seed husk tannins on *in vitro* rumen fermentation. **Animal Feed Science and Technology** 90(3-4): 143-152.
- Bowen, J.M., Cormican, P., Lister, S.J., McCabe, M.S., Duthie, C.A., Roehe, R. and Dewhurst, R.J. 2020. Links between the rumen microbiota, methane emissions and feed efficiency of finishing steers offered dietary lipid and nitrate supplementation. **PLoS One** 15(4): e0231759.
- Bureau of Animal Nutrition Development. 2016. **Collection and Improvement in Nutritive Values Database of feed stuffs**. Bureau of Animal Nutrition Development, DLD, Bangkok. (in Thai)
- Butler, L.G., Price, M.L. and Brotherton, J.E. 1982. Vanillin assay for proanthocyanidins (condensed tannins): modification of the solvent for estimation of the degree of polymerization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 30(6): 1087-1089.
- Duthie, C.A., Troy, S., Hyslop, J., Ross, D., Roehe, R. and Rooke, J. 2018. The effect of dietary addition of nitrate or increase in lipid concentrations, alone or in combination, on performance and methane emissions of beef cattle. **Animal** 12(2): 280-287.
- EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), Schrenk, D., Bignami, M., Bodin, L., Chipman, J.K., del Mazo, J., Grasl-Kraupp, B., Hoogenboom, L., Leblanc, J., Nebbia, C.S., Nielsen, E., Ntzani, E., Petersen, A., Sand, S., Schwerdtle, T., Vleminckx, C., Wallace, H., Bampidis, V., Cottrill, B., Frutos, M.

- J., Furst, P., Parker, A., Binaglia, M., Christodoulidou, A., Gergelova, P., Guajardo, I. M., Wenger, C. and Hogstrand, C. 2020. Scientific Opinion on the risk assessment of nitrate and nitrite in feed. **EFSA Journal** 18(11): 1-110.
- France, J. and Dijkstra, J. 2005. **Volatile fatty acid production**. Available source: [https://WWW.researchgate.net/profile/Andre-Bannink-2/publication/40117257\\_Rumen\\_Function/links/02e7e53ad990e71c39000000/Rumen-Function.pdf#page=169](https://WWW.researchgate.net/profile/Andre-Bannink-2/publication/40117257_Rumen_Function/links/02e7e53ad990e71c39000000/Rumen-Function.pdf#page=169), May 13, 2024.
- Glasson, C.R., Kinley, R.D., de Nys, R., King, N., Adams, S. L., Packer, M.A., Svenson, J., Eason, C.T. and Magnusson, M. 2022. Benefits and risks of including the bromoform containing seaweed *Asparagopsis* in feed for the reduction of methane production from ruminants. **Algal Research** 64: 102673.
- Huang, Q., Liu, X., Zhao, G., Hu, T. and Wang, Y. 2018. Potential and challenges of tannins as an alternative to in-feed antibiotics for farm animal production. **Animal Nutrition** 4(2): 137-150.
- Javier-Astete, R., Jimenez-Davalos, J. and Zolla, G. 2021. Determination of hemicellulose, cellulose, holocellulose and lignin content using FTIR in *Calycophyllum spruceanum* (Benth.) K. Schum. and *Guazuma crinita* Lam. **PLoS One** 16(10): e0256559.
- Kebreab, E. and Feng, X. 2021. **Strategies to reduce methane emissions from enteric and lagoon sources**. California Air Resources Board Project.
- Khongpradit, A., Boonsaen, P., Homwong, N., Suzuki, Y., Koike, S., Sawanon, S. and Kobayashi, Y. 2020. Effect of pineapple stem starch feeding on rumen microbial fermentation, blood lipid profile, and growth performance of fattening cattle. **Animal Science Journal** 91(1): e13459.
- Lee, C. and Beauchemin, K.A. 2014. A review of feeding supplementary nitrate to ruminant animals: nitrate toxicity, methane emissions, and production performance. **Canadian Journal of Animal Science** 94: 557-570.
- Makkar, H.P.S., Sharma, O.P., Dawra, R.K. and Negi, S.S. 1982. Simple determination of microbial protein in rumen liquor. **Journal of Dairy Science** 65(11): 2170-2173.
- Malik, P.K., Kolte, A.P., Bakshi, B., Baruah, L., Dhali, A. and Bhatta, R. 2017. Effect of tamarind seed husk supplementation on ruminal methanogenesis, methanogen diversity and fermentation characteristics. **Carbon Management** 8(4): 319-329.
- Mansingh, B.B., Binoj, J.S., Sai, N.P., Hassan, S.A., Siengchin, S., Sanjay, M.R. and Liu, Y.C. 2021. Sustainable development in utilization of *Tamarindus indica* L. and its by-products in industries: A review. **Current Research in Green and Sustainable Chemistry** 4: 100207.
- McDougall, E. 1948. Studies on ruminant saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva. **Biochemical Journal** 43(1): 99.
- Naumann, H.D., Tedeschi, L.O., Zeller, W.E. and Huntley, N.F. 2017. The role of condensed tannins in ruminant animal production: advances, limitations and future directions. **Revista Brasileira de Zootecnia** 46: 929-949.
- Newbold, J., Van Zijderveld, S., Hulshof, R., Fokkink, W., Leng, R., Terencio, P., Powers, W.J., van Adrichem, P.S. J., Paton, N.D. and Perdok, H. 2014. The effect of incremental levels of dietary nitrate on methane emissions in Holstein steers and performance in Nelore bulls. **Journal of Animal Science** 92(11): 5032-5040.
- Nolan, J.V., Godwin, I., de Raphélis-Soissan, V. and Hegarty, R. 2016. Managing the rumen to limit the incidence and severity of nitrite poisoning in nitrate-supplemented ruminants. **Animal Production Science** 56(8): 1317-1329.
- Poornachandra, K., Malik, P., Dhali, A., Kolte, A. and Bhatta, R. 2019. Effect of combined supplementation of tamarind seed husk and soapnut on enteric methane emission in crossbred cattle. **Carbon Management** 10(5): 465-475.
- R Core Team. 2024. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Available Source: <https://WWW.R-project.org>, February 20, 2024.
- Sawanon, S. 2018. **Rumen microbes and utilization** (2<sup>nd</sup> ed). Magic Publication, Bangkok. (in Thai)
- Sun, B., Ricardo-da-Silva, J.M. and Spranger, I. 1998. Critical factors of vanillin assay for catechins and

- proanthocyanidins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 46(10): 4267-4274.
- Thai Feed Mill Association. 2024. **Monthly Raw Material Price**. Available Source: <https://WWW.thaifeedmill.org/price-2>, March 10, 2024. (in Thai)
- Thongngok, M., Jongsathapatsin, Y., Gonmanee, J. and Mangmee, W. 2020. Results of Using Tamarind Seeds Husk in Concentrate Feed Rations towards Late Lactation of Dairy Cattle Productivity Performance. Bachelor of Science (Animal Science), Rajamangala University of Technology Thanyaburi. (in Thai)
- Thanomwongwatatana, S. 2018. Effect of Supplementing Tamarind Seed Husk in Ration on Productive Performance of Fattening Dairy Steer, pp. 228-233. In Budiati, T. eds. **The Proceeding of the 1st International Conference on Food and Agriculture**. State Polytechnic of Jember, Jawa Timur.
- van Wyngaard, J., Meeske, R. and Erasmus, L. 2019. Effect of dietary nitrate on enteric methane emissions, production performance and rumen fermentation of dairy cows grazing ryegrass pasture during spring. **Animal Feed Science and Technology** 252: 64-73.
- Vasta, V., Daghighi, M., Cappucci, A., Buccioni, A., Serra, A., Viti, C. and Mele, M. 2019. Invited review: Plant polyphenols and rumen microbiota responsible for fatty acid biohydrogenation, fiber digestion, and methane emission: Experimental evidence and methodological approaches. **Journal of Dairy Science** 102(5): 3781-3804.
- Vearaslip, T. 2005. **Ruminant Nutrition** (5<sup>th</sup> ed). Trio advertising & media, Chiang Mai. (in Thai)
- Villar, M.L., Hegarty, R.S., Nolan, J.V., Godwin, I.R. and McPhee, M. 2020. The effect of dietary nitrate and canola oil alone or in combination on fermentation, digesta kinetics and methane emissions from cattle. **Animal Feed Science and Technology** 259: 114294.
- Wanapat, M., Viennasay, B., Matra, M., Totakul, P., Phesatcha, B., Ampapon, T. and Wanapat, S. 2021. Supplementation of fruit peel pellet containing phytonutrients to manipulate rumen pH, fermentation efficiency, nutrient digestibility and microbial protein synthesis. **Journal of the Science of Food and Agriculture** 101(11): 4543-4550.
- Wang, W., Lund, P., Larsen, M. and Weisbjerg, M.R. 2023. Effect of nitrate supplementation, dietary protein supply, and genetic yield index on performance, methane emission, and nitrogen efficiency in dairy cows. **Journal of Dairy Science** 106(8): 5433-5451.
- Welty, C., Wenner, B., Wagner, B., Roman-Garcia, Y., Plank, J., Meller, R., Gehman, A.M. and Firkins, J. 2019. Rumen microbial responses to supplemental nitrate. II. Potential interactions with live yeast culture on the prokaryotic community and methanogenesis in continuous culture. **Journal of Dairy Science** 102(3): 2217-2231.
- Yang, C., Rooke, J.A., Cabeza, I. and Wallace, R.J. 2016. Nitrate and inhibition of ruminal methanogenesis: microbial ecology, obstacles, and opportunities for lowering methane emissions from ruminant livestock. **Frontiers in Microbiology** 7: 172645.