โครงการ
การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ ผลของสารเติมแต่งต่อประสิทธิภาพการหมักไซเลจหญ้าเนเปียร์ด้วยแบคทีเรียกรดแล็กติก

ชื่อนิสิต นาย วิธี แจ่มโภคา รหัสประจำตัว 5932350123

ภาควิชา จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา 2562

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

เรื่อง

ผลของสารเติมแต่งต่อประสิทธิภาพการหมักไซเลจหญ้าเนเปียร์ด้วยแบคทีเรียกรดแล็กติก

Effect of additives on fermentation quality of Napier silage with lactic acid bacteria

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา

นิสิตในโครงการ

นาย วิธี แจ่มโภคา

รหัสประจำตัว 5932350123

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อโครงงาน ผลของสารเติมแต่งต่อประสิทธิภาพการหมักไซเลจหญ้าเนเปียร์ด้วยแบคทีเรียกรดแล็กติก

โดย นายวิธี แจ่มโภคา รหัสนิสิต 5932350123
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงาน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา

ปีการศึกษา 2562

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับโครงงานฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาบัณฑิต ในรายวิชา 2312499 โครงงานวิทยาศาสตร์

..... หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)

คณะกรรมการสอบโครงงาน

..... อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงาน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา)

..... กรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร. อัญชริดา สวารชร)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. นราพร สมบูรณ์นะ)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร. ธัญนุช เกรียงไกรพิพัฒน์)

ชื่อโครงการ : ผลของสารเติมแต่งต่อประสิทธิภาพการหมักไซเลจหญ้าเนเปียร์ด้วยแบคทีเรียกรดแล็กติก

อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา

จัดทำโดย : นาย วิธี แจ่มโภคา รหัสประจำตัว 5932350123

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

การหมักไซเลจเป็นการรักษาคุณภาพของพืชอาหารสัตว์ที่นิยมกันอย่างแพร่หลาย การหมักไซเลจเพื่อให้ได้คุณภาพดีจำเป็นต้องให้เกิดกระบวนการหมักอย่างสมบูรณ์ที่รวดเร็ว การใช้สารเติมแต่งจึงเป็นอีกทางเลือกเพื่อให้ได้ไซเลจที่มีคุณค่าทางโภชนะสูง การศึกษาครั้งนี้สนใจการใช้กากน้ำตาลที่มีคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำได้สูง และกากถั่วเหลืองที่มีโปรตีนสูงมาใช้เป็นสารเติมแต่งเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการหมักไซเลจร่วมกับหัวเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติก *Lactobacillus casei* AN2 ที่คัดแยกได้จากไซเลจข้าวโพดและพบว่าให้ผลผลิตกรดแล็กติกที่สูง โดยทดลองหมักไซเลจหญ้าเนเปียร์เป็นเวลา 14 วันร่วมกับกากน้ำตาลในอัตราส่วน 0.5%, 1%, 2% หรือกากข้าวโพดในอัตราส่วน 10%, 15%, 20% ของน้ำหนักหญ้าสด แล้วติดตามผลโดยวิเคราะห์ผลทางเคมีและนับจำนวนจุลินทรีย์พบว่าไซเลจที่เติมกากน้ำตาลมีระดับความเป็นกรดเบสลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อเทียบกับชุดควบคุม และสามารถรักษาระดับความเป็นกรดเบสไว้ได้ที่ประมาณ 4.2 ซึ่งเหมาะสมต่อการหมัก ในการหมักที่เติมทั้งกากน้ำตาล และกากข้าวโพดมีมีจำนวนของแบคทีเรียกรดแล็กติกเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงแรกและคงไว้ได้ที่ประมาณ 10^8 CFU/g และไซเลจที่เติมสารเติมแต่งทั้งสองสามารถจำกัดการเจริญเติบโตของเซลล์ยีตส์และรา และแบคทีเรียคอลิฟอร์มได้เป็นอย่างดี อย่างไรก็ตามไซเลจที่เติมกากข้าวโพดพบว่ามีกลิ่นเน่าเสียเกิดขึ้นหลังจากหมักผ่านไป 5 วัน การเติมหัวเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติก *Lactobacillus casei* AN2 กากน้ำตาล หรือการเติมทั้งสองอย่างร่วมกันจะให้ผลประสิทธิภาพการหมักที่ดีขึ้นอย่างเห็นได้ชัดทั้งลักษณะทางกายภาพเช่นกลิ่นที่ดี, ระดับความเป็นกรดเบสที่ต่ำ และการจำกัดการเจริญของแบคทีเรียที่ไม่ต้องการได้เป็นอย่างดี

Project Title : Effect of additive on fermentation quality of Napier silage with lactic acid bacteria

Advisor : Assist Prof. Dr. Supat Chareonpornwattana

Invetigator : Mr. Vitee Jampoka ID: 5932350123

Department of Microbiology, Faculty of Science ,Chulalongkorn University

Abstract

Ensiling is the most popular process to preserve the forage. The quality of silage depends largely on the rapidity of the fermentation process. The use of additives is another alternative to achieve such a fermentation. In this study, we use molasses, which has a high content of water soluble carbohydrate and soybean meal for high content of protein as additives along with lactic acid bacterium *Lactobacillus casei* AN2, previously isolated form corn silage with high lactic acid production. Napier grass was ensiled for 14 days with molasses (0.5%, 1%, 2%) and molasses (0.5%+ *L.casei* AN2, 1%+ *L.casei* AN2, 2%+ *L.casei* AN2), soybean milled (10%, 15%, 20%) and soybean milled (10%+ *L.casei* AN2, 15%+ *L.casei* AN2, 20%+ *L.casei* AN2). Regarding chemical and microbiological analysis of silage, rapid decline in pH values was seen in molasses-added silage, in comparison with the control, and pH values was maintained at 4.2. Both additives resulted the increasing number of lactic acid bacterium and remained at 10^8 CFU/g and the decreas of yeast-mould and coliform bacteria. However soybean meal-added silage gave spoiled smell on day 5 of ensiling. Addition of *L.casei AN2,* molasses, and *L.casei* AN2 + molasses improved the silage fermentation quality as shoe by a good smell, low pH values and controlling of undesirable micro-organism.

กิตติกรรมประกาศ

การทำโครงการเรื่องผลของสารเติมแต่งต่อประสิทธิภาพการหมักไซเลจหญ้าเนเปียร์ด้วยแบคทีเรียกรดแล็กติก ไม่อาจสำเร็จสมบูรณ์ลงได้หากขาดความช่วยเหลือจากบุคคลเหล่านี้

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการที่คอยให้คำปรึกษา แนะแนวทางตลอดระยะเวลาในการทำงานวิจัย เอื้อเฟื้ออุปกรณ์ในการทำวิจัย และคอยให้คำปรึกษาช่วยเหลือแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นระหว่างการทำงาน ทั้งยังใส่ใจในการให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ อย่างละเอียดจนออกมาเป็นโครงการที่เสร็จสมบูรณ์เล่มนี้

ขอขอบคุณบริษัท ซันฟู้ด อินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด ที่ช่วยเหลือสนับสนุนพืชอาหารสัตว์หญ้าเนเปียร์ และสารเติมแต่งกากข้าวโพด

ขอขอบพระคุณนางสาว ณิชากร สโดอยู่ ที่คอยให้ความช่วยเหลือทั้งเรื่องของอุปกรณ์ต่างๆ กำลังใจ และคำแนะนำต่างๆตลอดระยะเวลาการทำวิจัย จนทำให้งายวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกคนที่อำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆ ของภาควิชาสำหรับการทดลอง ให้ความอื้อเฟื้อต่างๆมากมาย ทำให้งานวิจัยผ่านไปอย่างราบรื่น

ขอบคุณเพื่อนๆทุกคนที่คอยช่วยเหลือทั้งแรงกายแรงใจ ให้คำปรึกษา คอยดูแลห่วงใย ช่วยแก้ปัญหาตลอดระยะเวลาในการทำงานวิจัย

วิธี แจ่มโภคา

พฤษภาคม 2563

สารบัญ

บทคัดย่อ	ก
Abstract	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูป	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง	10
บทที่ 3 วิธีดำเนินการทดลอง	12
บทที่ 4 ผลการทดลอง	16
บทที่ 5 อภิปรายและสรุปผลการทดลอง	27
เอกสารอ้างอิง	30
ภาคผนวก	34

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ยระดับความเป็นกรดเบสของไซเลจที่เติมที่กากน้ำตาล 34

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยระดับความเป็นกรดเบสของไซเลจที่เติมที่กากถั่วเหลือง 34

ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ยปริมาณกรดรวมของของไซเลจที่เติมที่กากน้ำตาล 35

ตารางที่ 4 ค่าเฉลี่ยปริมาณกรดรวมของไซเลจที่เติมที่กากถั่วเหลือง 35

ตารางที่ 5 ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์แบคทีเรียกรดแล็กติกของไซเลจที่เติมที่กากน้ำตาล 36

ตารางที่ 6 ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์แบคทีเรียกรดแล็กติกของไซเลจที่เติมที่กากถั่วเหลือง 36

ตารางที่ 7 ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์แบคทีเรียคอลิฟอร์มของไซเลจที่เติมที่กากน้ำตาล 37

ตารางที่ 8 ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์แบคทีเรียคอลิฟอร์มของไซเลจที่เติมที่กากถั่วเหลือง 37

ตารางที่ 9 ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ยีสต์และราของไซเลจที่เติมที่กากน้ำตาล 38

ตารางที่ 10 ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ยีสต์และราของไซเลจที่เติมที่กากถั่วเหลือง 38

สารบัญรูป

รูปที่ 1 วิถีการหมักน้ำตาลกลูโคสของแบคทีเรียกรดแล็กติก 6

รูปที่ 2 แผนผังการหมักไซเลจ 14

รูปที่ 3 ค่าความเป็นกรดเบสของไซเลจหญ้าเนเปียร์ที่มีการเติมกากน้ำตาล
และเติมกากน้ำตาลร่วมกับหัวเชื้อแบคทีเรีย *L.casei* AN2 17

รูปที่ 4 ค่าความเป็นกรดเบสของไซเลจหญ้าเนเปียร์ที่มีการเติมกากถั่วเหลือง
และเติมถั่วเหลืองร่วมกับหัวเชื้อแบคทีเรีย *L.casei* AN2 18

รูปที่ 5 ปริมาณกรดรวมของไซเลจหญ้าเนเปียร์ที่มีการเติมกากน้ำตาล
และเติมกากน้ำตาลร่วมกับหัวเชื้อแบคทีเรีย *L.casei* AN2 19

รูปที่ 6 ปริมาณกรดรวมของไซเลจหญ้าเนเปียร์ที่มีการเติมกากถั่วเหลือง
และเติมกากถั่วเหลืองร่วมกับหัวเชื้อแบคทีเรีย *L.casei* AN2 20

รูปที่ 7 จำนวนเซลล์ของแบคทีเรียกรดแล็กติกของไซเลจหญ้าเนเปียร์ที่มีการเติมกากน้ำตาล
และเติมกากน้ำตาลร่วมกับหัวเชื้อแบคทีเรีย *L.casei* AN2 21

รูปที่ 8 จำนวนเซลล์ของแบคทีเรียกรดแล็กติกของไซเลจหญ้าเนเปียร์ที่มีการเติมกากถั่วเหลือง
และเติมกากถั่วเหลืองร่วมกับหัวเชื้อแบคทีเรีย *L.casei* AN2 22

รูปที่ 9 จำนวนเซลล์ของแบคทีเรียคอลิฟอร์มของไซเลจหญ้าเนเปียร์ที่มีการเติมกากน้ำตาล
และเติมกากน้ำตาลร่วมกับหัวเชื้อแบคทีเรีย *L.casei* AN2 23

รูปที่ 10 จำนวนเซลล์ของแบคทีเรียคอลิฟอร์มของไซเลจหญ้าเนเปียร์ที่มีการเติมกากถั่วเหลือง
และเติมกากถั่วเหลืองร่วมกับหัวเชื้อแบคทีเรีย *L.casei* AN2 24

รูปที่ 11 จำนวนเซลล์ของยีตส์และราของไซเลจหญ้าเนเปียร์ที่มีการเติมกากน้ำตาล
และเติมกากน้ำตาลร่วมกับหัวเชื้อแบคทีเรีย *L.casei* AN2 25

รูปที่ 12 จำนวนเซลล์ของยีตส์และราของไซเลจหญ้าเนเปียร์ที่มีการเติมกากถั่วเหลือง
และเติมกากถั่วเหลืองร่วมกับหัวเชื้อแบคทีเรีย *L.casei* AN2 26

บทที่ 1
บทนำ

ปัจจุบันประชากรโลกมีจำนวนที่สูงขึ้น ทำให้ความต้องการอุปโภค และบริโภคผลิตภัณฑ์ที่มาจากปศุสัตว์มีเพิ่มขึ้นเช่นกัน โดยเฉพาะจากสัตว์เคี้ยวเอื้อง มันเป็นที่คาดว่าในปี 2050 ประชากรโลกจะมีความต้องการเนื้อวัวเพิ่มขึ้นถึง 106 ล้านตัน (แผนพัฒนายุทธศาสตร์กรมปศุสัตว์, 2561-2565) ในประเทศไทยที่มีการสนับสนุนให้เลี้ยงทั้งวัวนม และวัวเนื้อมากขึ้นทุกปี สิ่งสำคัญที่ทำให้ผลผลิตมีคุณภาพ และปริมาณเพียงพอต่อความต้องการ ได้แก่ อาหารสัตว์ เนื่องจากการขยายตัวของเลี้ยงส่งผลให้เกษตรกร เผชิญกับปัญหาการขาดแคลนพืชอาหารสัตว์ทั้งด้านคุณภาพ และปริมาณที่ทำให้สัตว์มีโภชนะไม่เพียงพอ ความต้องการพืชอาหารสัตว์ที่เพิ่มขึ้นนั้นสวนทางกับ พื้นที่เกษตรที่ใช้เพาะปลูก รวมถึงฤดูกาลในของประเทศไทยในปัจจุบัน โดยเฉพาะในช่วงฤดูแล้งที่มีปริมาณน้ำน้อย พืชอาหารสัตว์จึงเจริญเติบโตได้ไม่ดีและมีคุณค่าทางอาหารที่น้อย (วีระพล แจ่มสวัสดิ์ และคณะ, 2554) ในทางกลับกันบางฤดูกาล เช่น ในฤดูฝน ที่พืชอาหารสัตว์จะเจริญเติบโตได้ดี จนทำให้ผลผลิตของพืชอาหารสัตว์ที่มากเกินความต้องการของเกษตรกรทำให้สูญเสียพืชไปโดยไม่เกิดประโยชน์ จึงจำเป็นต้องมีการถนอมพืชอาหารสัตว์ไว้ใช้ในยามที่ขาดแคลน โดยใช้กระบวนการหมักให้ได้เป็นพืชอาหารสัตว์หมักหรือ ไซเลจ (silage) ซึ่งเป็นวิธีที่เกษตรกรนิยมใช้เพื่อยืดอายุและถนอมพืชอาหารสัตว์ในขณะที่ยังมีคุณค่าทางอาหารสูง (ญาณิน โอภาสพัฒนกิจ และคณะ, 2559)

พืชอาหารสัตว์หมัก (silage)

พืชอาหารสัตว์หมักหมายถึงการนำพืชอาหารสัตว์สดต่างๆ สับให้มีขนาดเล็กลง และปรับให้มีความชื้นที่เหมาะสม นำมาหมักในภาวะสุญญากาศ โดยอาศัยจุลินทรีย์ที่มีอยู่ทั่วไปตามธรรมชาติ โดยเฉพาะกลุ่มของแบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic bacteria) ที่สามารถเปลี่ยนสภาพของพืชอาหารสัตว์ เมื่อพืชอาหารสัตว์เปลี่ยนเป็นสภาพของหญ้าหมัก จะสามารถยืดอายุการเก็บได้ยาวนานยิ่งขึ้น โดยมีหลักการที่สำคัญคือ

1.ลดกิจกรรมของแบคทีเรียที่ใช้ออกซิเจน และลดการออกซิเดชันที่เกิดขึ้นในเอนไซม์ของพืช โดยไล่อากาศออกจากกองพืชหมักให้เหลือน้อยที่สุด

2.ลดกิจกรรมของแบคทีเรียกลุ่ม Clostridial bacteria ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่จะทำลายโปรตีนในพืชอาหารสัตว์ ลดได้โดยอาศัยความเป็นกรดที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมัก (ภัทยา นาปะเสริฐ, 2560)

กระบวนการผลิตพืชอาหารหมัก

นำพืชอาหารสัตว์สดที่เก็บเกี่ยว ในระยะที่เหมาะสมมาสับเป็นชิ้นเล็กๆประมาณ 2-3 เซนติเมตร บรรจุลงในภาชนะ ไซโล หรือหลุมหมักและอัดให้แน่น ถ้าพืชหมักแห้งจนเกินไปอาจมีการพรมน้ำเพิ่มความชื้น หรือเติมสารช่วยหมัก ปิดภาชนะ หรือหลุมหมักให้สนิทเพื่อป้องกันอากาศซึมเข้า หลังจากนั้นทิ้งไว้ 3-4 สัปดาห์ก็จะได้หญ้าหมักที่สมบูรณ์(หญ้าหมัก, 2544) NH_3

คุณภาพของไซเลจที่ดี ควรมีสีเขียวแกมเหลือง กลิ่นเปรี้ยวอ่อนๆคล้ายผลไม้ดอง ความชื้นประมาณ 60-70% (หญ้าหมัก, 2544) ค่าความเป็นกรดเบสไม่เกิน 4.2 ปริมาณกรดแล็กติกไม่ต่ำกว่า 50% ของกรดอินทรีย์ทั้งหมดกรดบิวทิริกไม่เกิน 0.5% ของน้ำหนักวัตถุแห้ง และมีปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจนน้อยกว่า 10% ของไนโตรเจนทั้งหมด(Tjandraatmadja และคณะ, 1994)

คุณภาพของไซเลจที่ต่ำเกิดจากการปนเปื้อนเชื้อจลินทรีย์ที่ไม่พึงประสงค์ และสารพิษที่จุลินทรีย์สร้างขึ้น เช่น ยีสต์ ราที่สร้างสารพิษ เช่น *Fusarium* spp. และแบคทีเรียที่ก่อโรค เช่น *Enterobacteracae* และ *Clostridium* spp. เป็นต้น ซึ่งจุลินทรีย์ที่กล่าวมาทั้งหมด จะส่งผลต่อสุขภาพของวัวที่บริโภคไซเลจเข้าไป (Fijałkowska และคณะ, 2019)

กระบวนการหมักไซเลจ

กระบวนหมักไซเลจเกิดจากกิจกรรมของแบคทีเรียกรดแล็กติก (lactic acid bacteria, LAB) หมักคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำได้ (water soluble carbohydrate) และเปลี่ยนเป็นกรดแล็กติก เมื่อความเป็นกรดเพิ่มขึ้น ค่า pH ลดต่ำลงส่งผลให้จุลินทรีย์ที่ทำให้ไซเลจเสียคุณภาพถูกยับยั้งการเจริญเติบโต โดยกระบวนการหมักแบ่งออกเป็น 4 ระยะดังนี้

ระยะที่ 1. Aerobic phase

เป็นชั่วเวลาสั้นๆเพียงไม่กี่ชั่วโมง อากาศที่หลงเหลืออยู่หลังปิดภาชนะจะถูกใช้โดย จุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศ เช่น ยีตส์ รา หรือแบคทีเรียจำพวก *Enterobacteraceae* และยังคงมีการทำงานของเอนไซม์พืช เช่น เอนไซม์โปรตีเอส และคาร์โบไฮเดรส เป็นต้น(Elferink และคณะ, 2000)

ระยะ 2. Fermentation phase

ระยะที่ 2 จะเริ่มเมื่ออากาศที่หลงเหลืออยู่ในพืชถูกใช้หมด แบคทีเรียกรดแล็กติกจะผลิตกรดแล็กติกและเจริญจนกลายมาเป็นจุลินทรีย์หลักในพืชหมัก โดยค่า pH จะลดลงมาอยู่ที่ประมาณ 3.8-5.0 โดยในระยะที่ 2 จะใช้เวลาหลายวันหรือหลายสัปดาห์ขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของพืชหมัก และภาวะที่ใช้หมัก

ระยะที่ 3. Stable phase

แบคทีเรียกรดแล็กติกในระยะที่สองจำนวนจะค่อยๆลดลง จุลินทรีย์ที่สามรถทนกรดได้ เช่น *Clostridium* spp. หรือ *Bacili* จะอยู่ในรูปแบบของสปอร์ ซึ่งไม่สามรถทำกิจกรรมต่างๆได้

ระยะที่ 4. Feed-out phase or aerobic spoilage phase.

ระยะสุดท้ายจะเกิดขึ้นเมื่อเกิดการรั่วไหลของอากาศเข้าสู่พืชหมัก หรือการเปิดให้พืชหมักสัมผัสกับอากาศ โดยจะทำให้เกิดกิจกรรมของจุลินทรีย์ที่ใช้อากาศ เช่น ยีสต์ รา หรือกลุ่มของแบคทีเรียกรดอะซีติกที่ส่งผลให้ค่า pH เพิ่มขึ้น ทำให้วัตถุแห้งของพืชหมักลดลง 1.5-4.5% ต่อวัน

ปัจัยที่มีผลต่อการหมักไซเลจ

1.ชนิดของพืชที่นำมาทำพืชอาหารสัตว์หมัก

พืชอหารสัตว์ที่เหมาะสมนำมาทำเป็นพืชหมักควรประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำได้ (water soluble carbohydrate, WSC) ในปริมาณที่เพียงต่อการหมักโดยแบคทีเรียกรดแล็กติก(McDonald และคณะ, 1991)

พืชที่นิยมทำมาทำเป็นพืชหมัก

1.พืชตระกูลหญ้า

พืชตะกูลหญ้าที่นิยม เช่น หญ้ารูซี่ (*Brachiaria ruziziensis*), หญ้าขน (*Brachiaria mutica*), หญ้าอัลฟาฟ่า(*Medicago sativa*), หญ้าอิตาเลี่ยน(*Lolium multiflorum*), และหญ้ากินนี(*Panicum maximum*), สำหรับในประเทศไทยนิยมใช้หญ้าเนเปียร์(*Pennisetum purpureum*) สำหรับการผลิตเป็นพืชอาหารสัตว์หมัก

2.ธัญพืช

ธัญพืชที่นิยม เช่น ข้าวโพด(*Zea mays*), ข้างฟ่าง(*Sorghum bicolor*)

3.พืชตะกูลถั่ว

พืชตะกูลถั่วที่นิยม เช่น ถั่วคาวาลเคด(*Centrocema pascuorum cv Cavalcade*), ถั่วไมยรา (Desmanthus virgathus)

2.อายุของพืชที่นำมาหมัก

อายุของพืชที่นำมาหมักควรอยู่ในระยะที่เหมาะสม ขึ้นกับพืชแต่ละชนิด ถ้าพืชมีอายุน้อยเกินไปจะมีความชื้นสูงทำให้ไซเลจเกิดการเน่าสียได้ง่าย และมีวัตถุแห้งที่ต่ำ แต่ถ้าพืชที่นำมาทำพืชหมักมีอายุมากเกินไปจะมีเยื่อใยสูง มีคาร์โบไฮเดรตที่ย่อยง่ายลดลง เมื่อหมักแล้วจะได้เป็นไซเลจที่คุณภาพต่ำลง และการบริโภคของสัตว์ลดลงเช่นกัน (Humphreys, 1991)

3.องค์ประกอบของวัตถุแห้ง

พืชอาหารสัตว์ที่เหมาะสมจะนำไปทำไซเลจควรมีวัตถุแห้งไม่ต่ำกว่า 22% (Raymond และคณะ, 1986) พืชที่ยิ่งมีอายุมากจะมีองค์ประกอบแห้งที่มากขึ้นแต่ จะทำให้วัวที่เลี้ยงด้วยพืชหมักที่มีอายุมากมีการเจริญเติบโตและให้ผลผลิตที่ต่ำลง(Esperance และคณะ, 1980)

4.ความยาวของท่อนพืช

พืนที่นำมาหมักจะถูกสับเป็นชิ้นเล็กๆ การที่พืชมีขนาดเล็กจะทำให้มีการสูญเสียของวัตถุแห้งที่ต่ำ และวัวสามารถย้อยได้ดีขึ้นส่งให้ผลผลิตสูงขึ้น แต่ต้องใช้พลังงานมากในการสับให้พืชมีชิ้นที่เล็ก (Savoie และคณะ, 1992) การสับพืชให้มีขนาดเล็กทำให้ง่ายต่อการหมักสูญเสียคุณค่าทางโภชนาการน้อย เนื่องจากกระบวนการหมักเกิดขึ้นสมบูรณ์ได้เร็วโดยทั่วไปความยาวของท่อนพืชควรมีขนาดประมาณ 2.5 – 5.0 เซนติเมตร(Esperance และคณะ, 1980)

5.การบรรจุพืชลงในไซโล

การบรรจุและอัดพืชลงในไซโลให้แน่นจะลดการเสียคุณภาพของไซเลจจากความร้อนเนื่องจาก มีอากาศที่หลงเหลือน้อยอัตราการหายใจของพืชลดลง หากพบว่าอุณภูมิภายในกองพืชหมักสูงกว่า 35 – 40 องศาเซลเซียสควรมีการอัดทับด้วยลูกกลิ้งให้แน่น ประเทศที่อยู่ในแทบร้อนชื้นปัญหาด้านอุณหภูมิของสิ่งแวดล้อมจึงเป็นปัจจัยสำคัญต่อคุณภาพของไซเลจ (Wilkinson, 1983)

6.การใช้สารเติมแต่ง

การใช้สารเติมแต่งเพื่อให้กระบวนการหมักสมบูรณ์เร็วขึ้น ทำให้ได้พืชอาหารหมักที่มีคุณภาพดีขึ้น เช่น การเติมกากน้ำตาล หรือเมล็ดธัญพืชเพื่อช่วยให้จุลินทรีย์ที่สำคัญต่อกระบวนการหมักมีอาหารสำหรับเพิ่มจำนวนและสร้างกรดได้อย่างรวดเร็ว (McDonald และคณะ, 1991)

6.1 กากน้ำตาล (molasses)

เป็นผลพลอยได้จากโรงงานอุสาหกรรมการผลิตน้ำตาลทราย มีลักษณะเป็นของเหลวเหนียวข้น มีสีดำ ซึ่งนิยมนำมาใช้เป็นอาหารสัตว์อย่างแพร่หลายโดยเฉพาะอย่างยิ่งในสัตว์เคี้ยวเอื้องที่สามารถกินกากน้ำตาลได้มากกว่าในสัตว์กระเพาะเดี่ยว ซึ่งองค์ประกอบของกากน้ำตาลส่วนใหญ่เป็นคาร์โบไฮเดรตประมาณ 65% (Thomas, 1978) เป็นน้ำตาลซูโครส 30-40% น้ำตาลกลูโคสและฟรุกโทสอีก 9-21% และยังมีองค์ประกอบของน้ำตาลชนิดอื่นๆอีก นอกจากนี้ยังมีโปรตีนหยาบ ไขมัน ผนังเซลล์ (neutral detergent fiber, NDF) ส่วนที่เป็นลิกนินและเซลลูโลส (acid detergent fiber, ADF) อีกด้วย (Caballero และคณะ, 2003) ด้วยองค์ประกอบทางเคมีต่างๆ จึงทำให้เกษตรกรนิยม

นำกากน้ำตาลมาใช้เป็นสารเสริมในการทำพืชหมักเพราะสามารถเป็นสารอาหารให้แล็กติกแอซิดแบคทีเรีย ช่วยเพิ่มปริมาณกรดแล็กติกยับยั้งจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ ทำให้พืชหมักมีคุณภาพที่ดีขึ้น

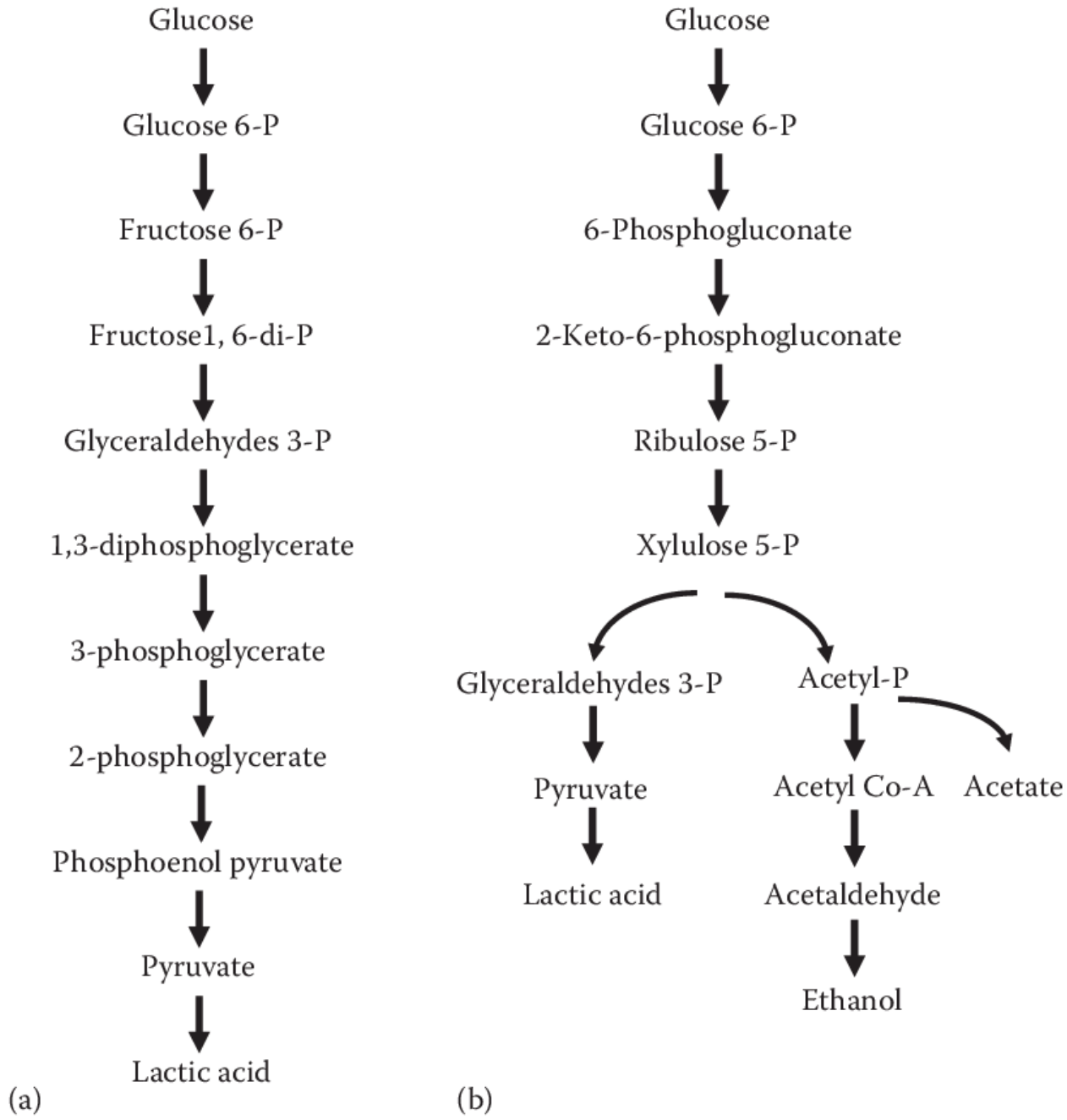
6.2 กากถั่วเหลือง (Soybean meal)

ถั่วเหลืองเป็นพืชตระกูลถั่วที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่งของประเทศไทย ถั่วเหลืองประกอบด้วยโปรตีนประมาณ 30-40% และมีไขมัน 13-24% สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลายอย่าง เช่น เป็นอาหารมนุษย์ ทั้งบริโภคโดยตรงหรือแบบแปรรูป และยังใช้ในอุตสาหกรรมสกัดน้ำมัน โดยกากถั่วเหลืองจากอุตสาหกรรมเกษตรกรนิยมนำมาเป็นอาหารวัวเนื่องจากโปรตีนที่สูง (เอกสารวิชาการ กรมพัฒนาที่ดิน, 2548) ในกระเพาะรูเมนของวัวจะสามารถย่อยโปรตีนจากถั่วเหลืองได้มากกว่าธัญพืชอื่นๆ เพราะในถั่วเหลืองมีไลซีน ที่มาก (Elwakeel และคณะ, 2012) การให้กากถั่วเหลืองเป็นอาหารวัวนม จะทำให้ได้ผลผลิตของน้ำนมที่มากกว่า การใช้หญ้าอัลฟาฟ่า หรือข้าวโพดในการเลี้ยงโคนม(Broderick และคณะ, 1990) และจากงานวิจัยของ ภคนิจ และคณะ (2556) พบว่าการใช้กากถั่วเหลืองเป็นอาหารโคสามารถเพิ่มไอโซฟลาโวนในน้ำนมวัวได้อีกด้วย ดังนั้นการนำกากถั่วเหลืองมาหมักร่วมกับหญ้าเนเปียร์จะทำให้คุณค่าทางโภชนาการของพืชหมักดีขึ้น

จุลินทรีย์ในไซเลจ

1.แบคทีเรียกรดแล็กติก(lactic acid bacteria; LAB)

แบคทีเรียกรดแล็กติกเป็นจุลินทรีย์ที่อิงอาศัย (epiphytic bacteria) ตามชิ้นส่วนทั่วไปบนพืช โดยจะเพิ่มจำนวนระหว่างการเก็บเกี่ยวและระหว่างกระบวนการหมักซึ่งการเจริญเติบโตของ LAB ในระหว่างกระบวนการหมักจะขึ้นอยู่กับลักษณะของพืช, ปริมาณองค์ประกอบของน้ำตาลและปริมาณวัตถุแห้งในพืช, ความสามารถของ LAB เอง เช่น ความสามารถในการทนกรด และการใช้องค์ประกอบต่างๆ (McDonald และคณะ, 1991; Woolford, 1984) LAB เป็นสกุลที่พบบ่อยในกระบวนการหมัก เช่น *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Lactococcus* และ *Streptococcus*. เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25-40 องศาเซลเซียส สามารถเปลี่ยนน้ำตาลเป็นกรดแล็กติกลดความเป็นกรดเบสลงได้มากน้อยขึ้นกับแต่ละสายพันธุ์และประเภทของพืชที่นำมาหมัก(Hammes,1992; Weinberg และคณะ, 1993) LAB แบ่งออกได้เป็น 2 ประเภทได้แก่ 1. Homofermentative จะหมักน้ำตาลประเภทเฮกโซส (C_6) เช่น น้ำตาลกลูโคส 2.Heterofermentative จะสามารถหมักได้ทั้งน้ำตาลเฮกโซส และน้ำตาลเพนโทส (C_5) เช่น น้ำตาลไซโลส ซึ่งนอกจากจะได้จะผลิตภัณฑ์หลักเป็นกรดแล็กติกแล้ว ยังได้ผลิตภัณฑ์เป็น เอทานอล, คาร์บอนไดออกไซด์, และอะซิเทตอีกด้วย (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 วิถีการหมักน้ำตาลกลูโคสของแบคทีเรียกรดแล็กติก(Kumar และคณะ, 2015)

(a) Homofermentative และ (B) Heterofermentative

2.ยีสต์ (Yeast)

สามารถเจริญได้ดีในภาวะที่มีออกซิเจน ในภาวะที่มีออกซิเจน ยีสต์จะหมักน้ำตาลได้เป็นเอทานอล และคาร์บอนไดออกไซด์ (Schlegelและ Zaborosch, 1993) หากมีการปนเปื้อนของยีตส์ในไซเลจจะทำให้น้ำตาลถูกใช้ไปในการหมักเอทานอล แทนที่แบคทีเรียกรดแล็กติกจะหมักให้เป็นกรดแล็กติก และส่งผลเมื่อวัวกินเข้าไปแล้ว อาจทำให้น้ำนมมีรสชาติที่แย่ลง (Randby และคณะ, 1999) มียีตส์หลายสายพันธุ์ที่สามารถย่อยสลายกรดแล็กติกเปลี่ยนเป็น คาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ ทำให้ค่า pH ของไซเลจสูงขึ้น เป็นผลให้จุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการชนิดอื่นๆ สามารถเจริญเติบโตได้(McDonald และคณะ, 1991)

3.รา (Mould)

ในไซเลจจะสามารถตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อราได้ง่าย จากการสร้างเส้นใย และสปอร์ของราโดยจะเจริญอยู่ในส่วนที่มีออกซิเจนหลงเหลืออยู่ในไซเลจส่วนใหญ่จะเจริญอยู่บนผิวหน้าของไซเลจ นอกจากราจะทำให้สารอาหารในไซเลจลดลงแล้วยังส่งผลเสียต่อสุขภาพของสัตว์เมื่อบริโภคเข้าไปเนื่องจากสารพิษที่สร้างจากรา ราส่วนมากที่พบในไซเลจเช่น *Penicillium*, *Fusarium* และ *Aspergillus* เป็นต้น(Oldenburg, 1991; Pelhate, 1977; Woolford, 1984)

4.Clostridia

เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่สร้างเอนโดสปอร์ ที่เปลี่ยนคาร์โบไฮเดรต และกรดแล็กติกในไซเลจได้เป็นกรดบิวทิริก นอกจากนี้ยังสามารถเปลี่ยนโปรตีนเป็นเอมีน และแอมโมเนียทำให้พืชหมักที่ได้มีกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ได้อีกด้วย เป็นผลให้สารอาหารในไซเลจลดลง (Goudkovและ Sharpe, 1965; Jonsson, 1991)

$$2 \text{ lactic acid} \longrightarrow 1 \text{ butyric acid} + 2\ H_2 + 2\ CO_2$$

แบคทีเรียในกลุ่มของคลอสตริเดียบางสายพันธุ์สามารถสร้างสารพิษได้ เช่น *Clostridium botulinum* ซึ่งจะสร้างสารพิษที่ชื่อว่า Butolinum toxin มีผลต่อระบบประสาทรุนแรงเป็นสาเหตุผลโรค Butolism ที่อาจส่งผลให้ปศุสัตว์ตายได้ การปนเปื้อของคลอสตริเดียจะทำให้ค่า pH ของไซเลจมีค่าเกิน 5 การที่ไซเลจมีค่า pH ลดลงอย่างรวดเร็วจะเป็นการยับยั้งคลอสตริเดียได้ และแบคทีเรียชนิดนี้จะไม่ทนต่อสภาพที่มี water activity (a_w) ต่ำดังนั้นการใช้พืชที่มีองค์ประกอบของวัตถุแห้ง หรือการเพิ่มวัตถุแห้งในกระบวนการหมักจะเป็นการช่วยยับยั้งคลอสตริเดียได้ (Kehlerและ Scholz, 1996; Wieringa, 1958)

5.*Bacillus* spp.

เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ,รูปแท่ง ,สร้างเอนโดสปอร์ได้ และสามารถหมักคาร์โบไฮเดรตให้เป็นกรดอินทรีย์ได้ เช่น กรดอะซิติก หรือกรดแล็กติก มีส่วนช่วยให้แบคทีเรียกรดแล็กติกเจริญได้ดี เพราะสามารถผลิตเอนไซมม์ออกมาย่อยผนังเซลล์ของพืชได้ทำให้เกิดการปลดปล่อยน้ำตาลที่เป็นแหล่งอาหารของแบคที่เรียกรดแล็กติก (Cato และคณะ, 1986; Clausและ Berkeley, 1986)แบคทีเรียบาซิลลัสบางสายพันธุ์สามารถสร้างสารยังยั้งราได้อีกด้วย แต่อย่างไรก็ตามกรดที่บาซิลลัสผลิตได้นั้นมีประสิทธิภาพไม่ดีเท่ากับกรดที่แบคทีเรียกรดแล็กติกสามารถผลิตได้ (McDonald และคณะ, 1991; Moran และคณะ, 1993)

6.Enterobacteria

เป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ทั้งในภาวะที่มีออกซิเจน และไมมีออกซิเจน การปนเปื้อนของเอนเทอโรแบคทีเรียไม่เป็นที่พึงประสงค์ เนื่องจากแบคทีเรียชนิดนี้จะแย่งกันใช้กับน้ำตาลกับแบคทีเรียกรดแล็กติก และหมักน้ำตาลได้กรดเป็นอะซีติก สามารถย่อยสลายกรดอะมิโนในไซเลจได้ (McDonald และคณะ, 1991; Van Osและ Dulphy, 1996)

Ni และคณะ, 2017 ทำการศึกษาการใช้กากน้ำตาลและหัวเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกในการหมักไซเลจถั่วเหลืองพบว่า การใส่สารเติมแต่งสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการหมักของไซเลจได้ โดยสามารถทำให้ค่า pH ลดลงอย่างรวดเร็วและยับยั้งจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Ni และคณะ, 2017)

จากการคัดแยกจุลินทรีย์ในกลุ่มแบคทีเรียกรดแล็กติกจากไซเลจข้าวโพด (กวิน เจริญยงค์ ,2556) พบว่ามีแบคทีเรียกรดแล็กติกที่น่าสนใจนำมาใช้ในการหมักไซเลจเนื่องจากสามารถผลิตกรดแล็กติกได้ในปริมาณสูง มีความสามารถทนต่อความเป็นกรดเบส 3 และทนอุณหภูมิ 60 °C ซึ่งมีทั้งหมด 2 สายพันธุ์คือ
1. *Lactobacillus casei* AN2 และ 2. *Lactobacillus paracasei* AN3

ด้วยเหตุนี้จึงสนใจศึกษาการเพิ่มประสิทธีภาพการหมักไซเลจหญ้า โดยใช้หญ้าเนเปียร์หมักร่วมกับหัวสารเติมแต่ง 2 ชนิดได้แก่ กากน้ำตาล และกากถั่วเหลืองโดยแปรผันความเข้มข้นของสารแต่ละชนิดเพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ทำให้ได้พืชหมักที่มีคุณภาพ และศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อ *Lactobacillus casei* AN2 เมื่อหมักร่วมกับสารเติมแต่งทั้ง 2 ชนิด

วัตถุประสงค์

เพื่อทำการศึกษาผลของกากน้ำตาล และกากถั่วเหลืองเมื่อใช้เป็นสารเติมแต่งต่อประสิทธิภาพการหมักของไซเลจหญ้าเนเปียร์ และเมื่อใช้ร่วมกับหัวเชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus casei* AN2

บทที่ 2

อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1.จุลินทรีย์

Lactobacillus casei AN2 ที่คัดแยกได้จากข้าวโพด (กวิน เจริญยงค์ ,2556)

2.พืชอาหารสัตว์

หญ้าเนเปียร์ สายพันธุ์ปากช่อง 1 อายุ 120 วัน จากบริษัท ซันฟู้ด อินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด

3.สารเสริมประสิทธิภาพการหมัก

3.1กากน้ำตาล (molasses) จากร้านค้าทั่วไป

3.2กากถั่วเหลือง (soybean meal) จากบริษัท ซันฟู้ด อินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด

4.อุปกรณ์

4.1 เครื่องชั่งละเอียด (Mettler Toledo, สวิตเซอร์แลนด์)

4.2 เครื่องวัดระดับความเป็นกรดเบส (EutechCybematrics, สหรัฐอเมริกา)

4.3 ตู้ปลอดเชื้อ (LAB service, ไทย)

4.4 ตู้บ่มเชื้อ (Memmert, เยอรมัน)

4.5หม้อนึ่งความดัน (Sanyo, ญี่ปุ่น)

4.6 เครื่องปั่นผสม (Scienctific Industries, สหรัฐอเมริกา)

4.7 ไมโครปิเปตต์รุ่น P20, P200 ,P1000 และ P10000 (Gilson, ฝรั่งเศส)

4.8 ขวดรูปชมพู่ขนาด 50, 250, และ 500 มิลลิลิตร

4.9กระบอกตวง 10, 50 และ 1000 มิลลิลิตร

4.10 ขวดดูแรนขนาด 1 ลิตร

4.11 หลอดทดลอง

4.12 ตะเกียงแอลกอฮอล์

4.13 จานเพาะเชื้อพลาสติก

4.14 บิวเรตต์ขนาด 50 มิลลิลิตร

4.15 ช้อนตักสาร

4.16 ถุงพลาสติกชนิดทนร้อน

5.อาหารเลี้ยงเชื้อ

5.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ de Man, Rogosa & Sharpe (Dickinson and company, สหรัฐอเมริกา)

5.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ Dichloran Rose-Bengor Chloramphenical (Merck, เยอรมัน)

5.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey (Dickinson and company, สหรัฐอเมริกา)

6.สารเคมี

6.1 โซเดียมคลอไรด์ (Merck, เยอรมัน)

6.2 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Merck, เยอรมัน)

6.3 โปรแทสเซียมไฮโดรเจนพาทาเลต (Famitalia Carlo Erba, อิตาลี)

6.4 เอทานอล

6.5 ฟีนอล์ฟทาลีน (Ajax Chemicals, ออสเตรเรีย)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการทดลอง

1. การเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น *Lactobacillus casei* AN2 ความเข้มข้น 1×10^7 CFU/g

1.1 การเตรียมหัวเชื้อบริสุทธิ์

1.1.1 นำเชื้อ *L.casei* AN2 บริสุทธิ์ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 °C ทำให้แขวนลอย

1.1.2 ถ่ายเชื้อลงอาหารเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

1.1.3 ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเชื้อโดย streak ลงบนอาหารแข็ง MRS บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

1.1.4 เขี่ยเชื้อบริสุทธิ์โคโลนีเดี่ยวแทงลงในอาหารแข็ง MRS บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อเก็บรักษาเป็นสต็อก และทำการต่อเชื้อซ้ำทุก 1 เดือน

1.2 การเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น *Lactobacillus casei* AN2 ความเข้มข้น 1×10^7 CFU/g

1.2.1 ถ่ายเชื้อ *L.casei* AN2 จากสต็อก เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

1.2.2 ถ่ายเชื้อที่ได้ปริมาตร 5% v/v ลงในอาหารเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 23 ชั่วโมง เพื่อให้ได้เชื้อในช่วงการเจริญ mid log phase

1.2.3 ถ่ายเชื้อ 1 มิลลิลิตร ลงในโซเดียมคลอไรด์ 0.85% ปริมาตร 9 มิลลิลิตร เพื่อเจือจางแบบ 10 เท่า (serial dilution)

1.2.4 นับจำนวนเชื้อได้โดยใช้เทคนิค drop plate ลงบนอาหารแข็ง MRS บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 36 ชั่วโมง โดยทำซ้ำ 3 ครั้ง

1.2.5 นับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียในช่วง 3-30 โคโลนี แล้วคำนวณหาค่า colony-forming unit ต่อมิลลิลิตร (CFU/ml)

1.2.6 คำนวณปริมาตรของอาหารเหลว MRS ที่มีเชื้อเจริญอยู่ในช่วง mid-log phase หรือหัวข้อ 1.2.2 ที่ต้องใช้เป็นหัวเชื้อสำหรับหมักหญ้าเนเปียร์ 50 กรัม โดยต้องการความเข้มข้นเริ่มต้นข้องหัวเชื้อเท่ากับ 10×10^7 ต่อหญ้าเนเปียร์ 1 กรัม

ตัวอย่างการคำนวณ

สมมติให้ในหัวข้อ 1.2.5 นับจำนวนเชื้อได้ 1×10^9 CFU/ml แสดงว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มีเชื้อ *L.casei* AN2 จำนวน 1×10^9 CFU ต้องการหัวเชื้อเริ่มต้นความเข้มข้น 1×10^7 CFU/g

หญ้า 1 กรัม ต้องใส่อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS หัวข้อ 1.2.5 ปริมาตร เท่ากับ

$$\frac{1 \text{ ml}}{1\times10^9 \text{ CFU}} \times 1\times10^9 \text{ CFU} = 0.01 \text{ ml หรือ } 10 \text{ µl}$$

ดังนั้น หญ้าเนเปียร์ 50 กรัม ต้องใส่อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS หัวข้อ 1.2.5 ปริมาตร

0.01 ml × 50 g = 0.5 ml หรือ 500 ไมโครลิตร

2. การศึกษาผลการเสริมประสิทธิภาพการหมักไซเลจหญ้าเนเปียร์โดยใช้กากน้ำตาลและกากถั่วเหลือง

ทำการหมักไซเลจหญ้าเนเปียร์ โดยแบ่งออกเป็น 2 รูปแบบตามการใช้สารเสริมประสิทธิภาพการหมัก คือ กากน้ำตาล และกากถั่วเหลือง เมื่อใช้หรือไม่ใช้ร่วมกับหัวเชื้อ *Lactobacillus casei* AN2

2.1 เสริมประสิทธิภาพการหมักไซเลจหญ้าเนเปียร์ด้วยกากน้ำตาล

2.1.1 นำหญ้าเนเปียร์ที่ถูกสับเป็นชิ้นเล็กๆประมาณ 1-2 เซนติเมตร ผสมกับกากน้ำตาลในอัตราส่วน 0.5, 1.0 และ 2.0% ของน้ำหนักหญ้า

2.1.2 เติมหัวเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติก *L.casei* AN2 ความเข้มข้น 1×10^7 CFU ต่อหญ้าสับ 1 กรัม เฉพาะชุดการทดลองที่ศึกษาการหมักร่วมกับหัวเชื้อแบคทีเรีย

2.1.3 บรรจุหญ้าสับที่ผสมกับกากน้ำตาลแล้ว 50 กรัมลงถุงพลาสติกชนิดทนร้อน

2.1.4 ม้วนถุงให้แน่นเพื่อไล่อากาศออก แล้วรัดหนังยาง บ่มที่อุณหภูมิห้อง หรือประมาณ 35 °C เป็นเวลา 14 วัน

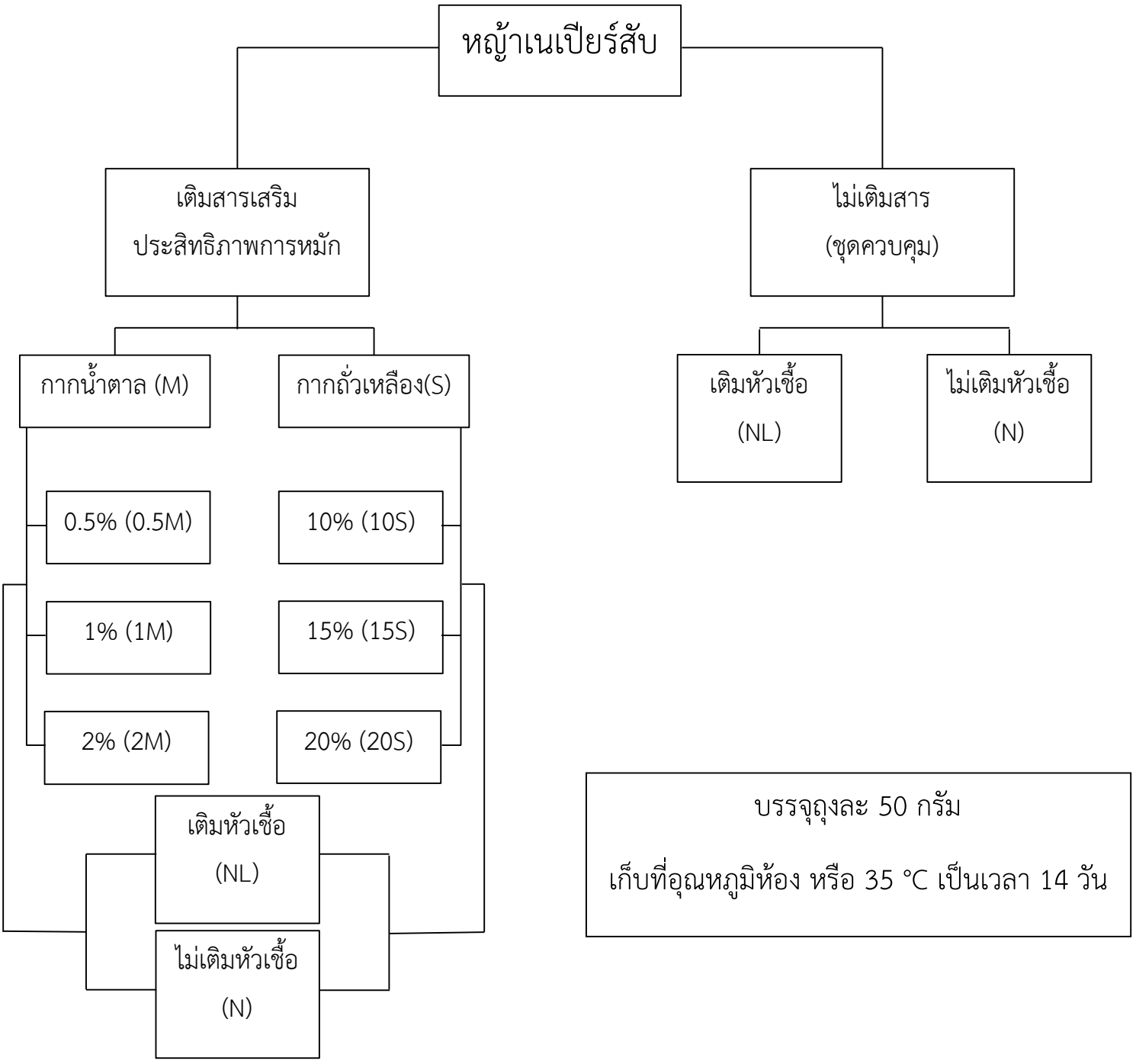
2.1.5 ติดตามผลการทดลองทุกวันที่ 0, 1, 3, 5, 7 และ 14 ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ครั้ง

2.2 เสริมประสิทธิภาพการหมักไซเลจหญ้าเนเปียร์ด้วยกากถั่วเหลือง

ทำการทดลองเช่นเดียวกับหัวข้อ 2.1 แต่เปลี่ยนมาใช้กากถั่วเหลือง เป็นสารเสริมประสิทธิภาพการหมัก ในอัตราส่วน 10, 15 และ 20% ของน้ำหนักหญ้า

*ชุดควบคุมคือ ชุดที่ไม่มีการเติมสารเสริมประสิทธิภาพการหมัก

แผนผังการหมักไซเลจ



รูปที่ 2 แผนผังแสดงการหมักไซเลจหญ้าเนเปียร์

3.การเตรียมตัวอย่างไซเลจเพื่อใช้ในการวิเคราะห์

ตัวอย่างไซเลจที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมี เตรียมโดยใช้ตัวอย่างไซเลจ 10 กรัมเติมน้ำกลั่น 90 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ใช้ปิเปตต์ดูดเฉพาะส่วนน้ำมาวัดระดับความเป็นกรด-เบส และวิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมด

ตัวอย่างไซเลจที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ ใช้ส่วนน้ำเดียวกันกับตัวอย่างไซเลจที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมี โดยทำการวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ก่อน

4.การวิเคราะห์ไซเลจ

4.1 ระดับความเป็นกรดเบส

ใช้ส่วนน้ำจากหัวข้อที่ 3 วัดความเป็นกรดเบสโดยใช้ pH meter

4.2 ความเข้มข้นของกรดทั้งหมด

นำส่วนน้ำจากหัวข้อที่ 3 มาไทเทรตกับ 0.1 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ที่ผ่านการเทียบค่ามาตรฐานโดยใช้ 0.1โมลาร์ ของโปแทสเซียมไฮโดรเจนพาทาเลต (KHP) เป็นสารมาตรฐานปฐมภูมิ ใช้ฟีนอฟทาลีน 1-2 หยด เป็นอินดิเคเตอร์จนได้จุดยุติเป็นสีชมพูอ่อน (รัชนา พระนิมิตร, 2557) ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างละ 3 ครั้ง จากนั้นนำไปคำนวณหาปริมาณกรดทั้งหมดแล้วหาค่าเฉลี่ย

4.3 ปริมาณจุลินทรีย์

4.3.1 นำส่วนน้ำจาดหัวข้อที่ 3 มาเจือจาง 10 เท่าและ 100 เท่า ในโซเดียมคลอไรด์ 0.85%

4.3.2 หาจำนวนแบคทีเรียคอลิฟอร์ม โดยเทคนิค drop plate บนอาหารแข็ง MacConkey บ่มที่อุณหภูมิ 37° C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4.3.3 หาจำนวนแบคทีเรียกรดแล็กติก โดยเทคนิค drop plate บนอาหารแข็ง MRS บ่มที่อุณหภูมิ 30° C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

4.3.4 หาจำนวนยีสต์และรา โดยเทคนิค spread plate บนอาหารแข็ง DRBC บ่มที่ อุณหภูมิ 30° C เป็นเวลา 5 วัน

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1.การเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น *Lactobacillus casei* AN2 ความเข้มข้น 1×10^7 CFU/g

ทำการเชื้อ *L.casei* AN2 ในช่วงการเจริญ mid log phase โดยเลี้ยงในอาหารเหลว MRS เป็นเวลา 23 ชั่วโมง นำมา drop plate บนอาหารแข็ง MRS ปริมาตร 10 µl สามารถนับจำนวนเชื้อเฉลี่ยได้ 26.8 โคโลนีที่ระดับความเจือจาง 10^{-5} แสดงว่าในอาหารเหลว MRS มีเชื้อความเข้มข้น

$$\frac{26 \times 1000\mu l \times 10^5}{10\ \mu l \times 1ml} = 2.60 \times 10^8 \text{ CFU/ml}$$

แสดงว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มีเชื้อ *L.casei* AN2 จำนวน 2.60×10^8 CFU โดยการหมักไซเลจหญ้าเนเปียร์ต้องการความเข้มข้น 10^7 CFU/g

หญ้าเนเปียร์ 1 กรัมต้องใส่อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่มีเชื้อเท่ากับ

$$\frac{1 \text{ ml}}{2.6 \times 10^8 \text{ CFU}} \times 1 \times 10^7 \text{ CFU} = 0.038 \text{ ml หรือ } 38\ \mu l$$

ดังนั้นหญ้าเนเปียร์ 50 กรัม ต้องใส่อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่มีเชื้อเท่ากับ

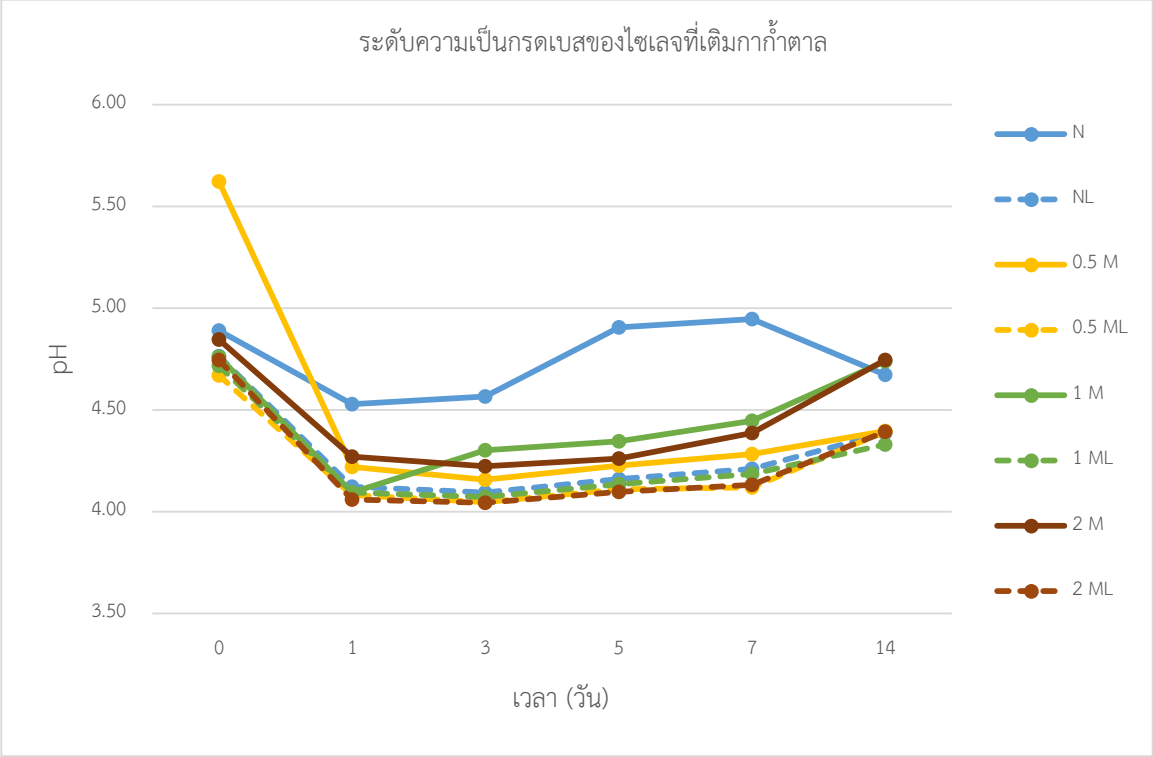
$$0.038 \text{ ml} \times 50g = 1.9 \text{ ml หรือ } 1900\ \mu l$$

2.การศึกษาผลการเสริมประสิทธิภาพการหมักไซเลจหญ้าเนเปียร์โดยใช้กากน้ำตาล และกากถั่วเหลือง

ศึกษาผลของกากน้ำตาลและกากถั่วเหลืองต่อคุณภาพการหมักของไซเลจหญ้าเนเปียร์ โดยมีชุดควบคุม คือไซเลจที่มีแต่หญ้าเนเปียร์(N) และไซเลจที่มีการหมักร่วมกับกากน้ำตาล(M) และกากถั่วเหลือง(S) ที่อัตรส่วนต่างๆ และศึกษาผลของการใช้เชื้อ *L.casei* AN2 เป็นหัวเชื้อเพื่อหมักไซลเลจหญ้าเนเปียร์ร่วมกับสารเสริมประสิทธิภาพการหมัก โดยมีชุดที่หมักหญ้าเนเปียร์ร่วมกับเชื้อ *L.casei* AN2 (NL) และไซเลจหญ้าเนเปียร์ที่เติมหัวเชื้อร่วมกับกากน้ำตาล(ML) และกากถั่วเหลือง(SL)ที่อัตรส่วนต่างๆ

2.1ค่าความเป็นกรดเบส pH ของไซเลจ

จากการทดลองพบว่าระดับความเป็นกรดเบสของทุกชุดการทดลองมีค่ามากกว่า 4.60 ในวันที่ 0 โดยไซเลจที่หมักโดยมีการเติมกากน้ำตาล ร่วมกับหัวเชื้อแบคทีเรีย *L.casei* AN2 มีระดับความเป็นกรดเบสลดลงอย่างรวดเร็ว ตั้งแต่วันแรกของการหมักเมื่อเทียบกับชุดที่ไม่มีการเติมกากน้ำตาล และหัวเชื้อแบคทีเรียโดยไซเลจโดยไซเลจทุกชุดการทดลองที่มีการเติม กากน้ำตาลร่วมกับหัวเชื้อแบคทีเรีย *L.casei* AN2 มีระดับความเป็นกรดเบสต่ำกว่า 4.20 ตั้งแต่วันแรกจนถึงวันที่ 7 และหลังจากหมักครบ 14 วันไซเลจที่มีการเติมกากน้ำตาลร่วมกับหัวเชื้อแบคทีเรีย *L.casei* AN2 มีระดับความเป็นกรดเบสเพิ่มขึ้นเล็กน้อยส่วนในชุดที่มีการเติมเฉพาะกากน้ำตาลและชุดที่ไม่มีการเติมสารใดๆเลยจะมีค่าความเป็นกรดเบสเพิ่มขึ้นเกิน 4.50 ดังแสดงในรูปที่



รูปที่ 3 ค่าความเป็นกรดเบสของไซเลจหญ้าเนเปียร์ที่มีการเติมกากน้ำตาล และเติมกากน้ำตาลร่วมกับหัวเชื้อแบคทีเรีย *L.casei AN2*

N = ชุดควบคุม

NL = เติม L.casei AN2

0.5M = เติมกากน้ำตาล 0.5%/g FM

1M = เติมกากน้ำตาล 1%/g FM

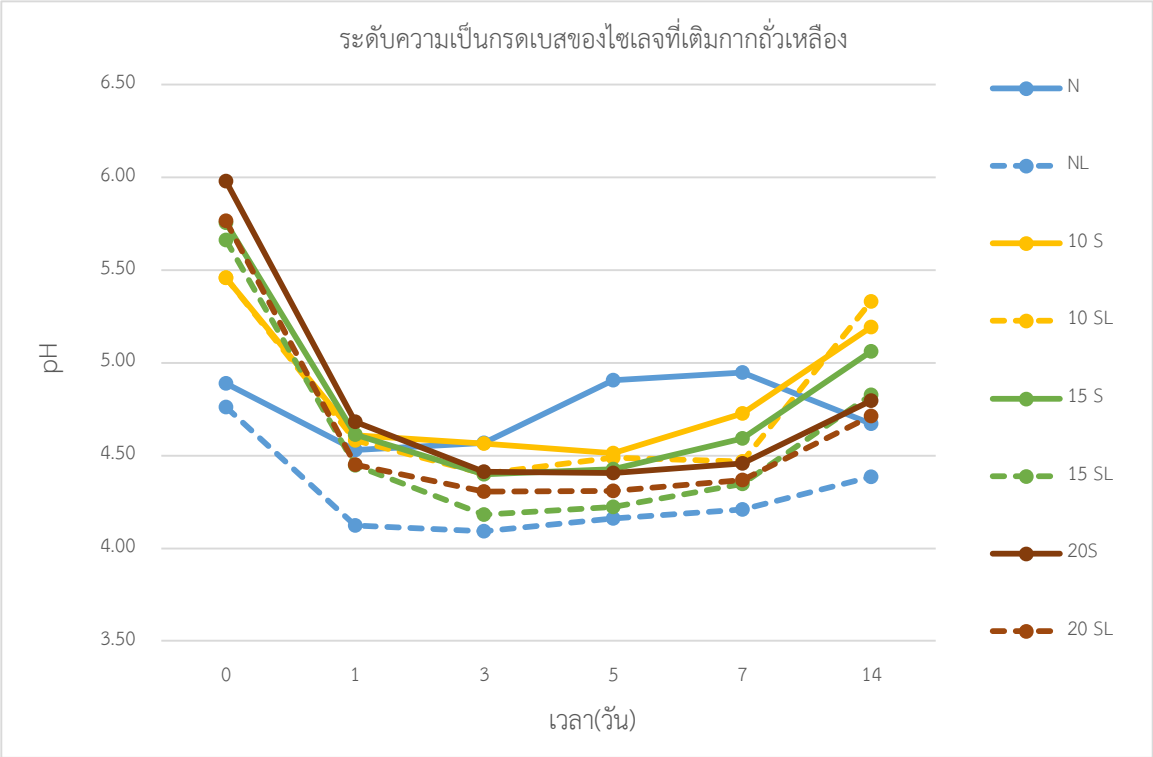
2M = เติมกากน้ำตาล 2%/g FM

0.5M = เติมกากน้ำตาล 0.5%/g FM+ L.casei AN2

1M = เติมกากน้ำตาล 1%/g FM+ L.casei AN2

2M = เติมกากน้ำตาล 2%/g FM+ L.casei AN2

และจากการทดลองใช้กากถั่วเหลืองเป็นสารเติมแต่งเพิ่มประสิทธิภา พบว่าในวันที่ 0 ค่าความเป็นกรดเบสของทุกไซเลจที่มีการเติมกากถั่วเหลืองมีค่ามากกว่า 5.20 โดยไซเลจที่มีการเติมกากถั่วเหลืองและหัวเชื้อแบคทีเรีย *L.casei* AN2 จะมีระดับความเป็นกรดเบสลดลงเร็วกว่าในชุดการทดลองที่มีการเติมเฉพาะกากถั่วเหลือง โดยรวมตั้งแต่วันที่ 1-7 มีค่าความเป็นกรดเบสประมาณ 4.20-4.65 และเมื่อหมักไซเลจครบ 14 วันพบว่าทุกไซเลจที่มีการเติมกากถั่วเหลืองมีค่า pH เกิน 5.0 ซึ่งมากกว่าในชุดควบคุมและชุดที่มีการเติมเฉพาะหัวเชื้อแบคทีเรีย *L.casei* AN2



รูปที่ 4 ค่าความเป็นกรดเบสของไซเลจหญ้าเนเปียร์ที่มีการเติมกากถั่วเหลือง และเติมถั่วเหลืองร่วมกับหัวเชื้อแบคทีเรีย *L.casei AN2*

N = ชุดควบคุม

NL = เติม L.casei AN2

10S = เติมกากถั่วเหลือง 0.5%/g FM

15S = เติมกากถั่วเหลือง 1%/g FM

20S = เติมกากถั่วเหลือง 2%/g FM

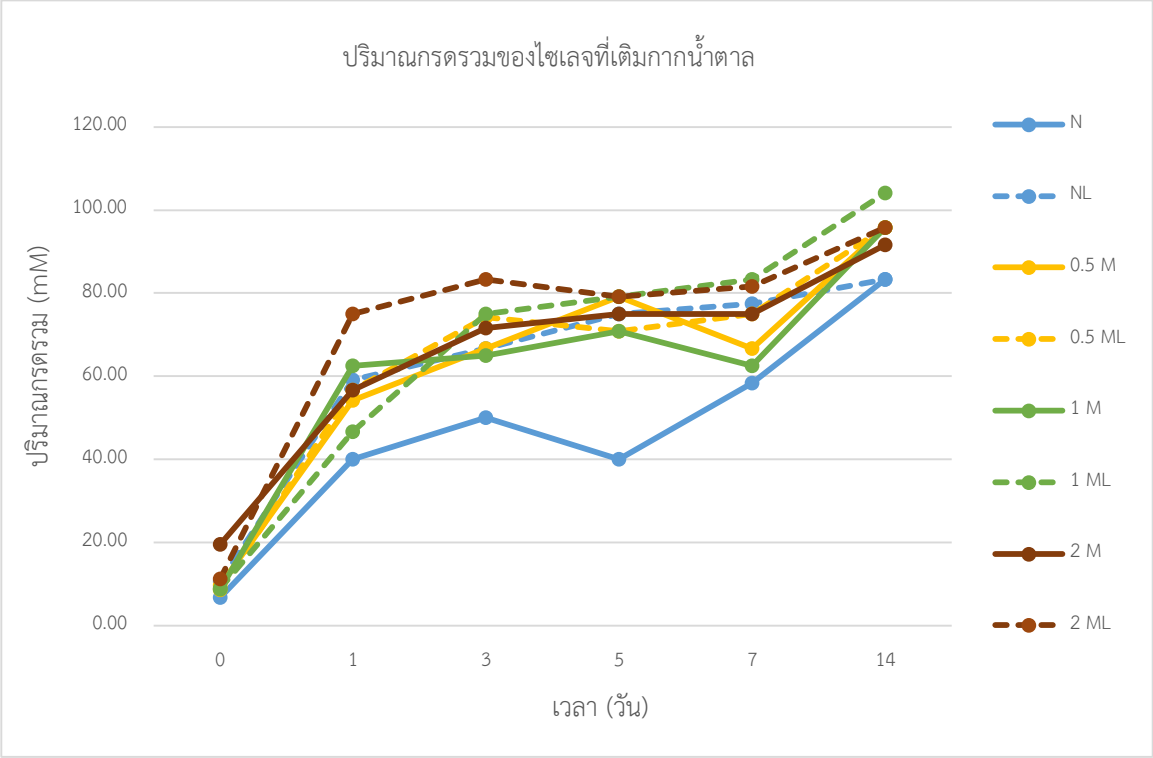
10S = เติมกากถั่วเหลือง 0.5%/g FM + L.casei AN2

15S = เติมกากถั่วเหลือง 1%/g FM + L.casei AN2

20S = เติมกากถั่วเหลือง 2%/g FM + L.casei AN2

2.2 ปริมาณกรดรวมของไซเลจ

จากการทดลองพบว่า ในตอนเริ่มต้นทุกชุดการทดลองปริมาณกรดรวมใกล้เคียงกัน และมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 3 วันแรก หลังจากนั้นยังคงมีแนวโน้มว่าจะเพิ่มขึ้นต่อไป โดยไซเลจที่ไม่มีการเติมสารใดๆเลยจะมีปริมาณของกรดรวมที่ต่ำและเพิ่มขึ้นช้ากว่าในชุดการทดลองที่มีการเติมหัวเชื้อแบคทีเรีย *L.casei AN2* และชุดที่มีการเติมกากน้ำตาลเป็นสารเสริมประสิทธิภาพ จากกราฟจะเห็นว่าชุดกรทดลองที่มีการเติมหัวเชื้อแบคทีเรีย *L.casei AN2* รวมกับ 2% กากน้ำตาล (2mL) จะมีปริมาณกรดเพิ่มขึ้นเร็วที่สุดในช่วงแรกและมีปริมาณกรดรวมเท่ากับ 95.83 mM ในวันที่ 14 และชุดการทดลองที่มีการเติมหัวเชื้อแบคทีเรีย *L.casei AN2* รวมกับ 1% กากน้ำตาล (1ML) จะให้ปริมาณกรดรวมสูงที่สุดที่ 104.1 mM ในวันที่ 14



รูปที่ 5 ปริมาณกรดรวมของไซเลจหญ้าเนเปียร์ที่มีการเติมกากน้ำตาล และเติมกากน้ำตาลร่วมกับหัวเชื้อแบคทีเรีย *L.casei AN2*

N = ชุดควบคุม

NL = เติม L.casei AN2

0.5M = เติมกากน้ำตาล 0.5%/g FM

1M = เติมกากน้ำตาล 1%/g FM

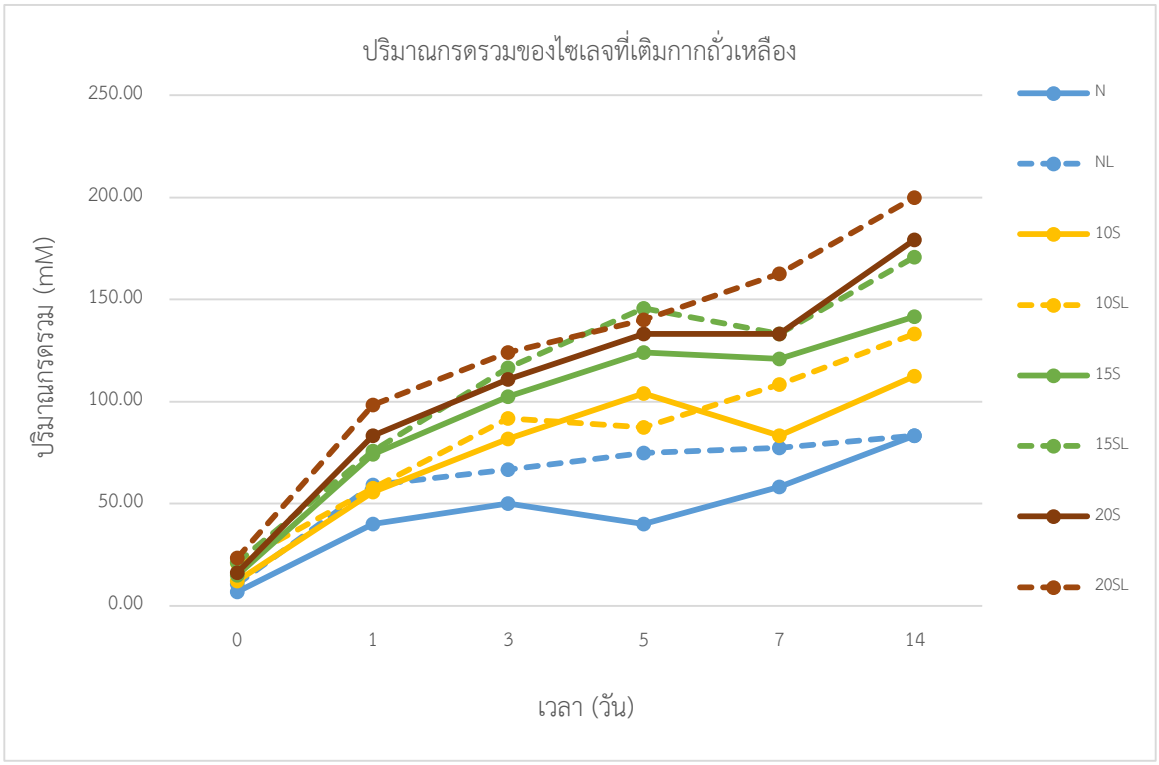
2M = เติมกากน้ำตาล 2%/g FM

0.5M = เติมกากน้ำตาล 0.5%/g FM+ L.casei AN2

1M = เติมกากน้ำตาล 1%/g FM+ L.casei AN2

2M = เติมกากน้ำตาล 2%/g FM+ L.casei AN2

และจากการหมักไซเลจโดยใช้กากถั่วเหลืองเป็นสารเสริมประสิทธิภาพ พบว่าในตอนเริ่มต้นทุกชุดการทดลองปริมาณกรดรวมใกล้เคียงกัน และมีค่าเพิ่มขึ้นเรื่อยๆโดยชุดการทดลองที่มีการเติมหัวเชื้อแบคทีเรีย *L.casei* AN2 รวมกับ 20% กากถั่วเหลือง (20SL) มีปริมาณกรดเพิ่มขึ้นรวดเร็วที่สุดในช่วงแรกและให้ปริมาณกรดรวมสูงที่สุดเมื่อหมักครบ 14 วัน ที่ 200 mM โดยในชุดการทดลองอื่นๆชุดที่มีการเติมหัวเชื้อแบคทีเรีย *L.casei* AN2 จะให้ปริมาณกรดมากกว่าชุดที่ไม่มีการเติมและ ชุดที่มีการเติมกากถั่วเหลืองในปริมาณที่มากกว่าจะให้ปริมาณกรดรวมที่มากกว่าตามลำดับ



รูปที่ 6 ปริมาณกรดรวมของไซเลจหญ้าเนเปียร์ที่มีการเติมกากถั่วเหลือง และเติมกากถั่วเหลืองร่วมกับหัวเชื้อแบคทีเรีย *L.casei AN2*

N = ชุดควบคุม

NL = เติม L.casei AN2

10S = เติมกากถั่วเหลือง 0.5%/g FM

15S = เติมกากถั่วเหลือง 1%/g FM

20S = เติมกากถั่วเหลือง 2%/g FM

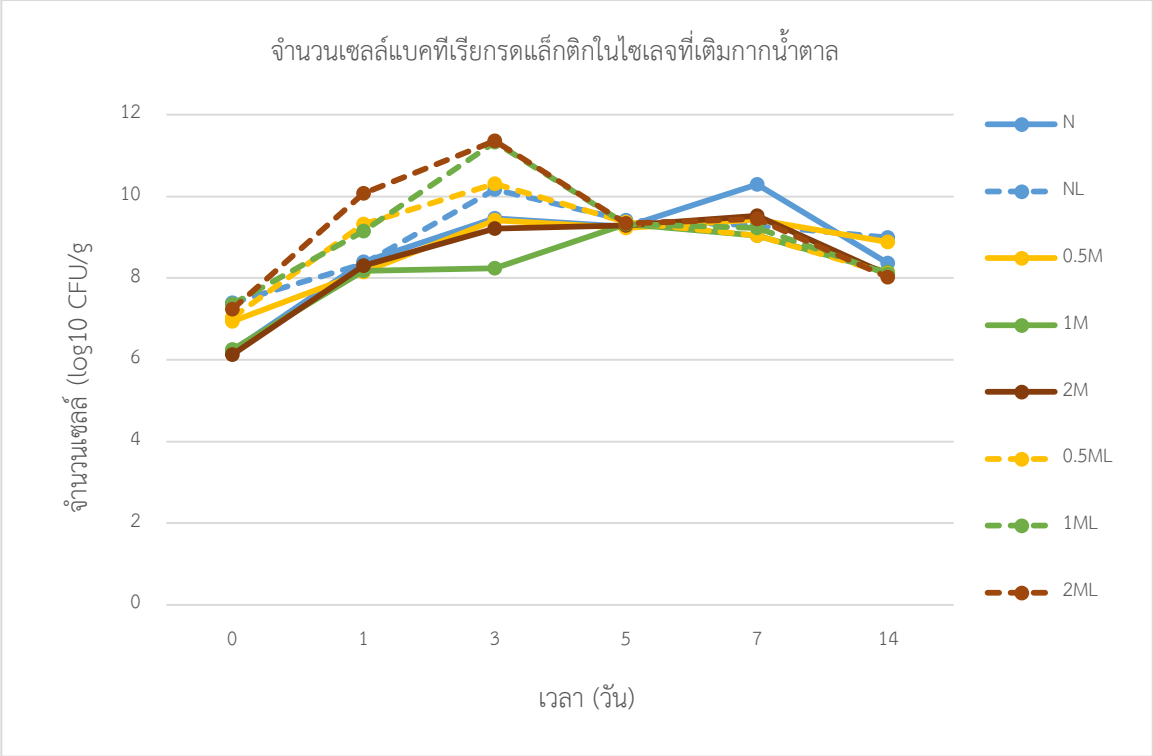
10S = เติมกากถั่วเหลือง 0.5%/g FM + L.casei AN2

15S = เติมกากถั่วเหลือง 1%/g FM + L.casei AN2

20S = เติมกากถั่วเหลือง 2%/g FM + L.casei AN2

2.3 จำนวนเซลล์แบคทีเรียกรดแล็กติก

จากการทดลองพบว่าในชุดที่มีการเติมหัวเชื้อแบคทีเรีย *L.casei* AN2 จะมีจำนวนเซลล์เริ่มต้นอยู่ที่ประมาณ 10^7 CFU/g ซึ่งมากกว่าในชุดที่ไม่มีการเติมหัวเชื้อ โดยชุดที่ไม่มีการเติมหัวเชื้อจะมีเชื้อแบคทีเรีย *L.casei* AN2 อยู่ที่ประมาณ 10^6 CFU/g โดยในชุดที่มีการเติมหัวเชื้อแบคทีเรีย *L.casei* AN2 ร่วมกับกากน้ำตาลปริมาณ 1% และ 2% (1%ML และ 2% ML) จะมีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นเร็วที่สุด และสูงสุดที่ประมาณ 10^{11} CFU/g ในวันที่ 3 ส่วนในชุดการทดลองอื่นๆจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นจนถึงในวันที่ 3 เช่นกัน จากนั้นจำนนเซลล์จะค่อยๆลดลงจนค่อนข้างจะคงที่ในทุกชุดการทดลอง จนกระทั่งวันที่ 14 จำมีจำนวนเซลล์ที่ประมาณ 10^8 CFU/g



รูปที่ 7 จำนวนเซลล์ของแบคทีเรียกรดแล็กติกของไซเลจหญ้าเนเปียร์ที่มีการเติมกากน้ำตาล และเติมกากน้ำตาลร่วมกับหัวเชื้อแบคทีเรีย *L.casei AN2*

N = ชุดควบคุม

NL = เติม L.casei AN2

0.5M = เติมกากน้ำตาล 0.5%/g FM

1M = เติมกากน้ำตาล 1%/g FM

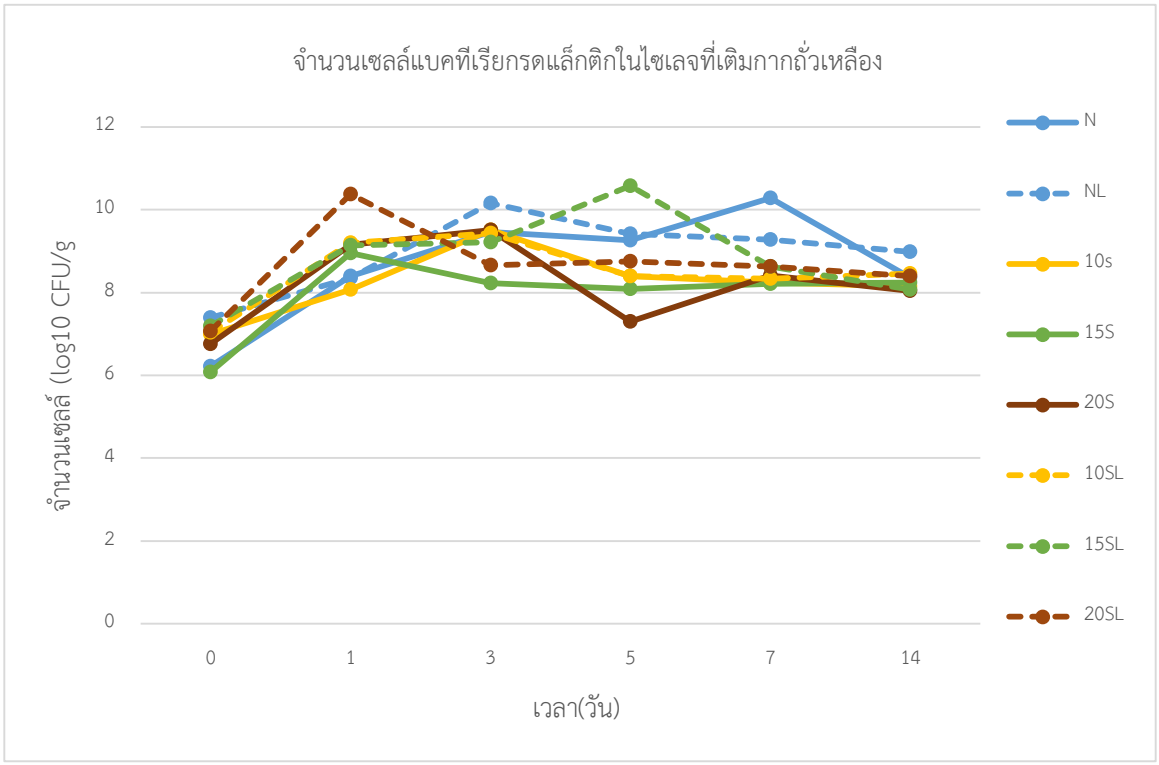
2M = เติมกากน้ำตาล 2%/g FM

0.5M = เติมกากน้ำตาล 0.5%/g FM+ L.casei AN2

1M = เติมกากน้ำตาล 1%/g FM+ L.casei AN2

2M = เติมกากน้ำตาล 2%/g FM+ L.casei AN2

และจากการทดลองพบว่าการเติมกากถั่วเหลืองเป็นสารเสริมประสิทธิภาพ ในชุดที่มีการเติมหัวเชื้อแบคทีเรีย *L.casei* AN2 จะมีจำนวนเซลล์เริ่มต้นอยู่ที่ประมาณ 10^7 CFU/g ซึ่งมากกว่าในชุดที่ไม่มีการเติมหัวเชื้อ ในวันแรกชุดการทดลองที่มีการเติมหัวเชื้อแบคทีเรีย *L.casei* AN2 ร่วมกับ 20% กากถั่วเหลืองมีจำนวนเซลล์แบคทีเรียกรดแล็กติกสูงสุดที่ 10^{10} CFU/g หลังจากนั้นในทุกชุดการทดลองจะมีแบคทีเรียโดยประมาณ $10^8 - 10^{10}$ CFU/g ไปตลอดจนจนสิ้นสุดการหมัก และในวันที่ 14 ชุดการทดลองที่มีการเติมหัวเชื้อแบคทีเรีย *L.casei* AN2 (NL) เพียงอย่างเดียวมีปริมาณเซลล์ของแบคทีเรียกรดแล็กติกสูงที่สุด



รูปที่ 8 จำนวนเซลล์ของแบคทีเรียกรดแล็กติกของไซเลจหญ้าเนเปียร์ที่มีการเติมกากถั่วเหลือง และเติมกากถั่วเหลืองร่วมกับหัวเชื้อแบคทีเรีย *L.casei AN2*

N = ชุดควบคุม

NL = เติม L.casei AN2

10S = เติมกากถั่วเหลือง 0.5%/g FM

15S = เติมกากถั่วเหลือง 1%/g FM

20S = เติมกากถั่วเหลือง 2%/g FM

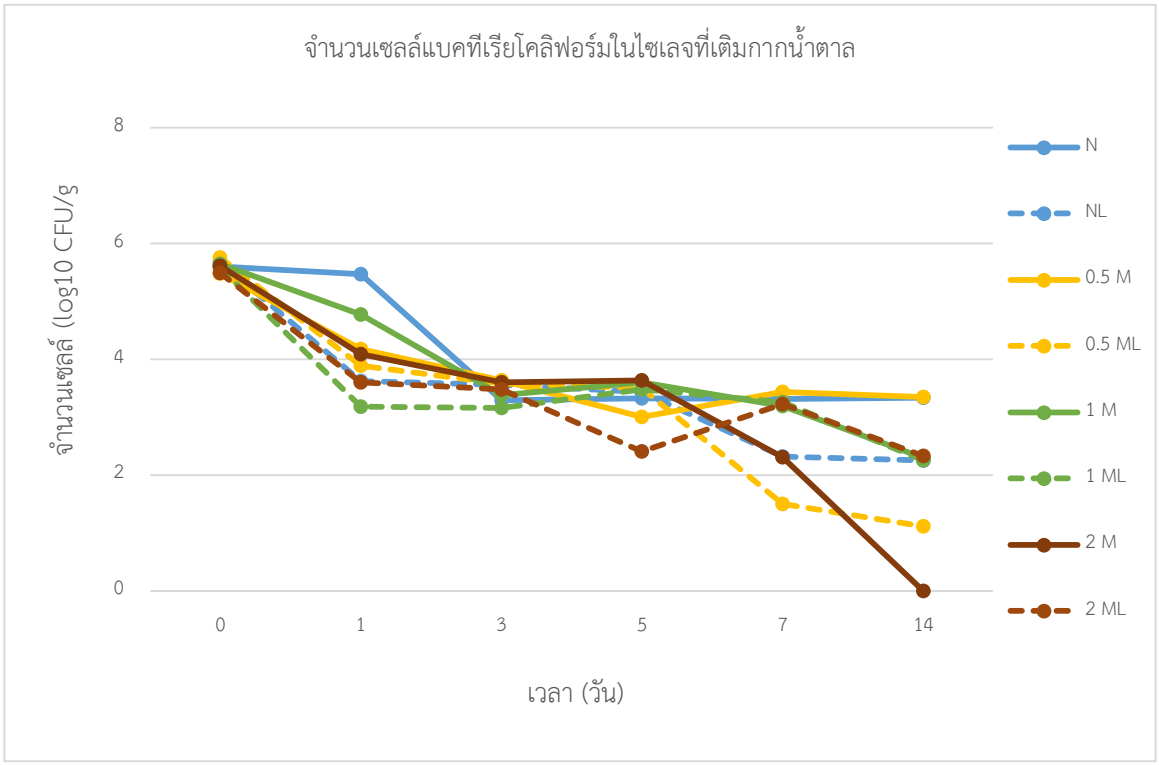
10S = เติมกากถั่วเหลือง 0.5%/g FM + L.casei AN2

15S = เติมกากถั่วเหลือง 1%/g FM + L.casei AN2

20S = เติมกากถั่วเหลือง 2%/g FM + L.casei AN2

2.4 จำนวนเซลล์แบคทีเรียคอลิฟอร์ม

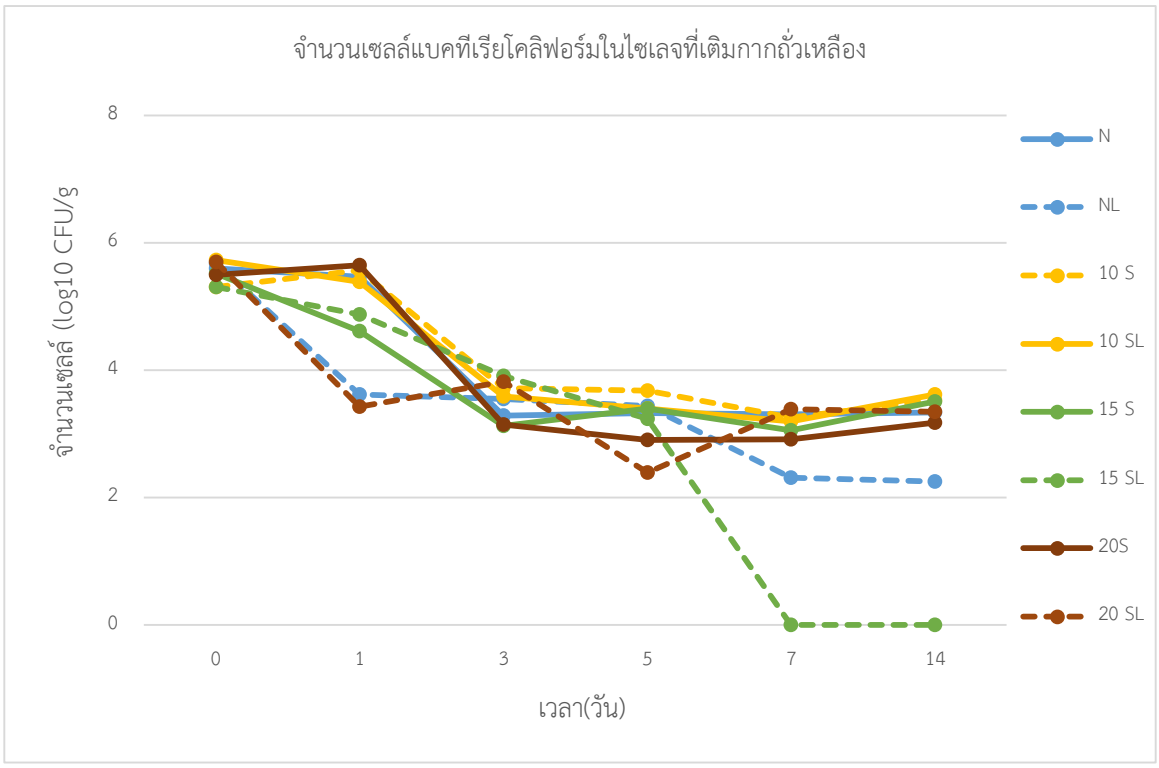
เมื่อทำการวิเคราะห์จำนวนเซลล์แบคทีเรียคอลิฟอร์ม ในไซเลจหญ้าเนเปียร์ที่มีการเติมกากน้ำตาล และเติมกากน้ำตาลร่วมกับหัวเชื้อแบคทีเรีย *L.casei* AN2 พบว่าในแรกเริ่มจะมีปริมาณเซลล์อยู่ที่ 10^5 CFU/g ในทุกชุดการทดลองโดยจากกราฟจะเห็นได้ว่าชุดการทดลองที่มีการเติมกากน้ำตาล และเติมกากน้ำตาลร่วมกับหัวเชื้อแบคทีเรีย *L.casei* AN2 จะมีปริมาณเซลล์ของแบคทีเรียคอลิฟอร์มลดลงเร็วกว่าในชุดควบคุม (N) ปริมาณเซลล์จะลดลงจนถึงวันที่ 3 และจะคงที่ตลอดการหมักจนครบ 14 วันที่ ต่ำกว่า 10^4 และชุดการทดลองที่มีการเติม หัวเชื้อแบคทีเรีย *L.casei* AN2 ร่วมกับ 0.5% และ 2% กากน้ำตาล (0.5ML และ 2ML) มีจำนวนเซลล์แบคทีเรียคอลิฟอร์มต่ำกว่า 10^2 CFU/g



รูปที่ 9 จำนวนเซลล์ของแบคทีเรียโคลิฟอร์มของไซเลจหญ้าเนเปียร์ที่มีการเติมกากน้ำตาล และเติมกากน้ำตาลร่วมกับหัวเชื้อแบคทีเรีย *L.casei AN2*

N = ชุดควบคุม
NL = เติม L.casei AN2
0.5M = เติมกากน้ำตาล 0.5%/g FM
1M = เติมกากน้ำตาล 1%/g FM
2M = เติมกากน้ำตาล 2%/g FM
0.5M = เติมกากน้ำตาล 0.5%/g FM+ L.casei AN2
1M = เติมกากน้ำตาล 1%/g FM+ L.casei AN2
2M = เติมกากน้ำตาล 2%/g FM+ L.casei AN2

และจากการใช้กากถั่วเหลืองเป็นสารเติมแต่งเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพพบว่าในชุดการทดลองที่มีการเติม 20% กากถั่วเหลืองร่วมกับหัวเชื้อแบคทีเรีย *L.casei* AN2 (20SL) มีจำนวนเซลล์แบคทีเรียคอลิฟอร์มลดมากที่สุด จนต่ำกว่า 10^4 CFU/g ในวันแรก จากเดิมที่ทุกชุดมีจำนวนเซลล์ประมาณ 10^5 CFU/g จากกราฟทุกชุดการทดลองจะมีจำนวนเซลล์ลดลงจนถึงวันที่ 3 และคงจนครบระยะเวลาการหมัก 14 วันโดยมีจำนวนต่ำกว่า 10^4 CFU/g และในชุดการทดลองที่มีการเติมหัวเชื้อแบคทีเรีย *L.casei* AN2 ร่วมกับ 15% กากถั่วเหลือง (15SL) มีจำนวนเซลล์แบคทีเรียคอลิฟอร์มลดลงจนตรวจไม่พบที่ระดับความเจือจาง 10^{-2} ตั้งแต่ในวันที่ 7 จนถึงวันที่ 14



รูปที่ 10 จำนวนเซลล์ของแบคทีเรียลิฟอร์มของไซเลจหญ้าเนเปียร์ที่มีการเติมกากถั่วเหลือง และเติมกากถั่วเหลืองร่วมกับหัวเชื้อแบคทีเรีย *L.casei AN2*

N = ชุดควบคุม

NL = เติม L.casei AN2

10S = เติมกากถั่วหลือง 0.5%/g FM

15S = เติมกากถั่วหลือง 1%/g FM

20S = เติมกากถั่วหลือง 2%/g FM

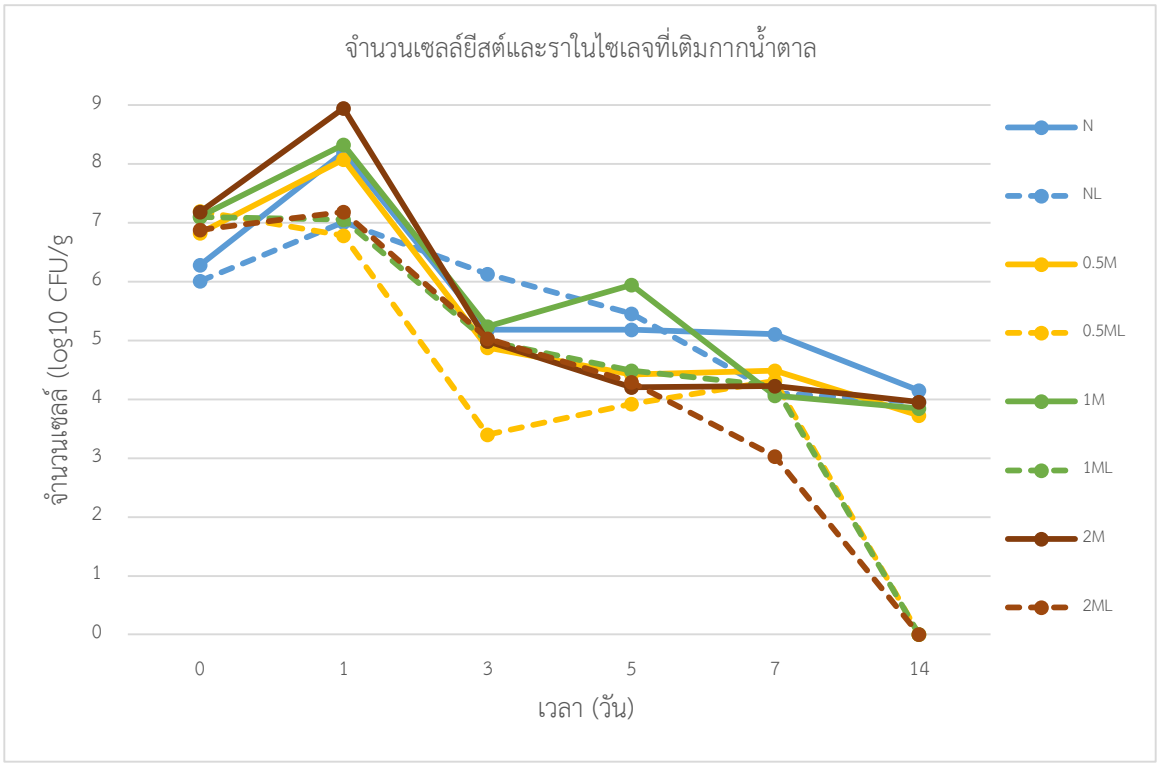
10S = เติมกากถั่วหลือง 0.5%/g FM + L.casei AN2

15S = เติมกากถั่วหลือง 1%/g FM + L.casei AN2

20S = เติมกากถั่วหลือง 2%/g FM + L.casei AN2

2.5 จำนวนเซลล์ยีสต์และรา

จำนวนของเซลล์ยีสต์และราในตอนแรกเริ่มมีปริมาณใกล้เคียงกันที่ 10^6-10^7 CFU/g หลังจากเริ่มทำการหมักในทุกชุดการลดลองจำนวนของเซลล์ยีสต์และรามีปริมาณเพิ่มขึ้นในวันแรกและลดลงในวันที่ 3 และหลังจากนั้นอย่างต่อเนื่อง โดยในชุดการทดลองที่มีการเติมกากน้ำตาล และเติมกากน้ำตาลร่วมกับหัวเชื้อแบคทีเรีย *L.casei* AN2 จะมีจำนวนเซลล์ลดลงเร็วกว่าในชุดที่ไม่มีการเติมสารใดๆเลย และชุดที่มีเพียงการเติมหัวเชื้อแบคทีเรีย *L.casei* AN2 เพียงอย่างเดียว หลังจากหมักครบ 14 วันทุกชุดการทดลองมีจำนวนเซลล์ยีสต์และราต่ำกว่า หรือประมาณ 10^4 ยกเว้นในชุดที่มีการเติมกากน้ำตาลร่วมกับหัวเชื้อแบคทีเรีย *L.casei* AN2 (0.5ML ,1ML และ 2ML) ไม่สามารถตรวจพบจำนวนเซลล์ได้ที่ระดับความเจือจาง 10^{-2}



รูปที่ 11 จำนวนเซลล์ของยีตส์และราของไซเลจหญ้าเนเปียร์ที่มีการเติมกากน้ำตาล และเติมกากน้ำตาลร่วมกับหัวเชื้อแบคทีเรีย *L.casei AN2*

N = ชุดควบคุม

NL = เติม L.casei AN2

0.5M = เติมกากน้ำตาล 0.5%/g FM

1M = เติมกากน้ำตาล 1%/g FM

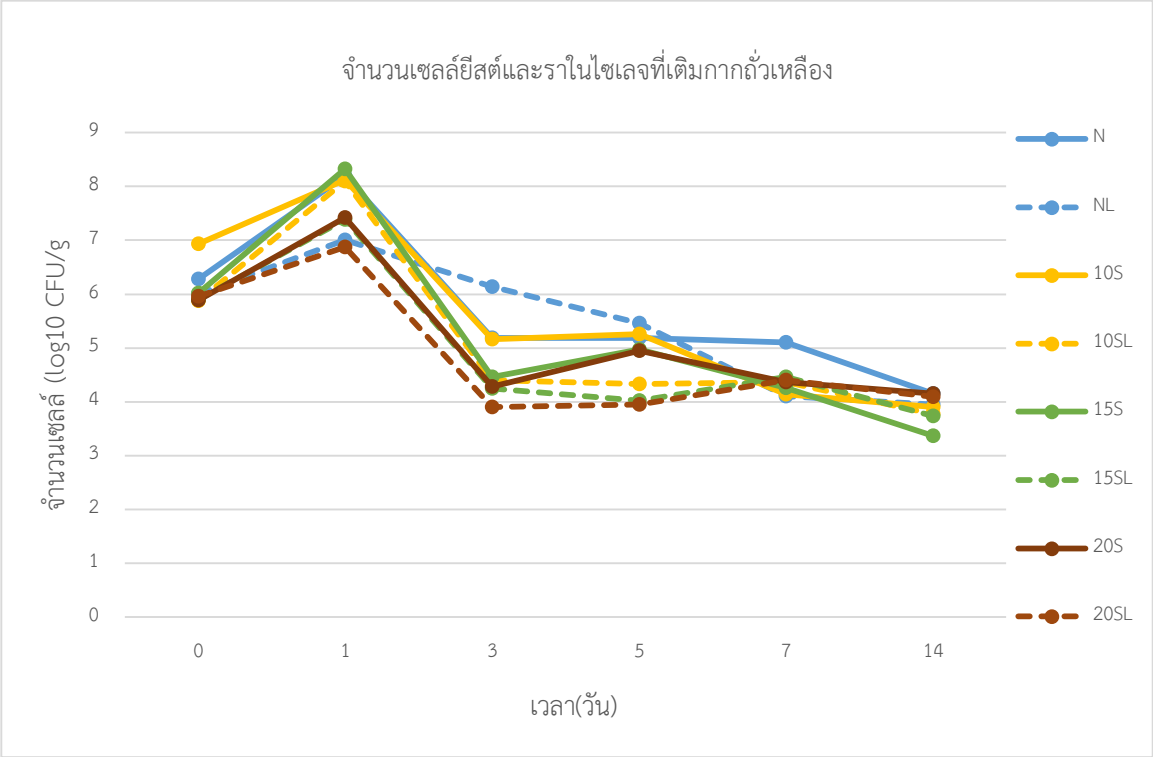
2M = เติมกากน้ำตาล 2%/g FM

0.5M = เติมกากน้ำตาล 0.5%/g FM+ L.casei AN2

1M = เติมกากน้ำตาล 1%/g FM+ L.casei AN2

2M = เติมกากน้ำตาล 2%/g FM+ L.casei AN2

สำหรับการหมักไซเลจหญ้าเนเปียร์โดยใช้กากถั่วเหลืองเป็นสารเติมแต่งเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพ พบว่าในวันแรกจำนวนเซลล์ของยีสต์และรามีจำนวนเพิ่มขึ้นจากประมาณ 10^6 – 10^7 CFU/g เป็นประมาณ 10^8 CFU/g โดยในชุดการทดลองที่การเติม 20%กากถั่วเหลืองร่วมกับหัวเชื้อแบคทีเรีย *L.casei* AN2 มีจำนวนเซลล์ที่เพิ่มขึ้นน้อยที่สุด และจำนวนเซลล์ลดลงเหลือน้อยที่สุดในการหมักวันที่ 3 โดยหลังจากทำการหมักผ่านไปครบ 14 วันพบว่าในชุดการทดลองที่มีการเติมกากถั่วเหลืองร่วมกับหัวเชื้อแบคทีเรีย *L.casei* AN2 มีจำนวนเซลล์ของยีสต์และราต่ำกว่า 10^4 CFU/g ยกเว้นชุดการทดลอง 20S และ 20SL ที่มีจำนวนเซลล์ยีสต์และราสูงกว่า 10^4 CFU/g เพียงเล็กน้อยเท่านั้น



รูปที่ 12 จำนวนเซลล์ของยีตส์และราของไซเลจหญ้าเนเปียร์ที่มีการเติมกากถั่วเหลือง และเติมกากถั่วเหลืองร่วมกับหัวเชื้อแบคทีเรีย *L.casei AN2*

N = ชุดควบคุม

NL = เติม L.casei AN2

10S = เติมกากถั่วเหลือง 0.5%/g FM

15S = เติมกากถั่วเหลือง 1%/g FM

20S = เติมกากถั่วเหลือง 2%/g FM

10S = เติมกากถั่วเหลือง 0.5%/g FM + L.casei AN2

15S = เติมกากถั่วเหลือง 1%/g FM + L.casei AN2

20S = เติมกากถั่วเหลือง 2%/g FM + L.casei AN2

อภิปราย และสรุปผลการทดลอง

การศึกษาได้ทำการหมักไซเลจหญ้าเนเปียร์โดยมีการเติมหัวเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติก *Lactobacillus casei* AN2 ร่วมกับสารเติมแต่งอีกสองชนิด ได้แก่ กากน้ำตาล และกากถั่วเหลืองที่ปริมาณต่างๆ พบว่าไซเลจที่มีการเติมกากน้ำตาลร่วมกับเติมหัวเชื้อแบคทีเรีย *L.casei* AN2 จะมีระดับความเป็นกรดเบสลดลงรวดเร็ว และต่ำกว่าในชุดการทดลองอื่นๆ เนื่องจากการเติมกากน้ำตาลเป็นการเพิ่มคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำได้ให้กับแบคทีเรียกรดแล็กติก (Chen และคณะ, 2014) จึงทำให้สามารถผลิตกรดแล็กติกได้ในปริมาณมากและรวดเร็ว Baytok และคณะ (2005) รายงานว่าในกากน้ำตาลมีปริมาณของน้ำตาลซูโครสที่แบคทีเรียกรดแล็กติก สามารถนำไปใช้ได้สูง นอกจากนั้นการเติมกากน้ำตาลช่วยเพิ่มการย่อยสลายโครงสร้างของคาร์โบไฮเดรตจึงทำให้มีน้ำตาลในไซเลจมากขึ้น (Baytok และคณะ, 2005) Liu และคณะ (2020) พบว่าการเติมหัวเชื้อแล็กติกแอซิดแบคทีเรียร่วมกับกากน้ำตาลช่วยทำให้ค่าความเป็นกรดเบสลดลงอย่างรวดเร็ว ลดปริมาณแอมโมเนียในไซเลจ และยังเพิ่มความคงทนของไซเลจอีกด้วย (Liu และคณะ, 2020)

จากการหมักไซเลจที่เติมกากถั่วเหลืองเป็นสารเสริมประสิทธิภาพพบว่าทุกชุดทดลองที่มีการเติมกากถั่วเหลืองและกากถั่วเหลืองร่วมกับหัวเชื้อแบคทีเรีย *L.casei* AN2 มีระดับความเป็นกรดเบสที่สูงเมื่อเทียบกับชุดควบคุมและชุดที่เติมกากน้ำตาล เมื่อทำการหมักจนครบ 14 วันพบว่าทุกชุดการทดลองมีค่าความเป็นกรดเบสที่สูงกว่าในชุดควบคุม (N) โดยมีค่าสูงถึง 4.7 – 5.3 ซึ่งเป็นภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการหมักเนื่องจากไซเลจที่ดีควรมีค่าความเป็นกรดเบสไม่เกิน 4.2 (Tjandraatmadja และคณะ, 1994) อาจเนื่องมาจากในกากถั่วเหลืองมีปริมาณของคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำได้ต่ำ จึงทำให้แบคทีเรียกรดแล็กติกเจริญได้ช้า(Mustafaและ Seguin, 2003) จากรายงานของ Mustafa และคณะ (2003) พบว่าการหมักไซเลจด้วยถั่วเหลืองมีค่าความเป็นกรดเบสสูงที่สุดมากกว่า 4.5 แต่การเติมกากถั่วเหลืองจะช่วยเพิ่มค่าโปรตีนในไซเลจ และเพิ่มค่ากากใยที่สามารถย่อยได้ทำให้ไซเลจมีคุณค่าทางอาหารที่สมบูรณ์ยิ่งขึ้น (Pereira และคณะ, 2015)

จากการทดลองพบว่าไซเลจที่มีการเติมกากถั่วเหลืองมีปริมาณกรดรวมมากกว่าในไซเลจที่มีการเติมการน้ำตาลทั้งๆที่พบว่ามีค่าความเป็นกรดเบสที่สูงกว่าอาจเนื่องมาจากในการทดลองเป็นการหาปริมาณกรดรวม โดย Ni และคณะ (2017) กล่าวไว้ว่ากรดแล็กติกเป็นกรดแก่มีค่า pK_a สูงถึง 3.86 ซึ่งเป็นปัจจัยหลักที่ทำให้ค่าความเป็นกรดเบสลดลง และจากการทดลองของ Desta และคณะ (2016) พบว่าในชุดการทดลองที่เติมกากน้ำตาลจะมีกรดแล็กติกเป็นหลักทำให้ทีความเป็นกรดเบสที่ต่ำ เมื่อเทียบกับชุดที่ไม่มีการเติมกากน้ำตาลพบว่าจะมีปริมาณของกรดบิวทิริกที่สูงและค่าความเป็นกรดเบสที่สูงกว่า (Desta และคณะ, 2016) และค่าความเป็นกรดเบสที่สูงในตอนเริ่มอาจเนื่องมาจากเถ้าที่เป็นองค์ประกอบของกากถั่วเหลืองอยู่ถึง 5% (Kotha และคณะ, 2019)

การเติมหัวเชื้อแบคทีเรีย *L.casei* AN2 ทำให้มีปริมาณเซลล์แบคทีเรียกรดแล็กติกในตอนเริ่มต้นเพิ่มขึ้นประมาณ 10 เท่าโดยในช่วงแรกชุดการทดลองที่มีการเติมกากน้ำตาลจะมีจำนวนเซลล์ที่สูงกว่าในชุดที่มีการเติมกากถั่วเหลือง อาจเนื่องมาจากการเติมกากน้ำตาลเป็นการเพิ่มคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำได้ซึ่งจำเป็นต่อการเจริญของแบคทีเรียกรดแล็กติก (Baytok และคณะ, 2005) Nishino และคณะ (2011) รายงานว่าจำนวนเซลล์กรดแล็กติกมีปริมาณเพิ่มขึ้นเพิ่มขึ้นเมื่อมีการเติมกากน้ำตาล โดยเมื่อเข้าสู่วันที่ 7 ถึง 14 ทั้งชุดการทดลองที่เติมกากถั่วเหลือง และชุดการทดลองที่เติมกากน้ำตาลมีจำนวนเซลล์ของแบคทีเรียกรดแล็กติกค่อนข้างคงที่ที่ประมาณ 10^8 – 10^9 CFU/g แต่อาจจะมีจำนวนเซลล์ลดลงอีกจากรายงานของ Ni และคณะ (2017) ทั้งชุดการทดลองที่หมักเพียงถั่วเหลืองและมีการเติมกากน้ำตาล พบว่าแบคที่เรียกรดแล็กติกจะลกลงจนคงที่ประมาณ 10^6 CFU/g ตลอดทั้งการหมัก 60 วัน

จำนวนเซลล์ของแบคทีเรียคอลิฟอร์มปริมาณลดลงทั้งในชุดการทดลองที่เติมกากน้ำตาล และกากถั่วเหลือง เนื่องจากการลดลงของค่าความเป็นกรดเบสทำให้สามารถจำกัดการเจริญของแบคทีเรียคอลิฟอร์มได้ Tanaka และคณะ (1994) ได้ทำการคัดแยกสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแล็กติกสำหรับการหมักไซเลจพบว่าแบคทีเรียกรดแล็กติกสายพันธุ์ที่เจริญเติบโตได้เร็ว และผลิตกรดได้มากทำให้ไซเลจมีความเป็นกรดเบสต่ำจึงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียคอลิฟอร์มเช่นเดียวกับ หัวเชื้อแบคทีเรีย *L.casei* AN2 ที่สามารถผลิตกรดได้ในปริมาณมาก (Tanaka และคณะ, 1994) Kung และคณะ (1991) ทำการทดลองแสดงให้เห็นว่าการเติมหัวเชื้อแล็กติกแอซิดแบคทีเรียมีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียโคลิฟอร์มากกว่าการใช้สารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียคอลิฟอร์มในไซเลจ (Kung Jr และคณะ, 1991)

จำนวนเซลล์ของยีสต์และรามีปริมาณเพิ่มขึ้นในวันแรกของการหมักทั้งในไซเลจที่เติมกากน้ำตาล และกากถั่วเหลือง Stephanie และคณะ (2000) กล่าวไว้ว่าจำนวนของเซลล์ยีสต์สามารถเพิ่มจำนวนได้มากในอาทิตย์แรกของการหมักเนื่องจากปริมาณกรดในไซเลจยังคงมีไม่มากพอที่ควบคุมจำนวนเซลล์ยีตส์ได้ โดยหลังจากวันแรกเซลล์ยีตส์ค่อยๆลดลงในทุกชุดการทดลองจนมีปริมาณเซลล์ประมาณ 10^4 CFU/g

Ni และคณะ (2015) รายงานว่าการสูญเสียปริมาณของวัตถุแห้งในไซเลจเกิดการทำงานของเซลล์ยีตส์ที่ไม่สามารถควบคุมได้ และที่ค่าความเป็นกรดเบสสามารถควบคุมเซลล์ยีต์ให้มีปริมาณ 10^4 CFU/g ได้ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่สามารถควบคุมเซลล์ยีตส์ให้ทุกชุดการทดลองมีเซลล์ยีสต์ประมาณ 10^4 CFU/g ยกเว้นในชุดการทดลองที่มีการเติมกากน้ำตาลร่วมกับเติมหัวเชื้อแบคทีเรีย *L.casei* AN2 (1ML และ 2ML) ที่ตรวจไม่พบเซลล์ยีตส์ที่ระดับความเจือจาง 10^{-2} ในวันที่ 14

ถึงแม้ว่าในชุดการทดลองที่มีการเติมกากถั่วเหลืองจะมีระดับความเป็นกรดเบสที่สูงแต่ก็ยังสามารถควบคุมปริมาณของแบคทีเรียคอลิฟอร์ม และจำนวนของยีตส์และราได้ใกล้เคียงกับในชุดการทดลองที่เติมกากน้ำตาล เช่นเดียวกับ Lv และคณะ (2020) ในคณะที่ไซเลจมีระดับความเป็นกรดเบสที่ 4.2 ยังคงพบแบคทีเรียคอลิฟอร์มที่ 10^6 และพบยีตส์ที่ 10^4 (Lv และคณะ, 2020)

และจากการทดลองพบว่าไซเลจที่มีการเติมกากถั่วเหลืองเพียงอย่างเดียว (10S, 15S และ 20S) เริ่มมีกลิ่นที่ไม่พึ่งประสงค์หลังจากการหมักในวันที่ 5 ซึ่งอาจเกิดจากแบคทีเรียคลอสตริเดีย(Goudkovและ Sharpe, 1965) ที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นหลังจากที่ค่าความเป็นกรดเบสค่อยๆเพิ่มขึ้น ซึ่งในชุดการทดลองที่เติมกากน้ำตาลมีกลิ่นหอมเปรี้ยวอ่อนๆ

จากการทดลองหมักไซเลจหญ้าเนเปียร์โดยเติมกากน้ำตาล และกากถั่วเหลืองเป็นสารเสริมประสิทธิภาพและเติมกากน้ำตาล และกากถั่วเหลืองร่วมกับหัวเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติก *Lactobacillus casei* AN2 พบว่าการเติม 0.5%กากน้ำตาลจะช่วยให้การหมักไซเลจมีประสิทธิภาพที่ดีขึ้น และการเติมกากน้ำตาลร่วมกับหัวเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติก *L.casei* AN2 จะให้ประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น โดยการเติมเพียงหัวเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติก *L.casei* AN2 ก็สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการหมักไซเลจได้ เพราะทำให้ระดับความเป็นกรดเบสลดลง มีจำนวนเซลล์ของแบคทีเรียกรดแล็กติกสูง และสามารถควบคุมการเจริญของแบคทีเรียโคลิฟอร์ม และยีตส์ราที่เป็นจุลินทรีย์ที่พึ่งประสงค์ทำให้เกิดการเน่าเสีย แต่ในชุดการทดลองที่เติมกากถั่วเหลืองเป็นสามารถเสริมประสิทธิภาพเพียงอย่างเดียวไม่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการหมักของไซเลจได้เนื่องจากมีค่าความเป็นกรดเบสที่สูง และสุดท้ายเกิดการเน่าเสียของไซเลจอีกด้วย ดังนั้นการหมักไซเลจโดยเติมหัวเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติก *L.casei* AN2 และเติมหัวเชื้อร่วมกับกากน้ำตาลจะให้ประสิทธิภาพการหมักของไซเลจหญ้าเนเปียร์ดียิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

กรมพัฒนาที่ดิน. (2548). เอกสารวิชาการ ถั่วเหลือง. กลุมวิจัยและพัฒนาการอนุรักษ์ดินและน้ำพื้นที่พืชไร สำนักวิจัยและพัฒนาการจัดการที่ดิน

กรมปศุสัตว์. (2561-2565). แผนพัฒนายุทธศาสตร์กรมปศุสัตว์. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. ศูนย์บริหารวิชาการ สถาบันบัณฑิตพัฒนบริหารศาสตร์. กรุงเทพฯ

วีระพล แจ่มสวัสดิ์, ปรีชา อินนุรักษ์, สุรณีย์ เหล่าวัฒนกุล. (2554). การวิจัยเพื่อพัฒนาอาหารหยาบแห้งสำหรับใช้เลี้ยงโคสาวทดแทน, คณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก

ภคนิจ คุปพิทยานันท์, ศจีรา คุปพิทยานันท์.(2556). ระดับไอโซฟลาโวนในน้ำนมโค,สาขาวิชาสรีรวิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ญาณิน โอภาสพัฒนกิจ, วรียุทธอยู่บุญ, สุบรรณ ฝอยกลาง. (2559). ผลของการหมักต้นข้าวโพดสดโดยใช้สารเสริมชนิดต่างๆ ต่อ องค์ประกอบทางเคมี และการย่อยได้โดยใช้เทคนิคถุงไนล่อน, วารสารแก่นเกษตรปีที่ 44 ฉบับพิเศษ 2

ภัทยา นาปะเสริฐ. (2560). เอกสารประกอบการสอน รายวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืชอาหารสัตว์, คณะเทคโนโลยีมหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธาน

หญ้าหมัก. (2544). เอกสารคำแนะนำ, กองปศุสัตว์สำพันธุ์ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

Baytok, E., Aksu, T., KARSLI, M. A., Muruz, H. (2005). The effects of formic acid, molasses and inoculant as silage additives on corn silage composition and ruminal fermentation characteristics in sheep. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 29*(2), 469-474.

Broderick, G. A., Ricker, D. B., Driver, L. S. (1990). Expeller soybean meal and corn by-products versus solvent soybean meal for lactating dairy cows fed alfalfa silage as sole forage. *Journal of Dairy Science, 73*(2), 453-462.

Caballero, B., Trugo, L. C., Finglas, P. M. (2003). *Encyclopedia of food sciences and nutrition*: Academic.

Cato, E., George, W., Finegold, S. (1986). Genus Clostridium Prazmowski 1880, 23AL. 69. *Clostridium sporogenes*, 1191-1192.

Chen, L., Guo, G., Yuan, X., Shimojo, M., Yu, C., Shao, T. (2014). Effect of applying molasses and propionic acid on fermentation quality and aerobic stability of total mixed ration silage

prepared with whole-plant corn in Tibet. *Asian-Australasian journal of animal sciences, 27*(3), 349.

Claus, D., Berkeley, R. (1986). Genus Bacillus. 1105–1139. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2*.

Desta, S. T., Yuan, X., Li, J., Shao, T. (2016). Ensiling characteristics, structural and nonstructural carbohydrate composition and enzymatic digestibility of Napier grass ensiled with additives. *Bioresource Technology, 221*, 447-454.

Elferink, S., Driehuis, F., Gottschal, J. C., Spoelstra, S. F. (2000). Silage fermentation processes and their manipulation. *FAO Plant Production and Protection Papers*, 17-30.

Elwakeel, E. A., Titgemeyer, E. C., Cheng, Z. J., Nour, A. M., Nasser, M. E. (2012). In Vitro assessment of the nutritive value of expanded soybean meal for dairy cattle. *Journal of animal science and biotechnology, 3*(1), 10.

Esperance, M., Caceres, O., Ojeda, F., Perdomo, A. (1980). Fermentation characteristics, nutritive value and milk production potential of Pangola grass ensiled at two stages. *Pastos y Forrajes, 3*(1), 147-161.

Fijałkowska, M., Przemieniecki, S. W., Purwin, C., Lipiński, K., Kurowski, T. P., Karwowska, A. (2019). The effect of an additive containing three Lactobacillus species on the fermentation pattern and microbiological status of silage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*.

Goudkov, A., Sharpe, M. E. (1965). Clostridia in dairying. *Journal of Applied Bacteriology, 28*(1), 63-73.

Hammes, P. (1992). The genera lactobacillus and carnobacterium. *The Prokyatyotes*, 1535-1594.

Humphreys, L. R. (1991). *Tropical pasture utilisation*: Cambridge university press.

Jonsson, A. (1991). Growth of Clostridium tyrobutyricum during fermentation and aerobic deterioration of grass silage. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 54*(4), 557-568.

Kehler, W., Scholz, H. (1996). Botulismus des Rindes. *UBERSICHTEN ZUR TIERERNAHRUNG, 24*, 83-91.

Kotha, R. R., Natarajan, S., Wang, D., Luthria, D. L. (2019). Compositional Analysis of Non-Polar and Polar Metabolites in 14 Soybeans Using Spectroscopy and Chromatography Tools. *Foods, 8*(11), 557.

Kumar, R., Kaur, M., Garsa, A. K., Shrivastava, B., Reddy, V., Tyagi, A. (2015). Natural and Cultured Buttermilk. *Fermented milk and dairy products*, 203-225.

Kung Jr, L., Tung, R., Maciorowski, K. (1991). Effect of a microbial inoculant (Ecosyl™ and/or a glycopeptide antibiotic (vancomycin) on fermentation and aerobic stability of wilted alfalfa silage. *Animal feed science and technology, 35*(1-2), 37-48.

Liu, B., Yang, Z., Huan, H., Gu, H., Xu, N., Ding, C. (2020). impact of molasses and microbial inoculants on fermentation quality, aerobic stability, and bacterial and fungal microbiomes of barley silage. *Scientific Reports, 10*(1), 1-10.

Lv, H., Pian, R., Xing, Y., Zhou, W., Yang, F., Chen, X., Zhang, Q. (2020). Effects of citric acid on fermentation characteristics and bacterial diversity of Amomum villosum silage. *Bioresource Technology*, 123290.

McDonald, P., Henderson, A., Heron, S. (1991). *The biochemistry of silage*: Chalcombe publications.

Moran, J., Pullar, D., Owen, T., O'Kiely, P., O'Connell, M., Murphy, J. (1993). *The development of a novel bacterial inoculant to reduce mould spoilage and improve the silage fermentation in big bale silage.* Paper presented at the Silage Research 1993, Proc. 10th Int. Conf. Silage Res., Dublin, Ireland.

Mustafa, A., Seguin, P. (2003). Characteristics and in situ degradability of whole crop faba bean, pea, and soybean silages. *Canadian Journal of Animal Science, 83*(4), 793-799.

Ni, K., Wang, F., Zhu, B., Yang, J., Zhou, G., Pan, Y., . . . Zhong, J. (2017). Effects of lactic acid bacteria and molasses additives on the microbial community and fermentation quality of soybean silage. *Bioresource Technology, 238*, 706-715.

Oldenburg, E. (1991). Mycotoxins in conserved forage. *Landbauforschung Voelkenrode. Sonderheft (Germany, FR)*.

Pelhate, J. (1977). Maize silage: incidence of moulds during conservation. *Folia Veterinaria Latina, 7*(1), 1-16.

Pereira, A., Zeringue, L., Leonardi, C., Jenny, B., Williams, C., McCormick, M., Moreira, V. (2015). Substituting dry distillers grains with solubles and rumen-protected amino acids for soybean meal in late-lactation cows' diets based on corn silage or ryegrass silage. *Journal of Dairy Science, 98*(11), 8121-8127.

Randby, Å., Selmer-Olsen, I., Baevre, L. (1999). Effect of ethanol in feed on milk flavor and chemical composition. *Journal of Dairy Science, 82*(2), 420-428.

Raymond, F., Redman, P., Waltham, R. (1986). *Forage conservation and feeding*: Farming Press Ltd.

Savoie, P., Flipot, P., Tremblay, D., Thériault, R., Tremblay, G., Wauthy, J.-M. (1992). Effect of length of cut on quality of stack silage and milk production. *Canadian Journal of Animal Science, 72*(2), 253-263.

Schlegel, H. G., Zaborosch, C. (1993). *General microbiology*: Cambridge university press.

Tanaka, O., Kimura, H., Takahashi, E., Ogata, S., Ohmomo, S. (1994). Screening of lactic acid bacteria for silage inoculants by using a model system of silage fermentation. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 58*(8), 1412-1415.

Thomas, J. (1978). Preservatives for conserved forage crops. *Journal of Animal Science, 47*(3), 721-735.

Tjandraatmadja, M., Norton, B., Mac Rae, I. (1994). Ensilage characteristics of three tropical grasses as influenced by stage of growth and addition of molasses. *World Journal of Microbiology and Biotechnology, 10*(1), 74-81.

Van Os, M., Dulphy, J. (1996). Voluntary intake and intake control of grass silage by ruminants. *Role of ammonia and biogenic amines in intake of grass silage by ruminants*, 8.

Weinberg, Z., Ashbell, G., Hen, Y., Azrieli, A. (1993). The effect of applying lactic acid bacteria at ensiling on the aerobic stability of silages. *Journal of Applied Bacteriology, 75*(6), 512-518.

Wieringa, G. (1958). The effect of wilting on butyric acid fermentation in silage. *NJAS wageningen journal of life sciences, 6*(3), 204-210.

Wilkinson, J. (1983). Silages made from tropical and temperate crops Part 1 The ensiling process and its influences on feed value. *World Anim. Rev., 45*, 36-45.

Woolford, M. K. (1984). *The silage fermentation*: Marcel Dekker, Inc.

ภาคผนวก ก

การศึกษาผลการเสริมประสิทธิภาพการหมักไซเลจหญ้าเนเปียร์โดยใช้กากน้ำตาลและกากถั่วเหลือง

* ชุดการทดลองควบคุม (N), เติมหัวเชื้อแบคทีเรีย *L.casei* AN2 (L), เติมกากน้ำตาล (M), เติมกากถั่วเหลือง (S) และเติมกากน้ำตาลหรือกากถั่วเหลืองร่วมกับหัวเชื้อแบคทีเรีย *L.casei* AN2 (ML หรือ SL)

1.ระดับความเป็นกรดเบสของไซเลจหญ้าเนเปียร์ที่เติมกากน้ำตาลและกากถั่วเหลือง

ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ยระดับความเป็นกรดเบสของไซเลจที่เติมกากน้ำตาล

วันที่	ค่าเฉลี่ยระดับความเป็นกรดเบสของไซเลจที่เติมกากน้ำตาล							
	N	NL	0.5M	1M	2M	0.5ML	1ML	2ML
0	4.89	4.76	5.62	4.76	4.85	4.67	4.72	4.75
1	4.53	4.12	4.22	4.09	4.27	4.08	4.09	4.06
3	4.57	4.09	4.16	4.30	4.22	4.05	4.07	4.04
5	4.91	4.16	4.23	4.35	4.26	4.11	4.14	4.10
7	4.95	4.21	4.28	4.45	4.39	4.12	4.19	4.13
14	4.67	4.39	4.40	4.74	4.75	4.39	4.33	4.39

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยระดับความเป็นกรดเบสของไซเลจที่เติมกากถั่วหลือง

วันที่	ค่าเฉลี่ยระดับความเป็นกรดเบสของไซเลจที่เติมกากถั่วหลือง							
	N	NL	10S	15S	20S	10SL	15SL	20SL
0	4.89	4.76	5.46	5.76	5.98	5.46	5.66	5.77
1	4.53	4.12	4.61	4.61	4.68	4.58	4.45	4.45
3	4.57	4.09	4.56	4.40	4.41	4.40	4.18	4.31
5	4.91	4.16	4.51	4.43	4.41	4.49	4.22	4.31
7	4.95	4.21	4.73	4.59	4.46	4.47	4.35	4.37
14	4.67	4.39	5.19	5.06	4.80	5.33	4.83	4.71

2.ค่าเฉลี่ยปริมาณกรดรวมของไซเลจหญ้าเนเปียร์ที่เติมกากน้ำตาลและกากถั่วเหลือง

ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ยปริมาณกรดรวมของไซเลจหญ้าเนเปียร์ที่เติมกากน้ำตาล

วันที่	ค่าเฉลี่ยปริมาณกรดรวมของไซเลจหญ้าเนเปียร์ที่เติมกากน้ำตาล (mM)							
	N	NL	0.5M	1M	2M	0.5ML	1ML	2ML
0	6.83	10.67	9.67	8.83	19.50	8.67	9.00	11.17
1	40.00	59.17	54.17	62.50	56.67	56.67	46.67	75.00
3	50.00	66.67	66.67	65.00	71.67	74.17	75.00	83.33
5	40.00	75.00	79.17	70.83	75.00	70.83	79.17	79.17
7	58.33	77.50	66.67	62.50	75.00	75.00	83.33	81.67
14	83.33	83.33	95.83	95.83	91.67	95.83	104.17	95.83

ตารางที่ 4 ค่าเฉลี่ยปริมาณกรดรวมของไซเลจหญ้าเนเปียร์ที่เติมกากถั่วเหลือง

วันที่	ค่าเฉลี่ยปริมาณกรดรวมของไซเลจหญ้าเนเปียร์ที่เติมกากถั่วเหลือง (mM)							
	N	NL	10S	15S	20S	10SL	15SL	20SL
0	6.83	10.67	12.33	15.00	16.17	20.83	21.17	23.50
1	40.00	59.17	55.83	74.17	83.33	57.50	75.83	98.33
3	50.00	66.67	81.67	102.50	110.83	91.67	116.67	124.17
5	40.00	75.00	104.17	124.17	133.33	87.50	145.83	140.00
7	58.33	77.50	83.33	120.83	133.33	108.33	133.33	162.50
14	83.33	83.33	112.50	141.67	179.17	133.33	170.83	200.00

3.ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์กรดแล็กติกของไซเลจหญ้าเนเปียร์ที่เติมกากน้ำตาลและกากถั่วเหลือง

ตารางที่ 5 ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์กรดแล็กติกของไซเลจหญ้าเนเปียร์ที่เติมกากน้ำตาล

วันที่	ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์กรดแล็กติกของไซเลจหญ้าเนเปียร์ที่เติมกากน้ำตาล (CFU/g)							
	N	NL	0.5M	1M	2M	0.5ML	1ML	2ML
0	1.64×10^{6}	2.47×10^{7}	8.60×10^{6}	1.77×10^{6}	1.31×10^{6}	1.07×10^{7}	2.31×10^{7}	1.73×10^{7}
1	2.46×10^{8}	2.27×10^{8}	1.40×10^{8}	1.49×10^{8}	2.01×10^{8}	2.10×10^{9}	1.43×10^{9}	1.17×10^{10}
3	2.88×10^{9}	1.45×10^{10}	2.56×10^{9}	1.76×10^{8}	1.63×10^{9}	2.00×10^{10}	2.09×10^{11}	2.24×10^{11}
5	1.81×10^{9}	2.58×10^{9}	1.70×10^{9}	2.10×10^{9}	1.97×10^{9}	2.32×10^{9}	2.07×10^{9}	2.16×10^{9}
7	1.94×10^{10}	1.91×10^{9}	2.72×10^{9}	1.10×10^{9}	3.30×10^{9}	1.11×0^{9}	1.68×10^{9}	2.74×10^{9}
14	2.32×10^{8}	9.80×10^{8}	7.50×10^{8}	1.40×10^{8}	1.20×10^{8}	1.31×10^{8}	1.25×10^{8}	1.06×10^{8}

ตารางที่ 6 ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์กรดแล็กติกของไซเลจหญ้าเนเปียร์ที่เติมกากถั่วเหลือง

วันที่	ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์กรดแล็กติกของไซเลจหญ้าเนเปียร์ที่เติมกากถั่วเหลือง (CFU/g)							
	N	NL	10S	15S	20S	10SL	15SL	20SL
0	1.64×10^{6}	2.47×10^{7}	9.75×10^{6}	1.20×10^{6}	5.80×10^{6}	1.08×10^{7}	1.58×10^{7}	1.18×10^{7}
1	2.46×10^{8}	2.27×10^{8}	1.19×10^{8}	9.16×10^{8}	1.41×10^{9}	1.57×10^{9}	1.38×10^{9}	2.35×10^{10}
3	2.88×10^{9}	1.45×10^{10}	3.20×10^{9}	1.67×10^{8}	3.30×10^{9}	2.73×10^{9}	1.67×10^{9}	4.53×10^{8}
5	1.81×10^{9}	2.58×10^{9}	2.51×10^{8}	1.24×10^{8}	1.98×10^{7}	2.47×10^{8}	3.81×10^{10}	5.70×10^{8}
7	1.94×10^{10}	1.91×10^{9}	1.74×10^{8}	1.66×10^{8}	2.63×10^{8}	2.18×10^{8}	4.23×10^{8}	4.22×10^{8}
14	2.32×10^{8}	9.80×10^{8}	1.40×10^{8}	1.78×10^{8}	1.12×10^{8}	2.88×10^{8}	1.19×10^{8}	2.54×10^{8}

4.ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์คอลิฟอร์มแบคทีเรียของไซเลจหญ้าเนเปียร์ที่เติมกากน้ำตาลและกากถั่วเหลือง

ตารางที่ 7 ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์คอลิฟอร์มแบคทีเรียของไซเลจหญ้าเนเปียร์ที่เติมกากน้ำตาล

วันที่	ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์โคลิฟอร์มแบคทีเรียของไซเลจหญ้าเนเปียร์ที่เติมกากน้ำตาล (CFU/g)							
	N	NL	0.5M	1M	2M	0.5ML	1ML	2ML
0	4.00×10^5	4.75×10^5	3.00×10^5	4.34×10^5	4.1×10^5	5.68×10^5	3.75×10^5	3.04×10^5
1	2.93×10^5	4.20×10^3	1.47×10^4	5.9×10^4	1.21×10^4	7.6×10^3	1.5×10^3	4.00×10^3
3	1.93×10^3	3.55×10^3	4.32×10^3	2.4×10^3	3.93×10^3	3.78×10^3	1.45×10^3	3.00×10^3
5	2.11×10^3	2.74×10^3	1.00×10^3	3.96×10^3	4.3×10^3	3.14×10^3	3.00×10^3	2.57×10^2
7	2.03×10^3	2.06×10^2	2.71×10^3	1.55×10^3	2.03×10^2	ND	1.8×10^3	1.67×10^3
14	2.16×10^3	1.78×10^2	2.20×10^3	1.96×10^2	ND	ND	1.76×10^2	2.1×10^2

ตารางที่ 8 ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์คอลิฟอร์มแบคทีเรียของไซเลจหญ้าเนเปียร์ที่เติมกากถั่วเหลือง

วันที่	ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์คอลิฟอร์มแบคทีเรียของไซเลจหญ้าเนเปียร์ที่เติมกากถั่วเหลือง (CFU/g)							
	N	NL	10S	15S	20S	10SL	15SL	20SL
0	4.00×10^5	4.75×10^5	2.00×10^5	3.25×10^5	3.12×10^5	5.40×10^5	2.04×10^5	4.94×10^5
1	2.93×10^5	4.20×10^3	3.73×10^5	4.07×10^4	4.43×10^5	2.41×10^5	7.53×10^4	2.70×10^3
3	1.93×10^3	3.55×10^3	5.24×10^3	1.34×10^3	1.41×10^3	3.87×10^3	8.12×10^3	6.54×10^3
5	2.11×10^3	2.74×10^3	4.73×10^3	2.52×10^3	8.00×10^2	2.49×10^3	1.71×10^3	2.50×10^2
7	2.03×10^3	2.06×10^2	1.80×10^3	1.14×10^3	8.20×10^2	1.58×10^3	ND	2.43×10^3
14	2.16×10^3	1.78×10^2	3.35×10^3	3.22×10^3	1.52×10^3	4.16×10^3	ND	2.24×10^3

5.ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ยีตส์และราของไซเลจหญ้าเนเปียร์ที่เติมกากน้ำตาลและกากถั่วเหลือง

ตารางที่ 9 ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ยีตส์และราของไซเลจหญ้าเนเปียร์ที่เติมกากน้ำตาล

วันที่	ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ยีตส์และราของไซเลจหญ้าเนเปียร์ที่เติมกากน้ำตาล (CFU/g)							
	N	NL	0.5M	1M	2M	0.5ML	1ML	2ML
0	1.93×10^{6}	1.03×10^{6}	6.7×10^{6}	1.28×10^{7}	1.53×10^{7}	1.57×10^{7}	1.26×10^{7}	7.66*10^6
1	1.56×10^{8}	1.01×10^{7}	1.18×10^{8}	2.10×10^{8}	8.88×10^{8}	6.00×10^{6}	1.13×10^{7}	1.53×10^{7}
3	1.52×10^{5}	1.36×10^{6}	7.50×10^{5}	1.74×10^{5}	9.77×10^{5}	2.50×10^{3}	9.70×10^{5}	1.06×10^{5}
5	1.52×10^{5}	2.87×10^{5}	2.62×10^{5}	8.80×10^{5}	1.58×10^{5}	8.30×10^{3}	3.07×10^{5}	1.96×10^{4}
7	1.27×10^{5}	1.26×10^{4}	3.05×10^{5}	1.16×10^{5}	1.68×10^{5}	2.03×10^{5}	1.68×10^{5}	1.08×10^{3}
14	1.40×10^{4}	9.00×10^{3}	5.30×10^{3}	7.00×10^{3}	8.90×10^{3}	ND	ND	ND

ตารางที่ 10 ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ยีตส์และราของไซเลจหญ้าเนเปียร์ที่เติมกากถั่วเหลือง

วันที่	ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ยีตส์และราของไซเลจหญ้าเนเปียร์ที่เติมกากถั่วเหลือง (CFU/g)							
	N	NL	10S	15S	20S	10SL	15SL	20SL
0	1.93×10^{6}	1.03×10^{6}	8.55×10^{6}	1.04×10^{6}	7.66×10^{5}	7.44×10^{5}	8.00×10^{5}	9.22×10^{5}
1	1.56×10^{8}	1.01×10^{7}	1.32×10^{8}	2.10×10^{8}	2.66×10^{7}	1.26×10^{8}	2.43×10^{7}	7.50×10^{6}
3	1.52×10^{5}	1.36×10^{6}	1.45×10^{5}	2.93×10^{4}	1.92×10^{4}	2.51×10^{4}	1.76×10^{4}	8.00×10^{3}
5	1.52×10^{5}	2.87×10^{5}	1.83×10^{5}	9.50×10^{4}	9.00×10^{4}	2.16×10^{4}	1.04×10^{4}	8.88×10^{3}
7	1.27×10^{5}	1.26×10^{4}	1.38×10^{4}	1.80×10^{4}	2.33×10^{4}	2.30×10^{5}	2.93×10^{4}	2.50×10^{4}
14	1.40×10^{4}	9.00×10^{3}	8.00×10^{3}	2.03×10^{4}	1.40×10^{4}	5.83×10^{3}	5.44×10^{3}	1.25×10^{4}