การเปรียบเทียบระดับการเติม *Pediococcus pentosaceus* สำหรับอาหารผสมครบส่วนแบบหมัก ต่อคุณภาพการหมัก คุณค่าทางโภชนะและการย่อยได้ในหลอดทดลอง

Comparative Levels Inoculation of *Pediococcus pentosaceus* for Ensiled Total Mixed Ration on Fermentation Quality, Nutritive Values and *In Vitro* Digestibility

ณัชชา เกษพานิช[1*] เสาวลักษณ์ แย้มหมื่นอาจ[2] ทศพล มูลมณี[2]
ก ทีปลักษณ์ ระงับเหตุ[1] และ พงศ์ธร คงมั่น[1]

Natcha Ketpanich[1*], Saowaluck Yammuen-art[2], Tossapol Moolmanee[2],
K. Teepalak Rangubhet[1] and Phongthorn Kongmun[1]

[1]ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900
[1]Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand
[2]ภาควิชาสัตวศาสตร์และสัตว์น้ำ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200
[2]Department of Animal and Aquatic Science, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand
**Corresponding author: Email: Natcha_ketpanich@hotmail.com*

(Received: 13 October 2021; Accepted: 30 December 2021)

Abstract: : The objective of this study was to compare the levels of *Pediococcus pentosaceus* for ensiled total mixed rations (eTMR) production on fermentation quality, nutritive values, and rumen fermentation characteristics by using *in vitro* gas production technique. The experimental design was a completely randomized design (CRD) with 5 treatments and 3 replicates, 1) fresh total mixed ration (fresh TMR), 2) eTMR + no *P. pentosaceus*, 3) eTMR + *P. pentosaceus* 10^4 CFU/g (PP4), 4) eTMR + *P. pentosaceus* 10^5 CFU/g(PP5) and 5) eTMR + *P. pentosaceus* 10^6 CFU/g (PP6), respectively. Comparison of fresh TMR and eTMR had shown that ensiling process can reduce pH values, increase NH_3-N, lactic acid, and butyric acid concentration significantly difference among treatments. In addition, it was significantly decreased proportion of EE, NDF, hemicellulose and accumulative gas production at 72 hours while, using *P. pentosaceus* inoculation were significantly reduce pH values and butyric acid concentration when compare with eTMR. Moreover, using *P. pentosaceus* inoculation can enhance *in vitro* gas production and increase IVDMD and IVOMD of eTMR. The different levels of *P. pentosaceus* inoculation can significantly affect on pH values and NH_3-N concentration. It was found that at PP6 inoculation has shown the lowest of NH_3-N concentration. However, the levels of *P. pentosaceus* inoculation shown similar results in nutritive values, IVDMD and IVOMD. Under this study, it could be concluded that *P. pentosaceus* inoculation at 10^4

Copyright @ Journal of Agriculture, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University. All rights reserved.

to 10^6 CFU/g can be used for eTMR production, the highest quality of eTMR fermentation in terms of the lowest pH and NH_3-N concentration can obtain by using *P. pentosaceus* inoculation at 10^6 CFU/g.

Keywords: Ensiled total mixed ration, Lactic acid bacteria, *Pediococcus pentosaceus*, *in vitro* gas production technique

บทคัดย่อ: จุดประสงค์ของการศึกษานี้คือ การเปรียบเทียบระดับของการเติมเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* ในการผลิตอาหารผสมครบส่วนแบบหมัก (ensiled total mixed ration; eTMR) ต่อคุณภาพการหมัก คุณค่าทางโภชนะและคุณลักษณะกระบวนการหมักในกระเพาะรูเมนโดยวิธีการผลิตแก๊สในหลอดทดลอง (*In vitro* gas production technique) การศึกษานี้ทำการแบ่งกลุ่มทดลองออกเป็น 5 กลุ่ม 3 ซ้ำ คือ 1) อาหารผสมครบส่วนสด (fresh TMR) 2) อาหารผสมครบส่วนแบบหมักที่ไม่เติมเชื้อ (eTMR) 3) อาหารผสมครบส่วนแบบหมักที่เติมเชื้อ *P. pentosaceus* ที่ระดับ 10^4 CFU / g (PP4) 4) อาหารผสมครบส่วนแบบหมักที่เติมเชื้อ *P. pentosaceus* ที่ระดับ 10^5 CFU / g (PP5) และ 5) อาหารผสมครบส่วนแบบหมักที่เติมเชื้อ *P. pentosaceus* ที่ระดับ 10^6 CFU / g (PP6) ตามลำดับ ผลการศึกษาพบว่า กระบวนการหมักทำให้ค่า pH ปริมาณไขมัน เยื่อใยที่ไม่ละลายในสารละลายเป็นกลาง เฮมิเซลลูโลสและปริมาณแก๊สสะสมที่ 72 ชั่วโมงลดลง ในขณะที่ปริมาณNH_3-N กรดแลคติก และกรดบิวทีริกสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารผสมครบส่วนแบบสด การเติมเชื้อ *P. pentosaceus* ทำให้ค่า pH และปริมาณกรดบิวทีริกต่ำลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้ใช้ อีกทั้งการเติมเชื้อ *P. pentosaceus* ยังทำให้ปริมาณแก๊สและการย่อยได้ของวัตถุแห้ง (IVDMD) และอินทรียวัตถุ (IVOMD) ในหลอดทดลองของอาหารผสมครบส่วนแบบหมักสูงขึ้น ระดับของการเติมเชื้อ *P. pentosaceus* ที่ต่างกันส่งผลให้ค่า pH และปริมาณ NH_3-N มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยพบว่าการเติมเชื้อ *P. pentosaceus* ที่ 10^6 CFU / g มีค่าต่ำที่สุด แต่ทั้งนี้กลับไม่ส่งผลต่อคุณค่าทางโภชนะและการย่อยได้ในหลอดทดลอง จากผลการศึกษานี้สามารถสรุปได้ว่าการเติมเชื้อ *P. pentosaceus* ที่ 10^4 CFU/g ถึง 10^6 CFU / g สามารถใช้ในการผลิตอาหารผสมครบส่วนแบบหมักได้ ในขณะที่การเติมเชื้อ *P. pentosaceus* ที่ 10^6 CFU / g ให้ผลลัพธ์ในกระบวนการหมักที่ดีในแง่ของค่า pH และปริมาณ NH_3-N ของอาหารผสมครบส่วนแบบหมักที่ต่ำ

คำสำคัญ: อาหารผสมครบส่วนแบบหมัก แบคทีเรียผลิตกรดแลคติก *Pedicoccus pentosaceus* การย่อยได้ในหลอดทดลอง

คำนำ

อาหารผสมครบส่วน หรือ ทีเอ็มอาร์ (total mixed ration, TMR) คือ การผสมอาหารข้นและอาหารหยาบเข้าด้วยกันในสัดส่วนที่คำนวณไว้โดยคำนึงถึงคุณค่าและความต้องการโภชนะของสัตว์ เป็นรูปแบบการให้อาหารที่มีจุดเด่นเรื่องของการเพิ่มประสิทธิภาพของการใช้อาหารได้มากขึ้นในสัตว์เคี้ยวเอื้องเนื่องจากช่วยรักษาสมดุลนิเวศวิทยาในกระเพาะรูเมนและสนับสนุนกิจกรรมของจุลินทรีย์ในกระเพาะได้ การย่อยได้ในกระเพาะรูเมนมีประสิทธิภาพจากการกระจายตัวของอาหารหยาบและอาหารข้นมีความสม่ำเสมอ มีความน่ากินที่ช่วยเพิ่มปริมาณการกินและลดการเลือกกินของสัตว์เคี้ยวเอื้องได้มากกว่าการให้อาหารแบบแยกส่วน ซึ่งการผลิตอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้องมีต้นทุนสูงขึ้นในช่วงฤดูแล้ง เนื่องจากมีการขาดแคลนอาหารหยาบทั้งด้านปริมาณและคุณภาพ จึงจำเป็นต้องมีการเก็บรักษาอาหารในรูปของการหมัก ที่พึงควรระวังด้านการจัดเก็บและคุณภาพรวมถึงสารพิษต่างๆ ที่อาจ

เกิดขึ้นในกระบวนการเตรียมและจัดเก็บ เพื่อให้เพียงพอตลอดทั้งปี

อาหารผสมครบส่วนแบบหมัก (ensiled total mixed ration, eTMR) เป็นกระบวนการเก็บรักษาอาหารผสมครบส่วนแบบหมักในสภาพไร้ออกซิเจน (Wongnen *et al.*, 2009) โดยการทำงานของจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลคติก (lactic acid bacteria, LAB) เป็นหลัก โดยทำหน้าที่เปลี่ยนแปลงน้ำตาลให้เป็นกรดแลคติก ซึ่งส่งผลให้ค่า pH ในสภาพแวดล้อมลดลงหรือมีสภาพเป็นกรดอย่างรวดเร็ว ซึ่งเป็นประโยชน์ในการยับยั้งจุลินทรีย์กลุ่มอื่น ๆ ที่ทำให้อาหารเกิดการเน่าเสีย หรือคุณค่าทางโภชนะของอาหารลดลง เนื่องจากกระบวนการหมักตามธรรมชาติมีการสูญเสียคุณค่าทางโภชนะจากการหายใจของพืช และการย่อยสลายของโปรตีน เป็นต้น (Ramos *et al.*, 2016) ดังนั้น การเร่งกระบวนการหมักด้วยการเติมจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลคติกให้มากขึ้น จึงเป็นแนวทางในการลดการเน่าเสียหรือการสูญเสียคุณค่าทางโภชนะได้ (Kim *et al.*, 2021) ถึงแม้ว่าในการทำหญ้าหมักนิยมใช้ *Lactobacillus plantarum* แต่อย่างไรก็ตาม ได้มีการรายงานว่ากลุ่มเชื้อ *Pediococcus spp.* มีคุณสมบัติในการเจริญเติบโตได้ดีในสภาวะอุณหภูมิและค่า pH ที่แปรปรวนได้ดีกว่ากลุ่มเชื้อ *Lactobacillus spp.* (Agarussi *et al.*, 2019) Oliveira *et al.* (2017) ได้ทำการศึกษาอภิมาน (Meta-analysis) ของการเติมต้นเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกลงในพืชอาหารสัตว์หมัก ผลการศึกษาพบว่าระดับของการเติมเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกมีหลากหลายความเข้มข้นซึ่งในระดับห้องปฏิบัติการนิยมเติมเชื้อระดับที่ 10^6 CFU/g 53 (60.1 %) ตามด้วย 10^5 CFU/g (34.1), 10^4 CFU/g (3.5 %) และ 10^7 CFU/g (2.5 %) ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์นี้ไม่ได้แสดงถึงระดับการเติมที่เหมาะสม ซึ่งหากมีการศึกษาเปรียบเทียบระดับของการเติมเชื้อก็จะทำให้ได้ระดับของการเติมเชื้อที่เหมาะสม จะส่งผลไปถึงการลดต้นทุนในการผลิตพืชอาหารสัตว์หมักได้อีกด้วย

P. pentosaceus เป็นแบคทีเรียแกรมบวกในกลุ่ม homofermentative สามารถผลิตพลังงานได้ด้วยกระบวนการหมักแบบไม่ใช้ออกซิเจน และสามารถผลิตแบคเทอริโอซิน (bacteriocins) มีฤทธิ์ในการควบคุมการเจริญเติบโตของแบคทีเรียกลุ่มที่ไม่ก่อประโยชน์ได้หรือมีคุณสมบัติในการถนอมอาหาร ได้มีการศึกษาถึงการเติมเชื้อ *P. pentosaceus* แบบเดี่ยวและผสมร่วมกับเชื้อกลุ่มอื่นในกระบวนการผลิตอาหารครบส่วนแบบหมักพบว่าสามารถใช้ *P. pentosaceus* ในระดับความเข้มข้น ตั้งแต่ 10^4 จนถึง 10^6 CFU/g ในการหมักถั่วสไตโลท่าพระ หญ้าอัลฟัลฟ่าหมัก และใช้ *P. pentosaceus* ร่วมกับ *L. plantarum* ในการหมักต้นข้าวบาร์เลย์ รวมถึงการเติมเชื้อในกระบวนการหมักอาหารผสมครบส่วน จากการรวบรวมเอกสารรายงานว่า *P. pentosaceus* สามารถลดค่า pH ได้ดีและรักษาคุณภาพของการหมักได้ดี (Filya *et al.*, 2007; Jiang *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2012; Taylor *et al.*, 2002) แต่อย่างไรก็ตามระดับของความเข้มข้นในการเติมเชื้อ *P. pentosaceus* ยังมีความผันแปรสูง สมมติฐานของงานวิจัยนี้คือการเติมเชื้อระดับที่น้อยลงจะให้ผลใกล้เคียงกับการเติมเชื้อระดับสูง ซึ่งจะส่งผลให้ลดต้นทุนในการทำพืชอาหารสัตว์หมักได้ ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเปรียบเทียบระดับการเติมเชื้อ *P. pentosaceus* สำหรับการผลิตอาหารผสมครบส่วนแบบหมักต่อคุณค่าทางโภชนะและกระบวนการหมักในกระเพาะรูเมนด้วยเทคนิคการผลิตแก๊สในหลอดทดลอง (*in vitro* gas production)

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมเชื้อ คัดแยกเชื้อ *P. pentosaceus* และการเตรียมอาหารผสมครบส่วนแบบหมัก

การศึกษานี้ได้เติมเชื้อ *P. pentosaceus* ที่พบในอาหารผสมครบส่วนแบบหมักซึ่งคัดแยกได้จากการศึกษาก่อนหน้า (Ketpanich *et al.*, 2021) โดยนำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว MRS (de Man *et al.*, 1960) บ่มในอุณหภูมิ 37 °C เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นของเชื้อจนถึง 10^9 CFU/ml จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บเซลล์เชื้อ *P. pentosaceus* และปรับความเข้มข้นของเชื้อโดย

ผสมน้ำเกลือ (0.85 %) เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของเชื้อเป็น 10^8 CFU/ml เพื่อนำไปใช้ในเป็นต้นเชื้อในการหมักอาหารผสมครบส่วนต่อไป สำหรับการหมักอาหารผสมครบส่วนทำโดยการฉีดพ่นต้นเชื้อ *P. pentosaceus* ลงบนอาหารผสมครบส่วนอัตราส่วนเชื้อ ปริมาณ 10 มิลลิลิตร ต่ออาหารผสมครบส่วน 1 กิโลกรัม (as fed basis) เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายคือ 10^6 CFU/g และทำการเจือจางเชื้อ *P. pentosaceus* ให้เป็น 10^7 CFU/ml และ 10^6 CFU/ml ก่อนนำไปฉีดลงบนอาหารผสมครบส่วนเพื่อให้ได้ระดับความเข้มข้นของต้นเชื้อสุดท้ายเป็น 10^5 และ 10^4 CFU/g ตามลำดับ

องค์ประกอบของวัตถุดิบที่ใช้ในการเตรียมอาหารผสมครบส่วนแสดงใน Table 1 โดยคำนวณให้ได้โปรตีนหยาบเท่ากับ 16 % และโภชนะที่ย่อยได้รวม (Total Digestible Nutrient, TDN) เท่ากับ 68 % การผสมอาหารผสมครบส่วนใช้เครื่องผสมอาหารผสมครบส่วน (Jaylor, Canada) เพื่อให้มีอาหารมีความสม่ำเสมอกัน

แผนการทดลอง

การศึกษาในครั้งนี้เพื่อเปรียบเทียบผลของการเติมเชื้อ *P. pentosaceus* ที่แตกต่างกัน 3 ระดับ สำหรับการผลิตอาหารผสมครบส่วนแบบหมักที่มีต่อคุณค่าทางโภชนะหลังการหมัก โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design, CRD) จำนวน 5 กลุ่มทดลอง ๆ ละ 3 ซ้ำ ดังนี้

กลุ่มที่ 1 อาหารผสมครบส่วนสด (fresh TMR)

กลุ่มที่ 2 อาหารผสมครบส่วนแบบหมักที่ไม่เติมเชื้อ *P. pentosaceus* (eTMR)

กลุ่มที่ 3 อาหารผสมครบส่วนแบบหมักที่เติมเชื้อ *P. pentosaceus* ในระดับ 10^4 CFU/g (PP4)

กลุ่มที่ 4 อาหารผสมครบส่วนแบบหมักที่เติมเชื้อ *P. pentosaceus* ในระดับ 10^5 CFU/g (PP5)

กลุ่มที่ 5 อาหารผสมครบส่วนแบบหมักที่เติมเชื้อ *P. pentosaceus* ในระดับ10^6 CFU/g (PP6)

บรรจุอาหารผสมครบส่วนในกลุ่มที่ 2 ถึง 5 ในกระสอบพลาสติกขนาด 18 x 30 นิ้ว และรีดอากาศภายในออกเพื่อให้อยู่ในกระบวนการหมัก

Table 1. Feed ingredient composition for ensiled total mixed ration (eTMR) in this study (as fed basis)

Ingredients	Amount (kg)
Fresh Napier grass	60.00
Maize hulk	10.00
Ground corn	10.00
Dried brewer's grain	8.00
Soybean meal	5.00
Rice bran	3.60
Molasses	2.00
Dicalcium phosphate (DCP)	0.50
Mineral mixed	0.50
Urea	0.40
Total	**100.00**

แบบไร้ออกซิเจน ทำการหมักเป็นระยะเวลา 21 วัน หลังจากนั้นเก็บตัวอย่างอาหารทั้งหมดทุกกลุ่มไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อนำไปวิเคราะห์หาคุณภาพการหมัก และองค์ประกอบทางเคมีต่อไป หลังจากนั้นจึงนำอาหารผสมครบส่วนทั้ง 5 กลุ่มมาศึกษากระบวนการหมักในกระเพาะรูเมนด้วยเทคนิคการวัดผลิตแก๊สแบบ *in vitro* gas production

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของอาหารผสมครบส่วนแบบหมัก

นำตัวอย่างอาหารผสมครบส่วนทุกกลุ่มผสมกับน้ำกลั่นในอัตราส่วน 10 กรัม ต่อน้ำกลั่น 90 มิลลิลิตร และทำการวัดค่า pH ตามวิธีการของ Bal *et al*. (1997) ด้วยเครื่อง pH meter วิเคราะห์ปริมาณของกรดไขมันที่ระเหยได้ง่าย (volatile fatty acids; VFAs) และกรดแลคติกตามวิธีของ Scherer *et al*. (2012) โดยใช้เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC, C18; mobile phase 20 % acetonitrile และ 80 % KH_2PO_4 อัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาทีและ ใช้ UV 210 nm) (1220 Infinity II LC, Agilent Technologies, USA) ปริมาณของแอมโมเนียไนโตรเจน (NH_3-N) อ้างอิงตามวิธีการของ Chaney and Marbach (1962) สำหรับการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีโดยวิธีประมาณ (proximate analysis) ทำโดยอบตัวอย่างอาหารที่ 60 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง บดและร่อนผ่านตะแกรง 1 มิลลิเมตร วิเคราะห์วัตถุแห้ง (dry matter; DM) อินทรียวัตถุ (organic matter; OM) โปรตีนหยาบ (crude protein; CP) ไขมัน (ether extract; EE) ตามวิธีของ AOAC (2000) และวิเคราะห์เยื่อใยด้วยวิธีของ Van Soest *et al*. (1991) ประกอบด้วยเยื่อใยที่ไม่ละลายในสารละลายที่เป็นกลาง (neutral detergent fiber; NDF) เยื่อใยที่ไม่ละลายในกรด (acid detergent fiber; ADF) และลิกนิน (acid detergent lignin; ADL) ตามลำดับ และนำมาคำนวณปริมาณ Hemicellulose และ Cellulose โดยสมการดังนี้

Hemicellulose = NDF – ADF และ

Cellulose = ADF – ADL

การศึกษากระบวนการหมักในกระเพาะรูเมน

สำหรับการศึกษากระบวนการหมักในกระเพาะรูเมน วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design, CRD) จำนวน 5 กลุ่มทดลอง ๆ ละ 3 ซ้ำ นำอาหารผสมครบส่วนทั้ง 5 กลุ่ม อบไล่ความชื้นที่ 60 °C บดและร่อนผ่านตะแกรงขนาด 1 มิลลิเมตร ชั่งตัวอย่างอาหารในกลุ่มทดลองปริมาณ 200 มิลลิกรัม บรรจุลงในขวดปริมาตร 50 มิลลิลิตร การศึกษาในครั้งนี้ใช้ของเหลวจากกระเพาะรูเมนของโคนมปลดระวางจำนวน 3 ตัว ซึ่งได้จากโรงฆ่าสัตว์ จังหวัดสระบุรี ผสมกับสารละลายน้ำลายเทียมในอัตราส่วน 2 ต่อ 1 ใส่ลงในขวดที่มีอาหารที่เตรียมไว้ในปริมาณ 30 มิลลิลิตร ตามวิธีการของ Menke and Steingass (1988) ทำการไล่แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์อย่างต่อเนื่อง ปิดด้วยจุกยางและฝาอลูมิเนียม บ่มไว้ที่ 39 °C ทำการบันทึกแก๊สที่เกิดขึ้นที่ชั่วโมงที่ 0, 2, 4, 8, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมงหลังการบ่ม นำปริมาณแก๊สที่เกิดขึ้นมาคำนวณจลนศาสตร์การผลิตแก๊สตามสมการของ Ørskov and McDonald (1979) ด้วยโปรแกรม SigmaPlot ดังนี้

$$Y = a + b\,(1 - e^{-ct})$$
$$P = |a + b|$$

เมื่อ a คือแก๊สที่เกิดขึ้นจากส่วนที่ย่อยสลายได้ทันที
b คือแก๊สที่เกิดจากส่วนที่ย่อยสลายไม่ได้แต่หมักย่อยได้
c คืออัตราการผลิตแก๊ส
t คือเวลา
Y คือ ปริมาณแก๊สที่เกิดขึ้นที่ชั่วโมงต่าง ๆ (t)
P คือประสิทธิภาพการผลิตแก๊ส

การศึกษาความสามารถในการย่อยได้แบบ *in vitro*

เก็บตัวอย่างในชุดที่บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมงมาทำการศึกษาความสามารถในการย่อยได้ ตามวิธีของ Ørskov and McDonald (1979) โดยนำอาหารที่เหลืออยู่ในขวดล้างด้วยน้ำกลั่นและสารละลายที่เป็นกลาง (neutral detergent solution) และอบไล่

ความชื้นที่ 100 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ชั่งและบันทึก น้ำหนักเพื่อนำมาคำนวณความสามารถในการย่อยได้ของวัตถุแห้งในหลอดทดลอง (*in vitro* dry matter digestibility; IVDMD) และการย่อยได้ของอินทรียวัตถุในหลอดทดลอง (*in vitro* organic matter digestibility; IVOMD) ตามสมการของ Tilley and Terry (1963) ดังนี้

$$\text{IVDMD (\%)} = \frac{\text{(DM Initial weigh- DM final weigh)}}{\text{DM Initial weigh}} \times 100$$

$$\text{IVDMD (\%)} = \frac{\text{(OM Initial weigh- OM final weigh)}}{\text{OM Initial weigh}} \times 100$$

การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล ตามแผนการทดลอง completely randomized design ด้วย ANOVA โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistics 25 วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's new multiple range test (Steel and Torrie, 1980) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % หรือ *P* - value ≤ 0.05 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างทรีทเมนต์ทดสอบโดยวิธี orthogonal contrast

ผลการทดลองและวิจารณ์

คุณภาพการหมักของอาหารผสมครบส่วนแบบหมัก

ผลการทดลองพบว่ากระบวนการหมักส่งผลให้ค่า pH ของอาหารผสมครบส่วนแบบหมักที่ไม่เติมเชื้อลดลงอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารผสมครบส่วนแบบสด (5.93 เทียบกับ 5.00) (Table 2) เนื่องจากกระบวนการหมักจุลินทรีย์ใช้ประโยชน์จากน้ำตาลเปลี่ยนเป็นกรดแลคติก ซึ่งเป็นการทำงานของแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกส่งผลให้ค่า pH ในอาหารผสมครบส่วนลดลง และเมื่อใช้เชื้อ *P. pentosaceus* ในกระบวนการหมัก พบว่า สามารถลดค่า pH ได้ต่ำกว่ากลุ่มที่ไม่ใช้เชื้อ *P. pentosaceus* (eTMR) อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (4.53 เทียบกับ 5.00) ($p < 0.01$) มากไปกว่านั้นการเติมต้นเชื้อที่ระดับที่ต่างกันส่งผลให้ค่า pH ของอาหารผสมครบส่วนแบบหมักมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและต่ำสุดในกลุ่มที่เติมต้นเชื้อ 10^6 CFU/g เกิดจากการเติม *P. pentosaceus* ส่งผลให้อัตราการเพิ่มจำนวนของ *P. pentosaceus* สูงขึ้น ส่งผลให้เกิดการผลิตกรดแลคติกที่มากขึ้น จึงทำให้ค่า pH ลดลงต่ำที่สุด (Ertekin and Kızılsimsek, 2020) เมื่อพิจารณาที่ปริมาณของ NH_3-N พบว่า กระบวนการหมักส่งผลให้ปริมาณ NH_3-N ในกลุ่มอาหารผสมครบส่วนแบบหมัก (eTMR) สูงกว่ากลุ่มอาหารผสมครบส่วนแบบสด (fresh TMR) อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p < 0.01$) ซึ่งการเพิ่มขึ้นของปริมาณ NH_3-N ที่เป็นตัวชี้วัดถึงระดับโปรตีนในอาหารหมักที่ถูกนำไปใช้ในกระบวนการหมักและทำให้คุณภาพของอาหารหมักมีคุณค่าทางโภชนะลดลง โดยการย่อยสลายโปรตีนนั้นเกิดขึ้นโดยการทำงานของแบคทีเรียกลุ่ม *Clostridia* และ *Enterococcus* ทำการเปลี่ยนโปรตีนให้กลายเป็นกรดอะมิโนและซึ่งถูกใช้ประโยชน์ต่อไปจนกลายเป็น NH_3-N ในที่สุด (Bueno *et al*., 2020; Jiang *et al*., 2020; Fijalkowska *et al*., 2015) การเติมเชื้อ *P. pentosaceus* ไม่ส่งผลต่อปริมาณของ NH_3-N เมื่อเทียบกับกลุ่มอาหารผสมครบส่วนแบบหมักที่ไม่เติมเชื้อ *P. pentosaceus* (eTMR) ($p > 0.05$) เมื่อพิจารณาที่ระดับของการเติมเชื้อพบว่าการเติมเชื้อ *P. pentosaceus* ในระดับ 10^6 CFU/g (PP6) มีปริมาณ NH_3-N ต่ำที่สุด เกิดจากการเพิ่มระดับของแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกนั้นทำให้เกิดอัตราการผลิตกรดแลคติกที่มากขึ้น ส่งผลให้ค่า pH ลดลง และยับยั้งการย่อยสลายของโปรตีน จึงส่งผลให้กลุ่มที่ใช้เชื้อ PP6 มีปริมาณ NH_3-N ต่ำที่สุด สอดคล้องกับ Oliveira *et al*. (2017) รายงานว่าการเติมเชื้อกลุ่มที่ผลิตกรดแลคติกในพืชอาหารหมัก ในระดับที่ 10^5 และ 10^6 CFU/g สามารถลดปริมาณของ NH_3-N ที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมักซึ่งเป็นผลจากกิจกรรมการย่อยสลายของโปรตีนที่น้อยลง

Table 2. Fermentation quality and nutritive values of fresh total mixed ration and ensiled total mixed ration inoculant with different levels at *Pedioccoccus pentosaceus* for 21 days of ensiling times

Items	Treatments					SEM	*P* - value[2]		
	Fresh TMR	eTMR[1]	PP4	PP5	PP6		Ensiling	Inoculation	Level
Fermentation quality									
pH	5.93	5.00	4.86^{A}	4.43^{B}	4.30^{B}	0.105	**	*	**
NH_3-N (mg/dl)	5.76	28.67	28.22^{A}	29.16^{A}	22.38^{B}	1.702	**	NS	**
Lactic acid (%DM)	ND	2.94	2.81	3.05	1.92	0.201	**	NS	NS
Volatile fatty acid (%DM)									
Acetic acid	0.70	0.84	0.84	0.77	0.79	0.014	NS	NS	NS
Propionic acid	ND	ND	ND	ND	ND	-	-	-	-
Butyric acid	0.01	0.07	0.02	ND	0.01	0.005	*	*	NS
Nutritive values (%DM)[3]									
DM (%as fed)	43.06	37.94	40.95	45.57	36.64	1.012	NS	NS	NS
OM	92.08	92.07	92.98	92.28	92.05	0.083	NS	NS	NS
CP	15.97	15.29	14.77	15.02	15.38	0.188	NS	NS	NS
EE	3.93	2.64	2.97	3.26	2.69	0.139	**	NS	NS
NDF	72.28	63.12	64.49	64.31	65.05	0.795	**	NS	NS
ADF	36.69	35.93	33.02	33.85	32.10	0.586	NS	NS	NS
Hemicellulose[4]	35.59	27.19	31.47	30.45	32.95	0.592	*	*	NS
Cellulose[5]	32.44	28.70	28.14	29.79	27.12	0.678	NS	NS	NS
Lignin	6.21	6.52	4.39	4.31	4.40	0.264	NS	*	NS

A-B show superscript significantly differences between the level of ($P < 0.05$). [1]eTMR: ensiled total mixed ration,[2]Ensiling: Fresh TMR vs eTMR, Inoculation: eTMR vs PP4, PP5, and PP6, Level: Compared among PP4, PP5 and PP6

[3] DM= Dry matter, OM= Organic matter, CP= Crude Protein, EE= Ether extract, NDF= Neutral detergent fiber and ADF= Acid detergent fiber

[4] Hemicellulose = NDF-ADF and [5]Cellulose = ADF-ADL, * = $p<0.05$, ** = $p<0.0$

จากการศึกษาคุณภาพการหมักของอาหารผสมครบส่วนแบบหมักในครั้งนี้พบว่าไม่สามารถตรวจวัดปริมาณของกรดแลคติกในอาหารผสมครบส่วนแบบสดและเพิ่มสูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) เมื่อผ่านการหมักที่ 21 วัน แต่ไม่พบความแตกต่างที่เกิดจากระดับของการเติมเชื้อ *P. pentosaceus* ปริมาณกรดอะซิติกไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$) นอกจากนี้พบว่าปริมาณของกรดบิวทีริกสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างอาหารผสมครบส่วนแบบสดและอาหารผสมครบส่วนแบบหมักที่ไม่เติมเชื้อ *P. pentosaceus* (eTMR) ($p < 0.05$) อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบ eTMR และกลุ่มใช้เชื้อ *P. pentosaceus* ที่ระดับ 10^6 CFU/g ส่งผลให้ระดับของปริมาณกรดบิวทีริกลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แสดงให้เห็นถึงคุณสมบัติที่ดีของเชื้อ *P. pentosaceus* ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์กลุ่ม Clostridia โดยการทำให้ค่า pH ลดลงอย่างรวดเร็ว (Agarussi *et al*., 2019) หรือการผลิตสารยับยั้งการเจริญเติบโตหรือแบคเทอริโอซิน (bacteriocins) อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างของระดับของการเติม *P. pentosaceus* ต่อปริมาณของกรดบิวทีริก

คุณค่าทางโภชนะของอาหารผสมครบส่วนแบบหมัก

คุณค่าทางโภชนะของอาหารผสมครบส่วนแบบสดและอาหารผสมครบส่วนแบบหมักแสดงใน Table 2 ปริมาณวัตถุแห้ง อินทรียวัตถุ โปรตีนหยาบ เยื่อใยที่ไม่ละลายในกรด (ADF) และเซลลูโลส ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) จากการวิเคราะห์ปริมาณไขมันพบว่า กระบวนการหมักส่งผลให้ปริมาณไขมันในอาหารผสมครบส่วนลดลงอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.01$) เนื่องจากในกระบวนการ หมักไขมันจากพืชถูกนำไปใช้ประโยชน์โดยจุลินทรีย์ผ่านกระบวนการย่อยโดยเอนไซม์ไลเปส (lipase) และการเติมไฮโดรเจนในกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวให้เป็นกรดไขมันที่อิ่มตัว (biohydrogenation) (Bueno *et al*., 2020; Han and Zhou, 2013; Wu *et al*., 2021) ปริมาณเยื่อใย NDF ของอาหารผสมครบส่วนแบบหมัก (eTMR) ลดลง ($p < 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบอาหารผสมครบส่วนแบบสด (72.28 เทียบกับ 63.12 %) อีกทั้งสัดส่วนเฮมิเซลลูโลสในอาหารผสมครบส่วนแบบหมักมีค่าต่ำกว่าอาหารผสมครบส่วนแบบสดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (27.19 เทียบกับ 35.59 เปอร์เซ็นต์) เนื่องจากในระหว่างกระบวนการหมักเฮมิเซลลูโลสถูกใช้เป็นแหล่งพลังงานโดยจุลินทรีย์และเฮมิเซลลูโลสเป็นโครงสร้างที่ถูกไฮโดรไลซ์โดยกรดได้ง่าย (Bueno *et al*., 2020; Dewar *et al*., 1963; Houfani *et al*., 2020; Patel and Parsania, 2018) จึงเป็นผลทำให้ปริมาณเยื่อ NDF และสัดส่วนเฮมิเซลลูโลสลดลง นอกจากนี้พบว่าการเติมต้นเชื้อ *P. pentosaceus* สามารถลดการสูญเสียเฮมิเซลลูโลสในกระบวนการหมักได้ ($p < 0.05$) (31.62 เทียบกับ 27.19 % วัตถุแห้ง) แต่ไม่พบความแตกต่างของระดับของการเติมเชื้อ *P. pentosaceus* ต่อปริมาณวัตถุแห้ง ปริมาณเยื่อใยที่ไม่ละลายในกรด (ADF) ของอาหารผสมครบส่วนแบบสดและอาหารผสมครบส่วนแบบหมัก (eTMR) ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับ Wang *et al*. (2016) ที่รายงานว่าปริมาณเยื่อใย NDF มีปริมาณลดลงในกระบวนการหมัก ในขณะที่เยื่อใยไม่ละลายในกรด (ADF) ไม่มีการเปลี่ยนแปลงซึ่งเกิดจากการสลายตัวของเฮมิเซลลูโลสในระหว่างกระบวนการหมัก การเติมเชื้อ *P. pentosaceus* ทำให้ปริมาณลิกนินในอาหารผสมครบส่วนแบบหมักลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (6.52 เทียบกับ 4.36 % วัตถุแห้ง) เนื่องจากการทำงานของแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกที่ผลิตเอนไซม์ lignin peroxidase ทำให้สามารถย่อยองค์ประกอบต่าง ๆ ที่อยู่ในลิกนินส่งให้ปริมาณลิกนินลดลง (Kachouri *et al*., 2016; Kietkwanboot, 2013)

การศึกษากระบวนการหมักในกระเพาะรูเมนด้วยเทคนิคการวัดผลผลิตแก๊สแบบ *in vitro*

จากการประเมินโดยใช้เทคนิคการผลิตแก๊สในหลอดทดลองและการย่อยได้แสดงใน Table 3 พบว่า ค่าส่วนที่ละลายได้ (a), ส่วนที่ไม่ละลายแต่หมักย่อยได้ (b), อัตราการผลิตแก๊ส (c) และศักยภาพ

Table 3. Kinetics of gas production and digestibility of fresh total mixed ration and ensiled total mixed ration inoculant with different levels of *Pediococcus pentosaceus* for 21 days of ensiling times

Item	Treatments					SEM	*P*-values4		
	Fresh TMR	eTMR[1]	PP4	PP5	PP6		Ensiling	Inoculation	Level
Kinetic of gas production[2]									
a	-2.90	-2.97	-2.90	-2.83	-2.54	0.089	NS	NS	NS
b	54.50	46.24	64.26	64.82	53.37	2.164	NS	NS	NS
c	0.02	0.03	0.02	0.02	0.02	0.001	NS	NS	NS
P	57.41	49.21	67.15	67.65	55.91	2.185	NS	NS	NS
Gas accumulative 72h,	38.98	32.22	41.63	43.72	38.18	1.017	*	*	
ml/0.2DM									NS
Digestibility 24 h[3]									
IVDMD, %	54.25	48.95	55.84	54.87	56.16	0.817	NS	*	NS
IVOMD, %	56.25	51.76	58.29	56.90	58.09	0.751	NS	*	NS

[A–B] show superscript significantly differences between the level of ($P<0.05$). [1]eTMR: ensiled total mixed ration Hemicellulose = NDF-ADF, Cellulose = ADF-ADL

[2]*a* = gas production (ml) from quickly soluble fraction, *b* = gas production (ml) from insoluble fraction, *c* = gas production rate and P= potential gas production

[3] IVDMD = In vitro dry matter digestibility and IVOMD= In vitro organic matter digestibility

[4] Ensiling: Fresh TMR vs eTMR, Inoculation: eTMR vs PP4, PP5, and PP67, Level: Compared among PP4, PP5 and PP6, * = $p<0.05$, ** = $p<0.01$

การผลิตแก๊ส (P) ไม่มีความแตกต่างทางสถิติระหว่างกลุ่มทดลอง ($p > 0.05$) ในขณะที่การผลิตแก๊สที่ 72 ชั่วโมงของอาหารผสมครบส่วนแบบสดมากกว่าอาหารผสมครบส่วนแบบหมักอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) (38.98 เทียบกับ 32.22 มิลลิลิตร) เนื่องจากกระบวนการหมักมีการสูญเสียโภชนะที่เกิดมาจากจุลินทรีย์ต่าง ๆ ที่ทำการเปลี่ยนโภชนะต่าง ๆ โดยเฉพาะน้ำตาลเปลี่ยนเป็นสารอื่น ๆ เช่น กรดไขมันระเหยง่ายและกรดแลคติกเป็นต้น จึงส่งผลให้สารตั้งต้นในการใช้งานโดยจุลินทรีย์ในของเหลวในกระเพาะรูเมนลดลง (Ali *et al*., 2015; Zhao *et al*., 2018) อย่างไรก็ตามการเติมเชื้อ *P. pentosaceus* ในอาหารนั้นส่งผลให้การผลิตแก๊สมากขึ้น (41.17 เทียบกับ 32.22 มิลลิลิตร) ($p < 0.05$) เนื่องจากการเติมเชื้อ *P. pentosaceus* มีแนวโน้มที่ปริมาณองค์ประกอบเยื่อใย NDF คงเหลือ มากกว่ากลุ่มไม่เติมเชื้อ *P. pentosaceus* จึงผลทำให้มีค่าผลผลิตแก๊สที่มากขึ้น สอดคล้องกับการศึกษาของ Huo *et al.* (2021) ที่ได้ศึกษาการเติมแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกลงในถั่วอัลฟาฟ่าหมัก พบว่าสามารถผลิตแก๊สได้มากกว่ากลุ่มที่ไม่เติมเชื้อ ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าความสามารถในการย่อยได้ของวัตถุแห้งและอินทรียวัตถุในหลอดทดลองของกลุ่มที่เติมเชื้อ *P. pentosaceus* สูงกว่ากลุ่มที่ไม่ใช้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (55.62 เทียบกับ 48.95 % และ 57.76 เทียบกับ 51.76 % ตามลำดับ) เนื่องจากการลดลงของค่า pH และกรดแลคติกที่เกิดขึ้นระหว่างการหมักนั้นส่งผลทำให้เกิดการสลายลิกนินที่เกาะอยู่กับคาร์โบไฮเดรตที่เป็นโครงสร้าง และเนื่องจากลิกนินมีปฏิสัมพันธ์กับค่าการย่อยได้ การที่ลิกนินลดลงจึงส่งผลให้เกิดการย่อยได้ที่มากยิ่งขึ้น (Kaewpila *et al*., 2021; Raffrenato *et al.,* 2017)

สรุป

การเติมเชื้อ *P. pentosaceus* ที่ระดับตั้งแต่ 10^4 ถึง 10^6CFU/g สามารถใช้ในกระบวนการหมักอาหารผสมครบส่วนโดยไม่ส่งผลเสียต่อกระบวนการหมักในกระเพาะรูเมน และเพิ่มความสามารถในการย่อยของวัตถุแห้งและอินทรียวัตถุ นอกจากนี้ยังพบว่า การเติมเชื้อที่ระดับ 10^6CFU/g สามารถปรับปรุงคุณภาพของการหมักได้เหมาะสม ทั้งยังช่วยลดระดับ pH และปริมาณของ NH_3-N ของอาหารผสมครบส่วนแบบหมักได้มากที่สุด แต่ทั้งนี้ควรคำนึงถึงชนิดของวัตถุดิบ สัดส่วนของอาหารข้นและอาหารหยาบ รวมไปถึงความคุ้มทุนในการเติมเชื้อด้วย

เอกสารอ้างอิง

AOAC. 2000. Official Methods of Analysis. 17th ed. Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, M.D.

Agarussi, M.C.N., O.G. Pereira, R.A. de Paula, V.P. da Silva, J.P.S. Roseira and F.F. e Silva. 2019. Novel lactic acid bacteria strains as inoculants on alfalfa silage fermentation. Scientific Reports 9(1): 0087, doi: 10.1038/s41598-019-44520-9

Ali, M., J.W. Cone, N.A. Khan, W.H. Hendriks and P.C. Struik. 2015. Effect of temperature and duration of ensiling on *in vitro* degradation of maize silages in rumen fluid. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition 99(2): 251-257.

Bal, M.A., J.G. Coors and R.D. Shaver. 1997. Impact of the maturity of corn for use as silage in the diets of dairy cows on intake, digestion, and milk production. Journal of Dairy Science 80(10): 2497-2503.

Bueno, A.V.I., G. Lazzari, C.C. Jobim and J.L.P. Daniel. 2020. Ensiling total mixed ration for ruminants: A review. Agronomy 10(6): 879, doi: 10.3390/agronomy10060879.

Chaney, A.L. and E.P. Marbach. 1962. Modified reagents for determination of urea and ammonia. Clinical Chemistry 8(2): 130-132.

De Man, J.C., M. Rogosa and M.E. Sharpe. 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. Journal of Applied Bacteriology 23(1): 130-135.

Dewar, W.A., P. McDonald and R. Whittenbury. 1963. The hydrolysis of grass hemicelluloses during ensilage. Journal of the Science of Food and Agriculture 14(6): 411-417.

Ertekin, I. and M. Kızılsimsek. 2020. Effects of lactic acid bacteria inoculation in pre-harvesting period on fermentation and feed quality properties of alfalfa silage. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences *33*(2): 245.

Fijalkowska, M., B. Pysera, K. Lipinski and D. Strusinska. 2015. Changes of nitrogen compounds during ensiling of high protein herbages - A review. Annals of Animal Science 15(2): 289-305.

Filya, I., R.E. Muck, and F.E. Contreras-Govea. 2007. Inoculant effects on alfalfa silage: Fermentation products and nutritive value. Journal of Dairy Science 90(11): 5108-5114.

Han, L. and H. Zhou. 2013. Effects of ensiling processes and antioxidants on fatty acid concentrations and compositions in corn silages. Journal of Animal Science and Biotechnology 4(1): 48, doi: 10.1186/2049-1891-4-48.

Houfani, A. A., N. Anders, A.C. Spiess, P. Baldrian and S. Benallaoua. 2020. Insights from enzymatic degradation of cellulose and hemicellulose to fermentable sugars- A review. Biomass and Bioenergy 134: 105481, doi: 10.1016/j.biombioe.2020.105481.

Huo, W., X. Wang, Z. Wei, H. Zhang, Q. Liu, S. Zhang, C. Wang, L. Chen, Q. Xu and G. Guo. 2021. Effect of lactic acid bacteria on the ensiling characteristics and *in vitro* ruminal fermentation parameters of alfalfa silage. Italian Journal of Animal Science 20(1): 623-631.

Jiang, D., B. Li, M. Zheng, D. Niu, S. Zuo and C. Xu. 2020. Effects of *Pediococcus pentosaceus* on fermentation, aerobic stability and microbial communities during ensiling and aerobic spoilage of total mixed ration silage containing alfalfa (*Medicago sativa* L.). Grassland Science 66(4): 215-224.

Kachouri, F., K. Setti, H. Ksontini, M. Mechmeche and M. Hamdi. 2016. Improvement of antioxidant activity of olive mill wastewater phenolic compounds by *Lactobacillus plantarum* fermentation. Desalination and Water Treatment 57(56): 27125-27137.

Kaewpila, C., P. Gunun, P. Kesorn, S. Subepang, S. Thip-Uten, Y. Cai, S. Pholsen, A. Cherdthong and W. Khota. 2021. Improving ensiling characteristics by adding lactic acid bacteria modifies *in vitro* digestibility and methane production of forage-sorghum mixture silage. Scientific Reports 11(1): 1968, doi: 10.1038/s41598-021-81505-2.

Ketpanich, N., S. Yammuen-art and P. Kongmun. 2021. Screening and selection of lactic acid bacteria fromensiled total mixed ration at different ensiling time, pp. 55-58. *In:* Proceedings of the 1st International Conference on Sustainable Agriculture and Aquaculture for Well Being and Food Security.

Kietkwanboot, A. 2013. Decolorization and biodegradation of phenolics in palm oil mill effluent by white rot fungi immobilized on oil palm residues. M.S. Thesis. Prince of Songkla University, Songkhla. (in Thai)

Kim, D.H., K.D. Lee and K.C. Choi. 2021. Role of LAB in silage fermentation: Effect on nutritional quality and organic acid production. AIMS Agriculture and Food 6(1): 216-234.

Liu, Q., M. Chen, J. Zhang, S. Shi and Y. Cai. 2012. Characteristics of isolated lactic acid bacteria and their effectiveness to improve stylo (*Stylosanthes guianensis* Sw.) silage quality at various temperatures. Animal Science Journal 83(2): 128-135.

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(1): 7-55.

Oliveira, A.S., Z.G. Weinberg, I.M. Ogunade, A.A.P. Cervantes, K.G. Arriola, Y. Jiang, D. Kim, X. Li, M.C.M. Gonçalves, D. Vyas and A.T. Adesogan. 2017. Meta-analysis of effects of inoculation with homofermentative and facultative heterofermentative lactic acid bacteria on silage fermentation, aerobic stability, and the performance of dairy cows. Journal of Dairy Science 100(6): 4587-4603.

Ørskov, E.R. and I. McDonald. 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. The Journal of Agricultural Science 92(2): 499-503.

Patel, J.P. and P.H. Parsania. 2018. Characterization, testing, and reinforcing materials of biodegradable composites. Biodegradable and Biocompatible Polymer Composites, doi: 10.1016/B978-0-08-100970-3.00003-1.

Raffrenato, E., R. Fievisohn, K.W. Cotanch, R.J. Grant, L.E. Chase and M.E. Van Amburgh. 2017. Effect of lignin linkages with other plant cell wall components on *in vitro* and *in vivo* neutral detergent fiber digestibility and rate of digestion of grass forages. Journal of Dairy Science 100(10): 8119-8131.

Ramos, J.P.F., E.M. Santos, A.P.M. dos Santos, W.H. de Souza and J.S. Oliveira. 2016. Ensiling of forage crops in semiarid regions. pp. 65-84. *In*: T. Da Silva (ed.). Advances in Silage Production and Utilization, IntechOpen Limited, London.

Scherer, R., A.C.P. Rybka, C.A. Ballus, A.D. Meinhart, J.T. Filho and H.T. Godoy. 2012. Validation of a HPLC method for simultaneous determination of main organic acids in fruits and juices. Food Chemistry 135(1): 150-154.

Steel, R.G.D., J.H. Torrie and D.A. Dickey. 1980. Principles and Procedures of Statistics: A Biometrical Approach. 2nd ed. McGraw-Hill, New York. 672 p.

Taylor, C.C., N.J. Ranjit, J.A. Mills, J.M. Neylon and L. Kung. 2002. The effect of treating whole-plant barley with *Lactobacillus buchneri* 40788 on silage fermentation, aerobic stability, and nutritive value for dairy cows. Journal of Dairy Science 85(7): 1793-1800

Tilley, J.M.A. and R.A. Terry. 1963. A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. Grass and Forage Science 18(2): 104-111.

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(10): 3583-3597.

Wang, H., T. Ning, W. Hao, M. Zheng and C. Xu. 2016. Dynamics associated with prolonged ensiling and aerobic deterioration of total mixed ration silage containing whole crop corn. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences 29(1): 62-72

Weinberg, Z.G., G. Ashbell, Y. Hen and A. Azrieli. 1993. The effect of applying lactic acid bacteria at ensiling on the aerobic stability of silages. Journal of Applied Bacteriology 75(6): 512-518.

Wongnen, C., C. Wachirapakorn, C. Patipan, D. Panpong, K. Kongweha, N. Namsaen, P. Gunun and C. Yuangklang. 2009. Effects of fermented total mixed ration and cracked cottonseed on milk yield and milk composition in dairy cows. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences 22(12): 1625-1632.

Wu, J.X., C. Zong, T. Shao, Y.S. Liang, J.C. McCann, Z.H. Dong, J.F. Li, J. Zhang and Q.H. Liu. 2021. Clarifying the relationships among bacteria, lipid-related enzymes, main polyunsaturated fatty acids and fat-soluble vitamins in alfalfa (*Medicago sativa* L.) silage using various sugar supplementations. Animal Feed Science and Technology 272: 114799, doi: 10.1016/j.anifeedsci.2020.114799

Zhao, J., Z. Dong, J. Li, L. Chen, Y. Bai, Y. Jia and T. Shao. 2018. Ensiling as pretreatment of rice straw: The effect of hemicellulase and *Lactobacillus plantarum* on hemicellulose degradation and cellulose conversion. Bioresource Technology 266: 158-165.