การเตรียมและทดสอบเอนไซม์ย่อยสลายจาก *Bacillus subtilis* GN156 เพื่อปรับปรุงคุณภาพของไซเลจหญ้าเนเปียร์

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

คำนำ

หญ้าเนเปียร์ (Napier grass) เป็นพืชที่เจริญได้ในทุกภาคของประเทศไทย ทนแล้งได้ดี ให้ผลผลิต และคุณค่าทางอาหารสูง (สายัณห์, 2531) จึงเหมาะกับการใช้เป็นอาหารของสัตว์เคี้ยวเอื้องทั้งในรูปแบบของการบริโภคสด และการถนอมรักษาด้วยการหมัก หรือไซเลจ (silage) ซึ่งสามารถเก็บไว้เป็นอาหารของสัตว์เคี้ยวเอื้องในฤดูแล้งซึ่งเป็นยามที่ขาดแคลนพืชอาหารสัตว์สดโดยไม่เน่าเสีย หรือสูญเสียคุณค่าทางอาหาร อย่างไรก็ตามหญ้าเนเปียร์มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำจำกัด ในช่วงแรกของกระบวนการหมักไซเลจจึงมีกรดแลกติกปริมาณต่ำ อัตราการลดลงของค่าความเป็นกรดด่างต่ำ และมีค่าเกิน 4.0 ส่งผลให้ไซเลจหญ้าเนเปียร์มีคุณภาพต่ำ และเสื่อมเสียได้ง่ายหลังเปิดภาชนะหมัก (Yang *et al*., 2004)

การเพิ่มปริมาณกรดแลกติก และอัตราการลดลงของระดับความเป็นกรดด่างในไซเลจทำได้โดยการใช้แบคทีเรียกรดแลกติก และเอนไซม์ย่อยสลายเป็นสารเสริม (additive) โดยเอนไซม์ย่อยสลายจะย่อยสลายโครงสร้างผนังเซลล์ของพืชอาหารสัตว์ได้น้ำตาลรีดิวซ์ซึ่งแบคทีเรียกรดแลกติกสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดแลกติก ส่งผลให้ระดับความเป็นกรดด่างในไซเลจลดลงอย่างรวดเร็ว (Weinberg *et al*., 1995; Sheperd and Kung, 1996; Rodrigues *et al*., 2001; Zahiroddini *et al*., 2004) โดยทั่วไปเอนไซม์ที่ใช้เป็นสารเสริมมักเป็นเอนไซม์ในกลุ่มเฮมิเซลลูเลส เซลลูเลส และเพคติเนส ซึ่งมีความสามารถในการย่อยสลายเฮมิเซลลูโลส เซลลูโลส และเพคตินที่เป็นคาร์โบไฮเดรตส่วนโครงสร้างผนังเซลล์ของพืชอาหารสัตว์ (Weinberg *et al*., 1995; Hoffman and Muck, 1999)

เอนไซม์ย่อยสลายจากเชื้อ *Bacillus subtilis* GN156 เป็นเอนไซม์ที่สามารถทำงานได้ดี และมีความเสถียรที่อุณหภูมิ 37-60 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่างในช่วง 4.5-7.1 ซึ่งเป็น

สภาวะที่พบในระหว่างกระบวนการหมัก รวมทั้งพบว่ามีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ซีเอ็ม-เซลลูเลส และเพคติเนสที่สูงถึง 0.085 และ 0.135 หน่วยต่อมิลลิลิตรตามลำดับ (ทองเลียน, 2541) จึงเหมาะที่จะทดลองใช้เป็นสารเสริมในไซเลจ

ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ

1. ศึกษาการเตรียมเอนไซม์ย่อยสลายจากเชื้อ *Bacillus subtilis* GN156

2. ศึกษาผลจากการใช้เอนไซม์ย่อยสลายจากเชื้อ *Bacillus subtilis* GN156 เป็นสารเสริมร่วมกับแบคทีเรียกรดแลกติกในการผลิตไซเลจจากหญ้าเนเปียร์

การตรวจเอกสาร

1. พืชอาหารสัตว์หมัก หรือไซเลจ (silage)

ไซเลจ คือ พืชอาหารสัตว์ เช่น หญ้า พืชตระกูลถั่ว ธัญพืช รวมทั้งวัสดุเหลือใช้จากการเกษตรอื่น ๆ ที่มีสภาพทางกายภาพ เคมี และจุลินทรีย์เปลี่ยนแปลงให้เหมาะสมต่อการบริโภคของสัตว์เคี้ยวเอื้องโดยกระบวนการหมัก

การผลิตไซเลจเป็นวิธีการถนอมอาหารที่มีจุดเริ่มต้นตั้งแต่สมัยก่อนคริสตกาล ชาวฮีบรูจะหมักเมล็ดธัญพืชกับเกลือเพื่อใช้เป็นอาหารสำหรับมนุษย์ และโคยามขาดแคลนอาหาร (Wood, 1998) หลังจากนั้นเกษตรกรในโลกตะวันตกได้พัฒนาการผลิตไซเลจทั้งด้านคุณภาพ และปริมาณเพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์ทดแทนวิธีการตากแห้ง ซึ่งมีข้อจำกัดในการผลิตสูง เช่น การลดลงของคุณค่าทางอาหาร และความเสี่ยงในการเกิดอัคคีภัย เป็นต้น (Wattiaux, 2000) ดังปรากฏในสถิติการผลิตไซเลจหญ้าของสหราชอาณาจักรในปีค.ศ. 1960 ที่มีการผลิตปริมาณ 5,580 กิโลกรัม ซึ่งน้อยกว่าหญ้าแห้ง (hay) ที่มีการผลิตเท่ากับ 6,935 กิโลกรัม อย่างไรก็ตามในปี ค.ศ. 1985 พบการผลิตไซเลจหญ้าสูงกว่าถึงประมาณ 10 เท่า โดยมีการผลิตไซเลจหญ้า 40,850 กิโลกรัม ขณะที่มีการผลิตหญ้าแห้งเพียง 4,650 กิโลกรัม (Holmes, 1989)

สำหรับในประเทศไทยการผลิตไซเลจเป็นวิธีการถนอมพืชอาหารสัตว์อีกทางเลือกหนึ่งที่ช่วยให้มีพืชอาหารสัตว์เพียงพอต่อการใช้เลี้ยงสัตว์เคี้ยวเอื้องในทุกฤดูกาล โดยสามารถแก้ปัญหาการขาดแคลนพืชอาหารสัตว์ในฤดูแล้ง และการมีปริมาณพืชอาหารสัตว์ที่มากเกินพอในฤดูฝนได้เป็นอย่างดี ดังจะเห็นได้จากการที่เกษตรกรในภาคเหนือเริ่มทดลองผลิตไซเลจปริมาณ 2-3 ตันจากต้น เปลือก และฝักข้าวโพดอ่อนที่เป็นวัสดุเหลือใช้จากโรงงานอุตสาหกรรม โดยหมักในภาชนะที่สานด้วยไม้ไผ่ และกรุด้วยพลาสติกเพื่อใช้เลี้ยงโค และกระบือในฤดูแล้ง (สุรีลักษณ์ และคณะ, 2545) รวมทั้งการที่รัฐบาลมีนโยบายสนับสนุนให้กองอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตร และทรัพยากรผลิตไซเลจหญ้าเพื่อเป็นเสบียงสัตว์สำรองสำหรับแจกจ่ายให้เกษตรกรยามประสบภัยแล้ง และอุทกภัยดังปีงบประมาณพ.ศ. 2549 ที่มีการผลิตในปริมาณ 911,818 กิโลกรัม ซึ่งคิดเป็น 6.28 เปอร์เซ็นต์ของเสบียงสัตว์ที่ผลิตขึ้นทั้งหมด โดยได้แจกจ่ายไซเลจหญ้าที่ผลิตขึ้นบางส่วนแก่เกษตรกรที่ประสบปัญหาอุทกภัยในจังหวัดเพชรบูรณ์ และเกษตรกรที่ประสบภัยแล้งในจังหวัด

ภาคใต้เพื่อใช้เลี้ยงสัตว์ และได้จำหน่ายให้แก่เกษตรกรในปริมาณ 74,453 กิโลกรัม คิดเป็นมูลค่ากว่า 83,205 บาท (กองอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์, 2549)

การผลิตไซเลจมีทั้งข้อดี และข้อเสีย (ตารางที่ 1) อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกับการทำแห้งที่ไม่สามารถทำได้ในสภาวะอากาศชื้น ต้องการพื้นที่ในการผลิตสูง และสูญเสียคุณค่าทางอาหารในปริมาณสูง (Wood, 1998) จะเห็นได้ว่าการผลิตไซเลจเป็นวิธีที่มีข้อได้เปรียบสูง และเป็นวิธีการผลิตอาหารเลี้ยงสัตว์บริโภคพืชที่มีประสิทธิภาพสูงสุดวิธีหนึ่ง

ตารางที่ 1 ข้อดี และข้อเสียของการผลิตไซเลจ

ข้อดี	ข้อเสีย
1. มีการสูญเสียคุณค่าทางอาหารต่ำจึงมีคุณค่าทางอาหารใกล้เคียงกับพืชอาหารสัตว์สด	1. เกษตรกรต้องมีความชำนาญในการผลิตไซเลจ
2. ทำได้ทุกสภาวะอากาศ และฤดูกาล และเก็บไว้ได้นาน	2. ไซเลจขาดวิตามินดี
3. ผลิตได้จากพืชวัตถุดิบที่หลากหลาย	3. ลงทุนสูงในระยะแรก
4. สามารถผลิตได้จากวัชพืชและวัสดุเหลือใช้ในการเกษตร	4. ต้องการแรงงานในปริมาณสูง
5. ส่วนของพืชที่แข็งจะอ่อนนุ่มสัตว์สามารถใช้ประโยชน์ได้เพิ่มขึ้น	5. ต้องรีบใช้ทันทีเมื่อนำออกจากหลุมหมักเพราะจะเสียหายได้ง่ายเมื่อสัมผัสกับอากาศ
6. พืชบางชนิดเมื่อทำเป็นไซเลจแล้วความชอบกินของสัตว์เพิ่มขึ้น	6. ไซเลจมีฤทธิ์เป็นกรดจึงทำลายภาชนะที่เป็นโลหะได้
7. ลดต้นทุนในการเก็บรักษา เพราะใช้พื้นที่ในการเก็บรักษาน้อย และใช้หลุมหมักได้หลายครั้ง	
8. มีความน่ากิน	
9. เพิ่มประสิทธิภาพในการใช้ที่ดิน	
10. ไม่เสี่ยงต่อการเกิดอัคคีภัย	
11. น้ำนมที่ได้จากสัตว์ที่บริโภคไซเลจหญ้ามีวิตามินเอและโปรตีนสูง	
12. มีพืชอาหารสัตว์ไว้ใช้เลี้ยงสัตว์ยามขาดแคลน	

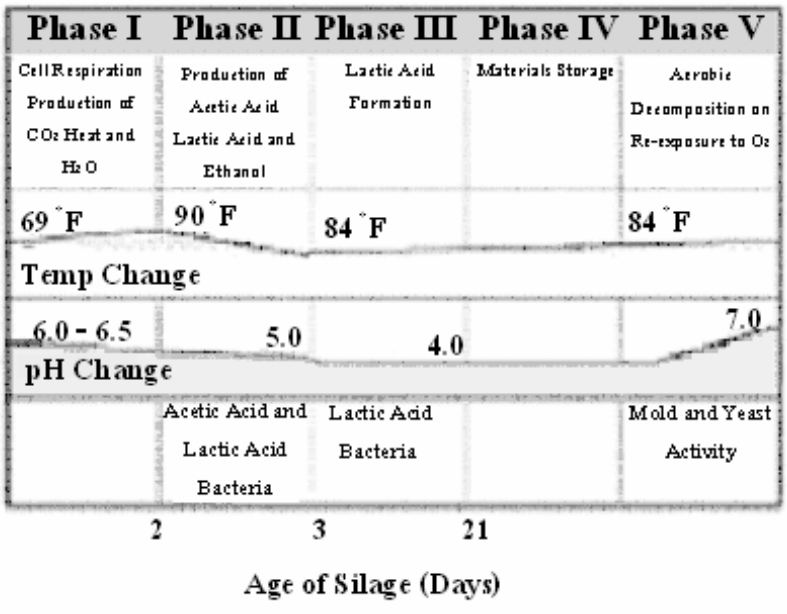
ที่มา: ดัดแปลงจากสายัณห์ (2531) และ Wattiaux (2000)

1.1 การผลิตไซเลจ (Ensiling)

ไซเลจสามารถผลิตได้โดยใช้พืชอาหารสัตว์หลายชนิด เช่น ธัญพืช พืชตระกูลถั่ว หญ้า หรือ วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร เริ่มจากการเก็บเกี่ยว และตัดพืชอาหารสัตว์ให้เป็นชิ้นขนาดเล็กเพื่อให้จุลินทรีย์ทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพระหว่างกระบวนการหมักซึ่งอาจทำได้โดยใช้แรงงานมนุษย์ หรือใช้เครื่องตัด จากนั้นผึ่งเพื่อลดความชื้น (wilt) ให้มีปริมาณวัตถุแห้ง 200 กรัมต่อกิโลกรัมพืชอาหารสัตว์ (Wood, 1998) ก่อนอัดให้แน่นในภาชนะบรรจุ ซึ่งอาจเป็นถุงพลาสติก ถัง ห่อ (bale) บังเกอร์ (bunker) หรือ ไซโล (silo) คลุมด้วยแผ่นโพลีเอทธิลีน และวางยางรถยนต์ทับที่ด้านบน เพื่อทำให้ภาชนะที่ใช้หมักปราศจากอากาศมากที่สุด เมื่อต้องการใช้ไซเลจเป็นอาหารสัตว์ให้เปิดภาชนะ แล้วนำไซเลจออกจากภาชนะให้เพียงพอกับความต้องการ หลังจากนั้นจึงปิดภาชนะให้สนิทเช่นเดิมเพื่อป้องกันอากาศ และการสูญเสียคุณค่าทางอาหาร (Wilkinson, 1985)

1.2 การเปลี่ยนแปลงทางเคมี และจุลินทรีย์ระหว่างการผลิตไซเลจ

การเปลี่ยนแปลงทางเคมี และจุลินทรีย์ตลอดกระบวนการหมักไซเลจอธิบายได้ดังภาพที่ 1 โดยแบ่งการเปลี่ยนแปลงเป็นช่วงได้ดังต่อไปนี้



ภาพที่ 1 การเปลี่ยนแปลงตลอดกระบวนการหมักไซเลจ

ที่มา: Seglar (2003)

1.2.1 สภาวะที่มีอากาศ (phase I)

ช่วงแรกของกระบวนการหมักเป็นช่วงของการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในสภาวะที่มีอากาศ (aerobic phase) โดยเริ่มตั้งแต่การเตรียมพืชวัตถุดิบที่จะใช้ในการหมักจนถึงช่วงต้นของการหมัก ซึ่งมักใช้เวลาประมาณ 2 วัน โดยทั่วไปพืชอาหารสัตว์ก่อนเก็บเกี่ยวจะมีแบคทีเรียแกรมลบที่ต้องการอากาศชนิด Heterotrophic เช่น แบคทีเรียกลุ่ม Aeromonas Cellulomonas Chromobacterium Corynebacterium Pseudomonas และ Xanthomonas แบคทีเรียแกรมบวกที่สามารถสร้างสปอร์ได้ เช่น แบคทีเรียกลุ่ม Bacillus รวมทั้งเชื้อยีสต์ และราในปริมาณที่สูง และมีแบคทีเรียกรดแลกติกทั้งชนิด Homofermentative และ Heterofermentative ในปริมาณที่ต่ำกว่า 100 โคโลนีต่อกรัมไซเลจ (Wood, 1998)

จุลินทรีย์เหล่านี้จะใช้อากาศในการเจริญ และใช้คาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำ (water soluble carbohydrate) บางส่วนในพืชอาหารสัตว์เป็นสารตั้งต้นในวิถีไกลโคไลซิส ได้สารผลิตภัณฑ์คือ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และความร้อนดังสมการในภาพที่ 2 รวมทั้งมีการผลิตเอนไซม์กลุ่มโปรทิเอส (protease) ซึ่งจะย่อยสลายโปรตีนเกือบ 50 เปอร์เซ็นต์ที่เป็นองค์ประกอบในพืชอาหารสัตว์ได้กรดอะมิโนเป็นสารผลิตภัณฑ์ซึ่งสามารถเกิดปฏิกิริยา Maillard กับคาร์โบไฮเดรตได้สารประกอบเชิงซ้อนที่สัตว์ไม่สามารถใช้ประโยชน์ได้ ทำให้ไซเลจมีคุณค่าทางอาหารลดลง (Perry and Cecava, 1995; Driehuis *et al*., 1997; Seglar, 2003)

$$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \longrightarrow 6CO_2 + 6H_2O + \text{heat (3.8 Mcal/kg sugar)}$$

ภาพที่ 2 สมการการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นเนื่องจากพืชอาหารสัตว์หายใจ และกระบวนการเมทาบอลิซึมของจุลินทรีย์

ที่มา: Wattiaux (2000)

การลดการสูญเสียจากกระบวนการเมทาบอลิซึม (metabolism) ของจุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศในช่วงนี้ทำได้ด้วยการลดระยะเวลาของช่วงการเปลี่ยนแปลงนี้ให้สั้นที่สุดโดยใช้เวลาในการตัดพืชอาหารสัตว์ และบรรจุลงภาชนะหมักให้สั้นที่สุด รวมทั้งอัดพืชอาหารสัตว์ให้แน่นที่สุดเพื่อลดปริมาณอากาศในภาชนะหมักให้ต่ำที่สุด อย่างไรก็ตามพบว่าในช่วงกระบวนการ

หมักนี้มีการเปลี่ยนแปลงที่ก่อให้เกิดประโยชน์ต่อกระบวนการหมักโดยเป็นช่วงของการเตรียมน้ำตาลรีดิวซ์ให้กับแบคทีเรียกรดแลกติกสำหรับใช้ในการเจริญช่วงต่อไปโดยเซลล์ของพืชอาหารสัตว์ และจุลินทรีย์บางกลุ่มที่เจริญในช่วงนี้ เช่น Bacillus และราจะผลิตเอนไซม์ย่อยสลายแป้ง (starch) และเฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) ให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (Seglar, 2003)

1.2.2 กระบวนการหมักแบบมีอากาศ (phase II)

เมื่อภาชนะหมักมีปริมาณออกซิเจนลดลง ระบบจะเข้าสู่กระบวนการหมักแบบมีอากาศซึ่งจุลินทรีย์กลุ่ม Enterobacteria และแบคทีเรียกรดอะซิติก (acetic acid bacteria) จะใช้น้ำตาลเฮกโซส (hexose) เช่น กลูโคส และฟรุกโตส (fructose) และน้ำตาลเพนโตส (pentose) เช่น ไซโลส (xylose) และไรโบส (ribose) ทั้งที่เป็นองค์ประกอบในพืชอาหารสัตว์ และเกิดจากการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตโมเลกุลใหญ่ในพืชอาหารสัตว์โดยเอนไซม์ย่อยสลายในช่วงของการเปลี่ยนแปลงที่ผ่านมาเป็นสารตั้งต้นในการผลิตสารผลิตภัณฑ์คือ กรดแลกติก กรดอะซิติก กรดบิวทีริก กรดโปรปิโอนิก กรดฟอร์มิก เอธานอล ก๊าซไฮโดรเจน และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (Wood, 1998; Wattiaux, 2000; Seglar, 2003) นอกจากนี้จุลินทรีย์กลุ่ม Enterobacteria ยังสามารถผลิตเอนไซม์ในกลุ่มโปรทิเอสที่สามารถย่อยสลายโปรตีนเช่นเดียวกับที่พบในช่วงของการเปลี่ยนแปลงที่ผ่านมา (Wattiaux, 2000)

กรดชนิดต่าง ๆ ที่ผลิตในช่วงของการเปลี่ยนแปลงนี้จะส่งผลให้ค่าความเป็นกรดด่างในระบบลดลงเป็น 5 ซึ่งเป็นการเตรียมสภาวะให้เหมาะสมกับการเจริญของแบคทีเรียกรดแลกติกในช่วงของการเปลี่ยนแปลงต่อไป โดยปกติกระบวนการหมักแบบมีอากาศจะเกิดขึ้นเป็นเวลา 1-3 วันหลังจากช่วงสภาวะที่มีอากาศสิ้นสุด (Wood, 1998; Seglar, 2003)

1.2.3 กระบวนการหมักแบบไม่มีอากาศ (phase III)

แบคทีเรียกรดแลกติกชนิด Homofermentative เช่น *Lactobacillus plantarum* และ *Lactobacillus curvatus* จะเริ่มการเจริญเมื่อค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.5-5.7 โดยจะเพิ่มปริมาณได้ถึง 9-11 log CFU ต่อกรัมไซเลจ และผลิตกรดแลกติกเป็นสารผลิตภัณฑ์หลัก (Wood, 1998) ในระยะต่อมามักพบแบคทีเรียกรดแลกติกชนิด Heterofermentative เช่น *Lactobacillus brevis* และ *Lactobacillus buchneri* ซึ่งผลิตกรดอะซิติกควบคู่กับกรดแลกติก (Sebastian *et al.*,

1996) การเจริญของแบคทีเรียกรดแลกติกทำให้เกิดการผลิตกรดแลกติกอย่างรวดเร็วจนมีปริมาณ 4-10 เปอร์เซ็นต์วัตถุแห้ง ส่งผลให้ค่าความเป็นกรดด่างลดลงอย่างรวดเร็วจนมีค่าประมาณ 4 เมื่อการหมักเข้าสู่วันที่ 21 (Perry and Cecava, 1995; Seglar, 2003) ถ้าในช่วงของการเปลี่ยนแปลงนี้ไซเลจมีค่าความเป็นกรดด่างเกิน 5.0 หรือมีความชื้นเกิน 70 เปอร์เซ็นต์เชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม Clostridia จะเจริญโดยใช้กรดแลกติกเป็นแหล่งคาร์บอนผลิตกรดบิวทีริกเป็นสารผลิตภัณฑ์ และย่อยสลายโปรตีนเป็นแอมโมเนีย ส่งผลให้ไซเลจสูญเสียคุณค่าทางอาหาร และเน่าเสียได้ (Pauly *et al*., 1999; Danner *et al*., 2003)

ช่วงของสภาวะที่มีอากาศถึงช่วงกระบวนการหมักที่ไม่ต้องการออกซิเจน (phase I - phase III) ใช้เวลา 2-3 สัปดาห์ขึ้นกับค่า buffering capacity ปริมาณความชื้น และอายุของพืชอาหารสัตว์ที่ใช้ในการผลิตไซเลจ (Perry and Cecava, 1995)

1.2.4 การเก็บรักษา (phase IV)

ช่วงการเก็บรักษา (Storage) เกิดหลังวันที่ 21 ของการหมัก และสิ้นสุดเมื่อเปิดภาชนะหมักเพื่อนำไซเลจไปใช้ประโยชน์ การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในช่วงนี้ขึ้นอยู่กับปริมาณกรดแลกติกในไซเลจ ถ้าไซเลจมีปริมาณกรดแลกติกต่ำกว่า 15 กรัมต่อกิโลกรัมวัตถุแห้ง และค่าความเป็นกรดด่างสูงกว่า 4.2 ไซเลจจะเกิดการเสื่อมเสียจากการเจริญของจุลินทรีย์กลุ่ม Clostridia เชื้อยีสต์ และราซึ่งจะใช้กรดแลกติกเป็นแหล่งคาร์บอน ส่งผลให้ค่าความเป็นกรดด่างของไซเลจสูงขึ้น และก่อให้เกิดความเสื่อมเสียในช่วงการเปลี่ยนแปลงต่อไป ในขณะที่ถ้าไซเลจมีปริมาณกรดแลกติก 15-20 กรัมต่อกิโลกรัมวัตถุแห้ง และค่าความเป็นกรดด่างไม่เกิน 4.0 การเจริญของจุลินทรีย์ทุกชนิดในไซเลจรวมทั้งแบคทีเรียกรดแลกติกจะถูกยับยั้งเนื่องจากสภาวะความเป็นกรดด่างต่ำ (Wattiaux, 2000) การเสื่อมเสียเนื่องจากจุลินทรีย์กลุ่ม Clostridia เชื้อยีสต์ และราจึงไม่เกิดขึ้น (Seglar, 2003)

1.2.5 เปิดภาชนะหมัก

เมื่อเปิดภาชนะที่ใช้หมักเพื่อนำไซเลจไปใช้ประโยชน์ ไซเลจจะสัมผัสกับอากาศ ถ้าไซเลจมีคุณภาพดี ไซเลจจะมีสมบัติเปลี่ยนแปลงไม่มากนัก ถ้าไซเลจมีกระบวนการหมักแบบไม่ต้องการอากาศเกิดขึ้นอย่างไม่สมบูรณ์ ยีสต์จะเจริญจนมีปริมาณ 9-12 log CFU ต่อกรัม

ไซเลจภายใน 2-3 วัน จุลินทรีย์ชนิดที่ต้องการอากาศในการเจริญ และสามารถทนกรดได้ (acid-tolerant microorganism) เช่น แบคทีเรียกรดอะซิติก แบคทีเรียกลุ่ม Bacillus และเชื้อราจะเจริญร่วมกับยีสต์ส่งผลให้อุณหภูมิ และค่าความเป็นกรดด่างของไซเลจเพิ่มขึ้น ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และกรดแลกติกลดลงทำให้ไซเลจสูญเสียคุณค่าทางอาหาร (Wood, 1998; Seglar, 2003)

1.3 ลักษณะไซเลจที่มีคุณภาพดี

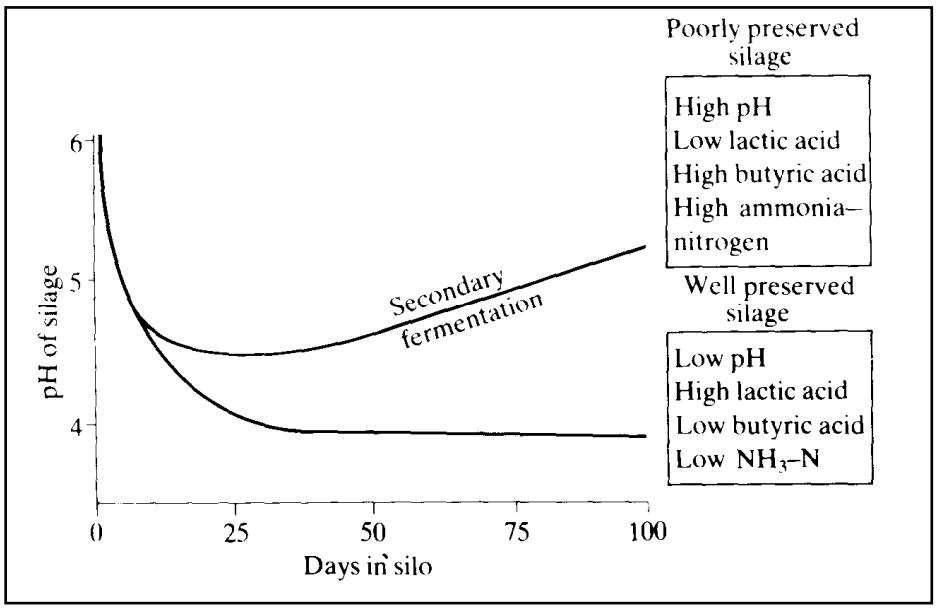
การผลิตไซเลจให้มีคุณภาพดีพร้อมที่จะนำไปใช้ประโยชน์เมื่อเปิดภาชนะหมักจะเกิดขึ้นเมื่อการเปลี่ยนแปลงในทุกช่วงของกระบวนการหมักเกิดขึ้นอย่างเหมาะสม ซึ่งสามารถบ่งชี้ได้โดยการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างไซเลจจากทุกช่วงของการเปลี่ยนแปลงด้วยวิธีทางเคมีเช่น ค่าความเป็นกรดด่าง ปริมาณกรดชนิดต่าง ๆ ปริมาณไมโคทอกซิน (mycotoxin) ปริมาณโปรตีนและแอมโมเนียไนโตรเจน วิธีทางกายภาพ เช่น สี กลิ่น ปริมาณความชื้น เนื้อและผิวสัมผัส (texture) ของไซเลจ และวิธีทางจุลชีววิทยา เช่น ปริมาณเชื้อยีสต์ รา และแบคทีเรียกลุ่ม Bacillus

Wilkinson (1985) รายงานถึงการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรดด่างในกระบวนการหมักที่ส่งผลต่อคุณภาพของไซเลจดังแสดงในภาพที่ 3 ไซเลจที่มีคุณภาพดีควรมีค่าความเป็นกรดด่างประมาณ 4 ตั้งแต่วันที่ 25 ของการหมักเป็นต้นไป และไซเลจเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักควรมีปริมาณกรดแลกติกสูง กรดบิวทีริก และแอมโมเนียไนโตรเจนต่ำ

Seglar (2003) รายงานถึงสมบัติของไซเลจข้าวโพด ไซเลจหญ้าอัลฟาฟาซึ่งเป็นพืชตระกูลถั่ว และไซเลจหญ้าที่มีคุณภาพดีในตารางที่ 2 ซึ่งมีมาตรฐานที่ใช้พิจารณาคุณภาพของไซเลจแตกต่างกัน

วารุณี และคณะ (2547) รวบรวมเกณฑ์การประเมินมาตรฐานทางกายภาพ และทางเคมีของไซเลจที่มีคุณภาพดีซึ่งกำหนดโดยกองอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์ไว้ว่า ไซเลจที่ดีควรมีกลิ่นหอมเปรี้ยวอ่อน ๆ คล้ายผลไม้ดอง ไม่มีกลิ่นเหม็นเน่า หรือ กลิ่นฉุนของแอมโมเนีย เนื้อของไซเลจต้องไม่เป็นเมือก เละ มีรา หรือมีส่วนที่บูดเน่า สีของไซเลจควรเป็นสีเหลืองอมเขียว ไม่เป็นสีน้ำตาลไหม้หรือดำ ค่าความเป็นกรดด่างควรอยู่ในช่วง 3.5-4.2 ปริมาณกรดแลกติก และกรดอะซิติกควรอยู่ระหว่าง 15-25 และ 5-8 กรัมต่อกิโลกรัมวัตถุแห้งตามลำดับ และกรดบิวทีริกไม่ควรเกิน 1 กรัมต่อกิโลกรัมวัตถุแห้ง

นอกจากการใช้ปริมาณกรด จุลินทรีย์ สมบัติทางเคมีอื่น ๆ และลักษณะทางกายภาพของไซเลจในการกำหนดมาตรฐานของไซเลจยังมีการศึกษาถึงการใช้ปริมาณไมโคทอกซินกลุ่มอัลฟาทอกซิน (alfatoxin) และ Deoxynivalenol (DON) ซึ่งเป็นสารพิษที่ผลิตโดยเชื้อราที่อาจตรวจพบในไซเลจกำหนดคุณภาพของไซเลจ เช่น Amigot *et al.* (2006) รายงานถึงเกณฑ์ของปริมาณอัลฟาทอกซิน และ DON ที่กำหนดคุณภาพของไซเลจโดยศึกษาจากปริมาณที่พบในไซเลจ 147 ตัวอย่าง และสรุปไว้ว่าไซเลจที่ได้รับการยอมรับว่ามีคุณภาพดีปลอดภัยจากสารอัลฟาทอกซิน และ DON ควรมีปริมาณอัลฟาทอกซิน และ DON ไม่เกิน 3 และ 400 ไมโครกรัมต่อไซเลจ 1 กิโลกรัม ตามลำดับ



ภาพที่ 3 การเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรดด่างในกระบวนการหมัก และสมบัติทางเคมีของไซเลจที่มีคุณภาพดีเมื่อสิ้นสุดการหมัก

ที่มา: Wilkinson (1985)

ตารางที่ 2 สมบัติของไซเลจข้าวโพด ไซเลจหญ้าอัลฟาฟา และไซเลจหญ้าที่มีคุณภาพดี

สมบัติของไซเลจ (กรัมต่อกิโลกรัมวัตถุแห้ง)	ไซเลจข้าวโพด	ไซเลจหญ้าอัลฟาฟา	ไซเลจหญ้า
ความชื้น (เปอร์เซ็นต์)	50-72	50-70	50-72
ADF	230-300	300	300
NDF	460-500	400	550
โปรตีนหยาบ	71-79	200	180
แอมโมเนียไนโตรเจน (เปอร์เซ็นต์ไนโตรเจน)	ต่ำกว่า 10	ต่ำกว่า 15	ต่ำกว่า 15
ค่าความเป็นกรดด่าง	ต่ำกว่า 4.0	ต่ำกว่า 4.5	ต่ำกว่า 4.2
กรดแลกติก	สูงกว่า 30	สูงกว่า 20	สูงกว่า 30
กรดอะซิติก	ต่ำกว่า 30	ต่ำกว่า 20	ต่ำกว่า 20
กรดโปรปีโอนิก	ต่ำกว่า 10	ต่ำกว่า 10	ต่ำกว่า 10
กรดบิวทีริก	ต่ำกว่า 1	ต่ำกว่า 1	ต่ำกว่า 1
แอลกอฮอล์	ต่ำกว่า 5	0	0
ยีสต์ (log CFU ต่อกรัมไซเลจ)	ต่ำกว่า 5.0	ต่ำกว่า 5.0	ต่ำกว่า 5.0
รา (log CFU ต่อกรัมไซเลจ)	ต่ำกว่า 5.0	ต่ำกว่า 5.0	ต่ำกว่า 5.0
แบคทีเรียกลุ่ม Bacillus (log CFU ต่อกรัมไซเลจ)	ต่ำกว่า 5.0	ต่ำกว่า 5.0	ต่ำกว่า 5.0
ไมโคทอกซิน (ppm)	0	0	0

ที่มา: Seglar (2003)

1.4 ปัจจัยที่ส่งผลต่อคุณภาพของไซเลจ

1.4.1 อายุ และช่วงการเจริญของพืชที่ใช้ผลิตไซเลจ

พืชอาหารสัตว์ในแต่ละชนิดมีอายุ และช่วงการเจริญที่เหมาะสมในการผลิตไซเลจต่างกันดังแสดงในตารางที่ 3 เช่น การผลิตไซเลจจากข้าวโพดในระยะน้ำนมช่วงกลาง (1/2

milk-line) และช่วงปลาย (2/3 milk-line) ส่งผลให้ไซเลจข้าวโพดมี NDF (neutral detergent fiber) และ aerobic stability สูงที่สุด (Perry and Cecava, 1995; Kung *et al*., 2000; Filya, 2004) ในขณะที่การใช้หญ้าซิกแนล (Signal) อายุ 50 วันผลิตไซเลจจะได้ไซเลจที่มีคุณภาพดีที่สุด (สุรเดช และคณะ, 2540) ส่วนข้าวสาลีควรเก็บเกี่ยวในระยะแป้งอ่อนช่วงปลาย (hard-dough) จึงจะได้ไซเลจที่มีคุณภาพดี (Adogla-Bessa and Owen, 1995; Filya, 2003)

ตารางที่ 3 อายุของพืช ขนาดของชิ้นพืช และปริมาณความชื้นของพืชอาหารสัตว์แต่ละชนิดก่อนการหมัก

พืชอาหารสัตว์	อายุ หรือ ระยะการเจริญ	ความชื้นของพืช (เปอร์เซ็นต์)	ขนาดของชิ้นพืช (นิ้ว)
ข้าวโพด	ระยะน้ำนมช่วงกลาง (1/2 milk-line) และช่วงปลาย (2/3 milk-line)	50-60	3/8-1/2
หญ้าอัลฟาฟา	ระยะ Mid-bud ถึงระยะ 1/10 ของการออกดอก (1/10 bloom)	50-60	1/4 -3/8
ธัญพืช	ระยะน้ำนม และระยะแป้งอ่อนช่วงแรก (soft dough)	50-60	1/4 -3/8
หญ้า	ระยะแรกของการแทงลำต้น (Stems first head out)	50-60	1/4 -3/8
Clover	ระยะ 1/4-1/2 ของการออกดอก (1/4-1/2 bloom)	50-60	1/4 -3/8

ที่มา: Perry and Cecava (1995)

1.4.2 ขนาดของชิ้นพืชอาหารสัตว์

การตัดพืชอาหารสัตว์ให้มีขนาด 1/4 -1/2 นิ้ว (ตารางที่ 3) จะทำให้น้ำตาลที่มีอยู่ในพืชปลดปล่อยออกมาได้เร็วขึ้นส่งผลให้แบคทีเรียกรดแลกติกสามารถผลิตกรดแลกติกได้ในระยะเวลาสั้น นอกจากนี้ยังทำให้สามารถบรรจุพืชอาหารสัตว์ลงในภาชนะหมักได้แน่นส่งผลให้ปริมาณออกซิเจนในภาชนะหมักลดลง การหมักแบบไม่มีอากาศจึงเกิดได้เร็วขึ้น

เมื่อพิจารณาในด้านโภชนะของไซเลจพบว่าไซเลจควรมีชิ้นพืชอาหารสัตว์ขนาดใหญ่กว่า 1/2 นิ้วเป็นองค์ประกอบบ้างเพื่อให้ไซเลจมีปริมาณเส้นใยเพียงพอต่อการใช้ประโยชน์ของสัตว์เคี้ยวเอื้อง Wattiaux (2000) รายงานว่า พืชอาหารสัตว์ที่ใช้ผลิตไซเลจควรมีขนาดของชิ้นไม่เกิน 1 เซนติเมตร และควรให้มีชิ้นพืชอาหารสัตว์ที่บรรจุในภาชนะหมักขนาดเกิน 2.5 เซนติเมตร 20 เปอร์เซ็นต์

1.4.3 ความชื้นของพืช

ความชื้นเป็นปัจจัยที่สำคัญที่ส่งผลต่อคุณภาพของไซเลจ โดยทั่วไปพืชอาหารสัตว์ก่อนหมักควรมีความชื้น 70-80 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นกับชนิดของพืชอาหารสัตว์ และภาชนะที่ใช้ในการหมัก (ตารางที่ 4) ความชื้นต่ำทำให้บรรจุพืชอาหารสัตว์ในภาชนะได้ยาก ส่งผลให้ช่องว่างระหว่างชิ้นพืชมีอากาศแทรกได้สูง ในขณะที่ความชื้นสูงทำให้จุลินทรีย์กลุ่ม *Clostridium* เจริญได้ดี และเกิดการสูญเสียคุณค่าทางอาหารผ่านทางก๊าช และน้ำจากไซเลจ (effluent) ซึ่งมักเกิดเมื่อมีความชื้นมากกว่า 75 เปอร์เซ็นต์ (Wilkinson, 1985; Wattiaux, 2000)

ตารางที่ 4 ปริมาณวัตถุแห้งที่เหมาะสมกับพืชอาหารสัตว์แต่ละชนิด

พืชอาหารสัตว์	ปริมาณวัตถุแห้ง (เปอร์เซ็นต์)	
	ไซโลแบบกำแพงคอนกรีต	ไซโลแบบหอคอย
Perennial grass	20-30	35-55
Italian ryegrass	20-30	35-55
ธัญพืช	40-50	40-50
พืชตระกูลถั่ว	25-35	35-55
ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ และข้าวฟ่าง	25-35	30-35

ที่มา: Wilkinson (1985)

ในกรณีที่พืชอาหารสัตว์ก่อนการหมักมีความชื้นสูงเกินกว่ากำหนดสามารถลดความชื้นได้โดยวิธีการผึ่งให้แห้ง (wilting) ซึ่งจะทำให้ปริมาณจุลินทรีย์ชนิดที่ต้องการอากาศลดลง กระบวนการที่ต้องการออกซิเจนในระหว่างการหมักลดระยะเวลาลง จึงเกิดการสูญเสียทาง

ก๊าซ และน้ำจากการหมักลดลงดังที่ Holmes (1989) รายงานว่า ไซเลจจากพืชอาหารสัตว์ที่ไม่ได้ผึ่งแห้งจะมีการสูญเสียโดยรวม 17.6 เปอร์เซ็นต์ โดยแบ่งเป็นการสูญเสียทางน้ำ 7.4 เปอร์เซ็นต์ และทางก๊าซ 10.2 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ไซเลจที่ผลิตจากพืชอาหารสัตว์ผึ่งแห้งมีการสูญเสียโดยรวม การสูญเสียทางน้ำ และทางก๊าซเพียง 10.4 1.6 และ 8.8 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และดังที่ Wattiaux (2000) รายงานว่า การผลิตไซเลจโดยใช้หญ้าความชื้นลดลงจาก 85 เป็น 80 และ 75 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลให้การสูญเสียทางวัตถุแห้ง (Dry matter loss) ลดลงจาก 7.2 เป็น 1.6 และ 0.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

นอกจากนี้การผึ่งให้แห้งยังช่วยลดปริมาณของกรดซิตริก (citric acid) และกรดมาลิก (malic acid) ซึ่งมีบทบาทในการสนับสนุนการทำงานของเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีนในพืชอาหารสัตว์ (Wood, 1998) ส่งผลให้ปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจนที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายของโปรตีนลดลง (Yan *et al.*,1998) รวมทั้งการผึ่งแห้งยังช่วยให้ไซเลจต้องการปริมาณกรดแลกติกในการรักษาคุณภาพของไซเลจในช่วงของการเก็บรักษาต่ำลง ส่งผลให้ไซเลจมีเสถียรภาพได้ที่ค่าความเป็นกรดด่างสูงกว่าไซเลจที่ผลิตจากพืชอาหารสัตว์ที่ไม่ได้ผึ่งแห้งดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ค่าความเป็นกรดด่างที่ทำให้ไซเลจมีเสถียรภาพที่ดีในช่วงการเก็บรักษาเมื่อผลิตจากหญ้า และพืชตระกูลถั่วที่มีปริมาณวัตถุแห้งต่าง ๆ

ปริมาณวัตถุแห้ง (เปอร์เซ็นต์)	ค่าความเป็นกรดด่าง	
	ไซเลจหญ้า	ไซเลจพืชตระกูลถั่ว
20	4.16	4.26
25	4.26	4.45
30	4.43	4.60
35	4.63	5.04
40	4.90	5.56
45	5.14	ไม่มีข้อมูล

ที่มา: Wattiaux (2000)

1.4.4 ปริมาณออกซิเจน

ปริมาณออกซิเจนเป็นตัวกำหนดระยะเวลาของกระบวนการต้องการออกซิเจนในระหว่างหมัก จึงเป็นปัจจัยที่กำหนดการสูญเสียปริมาณวัตถุแห้ง และคุณภาพของไซเลจเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักด้วย Wattiaux (2000) รายงานว่า ไซเลจที่หมักในภาชนะปิดสนิทจะมีการสูญเสียปริมาณวัตถุแห้งเพียง 4 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ไซเลจที่หมักในภาชนะปิดไม่สนิทจะมีการสูญเสียถึง 32 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าความเป็นกรดด่าง 6.8 ดังนั้นในการผลิตไซเลจจึงควรระวังให้ภาชนะหมักมีออกซิเจนในปริมาณที่ต่ำที่สุด ซึ่งทำได้โดยการอัดพืชอาหารสัตว์ใส่ในภาชนะให้แน่นที่สุด ใช้แผ่นพลาสติกป้องกันอากาศเข้า และวางยางรถยนต์ หรือวัตถุที่มีน้ำหนักมากทับ (Patterson *et al*., 1997) ในบางกรณีอาจใช้ pump ดูดอากาศออกก่อนปิดภาชนะหมักให้สนิท (Adogla-Bessa *et al*., 1995; Nishino *et al*., 2003)

1.4.5 ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น

พืชอาหารสัตว์แต่ละชนิดจะมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำ และน้ำตาลรีดิวซ์ไม่เท่ากันเช่น ข้าวโพดมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำ 80-300 กรัมต่อกิโลกรัมวัตถุแห้ง ในขณะที่พืชตระกูลหญ้า และหญ้าอัลฟาฟามีปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำ 35-300 และ 20-150 กรัมต่อกิโลกรัมวัตถุแห้งตามลำดับ (Wattiaux, 2000) นอกจากนี้พืชอาหารสัตว์ชนิดเดียวกันแต่มีอายุ และจำนวนครั้งของการงอกใหม่หลังจากการตัด (regrowth) ต่างกันก็จะมีปริมาณน้ำตาลต่างกันด้วย ซึ่งโดยส่วนใหญ่พบว่าพืชที่อายุมากขึ้น หรือมีจำนวนครั้งของการงอกใหม่หลังการตัดเพิ่มขึ้นมักมีปริมาณน้ำตาลที่ลดต่ำลง (Knudsen, 1997) เช่น ข้าวโพดในระยะน้ำนมช่วงแรก (1/3 milkline) ระยะน้ำนมช่วงปลาย (2/3 milkline) และระยะ Blackline จะมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำ 78 55 และ 30 กรัมต่อกิโลกรัมวัตถุแห้งตามลำดับ (Filya, 2004) หญ้าที่งอกใหม่หลังการตัดครั้งแรก ครั้งที่ 2 และครั้งที่ 3 จะมีปริมาณน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว 61 45 และ 32 กรัมต่อกิโลกรัมวัตถุแห้งตามลำดับ (Knudsen, 1997) อย่างไรก็ตามพืชก่อนการหมักควรมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำไม่ต่ำกว่า 30 กรัมต่อกิโลกรัมวัตถุแห้ง (O'Kiely *et al*., 1986) หรือมีปริมาณน้ำตาลเฮกโซส 30-50 กรัมต่อกิโลกรัมวัตถุแห้ง (Weinberg *et al*., 1995) จึงจะทำให้ปริมาณกรดแลกติกในกระบวนการหมักเพียงพอที่จะส่งผลให้การหมักเกิดขึ้นอย่างมีประสิทธิภาพ (Wilkinson, 1985)

1.5 แหล่งของพืชอาหารสัตว์

พืชอาหารสัตว์มีส่วนประกอบหลักเป็นสารพวกคาร์โบไฮเดรตซึ่งแบ่งได้เป็น 2 ชนิด คือ คาร์โบไฮเดรตที่ไม่เป็นส่วนประกอบโครงสร้างของพืช (Nonstructural carbohydrate) หรือคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำ เช่น น้ำตาลซูโครส (sucrose) ฟรุกโตส และเมลิไบโอส (melibiose) ซึ่งเป็นน้ำตาลที่แบคทีเรียกรดแลกติกสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้ง่ายเนื่องจากมีโครงสร้างที่ไม่ซับซ้อน และย่อยสลายได้ง่าย และคาร์โบไฮเดรตที่เป็นส่วนประกอบโครงสร้างของพืช (Structural carbohydrate) หรือคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ละลายน้ำ (non-water soluble carbohydrate) ได้แก่ เฮมิเซลลูโลส เซลลูโลส และลิกนิน (lignin) ในสัดส่วนเซลลูโลส 40-45 เปอร์เซ็นต์ เฮมิเซลลูโลส 30-35 เปอร์เซ็นต์ และลิกนิน 20-23 เปอร์เซ็นต์ (Bedford and Patridge, 2001) ซึ่งต้องใช้เอนไซม์ที่แบคทีเรียกรดแลกติกส่วนใหญ่ไม่สามารถผลิตได้ในการย่อยสลาย โดยทั่วไปในพืชอาหารสัตว์มักพบคาร์โบไฮเดรตชนิดที่ไม่ละลายน้ำมากกว่าชนิดที่ละลายน้ำ พืชอาหารสัตว์ที่มักใช้เป็นวัตถุดิบผลิตไซเลจแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่คือ

1.5.1 พืชตระกูลหญ้า

พืชตระกูลหญ้าที่นิยมใช้ผลิตไซเลจในประเทศเขตร้อนได้แก่ หญ้าเนเปียร์ *(Pennisetum purpureum)* หญ้าขน *(Brachiaria mutica)* หญ้ารูซี่ *(Brachiaria ruziziensis)* หญ้ากินี (*Panicum maximum*) หญ้าแพงโกล่า (*Digitaria eriantha*) และหญ้าซิกแนล (*Brachiaria decumbens*) โดยทั่วไปหญ้ามีคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำที่ประกอบด้วยกลูโคส ฟรุกโตส ซูโครส และฟรุกแตน ในอัตราส่วนฟรุกโตส 3 โมเลกุลต่อกลูโคส 1 โมเลกุล (ทองเลียน, 2541) นอกจากนี้จากการสำรวจตัวอย่างหญ้า 13 สายพันธุ์ที่อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมาพบว่า พืชตระกูลหญ้าประกอบด้วยโปรตีน 9.5-11.5 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 1.4-2.8 เปอร์เซ็นต์ และแร่ธาตุ 9.8-13.8 เปอร์เซ็นต์ (โครงการสารานุกรมไทยสำหรับเยาวชน, 2547) และจากการศึกษาองค์ประกอบของไซเลจหญ้า 94 ตัวอย่างในประเทศฟินแลนด์พบว่า มีเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินเป็นองค์ประกอบ 281 238 และ 29 กรัมต่อกิโลกรัมวัตถุแห้งตามลำดับ (Mawadza *et al*., 2000)

หญ้าเนเปียร์ (*Pennisetum sp*.) เป็นพืชตระกูลหญ้าที่นิยมใช้ผลิตไซเลจในประเทศไทย มีทรงต้นเป็นกอตั้งตรงคล้ายอ้อย ขยายพันธุ์ด้วยท่อนพันธุ์ เจริญเติบโตได้ในดินร่วนปนทรายถึงดินเหนียว มีผลผลิตสูงและคุณภาพดี แบ่งออกเป็นหลายสายพันธุ์ เช่น หญ้าเนเปียร์

ธรรมดา (*P. purpureum*) หญ้าเนเปียร์แคระ (*P. purpurcum* cv. Mott) และหญ้าเนเปียร์ลูกผสม (*P. purpureum* x *P. americanum*) ซึ่งมี 2 สายพันธุ์ย่อยคือ เนเปียร์ยักษ์ (King grass) และบาน่า (Bana grass) หญ้าเนเปียร์ธรรมดา และหญ้าเนเปียร์ลูกผสมเมื่อโตเต็มที่จะสูงประมาณ 3-4 เมตร ส่วนหญ้าเนเปียร์แคระจะมีการแตกกอดี มีส่วนของใบมากกว่าส่วนของต้น และออกดอกเร็ว เมื่อเจริญเต็มที่จะสูงประมาณ 1-2 เมตร

Tessema and Baars (2004) รายงานถึงองค์ประกอบที่สำคัญของหญ้าเนเปียร์ว่าประกอบด้วยโปรตีน NDF ADF (acid detergent fiber) เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส แคลเซียม และฟอสฟอรัส 72 616 326 198 289 4.7 และ 1.90 กรัมต่อกิโลกรัมวัตถุแห้งตามลำดับ รวมทั้งมีค่าการย่อยได้ของวัตถุแห้งในหลอดทดลอง (*In vitro* dry matter digestibility) 668 กรัมต่อหญ้าเนเปียร์ 1 กิโลกรัม

1.5.2 ธัญพืช

ธัญพืชมีน้ำตาลรีดิวซ์ และคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำในสัดส่วนที่สูงกว่าพืชตระกูลหญ้า และพืชตระกูลถั่ว เมื่อใช้ผลิตไซเลจจะให้ไซเลจที่มีคุณค่าทางอาหารสูง และไม่ประสบปัญหาการขาดแคลนน้ำตาลระหว่างหมัก ธัญพืชที่นิยมใช้ทำไซเลจได้แก่ ข้าวโพด (*Zea mays L.*) ซึ่งประกอบด้วยเซลลูโลส 28 เปอร์เซ็นต์ เฮมิเซลลูโลส 20-24 เปอร์เซ็นต์ ลิกนิน 3-7 เปอร์เซ็นต์ โปรตีน และคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำ 8.9 และ 8-30 เปอร์เซ็นต์โดยวัตถุแห้งตามลำดับ และน้ำตาลในอัตราส่วนฟรุกโตส 1 โมเลกุลต่อกลูโคส 1.5 โมเลกุล และข้าวฟ่าง (*Sorghum bicolor*) ซึ่งมีโปรตีน 7.4 เปอร์เซ็นต์ และมีเส้นใย 28 เปอร์เซ็นต์โดยวัตถุแห้ง (Miller, 1979)

วารุณี และคณะ (2549) รายงานว่า พันธุ์ข้าวโพด และข้าวฟ่างที่นิยมปลูกเพื่อเลี้ยงสัตว์ และผลิตไซเลจในประเทศไทยได้แก่ ข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 1 สุวรรณ 1 สุวรรณ 3 และสุวรรณ 5 และข้าวฟ่างพันธุ์สุพรรณบุรี 1

1.5.3 พืชตระกูลถั่ว (legume)

พืชตระกูลถั่วสายพันธุ์ที่นิยมใช้เป็นอาหารสัตว์ และผลิตไซเลจในประเทศไทยได้แก่ ถั่วลาย (*Centrosema pubescens*) ถั่วฮามาตา (*Stylosanthes hamata*) ถั่วสไตโล

(*Stylosanthes guianensis*) ถั่วแระต้น (*Cajanus cajan*) ทองหลางป่า (*Erythrina subumbrans*) แค (*Sesbania grandiflora*) และกระถินยักษ์ (*Leucaena leucocephala*) พืชตระกูลถั่วเป็นพืชที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบ 14.1-23.7 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 2.0-9.4 เปอร์เซ็นต์ และแร่ธาตุ 6.7-11.9 เปอร์เซ็นต์ (โครงการสารานุกรมไทยสำหรับเยาวชน, 2547) รวมทั้งมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำในช่วง 20-150 กรัมต่อกิโลกรัมวัตถุแห้ง (Wattiaux, 2000) ซึ่งต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับพืชอาหารสัตว์ชนิดอื่น ส่งผลให้แบคทีเรียกรดแลกติกมีปริมาณน้ำตาลไม่เพียงพอต่อการผลิตกรดแลกติก ค่าความเป็นกรดด่างของไซเลจพืชตระกูลถั่วจึงค่อนข้างสูง ส่งผลให้จุลินทรีย์ชนิดอื่นเจริญ และย่อยสลายโปรตีนไซเลจที่ได้จึงมีคุณค่าทางอาหารต่ำ

1.6 สารเสริมในไซเลจ

สารเสริมเป็นสารที่เติมลงในพืชอาหารสัตว์สดที่เป็นวัตถุดิบก่อนการหมักเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต และมีคุณค่าทางอาหารในไซเลจ สารเสริมที่ดีควรสนับสนุนให้ไซเลจมีสัดส่วนกรดแลกติกต่อกรดอะซิติก และความสามารถในการย่อยได้สูงขึ้น การสูญเสียวัตถุแห้งและการย่อยสลายโปรตีนลดลง รวมทั้งมีค่า aerobic stability สูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับไซเลจที่ไม่ได้ใช้สารเสริม (Zahiroddini *et al*., 2004) สารเสริมแบ่งออกเป็นหลายชนิดดังแสดงในตารางที่ 6

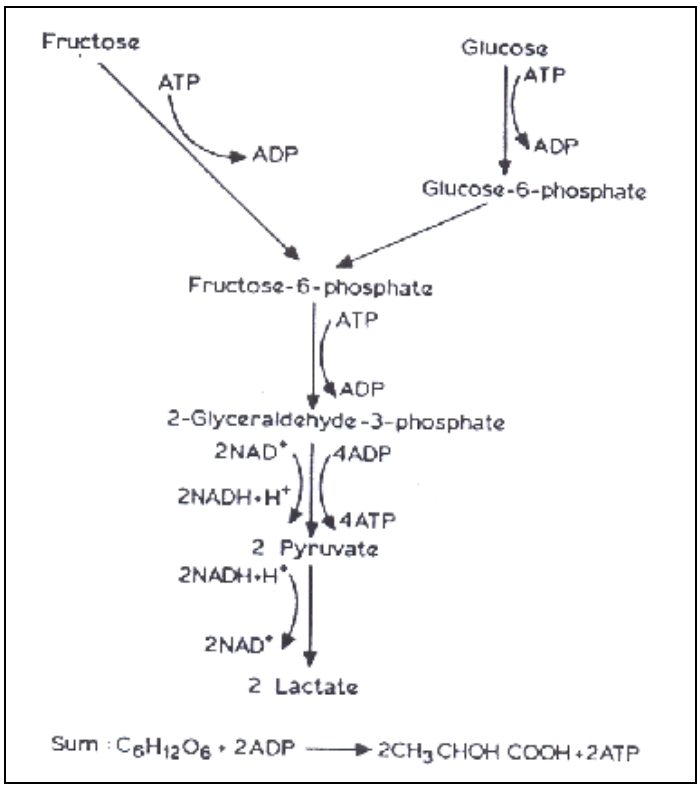
ตารางที่ 6 สารเสริมชนิดต่าง ๆ ที่นิยมใช้ในไซเลจ

สารที่เติมเพื่อยับยั้ง (Inhibitor)		สารที่เติมเพื่อกระตุ้น (Stimulant)			แหล่งของสารอาหาร
กรด	สารอื่น	หัวเชื้อแบคทีเรีย	เอนไซม์	แหล่งของสับสเทรต	
กรดไฮโดรคลอริก	ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์	แบคทีเรียกรดแลกติก	เซลลูเลส	กากน้ำตาล	แอมโมเนีย
กรดซัลฟิวริก	แอมโมเนีย	แบคทีเรียกรดโปรปิโอนิก	เฮมิเซลลูเลส	กลูโคส	ยูเรีย
กรดฟอร์มิก	ยูเรีย	actinomycete	เพคติเนส	ซูโครส	หินปูน
กรดโปรปิโอนิก	Sodium chloride		ไซลาเนส	เมล็ดธัญพืช	แร่ธาตุ
กรดอะซิติก	Sodium hydroxide		เบตา-กลูคาเนส	Dextrose	
กรดแลกติก	Sodium nitrite		อะไมเลส	Whey	
Caproic acid	Sodium sulfate		โปรทิเอส	Beet pulp	
Sorbic acid	Sodium sulfite			Citrus pulp	
Benzoic acid	Sulfur dioxide				
Acrylic acid	Formaldehyde				
	Paraformaldehyde				

ที่มา: ดัดแปลงจาก Wallace and Chesson (1995)

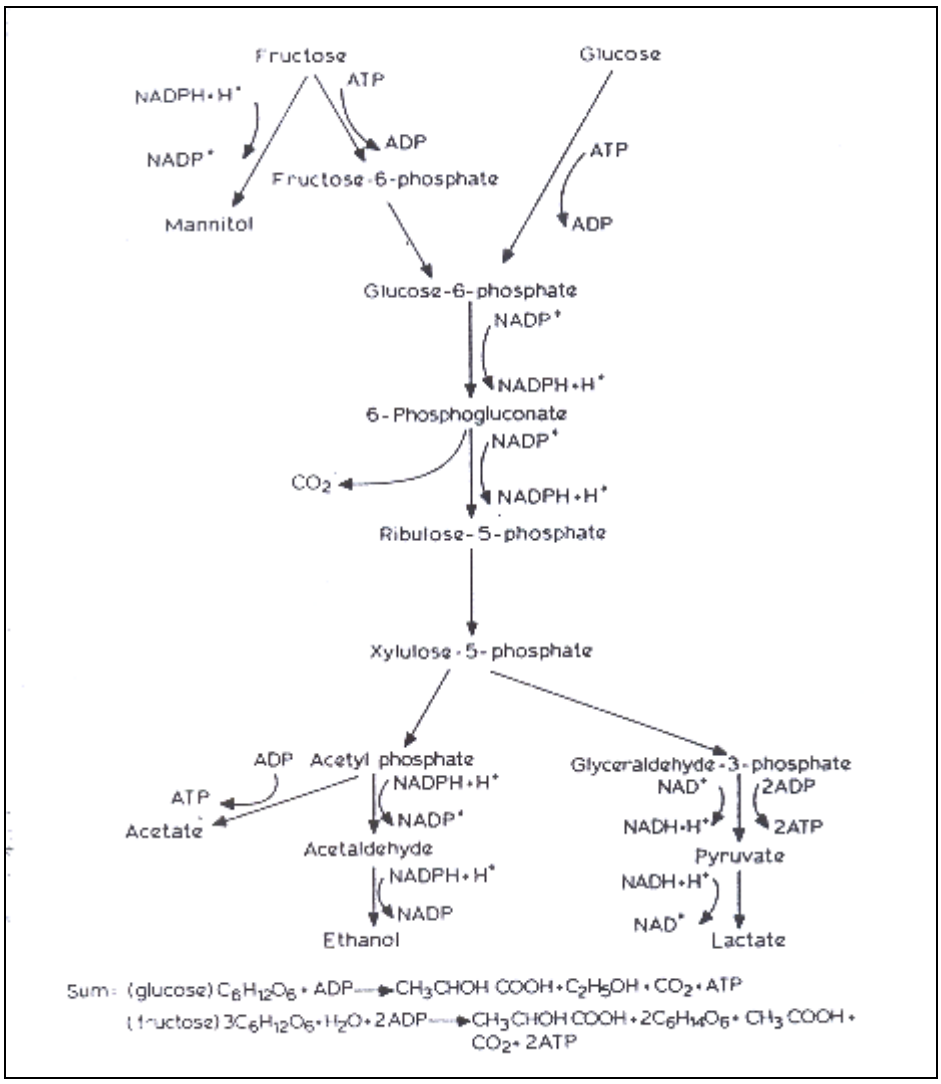
1.6.1 แบคทีเรียกรดแลกติก

แบคทีเรียกรดแลกติกเป็น facultative anaerobic bacteria ชนิดแกรมบวก เจริญได้ดีในที่ไม่มีอากาศ หรือมีอากาศน้อย แบคทีเรียกรดแลกติกสามารถผลิตกรดแลกติกเป็นสารผลิตภัณฑ์หลัก สามารถแบ่งแบคทีเรียกรดแลกติกตามชนิดของการผลิตสารผลิตภัณฑ์ได้ 2 กลุ่มคือ Homofermentative ซึ่งผลิตกรดแลกติกเป็นผลิตภัณฑ์ 80-90 เปอร์เซ็นต์ โดยสามารถเปลี่ยนกลูโคสหรือฟรุกโตส 1 โมเลกุลเป็นกรดแลกติก 2 โมเลกุล ดังภาพที่ 4 และ Heterofermentative ซึ่งผลิตกรดแลกติกควบคู่กับกรดอะซิติก หรือเอธานอลเป็นสารผลิตภัณฑ์ โดยสามารถเปลี่ยนฟรุกโตส 3 โมเลกุล หรือกลูโคส 1 โมเลกุลเป็นกรดแลกติก 1 โมเลกุลดังภาพที่ 5 (Wood, 1998)



<u>ภาพที่ 4</u> การผลิตกรดแลกติกโดยแบคทีเรียกรดแลกติกชนิด Homofermentative

ที่มา: Wood (1998)



<u>ภาพที่ 5</u> การผลิตกรดแลกติกของแบคทีเรียกรดแลกติกชนิด Heterofermentative
ที่มา: Wood (1998)

การใช้แบคทีเรียกรดแลกติกเป็นสารเสริมทำให้ปริมาณแบคทีเรียกรดแลกติกในจุดเริ่มต้นของการหมักเพิ่มขึ้น ส่งผลให้การผลิตกรดแลกติกเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว ค่าความเป็นกรดด่างจึงลดต่ำลง ซึ่งส่งผลต่อการลดการเจริญของจุลินทรีย์ที่ไม่พึงประสงค์ กระบวนการหมักไซเลจจึงเกิดขึ้นอย่างมีประสิทธิภาพ (Zahiroddini *et al*., 2004)

ประสิทธิภาพของการใช้แบคทีเรียกรดแลกติกเป็นสารเสริมขึ้นกับสายพันธุ์ ปริมาณ และความสามารถในการผลิตกรดของแบคทีเรียกรดแลกติก รวมทั้งปริมาณความชื้น และปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำของพืชอาหารสัตว์ที่จุดเริ่มต้นของกระบวนการหมัก (McAllister

et al., 1998) แบคทีเรียกรดแลกติกสายพันธุ์ที่ใช้อย่างแพร่หลายคือ *Lactobacillus sp. Enterococus sp.* และ *Pediococcus sp.* (Filya *et al*., 2000) โดย *L. plantarum* เป็นสายพันธุ์แรกที่มีการทดลองใช้ ต่อมามีรายงานถึงการเพิ่มประสิทธิภาพของสารเสริมโดยใช้แบคทีเรียกรดแลกติกสายพันธุ์อื่นใน ปริมาณ 5-6 log CFU ต่อกรัมพืชอาหารสัตว์เป็นสารเสริมร่วมเช่น *E. faecius L. acidophilus L. buchneri P. acidilactici* และ *P. pentosaceus* ซึ่งมีคุณสมบัติแตกต่างกันดังตารางที่ 7 (Weinberg and Muck, 1996) และมีรายงานว่าการใช้แบคทีเรียกรดแลกติกเป็นสารเสริมจะเกิดประสิทธิภาพสูงสุดเมื่อพืชอาหารสัตว์มีค่า water activity สูงเพียงพอต่อการเจริญ และการผลิตกรดของแบคทีเรียกรดแลกติก (Driehuis *et al*., 1997)

ตารางที่ 7 ตัวอย่างสายพันธุ์ และคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลกติกที่นิยมใช้เป็นสารเสริม

สายพันธุ์ของจุลินทรีย์	กลุ่มของจุลินทรีย์	ความสามารถของจุลินทรีย์	สารผลิตภัณฑ์
Lactobacillus plantarum	แบคทีเรียกรดแลกติกชนิด Homofermentative	ผลิตกรดแลกติกได้เร็วและทนต่อกรดสูง	กรดแลกติก
Pediococcus acidilactici และ *P. cerevisiae*	แบคทีเรียกรดแลกติกชนิด Homofermentative	ผลิตกรดแลกติกได้เร็วเจริญเร็วกว่ากลุ่ม Lactobacillus และมีสมบัติ osmotolerance	กรดแลกติก
Enterococcus faecium	แบคทีเรียกรดแลกติกชนิด Homofermentative	ผลิตกรดแลกติกได้เร็วและเจริญเร็วกว่าแบคทีเรียกรดแลกติกกลุ่มอื่น	กรดแลกติก
Propionibacterium shermanii และ *P. jensenii*	แบคทีเรียกรดโปรปิโอนิก	ผลิต antifungal compound	กรดโปรปิโอนิก กรดอะซิติก และคาร์บอนไดออกไซด์
Lactobacillus buchneri	แบคทีเรียกรดแลกติกชนิด Heterofermentative	ผลิต antifungal compound	กรดแลกติก กรดอะซิติก โพรเพนไดออล และคาร์บอนไดออกไซด์

ที่มา: Kung (2001)

ก. การใช้แบคทีเรียกรดแลกติกชนิด Homofermentative เป็นสารเสริม

แบคทีเรียกรดแลกติกชนิด Homofermentative เป็นแบคทีเรียกรดแลกติกกลุ่มแรกที่มีผู้ทดลองใช้เป็นสารเสริม เนื่องจากสามารถผลิตสารผลิตภัณฑ์หลักเป็นกรดแลกติกที่มีค่า pK_a 3.86 ซึ่งต่ำกว่ากรดชนิดอื่นที่มีการผลิตในไซเลจจึงมีประสิทธิภาพในการลดค่าความเป็นกรดด่างในไซเลจได้สูง (Danner *et al.*, 2003) ส่งผลให้การเสื่อมเสียเนื่องจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นในไซเลจเกิดขึ้นต่ำ การสูญเสียคุณค่าทางอาหารของไซเลจจึงลดลง

Driehuis *et al.* (1997) รายงานถึงการใช้ *L. plantarum* และ *E. faecium* ปริมาณ 5 log CFU ต่อกรัมไซเลจเป็นสารเสริม และพบว่าตัวอย่างไซเลจหญ้า perennial ryegrass ที่ผลิตทั้งในระดับห้องปฏิบัติการ และระดับอุตสาหกรรม (40 ตัน) มีปริมาณกรดแลกติกสูง และแอมโมเนียไนโตรเจนต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับไซเลจที่ไม่ใช้สารเสริม

Meeske *et al.* (2002) รายงานถึงการทดลองเลี้ยงโคโดยใช้ไซเลจข้าวโอ๊ตที่ใช้ *L. plantarum P. acidilactici* และ *Streptococcus faecium* ปริมาณ 6 log CFU ต่อกรัมไซเลจเป็นสารเสริมพบว่า โคมีปริมาณการบริโภค และการผลิตน้ำนมสูงกว่าโคที่เลี้ยงโดยใช้ไซเลจที่ไม่ใช้สารเสริมประมาณ 0.6 และ 1 กิโลกรัมต่อตัวต่อวันตามลำดับ อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาองค์ประกอบทางเคมีของไซเลจพบว่าไม่ปรากฏความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบไซเลจที่ไม่ใช้สารเสริมแต่อย่างใด

อย่างไรก็ตามการใช้แบคทีเรียกรดแลกติกกลุ่มนี้เป็นสารเสริมมีข้อเสียคือ ไซเลจมีค่า aerobic stability หลังเปิดภาชนะหมักต่ำ เนื่องจากการมีกรดแลกติกในปริมาณสูง ซึ่งส่งผลให้ยีสต์ที่ใช้กรดแลกติกเป็นแหล่งคาร์บอน (lactate-assimilating yeast) เจริญได้ดีหลังเปิดภาชนะหมัก (Filya *et al*., 2000) และการมีกรดชนิดอื่น เช่น กรดอะซิติก ซึ่งเป็นสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา และยีสต์ที่เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสียของไซเลจหลังเปิดภาชนะหมักในปริมาณต่ำ (Danner *et al*., 2003)

ข. การใช้แบคทีเรียกรดแลกติกชนิด Heterofermentative เป็นสารเสริม

เนื่องจากการใช้แบคทีเรียกรดแลกติกชนิด Homofermentative เป็นสารเสริมส่งผลให้ไซเลจมีค่า aerobic stability ต่ำ ในการศึกษาช่วงต่อมาจึงมีผู้ทดลองใช้แบคทีเรียกรดแลกติกกลุ่ม Heterofermentative เป็นสารเสริมโดยพบว่า การใช้แบคทีเรียกรดแลกติกกลุ่มนี้เป็นสารเสริมช่วยลดการเสื่อมเสีย และเพิ่มค่า aerobic stability ของไซเลจหลังเปิดภาชนะหมักได้ เนื่องจากแบคทีเรียกรดแลกติกกลุ่ม Heterofermentative สามารถผลิตกรดอะซิติกควบคู่กับการผลิตกรดแลกติก กรดอะซิติกเป็นสารยับยั้ง (inhibitor) เชื้อจุลินทรีย์เช่น ยีสต์ และราซึ่งเป็นสาเหตุของการเสื่อมเสียในไซเลจหลังเปิดภาชนะหมัก ส่งผลให้ไซเลจมีค่า aerobic stability เพิ่มขึ้น (Weinberg *et al*., 1999; Danner *et al*., 2003; Zahiroddini *et al*., 2004) แบคทีเรียกรดแลกติกกลุ่ม Heterofermentative สายพันธุ์ที่นิยมใช้เป็นสารเสริมได้แก่ *Lactobacillus buchneri* (Weinberg *et al*., 1999) ซึ่งมีกลไกการเพิ่มปริมาณกรดอะซิติกโดยการเปลี่ยนกรดแลกติกเป็น 1,2-propanediol และกรดอะซิติกในสภาวะที่ไม่มีอากาศ ส่งผลให้ค่า aerobic stability ของไซเลจสูงถึง 274 ชั่วโมง (Driehuis *et al*., 1996; Danner *et al.*, 2003)

Danner *et al.* (2003) รายงานถึงการผลิตไซเลจข้าวโพดโดยใช้แบคทีเรียกรดแลกติกกลุ่ม Heterofermentative 2 สายพันธุ์เป็นสารเสริม และพบว่าไซเลจที่ใช้ *L. brevis* เป็นสารเสริมมีค่าความเป็นกรดด่าง และปริมาณกรดแลกติกใกล้เคียงกับการใช้แบคทีเรียกรดแลกติกกลุ่ม Homofermentative เป็นสารเสริม แต่มีปริมาณกรดอะซิติกสูงกว่าประมาณ 4 เท่า ส่งผลให้ค่า aerobic stability สูงขึ้นประมาณ 2.5 เท่า และการใช้ *L. buchneri* เป็นสารเสริมส่งผลให้ไซเลจมีปริมาณกรดอะซิติก และค่า aerobic stability สูงกว่าการใช้แบคทีเรียกรดแลกติกกลุ่ม Homo fermentative ประมาณ 6 และ 9.5 เท่าตามลำดับ

ค. การใช้แบคทีเรียกรดแลกติกทั้ง 2 ชนิดเป็นสารเสริมร่วมกัน

เนื่องจากการใช้แบคทีเรียกรดแลกติกชนิด Homofermentative และ Heterofermentative เป็นสารเสริมส่งผลให้ไซเลจมีความโดดเด่นแตกต่างกัน จึงได้มีผู้ทดลองใช้แบคทีเรียกรดแลกติกทั้ง 2 กลุ่มเป็นสารเสริมร่วมกันเพื่อให้ได้ไซเลจที่มีปริมาณกรดแลกติก และค่า aerobic stability ที่สูงดังเช่นการศึกษาของ Weinberg *et al*. (1999) ที่ใช้แบคทีเรียกรดแลกติกกลุ่ม Homofermentative สายพันธุ์ *L. plantarum* เป็นสารเสริมร่วมกับ *L. buchneri* ซึ่งเป็นกลุ่ม

Heterofermentative ส่งผลให้ไซเลจข้าวฟ่างมีความโดดเด่นที่เป็นผลจากการทำงานของแบคทีเรียกรดแลกติกทั้ง 2 กลุ่มอย่างครบถ้วน โดยมีค่าความเป็นกรดด่างต่ำ และปริมาณกรดแลกติกสูงเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ *L. buchneri* เป็นสารเสริมเพียงอย่างเดียว รวมทั้งมีปริมาณยีสต์ต่ำ และค่า aerobic stability สูงเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ *L. plantarum* เป็นสารเสริมเพียงอย่างเดียว

1.6.2 เอนไซม์

เอนไซม์ที่ใช้เป็นสารเสริมในไซเลจส่วนใหญ่เป็นเอนไซม์ในกลุ่มเอนไซม์ย่อยสลายเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส ซึ่งสามารถย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ละลายน้ำที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์พืชอาหารสัตว์ได้คาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำที่แบคทีเรียกรดแลกติกสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อสร้างกรดแลกติกในกระบวนการหมักได้ การย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ละลายน้ำยังส่งผลในการเพิ่มอัตราการย่อย และค่าการย่อยได้ของไซเลจในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ สัตว์จึงได้รับคุณค่าทางอาหารจากการบริโภคไซเลจเพิ่มขึ้น (Chamberlain and Robertson, 1992; Rodrigues *et al*., 2001; Zahiroddini *et al*., 2004) นอกจากนี้การใช้เอนไซม์เป็นสารเสริมยังทำได้ง่าย มีความปลอดภัยสูง และไม่สร้างมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อม ดังนั้นการใช้เอนไซม์ย่อยสลายเป็นสารเสริมจึงเป็นวิธีที่สามารถใช้แก้ปัญหาการมีคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำต่ำในการผลิตไซเลจจากพืชตระกูลถั่ว และหญ้าได้เป็นอย่างดี (Weinberg *et al*., 1995)

การใช้เอนไซม์เป็นสารเสริมควรคำนึงถึงชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้ผลิตเอนไซม์ คุณสมบัติ ชนิด และความเข้มข้นของเอนไซม์ รวมทั้งความชื้นของพืชอาหารสัตว์ที่ใช้ จุลินทรีย์ที่นิยมใช้ผลิตเอนไซม์เพื่อใช้เป็นสารเสริมได้แก่ ยีสต์ ราสายพันธุ์ *Aspergillus oryzae* และ *A. niger* และแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus subtilis* (Bedford and Patridge, 2001) และพืชอาหารสัตว์ที่มีความชื้นก่อนการหมักสูงช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์โดยช่วยให้เอนไซม์มีค่ากิจกรรมจำเพาะที่สูงขึ้น (Adogla-Bessa and Owen, 1995; Weinberg *et al*., 1995; Schimidt *et al*., 2001)

Rodrigues *et al.* (2001) รายงานถึงการใช้เอนไซม์เซลลูเลสจาก *Trichoderma viridae* เป็นสารเสริมในการผลิตไซเลจหญ้า perennial ryegrass ส่งผลให้ไซเลจมีปริมาณ NDF และ ADF ลดลงประมาณ 1.5 เท่า มีปริมาณกรดแลกติกสูง และค่าความเป็นกรดด่างต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับการไม่ใช้สารเสริม Sheperd and Kung (1996) รายงานถึงการใช้เอนไซม์ที่มีองค์ประกอบของ

เอนไซม์เซลลูเลส และเฮมิเซลลูเลสจาก *T. reesei* เป็นสารเสริมในการผลิตไซเลจข้าวโพด ส่งผลให้ไซเลจมีปริมาณ NDF และ ADF ต่ำ และมีค่าการย่อยได้ในหลอดทดลองสูงเมื่อเปรียบเทียบกับการไม่ใช้สารเสริม และ Chamberlain and Robertson (1992) รายงานถึงการใช้เอนไซม์ที่มีองค์ประกอบของเอนไซม์เซลลูเลส และไซลาเนสเป็นสารเสริมในการผลิตไซเลจหญ้า perennial ryegrass ที่พบว่าไซเลจที่ได้มีองค์ประกอบทางเคมีใกล้เคียงกับการไม่ใช้สารเสริม และโคนมที่บริโภคไซเลจที่ได้มีผลผลิตน้ำนม และปริมาณโปรตีนในน้ำนมสูงเมื่อเปรียบเทียบกับการไม่ใช้สารเสริม

นอกจากนี้ยังได้มีการเพิ่มประสิทธิภาพของการใช้เอนไซม์เป็นสารเสริมโดยการใช้ควบคู่กับหัวเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกเพื่อให้น้ำตาลรีดิวซ์ที่เอนไซม์ผลิตขึ้นถูกใช้ในการผลิตกรดแลกติกอย่างเจาะจงดังเช่น Islam *et al.* (2001) รายงานถึงการใช้เอนไซม์เป็นสารเสริมร่วมกับแบคทีเรียกรดแลกติกในการผลิตไซเลจ Italian ryegrass ส่งผลให้ไซเลจมีปริมาณโปรตีนหยาบเพิ่มขึ้นจาก 107 เป็น 121 กรัมต่อกิโลกรัมวัตถุแห้ง แอมโมเนียไนโตรเจนลดลงจาก 3.4 เป็น 2.8 กรัมต่อกิโลกรัมวัตถุแห้ง ค่าความเป็นกรดด่างลดต่ำลงจาก 4.11 เป็น 3.82 และปริมาณกรดแลกติกเพิ่มขึ้นจาก 16.76 เป็น 22.91 กรัมต่อกิโลกรัมวัตถุแห้งเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้เอนไซม์เป็นสารเสริมเพียงอย่างเดียว

Zahiroddini *et al*. (2004) รายงานถึงการใช้เอนไซม์ผสมจากเชื้อ *A. oryzae A. niger* และ *B. subtilis* ในสัดส่วนเอนไซม์ซีเอ็ม-เซลลูเลส: ไซลาเนส: อัลฟา-อะไมเลส: เบตา-กลูคาเนส 0.4637: 1.2792: 1.3176: 1.2276 ร่วมกับแบคทีเรียกรดแลกติกกลุ่ม *Pediococcus Lactobacillus* และ *Enterococcus sp.* ในการผลิตไซเลจข้าวบาร์เลย์ ส่งผลให้ไซเลจมีปริมาณกรดแลกติกสูง ค่าความเป็นกรดด่างและกรดบิวทีริกต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับไซเลจที่ใช้เอนไซม์ หรือแบคทีเรียกรดแลกติกเป็นสารเสริมเพียงอย่างเดียว หรือ การไม่ใช้สารเสริม

Weinberg *et al*. (1995) รายงานว่าการใช้เอนไซม์ทางการค้าที่มีองค์ประกอบของเซลลูเลส และเบตา-กลูคาเนสเป็นสารเสริมร่วมกับแบคทีเรียกรดแลกติกสายพันธุ์ *E. faecium P. acidilactis* และ *L. plantarum* ส่งผลให้ไซเลจพืชตระกูลถั่วมีค่าความเป็นกรดด่างต่ำ ปริมาณกรดแลกติก ADF และ NDF สูงเมื่อเปรียบเทียบกับการไม่ใช้สารเสริม นอกจากนี้ไซเลจยังมีการเสื่อมเสียที่เป็นผลจากการเจริญของยีสต์ และราสูงกว่าการไม่ใช้สารเสริม แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ที่ช่วยสนับสนุนการเจริญของแบคทีเรียกรดแลกติกกลุ่ม Homofermentative ที่ใช้เป็นสารเสริมได้เป็นอย่างดี

Meeske and Basson (1995) รายงานว่าการใช้เอนไซม์ทางการค้าที่มีองค์ประกอบของเซลลูเลส และอะไมเลสเป็นสารเสริมร่วมกับ *P. acidophilus L. plantarum* และ *L. bulgaricusm* ไม่ส่งผลให้ไซเลจข้าวโพดมีค่าความเป็นกรดด่าง หรือปริมาณกรดแลกติกแตกต่างกับการไม่ใช้สารเสริม อย่างไรก็ตามเมื่อนำไซเลจไปเลี้ยงแกะพบว่า แกะเลือกที่จะบริโภคไซเลจที่ใช้สารเสริมในปริมาณสูงส่งผลให้แกะมีน้ำหนักตัวสูงกว่าแกะที่บริโภคไซเลจที่ไม่ได้ใช้สารเสริมเล็กน้อย

Meeske *et al.* (1999) รายงานถึงการใช้เอนไซม์ทางการค้าที่มีองค์ประกอบของเซลลูเลส เฮมิเซลลูเลส และอะไมเลสเป็นสารเสริมร่วมกับ *L. plantarum P. acidilactici* และ *Steptococcus faecium* ส่งผลให้ไซเลจหญ้า Smuts-finger มีค่าความเป็นกรดด่างลดลงอย่างรวดเร็ว ปริมาณกรดแลกติกสูง ปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจน และจุลินทรีย์กลุ่ม Enterobacteria Clostridia ยีสต์ และราต่ำ รวมทั้งมีค่า aerobic stability และค่าการย่อยได้ในร่างกายสัตว์ทดลองที่สูงเมื่อเปรียบเทียบกับไซเลจที่ไม่ได้ใช้สารเสริม

Kung *et al.* (1991) รายงานถึงการใช้เอนไซม์เซลลูเลส และเพคติเนสจาก *T. reesei* และ *A. niger* เป็นสารเสริมร่วมกับแบคทีเรียกรดแลกติกสายพันธุ์ *L. plantarum* และ *P. cerevisiae* ส่งผลให้ไซเลจหญ้าอัลฟาฟามีค่าความเป็นกรดด่างลดลงเร็ว ปริมาณกรดแลกติกสูง และปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจนต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับไซเลจที่ใช้เอนไซม์เป็นสารเสริมเพียงอย่างเดียวตลอดกระบวนการหมัก

Schimidt *et al.* (2001) รายงานถึงการใช้เอนไซม์ย่อยสลายที่มีองค์ประกอบของเซลลูเลส และไซลาเนสในอัตราส่วน 1: 638.9 จากเชื้อ *Glicladium sp.* เป็นสารเสริมร่วมกับแบคทีเรียกรดแลกติกสายพันธุ์ *L. plantarum* และ *S. faecium* ส่งผลให้ไซเลจหญ้าอัลฟาฟามีค่าความเป็นกรดด่างลดลงเร็ว ปริมาณกรดแลกติกสูง และปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจนรวมทั้ง ADF และ NDF ต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับไซเลจที่ไม่ได้ใช้สารเสริม ไซเลจที่ใช้แบคทีเรียกรดแลกติก หรือใช้เอนไซม์เป็นสารเสริมเพียงอย่างเดียวอย่างชัดเจน

ในบางกรณีเอนไซม์ และแบคทีเรียกรดแลกติกอาจไม่สามารถส่งเสริม และสนับสนุนการทำงานระหว่างกัน (antagonism) ส่งผลให้สารเสริมทั้งสองชนิดทำงานได้จำกัดกว่าการใช้สารเสริมเพียงชนิดเดียว (Sheperd and Kung, 1996) ในปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาที่อธิบายถึง

เหตุผลที่แท้จริงของการเกิด antagonism ได้ แต่มีข้อสันนิษฐานว่า antagonism อาจเกิดจากการที่แบคทีเรียกรดแลกติกที่ใช้เป็นสารเสริมไม่สามารถใช้น้ำตาลที่เอนไซม์ที่ใช้เป็นสารเสริมผลิตขึ้นจึงขาดแคลนสารตั้งต้นในการผลิตกรดแลกติก และเมื่อน้ำตาลไม่ถูกใช้จะเพิ่มปริมาณขึ้นจนเกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โดยสารผลิตภัณฑ์ (product inhibition) ทำให้เอนไซม์หยุดการทำงาน ดังที่ Stoke (1992) รายงานถึงการใช้เอนไซม์ย่อยสลายที่มีองค์ประกอบของเซลลูเลส ไซลาเนส เซลโลไบเอส และกลูโคสออกซิเดส (glucose oxidase) ในสัดส่วน 36000: 16000: 46: 110 เป็นสารเสริมร่วมกับแบคทีเรียกรดแลกติกสายพันธุ์ *L. plantarum L. brevis P. acidilactici* และ *S. cremoris* ส่งผลให้ไซเลจผสมของหญ้า และพืชตระกูลถั่วไม่มีความแตกต่างอย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับการไม่ใช้สารเสริม ในขณะที่การใช้เอนไซม์ หรือแบคทีเรียกรดแลกติกเป็นสารเสริมเพียงอย่างเดียวส่งผลให้ไซเลจมีคุณภาพสูงขึ้น และส่งเสริมให้โคนมผลิตน้ำนมที่มีโปรตีนสูงขึ้น

1.6.3 แหล่งคาร์บอน (carbon source)

แหล่งคาร์บอนเป็นสารเสริมที่นิยมใช้ในการผลิตไซเลจจากพืชวัตถุดิบที่มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำต่ำเช่น พืชตระกูลถั่ว และหญ้า โดยจะสนับสนุนการผลิตกรดแลกติก และกรดอะซิติก และเพิ่มรสชาติของไซเลจให้เป็นที่ยอมรับของสัตว์มากขึ้น นอกจากนี้ยังสามารถใช้ปรับความชื้นในไซเลจให้ได้ตามต้องการ อย่างไรก็ตามการใช้แหล่งคาร์บอนในสภาวะที่อุณหภูมิต่ำอาจเกิดปัญหาเรื่องความหนืด ทำให้ใช้งานได้ยาก ตัวอย่างสารเสริมชนิดนี้ได้แก่ กากน้ำตาล (Molasses) และเมล็ดธัญพืชชนิดต่าง ๆ โดยทั่วไปจะเติมกากน้ำตาลในปริมาณ 80 ปอนด์ต่อตันของพืชตระกูลถั่ว และ40 ปอนด์ต่อตันของหญ้า (Perry and Cecava, 1995) ดังการทดลองของ Islam *et al.* (2001) ที่เติมกากน้ำตาลใน Italian ryegrass เพื่อเพิ่มปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำจาก 181 กรัมต่อกิโลกรัมวัตถุแห้งในหญ้าสดเป็น 243.2 กรัมต่อกิโลกรัมวัตถุแห้ง ส่งผลให้ไซเลจมีปริมาณกรดแลกติกสูงขึ้น 4.41 กรัมต่อกิโลกรัมวัตถุแห้งเมื่อเปรียบเทียบกับไซเลจที่ไม่ใช้กากน้ำตาลเป็นสารเสริม

1.6.4 แหล่งไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีน (non protein nitrogen)

แหล่งไนโตรเจนเป็นสารเสริมที่ช่วยเพิ่มค่าการย่อยได้ของอินทรีย์วัตถุในไซเลจ เนื่องจากแอมโมเนียที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายแหล่งไนโตรเจนโดยจุลินทรีย์สามารถสลาย

พันธะลิกโนเซลลูโลส (lignocellulose bond) ในผนังเซลล์ของพืช ทำให้จุลินทรีย์สามารถผลิตกรดแลกติก และกรดอะซิติกได้เพิ่มขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก และทำให้กระเพาะอาหารของสัตว์ย่อยสลายส่วนของผนังเซลล์ในไซเลจได้มากขึ้น นอกจากนี้การเติมแหล่งไนโตรเจนจะเพิ่มสภาวะความเป็นด่างในไซเลจจึงสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรทิเอสซึ่งทำให้เกิดการย่อยสลายโปรตีนในไซเลจ และยังช่วยยับยั้งการเจริญของรา และจุลินทรีย์กลุ่ม Clostridia ส่งผลให้ไซเลจมีค่า aerobic stability สูงหลังเปิดภาชนะหมัก (Adogla-Bessa *et al*., 1999; Kung *et al*., 2000) ตัวอย่างของแหล่งไนโตรเจนที่นิยมใช้คือ แอมโมเนีย และยูเรียในปริมาณ 5-10 และ 10-20 ปอนด์ต่อข้าวโพด 1 ตันตามลำดับ (Perry and Cecava, 1995)

Kung *et al.* (2000) รายงานถึงการใช้แอมโมเนียในรูปของ NH_4OH ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ของไนโตรเจนเป็นสารเสริม ส่งผลให้ไซเลจข้าวโพดมีปริมาณเชื้อยีสต์ลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงเริ่มต้นของการหมัก และมีการเจริญของยีสต์ และราหลังเปิดภาชนะหมักต่ำ และ Islam *et al.* (2001) รายงานว่าการใช้ยูเรีย 4 เปอร์เซ็นต์เป็นสารเสริม ส่งผลให้ไซเลจ Italian ryegrass มีค่าการย่อยได้ของอินทรีย์วัตถุเพิ่มขึ้น 3.78 เปอร์เซ็นต์

1.6.5 กรดชนิดต่าง ๆ

การใช้กรดชนิดต่าง ๆ เป็นสารเสริมทำให้ค่าความเป็นกรดด่างของไซเลจลดลงอย่างรวดเร็ว ส่งผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ การผลิตกรดที่ไม่พึงประสงค์ และการทำงานของเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีน และส่งผลในการเพิ่มการเจริญ และการผลิตกรดแลกติกของแบคทีเรียกรดแลกติก นอกจากนี้ยังเพิ่มค่า aerobic stability ของไซเลจหลังเปิดภาชนะหมัก (Randby, 2000) กรดที่นิยมใช้เป็นสารเสริมได้แก่ กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก กรดไฮโดรคลอริก ควบคู่กับกรดซัลฟิวริก และกรดโปรปิโอนิก (Wallace and Chesson, 1995)

Davies *et al.* (1998) รายงานว่าการใช้กรดฟอร์มิก 3 ลิตรต่อไซเลจ 1 ตันเป็นสารเสริม ส่งผลให้ไซเลจ perennial ryegrass มีค่าความเป็นกรดด่างต่ำ และมีการลดลงของจุลินทรีย์กลุ่ม Enterobacteria อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับไซเลจที่ไม่ใช้สารเสริม และ Randby (2000) รายงานว่าการใช้กรดฟอร์มิกปริมาณ 850 กรัมต่อกิโลกรัมวัตถุแห้งเป็นสารเสริม ส่งผลให้ไซเลจหญ้า sward มีค่าความเป็นกรดด่าง 4.31 ซึ่งต่ำกว่าไซเลจที่ไม่ใช้สารเสริมซึ่งมีค่าความเป็น

กรดด่าง 4.93 และมีปริมาณกรดแลกติก 68.7 กรัมต่อกิโลกรัมวัตถุแห้งซึ่งสูงกว่าไซเลจที่ไม่ใช้สารเสริมซึ่งมีปริมาณกรดแลกติก 63.1 กรัมต่อกิโลกรัมวัตถุแห้ง

1.7 จุลินทรีย์ที่พบในการผลิตไซเลจ

1.7.1 แบคทีเรียกรดแลกติก

แบคทีเรียกรดแลกติกที่พบในไซเลจมีทั้งชนิดรูปร่างกลม (cocci) และท่อน (rod) (ตารางที่ 8) สามารถใช้คาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำในไซเลจเป็นแหล่งคาร์บอนได้ โดยทั่วไปก่อนกระบวนการหมักจะพบแบคทีเรียกรดแลกติกไม่เกิน 2 log CFU ต่อกรัมพืชอาหารสัตว์ จากนั้นแบคทีเรียกรดแลกติกจะเพิ่มปริมาณอย่างรวดเร็วในช่วงกระบวนการที่ไม่ต้องการออกซิเจน จนมีปริมาณ 3-7 log CFU ต่อกรัมไซเลจ โดยแบคทีเรียกรดแลกติกชนิด Homofermentative เช่น *Lactobacillus plantarum* และ *Lactobacillus curvatus* จะเจริญ และผลิตกรดแลกติกในปริมาณสูงในช่วงแรก และแบคทีเรียกรดแลกติกชนิด Heterofermentative เช่น *Lactobacillus brevis* และ *Lactobacillus buchneri* ซึ่งสามารถเจริญที่ระดับความเป็นกรดด่างต่ำได้ดีจะมีบทบาทเพิ่มขึ้นในช่วงต่อมา (Wood, 1998) แบคทีเรียกรดแลกติกส่วนใหญ่จะถูกยับยั้งการเจริญเมื่อไซเลจมีค่าความเป็นกรดด่างต่ำกว่า 4.5 (Wattiaux, 2000)

ตารางที่ 8 สายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลกติกที่มักพบในไซเลจ

Genus	ชนิด	สัณฐานวิทยา	สายพันธุ์
Lactobacillus	Homofermentative	Rod	*L. acidophilus*
			L. casei
			L. coryniformis
			L. curvatus
			L. plantarum
			L. salivarius
			L. alimentarius
			L. delbrueckii
			L. farciminis
			L. leichmannii
			L. sake
			L. sharpeae
Lactobacillus	Heterofermentative	Rod	*L. brevis*
			L. buchneri
			L. fermentum
			L. viridescens
			L. cellobiosus
			L. coprophilus
			L. corynoides
			L. divergens
			L. reuteri

ที่มา: ดัดแปลงจาก Ree (1997)

ตารางที่ 8 (ต่อ) สายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลกติกที่มักพบในไซเลจ

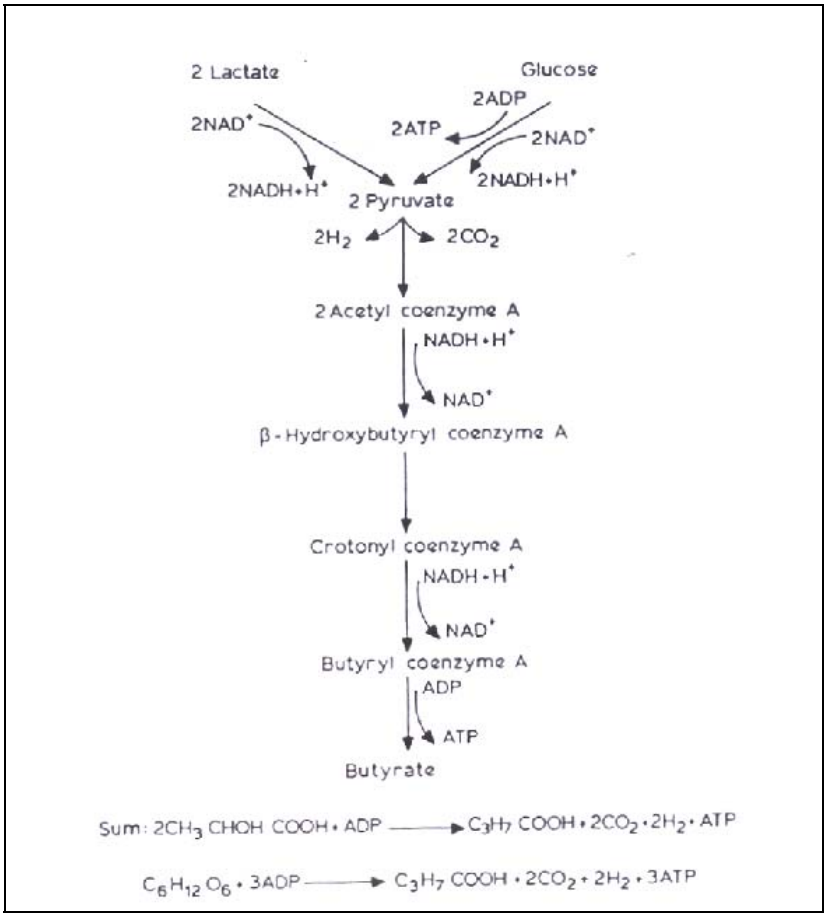
Genus	ชนิด	สัณฐานวิทยา	สายพันธุ์
Pediococcus	Homofermentative	Coccus	*P. acidilacti*
			P. damnosus
			P. pentosaceus
			P. dextrinicus
			P. halophilus
			P. parvulus
Enterococcus	Homofermentative	Coccus	*E. faecalis*
			E. faecium
Lactococcus	Homofermentative	Coccus	*L. lactis*
Streptococcus	Homofermentative	Coccus	*S. bovis*
			S. faecalis
			S. faecium
			S. lactis
Leuconostoc	Heterofermentative	Coccus	*L. mesenteroides*
			L.paramesenteroides

ที่มา: ดัดแปลงจาก Ree (1997)

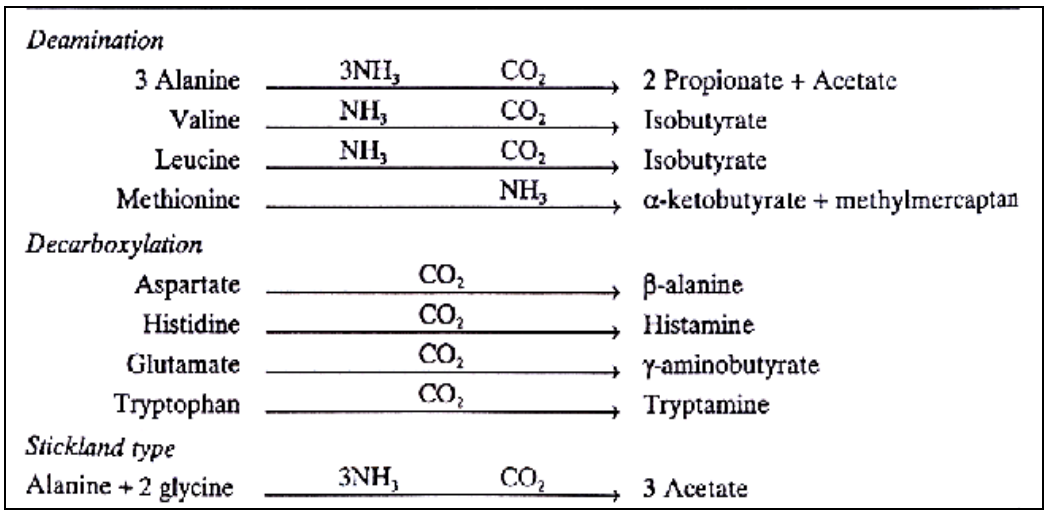
1.7.2 Clostridia

จุลินทรีย์กลุ่ม Clostridia เป็นแบคทีเรียแกรมบวก เจริญได้ดีในสภาวะที่ไม่มีอากาศ อุณหภูมิประมาณ 35 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่างสูงกว่า 5.0 (Meeske *et al*.,

1999; Pauly *et al*., 1999) มักพบในรูปของเอนโดสปอร์ (endospore) ในพืชอาหารสัตว์ที่มีดินปนเปื้อนขณะเก็บเกี่ยว ถ้าการหมักมีประสิทธิภาพต่ำโดยมีความชื้นเกิน 70 เปอร์เซ็นต์ Clostridia กลุ่ม Saccharolytic เช่น *C. butyricum* และ *C. tyrobutyricum* จะแข่งขันในการเจริญกับแบคทีเรียกรดแลกติก โดยจะใช้กรดแลกติก และน้ำตาลเฮกโซสเป็นแหล่งคาร์บอนผลิตกรดบิวทีริก ก๊าซไฮโดรเจน และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (ภาพที่ 6) ส่งผลให้ค่าความเป็นกรดด่างของไซเลจสูงขึ้น ซึ่งเป็นการเตรียมสภาวะให้เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อ Clostridia กลุ่ม Proteolytic เช่น *C. sporogenes* ซึ่งสามารถย่อยสลายโปรตีนในไซเลจด้วยปฏิกิริยา 3 ขั้นตอนคือ Deamination Decarboxylation และ Strickland type (ภาพที่ 7) ได้สารกลุ่มเอมีน เอไมด์ และสารประกอบไนโตรเจนอื่น ๆ เป็นสารผลิตภัณฑ์ รวมทั้งเกิด isobutyrate cadaverine putrescine และ histamine ซึ่งเป็นพิษต่อสัตว์ที่บริโภคไซเลจ (Wood, 1998)



<u>ภาพที่ 6</u> การผลิตกรดบิวทีริกจากกรดแลกติก และกลูโคส ของ Saccharolytic Clostridia
ที่มา: Wood (1998)



ภาพที่ 7 ปฏิกิริยาการสลายโปรตีนของ Proteolytic Clostridia
ที่มา: Wood (1998)

ไซเลจที่เกิดการเสื่อมเสียจากการเจริญของจุลินทรีย์กลุ่ม Clostridia จะมีค่าความเป็นกรดด่างเกิน 5.0 และมีปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจนสูงกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด มีกลิ่นของกรดบิวทีริก และมีปริมาณกรดบิวทีริกสูงกว่ากรดแลกติก (Wattiaux, 2000)

1.7.3 Enterobacteria

Enterobacteria เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่ไม่สร้างสปอร์ชนิด Facultative anaerobe รูปร่างเป็นแท่ง เจริญได้ดีที่ค่าความเป็นกรดด่างประมาณ 5-7 และถูกยับยั้งการเจริญที่ค่าความเป็นกรดด่างต่ำกว่า 4.5 สามารถเปลี่ยนน้ำตาลเฮกโซส เช่น กลูโคส และฟรุกโตส และน้ำตาลเพนโตส เช่น ไซโลส และไรโบสเป็นกรดอะซิติก กรดแลกติก กรดฟอร์มิก กรดบิวทีริก กรดซักซินิก 2,3-บิวเทนไดออล (2,3-butanediol) เอธานอล ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และก๊าซไฮโดรเจน และสร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase) (Driehuis *et al*., 1997; Robinson *et al*., 2000; Wattiaux, 2000; Seglar, 2003)

1.7.4 ยีสต์

ยีสต์ที่พบในพืชอาหารสัตว์ก่อนการหมักได้แก่ *Candida sp. Hansenula sp. Pichia sp.* และ *Torulopsi sp.* ในระหว่างกระบวนการหมักจะพบยีสต์กลุ่มที่สามารถใช้กรดแลกติกเป็นแหล่งคาร์บอนในสภาวะที่มีออกซิเจน (lactic-assimilating yeast) เช่น *Candida lambica* และ *Hansenula anomola* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคในมนุษย์ (pathogen) ในปริมาณ 6.11-6.46 log CFU ต่อกรัมไซเลจ ซึ่งก่อให้เกิดการเสื่อมเสียของไซเลจหลังเปิดภาชนะหมักโดยจะเพิ่มจำนวนเป็น 9-12 log CFU ต่อกรัมไซเลจภายในเวลา 2-3 วัน และผลิตก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และความร้อนเป็นสารผลิตภัณฑ์ (Seglar, 2003; O'Brien *et al*., 2006) ส่งผลในการกระตุ้นการเจริญของเชื้อราตามมา อย่างไรก็ตามในระหว่างการบวนการหมักสามารถพบยีสต์ที่เป็นประโยชน์ต่อการรักษาเสถียรภาพของไซเลจเช่น *Endomycopsis* และ *Saccharomyces* โดยสามารถยับยั้งการเจริญของราได้ (Wood, 1998)

ยีสต์ส่วนใหญ่ที่พบในไซเลจสามารถเจริญได้ดีที่ค่าความเป็นกรดด่างช่วง 3-8 บางสายพันธุ์สามารถทนค่าความเป็นกรดด่างได้ถึง 2 (Meeske *et al*., 1999) ตลอดทั้งกระบวนการหมักจึงมักตรวจพบเชื้อยีสต์ควบคู่กับแบคทีเรียกรดแลกติก ยีสต์สามารถใช้คาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำเพื่อผลิตแอลกอฮอล์เป็นสารผลิตภัณฑ์หลัก (Driehuis *et al*., 1997) ผลิตสารกลุ่มเอสเทอร์เช่น methyl-acetate และ ethyl-acetate ซึ่งมีกลิ่นเฉพาะตัว (Seglar, 2003) และกรดเช่น กรดแลกติก และกรดอะซิติก (Weinberg *et al.,* 1999) เชื้อยีสต์ในไซเลจถูกยับยั้งได้โดยกรดอะซิติก กรดบิวทีริก และกรดโปรปิโอนิก (Filya, 2004)

1.7.5 จุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ

จุลินทรีย์ชนิดอื่นที่มักพบในไซเลจคือ เชื้อราซึ่งพบกว่า 60 สายพันธุ์ในไซเลจ (Wattiaux, 2000) สายพันธุ์ที่พบบ่อยคือ *Penicillium roqueforti* และ *Aspergillus fumigatus* ในปริมาณ 5.54 log CFU ต่อกรัมไซเลจ ราทั้ง 2 สายพันธุ์สามารถอยู่รอดได้ในสภาวะไม่มีอากาศ และที่ค่าความเป็นกรดด่าง 3.6 รวมทั้งสามารถผลิตไมโคทอกซินเช่น mycophenolic acid Gliotoxin Roquefortine C และ PR toxin ซึ่งสามารถสะสมในร่างกายสัตว์ที่บริโภคไซเลจ ส่งผลให้สัตว์มีปริมาณการบริโภคอาหารต่ำลง ผลิตน้ำนมลดลง และมีโอกาสการติดเชื้อสูงขึ้น รวมทั้งเป็นอันตรายต่อมนุษย์ที่บริโภคเนื้อ น้ำนม และผลิตภัณฑ์ของสัตว์นั้นด้วย (Wood, 1998; Amigot *et al*.,

2006; O'Brien *et al*., 2006) เชื้อราในไซเลจสามารถใช้คาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำ และกรดแลกติกเป็นแหล่งคาร์บอน รวมทั้งสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตที่เป็นโครงสร้างผนังเซลล์พืชเช่น เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และเพคตินด้วย (Weinberg *et al*., 1999; Yahaya *et al*., 2001)

แบคทีเรียกลุ่ม Bacillus สามารถเจริญได้ดีในสภาวะมีอากาศ จึงมักพบในไซเลจช่วงที่มีออกซิเจน โดยเฉพาะหลังเปิดภาชนะหมัก ไซเลจที่พบแบคทีเรียกลุ่มนี้จะมีปริมาณกรดแลกติกลดลงเนื่องจากถูกใช้เป็นแหล่งคาร์บอน และมีปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจนสูงจากการย่อยสลายโปรตีน (McAllister *et al*., 1998)

Listeria monocytogenes เป็นจุลินทรีย์ก่อโรคที่พบไม่สูงนักในไซเลจเนื่องจากเจริญได้ต่ำที่ค่าเป็นกรดด่างต่ำกว่า 5 นอกจากนี้ยังอาจพบแบคทีเรียกรดอะซิติก และแบคทีเรียกรดโปรปิโอนิกในไซเลจหลังการเปิดภาชนะหมักด้วย (Wood, 1998)

2. <u>เอนไซม์ย่อยสลายที่ใช้ในการผลิตไซเลจ</u>

การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไซเลจวิธีหนึ่งทำได้โดยใช้เอนไซม์ย่อยสลายในกลุ่มเซลลูเลส และเฮมิเซลลูเลสเป็นสารเสริม เพื่อย่อยสลายส่วนเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลสซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักในโครงสร้างผนังเซลล์พืชอาหารสัตว์ได้น้ำตาลซึ่งแบคทีเรียกรดแลกติกสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอน ส่งผลให้ไซเลจมีคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำเพิ่มขึ้น NDF ลดลง และในบางการศึกษาพบว่า สัตว์ที่บริโภคไซเลจผลิตน้ำนมได้เพิ่มขึ้น (Hoffman and Muck, 1999) เอนไซม์ย่อยสลายกลุ่มนี้ผลิตได้จากจุลินทรีย์ทั้งชนิดที่ต้องการ และไม่ต้องการอากาศในการเจริญดังแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 สายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ย่อยสลายเซลลูเลส และเฮมิเซลลูเลส

สายพันธุ์	
แบคทีเรียที่ต้องการอากาศ	แบคทีเรียที่ไม่ต้องการอากาศ
Cellulomonas fimi	*Clostridium thermocellum*
Pseudomonas fluorescens	*C. stercorarium*
Microbispora bispora	*Bacteriodes cellulovorans*
Clostridium cellulolyticum	*Ruminococcus albus*
	R. flavefaciens
ราที่ไม่ต้องการอากาศ และเจริญได้ดีที่อุณหภูมิปานกลาง	*Fibrobacter succinogenes*
	Acetivibrio cellulolyticus
Neocallimastix frontalis	
N. patriciarum	ราที่ต้องการอากาศ และเจริญได้ดีที่อุณหภูมิปานกลาง
Piromyces equi	
P. communis	*Trichoderma koningii*
Sphaeromonas communis	*T. viride*
	T. reesei
ราที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูง	*Pennicilium pinophilum*
Humicola insolens	*Sporotrichum pulverulentum*
Sporotrichum thermophile	*Fusarium solani*
Thermoascus aurantiacus	*Talaromyces emersonii*
Chaetomium thermophile	

ที่มา: ดัดแปลงจาก Bedford and Patridge (2001)

2.1 ชนิดของเอนไซม์ย่อยสลาย

2.1.1 เอนไซม์เซลลูเลส

เอนไซม์เซลลูเลสเป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสซึ่งเป็นสารที่ให้ความแข็งแรงในโครงสร้างของเซลล์พืชประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสเชื่อมกันด้วยพันธะ beta-1,4 glycosidic เอนไซม์เซลลูเลสประกอบด้วยเอนไซม์ย่อยสลาย 3 กลุ่มใหญ่คือ เอกโซเซลลูเลส (Exocellulase) เอนโดเซลลูเลส (Endocellulase) และเซลโลไบเอส (cellobiase) (Kung *et al*., 1991; Mawadza *et al*., 2000) (ภาพที่ 8)

เอนไซม์เอกโซเซลลูเลส หรือ Cellobiohydrolase (EC 3.2.1.91) เป็นเอนไซม์ที่ตัดเซลลูโลสจากปลายสายให้เป็นหน่วยย่อยคือ เซลโลไบโอส เอกโซเซลลูเลสแบ่งเป็น 2 ชนิด คือ CBHI ซึ่งสลายพันธะ beta-1,4 glycosidic ที่ด้าน reducing end และ CBHII ซึ่งสลายพันธะ beta-1,4 glycosidic ที่ด้าน nonreducing end (Barr *et al*., 1996)

เอนไซม์เอนโดเซลลูเลส หรือ Endo 1,4-beta-glucanase (EC 3.2.1.4) เป็นเอนไซม์ที่ตัดพันธะ beta-1,4 glycosidic ในสายเซลลูโลสอย่างสุ่ม แบ่งออกเป็นเอนไซม์แบบจำเพาะที่ย่อยสลายเซลลูโลสอย่างเจาะจง และเอนไซม์แบบไม่จำเพาะที่สามารถย่อยสลายสารชนิดอื่นนอกเหนือจากเซลลูโลสเช่น ไซแลนได้ (Bedford and Patridge, 2001)

เอนไซม์เซลโลไบเอส หรือ 1,4-beta-glucosidase (EC 3.2.1.21) เป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายเฉพาะเซลลูโลสสายสั้นเช่น เซลโลไบโอส เซลโลเดกซ์ตริน และเซลโลเฮกซาโนส ได้กลูโคสเป็นโมโนเมอร์ (monomer) (Bedford and Patridge, 2001)

เอนไซม์เซลลูเลสมักพบในเชื้อรากลุ่ม White rod fungi หรือ Brown rod fungi และแบคทีเรียกลุ่ม *Cellulomonas sp. Bacillus sp.* และ *Pseudomonas sp.* การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากจุลินทรีย์ทำได้โดยการใช้สารเหนี่ยวนำเช่น แมนโนส (mannose) และ guar gum ในขณะที่น้ำตาลกลูโคส และเซลโลไบโอสจะยับยั้งการผลิตเอนไซม์โดยกระบวนการ catabolic repression (Kung *et al*., 1991; Gardner *et al.,* 1995)

Enzyme	Mode of action
Endoglucanase or endocellulase (1,4-β-D-glucan glucanohydrolase; EC 3.2.1.4)	–G–G–G–G–G–G–G–G–G–G– ↑ ↑ Cleaves 1,4-β linkages at random (Wood and Bhat, 1988)
Cellobiohydrolase (CBH) or exocellulase (1,4-β-D-glucan cellobiohydrolase; EC 3.2.1.91)	G–G–G–G–G–G–G–G–G–G–G– ↑ (type I) ↑ (type II) Releases cellobiose from both reducing (type II) and non-reducing ends (type I) (Wood *et al.*, 1988; Vrsanska and Biely, 1992; Barr *et al.*, 1996; Gilkes *et al.*, 1997)
β-Glucosidase or cellobiase (β-D-glucoside glucohydrolase; EC 3.2.1.21)	G–G; G–G–G–G; G–G–G–G–G ↑ ↑ ↑ ↑ • ↑ Releases glucose from cellobiose and hydrolyses short-chain cello-oligosaccharides from both reducing and non-reducing ends by releasing one glucose unit at a time (Wood and Bhat, 1988; Christakopoulos *et al.*, 1994a)

ภาพที่ 8 การทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส

ที่มา: Bedford and Patridge (2001)

เอนไซม์เซลลูเลสสามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ และระดับความเป็นกรดด่างต่างกันขึ้นกับแหล่ง และชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้ผลิตเอนไซม์ Mawadza *et al.* (2000) รายงานว่า เอนไซม์เซลลูเลสจาก *B. subtilis* CH43 ซึ่งเป็นเชื้อที่แยกจากบ่อน้ำพุร้อนสามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ระดับความเป็นกรดด่างประมาณ 5.0-6.5 Kung *et al.* (1990) รายงานว่า เอนไซม์เซลลูเลสจาก *Aspergillus niger* ทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่าง 4.5 George *et al.* (2001) รายงานว่า เอนไซม์ซีเอ็ม-เซลลูเลสจาก Actinomycete สายพันธุ์ *Thermomonospora sp.* ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0 Rouau and Foglietti (1985) รายงานว่า เอนไซม์เอนโดเซลลูเลสจาก White rot fungi สายพันธุ์ *Dichomitus squalens* ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่าง 4.8 และ Kung *et al.* (1991) รายงานว่า เอนไซม์เซลลูเลสจาก *Trichoderma reesei* ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 50-70 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่าง 4.5-5.0

2.1.2 เอนไซม์ไซลาเนส

ไซลาเนสเป็นเอนไซม์ย่อยสลายหลักที่ใช้เป็นสารเสริมในไซเลจ มักพบในพืชเช่น Antarctic krill และข้าวบาร์เลย์ รวมทั้งจุลินทรีย์ทั้งยีสต์ รา และแบคทีเรียเช่น *Trichoderma*

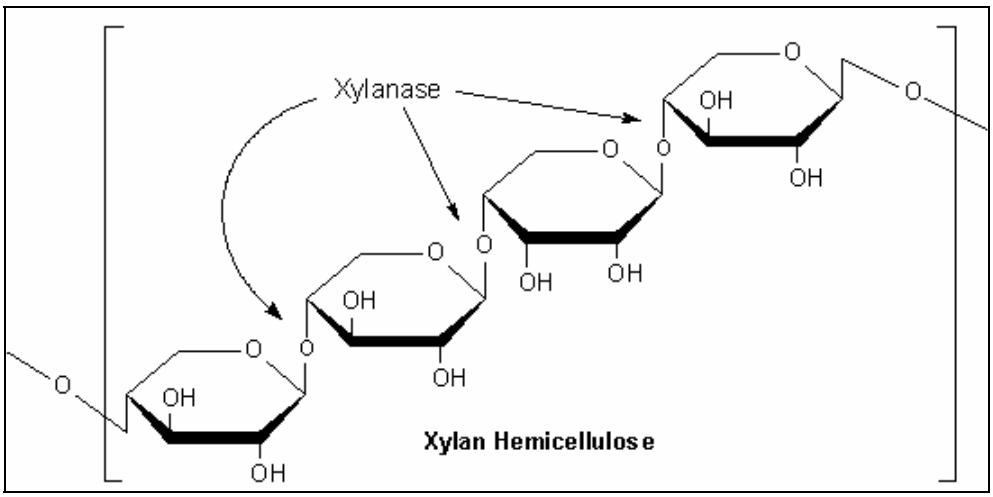
sp. Bacillus sp. Aspergillus sp. Penicillium sp. Aureobasidium sp. และ *Talaromyces sp.* (Bedford and Patridge, 2001; Sa´-Pereira *et al*., 2002) การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากแบคทีเรียจำเป็นต้องใช้ไซแลน หรือรำข้าวสาลีเป็นสารเหนี่ยวนำเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิต ในขณะที่การใช้น้ำตาลไซโลส กลูโคส แมนโนส แลกโตส (lactose) เซลโลไบโอส ซูโครส มอลโตส และเมลิไบโอสจะทำให้เกิด catabolic repression (Liu *et al*., 1999; Sa´-Pereira *et al*., 2002)

ไซลาเนสมีคุณสมบัติในการย่อยสลายสารประกอบไซแลนซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักในส่วนของเฮมิเซลลูโลสในพืชตระกูลหญ้า ไซแลนเป็นเฮเทอโรโพลิเมอร์ (hetero polymer) ของน้ำตาลไซโลสที่เชื่อมกันด้วยพันธะ 1,3-1,4-xylosyl linkage ซึ่งชนิดที่พบในพืชอาหารสัตว์จะมีกรดยูโรนิก กาแลกโตส และ 4-o-methyl ether เป็นองค์ประกอบด้วย (Bedford and Patridge, 2001)

เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายไซแลนสามารถแบ่งได้เป็น 2 ชนิดคือ เอนโดไซลาเนส (Endoxylanase) หรือ Endo-beta-1,4-D-xylanase หรือ 1,4-beta-D-xylan xylanohydrolase (EC 3.2.1.8) และเบตา-ไซโลซิเดส (beta-xylosidase) หรือ 1,4-beta-D-xylan xylohydrolase (EC 3.2.1.37) (Sa´-Pereira *et al*., 2002) โดยเอนโดไซลาเนสจะสลายพันธะของไซแลนในลักษณะสุ่ม (random) ได้ผลิตภัณฑ์เป็น xylo-oligosaccharide ที่มีความยาวต่างกัน และเอนไซม์เบตา-ไซโลซิเดสจะย่อยไซโลไบโอส (xylobiose) และ xylo-oligosaccharide สายสั้นได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลไซโลส (ภาพที่ 9)

ความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ไซลาเนสขึ้นกับแหล่ง และชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้ผลิตเอนไซม์ Taneja *et al*. (2002) รายงานว่าเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Aspergillus nidulans* KK-99 ซึ่งแยกจากน้ำทิ้งของโรงงานกระดาษทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่าง 8 Heidorne *et al.* (2006) รายงานว่าเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Ceriporiopsis subvermispora* ทำงานได้ดีที่ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0 และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส รวมทั้งมีความเสถียรที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส Chivero *et al.* (2001) รายงานว่าเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Bacillus sp.* ซึ่งแยกจากผลไม้ในประเทศซิมบับเวทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่าง 8 และมีความเสถียรที่อุณหภูมิ 30-50 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่าง 6-9 และ Sa´-Pereira *et al.* (2002) รายงานว่าเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Bacillus subtilis* ซึ่งแยกจากบ่อน้ำ

ร้อนในประเทศโปรตุเกสทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่าง 6 และมีความเสถียรที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่าง 8.2



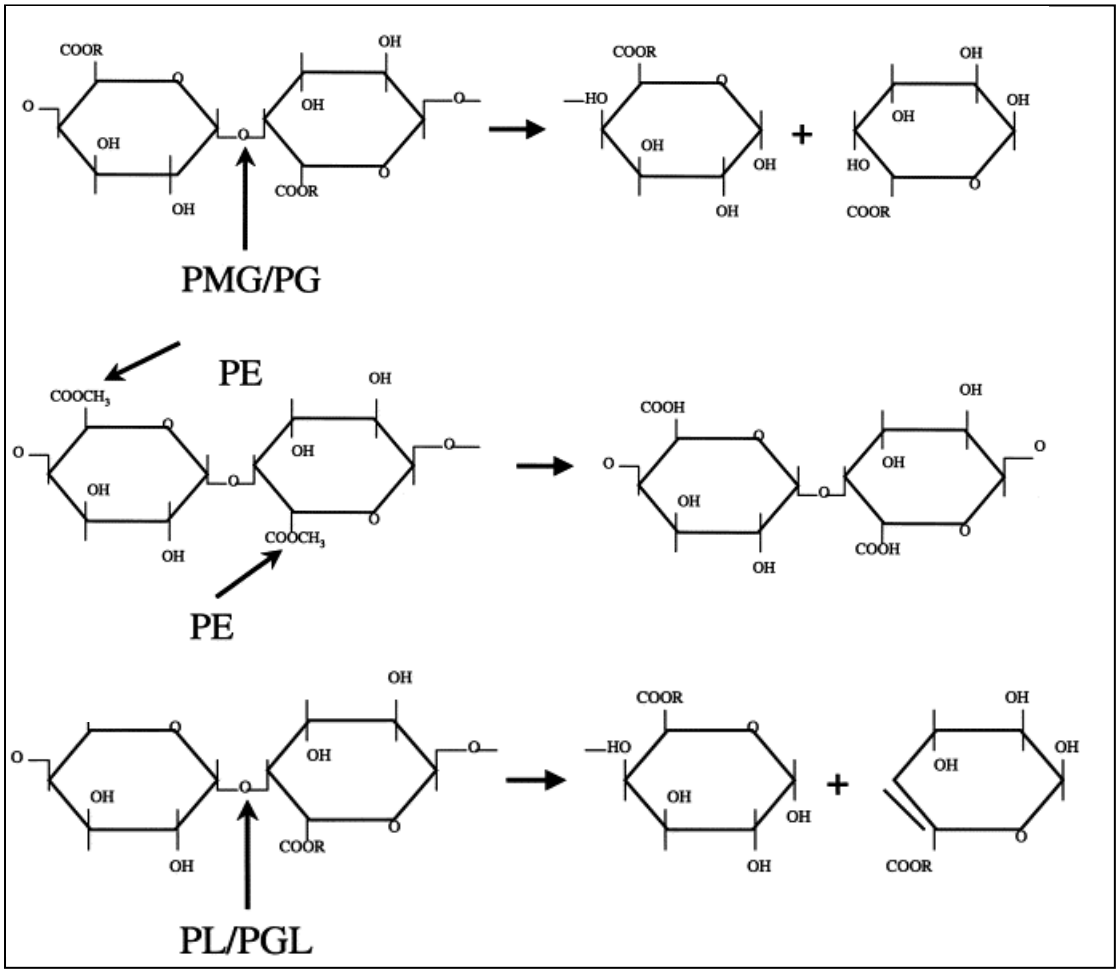
ภาพที่ 9 การทำงานของเอนไซม์ไซลาเนส
ที่มา: ดัดแปลงจาก Bedford and Patridge (2001)

2.1.3 เอนไซม์เพคติเนส

เพคติเนสเป็นเอนไซม์ที่ใช้ย่อยสลายสารประกอบเพคติน และอนุพันธ์ของ alfa-1,4-D-Galacturonopyranose เพคตินเป็นโพลิเมอร์ที่มีกรดกาแลกตูโรนิก (galacturonic acid) เชื่อมกันด้วยพันธะ alfa-1,4-glycosidic เป็นโครงสร้างหลัก และมีกิ่งของแรมโนส (ramnose) อาราบิโนส (arabinose) กาแลกโตส (galactose) และไซโลส ในบางกรณีหมู่คาร์บอกซิลของโมเลกุลกรดกาแลกตูโรนิกอาจเกิดปฏิกิริยา Esterification กับหมู่เมธิล และอาจถูกทำให้เป็นกลางโดยการเกิดปฏิกิริยากับโซเดียม โพแทสเซียม หรือแอมโมเนียมไอออน ทำให้สามารถแบ่งชนิดของเพคตินได้เป็นกรดเพคติก (pectic acid) กรดเพคตินิก (pectinic acid) โพรโตเพคติน (protopectin) และเพคติน (Kashyap *et al*., 2001)

เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายเพคตินสามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มคือ Pectinesterase (PE) หรือ Pectin pectylhydrolase หรือ Pectinmethyl hydrolase (EC.3.1.1.11) ซึ่งทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยพันธะเอสเทอร์ระหว่างหมู่เมธิล และหมู่คาร์บอกซิลของสารประกอบเพคติน Polygalacturonase (PG) หรือ Poly-alfa-1,4-galacturonide glycohydrolase (EC 3.2.2.15)

ซึ่งทำหน้าที่ย่อยพันธะ alfa-1,4-glycosidic ในสารประกอบเพคติน และ Pectate lyase (PL) หรือ Poly-alfa-1,4-D-galacturonide lyases (EC 4.2.9.3) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่อยู่ในกลุ่มไลเอส (lyase) มีลักษณะปฏิกิริยาของการย่อยพันธะ alfa-1,4-glycosidic ในเพคติน และกรดเพคติกได้โพลิเมอร์สายสั้นที่สายหนึ่งมีปลายรีดิวซ์ และอีกสายมีพันธะคู่ (ภาพที่ 10) (Kashyap *et al*., 2001)



ภาพที่ 10 ปฏิกิริยาการย่อยสลายเพคตินโดยเอนไซม์เพคติเนส; PG, Polygalacturonase; PE, Pectin esterase; PL, Pectate lyase

ที่มา: Gummadi and Panda (2003)

เอนไซม์เพคติเนสสามารถผลิตได้จากพืชเช่น เปลือกส้ม เนื้อมะเขือเทศ สับปะรด มะนาว และเทอร์นิบ (turnip) และจุลินทรีย์ทั้งแบคทีเรีย ยีสต์ และรา เช่น *Aspergillus niger A. awamori Aureobasidium pullulans Trichoderma reesei Rhizopus stolonife*

Clostridium aectobutylicum Bacillus macerans B. subtilis Erwinia carotovara E. chrysanthemi Penicillium capsulatum และ *Kluveromyces marxianus* การเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตเพคติเนสจากจุลินทรีย์ทำได้โดยใช้สารเหนี่ยวนำเช่น กลูโคส กรดกาแลกตูโรนิก และซูโครส (Gummadi and Panda, 2003)

ความสามารถในการทำงานของเอนไซม์เพคติเนสขึ้นกับแหล่ง และชนิดของจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ Moyo *et al*. (2003) รายงานว่าเอนไซม์เพคติเนสจาก *K. wickerhamii* ซึ่งแยกจากผลไม้ในประเทศบอทซวานาทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่าง 5 Kung *et al.* (1991) รายงานว่าเอนไซม์เพคติเนสจาก *A. niger* ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่าง 3.2 Gillespie *et al*. (1990) รายงานว่า เอนไซม์ Endo polygalacturonase จาก *P. capsulatum* ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 62 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่าง 4.68 และ Manachini *et al.* (1988) รายงานว่าเอนไซม์ pectate lyase 2 ตัวจากเชื้อ *Aureobasidium pullulans* มีความเสถียรที่ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0 และ 7.5 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

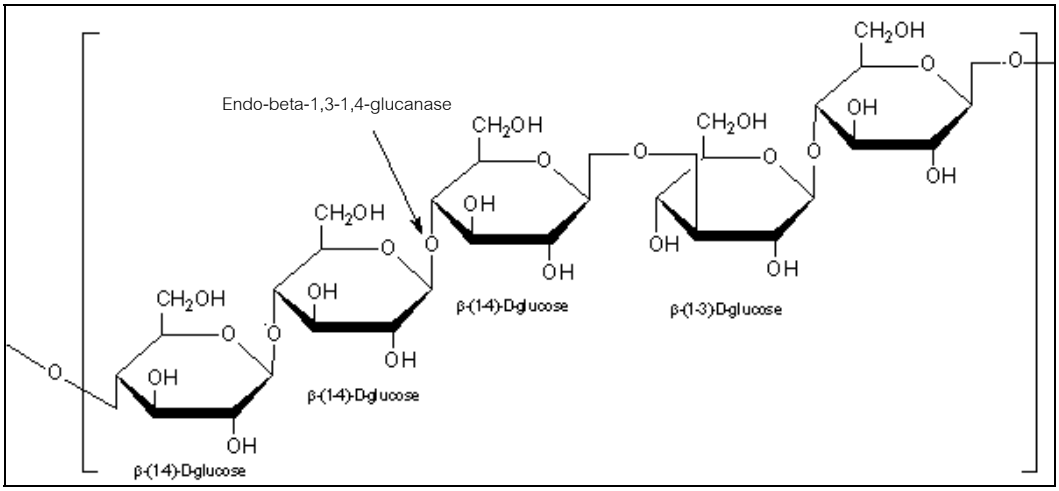
2.1.4 เอนไซม์เบตา-กลูคาเนส

เอนไซม์เบตา-กลูคาเนส หรือเอนโด-เบตา-1,3-1,4-กลูคาเนส (Endo-beta-1,3-1,4-glucanase, EC3.2.1.73) เป็นเอนไซม์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายเบตา-1,3-1,4-กลูแคน (beta-1,3-1,4-glucan) ซึ่งเป็นสารประกอบส่วนเฮมิเซลลูโลสในผนังเซลล์ของพืชอาหารสัตว์โดยเอนไซม์จะตัดพันธะ beta-1,4 ที่อยู่ติดกับพันธะ beta-1,3-glycosidic บริเวณปลายด้าน non-reducing ได้สารผลิตภัณฑ์คือ น้ำตาลกลูโคส (Malet *et al*., 1993) (ภาพที่ 11)

เอนไซม์เบตา-กลูคาเนสสามารถผลิตได้จากทั้งพืชเช่น มอลท์ (malt) และจุลินทรีย์กลุ่ม Bacillus เช่น *B. subtilis B. macerans B. licheniformis B. polymyxa B. brevis* และ *B. amyloliquefaciens* และจุลินทรีย์ทรีย์กลุ่มอื่นเช่น *Fibrobacter succinogenes Streptococcus bovis Clostridium thermocellum* และ *Orpinomyces sp.* (Tang *et al*., 2004)

การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์เบตา-กลูคาเนสจากจุลินทรีย์ทำได้โดยการใช้เบตา-กลูแคน และสารประกอบที่ได้จากการย่อยสลายเบตา-กลูแคนเป็นสารเหนี่ยวนำเช่น

Tang *et al.* (2004) รายงานว่าเดกซ์ตริน (dextrin) เป็นสารเหนี่ยวนำที่เหนี่ยวนำให้เชื้อ *Bacillus subtilis* ZJF-1A5 ผลิตเอนไซม์เบตา-กลูคาเนสได้สูงสุด ส่วนแมนโนส และเซลโลไบโอสสามารถเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์เบตา-กลูคาเนสได้ในปริมาณที่รองลงมา ในขณะที่ฟรุกโตส อาราบิโนส และซูโครสส่งผลให้เกิด catabolic repression (Gardner *et al*., 1995)



<u>ภาพที่ 11</u> ปฏิกิริยาการย่อยสลายเบตา-1,3-1,4-กลูแคนโดยเอนไซม์เอนโด-เบตา-1,3-1,4-กลูคาเนส
ที่มา: Malet *et al*. (1993)

2.2 การทำให้เอนไซม์ย่อยสลายเข้มข้นด้วยวิธีการตกตะกอน

การตกตะกอนเอนไซม์เป็นวิธีหนึ่งของการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์บางส่วน (partial purification) และทำให้เอนไซม์มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น ผลิตภัณฑ์เอนไซม์ที่ได้จากการตกตะกอนจะสามารถย่อยสลายสับสเทรตได้อย่างเจาะจงในปริมาณที่สูงขึ้นเมื่อใช้เอนไซม์ปริมาณเท่าเดิม การตกตะกอนเอนไซม์ที่นิยมใช้ในปัจจุบันมี 2 วิธีคือ

2.2.1 การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นเกลือที่มีผู้ใช้มากที่สุดชนิดหนึ่งในการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือ เนื่องจากแอมโมเนียมซัลเฟตทำให้โปรตีนสูญเสียสภาพทางธรรมชาติในอัตราที่ต่ำ หาได้ง่าย มีราคาถูก สามารถใช้งานได้ในช่วงความเป็นกรดด่างที่กว้าง และแยกตะกอนของโปรตีนจากการตกตะกอนออกได้ง่ายด้วยเครื่องเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (Roe, 2001)

พื้นผิวของโมเลกุลโปรตีนจะประกอบส่วนที่ชอบน้ำ หรือไฮโดรฟิลิก (hydro philic) และส่วนที่ไม่ชอบน้ำ หรือไฮโดรโฟบิก (hydrophobic) เมื่อเติมเกลือลงในสารละลายโปรตีนจะเกิดแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลของเกลือ และน้ำซึ่งเป็นแรงดึงดูดที่แข็งแรงกว่าแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลของน้ำ และส่วนที่ชอบน้ำของโปรตีน ทำให้แรงดึงดูดระหว่างน้ำ และโปรตีนลดลง เกิดการตกตะกอนซึ่งเรียกว่า salting out (Scopes, 1988)

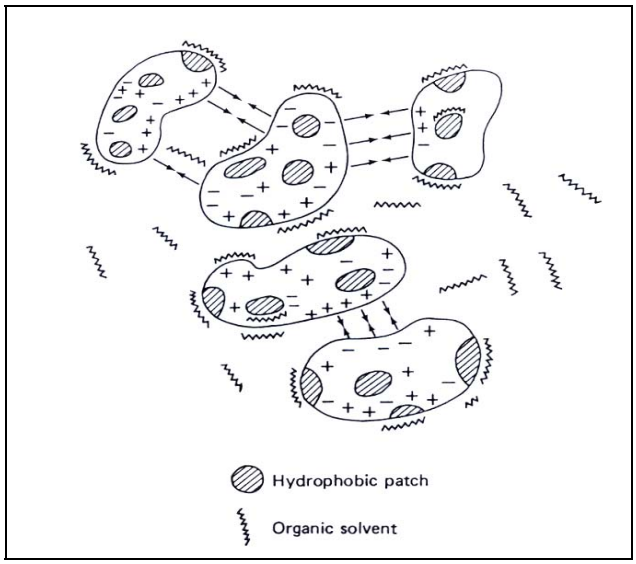
ตัวอย่างการตกตะกอนเอนไซม์ย่อยสลายกลุ่มเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลสด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตเช่น การใช้แอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 40–80 เปอร์เซ็นต์ตกตะกอนเอนไซม์เอนโดไซลาเนสจากเชื้อ *Rhizopus oryzae* (Bakir *et al.*, 2001) การใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 30–55 เปอร์เซ็นต์ตกตะกอนเอนไซม์ซีเอ็ม-เซลลูเลสจาก *Alkalothermophilic actinomycete* (George *et al.*, 2001) และการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ตกตะกอนเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Aspergillus nidulans* KK-99 ที่พบว่าเอนไซม์หลังการตกตะกอนมีผลได้ (% yield) 74.6 เปอร์เซ็นต์ (Taneja *et al.*, 2002)

การใช้แอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นสูงในการตกตะกอนมีแนวโน้มที่จะทำให้เอนไซม์สูญเสียค่ากิจกรรมเช่น การใช้แอมโมเนียซัลเฟตเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ตกตะกอนเอนไซม์เพคติเนสจากเชื้อ *Aspergillus carbonarius* สามารถตกตะกอนโปรตีนได้ดี แต่ทำให้เอนไซม์สูญเสียค่ากิจกรรม ทำให้ได้ผลได้เพียง 30 เปอร์เซ็นต์ (Singh *et al.*, 1999) การใช้แอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 65 เปอร์เซ็นต์ตกตะกอนเอนไซม์ Endo-1,3(4)-beta-xylanase Xyl II จากเชื้อ *Bacillus subtilis* ทำให้เอนไซม์หลังการตกตะกอนมีค่ากิจกรรมจำเพาะลดลง 0.95 เท่า และมีผลได้เพียง 37 เปอร์เซ็นต์ (Sa´-Pereira *et al.*, 2002) และการใช้แอมโมเนียซัลเฟตความเข้มข้นสูงกว่า 65 เปอร์เซ็นต์ตกตะกอนเอนไซม์ซูเครสจากเชื้อ *B. subtilis* ทำให้เอนไซม์สูญเสียค่ากิจกรรม 98 เปอร์เซ็นต์ (Gorrec *et al.*, 2002)

2.2.2 การตกตะกอนเอนไซม์ด้วยอะซิโตน (acetone)

อะซิโตนเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent) ที่ใช้ตกตะกอนโปรตีนอย่างแพร่หลายในภาคอุตสาหกรรมเนื่องจากอะซิโตนมีประสิทธิภาพในการตกตะกอนสูง ไม่ทำปฏิกิริยากับโปรตีน ไม่ทำให้โปรตีนสูญเสียสภาพธรรมชาติ และสามารถแยกออกจากตะกอนของโปรตีนได้ง่าย (Scopes, 1988)

อะซิโตนทำให้ความสามารถในการละลายน้ำของโปรตีนหรือเอนไซม์ลดลง โดยโมเลกุลของอะซิโตนจะเข้าแทนที่โมเลกุลของน้ำที่อยู่รอบ ๆ โมเลกุลของโปรตีน ส่งผลให้โมเลกุลของโปรตีนตกตะกอน โดยโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่จะตกตะกอนก่อน (ภาพที่ 12)



ภาพที่ 12 การทำงานของตัวทำละลายอินทรีย์ในการตกตะกอนเอนไซม์ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์
ที่มา: Scopes (1988)

ข้อจำกัดของการใช้อะซิโตนความเข้มข้นสูงในการตกตะกอนเอนไซม์คือ ปริมาตรของสารละลายเอนไซม์ที่ตกตะกอนจะเพิ่มขึ้นมากทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนสูงในการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ และต้องใช้ภาชนะขนาดใหญ่ในการตกตะกอน จึงมีการศึกษาไม่มากนักที่ใช้วิธีนี้ในการเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์เช่น การศึกษาของ Michail *et al*. (2006) ที่ใช้อะซิโตนความเข้มข้น 43 50 และ 56 เปอร์เซ็นต์ตกตะกอนเอนไซม์โปรทิเอสจากหัวปลา Rainbow trout และพบว่าการใช้อะซิโตนความเข้มข้น 56 เปอร์เซ็นต์ส่งผลให้เอนไซม์หลังการตกตะกอนมีค่ากิจกรรมจำเพาะสูงเป็น 32.75 เท่า การศึกษาของ Kavian *et al*. (1999) ที่ใช้ อะซิโตนความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ตกตะกอนเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *Trichoderma viride* BRC-25 แล้วพบว่าเอนไซม์มีค่ากิจกรรมจำเพาะเพิ่มขึ้นเกือบ 5 เท่า การศึกษาของ Mawadza *et al.* (2000) ที่ใช้อะซิโตนความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ตกตะกอนเอนไซม์เซลลูเลสจาก *B. subtilis* CH43 แล้วพบว่าเอนไซม์ที่ได้มีค่ากิจกรรมจำเพาะเพิ่มขึ้นเกือบ 3 เท่า และการศึกษาของ Singh *et al.* (1999) ที่พบว่าการใช้

อะซิโตนเข้มข้น 52.38 เปอร์เซ็นต์ตกตะกอนเอนไซม์เพคติเนสจากเชื้อ *Aspergillus carbonarius* สามารถตกตะกอนโปรตีนได้ดี แต่เอนไซม์ที่ได้สูญเสียค่ากิจกรรม และมีผลได้เพียง 53 เปอร์เซ็นต์

2.3 องค์ประกอบของเอนไซม์ย่อยสลายที่ใช้เป็นสารเสริมในไซเลจ

เอนไซม์ย่อยสลายที่นิยมใช้เป็นสารเสริมในไซเลจมักมีองค์ประกอบของเอนไซม์เซลลูเลสซึ่งทำหน้าที่ย่อยสลายส่วนของเซลลูโลสในพืชอาหารสัตว์ เฮมิเซลลูเลสเช่น ไซลาเนส และเบตา-กลูคาเนสซึ่งทำหน้าที่ย่อยสลายส่วนเฮมิเซลลูโลส เพคติเนสซึ่งทำหน้าที่ย่อยสลายส่วนเพคติน และอัลฟา-อะไมเลส (alfa-amylase) ซึ่งทำหน้าที่ย่อยสลายส่วนของแป้ง (Stokes, 1992; Chen *et al*., 1994; Weinberg *et al*., 1995; Colombatto *et al*., 2004) เอนไซม์ย่อยสลายที่ใช้เป็นสารเสริมจะมีเอนไซม์องค์ประกอบแต่ละชนิดในสัดส่วนเช่นใดขึ้นกับชนิด อายุ และองค์ประกอบทางเคมีของพืชอาหารสัตว์ และสภาวะในการผลิตไซเลจ (Rodrigues *et al*., 2001) ดังที่ Kung *et al.* (1991) รายงานว่าการใช้เอนไซม์เซลลูเลสร่วมกับเพคติเนสเป็นสารเสริมช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการผลิตไซเลจหญ้าอัลฟาฟาได้ดี ในขณะที่ Weinberg *et al.* (1995) สรุปว่าการใช้เอนไซม์เซลลูเลสเป็นสารเสริมเพียงอย่างเดียวเพิ่มประสิทธิภาพของการผลิตไซเลจหญ้าอัลฟาฟาได้น้อยกว่าการใช้เฮมิเซลลูเลส และเพคติเนสร่วมด้วย และ Jaster and Moore (1990) รายงานว่าการใช้เอนไซม์เซลลูเลสร่วมกับอะไมเลสเป็นสารเสริมไม่สามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไซเลจหญ้าอัลฟาฟาได้

การใช้แบคทีเรียกรดแลกติกเป็นสารเสริมร่วมกับเอนไซม์ และการใช้พืชอาหารสัตว์ชนิดต่างกันล้วนเป็นปัจจัยที่ต้องคำนึงถึงในการเลือกใช้องค์ประกอบของเอนไซม์ย่อยสลายให้เหมาะสมดังเช่น Schmidt *et al.* (2001) รายงานว่าการใช้เอนไซม์ย่อยสลายจากเชื้อ *Gliocladium sp.* ซึ่งประกอบด้วยเซลลูเลส และไซลาเนสในสัดส่วน 1: 638.89 เป็นสารเสริมในไซเลจหญ้าอัลฟาฟาเปรียบเทียบกับเอนไซม์ทางการค้าที่มีสัดส่วนของเซลลูเลส และไซลาเนสเท่ากับ 1: 400 ร่วมกับแบคทีเรียกรดแลกติกสายพันธุ์ *Lactobacillus plantarums* และ *Streptococcus faecium* และพบว่าไซเลจที่ผลิตโดยใช้เอนไซม์ทั้งสองเป็นสารเสริมมีคุณสมบัติที่ใกล้เคียงกันแสดงว่าการใช้เอนไซม์ย่อยสลายทั้งสองสัดส่วนส่งผลไม่ต่างกันต่อการผลิตไซเลจ ในขณะที่ Chamberlain and Robertson (1992) รายงานถึงการใช้เอนไซม์ย่อยสลายที่ประกอบด้วยซีเอ็ม-เซลลูเลส และไซลาเนสในสัดส่วน 1: 3.76 และ 1: 8.31 เป็นสารเสริมในไซเลจหญ้า perennial ryegrass แล้วพบว่าไซเลจที่ผลิตโดยใช้เอนไซม์อัตราส่วนแรกมีปริมาณกรดแลกติกสูง และกรดอะซิติกต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับอัตราส่วนที่

2 เนื่องจากเอนไซม์อัตราส่วนหลังมีปริมาณไซลาเนสสูงจึงย่อยสลายส่วนของเฮมิเซลลูโลสได้สูง ส่งผลให้เกิดน้ำตาลเพนโตสสูงจึงผลิตกรดอะซิติกได้สูง และพบว่าสัตว์บริโภคไซเลจที่ผลิตจากเอนไซม์อัตราส่วนหลังได้มากกว่า

Rodrigues *et al.* (2001) รายงานถึงการใช้เอนไซม์เอนโดไซลาเนส และเซลลูเลสจากเชื้อ *Trichoderma varidae* เป็นสารเสริมในไซเลจหญ้า perennial ryegrass และพบว่าไซเลจที่ใช้เอนไซม์เอนโดไซลาเนสเป็นสารเสริมมีค่าการย่อยได้สูงกว่าไซเลจที่ใช้เอนไซม์เซลลูเลสเป็นสารเสริมเมื่อใช้เอนไซม์ทั้งสองปริมาณเท่ากัน แสดงว่าเอนไซม์เอนโดไซลาเนสที่ใช้เป็นสารเสริมในการทดลองนี้ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตไซเลจหญ้า perennial ryegrass ได้ดี

Adogla-Bessa and Owen (1995) รายงานว่าการใช้เอนไซม์ย่อยสลายที่มีองค์ประกอบของเอนไซม์เซลลูเลส ซีเอ็ม-เซลลูเลส เซลโลไบเอส และไซลาเนสในสัดส่วน 2.55: 58.41: 6.90: 217.60 เป็นสารเสริมเปรียบเทียบกับการใช้เอนไซม์ย่อยสลายที่มีองค์ประกอบของเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิดในสัดส่วน 2.85: 63.04: 2.83: 179.8 เป็นสารเสริมไม่ส่งผลให้ไซเลจข้าวสาลีที่ผลิตขึ้นมีองค์ประกอบทางเคมีแตกต่างกัน แสดงว่าการใช้สารเสริมที่มีสัดส่วนของเอนไซม์เซลโลไบเอสและไซลาเนสเพิ่มขึ้นไม่ส่งผลในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไซเลจข้าวสาลีในการทดลองนี้

2.4 เอนไซม์ย่อยสลายจากเชื้อ *Bacillus subtilis* GN156

2.4.1 ลักษณะของเชื้อ *Bacillus subtilis* GN156

ทองเลียน (2541) และ Apiraksakorn *et al.* (2006) รายงานการแยกเชื้อ *Bacillus subtilis* GN156 จากตัวอย่างข้าวโพดหมัก 70 วัน ฟาร์มโชคชัย จังหวัดนครราชสีมา โคโลนีของเชื้อมีสีขาว กลม (circular) นูน (raised) ผิวหน้าเรียบ (smooth) ริมขอบโคโลนีเป็นคลื่นที่โค้งหรือเว้าเล็กน้อย (undulate) เซลล์เป็นรูปแท่ง (rod) เคลื่อนที่ได้ ติดสีแกรมบวก และมีเอนโดสปอร์ลักษณะค่อนข้างรีอยู่ตรงกลางเซลล์ เชื้อ *B. subtilis* GN156 สามารถใช้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเป็นแหล่งคาร์บอนได้เกือบทุกชนิดยกเว้นน้ำตาลกาแลกโตส แรมโนส และซอร์โบส สามารถใช้น้ำตาลโมเลกุลคู่เช่น เซลโลไบโอส มอลโตส และแลกโตส และสามารถใช้คาร์โบไฮเดรตโมเลกุลใหญ่เช่น ไกลโคเจน และแป้ง รวมทั้งกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนได้

2.4.2 การผลิต และคุณสมบัติของเอนไซม์ย่อยสลายจากการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหาร NB

ทองเลียน (2541) และ Apiraksakorn *et al.* (2006) รายงานถึงการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายจาก *B. subtilis* GN156 ซึ่งเลี้ยงในอาหาร NB และใช้ตู้บ่มแบบเขย่าที่มีความเร็วรอบของการเหวี่ยง 150 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงเหวี่ยงแยกเซลล์ออก และศึกษาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ซีเอ็ม-เซลลูเลส และเพคติเนสของ supernatant ที่ได้โดยดัดแปลงจากวิธีของ Miller (1959) โดยพบว่าเอนไซม์ซีเอ็ม-เซลลูเลสมีค่ากิจกรรมสูงสุดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่าง 5.3 โดยมีค่ากิจกรรม 0.085 และ 0.063 หน่วยต่อมิลลิลิตรตามลำดับ และมีความเสถียรที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสโดยแสดงค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ที่สูงกว่า 60 เปอร์เซ็นต์หลังจากการบ่มที่อุณหภูมิดังกล่าวเป็นเวลา 1 ชั่วโมง รวมทั้งมีความเสถียรที่ค่าความเป็นกรดด่างตั้งแต่ 3.7-7.1 โดยแสดงค่ากิจกรรมสัมพัทธ์สูงกว่า 85 เปอร์เซ็นต์หลังจากการบ่มที่ค่าความเป็นกรดด่างดังกล่าวเป็นเวลา 1 ชั่วโมง และพบว่าเอนไซม์เพคติเนสมีค่ากิจกรรมสูงสุดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่าง 4.6 โดยมีค่ากิจกรรม 0.135 และ 0.094 หน่วยต่อมิลลิลิตรตามลำดับ

Kiatgrajai *et al.* (2005) ศึกษาถึงการเจริญ และการผลิตเอนไซม์ของเชื้อ *B. subtilis* GN156 ในอาหาร NB โดยใช้ตู้บ่มแบบเขย่าที่มีความเร็วรอบของการเหวี่ยง 200 รอบต่อนาทีโดยเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ทุก 2 ชั่วโมงเป็นเวลาติดต่อกัน 24 ชั่วโมงพบว่า ใน 2 ชั่วโมงแรกเชื้อมีการเจริญระยะ lag phase แล้วจึงเข้าสู่ระยะ log phase จนถึงชั่วโมงที่ 10 จึงเข้าสู่ระยะ stationary phase และพบว่าเชื้อเริ่มผลิตเอนไซม์ย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตโมเลกุลใหญ่ในหญ้าเนเปียร์ในชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อ และผลิตอย่างคงที่ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 14 เป็นต้นไป เมื่อศึกษาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ในชั่วโมงที่ 18 ของการเลี้ยงเชื้อพบว่า มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ซีเอ็ม-เซลลูเลส เพคติเนส และไซลาเนส 11.26 110.51 และ 60.92 หน่วยต่อมิลลิลิตรตามลำดับ

2.4.3 การผลิต และระบบของเอนไซม์ย่อยสลายที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหาร NB ที่ใส่สารเหนี่ยวนำ

วิชชุดา (2545) ศึกษาการใช้หญ้าเนเปียร์บด เซลโลไบโอส ซีเอ็ม-เซลลูโลส เพคติน และไซแลนความเข้มข้น 0.1-1.0 เปอร์เซนต์เป็นสารเหนี่ยวนำในอาหาร NB เพื่อเพิ่มการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตโมเลกุลใหญ่ในหญ้าเนเปียร์ โดยพบว่าการใช้เซลโลไบโอสและเพคตินเป็นสารเหนี่ยวนำไม่สามารถเพิ่มการเจริญ และการผลิตเอนไซม์ของเชื้อ การใช้หญ้า

เนเปียร์เป็นสารเหนี่ยวนำช่วยเพิ่มระยะ log phase ส่งผลให้การเจริญของเชื้อเพิ่มขึ้น แต่การเจริญที่เพิ่มขึ้นไม่ส่งผลให้มีการผลิตเอนไซม์เพิ่มขึ้นแต่อย่างใด ในขณะที่การใช้ซีเอ็ม-เซลลูโลส และไซแลนความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์สามารถเหนี่ยวนำการเจริญของเชื้อให้สูงเป็น 3.33 และ 14.29 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับการไม่ใช้สารเหนี่ยวนำ และมีน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดจากการย่อยสลายหญ้าเนเปียร์บดแห้งของเอนไซม์ย่อยสลายสูงเป็น 2 และ 3 เท่าของการไม่ใช้สารเหนี่ยวนำตามลำดับ

2.4.4 การทำให้เอนไซม์ย่อยสลายที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหาร NB ที่ใส่สารเหนี่ยวนำเข้มข้นขึ้นด้วยวิธีการตกตะกอน

Kiatgrajai *et al*. (2005) รายงานถึงการทำให้เอนไซม์ย่อยสลายที่ผลิตจากการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 18 ชั่วโมงในอาหาร NB ที่ใช้ไซแลนความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์เป็นสารเหนี่ยวนำเข้มข้นขึ้น 10 เท่าโดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต และอะซิโตนความเข้มข้นต่าง ๆ โดยพบว่าการใช้อะซิโตนความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ในการตกตะกอนทำให้ได้เอนไซม์ย่อยสลายเข้มข้นที่มีค่ากิจกรรมรวมสูงสุดที่ 99.0 หน่วย มีค่ากิจกรรม และปริมาณโปรตีนรวมเป็น 19.8 หน่วยต่อมิลลิลิตร และ 8.36 มิลลิกรัมตามลำดับ การใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ในการตกตะกอนทำให้ได้เอนไซม์ย่อยสลายเข้มข้นที่มีค่ากิจกรรมรวมสูงสุดที่ 167.5 หน่วย มีค่ากิจกรรม และปริมาณโปรตีนรวมเท่ากับ 33.5 หน่วยต่อมิลลิลิตร และ 11.57 มิลลิกรัมตามลำดับ และสามารถเพิ่มปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ได้ 18.10 มิลลิกรัมจากการย่อยสลายหญ้าเนเปียร์บดแห้ง 1 กรัมในเวลา 30 นาที ซึ่งสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำตาลรีดิวซ์ปริมาณ 36 กรัมที่ได้จากการย่อยสลายหญ้าเนเปียร์บดแห้ง 1 กรัมของเอนไซม์ย่อยสลายก่อนการตกตะกอนที่ใช้เวลาถึง 24 ชั่วโมง

นอกจากนี้ Kiatgrajai *et al*. (2005) ยังรายงานถึงเปอร์เซ็นต์ค่ากิจกรรมของเพคติเนสต่อผลรวมของค่ากิจกรรมซีเอ็ม-เซลลูเลส เพคติเนส ไซลาเนส และเบตา-กลูคาเนสในระบบเอนไซม์ย่อยสลายเข้มข้นหลังตกตะกอนด้วยอะซิโตน 70 เปอร์เซ็นต์ว่ามีค่าเป็น 0.58 เท่าของที่พบในเอนไซม์ย่อยสลายก่อนการตกตะกอน ส่งผลให้ประสิทธิภาพการทำงานร่วมกันในระบบลดลง และรายงานถึงเปอร์เซ็นต์ค่ากิจกรรมของเพคติเนสในระบบเอนไซม์ย่อยสลายเข้มข้นหลังตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 40 เปอร์เซ็นต์ว่ามีค่าเป็น 3.17 เท่าของที่พบในเอนไซม์ย่อยสลายก่อนการตกตะกอน ส่งผลให้ประสิทธิภาพการทำงานร่วมกันในระบบการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตโมเลกุลใหญ่ในหญ้าเนเปียร์เพิ่มขึ้นโดยมีค่ากิจกรรมเป็น 1.37 เท่าของเอนไซม์ย่อยสลายก่อนการตกตะกอน