วิทยานิพนธ์

การเตรียมและทดสอบเอนไซม์ย่อยสลายจาก *Bacillus subtilis* GN156 เพื่อปรับปรุงคุณภาพของไซเลจหญ้าเนเปียร์

Preparation and Activity Test of Hydrolytic Enzymes from *Bacillus subtilis* GN156 for Napier Silage Quality Improvement

นางสาวเมธิวรรณ เกียรติกระจาย

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. 2550

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ปริญญา

เทคโนโลยีชีวภาพ	เทคโนโลยีชีวภาพ
สาขา	**ภาควิชา**

เรื่อง การเตรียมและทดสอบเอนไซม์ย่อยสลายจาก *Bacillus subtilis* GN156 เพื่อปรับปรุงคุณภาพของไซเลจหญ้าเนเปียร์

Preparation and Activity Test of Hydrolytic Enzymes from *Bacillus subtilis* GN156 for Napier Silage Quality Improvement

นามผู้วิจัย นางสาวเมธิวรรณ เกียรติกระจาย

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ .....

(รองศาสตราจารย์สุนีย์ นิธิสินประเสริฐ, D.Sc.)

กรรมการ .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุทธิพันธุ์ แก้วสมพงษ์, Ph.D.)

กรรมการ .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ปทุมพร ฉิมเอนก, Dr. Eng.)

หัวหน้าภาควิชา .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์วิรัตน์ วาณิชย์ศรีรัตนา, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....

(รองศาสตราจารย์วินัย อาจคงหาญ, M.A.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ..... **เดือน** ..... **พ.ศ.** .....

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การเตรียมและทดสอบเอนไซม์ย่อยสลายจาก *Bacillus subtilis* GN156 เพื่อปรับปรุงคุณภาพของไซเลจหญ้าเนเปียร์

Preparation and Activity Test of Hydrolytic Enzymes from *Bacillus subtilis* GN156 for Napier Silage Quality Improvement

โดย

นางสาวเมธิวรรณ เกียรติกระจาย

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
พ.ศ. 2550

เมธิวรรณ เกียรติกระจาย 2550: การเตรียมและทดสอบเอนไซม์ย่อยสลายจาก *Bacillus subtilis* GN156 เพื่อปรับปรุงคุณภาพของไซเลจหญ้าเนเปียร์ ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ประธานกรรมการที่ปรึกษา: รองศาสตราจารย์สุนีย์ นิธิสินประเสริฐ, D.Sc. 166 หน้า

หญ้าเนเปียร์ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำเพียง 2.4-3.5 กรัมต่อกิโลกรัมวัตถุแห้ง เป็นสาเหตุให้ไซเลจหญ้าเนเปียร์มีคุณภาพต่ำหลังการหมัก 60 วันคือ มีระดับความเป็นกรดด่าง 4.3 ปริมาณกรดแลกติก กรดอะซิติก แอมโมเนียไนโตรเจน 19.95, 15.63 และ 1.69 กรัมต่อกิโลกรัมวัตถุแห้งตามลำดับ พบเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก 7.44 log CFU ต่อกรัมไซเลจ เชื้อรา ยีสต์ และจุลินทรีย์กลุ่ม Enterobacteria น้อยกว่า 1 log CFU ต่อกรัมไซเลจ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการปรับปรุงกระบวนการหมักโดยใช้เอนไซม์ย่อยสลายจากการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* GN156 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิดคือ เอนไซม์ย่อยสลาย E-NB จากการเลี้ยงเชื้อในอาหาร NB ที่ใช้ไซแลนเป็นสารเหนี่ยวนำ และทำให้เข้มข้นโดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต และเอนไซม์ย่อยสลาย E-NM จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร NM (กรัมต่อลิตร, เดกซ์ตริน, 20; สารสกัดจากยีสต์, 20; NaCl, 5; KH_2PO_4, 1; $MgSO_4$. $7H_2O$, 0.1; $CaCl_2$, 0.1) เอนไซม์ย่อยสลายทั้งสองมีระบบที่แตกต่างกันทั้งปริมาณ และชนิดของเอนไซม์ โดยเอนไซม์ย่อยสลาย E-NB ประกอบด้วยกิจกรรมของซีเอ็ม-เซลลูเลส เพคติเนส ไซลาเนส และเบตา-กลูคาเนส 3.05, 71.64, 0.00 และ 33.50 หน่วยต่อมิลลิลิตร ขณะที่เอนไซม์ย่อยสลาย E-NM ประกอบด้วยค่ากิจกรรม 464.05, 4799.45, 6167.82 และ 13370.46 หน่วยต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ส่งผลให้ค่ากิจกรรมการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตโมเลกุลใหญ่ในหญ้าเนเปียร์ของเอนไซม์ย่อยสลาย E-NM (333.54 หน่วยต่อมิลลิลิตร) สูงกว่าเอนไซม์ย่อยสลาย E-NB (33.50 หน่วยต่อมิลลิลิตร) เป็น 9.96 เท่า การใช้เอนไซม์ย่อยสลาย E-NB กิจกรรม 7.26 หน่วยต่อมิลลิลิตร และ 29.04 หน่วยต่อมิลลิลิตรเป็นสารเสริมร่วมกับแบคทีเรียกรดแลกติกสามารถเพิ่มน้ำตาลรีดิวซ์ในไซเลจให้สูงกว่าชุดควบคุมที่ไม่ใส่เอนไซม์ 21.76 และ 33.98 เปอร์เซ็นต์ในวันที่ 0 ของการหมักตามลำดับ แต่น้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้นไม่ส่งผลให้ปริมาณกรดแลกติกแตกต่างจากชุดควบคุมใน 3 วันแรกของการหมัก ขณะที่การใช้เอนไซม์ย่อยสลาย E-NM เป็นสารเสริมสามารถเพิ่มปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในไซเลจให้สูงกว่าการใช้เอนไซม์ย่อยสลาย E-NB เป็นสารเสริม 28.21 เปอร์เซ็นต์ในวันที่ 0 ของการหมัก ส่งผลให้ปริมาณกรดแลกติกในไซเลจสูงกว่าการใช้เอนไซม์ย่อยสลาย E-NB เป็นสารเสริม 37.45 และ 41.52 เปอร์เซ็นต์ในวันที่ 1 และ 3 ของการหมักตามลำดับ อย่างไรก็ตามปริมาณกรดแลกติกยังไม่สูงพอที่จะส่งผลให้คุณภาพของไซเลจที่ใช้เอนไซม์ย่อยสลาย E-NM เป็นสารเสริมแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับไซเลจที่ใช้เอนไซม์ย่อยสลาย E-NB เป็นสารเสริม เมื่อศึกษาชนิดของคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำที่เป็นแหล่งคาร์บอนของแบคทีเรียกรดแลกติกโดยวิธีโครมาโทรกราฟีแบบแผ่นบางพบโอลิโกแซคคาไรด์ขนาดระหว่างไตรแซคคาไรด์ และเตตราแซคคาไรด์ น้ำตาลไรโบส อาราบิโนส กลูโคส แมนโนส กาแลกโตส ฟรุกโตส และซูโครสจากไซเลจที่ใช้เอนไซม์ย่อยสลาย E-NM และ E-NB เป็นสารเสริมซึ่งไม่แตกต่างกัน

_____ / / _____

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่อประธานกรรมการ

Maythiwan Kiatgrajai 2007: Preparation and Activity Test of Hydrolytic Enzymes from *Bacillus subtilis* GN156 for Napier Silage Quality Improvement. Master of Science (Biotechnology), Major Field: Biotechnology, Department of Biotechnology. Thesis Advisor: Associate Professor Sunee Nitisinprasert, D.Sc. 166 pages.

Only 2.4-3.5 g/kg DM of water soluble carbohydrates were found in Napier grass. It affected low silage quality which were pH 4.3, 19.95 g/kg DM of lactic acid, 15.63 g/kg DM of acetic acid, 1.69 g/kg DM of ammonia nitrogen, 7.44 log CFU/g silage of lactic acid bacteria (LAB) and less than 1 log CFU/g of Enterobacteria, yeast and mold. Therefore, the objectives of this study were to improve silage quality by the use of hydrolytic enzymes from *Bacillus subtilis* GN156. Two different enzyme preparation, the E-NB and E-NM, were obtained from cell free culture fluid (CFS) of Nutrient broth culture with xylan as an inducer later concentrated by ammonium sulfate precipitation and from CFS of NM (g/l, dextrin, 20; yeast extract, 20; NaCl, 5; KH_2PO_4, 1; $MgSO_4$. $7H_2O$, 0.1 and $CaCl_2$, 0.1), respectively. The E-NB contained CMCase, pectinase, xylanase and beta-glucanase of 3.05, 71.46, 0.00 and 33.5 units/ml while the E-NM did of 464.05, 4799.45, 6167.82 and 13370.46 units/ml, respectively. They were different in both enzymatic system and quantity resulting in higher grass degradation of the E-NM (333.54 units/ml) than the one of the E-NB (33.50 units/ml) for 9.96 times. When 7.26 and 29.04 units/ml of E-NB were applied with lactic acid bacteria as additives, the reducing sugar contents of silage were higher than the control for 21.76 and 33.98 % in d 0 of ensiling, respectively. However these sugar content increments did not affect the lactic acid production during 0-3 d of ensiling. When the E-NM was applied, reducing sugar concentration of the E-NM treated silage were higher for 28.21 % of d 0 fermentation resulting in higher lactic acid concentration of 37.45 and 41.52 % of d 1 and 3 comparing to the E-NB treated silage. However both silage products showed no significant difference of the chemical and microbiological properties of the E-NM and the E-NB treated silage on d 60 of fermentation. When water soluble carbohydrates used as carbon source by LAB were analyzed by thin-layer chromatography, both the E-NB and E-NM treated silage of 4 h showed similar in both type and molecular weight oligosaccharide between trisaccharide and tetrasaccharide, as well as mono- and di-saccharide of ribose, arabinose, glucose, mannose, galactose, fructose and sucrose.

_____ _____ ___ / ___ / ___

Student's signature Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สุนีย์ นิธิสินประเสริฐ ประธานกรรมการที่ปรึกษา ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือและให้คำปรึกษาในการวางแผนงานวิจัย ตลอดจนตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุทธิพันธุ์ แก้วสมพงษ์ กรรมการที่ปรึกษาวิชาเอก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปทุมพร ฉิมเอนก กรรมการที่ปรึกษาวิชารอง และรองศาสตราจารย์ ดร.อำไพวรรณ ภราดร์นุวัฒน์ ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำแนะนำและช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ ศาสตราจารย์ ดร. ปรีชา เกียรติกระจาย และคุณแม่ รองศาสตราจารย์เมธากุล เกียรติกระจาย ผู้ให้กำเนิด เลี้ยงดูสั่งสอน ส่งเสริมในการศึกษาทุก ๆ ด้าน และเป็นแบบอย่างของความขยันหมั่นเพียร ความทุ่มเทในการทำงานจนเป็นแรงบันดาลใจให้ตั้งใจเจริญรอยตามทั้งในด้านการศึกษา และหน้าที่การงานต่อไป ขอบคุณกำลังใจจากน้องชายที่ทำให้สามารถอดทน และผ่านอุปสรรคต่าง ๆ ในการทำวิทยานิพนธ์ไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ ดร. สมจิตร ถนอมวงศ์วัฒนะ ที่กรุณาเอื้อเฟื้อหญ้าเนเปียร์ และคำแนะนำที่มีค่าตลอดการทดลอง ขอบคุณ คุณกิ่งกาญจน์ วงษ์สุทธิโชติ คุณสโรชา ปัญจนวพร คุณชลิดา ยอดกันสี พี่น้องสมาชิกคริสตจักรความหวังกรุงเทพ เพื่อน ๆ ร่วมรุ่นปริญญาโท และสมาชิกทุกคนในห้องปฏิบัติการ 3611 สำหรับทุกความห่วงใย กำลังใจ และความช่วยเหลือที่มอบให้ตลอดการทำวิทยานิพนธ์

สุดท้าย ขอขอบคุณ การทำวิจัย และวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ที่ทำให้รู้จักตัวเอง และเติบโตขึ้นทั้งด้านวุฒิภาวะ และการทำงาน

เมธิวรรณ เกียรติกระจาย

มกราคม 2550

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(6)
คำนำ	1
การตรวจเอกสาร	3
อุปกรณ์และวิธีการ	51
อุปกรณ์	51
วิธีการ	51
ผลและวิจารณ์	61
สรุปและข้อเสนอแนะ	114
สรุป	114
ข้อเสนอแนะ	116
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	117
ภาคผนวก	132

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ข้อดี และข้อเสียของการผลิตไซเลจ	4
2	สมบัติของไซเลจข้าวโพด ไซเลจหญ้าอัลฟาฟา และไซเลจหญ้าที่มีคุณภาพดี	11
3	อายุของพืช ขนาดของชิ้นพืช และปริมาณความชื้นของพืชอาหารสัตว์แต่ละชนิดก่อนการหมัก	12
4	ปริมาณวัตถุแห้งที่เหมาะสมกับพืชอาหารสัตว์แต่ละชนิด	13
5	ค่าความเป็นกรดด่างที่ทำให้ไซเลจมีเสถียรภาพที่ดีในช่วงการเก็บรักษาเมื่อผลิตจากหญ้า และพืชตระกูลถั่วที่มีปริมาณวัตถุแห้งต่าง ๆ	14
6	สารเสริมชนิดต่าง ๆ ที่นิยมใช้ในไซเลจ	19
7	ตัวอย่างสายพันธุ์ และคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลกติกที่นิยมใช้เป็นสารเสริม	22
8	สายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลกติกที่มักพบในไซเลจ	31
9	สายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ย่อยสลายเซลลูเลส และเฮมิเซลลูเลส	37
10	สมบัติทางเคมี และจุลินทรีย์ของไซเลจในวันที่ 60 ของการหมัก	71
11	สมบัติทางเคมี และจุลินทรีย์ของไซเลจหลังเปิดถุงหมัก 3 วัน	73
12	สมบัติทางเคมี และจุลินทรีย์ของไซเลจที่ใช้กลูโคสเป็นสารเสริมร่วมในวันที่ 60 ของการหมัก	82
13	สมบัติทางเคมี และจุลินทรีย์ของไซเลจที่ใช้กลูโคสเป็นสารเสริมร่วมหลังเปิดถุงหมัก 3 วัน	83
14	ระบบของเอนไซม์ย่อยสลายที่ผลิตจากการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร NM ที่มีสารเหนี่ยวนำ	92
15	ระบบของเอนไซม์ย่อยสลาย E-NM ก่อนและหลังการตกตะกอนเปรียบเทียบกับเอนไซม์ย่อยสลาย E-NB	95
16	สมบัติทางเคมี และจุลินทรีย์ของไซเลจชุดการทดลอง S-NM เปรียบเทียบกับชุดควบคุมในวันที่ 60 ของการหมัก	102

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
ก1	ปริมาณของแอมโมเนียมซัลเฟต (กรัม) ที่ใช้ในการตกตะกอนตัวอย่างปริมาตร 1 ลิตร	134
ก2	สารละลายที่ใช้เป็น mobile phase ในการวิเคราะห์น้ำตาลด้วยวิธี TLC สูตรต่าง ๆ	140
ก3	ค่า R_F ของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว และคู่ชนิดต่าง ๆ จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี TLC เมื่อใช้สารละลายสูตรต่าง ๆ เป็น mobile phase	141
ข1	สมบัติทางเคมี และจุลินทรีย์ ของไซเลจหญ้าเนเปียร์ในชุดควบคุม ชุดการทดลอง NB-L และชุดการทดลอง NB-H ในวันที่ 0 ของการหมัก	146
ข2	สมบัติทางเคมี และจุลินทรีย์ ของไซเลจหญ้าเนเปียร์ในชุดควบคุม ชุดการทดลอง NB-L และชุดการทดลอง NB-H ในวันที่ 1 ของการหมัก	147
ข3	สมบัติทางเคมี และจุลินทรีย์ ของไซเลจหญ้าเนเปียร์ในชุดควบคุม ชุดการทดลอง NB-L และชุดการทดลอง NB-H ในวันที่ 3 ของการหมัก	148
ข4	สมบัติทางเคมี และจุลินทรีย์ ของไซเลจหญ้าเนเปียร์ในชุดควบคุม ชุดการทดลอง NB-L และชุดการทดลอง NB-H ในวันที่ 10 ของการหมัก	149
ข5	สมบัติทางเคมี และจุลินทรีย์ ของไซเลจหญ้าเนเปียร์ในชุดควบคุม ชุดการทดลอง NB-L และชุดการทดลอง NB-H ในวันที่ 21 ของการหมัก	150
ข6	สมบัติทางเคมี และจุลินทรีย์ของไซเลจหญ้าเนเปียร์ในชุดควบคุม ชุดการทดลอง NB-L +G และชุดการทดลอง NB-H +G ในวันที่ 0 ของการหมัก	151
ข7	สมบัติทางเคมี และจุลินทรีย์ของไซเลจหญ้าเนเปียร์ในชุดควบคุม ชุดการทดลอง NB-L +G และชุดการทดลอง NB-H +G ในวันที่ 1 ของการหมัก	152
ข8	สมบัติทางเคมี และจุลินทรีย์ของไซเลจหญ้าเนเปียร์ในชุดควบคุม ชุดการทดลอง NB-L +G และชุดการทดลอง NB-H +G ในวันที่ 3 ของการหมัก	153
ข9	สมบัติทางเคมี และจุลินทรีย์ของไซเลจหญ้าเนเปียร์ในชุดควบคุม ชุดการทดลอง NB-L +G และชุดการทดลอง NB-H +G ในวันที่ 10 ของการหมัก	154
ข10	สมบัติทางเคมี และจุลินทรีย์ของไซเลจหญ้าเนเปียร์ในชุดควบคุม ชุดการทดลอง NB-L +G และชุดการทดลอง NB-H +G ในวันที่ 21 ของการหมัก	155

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่ **หน้า**

ข11 ค่าการดูดกลืนแสง ค่าความเป็นกรดด่าง ปริมาณเชื้อ และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายที่ผลิตจากการลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* GN156 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร NM 156

ข12 ค่าการดูดกลืนแสง ค่าความเป็นกรดด่าง ปริมาณเชื้อ และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายที่ผลิตจากการลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* GN156 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร DXM 157

ข13 ค่าการดูดกลืนแสง ค่าความเป็นกรดด่าง ปริมาณเชื้อ และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายที่ผลิตจากการลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* GN156 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NMc 158

ข14 ค่าการดูดกลืนแสง ค่าความเป็นกรดด่าง ปริมาณเชื้อ และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายที่ผลิตจากการลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* GN156 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NMp 159

ข15 ค่าการดูดกลืนแสง ค่าวามเป็นกรดด่าง ปริมาณเชื้อ และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายที่ผลิตจากการลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* GN156 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NMx 160

ข16 ค่ากิจกรรม ค่ากิจกรรมรวม ปริมาณโปรตีนรวม และค่ากิจกรรมเฉพาะของเอนไซม์ย่อยสลายเข้มข้นที่ผลิตโดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นต่าง ๆ 161

ข17 สมบัติทางเคมี และจุลินทรีย์ของไซเลจหญ้าเนเปียร์ในชุดการทดลอง S-NM เปรียบเทียบกับชุดควบคุมในวันที่ 0 ของการหมัก 162

ข18 สมบัติทางเคมี และจุลินทรีย์ของไซเลจหญ้าเนเปียร์ในชุดการทดลอง S-NM เปรียบเทียบกับชุดควบคุมในวันที่ 1 ของการหมัก 163

ข19 สมบัติทางเคมี และจุลินทรีย์ของไซเลจหญ้าเนเปียร์ในชุดการทดลอง S-NM เปรียบเทียบกับชุดควบคุมในวันที่ 3 ของการหมัก 164

ข20 สมบัติทางเคมี และจุลินทรีย์ของไซเลจหญ้าเนเปียร์ในชุดการทดลอง S-NM เปรียบเทียบกับชุดควบคุมในวันที่ 10 ของการหมัก 165

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่ **หน้า**

ข21 สมบัติทางเคมี และจุลินทรีย์ของไซเลจหญ้าเนเปียร์ในชุดการทดลอง S-NM เปรียบเทียบกับชุดควบคุมในวันที่ 21 ของการหมัก 166

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	การเปลี่ยนแปลงตลอดกระบวนการหมักไซเลจ	5
2	สมการการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นเนื่องจากพืชอาหารสัตว์หายใจและกระบวนการเมทาบอลิซึมของจุลินทรีย์	6
3	การเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรดด่างในกระบวนการหมัก และสมบัติทางเคมีของไซเลจที่มีคุณภาพดีเมื่อสิ้นสุดการหมัก	10
4	การผลิตกรดแลกติกโดยแบคทีเรียกรดแลกติกชนิด Homofermentative	20
5	การผลิตกรดแลกติกของแบคทีเรียกรดแลกติกชนิด Heterofermentative	21
6	การผลิตกรดบิวทีริกจากกรดแลกติก และกลูโคสของ Saccharolytic Clostridia	33
7	ปฏิกิยาการสลายโปรตีนของ Proteolytic Clostridia	34
8	การทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส	39
9	การทำงานของเอนไซม์ไซลาเนส	41
10	ปฏิกิริยาการย่อยสลายเพคตินโดยเอนไซม์เพคติเนส	42
11	ปฏิกิริยาการย่อยสลายเบตา-1,3-1,4-กลูแคนโดยเอนไซม์เอนโด-เบตา-1,3-1,4-กลูคาเนส	44
12	การทำงานของตัวทำละลายอินทรีย์ในการตกตะกอนเอนไซม์ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์	46
13	การเปลี่ยนแปลงทางเคมีของไซเลจในชุดควบคุมที่อายุการหมักต่าง ๆ	64
14	การเปลี่ยนแปลงทางจุลินทรีย์ของไซเลจในชุดควบคุมที่อายุการหมักต่าง ๆ	64
15	การเปลี่ยนแปลงทางเคมีของไซเลจในชุดการทดลอง NB-L ที่อายุการหมักต่าง ๆ	66
16	การเปลี่ยนแปลงทางจุลินทรีย์ของไซเลจในชุดการทดลอง NB-L ที่อายุการหมักต่าง ๆ	66
17	การเปลี่ยนแปลงทางเคมีของไซเลจในชุดการทดลอง NB-H ที่อายุการหมักต่าง ๆ	68
18	การเปลี่ยนแปลงทางจุลินทรีย์ของไซเลจในชุดการทดลอง NB-H ที่อายุการหมักต่าง ๆ	68
19	การเปลี่ยนแปลงทางเคมีของไซเลจในชุดควบคุมที่อายุการหมักต่าง ๆ	76
20	การเปลี่ยนแปลงทางจุลินทรีย์ของไซเลจในชุดควบคุมที่อายุการหมักต่าง ๆ	76

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
21	การเปลี่ยนแปลงทางเคมีของไซเลจในชุดการทดลอง NB-L +G ที่อายุการหมักต่าง ๆ	78
22	การเปลี่ยนแปลงทางจุลินทรีย์ของไซเลจในชุดการทดลอง NB-L +G ที่อายุการหมักต่าง ๆ	78
23	การเปลี่ยนแปลงทางเคมีของไซเลจในชุดการทดลอง NB-H +G ที่อายุการหมักต่างๆ	80
24	การเปลี่ยนแปลงทางจุลินทรีย์ของไซเลจในชุดการทดลอง NB-H +G ที่อายุการหมักต่าง ๆ	80
25	การเจริญ ค่าความเป็นกรดด่าง และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายที่ผลิตจากการเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* GN156 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรต่าง ๆ	86
26	การเจริญ ค่าความเป็นกรดด่าง และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายที่ผลิตจากการเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* GN156 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร NM ที่มีสารเหนี่ยวนำชนิดต่าง ๆ	89
27	ค่ากิจกรรมรวม และปริมาณโปรตีนรวมของสารละลายตะกอนที่ได้จากการตกตะกอนเอนไซม์ย่อยสลาย E-NM ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 30-90 เปอร์เซ็นต์	93
28	การเปลี่ยนแปลงทางเคมีของไซเลจในชุดการทดลอง S-NM ที่อายุการหมักต่าง ๆ	98
29	การเปลี่ยนแปลงทางจุลินทรีย์ของไซเลจในชุดการทดลอง S-NM ที่อายุการหมักต่าง ๆ	98
30	การเปลี่ยนแปลงทางเคมีของไซเลจในชุดควบคุมที่อายุการหมักต่าง ๆ	100
31	การเปลี่ยนแปลงทางจุลินทรีย์ของไซเลจในชุดควบคุมที่อายุการหมักต่าง ๆ	100
32	โครมาโตแกรม (Chromatogram) ของสารละลายมาตรฐานโอลิโกแซคคาไรด์แต่ละชนิดจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี TLC	106
33	โครมาโตแกรมของโอลิโกแซคคาไรด์ในตัวอย่างไซเลจหลังจากปิดถุงหมัก 4 ชั่วโมงจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี TLC เปรียบเทียบกับหญ้าเนเปียร์สด	107

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

34 โครมาโตแกรมของสารละลายมาตรฐานน้ำตาลแต่ละชนิดจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี TLC โดยใช้ mobile phase สูตรต่าง ๆ 109

35 โครมาโตแกรมของสารละลายมาตรฐานน้ำตาลแต่ละชนิดจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี TLC โดยใช้ mobile phase สูตร A 110

36 โครมาโตแกรมของน้ำตาลในตัวอย่างไซเลจหลังจากปิดถุงหมัก 4 ชั่วโมงจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี TLC เปรียบเทียบกับหญ้าเนเปียร์สด 111

ภาพผนวกที่

ก1 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของโปรตีน 136

ก2 กราฟมาตรฐานสารละลายน้ำตาลกลูโคส 138

ก3 กราฟมาตรฐานสารละลายน้ำตาลกาแลกโตส 138

ก4 กราฟมาตรฐานสารละลายน้ำตาลไซโลส 138

ก5 กราฟมาตรฐานสารละลายน้ำตาลกลูโคสสำหรับวิเคราะห์คาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำ 140

ก6 กราฟมาตรฐานกรดแลกติก 142

ก7 กราฟมาตรฐานกรดอะซิติก 143

ก8 กราฟมาตรฐานกรดโปรปิโอนิก 143

ก9 กราฟมาตรฐานกรดบิวทีริก 143

ก10 กราฟมาตรฐานสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟต 145

ก11 เครื่องบีบอัด 145