วารสารแก่นเกษตร
THAIJO
Content List Available at ThaiJo
Khon Kaen Agriculture Journal
Journal Home Page : https://li01.tci-thaijo.org/index.php/agkasetkaj

# การปรับปรุงคุณค่าทางโภชนะต้นข้าวโพดแห้งหมักด้วยเชื้อรา *Trichoderma viride* UP15 แบบเหลวที่ผลิตเอนไซม์ย่อยเยื่อใยพืชร่วมกับจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลคติก

# Maize-crop stubble nutrition improvement using fibrolytic fungus *Trichoderma viride* UPLS01 culture and lactic acid bacteria

**ศุภคม คล้ายโตนด[1], เยาวลักษณ์ แหม่งปัง[2], ชัยณรงค์ วงศ์สรรศรี[3], โชค โสรัจกุล[1] รวิสรา รื่นไวย์[1] และ ขรรค์ชัย ดั้นเมฆ[1]***

Supakhom Klaitanoad[1], Yaowalak Mangpung[2], Chainarong Wongsansree[3], Choke Sorachakura[1], Rawisara Ruenwai[1], and Khanchai Danmek[1]*

[1] *คณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา*
[1] *School of Agriculture and Natural Resources, University of Phayao, Phayao, Thailand*
[2] *ศูนย์วิจัยและพัฒนามาตรฐานอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้อง จังหวัดขอนแก่น*
[2] *Ruminants Feeding Standard Research and Development Center, Khon kaen, Thailand*
[3] *ศูนย์วิจัยและพัฒนาอาหารสัตว์เชียงราย*
[3] *Chaing Rai Animal Nutrition Research and Development Center*

**บทคัดย่อ:** การคัดแยกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์ย่อยเยื่อใยพืชจากบริเวณที่ปลูกข้าวโพดพื่อนำมาประยุกต์ใช้เป็นหัวเชื้อหมักเพิ่มโภชนะต้นข้าวโพดแห้งหลังการเก็บเกี่ยวที่ไม่มีเมล็ดสำหรับเป็นอาหารสัตว์ ผลการทดลองพบว่าเชื้อรา *Trichoderma viride* UP15 สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยเยื่อใยพืช (เซลลูเลส และไซแลนเนส) ได้มีประสิทธิภาพสูงสุด การศึกษานี้ทำการปรับสภาวะที่เหมาะสมในการปรับปรุงโภชนะ ดังนี้ คือ ต้นข้าวโพดแห้งที่ความชื้นเริ่มต้น 70 เปอร์เซ็นต์ ค่า pH เริ่มต้น 6.0-7.0 เติมหัวเชื้อจุลินทรีย์ 0.2 เปอร์เซ็นต์ และหมักที่อุณหภูมิห้องซึ่งมีค่าเฉลี่ย 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 21 วัน โดยใช้การทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ซึ่งทำการทดลองโดยมีการเติมหัวเชื้อทั้งสี่แบบดังต่อไปนี้ คือ ไม่เติมจุลินทรีย์เป็นชุดควบคุม (T0) เติมจุลินทรีย์ *Lactobacillus plantarum* (T1) เติมจุลินทรีย์ *Trichoderma viride* UP15 (T2) และเติมจุลินทรีย์ผสมระหว่าง *L. plantarum* ร่วมกับ *T. viride* UP15 ในอัตราส่วน 1:1 (T3) ผลการทดลองพบว่า ต้นข้าวโพดแห้งหมักที่มีการเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์ (T2 และ T3) มีปริมาณโปรตีนสูงขึ้น และมีค่าเยื่อใยต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (T0) ($P<0.05$) การวิเคราะห์กรดไขมันที่ระเหยได้จากต้นข้าวโพดแห้งหมักพบว่า กรดแลคติกมีการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเฉพาะในต้นข้าวโพดแห้งหมักด้วยจุลินทรีย์ผสม T3 ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าการหมักต้นข้าวโพดแห้งด้วยหัวเชื้อแบบเหลวที่ผลิตเอนไซม์ย่อยเยื่อใยพืชและจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลคติกจึงเป็นวิธีการช่วยปรับปรุงคุณภาพและคุณค่าทางโภชนะต้นข้าวโพดแห้งได้
**คำสำคัญ :** ต้นข้าวโพดแห้ง; เอนไซม์ย่อยเยื่อใยพืช; การหมัก; *Trichoderma viride*; จุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลคติก

**ABSTRACT:** Screening of fibrolytic fungi from maize producing areas in Phayao Province for used as microbial inoculum to improve the nutritional values of post-harvest maize plant without grain (MPWG) for ruminant feed. The results showed that *Trichoderma* viride UP15 was able to produce the fibrolytic enzymes (cellulases and xylanase) with the highest efficiency. In this study, the optimal conditions for nutrition improvement were MPWG at initial moisture 70%, initial pH 6.0-7.0 supplemented by 0.2% of microbial inoculums and cultivated at 30°C for a period of 21 days. A completely randomized design (CRD) was conducted in which the following four inoculations were added including non-microbial inoculum (control: T0), *Lactobacillus plantarum* (T1), *Trichoderma viride* UP15 (T2), and mixed inoculum in 1:1 ratio between *L. plantarum* and *T. viride* UP15. (T3) The results showed that ensiled

* Corresponding author: khanchai.da@up.ac.th
Received: date; May 25, 2021 Accepted: date; December 20, 2021 Published: date; April 1, 2022

MPWG with the addition of microorganisms had higher protein content than the control ($p<0.05$). The analysis of volatile fatty acids from MPWG showed that lactic acid was significantly increased in a mixed inoculum of T3. The ensiling of MPWG with culture of fibrolylic fungi and lactic acid producing microorganisms improves their qualities and nutritional values of MPWG.
**Keywords:** post-harvest maize plant without grain; fibrolytic enzyme; ensiling; *Trichoderma viride*; lactic acid bacteria

**บทนำ**

ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศ มีพื้นที่เพาะปลูกทั่วประเทศกว่า 7 ล้านไร่ และมีผลผลิตเมล็ดข้าวโพดกว่า 4.5 ล้านตัน ซึ่งพะเยาเป็นพื้นที่ผลิตข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ที่สำคัญของภาคเหนือมีผลผลิตข้าวโพดกว่า 1.5 แสนตันต่อปีโดยในพื้นที่ราบพื้นที่ที่มีการปลูกข้าวโพดต่อปีมากที่สุดคืออำเภอเมืองพะเยา อำเภอจุล อำเภอภูกามยาว และอำเภอแม่ใจตามลำดับ โดยในอำเภอเมืองพะเยาพื้นที่ที่ปลูกมากที่สุดอยู่ในพื้นที่ตำบลแม่กา และตำบลแม่นาเรือ (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2562) โดยทั่วไปเมื่อเมล็ดข้าวโพดแก่ เกษตรกรจะปล่อยให้ฝักแห้งอยู่กับต้นจึงทำการเก็บฝัก โดยไม่ได้สนใจนำต้นข้าวโพดหลังเก็บเกี่ยวไปใช้ประโยชน์ ทำให้มีต้นข้าวโพดเลี้ยงสัตว์หลังเก็บเกี่ยวแห้งยืนต้นอยู่เป็นจำนวนมาก ซึ่งผลผลิตเฉลี่ยของต้นข้าวโพดแห้งมีประมาณ 2 ตัน/ไร่ (จินดา, 2539) กรมปศุสัตว์ได้ส่งเสริมให้เกษตรกรนำต้นข้าวโพดแห้งมาปรับปรุงคุณภาพเพื่อใช้สำหรับเลี้ยงสัตว์ในหลายวิธี เช่น การใช้ยูเรียผสมกากน้ำตาลราดต้นข้าวโพดแห้ง แล้วใช้เลี้ยงสัตว์ร่วมกับอาหารข้น เป็นต้น ต้นข้าวโพดแห้ง มีวัตถุแห้งเฉลี่ย โปรตีน และเยื่อใย เท่ากับ 90, 2.0 และ 33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (จินดา, 2539; ทิพาพรและคณะ, 2559) อย่างไรก็ตามปริมาณเยื่อใยที่ยังสูง และความน่ากินต่ำทำให้ต้นข้าวโพดแห้งยังไม่เป็นที่นิยมสำหรับเกษตรกรนำมาใช้เลี้ยงสัตว์ ดังนั้นการเพิ่มการย่อยได้ของเยื่อใย เพิ่มความน่ากิน และหาวิธีในการเก็บรักษา จึงเป็นแนวทางที่ควรศึกษาเพื่อเพิ่มคุณค่าทางโภชนะให้กับต้นข้าวโพดแห้ง ซึ่งจะช่วยทำให้เพิ่มการใช้ประโยชน์ของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร และช่วยลดต้นทุนค่าอาหารสัตว์ลงได้

การทำพืชหมักเป็นวิธีการหนึ่งที่จะช่วยรักษาคุณค่าทางโภชนะของวัสดุทางการเกษตรเพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์ โดยเริ่มมีการเผยแพร่ข้อมูลรูปแบบการทำพืชหมักในประเทศไทยโดยสำนักพัฒนาอาหารสัตว์ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2544 จึงได้มีการวิจัยและพัฒนาการหมักพืชอาหารสัตว์ชนิดต่าง ๆ มาจนถึงปัจจุบัน วิธีการหมักที่กรมปศุสัตว์เผยแพร่ และแนะนำแก่เกษตรกร จะใช้วิธีการหมักใส่ภาชนะเก็บไว้ในสภาวะที่ไม่มีอากาศเพื่อกระตุ้นให้จุลินทรีย์กลุ่มที่ผลิตกรดแลคติก (Lactic acid bacteria, LAB) เจริญเติบโต และส่งผลให้พืชหมักมีความเป็นกรดโดยมีค่า pH อยู่ในช่วง 3.0-4.0 (กรมปศุสัตว์, 2547) สภาวะการหมักดังกล่าวนี้จะทำให้สามารถเก็บพืชหมักไว้เป็นอาหารสำหรับสัตว์ได้เป็นเวลานาน โดยไม่เน่าเสีย หรือสูญเสียคุณค่าทางโภชนะ เนื่องจากจุลินทรีย์กลุ่มย่อยสลาย และก่อโรคไม่สามารถเจริญได้ (สีอุดม, 2560; Thana et al., 2019) แต่วิธีนี้มีข้อจำกัด คือ พืชหมักต้องมีความชื้น และสารอาหารเพียงพอสำหรับให้จุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลคติกเจริญเติบโตได้ ดังนั้นพืชที่มีคุณค่าทางโภชนะต่ำ และความชื้นไม่เพียงพอ อย่างเช่นต้นข้าวโพดแห้ง จึงจำเป็นที่จะต้องนำมาปรับเพิ่มความชื้น และใส่สารอาหารเพื่อกระตุ้นการเจริญของจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลคติก เช่น กากน้ำตาล เป็นต้น (จินดา, 2539; ทิพาพรและคณะ, 2559) นอกจากนี้ การเติมจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลคติกยังจะช่วยเร่งกระบวนการหมัก และทำให้เกิดการหมักที่สมบูรณ์ได้ในระยะเวลาที่รวดเร็วขึ้น ดังรายงานการศึกษาของ Nitisinprasert et al., (2001) ที่เติม *Lactobacillus pentosus* (KUB ST 10-1) ลงไปในการทำหญ้าหมักพบว่า สามารถช่วยเร่งปฏิกิริยาการหมักให้เกิดขึ้นได้เร็วยิ่งขึ้น พืชหมักมีโภชนะเพิ่มขึ้นจากการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลคติก อย่างไรก็ตามการใช้จุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลคติกมีข้อจำกัด คือ จุลินทรีย์กลุ่มนี้ส่วนมากไม่มีการผลิตเอนไซม์ย่อยเยื่อใยพืชในกลุ่มเซลลูเลส และไซแลนเนส จึงไม่ได้ช่วยเพิ่มการย่อยได้ของพืชหมัก ต้องใช้คาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำในการเจริญและเพิ่มปริมาณโปรตีนในพืชหมักได้ต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ยีสต์ (ไอยวริญและคณะ, 2563; Kung et al., 2018)

การเพิ่มประสิทธิภาพการหมัก และการย่อยได้ของวัตถุดิบให้ดีขึ้นสามารถทำได้โดยการเติมเอนไซม์ที่ย่อยเยื่อใยพืช เช่น เซลลูเลส และไซแลนเนส โดยเอนไซม์ในกลุ่มนี้จะย่อยเยื่อใยพืช ทำให้ได้ผลผลิตเป็นคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำ (water soluble carbohydrate: WSC) และเป็นน้ำตาล (C5 และ C6) ซึ่งจะเป็นสารอาหารสำคัญของยีสต์ และจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลคติกนำไปใช้ในการเจริญเติบโตในสภาพที่ไม่มีอากาศ และเกิดการหมักทำให้มีการเพิ่มขึ้นของโปรตีนจากเซลล์ของจุลินทรีย์ และการเพิ่มขึ้นของคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำในระหว่างกระบวนการหมัก (Adesogan et al., 2004; Dean et al., 2005) รวมไปถึงการย่อยได้ของพืชหมักที่เพิ่มขึ้นจากการทำงานของเอนไซม์ จึงทำให้สัตว์สามารถใช้ประโยชน์จากพืชหมักได้ดียิ่งขึ้น (Hristov et al., 2000) อย่างไรก็ตาม

การใช้เอนไซม์เสริมโดยตรงในการผลิตพืชหมักจะเป็นการจะทำให้ต้นทุนการผลิตสูงขึ้นเนื่องจากเอนไซม์ทางการค้าที่มีจำหน่ายในเชิงพาณิชย์มีราคาสูง ด้วยเหตุนี้ จึงมีนักวิจัยหลายคนที่สนใจศึกษาการคัดแยกเชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์กลุ่มย่อยเยื่อใยพืชมาใช้ในการหมักพืชอาหารสัตว์ทดแทนการเสริมเอนไซม์ในพืชหมักโดยตรง อาทิ เช่น Newbold, (1997) ใช้เชื้อรา *Aspergillus foetidus* ใส่ลงไปในบ่อหมักพืชอาหารสัตว์เพื่อกระตุ้นการหมักให้มีความสมบูรณ์มากขึ้น ในขณะที่ Morgavi et al. (2000) ใช้เอนไซม์จากเชื้อรา *Trichoderma longibrachiatum* ร่วมกับเอนไซม์จากจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมนของโคนมในการหมักพบว่า สามารถเพิ่มโภชนะ และการย่อยได้ของพืชหมัก และ Thana et al. (2019) เพิ่มประสิทธิภาพการหมักต้นข้าวโพดแห้งด้วยการเติมเชื้อรา *T. viride* ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ผลการทดลองที่ได้พบว่า พืชหมักมีคุณค่าทางโภชนะเพิ่มขึ้นแตกต่างจากพืชที่หมักแบบไม่เติมเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์กลุ่มนี้อย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตาม การเติมเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์ย่อยเยื่อใยพืชเพื่อใช้เพิ่มประสิทธิภาพการหมักพืชอาหารสัตว์มีข้อจำกัด คือ เชื้อรากลุ่มนี้ส่วนมากจะเจริญเติบโตได้ดีในสภาวะที่มีอากาศ อุณหภูมิเฉลี่ย 30-40 องศาเซลเซียส และค่า pH 5-6 ดังนั้น จึงไม่เหมาะกับการนำไปใช้หมักพืชอาหารสัตว์ในสภาวะที่ไม่มีอากาศ ความเป็นกรดสูง และความร้อนสูง ดังนั้น การพัฒนาวิธีการผลิต และใช้ประโยชน์หัวเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถทำงานได้ภายใต้การหมักในสภาวะที่ไม่มีอากาศ จะช่วยแก้ปัญหาและเพิ่มประสิทธิภาพการหมักพืชอาหารสัตว์ได้

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ย่อยเยื่อใยพืชหมักต้นข้าวโพดแห้งร่วมกับจุลินทรีย์ในกลุ่ม LAB ภายใต้สภาวะการหมักแบบไร้อากาศ เพื่อปรับปรุงคุณค่าทางโภชนะของต้นข้าวโพดแห้ง และให้มีค่าการย่อยได้ที่เพิ่มขึ้น โดยเริ่มจากการคัดแยกจุลินทรีย์ที่มีเอนไซม์ย่อยเยื่อใยพืช การผลิตหัวเชื้อแบบเหลว และทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์ การนำไปทดสอบประสิทธิภาพการหมักต้นข้าวโพดแห้ง และทำการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนะที่เกิดขึ้นเพื่อเปรียบเทียบกับการหมักแบบเดิมที่ไม่เติมหัวเชื้อจุลินทรีย์ และการเติมเฉพาะจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลคติก ซึ่งผลที่ได้จะนำไปสู่การประยุกต์ใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ผสม และเอนไซม์ที่จะนำไปใช้หมักพืชอาหารสัตว์เพื่อเพิ่มโภชนะการย่อยได้ และรักษาโภชนะพืชอาหารสัตว์ให้เก็บไว้ได้นานขึ้น แตกต่างจากการหมักแบบเดิมที่ไม่ใส่หัวเชื้อจุลินทรีย์ หรือการใส่จุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลคติกซึ่งเป็นเพียงการหมักที่เน้นการถนอมรักษาโภชนะพืชอาหารสัตว์เพียงอย่างเดียว

## วิธีการศึกษา

### 2.1 การคัดแยกเชื้อรา

สุ่มตัวอย่างดินจากบริเวณที่แปลงปลูกข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ บริเวณบ้านโซ้ ตำบลแม่กา อำเภอเมือง จังหวัดพะเยา พิกัด 19°02'45"N 99°52'37"E ซึ่งเป็นแหล่งเพาะปลูกข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ในช่วงเดือนพฤศจิกายนถึงธันวาคม พ.ศ.2563 โดยเก็บมาเพื่อใช้คัดแยกหาเชื้อราที่มีการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส บนอาหารแข็ง Semi-synthetic medium (SS) (Danmek et al., 2014) ที่มีส่วนประกอบของแหล่งอาหารที่สำคัญ คือ CMC (1.0 %w/v) yeast extract (0.1 %w/v Peptone (0.2 %w/v) $KH_2PO_4$ (0.2 %w/v) $CaCl_2$ (0.01 %w/v) $MgSO_4$ (0.05 %w/v) $MnSO_4.H_2O$ (0.005 %w/v) $FeSO_4.7H_2O$ (0.005 %w/v) $ZnSO_4.7H_2O$ (0.005 %w/v) และ Agar (2.0 %w/v) ทำการแยกเชื้อโดยใช้วิธี Spread plate technique และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 วัน เมื่อเชื้อราเจริญทำการคัดแยกลงในอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) เพื่อแยกให้ได้เชื้อราที่บริสุทธิ์ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาบนอาหารแข็งตามวิธีการของ (Danmek et al., 2014; Klich, 2002; Klich, 2007) โดยศึกษาลักษณะต่าง ๆ เช่น ขนาดของโคโลนี สีของโคโลนี สีของสปอร์ ลักษณะของ condia ขนาดของ sclerotia และสีด้านหลังของโคโลนี เป็นต้น

### 2.2 การผลิตหัวเชื้อแบบเหลวที่มีเอนไซม์ย่อยเยื่อใยพืช

การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสทำได้โดยการนำสารละลายสปอร์ของเชื้อราที่คัดแยกได้ 1.0 มิลลิลิตร ($10^5$ spore/ml) ใส่ลงในอาหารเหลวสูตร SS medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร (Danmek et al., 2014) ที่ใส่แหล่งคาร์บอนเป็นกระดาษกรอง Whatman No.1 (2.0% w/v) ปรับค่า pH 5.5-6.0 บ่ม และเขย่าเชื้อราที่ความเร็ว 80 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปวัดแอคติวิตีเพื่อคัดเลือกหาเชื้อราที่มีการผลิตเอนไซม์ดีที่สุดสำหรับนำไปใช้หมักต้นข้าวโพดแห้ง

**2.3 การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์**

นำหัวเชื้อแบบเหลวที่มีเอนไซม์เซลลูเลสไปทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายโครงสร้างเซลลูโลส โดยการวัดค่าแอคติวิตีของเซลลูเลสด้วยสารละลาย 3,5-Dinitrosalicylic acid (DNS) (Miller, 1959) โดยใส่สารละลายเอนไซม์ที่จะใช้วัดแอคติวิตีปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติมสับเสตรทที่จำเพาะต่อเอนไซม์แต่ละชนิดที่ละลายใน 50 mM sodium citrate buffer pH 5.0 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ดังนี้ คือ เอกโซกลูคาเนส (exoglucanase) ใช้ avicel® 1.0%(w/v) เอนโดกลูคาเนส (endoglucanase) ใช้ carboxy methyl cellulose (CMC) 2.0%(w/v) (Ghose, 1987) เบตากลูโคซิเดส (ß-glucosidase) ใช้ salicin 4 mg/ml (Sternberg et al., 1976) และไซแลนเนส (xylanase) ใช้ xylan 1.0%(w/v) (Ghose and Bisaria, 1987) ตามลำดับ ทั้งหมดถูกนำไปบ่มทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 นาที เพื่อให้เอนไซม์ย่อยสลายสับเสตรทเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ และวัดน้ำตาลที่เกิดขึ้นด้วยการเติมสารละลาย DNS 3.0 มิลลิลิตร ร่วมกับการเร่งปฏิกิริยาโดยการนำไปต้มในน้ำเดือด 10 นาที จากนั้นเติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ กำหนดให้ 1 ยูนิต ของเอนไซม์ หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายสับเสตรทให้เป็นน้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครโมล ภายใน 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ใช้ทดสอบ

**2.4 การหมักต้นข้าวโพดแห้งด้วยเชื้อจุลินทรีย์**

นำต้นข้าวโพดแห้งมาสับให้มีขนาดใกล้เคียงกันด้วยเครื่องมือเชิงกลที่ใช้สำหรับหั่นพืช ปรับความชื้นของ ต้นข้าวโพดแห้งโดยการเติมน้ำสะอาดให้มีความชื้น 70 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นจึงนำมาหมักโดยนำต้นข้าวโพดแห้งที่ปรับความชื้นแล้ว 10 กิโลกรัม มาใส่ในถุงพลาสติกชนิด High Density Polyethylene (HDPE) ขนาดบรรจุ 25 กิโลกรัม ซึ่งจะมีการเติมจุลินทรีย์ที่แตกต่างกันในอัตราส่วน 0.2 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักต้นข้าวโพดแห้ง โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Complete Randomized Design, CRD) ประกอบด้วย 4 สิ่งทดลอง ๆ ละ 4 ซ้ำ ดังต่อไปนี้ คือ สิ่งทดลองที่ 1 ชุดควบคุม (control) ใส่น้ำกลั่นที่ไม่มีจุลินทรีย์ (T0) สิ่งทดลองที่ 2 เติมสารละลายจุลินทรีย์ที่ผลิตแลคติกชนิด *L. plantarum* ($10^6$spore/ml) ปริมาตร 20 ml (T1) สิ่งทดลองที่ 3 เติมหัวเชื้อจุลินทรีย์เหลวที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ปริมาตร 20 มิลลิลิตร (T2) และสิ่งทดลองที่ 4 เติมหัวเชื้อจุลินทรีย์เหลวที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสชนิด *T. viride* UP15 ร่วมกับสารละลายจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลคติกชนิด *L. plantarum* ในอัตราส่วน 1:1 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร (T3) ผสมสารละลายจุลินทรีย์ให้เข้ากันดีกับต้นข้าวโพดแห้งสับ นำไปบรรจุในถุงพลาสติก และไล่อากาศออกแล้วปิดถุงให้สนิท หมักในห้องปิดที่อุณหภูมิห้องซึ่งมีค่าเฉลี่ย 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน ตามแนวทางการหมักพืชอาหารสัตว์กรมปศุสัตว์

**2.5 การศึกษาคุณค่าทางโภชนะของอาหารหมัก**

การตรวจสอบลักษณะทางกายภาพ และคุณค่าทางโภชนะของอาหารหมัก โดยสุ่มตัวอย่างที่ศึกษาเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกนำมาอบให้แห้งจนน้ำหนักคงที่ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เพื่อนำมาศึกษาคุณค่าทางโภชนะต่าง ๆ ตามวิธีของกรมปศุสัตว์ (Department of livestock development, 2004) และการวิเคราะห์ Proximate analysis (AOAC, 2016) ได้แก่ ค่าวัตถุแห้ง (Dry matter; DM) โปรตีน (Crude protein; CP) ไขมัน (Crude fat; EE) เยื่อใย (Crude fiber; CF) เถ้า (Ash) คาร์โบไฮเดรตที่ย่อยได้ง่าย (Nitrogen free extract; NFE) การย่อยได้ของวัตถุแห้ง (*In vitro* dry matter digestibility: IVDMD) และการย่อยได้ของส่วนประกอบของผนังเซลล์ (*In vitro* neutral detergent fiber digestibility; IVNDFD) ด้วยวิธีการของ Ankom Technology ( 2017) ส่วนการวิเคราะห์เยื่อใยใช้วิธี Detergent analysis (Soest et al., 1991) เพื่อวิเคราะห์ผนังเซลล์ (Neutral detergent fiber; NDF) ลิกโนเซลลูโลส (Acid detergent fiber; ADF) และลิกนิน (Acid detergent lignin; ADL) ในขณะที่อาหารหมักส่วนที่สองใส่ในถุงพลาสติกชนิดเย็นรีดอากาศออกให้มากที่สุดจากนั้นแช่น้ำแข็งเพื่อหยุดปฏิกิริยาการหมัก และนำไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดอินทรีย์ ได้แก่ กรดแลคติก กรดอะซิติก กรดบิวทิริก และค่า pH ตามวิธีของ Bal et al. (1998) อ้างโดย สมสุข (2544) ศูนย์วิจัยและพัฒนาอาหารสัตว์นครราชสีมา

**2.6 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ**

การทดลองใช้แผนการทดลงแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely randomized design, CRD) เปรียบเทียบโภชนะของต้นข้าวโพดแห้งก่อนและหลังการหมัก โดยนำค่าเฉลี่ยของผลการทดสอบมาวิเคราะห์ความแปรปรวนโดยใช้ Analysis of variance (ANOVA) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มโดยวิธี Duncan's new multiple rang test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป (SPSS ver.19) (Steel and torrie, 1990)

**ผลการศึกษา**

**3.1 การคัดแยกเชื้อรา**

การคัดแยกเชื้อราจากดินบริเวณแปลงข้าวโพดเลี้ยงสัตว์โดยใช้อาหาร SS medium ที่มีการเติมแหล่งคาร์บอนที่เป็นเซลลูโลส คือ CMC พบเชื้อราที่สามารถเจริญบนอาหารทั้งหมด 39 ไอโซเลท **(Figure 1)** นำเชื้อราที่คัดเลือกมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่า เป็นเชื้อรา *Aspergillus* section *Flavi* ชนิด *A. flavus* 3 ไอโซเลท **Figure 1** (1.1-1.3) และ *A. parasiticus* 1 ไอโซเลท **Figure 1** (1.4) เชื้อรา *Aspergillus* section *Nigri* 7 ไอโซเลท **Figure 1** (1.5-1.11) เชื้อรา *Aspergillus* section *Terrei* ชนิด *A. terreus* 1 ไอโซเลท **Figure 1** (1.12) และ *A. melleus* 1 ไอโซเลท **Figure 1** (1.13) เชื้อรา *Trichoderma* spp. 6 ไอโซเลท **Figure 1** (1.14-1.19) เชื้อรา *Fusarium* spp. 6 ไอโซเลท **Figure 1** (1.20-1.27) เชื้อรา *Neurospora* spp. 2 ไอโซเลท **Figure 1** (1.28-1.29) เชื้อรา *Penicillium* spp. 5 ไอโซเลท **Figure 1** (1.30-1.34) เชื้อรา *Rhizopus* spp. 4 ไอโซเลท **Figure 1** (1.35-1.38) และเชื้อรา *Chaetomium* spp. 1 ไอโซเลท **Figure 1** (1.39) โดยเชื้อราในกลุ่ม (Genus) ที่พบมากที่สุด คือ *Aspergillus* spp. เฉลี่ย 33.33 % รองลงมา คือ *Fusarium* spp. เฉลี่ย 20.51 % *Trichoderma* spp. เฉลี่ย 15.38 เปอร์เซ็นต์ *Penicillium* spp. เฉลี่ย 12.82 เปอร์เซ็นต์ *Rhizopus* spp. เฉลี่ย 10.25 เปอร์เซ็นต์ *Neurospore* spp. เฉลี่ย 5.12 เปอร์เซ็นต์ และ *Chaetomium* spp. เฉลี่ย 2.56 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ **(Table 1)**

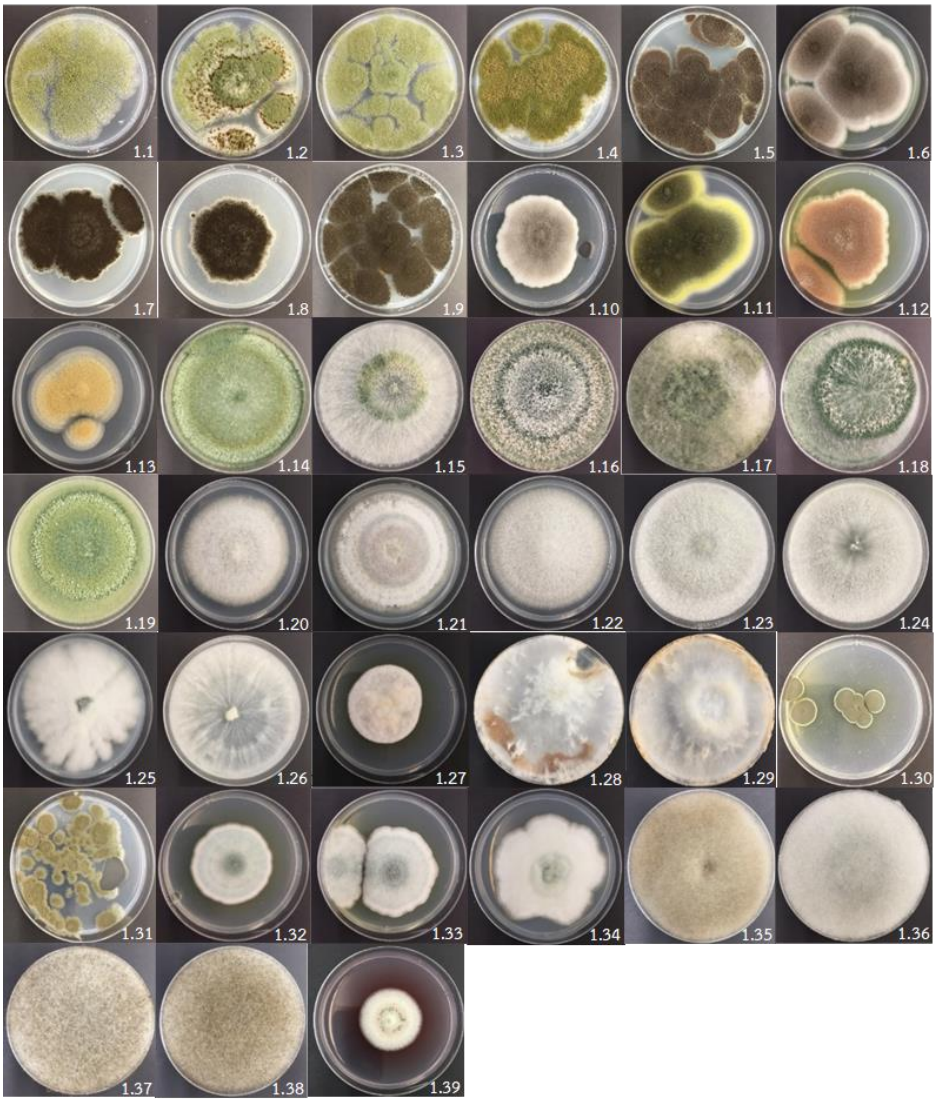



**Figure 1** Isolated fungi from maize field in Phayao province on SS medium at 30$^{O}$C for 7 days

**Table 1** Occurrence (%) of isolated fungi from maize field in Phayao province

| Fungi | Occurrence (%) |
|---|---|
| *Aspergillus* spp. | 33.33 |
| *Fusarium* spp. | 20.51 |
| *Trichoderma* spp. | 15.38 |
| *Penicillium* spp. | 12.82 |
| *Rhizopus* spp. | 10.25 |
| *Neurospora* spp. | 5.12 |
| *Chaetomium* spp. | 2.56 |

**3.2 การผลิตหัวเชื้อแบบเหลวที่มีเอนไซม์ย่อยเยื่อใยพืช**

เชื้อรา *Trichoderma* spp. ซึ่งเป็นเชื้อราที่มีจุดเด่นในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ไซแลนเนส และไม่เป็นเชื้อราที่ก่อโรคจำนวน 6 สายพันธุ์ (**Figure** 1.14-1.19) ที่เจริญได้ดี และมีขนาดโคโลนีมากกว่า 6 เซนติเมตร บนอาหารแข็ง SS medium เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน ได้ถูกนำมาทดสอบประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ในอาหารเหลวสูตร SS medium พบว่าเชื้อราส่วนมากมีการผลิตเอนไซม์ทั้งเซลลูเลส และไซแลนเนส โดยเชื้อรา *Trichoderma* spp. UP15 **Figure 1** (1.15) มีค่าแอคติวิตีของเอนไซม์สูงที่สุด ดังนี้ คือ เซลลูเลสรวม เอกโซกลูคาเนส เอนโดกลูคาเนส เบตากลูโคซิเดส และไซแลนเนส เท่ากับ 0.072±0.012 0.069±0.001 0.077±0.014 0.065±0.011 และ 0.202±0.028 U/ml ตามลำดับ (**Figure 2**) เมื่อทำการศึกษาลักษณะสัณฐานทางวิทยาของเชื้อรา *Trichoderma* spp. UP15 พบว่า เส้นใยสีขาว สปอร์เขียว เป็นเชื้อราที่เส้นใยมีผนังกั้น (septate hypha) เส้นใยแตกกิ่งก้านสาขาออกหลายแขนง มีก้านชูสปอร์ (conidiophores) บริเวณตรงปลายแบ่งเป็นสามแฉก หรือสามง่าม มีการสร้างสปอร์ (conidia) รูปร่างกลม สีเขียว ซึ่งเป็นลักษณะเด่นของเชื้อรา *T. viride* UP15 **(Figure 3)**

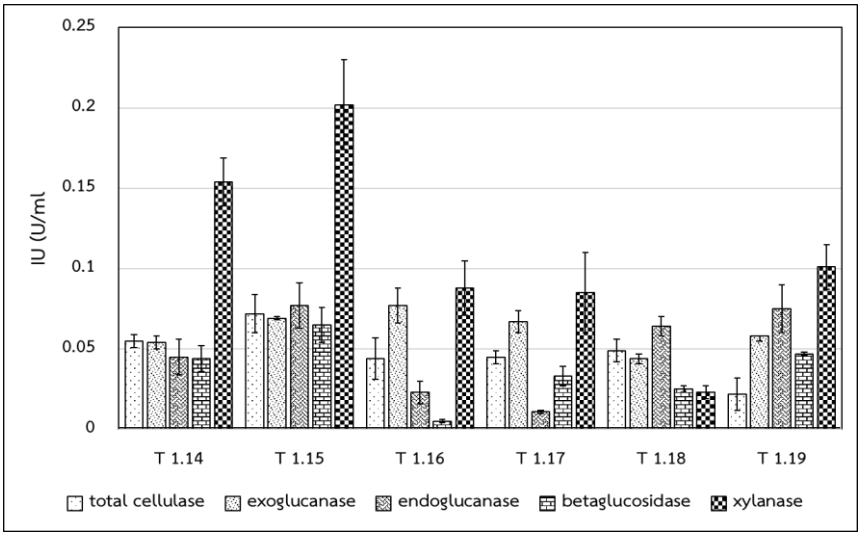
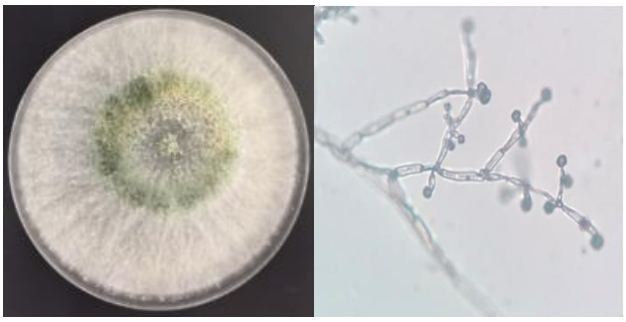



**Figure 2** Cellulase and xylanase activities (IU) derived from *Trichoderma* spp. T14-T19



(a) (b)

**Figure 3** *Trichoderma vride* UPLS15 on SS medium at 30$^{O}$C for 7 days (a) and under microscope at 40X (b)

**3.3 การหมักต้นข้าวโพดแห้งด้วยเชื้อจุลินทรีย์**

การวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนะของพืชหมัก (T1 T2 และ T3) ด้วยวิธีการ proximate analysis เทียบกับต้นข้าวโพดแห้งที่ ไม่ผ่านการหมัก (T0) แสดงใน **Table 2** พบว่า ปริมาณวัตถุแห้ง ไขมัน และเถ้าของทุกสิ่งทดลองที่มีการเติมจุลินทรีย์ (T1 T2 และ T3) ให้ผลการทดลองไม่แตกต่าง (P≥0.05) กับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมจุลินทรีย์ (T0) แต่ต้นข้าวโพดแห้งหมักที่มีการเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์ *T. viride* UP15 แบบเหลวที่มีเอนไซม์เซลลูเลส (T2) มีค่า NDF ADF และ ADL เท่ากับ 72.18 40.46 และ 6.98 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) แสดงว่าเส้นใยของพืชหมักถูกย่อยด้วยจุลินทรีย์ และเอนไซม์สอดคล้องกับสิ่งทดลองที่มีการเติมหัวเชื้อ *T. viride* UP15 แบบเหลวที่มีเอนไซม์ย่อยเยื่อใยพืชร่วมกับจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลคติก *L. plantarum* (T3) ซึ่งทำให้ต้นข้าวโพดแห้งหมักมีค่า NDF ADF และ ADL เท่ากับ 72.73 38.15 และ 6.76 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ อีกทั้งยังมีแนวโน้มของค่าเยื่อใยทุกชนิดต่ำที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสิ่งทดลอง T1 และ T2 และมีค่าแตกต่าง (P<0.05) อย่างมีนัยสำคัญกับชุดควบคุม (T0) อย่างไรก็ตาม ค่าการย่อยได้ของวัตถุแห้ง (IVDMD) ในทุกสิ่งทดลองที่เติมหัวเชื้อจุลินทรีย์ (T1 T2 และ T3) มีค่าไม่แตกต่างกันกับชุดควบคุม (T0) แต่ค่าการย่อยได้ของส่วนประกอบของผนังเซลล์ (IVNDFD) ในต้นข้าวโพดแห้งหมักที่มีการเติมหัวเชื้อผสม (T3) มีค่าการย่อยได้เพิ่มขึ้นแตกต่าง (P<0.05) อย่างมีนัยสำคัญกับต้นข้าวโพดแห้งหมักชุดควบคุม (T0) ในขณะที่ค่าโปรตีนมีแนวโน้มสูงขึ้นในต้นข้าวโพดแห้งหมัก ที่เติมจุลินทรีย์ในทุกสิ่งทดลอง (T1 T2 และ T3) โดยต้นข้าวโพดแห้งหมักที่เติมหัวเชื้อจุลินทรีย์ *T. viride* UP15 อย่างเดียว (T2) และ ที่เติมแบบผสม (T3) พบว่า มีค่าโปรตีนเพิ่มขึ้น เท่ากับ 6.34 และ 6.46 เปอร์เซ็นต์

การวิเคราะห์กรดไขมันที่ระเหยง่ายชนิดกรดบิวทีริกที่มีในต้นข้าวโพดแห้งหมักที่มีการเติมหัวเชื้อผสม (T3) มีค่าต่ำกว่าการทดลองอื่น ๆ (P<0.05) แต่มีกรดไขมันที่ระเหยได้ชนิดกรดแลคติกมีปริมาณสูงที่สุด คือ 1.52 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ค่า pH ต้นข้าวโพดแห้งก่อนหมักเท่ากับ 6.57 ลดลงเป็น 4.84 แตกต่างจากชุดควบคุม (T0) รวมไปถึงการทดลองอื่น ๆ (P<0.05) ซึ่งเป็นผลมาจากปริมาณกรดแลคติก (pKa 3.86) และกรดอะซีติก (pKa 4.75) ที่เกิดขึ้นอันเป็นผลมาจากเชื้อรา *T. viride* UP15 และเอนไซม์เซลลูเลสย่อยโครงสร้างของต้นข้าวโพดแห้งได้เป็นคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำเป็นอาหารแก่จุลินทรีย์ในธรรมชาติซึ่งติดมากับต้นข้าวโพดแห้งซึ่งเป็นได้ทั้งจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลคติกชนิดเดียว (homofermentative lactic acid bacteria) และจุลินทรีย์ที่ผลิตทั้งกรดแลคติก และอะซีติก (heterofermentative lactic acid bacteria)

**Table 2** Chemical compositions of maize plant ensiled with microbial inoculums at 30°C for 21 days

| Composition (%)[1/] | Inoculum Treatments[2/] | | | |
|---|---|---|---|---|
| | T0 | T1 | T2 | T3 |
| Dry matter (DM) % | 75.06±4.69[a] | 76.22±3.66[a] | 73.78±1.68[a] | 74.85±5.72[a] |
| CP % | 5.22±0.23[b] | 5.86±0.42[ab] | 6.34±0.38[a] | 6.46±0.21[a] |
| EE % | 0.97±0.25[a] | 1.01±0.10[a] | 0.85±0.11[a] | 0.91±0.09[a] |
| CF % | 39.87±2.32[a] | 40.57±0.72[a] | 40.69±2.15[a] | 40.22±1.15[a] |
| Ash % | 9.25±0.33[a] | 8.95±0.70[a] | 9.15±0.58[a] | 9.06±0.55[a] |
| NDF % | 74.5±0.73[a] | 74.04±0.90[ab] | 72.18±0.98[b] | 72.73±0.86[b] |
| ADF % | 42.38±1.05[a] | 41.84±0.77[ab] | 40.46±0.66[b] | 38.15±0.86[c] |
| ADL % | 7.51±0.23[a] | 6.96±0.40[b] | 6.98±0.30[b] | 6.76±0.35[b] |
| IVNDFD % | 37.02±0.65[b] | 38.63±0.81[ab] | 38.58±1.10[ab] | 39.59±1.45[a] |
| IVDMD % | 54.55±0.99[a] | 54.68±1.08[a] | 54.75±1.37[a] | 55.55±0.55[a] |
| pH | 5.36±0.11[a] | 5.30±0.11[a] | 5.30±0.12[a] | 4.84±0.13[b] |
| Lactic acid | 0.94±0.23[b] | 1.18±0.15[b] | 0.93±0.11[b] | 1.52±0.09[a] |
| Acetic acid | 1.52±0.10[b] | 1.84±0.20[ab] | 1.98±0.10[a] | 1.64±0.08[b] |
| Butyric acid | 0.96±0.14[b] | 1.26±0.06[a] | 1.43±0.22[a] | 0.88±0.04[b] |
| Yeast/Mold (log10 CFU/g silage) | 3.44±0.35[b] | 3.90±0.42[ab] | 4.60±0.20[a] | 4.22±0.63[ab] |
| Bacteria (log10 CFU/g silage) | 3.64±0.21[b] | 4.29±0.21[a] | 4.18±0.08[a] | 4.33±0.30[a] |

[1/]DM = dry matter; CP = crude protein; EE = crude fat; CF = crude fiber; ash; NDF = neutral detergent fiber; ADF = acid detergent fiber; ADL = acid detergent lignin; IVNDFD = In vitro neutral detergent fiber digestibility; IVDMD = In vitro dry matter digestibility

[2/]T0 = control; T1 = culture of *L. Plantarum*; T2 = culture of *T. viride* UP15; T3 = culture of *L. plantarum* and *T. viride* UP15. (1:1)

**วิจารณ์**

การคัดแยกเชื้อราในดินจากแปลงข้าวโพดเลี้ยงสัตว์พบเชื้อราที่สามารถเจริญบนอาหารที่มีเซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอนทั้งหมด 39 ไอโซเลท การจำแนกโดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น ขนาดของโคโลนี สีของโคโลนี สีของสปอร์ ลักษณะของ condia ขนาดของ sclerotia และสีด้านหลังของโคโลนี ตามวิธีการของ (กวินทรา และคณะ, 2558; Danmek et al., 2014; Klich, 2002; Klich, 2007) ทำให้สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม ดังนี้ คือ กลุ่มแรกเป็นเชื้อราที่เส้นใยไม่มีผนังกั้น สีขาว ฟูกระจายแบบโปร่งมีก้านชูสปอร์ซึ่งมีสปอร์สีน้ำตาลจนถึงดำจำแนกเป็น *Rhizopus* spp. ในขณะที่ชนิดอื่น ๆ ที่แยกได้เป็นเชื้อราในกลุ่มที่เส้นใยมีผนังกั้น ซึ่งอันดับสูงกว่า ได้แก่ เชื้อราในกลุ่ม *Aspergillus* spp. จะมีสปอร์เป็นทรงกลมอัดกันแน่นเป็นรูปแท่งบนก้านชูสปอร์ (conidiophore) ที่มีการขยายออก และมีสปอร์เรียงกันอยู่ซึ่งเชื้อรา *Aspergillus* spp. ที่มีสปอร์สีเขียวจะถูกจัดอยู่ในกลุ่ม *Aspergillus* section *Flavi* (กวินทราและคณะ, 2558) สปอร์มีสีดำอยู่ในกลุ่ม *Aspergillus* section *Nigri* และสปอร์มีสีน้ำตาลอยู่ในกลุ่ม *Aspergillus* section *Terrei* (Danmek et al., 2014) เป็นต้น เชื้อรา *Trichoderma* spp. และ *Penicillium* spp. มีสปอร์เหลืองจนถึงสีเขียวคล้ายเชื้อรา *Aspergillus* section *Flavi* แต่มีความแตกต่างกัน คือ *Trichoderma* spp. มีก้านชูสปอร์ที่บริเวณตรงปลายยอดจะแตกแขนงเป็นสามแฉก หรือสามง่าม และมีสปอร์รูปร่างกลมติดอยู่ที่ปลายก้านชูสปอร์ ในขณะที่ *Penicillium* spp. มีลักษณะเด่นของโคโลนี คือ โคโลนีสีเขียวจนถึงเขียวอมเทา ปลายขอบโคโลนีจะมีขอบสีขาว และบางชนิดจะสร้างเม็ดสีที่ใต้โคโลนีซึ่งส่วนมากเป็นสีเหลืองจนถึงแดง ที่ก้านชูสปอร์ไม่มีการขยายเหมือน *Aspergillus* spp. แต่จะมีการสร้าง Phialide ปลายแหลมคล้ายเข็มหลายอันที่ด้านปลาย มีสปอร์เรียงกันอยู่เป็นเส้นในขณะที่เชื้อรา *Fusarium* spp. และ *Neurospora* spp. จะมีลักษณะคล้ายกัน คือ เส้นใยสีขาวฟู และสปอร์สีส้มแดงแต่มี

ความแตกต่างกัน คือ *Fusarium* spp. จะมีสปอร์เป็นรูปจันทร์เสี้ยว ในขณะที่ *Neurospora* spp. สปอร์เป็นรูปไข่เรียงเป็นเส้นที่ปลายเส้นใย (Barnet and Hunter, 2006) โดยเชื้อราที่พบสูงสุด คือ เชื้อราในกลุ่ม *Aspergillus* spp. และ *Fusarium* spp. ซึ่งเป็นชนิดที่พบได้ในแปลงเกษตรกรรมทั่วไปแต่จะมีความถี่สูงในแปลงข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ (กวินทรา และคณะ, 2558) ในขณะที่เชื้อรา *Trichoderma* spp. เป็นเชื้อราที่มีความสำคัญในกระบวนการย่อยสลายซากพืชเนื่องจากมีเอนไซม์ย่อยเยื่อใยพืชจึงสามารถพบได้ทั่วไปจากแหล่งธรรมชาติบนวัตถุดิบที่มีลิกโนเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบ (พิมพ์ชนา และคณะ, 2559; Thana et al., 2019) การศึกษาประสิทธิภาพของการผลิตเอนไซม์ย่อยเยื่อใยพืชจากเชื้อราทั้งหมดที่คัดแยกได้พบว่า เชื้อรา *T. viride* UP15 มีการผลิตทั้งเซลลูเลส และไซแลนเนส และให้ค่า แอคติวีตีของเอนไซม์สูงที่สุดแตกต่าง จากเชื้อรา *Trichoderma* spp. ชนิดอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) (**Figure 2**) เมื่อตรวจสอบในเอกสารรายงานวิจัยพบว่า เชื้อราชนิดนี้พบได้ในพืชอาหารสัตว์ และสามารถนำไปใช้หมักต้นข้าวโพดเพื่อให้มีโภชนะสูงขึ้นได้ (Thana et al., 2019)

การวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนะของพืชหมักด้วยเชื้อรา *T. viride* UP15 แบบเหลวที่ผลิตเอนไซม์ย่อยเยื่อใยพืชร่วมกับจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลคติกเปรียบเทียบกับต้นข้าวโพดแห้งที่หมักแบบไม่เติมจุลินทรีย์พบว่า ปริมาณวัตถุแห้ง ไขมัน และเถ้าของต้นข้าวโพดแห้งหมักที่มีการเติมจุลินทรีย์ (T1 T2 และ T3) ให้ผลการทดลองไม่แตกต่างจากชุดควบคุม (T0) แต่จะมีแนวโน้มของค่า NDF ADF และ ADL ลดลง แสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์และเอนไซม์ที่ใส่ลงไปมีส่วนช่วยย่อยสลายโครงสร้างของพืชได้คาร์โบไฮเดรตละลายน้ำออกมาเป็นอาหารให้จุลินทรีย์ที่ติดมากับพืชหมักโดยเฉพาะยีสต์ และจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลคติกเจริญเติบโตมากขึ้น ส่งผลให้มีเกิดการหมักจึงส่งผลให้ต้นข้าวโพดแห้งหมักที่เติมจุลินทรีย์มีเยื่อใยพืชลดลงลง และมีโภชนะเพิ่มขึ้นจากโปรตีนเซลล์ของจุลินทรีย์มากกว่าข้าวโพดแห้งหมักที่ไม่ใส่จุลินทรีย์สอดคล้องกับงานวิจัยของ Thana et al. (2019) ซึ่งมีการใช้จุลินทรีย์ที่มีการผลิตเอนไซม์ย่อยเยื่อใยพืชปรับโภชนะพืชอาหารสัตว์ แต่มีความแตกต่างกัน คือ งานวิจัยนี้เป็นการพัฒนาหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่มีเอนไซม์ย่อยเยื่อใยพืชร่วมกับจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลคติกเพื่อใช้หมักพืชอาหารสัตว์ ซึ่งผลที่ได้พบว่า การใช้จุลินทรีย์ผสม (T3) ทำให้พืชหมักมีโภชนะ และปริมาณกรดอินทรีย์ที่มีประโยชน์ชนิดกรดแลคติกสูงมากกว่าการหมักแบบเดิมที่ไม่เติมจุลินทรีย์ หรือใส่เฉพาะจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลคติก (T1) และจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (T2)

การวิเคราะห์กรดไขมันที่ระเหยง่ายชนิดกรดบิวทีริกที่เกิดขึ้นในต้นข้าวโพดแห้งหมักที่ใส่หัวเชื้อจุลินทรีย์ผสม (T3) มีค่าต่ำกว่าต้นข้าวโพดแห้งชุดควบคุม และมีค่า pH ลดลงเท่ากับ 4.85 เนื่องมาจากมีจุลินทรีย์และเอนไซม์ช่วยย่อยเยื่อใยพืชได้คาร์โบไฮเดรตละลายน้ำออกมาเป็นอาหารให้จุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลคติกเจริญเติบโตมากขึ้นทำให้มี pH ที่ลดต่ำลง (Hou et al., 2017) ซึ่งเป็นสภาวะเหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ และการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสที่ทำงานได้ดีในช่วง pH 4.0-6.0 จึงทำให้โปรตีนและการย่อยได้ของต้นข้าวโพดแห้งหมักเพิ่มขึ้น (Thana et al., 2019) อีกทั้งเป็นสภาวะที่ทำให้จุลินทรีย์ก่อโรค และจุลินทรีย์กลุ่มย่อยสลายพืชหมักที่ส่วนมากเป็นแบคทีเรียซึ่งเจริญได้ดีที่ pH 7.0 ไม่เจริญ (Muck and Kung, 1997; Tao et al., 2011) แตกต่างจากการหมักพืชอาหารสัตว์แบบเดิมที่เป็นการหมักถนอมอาหารพืชหมักไม่ให้เน่าเสียที่มุ่งเน้นการเจริญของจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลคติก และให้ค่า pH ของพืชต่ำลดต่ำกว่า 4.20 (Kung et al., 2018)

ดังนั้นจึงถือว่ากระบวนการนี้นอกจากช่วยเพิ่มโภชนะของต้นข้าวโพดแห้งหมักแล้วยังเป็นการถนอมอาหารหมักให้เก็บได้นานขึ้นโดยไม่เสียจากการที่มีจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์อยู่ในพืชหมัก (ชัยวัฒน์ และคณะ, 2562; ไอยวริญ และคณะ, 2563) เพราะ ในธรรมชาติแบคทีเรียกลุ่มย่อยสลายโดยเฉพาะ *Clostridium* spp. ที่ปนเปื้อนมากับต้นข้าวโพดแห้งหมักสามารถใช้สารอาหารจากกระบวนการหมักในการเจริญ และผลิตเป็นกรดบิวทีริกออกมาได้ (Khota et al., 2018) ต้นทุนการผลิตต้นข้าวโพดแห้งหมักที่มีการเติมจุลินทรีย์ (T1 T2 และ T3) มีค่าเฉลี่ยไม่เกิน 150 บาทต่อลิตร ซึ่งมีราคาต่ำกว่าเอนไซม์ทางการค้าทั่วไปที่มีราคาเฉลี่ยมากกว่า 500 บาทต่อลิตร เมื่อนำหัวเชื้อ และเอนไซม์ที่ผลิตเองใช้หมักในอัตราส่วน 0.2 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักต้นข้าวโพดแห้ง จะมีต้นทุนเพิ่มขึ้นเท่ากับ 0.30 บาทต่อการหมักต้นข้าวโพดแห้ง 1 กิโลกรัม ต้นทุนเท่ากับการหมักพืชอาหารสัตว์โดยใช้กากน้ำตาล 2.0 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักพืช ซึ่งจะมีต้นทุนหญ้าหมักเพิ่มขึ้นเท่ากับ 0.30 บาท/กิโลกรัม และต่ำกว่าการใช้น้ำตาลกลูโคส 2.0 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักพืช ซึ่งจะมีต้นทุนหญ้าหมักเพิ่มขึ้น 1.0 บาท/กิโลกรัม ตามลำดับ (ทิพาพร และคณะ, 2559) แต่มีการย่อยได้ของวัตถุดิบเพิ่มขึ้นอันเนื่องมาจากการทำงานของเอนไซม์ซึ่งแตกต่างจากการหมักถนอมพืชอาหารสัตว์แบบเดิม (กรมปศุสัตว์, 2547) อย่างไรก็ตามผลการหมักต้นข้าวโพดแห้งด้วยหัว

เชื้อจุลินทรีย์ผสมยังให้ค่าโปรตีนเพิ่มขึ้นค่อนข้างต่ำอาจเป็นเพราะความเข้มข้นของจุลินทรีย์ และเอนไซม์ไม่เหมาะสม โดย Thana et al. (2019) ได้อธิบายว่าปริมาณ และชนิดของหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ย่อยเยื่อใยพืชมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดปริมาณโปรตีนที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมักพืชอาหารสัตว์ทั้งในด้านปริมาณ และคุณภาพ ดังนั้นวิธีดังกล่าวนี้จึงถือได้ว่าเป็นการพัฒนารูปแบบการหมักที่มีการใส่หัวเชื้อจุลินทรีย์ผสม *T. viride* UP15 แบบเหลวพร้อมใช้ที่มีเอนไซม์ย่อยเยื่อใยพืช (เซลลูเลส และ ไซแลนเนส) ร่วมกับจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลคติกเพื่อนำไปใช้เพิ่มประสิทธิภาพการหมักพืชอาหารสัตว์ให้ดีขึ้นกว่าการหมักพืชอาหารสัตว์แบบดั้งเดิมที่ไม่ใส่หัวเชื้อจุลินทรีย์ และการใช้จุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลคติก (กรมปศุสัตว์, 2547) การใช้เอนไซม์ทางการค้าซึ่งมีต้นทุนสูง และการใส่เฉพาะจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ย่อยเยื่อใยพืช (Thana et al., 2019)

**สรุป**

การคัดแยกเชื้อราจากแปลงข้าวโพดเลี้ยงสัตว์สามารถแยกเชื้อราได้ทั้งหมด 39 ไอโซเลท ซึ่งเชื้อรา *T. viride* UP15 มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์ย่อยเยื่อใยพืชสูงสุด เมื่อนำ *T. viride* UP15 มาผลิตเป็นหัวเชื้อแบบเหลวที่มีเอนไซม์ร่วมกับจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลคติกเพื่อใช้หมักต้นข้าวโพดแห้งเลี้ยงสัตว์พบว่า สามารถช่วยเพิ่มโภชนะโดยเฉพาะโปรตีน การย่อยได้ และกรดอินทรีย์ที่มีประโยชน์โดยเฉพาะกรดแลคติก ผลที่ได้นี้จะนำไปสู่การพัฒนาหัวเชื้อหมักพืชอาหารสัตว์ซึ่งเป็นจุลินทรีย์กรดแลคติกผสมเอนไซม์ย่อยเยื่อใยพืชสำหรับใช้ในการหมักเพิ่มโภชนะของพืชอาหารสัตว์ และผลผลิตทางการเกษตรอื่น ๆ สำหรับผลิตเป็นอาหารสัตว์คุณภาพสูงได้

**คำขอบคุณ**

งานวิจัยนี้ดำเนินการอย่างสมบูรณ์ได้ด้วยความร่วมมือทางวิชาการระหว่างมหาวิทยาลัยพะเยา และสำนักพัฒนา อาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์ และทุนสนับสนุนจากโครงการการจัดการความรู้การวิจัยเพื่อการใช้ประโยชน์ในมิติเชิงชุมชน สังคม ตามแนวพระราชดำริ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ปีงบประมาณ พ.ศ.2564

**เอกสารอ้างอิง**

กรมปศุสัตว์. 2547. มาตรฐานพืชอาหารสัตว์หมัก. กองอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด. กรุงเทพฯ.

กวินทรา แข่งขัน, ทศวรรต อะโนราช, พยุงศักดิ์ อินต๊ะวิชา, สมชาติ ธนะ, โชค โสรัจกุล และขรรค์ชัย ดั้นเมฆ. 2558. การยับยั้งอะฟลาทอกซิน บี 1 โดยการใช้สายพันธุ์ไม่ผลิตสารพิษของเชื้อรา *Aspergillus flavus*. วารสารเกษตร. 31(1): 47–57.

จินดา สนิทวงศ์ ณ อยุธยา. 2539. ข้าวโพดและเศษเหลือจากข้าวโพดเป็นอาหารสัตว์. รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2539. กองอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์. กรุงเทพฯ.

ชัยวัฒน์ สิงห์ชัย, ชัยณรงค์ วงค์สรรศรี, สมชาติ ธนะ, โชค โสรัจกุล และขรรค์ชัย ดั้นเมฆ. 2562. ผลของการใช้ฟักทองหมักร่วมกับรำข้าวในอาหารต่อประสิทธิภาพการผลิตและคุณภาพของเนื้อไก่พื้นเมือง. วารสารวิจัยและส่งเสริมวิชาการเกษตร. 36(2): 45-57.

ทิพาพร ชาญปรีชา, พรพรรณ แสนภูมิ, จันทร์จิรา สิทธิยะ และสุภาวดี ฉิมทอง. 2559. ผลของชนิดหญ้าต่อคุณภาพน้ำหมัก. แก่นเกษตร ฉบับพิเศษ. 44(1): 19-24.

พิมพ์ชนา วงศ์พิศาล, พรศิลป์ สีเผือก, ชัยสิทธิ์ ปรีชา และวุฒิชัย สีเผือก. 2559. การคัดเลือกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนส จากซากใบปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis* Jacq.). แก่นเกษตรฉบับพิเศษ. 44(1): 948-952.

สมสุข พวงดี. 2544. การผลิตหญ้ารูซี่หมักคุณภาพสูง: การประเมินคุณค่าโภชนะและความต้องการ พลังงานและโปรตีนของโครีดนมลูกผสมขาวดำ. วิทยานิพนธ์ ปริญญาวิทยาศาสตร มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. เชียงใหม่.

สีอุดม ลั่งสุมีไชย, ไกรสิทธิ วสุเพ็ญ, เฉลิมพล เยื้องกลาง, เบญญา แสนมหายักษ์ และเสมอใจ บุรีนอก. 2560. ผลของการเสริมเอนไซม์ไซแลนเนสและเซลลูเลสจากกากมะเขือเทศแห้งที่ หมักโดย *Aspergillus niger* ที่ระดับต่างๆต่อคุณภาพการหมักและคุณค่าทาง

โภชนะของหญ้าเนเปียร์ปากช่อง 1 หมัก. แก่นเกษตรฉบับพิเศษ. 45(1): 729-734.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2564. ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์. แหล่งข้อมูล : http://www.oae.go.th/assets /portals/1/fileups/prcaidata/files/maize%20province%2062.pdf. ค้นเมื่อ 21 มกราคม 2564.

ไอยวริญ ใจคำ, ชัยณรงค์ วงค์สรรศรี, โชค โสรัจกุล และขรรค์ชัย ดั้นเมฆ. 2563. การประยุกต์ใช้ เชื้อรา *Aspergillus terreus* C411 ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสหมักเพิ่มโภชนะของฟักทองเพื่อใช้เป็นอาหารไก่กระดูกดำปาปาซุง. น. 404-413. ใน: ประชุมวิชาการและนวัตกรรมสร้างสรรค์ CRCI ครั้งที่ 6 2-3 กันยายน 2563. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา, เชียงใหม่.

Adesogan, A.T., N. Krueger, M. B. Salawu, D. B. Dean, and C.R. Staples. 2004. The influence of treatment with dual purpose bacterial inoculants or soluble carbohydrates on the fermentation and aerobic stability of Bermuda grass. Journal of Dairy Science. 87: 3407-3416.

ANKOM Technology. 2017. In vitro True Digestibility using the DAISY II Incubator. Available source: https://www.ankom.com/sites/default/files/documentfiles/Method_3_Invitro_D200_D200I.pdf. Accessed May 10, 2019.

AOAC. 2016. Official Methods of Analysis of AOAC International 20th ed. Maryland.

Bal, M.A., J.R. Coors., and Shaver R.D. 1997. Impact of the maturity of corn for use as silage in the diets of dairy cow on intake, digestion and milk production. Journal of Dairy Science. 80: 2497-2503.

Barnet, H.L., and Hunter, B.B. 2006. Illustrated genera of imperfect fungi. 4th ed. The American Phytopathological Society. Minnesota, USA.

Danmek, K., P. Intawicha, S. Thana, C. Sorachakula, M. Meijer, and R.A. Samson. 2014. Characterization of cellulase producing from *Aspergillus melleus* by solid state fermentation using maize crop residues. African journal of Microbiology Research. 8(24): 2397-2404.

Dean, D.B., A.T. Adesogan, N.K. Krueger, and R.C. Littell. 2005. Effect of fibrolytic enzymes on the fermentation characteristics aerobic stability and digestibility of bermudagrass silage. Journal of Dairy Science. 88: 994-103.

Department of Livestock Development. 2004. Table of Nutritive Values Database of Feed Stuffs. The guidance document. Department of Livestock, Ministry of Agriculture and Cooperatives. Bangkok.

Ghose, T.K. 1987. Measurement of cellulase activities. Pure and Applied Chemistry. 59: 257-268.

Ghose, T.K., and V.S. Bisaria. 1987. Measurement of hemicellulose activities Part 1: Xylanase. Pure and Applied Chemistry. 59(2): 1739-1752.

Hou, M., G. Gentu, T. Liu, Y. Jia, Y. Cai. 2017. Silage preparation and fermentation quality of natural grasses treated with lactic acid bacteria and cellulase in meadow steppe and typical steppe. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences. 30(6): 788-796.

Hristov, A.N., T.A. Mc Allister, and K.J. Cheng. 2000. Intra ruminal supplementation with increasing levels of exogenous polysaccharide-degrading enzymes: Effects on nutrient digestion in cattle fed a barley grain diet. Journal of Animal Science. 78: 477-487.

Khota, W., S. Pholsen, D. Higgs, and Y. Cai. 2018. Comparative analysis of silage fermentation and in vitro digestibility of tropical grass prepared with Acremonium and *Tricoderma* species producing cellulases. Journal of Animal Science. 31: 1913-1922.

Klich, M. A. 2002. Identification of Common *Aspergillus* species. The Netherlands: Centraalbureau Voor

Schimmelcultures.

Klich, M.A. 2007. Environmental and developmental factors influencing aflatoxin production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. Mycoscience 48: 71-80.

Kung, J.R., L. Shaver, R.D. Grant, and R.J. Schmldt. 2018. Silage review: interpretation of chemical, microbial, and organoleptic components of silages. Journal of Dairy Science. 101: 4020-4033.

Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry. 31: 426-428.

Morgavi, D.P., K.A. Beauchemin, V.L. Nsereko, L.M. Rode, A.D. Iwaasa, W.Z. Yang, T.A. McAllister, and Y. Wang. 2000. Synergy between the ruminal fibrolytic enzymes and enzymes from *Trichoderma longibrachiatum*. Journal of Dairy Science. 83: 1310–1321.

Muck, R.E., and L.J.R. Kung. 1997. Effects of silage additives on ensiling. pp. 187-199. In proceedings from the silage: Field to Feedbunk North American Conference, Hershey, 11-13 February 1997, NRAES-99.

Newbold, J. 1997. Proposed mechanisms for enzymes as modifiers of ruminal fermentation. pp. 146-159. In proceedings of the 8th Annual Florida Ruminant Nutrition Symposium. Gainesville. Florida.

Nitisinprasert, S., P. Bunyeun, T. Jaided, R. Chatthong, and A. Jarerat. 2001. Three effective lactic acid bacteria optimizing grass silage fermentation. P.365. In Abstract of Bio-Thailand 2001: From Research to Market. 7 - 10 November, 2001. Queen Sirikit National Convention Center. Bangkok.

Soest V.P.J., J.B. Robertson, and B.A. Lewis. 1991. Methods for dietary fibre, neutral detergent fibre and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. Journal of Dairy Science. 74: 3583–3597.

Steel, R. G. D., and J. H. Torrie. 1990. Prinsip dan Prosedur Statistik. Suatu Pendekatan Biometrik. Alih Bahasa Ir.B. Soemantri. Ed II. Gramedia Jakarta.

Sternberg, D. 1976. Beta-glucosidase of *Trichoderma*: its biosynthesis and role in saccharification of cellulose. Applied and Environmental Microbiology. 31(5): 648-654.

Tao, L., Z. Yu., X.S. Guo, and H. Zhou. 2011. Ensiling and *in vitro* digestibility characteristics of *Ceratoides arborescens* treated with lactic acid bacteria inoculants. African Journal of Biotechnology. 10(66): 14947-14953.

Thana, S., T. Tosawat, C. Sorachakula, and K. Danmek. 2019. Nutrition composition of maize silage generated from solid state fermentation by *Trichoderma viride* UP01. Pakistan Journal of Botany. 51(6): 2255-2260.