ผลของการหมักใยอาหารที่สกัดได้จากกากมันสำปะหลัง และกากมันเอทานอล ในหลอดทดลองต่อประชากรจุลินทรีย์ การผลิตกรดไขมันสายสั้น และกรดแลคติก

In vitro Fermentation of Extracted Dietary Fiber from Cassava Pulp and Cassava Distiller's Dried Grain and their Effects on Microbial Populations, Short Chain Fatty Acids and Lactic Acid Production

สุภัตรา โอกระโทก[1], เมริษา ศิริโสภาพงษ์[1], วิทธวัช โมฬี[1] และ สุทิศา เข็มผะกา[1*]

Supattra Okrathok[1], Merisa Sirisopapong[1], Wittawat Molee[1] and Sutisa Khempaka[1*]

บทคัดย่อ: วัตถุประสงค์ของการทดลองนี้เพื่อหาอัตราส่วนของเอนไซม์เซลลูเลส : ไซลาเนส (มี 4 ระดับ 0:0, 9:3, 36:12 และ 72:24 หน่วย/กรัมของสารตั้งต้น) ที่เหมาะสม เพื่อปรับปรุงคุณภาพใยอาหารที่สกัดได้จากกากมันสำปะหลัง และกากมันเอทานอล และประเมินผลใยอาหารดัดแปลงที่ได้ด้วยการจำลองกระบวนการหมักย่อยในหลอดทดลองที่มีการใช้เชื้อจุลินทรีย์จากซีกัมของไก่ ผลการทดลองพบว่าใยอาหารที่สกัดจากกากมันสำปะหลังและกากมันเอทานอลสามารถเพิ่มประชากร *Lactobacillus* spp. และ *Bifidobacterium* spp. กรดไขมันสายสั้น (อะซิเตท โพรพิโอเนท และบิวทีเรท) และกรดแลคติก และลดค่า pH หลังการหมักเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยใยอาหารจากกากมันสำปะหลังมีประสิทธิภาพที่ดีกว่าใยอาหารจากกากมันเอทานอล ใยอาหารดัดแปลงด้วยเอนไซม์จากกากมันสำปะหลังแสดงผลต่อพารามิเตอร์ที่ทำการศึกษาดีกว่าใยอาหารหยาบ (ไม่ได้ใช้เอนไซม์) ซึ่งเอนไซม์เซลลูเลส และไซลาเนสที่อัตราส่วน 36:12 และ 72:24 หน่วย/กรัมของสารตั้งต้น สามารถเพิ่มการผลิตกรดไขมันสายสั้นไม่แตกต่างกัน เมื่อพิจารณาถึงประโยชน์ที่จะนำไปใช้กับไก่ และการผลิตที่มีต้นทุนต่ำ การใช้เอนไซม์ที่อัตราส่วน 36:12 หน่วย/กรัมของสารตั้งต้น น่าจะเป็นระดับที่เหมาะสมที่สุด อย่างไรก็ตามใยอาหารดัดแปลงจากกากมันเอทานอลแสดงผลไม่แตกต่างจากใยอาหารหยาบ โดยสรุปการดัดแปลงใยอาหารจากกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์เซลลูโลส : ไซลาเนสที่อัตราส่วน 36:12 หน่วย/กรัมของสารตั้งต้น มีผลดีต่อประชากร *Lactobacillus* spp. และ *Bifidobacterium* spp. การผลิตกรดไขมันสายสั้น กรดแลคติก และค่า pH

คำสำคัญ: การหมักในหลอดทดลอง, ใยอาหาร, กากมันสำปะหลัง, กากมันเอทานอล, กรดไขมันสายสั้น

ABSTRACT: The objective of this study was to investigate the optimal ratio of cellulase : xylanase enzymes (4 levels 0:0, 9:3, 36:12 and 72:24 U/g substrate) in order to improve dietary fiber extracted from cassava pulp (D-CP) and cassava distiller's dried grain (D-CDDG) and evaluate the modified dietary fibers by using *in vitro* fermentation method inoculated with cecal microbial. The results showed that dietary fiber extracted from D-CP and D-CDDG can increase *Lactobacillus* spp. and *Bifidobacterium* spp.populations, short chain fatty acids (SCFA) (acetate,

Received July 16, 2018
Accepted November 22, 2018

[1] สาขาวิชาเทคโนโลยีและนวัตกรรมทางสัตว์ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี นครราชสีมา 30000, School of Animal Technology and Innovation, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima 30000

* Corresponding author: khampaka@sut.ac.th

propionate and butyrate) and lactic acid productions and reduce pH values after 24 h incubation. Dietary fiber from D-CP showed more efficient than the D-CDDG. The modified-dietary fiber with enzymes from D-CP showed better results on measurement parameters than the crude dietary fiber (without modifying with enzymes). The cellulase : xylanase at ratios of 36:12 and 72:24 U/g substrate showed the similar result in enhancing SCFA production. When considering the beneficial effects of dietary fiber for further apply to chickens and minimum production cost, the enzyme ratio of 36:12 U/g substrate would be an appropriate level for modifying dietary fiber from D-CP. Unfortunately, there was no significant difference between modified-dietary fiber and crude dietary fiber from D-CDDG. In conclusion, it is suggested that the modified-dietary fiber from D-CP with cellulase : xylanase at ratio of 36:12 U/g substrate revealed the beneficial effects on *Lactobacillus* spp. and *Bifidobacterium* spp. populations, SCFA and lactic acid productions and pH value.
Keywords: *in vitro* fermentation, dietary fiber, cassava pulp, cassava distiller's dried grain, short chain fatty acid

บทนำ

การสร้างสูตรอาหารสำหรับสัตว์ปีก นอกจากจะต้องคำนึงถึงสารอาหารชนิดต่างๆ ให้เพียงพอต่อความต้องการของร่างกาย และมีความสมดุลระหว่างโภชนะแล้ว สูตรอาหารยังควรมีคุณสมบัติที่ช่วยส่งเสริมสุขภาพสัตว์ให้ดีขึ้นเพื่อลดความเสี่ยงจากการติดเชื้อหรือการอักเสบในทางเดินอาหาร (Choct, 2009; Gaggia et al., 2010) โดยใยอาหาร (dietary fiber) เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจเนื่องจากมีคุณสมบัติเชิงหน้าที่ ซึ่งอาหารที่มีคุณสมบัติเชิงหน้าที่ (functional feed) เป็นลักษณะของอาหารที่มีสารอื่นที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพ นอกเหนือจากมีสารอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการ เช่น ช่วยเพิ่มระบบภูมิคุ้มกันโรค ป้องกันโรค และรักษาโรค เป็นต้น (Vermeulen et al., 2017) ใยอาหารมีบทบาทสำคัญในการช่วยเพิ่มความสามารถของกลไกร่างกายในการดูแลสุขภาพ เช่น ช่วยปรับสมดุลจุลินทรีย์ในลำไส้และส่งเสริมสุขภาพลำไส้ (gut health) (Choct, 2009) แต่อย่างไรก็ตามใยอาหารมีคุณสมบัติผันแปรแตกต่างกันขึ้นอยู่กับแหล่งที่มา กระบวนการสกัดองค์ประกอบของเยื่อใย และโครงสร้างทางเคมี ที่ทำให้การแสดงผลในตัวสัตว์มีความแตกต่างกันไป ซึ่งการประเมินประสิทธิภาพของใยอาหารในเบื้องต้นน่าจะช่วยคัดเลือกใยอาหารก่อนที่จะนำไปทดสอบในตัวสัตว์ต่อไป

ใยอาหาร คือคาร์โบไฮเดรตประเภทโครงสร้างที่เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์พืช มีองค์ประกอบหลักเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้ง (non-starch polysaccharides, NSPs) โดยใยอาหารจำแนกออกได้เป็น 2 ประเภทตามความสามารถในการละลายน้ำ ได้แก่ ใยอาหารที่ละลายน้ำ (soluble fiber) และใยอาหารที่ไม่ละลายน้ำ (insoluble fiber) ซึ่งใยอาหารจะไม่ถูกย่อยโดยเอนไซม์ในทางเดินอาหารของสัตว์ปีก แต่เมื่อถูกส่งผ่านไปยังทางเดินอาหารส่วนท้ายจะถูกหมักย่อยโดยจุลินทรีย์ในซีกัม (caecum) ได้ผลผลิตสุดท้ายเป็นกรดไขมันสายสั้น (short chain fatty acids, SCFA) ทำให้ค่า pH ในซีกัมลดลง และช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียก่อโรค (Józefiak et al., 2004; Zdunczyk et al., 2015) นอกจากนี้ใยอาหารยังช่วยส่งเสริมสุขภาพทางเดินอาหาร ส่งผลให้ไก่มีสุขภาพดี และผลผลิตที่ดีขึ้น (van der Wielen et al., 2000; Choct, 2009; Pourabedin and Zhao, 2015)

ผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมมันสำปะหลังในรูปของกากมันสำปะหลัง และกากมันเอทานอล เป็นแหล่งทางเลือกของใยอาหารที่น่าสนใจ เนื่องจากวัตถุดิบทั้งสองชนิดมี NSPs เป็นองค์ประกอบสูงซึ่งน่าจะสามารถนำมาสกัดใยอาหารได้ อย่างไรก็ตาม NSPs ที่เป็นองค์ประกอบในมันสำปะหลังจัดเป็นคาร์โบไฮเดรตสายยาว (polysaccharides) ซึ่งจุลินทรีย์ในซีกัมอาจหมักย่อยหรือใช้ประโยชน์ได้ไม่เต็มที่ แต่ถ้าหากมีการสกัดใยอาหาร และย่อยสลายพันธะ NSPs ของกากมันสำปะหลัง และกากมันเอทานอลด้วยเอนไซม์ให้อยู่ในรูปของคาร์โบไฮเดรตสายสั้น (oligosaccharides) ก็น่าจะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการใช้ประโยชน์ของจุลินทรีย์ได้ และเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการเพิ่มคุณภาพของใยอาหารให้มีคุณสมบัติที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นสารเสริมอาหารสัตว์ (feed

additives) โดยสารเสริมหรือวัตถุที่เติมในอาหารสัตว์ หมายถึงวัตถุหรือสารใดๆ ที่ใช้เติมเข้าไปในอาหารสัตว์ที่ผสมจากวัตถุดิบหลักเพื่อให้ได้ผลตามวัตถุประสงค์อย่างใดอย่างหนึ่งซึ่งแบ่งออกเป็นสารเสริมที่จัดอยู่ในพวกอาหารหลัก และสารเสริมที่ไม่ได้จัดอยู่ในพวกอาหารหลัก (AAFCO, 2007) ดังนั้นใยอาหารจัดเป็นสารเสริมชนิดที่ไม่ได้จัดอยู่ในพวกอาหารหลัก แต่ใช้เพื่อวัตถุประสงค์เฉพาะอย่างคือส่งเสริมความสมดุลจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารส่วนท้ายของสัตว์ปีก จากการรวบรวมข้อมูลเพื่อหาความเป็นไปได้ในการใช้เอนไซม์ย่อยสลายพันธะ NSPs เพื่อปรับปรุงคุณภาพใยอาหารจากกากมันสำปะหลัง และกากมันเอทานอลนั้นไม่มีการทดลองก่อนหน้านี้จึงทำการค้นคว้าเอกสารในวัตถุดิบชนิดอื่นที่มีองค์ประกอบโครงสร้างของ NSPs ซึ่งมีการทดลองโดย Ravn et al. (2017) รายงานว่าเอนไซม์ไซลาเนส (xylanase) สามารถย่อยสลายใยอาหารในรำข้าวสาลีให้มีความยาวสายของโครงสร้าง (degree of polymerization, DP) ที่สั้นลง จากอะราบิโนไซแลน (arabinoxylan) เป็นอะราบิโนไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ (arabinoxylo-oligosaccharides) และเมื่อนำตัวอย่างที่ได้ไปศึกษาการหมักย่อยในหลอดทดลอง (*in vitro* fermentation) พบว่าจุลินทรีย์จากซีกัมของไก่สามารถหมักย่อยและใช้ประโยชน์ได้ดี มีการเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์ และมีการผลิตกรดไขมันสายสั้นเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกับการย่อยข้าวสาลีด้วยเอนไซม์รวม (multicomponent enzyme) พบว่าสามารถลดค่า DP ของสายไซแลนให้สั้นลง และมีการผลิตอะซิเตท (acetate) และบิวทีเรท (butyrate) หลังทดสอบการหมักในหลอดทดลองได้มากขึ้น (Yacoubi et al., 2016)

ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาการปรับปรุงคุณภาพหรือดัดแปลงใยอาหารที่ได้จากกากมันสำปะหลัง และกากมันเอทานอลด้วยเอนไซม์เซลลูเลส และไซลาเนส ที่ระดับต่าง ๆ และประเมินผลใยอาหารที่ได้โดยจำลองการหมักย่อยในหลอดทดลอง ทำการวัดผลจากปริมาณจุลินทรีย์ การผลิตกรดไขมันสายสั้น กรดแลคติก และค่า pH เพื่อประเมินผลในเบื้องต้นก่อนที่จะขยายการทดสอบในตัวไก่ต่อไป

วิธีการศึกษา

การออกแบบการทดลอง

การทดลองครั้งนี้เป็นการทดสอบหาอัตราส่วนเอนไซม์เซลลูเลส : ไซลาเนส ที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการปรับปรุงคุณภาพหรือดัดแปลงใยอาหารที่ได้จากกากมันสำปะหลัง และกากมันเอทานอล และประเมินผลใยอาหารดัดแปลงที่ได้ด้วยการจำลองกระบวนการหมักย่อยในหลอดทดลองที่มีการใช้เชื้อจุลินทรีย์จากซีกัมของไก่ (cecal inoculum) โดยใช้เอนไซม์ เซลลูเลส : ไซลาเนส อัตราส่วน 0:0, 9:3, 36:12 และ 72:24 หน่วย/กรัมของสารตั้งต้น ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD) การทดลองมีจำนวน 9 กลุ่มๆ ละ 4 ซ้ำ ดังแสดงใน **Table 1** สำหรับรายละเอียดในการเตรียมใยอาหารดัดแปลงด้วยเอนไซม์ และวิธี

Table 1 Dietary fiber and enzyme ratios of the sample in the *in vitro* fermentation

Treatment	Dietary fiber source	
	Cassava pulp (D-CP)	Cassava distiller's dried grain (D-CCDG)
cellulase : xylanase (U/g substrate)	0:0	0:0
	9:3	9:3
	36:12	36:12
	72:24	72:24
Control (cecal inoculum)	-	-

การทดสอบกระบวนการหมักย่อยในหลอดทดลองได้กล่าวรายละเอียดไว้ในส่วนต่อไป

การสกัดใยอาหารจากกากมันสำปะหลัง และกากมันเอทานอล

นำวัตถุดิบทั้ง 2 ชนิดที่ได้จากโรงงานอุตสาหกรรม คือ กากมันสำปะหลังสดจากบริษัทอุตสาหกรรมแป้งโคราช จำกัด จังหวัดนครราชสีมา และกากมันเอทานอลจากบริษัทไทยเอทานอล พาวเวอร์ จำกัด (มหาชน) จังหวัดขอนแก่น มาทำการอบแห้งที่อุณหภูมิ 55 - 60 ºC และบดให้ละเอียด (ขนาด 1.0 มิลลิเมตร) จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ไปสกัดใยอาหารซึ่งดัดแปลงจากวิธีการของ Daou and Zhanh (2013) โดยการสกัดด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอคไซด์ (NaOH) ที่ความเข้มข้น 6% สำหรับกากมันสำปะหลัง และ 4% สำหรับกากมันเอทานอล และกำจัดแป้งออกด้วยเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส (alpha-amylase; EC 3.2.1.1, Megazyme, Ireland) โดยใยอาหารที่ได้จากกระบวนการนี้เรียกว่า "**ใยอาหารหยาบ**" หรือ crude dietary fiber จากนั้นดัดแปลงใยอาหารที่ได้โดยใช้เอนไซม์เซลลูเลส (cellulase; EC 3.2.1.4, Megazyme, Ireland) และไซลาเนส (xylanase; EC 3.2.1.8, Megazyme, Ireland) ที่ระดับแตกต่างกันคือ 0:0, 9:3, 36:12 และ 72:24 หน่วย (Unit) ต่อการย่อยวัตถุดิบ 1 กรัม ทำการย่อยด้วยเอนไซม์เป็นระยะเวลา 10 ชั่วโมง จากนั้นตกตะกอนด้วยเอทานอล (ethanol) 95% ที่อุณหภูมิ 60 ºC เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และกรองแยกตัวอย่างออกจากสารละลาย โดยล้างตะกอนตัวอย่างด้วยเอทานอล 78% เอทานอล 95% และอะซีโทน (acetone) ตามลำดับ จากนั้นนำตัวอย่างไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 55 - 60 ºC ซึ่งใยอาหารที่ได้ในขั้นตอนนี้เรียกว่า "**ใยอาหารดัดแปลง**" หรือ modified-dietary fiber

การประเมินผลใยอาหารที่สกัดได้จากกากมันสำปะหลัง และกากมันเอทานอลในหลอดทดลอง

ทำการประเมินผลใยอาหารด้วยการจำลองกระบวนการหมักย่อยในหลอดทดลองตามวิธีการของ Dunkley et al. (2007) และ Donalson et al. (2008) โดยเก็บตัวอย่างสิ่งย่อย (digesta) จากซีกัมของไก่ไข่สายพันธุ์ทางการค้า (Isa Brown) ที่อายุประมาณ 50 - 60 สัปดาห์ ใส่ในหลอดเก็บตัวอย่างขนาด 50 มิลลิลิตร ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อโรค (autoclave) (ใช้สิ่งย่อยจากซีกัมที่เก็บเสร็จภายในระยะเวลา 15 นาทีหลังการฆ่า) จากนั้นนำสิ่งย่อยที่ได้มาผสมให้เข้ากันและนำไปเจือจางกับสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟตแบบไร้ออกซิเจน (anaerobic phosphate buffer) ที่ความเข้มข้น 1:3,000 (wt/vol) สำหรับเตรียมเป็นหัวเชื้อ (cecal inoculum) โดยระหว่างการเตรียมต้องเติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ลงในสารละลายหัวเชื้อตลอดเวลาเพื่อควบคุมให้อยู่ในสภาวะที่ไร้ออกซิเจน (anaerobic) จากนั้นชั่งตัวอย่างใยอาหารดัดแปลงที่ได้จากกากมันสำปะหลัง และกากมันเอทานอลที่ผ่านการปรับปรุงด้วยเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนส จำนวน 250 มิลลิกรัม ใส่ในขวดแก้ว (vial) ขนาด 10 มิลลิลิตร ที่ปราศจากเชื้อ และเติมหัวเชื้อปริมาณ 5 มิลลิลิตร ลงในขวดแก้ว นอกจากนี้ยังมีการเปรียบเทียบผลกับกลุ่มควบคุมที่ไม่มีการใส่ใยอาหารลงในหัวเชื้อด้วย ดังนั้นงานทดลองนี้มีทั้งหมด 9 กลุ่มทดลอง แต่ละกลุ่มทดลองทำ 4 ซ้ำ โดยทำการเก็บตัวอย่างเพื่อวัดผล 2 ช่วง คือ ที่ 0 และ 24 ชั่วโมงหลังการบ่ม ซึ่งในการบ่มตัวอย่างต้องทำให้สภาวะภายในขวดแก้วไร้ออกซิเจนโดยการเติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ แล้วทำการปิดฝาขวดให้แน่นและนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 ºC เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การเก็บข้อมูลโดยสุ่มเก็บตัวอย่างจำนวน 1 มิลลิลิตร ในแต่ละกลุ่มการทดลอง ที่ 0 และ 24 ชั่วโมงหลังการบ่ม นำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 10,000 x g อุณหภูมิ 4 ºC เป็นเวลา 10 นาที เก็บเฉพาะส่วนใสด้านบน (supernatant) ไว้ที่อุณหภูมิ -20 ºC เพื่อรอวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันสายสั้น และกรดแลคติกต่อไป และทำการเก็บตัวอย่างอีก 1 มิลลิลิตร ในตัวอย่างที่มีการบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาตรวจนับปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ (*Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp. และ *E.coli*) ด้วยเทคนิคการเจือจางตัวอย่าง (dilution plate count) โดยเลี้ยงเชื้อบนอาหารที่คัดเลือกเฉพาะ (selective medium) นอกจากนี้ยังทำการวัดค่า pH หลังการบ่มตัวอย่างด้วย

การวิเคราะห์กรดไขมันสายสั้น และกรดแลคติก

วิเคราะห์หาปริมาณกรดไขมันสายสั้น ได้แก่ อะซิเตท โพรพิโอเนท และบิวทีเรท และกรดแลคติก จากตัวอย่างด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟี (gas chromatography; GC, Agilent 7890B) โดยใช้คอลัมน์ CP-Sil 5 CB (0.32 mm x 25 m fused silica capillary column) และใช้ flame-ionization detector (FID) เป็นตัวตรวจวัด มีการใช้ 4-methylvaleric acid (Alfa Aesar, United Kingdom) และ fumaric acid (Alfa Aesar, United Kingdom) เป็นสารมาตรฐานภายใน (internal standard) สำหรับการวิเคราะห์กรดไขมันสายสั้น และกรดแลคติกตามลำดับ (Mookiah et al., 2014) การคำนวณความเข้มข้นสุดท้ายของกรดไขมันสายสั้น และกรดแลคติกดัดแปลงตามวิธีการของ Donalson et al. (2008) คำนวณจากผลต่างระหว่างความเข้มข้นที่ 24 ชั่วโมง และ 0 ชั่วโมง จากการหมักในหลอดทดลองตามสมการดังนี้

$$\text{Net short-chain fatty acid production (NSp)} = S_{(t24)} - S_{(t0)}$$

$$\text{Net lactic acid production (NLp)} = L_{(t24)} - L_{(t0)}$$

เมื่อ, $S_{(t24)}$ และ $S_{(t0)}$ คือปริมาณของกรดไขมันสายสั้น (mM/ml) ที่ 24 ชั่วโมง และ 0 ชั่วโมง ตามลำดับ

$L_{(t24)}$ และ $L_{(t0)}$ คือปริมาณของกรดแลคติก (mM/ml) ที่ 24 ชั่วโมงและ 0 ชั่วโมง ตามลำดับ

การวิเคราะห์ทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์หาค่าความแปรปรวน (analysis of variance, ANOVA) ตามแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในแต่ละกลุ่มการทดลองโดยวิธี Tukey's test และใช้ Orthogonal contrasts เพื่อเปรียบเทียบดังนี้ 1) กลุ่มควบคุม vs. ใยอาหารจากกากมันสำปะหลัง และกากมันเอทานอล 2) ใยอาหารจากกากมันสำปะหลัง vs. ใยอาหารจากกากมันเอทานอล 3) ใยอาหารดัดแปลงจากกากมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยเซลลูเลส : ไซลาเนส vs. ใยอาหารหยาบจากกากมันปะหลัง และ 4) ใยอาหารดัดแปลงจากกากมันเอทานอลที่ย่อยด้วยเซลลูเลส : ไซลาเนส vs. ใยอาหารหยาบจากกากมันเอทานอล โดยใช้โปรแกรมสถิติ SPSS เวอร์ชัน 18.0 (SPSS, 2010) ในการวิเคราะห์

ผลการศึกษา

ผลของการเปลี่ยนแปลงปริมาณจุลินทรีย์หลังการหมักใยอาหารในหลอดทดลองเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยเชื้อจุลินทรีย์จากสิ่งย่อยในซีกัมได้แสดงไว้ใน **Table 2** จากการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มทดลองโดยวิธี orthogonal contrasts พบว่าใยอาหารจากทั้งกากมันสำปะหลัง และกากมันเอทานอลสามารถเพิ่มจำนวนประชากรจุลินทรีย์ *Lactobacillus* spp. และ *Bifidobacterium* spp. ได้เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่มีการเสริมใยอาหารในกระบวนการหมัก ($P < 0.05$) แต่ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณของ *E.coli* ($p > 0.05$) โดยใยอาหารจากกากมันสำปะหลังมีผลในการเพิ่มจำนวนของ *Bifidobacterium* spp. ได้ดีกว่าใยอาหารจากกากมันเอทานอล ($P < 0.05$) อย่างไรก็ตาม ใยอาหารหยาบ และใยอาหารดัดแปลงด้วยเอนไซม์จากทั้งกากมันสำปะหลัง และกากมันเอทานอลมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงจำนวนประชากรจุลินทรีย์ที่ไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$)

ผลของการหมักใยอาหารจากกากมันสำปะหลังและกากมันเอทานอลในหลอดทดลองเป็นเวลา 24 ชั่วโมงด้วยเชื้อจุลินทรีย์จากสิ่งย่อยในซีกัม ต่อปริมาณกรดไขมันสายสั้น กรดแลคติก และค่า pH ได้แสดงไว้ใน **Table 3** จากการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มการทดลองแบบ orthogonal contrasts พบว่าใยอาหารจากทั้งกากมันสำปะหลังและกากมันเอทานอลสามารถเพิ่มการผลิตกรดไขมันสายสั้น (อะซิเตท โพรพิโอเนท และบิวทีเรท) และกรดแลคติก และลดค่า pH ได้เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่มีการเสริมใยอาหารในกระบวนการหมัก ($P < 0.05$) อย่างไรก็ตามใยอาหารดัดแปลงด้วยเอนไซม์จากกากมันสำปะหลังสามารถลดค่า pH และเพิ่มการผลิตกรดไขมันสายสั้น และกรดแลคติกได้สูงกว่าใยอาหารดัดแปลงจากกากมันเอทานอล ($P < 0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่าใยอาหารดัดแปลงด้วยเอนไซม์ (เซลลูเลส : ไซลาเนส) ที่ได้จากกากมันสำปะหลังสามารถเพิ่มปริมาณการผลิตกรดไขมันสายสั้นและกรดแลคติกหลังจากการหมักในหลอดทดลองได้ ($P < 0.05$) สูงกว่าใยอาหารหยาบ แต่ไม่พบความ

เกษตรศาสตร์ 47 (2) : 271-280 (2562). /doi: 10.14456/kaj.2019.33

Table 2 Microbial populations (log CFU/ml) after the *in vitro* fermentation of dietary fiber with chicken cecal inocula

Item	Cassava pulp (D-CP)[1/]				Cassava distiller's dried grain (D-CDDG)[1/]				Control[1/]	Pooled	Orthogonal contrasts[2/]			
	0:0	9:3	36:12	72:24	0:0	9:3	36:12	72:24		SEM	1	2	3	4
Lactobacillus spp.	6.30[a]	6.21[a]	6.21[a]	6.29[a]	6.38[a]	6.42[a]	6.21[a]	6.00[ab]	5.53[b]	0.054	<0.01	0.98	0.64	0.20
Bifidobacterium spp.	6.14[a]	6.16[a]	6.10[a]	6.08[ab]	5.96[ab]	5.91[ab]	5.93[ab]	5.80[ab]	5.70[b]	0.035	<0.01	<0.01	0.78	0.42
E. coli	4.96	4.92	4.73	4.97	4.94	4.79	4.76	4.81	4.63	0.038	0.06	0.40	0.50	0.26

[a, b] Means with different superscripts in a row are significantly different ($p < 0.05$).

[1/] Cellulase: Xylanase ratios, 0:0, 9:3, 36:12 and 72:24 U/g substrate; Control = cecal inoculum.

[2/] Orthogonal contrasts: 1) Control vs. dietary fiber from D-CP and D-CDDG, 2) D-CP dietary fiber vs. D-CDDG dietary fiber, 3) D-CP modified-dietary fiber with cellulase: xylanase vs. D-CP crude dietary fiber and 4) D-CDDG modified-dietary fiber with cellulase: xylanase vs. D-CDDG crude dietary fiber.

Table 3 Concentrations of short-chain fatty acids, lactic acid and pH after the *in vitro* fermentation of dietary fiber with chicken cecal inocula

Item	Cassava pulp (D-CP)[1/]				Cassava distiller's dried grain (D-CDDG)[1/]				Control[1/]	Pooled	Orthogonal contrasts[2/]			
	0:0	9:3	36:12	72:24	0:0	9:3	36:12	72:24		SEM	1	2	3	4
Short-chain fatty acid [3/] (mM/ml)														
Acetate	35.58[cd]	57.72[abc]	69.23[ab]	78.83[a]	34.76[d]	35.32[cd]	52.28[bcd]	53.02[bcd]	34.69[d]	3.049	<0.01	<0.01	<0.01	0.05
Propionate	8.24[cd]	16.61[ab]	18.76[ab]	20.57[a]	8.14[cd]	13.72[bc]	15.24[ab]	15.31[ab]	7.18[d]	0.870	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
Butyrate	2.27[b]	3.52[a]	3.63[a]	3.74[a]	2.24[b]	3.05[ab]	3.07[ab]	3.01[ab]	1.11[c]	0.157	<0.01	0.01	<0.01	<0.01
Lactic acid [3/] (mM/ml)														
	7.77[d]	14.54[c]	20.97[b]	39.52[a]	6.68[d]	6.54[d]	7.10[d]	7.50[d]	5.82[d]	1.130	<0.01	<0.01	<0.01	0.47
pH after 24 h the *in vitro* fermentation														
	6.80[c]	6.73[d]	6.72[d]	6.66[e]	6.85[b]	6.84[bc]	6.85[b]	6.85[b]	7.03[a]	0.017	<0.01	<0.01	<0.01	0.78

[a, b, c, d, e] Means with different superscripts in a row are significantly different ($p < 0.05$).

[1/] Cellulase : Xylanase ratios, 0:0, 9:3, 36:12 and 72:24 U/g substrate; Control = Cecal inoculum.

[2/] Orthogonal contrasts: 1) Control vs. dietary fiber from D-CP and D-CDDG, 2) D-CP dietary fiber vs. D-CDDG dietary fiber, 3) D-CP modified-dietary fiber with cellulase : xylanase vs. D-CP crude dietary fiber and 4) D-CDDG modified-dietary fiber with cellulase: xylanase vs. D-CDDG crude dietary fiber.

[3/] Net production of short-chain fatty acids and lactic acid were subtracted the baseline (time 0) from 24 h samples.

แตกต่างดังกล่าวในใยอาหารที่ได้จากกากมันเอทานอล (P >0.05)

การใช้เอนไซม์เซลลูเลส : ไซลาเนส อัตราส่วน 36:12 และ 72:24 หน่วย/กรัมของสารตั้งต้น เพื่อปรับปรุงคุณภาพใยอาหารจากกากมันสำปะหลัง โดยภาพรวมพบว่าใยอาหารดัดแปลงที่ใช้เอนไซม์ในระดับดังกล่าวเมื่อผ่านกระบวนการหมักในหลอดทดลองสามารถเพิ่มการผลิตกรดไขมันสายสั้น (อะซิเตท โพรพิโอเนท และบิวทีเรท) ได้สูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับใยอาหารหยาบ และกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้เสริมใยอาหารระหว่างกระบวนการหมัก โดยเอนไซม์ทั้ง 2 ระดับให้ผลที่ไม่แตกต่างกัน ส่วนกรดแลคติกมีปริมาณเพิ่มขึ้น และ pH มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ตามสัดส่วนของเอนไซม์เซลลูเลส : ไซลาเนสที่เพิ่มขึ้น สำหรับการปรับปรุงใยอาหารจากกากมันเอทานอล ถึงแม้ว่าการใช้เอนไซม์เซลลูเลส : ไซลาเนส อัตราส่วน 36:12 และ 72:24 หน่วย/กรัมของสารตั้งต้น สามารถเพิ่มปริมาณการผลิตโพรพิโอเนทเมื่อเปรียบเทียบกับใยอาหารหยาบ และกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้มีการเสริมใยอาหารระหว่างกระบวนการหมัก (P<0.05) แต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติในพารามิเตอร์อื่น ๆ ที่ทำการศึกษา

วิจารณ์ผล

ภาพรวมสรุปได้ว่าใยอาหารที่สกัดได้จากกากมันสำปะหลัง และกากมันเอทานอลสามารถเพิ่มจำนวนประชากรจุลินทรีย์ *Lactobacillus* spp. และ *Bifidobacterium* spp. เพิ่มการผลิตกรดไขมันสายสั้น (อะซิเตท โพรพิโอเนท และบิวทีเรท) และกรดแลคติก รวมถึงลดค่า pH หลังกระบวนการหมักในหลอดทดลองได้ ซึ่งอาจเนื่องมาจากจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์หรือแบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic bacteria) ในซีกัม สามารถใช้ใยอาหารจากกากมันสำปะหลังและกากมันเอทานอลเป็นแหล่งของสารอาหารสำหรับการเจริญเติบโต และผลิตผลผลิตสุดท้ายในรูปของกรดไขมันสายสั้น และกรดแลคติกขึ้น สารเหล่านี้มีผลทำให้ค่า pH ลดลง ซึ่งเอื้อต่อการมีชีวิตของจุลินทรีย์ที่ชอบสภาวะเป็นกรด *เช่น Lactobacillus* spp. และ *Bifidobacterium* spp. ส่งผลให้ประชากรจุลินทรีย์เหล่านี้เพิ่มขึ้น สอดคล้องกับ Donalson et al. (2008) รายงานว่าจุลินทรีย์ในซีกัมสามารถหมักย่อยเซลลูโลส ส่งผลให้มีการผลิตอะซิเตทเพิ่มขึ้น นอกจากนี้การศึกษาการหมักใยอาหารจากกากถั่วเหลือง เปลือกถั่วเหลือง และอัลฟัลฟา ซึ่งจัดเป็นกลุ่มใยอาหารที่ไม่ละลายน้ำในหลอดทดลอง พบว่าหลังการหมักใยอาหารเหล่านี้สามารถเพิ่มจำนวนประชากรจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ และเพิ่มการผลิตอะซิเตท โพรพิโอเนท บิวทีเรท และไอโซบิวทีเรท (Dunkley et al., 2007; Zdunczyk et al., 2015) โดย Meimandipour et al. (2009) รายงานว่าการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียแลคติก (Lactic acid bacteria) เช่น *Lactobacillus* spp. และ *Bifidobacterium* spp. มีความสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของบิวทีเรท ดังนั้นจึงถือได้ว่าใยอาหารมีบทบาทสำคัญในการเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์ในทางเดินอาหาร (Lan et al., 2005) จากผลของกระบวนการหมัก และการผลิตกรดไขมันสายสั้นซึ่งส่งผลต่อเนื่องไปยังการควบคุมสมดุลจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ต่อไป

การใช้เอนไซม์เซลลูเลส และไซลาเนสปรับปรุงคุณภาพใยอาหารจากกากมันสำปะหลังให้อยู่ในรูปของใยอาหารดัดแปลง พบว่าสามารถเพิ่มการผลิตกรดไขมันสายสั้น ได้แก่ อะซิเตท โพรพิโอเนท และบิวทีเรท รวมทั้งกรดแลคติก และลดค่า pH ได้เมื่อเปรียบเทียบกับใยอาหารหยาบ ทั้งนี้เนื่องจากเอนไซม์เซลลูเลส และไซลาเนสสามารถย่อยสลายพันธะ NSPs ของใยอาหารให้สั้นลงได้ จึงส่งผลให้จุลินทรีย์สามารถใช้ประโยชน์จากใยอาหารได้ดีขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Ravn et al. (2017) รายงานว่าเอนไซม์ไซลาเนสสามารถย่อยสลายใยอาหารในรำข้าวสาลีให้มีความยาวของสายโครงสร้างหรือค่า DP ที่สั้นซึ่งได้ผลผลิตเป็นคาร์โบไฮเดรตสายสั้น และเมื่อนำไปทดสอบการหมักในหลอดทดลองพบว่าจุลินทรีย์จากซีกัมสามารถหมักย่อยได้ดีส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์ และการผลิตกรดไขมันสายสั้นที่เพิ่มขึ้น โดยค่า DP ของคาร์โบไฮเดรตสายสั้นนั้นมีอิทธิพลต่อความเร็วในกระบวนการหมัก คือ

ใยอาหารที่มีค่า DP ต่ำจะเกิดการหมักของจุลินทรีย์ได้เร็วขึ้น (Yacoubi et al., 2016) ในการทดลองนี้พบว่าการใช้เอนไซม์เซลลูเลส : ไซลาเนสที่อัตราส่วน 36:12 และ 72:24 หน่วย/กรัมของสารตั้งต้น ได้ใยอาหารดัดแปลงที่มีผลในการเพิ่มการผลิตกรดไขมันสายสั้น คือ อะซิเตท โพรพิโอเนท และบิวทีเรทหลังกระบวนการหมักไม่แตกต่างกัน (P<0.05) ซึ่งกรดไขมันสายสั้นที่ผลิตขึ้นในสัตว์ปีก มีบทบาทในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคบางชนิด และถูกดูดซึมนำไปใช้เป็นพลังงานให้กับเยื่อบุเซลล์ของทางเดินอาหาร อีกทั้งยังช่วยส่งเสริมสุขภาพของสัตว์ (Józefiak et al., 2004; Mookiah et al., 2014) เมื่อพิจารณาเลือกใช้เอนไซม์ที่ก่อให้เกิดประโยชน์ต่อตัวไก่ และประหยัดต้นทุนการผลิต การใช้เอนไซม์เซลลูเลส : ไซลาเนส ที่ระดับ 36:12 หน่วย/กรัมของสารตั้งต้นน่าจะเหมาะสมที่สุด

อย่างไรก็ตามใยอาหารดัดแปลงด้วยเอนไซม์จากกากมันเอทานอลแสดงผลไม่แตกต่างกับใยอาหารหยาบ และมีผลในการเปลี่ยนแปลงกรดไขมันสายสั้น กรดแลคติก ค่า pH และปริมาณจุลินทรีย์ได้น้อยกว่าใยอาหารจากกากมันสำปะหลัง อาจเนื่องมาจากวัตถุดิบทั้ง 2 ชนิด มีองค์ประกอบของเยื่อใยที่แตกต่างกันโดยเฉพาะอย่างยิ่งลิกนิน (lignin) โดยมีการรายงานว่ากากมันเอทานอล และกากมันสำปะหลังมีลิกนินเป็นองค์ประกอบ 11.30 และ 2.20% ตามลำดับ (ศศิธร และคณะ, 2556; Kosugi et al., 2009) โดยลิกนินมีสายโมเลกุลที่ยาว เอนไซม์เซลลูเลส และไซลาเนสไม่สามารถตัดย่อยพันธะได้ ทำให้จุลินทรีย์ไม่สามารถใช้เป็นแหล่งของสารอาหารจึงทำให้มีการผลิตกรดไขมันสายสั้น และกรดแลคติกที่ต่ำกว่า รวมถึงมีค่า pH ที่เปลี่ยนแปลงหรือลดลงได้น้อยกว่าใยอาหารที่สกัดได้จากกากมันสำปะหลัง ดังนั้นหากต้องการใช้กากมันเอทานอลเพื่อเป็นแหล่งของใยอาหารควรมีการปรับปรุงสายโครงสร้างของลิกนิน เช่น การใช้วิธีทางกายภาพ (ความร้อนสูง แรงดันสูง และการใช้เทคนิคอัลตราโซนิกส์) หรือการใช้จุลินทรีย์ในการหมักก่อนกระบวนการสกัด (Zhang et al., 2018) เพื่อช่วยเพิ่มการใช้ประโยชน์ของจุลินทรีย์จากซีกัมของไก่

สรุป

ใยอาหารที่สกัดได้จากกากมันสำปะหลัง และกากมันเอทานอลสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ *Lactobacillus* spp. และ *Bifidobacterium* spp. เพิ่มการผลิตกรดไขมันสายสั้น (อะซิเตท โพรพิโอเนท และบิวทีเรท) และกรดแลคติก และลดค่า pH หลังการหมักในหลอดทดลองเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยใยอาหารจากกากมันสำปะหลังมีประสิทธิภาพที่ดีกว่าใยอาหารจากกากมันเอทานอล นอกจากนี้ยังพบว่าใยอาหารดัดแปลงด้วยเอนไซม์จากกากมันสำปะหลังมีประสิทธิภาพที่ดีกว่าใยอาหารหยาบ โดยระดับเอนไซม์เซลลูเลส และไซลาเนสที่เหมาะสมสำหรับใช้ปรับปรุงคุณภาพใยอาหาร คือ 36:12 หน่วย/กรัมของสารตั้งต้น อย่างไรก็ตามใยอาหารดัดแปลงจากกากมันเอทานอลมีผลไม่แตกต่างจากใยอาหารหยาบ โดยภาพรวมการประยุกต์ใช้ใยอาหารดัดแปลงจากกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์น่าจะมีศักยภาพสูงสุดต่อตัวไก่

คำขอบคุณ

การศึกษาครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากโครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก (คปก.) ภายใต้กองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) สัญญาเลขที่ PHD/0054/2556 และทุนอุดหนุนการวิจัย จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) สัญญาเลขที่ SUT3-303-60-36-09

เอกสารอ้างอิง

ศศิธร เจาะจง, ศุภชัย อุดชาชน และ รำไพร นามสีลี. 2556. คุณค่าทางโภชนะ และพลังงานใช้ประโยชน์ได้ของกากมันเอทานอลในโคเนื้อ. รายงานผลงานวิจัยสานักพัฒนาอาหารสัตว์, กรมปศุสัตว์

AAFCO. 2007. Official Publication 2007. Atlanta, Georgia, USA: Association of American Feed Control Officials Inc.

Choct, M. 2009. Managing gut health through nutrition. British. Poult. Sci. 50: 9-15.

Daou, C., and H. H. Zhang. 2013. Optimization of processing parameters for extraction of total, insoluble and soluble dietary fibers of defatted rice bran. J. Food Agric. 25: 562-575.

Donalson, L. M., W. K. Kim, V. I. Chalova, P. Herrera, J. L. McReynolds, V. G. Gotcheva, D. Vidanovic, C. L. Woodward, L. F. Kubena, D. J. Nisbet, and S. C. Ricke. 2008. *In vitro* fermentation response of laying hen cecal bacteria to combinations of fructooligosaccharide prebiotics with alfalfa or a layer ration. Poult. Sci. 87: 1263-1275.

Dunkley, K. D., C. S. Dunkley, N. L. Njongmeta, T. R. Callaway, M. E. Hume, L. F. Kubena, D. J. Nisbet, and S. C. Ricke. 2007. Comparison of *in vitro* fermentation and molecular microbial profiles of high-fiber feed substrates incubated with chicken cecal inocula. Poult. Sci. 86: 801-810.

Gaggìa, F., P. Mattarelli, and B. Biavati. 2010. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. Int. J. Food. Microbiol. 141: 15-28.

Jozefiak, D., A. Rutkowski, and S. A. Martin. 2004. Carbohydrate fermentation in the avian ceca: a review. Anim. Feed. Sci. Tech. 113: 1-15.

Kosugi, A., A. Kondo, M. Ueda, Y. Murata, P. Vaithanomsat, W. Thanapase, T. Arai, and Y. Mori. 2009. Production of ethanol from cassava pulp via fermentation with a surfaceengineered yeast strain displaying glucoamylase. Elsev. 34: 1354-1358.

Lan, Y., B. A. Williams, S. Tamminga, H. Boer, A. Akkermans, G. Erdi, and M. W. A. Verstegen. 2005. *In vitro* fermentation kinetics of some non-digestible carbohydrates by the caecal microbial community of broilers. Anim. Feed Sci. Technol. 123: 687-702.

Meimandipour, A., M. Shuhaimi, M. Hair-Bejo, K. Azhar, B. M. Kabeir, B. Rasti, and A. M. Yazid. 2009. *In vitro* fermentation of broiler cecal content: the role of lactobacilli and pH value on the composition of microbiota and end products fermentation. Lett. Appl. Microbiol. 49: 415-420.

Mookiah, S., C. C. Sieo, K. Ramasamy, N. Abdullah, and Y. W. Ho. 2014. Effects of dietary prebiotics, probiotic and synbiotics on performance, caecal bacterial populations and caecal fermentation concentrations of broiler chickens. J. Sci. Food. Agri. 94: 341-348.

Pourabedin, M., and X. Zhao. 2015. Prebiotics and gut microbiota in chickens. FEMS. Microbiol. Lett. 362: 1-8.

Ravn, J. L., J. C. Thøgersen, J. Eklöf, D. Pettersson, R. Ducatelle, F. Van Immerseel, and N. R. Pedersen. 2017. GH11 xylanase increases prebiotic oligosaccharides from wheat bran favouring butyrate-producing bacteria *in vitro*. Anim. Feed. Sci. Tech. 226: 113-123.

SPSS. 2010. User's Guide. Version 18.0 SPSS Inc., Chicago, IL.

van der Wielen, P. W., S. Biesterveld, S. Notermans, H. Hofstra, B. A. Urlings, and F. van Knapen. 2000. Role of volatile fatty acids in development of the cecal microflora in broiler chickens during growth. Appl. Environ. Microbiol. 66: 2536-2540.

Vermeulen, K., J. Verspreet, C. M. Courtin, F. Haesebrouck, R. Ducatelle, and F. Van Immerseel. 2017. Reduced particle size wheat bran is butyrogenic and lowers Salmonella colonization, when added to poultry feed. Vet. Microbiol. 198: 64-71.

Yacoubi, N., F. Van Immerseel, R. Ducatelle, L. Rhayat, E. Bonnin, and L. Saulnier. 2016. Water-soluble fractions obtained by enzymatic treatment of wheat grains promote short chain fatty acids production by broiler cecal microbiota. Anim. Feed. Sci. Tech. 218: 110-119.

Zdunczyk, Z., J. Jankowski, S. Kaczmarek, and J. Juskiewicz. 2015. Determinants and effects of postileal fermentation in broilers and turkeys part 1: gut microbiota composition and its modulation by feed additives. World Poul. Sci. J. 71: 37-48.

Zhang, H., H. Wang, X. Cao, and J. Wang. 2018. Preparation and modification of high dietary fiber flour: A review. Food. Res. Int. 113: 24-35.