



## การปรับปรุงคุณค่าทางโภชนาการต้นข้าวโพดแห้งหมักด้วยเชื้อรา *Trichoderma viride* UP15 แบบเหลวที่ผลิตเอนไซม์ย่อยเยื่อใยพืชร่วมกับจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลคติก

### Maize-crop stubble nutrition improvement using fibrolytic fungus *Trichoderma viride* UPLS01 culture and lactic acid bacteria

ศุภคม คล้ายโตนด<sup>1</sup>, เยาวลักษณ์ แหม่งปัง<sup>2</sup>, ชัยณรงค์ วงศ์สรศรี<sup>3</sup>, โชค โสรัจกุล<sup>1</sup>  
รวีสรา รื่นไวย<sup>1</sup> และ ขรรค์ชัย ดันเมฆ<sup>1\*</sup>

Supakhom Klaitanoad<sup>1</sup>, Yaowalak Mangpung<sup>2</sup>, Chainarong Wongsansree<sup>3</sup>,  
Choke Sorachakura<sup>1</sup>, Rawisara Ruenwai<sup>1</sup>, and Khanchai Danmek<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> คณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา

<sup>1</sup> School of Agriculture and Natural Resources, University of Phayao, Phayao, Thailand

<sup>2</sup> ศูนย์วิจัยและพัฒนามาตรฐานอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้อง จังหวัดขอนแก่น

<sup>2</sup> Ruminants Feeding Standard Research and Development Center, Khon kaen, Thailand

<sup>3</sup> ศูนย์วิจัยและพัฒนาอาหารสัตว์เชิงราย

<sup>3</sup> Chaing Rai Animal Nutrition Research and Development Center

**บทคัดย่อ:** การคัดแยกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์ย่อยเยื่อใยพืชจากบริเวณที่ปลูกข้าวโพดเพื่อนำมาประยุกต์ใช้เป็นหัวเชื้อหมักเพิ่มโภชนาการต้นข้าวโพดแห้งหลังการเก็บเกี่ยวที่ไม่มีเมล็ดสำหรับเป็นอาหารสัตว์ ผลการทดลองพบว่าเชื้อรา *Trichoderma viride* UP15 สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยเยื่อใยพืช (เซลลูเลส และไซแลนเนส) ได้มีประสิทธิภาพสูงสุด การศึกษาการทำการปรับสภาวะที่เหมาะสมในการปรับปรุงโภชนาการ ดังนี้ คือ ต้นข้าวโพดแห้งที่ความชื้นเริ่มต้น 70 เปอร์เซ็นต์ ค่า pH เริ่มต้น 6.0-7.0 เติมหัวเชื้อจุลินทรีย์ 0.2 เปอร์เซ็นต์ และหมักที่อุณหภูมิห้องซึ่งมีค่าเฉลี่ย 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 21 วัน โดยทำการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ซึ่งทำการทดลองโดยมีการเติมหัวเชื้อทั้งสี่แบบดังต่อไปนี้ คือ ไม่เติมจุลินทรีย์เป็นชุดควบคุม (T0) เติมจุลินทรีย์ *Lactobacillus plantarum* (T1) เติมจุลินทรีย์ *Trichoderma viride* UP15 (T2) และเติมจุลินทรีย์ผสมระหว่าง *L. plantarum* ร่วมกับ *T. viride* UP15 ในอัตราส่วน 1:1 (T3) ผลการทดลองพบว่า ต้นข้าวโพดแห้งหมักที่มีการเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์ (T2 และ T3) มีปริมาณโปรตีนสูงชัน และมีค่าเยื่อใยต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (T0) ( $P < 0.05$ ) การวิเคราะห์กรดไขมันที่ระเหยได้จากต้นข้าวโพดแห้งหมักพบว่า กรดแลคติกมีการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเฉพาะในต้นข้าวโพดแห้งหมักด้วยจุลินทรีย์ผสม T3 ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าการหมักต้นข้าวโพดแห้งด้วยหัวเชื้อแบบเหลวที่ผลิตเอนไซม์ย่อยเยื่อใยพืชและจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลคติกจึงเป็นวิธีการช่วยปรับปรุงคุณภาพและคุณค่าทางโภชนาการต้นข้าวโพดแห้งได้

**คำสำคัญ :** ต้นข้าวโพดแห้ง; เอนไซม์ย่อยเยื่อใยพืช; การหมัก; *Trichoderma viride*; จุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลคติก

**ABSTRACT:** Screening of fibrolytic fungi from maize producing areas in Phayao Province for used as microbial inoculum to improve the nutritional values of post-harvest maize plant without grain (MPWG) for ruminant feed. The results showed that *Trichoderma viride* UP15 was able to produce the fibrolytic enzymes (cellulases and xylanase) with the highest efficiency. In this study, the optimal conditions for nutrition improvement were MPWG at initial moisture 70%, initial pH 6.0-7.0 supplemented by 0.2% of microbial inoculums and cultivated at 30°C for a period of 21 days. A completely randomized design (CRD) was conducted in which the following four inoculations were added including non-microbial inoculum (control: T0), *Lactobacillus plantarum* (T1), *Trichoderma viride* UP15 (T2), and mixed inoculum in 1:1 ratio between *L. plantarum* and *T. viride* UP15. (T3) The results showed that ensiled

\* Corresponding author: [khanchai.da@up.ac.th](mailto:khanchai.da@up.ac.th)

MPWG with the addition of microorganisms had higher protein content than the control ( $p < 0.05$ ). The analysis of volatile fatty acids from MPWG showed that lactic acid was significantly increased in a mixed inoculum of T3. The ensiling of MPWG with culture of fibrolytic fungi and lactic acid producing microorganisms improves their qualities and nutritional values of MPWG.

**Keywords:** post-harvest maize plant without grain; fibrolytic enzyme; ensiling; *Trichoderma viride*; lactic acid bacteria

## บทนำ

ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศ มีพื้นที่เพาะปลูกทั่วประเทศกว่า 7 ล้านไร่ และมีผลผลิตเมล็ดข้าวโพดกว่า 4.5 ล้านตัน ซึ่งพะเยาเป็นพื้นที่ผลิตข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ที่สำคัญของภาคเหนือมีผลผลิตข้าวโพดกว่า 1.5 แสนตันต่อปีโดยในพื้นที่ราบพื้นที่ที่มีการปลูกข้าวโพดต่อปีมากที่สุดคืออำเภอเมืองพะเยา อำเภอจุน อำเภอภูกามยาว และอำเภอแม่ใจตามลำดับ โดยในอำเภอเมืองพะเยาพื้นที่ที่ปลูกมากที่สุดอยู่ในพื้นที่ตำบลแม่กา และตำบลแม่ยาว (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2562) โดยทั่วไปเมื่อเมล็ดข้าวโพดแก่ เกษตรกรจะปล่อยให้ฝักแห้งอยู่กับต้นจึงทำการเก็บฝัก โดยไม่ได้สนใจนำต้นข้าวโพดหลังเก็บเกี่ยวไปใช้ประโยชน์ ทำให้มีต้นข้าวโพดเลี้ยงสัตว์หลังเก็บเกี่ยวแห้งยืนต้นอยู่เป็นจำนวนมาก ซึ่งผลผลิตเฉลี่ยของต้นข้าวโพดแห้งมีประมาณ 2 ตัน/ไร่ (จินดา, 2539) กรมปศุสัตว์ได้ส่งเสริมให้เกษตรกรนำต้นข้าวโพดแห้งมาปรับปรุงคุณภาพเพื่อใช้สำหรับเลี้ยงสัตว์ในหลายวิธี เช่น การใช้ยูเรียผสมกากน้ำตาลรดต้นข้าวโพดแห้ง แล้วใช้เลี้ยงสัตว์ร่วมกับอาหารข้น เป็นต้น ต้นข้าวโพดแห้ง มีวัตถุดิบหลักคือ โปรตีน และเยื่อใย เท่ากับ 90, 2.0 และ 33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (จินดา, 2539; ทิพาพรและคณะ, 2559) อย่างไรก็ตามปริมาณเยื่อใยที่ยังสูง และความน่ากินต่ำทำให้ต้นข้าวโพดแห้งยังไม่เป็นที่นิยมสำหรับเกษตรกรนำมาใช้เลี้ยงสัตว์ ดังนั้นการเพิ่มการย่อยได้ของเยื่อใย เพิ่มความน่ากิน และหาวิธีในการเก็บรักษา จึงเป็นแนวทางที่ควรศึกษาเพื่อเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการให้กับต้นข้าวโพดแห้ง ซึ่งจะช่วยให้เพิ่มการใช้ประโยชน์ของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร และช่วยลดต้นทุนค่าอาหารสัตว์ลงได้

การทำพืชหมักเป็นวิธีการหนึ่งที่จะช่วยรักษาคุณค่าทางโภชนาการของวัสดุทางการเกษตรเพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์ โดยเริ่มมีการเผยแพร่ข้อมูลรูปแบบการทำพืชหมักในประเทศไทยโดยสำนักพัฒนาอาหารสัตว์ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2544 จึงได้มีการวิจัยและพัฒนาการหมักพืชอาหารสัตว์ชนิดต่าง ๆ มาจนถึงปัจจุบัน วิธีการหมักที่กรมปศุสัตว์เผยแพร่ และแนะนำแก่เกษตรกร จะใช้วิธีการหมักใส่ภาชนะเก็บไว้ในสภาวะที่ไม่มีอากาศเพื่อกระตุ้นให้จุลินทรีย์กลุ่มที่ผลิตกรดแลคติก (Lactic acid bacteria, LAB) เจริญเติบโต และส่งผลให้พืชหมักมีความเป็นกรดโดยมีค่า pH อยู่ในช่วง 3.0-4.0 (กรมปศุสัตว์, 2547) สภาวะการหมักดังกล่าวนี้จะทำให้สามารถเก็บพืชหมักไว้เป็นอาหารสำหรับสัตว์ได้เป็นเวลานาน โดยไม่เน่าเสีย หรือสูญเสียคุณค่าทางโภชนาการ เนื่องจากจุลินทรีย์กลุ่มย่อยสลาย และก่อโรคไม่สามารถเจริญได้ (สิอุดม, 2560; Thana et al., 2019) แต่วิธีนี้มีข้อจำกัด คือ พืชหมักต้องมีความชื้น และสารอาหารเพียงพอสำหรับให้จุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลคติกเจริญเติบโตได้ ดังนั้นพืชที่มีคุณค่าทางโภชนาการต่ำ และความชื้นไม่เพียงพอ อย่างเช่นต้นข้าวโพดแห้ง จึงจำเป็นต้องนำมาปรับเพิ่มความชื้น และใส่สารอาหารเพื่อกระตุ้นการเจริญของจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลคติก เช่น กากน้ำตาล เป็นต้น (จินดา, 2539; ทิพาพรและคณะ, 2559) นอกจากนี้ การเติมจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลคติกจะช่วยเร่งกระบวนการหมัก และทำให้เกิดการหมักที่สมบูรณ์ได้ในระยะเวลาที่รวดเร็วขึ้น ดังรายงานการศึกษาของ Nitisinprasert et al., (2001) ที่เติม *Lactobacillus pentosus* (KUB ST 10-1) ลงไปในการทำหญ้าหมักพบว่า สามารถช่วยเร่งปฏิกิริยาการหมักให้เกิดขึ้นได้เร็วยิ่งขึ้น พืชหมักมีโภชนาการเพิ่มขึ้นจากการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลคติก อย่างไรก็ตามการใช้จุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลคติกมีข้อจำกัด คือ จุลินทรีย์กลุ่มนี้ส่วนมากไม่มีการผลิตเอนไซม์ย่อยเยื่อใยพืชในกลุ่มเซลลูโลส และไซแลนเนส จึงไม่ได้ช่วยเพิ่มการย่อยได้ของพืชหมัก ต้องใช้คาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำในการเจริญ และเพิ่มปริมาณโปรตีนในพืชหมักได้ต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ยีสต์ (ไวยวริญและคณะ, 2563; Kung et al., 2018)

การเพิ่มประสิทธิภาพการหมัก และการย่อยได้ของวัตถุดิบให้ดีขึ้นสามารถทำได้โดยการเติมเอนไซม์ที่ย่อยเยื่อใยพืช เช่น เซลลูโลส และไซแลนเนส โดยเอนไซม์ในกลุ่มนี้จะย่อยเยื่อใยพืช ทำให้ได้ผลผลิตเป็นคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำ (water soluble carbohydrate: WSC) และเป็นน้ำตาล (C5 และ C6) ซึ่งจะเป็นสารอาหารสำคัญของยีสต์ และจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลคติกนำไปใช้ในการเจริญเติบโตในสภาพที่ไม่มีอากาศ และเกิดการหมักทำให้มีการเพิ่มขึ้นของโปรตีนจากเซลล์ของจุลินทรีย์ และการเพิ่มขึ้นของคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำในระหว่างกระบวนการหมัก (Adesogan et al., 2004; Dean et al., 2005) รวมไปถึงการย่อยได้ของพืชหมักที่เพิ่มขึ้นจากการทำงานของเอนไซม์ จึงทำให้สัตว์สามารถใช้ประโยชน์จากพืชหมักได้ดียิ่งขึ้น (Hristov et al., 2000) อย่างไรก็ตาม

การใช้เอนไซม์เสริมโดยตรงในการผลิตพืชหมักจะเป็นการจะทำให้ต้นทุนการผลิตสูงขึ้นเนื่องจากเอนไซม์ทางการค้าที่มีจำหน่ายในเชิงพาณิชย์มีราคาสูง ด้วยเหตุนี้ จึงมีนักวิจัยหลายคนที่น่าสนใจศึกษาการคัดเลือกเชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์กลุ่มย่อยเยื่อใยพืชมาใช้ในการหมักพืชอาหารสัตว์ทดแทนการเสริมเอนไซม์ในพืชหมักโดยตรง อาทิ เช่น Newbold, (1997) ใช้เชื้อรา *Aspergillus foetidus* ใส่ลงไปบ่มหมักพืชอาหารสัตว์เพื่อกระตุ้นการหมักให้มีความสมบูรณ์มากขึ้น ในขณะที่ Morgavi et al. (2000) ใช้เอนไซม์จากเชื้อรา *Trichoderma longibrachiatum* ร่วมกับเอนไซม์จากจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมนของโคนมในการหมักพบว่า สามารถเพิ่มโภชนะ และการย่อยได้ของพืชหมัก และ Thana et al. (2019) เพิ่มประสิทธิภาพการหมักต้นข้าวโพดแห้งด้วยการเติมเชื้อรา *T. viride* ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ผลการทดลองที่ได้พบว่า พืชหมักมีคุณค่าทางโภชนะเพิ่มขึ้นแตกต่างจากพืชที่หมักแบบไม่เติมเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์กลุ่มนี้ อย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตาม การเติมเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์ย่อยเยื่อใยพืชเพื่อใช้เพิ่มประสิทธิภาพการหมักพืชอาหารสัตว์มีข้อจำกัดคือ เชื้อราในกลุ่มนี้ส่วนมากจะเจริญเติบโตได้ดีในสภาวะที่มีอากาศ อุณหภูมิเฉลี่ย 30-40 องศาเซลเซียส และค่า pH 5-6 ดังนั้น จึงไม่เหมาะกับการนำไปใช้หมักพืชอาหารสัตว์ในสภาวะที่ไม่มีอากาศ ความเป็นกรดสูง และความชื้นสูง ดังนั้น การพัฒนาวิธีการผลิต และใช้ประโยชน์หัวเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถทำงานได้ภายใต้การหมักในสภาวะที่ไม่มีอากาศ จะช่วยแก้ปัญหาและเพิ่มประสิทธิภาพการหมักพืชอาหารสัตว์ได้

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ย่อยเยื่อใยพืชหมักต้นข้าวโพดแห้งร่วมกับจุลินทรีย์ในกลุ่ม LAB ภายใต้สภาวะการหมักแบบไร้อากาศ เพื่อปรับปรุงคุณค่าทางโภชนะของต้นข้าวโพดแห้ง และให้มีความการย่อยได้ที่เพิ่มขึ้น โดยเริ่มจากการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีเอนไซม์ย่อยเยื่อใยพืช การผลิตหัวเชื้อแบบเหลว และทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์ การนำไปทดสอบประสิทธิภาพการหมักต้นข้าวโพดแห้ง และทำการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนะที่เกิดขึ้นเพื่อเปรียบเทียบกับหมักแบบเดิมที่ไม่เติมหัวเชื้อจุลินทรีย์ และการเติมเฉพาะจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลคติก ซึ่งผลที่ได้จะนำไปสู่การประยุกต์ใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ผสม และเอนไซม์ที่จะนำไปใช้หมักพืชอาหารสัตว์เพื่อเพิ่มโภชนะการย่อยได้ และรักษาโภชนะพืชอาหารสัตว์ให้เก็บไว้ได้นานขึ้น แตกต่างจากการหมักแบบเดิมที่ไม่ใส่หัวเชื้อจุลินทรีย์ หรือการใส่จุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลคติกซึ่งเป็นเพียงการหมักที่เน้นการถนอมรักษาโภชนะพืชอาหารสัตว์เพียงอย่างเดียว

## วิธีการศึกษา

### 2.1 การคัดเลือกเชื้อรา

สุ่มตัวอย่างดินจากบริเวณที่แปลงปลูกข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ บริเวณบ้านไร่ ตำบลแม่กา อำเภอเมือง จังหวัดพะเยา พิกัด 19°02'45"N 99°52'37"E ซึ่งเป็นแหล่งเพาะปลูกข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ในช่วงเดือนพฤศจิกายนถึงธันวาคม พ.ศ.2563 โดยเก็บมาเพื่อใช้คัดแยกหาเชื้อราที่มีการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส บนอาหารแข็ง Semi-synthetic medium (SS) (Danmek et al., 2014) ที่มีส่วนประกอบของแหล่งอาหารที่สำคัญ คือ CMC (1.0 %w/v) yeast extract (0.1 %w/v) Peptone (0.2 %w/v) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.2 %w/v) CaCl<sub>2</sub> (0.01 %w/v) MgSO<sub>4</sub> (0.05 %w/v) MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (0.005 %w/v) FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0.005 %w/v) ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0.005 %w/v) และ Agar (2.0 %w/v) ทำการแยกเชื้อโดยใช้วิธี Spread plate technique และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 วัน เมื่อเชื้อราเจริญทำการคัดแยกลงในอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) เพื่อแยกให้ได้เชื้อราที่บริสุทธิ์ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาบนอาหารแข็งตามวิธีการของ (Danmek et al., 2014; Klich, 2002; Klich, 2007) โดยศึกษาลักษณะต่าง ๆ เช่น ขนาดของโคโลนี สีของโคโลนี สีของสปอร์ ลักษณะของ conidia ขนาดของ sclerotia และสีด้านหลังของโคโลนี เป็นต้น

### 2.2 การผลิตหัวเชื้อแบบเหลวที่มีเอนไซม์ย่อยเยื่อใยพืช

การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสทำได้โดยการนำสารละลายสปอร์ของเชื้อราที่คัดแยกได้ 1.0 มิลลิลิตร (10<sup>5</sup> spore/ml) ใส่ลงในอาหารเหลวสูตร SS medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร (Danmek et al., 2014) ที่ใส่แหล่งคาร์บอนเป็นกระดาษกรอง Whatman No.1 (2.0% w/v) ปรับค่า pH 5.5-6.0 บ่ม และเขย่าเชื้อราด้วยความเร็ว 80 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปวัดแอกติวิตีเพื่อคัดเลือกหาเชื้อราที่มีการผลิตเอนไซม์ดีที่สุดสำหรับนำไปใช้หมักต้นข้าวโพดแห้ง

### 2.3 การวัดแอกติวิตีของเอนไซม์

นำหัวเชื้อแบบเหลวที่มีเอนไซม์เซลลูเลสไปทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายโครงสร้างเซลลูโลส โดยการวัดค่าแอกติวิตีของเซลลูเลสด้วยสารละลาย 3,5-Dinitrosalicylic acid (DNS) (Miller, 1959) โดยใส่สารละลายเอนไซม์ที่จะใช้วัดแอกติวิตีปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติมสับเสตรที่จำเพาะต่อเอนไซม์แต่ละชนิดที่ละลายใน 50 mM sodium citrate buffer pH 5.0 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ดังนี้ คือ เอกโซกลูคาเนส (exoglucanase) ใช้ avicel<sup>®</sup> 1.0%(w/v) เอนโดกลูคาเนส (endoglucanase) ใช้ carboxy methyl cellulose (CMC) 2.0%(w/v) (Ghose, 1987) เบตาไกลูโคซิเดส ( $\beta$ -glucosidase) ใช้ salicin 4 mg/ml (Sternberg et al., 1976) และไซแลนเนส (xylanase) ใช้ xylan 1.0%(w/v) (Ghose and Bisaria, 1987) ตามลำดับ ทั้งหมดถูกนำไปป้อนทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 นาที เพื่อให้เอนไซม์ย่อยสลายสับเสตรที่เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ และวัดน้ำตาลที่เกิดขึ้นด้วยการเติมสารละลาย DNS 3.0 มิลลิลิตร ร่วมกับการเร่งปฏิกิริยาโดยการนำไปต้มในน้ำเดือด 10 นาที จากนั้นเติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาค่าแอกติวิตีของเอนไซม์ กำหนดให้ 1 ยูนิต ของเอนไซม์ หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายสับเสตรให้เป็นน้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครโมล ภายใน 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ใช้ทดสอบ

### 2.4 การหมักต้นข้าวโพดแห้งด้วยเชื้อจุลินทรีย์

นำต้นข้าวโพดแห้งมาสับให้มีขนาดใกล้เคียงกันด้วยเครื่องมือเชิงกลที่ใช้สำหรับหั่นพืช ปรับความชื้นของ ต้นข้าวโพดแห้ง โดยการเติมน้ำสะอาดให้มีความชื้น 70 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นจึงนำมาหมักโดยนำต้นข้าวโพดแห้งที่ปรับความชื้นแล้ว 10 กิโลกรัม มาใส่ในถุงพลาสติกชนิด High Density Polyethylene (HDPE) ขนาดบรรจุ 25 กิโลกรัม ซึ่งจะมีการเติมจุลินทรีย์ที่แตกต่างกันในอัตราส่วน 0.2 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักต้นข้าวโพดแห้ง โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Complete Randomized Design, CRD) ประกอบด้วย 4 สิ่งทดลอง ๆ ละ 4 ซ้ำ ดังต่อไปนี้ คือ สิ่งทดลองที่ 1 ชุดควบคุม (control) ใส่ น้ำกลั่นที่ไม่มีจุลินทรีย์ (TO) สิ่งทดลองที่ 2 เติมสารละลายจุลินทรีย์ที่ผลิตแลคติกชนิด *L. plantarum* ( $10^6$  spore/ml) ปริมาตร 20 ml (T1) สิ่งทดลองที่ 3 เติมหัวเชื้อจุลินทรีย์เหลวที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ปริมาตร 20 มิลลิลิตร (T2) และสิ่งทดลองที่ 4 เติมหัวเชื้อจุลินทรีย์เหลวที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสชนิด *T. viride* UP15 ร่วมกับสารละลายจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลคติกชนิด *L. plantarum* ในอัตราส่วน 1:1 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร (T3) ผสมสารละลายจุลินทรีย์ให้เข้ากันดีกับต้นข้าวโพดแห้งสับ นำไปบรรจุในถุงพลาสติก และไล่อากาศออกแล้วปิดถุงให้สนิท หมักในห้องปิดที่อุณหภูมิห้องซึ่งมีค่าเฉลี่ย 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน ตามแนวทางการหมักพืชอาหารสัตว์กรมปศุสัตว์

### 2.5 การศึกษาคุณค่าทางโภชนะของอาหารหมัก

การตรวจสอบลักษณะทางกายภาพ และคุณค่าทางโภชนะของอาหารหมัก โดยสุ่มตัวอย่างที่ศึกษาเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกนำมาอบให้แห้งจนน้ำหนักคงที่ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เพื่อนำมาศึกษาคุณค่าทางโภชนะต่าง ๆ ตามวิธีของกรมปศุสัตว์ (Department of livestock development, 2004) และการวิเคราะห์ Proximate analysis (AOAC, 2016) ได้แก่ ค่าวัตถุแห้ง (Dry matter; DM) โปรตีน (Crude protein; CP) ไขมัน (Crude fat; EE) เยื่อใย (Crude fiber; CF) เถ้า (Ash) คาร์โบไฮเดรตที่ย่อยได้ง่าย (Nitrogen free extract; NFE) การย่อยได้ของวัตถุแห้ง (*In vitro* dry matter digestibility: IVDMD) และการย่อยได้ของส่วนประกอบของผนังเซลล์ (*In vitro* neutral detergent fiber digestibility; IVNDFD) ด้วยวิธีการของ Ankom Technology (2017) ส่วนการวิเคราะห์เยื่อใยใช้วิธี Detergent analysis (Soest et al., 1991) เพื่อวิเคราะห์ผนังเซลล์ (Neutral detergent fiber; NDF) ลิกโนเซลลูโลส (Acid detergent fiber; ADF) และลิกนิน (Acid detergent lignin; ADL) ในขณะที่อาหารหมักส่วนที่สองใส่ในถุงพลาสติกชนิดเย็นรีดอากาศออกให้มากที่สุดจากนั้นแช่น้ำแข็งเพื่อหยุดปฏิกิริยาการหมัก และนำไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดอินทรีย์ ได้แก่ กรดแลคติก กรดอะซิติก กรดบิวทริก และค่า pH ตามวิธีของ Bal et al. (1998) อ้างโดย สมสุข (2544) ศูนย์วิจัยและพัฒนาอาหารสัตว์นครราชสีมา

### 2.6 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การทดลองใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely randomized design, CRD) เปรียบเทียบโภชนะของต้นข้าวโพดแห้งก่อนและหลังการหมัก โดยนำค่าเฉลี่ยของผลการทดสอบมาวิเคราะห์ความแปรปรวนโดยใช้ Analysis of variance (ANOVA) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มโดยวิธี Duncan's new multiple rang test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป (SPSS ver.19) (Steel and torrie, 1990)

ผลการศึกษา

3.1 การคัดแยกเชื้อรา

การคัดแยกเชื้อราจากดินบริเวณแปลงข้าวโพดเลี้ยงสัตว์โดยใช้อาหาร SS medium ที่มีคาร์บอนที่เป็นเซลลูโลส คือ CMC พบเชื้อราที่สามารถเจริญบนอาหารทั้งหมด 39 ไอโซเลท (Figure 1) นำเชื้อราที่คัดเลือกมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่า เป็นเชื้อรา *Aspergillus* section *Flavi* ชนิด *A. flavus* 3 ไอโซเลท Figure 1 (1.1-1.3) และ *A. parasiticus* 1 ไอโซเลท Figure 1 (1.4) เชื้อรา *Aspergillus* section *Nigri* 7 ไอโซเลท Figure 1 (1.5-1.11) เชื้อรา *Aspergillus* section *Terrei* ชนิด *A. terreus* 1 ไอโซเลท Figure 1 (1.12) และ *A. melleus* 1 ไอโซเลท Figure 1 (1.13) เชื้อรา *Trichoderma* spp. 6 ไอโซเลท Figure 1 (1.14-1.19) เชื้อรา *Fusarium* spp. 6 ไอโซเลท Figure 1 (1.20-1.27) เชื้อรา *Neurospora* spp. 2 ไอโซเลท Figure 1 (1.28-1.29) เชื้อรา *Penicillium* spp. 5 ไอโซเลท Figure 1 (1.30-1.34) เชื้อรา *Rhizopus* spp. 4 ไอโซเลท Figure 1 (1.35-1.38) และเชื้อรา *Chaetomium* spp. 1 ไอโซเลท Figure 1 (1.39) โดยเชื้อราในกลุ่ม (Genus) ที่พบมากที่สุด คือ *Aspergillus* spp. เฉลี่ย 33.33 % รองลงมา คือ *Fusarium* spp. เฉลี่ย 20.51 % *Trichoderma* spp. เฉลี่ย 15.38 เปอร์เซ็นต์ *Penicillium* spp. เฉลี่ย 12.82 เปอร์เซ็นต์ *Rhizopus* spp. เฉลี่ย 10.25 เปอร์เซ็นต์ *Neurospora* spp. เฉลี่ย 5.12 เปอร์เซ็นต์ และ *Chaetomium* spp. เฉลี่ย 2.56 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Table 1)

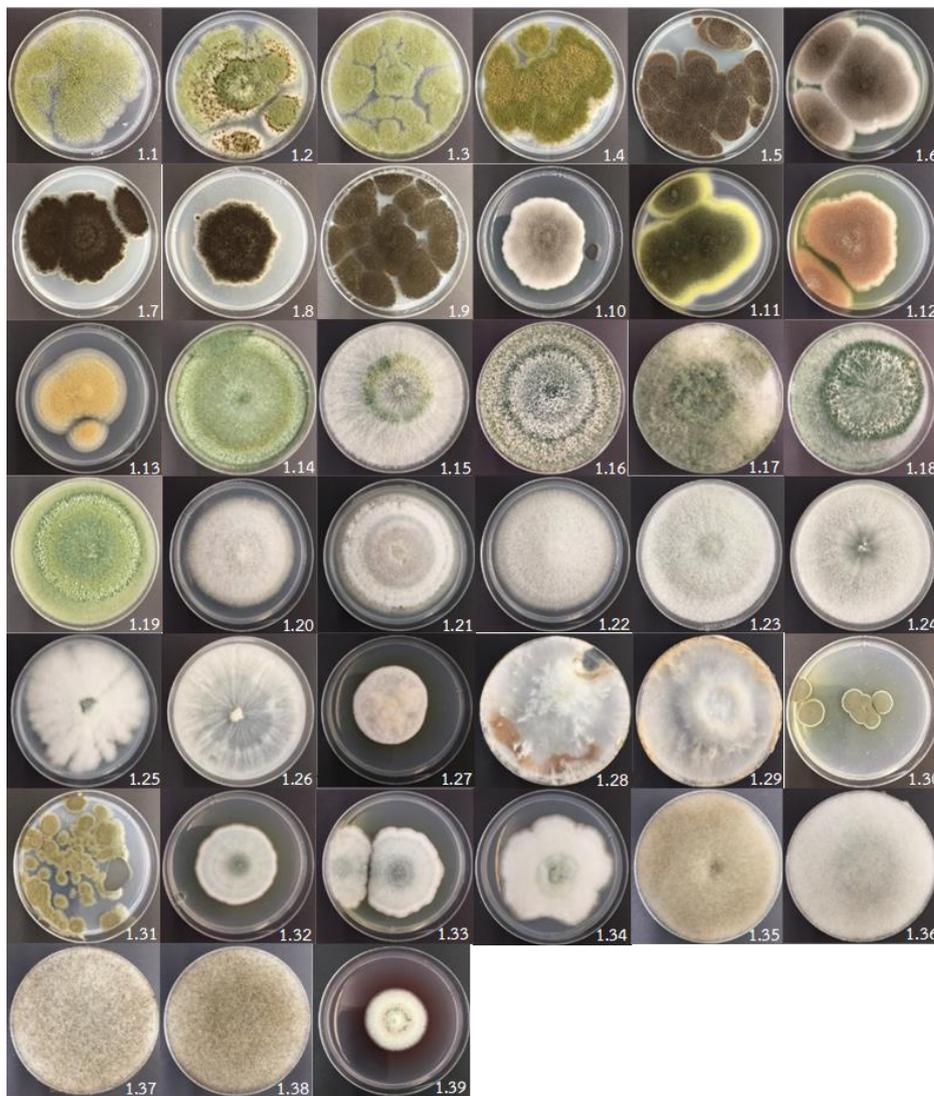


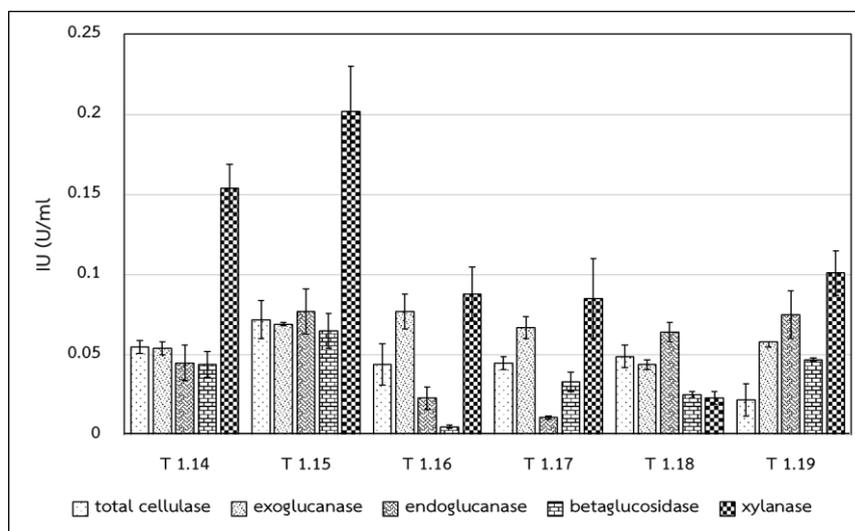
Figure 1 Isolated fungi from maize field in Phayao province on SS medium at 30°C for 7 days

**Table 1** Occurrence (%) of isolated fungi from maize field in Phayao province

Fungi	Occurrence (%)
<i>Aspergillus</i> spp.	33.33
<i>Fusarium</i> spp.	20.51
<i>Trichoderma</i> spp.	15.38
<i>Penicillium</i> spp.	12.82
<i>Rhizopus</i> spp.	10.25
<i>Neurospora</i> spp.	5.12
<i>Chaetomium</i> spp.	2.56

### 3.2 การผลิตหัวเชื้อแบบเหลวที่มีเอนไซม์ย่อยเยื่อใยพืช

เชื้อรา *Trichoderma* spp. ซึ่งเป็นเชื้อราที่มีจุดเด่นในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ไซแลนเนส และไม่เป็นเชื้อราที่ก่อโรคจำนวน 6 สายพันธุ์ (Figure 1.14-1.19) ที่เจริญได้ดี และมีขนาดโคโลนีมากกว่า 6 เซนติเมตร บนอาหารแข็ง SS medium เมื่อป้อนที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน ได้ถูกนำมาทดสอบประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ในอาหารเหลวสูตร SS medium พบว่าเชื้อราส่วนมากมีการผลิตเอนไซม์ทั้งเซลลูเลส และไซแลนเนส โดยเชื้อรา *Trichoderma* spp. UP15 Figure 1 (1.15) มีค่าแอกติวิตีของเอนไซม์สูงสุด ดังนี้ คือ เซลลูเลสรวม เอกโซกลูคาเนส เอนโดกลูคาเนส เบตาไกลูโคซิเดส และไซแลนเนส เท่ากับ  $0.072 \pm 0.012$   $0.069 \pm 0.001$   $0.077 \pm 0.014$   $0.065 \pm 0.011$  และ  $0.202 \pm 0.028$  U/ml ตามลำดับ (Figure 2) เมื่อทำการศึกษาลักษณะสัณฐานทางวิทยาของเชื้อรา *Trichoderma* spp. UP15 พบว่า เส้นใยสีขาว สปอร์เขียว เป็นเชื้อราที่เส้นใยมีผนังกัน (septate hypha) เส้นใยแตกกิ่งก้านสาขาออกหลายแขนง มีก้านชูสปอร์ (conidiophores) บริเวณตรงปลายแบ่งเป็นสามแฉก หรือสามง่าม มีการสร้างสปอร์ (conidia) รูปร่างกลม สีเขียว ซึ่งเป็นลักษณะเด่นของเชื้อรา *T. viride* UP15 (Figure 3)



**Figure 2** Cellulase and xylanase activities (IU) derived from *Trichoderma* spp. T14-T19

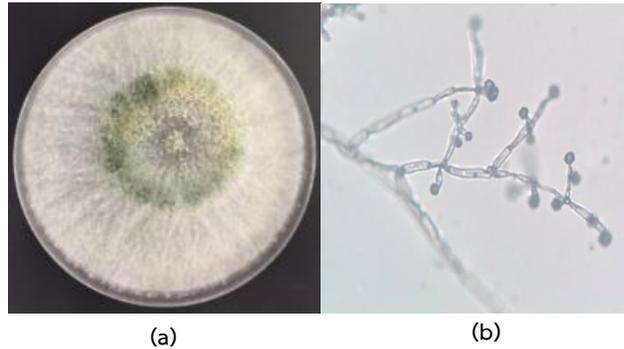


Figure 3 *Trichoderma viride* UPLS15 on SS medium at 30°C for 7 days (a) and under microscope at 40X (b)

### 3.3 การหมักต้นข้าวโพดแห้งด้วยเชื้อจุลินทรีย์

การวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของพืชหมัก (T1 T2 และ T3) ด้วยวิธีการ proximate analysis เทียบกับต้นข้าวโพดแห้งที่ไม่ผ่านการหมัก (T0) แสดงใน Table 2 พบว่า ปริมาณวัตถุดิบแห้ง ไขมัน และเถ้าของทุกสิ่งทดลองที่มีการเติมจุลินทรีย์ (T1 T2 และ T3) ให้ผลการทดลองไม่แตกต่าง ( $P \geq 0.05$ ) กับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมจุลินทรีย์ (T0) แต่ต้นข้าวโพดแห้งหมักที่มีการเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์ *T. viride* UP15 แบบเหลวที่มีเอนไซม์เซลลูเลส (T2) มีค่า NDF ADF และ ADL เท่ากับ 72.18 40.46 และ 6.98 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) แสดงว่าเส้นใยของพืชหมักถูกย่อยด้วยจุลินทรีย์ และเอนไซม์สอดคล้องกับสิ่งทดลองที่มีการเติมหัวเชื้อ *T. viride* UP15 แบบเหลวที่มีเอนไซม์ย่อยเยื่อใยพืชร่วมกับจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลคติก *L. plantarum* (T3) ซึ่งทำให้ต้นข้าวโพดแห้งหมักมีค่า NDF ADF และ ADL เท่ากับ 72.73 38.15 และ 6.76 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ อีกทั้งยังมีแนวโน้มของค่าเยื่อใยทุกชนิดต่ำที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสิ่งทดลอง T1 และ T2 และมีค่าแตกต่าง ( $P < 0.05$ ) อย่างมีนัยสำคัญกับชุดควบคุม (T0) อย่างไรก็ตาม ค่าการย่อยได้ของวัตถุดิบ (IVDMD) ในทุกสิ่งทดลองที่เติมหัวเชื้อจุลินทรีย์ (T1 T2 และ T3) มีค่าไม่แตกต่างกันกับชุดควบคุม (T0) แต่ค่าการย่อยได้ของส่วนประกอบของผนังเซลล์ (IVNDFD) ในต้นข้าวโพดแห้งหมักที่มีการเติมหัวเชื้อผสม (T3) มีค่าการย่อยได้เพิ่มขึ้นแตกต่าง ( $P < 0.05$ ) อย่างมีนัยสำคัญกับต้นข้าวโพดแห้งหมักชุดควบคุม (T0) ในขณะที่ค่าโปรตีนมีแนวโน้มสูงขึ้นในต้นข้าวโพดแห้งหมัก ที่เติมจุลินทรีย์ในทุกสิ่งทดลอง (T1 T2 และ T3) โดยต้นข้าวโพดแห้งหมักที่เติมหัวเชื้อจุลินทรีย์ *T. viride* UP15 อย่างเดียว (T2) และ ที่เติมแบบผสม (T3) พบว่า มีค่าโปรตีนเพิ่มขึ้น เท่ากับ 6.34 และ 6.46 เปอร์เซ็นต์

การวิเคราะห์กรดไขมันที่ระเหยง่ายชนิดกรดบิวทริกที่มีในต้นข้าวโพดแห้งหมักที่มีการเติมหัวเชื้อผสม (T3) มีค่าต่ำกว่าการทดลองอื่น ๆ ( $P < 0.05$ ) แต่มีกรดไขมันที่ระเหยได้ชนิดกรดแลคติกมีปริมาณสูงที่สุด คือ 1.52 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ค่า pH ต้นข้าวโพดแห้งก่อนหมักเท่ากับ 6.57 ลดลงเป็น 4.84 แตกต่างจากชุดควบคุม (T0) รวมไปถึงการทดลองอื่น ๆ ( $P < 0.05$ ) ซึ่งเป็นผลมาจากปริมาณกรดแลคติก (pKa 3.86) และกรดอะซีติก (pKa 4.75) ที่เกิดขึ้นอันเป็นผลมาจากเชื้อรา *T. viride* UP15 และเอนไซม์เซลลูเลสย่อยโครงสร้างของต้นข้าวโพดแห้งได้เป็นคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำเป็นอาหารแก่จุลินทรีย์ในธรรมชาติซึ่งติดมากับต้นข้าวโพดแห้งซึ่งเป็นที่ตั้งจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลคติกชนิดเดียว (homofermentative lactic acid bacteria) และจุลินทรีย์ที่ผลิตทั้งกรดแลคติก และอะซีติก (heterofermentative lactic acid bacteria)

**Table 2** Chemical compositions of maize plant ensiled with microbial inoculums at 30°C for 21 days

Composition (%) <sup>1/</sup>	Inoculum Treatments <sup>2/</sup>			
	T0	T1	T2	T3
Dry matter (DM) %	75.06±4.69 <sup>a</sup>	76.22±3.66 <sup>a</sup>	73.78±1.68 <sup>a</sup>	74.85±5.72 <sup>a</sup>
CP %	5.22±0.23 <sup>b</sup>	5.86±0.42 <sup>ab</sup>	6.34±0.38 <sup>a</sup>	6.46±0.21 <sup>a</sup>
EE %	0.97±0.25 <sup>a</sup>	1.01±0.10 <sup>a</sup>	0.85±0.11 <sup>a</sup>	0.91±0.09 <sup>a</sup>
CF %	39.87±2.32 <sup>a</sup>	40.57±0.72 <sup>a</sup>	40.69±2.15 <sup>a</sup>	40.22±1.15 <sup>a</sup>
Ash %	9.25±0.33 <sup>a</sup>	8.95±0.70 <sup>a</sup>	9.15±0.58 <sup>a</sup>	9.06±0.55 <sup>a</sup>
NDF %	74.5±0.73 <sup>a</sup>	74.04±0.90 <sup>ab</sup>	72.18±0.98 <sup>b</sup>	72.73±0.86 <sup>b</sup>
ADF %	42.38±1.05 <sup>a</sup>	41.84±0.77 <sup>ab</sup>	40.46±0.66 <sup>b</sup>	38.15±0.86 <sup>c</sup>
ADL %	7.51±0.23 <sup>a</sup>	6.96±0.40 <sup>b</sup>	6.98±0.30 <sup>b</sup>	6.76±0.35 <sup>b</sup>
IVNDFD %	37.02±0.65 <sup>b</sup>	38.63±0.81 <sup>ab</sup>	38.58±1.10 <sup>ab</sup>	39.59±1.45 <sup>a</sup>
IVDMD %	54.55±0.99 <sup>a</sup>	54.68±1.08 <sup>a</sup>	54.75±1.37 <sup>a</sup>	55.55±0.55 <sup>a</sup>
pH	5.36±0.11 <sup>a</sup>	5.30±0.11 <sup>a</sup>	5.30±0.12 <sup>a</sup>	4.84±0.13 <sup>b</sup>
Lactic acid	0.94±0.23 <sup>b</sup>	1.18±0.15 <sup>b</sup>	0.93±0.11 <sup>b</sup>	1.52±0.09 <sup>a</sup>
Acetic acid	1.52±0.10 <sup>b</sup>	1.84±0.20 <sup>ab</sup>	1.98±0.10 <sup>a</sup>	1.64±0.08 <sup>b</sup>
Butyric acid	0.96±0.14 <sup>b</sup>	1.26±0.06 <sup>a</sup>	1.43±0.22 <sup>a</sup>	0.88±0.04 <sup>b</sup>
Yeast/Mold (log <sub>10</sub> CFU/g silage)	3.44±0.35 <sup>b</sup>	3.90±0.42 <sup>ab</sup>	4.60±0.20 <sup>a</sup>	4.22±0.63 <sup>ab</sup>
Bacteria (log <sub>10</sub> CFU/g silage)	3.64±0.21 <sup>b</sup>	4.29±0.21 <sup>a</sup>	4.18±0.08 <sup>a</sup>	4.33±0.30 <sup>a</sup>

<sup>1/</sup>DM = dry matter; CP = crude protein; EE = crude fat; CF = crude fiber; ash; NDF = neutral detergent fiber; ADF = acid detergent fiber; ADL = acid detergent lignin; IVNDFD = In vitro neutral detergent fiber digestibility; IVDMD = In vitro dry matter digestibility

<sup>2/</sup>T0 = control; T1 = culture of *L. Plantarum*; T2 = culture of *T. viride* UP15; T3 = culture of *L. plantarum* and *T. viride* UP15. (1:1)

## วิจารณ์

การคัดแยกเชื้อราในดินจากแปลงข้าวโพดเลี้ยงสัตว์พบเชื้อราที่สามารถเจริญบนอาหารที่มีเซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอนทั้งหมด 39 ไอโซเลท การจำแนกโดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น ขนาดของโคโลนี สีของโคโลนี สีของสปอร์ ลักษณะของ conidia ขนาดของ sclerotia และสีด้านหลังของโคโลนี ตามวิธีการของ (กวินทรา และคณะ, 2558; Danmek et al., 2014; Klich, 2002; Klich, 2007) ทำให้สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม ดังนี้ คือ กลุ่มแรกเป็นเชื้อราที่เส้นใยไม่มีผนังกัน สีขาว พูกระจายแบบโปร่งมีก้านชูสปอร์ ซึ่งมีสปอร์สีน้ำตาลจนถึงดำจำแนกเป็น *Rhizopus* spp. ในขณะที่ชนิดอื่น ๆ ที่แยกได้เป็นเชื้อราในกลุ่มที่เส้นใยมีผนังกัน ซึ่งอันดับสูงกว่า ได้แก่ เชื้อราในกลุ่ม *Aspergillus* spp. จะมีสปอร์เป็นทรงกลมอัดกันแน่นเป็นรูปแท่งบนก้านชูสปอร์ (conidiophore) ที่มีการขยายออก และมีสปอร์เรียงกันอยู่ซึ่งเชื้อรา *Aspergillus* spp. ที่มีสปอร์สีเขียวจะถูกจัดอยู่ในกลุ่ม *Aspergillus* section *Flavi* (กวินทราและคณะ, 2558) สปอร์มีสีดำอยู่ในกลุ่ม *Aspergillus* section *Nigri* และสปอร์มีสีน้ำตาลอยู่ในกลุ่ม *Aspergillus* section *Terrei* (Danmek et al., 2014) เป็นต้น เชื้อรา *Trichoderma* spp. และ *Penicillium* spp. มีสปอร์เหลืองจนถึงสีเขียวคล้ายเชื้อรา *Aspergillus* section *Flavi* แต่มีความแตกต่างกัน คือ *Trichoderma* spp. มีก้านชูสปอร์ที่บริเวณตรงปลายยอดจะแตกแขนงเป็นสามแฉก หรือสามง่าม และมีสปอร์รูปร่างกลมติดอยู่ที่ปลายก้านชูสปอร์ ในขณะที่ *Penicillium* spp. มีลักษณะเด่นของโคโลนี คือ โคโลนีสีเขียวจนถึงเขียวอมเทา ปลายขอบโคโลนีจะมีขอบสีขาว และบางชนิดจะสร้างเม็ดสีที่ได้โคโลนีซึ่งส่วนมากเป็นสีเหลืองจนถึงแดง ที่ก้านชูสปอร์ไม่มีการขยายเหมือน *Aspergillus* spp. แต่จะมีการสร้าง Phialide ปลายแหลมคล้ายเข็มหลายอันที่ด้านปลาย มีสปอร์เรียงกันอยู่เป็นเส้นในขณะที่เชื้อรา *Fusarium* spp. และ *Neurospora* spp. จะมีลักษณะคล้ายกัน คือ เส้นใยสีขาวฟู และสปอร์สีส้มแดงแต่มี

ความแตกต่างกัน คือ *Fusarium* spp. จะมีสปอร์เป็นรูปจันทร์เสี้ยว ในขณะที่ *Neurospora* spp. สปอร์เป็นรูปไข่เรียงเป็นเส้นที่ปลายเส้นใย (Barnet and Hunter, 2006) โดยเชื้อราที่พบสูงสุด คือ เชื้อราในกลุ่ม *Aspergillus* spp. และ *Fusarium* spp. ซึ่งเป็นชนิดที่พบได้ในแปลงเกษตรกรรมทั่วไปแต่จะมีความถี่สูงในแปลงข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ (กวินทรา และคณะ, 2558) ในขณะที่เชื้อรา *Trichoderma* spp. เป็นเชื้อราที่มีความสำคัญในกระบวนการย่อยสลายซากพืชเนื่องจากมีเอนไซม์ย่อยเยื่อใยพืชซึ่งสามารถพบได้ทั่วไปจากแหล่งธรรมชาติบนวัตถุที่มีลิกโนเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบ (พิมพ์ชนา และคณะ, 2559; Thana et al., 2019) การศึกษาประสิทธิภาพของการผลิตเอนไซม์ย่อยเยื่อใยพืชจากเชื้อราทั้งหมดที่คัดแยกได้พบว่า เชื้อรา *T. viride* UP15 มีการผลิตทั้งเซลลูเลส และไซแลนเนส และให้ค่า แอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุดแตกต่าง จากเชื้อรา *Trichoderma* spp. ชนิดอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) (Figure 2) เมื่อตรวจสอบในเอกสารรายงานวิจัยพบว่า เชื้อราชนิดนี้พบได้ในพืชอาหารสัตว์ และสามารถนำไปใช้หมักต้นข้าวโพดเพื่อให้มีโภชนะสูงขึ้นได้ (Thana et al., 2019)

การวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนะของพืชหมักด้วยเชื้อรา *T. viride* UP15 แบบเหลวที่ผลิตเอนไซม์ย่อยเยื่อใยพืชร่วมกับจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลคติกเปรียบเทียบกับต้นข้าวโพดแห้งที่หมักแบบไม่เติมจุลินทรีย์พบว่า ปริมาณวัตถุแห้ง ไขมัน และเถ้าของต้นข้าวโพดแห้งหมักที่มีการเติมจุลินทรีย์ (T1 T2 และ T3) ให้ผลการทดลองไม่แตกต่างจากชุดควบคุม (T0) แต่จะมีแนวโน้มของค่า NDF ADF และ ADL ลดลง แสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์และเอนไซม์ที่ใส่ลงไปมีส่วนช่วยย่อยสลายโครงสร้างของพืชได้คาร์โบไฮเดรตละลายน้ำออกมาเป็นอาหารให้จุลินทรีย์ที่ติดมากับพืชหมักโดยเฉพาะยีสต์ และจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลคติกเจริญเติบโตมากขึ้น ส่งผลให้มีเกิดการหมักจึงส่งผลให้ต้นข้าวโพดแห้งหมักที่เติมจุลินทรีย์มีเยื่อใยพืชลดลง และมีโภชนะเพิ่มขึ้นจากโปรตีนเซลล์ของจุลินทรีย์มากกว่าข้าวโพดแห้งหมักที่ไม่ใส่จุลินทรีย์สอดคล้องกับงานวิจัยของ Thana et al. (2019) ซึ่งมีการใช้จุลินทรีย์ที่มีการผลิตเอนไซม์ย่อยเยื่อใยพืชปรับโภชนะพืชอาหารสัตว์ แต่มีความแตกต่างกัน คือ งานวิจัยนี้เป็นการพัฒนาหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่มีเอนไซม์ย่อยเยื่อใยพืชร่วมกับจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลคติกเพื่อใช้หมักพืชอาหารสัตว์ ซึ่งผลที่ได้พบว่าการใช้จุลินทรีย์ผสม (T3) ทำให้พืชหมักมีโภชนะ และปริมาณกรดอินทรีย์ที่มีประโยชน์ชนิดกรดแลคติกสูงมากกว่าการหมักแบบเดิมที่ไม่เติมจุลินทรีย์ หรือใส่เฉพาะจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลคติก (T1) และจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (T2)

การวิเคราะห์กรดไขมันที่ระเหยง่ายชนิดกรดบิวทีริกที่เกิดขึ้นในต้นข้าวโพดแห้งหมักที่ใส่หัวเชื้อจุลินทรีย์ผสม (T3) มีค่าต่ำกว่าต้นข้าวโพดแห้งชุดควบคุม และมีค่า pH ลดลงเท่ากับ 4.85 เนื่องจากมีจุลินทรีย์และเอนไซม์ช่วยย่อยเยื่อใยพืชได้คาร์โบไฮเดรตละลายน้ำออกมาเป็นอาหารให้จุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลคติกเจริญเติบโตมากขึ้นทำให้มี pH ที่ลดต่ำลง (Hou et al., 2017) ซึ่งเป็นสภาวะเหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ และการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสที่ทำงานได้ดีในช่วง pH 4.0-6.0 จึงทำให้โปรตีนและการย่อยได้ของต้นข้าวโพดแห้งหมักเพิ่มขึ้น (Thana et al., 2019) อีกทั้งเป็นสภาวะที่ทำให้จุลินทรีย์ก่อโรค และจุลินทรีย์กลุ่มย่อยสลายพืชหมักที่ส่วนมากเป็นแบคทีเรียซึ่งเจริญได้ดีที่ pH 7.0 ไม่เจริญ (Muck and Kung, 1997; Tao et al., 2011) แตกต่างจากการหมักพืชอาหารสัตว์แบบเดิมที่เป็นการหมักถนอมอาหารพืชหมักไม่ให้น้ำเสียที่มุ่งเน้นการเจริญของจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลคติก และให้ค่า pH ของพืชต่ำลงต่ำกว่า 4.20 (Kung et al., 2018)

ดังนั้นจึงถือว่ากระบวนการนี้นอกจากช่วยเพิ่มโภชนะของต้นข้าวโพดแห้งหมักแล้วยังเป็นการถนอมอาหารหมักให้เก็บได้นานขึ้นโดยไม่เสียจากการที่มีจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์อยู่ในพืชหมัก (ชัยวัฒน์ และคณะ, 2562; ไอยวริญ และคณะ, 2563) เพราะ ในธรรมชาติแบคทีเรียกลุ่มย่อยสลายโดยเฉพาะ *Clostridium* spp. ที่ปนเปื้อนมากับต้นข้าวโพดแห้งหมักสามารถใช้สารอาหารจากกระบวนการหมักในการเจริญ และผลิตเป็นกรดบิวทีริกออกมาได้ (Khota et al., 2018) ต้นทุนการผลิตต้นข้าวโพดแห้งหมักที่มีการเติมจุลินทรีย์ (T1 T2 และ T3) มีค่าเฉลี่ยไม่เกิน 150 บาทต่อลิตร ซึ่งมีราคาต่ำกว่าเอนไซม์ทางการค้าทั่วไปที่มีราคาเฉลี่ยมากกว่า 500 บาทต่อลิตร เมื่อนำหัวเชื้อ และเอนไซม์ที่ผลิตเองใช้หมักในอัตราส่วน 0.2 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักต้นข้าวโพดแห้ง จะมีต้นทุนเพิ่มขึ้นเท่ากับ 0.30 บาทต่อการหมักต้นข้าวโพดแห้ง 1 กิโลกรัม ต้นทุนเท่ากับการหมักพืชอาหารสัตว์โดยใช้กากน้ำตาล 2.0 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักพืช ซึ่งจะมีต้นทุนหญ้าหมักเพิ่มขึ้นเท่ากับ 0.30 บาท/กิโลกรัม และต่ำกว่าการใช้น้ำตาลกลูโคส 2.0 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักพืช ซึ่งจะมีต้นทุนหญ้าหมักเพิ่มขึ้น 1.0 บาท/กิโลกรัม ตามลำดับ (ทิพาพร และคณะ, 2559) แต่มีการย่อยได้ของวัตถุดิบเพิ่มขึ้นอันเนื่องมาจากการทำงานของเอนไซม์ซึ่งแตกต่างจากการหมักถนอมพืชอาหารสัตว์แบบเดิม (กรมปศุสัตว์, 2547) อย่างไรก็ตามผลการหมักต้นข้าวโพดแห้งด้วยหัว

เชื้อจุลินทรีย์ผสมยังให้ค่าโปรตีนเพิ่มขึ้นค่อนข้างต่ำอาจเป็นเพราะความเข้มข้นของจุลินทรีย์ และเอนไซม์ไม่เหมาะสม โดย Thana et al. (2019) ได้อธิบายว่าปริมาณ และชนิดของหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ย่อยเยื่อใยพืชมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดปริมาณโปรตีนที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมักพืชอาหารสัตว์ทั้งในด้านปริมาณ และคุณภาพ ดังนั้นวิธีดังกล่าวนี้จึงถือได้ว่าเป็นการพัฒนา รูปแบบการหมักที่มีการใส่หัวเชื้อจุลินทรีย์ผสม *T. viride* UP15 แบบเหลวพร้อมใช้ที่มีเอนไซม์ย่อยเยื่อใยพืช (เซลลูเลส และ ไซแลนเนส) ร่วมกับจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลคติกเพื่อนำไปใช้เพิ่มประสิทธิภาพการหมักพืชอาหารสัตว์ให้ดีขึ้นกว่าการหมักพืชอาหารสัตว์แบบดั้งเดิมที่ไม่ใส่หัวเชื้อจุลินทรีย์ และการใช้จุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลคติก (กรมปศุสัตว์, 2547) การใช้เอนไซม์ทางการค้าซึ่งมีต้นทุนสูง และการใส่เฉพาะจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ย่อยเยื่อใยพืช (Thana et al., 2019)

## สรุป

การคัดแยกเชื้อราจากแปลงข้าวโพดเลี้ยงสัตว์สามารถแยกเชื้อราได้ทั้งหมด 39 ไอโซเลท ซึ่งเชื้อรา *T. viride* UP15 มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์ย่อยเยื่อใยพืชสูงสุด เมื่อนำ *T. viride* UP15 มาผลิตเป็นหัวเชื้อแบบเหลวที่มีเอนไซม์ร่วมกับจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลคติกเพื่อใช้หมักต้นข้าวโพดแห้งเลี้ยงสัตว์พบว่า สามารถช่วยเพิ่มโภชนะโดยเฉพาะโปรตีน การย่อยได้ และกรดอินทรีย์ที่มีประโยชน์โดยเฉพาะกรดแลคติก ผลที่ได้นี้จะนำไปสู่การพัฒนาหัวเชื้อหมักพืชอาหารสัตว์ซึ่งเป็นจุลินทรีย์กรดแลคติกผสมเอนไซม์ย่อยเยื่อใยพืชสำหรับใช้ในการหมักเพิ่มโภชนะของพืชอาหารสัตว์ และผลผลิตทางการเกษตรอื่น ๆ สำหรับผลิตเป็นอาหารสัตว์คุณภาพสูงได้

## คำขอขอบคุณ

งานวิจัยนี้ดำเนินการอย่างสมบูรณ์ได้ด้วยความร่วมมือทางวิชาการระหว่างมหาวิทยาลัยพะเยา และสำนักพัฒนา อาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์ และทุนสนับสนุนจากโครงการการจัดการความรู้การวิจัยเพื่อการใช้ประโยชน์ในมิติเชิงชุมชน สังคม ตามแนวพระราชดำริ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ปีงบประมาณ พ.ศ.2564

## เอกสารอ้างอิง

- กรมปศุสัตว์. 2547. มาตรฐานพืชอาหารสัตว์หมัก. กองอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด. กรุงเทพฯ.
- กวินทรา แข่งขัน, ทศวรรต อะโนราช, พยุงศักดิ์ อินตะวิธา, สมชาติ ธนะ, โชค โสรัจกุล และชรรค์ชัย ต้นเมฆ. 2558. การยับยั้งอะฟลาทอกซิน ปี 1 โดยการใช้สายพันธุ์ไม่ผลิตสารพิษของเชื้อรา *Aspergillus flavus*. วารสารเกษตร. 31(1): 47-57.
- จินดา สนิทวงศ์ ณ ออยุธยา. 2539. ข้าวโพดและเศษเหลือจากข้าวโพดเป็นอาหารสัตว์. รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2539. กองอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์. กรุงเทพฯ.
- ชัยวัฒน์ สิงห์ชัย, ชัยณรงค์ วงศ์สรรศรี, สมชาติ ธนะ, โชค โสรัจกุล และชรรค์ชัย ต้นเมฆ. 2562. ผลของการใช้ฟักทองหมักร่วมกับรำข้าวในอาหารต่อประสิทธิภาพการผลิตและคุณภาพของเนื้อไก่พื้นเมือง. วารสารวิจัยและส่งเสริมวิชาการเกษตร. 36(2): 45-57.
- ทิพาพร ชาญปรีชา, พรพรรณ แสนภูมิ, จันทร์จิรา สิทธิยะ และสุภาวดี ฉิมทอง. 2559. ผลของชนิดหญ้าต่อคุณภาพน้ำหมัก. แก่นเกษตรฉบับพิเศษ. 44(1): 19-24.
- พิมพ์ชนา วงศ์พิศาล, พรศิลป์ สีเผือก, ชัยสิทธิ์ ปรีชา และวุฒิชัย สีเผือก. 2559. การคัดเลือกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนส จากซากใบปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis* Jacq.). แก่นเกษตรฉบับพิเศษ. 44(1): 948-952.
- สมสุข พวงดี. 2544. การผลิตหัวเชื้อหมักคุณภาพสูง: การประเมินคุณค่าโภชนะและความต้องการ พลังงานและโปรตีนของโครีดนมลูกผสมขาวดำ. วิทยานิพนธ์ ปริญญาวิทยาศาสตร มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. เชียงใหม่.
- สีอุดม ลั่งสุมีไชย, ไกรสิทธิ์ วสุเพ็ญ, เฉลิมพล เยื้องกลาง, เบญญา แสนมหาชัย และเสมอใจ บุรินอก. 2560. ผลของการเสริมเอนไซม์ไซแลนเนสและเซลลูเลสจากกากมะเขือเทศแห้งที่ หมักโดย *Aspergillus niger* ที่ระดับต่างๆต่อคุณภาพการหมักและคุณค่าทาง

- โภชนะของหญ้าเนเปียร์ปากช่อง 1 หมัก. แก่นเกษตรฉบับพิเศษ. 45(1): 729-734.
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2564. ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์. แหล่งข้อมูล : <http://www.oae.go.th/assets/portals/1/fileups/prcaidata/files/maize%20province%2062.pdf>. ค้นเมื่อ 21 มกราคม 2564.
- ไอยวริณ ใจคำ, ชัยณรงค์ วงศ์สรรศรี, โชค โสรังกุล และชรรค์ชัย ตันเมฆ. 2563. การประยุกต์ใช้ เชื้อรา *Aspergillus terreus* C411 ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสหมักเพิ่มโภชนะของฟักทองเพื่อใช้เป็นอาหารไก่กระดุกดำปาปาซุง. น. 404-413. ใน: ประชุมวิชาการและนวัตกรรมสร้างสรรค์ CRCI ครั้งที่ 6 2-3 กันยายน 2563. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา, เชียงใหม่.
- Adesogan, A.T., N. Krueger, M. B. Salawu, D. B. Dean, and C.R. Staples. 2004. The influence of treatment with dual purpose bacterial inoculants or soluble carbohydrates on the fermentation and aerobic stability of Bermuda grass. *Journal of Dairy Science*. 87: 3407-3416.
- ANKOM Technology. 2017. In vitro True Digestibility using the DAISY II Incubator. Available source: [https://www.ankom.com/sites/default/files/documentfiles/Method\\_3\\_Invitro\\_D200\\_D200l.pdf](https://www.ankom.com/sites/default/files/documentfiles/Method_3_Invitro_D200_D200l.pdf). May 10 2019.
- AOAC. 2016. Official Methods of Analysis of AOAC International 20<sup>th</sup> ed. Maryland.
- Bal, M.A., J.R. Coors., and Shaver R.D. 1997. Impact of the maturity of corn for use as silage in the diets of dairy cow on intake, digestion and milk production. *Journal of Dairy Science*. 80: 2497-2503.
- Barnet, H.L., and Hunter, B.B. 2006. Illustrated genera of imperfect fungi. 4<sup>th</sup> ed. The American Phytopathological Society. Minnesota, USA.
- Danmek, K., P. Intawicha, S. Thana, C. Sorachakula, M. Meijer, and R.A. Samson. 2014. Characterization of cellulase producing from *Aspergillus melleus* by solid state fermentation using maize crop residues. *African journal of Microbiology Research*. 8(24): 2397-2404.
- Dean, D. B., A. T. Adesogan, N. K. Krueger, and R. C. Littell. 2005. Effect of fibrolytic enzymes on the fermentation characteristics aerobic stability and digestibility of bermudagrass silage. *Journal of Dairy Science*. 88: 994-103.
- Department of Livestock Development. 2004. Table of Nutritive Values Database of Feed Stuffs. The guidance document. Department of Livestock, Ministry of Agriculture and Cooperatives. Bangkok.
- Ghose, T.K. 1987. Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry*. 59: 257-268.
- Ghose, T.K., and V.S. Bisaria. 1987. Measurement of hemicellulose activities Part 1: Xylanase. *Pure and Applied Chemistry*. 59(2): 1739-1752.
- Hou, M., G. Gentu, T. Liu, Y. Jia, Y. Cai. 2017. Silage preparation and fermentation quality of natural grasses treated with lactic acid bacteria and cellulase in meadow steppe and typical steppe. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 30(6): 788-796.
- Hristov, A.N., T.A. Mc Allister, and K.J. Cheng. 2000. Intra ruminal supplementation with increasing levels of exogenous polysaccharide-degrading enzymes: Effects on nutrient digestion in cattle fed a barley grain diet. *Journal of Animal Science*. 78: 477-487.
- Khota, W., S. Pholsen, D. Higgs, and Y. Cai. 2018. Comparative analysis of silage fermentation and in vitro digestibility of tropical grass prepared with *Acremonium* and *Trichoderma* species producing cellulases. *Journal of Animal Science*. 31: 1913-1922.
- Klich, M. A. 2002. Identification of Common *Aspergillus* species. The Netherlands: Centraalbureau Voor

Schimmelcultures.

- Klich, M.A. 2007. Environmental and developmental factors influencing aflatoxin production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Mycoscience* 48: 71-80.
- Kung, J.R., L. Shaver, R.D. Grant, and R.J. Schmltd. 2018. Silage review: interpretation of chemical, microbial, and organoleptic components of silages. *Journal of Dairy Science*. 101: 4020-4033.
- Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. 31: 426-428.
- Morgavi, D.P., K.A. Beauchemin, V.L. Nsereko, L.M. Rode, A.D. Iwaasa, W.Z. Yang, T.A. McAllister, and Y. Wang. 2000. Synergy between the ruminal fibrolytic enzymes and enzymes from *Trichoderma longibrachiatum*. *Journal of Dairy Science*. 83: 1310–1321.
- Muck, R.E., and L.J.R. Kung. 1997. Effects of silage additives on ensiling. pp. 187-199. In proceedings from the silage: Field to Feedbunk North American Conference, Hershey, 11-13 February 1997, NRAES-99.
- Newbold, J. 1997. Proposed mechanisms for enzymes as modifiers of ruminal fermentation. pp. 146-159. In proceedings of the 8<sup>th</sup> Annual Florida Ruminant Nutrition Symposium. Gainesville. Florida.
- Nitisinprasert, S., P. Bunyeun, T. Jaieded, R. Chatthong, and A. Jarerat. 2001. Three effective lactic acid bacteria optimizing grass silage fermentation. P.365. In Abstract of Bio-Thailand 2001: From Research to Market. 7 - 10 November, 2001. Queen Sirikit National Convention Center. Bangkok.
- Soest V.P.J., J.B. Robertson, and B.A. Lewis. 1991. Methods for dietary fibre, neutral detergent fibre and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*. 74: 3583–3597.
- Steel, R. G. D., and J. H. Torrie. 1990. Prinsip dan Prosedur Statistik. Suatu Pendekatan Biometrik. Alih Bahasa Ir.B. Soemantri. Ed II. Gramedia Jakarta.
- Sternberg, D. 1976. Beta-glucosidase of *Trichoderma*: its biosynthesis and role in saccharification of cellulose. *Applied and Environmental Microbiology*. 31(5): 648-654.
- Tao, L., Z. Yu., X.S. Guo, and H. Zhou. 2011. Ensiling and *in vitro* digestibility characteristics of *Ceratoides arborescens* treated with lactic acid bacteria inoculants. *African Journal of Biotechnology*. 10(66): 14947-14953.
- Thana, S., T. Tosawat, C. Sorachakula, and K. Danmek. 2019. Nutrition composition of maize silage generated from solid state fermentation by *Trichoderma viride* UP01. *Pakistan Journal of Botany*. 51(6): 2255-2260.