

ผลของ *Lactobacillus fermentum* ต่อคุณภาพและองค์ประกอบทางเคมี ของอาหารผสมครบส่วนหมักที่ระยะเวลาหมักต่างกัน

Effect of *Lactobacillus fermentum* on fermentation quality and chemical
compositions in ensiled total mixed ration at different ensiling time

ปริชาติ ช่างสัก¹, เสาวลักษณ์ แย้มหมื่นอาจ^{1*} และ ศิวะ สังข์ศรีทวงษ์²

Parichat changsak¹, Saowaluck Yammuen-art^{1*} and Siwat Sangsritavong²

บทคัดย่อ: วัตถุประสงค์ในการทดลองครั้งนี้เพื่อศึกษาผลของ *Lactobacillus fermentum* ต่อคุณภาพการหมักและองค์ประกอบทางเคมีของอาหารผสมครบส่วนหมักที่ระยะเวลาหมักต่างกัน โดยแบ่งกลุ่มการทดลองออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มควบคุม และกลุ่ม LF ทำการผสมอาหารผสมครบส่วนหมักที่อายุการหมัก 0, 3, 5, 7, 14 และ 21 วัน นำมาประเมินคุณภาพของการหมักและองค์ประกอบทางเคมี พบว่าในระยะเวลาหมักที่ 3, 5, 7, 14 และ 21 วัน ค่า pH ของกลุ่มที่เติม LF มีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (4.31 เทียบกับ 4.49, 4.27 เทียบกับ 4.47, 4.27 เทียบกับ 4.46, 4.26 เทียบกับ 4.57 และ 4.17 เทียบกับ 4.56 ตามลำดับ) ปริมาณกรดแลคติกของกลุ่ม LF สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในระยะเวลาหมัก 3 วัน (3.15% เทียบกับ 2.30%) และ 5 วัน (3.28% เทียบกับ 2.23%) สำหรับการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี พบว่า ปริมาณโปรตีน (CP) ของกลุ่ม LF สูงกว่ากลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในระยะเวลาหมักที่ 14 และ 21 วัน 16.46% เทียบกับ 14.95% (P=0.001) และ 16.61% เทียบกับ 13.94% (P=0.025) ตามลำดับและยังพบว่าปริมาณเยื่อใยชนิด NDF ในกลุ่ม LF มีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุม ในระยะเวลาหมักที่ 21 วัน คือ 52.21% เทียบกับ 55.50% (P=0.038) ดังนั้น การเสริม *Lactobacillus fermentum* จะช่วยรักษาคุณภาพของอาหารผสมครบส่วนหมักและช่วยลดการสูญเสียโภชนาการที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมักได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อจำเป็นต้องเก็บรักษาไว้เป็นระยะเวลานาน

คำสำคัญ: *Lactobacillus fermentum*, อาหารผสมครบส่วนหมัก, ระยะเวลาหมัก

ABSTRACT: The objectives of this study aimed to evaluate the effects of *Lactobacillus fermentum* inoculation on fermentation quality and chemical compositions of ensiled total mixed ration at different storage time. Fresh TMR was prepared and ensiled with or without *L. fermentum* inoculation (LF group). The samples were collected at 0, 3, 5, 7, 14 and 21 days after fermentation for the determination of fermentation quality (pH value, organic acid profile, NH₃-N) as well as chemical compositions. This study found that the pH values of LF group were significantly less than that of the control group at day 3 (4.31 vs 4.49), day 5 (4.27 vs 4.47), day 7 (4.27 vs 4.46), day 14 (4.26 vs 4.57) and day 21 (4.17 vs

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

4.56). Lactic acid concentration in LF group were higher than control group ($p < 0.05$) at day 3 (3.15% vs 2.30%) and day 5 (3.28% vs 2.23%). CP in LF group were also greater than that of in control group at day 14 (16.46% vs 14.95%, $P = 0.001$) and day 21 (16.61% vs 13.94%, $P = 0.025$). In addition, NDF in LF group was less than that of in control group on day 21 (52.21% vs 55.50%, $P = 0.038$). Results from this study indicated that *Lactobacillus fermentum* inoculation can enhance fermentation quality and reduce the nutrients loss during the ensiling process.

Keywords: *Lactobacillus fermentum*, Lactic acid bacteria, ensiled total mixed ration, ensiling time

บทนำ

ในปัจจุบันเกษตรกรผู้เลี้ยงโคส่วนใหญ่มีความสนใจเกี่ยวกับอาหารผสมครบส่วน (Total Mixed Ration, TMR) เพิ่มมากขึ้น แต่อาหาร TMR จะต้องทำการผสมทุกวัน บางฟาร์มอาจจะต้องทำหลายสูตรซึ่งอาจจะทำให้เสียเวลาและใช้แรงงานมาก ดังนั้นจึงได้มีแนวทางที่จะช่วยลดปัญหาดังกล่าวโดยการนำอาหาร TMR มาหมัก หรือที่เรียกว่าอาหารผสมครบส่วนแบบหมัก (ensiled Total Mixed Ration, eTMR) เพื่อที่จะผสมครั้งเดียวแล้วสามารถเก็บถนอมไว้ใช้ได้ (Wang et al., 2010) แต่การทำอาหารผสมครบส่วนแบบหมักอาจจะไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร เนื่องจากอาหาร eTMR มีส่วนประกอบของอาหารขึ้นรวมด้วยซึ่งอาจจะทำให้เกิดการสูญเสียโภชนาการไปในกระบวนการหมัก หากกระบวนการหมักเกิดขึ้นช้าก็จะทำให้สูญเสียโภชนาการในปริมาณมาก ดังนั้นการเติมแบคทีเรียกรดแลคติก (Lactic acid bacteria, LAB) จึงน่าจะช่วยให้คุณภาพของการหมักดีขึ้น มีคุณภาพที่สม่ำเสมอในทุกชุดการผลิต รวมไปถึงการเติมแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกจะทำให้กระบวนการหมักเกิดขึ้นและเสร็จสมบูรณ์ในระยะเวลาอันสั้น *Lactobacillus fermentum* เป็นแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกที่จัดอยู่ในกลุ่ม Heterofermentative bacteria จึงสามารถผลิตกรดแลคติก และยังสามารถผลิตกรดอื่น ๆ เช่น กรดอะซิติกได้ด้วย (Carvalho et al., 2014) ดังนั้นการเติม *L. fermentum* ลงไปในกระบวนการหมักจะทำให้ pH ลดลงได้รวดเร็วกว่าการหมักแบบธรรมชาติ ยับยั้งการสูญเสียคุณค่า และการเจริญเติบโตของยีสต์ทั้งในระหว่างการหมักและภายหลังจากการสัมผัสกับอากาศ (Kristensen et al., 2010) การเติม *L. fermentum* ทำให้คุณภาพของพืชหมักดีกว่ากลุ่มที่ไม่เติม โดยพบว่ากลุ่มที่เติม *L. fermentum* มีค่า pH ต่ำ กรดแลคติกสูงและ

กรดอะซิติกสูงกว่ากลุ่มควบคุม (Jalc et al., 2009) การเสริม *L. fermentum* จึงเป็นอีกหนึ่งแนวทางในการเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการของอาหารผสมครบส่วนแบบหมักได้ ดังนั้นวัตถุประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้คือ ศึกษาผลของการเติม *Lactobacillus fermentum* ต่อคุณภาพการหมัก และองค์ประกอบทางเคมีของอาหารผสมครบส่วนแบบหมักที่ระยะในการเก็บรักษาต่าง ๆ

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลคติก

เตรียมเชื้อจุลินทรีย์ *Lactobacillus fermentum* (LF) ที่คัดเลือกได้จากหญ้าเนเปียร์ปากช่อง 1 หมัก นำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS media แล้วบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บ่มเหียงเพื่อเก็บเฉพาะเซลล์แบคทีเรีย จากนั้นทำการผสมต้นเชื้อกับน้ำเกลือความเข้มข้น 0.85% ปรับความเข้มข้นให้ได้ 108 cfu/ml จากนั้นนำไปเติม TMR อัตราส่วน 100 มิลลิลิตร ต่อ TMR สด 1 กิโลกรัม

การเตรียมอาหารผสมครบส่วนแบบหมัก

นำวัตถุดิบที่เป็นส่วนประกอบของอาหารขึ้นและอาหารหยาบมาผสมเป็นอาหารผสมครบส่วนโดยจะทำการเปรียบเทียบอาหารผสมครบส่วน 2 กลุ่ม คือ

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม :อาหารผสมครบส่วนที่เติม 0.85%NaCl

กลุ่มที่ 2 กลุ่ม LF :อาหารผสมครบส่วนที่เสริม *Lactobacillus fermentum*

จากนั้นทำการดูอากาศออกเพื่อให้อาหารหมักอยู่สภาพไร้อากาศ ทำการเก็บตัวอย่างในวันที่ 0, 3, 5, 7, 14 และ 21 วัน ของการหมัก เก็บตัวอย่างไว้ที่ -200C เพื่อรอการวิเคราะห์ต่อไป

วิเคราะห์คุณภาพการหมักของอาหารผสมครบส่วนหมัก

ทำการสุ่มตัวอย่าง TMR หมัก จากนั้นนำไปวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) โดยเครื่อง pH meter วิเคราะห์หาปริมาณของกรดอินทรีย์โดยใช้ High Performance Liquid Chromatography (HPLC) โดยใช้ 0.02 N H₂SO₄ เป็นตัวทำละลายเคลื่อนที่ (Mobile phase) (De Baere et al., 2013) และวิเคราะห์หาปริมาณของแอมโมเนียไนโตรเจน (NH₃) ด้วยวิธี Kjeldahl method (Chen et al., 1994)

วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของอาหารผสมครบส่วนหมัก

นำตัวอย่าง TMR หมัก มาวิเคราะห์หาปริมาณ วัตถุแห้ง (Dry matter, DM), อินทรีย์วัตถุ (Organic matter, OM), โปรตีนหยาบ (Crude protein, CP), ไขมัน (Ether extract, EE) และเยื่อใย (Crude fiber, CF) ตามวิธี Proximate analysis (A.O.A.C., 2000) วิเคราะห์เยื่อใยที่เป็นผนังเซลล์ (neutral detergent fiber, NDF), ลิกโนเซลลูโลส (acid detergent fiber, ADF), Acid detergent lignin (ADL) ตามวิธี Detergent method (Van Soest, 1994)

การวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ

ทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของข้อมูล โดยใช้สถิติค่าเฉลี่ยของกลุ่มการทดลอง 2 กลุ่มอิสระต่อกัน (t-test for Independent Sample)

ผลและวิจารณ์ผลการศึกษา

จากการประเมินคุณภาพของอาหารผสมครบส่วนหมักที่เติมและไม่เติม LF ในระยะการหมัก 0, 3, 5, 7, 14 และ 21 วัน ดังแสดงใน Figure 1 พบว่า ค่า pH ของกลุ่มที่เติม LF ในระยะการหมัก 3, 5, 7, 14 และ 21 วัน มีค่าต่ำกว่ากลุ่มที่ไม่เติม LF (4.31 เทียบกับ 4.49, 4.27 เทียบกับ 4.47, 4.27 เทียบกับ 4.46, 4.26 เทียบกับ 4.57 และ 4.17 เทียบกับ 4.56 ตามลำดับ) แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ปริมาณกรดแลคติกของกลุ่มที่เติม LF มีปริมาณมากกว่ากลุ่มที่ไม่เติม LF ในระยะการหมัก 3 วัน คือ 3.15% เทียบกับ 2.30% และ 5 วัน คือ 3.28%

เทียบกับ 2.23% ($p < 0.05$) เนื่องมาจากการเติมแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกทำให้ปริมาณของแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกเพิ่มขึ้นในกระบวนการหมัก ซึ่งแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกจะเปลี่ยนพวกคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำได้ง่าย (WSC) ได้เป็นกรดแลคติก (Cai et al., 2003) ซึ่งกรดแลคติกมีความเป็นกรดที่แรงกว่ากรดชนิดอื่นๆ หากผลิตได้ในปริมาณที่มากก็จะทำให้ค่า pH มีค่าลดลง (Vakily et al., 2011) ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณ NFE ในอาหารผสมครบส่วนสด (day 0) ที่มีปริมาณต่ำกว่าอาหารผสมครบส่วนแบบหมัก สำหรับปริมาณกรดอะซิติก และกรด โพพิโอนิกในกลุ่มที่เติม LF มีแนวโน้มที่สูงกว่ากลุ่มที่ไม่เติมแต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจนในกลุ่มที่เติม LF มีแนวโน้มที่ต่ำกว่ากลุ่มที่ไม่เติม LF ในขณะที่มีปริมาณกรดบิวทริกไม่แตกต่างกัน

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของอาหารผสมครบส่วนหมักที่เติม LF และไม่เติม LF ในระยะการหมัก 0, 3, 5, 7, 14 และ 21 วัน ดังแสดงใน Table 1 พบว่า ปริมาณโปรตีน (CP) ของกลุ่มที่เติม LF สูงกว่ากลุ่มที่ไม่เติม LF ในระยะการหมักที่ 14 วัน คือ 16.46% เทียบกับ 14.95% และ 21 วัน คือ 16.61% เทียบกับ 13.94% แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ทั้งนี้เป็นเพราะว่าการเติมแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกในกระบวนการหมักทำให้มีค่า pH ลดลงเพียงพอที่จะไปยับยั้งการทำงานของจุลินทรีย์กลุ่ม proteolytic และหยุดการทำงานของเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีน ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวจะไม่สามารถทำงานได้ในสภาวะที่เป็นกรดหรือที่ pH ประมาณ 4.5-3.8 (Sharp et al., 1994) และยังพบว่าการเติม LF ในอาหารผสมครบส่วนหมักมีผลทำให้ปริมาณเยื่อใยที่เป็นผนังเซลล์ (NDF) ลดลงในระยะการหมักที่ 21 วัน เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่เติมคือ 52.21% เทียบกับ 55.50% แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในการเติมแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกจะทำให้ได้กรด แลคติกในปริมาณมาก ดังนั้นการลดลงของเยื่อใยอาจจะเป็นเพราะการเกิดปฏิกิริยา acid hydrolysis กับส่วนประกอบของเยื่อใยจึงเป็นผลทำให้ปริมาณ NDF ลดลงในกลุ่มที่เติม LF (McDonald et al., 1991) แต่การเติม LF ไม่มีผลต่อการสูญเสียปริมาณวัตถุแห้ง ไขมัน คาร์โบไฮเดรตที่ละลายง่าย (NFE) ลิกโนเซลลูโลส (ADF) และลิกนิน (ADL)

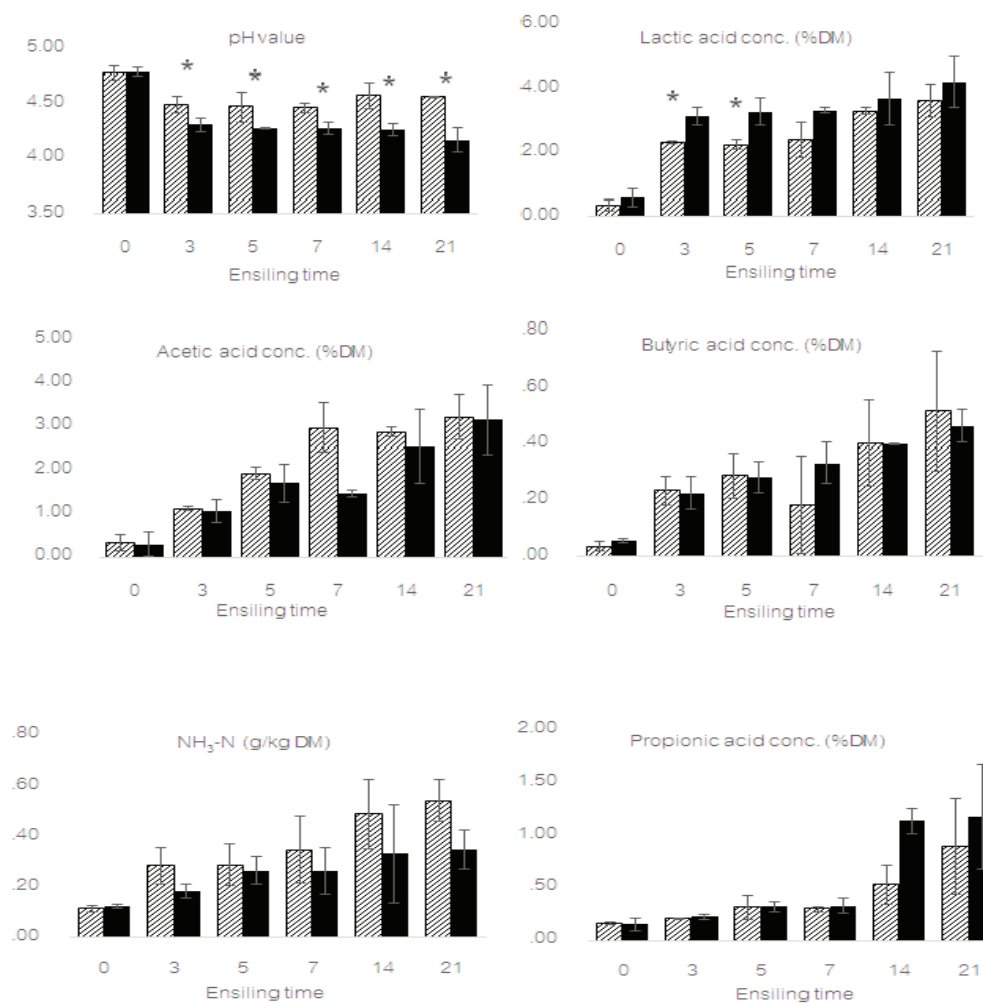


Figure 1. Fermentation quality include the pH, lactic acid, acetic acid, butyric acid, propionic acid concentration and ammonia nitrogen in eTMR with (■) or (▨) without *L. fermentum* (LF) inoculation at different ensiling times. * showed significant differences ($P < 0.05$)

Table 1. Chemical composition of eTMR with or without *L. fermentum* (LF) inoculation at different ensiling times

Day	Treatment	DM	OM	CP	EE	NFE	NDF	ADF	ADL
		(%)				(% DM basis)			
0	Control	45.14	93.34	16.27	3.72	53.14	55.24	27.14	5.34
	LAB	47.90	93.10	16.35	4.06	52.21	55.38	28.28	6.11
	SEM	1.156	0.141	0.196	0.299	0.317	0.764	0.429	0.143
	p-value	0.251	0.418	0.845	0.584	0.153	0.930	0.192	0.659
3	Control	39.04	92.53	16.01	4.42	53.13	55.83	27.47	5.73
	LAB	41.08	92.40	16.39	4.51	52.93	55.44	28.49	6.11
	SEM	0.741	0.083	0.412	0.140	0.710	0.508	0.514	0.252
	p-value	0.174	0.434	0.682	0.767	0.896	0.720	0.336	0.473
5	Control	40.72	92.38	15.86	5.15	49.25	54.23	23.98	5.48
	LAB	43.60	92.19	16.90	5.39	48.44	53.27	26.03	6.31
	SEM	0.783	0.067	0.704	0.180	1.019	0.869	0.843	0.258
	p-value	0.062	0.164	0.493	0.526	0.702	0.602	0.236	0.110
7	Control	40.56	92.35	15.99	5.37	49.96	51.27	26.51	5.94
	LAB	42.54	92.28	16.38	5.33	49.88	51.16	24.71	5.82
	SEM	0.552	0.114	0.458	0.158	0.279	0.506	0.480	0.362
	p-value	0.072	0.768	0.718	0.899	0.896	0.922	0.058	0.870
14	Control	40.41	92.51	14.95 ^A	4.79	50.46	55.92	29.93	6.21
	LAB	40.93	92.76	16.46 ^B	5.21	49.83	54.73	27.57	6.18
	SEM	1.189	0.094	0.943	0.137	0.238	0.844	0.669	0.276
	p-value	0.837	0.178	0.001	0.130	0.222	0.520	0.077	0.951
21	Control	40.11	92.86	13.94 ^A	4.73	49.95	55.50 ^A	27.94	5.95
	LAB	39.34	92.76	16.61 ^B	4.40	49.90	52.21 ^B	28.62	6.08
	SEM	0.793	0.079	0.564	0.166	0.235	0.807	0.625	0.256
	p-value	0.657	0.529	0.025	0.332	0.921	0.038	0.600	0.809

^{A, B} Means along columns among ensiling times with different superscripts are significantly different at $P < 0.05$

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาการเติม *L. fermentum* ในอาหารผสมครบส่วนหมัก สามารถช่วยรักษาคุณภาพของอาหารผสมครบส่วนหมักได้และสามารถช่วยให้เกิดกระบวนการหมักเร็วขึ้น โดยทำให้มีปริมาณกรดแลกติกสูงขึ้นตั้งแต่ 3 วันของการหมัก นอกจากนี้การเติม LF ยังทำให้ของปริมาณกรดอะซิติกและกรดฟิโตนิกมีแนวโน้มที่สูงกว่ากลุ่มที่ไม่เติม และที่สำคัญการเติม LF ยังไปช่วยลดการสูญเสียปริมาณโปรตีนในช่วงเริ่มต้นของกระบวนการหมักได้

เอกสารอ้างอิง

- A.O.A.C. 2000. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Vol.1, 15th ED., Washington.
- Cai, Y., Y. Fujita, M. Murai, M. Ogawa, N. Yoshida, R. Kitamura and T. Miura. 2003. Application of lactic acid bacteria (*Lactobacillus plantarum* Chikuso-1) for silage preparation of forage paddy rice. Jpn. J. Grassl. Sci. 49:477-485.
- Carvalho, B. F., C. L. S. Ávila, J. C. Pinto, J. Neri, and R. F. Schwana. 2014. Microbiological and chemical profile of sugar cane silage fermentation inoculated with wild strains of lactic acid bacteria. Anim. Feed Sci. 195:1-13.
- 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.
- De Baere, S., V. Eeckhaut, M. Steppe, C. De Maesschalck, P. De Backer, F. Van 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. J. Pharm Biomed Anal. 80:107-115.
- Jalc, D., A. Lauková, M. Simonová, Z. Váradyová, and P. Homolka. 2009. The use of bacterial inoculants for grass silage: their effects on nutrient composition and fermentation parameters in grass silages. Czech J. Anim. Sci. 54:84-91.
- Kristensen, N. B., K. H. Sloth, O. Hojberg, N. H. Spliid, C. Jensen, and R. Thøgersen. 2010. Effects of microbial inoculants on corn silage fermentation, microbial contents, aerobic stability, and milk production under field conditions. J. Dairy Sci. 93:3764-3774.
- McDonald, P., A. R. Henderson, and S. J. E. Heron. 1991. The biochemistry of silage. 2nd ed. Chalcombe Publications, Marlow, Bucks, UK.
- Sharp, R. P. G. Hooper and D. G. Armstrong, 1994. The digestion of grass silages produced using inoculants of lactic acid bacteria. Grass Forage Sci. 49:42-53.
- Vakil, H., A. A. Khadem, M. Rezaeian, A. Afzalzadeh and A. S. Chaudhry. 2011. The impact of a bacterial inoculant on chemical composition, aerobic stability and in sacco degradability of corn silage and the subsequent performance of dairy cows. Int. J. Vet. Res. 5:21-29.
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A., 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. J. Dairy Sci. 74:3583-3597.
- Wang, J., J.Q. Wang, D.P. Bu, W.J. Guo, Z.T. Song, and J.Y. Zhang. 2010. Effect of storing total mixed rations anaerobically in bales on feed quality. Animal Feed Sci Technol 161:94-102.