

การคัดเลือกต้นเชื้อและผลของการใช้ต้นเชื้อต่อคุณภาพการหมัก ของอาหารครบส่วนแบบหมักที่ระยะการหมักที่แตกต่างกัน

Selection of starter cultures and effects of lactic acid bacteria on fermentative
quality ensiled total mixed ration

ณรงค์ฤทธิ์ ใจพลแสน¹, ศิวาช สังข์ศรีทวงษ์², เสาวลักษณ์ แย้มหมื่นอาจ^{1*},
เวทชัย เปล่งวิทยา² และ กิตติมา กองทอง²

Narongrit Jaipolsaen¹, Siwat Sangsritavong², Saowaluck Yammuen-art^{1*},
Vethachai Plengvidhya² and Kittima Kongtong²

บทคัดย่อ: การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกต้นเชื้อสำหรับผลิตอาหารผสมครบส่วนแบบหมักให้มีคุณภาพการหมักที่ดี โดยทำการคัดเลือกต้นเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกจากอาหารผสมครบส่วนแบบหมัก จากความสามารถในการผลิตกรดแลคติก อัตราการเจริญเติบโต และการเจริญเติบโตในสภาวะอุณหภูมิสูง (45°C) จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้มาใช้เป็นต้นเชื้อเพื่อผลิตอาหารผสมครบส่วนแบบหมัก โดยแบ่งอาหารออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 ไม่เติมต้นเชื้อ (กลุ่มควบคุม) กลุ่มที่ 2 เติมต้นเชื้อ *L. plantarum* J39 และกลุ่มที่ 3 เติมต้นเชื้อ *L. fermentum* J116 ที่ความเข้มข้น 10⁶ CFU/g น้ำหนักสด เก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์คุณภาพการหมัก จากผลการทดลองพบว่า *Lactobacillus plantarum* J39 สามารถผลิตกรดแลคติกได้ดี มีอัตราการเจริญเติบโตเร็ว และลดค่าความเป็นกรด-ด่าง ในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ดีที่สุด ในขณะที่ *L. fermentum* J116 สามารถทนความร้อนได้ดี เพิ่มจำนวนเซลล์และผลิตกรดได้ภายใต้สภาวะอุณหภูมิสูง เมื่อนำมาผลิต TMR แบบหมัก พบว่า TMR หมักที่เติมต้นเชื้อ *L. plantarum* J39 และ *L. fermentum* J116 มีปริมาณของกรดอะซิติกและกรดโพรพิโอนิกสูงกว่า ในขณะที่กรดบิวทริกมีปริมาณต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ การเติมต้นเชื้อทำให้กรดแลคติกมีแนวโน้มสูงกว่ากลุ่มควบคุม รวมทั้งแอมโมเนียไนโตรเจนในกลุ่มที่เติมต้นเชื้อยังมีแนวโน้มต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอีกด้วย ดังนั้นการเติมต้นเชื้อ *L. plantarum* J39 และ *L. fermentum* J116 สามารถช่วยให้อาหารผสมครบส่วนแบบหมักมีคุณภาพการหมักดีขึ้น

คำสำคัญ: แบคทีเรียผลิตกรดแลคติก, *L. plantarum*, *L. fermentum*, อาหารผสมครบส่วนแบบหมัก

¹ ภาควิชาสัตวศาสตร์และสัตว์น้ำ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ ประเทศไทย 50200

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

² ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ อุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย ประเทศไทย 12120

National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Thailand Science Park, Thailand, 12120

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

ABSTRACT: This set of experiments were aimed to selected starter cultures that could enhance fermentative quality of ensiled total mixed ration (eTMR). The potential starter cultures were isolated from ensiled TMR. The main criterions to identify potential bacteria were its competencies to produce large amount lactic acid, while tolerated to high temperature (45oC). Three treatment groups were allocated in fermentation quality analysis including without inoculation (control) while *L. plantarum* J39 (group 2) and *L. fermentum* J116 (group 3) were inoculated to supply 106 cfu/g fresh weight. All samples were subjected for the evaluations of fermentative qualities as well as ammonia nitrogen concentration. This study found that, *Lactobacillus plantarum* J39 produce highest amount of lactic acid while *L. fermentum* J116 can tolerated to high temperature. For fermentation quality, comparing with control group, inoculation of *L. plantarum* J39 and *L. fermentum* J116 showed statistically greater acetic and propionic acid content when kept for 28 days. In addition, inoculation of J 39 and J 116 led to significantly less butyric acid. Furthermore, the inoculated TMR trend to have higher lactic acid content. It is worth to note that ammonia nitrogen concentration trended to be lower in inoculations groups. Results from this study indicated that inoculations of selected starter culture into fermented TMR could be benefit both for enhance fermentative quality.

Keywords: Lactic acid bacteria, *L. plantarum*, *L. fermentum*, ensiled total mixed ration

บทนำ

อาหารผสมครบส่วนเป็นอาหารที่ประกอบไปด้วยทั้งอาหารข้นและอาหารหยาบเพื่อให้มีคุณค่าทางเพียงพอต่อการให้ผลผลิตของสัตว์ เนื่องจากอาหารผสมครบส่วนมีโปรตีน และพลังงานสูงจึงน่าจะเสี่ยงง่ายจากการทำงานของแบคทีเรียที่อยู่ในสภาวะแวดล้อม (opportunistic bacteria) การหมักอาหารผสมครบส่วนให้มีคุณภาพดีจึงจำเป็นต้องควบคุมกระบวนการหมักให้ค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ลดลงอย่างรวดเร็ว เพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุหลักของการเน่าเสีย วิธีการผลิตอาหารหมักให้ได้คุณภาพดีนั้นต้องทำให้อาหารหมักอยู่ในสภาพไร้อากาศให้มากที่สุดหรือการเติมแบคทีเรียผลิตกรดแลคติก (Lactic acid bacteria, LAB) ลงไปจะทำให้กระบวนการหมักเกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็วยิ่งขึ้น ส่งผลให้ pH ลดลงอย่างรวดเร็ว การสูญเสียโภชนาจากการหมักน้อยลง ในกรณีของการผลิตพืชอาหารสัตว์หมัก LAB ที่ติดมากับพืช (epiphytic bacteria) โดยเฉพาะอย่างยิ่งพืชอาหารสัตว์ในเขตร้อนมักจะพบในปริมาณน้อย (Cai et al., 1998) ทำให้ไม่สามารถแข่งขันกับแบคทีเรียชนิดอื่นที่อยู่ในสภาวะแวดล้อม ดังนั้นเมื่อนำไปหมักจึงทำให้ได้พืชอาหารสัตว์หมักที่มีคุณภาพต่ำ เก็บรักษาไว้ได้ไม่นาน (Cai et al., 1998) การเติม LAB ลงไปในระหว่างกระบวนการหมัก ทำให้ได้พืชอาหารสัตว์หมักที่มี

คุณภาพการหมักที่ดีขึ้น กล่าวคือมีปริมาณของกรดแลคติกสูงขึ้น ในขณะที่กรดบิวทริกลดลง (Chen et al., 2016) นอกจากนี้การใช้ต้นเชื้อในการผลิตยังทำให้ได้พืชอาหารสัตว์หมักที่มีคุณภาพสม่ำเสมอในทุกชุดผลิตอีกด้วย (Oliveira et al., 2017) อย่างไรก็ตามแบคทีเรียที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มคุณภาพการหมักจะต้องถูกคัดเลือก ด้วยเกณฑ์การคัดเลือกที่เหมาะสม เมื่อนำต้นเชื้อที่คัดเลือกได้มาใช้จึงจะมีประสิทธิภาพ ทำให้ได้อาหารผสมครบส่วนหมักที่มีคุณภาพดีตามความต้องการวัตถุประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้เพื่อคัดเลือต้นเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกสำหรับผลิตอาหารผสมครบส่วนแบบหมักให้มีคุณภาพการหมักที่ดี

อุปกรณ์และวิธีการ

การคัดเลือต้นเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลคติก

ทำการเตรียมอาหารผสมครบส่วนแบบหมักเก็บตัวอย่างที่ระยะการหมัก 5 วัน เพื่อนำมาคัดเลือต้นเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลคติก โดยวัดปริมาณกรดแลคติกที่แบคทีเรียผลิตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS media ด้วยเทคนิค HPLC-UV โดยมี 0.02 N H₂SO₄ เป็น Mobile phase (APHA, 1995) ประเมินอัตราการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ระยะเวลา 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 และ 24 ชั่วโมงที่ 37°C และทำการทดสอบการเพิ่มจำนวนเซลล์ และความสามารถในการสร้างกรดแลคติกที่อุณหภูมิสูง

(450C) ทำการประเมินที่ระยะเวลา 0 และ 24 ชั่วโมง ทำการจัดกลุ่มแบคทีเรียด้วยวิธี Repetitive element sequence-based PCR หรือ rep-PCR โดยใช้ (GTG)₅ primer (PrimerQuest® program, IDT, Coralville, USA) เพื่อเปรียบเทียบลายพิมพ์ DNA ของแต่ละไอโซเลต กับแบคทีเรียผลิตภัณฑ์คัตที่ทราบลายพิมพ์ดีเอ็นเอแล้ว (Thailand Bioresource Research Center, TBRC, Thailand Science Park) (Figure 1) แล้วทำการหาลำดับนิว

คลีโอไทด์ด้วยวิธี Sequencing method โดยใช้ 16s rRNA primer เพื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปเทียบกับฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information (NCBI) เพื่อระบุชนิด (species) ของแบคทีเรียผลิตภัณฑ์คัต

เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแบคทีเรียผลิตภัณฑ์คัต (Figure 1) พบว่ารูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอแบบที่ 2 (P2) เป็นแบคทีเรียผลิตภัณฑ์คัตที่พบมากที่สุด คิด

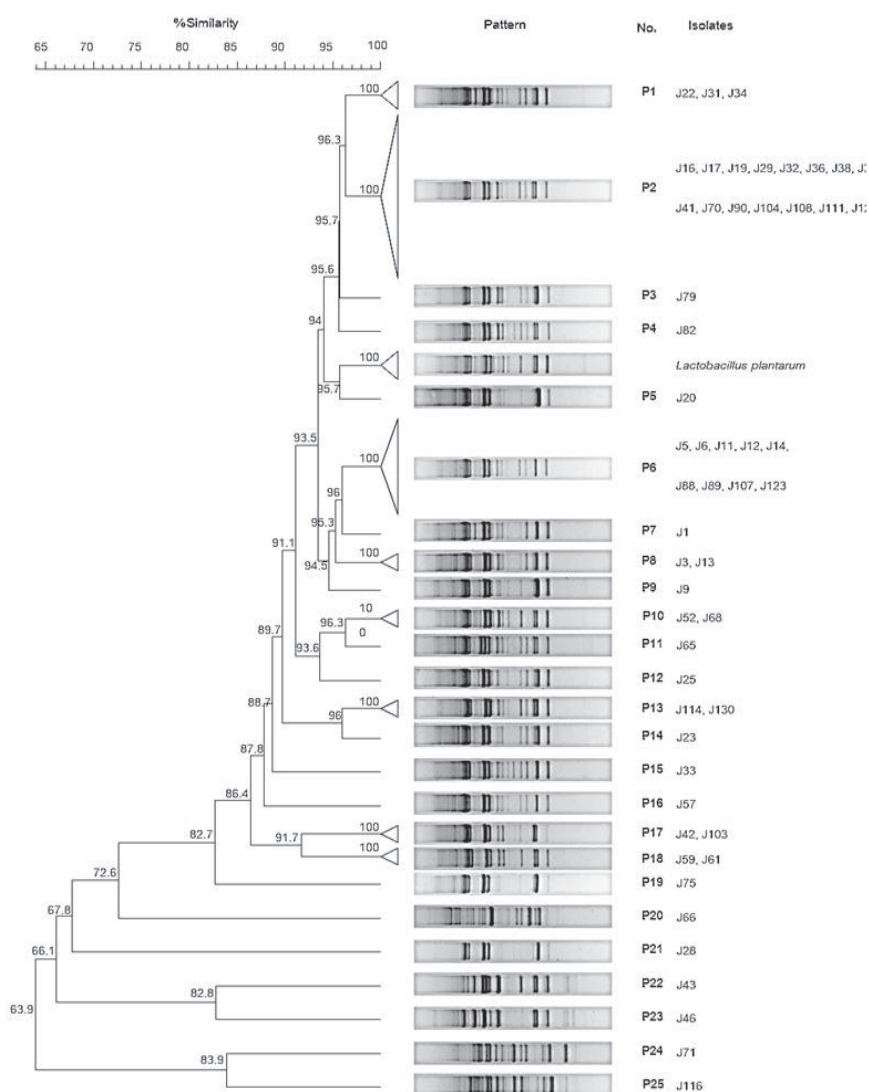


Figure 1 Phylogenetic tree showing the relative position of LAB strains were isolated from eTMR.

เป็น 28% ของ LAB ที่คัดเลือกทั้งหมด ตามด้วย P6 คิดเป็น 17%, P1 คิดเป็น 6%, P8, P10, P13, P17 และ P18 พบในสัดส่วนที่เท่ากัน คิดเป็น 4% ส่วนรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอแบบที่ P3, P4, P5, P7, P9, P11, P12, P14, P15, P16, P19, P20, P21, P22, P23, P24 และ P25 พบในสัดส่วนที่เท่ากัน คิดเป็น 2% ซึ่งเป็นสัดส่วนที่พบน้อยที่สุด ทั้งนี้ ไอโซเลต J39 ก็ยังจัดอยู่ในกลุ่มที่พบบ่อย (dominant species, P2) ที่สุด (Figure 1)

การเตรียมต้นเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกสำหรับผลิตอาหารผสมครบส่วน

นำโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียผลิตกรดแลคติก *L. plantarum* J39 และ *L. fermentum* J116 เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS media แล้วบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เพื่อให้ได้เชื้อที่มีความเข้มข้น 109 CFU/ml นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ LAB ล้างเซลล์ LAB ด้วย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ หลังจากนั้นปรับความเข้มข้นเชื้อโดยการเติม 0.85% โซเดียมคลอไรด์ให้ได้ LAB ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 109 CFU/ml

การเตรียมอาหารผสมครบส่วนแบบหมัก

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) โดยทำการทดลองในอาหารผสมครบส่วนที่มีต้นข้าวโพดพร้อมฝักตัดที่อายุ 80 วันเป็นอาหารหลักในสัดส่วน 57%

และอาหารชั้น 43% โดยใช้กากถั่วเหลือง Rapeseed meal และ DGGS เป็นแหล่งโปรตีนและมีนํ้าปะหลังแห้งเป็นแหล่งพลังงานเพื่อประกอบเป็นอาหารผสมครบส่วนที่มีโปรตีนรวม 17% ประกอบด้วยอาหาร 3 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 อาหารผสมครบส่วนหมักไม่เสริมต้นเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลคติก (Control)

กลุ่มที่ 2 อาหารผสมครบส่วนหมักเสริมต้นเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลคติก *L. plantarum* J39 106 CFU/g

กลุ่มที่ 3 อาหารผสมครบส่วนหมักเสริมต้นเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลคติก *L. fermentum* J116 106 CFU/g

กลุ่มที่เสริมต้นเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกจะเติมเชื้อ 1 มิลลิลิตร ต่ออาหารผสมครบส่วน 1 กิโลกรัม เพื่อให้ได้เชื้อที่ความเข้มข้นเท่ากับ 106 CFU/g ในขณะที่โดยกลุ่มควบคุมจะเติม 0.85% โซเดียมคลอไรด์ 1 มิลลิลิตร ต่อ 1 กิโลกรัมอาหารสด ทำการหมักในถุงพลาสติกหนา 200 ไมโครเมตร และสวมทับด้วยถุงกระสอบ ดูดอากาศออกจนหมดด้วยเครื่องดูดอากาศและเครื่องซีลปากถุงอัตโนมัติ เก็บตัวอย่างในวันที่ 0, 7, 14 และ 28 โดยเก็บตัวอย่างจำนวน 3 ซ้ำ ต่อกลุ่มการทดลองในแต่ละระยะการหมัก เก็บรักษาตัวอย่างไว้ที่ -200 °C เพื่อรอการวิเคราะห์ต่อไป

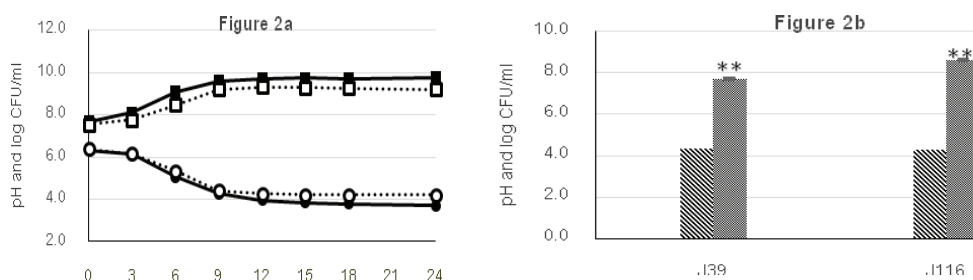


Figure 2 Illustrated pH (●,○) and growth curves (■,□) of *L. plantarum* J39 (—) and *L. fermentum* J116 (...) cultured at 37 °C for 24 hrs (2a), documented pH (▨) and cell numbers (■) of *L. plantarum* J39 and *L. fermentum* J116 when challenged at 45 °C for 24 hrs (2b).

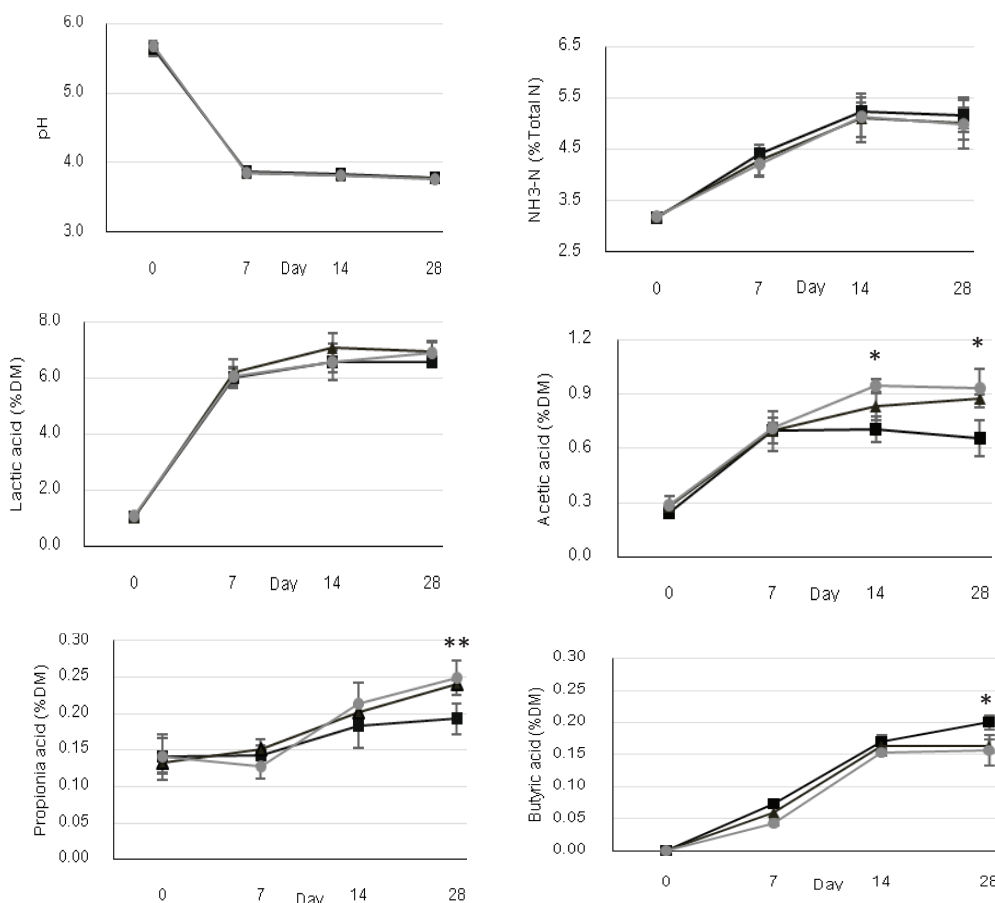


Figure 3 demonstrated pH, ammonia nitrogen, lactic acid, acetic acid, propionic acid and butyric acid concentration in ensiled TMR with *L. plantarum* J39 (▲), *L. fermentum* J116 (●) or without (■) inoculations when kept for 28 d

การวิเคราะห์คุณภาพการหมักของอาหารผสม ครบส่วนแบบหมัก

วิเคราะห์ค่า pH ด้วยเครื่อง pH meter วิเคราะห์ปริมาณกรดแลคติกและกรดอินทรีย์ด้วย HPLC โดยใช้ 0.02 N H₂SO₄ เป็น Mobile phase (De Baere et al., 2013) และวิเคราะห์ NH₃-N ด้วย Kjeldahl method (Chen et al., 1994)

การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล (Analysis of Variance, ANOVA) โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey's range test

ผลการศึกษาและวิจารณ์ผลการศึกษา

แบคทีเรียผลิตกรดแลคติกที่เจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำนวน 132 โคโลนี และเมื่อวัดระดับค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกที่มีค่า pH ต่ำกว่า 4.2 มีจำนวน 54 ไอโซเลต โดยไอโซเลตที่ J39 มีค่า pH ต่ำที่สุด คือ 3.63 สอดคล้องกับปริมาณการผลิตกรดแลคติกของ J39 ซึ่งมีมากที่สุดคือ 21.7 g/l เนื่องจากแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกจะเปลี่ยนน้ำตาลให้กลายเป็นกรดอินทรีย์ เช่น กรดแลคติก กรดอะซิติก หรือกรดโพรพิโอนิก เมื่อมีปริมาณกรดเพิ่มสูงขึ้นในกระบวนการหมัก จะมีผลทำให้ค่า pH ลดต่ำลง (Wang et al., 2014)

จากการทดสอบอัตราการเจริญ (growth curve) ที่ 370 C พบว่าในช่วงเวลาที่ 6 ถึง 15 J39 มีอัตราการเพิ่มปริมาณของเซลล์ใกล้เคียงกับ J116 รวมถึงค่าความเป็นกรดต่างก็มีความใกล้เคียงกัน เมื่อทำการทดสอบการเจริญเติบโตที่อุณหภูมิสูง (45 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า J116 มีการเพิ่มของจำนวนเซลล์ได้ดีกว่า J39 อย่างมีนัยสำคัญ (Figure 2b) ข้อมูลที่ได้บ่งชี้ว่าไฮโซเลต J39 สามารถผลิตกรดแลคติกได้ดีและมีอัตราการเจริญเติบโตสูง ในขณะที่ไฮโซเลต J116 สามารถทนร้อนได้ดีจึงเจริญเติบโตและผลิตกรดได้ดีที่อุณหภูมิสูง เมื่อระบุชนิด (Species) ของแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกพบว่า ไฮโซเลต J39 คือ *Lactobacillus plantarum* J39 และไฮโซเลต J116 คือ *L. fermentum* J116

การประเมินคุณภาพการหมักที่ระยะเวลาการหมัก 0, 7, 14 และ 28 วัน (Figure 3) พบว่า ค่าความเป็นกรด-ด่าง ในทุกช่วงของการหมักไม่แตกต่างกันในทางสถิติ ในขณะที่หลังจากหมัก 14 และ 28 วัน กลุ่มที่เติมต้นเชื้อ *L. fermentum* J116 มีปริมาณอะซิติกสูงกว่ากลุ่ม control แต่ไม่แตกต่างกับกลุ่ม *L. plantarum* J39 และในวันที่ 28 ของการหมักปริมาณกรดไพรูวิกของไฮโซเลตของกลุ่มที่เติมต้นเชื้อ *L. fermentum* J116 และ *L. plantarum* J39 มีค่าสูงกว่ากลุ่ม control คือ 0.25, 0.24 และ 0.19 %DM ตามลำดับ ($P=0.002$) ในขณะที่ปริมาณกรดบิวทริกหลังจากหมัก 28 วัน ของกลุ่ม control มีค่าสูงกว่ากลุ่มที่เติมต้นเชื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.022$) เนื่องจากในกระบวนการหมักจะมีจุลินทรีย์ตามธรรมชาติร่วมอยู่ด้วยในช่วงแรกของการหมัก กลุ่มที่เติมต้นเชื้อมีแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกมากกว่าทำให้กระบวนการหมักเกิดขึ้นรวดเร็วกว่า pH ที่ลดลงอย่างรวดเร็วจึงไปยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียในกลุ่ม *Clostridia* spp. ซึ่งผลิตกรดบิวทริก (Chen et al., 2016) ส่งผลให้อาหารผสมครบส่วนหมักที่

เติมต้นเชื้อมีปริมาณของกรดบิวทริกต่ำกว่ากลุ่มควบคุม

ปริมาณกรดอะซิติกและไพรูวิกของ กลุ่มที่เติมต้นเชื้อมีปริมาณสูงกว่ากลุ่มควบคุม ซึ่งเกิดจากคุณสมบัติของ LAB ซึ่งโดยทั่วไป LAB ที่อยู่ในกลุ่ม Obligate homofermentative จะผลิตกรดแลคติกเพียงอย่างเดียว ในขณะที่กลุ่ม Obligate heterofermentative จะผลิตกรดแลคติกและกรดอินทรีย์อื่น ๆ เช่น กรดอะซิติกและกรดไพรูวิกได้ด้วย โดยต้นเชื้อในการศึกษาครั้งนี้ ได้แก่ *L. fermentum* จัดอยู่ในกลุ่ม Obligate heterofermentative ในขณะที่ *L. plantarum* จัดอยู่ในกลุ่ม Facultative heterofermentative แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถปรับเปลี่ยนตัวเองให้อยู่ในกลุ่ม obligate heterofermentative หรือ obligate homofermentative ได้ (สุรลักษณ์ และคณะ, 2545) ดังนั้นเมื่อมีการเสริมต้นเชื้อในอาหารผสมครบส่วน ในระหว่างการหมักจึงพบกรดอะซิติกและกรดไพรูวิกอยู่ด้วย

นอกจากนี้ปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจน ($\text{NH}_3\text{-N}$) ของอาหารหมักในกลุ่มที่เติมต้นเชื้อมีแนวโน้มต่ำกว่ากลุ่มควบคุม ในขณะที่ปริมาณของกรดแลคติกมีแนวโน้มที่สูงกว่า เมื่อเกิดกระบวนการหมัก แบคทีเรียที่ย่อยสลายโปรตีน (proteolytic bacteria) จะทำให้โปรตีนแตกตัวไปเป็นแอมโมเนียไนโตรเจนรวมถึงสารประกอบไนโตรเจนอื่น ๆ (Acosta et al., 1991) อย่างไรก็ตามแบคทีเรียที่ย่อยสลายโปรตีนจะถูกยับยั้งโดยสภาวะแวดล้อมที่เป็นกรด (Shibata et al., 2007)

สรุปผลการศึกษา

การเติมต้นเชื้อ *L. plantarum* J39 และ *L. fermentum* J116 ทำให้อาหารที่ได้มีคุณภาพการหมักดีขึ้น กล่าวคือปริมาณของกรดบิวทริกหลังจากการหมักที่ 28 วันต่ำกว่ากลุ่มควบคุม

และมีแนวโน้มของกรดแลคติกสูงขึ้น อีกทั้งการเติมต้นเชื้อยังทำให้ปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจนมีแนวโน้มต่ำลง นอกจากนี้อาหารหมักมีกรดอะซิติก และโพรพิโอนิกสูงในกลุ่มที่ใช้ต้นเชื้อ ซึ่งเป็นประเด็นที่น่าจะต้องมีการศึกษาความเสถียรของอาหารหมักเมื่อสัมผัสอากาศ (aerobic stability) ต่อไปอย่างไรก็ตามจากผลการศึกษาครั้งนี้ยังต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมในด้านปริมาณการกินได้อิสระ อัตราการเจริญเติบโต และผลผลิตของสัตว์ที่ได้รับอาหารผสมครบส่วนที่หมักด้วยต้นเชื้อเปรียบเทียบกับอาหารหมักแบบธรรมชาติ

เอกสารอ้างอิง

- สุวิลักษณ์ รอดทอง, หนึ่ง เตียอำรุง และ พงษ์ฤทธิ์ ครอบปรัชญา. 2545. ความหลากหลายของสายพันธุ์แลคโตบาซิลลัสในหญ้าหมักของไทย. รายงานการวิจัย, นครราชสีมา: มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.
- Acosta, Y. M., C. C. Stallings, C. E. Polan and C. N. Miller. 1991. Evaluation of barley silage harvested at boot and soft dough stages. *J. Dairy Sci.* 74:167.
- APHA. 1995. Standard method for the examination of water and wastewater. 19th ed., Washington, D.C. APHA/AWWA/WPCF. pp. 2.23-5.16.
- Cai, Y., Y. Benno, M. Ogawa, S. Ohmomo, S. Kumai and T. Nakase. 1998. Influence of *Lactobacillus* spp. from an inoculant and of *Weissella* and *Leuconostoc* spp. from forage crops on silage fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:2982-2987.
- Chen, J., M. R. Stokes and C. R. Wallace. 1994. Effects of enzyme- inoculant systems on preservation and nutritive value of hay crop and corn silages. *J. Dairy Sci.* 77:501-512.
- Chen, L., Y. Xian-jun, L. Jun-feng, W. Si-ran, D. Zhi-hao and S. Tao. 2016. Effect of lactic acid bacteria and propionic acid on conservation characteristics, aerobic stability and in vitro gas production kinetics and digestibility of whole-crop corn based total mixed ration silage. *J. Intergr. Agr.* 15(7):1592-1600.
- De Baere, S., V. Eeckhaut, M. Steppe, C. De Maesschalck, P. De Backer, F. V. Immerseel and S. Croubels. 2013. Development of a HPLC-UV method for the quantitative determination of four short-chain fatty acids and lactic acid produced by intestinal bacteria during in vitro fermentation. *Pharm. Biomed. Anal.* 80:107-115.
- Oliveira, A. S., Z. G. Weinberg, I. M. Ogunade, A. A. P. Cervantes, K. G. Arriola, Y. Jiang, D. Kim, X. Li, M. C. M. Goncalves and D. Vyas. 2017. Meta-analysis of effects of inoculation with homofermentative and facultative heterofermentative lactic acid bacteria on silage fermentation, aerobic stability, and the performance of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 100:4587-4603.
- Shibata, K., D.M. Flores, G. Kobayashi and K. Sonomoto. 2007. Direct lactic acid fermentation with sago starch by a novel amylolytic lactic acid bacterium. *Enterococcus faecium*. *Enzyme Microb. Tech.* 41:149-155.

- Wang, M., C. Yang, L. Jia, and L. Yu. 2014.
Effect of *L. buchneri* and *L. plantarum*
on the fermentation characteristics
and aerobic stability of whip grass
silage in laboratory silos. J. Japan
Soc. Grass Sci. 60:233-239.