

ผลของการเสริม *Lactobacillus plantarum* BCC 65951 ต่อคุณภาพการหมักของ
หญ้าเนเปียร์ปากช่อง 1 หมัก โดยวิธีวัดแก๊สในห้องปฏิบัติการ
และการย่อยสลายในกระเพาะรูเมน

Effects of *Lactobacillus plantarum* BCC 65951 Inoculation on Fermentation Quality
of Napier Pakchong 1 Silage by *In vitro* Gas Production Technique
and Ruminant Degradability

นริสรา คงสุข¹ ศิวา สังกษ์ศรีทวงษ์² เวทชัย เปล่งวิทยา² กิตติมา กองทอง²
และ เสาวลักษณ์ แย้มหมื่นอาจ^{1*}

Narissara Kongsuk¹, Siwat Sangsritavong², Vethachai Plengvidhya², Kittima Kongtong²
and Saowaluck Yammuen-art^{1*}

¹ภาควิชาสัตวศาสตร์และสัตว์น้ำ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200

¹Department of Animal and Aquatic Sciences, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

²ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ อุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย จ. ปทุมธานี 12120

²National center for genetic engineering and biotechnology, Thailand Science Park, Pathum Thani 12120, Thailand

*Corresponding author: Email: saowaluck.y@cmu.ac.th

(Received: 9 October 2018; Accepted: 15 June 2019)

Abstract: The aims of this study were to evaluate fermentation quality, chemical compositions and ruminal degradability of Napier Pakchong 1 ensiled with or without *Lactobacillus plantarum* BCC 65951. The grass was harvested at 45 days of maturity. The silages were divided into 2 groups i.e. Napier Pakchong 1 silage (control) and Napier Pakchong 1 silage inoculated with *L. plantarum* BCC 65951 at 10^7 CFU/g fresh grass (LAB). The samples were collected at 21 days after ensiling. The fermentation quality was evaluated and chemical compositions were analyzed by proximate analysis. Detergent fiber method was employed to determine fiber compositions. Ruminal Degradability was determined using *in vitro* gas production technique. Ruminal fluid was obtained from 4 rumen fistulated Thai native cattle. Gas production was recorded after incubation at 2, 4, 8, 10, 12, 24, 48, 72 and 96 hr. The evaluation of fermentation quality showed that the concentrations of lactic acid, acetic acid propionic acid and ammonia nitrogen were significantly higher in LAB group when compared to control group ($P<0.001$). From the result of the chemical composition, control group showed significantly higher dry matter contents when compared to LAB group ($P<0.05$). Moreover, gas production at 2 hr after incubation was significantly greater in LAB groups ($P<0.05$). However, differences among groups in microbial biomass yield (MBY), metabolizable (ME), organic matter (OMD) and short chain fatty acids (SCFA) were not significant.

Based on this experiment, it could be concluded that the inoculation of *L. plantarum* BCC 65951 as a starter culture for the fermentation of Napier Pakchong 1 led to a decrease in dry matter content and increased lactic acid, acetic acid, propionic acid and ammonia nitrogen concentrations and faster ruminal degradability during the first 2 hr of incubation.

Keywords: *Lactobacillus plantarum* BCC 65951, Napier Pakchong 1 silage, *in vitro* gas production technique, Thai native

บทคัดย่อ: วัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้เพื่อศึกษาคุณภาพการหมัก องค์ประกอบทางเคมีและการย่อยสลายในกระเพาะรูเมนของหญ้าเนเปียร์ปากช่อง 1 ที่เสริมและไม่เสริม *Lactobacillus plantarum* BCC 65951 โดยทำการตัดหญ้าเนเปียร์ปากช่อง 1 ที่อายุ 45 วัน แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มทดลอง คือ กลุ่มที่ 1 หญ้าเนเปียร์ปากช่อง 1 หมักแบบไม่เติม *L. plantarum* BCC 65951 (control) และกลุ่มที่ 2 หญ้าเนเปียร์ปากช่อง 1 หมักแบบเติม *L. plantarum* BCC 65951 ในปริมาณ 10^7 CFU ต่อกรัมหญ้าสด (LAB) เมื่อหญ้าหมักมีระยะการหมักได้ 21 วัน นำหญ้าหมักที่ได้มาวิเคราะห์คุณภาพการหมัก องค์ประกอบทางเคมีโดยวิธี Proximate analysis และวิเคราะห์เยื่อใยโดยวิธี Detergent fiber method และวิเคราะห์การย่อยสลายในกระเพาะรูเมนโดยวิธี *in vitro* gas production technique โดยใช้ของเหลวจากกระเพาะรูเมนของโคพื้นเมืองเจาะกระเพาะเพศผู้ จำนวน 4 ตัว โดยบ่มตัวอย่างเป็นเวลา 2, 4, 8, 10, 12, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง จากการศึกษาคูณภาพการหมัก พบว่า ปริมาณกรดแลกติก กรดอะซิติก กรดโพรพิโอนิกและแอมโมเนียไนโตรเจนของ LAB สูงกว่า control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$) จากค่าองค์ประกอบทางเคมีของหญ้าเนเปียร์ปากช่อง 1 หมัก พบว่า ปริมาณวัตถุแห้งของ control มีค่าสูงกว่า LAB อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) นอกจากนี้ปริมาณแก๊สสุทธิที่เกิดขึ้นในชั่วโมงที่ 2 ของ LAB สูงกว่า control ($P < 0.05$) อย่างไรก็ตามปริมาณจุลินทรีย์ที่เกิดจากการหมัก ค่าพลังงานใช้ประโยชน์ได้ การย่อยได้ของอินทรีย์วัตถุ และปริมาณกรดไขมันระเหยได้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) โดยการศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่าการใช้ *L. plantarum* BCC 65951 ในหญ้าเนเปียร์ปากช่อง 1 หมัก ทำให้มีปริมาณวัตถุแห้งลดลง และยังคงผลให้หญ้าหมักมีกรดแลกติก กรดอะซิติก กรดโพรพิโอนิก และแอมโมเนียไนโตรเจนสูง อีกทั้งยังมีการย่อยสลายในกระเพาะรูเมนช่วง 2 ชั่วโมงแรกได้ดีกว่าอีกด้วย

คำสำคัญ: *Lactobacillus plantarum* BCC 65951 หญ้าเนเปียร์ปากช่อง 1 หมัก การผลิตแก๊สในหลอดทดลอง โคพื้นเมือง

คำนำ

หญ้าเนเปียร์ปากช่อง 1 เป็นพืชอาหารสัตว์ที่นิยมปลูกมาก เนื่องจากมีลำต้นและใบอ่อนนุ่ม ทำให้โคชอบกิน และในแง่ของคุณค่าทางโภชนาการ พบว่า หญ้าเนเปียร์ปากช่อง 1 ที่อายุการตัด 45 วัน มีวัตถุแห้ง 22.33% โปรตีน 9.16% และไขมัน 3.17% (Yammuen-art *et al.*, 2016) แต่การเจริญเติบโตของพืชอาหารสัตว์นั้นแปรตามฤดูกาล จึงทำให้มีพืชอาหารสัตว์ไม่สม่ำเสมอตลอดทั้งปี การเก็บถนอมพืชอาหารสัตว์ที่มีมากเกินไปในฤดูฝนไว้ใน

รูปของหญ้าหมัก เพื่อให้มีพืชอาหารสัตว์ใช้อย่างพอเพียง ในฤดูที่ขาดแคลนพืชสดจึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง การผลิตหญ้าหมักที่มีคุณภาพดีจำเป็นต้องอาศัยปัจจัยหลายประการ เช่น มีความชื้นที่เหมาะสม แหล่งคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำได้สูง ตลอดจนแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลกติก (McDonald *et al.*, 1991) กระบวนการหมักจะเกิดขึ้นช้าหรือเร็วขึ้นอยู่กับแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลกติกที่มีติดมากับต้นพืช การเติมแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลกติกลงไปเพิ่มจะทำให้กระบวนการหมักเสร็จสิ้นสมบูรณ์ได้อย่างรวดเร็ว (Weinberg *et al.*, 1993) และยังสามารถลด

การสูญเสียโภชนะของพืชในระหว่างกระบวนการหมักได้อีกด้วย แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลกติกที่นิยมใช้ในการผลิตพืชหมัก คือ *Lactobacillus plantarum* การเสริม *L. plantarum* 16.18×10^7 cfu ต่อกรัม ลงในหนุ่เนเปียร์มีผลทำให้โปรตีน สูงกว่ากลุ่มที่ไม่เสริม คือ 10.63 ± 0.75 เทียบกับ 7.70 ± 0.51 (Arasu *et al.*, 2014) และจากการศึกษาผลของการเสริม *L. plantarum* 1×10^6 CFU ต่อกรัม ของหนุ่เนเปียร์อัลฟาต่อการย่อยได้โดยวิธี *in vitro* gas production technique พบว่า การเสริม *L. plantarum* มีผลทำให้เกิดปริมาณจุลินทรีย์ที่เกิดจากการหมัก (microbial biomass yield) สูงกว่ากลุ่มที่ไม่เสริม (47.3 เทียบกับ 43.7 มิลลิกรัม microbial DM/100mg truly digested DM) (Contreras-Govea *et al.*, 2013) ดังนั้นแสดงให้เห็นได้ว่าการเสริม *L. plantarum* ในหนุ่เนเปียร์หมักทำให้คุณภาพขององค์ประกอบทางเคมีและการย่อยสลายในกระเพาะรูเมนดีขึ้น นอกจากนี้การศึกษาด้านการเจริญเติบโตในโค พบว่าโคที่ได้รับข้าวโพดหมักในกลุ่มที่ใช้ *L. plantarum* ร่วมกับ *Enterococcus faecium* เป็นต้นเชื้อมีการเจริญเติบโตที่ดีกว่ากลุ่มควบคุม (Fellner *et al.*, 2001) อย่างไรก็ตามในประเทศไทยยังมีการศึกษาทดลองเชื้อ *L. plantarum* เพื่อผลิตพืชอาหารสัตว์หมักอยู่ไม่มากนัก ซึ่ง *L. plantarum* BCC 65951 เป็นเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลกติกซึ่งคัดเลือกได้จากอ้อยอาหารสัตว์หมักที่ผลิตในประเทศไทย โดยศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ได้ทดสอบแล้วว่าเป็นต้นเชื้อที่มีคุณภาพดี ดังนั้นในการศึกษาในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาคุณภาพการหมัก องค์ประกอบทางเคมีและการย่อยสลายในกระเพาะรูเมนของหนุ่เนเปียร์ปากช่อง 1 ที่เสริมและไม่เสริม *L. plantarum* BCC 65951

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมเชื้อ ในงานวิจัยนี้ใช้เชื้อจุลินทรีย์ *L. plantarum* BCC 65951 ที่คัดเลือกได้จากอ้อยอาหารสัตว์หมัก โดยศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ทำการผสมต้นเชื้อที่มีความเข้มข้น 10^9 CFU/มิลลิลิตร ปริมาณ 10 มิลลิลิตร ต่อน้ำเกลือเข้มข้น (NaCl)

0.85% ปริมาณ 10 ลิตร เพื่อให้ได้ต้นเชื้อที่มีความเข้มข้น 10^7 CFU/มิลลิลิตร หลังจากนั้นเขย่าผสมให้เข้ากันดี ฟันลงในหนุ่เนเปียร์ที่สับแล้วปริมาณ 1,000 กิโลกรัม คลุกเคล้าให้ทั่ว เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของเชื้อที่ใช้เท่ากับ 10^7 CFU ต่อกรัมหนุ่เนเปียร์ โดยจะมีอัตราส่วนที่ใช้ต้นเชื้อที่มีความเข้มข้น 10^7 CFU 10 มิลลิลิตร ต่อ หนุ่เนเปียร์ 1 กิโลกรัม (Mayr-Harting *et al.*, 1972)

การเตรียมหนุ่เนเปียร์หมัก ตัดหนุ่เนเปียร์ปากช่อง 1 อายุ 45 วัน ให้มีขนาดชิ้นละประมาณ 2-3 เซนติเมตร แบ่งหนุ่เนเปียร์ออกเป็น 2 กลุ่ม ในแต่ละกลุ่มประกอบไปด้วย 3 ซ้ำ คือ

กลุ่มที่ 1 หนุ่เนเปียร์ปากช่อง 1 หมักแบบไม่เติม *L. plantarum* BCC 65951 (control)

กลุ่มที่ 2 หนุ่เนเปียร์ปากช่อง 1 หมักแบบเติม *L. plantarum* BCC 65951 ที่ความเข้มข้น 10^7 CFU ต่อกรัมหนุ่เนเปียร์สด (LAB)

นำไปหมักใส่ถุง 2 ชั้น ขึ้นในเป็นถุงสุญญากาศ 200 ไมครอน และขึ้นนอกเป็นถุงกระสอบ โดยบรรจุหนุ่เนเปียร์ 25 กิโลกรัม กดอัดให้แน่น จากนั้นทำการดูดอากาศออกให้หมด เพื่อให้มีสภาพไร้ออกซิเจน มัดถุงให้แน่นด้วยเชือกฟาง

สุ่มตัวอย่างหนุ่เนเปียร์หมักที่อายุการหมัก 21 วันอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและการหาการย่อยสลายในกระเพาะรูเมนโดยวิธี *in vitro* gas production technique ต่อไป

การวิเคราะห์คุณภาพการหมัก นำตัวอย่างที่ได้จากการทดลองแบบสดตัวอย่างละ 10 กรัม วิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ตามวิธีการของ Bal *et al.* (1997) โดยเครื่อง pH meter ยี่ห้อ Denver รุ่น UB-10 นำตัวอย่างแบบสดตัวอย่างละ 50 กรัม ไปวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันระเหยได้ (volatile fatty acid, VFA) ประกอบด้วย กรดอะซิติก (acetic acid) กรดโพรพิโอนิก (propionic acid) และกรดบิวทิริก (butyric acid) โดยใช้เครื่อง gas chromatography (GC) รุ่น Shimadzu GC-148 และวิเคราะห์ปริมาณกรดแลกติก (lactic acid) โดยใช้เครื่อง high performance liquid chromatography (HPLC) รุ่น Serial 1110 ส่วนการวิเคราะห์แอมโมเนีย

ไนโตรเจน (ammonia nitrogen, $\text{NH}_3\text{-N}$) นำตัวอย่างพืชหมักสด 10 กรัม บั่นร่วมกับสารละลายกรดกำมะถันเข้มข้น (H_2SO_4) 0.1 N ปริมาตร 100 มิลลิลิตร กรองผ่านผ้าขาวบาง 2 ชั้น แล้วนำสารที่ได้ไปกลั่นด้วยเครื่อง Tecator Auto-Kjeldahl analyzer โดยมีโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 40% เป็นตัวจับไนโตรเจน และหลังจากการกลั่นนำมาไทเทรตด้วยกรดเกลือ (HCl) ความเข้มข้น 0.1 N (Chen *et al.*, 1994)

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมี ตัวอย่างอาหารที่สุ่มเก็บนำไปวิเคราะห์หาปริมาณ วัตถุแห้ง (dry matter, DM) อินทรีย์วัตถุ (organic matter, OM) โปรตีนหยาบ (crude protein, CP) ไขมัน (ether extract, EE) และเยื่อใยหยาบ (crude fiber, CF) ตามวิธี Proximate analysis (AOAC, 2000) วิเคราะห์เยื่อใยที่เป็นผนังเซลล์ (neutral detergent fiber, NDF) ลิกโนเซลลูโลส (acid detergent fiber, ADF) ลิกนิน (acid detergent lignin, ADL) ตามวิธี Detergent fiber method (Van Soest *et al.*, 1991)

การหาการย่อยได้โดยวิธี *in vitro* gas production technique: เก็บของเหลวจากกระเพาะรูเมนของโคพื้นเมืองเพศผู้ ที่ผ่าตัดเจาะกระเพาะรูเมน (rumen fistulated Thai native beef cattle) จำนวน 4 ตัว อายุ 8-10 ปี น้ำหนักเฉลี่ย 249 ± 31 กิโลกรัม ที่ได้รับอาหารข้นวันละ 1 กิโลกรัม และอาหารหยาบเป็นหญ้าหมักให้กินเต็มที ทำการเก็บของเหลวจากกระเพาะรูเมนช่วงก่อนให้อาหารเช้าแล้วนำมาผสมกับสารละลาย buffer ที่เตรียมไว้ (Blümmel *et al.*, 1997; Menke *et al.*, 1979) บ่มสารละลาย rumen liquor buffer จำนวน 30 มิลลิลิตร ลงในหลอดที่มีตัวอย่างอาหารซึ่งบดผ่านตะแกรง 1 มิลลิเมตร ประมาณ 200 มิลลิกรัม นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส อ่านค่าแก๊สที่เวลา 2, 4, 8, 10, 12, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง จากนั้นนำมาคำนวณค่าแก๊สสุทธิ ค่าการย่อยสลายของตัวอย่างตามสมการ $P = a + b(1 - e^{-ct})$

P คือ ค่าการสลายตัวได้ที่ช่วงเวลาต่างกัน (%)

A คือ ค่าการย่อยสลายของส่วนที่ละลายได้ทันที (%)

B คือ ค่าการย่อยสลายของส่วนที่ไม่ละลายแต่สามารถเกิดการหมักย่อยได้ (%)

C คือ อัตราการย่อยสลายของอาหารส่วน B (fraction/h)

T คือ ช่วงเวลา (hr)

วัดปริมาณจุลินทรีย์ที่เกิดจากการหมัก (microbial biomass yield: MBY) โดยบ่มตัวอย่างที่ 24 ชั่วโมง แล้วนำตัวอย่างที่เหลือจากการย่อยซึ่งจะเป็นส่วนที่ย่อยไม่ได้แบบปรากฏ (apparent undegradable substrate) ไปหักออกจากน้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น ซึ่งจะได้ค่าปริมาณอาหารที่ย่อยสลายปรากฏ (apparent degradable substrate) จากนั้นนำส่วนที่ย่อยไม่ได้แบบปรากฏไปต้มกับสารละลาย NDS (neutral detergent solution) แล้วนำตัวอย่างที่เหลือซึ่งจะเป็นส่วนที่ไม่ย่อยสลายอย่างแท้จริง (true undegradable substrate) ไปหักกับตัวอย่างเริ่มต้นก็จะได้ค่าการย่อยได้ที่แท้จริง (True degraded substrate) จากนั้นคำนวณ microbial biomass yield (mg) จากสมการ Microbial biomass yield (mg) = True degraded substrate - Apparent degradable substrate (Blümmel *et al.*, 1997)

คำนวณค่าการย่อยได้ของอินทรีย์วัตถุ (OMD) และค่าพลังงานใช้ประโยชน์ได้ (ME) โดยสมการของ Menke and Steingass (1988) คือ

$$\text{ME (MJ/Kg DM)} = 2.20 + 0.136\text{Gv} + 0.0057\text{CP} + 0.00029\text{CF}$$

$$\text{OMD (\%)} = 15.38 + 0.8453\text{Gv} + 0.0595\text{CP} + 0.0675\text{XA}$$

$$\text{SCFA (mol)} = 0.0239\text{Gv} - 0.0601$$

เมื่อ Gv = ปริมาณแก๊ส (มิลลิลิตร) บ่มที่ 24 ชั่วโมง

CP = ปริมาณโปรตีน (g/kg DM)

CF = ปริมาณเยื่อใยหยาบ (g/kg DM)

XA = ปริมาณเถ้า (g/kg DM)

การวิเคราะห์ทางสถิติ ทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของข้อมูล โดยใช้สถิติค่าเฉลี่ยของกลุ่มการทดลอง 2 กลุ่มอิสระต่อกัน (t-test for Independent Sample) ตามหลักการของ Steel and Torrie (1980)

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการประเมินคุณภาพการหมัก (Table 1) พบว่า ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) และ ปริมาณกรดบิวทริกของหญ้าหมักกลุ่มไม่เสริม (control) และหญ้าหมักกลุ่มที่เสริม *L. plantarum* (LAB) ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$)

หญ้าหมักที่เสริม *L. plantarum* (LAB) มีปริมาณกรดแลกติก กรดอะซิติก และโพรพิโอนิก สูงกว่าหญ้าหมักกลุ่มไม่เสริม (control) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.01$) คือ 3.22 เทียบกับ 1.09, 0.13 เทียบกับ 0.04 และ 0.19 เทียบกับ 0.02% ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจาก *L. plantarum* เป็นแบคทีเรียในกลุ่ม facultative heterofermentative lactic acid bacteria นอกจากนี้จะสามารถผลิตกรดแลกติก และยังสามารผลิตกรดอะซิติกได้ด้วย และยังสามารถเปลี่ยนกรดแลกติกเป็นกรดอะซิติกและโพรพิโอนิกจึงอาจจะส่งผลให้ปริมาณกรดอะซิติกและโพรพิโอนิกสูงกว่ากลุ่มควบคุม (Hoffman and Ocker, 1997; Martinez-Campos and Torre, 2002; Whitlock *et al.*, 2000)

นอกจากนี้การศึกษานี้ยังพบว่าหญ้าหมักที่เสริม *L. plantarum* (LAB) มีแอมโมเนียไนโตรเจนสูงกว่าหญ้าหมักกลุ่มไม่เสริม (control) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.01$) คือ 2.04 เทียบกับ 1.48 g/kg DM และ 145.57 เทียบกับ 106.72 g/kg TDN ตามลำดับ อาจเป็น

ผลของ *L. plantarum* ที่เสริมมีการเร่งกระบวนการหมักมีการ proteolysis protein ทำให้เกิดการสูญเสียโปรตีนเพื่อสร้างแอมโมเนียระหว่างการหมัก (Phiri *et al.*, 2007) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในพืชที่มีความชื้นสูงจะมีการผลิต non protein nitrogen ในระหว่างกระบวนการหมักมากขึ้น (Adesoji *et al.*, 2010)

เมื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของหญ้าหมัก (Table 2) พบว่า หญ้าเนเปียร์ปากช่อง 1 หมัก (control) มีปริมาณของวัตถุแห้ง (DM) สูงกว่าหญ้าเนเปียร์ปากช่อง 1 หมัก ที่เสริม *L. plantarum* (LAB) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) คือ 16.42 ± 0.53 เทียบกับ $14.89 \pm 0.79\%$ ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากหญ้าหมักที่เสริมแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกมีกระบวนการย่อยสลายมากกว่ากลุ่มควบคุม จึงมีการผลิตน้ำออกมามากขึ้นส่งผลทำให้วัตถุแห้งลดลง (Basso, 2013) และเห็นได้ว่าปริมาณเยื่อใยของหญ้าเนเปียร์ปากช่อง 1 หมัก ที่เสริม *L. plantarum* (LAB) มีแนวโน้มลดลงกว่าหญ้าเนเปียร์ปากช่อง 1 หมัก (control) เพราะว่าจุลินทรีย์ที่เพิ่มจำนวนมากขึ้นมีการหลั่งเอนไซม์ ย่อยสลายเยื่อใยในระหว่างการหมัก (Ni *et al.*, 2014)

เมื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของหญ้าหมัก (Table 2) พบว่า หญ้าเนเปียร์ปากช่อง 1 หมัก (control) มีปริมาณของวัตถุแห้ง (DM) สูงกว่าหญ้าเนเปียร์ปากช่อง 1 หมัก ที่เสริม *L. plantarum* (LAB) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) คือ 16.42 ± 0.53 เทียบกับ $14.89 \pm 0.79\%$

Table 1. pH value, lactic acid, volatile fatty acid and ammonia nitrogen of Napier Pakchong 1 grass silage with or without *Lactobacillus plantarum* BCC 65951 inoculation

Item	Treatment		SEM	P-value
	Control	LAB		
pH	4.37	4.37	0.033	0.990
Lactic acid (%)	1.09 ^b	3.22 ^a	0.478	<0.01
Acetic acid (%)	0.04 ^b	0.13 ^a	0.014	<0.01
Propionic acid (%)	0.02 ^b	0.19 ^a	0.028	<0.01
Butyric acid (%)	0.09	0.04	0.013	0.097
NH ₃ -N				
(g/kg DM)	1.48 ^b	2.04 ^a	0.088	<0.01
(g/kg TN)	106.70 ^b	145.57 ^a	6.158	<0.01

LAB: *Lactobacillus plantarum* BCC 65951 inoculation, TN: Total nitrogen

^{a, b} : Means along row among treatment with different superscripts are significantly different at $P<0.05$

ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากหญ้าหมักที่เสริมแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกมีกระบวนการย่อยสลายมากกว่ากลุ่มควบคุม จึงมีการผลิตน้ำออกมามากขึ้น ส่งผลทำให้วัตถุแห้งลดลง (Basso, 2013) และเห็นได้ว่าปริมาณเยื่อใยของหญ้าเนเปียร์ปากช่อง 1 หมักที่เสริม *L. plantarum* (LAB) มีแนวโน้มลดลงกว่าหญ้าเนเปียร์ปากช่อง 1 หมัก (control) เพราะว่าจุลินทรีย์ที่เพิ่มจำนวนมากขึ้นมีการหลั่งเอนไซม์ย่อยสลายเยื่อใยในระหว่างการหมัก (Ni *et al.*, 2014)

ค่าการย่อยสลายในกระเพาะรูเมน พบว่า ค่าปริมาณแก๊สสุทธิในช่วง 2 ชั่วโมงที่ 2 ของหญ้าเนเปียร์ปากช่อง 1 หมักที่เสริม *L. plantarum* (LAB) สูงกว่าหญ้าเนเปียร์ปากช่อง 1 หมัก (control) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) คือ 2.68 ± 0.24 เทียบกับ 1.95 ± 0.20 มิลลิลิตร เนื่องจากการสลายในช่วง 2 ชั่วโมงแรกนั้นเป็นการย่อยสลายของส่วนที่ละลายได้ง่าย เช่น คาร์โบไฮเดรตหรือโปรตีน (Menke and Steingass, 1988) ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณ คาร์โบไฮเดรตที่ไม่มีโครงสร้าง (non structural carbohydrate, NSC) ในหญ้าหมักของกลุ่ม LAB ที่มี

แนวโน้มสูง จึงทำให้สามารถผลิตแก๊สได้มากกว่า ดังแสดงใน Table 3

อย่างไรก็ตามปริมาณจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมัก (MBY) ของหญ้าเนเปียร์ปากช่อง 1 หมักที่ไม่เสริมและหญ้าหมักที่เสริม *L. plantarum* BCC 65951 ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) คือ 71.14 ± 3.64 เทียบกับ 67.85 ± 4.41 มิลลิกรัม และ 55.08 ± 6.75 เทียบกับ $50.38 \pm 6.96\%$ of true degraded substrate นอกจากนี้ยังพบว่าค่าพลังงานใช้ประโยชน์ได้ (ME) การย่อยสลายของอินทรีย์วัตถุ (OMD) และปริมาณกรดไขมันระเหยได้ (SCFA) ของหญ้าเนเปียร์ปากช่อง 1 หมักที่เสริม *L. plantarum* (LAB) และหญ้าเนเปียร์ปากช่อง 1 หมัก (control) ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Ferreira *et al.* (2013) ที่รายงานว่า การเสริมต้นเชื้อไม่มีผลต่อ *in vitro* DM digestibility ในหญ้าเนเปียร์ ทั้งนี้เนื่องจากในกระบวนการหมักที่มีการเสริมต้นเชื้อ LAB สามารถช่วยย่อยสลายได้เพียงส่วนที่ละลายได้ แต่ไม่สามารถช่วยย่อยเซลลูโลสได้ จึงไม่มีผลต่อการย่อยสลายที่เกิดขึ้นในกระเพาะรูเมนได้ (Chen *et al.*, 2016; Yuan *et al.*, 2015)

Table 2. Chemical composition (%DM basis) of Napier Pakchong 1 grass silage with or without *Lactobacillus plantarum* BCC 65951 inoculation

Item	Ensiled		SEM	P-value
	Control	LAB		
Dry matter (%)	16.42 ± 0.53^a	14.89 ± 0.79^b	0.345	0.013
Chemical composition (%DM basis)				
Organic matter	90.10 ± 1.19	89.21 ± 1.02	0.333	0.195
Crude protein	8.67 ± 0.71	8.74 ± 0.26	0.148	0.830
Ether extract	4.83 ± 0.74	5.00 ± 1.13	0.264	0.769
Crude fiber	33.60 ± 1.01	33.40 ± 1.57	0.366	0.801
Non structural carbohydrate	7.26 ± 0.99	10.25 ± 2.40	0.827	0.061
Ash - free neutral detergent fiber	71.20 ± 1.58	67.86 ± 4.20	1.008	0.098
Ash - free acid detergent fiber	47.08 ± 1.49	45.30 ± 3.22	0.546	0.442
Acid detergent lignin	7.22 ± 0.68	6.74 ± 0.54	0.184	0.209
Hemi-cellulose	24.12 ± 2.63	22.56 ± 2.11	0.697	0.285
Cellulose	49.76 ± 0.71	49.34 ± 2.18	0.451	0.666
Lignin	2.63 ± 1.06	4.05 ± 1.16	0.369	0.060

LAB: *Lactobacillus plantarum* BCC 65951 inoculation, Non structural carbohydrate = %OM - %EE - %CP - %NDF

^{a, b}: Means along row among treatment with different superscripts are significantly different at $P < 0.05$

Table 3. Ruminal Degradability of Napier Pakchong 1 grass silage with or without *Lactobacillus plantarum* BCC 65951 inoculation

Item	Ensiled		SEM	P-value
	Control	LAB		
Gas production (ml)				
at 2 hr	1.95 ± 0.20 ^b	2.68 ± 0.24 ^a	0.183	0.016
at 4 hr	3.23 ± 0.41	3.83 ± 0.36	0.195	0.131
at 8 hr	6.09 ± 0.54	7.05 ± 0.77	0.326	0.151
at 10 hr	7.06 ± 0.41	8.02 ± 0.67	0.296	0.103
at 12 hr	9.01 ± 0.82	9.61 ± 0.78	0.312	0.414
at 24 hr	26.79 ± 1.96	27.11 ± 1.61	0.660	0.838
at 48 hr	39.69 ± 2.08	42.22 ± 1.19	0.942	0.227
at 72 hr	43.91 ± 2.35	47.34 ± 2.44	1.170	0.266
at 96 hr	45.17 ± 2.71	48.42 ± 2.65	1.313	0.278
True degraded substrate (%)	43.16 ± 2.91	45.03 ± 3.29	1.209	0.504
Microbial Biomass Yield (MBY)				
(mg)	71.14 ± 3.64	67.85 ± 4.41	1.601	0.361
(% of true degraded substrate)	55.08 ± 6.75	50.38 ± 6.96	2.176	0.449
Estimate parameter				
ME (MJ/Kg DM)	6.43 ± 0.27	6.48 ± 0.22	0.090	0.825
OMD (%)	48.87 ± 1.65	50.78 ± 1.36	0.590	0.502
SCFA (mol)	0.58 ± 0.05	0.59 ± 0.04	0.016	0.837

LAB: *Lactobacillus plantarum* BCC 65951 inoculation

^{a, b}: Means along row among treatment with different superscripts are significantly different at $P < 0.05$

สรุป

การเสริม *L. plantarum* BCC 65951 ในหญ้าเนเปียร์ปากช่อง 1 หมัก ทำให้กระบวนการหมักเร็วขึ้นโดยมีผลให้ปริมาณวัตถุแห้งลดลงและแอมโมเนียในโตรเจนสูงขึ้น และยังสามารถรักษาคุณภาพของหญ้าหมักไว้ได้เนื่องจากกรดแลกติก กรดอะซิติก และกรดโพรพิโอนิกสูงขึ้น นอกจากนี้ยังทำให้การย่อยสลายของหญ้าเนเปียร์ปากช่อง 1 หมัก ในช่วง 2 ชั่วโมงแรกดีขึ้นอีกด้วย แต่การเสริม *L. plantarum* BCC 65951 ในหญ้าเนเปียร์ปากช่อง 1 หมักไม่มีผลต่อการย่อยสลายในกระเพาะรูเมน อย่างไรก็ตามควรศึกษาผลการเสริม *L. plantarum* BCC 65951 ในหญ้าเนเปียร์ปากช่อง 1 หมักต่อสมรรถภาพการผลิตในสัตว์ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณมูลนิธิโครงการหลวงที่สนับสนุนงบประมาณสำหรับดำเนินงานวิจัย ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ที่อนุเคราะห์ตั้งให้ *Lactobacillus plantarum* BCC 65951 โครงการทุนสถาบันบัณฑิตวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีไทย (TGIST) ที่สนับสนุนทุนการศึกษา และขอบคุณนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา ภาควิชาสัตวศาสตร์และสัตว์น้ำ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เจ้าหน้าที่และสมาชิกผู้เลี้ยงกระบือณศูนย์พัฒนาโครงการหลวงแม่ทาเหนือ อ.แม่ออน จ.เชียงใหม่ ที่อนุเคราะห์อุปกรณ์และให้ความช่วยเหลือในการผลิตหญ้าหมักในการศึกษาครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- Adesoji, A.T., A.A. Ogunjobi, O.E. Fagade and O.J. Babayemi. 2010. Effect of *Lactobacillus plantarum* starter culture on the microbial succession, chemical composition, aerobic stability and acceptability by ruminant of fermented *Panicum maximum* grass. Assumption University Journal of Technology 14(1): 11-24.
- AOAC. 2000. Official Methods of Analysis of AOAC International. 17th ed. AOAC International, Gaithersburg, Maryland.
- Arasu, M.V., M.W. Jung, D.H. Kim, S. Ilavenil, M. Jane, H.S. Park, N.A. Al-Dhabi, B.T. Jeon and K.C. Choi. 2014. Enhancing nutritional quality of silage by fermentation with *Lactobacillus plantarum*. Indian Journal of Microbiology 54(4): 396-402.
- Bal, M.A., J.G. Coors and R.D. Shaver. 1997. Impact of the maturity of corn for use as silage of dairy cows on intake, digestion and milk production. Journal of Dairy Science 80(18): 2497-2503.
- Basso, F.C. 2013. Corn silage inoculated with microbial additives. Ph.D. Thesis. Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal, Sao Paulo. 81 p.
- Blümmel, M., H.P.S. Makkar and K. Becker. 1997. *In vitro* gas production: a technique revisited. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition 77(1-5): 24-34.
- Chen L., G. Guo, X. Yuan, J. Zhang, J. Li and T. Shao. 2016. Effects of applying molasses, lactic acid bacteria and propionic acid on fermentation quality, aerobic stability and *in vitro* gas production of total mixed ration silage prepared with oat-common vetch intercrop on the Tibetan Plateau. Journal of the Science of Food and Agriculture 96(5): 1678-1685.
- Chen, J., M.R. Stokes and C.R. Wallace. 1994. Effects of enzyme-inoculant systems on preservation and nutritive value of haycrop and corn silages. Journal of Dairy Science 77(2): 501-512.
- Contreras-Govea, F.E., R.E. Muck, G.A. Broderick and P.J. Weimer. 2013. *Lactobacillus plantarum* effects on silage fermentation and *in vitro* microbial yield. Animal Feed Science and Technology 179: 61-68.
- Fellner, V., L.E. Phillip, S. Sebastian and E.S. Idziak. 2001. Effects of a bacterial inoculant and propionic acid on preservation of high-moisture ear corn, and on rumen fermentation, digestion and growth performance of beef cattle. Canadian Journal of Animal Science 81(2): 273-280.
- Ferreira, D.d.J., R.d.P. Lana, A.d.M. Zanine, E.M. Santos, C.M. Veloso and G.A. Ribeiro. 2013. Silage fermentation and chemical composition of elephant grassinoculated with rumen strains of *Streptococcus bovis*. Animal Feed Science and Technology 183: 22-28.
- Hoffman, P.C. and S.M. Ocker. 1997. Quantification of milk yield losses associated with feeding aerobically unstable high moisture corn. Journal of Dairy Science 80(Suppl. 1): 234. (abstract)
- Martínez-Campos, R. and M. de la Torre. 2002. Production of propionate by fed-batch fermentation of *Propionibacterium acidipropionici* using mixed feed of lactate and glucose. Biotechnology Letters 24(6): 427-431.

- Mayr-Harting, A., A.J. Hedges and R.C.W. Berkeley. 1972. Method for studying bacteriocins. pp. 315-422. In: J.R. Norris and D.W. Ribbons (eds.). Methods in Microbiology. Academic Press, Inc., London.
- McDonald, P., A.R. Henderson and S.J.E. Heron. 1991. The Biochemistry of Silage. 2nd ed. Chalcombe Publications, Marlow, Bucks.
- Menke, K.H. and H. Steingass. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. Animal Research and Development 28: 7-55.
- Menke, K.H., L. Raab, A. Salewski, H. Steingass, D. Fritz and W. Schneider. 1979. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. The Journal of Agricultural Science 93(1): 217-222.
- Ni, K.K., Y.P. Wang, H.L. Pang and Y.M. Cai. 2014. Effect of cellulase and lactic acid bacteria on fermentation quality and chemical composition of wheat straw silage. American Journal of Plant Sciences 5: 1877-1884.
- Phiri, M.S., N.T. Ngongoni, B.V. Maasdorp, M. Titterton, J.F. Mupangwa and A. Sebata. 2007. Ensiling characteristics and feeding value of silage made from browse tree legume-maize mixtures. Tropical and Subtropical Agroecosystems 7(3): 149-156.
- Steel, R.G.D. and J.H. Torrie. 1980. Principles and Procedures of Statistics, A Biometrical Approach. 2nd ed. McGraw-Hill Book Company, New York.
- Van Soest, P.J., J.B. Robertson and B.A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. Journal of Dairy Science 74(11): 3583-3597.
- Weinberg, Z.G., G. Ashbell, A. Azrieli and I. Brukental. 1993. Ensiling peas, ryegrass and wheat with additives of lactic acid bacteria (LAB) and cell wall degrading enzymes. Grass and Forage Science 48(1): 70-78.
- Whitlock, M.C., P.K. Ingvarsson and T. Hatfield. 2000. Local drift load and the heterosis of interconnected populations. Heredity 84(4): 452-457.
- Yammuen-art, S., P. Somrak and C. Phatsara. 2016. Effect of maize cob and husk ratio in napier Pakchong 1 silage on nutritive value and *in vitro* gas production in rumen fluid of Thai native cattle. Animal Production Science 57(8): 1603-1606.
- Yuan, X., G. Guo, A. Wen, S.T. Desta, J. Wang, Y. Wang and T. Shao. 2015. The effect of different additives on the fermentation quality, *in vitro* digestibility and aerobic stability of a total mixed ration silage. Animal Feed Science and Technology 207: 41-50.