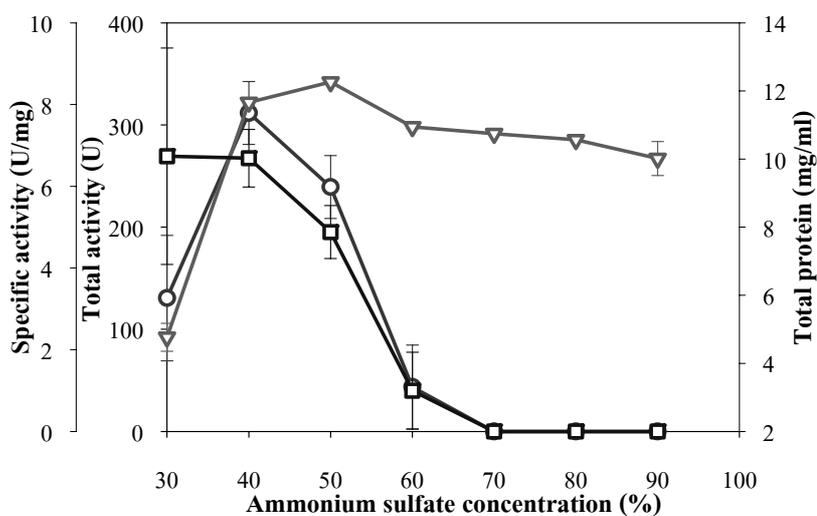


2.3.1 การตกตะกอนเอนไซม์ย่อยสลาย E-NM ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

เมื่อทดลองตกตะกอนเอนไซม์ย่อยสลาย E-NM ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 30-90 เปอร์เซ็นต์พบว่า ได้ผลดังภาพที่ 27 ซึ่งจะเห็นว่าเอนไซม์ย่อยสลาย E-NM หลังการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์มีค่ากิจกรรม และค่ากิจกรรมรวมสูงสุดโดยมีค่า 62.36 หน่วยต่อมิลลิลิตร และ 311.78 หน่วยตามลำดับ รวมทั้งพบว่าเอนไซม์ย่อยสลาย E-NM หลังการตกตะกอนมีค่ากิจกรรมเฉพาะ 26.74 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งต่ำกว่าค่ากิจกรรมเฉพาะของเอนไซม์ย่อยสลายหลังตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ที่มีค่าสูงสุดที่ 27.41 หน่วยต่อมิลลิลิตรเพียงเล็กน้อย ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอมโมเนียมซัลเฟตในการตกตะกอนเอนไซม์ย่อยสลาย E-NM คือ 40 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตเดียวกับที่ใช้ในการตกตะกอนเอนไซม์ย่อยสลายจากการเลี้ยงเชื้อในอาหาร NB (Kiatgrajai *et al.*, 2005)



ภาพที่ 27 ค่ากิจกรรมรวม และปริมาณโปรตีนรวมของสารละลายตะกอนที่ได้จากการตกตะกอนเอนไซม์ย่อยสลาย E-NM ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 30-90 เปอร์เซ็นต์;

○, ค่ากิจกรรมรวม; □, ค่ากิจกรรมจำเพาะ; ▽, ปริมาณโปรตีนรวม

เมื่อเปรียบเทียบสมบัติของเอนไซม์ย่อยสลาย E-NM ทั้งก่อนและหลังการตกตะกอนพบว่า เอนไซม์ย่อยสลายหลังการตกตะกอนมีค่ากิจกรรม ค่ากิจกรรมรวม ปริมาณโปรตีนรวม และค่ากิจกรรมเฉพาะเป็น 0.19 0.02 0.04 และ 0.52 เท่าของเอนไซม์ย่อยสลายก่อนการ

ตกตะกอนตามลำดับ โดยเอนไซม์ย่อยสลายก่อนตกตะกอนมีค่ากิจกรรม ค่ากิจกรรมรวม ปริมาณ โปรตีนรวม และค่ากิจกรรมเฉพาะ 333.54 หน่วยต่อมิลลิลิตร 16,676.82 หน่วย 322.52 มิลลิกรัม และ 51.71 หน่วยต่อมิลลิกรัมตามลำดับ

2.3.2 ระบบของเอนไซม์ย่อยสลาย E-NM ก่อนและหลังการตกตะกอน

เมื่อพิจารณาระบบของเอนไซม์ย่อยสลายคาร์โบไฮเดรต โมเลกุลใหญ่ในหุ้มน้ำเนเปียร์ของเอนไซม์ย่อยสลาย E-NM ก่อนและหลังการตกตะกอน (ตารางที่ 15) พบว่า เอนไซม์ย่อยสลายหลังตกตะกอนมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ทุกชนิดในระบบต่ำกว่าเอนไซม์ย่อยสลายก่อนตกตะกอนอย่างชัดเจน โดยเฉพาะค่ากิจกรรมของเอนไซม์เบตา-กลูคาเนสที่ไม่พบในเอนไซม์ย่อยสลายหลังตกตะกอนแต่พบสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์อื่นในระบบของเอนไซม์ย่อยสลายก่อนตกตะกอน และพบว่าเปอร์เซ็นต์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่เป็นองค์ประกอบทุกชนิดในระบบของเอนไซม์ย่อยสลายหลังตกตะกอนเปลี่ยนแปลงไปจากก่อนตกตะกอนอย่างชัดเจน แสดงว่าการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตตกตะกอนเอนไซม์ย่อยสลาย E-NM ส่งผลในการลดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ทุกชนิดในระบบ เปอร์เซ็นต์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ทุกชนิดในระบบจึงเปลี่ยนแปลงจนไม่เหมาะสมต่อการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรต โมเลกุลใหญ่ของหุ้มน้ำเนเปียร์ ค่ากิจกรรมการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรต โมเลกุลใหญ่ของหุ้มน้ำเนเปียร์ของเอนไซม์ย่อยสลายหลังการตกตะกอนจึงลดลงกว่า 5 เท่า ดังนั้นการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตจึงเป็นวิธีที่ไม่เหมาะสมในการเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ย่อยสลาย E-NM

เมื่อเปรียบเทียบผลของการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตต่อระบบของเอนไซม์ย่อยสลาย E-NM หลังตกตะกอน และเอนไซม์ย่อยสลาย E-NB พบว่า การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตส่งผลต่อการลดลงของเอนไซม์ทุกชนิดในระบบของเอนไซม์ย่อยสลาย E-NB โดยส่งผลให้เกิดการสูญเสียค่ากิจกรรมทั้งหมดของเอนไซม์ไซลานเนสซึ่งเป็นเอนไซม์หลักที่ไซแลนในอาหาร NB เหนี่ยวนำให้มีการผลิต (Kiatgrajai *et al.*, 2005) เช่นเดียวกับการสูญเสียค่ากิจกรรมทั้งหมดของเอนไซม์เบตา-กลูคาเนสซึ่งเป็นเอนไซม์หลักที่เดกซ์ทรินในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร NM เหนี่ยวนำให้มีการผลิตในเอนไซม์ย่อยสลาย E-NM อย่างไรก็ตามการสูญเสียค่ากิจกรรมทั้งหมดของเอนไซม์ไซลานเนสไม่ส่งผลให้ค่ากิจกรรมการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรต โมเลกุลใหญ่ในหุ้มน้ำเนเปียร์ของเอนไซม์ย่อยสลาย E-NB ลดลง แต่มีค่าเพิ่มขึ้นเป็น 1.37 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ก่อนการตกตะกอน ในขณะที่การสูญเสียค่ากิจกรรมทั้งหมดของเอนไซม์เบตา-กลูคาเนสส่งผลให้

ค่ากิจกรรมการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตโมเลกุลใหญ่ในหุ้มน้ำเนเปียร์ของเอนไซม์ย่อยสลาย E-NM หลังตกตะกอนลดลงกว่า 5 เท่าจากเอนไซม์ย่อยสลายก่อนตกตะกอน แสดงว่าเอนไซม์เบตา-กลูคาเนสเป็นเอนไซม์หลักในระบบที่กำหนดประสิทธิภาพการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตโมเลกุลใหญ่ในหุ้มน้ำเนเปียร์บดแห้งที่ใช้ในการศึกษาค่ากิจกรรมการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตโมเลกุลใหญ่ในหุ้มน้ำเนเปียร์

ตารางที่ 15 ระบบของเอนไซม์ย่อยสลาย E-NM ก่อนและหลังการตกตะกอนเปรียบเทียบกับเอนไซม์ย่อยสลาย E-NB

ชนิดของ เอนไซม์	E-NB		E-NM ก่อนตกตะกอน		E-NM หลังตกตะกอน	
	ค่ากิจกรรม (U/ml)	% ของค่า กิจกรรม	ค่ากิจกรรม (U/ml)	% ของค่า กิจกรรม	ค่ากิจกรรม (U/ml)	% ของค่า กิจกรรม
ซีเอ็ม-เซลลูเลส	3.05	2	464.05	2	40.60	13
เพคตินเนส	71.64	38	4,799.45	19	99.04	32
ไซลานเนส	0.00	0	6,167.82	25	167.45	55
เบตา-กลูคาเนส	111.17	60	13,370.46	54	0.00	0
การย่อยสลาย คาร์โบไฮเดรต โมเลกุลใหญ่ ในหุ้มน้ำเนเปียร์	33.50	-	333.54	-	62.36	-

2.4 ผลของการใช้เอนไซม์ย่อยสลาย E-NM ต่อการผลิตไซเลจหุ้มน้ำเนเปียร์

แม้ว่าเอนไซม์ย่อยสลาย E-NM จะไม่สามารถทำให้เข้มข้นขึ้นโดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตได้ แต่เอนไซม์ย่อยสลาย E-NM ก็มีค่ากิจกรรมการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตโมเลกุลใหญ่ในหุ้มน้ำเนเปียร์ที่สูงเป็น 9.96 เท่าของเอนไซม์ย่อยสลาย E-NB นอกจากนี้เอนไซม์ย่อยสลาย E-NM ยังมีระบบการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตโมเลกุลใหญ่ในหุ้มน้ำเนเปียร์ที่แตกต่างจากเอนไซม์ย่อยสลาย E-NB โดยมีเปอร์เซ็นต์ของเอนไซม์เพคตินเนสที่ต่ำกว่า 2 เท่า และมีเปอร์เซ็นต์ของเอนไซม์ไซลานเนสที่สูงกว่า 25 เท่าจึงเป็นไปได้ว่าเมื่อใช้เอนไซม์ย่อยสลาย E-NM เป็นสารเสริม

ในการผลิตไซเลจหญ้าเนเปียร์จะสามารถเพิ่มปริมาณน้ำตาลรีดิวิซได้สูงกว่าการใช้เอนไซม์ย่อยสลาย E-NB เป็นสารเสริม และน้ำตาลรีดิวิซที่ผลิตขึ้นจะเป็นน้ำตาลชนิดที่แบคทีเรียกรดแลกติกที่ใช้เป็นสารเสริมสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดแลกติกได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นในการทดลองนี้จึงผลิตไซเลจหญ้าเนเปียร์โดยแบ่งเป็น 2 ชุดการทดลองคือ ชุดการทดลอง S-NM ซึ่งใช้เอนไซม์ย่อยสลาย E-NM ที่มีค่ากิจกรรมการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตโมเลกุลใหญ่ในหญ้าเนเปียร์ 290.40 หน่วยต่อมิลลิกรัมเป็นสารเสริมร่วมกับแบคทีเรียกรดแลกติก ปริมาณ 6.83 log CFU ต่อกรัมไซเลจ และชุดควบคุมซึ่งใช้เอนไซม์ย่อยสลาย E-NB ที่มีค่ากิจกรรม 29.04 หน่วยต่อมิลลิกรัมเป็นสารเสริมร่วมกับแบคทีเรียกรดแลกติก โดยคาดหวังว่าเอนไซม์ย่อยสลาย E-NM จะเป็นสารเสริมที่ส่งผลในการเพิ่มการผลิตกรดแลกติก และเพิ่มคุณภาพของไซเลจในวันที่ 60 ของการหมักได้

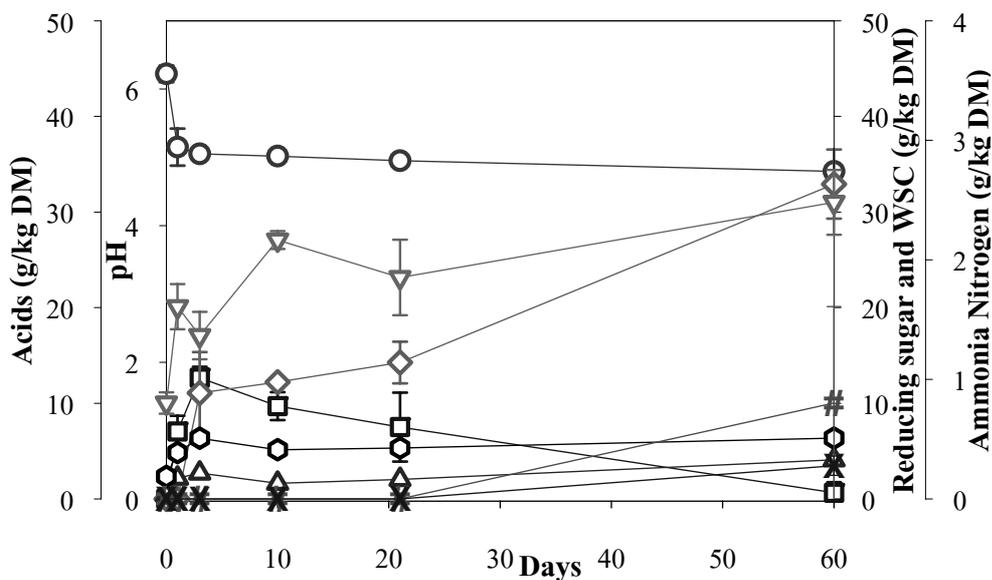
2.4.1 การเปลี่ยนแปลงทางเคมี และจุลินทรีย์ระหว่างการหมัก

ก. การเปลี่ยนแปลงทางเคมี และจุลินทรีย์ในชุดการทดลอง S-NM

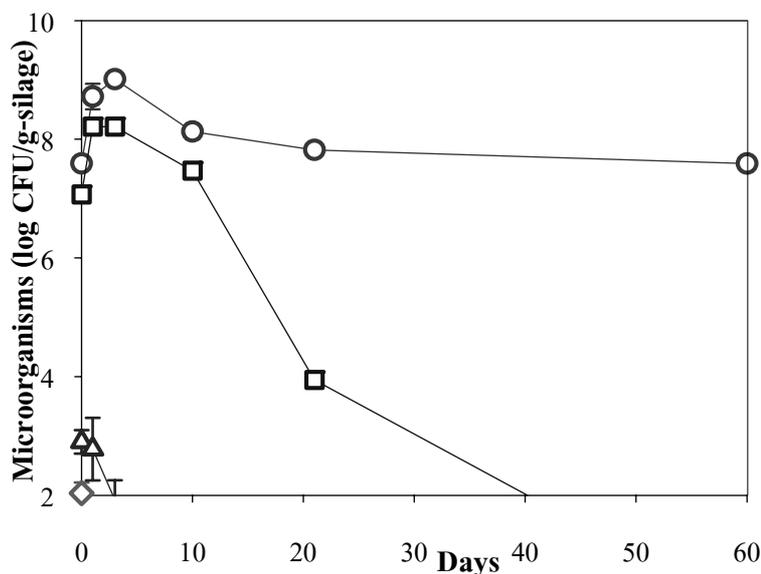
จากภาพที่ 28 และ 29 พบว่า ไซเลจในช่วง 3 วันแรกของการหมักมีน้ำตาลรีดิวิซ และคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนสูงสุดที่ 2.71 และ 6.34 กรัมต่อ กิโลกรัมวัตถุดิบในวันที่ 3 ของการหมักตามลำดับ ส่งผลให้จุลินทรีย์กลุ่ม Enterobacteria และแบคทีเรียกรดแลกติกเจริญจนมีปริมาณสูงสุดที่ 8.21 และ 9.01 log CFU ต่อกรัมไซเลจในวันที่ 3 ของการหมักตามลำดับ การเจริญอย่างรวดเร็วของแบคทีเรียกรดแลกติกส่งผลให้การผลิตกรดแลกติกเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเป็น 12.67 กรัมต่อกิโลกรัมวัตถุดิบ ค่าความเป็นกรดต่างของไซเลจจึงลดลงอย่างรวดเร็วจนมีค่า 5.05 ในวันที่ 3 ของการหมัก เชื้อยีสต์ และรามิมีปริมาณลดลงจนต่ำกว่า 2 log CFU ต่อกรัมไซเลจในวันที่ 3 และวันที่ 1 ของการหมักตามลำดับ

ในวันที่ 3-60 ของการหมัก ปริมาณน้ำตาลรีดิวิซ และคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำมีแนวโน้มคงที่ ค่าความเป็นกรดต่างคงที่ลดลงในอัตราต่ำจนมีค่า 4.79 ในวันที่ 60 ของการหมัก กรดแลกติกลดลงในขณะที่กรดอะซิติกเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนมีปริมาณ 0.64 และ 32.92 กรัมต่อกิโลกรัมวัตถุดิบในวันที่ 60 ของการหมัก แบคทีเรียกรดแลกติกมีปริมาณลดลง 1.42 log CFU ต่อกรัมไซเลจ จุลินทรีย์กลุ่ม Enterobacteria ลดลงอย่างรวดเร็วจนต่ำกว่า 1 log CFU ต่อกรัมไซเลจหลังวันที่ 21 ของการหมัก แบคทีเรียกรดแลกติกลดปริมาณลง 0.19 log CFU ต่อกรัมไซเลจ

กรดแลกติกมีปริมาณลดลง 5.16 กรัมต่อกิโลกรัมวัสดุแห้ง และกรดอะซิติกเพิ่มขึ้นเล็กน้อยจนมีปริมาณ 14.26 กรัมต่อกิโลกรัมวัสดุแห้ง ปริมาณแอมโมเนียในโตรเจนมีแนวโน้มของการเพิ่มขึ้นจนมีปริมาณ 2.48 กรัมต่อกิโลกรัมวัสดุแห้งในวันที่ 60 ของการหมัก กรดบิวทีริก และกรดโพรปิโอนิกมีปริมาณ 10.10 และ 1.01 กรัมต่อกิโลกรัมวัสดุแห้งในวันที่ 60 ของการหมัก ตลอดทั้งกระบวนการหมักจุลินทรีย์กลุ่ม Clostridia มีปริมาณที่ต่ำกว่า 1 log CFU ต่อกรัมไซเลจ



ภาพที่ 28 การเปลี่ยนแปลงทางเคมีของไซเลจในชุดการทดลอง S-NM ที่อายุการหมักต่าง ๆ;
 ○, ค่าความเป็นกรดต่าง; □, ปริมาณกรดแลกติก; ◇, ปริมาณกรดอะซิติก;
 #, ปริมาณกรดบิวทีริก; X, ปริมาณกรดโปรปิโอนิก; △, ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์;
 ◻, ปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำ; ▽, ปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจน

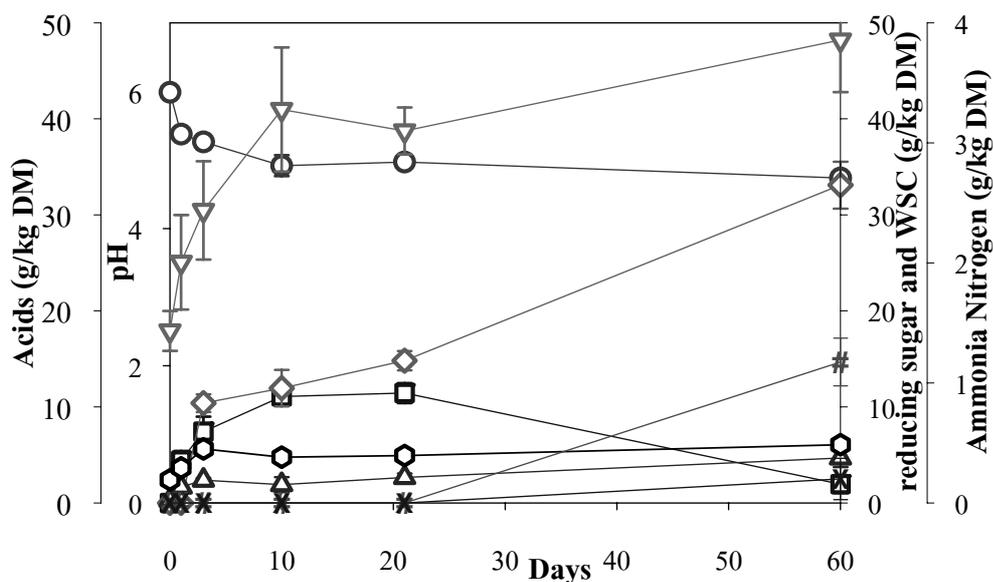


ภาพที่ 29 การเปลี่ยนแปลงทางจุลินทรีย์ของไซเลจในชุดการทดลอง S-NM ที่อายุการหมักต่าง ๆ;
 ○, ปริมาณเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก; □, ปริมาณเชื้อกลุ่ม Enterobacteria; ◇, ปริมาณ
 เชื้อรา; △, ปริมาณเชื้อยีสต์

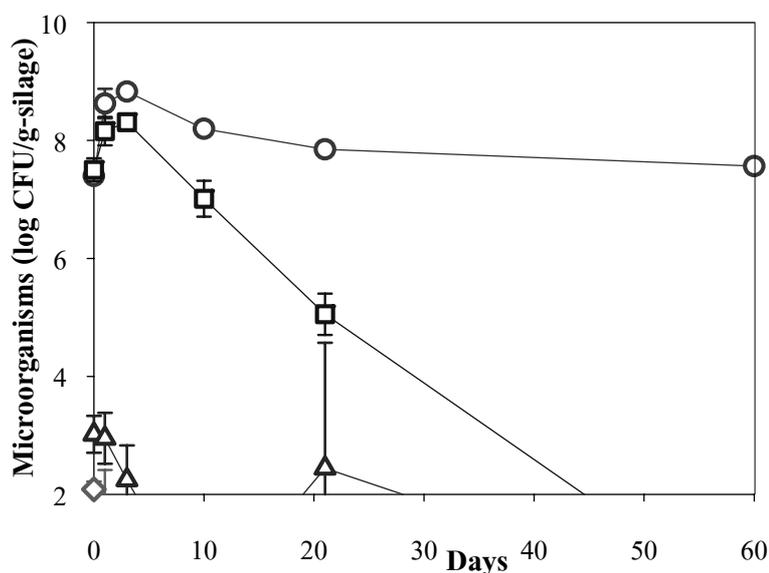
ข. การเปลี่ยนแปลงทางเคมี และจุลินทรีย์ในชุดควบคุม

จากภาพที่ 30 พบว่า น้ำตาลรีดิวิซ์ และคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนมีปริมาณ 2.37 และ 5.62 กรัมต่อกิโลกรัมวัสดุแห้งในวันที่ 3 ของการหมัก จากนั้นเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในวันที่ 21-60 ของการหมัก ค่าความเป็นกรดต่างลดลงจนถึงวันที่ 10 จากนั้นค่อนข้างคงที่จนมีค่า 4.79 ในวันที่ 60 ของการหมัก ปริมาณกรดแลกติกเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนถึงวันที่ 10 ของการหมัก จากนั้นลดลงอย่างต่อเนื่องจนมีปริมาณ 0.20 กรัมต่อกิโลกรัมวัสดุแห้งในวันที่ 60 กรดอะซิติกเริ่มตรวจพบในวันที่ 3 ของการหมัก และผลิตเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนมีปริมาณ 33.10 กรัมต่อกิโลกรัมวัสดุแห้งในวันที่ 60 แอมโมเนียในโตรเจนมีแนวโน้มของการเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนมีค่า 3.86 กรัมต่อกิโลกรัมวัสดุแห้งในวันที่ 60 ของการหมัก กรดบิวทีริก และกรดโพรปิโอนิกตรวจพบในปริมาณ 14.68 และ 2.49 กรัมต่อกิโลกรัมวัสดุแห้งเฉพาะในวันที่ 60 ของการหมักตามลำดับ

จากภาพที่ 31 พบว่า จุลินทรีย์กลุ่ม Enterobacteria และแบคทีเรียกรดแลกติกเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนมีปริมาณสูงสุดที่ 8.31 และ 8.83 log CFU ต่อกรัมไซเลจในวันที่ 3 ของการหมัก จากนั้นแบคทีเรียกรดแลกติกลดลงอย่างต่อเนื่องจนมีปริมาณ 7.57 log CFU ต่อกรัมไซเลจในวันที่ 60 ของการหมัก และจุลินทรีย์กลุ่ม Enterobacteria ลดลงจนมีปริมาณ 5.05 log CFU ต่อกรัมไซเลจในวันที่ 21 เชื้อราตรวจพบในปริมาณ 2.08 log CFU ต่อกรัมไซเลจในวันที่ 0 ของการหมัก เชื้อยีสต์ลดลงจนมีปริมาณ 2.25 log CFU ต่อกรัมไซเลจในวันที่ 3 ของการหมัก



ภาพที่ 30 การเปลี่ยนแปลงทางเคมีของไซเลจในชุดควบคุมที่อายุการหมักต่าง ๆ; ○, ค่าความเป็นกรดต่าง; □, ปริมาณกรดแลกติก; ◇, ปริมาณกรดอะซิติก; #, ปริมาณกรดบิวทีริก; X, ปริมาณกรดโปรปิโอนิก; △, ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์; ◊, ปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำ; ▽, ปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจน



ภาพที่ 31 การเปลี่ยนแปลงทางจุลินทรีย์ของไซเลจในชุดควบคุมที่อายุการหมักต่าง ๆ; ○, ปริมาณเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก; □, ปริมาณเชื้อกลุ่ม Enterobacteria; ◇, ปริมาณเชื้อรา; △, ปริมาณเชื้อยีสต์

เมื่อเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงทางเคมี และจุลินทรีย์ระหว่างกระบวนการหมักของทั้ง 2 ชุดการทดลองพบว่า ชุดการทดลอง S-NM มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงกว่าชุดควบคุม 0.52 และ 0.34 กรัมต่อกิโลกรัมวัตถุดิบในวันที่ 1 และ 3 ของการหมักตามลำดับ มีปริมาณกรดแลกติกสูงกว่าชุดควบคุม 2.64 และ 5.26 กรัมต่อกิโลกรัมวัตถุดิบในวันที่ 1 และ 3 ของการหมักตามลำดับ มีค่าความเป็นกรดต่ำกว่าชุดควบคุม 0.23 และ 0.21 ในวันที่ 1 และ 3 ของการหมักตามลำดับ มีปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจนที่ลดต่ำลง ในขณะที่ชุดควบคุมมีปริมาณเพิ่มขึ้นในวันที่ 1-3 ของการหมัก มีปริมาณจุลินทรีย์กลุ่ม Enterobacteria ต่ำกว่าชุดควบคุม 0.43 log CFU ต่อกรัมไซเลจในวันที่ 0 ของการหมัก มีปริมาณเชื้อยีสต์ในช่วง 1-2 และต่ำกว่า 1 log CFU ต่อกรัมไซเลจ ในขณะที่ชุดควบคุมมีปริมาณเชื้อยีสต์ 2.25 และ 2.44 log CFU ต่อกรัมไซเลจในวันที่ 3 และ 21 ของการหมักตามลำดับ แสดงว่าเอนไซม์ย่อยสลาย E-NM มีประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในไซเลจหญ้าเนเปียร์ได้สูงกว่าเอนไซม์ย่อยสลาย E-NB ในช่วง 3 วันแรกของการหมัก โดยน้ำตาลรีดิวซ์ที่เอนไซม์ย่อยสลาย E-NM ผลิตไม่ส่งผลต่อการเพิ่มปริมาณของจุลินทรีย์กลุ่ม Enterobacteria และเชื้อยีสต์คั่งเช่นน้ำตาลรีดิวซ์ที่เอนไซม์ย่อยสลาย E-NB ผลิตขึ้น แต่เป็นน้ำตาลที่แบคทีเรียกรดแลกติกที่ใช้เป็นสารเสริมสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเพิ่มการผลิตกรดแลกติกได้ ส่งผลในการลดค่าความเป็นกรดต่าง และปริมาณการย่อยสลายโปรตีนในไซเลจในช่วง 3 วันแรกของการหมัก

2.4.2 สมบัติทางเคมี และจุลินทรีย์ของไซเลจในวันที่ 60 ของการหมัก

เมื่อพิจารณาสมบัติทางเคมี และจุลินทรีย์ของไซเลจในวันที่ 60 ของการหมัก (ตารางที่ 16) พบว่า ไซเลจทั้ง 2 ชุดการทดลองมีสีเขียวเข้ม มีปริมาณกรดแลกติกต่ำกว่า 15 กรัมต่อกิโลกรัมวัตถุดิบ มีค่าความเป็นกรดต่างสูงกว่า 4.2 มีกรดอะซิติก และกรดบิวทิริกสูงกว่า 8 และ 1 กรัมต่อกิโลกรัมวัตถุดิบตามลำดับ ซึ่งแสดงถึงคุณภาพทางเคมีของไซเลจที่ต่ำกว่ามาตรฐานตามเกณฑ์ของกองอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์ อย่างไรก็ตามไซเลจทั้ง 2 ชุดการทดลองมีปริมาณเชื้อยีสต์และราต่ำกว่า 5.00 log CFU ต่อกรัมไซเลจ ซึ่งเป็นค่าที่ยอมรับได้ตามเกณฑ์ของ Seglar (2003)

ไซเลจทั้ง 2 ชุดการทดลองมีสมบัติทางเคมี และจุลินทรีย์โดยส่วนใหญ่ที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามพบว่าไซเลจในชุดควบคุมมีปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจนที่สูงกว่าชุดการทดลอง S-NM อย่างมีนัยสำคัญซึ่งแสดงถึงการเกิดการย่อยสลายโปรตีนในไซเลจชุดควบคุมที่สูงกว่าชุดการทดลอง S-NM

ตารางที่ 16 สมบัติทางเคมี และจุลินทรีย์ของไซเลจชุดการทดลอง S-NM เปรียบเทียบกับชุดควบคุมในวันที่ 60 ของการหมัก

สมบัติของไซเลจ (กรัมต่อกิโลกรัมวัตถุแห้ง)	ชุดการทดลอง	
	ชุดควบคุม	S-NM
วัตถุแห้ง	139 ^A (±4.02)	126 ^A (±4.26)
ค่าความเป็นกรดต่าง	4.74 ^A (±0.06)	4.79 ^A (±0.04)
น้ำตาลรีดิวิซ์	4.69 ^A (±0.95)	4.09 ^A (±0.45)
คาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำ	6.06 ^A (±0.50)	6.35 ^A (±0.46)
กรดแลกติก	1.95 ^A (±0.93)	0.64 ^A (±1.01)
กรดอะซิติก	33.10 ^A (±2.45)	32.92 ^A (±3.61)
กรดโพรปีโอนิก	2.49 ^A (±2.16)	3.74 ^A (±1.01)
กรดบิวทีริก	14.68 ^A (±2.49)	10.02 ^A (±10.10)
แอมโมเนียไนโตรเจน	3.86 ^A (±0.43)	2.48 ^B (±0.27)
แบคทีเรียกรดแลกติก (log CFU ต่อกรัมไซเลจ)	7.57 ^A (±0.08)	7.59 ^A (±0.02)
จุลินทรีย์กลุ่ม Enterobacteria (log CFU ต่อกรัมไซเลจ)	<1.00	<1.00
รา (log CFU ต่อกรัมไซเลจ)	<1.00	<1.00
ยีสต์ (log CFU ต่อกรัมไซเลจ)	<1.00	<1.00

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวนอนไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ตามการวิเคราะห์ด้วยวิธีของ Turkey's ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ และค่าในวงเล็บด้านหลังค่าเฉลี่ยคือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

จากผลของการเปลี่ยนแปลงระหว่างกระบวนการหมัก และสมบัติของไซเลจในวันที่ 60 ของการหมักของไซเลจทั้ง 2 ชุดการทดลองทำให้สรุปผลของการใช้เอนไซม์ย่อยสลาย E-NM เป็นสารเสริมในการผลิตไซเลจหญ้าเนเปียร์ได้ว่า การใช้เอนไซม์ย่อยสลาย E-NM เป็นสารเสริมสามารถปรับปรุงกระบวนการผลิตไซเลจหญ้าเนเปียร์ช่วง 3 วันแรกของการหมักได้โดยสามารถผลิตน้ำตาลรีดิวิซ์ที่แบคทีเรียกรดแลกติกที่ใช้เป็นสารเสริมสามารถใช้ในการเพิ่มการผลิต

กรดแลกติกได้ ส่งผลให้ค่าความเป็นกรดต่าง และการย่อยสลายโปรตีนในไซเลจลดลง อย่างไรก็ตามเอนไซม์ย่อยสลาย E-NM ยังมีประสิทธิภาพการทำงานเป็นสารเสริมไม่เพียงพอที่จะผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ในปริมาณที่ทำให้เกิดการผลิตกรดแลกติกในปริมาณที่สูงพอที่จะปรับปรุงกระบวนการผลิตหลังวันที่ 3 ของการหมัก ไซเลจหญ้าเนเปียร์ในวันที่ 60 ของการหมักจึงมีคุณภาพต่ำกว่าเกณฑ์ที่กองอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์กำหนด

เอนไซม์ย่อยสลาย E-NM มีประสิทธิภาพการทำงานเป็นสารเสริมในการผลิตไซเลจหญ้าเนเปียร์สูงกว่าเอนไซม์ย่อยสลาย E-NB โดยเอนไซม์ย่อยสลาย E-NM สามารถเพิ่มน้ำตาลรีดิวซ์ในปริมาณที่สูงกว่าเอนไซม์ย่อยสลาย E-NB ในช่วง 3 วันแรกของการหมัก และน้ำตาลรีดิวซ์ที่เอนไซม์ย่อยสลาย E-NM ผลิตขึ้นเป็นน้ำตาลที่แบคทีเรียกรดแลกติกที่ใช้เป็นสารเสริมสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนผลิตกรดแลกติกได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงกว่าน้ำตาลรีดิวซ์ที่เอนไซม์ย่อยสลาย E-NB ผลิตขึ้น รวมทั้งน้ำตาลรีดิวซ์ที่เอนไซม์ย่อยสลาย E-NM ผลิตขึ้นไม่ส่งผลในการเพิ่มปริมาณของเชื้อยีสต์ และจุลินทรีย์กลุ่ม Enterobacteria ซึ่งเป็นผลที่เกิดขึ้นในกรณีของน้ำตาลรีดิวซ์ที่เอนไซม์ย่อยสลาย E-NB ผลิตขึ้น การที่เอนไซม์ย่อยสลายทั้งสองมีประสิทธิภาพการทำงานที่แตกต่างกันเป็นไปได้ว่าเป็นเพราะเอนไซม์ย่อยสลายทั้งสองมีค่ากิจกรรมการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตโมเลกุลใหญ่ที่แตกต่างกัน โดยเอนไซม์ย่อยสลาย E-NM มีค่ากิจกรรมที่สูงกว่า 9.96 เท่า และเอนไซม์ย่อยสลายทั้งสองมีระบบการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตโมเลกุลใหญ่ในหญ้าเนเปียร์ที่แตกต่างกัน โดยระบบของเอนไซม์ย่อยสลาย E-NM มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เพคตินเอส และไซลานเนส 19 และ 25 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ในขณะที่เอนไซม์ย่อยสลาย E-NB มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เพคตินเอส 38 เปอร์เซ็นต์ และไม่มีค่ากิจกรรมของไซลานเนส (ตารางที่ 14)

3. ผลของการเปลี่ยนแปลงของชนิดคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำที่เกิดขึ้นในไซเลจหญ้าเนเปียร์ที่ใช้เอนไซม์ย่อยสลาย E-NB และเอนไซม์ย่อยสลาย E-NM เป็นสารเสริม

เนื่องจากมีความเป็นไปได้ว่าการมีระบบของเอนไซม์ย่อยสลายที่แตกต่างกันส่งผลให้เอนไซม์ย่อยสลาย E-NB และเอนไซม์ย่อยสลาย E-NM ผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ที่มีชนิดแตกต่างกัน การเปลี่ยนแปลงของปริมาณจุลินทรีย์ในไซเลจจึงเกิดขึ้นแตกต่างกันในช่วง 3 วันแรกของการหมัก เมื่อใช้เอนไซม์ย่อยสลายทั้งสองเป็นสารเสริม ดังนั้นจึงได้ทดลองผลิตไซเลจหญ้าเนเปียร์โดยใช้เอนไซม์ย่อยสลาย E-NB และเอนไซม์ย่อยสลาย E-NM ที่ค่ากิจกรรมการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตโมเลกุลใหญ่ในหญ้าเนเปียร์ 29.39 หน่วยต่อมิลลิลิตรเท่ากันเป็นสารเสริมร่วมกับแบคทีเรียกรด

แลกติกปริมาณ 6.04 log CFU ต่อกรัมไซเลจในชุดการทดลอง NB-H และชุดการทดลอง S-NM ตามลำดับ และศึกษาการเปลี่ยนแปลงของชนิดคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำจากตัวอย่างไซเลจทั้ง 2 ชุดการทดลองในวันที่ 0 ของการหมักซึ่งเป็นช่วงเวลาหลังปิดถุงหมัก 4 ชั่วโมงเปรียบเทียบกับตัวอย่างไซเลจจากชุดควบคุมซึ่งใช้เบคทีเรียกรดแลกติกเป็นสารเสริมเพียงอย่างเดียว และตัวอย่างหญ้าเนเปียร์สดด้วยวิธี TLC โดยคาดหวังว่าจะสามารถอธิบายได้ถึงผลของการใช้เอนไซม์ย่อยสลายที่มีระบบของเอนไซม์ย่อยสลายที่แตกต่างกันเป็นสารเสริมต่อการปรับปรุงคุณภาพของในไซเลจหญ้าเนเปียร์ซึ่งจะเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่สามารถใช้ในการปรับปรุงการเตรียมเอนไซม์ย่อยสลายจากเชื้อ *B. subtilis* GN156 เพื่อใช้เป็นสารเสริมได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

3.1 การเปลี่ยนแปลงของชนิดโอลิโกแซคคาไรด์ในไซเลจที่ใช้เอนไซม์ย่อยสลายเป็นสารเสริม

Thin layer chromatography (TLC) เป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์เชิงคุณภาพของน้ำตาลโมลกุลเดี่ยว (monosaccharide) น้ำตาลโมลกุลคู่ (disaccharide) และโอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharide) ในตัวอย่างพืช (Batisse *et al.*, 1992; Maraschin *et al.*, 2000; Tolsma, 2002) TLC เป็นเทคนิคที่ประหยัดเวลา และทำได้ง่าย จึงนิยมใช้ในการวิเคราะห์เบื้องต้นก่อนการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ซึ่งสามารถวิเคราะห์ในเชิงปริมาณได้ด้วย อย่างไรก็ตามเทคนิคนี้มีข้อจำกัดในเรื่องการมี resolution ต่ำ และบางระบบไม่สามารถแยกน้ำตาลบางชนิดออกจากกันได้อย่างเด่นชัด

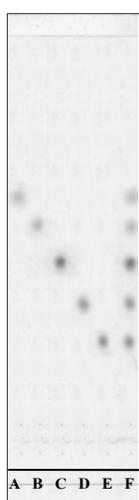
Apiraksakorn (2006) ได้วิเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ชนิดต่าง ๆ ที่ได้จากการใช้เอนไซม์เบตา-กลูคาเนสย่อยสลายเบตา-กลูแคนด้วยวิธี TLC โดยใช้สารละลายที่ประกอบด้วย บิวทานอล ไอโซโพรพานอล เอทานอล และน้ำกลั่นในอัตราส่วน 20: 30: 30: 20 เป็น mobile phase และ develop ให้เกิดสีด้วย orcinol ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส 15 นาที ปรากฏว่าสามารถวิเคราะห์ผลของโอลิโกแซคคาไรด์ชนิดเซลโลไบโอส เซลโลไตรโอส เซลโลเตตราโอส เซลโลเพนตาโอส และขนาดใหญ่กว่าเซลโลเพนตาโอสได้เป็นอย่างดี ดังนั้นจึงได้เลือกใช้ mobile phase และวิธี develop ดังกล่าวเพื่อวิเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ในตัวอย่างหญ้าเนเปียร์สด ตัวอย่างในชุดควบคุม ชุดการทดลอง NB-H และชุดการทดลอง S-NM

เมื่อวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานกลูโคส เซลโลไบโอส เซลโลไตรโอส เซลโลเตตราโอส และเซลโลเพนตาโอสซึ่งเป็นตัวแทนของน้ำตาลโมลกุลเดี่ยว น้ำตาลโมลกุลคู่

ไตรแซคคาไรด์ (trisaccharide) เตตราแซคคาไรด์ (tetrasaccharide) และเพนตาแซคคาไรด์ (pentasaccharide) ตามลำดับ เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน โอลิโกแซคคาไรด์ผสม และคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ R_f ของสารละลายมาตรฐานน้ำตาลแต่ละชนิด (ภาพที่ 32) พบว่า จุดของโอลิโกแซคคาไรด์ที่ปรากฏบนแผ่น TLC มีสีม่วงชมพูที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาของ orcinol กับน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการที่กรดซัลฟิวริกเข้าตัดพันธะเบตา-1,4-ไกลโคซิดิกที่เชื่อมระหว่างโมเลกุลของกลูโคสในโอลิโกแซคคาไรด์ (Jevons, 1964) โดยจุดที่แสดงน้ำตาลกลูโคสซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว และมีน้ำหนักโมเลกุลน้อยที่สุดมีค่าเปอร์เซ็นต์ R_f สูงสุด ในขณะที่จุดที่แสดงเซลโลเพนตาออสซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส 5 โมเลกุลเชื่อมกันด้วยพันธะเบตา-1,4-ไกลโคซิดิกมีน้ำหนักโมเลกุลสูงที่สุดจึงเคลื่อนที่ได้ระยะทางสั้นที่สุด และมีค่าเปอร์เซ็นต์ R_f ต่ำสุด ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากระบบสารละลายที่ใช้เป็น mobile phase ใช้แยกสารตามความแตกต่างของน้ำหนักโมเลกุล และจำนวนหมู่ไฮดรอกซิลของโอลิโกแซคคาไรด์ โดยโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีขนาดเล็ก และมีจำนวนหมู่ไฮดรอกซิลที่เป็นอิสระมากกว่าจะสร้างพันธะกับ mobile phase ได้ดีกว่า จึงถูก mobile phase นำให้เคลื่อนที่ได้ไกลกว่าโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีขนาดใหญ่ (Sherma and Fried, 1996) และเมื่อพิจารณาถึงความสามารถของสารละลายที่ใช้เป็น mobile phase ในการแยกโอลิโกแซคคาไรด์แต่ละชนิดในสารละลายมาตรฐาน โอลิโกแซคคาไรด์ผสมพบว่า โอลิโกแซคคาไรด์แต่ละชนิดแยกจากกันได้ชัดเจน จึงใช้สารละลายสูตรนี้เป็น mobile phase ในการวิเคราะห์ตัวอย่างไซเลจซึ่งคาดว่ามิโอลิโกแซคคาไรด์ผสมอยู่หลายชนิดต่อไป

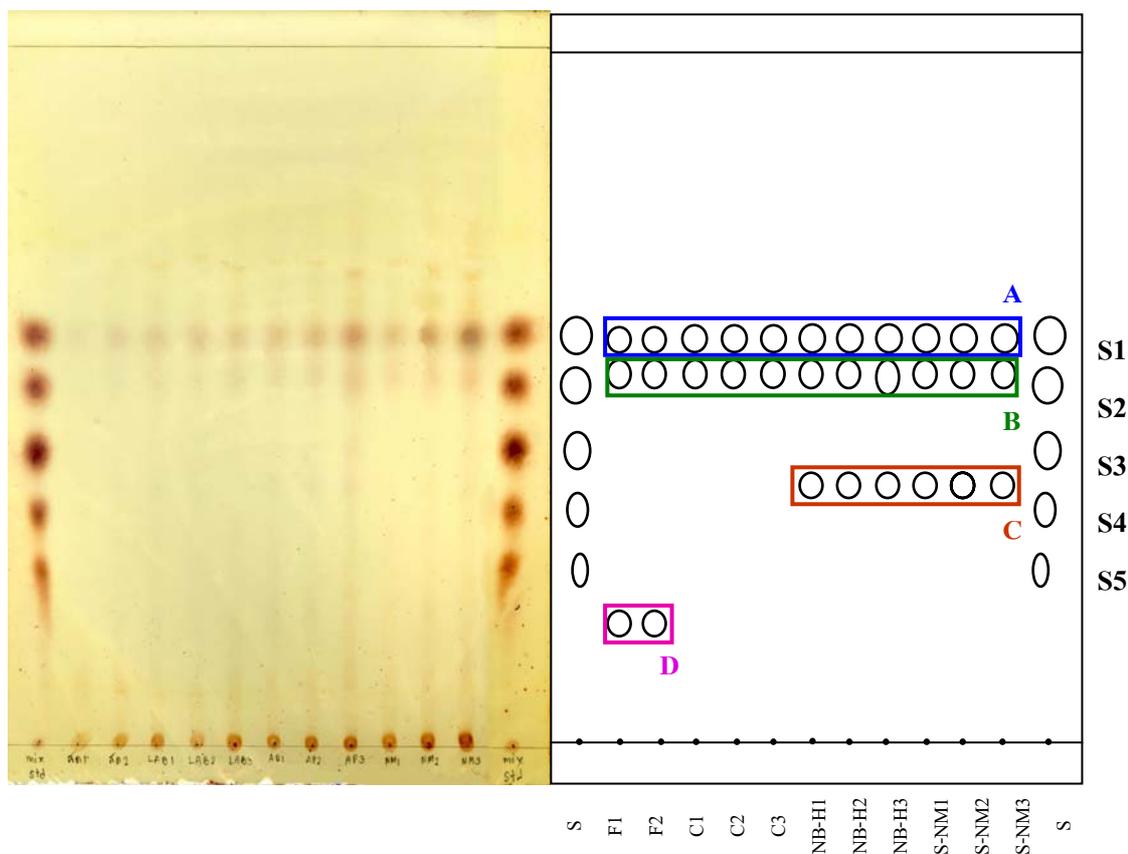
เมื่อวิเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ของตัวอย่างของไซเลจทั้ง 3 ชุดการทดลองหลังปิดถุงหมัก 4 ชั่วโมงด้วยวิธี TLC เปรียบเทียบกับหญ้าเนเปียร์สด (ภาพที่ 33) พบว่า ไซเลจทุกชุดการทดลอง และหญ้าเนเปียร์สดมีน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว และคู่เป็นองค์ประกอบสังเกตได้จากจุด A และ B ที่มีค่าเปอร์เซ็นต์ R_f ใกล้เคียงกับเปอร์เซ็นต์ R_f ของน้ำตาลกลูโคส และเซลโลไบโอสตามลำดับ โดยไซเลจชุดการทดลอง NB-H และ S-NM มีความเข้มของจุด A และ B สูงกว่าไซเลจชุดควบคุม และไซเลจชุดควบคุมมีความเข้มสูงกว่าหญ้าเนเปียร์สด แสดงว่าไซเลจชุดควบคุมมีการทำงานของเอนไซม์ย่อยสลายซึ่งผลิตจากจุลินทรีย์ในไซเลจ และไซเลจชุดการทดลอง NB-H และชุดการทดลอง S-NM มีการทำงานของเอนไซม์ย่อยสลายที่ใช้เป็นสารเสริมร่วมด้วย ในหญ้าเนเปียร์สดพบจุด D ที่มีค่าเปอร์เซ็นต์ R_f ต่ำกว่าค่าเปอร์เซ็นต์ R_f ของเซลโลเพนตาออสมากจึงสันนิษฐานว่าเป็นโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีขนาดใหญ่กว่าเซลโลเพนตาออส ในขณะที่ไซเลจจากชุดการทดลอง NB-H และชุดการทดลอง S-NM ซึ่งใช้เอนไซม์ย่อยสลายเป็นสารเสริมพบจุด C ที่มีค่า R_f อยู่ระหว่างค่า R_f ของเซลโลไตรออส และเซลโลเตตราออส จึงสันนิษฐานว่าเป็นโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีขนาด

ระหว่างไตรแซคคาไรด์ และเตตราแซคคาไรด์ซึ่งเป็นไปได้ว่าเกิดจากการย่อยสลายโอลิโกแซคคาไรด์ขนาดใหญ่กว่าเซลโลเพนตาออสที่พบเฉพาะในหญ้าเนเปียร์สด เพราะฉะนั้นจึงสรุปได้ว่าเอนไซม์ย่อยสลาย E-NB และเอนไซม์ย่อยสลาย E-NM ที่ใช้เป็นสารเสริมสามารถย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตโมเลกุลใหญ่ในหญ้าเนเปียร์ได้สารผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว โมเลกุลคู่ และโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีขนาดระหว่างไตรแซคคาไรด์ และเตตราแซคคาไรด์ได้ตั้งแต่ช่วง 4 ชั่วโมงแรกของการหมัก และไม่พบความแตกต่างระหว่างชนิดของโอลิโกแซคคาไรด์ที่เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ย่อยสลายทั้งสอง



โอลิโกแซคคาไรด์	เปอร์เซ็นต์ R_f
เซลโลเพนตาออส (E)	32
เซลโลเตตราออส (D)	40
เซลโลไตรออส (C)	50
เซลโลไบออส (B)	58
กลูโคส (A)	64

ภาพที่ 32 โครมาโตแกรม (Chromatogram) ของสารละลายมาตรฐานโอลิโกแซคคาไรด์แต่ละชนิดจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี TLC; A, กลูโคส; B, เซลโลไบออส; C, เซลโลไตรออส; D, เซลโลเตตราออส; E, เซลโลเพนตาออส; F, สารละลายมาตรฐานโอลิโกแซคคาไรด์ผสม

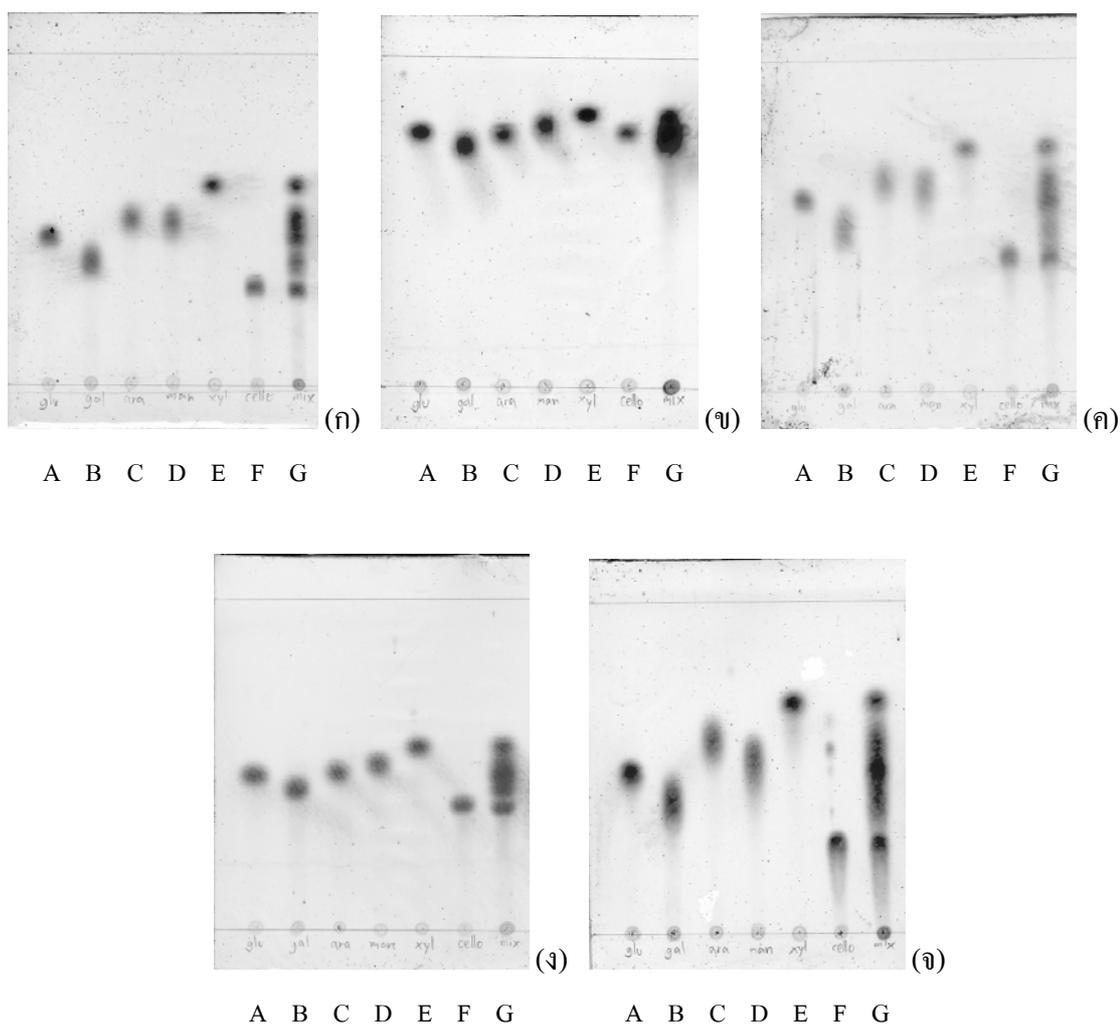


ภาพที่ 33 โครมาโตแกรมของโอลิโกแซคคาไรด์ในตัวอย่างไซเลจหลังจากปิดถุงหมัก 4 ชั่วโมงจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี TLC เปรียบเทียบกับฐานเปียร์สค; S, สารละลายมาตรฐานโอลิโกแซคคาไรด์ผสม; F, ฐานเปียร์สค; C, ชุดควบคุม; NB-H, ชุดการทดลอง NB-H; S-NM, ชุดการทดลอง S-NM; S1, กลูโคส; S2, เซลโลไบโอส; S3, เซลโลไตรโอส; S4, เซลโลเตตราโอส; S5, เซลโลเพนตาโอส

3.2 การเปลี่ยนแปลงของชนิดน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว และคู่ในไซเลจที่ใช้เอนไซม์ย่อยสลายเป็นสารเสริม

จากการวิเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ด้วยวิธี TLC พบว่า น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว และโมเลกุลคู่เป็นคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำหลักที่พบในไซเลจทั้ง 3 ชุดการทดลอง ดังนั้นเพื่อศึกษาชนิดของคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำในไซเลจฐานเปียร์ที่ใช้เอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดเป็นสารเสริมที่ชัดเจนยิ่งขึ้นจึงมุ่งไปที่การศึกษาชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว และโมเลกุลคู่ที่เอนไซม์ย่อยสลาย E-NB และเอนไซม์ย่อยสลาย E-NM ผลิตขึ้นในไซเลจ

เนื่องจากไม่มีข้อมูลการทดลองใช้วิธี TLC ในการวิเคราะห์น้ำตาลโมลกุลเดี่ยว และคู่ในไซเลลจากการศึกษาใดก่อนหน้านี ในการทดลองนี้จึงเริ่มจากการศึกษาสูตรของ mobile phase ที่มีความสามารถในการแยกน้ำตาลที่คาดว่าพบในระหว่างกระบวนการหมักไซเลลคือ กลูโคส ไซโลส กาแลคโตส อาราบิโนส แมนโนส และเซลโลไบโอสซึ่งผสมรวมกันในสารละลายมาตรฐานน้ำตาลผสม โดยเลือกใช้ mobile phase สูตร A B และ C (Ghebrezabher *et al.*, 1976) สูตร D (Ovodov *et al.*, 1967) และสูตร E (Lato *et al.*, 1969) ได้ผลการทดลองดังภาพที่ 34 และได้ค่าเปอร์เซ็นต์ R_f ดังตารางผนวกที่ ก3 ซึ่งพบว่าสูตร E ที่มีอะซิโตนเป็นองค์ประกอบในสัดส่วนสูงสุดสามารถแยกน้ำตาลแต่ละชนิดออกจากกันได้มากที่สุด ค่าเปอร์เซ็นต์ R_f แตกต่างกันอย่างชัดเจน แต่ในแต่ละจุดมีหางเกิดขึ้นอย่างชัดเจนส่งผลให้การแยกน้ำตาลผสมเกิดขึ้นอย่างไม่ชัดเจน สูตร A และ C ที่มีสารชนิดเดียวกันเป็นองค์ประกอบในอัตราส่วนที่ต่างกันสามารถแยกน้ำตาลแต่ละชนิดออกจากกันในรูปแบบที่ใกล้เคียงกับสูตร E แต่มีประสิทธิภาพการแยกอาราบิโนส และแมนโนสออกจากกันได้ต่ำกว่า อย่างไรก็ตามสูตร A และ C มีประสิทธิภาพการแยกน้ำตาลผสมสูงกว่าสูตร E เนื่องจากแต่ละจุดเกิดหางน้อยกว่าการใช้สูตร E สูตร B ที่มีอะซิโตนเป็นองค์ประกอบน้อยกว่าสูตร A แยกน้ำตาลแต่ละชนิดออกจากกันด้วยประสิทธิภาพที่ต่ำสุด สังเกตได้จากการที่จุดของเซลโลไบโอส กลูโคส และอาราบิโนสมีค่าเปอร์เซ็นต์ R_f เกือบเท่ากัน จึงส่งผลให้การแยกน้ำตาลผสมเกิดขึ้นในประสิทธิภาพต่ำ ในขณะที่สูตร D ที่ไม่มีอะซิโตนเป็นองค์ประกอบสามารถแยกน้ำตาลออกจากกันอย่างชัดเจน แต่ทุกจุดมีค่าเปอร์เซ็นต์ R_f ใกล้เคียงกันมากส่งผลให้การแยกน้ำตาลผสมมีประสิทธิภาพต่ำกว่าสูตร A C และ E ดังนั้นจึงได้เลือกใช้สูตร A ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงสุดในการแยกสารละลายมาตรฐานน้ำตาลผสมเป็น mobile phase ต่อไป อย่างไรก็ตามเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการระบุชนิดของน้ำตาลในไซเลลจึงได้ใช้สารละลายมาตรฐานไรโบส มอลโตส ฟรุคโตส แลคโตส และซูโครสในการวิเคราะห์เพิ่มเติมดังแสดงผลในภาพที่ 35



ภาพที่ 34 โครมาโตแกรมของสารละลายมาตรฐานน้ำตาลแต่ละชนิดจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี TLC โดยใช้ mobile phase สูตรต่าง ๆ ; A, กลูโคส; B, กาแลกโตส; C, อาราบิโนส; D, แมนโนส; E, ไซโลส; F, เซลโลไบโอส; G, สารละลายมาตรฐานน้ำตาลผสม

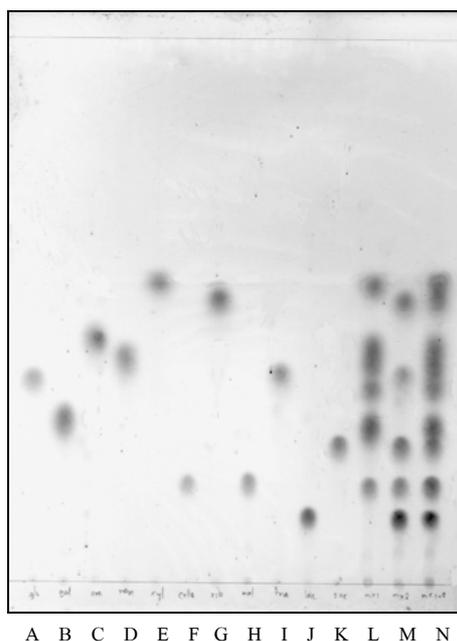
(ก) สูตร A

(ข) สูตร B

(ค) สูตร C

(ง) สูตร D

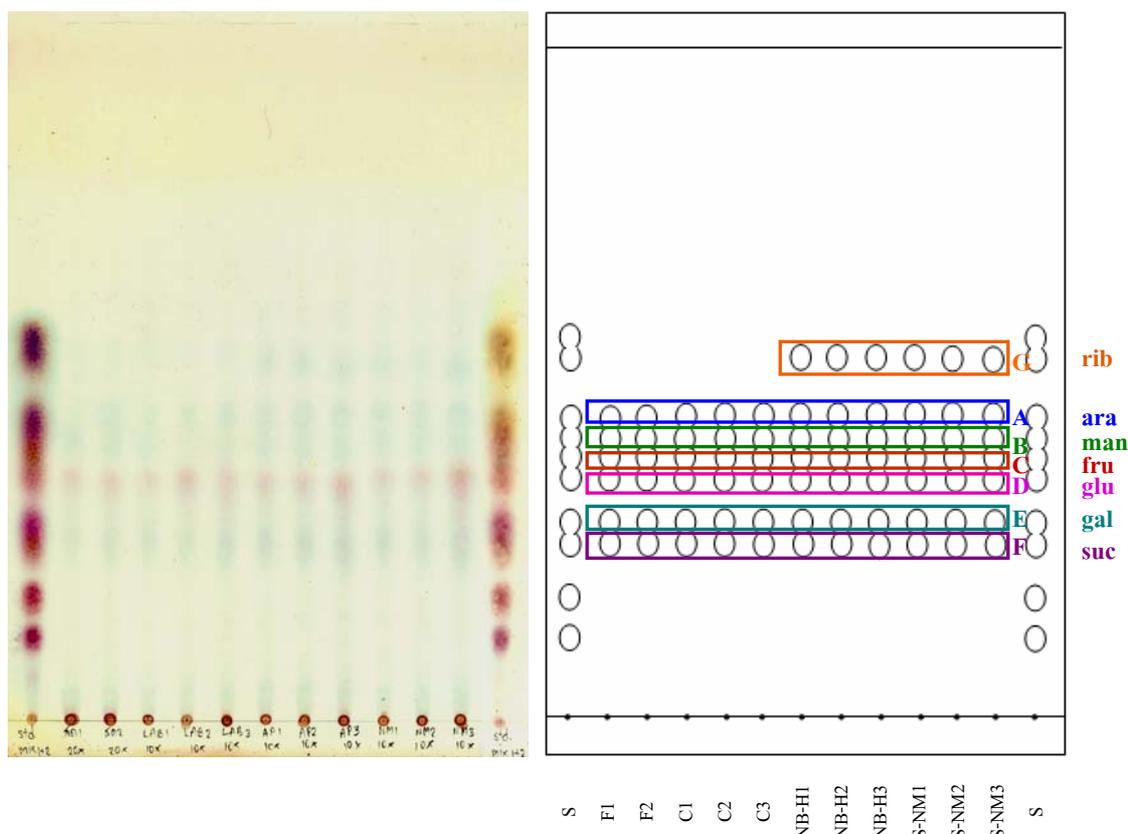
(จ) สูตร E



น้ำตาล	เปอร์เซ็นต์ R _F
แลกโตส (J)	12
เซลโลไบโอส (F)	18
มอลโตส (H)	18
ซูโครส (K)	26
กาแลกโตส (B)	29
กลูโคส (A)	37
ฟรุกโตส (I)	39
แมนโนส (D)	41
อาราบีโนส (C)	44
ไรโบส (G)	53
ไซโลส (E)	55

ภาพที่ 35 โครมาโตแกรมของสารละลายมาตรฐานน้ำตาลแต่ละชนิดจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี TLC โดยใช้ mobile phase สูตร A; A, กลูโคส; B, กาแลกโตส; C, อาราบีโนส; D, แมนโนส; E, ไซโลส; F, เซลโลไบโอส; G, ไรโบส; H, มอลโตส; I, ฟรุกโตส; J, แลกโตส; K, ซูโครส; L, สารละลายมาตรฐานน้ำตาลผสม A-F; M, สารละลายมาตรฐานน้ำตาลผสม G-K; N, สารละลายมาตรฐานน้ำตาลผสม A-K

เมื่อวิเคราะห์น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว และคู่ของตัวอย่างไซเลจทั้ง 3 ชุดการทดลองหลังปิดภาชนะหมัก 4 ชั่วโมงด้วยวิธี TLC เปรียบเทียบกับหลูานเปียร์สด (ภาพที่ 36) พบว่า หลูานเปียร์สดมีจุด A B C D E และ F ที่ตรงกับค่าเปอร์เซ็นต์ R_F ของอาราบีโนส แมนโนส ฟรุกโตส กลูโคส กาแลกโตส และซูโครสตามลำดับ โดยจุด D ที่แสดงกลูโคสมีความเข้มของจุดสูงกว่าจุดอื่น ๆ Knudsen (1997) รายงานว่า ส่วนคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำของตัวอย่างหญ้าบดในทวีปยุโรป ซึ่งทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC มีอาราบีโนส แมนโนส กาแลกโตส และกลูโคสเป็นองค์ประกอบในปริมาณ 3-5 กรัมต่อกิโลกรัมวัตถุแห้ง และซูโครสเป็นองค์ประกอบ 13 กรัมต่อกิโลกรัมวัตถุแห้ง ดังนั้นจะเห็นได้ว่าเทคนิค TLC ที่ใช้ในการทดลองนี้สามารถวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในส่วน of คาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำในหลูานเปียร์สดได้ผลที่ใกล้เคียงกับเทคนิค HPLC อย่างไรก็ตามความแตกต่างในเรื่องของปริมาณของกลูโคส และซูโครสที่ตรวจพบอาจเป็นผลจากความแตกต่างของสายพันธุ์ และอายุของตัวอย่างหญ้าที่ใช้ในการวิเคราะห์ รวมทั้งประสิทธิภาพในการวิเคราะห์เชิงปริมาณของวิธี TLC ที่ต่ำกว่าวิธี HPLC



ภาพที่ 36 โครมาโตแกรมของน้ำตาลในตัวอย่างไซเลจหลังจากปิดถุงหมัก 4 ชั่วโมงจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี TLC เปรียบเทียบกับหญ้าเนเปียร์สด; S, สารละลายมาตรฐานน้ำตาลผสม; F, หญ้าเนเปียร์สด; C, ชุดควบคุม; NB-H, ชุดการทดลอง NB-H; S-NM, ชุดการทดลอง S-NM; rib, ไรโบส; ara, อารา บิโนส; man, แมนโนส; fru, ฟรุกโตส; glu, กลูโคส; gal, กาแลคโตส; suc, ซูโครส

ตัวอย่างไซเลจทั้ง 3 ชุดการทดลองมีจุด A B C D E และ F ที่แสดงน้ำตาลทั้ง 6 ชนิด ในความเข้มข้นของจุดที่ใกล้เคียงกัน และใกล้เคียงกับหญ้าเนเปียร์สด อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาถึงความเข้มข้นของตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์พบว่า ตัวอย่างหญ้าเนเปียร์สดผ่านการทำให้เข้มข้นขึ้น 20 เท่า ในขณะที่ตัวอย่างไซเลจทั้ง 3 ชุดการทดลองผ่านการทำให้เข้มข้นขึ้นเพียง 10 เท่า แสดงว่าตัวอย่างไซเลจทั้ง 3 ชุดการทดลองมีปริมาณน้ำตาลทั้ง 6 ชนิดในส่วนคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำสูงกว่าหญ้าเนเปียร์สด ซึ่งเป็นผลจากการทำงานของเอนไซม์ย่อยสลายที่ผลิตจากหญ้าเนเปียร์ และจุลินทรีย์ในหญ้าเนเปียร์ที่ย่อยสลายส่วนเฮมิเซลลูโลส เซลลูโลส และเพคตินที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ รวมทั้งแป้ง และฟรุกแตนที่เป็นแหล่งสะสมคาร์โบไฮเดรตในเซลล์ของหญ้าเนเปียร์

ตัวอย่างไซเลจจากชุดการทดลอง NB-H และ S-NM ที่ใช้เอนไซม์ย่อยสลายเป็นสารเสริมตรวจพบจุด G ที่ตรงกับค่าเปอร์เซ็นต์ R_f ของไรโบส ซึ่งตรวจไม่พบในไซเลจจากชุดควบคุมหรือหญ้าเนเปียร์สด Lee *et al.* (1970) รายงานถึงปริมาณกลูโคส ฟรุคโตส ซูโครส raffinose และ Stachyose ในพืช 206 ตัวอย่าง แต่ไม่มีรายงานถึงการตรวจพบไรโบสแต่อย่างใด Knudsen (1997) รายงานถึงน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบของโพลีแซคคาไรด์ในพืชอาหารสัตว์ 38 ชนิด แต่ไม่มีรายงานถึงการตรวจพบไรโบสเช่นกัน Chaikumpollert *et al.* (2004) รายงานว่า ส่วนเฮมิเซลลูโลสของหญ้าแฝกมีอาราบินอส ไซโลส กลูโคส และกาแลกโตสเป็นองค์ประกอบ และ Tolsma (2002) รายงานว่า แป้ง และเซลลูโลสในพืชมีโมโนเมอร์เป็นกลูโคส ในขณะที่ฟรุคแตนประกอบด้วยหน่วยย่อยเป็นซูโครส และฟรุคโตส ดังนั้นจะเห็นว่าคาร์โบไฮเดรตทั้งส่วนที่เป็นโครงสร้างผนังเซลล์ และแหล่งสะสมในพืชไม่มีไรโบสเป็นองค์ประกอบ ในขณะที่กรดนิวคลีอิกในเซลล์พืชมีไรโบสเป็นองค์ประกอบสำคัญ (Lee *et al.*, 1970) จึงเป็นไปได้ว่าไรโบสที่ตรวจพบในไซเลจชุดการทดลอง NB-H และ S-NM เป็นน้ำตาลจากภายในเซลล์ของหญ้าเนเปียร์ซึ่งตรวจพบได้เพราะผนังเซลล์ของหญ้าเนเปียร์ถูกย่อยสลาย ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับหญ้าเนเปียร์สด และไซเลจชุดควบคุมที่ตรวจไม่พบไรโบส แสดงว่าเอนไซม์ย่อยสลาย E-NB และเอนไซม์ย่อยสลาย E-NM ที่ใช้เป็นสารเสริมสามารถย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตส่วนที่เป็นผนังเซลล์ของหญ้าเนเปียร์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

การมีไรโบสเพิ่มเติมจากน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว และโมเลกุลคู่อื่น เป็นผลดีต่อกระบวนการหมักเนื่องจากเชื้อ *Lactobacillus pentosus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียกรดแลกติกสายพันธุ์เดียวกับที่ใช้เป็นสารเสริมมีประสิทธิภาพการใช้ไรโบสเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดแลกติก รองจากการใช้กลูโคสที่มีประสิทธิภาพสูงสุด (Lampen and Peterjohn, 1951) และเชื้อยีสต์กลุ่ม *Debaryomyces* และกลุ่ม *Candida* ซึ่งคัดแยกได้จากไซเลจไม่สามารถใช้ไรโบสเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญได้ (Uchida and Murata, 2004)

เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของชนิดน้ำตาลในชุดการทดลอง NB-H และ S-NM ไม่พบความแตกต่างของชนิดน้ำตาลที่เกิดขึ้นแต่อย่างใด แสดงว่าการมีเอนไซม์เพคตินเอสในระบบเอนไซม์ย่อยสลาย E-NB ที่สูงเป็น 2 เท่าของเอนไซม์ย่อยสลาย E-NM และการมีเอนไซม์ไซลานเอสในระบบเอนไซม์ย่อยสลาย E-NM ไม่ส่งผลให้เกิดการผลิตน้ำตาลชนิดที่แตกต่างกันอย่างที่คาดไว้ เมื่อใช้เป็นสารเสริมในไซเลจหญ้าเนเปียร์ที่ค่ากิจกรรม 29.39 หน่วยต่อมิลลิลิตร

จากผลของชนิดคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำที่พบในไซเลจหญ้าเนเปียร์ที่ใช้เอนไซม์ย่อยสลาย E-NB และเอนไซม์ย่อยสลาย E-NM เป็นสารเสริม ทำให้สรุปผลของการเปลี่ยนแปลงของชนิดคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำที่เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ย่อยสลายทั้งสองได้ว่าเกิดโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีขนาดระหว่างไตรแซคคาไรด์และเตตราแซคคาไรด์ที่เป็นผลจากการย่อยสลายโอลิโกแซคคาไรด์ขนาดใหญ่กว่าเซลโลเพนตาออสที่พบในหญ้าเนเปียร์สด และตรวจพบไรโบสซึ่งเป็นองค์ประกอบในเซลล์หญ้าเนเปียร์ อย่างไรก็ตามระบบที่แตกต่างกันของเอนไซม์ย่อยสลาย E-NB และเอนไซม์ย่อยสลาย E-NM ไม่ส่งผลให้เกิดความแตกต่างของชนิดคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำในไซเลจเมื่อใช้เอนไซม์ย่อยสลายทั้งสองเป็นสารเสริมที่ค่ากิจกรรมเท่ากัน จึงอาจเป็นไปได้ว่าการที่น้ำตาลรีดิวซ์จากการทำงานของเอนไซม์ย่อยสลาย E-NB และ E-NM ในการทดลองที่ผ่านมาส่งผลที่แตกต่างกันต่อการใช้เป็นแหล่งคาร์บอนของแบคทีเรียกรดแลกติก จุลินทรีย์กลุ่ม Enterobacteria และยีสต์ในไซเลจช่วง 3 วันแรกของการหมักไม่ได้เกิดจากชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว และคู่ที่แตกต่างกัน แต่เกิดจากปริมาณที่แตกต่างกันของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว และคู่แต่ละชนิดที่เอนไซม์ย่อยสลาย E-NM และ E-NB ผลิตขึ้นซึ่งคงต้องใช้วิธีการวิเคราะห์ขั้นสูงเช่น HPLC ในการศึกษาต่อไป