การศึกษาคุณภาพของไซเลจต่อโครีดนม

Study on Quality of Silage on Lactating Cow

คำนำ

ปัญหาสำคัญประการหนึ่งของการเลี้ยงโค-กระบือ และสัตว์เคี้ยวเอื้องอื่น ๆ ของประเทศไทยคือการขาดแคลนพืชอาหารสัตว์คุณภาพดี โดยเฉพาะฤดูร้อนซึ่งพืชอาหารสัตว์ไม่สามารถเติบโตได้ ในขณะที่ฤดูฝนมีปริมาณมากเกินความต้องการของสัตว์ ดังนั้นการสำรองอาหารดังกล่าวไว้ในรูปของพืชหมัก หรือไซเลจ (silage) นอกจากจะเป็นวิธีแก้ปัญหาที่เหมาะสมเนื่องจากไม่เสี่ยงต่อการสูญเสียจากสภาพภูมิอากาศแล้ว ยังเป็นการรักษาคุณภาพของพืชอาหารสัตว์ให้สม่ำเสมอตลอดปี ซึ่งทำให้สะดวกต่อการจัดการฟาร์มเป็นอย่างยิ่ง อย่างไรก็ตาม การทำไซเลจโดยวิธีปรกติมักเกิดการสูญเสียระหว่างกระบวนการหมักค่อนข้างมาก เนื่องจากมีการปนเปื้อนจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ ก่อให้เกิดกลิ่น รสชาติ และคุณภาพของไซเลจด้อยลง ดังนั้นการเพิ่มประสิทธิภาพการหมักด้วยการใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ที่เหมาะสมจึงเป็นแนวทางแก้ปัญหาที่ได้รับการค้นคว้าอย่างต่อเนื่อง ปัจจุบันแม้ว่าจะมีการผลิตหัวเชื้อดังกล่าวในเชิงการค้าแล้วก็ตาม แต่ยังมีราคาแพง เนื่องจากต้องนำเข้าจากต่างประเทศ อีกทั้งหัวเชื้อดังกล่าวอาจไม่เหมาะสมกับพืชอาหารสัตว์ของประเทศไทย เนื่องจากลักษณะทางกายภาพและสรีรวิทยาของพืชอาหารสัตว์ในเขตร้อนชื้นต่างจากพืชอาหารสัตว์ในเขตอบอุ่นอย่างมาก การศึกษาของอำนาจ (2540) และ Nitisinprasert *et al.* (2001) พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติคบางชนิดทำให้กระบวนการหมักไซเลจเสร็จสิ้นโดยเร็ว และไซเลจมีความเสถียรต่ออากาศสูง จึงมีศักยภาพที่จะผลิตเป็นหัวเชื้อในการหมักไซเลจของประเทศไทยได้ดี การวิจัยครั้งนี้ต้องการศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตและการใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์สำหรับการหมักไซเลจ เพื่อเป็นแนวทางประยุกต์ในระดับฟาร์มต่อไป

<u>วัตถุประสงค์</u>

1. เพื่อผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์ชนิดผงในการหมักไซเลจ
2. เพื่อศึกษาคุณภาพของไซเลจที่หมักด้วยหัวเชื้อจุลินทรีย์
3. เพื่อศึกษาผลของไซเลจต่อการให้ผลผลิตของโครีดนม

การตรวจเอกสาร

1. ไซเลจ

พืชหมัก หรือไซเลจ เป็นพืชอาหารสัตว์ที่เก็บรักษาไว้ในสภาพอวบน้ำและไร้อากาศ เพื่อคงคุณภาพของพืชอาหารสัตว์ไว้ดังเดิม และเป็นที่ยอมรับสำหรับสัตว์ (Humpreys, 1991) ปรกติจะเกิดการหมักโดยแบคทีเรียกรดแลคติก (lactic acid bacteria; LAB) ซึ่งใช้คาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำได้ (water-soluble carbohydrate; WSC) เป็นสับสเตรทเพื่อผลิตกรดแลคติก ทำให้พีเอช (pH) ของไซเลจลดลง ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเติบโตของจุลินทรีย์อื่น ๆ ที่จะก่อให้เกิดการเน่าเสียของไซเลจ คุณภาพของไซเลจที่ดีประกอบด้วยพีเอชไม่เกิน 4.2 ปริมาณกรดแลคติกไม่ต่ำกว่า 50% ของกรดอินทรีย์ทั้งหมด ปริมาณกรดบิวทีริคไม่เกิน 0.5% ของวัตถุแห้ง และปริมาณของแอมโมเนียไนโตรเจน (NH_3-N) น้อยกว่า 10% ของไนโตรเจนทั้งหมด (Tjandraatmadja, 1989)

1.1 ปัจจัยที่มีผลต่อคุณภาพของไซเลจ

1.1.1 อายุของพืชอาหารสัตว์ เป็นปัจจัยสำคัญต่อคุณภาพของไซเลจ พืชที่ตัดในช่วงอายุน้อยเกินไปจะมีความชื้นสูง ทำให้ไซเลจเน่าเสียได้ง่าย และทำให้ได้ผลผลิตในรูปวัตถุแห้งต่ำ ในขณะที่การตัดเมื่ออายุมากเกินไปจะทำให้มีเยื่อใยสูง มีคาร์โบไฮเดรตที่ย่อยได้ง่ายต่ำ คุณภาพของไซเลจจะต่ำลง การกินได้ของสัตว์ก็จะลดลง (Humpreys, 1991)

1.1.2 องค์ประกอบของวัตถุแห้ง โดยทั่วไปพืชอาหารสัตว์ที่จะทำไซเลจควรมีวัตถุแห้งไม่ต่ำกว่า 22% (Frank *et al.*, 1986) แต่ถ้าพืชที่มีอายุมากแม้ว่าจะมีวัตถุแห้งสูงก็จะทำให้การย่อยได้ต่ำ ทำให้การเติบโตและการให้ผลผลิตของโคที่เลี้ยงด้วยไซเลจจากพืชที่มีอายุมากต่ำลงด้วย (Esperance *et al*., 1980)

1.1.3 ความยาวของพืชที่จะหมัก การหั่นพืชให้สั้นจะช่วยทำให้ง่ายต่อการหมัก การสูญเสียคุณค่าทางโภชนะจะลดลง เนื่องจากกระบวนการหมักเกิดขึ้นสมบูรณ์ได้เร็ว โดยทั่วไปความยาวของท่อนพืชควรมีขนาด 2.5-5.0 cm (Frank *et al.,* 1986) อย่างไรก็ตาม ความยาวดังกล่าวจะผันแปรไปตามปริมาณวัตถุแห้งในพืชดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณวัตถุแห้ง และความยาว ของพืชที่เหมาะสมในการหมัก

ปริมาณวัตถุแห้ง (%)	ความยาวของพืช (cm)
ต่ำกว่า 20	20
20-25	13
25-30	8
มากกว่า 30	2.5

ที่มา: Frank *et al*. (1986)

1.1.4 การจัดการก่อนการหมัก การทำให้พืชเหี่ยว (wilting) ก่อนการบรรจุลงในไซโล (silo) จะช่วยเพิ่มคาร์โบไฮเดรตที่ละลายง่าย และลดการสูญเสียโภชนะจากของเหลวที่ไหลออกจากพืชในระหว่างการหมักได้ (Wilkinson, 1983b) ระยะเวลาของการทำให้พืชเหี่ยวยังไม่สามารถกำหนดได้แน่ชัด แต่การทำให้เหี่ยวโดยเร็วถือเป็นข้อได้เปรียบ

1.1.5 การบรรจุพืชลงในไซโล การบรรจุและอัดพืชลงในไซโลให้แน่นจะลดการสูญเสียคุณภาพของไซเลจจากความร้อน เนื่องจากอัตราการหายใจของพืชลดลง ในทางปฏิบัติหากพบว่าอุณหภูมิภายในกองพืชหมักสูงกว่า 35-40 ˚C ควรมีการอัดทับด้วยลูกกลิ้งให้แน่น ดังนั้นประเทศที่อยู่ในเขตร้อนชื้น ปัญหาด้านอุณหภูมิสิ่งแวดล้อมจึงเป็นปัจจัยสำคัญต่อคุณภาพของไซเลจ (Wilkinson, 1983a)

1.1.6 การใช้สารเติมแต่ง (additive) เพื่อเร่งการหมักให้เกิดเร็วขึ้น ทำให้ไซเลจมีคุณภาพดีขึ้น Woolford (1985) แบ่งประเภทของสารเติมแต่งออกเป็น 4 ประเภท ได้แก่

1.1.6.1 สารกระตุ้นการหมัก (fermentation stimulants) เป็นสารที่กระตุ้นให้เกิดกรดแลคติกอย่างรวดเร็ว ได้แก่ กากน้ำตาล มันสำปะหลังบด กะทิมะพร้าว เอนไซม์ย่อยสลายเซลลูโลสและอะไมโลสและเชื้อจุลินทรีย์

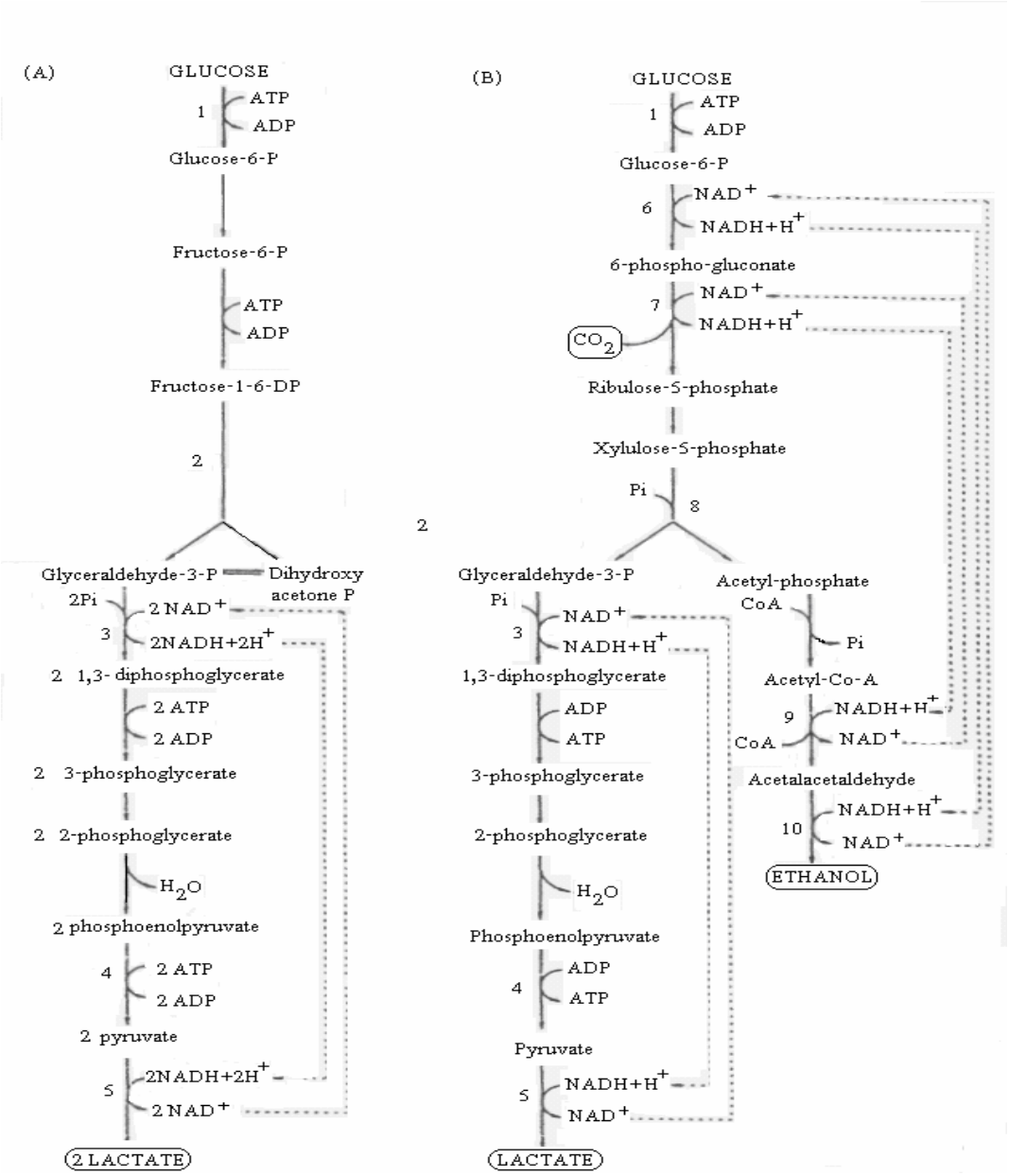
1.1.6.2 สารยับยั้งการหมัก (fermentation inhibitors) เป็นสารที่เติมลงไปเพื่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา เช่น ฟอร์มาลดีไฮด์ และโซเดียมเมตาไบซัลไฟท์

1.1.6.3 กรด เป็นกรดที่จำเพาะต่อเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ เช่น กรดซัลฟูริค กรดเกลือ กรดฟอร์มิค และออร์โธฟอสฟอริค

1.1.6.4 สารต่อต้านแบคทีเรียกลุ่ม Clostridium ได้แก่ โซเดียมไนเตรท และยาปฏิชีวนะ แต่สารกลุ่มนี้ไม่มีการนำมาใช้ในประเทศเขตร้อนชื้น

1.2 จุลินทรีย์ในไซเลจ

1.2.1 Lactic acid bacteria (LAB) เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกชนิดแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ ผลิตกรดแลคติกจากคาร์โบไฮเดรทเป็นผลิตภัณฑ์หลัก แบ่งออกเป็น 14 สกุล ได้แก่ Aerococcus, Alloiococcus, Carnobacterium, Dolosigranulum, Enterococcus, Globicatella, Lactobacillus, Lactococcus, Lactosphaera, Leuconostoc, Oenococcus, Pediococcus, Streptococcus, Tetragenococcus, Vagococcus และ Weissella. (Axelsson, 1998) มีกระบวนการหมักน้ำตาลที่แตกต่างกัน 2 วิถี คือ Embden-Meyerhof-Parnas หรือ Glycolysis ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นกรดแลคติก เรียกกระบวนการหมักนี้ว่า Homolactic fermentation ส่วนกระบวนการหมักอีกวิถีหนึ่งคือ 6-phosphogluconate หรือ Phosphoketolase ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายหลายชนิดที่นอกเหนือจากกรดแลคติก เช่น เอธานอล อะซิเตท และคาร์บอนไดออกไซด์ เรียกการหมักแบบนี้ว่า Heterolactic fermentation (ภาพที่ 1) แบคทีเรียกรดแลคติกถูกนำมาใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะการหมักในอุตสาหกรรมอาหารมนุษย์และอาหารสัตว์ (Teuber, 1993) การใช้เป็นโปรไบโอติก (probiotic) และสารต้านจุลชีพในปศุสัตว์ การใช้เพื่อควบคุมโรคพืช การใช้เพื่อควบคุมการเกิดมะเร็ง และการใช้เพื่อสลายสารอินทรีย์ในธรรมชาติ (Wood, 1992) แบคทีเรียกรดแลคติกที่พบในไซเลจมี 4 สกุล (ตารางที่ 2) ส่วนใหญ่เป็นพวกเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25-40˚C ต้องการอากาศเพียงเล็กน้อย (facultative anaerobes) บางสายพันธุ์เติบโตได้ในสภาพไร้อากาศ แบคทีเรียที่มีบทบาทมากที่สุดในการหมักไซเลจ คือ กลุ่ม Homolactic fermentation เนื่องจากผลิตกรดแลคติกได้สูง (80-90%) แบคทีเรียกรดแลคติกที่พบในไซเลจในเขตร้อนชื้นส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียสกุล Pediococcus รองลงมาได้แก่ Lactobacillus และ Streptococcus (Tjandraatmadja *et al*., 1990)



<u>ภาพที่ 1</u> วิถีการหมักน้ำตาลกลูโคสของแบคทีเรียกรดแลคติก

(A) = Homolactic fermentation (glycolysis; Embden - Meyerhof Parnas pathway)

(B) = Heterolactic fermentation (6 - phosphogluconate)

ที่มา: Axelsson (1998)

1.2.1.1 Lactobacilli แบคทีเรียสกุลนี้มีลักษณะการเติบโต และประสิทธิภาพการหมักแตกต่างกัน แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม (Hammes and Vogel, 1995) คือ

- Homofermentation ผลิตกรดแลคติกผ่านวิถี Glycolysis
- Facultative heterofermentation ผลิตกรดแลคติก ผลิตภัณฑ์ผสมของกรดแลคติก กรดอะซิติก เอธานอล และกรดฟอร์มิค โดยน้ำตาลเฮกโซส (hexose) จะถูกหมักโดยกระบวนการ Homofermentation ส่วนน้ำตาลเพนโทส (pentose) จะถูกหมักโดยกระบวนการ Heterofermentation ผ่านวิถี Phosphoketolase ได้ผลิตภัณฑ์ผสมของกรดแลคติก และกรดอะซิติก
- Heterofermentation ผลิตกรดชนิดต่าง ๆ จากน้ำตาลเฮกโซส เช่น กรดแลคติก กรดอะซิติก และคาร์บอนไดออกไซด์ นอกจากนี้ยังผลิตกรดแลคติก และกรดฟอร์มิคจากน้ำตาลเพนโทสอีกด้วย

1.2.1.2 Streptococci เซลล์มีรูปร่างกลม เจริญเป็นคู่หรือเป็นสาย ไม่มีการเคลื่อนที่ มีระบวนการหมักแบบ Homofermentation เติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 30˚C แบคทีเรียกรดแลคติกสกุลนี้ยังรวมถึง Enterococci ซึ่งเซลล์มีลักษณะกลมจัดเรียงกันเป็นโซ่สั้น ๆ เป็นแบคทีเรียที่สำคัญในการหมักไซเลจอีกชนิดหนึ่ง

ตารางที่ 2 แบคทีเรียกรดแลคติกที่พบในไซเลจ

Lactobacillus			Streptococcus	Pediococcus	Leuconostoc
Homofermentative (Thermobacteria)	Facultative (Streptobacteria)	Heterofermentative (Betabacteria)	Homofermentative	Homofermentative	Heterofermentative
L. acidophilus	*L. plantarum*	*L. brevis*	*S. faecalis*	*P. acidilactici*	*L. mesenteroides*
L. delbrueckii	*L. casei*	*L. buchneri*	*S. faecium*	*P. pentosaceus*	*L. paramesenteroides*
	L. coryniformis	*L. fermentum*	*S. lactis*	*P. dextrinicus*	*L. lactis*
	L. curvatus	*L. cellobiosus*	*S. cremoris*		*L. dextranicum*
	L. farciminis	*L. viridescens*	*S. raffinolactis*		
		L. confusus			

ที่มา: Brookes and Buckle (1992)

1.2.1.3 Pediococci เซลล์มีรูปร่างกลมเกาะกันอยู่แบบ Tetrad แบ่งตัวเป็น 2 ทิศทาง มีกระบวนการหมักน้ำตาลแบบ Homofermentation

1.2.1.4 Leuconostoc เซลล์มีรูปร่างกลม (spherical shape) ส่วนใหญ่อยู่เป็นคู่ หรือเป็นโซ่สั้น ๆ เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 20-30°C ขนาดของเซลล์ขึ้นอยู่กับภาวะการเติบโต แบคทีเรียสกุลนี้มีกระบวนการหมักแบบ Heterofermentive โดยเมแทบอไลซ์กลูโคสผ่านวิถี Hexose-monophosphate และ Phosphoketolase ต้องการสารอาหารที่เจาะจงมากกว่ากลุ่มอื่น ๆ

1.2.2 จุลินทรีย์กลุ่มอื่น ๆ

1.2.2.1 คลอสตริเดียม เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างเป็นท่อน ไม่ต้องการอากาศสำหรับการเติบโต สร้างเอนโดสปอร์ (endospore) เจริญได้ดีที่พีเอช 7.0-7.4 สามารถเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นกรดบิวทิริค และเปลี่ยนกรดอะมิโนให้เป็นเอมีนและแอมโมเนีย ทำให้ไซเลจมีกลิ่นเหม็นเน่า (Woolford, 1990; Muck, 1991) โดยทั่วไปจะพบเชื้อคลอสตริเดียมได้ช่วงแรก ๆ ของการหมัก หลังจากนั้นแบคทีเรียพวกนี้จะถูกยับยั้งโดยปริมาณกรดและสารเมแทบอไลท์ที่แบคทีเรียกรดแลคติกสร้างขึ้น (Woolford and Pahlow, 1998)

1.2.2.2 เอนเทอโรแบคทีเรีย เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ต้องการอากาศเล็กน้อยในการเติบโต ไม่สร้างสปอร์ เจริญได้ที่พีเอช 7.0 แบคทีเรียพวกนี้สามารถเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นกรดอะซิติก เอธานอล กรดแลคติก ก๊าซไฮโดรเจน และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

1.2.2.3 ยีสต์และราเส้นใย เป็นจุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศสำหรับการเติบโต ไม่มีผลต่อกระบวนการหมักไซเลจ แต่จะทำให้ไซเลจเกิดการเสื่อมสลายเมื่อเปิดหลุมหมักให้ไซเลจสัมผัสกับอากาศ (Muck, 1991)

1.2.2.4 แบคทีเรียชนิดอื่น ๆ เช่น *Bacillus* sp. เป็นแบคทีเรียที่ต้องการอากาศในการเติบโต สามารถผลิตเอนไซม์ไปย่อยสลายองค์ประกอบของผนังเซลล์พืช ทำให้น้ำตาลถูกปล่อยออกมาเป็นอาหารของแบคทีเรียกรดแลคติก (Woolford and Pahlow, 1998) แบคทีเรียพวกนี้บางชนิด เช่น *Listeria monocytogenes* เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคในสัตว์ แต่ไม่สามารถเจริญได้เมื่อสภาวะพีเอชต่ำกว่า 4.2 (Muck, 1991)

1.3 การใช้สารเติมแต่งในไซเลจ

สารเคมีและสารชีวภาพหลายชนิดถูกใช้ในไซเลจ เพื่อช่วยลดจำนวนจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการในระหว่างการหมัก ปัจจุบันมีจุลินทรีย์ทางการค้าหลายชนิดที่ช่วยปรับปรุงคุณค่าทางโภชนะและองค์ประกอบทางเคมีของไซเลจ ส่งผลต่อการเติบโตและการให้ผลผลิตของสัตว์ดีขึ้น (Wilkins, 1996) Muck (1996) รายงานว่า การใช้จุลินทรีย์ในการหมักไซเลจทำให้เกิดผลสำคัญ 3 ประการ คือ ผลต่อกระบวนการหมัก ผลต่อคุณภาพของไซเลจ และผลต่อการให้ผลผลิตของสัตว์

1.3.1 ผลต่อกระบวนการหมัก ได้แก่การเพิ่มอัตราการหมักและการเปลี่ยนแปลงของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการหมัก ถ้าหากแบคทีเรียกรดแลคติกเป็นจุลินทรีย์หลักของกระบวนการหมัก การเติบโตของจุลินทรีย์ดังกล่าวจะทำให้พีเอชของไซเลจลดลงโดยเร็ว เนื่องจากความเข้มข้นของกรดแลคติกเพิ่มขึ้น กระบวนการหมักจะยุติโดยเร็ว และจากการที่กรดแลคติกเป็นกรดที่มีความแรงมากกว่ากรดอะซิติก ดังนั้นจึงทำให้พีเอชลดลงโดยเร็ว นอกจากนี้ ความสำเร็จของการใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ ในการหมักไซเลจควรทำให้พีเอชสุดท้ายลดต่ำลง เนื่องจากหัวเชื้อจุลินทรีย์กรดแลคติกสามารถเจริญได้ในสภาวะที่พีเอชต่ำ ดังนั้นกระบวนการหมักจึงดำเนินต่อไปได้ อย่างไรก็ตาม แม้ว่ากระบวนการหมักในสภาวะนี้จะถูกจำกัดโดยน้ำตาล แต่การเปลี่ยนกรดอะซิติกไปเป็นกรดแลคติกก็จะทำให้พีเอช ต่ำลงได้

1.3.2 ผลต่อคุณภาพของไซเลจ โดยทำให้วัตถุแห้ง (dry matter; DM) และ พลังงานของ ไซเลจสูงขึ้น เนื่องจากเป็นการหมักชนิด Homofermentation (ตารางที่ 3) โดยทั่วไปวัตถุแห้งจากกระบวนการหมักที่ใช้เชื้อจุลินทรีย์จะมีค่ามากกว่าการหมักแบบไม่ใช้เชื้อประมาณ 1-3% นอกจากนี้ หัวเชื้อจุลินทรีย์ยังทำให้พีเอชของไซเลจลดลงอย่างรวดเร็ว ซึ่งเป็นการป้องกันการสูญเสียโปรตีนที่แท้จริง (true protein) เพราะแบคทีเรียกรดแลคติกเติบโตได้โดยไม่ต้องใช้กรดอะมิโน ทำให้ความเข้มข้นของแอมโมเนียต่ำลง และจากการที่พีเอชลดต่ำลงอย่างรวดเร็วนี้ จะส่งผลให้เอนไซม์ที่ย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสลดลง ในขณะที่ทำให้เกิดกระบวนการย่อยสลายโดยกรดสูงขึ้น ซึ่งมีผลเสียต่อไซเลจน้อยกว่าการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ นอกจากนี้จุลินทรีย์ที่ต้องการออกซิเจนในไซเลจจะถูกยับยั้งโดยกรดไขมันระเหยง่าย (volatile fatty acid; VFA) และระดับของการยับยั้งจะสูงยิ่งขึ้นเมื่อพีเอชยิ่งต่ำลง อีกทั้งจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการสูญเสียของไซเลจเติบโตโดยใช้น้ำตาลมากกว่าผลิตภัณฑ์จากการหมัก ดังนั้นเมื่อมีการใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ก็จะทำให้ปริมาณน้ำตาลเหลืออยู่น้อยจุลินทรีย์ที่ต้องการออกซิเจนหรือจุลินทรีย์ที่ทำให้ไซเลจสูญเสียอื่น ๆ ก็จะเจริญได้น้อย

ตารางที่ 3 การสูญเสียวัตถุแห้งและพลังงานในกระบวนการหมักโดยแบคทีเรียกรดแลคติก

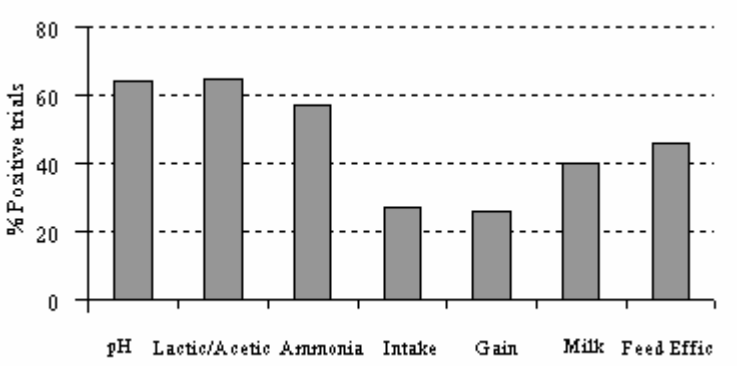
Pathway	Loss (%)	
	Dry matter	Energy
Homofermentation		
glucose + 2 ADP Ⓡ lactate + 2 ATP	0.0	0.7
fructose + 2 ADP Ⓡ lactate + 2 ATP	0.0	0.7
Heterofermentation		
glucose + 2 ADP Ⓡ lactate + ethanol + CO_2 + ATP	24.0	1.7
3 lactose +2 ADP Ⓡ lactate + acetate + 2 mannitol + CO_2 + ATP	4.8	1.0

ที่มา: Muck (1996)

1.3.3 ผลต่อการเติบโตและการให้ผลผลิตของสัตว์ การใช้เชื้อจุลินทรีย์ในไซเลจ มีผลในทางบวกต่อการเติบโตและการให้ผลผลิตของสัตว์ เนื่องจากจุลินทรีย์เหล่านี้นอกจากจะมีบทบาทสำคัญในการผลิตกรดแลคติกเพื่อรักษาคุณภาพของไซเลจแล้ว ยังช่วยเพิ่มการย่อยได้ของโภชนะอีกด้วย นอกจากนี้ ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการหมัก เช่น กรดแลคติก กรดอะซิติก และเอธานอลยังถูกจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมนของสัตว์ใช้ประโยชน์ได้ดี โดยเฉพาะกรดแลคติก ซึ่งต่อมาจุลินทรีย์ในกระเพาะนี้จะถูกจับเป็นแหล่งโปรตีนในระบบทางเดินอาหารส่วนหลังของสัตว์ และถูกย่อยนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป นอกจากนี้ การใช้เชื้อจุลินทรีย์ในการหมักไซเลจ ยังทำให้เกิดการยับยั้งการสร้างสารพิษซึ่งเป็นผลดีต่อระบบนิเวศภายในกระเพาะรูเมน จึงส่งผลให้สัตว์เติบโต และให้ผลผลิตได้ดีขึ้น

การศึกษาการใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ในการหมักไซเลจตั้งแต่ปี 1985-1992 ส่วนใหญ่เป็นข้อมูลจากประเทศในแถบอเมริกาเหนือและยุโรป ซึ่งเป็นการศึกษาในพืชตระกูลถั่ว หญ้า และข้าวโพด พบว่า การใช้เชื้อจุลินทรีย์ไม่ได้ส่งผลในทางบวกต่อการหมักไซเลจอย่างชัดเจน (ภาพที่ 2) แต่อัตราส่วนของกรดแลคติกต่อกรดอะซิติกเพิ่มขึ้น และพีเอชลดลงประมาณ 2 ใน 3 ของการทดลองทั้งหมด การใช้เชื้อจุลินทรีย์มีผลต่อกระบวนการหมักเล็กน้อยสำหรับไซเลจจากข้าวโพดเมื่อเทียบกับถั่วอัลฟัลฟา หรือพืชตระกูลหญ้าอื่น ๆ ส่วนแอมโมเนียไนโตรเจนลดลงมากกว่าครึ่งหนึ่งของรายงานการทดลอง โดยสรุปแล้วการใช้เชื้อจุลินทรีย์ในการหมักไซเลจถือว่าประสบผลสำเร็จในการปรับปรุงกระบวนการหมักโดยเฉพาะในพืชตระกูลถั่ว และพืชตระกูลหญ้าที่ไม่ใช่ข้าวโพด

Muck (1996) รายงานว่า การใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์จะช่วยปรับปรุงการให้ผลผลิตสัตว์ได้ 25-มากกว่า 40% ขึ้นอยู่กับลักษณะที่ทำการศึกษา จากภาพที่ 2 จะเห็นว่าประสิทธิภาพการใช้อาหารได้รับการปรับปรุงมากกว่าลักษณะอื่น ๆ รองลงมาได้แก่ผลผลิตน้ำนม ส่วนการกินได้และการเพิ่มน้ำหนักตัวได้รับการปรับปรุงน้อยที่สุด



ภาพที่ 2 ผลของหัวเชื้อจุลินทรีย์ต่อผลสำเร็จในการปรับปรุงคุณภาพไซเลจและสมรรถภาพการผลิตสัตว์

ที่มา: Muck (1996)

Alli *et al*. (1984) ศึกษาการใช้กากน้ำตาลหมักกระถินในอัตรา 2.3% และ 4.5% ของพืชสด พบว่าคาร์โบไฮเดรตที่ละลายได้เพิ่มขึ้นจาก 6.3% เป็น 9.7% และ 13% ของวัตถุแห้งตามลำดับ ซึ่งการเพิ่มขึ้นของปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ละลายได้นี้ทำให้พีเอชต่ำลง นอกจากนี้การใช้กากน้ำตาลเป็นสารเติมแต่งในไซเลจยังทำให้สารประกอบไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีนลดลงอีกด้วย แสดงว่ากากน้ำตาลเป็นสารช่วยเพิ่มการย่อยสลายโปรตีน สำหรับอัตราส่วนของกรดแลคติกต่อกรดอะซิติกมีค่าลดลงเป็นผลดีต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อยีสต์และราเส้นใยในไซเลจ ผลของการใช้กากน้ำตาลต่อส่วนประกอบทางเคมีของไซเลจแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ผลของกากน้ำตาลต่อส่วนประกอบทางเคมีของกระถินหมักที่อายุ 28 วัน

ส่วนประกอบทางเคมี	ปริมาณกากน้ำตาล (%)		
	0	2.3	4.5
พีเอช	4.7	4.3	4.1
วัตถุแห้ง (%)	38	38	38
ไนโตรเจนทั้งหมด (%)	2.8	2.9	2.9
ไนโตรเจนที่ระเหยได้ (%)	5.6	4.9	4.9
ไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีน(% total N)	15.5	13.3	11.9
กรดแลคติก (%)	2.0	4.1	5.0
กรดอะซิติก (%)	0.4	0.6	0.7
กรดโปรปีโอนิก (%)	0.2	0.5	0.6

ที่มา: Alli *et al.* (1984)

Hill *et al.* (2001) ศึกษาการใช้ *Streptomyces achromogenes* ISP 5028 ต่อคุณภาพของไซเลจจากหญ้าไรน์ (*Lolium perenne* L.) โดยใช้อัตราส่วนของเชื้อ $2x10^5$ สปอร์ต่อกรัมของพืชสดหมักในถุงพลาสติกชนิดพอลิธีน (polythene) ขนาดบรรจุ 10 กิโลกรัม ตรวจสอบคุณภาพเมื่อทำการหมักได้ 0, 1, 2, 3, 5, 10, 30 และ 60 วัน ผลการศึกษา พบว่าปริมาณกรดแลคติกเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 3-5 วันในไซเลจที่หมักด้วยเชื้อจุลินทรีย์ นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณกรดแลคติกไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อตรวจสอบที่อายุการหมัก 60 วัน สำหรับกรดไขมันระเหยง่ายที่บ่งบอกถึงคุณภาพด้านกลิ่น พบว่า ไซเลจที่หมักด้วยเชื้อจุลินทรีย์มีปริมาณมากกว่าไซเลจที่ไม่ได้หมักด้วยเชื้ออย่างชัดเจน ($P<0.01$) ในขณะที่คุณค่าทางโภชนะบางชนิดของไซเลจมีแนวโน้ม ดีขึ้น ดังตารางที่ 5

McAllister *et al.* (1995) ศึกษาคุณภาพของไซเลจจากบาร์เลย์ที่หมักด้วยเชื้อจุลินทรีย์ทางการค้า SILA-BAC® (1174) และ X2637 เปรียบเทียบกับไซเลจที่ไม่ใช้เชื้อจุลินทรีย์ พบว่ามีคุณภาพไม่แตกต่างกัน แต่เมื่อนำไซเลจดังกล่าวไปเลี้ยงแกะทดลองเพศผู้ลูกผสม Suffolk x Romanor ปรากฏว่าแกะกลุ่มที่เลี้ยงด้วยไซเลจซึ่งหมักด้วยเชื้อจุลินทรีย์มีอัตราการเติบโตได้ดีกว่ากลุ่มที่เลี้ยงด้วยไซเลจที่ไม่ใช้เชื้ออย่างชัดเจน (ตารางที่ 6) เนื่องจากกินไซเลจที่หมักด้วยเชื้อจุลินทรีย์ในรูปวัตถุแห้งได้มากกว่ากลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตาม ปริมาณการกินได้ของไซเลจจะ

มีค่าต่ำกว่าหญ้าสดประมาณ 4-50% เนื่องจากผลกระทบจากพีเอช ความชื้น สารจำพวกเอมีน และแอมโมเนีย (Erdman, 1987)

ตารางที่ 5 ส่วนประกอบทางเคมีและคุณค่าทางโภชนะของไซเลจภายหลังการหมัก 60 วัน

Item	Control	Inoculated	S.E.
Corrected DM (%)	23.5	23.6	11.4
NDF (g/kg DM)	512	448	13.5**
ADF (g/kg DM)	295	288	12.6
Crude hemicellulose (g/kg DM)	32.8	31.9	2.25
WSC (g/kg DM)	18	19	3.24
CP (g/kg DM)	177	168	6.65
NH_4-H (g/kg total N)	87	77	10.3
pH	4.12	4.02	0.49
Neutralizing (mE /kg DM)	557	778	27.8**
Ethanol (g/kg DM)	18.4	13.9	1.1**
Lactic acid (g/kg DM)	78.1	101.7	11.5**
Acetic acid (g/kg DM)	16	21.7	6.65
Propionic acid (g/kg DM)	trace	0.12	0.11
i-Butyric acid (g/kg DM)	0.32	0.55	0.07
n-Butyric acid (g/kg DM)	0	0.42	0.08***
i-Vareric acid (g/kg DM)	0.12	0.71	0.03***
n-Vareric acid (g/kg DM)	0	0.31	0.04***

หมายเหตุ: * = P < 0.05, ** = P < 0.01, *** = P < 0.001

ที่มา: ดัดแปลงจาก Hill *et al.* (2001)

ตารางที่ 6 ผลการใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ในไซเลจต่อการย่อยได้ของโภชนะ เมแทบอลิซึมของไนโตรเจน และอัตราการเติบโตของแกะทดลอง

Item	Inoculants			
	1174	X2637	Control	S.E.
Dry matter intake (gd^{-1})	877.2	870.4	826.4	22.9
Dry matter intake ($g\ Kg^{-75}$)	67.8	67.2	63.9	1.7
Organic matter intake ($g\ d^{-1}$)	802.3	796.9	752.5	20.9
Digestibility (%)				
Dry matter	63.5	63.6	64.5	0.5
Orrganic matter	65.2	65.3	664	0.5
Acid detergent fiber	37.1	35.9	36.7	1.2
Neutral detergent fiber	45.0	44.5	46.0	0.8
Nitrogen intake ($g\ d^{-1}$)	14.3^{a}	13.4^{b}	13.1^{b}	0.3
Nitrogen digested ($g\ d^{-1}$)	7.8	6.7	7.1	0.3
Urinary nitrogen ($g\ d^{-1}$)	5.1	4.6	5.4	0.2
Fecal nitrogen ($g\ d^{-1}$)	6.5	6.6	6.0	0.2
Nitrogen retained ($g\ d^{-1}$)	2.6^{a}	2.1^{ab}	1.7^{b}	0.3
Average daily gain ($g\ d^{-1}$)	198.7^{c}	191.3^{c}	149.6^{d}	10.4
Feed efficiency	4.6	4.7	7.8	1.5

[ab]อักษรกำกับในแถวเดียวกันต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$

[cd]อักษรกำกับในแถวเดียวกันต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P< 0.01$)

ที่มา: ดัดแปลงจาก McAllister *et al.* (1995)

จากรายงานการวิจัยที่เกี่ยวกับการใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ต่อคุณภาพของไซเลจและการให้ผลผลิตของสัตว์ทดลอง ซึ่งรวบรวมโดย Weinberg and Muck (1996) ดังตารางที่ 7 จะเห็นว่าส่วนใหญ่เป็นผลดีต่อการหมัก แต่ให้ผลไม่แน่นอนต่อการให้ผลผลิตของสัตว์ทดลอง

ตารางที่ 7 ผลของหัวเชื้อจุลินทรีย์ต่อคุณค่าทางโภชนะของไซเลจและการให้ผลผลิตของสัตว์

งานวิจัย	ชนิดไซเลจ	หัวเชื้อ	ผลต่อการหมัก[a]	ผลต่อการให้ผลผลิตของสัตว์ทดลอง[c]
Wardynski (1993)	HMC[d]	*L. plantarum*, *Ent. faecium* *P. acidilactici* ($2x10^6$)[e]	+, AS-	DM+, LWG 0 (steer)
Sanderson (1993)	Corn	*L. plantarum*, *Ent. faecium* ($1.1x10^5$)	+, AS-	
	Forage, sorghum	*L. plantarum*, *Ent. faecium* ($1.1x10^5$)	+, AS-	
Kung (1993)	Corn	*L. plantarum*, *Ent. faecium* (10^5)	0	0 (cow)
Phillip (1992)	HMEC	*L. plantarum* MTD1 (10^5) combination of *L. plantarum* MTD1 and *Serratia rubidaea*, *B. subtilis*, *S. thermophillus*	+, AS+**	FCM+ (cow) DMI 0, LWG 0 (steer)
Daenicke (1992)	Corn	*L. plantarum*, *Ent. Faecium* (10^5)	0	DMI+, LWG+** (growing bull)
William (1995)	Wheat	*L. plantarum*, *Ent. faecium* (10^4-10^5)	+, **	
Mir (1995)	Lucern	*L. plantarum* ($0.4 x10^6$)		DMI 0 (steer, sheep)

หมายเหตุ:

[a] Fermentation effect = lower final pH, faster fermentation rate, and/or high lactate:acetate ratio.

[c] DMI=dry matter intake, LWG=live weight gain, MY=milk yield, FCM=fat corrected milk

[d] HMC=high moisture corn, HMEC=high moisture ear corn, AS=aerobic stability

[e] Number in parenthesis gives inoculation rate in cfu/g forage

[f] +,0,- = designates improvement, no effect and decrease relative to the control respectively

, * = Significant at P< 0.1,0.05 and 0.001, respectively

ที่มา: Weinberg and Muck (1996)

Muck (1996) รายงานว่าการใช้เชื้อจุลินทรีย์ในไซเลจที่จะมีผลต่อการให้น้ำนมของโคเพิ่มขึ้นนั้น ต้องใช้เชื้อจุลินทรีย์มากกว่าจุลินทรีย์ในธรรมชาติถึง 10 เท่า (ตารางที่ 8) แสดงว่าจำนวนจุลินทรีย์ที่ต้องใช้ในการปรับปรุงการให้ผลผลิตสัตว์จะสูงกว่าที่ต้องใช้สำหรับปรับปรุงคุณภาพการหมัก

ตารางที่ 8 ผลการใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ในไซเลจต่อการให้น้ำนมของโคนม

Ratio of LAB (Treated / Control)	Milk Yield (% of Control)
151	101.5
140	106.2
110	103.0
46	100.0
36	100.4
18	102.2
11	108.0
8	97.8
7	100.7
6	99.6
4	98.5
1	100.0
1	98.5

ที่มา: Muck (1996)

Hag *et al.* (1982) ศึกษาการหมักต้นข้าวโพดที่มีวัตถุแห้ง 38% ด้วยหัวเชื้อจุลินทรีย์ผสม *Lactobacillus acidophilus, Streptococus cremoris, Lactobacillus plantalum* และ *Streptococcus diacelylactus* ในอัตรา 0, 10 และ 50 ppm เป็นเวลา 21 วัน พบว่า คุณภาพของไซเลจไม่มีความแตกต่างกัน เมื่อนำไซเลจที่หมักด้วยหัวเชื้อจุลินทรีย์ และไซเลจที่หมักโดยวิธีปรกติไปทดลองเลี้ยงโคสาวก็ไม่ทำให้การให้ผลผลิตของโคแตกต่างกัน ยกเว้นน้ำหนักซากอุ่นเท่านั้นที่โคซึ่งเลี้ยงด้วยไซเลจเสริมเชื้อจุลินทรีย์มีน้ำหนักมากกว่า

Yan *et al.* (1996) ศึกษาผลตอบสนองของพืชอาหารสัตว์ที่ทำให้เหี่ยว และพืชอาหารสัตว์สดในการหมักด้วยแบคทีเรียกรดแลคติกต่อองค์ประกอบทางเคมี การย่อยได้ของโภชนะ และการให้ผลผลิตของโคนม พบว่า การหมักด้วยแบคทีเรียกรดแลคติกในพืชสดทำให้ พีเอช และอัตราส่วนของ NH_4-N ต่อไนโตรเจนทั้งหมดลดลง ในขณะที่พืชที่ทำให้เหี่ยวก่อนการหมัก เมื่อหมักด้วยหัวเชื้อแบคทีเรียจะมีผลให้ค่าดังกล่าวกลับสูงขึ้นชัดเจน ($P< 0.01$) สำหรับการย่อยได้ของโภชนะ พบว่าการหมักทั้ง 2 วิธีไม่ส่งผลให้ค่าดังกล่าวแตกต่างกันอย่างชัดเจน เช่นเดียวกับการนำไซเลจไปทดลองเลี้ยงโคนมก็ไม่มีผลต่อการให้ผลผลิตน้ำนมของโค อย่างไรก็ตาม โคทดลองกินพืชเหี่ยวที่หมักด้วยหัวเชื้อแบคทีเรียได้มากขึ้น

2. *Lactobacillus pentosus*

Lactobacillus pentosus เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกที่เซลล์มีลักษณะเป็นแท่งตรง (straight rod) ส่วนปลายเซลล์กลม กว้าง 1.0-1.2 μm ยาว 2.0-5.0 μm อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว ๆ เป็นคู่ หรือ เป็นโซ่สั้น ๆ แบคทีเรียชนิดนี้แยกได้จากไซเลจ ไม้ตระกูลมะกอกที่อยู่ระหว่างการหมัก และสิ่งปฏิกูลต่าง ๆ มีกระบวนการหมักแบบ Facultative heterofermentation เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 40˚C (Hammes and Vogel, 1995) มีสมบัติและการหมักน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ดังตารางที่ 9

Nitisinprasert *et al.* (2001) แยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากดิน และไซเลจในแหล่งที่เลี้ยงโคนม พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติก 3 ชนิดมีศักยภาพในการหมักไซเลจที่ดีคือ KUB-L0023, KUB-K7 และ KUB-ST10-1โดย KUB-K7 ทำให้กระบวนการหมักเกิดขึ้นสมบูรณ์เร็วที่สุด รองลงมาได้แก่ KUB-L0023 และ KUB-ST10-1 ตามลำดับ ในขณะที่ KBU-ST10-1 ทำให้ไซเลจมีความเสถียรต่ออากาศมากที่สุด เมื่อทดสอบทางกายภาพและเคมีของแบคทีเรียดังกล่าว ปรากฏว่า KUB-K7 และ KUB-ST10-1 เป็นเชื้อ *Lactobacillus pentosus* ส่วน KUB-L023 เป็นเชื้อ *Pediococcus acidilactici*

Filya *et al*. (2000) ศึกษาการใช้หัวเชื้อ *Lactobacillus plantarum* + *Enterococcus ferecium* และ *Lactobacillus pentosus* ในการหมักต้นข้าวสาลี พบว่าถ้าหมักต้นข้าวสาลีในสภาพสด การใช้หัวเชื้อดังกล่าวไม่ทำให้คุณภาพและความเสถียรต่ออากาศของไซเลจแตกต่างไปจากการไม่ใช้หัวเชื้อ แต่ถ้าหมักต้นข้าวสาลีในสภาพเหี่ยว การใช้หัวเชื้อ *L. pentosus* ทำให้ไซเลจมีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์เกิดขึ้นน้อยที่สุด รองลงมาได้แก่การใช้หัวเชื้อ *L. plantarum* และกลุ่มที่ไม่ใช้

หัวเชื้อตามลำดับ นอกจากนี้ การใช้หัวเชื้อจาก *L. pentosus* ยังทำให้ไซเลจมีความเสถียรต่ออากาศได้ดีอีกด้วย

Garde *et al.* (2002) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากฟางข้าวสาลีที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์และกรดซัลฟูริค 4% โดยใช้เชื้อ *Lactobacillus brevis* และ *L. pentosus* พบว่าการใช้เชื้อเดี่ยว ๆ ในการหมักสับสเตรตดังกล่าวจะได้กรดแลคติก 51% และ 88% ของปริมาณกรดที่ควรจะได้สูงสุด ในขณะที่การใช้เชื้อทั้งสองชนิดในลักษณะเชื้อผสมจะได้กรดสูงถึง 95% ของปริมาณกรดที่ควรจะได้สูงสุด

ตารางที่ 9 การทดสอบสมบัติและการหมักคาร์โบไฮเดรตของ *Lactobacillus pentosus*

การทดสอบ	ผล
G + C content (mol, %)	46-47
Lactic acid isomer	DL
การเติบโต 15/45 (°C)	+ / -
การหมักคาร์โบไฮเดรต	
อะมิกดาลิน (amygdalin)	+
อะราบิโนส (arabinose)	+
เซลโลไบโอส (cellobiose)	+
กลูโคเนท (gluconate)	+
แมนิทอล (manitol)	+
เมเลซิโทส (melezitose)	d
เมลิบิโอส (melibiose)	+
แรฟฟีโนส (raffinose)	+
ไรโบส (ribose)	+
ซอร์บิทอล (sorbital)	+
ซูโครส (sucrose)	+
ไซโลส (xylose)	+

+ = ให้ผลบวกในการทดสอบ $\geq$ 90 %, d = ให้ผลบวกในการทดสอบ 11-90 %

ที่มา: ดัดแปลงจาก Hammes and Vogel (1995)

Nieto-Lozano *et al*. (2002) พบว่า *L. pentosus* ซึ่งแยกได้จากหัวเชื้อผสมสำหรับอุตสาหกรรมเนื้อสัตว์ในประเทศสเปน แสดงกิจกรรมยับยั้งเชื้อ *Clostridium perfringens* ได้ชัดเจนเท่าเทียมกับเชื้อ *Pediococcus acidilactici*

Fooks and Gibson (2002) ศึกษาผลการยับยั้งต่อเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคในลำไส้เล็กของมนุษย์ของโปรไบโอติก และพรีไบโอติก (prebiotic) ชนิดต่าง ๆ ปรากฏว่า *L. pentosus* และ *L. plantarum* เป็นเชื้อที่มีประสิทธิผลในการยับยั้ง *Escherichia coli* และ *Salmonella enteritidis* ได้ดี

จากรายงานดังกล่าว แสดงว่า *L. pentosus* มีศักยภาพที่สามารถเพิ่มคุณภาพการหมัก การใช้เป็นสารยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ไม่ต้องการและการใช้เป็นโปรไบโอติกได้

3. <u>การผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์สำหรับการหมักไซเลจ</u>

สมบัติจำเพาะของจุลินทรีย์ที่จะใช้ผลิตหัวเชื้อสำหรับการหมักไซเลจ ได้แก่ ความสามารถในการเติบโตได้รวดเร็ว ทนต่อสภาวะความเป็นกรดได้ดี สามารถหมักน้ำตาลแบบ Homofermentation เพื่อผลิตกรดแลคติกได้เร็ว เจริญได้ดีในกองไซเลจที่มีความชื้นต่ำและมีช่วงอุณหภูมิสูง ง่ายต่อการผลิตให้อยู่ในรูปผงหรือเกล็ด และมีความเสถียรในการเก็บรักษาสูง (Brooker and Buckle, 1992) การผลิตหัวเชื้อประกอบด้วยขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารและสภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้ได้ปริมาณเซลล์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุด จากนั้นแยกเซลล์ออกจากน้ำหมัก ขั้นตอนสุดท้ายเป็นการเลือกรูปแบบและวิธีการเก็บรักษาหัวเชื้อเพื่อให้สะดวกต่อการใช้งาน (สุพรรณิการ์, 2544)

3.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการเติบโตของเซลล์

3.1.1 ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นจุลินทรีย์ที่ต้องการอาหารสมบูรณ์ (complete medium) ต้องการแหล่งไนโตรเจนที่อยู่ในรูปของสารอินทรีย์ ส่วนแหล่งคาร์บอนที่นิยมใช้มีหลายชนิด เช่น น้ำตาลแล็กโทส ซูโครส และเวย์ นอกจากนี้ ยังต้องมีวิตะมินและแร่ธาตุครบถ้วน สิ่งที่ต้องคำนึงในการผลิตหัวเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกเพื่อการค้า ได้แก่ ราคา ปริมาณของแหล่งโภชนะที่สามารถผลิตเซลล์ได้ในปริมาณมาก และการมีผลกระทบต่อวิธีการเก็บเกี่ยวเซลล์ แหล่งโภชนะที่นิยมใช้ในสูตรอาหารในการผลิตหัวเชื้อแบคทีเรีย แสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 แหล่งสารอาหารที่นิยมใช้สำหรับการผลิตแบคทีเรียกรดแลคติก

Carbon Source	Nitrogen Source	Vitamins and Minerals	Antioxidants	Neutralizes
Lactose	Milk protein	Yeast extract	Ascorbic acid	Carbonate
Maltose	Whey protein		$FeSO_4$	Phosphate
Sucrose	Corn Steep			Hydroxide
Glucose				

ที่มา: Cogan and Accolas (1996)

3.1.2 การควบคุมสภาวะระหว่างการเพาะเลี้ยง

3.1.2.1 อุณหภูมิ เป็นปัจจัยที่มีผลต่อการเติบโตของจุลินทรีย์ทุกชนิด แต่จะผันแปรไปตามชนิดของจุลินทรีย์ (Simpson and Taguchi, 1995) การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกที่อุณหภูมิไม่เหมาะสมจะทำให้เซลล์มีการเติบโตช้า ช่วงเวลาของการแบ่งเซลล์ยาวนานขึ้น นอกจากนี้ยังส่งผลกระทบต่อความคงตัวของเชื้อในกระบวนการแช่แข็ง และการทำแห้งแบบเยือกแข็งอีกด้วย (Makinen and Bigret, 1998)

3.1.2.2 พีเอช แม้ว่าแบคทีเรียกรดแลคติกจะเติบโตได้ในช่วงพีเอชกว้าง (4.1-8.5) แต่ค่าที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 6.0-6.5 ผลจากการที่แบคทีเรียผลิตกรดแลคติกขึ้นนี้ ทำให้พีเอชของอาหารลดลง เซลล์จำเป็นต้องมีกลไกเพื่อปรับพีเอชให้สูงขึ้นโดยการขับโปรตอนออกจากไซโตพลาสซึม ซึ่งต้องใช้เอนไซม์ H^+ ATPase และ ATP ดังนั้นการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในสภาพเป็นกรดจะทำให้การเติบโตลดลง นอกจากนี้ ยังส่งผลกระทบต่อการอยู่รอดของเชื้อขณะเก็บรักษาอีกด้วย เนื่องจากเซลล์บางส่วนได้รับความเสียหาย การปรับพีเอชในระหว่างการเพาะเลี้ยงเชื้อจำเป็นต้องเลือกชนิดของด่างให้เหมาะสม เช่น การปรับด้วยแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ หรือแคลเซียมไฮดรอกไซด์ สำหรับการเพาะเลี้ยง *Streptococcus* spp. นั้น เชื้อจะเจริญได้ดีกว่าการปรับด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ แต่เชื้อที่ได้จะดำเนินกิจกรรมการหมักได้ช้ากว่าการปรับด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ เนื่องจากทำให้ประสิทธิภาพของเอนไซม์โปรติเอสต่ำลง อย่างไรก็ตาม ข้อจำกัดนี้ไม่ส่งผลกระทบถึงการนำไปใช้ในระดับการขยายขนาด เนื่องจากระหว่างการเตรียมหัวเชื้อนั้น เชื้อจะปรับตัวสร้างโปรติเอสได้เช่นเดิม สำหรับผลต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ขณะแช่แข็ง พบว่าการ

ปรับพีเอชในระหว่างการเพาะเลี้ยงด้วยแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์จะทำให้เชื้อมีชีวิตรอดดีกว่าการปรับด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (นภา, 2535)

3.1.2.3 ออกซิเจน แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นจุลินทรีย์ที่เมแทบอไลซ์สารอาหารในสภาวะมีอากาศเล็กน้อย การเพาะเลี้ยงจึงไม่ต้องเติมอากาศลงในถังหมัก แต่มีความจำเป็นต้องกวนเพื่อให้อาหารเป็นเนื้อเดียวกันตลอดเวลา ส่งผลให้มีอากาศเข้าไปในอาหารได้ซึ่งจะทำให้เกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ สภาวะเช่นนี้ทำให้การเติบโตของเชื้อลดลง ปัญหานี้สามารถแก้ไขได้โดยการเติมเอนไซม์แคตาเลส หรือสารรีดิวซ์อื่น ๆ เช่น ไพรูเวต หรือเฟอรัสซัลเฟต นอกจากนี้อาจควบคุมปริมาณออกซิเจนในถังหมักได้โดยการให้ก๊าซไนโตรเจน หรือการพ่นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ลงในถังหมัก เป็นต้น

3.2 การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์

การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ มีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตเซลล์ เอนไซม์ ผลิตภัณฑ์ หรือสารเมแทบอไลท์อื่น ๆ และเพื่อเปลี่ยนสารประกอบที่เติมลงไป (สมใจ, 2537) การเพาะเลี้ยงมี 3 แบบ คือ

3.2.1 การเพาะเลี้ยงแบบเบ็ดเสร็จ (batch cultivation) เป็นการเพาะเลี้ยงแบบปิดที่มีสารอาหารเริ่มต้นจำกัด เมื่อเติมจุลินทรีย์ที่ต้องการลงไปในระบบแล้วจะไม่มีการเติมสารอาหารใด ๆ ลงไปอีก การเพาะเลี้ยงแบบนี้ได้รับความนิยมทางอุตสาหกรรมมากที่สุด (Kim *et al.*,1992)

3.2.2 การเพะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง (continuous cultivation) เป็นการเพาะเลี้ยงที่มีการเติมอาหารใหม่ และถ่ายอาหารเก่าออกจากระบบในอัตราเดียวกันตลอดเวลา ทำให้จุลินทรีย์เติบโตและเพิ่มจำนวนได้อย่างต่อเนื่องโดยไม่มีข้อจำกัดด้านอาหาร การเพาะเลี้ยงแบบนี้แม้ว่าจะมีความสามารถในการผลิต (productivity) สูงที่สุด แต่ก็ใช้เพื่อการศึกษาด้านสรีรวิทยาของเชื้อมากกว่าเพื่อการค้า เนื่องจากจุลินทรีย์กลายพันธุ์หรือปนเปื้อนได้ง่าย

3.2.3 การเพาะเลี้ยงแบบครั้งคราว (fed-batch cultivation) เป็นการเพาะเลี้ยงแบบเปิดมีการเติมสารอาหารลงไปในระบบเป็นระยะ ๆ เพื่อให้จุลินทรีย์เติบโตและใช้สารอาหารได้อย่างเต็มที่โดยไม่มีการถ่ายอาหารเก่าออก เป็นการแก้ปัญหาเกี่ยวกับความเข้มข้นของสารอาหารเริ่มต้น

อย่างไรก็ตาม หากมีการเติมอาหารมากเกินไปอาจมีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ การเพาะเลี้ยงแบบนี้ได้รับความนิยมอย่างกว้างขวางสำหรับการผลิตผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ (Lee *et al*., 1999)

Desmons *et al*. (1998) เปรียบเทียบการผลิตเซลล์ของเชื้อ *Lactobacillus brevis* โดยการเพาะเลี้ยงแบบครั้งคราว และแบบเบ็ดเสร็จซึ่งมีน้ำแช่ข้าวโพดเป็นอาหาร พบว่า การเพาะเลี้ยงแบบครั้งคราวได้ผลผลิตเซลล์มากกว่าการเพาะเลี้ยงแบบเบ็ดเสร็จ ($2.8x10^{10}$ cfu/ml vs $1.5x10^{10}$ cfu/ml)

Pongsungvorn (1999) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Candida utilis* TISTR 5001 ภายใต้สภาวะการให้อากาศมากเกินพอ พบว่าการเพาะเลี้ยงแบบครั้งคราวผลิตเซลล์ได้มากกว่าการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง 1.2 และ1.4 เท่าที่ความเข้มข้นของกลูโคสในอาหาร 20 g/l และ 25 g/l ตามลำดับ

Chiarini *et al*. (1992) ศึกษาผลของการใช้สารเติมแต่งต่อการผลิต *Lactobacillus helveticus* จาก Whey ullrafillrate พบว่า การเพาะเลี้ยงแบบครั้งคราวที่อุณภูมิ 42 ˚C พีเอช 5.7 และความเร็วของการกวนเท่ากับ 160 rpm การใช้ยีสต์สกัด 1% เป็นสารเสริมในอาหารได้ปริมาณเซลล์มากกว่าการใช้กากน้ำตาล (10^{9} cfu/ml vs 10^{8} cfu/ml)

นพวรรณ (2537) รายงานว่าเชื้อ *Streptococcus thermophillus* เจริญได้ดีในอาหารชนิดต่าง ๆ เรียงตามลำดับคือ นมสดที่ปลอดเชื้อ นมผงขาดมันเนย 10% หางนมผง 10% (pH 6.8) M17 และ MRS โดยมีอุณหภูมิที่เหมาะสมเท่ากับ 43 ˚C และมีพีเอชอยู่ในช่วง 6-8 นอกจากนี้ยังพบว่าสภาวะที่มีและไม่อากาศทำให้การเจริญของเชื้อใกล้เคียงกัน เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบบหมุนเวียนเซลล์โดยแยกเซลล์ออกจากน้ำหมัก จากนั้นผสมเซลล์ที่แยกได้กับอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ก่อนเติมกลับลงไปในถังหมักอีกครั้ง ทำให้ได้ความเข้มข้นของเซลล์มากกว่าการเพาะเลี้ยงแบบครั้งคราว (10^{8} cfu/ml vs 10^{6} cfu/ml)

3.3 รูปแบบของหัวเชื้อจุลินทรีย์

หัวเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตเพื่อการค้า จำเป็นต้องมีอายุการเก็บได้นาน ขนส่งได้สะดวกและไม่สูญเสียกิจกรรมระกว่างการขนส่งและการเก็บรักษา โดยทั่วไปผลิตออกมา 2 รูปแบบ คือ หัวเชื้อเหลวและหัวเชื้อผง

3.3.1 หัวเชื้อเหลว เป็นหัวเชื้อที่ได้รับความนิยมแพร่หลาย แต่เก็บรักษาได้ไม่นาน และผลิตในปริมาณน้อย หัวเชื้อชนิดนี้มีข้อดีที่สามารถตรวจสอบได้ก่อนใช้ แต่มีข้อเสียที่กิจกรรมของเชื้อไม่มีความสม่ำเสมอ การเก็บรักษาเชื้อชนิดเหลวมี 2 วิธี คือ หัวเชื้อที่เก็บเพื่อใช้งานประจำ (working stock culture) และหัวเชื้อที่เก็บสำรอง (reserved stock culture) หัวเชื้อเหล่านี้ก่อนที่จะนำมาใช้จะต้องทำการเพิ่มจำนวนของเชื้อเสียก่อน ซึ่งโดยทั่วไปใช้อัตราส่วนของเชื้อ 2% (Tamime, 1990)

3.3.2 หัวเชื้อผง เป็นหัวเชื้อที่ผ่านกระบวนการกำจัดเอาน้ำออกจากตัวอย่าง เพื่อทำให้อยู่ในสภาพแห้ง ซึ่งมีหลายวิธี ได้แก่ การทำแห้งภายใต้สุญญากาศ การทำแห้งแบบเยือกแข็ง และการทำแห้งแบบพ่นฝอย (สมบูรณ์, 2544)

การทำแห้งแบบสุญญากาศ เป็นวิธีเก็บรักษาจุลินทรีย์ที่ไวต่ออุณหภูมิต่ำ โดยผสมเชื้อลงในสารละลายน้ำตาลแล็กโทสจากนั้นปรับสภาพให้เป็นกลางด้วยแคลเซียมคาร์บอเนต ขั้นสุดท้ายจึงทำให้แห้งภายใต้สภาพสุญญากาศ วิธีการนี้เชื้อจะมีการรอดชีวิตประมาณ 1-2% ดังนั้นก่อนการใช้งานจึงต้องมีการถ่ายเชื้อหลายครั้งเพื่อให้เชื้อมีกิจกรรมสูงสุด (Tamime and Robison, 1985)

การทำแห้งแบบเยือกแข็ง เป็นวิธีหนึ่งที่ใช้ในการผลิตหัวเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกทางการค้า การทำแห้งแบบนี้เป็นการระเหยน้ำออกจากสารละลายที่เยือกแข็งแล้ว ซึ่งมีขั้นตอน คือ เตรียมเซลล์แขวนลอยไปทำให้เยือกแข็ง และต่อเข้าสู่ระบบสุญญากาศ ไอน้ำที่ระเหยไปจะถูกจับไว้ที่เครื่องควบแน่นซึ่งมีอุณหภูมิต่ำ หัวเชื้อที่ผ่านกระบวนการทำแห้งแบบนี้มีเซลล์ที่มีประสิทธิภาพลดจำนวนลง 50-80% และจะลดลงไปอีกเมื่อเก็บรักษาไว้ในสภาพแวดล้อมและระยะเวลาที่แตกต่างกัน เนื่องจากเซลล์ได้รับความเสียหาย (Porubcan and Sellers, 1975) อย่างไรก็ตาม สามารถลดความเสียหายดังกล่าวได้โดยการใช้สารป้องกันเซลล์ (protectant) เช่น กรดแอสคอร์บิก โมโนโซเดียมกลูตาเมต สารประกอบแอสพาเตต อินโนซิทอล ซอร์บิทอล กลูโคส และซูโครส (สมบูรณ์, 2544) นอกจากนี้การประกอบสูตรอาหารที่เหมาะสม และการทำแห้งในช่วงที่เชื้อเจริญในระยะเข้าสู่ระยะคงที่ก็จะลดการสูญเสียของเซลล์ได้ (Kilara *et al*., 1977; Cogan and Accolas, 1996; Desmons *et al*., 1998)

การทำแห้งแบบพ่นฝอย การเก็บรักษาเซลล์ในสภาพเยือกแข็งมีความยุ่งยากต่อการขนส่งและการเก็บรักษามาก เนื่องจากหัวเชื้อมีน้ำเป็นองค์ประกอบสูงถึง 90% ทำให้มีน้ำหนักมาก แต่

ความเข้มข้นของเซลล์ต่ำ ในขณะที่การเก็บรักษาในสภาพแห้งแบบเยือกแข็ง หัวเชื้อมีน้ำหนักเบา ความเข้มข้นของเซลล์สูง แต่มีต้นทุนการผลิตที่สูง ดังนั้น การทำแห้งแบบพ่นฝอยสำหรับการผลิตหัวเชื้อจึงถูกพัฒนาขึ้นมา เนื่องจากเป็นวิธีที่มีข้อดีเช่นเดียวกับการทำแห้งแบบเยือกแข็งแต่มีต้นทุนต่ำกว่า อย่างไรก็ตาม เนื่องจากหัวเชื้อมีความไวต่อความร้อน การทำแห้งแบบนี้จึงต้องเข้าใจถึงกลไกเพื่อการรักษาสภาพเซลล์ของหัวเชื้อแต่ละชนิด

4. การทำแห้งแบบพ่นฝอย

การทำแห้งแบบพ่นฝอย (spray-drying) เป็นวิธีการทำแห้งที่ถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมเภสัชกรรม เช่น ปฏิชีวนะ วัคซีน เอนไซม์ พลาสติก และสารผสมตัวยา (excipients) รวมทั้งการเตรียมสารต่าง ๆ เพื่อให้มีลักษณะที่ค่อย ๆ ปลดปล่อยออกมาใช้ประโยชน์ และสารชีวภาพต่าง ๆ (Millqvist-Fureby *et al.,* 1999) วิธีการนี้เกิดขึ้นเมื่อ ค.ศ.1914 โดย Rogers, L.A. เป็นผู้ศึกษาการทำแห้งเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกสำหรับอุตสาหกรรมน้ำนม แต่ไม่ประสบผลสำเร็จเท่าที่ควรเนื่องจากอัตราการรอดตายของเซลล์ต่ำ หัวเชื้อไม่มีความเสถียรขณะทำการเก็บรักษา และค่อนข้างยุ่งยากต่อการทำให้อยู่ในสภาพของเหลวใหม่ (rehydration) แต่วิธีการทำแห้งแบบนี้ก็ได้รับการศึกษาอย่างต่อเนื่อง และพบว่าสารป้องกันเซลล์บางชนิดและช่วงการเติบโตของจุลินทรีย์ที่นำไปทำแห้งสามารถลดปัญหาดังกล่าวได้ระดับหนึ่ง หลักการทำงานของการทำแห้งแบบพ่นฝอยประกอบด้วยการพ่นเซลล์แขวนลอยเชื้อเข้าไปในห้องอากาศร้อนซึ่งมีอุณหภูมิ 150-200˚C ความชื้นจะระเหยไปอย่างรวดเร็ว ในขณะที่อุณหภูมิของผลิตภัณฑ์ค่อนข้างต่ำ ทำให้ผลิตภัณฑ์เกิดความเสียหายไม่มากนัก (Brennan, 1994)

4.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการทำแห้งหัวเชื้อแบบพ่นฝอย

4.1.1 อุณหภูมิอากาศเข้า หมายถึงอุณหภูมิของอากาศที่เคลื่อนผ่านเข้าไปยังชุดอุปกรณ์ทำแห้งโดยอาศัยเครื่องเป่าลมร้อน โดยทั่วไปมีค่าอยู่ระหว่าง 150-170 ˚C เนื่องจากหากอุณหภูมิต่ำกว่านี้จะทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความชื้นสูง แต่ถ้าอุณหภูมิสูงกว่า 170 ˚C จะทำให้ไม่สามารถควบคุมอุณหภูมิอากาศร้อนออกได้ เนื่องจากการควบคุมอุณหภูมิอากาศออกอาศัยการปรับอัตราการป้อนสารเข้าซึ่งจะทำให้มีความหนืดสูง เป็นผลกระทบต่อขีดจำกัดของปั๊ม (Kim and Bhowmik, 1990) อย่างไรก็ตาม อุณหภูมิของอากาศเข้าที่ใช้ในกระบวนการต้องสูงกว่าจุดเดือดของตัวทำละลาย

4.1.2 อุณหภูมิอากาศออก หมายถึงอุณหภูมิของกระแสอากาศที่ทำหน้าที่เป็นตัวพาผลิตภัณฑ์ก่อนเข้าสู่ไซโคลน (cyclone) อุณหภูมิของอากาศเป็นผลที่เกิดจากอุณหภูมิของอากาศเข้า ความเข้มข้นของสารละลาย และปริมาณอากาศ (สุพรรณิการ์, 2544) อุณหภูมิของอากาศออกมีความสำคัญยิ่งต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ โดยทั่วไปมีค่าอยู่ระหว่าง 60-90°C อุณหภูมิที่ต่ำกว่า 60°C จะทำให้ผลิตภัณฑ์มีความชื้นสูงเกินไป แต่ถ้าอุณหภูมิสูงกว่า 90°C จะทำให้ผลิตภัณฑ์เกิดสีน้ำตาล และเซลล์จะรอดชีวิตต่ำลง (Kim and Bhowmik, 1990)

4.1.3 ความดันอากาศที่ผ่านเข้าสู่หัวฉีด (automizing air pressure) โดยทั่วไป ความดันนี้ถูกจำกัดให้อยู่ระหว่าง 98-196 kPa เนื่องจากความดันที่ต่ำกว่า 98 kPa จะทำให้ขนาดของผงผลิตภัณฑ์ใหญ่เกินไป หรืออาจไม่เกิดผงผลิตภัณฑ์ถ้าสารละลายตัวอย่างมีความหนืดสูง ในทางกลับกันหากใช้ความดันสูงกว่า 196 kPa ผงผลิตภัณฑ์จะมีความละเอียดมากเกินไปทำให้ไม่สามารถแยกผลิตภัณฑ์ในส่วนของไซโคลนได้ นอกจากนี้ความดันที่ผ่านเข้าสู่หัวฉีดสูงเกินไปยังส่งผลให้การมีชีวิตรอดของเซลล์ในระหว่างกระบวนการทำแห้งลดลงอีกด้วย

4.1.4 สารป้องกันเซลล์ (protective agent) เชื้อที่ผ่านกระบวนการผลิตอาจถูกทำลายด้วยความร้อน ทำให้อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ลดลง ดังนั้น จึงต้องมีการป้องกันไม่ให้เซลล์ได้รับอันตรายโดยการเติมสารบางชนิดที่มีผลให้เซลล์รอดชีวิตมากขึ้น เรียกว่าสารป้องกันเซลล์ ซึ่งสารนี้ต้องมีสมบัติป้องกันเซลล์ถูกทำลายในระหว่างกระบวนการได้ มีความสะดวกต่อการทำแห้ง มีความคงทนและคืนรูปได้ดี และไม่เป็นพิษต่อเซลล์ (ภัทรียา, 2541) สารป้องกันเซลล์มีหลายชนิด ได้แก่

4.1.4.1 พอลิออล (polyol) ตัวอย่างสารป้องกันเซลล์ในกลุ่มนี้ ได้แก่ กลีเซอรอล อะโดนิทอล (adonital) อินโนซิทอล (inositol) และซอร์บิทอล โดยที่กลีเซอรอลถูกนำมาใช้มากกว่าชนิดอื่น ๆ

4.1.4.2 พอลิแซคคาไรด์ (polysaccharides) ตัวอย่างของสารกลุ่มนี้ ได้แก่ เพคติน เด็กซ์แทรน (dextran) และพอลิเอทธิลีนไกลคอล (polyethylene glycol) สารเหล่านี้จะให้ผลดีต่อการปกป้องเซลล์จำเพาะชนิด เช่น เพคติน และเด็กซ์แทรน จะสามารถเพิ่มอัตราการอยู่รอดของเชื้อ *Lactobacilli* และ *Lactococci* ได้เป็นส่วนใหญ่ ในขณะที่พอลิเอทธิลีนไกลคอลสามารถป้องกันเซลล์ของ *Steptococcus thermophillus* ได้ดี เป็นต้น

4.1.4.3 ไดแซคคาไรด์ ตัวอย่างของสารป้องกันเซลล์กลุ่มนี้ ได้แก่ น้ำตาลแล็กโทสและ น้ำตาลซูโครส สารเหล่านี้จะยับยั้งการสร้างอนุภาคอิสระ โดยต้องการ Hydroxyl group 5 โมเลกุล สำหรับการจัดเรียงตัวเพื่อการป้องกันเซลล์ สารป้องกันเซลล์จะเชื่อมต่อกับโปรตีนด้วยพันธะไฮโดรเจนเพื่อแทนที่น้ำในการให้โปรตีนมีความคงทน

4.1.4.4 กรดอะมิโนและโปรตีน เช่น โซเดียมกลูตาเมต กรดแอสปาติค และซีสตีน กลไกการป้องกันเซลล์โดยกรดอะมิโนนั้น เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างกลุ่ม Carboxyl ของโปรตีนในเซลล์จุลินทรีย์และกลุ่มอะมิโนของสารป้องกันเซลล์ ทำให้โครงสร้างโปรตีนของเชื้อมีความเสถียรมากขึ้น

4.1.4.5 สารประกอบอื่น ๆ เช่น ดินที่ฆ่าเชื้อแล้ว เกลือฟอสเฟต เกลือซิเตรท และวิตะมินบางชนิด เป็นต้น

ความสำเร็จของการทำแห้งจุลินทรีย์แบบพ่นฝอย วัดได้จากการมีชีวิตรอดของเซลล์ กิจกรรมทางชีวเคมีที่เหลืออยู่ภายหลังการทำแห้งและระหว่างการเก็บรักษา ความชื้นของผลิตภัณฑ์ ความหนาแน่นของเซลล์ ความสม่ำเสมอในการกระจายตัวของเชื้อ และขนาดอนุภาคของผลิตภัณฑ์ (Masters, 1991) Desmons *et al*. (1998) ศึกษาการผลิตเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกชนิดต่าง ๆ แบบพ่นฝอย สรุปได้ว่า ความสำเร็จของวิธีดังกล่าวขึ้นอยู่กับกระบวนการเพาะเลี้ยงเพื่อให้ได้ความเข้มข้นของเซลล์สูงสุด อันเป็นผลจากการจัดการสูตรอาหาร พีเอช อุณหภูมิ การกวน และการให้อากาศที่เหมาะสม นอกจากนี้การทำให้เกิด Osmotic shock ในระหว่างการเพาะเลี้ยงจะทำให้เซลล์มีความทนต่อการทำแห้งได้ดีขึ้น สำหรับอิทธิพลของระบบการทำแห้งปรากฏว่าอุณหภูมิของอากาศเข้า ความเครียดเฉือน (shear stress) และออกซิเดชัน เป็นปัจจัยหลักที่ส่งผลต่อการอยู่รอดของเซลล์หลังการพ่นฝอย ด้านการใช้สารเติมแต่งและการใช้สารห่อหุ้ม (microencapsulation) พบว่าทำให้เซลล์อยู่รอดสูงถึง 93.8% เมื่อเทียบกับการไม่ใช้ซึ่งอยู่รอดเพียง 3-6% สำหรับเทคนิคอื่น ๆ ที่ช่วยทำให้การอยู่รอดของเซลล์สูงขึ้นได้แก่ การใช้วิธีพ่นฝอยร่วมกับวิธีการอื่นๆ เช่น Fluidization และ Freez-drying ส่วนการลด Water activity จะช่วยให้เซลล์มีความเสถียรในระหว่างการเก็บรักษามากขึ้น

4.2 การทำแห้งจุลินทรีย์แบบพ่นฝอย

Espina and Packard (1979) ทำการทดลองโดยใช้นมผงพร่องมันเนยในเซลล์แขวนลอยตัวอย่าง 25% และ 40% สำหรับการทำแห้ง *Lactobacillus acidophillus* แบบพ่นฝอย กำหนดให้อุณหภูมิอากาศออกเป็น 75, 80 และ 85˚C อุณหภูมิอากาศเข้าเท่ากับ 170˚C พบว่า การอยู่รอดของเซลล์สูงขึ้นเมื่อใช้นมผงพร่องมันเนย 25% ในเซลล์แขวนลอยที่อุณหภูมิอากาศออก 75˚C ทั้งในช่วงหลังกระบวนการทำแห้งและที่อายุการเก็บรักษา 30 วัน

Johnson and Etzel (1994) เปรียบเทียบวิธีการเก็บรักษาต่อการอยู่รอดของเซลล์ 4 วิธี คือ การทำแห้งแบบพ่นฝอยที่กำหนดอุณหภูมิอากาศออก 82˚C และ 120˚C การทำแห้งแบบเยือกแข็ง และการเก็บรักษาในสภาพแช่แข็ง โดยทำการคืนสภาพ (reconstitution) ของ Cell paste ด้วยสารละลายมอลโทเดกซ์ทริน (maltodextrin) เข้มข้น 19% ปรับพีเอชเท่ากับ 7 ผลการทดลองพบว่า การเก็บรักษาในสภาพแช่แข็งมีอัตราการรอดตายของเซลล์สูงที่สุด รองลงมาได้แก่การทำแห้งแบบแช่แข็ง การทำแห้งแบบพ่นฝอยที่ใช้อุณหภูมิของอากาศออก 82˚C และ 120 ˚C โดยมีค่าเท่ากับ 54, 48, 15 และ 0.08% ตามลำดับ ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองของ Fu and Etzel (1995) ที่พบว่า การทำแห้งแบบพ่นฝอยทำให้การอยู่รอดของ *Lactococcus lactis* ต่ำที่สุด ในขณะที่การแช่แข็งทำให้เซลล์อยู่รอดสูงที่สุด รองลงมาได้แก่การทำแห้งแบบเยือกแข็ง นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อผันแปรอุณหภูมิของอากาศออกจากห้องอบลมร้อนเป็น 77, 90, 100, 110 และ 120 ˚C โดยใช้อุณหภูมิของอากาศเข้าเท่ากับ 200˚C การอยู่รอดของเซลล์จะยิ่งลดลงเมื่อกำหนดอุณหภูมิอากาศออกสูงขึ้น เมื่อเก็บผลิตภัณฑ์หลังจากกระบวนการทำแห้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 ˚C เป็นเวลา 3 เดือน พบว่าการอยู่รอดของเซลล์จะลดลง 34-86% อย่างไรก็ตาม การผลิตกรดแลคติกของ Single cell paste จากการเก็บรักษาในรูปแบบต่าง ๆ ไม่มีความแตกต่างกัน แต่มีระยะการปรับตัวก่อนการผลิตกรดแลคติกแตกต่างกัน

Teixeira *et al.* (1995a) ศึกษาการอยู่รอดของ *Lactobacillus delbrueckii* จากวิธีการทำแห้งแบบพ่นฝอย โดยเตรียมตัวอย่างจากเซลล์แขวนลอยเชื้อผสมกับสารละลายหางนมผงที่มีกรดแอสคอร์บิก 12.5 g/l และโมโนโซเดียมกลูตาเมต 12.5 g/l ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร กำหนดให้อุณหภูมิของอากาศเข้าและออกเท่ากับ 200 ˚C และ 70 ˚C ตามลำดับ นำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปปรับสภาพให้มี Water activity เท่ากับ 0.03, 0.11, 0.23, 0.43 และ 0.75 ในขณะเดียวกันทำการศึกษาถึงผลของอุณหภูมิที่เก็บรักษาต่อการอยู่รอดของเซลล์ ผลการทดลองปรากฏว่าใน

สภาพที่ไม่มีการควบคุม Water activity จำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดจะยิ่งลดลงเมื่ออุณหภูมิการเก็บรักษายิ่งสูงขึ้น ในขณะที่ผลิตภัณฑ์ที่มี Water activity สูงจะทำให้เซลล์มีอัตราการตายสูงเช่นกัน สำหรับผลของกรดแอสคอร์บิกและโมโนโซเดียมกลูตาเมต พบว่าทำให้เซลล์มีชีวิตรอดสูงขึ้นเมื่อเก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิต่ำ ($P< 0.01$) แต่จะยิ่งทำให้อัตราการตายสูงขึ้นเมื่อเก็บในที่อุณหภูมิสูงขึ้น (20˚C) เพราะกรดแอสคอร์บิกมีสมบัติเป็นทั้งสารต่อต้านอนุมูลอิสระ และเป็น Pro-oxidant ซึ่งสมบัติที่เป็น Pro-oxidant นี้ทำให้เกิด Hydroxyl radicals ซึ่งออกซิไดซ์ชีวโมเลกุลของเซลล์ได้ ส่งผลให้เซลล์มีอัตราการตายสูงขึ้น

Mauriello *et al.* (1999) ศึกษาผลของการทำแห้งแบบพ่นฝอยต่อการอยู่รอดและการแสดงกิจกรรมของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตแบคเทอริโอซิน (bacteriocin) โดยเตรียมเซลล์แขวนลอยเพื่อป้อนเข้าสู่ระบบแตกต่างกัน 2 แบบ คือ แบคทีเรียที่แขวนลอยในนมผงพร่องมันเนย และแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงโดยตรงในหางนม ผันแปรอุณหภูมิของอากาศเข้า 3 ระดับ คือ 160, 180 และ 200˚C อุณหภูมิของอากาศออกเท่ากับ 68˚C ใช้อัตราการไหลของเซลล์แขวนลอยป้อนเข้าสู่ระบบ 3 ระดับ คือ 10, 13 และ 17 ml/min จากนั้นเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ไว้ที่อุณหภูมิ 4 ˚C และทำการตรวจสอบการอยู่รอดของเซลล์และกิจกรรมของแบคเทอริโอซินหลังการทำแห้งที่ 2, 5, 15, 30 และ 60 วัน ผลการทดลองปรากฏว่า รูปแบบของการเตรียมตัวอย่างไม่มีผลต่อการอยู่รอดของเซลล์ แต่การเพิ่มอุณหภูมิอากาศเข้าทำให้การอยู่รอดของเซลล์ลดลง อย่างไรก็ตาม กิจกรรมของแบคเทอริโอซินไม่ถูกทำลาย เมื่อนำผลิตภัณฑ์ไปทดสอบด้วยโซเดียมคลอไรด์ พบว่าเซลล์สูญเสียกิจกรรมชั่วคราวเท่านั้น เมื่อเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ไว้ที่ 4 ˚C เป็นเวลา 2 เดือน พบว่า การอยู่รอดของเซลล์จะค่อย ๆ ลดลง แต่ไม่มีผลเสียต่อกิจกรรมของแบคเทอริโอซินแต่อย่างใด

Lian *et al*. (2002) ศึกษาการมีชีวิตรอดของ *Bifidobacterium* spp.จากการทำแห้งแบบพ่นฝอย พร้อมกับการผันแปรชนิดของสารป้องกันเซลล์ พบว่าสารป้องกันเซลล์แต่ละชนิดมีความเหมาะสมกับ Bifidobacterium ต่างกัน โดยนมผงพร่องมันเนย 10% ทำให้การอยู่รอดของเชื้อ *B. longum* B6 สูงที่สุด ในขณะที่สารละลายแป้ง 10% ทำให้การอยู่รอดของเซลล์ *B. infantis* CCRC 14633 ต่ำที่สุด ($P< 0.05$)

Desmond *et al*. (2002) พบว่า การทำให้แบคทีเรียกรดแลคติกปรับตัวต่อความร้อนและโซเดียมคลอไรด์ก่อนทำแห้งแบบพ่นฝอยจะทำให้การอยู่รอดของเซลล์สูงกว่าแบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่มที่ไม่ทำให้มีการปรับตัวอย่างชัดเจน

Millqvist-Fureby *et al.* (1999) ศึกษาผลการทำแห้งแบบพ่นฝอยของเอนไซม์ทริปซินโดยใช้สารละลายคาร์โบไฮเดรตชนิดต่าง ๆ เป็นสารป้องกันการถูกทำลายของเอนไซม์ ได้แก่ แล็กโทส ซูโครส แมนนิทอล อัลฟา-ไซโคลเด็กซ์ทริน และเด็กซ์ทริน ใช้อัตราส่วนของสารละลายคาร์โบไฮเดรตแต่ละชนิดต่อสารละลายเอนไซม์ในสัดส่วน 99.8/0.2, 99/1 และ 95/5 (w/w) โดยกำหนดให้มีของแข็ง 10% ของสารละลายผสม จากนั้นทำแห้งภายใต้สภาวะอุณหภูมิของอากาศเข้าเท่ากับ 180˚C อุณหภูมิอากาศออกเท่ากับ 65˚C และ 70˚C อัตราการป้อนสารละลายเท่ากับ 4.6 ml/min และอัตราการไหลของอากาศร้อนเท่ากับ 0.8 m^3/min ผลการทดลองปรากฏว่า ภายหลังผ่านกระบวนการทำแห้งแล้ว เอนไซม์ ทริปซินสามารถแสดงกิจกรรมได้มากกว่า 90%

การผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์สำหรับหมักไซเลจซึ่งศึกษาโดย สุพรรณิการ์ (2544) พบว่า การเพาะเลี้ยง *Pediococcus acidilactici* (M6) โดยใช้กากน้ำตาล 7% เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้น้ำแช่ข้าวโพด 9% เป็นแหล่งไนโตรเจนในถังหมักขนาด 2 ลิตร ภายใต้สภาวะพีเอชเท่ากับ 7 อุณหภูมิ 37˚C อัตรการกวนที่ 50 rpm ได้ผลผลิตเซลล์เท่ากับ 5.42×10^{11} cfu/g ของซูโครส และปริมาณเซลล์สูงสุดเท่ากับ 1.7×10^{9} cfu/ml ที่เวลา 6 ชั่วโมง เมื่อทำการแยกเซลล์ที่ได้ไปศึกษาการทำให้แห้งแบบพ่นฝอย ปรากฏว่าสภาวะที่เหมาะสมของกระบวนการดังกล่าวคือ การใช้นมผงพร่องมันเนย 20% เป็นสารป้องกันเซลล์ ใช้อุณหภูมิอากาศเข้าและออกเท่ากับ 120˚C และ 60˚C ตามลำดับ จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปผสมด้วยโมโนโซเดียมกลูตาเมตร่วมกับกรดแอสคอร์บิคในอัตราส่วน 0.1:2.0% แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 ˚C ทำให้อัตราการรอดชีวิตของเซลล์สูงถึง 80.65% ที่อายุ 70 วัน แต่การรอดชีวิตเหลือเพียง 48.57% เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องที่อายุเก็บรักษาเดียวกัน

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. แหล่งจุลินทรีย์

ใช้เชื้อ *Lactobacillus pentosus* KUB-ST10-1 ที่แยกโดย Nitisinprasert *et al*. (2001)

2. พืชอาหารสัตว์

ใช้หญ้าเนเปียร์แคระ (dwarf napiergrass) ชนิดต้นสูง

3. สัตว์ทดลอง

ใช้โคนมเพศเมียเจาะกระเพาะ (fistulated cow) และโคนม ที่อยู่ระหว่างการให้น้ำนมช่วงกลางของระยะการให้นม พันธ์ลูกผสมขาว-ดำ ระดับเลือด 87.5 % ประเภทละ 4 ตัว

4. อุปกรณ์

4.1 เครื่องชั่งละเอียด (Satorius, Germany)
4.2 เครื่องวัด พีเอช (Schott, Germany)
4.3 เครื่องสเปคโทรโฟโตมิเตอร์ (Thermospectronic, Helios Gamma, England)
4.4 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Hermle, Germany)
4.5 ตู้ปลอดเชื้อ
4.6 ตู้บ่มเชื้อ (Memmert, Germany)
4.7 หม้อนึ่งความดัน (Hirayama, Japan)
4.8 ถังหมักขนาด 2 ลิตร (New Brunswick Scientific, NJ, USA)
4.9 เครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอยระดับห้องปฏิบัติการ (Buchi, Switzerland)
4.10 เครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอยระดับนำร่อง (Alfa, Japan)
4.11 ตู้อบลมร้อน (Memmert, Germany)

4.12 เครื่องวิเคราะห์โปรตีนโดยวิธี Kjeldhal

4.13 เครื่องวิเคราะห์ปริมาณเยื่อใย

4.14 โถดูดความชื้น

4.15 เครื่องหั่นหญ้าสำหรับการหมักไซเลจ

4.16 ถุงพลาสติกชนิดป้องกันอากาศได้

4.17 เครื่องวิเคราะห์น้ำนม (Milko scan; Combifoss 6000)

4.18 อุปกรณ์สำหรับการหมักไซเลจระดับขยายขนาด

4.19 อุปกรณ์รีดนม (Bucket type system; Strengo, Denmark)

5. <u>สารเคมี</u>

5.1 Glucose

5.2 Tween 80

5.3 K_2HPO_4

5.4 Na-acetate

5.5 $(NH_4)_2$ citrate

5.6 $MgSO_4.7H_2O$

5.7 $MnSO_4.7H_2O$

5.8 Na $HPO_4.12H_2O$

5.9 NaOH และ H_2SO_4 conc.

5.10 $CuSO_4.5H_2O$

5.11 $NaSO_4$

5.12 HCl conc.

5.13 H_3BO_3

5.14 Na_2CO_3

5.15 Bromocresal green

5.16 K_2SO_4

5.17 Methyl red

5.18 MgO

5.19 Sodium lauryl sulphate

วิธีการ

1. การศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเติบโตของ *L. pentosus* KUB-ST10-1

1.1 การเตรียมเชื้อบริสุทธิ์

นำกล้าเชื้อบริสุทธิ์ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80 ˚C มาทำเป็นเซลล์แขวนลอย แล้วถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว MRS บ่มไว้ที่ 37˚C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเชื้อโดยขีดลงบนอาหารแข็ง MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37˚C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อได้เชื้อบริสุทธิ์แล้วนำมาเก็บรักษาเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อสำหรับการใช้งาน โดยแทงลงในอาหารแข็ง MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37˚C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4˚C และทำการต่อเชื้อทุก ๆ เดือน

1.2 การเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น

ถ่ายกล้าเชื้อสำหรับการใช้งานลงในอาหารเหลว MRS แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37˚C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อที่ได้ปริมาณ 5% (v/v) ลงในอาหารเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37˚C เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ซึ่งเชื้อจะเจริญในระยะทวีคูณ

1.3 การศึกษาปริมาณแหล่งไนโตรเจนและคาร์บอนต่อการเติบโตของ *L. pentosus* KUB-ST10-1

ถ่ายหัวเชื้อจากข้อ 1.2 ปริมาณ 5% (v/v) ลงในฟลาสก์ที่บรรจุอาหารพื้นฐาน (ตารางผนวกที่ ข1) โดยแทนที่แอมโมเซียมซัลเฟตด้วยแหล่งไนโตรเจนจากน้ำแช่ข้าวโพด หรือยูเรีย และแทนที่โซเดียมอะซิเตทด้วยแหล่งคาร์บอนจากกากน้ำตาล โดยผันแปรความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนและคาร์บอนระดับต่าง ๆ บ่มที่อุณหภูมิ 37 ˚C เป็นเวลา 14 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 2 ชั่วโมงเพื่อวัดพีเอช ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

1.3.1 ปริมาณยูเรียและกากน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการเติบโตของเชื้อ *L. pentosus* KUB-ST10-1

1.3.1.1 แผนการทดลอง ใช้แบบ 4^2 factorial experiment ในแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design, CRD) ประกอบด้วยปริมาณของยูเรีย 4 ระดับ คือ 0, 1.0, 2.0, และ 3.0% และปริมาณกากน้ำตาล 4 ระดับ คือ 3, 5, 7 และ 9% รวมสิ่งทดลองทั้งหมดเท่ากับ 16 treatment combination (TC) โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ (replication)

1.3.1.2 การวิเคราะห์ข้อมูล วิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) ของค่า พีเอช ปริมาณเซลล์มีชีวิต อัตราการเติบโตจำเพาะ (μ) และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ปริมาณเซลล์มีชีวิตสูงสุด เปรียบเทียบความแตกต่างของทรีตเมนต์โดยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SAS (SAS, 1996) โดยมีแบบหุ่นการวิเคราะห์ทางสถิตินี้ดังนี้

$$Yijk = \chi + Ai + Bj + ABij + \varepsilon ijk$$

เมื่อ Yijk = ค่าสังเกตใด ๆ ที่ทำการศึกษา

χ = ค่าเฉลี่ยรวม

Ai = อิทธิพลของความเข้มข้นของยูเรียที่ระดับ i

Bj = อิทธิพลของความเข้มข้นของกากน้ำตาลที่ระดับ j

ABij = อิทธิพลร่วมของยูเรียและกากน้ำตาลที่ระดับ ij

εijk = ความคลาดเคลื่อนของการทดลอง

1.3.2 ปริมาณน้ำแช่ข้าวโพดและกากน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการเติบโตของเชื้อ *L. pentosus* KUB-ST10-1

1.3.2.1 แผนการทดลอง ใช้แบบ 4x3 factorial experiment ในแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ ประกอบด้วยปริมาณน้ำแช่ข้าวโพด 4 ระดับ คือ 5, 7, 9 และ 11% และปริมาณกากน้ำตาล 3 ระดับคือ 5, 7 และ 9% รวมสิ่งทดลองทั้งหมด 12 treatment combination ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

1.3.2.2 การวิเคราะห์ข้อมูล วิเคราะห์ความแปรปรวนของค่า พีเอช ปริมาณเซลล์มีชีวิต อัตราการเติบโตจำเพาะ และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ปริมาณเซลล์มีชีวิตสูงสุด เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างทรีตเมนต์ โดยวิธี DMRT โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SAS ตามแบบหุ่นทางสถิติ ดังนี้

$$Yijk = \chi + Ai + Bj + ABij + \varepsilon ijk$$

เมื่อ Yijk = ค่าสังเกตใด ๆ ที่ทำการศึกษา

χ = ค่าเฉลี่ยรวม

Ai = อิทธิพลของความเข้มข้นของน้ำแช่ข้าวโพดที่ระดับ i

Bj = อิทธิพลของความเข้มข้นของกากน้ำตาลที่ระดับ j

ABij = อิทธิพลร่วมของน้ำแช่ข้าวโพดและกากน้ำตาลที่ระดับ ij

εijk = ความคลาดเคลื่อนของการทดลอง

1.4 ผลของอาหาร MRS และอาหารคัดเลือกต่อการเติบโตของ *L. pentosus* KUB-ST10-1

ถ่ายหัวเชื้อจากข้อ 1.2 ปริมาณ 5% (v/v) ลงในฟลาสก์ที่บรรจุอาหาร MRS และอาหารที่คัดเลือกจากการทดลองที่ 1.3.1 และ 1.3.2 รวมทั้งน้ำหมักวุ้นมะพร้าว บ่มที่อุณหภูมิ 37 ˚C เป็นเวลา 14 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก ๆ 2 ชั่วโมง เพื่อวัดค่าพีเอช การเติบโตของเซลล์โดยวิธีนับปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

1.4.1 แผนการทดลอง ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ มี 4 ทรีตเมนต์ คือ

ทรีตเมนต์ที่ 1 ยูเรีย-กากน้ำตาล (สูตรที่ 6 จากการทดลองที่ 1.3.1)
ทรีตเมนต์ที่ 2 น้ำแช่ข้าวโพด-กากน้ำตาล (สูตรที่ 12 จากการทดลองที่ 1.3.2)
ทรีตเมนต์ที่ 3 น้ำหมักวุ้นมะพร้าว
ทรีตเมนต์ที่ 4 MRS broth

1.4.2 การวิเคราะห์ข้อมูล วิเคราะห์ความแปรปรวนของ พีเอชเริ่มต้น ปริมาณเซลล์เริ่มต้น พีเอชที่ปริมาณเซลล์สูงสุด ปริมาณเซลล์สูงสุด และระยะการเพาะเลี้ยงที่ปริมาณเซลล์สูงสุด

เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างทรีตเมนต์โดยวิธี DMRT โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SAS ซึ่งมีแบบหุ่นทางสถิติ ดังนี้

$$Yij = \chi + \tau i + \varepsilon ij$$

เมื่อ Yij = ค่าสังเกตใด ๆ ที่ทำการศึกษา

χ = ค่าเฉลี่ยรวม

τi = อิทธิพลของทรีตเมนต์ที่ i

εij = ความคลาดเคลื่อนของการทดลอง

1.5 ผลของพีเอชต่อการเติบโตของ *L. pentosus* KUB-ST 10-1

1.5.1 การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ ถ่ายเชื้อจากข้อ 1.2 ปริมาณ 5% (v/v) ลงในถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยใช้น้ำหมักวุ้นมะพร้าวเป็นอาหารเพาะเลี้ยง ผันแปรพีเอชของอาหารในระหว่างการเพาะเลี้ยงแตกต่างกัน 4 ระดับ คือ 5.5, 6.0, 6.5 และ 7.0 ควบคุมอัตราการกวนเท่ากับ 50 rpm อุณหภูมิในถังหมักเท่ากับ 37°C ตลอดการเพาะเลี้ยง ซึ่งใช้เวลา 14 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณเซลล์มีชีวิต และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ทุก ๆ 2 ชั่วโมง

1.5.2 การวิเคราะห์ข้อมูล วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลที่ศึกษาตามแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ที่มีการวัดค่าซ้ำ (repeated measurements) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างระยะเวลาในการหมัก หรือ ทรีตเมนต์โดยวิธี DMRT โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SAS โดยมีแบบหุ่นทางสถิติ ดังนี้

$$Yijk = \chi + \alpha i + \delta k(i) + \tau j + \alpha\tau ij + \varepsilon ijk$$

เมื่อ $Yijk$ = ค่าสังเกตุจากทรีตเมนต์ที่ i ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงที่ j และซ้ำที่ k

χ = ค่าเฉลี่ยรวม

αi = อิทธิพลเนื่องจากทรีตเมนต์ ที่ระดับ i

τj = อิทธิพลเนื่องจากระยะเวลาการเพาะเลี้ยงที่ระดับ j

$\alpha\tau ij$ = อิทธิพลเนื่องจากทรีตเมนต์ ที่ระดับ i และระยะเวลาการเพาะเลี้ยงที่ระดับ j

$\delta k(i)$ = อิทธิพลเนื่องจากหน่วยทดลองที่ระดับ k

εijk = Correlated error

2. <u>การศึกษาสภาวะการทำแห้งแบบพ่นฝอยของ *L. pentosus* KUB-ST 10-1</u>

ทำการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ *L. pentosus* KUB-ST 10-1 ในสภาวะที่เหมาะสมจากข้อ1.5 เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำหัวเชื้อซึ่งอยู่ในสภาพของเหลวที่ได้มาศึกษาดังต่อไปนี้

2.1 ผลของอุณหภูมิอากาศเข้าและออกต่อการทำแห้งของเชื้อ *L. pentosus* KUB-ST 10-1

ผสมนมผงพร่องมันเนย (skim milk powder) ลงในเซลล์แขวนลอยที่เตรียมไว้ 20% (w/v) จากนั้นนำไปทำแห้งแบบฝอยในระดับห้องปฏิบัติการด้วยเครื่อง Mini spray dryer ผันแปรอุณหภูมิอากาศเข้าเท่ากับ 110, 120 และ 130˚C และอุณหภูมิอากาศออกเท่ากับ 60, 70 และ 80˚C สุ่มตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปนับจำนวนเซลล์มีชีวิตทั้งหมด และวิเคราะห์หาความชื้น

2.1.1 แผนการทดลอง ใช้แบบ 3^2 factorial experiment ในแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ ประกอบด้วยอุณหภูมิอากาศเข้า 3 ระดับ และอุณหภูมิอากาศออก 3 ระดับ รวม 9 treatment combination ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

2.1.2 การวิเคราะห์ข้อมูล วิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนเซลล์มีชีวิตทั้งหมดและความชื้นในผลิตภัณฑ์ และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างทรีตเมนต์โดยวิธี DMRT โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SAS ซึ่งมีแบบหุ่นทางสถิติดังนี้

$$Yijk = \chi + Ai + Bj + ABij + \varepsilon ijk$$

เมื่อ Yijk = ค่าสังเกตุที่ศึกษาจาก treatment combination ที่ ij ซ้ำที่ k

χ = ค่าเฉลี่ยรวม

Ai = อิทธิพลของอากาศเข้าที่ระดับ i

Bj = อิทธิพลของอากาศออกที่ระดับ j

ABij = อิทธิพลร่วมของอากาศเข้าและออกที่ระดับ ij

εijk = ความคลาดเคลื่อนของการทดลอง

2.2 ผลของอัตราส่วนนมผงพร่องมันเนยต่อมอลโทเดกซ์ทรินและปริมาณวัตถุแห้งในเซลล์แขวนลอยต่ออัตราการรอดชีวิตของ *L. pentosus* KUB ST10-1 และผลได้ของผลิตภัณฑ์

การใช้นมผงพร่องมันเนยเป็นสารตัวพาเพียงอย่างเดียวในการทำแห้งโดยวิธีพ่นฝอยจะทำให้ผลิตภัณฑ์มีต้นทุนการผลิตสูง ดังนั้นการทดแทนนมผงพร่องมันเนยด้วยสารตัวพาที่มีราคาถูกจึงมีความจำเป็นต่อการผลิตหัวเชื้อระดับนำร่องและระดับขยายขนาด การทดลองครั้งนี้จึงผันแปรอัตราส่วนนมผงพร่องมันเนยต่อมอลโทเดกซ์ทรินและปริมาณวัตถุแห้งในเซลล์แขวนลอย จากนั้นทำแห้งแบบพ่นฝอยโดยควบคุมอุณหภูมิอากาศเข้าและอุณหภูมิออกตามสภาวะที่เหมาะสมในการทดลองที่ 2.1

2.2.1 แผนการทดลอง ใช้แบบ 3^2 factorial experiment ในแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ ประกอบด้วย 2 ปัจจัย ได้แก่ อัตราส่วนโดยน้ำหนักของนมผงพร่องมันเนยต่อมอลโทเดกซ์ทริน ซึ่งมี 3 ระดับ คือ 25:75, 50:50 และ 75:25 และ ปริมาณวัตถุแห้งในเซลล์แขวนลอย(w/v) ซึ่งมี 3 ระดับเช่นกัน คือ 15, 17 และ 19% รวม 9 treatment combination ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

2.2.2 การวิเคราะห์ข้อมูล วิเคราะห์ความแปรปรวนของอัตราการรอดชีวิตของเซลล์และความชื้นในผลิตภัณฑ์ เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างทรีตเมนต์โดยวิธี DMRT โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SAS ซึ่งมีแบบหุ่นทางสถิติดังนี้

$$Yijk = \chi + Ai + Bj + ABij + \varepsilon ijk$$

เมื่อ $Yijk$ = ค่าสังเกตุที่ศึกษาจาก treatment combination ที่ ij ซ้ำที่ k

χ = ค่าเฉลี่ยรวม

Ai = อัตราส่วนโดยน้ำหนักของนมผงขาดมันเนยต่อมอลโทเดกซ์ทรินที่ระดับ i

Bj = ปริมาณวัตถุแห้งในหัวเชื้อเหลว ที่ระดับ j

$ABij$ = อิทธิพลร่วมของอัตราส่วนโดยน้ำหนักของนมผงขาดมันเนยต่อมอลโทเดกซ์ทรินและวัตถุแห้งในหัวเชื้อเหลว ที่ระดับ ij

εijk = ความคลาดเคลื่อนของการทดลอง

2.3 ผลของสารป้องกันเซลล์ และอุณหภูมิในการเก็บรักษาต่ออัตราการรอดชีวิตของเซลล์

หลังจากได้สภาวะที่เหมาะสมในการทำแห้งในข้อ 2.2 แล้วจึงนำมาศึกษาผลของสารป้องกันเซลล์ต่อการเก็บรักษาหัวเชื้อสำเร็จ โดยใช้โมโนโซเดียมกลูตาเมตในอัตรา 0, 1, 2 และ3% ร่วมกับกรดแอสคอร์บิกระดับ 0, 0.5 และ 1% เก็บรักษาผลิตภัณฑ์ไว้ที่อุณหภูมิ 4 ˚C และ 30 ˚C จากนั้นจึงสุ่มตัวอย่างมาหาจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตทั้งหมดและความชื้นที่ 0, 14, 30, 90 และ 150 วัน

2.3.1 แผนการทดลอง ใช้แบบ 4x3x2 factorial experimentในแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ ประกอบด้วย 3 ปัจจัย ได้แก่

ปัจจัยที่ 1 คือ โมโนโซเดียมกลูตาเมต มี 4 ระดับ คือ 0, 1, 2 และ 3%
ปัจจัยที่ 2 คือ กรดแอสคอร์บิกมี 3 ระดับ คือ 0, 0.5 และ 1%
ปัจจัยที่ 3 คือ อุณหภูมิการเก็บรักษา มี 2 ระดับ คือ อุณหภูมิ 4 ˚C และ 30 ˚C
รวม 24 treatment combination ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

2.3.2 การวิเคราะห์ข้อมูล วิเคราะห์ความแปรปรวนของอัตราการรอดชีวิตของเซลล์และความชื้นในผลิตภัณฑ์ที่อายุการเก็บรักษา 150 วัน และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่าง กลุ่มทดลองโดยวิธี DMRT โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SAS ตามแบบหุ่นทางสถิติ ดังนี้

$$Yijkl = \chi + Ai + Bj + Ck + ABij + ACik + BCjk + ABCijk + \varepsilon ijkl$$

เมื่อ Yijkl = ค่าสังเกตุที่ศึกษาจาก treatment combination ที่ ijk ซ้ำที่ l
χ = ค่าเฉลี่ยรวม
Ai = อิทธิพลของโมโนโซเดียมกลูตาเมตที่ระดับ i
Bj = อิทธิพลของกรดแอสคอร์บิกที่ระดับ j
Ck = อิทธิพลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาที่ระดับ k
ABij = อิทธิพลร่วมของโมโนโซเดียมกลูตาเมต และกรดแอสคอร์บิกที่ระดับ ij
ACik = อิทธิพลร่วมของโมโนโซเดียมกลูตาเมต และอุณหภูมิการเก็บรักษาที่ ระดับ ik
BCjk = อิทธิพลร่วมของกรดแอสคอร์บิกและอุณหภูมิการเก็บรักษาที่ระดับ jk

ABC_{ijk} อิทธิพลร่วมของโมโนโซเดียมกลูตาเมต กรดแอสคอร์บิกและอุณหภูมิการเก็บรักษา ที่ระดับ ijk

ε_{ijkl} = ความคลาดเคลื่อนของการทดลอง

3. <u>การศึกษาสภาวะการหมักไซเลจ</u>

เตรียมพื้นที่เพาะปลูกโดยการไถดะและไถพรวนอย่างละ 1 ครั้ง จากนั้นปลูกหญ้าเนเปียร์แคระด้วยท่อนพันธุ์ให้มีระยะห่างระหว่างหลุม 50 cm และระหว่างแถว 50 cm ใส่ปุ๋ยและดูแลแปลงหญ้าตามหลักการจัดการทุ่งหญ้าทั่วไป เมื่อหญ้าเนเปียร์มีอายุได้ 75-90 วันจึงทำการตัดเพื่อใช้ประโยชน์ หรือเพื่อให้มีการแตกกอใหม่สำหรับไว้ใช้ในการศึกษาต่อไป

3.1 ผลของปริมาณหัวเชื้อต่อประสิทธิภาพการหมักไซเลจ

3.1.1 แผนการทดลอง ใช้แผนการทดลอง แบบสปลิทพล็อทที่จัดพล็อทหลักเป็นแบบสุ่มสมบูรณ์ (split plot design; main plot CRD) ประกอบด้วยปริมาณหัวเชื้อที่ใช้หมักไซเลจแตกต่างกัน 5 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ใช้หัวเชื้อปริมาณ 10^4, 10^5, 10^6 และ10^7 cfu/g ของพืชสด และระยะเวลาที่ทำการหมักไซเลจแตกต่างกัน 8 ระยะ คือ 0, 1, 3, 5, 7, 10, 21 และ 25 วัน

3.1.2 การเตรียมหัวเชื้อ ถ่ายหัวเชื้อจากข้อ 1.2 ปริมาณ 5% (v/v) ลงในอาหารเหลว MRS บ่มไว้ที่ 37˚C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ซึ่งจะได้ปริมาณเชื้อเท่ากับ 10^{10}cfu/ml จากนั้นเจือจางด้วยสารละลาย 0.85% NaCl ให้ได้ปริมาณเชื้อเท่ากับ 10^6, 10^7, 10^8 และ 10^9 cfu/ml เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อในการทดลอง

3.1.3 การหมักไซเลจ นำหญ้าเนเปียร์อายุ 90 วันมาหั่นให้มีขนาด 2.0-2.5 cm ผสมด้วยน้ำตาลกลูโคสอัตรา 2% (w/w) แล้วบรรจุลงในถุงพลาสติกชนิดpolythene ขนาด 8x12 in^2 ถุงละ 50 g จากนั้นนำสารละลายเชื้อที่เตรียมไว้ในข้อ 3.1.2 มาผสมกับสารละลาย 0.85% NaCl ในอัตราส่วน 1:1 (v/v) ก่อนผสมให้เข้ากับพืชในถุงหมักถุงละ 1 ml ซึ่งจะได้ปริมาณเชื้อในพืชก่อนการหมัก 10^4, 10^5, 10^6 และ10^7 cfu/g ของพืช ตามลำดับ อัดให้ชิ้นส่วนของพืชให้แตกด้วยเครื่องอัดแบบเกลียว จากนั้นปิดถุงพืชหมักด้วยเครื่องซีลแบบสุญญากาศ แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30 ˚C เพื่อรอการวิเคราะห์ต่อไป

3.1.4 การวิเคราะห์ทางเคมีและจุลินทรีย์ เมื่อทำการหมักไซเลจได้ 0, 1, 3, 5, 7, 10, 21 และ 25 วัน จึงเก็บตัวอย่าง เพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีบางประการ ได้แก่ พีเอช ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณกรดแลคติก และปริมาณกรดไขมันที่ระเหยง่าย ด้านจุลินทรีย์ ทำการวิเคราะห์หาปริมาณ แบคทีเรียกรดแลคติก ยีสต์และราเส้นใย เอนเทอโรแบคทีเรีย และเชื้อคลอสตริเดียม

3.1.5 การวิเคราะห์ข้อมูล วิเคราะห์ความแปรปรวนของลักษณะที่ศึกษา และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างทรีตเมนต์ หรือระยะเวลาในการหมักโดยวิธี DMRT โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SAS ตามแบบหุ่นทางสถิติ ดังนี้

$$Yijk = \chi + \alpha i + \delta k(j) + \beta j + \alpha\beta ij + \varepsilon ijk$$

เมื่อ $Yijk$ = ค่าสังเกตจาก treatment combination ที่ ij ซ้ำที่ k

χ = ค่าเฉลี่ยรวม

αi = อิทธิพลจากทรีทเมนต์ที่ i

βj = อิทธิพลจากเวลาที่ j

$\alpha\beta ij$ = อิทธิพลร่วมจากทรีทเมนต์และเวลาที่ i j

$\delta k(j)$ = Main plot error

εijk = Sub plot error

3.2 ผลของปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เสริมในพืชต่อประสิทธิภาพการหมักไซเลจ

3.2.1 แผนการทดลอง ใช้แผนการทดลองแบบสปลิทพล็อทที่จัดพล็อทหลักเป็นแบบสุ่มสมบูรณ์ ประกอบด้วยปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ใช้เสริมในพืชก่อนการหมัก 4 กลุ่มทดลอง คือ กลุ่มควบคุม กลุ่มที่หมักโดยเสริมน้ำตาลกลูโคส 1, 2 และ 3% ใช้เวลาในการหมักแตกต่างกัน 9 ระยะเวลา คือ 0, 1, 3, 5, 7, 10, 21, 60 และ 65 วัน

3.2.2 การเตรียมหัวเชื้อ ถ่ายหัวเชื้อจากข้อ 1.2 ปริมาณ 5% (v/v) ลงในอาหารเหลว MRS บ่มไว้ที่ 37°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ซึ่งจะได้ปริมาณเชื้อเท่ากับ 10^{10} cfu/ml จากนั้นเจือจางด้วยสารละลาย0.85% NaCl ให้ได้ปริมาณเชื้อเท่ากับ 10^{8} cfu/ml เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อในการทดลอง

3.2.3 การหมักไซเลจ นำหญ้าเนเปียร์ที่มีอายุ 75 วันมาหั่นให้มีขนาด 2.0-2.5 cm ผสมด้วยน้ำตาลกลูโคสในอัตราที่แตกต่างกัน ตามทรีตเมนต์ที่กำหนด คือ 0, 1, 2 และ 3% (w/w) บรรจุลงในถุงพลาสติกชนิดพอลิธีน ขนาด 8x12 in^2 ถุงละ 50 g จากนั้นนำสารละลายเชื้อที่เตรียมไว้ในข้อ 3.1.2 มาผสมกับสารละลาย 0.85% NaCl ในอัตราส่วน 1:1 (v/v) ก่อนผสมเข้ากับพืชในถุงหมักถุงละ 1 ml ซึ่งจะทำให้ได้ปริมาณเชื้อในพืชก่อนการหมัก 10^6cfu/g ของพืชสด อัดชิ้นส่วนของพืชให้แตกด้วยเครื่องอัดแบบเกลียว จากนั้นปิดถุงพืชหมักด้วยเครื่องซีลแบบสุญญากาศแล้วเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 30˚C เพื่อรอการวิเคราะห์ต่อไป

3.2.4 การวิเคราะห์ทางเคมี เมื่อทำการหมักไซเลจได้ 0, 1, 3, 5, 7, 10, 21, 60 และ 65 วัน จึงเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีที่แสดงถึงประสิทธิภาพการหมักบางประการ ได้แก่ ค่าพีเอช บัฟเฟอริงคาพาซิตี ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณกรดแลคติก และปริมาณกรดไขมันที่ระเหยง่าย

3.2.5 การวิเคราะห์ข้อมูล วิเคราะห์ความแปรปรวนของลักษณะที่ศึกษา และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างทรีตเมนต์และระยะเวลาในการหมักโดยวิธี DMRT โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SAS ตามแบบหุ่นทางทางสถิติ ดังนี้

$$Yijk \quad \chi + \alpha i + \delta k(j) + \beta j + \alpha\beta ij + \varepsilon ijk$$

เมื่อ $Yijk$ ค่าสังเกตจาก treatment combination ที่ ij ซ้ำที่ k

χ ค่าเฉลี่ยรวม

αi อิทธิพลของทรีทเมนต์ที่ระดับ i

βj อิทธิพลของระยะเวลาในการหมักที่ระดับ j

$\alpha\beta ij$ อิทธิพลร่วมของทรีทเมนต์และระยะเวลาในการหมักที่ระดับ ij

$\delta k(j)$ Main plot error

εijk Sub plot error

3.3 ผลของหัวเชื้อสำเร็จต่อประสิทธิภาพการหมัก และคุณค่าทางโภชนะของไซเลจ

3.3.1 แผนการทดลอง ใช้แผนการทดลองแบบสปลิทพล็อทที่จัดพล็อทหลักแบบสุ่มสมบูรณ์ มี 3 ทรีตเมนต์ คือ ไซเลจที่หมักโดยวิธีปรกติ (กลุ่มควบคุม) ไซเลจที่หมักโดยใช้

กากน้ำตาลเป็นสารเสริม และไซเลจที่หมักโดยใช้กากน้ำตาลร่วมกับหัวเชื้อสำเร็จเป็นสารเสริม ใช้เวลาในการหมักแตกต่างกัน 10 ระยะ คือ 0, 1, 3, 5, 7, 10, 21, 45, 90 และ 95 วัน

3.3.2 การเตรียมหัวเชื้อ นำหัวเชื้อสำเร็จจากการทดลองในข้อ 2.2 (ทรีตเมนต์ที่ 9) จำนวน 1 g ละลายลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 100 ml บ่มไว้ที่ 37°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จะได้ปริมาณเชื้อเท่ากับ 10^{11}cfu/ml จากนั้นเจือจางด้วยสารละลาย 0.85% NaCl ให้เหลือความเข้มข้นของเซลล์เท่ากับ 10^{8}cfu/ml เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

3.3.3 การหมักไซเลจ นำหญ้าเนเปียร์ที่มีอายุ 90 วันมาหั่นให้มีขนาด 2.0-2.5 cm มาหมักในถุงพลาสติกชนิด polythene ขนาด 8x12 in^2 ถุงละ300 g แตกต่างกันตาม ทรีตเมนต์กำหนด คือ หมักโดยวิธีปรกติ (ผสมน้ำกลั่นลงไปถุงละ 12 ml เพื่อปรับความชื้นให้เท่ากับทรีตเมนต์อื่น ๆ) หมักโดยใช้กากน้ำตาลเป็นสารเสริม 3.6% (ละลายกากน้ำตาล 10.8 g ในน้ำกลั่น 12 ml ผสมลงในพืชก่อนการหมัก 300 g) และหมักโดยใช้กากน้ำตาลร่วมกับหัวเชื้อสำเร็จเป็นสารเสริม (ละลายกากน้ำตาล 10.8 gในน้ำกลั่น 9 ml ร่วมกับสารละลายหัวเชื้อที่เตรียมในข้อ 3.3.2 จำนวน 3 ml ผสมลงในพืชก่อนการหมัก 300 g ซึ่งจะทำให้ได้ปริมาณเชื้อในพืชก่อนการหมัก 10^{6}cfu/g ของพืชสด) ปิดถุงพืชหมักด้วยเครื่องซีลแบบสุญญากาศแล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30°C เพื่อรอการวิเคราะห์ต่อไป

3.3.4 การวิเคราะห์ทางเคมี และจุลินทรีย์ เมื่อทำการหมักพืชอาหารสัตว์ได้ 0, 1, 3, 5, 7, 10, 21, 45, 90 และ 95 วัน จึงเก็บตัวอย่าง เพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีที่แสดงถึงประสิทธิภาพการหมัก และคุณค่าทางโภชนะของไซเลจ ได้แก่ พีเอช ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณกรดแลคติก และปริมาณกรดไขมันที่ระเหยง่าย ค่าบัฟเฟอริงคาปาซิตี ปริมาณจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในไซเลจ ได้แก่ แบคทีเรียกรดแลคติก ยีสต์และราเส้นใย เอนเทอโรแบคทีเรีย และคลอสตริเดียม และคุณค่าทางโภชนะได้แก่ ปริมาณโปรตีนรวม (crude protein, CP) ปริมาณผนังเซลล์ (neutral detergent fiber, NDF) และปริมาณลิกโนเซลลูโลส (acid detergent fiber, ADF)

3.3.5 การวิเคราะห์ข้อมูล วิเคราะห์ความแปรปรวนของลักษณะที่ศึกษาตามแผนการทดลองที่กำหนด เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างทรีตเมนต์ หรือระยะเวลาในการหมักโดยวิธี DMRT ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SAS โดยมีแบบหุ่นทางสถิติดังนี้

$Y_{ijk} = \chi + \alpha_i + \delta_{k(j)} + \beta_j + \alpha\beta_{ij} + \varepsilon_{ijk}$

เมื่อ Y_{ijk} = ค่าสังเกตจาก treatment combination ที่ ij ซ้ำที่ k

χ = ค่าเฉลี่ยรวม

α_i = อิทธิพลของทรีทเมนต์ที่ i

β_j = อิทธิพลของระยะเวลาในการหมักที่ j

$\alpha\beta_{ij}$ = อิทธิพลร่วมของทรีทเมนต์และระยะเวลาในการหมักที่ i j

$\delta_{k(j)}$ = Main plot error

ε_{ijk} = Sub plot error

3.4 ผลของหัวเชื้อสำเร็จต่อการสลายได้ของวัตถุแห้งของไซเลจในกระเพาะรูเมน

3.4.1 การเตรียมตัวอย่าง นำหญ้าหมักจากการทดลองที่ 3.3 เฉพาะที่อายุการการหมัก 0, 3, 7, 21, 45, 90 และ 95 วัน ซึ่งอบแห้งที่อุณหภูมิ 65 ˚C เป็นเวลา 48 ชั่วโมงแล้วมาบดผ่านตะแกรงขนาด 1 มิลลิเมตรเพื่อใช้สำหรับหาการสลายได้ของวัตถุแห้งตามวิธีของ Orskov *et al.* (1980) โดยชั่งน้ำหนักตัวอย่างประมาณ 3 กรัมใส่ลงในถุงไนลอนที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 65˚C เป็นเวลา 48 ชั่วโมงแล้ว ชั่งน้ำหนักตัวอย่างพร้อมถุงไนลอนอีกครั้ง จากนั้นจึงมัดปากถุงให้แน่นด้วยยางพลาสติกเพื่อรอการบ่มในกระเพาะรูเมนของโค

3.4.2 การเตรียมโคทดลอง แม่โคนม พันธุ์ขาว-ดำ ระดับเลือด 87.50% ที่เจาะกระเพาะ จำนวน 4 ตัวถูกนำมาเลี้ยงในคอกขังเดี่ยว ให้ได้รับอาหารหยาบตามชนิดอาหารที่ต้องการหาค่าการสลายได้ของวัตถุแห้งโดยให้กินแบบเต็มที่ (*ad libitum*) ส่วนอาหารข้นให้กินในอัตรา 0.5% ของน้ำหนักตัวต่อวัน สำหรับน้ำ และแร่ธาตุก้อนถูกจัดไว้ให้สัตว์กินได้ตลอดเวลา ใช้เวลาในการทดลอง 4 ระยะ ๆ ละ 8 วัน

4.3.3 การบ่มตัวอย่างในกระเพาะรูเมน นำตัวอย่างที่เตรียมไว้จากข้อ 4.3.1 มาจัดกลุ่มตามชนิดของอาหารหยาบ ระยะเวลาในการหมักไซเลจ และระยะเวลาที่ต้องบ่มในกระเพาะรูเมนของโค จากนั้นนำตัวอย่างแต่ละถุงของแต่ละกลุ่มมาผูกติดกับเชือกไนลอนและบรรจุลงในถุงตาข่ายไนลอนอีกครั้งก่อนนำไปบ่มในกระเพาะรูเมนของโคในช่วง 3 วันสุดท้ายของแต่ละระยะเป็นเวลา 0, 8, 16, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดแล้วจึงนำตัวอย่างออกมาล้างเบา ๆ ด้วยน้ำก็อกจนกระทั่งน้ำล้างถุงตัวอย่างสะอาดเช่นเดียวกับน้ำก็อกเดิม แล้วนำถุงตัวอย่างไปปั่นแห้งด้วย

เครื่องซักผ้าก่อนนำไปอบที่อุณหภูมิ 65˚C เป็นเวลา 48 ชั่วโมงอีกครั้ง จากนั้นทำการชั่งน้ำหนักเพื่อวิเคราะห์หาส่วนที่สลายได้

4.3.4 การเก็บตัวอย่างของเหลวในกระเพาะรูเมน เก็บหลังจากให้อาหารตอนเช้าที่เวลา 0, 4 และ 8 ชั่วโมงในวันสุดท้ายของแต่ละระยะการทดลอง เพื่อวัดค่าพีเอชและปริมาณของแอมโมเนียไนโตรเจน

4.3.5 การคำนวณค่าพารามิเตอร์ของการสลายได้และการวิเคราะห์ทางสถิติ นำข้อมูลการสลายได้ของวัตถุแห้งในกระเพาะรูเมนที่เวลาต่าง ๆ ของอาหารทดลองแต่ละชนิดมาคำนวณหาส่วนที่สลายได้ง่าย ส่วนที่หมักได้ในกระเพาะรูเมน ศักยภาพการสลายได้ ค่าคงที่ของการสลายตัว ประสิทธิภาพของการสลายได้ และระยะการปรับตัวของจุลินทรีย์ก่อนการเข้าสลาย โดยใช้โปรแกรม Neway Excel (Chen, 1997) วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลที่ศึกษาตามแผนการทดลองแบบสปลิทพล็อทที่จัดพล็อทหลักแบบ Latin square design (LSD) เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างทรีตเมนต์โดยวิธี DMRT โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SAS

3.5 ผลของของไซเลจต่อการให้ผลผลิตน้ำนมของโคนม

3.5.1 แผนการทดลอง วางแผนการทดลองแบบ 4x4 LSD มี 4 ทรีตเมนต์ คือ หญ้าเนเปียร์สด และหญ้าเนเปียร์ที่หมักแตกต่างกัน 3 ชนิด คือ หมักแบบปรกติ (S-1) หมักโดยเสริมกากน้ำตาล 3.6% (S-2) และหมักโดยเสริมกากน้ำตาล 3.6% ร่วมกับหัวเชื้อสำเร็จอัตรา 10^6 cfu/g ของพืชสด (S-3) ทำการทดลอง 4 ระยะ แต่ละระยะใช้เวลา 21 วัน เว้นช่วงระหว่างระยะ 7 วันรวมระยะเวลาการทดลอง 112 วัน

3.5.2 การเตรียมสัตว์ทดลอง แม่โคนมลูกผสมพันธุ์ขาว-ดำ ระดับเลือดประมาณ 87.5% ซึ่งให้น้ำนมครั้ง 5 และอยู่ในระยะการให้นมช่วงกลาง (120±21 วัน) จำนวน 4 ตัวถูกนำมาชั่งน้ำหนักและเข้าคอกทดลอง เพื่อให้ปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมของคอกก่อนเริ่มการทดลองเป็นเวลา 2 สัปดาห์

3.5.3 การเตรียมอาหารทดลอง

- อาหารข้น ใช้อาหารอัดเม็ดสำหรับโครีดนมซึ่งผลิตโดยบริษัทเอกชนที่มีจำหน่ายในท้องถิ่น มีปริมาณวัตถุแห้ง โปรตีนรวม ไขมัน และเยื่อใยเท่ากับ 88.04, 16.50, 3.50 และ 10.36% ของวัตถุแห้ง ตามลำดับ

- อาหารหยาบ ได้แก่ หญ้าสด ใช้หญ้าหญ้าเนเปียร์ที่มีอายุประมาณ 75-90 วัน หั่นด้วยเครื่องหั่นให้มีขนาด 2.0-2.5 cm ก่อนให้โคกิน ส่วนไซเลจเตรียมจากหญ้าเนเปียร์ที่มีอายุประมาณ 90-100 วัน ซึ่งหมักแตกต่างกัน 3 แบบ คือ หมักแบบปรกติ (S-1) หมักโดยเสริมกากน้ำตาล 3.6% (S-2) และหมักโดยเสริมกากน้ำตาล 3.6% ร่วมกับหัวเชื้อสำเร็จอัตรา 10^6 cfu/g ของพืชสด (S-3) ไซเลจแต่ละชนิดมีอายุการเก็บรักษาประมาณ 4 เดือน ก่อนนำมาใช้ในการทดลอง

3.5.4 การเลี้ยงและการจัดการสัตว์ทดลอง

- การให้อาหารหยาบ ให้กินแบบเต็มที่ โดยหญ้าเนเปียร์สดจะถูกนำมาหั่นด้วยเครื่องหั่นให้มีขนาด 2.0-2.5 cm ก่อนการให้โคกิน

- การให้อาหารข้น ให้ตามปริมาณน้ำนมที่แม่โคผลิตได้ในอัตรา 1:2.5 โดยน้ำหนัก (อาหารข้น : น้ำนม) โดยแบ่งให้ 2 ครั้ง คือ ก่อนการรีดนมตอนเช้า และตอนเย็น ทำการปรับปริมาณการให้ทุก 7 วัน

- การให้แร่ธาตุและน้ำดื่ม จัดให้มีแร่ธาตุก้อนและน้ำดื่มสำหรับสัตว์ทดลองแต่ละตัวกินอย่างอิสระตลอดเวลา

- การรีดนม ทำการรีดวันละ 2 ครั้ง ด้วยเครื่องรีดนมแบบ Bucket type system ในช่วงเช้าระหว่างเวลา 06.00-07.00 น. และช่วงเย็นเวลา 17.00-18.00 น.

3.5.5 การเก็บตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์ สุ่มเก็บตัวอย่างอาหารหยาบ อาหารข้น และน้ำนมในสัปดาห์สุดท้ายของแต่ละคาบทดลองทั้งในตอนเช้าและตอนเย็นโดยเก็บตัวอย่างอาหารสลับวันกับการเก็บตัวอย่างน้ำนม เพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี สำหรับตัวอย่างน้ำนมทำการรักษาคุณภาพก่อนการวิเคราะห์ด้วยโปแทสเซียมไดโครเมตอัตรา 0.03% โดยเก็บที่อุณหภูมิ 4 ˚C

3.5.6 การวิเคราะห์ทางเคมี ตัวอย่างอาหาร วิเคราะห์หาค่า พีเอช และ บัฟเฟอริงคาปาซิตี โดยวิธีของ Bolsen *et al*. (1992) ปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจน ตามวิธีที่รายงานโดยจีระชัย

(2541) DM, CP, CF, NDF และ ADF วิเคราะห์ตามวิธีที่รายงานโดยอังคณา และดวงสมร (2532) ส่วนตัวอย่างน้ำนม วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ไขมัน แล็กโทสของแข็งทั้งหมด และของแข็งไม่รวมไขมัน โดยใช้เครื่อง Milkoscan (Combifoss-6000, Denmark)

3.5.7 การบันทึกข้อมูล บันทึกปริมาณอาหารที่กิน และการให้ผลผลิตน้ำนมทุกวันตลอดการทดลอง เพื่อคำนวณหาปริมาณน้ำนมที่ปรับไขมัน 4% (4% Fat corrected milk, FCM) ตามวิธีของ Schmidt and van Vleck. (1974) และต้นทุนค่าอาหารต่อการผลิตน้ำนมของโค

3.5.8 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ วิเคราะห์ความแปรปรวนของลักษณะที่ศึกษา และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างทรีทเมนต์โดยวิธี DMRT โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SAS ซึ่งมีแบบหุ่นทางสถิติดังนี้

$$Yij(k) = \chi + Ri + Cj + \tau k + \varepsilon ij(k)$$

เมื่อ $Yij(k)$ = ค่าสังเกตุที่ทำการศึกษา

χ = ค่าเฉลี่ยรวมของค่าสังเกต

Ri = อิทธิพลของโคตัวที่ i

Cj = อิทธิพลของคาบที่ j

τk = อิทธิพลของทรีทเมนต์ที่ k

$\varepsilon ij(k)$ = ความคลาดเคลื่อนของการทดลอง

สถานที่ทำการทดลอง

1. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ

2. ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตร มหาวิยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ

3. สถาบันวิจัยเคมี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี อ. ธัญบุรี จ. ปทุมธานี

4. คณะวิศวกรรมและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี อ. ธัญบุรี จ. ปทุมธานี

5. คณะวิชาสัตวศาสตร์ วิทยาเขตปทุมธานี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี อ. ธัญบุรี จ. ปทุมธานี

6. คณะวิชาสัตวศาสตร์ วิทยาเขตนครศรีธรรมราช มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย อ.ทุ่งสง จ. นครศรีธรรมราช

7. ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคใต้ อ. ทุ่งสง จ. นครศรีธรรมราช

ระยะเวลาทำการทดลอง

เริ่มการทดลอง เดือนมิถุนายน 2545 สิ้นสุดการทดลอง เดือน มกราคม 2548

ผลและวิจารณ์

1. ผลการศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเติบโตของ *Lactobacillus pentosus* KUB-ST10-1

1.1 ผลของปริมาณแหล่งไนโตรเจนและคาร์บอนต่อการเติบโตของ *L. pentosus* KUB-ST10-1

โดยทั่วไปนิยมใช้อาหาร MRS สำหรับการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกในห้องปฏิบัติการ แต่เนื่องจากอาหารดังกล่าวมีราคาแพงจึงไม่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงในระดับขยายขนาด การศึกษาของสุพรรณิการ์ (2544) พบว่า การเพาะเลี้ยง *Pediococcus acidilactici* (M6) ด้วยสูตรอาหารพื้นฐาน ทำให้เชื้อเติบโตได้เพียง $1x10^8$ cfu/ml แต่เมื่อมีการแทนที่แหล่งไนโตรเจนจากแอมโมเนียมซัลเฟตในสูตรอาหารดังกล่าวด้วยทริปโตน หรือ เปปโตนทำให้การเติบโตเพิ่มเป็น $3.6x10^8$ cfu/ml ดังนั้น การทดลองครั้งนี้จึงศึกษาปริมาณของแหล่งไนโตรเจน และคาร์บอนบางชนิดที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง *L. pentosus* KUB-ST10-1 เพื่อผลิตเป็นหัวเชื้อไซเลจต่อไป

1.1.1 ผลของปริมาณยูเรียและกากน้ำตาลต่อการเติบโตของ *L. pentosus* KUB-ST10-1

ผลการเพาะเลี้ยง *L. pentosus* KUB ST10-1 ในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีการแทนที่แหล่งไนโตรเจนจากแอมโมเนียมซัลเฟตด้วยยูเรีย และแทนที่แหล่งคาร์บอนจากโซเดียมอะซิเตทด้วยกากน้ำตาลปริมาณต่าง ๆ แสดงในตารางที่ 11 จะเห็นว่าปริมาณยูเรียในสูตรอาหารมีผลชัดเจนต่อการเติบโตของเชื้อทั้งในด้านปริมาณเซลล์ที่เพิ่มขึ้น และอัตราการเติบโตจำเพาะ ($P<0.01$) ส่วนปริมาณกากน้ำตาลในสูตรอาหาร และอิทธิพลร่วมของปริมาณยูเรียและกากน้ำตาลมีผลต่อลักษณะดังกล่าวไม่ชัดเจน เซลล์เติบโตดีที่สุดในสูตรอาหารที่มียูเรีย 1% รองลงมาคือสูตรอาหารที่ไม่มียูเรียและสูตรอาหารที่มียูเรีย 2% และ 3% ตามลำดับ การเติบโตของเซลล์ลดลงชัดเจน ($P<0.05$) เมื่อไม่มีการแทนที่แอมโมเนียมซัลเฟตด้วยยูเรียในสูตรอาหารพื้นฐานอาจเกิดจากไนโตรเจนในสูตรอาหารไม่เพียงพอต่อความต้องการของเชื้อ รวมทั้งอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนในสูตรอาหารไม่เหมาะสม เนื่องจากเซลล์ของแบคทีเรียมีสัดส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนประมาณ 50-53 ต่อ 12-15% โดยน้ำหนักแห้ง (Stanbury and Whitaker, 1984) นอกจากนี้ยังพบว่าสูตรอาหารดังกล่าวมีพีเอชที่ปริมาณเซลล์สูงสุดต่ำลงมาก ซึ่งการที่พีเอชในอาหารต่ำลงนี้ เชื้อจุลินทรีย์ต้องใช้พลังงานเพิ่มขึ้นในการรักษาสมดุลพีเอชภายในเซลล์ กลไกนี้ทำให้สูญเสียพลังงาน ส่งผลให้การเติบโตของ

เซลล์ช้าลง (สุมณฑา, 2545) สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Narendranath and Power (2005) ซึ่งพบว่าอัตราการเติบโตจำเพาะของ *L. pentosus* ลดลงเมื่ออาหารมีพีเอชต่ำกว่า 5.5

ตารางที่ 11 ผลของปริมาณยูเรียและกากน้ำตาลต่อการเติบโตของ *L. pentosus* KUB-ST 10-1

พารามิเตอร์	ยูเรีย (%)	กากน้ำตาล (%)				เฉลี่ย	CV
		3	5	7	9		(%)
ปริมาณเซลล์สูงสุด	0	10.273	10.560	10.048	9.799	10.170^{B}	
(log cfu/ml)	1	10.604	11.089	10.874	11.068	10.914^{A}	
	2	8.557	8.718	8.372	9.134	8.665^{C}	
	3	8.727	8.743	8.046	8.893	8.590^{C}	
	เฉลี่ย	9.630	9.871	9.340	9.777		7.01
อัตราการเติบโต	0	0.43	0.48	0.34	0.35	0.40^{B}	
จำเพาะ	1	0.66	0.80	0.58	0.59	0.66^{A}	
(ชั่วโมง$^{-1}$)	2	0.06	0.06	0.15	0.19	0.11^{C}	
	3	0.15	0.21	0.08	0.21	0.16^{C}	
	เฉลี่ย	0.37	0.40	0.30	0.34		37.87
พีเอช	0	3.83	3.90	4.40	4.33	4.12^{C}	
	1	5.50	5.43	4.60	4.83	5.09^{B}	
	2	8.45	8.40	8.17	8.05	8.27^{A}	
	3	8.60	8.60	8.57	8.53	8.57^{A}	
	เฉลี่ย	6.43	6.40	6.43	6.29		12.54
ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์	0	1.93^{g}	5.24^{ef}	12.12^{c}	17.27^{a}	9.14^{A}	
(g/l)	1	1.89^{g}	1.70^{g}	7.07^{de}	10.90^{c}	5.38^{B}	
	2	4.76^{f}	8.10^{d}	10.14^{c}	15.60^{ab}	9.48^{A}	
	3	3.99^{f}	7.88^{d}	1.86^{c}	14.64^{b}	9.34^{A}	
	เฉลี่ย	3.00^{D}	5.73^{C}	10.08^{B}	14.51^{A}		8.37

^{ABC}อักษรกำกับของอิทธิพลหลักในพารามิเตอร์เดียวกันต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

^{abcdefg}อักษรกำกับต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

การเติบโตของเชื้อยิ่งต่ำลงเมื่อเพิ่มปริมาณยูเรียในสูตรอาหารเป็น 2% และ 3% เนื่องจากสูตรอาหารดังกล่าวมีพีเอชสูงเกินไป ซึ่งเป็นผลมาจากยูเรียแตกตัวให้คาร์บอนไดออกไซด์ และแอมโมเนีย ทำให้มีการสะสม NH_4^+ มากขึ้น เป็นเหตุให้พีเอชสูงขึ้น (Robertson, 1978) จากการศึกษาของ Krueger and Peterson (1948) พบว่า ระดับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6 มีความเหมาะสมต่อการเติบโตของ *L. pentosus* แต่พีเอชในช่วง 5.5-7.0 ไม่มีผลทำให้การเติบโตของเชื้อแตกต่างกัน อย่างไรก็ตาม Sjostrom and Larsson (1996) พบว่า ที่พีเอช 5 ยูเรียจะส่งเสริมการเติบโตของเชื้อ ในขณะที่พีเอช 7 ยูเรียจะเป็นพิษต่อเซลล์ Caldwell (1995) รายงานว่าพีเอชสูงหรือต่ำเกินไป จะทำให้จุลินทรีย์สูญเสียพลังงานมากในการนำ H^+ เข้าและออกจากเซลล์เพื่อปรับสมดุลพีเอช เป็นผลให้การเติบโตลดลง และหากพีเอชสูงหรือต่ำเกินกว่าที่จุลินทรีย์จะปรับตัวได้จะส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์หลายชนิดซึ่งแสดงกิจกรรมได้ในช่วงพีเอชที่เหมาะสมเฉพาะของแต่ละชนิด ผลที่ตามมานอกจากจุลินทรีย์มีการเติบโตช้าแล้ว การสร้างผลิตภัณฑ์ก็จะไม่เกิดขึ้น สอดคล้องกับผลการทดลองครั้งนี้ที่ระดับน้ำตาลยังคงเหลือจำนวนมากในสูตรอาหารที่ไม่มียูเรียและมียูเรีย 2-3%

1.1.2 <u>ผลของปริมาณน้ำแช่ข้าวโพดและกากน้ำตาลต่อการเติบโตของ *L. pentosus* KUB- ST 10-1</u>

น้ำแช่ข้าวโพด (corn steep liquor, CSL) เป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมแป้งข้าวโพดที่มีคุณค่าทางโภชนะสูง จึงนำมาใช้เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์หลายชนิด (Liggett and Koffler, 1948) CSL มีไนโตรเจน 2.7-4.5% มีปริมาณน้ำตาล 0.1-11% นิยมใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ (สมใจ, 2537) สำหรับกากน้ำตาลซึ่งเป็นผลพลอยได้จากโรงงานผลิตน้ำตาล โดยทั่วไปมีความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดไม่ต่ำกว่า 46% (Curtin, 1983) นิยมใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ทางการค้าหลายชนิด เนื่องจากมีราคาถูก

เมื่อเพาะเลี้ยง *L. pentosus* KUB ST10-1 ในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีการแทนที่แอมโมเนียมซัลเฟตด้วย CSL และแทนที่โซเดียมอะซิเตทด้วยกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นต่างๆ พบว่า เชื้อเติบโตได้ดีขึ้นเมื่อใช้ CSL และกากน้ำตาลในสูตรอาหารสูงขึ้น ($P<0.01$) นอกจากนี้ยังพบว่า อิทธิพลร่วมของระดับ CSL และกากน้ำตาลเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการเติบโตของ *L. pentosus* KUB ST10-1 อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.01$) โดยปริมาณ CSL และกากน้ำตาลในสูตรอาหารที่ทำให้เชื้อมีการเติบโตได้ดีที่สุดคือ 11% และ 5% ตามลำดับ ได้ปริมาณเซลล์สูงสุด เท่ากับ 12.001 log cfu/ml อย่างไรก็ตาม ปริมาณเซลล์ดังกล่าวมีค่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับปริมาณเซลล์ที่

เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่มี CSL เท่ากับ 9-11%ในทุกระดับความเข้มข้นของกากน้ำตาล และสูตรอาหารที่มี CSL และกากน้ำตาลเท่ากับ 5% และ 9% ตามลำดับ (P>0.05) ดังแสดงในตารางที่ 12

ตารางที่ 12 ผลของปริมาณ CSL และกากน้ำตาลต่อการเติบโตของ *L. pentosus* KUB ST10-1

พารามิเตอร์	CSL (%)	กากน้ำตาล (%)			เฉลี่ย	CV
		5	7	9		(%)
ปริมาณ	5	10.788^{e}	11.030^{de}	11.968^{a}	11.262^{C}	
เซลล์สูงสุด	7	11.283^{ed}	11.341^{bcd}	11.356^{bcd}	11.327^{C}	
(log cfu/ml	9	11.597^{abc}	11.788^{ab}	11.730^{abc}	11.705^{B}	
	11	12.001^{a}	11.906^{a}	11.949^{a}	11.952^{A}	
	เฉลี่ย	11.417^{B}	11.516^{B}	11.751^{A}		2.03
อัตราการ	5	0.77	0.67	0.89	0.78	
เติบโต	7	0.76	0.85	0.78	0.80	
จำเพาะ	9	0.77	0.77	0.77	0.77	
(ชั่วโมง$^{-1}$)	11	0.79	0.82	0.88	0.83	
	เฉลี่ย	0.77	0.78	0.83		9.88
พีเอช	5	4.40	4.26	4.29	4.23	
	7	4.22	4.03	4.06	4.10	
	9	4.09	4.14	4.11	4.11	
	11	4.12	4.12	4.15	4.15	
	เฉลี่ย	4.23	4.15	4.15		3.56
ปริมาณ	5	8.03	9.92	12.36	10.11	
น้ำตาล	7	8.48	9.81	12.72	10.33	
รีดิวซ์	9	9.33	10.28	11.97	10.52	
(g/l)	11	8.22	11.51	13.17	10.97	
	เฉลี่ย	8.52	10.38	12.56		8.03

^{ABC}อักษรกำกับของอิทธิพลหลักภายในพารามิเตอร์เดียวกันต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

^{abcde}อักษรกำกับในพารามิเตอร์เดียวกันต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

หากพิจารณาถึงปัจจัยหลักแต่ละปัจจัย จะเห็นว่า ปริมาณเซลล์จะสูงขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณ CSL และกากน้ำตาลในสูตรอาหารมากขึ้น แสดงให้เห็นว่า ปริมาณสารอาหารในสูตรอาหารทดลองต่ำกว่าปริมาณสารอาหารที่จุลินทรีย์ต้องการ Bai *et al.* (2003) รายงานว่า เชื้อเติบโตได้ดีที่สุดในสูตรอาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเท่ากับ 30 g/l ในขณะที่ความเข้มข้นในช่วง 42-80 g/l จะทำให้การเติบโตลดลง เนื่องจากเกิด Catabolite repression (Akerberg *et al.*, 1998)

การทดลองครั้งนี้ มีปริมาณน้ำตาลในสูตรอาหารค่อนข้างต่ำ (8-13 g/l) จึงทำให้เชื้อมีแนวโน้มเติบโตได้มากขึ้นเมื่อความเข้มข้นของ CSL และกากน้ำตาลในสูตรอาหารสูงขึ้น อย่างไรก็ตาม ผลของอิทธิพลร่วมของปริมาณ CSL และกากน้ำตาลในสูตรอาหารที่มีต่อการเติบโตของ *L. pentosus* KUB-ST10-1 ในการทดลองครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า การใช้ CSL 9-11% ร่วมกับกากน้ำตาล 5-9%ในสูตรอาหารพื้นฐานเป็นปริมาณที่เหมาะสมต่อการเติบโตของเชื้อชนิดนี้ ทั้งในด้านปริมาณเซลล์ที่เพิ่มขึ้น และอัตราการเติบโตจำเพาะ การที่ปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อปริมาณของ CSL และกากน้ำตาลในสูตรอาหารเพิ่มขึ้นในขณะที่ปริมาณของน้ำตาลยังไม่สูงมากนักเป็นผลจากพีเอชของอาหารเพาะเลี้ยงลดลง Narendranath and Power (2005) แสดงให้เห็นว่าการเติบโตของ *L. pentosus* ต่ำลงตามลำดับของพีเอชในอาหารเพาะเลี้ยงที่ต่ำลงจาก 5.5-4.0 สอดคล้องกับพีเอชในอาหารเพาะเลี้ยงในการทดลองนี้ ซึ่งมีค่าสูงกว่า 4 เพียงเล็กน้อย จากตารางที่ 12 จะเห็นว่า พีเอช ที่ปริมาณเซลล์สูงสุดของอาหารเพาะเลี้ยงมีค่าไปในทิศทางเดียวกับปริมาณเซลล์และอัตราการเติบโตจำเพาะ กล่าวคือ ปริมาณเซลล์และอัตราการเติบโตจำเพาะจะสูงขึ้นเมื่อพีเอชมีค่าสูงขึ้น ในขณะที่ปริมาณของน้ำตาลมีความสัมพันธ์ไม่แน่นอนกับลักษณะการเติบโตของเชื้อทั้งในด้านปริมาณเซลล์ที่เพิ่ม และอัตราการเติบโตจำเพาะ แสดงว่าปริมาณของ CSL และกากน้ำตาลอาจถูกจำกัดในการนำไปใช้สำหรับการเติบโตของ *L. pentosus* KUB-ST 10-1 ด้วยภาวะความเป็นกรด-ด่างของอาหาร เนื่องจากสภาวะที่พีเอชต่ำเป็นข้อจำกัดในการทำงานของเอนไซม์หลายชนิด (Harvey, 1965) สอดคล้องกับรายงานของ Guerra and Pastrana (2002) ที่ระบุว่า สภาวะที่เป็นกรดเป็นข้อจำกัดต่อกระบวนการทางชีวเคมีในไซโทพลาสซึม ซึ่งจะทำให้การเติบโตของแบคทีเรียช้าลง

1.2 ผลของอาหาร MRS และอาหารคัดเลือกต่อการเติบโตของ *L. pentosus* KUB-ST10-1

การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกในระดับขยายขนาด หรือการผลิตในเชิงการค้าจำเป็นต้องเลือกแหล่งอาหารที่มีราคาถูก ง่ายต่อการนำไปใช้ และเชื้อสามารถเติบโตและสร้าง

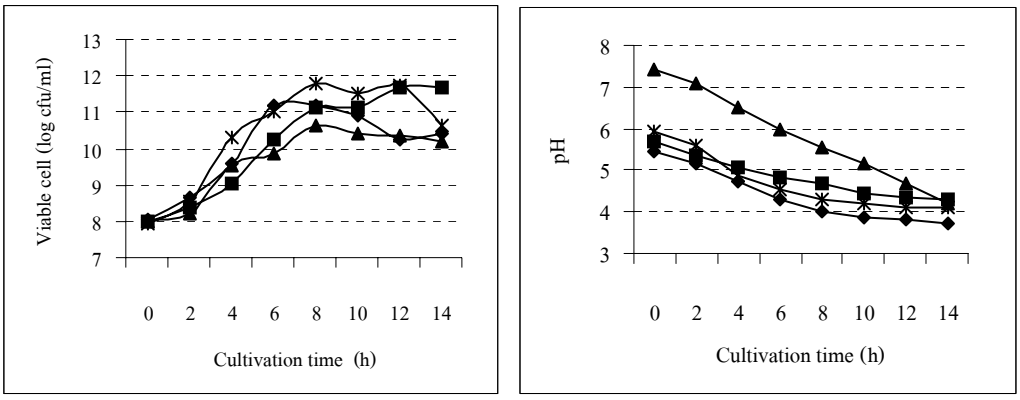
ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการได้ดี การทดลองเพื่อหาแหล่งอาหารที่มีราคาถูก โดยเพาะเลี้ยง *L. pentosus* KUB-ST10-1 ใน MRS broth และอาหารคัดเลือกชนิดต่าง ๆ คือ น้ำหมักวุ้นมะพร้าว (nata de coco fermented medium, NDCFM) ยูเรีย-กากน้ำตาล (urea-molasses, UM) และน้ำแช่ข้าวโพด-กากน้ำตาล (corn steep liqour-molasses, CSLM) ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 13 ซึ่งจะเห็นว่า เชื้อเติบโตได้ดีที่สุดในน้ำแช่ข้าวโพด-กากน้ำตาล รองลงมาได้แก่ น้ำหมักวุ้นมะพร้าว MRS broth และยูเรีย-กากน้ำตาล ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าน้ำแช่ข้าวโพด-กากน้ำตาล และน้ำหมักวุ้นมะพร้าวมีศักยภาพที่ดีสำหรับการเพาะเลี้ยง *L. pentosus* KUB ST10-1 ในระดับขยายขนาด เชื้อที่เพาะเลี้ยงในน้ำแช่ข้าวโพด-กากน้ำตาล และน้ำหมักวุ้นมะพร้าวมีปริมาณเซลล์สูงสุด มากกว่าที่เพาะเลี้ยงใน MRS broth อาจเนื่องจากพีเอชเริ่มต้นของอาหารทั้ง 2 ชนิดอยู่ในช่วงที่ไม่กระทบต่อการเติบโตของเชื้อ *L. pentosus* คือ 5.5-7.0 (Krueger and Peterson, 1948) ในขณะที่พีเอชเริ่มต้นของ MRS broth ค่อนข้างต่ำคือ 5.43 นอกจากนี้ Stanbury and Whitaker (1984) และ Liggett and Koffler (1948) ยังแสดงให้เห็นว่าน้ำแช่ข้าวโพดมีองค์ประกอบของสารอาหารสูงแต่มีสัดส่วนของน้ำตาลรีดิวซ์ต่อไนโตรเจนต่ำ ดังนั้นการเสริมกากน้ำตาลในอาหารชนิดนี้จึงช่วยทำให้เชื้อมีการเติบโตได้ดีขึ้น เช่นเดียวกับน้ำหมักวุ้นมะพร้าวที่มีปริมาณสารอาหารสูงโดยเฉพาะไนโตรเจนและน้ำตาล สำหรับยูเรีย-กากน้ำตาล ซึ่งเป็นสูตรอาหารที่เชื้อมีปริมาณเซลล์สูงสุด ต่ำกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรอื่น ๆ อาจเกิดจากมีพีเอช เริ่มต้นสูงกว่าช่วงพีเอชที่ไม่กระทบต่อการเติบโตของเชื้อดังที่กล่าวมาแล้ว ซึ่งเป็นผลมาจากยูเรียแตกตัวให้แอมโมเนีย และเกิดการสะสม NH_4^+ ขึ้น ทำให้ พีเอชเพิ่มขึ้น (Robertson, 1978; Pernoud *et al.*, 2004) นอกจากนี้ ยูเรียยังเป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนที่เชื้อจุลินทรีย์ใช้ได้ยาก รวมทั้งยูเรียมีบัฟเฟอริงคาปาซิตีสูง จึงต้องใช้กรดจำนวนมากเพื่อลดพีเอชให้อยู่ในระดับที่เหมาะสมต่อการเติบโตของเชื้อ ปัจจัยเหล่านี้ทำให้การเติบโตของจุลินทรีย์ลดลง

สำหรับผลของระยะเวลาเพาะเลี้ยงต่อปริมาณเซลล์สูงสุด พบว่า น้ำหมักวุ้นมะพร้าวใช้เวลามากกว่าอาหารชนิดอื่นๆ ($P<0.05$) อย่างไรก็ตาม ปริมาณเซลล์ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 ของการเพาะเลี้ยงในอาหารชนิดนี้ก็มีค่าค่อนข้างสูงและยังคงปริมาณเซลล์ที่สูงได้นานกว่าอาหารสูตรอื่นๆ ยกเว้นอาหารจากน้ำแช่ข้าวโพด-กากน้ำตาล (ภาพที่ 3) แสดงว่า *L. pentosus* KUB ST10-1 สามารถปรับตัวเข้ากับอาหารเพาะเลี้ยงจากน้ำหมักวุ้นมะพร้าวได้ดี ดังนั้น การศึกษาเกี่ยวกับการผลิตหัวเชื้อไซเลจในการทดลองต่อไปจึงใช้อาหารชนิดนี้ในการเพาะเลี้ยง

ตารางที่ 13 ผลของอาหาร MRS และอาหารคัดเลือกต่อการเติบโตของ *L. pentosus* KUB ST10-1

ลักษณะที่ศึกษา	ชนิดของอาหาร				CV (%)
	MRS	NDCFM	UM	CSLM	
ปริมาณเซลล์ (log cfu/ml)					
- เริ่มต้น	8.060	8.010	7.990	7.959	0.81
- สูงสุด	11.257[c]	11.706[b]	10.694[d]	12.019[a]	1.26
พีเอช					
- เริ่มต้น	5.43[d]	5.69[c]	7.63[a]	5.97[b]	1.88
- ที่ปริมาณเซลล์สูงสุด	4.12	4.28	5.67	4.22	12.90
ระยะเวลาเพาะเลี้ยงที่ปริมาณเซลล์สูงสุด (ชั่วโมง)	7.33[b]	13.33[a]	9.33[b]	10.00[b]	17.32

[abcd]อักษรกำกับในแถวแนวเดียวกันต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

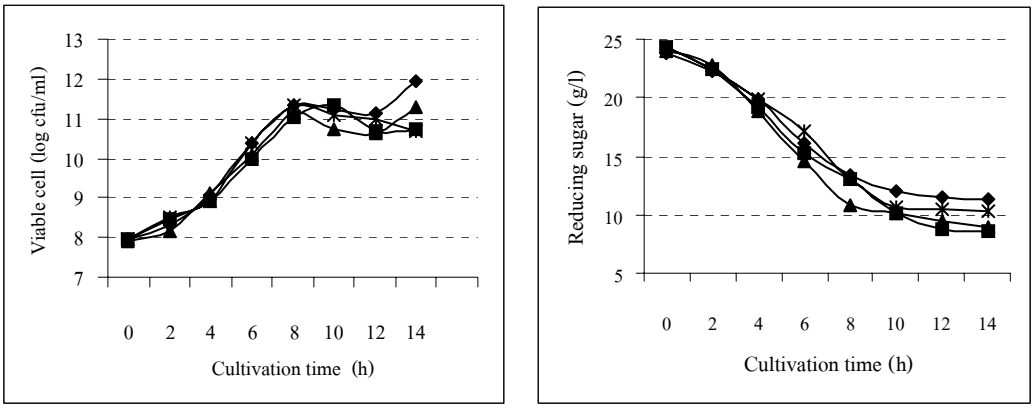


ภาพที่ 3 ผลของอาหารต่อการเติบโตของ *L. pentosus* KUB ST10-1

1.3 ผลของพีเอชต่อการเติบโตของ *L. pentosus* KUB ST10-1

การผลิตกรดอินทรีย์ระหว่างการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกจะทำให้ พีเอช ของอาหารเพาะเลี้ยงต่ำลง ส่งผลให้การเติบโตของจุลินทรีย์ลดลง Muck (1996) รายงานว่าการเติบโตของแบคทีเรียกรดแลคติกในไซเลจส่วนใหญ่ถูกยับยั้งเมื่อพีเอชต่ำกว่า 5 ดังนั้นการเพาะเลี้ยง

แบคทีเรียกรดแลคติกเพื่อให้ได้ความเข้มข้นของเซลล์สูงจึงทำได้โดยควบคุมพีเอชของสภาพแวดล้อมในระหว่างการเพาะเลี้ยง (Yang and Ray, 1994) การทดลองนี้ ใช้น้ำหมักวุ้นมะพร้าวเป็นอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยง *L. pentosus* KUB ST10-1 เนื่องจากเป็นเศษเหลือทิ้งที่หาได้ง่ายและยังไม่ถูกนำไปพัฒนาให้เกิดมูลค่าเพิ่มในปัจจุบัน ผันแปรพีเอชของอาหารเพาะเลี้ยง 4 ระดับ คือ 5.5, 6.0, 6.5 และ 7.0 พบว่าระดับพีเอชดังกล่าวไม่ทำให้การเติบโตของเชื้อทั้งในรูปของปริมาณเซลล์สูงสุดและอัตราการเติบโตจำเพาะเฉลี่ยแตกต่างกัน ($P>0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณน้ำตาลที่เหลืออยู่ในอาหารเมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงที่ 14 ชั่วโมงมีค่าใกล้เคียงกัน ($P>0.05$) ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4 แสดงว่า *L. pentosus* KUB ST10-1 ปรับตัวเข้ากับพีเอชของอาหารในช่วงดังกล่าวได้ดี ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Krueger and Peterson (1948) ที่ผันแปรพีเอชในอาหารสูตรต่าง ๆ สำหรับการเพาะเลี้ยง *L. pentosus* 124-2 ตั้งแต่พีเอช 4.5-7.0 และพบว่าที่พีเอช 5.5-7.0 ไม่มีผลกระทบต่อการเติบโตของเชื้อ ในขณะที่ Hofvendahl and Hahn-Hagerdal (2000) รายงานว่า พีเอชที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดแลคติกผันแปรอยู่ในช่วง 5-7 อย่างไรก็ตาม Juavez Tomas *et al.* (2002) พบว่า เชื้อ *L. pentosus* เติบโตได้ดีที่สุดเมื่อพีเอชเริ่มต้นในอาหารเท่ากับ 6.5 Kandler and Weiss (1986) รายงานว่า Lactobacillus ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกที่ชอบสภาวะเป็นกลาง (neutrophiles) แต่มีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเติบโตในช่วงกว้างคือ ผันแปรอยู่ในช่วง 5-9 ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อ



ภาพที่ 4 ผลของพีเอชต่อการเติบโตของ *L. pentosus* KUB ST10-1

ในระหว่างการเติบโต จุลินทรีย์จะมีกลไกควบคุมระดับพีเอชภายในเซลล์ให้คงที่ เพื่อให้เอนไซม์ ชนิดต่าง ๆ แสดงกิจกรรมได้อย่างมีประสิทธิภาพ เมื่อระดับพีเอชของสภาพแวดล้อมภายนอกเซลล์ผันแปรไปจากระดับพีเอชที่เหมาะสมภายในเซลล์ จุลินทรีย์ต้องใช้พลังงานในการ

นำไฮโดรเจนไอออนเข้าหรือออกจากเซลล์เพื่อคงระดับพีเอชที่เหมาะสมในเซลล์ไว้ (Kashket, 1987; Narendranath *et al.*, 2000) เมื่อระดับพีเอชภายนอกเซลล์แตกต่างไปจากพีเอชภายในเซลล์มากขึ้นจนกระทั่งเซลล์ไม่สามารถรักษาพีเอชภายในเซลล์ให้อยู่ในระดับที่เหมาะสมได้ จะทำให้เอนไซม์ต่าง ๆ ไม่สามารถแสดงกิจกรรมได้อย่างมีประสิทธิภาพ การสร้างผลิตภัณฑ์ และการเติบโตจะลดลง การทดลองครั้งนี้จะเห็นว่าอาหารเพาะเลี้ยงที่ควบคุมพีเอชระดับต่าง ๆ มีปริมาณน้ำตาลภายหลังการเพาะเลี้ยงแตกต่างกันไม่มาก ($P>0.05$) แสดงว่าพีเอชของอาหารในช่วง 5.5-7.0 ไม่มีผลกระทบต่อการปรับตัวของเชื้อ *L. pentosus* KUB-ST 10-1

2. <u>ผลการศึกษาสภาวะการทำแห้งแบบพ่นฝอยของเชื้อ *L. pentosus* KUB-ST 10-1</u>

2.1 ผลของอุณหภูมิอากาศเข้าและออกต่อการทำแห้งของเชื้อ *L. pentosus* KUB-ST 10-1

การลดลงของปริมาณเซลล์ในระหว่างการทำแห้งแบบพ่นฝอยมีสาเหตุจากการได้รับบาดเจ็บเนื่องจากความร้อนและการระเหยของน้ำในเซลล์ (Johnson and Etzel, 1994) ทำให้ผนังเซลล์ถูกทำลายและสูญเสียน้ำในเซลล์ ซึ่งกระทบต่อสมบัติของโมเลกุลที่ชอบน้ำของเซลล์ (Selmer-Olsen *et al.*, 1999) จากการศึกษาของ Desmons *et al.* (1998) พบว่า การรอดชีวิตของเซลล์ภายหลังการทำแห้งโดยวิธีพ่นฝอยขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ เช่น อุณหภูมิของอากาศ ชนิดของเครื่องทำแห้ง และสารเติมแต่งที่ใช้ในการทำแห้ง การทดลองครั้งนี้ใช้นมผงพร่องมันเนยเป็นสารตัวพา (carrier medium) เนื่องจากละลายได้ง่าย และมีสมบัติในการป้องกันเซลล์ที่ดี (Abadias *et al.*, 2001) การทดลองโดยผันแปรอุณหภูมิอากาศเข้าตั้งแต่ 110-130˚C และอุณหภูมิอากาศออกตั้งแต่ 60-80 ˚C ได้ผลดังตารางที่ 14 ซึ่งจะเห็นว่าเซลล์มีอัตราการรอดชีวิตค่อนข้างสูง โดยเฉพาะการทำแห้งที่อุณหภูมิอากาศเข้า 120˚C และ 130˚C ร่วมกับอุณหภูมิอากาศออก 80 ˚C ที่เซลล์มีอัตราการรอดชีวิตสูงถึง 76.01% และ 76.4% ตามลำดับ ในขณะที่ Johnson and Etzel (1994) และ สุพรรณิการ์ (2544) รายงานว่าเซลล์ของแบคทีเรียกรดแลคติกมีอัตราการรอดชีวิตหลังจากการทำแห้งแบบพ่นฝอยเพียง 0.08% และ 0.013% ตามลำดับ

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ พบว่าอิทธิพลของอุณหภูมิอากาศเข้าและอุณหภูมิอากาศออก รวมทั้งอิทธิพลร่วมของปัจจัยดังกล่าวไม่ทำให้อัตราการรอดชีวิตของเซลล์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ซึ่งขัดแย้งกับรายงานของ Desmons *et al.* (1998) และ สุพรรณิการ์ (2544) ที่แสดงให้เห็นว่า อัตราการรอดชีวิตของเซลล์จะลดลงเมื่ออุณหภูมิอากาศออกสูงขึ้น

ในขณะที่ Mauriello *et al.* (1999) พบว่าอุณหภูมิอากาศเข้าที่สูงขึ้นจะทำให้อัตรารอดชีวิตของเซลล์ลดลง ทั้งนี้อาจเกิดจากช่วงการผันแปรอุณหภูมิ ชนิดของเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ และสารเติมแต่งที่ใช้ในการศึกษามีความแตกต่างกัน อย่างไรก็ตาม ผลการทดลองที่สอดคล้องกับรายงานดังกล่าวคือ ผลิตภัณฑ์มีความชื้นต่ำลงเมื่อใช้อุณหภูมิอากาศออกสูงขึ้น เช่นเดียวกับการศึกษาของ Gardiner *et al.* (2000) และ Espina and Packard (1979) จากการศึกษาของ Zhou *et al.* (2004) พบว่า หากควบคุมอุณหภูมิอากาศเข้าให้คงที่ แล้วลดอัตราการป้อนเซลล์แขวนลอยเชื้อเข้าสู่ระบบ จะทำให้อุณหภูมิอากาศออกสูงขึ้น ผลิตภัณฑ์มีความชื้นต่ำลง เนื่องจากมีอัตราการระเหยน้ำที่เร็วขึ้น การที่อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ไม่ได้รับผลกระทบจากระดับอุณหภูมิอากาศเข้า อุณหภูมิอากาศออก รวมทั้งอิทธิพลร่วมของทั้ง 2 ปัจจัยในการทดลองนี้ อาจเกิดจากการผันแปรอุณหภูมิในช่วงแคบเกินไป

ตารางที่ 14 ผลของอุณหภูมิอากาศเข้าและออกในการทำแห้งแบบพ่นฝอยต่ออัตราการรอดชีวิตของเซลล์และปริมาณความชื้นของผลิตภัณฑ์

ลักษณะที่ศึกษา	อุณหภูมิอากาศเข้า	อุณหภูมิอากาศออก (˚C)			เฉลี่ย	C.V.
	(˚C)	60	70	80		(%)
การรอดชีวิต	110	53.23	59.89	50.35	54.49	
ของเซลล์ (%)	120	45.89	61.31	71.01	59.39	
	130	49.86	62.86	76.49	63.07	
	เฉลี่ย	49.64	61.36	65.95		30.93
ปริมาณความชื้น	110	8.86	7.29	5.88	7.35	
ของผลิตภัณฑ์	120	8.52	6.83	5.35	6.9	
(%)	130	8.43	7.34	5.64	7.14	
	เฉลี่ย	8.60^{a}	7.15^{b}	5.62^{c}		0.40

^{abc}อักษรกำกับในแถวแนวเดียวกันต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

2.2 ผลของอัตราส่วนนมผงพร่องมันเนยต่อมอลโทเดกซ์ทรินและปริมาณวัตถุแห้งในเซลล์แขวนลอยต่ออัตราการรอดชีวิตของ *L. pentosus* KUB ST10-1 และผลได้ของผลิตภัณฑ์

เนื่องจากนมผงพร่องมันเนยเป็นสารตัวพาที่มีราคาแพง ในขณะที่การผลิตหัวเชื้อทางการค้าจำเป็นต้องให้มีต้นทุนการผลิตต่ำ ดังนั้น การใช้สารตัวพาที่มีราคาถูกเพื่อทดแทนนมผงพร่องมันเนยในเซลล์แขวนลอยในการทำแห้งหัวเชื้อจึงเป็นทางเลือกที่น่าสนใจ อย่างไรก็ตามผลิตภัณฑ์ที่ได้ควรมีปริมาณมากและมีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์สูง การทดลองโดยผันแปรอัตราส่วนของนมผงพร่องมันเนยต่อมอลโทเดกซ์ทรินและปริมาณของแข็งในเซลล์แขวนลอยระดับต่าง ๆ กำหนดอุณหภูมิในการทำแห้งตามสภาวะที่เหมาะสมจากผลการศึกษาในข้อ 2.1 คืออุณหภูมิอากาศเข้า และอุณหภูมิอากาศออก เท่ากับ 120-130˚C และ 80˚C ตามลำดับ แต่เนื่องจากผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำแห้งที่อุณหภูมิอากาศเข้า 130˚C และอุณหภูมิอากาศออก 80˚C มีลักษณะสีน้ำตาลไหม้ การทดลองครั้งนี้จึงกำหนดอุณหภูมิอากาศเข้า และอุณหภูมิอากาศออกเท่ากับ 120 ˚C และ 80˚C ตามลำดับ ควบคุมความเร็วรอบของ Atomizer เท่ากับ 39,000 rpm ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 15 ซึ่งจะเห็นว่า อัตราส่วนของนมผงพร่องมันเนยต่อมอลโทเดกซ์ทริน และปริมาณวัตถุแห้งในเซลล์แขวนลอยระดับต่าง ๆ ไม่ทำให้อัตราการรอดชีวิตของเซลล์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) อย่างไรก็ตาม อัตราการรอดชีวิตของเซลล์มีแนวโน้มสูงขึ้นเมื่อเพิ่มอัตราส่วนของนมผงพร่องมันเนยต่อมอลโทเดกซ์ทรินมากขึ้น เนื่องจากนมผงพร่องมันเนยมีสมบัติเป็นสารป้องกันเซลล์ที่มีประสิทธิภาพระหว่างการทำแห้งโดยใช้ความร้อน (Teixeira *et al.*, 1995a) ซึ่งกลไกการป้องกันดังกล่าวเกิดจากเซลล์จุลินทรีย์ถูกหุ้มด้วยอนุภาคของนมผงพร่องมันเนย ทำให้ได้รับความร้อนน้อยลง (Gardiner *et al.*, 2000) รวมทั้งการเกิดปฏิกิริยาระหว่างหมู่อะมิโนของโปรตีนจากนมผงพร่องมันเนยกับหมู่คาร์บอกซิลของกรดอะมิโนในโปรตีนของตัวจุลินทรีย์ทำให้โครงสร้างโปรตีนจุลินทรีย์มีความคงทนขึ้น (Carvalho *et al.*, 2003)

สำหรับผลได้ของหัวเชื้อผง หรือผลได้ของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากส่วนรองรับ (vessel) ในระบบไซโคลน (cyclone) พบว่าปริมาณวัตถุแห้งในเซลล์แขวนลอย 19% ให้ผลได้ของผลิตภัณฑ์สูงสุด ($P<0.05$) ในขณะที่ปริมาณวัตถุแห้งในเซลล์แขวนลอย 15% และ 17% ให้ผลได้ของผลิตภัณฑ์ไม่แตกต่างกัน ($P>0.05$) ผลได้ของของผลิตภัณฑ์ลดลงเมื่อมีปริมาณวัตถุแห้งในเซลล์แขวนลอยลดลง อาจเกิดจากอนุภาคของผลิตภัณฑ์มีขนาดเล็ก ไม่สามารถรองรับได้ในส่วนรองรับที่ระบบไซโคลน Zhou *et al*. (2004) รายงานว่า ที่ความดันของหัวฉีดหรืออัตราความเร็วรอบของหัวฉีดสูง ๆ จะทำให้อุภาคของผงเชื้อถูกพ่นหรือเหวี่ยงออกไปติดกับผนังของห้องอบ (chamber)

ในขณะที่อนุภาคเล็ก ๆ บางส่วนมีน้ำหนักเบาจะไม่สามารถถูกรองรับได้ในส่วนไซโคลน ทำให้ผลได้ของผลิตภัณฑ์ลดลง อย่างไรก็ตาม Desmons *et al.* (1998) รายงานว่าหากมีปริมาณวัตถุแห้งในเซลล์แขวนลอยสูงเกินไปจะทำให้อนุภาคของผลิตภัณฑ์มีขนาดใหญ่ซึ่งต้องใช้เวลาในการทำให้แห้งในห้องอบนานขึ้น จะส่งผลให้อัตราการตายของเชื้อสูงขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าการมีปริมาณวัตถุแห้งในเซลล์แขวนลอยสูงจะต้องปรับอุณหภูมิอากาศออกให้สูงขึ้น ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อการควบคุมอุณหภูมิอากาศเข้า อัตราการป้อนสาร (flow rate) และความเร็วรอบของ Atomizer อีกทั้งหากอนุภาคของผงเชื้อที่ใหญ่เกินไปจะมีน้ำหนักมาก จึงไม่สามารถถูกดูดเข้าสู่ระบบไซโคลนได้ อนุภาคเหล่านี้จึงตกและเกาะอยู่ภายในห้องอบแห้ง ยิ่งจะทำให้เซลล์มีอัตราการตายสูงขึ้น เช่นเดียวกับความหนืดของเซลล์แขวนลอยจะส่งผลให้อนุภาคของแข็งมีขนาดใหญ่ ซึ่งจะเกาะติดกับผนังห้องอบ และระบบท่อของเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอยได้ง่าย (Zhou *et al.*, 2004) อัตราส่วนของนมผงพร่องมันเนยต่อมอลโทเดกซ์ทริน และปริมาณวัตถุแห้งในเซลล์แขวนลอยที่ระดับ 75:25 และ 19% ทำให้อัตราการรอดชีวิตของเซลล์สูงกว่าสภาวะอื่นๆในขณะที่ได้ผลได้ของผลิตภัณฑ์มากที่สุด จึงใช้สภาวะการทำแห้งนี้ในการศึกษาขั้นต่อไป

ตารางที่ 15 ผลของอัตราส่วนนมผงพร่องมันเนยต่อมอลโทเดกซ์ทรินและปริมาณวัตถุแห้งในเซลล์แขวนลอยต่อการรอดชีวิตของ *L. pentosus* KUB ST10-1 ในการทำแห้งแบบพ่นฝอย

ลักษณะที่ศึกษา	นมผงพร่องมันเนยต่อมอลโทเดกซ์ทริน (%)	ปริมาณของแข็งในเซลล์แขวนลอย (%)			เฉลี่ย	C.V. %
		15	17	19		
อัตราการรอดชีวิต (%)	25 : 75	0.0031	0.0333	0.1161	0.0508	
	50 : 50	0.0044	0.0129	0.0810	0.0328	
	75 : 25	0.0055	0.0054	0.2787	0.0965	
	เฉลี่ย	0.0044	0.0172	0.1586		9.82
ผลได้ของผลิตภัณฑ์ (%)	25 : 27	58.16	58.33	60.16	58.85	
	50 : 50	57.81	58.68	59.02	58.51	
	75 : 25	57.98	58.33	58.85	58.33	
	เฉลี่ย	57.98[b]	58.33[b]	59.35[a]		
						3.62

[AB] อัตรากำกับในแถวนอนเดียวกันต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

2.3 ผลของสารป้องกันเซลล์และอุณหภูมิในการเก็บรักษาต่ออัตราการรอดชีวิตของเซลล์

2.3.1 ผลของสารป้องกันเซลล์ต่ออัตราการรอดชีวิตของ *L. pentosus* KUB ST10-1 หลังการทำแห้งแบบพ่นฝอย

การบาดเจ็บและการตายของเซลล์นอกจากจะเกิดขึ้นในช่วงการทำแห้งแล้วยังเกิดขึ้นได้ในช่วงการเก็บรักษาอีกด้วย (Johson and Etzel, 1995; Selmer- Olsen *et al.*, 1999) ดังนั้นการเติมสารป้องกันเซลล์ลงในเซลล์แขวนลอยก่อนการทำแห้งแบบพ่นฝอยเพื่อแก้ปัญหาดังกล่าวจึงมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์ในระดับอุตสาหกรรม (Gardiner *et al.*, 2000; Carvalho *et al.*, 2003) ตัวอย่างของสารป้องกันเซลล์ที่ช่วยให้เซลล์มีชีวิตรอดได้ดีในระหว่างการเก็บรักษาผงเชื้อ ได้แก่ Trehalose-borate (Conrad *et al.*, 2000) เดกซ์ทริน และสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) เช่น กรดแอสคอร์บิก และโมโนโซเดียมกลูตาเมต (Teixeira *et al.*, 1995b) ชนิดและปริมาณของสารป้องกันเซลล์ที่ใช้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ (Carvalho *et al.*, 2003) รวมทั้งอุณหภูมิในการเก็บรักษาผงเชื้อ (Gardiner *et al.*, 2000) อย่างไรก็ตาม กรดแอสคอร์บิกและโมโนโซเดียมกลูตาเมตเป็นสารป้องกันเซลล์ที่ได้รับความนิยมแพร่หลายในการทำแห้งแบบพ่นฝอย (Abadias *et al.*, 2001; Porubcan *et al.*, 1975) ในขณะที่นมผงพร่องมันเนยนิยมใช้เป็นทั้งสารแขวนลอยเชื้อ และสารป้องกันเซลล์ (Johnson and Etzel, 1993; Lian *et al.*, 2002; Desmond *et al.*, 2002) จากการทดลองโดยเติมกรดแอสคอร์บิกและโมโนไซเดียมกลูตาเมตปริมาณต่าง ๆ ลงในเซลล์แขวนลอย *L. pentosus* KUB ST10-1 ที่เพาะเลี้ยงด้วยน้ำหมักวุ้นมะพร้าวเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ก่อนการทำแห้งแบบพ่นฝอย พบว่า อัตราการรอดชีวิตของเซลล์สูงขึ้นอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อใช้ปริมาณโมโนโซเดียมกลูตาเมตสูงขึ้น ($P>0.05$) ในขณะที่อัตราการรอดชีวิตของเซลล์มีแนวโน้มลดลงเมื่อใช้ปริมาณกรดแอสคอร์บิกสูงขึ้น แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ดังตารางที่ 16 แม้ว่าระดับโมโนโซเดียมกลูตาเมตจะไม่มีผลชัดเจนต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ภายหลังการทำแห้งแบบพ่นฝอย แต่การใช้ในปริมาณที่สูงขึ้นก็มีแนวโน้มทำให้อัตราการรอดชีวิตของเซลล์สูงขึ้น อาจเป็นเพราะคุณสมบัติในการป้องกันเซลล์ของกรดอะมิโนดังที่กล่าวแล้วตอนต้น ส่วนกรดแอสคอร์บิกมีแนวโน้มทำให้อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ลดลงตามปริมาณกรดที่เพิ่มขึ้น อาจเกิดจากการมีสมบัติเป็น Prooxidant ซึ่งเป็นอันตรายต่อเซลล์ ทำให้ปริมาณเซลล์มีชีวิตของจุลินทรีย์ลดลง (Champagne *et al.*, 1991; Teixeira *et al.*, 1995 b)

ตารางที่ 16 ผลของปริมาณกรดแอสคอร์บิกและโมโนโซเดียมกลูตาเมตต่ออัตราการรอดชีวิตของ *L. pentosus* KUB ST10-1 ภายหลังการทำแห้งแบบพ่นฝอย

กรดแอสคอร์บิก (%)	อัตราการรอดชีวิต (%) โมโนโซเดียมกลูตาเมต (%)				เฉลี่ย
	0	1	2	3	
0.0	2.74	2.28	1.36	3.94	2.58
0.5	1.35	1.64	1.87	2.77	1.91
1.0	1.37	1.58	1.84	1.44	1.56
เฉลี่ย	1.82	1.83	1.69	2.72	

2.3.2 ผลของสารป้องกันเซลล์และอุณหภูมิในการเก็บรักษาต่ออัตราการรอดชีวิตของ *L. pentosus* KUB ST10-1

การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการรอดชีวิตของ *L. pentosus* KUB ST10-1 ในช่วงการเก็บรักษา พบว่าอุณหภูมิในการเก็บรักษา ปริมาณโมโนโซเดียมกลูตาเมต และอิทธิพลร่วมของอุณหภูมิและปริมาณโมโนโซเดียมกลูตาเมตเป็นปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการรอดชีวิตของเชื้ออย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.01$) ส่วนปริมาณกรดแอสคอร์บิก และอิทธิพลร่วมอื่น ๆ ไม่มีผลต่ออัตราการรอดชีวิตของเชื้อ (ตารางที่ 17)

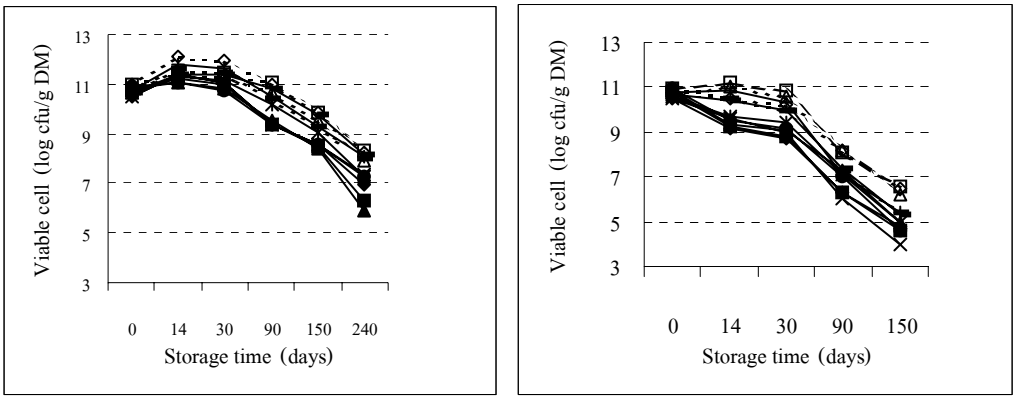
2.3.2.1 ผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาต่ออัตราการอดชีวิตของ *L. pentosus* KUB ST 10-1

อุณหภูมิในการเก็บรักษาเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญยิ่งต่ออัตราการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ ผงผลิตภัณฑ์ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิต่ำจะมีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์สูงกว่าผงผลิตภัณฑ์ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิสูง (Gardiner *et al.*, 2000; Teixeira *et al.*,1995b) ภายใต้สภาวะการเก็บรักษาผงเชื้อ *L. pentosus* KUB ST10-1 ที่อุณหภูมิ 4˚C พบว่า เชื้อยังคงมีอัตราการรอดชีวิตค่อนข้างสูงที่ระยะการเก็บรักษา 240 วัน ในขณะที่การเก็บรักษาผงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 ˚C อัตราการรอดชีวิตของเชื้อจะลดลงจนกระทั่งไม่สามารถตรวจพบที่อัตราการเจือจางที่ 10^{-2}cfu/g DM (ภาพที่ 5)

ตารางที่ 17 ปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการรอดชีวิตของ *L. pentosus* KUB ST10-1ในช่วงการเก็บรักษา 150 วัน

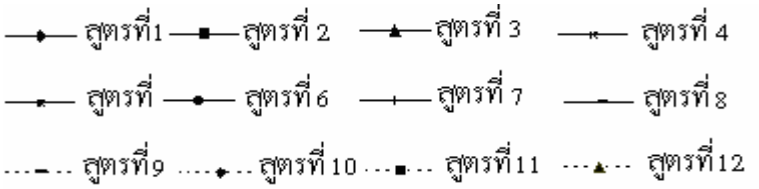
ปัจจัยที่ศึกษา	ระดับนัยสำคัญทางสถิติ
อุณหภูมิในการเก็บรักษา	**
ระดับโมโนโซเดียมกลูตาเมต (MSG)	**
ระดับกรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid)	ns
อิทธิพลร่วมของอุณหภูมิ และ MSG	**
อิทธิพลร่วมของอุณหภูมิ และกรดแอสคอร์บิก	ns
อิทธิพลร่วมของ MSG และ กรดแอสคอร์บิก	ns
อิทธิพลของ 3 ปัจจัย	ns

หมายเหตุ ** = P<0.01, ns = P > 0.05



(a) (b)

ภาพที่ 5 ปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4˚C (a) และอุณหภูมิ 30˚C (b)



ที่อายุการเก็บรักษา 150 วัน ผงเชื้อที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4˚C มีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่าที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30 ˚C (P<0.01) มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 9.375% และ 0.002% ตามลำดับ (ตารางที่ 18) ปริมาณเซลล์มีชีวิตของเชื้อที่เก็บในอุณหภูมิ 4 ˚C เพิ่มขึ้นในช่วงเดือนแรก อาจเนื่องจากเซลล์ที่ได้รับบาดเจ็บในระหว่างกระบวนการทำแห้งมีการซ่อมแซมตัวเองจนกระทั่งสามารถแสดง

กิจกรรมได้ สอดคล้องกับรายงานของ Mauriello *et al.* (1999) ซึ่งระบุว่าเซลล์ได้รับบาดเจ็บชั่วคราวในระหว่างการทำแห้งแบบพ่นฝอย เช่นเดียวกับการศึกษาโดย Hamsupho (2005) ซึ่งพบว่าเชื้อ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC 5 ที่ทำแห้งแบบพ่นฝอยทั้งในระดับนำร่องและระดับห้องปฏิบัติการมีปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้นในช่วงแรก ๆ ของการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4˚C จากนั้นปริมาณเซลล์มีชีวิตจะค่อย ๆ ลดลงเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษายาวนานขึ้น สำหรับเชื้อที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30˚C ปริมาณเซลล์มีชีวิตไม่เพิ่มขึ้น แต่กลับลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อเทียบกับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4˚C Desmons *et al.,* (1998) รายงานว่า นอกจากสภาพบรรยากาศและความชื้นของผลิตภัณฑ์แล้ว อุณหภูมิในการเก็บรักษาก็เป็นปัจจัยที่สำคัญยิ่งที่มีผลต่ออัตราการรอดชีวิตของเซลล์ ผงเชื้อที่มีความชื้นสูงจะทำให้อัตราการตายของเซลล์สูงขึ้น (Johnson *et al.*,1993; Teixera *et al.*, 1995b)

ตารางที่18 ผลของอุณหภูมิการเก็บรักษาต่ออัตราการรอดชีวิตของ *L. pentosus* KUB ST10-1 ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา150 วัน

ปริมาณของสารป้องกันเซลล์ (%)		อัตราการรอดชีวิต (%) อุณหภูมิในการเก็บรักษา	
กรดแอสคอร์บิค	โมโนโซเดียมกลูตาเมต	4°C	30°C
0	0	2.3102	0.0005
	1	3.7975	0.0001
	2	12.5755	0.0008
	3	13.5536	0.0075
0.5	0	1.1075	0.0001
	1	8.1190	0.0003
	2	23.6313	0.0005
	3	9.4022	0.0101
1.0	0	1.7112	0.0003
	1	2.4059	0.0001
	2	24.2295	0.0015
	3	9.6580	0.0043
เฉลี่ย		9.3750A	0.0020

[AB] อัตรากำกับในแถวนอนเดียวกันต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.01$)

2.3.2.2 ผลของโมโซเดียมกลูตาเมตต่ออัตราการรอดชีวิตของ *L. pentosus* KUB ST10-1

โมโนโซเดียมกลูตาเมต มีบทบาทสำคัญในการป้องกันเซลล์ในระหว่างการทำแห้งและการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ โดยหมู่อะมิโนของโมโนโซเดียมกลูตาเมตจะเข้าทำปฏิกิริยากับหมู่คาร์บอกซิลของโปรตีนจุลินทรีย์ ทำให้โครงสร้างโปรตีนของตัวจุลินทรีย์มีความเสถียรมากขึ้น (Carvalho *et al.*, 2003) การเติมโมโนโซเดียมกลูตาเมตในสารแขวนลอยเชื้อที่ระดับ 0, 1, 2 และ 3% พบว่า อัตราการรอดชีวิตของเซลล์สูงสุดหลังการเก็บรักษาเป็นเวลา 150 วัน คือการใช้ที่ระดับ 2% แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการใช้ที่ระดับ 3% ($P>0.05$) ส่วนผงเชื้อที่ไม่มีการเติมโมโนโซเดียมกลูตาเมตมีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ต่ำที่สุด (ตารางที่ 19) ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ สุพรรณิการ์ (2544) ซึ่งพบว่า การใช้โมโนโซเดียมกลูตาเมตเป็นสารป้องกันเซลล์ของ *Pediococcus acidilactici* (M6) ระดับ 2-3% ทำให้อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ในช่วงการเก็บรักษาสูงสุด

ตารางที่ 19 ผลของปริมาณโมโนโซเดียมกลูตาเมตต่ออัตราการรอดชีวิตของ *L. pentosus* KUB ST10-1 ในช่วงการเก็บรักษาที่ 150 วัน

อุณหภูมิ	กรดแอสคอร์บิก (%)	อัตราการรอดชีวิต (%)			
		โมโนโซเดียมกลูตาเมต (%)			
		0	1	2	3
4°C	0 %	2.3102	3.7975	12.5755	13.5536
	0.5 %	1.1075	8.1190	23.6313	9.4022
	1.0 %	1.7112	2.4059	24.2295	9.6580
30°C	0 %	0.0005	0.0001	0.0008	0.0075
	0.5 %	0.0001	0.0003	0.0005	0.0101
	1.0 %	0.0003	0.0001	0.0015	0.0043
เฉลี่ย		0.855^{C}	2.387^{BC}	10.073^{A}	5.439^{AB}

^{ABC}อักษรกำกับในแถวนอนเดียวกันต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

2.3.2.3 ผลของกรดแอสคอร์บิกต่ออัตราการรอดชีวิตของ *L. pentosus* KUB ST10-1

เนื่องจากอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ที่ลดลงในระหว่างการเก็บรักษาผงเชื้อ มีสาเหตุสำคัญจากกระบวนการออกซิเดชันของเซลล์ (Desmons *et al.*, 1998) ในขณะที่กรดแอสคอร์บิกจัดเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและแสดงกิจกรรมโดยการกำจัดอนุมูลอิสระ (scavenger of free radical) ที่มีประสิทธิภาพ (Feusner, 1996) ดังนั้นจึงนิยมใช้กรดแอสคอร์บิกเป็นสารป้องกันเซลล์ในการทำแห้งและการเก็บรักษาผงเชื้อ การทดลองครั้งนี้ใช้กรดแอสคอร์บิกเป็นสารป้องกันเซลล์โดยเติมลงในเซลล์แขวนลอยก่อนการทำแห้งแบบพ่นฝอยที่ระดับ 0, 0.5 และ 1% (w/v) พบว่าการใช้ที่ระดับ 0.5% ทำให้อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ในช่วงการเก็บรักษาผงเชื้อที่อายุ 150 วันสูงกว่าการใช้ที่ระดับ 1% ในขณะที่การไม่ใช้กรดแอสคอร์บิกเป็นสารป้องกันเซลล์อัตราการรอดชีวิตของเซลล์มีค่าต่ำที่สุด แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 20) อาจเนื่องจากกรดแอสคอร์บิกมีสถานะเป็นทั้งสารป้องกันการเกิดออกซิเดชันและPro-oxidant รวมทั้งการมีฤทธิ์รีดิวซ์ที่รุนแรง (Trommer *et al.*, 2002) ดังนั้น กรดแอสคอร์บิกจึงอาจทำให้อัตราการรอดชีวิตของเซลล์สูงขึ้นหรือต่ำกว่าการไม่ใช้ก็ได้ ขึ้นอยู่กับสารละลายนั้นมีโลหะหนัก โดยเฉพาะเหล็กและทองแดง การทดลองครั้งนี้ พบว่า อัตราการรอดชีวิตของเซลล์สูงขึ้นอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) เมื่อมีการใช้กรดแอสคอร์บิกเป็นสารป้องกันเซลล์สอดคล้องกับการศึกษาของ Teixeira *et al.* (1995b) แต่เกิดขึ้นในทางตรงกันข้ามกับการศึกษาของ สุพรรณิการ์ (2544) ซึ่งพบว่าการใช้กรดแอสคอร์บิกเป็นสารป้องกันเซลล์ ทำให้อัตราการรอดชีวิตของ *P. acidilactici* (M6) ลดลงเมื่ออายุการเก็บรักษาที่ 70 วัน

Feusner (1996) รายงานว่า กระบวนการเมแทบอลิซึมที่ใช้ออกซิเจนซึ่งเกิดขึ้นในเซลล์จะทำให้เกิด Reactive oxygen species (ROS) หลายชนิด เช่น ไฮดรอกซิล แรดิคอล ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซูเปอร์ออกไซด์ และ Singlet oxygen ซึ่ง ROS เหล่านี้จะเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน และทำให้ ดีเอนเอเสียหาย นอกจากนี้อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจะทำลายไขมัน เอนไซม์และโปรตีน ทำให้เซลล์เสียหายและอัตราการรอดชีวิตลดลง ด้วยกลไกการเสียหายของเซลล์ดังกล่าวนี้ กรดแอสคอร์บิกจะยับยั้งการเกิดออกซิเดชัน โดยเกิด Chain-breaking antioxidants และโดยการกำจัดอนุมูลอิสระ นอกจากนี้กรดแอสคอร์บิกยังปกป้องผนังเซลล์ไม่ให้ถูกทำลายจากกระบวนการ Peroxidation โดยวิธี Trapping peroxyl radical ทำให้เซลล์มีอัตราการรอดชีวิตสูงขึ้น อย่างไรก็ตาม ในสภาวะที่มีไอออนโลหะและออกซิเจน กรดแอสคอร์บิกจะมีสมบัติเป็นPro-

oxidant ซึ่งสามารถสลาย Lipid hydroperoxides ทำให้ดีเอนเอเสียหาย (Trommer *et al.*, 2002) กลไกนี้เกิดจากกรดแอสคอร์บิกไปรีดิวซ์ไอออนโลหะ เช่น Fe^{3+} หรือ Cu^{2+} ให้ได้ Fe^{2+} และ Cu^{+} ตามลำดับ จากนั้น Fe^{2+} และ Cu^{+} จะไปสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และไฮโดรเปอร์ออกไซด์ ทำให้เกิดอนุมูลอิสระ เช่น Superoxide radical anion และ Hydroxyl radical อนุมูลเหล่านี้สามารถออกซิไดซ์สารชีวโมเลกุลของจุลินทรีย์ ทำให้เป็นอันตรายต่อเซลล์ ปริมาณเซลล์มีชีวิตจึงลดลง (Champagne *et al.*, 1991; Teixeira *et al.*, 1995b)

ตารางที่ 20 ผลของกรดแอสคอร์บิกต่ออัตราการรอดชีวิตของ *L. pentosus* KUB ST10-1 ในช่วงการเก็บรักษาที่ 150 วัน

อุณหภูมิในการเก็บรักษา	โมโนโซเดียมกลูตาเมต (%)	อัตราการรอดชีวิต (%)		
		กรดแอสคอร์บิก (%)		
		0	0.5	1.0
4°C	0	2.3102	1.1075	1.7112
	1	3.7975	8.1190	2.4059
	2	12.5755	23.6313	24.2295
	3	13.5536	9.4022	9.6580
30°C	0	0.0005	0.0001	0.0003
	1	0.0001	0.0003	0.0001
	2	0.0008	0.0005	0.0015
	3	0.0075	0.0101	0.0043
เฉลี่ย		4.031	5.284	4.751

สำหรับอิทธิพลร่วมของกรดแอสคอร์บิกและโมโนโซเดียมกลูตาเมตซึ่งแม้ว่าจะไม่มีผลต่ออัตราการรอดชีวิตของเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติก็ตาม แต่อัตราการรอดชีวิตของเซลล์มีแนวโน้มลดลงเมื่อมีการเพิ่มระดับของโมโนโซเดียมกลูตาเมตและระดับกรดแอสคอร์บิกในการป้องกันเซลล์มากขึ้น อาจเกิดจากกระบวนการอะมิโนคาร์บอนิลรีแอคชันระหว่างสารป้องกันเซลล์ทั้ง 2 ชนิด กลไกนี้จะทำให้เกิดสารสีแดง และทำให้การคงตัวของกรดแอสคอร์บิกลดลง (Hayashi *et al.*, 1985; Porubcan *et al.*, 1975) ส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ลดลง Abadias *et al.* (2001) พบว่า การใช้ โมโนโซเดียมกลูตาเมตเพียงอย่างเดียวในการป้องกันเซลล์ทำให้การรอดชีวิต

ของเซลล์ยีสต์ *Candida sake* ดีกว่าการใช้ร่วมกับนมผงพร่องมันเนย ซึ่งขัดแย้งกับการศึกษาของ Carvalho *et al*. (2003) ที่ให้ผลในทางตรงข้าม

2.3.2.4 ผลของอุณหภูมิและโมโนโซเดียมกลูตาเมตต่ออัตราการรอดชีวิตของ *L. pentosus* KUB ST10-1

นอกจากอุณหภูมิและโมโนโซเดียมกลูตาเมตจะเป็นปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการรอดชีวิตของ *L. pentosus* KUB ST10-1 อย่างชัดเจน ($P<0.01$) แล้ว ยังพบว่าอิทธิพลร่วมของอุณหภูมิและระดับโมโนโซเดียมกลูตาเมตก็มีผลต่ออัตราการรอดชีวิตของเซลล์ชัดเจน ($P<0.01$) โดยความแตกต่างของอัตราการรอดชีวิตของเซลล์จะเห็นได้ชัดในผงเชื้อที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4˚C ในขณะที่การเก็บที่อุณหภูมิ 30˚C ระดับโมโนโซเดียมกลูตาเมตไม่มีผลทำให้อัตราการรอดชีวิตของเชื้อแตกต่างกัน ($P>0.05$) การใช้โมโนโซเดียมกลูตาเมตเป็นสารป้องกันเซลล์ 2-3% ภายใต้การเก็บรักษาผงเชื้อที่อุณหภูมิ 4˚C ทำให้อัตราการรอดชีวิตของเชื้อสูงที่สุด ในขณะที่การไม่ใช้จะทำให้อัตราการรอดตายของเชื้อต่ำที่สุดเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิเดียวกัน แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับอัตราการรอดตายของเชื้อที่เก็บรักษาในอุณหภูมิ 30˚C ทั้งที่มีการใช้และไม่ใช้สารป้องกันเซลล์ ดังตารางที่ 21

ตารางที่ 21 ผลของอุณหภูมิและโมโนโซเดียมกลูตาเมตต่ออัตราการรอดชีวิตของ *L. pentosus* KUB ST10-1 ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 150 วัน

	อัตราการรอดชีวิต (%)			
ระดับโมโนโซเดียมกลูตาเมต (%)	0	1	2	3
อุณหภูมิ 4˚C	1.710^{bc}	4.774^{b}	20.145^{a}	10.871^{a}
อุณหภูมิ 30˚C	0.000^{c}	0.000^{c}	0.001^{c}	0.007^{c}

^{abc} อักษรกำกับแตกต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

แม้มีรายงานว่าโมโนโซเดียมกลูตาเมตช่วยเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ในระหว่างการทำแห้งและระหว่างการเก็บรักษาได้ก็ตาม แต่ภายใต้สภาวะอุณหภูมิและความชื้นสูง อัตราการรอดชีวิตของเซลล์จะลดลงอย่างมาก เนื่องจากสภาวะดังกล่าวจะทำให้เกิดอนุมูลอิสระจากกระบวนการออกซิเดชันได้ง่าย ซึ่งผลที่เกิดขึ้นจะกระทบต่อระบบการทำงานของเอนไซม์ที่

เกี่ยวข้องกับกิจกรรมของผนังเมมเบรน (Castro *et al*., 1996) ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Hamsupho (2005) ซึ่งพบว่า แม้จะใช้โมโนโซเดียมกลูตาเมตในการป้องกันเซลล์ แต่ปริมาณเซลล์มีชีวิตจะลดลงอย่างมากเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30 ˚C เช่นเดียวกับการศึกษาของ Teixeira *et al.* (1995b) ที่พบว่า การใช้โมโนโซเดียมกลูตาเมตเป็นสารป้องกันเซลล์ทำให้การรอดชีวิตของ *Lactobacillus delbrueckii* ต่ำกว่ากลุ่มที่ไม่ใช้เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 20˚C

3. <u>ผลการศึกษาสภาวะการหมักไซเลจ</u>

3.1 ผลของปริมาณหัวเชื้อต่อประสิทธิภาพการหมักไซเลจ

ปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติก (lactic acid bacteria; LAB) ในพืชก่อนการหมักเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อประสิทธิภาพการหมักไซเลจ การมีปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกที่พอเพียงและมีประสิทธิภาพรวมทั้งมีปริมาณน้ำตาลที่เหมาะสมในพืชภายใต้การหมักที่ถูกต้องจะทำให้ไซเลจมีพีเอชลดลงอย่างรวดเร็ว ส่งผลให้จุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ โดยเฉพาะเชื้อคลอสตรีเดียมในไซเลจถูกยับยั้ง ไซเลจจึงยังคงคุณค่าทางโภชนะไว้ใกล้เคียงกับพืชก่อนการหมัก อย่างไรก็ตามปริมาณและชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกในพืชอาหารสัตว์ตามธรรมชาติมีความแปรปรวนสูง (Muck, 1996) ดังนั้นการเติมแบคทีเรียกรดแลคติกในพืชก่อนการหมักในการทดลองนี้นอกจากจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการหมักและการย่อยได้ (Harrison *et al.*, 1989; Hill *et al.*, 2001) แล้ว ยังจะทำให้ทราบถึงปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกที่เหมาะสมในการใช้อีกด้วย การผันแปรปริมาณ *L. pentosus* KUB ST10-1 ลงในพืชก่อนการหมักแตกต่างกัน 5 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุม กลุ่มที่เติมปริมาณเชื้อ 10^4, 10^5, 10^6 และ 10^7 cfu/g ของพืชสดในการทดลองครั้งนี้ ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 22