ชื่อโครงการวิจัย : **สภาวะการหมักอาหารเหลวที่เหมาะสมสำหรับสุกร และคุณภาพของอาหารหมักที่ได้จากการศึกษาในห้องปฏิบัติการ**

: **Suitable Fermentation Situation of Liquid Feed for Pigs and *in vitro* Study for Feed Quality.**

บทที่ 1
บทนำ

จากปัญหาราคาสุกรหน้าฟาร์มและเนื้อสุกร ที่มีราคาแพงดังปรากฏเป็นข่าวตามสื่อต่างๆ เกือบทุกวันตั้งแต่ต้นปี 2551 เป็นต้นมา สาเหตุหลักคือจำนวนสุกรที่ลดลงมาก จากการเลิกเลี้ยงของผู้เลี้ยงรายย่อย และการสูญเสียสุกรอันเนื่องมาจากโรคระบบทางเดินอาหาร PED (Porcine Epidemic Diarrhea) ที่ทำให้เกิดท้องร่วงรุนแรงในลูกสุกรในช่วงเดือน พฤศจิกายน 2550 ถึง มกราคม 2551 ทำให้มีการสูญเสียลูกสุกรไป 5-6 แสนตัว (กรุงเทพธุรกิจ 16 มี.ค. 51) ถึงแม้สาเหตุของโรคจะเกิดจากเชื้อโคโรนาไวรัสซึ่งไม่มียารักษา แต่โรคแทรกซ้อนที่เกิดขึ้นคือการอักเสบในลำไส้และจากเชื้อแบคทีเรีย โดยเฉพาะ *E.coli* ทำให้เกิดการสูญเสียลูกสุกรอย่างรวดเร็วเป็นจำนวนมาก อย่างไรก็ตามปริมาณการเลี้ยงสุกรโดยรวมเปลี่ยนแปลงไม่มาก เนื่องจากผู้เลี้ยงรายใหญ่สามารถเพิ่มการผลิตได้มาก แต่จำนวนผู้เลี้ยงสุกรรายย่อย หรือฟาร์มขนาดเล็กมีแนวโน้มลดลงมาก ซึ่งมีสาเหตุหลักมาจากต้นทุนค่าอาหารสัตว์ที่เพิ่มมากขึ้นไม่ต่ำกว่า 30% ในปี 2551 เมื่อเทียบกับปีเดือน กุมภาพันธ์ 2549 (กรุงเทพธุรกิจ 16 มี.ค. 51) ตามสภาวะราคาของน้ำมันเชื้อเพลิงที่ใช้สำหรับการขนส่งที่เพิ่มมากขึ้น และสินค้าเกษตรในกลุ่มพืชพลังงานและพืชน้ำมัน ทั้งกากถั่วเหลือง ปลายข้าว ข้าวโพด มีราคาแพงขึ้น อีกสาเหตุหนึ่งมาจากการที่โลกหันไปให้ความสำคัญกับการพัฒนาพลังงานเชื้อเพลิง เพื่อทดแทนน้ำมันดิบที่มีปริมาณลดลงเรื่อยๆ ทำให้ราคาวัตถุดิบอาหารสัตว์แพงขึ้น ทำให้ผู้เลี้ยงสุกรส่วนใหญ่ไม่สามารถแบกรับภาระต้นทุนค่าอาหารสัตว์ได้ก็ต้องเลิกเลี้ยงไปในที่สุด โดยแท้ที่จริงแล้วเกษตรกรส่วนใหญ่ จะมีอาชีพปลูกพืชเป็นหลักอยู่แล้ว จึงมีวัตถุดิบอาหารสัตว์ตามธรรมชาติอยู่มากมาย เพียงแต่จำเป็นต้องศึกษารูปแบบการนำมาใช้เป็นอาหารสุกรที่เหมาะสมให้ประโยชน์สูงสุด เพราะสุกรเป็นสัตว์กระเพาะเดี่ยว ไม่เหมือนกับโคกระบือที่กินหญ้าก็โตได้ ทำให้การเลี้ยงสุกร ต้นทุนมากกว่า 70% เป็นต้นทุนค่าอาหาร นอกจากนี้จากปัญหาเรื่องโรคในระบบทางเดินอาหารของสุกร ส่งผลกระทบอย่างมากต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกร ทำให้นักวิชาการอาหารสัตว์ต่างๆ ทั่วโลกพยายามที่จะศึกษาวิจัยเพื่อหาแนวทางที่เหมาะสมในการป้องกัน เพราะการใช้ยาปฏิชีวนะในการผสมลงไปในอาหารเพื่อป้องกันโรคระบบทางเดินอาหาร หรืออีกนัยหนึ่งก็คือ การกระตุ้นการเจริญเติบโตให้สุกร ไม่สามารถทำได้อีกต่อไป จึงมีการผลิตสินค้าในกลุ่มสารเสริมในอาหารชนิดต่างๆ ออกมาจำหน่ายมากมายหลายชนิด เช่น โพรไบโอติค พรีไบโอติค กรดอินทรีย์ เอนไซม์ สมุนไพรในรูปแบบต่างๆ สิ่งเหล่านี้ ล้วนเป็นการเพิ่มต้นทุนค่าอาหารสัตว์แทบทั้งสิ้น ดังนั้นแนวทางที่ควรศึกษาวิจัยเชิงวิชาการ ในการนำมาวัสดุอาหารสัตว์หรืออาหารผสม มาผ่านกระบวนการหมักที่เหมาะสม และนำไปใช้ได้อย่างถูกวิธี เพื่อเพิ่มคุณค่าทางอาหารให้กับสุกรที่พอเหมาะกับความต้องการทางพันธุกรรม และระยะของการเจริญเติบโต โดยไม่จำเป็นต้องเพิ่มเติมวัสดุอาหารเสริมใดๆ ลงไป

การใช้อาหารหมักที่เหมาะสม สามารถส่งเสริมสุขภาพทางเดินอาหารของสุกร จากจุลินทรีย์ที่เกิดจากการบวนการหมัก โดยเฉพาะ Lactic acid bacteria ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติค ความเป็นกรดที่เกิดจากกรดแลคติคที่จุลินทรีย์สังเคราะห์จากการเปลี่ยนอาหารคาร์โบไฮเดรต ซึ่งจัดได้ว่าเป็นกรดอินทรีย์เป็นตัวช่วยกระตุ้นความอยากอาหาร ทำให้ความเป็นกรดในระบบทางเดินอาหารเพิ่มมากขึ้น (หรือ pH ลดต่ำลง) ทำให้การย่อยสารอาหารต่างๆ ได้ดีขึ้น สุกรสุขภาพดี ลดการใช้ยาในฟาร์มได้ และไม่ต้องกังวลกับการตกค้างของยาในเนื้อสุกร ที่จะส่งผลไม่ดีต่อผู้บริโภคได้ เพราะอาหารหมักไม่สามารถใช้ยาปฏิชีวนะเสริมในอาหารได้ ซึ่งเป็นการช่วยให้ผู้เลี้ยงสุกรรายเล็ก

รายย่อย สามารถลดต้นทุนการผลิตได้ ดังนั้นวัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย คือ ศึกษาสภาวะที่เหมาะสำหรับผลิตอาหารหมักเหลวเลี้ยงสุกร

\

บทที่ 2
การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

2.1 การหมัก (Fermentation)

การหมักในแง่ของชีวเคมี หมายถึงกระบวนการที่สารประกอบอินทรีย์ (โดยเฉพาะคาร์โบไฮเดรต) ถูกย่อยสลายทำให้ได้พลังงาน โดยที่ไม่เกี่ยวข้องกับตัวรับอิเล็คตรอนตัวสุดท้ายเช่นออกซิเจน ปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เกิดขึ้นบางส่วนทำให้ได้พลังงานจาก ATP เพียงเล็กน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับพลังงานที่ได้จากปฏิกิริยาที่มีตัวรับอิเล็คตรอนตัวสุดท้ายเข้ามาเกี่ยวข้องสารประกอบต่าง ๆ ที่สร้างขึ้นจากจุลินทรีย์มีความแตกต่างกันอย่างมาก ขึ้นอยู่กับจุลินทรีย์แต่ละชนิดและเกิดจากปฏิกิริยาที่แตกต่างกันภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ (ธีรพร, 2546)

ประเภทของกระบวนการหมักอาหาร กระบวนการหมักอาหาร แบ่งเป็นประเภทต่างๆ ได้ดังนี้

1) กระบวนการหมักอาหารที่เป็นกรด (Acid food fermentations) ได้แก่ ผลิตภัณฑ์น้ำนมหมัก เช่นเนยแข็ง เนยเหลว โยเกิร์ต และคีเฟอร์ (kefir) ผลิตภัณฑ์ผักหมักเช่น กะหล่ำปลีหมัก (Sauerkraut) มะกอกและผักดองอื่นๆ ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์หมักเช่น เนื้อหมักกึ่งแห้ง ได้แก่ Cerevilat และเนื้อหมักชนิดแห้งเช่น ซาลามีและเพบเพอโรนี รวมทั้งผลิตภัณฑ์ขนมอบเช่นขนมปังเปรี้ยว (Sourdough breads) เป็นต้น ผลิตภัณฑ์อาหารหมักชนิดที่เป็นกรดนี้ส่วนใหญ่ผลิตโดยใช้แบคทีเรียแลคติค ในปัจจุบันการผลิตส่วนใหญ่ใช้สตาร์ทเตอร์ ยกเว้นการผลิตกะหล่ำปลีหมัก ซึ่งกระบวนการดังกล่าวยังใช้เชื้อแบคทีเรียแลคติคที่ปนเปื้อนจากธรรมชาติบนใบของกะหล่ำปลี ในบางครั้งการหมักประเภทนี้ต้องเติมน้ำตาลลงไปเพื่อปรับให้มีปริมาณที่พอเหมาะต่อการเจริญของแบคทีเรียแลคติค โดยเฉพาะในวัตถุดิบที่มีปริมาณน้ำตาลต่ำ นอกจากนั้นยังอาจเติมเกลือ เพื่อยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทั่วไปที่ทำให้ กระหล่ำปลีหมักเสื่อมเสียและทำให้แบคทีเรียแลคติคเจริญได้ดีขึ้น ในส่วนของวัตถุดิบ อาจนำไปพาสเจอไรส์เพื่อทำลายเชื้อโรค และลดเชื้อจุลินทรีย์ตามธรรมชาติเริ่มต้น ที่อาจเจริญแข่งขันกับแบคทีเรียแลคติคที่ใช้เป็นสตาร์ทเตอร์ได้
2) กระบวนการหมักโดยยีสต์ (Yeast fermentations) ยีสต์มีความสำคัญในกระบวนการหมัก เนื่องจากสามารถสร้างคาร์บอนไดออกไซด์และเอธานอล สำหรับคาร์บอนไดออกไซด์นั้นเป็นผลิตผลจากเมตาโบลิซึมที่สำคัญและใช้ในการผลิตขนมอบทำให้ขึ้นฟู ส่วนเอธานอลเป็นผลิตผลที่ได้จากการผลิตเบียร์ ไวน์และสุรา ทั้งคาร์บอนไดออกไซด์รวมทั้งตัวเซลล์ยีสต์เองเป็นผลิตผลพลอยได้ ที่สำคัญในการผลิตเบียร์
3) กระบวนการหมักในสภาวะของแข็ง (Solid state fermentations) กระบวนการหมักประเภทนี้เกี่ยวข้องกับการใช้วัตถุดิบเริ่มต้นที่เป็นของแข็งมาใช้ในกระบวนการหมัก แล้วจึงเติมจุลินทรีย์เข้าไป โดยจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ที่ใช้คือเชื้อรา ตัวอย่างเช่นในกระบวนการผลิตโคจิ และในขั้นตอนที่สองของกระบวนการหมักเทมเป้
4) กระบวนการหมักอาหารวิธีดั้งเดิมและอาหารหมักของชาวตะวันออก อาหารหมักในกลุ่มนี้มีมากมายหลายชนิดแตกต่างกันไปตามพื้นที่หรือประเทศ โดยเฉพาะในแถบทวีปเอเชียและแอฟริกา ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่มักไม่เป็นที่รู้จักในประเทศตะวันตก ในกระบวนการหมักอาหารดังกล่าวมีการใช้แบคทีเรียแลคติคบ้าง แต่มักใช้ยีสต์และเชื้อราเป็นส่วนใหญ่ รวมทั้งเป็นกระบวนการหมักในสภาวะของแข็ง ระดับการผลิตของผลิตภัณฑ์หมัก มักจะทำการผลิตในระดับครัวเรือน แต่มีการผลิตในระดับอุตสาหกรรมขนาดใหญ่เพียงเล็กน้อย (ธีรพร, 2546)

2.2 จุลชีววิทยาของกระบวนการหมักอาหารที่เป็นกรด

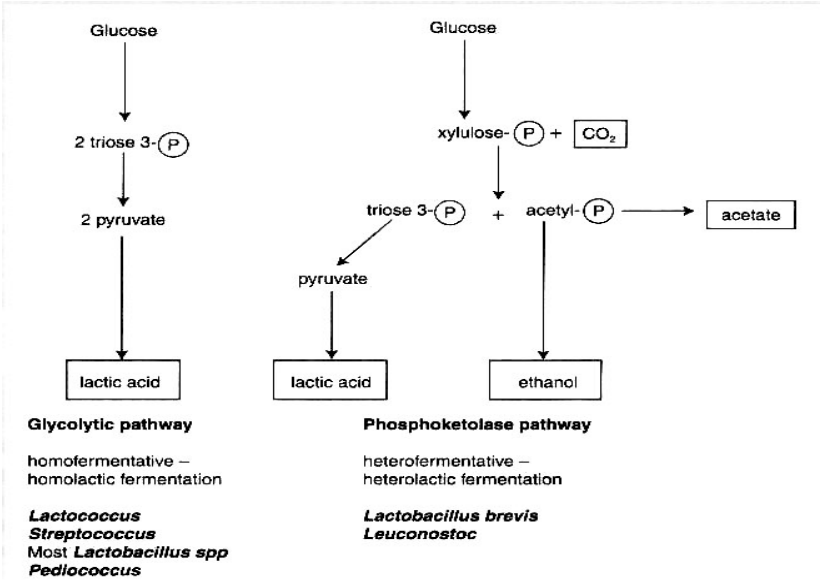
การผลิตผลิตภัณฑ์อาหารหมักที่เป็นกรดขึ้นอยู่กับความสามารถของแบคทีเรียแลคติค ในการหมักคาร์โบไฮเดรตทำให้ได้กรดแลคติค แบคทีเรียแลคติคชนิดมีโซไฟล์ (mesophiles) ที่นำมาใช้ได้แก่ *Lactococcus, Leuconostoc*, *Lactobacillus* และ *Pediococcus* โดยอุณหภูมิที่ใช้หมักอยู่ระหว่าง 20 – 30 องศาเซลเซียส ส่วนแบคทีเรียแลคติคชนิดเทอร์โมไฟล์ (thermophiles) เช่น *Lactobacillus* spp. และ *Streptococcus* spp. จะใช้หมักที่อุณหภูมิสูง เช่นที่ 45 องศาเซลเซียส (อารีรัตน์, 2546)

แบคทีเรียแลคติค (Lactic acid bacteria : LAB) แลคติคแอซิดแบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์ชนิดอิงอาศัย (Epiphytic bacteria) พบอยู่ทั่วไปตามชิ้นส่วนของพืช โดยจะเพิ่มจำนวนในระหว่างการเก็บเกี่ยวและการหมักพืช ซึ่งในระหว่างการหมักจะมีการแข่งขันกับจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ โดยจะมีมากน้อยแค่ไหนขึ้นอยู่กับลักษณะของพืช ปริมาณวัตถุแห้ง ปริมาณและองค์ประกอบของน้ำตาลที่มีอยู่ในพืช รวมทั้งคุณสมบัติเฉพาะของ LAB เช่น ความทนต่อกรดและแรงดันออสโมซีส (Osmotic pressure) เป็นต้น

ชนิดของ LAB ที่เกี่ยวข้องกับการหมัก ได้แก่ *Lactobacillus*, *Pediococcus, Leuconostoc, Enterococcus, Lactococcus* และ *Streptococcus* แบคทีเรียเหล่านี้สามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 5 ถึง 50 องศาเซลเซียส สามารถทำให้พืชหมักมีค่า pH เท่ากับ 4-5 ได้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดและลักษณะของพืชที่ใช้ LAB ทุกชนิดสามารถเจริญได้ทั้งในสภาพที่ไม่มีก๊าซออกซิเจน (Obligative anaerobic) และมีก๊าซออกซิเจน (Facultative anaerobic) เมื่อพิจารณาถึงการใช้ประโยชน์จากน้ำตาลของ LAB สามารถจะจำแนกได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ๆด้วยกัน คือ

1) Obligative homofermenter หมายถึงแบคทีเรียพวกที่หมักแล้วได้ผลผลิตเป็นกรดแลคติคเพียงอย่างเดียวในสภาพที่ไม่มีออกซิเจน ได้แก่ *Pediococcus damnosus* และ *Lactobacillus ruminis* แบคทีเรียในกลุ่มนี้ สามารถผลิตกรดแลคติคได้มากกว่า 85% จากน้ำตาล hexose (น้ำตาลที่มีคาร์บอนอยู่ 6 อะตอม หรือ C_6 sugar) เช่น กลูโคส แต่ไม่สามารถย่อยสลายน้ำตาล pentose (น้ำตาลที่มีคาร์บอนอยู่ 5 อะตอม หรือ C_5 sugar) เช่น xylose ได้
2) Facultative heterofermenter หมายถึงแบคทีเรียพวกที่หมักแล้วให้ผลผลิตเป็นกรดแลคติค ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และกรดอะซิติค หรือเอธานอล ได้ทั้งในสภาพที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน ได้แก่ *Lactobacillus plautarum*, *L. pentosus*, *Pediococcus acidilactici*, *P. pentosaceus* และ *Enterococcus faecium* แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถผลิตกรดแลคติคจากน้ำตาล hexose ได้ และสามารถใช้น้ำตาล pentose ได้เล็กน้อย
3) Obligative heterofermenter หมายถึงแบคทีเรียพวกที่หมักแล้วให้ผลผลิตเป็นกรดแลคติค ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และกรดอะซิติค หรือเอธานอล ได้ในสภาพที่ไม่มีออกซิเจน ได้แก่ แบคทีเรียในกลุ่มของ *Leuconostoc* และกลุ่มของ *Lactobacillus* บางชนิด เช่น *Lactobacillus brevis* และ *Lactobacillus buchneri* แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถใช้น้ำตาล hexose และ pentose ได้ดี (อารีรัตน์, 2546)

เมตาโบลิซึมของแบคทีเรียแลคติค โดยทั่วไปสามารถแบ่งประเภทของแบคทีเรียแลคติคตามวิถีเมตาโบลิซึมที่ใช้ในการย่อยสลายสารคาร์โบไฮเดรตและปลดปล่อยพลังงานทำให้ได้ผลิตภัณฑ์หมักเป็นผลพลอยได้ออกเป็น 2 ประเภท คือ แบคทีเรียโฮโมแลกติก (homolactic bacteria) ซึ่งสร้างกรดแลคติคเป็นผลิตผลหลักและแบคทีเรียเฮทเทอโรแลคติค (heterolactic bacteria) ซึ่งสร้างสารอื่นๆ นอกเหนือจากกรดแลคติค เช่น กรดอะซิติก คาร์บอนไดออกไซด์ และเอธานอล วิถีเมตาโบลิซึมของ LAB ทั้งสองประเภท แสดงดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 วิถีเมตาโบลิซึมที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมักจนได้กรดแลคติค

แบคทีเรียแลคติคมีความสำคัญต่อการสร้างสารอินทรีย์อื่นๆ ที่ทำให้เกิดกลิ่น รสเฉพาะของผลิตภัณฑ์หมักนอกเหนือจากกลิ่นรสของกรดแลคติค แม้ว่าสารชนิดอื่นๆที่แบคทีเรียนี้สร้างขึ้นอาจมีปริมาณน้อย แต่เมื่อผสมรวมกันแล้วทำให้เกิดกลิ่นรสที่เฉพาะ เช่นการใช้ *Lactococcus* var. *diacetylactis* และ *Leuconostoc* spp. ซึ่งจะสามารถเปลี่ยนซิเตรท (citrate) ไปเป็นไดอะเซทิล (diacetyl) ซึ่งเป็นกลิ่นรสหลักของเนยแข็งคอทเทจ (cottage cheese) ควาร์ก (quark) และเนยบัตเตอร์ (butter) หรือกลิ่นรสของโยเกิร์ตที่เกิดจากการสร้างอะซิตัลดีไฮด์ (acetaldehyde) โดย *Lactobacillus delbreukii* subsp. *bulgaricus* เป็นต้น แบคทีเรียที่ใช้เป็นสตาร์ทเตอร์ในการผลิตผลิตภัณฑ์ที่ให้รสชาติและกลิ่นรสที่เฉพาะ เรียกว่า aroma bacteria นอกจากนั้นแบคทีเรียแลคติคบางชนิดจะสร้างสารโพลิเมอร์ (polymers) หรือสารเมือก (slime) ซึ่งจะทำให้ได้ลักษณะเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ (ธีรพร, 2546)

2.3 กระบวนการหมักอาหารสำหรับสุกร

การผสมอาหารกับน้ำให้อยู่ในรูปเปียก จะเกิดกระบวนการหมักเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว (Canibe and Jensen, 2003) Pedersen and Lindberg (2003) ศึกษาการหมักในห้องปฏิบัติการ พบว่าช่วยปรับปรุงการย่อยได้ของสารอินทรีย์ในอาหาร และโปรตีน รวมทั้งดีกว่าอาหารที่ผ่านการทำให้สุกด้วยความร้อน (Hong and Linberg, 2007) นอกจากนี้ ตามที่ทราบกันดีอยู่แล้วว่า ในวัตถุดิบอาหารสัตว์ โดยเฉพาะกลุ่มธัญพืช จะมีฟอสฟอรัสที่อยู่ในรูปไฟเตท หรือ อิโนซิทอลเฮกซะฟอสเฟต (inositol hexaphosphate; IP_6) เป็นองค์ประกอบอยู่เป็นส่วนใหญ่ ซึ่งตัวของสัตว์เองไม่สามารถใช้ประโยชน์ฟอสฟอรัสในรูปดังกล่าวได้ ทำให้ต้องมีการเสริมเอนไซม์ไฟเตสในอาหาร เพื่อดึงเอาฟอสฟอรัสในวัตถุดิบอาหารสัตว์ออกมาใช้ อย่างไรก็ตามผลดีจากการหมักอาหารก่อนให้สุกรกินซึ่งจุลินทรีย์ในอาหารทั้งจุลินทรีย์กลุ่มผลิตกรดแลคติค และยีสต์ที่พบในอาหารหมัก (Jensen and Mikkelsen, 1998) สามารถแตกตัว IP_6 (Lyberg et al., 2005) ทำให้สุกรสามารถใช้ประโยชน์ฟอสฟอรัสได้มากขึ้น

อุณหภูมิสำหรับอาหารหมักเหลว มีผลต่อระยะเวลาในการหมักอาหารและความเข้มข้นของกรดแลคติคในอาหาร Lyberg et al. (2005) ทดสอบการหมักอาหารเหลวซึ่งประกอบด้วยธัญพืชผสม ข้าวสาลี ข้าวบาเล่ย์ และไตรติเคล (triticale) โดยมีแหล่งที่แตกต่างกัน 3 ชนิด ได้แก่หางนม (whey) ส่าเบียร์เปียก (wet wheat distillers'grain (DDG) และน้ำ ซึ่งพบว่า การหมักอาหารทั้ง 3 ที่อุณหภูมิ 10 C° ทำให้ pH ลดลงถึง 4 ในวันที่ 5 ของการหมัก โดยการหมักที่อุณหภูมิสูง (20 C°) มีผลทำให้ pH ลดลงถึง 4 เร็วกว่าที่อุณหภูมิต่ำกว่า นอกจากนี้ยังพบอีกว่า จำนวน LAB มากที่สุดเมื่อหมักด้วยน้ำที่อุณหภมิสูง รวมทั้งมีปริมาณกรดอินทรีย์เพิ่มขึ้น ตามอุณหภูมิการหมักที่เพิ่มขึ้น และไม่พบ *Enterobacteriaceae* จากการหมักด้วยน้ำในทุกสภาพอุณหภูมิ (10, 15 หรือ 20 C°) แต่อย่างใด แสดงให้เห็นว่า การหมักธัญพืชผสมด้วยน้ำเพียงอย่างเดียว สามารถนำมาใช้เป็นอาหารสุกรได้อย่างปลอดภัย และการหมักที่อุณหภูมิสูงให้ผลเร็วกว่าที่อุณหภูมิต่ำ ซึ่งเช่นเดียวกับที่เคยมีรายงานไว้ว่า ถ้าหมักอาหารที่อุณหภูมิ 20 °C ต้องใช้เวลาในการหมักถึง 96 ชั่วโมง หรือ 4 วัน ถึงจะให้ปริมาณกรดแลคติคใกล้เคียงกับเมื่อหมักที่อุณหภูมิ 37 °C ที่ใช้เวลาในการหมักเพียง 48 ชั่วโมง หรือ 2 วัน (ความเข้มข้นของกรดแลคติค 229-254 nM) และจากรายงานนี้ ของ Beal et al. (2001) พบว่าการมีชีวิตรอดของ *E.coli* ในอาหารหมัก ที่อุณหภูมิ 20 °C มีชีวิตรอดอยู่ได้ 3-6 ชั่วโมง แต่อาหารหมักที่อุณหภูมิ 37 °C เมื่อใส่เชื้อ *E.coli* เข้าไปในอาหาร พบว่าเชื้อไม่สามารถมีชีวิตรอดอยู่ได้ นอกจากนี้การที่ pH ในอาหารต่ำ ช่วยในการกระตุ้นการย่อยโปรตีน เนื่องจากการทำงานของเอนไซม์เปบซิน จะทำงานได้ดีที่สภาพ pH ในกระเพาะต่ำ การเคลื่อนที่ของอาหารในกระเพาะจะช้าลง ทำให้เอนไซม์สามารถทำการย่อยได้นานขึ้น นอกจากนี้การที่อาหารมี pH ต่ำที่เกิดจากการหมักยังเป็นการช่วยลดจุลินทรีย์ที่เป็นโทษ เช่น *Coliforms* และ *Salmonella* spp. ในอาหารของสุกรได้อีกด้วย (Russell et al., 1996; Scholten et al., 1999; Van Winsen et.al., 2001) รวมทั้งช่วยคงสภาพของผนังเซลล์ภายในลำไส้เล็กของลูกสุกรหลังหย่านม ทำให้การดูดซึมสารอาหารได้ดี (Scholten et.al., 2002) สุกรที่กินอาหารหมักจะได้รับ Lactic acid bacteria ประมาณ 3.6 X 10^9 $cfug^{-1}$ (Mikkelsen and Jensen, 1998) ซึ่งในทางวิชาการอาหารสัตว์ มักมีการใช้ Lactic acid bacteria ในรูปของสารโพรไบโอติค (Probiotic) ที่เรียกว่า "สารเสริมจุลินทรีย์มีชีวิต" ซึ่งช่วยปรับปรุงให้จุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารมีความสมดุล อย่างไรก็ตามการใช้โพรไบโอติคเสริมในอาหารสัตว์ ไม่สามารถนำมาเปรียบเทียบกับการใช้อาหารหมักได้ เนื่องจากการหมัก มีทั้งส่วนที่เป็นจุลินทรีย์มีชีวิต และผลผลิตในรูปกรดอินทรีย์ ซึ่งให้ผลดีโดยรวมต่อระบบทางเดินอาหารทั้งสิ้น ในอาหารคนมีการใช้กรดแลคติค เพื่อกระตุ้นความอยากอาหาร (Schelef, 1994) เช่นเดียวกับในสุกร เมื่อเสริมกรดแลคติคในอาหารเหลว ช่วยให้ปริมาณการกินอาหารดีขึ้น รวมถึงมีอัตราการเจริญเติบโตที่ดีขึ้น (Roth et al., 1993; Jongbloed and Jongbloed, 1996)

กลุ่มจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลคติค หรือที่เรียกว่า Lactic acid bacteria (LAB) เป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดแลคติคได้ จากการเปลี่ยนน้ำตาลหรือคาร์โบไฮเดรต โดยผ่านกระบวนการที่เรียกว่าการหมัก โดยกลุ่มที่สำคัญ ได้แก่ *Lactobacillus, Leuconostoc, Pediococcus* และ *Streptococcus* ซึ่งสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิตั้งแต่ 5-45 °C สามารถทนสภาพกรดได้ดี โดยเกือบทุกชนิด สามารถเจริญได้ที่ pH 4.4 มีการใช้ LAB เป็นโพรไบโอติคในอาหารหมักสำหรับมนุษย์มาตั้งแต่สมัยโบราณ วัตถุประสงค์เพื่อการถนอมอาหาร และให้ประโยชน์ต่อสุขภาพ รวมทั้งมีการผลิตในทางการค้ามานับพันปีแล้ว Metchnikoff (1907) ได้รายงานถึงประโยชน์ต่อสุขภาพที่เชื่อมโยงถึงการบริโภคน้ำนมหมัก ซึ่งเขาได้ทำการวิจัยแล้วโดยให้ชื่อว่า "Bulgarian bacillus" ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ ที่หมายถึง *Lactobacillus delbreuckii* ssp. *bulgaricus* ซึ่งเป็นหัวเชื้อหมักเริ่มต้นที่เป็น LAB ของโยเกิร์ต หลังจากนั้นมา ก็มีการนำ Lactobacilli มาใช้เป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติคอย่างต่อเนื่องตลอดมา และในปัจจุบันมีการนำจุลินทรีย์อีกหลายชนิดมาใช้เป็นโพรไบติคสำหรับอาหารคน เช่น *L. delbreuckii* ssp. *bulgaricus*, *L. acidophilus, L. casei, L. fermentum, L. plantarum, L. brevis, L. lactis* และ *L. reuteri* (Naidu and Clemens, 2000) ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ จุลินทรีย์ที่เป็นตัวช่วยในการปรับสมดุลในระบบทางเดินอาหารเป็นสิ่งสำคัญ (Kurti and Hansen, 2007) ตัวอย่างจุลินทรีย์กลุ่มดังกล่าวที่มีการนำมาใช้ เช่น *Lactobacillus spp., Bifidobacteria*

spp, หรือ *Enterococcus faecium* ที่สามารถสร้างโคโลนีในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ เช่น ในสุกร เป็นต้น และสามารถแข่งขัน และลดปริมาณจุลินทรีย์ก่อโรค เช่น *Escherichia coli.* นอกจากนี้ยังมี yeasts, streptococci, และ *E.coli* ที่ไม่ก่อโรค ซึ่งชนิดที่มีการนำมาใช้มากที่สุดคือ lactobacilli และสามารถแยกได้อย่างน้อย 7 ชนิดที่ให้ผลดีต่อระบบทางเดินอาหาร เนื่องจากสามารถผลิตกรดแลคติคได้ในปริมาณมาก ทำให้สภาพแวดล้อมในระบบทางเดินอาหารมีสภาพเป็นกรดมีส่วนในการป้องกันการเกิด *E.coli* ชนิดที่ก่อโรคโดยในสภาวะปกติของระบบทางเดินอาหารสุกร จะมีจุลินทรีย์มากกว่า 400 ชนิดที่ทำหน้าที่ในการป้องกันโรค และจุลินทรีย์ที่มีความจำเพาะบางชนิดมีหน้าที่จำเพาะต่อจุลินทรีย์ก่อโรคบางชนิด ดังนั้นจึงเชื่อกันว่าโพรไบโอติคทำหน้าที่หลักๆ ดังต่อไปนี้คือ

1) เจือจางสารพิษที่เกิดขึ้นในระบบทางเดินอาหาร
2) ป้องกันการจับตัวของจุลินทรีย์ก่อโรคกับเซลล์ผนังลำไส้เล็ก ในลักษณะการแข่งขันกัน
3) กระตุ้นภูมิคุ้มกันเฉพาะส่วน
4) ลดจำนวนจุลินทรีย์ก่อโรคในลักษณะการแข่งขันกัน

ประโยชน์ของโพรไบโอติค ทางด้านการเพิ่มภูมิต้านทานโรค Fuller (2007) สรุปไว้เป็น 3 แนวทางหลักคือ (1) เพิ่มการทำงานของ macrophage โดยแสดงให้เห็นในลักษณะของสามารถเพิ่มศักยภาพ ในการเข้าทำลายเชื้อโรค (2) การเพิ่มผลผลิตของระบบภูมิคุ้มกัน ได้แก่การเพิ่มขึ้นของอิมมิวโนกอร์บบิวลิน ในกลุ่ม IgG และ IgM และ Interferon (สารต่อต้านไวรัสแบบไม่จำเพาะเจาะจง) และ (3) เพิ่มแอนติบอดี้ เฉพาะส่วนบริเวณเยื่อบุผนังลำไส้เล็ก ซึ่งมักจะเป็น IgA

ตามรายงานของ Van Winsen et al. (2001a) แนะนำไว้ว่า อาหารหมักเหลวควรมีปริมาณ กรดแลคติคที่เพียงพอ เพื่อต่อต้านจุลินทรีย์ก่อโรค ดังนั้นการหมักอาหารควรได้อาหารหมักที่มีคุณสมบัติดังต่อไปนี้คือ

(1) pH ต่ำกว่า 4.5

(2) ความเข้มข้นของ LAB มากกว่า 9 $\log_{10}$ CFU/ml

(3) ความเข้มข้นของกรดแลคติค มากกว่า 150 mmol/L

(4) มีความเข้มข้นของ กรดอะซิติคและเอทานอล ต่ำกว่า 40 และ 0.8 mmol/L ตามลำดับ

Missotten et al. (2009) ทำการคัดแยกชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารหมักเหลวของสุกร พบว่า *L. johnsoni*, *L. salivarius* group และ *L. plantarum* มีศักยภาพมากในอาหารหมักเหลวของสุกร ทำให้ pH ของอาหารหมักลดลงจาก 5.9 เป็น 4.2 , 4.3 และ 4.4 หลังจากหมักเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง และลดลงเป็น 4.1 หลังการหมัก 48 ชั่วโมง นอกจากนี้สายพันธุ์ดังกล่าวมีประสิทธิภาพในการต่อต้านจุลินทรีย์ก่อโรค *Salmonella* โดยสามารถผลิตกรดแลคติคได้มากกว่า 100 mmol/L ภายใน 48 ชั่วโมง

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 สภาวะการหมักอาหารเหลวที่เหมาะสมสำหรับสุกร และคุณภาพของอาหารหมักที่ได้จากการศึกษาในห้องปฏิบัติการ (Suitable Fermentation Condition of Liquid Feed for Pigs and *in vitro* Study for Feed Quality)

อาหารทดลองมีทั้งหมด 4 สูตร สำหรับสุกรทั้ง 4 ระยะ ได้แก่ อาหารสุกรระยะเล็ก (สำหรับสุกรน้ำหนักตัว 10-20 ก.ก.) ระยะรุ่น (สำหรับสุกรน้ำหนักตัว 20-50 ก.ก.) ระยะขุน 1 (สำหรับสุกรน้ำหนักตัว 50-80 ก.ก.) และระยะขุน 2 (สำหรับสุกรน้ำหนักตัว 80-100 ก.ก.) จากคำนวณสูตรอาหารให้มีโภชนะตามความต้องการของสุกรแต่ละระยะ (NRC, 1998) โดยใช้วัตถุดิบอาหารหลักคือ กากถั่วเหลือง ปลายข้าว ข้าวโพด รำละเอียด ปรับปริมาณแคลเซียม และฟอสฟอรัสตามความต้องการ โดยใช้ แคลเซียมคาร์บอเนต และไดแคลเซียมฟอสเฟต เสริมแร่ธาตุและไวตามินในรูปพรีมิกซ์ เปรียบเทียบปริมาณความต้องการโภชนะของสุกรแต่ละระยะตาม NRC (1998) กับอาหารทดลองทั้ง 4 ชนิด ดังแสดงในตาราง 3.1 และ 3.2

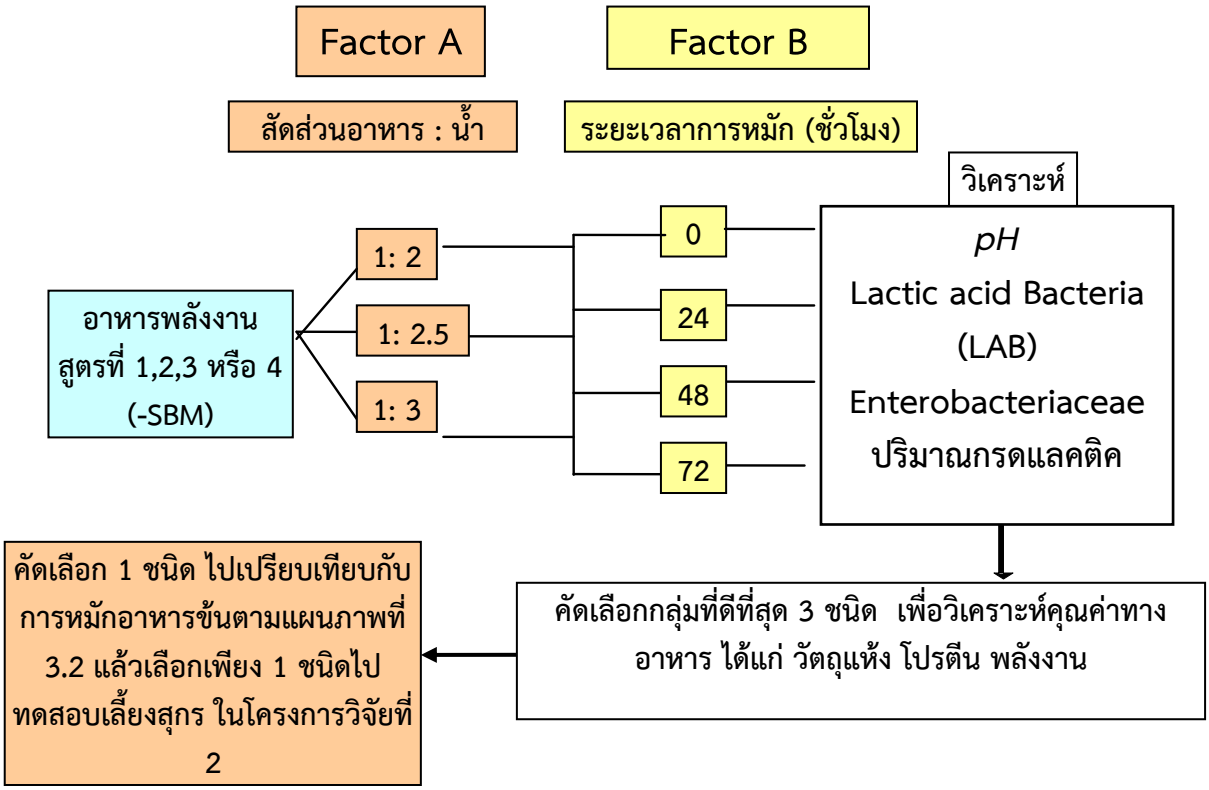
ตาราง 3.1 เปรียบเทียบปริมาณความต้องการของสุกรตาม NRC (1998) กับอาหารทดลองทั้ง 4 ชนิด

โภชนะ	NRC (1998)		อาหารทดลองชนิดที่ 1	NRC (1998)	อาหารทดลองชนิดที่ 2	NRC (1998)	อาหารทดลองชนิดที่ 3	NRC (1998)	อาหารทดลองชนิดที่ 4
	5-10 kgBW	10-20 kgBW	หย่านม-20 kgBW	20-50 kgBW	20-50 kgBW	50-80 kgBW	50-80 kgBW	80-100 kgBW	80-100 kgBW
Crude Protein (%)	23.7	20.9	20.50	18.0	17.19	15.5	14.69	13.2	12.61
Total Lysine (%)	1.35	1.15	1.29	0.95	0.99	0.75	0.78	0.60	0.61
ME (kcal/kg)	3,265	3,265	3,180	3,265	3,208	3,265	3,194	3,265	3,232

3.1.1 <u>การทดลองที่ 1:</u> ศึกษาสภาวะการหมักอาหารพลังงานที่เหมาะสม และคุณภาพของอาหารหมักที่ได้ ในห้องปฏิบัติการ

อาหารทดลองสำหรับสุกรระยะต่างๆ ดังแสดงในตาราง 3.2 โดยการทดลองนี้ กากถั่วเหลืองซึ่งเป็นแหล่งของโปรตีนหลัก และกรดอะมิโนสังเคราะห์ จะไม่รวมเข้าไว้ในอาหารที่ทำการหมัก นำอาหารทั้ง 4 ชนิด มาผสมน้ำในอัตราส่วน 1:2, 1:2.5 และ 1:3 หมักในสภาวะไร้อากาศที่อุณหภูมิห้อง ในถังหมักที่มีฝาปิดโดยมี air lock ที่ฝาถังเพื่อทำหน้าที่ในการระบายก๊าซที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมัก โดยหมักอาหารตามสัดส่วนดังกล่าวชนิดละ 12 ถัง หลังจากนั้นสุ่มตัวอย่างอาหารในแต่ละถังวันละ 9 ถัง (อัตราส่วนละ 3 ถัง หรือ 3 ซ้ำ) ซึ่งผ่านการหมักที่ 0, 24, 48 และ 72 ชั่งโมง ตามลำดับ โดยจัดกลุ่มการทดลองแบบ 3x4 Factorial Arrangement in CRD แล้ววัด pH ปริมาณ LAB ปริมาณ Enterobacteriaceae และปริมาณกรดแลคติคทั้งหมดที่ได้จากการไทเทรตตามวิธีการของ AOAC (2000) คัดเลือกวิธีเตรียมและระยะเวลาการ

หมักที่เหมาะสม 3 ชนิด โดยพิจารณาจากปริมาณ LAB ที่ดีที่สุด ปริมาณกรดแลคติค และ pH ของอาหารหมัก และมี Enterobacteriaceae ที่ต่ำสุด เพื่อนำไปวิเคราะห์คุณค่าทางอาหาร ได้แก่ วัตถุแห้ง โปรตีน และพลังงาน มาใช้ในการผลิตอาหารหมักสำหรับโครงการวิจัยที่ 2 ต่อไป โดยที่สภาวะที่เหมาะสมของอาหารหมักเหลวนั้น ควรคัดเลือกระยะเวลาการหมักที่เหมาะสม โดยพิจารณาจากปริมาณคุณค่าทางอาหาร (1) ปริมาณ LAB ที่ดีที่สุด คือ มากกว่า 6 $\log_{10}$cfu/g, (2) ปริมาณ Enterobacteriaceae ที่ต่ำสุด คือ ต่ำกว่า 4 $\log_{10}$cfu/g (3) มี pH น้อยกว่า 4.5 และ (4) มีปริมาณกรดแลคติคมากกว่า 150 mmol /L (van Winsem et.al., 2001)

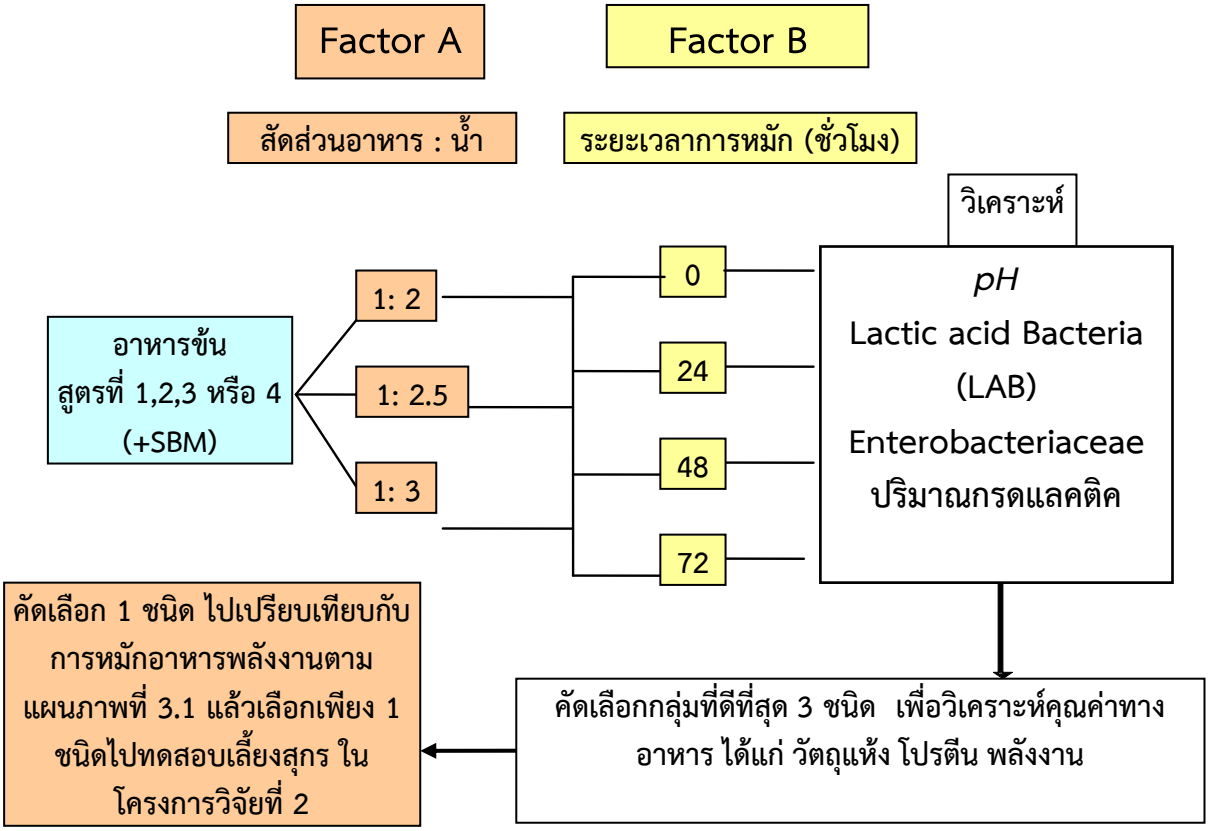


แผนภาพที่ 3.1 แสดงผังแนวทางการทดลองอาหารพลังงาน (ไม่รวมกากถั่วเหลือง) ทั้ง 4 ชนิด

3.1.2 <u>การทดลองที่ 2:</u> ศึกษาสภาวะการหมักอาหารข้นที่เหมาะสม และคุณภาพของอาหารหมักที่ได้ ในห้องปฏิบัติการ

อาหารข้นทั้ง 4 ชนิด (รวมแหล่งโปรตีนจากกากถั่วเหลือง) ส่วนประกอบของอาหารดังแสดงในตาราง 3.2 มาผสมน้ำในอัตราส่วน 1:2, 1:2.5 และ 1:3 หมักในสภาวะไร้อากาศที่อุณหภูมิห้อง ในถังหมักที่มีฝาปิดโดยมี air lock ที่ฝาถังเพื่อทำหน้าที่ในการระบายก๊าซที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมัก โดยหมักอาหารตามสัดส่วนดังกล่าวชนิดละ 12 ถัง หลังจากนั้นสุ่มตัวอย่างอาหารในแต่ละถังวันละ 9 ถัง (อัตราส่วนละ 3 ถัง หรือ 3 ซ้ำ) ซึ่งผ่านการหมักที่ 0, 24, 48 และ 72 ชั่งโมง ตามลำดับ โดยจัดกลุ่มการทดลองแบบ 3x4 Factorial Arrangement in CRD ตามผังการทดลองดังแสดงในภาพที่ 3.2 ทำการวัดค่า pH ปริมาณ LAB ปริมาณ Enterobacteriaceae ปริมาณกรดแลคติคทั้งหมดที่ได้จากการไทเทรตตามวิธีการของ AOAC (2000) คัดเลือกวิธีเตรียมและระยะเวลาการหมักที่เหมาะสม 3 ชนิด โดยพิจารณาจากปริมาณ LAB ที่ดีที่สุด ปริมาณกรดแลคติค และ pH ของอาหารหมัก และมี Enterobacteriaceae ที่ต่ำสุด เพื่อนำไปวิเคราะห์

คุณค่าทางอาหาร ได้แก่ วัตถุแห้ง โปรตีน และพลังงาน มาใช้ในการผลิตอาหารหมักสำหรับโครงการวิจัยที่ 2 ต่อไป



แผนภาพที่ 3.2 แสดงผังแนวทางการทดลองอาหารข้น (รวมกากถั่วเหลือง) ทั้ง 4 ชนิด

ตาราง 3.2 องค์ประกอบของอาหารทดลองทั้ง 4 ชนิด ประกอบด้วยอาหารข้นมีกากถั่วเหลือง (+SBM) และอาหารพลังงานถอดกากถั่วเหลืองออก (-SBM)

ชนิดของอาหาร	**ชนิดที่ 1**		**ชนิดที่ 2**		**ชนิดที่ 3**		**ชนิดที่ 4**	
	สุกรอนุบาล-เล็ก (นน.ตัว 10-20 กก.)		**สุกรรุ่น (นน.ตัว 20-50 กก.)**		**สุกรขุน1 (นน.ตัว 50-80 กก.)**		**สุกรขุน 2 (นน.ตัว 80-100 กก.)**	
	+SBM	**-SBM**	**+SBM**	**-SBM**	**+SBM**	**-SBM**	**+SBM**	**-SBM**
วัตถุดิบ (%)								
ข้าวโพด	45	45	60	60	60	60	70	70
รำละเอียด	3	3	10	10	20	20	16	16
กากถั่วเหลือง (44%)	41	0	27.4	0	18	0	12	0
หางนม	5	5	0	0	0	0	0	0
ไดแคลเซียมฟอสเฟต (P 18)	1.2	1.2	1	1	0.7	0.7	0.7	0.7
หินฝุ่น ($CaCO_3$)	1.2	1.2	1	1	0.7	0.7	0.7	0.7
น้ำมันพืช	3	3	0	0	0	0	0	0
เกลือ	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35
พรีมิกซ์	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
รวม	100	59	100	72.6	100	82	100	88
ต้นทุนค่าอาหารทดลอง(บาท/1กก.)*	18.00		12.90		12.00		12.00	
<u>คุณค่าทางโภชนะจากการคำนวณ</u>								
พลังงานรวม (kcal/kg.)	4,609	4,474	4,487	4,377	4,508	4,436	4,490	4,442
พลังงานใช้ประโยชน์ได้ (kcal/kg.)	3,180	1,877	3,208	2,337	3,194	2,622	3,232	2,850
ระดับโปรตีน (%)	20.50	4.10	17.19	6.23	14.69	7.49	12.61	7.81
แคลเซียม (%)	0.89	0.76	0.73	0.64	0.51	0.45	0.49	0.46
ฟอสฟอรัสที่ใช้ประโยชน์ได้ (%)	*0.31*	0.23	0.27	0.22	0.22	0.19	0.21	0.18
ไลซีน (%)	1.29	0.13	0.99	0.21	0.78	0.27	0.61	0.27
เมทไทโอนีน + ซีสทีน (%)	0.72	0.18	0.63	0.27	0.56	0.32	0.49	0.34

* ต้นทุนค่าอาหารคำนวณจากราคาวัตถุดิบเฉลี่ยระหว่างช่วงเดือน มกราคม-มิถุนายน 2555 และนำราคาดังกล่าวไปใช้เป็นฐานในการคำนวนต้นทุนค่าอาหารตลอดการวิจัยของโครงการวิจัยที่ 2

3.1.3 <u>การทดลองที่ 3:</u> ศึกษาสภาวะการหมักที่เหมาะสมของอาหารข้นผสมกรดซิตริค

อาหารข้น (รวมกากถั่วเหลือง) ของสูตรสุกรระยะเล็ก (สูตรที่ 1) นำมาผสมน้ำให้เป็นอาหารเหลว ในสัดส่วนอาหารต่อน้ำ 1:2.5 มาเติมกรดซิตริค ในปริมาณ 1.1 และ 1.2 % ตามลำดับ โดยใช้เกณฑ์คือความเข้มข้นของกรดที่ใช้ สามารถปรับ pH อาหารใกล้เคียง 5.0 มากที่สุด หมักในสภาวะไร้อากาศ ที่อุณหภูมิห้องในถังหมักที่มีฝาปิดโดยมี air lock ที่ฝาถังเพื่อทำหน้าที่ในการระบายก๊าซที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมัก โดยหมักอาหารตามสัดส่วนดังกล่าวชนิดละ 12 ถัง หลังจากนั้นสุ่มตัวอย่างอาหารในแต่ละถังวันละ 6 ถัง (อัตราส่วนละ 3 ถัง หรือ 3 ซ้ำ) ซึ่งผ่านการหมักที่ 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ โดยจัดกลุ่มการทดลองแบบ 2x4 Factorial Arrangement in CRD วัดค่า pH ปริมาณ LAB ปริมาณ Enterobacteriaceae คัดเลือกปริมาณกรดซิตริคที่เหมาะสม โดยพิจารณาจากปริมาณ LAB ที่ดีที่สุด ปริมาณกรดแลคติค และ pH ของอาหารหมัก และมี Enterobacteriaceae ที่ต่ำสุด มาใช้ในการผลิตอาหารหมักสำหรับสุกรระยะเล็กในโครงการวิจัยที่ 2 ต่อไป

3.1.4 <u>การทดลองที่ 4:</u> ศึกษาสภาวะการหมักที่เหมาะสมของอาหารข้นผสมกรดฟอร์มิค

อาหารข้น (รวมกากถั่วเหลือง) ของสูตรสุกรระยะเล็ก (สูตรที่ 1) นำมาผสมน้ำให้เป็นอาหารเหลว ในสัดส่วนอาหารต่อน้ำ 1:2.5 มาเติมกรดฟอร์มิค ในปริมาณ 0.5 และ 0.6 % ตามลำดับโดยใช้เกณฑ์คือความเข้มข้นของกรดที่ใช้ สามารถปรับ pH อาหารใกล้เคียง 5.0 มากที่สุด หมักในสภาวะไร้อากาศ ที่อุณหภูมิห้องในถังหมักที่มีฝาปิดโดยมี air lock ที่ฝาถังเพื่อทำหน้าที่ในการระบายก๊าซที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมัก โดยหมักอาหารตามสัดส่วนดังกล่าวชนิดละ 12 ถัง หลังจากนั้นสุ่มตัวอย่างอาหารในแต่ละถังวันละ 6 ถัง (อัตราส่วนละ 3 ถัง หรือ 3 ซ้ำ) ซึ่งผ่านการหมักที่ 0, 24, 48 และ 72 ชั่งโมง ตามลำดับ โดยจัดกลุ่มการทดลองแบบ2x4 Factorial Arrangement in CRD วัดค่า pH ปริมาณ LAB ปริมาณ Enterobacteriaceae คัดเลือกปริมาณกรดฟอร์มิคที่เหมาะสม โดยพิจารณาจากปริมาณ LAB ที่ดีที่สุด ปริมาณกรดแลคติค และ pH ของอาหารหมัก และมี Enterobacteriaceae ที่ต่ำสุด มาใช้ในการผลิตอาหารหมักสำหรับสุกรระยะเล็กในโครงการวิจัยที่ 2 ต่อไป

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

4.1 โครงการวิจัยที่ 1 สภาวะการหมักอาหารเหลวที่เหมาะสมสำหรับสุกร และคุณภาพของอาหารหมักที่ได้จากการศึกษาในห้องปฏิบัติการ (Suitable Fermentation Condition of Liquid Feed for Pigs and *in vitro* Study for Feed Quality)

4.1.1 การทดลองที่ 1: ศึกษาสภาวะการหมักอาหารพลังงานที่เหมาะสม และคุณภาพของอาหารหมักที่ได้ในห้องปฏิบัติการ

4.1.1.1 ผลการศึกษาการทดลอง การศึกษาสภาวะการหมัก**อาหารพลังงานของสุกรระยะเล็ก** (อาหารชนิดที่ 1, -SBM) ที่เหมาะสม และคุณภาพของอาหารหมักที่ได้ ในห้องปฏิบัติการ

จากตาราง 4.1 ผลการทดลองการหมักอาหารพลังงานของสุกรระยะอนุบาลพบว่า ค่า pH ในกลุ่มทดลองที่ 1, 2 และ 3 ที่เวลา 48 และ 72 ชั่วโมง มีค่า pH ใกล้เคียงกับค่าเกณฑ์ที่กำหนดไว้ คือ pH<4.5 ในส่วนของจำนวนแบคทีเรียนั้นพบว่าในกลุ่มทดลองที่ 1, 2 และ 3 จะมีจำนวน Lactic acid bacteria ที่ระยะเวลาการหมัก 48 และ72 ชั่วโมง คือ 9 และ 11 $\log_{10}$ cfu/g ตามลำดับ จำนวน Enterobacteriaceae มีค่าใกล้เคียงกันคือ 6 และ 7 $\log_{10}$ cfu/g ตามลำดับ ส่วนปริมาณกรดแลคติคนั้นตั้งแต่ชั่วโมงการหมักที่ 24 ของทุกกลุ่มทดลองมีปริมาณกรดแลคติคมากกว่า 150 mmol/L ดังนั้นจากผลการวิเคราะห์ที่กล่าวมาข้างต้นทางผู้วิจัยจึงเลือก 3 ตัวอย่าง คือ อาหารหมักกลุ่มทดลองที่ 1 ซึ่งมีระยะเวลาการหมักที่ 48 และ 72 ชั่วโมง และอาหารหมักกลุ่มทดลองที่ 3 ซึ่งมีระยะเวลาการหมักที่ 72 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนะ คือ ค่าโปรตีน และค่าพลังงาน ผลการวิเคราะห์ พบว่าอาหารหมักกลุ่มทดลองที่ 1 ซึ่งมีระยะเวลาการหมักที่ 48 มีค่าโปรตีน 4.36 เปอร์เซ็นต์ และค่าพลังงาน 4,432 กิโลแคลอรี่ต่อกิโลกรัม อาหารหมักกลุ่มทดลองที่1 ซึ่งมีระยะเวลาการหมักที่ 72 ชั่วโมง มีค่าโปรตีน 4.47 เปอร์เซ็นต์ และค่าพลังงาน 4,410 กิโลแคลอรี่ต่อกิโลกรัม ส่วนอาหารหมักกลุ่มทดลองที่ 3 ซึ่งมีระยะเวลาการหมักที่ 72 ชั่วโมง มีค่าโปรตีน 4.33 เปอร์เซ็นต์ และค่าพลังงาน 4,437 กิโลแคลอรี่ต่อกิโลกรัม ตามลำดับ จากผลการทดลองพบว่า อาหารสุกรที่ผ่านกระบวนการหมักดังกล่าวข้างต้นไม่สามารถนำไปให้สุกรกินได้ เนื่องจากระดับของ pH ที่ยังคงสูงและส่งผลทำให้ปริมาณของ Enterobacteriaceae มีค่าสูงมากกว่า 4 $\log_{10}$cfu/g ซึ่งอาจเป็นอันตรายต่อสุกรได้ ถึงแม้จะมี Lactic acid bacteria ที่มากกว่า 6 $\log_{10}$cfu/g. ก็ตาม

ตาราง 4.1 ค่า pH, จำนวน Lactic acid bacteria, จำนวน Enterobacteriaceae, ปริมาณกรดแลคติค, ค่าโปรตีน และค่าพลังงาน ของอาหารพลังงานระยะอนุบาล-เล็ก (สูตร 1, -SBM)

กลุ่มทดลอง	ระยะเวลาในการหมัก (ชั่วโมง)				SEM	Probability[1/]		
	0	24	48	72		A	B	A X B
pH								
กลุ่ม 1 (1:2)	6.52^{a}	5.10^{b}	**4.82^{c}**	**4.70^{c}**	0.76	NS	***	NS
กลุ่ม 2 (1:2.5)	6.56^{a}	5.04^{b}	4.74^{c}	4.78^{c}	0.79	NS	***	NS
กลุ่ม 3 (1:3)	6.60^{a}	5.10^{b}	4.83^{c}	**4.71^{c}**	0.80	NS	***	NS
Lactic acid bacteria (cfu/g)								
กลุ่ม 1 (1:2)	3.5x10^{3cz}	7.8x10^{8b}	**1.4 x10^{11az}**	**3 x10^{9bx}**	2.91	*	***	***
กลุ่ม 2 (1:2.5)	3.8x10^{2cy}	6.4x10^{8b}	1.1x10^{9by}	5.6 x10^{11ay}	3.49	*	***	***
กลุ่ม 3 (1:3)	1.5x10^{3dz}	3.0x10^{8c}	2.8x10^{11bz}	**1.5x10$^{13\ az}$**	3.65	*	***	***
Enterobacteriaceae (cfu/g)								
กลุ่ม 1 (1:2)	nd	2.1x10^{7a}	**8.7x10^{6b}**	**3.5x10^{6b}**	2.95	NS	*	*
กลุ่ม 2 (1:2.5)	nd	3.2x10^{6b}	2.0x10^{7a}	2.0x10^{7a}	2.93	NS	*	*
กลุ่ม 3 (1:3)	nd	5.8x10^{7a}	1.0x10^{7a}	**6.5x10^{6b}**	3.07	NS	*	*
ปริมาณกรดแลคติคทั้งหมด (mmol/L)								
กลุ่ม 1 (1:2)	92.13^{c}	377.40^{az}	**336.33^{az}**	**288.60^{bx}**	29.18	***	***	***
กลุ่ม 2 (1:2.5)	92.13^{c}	309.69^{by}	286.38^{by}	**361.86^{az}**	34.25	***	***	***
กลุ่ม 3 (1:3)	98.79^{c}	279.72^{bx}	265.29^{by}	327.45^{ay}	19.50	***	***	***
<u>องค์ประกอบทางโภชนะ</u>								
ค่าโปรตีน (%)								
กลุ่ม 1 (1:2)	4.30		**4.36**	**4.47**				
กลุ่ม 3 (1:3)	4.25			**4.33**				
ค่าพลังงาน (Kcal/Kg.)								
กลุ่ม 1 (1:2)			**4,432**	**4,410**				
กลุ่ม 3 (1:3)				**4,437**				

[1/] A: อิทธิพลของสัดส่วนของอาหารต่อน้ำ, B: อิทธิพลของระยะเวลาในการหมัก, A x B: อิทธิพลร่วมระหว่างสัดส่วนของอาหารต่อน้ำและระยะเวลาในการหมัก, *: $P< 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$, NS: non-significance

$^{a, b, c}$ ตัวอักษรที่แตกต่างกันที่อยู่ในแนวนอนเดียวกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ *(p<0.05)*

$^{W, X, Y, Z}$ ตัวอักษรที่แตกต่างกันที่อยู่ในแนวตั้งเดียวกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ *(p<0.05)*

nd: not detected

4.1.1.2 <u>ผลการศึกษาการทดลอง</u> การศึกษาสภาวะการหมัก**<u>อาหารพลังงานของสุกรระยะรุ่น (ชนิดที่ 2, -SBM)</u>** ที่เหมาะสม และคุณภาพของอาหารหมักที่ได้ ในห้องปฏิบัติการ

จากตาราง 4.2 ผลการทดลองพบว่า ค่า pH ในกลุ่มทดลองที่ 1, 2 และ 3 ที่ระยะเวลาการหมัก 72 ชั่วโมง มีค่า pH ต่ำที่สุด คือประมาณ 4.15-4.17 ในส่วนของจำนวนแบคทีเรียนั้นพบว่าในกลุ่มทดลองที่ 1, 2 และ 3 จะมีจำนวน Lactic acid bacteria ที่ระยะเวลาการหมัก 72 ชั่วโมง คือ 12, 11 และ 11 log10 cfu/g ตามลำดับ จำนวน Enterobacteriaceae มีค่าต่ำสุด คือ 4, 4 และ 5 log10 cfu/g ตามลำดับ และมีปริมาณกรดแลคติคต่ำที่สุดอยู่ที่ระยะเวลาการหมัก 0 ชั่วโมงและจะเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ จนถึงมีค่าสูงสุดที่ระยะเวลาการหมัก 72 ชั่วโมง ซึ่งจากผลการวิจัยแสดงให้เห็นปฏิกริยาร่วมของอัตราส่วนของอาหารต่อน้ำและระยะเวลาหมักที่มีต่อปริมาณ Lactic acid bacteria, Enterobacteriaceae และปริมาณกรดแลคติค ดังนั้นจากผลการวิเคราะห์ที่กล่าวมาข้างต้นทางผู้วิจัยจึงเลือก 3 ตัวอย่าง คือ อาหารหมักกลุ่มทดลองที่ 1, 2 และ 3 ซึ่งมีระยะเวลาการหมักที่ 72 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนะ (โปรตีน และพลังงาน) ผลการวิเคราะห์ พบว่า กลุ่มทดลองที่ 1, 2 และ 3 มีค่าโปรตีนเท่ากับ 6.36 , 6.91 และ 6.48 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีค่าพลังงานเท่ากับ 4,267, 4,338 และ 4,354 และกิโลแคลอรี่ต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างกันมากนัก

ตาราง 4.2 แสดงค่า pH, จำนวน Lactic acid bacteria, จำนวน Enterobacteriaceae , ปริมาณกรดแลคติค, ค่าโปรตีน และค่าพลังงานของอาหารพลังงานสุกรระยะรุ่น (ชนิดที่2, -SBM)

กลุ่มทดลอง	ระยะเวลาในการหมัก (ชั่วโมง)				SEM	Probability[1/]		
	0	24	48	72		A	B	A X B
pH								
กลุ่ม 1 (1:2)	6.08^{a}	4.64^{b}	4.42^{b}	**4.17^{b}**	0.78	NS	***	***
กลุ่ม 2 (1:2.5)	6.14^{a}	4.66^{b}	4.48^{b}	**4.15^{b}**	0.79	NS	***	***
กลุ่ม 3 (1:3)	6.12^{a}	4.69^{b}	4.45^{b}	**4.16^{b}**	0.79	NS	***	***
Lactic acid bacteria (cfu/g)								
กลุ่ม 1 (1:2)	$6.2x10^{4d}$	$4.4\ x10^{8c}$	$4.5\ x10^{10b}$	**$8.5\ x10^{12a}$**	2.93	NS	***	NS
กลุ่ม 2 (1:2.5)	$3.6\ x10^{4d}$	$2.4\ x10^{8c}$	$1.2\ x10^{9b}$	**$2.5\ x10^{11a}$**	2.93	NS	***	NS
กลุ่ม 3 (1:3)	$6.7\ x10^{4d}$	$2.8\ x10^{8c}$	$1.1\ x10^{9b}$	**$2.2\ x10^{11a}$**	3.22	NS	***	NS
Enterobacteriaceae (cfu/g)								
กลุ่ม 1 (1:2)	$4.4\ x10^{4cy}$	$2.5\ x10^{6a}$	$9.2\ x10^{5b}$	**$2.2x10^{4c}$**	0.97	*	***	*
กลุ่ม 2 (1:2.5)	$1.1\ x10^{6az}$	$2.0\ x10^{6a}$	$1.7\ x10^{6a}$	**$9.8x10^{4b}$**	0.87	*	***	*
กลุ่ม 3 (1:3)	$2.4\ x10^{4by}$	$7.5\ x10^{5a}$	$7.9\ x10^{5a}$	**$2.0x10^{5a}$**	0.67	*	***	*
ปริมาณกรดแลคติคทั้งหมด (mmol/L)								
กลุ่ม 1 (1:2)	63.27^{dz}	263.07^{cz}	357.42^{bz}	**411.81^{az}**	38.61	***	***	***
กลุ่ม 2 (1:2.5)	52.17^{cy}	260.85^{bz}	296.37^{by}	**365.19^{ay}**	21.79	***	***	***
กลุ่ม 3 (1:3)	52.17^{dy}	228.66^{cy}	291.93^{by}	**374.07^{ay}**	22.72	***	***	***

ตาราง 4.2 (ต่อ)

กลุ่มทดลอง	ระยะเวลาในการหมัก (ชั่วโมง)				SEM	Probability[1/]		
	0	24	48	72		A	B	A X B
<u>องค์ประกอบทางโภชนะ</u>								
โปรตีน (%)								
กลุ่ม 1 (1:2)	6.29			**6.36**				
กลุ่ม 2 (1:2.5)	6.86			**6.91**				
กลุ่ม 3 (1:3)	6.09			**6.48**				
พลังงาน (Kcal/Kg.)								
กลุ่ม 1 (1:2)				**4,267**				
กลุ่ม 2 (1:2.5)				**4,338**				
กลุ่ม 3 (1:3)				**4,354**				

[1/] A: อิทธิพลของสัดส่วนของอาหารต่อน้ำ, B: อิทธิพลของระยะเวลาในการหมัก, A x B: อิทธิพลร่วมระหว่างสัดส่วนของอาหารต่อน้ำและระยะเวลาในการหมัก, *: $P< 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$, NS : non-significance

[a, b, c, d] ตัวอักษรที่แตกต่างกันที่อยู่ในแนวนอนเดียวกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ *(p<0.05)*

[Y, Z] ตัวอักษรที่แตกต่างกันที่อยู่ในแนวตั้งเดียวกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ *(p<0.05)*

4.1.1.3 <u>ผลการศึกษาการทดลอง</u> การศึกษาสภาวะการหมัก**<u>อาหารพลังงานของสุกรระยะขุน 1 (ชนิดที่ 3, -SBM)</u>** ที่เหมาะสม และคุณภาพของอาหารหมักที่ได้ ในห้องปฏิบัติการ

จากตาราง 4.3 ผลการทดลองพบว่าระยะเวลาการหมักที่ 72 ชั่วโมง กลุ่มทดลองที่ 1 และ 2 มีค่า pH ต่ำกว่า 4.5 ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) กับกลุ่มทดลองที่ 3 ซึ่งมีค่า pH เท่ากับ 4.49 จำนวน Lactic acid bacteria ตั้งแต่ระยะเวลาการหมักที่ 24 ชั่วโมงจะมีจำนวนมากกว่า 6 $\log_{10}$ cfu/g และจะมีมากที่สุดที่ระยะเวลาการหมักที่ 72 ชั่วโมง ในกลุ่มทดลองที่ 1 2 และ 3 จำนวน Enterobacteriaceae ที่ระยะเวลาการหมักที่ 72 ชั่วโมง พบว่า มีจำนวน 6, 4 และ 3 $\log_{10}$ cfu/g ตามลำดับ (P<0.05) และปริมาณกรดแลคติคจะมีปริมาณมากที่สุดอยู่ที่ประมาณ 500 mmol/L ในกลุ่มทดลองที่ 1 ที่ระยะเวลาการหมัก 72 ชั่วโมง ซึ่งจากผลการวิจัยแสดงให้เห็นปฏิกริยาร่วมของอัตราส่วนของอาหารต่อน้ำและระยะเวลาหมักที่มีต่อ pH ของอาหารหมัก และปริมาณ Lactic acid bacteria, Enterobacteriaceae และปริมาณกรดแลคติค ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกกลุ่มทดลองที่ 1, 2 และ 3 ที่ระยะเวลาการหมัก 72 ชั่วโมงตามเกณฑ์ที่กำหนดไว้ ทั้ง 4 ข้อ ไปทำการวิเคราะห์หาคุณค่าทางโภชนะ(โปรตีน และพลังงาน) ผลการวิเคราะห์พบว่า ค่าโปรตีน 7.28, 7.46 และ 7.09 เปอร์เซ็นต์ ค่าพลังงาน 4,574, 4,490 และ 4,428 กิโลแคลอรี่ต่อกิโลกรัม ในกลุ่มทดลองที่ 1, 2 และ 3 ที่ระยะเวลาการหมัก 72 ชั่วโมง ตามลำดับ

ตาราง 4.3 ค่า pH, จำนวน Lactic acid bacteria, จำนวน Enterobacteriaceae, ปริมาณกรดแลคติค, ค่าโปรตีน และค่าพลังงานของอาหารพลังงานระยะขุน 1(ชนิดที่ 3,-SBM)

กลุ่มทดลอง	ระยะเวลาในการหมัก (ชั่วโมง)				SEM	Probability[1/]		
	0	24	48	72		A	B	A X B
pH								
กลุ่ม 1 (1:2)	6.18^{a}	4.69^{bz}	4.58^{bz}	**4.38^{cy}**	0.73	*	***	***
กลุ่ม 2 (1:2.5)	6.13^{a}	4.41^{by}	4.45^{by}	**4.31^{by}**	0.79	*	***	***
กลุ่ม 3 (1:3)	6.12^{a}	4.60^{bz}	4.55^{bz}	4.49^{bz}	0.72	*	***	***
Lactic acid bacteria (cfu/g)								
กลุ่ม 1 (1:2)	1.7x10^{5cy}	7.7x10^{10bz}	3.6x10^{12az}	**6.5x10^{12ay}**	3.04	***	***	***
กลุ่ม 2 (1:2.5)	4.6x10^{4dx}	5.7x10^{8cy}	1.2x10^{10by}	**3.2x10^{14az}**	3.52	***	***	***
กลุ่ม 3 (1:3)	4.7x10^{6cz}	1.3x10^{10bz}	1.8x10^{10by}	**7.7x10^{14az}**	3.23	***	***	***
Enterobacteriaceae (cfu/g)								
กลุ่ม 1 (1:2)	1.1x10^{5by}	3.7x10^{6a}	2.0x10^{6a}	**1.1x10^{6az}**	0.58	*	***	***
กลุ่ม 2 (1:2.5)	2.3x10^{6az}	5.9x10^{6a}	1.1x10^{6a}	**3.4x10^{4by}**	0.99	*	***	***
กลุ่ม 3 (1:3)	1.7x10^{6az}	2.9x10^{6a}	1.6x10^{6a}	**4.1x10^{3bx}**	1.31	*	***	***
ปริมาณกรดแลคติคทั้งหมด (mmol/L)								
กลุ่ม 1 (1:2)	106.56^{cz}	366.30^{bz}	370.74^{bz}	**510.60^{az}**	52.44	***	***	***
กลุ่ม 2 (1:2.5)	89.91^{cy}	356.31^{bz}	394.05^{bz}	**468.42^{ay}**	48.86	***	***	***
กลุ่ม 3 (1:3)	65.49^{by}	344.10^{ay}	341.88^{ay}	**386.28^{ax}**	33.35	***	***	***
<u>องค์ประกอบทางโภชนะ</u>								
โปรตีน (%)								
กลุ่ม 1 (1:2)	7.75			**7.28**				
กลุ่ม 2 (1:2.5)	7.62			**7.46**				
กลุ่ม 3 (1:3)	7.08			**7.09**				
พลังงาน (Kcal/Kg.)								
กลุ่ม 1 (1:2)				**4,574**				
กลุ่ม 2 (1:2.5)				**4,490**				
กลุ่ม 3 (1:3)				**4,428**				

[1/] A: อิทธิพลของสัดส่วนของอาหารต่อน้ำ, B: อิทธิพลของระยะเวลาในการหมัก, A x B: อิทธิพลร่วมระหว่างสัดส่วนของอาหารต่อน้ำและระยะเวลาในการหมัก, *: $P< 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$, NS: non-significance

[a, b, c, d] ตัวอักษรที่แตกต่างกันที่อยู่ในแนวนอนเดียวกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ *(p<0.05)*

[X, Y, Z] ตัวอักษรที่แตกต่างกันที่อยู่ในแนวตั้งเดียวกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ *(p<0.05)*

4.1.1.4 <u>ผลการศึกษาการทดลอง</u> การศึกษาสภาวะการหมัก**<u>อาหารพลังงานของสุกรระยะขุน 2 (ชนิดที่ 4,-SBM)</u>** ที่เหมาะสม และคุณภาพของอาหารหมักที่ได้ ในห้องปฏิบัติการ

จากตาราง 4.4 ผลการทดลองพบว่า ค่า pH ของทุกกลุ่มทดลอง จะลดลงเรื่อยๆ และมีค่าต่ำสุดอยู่ที่ประมาณ 4.6 ในชั่วโมงการหมักที่ 72 ชั่วโมง ปริมาณ Lactic acid bacteria ที่มีค่ามากกว่า 6 log_{10} cfu/g ตั้งแต่ชั่วโมงการหมักที่ 24 ชั่วโมง ปริมาณ Enterobacteriaceae ที่มีค่าใกล้เคียงเกณฑ์ที่กำหนดไว้ คือ น้อยกว่า 4 log_{10} cfu/g ที่ชั่วโมงการหมักที่ 72 ชั่วโมง ในทุกกลุ่มการทดลอง และปริมาณกรดแลคติคที่มากกว่าเกณฑ์ที่กำหนดไว้ คือ 150 mmol/L ตั้งแต่ชั่วโมงการหมักที่ 24 ชั่วโมง ซึ่งจากผลการทดลองแสดงให้เห็นปฏิกริยาร่วมของอัตราส่วนของอาหารต่อน้ำและระยะเวลาหมักที่มีต่อ pH ของอาหารหมัก ปริมาณ Lactic acid bacteria และปริมาณกรดแลคติค คือเมื่ออาหารมีความเจือจางมากขึ้นการลดลงของ pH จะช้าลง การเพิ่มขึ้นของ Lactic acid bacteria และปริมาณกรดแลคติค ก็จะน้อยกว่าอาหารที่มีความเข้มข้นกว่า จากผลการทดลองดังกล่าวผู้วิจัยจึงเลือกกลุ่มทดลองที่ 1, 2 และ 3 ที่ชั่วโมงการหมักที่ 72 ชั่วโมง ไปทำการวิเคราะห์หาค่าโปรตีนและพลังงาน ได้ผลการวิเคราะห์ดังนี้ กลุ่มทดลองที่ 1 มีค่าโปรตีน 7.34 เปอร์เซ็นต์ ค่าพลังงาน 4,434 กิโลแคลอรี่ต่อกิโลกรัม กลุ่มทดลองที่ 2 มีค่าโปรตีน 7.39 เปอร์เซ็นต์ ค่าพลังงาน 4,571 กิโลแคลอรี่ต่อกิโลกรัม และกลุ่มทดลองที่ 3 มีค่าโปรตีน 7.35 เปอร์เซ็นต์ ค่าพลังงาน 4,438 กิโลแคลอรี่ต่อกิโลกรัม ตามลำดับ

ตาราง 4.4 ค่า pH, จำนวน Lactic acid bacteria, จำนวน Enterobacteriaceae, ปริมาณกรดแลคติค, ค่าโปรตีน และค่าพลังงานของอาหารพลังงานระยะขุน 2 (ชนิดที่ 4,-SBM)

กลุ่มทดลอง	ระยะเวลาในการหมัก (ชั่วโมง)				SEM	Probability[1/]		
	0	24	48	72		A	B	A X B
pH								
กลุ่ม 1 (1:2)	5.97^{a}	5.15^{b}	4.96^{b}	**4.59^{c}**	0.53	NS	***	***
กลุ่ม 2 (1:2.5)	6.02^{a}	4.91^{b}	4.54^{c}	**4.60^{c}**	0.64	NS	***	***
กลุ่ม 3 (1:3)	6.07^{a}	4.82^{b}	4.72^{b}	**4.62^{b}**	0.62	NS	***	***
Lactic acid bacteria (cfu/g)								
กลุ่ม 1 (1:2)	1.4x10^{4c}	7.1x10^{9bz}	1.4x10^{12a}	**2.0x10^{12a}**	3.44	**	***	**
กลุ่ม 2 (1:2.5)	1.2x10^{4c}	7.1x10^{7by}	2.8x10^{12a}	**3.1x10^{11a}**	3.23	**	***	**
กลุ่ม 3 (1:3)	1.3x10^{4c}	6.7x10^{7by}	4.2x10^{12a}	**4.2x10^{11a}**	3.42	**	***	**
Enterobacteriaceae (cfu/g)								
กลุ่ม 1 (1:2)	2.3x10^{4cz}	1.7x10^{6az}	9.3x10^{5b}	**1.5x10^{4cz}**	0.87	*	***	NS
กลุ่ม 2 (1:2.5)	4.4x10^{3cy}	6.2x10^{5ay}	1.1x10^{5a}	**3.5x10^{4bz}**	0.86	*	***	NS
กลุ่ม 3 (1:3)	9.2x10^{3by}	6.0x10^{5ay}	4.6x10^{5a}	**7.9x10^{3by}**	1.03	*	***	NS

ตาราง 4.4 (ต่อ)

กลุ่มทดลอง	ระยะเวลาในการหมัก (ชั่วโมง)				SEM	Probability[1/]		
	0	24	48	72		A	B	A X B
ปริมาณกรดแลคติคทั้งหมด (mmol/L)								
กลุ่ม 1 (1:2)	74.37^{dz}	199.80^{cy}	279.72^{by}	**436.23^{az}**	37.13	***	***	***
กลุ่ม 2 (1:2.5)	69.93^{dz}	219.78^{cz}	334.11^{bz}	**416.25^{az}**	35.66	***	***	***
กลุ่ม 3 (1:3)	59.94^{dy}	224.22^{cz}	296.37^{by}	**376.20^{ay}**	21.78	***	***	***
<u>องค์ประกอบทางโภชนะ</u>								
โปรตีน (%)								
กลุ่ม 1 (1:2)	7.31			**7.34**				
กลุ่ม 2 (1:2.5)	7.34			**7.39**				
กลุ่ม 3 (1:3)	7.93			**7.35**				
พลังงาน (Kcal/Kg.)								
กลุ่ม 1 (1:2)				**4,434**				
กลุ่ม 2 (1:2.5)				**4,571**				
กลุ่ม 3 (1:3)				**4,438**				

[1/] A: อิทธิพลของสัดส่วนของอาหารต่อน้ำ, B: อิทธิพลของระยะเวลาในการหมัก, A x B: อิทธิพลร่วมระหว่างสัดส่วนของอาหารต่อน้ำและระยะเวลาในการหมัก, *: $P< 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$, NS: non-significance

[a, b, c, d] ตัวอักษรที่แตกต่างกันที่อยู่ในแนวนอนเดียวกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ *(p<0.05)*

[X, Y, Z] ตัวอักษรที่แตกต่างกันที่อยู่ในแนวตั้งเดียวกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ *(p<0.05)*

4.1.2 <u>การทดลองที่ 2:</u> ศึกษาสภาวะการหมักอาหารข้นที่เหมาะสม และคุณภาพของอาหารหมักที่ได้ห้องปฏิบัติการ

4.1.2.1 <u>ผลการศึกษาการทดลอง</u> การศึกษาสภาวะการหมัก**<u>อาหารข้นของสุกรระยะเล็ก</u>** (ชนิดที่ 1, +SBM) ที่เหมาะสม และคุณภาพของอาหารหมักที่ได้ในห้องปฏิบัติการ

จากตาราง 4.5 ผลการทดลองการหมักอาหารข้นของสุกรระยะอนุบาลพบว่า ค่า pH ในกลุ่มทดลองที่ 2 และ 3 ที่ระยะเวลาการหมัก 48 และ72 ชั่วโมง มีค่า pH ใกล้เคียงกันคือประมาณ 4.7 ทั้งนี้ในส่วนของจำนวนแบคทีเรียนั้นพบว่าในกลุ่มทดลองที่ 2 จะมีจำนวน Lactic acid bacteria ที่ระยะเวลาการหมัก 48 และ 72 ชั่วโมง คือ 10 และ 11 $\log_{10}$cfu/g ตามลำดับ จำนวน Enterobacteriaceae มีค่าใกล้เคียงกันคือ 5 $\log_{10}$ cfu/g และมีปริมาณกรดแลคติคที่ชั่วโมงการหมักที่ 24 ชั่วโมงขึ้นไปมากกว่า 150 mmol/L ตามที่ Canibe et al (2006) ได้รายงานว่าอาหารหมักที่มีคุณภาพดีนั้นควรมีค่า pH<4.5, Enterobacteriaceae <4 $\log_{10}$ cfu/g, Lactic acid bacteria >

6-7 log_{10} cfu/g และ Lactic acid > 150 mmol/L ซึ่งจากผลการทดลองแสดงให้เห็นปฏิกริยาร่วมของอัตราส่วนของอาหารต่อน้ำและระยะเวลาหมักที่มีต่อ ปริมาณ Lactic acid bacteria, Enterobacteriaceae และปริมาณกรดแลคติค คือเมื่ออาหารมีความเจือจางมากขึ้นการเพิ่มขึ้นของ Lactic acid bacteria และปริมาณกรดแลคติค ก็จะน้อยกว่าอาหารที่มีความเข้มข้นกว่า ในทางกลับกันปริมาณ Enterobacteriaceae เพิ่มมากขึ้นเมื่ออาหารเจือจางมากขึ้นและลดลงเมื่อระยะเวลาการหมักนานขึ้น ดังนั้นจากผลการวิเคราะห์ที่กล่าวมาข้างต้นทางผู้วิจัยจึงเลือก 3 ตัวอย่าง คือ อาหารหมักกลุ่มทดลองที่ 2 ซึ่งมีระยะเวลาการหมักที่ 48 และ 72 ชั่วโมง และอาหารหมักกลุ่มทดลองที่ 3 ซึ่งมีระยะเวลาการหมักที่ 48 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนะ (โปรตีน และพลังงาน) ผลการวิเคราะห์พบว่าอาหารหมักกลุ่มทดลองที่ 2 ซึ่งมีระยะเวลาการหมักที่ 48 และ 72 ชั่วโมง มีค่าโปรตีน คือ 21.13 และ 21.28 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ค่าพลังงาน 4,637 และ 4,733 กิโลแคลอรี่ต่อกิโลกรัม ตามลำดับ และในอาหารหมักกลุ่มทดลองที่ 3 ซึ่งมีระยะเวลาการหมักที่ 48 ชั่วโมงมีค่าโปรตีน 21.59 เปอร์เซ็นต์และค่าพลังงานเท่ากับ 4,669 กิโลแคลอรี่ต่อกิโลกรัม

จากผลการทดลองดังกล่าว ยังไม่สามารถนำสภาวะการหมักไปใช้สำหรับหมักให้สุกรกินได้ เนื่องจากระดับของ pH ที่สูงอยู่ ส่งผลให้ปริมาณของ Enterobacteriaceae มีค่าสูงมากกว่า 4 log_{10}cfu/g ซึ่งอาจเป็นอันตรายต่อสุกรได้ ถึงแม้จะมี LAB ที่มากกว่า 6 log_{10}cfu/g ก็ตาม ดังนั้นในอาหารสุกรอนุบาล-ระยะเล็ก การหมักในสภาวะตามแผนการทดลองทุกสภาวะ ไม่สามารถทำให้คุณภาพของอาหารหมัก เหมาะสมสำหรับสุกรได้ จึงจำเป็นต้องเพิ่มการทดลอง โดยการเติมกรดเพื่อปรับ pH ของอาหารให้เหมาะสมก่อนทำการหมัก โดยคัดเลือกสัดส่วนของอาหารต่อน้ำที่ให้ผลดีที่สุด คืออาหารข้น (รวมกากถั่วเหลือง) ในสัดส่วนอาหารต่อน้ำ 1:2.5 มาเติมกรด 2 ชนิดคือ กรดซิตริค และกรดฟอร์มิค โดยใช้เกณฑ์คือความเข้มข้นของกรดที่ใช้ สามารถปรับ pH อาหารใกล้เคียง 5.0 มากที่สุด ผลดังแสดงในตาราง 4.9 และ 4.10

ตาราง 4.5 ค่า pH, จำนวน Lactic acid bacteria, จำนวน *Enterobacteriaceae*, ปริมาณกรดแลคติค, ค่าโปรตีน และค่าพลังงานของอาหารข้นระยะอนุบาล-ระยะเล็ก (ชนิดที่ 1, +SBM)

กลุ่มทดลอง	ระยะเวลาในการหมัก (ชั่วโมง)				SEM	Probability[1/]		
	0	24	48	72		A	B	A X B
pH								
กลุ่ม 1 (1:2)	6.55^{a}	5.06^{b}	4.86^{c}	4.78^{c}	0.77	NS	***	NS
กลุ่ม 2 (1:2.5)	6.59^{a}	5.05^{b}	**4.79^{c}**	**4.75^{c}**	0.79	NS	***	NS
กลุ่ม 3 (1:3)	6.59^{a}	5.09^{b}	**4.75^{c}**	4.70^{c}	0.79	NS	***	NS
Lactic acid bacteria (cfu/g)								
กลุ่ม 1 (1:2)	6.4×10^{3d}	8.9×10^{8c}	1.8×10^{11a}	4.0×10^{9b}	3.05	NS	***	***
กลุ่ม 2 (1:2.5)	4.1×10^{2d}	3.4×10^{8c}	**3.8×10^{10b}**	**3.7×10^{11a}**	3.53	NS	***	***
กลุ่ม 3 (1:3)	8.4×10^{3c}	2.0×10^{10a}	**1.2×10^{10a}**	3.3×10^{9b}	3.23	NS	***	***
***Enterobacteriaceae* (cfu/g)**								
กลุ่ม 1 (1:2)	nd	3.1×10^{9az}	3.3×10^{6b}	2.3×10^{6b}	3.41	*	***	*
กลุ่ม 2 (1:2.5)	nd	6.8×10^{7ay}	**1.4×10^{5b}**	**2.9×10^{5b}**	2.80	*	***	*
กลุ่ม 3 (1:3)	nd	4.3×10^{9az}	**6.4×10^{6b}**	3.7×10^{6b}	3.30	*	***	*

ตาราง 4.5 (ต่อ)

กลุ่มทดลอง	ระยะเวลาในการหมัก (ชั่วโมง)				SEM	Probability[1/]		
	0	24	48	72		A	B	A X B
ปริมาณกรดแลคติค (mmol/L)								
กลุ่ม 1 (1:2)	78.81^{dz}	237.54^{cz}	402.93^{bz}	517.26^{az}	30.29	***	***	***
กลุ่ม 2 (1:2.5)	64.38^{dy}	226.44^{cz}	**407.37^{bz}**	**510.60^{az}**	42.97	***	***	***
กลุ่ม 3 (1:3)	63.27^{dy}	210.90^{cy}	**352.98^{by}**	456.21^{ay}	54.72	***	***	***
องค์ประกอบทางโภชนะ								
โปรตีน (%)								
กลุ่ม 2 (1:2.5)	21.6		**21.13**	**21.28**				
กลุ่ม 3 (1:3)	21.4		**21.59**					
พลังงาน (Kcal/Kg.)								
กลุ่ม 2 (1:2.5)			**4,637**	**4,733**				
กลุ่ม 3 (1:3)			**4,669**					

[1/] A: อิทธิพลของสัดส่วนของอาหารต่อน้ำ, B: อิทธิพลของระยะเวลาในการหมัก, A x B: อิทธิพลร่วมระหว่างสัดส่วนของอาหารต่อน้ำและระยะเวลาในการหมัก, *: $P< 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$, NS: non-significance

[a, b, c, d] ตัวอักษรที่แตกต่างกันที่อยู่ในแนวนอนเดียวกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ *(p<0.05)*

[Y, Z] ตัวอักษรที่แตกต่างกันที่อยู่ในแนวตั้งเดียวกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ *(p<0.05)*

nd: not detected

4.1.2.2 <u>ผลการศึกษาการทดลอง</u> การศึกษาสภาวะการหมัก**<u>อาหารข้นของสุกรระยะรุ่น (ชนิดที่2, +SBM)</u>** ที่เหมาะสม และคุณภาพของอาหารหมักที่ได้ในห้องปฏิบัติการ

จากตาราง 4.6 ผลการทดลองพบว่า ค่า pH ในกลุ่มทดลองที่ 1, 2 และ 3 ที่เวลา 72 ชั่วโมง มีค่า pH ใกล้เคียงกันคือประมาณ 4.6 ในส่วนของจำนวนแบคทีเรียนั้นพบว่าในกลุ่มทดลองที่ 1, 2 และ 3 จะมีจำนวน Lactic acid bacteria ที่ระยะเวลาการหมัก 72 ชั่วโมง มีค่ามากที่สุด คือ 13 $\log_{10}$ cfu/g แต่ที่ระยะเวลาการหมัก 24 และ 48 ชั่วโมง ค่า Lactic acid bacteria ก็สูงเช่นกัน คืออยู่ที่ 8 และ 12 $\log_{10}$ cfu/g จำนวน Enterobacteriaceae มีค่าใกล้เคียงกันคือ 2 และ 3 $\log_{10}$ cfu/g ในส่วนของปริมาณ Lactic acid ในทุกกลุ่มการทดลองที่ระยะเวลาการหมักที่ 24 ชั่วโมงเป็นต้นไปมีค่ามากว่า 150 mmol/L ตามเกณฑ์ที่กำหนดไว้ ซึ่งจากผลการทดลองแสดงให้เห็นปฏิกริยาร่วมของอัตราส่วนของอาหารต่อน้ำและระยะเวลาหมักที่มีต่อ pH ปริมาณ Lactic acid bacteria, Enterobacteriaceae และปริมาณกรดแลคติค คือเมื่ออาหารมีความเจือจางมากขึ้นการเพิ่มขึ้นของ Lactic acid bacteria และปริมาณกรดแลคติค ก็จะน้อยกว่าอาหารที่มีความเข้มข้นกว่า ดังนั้นจากผลการวิเคราะห์ที่กล่าวมาข้างต้นทางผู้วิจัยจึงเลือก 3 ตัวอย่าง คือ กลุ่มทดลองที่ 1 ที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง กลุ่มทดลองที่ 2 ที่ระยะเวลาการหมัก 48 และ 72 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์หาค่าโปรตีนและค่าพลังงาน ซึ่งได้ผลการวิเคราะห์ดังนี้ กลุ่มทดลองที่ 1 ที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง มีค่าโปรตีน 17.35 เปอร์เซ็นต์ ค่าพลังงาน 4,469 กิโลแคลอรี่ต่อกิโลกรัม ในกลุ่มทดลองที่ 2 ที่ระยะเวลาการหมัก 48 และ 72 ชั่วโมง มีค่าโปรตีน 17.56 และ 17.81 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ค่าพลังงานเท่ากับ 4,416 และ 4,484 กิโลแคลอรี่ต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ซึ่งคุณค่าทางทางโภชนะมีค่าไม่แตกต่างกันมากนัก

ตาราง 4.6 ค่า pH, จำนวน Lactic acid bacteria, จำนวน Enterobacteriaceae, ปริมาณกรดแลคติค, ค่าโปรตีนและค่าพลังงานของอาหารข้นสุกรระยะรุ่น (ชนิดที่2, +SBM)

กลุ่มทดลอง	ระยะเวลาในการหมัก (ชั่วโมง)				SEM	Probability[1/]		
	0	24	48	72		A	B	A X B
pH								
กลุ่ม 1 (1:2)	6.10^{a}	4.95^{b}	**4.95^{b}**	4.67^{c}	0.57	NS	***	*
กลุ่ม 2 (1:2.5)	6.10^{a}	4.96^{b}	**4.94^{b}**	**4.59^{c}**	0.58	NS	***	*
กลุ่ม 3 (1:3)	6.10^{a}	4.99^{b}	4.98^{b}	4.61^{c}	0.56	NS	***	*
Lactic acid bacteria (cfu/g)								
กลุ่ม 1 (1:2)	2.5 x10^{5d}	8.9 x10^{8cy}	**1.4** x10^{12bz}	4.3 x10^{13a}	3.25	**	***	***
กลุ่ม 2 (1:2.5)	2.0 x10^{6d}	2.5 x10^{11bz}	**9.7 x10^{8cy}**	**1.5 x10^{13a}**	2.79	**	***	***
กลุ่ม 3 (1:3)	2.5 x10^{5c}	6.9 x10^{8by}	6.9 x10^{8by}	1.5 x10^{13a}	2.78	**	***	***
Enterobacteriaceae (cfu/g)								
กลุ่ม 1 (1:2)	2.6 x10^{7a}	2.1x10^{7a}	**5.0 x10^{3c}**	8.1 x10^{6bz}	1.59	*	***	***
กลุ่ม 2 (1:2.5)	3.0 x10^{7a}	3.2x10^{6b}	**5.0 x10^{2c}**	**6.6 x10^{2cy}**	2.15	*	***	***
กลุ่ม 3 (1:3)	2.2 x10^{7a}	5.9x10^{7a}	1.0 x10^{3c}	9.0 x10^{6bz}	1.78	*	***	***
ปริมาณกรดแลคติคทั้งหมด (mmol/L)								
กลุ่ม 1 (1:2)	92.13^{c}	377.40^{az}	**336.33^{az}**	288.60^{by}	18.06	***	***	***
กลุ่ม 2 (1:2.5)	92.13^{c}	309.69^{by}	**286.38^{by}**	**361.86^{az}**	25.02	***	***	***
กลุ่ม 3 (1:3)	98.79^{c}	279.72^{bx}	265.29^{by}	327.45^{az}	31.38	***	***	***
<u>องค์ประกอบทางโภชนะ</u>								
โปรตีน (%)								
กลุ่ม 1 (1:2)	17.29		**17.35**					
กลุ่ม 2 (1:2.5)	16.97		**17.56**	**17.81**				
พลังงาน (Kcal/Kg.)								
กลุ่ม 1 (1:2)			**4,469**					
กลุ่ม 2 (1:2.5)			**4,416**	**4,484**				

[1/] A: อิทธิพลของสัดส่วนของอาหารต่อน้ำ, B: อิทธิพลของระยะเวลาในการหมัก, A x B: อิทธิพลร่วมระหว่างสัดส่วนของอาหารต่อน้ำและระยะเวลาในการหมัก, *: $P< 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$, NS: non-significance

$^{a, b, c, d}$ ตัวอักษรที่แตกต่างกันที่อยู่ในแนวนอนเดียวกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ *(p<0.05)*

$^{W, Y, Z}$ ตัวอักษรที่แตกต่างกันที่อยู่ในแนวตั้งเดียวกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ *(p<0.05)*

4.1.2.3 <u>ผลการศึกษาการทดลอง</u> การศึกษาสภาวะการหมัก**<u>อาหารข้นของสุกรระยะขุน 1 (ชนิดที่ 3, +SBM)</u>** ที่เหมาะสม และคุณภาพของอาหารหมักที่ได้ในห้องปฏิบัติการ

จากตาราง 4.7 พบว่าค่า pH เริ่มต้นหรือที่ชั่วโมงการหมักที่ 0 ชั่วโมงของทุกกลุ่มทดลองจะอยู่ที่ประมาณ 6 และจะลดลงเรื่อยๆ จนเหลือ pH ประมาณ 4.4 ในชั่วโมงการหมักที่ 48 ชั่วโมง และ 4.3 ในชั่วโมงการหมักที่ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ ปริมาณ Lactic acid bacteria มีค่ามากกว่า 6 $\log_{10}$ cfu/g ตั้งแต่ชั่วโมงการหมักที่ 24 ส่วนปริมาณ Enterobacteriaceae จะมีจำนวน 5 $\log_{10}$ cfu/g ในชั่วโมงการหมักที่ 48 ในกลุ่มทดลองที่ 2 และในชั่วโมงการหมักที่ 72 ในกลุ่มทดลองที่ 1 และ 3 และมีปริมาณ Lactic acid มากกว่า 150 mmol/L ตั้งแต่ชั่วโมงการหมักที่ 24 ซึ่งจากผลการทดลองแสดงให้เห็นปฏิกริยาร่วมของอัตราส่วนของอาหารต่อน้ำและระยะเวลาหมักที่มีต่อ pH ปริมาณ Lactic acid bacteria, Enterobacteriaceae และปริมาณกรดแลคติค คือเมื่ออาหารมีความเจือจางมากขึ้น การเพิ่มขึ้นของ Lactic acid bacteria และปริมาณกรดแลคติค ก็จะน้อยกว่าอาหารที่มีความเข้มข้นกว่า จากผลการทดลองข้างต้นผู้วิจัยจึงเลือก กลุ่มทดลองที่ 1 ชั่วโมงการหมักที่ 72 ชั่วโมง กลุ่มทดลองที่ 2 ชั่วโมงการหมักที่ 48 ชั่วโมง และกลุ่มทดลองที่ 3 ชั่วโมงการหมักที่ 72 ชั่วโมง ไปทำการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนะ ได้แก่ โปรตีน และพลังงาน ผลการวิเคราะห์ พบว่า กลุ่มทดลองที่ 1ชั่วโมงการหมักที่ 72 ชั่วโมง มีโปรตีน 14.30 เปอร์เซ็นต์ และพลังงาน 4,503 กิโลแคลอรี่ต่อกิโลกรัม กลุ่มทดลองที่ 2 ชั่วโมงการหมักที่ 48 ชั่วโมง มีโปรตีน 14.62 เปอร์เซ็นต์ และพลังงาน 4,472 กิโลแคลอรี่ต่อกิโลกรัม และกลุ่มทดลองที่ 3 ชั่วโมงการหมักที่ 72 ชั่วโมงมีโปรตีน 14.11 เปอร์เซ็นต์ และพลังงาน 4,568 กิโลแคลอรี่ต่อกิโลกรัม

ตาราง 4.7 ค่า pH, จำนวน Lactic acid bacteria, จำนวน Enterobacteriaceae, ปริมาณกรดแลคติค, ค่าโปรตีน และค่าพลังงานของอาหารข้นระยะขุน 1 (ชนิดที่ 3, +SBM)

กลุ่มทดลอง	ระยะเวลาในการหมัก (ชั่วโมง)				SEM	Probability[1/]		
	0	24	48	72		A	B	A X B
pH								
กลุ่ม 1 (1:2)	6.01^{a}	4.62^{b}	4.41^{b}	**4.26^{b}**	0.72	NS	***	NS
กลุ่ม 2 (1:2.5)	6.04^{a}	4.65^{b}	**4.37^{b}**	4.30^{b}	0.74	NS	***	NS
กลุ่ม 3 (1:3)	6.10^{a}	4.66^{b}	4.41^{b}	**4.28^{b}**	0.77	NS	***	NS
Lactic acid bacteria (cfu/g)								
กลุ่ม 1 (1:2)	2.4x10^{5d}	6.0x10^{8cy}	3.5x10^{12b}	**6.6x10^{13a}**	3.14	*	***	***
กลุ่ม 2 (1:2.5)	4.9x10^{6d}	8.3x10^{9cy}	**2.8x10^{11b}**	4.7x10^{13a}	2.84	*	***	***
กลุ่ม 3 (1:3)	1.7x10^{6c}	1.1x10^{11bz}	2.0x10^{11b}	**1.6x10^{12a}**	2.49	*	***	***
Enterobacteriaceae (cfu/g)								
กลุ่ม 1 (1:2)	4.4x10^{4c}	2.1x10^{6ax}	1.7x10^{6a}	**3.6x10^{5by}**	0.99	*	***	***
กลุ่ม 2 (1:2.5)	3.8x10^{4d}	1.3x10^{8ay}	**3.7x10^{5c}**	1.1x10^{7bz}	1.41	*	***	***
กลุ่ม 3 (1:3)	1.2x10^{5c}	3.2x10^{10az}	1.2x10^{6b}	**1.6x10^{5cy}**	2.19	*	***	***

ตาราง 4.7 (ต่อ)

กลุ่มทดลอง	ระยะเวลาในการหมัก (ชั่วโมง)				SEM	Probability[1/]		
	0	24	48	72		A	B	A X B
ปริมาณกรดแลคติคทั้งหมด (mmol/L)								
กลุ่ม 1 (1:2)	86.58^{d}	414.03^{cz}	543.90^{bz}	**634.92^{az}**	16.96	***	***	***
กลุ่ม 2 (1:2.5)	82.14^{c}	355.2^{by}	**493.95^{ay}**	489.51^{ay}	34.56	***	***	***
กลุ่ม 3 (1:3)	82.14^{c}	344.1^{by}	445.11^{ay}	**487.29^{ay}**	21.23	***	***	***
องค์ประกอบทางโภชนะ								
โปรตีน (%)								
กลุ่ม 1 (1:2)	14.98			**14.3**				
กลุ่ม 2 (1:2.5)	14.04		**14.62**					
กลุ่ม 3 (1:3)	14.42			**14.11**				
พลังงาน (Kcal/Kg.)								
กลุ่ม 1 (1:2)				**4,503**				
กลุ่ม 2 (1:2.5)			**4,472**					
กลุ่ม 3 (1:3)				**4,568**				

[1/] A: อิทธิพลของสัดส่วนของอาหารต่อน้ำ, B: อิทธิพลของระยะเวลาในการหมัก, A x B: อิทธิพลร่วมระหว่างสัดส่วนของอาหารต่อน้ำและระยะเวลาในการหมัก, *: $P< 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$, NS: non-significance

[a, b, c, d] ตัวอักษรที่แตกต่างกันที่อยู่ในแนวนอนเดียวกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ *(p<0.05)*

[W, Y, Z] ตัวอักษรที่แตกต่างกันที่อยู่ในแนวตั้งเดียวกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ *(p<0.05)*

4.1.2.4 <u>ผลการศึกษาการทดลอง</u> การศึกษาสภาวะการหมัก**<u>อาหารข้นของสุกรระยะขุน 2 (ชนิดที่ 4, +SBM)</u>** ที่เหมาะสม และคุณภาพของอาหารหมักที่ได้ในห้องปฏิบัติการ

จากตาราง 4.8 พบว่า กลุ่มทดลองที่ 2 และ 3 ที่ชั่วโมงการหมักที่ 48 ชั่วโมง และชั่วโมงการหมักที่ 72 ชั่วโมง ของทุกกลุ่มทดลองจะมีค่า pH ต่ำกว่า 4.5 ในส่วนของปริมาณ Lactic acid bacteria พบว่า ชั่วโมงการหมักที่ 24 ชั่วโมงเป็นต้นไปของทุกกลุ่มทดลองจะมีค่ามากกว่า 6 $\log_{10}$ cfu/g และปริมาณ Enterobacteriaceae ที่ 4 $\log_{10}$ cfu/g จะพบใน (1) กลุ่มทดลองที่ 2 ที่ชั่วโมงการหมักที่ 48 ชั่วโมง (2) กลุ่มทดลองที่ 2 ที่ชั่วโมงการหมักที่ 72 ชั่วโมง และ (3) กลุ่มทดลองที่ 3 ที่ชั่วโมงการหมักที่ 72 ชั่วโมง ส่วนปริมาณ Lactic acid นั้น ตั้งแต่ชั่วโมงการหมักที่ 24 ชั่วโมงเป็นต้นไปมีปริมาณ Lactic acid มากกว่า 150 mmol/L ตามเกณฑ์ที่ตั้งไว้ ซึ่งจากผลการทดลองแสดงให้เห็นปฏิกิริยาร่วมของอัตราส่วนของอาหารต่อน้ำและระยะเวลาหมักที่มีต่อปริมาณ Enterobacteriaceae และปริมาณกรดแลคติค คือเมื่ออาหารมีความเจือจางมากขึ้นการเพิ่มขึ้นของปริมาณกรดแลคติค ก็จะน้อยกว่าอาหารที่มีความเข้มข้นกว่า ในขณะที่ปริมาณ Enterobacteriaceae จะมากเมื่ออาหารมีความเจือจางแต่ลดลงเมื่อระยะเวลาการหมักนานขึ้นและลดลงได้มากกว่าเมื่ออาหารเจือจางมากกว่า

ตาราง 4.8 ค่า pH, จำนวน Lactic acid bacteria, จำนวน Enterobacteriaceae, ปริมาณกรดแลคติค, ค่าโปรตีน และค่าพลังงานของอาหารข้นของสุกรระยะขุน 2 (ชนิดที่ 4, +SBM)

กลุ่มทดลอง	ระยะเวลาในการหมัก (ชั่วโมง)				SEM	Probability[1/]		
	0	24	48	72		A	B	A X B
pH								
กลุ่ม 1 (1:2)	6.23^{a}	4.09^{b}	4.53^{b}	4.06^{b}	0.94	NS	***	NS
กลุ่ม 2 (1:2.5)	6.19^{a}	4.06^{b}	**4.45^{b}**	**4.01^{b}**	0.92	NS	***	NS
กลุ่ม 3 (1:3)	6.20^{a}	4.07^{b}	4.41^{b}	**4.05^{b}**	0.92	NS	***	NS
Lactic acid bacteria (cfu/g)								
กลุ่ม 1 (1:2)	1.1x10^{4cy}	1.8x10^{11b}	4.4x10^{12a}	1.8x10^{12a}	3.42	**	***	NS
กลุ่ม 2 (1:2.5)	9.5x10^{3dx}	4.9x10^{10c}	**1.2x10^{11b}**	**3.9x10^{12a}**	3.49	**	***	NS
กลุ่ม 3 (1:3)	1.0x10^{5dz}	5.1x10^{10c}	2.3x10^{12b}	**1.1x10^{13a}**	3.12	**	***	NS
Enterobacteriaceae (cfu/g)								
กลุ่ม 1 (1:2)	3.1x10^{4c}	3.3x10^{9az}	1.2x10^{5b}	1.4x10^{5b}	1.93	*	***	***
กลุ่ม 2 (1:2.5)	4.0x10^{4b}	9.2x10^{6ay}	**7.0x10^{4b}**	**6.1x10^{4b}**	0.99	*	***	***
กลุ่ม 3 (1:3)	1.5x10^{5b}	1.3x10^{10az}	2.5x10^{5b}	**1.2x10^{4c}**	2.71	*	***	***
ปริมาณกรดแลคติคทั้งหมด (mmol/L)								
กลุ่ม 1 (1:2)	84.36^{d}	371.85^{cz}	473.97^{bz}	745.92^{az}	20.9	***	***	***
กลุ่ม 2 (1:2.5)	89.91^{d}	394.05^{cz}	**473.97^{bz}**	**740.37^{az}**	18.6	***	***	***
กลุ่ม 3 (1:3)	82.14^{d}	341.88^{cy}	448.44^{by}	**638.25^{ay}**	32.56	***	***	***
<u>องค์ประกอบทางโภชนะ</u>								
โปรตีน (%)								
กลุ่ม 2 (1:2.5)	12.56		**12.61**	**12.38**				
กลุ่ม 3 (1:3)	12.8			**12.63**				
พลังงาน (Kcal/Kg.)								
กลุ่ม 2 (1:2.5)			**4,477**	**4,497**				
กลุ่ม 3 (1:3)				**4,445**				

[1/] A: อิทธิพลของสัดส่วนของอาหารต่อน้ำ, B: อิทธิพลของระยะเวลาในการหมัก, A x B: อิทธิพลร่วมระหว่างสัดส่วนของอาหารต่อน้ำและระยะเวลาในการหมัก, *: $P< 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$, NS: non-significance

$^{a, b, c, d}$ ตัวอักษรที่แตกต่างกันที่อยู่ในแนวนอนเดียวกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ *(p<0.05)*

$^{Y, Z}$ ตัวอักษรที่แตกต่างกันที่อยู่ในแนวตั้งเดียวกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ *(p<0.05)*

ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือก (1) กลุ่มทดลองที่ 2 ที่ชั่วโมงการหมักที่ 48 ชั่วโมง (2) กลุ่มทดลองที่ 2 ที่ชั่วโมงการหมักที่ 72 ชั่วโมง และ (3) กลุ่มทดลองที่ 3 ที่ชั่วโมงการหมักที่ 72 ชั่วโมง ไปวิเคราะห์ค่าโปรตีนและพลังงาน ได้ผลการวิเคราะห์ดังนี้ (1) กลุ่มทดลองที่ 2 ที่ชั่วโมงการหมักที่ 48 ชั่วโมง โปรตีนเท่ากับ 12.61 เปอร์เซ็นต์ พลังงานเท่ากับ 4,477 กิโลแคลอรี่ต่อกิโลกรัม (2) กลุ่มทดลองที่ 2 ที่ชั่วโมงการหมักที่ 72 ชั่วโมง โปรตีนเท่ากับ 13.38 เปอร์เซ็นต์ พลังงานเท่ากับ 4,497 กิโลแคลอรี่ต่อกิโลกรัม และ(3) กลุ่มทดลองที่ 3 ที่ชั่วโมงการหมักที่ 72 ชั่วโมง โปรตีนเท่ากับ 13.63 เปอร์เซ็นต์ พลังงานเท่ากับ 4,445 กิโลแคลอรี่ต่อกิโลกรัม

4.1.3. <u>การทดลองที่ 3</u>: ศึกษาสภาวะการหมักที่เหมาะสมของอาหารข้นผสมกรดซิตริค

จากตาราง 4.9 เมื่อพิจารณาค่าที่เหมาะสมตามเกณฑ์ที่กำหนดไว้ คือ ค่า pH ต่ำกว่า 4.5 ปริมาณ Lactic acid bacteria มากกว่า 6 log_{10}cfu/g และปริมาณ Enterobacteriaceae ต่ำกว่า 4 log_{10}cfu/g พบว่า กลุ่มทดลองที่ 1 ซึ่งเติมกรดซิตริคในระดับ 1.1% จะมีค่า pH ลดลงที่ระยะการหมัก 48 และ 72 ชั่วโมง เท่ากับ 4.11 และ 3.88 ตามลำดับ ในกลุ่มทดลองที่ 2 ที่เติมกรดซิตริคในระดับ 1.2% ลดลงที่ระยะการหมัก 48 และ 72 ชั่วโมง เท่ากับ 3.96 และ 3.87 ตามลำดับ ซึ่งค่า pH ในระยะเวลาการหมักที่ 48 ชั่งโมงในกลุ่มทดลองที่ 1 และกลุ่มทดลองที่ 2 แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ปริมาณ Lactic acid bacteria ในกลุ่มทดลองที่ 1 ซึ่งเติมกรดซิตริคที่ระดับ 1.1% จะมีจำนวนเพิ่มขึ้นในระยะการหมักที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เท่ากับ 5.1×10^{7} , 4.7×10^{8} และ 5.4×10^{8} cfu/g ตามลำดับ ในกลุ่มทดลองที่ 2 ซึ่งเติมกรดซิตริคในระดับ 1.2% มีจำนวนเพิ่มขึ้นในระยะการหมักที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เท่ากับ 4.9×10^{7} , 8.0×10^{8} และ 4.8×10^{8} cfu/g ตามลำดับ และปริมาณ Enterobacteriaceae ในกลุ่มทดลองที่ 1 ซึ่งเติมกรดซิตริคในระดับ 1.1% มีจำนวนลดลงในระยะการหมักที่ 48 และ 72 ชั่วโมง เท่ากับ 2.8×10^{4} และ 2.2×10^{4} cfu/g ตามลำดับ ในกลุ่มทดลองที่ 2 ซึ่งเติมกรดซิตริคในระดับ 1.2% มีจำนวนลดลงในระยะการหมักที่ 48 และ 72 ชั่วโมง เท่ากับ 5.1×10^{4} และ 4.0×10^{4} cfu/g ตามลำดับ

ตาราง 4.9 แสดงค่า pH, จำนวน Lactic acid bacteria และ Enterobacteriaceae ของอาหารข้นที่เติมกรดซิตริคในกระบวนการหมัก โดยใช้อัตราส่วนอาหารข้นต่อน้ำ 1:2.5

กลุ่มทดลอง	ระยะเวลาในการทดลอง (ชั่วโมง)				SEM	Probability[1/]		
	0	24	48	72		A	B	A X B
pH								
กลุ่ม 1 (1.1%)	5.27[a]	5.06[a]	**4.11**[b]	**3.88**[c]	0.65	NS	***	NS
กลุ่ม 2 (1.2%)	5.21[a]	5.04[a]	**3.96**[b]	**3.87**[b]	0.63	NS	***	NS
Lactic acid bacteria (cfu/g)								
กลุ่ม 1 (1.1%)	1.6×10^{3}[3c]	5.1×10^{7}[7b]	**4.7×10^{8}**[8a]	**5.4×10^{8}**[8a]	2.05	NS	***	NS
กลุ่ม 2 (1.2%)	2.7×10^{3}[3c]	4.9×10^{7}[7b]	**8.0×10^{8}**[8a]	**4.8×10^{8}**[8a]	1.98	NS	***	NS
Enterobacteriaceae (cfu/g)								
กลุ่ม 1 (1.1%)	5.0×10^{2}[2c]	2.7×10^{7}[7a]	**2.8×10^{4}**[4b]	**2.2×10^{4}**[4b]	1.77	NS	***	NS
กลุ่ม 2 (1.2%)	1.4×10^{3}[3c]	2.4×10^{7}[7a]	**5.1×10^{4}**[4b]	**4.0×10^{4}**[4b]	1.49	NS	***	NS

[1/] A: อิทธิพลของสัดส่วนของอาหารต่อน้ำ, B: อิทธิพลของระยะเวลาในการหมัก, A x B: อิทธิพลร่วมระหว่างสัดส่วนของอาหารต่อน้ำและระยะเวลาในการหมัก, *: P< 0.05, **: P < 0.01, ***: P < 0.001, NS: non-significance

[a, b, c] ตัวอักษรที่แตกต่างกันที่อยู่ในแนวนอนเดียวกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ *(p<0.05)*

ดังนั้นเมื่อพิจารณาค่าที่เหมาะสมของอาหารข้นหมักที่เติมกรดซิตริคในระดับ 1.1% และ 1.2% พบว่าระยะเวลาการหมักที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 48 และ 72 ชั่วโมง เนื่องจาก ค่า pH ปริมาณ Lactic acid bacteria และปริมาณ Enterobacteriaceae มีค่าใกล้เคียงกัน ดังนั้นสามารถใช้กรดซิตริคเติมในอาหารหมักได้ที่ระดับ 1.1% และ 1.2%

4.1.4 <u>การทดลองที่ 4:</u> ศึกษาสภาวะการหมักที่เหมาะสมของอาหารข้นผสมกรดฟอร์มิค

จากตาราง 4.10 เมื่อพิจารณาค่าที่เหมาะสมตามเกณฑ์ที่กำหนดไว้ คือ ค่า pH ต่ำกว่า 4.5 ปริมาณ Lactic acid bacteria มากกว่า 6 log_{10}cfu/g และปริมาณ Enterobacteriaceae ต่ำกว่า 4 log_{10}cfu/g พบว่า ค่า pH ในกลุ่มทดลองที่ 1 ที่เติมกรดฟอร์มิคในระดับ 0.5% ลดลงในระยะการหมักที่ 48 และ 72 ชั่วโมง เท่ากับ 4.21 และ 3.88 ตามลำดับ ในกลุ่มทดลองที่ 2 ที่เติมกรดฟอร์มิคในระดับ 0.6% ลดลงในระยะการหมักที่ 48 และ 72 ชั่วโมง เท่ากับ 4.61 และ 3.94 ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ปริมาณ Lactic acid bacteria ในกลุ่มทดลองที่ 1 ที่เติมกรดฟอร์มิคในระดับ 0.5% มีจำนวนเพิ่มขึ้นในระยะการหมักที่ 48 และ 72 ชั่วโมง เท่ากับ $1.1x10^9$ และ $9.9x10^9$ ตามลำดับ ในกลุ่มทดลองที่ 2 ที่เติมกรดฟอร์มิคในระดับ 0.6% เพิ่มขึ้นในระยะการหมักที่ 48 และ 72 ชั่วโมง เท่ากับ $4.0x10^8$ และ $1.1x10^9$ cfu/g ตามลำดับ ซึ่งปริมาณ Lactic acid bacteria ในระยะเวลาการหมักที่ 48 ชั่วโมงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) และปริมาณ Enterobacteriaceae ในกลุ่มทดลองที่ 1 ที่เติมกรดฟอร์มิคในระดับ 0.5% ลดลงในระยะการหมักที่ 48 และ 72 ชั่วโมง เท่ากับ $3.6x10^4$ และ $1.3x10^3$ cfu/g ตามลำดับ ในกลุ่มทดลองที่ 2 ที่เติมกรดฟอร์มิคในระดับ 0.6% ลดลงในระยะการหมักที่ 48 และ 72 ชั่วโมง เท่ากับ $1.7x10^4$ และ $3.5x10^3$ cfu/g ตามลำดับ ดังนั้นเมื่อพิจารณาค่าที่เหมาะสมของของการเติมกรดฟอร์มิคในอาหารหมักเหลว พบว่ากลุ่มทดลองที่ 1 ที่เติมกรดฟอร์มิคในระดับ 0.5% ที่ระยะเวลาการหมักที่ 48-72 ชั่วโมง เหมาะสมมากที่สุด

ตาราง 4.10 ค่า pH, จำนวน Lactic acid bacteria และ Enterobacteriaceae ของอาหารข้นที่เติมกรดฟอร์มิคในกระบวนการหมักโดยใช้อัตราส่วนอาหารข้นต่อน้ำ 1:2.5

กลุ่มทดลอง	ระยะเวลาในการหมัก (ชั่วโมง)				SEM	Probability[1/]		
	0	24	48	72		A	B	A X B
pH								
กลุ่ม 1 (0.5%)	5.37^{a}	5.30^{a}	**4.21^{b}**	**3.88^{c}**	0.69	NS	***	NS
กลุ่ม 2 (0.6%)	5.18^{a}	5.18^{a}	**4.61^{b}**	**3.94^{c}**	0.56	NS	***	NS
Lactic acid bacteria (cfu/g)								
กลุ่ม 1 (0.5%)	$1.3x10^{3c}$	$3.0x10^{5b}$	**$1.1\ x10^{9a}$**	**$9.9\ x10^{9a}$**	3.11	NS	***	NS
กลุ่ม 2 (0.6%)	$1.4x10^{3d}$	$1.5x10^{5c}$	**$4.0x10^{8b}$**	**$1.1\ x10^{9a}$**	2.71	NS	***	NS
Enterobacteriaceae (cfu/g)								
กลุ่ม 1 (0.5%)	$3.4x10^{3c}$	$4.7x10^{7a}$	**$3.6x10^{4b}$**	**$1.3x10^{3c}$**	1.81	NS	***	NS
กลุ่ม 2 (0.6%)	$1.9x10^{3c}$	$1.5x10^{8a}$	**$1.7x10^{4b}$**	**$3.5x10^{3c}$**	2.27	NS	***	NS

[1/] A: อิทธิพลของสัดส่วนของอาหารต่อน้ำ, B: อิทธิพลของระยะเวลาในการหมัก, A x B: อิทธิพลร่วมระหว่างสัดส่วนของอาหารต่อน้ำและระยะเวลาในการหมัก, *: P<0.05, **: P < 0.01, ***: P < 0.001, NS: non-significance

[a, b, c] ตัวอักษรที่แตกต่างกันที่อยู่ในแนวนอนเดียวกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ *($p<0.05$)*

บทที่ 5
วิจารณ์ผลการทดลอง

เมื่ออาหารสัตว์ถูกแช่ในน้ำในช่วงระยะเวลาหนึ่ง แบคทีเรียแลคติคและยีสต์ที่มีอยู่ตามธรรมชาติในวัตถุดิบอาหารสัตว์ก็จะขยายเพิ่มจำนวนขึ้นเมื่อสภาวะแวดล้อมเหมาะสมได้ผลผลิตหลักคือกรดแลคติค กรดอะซิติค เอธานอล ทำให้ส่วนผสมมี pH ลดต่ำลง ซึ่งการลดต่ำลงของ pH เนื่องมาจากการเพิ่มของกรดแลคติค เป็นสิ่งที่ต้องการสำหรับอาหารหมัก เพื่อเป็นการป้องกันจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเน่าเสีย หรือเชื้อโรคที่มากับอาหาร (Nout et. al. 1989; Russel and Diez-Gonzales, 1998; Van Winsen et. al., 2001a) ถ้าอุณหภูมิในถังหมักประมาณ 20 องศาเซลเซียส แช่อาหารเป็นเวลา 8 ชั่วโมง และนำอาหารที่แช่น้ำไว้ 50 % ผสมกับอาหารข้นเพื่อให้มี pH ต่ำกว่า 4.5 ซึ่งพบว่ามี coliform bacteria อยู่ในระดับต่ำ มี Lactic acid bacteria และยีสต์อยู่ในปริมาณมาก และมีกรดแลคติคอยู่ในปริมาณมาก ซึ่งถือว่าเป็นอาหารหมักคุณภาพดี (Jensen and Mikkelsen, 1998; Canibe and Jensen, 2003) แต่จากการทดลองนี้ อุณหภูมิของน้ำในถังหมักอยู่ที่ประมาณ 28-30 องศาเซลเซียส ซึ่งจะใช้เวลาหมักเพื่อให้ได้ลักษณะอาหารหมักเหลวที่เหมาะสมดังกล่าวเพียง 48 ชั่วโมงเท่านั้น Canibe and Jensen (2003) หมักอาหารเหลว อัตราส่วนอาหารต่อน้ำ 1:2.5 ที่อุณหภูมิ 20 °C พบว่าใช้เวลา 4 วัน ซึ่งพบว่า อาหารที่ผ่านการหมักมีปริมาณ LAB มากที่สุดคือ 9.4 log cfu/g และมีกรดแลคติคประมาณ 169 mmol/kg มี *Enterobacteriaceae* น้อยกว่า 3.2 log cfu/g และ pH 4.4 เปรียบเทียบกับอาหารเหลวที่ไม่ได้ผ่านการหมักซึ่งมี LAB 7.2 log cfu/g มี *Enterobacteriaceae* 6.2 log cfu/g และ pH 4.4 ตามที่ Lyberg et al. (2005) ทดสอบการหมักอาหารเหลวซึ่งประกอบด้วยธัญพืชผสม ข้าวสาลี ข้าวบาเล่ย์ และไตรติเคล (triticale) โดยมีแหล่งที่แตกต่างกัน 3 ชนิด ได้แก่ หางนม (whey) ส่าเบียร์เปียก (wet wheat distillers'grain (DDG) และน้ำ ซึ่งพบว่า การหมักอาหารทั้ง 3 ที่อุณหภูมิ 10 °C ทำให้ pH ลดลงถึง 4 ในวันที่ 5 ของการหมัก โดยการหมักที่อุณหภูมิสูง (20 °C) มีผลทำให้ pH ลดลงถึง 4 เร็วกว่าที่อุณหภูมิต่ำกว่า นอกจากนี้ยังพบอีกว่า จำนวน LAB มากที่สุดเมื่อหมักด้วยน้ำที่อุณหภูมิสูง รวมทั้งมีปริมาณกรดอินทรีย์เพิ่มขึ้น ตามอุณหภูมิการหมักที่เพิ่มขึ้น และไม่พบ *Enterobacteriaceae* จากการหมักด้วยน้ำในทุกสภาพอุณหภูมิ (10, 15 หรือ 20 °C) แต่อย่างใด แสดงให้เห็นว่า การหมักธัญพืชผสมด้วยน้ำเพียงอย่างเดียว สามารถนำมาใช้เป็นอาหารสุกรได้อย่างปลอดภัย และการหมักที่อุณหภูมิสูงให้ผลเร็วกว่าที่อุณหภูมิต่ำ ซึ่งเช่นเดียวกับที่เคยมีรายงานไว้ว่า ถ้าหมักอาหารที่อุณหภูมิ 20 °C ต้องใช้เวลาในการหมักถึง 96 ชั่วโมง หรือ 4 วัน ถึงจะให้ปริมาณกรดแลคติคใกล้เคียงกับเมื่อหมักที่อุณหภูมิ 37 °C ที่ใช้เวลาในการหมักเพียง 48 ชั่วโมง หรือ 2 วัน (ความเข้มข้นของกรดแลคติค 229-254 nM) แต่สำหรับผลการทดลองนี้ที่ได้ คือการหมักที่อุณหภูมิ 28-30 °C ในอัตราส่วนของอาหาร:น้ำ 1:2.5 ทำให้ได้ปริมาณกรดแลคติค มากกว่า 200 mmol/kg ตั้งแต่การหมักที่ 24 ชั่วโมงเป็นต้นไป แต่การลดลงของ pH และ *Enterobacteriaceae* การเพิ่มขึ้นของ LAB จนอยู่ในเกณฑ์ที่ปลอดภัยและเหมาะสมสามารถนำไปใช้เลี้ยงสุกรได้จะเกิดขึ้นหลัง 48 ชั่วโมงเป็นต้นไป ยกเว้นในอาหารสุกรอนุบาล-เล็ก ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากอาหารสุกรระยะนี้ มีส่วนประกอบของน้ำมันพืชอยู่ถึง 3% ทำให้ไปขัดขวางกระบวนการหมักของจุลินทรีย์ การเกิดกรดในอาหารจึงเกิดช้า ทำให้ไม่ปลอดภัยสำหรับสุกรระยะเล็ก แต่การเติมกรดช่วยปรับระดับ pH เริ่มต้นให้อยู่ที่ประมาณ 5 ก็สามารถควบคุมกระบวนการหมักได้อย่างมีประสิทธิภาพ และมีความปลอดภัย โดยใช้อัตราส่วนของอาหารข้นต่อน้ำ 1:2.5 และระยะเวลาในการหมัก 48 ชั่วโมง เช่น เดียวกับอาหารสุกรชนิดอื่นๆ

บทที่ 6
สรุปผลการวิจัย

6.1 สรุปอาหารสุกรระยะเล็ก (ชนิดที่ 1 สำหรับสุกรน้ำหนักตัว 10-20 กิโลกรัม)

จากผลการศึกษาการเติมกรดในอาหารหมักเหลวในตาราง 4.9 และ 4.10 พบว่าการเติมกรดซิตริคในระดับ 1.1% และการเติมกรดฟอร์มิคในระดับ 0.5% ในระยะเวลาการหมักที่ 48-72 ชั่วโมงสามารถเพิ่มปริมาณ Lactic acid bacteria และลดค่า pH ให้ต่ำลง ซึ่งจะขัดขวางการทำงานของ Enterobacteriaceae ที่ทำให้เกิดโรคกับสุกรได้ เมื่อเปรียบเทียบด้านราคาระหว่างกรดซิตริค และกรดฟอร์มิค พบว่ากรดซิตริคมีราคา 90 บาท/กก. และกรดฟอร์มิคมีราคา 875 บาท/ลิตร ซึ่งกรดฟอร์มิคมีราคาที่สูงกว่ากรดซิตริคหลายเท่า ดังนั้นเราจึงควรเลือกใช้กรดซิตริคมาเติมในอาหารหมักเหลวในระดับ 1.1% ดังนั้นอาหารข้นหมักอัตราส่วนอาหารต่อน้ำ 1:2.5 เติมกรดซิตริคในระดับ 1.1% ระยะเวลาการหมักที่ 48 ชั่วโมง มีความเหมาะสมสำหรับใช้เลี้ยงสุกรโครงการวิจัยที่ 2 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการผลิตสุกรต่อไป

6.2 สรุปอาหารสุกรระยะรุ่น (ชนิดที่ 2 สำหรับสุกรน้ำหนักตัว 20-50 กิโลกรัม)

จากผลการศึกษาที่ 4.1.1.2 และ 4.1.2.2 จะเห็นได้ว่า ถ้าเป็นอาหารที่ไม่รวมแหล่งโปรตีนจากกากถั่วเหลือง จากการทดลองที่ 4.1.1.2 อัตราส่วนอาหารต่อน้ำที่เหมาะสมได้ตั้งแต่ 1:2 หรือ 1:2.5 และระยะเวลาการหมักที่ 72 ชั่วโมง ถ้าเป็นอาหารที่รวมแหล่งโปรตีนจากกากถั่วเหลือง จากการทดลองที่ 4.1.2.2 อัตราส่วนอาหารต่อน้ำที่เหมาะสม คือ 1:2.5 ระยะเวลาการหมักที่ 72 ชั่วโมง นอกจากมีค่า pH ที่ยอมรับได้แล้ว คุณค่าทางโภชนะไม่เปลี่ยนแปลงไปจากเดิมมากนัก ดังนั้นเพื่อความสะดวกในการปฏิบัติงานจึงนำอาหารข้นอัตราส่วนอาหารต่อน้ำ 1:2.5 ระยะเวลาการหมักที่ 48 ชั่วโมง เป็นต้นไป ไปใช้ทดสอบการเลี้ยงในสุกรต่อไป

6.3 สรุปอาหารสุกรระยะขุน 1 (ชนิดที่ 3 สำหรับสุกรน้ำหนักตัว 50-80 กิโลกรัม)

จากผลการศึกษาที่ 4.1.1.3 และ 4.1.2.3 จะเห็นได้ว่า ถ้าเป็นอาหารที่ไม่รวมแหล่งโปรตีนจากกากถั่วเหลือง จากการทดลองที่ 4.1.1.3 อัตราส่วนอาหารต่อน้ำที่เหมาะสมได้ตั้งแต่ 1:2.5 หรือ 1:3 และระยะเวลาการหมักที่ 72 ชั่วโมง ถ้าเป็นอาหารที่รวมแหล่งโปรตีนจากกากถั่วเหลือง จากการทดลองที่ 4.1.2.3 อัตราส่วนอาหารต่อน้ำที่เหมาะสม คือ 1:2.5 ระยะเวลาการหมักที่ 72 ชั่วโมง นอกจากมีค่า pH ที่ยอมรับได้แล้ว คุณค่าทางโภชนะไม่เปลี่ยนแปลงไปจากเดิมมากนัก ดังนั้นเพื่อความสะดวกในการปฏิบัติงานจึงนำอาหารข้นอัตราส่วนอาหารต่อน้ำ 1:2.5 ระยะเวลาการหมักที่ 72 ชั่วโมง ไปใช้ทดสอบการเลี้ยงในสุกรต่อไป

6.4 สรุปอาหารสุกรระยะขุน 2 (ชนิดที่ 4 สำหรับสุกรกิโลกรัม 80-100 กิโลกรัม)

จากผลการศึกษาที่ 4.1.1.4 และ 4.1.2.4 จะเห็นได้ว่า ถ้าเป็นอาหารที่ไม่รวมแหล่งโปรตีนจากกากถั่วเหลือง จากการทดลองที่ 4.1.1.4 อัตราส่วนอาหารต่อน้ำที่เหมาะสมได้ตั้งแต่ 1:2, 1:2.5 หรือ 1:3 และระยะเวลาการหมักที่ 72 ชั่วโมง ถ้าเป็นอาหารที่รวมแหล่งโปรตีนจากกากถั่วเหลือง จากการทดลองที่ 4.1.2.4 อัตราส่วนอาหารต่อน้ำที่เหมาะสม คือ 1:2.5 ระยะเวลาการหมัก ที่ 48 หรือ 72 ชั่วโมง นอกจากมีค่า pHที่ยอมรับได้แล้ว ปริมาณ Enterobacteriaceae อยู่ในระดับที่ปลอดภัย คุณค่าทางโภชนะไม่

เปลี่ยนแปลงไปจากเดิมมากนัก ดังนั้นเพื่อความสะดวกในการปฏิบัติงาน จึงนำอาหารข้นอัตราส่วนอาหารต่อน้ำ 1:2.5 ระยะเวลาการหมักที่ 48 เป็นต้นไป ถึง 72 ชั่วโมง ไปใช้ทดสอบการเลี้ยงในสุกรต่อไป

บรรณานุกรม

ธีรพร กงบังเกิด. 2546. จุลชีววิทยาอาหาร. ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร. 198 น.

อารีรัตน์ ลุนผา. 2546. แลคติคแอซิดแบคทีเรีย ทางเลือกใหม่ในการเพิ่มคุณภาพของพืชหมัก. วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีการเกษตร วิชาเอกสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. สืบค้นเมื่อ 1 มีนาคม 2551, จาก http://www.agri.ubu.ac.th/seminar/masterstu/Lactic_Acid_Bacteria.htm

AOAC. 2000. Official Methods of Analysis. Of AOAC International. (17th ed.). AOAC International. Aryland.

Beal, J.D., C.A. Moran, A. Campbell, and P.H. Brooks. 2001. The Survival of Potential Pathogenic *E.coli* in fermented liquid feed. Pp 351-353. *In* J.E. Lindberg and B. Ogle (Eds). Digestive Physiology of pigs. CABI Publishing.

Canibe, N., and B.B. Jensen. 2003. Fermented and non-fermented liquid feed to growing pigs: effect on aspects of gastrointestinal ecology and growth performance. J. Anim. Sci. 81: 2019-2031

Canibe, N, O. Hojberg, J.H. Badsberg, and B.B. Jensen. 2007. Effect of feeding fermented liquid feed and fermented grain on gastrointestinal ecology and growth performance in piglets. J. Anim. Sci. 85: 2959-2771.

Fuller, R. 2007. History and development of probiotics. http://www.albertaclassic.net/probitics.php

Hong, T.T.T. and J.E. Linberg. 2007. Effect of cooking and fermentation of a pig diet on gut environment and digestibility in growing pig. Livest. Sci. 109: 135-137.

Jensen, B.B. and L.L. Mikkelsen. 1998. Feeding liquid to pigs. pp 107-126. *In* P.C. Gansworthy, J. Wiseman, (eds). Recent developments in pig nutrition 3. Nottingham University Press, UK.

Jongbloed, A.W. and R. Jongbloed. 1996. The effect of organic acids in diets for growing pigs on enhancement of microbial phytase efficacy. Report ID-DLO No. 96009. Lelystad, The Natherlands.

Kurti, P., and C. Hansen. 2007. Microbial balance and optimal digestion in pigs. http://www.thepigsite.com/article/3/feed-nutrition-and-water/1603/microbial-balance-and-optimal-digestion-in-pigs. 5 p.

Lyberg, K., A. Simonsson, and J.E. Lindberg 2005. Influence of phosphorus level and soaking of food on phosphorus availability and performance in growing-finishing pigs. Anim. Sci. 81: 375-381

Metchnikoff, E. 1907. The Prolongation of life. London: Heinemann.

Mikkelsen, L.L. and B.B. Jensean. 1998. Performance and microbial activity in the gastrointestinal tract of piglets fed fermented liquid feed at weaning. J. Anim. Feed Sci. 7: 211-215.

Missotten, J.A.M., J. Goris, J. Michiels, E. van Coillie, L. Herman, S. De Smet, N.A. Dierick, and M. Heyndrickx. 2009. Screening of isolated lactic acid bacteria as potential beneficial strains for fermented liquid pig feed production. Anim. Feed Sci. Technol. 150: 122-138.

Naidu, A.S. and R.A. Clemens. 2000. Probiotics. pp 431-462. *In* Natural food antimicrobial systems, A.S. Naidu (Ed). CRC Press LLC, 2000 N.W. Corporate Blvd., Boca Ration, Florida, USA.

Nout, M.J.R., F.M. Rombouts, and A. Havelaar. 1989. Effect of accelerated natural lactic fermentation of infant food ingredients on some pathogenic microorganisms. In. J. Food Microbiol. 8: 351-361.

NRC. 1998. Nutrient Requirements of swine. 10th ed. National Academy Press, Washington, DC.

Pederson, C., and J.E. Lindberg. 2003. Effect of fermentation in a liquid diet on nitrogen metabolism in growing pigs. Pp: 641-644., E.A.A.P. publication No. 109.

Roth, F.X., Eidelsberger, U., and M. Kirchgessner. 1993. Zur Nutritiven Wirksamkeit von Michsaeure Ferkelaufzuct. Agribiol. Res.46: 229-239.

Russel, J.B. and F. Diez-Gonzales. 1998. The effects of fermentation acids on bacterial growth. Adv. Microb. Physiol. 39: 205-234.

Russell, P.J., Geary, T.M., Brooks, P.H., and A. Campbell. 1996. Performance, water use and effluent output of weaner pig fed *ad libitum* with either dry pellets or liquid feed and the role microbial activity in the liquid feed. J. Sci. Food Agric. 72: 8-16.

Schelef, L.A. 1994. Antimicrobial effects of lactates: a review. J. of food Protection 57, 445-450.

Scholten, R.H.J., C.M.C. van der Peet-Schwering, L.A. den Hartog, M. Balk, J.W. Schrama, and M.W.A. Verstegen. 2002. Fermented wheat in liquid diets: effects on gastrointestinal characteristics in weanling piglets. J. Anim. Sci. 80: 1179-1186.

Scholten, R.H.J., C.M.C. van der Peet-Schwering, M.W.A. Verstegen, L.A. den Hartog, J.W. Schrama, and P.C. Vesseur. 1999. Fermented co-products and fermented compound diets for pigs: a review. Anim. Feed Sci. and Technol. 82: 1-19

Van Winsen, R.L., B.A.P. Urlings, L.J.A. Lipman, J.M.A. Snijders, D. Keuzenkamp, J.H.M. Verheijden, and F. van Knapen. 2001. Effect of fermented feed on the microbial population of the gastrointestinal tracts of pigs. Appl. and Environ. Micrbiol. 67(7): 3071-3076.

Van Winsen, R.L., L.J.A. Lipman, S. Biesterveld, B.A.P.,Urlings, J.M.A. Snijders, and F.van Knapen. 2001. Mechanism of Salmonella reduction in fermented pig feed. J. Sci. Food Agric. 81: 342-346.

ภาคผนวก

วิธีการตรวจวิเคราะห์ คุณภาพและองค์ประกอบของอาหารหมักเหลว

1. การตรวจวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ชั่งตัวอย่างอาหารหมัก 25 กรัม ใส่ในถุงพลาสติก เจือจางด้วยน้ำโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ปริมาณ 225 มิลลิลิตร แล้วเขย่าให้เข้ากัน เพื่อตรวจวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด ยีสต์และรา, Enterobacter และแบคทีเรียแลคติคดังนี้

1.1 การตวรจหาปริมาณ Enterobacter ทำการเจือจางตัวอย่างที่10^{1}- 10^{8} แล้วดูดตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ใส่จานเลี้ยงเชื้อแล้วเทอาหารเลี้ยงเชื้อTryptic Soy Ager (TSA) ทิ้งไว้ 2 ชั่วโมงแล้วเททับด้วย Violet red bile ager (VRBA)หลังจากนั้นบ่มจานเพาะเชื้อทั้งหมดที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ตรวจนับโคโลนีที่มีสีแดงเข้มและมีโซนสีชมพูอ่อนรอบโคโลนี โดยนับจำนวนโคโลนีที่อยู่ระหว่าง 25-300 โคโลนี และรายงานผลจำนวนโคโลนีในหน่วย cfu/g

1.2 การตรวจหาปริมาณแบคทีเรียแลคติค ทำการเจือจางตัวอย่างที่ 10^{4}-10^{8} แล้วดูดตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ใส่จานเลี้ยงเชื้อแล้วเทอาหารเลี้ยงเชื้อ 108MRS ager +0.5 % $CaCO_3$หลังจากนั้นบ่มจานเพาะเชื้อทั้งหมดภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนที่อุณหภูมิห้องเป็นวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่อยู่ระหว่าง 25-300 โคโลนี โดยสังเกตโซนใสรอบโคโลนี และรายงานผลจำนวนโคโลนีในหน่วย cfu/g

1.3 การวิเคราะห์ความเป็นกรดด่าง หรือ พีเอช(pH)ชั่งอาหารหมัก 5 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตรเติมน้ำกลั่นจำนวน 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้ววัดค่าพีเอช (pH)โดยใช้เครื่องวัดพีเอช (pH meter)

1.4 การวัดปริมาณกรดแลคติคโดยการไทเตรทAOAC (2000)ชั่งอาหารหมักเหลว 10 กรัมมาใส่ในบีกเกอร์ขนาด 250 มล.แล้วใช้น้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 125 มล. หลังจากนั้นดูดมาใส่ขวด erlenmeyer10 มล. หลังจากนั้นหยด phenolphthalein 1%ลงไป แล้วใช้ 0.1 N. NaOHเป็นตัวไตเตรท เมื่อไตเตรทแล้วสีเปลี่ยนเป็นสีชมพูให้จดบันทึกปริมาณ 0.1 N. NaOHที่ใช้ไป เพื่อนำค่าที่ได้ไปคำนวณปริมาณของกรดแลคติค

ปริมาณกรดที่ไตเตรทได้ทั้งหมด, ร้อยละของน้ำหนัก (คำนวณเป็นกรดแลคติค) $= \frac{0.009 \times M \times V \times 100}{0.1 \times W}$

เมื่อ

M = ความเข้มข้นแน่นอนสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (โมลาร์)

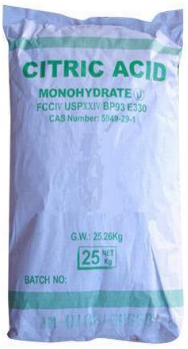
V = ปริมาตรสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ไตเตรท (มิลลิลิตร)

W = น้ำหนักของตัวอย่าง (กรัม)

1.5 การพิจารณาค่าที่เหมาะสมของอาหารหมักที่ดี คือ มีค่า pH ต่ำกว่า 4.5 ค่า LAB มากกว่า log6 (cfu/g) ค่า Enterobacteriaceaeต่ำกว่า log4 (cfu/g) และปริมาณกรดแลคติค มากกว่า 150 mmol / kg.

ภาพที่ 1 อุปกรณ์การทำอาหารหมักเหลว

ภาพที่ 2 กรดซิตริค (Citric acid)



ภาพที่ 3 การผสมอาหารเพื่อใช้ในการทำอาหารหมักเหลว

ภาพที่ 4 การเติมน้ำในอัตราส่วน 1:2, 1:2.5 และ1:3 เพื่อทำอาหารหมักเหลว

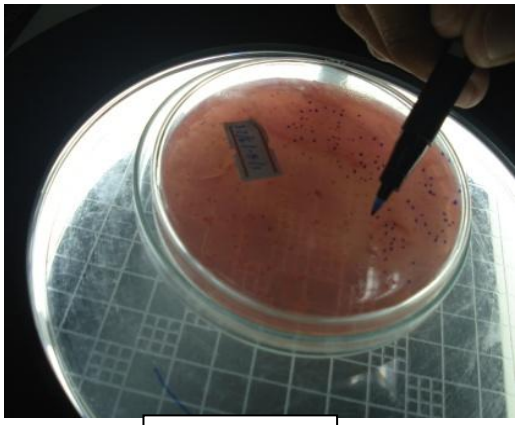
ภาพที่ 5 การวัดอุณหภูมิน้ำก่อนปิดและหลังเปิดฝาถังอาหารหมัก

ภาพที่ 6 การเก็บตัวอย่างตามระยะเวลาในการหมักชั่วโมงที่ 0, 24, 48 และ72 เพื่อหาค่า pH และเพาะเชื้อ LAB, Enterobacteriaceae

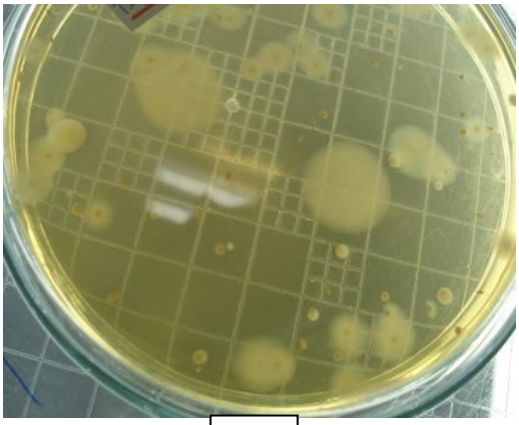
ภาพที่ 7 การวัดค่า pH

ภาพที่ 8 การทำอาหารเลี้ยงเชื้อ

ภาพที่ 9 การเพาะเชื้อ LAB, Enterobacteriaceae



Enterobacter



LAB

ภาพที่ 10 การนับโคโลนีของ Enterobacterและ Lactic acid bacteria