ผลและวิจารณ์

1. ผลของการใช้เอนไซม์ย่อยสลายจากการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* GN156 ด้วยอาหาร NB ที่ใช้ไซแลนเป็นสารเหนี่ยวนำ และทำให้เข้มข้นขึ้นโดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตต่อการผลิตไซเลจหญ้าเนเปียร์

เนื่องจากการใช้เอนไซม์ย่อยสลายจากการเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* GN156 ในอาหาร NB เป็นสารเสริมร่วมกับแบคทีเรียกรดแลกติกส่งผลให้ไซเลจหญ้าขนมีคุณภาพสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับไซเลจที่ไม่ใช้สารเสริม (ทองเลียน, 2541) ในการทดลองนี้จึงเลือกใช้เอนไซม์ย่อยสลายเข้มข้นที่ผลิตจากการเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* GN156 ด้วยอาหาร NB ที่มีไซแลน 1 เปอร์เซ็นต์เป็นสารเหนี่ยวนำ และทำให้เข้มข้นขึ้นโดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 40 เปอร์เซ็นต์ (เอนไซม์ย่อยสลาย E-NB) (Kiatgrajai *et al.*, 2005) เป็นสารเสริมร่วมกับแบคทีเรียกรดแลกติก *Lactobacillus pentosus* ST10-1 ทั้งในสภาวะที่มี และไม่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นสารเสริมร่วมอีก 1 ชนิด โดยคาดหวังว่าเอนไซม์ย่อยสลาย E-NB จะสามารถปรับปรุงกระบวนการผลิต และคุณภาพไซเลจหญ้าเนเปียร์ในวันที่ 60 ของการหมัก และหลังการเปิดภาชนะหมัก 3 วัน

1.1 การใช้เอนไซม์ย่อยสลาย E-NB เป็นสารเสริมร่วมกับแบคทีเรียกรดแลกติกในการผลิตไซเลจหญ้าเนเปียร์

การผลิตไซเลจจากหญ้าเนเปียร์ในหัวข้อนี้แบ่งออกเป็น 3 ชุดการทดลองคือ ชุดการทดลอง NB-L ซึ่งใช้เอนไซม์ย่อยสลาย E-NB ความเข้มข้นต่ำที่มีค่ากิจกรรมการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตโมเลกุลใหญ่ในหญ้าเนเปียร์ 7.26 หน่วยต่อมิลลิลิตร ชุดการทดลอง NB-H ซึ่งใช้เอนไซม์ย่อยสลาย E-NB ความเข้มข้นสูงที่มีค่ากิจกรรม 29.04 หน่วยต่อมิลลิลิตร และชุดควบคุมซึ่งไม่ใช้เอนไซม์ย่อยสลาย E-NB เป็นสารเสริม ทุกชุดการทดลองใช้แบคทีเรียกรดแลกติกเป็นสารเสริมในปริมาณ 6.88 log CFU ต่อกรัมหญ้าเนเปียร์

1.1.1 การเปลี่ยนแปลงทางเคมี และจุลินทรีย์ระหว่างการหมัก

ก. การเปลี่ยนแปลงทางเคมี และจุลินทรีย์ในชุดควบคุม

จากภาพที่ 13 พบว่า น้ำตาลรีดิวซ์ และคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำมีการเปลี่ยนแปลงในทิศทางเดียวกันตลอดทั้งกระบวนการหมักคือ เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนสูงสุดที่ 6.95 และ 7.32 กรัมต่อกิโลกรัมวัตถุแห้งในวันที่ 1 ของการหมักตามลำดับ จากนั้นลดลงอย่างชัดเจนหลังวันที่ 3 และคงที่ในวันที่ 60 ของการหมัก ปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำที่ได้จากการวิเคราะห์เป็นค่าที่แสดงความสัมพันธ์ของปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำที่ได้จากการทำงานของเอนไซม์ย่อยสลายที่ผลิตจากพืชอาหารสัตว์ และจุลินทรีย์ในพืชอาหารสัตว์กับปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำที่ถูกใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญ และการผลิตสารผลิตภัณฑ์ของจุลินทรีย์ในไซเลจ (Pippard *et al*., 1996; Weinberg *et al*., 1999)

ปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำที่เพิ่มขึ้นในช่วง 3 วันแรกของการหมักเป็นผลจากการทำงานของเอนไซม์ย่อยสลายที่ผลิตจากหญ้าเนเปียร์ และจุลินทรีย์ในหญ้าเนเปียร์ช่วงก่อนกระบวนการหมักแบบมีอากาศจะเริ่มขึ้น (Seglar, 2003) ปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้จุลินทรีย์กลุ่ม Enterobacteria ซึ่งเป็นจุลินทรีย์กลุ่มที่มีพบตามธรรมชาติในหญ้าเนเปียร์สด และแบคทีเรียกรดแลกติกเจริญจนมีปริมาณสูงสุดที่ 8.33 และ 8.97 log CFU ต่อกรัมไซเลจในวันที่ 3 ของการหมักตามลำดับ (ภาพที่ 14)

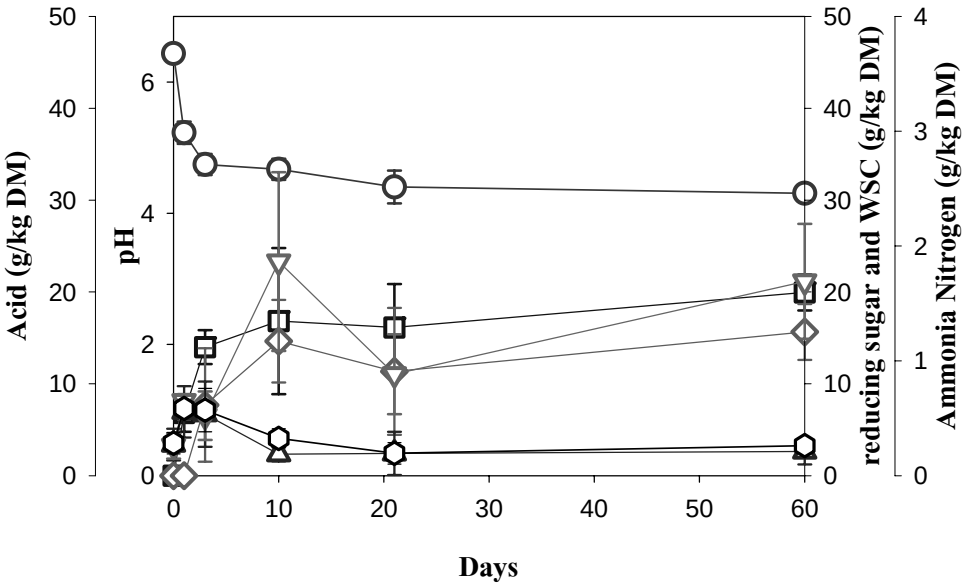
ปริมาณแบคทีเรียกรดแลกติกที่เพิ่มขึ้นถึง 3.24 log CFU ต่อกรัมไซเลจ และการผลิตคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำอย่างต่อเนื่องในช่วง 3 วันแรกของการหมักส่งผลต่อการผลิตกรดแลกติกที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเป็น 16.82 กรัมต่อกิโลกรัมวัตถุแห้ง ค่าความเป็นกรดด่างของไซเลจจึงลดลงอย่างรวดเร็วจนต่ำกว่า 5.00 ในวันที่ 3 ของการหมักซึ่งเป็นสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์กลุ่ม Enterobacteria (Wattiaux, 2000) ส่งผลให้จุลินทรีย์กลุ่ม Enterobacteria มีปริมาณลดลงอย่างรวดเร็วจนมีปริมาณต่ำกว่า 1 log CFU ต่อกรัมไซเลจหลังวันที่ 21 ของการหมัก

ปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำที่ลดลงหลังวันที่ 3 ของการหมักเป็นผลจากการทำงานที่ลดลงของเอนไซม์ย่อยสลายเมื่อเปรียบเทียบกับในช่วงแรกของการหมัก ในขณะที่แบคทีเรียกรดแลกติกยังคงใช้คาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำผลิตกรดแลกติกอย่างต่อเนื่องจนมีปริมาณ

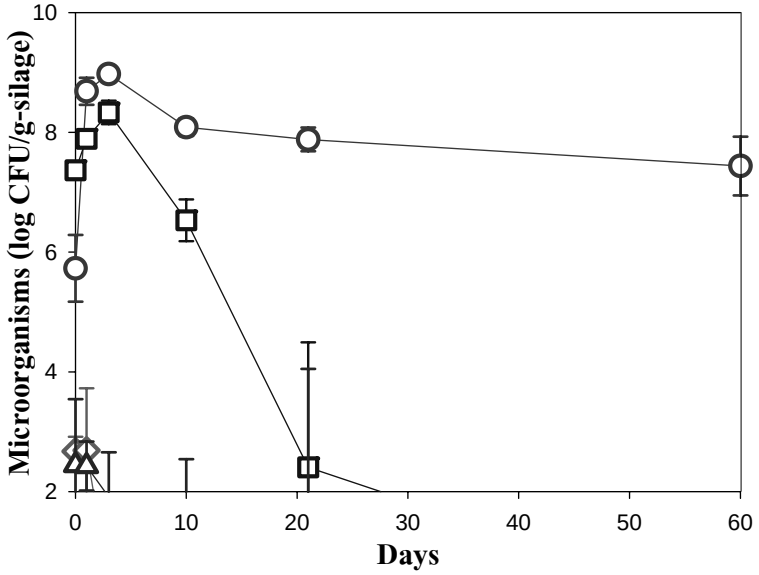
กรดแลกติก 19.95 กรัมต่อกิโลกรัมวัตถุแห้งในวันที่ 60 ของการหมัก การมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำที่ลดลงส่งผลให้แบคทีเรียกรดแลกติกที่ใช้เป็นสารเสริมมีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในปริมาณจำกัดส่งผลให้มีการผลิตกรดอะซิติกควบคู่กับกรดแลกติกตั้งแต่วันที่ 3 ของการหมักแทนการผลิตกรดแลกติกเป็นสารผลิตภัณฑ์เพียงชนิดเดียวซึ่งจะผลิตในสภาวะที่มีปริมาณน้ำตาลกลูโคสเพียงพอ (Pot *et al*., 1994) ในช่วงแรกของการหมัก โดยการผลิตกรดอะซิติกจะเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องจนมีปริมาณ 15.63 กรัมต่อกิโลกรัมวัตถุแห้งในวันที่ 60 ของการหมัก

ในวันที่ 0 และวันที่ 1 ของการหมัก ตรวจพบเชื้อยีสต์ และรา 2.4-2.7 log CFU ต่อกรัมไซเลจ จากนั้นตรวจพบเชื้อยีสต์ในปริมาณ 1-2 log CFU ต่อกรัมไซเลจจนถึงวันที่ 21 ของการหมัก จุลินทรีย์กลุ่ม Clostridia มีปริมาณต่ำกว่า 1 log CFU ต่อกรัมไซเลจจึงตรวจไม่พบและไม่พบการผลิตกรดบิวทีริกตลอดทั้งกระบวนการหมัก

การตรวจพบเชื้อยีสต์ และราในวันที่ 0-1 ของการหมัก และการตรวจพบจุลินทรีย์กลุ่ม Enterobacteria ในปริมาณสูงกว่า 6 log CFU ต่อกรัมไซเลจในวันที่ 0-10 ของการหมักส่งผลให้ปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจนที่เกิดจากการย่อยสลายโปรตีนในไซเลจมีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนสูงสุดที่ 1.86 กรัมต่อกิโลกรัมวัตถุแห้งในวันที่ 10 ของการหมัก (ภาพที่ 13) จากนั้นจุลินทรีย์กลุ่ม Enterobacteria ยีสต์ และรามีปริมาณลดลงจนต่ำกว่า 1 log CFU ต่อกรัมไซเลจ ปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจนจึงมีแนวโน้มของการลดลง



ภาพที่ 13 การเปลี่ยนแปลงทางเคมีของไซเลจในชุดควบคุมที่อายุการหมักต่าง ๆ; ○, ค่าความเป็นกรดด่าง; □, ปริมาณกรดแลกติก; ◇, ปริมาณกรดอะซิติก; △, ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์; ⬡, ปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำ; ▽, ปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจน

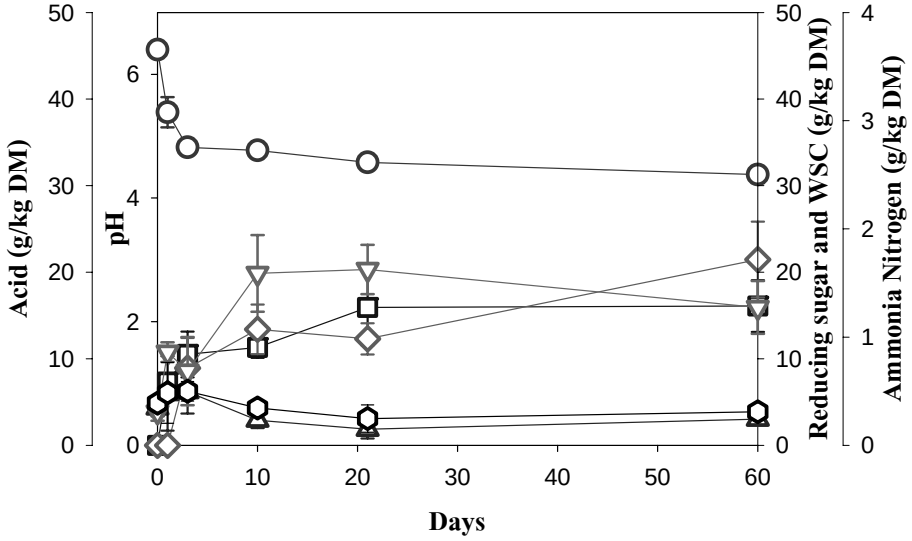


ภาพที่ 14 การเปลี่ยนแปลงทางจุลินทรีย์ของไซเลจในชุดควบคุมที่อายุการหมักต่าง ๆ; ○, ปริมาณเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก; □, ปริมาณเชื้อกลุ่ม Enterobacteria; ◇, ปริมาณเชื้อรา; △, ปริมาณเชื้อยีสต์

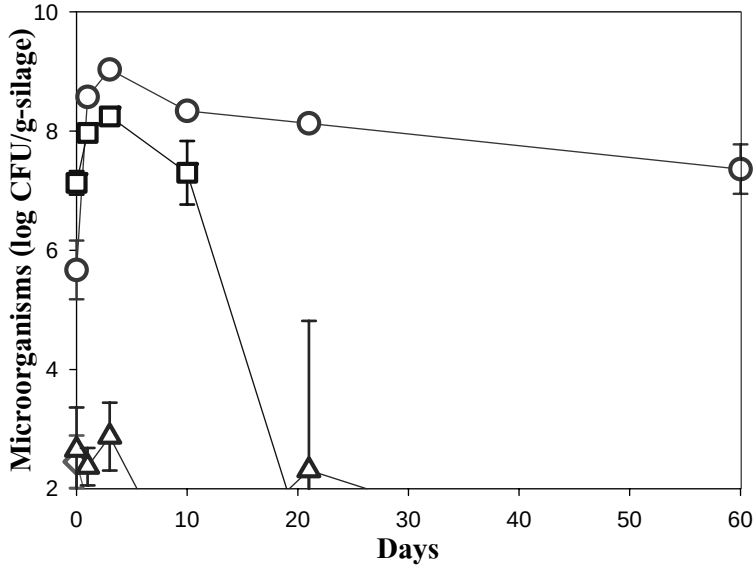
ข. การเปลี่ยนแปลงทางเคมี และจุลินทรีย์ในชุดการทดลอง NB-L

จากภาพที่ 15 และ 16 พบว่า น้ำตาลรีดิวซ์ และคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำในชุดการทดลอง NB-L มีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนสูงสุดที่ 6.19 และ 6.24 กรัมต่อกิโลกรัมวัตถุแห้งในวันที่ 3 ของการหมักตามลำดับ จากนั้นลดลงอย่างรวดเร็ว และมีปริมาณคงที่หลังวันที่ 10 ของการหมัก แบคทีเรียกรดแลกติก และจุลินทรีย์กลุ่ม Enterobacteria มีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนสูงสุดที่ 9.03 และ 8.25 log CFU ต่อกรัมไซเลจในวันที่ 3 ของการหมัก หลังจากนั้นแบคทีเรียกรดแลกติกลดลงอย่างต่อเนื่องจนมีปริมาณ 7.23 log CFU ต่อกรัมไซเลจในวันที่ 60 ของการหมัก และจุลินทรีย์กลุ่ม Enterobacteria มีปริมาณที่ต่ำกว่า 1 log CFU ต่อกรัมไซเลจหลังวันที่ 10 ของการหมัก เชื้อรามีปริมาณลดลงอย่างต่อเนื่องจนต่ำกว่า 2 log CFU ต่อกรัมไซเลจในวันที่ 1 ของการหมัก เชื้อยีสต์มีแนวโน้มของการตรวจพบที่ไม่แน่นอนโดยตรวจพบในปริมาณ 2.31-2.87 log CFU ต่อกรัมไซเลจในวันที่ 0 1 3 และ 21 ของการหมัก และมีปริมาณที่ต่ำกว่า 1 log CFU ต่อกรัมไซเลจ

ปริมาณกรดแลกติกเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนถึงวันที่ 3 ของการหมัก จากนั้นเพิ่มขึ้นในอัตราที่ลดต่ำลงจนมีปริมาณ 16.08 กรัมต่อกิโลกรัมวัตถุแห้งในวันที่ 60 ของการหมัก กรดอะซิติกมีแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงในทิศทางเดียวกับกรดแลกติกโดยเริ่มผลิตในวันที่ 3 ของการหมัก และผลิตเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนถึงวันที่ 60 ของการหมัก ค่าความเป็นกรดด่างลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 3 วันแรกของการหมัก จากนั้นลดลงด้วยอัตราที่ต่ำลงจนมีค่า 4.38 ในวันที่ 60 ของการหมัก แอมโมเนียไนโตรเจนมีปริมาณเพิ่มขึ้นจนมีค่าสูงสุดที่ 1.63 กรัมต่อกิโลกรัมวัตถุแห้งในวันที่ 21 ของการหมัก จากนั้นมีปริมาณลดลงจนเท่ากับ 1.27 กรัมต่อกิโลกรัมวัตถุแห้งในวันที่ 60 ของการหมัก จุลินทรีย์กลุ่ม Clostridia กรดโปรปิโอนิก และกรดบิวทีริกไม่มีการตรวจพบตลอดทั้งกระบวนการหมัก



ภาพที่ 15 การเปลี่ยนแปลงทางเคมีของไซเลจในชุดการทดลอง NB-L ที่อายุการหมักต่าง ๆ; ○, ค่าความเป็นกรดด่าง; □, ปริมาณกรดแลกติก; ◇, ปริมาณกรดอะซิติก; △, ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์; ⬡, ปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำ; ▽, ปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจน

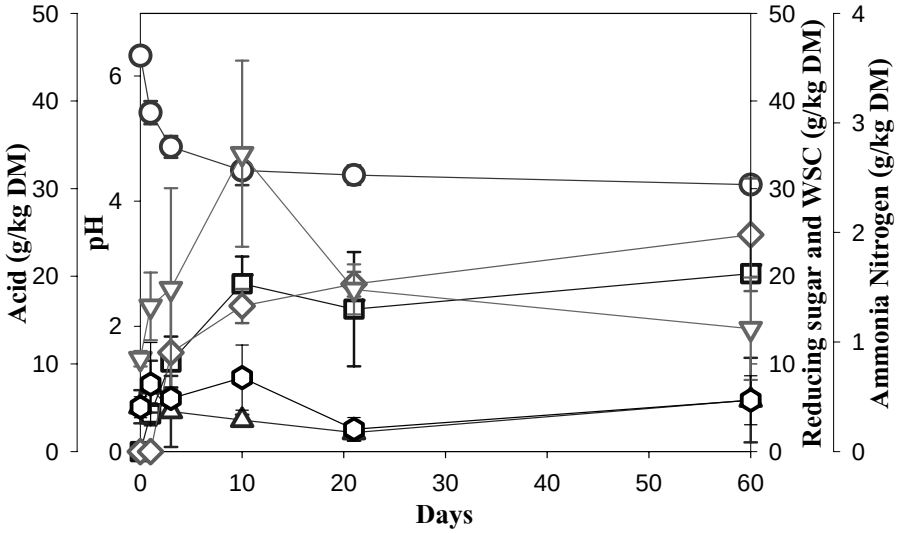


ภาพที่ 16 การเปลี่ยนแปลงทางจุลินทรีย์ของไซเลจในชุดการทดลอง NB-L ที่อายุการหมักต่าง ๆ; ○, ปริมาณเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก; □, ปริมาณเชื้อกลุ่ม Enterobacteria; ◇, ปริมาณเชื้อรา; △, ปริมาณเชื้อยีสต์

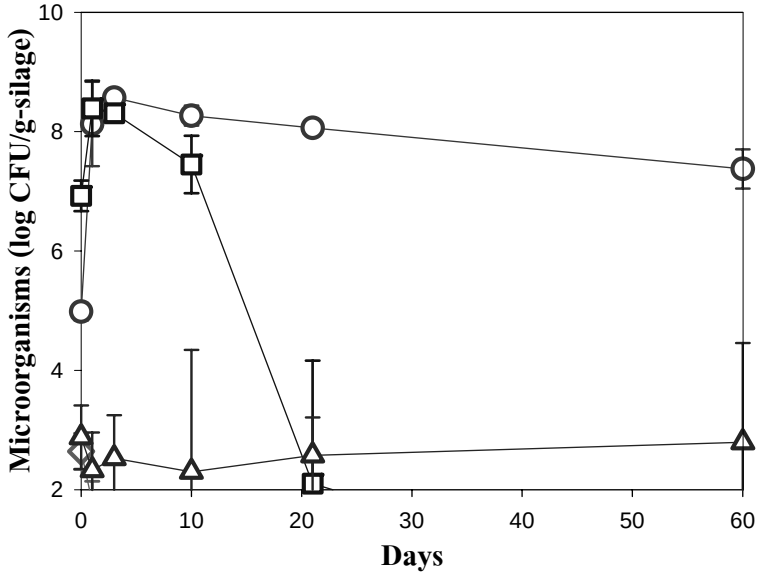
ค. การเปลี่ยนแปลงทางเคมี และจุลินทรีย์ในชุดการทดลอง NB-H

จากภาพที่ 17 และ 18 พบว่า น้ำตาลรีดิวซ์ และคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำในชุดการทดลอง NB-H มีปริมาณใกล้เคียงกันเกือบทั้งกระบวนการหมัก มีเพียงวันที่ 10 ของการหมักที่มีน้ำตาลรีดิวซ์ในปริมาณ 3.57 กรัมต่อกิโลกรัมวัตถุแห้ง ในขณะที่มีคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำในปริมาณที่สูงถึง 8.43 กรัมต่อกิโลกรัมวัตถุแห้ง จุลินทรีย์กลุ่ม Enterobacteria และแบคทีเรียกรดแลกติกมีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนสูงสุดที่ 8.52 และ 8.58 log CFU ต่อกรัมไซเลจในวันที่ 1 และ 3 ของการหมักตามลำดับ จากนั้นแบคทีเรียกรดแลกติกลดลงจนมีปริมาณ 7.45 log CFU ต่อกรัมไซเลจในวันที่ 60 ของการหมัก และจุลินทรีย์กลุ่ม Enterobacteria ลดลงจนมีปริมาณต่ำกว่า 1 log CFU ต่อกรัมไซเลจหลังวันที่ 21 ของการหมัก เชื้อรามีปริมาณลดลงจนต่ำกว่า 2 log CFU ต่อกรัมไซเลจในวันที่ 1 และ 3 ของการหมัก และต่ำกว่า 1 log CFU ต่อกรัมไซเลจหลังจากนั้น เชื้อยีสต์มีปริมาณ 2.30-2.88 log CFU ต่อกรัมไซเลจตลอดกระบวนการหมัก

กรดแลกติกมีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนเท่ากับ 19.14 กรัมต่อกิโลกรัมวัตถุแห้งในวันที่ 10 และมีปริมาณค่อนข้างคงที่จนถึงวันที่ 60 ของการหมัก กรดอะซิติกเริ่มตรวจพบในวันที่ 3 ของการหมัก และเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนมีปริมาณ 24.72 กรัมต่อกิโลกรัมวัตถุแห้งในวันที่ 60 ของการหมัก ค่าความเป็นกรดด่างลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 3 วันแรกของการหมัก จากนั้นลดลงด้วยอัตราที่ต่ำจนมีค่า 4.26 ในวันที่ 60 ของการหมัก แอมโมเนียไนโตรเจนมีแนวโน้มที่สูงตลอดทั้งกระบวนการหมักเนื่องจากเอนไซม์ย่อยสลาย E-NB ที่ใช้เป็นสารเสริมผ่านการทำให้เข้มข้นขึ้นโดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ซึ่งสามารถแตกตัวให้แอมโมเนียได้



ภาพที่ 17 การเปลี่ยนแปลงทางเคมีของไซเลจในชุดการทดลอง NB-H ที่อายุการหมักต่าง ๆ; ○, ค่าความเป็นกรดด่าง; □, ปริมาณกรดแลกติก; ◇, ปริมาณกรดอะซิติก; △, ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์; ⬡, ปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำ; ▽, ปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจน



ภาพที่ 18 การเปลี่ยนแปลงทางจุลินทรีย์ของไซเลจในชุดการทดลอง NB-H ที่อายุการหมักต่าง ๆ; ○, ปริมาณเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก; □, ปริมาณเชื้อกลุ่ม Enterobacteria; ◇, ปริมาณเชื้อรา; △, ปริมาณเชื้อยีสต์

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ระหว่าง 3 ชุดการทดลองพบว่า ในวันที่ 0 และ 1 ของการหมักชุดการทดลอง NB-H มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงเป็น 1.19 และ 1.24 เท่าของชุดการทดลอง NB-L และสูงเป็น 1.52 และ 1.06 เท่าของชุดควบคุมตามลำดับ และในวันที่ 0 ของการหมักชุดการทดลอง NB-L มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงเป็น 1.28 เท่าของชุดควบคุม แสดงว่าการใช้เอนไซม์ย่อยสลาย E-NB เป็นสารเสริมสามารถเพิ่มปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตโมเลกุลใหญ่ที่เป็นโครงสร้างของหญ้าเนเปียร์ได้ และความเข้มข้นของเอนไซม์ย่อยสลาย E-NB ที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้ได้น้ำตาลรีดิวซ์ในปริมาณที่สูงขึ้น

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณจุลินทรีย์ และปริมาณกรดระหว่าง 3 ชุดการทดลอง พบว่า ปริมาณแบคทีเรียกรดแลกติกในชุดการทดลอง NB-H ต่ำกว่าชุดควบคุม 0.40-0.75 log CFU ต่อกรัมไซเลจในช่วง 3 วันแรกของการหมัก ปริมาณจุลินทรีย์กลุ่ม Enterobacteria ในชุดการทดลอง NB-H และชุดการทดลอง NB-L เพิ่มขึ้น 1.47 และ 0.84 log CFU ต่อกรัมไซเลจในวันที่ 0-1 ของการหมักตามลำดับ ในขณะที่ปริมาณจุลินทรีย์กลุ่ม Enterobacteria ในชุดควบคุมเพิ่มขึ้นเพียง 0.52 log CFU ต่อกรัมไซเลจในวันที่ 0-1 ของการหมัก และปริมาณเชื้อยีสต์ในชุดการทดลอง NB-H และชุดการทดลอง NB-L อยู่ในช่วง 2-3 log CFU ต่อกรัมไซเลจ ในขณะที่ปริมาณเชื้อยีสต์ในชุดควบคุมอยู่ในช่วง 1-2 log CFU ต่อกรัมไซเลจในวันที่ 3 และ 21 ของการหมัก ปริมาณกรดแลกติกในชุดการทดลอง NB-H ช่วง 3 วันแรกของการหมัก และในชุดการทดลอง NB-L วันที่ 3 ของการหมักต่ำกว่าชุดควบคุม 2.52-3.79 และ 3.50 กรัมต่อกิโลกรัมวัตถุแห้งตามลำดับ ปริมาณกรดอะซิติกในชุดการทดลอง NB-H สูงกว่าชุดควบคุมตลอดทั้งกระบวนการหมัก แสดงว่าน้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้นจากการทำงานของเอนไซม์ย่อยสลาย E-NB ในวันที่ 0 และ 1 ของการหมักไม่ส่งผลให้การเจริญ และการผลิตกรดแลกติกของแบคทีเรียกรดแลกติกเพิ่มขึ้นในช่วง 3 วันแรกของการหมักแต่ส่งผลให้การเจริญของจุลินทรีย์กลุ่ม Enterobacteria เพิ่มขึ้นในวันที่ 0-1 ของการหมัก และการเจริญของเชื้อยีสต์เพิ่มขึ้นหลังจากวันที่ 3 ของการหมัก ซึ่งส่งผลต่อการเพิ่มการผลิตกรดอะซิติกตลอดกระบวนการหมัก โดยผลของน้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้นต่อการเจริญ และการผลิตกรดของจุลินทรีย์จะเกิดขึ้นอย่างชัดเจนเมื่อใช้เอนไซม์ย่อยสลาย E-NB เป็นสารเสริมที่ความเข้มข้นสูง

ผลของการเปลี่ยนแปลงของปริมาณจุลินทรีย์ และกรดที่เกิดขึ้นจากการใช้เอนไซม์ย่อยสลาย E-NB เป็นสารเสริมที่พบข้างต้นสอดคล้องกับผลที่พบเมื่อใช้เอนไซม์เพคติเนสเป็นสารเสริมร่วมกับแบคทีเรียกรดแลกติกในการผลิตไซเลจหญ้าอัลฟาฟาที่ส่งผลในการเพิ่มปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำเป็น 1.27 เท่า โดยคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำที่เพิ่มขึ้นไม่ส่งผลต่อ

การเพิ่มปริมาณแบคทีเรียกรดแลกติก แต่ส่งผลต่อการเพิ่มปริมาณของจุลินทรีย์กลุ่ม Enterobacteria ในวันที่ 1 รวมทั้งเชื้อยีสต์ รา และกรดอะซิติกตลอดทั้งกระบวนการหมัก (Kung *et al.*, 1991) และตรงข้ามกับผลที่ Weinberg *et al.* (1995) รายงานว่า การใช้เอนไซม์เซลลูเลส และเบตา-กลูคาเนส เป็นสารเสริมร่วมกับแบคทีเรียกรดแลกติกส่งผลต่อการเพิ่มคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำในไซเลจถั่ว *Pisum sativum* เป็น 2.35 เท่า โดยปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำที่เพิ่มขึ้นส่งผลต่อการเพิ่มปริมาณของแบคทีเรียกรดแลกติก และกรดแลกติกในวันที่ 4 ของการหมัก และเชื้อยีสต์ในวันที่ 45 ของการหมัก

1.1.2 สมบัติทางเคมี และจุลินทรีย์ของไซเลจในวันที่ 60 ของการหมัก

เมื่อพิจารณาสมบัติทางเคมี และจุลินทรีย์ของไซเลจในวันที่ 60 ของการหมัก (ตารางที่ 10) พบว่า ไซเลจจากทุกชุดการทดลองมีสีเขียวอมเหลือง มีปริมาณกรดแลกติก และกรดบิวทีริกอยู่ในช่วง 15-25 และต่ำกว่า 1 กรัมต่อกิโลกรัมวัตถุแห้งตามลำดับ ซึ่งเป็นค่าที่ยอมรับว่าได้มาตรฐานตามเกณฑ์ของกองอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์ และมีปริมาณเชื้อยีสต์ต่ำกว่า 5.00 log CFU ต่อกรัมไซเลจ ซึ่งเป็นค่าที่ยอมรับได้ตามเกณฑ์ของ Seglar (2003) อย่างไรก็ตามพบว่าไซเลจมีค่าความเป็นกรดด่าง และมีปริมาณกรดอะซิติกสูงกว่าเกณฑ์ที่กำหนดซึ่ง Ohshima *et al.* (1997) รายงานว่าไซเลจหญ้าอัลฟาฟาที่มีค่าความเป็นกรดด่างอยู่ในช่วง 4.2-4.8 และมีกรดบิวทีริกต่ำกว่า 0.2 กรัมต่อกิโลกรัมวัตถุแห้งเป็นไซเลจที่มีคุณภาพดี ดังนั้นไซเลจที่ผลิตขึ้นในการทดลองนี้จึงน่าจะมีค่าความเป็นกรดด่างที่ยอมรับได้เช่นเดียวกัน และ Danner *et al.* (2003) รายงานว่า การมีกรดอะซิติกในปริมาณสูงจะช่วยเพิ่มค่า aerobic stability ของไซเลจได้โดยไซเลจหญ้าที่มีค่า aerobic stability ที่สูงสุดมีกรดอะซิติกอยู่สูงถึง 55.3 กรัมต่อกิโลกรัมวัตถุแห้ง ดังนั้นการที่ไซเลจที่ได้จากการทดลองมีปริมาณกรดอะซิติกอยู่ในช่วง 15.63-24.72 กรัมต่อกิโลกรัมวัตถุแห้งน่าจะส่งผลดีต่อการรักษาคุณภาพของไซเลจหลังการเปิดถุงหมัก อย่างไรก็ตามการที่มีกรดอะซิติกในปริมาณสูงกว่าเกณฑ์อาจส่งผลต่อการยอมรับของสัตว์เมื่อใช้ไซเลจเป็นอาหารสัตว์ได้

ไซเลจทั้ง 3 ชุดการทดลองมีสมบัติทางเคมี และจุลินทรีย์ที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามพบว่าไซเลจชุดการทดลอง NB-H มีปริมาณเชื้อยีสต์สูงกว่าไซเลจชุดการทดลอง NB-L และชุดควบคุมซึ่งเป็นผลต่อเนื่องจากการทำงานของเอนไซม์ย่อยสลาย E-NB ที่ใช้เป็นสารเสริม จึงส่งผลให้ไซเลจชุดการทดลอง NB-H มีปริมาณกรดอะซิติกสูงกว่าชุดควบคุมและชุดการทดลอง NB-L 9.09 และ 3.27 กรัมต่อกิโลกรัมวัตถุแห้งตามลำดับ ซึ่งเป็นผลที่สอด

คล้องกับที่ Kung *et al.* (1991) รายงานว่า ไซเลจที่ใช้เอนไซม์ย่อยสลายเป็นสารเสริมร่วมกับแบคทีเรียกรดแลกติกมีปริมาณเชื้อยีสต์และรา และกรดอะซิติกสูงกว่าไซเลจที่ไม่ได้ใช้เอนไซม์เป็นสารเสริม 1.58 log CFU ต่อกรัมไซเลจ และ 29.9 กรัมต่อกิโลกรัมวัตถุแห้งตามลำดับ

ตารางที่ 10 สมบัติทางเคมี และจุลินทรีย์ของไซเลจในวันที่ 60 ของการหมัก

สมบัติของไซเลจ (กรัมต่อกิโลกรัมวัตถุแห้ง)	ชุดการทดลอง		
	ชุดควบคุม	NB-L	NB-H
วัตถุแห้ง	213 ^{A} (±15.10)	230 ^{A} (±5.22)	211 ^{A} (±6.13)
ค่าความเป็นกรดด่าง	4.30 ^{A} (±0.02)	4.38 ^{A} (±0.13)	4.26 ^{A} (±0.13)
น้ำตาลรีดิวซ์	2.63 ^{A} (±1.41)	3.01 ^{A} (±0.34)	5.87 ^{A} (±4.82)
คาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำ	3.26 ^{A} (±0.50)	3.87 ^{A} (±0.24)	5.85 ^{A} (±0.47)
กรดแลกติก	19.95 ^{A} (±1.96)	16.08 ^{A} (±2.99)	20.29 ^{A} (±0.90)
กรดอะซิติก	15.63 ^{A} (±3.04)	21.45 ^{A} (±4.38)	24.72 ^{A} (±6.41)
กรดบิวทีริก	0.00 ^{A} (±0.00)	0.00 ^{A} (±0.00)	0.00 ^{A} (±0.00)
แอมโมเนียไนโตรเจน	1.69 ^{A} (±0.50)	1.27 ^{A} (±0.24)	1.12 ^{A} (±0.47)
แบคทีเรียกรดแลกติก (log CFU ต่อกรัมไซเลจ)	7.44 ^{A} (±0.49)	7.36 ^{A} (±0.42)	7.37 ^{A} (±0.33)
จุลินทรีย์กลุ่ม Enterobacteria (log CFU ต่อกรัมไซเลจ)	<1.00	<1.00	<1.00
รา (log CFU ต่อกรัมไซเลจ)	<1.00	<1.00	<1.00
ยีสต์ (log CFU ต่อกรัมไซเลจ)	<1.00	<1.00	2.79 (±1.67)

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวนอนไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ตามการวิเคราะห์ด้วยวิธีของ Turkey's ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ และค่าในวงเล็บที่อยู่หลังค่าเฉลี่ยคือค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

1.1.3 สมบัติทางเคมี และจุลินทรีย์ของไซเลจหลังเปิดถุงหมักเป็นเวลา 3 วัน

เมื่อการหมักเสร็จสิ้นที่ 60 วัน ทำการเปิดถุงหมักให้ไซเลจสัมผัสอากาศเป็นเวลา 3 วัน จากนั้นเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ทางเคมี และจุลินทรีย์ของไซเลจ (ตารางที่ 11) พบว่าไซเลจทุกชุดการทดลองมีปริมาณเชื้อยีสต์ และราเปลี่ยนแปลงไปในปริมาณที่ต่ำกว่า 1.0 log CFU ต่อกรัมไซเลจเมื่อเปรียบเทียบกับไซเลจก่อนการเปิดถุงหมัก มีปริมาณของกรดแลกติก และกรดอะซิติกลดลงประมาณ 1-10 กรัมต่อกิโลกรัมวัตถุแห้ง และมีค่าความเป็นกรดด่างเพิ่มขึ้น 0.13-0.33 ซึ่งสอดคล้องกับที่ Gonza'lez and Rodri'guez (2003) รายงานว่า หลังจากวันที่ 3 ของการเปิดภาชนะหมักไซเลจหญ้ากีนีสีม่วงมีปริมาณยีสต์และราเพิ่มขึ้นประมาณ 1 log CFU ต่อกรัมไซเลจ มีปริมาณกรดแลกติกลดลงกว่า 1 เท่า และมีแบคทีเรียทั้งหมด 6.25 log CFU ต่อกรัม ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่า การลดลงของกรดแลกติก และกรดอะซิติกเกิดจากการที่แบคทีเรียกลุ่มที่ต้องการอากาศในการเจริญใช้กรดแลกติก และกรดอะซิติกเป็นแหล่งคาร์บอน และการมีกรดอะซิติกในปริมาณที่สูงกว่าเกณฑ์ที่กองอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์กำหนดในตัวอย่างไซเลจวันที่ 60 ของการหมักส่งผลในการยับยั้งการเพิ่มปริมาณของยีสต์ และราโดยการทำลายส่วนของ plasma membrane ของเซลล์ยีสต์และรา (Danner *et al*., 2003) ได้ตามที่คาดการณ์ไว้

ไซเลจทั้ง 3 ชุดการทดลองมีสมบัติทางเคมี และจุลินทรีย์ที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติซึ่งแสดงให้เห็นว่าการใช้เอนไซม์ย่อยสลาย E-NB เป็นสารเสริมทั้งที่ความเข้มข้นสูง และต่ำไม่สามารถลดการเสื่อมเสียของไซเลจหญ้าเนเปียร์ที่มีแนวโน้มจากการเจริญของแบคทีเรียที่ต้องการอากาศในการเจริญหลังเปิดภาชนะหมักเป็นเวลา 3 วันได้

จากผลของการเปลี่ยนแปลงระหว่างกระบวนการหมัก สมบัติของไซเลจวันที่ 60 ของการหมัก และสมบัติของไซเลจหลังเปิดถุงหมัก 3 วันของไซเลจทั้ง 3 ชุดการทดลองทำให้สรุปผลของการใช้เอนไซม์ย่อยสลาย E-NB เป็นสารเสริมในการผลิตไซเลจหญ้าเนเปียร์ได้ว่าเอนไซม์ย่อยสลาย E-NB สามารถเพิ่มปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ได้ในวันที่ 0 และ 1 ของการหมัก โดยปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้นไม่ส่งผลในการเพิ่มการเจริญ และการผลิตกรดแลกติกของแบคทีเรียกรดแลกติก แต่ส่งผลในการเพิ่มการเจริญของจุลินทรีย์กลุ่ม Enterobacteria ในวันที่ 0 และ 1 ของการหมัก การเพิ่มการเจริญของเชื้อยีสต์หลังวันที่ 3 ของการหมัก และการเพิ่มการผลิตกรดอะซิติกตลอดทั้งกระบวนการหมัก ซึ่งส่งผลให้ไซเลจในวันที่ 60 ของการหมักมีปริมาณเชื้อยีสต์ และกรดอะซิติกที่สูงกว่าการไม่ใช้เอนไซม์ E-NB เป็นสารเสริมโดยการเปลี่ยนแปลงทั้งหมดที่เกิดจาก

การเพิ่มขึ้นของน้ำตาลรีดิวซ์จะปรากฏอย่างชัดเจนเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ย่อยสลาย E-NB นอกจากการมีปริมาณเชื้อยีสต์และกรดอะซิติกที่สูงแล้วไม่พบความแตกต่างของสมบัติทางเคมี และจุลินทรีย์ของไซเลจทั้งก่อน และหลังการเปิดถุงหมักที่แสดงให้เห็นถึงคุณภาพของไซเลจที่เพิ่มขึ้นจากการใช้เอนไซม์ย่อยสลาย E-NB เป็นสารเสริมแต่อย่างใด

ตารางที่ 11 สมบัติทางเคมี และจุลินทรีย์ของไซเลจหลังเปิดถุงหมัก 3 วัน

สมบัติของไซเลจ (กรัมต่อกิโลกรัมวัตถุแห้ง)	ชุดการทดลอง		
	ชุดควบคุม	NB-L	NB-H
วัตถุแห้ง	362 ^{A} (± 109.81)	498 ^{A} (± 187.58)	263 ^{A} (± 28.80)
ค่าความเป็นกรดด่าง	4.57 ^{A} (± 0.10)	4.51 ^{A} (± 0.18)	4.59 ^{A} (± 0.08)
กรดแลกติก	13.28 ^{A} (± 4.49)	13.03 ^{A} (± 12.88)	16.52 ^{A} (± 5.13)
กรดอะซิติก	15.04 ^{A} (± 7.65)	11.38 ^{A} (± 5.82)	19.91 ^{A} (± 5.66)
กรดบิวทีริก	0.00 ^{A} (±0.00)	0.00 ^{A} (±0.00)	0.00 ^{A} (±0.00)
แบคทีเรียกรดแลกติก (log CFU ต่อกรัมไซเลจ)	7.24 ^{A} (± 0.17)	7.14 ^{A} (± 0.33)	7.35 ^{A} (± 0.13)
จุลินทรีย์กลุ่ม Enterobacteria (log CFU ต่อกรัมไซเลจ)	<1.00	<1.00	<1.00
รา (log CFU ต่อกรัมไซเลจ)	<1.00	<1.00	<1.00
ยีสต์ (log CFU ต่อกรัมไซเลจ)	1.00-2.00	<1.00	1.00-2.00

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวนอนไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ตามการวิเคราะห์ด้วยวิธีของ Turkey's ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ และค่าในวงเล็บหลังค่าเฉลี่ยคือค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

1.2 การใช้เอนไซม์ย่อยสลาย E-NB เป็นสารเสริมร่วมกับแบคทีเรียกรดแลกติก และน้ำตาลกลูโคสในการผลิตไซเลจหญ้าเนเปียร์

ปัญหาหนึ่งที่พบเมื่อใช้เอนไซม์ย่อยสลาย E-NB เป็นสารเสริมในการผลิตไซเลจหญ้าเนเปียร์คือ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้นจากการทำงานของเอนไซม์ไม่ส่งผลต่อการเพิ่มการ

เจริญ และการผลิตกรดแลกติกของแบคทีเรียกรดแลกติก ซึ่งเป็นไปได้ว่าอาจเกิดจากการที่เอนไซม์ย่อยสลาย E-NB ไม่สามารถเพิ่มปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำในวันที่ 0 ของการหมักให้สูงถึง 30 กรัมต่อกิโลกรัมวัตถุแห้งซึ่งเป็นปริมาณส่งผลให้กระบวนการหมักเกิดขึ้นอย่างมีประสิทธิภาพ (O'Kiely *et al*., 1986) รวมทั้งเป็นไปได้ว่าน้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้นจากการทำงานของเอนไซม์อาจไม่ใช่น้ำตาลกลูโคสซึ่งเป็นน้ำตาลที่แบคทีเรียกรดแลกติกสายพันธุ์ *L. pentosus* สามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญ และการผลิตกรดแลกติกได้มีประสิทธิภาพสูงสุด (Lampen and Peterjohn, 1951) ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้เลือกใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นสารเสริมร่วมกับเอนไซม์ย่อยสลาย E-NB และแบคทีเรียกรดแลกติกโดยคาดหวังว่าการเติมน้ำตาลกลูโคสจะเป็นการเพิ่มแหล่งคาร์บอนโดยตรงให้กับแบคทีเรียกรดแลกติก และจุลินทรีย์กลุ่มอื่นในไซเลจที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลายที่สามารถทำงานร่วมกับเอนไซม์ย่อยสลาย E-NB ในการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตที่เป็นองค์ประกอบในผนังเซลล์ของหญ้าเนเปียร์จนได้น้ำตาลรีดิวซ์ที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นองค์ประกอบในปริมาณที่สูงขึ้นซึ่งเป็นการเพิ่มแหล่งคาร์บอนให้กับแบคทีเรียกรดแลกติกในการผลิตกรดแลกติกได้อีกทางหนึ่ง และจะส่งผลต่อมาในการปรับปรุงคุณภาพของไซเลจทั้งก่อน และหลังการเปิดถุงหมัก

การผลิตไซเลจจากหญ้าเนเปียร์ในหัวข้อนี้แบ่งออกเป็น 3 ชุดการทดลองคือ ชุดการทดลอง NB-L +G ซึ่งใช้เอนไซม์ย่อยสลาย E-NB ความเข้มข้นต่ำ ชุดการทดลอง NB-H +G ซึ่งใช้เอนไซม์ย่อยสลาย E-NB ความเข้มข้นสูง และชุดควบคุมซึ่งไม่ใช้เอนไซม์ย่อยสลาย E-NB เป็นสารเสริม ทุกชุดการทดลองใช้แบคทีเรียกรดแลกติก และน้ำตาลกลูโคสเป็นสารเสริม โดยใช้น้ำตาลกลูโคสที่ปริมาณที่ทำให้คาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำในวันที่ 0 ของการหมักมีปริมาณ 40.42-45.12 กรัมต่อกิโลกรัมวัตถุแห้ง และใช้เอนไซม์ย่อยสลาย E-NB และแบคทีเรียกรดแลกติกในสภาวะเดียวกับในการทดลองที่ผ่านมา

1.2.1 การเปลี่ยนแปลงทางเคมี และจุลินทรีย์ระหว่างการหมัก

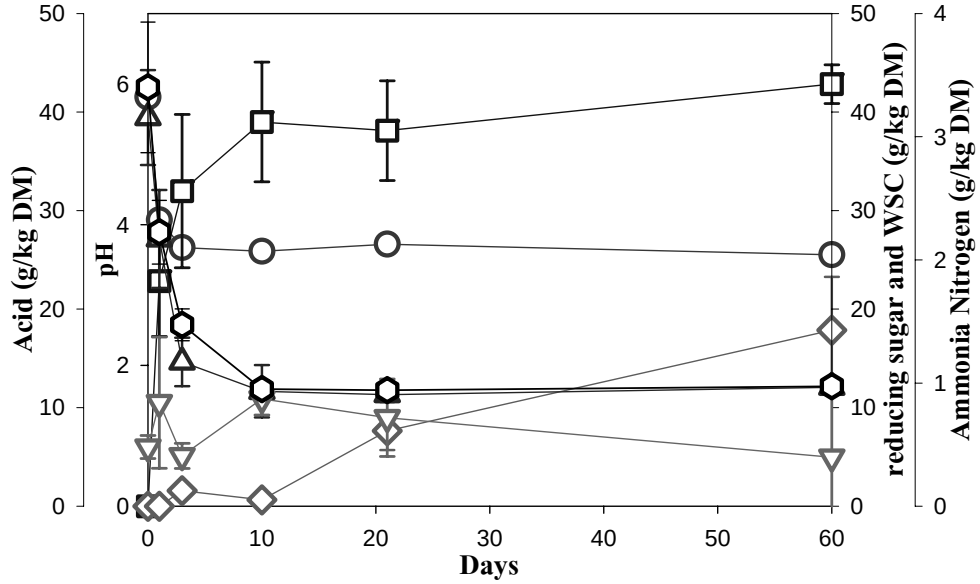
ก. การเปลี่ยนแปลงทางเคมี และจุลินทรีย์ในชุดควบคุม

จากภาพที่ 19 และ 20 พบว่า น้ำตาลรีดิวซ์ และคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำลดลงอย่างรวดเร็วกว่า 3 เท่าในช่วง 10 วันแรกของการหมักซึ่งเป็นผลจากการใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญของจุลินทรีย์กลุ่ม Enterobacteria และแบคทีเรียกรดแลกติกที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่าง

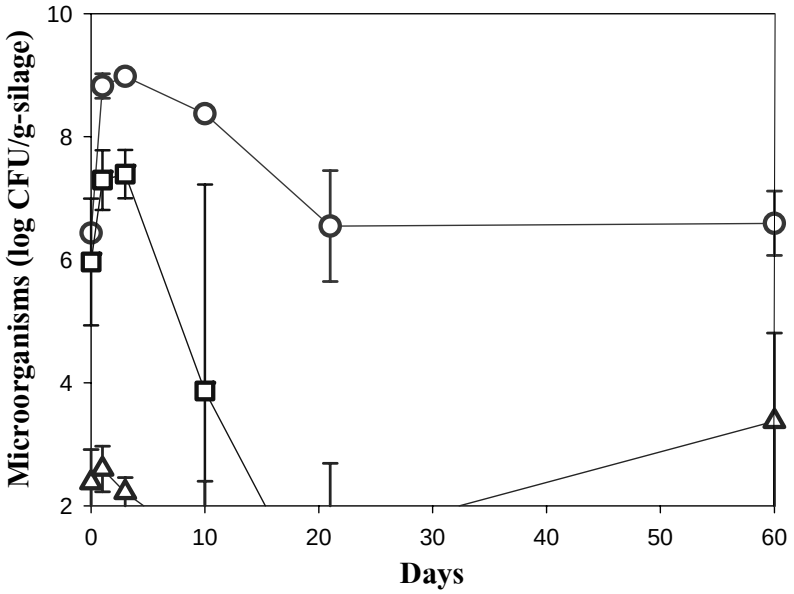
รวดเร็วจนสูงสุดที่ 7.39 และ 8.98 log CFU ต่อกรัมไซเลจในวันที่ 3 ของการหมักตามลำดับ การเพิ่มปริมาณอย่างรวดเร็วของแบคทีเรียกรดแลกติกส่งผลให้มีการผลิตกรดแลกติกอย่างโดดเด่นจนมีปริมาณสูงสุดที่ 38.99 กรัมต่อกิโลกรัมวัตถุแห้งในวันที่ 10 ของการหมัก ซึ่งส่งผลให้ค่าความเป็นกรดด่างของไซเลจลดลงต่ำกว่า 4.2 ตั้งแต่วันที่ 1 ของการหมัก

ค่าความเป็นกรดด่างที่อยู่ในช่วง 3.57-3.72 ในวันที่ 3-60 ของการหมักส่งผลให้แบคทีเรียกรดแลกติก จุลินทรีย์กลุ่ม Enterobacteria และเชื้อราถูกยับยั้งการเจริญ โดยแบคทีเรียกรดแลกติกมีปริมาณลดลงประมาณ 2 log CFU ต่อกรัมไซเลจหลังวันที่ 10 ของการหมัก จุลินทรีย์กลุ่ม Enterobacteria มีปริมาณที่ต่ำกว่า 1 log CFU ต่อกรัมไซเลจหลังวันที่ 10 ของการหมัก และเชื้อรามีปริมาณที่ต่ำกว่า 1 log CFU ตลอดทั้งกระบวนการหมัก จึงส่งผลให้แอมโมเนียไนโตรเจนที่มีปริมาณสูงขึ้น 0.39 กรัมต่อกิโลกรัมวัตถุแห้งใน 10 วันแรกของการหมักลดลงจนมีปริมาณ 0.40 กรัมต่อกิโลกรัมวัตถุแห้งในวันที่ 60 ของการหมัก และส่งผลให้การใช้น้ำตาลรีดิวซ์ และคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำเป็นแหล่งคาร์บอนลดลง ปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำ และน้ำตาลรีดิวซ์จึงค่อนข้างคงที่หลังวันที่ 10 ของการหมัก

การผลิตกรดอะซิติกเริ่มขึ้นอย่างชัดเจนในวันที่ 10 ของการหมัก และผลิตเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนมีปริมาณ 17.87 กรัมต่อกิโลกรัมวัตถุแห้งในวันที่ 60 ของการหมัก โดยในช่วงวันที่ 10-60 เป็นผลจากการผลิตควบคู่กับกรดแลกติกของแบคทีเรียกรดแลกติก และในช่วงวันที่ 21-60 ของการหมัก เป็นผลจากการผลิตของเชื้อยีสต์ที่เจริญอย่างรวดเร็วจนมีปริมาณ 3.37 log CFU ต่อกรัมไซเลจในวันที่ 60 ของการหมัก ตลอดทั้งกระบวนการหมักตรวจไม่พบจุลินทรีย์กลุ่ม Clostridia กรดบิวทีริก และกรดโปรปิโอนิก



ภาพที่ 19 การเปลี่ยนแปลงทางเคมีของไซเลจในชุดควบคุมที่อายุการหมักต่าง ๆ; ○, ค่าความเป็นกรดด่าง; □, ปริมาณกรดแลกติก; ◇, ปริมาณกรดอะซิติก; △, ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์; ⬡, ปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำ; ▽, ปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจน

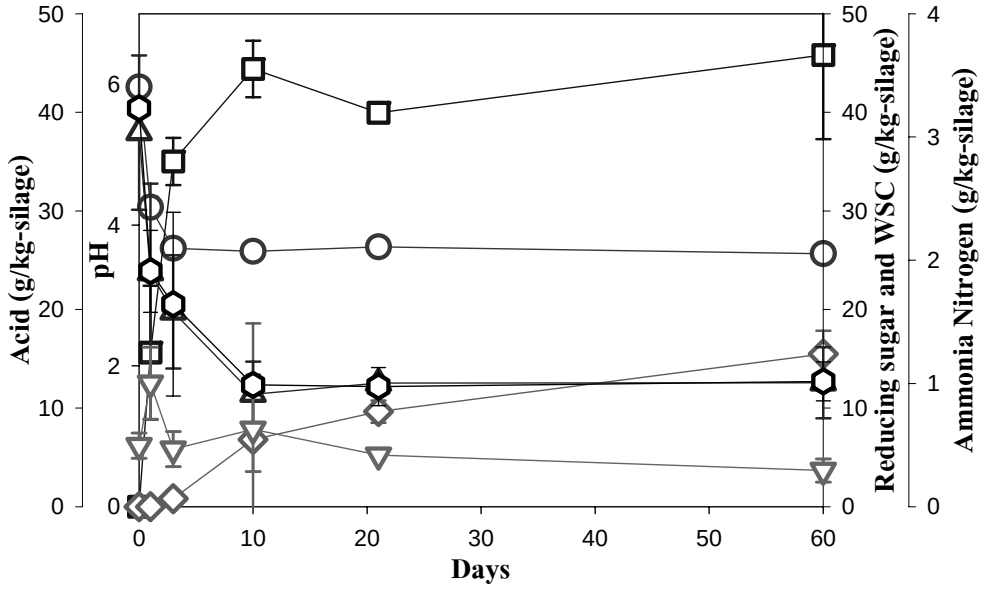


ภาพที่ 20 การเปลี่ยนแปลงทางจุลินทรีย์ของไซเลจในชุดควบคุมที่อายุการหมักต่าง ๆ; ○, ปริมาณเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก; □, ปริมาณเชื้อกลุ่ม Enterobacteria; ◇, ปริมาณเชื้อรา; △, ปริมาณเชื้อยีสต์

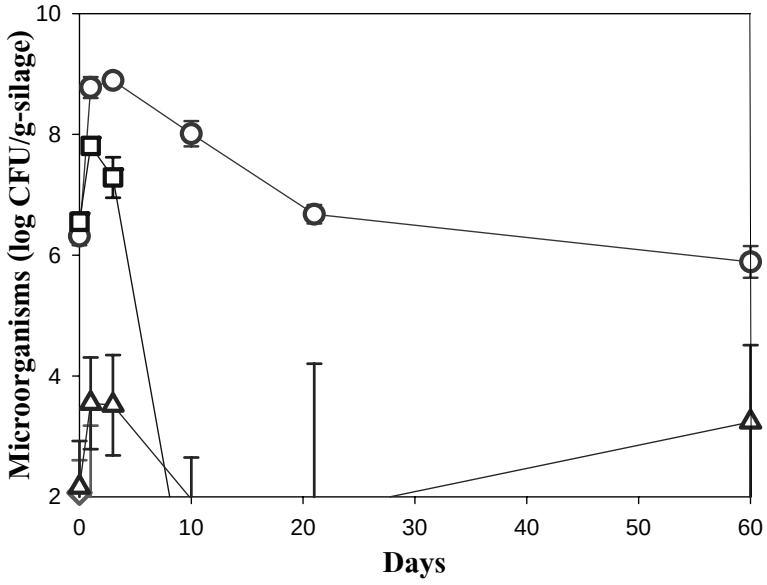
ข. การเปลี่ยนแปลงทางเคมี และจุลินทรีย์ในชุดการทดลอง NB-L +G

จากภาพที่ 21 และ 22 พบว่า น้ำตาลรีดิวซ์ และคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำมีปริมาณลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 10 วันแรกของการหมัก และมีปริมาณคงที่จนถึงวันที่ 60 ของการหมัก จุลินทรีย์กลุ่ม Enterobacteria และแบคทีเรียกรดแลกติกมีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนสูงสุดที่ 7.81 และ 8.89 log CFU ต่อกรัมไซเลจในวันที่ 1 และวันที่ 3 ของการหมักตามลำดับ หลังจากนั้นแบคทีเรียกรดแลกติกมีปริมาณลดลงอย่างต่อเนื่องจนเท่ากับ 5.89 log CFU ต่อกรัมไซเลจในวันที่ 60 ของการหมัก และจุลินทรีย์กลุ่ม Enterobacteria ลดลงจนมีปริมาณต่ำกว่า 1 log CFU ต่อกรัมไซเลจหลังวันที่ 3 ของการหมัก เชื้อรามีปริมาณต่ำกว่า 1 log CFU ต่อกรัมไซเลจตั้งแต่วันที่ 3 ของการหมัก เชื้อยีสต์มีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนเท่ากับ 3.52 log CFU ต่อกรัมไซเลจในวันที่ 3 จากนั้นมีปริมาณ 1-2 log CFU ต่อกรัมไซเลจจนถึงวันที่ 60 ของการหมัก

ปริมาณกรดแลกติกเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนถึงวันที่ 10 ของการหมัก จากนั้นมีแนวโน้มคงที่จนมีปริมาณ 45.82 กรัมต่อกิโลกรัมวัตถุแห้งในวันที่ 60 ของการหมัก กรดอะซิติกเริ่มตรวจพบในวันที่ 3 ของการหมัก และมีปริมาณที่สูงขึ้นอย่างต่อเนื่องตลอดทั้งกระบวนการหมัก ค่าความเป็นกรดด่างลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 3 วันแรกของการหมัก จากนั้นค่อนข้างคงที่จนมีค่า 3.59 ในวันที่ 60 ของการหมัก แอมโมเนียไนโตรเจนมีปริมาณเพิ่มขึ้นจนสูงสุดที่ 1.00 กรัมต่อกิโลกรัมวัตถุแห้งในวันที่ 1 จากนั้นมีปริมาณที่ลดลงอย่างต่อเนื่องจนเท่ากับ 0.29 กรัมต่อกิโลกรัมวัตถุแห้งในวันที่ 60 ของการหมัก



ภาพที่ 21 การเปลี่ยนแปลงทางเคมีของไซเลจในชุดการทดลอง NB-L +G ที่อายุการหมักต่าง ๆ; ○, ค่าความเป็นกรดด่าง; □, ปริมาณกรดแลกติก; ◇, ปริมาณกรดอะซิติก; △, ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์; ⬡, ปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำ; ▽, ปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจน

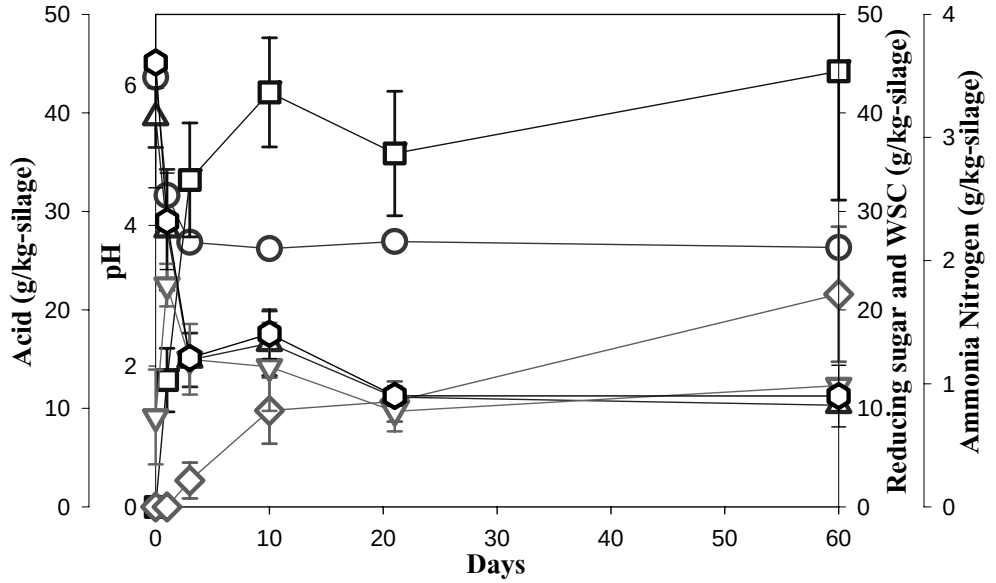


ภาพที่ 22 การเปลี่ยนแปลงทางจุลินทรีย์ของไซเลจในชุดการทดลอง NB-L +G ที่อายุการหมักต่าง ๆ; ○, ปริมาณเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก; □, ปริมาณเชื้อกลุ่ม Enterobacteria; ◇, ปริมาณเชื้อรา; △, ปริมาณเชื้อยีสต์

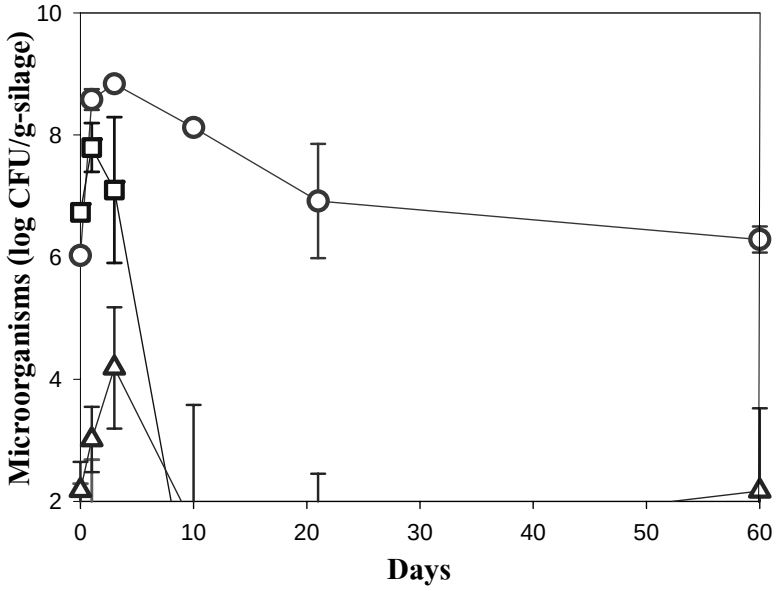
ค. การเปลี่ยนแปลงทางเคมี และจุลินทรีย์ในชุดการทดลอง NB-H +G

จากภาพที่ 23 และ 24 พบว่า น้ำตาลรีดิวซ์ และคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำมีปริมาณที่ลดลงกว่า 2 เท่าในช่วง 3 วันแรกของการหมัก จากนั้นลดลงด้วยอัตราที่ช้าลงจนเท่ากับ 10.31 และ 11.25 กรัมต่อกิโลกรัมวัตถุแห้งในวันที่ 60 ของการหมักตามลำดับ จุลินทรีย์กลุ่ม Entero bacteria และแบคทีเรียกรดแลกติกมีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนสูงสุดที่ 7.80 และ 8.84 log CFU ต่อกรัมไซเลจในวันที่ 1 และวันที่ 3 ของการหมักตามลำดับ หลังจากนั้นจุลินทรีย์กลุ่ม Entero bacteria มีปริมาณลดลงจนต่ำกว่า 1 log CFU ต่อกรัมไซเลจนถึงวันที่ 60 ของการหมัก และแบคทีเรียกรดแลกติกมีปริมาณลดลงจนเท่ากับ 6.29 log CFU ต่อกรัมไซเลจในวันที่ 60 ของการหมัก เชื้อรามีปริมาณต่ำกว่า 1 log CFU ต่อกรัมไซเลจตั้งแต่วันที่ 3 ของการหมัก เชื้อยีสต์มีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนสูงสุดที่ 4.19 log CFU ต่อกรัมไซเลจในวันที่ 3 ของการหมัก จากนั้นมีปริมาณ 2.17 log CFU ต่อกรัมไซเลจในวันที่ 60 ของการหมัก

ปริมาณกรดแลกติกเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนเท่ากับ 42.07 กรัมต่อกิโลกรัมวัตถุแห้งในวันที่ 10 จากนั้นมีปริมาณค่อนข้างคงที่จนถึงวันที่ 60 ของการหมัก กรดอะซิติกเริ่มตรวจพบในวันที่ 3 ของการหมัก และมีปริมาณสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องจนถึงวันที่ 60 ของการหมัก ค่าความเป็นกรดด่างลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงเริ่มต้นถึงวันที่ 3 ของการหมัก จากนั้นค่อนข้างคงที่จนมีค่า 3.69 ในวันที่ 60 ของการหมัก แอมโมเนียไนโตรเจนมีปริมาณเพิ่มขึ้นจนสูงสุดที่ 1.80 กรัมต่อกิโลกรัมวัตถุแห้งในวันที่ 1 ของการหมัก จากนั้นมีปริมาณที่ลดลงอย่างต่อเนื่องจนเท่ากับ 0.98 กรัมต่อกิโลกรัมวัตถุแห้งในวันที่ 60 ของการหมัก



ภาพที่ 23 การเปลี่ยนแปลงทางเคมีของไซเลจในชุดการทดลอง NB-H +G ที่อายุการหมักต่าง ๆ; ○, ค่าความเป็นกรดด่าง; □, ปริมาณกรดแลกติก; ◇, ปริมาณกรดอะซิติก; △, ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์; ⬡, ปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำ; ▽, ปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจน



ภาพที่ 24 การเปลี่ยนแปลงทางจุลินทรีย์ของไซเลจในชุดการทดลอง NB-H +G ที่อายุการหมักต่าง ๆ; ○, ปริมาณเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก; □, ปริมาณเชื้อกลุ่ม Enterobacteria; ◇, ปริมาณเชื้อรา; △, ปริมาณเชื้อยีสต์

เมื่อเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงทางเคมี และจุลินทรีย์ของทั้ง 3 ชุดการทดลองพบว่า ไม่ปรากฏความแตกต่างของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่คาดว่าเป็นผลจากการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ย่อยสลาย E-NB ที่ใช้เป็นสารเสริม และเอนไซม์ย่อยสลายที่ผลิตจากจุลินทรีย์ในไซเลจในช่วง 3 วันแรกของการหมัก ปริมาณแบคทีเรียกรดแลกติกของทั้ง 3 ชุดการทดลองแตกต่างกันไม่เกิน 0.4 log CFU ต่อกรัมไซเลจในช่วง 3 วันแรกของการหมัก ปริมาณกรดแลกติกในชุดการทดลอง NB-H +G และชุดการทดลอง NB-L +G ต่ำกว่าชุดควบคุม 9.97 และ 7.21 กรัมต่อกิโลกรัมวัตถุแห้งในวันที่ 1 ของการหมัก ปริมาณจุลินทรีย์กลุ่ม Enterobacteria ในชุดการทดลอง NB-H +G และชุดการทดลอง NB-L +G สูงกว่าชุดควบคุม 0.60-0.77 log CFU ต่อกรัมไซเลจในวันที่ 0 และ 0.50 log CFU ต่อกรัมไซเลจในวันที่ 1 ของการหมัก ปริมาณเชื้อยีสต์ในชุดการทดลอง NB-H +G และชุดการทดลอง NB-L +G สูงกว่าชุดควบคุม 0.41-0.95 log CFU ต่อกรัมไซเลจในวันที่ 1 และ 1.30-1.97 log CFU ต่อกรัมไซเลจในวันที่ 3 ของการหมัก และปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจนในชุดการทดลอง NB-H +G และชุดการทดลอง NB-L +G เพิ่มขึ้นเป็น 2.47 และ 2.00 เท่า ในขณะที่ชุดควบคุมมีปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจนเพิ่มขึ้นเพียง 1.75 เท่าในวันที่ 1 ของการหมัก แสดงว่าการใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นสารเสริมร่วมกับเอนไซม์ย่อยสลาย E-NB ทั้งที่ความเข้มข้นสูง และต่ำไม่สามารถสนับสนุนให้เกิดการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายจากจุลินทรีย์ในไซเลจที่สามารถทำงานร่วมกับเอนไซม์ย่อยสลาย E-NB ในการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตที่เป็นองค์ประกอบในผนังเซลล์ของหญ้าเนเปียร์จนได้น้ำตาลรีดิวซ์ที่แบคทีเรียกรดแลกติกที่ใช้เป็นสารเสริมสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดแลกติกได้อย่างมีประสิทธิภาพ และน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ย่อยสลาย E-NB ยังคงส่งผลในการเพิ่มการเจริญของจุลินทรีย์กลุ่ม Enterobacteria และเชื้อยีสต์ ซึ่งส่งผลให้เกิดการย่อยสลายโปรตีนในปริมาณสูงก่อให้เกิดการสูญเสียคุณค่าทางอาหารของไซเลจในช่วง 3 วันแรกของการหมัก

1.2.2 สมบัติทางเคมี และจุลินทรีย์ของไซเลจในวันที่ 60 ของการหมัก

เมื่อพิจารณาสมบัติทางเคมี และจุลินทรีย์ของไซเลจในวันที่ 60 ของการหมัก (ตารางที่ 12) พบว่า ไซเลจทั้ง 3 ชุดการทดลองมีสมบัติทางเคมี และจุลินทรีย์ที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ไซเลจทุกชุดการทดลองมีสีเขียวอมเหลือง มีค่าความเป็นกรดด่างต่ำกว่า 4.2 และมีปริมาณกรดบิวทีริกต่ำกว่า 1 กรัมต่อกิโลกรัมวัตถุแห้ง ซึ่งเป็นค่าที่ยอมรับว่าได้มาตรฐานตามเกณฑ์ของกองอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์ และมีปริมาณเชื้อยีสต์ต่ำกว่า 5.00 log CFU ต่อกรัมไซเลจ ซึ่งเป็นค่าที่ยอมรับได้ตามเกณฑ์ของ Seglar (2003) อย่างไรก็ตามพบว่าไซเลจมีปริมาณกรดแลกติก

42.83-45.82 กรัมต่อกิโลกรัมวัตถุแห้ง และมีปริมาณกรดอะซิติก 15.48-21.58 กรัมต่อกิโลกรัมวัตถุแห้งซึ่งสูงกว่า 25 และ 8 กรัมต่อกิโลกรัมวัตถุแห้งซึ่งเป็นเกณฑ์ที่กองอาหารสัตว์กำหนดตามลำดับ Sheperd and Kung (1996) ได้ทดลองใช้ไซเลจข้าวโพดที่มีค่าความเป็นกรดด่าง 3.63 มีกรดแลกติกและกรดอะซิติก 44.8 และ 26.1 กรัมต่อกิโลกรัมวัตถุแห้งตามลำดับเป็นอาหารของโคนมพันธุ์ Hostein เป็นเวลา 10 สัปดาห์แล้วพบว่า โคยังคงผลิตน้ำนมในปริมาณสูง และน้ำนมมีคุณค่าทางอาหารตามปกติ จึงคาดว่าการที่ไซเลจหญ้าเนเปียร์ทั้ง 3 ชุดการทดลองมีปริมาณกรดที่เกินเกณฑ์ที่กำหนดจะไม่เป็นปัญหาต่อสุขภาพ และการผลิตน้ำนมของสัตว์ที่บริโภค

ตารางที่ 12 สมบัติทางเคมี และจุลินทรีย์ของไซเลจที่ใช้กลูโคสเป็นสารเสริมร่วมในวันที่ 60 ของการหมัก

สมบัติของไซเลจ (กรัมต่อกิโลกรัมวัตถุแห้ง)	ชุดการทดลอง		
	ชุดควบคุม	NB-L +G	NB-H +G
วัตถุแห้ง	189 ^{A} (± 5.30)	174 ^{A} (± 3.99)	180 ^{A} (± 16.80)
ค่าความเป็นกรดด่าง	3.57 ^{A} (± 0.06)	3.59 ^{A} (± 0.05)	3.69 ^{A} (± 0.12)
น้ำตาลรีดิวซ์	12.08 ^{A} (± 0.76)	12.57 ^{A} (± 3.61)	10.31 ^{A} (± 0.55)
คาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำ	12.17 ^{A} (± 0.91)	12.71 ^{A} (± 1.98)	11.25 ^{A} (± 3.12)
กรดแลกติก	42.83 ^{A} (± 1.97)	45.82 ^{A} (± 8.54)	44.23 ^{A} (± 13.08)
กรดอะซิติก	17.87 ^{A} (± 5.41)	15.48 ^{A} (± 2.37)	21.58 ^{A} (± 6.85)
กรดบิวทีริก	0.00 ^{A} (± 0.00)	0.00 ^{A} (± 0.00)	0.00 ^{A} (± 0.00)
แอมโมเนียไนโตรเจน	0.40 ^{A} (± 0.51)	0.29 ^{A} (± 0.09)	0.98 ^{A} (± 0.05)
แบคทีเรียกรดแลกติก (log CFU ต่อกรัมไซเลจ)	6.59 ^{A} (± 0.52)	5.89 ^{A} (± 0.26)	6.29 ^{A} (± 0.21)
จุลินทรีย์กลุ่ม Enterobacteria (log CFU ต่อกรัมไซเลจ)	<1.00	<1.00	<1.00
รา (log CFU ต่อกรัมไซเลจ)	< 1.00	< 1.00	< 1.00
ยีสต์ (log CFU ต่อกรัมไซเลจ)	3.37 ^{A} (± 1.43)	3.24 ^{A} (± 1.27)	2.17 ^{A} (± 1.36)

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวนอนไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ตามการวิเคราะห์ด้วยวิธีของ Turkey's ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ และค่าในวงเล็บที่อยู่หลังค่าเฉลี่ยคือค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

1.2.3 สมบัติทางเคมี และจุลินทรีย์ของไซเลจหลังเปิดถุงหมักเป็นเวลา 3 วัน

เมื่อการหมักเสร็จสิ้นที่ 60 วัน ทำการเปิดถุงหมักให้ไซเลจสัมผัสอากาศเป็นเวลา 3 วัน จากนั้นเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ทางเคมี และจุลินทรีย์ของไซเลจ (ตารางที่ 13) พบว่าไซเลจทุกชุดการทดลองมีสมบัติทางเคมี และจุลินทรีย์ใกล้เคียงกับไซเลจก่อนการเปิดถุงหมัก และมีสมบัติทางเคมี และจุลินทรีย์ที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 13 สมบัติทางเคมี และจุลินทรีย์ของไซเลจที่ใช้กลูโคสเป็นสารเสริมร่วมหลังเปิดถุงหมัก 3 วัน

สมบัติของไซเลจ (กรัมต่อกิโลกรัมวัตถุแห้ง)	ชุดการทดลอง		
	ชุดควบคุม	NB-L +G	NB-H +G
วัตถุแห้ง	311^{A} (± 57.97)	268^{A} (± 101.29)	287^{A} (± 2.95)
ค่าความเป็นกรดด่าง	3.59^{A} (± 0.08)	3.53^{A} (± 0.06)	3.65^{A} (± 1.14)
กรดแลกติก	45.61^{A} (± 12.32)	44.97^{A} (± 26.28)	36.50^{A} (± 19.51)
กรดอะซิติก	27.22^{A} (± 9.50)	22.09^{A} (± 8.28)	16.06^{A} (± 10.74)
กรดบิวทีริก	0.00^{A} (± 0.00)	0.00^{A} (± 0.00)	0.00^{A} (± 0.00)
แบคทีเรียกรดแลกติก (log CFU ต่อกรัมไซเลจ)	5.60^{A} (± 1.46)	6.38^{A} (± 0.49)	5.60^{A} (± 0.85)
จุลินทรีย์กลุ่ม Enterobacteria (log CFU ต่อกรัมไซเลจ)	<1.00	<1.00	<1.00
รา (log CFU ต่อกรัมไซเลจ)	< 1.00	< 1.00	< 1.00
ยีสต์ (log CFU ต่อกรัมไซเลจ)	3.22 (± 3.00)	3.43 (± 1.24)	1.00-2.00

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวนอนไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ตามการวิเคราะห์ด้วยวิธีของ Turkey's ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ และค่าในวงเล็บที่อยู่หลังค่าเฉลี่ยคือค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

จากการทดลองใช้เอนไซม์ย่อยสลาย E-NB ทั้งความเข้มข้นสูง และต่ำเป็นสารเสริมร่วมกับแบคทีเรียกรดแลกติกทั้งในสภาวะที่มี และไม่มีน้ำตาลกลูโคสในการผลิตไซเลจ

หญ้าเนเปียร์แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ย่อยสลาย E-NB สามารถเพิ่มปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำในช่วง 3 วันแรกของการหมัก โดยน้ำตาลที่เพิ่มขึ้นไม่ส่งผลในการเพิ่มการเจริญและการผลิตกรดแลกติกของแบคทีเรียกรดแลกติกที่ใช้เป็นสารเสริม แต่ส่งผลในการเพิ่มปริมาณเชื้อยีสต์ และจุลินทรีย์กลุ่ม Enterobacteria ในระหว่างกระบวนการหมัก จึงไม่ส่งผลให้ไซเลจหญ้าเนเปียร์ที่ใช้เอนไซม์ย่อยสลาย E-NB เป็นสารเสริมมีคุณภาพเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับไซเลจที่ไม่ได้ใช้เอนไซม์เป็นสารเสริมทั้งก่อน และหลังการเปิดถุงหมัก การใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นสารเสริมร่วมกับเอนไซม์ย่อยสลาย E-NB ไม่สามารถสนับสนุนให้เกิดการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายจากจุลินทรีย์ในไซเลจที่สามารถทำงานร่วมกับเอนไซม์ย่อยสลาย E-NB ในการเพิ่มน้ำตาลรีดิวซ์ที่แบคทีเรียกรดแลกติกสามารถใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพในการเพิ่มการผลิตกรดแลกติกในระหว่างกระบวนการหมักได้ ไซเลจหญ้าเนเปียร์ที่ใช้เอนไซม์ย่อยสลาย E-NB เป็นสารเสริมจึงยังมีการเจริญของจุลินทรีย์กลุ่ม Enterobacteria และเชื้อยีสต์ที่สูง และมีคุณภาพที่ไม่แตกต่างในทางสถิติกับไซเลจที่ไม่ได้ใช้เอนไซม์เป็นสารเสริมทั้งก่อน และหลังการเปิดถุงหมัก

2. ผลของเอนไซม์ย่อยสลายจากการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtils* GN156 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร NM ต่อการผลิตไซเลจหญ้าเนเปียร์

เนื่องจากเอนไซม์ย่อยสลาย E-NB ผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ที่แบคทีเรียกรดแลกติกที่ใช้เป็นสารเสริมสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อผลิตกรดแลกติกในไซเลจหญ้าเนเปียร์ได้ในประสิทธิภาพต่ำ ดังนั้นในหัวข้อนี้จึงทดลองผลิตเอนไซม์ย่อยสลายด้วยการเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* GN156 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร NM ซึ่งเป็นสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* ZJF-1A5 แล้วทำให้เชื้อผลิตมวลชีวภาพ (biomass) 3.8 กรัมต่อลิตร และผลิตเอนไซม์เอนโด-เบตา-1,3-1,4-กลูคาเนส 131 หน่วยต่อมิลลิลิตรในชั่วโมงที่ 36 ของการเลี้ยงเชื้อ (Tang *et al*., 2004) และอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร DXM ซึ่งเป็นสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อ *B. subtils* แล้วทำให้เชื้อเจริญได้สูง และผลิตเอนไซม์ไซลาเนสที่ปราศจากเซลลูเลสได้สูงสุดประมาณ 9 หน่วยต่อมิลลิลิตรในชั่วโมงที่ 18 (Sa-Pereira *et al.*, 2002) จากนั้นทดลองเพิ่มปริมาณเอนไซม์ย่อยสลายที่ผลิตขึ้นโดยการใช้สารเหนี่ยวนำในการเลี้ยงเชื้อ และทำให้เข้มข้นขึ้นโดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต โดยคาดว่าเมื่อใช้เอนไซม์ย่อยสลายที่เตรียมขึ้นเป็นสารเสริมร่วมกับแบคทีเรียกรดแลกติกจะเพิ่มการผลิตกรดแลกติก ซึ่งจะส่งผลให้ไซเลจหญ้าเนเปียร์มีคุณภาพที่ดีขึ้นได้

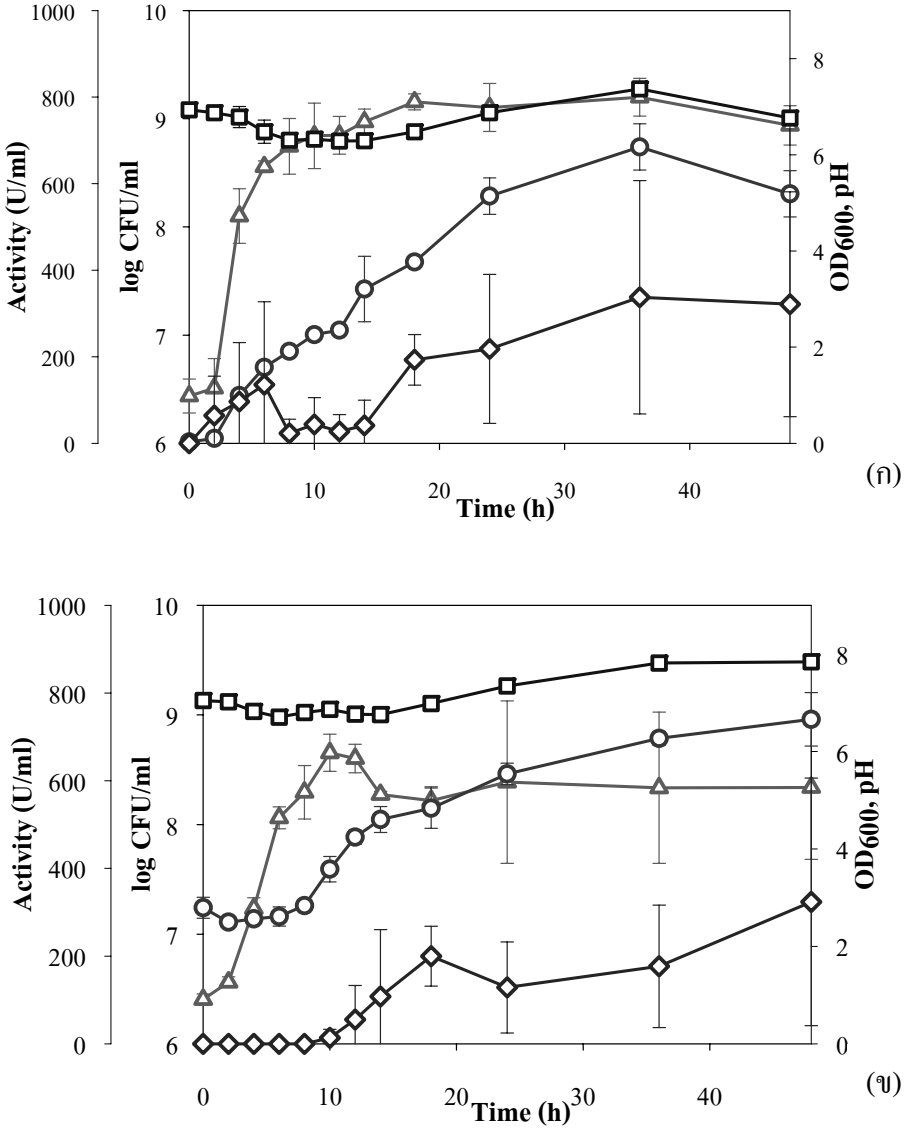
2.1 การเจริญ และการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายของเชื้อ *B. subtilis* GN156 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร NM และ DXM

2.1.1 การเจริญ และการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร NM

เมื่อทดลองเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* GN156 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร NM โดยใช้เครื่องบ่มเชื้อแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที แล้วเก็บตัวอย่างเพื่อวัดจำนวนโคโลนีของเชื้อ ค่าความเป็นกรดด่าง และค่ากิจกรรมการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตโมเลกุลใหญ่ในหญ้าเนเปียร์ของเอนไซม์ย่อยสลายที่เชื้อผลิตขึ้นโดยทำการทดลอง 2 ซ้ำ (ภาพที่ 25(ก)) พบว่า เชื้อ *B. subtilis* GN156 เจริญได้อย่างรวดเร็วโดยมีช่วง lag phase เพียง 2 ชั่วโมงแรก จากนั้นเข้าสู่ช่วง log phase จนถึงชั่วโมงที่ 10 จึงเข้าสู่ช่วง stationary phase โดยมีปริมาณเชื้อสูงสุดที่ 9.22 log CFU ต่อมิลลิลิตรที่ 36 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ หลังจากนั้นเชื้อจะเข้าสู่ death phase การที่เชื้อสามารถเจริญได้ดีจนมีปริมาณสูงสุดที่ 36 ชั่วโมงนี้เป็นเพราะปริมาณสารอาหารในอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุดมสมบูรณ์โดยมีสารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) 2 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งไนโตรเจน และมีเดกซ์ตรินซึ่งเป็นโพลิเมอร์ของกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์จึงส่งผลให้เชื้อเจริญ และเพิ่มปริมาณอย่างต่อเนื่อง

การผลิตเอนไซม์ย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตโมเลกุลใหญ่ในหญ้าเนเปียร์เริ่มขึ้นในชั่วโมงที่ 2 ของการเลี้ยงเชื้อโดยมีค่ากิจกรรม 64.2 หน่วยต่อมิลลิลิตร และมีการผลิตที่ลดลงในชั่วโมงที่ 6-14 แล้วจึงผลิตเพิ่มขึ้นในชั่วโมงที่ 18 ของการเลี้ยงเชื้อจนมีปริมาณสูงสุดที่ 337.5 หน่วยต่อมิลลิลิตรในชั่วโมงที่ 36 ของการเลี้ยงเชื้อ จะเห็นได้ว่าการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตโมเลกุลใหญ่ในหญ้าเนเปียร์บดแห้งมีแนวโน้มที่ไม่แน่นอนเพราะค่ากิจกรรมที่วัดได้เป็นการแสดงถึงการมีอยู่ และการทำงานของเอนไซม์ที่เป็นองค์ประกอบหลายชนิดร่วมกัน ซึ่งเป็นไปได้ว่าในแต่ละช่วงการเจริญของเชื้ออาจมีการผลิตเอนไซม์องค์ประกอบในปริมาณที่แตกต่างกันจึงส่งผลให้ค่ากิจกรรมการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตโมเลกุลใหญ่ในหญ้าเนเปียร์ที่วัดได้แตกต่างกันด้วย อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาถึงแนวโน้มของการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายในภาพรวมสามารถสรุปได้ว่าเอนไซม์ย่อยสลายถูกผลิตขึ้นโดยมีลักษณะการผลิตแบบ secondary metabolite คือ เริ่มผลิตเพิ่มขึ้นอย่างเด่นชัดหลังจากที่การเจริญของเชื้อเข้าสู่ระยะ stationary phase Tang *et al.* (2004) รายงานว่าการผลิตเอนไซม์เอนโด-เบตา-1,3-1,4-กลูคาเนสเริ่มขึ้นเมื่อเชื้อเข้าสู่ระยะ stationary phase เนื่องจากยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์เอนโด-เบตา-1,3-1,4-กลูคาเนสจะถูกกระตุ้นให้เริ่มทำงาน

เมื่อเชื้อเข้าสู่ช่วง Stationary phase และมีปริมาณ GTP ในเซลล์ลดลง จึงเป็นไปได้ที่เอนไซม์ย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตโมเลกุลใหญ่ในหญ้าเนเปียร์ซึ่งเกิดจากการทำงานเป็นระบบของเอนไซม์หลายชนิดรวมทั้งเอนไซม์เบตา-กลูคาเนสมีลักษณะการผลิตแบบ secondary metabolite



ภาพที่ 25 การเจริญ ค่าความเป็นกรดด่าง และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายที่ผลิตจากการเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* GN156 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรต่าง ๆ; △, ปริมาณเชื้อ (log CFU ต่อมิลลิลิตร); ○, ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร; □, ค่าความเป็นกรดด่าง; ◇, ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลาย (หน่วยต่อมิลลิลิตร)

(ก) อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร NM

(ข) อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร DXM

2.1.2 การเจริญ และการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร DXM

จากภาพที่ 25(ข) พบว่า เชื้อ *B. subtilis* GN156 มีการเจริญอย่างรวดเร็ว โดยมีช่วง lag phase เพียง 2 ชั่วโมงแรก จากนั้นเข้าสู่ช่วง log phase จนถึงชั่วโมงที่ 10 ซึ่งเชื้อมีปริมาณสูงสุดที่ 8.67 log CFU ต่อมิลลิลิตร เชื้อจึงเข้าสู่ช่วง stationary phase และมีปริมาณคงที่จนถึงชั่วโมงที่ 48 การผลิตเอนไซม์ย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตโมเลกุลใหญ่ในหญ้าเนเปียร์เริ่มขึ้นในชั่วโมงที่ 10 ของการเลี้ยงเชื้อโดยมีค่ากิจกรรม 13.8 หน่วยต่อมิลลิลิตร แล้วผลิตเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนเท่ากับ 199.7 หน่วยต่อมิลลิลิตรในชั่วโมงที่ 18 และมีปริมาณคงที่จนสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อ แสดงให้เห็นว่าเชื้อผลิตเอนไซม์ย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตโมเลกุลใหญ่ในหญ้าเนเปียร์แบบ secondary meta bolite โดยเริ่มการผลิตเมื่อเชื้อเข้าสู่ระยะ stationary phase ซึ่งสอดคล้องกับการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อ *B. subtilis* ที่คัดแยกจากบ่อน้ำพุร้อนในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร DXM (Sa-Pereira *et al.*, 2002)

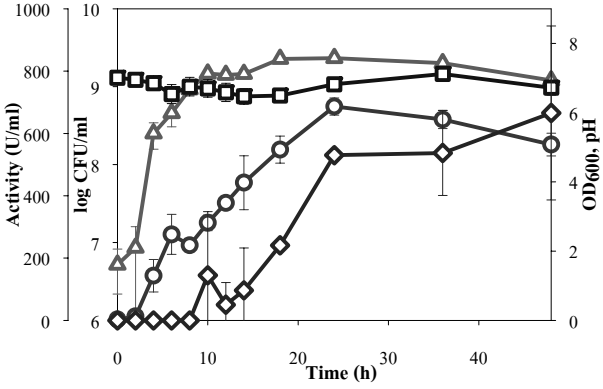
เมื่อเปรียบเทียบการเจริญ และการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายของเชื้อ *B. subtilis* GN156 ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 สูตรพบว่า เชื้อมีช่วงการเจริญ และมีการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตโมเลกุลใหญ่ในหญ้าเนเปียร์แบบ secondary metabolite ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 สูตรเช่นเดียวกัน อย่างไรก็ตามพบว่าปริมาณสูงสุดของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร NM สูงกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร DXM 0.55 log CFU ต่อมิลลิลิตร และการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตโมเลกุลใหญ่ในหญ้าเนเปียร์ของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร NM มีปริมาณสูงสุดถึง 337.5 หน่วยต่อมิลลิลิตรในชั่วโมงที่ 36 ในขณะที่การผลิตเอนไซม์ย่อยสลายของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร DXM มีปริมาณสูงสุดเพียง 199.7 หน่วยต่อมิลลิลิตรในชั่วโมงที่ 18 ของการเลี้ยงเชื้อ แสดงว่าเชื้อ *B. subtilis* GN156 สามารถใช้เดกซ์ตรินเป็นแหล่งคาร์บอน และสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร NM ในการเจริญ และการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายได้ในประสิทธิภาพสูงกว่าการใช้ไซแลน และแป้งถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร DXM ดังนั้นจึงเลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร NM ในการศึกษาการเพิ่มการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายของเชื้อโดยการใช้สารเหนี่ยวนำต่อไป

2.2 การเพิ่มการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายของเชื้อ *B. subtilis* GN156 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร NM โดยใช้สารเหนี่ยวนำ

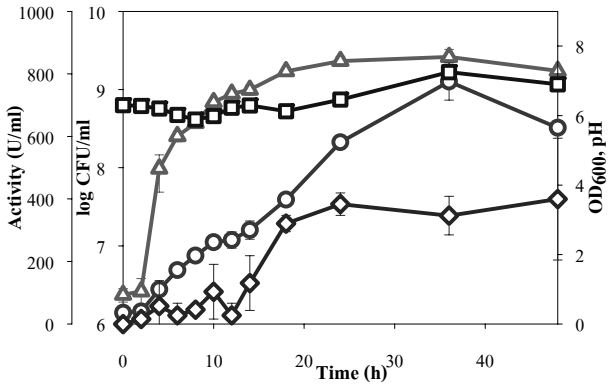
การใช้สารเหนี่ยวนำเป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถเพิ่มปริมาณการผลิตเอนไซม์จากการเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* GN156 ในอาหาร NB เช่น การใช้ไซแลนความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์เป็นสารเหนี่ยวนำสามารถเพิ่มการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตโมเลกุลใหญ่ในหญ้าเนเปียร์ได้ 3 เท่าของการไม่ใช้สารเหนี่ยวนำ โดยสามารถเพิ่มค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสซึ่งเป็นเอนไซม์องค์ประกอบในระบบของเอนไซม์ย่อยสลายได้ถึง 4 เท่า (วิชชุดา, 2545) การใช้เพคติน และซีเอ็ม-เซลลูโลสเป็นสารเหนี่ยวนำสามารถเหนี่ยวนำให้มีการผลิตเอนไซม์เบตา-1,3-1,4-กลูคาเนสเพิ่มขึ้น 41 และ 47 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับการไม่ใช้สารเหนี่ยวนำตามลำดับ (Apiraksakorn *et al*., 2006) ดังนั้นในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายจากอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร NM จึงเลือกใช้ซีเอ็ม-เซลลูโลส (อาหารเลี้ยงเชื้อ NMc) เพคติน (อาหารเลี้ยงเชื้อ NMp) และไซแลน (อาหารเลี้ยงเชื้อ NMx) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์เป็นสารเหนี่ยวนำ โดยคาดหวังว่าจะสามารถเพิ่มปริมาณการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร NM อย่างโดดเด่นเพื่อนำไปสู่การใช้เป็นสารเสริมที่มีประสิทธิภาพในการปรับปรุงคุณภาพของไซเลจหญ้าเนเปียร์ต่อไป

2.2.1 การเจริญ และการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร NM ที่มีสารเหนี่ยวนำ

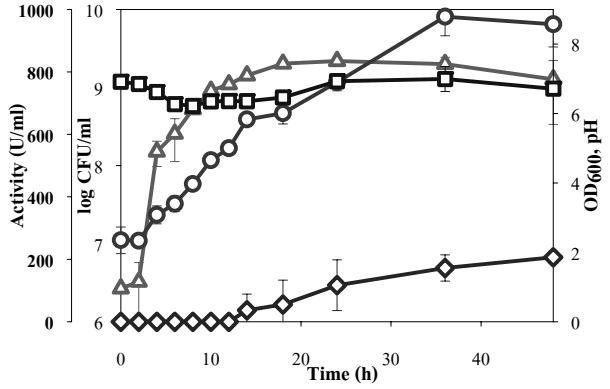
เมื่อทดลองเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* GN156 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร NM ที่มีสารเหนี่ยวนำทั้ง 3 ชนิดแล้วเก็บตัวอย่างเพื่อวัดจำนวนโคโลนีของเชื้อ ค่าความเป็นกรดด่าง และค่ากิจกรรมการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตโมเลกุลใหญ่ในหญ้าเนเปียร์โดยทำการทดลอง 2 ซ้ำ (ภาพที่ 26) พบว่าเชื้อสามารถเจริญในอาหารที่ใส่สารเหนี่ยวนำทุกชนิดโดยมีช่วงของการเจริญเช่นเดียวกับอาหารที่ไม่ใส่สารเหนี่ยวนำคือ มีช่วง lag phase 2 ชั่วโมงแรก จากนั้นเข้าสู่ช่วง log phase จนถึงชั่วโมงที่ 10 จึงเข้าสู่ช่วง stationary phase และเข้าสู่ช่วง death phase ในชั่วโมงที่ 36 ของการเลี้ยงเชื้อ โดยในอาหารเลี้ยงเชื้อ NMc NMp และ NMx มีปริมาณเชื้อสูงสุดที่ 9.37 log cfu ต่อมิลลิลิตรในชั่วโมงที่ 24 9.42 log cfu ต่อมิลลิลิตรในชั่วโมงที่ 36 และ 9.31 log cfu ต่อมิลลิลิตรในชั่วโมงที่ 24 ของการเลี้ยงเชื้อตามลำดับซึ่งใกล้เคียงกับปริมาณเชื้อสูงสุดที่ 9.21 log cfu ต่อมิลลิลิตรในอาหารเลี้ยงเชื้อ NM ที่ไม่ใส่สารเหนี่ยวนำ แสดงว่าการใช้สารเหนี่ยวนำทั้ง 3 ชนิดไม่ส่งผลในการเพิ่มการเจริญของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร NM เมื่อเปรียบเทียบกับการไม่ใช้สารเหนี่ยวนำ



(ก)



(ข)



(ค)

<u>ภาพที่ 26</u> การเจริญ ค่าความเป็นกรดด่าง และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายจากการเลี้ยงเชื้อ *B .subtilis* GN156 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร NM ที่มีสารเหนี่ยวนำชนิดต่าง ๆ; △, ปริมาณเชื้อ (log CFU ต่อมิลลิลิตร); ○, ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร; □, ค่าความเป็นกรดด่าง; ◇, ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลาย (หน่วยต่อมิลลิลิตร)

(ก) อาหารเลี้ยงเชื้อ NMc

(ข) อาหารเลี้ยงเชื้อ NMp

(ค) อาหารเลี้ยงเชื้อ NMx

ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NMc เริ่มมีการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตโมเลกุลใหญ่ในหญ้าเนเปียร์ในชั่วโมงที่ 10 ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่เชื้อเริ่มเข้าสู่ Stationary phase และผลิตเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนถึงชั่วโมงที่ 24 จึงผลิตเพิ่มขึ้นในอัตราต่ำ โดยมีค่ากิจกรรมสูงสุดที่ 665.7 หน่วยต่อมิลลิลิตรในชั่วโมงที่ 48 ของการเลี้ยงเชื้อ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NMp มีการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายในแนวโน้มที่ไม่แน่นอนจนถึงชั่วโมงที่ 12 จากนั้นมีการผลิตเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนถึงชั่วโมงที่ 24 และผลิตเพิ่มขึ้นในอัตราต่ำจนถึงชั่วโมงที่ 48 ซึ่งมีค่ากิจกรรมสูงสุดที่ 399.4 หน่วยต่อมิลลิลิตร และในอาหารเลี้ยงเชื้อ NMx เริ่มมีการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายในชั่วโมงที่ 14 และมีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนมีค่ากิจกรรมสูงสุด 206.6 หน่วยต่อมิลลิลิตรในชั่วโมงที่ 24 ของการเลี้ยงเชื้อ แสดงว่าซีเอ็ม-เซลลูโลสเป็นสารเสริมที่สามารถเหนี่ยวนำเชื้อ *B. subtilis* GN156 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร NM ให้ผลิตเอนไซม์ย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตโมเลกุลใหญ่ในหญ้าเนเปียร์ที่มีค่ากิจกรรมสูงเป็น 1.55 3.12 และ 1.59 เท่าของการใช้เพคติน ไซแลน และการไม่ใช้สารเหนี่ยวนำในชั่วโมงที่ 36 ของการเลี้ยงเชื้อตามลำดับ และสูงเป็น 1.67 3.22 และ 2.07 เท่าในชั่วโมงที่ 48 ของการเลี้ยงเชื้อตามลำดับ

2.2.2 ระบบของเอนไซม์ย่อยสลายที่ผลิตจากการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร NM ที่มีสารเหนี่ยวนำ

เมื่อพิจารณาระบบของเอนไซม์ย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตโมเลกุลใหญ่ในหญ้าเนเปียร์ที่ผลิตจากการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 36 ชั่วโมงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NMc อาหารเลี้ยงเชื้อ NMp และอาหารเลี้ยงเชื้อ NMx เปรียบเทียบกับในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร NM ที่ไม่ใช้สารเหนี่ยวนำ (ตารางที่ 14) พบว่า ซีเอ็ม-เซลลูโลสสามารถเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์เบตา-กลูคาเนสได้เพิ่มขึ้น 1.17 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับการไม่ใช้สารเหนี่ยวนำ จึงส่งผลให้เอนไซม์ย่อยสลายที่ผลิตจากอาหารเลี้ยงเชื้อ NMc มีค่ากิจกรรมการเอนไซม์ย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตโมเลกุลใหญ่ในหญ้าเนเปียร์สูงเป็น 1.61 เท่าของเอนไซม์ย่อยสลายที่ผลิตโดยไม่ใช้สารเหนี่ยวนำ ซึ่งสอดคล้องกับผลที่ Apiraksakorn *et al.* (2006) พบเมื่อใช้ซีเอ็ม-เซลลูโลสเป็นสารเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์เบตา-กลูคาเนสในอาหาร NB

เพคตินไม่สามารถเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์ใด ๆ ในระบบเอนไซม์ย่อยสลายได้ จึงไม่ส่งผลให้ค่ากิจกรรมการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตโมเลกุลใหญ่ในหญ้าเนเปียร์ของเอนไซม์ย่อยสลายจากการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ NMp แตกต่างอย่างชัดเจนจากเอนไซม์ย่อยสลายที่

ผลิตโดยไม่ใช้สารเหนี่ยวนำ ซึ่งเป็นผลตรงข้ามกับการที่พบว่าเพคตินสามารถเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์ เบตา-กลูคาเนสในอาหาร NB (Apiraksakorn *et al*., 2006)

ไซแลนไม่สามารถเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์ใด ๆ ในระบบเอนไซม์ย่อยสลาย แต่กลับส่งผลในการยับยั้งการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสอย่างชัดเจน ส่งผลให้เปอร์เซ็นต์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสลดลงเกือบ 1 เท่า ความเหมาะสมในการทำงานร่วมกันเป็นระบบการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตโมเลกุลใหญ่ในหญ้าเนเปียร์ของเอนไซม์ที่เป็นองค์ประกอบจึงลดลง ค่ากิจกรรมการย่อยสลายจึงเป็น 0.61 เท่าของเอนไซม์ย่อยสลายที่ผลิตโดยไม่ใช้สารเหนี่ยวนำ ซึ่งเป็นผลที่ตรงข้ามกับการที่พบว่าไซแลนสามารถเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสในอาหาร NB (วิชชุดา, 2545)

แม้ว่าการใช้ซีเอ็ม-เซลลูโลสเป็นสารเหนี่ยวนำจะสามารถเพิ่มการผลิตเอนไซม์เบตา-กลูคาเนสได้ แต่เอนไซม์ย่อยสลายที่ผลิตขึ้นมีเปอร์เซ็นต์ของค่ากิจกรรมของเอนไซม์ซีเอ็ม-เซลลูเลส เพคติเนส ไซลาเนส และเบตา-กลูคาเนสไม่แตกต่างจากเอนไซม์ที่ผลิตโดยไม่ใช้สารเหนี่ยวนำ และมีค่ากิจกรรมการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตโมเลกุลใหญ่ในหญ้าเนเปียร์เพิ่มขึ้นไม่ถึง 2 เท่า ดังนั้นจึงไม่ได้ใช้เอนไซม์ย่อยสลายที่ผลิตจากอาหารเลี้ยงเชื้อ NMc ในการศึกษาการเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์โดยการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตต่อไป

2.3 การเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ย่อยสลายของเชื้อ *B. subtilis* GN156 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร NM โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตโมเลกุลใหญ่ในหญ้าเนเปียร์ที่ผลิตจากเชื้อ *B. subtilis* GN156 ในอาหาร NB (Kiatgrajai *et al*., 2005) ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือกใช้วิธีการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมเพื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ย่อยสลายที่ผลิตจากการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร NM เป็นเวลา 36 ชั่วโมง (เอนไซม์ย่อยสลาย E-NM) โดยคาดหวังว่าหลังการตกตะกอนเอนไซม์ย่อยสลายจะมีค่ากิจกรรมการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตโมเลกุลใหญ่ในหญ้าเนเปียร์สูงขึ้นจนสามารถใช้เป็นสารเสริมในการผลิตไซเลจหญ้าเนเปียร์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ