การพัฒนาอาหารสัตว์จากฟักทองและมันสำปะหลังหมัก เพื่อการนำไปเลี้ยงโคขุน

ทศวรรต อะโนราช

วิทยานิพนธ์เสนอมหาวิทยาลัยพะเยา เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
พฤศจิกายน 2562
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยพะเยา

การพัฒนาอาหารสัตว์จากฟักทองและมันสำปะหลังหมัก เพื่อการนำไปเลี้ยงโคขุน

ทศวรรต อะโนราช

วิทยานิพนธ์เสนอมหาวิทยาลัยพะเยา เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
หลักสตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
พฤศจิกายน 2562
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยพะเยา

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การพัฒนาอาหารสัตว์จากฟักทองและมันสำปะหลังหมักเพื่อการนำไปเลี้ยงโคขุน

ของ ทศวรรต อะโนราช

ได้รับการพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ของมหาวิทยาลัยพะเยา

..... ประธาน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กิตติศักดิ์ โชติกเดชาณรงค์)

..... กรรมการ ..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.โชค โสรัจกุล) (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุภัค มหัทธนพรรค)

..... กรรมการ ..... กรรมการ
ดร.ขรรค์ชัย ดั้นเมฆ) (ดร.รวิสรา รื่นไวย์)

อนุมัติ

.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บุญฤทธิ์ สินค้างาม)
คณบดีคณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ
พฤศจิกายน 2562

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ด้วยการช่วยเหลือจากหลายฝ่าย ขอขอบคุณอาจารย์ที่ปรึกษา ดร.ขรรค์ชัย ดั้นเมฆ และรองศาสตราจารย์ ดร.โชค โสรัจกุล ที่ให้คำแนะนำในการวิจัย ตลอดจนการช่วยเหลือในด้านวิชาการและด้านอื่น ๆ ระหว่างการเรียนมาโดยตลอด

ขอขอบคุณ โครงการวิจัยจากสำนักพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) งบประมาณปี พ.ศ. 2561 รหัสโครงการ NNR–RD–2559–01 ที่สนับสนุนการทำวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณ ศูนย์วิจัยและพัฒนาอาหารสัตว์เชียงราย สำนักพัฒนาอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์ ที่สนับสนุนนักวิชาการ เจ้าหน้าที่ และวัสดุอุปกรณ์ สำหรับใช้ดำเนินงานวิจัยในภาคสนาม

สุดท้ายนี้ ผู้เขียนขอขอบคุณกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ทุกท่าน ตลอดจนนิสิตสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา ที่ช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ จนทำให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ทศวรรต อะโนราช

เรื่อง: การพัฒนาอาหารสัตว์จากฟักทองและมันสำปะหลังหมักเพื่อการนำไปเลี้ยงโคขุน

ผู้วิจัย: ทศวรรต อะโนราช, วิทยานิพนธ์: วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ), มหาวิทยาลัยพะเยา, 2562

ประธานที่ปรึกษา: ดร. ขรรค์ชัย ดั้นเมฆ, **กรรมการที่ปรึกษา:** รองศาสตราจารย์ ดร.โชค โสรัจกุล

คำสำคัญ: การเจริญ, คุณภาพซาก, โคเนื้อ, จุลินทรีย์กลุ่มที่ย่อยสลายชีวมวลพืช

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาผลของอาหารสัตว์ที่มีส่วนผสมของฟักทองและมันสำปะหลังหมักต่อสมรรถภาพการเจริญเติบโต การใช้อาหาร และลักษณะซากของโคเนื้อ กระบวนการหมักทำได้โดยนำฟักทองและมันสำปะหลัง ซึ่งเป็นวัตถุดิบหลัก (อัตราส่วนของแข็งต่อของเหลว 1:1) หมักร่วมกับกากน้ำตาล 1.0% และกลุ่มจุลินทรีย์ย่อยชีวมวลพืช 0.1% (*Aspergillus* spp.: *Rhizopus* spp.: *Trichoderma* spp.: and *Saccharomyces cerevisiae* in the ratio of 1:1:1:1) เป็นระยะเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิห้องเพื่อเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการและการย่อยได้ของผลิตภัณฑ์ ผลการทดลอง พบว่า อาหารหมักมีปริมาณโปรตีนสูงและสามารถเก็บไว้ได้นานกว่า 6 เดือน โดยไม่เน่าเสีย เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม เมื่อนำอาหารหมักไปพัฒนาเป็นอาหารข้นมีปริมาณโปรตีน 12% สำหรับนำไปใช้เลี้ยงโคเนื้อ โดยใช้โคเนื้อสายพันธุ์ลูกผสมเพศผู้ตอน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ ชาร์โรเล่ส์ ซิมเมนทัล และแองกัส ที่มีน้ำหนักตัวเฉลี่ย 350±50 กก. โดยโคแต่ละตัวจะได้รับอาหารหยาบเป็นหญ้าเนเปียร์ปากช่อง 1 และเปลือกข้าวโพดแห้ง สำหรับอาหารข้นจะใช้อาหารข้นที่มีโปรตีน 12% ในอัตราส่วน 2% ของน้ำหนักตัวต่อวัน ทดลองเลี้ยงเป็นระยะเวลา 10 เดือน เมื่อสิ้นสุดการทดลอง พบว่า โคเนื้อลูกผสมสายพันธุ์ชาร์โรเล่ส์ มีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุด แต่มีอัตราการแลกเนื้อต่ำที่สุด เปอร์เซ็นต์ของซากตัดแต่งของโคเนื้อทั้งหมด มีค่าใกล้เคียงกัน (52–55%) ($P > 0.05$) สำหรับเกรดไขมันแทรก พบว่า เนื้อโคลูกผสมสายพันธุ์แองกัส ได้คะแนน 3.5 จากคะแนนเต็ม 5.0

Title: DEVELOPMENT OF ANIMAL RATION FROM FERMENTED PUMPKIN AND CASSAVA FOR CATTLE PRODUCTION

Author: Tosawach Anorach, Thesis: M.S. (Biotechnology), University of Phayao, 2019.

Advisor: Dr.Kanchai Danmak, **Co-advisor:** Associate Professor.Dr.Choke Sorachakul

Keywords: Growth performances, carcass characteristics, beef cattle, biomass degrading microbial consortium

ABSTRACT

This study was conducted to investigate the effect of concentrate feed containing fermented pumpkin and cassava on growth performance, feed utilization and carcass characteristic of beef cattles. The process was conducted by using raw material as pumpkin and cassava (solid/liquid ratio, 1:1) supplemented with 1.0% (w/v) of molasses and 0.1 % (w/v) of biomass degrading microbial consortium (*Aspergillus* spp.: *Rhizopus* spp.: *Trichoderma* spp.: and *Saccharomyces cerevisiae* in the ratio of 1:1:1:1) and then fermented for 7 days at room temperature in order to enhance the nutritive values and digestibility of their products. The results showed that fermented products had high protein content and could be persevered for more than 6 months when compared with control. The fermented products were formulated as 12% protein of fermented concentrate feed for beef cattle production. Three types of cattles including castrated male crossbred Charolais, Simmental and Angus with body weight of 350±50 kg were used. All cattle were fed with Napier Packchong 1 grass and maize husk as roughage. For concentrate feeds, 12% protein of fermented concentrate feed was fed in the ratio of 2% of body weight per day for 10 months. At the end of the experiment, crossbred Charolais showed the highest data of average daily grain (ADG) but the lowest of feed conversion rate (FCR). Dressing carcass percentage of all cattle was similar (52–55%) ($P > 0.05$). In addition, crossbred Angus beef has got a marbling score as 3.5 out of 5.0.

สารบัญ

บทที่ **หน้า**

1 บทนำ 1

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1

วัตถุประสงค์ของการวิจัย 2

สมมุติฐานของงานวิจัย 2

กรอบแนวคิดของแผนงานวิจัย 3

ขอบเขตของการวิจัย 3

ประโยชน์ที่จะได้รับจาการวิจัย 3

2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 5

สถานการณ์การเลี้ยงโคเนื้อในประเทศไทย 5

การใช้อาหารหมักในการเลี้ยงโค 7

การหมัก (Fermentation) 8

ลูกแป้งข้าวหมาก 10

ยีสต์ (Yeast) 10

อะไมเลส (Amylase) 11

เซลลูเลส (Cellulase) 13

สตารช (Starch) 14

เซลลูโลส (Cellulose) 15

เฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose) 16

ลิกนิน (Lignin) 17

แหล่งโภชนะที่สำคัญในอาหารโคขุน 18

สายพันธุ์โคเนื้อ 21

3 วิธีดำเนินการวิจัย 25

การเก็บตัวอย่างลูกแป้งข้าวหมาก 25

การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ย่อยชีวมวลจากลูกแป้งข้าวหมาก 25

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ **หน้า**

3 วิธีดำเนินการวิจัย (ต่อ) .....

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราที่คัดแยกได้ 29

การผลิตเอนไซม์และการศึกษาลักษณะสมบัติบางประการของเอนไซม์ 29

การผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์ 32

การผลิตอาหารหมักและศึกษาลักษณะทางกายภาพต่าง ๆ ของอาหารหมัก ... 32

การวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนะของอาหารหมัก 33

การเตรียมสัตว์ทดลอง..... 33

การให้อาหารสัตว์ทดลอง 33

การวัดสมรรถภาพการการเจริญเติบโตและศึกษาลักษณะซากของ
สัตว์ทดลอง..... 35

สถานที่ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัยและรวบรวมข้อมูล 35

การวิเคราะห์ทางสถิติ..... 35

ระยะเวลาดำเนินการวิจัย..... 35

4 ผลการทดลอง..... 36

การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ย่อยชีวมวลจากลูกแป้งข้าวหมาก..... 36

การคัดแยกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลส 36

การคัดแยกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส 37

การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์อะไมเลสและเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา
ที่คัดแยกได้ 37

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราที่คัดแยกได้ 40

การผลิตเอนไซม์และการศึกษาลักษณะสมบัติบางประการของเอนไซม์ 42

การผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์ 53

การผลิตอาหารหมัก..... 55

การทดสอบเชื้อในอาหารหมัก..... 56

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ **หน้า**

4 ผลการทดลอง (ต่อ) .....

การวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนะของอาหารหมัก (proximate analysis) 56

การวัดสมรรถภาพการการเจริญเติบโตและศึกษาลักษณะซากของสัตว์ทดลอง . 57

5 บทสรุป 60

สรุปผลการวิจัย 60

อภิปรายผลการวิจัย 61

ข้อเสนอแนะ 65

บรรณานุกรม 66

ภาคผนวก 75

ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ 76

ภาคผนวก ข การเตรียมสารละลายและการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ 80

ภาคผนวก ค กราฟมาตรฐานและการคำนวณค่าแอคติวีตีของเอนไซม์..... 91

ประวัติผู้วิจัย 95

สารบัญตาราง

ตาราง **หน้า**

1 แสดงคุณค่าทางโภชนะของมันสำปะหลัง (Cassava, *Manihot esculenta*)..... 19
2 แสดงสัดส่วนของอาหารที่ให้โคทดลองในแต่ละวัน..... 34
3 แสดงอัตราส่วนของวงใส (clear zone) ต่อการเจริญและลักษณะสัณฐานวิทยา ของเชื้อราที่แยกได้จากลูกแป้งข้าวหมาก บนอาหาร SS medium ที่มี soluble starch เป็นแหล่งคาร์บอน..... 36
4 แสดงอัตราส่วนของวงใส (clear zone) ต่อการเจริญและลักษณะสัณฐานวิทยา ของเชื้อราที่แยกได้จากลูกแป้งข้าวหมาก บนอาหาร CMC agar 37
5 แสดงค่าแอคติวิตีจำเพาะของอะไมเลสที่ผลิตจากเชื้อราที่คัดแยกได้ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน (หน่วยเป็น Unit, U)..... 38
6 แสดงค่าแอคติวิตีจำเพาะของเซลลูเลสและไซแลนเนส ที่ผลิตจากเชื้อราIsolate UP07 เมื่อเลี้ยงในอาหาร SS medium ที่มีกระดาษกรองเป็นแหล่งคาร์บอนแทน เซลลูโลส ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน (หน่วยเป็น Unit, U)..... 39
7 แสดงค่าแอคติวิตีจำเพาะของอะไมเลสที่ผลิตจากเชื้อราที่คัดแยกได้ที่อุณหภูมิ 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน (หน่วยเป็น Unit, U) 42
8 แสดงค่าแอคติวิตีจำเพาะของเซลลูเลสที่ผลิตจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. UP07เมื่อเลี้ยงในอาหาร SS medium ที่มีกระดาษกรองเป็นแหล่งคาร์บอน แทนเซลลูโลสที่อุณหภูมิ 50 60 70 และ 80 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน (หน่วยเป็น Unit, U) 43
9 แสดงปริมาณคุณค่าทางโภชนาการของอาหารหมักจากฟักทองและมัน สำปะหลัง..... 56
10 Growth performances crossbred beef cattle fed with fermented feed 58
11 Carcass characteristics of crossbred beef cattle fed with fermented feed..... 58
12 แสดงสูตรอาหารที่ใช้สำหรับเลี้ยงโคขุนในการทดลองนี้ 60
13 แสดงต้นทุนเมื่อเลี้ยงระยะเวลา 1 ปี 61
14 แสดงขั้นตอนการวัดปริมาณโปรตีน 89

สารบัญภาพ

ภาพ **หน้า**

1 แสดงกรอบแนวคิดของแผนงานวิจัย 3
2 แสดงสมการการย่อยสลายแป้งไปเป็นแอลกอฮอล์ 10
3 แสดงการทำงานของเอนไซม์ แอลฟา–อะไมเลส (ลูกศรสีน้ำเงิน)..... 12
4 แสดงการทำงานของเอนไซม์ บีตา–อะไมเลส (ลูกศรสีแดง)..... 12
5 แสดงการทำงานของเอนไซม์ แกมมา–อะไมเลส กลูโคอะไมเลสหรืออะไมโลกลูโคซิเดส (ลูกศรสีเหลือง) 13
6 แสดงโครงสร้างของอะไมโลส (amylose)..... 14
7 แสดงโครงสร้างของไมโลเพกติน (amylopectin) 15
8 แสดงการเชื่อมต่อกันของกลูโคสด้วยพันธะ β–1, 4 glycosidic linkage 16
9 แสดงรูปแบบโมเลกุลของสายเซลลูโลส 16
10 แสดงรูปแบบโครงสร้างโมเลกุลของลิกนิน 17
11 แสดงโคลูกผสมสายพันธุ์ชาโรเลส์ (Charolais crossbred) 21
12 แสดงโคลูกผสมสายพันธุ์ซิมเมนทัล (Simmental crossbred)..... 23
13 แสดงค่าแอคติวิตีจำเพาะของอะไมเลสที่ผลิตจากเชื้อราที่คัดแยกได้ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 38
14 ค่าแอคติวิตีจำเพาะของเซลลูเลสและไซแลนเนสที่ผลิตจาก เชื้อรา IsolateUP07 เมื่อเลี้ยงในอาหาร SS medium ที่มีกระดาษกรองเป็นแหล่งคาร์บอนแทนเซลลูโลส ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน (หน่วยเป็น Unit, U)..... 39
15 แสดงลักษณะการเจริญของ *Rhizopus* spp. UP01 ที่เจริญบนอาหาร PDA เป็นระยะเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส..... 40
16 แสดงลักษณะการเจริญของ *Trichoderma* spp. UP07 ที่เจริญบนอาหาร PDA เป็นระยะเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส..... 41
17 แสดงค่าแอคติวิตีจำเพาะของอะไมเลสที่ผลิตจากเชื้อราที่คัดแยกได้ที่อุณหภูมิ 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส..... 42

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพ **หน้า**

18 แสดงค่าแอคติวิตีจำเพาะของ Total cellulase ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. UP07 ที่คัดแยกได้ เมื่อเลี้ยงในอาหาร SS medium ที่มีกระดาษกรองเป็นแหล่งคาร์บอนแทนเซลลูโลส..... 44

19 แสดงค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอกโซกลูคาเนส ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. UP07 ที่คัดแยกได้ เมื่อเลี้ยงในอาหาร SS medium ที่มีกระดาษกรองเป็นแหล่งคาร์บอนแทนเซลลูโลส..... 44

20 แสดงค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนโดกลูคาเนส ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. UP07 ที่คัดแยกได้เมื่อเลี้ยงในอาหาร SS medium ที่มีกระดาษกรองเป็นแหล่งคาร์บอนแทนเซลลูโลส..... 45

21 แสดงค่าแอคติวิตีจำเพาะของเบตา–กลูโคซิเดส ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. UP07 ที่คัดแยกได้เมื่อเลี้ยงในอาหาร SS medium ที่มีกระดาษกรองเป็นแหล่งคาร์บอนแทนเซลลูโลส..... 45

22 แสดงค่าแอคติวิตีจำเพาะของไซแลนเนส ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. UP07 ที่คัดแยกได้เมื่อเลี้ยงในอาหาร SS medium ที่มีกระดาษกรองเป็นแหล่งคาร์บอนแทนเซลลูโลส 46

23 แสดงค่าแอคติวิตีจำเพาะของเซลลูเลสและไซแลนเนสที่ผลิตจาก *Trichoderma* spp. UP07..... 46

24 แสดงผลของ pH ต่อค่าแอคติวิตีจำเพาะของเซลลูเลสและไซแลนเนสที่ผลิตจาก *Trichoderma* spp. UP07 47

25 แสดงผลของ metal ion ต่อค่าแอคติวิตีจำเพาะของเซลลูเลสและไซแลนเนส ที่ผลิตจาก *Trichoderma* spp. UP07 48

26 แสดงน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์อะไมเลส 48

27 แสดงน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยเปลือกข้าวโพดด้วยเอนไซม์เซลลูเลส..... 49

28 แสดงน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยซังข้าวโพดด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 49

29 น้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยฟางข้าวด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 50

30 แสดงความเสถียรของเอนไซม์อะไมเลสที่ช่วงเวลาต่าง ๆ..... 50

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพ **หน้า**

31 แสดงความเสถียรของเอนไซม์เซลลูเลส (Total cellulase) ที่ช่วงเวลาต่าง ๆ..... 51
32 แสดงความเสถียรของเอนไซม์เซลลูเลส (exolglucanase) ที่ช่วงเวลาต่าง ๆ..... 51
33 แสดงความเสถียรของเอนไซม์เซลลูเลส (endoglucanase) ที่ช่วงเวลาต่าง ๆ 52
34 แสดงความเสถียรของเอนไซม์เซลลูเลส (betaglucosidase) ที่ช่วงเวลาต่าง ๆ..... 52
35 แสดงความเสถียรของเอนไซม์ไซแลนเนส ที่ช่วงเวลาต่าง ๆ..... 53
36 แสดงหัวเชื้อจุลินทรีย์สำหรับใช้ผลิตอาหารหมักจากวัสดุทางการเกษตร..... 54
37 แสดงการทดสอบหัวเชื้อโดยใช้วิธีการ spread plate โดยทำการเจือจาง
ความเข้มข้นที่ 10,000 เท่า ลงในอาหาร PDA..... 54
38 แสดงมันสำปะหลังที่ผ่านกระบวนการหมักร่วมกับหัวเชื้อจุลินทรีย์หมักไว้
เป็นระยะเวลา 15 วัน..... 55
39 แสดงฟักทองที่ผ่านกระบวนการหมักร่วมกับหัวเชื้อจุลินทรีย์หมักไว้
เป็นระยะเวลา 15 วัน..... 55
40 แสดงคุณภาพซากและไขมันของโคขุนลูกผสมที่เลี้ยงด้วยขุนเป็นระยะเวลา
12 เดือน และบ่มไว้ในห้องเย็นอุณหภูมิ $4^{O}C$ เป็นระยะเวลา 7 วัน..... 59
41 แสดงกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส..... 91
42 แสดงกราฟมาตรฐานน้ำตาลไซโลส..... 92
43 แสดงกราฟมาตรฐานโปรตีน..... 93

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ประเทศไทยมีโคเนื้อ 4,407,108 ตัว จากเกษตรกร 764,668 ครัวเรือน และโคนม 509,524 ตัว จากเกษตรกร 16,248 ครัวเรือน ในเขตปศุสัตว์ที่ 5 ของส่วนจังหวัดพะเยา พบว่า มีการผลิตโคเนื้อและโคนมในปริมาณที่สูง คือ โคเนื้อ 36,961 ตัว จากเกษตรกร 4,010 ครัวเรือน และโคนม 244 ตัว จากเกษตรกร 22 ครัวเรือน ซึ่งในปี 2557 ที่ผ่านมามีปริมาณการส่งออกโคเนื้อ คิดเป็นมูลค่า 7,122,655,693 บาท (ศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร กรมปศุสัตว์, 2557)

จากสถิติของกรมปศุสัตว์ พบว่า การผลิตโคเนื้อและโคนม ตั้งแต่ช่วงปี พ.ศ. 2557 ที่ผ่านมา มีอัตราการผลิตเพิ่มขึ้นประมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ อาจเป็นเพราะว่าราคาพืชผลทางการเกษตรที่ตกต่ำ เกษตรกรจึงหันมาเลี้ยงโคกันมากขึ้น และจากการลงพื้นที่สำรวจกลุ่มเกษตรกรผู้เลี้ยงโคเนื้อในพื้นที่จังหวัดพะเยา พบว่า ยังมีปัญหาอยู่หลายประการ เช่น ขาดความรู้ด้านการจัดการปัญหาโรคระบาด และโดยเฉพาะอย่างยิ่งปัญหาการขาดแคลนอาหารสัตว์ โดยเฉพาะหญ้าอาหารสัตว์ในช่วงฤดูแล้ง (ส่วนวิจัยเศรษฐกิจปศุสัตว์และประมง สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2549) และจากการสอบถามข้อมูล โดยการสัมภาษณ์ นายมานิต อินต๊ะสาร ประธานสหกรณ์โคขุนดอกคำใต้ ตำบลบ้านถ้ำ อำเภอดอกคำใต้ จังหวัดพะเยา พบว่า การผลิตโคเนื้อโดยเฉพาะโคขุน ต้นทุนมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ จะอยู่ในส่วนของอาหารสัตว์และในฤดูแล้งมักจะมีปัญหาการขาดแคลนหญ้าอาหารสัตว์ และหญ้ามีราคาแพง ทำให้เกษตรกรแบกภาระต้นทุนมาก เกษตรกรจึงขาดแรงจูงใจในการเลี้ยงโค และหันไปประกอบอาชีพอื่นแทน ดังนั้น ถ้ามีแนวทางนำวัสดุทางการเกษตรที่หาง่ายในท้องถิ่นมาผลิตเป็นอาหารสัตว์ และเพิ่มคุณค่าทางโภชนะเพื่อนำไปเลี้ยงโคขุน จะทำให้ช่วยแก้ไขปัญหาด้านต้นทุนอาหารสัตว์ และปัญหาการขาดแคลนอาหารสัตว์ได้อย่างยั่งยืน

ซึ่งในเบื้องต้นได้มีการแก้ไขปัญหาดังกล่าว คือ มีการใช้เศษเหลือจากการปลูกข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ มาผลิตเป็นอาหารหมักสำหรับทดแทนหญ้าอาหารสัตว์ในช่วงฤดูแล้ง แต่ก็ยังมีปริมาณโปรตีนในอาหารหมักที่ยังไม่เพียงพอต่อการผลิตโคขุน จึงได้หาวัสดุที่หาได้ง่ายในท้องถิ่นที่มีราคาถูก มาผลิตเป็นอาหารหมักที่มีคุณค่าทางโภชนะสูง และต้นทุนต่ำเพื่อนำมาผลิตเป็นอาหารที่มีโปรตีนสูง สำหรับนำไปใช้เลี้ยงโคขุน และจากการสำรวจพื้นที่ในจังหวัดพะเยา พบว่า

ในจังหวัดพะเยามีการเพาะปลูกฟักทองและมันสำปะหลังจำนวนมาก อย่างเช่น ฟักทองที่เกษตรกรเพาะปลูก จะเป็นฟักทองที่ขายเมล็ดให้กับโรงงาน ส่วนของเนื้อฟักทองก็จะทิ้งไป ซึ่งแต่ละวันจะมีปริมาณเนื้อฟักทองไม่ต่ำกว่า 1 ตัน ดังนั้น ถ้าหากมีการใช้ผลผลิตทางการเกษตรที่หาง่ายในท้องถิ่นและมีราคาถูก เช่น มันเส้น ซึ่งมีราคาประมาณ 2–5 บาทต่อกิโลกรัม และฟักทองราคา 1 บาทต่อกิโลกรัม มาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเป็นอาหารสัตว์ จะทำให้ช่วยแก้ไขปัญหาดังกล่าวได้ ซึ่งนอกจากเกษตรกรผู้เลี้ยงโคขุนจะได้วัตถุดิบมาผลิตเป็นอาหารสัตว์ที่มีราคาถูกแล้ว เกษตรกรผู้ปลูกฟักทอง และเกษตรกรผู้ปลูกมันสำประหลัง ยังได้กำไรจากการขายผลผลิตทางการเกษตรได้อีกช่องทางหนึ่ง โดยไม่ต้องกังวลเรื่องราคาของผลผลิตที่ตกต่ำ

ดังนั้น ในโครงการวิจัยนี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาอาหารหมักโดยใช้ผลผลิตทางการเกษตรในท้องถิ่น ได้แก่ มันสำปะหลัง และฟักทอง มาหมักร่วมกับหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตได้เพื่อนำไปใช้เป็นอาหารเลี้ยงโคขุน

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

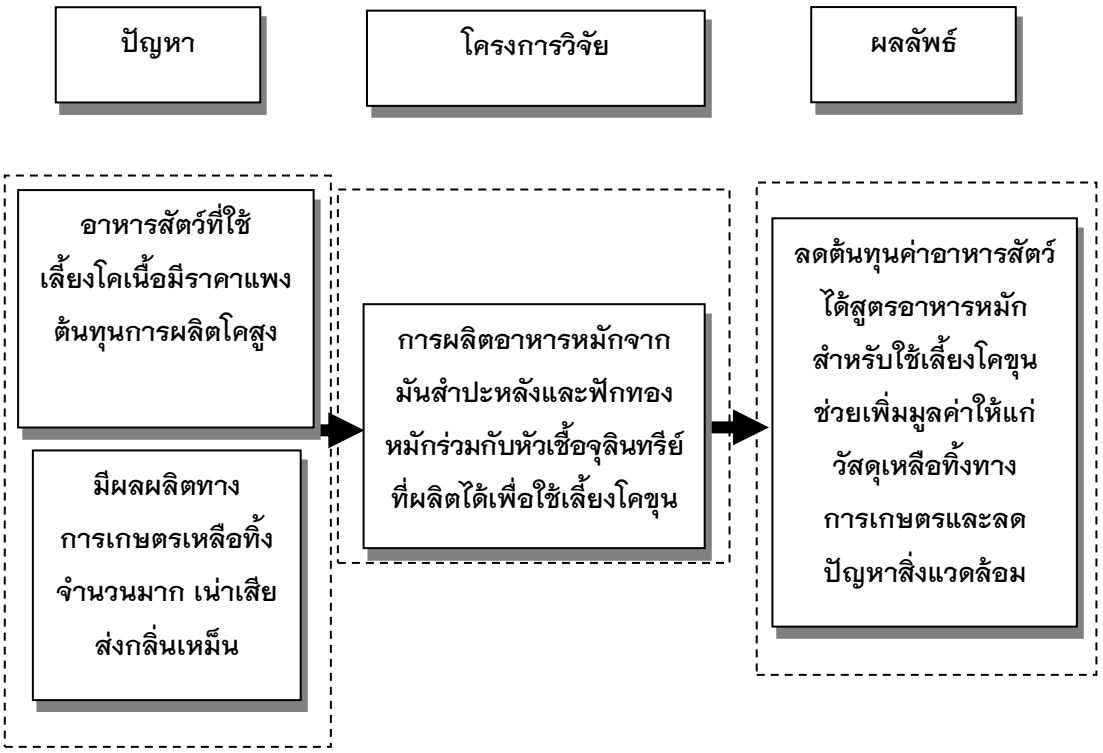
1. เพื่อทำการคัดแยกจุลินทรีย์จากลูกแป้งหมัก แล้วนำมาศึกษาศักยภาพในกระบวนการหมัก และผลิตเป็นหัวเชื้อ

2. เพื่อศึกษาผลของการใช้มันสำปะหลัง และฟักทองหมักร่วมกับหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตได้ในการนำไปใช้เลี้ยงโคขุน

สมมุติฐานของงานวิจัย

การหมักมันสำปะหลังและฟักทองร่วมกับหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตได้สามารถเพิ่มคุณค่าทางโภชนะ โดยเฉพาะในส่วนของโปรตีน และสามารถนำไปผสมเป็นอาหารสำหรับนำไปใช้เลี้ยงโคขุนได้

กรอบแนวคิดของแผนงานวิจัย



ภาพ 1 แสดงกรอบแนวคิดของแผนงานวิจัย

ขอบเขตของการวิจัย

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นศึกษาจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการหมักที่คัดแยกได้จากลูกแป้งและนำมาผลิตเป็นหัวเชื้อสำหรับใช้ในการหมักมันสำปะหลังและฟักทอง และทำการศึกษาคุณค่าทางโภชนะของอาหารหมักที่ผลิตได้ เพื่อนำไปใช้เลี้ยงโคเนื้อลูกผสมเลือดยุโรป (สายพันธุ์ชาร์โรเล่ส์และซิมเมนทัล)

ประโยชน์ที่จะได้รับจาการวิจัย

1. ได้อาหารหมักที่มีราคาถูก ทำให้ต้นทุนการผลิตโคขุนต่ำลง
2. เป็นแนวทางในการผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์เพื่อใช้ในการผลิตอาหารหมักและจำหน่ายแก่กลุ่มเกษตรกรเป้าหมาย
3. ช่วยลดปริมาณผลผลิตทางการเกษตรที่มีมากจนล้นตลาด
4. ช่วยแก้ไขปัญหาการเน่าเสียของเศษเหลือทิ้งทางการเกษตร

5. สามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อลดต้นทุนของการผลิตสัตว์อื่น ๆ เช่น กระบือ และโคขาวลำพูน ของศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์พะเยา รวมถึงโคเนื้อของเกษตรกรในพื้นที่

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

สถานการณ์การเลี้ยงโคเนื้อในประเทศไทย

การเลี้ยงโคเนื้อเป็นอาชีพทางการเกษตรที่สำคัญอีกอาชีพหนึ่งในประเทศไทย ในแต่ละปีจะมีมูลค่าการซื้อขายไม่ต่ำกว่า 7 หมื่นล้านบาท และเกี่ยวข้องกับเกษตรกรไม่น้อยกว่า 1.3 ล้านครอบครัว (ศูนย์สารสนทศ กรมปศุสัตว์, 2556) การเลี้ยงโคเนื้อของเกษตรกรไทยในอดีตจะเลี้ยงไว้เพื่อใช้แรงงานสำหรับทำการเกษตรเป็นหลัก ปัจจุบันรูปแบบการเลี้ยงโคเนื้อได้เปลี่ยนมาเป็นการเลี้ยงเพื่อจำหน่ายเป็นโคเนื้อเพื่อผลิตเนื้อโค เนื่องจากความต้องการบริโภคเนื้อสัตว์เพิ่มขึ้น ทั้งจากความต้องการของประชากรในประเทศเอง และนักท่องเที่ยวจากต่างประเทศ จากสถิติกรมปศุสัตว์ปี 2559 ประเทศไทยมีโคเนื้อ จำนวน 4.92 ล้านตัว สามารถผลิตลูกโคได้จำนวน 1.01 ล้านตัว (ศูนย์สารสนทศ กรมปศุสัตว์, 2556) หรือ 20% ของโควัยเจริญพันธุ์เท่านั้น ซึ่งอาจสืบเนื่องมาจากเหตุผลหลายประการ เช่น ขาดความรู้ด้านการจัดการและดูแล ปัญหาโรคระบาด และโดยเฉพาะอย่างยิ่งราคาต้นทุนที่สูงของอาหารสัตว์ โดยเฉพาะอาหารข้นซึ่งมีส่วนประกอบของกากเบียร์ที่มีราคาแพง

จากข้อมูลของสำนักงานปศุสัตว์จังหวัดพะเยา ว่าด้วยนโยบายเร่งด่วนของรัฐบาลในการยกระดับราคาสินค้าเกษตรเพื่อเพิ่มรายได้ให้แก่เกษตรกรในการดำรงชีพ และมีนโยบายสำคัญที่จะเพิ่มมูลค่าการส่งออกสินค้าเกษตรและอาหารไทย พัฒนาผู้ประกอบการด้านสินค้าปศุสัตว์อาหารฮาลาลให้ได้มาตรฐาน ซึ่งสอดคล้องกับยุทธศาสตร์การเข้าสู่ประชาคมอาเซียนในด้านการเสริมสร้างความสามารถในการแข่งขันของสินค้าบริการ การค้า และการลงทุน และสอดคล้องกับยุทธศาสตร์กลุ่มภาคเหนือตอนบน 2: การสร้างความเข้มแข็งและเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตภาคเกษตรและอุตสาหกรรมการเกษตรเพื่อเพิ่มมูลค่าสินค้าเกษตรที่มีศักยภาพ กลุ่มจังหวัดภาคเหนือตอนบน 2 เป็นแหล่งผลิตการเลี้ยงโคเนื้อพื้นเมือง มาเป็นระยะเวลายาวนานหลาย 10 ปี แต่ต่อมาสถานการณ์ของเศรษฐกิจโลกเปลี่ยนแปลงไป และเกษตรกรผู้เลี้ยงโคเนื้อ มีปริมาณลดลงเรื่อย ๆ ทั้งนี้เนื่องมาจากปัจจัยหลายประการที่เป็นตัวแปร อาทิเช่น ประชากรของโลกและของประเทศไทยมีปริมาณเพิ่มขึ้น ทำให้อัตราการบริโภคไม่สมดุลกับปริมาณการผลิตโดยเฉพาะในประเทศไทย จึงเป็นผลให้ประชากรโคเนื้อในประเทศลดลงอย่างมหาศาล เกษตรกรสู้การแข่งขันด้านคุณภาพโคจากต่างประเทศไม่ได้ เนื่องจากโคเนื้อส่วนใหญ่เป็นโคพื้นเมือง จึงก่อให้เกิดการจำหน่ายโคที่เลี้ยงออกไป เพราะถูกกดราคาอยู่บ่อย ๆ

จึงเป็นวิกฤตการณ์ผันผวน ทำให้เกษตรกรเกิดความเชื่อมั่นน้อยลงกว่าเดิมในราคาตลาดโคพื้นเมืองประจำถิ่น และมีการจำหน่ายสู่ตลาดจีน และเวียดนามเป็นจำนวนมาก ทั้ง ๆ ที่สภาพพื้นที่ภูมิอากาศของกลุ่มภาคเหนือตอนบนมีศักยภาพในการผลิตสูง เนื่องจากมีสภาพพื้นที่กว้างใหญ่ มีพืชทางการเกษตรที่สามารถนำมาเป็นอาหารสัตว์ได้เป็นจำนวนมาก ตลอดจนมีแหล่งปลูกพืชอาหารสัตว์กว้างใหญ่ไพศาล ประชากรส่วนใหญ่ในภาคเหนือตอนบน ประกอบด้วย จังหวัดพะเยา แพร่ น่าน และเชียงราย มีการบริโภคโคเนื้อเป็นอาหารท้องถิ่นทุก ๆ จังหวัด และอัตราแนวโน้มเพิ่มขึ้นของประชากรมากขึ้นทุกปี จากแหล่งข้อมูลด้านเศรษฐกิจการเกษตรของสำนักงานเศรษฐกิจแห่งชาติ ปี 2552 มีการลดลงจำนวนประชากรในพื้นที่เขตภาคเหนือ ตอนบนทั้ง 4 จังหวัด ประมาณ 34% จากปี 2551 ซึ่งสถิติการเลี้ยงโคจากภาคเหนือตอนบนมีโคเนื้ออยู่เพียงจำนวน 353,167 ตัว และมีแนวโน้มจะลดลงเรื่อย ๆ หากไม่มีการสนับสนุนการเลี้ยงโคหรือการพัฒนาปรับปรุงด้านต่าง ๆ เช่น อาหารสัตว์ และสายพันธุ์โคให้ดีขึ้น จะทำให้ธุรกิจการเลี้ยงโคเนื้อลดปริมาณอย่างรวดเร็ว นอกจากนี้จะต้องเพิ่มองค์ความรู้ แนวทาง เทคโนโลยี แผนใหม่ ปรับปรุง องค์ความรู้แก่เกษตรกร และเพิ่มศักยภาพของกลุ่มเกษตรกรให้มีความเข้มแข็งยิ่งขึ้น ทันต่อสถานการณ์ การตลาด และครัวโลกด้านอาหารปลอดภัย สามารถรองรับตลาดของครัวโลกด้านอาหารปลอดภัยในอนาคตได้ และจากสถิติของศูนย์สารสนเทศ กรมปศุสัตว์ หากย้อนกลับไปดูข้อมูลจำนวนโคเนื้อ เมื่อปี พ.ศ. 2554-2555 ที่ผ่านมา พบว่าการผลิตโคเนื้อ มีอัตราการผลิตลดลงประมาณ 6-8 เปอร์เซ็นต์ (ศูนย์สารสนทศ กรมปศุสัตว์, 2556) ซึ่งอาจสืบเนื่องมาจากเหตุผลหลายประการ เช่น ขาดความรู้ด้านการจัดการและดูแลปัญหาโรคระบาด และโดยเฉพาะอย่างยิ่งราคาต้นทุนที่สูงของอาหารสัตว์โดยเฉพาะอาหารข้น ซึ่งมีส่วนประกอบของกากเบียร์มีราคาแพง ร่วมกับการสอบถามข้อมูลโดยการสัมภาษณ์ นายมานิต อินต๊ะสาร ประธานสหกรณ์โคขุนดอกคำใต้ จำกัด และสอดคล้องกับการรายงานของส่วนวิจัยเศรษฐกิจปศุสัตว์และประมง สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร ซึ่งสรุปได้ว่า ต้นทุนการผลิตโคขุนจะอยู่ในส่วนของอาหารสัตว์ โดยเฉพาะอาหารสัตว์ซึ่งเป็นส่วนของต้นทุนผันแปรที่เป็นเงินสดมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ทำให้เกษตรกรแบกภาระต้นทุนมาก เกษตรกรจึงขาดแรงจูงใจในการเลี้ยงโค และหันไปประกอบอาชีพอื่นแทน และปัญหาอีกอย่างหนึ่งก็คือ ในช่วงฤดูแล้งมักจะขาดแคลนพืชอาหารสัตว์ซึ่งเป็นอาหารหยาบ ดังนั้น ถ้ามีแนวทางนำวัสดุทางการเกษตรที่หาง่ายในท้องถิ่นมาผลิตเป็นอาหารเพื่อเลี้ยงโคขุน ทั้งในส่วนของอาหารข้น และอาหารหยาบจะทำให้ช่วยแก้ไขปัญหาด้านต้นทุนอาหารสัตว์ได้อย่างยั่งยืน

การใช้อาหารหมักในการเลี้ยงโค

ในต่างประเทศช่วงที่ขาดแคลนอาหารสัตว์มักจะมีการนำพืชและวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรต่าง ๆ มาหมัก เพื่อจำหน่ายเป็นอาหารสัตว์โปรตีนสูง (silage) เพื่อผสมในอาหารข้นได้ เพราะจากรายงานวิจัยของ Bennett, et al. (1995) พบว่า การเลี้ยงโคด้วยอาหารข้นที่ทำให้เนื้อโคมีรสชาติดีกว่าการเลี้ยงด้วยหญ้า และมีอัตราการเจริญและน้ำหนักซากที่ดีกว่า ในขณะที่อาหารผสมสำเร็จรูป (Total Mixed Ration: TMR) จะเป็นอาหารที่ผลิตขึ้นมาจากการนำอาหารหยาบ และอาหารข้นมาผสมกันในอัตราส่วนที่เหมาะสม ดังเช่นในประเทศเนเธอร์แลนด์ ฝรั่งเศส และอิตาลี จะมีการใช้พืชอาหารหมักเพื่อเป็นอาหารสัตว์มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ (ดรุณี ศรีชนะ, 2550; วัชรวิทย์ มีหนองใหญ่ และคณะ, 2555)

สำหรับการนำวัสดุดังกล่าวมาผลิตเป็นอาหารหมักจำเป็นต้องคำนึงถึงองค์ประกอบต่าง ๆ ด้วย เช่น ปริมาณของวัตถุดิบ แหล่งไนโตรเจน โดยเฉพาะจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมัก ซึ่งจุลินทรีย์ที่ใช้ส่วนมากเป็นกลุ่มของเชื้อราที่มีความสามารถในการใช้คาร์โบไฮเดรตและผลิตเอนไซม์อะไมเลส เช่น *Rhizopus oryzae* และยีสต์ชนิดต่าง ๆ ซึ่งที่นิยมใช้กัน คือ *Saccharomyces* spp. (Saito, et al., 2004; Okine, et al., 2007)

คามินท์ ไชยมงคล และสุริยะ สะวานนท์ (2555) รายงานว่า ได้ศึกษาผลของการใช้ใบมันสำปะหลังแหง และใบมันสำปะหลังหมักเปรียบเทียบกับการใช้ใบกระถินในสูตรอาหารโคขุนต่อสมรรถภาพการผลิต ลักษณะซาก และผลตอบแทนทางเศรษฐกิจ โดยการใช้ใบมันสำปะหลังหมักในสูตรอาหารผสมเสร็จ (TMR) ที่ระดับ 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ (วัตถุแห้ง) พบว่า สมรรถภาพการผลิตของโคแต่ละกลุ่มไม่แตกต่างกันในทุกช่วงการทดลอง ส่วนลักษณะซากโคทดลองไม่แตกต่างกันในทางสถิต

ศุภชัย อุดชาชน และคณะ (2558) รายงานว่า การใช้กากมันสำปะหลังหมักยีสต์ทดแทนอาหารข้นในโคพันธุ์กบินทร์บุรี เพศผู้ไม่ตอน พบว่า อัตราการเจริญเติบโต ปริมาณอาหารที่กินได้ ปริมาณโปรตีนที่ได้รับต่อวัน ลักษณะซาก ชิ้นส่วนของเนื้อหลัก ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเทียบกับโคกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับกากมันหมักยีสต์

สุริยะ สะวานนท์ และคณะ (2554) ศึกษาผลของการเสริมกระถินหมักต่อสมรรถภาพการผลิต คุณลักษณะซาก ของโคเนื้อลูกผสมเพศผู้ พบว่า การเสริมกระถินหมักที่ 3 กิโลกรัมน้ำหนักสดต่อตัวต่อวัน มีผลทำให้ปริมาณอาหารที่กิน อัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน น้ำหนักตัวเมื่อสิ้นสุดการทดลอง และน้ำหนักซาก สูงกว่าโคกลุ่มที่ไม่ได้เสริมกระถินหมัก (กลุ่มควบคุม) ในขณะที่ลักษณะซากในด้านอื่น ๆ แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

และจากผลของการเสริมกระถินหมักที่ทำให้โคมีอัตราการเจริญเติบโตดีกว่านั้น ส่งผลทำให้ได้รับผลตอบแทนทางเศรษฐกิจ (กำไร) จากการขุนโคสูงกว่ากลุ่มควบคุม (3,924 บาทต่อตัว)

การหมัก (Fermentation)

การหมัก Fermentation มาจากภาษาละติน คือ Fervere หมายถึง การเดือด (Boil) ซึ่งสื่อถึงลักษณะของฟองก๊าซที่เกิดขึ้นจากการหมักผลไม้และข้าวมอลต์โดยยีสต์ โดยลักษณะของฟองที่เกิดขึ้น ก็เนื่องมาจากยีสต์ใช้น้ำตาลในผลไม้เป็นแหล่งอาหาร (แหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอน) ทำให้ได้คาร์บอนไดออกไซด์และแอลกอฮอล์ ซึ่งฟองที่เกิดขึ้นมาจากก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

การหมัก เป็นกระบวนทางชีวเคมีภายในเซลล์ เพื่อสร้างพลังงานจากการย่อยสลายสารอินทรีย์ หรือการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของสารประกอบอินทรีย์ โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์จากจุลินทรีย์

ประเภทของการหมัก

1. แบ่งตามผลผลิต

1.1 ผลผลิตเป็นตัวเซลล์ (Microbial cell) เช่น การผลิตยีสต์เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมขนมอบ (Bakers' yeast) การผลิตเซลล์จุลินทรีย์เพื่อใช้เป็นอาหารมนุษย์และสัตว์ (Single cell protein, SCP)

1.2 ผลผลิตเป็นเอนไซม์ (Microbial enzyme) ส่วนใหญ่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น เอนไซม์อะไมเลส (Amylase) เอนไซม์ไลเปส (Lipase) เอนไซม์โปรตีเอส (Proteases) เป็นต้น

1.3 ผลผลิตเป็นสารเมทาบอไลท์ (Microbial metabolite) อาจจะเป็นสารเมทา–บอไลท์ปฐมภูมิ (Primary metabolite) เช่น เอทานอล บิวทานอล ไลซีน วิตามิน เป็นต้น จุลินทรีย์จะผลิตสารเหล่านี้ขึ้นในช่วง Log phase และสารเมทาบอไลท์ทุติยภูมิ (Secondary metabolite) ซึ่งเป็นผลผลิตจากกระบวนการเมตาบอลิซึมปฐมภูมิ ซึ่งพบในจุลินทรีย์บางชนิดในช่วง Stationary phase ของการเจริญ แต่มีความสำคัญ เช่น ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ เป็นสารส่งเสริมการเจริญเติบโต (Growth promoter) หรือมีคุณสมบัติเป็นยารักษาโรค เป็นต้น

1.4 เกิดการเปลี่ยนรูปของสารประกอบที่เติมลงไป (Transformation process) เป็นกระบวนการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารประกอบให้อยู่ในรูปที่คล้ายกัน แต่มีราคาสูงขึ้น เช่น กระบวนการผลิตน้ำส้มสายชู (การเปลี่ยนเอทานอลไปเป็นกรดน้ำส้ม) การผลิตยาปฏิชีวนะ เป็นต้น

2. แบ่งตามความต้องการอากาศหรือออกซิเจน

2.1 Aerobic fermentation เป็นการหมักที่ต้องการอากาศ เช่น การหมักกรดซิตริก และกรดน้ำส้ม เป็นต้น

2.2 Anaerobic fermentation เป็นการหมักที่ไม่ต้องการออกซิเจน เช่น การหมักอะซิโตน และบิวทานอล

3. แบ่งตามสภาพการควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อ

3.1 Septic fermentation เป็นการหมักในสภาพเปิด ไม่จำเป็นต้องฆ่าเชื้อจุลินทรีย์

3.2 Semi-septic fermentation เป็นการหมักในสภาพปิดเพื่อป้องกันการปนเปื้อนเชื้อจากภายนอก แต่ไม่จำเป็นต้องฆ่าเชื้อที่ปนเปื้อนมากับวัตถุดิบ

3.3 Aseptic fermentation เป็นการหมักในสภาพปิดที่ปราศจากการปนเปื้อนเชื้อทั้งหมด

4. แบ่งตามลักษณะหรือปริมาณน้ำในอาหารเลี้ยงเชื้อ (วิเชียร ลีลาวัชรมาศ, 2553)

4.1 Solid state fermentation คือ กระบวนการหมักแบบแห้ง เป็นกระบวนการหมักที่ให้เชื้อจุลินทรีย์เจริญเติบโตบนอาหารที่มีลักษณะเป็นของแข็ง ได้แก่ การหมักโคจิต่าง ๆ อย่างเช่น ซีอิ้ว ลูกแป้ง การหมักรำข้าว หรือกากมันสำปะหลัง ซึ่งการหมักในลักษณะนี้เป็นการหมักที่มีประสิทธิภาพสูง มักจะใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์ เช่น การผลิตสารปฏิชีวนะการ ผลิตโปรตีนในอาหารสัตว์ การผลิตเอนไซม์ การผลิต เอทานอล เป็นต้น

4.2 Submerge state fermentation คือ กระบวนการหมักแบบเปียกเป็นกระบวนการหมักที่มีการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารที่มีลักษณะเหลว ได้แก่ การผลิตเบียร์ การผลิตกรดมะนาว กรดแลกติก และกรดอะซีติก เป็นต้น

5. แบ่งตามลักษณะของกระบวนการที่ใช้

5.1 การหมักแบบไม่ต่อเนื่อง (Batch fermentation) ทำในระบบปิดที่มีสารอาหารเริ่มต้นปริมาณจำกัด เมื่อใส่จุลินทรีย์เพาะเลี้ยงลงไปในระบบแบบต่อเนื่องแล้วจะไม่มีการเติมสารใด ๆ ลงไปอีก

5.2 การหมักแบบต่อเนื่อง (Continuous fermentation) เป็นโดยมีการเติมอาหารใหม่และถ่ายอาหารเก่าออกจากระบบในอัตราเดียวกันตลอดเวลา

5.3 Fed-batch fermentation เป็นการหมักที่มีการเติมสารอาหารบางอย่างเพิ่มลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นระยะ ๆ

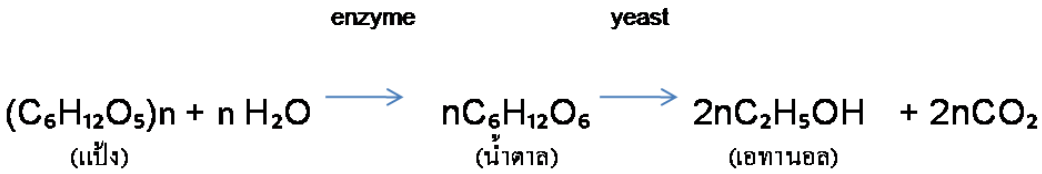
ลูกแป้งข้าวหมาก

การทำลูกแป้งหมักเป็นภูมิปัญญาพื้นบ้านที่มีมายาวนาน ผู้ผลิตต้องมีความชำนาญและจะมีการสืบทอดสูตรกรรมวิธีการผลิตภายในครอบครัว ลูกแป้งหมักเป็นกล้าเชื้อจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ ที่ได้จากการผสมแป้งข้าวเจ้ากับลูกแป้งเดิมที่สำเร็จแล้ว เพื่อเป็นการต่อเชื้อ และมีส่วนผสมของ กระเทียม ขิง ข่า ชะเอม ดีปลี และพริกไทย เป็นต้น เพื่อช่วยในการควบคุมเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการได้ คุณภาพของลูกแป้งหมักขึ้นอยู่กับวัตถุดิบและกรรมวิธีในการผลิต การนำลูกแป้งไปใช้ประโยชน์เพื่อการผลิตข้าวหมากหรือสาโทเป็นหลัก ซึ่งจะใช้ข้าวเป็นวัตถุดิบหลักในการหมัก ในลูกแป้งหมัก ประกอบด้วย จุลินทรีย์หลายชนิด ได้แก่ รากลุ่ม *Amylomayces* sp. *Rhizopus* sp. และ *Aspergillus* sp. ส่วนยีสต์เป็นกลุ่ม *Saccharomyces* sp. และยังมีแบคทีเรียแลคติก เป็นต้น ซึ่งบทบาทในกระบวนการหมักของเชื้อจุลินทรีย์ในลูกแป้งหมักจะเป็นการเปลี่ยนแป้งไปเป็นน้ำตาล โดยกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์อะไมเลส และกลุ่มที่ใช้น้ำตาลที่เกิดขึ้นได้เป็นเอทานอลและคาร์บอนไดออกไซด์

บทบาทของจุลินทรีย์ในลูกแป้งข้าวหมากต่อกระบวนการหมัก

บทบาทของจุลินทรีย์ที่พบในลูกแป้งข้าวหมากนั้นมีอยู่ 2 ประเภท คือ

1. การเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาล โดยจุลินทรีย์ในกลุ่มที่สร้างเอนไซม์อะไมเลส
2. การหมักน้ำตาลที่เกิดขึ้นให้เป็นเอทานอลกับคาร์บอนไดออกไซด์โดยกลุ่มของยีสต์



ภาพ 2 แสดงสมการการย่อยสลายแป้งไปเป็นแอลกอฮอล์

ยีสต์ (Yeast)

ยีสต์ เป็นสิ่งมีชีวิตในอาณาจักรเห็ดรา (Kingdom Fungi) แต่มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว (Unicellular) มีขนาด 5–10 ไมครอน มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส (eukaryotic micro–organisms) และมีรูปร่างหลายแบบ เช่น รูปร่างกลม รี สามเหลี่ยม เป็นต้น ส่วนใหญ่มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (asexual reproduction) โดยวิธีการแตกหน่อ (budding) พบทั่วไปในธรรมชาติในดิน ในน้ำ ในส่วนต่าง ๆ ของพืช ยีสต์บางชนิดพบอยู่กับแมลง และในกระเพาะของสัตว์บางชนิด แหล่งที่

มักจะพบยีสต์อยู่บ่อย ๆ คือ แหล่งที่มีน้ำตาลความเข้มข้นสูง เช่น น้ำผลไม้ที่มีรสหวาน ยีสต์เป็นสิ่งมีชีวิตที่มีขนาดเล็กมาก จัดอยู่ในกลุ่มจำพวกเห็ด รา (Fungi) ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่รู้จักกันมาตั้งแต่สมัยโบราณ มีการนำยีสต์มาใช้ประโยชน์นานมาแล้ว โดยเฉพาะการผลิตอาหารที่มีแอลกอฮอล์ แม้แต่คนไทยก็รู้จักใช้ประโยชน์จากยีสต์มาเป็นเวลานาน เช่น ในการทำอาหารหมักบางชนิด ได้แก่ ข้าวหมาก ปลาแจ่ว ของดองของเมาหลายชนิด เช่น อุ สาโท และกระแช่ เป็นต้น ปัจจุบันมีการนำยีสต์มาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมหลายประเภท ไม่ว่าจะเป็นการผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ชนิดต่าง ๆ เช่น เบียร์ ไวน์ และวิสกี้ การผลิตเซลล์ยีสต์ เพื่อใช้เป็นยีสต์ขนมปัง และเป็นโปรตีนเซลล์เดียว (single cell protein) เนื่องจากคุณสมบัติที่มีขนาดเล็กมาก สามารถเพาะเลี้ยงขยายเพิ่มจำนวนได้ในระยะเวลาอันรวดเร็ว และมีวิธีการที่ไม่ยุ่งยาก โดยยีสต์มีคุณสมบัติในการเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นคาร์บอนไดออกไซด์และแอลกอฮอล์

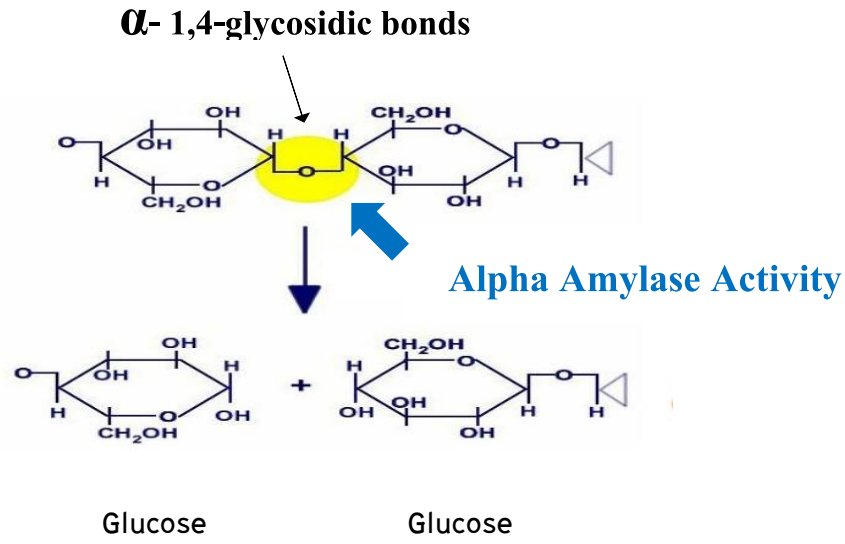
อะไมเลส (Amylase)

เอนไซม์อะไมเลส (amylase or amylolytic enzyme) ถูกค้นพบขึ้นเป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1831 และในปี ค.ศ. 1833 นักเคมีชาวฝรั่งเศสชื่อ Anselme Payen และ Jean–Francois Persoz ก็สามารถแยกเอนไซม์อะไมเลสออกจากข้าวบาร์เลย์งอก

อะไมเลส (amylase) เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม Hydrolases และเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (Catalyst) ในการเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาลโดยไฮโดรไลซ์พันธะ 1, 4–glycosidase bond ในโมเลกุลของสตาร์ช (starch) ให้มีขนาดของโมเลกุลเล็กลง ได้แก่ น้ำตาลมอลโตไตรโอส (moltotriose) มอลโตส (maltose) ซูโครส (sucrose) เด็กซ์ตริน (dextrin) กลูโคส (glucose) และฟรุคโตส (fructose) เอนไซม์อะไมเลสสามารถพบได้ทั้งใน พืช สัตว์ และจุลินทรีย์

เอนไซม์อะไมเลส แบ่งออกได้ 3 ชนิด คือ

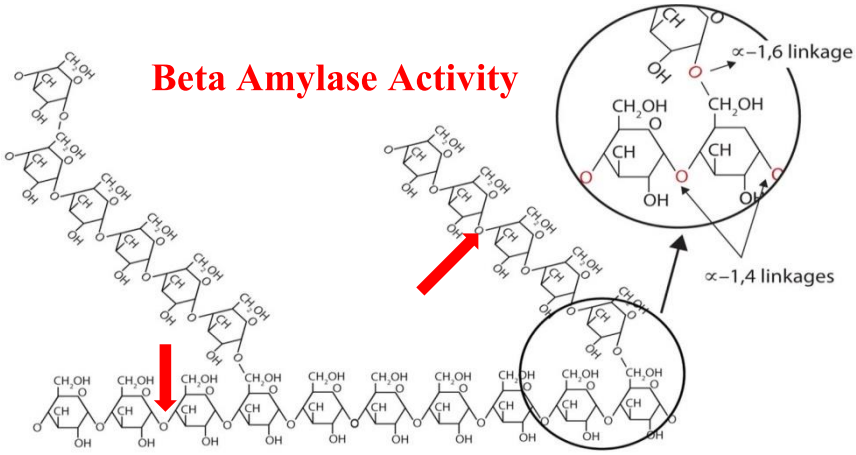
1. แอลฟา–อะไมเลส (alpha–amylase) เป็นเอนไซม์ที่ไฮโดรไลซ์พันธะไกลโคไซด์ภายในสายพอลิเมอร์ของโมเลกุลสตาร์ช (starch) และไกลโคเจน (glycogen) ที่ตำแหน่งแอลฟา 1–4 แบบสุ่ม ดังภาพ 3



ภาพ 3 แสดงการทำงานของเอนไซม์ แอลฟา–อะไมเลส (ลูกศรสีน้ำเงิน)

ที่มา: Periyasamy, 2012

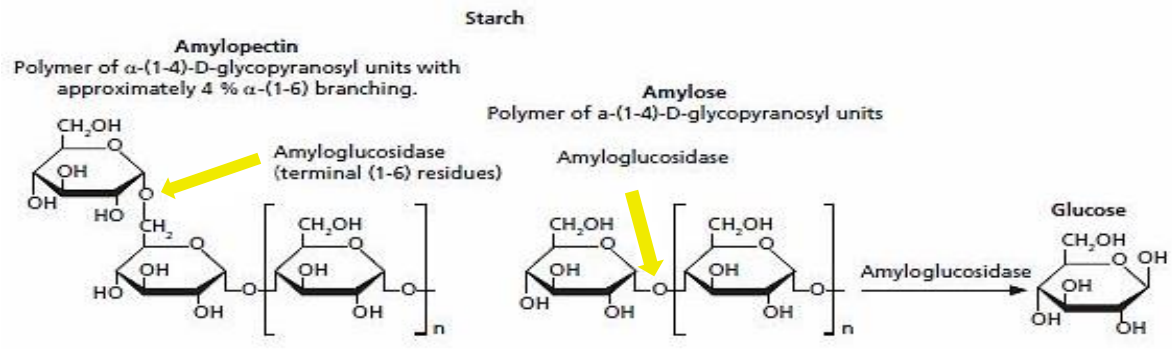
2. บีตา–อะไมเลส (beta–amylase) เป็นเอนไซม์ที่ไฮโดรไลซ์สตาร์ช (starch) ที่ตำแหน่งแอลฟา 1–4 ของพันธะไกลโคไซด์ที่เฉพาะส่วนปลายสายด้านที่เป็นนอนรีดิวส์ (non reducing end) ดังภาพ 4



ภาพ 4 แสดงการทำงานของเอนไซม์ บีตา–อะไมเลส (ลูกศรสีแดง)

ที่มา: Enevoldsen and Bathgate, 1969

3. แกมมา–อะไมเลส กลูโคอะไมเลส หรืออะไมโลกลูโคซิเดส (γ–1, 4–glucan glucohydrolase) เป็นเอนไซม์ที่ไฮโดรไลซ์สายพอลิเมอร์ของสตาร์ช (starch) ได้ทั้งที่พันธะไกลโคไซด์ที่ตำแหน่งแอลฟา 1–4 และแอลฟา 1–6 ดังภาพ 5



ภาพ 5 แสดงการทำงานของเอนไซม์ แกมมา–อะไมเลส กลูโคอะไมเลส หรืออะไมโลกลูโคซิเดส (ลูกศรสีเหลือง)

ที่มา: Siegrist, 2017

เซลลูเลส (Cellulase)

เอนไซม์เซลลูเลส (cellulase or cellulolytic enzyme) เป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการย่อยสลายเซลลูโลสไปเป็นน้ำตาลกลูโคส ประกอบด้วยเอนไซม์หลายองค์ประกอบ (multicomponent enzymes) ทำงานร่วมกันอย่างน้อย 3 กลุ่ม คือ

1. บีตา–1, 4–กลูแคนกลูคาโนไฮโดรเลส (β–1, 4–glucan glucanohydrolase: EC 3. 2.1.4) หรือเรียกว่า เอนโดกลูคาเนส ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายเซลลูโลสบริเวณพันธะ β–1, 4–glycosidic linkage ของสายเซลลูโลสบริเวณ amorphous cellulose แบบสุ่ม ทำให้ได้เป็นน้ำตาลโมเลกุลสั้น ๆ เช่น เซลโลไบโอส และถ้าเกิดปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์จะได้เป็นน้ำตาลกลูโคส สามารถวิเคราะห์ได้จากปฏิกิริยาย่อยสลาย Carboxymethyl cellulose (CMC)

2. บีตา–1, 4–กลูแคนเซลโลไบโอไฮโดรเลส (β–1, 4–glucan cellobiohydrolase, CBH: EC 3.2.1.91) หรือเรียกว่า เอกโซกลูคาเนส ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายเซลลูโลสบริเวณพันธะ β–1, 4–glycosidic linkage ของสายเซลลูโลสบริเวณปลายด้าน non–reducing end ของ crystalline cellulose ทำให้ได้เป็นน้ำตาลโมเลกุลสั้น ๆ เช่น เซลโลไบโอส ถ้าปฏิกิริยา

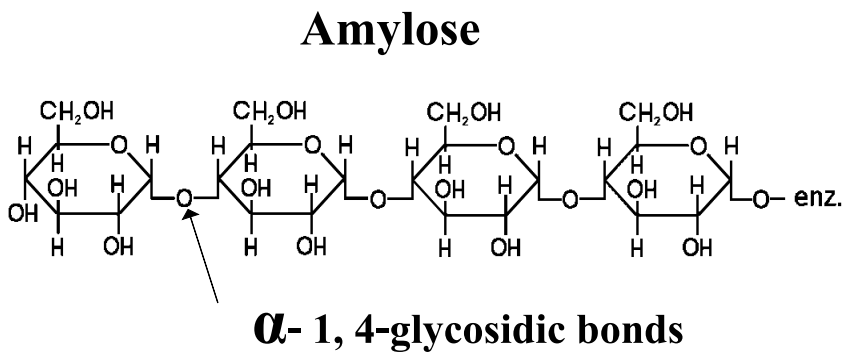
เกิดอย่างสมบูรณ์จะได้เป็นน้ำตาลกลูโคส สามารถวิเคราะห์ได้จากการวัดแอคติวีตี โดยให้ทำปฏิกิริยากับ crystalline cellulose เช่น กระดาษกรอง Avicel เป็นต้น

3. บีตา-กลูโคซิเดส (β-glucosidase: EC 3.2.1.21) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายเซลโลไบโอสบริเวณพันธะ β-glucosidic bond ทำให้ได้เป็นน้ำตาลกลูโคส (β-D-glucose) 2 โมเลกุล สามารถวัดแอคติวีตีโดยให้ทำปฏิกิริยากับ cellobiose และ ρ-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside (ρ-NPG) เป็นต้น (Wike, et al., 1983)

การย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเซลลูเลสจะสมบูรณ์เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นกลูโคสนั้น ต้องอาศัยการทำงานของ เอนโดกลูคาเนส เอกโซกลูคาเนส และบีตา-กลูโคซิเดสร่วมกัน

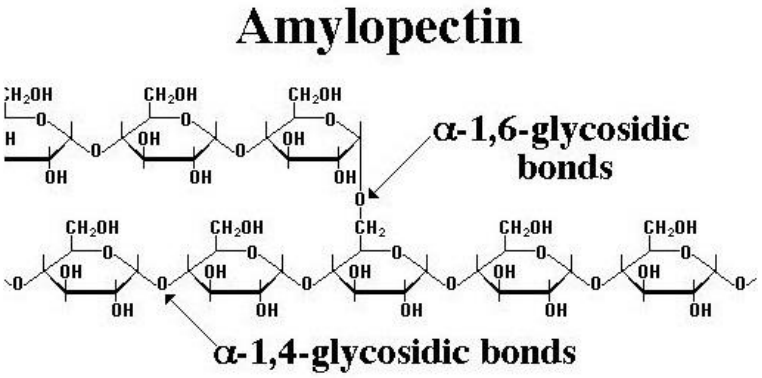
สตารช (Starch)

สตารช (Starch) เป็นส่วนประกอบสำคัญในอาหาร เช่น ขนม อาหารสำเร็จรูป และอาหารกึ่งสำเร็จรูป เป็นต้น สตารชเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) ที่พบได้ในพืช เช่น เมล็ดธัญพืช พืชหัว และถั่วเมล็ดแห้ง มีน้ำตาลกลูโคส (glucose) เป็นมอโนเมอร์ ของน้ำตาลกลูโคสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคไซด์ (glycosidic bond) ที่ตำแหน่ง α-1, 4 มีโครงสร้างเป็นแบบอะไมโลส (amylose) ดังภาพ 6 ส่วนที่ตำแหน่ง α-1, 4 และ แอลฟา α-1, 6 มีโครงสร้างเป็นแบบอะไมโล-เพกทิน (amylopectin) ดังภาพ 7



ภาพ 6 แสดงโครงสร้างของอะไมโลส (amylose)

ที่มา: Mann and Truswell, 2007

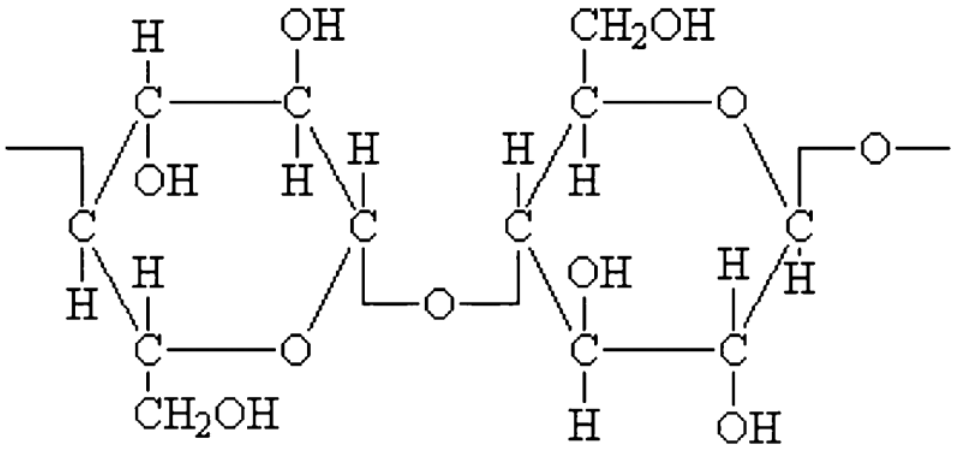


ภาพ 7 แสดงโครงสร้างของไมโลเพกติน (amylopectin)

ที่มา: Mann and Truswell, 2007

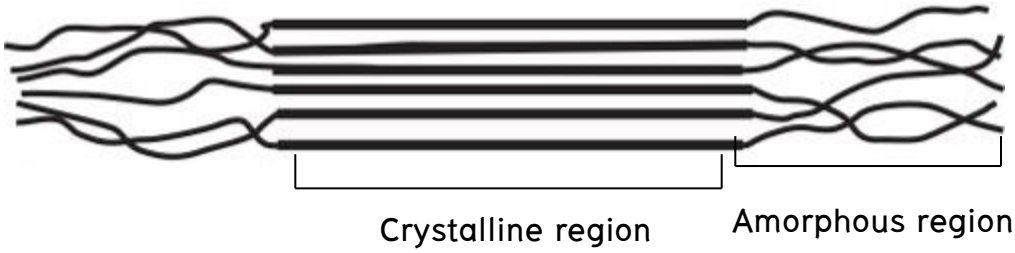
เซลลูโลส (Cellulose)

เป็นคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) ที่มีมากที่สุดในธรรมชาติ เป็นองค์ประกอบหลักที่สำคัญของผนังเซลล์พืช เซลลูโลส ประกอบด้วย สายพอลิเมอร์ของกลูโคสที่เชื่อมกันแบบไม่มีกิ่งก้านสาขา (unbranched polymer) เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β–1, 4 glycosidic linkage (ภาพ 8) เซลลูโลสมีลักษณะเรียงตัวเป็นสายยาว มีบริเวณที่มีพันธะไฮโดรเจนอยู่หนาแน่นทำให้โครงสร้างแข็งแรง เป็นระเบียบ ทำให้ย่อยสลายได้ยาก เรียงตัวแบบผลึก เรียกว่า Crystalline regions ซึ่งมีอยู่ประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ และบริเวณที่มีพันธะไฮโดรเจนน้อย ทำให้โครงสร้างเรียงตัวอย่างไม่เป็นระเบียบ จึงถูกย่อยสลายได้ง่ายกว่า บริเวณนี้เรียกว่า Amorphous regions ซึ่งมีอยู่ประมาณ 15 เปอร์เซ็นต์ (Voet, 1995) (ภาพ 9) ในธรรมชาติเซลลูโลสไม่ได้อยู่เป็นสายเดี่ยว ๆ แต่จะเรียงตัวกันเป็นไมโครไฟบริล (micro fibril) และจับกันเป็นกลุ่มที่มีความแข็งแรงและมีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ เนื่องมาจากมีพันธะไฮโดรเจนจำนวนมากที่ยึดระหว่างสายพอลิเมอร์ทำให้น้ำไม่สามารถเข้าไปได้



ภาพ 8 แสดงการเชื่อมต่อกันของกลูโคสด้วยพันธะ β–1, 4 glycosidic linkage

ที่มา: Harane, et al., 2014



ภาพ 9 แสดงรูปแบบโมเลกุลของสายเซลลูโลส

ที่มา: Visakh and Thomas, 2010

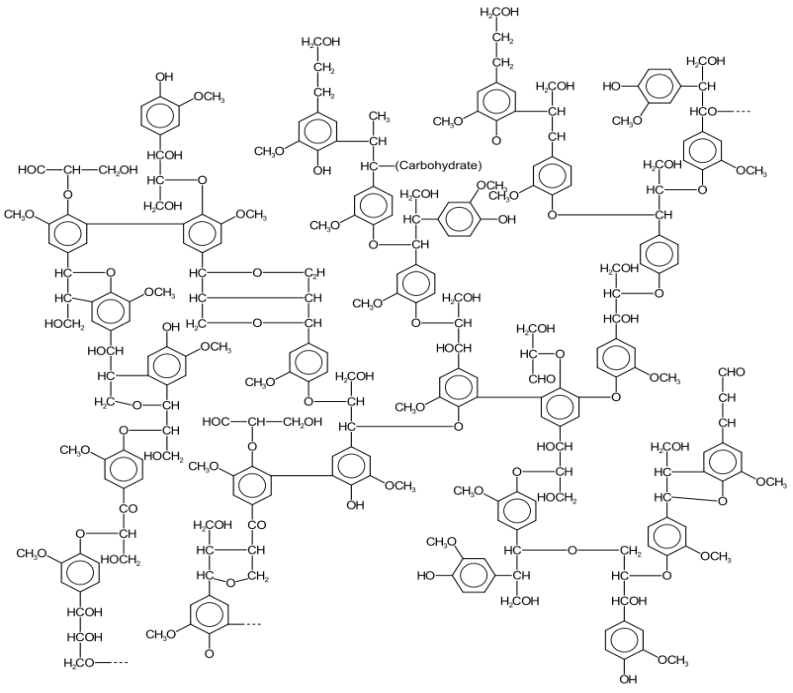
เฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose)

เป็นคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) ประเภทพอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) พบมากเป็นอันดับสองรองจากเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสเป็นพอลิเมอร์ส่วนที่ยึดติดกับเซลลูโลสในผนังของเซลล์พืช มีหน้าที่ช่วยในการเสริมสร้างโครงสร้างของผนังเซลล์ให้หนา และแข็งแรงขึ้นในระหว่างที่พืชมีการเจริญเติบโต ในโมเลกุลของเฮมิเซลลูโลสเป็นเฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ (heteropolysaccharide) ที่ประกอบด้วยน้ำตาลหลายชนิด องค์ประกอบหลัก คือ น้ำตาล 5 โมเลกุล เช่น ไซโลส (xylose) หรือ ไซแลน (xylan) เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคไซด์ (glycosidic bond)

ที่ตำแหน่ง β-1, 4 เป็นโซ่หลัก อาจมีน้ำตาลแมนโนส (mannose) กาแล็กโทส (galactose) หรือกลูโคส (glucose) มาต่อกันเป็นโซ่หลักด้วย และมีน้ำตาลชนิดอื่นมาต่อกันเป็นกิ่งก้านสาขาหรือโซ่แขนง ได้แก่ น้ำตาลอะราบิโนส (arabinose) กรดกลูคูโรนิก (glucuronic acid)

ลิกนิน (Lignin)

เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์พืชที่มีมากเป็นอันดับ 3 รองจากเซลลูโลส และเฮมิ-เซลลูโลส โครงสร้างโมเลกุลของลิกนินเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) ที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่และจัดเป็นสารประกอบอะโรมาติก (aromatic compound) โครงสร้างประกอบด้วยหน่วยย่อยที่เรียกว่า ฟีนิลโพรเพน (phenyl propane) เป็นหน่วยโครงสร้างที่มีคาร์บอนหลัก 9 อะตอม มีหมู่ฟีนอลิกไฮดรอกซี (phenolic hydroxyl group) และส่วนที่มีหมู่เมทิล (methyl group) โดยที่หน่วยย่อยนี้จะเป็นโครงสร้างพื้นฐานของพารา-ไฮดรอกซีฟีนิล, ไกวเอซิล และไซรินจิล ซึ่งจะมีการจับประสานกันเป็นพอลิเมอร์ และต่อกันเป็นเครือข่าย 3 มิติ ที่มีกิ่งก้านจำนวนมาก (ภาพ 10)



ภาพ 10 แสดงรูปแบบโครงสร้างโมเลกุลของลิกนิน

ที่มา: Glazer and Nikaido, 1995

แหล่งโภชนะที่สำคัญในอาหารโคขุน

1. แหล่งของโปรตีน

สำหรับโคขุนที่มีอายุ 1 ปีขึ้นไป หรือน้ำหนักไม่ต่ำกว่า 200 กิโลกรัม จะต้องได้รับอาหารที่มีปริมาณโปรตีนไม่ต่ำกว่า 14 เปอร์เซ็นต์ แหล่งของโปรตีนในอาหารโคขุน คือ ฟักทองหมักและมันสำปะหลังหมัก

ฟักทองหมัก (fermented pumpkin) เป็นฟักทองที่นำไปผ่านกระบวนการหมักร่วมกับจุลินทรีย์ ทำให้มีคุณค่าทางโภชนะเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะในส่วนของโปรตีนและไขมัน เพิ่มขึ้นเป็น 15.97 และ 7.12 เปอร์เซ็นต์วัตถุแห้ง ฟักทองที่ผ่านกระบวรการหมักจะมีเนื้อสัมผัสที่นุ่มขึ้นและเกิดกลิ่นหอม ส่วนประกอบของฟักทองหมัก จะประกอบด้วย ฟักทอง กากน้ำตาล หัวเชื้อจุลินทรีย์ และน้ำ

มันสำปะหลังหมัก (fermented cassava) มันสำปะหลังเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย โดยประเทศไทยสามารถส่งออกผลิตภัณฑ์มันสำปะหลังได้หลายรูปแบบ เช่น มันเส้น มันอัดเม็ด แป้งมันสำปะหลัง ทั้งในรูปของแป้งดิบและแป้งแปรรูป เป็นต้น ในปัจจุบันประเทศไทยเป็นผู้ส่งออกผลิตภัณฑ์มันสำปะหลังรายใหญ่ที่สุดของโลก โดยมีส่วนแบ่งตลาดสูงถึงร้อยละ 70 ส่วนในตลาด ASEAN นั้น ประเทศไทยสามารถครองอันดับ 1 ในการส่งออกมาเป็นเวลานานกว่า 10 ปี (สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ, 2559)

องค์ประกอบทางเคมีของมันสำปะหลัง ประกอบไปด้วย เส้นใย (fiber) และเถ้า (ash) ซึ่งอยู่ในช่วง 0.77–4.62 เปอร์เซ็นต์วัตถุแห้ง และ 0.7–2.2 เปอร์เซ็นต์วัตถุแห้ง ตามลำดับ (Apea–Bah, 2011) และมีปริมาณโปรตีน 2.50 เปอร์เซ็นต์วัตถุแห้ง (กรมปศุสัตว์, 2547) เนื่องจากมันสำปะหลังมีปริมาณโปรตีนอยู่น้อย ซึ่งไม่เพียงพอต่อความต้องการของโค เพราะฉะนั้นจึงต้องหาวิธีการในการเพิ่มปริมาณโปตีนให้กับมันสำปะหลังให้เพิ่มสูงขึ้น โดยการนำมาผ่านกระบวนการหมักร่วมกับจุลินทรีย์ กระบวนการหมักมันสำปะหลังนั้นมีมานานแล้ว ทั้งในประเทศเองและต่างประเทศ ก็มีการนำมันสำปะหลังมาผ่านกระบวนการหมัก เพื่อเพิ่มโปรตีน อย่างเช่นในรายงานของ Muindi and Hanssen (1981); Mikami, et al. (1982) ได้ทำการศึกษากระบวนการหมักมันสำปะหลังร่วมกับเชื้อรา acidophilic สองสายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อรา *Trichoderma harzianum* และ *Cephalosporium eichhorniae* ตามลำดับ พบว่า โปรตีนจาก 2.4% เพิ่มขึ้นเป็น 37.6% และ 41% สำหรับ T.*harzianum* และ C *eichhorniae* ตามลำดับ

Nwafor and Ejukonemu (2004); Kompiang, et al. (1994); Sukara and Doelle (1988); Brook, et al. (1969); Gray and Abou–El–Seoud (1966) รายงานว่า มันสำปะหลัง

ที่ผ่านกระบวนการหมัก พบว่า มีปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านกระบวนการหมัก

Steinkraus (1995) รายงานว่า การหมักจะช่วยขับสารพิษ หรือสารต้านการเจริญเติบโตออกจากวัตถุดิบในระหว่างขั้นตอนของกระบวนการหมัก และยังเพิ่มคุณค่าทางโภชนะ ได้แก่ โปรตีน กรดอะมิโนที่จำเป็น กรดไขมันที่จำเป็นและวิตามิน นอกจากนี้การในกระบวนหมักยังมีการผลิตกรดแลคติก กรดอะซิติก ซึ่งช่วยในการถนอมอาหารให้สามารถเก็บรักษาได้นานขึ้น

Varghese, et al. (1976) ทดลองหมักมันสำปะหลังกับเชื้อรา *Aspergillus Neurospora* และ *Rhizopus* spp. พบว่า มีปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้น 3% โดยมีการเสริมแหล่งไนโตรเจน เช่น รำข้าว สับปะรด และมูลไก่

ตาราง 1 แสดงคุณค่าทางโภชนะของมันสำปะหลัง (Cassava, *Manihot esculenta*)

ชนิดวัตถุดิบ	% วัตถุแห้ง											
	DM (%)	CP (%)	EE (%)	CF (%)	Ash (%)	NFE (%)	NDF (%)	ADF (%)	ADL (%)	TDN (%)	DE (Mcal/kg)	ME (Mcal/kg)
กากมัน	88.3	1.9	0.2	11.6	2.6	72.0	24.5	18.3	–	65[4/]	–	–
(starch	100	2.2	0.2	13.1	3.0	81.5	27.7	20.7	–	74[4/]	–	–
process	(*3.7*)	(*1.5*)	(*0.2*)	(*4.0*)	(*1.2*)	–	(*6.2*)	(*5.0*)	–	–	–	–
residue)												
เปลือก	88.5	3.7	0.7	17.9	6.7	59.5	27.2	21.4	1.4	60[4/]	–	–
หัวมัน แห้ง	100	4.1	0.8	20.2	7.6	67.2	30.8	24.2	1.6	68[4/]	–	–
(peelings,	(*5.0*)	(*0.7*)	(*0.3*)	(*3.2*)	(*3.6*)	–	(*5.8*)	(*4.9*)	–	–	–	–
dried)												
มันเส้น	89.6	2.0	0.4	2.7	3.4	81.0	8.4	4.9	1.5	71[4/]	3.51[1/]	3.15[1/]
(cassava	100	2.3	0.5	3.0	3.8	90.4	9.4	5.5	1.7	79 [4/]	4.06[1/]	3.65[1/]
chips)	(*3.1*)	(*0.5*)	(*0.2*)	(*1.2*)	(*2.0*)	–	(*3.8*)	(*2.9*)	(*0.3*)	–	–	–
มันอัดเม็ด	89.1	2.3	0.3	5.5	4.0	76.9	15.4	7.9	–	69[4/]	–	–
(cassava	100	2.6	0.4	6.2	4.5	86.3	17.3	8.9	–	77[4/]	–	–
tuber,	(*0.7*)	(*0.4*)	(*1.6*)	(*1.5*)	(*0.6*)	–	(*6.1*)	(*1.5*)	–	–	–	–
pellet)												
กากมัน	0.32	0.04	0.23	0.05	0.02	0.03	2.35	–	–	–		
หลังหมัก	1.23	0.16	0.86	0.21	0.06	0.12	8.90	–	–	–		
แอลกอฮอล์	(*0.48*)	(*0.06*)	(*0.0*)	(*0.01*)	–	(*0.0*)	(*4.89*)	–	–	–		
สด												
(cassava												
pulp,												
ethanol												
process												
residue,												
wet)												

หมายเหตุ: [1/] Harris *et al.*, 1982

[2/] NRC, 1984

[3/] NARO, 2001

[4/] สำนักพัฒนาอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์ (ผลวิเคราะห์ตัวอย่างปี 2559)

ที่มา: สำนักพัฒนาอาหารสัตว์, 2559

นอกจากนี้ในมันสำปะหลัง ยังมีสารต้านการเจริญเติบโตอยู่ในระดับสูง ได้แก่ ไฮโดรเจนไซยาไนด์ (HCN) แทนนิน (tannins) และไฟเตท (Akpan and Ikenebomeh, 1995)

Padmaja, et al. (2009) รายงานว่า ในหัวมันสำปะหลังสดมีปริมาณไฮโดรเจนไซยาไนด์ (HCN) อยู่ 55.1–190.2 มิลลิกรัม/กิโลกรัม สารต้านการเจริญเติบโตเหล่านี้ จะทำให้ประสิทธิภาพการย่อยอาหารของสัตว์ที่ได้รับเข้าไปในร่างกายลดต่ำลง ทำให้สัตว์กินอาหารได้น้อยลง (Alawa and Amadi, 1991; Adegbola and Oduozo, 1992)

การทำมันสำปะหลังหมักเพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์มีมาเป็นเวลานานแล้ว ซึ่งเป็นการเพิ่มปริมาณสารอาหารโดยเฉพาะในส่วนของโปรตีนและไขมัน และยังช่วยลดปริมาณสารต้านการเจริญของสัตว์ รวมถึงลดปริมาณสารพิษกรดไฮโดรไซยานิค นอกจากนี้ยังถือเป็นการเก็บรักษามันสำปะหลังไว้ใช้ได้นาน ๆ อีกด้วย ในกระบวนการหมักตามธรรมชาติหรือการหมักร่วมกับเชื้อจุลินทรีย์ นอกจากจะช่วยเพิ่มคุณค่าทางโภชนะอย่างเช่นโปรตีน วิตามิน กรดอะมิโนที่จำเป็นและกรดไขมันที่จำเป็นแล้วยังช่วยให้เกิดกลิ่นหอม รสชาติ และเนื้อสัมผัสที่ดีขึ้น (Aro, et al., 2008) และนอกจากนี้ยังสามารถลดปริมาณกรดไฮโดรไซยานิค เนื่องจากในกระบวนการหมักจะทำให้ pH ลดลง ทำให้เกิดสภาวะเหมาะสมที่จะเกิดการไฮโดรไลซ์สารไซยาโนจีนิคกลูโคไซด์ ให้กรดไฮโดรไซยานิคไหลออกไปกับน้ำ (เจริญศักดิ์ โรจนฤทธิ์พิเชษฐ์, 2519)

2. แหล่งของพลังงาน

แหล่งของพลังงานที่มีความสามารถในการย่อยสลายได้รวดเร็วเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในกระบวนการสังเคราะห์ของจุลินทรีย์โปรตีนในกระเพาะรูเมน แหล่งพลังงานในอาหารสัตว์ที่มักจะนิยมใช้ ได้แก่ กากน้ำตาล

กากน้ำตาล (molasses) เป็นของเหลวที่มีลักษณะข้นและเหนียวมีสีน้ำตาลดำที่เป็นผลพลอยได้จากการผลิตน้ำตาลทรายจากอ้อย ซึ่งไม่สามารถตกผลึกน้ำตาลได้อีก กรรมวิธีการผลิตน้ำตาลทรายจากอ้อยจะเริ่มจากการนำอ้อยเข้าหีบได้น้ำอ้อย กรองเอากากออกจากน้ำอ้อยแล้วเคี่ยวจนได้ผลึกของน้ำตาลทรายตกตะกอนออกมา จากนั้นจะนำมาปั่น (centrifuge) แยกผลึกน้ำตาลทราย ผลพลอยได้จากการผลิตน้ำตาลทรายจากอ้อย ได้แก่ กากน้ำตาล (molasses) กากตะกอนโคลน (filter cake) และกากอ้อย (bagasses)

กากน้ำตาล มีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลซูโครสที่ไม่ตกผลึก ในการผลิตน้ำตาลทรายนั้น จะมีกากน้ำตาลซึ่งเป็นผลพลอยได้เกิดขึ้น ประมาณ 4–6 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณอ้อยที่ใช้ในการผลิต กากน้ำตาลสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ชนิด ตามกรรมวิธีในการผลิตน้ำตาลทราย คือ

2.1 กากน้ำตาลที่ได้จากการผลิตน้ำตาลทรายขาว (plantation white sugar) หรือที่เรียกว่า black–strap molasses จะมีปริมาณน้ำตาลอยู่ประมาณ 50–60 เปอร์เซ็นต์

2.2 กากน้ำตาลที่ได้จากการผลิตน้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์ (refine sugar) หรือที่เรียกว่า refinery molasses จะมีปริมาณน้ำตาลอยู่ประมาณ 48 เปอร์เซ็นต์

2.3 กากน้ำตาลที่ได้จากการทำบางส่วนของน้ำอ้อยแปรสภาพให้เข้มข้นโดยการระเหย (inverted can juice) ซึ่งเราเรียกว่า invert molasses หรือ hightest molasses วิธีนี้เป็นการผลิตกากน้ำตาลโดยตรง

ในกากน้ำตาลนอกจากจะประกอบไปด้วย น้ำตาลประมาณ 50– 60 % ยังมีแร่ธาตุต่าง ๆ รวมอยู่ด้วย ได้แก่ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม

สายพันธุ์โคเนื้อ

สำหรับสายพันธุ์โคเนื้อที่กำลังได้รับความสนใจ และเป็นที่รู้จักกันดีของเกษตรกรในบ้านเรานั้น มีด้วยกันหลากหลายสายพันธุ์ โดยมีคุณลักษณะที่โดดเด่นทั้งข้อดีและข้อเสียแตกต่างกันไป ในการทดลองนี้จะใช้สายพันธุ์โคเนื้อ 2 สายพันธุ์ด้วยกัน ดังนี้

ภาพ 11 แสดงโคลูกผสมสายพันธุ์ชาโรเลส์ (Charolais crossbred)

1. โคลูกผสมสายพันธุ์ชาโรเลส์ (Charolais crossbred) เช่น พันธุ์ตาก (tak beef cattle) เป็นโคลูกผสมระหว่าง ชาโรเล่ส์กับพันธุ์บราห์มัน โดยกรมปศุสัตว์ได้มอบหมายให้ศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์ตาก ทำการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์ให้เป็นโคเนื้อพันธุ์ใหม่ที่โตเร็ว เนื้อนุ่ม เพื่อทดแทนการนำเข้าพันธุ์โคและเนื้อโคคุณภาพดีจากต่างประเทศ การสร้างพันธุ์ในฝูงปรับปรุงพันธุ์ ดำเนินการโดยนำน้ำเชื้อโคพันธุ์ชาโรเล่ส์คุณภาพสูงจากประเทศฝรั่งเศสมาผสมกับแม่โคพันธุ์บราห์มันพันธุ์แท้ ได้โคลูกผสมชั่วที่ 1 (เรียกว่า โคพันธุ์ตาก 1) ที่มีเลือด 50% ชาโรเล่ส์ และ 50% บราห์มัน

จากนั้นผสมแม่โคเพศเมียชั่วที่ 1 ดังกล่าว ด้วยน้ำเชื้อหรือพ่อบราห์มันพันธุ์แท้ ได้ลูกโคชั่วที่ 2 (เรียกโคพันธุ์ตาก 2) ซึ่งมีสายเลือด 25% ชาโรเล่ส์ และ 75% บราห์มัน จากนั้นผสมแม่โคเพศเมียชั่วที่ 2 ด้วยน้ำเชื้อโคพันธุ์ชาโรเล่ส์คุณภาพสูง ได้ลูกชั่วที่ 3 (เรียกว่าโคพันธุ์ตาก) ซึ่งมีเลือด 62.5% ชาโรเล่ส์ และ 37.5% บราห์มัน แล้วนำโคชั่วที่ 3 ผสมกัน คัดเลือกปรับปรุงพันธุ์ให้เป็นโคเนื้อพันธุ์ใหม่ เรียกว่า โคพันธุ์ตาก ส่วนใหญ่ตัวผู้ที่โตเต็มที่จะมีน้ำหนักประมาณ 800–1,000 กิโลกรัม และตัวเมีย มีน้ำหนักประมาณ 500–600 กิโลกรัม

โคพันธุ์ตากมีข้อดี คือ เจริญเติบโตเร็ว เนื้อนุ่ม เนื้อสันมีไขมันแทรก (marbling) ซากมีขนาดใหญ่ที่สนองต่อความต้องการของตลาดเนื้อโคคุณภาพได้ดี เลี้ยงง่าย หากินเก่ง ไม่เลือกกินหญ้า ทนทานต่อสภาพอากาศร้อนได้ดีพอสมควร ซึ่งเหมาะที่จะนำมาผสมกับแม่โคพื้นเมือง โคบราห์มัน และลูกผสมบราห์มันเพื่อนำลูกมาเลี้ยงเป็นโคขุนได้ โคแม่พันธุ์สามารถผสมพันธุ์ได้เร็ว ที่ศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์ตาก ผสมพันธุ์แม่โคที่อายุ 14 เดือน น้ำหนัก 280 กิโลกรัมขึ้นไป แต่ยังมีข้อเสีย คือ การเลี้ยงต้องอาศัยการดูแลเอาใจใส่พอสมควร ไม่เหมาะที่จะนำไปเลี้ยงแบบปล่อยทุ่ง แต่ถ้าหากจะเลี้ยงในสภาพปล่อยทุ่งควรใช้โคพันธุ์ตาก 1 หรือโคพันธุ์ตาก 2

ภาพ 12 แสดงโคลูกผสมสายพันธุ์ซิมเมนทัล (Simmental crossbred)

2. โคลูกผสมสายพันธุ์ซิมเมนทัล (Simmental crossbred) เช่น โคพันธุ์กบินทร์บุรี (kabinburi beef cattle) เป็นโคลูกผสมระหว่างพันธุ์ซิมเมนทัลกับพันธุ์บราห์มัน โดยกรมปศุสัตว์ได้มอบหมายให้ศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์ปราจีนบุรี (ซึ่งตั้งอยู่อำเภอกบินทร์บุรี) ทำการสร้างโคพันธุ์ใหม่ ให้เป็นโคกึ่งเนื้อกึ่งนม โดยลูกโคเพศผู้ใช้เป็นโคขุน และแม่โคใช้รีดนมได้

การสร้างพันธุ์ในฝูงปรับปรุงพันธุ์ดำเนินการโดยนำน้ำเชื้อโคพันธุ์ซิมเมนทัลคุณภาพสูงจากประเทศเยอรมันผสมกับแม่โคบราห์มันพันธุ์แท้ ได้ลูกโคชั่วที่ 1 ที่มีสายเลือด 50% ซิมเมนทัล และ 50% บราห์มัน แล้วผสมโคชั่วที่ 1 เข้าด้วยกัน คัดเลือกปรับปรุงให้เป็นโคเนื้อพันธุ์ใหม่เรียกว่า โคพันธุ์กบินทร์บุรี ส่วนใหญ่ตัวผู้โตเต็มที่ มีน้ำหนักประมาณ 800-900 กิโลกรัม และตัวเมีย มีน้ำหนักประมาณ 500-650 กิโลกรัม

สำหรับข้อดีของโคพันธุ์กบินทร์บุรี คือ เป็นโคเนื้อที่มีการเจริญเติบโตเร็ว ซากมีขนาดใหญ่ ซึ่งสนองความต้องการของตลาดเนื้อโคคุณภาพดีได้ ทนทานต่อสภาพอากาศร้อนได้ดีพอสมควร เหมาะที่จะนำมาผสมกับแม่โคพื้นเมือง โคบราห์มันและลูกผสมบราห์มัน เพื่อนำลูกเพศผู้มาเลี้ยงเป็นโคขุน ลูกเพศเมียใช้รีดนมได้มากพอสมควร แต่การเลี้ยงต้องอาศัยการดูแลเอาใจใส่พอสมควร ไม่เหมาะที่จะนำไปเลี้ยงแบบปล่อยทุ่ง หากใช้แม่โครีดนม ลูกโคที่เกิดออกมาต้องแยกเลี้ยงแบบลูกโคนม ดังนั้น ผู้เลี้ยงต้องมีความรู้ในการเลี้ยงโครีดนม

และต้องดูแลเอาใจใส่ให้ดี ส่วนเนื้อมีสีแดงเข้ม อาจเป็นข้อเปรียบเทียบด้านความนิยมของตลาดเนื้อโคคุณภาพดี ระหว่างโคลูกผสมชาโรเล่ส์ เช่น โคพันธุ์ตาก และโคพันธุ์กำแพงแสน

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การเก็บตัวอย่างลูกแป้งข้าวหมาก

ทำการเก็บตัวอย่างลูกแป้งในพื้นที่ต่าง ๆ ในจังหวัดพะเยา โดยทำการสำรวจแหล่งชุมชนที่มีการผลิตสุรากลั่นชุมชน และนำลูกแป้งของแต่ละแหล่งมาเพื่อทำการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์

การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ย่อยชีวมวลจากลูกแป้งข้าวหมาก

ในวัตถุดิบอาหารสัตว์นั้นมีองค์ประกอบที่เป็นทั้งเส้นใยและคาร์โบไฮเดรต จึงต้องอาศัยเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติในการย่อยเส้นใย ที่ประกอบไปด้วยเซลลูโลส คือ เอนไซม์เซลลูเลส และส่วนที่เป็นคาร์โบไฮเดรต ซึ่งต้องอาศัยเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติในการย่อยแป้ง ซึ่งเป็นเอนไซม์อะไมเลส

1. การคัดแยกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลส

นำหัวเชื้อจุลินทรีย์ท้องถิ่นซึ่งเป็นลูกแป้งข้าวหมาก 1.0 กรัม มาละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ (normal saline) ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ที่มีการเติมยาปฏิชีวนะ ampicillin ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที จากนั้นจึงใช้ปิเปตที่ฆ่าเชื้อแล้วดูดสารละลายปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ในจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร SS medium (Danmek, et al., 2014) (ภาคผนวก ก) ที่มีการเติม soluble starch แทนน้ำตาลกลูโคส ทำการแยกเชื้อโดยใช้วิธี Spread plate technique นำไปบ่มที่อุณหภูมิ30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 วัน เมื่อเชื้อราเจริญทำการคัดแยกลงในอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) (ภาคผนวก ก) เพื่อแยกให้ได้เชื้อราที่บริสุทธิ์ ทำการตรวจสอบการผลิตอะไมเลสของเชื้อรา โดยการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยเพื่อดูการเจริญ จากนั้น นำสารละลายไอโอดีน ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ และโพแทสเซียมไอโอไดด์ ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ มาราดทับเส้นใย ทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที เชื้อราที่เกิดวงใส (clear zone) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ คือ เชื้อราที่สามารถสร้างเอนไซม์อะไมเลส ทำการวัดขนาดของวงใสมาเปรียบเทียบกับขนาดของโคโลนี (Suyama, et al., 1993)

นำเชื้อราที่สามารถผลิตอะไมเลส ที่คัดแยกได้ มาทดสอบการผลิตอะไมเลส โดยทำการเลี้ยงเชื้อราบนอาหาร PDA เพื่อให้เส้นใยเจริญ จากนั้นใช้แท่งเจาะ (cork borer) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร เจาะที่ปลายเส้นใยเชื้อราจำนวน 5 ชิ้น นำมาใส่ลงในขวด

รูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร SS medium (Danmek, et al., 2014) (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่มีการเติม soluble starch 1.0 เปอร์เซ็นต์ แทนน้ำตาลกลูโคส เลี้ยงเชื้อรา ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบของการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 7 วัน จากนั้นเก็บเอนไซม์โดยการนำมาปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที เก็บเอนไซม์ส่วนใสเพื่อนำไปวัดค่าแอคติวิตีของเอนไซม์อะไมเลส (ดัดแปลงจาก Ghose (1987) โดยใช้ปิเปตดูดสารละลายเอนไซม์ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองแล้วเติมสารละลาย soluble starch ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ที่ละลายในสารละลายโซเดียมซิเตรตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดและด่าง เท่ากับ 5.0 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เติมสารละลาย 3,5-Dinitrosalicylic acid (DNS) (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 3.0 มิลลิลิตร (Miller, 1959) นำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายโซเดียมซิเตรต-บัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดและด่าง เท่ากับ 5.0 แทนเอนไซม์เป็นหลอดควบคุม (blank) เพื่อนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาค่าแอคติวิตีจำเพาะ (Specific activity) ตามวิธีแสดงในภาคผนวก ค

1 ยูนิตของเอนไซม์ หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลาย substrate ให้เป็น น้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครโมล ภายใน 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ใช้ทดสอบ

2. การคัดแยกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

นำลูกแป้งข้าวหมาก 1.0 กรัม มาละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ (normal saline) ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ที่มีการเติมยาปฏิชีวนะ ampicillin ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที จากนั้นจึงใช้ปิเปตที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วดูดสารละลายปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ในจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร carboxymethyl cellulose agar (CMC agar) (ภาคผนวก ก) ทำการแยกเชื้อโดยใช้วิธี Spread plate technique นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 วัน เมื่อเชื้อราเจริญทำการคัดแยกลงในอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) (ภาคผนวก ก) เพื่อแยกให้ได้เชื้อราที่บริสุทธิ์ ทำการตรวจสอบการผลิตเซลลูเลสของเชื้อรา โดยการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยเพื่อดูการเจริญ จากนั้นจึงนำสี Congo red ความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ มาราดทับเส้นใยตั้งทิ้งไว้ 15 นาที เทสีทิ้งและล้างสีส่วนเกินออกด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที สามารถสังเกตเชื้อราที่ผลิตเซลลูเลส ได้โดยดูวงใส (clear zone) ที่เกิดขึ้น ทำการวัดขนาดของวงใส เพื่อนำมาเปรียบเทียบกับขนาดของโคโลนี (Suyama, et al., 1993)

นำเชื้อราที่สามารถผลิตเซลลูเลส ที่คัดแยกได้มาทดสอบการผลิตเซลลูเลส โดยทำการเลี้ยงเชื้อรา บนอาหาร PDA เพื่อให้เส้นใยเจริญ จากนั้นใช้แท่งเจาะ (cork borer) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร เจาะที่ปลายเส้นใยเชื้อราจำนวน 5 ชิ้น นำมาใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร SS medium (Danmek, et al., 2014) (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่มีการเติม กระดาษกรอง Whatman No. 1 1.0 เปอร์เซ็นต์ แทนน้ำตาลกลูโคส เลี้ยงเชื้อราที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบของการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 7 วัน จากนั้น เก็บเอนไซม์โดยการนำมาปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที เก็บเอนไซม์ส่วนใสเพื่อนำไปวัดค่าแอคติวิตีของเอกโซกลู-คาเนส (exoglucanase) (Ghose, 1987), เอนโดกลูคาเนส (endoglucanase) (Ghose, 1987), เบตา-กลูโคซิเดส (β-glucosidase) (Sternberg, et al., 1976), ไซแลนเนส (xylanase) (Ghose and Bisaria,1987) เพื่อนำไปคำนวณหาค่าแอคติวิตีจำเพาะ (Specific activity) ตามวิธีแสดงใน ภาคผนวก ค

1 ยูนิตของเอนไซม์ หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลาย substrate ให้เป็น น้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครโมล ภายใน 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ใช้ทดสอบ

การวัดปริมาณเซลลูเลสในกลุ่มเอกโซกลูคาเนส (exoglucanase) โดยการวิเคราะห์หา FPA (Ghose, 1987)

นำเอนไซม์ที่ได้จากข้อ 2 ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติม สารละลายโซเดียมซิเตรตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดและด่าง เท่ากับ 5.0 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และกระดาษกรอง Whatman No.1 ขนาด 1.0×6.0 เซนติเมตร (50 มิลลิกรัม) เขย่าให้เข้ากัน นำไปอุ่นในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติมสารละลาย 3,5-Dinitrosalicylic acid (DNS) (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 3.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติมน้ำกลั่นหลอดละ 20 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 540 นาโนเมตร โดยใช้สารละลาย โซเดียมซิเตรตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดและด่าง เท่ากับ 5.0 แทนเอนไซม์ เป็นหลอดควบคุม (blank) จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบหาน้ำตาลกลูโคส จากกราฟน้ำตาลมาตรฐาน เพื่อนำไปคำนวณหาค่า unit of enzyme จากสูตรมาตรฐาน (ภาคผนวก ค)

การวัดปริมาณเซลลูเลสในกลุ่มเอนโดกลูคาเนส (endoglucanase) โดยการวิเคราะห์หา CMCase (Ghose, 1987)

นำเอนไซม์ที่ได้จากข้อ 2 ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติม Carboxymethyl cellulose (CMC) ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์กรัมต่อปริมาตร ที่ละลายในสารละลายโซเดียมซิเตรตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 5.0 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปอุ่นในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เติมสารละลาย 3,5–Dinitrosalicylic acid (DNS) (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 3.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติมน้ำกลั่นหลอดละ 20 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่นแสง 540 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายโซเดียมซิเตรตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดและด่าง เท่ากับ 5.0 แทนเอนไซม์เป็นหลอดควบคุม (blank) จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสจากกราฟน้ำตาลมาตรฐาน เพื่อนำไปคำนวณหาค่า unit of enzyme จากสูตรมาตรฐาน (ภาคผนวก ค)

การวัดปริมาณเซลลูเลสในกลุ่มเบตากลูโคซิเดส (β–glucosidase) โดยการวิเคราะห์หา β–glucosidase ตามวิธีการของ Sternberg (et al., 1976)

นำเอนไซม์ที่ได้จากข้อ 2 ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติมสารละลาย salicin ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ละลายในสารละลายโซเดียมซิเตรตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดและด่าง เท่ากับ 5.0 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปอุ่นในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เติมสารละลาย 3,5–Dinitrosalicylic acid (DNS) (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 3.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติมน้ำกลั่นหลอดละ 20 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่นแสง 540 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายโซเดียมซิเตรตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดและด่าง เท่ากับ 5.0 แทนเอนไซม์เป็นหลอดควบคุม (blank) จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสจากกราฟน้ำตาลมาตรฐาน เพื่อนำไปคำนวณหาค่า unit of enzyme จากสูตรมาตรฐาน (ภาคผนวก ค)

การวัดแอคติวิตีของไซแลนเนส (Ghose and Bisaria, 1987)

นำเอนไซม์ที่ได้จากข้อ 2 ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติมสารละลาย Xylan ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์กรัมต่อปริมาตร ที่ละลายในสารละลายโซเดียม–ซิเตรตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดและด่าง เท่ากับ 5.0 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร

เขย่าให้เข้ากัน นำหลอดทดลองไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติมสารละลาย Alkaline copper reagent (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 3.0 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงนำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติมน้ำกลั่นหลอดละ 20 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายโซเดียมซิเตรตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดและด่าง เท่ากับ 5.0 แทนเอนไซม์ เป็นหลอดควบคุม (blank) จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบหาปริมาณน้ำตาลไซโลสจากกราฟมาตรฐาน เพื่อนำไปคำนวณหาค่า unit of enzyme จากสูตรมาตรฐาน (ภาคผนวก ค)

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราที่คัดแยกได้

นำเชื้อราที่ผลิตเซลลูเลสและเชื้อราที่ผลิตอะไมเลส ที่คัดแยกได้มาทำการจำแนกชนิดโดยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาบนอาหารแข็งตามวิธีการของ Klich (2002); Danmek, et al. (2011); Danmek, et al. (2014) โดยศึกษาลักษณะต่าง ๆ เช่น สี ขนาด และรูปร่างของสปอร์ เป็นต้น

การผลิตเอนไซม์และการศึกษาลักษณะสมบัติบางประการของเอนไซม์

1. การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์

1.1 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของอะไมเลส

นำเชื้อราที่สามารถผลิตอะไมเลส ที่คัดแยกได้มาเลี้ยงบนอาหาร PDA เพื่อให้เส้นใยเจริญ จากนั้นใช้แท่งเจาะ (cork borer) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร เจาะที่ปลายเส้นใยเชื้อรา จำนวน 5 ชิ้น นำมาใส่ลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร SS medium (Danmek, et al., 2014) (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่มีการเติม soluble starch 1.0 เปอร์เซ็นต์ แทนน้ำตาลกลูโคส เลี้ยงเชื้อราที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบของการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 7 วัน จากนั้นเก็บเอนไซม์โดยการนำมาปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที เก็บเอนไซม์ส่วนใส จากนั้นนำไปวัดค่าแอคติวิตีของเอนไซม์อะไมเลส ที่อุณหภูมิต่างกัน คือ 50 องศาเซลเซียส, 60 องศาเซลเซียส, 70 องศาเซลเซียส และ 80 องศาเซลเซียส เพื่อศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

1.2 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเซลลูเลส

นำเชื้อราที่สามารถผลิตเซลลูเลส มาเลี้ยงบนอาหาร PDA เพื่อให้เส้นใยเจริญ จากนั้นใช้แท่งเจาะ (cork borer) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร เจาะที่ปลายเส้นใยเชื้อรา จำนวน 5 ชิ้น นำมาใส่ลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร SS medium (Danmek, et al., 2014) (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่มีการเติม กระดาษกรอง Whatman No.1 1.0 เปอร์เซ็นต์ แทนน้ำตาลกลูโคส เลี้ยงเชื้อราที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบของการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 7 วัน จากนั้นเก็บเอนไซม์โดยการนำมาปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที เก็บเอนไซม์ส่วนใส จากนั้นนำไปวัดแอกติวิตีของเซลลูเลสและไซแลนเนส ที่อุณหภูมิต่างกัน คือ 50 องศาเซลเซียส, 60 องศาเซลเซียส, 70 องศาเซลเซียส และ 80 องศาเซลเซียส เพื่อศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

2. การศึกษาผลของความเป็นกรดและด่างที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์

2.1 การศึกษาผลของความเป็นกรดและด่างที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์อะไมเลส

นำเอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตได้ มาวัดแอคติวีตีของอะไมเลสโดยปรับให้ภาวะการทำงานของเอนไซม์ให้มีค่าความเป็นกรดและด่าง ต่างๆ กัน คือ 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 และ 8.0 ตามลำดับ เพื่อศึกษาค่าความเป็นกรดและด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์อะไมเลส โดยมีสารละลายบัฟเฟอร์ต่าง ๆ เป็นตัวปรับค่าความเป็นกรดและด่าง (ภาคผนวก ข) ได้แก่ โซเดียมอะซีเตตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดและด่าง เท่ากับ 4.0 โซเดียมซิเตรต–บัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดและด่าง เท่ากับ 5.0 และโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดและด่าง เท่ากับ 6.0, 7.0 และ 8.0

2.2 การศึกษาผลของความเป็นกรดและด่างที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนส

นำเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนสที่ผลิตได้ มาวัดแอคติวีตีโดยปรับให้ภาวะการทำงานของเอนไซม์ให้มีค่าความเป็นกรดและด่าง ต่าง ๆ กัน คือ 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 และ 8.0 ตามลำดับ เพื่อศึกษาค่าความเป็นกรดและด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนส โดยมีสารละลายบัฟเฟอร์ต่าง ๆ เป็นตัวปรับค่าความเป็นกรดและด่าง (ภาคผนวก ข) ได้แก่ โซเดียมอะซีเตตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดและด่าง เท่ากับ 4.0 โซเดียม–ซิเตรตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดและด่าง เท่ากับ 5.0 และโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดและด่าง เท่ากับ 6.0, 7.0 และ 8.0

3. การศึกษาผลของ Metal ions ต่อการทำงานของเอนไซม์

3.1 การศึกษาผลของ Metal ions ต่อการทำงานของเอนไซม์อะไมเลส

ทำการทดสอบเอนไซม์อะไมเลสกับ Mg (MgSO4), Ca (CaCl2), Mn (MnSO4), Fe (FeSO4), Co (CoCl2), Cu (CuSO4), Zn (ZnSO4) และ ethylene–diaminetetra –acetic acid (Na–EDTA) ที่ความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ 0.1 โมลาร์ รวมเข้ากับเอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตได้แล้ว นำไปวัดค่าแอกติวีตีของเอนไซม์อะไมเลส

3.2 การศึกษาผลของ Metal ions ต่อการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส

ทำการทดสอบเอนไซม์เซลลูเลสกับ Mg (MgSO4), Ca (CaCl2), Mn (MnSO4), Fe (FeSO4), Co (CoCl2), Cu (CuSO4), Zn (ZnSO4) และ ethylene–diaminetetra –acetic acid (Na–EDTA) ที่ความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ 0.1 โมลาร์ รวมเข้ากับเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้แล้ว นำไปวัดค่าแอกติวีตีของเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนส

4. การศึกษาการย่อยสับสเตรทด้วยเอนไซม์

4.1 การศึกษาการย่อยสับสเตรทด้วยเอนไซม์อะไมเลส

นำมันสำปะหลังที่บดละเอียดมา 0.5 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีสารละลายโซเดียมซิเตรตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดและด่าง เท่ากับ 5.0 ปริมาตร 45 มิลลิลิตร เติมเอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตได้ ลงไปปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นจึงนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องและบ่มไว้ที่อุณหภูมิที่เหมาะสมตามข้อมูลที่ได้จากข้อ 3.1 โดยนำมาวัดปริมาณน้ำตาลทุก ๆ 7 วัน เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

4.2 การศึกษาการย่อยสับสเตรทด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

นำเปลือกข้าวโพด ซังข้าวโพด และฟางข้าว มาบดละเอียดแล้ว นำมาอย่างละ 0.5 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีสารละลายโซเดียมซิเตรตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดและด่าง เท่ากับ 5.0 ปริมาตร 45 มิลลิลิตร เติมเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้ ลงไปปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นจึงนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องและบ่มไว้ที่อุณหภูมิที่เหมาะสมตามข้อมูลที่ได้จากข้อ 3.1 โดยนำมาวัดปริมาณน้ำตาลทุก ๆ 7 วัน เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

5. การศึกษาเสถียรภาพของเอนไซม์

5.1 การศึกษาเสถียรภาพของเอนไซม์อะไมเลส

นำเอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตได้ มาทำการทดสอบโดยการเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำมาวัดค่าแอกติวีตี ที่อุณหภูมิที่เหมาะสมตามข้อมูลที่ได้จากข้อ 4.1 โดยนำมาวัดแอกติวีตีที่ระยะเวลาในการเก็บที่ต่างกัน คือ 1 วัน, 7 วัน, 14 วัน, 21 วัน และ 28 วัน เพื่อศึกษาเสถียรภาพของเอนไซม์

5.2 การศึกษาเสถียรภาพของเอนไซม์เซลลูเลส

นำเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้ มาทำการทดสอบโดยการเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำมาวัดค่าแอกติวีตี ที่อุณหภูมิที่เหมาะสมตามข้อมูลที่ได้จากข้อ 4.1 โดยนำมาวัดแอกติวีตีที่ระยะเวลาในการเก็บที่ต่างกัน คือ 1 วัน, 7 วัน, 14 วัน, 21 วัน และ 28 วัน เพื่อศึกษาเสถียรภาพของเอนไซม์

การผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์

นำสปอร์ของเชื้อราที่ผลิตอะไมเลส และสปอร์ของเชื้อราที่ผลิตเซลลูเลส มาเลี้ยงในอาหาร V8 juice medium นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน เพื่อให้สปอร์เติบโตเต็มที่ เตรียมสารละลายสปอร์เชื้อราในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ (normal saline) ที่มีการเติม Tween 80 ปริมาตร 0.01 เปอร์เซ็นต์ และทำการปรับให้มีปริมาณของสปอร์ เท่ากับ 106 spore/ml จากนั้นนำสารละลายสปอร์เชื้อราที่มีการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและอะไมเลส ที่เตรียมไว้มาผสมกับแป้งข้าวเจ้า ที่อัตราส่วนเชื้อ 100 มิลลิลิตร ต่อปริมารแป้ง 1,000 กรัม เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ลงไปคลุกเคล้าให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 วัน จากนั้นนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส แล้วนำมาบดให้เป็นผงเก็บไว้เพื่อนำไปใช้ทดสอบต่อไป

การผลิตอาหารหมักและศึกษาลักษณะทางกายภาพต่าง ๆ ของอาหารหมัก

อาหารหมักทำในถังพลาสติกแบบมีฝาปิดขนาดบรรจุ 120 ลิตร โดยภายในจะมีวัตถุดิบต่าง ๆ ซึ่งผสมเป็นอาหารหมัก ประกอบด้วยวัตถุดิบ 4 ชนิด ดังนี้ คือ ฟักทองหรือมันสำปะหลัง 60 กิโลกรัม หัวเชื้อจุลินทรีย์ 0.1 กิโลกรัม กากน้ำตาล 1.0 กิโลกรัม และน้ำสะอาด 40 ลิตร ปิดฝาให้สนิทและนำไปหมักไว้ที่ร่ม เป็นระยะเวลาประมาณ 15 วัน แล้วจึงนำมาตรวจสอบลักษณะทางกายภาพ โดยทำการสุ่มตัวอย่างอาหารหมักจากส่วนบน กลาง และล่าง ของถังหมักนำมาผสมให้เข้ากัน และตรวจสอบลักษณะของอาหารหมัก เช่น กลิ่น สี และวัดอุณหภูมิภายในถังหมัก โดยให้ระดับคะแนนตามเกณฑ์ประเมินคุณภาพพืชหมักทางกายภาพกองอาหารสัตว์ (กรมปศุสัตว์, 2547ก, 2547ข และ 2547ค) อบเพื่อหาวัตถุแห้ง (dry weight) ตามวิธีของ Akinfemi, et al. (2010) วัดค่าความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) (AOAC, 2006) และหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (DNS method: Miller, 1959) เป็นต้น

การวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนะของอาหารหมัก

ในการทดลองนี้จะใช้วิธีของ AOAC (2006) ทำการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการ 6 กลุ่มใหญ่ คือ ความชื้น (Moisture) เถ้า (Ash) โปรตีนรวม (Crude protein ,CP) ไขมัน (Crude fat หรือ Ether extract, EE) เยื่อใย (Crude fiber ,CF)

การเตรียมสัตว์ทดลอง

ใช้โคเนื้อสายพันธุ์ลูกผสมชาโรเลส์ (charolais crossbred) ที่มีเลือดชาโรเลส์ ไม่ต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ เพศผู้ที่ทำการตอนแล้ว จำนวน 4 ตัว และสายพันธุ์ลูกผสมซิมเมนทอล (Simmental crossbred) เพศผู้ที่ทำการตอนแล้ว จำนวน 4 ตัว โดยมีอายุเฉลี่ย 2–3 ปี มีน้ำหนักตัวเฉลี่ย 350 ±50 กิโลกรัม โคทุกตัวได้รับการฉีดยาถ่ายพยาธิ (Ivermectin) วัคซีนป้องกันโรคปากเท้าเปื่อยและคอบวม ก่อนเข้าทดลอง อย่างน้อย 1 สัปดาห์ โดยเลี้ยงในคอกขังเดี่ยว ขนาด 2 × 4 เมตร ที่มีรางอาหารและรางน้ำสะอาด แยกเฉพาะตัว มีน้ำและแร่ธาตุก้อนให้กินตลอดเวลาในแต่ละคอก

วางแผนการทดลองแบบเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของทรีทเมนท์ ประกอบด้วย 2 ทรีทเมนต์ (treatment) แต่ละทรีทเมนต์ (treatment) มี 4 ซ้ำ ดังนี้

ทรีทเมนต์ (treatment) 1 โคเนื้อลูกผสมสายพันธุ์ชาโรเลส์ (T1)

ทรีทเมนต์ (treatment) 2 โคเนื้อลูกผสมสายพันธุ์ซิมเมนทอล (T2)

โดยในแต่ละทรีทเมนต์ (treatment) จะได้รับเปลือกข้าวโพดหมักและอาหารสูตรผสมที่มีฟักทองหมักและมันสำปะหลังหมักเป็นส่วนประกอบ

การให้อาหารสัตว์ทดลอง

ระยะปรับสภาพสัตว์ทดลอง (preliminary period) โดยให้อาหารหยาบ คือ เปลือกข้าวโพดหมักแก่โคทุกตัวแบบเต็มที่ (ad libitum) ร่วมกับการให้อาหารข้น โดยให้ตามสัดส่วนของอาหารข้น 1 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว และมีน้ำสะอาดให้กินตลอดเวลา เป็นระยะเวลา 28 วัน ก่อนที่จะเริ่มการทดลองและบันทึกข้อมูล

การให้อาหารสัตว์ทดลองจะทำการชั่งอาหารที่ให้เป็นรายตัว เก็บอาหารเหลือของแต่ละตัวก่อนให้อาหารเช้าทุกวัน บันทึกข้อมูล น้ำหนักตัว ปริมาณอาหารหยาบ (เปลือกข้าวโพดหมัก) อาหารข้น และอาหารผสมที่มีฟักทองหมักและมันสำปะหลังหมักเป็นส่วนประกอบ ที่ให้กินและที่เหลือกินในแต่ละวัน โดยสัดส่วนของอาหารสัตว์ทดลอง ดังแสดงในตาราง 2

ตาราง 2 แสดงสัดส่วนของอาหารที่ให้โคทดลองในแต่ละวัน

		โคเนื้อสายพันธุ์ชาโรเล่ส์ (T1) **กก.**	โคเนื้อสายพันธุ์ซิมเมนทอล (T2) **กก.**
เดือนที่ 1–3	อาหารสูตรสำเร็จ	18	–
	ฟักทองหมัก	–	6
	มันสำปะหลังหมัก	–	6
	รำ หรือ ฝุ่นข้าวโพด	–	4
	กากน้ำตาล	–	2
	หญ้าสด	10	10
	เปลือกข้าวโพด	–	–
เดือนที่ 4–7	อาหารสูตรสำเร็จ	18	–
	ฟักทองหมัก	–	6
	มันสำปะหลังหมัก	–	6
	รำ หรือ ฝุ่นข้าวโพด	–	4
	กากน้ำตาล	–	2
	หญ้าสด	5	5
	เปลือกข้าวโพด	5	5
เดือนที่ 8–10	อาหารสูตรสำเร็จ	18	–
	ฟักทองหมัก	–	6
	มันสำปะหลังหมัก	–	6
	รำ หรือ ฝุ่นข้าวโพด	–	4
	กากน้ำตาล	–	2
	หญ้าสด	1	1
	เปลือกข้าวโพด	10	10

การวัดสมรรถภาพการการเจริญเติบโตและศึกษาลักษณะซากของสัตว์ทดลอง

1. การวัดการเจริญเติบโต

ทำการบันทึกน้ำหนักของสัตว์ทดลองเมื่อเริ่มต้น และสิ้นสุดการทดลอง โดยวัดน้ำหนักที่การเปลี่ยนแปลงทุก ๆ 4 สัปดาห์ ระยะเวลา 12 เดือน ตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน 2559 ถึง พฤศจิกายน 2560 เพื่อนำมาคำนวณหา

1.1 ปริมาณอาหารที่กินได้ (Feed intake, FI)

1.2 การเจริญเติบโตเฉลี่ย (Average daily gain, ADG)

1.3 ประสิทธิภาพการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนักตัว (Feed conversion ratio, FCR)

1.4 ต้นทุนค่าอาหารต่อการเพิ่มน้ำหนัก 1 กิโลกรัม (Feed cost for 1 kg. of weight gain, FCG)

2. การศึกษาลักษณะซาก

หลังสิ้นสุดการทดลอง จะทำการศึกษาลักษณะซากที่โรงชำแหละของบริษัท Premium Beef Co., Ltd ตำบลหนองหญ้าไซ อำเภอหนองหญ้าไซ จังหวัดสุพรรณบุรี 72240

สถานที่ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัยและรวบรวมข้อมูล

1. การทดสอบเลี้ยงโคจะดำเนินการที่ ศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์พะเยา ตำบลแม่กา อำเภอเมือง จังหวัดพะเยา

2. ห้องปฏิบัติการ คณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา

การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ค่าทางสถิติเพื่อหาค่าความแปรปรวน (Analysis of variance, ANOVA) โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design: CRD) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของแต่ละทรีทเมนท์ด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ กำหนดค่านัยสำคัญที่ใช้ในการทดสอบที่ $p < 0.05$

ระยะเวลาดำเนินการวิจัย

ระยะเวลาประมาณ 12 เดือน ตั้งแต่เดือน พฤศจิกายน 2559 ถึง พฤศจิกายน 2560

บทที่ 4

ผลการทดลอง

การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ย่อยชีวมวลจากลูกแป้งข้าวหมาก

ในวัตถุดิบอาหารสัตว์นั้นมีองค์ประกอบที่เป็นทั้งเส้นใยและคาร์โบไฮเดรต จึงต้องอาศัยเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติในการย่อยเส้นใยที่ประกอบไปด้วยเซลลูโลส คือ เอนไซม์เซลลูเลส และส่วนที่เป็นคาร์โบไฮเดรต ซึ่งต้องอาศัยเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติในการย่อยแป้งซึ่งเป็นเอนไซม์อะไมเลส

การคัดแยกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลส

การคัดแยกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากลูกแป้งข้าวหมาก ด้วยอาหาร SS medium (Danmek, et al., 2014) (ภาคผนวก ค) โดยมี soluble starch เป็นแหล่งคาร์บอน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 วัน พบว่า มีเชื้อราหลายชนิดที่สามารถเจริญเติบโตได้ โดยเชื้อรามีการสร้างสปอร์และเส้นใยขึ้น ซึ่งสามารถแยกเชื้อราชนิดต่าง ๆ ได้ทั้งหมดจำนวน 6 ชนิด จากนั้นนำเชื้อราทั้ง 6 ชนิด ที่คัดแยกได้มาเลี้ยงบนอาหาร SS medium ที่มี soluble starch เป็นแหล่งคาร์บอน เพื่อดูการเจริญและตรวจสอบการผลิตอะไมเลส โดยทำการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใย จากนั้นจึงใช้สารละลาย 0.1% (w/v) iodine และ 1.0% (w/v) potassium iodide ราดทับแล้วทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที เชื้อราที่เกิดวงใส (clear zone) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ คือ เชื้อราที่สามารถสร้างเอนไซม์อะไมเลสได้ โดยผลการทดลองดังแสดงในตาราง 3

ตาราง 3 แสดงอัตราส่วนของวงใส (clear zone) ต่อการเจริญและลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราที่แยกได้จากลูกแป้งข้าวหมาก บนอาหาร SS medium ที่มี soluble starch เป็นแหล่งคาร์บอน

Isolates	Colony diameter (cm)	Clear zone (cm)	Clear*ratio
1	3.2	4.0	1.28
2	3.5	4.3	1.22
3	3.7	4.4	1.21
4	3.7	4.3	1.16
5	3.7	4.4	1.20
6	3.6	4.5	1.23

หมายเหตุ: * บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

จากตาราง 3 พบว่า เชื้อราที่คัดแยกได้ทั้งหมด 6 ชนิด มีเชื้อราที่สร้างวงใส (clear zone) ได้ทั้งหมด 6 ชนิด ได้แก่ เชื้อรา UP01, UP02, UP03, UP04, UP05, UP06

การคัดแยกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

การคัดแยกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากลูกแป้งข้าวหมาก ด้วยอาหาร carboxymethyl cellulose agar (CMC agar) (ภาคผนวก ค) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 วัน พบว่า มีเชื้อราหลายชนิดที่สามารถเจริญเติบโตได้ โดยเชื้อรามีการสร้างสปอร์และเส้นใยขึ้น ซึ่งสามารถแยกเชื้อราชนิดต่าง ๆ ได้ทั้งหมดจำนวน 3 ชนิด จากนั้นนำเชื้อราที่คัดแยกได้มาเลี้ยงบนอาหาร carboxymethyl cellulose agar (CMC agar) ทำการตรวจสอบการผลิตเซลลูเลสของเชื้อรา โดยการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยเพื่อดูการเจริญ จากนั้นจึงนำสี Congo red ความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ มาราดทับเส้นใย ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที เทสีทิ้งและล้างสีส่วนเกินออกด้วยสารละลาย NaCl 1 โมลาร์ ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที สามารถสังเกตเชื้อราที่ผลิตเซลลูเลสได้โดยดูวงใส (clear zone) ที่เกิดขึ้น ได้ผลการทดลองดังแสดงในตาราง 4

ตาราง 4 แสดงอัตราส่วนของวงใส (clear zone) ต่อการเจริญและลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราที่แยกได้จากลูกแป้งข้าวหมาก บนอาหาร CMC agar

Isolates	Colony diameter (cm)	Clear zone (cm)	Clear*ratio
1	1.1	1.9	1.72
2	3.0	5.2	1.73
3	5.5	6.7	1.21

หมายเหตุ: * บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

จากตาราง 4 พบว่า เชื้อราที่คัดแยกได้ทั้งหมด 9 ชนิด มีเชื้อราที่สร้างวงใส (clear zone) ได้ทั้งหมด 3 ชนิด ได้แก่ UP07, UP08, UP09

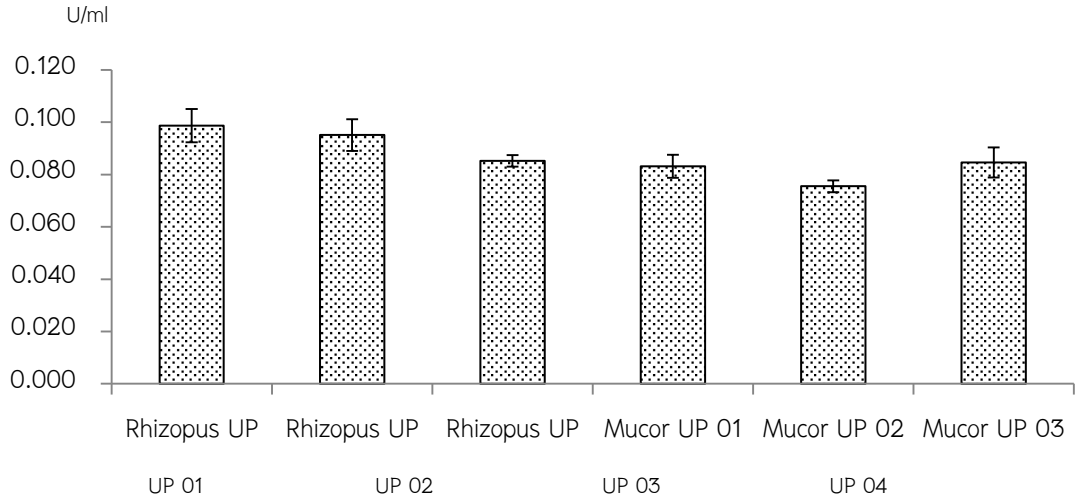
การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์อะไมเลสและเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อราที่คัดแยกได้

1. การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์อะไมเลส

ทำการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อราที่คัดแยกได้ ได้แก่ เชื้อรา UP01, UP02, UP03, UP04, UP05 และ UP06 ผลการทดลองแสดงในตาราง 5

ตาราง 5 แสดงค่าแอคติวิตีจำเพาะของอะไมเลสที่ผลิตจากเชื้อราที่คัดแยกได้ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน (หน่วยเป็น Unit, U)

Isolate	Activity of amylase (Unit)
UP 01	0.099
UP 02	0.095
UP 03	0.085
UP 04	0.083
UP 05	0.076
UP 06	0.085



ภาพ 13 แสดงค่าแอคติวิตีจำเพาะของอะไมเลสที่ผลิตจากเชื้อราที่คัดแยกได้ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

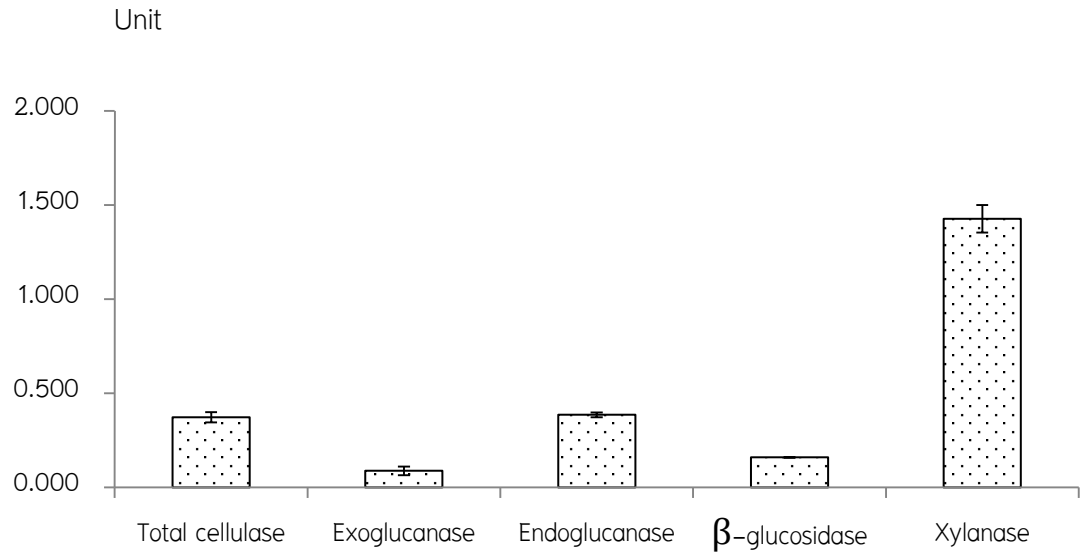
จากตาราง 5 และภาพ 13 สามารถคัดเลือกเชื้อราที่ผลิตอะไมเลสได้ดีที่สุด คือ เชื้อรา Isolate UP01 เนื่องจากสามารถผลิตอะไมเลสได้สูงสุด เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อรา Isolate อื่น ๆ โดยมีค่าแอกติวีตีของเอนไซม์ เท่ากับ 0.099 ยูนิต

2. การผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

ทำการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส จากเชื้อราที่คัดแยกได้ โดยทำการคัดเลือกเชื้อรา Isolate UP07 โดยผลการทดลองดังแสดงในตาราง 6 และภาพ 14

ตาราง 6 แสดงค่าแอคติวิตีจำเพาะของเซลลูเลสและไซแลนเนส ที่ผลิตจากเชื้อรา Isolate UP07 เมื่อเลี้ยงในอาหาร SS medium ที่มีกระดาษกรองเป็นแหล่งคาร์บอนแทนเซลลูโลส ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน (หน่วยเป็น Unit, U)

	Activity of cellulose (Unit)
Total cellulase	0.373
Exoglucanase	0.088
Endoglucanase	0.386
β-glucosidase	0.160
Xylanase	1.427



ภาพ 14 ค่าแอคติวิตีจำเพาะของเซลลูเลสและไซแลนเนสที่ผลิตจาก เชื้อรา Isolate UP07 เมื่อเลี้ยงในอาหาร SS medium ที่มีกระดาษกรองเป็นแหล่งคาร์บอนแทนเซลลูโลส ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน (หน่วยเป็น Unit, U)

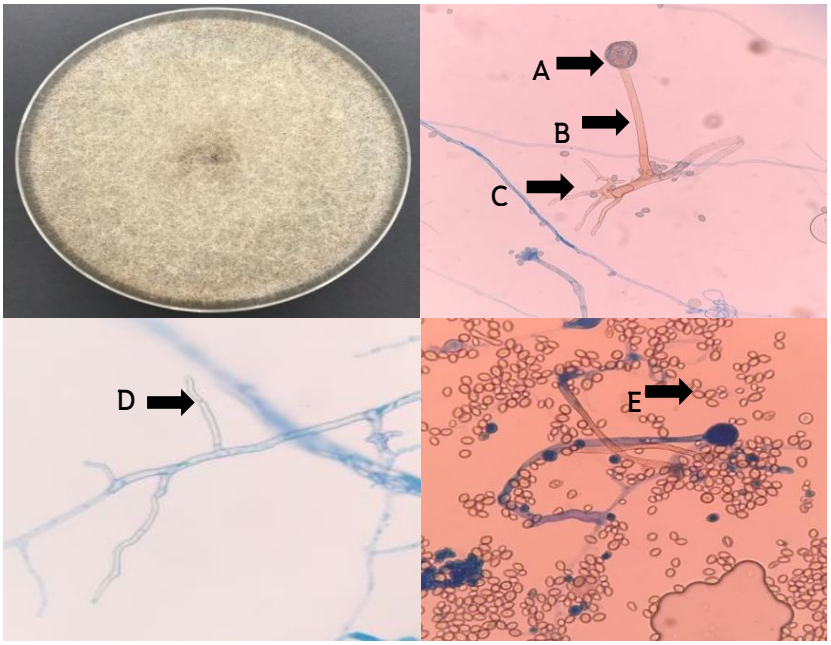
จากตาราง 6 และภาพ 14 พบว่า ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เชื้อรา Isolate UP07 สามารถผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสได้สูงสุด เท่ากับ 1.427 ยูนิต ซึ่งสูงกว่าTotal cellulose, Exoglucanase, Endoglucanase, β-glucosidase ที่มีค่าเท่ากับ 0.373 0.088 0.386 0.160 ยูนิต ตามลำดับ

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราที่คัดแยกได้

นำเชื้อราที่ผลิตเซลลูเลสและเชื้อราที่ผลิตอะไมเลส ที่คัดแยกได้มาทำการจำแนกชนิดโดยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาบนอาหารแข็งตามวิธีการของ Klich (2002); Danmek, et al. (2011); Danmek, et al. (2014) โดยศึกษาลักษณะต่าง ๆ เช่น สี ขนาด และรูปร่างของสปอร์ เป็นต้น พบว่า เชื้อที่คัดแยกได้เป็นเชื้อที่อยู่ในกลุ่มที่ย่อยชีวมวลพืชที่มีองค์ประกอบเป็นแป้ง และเชื้อที่อยู่ในกลุ่มที่ย่อยชีวมวลพืชที่มีองค์ประกอบเป็นเยื่อใย โดยเชื้อที่อยู่ในกลุ่มที่ย่อยชีวมวลพืชที่มีองค์ประกอบเป็นแป้ง ได้แก่ เชื้อราสายพันธุ์ *Rhizopus* spp. และเชื้อที่อยู่ในกลุ่มที่ย่อยชีวมวลพืชที่มีองค์ประกอบเป็นเยื่อใย ได้แก่ เชื้อราสายพันธุ์ *Trichoderma* spp.

1. เชื้อรา *Rhizopus* spp. UP01

ลักษณะของเชื้อราที่เจริญบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีการเจริญเติบโตที่ดี มีเส้นใยขาว สปอร์มีสีน้ำตาล ส่วนปลายมีคอลูเมลลา รูปร่างกลม ลักษณะสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เป็นเชื้อราที่เส้นใยมีผนังกั้น (septate hypha) สปอร์แรงจิโอปอร์ (sporangiospore) ซึ่งรวมกันอยู่ใน sporangium ที่มีรูปร่างกลม ที่ฐานของ sporangiophore ซึ่งเป็นก้านชูสปอร์ มีไรซอยด์ (rhizoid) และสโตลอน (stolon) ซึ่งเป็นเส้นใยที่เชื่อม sporangiospore ดังภาพ 15

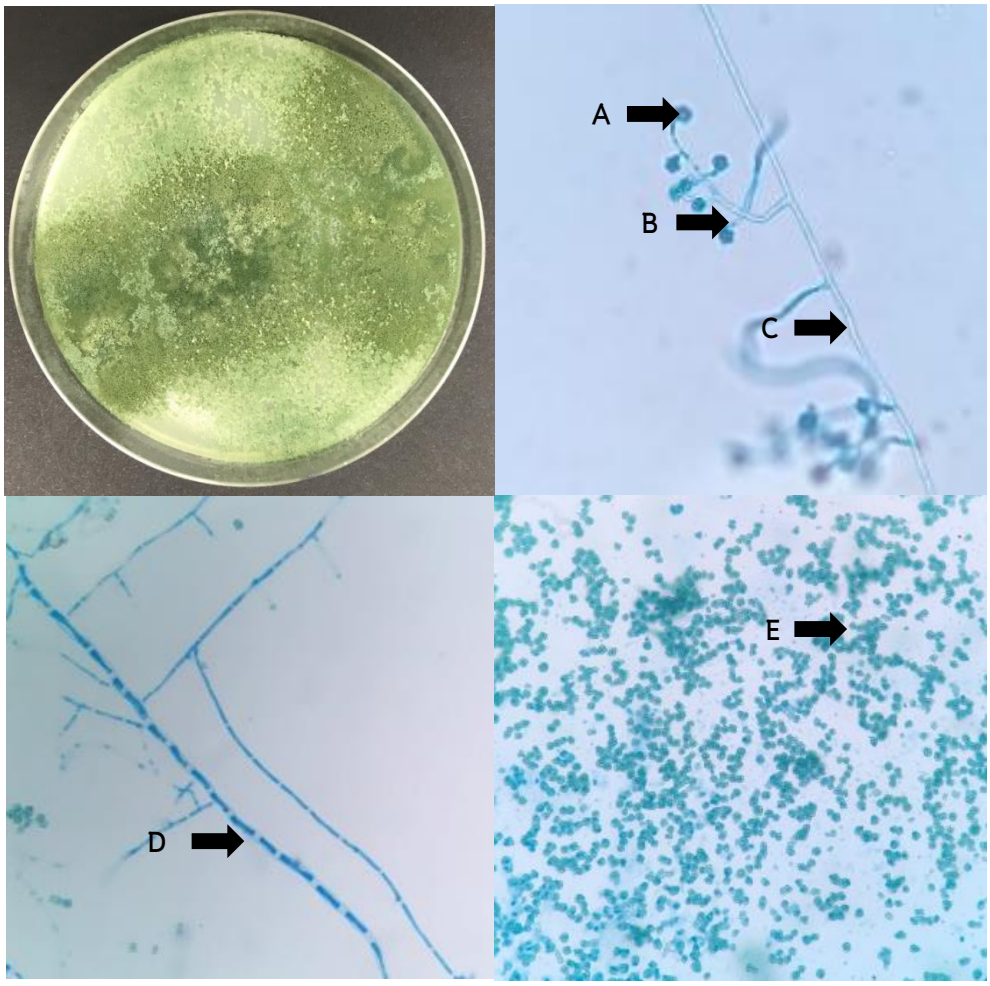


Sporangium (A), Sporangiophore (B), Rhizoids (C), Septum (D) and Sporangiospores (E)

ภาพ 15 แสดงลักษณะการเจริญของ *Rhizopus* spp. UP01 ที่เจริญบนอาหาร PDA เป็นระยะเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

2. เชื้อรา *Trichoderma* spp. UP07

ลักษณะของเชื้อราที่เจริญบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีการเจริญเติบโตที่ดี มีเส้นใยขาว สปอร์มีสีเหลืองและจะค่อย ๆ เปลี่ยนเป็นสีเขียวเมื่อเจริญเติบโตเต็มที่ ลักษณะสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เป็นเชื้อราที่เส้นใยมีผนังกั้น (septate hypha) เส้นใยแตกกิ่งก้านสาขาออกหลายแขนง มีก้านชูสปอร์ (conidiophores) บริเวณตรงปลายเส้นใยมีการสร้าง conidia รูปร่างกลม สีเขียว ดังภาพ 16



Conidia (phialospore) (A) (E), Conidiophore (B), Hyphae (C) and Septum (D)

ภาพ 16 แสดงลักษณะการเจริญของ *Trichoderma* spp. UP07 ที่เจริญบนอาหาร PDA เป็นระยะเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

การผลิตเอนไซม์และการศึกษาลักษณะสมบัติบางประการของเอนไซม์

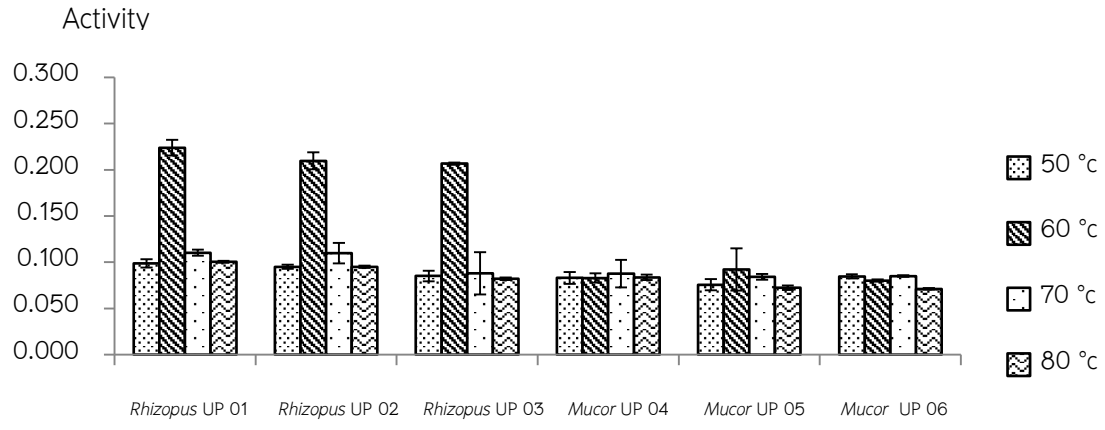
1. การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์

1.1 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของอะไมเลส

ทำการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อราที่คัดแยกได้ ได้แก่ เชื้อรา *Rhizopus* spp. UP01, *Rhizopus* spp. UP02, *Rhizopus* spp. UP03, *Mucor* spp. UP04, *Mucor* spp. UP05 และ *Mucor* spp. UP06 ผลการทดลองแสดงในตาราง 7 และภาพ 17

ตาราง 7 แสดงค่าแอคติวิตีจำเพาะของอะไมเลสที่ผลิตจากเชื้อราที่คัดแยกได้ที่อุณหภูมิ 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน (หน่วยเป็น Unit, U)

Isolate	Temperature (°c)			
	50	60	70	80
Rhizopus UP 01	0.099	0.224	0.110	0.101
Rhizopus UP 02	0.095	0.210	0.110	0.095
Rhizopus UP 03	0.085	0.207	0.088	0.082
Mucor spp. UP 04	0.083	0.083	0.088	0.084
Mucor spp. UP 05	0.076	0.092	0.084	0.072
Mucor spp. UP 06	0.085	0.080	0.085	0.071



ภาพ 17 แสดงค่าแอคติวิตีจำเพาะของอะไมเลสที่ผลิตจากเชื้อราที่คัดแยกได้ที่อุณหภูมิ 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส

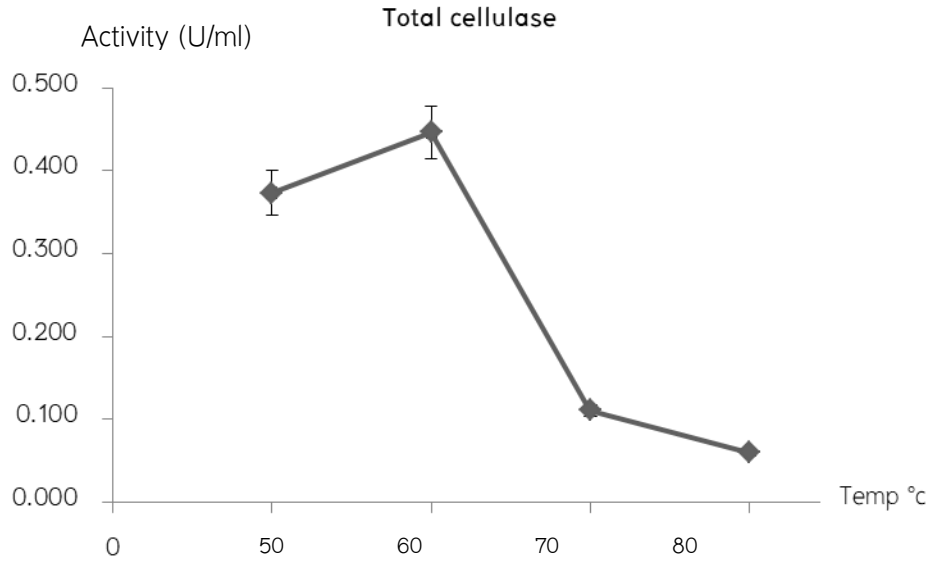
จากตาราง 7 และภาพ 17 สามารถคัดเลือกเชื้อราที่สามารถผลิตอะไมเลสได้ดี คือ *Rhizopus* spp. UP01 เนื่องจากสามารถผลิตอะไมเลสได้สูงสุด เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อรา Isolate อื่น ๆ และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คือ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส โดยมีค่าแอกติวีตีของเอนไซม์ เท่ากับ 0.224 ยูนิต

1.2 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเซลลูเลส

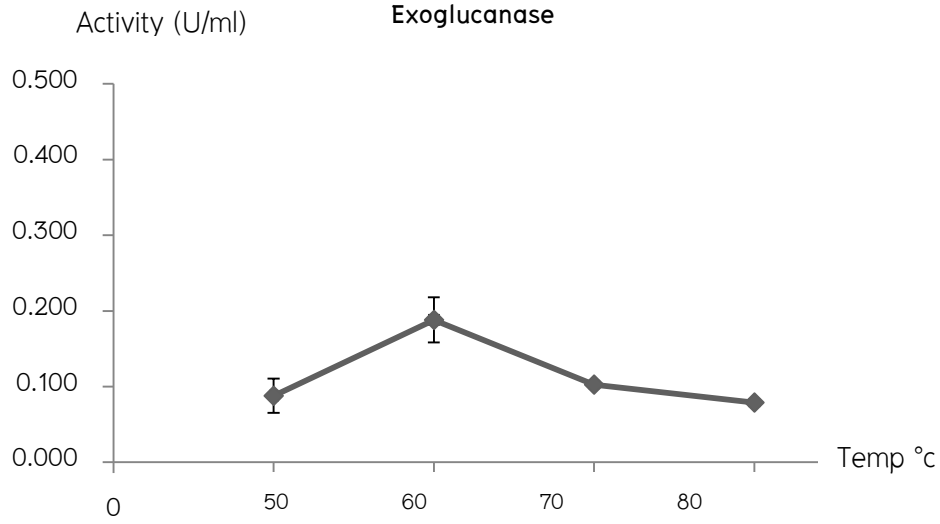
ทำการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส จากเชื้อราที่คัดแยกได้ โดยทำการคัดเลือกเชื้อรา *Trichoderma* spp. UP07 เนื่องจากเป็นเชื้อราสายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารพิษ เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้ออีกสองสายพันธุ์ที่คัดแยกได้ โดยผลการทดลองดังแสดงในตาราง 8 และภาพ 18

ตาราง 8 แสดงค่าแอคติวิตีจำเพาะของเซลลูเลสที่ผลิตจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. UP07เมื่อเลี้ยงในอาหาร SS medium ที่มีกระดาษกรองเป็นแหล่งคาร์บอนแทนเซลลูโลสที่อุณหภูมิ 50 60 70 และ 80 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน (หน่วยเป็น Unit, U)

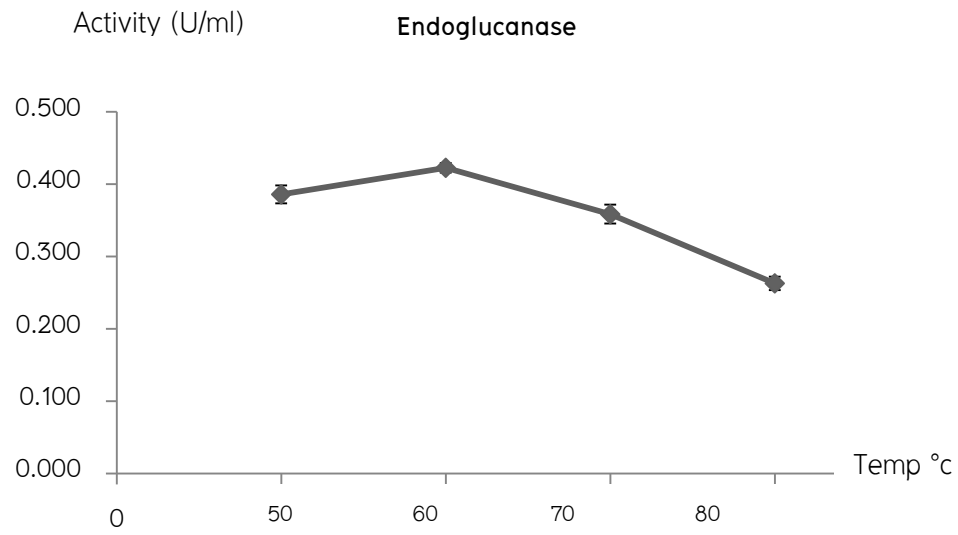
	Temperature (°c)			
	50	60	70	80
Total cellulase	0.373	0.447	0.111	0.060
Exoglucanase	0.088	0.188	0.103	0.079
Endoglucanase	0.386	0.422	0.358	0.263
β-glucosidase	0.160	0.222	0.206	0.091
Xylanase	1.427	1.633	1.693	1.326



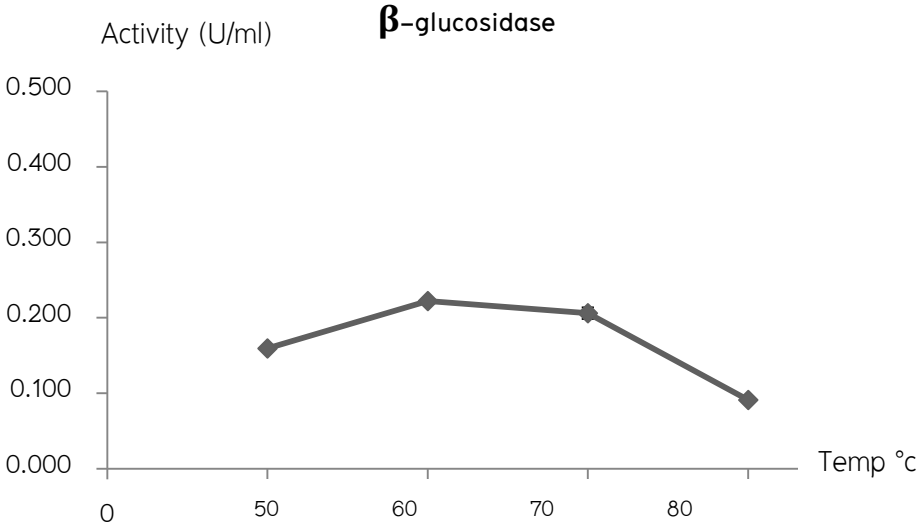
ภาพ 18 แสดงค่าแอคติวิตีจำเพาะของ Total cellulase ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. UP07 ที่คัดแยกได้ เมื่อเลี้ยงในอาหาร SS medium ที่มีกระดาษกรองเป็นแหล่งคาร์บอนแทนเซลลูโลส



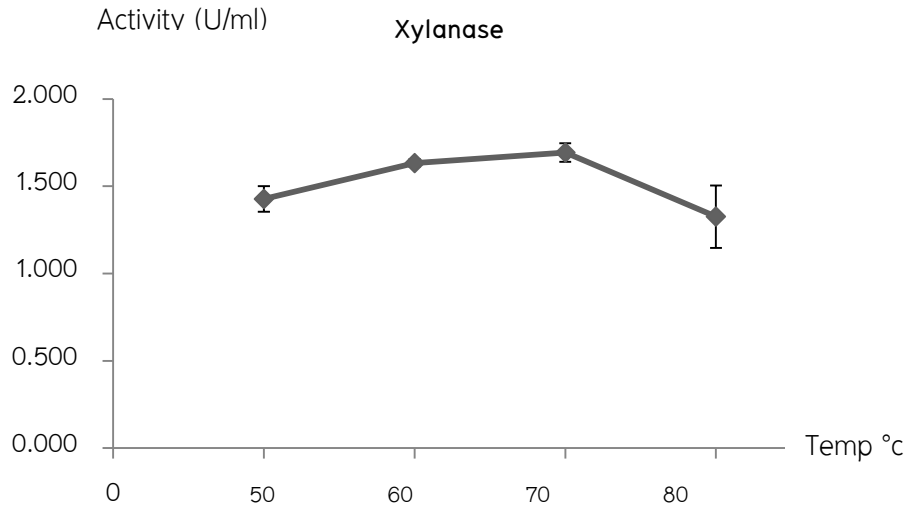
ภาพ 19 แสดงค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอกโซกลูคาเนส ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. UP07 ที่คัดแยกได้ เมื่อเลี้ยงในอาหาร SS medium ที่มีกระดาษกรองเป็นแหล่งคาร์บอนแทนเซลลูโลส



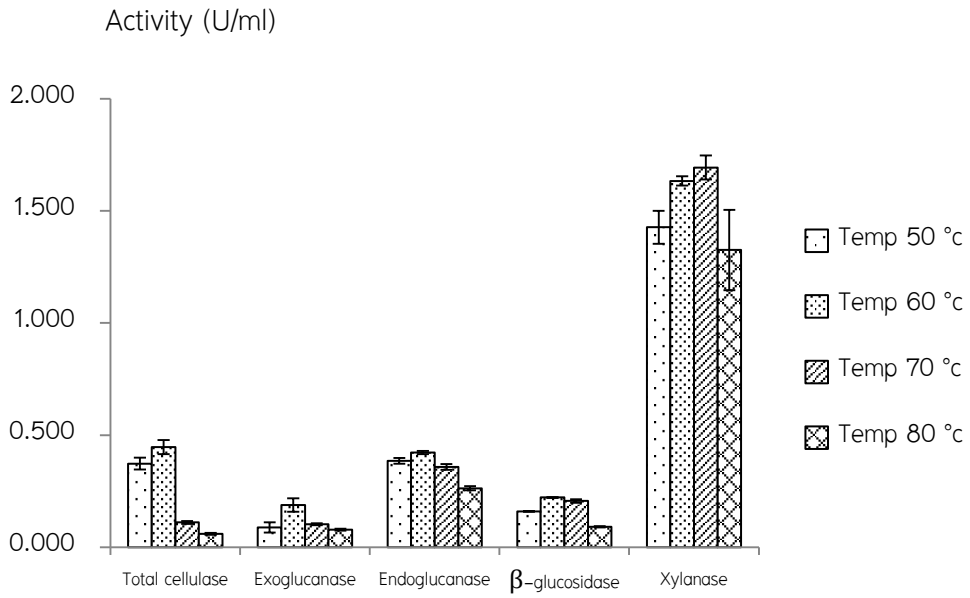
ภาพ 20 แสดงค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนโดกลูคาเนส ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. UP07 ที่คัดแยกได้เมื่อเลี้ยงในอาหาร SS medium ที่มีกระดาษกรองเป็นแหล่งคาร์บอนแทนเซลลูโลส



ภาพ 21 แสดงค่าแอคติวิตีจำเพาะของเบตา-กลูโคซิเดส ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. UP07 ที่คัดแยกได้เมื่อเลี้ยงในอาหาร SS medium ที่มีกระดาษกรองเป็นแหล่งคาร์บอนแทนเซลลูโลส

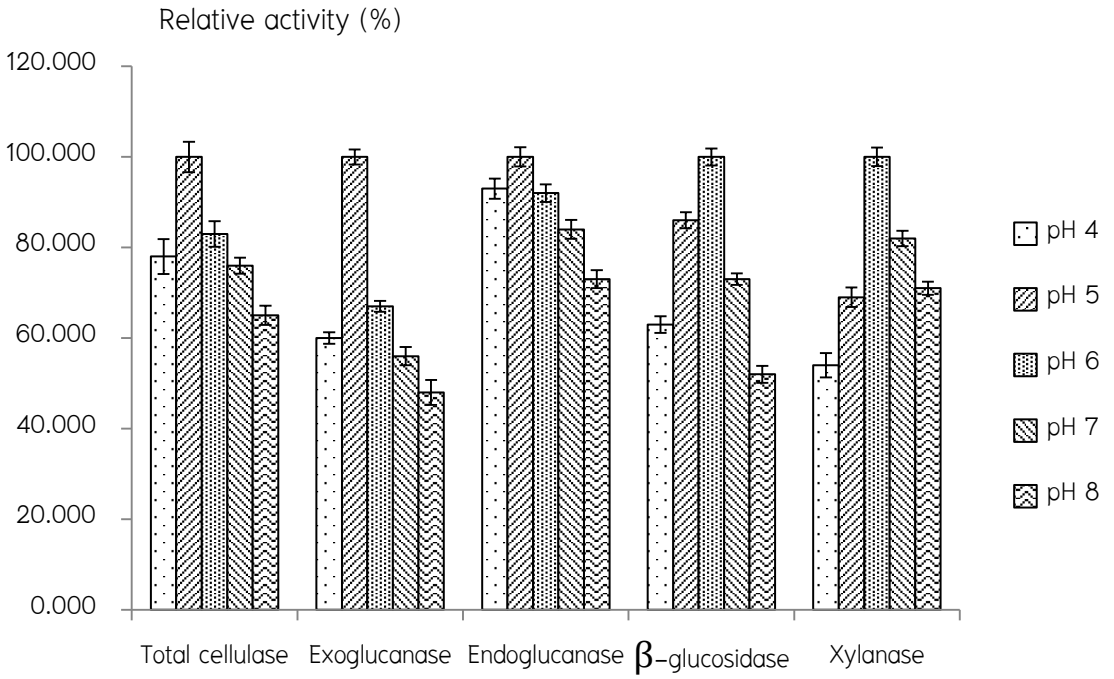


ภาพ 22 แสดงค่าแอคติวิตีจำเพาะของไซแลนเนส ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. UP07 ที่คัดแยกได้เมื่อเลี้ยงในอาหาร SS medium ที่มีกระดาษกรองเป็นแหล่งคาร์บอนแทนเซลลูโลส

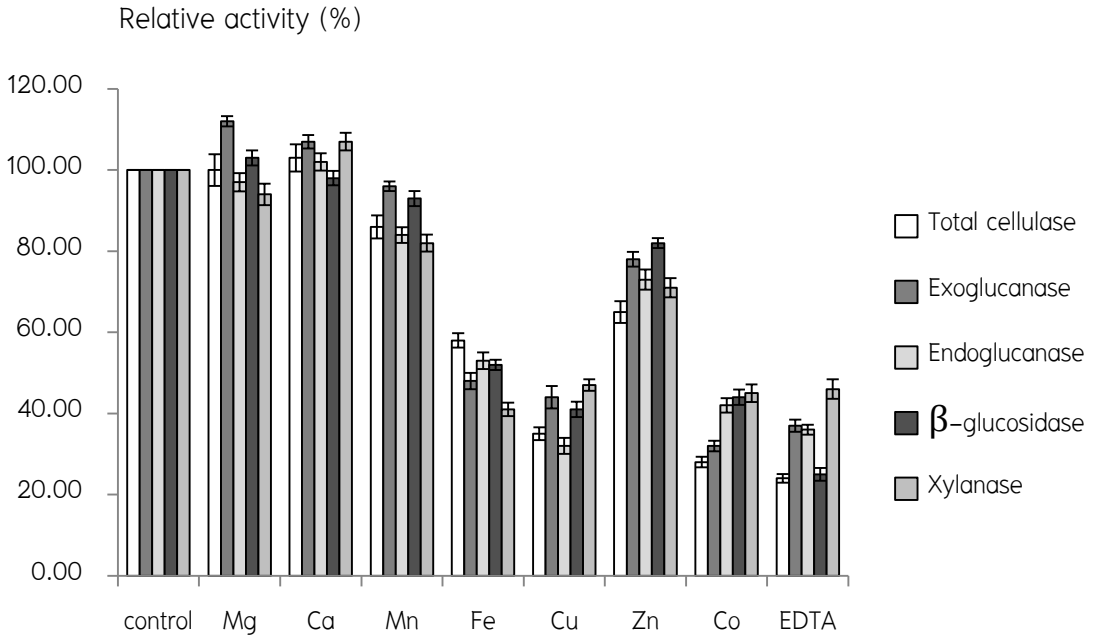


ภาพ 23 แสดงค่าแอคติวิตีจำเพาะของเซลลูเลสและไซแลนเนสที่ผลิตจาก *Trichoderma* spp. UP07

จากตาราง 8 และภาพ 21–22 พบว่า เอนไซม์เซลลูเลส (Total cellulose, Exoglucanase, Endoglucanase, β–glucosidase) ที่ผลิตโดยเชื้อรา *Trichoderma* spp. UP07 สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส คือ 0.447, 0.188, 0.422 และ 0.222 ยูนิต ตามลำดับ และเอนไซม์ไซแลนเนส สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส คือ 1.693 ยูนิต

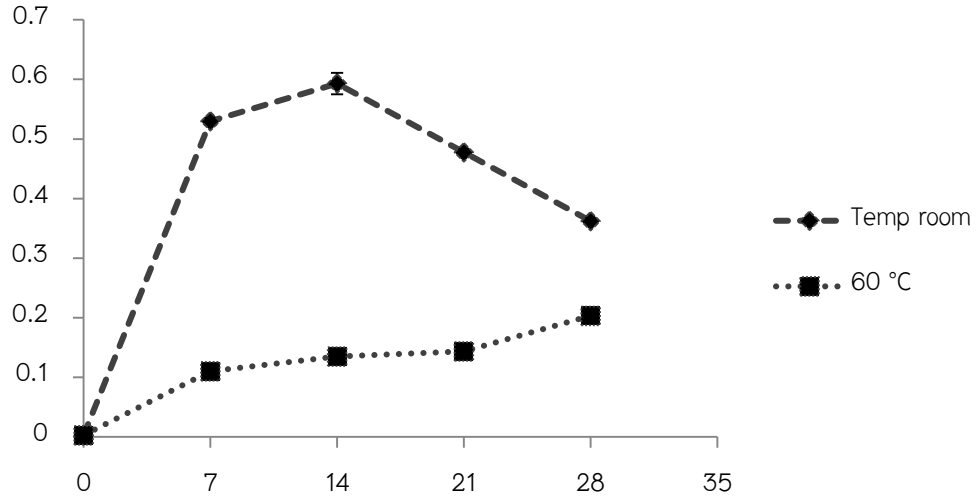


ภาพ 24 แสดงผลของ pH ต่อค่าแอคติวิตีจำเพาะของเซลลูเลสและไซแลนเนสที่ผลิตจาก *Trichoderma* spp. UP07

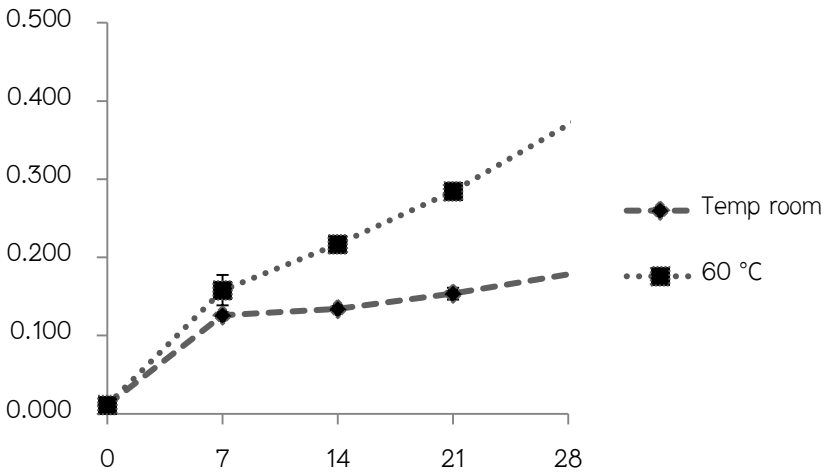


ภาพ 25 แสดงผลของ metal ion ต่อค่าแอคติวิตีจำเพาะของเซลลูเลสและไซแลนเนสที่ผลิตจาก *Trichoderma* spp. UP07

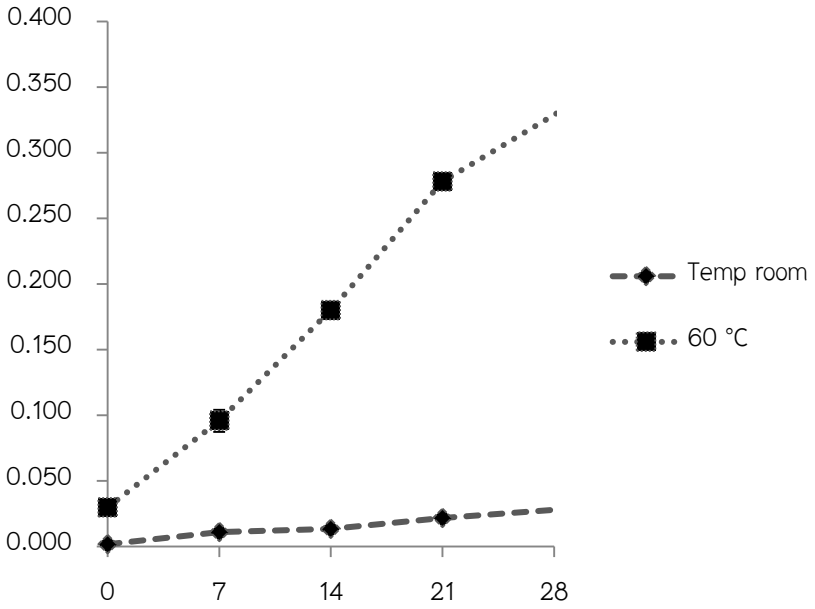
2. การศึกษาการย่อยสับสเตรทด้วยเอนไซม์



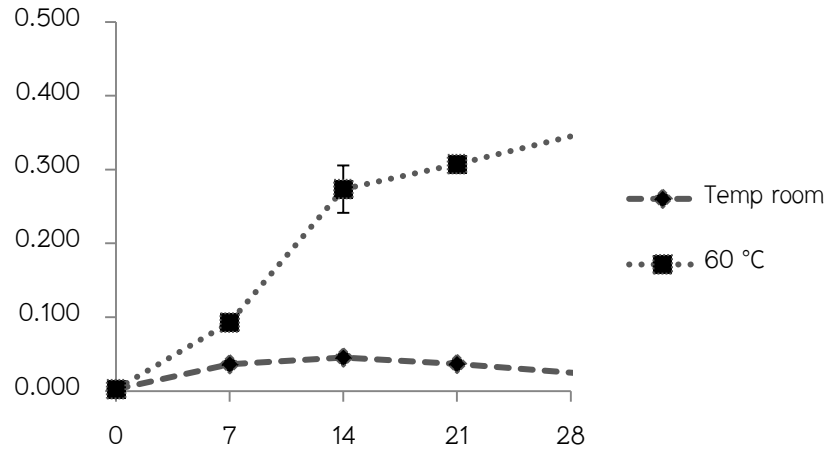
ภาพ 26 แสดงน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์อะไมเลส



ภาพ 27 แสดงน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยเปลือกข้าวโพดด้วยเอนไซม์เซลลูเลส



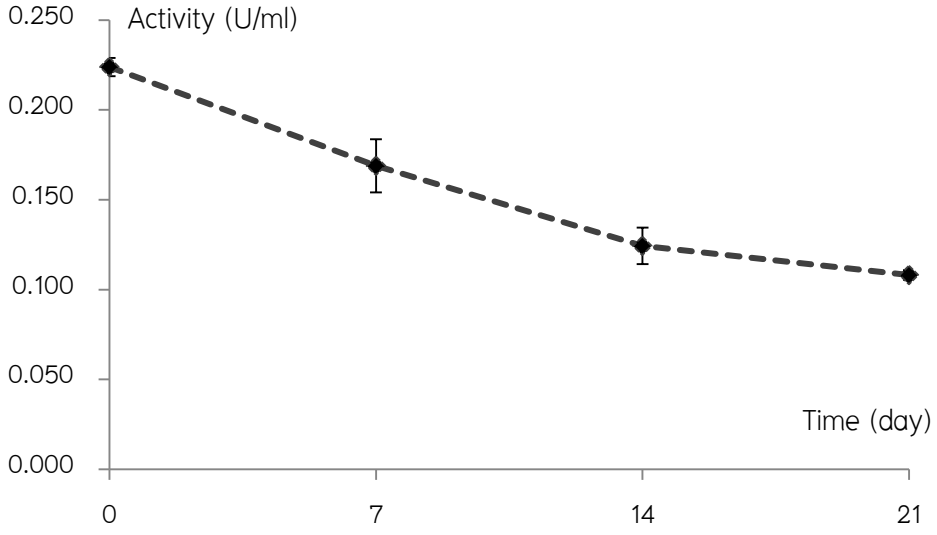
ภาพ 28 แสดงน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยซังข้าวโพดด้วยเอนไซม์เซลลูเลส



ภาพ 29 น้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยฟางข้าวด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

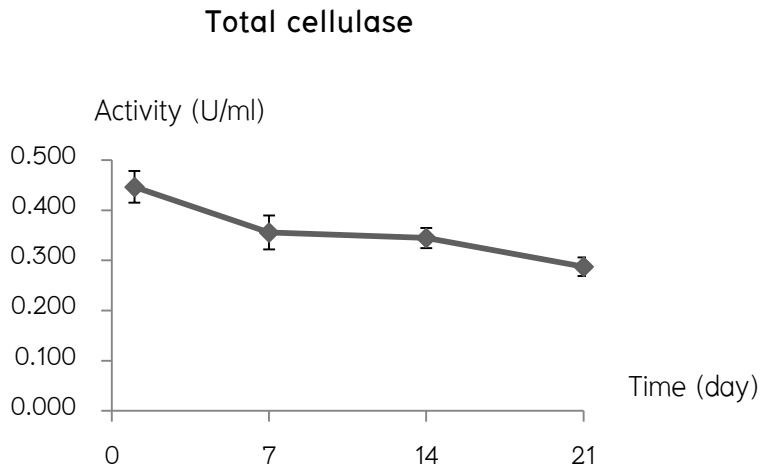
3. การศึกษาเสถียรภาพของเอนไซม์

3.1 การศึกษาเสถียรภาพของเอนไซม์อะไมเลส

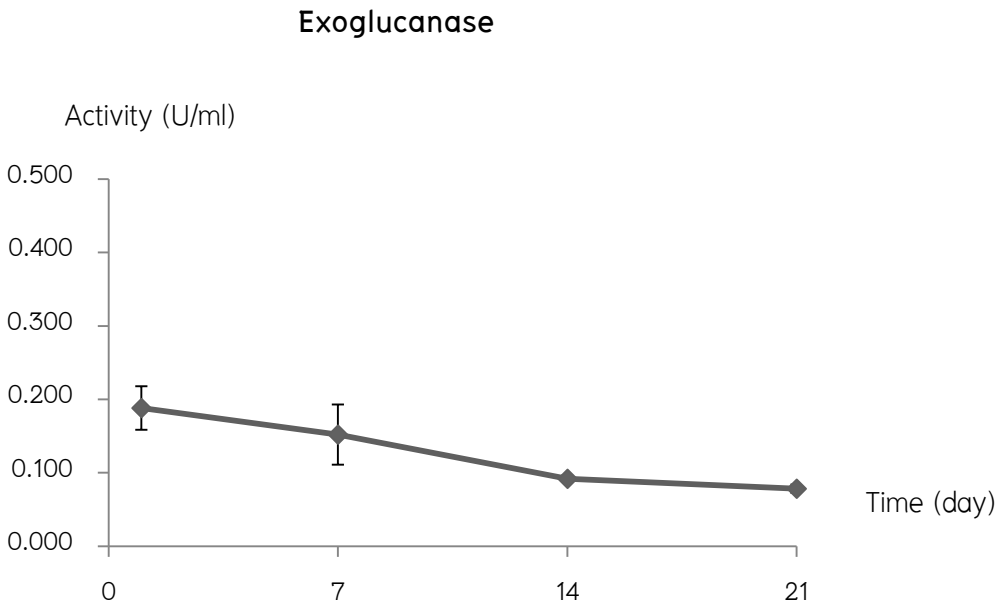


ภาพ 30 แสดงความเสถียรของเอนไซม์อะไมเลสที่ช่วงเวลาต่าง ๆ

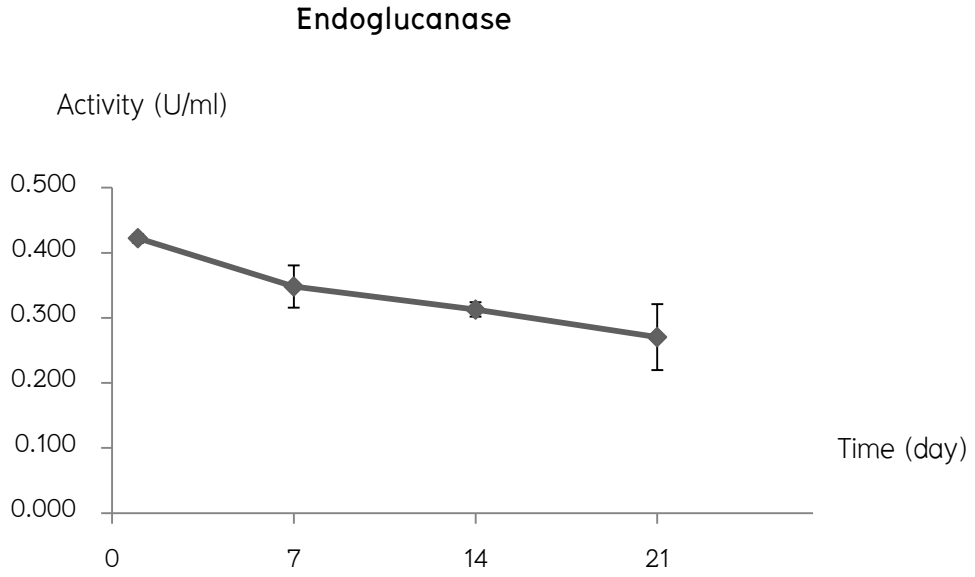
3.2 การศึกษาเสถียรภาพของเอนไซม์เซลลูเลส



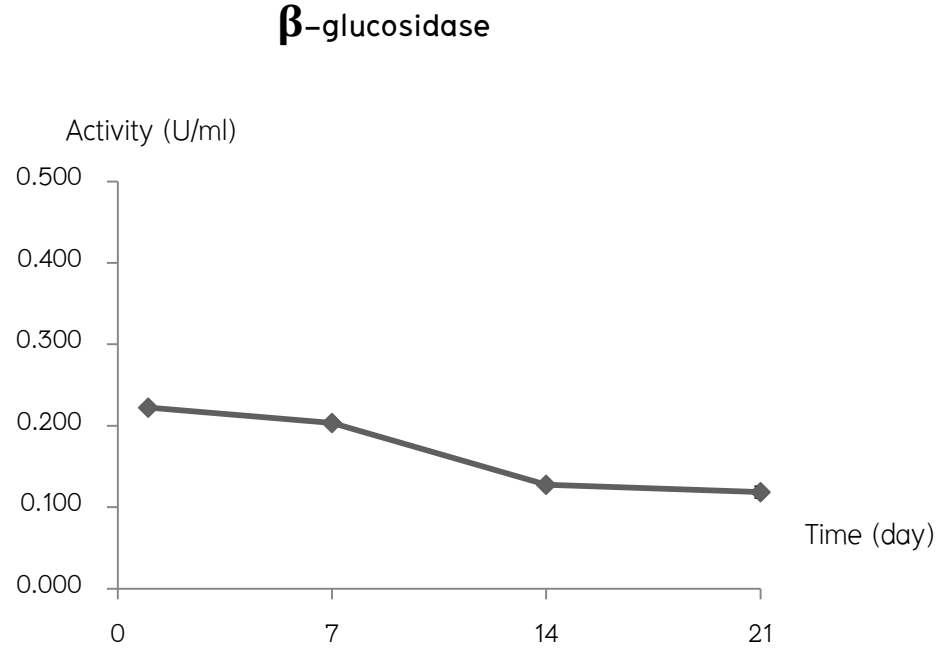
ภาพ 31 แสดงความเสถียรของเอนไซม์เซลลูเลส (Total cellulase) ที่ช่วงเวลาต่าง ๆ



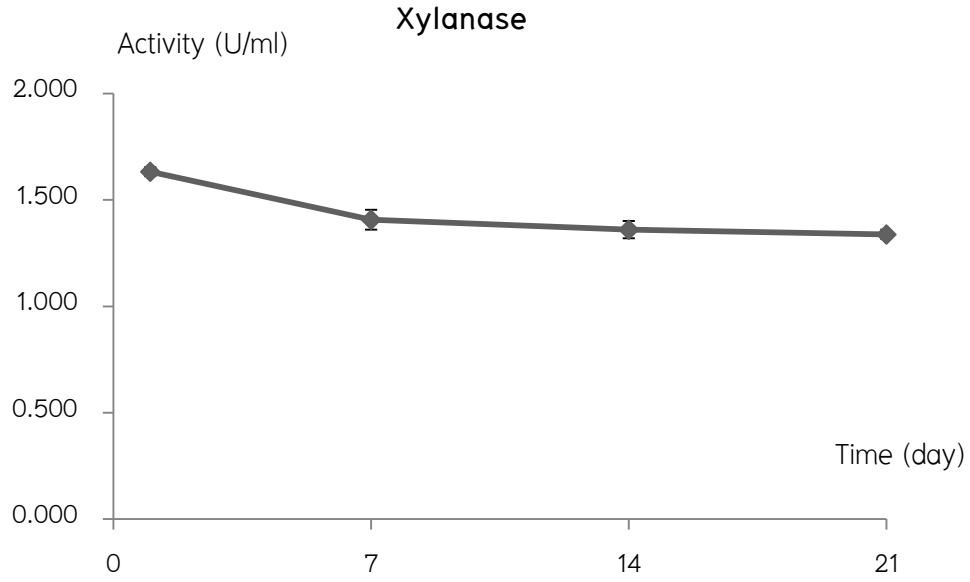
ภาพ 32 แสดงความเสถียรของเอนไซม์เซลลูเลส (exolglucanase) ที่ช่วงเวลาต่าง ๆ



ภาพ 33 แสดงความเสถียรของเอนไซม์เซลลูเลส (endoglucanase) ที่ช่วงเวลาต่าง ๆ



ภาพ 34 แสดงความเสถียรของเอนไซม์เซลลูเลส (betaglucosidase) ที่ช่วงเวลาต่าง ๆ

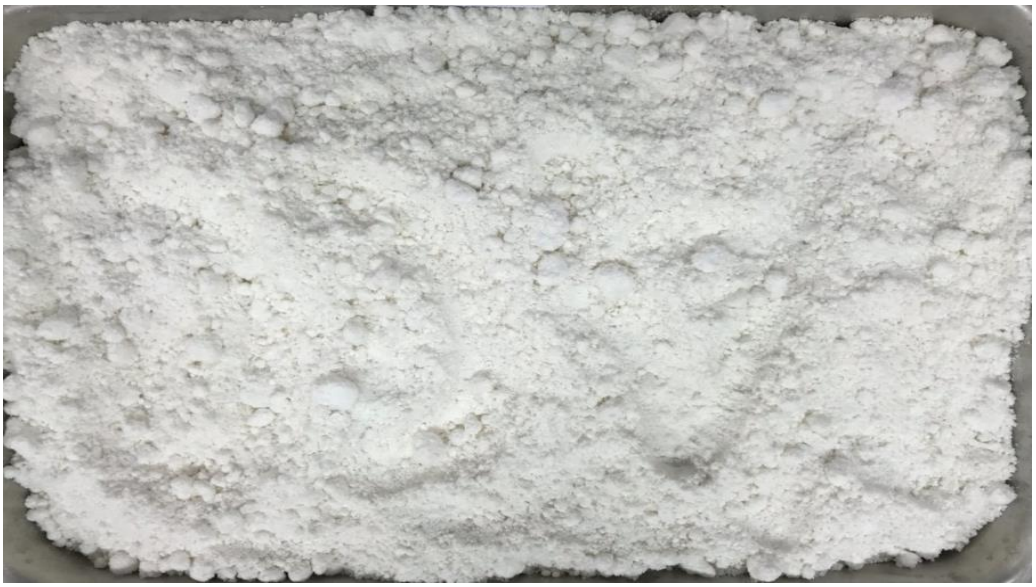


ภาพ 35 แสดงความเสถียรของเอนไซม์ไซแลนเนส ที่ช่วงเวลาต่าง ๆ

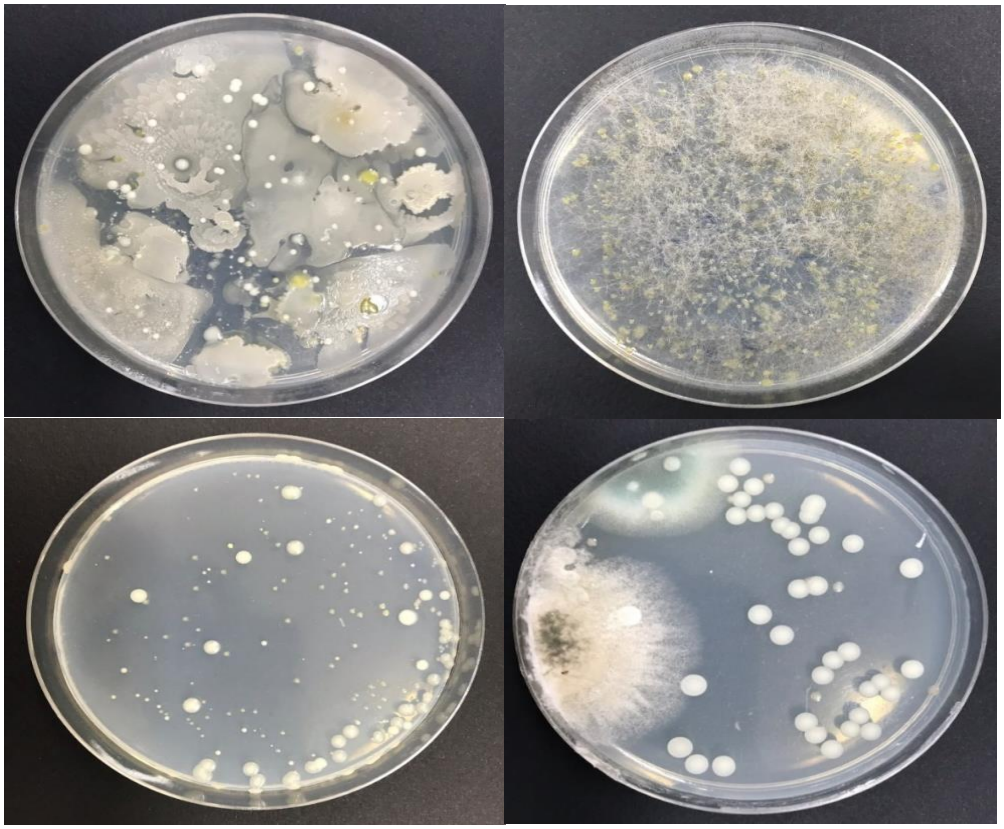
การผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์

นำเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้และมีการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและอะไมเลสมาเลี้ยงในอาหาร PDB ที่มีการเติมยาปฏิชีวนะลงไป ทำการเลี้ยงเชื้อราที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบของการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 3 วัน จากนั้นนำเชื้อจุลินทรีย์ที่เลี้ยงไว้ทำการผสมกับแป้งข้าวเจ้าที่อัตราส่วนเชื้อ 100 มิลลิลิตรต่อปริมารแป้ง 1,000 กรัม เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 500 มิลลิลิตร ลงไปคลุกเคล้าให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 วัน จากนั้นนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 วัน แล้วนำมาบดให้เป็นผง ดังภาพ 36

การทดสอบหัวเชื้อโดยใช้วิธีการ spread plate โดยทำการเจือจางความเข้มข้นที่ 10,000 เท่า ลงในอาหาร PDA ผลการทดลองดังแสดงในภาพ 37



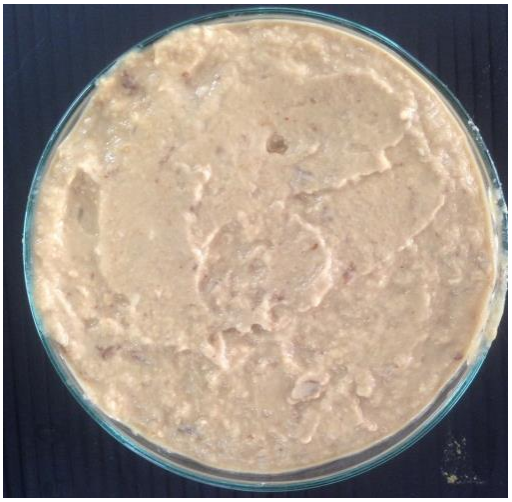
ภาพ 36 แสดงหัวเชื้อจุลินทรีย์สำหรับใช้ผลิตอาหารหมักจากวัสดุทางการเกษตร



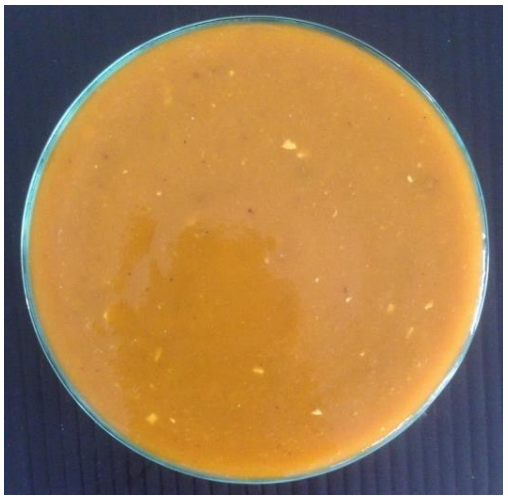
ภาพ 37 แสดงการทดสอบหัวเชื้อโดยใช้วิธีการ spread plate โดยทำการเจือจาง ความเข้มข้นที่ 10,000 เท่า ลงในอาหาร PDA

การผลิตอาหารหมัก

ทำการวางแผนการทดลองแบบ CRD 3 ทรีทเมนต์ (treatment) ประกอบไปด้วยวัสดุทางการเกษตร 2 ชนิด คือ มันสำปะหลัง และฟักทอง ทำการหมักไว้เป็นระยะเวลา 15 วัน ตัวอย่างอาหารหมัก ดังภาพ 38–39



ภาพ 38 แสดงมันสำปะหลังที่ผ่านกระบวนการหมักร่วมกับหัวเชื้อจุลินทรีย์ หมักไว้เป็นระยะเวลา 15 วัน



ภาพ 39 แสดงฟักทองที่ผ่านกระบวนการหมักร่วมกับหัวเชื้อจุลินทรีย์ หมักไว้เป็นระยะเวลา 15 วัน

การทดสอบเชื้อในอาหารหมัก

นำตัวอย่างอาหารหมักมาอย่างละ 1 กรัม มาใส่หลอดที่มีสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ (normal saline) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ เขย่าให้เข้ากัน ทำการเจือจางตัวอย่างต่อ ๆ ไปจนได้ระดับความเจือจางที่ 10^{-2}, 10^{-3} และ 10^{-4} ปิเปตต์ตัวอย่าง ที่ระดับความเจือจาง 10^{-4} ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ในจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) (ภาคผนวก ก) ทำการแยกเชื้อโดยใช้วิธี Spread plate technique นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 วัน สังเกตและนับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น

การวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนะของอาหารหมัก (proximate analysis)

ในการทดลองนี้จะใช้วิธีของ AOAC (2006) ทำการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการ 5 กลุ่มใหญ่ คือ ความชื้น (Moisture) เถ้า (Ash) โปรตีนรวม (Crude protein ,CP)ไขมัน (Crude fat หรือ Ether extract, EE) เยื่อใย (Crude fiber ,CF) นำค่าที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติทำการตรวจสอบความถูกต้องของข้อมูล วิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) โดยใช้แผนการทดลองแบบบล็อกสมบูรณ์ (RCBD) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของแต่ละกลุ่มการทดลองโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติกำหนดค่านัยสำคัญที่ใช้ในการทดสอบที่ $p < 0.05$ ผลการทดลองแสดงในตาราง 9

ตาราง 9 แสดงปริมาณคุณค่าทางโภชนาการของอาหารหมักจากฟักทองและมันสำปะหลัง

วัตถุดิบ	วัตถุแห้ง (%)	โปรตีน (%)	ไขมัน (%)	เถ้า (%)	เยื่อใย (%)
ฟักทอง	13.15	12.85	3.15	0.67	12.31
ฟักทองหมัก	9.12	18.01	5.02	0.52	15.21
ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์	73.21	8.64	2.78	0.66	3.11
ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์หมัก	51.14	10.11	3.12	0.78	3.33
มันสำปะหลัง	55.12	2.22	1.85	0.95	2.45
มันสำปะหลังหมัก	36.85	4.14	1.81	0.88	2.63

การวัดสมรรถภาพการการเจริญเติบโตและศึกษาลักษณะซากของสัตว์ทดลอง

1. การวัดการเจริญเติบโต

ทำการบันทึกน้ำหนักของสัตว์ทดลองเมื่อเริ่มต้น และสิ้นสุดการทดลอง โดยวัดน้ำหนักที่การเปลี่ยนแปลงทุก ๆ 4 สัปดาห์ ระยะเวลา 12 เดือน ตั้งแต่เดือน พฤศจิกายน 2559 ถึง พฤศจิกายน 2560 เพื่อนำมาคำนวณหา

1.1 ปริมาณอาหารที่กินได้ (Feed intake, FI)

1.2 การเจริญเติบโตเฉลี่ย (Average daily gain, ADG)

1.3 ประสิทธิภาพการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนักตัว (Feed conversion ratio, FCR)

1.4 ต้นทุนค่าอาหารต่อการเพิ่มน้ำหนัก 1 กิโลกรัม (Feed cost for 1 kg. of weight gain, FCG)

2. การศึกษาลักษณะซาก

เมื่อนำอาหารที่หมักไปประกอบเป็นสูตรอาหารเปรียบเทียบเลี้ยงโคขุนลูกผสม 3 สายพันธุ์ ได้แก่ ชาโรเล่ส์ แองกัส และวากิว โดยใช้สูตรของวิสาหกิจชุมชนรวมพลคนดอยโตน จังหวัดพะเยา เพื่อเลี้ยงโคขุนระยะสุดท้าย (โปรตีนเฉลี่ย 10–12%) ซึ่งเป็นโคที่ผ่านการเลี้ยงมาเป็นระยะเวลา 2 ปี ทำการเลี้ยงต่อไปอีกเป็นระยะเวลา 12 เดือน เพื่อให้โคขุนอายุครบ 3 ปี พบว่า โคขุนทั้ง 3 กลุ่ม มีอัตราเจริญ และคุณภาพซากไม่แตกต่างกัน โดยมีอัตราการเจริญเฉลี่ย 0.5 กิโลกรัมต่อวัน น้ำหนักซากอุ่นเฉลี่ย 52–54% ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับรายงานของ ศุภชัย อุดชาชน และคณะ (2558) อย่างไรก็ตามสำหรับเกรดไขมันแทรก (Marbling Score) โดยใช้หลักการตัดเกรดไขมันแทรกในส่วนของเนื้อสันในเมื่อนับจากกระดูกสันหลังข้อที่ 12 และ 13 ตามมาตรฐานเนื้อโคของมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ (มกอช.) พบว่า เนื้อโคขุนที่ได้รับอาหารทั้งสองกลุ่มได้เกรดเฉลี่ย 3.25–3.50 ดังนั้นแสดงให้เห็นว่า อาหารผสมที่เกษตรกรพัฒนาขึ้นสามารถใช้ผลิตโคเนื้อคุณภาพให้เกิดไขมันแทรกได้ ทั้งนี้เกรดของไขมันนี้จะขึ้นอยู่กับชนิดพันธุ์ของโคที่นำเข้าขุนด้วย เพราะ ถ้าใช้โคพันธุ์ลูกผสมที่มีไขมันแทรกสูง เช่น วากิว และแองกัส จะมีโอกาสที่ได้ไขมันแทรกเฉลี่ยมากขึ้น (ตาราง 10 และ 11)

ตาราง 10 Growth performances crossbred beef cattle fed with fermented feed

	T1	T2	T3	p-value
Number of cattle (head)	4	4	4	-
Initial weight (kg.)	355	267.5	268.6	0.120
Final weight (kg.)	680	562.5	557.25	0.111
Average daily gain (ADG, kg/d)	0.89	0.81	0.79	0.005
Feed intake (FI, kg/d)	15	15	15	0.000
- Silage*	2	2	2	0.000
- Concentrate	15	15	15	0.000
Feed conversion rate (FCR)	16.85	18.56	18.97	0.002
Feed cost for 1 kg of weight gain	67.38	74.24	75.87	0.015

หมายเหตุ: * Napier Packchong 1 grass and maize husk

ชาโรเลส์ (T1) ซิมเมนทัล (T2) และแองกัส (T3)

ตาราง 11 Carcass characteristics of crossbred beef cattle fed with fermented feed

	T1	T2	T3
Hot carcass (kg./%)	378.38 / 55.64	311.00 / 55.29	309.38 / 55.52
Marbling Score	3.0	3.0	4.0
Chuck Shoulder	1.97±0.5	1.85±0.4	1.93±0.5
Chuck Arm	1.35±0.3	1.15±0.5	1.31±0.5
Chuck Tender	0.87±0.2	0.55±0.3	0.63±0.2
Chuck Eye	0.96±0.5	0.74±0.3	0.86±0.4
Brisket	2.33±0.3	2.48±0.6	2.23±0.5
Rib Set	2.88±0.5	2.53±0.2	2.97±0.3
Short Rib	1.07±0.2	1.24±0.3	1.08±0.2
Fringer	0.56±0.2	0.75±0.4	0.66±0.3
Shank	2.73±0.5	2.43±0.1	2.23±0.5
Hump	0.82±0.7	0.65±0.3	0.49±0.4
Skirt	0.38±0.5	0.48±0.6	0.38±0.3
Silver Shark	0.24±0.5	0.31±0.3	0.25±0.5
Lean Meat	6.05±0.4	5.99±0.2	5.31±0.1
T-Bone	4.62±0.5	4.36±0.5	4.17±0.3

ตาราง 11 (ต่อ)

	T1	T2	T3
Strip Loin	1.84±0.3	1.69±0.2	1.91±0.5
Tender Loin	1.07±0.2	1.04±0.3	1.14±0.5
Flank Steak	0.44±0.1	0.28±0.5	0.54±0.1
Sirloin	2.21±0.3	2.45±0.4	2.56±0.5
Bottom Round	2.85±0.3	2.79±0.2	2.95±0.1
Top Round	3.76±0.5	3.38±0.5	3.66±0.2
Aiguillette	0.85±0.1	0.57±0.3	0.84±0.5
Bavette	0.68±0.5	0.53±0.5	0.76±0.3
Marrow Bone	9.67±0.5	9.78±0.2	9.28±0.1
Scrap Meat Grade A	1.07±0.4	2.66±0.5	2.15±0.2
Scrap Meat Grade B	0.56±0.1	1.03±0.3	0.51±0.2
Knuckle	1.59±0.2	1.96±0.5	1.82±0.4

หมายเหตุ: * ชาโรเลส์ (T1) ซิมเมนทัล (T2) และแองกัส (T3)

(ก) **(ข)** **(ค)**

ภาพ 40 แสดงคุณภาพซากและไขมันของโคขุนลูกผสมที่เลี้ยงด้วยขุนเป็นระยะเวลา 12 เดือน และบ่มไว้ในห้องเย็นอุณหภูมิ 4^{o}C เป็นระยะเวลา 7 วัน

หมายเหตุ: (ก) ลูกผสมชาโรเลสย์ (เกรดไขมันแทรก 3.0) (ข) ลูกผสมซิมเมนทัล (เกรดไขมันแทรก 3.5) (ค) ลูกผสมวากิว (เกรดไขมันแทรก 3.5)

บทที่ 5

บทสรุป

สรุปผลการวิจัย

1. สามารถคัดแยกจุลินทรีย์เพื่อใช้หมักเพิ่มโภชนะวัสดุการเกษตรเพื่อประกอบเป็นสูตรอาหารสัตว์ได้ คือ กลุ่มที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ได้แก่ *Trichoderma* spp. กลุ่มที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลส ได้แก่ *Rhizopus oryzae* และ ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*

2. วัสดุการเกษตรที่เหมาะสมสำหรับเป็นส่วนประกอบหลักในสูตรอาหารเลี้ยงโคขุนในพื้นที่จังหวัดพะเยา คือ ฟักทอง และมันสำปะหลัง เนื่องจากมีโภชนะสูง มีปริมาณมาก และมีราคาถูกโดยในช่วงเดือนมกราคม–เมษายน และสิงหาคม–พฤศจิกายน จะมีปริมาณมากในพื้นที่

3. สูตรอาหารที่ใช้สำหรับเลี้ยงโคขุนในการทดลองนี้

ตาราง 12 แสดงสูตรอาหารที่ใช้สำหรับเลี้ยงโคขุนในการทดลองนี้

สัดส่วน	โปรตีน	สัดส่วนที่ให้ต่อมื้อ (กก.)	สัดส่วน 100 (กก.)	โปรตีน คำนวณ %
อาหารสำเร็จรูป	12	1	13.33	1.60
มันสำปะหลังหมัก	10	3.5	46.67	4.67
ฟักทองหมัก	18	1	13.33	2.40
รำ	14	1	13.33	1.87
กากน้ำตาล	4.5	1	13.33	0.60
	รวม	**7.5**	**100.00**	**11.13**

4. การให้อาหารโคขุนในอัตราเฉลี่ย 15 กิโลกรัมต่อตัวต่อวัน เป็นระยะเวลา 12 เดือน ซึ่งจากข้อมูลของคุณสุริยะ ทองสา (เบอร์โทรศัพท์ 0817066818) วิสาหกิจชุมชนผู้เลี้ยงโคขุนรวมพลคนดอยโตน เครือข่ายสหกรณ์โคขุนดอกคำใต้ จังหวัดพะเยา ซึ่งได้ใช้สูตรอาหารดังที่กล่าวมาเพื่อเลี้ยงโคขุน โดยใช้โคลูกผสมเพศผู้สายพันธุ์ลูกผสมวากิว แองกัส ชาโรเล่ส์

หรือซิมเมนทอล ที่มีเลือดผสม 50–75% อายุเฉลี่ย 2.0–2.5 ปี มีฟันแท้ 2 ซี่ ผ่านการตอนมาแล้ว น้ำหนักก่อนเข้าขุนเฉลี่ย 400–450 กิโลกรัม เมื่อเลี้ยงระยะเวลา 1 ปี จะมีค่าต้นทุนดังนี้ คือ

ตาราง 13 แสดงต้นทุนเมื่อเลี้ยงระยะเวลา 1 ปี

รายละเอียด	**จำนวนเงิน (บาท/โค 1 ตัว)**
ต้นทุน	
โคเนื้อลูกผสมเพศผู้สายพันธุ์ยุโรป อายุ 2 ปี น้ำหนักเฉลี่ย 400–450 กิโลกรัม	45,000
ค่าอาหารสัตว์ (ผลิตและผสมเองโดยใช้วัสดุการเกษตร)	20,000
ค่าวัคซีน และเวชภัณฑ์	600
ค่าสาธารณูปโภคอื่น ๆ	2,400
รวม	68,000 บาท
กำไร	
โคเนื้อลูกผสมเพศผู้สายพันธุ์ยุโรป อายุ 3 ปี น้ำหนักเฉลี่ย 800 กิโลกรัม	85,000
รายได้สุทธิ (85,000–68,000 บาท)	17,000

อภิปรายผลการวิจัย

การใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่มีจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสและเซลลูเล ยีสต์ และจุลินทรีย์กลุ่มที่ผลิตแลคติกหมักวัสดุการเกษตร พบว่า ทำให้สับปะรดหมักมีค่าโภชนะเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะค่าโปรตีนและกรดไขมันที่ระเหยได้ เมื่อเปรียบเทียบกับเปลือกสับปะรดสด เมื่อศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการหมัก โดยใช้วิธีการหมักแบบ Simultaneous Scarification and Fermentation (SSF) เปรียบเทียบกับกระบวนการหมักแบบไม่เติมเชื้อจุลินทรีย์ในสภาพไม่มีอากาศ (EN) พบว่า กระบวนการหมักแบบ SSF จะทำให้คุณค่าทางโภชนะของโปรตีน เท่ากับ 60.2 g/kg ซึ่งเพิ่มขึ้นมากกว่ากลุ่มทดลองอื่น ๆ ซึ่งอาจเป็นผลจากการโปรตีน (Single cell protein) ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการเจริญเติบโต และเพิ่มจำนวนเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ สอดคล้องกับ Zhang, et al. (2000) อีกทั้งจากกระบวนการหมักที่ทำให้สับปะรดมีค่า pH ต่ำ จะมีส่วนช่วยในการควบคุมประชากรของจุลินทรีย์ก่อโรคกลุ่ม *Enterobacter* spp. ซึ่งเป็นส่วนสำคัญที่ทำให้สามารถเก็บรักษาอาหารหมักไว้ได้นานในถังหมักที่ปิดฝาสนิทไว้ได้ถึง 3 เดือน โดยที่ไม่เน่าเสียและโภชนะมีการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก (ขรรค์ชัย ดั้นเมฆ และคณะ, 2558)

งานวิจัยนี้จะใช้จุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากลูกแป้งข้าวหมาก จังหวัดพะเยา ซึ่งเมื่อศึกษาจุลินทรีย์ พบว่า เป็นเชื้อราในกลุ่ม *Aspergillus* section *Nigri Mucor* spp. และ *Rhizopus* spp. เชื้อรา isolate ที่ 4 มีค่าแอคติวิตีสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับ isolates อื่น ๆ และเมื่อนำไปศึกษาชนิดของเชื้อราตามวิธีการของ Klich (2002); Danmek, et al. (2011); Danmek, et al. (2014) พบว่า เป็นเชื้อราสายพันธุ์ *Aspergillus* spp. UP04 ซึ่งผลิตเอนไซม์อะไมเลสและทำงานได้ที่อุณหภูมิ 50–80 °C ส่วนเชื้อรากลุ่มที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา พบว่าเป็นเชื้อราสายพันธุ์ *Trichoderma* spp. UP09 โดยมีค่าแอคติวิตีทั้งเซลลูเลส และไซแลนเนสโดยมีค่าของ Xylanase สูงที่สุด ซึ่งเมื่อตรวจสอบในเอกสารรายงานวิจัย พบว่า เชื้อราทั้งสองสายพันธุ์ เป็นเชื้อราที่ใช้แพร่หลายในการผลิตอาหารหมักต่าง ๆ และไม่เป็นเชื้อราที่ผลิตสารพิษหรือก่อโรคในอาหารสัตว์

การนำฟักทองและมันสำปะหลังมาหมักร่วมกับหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบแสดงผลการวิเคราะห์ และคุณค่าทางโภชนะของอาหารหมัก ซึ่งประกอบไปด้วย โปรตีน, ไขมัน, เถ้า และเยื่อใย ซึ่งคุณค่าทางโภชนะเพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะโปรตีน ซึ่งอาจเป็นผลมาจากโปรตีนเซลล์เดียว (Single cell protein) ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการเจริญเติบโต และเพิ่มจำนวนเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ สอดคล้องกับ Zhang, et al. (2013) แต่สิ่งที่พบจากการศึกษานี้ คือ อาหารหมักนอกจากจะมีโปรตีนเพิ่มขึ้นมาแล้ว จะมีการผลิตกรดอินทรีย์ที่สำคัญที่ช่วยลด pH ของอาหารหมัก ทำให้สามารถเก็บรักษาไว้ได้นานในถังหมักที่ปิดฝาสนิทไว้ได้ถึง 6 เดือน โดยที่โภชนะมีการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก (Guyot, et al., 2000) สอดคล้องกับรายงานวิจัย เช่น Kompiang, et al. (1994) ใช้เชื้อรา *Aspergillus niger* หมักมันสำปะหลังแบบ solid substrate fermentation (SSF) ที่เสริมด้วยยูเรียและเกลือแร่ ในอัตราส่วนเชื้อ 2.0 กรัม ต่อ มันสำปะหลัง 1.0 กิโลกรัม พบว่า ปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นจาก 3% เป็น 18–42% Kompiang, et al. (1995); Nur (1995) ศึกษาการหมักกากแป้งมันสำปะหลังร่วมกับเชื้อ A. *niger* พบว่า ปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นจาก 1.55% เป็น 18.50% ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดวัตถุดิบ ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ วิธีการหมัก และระยะเวลาที่ใช้ นอกจากเชื้อรา *Aspergillus* แล้วยังมีการศึกษาการนำเชื้อราสายพันธุ์อื่น ๆ มาใช้ในกระบวนการหมักอาหารสัตว์ เช่น Hachmeister and Fung (1993) ซึ่งได้ศึกษาและคัดแยก *Rhizopus oryzae* จากอาหารหมักจากถั่วและแป้ง และ Saito, et al. (2004) ซึ่งศึกษาและคัดแยก R. *oryzae* IFO 4707 เพื่อใช้ในการหมักมันฝรั่ง เป็นต้น

เมื่อนำอาหารหมักที่ผลิตได้เมื่อนำไปผสมเป็นอาหารข้นเพื่อเลี้ยงโคเนื้อให้มีโปรตีนเฉลี่ย 12% พบว่า มีต้นทุน 4 บาท/กก และ ใช้เลี้ยงโคเนื้อสายพันธุ์ลูกผสมยุโรป 3 สายพันธุ์ คือ ชาโรเลส์ (T1), ซิมเมนทัล (T2) และแองกัส (T3) เพศผู้ที่ทำการตอนแล้ว ที่มีอายุเฉลี่ย 2–3 ปี

มีน้ำหนักตัวเฉลี่ย 300 ±50 กิโลกรัม เป็นระยะเวลา 10 เดือน พบว่า โดยโคลูกผสมยุโรปสายพันธุ์ชาโรเลส์ มีอัตราการเจริญสูงสุด รองลงมา คือ โคลูกผสมยุโรปสายพันธุ์ซิมเมนทัลและแองกัส ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.89, 0.81 และ 0.79 ตามลำดับ ในขณะที่ประสิทธิภาพการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนักตัว เท่ากับ 16.85, 18.56, 18.97 ตามลำดับ

เมื่อศึกษาคุณภาพซากของโคเนื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ พบว่า ซากอุ่น ซากตัดแต่ง (ซากเย็น) เปอร์เซ็นต์ซาก และชิ้นส่วนของเนื้อหลักของโคทั้งสามกลุ่ม มีค่าเฉลี่ย 52–55% และไม่แตกต่างกันทางสถิติ (P > 0.05) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับรายงานของ ศุภชัย อุดชาชน และคณะ (2558) โดยศึกษาซากโคขุนกบินทร์บุรี พบว่า มีเปอร์เซ็นต์ซากอุ่น 55.64, 55.29 และ 55.52% ซากตัดแต่ง 53.42, 53.67 และ 52.62% ตามลำดับ อย่างไรก็ตามสำหรับเกรดไขมันแทรก (Marbling Score) โดยใช้หลักการตัดเกรดไขมันแทรกในส่วนของเนื้อสันใน (เมื่อนับจากกระดูกสันหลัง ข้อที่ 12 และ 13 ตามมาตรฐานเนื้อโคของมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ (มกอช.)) พบว่า เนื้อโคลูกผสมยุโรปสายพันธุ์แองกัส ได้เกรดเฉลี่ย 4.0 ในขณะที่โคอีก 2 สายพันธุ์ได้เกรดไขมันแทรกเฉลี่ย 3.0 ดังนั้นแสดงให้เห็นว่า อาหารที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้ผลิตโคเนื้อคุณภาพให้เกิดไขมันแทรกได้ แต่เกรดของไขมันที่จะขึ้นอยู่กับชนิดพันธุ์ของโคที่นำเข้าขุนด้วย (Laorodphan, et al., 2012; Pilajun, et al., 2016) เมื่อพิจารณาถึงต้นทุนในการผลิตโคขุน พบว่า ค่าอาหารที่ผลิตได้ต้นทุน 4 บาทต่อกิโลกรัม หรือ 1,800 บาท/เดือน ซึ่งถูกกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับรายงานของ ศุภชัย อุดชาชน และคณะ (2558) ในการใช้กากมันสำปะหลังหมักเป็นอาหารเลี้ยงโคกบินทร์บุรี ซึ่งมีต้นทุนเท่ากับ 2,068 บาทต่อเดือน

ดังนั้น จากการศึกษาทั้งหมดนี้จึงสามารถสรุปเบื้องต้นได้ว่า ฟักทองและมันสำปะหลังสามารถนำหมักและประยุกต์ใช้เพื่อผลิตอาหารข้นสำหรับเลี้ยงโคขุนทดแทนการใช้อาหารข้นสำเร็จรูปได้ เมื่อนำวัตถุดิบมาหมักกับหัวเชื้อผสมที่มีส่วนผสมของจุลินทรีย์กลุ่มที่ย่อยสลายชีวมวลพืชและยีสต์จะทำให้อาหารหมักที่ได้มีโภชนะเพิ่มขึ้น เก็บรักษาได้นาน และเมื่อนำไปผสมเป็นอาหารข้นสำหรับเลี้ยงโคเนื้อลูกผสมสายพันธุ์ยุโรป พบว่า สามารถให้โคเนื้อเจริญได้ดีและมีไขมันแทรกสูง ซึ่งจากผลงานวิจัยนี้ได้มีการขยายผลไปร่วมขับเคลื่อนเกษตรกรผู้เลี้ยงโคเนื้อให้มีการรวมตัวเกิดเป็นสหกรณ์โคขุนดอกคำใต้ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการเลี้ยงโคเนื้อคุณภาพของเกษตรกร บนองค์ความรู้ของการจัดการด้านอาหารที่ใช้วัตถุดิบอาหารสัตว์ในเบื้องต้นเพื่อลดปริมาณการใช้อาหารสำเร็จรูป โดยไม่กระทบต่อประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของโคเนื้อ ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์จากเนื้อโคที่ปลอดภัยสู่ผู้บริโภค และทำให้สามารถสร้างความมั่นคงในอาชีพเลี้ยงโคเนื้อแก่เกษตรกร มีการเผยแพร่เทคโนโลยีและการดำเนินงานจนเป็นที่ยอมรับระดับประเทศ โดยเฉพาะยุทธศาสตร์โคขุน ของจังหวัดภาคเหนือตอนบนสอง (พะเยา เชียงราย แพร่ น่าน)

มีการส่งเสริมและพัฒนาการเลี้ยงโคขุนของเกษตรกรในจังหวัดภาคเหนือตอนบน ภายใต้การตระหนักถึงความสำคัญของสิ่งแวดล้อม โดยการใช้วัตถุที่หาได้ในท้องถิ่นที่มีราคาถูกมาผลิตเป็นอาหารสัตว์ที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง และต้นทุนต่ำ จะทำให้เกิดการกระตุ้นให้เกษตรกรผลิตสินค้าปศุสัตว์เพื่อรองรับความต้องการของผู้บริโภคทั้งในและนอกประเทศได้อย่างยั่งยืน เช่น การนำวัตถุดิบที่หาง่ายในท้องถิ่น เช่น เปลือกข้าวโพด มันสำปะหลัง และฟักทอง มาผลิตเป็นอาหารสัตว์ต้นทุนต่ำ ซึ่งจากการนำไปประยุกต์ใช้เลี้ยงโคขุนทำให้ โดยเหลือต้นทุน 40 ถึง 60 บาทต่อการผลิตโคขุน 1 ตัวต่อ 1 วัน (กรณีใช้อาหารสำเร็จรูปจะเสียค่าใช้จ่ายเฉลี่ย 90 บาทต่อตัวต่อวัน) และปัจจุบันทำให้มีการเพิ่มเกษตรกรจากผู้เลี้ยง 18 ราย เป็นกว่า 300 ราย (ข้อมูลจากสหกรณ์โคขุนดอกคำใต้) การขยายผลโดยมุ่งเน้นการใช้ผลผลิตทางการเกษตรที่เป็นพืชน้ำน้อย เช่น มันสำปะหลัง ฟักทอง และข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ มาผลิตเป็นอาหารสัตว์ต้นทุนต่ำ (ไม่เกิน 5 บาทต่อกิโลกรัม) พบว่า ผลผลิตทางการเกษตร เช่น มันสำปะหลัง ฟักทอง และข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ มีพลังงานสูงแต่โปรตีนต่ำ แต่เมื่อนำมาหมักร่วมกับจุลินทรีย์จะมีคุณค่าทางโภชนะและโปรตีนเพิ่มขึ้น และสามารถนำไปเสริมอาหารหรือทดแทนข้นสำหรับการเลี้ยงโคขุนทำให้ลดต้นทุนลงได้กว่า 30 เปอร์เซ็นต์

ดังนั้น จากจากสภาพปัญหาการขาดแคลนจำนวนโคเนื้อและเนื้อโคคุณภาพดีของประเทศไทย เนื้อโคพื้นเมืองเหนียวไขมันแทรกน้อย ในขณะที่การขุนโคลูกผสมยุโรปต้องใช้ต้นทุนสูง การประยุกต์ใช้วัตถุดิบอาหารสัตว์ในพื้นที่ที่มีโปรตีน และคาร์โบไฮเดรตที่สำคัญในภาคเหนือ ได้แก่ ข้าว ข้าวโพด ถั่วชนิดต่าง ๆ มันสำปะหลัง และฟักทองซึ่งมีมากในเขตภาคเหนือ สามารถนำมาหมักร่วมกับจุลินทรีย์เพื่อเพิ่มคุณค่าทางโภชนะ และใช้ผสมเป็นอาหารข้นสำหรับเลี้ยงสัตว์ ต้นทุนต่ำ จะทำให้สามารถบริหารจัดการอาหารสัตว์ได้ ซึ่งในการวิจัยนี้มีแนวทางในการผสมจุลินทรีย์เพื่อเป็นสูตรการหมักวัตถุดิบและพืชอาหารสัตว์จำเพาะโดยใช้จุลินทรีย์ผสม 3 กลุ่ม คือ

1. จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส เช่น *Trichoderma* spp.
2. จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลส เช่น *Rhizopus oryzae* และ *Mucor* spp.
3. จุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมัก เช่น *Saccharomyces cerevisiae* และ LAB

โดยระหว่างการหมัก เชื้อรา *Trichoderma* spp. *Rhizopus oryzae* และ *Mucor* spp. จะย่อยวัสดุทางการเกษตรส่วนที่เป็นเยื่อใยและแป้งเป็นน้ำตาล เพื่อให้พลังงานกับจุลินทรีย์สำหรับการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนมากขึ้น จากนั้น ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* จะเปลี่ยนน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์ และ *Acetobacter aceti* และจุลินทรีย์ที่เป็น probiotic เช่น *Lactobacillus lactis* จะผลิตกรดชนิดต่าง ๆ โดยเฉพาะ propionic acid ซึ่งเป็นส่วนสำคัญในการสร้าง

ไขมันแทรกในเนื้อโค และเมื่อนำอาหารหมักที่ได้มาประกอบเป็นสูตรอาหารที่มีโภชนะเหมาะสมกับการนำไปใช้เลี้ยงโคเนื้อพื้นเมืองเพื่อผลิตโคหนุ่มเนื้อหนุ่มอายุไม่เกิน 2 ปี หรือโคลูกผสมยุโรปที่มีไขมันแทรกสูงอายุไม่เกิน 3 ปี ที่ตรงความต้องการของตลาดจะทำให้สามารถเพิ่มการแข่งขันในการตลาดทั้งด้านราคา และลักษณะเชิงคุณภาพของเนื้อสัตว์ที่ให้ผลตอบแทนที่ดีแก่เกษตรกร สร้างเป็นอาชีพทางเลือกแก่เกษตรกรในการนำวัตถุดิบที่มีอยู่ในพื้นที่มาผลิตเป็นอาหารสำหรับเลี้ยงสัตว์ได้ ซึ่งกลุ่มเป้าหมายของผู้ได้รับเทคโนโลยีในโครงงานนี้ จะเป็นผู้นำชุมชนหรือผู้ที่สามารถใช้เทคโนโลยีที่ได้รับจากการวิจัยได้อย่างถูกต้อง โดยเบื้องต้นเน้นที่สหกรณ์โคขุนดอกคำใต้ ตำบลบ้านถ้ำ อำเภอดอกคำใต้ จังหวัดพะเยา ซึ่งเป็นแหล่งผลิตพืชอาหารสัตว์และผลิตสัตว์ที่สำคัญของจังหวัดพะเยา เพื่อให้แกนนำเกษตรกรสามารถกระจายความรู้ที่ได้รับต่อสมาชิกในชุมชนและพื้นที่ใกล้เคียงได้ รวมไปถึงนักเรียนและเยาวชนเกษตรที่มีความต้องการจะพัฒนาขีดความสามารถด้านการเกษตร โดยจะส่งเสริมการรวมตัวกันของเกษตรกรด้วยความสมัครใจให้ร่วมกันเรียนรู้และดำเนินกิจกรรมการเกษตรตามความสนใจจากการปฏิบัติจริงและการปฏิบัติงานพื้นฐานอาชีพด้านเกษตรกรรม เพื่อเตรียมความพร้อมให้เป็นเกษตรกรที่มีความพร้อมทั้งด้านความรู้ ความสามารถมีทักษะในการบริหารจัดการธุรกิจเกษตร ซึ่งเกษตรกรเหล่านี้จะเป็นพลังในการพัฒนาการเกษตรของประเทศไทยให้มีก้าวหน้าและเกิดความยั่งยืนตลอดไป

ข้อเสนอแนะ

จากสภาพการเลี้ยงโคเนื้อในปัจจุบันซึ่งส่วนมากโคพันธุ์ที่เลี้ยงเป็นโคพันธุ์พื้นเมือง 60 เปอร์เซ็นต์ และการเลี้ยงโคเนื้อลูกผสมกับพันธุ์แท้ประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ และการที่มีความหลากหลายของพันธุกรรมสูงมาก ซึ่งเมื่อศึกษาข้อมูลของเกษตรกรที่ร่วมโครงการและให้อาหารหมักโคตามสูตรที่ได้รับ แม้ว่าจะมีอัตราการให้เนื้อดี แต่จะมีอัตราการให้ไขมันแทรกในเนื้อผันผวนจากการที่ไม่สามารถควบคุมพันธุกรรมของโคแม่พันธุ์ได้ หรือไม่ทราบชนิดของโคแม่พันธุ์ ทำให้การการผลิตเนื้อโคคุณภาพมีความผันผวนของคุณภาพเนื้อและไขมันแทรกที่ได้อันเนื่องมาจากความหลากหลายทางพันธุกรรมของเนื้อโค แม้ว่าจะมีระบบการผลิตที่เหมือนกัน ดังนั้น การศึกษาทดลองเพื่อให้ทราบข้อมูลที่แน่ชัด ควรมีการศึกษาตั้งแต่การคัดเลือกน้ำเชื้อพ่อพันธุ์จากโคพ่อตัวเดียวกันมาผลิตลูก และศึกษาระยะยาวตั้งการแรกคลอดไปจนถึงอายุพร้อมชำแหละ 3 ปี

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

กรมปศุสัตว์. (2547 ก). **ตารางคุณค่าทางโภชนะของวัตถุดิบอาหารสัตว์**. เอกสารคำแนะนำ กรมปศุสัตว์: กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

กรมปศุสัตว์. (2547 ข). **มาตรฐานพืชอาหารสัตว์หมัก กองอาหารสัตว์**. เอกสารคำแนะนำ กรมปศุสัตว์: กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

กรมปศุสัตว์. (2547 ค). **มาตรฐานพืชอาหารสัตว์แห้ง กองอาหารสัตว์**. เอกสารคำแนะนำ กรมปศุสัตว์: กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

กองอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์. (2559) **โภชนะอาหารสัตว์**. สืบค้นเมื่อ 9 ตุลาคม 2559, จาก http://nutrition.dld.go.th/nutrition/images/knowledge/52.pdf

ขรรค์ชัย ดั้นเมฆ, โชค โสรัจกุล และชตุต ดงปาลีธรรม์. (2558). การประยุกต์ใช้เปลือกข้าวโพดหมักเพื่อเลี้ยงโคเนื้อในจังหวัดพะเยา. **วารสารสัตวบาล**, 25(108), 22-25

คามินท์ ไชยมงคล และสุริยะ สะวานนท์. (2555). สมรรถภาพการผลิต และลักษณะซากของโคเนื้อพันธุ์กำแพงแสน ที่ขุนด้วยอาหารผสมเสร็จ (TMR) ที่มีใบมันสำปะหลังเป็นแหล่งอาหารหยาบ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์: ม.ป.ท.

เจริญศักดิ์ โรจนฤทธิ์พิเชษฐ์. (2519). **มันสำปะหลัง.** กรุงเทพฯ: ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์,

จินดา สนิทวงศ์ ณ อยุธยา. (2539). ข้าวโพดและเศษเหลือจากข้าวโพดเป็นอาหารสัตว์. **กองอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์กระทรวงเกษตรและสหกรณ์,** 39(2), 0514-0585.

ดรุณี ศรีชนะ. (2550). **การวิเคราะห์คุณภาพอาหารสัตว์**. ปทุมธานี: ภาควิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต.

นิพัฒน์ สุขวิบูลย์. (2550). **ข้อมูลผลผลิตทางการเกษตร**. สืบค้นเมื่อ 9 ตุลาคม 2559, จาก http://www.oae.go.th/oae_report/export_import/export_result.php.

วิเชียร ลีลาวัชรมาศ. (2553). เทคโนโลยีการหมัก. **Food Focus Thailand**, 48(5), 36-37.

วัชรวิทย์ มีหนองใหญ่, ภานุวัฒน์ คัมภีราวัฒน์, ศุภรินธร์ มหาสวัสดิ์ และวัชระ เมืองนาค. (2555). ผลของการใช้เปลือกมันสำปะหลังหมักเป็นแหล่งพลังงานและเยื่อใยในสูตรอาหารต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต และคุณภาพซากของแกะขุนในเขตร้อน. **วารสารวิจัย มข. (ฉบับบัณฑิตศึกษา),** 17(2), 257-266.

ศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์ตาก. (2559). **โคพันธุ์ตาก.** สืบค้นเมื่อ 29 ตุลาคม 2559, จาก http://www.thailivestock.com/cattle_handling/โคพันธุ์ตาก.

ศูนย์สารสนเทศ กรมปศุสัตว์. (2559). **ข้อมูลจำนวนโคเนื้อ**. สืบค้นเมื่อ 29 ตุลาคม 2559, จาก http://www.dld.go.th/ict/th.

ศุภชัย อุดชาชน, วรรณา อ่างทอง, พิสัย วงศ์พาณิชย์ และอุดม ชัยนนท์. (2558). ผลของการใช้กากมันสำปะหลังหมักยีสต์ทดแทนอาหารข้นในสูตรอาหารโคขุนพันธุ์กบินทร์บุรีต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต และลักษณะซาก. **วารสารแก่นเกษตร,** 43(1), 46–49.

ส่วนวิจัยเศรษฐกิจปศุสัตว์และประมง สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. (2549). **ต้นทุนและผลตอบแทนในการเลี้ยงโคเนื้อ**. สืบค้นเมื่อ 9 ตุลาคม พ.ศ. 2559. จาก http://planning.dld.go.th/th/images/stories/section–5/2561/strategy01.pdf.

สุริยะ สะวานนท์, คงปฐม กาญจนเสริม, ริเชษฐ์ พึ่งชัย, พีระพงษ์ เหมือนตา และปัฐวนันท์ พันธุมาตร. (2554). ผลของการเสริมกระถินหมักและระยะเวลาในการตอนต่อสมรรถภาพการผลิต คุณลักษณะซาก และผลตอบแทนทางเศรษฐกิจจากการขุนโคเนื้อลูกผสมเพศผู้. **วิทยาสารกำแพงแสน**, 9(3), 28 –39.

สำนักงานเกษตรจังหวัดพะเยา. (2559). **ข้อมูลข้าวโพดเลี้ยงสัตว์.** สืบค้นเมื่อ 9 ตุลาคม 2559, จาก http://www.nfcpyo.com/uploads/news/3–khawphod–leiyng–satw–run–1–fn––3bddb7cd23.pdf.

สำนักงานเกษตรจังหวัดพะเยา. (2559). **ผลผลิตทางการเกษตรจังหวัดพะเยา**. สืบค้นเมื่อ 9 ตุลาคม 2559, จาก http://www.phayao.doae.go.th/data/dataplant2558–2559.pdf .

สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.). (2559). **มันสำปะหลัง**. สืบค้นเมื่อ 9 ตุลาคม พ.ศ. 2559. จาก https://www.nstda.or.th/industry/industry–casava.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. (2559). **ผลผลิตทางการเกษตร (ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์).** สืบค้นเมื่อ 9 ตุลาคม 2559, จาก http://www.oae.go.th/download/prcai/DryCrop/cassava.pdf.

สำนักพัฒนาอาหารสัตว์. (2559). **คุณค่าทางโภชนะของวัตถุดิบอาหารสัตว์**. สืบค้นเมื่อ 18 มกราคม 2560, จาก http://nutrition.dld.go.th/nutrition/images/feedstuff/feed–table.pdf

Adegbola, T. A., and Oduozo, P. C. (1992). Nutrient intake, digestibility and performance of rabbits fed varying levels of fermented and unfermented cassava peel meal. **Journal of Animal Health and Production**, 12(1), 41–47.

Akinfemi, A., Adu, O. A. and Doherty, F. (2010). Conversion of sorghum stover into animal feed with white–rot fungi: Pleurotus ostreatus and Pleurotus pulmonarius. **African Journal of Biotechnology,** 9(11), 1706–1712.

Akinfala, E. O. and Tewe, O. O. (2001). Utilization of whole cassava plant in the diets of growing pigs in the tropics. **Livestock Res. for Rural Dev**, 13(5), 43.

Akpan, I. and Ikenebomeh, M. J. (1995). Glutamic acid fermentation. **Nigerian Journal of Microbiology,** 10, 60–65.

Alawa, J. P. and Amadi, C. (1991). Voluntary intake and digestibility of diets containing corn cobs, brewers dried grains and wheat bran by rabbits. **Journal of Animal Health and Production,** 11, 9–20.

AOAC. (2006). **Animal feed**. Maryland: AOAC International.

Apea–Bah, F. B., Oduro, I., Ellis, W. O. and Safo–Kantanka, O. (2011). Factor analysis and age at harvest effect on the quality of flour from four cassava varieties. **Journal of Dairy Food and Science,** 6, 43–54.

Aro, S.O. (2008). Improvement in the nutritive quality of cassava and its by–products through microbial fermentation**. African Journal of Biotechnology**, 7(25), 4789–4797.

Aro, S. O., Aletor, V. A., Tewe, O. O., Fajemisin, A. N., Usifo, B. and Adesida, J. A. (May 21st, 2008). Studies on the nutritional potentials of cassava tuber wastes (CTW) collected from a factory. In **4th Annual Conference. SAAT, Federal University of Technology Akure** (pp. 86–92). Akure: Federal University of Technology Akure.

Aro, S. O., Aletor, V. A., Tewe, O. O., Fajemisin, A. N., Usifo, B., and Falowo, A. B. (2008). Preliminary investigation on the nutrients, anti–nutrients and mineral composition of microbially fermented cassava starch residues. In **33rd Annual Conference of Nigerian Society for Animal Production (NSAP)** (pp. 248–251). Ayetoro: Ogun State, Nigeria.

Aravin Periyasamy. (2012). **Effect of physical properties of cotton on enzyme concentration**. Retrieved January 4, 2017, from http://www.slideshare.net/abiramprince/effect-of-physical-properties-of-cotton-on-enzyme-concentration.

Barnhardt natural fibers group. (2015). **Know Your Fibers**: Cotton vs. Viscose Rayon. Retrieved January 4, 2017, from http://www.barnhardtcotton.net/blog/know-fibers-cotton-vs-viscose-rayon.

Bayman, P. and Cotty, P. J. (1991) Vagatative compatibility and genetic diversity in the *Aspergillus flavus* population of a single field. **Canadian Journal of Botany**, 69, 1707–1711.

Belewu, M. A. and Jimoh, N. O. (2005). Blood, carcass and organ measurement as influenced by *Aspergillus niger* treated cassava waste in the diets of West African Dwarf goats (WAD). **Global Journal of Agricultural Sciences**, 4(2), 125–128.

Bennett, L. L., Hammond, A. C., Williams, M. J., Kunkle, W. E., Johnson, D. D., Preston, R.L., et al. (1995). Performane, carcass yield, and carcass quality characteristics of steers finished on Rhizoma Peanut (Arachis glabrata) Tropical grass pasture or concentrate. **Journal of Animal Science,** 73, 1881–1887.

Brook, E. J., Stanton, W. R. and Wallbridge, A. (1969). Fermentation method for protein enrichment of cassava. **Biotechnology and Bioengineering,** 11, 1271–1284.

Campbell-Platt, G. (1994). Fermented foods–A world perspective. **Food Research International,** 27, 253.

Cotty, P. J. (1988). Aflatoxin and sclerotial production by Aspergillus flavus: Influenceof pH. **Phytopathology,** 78, 1250–1253.

Danmek, K., Prasongsuk, S., Lotrakul, P., Damann, K. E., Eveleigh, D. E. and Punnapayak, H. (2011). Effect of Avid® on the synnema-like formation of Aspergillus flavus grown on Czapek medium. **African Journal of Microbiology Research,** 5(18), 2812–2815.

Danmek, K., Intawicha, P., Thana, S., Sorachakula, C., Meijer, M. and Samson, R. A. (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.

Enevoldsen, B. S. and Bathgate, G. N. (1969). Structural analysis of wort dextrins by means of β–amylase and the debranching enzyme, pullulanase. **Journal of the Institute of Brewing**, 75, 433–443.

Fetuga, B. L. and Oluyemi, J. A. (1976). The metabolizable energy of some tropical tuber meals for chicks. **Poultry Science Journal,** 55, 868–873.

Gornall, A. G., Bardawill, C. J. and David, M. M. (1949). Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. **Journal of Biological Chemistry,** 177(2), 751–766.

Goering, H. K. and Van Soest, P.J. (1970). **Forage Fiber Analysis (apparatus, reagents, prosedures and some applications)**. USDA: Agricultural Handbook No. 379.

Ghose, T. K. (1987). Measurement of cellulase activities. **Intetntional Union of Pure and Applied Chemistry,** 59, 257–268.

Ghose, T. K., and Bisaria, V. S. (1987). Measurement of Hemicellulase activities Part 1: Xylanase. **Intenational Union of Pure and Applied Chemistry**, 59(2), 1739–1752.

Gray, W. D. and Abou–El–Seoud, M. D., (1966). Fungal protein for food and feeds. 3. Manioc as a potential crude raw materials for tropical areas. **Economic Botany,** 20, 251–255.

Glazer, A. W. and Nikaido, H. (1995). **Microbial Biotechnology: fundamentals of applied microbiology**. San Francisco: W. H. Freeman.

Guyot, J. P., Calderon, M. and Morlon–Guyot, J. (2000). Effect of pH control on lactic acid fermentation of starch by *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18010T. **Journal of Applied Microbiology,** 88, 176–182.

Hachmeister, K. A. and Fung, D. Y. C. (1993). Tempeh: a mold–modified indigenous fermented food made from soybean and/or cereal grains. **Critical Reviews in Microbiology,** 19, 137–188.

Harris, L. E., Leche, T. F., Kearl, L. C., Fonnesbeck, P. V. and Lloyd, H. (1982). **Central and Southeast Asia Tables of Feed Composition**. Logan: Utah State University.

Harane, R. S., Mehra, N. R., Tayade, P. B. and Adivarekar, R. V. (2014). A facile energy and water–conserving process for cotton dyeing. **International Journal of Energy and Environmental Engineering,** 5(96), 6–10.

Jvo Siegrist Enzymatic Food Analysis. (2017). **food–analysis**. Retrieved January 4, 2017, from http://www.sigmaaldrich.com/technical–documents/articles/ analytix/enzymatic– html#materials.

Klich, M. A. (2002). Biogeography of Aspergillus species in soil and litter. **Mycologia,** 94(1), 21– 27.

Kompiang, I. P., Sinurat, A. P., Supriyat, P. T. and Darma, J. (1992). Nutritive value of protein enriched cassava: cassapro. **Jurnal Ilmu–Ilmu Peternakan,** 7(2), 22–25.

Kompiang. I. P., Sinurat, A. P. and Supriyat, P. T. (1995). The effect of using protein enriched Sago and its by–products in comparison with fermented cassava fiber in the rations on the performance of broiler chickens. Research Results on Poultry and Miscellaneous Animals**. Research Institute for Animal Production. Ciawi, Bogor,** 490–498.

Laorodphan, N., Jaturasitha, S., Chongkasikit, N., Phatsara, C., Sirinupongsanun, V., and Waritthitham, A., et al. (2012). Effects of dried cassava pulp as a source of energy on growth performance and carcass quality in fattening beef cattle. **Chiang Mai University Journal of Natural Sciences,** 11, 309–314.

Mann, J. and Truswell, S. (2007). **Essentials of Human Nutrition (3rd ed.).** New York: Oxford University Press.

Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analysis of Chemistry**, 31, 426–428.

Mikami, Y., Gregory, K. F., Levadoux, W. L., Balagopalan, C. and Whitwell, S. T. (1982). Eactors affecting yield and protein production by *Cephalosporium eichhorniae*. **Applied and Environmental Microbiology,** 43, 403–411.

Muindi, P. J. and Hanssen, J. F. (1981b). Protein enrichment of cassava meal by Trichoderma harzianum for animal feed. **Journal of the Science of Food and Agriculture,** 32, 655–661.

National Research Council (NRC). (1984). **Nutrient Requirements of Beef Cattle**. Washington D.C: National Academy Press.

National Agricultural Research Organization (NARO). (2001). **Standard Tables of Feed Composition in Japan (2001)**. National Agricultural Research Organization.

Nwafor, O. E. and Ejukonemu, F. E. (2004). Bio–conversion of cassava wastes for protein enrichment using amylolytic fungi: a preliminary report. **Global Journal of Pure and Applied Sciences,** 10(4), 505–507.

Nur, Y. S. (1995). The utilization of different levels of fermented cassava fibre in the diets of broiler chickens. Proceedings of the National Seminar on Science and Technology. **Research Institute for Animal Production, Ciawi, Bogor,** 244–248.

Okine, A., Aibibula, Y., Hanada, M. and Okamoto, M. (2007). The use of fungal inoculants in the ensiling of potato pulp: effect of temperature and duration of storage on silage fermentation characteristics. **Asian–Australasian Journal of Animal Sciences,** 20(2), 214–219.

Omole, T. A. and Sonaiya, E. B. (1981). The effect of protein sources and methionine supplementation of cassava peel meal utilization by growing rabbits. **Nutrition Reports International,** 23(4), 729–737.

Padmaja, G., George, M. and Moorthy, S. N. (1993). Detoxification of cassava during fermentation with mixed culture. **Journal of the Science of Food and Agricultural,** 63, 473–481.

Pilajun, R. and Wanapat, M. (2016). Growth performance and carcass characteristics of feedlot Thai native×Lowline Angus crossbred steer fed with fermented cassava starch residue. **Tropical Animal Health and Production,** 48, 719–726.

Saito, K., Abe, A., Sujaya, I–N., Sone, T. and Oda, Y. (2004). Comparison of *Amylomyces rouxii* and *Rhizopus oryzae* in lactic acid fermentation of potato pulp. **Food Science and Technology Research,** 10(2), 224–226.

Stephen, B., David, K. Chung, Y. Chang, B. Tume, K. and Zembayashi, M. (2006). Adiposity, fatty acid composition and delta–9– desaturase acitivity during growth in beef cattle. **Journal of Animal Science,** 77, 478–486

Sternberg, D., Vijayakumar, P. and Reese, E. T. (1977). β–glucosidase: microbial production and effect on enzymatic hydrolysis of cellulose. **Canadian Journal of Microbiology**, 23, 139–147.

Steinkraus, K. H. (1995). **Handbook of indigenous fermented foods**. New York, Marcel Dekker.

Suyama, K., Hiroki, Y., Takahiko, N., Takashi, I. and Hajimu, K. (1993). A plate count method for aerobic cellulose decomposers in soil by congo red staining. **Soil Science and Plant Nutrition,** 39(2), 361–365.

Sukara, E. and Doelle, H. W. (1988). Cassava starch fermentation pattern of Rhizopus oligosporus MIRCEN. **Applied Microbiology and Biotechnology,** 4, 463–471.

Varghese, G., Thambirajah, J. J. and Wong, F. M. (August 1–7, 1976). **Protein enrichment of cassava by fermentation with micro–fungi and the role of natural nitrogenous supplements**. In Cock, J., MacIntyre, R. and Graham, M. (Eds.). **Proceedings of the fourth International Symposium of the International Society for tropical root crops** (pp.250–255). Ottawa: CIAT, Colombia.

Proceeding. 4th Int. Symposium of the International Society for Tropical Root Crops, CIAT. Cali, Colombia, 1st–7yh August, 1976, IDRC, Ottawa, 8, 250–255.

Visakh, P. M. and Thomas, S. (2010). Preparation of Bionanomaterials and their Polymer Nanocomposites from Waste and Biomass. **Waste and Biomass Valorization,** 1, 121–134.

Voet, D. and Voet, J. G. (1995). **Biochemistry** (2nd ed.). New York: John wiley and sons.

Wike, C. R., Maiorella, B., Sciamanna, A., Tangnu, K., Wiley, D. and Wong, H. (1983). **Enzymatic hydrolysis of cellulose**. Park Ridge, New Jersey, USA: Noyes Data Corporation.

Zhang, J., Cai, Y., Kobayashi, R. and Kumai, S. (2000). Characteristics of lactic acid bacteria isolated from forage crops and their effects on silage fermentation. **Journal of the Science of Food and Agriculture,** 80, 1455–1460.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Potato Dextrose Agar (PDA)

มันฝรั่ง	200 กรัม
น้ำตาลเดกโตรส (Dextrose)	20 กรัม
วุ้นผง (Agar)	20 กรัม
น้ำกลั่น	1 ลิตร

นำมันฝรั่งปอกเปลือก ล้างให้สะอาด และนำมาหั่นเป็นรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัสชิ้นเล็ก ๆ ขนาดประมาณ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร จำนวน 200 กรัม นำไปต้มในน้ำกลั่นประมาณ 700 มิลลิลิตร เพื่อให้สุก สังเกตได้จากการใช้มือบีบแล้วมันฝรั่งนุ่มแตกออกง่าย ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นนำมากรองแต่ส่วนน้ำ เติมน้ำตาลเดกโตรส 20 กรัม ลงไปผสมให้ละลาย เติมน้ำกลั่นลงไปเล็กน้อยให้มีปริมาตรของอาหารประมาณ 900 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดและด่างให้อยู่ในช่วง 5.5 – 6.0 ด้วย HCl 1 นอร์มอล หรือ NaOH 1 นอร์มอล เติมผงวุ้น 20 กรัม และนำไปต้มให้วุ้นละลาย ปรับปริมาตรสุดท้ายของอาหารให้เป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 120 องศา–เซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. Potato Dextrose Broth (PDB)

มันฝรั่ง	200 กรัม
น้ำตาลเดกโตรส (Dextrose)	20 กรัม
น้ำกลั่น	1 ลิตร

นำมันฝรั่งปอกเปลือก ล้างให้สะอาด และนำมาหั่นเป็นรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัสชิ้นเล็ก ๆ ขนาดประมาณ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร จำนวน 200 กรัม นำไปต้มในน้ำกลั่นประมาณ 700 มิลลิลิตร เพื่อให้สุก สังเกตได้จากการใช้มือบีบแล้วมันฝรั่งนุ่มแตกออกง่าย ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นนำมากรองแต่ส่วนน้ำ เติมน้ำตาลเดกโตรส 20 กรัม ลงไปผสมให้ละลาย เติมน้ำกลั่นลงไปเล็กน้อยให้มีปริมาตรของอาหารประมาณ 900 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดและด่างให้อยู่ในช่วง 5.5 – 6.0 ด้วย HCl 1 นอร์มอล หรือ NaOH 1 นอร์มอล ปรับปริมาตรสุดท้ายของอาหารให้เป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. Carboxymethyl cellulose agar (CMC agar) (Hankin and Anagnostakis, 1977)

Carboxymethyl cellulose	5.0 กรัม
$(NH_4)_2SO_4$	1.0 กรัม
Yeast extract	1.0 กรัม
วุ้นผง (Agar)	1.0 กรัม
น้ำกลั่น	1.0 ลิตร

ละลาย Carboxymethyl cellulose 5.0 กรัม ในน้ำร้อนประมาณ 500 มิลลิลิตร โดยค่อย ๆ ใส่พร้อมกับคนให้ละลายจนหมด เติมส่วนประกอบที่เหลือและปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. Czapex' s dox medium (Mandel and Sternberg, 1976)

$(NH_4)_2SO_4$	1.0 กรัม
KH_2PO_4	2.0 กรัม
Urea	0.3 กรัม
$CaCl_2$	0.3 กรัม
$MgSO_4$	0.3 กรัม
$FeSO_4$	5.0 มิลลิกรัม
$MnSO_4$	1.6 มิลลิกรัม
$ZnSO_4$	1.4 มิลลิกรัม
$CoCl_2$	2.0 มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	1.0 ลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น และนำไปใส่ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร ให้มีปริมาตรอาหารเท่ากับ 100 มิลลิลิตร จากนั้นใส่กระดาษกรอง Whatman No.1 ขนาดกว้าง 2.0 × 10.0 เซนติเมตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

5. SS medium (Danmek, et al., 2014)

Glucose	20.0 กรัม
Peptone	2.0 กรัม
Yeast extract	1.0 กรัม
KH_2PO_4	2.0 กรัม

$MgSO_4$	0.5 กรัม
$CaCl_2$	0.1 กรัม
Tween 80	2.0 มิลลิลิตร
0.0005 % (w/v) $ZnSO_4.7H_2O$	0.5 มิลลิลิตร
0.0005% (w/v) $FeSO_4.7H_2O$	0.5 มิลลิลิตร
0.005% (w/v) $MnSO_4.H_2O$	0.5 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

ละลาย Glucose, $CaCl_2$, $MgSO_4$, KH_2PO_4, yeast extract และ peptone ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นเติมสารละลาย $MnSO_4.H_2O$, $FeSO_4.7H_2O$ และ $ZnSO_4.7H_2O$ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และปรับค่าความเป็นกรดและด่างให้อยู่ในช่วง 5.5 – 6.0 ด้วย HCl 1 นอร์มอล หรือ NaOH 1 นอร์มอล เติม Tween 80 ลงไป 2 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร แล้วนำไปใส่ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร ให้มีปริมาตรอาหารเท่ากับ 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

6. V8 juice medium (Cotty, 1988)

น้ำผลไม้ V8	50 มิลลิลิตร
agar	20 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

ผสมน้ำผลไม้ V8 และน้ำกลั่นให้มีปริมาตรของอาหาร ประมาณ 900 มิลลิลิตร เติมผงวุ้น 20 กรัม และนำไปต้มให้วุ้นละลาย ปรับปริมาตรสุดท้ายของอาหารให้เป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

7. Malt Extract Peptone Agar (MEA)

Malt Extract	20 กรัม
Peptone	10 กรัม
Glucose	20 กรัม
Agar	20 กรัม
น้ำกลั่น	1 ลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมด ยกเว้นผงวุ้น (Agar) ด้วยน้ำกลั่น ปรับค่าความเป็นกรดและด่าง ให้อยู่ในช่วง 5.5 – 6.0 ด้วย HCl 1 นอร์มอล หรือ NaOH 1 นอร์มอล ปรับปริมาตรให้เป็น

1 ลิตร เติมผงวุ้น 20 กรัม และนำไปต้มให้วุ้นละลาย นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข การเตรียมสารละลายและการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ

การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์

1. การเตรียม 0.1 M Sodium Citrate

ชั่ง Tri-sodium Citrate dehydrate ($C_6H_5O_7Na.2H_2O$) จำนวน 29.41 กรัม ละลายน้ำและปรับปริมาตรเป็น 1ลิตร

2. การเตรียม 0.1 M Citric acid

ชั่ง Citric acid monohydrate ($C_6H_2O_7Na.2H_2O$) จำนวน 21.01 กรัม ละลายน้ำและปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

3. การเตรียม 0.025 M Citrate buffer pH 4.5

ชั่ง Tri-sodium Citrate dehydrate ($C_6H_5O_7Na.2H_2O$) จำนวน 1.3036 กรัม มาละลายในน้ำกลั่น 490 มิลลิลิตร แล้วเติม Citric acid monohydrate ($C_6H_2O_7Na.2H_2O$) ลงไป 1.6953 กรัม ปรับ pH ให้เป็น 4.5 เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร

4. การเตรียม 0.05 M Citrate buffer pH 4.8

ชั่ง Tri-sodium Citrate dehydrate ($C_6H_5O_7Na.2H_2O$) จำนวน 7.6466 กรัม มาละลายในน้ำกลั่น 990 มิลลิลิตร แล้วเติม Citric acid monohydrate ($C_6H_2O_7Na.2H_2O$) ลงไป 5.0434 กรัม ปรับ pH ให้เป็น 4.8 เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรเป็น 1 ลิตร

5. การเตรียม 0.05 M Citrate buffer pH 4.0

นำ 0.1 M Citric acid มา 59 มิลลิลิตร ผสมรวมกับ 0.1 M Sodium Citrate จำนวน 41 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย 0.1 M Citrate buffer pH 4.0 จากนั้นจึงทำการเจือจางลง 2 เท่าด้วยน้ำกลั่น

6. การเตรียม 0.2 M NaH_2PO_4

ชั่ง $NaH_2PO_4.2H_2O$ จำนวน 15.60 กรัม เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร

7. การเตรียม 0.2 Sodium phosphate buffer pH 6.0

นำ 0.2 M NaH_2PO_4 มา 87.7 มิลลิลิตร ผสมรวมกับ 0.2 M Na_2HPO_4 จำนวน 12.3 มิลลิลิตร

8. การเตรียม 0.2 M Sodium phosphate buffer pH 7.0

นำ 0.2 M NaH_2PO_4 มา 39 มิลลิลิตร ผสมรวมกับ 0.2 M Na_2HPO_4 จำนวน 61 มิลลิลิตร

9. การเตรียม 20 mM Sodium acetate

ชั่ง Sodium acetate trihydrate ($CH_3COONa.3H_2O$) จำนวน 2.721 กรัม ละลายน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

10. การเตรียม 20 mM Acetic acid

ตวง Acetic acid ปริมาตร 1.2 มิลลิลิตร ใส่ในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

11. การเตรียม 20 mM Sodium acetate buffer pH 5.0

นำ 20 mM Sodium acetate มาผสมรวมกับ 20 mM Acetic acid ในอัตราส่วน 70:30 โดยปริมาตร

การเตรียมสารละลาย Dinitrosalicylic acid (DNS) (ดัดแปลงจาก Miller, 1959)

1. เตรียมสารละลาย Dinitrosalicylic acid 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 880 มิลลิลิตร

2. ชั่ง Potassium sodium tartrate (NaKC4H4O6.4H2O) จำนวน 255 กรัม ละลายในสารละลาย NaOH 4.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 300 มิลลิลิตร

3. เตรียมสารละลาย NaOH 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 22 มิลลิลิตร ใส่ลงในสารละลาย phenol 10 กรัม เติมน้ำให้ครบ 1 ลิตร ผสมให้เข้ากัน เทแบ่งออกมา 69 มิลลิลิตร ใส่ NaHSO3 6.9 มิลลิลิตร

4. ผสมสารละลายจากข้อ 1 และ 2 ให้เข้ากัน จากนั้นจึงใส่สารละลายข้อ 3 ผสมให้เข้ากัน นำไปเก็บใส่ขวดสีชา และเก็บไว้ในตู่เย็นอย่างน้อย 1 คืน ก่อนนำมาใช้

การเตรียมสารละลาย Biuret (Gornall, et al,. 1949)

1. ชั่ง CuSO4.5H2O จำนวน 1.50 กรัม และ Potassium sodium tartrate จำนวน 6.0 กรัม ในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร

2. เตรียมสารละลาย NaOH 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 300 มิลลิลิตร

3. นำสารละลายจากข้อ 4.1 และ 4.2 มาผสมรวมกัน ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น เก็บไว้ในขวดสีชา

การเตรียมสารละลายสำหรับวัดแอกติวิตีไซแลนเนส (Nelson, 1944; Somogyi, 1952)

1. การเตรียม Alkali copper reagent

สารละลาย ก

Na_2CO_3	25 กรัม
Potassium sodium tartrate (NaKC4H4O6.4H2O)	25 กรัม
$NaHCO_3$	20 กรัม
Na_2SO_4	200 กรัม

น้ำกลั่น 1 ลิตร

ละลายสารเคมีทั้งหมดให้เข้ากันด้วยน้ำกลั่น และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร

สารละลาย ข

ชั่ง $CuSO_4.5H_2O$ จำนวน 15.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร จากนั้นเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นลงไป 2 หยด

สารละลาย Alkali copper reagent

เตรียมโดยผสมสารละลาย ก ปริมาตร 25 มิลลิลิตร และ สารละลาย ข ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน (ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้)

2. การเตรียม Arsenomolybdate reagent

ชั่ง Ammonium molybdate 25.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 450 มิลลิลิตร จากนั้นค่อย ๆ เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นปริมาตร 21 มิลลิลิตร ลงไป แล้วจึงเติม $Na_2HAsO_4.7H_2O$ ที่ละลายอยู่ในน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชา และตั้งทิ้งไว้ 2 วันก่อนนำมาใช้

การเตรียมสารละลายสำหรับวิเคราะห์องค์ประกอบของลิกโนเซลลูโลส

1. การเตรียมสารละลาย Neutral Detergent

Sodium lauryl sulphate	30 กรัม
Disodium ethylenediamine tetraacetate (EDTA) dihydrate	16.18 กรัม
Sodium borate decahydrate ($Na_2B_4O_7$ 10 H_2O)	6.81 กรัม
Na_2HPO_4	4.56 กรัม
2–Ethoxyethanol (ethylene glycol monoethyl ether)	10 มิลลิลิตร

นำ EDTA และ $Na_2B_4O_7$ 10 H_2O มาละลายในน้ำกลั่นพอประมาณ และนำไปต้มจนละลายหมด แล้วนำไปผสมกับ Sodium lauryl sulphate และ 2–Ethoxyethanol จากนั้นนำ Na_2HPO_4 มาละลายในน้ำกลั่นพอประมาณ และนำไปต้มจนละลายหมดแล้วนำไปผสมกับสารละลายข้างต้น ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร และ pH อยู่ในช่วง 6.9–7.1

2. การเตรียมสารละลาย Acid Detergent

Sulfuric acid (%assay=100)	49.04	กรัม
Cetyl trimethylammonium bromide	20	กรัม

นำกรดซัลฟูริกใส่ใน Volumetric flask ขนาด 1 ลิตร ที่มีน้ำกลั่นอยู่พอประมาณ ผสมให้เข้ากัน และปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร ตรวจความเข้มข้นของสารละลายด้วยวิธีการไตเตรทให้ได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 1 N แล้วเติม Cetyltrimethylammonium bromide ผสมให้เข้ากัน

3. การเตรียมสารละลาย Saturated potassium permanganate

$KMnO_4$ 50 กรัม

Ag_2SO_4 0.05 กรัม

ละลาย $KMnO_4$ และ Ag_2SO_4 ในน้ำกลั่น 1 ลิตร แล้วเก็บสารละลายไว้ในขวดแก้วสีชา เก็บไว้ในตู้เย็น อย่าให้โดนแสง

4. การเตรียมสารละลาย Lignin buffer

$Fe(NO_3)_3.9H_2O$	6	กรัม
$AgNO_3$	0.15	กรัม
Potassium acetate	5	กรัม
Acetic acid glacial	500	มิลลิลิตร
Tertiary butyl alcohol	400	มิลลิลิตร

ละลาย $Fe(NO_3)_3.9H_2O$ และ $AgNO_3$ ในน้ำกลั่น แล้วนำไปผสมกับ Acetic acid และ Potassium acetate แล้วเติม Tertiary butyl alcohol ผสมให้เข้ากัน

5. การเตรียมสารละลาย Combined permanganate

ผสม Saturated potassium permanganate กับ Lignin buffer ในอัตราส่วน 2:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เตรียมใหม่ก่อนใช้ โดยเก็บไว้ได้ไม่เกิน 1 สัปดาห์ ในตู้เย็นและไม่ให้ถูกแสง ถ้าสารละลายกลายเป็นสีแดงจะใช้ไม่ได้

6. การเตรียมสารละลาย Demineralizing

Oxalic acid dehydrate	50	กรัม
95% Ethanol	700	กรัม
HCl	50	กรัม
น้ำกลั่น	250	กรัม

ละลาย Oxalic acid ใน ethanol แล้วเติม HCl และน้ำกลั่น ตามลำดับ ผสมให้เข้ากัน

การวิเคราะห์หา Acid Detergent Fiber (ADF)

1. นำครูซิเบิล (Fritted glass crucible) ที่ล้างสะอาดแล้วไปอบในตู้อบแห้ง (Hot air oven) ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเอาออกใส่โถอบแห้ง (Desiccator) ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น และนำไปชั่งน้ำหนัก

2. นำตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ ทำให้แห้งและบดละเอียดขนาดประมาณ 20–30 mesh หรือ 1 มิลลิเมตร จำนวน 0.5 ถึง 1.0 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ทรงสูงขนาด 600 มิลลิลิตร เพื่อใช้สำหรับวิเคราะห์เยื่อใย

3. เติมสารละลาย Acid Detergent Fiber (ADF) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และ Decahydronaphthalene 2 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน นำไปต้มให้เดือด แล้วปรับอุณหภูมิให้ลดลงเล็กน้อย จากนั้นจึง Reflux ต่อไปเป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยนับเวลาตั้งแต่เริ่มเดือด

4. ถ่ายสารละลายและตัวอย่างที่ต้องการทดสอบทั้งหมดที่อยู่ในบีกเกอร์ ลงในครูซิเบิลที่วางอยู่บนชุดกรอง แล้วทำการล้างตัวอย่างที่ติดอยู่ในครูซิเบิล ด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ 90 ถึง 100 องศาเซลเซียส ประมาณ 1200 มิลลิลิตร หรือจนกว่าจะไล่สารละลาย Acid Detergent Fiber (ADF) ออกจนหมด

5. ล้างตัวอย่างที่ต้องการทดสอบที่ติดอยู่ในครูซิเบิลอีกครั้งด้วย Acetone 2 ถึง 3 ครั้ง หรือจนกระทั่งสารละลายที่ไหลออกจากครูซิเบิลไม่มีสี

6. นำครูซิเบิลไปอบในตู้อบแห้ง (Hoy air oven) ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 8 ชั่วโมง จากนั้นเอาออกใส่โถอบแห้ง (Desiccator) ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น และนำไปชั่งน้ำหนัก

7. น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นจากน้ำหนักของครูซิเบิล คือ ปริมาณ ADF

การวิเคราะห์หา Neutral Detergent Fiber (NDF)

1. นำครูซิเบิล (Fritted glass crucible) ที่ล้างสะอาดแล้วไปอบในตู้อบแห้ง (Hot air oven) ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเอาออกใส่ในโถอบแห้ง (Desiccator) ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น และนำไปชั่งน้ำหนัก

2. นำตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ ทำให้แห้งและบดละเอียดขนาดประมาณ 20–30 mesh หรือ 1 มิลลิเมตร จำนวน 0.5 ถึง 1.0 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ทรงสูงขนาด 600 มิลลิลิตร เพื่อใช้สำหรับวิเคราะห์เยื่อใย

3. เติมสารละลาย Neutral Detergent Fiber (NDF) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร Sodium sulphite anhydrous 0.5 กรัม และ Decahydronaphthalene 2 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน นำไปต้มให้เดือด แล้วปรับอุณหภูมิให้ลดลงเล็กน้อย จากนั้นจึง Reflux ต่อไปเป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยเริ่มนับเวลาตั้งแต่เริ่มเดือด

4. ถ่ายสารละลายและตัวอย่างที่ต้องการทดสอบทั้งหมดที่อยู่ในบีกเกอร์ ลงในครูซิเบิลที่วางอยู่บนชุดกรอง แล้วทำการล้างตัวอย่างที่ติดอยู่ในครูซิเบิล ด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ 90 ถึง 100 องศาเซลเซียสประมาณ 1200 มิลลิลิตร หรือจนกว่าจะไล่สารละลาย Neutral Detergent Fiber (NDF) ออกจนหมด

5. ล้างตัวอย่างที่ต้องการทดสอบที่ติดอยู่ในครูซิเบิลอีกครั้งด้วย Acetone 2 ถึง 3 ครั้ง หรือจนกระทั้งสารละลายที่ไหลออกจากครูซิเบิลไม่มีสี

6. นำครูซิเบิลไปอบในตู้อบแห้ง (Hot air oven) ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 8 ชั่วโมง จากนั้นเอาออกใส่ในโถอบแห้ง (Desiccator) ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น และนำไปชั่งน้ำหนัก

7. น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นจากน้ำหนักของครูซิเบิล คือ ปริมาณ NDF

การวิเคราะห์หา Permanganate lignin (PML)

1. นำครูซิเบิลที่มีตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ ซึ่งวิเคราะห์ ADF แล้วมาวางในถาดโลหะสแตนเลส

2. เติมสารละลาย Combined permanganate ประมาณ 25 มิลลิลิตร หรือให้ท่วมตัวอย่างที่อยู่ในครูซิเบิล ใช้แท่งแก้วคนสารตัวอย่างให้กระจายไม่จับตัวเป็นก้อน เพื่อให้สารละลายซึมเข้าได้ทั่ว

3. ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 90 ถึง 100 นาที ระหว่างนี้คอยเติมสารละลายเรื่อย ๆ เพื่อไม่ให้สารลายไหลออกนอกครูซิเบิลจนหมด และให้น้ำยาเป็นสีม่วงตลอดเวลา

4. นำครูเบิลไปวางบนขวดกรอง ดูดสารละลาย Combined permanganate ออกให้แห้ง แล้วเติมสารละลาย Demineralizing ลงไปให้ท่วมตัวอย่างที่ต้องการทดสอบในครูซิเบิล ระวังอย่าให้เป็นฟอง ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที ดูดสารละลายออกให้แห้ง ถ้าสารละลายที่อยู่ในครูซิเบิลยังเป็นสีน้ำตาลเข้ม ให้ทำซ้ำอีก จนกระทั่งล้างสารละลาย Combined permanganate ออกจากครูซิเบิลจนหมด

5. ล้างตัวอย่างในครูซิเบิลด้วยสารละลาย 80% Ethanol ประมาณ 2 ครั้ง

6. ล้างตัวอย่างในครูซิเบิลด้วย Acetone 2 ครั้ง และดูดสารละลายออกให้แห้ง

7. นำครูซิเบิลไปอบในตู้อบแห้ง (Hot air oven) ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 8 ชั่วโมง จากนั้นเอาออกใส่โถอบแห้ง (Desiccator) ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น และนำไปชั่งน้ำหนัก

8. น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของครูซิเบิล คือ ปริมาณ PML

การหาปริมาณเถ้า

นำตะกอนจากข้อ 8 มาเผาที่อุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 3 ชั่วโมง จากนั้นเอาใส่ในโถอบแห้ง (Desiccator) ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น และนำไปชั่งน้ำหนัก

การคำนวณหาปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน และเถ้า

ปริมาณ NDF (เปอร์เซ็นต์) เท่ากับ ((น้ำหนักตัวอย่างที่เหลือจากขั้นตอนวิเคราะห์ NDF – น้ำหนักเถ้า)/น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น) ×100

ปริมาณ ADF (เปอร์เซ็นต์) เท่ากับ ((น้ำหนักตัวอย่างที่เหลือจากขั้นตอนวิเคราะห์ ADF – น้ำหนักเถ้า)/น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น) ×100

ปริมาณเซลลูโลส (เปอร์เซ็นต์) เท่ากับ ((น้ำหนักตัวอย่างที่เหลือจากขั้นตอนวิเคราะห์ PML – น้ำหนักเถ้า)/น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น) ×100

ปริมาณเฮมิเซลลูโลส (เปอร์เซ็นต์) เท่ากับ ปริมาณ NDF (เปอร์เซ็นต์) – ปริมาณ ADF (เปอร์เซ็นต์)

ปริมาณลิกนิน (เปอร์เซ็นต์) เท่ากับ ((น้ำหนักตัวอย่างที่เหลือจากขั้นตอนวิเคราะห์ ADF – น้ำหนักตัวอย่างที่เหลือจากขั้นตอนวิเคราะห์ PML) – น้ำหนักเถ้า)/น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น) ×100

การวัดปริมาณเซลลูเลสในกลุ่มเอกโซกลูคาเนส (exoglucanase) โดยการวิเคราะห์หา FPA (Ghose, 1987)

1. นำเอนไซม์ที่ต้องการทดสอบปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง

2. เติมสารละลายโซเดียมซิเตรตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดและด่าง เท่ากับ 4.8 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และกระดาษกรอง Whatman No.1 ขนาด 1.0×6.0 เซนติเมตร (50 มิลลิกรัม) เขย่าให้เข้ากัน

3. นำไปอุ่นในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

4. เติมสารละลาย DNS reagent ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

5. เติมน้ำกลั่นหลอดละ 20 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 540 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายโซเดียมซิเตรตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดและด่าง เท่ากับ 4.8 แทนเอนไซม์ เป็นหลอดควบคุม (blank) จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบหาน้ำตาลกลูโคส จากกราฟน้ำตาลมาตรฐานเพื่อนำไปคำนวณหาค่า unit of enzyme จากสูตรมาตรฐาน (ภาคผนวก ค)

การวัดปริมาณเซลลูเลสในกลุ่มเอนโดกลูคาเนส (endoglucanase) โดยการวิเคราะห์หา CMCase (Ghose, 1987)

1. นำเอนไซม์ที่ต้องการทดสอบมา 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง

2. เติม CMC ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์กรัมต่อปริมาตร ที่ละลายในสารละลายโซเดียมซิเตรตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดและด่าง เท่ากับ 4.8 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

3. นำไปอุ่นในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

4. เติมสารละลาย DNS reagent ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือด นาน 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

5. เติมน้ำกลั่นหลอดละ 20 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 540 นาโนเมตร โดยสารละลายโซเดียมซิเตรตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดและด่าง เท่ากับ 4.8 แทนเอนไซม์เป็นหลอดควบคุม (blank) จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสจากกราฟน้ำตาลมาตรฐาน เพื่อนำไปคำนวณหาค่า unit of enzyme จากสูตรมาตรฐาน (ภาคผนวก ค)

การวัดปริมาณเซลลูเลสในกลุ่มเบตากลูโคซิเดส (β–glucosidase) โดยการวิเคราะห์หา β–glucosidase ตามวิธีการของ (Sternberg, et al., 1976)

1. นำเอนไซม์ที่ต้องการทดสอบมา 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง

2. เติมสารละลาย salicin ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ละลายในสารละลายโซเดียมซิเตรตบัฟเฟอร์ 0.025 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดและด่าง เท่ากับ 4.5 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

3. นำไปอุ่นในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

4. เติมสารละลาย DNS reagent ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือด นาน 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

5. เติมน้ำกลั่นหลอดละ 20 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 540 นาโนเมตร โดยสารละลายโซเดียมซิเตรตบัฟเฟอร์ 0.025 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดและด่าง เท่ากับ 4.5 แทนเอนไซม์เป็นหลอดควบคุม (blank) จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสจากกราฟน้ำตาลมาตรฐาน เพื่อนำไปคำนวณหาค่า unit of enzyme จากสูตรมาตรฐาน (ภาคผนวก ค)

การวัดแอคติวิตีของไซแลนเนส (Ghose and Bisaria, 1987)

1. นำไซแลนความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์กรัมต่อปริมาตร ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง

2. เติมสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ ค่าความเป็นกรดและด่าง เท่ากับ 7.0 ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร

3. เติมเอนไซม์ที่ต้องการทดสอบ ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

4. นำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

5. เติมสารละลาย Alkalinecopper reagent (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปให้ความร้อนโดยการต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 20 นาที แล้วจึงนำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็น

6. เติมสารละลาย Arsenomolybdate reagent (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

7. เติมน้ำกลั่นหลอดละ 5.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ pH 7.0 แทนเอนไซม์เป็นหลอดควบคุม (blank) จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบหาปริมาณน้ำตาลไซโลสจากกราฟมาตรฐาน เพื่อนำไปคำนวณหาค่า unit of enzyme จากสูตรมาตรฐาน (ภาคผนวก ค)

การวัดปริมาณโปรตีน (Lowry's method)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. Lowry's reagent

1.1 Lowry solution A: 2 % w/v Na_2CO_3 ใน 0.1 N NaOH

1.2 Lowry solution B: 0.5 % w/v $CuSO_4.5H_2O$ และ Sodium potassium tartrate ใน 1 % w/v ผสมกันในอัตราส่วน 0.5:0.5

*Lowry's reagent = Lowry solution A (50 ml): Lowry solution B (1 ml)

2. Folin – ciocalteu's Phenol reagent dilute กับน้ำอัตราส่วน 1:1

3. สารละลาย BSA 1000 μg/ml (0.01 g/10 ml) (0.005 g/5 ml) (1.0 mg/ml) เก็บเป็น stock

4. Test tube 10 อัน

5. Spectrophotometer

6. Micropipette 100, 1000 μl

7. Vortex

ขั้นตอนการวัดปริมาณโปรตีน

ตาราง 14 แสดงขั้นตอนการวัดปริมาณโปรตีน

สารละลาย (ml)	Standard						ตัวอย่าง	
	blank	1	2	3	4	5	1	2
BSA (μl)	–	50	100	150	200	250	–	–
น้ำกลั่น (μl)	1000	950	900	850	800	750	750	750
Crude enzyme	–	–	–	–	–	–	250	250
ความเข้มข้น (μg/ml)	o	50	100	150	200	250		
		1. เติมสารละลาย Lowry หลอดละ 3 ml ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 10 นาที						
		2. เติม Folin–ciocalteau ที่เจือจางอัตราส่วน 1:1 ปริมาตร 0.3 ml ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ 30 นาที						
		3. นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm						

การเตรียมสไลด์เพื่อศึกษาโครงสร้างของเชื้อรา

1. นำสไลด์ กระจกปิดสไลด์ และแท่นวางสไลด์ ใส่ลงในจารเพาะเชื้อ ปิดฝาและนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. เตรียมอาหาร PDA เทใส่จานเพาะเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้วอีกชุดหนึ่ง ตั้งทิ้งไว้จนอาหารแข็ง จากนั้นใช้มีดผ่าตัด ตัดชิ้นวุ้นเป็นรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัส ขนาดประมาณ 0.5 × 0.5 เซนติเมตร

3. ชิ้นอาหารที่ตัดได้มาวางไว้บนสไลด์ในจารเพาะเชื้อที่เตรียมจากข้อ 17.1

4. ใช้เข็มเขี่ยเชื้อลนไฟ ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นนำไปเขี่ยสปอร์ของเชื้อราที่ต้องการศึกษามาแตะที่มุมทั้งสี่ด้านของชิ้นอาหาร

5. ปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ โดยต้องระวังไม่ให้กระจกปิดสไลด์เอียงมาแตะกับสไลด์ที่อยู่ด้านล่าง

6. เทน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วลงไปเล็กน้อย แต่ไม่ให้ท่วมสไลด์ เพื่อให้เกิดความชื้น

7. นำไปบ่มเลี้ยงเพื่อให้เชื้อราเจริญ สังเกตเชื้อราจะค่อย ๆ เจริญแผ่เส้นใยไปบนสไลด์และกระจกปิดสไลด์

8. นำสไลด์ที่มีเส้นใยของเชื้อราเจริญอยู่มาเขี่ยชิ้นอาหารออก แต่ต้องระวังไม่ให้เส้นใยของเชื้อราติดมาด้วย ดังนั้นจะได้ส่วนที่มีเส้นใยของเชื้อราติดอยู่ 2 ส่วน คือ ที่สไลด์และกระจกปิดสไลด์

9. หยดแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ลงบนแผ่นสไลด์ หรือกระจกปิดสไลด์ที่มีเส้นใยของเชื้อราติดอยู่เพื่อให้เส้นใยของเชื้อราแผ่กระจาย ทิ้งไว้สักครู่เพื่อให้แอลกอฮอล์ระเหย

10. หยดสี Lactophenol-cotton blue หรือ Lactophenol-anelene blue ลงไปเพื่อย้อมเส้นใยเชื้อรา

11. นำกระจกปิดสไลด์ที่สะอาดแผ่นใหม่ปิดทับลงไป ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ ใช้กระดาษซับสีส่วนเกินออกให้หมด และปิดทับขอบกระจกปิดสไลด์ทั้ง 4 ด้านด้วยน้ำยาทาเล็บ

12. นำสไลด์ตัวอย่างเชื้อราที่ได้ไปดูรายละเอียดด้วยกล้องจุลทรรศน์

การเตรียมสารละลายตรวจสอบน้ำตาล (Detection reagent) (Chaplin and Kennedy, 1994)

ชั่ง Diphenylamine 4 กรัม ในอะซิโตน ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร แบ่งมา 96 มิลลิลิตร จากนั้นใช้ปิเปตดูด Aniline มา 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และเติม ortho-phosphoric acid ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ลงไปผสมให้เข้ากัน

ภาคผนวก ค กราฟมาตรฐานและการคำนวณค่าแอคติวีตีของเอนไซม์

การทำกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

1. เตรียมสารละลายน้ำตาลกลูโคสที่ละลายในสารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ค่าความเป็นกรดและด่าง เท่ากับ 5.0 โดยยมีน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นต่าง ๆ กัน คือ 0.00, 0.20, 0.40, 0.60, 0.80, 1.00, 1.20, 1.40 และ 1.60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2. ใส่สารละลายน้ำตาลความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เตรียมได้จากข้อ 1 ลงในหลอดทดลอง หลอดละ 1 มิลลิลิตร ทำความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ

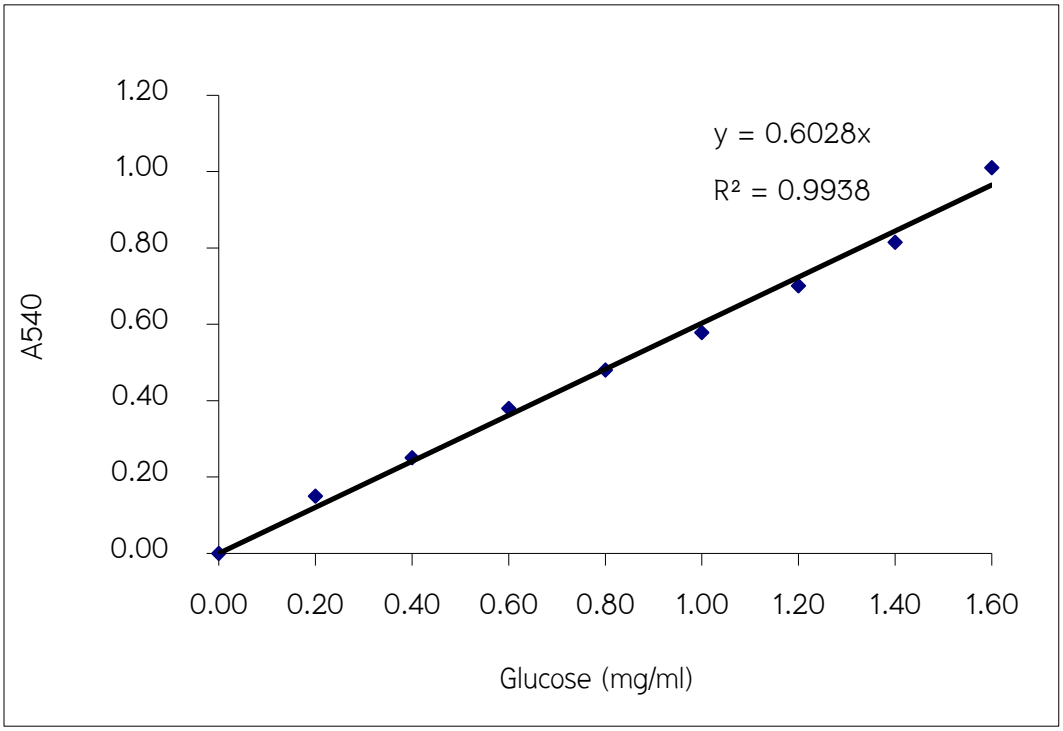
3. ใส่สารละลาย DNS (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงในแต่ละหลอด

4. นำไปตั้งในอ่างน้ำเดือดเป็นระยะเวลา 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น

5. เติมน้ำกลั่นหลอดละ 20 มิลลิลิตร

6. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยหลอดควบคุมใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายน้ำตาลกลูโคส

7. นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าดูดกลืนแสงและปริมาณน้ำตาลกลูโคส



ภาพ 41 แสดงกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

การทำกราฟมาตรฐานน้ำตาลไซโลส

1. เตรียมสารละลายน้ำตาลไซโลสที่ละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ค่าความเป็นกรดและด่าง เท่ากับ 7.0 โดยมีน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นต่าง ๆ กัน คือ 0.000, 0.025, 0.050, 0.075, 0.100, 0.125, 0.150, 0.175 และ 2.000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2. ใส่สารละลายน้ำตาลความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เตรียมได้จากข้อ 1 ลงในหลอดทดลอง หลอดละ 0.25 มิลลิลิตร ทำความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ

3. ใส่สารละลาย Alkali copper reagent (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในแต่ละหลอด

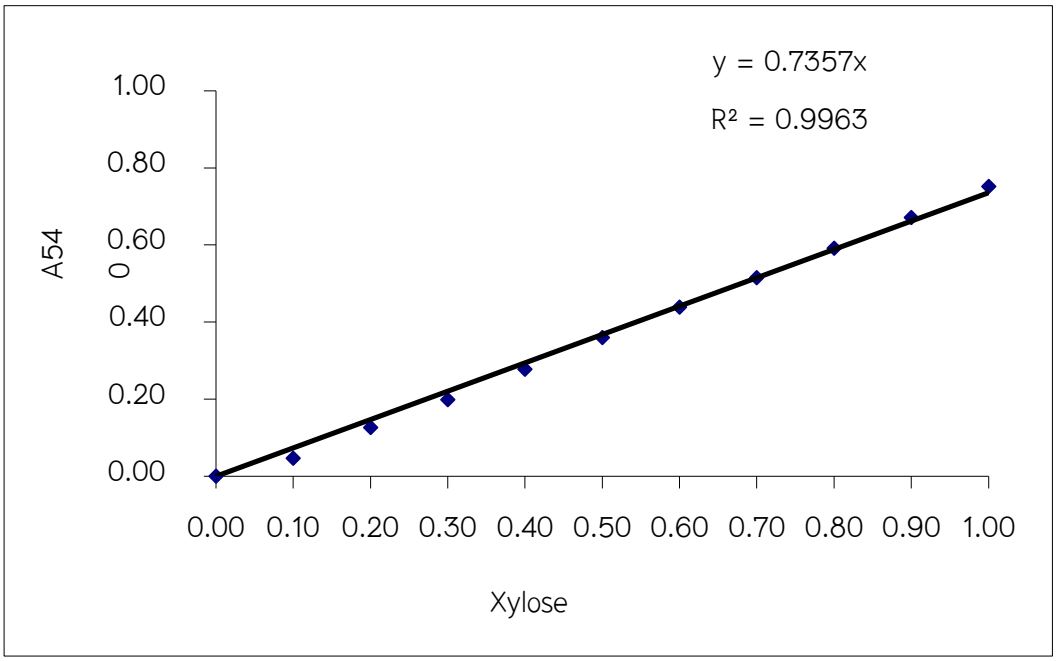
4. นำไปตั้งในอ่างน้ำเดือดเป็นระยะเวลา 20 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น

5. ใส่สารละลาย Arsenomolybdate reagent (ภาคผนวก ข) 20 มิลลิลิตร ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ลงในแต่ละหลอด

6. เติมน้ำกลั่นหลอดละ 10 มิลลิลิตร

7. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร โดยหลอดควบคุมใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายน้ำตาไซโลส

8. นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟระหว่างค่าดูดกลืนแสงและปริมาณน้ำตาลไซโลส



ภาพ 42 แสดงกราฟมาตรฐานน้ำตาลไซโลส

การทำกราฟมาตรฐานโปรตีน Bovine Serum Albumin (BSA)

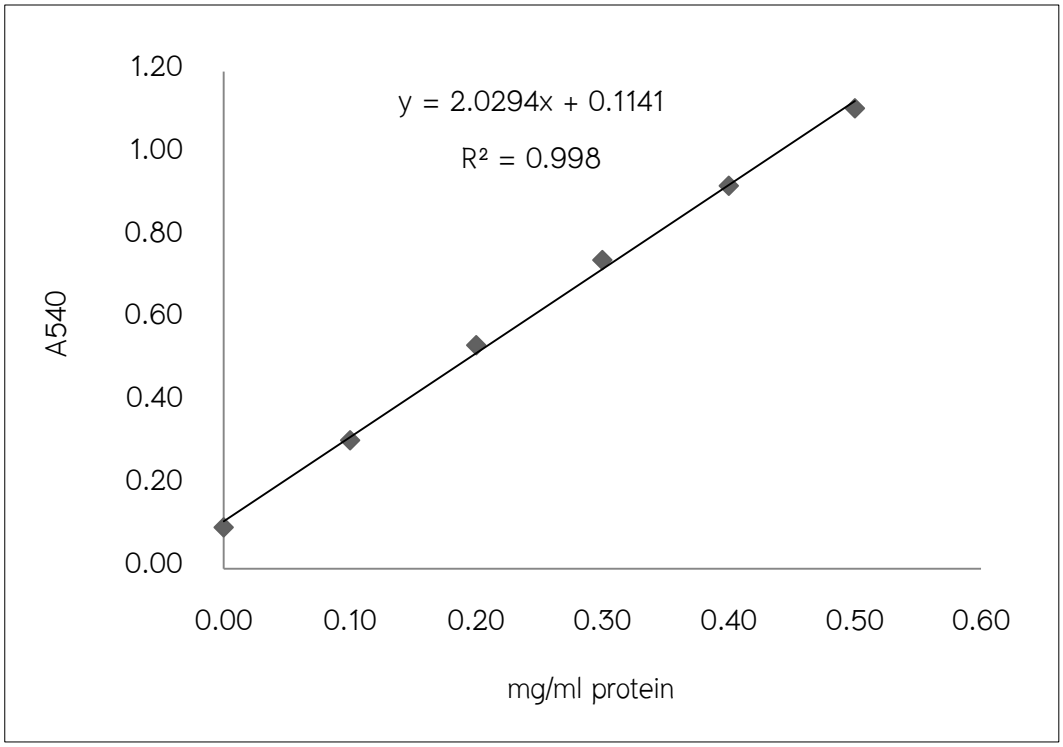
1. เตรียมสารละลาย Bovine Serum Albumin (BSA) ให้มีความเข้มข้น 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2. ใส่สารละลาย BSA ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เตรียมได้จากข้อ 1 ลงในหลอดทดลอง หลอดละ 1 มิลลิลิตร ทำความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ

3. เติมสารละลาย Biuret (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ในแต่ละหลอด จากนั้นเขย่าให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ 30 นาที

4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 550 นาโนเมตร โดยหลอดควบคุมใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายโปรตีน BSA

5. นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าดูดกลืนแสงและปริมาณโปรตีน



ภาพ 43 แสดงกราฟมาตรฐานโปรตีน

การคำนวณแอคติวีตีของเอกโซกลูคาเนส เอนโดกลูคาเนสและเบตากลูโคซิเดส

1 หน่วยของเอนไซม์ (ยูนิต) เท่ากับ ปริมาณของกลูโคส 1 ไมโครโมล ที่เกิดขึ้นภายใน 1 นาที ภายใต้ภาวะที่ใช้ทดสอบ เท่ากับกลูโคส 0.180 มิลลิกรัม ที่เกิดขึ้น ภายใน 1 นาที ภายใต้ภาวะที่ใช้ทดสอบ กลูโคส 0.180 มิลลิกรัม เท่ากับ 1 ไมโครโมล กลูโคส A มิลลิกรัม เท่ากับ (1 × A)/0.180 ไมโครโมล ดังนั้นจึงเท่ากับ A × 5.556 ไมโครโมล

จากการทดลองน้ำตาลกลูโคส A × 5.556 ไมโครโมล เกิดขึ้นภายใน 30 นาที ที่เวลา 30 นาที มีน้ำตาลกลูโคส เท่ากับ A × 5.556 ไมโครโมล ถ้า 1 นาที มีน้ำตาลกลูโคส เท่ากับ (1 × A × 5.556)/30 ไมโครโมลต่อนาที ดังนั้นจึง เท่ากับ A × 0.185 ไมโครโมลต่อนาที

จากการทดลองน้ำตาลกลูโคส A × 0.185 ไมโครโมลต่อนาที เกิดจากการใช้เอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร ใช้เอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร มีน้ำตาลกลูโคส เท่ากับ A × 0.185 ไมโครโมลต่อนาที ใช้เอนไซม์ 1.0 มิลลิลิตร มีน้ำตาลกลูโคส เท่ากับ (1 × (A × 0.185) / 0.5) ไมโครโมลต่อนาที ต่อมิลลิลิตร เท่ากับ A × 0.370 ไมโครโมลต่อนาทีต่อมิลลิลิตร ดังนั้นจึงเท่ากับ A × 0.370 ยูนิต ต่อมิลลิลิตร

การคำนวณแอคติวีตีของไซแลนเนส

1 หน่วยของเอนไซม์ (ยูนิต) เท่ากับปริมาณของไซโลส 1 ไมโครโมล ที่เกิดขึ้น ภายใน 1 นาที ภายใต้ภาวะที่ใช้ทดสอบ เท่ากับ ไซโลส 0.150 มิลลิกรัม ที่เกิดขึ้นภายใน 1 นาที ภายใต้ภาวะที่ใช้ทดสอบ ไซโลส 0.150 มิลลิกรัม เท่ากับ 1 ไมโครโมล ไซโลส A มิลลิกรัม เท่ากับ (1 × A)/0.150 ไมโครโมล ดังนั้นจึงเท่ากับA × 6.667 ไมโครโมล

จากการทดลองน้ำตาลไซโลส A × 6.667 ไมโครโมล เกิดขึ้นภายใน 10 นาที โดยใน 10 นาที มีน้ำตาลไซโลส เท่ากับ A × 6.667 ไมโครโมล 1 นาที มีน้ำตาลไซโลสเท่ากับ (1 × A × 6.667)/30 ไมโครโมลต่อนาที ดังนั้นจึงเท่ากับ A×0.667 ไมโครโมลต่อนาที

จากการทดลองน้ำตาลไซโลส A × 0.667 ไมโครโมลต่อนาที เกิดจากการใช้เอนไซม์ 0.25 มิลลิลิตร ใช้เอนไซม์ 0.25 มิลลิลิตร มีน้ำตาลไซโลสเท่ากับ A×0.667 ไมโครโมลต่อนาที ในการใช้เอนไซม์ 1.0 มิลลิลิตร มีน้ำตาลไซโลส เท่ากับ (1×(A×0.667)/0.25) ไมโครโมลต่อนาที ต่อมิลลิลิตร เท่ากับ A × 2.668 ไมโครโมลต่อนาทีต่อมิลลิลิตร ดังนั้นจึงเท่ากับ A × 2.668 ยูนิต ต่อมิลลิลิตร

ประวัติผู้วิจัย

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ นามสกุล ทศวรรต อะโนราช

วัน เดือน ป เกิด 19 ธันวาคม 2535

ที่อยู่ปัจจุบัน 39 หมู่ 4 ตำบลยางฮอม อำเภอขุนตาล จังหวัดเชียงราย

ที่ทำงานปัจจุบัน –

ตำแหน่งหน้าที่ปัจจุบัน –

ประสบการณ์การทำงาน –

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2557 วท.บ. (เทคโนโลยีชีวภาพ), มหาวิทยาลัยพะเยา, จังหวัดพะเยา

ผลงานตีพิมพ์

ที่เกี่ยวข้องกับวิทยานิพนธ์

ทศวรรต อะโนราช, สมชาติ ธนะ, ชัยณรงค์ วงศ์สรรศรี, โชค โสรัจกุล และขรรค์ชัย ดั้นเมฆ (ผู้บรรยาย). (20 กรกฎาคม พ.ศ. 2560). การเพิ่มคุณค่าทางโภชนะของมันสำปะหลังด้วยการหมักแบบ solid state fermentation ร่วมกับเชื้อรา Rhizopus spp. UP04 ที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลส. ใน **การประชุมวิชาการนำเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ เครือข่ายบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยราชภัฏภาคเหนือ ครั้งที่ 18 และลำปางวิจัย ครั้งที่ 4** (หน้า 63–73). ลำปาง: มหาวิทยาลัยราชภัฏลำปาง.

ผลงานตีพิมพ์อื่น ๆ

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