รหัสโครงการ SUT1-104-49-12-26

รายงานการวิจัย

การพัฒนารูปแบบของกล้าเชื้อหญ้าหมัก

(Development of Silage Inoculant Formula)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT1-104-49-12-26

รายงานการวิจัย

การพัฒนารูปแบบของกล้าเชื้อหญ้าหมัก

(Development of Silage Inoculant Formula)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรีลักษณ์ รอดทอง

สาขาวิชาจุลชีววิทยา

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ที่ปรึกษาโครงการ

ศาสตราจารย์ ดร. นันทกร บุญเกิด

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2549

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

ธันวาคม พ.ศ. 2554

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัย “การพัฒนารูปแบบของกล้าเชื้อหญ้าหมัก” เป็นโครงการที่ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีที่ให้การสนับสนุนด้านงบประมาณที่เป็นค่าใช้จ่าย เครื่องมือ และห้องปฏิบัติการในการดำเนินการวิจัย ขอขอบคุณ ศาสตราจารย์ ดร. นันทกร บุญเกิด ที่ปรึกษาโครงการวิจัย ขอขอบคุณเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมหมู่บ้านวะภูแก้ว ตำบลมะเกลือใหม่ อำเภอสูงเนิน จังหวัดนครราชสีมา ที่ให้ความร่วมมือในการทดลองใช้กล้าเชื้อที่พัฒนาได้ในการผลิตหญ้าหมัก โครงการวิจัยนี้มี นางสาวเมษา นันธิยา เป็นผู้ช่วยนักวิจัย และยังมีผู้ช่วยวิจัยของโครงการวิจัยอื่นภายใต้การดูแลของ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรีลักษณ์ รอดทอง บุคลากร และนักศึกษาบัณฑิตศึกษามหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยเฉพาะอย่างยิ่ง นางสาวยุบล พิกุลเงิน นางสาวกุณฑิกา เวชกลาง และนายขจรศักดิ์ วงศ์ชีวรัตน์ ที่มีส่วนช่วยให้การดำเนินงานสำเร็จลุล่วงด้วยดี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อ

หญ้าหมักเป็นผลิตภัณฑ์อาหารสัตว์ที่ได้จากกระบวนการหมักพืชอาหารสัตว์สด โดยกิจกรรมของจุลินทรีย์เพื่อการถนอมพืชอาหารสัตว์ ที่มีคุณค่าทางอาหารสูงกว่าหญ้าแห้ง ไว้ใช้ในฤดูกาลที่ไม่สามารถผลิตพืชสดได้ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนารูปแบบของกล้าเชื้อหญ้าหมัก จากกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกสายพันธุ์เด่นที่พบในหญ้าหมักที่ผลิตในประเทศไทยและในทางเดินอาหารของโคที่มีความเหมาะสมทั้งใช้เป็นกล้าเชื้อและสารเสริมชีวนะสำหรับโค จากแบคทีเรียกรดแล็กติกที่นำมาศึกษาจำนวน 191 ไอโซเลต คัดเลือกได้ 11 ไอโซเลต (สายพันธุ์) ซึ่งสามารถระบุชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานและสรีรวิทยาได้ คือ *Lactobacillus acidophilus* SUTC-T2R15, *L. brevis* SUTC-SL17, *L. fermentum* SUTC-P46, *L. paracasei* SUTC-T1R18, *L. plantarum* SUTC-T1R28, *L. rhamnosus* SUTC-T8F1, *Lactococcus lactis* SUTC-D44, *Leuconostoc mesenteroides* SUTC-FL36, *Pediococcus damnosus* SUTC-MCN23, *Pediococcus pentosaceus* SUTC-M2D3 และ *Pediococcus* sp. SUTC-F20 เมื่อศึกษาส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อลดต้นทุนการผลิตกล้าเชื้อจากส่วนประกอบของอาหารมาตรฐาน พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่พัฒนาได้ประกอบด้วย น้ำตาลทรายที่ผลิตจากอ้อย แอมโมเนียมซัลเฟต สารสกัดจากยีสต์ โซเดียมอะซิเตตไตรไฮเดรต ไดโพแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต แมกนีเซียมซัลเฟต และแมงกานีสซัลเฟต ร้อยละ 2.0, 3.0, 0.5, 0.5, 0.2, 0.02 และ 0.004 ตามลำดับ มีสภาวะการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมที่อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส ไม่มีการให้อากาศ แบคทีเรียกล้าเชื้อที่คัดเลือกทุกสายพันธุ์มีรูปแบบของการเจริญคล้ายคลึงกันที่ให้ปริมาณเซลล์สูงโดยเฉลี่ย 10^8-10^9 CFU ต่อมิลลิลิตร เมื่อเจริญได้ 18-20 ชั่วโมง จากการทดลองหารูปแบบของกล้าเชื้อเพื่อใช้หมักพืชอาหารสัตว์สด ด้วยการเตรียมเป็นกล้าเชื้อเดี่ยวที่สามารถเตรียมเป็นกล้าเชื้อผสมก่อนการใช้งานได้ง่าย พบว่ารูปแบบเชื้อแห้ง (ความชื้นประมาณร้อยละ 13-16) ที่มีกากถั่วเหลืองเป็นสารตัวกลางบรรจุในถุงพลาสติกปิดสนิทปริมาณ 500 กรัมต่อถุง ช่วยรักษาการมีชีวิตของแบคทีเรียได้ดีที่สุด และให้ความสะดวกในการกระจายเชื้ออย่างทั่วถึงในวัสดุหมักได้ง่าย สามารถเก็บกล้าเชื้อรูปแบบนี้ที่อุณหภูมิห้องได้นานอย่างน้อย 30 วัน และที่ 4 องศาเซลเซียส ได้นาน 2-6 เดือน ขึ้นกับสายพันธุ์ของแบคทีเรียกล้าเชื้อ เมื่อทดลองใช้กล้าเชื้อในรูปแบบที่พัฒนาได้ ผลิตหญ้าหมักจากหญ้าเนเปียร์ ณ ฟาร์มเกษตรกรผู้เลี้ยงโค ด้วยเชื้อเริ่มต้นในวัสดุหมักประมาณ 10^5-10^6 เซลล์ต่อกรัม หมักเป็นเวลา 21 วัน หญ้าหมักมีกลิ่นหอมของการหมัก หญ้าหมักที่เติมกล้าเชื้อมีความเป็นกรด-ด่างโดยเฉลี่ย 4.2-4.5 ซึ่งต่ำกว่าหญ้าหมักที่ไม่เติมกล้าเชื้อ (มีความเป็นกรด-ด่างโดยเฉลี่ยเท่ากับ 4.7) จัดได้ว่าเป็นผลิตภัณฑ์หญ้าหมักที่มีคุณภาพดี กล้าเชื้อ *Lactococcus lactis* SUTC-D44, *Lactobacillus acidophilus* SUTC-T2R15, *L. paracasei* SUTC-T1R18, *L. plantarum* SUTC-T1R28 และ *L. rhamnosus* SUTC-T8F1 มีศักยภาพสูงในการใช้ผลิตหญ้าหมัก และให้ผลิตภัณฑ์อาหารสัตว์ที่สัตว์สามารถบริโภคอาหารพร้อมแบคทีเรียกล้าเชื้อที่มีชีวิตที่สามารถให้ประโยชน์ต่อในด้านสารเสริมชีวนะ

Silage is an animal feed product obtained from controlled microbial fermentation of green forage crop retaining high moisture content and preserving the forage crop to be used as succulent feed during periods of feed scarcity. This study aimed to develop silage inoculant formula from dominant strains of lactic acid bacteria inhabiting natural silage produced in Thailand and from cow's digestive tract. The bacterial strains should be suitable for applying as both silage inoculants and probiotics. Eleven lactic acid bacterial isolates (strains) identified by their morphological and physiological characteristics as belonging to *Lactobacillus acidophilus* SUTC-T2R15, *L. brevis* SUTC-SL17, *L. fermentum* SUTC-P46, *L. paracasei* SUTC-T1R18, *L. plantarum* SUTC-T1R28, *L. rhamnosus* SUTC-T8F1, *Lactococcus lactis* SUTC-D44, *Leuconostoc mesenteroides* SUTC-FL36, *Pediococcus damnosus* SUTC-MCN23, *Pediococcus pentosaceus* SUTC-M2D3, and *Pediococcus* sp. SUTC-F20, were selected from the total of 191 isolates to be used as silage inoculants. These bacterial strains could grow very well in the cheap developed medium compared to lactic acid bacterium standard medium. The developed medium composed of cane sugar, ammonium sulphate, yeast extract, sodium acetate tri-hydrate, di-potassium hydrogen phosphate, magnesium sulfate, and manganese sulfate at concentrations of 2.0, 3.0, 0.5, 0.5, 0.2, 0.02, and 0.004%, respectively. The suitable cultivation conditions were at 30-35 degree Celsius without aeration. All 11 selected bacterial strains had similar growth profiles. Their high cell counts of 10^8-10^9 CFU per milliliter could be achieved after cultivation for 18-20 hours. The silage inoculant formula was then investigated. The best formula comprising only single strain of starter culture, which could be easily mixed to prepare mixed starter cultures before using, was the dry culture formula using soybean meal as supporting medium and containing approximately 13-16% moisture contents, in sealed plastic bag (500 grams per bag). The dry formula could preserve live inoculant bacteria during storage at room temperature for at least 30 days, and at 4 degree Celsius for 2-6 months depending on bacterial strains. It was also convenient for mixing to plant raw material for preparing silage. The dry culture formula was tested for producing silages using fresh Napier grass in a cattle farm. Silage prepared without adding inoculant (control) was compared to products with adding the bacterial inoculants (10^5-10^6 cells per gram of raw material). After incubation for 21 day, the animal feed products were very similar in appearance, and good qualities. The average pH of the grass silages with inoculants were 4.2-4.5, which were lower than the control silage (pH 4.7). Five strains of the silage inoculants belonging to *Lactococcus lactis* SUTC-D44, *Lactobacillus acidophilus* SUTC-T2R15, *L. paracasei* SUTC-T1R18, *L. plantarum* SUTC-T1R28, and *L. rhamnosus* SUTC-T8F1 had high potential as inoculants to produce silage from fresh Napier grass, and could be performed as probiotics in cattle.

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ..... ก
บทคัดย่อภาษาไทย..... ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... ค
สารบัญ..... ง
สารบัญตาราง..... ช
สารบัญภาพ..... ฌ
บทที่ 1 บทนำ
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย..... 1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... 2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย..... 2
1.4 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย..... 2
1.5 ทฤษฎีและกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย..... 3
1.6 ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 3
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย
2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัย..... 13
2.1.1 ครุภัณฑ์..... 13
2.1.2 วัสดุ..... 14
2.2 การเลือกและตรวจสอบสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแล็กติกเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อ..... 14
2.2.1 การเลือกสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแล็กติกเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อ..... 14
2.2.2 การตรวจสอบสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่เลือกเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อ..... 15
2.2.2.1 การตรวจสอบสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่เลือกเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา..... 15
2.2.2.2 การตรวจสอบสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่เลือกเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อด้วยวิธี Random amplified polymorphic DNA (RAPD)..... 16
2.3 การศึกษาส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับแบคทีเรียกรดแล็กติกที่ได้คัดเลือก..... 18
2.3.1 ชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอน..... 18
2.3.2 ชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจน..... 19
2.3.3 Essential element และ Growth factor ในส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ..... 19

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.4 การศึกษาสภาวะที่เหมาะต่อการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือก..... 19
2.4.1 อุณหภูมิ..... 19
2.4.2 สภาพที่มีออกซิเจน..... 19
2.5 การศึกษาวัฏภาคของการเจริญของแบคทีเรียและความจำเป็นและต้องการทำให้เซลล์ของเชื้อเข้มข้นขึ้น..... 19
2.6 การทดลองหารูปแบบของกล้าเชื้อเพื่อการใช้ประโยชน์..... 20
2.6.1 รูปแบบเชื้อแห้งบรรจุในถุงพลาสติก..... 20
2.6.2 รูปแบบเชื้อแห้งแบบลูกแป้ง..... 20
2.7 การศึกษาการอยู่รอดในเบื้องต้นของกล้าเชื้อในรูปแบบที่พัฒนาได้..... 21
2.8 การทดลองผลิตหญ้าหมักโดยใช้กล้าเชื้อในรูปแบบที่พัฒนาได้..... 21
2.8.1 วัตถุดิบและการเตรียมวัตถุดิบในการผลิตหญ้าหมัก..... 21
2.8.2 การหมักให้ได้ผลผลิตหญ้าหมัก..... 22
2.8.3 การเก็บตัวอย่างหญ้าหมัก..... 22
2.8.4 การวิเคราะห์ตัวอย่างหญ้าหมัก..... 22
บทที่ 3 ผลและอภิปรายผลการวิจัย
3.1 การเลือกและตรวจสอบสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อ..... 24
3.2 การศึกษาส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแล็กติกที่คัดเลือกได้ เพื่อลดต้นทุนการผลิตกล้าเชื้อ..... 43
3.2.1 ชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอน..... 43
3.2.2 ชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจน..... 50
3.2.3 Essential element และ Growth factor ในส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ..... 53
3.3 การศึกษาสภาวะที่เหมาะต่อการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือก..... 55
3.3.1 อุณหภูมิ..... 55
3.3.2 สภาพที่มีออกซิเจน..... 55
3.4 การศึกษาวัฏภาคของการเจริญของแบคทีเรียและความจำเป็นและต้องการทำให้เซลล์ของเชื้อเข้มข้นขึ้น..... 57
3.5 การทดลองหารูปแบบของกล้าเชื้อเพื่อการใช้ประโยชน์..... 61
3.5.1 รูปแบบเชื้อแห้งบรรจุในถุงพลาสติก..... 61

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.5.2 รูปแบบเชื้อแห้งแบบลูกแป้ง..... 65
3.6 การศึกษาการอยู่รอดในเบื้องต้นของกล้าเชื้อในรูปแบบที่พัฒนาได้..... 71
3.6.1 การอยู่รอดของแบคทีเรียกล้าเชื้อในรูปแบบเชื้อแห้งบรรจุในถุงพลาสติก…..….. 71
3.6.2 การอยู่รอดของแบคทีเรียกล้าเชื้อในรูปแบบลูกแป้ง……... 75
3.7 การทดลองผลิตหญ้าหมักโดยใช้กล้าเชื้อในรูปแบบที่พัฒนาได้..... 77
บทที่ 4 บทสรุป
4.1 สรุปผลการวิจัย..... 88
4.2 ข้อเสนอแนะ..... 96
บรรณานุกรม..... 97
ภาคผนวก
ภาคผนวก ก สีย้อมจุลินทรีย์..... 105
ภาคผนวก ข น้ำยาเคมี..... 105
ภาคผนวก ค อาหารเลี้ยงจุลินทรีย์..... 108
ประวัติผู้วิจัย..... 110
เอกสารแนบ..... 111

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 3.1 จำนวนไอโซเลตที่นำมาคัดเลือกจากแหล่งต่างๆ ที่แยกเชื้อ และไอโซเลตที่เลือกเพื่อทดลองใช้เป็นกล้าเชื้อผลิตหญ้าหมัก..... 25

ตารางที่ 3.2 ลักษณะเฉพาะที่แตกต่างกันของแบคทีเรียกรดแล็กติก 4 สกุล (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* และ *Pediococcus*) ที่คัดเลือกเป็นกล้าเชื้อเพื่อผลิตหญ้าหมัก..... 27

ตารางที่ 3.3 ลักษณะ/สมบัติ และผลการระบุชนิดของแบคทีเรียกรดแล็กติกไอโซเลตที่เลือกเป็นกล้าเชื้อ เมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลสมบัติทางชีวเคมีด้วยชุดทดสอบ API 50CH/CHL (bioMèrieux)..... 28

ตารางที่ 3.4 ส่วนประกอบของอาหาร MRS ที่ใช้ศึกษาชนิดและแหล่งสารอาหารที่เหมาะสม..... 44

ตารางที่ 3.5 การเจริญของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่คัดเลือกเพื่อพัฒนาเป็นกล้าเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบพื้นฐานตาม MRS medium แต่มีชนิดของแหล่งคาร์บอนต่างกัน 6 แหล่ง เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียเป็นเวลา 20 ชั่วโมง..... 45

ตารางที่ 3.6 การเจริญของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่คัดเลือกเป็นกล้าเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมน้ำตาลทรายที่ผลิตจากอ้อยความเข้มข้น 0.5-6.0% เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 20 ชั่วโมง..... 46

ตารางที่ 3.7 การเจริญของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อตามส่วนประกอบ MRS medium ที่เติมกากน้ำตาลความเข้มข้น 0.5-4.0% แทนกลูโคส เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 20 ชั่วโมง..... 49

ตารางที่ 3.8 การเจริญของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลทรายที่ผลิตจากอ้อย 2.0% เป็นแหล่งคาร์บอนหลัก และมีแหล่งไนโตรเจนต่างกันคือ แอมโมเนียมซัลเฟต กากถั่วเหลือง และยูเรีย เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 20 ชั่วโมง..... 51

ตารางที่ 3.9 การเจริญของแบคทีเรียกล้าเชื้อในอาหารที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 1.0-5.0% เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 20 ชั่วโมง..... 52

ตารางที่ 3.10 การเจริญของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลทราย 2.0% เป็นแหล่งคาร์บอน แอมโมเนียมซัลเฟต 3.0% และเติม Yeast extract ปริมาณแตกต่างกันในช่วง 0.3-1.0% เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 20 ชั่วโมง..... 54

ตารางที่ 3.11 การเจริญของแบคทีเรียในสภาวะควบคุมอุณหภูมิที่ 25-50 องศาเซลเซียส เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 20 ชั่วโมง..... 56

ตารางที่ 3.12 การเจริญของแบคทีเรียในสภาวะมีและไม่มีออกซิเจน ไม่มีการกวนหรือเขย่า ควบคุมอุณหภูมิที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง ในอาหารที่มี Yeast extract 0.5% และไม่เติม Tri-ammonium citrate และ Tween 80..... 57

สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

ตารางที่ 3.13 ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมที่พัฒนาได้..... 59
ตารางที่ 3.14 การเจริญของแบคทีเรียที่คัดเลือกเพื่อพัฒนาเป็นกล้าเชื้อหญ้าหมัก ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมเป็นเวลา 48 ชั่วโมง..... 59
ตารางที่ 3.15 การอยู่รอดของแบคทีเรียกล้าเชื้อในรูปแบบเชื้อแห้งบรรจุในถุงพลาสติก ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 วัน..... 72
ตารางที่ 3.16 การทดสอบการอยู่รอดของแบคทีเรียกล้าเชื้อในรูปแบบเชื้อแห้งที่มีกากถั่วเหลืองเป็นสารตัวกลาง บรรจุในถุงพลาสติก เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน..... 74
ตารางที่ 3.17 การอยู่รอดของแบคทีเรียกล้าเชื้อในรูปแบบลูกแป้งที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 วัน..... 75
ตารางที่ 3.18 ผลผลิตหญ้าเนเปียร์หมักที่ไม่เติมและที่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกแตกต่างกัน 11 สายพันธุ์ ณ เวลาหมักที่ 0 และ 21 วัน..... 82

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ 3.1 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่เลือกเพื่อทดลองพัฒนาเป็นกล้าเชื้อเพื่อผลิตหญ้าหมัก แบคทีเรียเจริญบนอาหาร MRS agar (ที่เติม 0.5% $CaCO_3$ ในอาหารบางจานเลี้ยงเชื้อ) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง..... 29

รูปที่ 3.2 รูปร่างและการเรียงตัวของเซลล์ของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่คัดเลือกเพื่อทดลองพัฒนาเป็นกล้าเชื้อหญ้าหมัก (ย้อมสีเซลล์แบคทีเรียแบบแกรม และถ่ายภาพจาก Light microscope)..... 31

รูปที่ 3.3 รูปร่างของเซลล์แบคทีเรียที่คัดเลือกเพื่อพัฒนาเป็นกล้าเชื้อ จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (Scanning electron microscope; SEM)..... 35

รูปที่ 3.4 ตัวอย่างผลการทดสอบสมบัติทางชีวเคมีตามระบบ API 50 CHL (Biomèrieux) ของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือก..... 37

รูปที่ 3.5 แบบแผน RAPD ของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่นำมาคัดเลือกเป็นกล้าเชื้อเมื่อใช้ Primer 3..... 41

รูปที่ 3.6 การเจริญของแบคทีเรียกล้าเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่มีน้ำตาลทรายแทนกลูโคสและเติมแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 1.0-5.0% ทดแทนแหล่งไนโตรเจนหลัก..... 53

รูปที่ 3.7 กราฟการเจริญของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่คัดเลือกเพื่อทดลองพัฒนาเป็นกล้าเชื้อหญ้าหมัก 11 สายพันธุ์..... 60

รูปที่ 3.8 การเก็บรักษาการมีชีวิตของแบคทีเรียที่คัดเลือกด้วยเทคนิคการทำแห้งแบบเยือกแข็ง.... 60

รูปที่ 3.9 การเตรียมกล้าเชื้อในรูปแบบเชื้อแห้งบรรจุในถุงพลาสติก..... 62

รูปที่ 3.10 ฤทธิ์ของเครื่องเทศกระเทียมต่อกล้าเชื้อ..... 66

รูปที่ 3.11 ฤทธิ์ของเครื่องเทศขิงต่อกล้าเชื้อ..... 67

รูปที่ 3.12 ฤทธิ์ของเครื่องเทศข่าต่อกล้าเชื้อ..... 68

รูปที่ 3.13 การเตรียมกล้าเชื้อในรูปแบบแห้งแบบลูกแป้ง..... 69

รูปที่ 3.14 การอยู่รอดของแบคทีเรียกล้าเชื้อ *Lactobacillus brevis* SUTC-SL17 และ *L. plantarum* SUTC-T1R28 ในรูปแบบเชื้อแห้งบรรจุในถุงพลาสติก ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 วัน..... 73

รูปที่ 3.15 การทดสอบการอยู่รอดของแบคทีเรียกล้าเชื้อในรูปแบบเชื้อแห้งที่มีกากถั่วเหลืองเป็นสารตัวกลาง บรรจุในถุงพลาสติก เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน..... 74

สารบัญภาพ (ต่อ)

หน้า

รูปที่ 3.16 การอยู่รอดของแบคทีเรียกล้าเชื้อ *Lactobacillus brevis* SUTC-SL17 และ *L. plantarum* SUTC-T1R28 ในรูปแบบลูกแป้ง ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 วัน..... 76
รูปที่ 3.17 หญ้าเนเปียร์สดใช้ทดลองหมักหญ้า..... 78
รูปที่ 3.18 การทดลองหมักหญ้าโดยใช้หญ้าเนเปียร์และกล้าเชื้อแบคทีเรียในรูปแบบที่พัฒนาได้.... 79
รูปที่ 3.19 ลักษณะของหญ้าเนเปียร์หมัก 21 วัน ที่ทดลองผลิตในฟาร์มเกษตรกรผู้เลี้ยงโค จากการหมักที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อและเติมกล้าเชื้อแบคทีเรีย..... 80
รูปที่ 3.20 โคโลนีของแบคทีเรียอายุ 48 ชั่วโมง แยกจากหญ้าเนเปียร์หมัก 21วัน ที่ผลิตโดยไม่เติมกล้าเชื้อและเติมกล้าเชื้อแบคทีเรีย..... 83
รูปที่ 3.21 แบบแผน RAPD ของแบคทีเรียกล้าเชื้อและแบคทีเรียที่ตรวจพบในหญ้าหมักเมื่อใช้ Primer 3……..……..... 87

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

หญ้าหมัก (Silage) จัดเป็นอาหารหยาบที่สำคัญสำหรับใช้ในการเลี้ยงโคในที่ขาดแคลนพืชสดในช่วงฤดูหนาวและฤดูแล้ง ซึ่งปัญหาการขาดแคลนพืชอาหารหยาบในช่วงฤดูหนาวและฤดูแล้งเป็นปัญหาที่เกษตรกรผู้เลี้ยงโคในประเทศไทยและอีกหลายประเทศพบเสมอ โดยเฉพาะเกษตรกรที่อาศัยน้ำฝนเป็นหลัก ในกรณีโคนมนั้นการให้โคนมได้รับอาหารหยาบคุณภาพดีจะช่วยให้โคให้น้ำนมได้ดีและเป็นน้ำนมที่มีคุณภาพดี จำหน่ายได้ราคาดี และยิ่งกว่านั้นถ้าได้อาหารหยาบที่มีคุณภาพดีจะช่วยลดค่าใช้จ่ายในการเสริมอาหารข้นซึ่งมีราคาแพงลงได้ การผลิตหญ้าหมักที่มีคุณภาพขึ้นอยู่กับคุณภาพของวัตถุดิบพืชอาหารสัตว์ที่นำมาใช้ทำพืชหมัก (ซึ่งควบคุมได้) และกรรมวิธีการหมัก การหมักพืชนี้เกิดได้โดยอาศัยจุลินทรีย์ตามธรรมชาติ และการผลิตหญ้าหมักในประเทศไทยยังคงอาศัยกิจกรรมของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนอยู่กับวัตถุดิบเป็นหลัก อย่างไรก็ตามในต่างประเทศมีการใช้กล้าเชื้อหรือหัวเชื้อเพื่อช่วยให้ได้ผลิตภัณฑ์หญ้าหมักที่มีคุณภาพดี และมีการผลิตกล้าเชื้อขึ้นจำหน่ายเป็นการค้า (Rooke, 1991; Kemin, 2004) ซึ่งกล้าเชื้อที่จำหน่ายนั้นใช้สายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแล็กติกเป็นหลัก แบคทีเรียกรดแล็กติกเป็นจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในการผลิตหญ้าหมักเนื่องจากความสามารถในการผลิตกรด และบางชนิดยังผลิตสารที่มีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเน่าเสียของวัสดุเกษตรและจุลินทรีย์ก่อโรค ดังนั้นผลดีจากการใช้กล้าเชื้อหรือหัวเชื้อคือ ระยะเวลาการหมัก (การเกิดกรด) สั้นกว่าการผลิตโดยอาศัยจุลินทรีย์ในธรรมชาติ ซึ่งช่วยป้องกันการสูญเสียคุณค่าทางอาหารของผลผลิตได้ดีกว่าการหมักโดยอาศัยจุลินทรีย์ตามธรรมชาติ

สำหรับประเทศไทยมีการนำเข้ากล้าเชื้อจากต่างประเทศมาทดลองใช้บ้างแล้ว ดังเช่นในระดับงานวิจัย มีรายงานการนำกล้าเชื้อหญ้าหมักซึ่งเป็นสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่เป็นการค้า (Commercial inoculant) จากต่างประเทศมาศึกษาการผลิต Silage ในประเทศไทย ที่ได้ผลโดยสรุปคือกล้าเชื้อมีความสามารถในการให้ผลผลิตที่มีคุณภาพดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และการเจริญของเชื้อลดลงอย่างมากพร้อมทั้งไม่ให้ผลผลิตที่มีคุณภาพเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นถึง 45 องศาเซลเซียส (Ohmomo *et al*., 2004a และ 2004b) ซึ่งถ้าพิจารณาการหมักวัสดุเกษตรหรือชีวภาพโดยทั่วไปในประเทศไทยที่ไม่ลงทุนสร้างถังหมักหรือโรงเรือนที่ควบคุมอุณหภูมิแล้ว ในระหว่างกระบวนการหมักในสภาพปิดของบ่อหมักเพื่อลดปริมาณออกซิเจนนั้น อุณหภูมิภายในกองวัสดุหมักอาจสูงถึง 40-45 องศาเซลเซียส ได้อย่างปกติ

ด้วยประโยชน์ของกล้าเชื้อหญ้าหมักดังกล่าวข้างต้นนี้ และลดการนำเข้ากล้าเชื้อจากต่างประเทศพร้อมทั้งแก้ปัญหาความไม่เหมาะสมของสายพันธุ์กล้าเชื้อนำเข้าเพื่อการผลิตหญ้าหมักในสภาพภูมิอากาศของประเทศไทยที่ไม่จำเป็นต้องสร้างโรงเรือนควบคุมอุณหภูมิสำหรับการผลิต ประกอบกับผู้วิจัยได้มีส่วนร่วมในการศึกษาถึงความหลากหลายของสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่พบในหญ้าหมักหรือ Silage

จากแหล่งผลิตในประเทศไทย ซึ่งเป็นสายพันธุ์ท้องถิ่นและเอื้ออำนวยในการพัฒนากล้าเชื้อหรือหัวเชื้อเพื่อใช้ในการผลิตหญ้าหมักหรือ Silage และยังพบสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่มีแนวโน้มที่จะใช้เป็น Probiotics (จุลินทรีย์ที่มีชีวิตที่ให้กับคนหรือสัตว์เพื่อประโยชน์ในแง่การปรับปรุงสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารให้ดีขึ้น ซึ่งส่งผลให้คนหรือสัตว์นั้นมีสุขภาพดีขึ้น) สำหรับโค อีกทั้งได้ทดลองใช้แบคทีเรียสายพันธุ์ที่ได้จากการศึกษานี้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตหญ้าหมักทั้งที่ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และกองอาหารสัตว์ อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา ซึ่งก็มีปัญหาในการเตรียมรูปแบบของกล้าเชื้อเพื่อใช้ประโยชน์เนื่องจากการใช้อาหารเหลว MRS medium (MERCK, Merck KgaA, Germany) ซึ่งมีราคาสูงยังคงเป็นทางเลือกที่ดีที่สุด และต้องดูแลเชื้อในระหว่างรอใช้ประโยชน์ ผู้วิจัยจึงประสงค์ที่จะพัฒนารูปแบบของกล้าเชื้อหญ้าหมักที่ใช้ประโยชน์ได้ง่าย ต้นทุนการผลิตต่ำ และพร้อมเพิ่มระดับการผลิตและใช้ประโยชน์โดยฟาร์มขนาดเล็กหรือเกษตรกรผู้เลี้ยงโค

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อให้ได้สภาวะที่เหมาะในการเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณกล้าเชื้อและได้กล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกสายพันธุ์ที่พบในประเทศไทยในรูปแบบที่สามารถใช้สำหรับการผลิตหญ้าหมักที่มีคุณภาพเพื่อเป็นอาหารสัตว์ได้ง่าย และมีแนวโน้มในการผลิต Probiotics (จุลินทรีย์ที่มีชีวิตที่ให้กับสัตว์เพื่อประโยชน์ในแง่การปรับปรุงสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารให้ดีขึ้น ซึ่งส่งผลให้สัตว์นั้นมีสุขภาพดีขึ้น) ด้วยในผลผลิตอาหารสัตว์ชนิดเดียว

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

การดำเนินงานของโครงการวิจัยนี้เป็นการพัฒนารูปแบบของกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกจากที่ผู้วิจัยได้มีส่วนร่วมในการศึกษาและคัดเลือกแบคทีเรียกรดแล็กติกสายพันธุ์เด่นที่พบในหญ้าหมักที่ผลิตในประเทศไทยและมีแนวโน้มว่าเป็นสายพันธุ์ที่เหมาะสมด้านการใช้เป็น Probiotics สำหรับโคด้วยในผลิตภัณฑ์อาหารสัตว์ชนิดเดียว (สุรีลักษณ์ รอดทอง และคณะ, 2545; สุรีลักษณ์ รอดทอง และ วิศิษฐิพร สุขสมบัติ, 2545) เพื่อประสิทธิภาพในการใช้ประโยชน์ทรัพยากรจุลินทรีย์และสร้างมูลค่าเพิ่มให้ผลผลิต โดยนำแบคทีเรียกรดแล็กติกสายพันธุ์ที่เลือกเป็นกล้าเชื้อมาพัฒนาเป็นรูปแบบของกล้าเชื้ออาจเป็นกล้าเชื้อชนิดเดียวและ/หรือเชื้อผสม ซึ่งได้จากการทดลองเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีส่วนประกอบที่เตรียมง่าย ต้นทุนการผลิตต่ำ ให้การเจริญของแบคทีเรียกรดแล็กติกสายพันธุ์นั้นๆ ดีในการผลิตเชื้อ และทดลองหารูปแบบและวิธีการเก็บเพื่อการใช้ประโยชน์ รวมถึงการอยู่รอดในเบื้องต้นของกล้าเชื้อนั้น

1.4 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

ประโยชน์ที่ได้จากผลสำเร็จของการวิจัยที่ได้รับ มีดังนี้

1) กล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกสายพันธุ์ที่พบในประเทศไทยในรูปแบบที่สามารถใช้สำหรับการ

ผลิตหญ้าหมักที่มีคุณภาพเพื่อเป็นอาหารสัตว์ได้ง่าย เพื่อให้ฟาร์มขนาดเล็กหรือเกษตรกรผู้เลี้ยงโครายย่อยได้ใช้ประโยชน์ในระยะแรก ส่งผลถึงการเพิ่มศักยภาพการเป็นครัวโลกของประเทศไทย และสนับสนุนการใช้ทรัพยากรจุลินทรีย์ของประเทศให้เป็นประโยชน์ทางเศรษฐกิจ โดยไม่ขาดดุลทางการค้าในการสั่งซื้อหัวเชื้อหรือกล้าเชื้อหญ้าหมักจากต่างประเทศ

2) องค์ความรู้ใหม่ของสภาวะที่เหมาะในการเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณกล้าเชื้อและกรรมวิธีการผลิตรูปแบบของกล้าเชื้อที่เป็นเทคนิคเฉพาะทางที่พัฒนาขึ้นเองเพื่อให้เหมาะกับสายพันธุ์เฉพาะของแบคทีเรียและให้ผลทางเศรษฐกิจโดยตรง

3) ผลงานวิจัยที่ช่วยเพิ่มความเข้มแข็งทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และเป็นประโยชน์ต่อองค์กรและเกษตรกรผู้เลี้ยงโค

4) ผลผลิตนักวิจัยรุ่นใหม่ที่มีประสบการณ์จากการเป็นผู้ช่วยนักวิจัย

1.5 ทฤษฎีและกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

การผลิตหญ้าหมัก (Silage) ซึ่งเป็นอาหารหยาบที่สำคัญสำหรับใช้ในการเลี้ยงโคในช่วงขาดแคลนพืชสดในฤดูหนาวและฤดูแล้งที่มีคุณภาพ ขึ้นอยู่กับคุณภาพของวัตถุดิบพืชอาหารสัตว์ที่นำมาใช้ทำหญ้าหมักและกรรมวิธีการหมัก ซึ่งการหมักนี้เกิดได้โดยอาศัยจุลินทรีย์ตามธรรมชาติ และถ้ามีการใช้กล้าเชื้อทำให้สามารถลดปัญหาหญ้าหมักที่มีคุณภาพต่ำและไม่คงที่ และเสียได้ง่าย การวิจัยครั้งนี้จึงมุ่งที่จะให้ได้สภาวะที่เหมาะในการเพิ่มปริมาณกล้าเชื้อและรูปแบบของกล้าเชื้อเพื่อการผลิตหญ้าหมักในประเทศไทยหรือในเขตร้อน ซึ่งรูปแบบกล้าเชื้อที่จะพัฒนานี้ อาจเป็นเชื้อชนิดเดียวและ/หรือเชื้อผสมของแบคทีเรียกรดแล็กติกจากที่ผู้วิจัยได้มีส่วนร่วมในการศึกษาและคัดเลือกแบคทีเรียกรดแล็กติกสายพันธุ์เด่นที่พบในหญ้าหมักที่ผลิตในประเทศไทยและมีแนวโน้มว่าเป็นสายพันธุ์ที่เหมาะสมด้านการใช้เป็น Probiotics สำหรับโคด้วยในผลิตภัณฑ์อาหารสัตว์ชนิดเดียว (สุรีลักษณ์ รอดทอง และคณะ, 2545; สุรีลักษณ์ รอดทอง และ วิศิษฐิพร สุขสมบัติ, 2545) เพื่อประสิทธิภาพในการใช้ประโยชน์ทรัพยากรจุลินทรีย์และสร้างมูลค่าเพิ่มให้ผลผลิต และในรูปแบบเชื้อแห้งบรรจุในภาชนะปิดหรืออาจเป็นแบบลูกแป้งที่มีการใช้ในการหมักข้าวหมากหรือเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์พื้นบ้านของไทย เช่น ตาม พิไลพรรณ พงษ์บูล (2523) ที่ใช้เครื่องเทศหรือสมุนไพรไทยมาเป็นองค์ประกอบของการทำลูกแป้งข้าวหมาก หรือเป็นรูปแบบตามที่ผู้วิจัยได้มีส่วนร่วมในการพัฒนาหัวเชื้อเพื่อการผลิตอาหารสัตว์โปรตีนสูงจากวัสดุเหลือทิ้งจากโรงงานแป้งมันสำปะหลังมาแล้ว (Chumkhunthod *et al*., 2001)

1.6 ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

หญ้าหมัก หรือ Silage เป็นอาหารสัตว์ซึ่งได้จากกระบวนการหมักพืชที่เกิดจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ที่มีความสามารถสร้างกรดชนิดที่ช่วยในการถนอมพืชอาหารสัตว์ หญ้าหมักจัดเป็นอาหารหยาบที่สำคัญที่ใช้ในการเลี้ยงโคและกระบือในช่วงฤดูหนาวและฤดูแล้งซึ่งขาดแคลนพืชอาหารหยาบ และให้ผลผลิตสัตว์ที่ดีกว่าการใช้ฟางข้าวและหญ้าแห้งเป็นอาหารหยาบหลัก เนื่องจากฟางข้าวและหญ้าแห้งเป็น

อาหารหยาบที่มีคุณภาพต่ำ (บุญล้อม ชีวะอิสระกุล, 2541) เมื่อนำมาใช้เลี้ยงโคนม เกษตรกรจำเป็นต้องเสริมอาหารข้นสำหรับเลี้ยงโคนมมากขึ้น ทำให้มีต้นทุนการผลิตเพิ่มขึ้น ยังผลให้รายได้จากการจำหน่ายน้ำนมลดลงไปด้วย การทำหญ้าหมักหรือพืชหมักซึ่งโดยปกติอาศัยกิจกรรมของจุลินทรีย์ที่อยู่กับพืชสดโดยธรรมชาตินั้น ช่วยในการเก็บพืชสดที่มีอย่างเหลือเฟือในช่วงฤดูฝนไว้ให้สัตว์กินในฤดูหนาวและฤดูแล้งโดยยังมีคุณค่าทางอาหารใกล้เคียงกับพืชสด

ตามรายงานจากสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตรปี 2547 และ 2550-2552 ประเทศไทยมีจำนวนโคเนื้อทั้งสิ้น 5,048,170; 6,480,876; 6,699,999 และ 6,647,325 ตัว และโคนม 392,625; 495,236; 493,893 และ 495,410 ตัว ตามลำดับ ส่วนใหญ่เป็นโคที่เลี้ยงในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2547 และ 2552) ซึ่งก็มีความต้องการพืชอาหารสัตว์สำหรับโคและกระบือในปริมาณที่เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจากอดีตถึงปัจจุบัน เห็นได้จากรายงานของสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร (2547 และ 2552) ที่มีการพัฒนาเพื่อเพิ่มการผลิตผลผลิตข้าวโพดอาหารสัตว์เนื่องจากความต้องการในปี พ.ศ. 2544, 2545 และ 2546 ซึ่งได้เท่ากับ 588, 598 และ 590 กิโลกรัมต่อไร่ และปี พ.ศ. 2550, 2551 และ 2551 ซึ่งได้เท่ากับ 611, 635 และ 639 กิโลกรัมต่อไร่ ตามลำดับ ดังนั้นการผลิตหญ้าหมักหรือ Silage จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่ทำให้ได้อาหารสัตว์ที่เพียงพอกับความต้องการใช้ในทุกฤดูกาลหรือลดปัญหาการขาดแคลนพืชอาหารสัตว์ในฤดูแล้งในบางพื้นที่ ดังตัวอย่างเช่น เกษตรกรในภาคเหนือที่พยายามผลิต Silage จากต้น เปลือก และฝักข้าวโพดอ่อนที่เหลือจากโรงงาน โดยหมักในภาชนะที่สานด้วยไม้ไผ่และกรุด้วยพลาสติกตามที่ได้รับการแนะนำจากศูนย์วิจัยพืชอาหารสัตว์ จังหวัดลำปาง สามารถผลิต Silage ที่ช่วยบรรเทาความเดือดร้อนในช่วงที่ขาดแคลนพืชอาหารสัตว์ในฤดูแล้งได้

จุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในการผลิตหญ้าหมักคือ แบคทีเรียในกลุ่มแบคทีเรียกรดแล็กติก (Lactic acid bacteria) เนื่องจากความสามารถในการสร้างกรดชนิด Lactic acid เป็นผลผลิตหลักในการเจริญ กรดที่เกิดในกระบวนการหมักเป็นสารช่วยในการถนอมอาหาร ซึ่งแบคทีเรียกรดแล็กติกที่มีบทบาทสำคัญในการผลิต Silage อยู่ในสกุล *Lactobacillus* และ *Pediococcus* (Hill and Hill, 1986; Cai *et al*., 1999) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Lactobacillus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่พบทั้ง Microaerophiles และ Anaerobes การเจริญมักถูกกระตุ้นด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ (Carbon dioxide) 5% อุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญอยู่ในช่วง 30-40 องศาเซลเซียส เป็นพวก Chemoorganotrophs ที่ต้องการธาตุอาหารสมบูรณ์ และสร้าง Lactic acid เป็นผลผลิตหลัก (อย่างน้อย 50%) จากการใช้กลูโคสและคาร์โบไฮเดรทอื่นๆ โดย Fermentative metabolism แบคทีเรียในสกุลนี้ยังแบ่งย่อยได้เป็นอีก 2 พวกหลักตาม Fermentation pathway คือพวกที่มี Homolactic fermentation ซึ่งผลิต Lactic acid เท่านั้นเป็นผลผลิตจากการใช้น้ำตาล และพวกที่มี Heterolactic fermentation ซึ่งเป็นพวกที่ใช้น้ำตาลแล้วเกิด Lactic acid และผลผลิตอื่นด้วย ได้แก่ Acetic acid, Ethanol, Carbon dioxide, Formic acid (Axelsson, 1998) พบ Lactobacilli ได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะอย่างยิ่งเป็น Normal microflora ในพืชและสัตว์ ซึ่งตามปกติมีถิ่นที่อยู่อาศัยเป็นระบบทางเดินอาหารของสัตว์เลือดอุ่นและนก (Kandler and

Weiss, 1986; Holt *et al*., 1994) ซึ่ง *Lactobacillus* species ที่พบใน Silage ตามที่มีรายงานได้แก่ *Lactobacillus brevis*, *L. buchneri*, *L. casei*, *L. coryniformis*, *L. curvatus*, *L. fermentum*, *L. plantarum* (Kandler and Weiss, 1986; Brookes and Buckle, 1992)

กรณี Silage ที่ผลิตโดยอาศัยกิจกรรมของจุลินทรีย์ตามธรรมชาติในประเทศไทยนั้น มีรายงานเกี่ยวกับแบคทีเรียกรดแล็กติกชนิดเด่นที่พบ ทั้ง Sorghum silage, Grass silage และ Corn silage คือ *Lactobacillus plantarum*, *L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. casei*, *L. delbrueckii*, *L. farciminis*, *L. fermentum*, *L. fructosus* และ *L. gasseri* (สุรีลักษณ์ รอดทอง และคณะ, 2545) และเมื่อศึกษาความหลากหลายของสายพันธุ์ของ Lactobacilli ชนิดเด่นด้วยวิธี Random amplified polymorphic DNA (RAPD) พบว่า *Lactobacillus plantarum* มีความหลากหลายของสายพันธุ์อย่างน้อย 8 สายพันธุ์ Lactobacilli ชนิดที่มีความหลากหลายของสายพันธุ์อย่างน้อย 3 สายพันธุ์คือ *L. casei* และ *L. fermentum* และชนิดที่มีความหลากหลายของสายพันธุ์อย่างน้อย 2 สายพันธุ์คือ *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. delbrueckii* และ *L. gasseri* (สุรีลักษณ์ รอดทอง และคณะ, 2545) ซึ่ง Lactobacilli บางชนิด ได้แก่ *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei* และ *L. delbrueckii* มีรายงานการใช้เพื่อผลิต Probiotics สำหรับสัตว์ (Fuller, 1992; Tannock, 1992)

วัตถุดิบที่มีการนำมาใช้ผลิต Silage มีทั้ง หญ้า ข้าวโพดและข้าวฟ่าง (รวมลำต้นและใบ) เมล็ดธัญพืช ฟางข้าว และพืชตระกูลถั่ว (Allen, 1990; Gillespie 1992) ซึ่งพืชที่นำมาผลิต Silage ที่มีคุณภาพดี ควรมีปริมาณน้ำตาลสูง อย่างน้อยควรมีประมาณ 3% ขณะที่มีการตัด (Allen, 1990) และในการผลิต Silage อาจใช้วัตถุดิบ (พืช) ชนิดเดียวหรือหลายชนิดผสมกันก็ได้ เช่น หญ้าผสมกับพืชตระกูลถั่ว (Gillespie, 1992) โดยบรรจุวัตถุดิบในภาชนะบรรจุได้หลายรูปแบบ ได้แก่ บ่อหมัก (บ่อดินหรือบ่อซีเมนต์) ถังหมัก (Bucket) ฉาง (เช่น ชนิด Airtight silo) ห่อหรือม้วน (Bale) ขนาดใหญ่หรือภาชนะบรรจุที่ลดการแพร่ของออกซิเจน (อากาศ) ไปยังวัตถุดิบในระหว่างที่มีการหมักโดยจุลินทรีย์ ทั้งนี้เพื่อให้เกิดสภาพไร้ออกซิเจน (Anaerobic condition) มากที่สุด การผลิต Silage มักอาศัยการหมักพืชตามธรรมชาติ โดยจุลินทรีย์ที่มีหรือปนเปื้อนมากับวัตถุดิบ และอาจเติมแหล่งอาหารเสริมสำหรับจุลินทรีย์ เช่นเติมกากน้ำตาล (Molasses) การผลิต Silage โดยอาศัยการหมักตามธรรมชาตินี้มักได้ผลผลิตที่มีคุณภาพไม่แน่นอน แต่ยังเป็นวิธีที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันรวมถึงในประเทศไทย

Silage ที่มีคุณภาพดีควรมีค่าความเป็นกรดด่าง (pH) อยู่ในช่วง 4.0-4.5 (Allen, 1990) กรณี Grass silage และ Legume silage ควรมีปริมาณความชื้น (Moisture content) อยู่ในช่วง 50-65% (Gillespie, 1992) และมี Crude protein content ประมาณ 15-20% Silage ที่ผลิตเพื่อเลี้ยงโคหรือกระบือควรมีค่า Digestibility (D) สูงกว่า 0.63 มีน้ำหนักแห้งอย่างน้อย 25% และมีกลิ่นหอมของการหมักที่เกิดขึ้นโดย Lactic acid bacteria (Allen, 1990)

การผลิต Silage ในรูปแบบที่พัฒนาขึ้นนั้นมีการใช้กล้าเชื้อหรือหัวเชื้อ (Inoculant หรือ Starter culture) ตัวอย่างเช่น ในสหราชอาณาจักรและสหรัฐอเมริกา มีการผลิตหัวเชื้อ Silage เป็นการค้า

(Rooke, 1991; Kemin, 2004; Livestock Nutritional Services, 2011) ผลดีจากการใช้หัวเชื้อคือ ระยะเวลาการหมัก (การเกิดกรด) สั้นกว่าการผลิตโดยอาศัยจุลินทรีย์ในธรรมชาติ ซึ่งช่วยป้องกันการสูญเสียคุณค่าทางอาหารของผลผลิตได้ดีกว่าการหมักตามธรรมชาติ กรณีการผลิตที่มีการเติมหัวเชื้ออาจมีการเติมเอนไซม์ที่ย่อยสารประกอบคาร์โบไฮเดรท และ/หรือเอนไซม์ที่ย่อยเซลลูโลสลงไปก่อนเติมหัวเชื้อ กรณีหัวเชื้อพบว่าแบคทีเรียในกลุ่ม Lactobacilli เป็นจุลินทรีย์ที่นิยมใช้เป็นหัวเชื้อในการผลิต Silage และที่มีรายงานการใช้มากคือ *Lactobacillus plantarum* (Hill and Hill, 1986; Cocconcelli *et al*., 1991; Flores, 1991; Rooke, 1991; Fitzsimons *et al*., 1992; Sharp *et al*., 1992; Weinberg *et al*., 1993; Emanuel *et al*., 2005; Vázquez *et al*., 2010)

Cocconcelli *et al*. (1991) รายงานการใช้ *Lactobacillus plantarum* L30 และ *Lactobacillus plantarum* L40 และ *Pediococcus pentosus* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ทนต่อออกซิเจน เป็นหัวเชื้อในการผลิต Silage และความพยายามในการผลิต Silage อย่างมีประสิทธิภาพจากวัตถุดิบที่มีสารประกอบคาร์โบ-ไฮเดรทที่มีโครงสร้างซับซ้อน มีปริมาณสูง และย่อยสลายยากโดยจุลินทรีย์ เช่น แป้ง และ เซลลูโลส เป็นต้น

การย่อยสารประกอบคาร์โบไฮเดรทประเภทแป้ง เป็นเป้าหมายหลักในการผลิต Silage จากข้าวโพด ข้าวฟ่าง และเมล็ดธัญพืช ซึ่งให้คุณค่าทางอาหารสูงกว่า Grass silage ได้มีรายงานการสร้าง Prototype recombinant strain ของ *Lactobacillus plantarum* โดยบรรจุ Gene ที่บงการการสร้าง α-Amylase ใน Plasmid ของแบคทีเรียดังกล่าว แต่สภาพความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่แบคทีเรียเจริญได้ดีไม่สอดคล้องกับสภาพที่เหมาะสมกับการแสดงออกของ Gene ที่สร้าง α-Amylase และการทำงานของเอนไซม์นั้น (Scheirlinck *et al*., 1989; Jones and Warner, 1990) นอกจากนี้การย่อยแป้งที่ได้ผลผลิตน้ำตาล ต้องการชุดของเอนไซม์ α-Amylase, β-Amylase และ Debranching enzymes

สำหรับการย่อยเซลลูโลสที่เป็นส่วนประกอบหลักของพืช เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นอย่างช้าๆ และเกี่ยวข้องกับ complex interaction ของเอนไซม์ แหล่งของเอนไซม์ที่ย่อยเซลลูโลสที่สำคัญคือ จุลินทรีย์ทั้งแบคทีเรียและรา ซึ่งในการผลิต Silage ยังพบว่ามีการเติมเอนไซม์ α-1,4 Endogluconase (Carboxy methyl cellulase) เพื่อช่วยย่อยสลายเซลลูโลส นอกจากนี้ยังมีรายงานการปรับปรุงสายพันธุ์ของ *Lactobacillus plantarum* โดยสร้าง Prototype strain ที่มี Gene ซึ่งเกี่ยวข้องกับ Endogluconase activity อยู่ที่ Chromosome (Bates *et al*., 1989) ข้อจำกัดของประสิทธิภาพของแบคทีเรียดังกล่าวอยู่ที่สภาพความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการเจริญของแบคทีเรียและกิจกรรมของเอนไซม์ ทำนองเดียวกับสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ย่อยแป้งดังกล่าวข้างต้น

Nadeau *et al*. (2000) พบว่าการเติมเอนไซม์ Cellulase (2 มิลลิลิตรต่อกิโลกรัม; 2500 IU ต่อมิลลิลิตร) จาก *Trichoderma longibrachiatum* ที่ผลิตเป็นการค้า ลงในกระบวนการผลิต Silage จาก Orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) และ Alfalfa (*Medicago sativa* L.) ทำให้กระบวนการหมักดีขึ้นและดียิ่งขึ้น (กระตุ้น Homolactic fermentation) เมื่อใช้ร่วมกับหัวเชื้อ (*Lactobacillus plantarum* และ

Pediococcus cerevisiae) แต่ถ้าเติม Formic acid เพิ่มลงไปกระบวนการหมัก มีผลให้ปริมาณกรดทั้งหมดที่เกิดขึ้นลดลงกว่าที่ไม่เติม เนื่องจาก Formic acid จำกัดกระบวนการหมักน้ำตาลในวัสดุหมัก

Cai *et al*. (1997) ได้ทดลองใช้ Additives ที่เติมลงในข้าวฟ่าง (*Sorghum bicolor*) ที่ใช้ผลิต Silage ดังนี้ (1) *Lactobacillus casei* LC-10 ซึ่งเป็น Lactic acid bacterium ที่ทนเกลือ (NaCl) (2) *Lactobacillus plantarum* LP-15 ซึ่งเป็น Lactic acid bacterium อีกสายพันธุ์หนึ่งที่ทนเกลือ (3) เกลือ (NaCl) 40 กรัมต่อกิโลกรัมของข้าวฟ่างสด (4) เกลือและ *Lactobacillus casei* LC-10 (5) เกลือและ *Lactobacillus plantarum* LP-15 เปรียบเทียบกับการหมักข้าวฟ่างที่ไม่เติมใดๆ (Control silage) พบว่าในช่วงแรกของการหมักมีปริมาณ Lactic acid bacteria ในข้าวฟ่างหมักที่เติมทุก Additives สูงกว่า Control silage อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) และระหว่างกระบวนการหมัก Silage นั้น ทั้งที่มีการเติมเกลือหรือการเติม Lactic acid bacteria สามารถยับยั้งการเจริญของ Aerobic bacteria และ Clostridia ได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่ไม่มีผลยับยั้งการเจริญของยีสต์ และทุกการทดลองที่เติม Additives มีค่า pH, Ammonia-nitrogen content, Dry matter loss และการผลิตก๊าซ ต่ำกว่า Control silage อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) แต่มี Lactic acid content และ Residual water soluble carbohydrates สูงกว่า Control silage อย่างมีนัยสำคัญ คุณภาพที่ดีของผลิตภัณฑ์ Silage ที่ได้เรียงเป็นลำดับตาม Additives ที่เติม ได้ดังนี้ LC-10 ใกล้เคียงกับ LP-15 ซึ่งดีกว่า เกลือและ *Lactobacillus casei* LC-10 (NaCl+LC-10) หรือ เกลือและ *Lactobacillus plantarum* LP-15 (NaCl+LP-15) ซึ่งดีกว่า เกลือ (NaCl) และดีกว่า การหมักข้าวฟ่างที่ไม่เติมใดๆ (Control silage) ตามลำดับ

Kung *et al*. (2000) รายงานถึงการเติม Ammonia-N (0.3%) หรือ Propionic acid preservative (0.3%) ลงในระหว่างกระบวนการผลิต Corn silage ทำให้จำนวนของยีสต์และราที่ปนเปื้อนใน Silage ลดลงอย่างรวดเร็ว จำนวนของ Enterobacteria ลดลงอย่างช้าๆ และไม่มีผลต่อจำนวนของ Lactic acid bacteria แต่มีการเจริญช้าลง เมื่อเปรียบเทียบกับการผลิต Silage ที่ไม่เติมใดๆ (Control) การเติม Ammonia-N (0.3%) มีผลให้ค่า pH เพิ่มเป็นด่าง (ประมาณ 8-9) ในวันแรกของการเติมและลดลงเป็นกรด (ประมาณ 5-6) ในวันต่อมา และคงที่ประมาณ pH 4-4.5 ตลอดช่วงของการหมัก Corn silage ที่ได้จากการหมักนาน 106 วัน ชนิดที่เติม Ammonia-N และที่เติม Propionic acid preservative ทนต่อการเสียในสภาพมีออกซิเจน (Aerobic stability) ได้นานกว่า Control คือทนได้นาน 82, 69 และ 32.3 ชั่วโมง ตามลำดับ

ปัญหาในการผลิต Silage เกิดขึ้นได้ง่าย เนื่องจากจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนหรือการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ ซึ่งก่อให้เกิดการเสียของ Silage ได้คือ Anaerobic spoilage พบว่าส่วนใหญ่เกิดจากแบคทีเรียกลุ่ม Clostridia ย่อยสลายสารอาหาร โดยเฉพาะอย่างยิ่งโปรตีนในวัสดุหมัก แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถปนเปื้อนมาจากดิน ปนเปื้อนกับวัตถุดิบที่ใช้ในการหมักและอุปกรณ์ที่เกี่ยวข้อง และ Aerobic spoilage ที่เกิดจากยีสต์และราซึ่งปนเปื้อนจากอากาศ ทั้งในระหว่างกระบวนการผลิตที่มีการสัมผัสอากาศมาก และระหว่างการให้ Silage แก่สัตว์เลี้ยง เชื้อราที่มักพบปนเปื้อนใน Silage ได้แก่

Aspergillus, *Monascus* และ *Penicillium* ราชนิดหนึ่งที่พบได้เป็นปกติคือ *Penicillium roqueforti* ที่สามารถสร้าง Secondary metabolites เช่น Roquefortine C, Isofumiclavines A และ B, PR toxin, Macrofortines และ Mycophenolic acid เป็นต้น (Pelhate, 1977; Cole and Cox, 1981; Nout *et al*., 1993; Frisvad and Thrane, 1996) และมีรายงานการตรวจพบ Roquefortine C บ่อยครั้งใน Silage (Häggblom, 1990; Auerbach *et al*., 1998; Tüller *et al*., 1998) ซึ่งไม่เป็นผลดีต่อสัตว์ที่บริโภค

มีข้อวิจารณ์ว่า Silage ที่ได้จากการหมักด้วย Homolactic inoculant นั้นจะเสียในสภาพมีอากาศ (aerobic spoilage) ซึ่งส่วนใหญ่เกิดขึ้นโดยกิจกรรมของยีสต์ในระหว่างการเก็บ ได้ง่ายกว่า Silage ที่หมักโดยธรรมชาติ เนื่องจาก Silage ที่หมักโดยธรรมชาตินั้นมีกรดหลายชนิดเช่น Acetic acid, Propionic acid, Butyric acid เกิดขึ้นด้วย และกรดเหล่านี้มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของยีสต์และรา (Weinberg *et al*.,1993)

Weinberg *et al*. (1993) รายงานผลของการใช้ Lactic acid bacteria inoculants ที่ผลิตเป็นการค้าต่อการคงตัวในสภาพที่มีออกซิเจน (อากาศ) (Aerobic stability) ของ Silage ในห้องปฏิบัติการ พืชที่นำมาใช้ผลิต Silage มีทั้ง เมล็ดข้าวสาลี (Wheat) ต้นข้าวโพดและข้าวฟ่าง โดยตัดพืชเป็นชิ้นและบรรจุใน Anaerobic jar ขนาด 1.5 ลิตร หัวเชื้อ (Inoculant) ที่ใช้ มี 3 ชุด คือ ชุดที่ 1 เป็น H/M F inoculant No. 9927 (Medipharm, U.S.A.) ประกอบด้วยเชื้อแห้งผง (powder) ที่มีจำนวนต่ำสุด $5x10^9$ CFU ต่อกรัมของเชื้อแห้ง ของเชื้อผสม *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecium* และ *Pediococcus acidilactici* ชุดที่ 2 เป็น Sil-All (Allteck, U.K.) ประกอบด้วยเชื้อผสม *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecium* และ *Pediococcus acidilactici* ที่ไม่ได้ระบุจำนวน และเอนไซม์ Cellulase, Hemicellulase และ Amylase และชุดที่ 3 เป็น Lacticil M74 (Medipharm, Sweden) ประกอบด้วยเชื้อแห้ง *Enterococcus faecium* ที่มีจำนวนต่ำสุด $1.5x10^{10}$ CFU ต่อกรัม การเติมหัวเชื้อลงในพืชที่เป็นวัตถุดิบโดยเฉลี่ยใช้ $0.5x10^6$ CFU ต่อกรัม และมี Control silage ที่ไม่เติมหัวเชื้อ ภายหลังการหมักเป็นเวลา 45 วัน นำ Silage มาทดสอบ Aerobic stability พบว่า Silage ที่ได้จากการเติมหัวเชื้อเกิดการเสียเร็วกว่า Control silage เนื่องจาก Silage ที่ได้จากการเติมหัวเชื้อมีปริมาณ Residual water-soluble carbohydrates และ Lactic acid สูงกว่า และขาดหรือมี Volatile fatty acids (เช่น Acetic acid, Propionic acid, Butyric acid) ในปริมาณน้อย ซึ่ง Volatile fatty acids เหล่านี้มีผลยับยั้งการเจริญของยีสต์และรา และพบว่าการเสียในสภาพที่มีออกซิเจนของ Silage ที่ได้จากการเติมหัวเชื้อครั้งนี้ เกิดเนื่องจากกิจกรรมของยีสต์เป็นหลัก

แนวโน้มในการป้องกันการเสียของ Silage แนวทางหนึ่งที่น่าจะปฏิบัติได้คือ การใช้หัวเชื้อเพื่อผลิต Silage ที่สามารถผลิตสารนอกเหนือจากกรดที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดการเสียของ Silage รวมถึงจุลินทรีย์ก่อโรคกับสัตว์ที่ปนเปื้อนอยู่ในผลิตภัณฑ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และไม่มีผลข้างเคียงกับสัตว์ที่บริโภค สารที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่สำคัญตามที่มีรายงานว่าผลิตจาก Lactic acid bacteria ได้แก่ Bacteriocins, Reuterin, Hydrogen peroxide, Diacetyl,

Acetaldehyde, และ D-Isomers ของ Amino acids (Klaenhammer, 1988, 1993; Piard and Desmazeaud, 1991, 1992; Stiles and Hastings, 1991) ทั้งนี้ในปัจจุบันมีการใช้ Lactic acid bacteria ซึ่งจัดเป็นแบคทีเรียที่ปลอดภัย (Safe bacteria; GRAS (Generally Regarded As Safe)) ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการหมักอาหารของคนและสัตว์และการถนอมอาหาร และใช้ทั้งในสภาพ Natural microflora และ Starter cultures (Cintas *et al*., 2001) รวมทั้งใช้ Bacteriocins ที่ผลิตจาก Lactic acid bacteria เป็นสารถนอมอาหารอยู่แล้ว (Hoover and Steenson, 1993) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า *Lactobacillus plantarum* หลายสายพันธุ์สามารถผลิต Plantacins หลายชนิดตามสายพันธุ์ของแบคทีเรีย ซึ่ง Plantacins จัดเป็น Heat-stable bacteriocins ที่โดยส่วนใหญ่มีผลยับยั้งการเจริญของพวก Gram-positive spoilage และ Food-borne pathogens โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Listeria monocytogenes* (West and Warner, 1988; Kato *et al*., 1994; Jiménez-Díaz *et al*., 1995; Diep *et al*., 1996; Remiger *et al*., 1999; Ehrmann *et al*., 2000)

ตัวอย่างของหัวเชื้อที่ผลิตเป็นการค้าได้แก่ Biomin BioStabil (www.biomin.net, 2010) เป็น Silage additive product ที่มีจำหน่ายทั้งในยุโรป อเมริกา และเอเชีย และมีแบคทีเรียกรดแล็กติกสายพันธุ์เฉพาะที่ช่วยให้มีสมดุลดีของผลผลิตจากจุลินทรีย์ ปริมาณ Lactic acid และ Acetic acid และกระบวนการหมัก (Fermentation process) และมีความคงตัวของหญ้าหมักในสภาวะที่มีออกซิเจน (Aerobic stability) จุลินทรีย์พื้นฐานที่มีใน Silage inoculants นี้เป็น Homolactic acid bacteria (ได้แก่ *Lactobacillus plantarum, Enterococcus faecium* และ *Pediococci* หลาย species) Heterolactic bacteria (มีเพียง *Lactobacillus buchneri* ขณะเดียวกัน *Lactobacillus plantarum* ก็ได้รับการจัดจำแนกใหม่ว่าเป็น Heterolactic acid bacterium) ที่ช่วยกระตุ้นกระบวนการหมักและทำให้มีอายุการเก็บผลิตภัณฑ์นานขึ้น และบางครั้งมี Propionibacteria ร่วมด้วย

Sila-Prime "S" 4X Water Soluble (10lb Pail) starter culture (Livestock Nutritional Services U.S.A., www.backyardfarmerdirect.com, 2011) เป็น Starter culture (inoculant) การค้าอีกชนิดหนึ่งที่ใช้เพื่อผลิต Silages และ Haylages โดยกล้าเชื้อ 10 ปอนด์ สามารถใช้ผลิต Silage หรือ Haylage ได้ 1,000 ตัน กล้าเชื้อที่ใช้มีแบคทีเรีย *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus lactis* และ *Bacillus subtillis* ในปริมาณของแบคทีเรียที่มีจำนวนเท่ากันคือ $1x10^{10}$ CFU ต่อกรัม และมีน้ำตาล Dextrose

บริษัท Pioneer Hi-Bred Japan, Co., Tokyo ประเทศญี่ปุ่น ผลิตแบคทีเรียกรดแลคติกชนิด *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum* และ *Lactobacillus buchneri* เป็นกล้าเชื้อสำหรับผลิต Maize silage สำหรับฟาร์มโคนม *Enterococcus faecium* และ *Lactobacillus plantarum* เป็น Homofermentative lactic acid bacteria ที่ผลิตกรดแล็กติกที่ให้ pH ของวัสดุหมักลดลงตามต้องการ และ *Lactobacillus buchneri* เป็น Heterofermentative lactic acid bacterium ที่ผลิตกรดแล็กติกและ

กรดอะซิติก ที่สามารถยับยั้งการเจริญของยีสต์ที่ลดการเสียของ Silage ในสภาวะที่มีออกซิเจน (Li and Nishino, 2011)

ในด้าน Probiotics ซึ่ง Fuller (1992, 1995) ได้ให้ความหมายไว้ว่าเป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิตชนิดเดียวหรือหลายชนิด หรือ Microbial stimulant ที่ให้กับคนหรือสัตว์เพื่อประโยชน์ในแง่การปรับปรุงสมบัติของ Indigenous microflora ให้ดีขึ้น ซึ่งส่งผลให้คนหรือสัตว์นั้นมีสุขภาพดีขึ้น ซึ่งในการผลิต Probiotics นั้นใช้จุลินทรีย์ที่มีสมบัติสำคัญคือ เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถกระตุ้นการเจริญหรือช่วยสร้างความต้านทานต่อโรคของสัตว์ (host) ได้ เป็นสายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรคหรือสร้างสารพิษ สามารถมีชีวิตอยู่รอดและเจริญ ทำให้พบในปริมาณมาก (มีความสามารถด้าน colonization) ในทางเดินอาหารของสัตว์ และสามารถเตรียมเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีชีวิตได้นานในระหว่างการเก็บเพื่อรอการใช้ประโยชน์

จุลินทรีย์ที่นิยมใช้ผลิต Probiotics กลุ่มสำคัญกลุ่มหนึ่งคือ Lactobacilli ที่นิยมใช้กันมากที่สุดคือ *Lactobacillus acidophilus* ซึ่งมีหลายสายพันธุ์และแต่ละสายพันธุ์ก็มีความจำเพาะต่อชนิดของสัตว์ด้วย *Lactobacillus* species อื่นที่มีรายงานการใช้อยู่บ้างเช่น *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. casei*, *L. helviticus* (Fuller, 1992) การพัฒนาด้านการผลิต Probiotics ยังคงดำเนินอยู่ในปัจจุบัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งการค้นหาสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพเพื่อการใช้ประโยชน์กับสัตว์แต่ละชนิด (Fuller, 1992; Tannock, 1992)

Huber (1997) สรุปถึงประโยชน์ที่เป็นไปได้หลายประการของ Lactic acid bacteria ในกลุ่ม Lactobacilli และ Enterococci ที่ใช้เป็น Probiotics สำหรับโคกระบือ (cattle) ซึ่งได้แก่ (1) การเกาะติด (Adhesion) ของ Lactic acid bacteria กับผนังทางเดินอาหารของสัตว์ทำให้ป้องกันหรือขัดขวางการเกาะของแบคทีเรียก่อโรค (2) การเกิด Neutralization ของ Enterotoxins ซึ่งเกิดได้จากหลากหลายสาเหตุในระบบทางเดินอาหาร (3) การลดความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในระบบทางเดินอาหาร ทำให้ยับยั้งการเพิ่มจำนวนอย่างมากมายของแบคทีเรียที่ให้โทษกับสัตว์ และ (4) การกระตุ้นการสังเคราะห์สารเฉพาะชนิดที่มีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค

ในทางเดินอาหารของโคหรือสัตว์เคี้ยวเอื้องนั้น Rumen เป็นกระเพาะอาหารส่วนแรก (Fore-stomach) ของสัตว์ที่มีการศึกษาจุลินทรีย์ที่อยู่อาศัยมากกว่าส่วนอื่น เนื่องจากมีการหมักหรือย่อยพืชอาหารสัตว์ ซึ่งมีจุลินทรีย์เกี่ยวข้องด้วยทั้งที่ให้ประโยชน์และโทษกับสัตว์ขึ้นกับชนิดของจุลินทรีย์ การศึกษาโดยส่วนใหญ่จึงเน้นกระบวนการย่อย และบทบาทของจุลินทรีย์ในการย่อย ซึ่งเกี่ยวข้องกับโภชนาการและสรีรวิทยาของสัตว์ (Hungate, 1966)

แบคทีเรียกรดแล็กติกเป็นจุลินทรีย์กลุ่มเด่นกลุ่มหนึ่งที่พบใน Rumen ซึ่งที่พบส่วนใหญ่เป็นพวก Lactobacilli, Streptococci และ Bifidobacteria และเป็นพวกที่พบในส่วนของระบบทางเดินอาหารส่วนอื่นด้วยเช่นกัน (Dutta and Devries, 1981, 1984; Hill and Hill, 1986; Karney *et al*., 1986; Stewart, 1992) จำนวนหรือปริมาณของแบคทีเรียเหล่านี้ผันแปรตามอายุของสัตว์และอาหารที่สัตว์ได้รับ (Krogh, 1963; Jayne-Williams, 1979) แบคทีเรียกรดแล็กติกใน Rumen เกี่ยวข้องกับสัตว์ด้านการเกิด Lactic acidosis เมื่อ

มีกรดชนิด Lactic acid ในปริมาณที่สูงมากใน Rumen ทำให้เกิดการดูดซึมกรดเข้ากระแสเลือดของสัตว์ได้ และเป็นสาเหตุให้เกิด Acidosis (Stewart, 1992) แต่ถ้าสามารถปรับความสมดุลของจุลินทรีย์ใน Rumen ได้ Lactic acid ก็เป็นสารชนิดหนึ่งที่แบคทีเรียแกรมลบที่พบเป็นปกติใน Rumen ของสัตว์ ใช้และเปลี่ยนเป็น Propionic acid ซึ่งเกี่ยวเนื่องถึงการให้ผลผลิตน้ำนมที่เพิ่มขึ้นในโคนม (Bartley *et al*., 1979) ความเกี่ยวข้องของแบคทีเรียกับสัตว์อีกด้านหนึ่งที่เป็นที่น่าสนใจถึงแม้ในปัจจุบันคือ บทบาทของ Lactic acid bacteria ที่ทำให้ลูกสัตว์เคี้ยวเอื้องมีสุขภาพดีขึ้น ซึ่งเกิดจากการปรับสมดุลย์ของ Microflora ใน Rumen (Gilliand *et al*., 1980; Fuller, 1992 และ 1995; Huber, 1997)

Lactobacilli ที่มักพบใน Rumen เป็น Micro-aerophilic lactobacilli ที่มีทั้ง Heterofermentative lactobacilli ได้แก่ *Lactobacillus fermentum*, *L. brevis*, *L. buchneri* และ *L. casei* และ Homofermentative lactobacilli ได้แก่ *Lactobacillus acidophilus*, *L. ruminis* และ *L. ritulinus* (Stewart, 1992)

Streptococci ที่พบใน Rumen ส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่ม Lancefield's serological group D (Hungate, 1966; Latham *et al*., 1979) ชนิดเด่นที่พบใน Rumen คือ *Streptococcus bovis* และอาจพบชนิดอื่นๆ ได้แก่ *Streptococcus faecalis*, *S. faecium*, *S. durans* (Ziolecki and Briggs, 1961) และ *S. liquefaciens* (Ford *et al*., 1958)

สำหรับพวก Bifidobacteria ที่มีรายงานว่าแยกได้จาก Rumen ได้แก่ *Bifidobacterium globosum*, *B. longum*, *B. adolescentis*, *B. thermophilum*, *B. boum* (Scardovi, 1981), *B ruminale* (Scardovi *et al*., 1969; Trovatelli and Matteuzzi, 1976), *B. merycicum* และ *B. ruminantium* (Biavati and Mattarelli, 1991)

แบคทีเรียแกรมบวกอื่นที่พบได้ใน Rumen ได้แก่กลุ่ม Clostridia, Peptostreptococci และ Methanogens เป็นกลุ่มที่สามารถสร้างแก๊สแอมโมเนียและมีเทน ซึ่งไม่พึงประสงค์สำหรับสัตว์ (Hendersen *et al*., 1981) เมื่อ Rumen ของสัตว์มีแก๊สเกิดขึ้นมากกว่าปกติ ทำให้เกิดโรคท้องอืด (Bloat) ซึ่งการเกิดโรคท้องอืดนี้เป็นผลร่วมกันจากปัจจัยที่เกี่ยวข้องคือ ชนิดของพืชที่สัตว์บริโภค ตัวอย่างเช่น พืชตระกูลถั่วที่มีโปรตีนสูงก่อให้เกิดก๊าซได้ดี และชนิดของจุลินทรีย์ใน Rumen

สุรีลักษณ์ รอดทอง และ วิศิษฐิพร สุขสมบัติ (2545) ได้ศึกษาถึงความสามารถในการอยู่รอดของ Silage lactobacilli ในทางเดินอาหารของโค ซึ่งเป็นข้อมูลชี้แนะถึงสายพันธุ์ของ Lactobacilli ที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นหัวเชื้อในการผลิต Silage และประโยชน์ในการพัฒนาการผลิต Probiotics สำหรับสัตว์อย่างมีประสิทธิภาพในประเทศไทย ซึ่งอาจจะเป็นการผลิต Probiotics ด้วยในผลผลิตอาหารสัตว์ชนิดเดียว จากการศึกษานี้พบว่าการอยู่รอดโดยเฉลี่ยของ Silage lactobacilli ในทางเดินอาหารของโคค่อนข้างคงที่ในช่วงที่โคได้รับอาหาร Silage อย่างต่อเนื่อง และลดน้อยลงหลังจากหยุดให้อาหาร Silage ซึ่งใกล้เคียงกับก่อนที่มีการให้อาหาร Silage แก่โคทดลอง จากการวิเคราะห์ชนิดของ Lactobacilli ที่แยกและเลือกเก็บทั้งจากตัวอย่างอาหารโคและตัวอย่างจากโคทดลอง (ตัวอย่างที่เก็บจาก Rumen และมูลของโคทดลอง) พบ Lactobacilli ชนิดเด่น คือ *Lactobacillus plantarum*, *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. casei*, *L. delbrueckii*, *L. fermentum*, *L. fructosus* และ *L. hilgardii* และพบสายพันธุ์

ของ Lactobacilli ที่มีความสามารถในการเกาะติดและเจริญในระบบทางเดินอาหารของโค และมีความเป็นไปได้ที่จะใช้เพื่อเป็นหัวเชื้อหรือกล้าเชื้อที่เหมาะสมในการผลิต Silage

บทที่ 2
วิธีดำเนินการวิจัย

การดำเนินงานของโครงการ การพัฒนารูปแบบของกล้าเชื้อหญ้าหมัก นี้ใช้สถานที่ปฏิบัติงานคือ ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา (อาคารเครื่องมือ 2) ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และมีส่วนของงานที่ได้ดำเนินการเพิ่มจากแผนคือการทดลองผลิตหญ้าหมักด้วยกล้าเชื้อที่ได้พัฒนาที่ได้รับความร่วมมือจากฟาร์มเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมหมู่บ้านวะภูแก้ว ตำบลมะเกลือใหม่ อำเภอสูงเนิน จังหวัดนครราชสีมา ครุภัณฑ์และวัสดุ-อุปกรณ์หลักที่ใช้ และวิธีดำเนินการของโครงการ มีดังนี้

2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัย

2.1.1 ครุภัณฑ์

ครุภัณฑ์หลักที่ใช้มีดังนี้ หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave; Hirayama, Hirayama Manufacturing Corp., Japan) ตู้อบไอร้อน (Hot air oven; 1375FX Shel Lab, Sheldon Manufacturing, Inc., U.S.A.) ตู้เขี่ยจุลินทรีย์ (Laminar flow hood, Caireb Clen Air, The Netherlands) ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 25 และ 35 องศาเซลเซียส (Shel Lab, Sheldon Manufacturing, Inc., U.S.A.) ตู้ควบคุมอุณหภูมิต่ำ 4-12 องศาเซลเซียส (FOC225I Velp® Scientific, Progen Scientific Ltd., U.K.) ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส (HLLE-370 Heto, Heto-Holten, Denmark) สำหรับเก็บเชื้อพันธุ์และสารชีวภาพ เครื่องชั่งละเอียด (Analytical balance, TC-205, Denver Instrument Company, Japan) เครื่องชั่งหยาบ (Pan balance, LB3200D Sartorius, Sartorius AG Göttingen, Germany) เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (CCMD 510 pH and conductivity meter, WPA, England) เครื่องนับโคโลนี (Colony counter, Colony-Star, Germany) กล้องจุลทรรศน์ชนิดที่ใช้แสง (Light microscope, Olympus BX51, Olympus Optical Co., Ltd., Japan) กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (Scanning electron microscope; SEM; JSM-6400, JEOL Ltd., Japan) กล้องถ่ายภาพภาคสนาม (Olympus, Camedia, Olympus Optical Co., Ltd., Japan) อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath, 1245PC Shel Lab, Sheldon Manufacturing Inc., U.S.A.) เครื่องกวนแม่เหล็ก (Magnetic stirrer, C-MAG HS 7 IKAMAG®, IKA®-WERKE GMBH & CO. KG, Germany) เครื่องควบคุมอุณหภูมิเพื่อเพิ่มจำนวน DNA (GeneAmp PCR system; Px2 Thermal cycler, Thermo electron corporation. U.S.A.), Anerobic/Environmental Chamber (Shel Lab, Sheldon Manufacturing, Inc., U.S.A.), Electrophoresis apparatus (MiNi SUB™DNA Cell, BIO-RAD, Italy), Freeze Dryer (Heto Dry winner:DW 3, Denmark), Microcentrifuge (Strip-Fuge™, Clover Labs, Taiwan), Micropipette sets (Nichipet EX, Nichiryo, Japan), High speed refrigerated centrifuge (Avanti 26 XPI, Beckman Coulter, Beckman Coulter, Inc., U.S.A.), Spectrophotometer UV/VISIBLE

GBC 916, Scientific Equipment Ltd., Australia), Vortex mixer (Finevortex, FinePCR®, Korea) และ UV transilluminator พร้อมกล้องถ่ายรูป (SynGene, Synopics Ltd., U.S.A.)

2.1.2 วัสดุ

วัสดุที่ใช้มีดังต่อไปนี้ เครื่องแก้วพื้นฐานสำหรับปฏิบัติการจุลชีววิทยา หลอดแก้วและพลาสติกชนิดทนต่อการแช่แข็งสำหรับเก็บเซลล์จุลินทรีย์ ขวดฝาเกลียวขนาดบรรจุ 250 และ 500 มิลลิลิตร ที่ทนความร้อนในการนึ่งฆ่าเชื้อ Anaerobic jar และ Anaerocult A (MERCK, Merck KgaA, Germany), Centrifuge tubes ขนาดบรรจุ 50 และ 250 มิลลิลิตร Microcentrifuge tubes, Micropipette tips อาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ ได้แก่ MRS medium (MERCK) และ ROGOSA agar (MERCK) สารที่ใช้เตรียมอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ ได้แก่ Beef extract (Himedia Laboratories, India), Glucose (Carlo Erba Reagenti, Italy), Proteose peptone (Himedia Laboratories), Skim milk (MERCK) และ Yeast extract (Himedia Laboratories) สารเคมีระดับคุณภาพวิเคราะห์ (Analytical grade) ได้แก่ Tri-ammonium citrate (Carlo Erba Reagenti), Ammonium sulphate (Carlo Erba Reagenti), Bromophenol blue (USB™, Amersham Life Science, England), Calcium carbonate (Carlo Erba Reagenti), Magnesium sulphate monohydrate (Fluka BioChemika, Germany), Manganese sulphate monohydrate (Carlo Erba Reagenti), Di-potassium hydrogen phosphate (Carlo Erba Reagenti), Sodium acetate (Carlo Erba Reagenti), Sodium chloride (MERCK), Tween 80 (ACROS ORGANICS, U.S.A.), Sucrose (Carlo Erba Reagenti) และ Urea (Carlo Erba Reagenti) สารวิเคราะห์สายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแล็กติกด้วยเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลได้แก่ Agarose (SeaKem® LE Agarose for gel electrophoresis, U.S.A.), 10X PCR buffer (Invitrogen, Invitrogen Life Technologies, U.S.A.), Ethidium bromide (ACROS ORGANICS), Ethylenediamine tetra-acetic acid (EDTA, Sigma®, Sigma Chemical Co., U.S.A.), Ethanol (MERCK), Isopropyl alcohol (MERCK), Magnesium chloride (Carlo Erba Reagenti), Genomic DNA Purified Kit (The Wizard Genomic DNA Purified Kit, Promega, Promega Corporation, U.S.A.), Gel and PCR clean-up system (The Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System, Promega) และสารชีวภาพ เช่น Lysozyme (Sigma), Mutanolysin (Sigma), Pronase (Invitrogen), Proteinase K (Invitrogen), Ribonuclease (Invitrogen), *Taq* DNA polymerase (Invitrogen), Oligonucleotide primers (The Science Pacific Company Ltd., Thailand) และ Nucleoside triphosphates (dATP, dCTP, dGTP, dTTP; Perkin Elmer, Applied Biosystems Inc., U.S.A.)

2.2 การเลือกและตรวจสอบสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแล็กติกเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อ

2.2.1 การเลือกสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแล็กติกเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อ

เลือกสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแล็กติกสายพันธุ์เด่นที่พบในหญ้าหมักที่ผลิตในประเทศไทย โดยอาศัยจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากธรรมชาติและที่มีแนวโน้มด้านการใช้เป็น Probiotics สำหรับโค ซึ่งเป็น

ผลจากที่ได้มีการศึกษาของผู้วิจัยและคณะที่ได้ดำเนินเสร็จสิ้นแล้ว (สุรีลักษณ์ รอดทอง และคณะ, 2545; สุรีลักษณ์ รอดทอง และ วิศิษฐิพร สุขสมบัติ, 2545) เพื่อนำมาผลิตกล้าเชื้อซึ่งอาจเป็นรูปแบบกล้าเชื้อชนิดเดียวและ/หรือเชื้อผสม เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะที่เหมาะสม ด้วยต้นทุนการผลิตที่ต่ำกว่าที่ควรจะเป็นตามแหล่งอาหารเฉพาะที่จำเป็นต้องใช้เลี้ยงแบคทีเรียกรดแล็กติก (MRS medium ภาคผนวก ค1)

เชื้อบริสุทธิ์ (Pure culture) ที่ใช้เป็นกล้าเชื้อมีการเก็บรักษาโดย Cross streak บนอาหาร MRS agar (ภาคผนวก ค1) บ่มให้เจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาพไร้ออกซิเจน ใน Anaerobic chamber (Shel Lab, Sheldon Manufacturing, Inc., U.S.A.) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ย้ายเชื้อลงในน้ำเกลือ (0.85% NaCl) (ภาคผนวก ข9) ปลอดเชื้อ ให้มีความเข้มข้นของเซลล์ไม่น้อยกว่า 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เติมสารละลาย Skim milk (10%) ปลอดเชื้อ ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของ Skim milk เท่ากับ 5% ผสมให้เข้ากัน เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.2.2 การตรวจสอบสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่เลือกเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อ

ตรวจสอบสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่เลือกเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อด้วยเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล เน้นเทคนิค Polymerase chain reaction ด้วยวิธี Random amplified polymorphic DNA (RAPD) ซึ่งเป็นเทคนิคที่ผู้วิจัยได้พัฒนาเพื่อให้เหมาะกับการตรวจหาเชื้อเป้าหมายไว้ระดับหนึ่งแล้ว (สุรีลักษณ์ รอดทอง และคณะ, 2545) รวมทั้งการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Ribosomal RNA gene ในกรณีแบคทีเรียสายพันธุ์ที่เลือกนั้นยังไม่สามารถระบุชนิดที่แน่นอนได้ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา

2.2.2.1 การตรวจสอบสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่เลือกเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา

1) การศึกษาสัณฐานวิทยาของเซลล์

ศึกษาสัณฐานวิทยาของเซลล์แบคทีเรียด้วยการย้อมสีเซลล์แบบแกรม (Gram stain) จากการเตรียมรอย Smear ของแบคทีเรียอายุ 18-24 ชั่วโมง ที่เจริญบนอาหาร MRS agar บนแผ่นแก้วสไลด์ที่สะอาดตรึงเซลล์ให้ติดแผ่นแก้วสไลด์ด้วยความร้อน หยดสี Crystal violet (ภาคผนวก ก1) ให้ท่วมรอย Smear เป็นเวลา 1 นาที ล้างสีออกด้วยน้ำเบาๆ และหยด Gram's iodine (ภาคผนวก ข5) ให้ท่วมรอย Smear เป็นเวลา 1 นาที ล้างรอย Smear ด้วย 95% Ethyl alcohol หรือ Acetone alcohol (ภาคผนวก ข1) จนไม่มีสีม่วงของ Crystal violet ออกมา แต่ไม่ควรเกิน 20 วินาที ล้างด้วยน้ำทันที ย้อมทับรอย Smear ด้วยสี Safranin (ภาคผนวก ก2) เป็นเวลา 1 นาที ล้างด้วยน้ำ ทิ้งให้แห้ง แล้วตรวจดูรูปร่าง โครงสร้าง และการเรียงตัวของเซลล์ ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กล้องจุลทรรศน์ชนิดที่ใช้แสง (Light microscope, Olympus BX51, Olympus Optical Co., Ltd., Japan) กำลังขยาย 1,000 เท่า วัดขนาดของเซลล์ด้วย Ocular micrometer ซึ่งได้เทียบค่าแล้วจาก Stage micrometer

2) การทดสอบสมบัติทางชีวเคมีด้วยชุดทดสอบ (Detection kit)

ทดสอบสมบัติทางชีวเคมีด้วยชุดทดสอบ API 50CHL (Bio-Mèrieux, bioMèrieux, Inc., France) โดยเตรียมเชื้อบริสุทธิ์อายุ 18-24 ชั่วโมง ที่เจริญบนอาหาร MRS agar ในน้ำเกลือ (0.85% NaCl, ภาคผนวก ข9) ปลอดเชื้อ 5 มิลลิลิตร ปรับให้มีความขุ่นของ Suspension ของเซลล์เท่ากับ McFarland standard scale 2 (ภาคผนวก ข7) ใส่ Suspension ของเชื้อที่เตรียมได้นั้นลงในแต่ละ Microtube ของ API 50CHL strip ซึ่งมี 50 Microtubes และดำเนินการตามข้อแนะนำของผู้ผลิตชุดทดสอบ

2.2.2.2 การตรวจสอบสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่เลือกเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อด้วยวิธี Random amplified polymorphic DNA (RAPD)

ตรวจสอบสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่เลือกเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อด้วยวิธี RAPD โดยดำเนินการตามขั้นตอนดังนี้

1) การสกัดหรือแยก Genomic DNA จากเซลล์ของ แบคทีเรียกรดแล็กติก

สกัดหรือแยก Genomic DNA จากเซลล์ของแบคทีเรียกรดแล็กติกสายพันธุ์ที่คัดเลือกเป็นกล้าเชื้อ ดำเนินการโดยใช้ชุดสกัด Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Promega Corporation, U.S.A.) โดยดัดแปลงวิธีการจากที่ผู้ผลิตระบุและอาศัยข้อมูลเบื้องต้นจาก Luchansky *et al*. (1991) เพื่อให้เหมาะสมกับสิ่งมีชีวิตเป้าหมาย ซึ่งวิธีการที่ใช้มีขั้นตอนดังนี้ นำแบคทีเรียที่เลี้ยงใน MRS broth (ภาคผนวก ค1) เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บรรจุลงใน Microcentrifuge tube (ขนาด 1.5 มิลลิลิตร) แล้วปั่นแยกที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที ล้างเซลล์หนึ่งครั้งด้วย TES buffer (ภาคผนวก ข12) เติม 50 mM Ethylenediaminetetracetic acid (EDTA, pH 8.0) ปริมาตร 240 ไมโครลิตร ลงละลายตะกอนเซลล์ เติมสารละลาย Lysozyme (10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร; Sigma) 30 ไมโครลิตร และ Mutanolysin (1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร; Sigma) 20 ไมโครลิตร ผสมเบาๆ ด้วยปลาย Pipette tip ให้เข้ากัน บ่มหลอดบรรจุส่วนผสมข้างต้นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม Nuclei lysis solution (Promega) ปริมาณ 300 ไมโครลิตร ผสมเบาๆ ด้วยปลาย Pipette tip ให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้เซลล์แตก จากนั้นทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 15 นาที) เติมสารละลาย RNase (Ribonuclease, Invitrogen; 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาณ 1.5 ไมโครลิตร ผสมโดยกลับหลอดขึ้น-ลง 25 ครั้ง แล้วจึงบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลา นำหลอดส่วนผสมไว้ที่อุณหภูมิห้องให้มีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง เติม Protein precipitation solution (Promega) 100 ไมโครลิตร ลงใน RNase-treated cell lysate ผสมอย่างรวดเร็ว โดยใช้ Vortex mixer ที่ความเร็วสูงสุด เป็นเวลา 20 วินาที วางหลอดบรรจุส่วนผสมบนน้ำแข็ง เป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงปั่นแยกที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 3 นาที ย้ายส่วนใส (supernatant) ซึ่งมี Genomic DNA อยู่ ใส่ลงใน Microcentrifuge tube (ขนาด 1.5 มิลลิลิตร) หลอดใหม่ที่บรรจุ Isopropanol (MERCK) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมโดยกลับหลอดขึ้น-ลงเบาๆ จนกระทั่งเห็นกลุ่มสีขาวของ DNA เก็บเกี่ยว DNA ที่ได้โดยการปั่นแยกด้วยความเร็ว 12,000

รอบต่อนาที นาน 3 นาที เทส่วนใส (supernatant) ทิ้งอย่างระมัดระวัง ล้างตะกอน DNA ด้วย Ethanol (70%) ทิ้งให้ตะกอนแห้ง (ประมาณ 30 นาที) แล้วจึงละลายตะกอนด้วย DNA rehydration solution (Promega) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตรวจวัดความเข้มข้นของ Genomic DNA ที่สกัดได้ด้วย Spectrophotometer (Smartspec plus, Bio-Rad Laboratories, U.S.A.) ที่มี software วัดความเข้มข้นของ DNA ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร พร้อมทั้งตรวจหา Genomic DNA ที่สกัดได้ด้วย Agarose gel electrophoresis ใช้ 0.9% Agarose (Low EEO Agarose, BIO 101, Inc., U.S.A.) ในสารละลาย Tris-Borate buffer (TBE) (ภาคผนวก ข13) และใช้ 1 Kb Plus DNA Ladder (Fermentas Life Science, E.U.) เป็น DNA Molecular weight markers แยกชิ้นของ DNA ตามขนาดด้วยค่าความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลท์ ตรวจหาตำแหน่งของแถบ DNA (DNA band) โดยย้อม Agarose gel ด้วย Ethidium bromide (1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) เป็นเวลา 15 นาที และตรวจดูการเรืองแสงของแถบ DNA ด้วย UV Transiluminator และถ้าพบ RNA ปนเปื้อนอยู่ในปริมาณสูง กำจัด RNA ออกอีกครั้งโดยใช้สารละลาย RNase (Sambrook *et al*., 2000)

2) การหาแบบแผน RAPD ด้วยการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)

การวิเคราะห์สายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแล็กติกด้วยวิธี RAPD นี้ อาศัยการเพิ่มปริมาณ DNA จาก Genomic DNA ของแบคทีเรียด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) โดยเตรียม PCR reaction mixture ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ในหลอดที่มีฝาปิด ขนาดบรรจุ 200 ไมโครลิตร ส่วนประกอบของ PCR reaction mixture ที่ใช้มีดังนี้ 1X PCR buffer ที่มี 1.5 mM $MgCl_2$ (QIAGEN, QIAGEN GmbH, Germany) 100 ไมโครโมล (μM) ของแต่ละชนิดของ Nucleoside triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP; Boehringer Mannheim, Boehringer Mannheim GmbH, Germany) 20 พิโคโมล (pmole) ของ Primer 3 (5'-GTAGACCCGT-3'; RAPD Analysis Primer Set, Pharmacia Biotech, Sweden) 1.6 หน่วย (Units) ของ *Taq* DNA polymerase (QIAGEN) และ 100 นาโนกรัม (ng) ของ Genomic DNA

จากนั้นเริ่มกระบวนการเพิ่มปริมาณ DNA ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (GeneAmp PCR system; Px2 Thermal cycler, Thermo electron corporation. U.S.A.) จำนวน 40 รอบ โดยใช้อุณหภูมิและเวลาต่างกันตามลำดับ ดังนี้

(1) Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที

(2) รอบที่ 1-40 โดยแต่ละรอบประกอบด้วย Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที Annealing ที่อุณหภูมิ 29 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.5 นาที และ Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.5 นาที

และ (3) Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

3) การวิเคราะห์ผลผลิต DNA ที่ผ่านกระบวนการ PCR ด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis และแบบแผน RAPD

ตรวจวิเคราะห์ผลผลิต DNA จากของเหลวที่ผ่านกระบวนการ PCR โดยใช้ของเหลวปริมาณ 10 ไมโครลิตร ผสมกับ Loading buffer (ภาคผนวก ข6) 2 ไมโครลิตร แล้วบรรจุลงในช่อง (Well) ของ Agarose gel (1.5%; Low EEO Agarose, BIO 101, Inc., U.S.A.) ในสารละลาย TBE (ภาคผนวก ข14) ใช้ 100 bp DNA ladder (Boehringer Mannheim) และ 100 bp DNA ladder (GIBCOBRL, Life Technologies, USA) เป็น DNA Molecular weight markers แยกชิ้นของ DNA ตามขนาดด้วยกระแสไฟฟ้าขนาด 50 โวลท์ จากนั้นตรวจหาตำแหน่งของแถบ DNA (DNA band) โดยย้อม Agarose gel ด้วย Ethidium bromide (เข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เป็นเวลา 15 นาที และตรวจดูการเรืองแสงของแถบ DNA ภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต ที่ความยาวช่วงคลื่น 295 นาโนเมตร ของ UV Transilluminator บันทึกผลโดยการถ่ายภาพ สรุปแบบแผน RAPD ของแบคทีเรียกรดแล็กติก

2.3 การศึกษาส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับแบคทีเรียกรดแล็กติกที่ได้คัดเลือก

ศึกษาส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับแบคทีเรียกรดแล็กติกที่ได้คัดเลือกเพื่อให้ได้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ให้การเจริญที่ดีที่สุดของแบคทีเรียกรดแล็กติกสายพันธุ์ที่เลือก และอาหารมีส่วนประกอบที่เตรียมง่ายและมีต้นทุนต่ำ อาหารเริ่มต้นที่ใช้ในการเลี้ยงและเก็บรักษาการมีชีวิตของเชื้อยังคงเป็น MRS medium (ภาคผนวก ค1) ปริมาณในช่วง 5-50 มิลลิลิตร บ่มให้เชื้อเจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาพไร้ออกซิเจน ใน Anaerobic chamber (Shel Lab) เป็นเวลา 18-20 ชั่วโมง วัดการเจริญของเชื้อที่เพาะเลี้ยงได้โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (A_{600}) เปรียบเทียบการนับจำนวนเซลล์ ตามวิธีนับมาตรฐาน (Standard plate count) ทางจุลชีววิทยา ด้วย Spread plate technique (Woolford, 1984) ทำการทดลองสองซ้ำ บ่มให้แบคทีเรียเจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาพไร้ออกซิเจน ใน Anaerobic chamber (Shel Lab) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจนับโคโลนีของแบคทีเรียที่เจริญบนผิวหน้าอาหาร เลือกวิธีวัดการเจริญโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ในขั้นตอนการวิจัยที่มีตัวอย่าง (จากการเลี้ยงแบคทีเรีย) จำนวนมากที่ต้องวัดการเจริญและอาหารไม่มีความขุ่นเนื่องจากสารที่เป็นส่วนประกอบของอาหาร ศึกษาส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนี้

2.3.1 ชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอน

โดยใช้ส่วนประกอบเริ่มต้นตาม MRS broth (ภาคผนวก ค1) และเปลี่ยนชนิดของแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลชนิดที่ราคาถูกกว่ากลูโคส ได้แก่ น้ำตาลทราย กากน้ำตาล และแป้ง ทั้งนี้แล้วแต่ความสามารถในการใช้สารอินทรีย์ที่เป็นแหล่งคาร์บอนของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่เลือก พร้อมทั้งทดลองเพื่อให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมนั้น

2.3.2 ชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจน

ทดลองเพื่อหาชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจนโดยใช้สูตรอาหารที่ได้จากการศึกษาในข้อ 2.3.1 แหล่งของไนโตรเจนที่สนใจ ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต ยูเรีย และ กากถั่วเหลือง เป็นต้น

2.3.3 Essential element และ Growth factor ในส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

ศึกษาความจำเป็นที่ต้องเติม Essential element และ/หรือ Growth factor ในส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นผลจากการศึกษาในข้อ 2.3.2

2.4 การศึกษาสภาวะที่เหมาะต่อการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือก

ศึกษาสภาวะที่เหมาะต่อการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกเพื่อมุ่งหวังให้ได้สภาวะที่แบคทีเรียกรดแล็กติกสายพันธุ์ที่คัดเลือกเจริญได้ดีที่สุด การทดสอบสภาวะการเลี้ยงที่เหมาะกับสายพันธุ์ที่คัดเลือกนี้โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ได้ศึกษาแล้ว โดยเตรียม เลี้ยง และตรวจวัดการเจริญของแบคทีเรียตามวิธีการทำนองเดียวกับที่ระบุในข้อ 2.3 ปัจจัยหลักที่ศึกษา คือ

2.4.1 อุณหภูมิ

ทดสอบความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิช่วง 4 ถึง 50 องศาเซลเซียส ทั้งนี้เพื่อประโยชน์ทั้งการเก็บกล้าเชื้อที่อุณหภูมิต่ำเมื่อจำเป็น อุณหภูมิอื่นที่มีแนวโน้มที่มีผลต่อการเก็บกล้าเชื้อระหว่างรอใช้ประโยชน์ เช่นอุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญในกรณีที่ต้องการใช้ในการผลิตกล้าเชื้อและการผลิตหญ้าหมัก

2.4.2 สภาพที่มีออกซิเจน

ทดสอบการเจริญในสภาพที่มีออกซิเจน เนื่องจากแบคทีเรียกรดแล็กติกมีทั้ง Microaerophiles และ Anaerobes ซึ่งถ้าเป็นพวกที่ทนออกซิเจนได้ซึ่งเป็นประโยชน์ในการนำกล้าเชื้อไปใช้ประโยชน์มากขึ้น

2.5 การศึกษาวัฏภาคของการเจริญของแบคทีเรียและความจำเป็นและต้องการทำให้เซลล์ของเชื้อเข้มข้นขึ้น

ศึกษาวัฏภาคของการเจริญของแบคทีเรียโดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะที่เหมาะสมตามวิธีการทำนองเดียวกับที่ระบุในข้อ 3 เก็บตัวอย่างจากการเจริญที่ระยะเวลาต่างๆ เป็นเวลา 3 วัน เพื่อนำผลจากการทดลองมาหากราฟของการเจริญ (Growth curve) ผลจากวัฏภาคของการเจริญของแบคทีเรียจะทำให้สามารถเลี้ยงและเก็บเกี่ยวเซลล์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตกล้าเชื้อ ส่วนความจำเป็นและต้องการทำให้เซลล์ของเชื้อเข้มข้นขึ้นนั้นขึ้นกับผลที่ได้ ที่จะสามารถผลิตได้ในปริมาณเซลล์สูงสุดเพียงใด และจะนำไปสู่การทดลองในข้อ 2.6 ซึ่งยังคงรักษาการมีชีวิตของเซลล์ การทำให้เซลล์ของเชื้อ

เข้มข้นขึ้นนี้อาจใช้วิธีปั่นแยกหรือวิธีทำให้เป็นผงแห้งด้วยเทคนิคการทำแห้งเยือกแข็ง (Lyophilization) ด้วยเครื่อง Freeze Dryer (Heto Dry winner: DW 3, Denmark)

2.6 การทดลองหารูปแบบของกล้าเชื้อเพื่อการใช้ประโยชน์

ทดลองหารูปแบบของกล้าเชื้อเพื่อการใช้ประโยชน์ ที่มีวิธีการเตรียมไม่ยุ่งยาก ต้นทุนการผลิตต่ำ และการใช้ประโยชน์ได้ง่าย ดังนี้

2.6.1 รูปแบบเชื้อแห้งบรรจุในถุงพลาสติก

โดยดัดแปลงจากวิธีการผลิตกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกที่ใช้หมักแหนม (นภา โล่ห์ทอง, 2535) และเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดเลือกในอาหารที่มีส่วนประกอบที่เหมาะสม ถึงประมาณปลาย Log phase (ผลจากข้อ 2.5) โดยนำกล้าเชื้อที่คัดเลือกมาเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมปริมาตรเริ่มต้นที่ 10 มิลลิลิตร บ่มให้แบคทีเรียเจริญ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาพไร้ออกซิเจน ใน Anaerobic chamber (Shel Lab) ถึงประมาณปลาย Log phase วัดการเจริญโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (A_{600}) กรณีที่อาหารเลี้ยงเชื้อมิได้เติมสารที่ทำให้อาหารมีความข่นพร้อมทั้งเจือจางเชื้อที่เลี้ยงได้เพื่อการตรวจนับด้วยเทคนิค Spread plate เก็บเกี่ยวเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (High speed refrigerated centrifuge, Avanti 26 XPI, Beckman Coulter, Beckman Coulter, Inc., U.S.A.) ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ล้างตะกอนเซลล์ด้วย 0.85% NaCl ปลอดเชื้อ นำตะกอนเซลล์ที่ได้มาผสมกับสารตัวกลางในสัดส่วนที่ให้ได้ผงเชื้อแห้งที่มีความชื้นประมาณ 13% มีจำนวนเชื้อ 10^8 เซลล์ต่อกรัมโดยประมาณ สารตัวกลางนี้มุ่งเน้นสารที่เป็นผลิตผลทางการเกษตรที่มีมูลค่าต่ำในประเทศไทย การเตรียมผงเชื้อแห้งด้วยการอบแห้งที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ตามเวลาที่เหมาะสมซึ่งตรวจวัดระหว่างการทดลอง บรรจุในถุงปิดสนิทและเก็บกล้าเชื้อแบบผงแห้งไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิต่ำ 4-12 องศาเซลเซียส (FOC225I Velp® Scientific, Progen Scientific Ltd., U.K.)

2.6.2 รูปแบบเชื้อแห้งแบบลูกแป้ง

รูปแบบเชื้อแห้งแบบลูกแป้งนี้มีวิธีการเตรียมทำนองเดียวกับที่มีการผลิตลูกแป้งที่ใช้ในการหมักข้าวหมากหรือเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์พื้นบ้านของไทย (พิไลพรรณ พงษ์บูล, 2523) ซึ่งใช้เครื่องเทศหรือสมุนไพรไทยมาเป็นองค์ประกอบของการทำลูกแป้งข้าวหมาก ตามที่ผู้วิจัยได้มีส่วนร่วมในการพัฒนาหัวเชื้อเพื่อการผลิตอาหารสัตว์โปรตีนสูงจากวัสดุเหลือทิ้งจากโรงงานแป้งมันสำปะหลังมาแล้ว (Chumkhunthod *et al*., 2001) ขั้นตอนการผลิตดังนี้

1) การทดสอบฤทธิ์ของเครื่องเทศที่ใช้ผสมในลูกแป้งในการยับยั้งการเจริญของกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติก

ทดสอบฤทธิ์ของเครื่องเทศที่ใช้ผสมในลูกแป้งในการยับยั้งการเจริญของกล้า

เชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติก เพื่อหลีกเลี่ยงการใช้เครื่องเทศชนิดที่มีผลยับยั้งการเจริญของกล้าเชื้อ ด้วยวิธี Agar disk diffusion ตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Murray *et al*. (1999) โดยเลี้ยงแบคทีเรียกล้าเชื้อบนอาหาร MRS agar (ภาคผนวก ค1) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาพไร้ออกซิเจน ใน Anaerobic chamber (Shel Lab) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เตรียมด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 0.85% (ภาคผนวก ข9) ปลอดเชื้อ ให้ได้ความขุ่นเท่ากับ McFarland standard scale 0.5 (ภาคผนวก ข7) ซึ่งจะได้ปริมาณเชื้อ 10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร โดยประมาณ ใช้ cotton swab ปลอดเชื้อจุ่ม suspension ของเชื้อที่เตรียมได้ ป้ายลงบนผิวอาหาร MRS agar เป็น 3 ระนาบ (three dimension swab) ให้ทั่วผิวหน้า จากนั้นหยดสารสกัดจากเครื่องเทศที่เตรียมตามความเข้มข้นที่ใช้ผสมลงในลูกแป้ง ปริมาตร 20 ไมโครลิตร บน paper disk มาตรฐานปลอดเชื้อ (6 mm in diameter, Whatman, U.K.) ก่อนใช้ทำให้สารสกัดปลอดเชื้อด้วยการกรองผ่านเยื่อกรอง (0.45 ไมโครเมตร) ปลอดเชื้อ วาง paper disks ลงบนผิวอาหารที่ป้ายเชื้อแล้ว บ่มให้เชื้อเจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาพไร้ออกซิเจน ใน Anaerobic chamber เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบการเกิดบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ใช้สารมาตรฐาน Streptomycin (10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) หรือ (7 ไมโครกรัมต่อ 20 ไมโครลิตร) เป็น positive control

2) การเตรียมเชื้อแห้งแบบลูกแป้ง

เลี้ยงกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกและเตรียมตะกอนเซลล์เช่นเดียวกับข้อ 2.6.1 นำตะกอนเซลล์ที่ได้มาผสมกับแป้งและเครื่องเทศ อบแห้งและเก็บรักษาเช่นเดียวกับการเตรียมรูปแบบเชื้อแห้งบรรจุในถุงพลาสติก

2.7 การศึกษาการอยู่รอดในเบื้องต้นของกล้าเชื้อในรูปแบบที่พัฒนาได้

กล้าเชื้อที่ผลิตขึ้นใช้ จำเป็นต้องเก็บนานได้ ทนต่อการขนส่ง โดยทดลองเก็บกล้าเชื้อในรูปแบบที่ผลิตที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1, 7 และ 30 วัน และ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน ติดตามจำนวนและการอยู่รอดของกล้าเชื้อด้วยเทคนิคทางจุลชีววิทยาโดยตรวจนับจำนวนเชื้อที่มีชีวิตด้วย Spread plate technique (Woolford, 1984) และใช้เทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล (RAPD) (สุรีลักษณ์ รอดทอง และคณะ, 2545) เข้าช่วยในกรณีที่เป็นกล้าเชื้อผสม

2.8 การทดลองผลิตหญ้าหมักโดยใช้กล้าเชื้อในรูปแบบที่พัฒนาได้

ผลิตหญ้าหมักโดยเติมกล้าเชื้อ (Inoculant หรือ Starter) ในรูปแบบที่พัฒนาได้ และหญ้าหมักที่ได้จากการหมักโดยจุลินทรีย์ในธรรมชาติที่มีหรือปนเปื้อนในวัตถุดิบที่ใช้ผลิต ดังนี้

2.8.1 วัตถุดิบและการเตรียมวัตถุดิบในการผลิตหญ้าหมัก

วัตถุดิบที่นำมาผลิตคือพืชอาหารสัตว์ที่เป็นหญ้าเนเปียร์ (Napier grass, Elephant grass) *Pennisetum purpureum* เก็บเกี่ยวขณะสดและทิ้งตากแดด 1 วัน ให้พอเหี่ยวเพื่อลดปริมาณน้ำใน

วัตถุดิบ มาหั่นเป็นท่อนความยาว 5-10 เซนติเมตร ด้วยเครื่องหั่น เก็บวัตถุดิบเพื่อตรวจหาแบคทีเรียกรดแล็กติก

2.8.2 การหมักให้ได้ผลผลิตหญ้าหมัก

บรรจุชิ้นวัตถุดิบที่เตรียมได้ลงในถุงพลาสติกหนาสองชั้น ถุงละ 20 กิโลกรัม อัดให้ภายในถุงมีอากาศเหลือน้อยที่สุด ปิดปากถุงให้สนิททันทีสำหรับการผลิตหญ้าหมักที่อาศัยการหมักโดยแบคทีเรียหรือจุลินทรีย์ที่พบหรือปนเปื้อนอยู่กับวัตถุดิบตามธรรมชาติ

สำหรับการผลิตหญ้าหมักที่มีการเติมกล้าเชื้อนั้น เติมกล้าเชื้อในปริมาณ 10^5 เซลล์ต่อกรัมของวัสดุหมัก โดยประมาณ ปิดปากถุงให้สนิทภายหลังจากเติมหัวเชื้อ เก็บถุงที่เตรียมได้ทั้งหมดไว้ในโรงเรือนให้เกิดการหมักในสภาพจำกัดออกซิเจนนาน 1 เดือน

2.8.3 การเก็บตัวอย่างหญ้าหมัก

ตัวอย่างหญ้าหมักที่เก็บเพื่อวิเคราะห์ มีดังนี้

1) วัตถุดิบก่อนหมัก

2) หญ้าหมัก ที่หมักวันที่ 0

3) หญ้าหมัก ที่หมักครบ 1 เดือน

เก็บตัวอย่างโดยใช้ปากคีบขนาดยาวประมาณ 1 ฟุต (ทำให้ปลอดเชื้อก่อนใช้ โดยจุ่มแอลกอฮอล์ (95%) แล้วผ่านเปลวไฟ ทิ้งให้เย็นประมาณ 15 วินาที ก่อนใช้งาน) คีบอาหารจากภาชนะบรรจุ ให้ได้ประมาณ 500 กรัมต่อซ้ำต่อตัวอย่าง เก็บสองซ้ำ บรรจุตัวอย่างอาหารลงในถุงพลาสติกใหม่และสะอาด รีดอากาศออกจากถุงบรรจุให้ได้มากที่สุด ปิดปากถุงให้สนิท เพื่อนำมาวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

2.8.4 การวิเคราะห์ตัวอย่างหญ้าหมัก

วิเคราะห์ตัวอย่างหญ้าหมัก ดังนี้

1) กลิ่นและลักษณะปรากฏ

2) ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)

วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของทุกตัวอย่างอาหารด้วยเครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH Meter) (CCMD 510 pH and conductivity meter, WPA, England)

3) การตรวจนับแบคทีเรียกรดแล็กติก

ตรวจนับแบคทีเรียกรดแล็กติกในตัวอย่างหญ้าหมักตามวิธีนับมาตรฐาน (Standard plate count) ทางจุลชีววิทยา โดยใช้อาหาร MRS agar (ภาคผนวก ค1) และ MRS agar ที่เติม 0.5% $CaCO_3$ Rogosa SL agar (Lactobacillus selective agar, ภาคผนวก ค2) โดยนำตัวอย่างหญ้าหมักปริมาณ 50 กรัม เจือจางในน้ำกลั่นปลอดเชื้อด้วยวิธี Serial dilution และเกลี่ย suspension ของเชื้อบนผิวหน้าอาหารด้วย Spread plate technique (Woolford, 1984) ทำการทดลองสองซ้ำ บ่มให้แบคทีเรีย

เจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาพไร้ออกซิเจน ใน Anaerobic chamber เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจนับโคโลนีของแบคทีเรียที่เจริญบนผิวหน้าอาหาร บันทึกค่า CFU (Colony forming unit) โดยถือว่า 1 CFU เจริญมาจาก 1 เซลล์ เลือกเก็บโคโลนีของที่มีลักษณะแตกต่างกัน และที่เหมือนกับกล้าเชื้อแยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ (pure culture) ด้วยวิธี Cross streak โดยใช้อาหาร MRS agar พร้อมทั้งตรวจสอบสัณฐานวิทยาของเซลล์ และวิเคราะห์สายพันธุ์ด้วยวิธีทางกรดนิวคลีอิค ตามวิธีที่ระบุในข้อ 2.2

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 3
ผลและอภิปรายผลการวิจัย

การดำเนินงานของโครงการวิจัย การพัฒนารูปแบบของกล้าเชื้อหญ้าหมัก เพื่อใช้ประโยชน์ในประเทศไทยหรือในเขตร้อนโดยเลือกกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกสายพันธุ์ธรรมชาติที่สามารถเจริญได้ดีในสิ่งแวดล้อมที่เอื้ออำนวยต่อการผลิตหญ้าหมักในสภาวะที่ไม่ต้องควบคุมอุณหภูมิ ได้ผลดังนี้

3.1. การเลือกและตรวจสอบสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อ

จากการเลือกสายพันธุ์ (ไอโซเลต) ของแบคทีเรียแล็กติกสายพันธุ์เด่นที่พบในหญ้าหมักที่ผลิตในประเทศไทย และแยกได้จากทางเดินอาหารของโค ที่มีแนวโน้มด้านการใช้เป็น Probiotics สำหรับโค ซึ่งเป็นผลจากที่ได้มีการศึกษาของผู้วิจัยและคณะที่ได้ดำเนินเสร็จสิ้นแล้ว (สุรีลักษณ์ รอดทอง และคณะ, 2545; สุรีลักษณ์ รอดทอง และ วิศิษฐิพร สุขสมบัติ, 2545) และเก็บรักษาอยู่ ณ หน่วยวิจัยเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์และการใช้ประโยชน์จุลินทรีย์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี เพื่อพัฒนาเป็นกล้าเชื้อเพื่อผลิตหญ้าหมัก คัดเลือกแบคทีเรียได้จำนวนทั้งสิ้น 191 ไอโซเลต (ตารางที่ 3.1) แบคทีเรียที่คัดเลือกเป็นกล้าเชื้อเหล่านี้แยกได้จากหลายแหล่ง ได้แก่ Sorghum silage และ Grass silage จากภาคเอกชน และหน่วยงานที่ผลิตระดับการค้าและที่ผลิตจากฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อุจจาระของโคทดลองที่ให้อาหาร Sorghum silage และกระเพาะหมักที่หนึ่ง (Rumen) ของโคทดลองที่ให้อาหาร Sorghum silage (ตารางที่ 3.1)

แบคทีเรียที่นำมาคัดเลือกส่วนใหญ่เป็น Lactobacilli ที่แยกและเลือกเก็บทั้งจากตัวอย่างอาหารโคและตัวอย่างจากโคทดลอง (โดยเจาะกระเพาะของโคทดลอง) ที่มีสมบัติทางสัณฐานวิทยาและทางชีวเคมีที่เป็น Lactobacilli ชนิดเด่น 11 ชนิด คือ *Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. casei*, *L._paracasei*, *L. delbrueckii*, *L. fermentum*, *L. fructosus*, *L. hilgardii* และ *L. rhamnosus* โดยที่สายพันธุ์เฉพาะของ *Lactobacillus plantarum* ได้ทดลองใช้เป็นหัวเชื้อในการผลิต Sorghum silage และผ่านการทดสอบความสามารถด้าน colonization ในระบบทางเดินอาหารของโค และมีความเป็นไปได้สำหรับการใช้เป็นหัวเชื้อ (Inoculant) ที่เหมาะสมในการผลิต Silage

เมื่อทดสอบแบคทีเรียกรดแล็กติกเหล่านี้ด้านความสามารถในการเจริญที่ดีและเร็วในอาหารเลี้ยงเชื้อ และรูปแบบเมแทบอลิซึมของกระบวนการหมักที่เป็น Homo- และ Hetero-lactic fermentation ประกอบกับข้อมูลที่ระบุถึงสมบัติของแบคทีเรียที่มีศักยภาพที่มีแนวโน้มด้านการใช้เป็น Probiotics สำหรับโค รวมทั้งเป็นชนิดเดียวกับที่มีการรายงานถึงสมบัติ Probiotics คัดเลือกเชื้อได้ 11 ไอโซเลต (สายพันธุ์) (ตารางที่ 3.1) ที่จัดอยู่ใน 4 สกุล คือ *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* และ *Pediococcus* ที่เมื่อตรวจสอบสายพันธุ์ของแบคทีเรียนั้นด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสมบัติทางชีวเคมีด้วยระบบ API (API 50CH/CHL, bioMérieux, France) ระบุชนิดได้แตกต่างกันดังนี้ *Lactobacillus acidophilus*

SUTC-T2R15, *L. brevis* SUTC-SL17, *L. fermentum* SUTC-P46, *L. paracasei* SUTC-T1R18, *L. plantarum* SUTC-T1R28, *L. rhamnosus* SUTC-T8F1, *Lactococcus lactis* SUTC-D44, *Leuconostoc mesenteroides* SUTC-FL36, *Pediococcus damnosus* SUTC-MCN23, *Pediococcus pentosaceus* SUTC-M2D3 และ *Pediococcus* sp. SUTC-F20 (ตารางที่ 3.2 และ 3.3) ที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาค่อนข้างแตกต่างกันทั้งโคโลนีที่เจริญบน MRS agar (รูปที่ 3.1) และรูปร่างและการเรียงตัวของเซลล์จากการย้อมสีแบบแกรม (รูปที่ 3.2) นอกจากนี้ยังได้ศึกษารูปร่างและการเรียงตัวของเซลล์ของแบคทีเรียที่เลือกเป็นกล้าเชื้อบางสายพันธุ์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope; SEM) เพื่อเพิ่มกำลังขยายให้เห็นรูปร่างและการเรียงตัวของเซลล์ที่แน่นอนยิ่งขึ้น โดยเตรียมเซลล์แบคทีเรียอายุ 48 ชั่วโมง ที่เจริญบน MRS agar บรรจุในจาน เลี้ยงเชื้อ ตัดชิ้นวุ้นบริเวณที่มีโคโลนีของแบคทีเรียเจริญให้ได้ชิ้นวุ้นขนาดประมาณ 3 ตารางมิลลิเมตร

ตารางที่ 3.1 จำนวนไอโซเลตของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่นำมาคัดเลือกที่แยกได้จากแหล่งต่างๆ และไอโซเลตที่เลือกเพื่อทดลองใช้เป็นกล้าเชื้อผลิตหญ้าหมัก

Source for bacterial isolation	**No. of isolate for selection**	**No. of selected isolate**	**Selected bacterial isolate**	
			code	**species**
Sorghum silage and Grass silage from commercial/ large scale production in Thailand	20	4	SUTC-D44	*Lactococcus lactis*
			SUTC-M2D3	*Pediococcus pentosaceus*
			SUTC-FL36	*Leuconostoc mesenteroides*
			SUTC-MCN23	*Pediococcus damnosus*
Sorghum silage and Grass silage from Suranaree University of Technology Farm	93	3	SUTC-SL17	*Lactobacillus brevis*
			SUTC-P46	*Lactobacillus fermentum*
			SUTC-F20	*Pediococcus* sp.
Rumen of fistulated cows fed with sorghum silage	42	3	SUTC-T2R15	*Lactobacillus acidophilus*
			SUTC-T1R18	*Lactobacillus paracasei*
			SUTC-T1R28	*Lactobacillus plantarum*
Feces of cows fed with sorghum silage	31	1	SUTC-T8F1	*Lactobacillus rhamnosus*
Total	191	11		

ตรึงเซลล์ด้วย 2% Glutaraldehyde (ภาคผนวก ก4) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย Cacodylate buffer (ภาคผนวก ก3) 2 ครั้ง จากนั้นแช่ใน Osmium tetroxide (ภาคผนวก ก9) ประมาณ 2 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย Cacodylate buffer 2 ครั้ง ดึงน้ำออกจากเซลล์และชิ้นวุ้นด้วยแอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้นเป็นลำดับในช่วง 30-100% ทำแห้งตัวอย่างที่จะตรวจสอบด้วย SEM ด้วยเครื่อง Critical point dryer (CPD, SAMDRI/PVT-3B, Tousimis Research Corporation, U.S.A.) จากนั้นติดตัวอย่างแห้งบน stub นำไปฉาบทองด้วยเครื่อง Ion sputtering device (JEOL, JFC-1100E, Japan) ตรวจดูรูปร่างและการเรียงตัวของเซลล์แบคทีเรียด้วย SEM (JSM-6400 Scanning Microscope, JEOL, JEOL Ltd., Japan) ซึ่งสามารถยืนยันรูปร่างและการเรียงตัวของเซลล์ของแบคทีเรียกรดแล็กติกได้ชัดเจน โดยเฉพาะอย่างยิ่งสายพันธุ์ *Lactococcus lactis* SUTC-D44, *Lactobacillus acidophilus* SUTC-T2R15, *L. plantarum* SUTC-T1R28, *L. paracasei* SUTC-T1R18, *Pediococcus damnosus* SUTC-MCN23 และ *Pediococcus pentosaceus* SUTC-M2D3 (รูปที่ 3.3)

อย่างไรก็ตามการระบุชนิดของแบคทีเรียกรดแล็กติกของโครงการนี้ อาศัยสมบัติทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีเป็นหลัก หลายไอโซเลตมีค่าความเหมือนต่ำกว่า 99% เมื่อเทียบกับแบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิง (ตารางที่ 3.3 และรูปที่ 3.4) โดยเฉพาะอย่างยิ่งไอโซเลต SUTC-D44 เหมือนกับ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 1 97.8%, SUTC-F20 ไม่สามารถระบุค่าความเหมือนกับชนิดใดในสกุล *Pediococcus* และ SUTC-FL36, SUTC-MCN23 และ SUTC-T2R15 ที่มีค่าความเหมือน 98.8, 93.8 และ 97.1% กับแบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิง *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus damnosus* และ *Lactobacillus acidophilus* ตามลำดับ แบคทีเรียที่แยกได้จากแหล่งธรรมชาติเหล่านี้อาจเป็นชนิดใหม่ จึงควรมีการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene ต่อไป

แบคทีเรียที่คัดเลือกเพื่อพัฒนาเป็นกล้าเชื้อหญ้าหมักจำนวน 11 สายพันธุ์ นี้มีทั้งที่จัดเป็น Homofermentatives และ Heterofermentatives เมื่อคำนึงถึง Fermentation pathway ของการใช้สารประกอบคาร์โบไฮเดรท ซึ่ง *Lactobacillus acidophilus*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus, Lactococcus lactis* และ *Pediococcus* sp. สายพันธุ์ที่คัดเลือกเป็น Homofermentatives ที่มี Homolactic fermentation สามารถผลิตกรดแล็กติกเท่านั้นเป็นผลผลิตจากการใช้น้ำตาลสำหรับ *Lactobacillus paracasei*, *L. plantarum* และ *L. rhamnosus* อาจจัดเป็น Facultative heterofermentatives ในขณะที่ *Lactobacillus brevis*, *L. fermentum* (ในบางสภาวะของการเจริญ) และ *Leuconostoc mesenteroides* เป็น Heterofermentatives ที่มี Heterolactic fermentation เมื่อใช้น้ำตาลแล้วเกิดกรดแล็กติกและผลผลิตอื่นด้วย ได้แก่ Acetic acid, Ethanol, Formic acid และคาร์บอนไดออกไซด์

ตารางที่ 3.2 ลักษณะเฉพาะที่แตกต่างกันของแบคทีเรียกรดแล็กติก 4 สกุล (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* และ *Pediococcus*) ที่คัดเลือกเป็นกล้าเชื้อเพื่อผลิตหญ้าหมัก

Characteristics	**Genus of lactic acid bacteria**			
	Lactobacillus	*Lactococcus*	*Leuconostoc*	*Pediococcus*
Cell morphology	Rods	Cocci	Ovoid, cocco-bacilli	Cocci
Tetrad formation	-	-	-	+
CO_2 from glucose[a]	±	-	+	-
Growth at 10ºC	±	+	+	±
Growth at 45ºC	±	-	-	±
Growth in 6.5% NaCl	±	-	±	±
Growth in 18% NaCl	-	-	-	-
Growth at pH 4.4	±	±	±	+
Growth at pH 9.6	-	-	-	-
Lactic acid[b]	D, L, DL[c]	L	D	L, DL[c]

+, Positive; -, negative; ±, response varies between bacterial species.

[a] Test for homo- or hetero-fermentation of glucose; negative and positive denotes homo-fermentative and hetero-fermentative, respectively.

[b] Configuration of lactic acid produced from glucose.

[c] Production of D-, L- or DL-lactic acid varies among species.

ที่มา: Axelsson (1998)

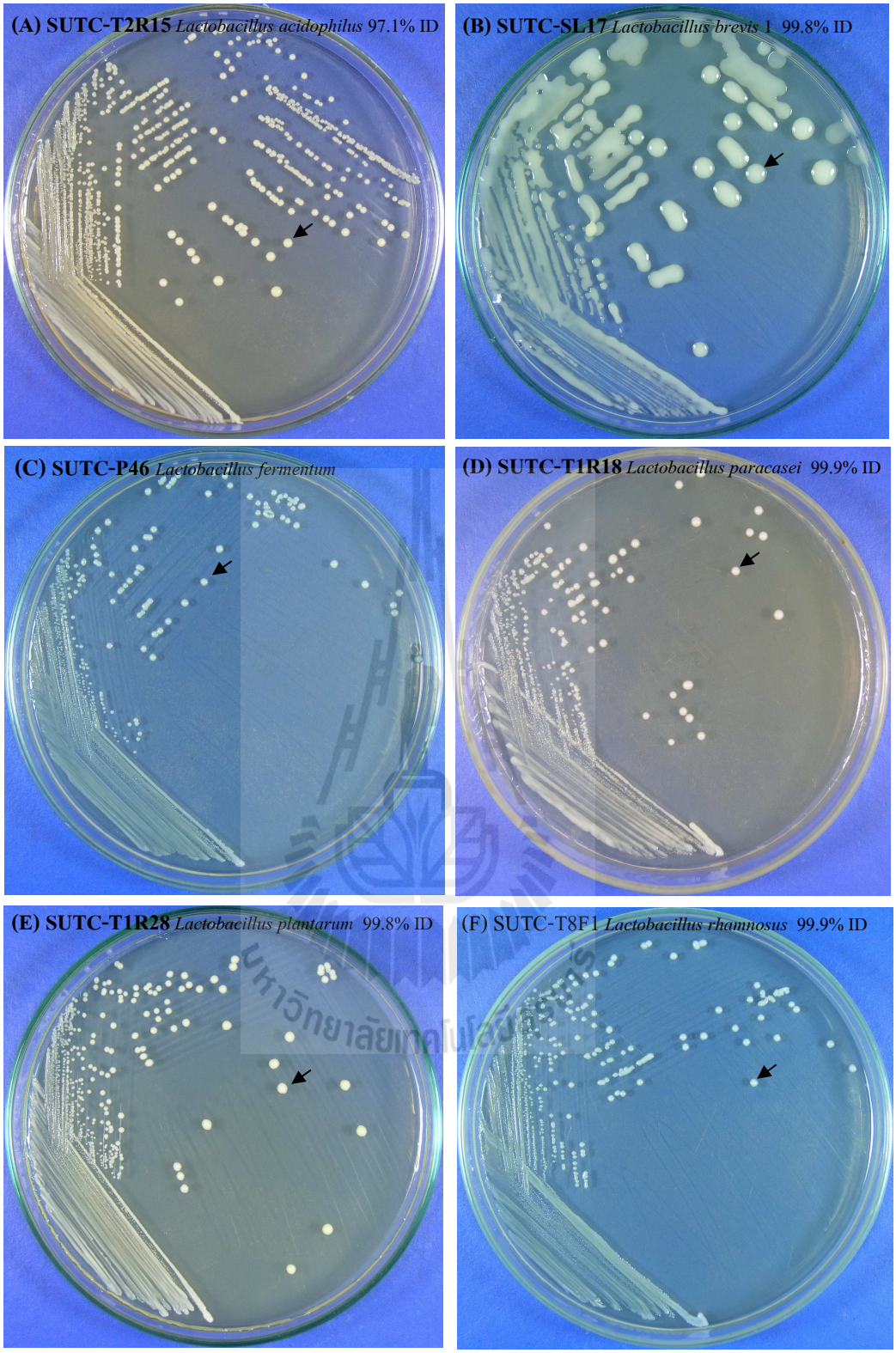
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 3.3 ลักษณะ/สมบัติ และผลการระบุชนิดของแบคทีเรียกรดแล็กติกไอโซเลตที่เลือกเป็นกล้าเชื้อ เมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียกรดแล็กติกจากฐานข้อมูลที่ทดสอบด้วยชุดทดสอบ API 50CH/CHL (bioMèrieux, France)

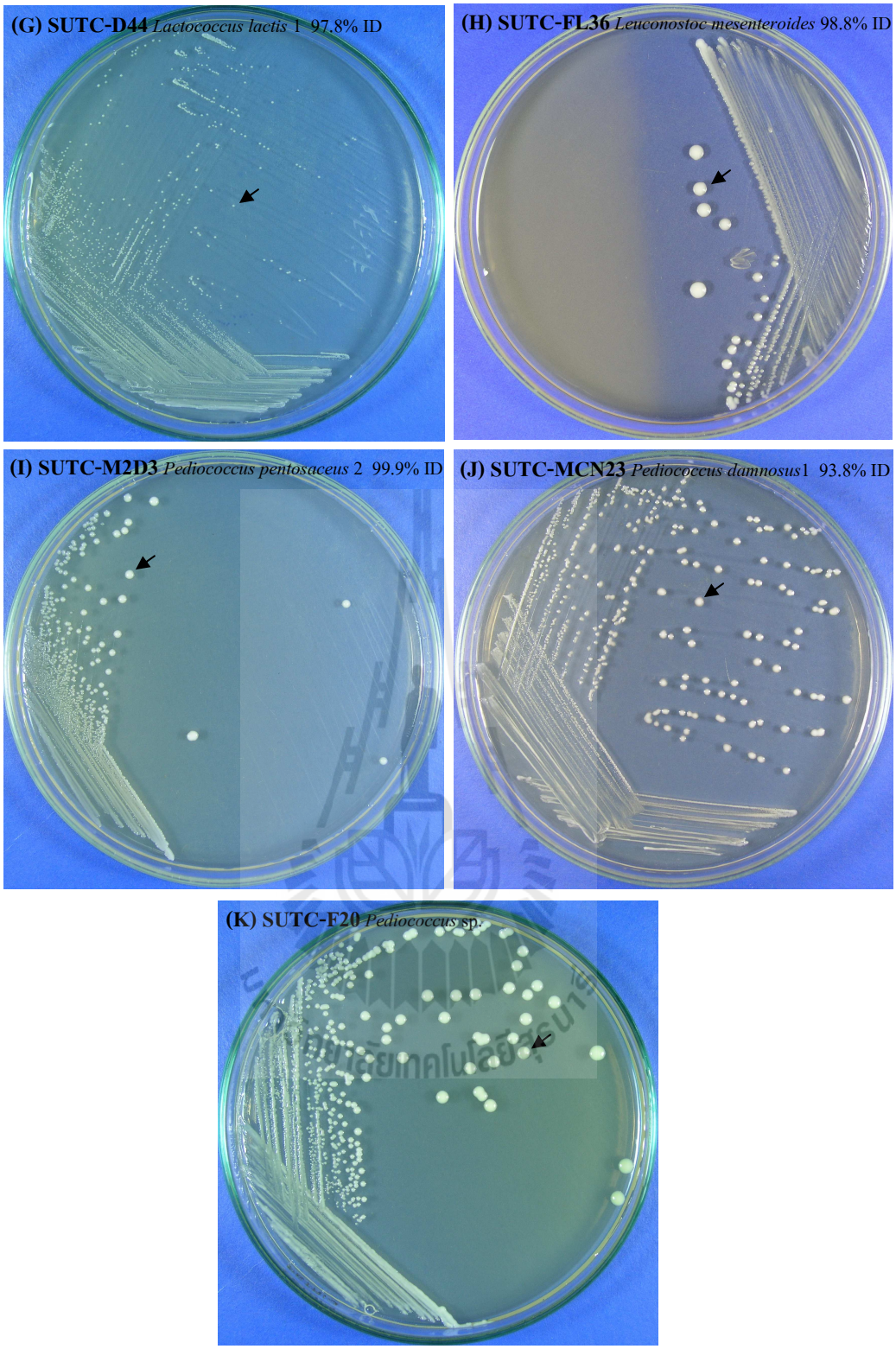
Isolate code	Colony on MRS agar (48 h)		Cell from Gram staining		Gas From glucose	Identification	
	Appearance	Diameter (mm)	Cell shape/ arrangement	Cell size (µm)		API 50CH/CHL database	% Identity[a]
SUTC-D44	White, translucent, smooth, circular, convex, entire	0.5-0.6	Cocci/ Chains (2-6 cells)	0.7-0.8	-	*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 1	97.8
SUTC-F20	White, smooth, circular, convex, entire	2.0-3.0	Cocci, tetrads	0.8-1.0	-	*Pediococcus* sp.	ND
SUTC-FL36	White, smooth, circular, convex, entire	2.0-3.0	Ovoid, cocco-bacilli, chains (2-6 cells)	0.6-0.7 ×0.8-1.0	+	*Leuconostoc mesenteroides*	98.8
SUTC-MCN23	White, smooth, circular, convex, entire	2.0-2.5	Cocci, tetrads	0.8-1.0	-	*Pediococcus damnosus*	93.8
SUTC-M2D3	White, smooth, circular, convex, entire	2.0-3.0	Cocci, tetrads	0.9-1.0	-	*Pediococcus pentosaceus* 2	99.9
SUTC-P46	White, translucent, smooth, circular, convex, entire	1.0-2.0	Rods, chains (2-4 cells)	0.5-0.8 ×1.0-2.0	+	*Lactobacillus fermentum*	ND
SUTC-SL17	White, creamy, smooth, circular, convex, entire	3.0-4.0	Rods, chains (2-6 cells)	0.5-0.7 ×0.8-1.0	-	*Lactobacillus brevis* 1	99.8
SUTC-T1R18	Convex, without pigment, entire, opaque	1.0-2.0	Rods, chains (2-4 cells)	0.6-0.8 ×1.0-1.5	-	*Lactobacillus paracasei*	99.9
SUTC-T1R28	Convex, entire, light yellow, opaque	2.0-2.5	Rods, chains (2-4 cells)	0.6-0.8 ×1.0-2.0	-	*Lactobacillus plantarum*	99.8
SUTC-T2R15	White, smooth, convex, entire, opaque	2.0-2.5	Rods, chains (2-4 cells)	0.6-0.8 ×1.0-3.0	-	*Lactobacillus acidophilus*	97.1
SUTC-T8F1	White, smooth, convex, entire, opaque	1.0-2.0	Rods, chains (2-6 cells)	0.5-0.6 ×1.0-3.0	-	*Lactobacillus rhamnosus*	99.9

ND, No data shown from API Database (bioMérieux)

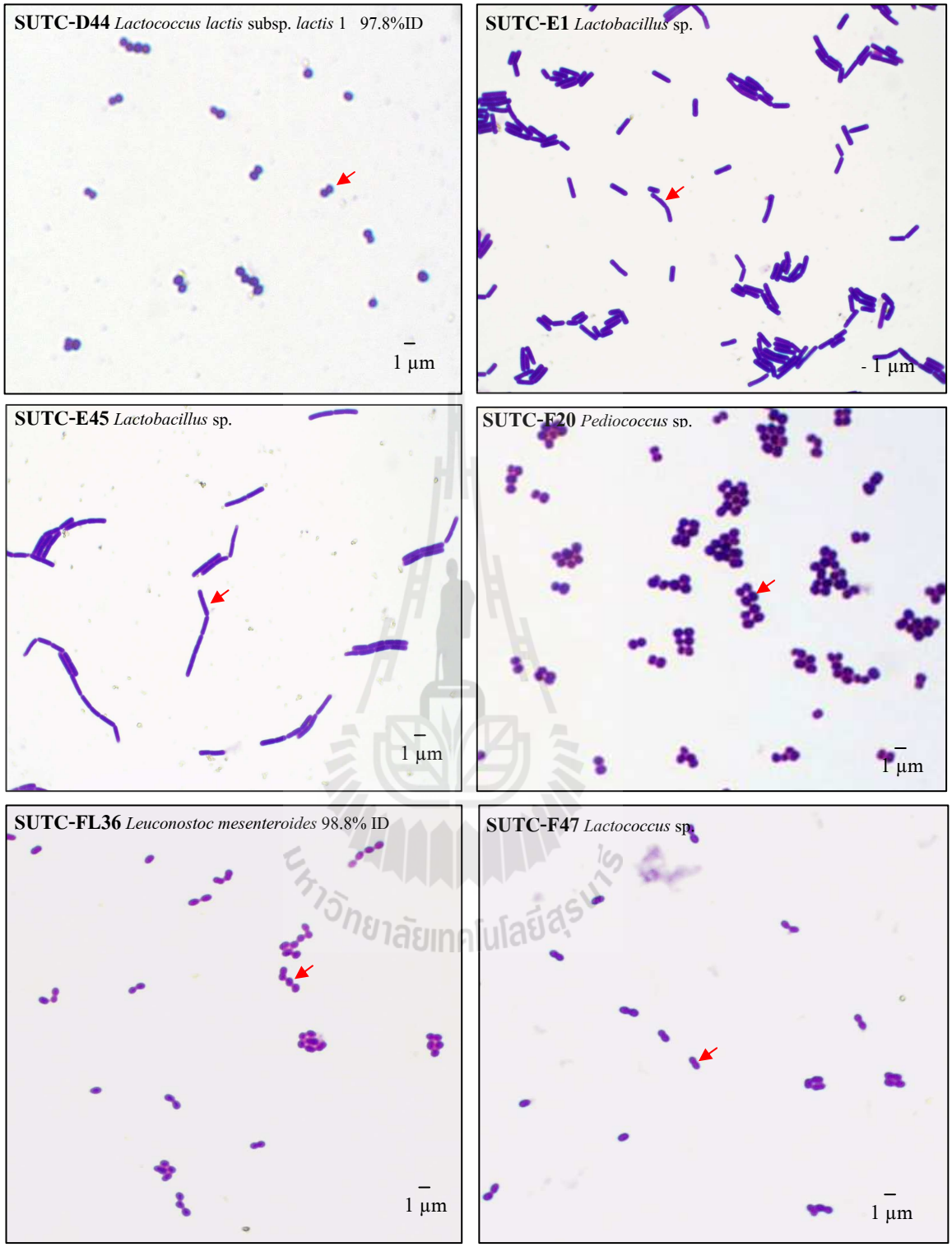
[a] Identity ที่น้อยกว่า 99% มีแนวโน้มที่อาจเป็นชนิดใหม่ ทั้งนี้ควรมีการศึกษาสารพันธุกรรม โดยเฉพาะอย่างยิ่ง 16S rRNA gene ต่อไป



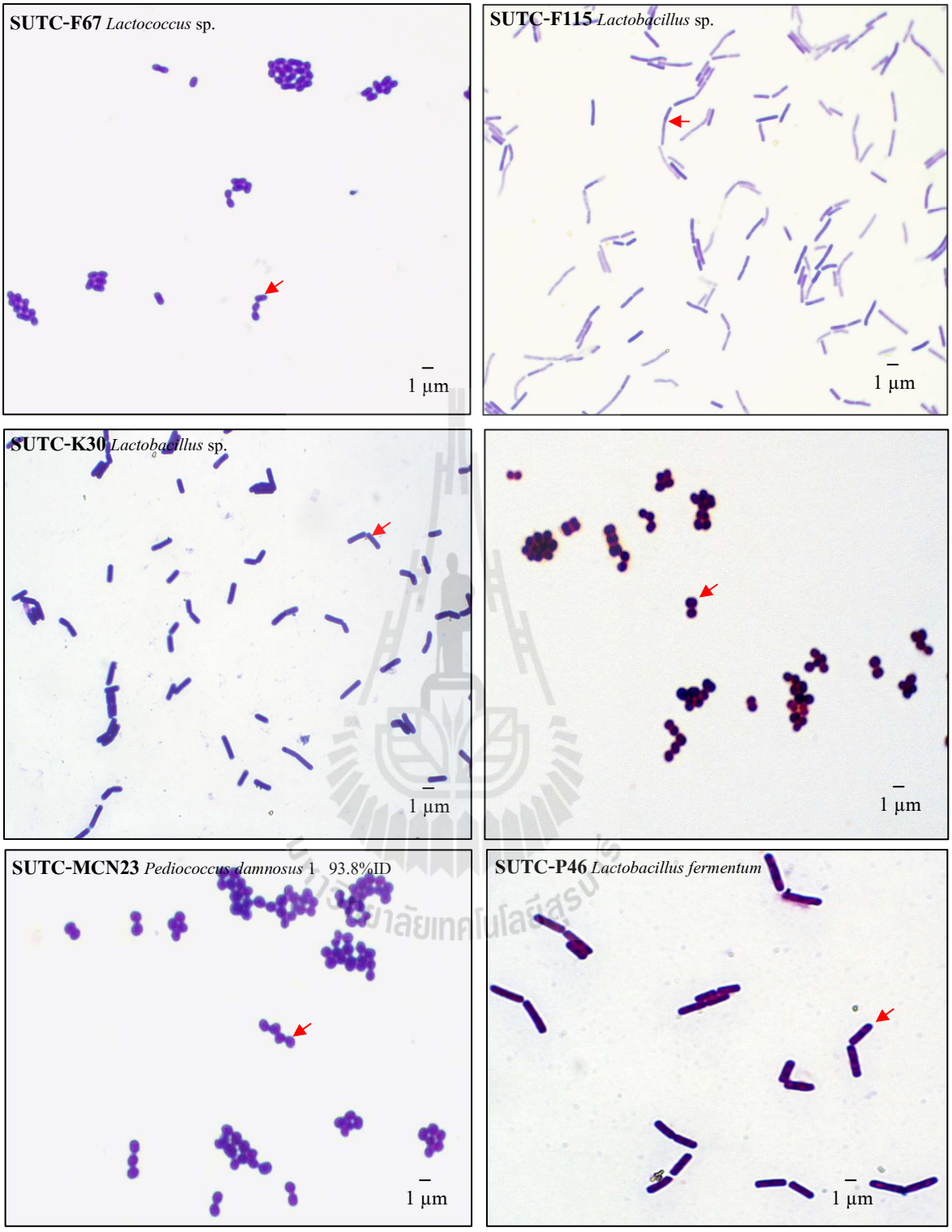
รูปที่ 3.1 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่เลือกเพื่อทดลองพัฒนาเป็นกล้าเชื้อเพื่อผลิตหญ้าหมัก (A) *Lactobacillus acidophilus* SUTC-T2R15, (B) *L. brevis* SUTC-SL17, (C) *L. fermentum* SUTC-P46, (D) *L. paracasei* SUTC-T1R18, (E) *L. plantarum* SUTC-T1R28, (F) *L. rhamnosus* SUTC-T8F1, (G) *Lactococcus lactis* SUTC-D44, (H) *Leuconostoc mesenteroides* SUTC-FL36, (I) *Pediococcus pentosaceus* SUTC-M2D3, (J) *Pediococcus damnosus* SUTC-MCN23 และ (K) *Pediococcus* sp. SUTC-F20 แบคทีเรียเจริญบนอาหาร MRS agar (ที่เติม 0.5% $CaCO_3$ ในอาหารบางจานเลี้ยงเชื้อ) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง



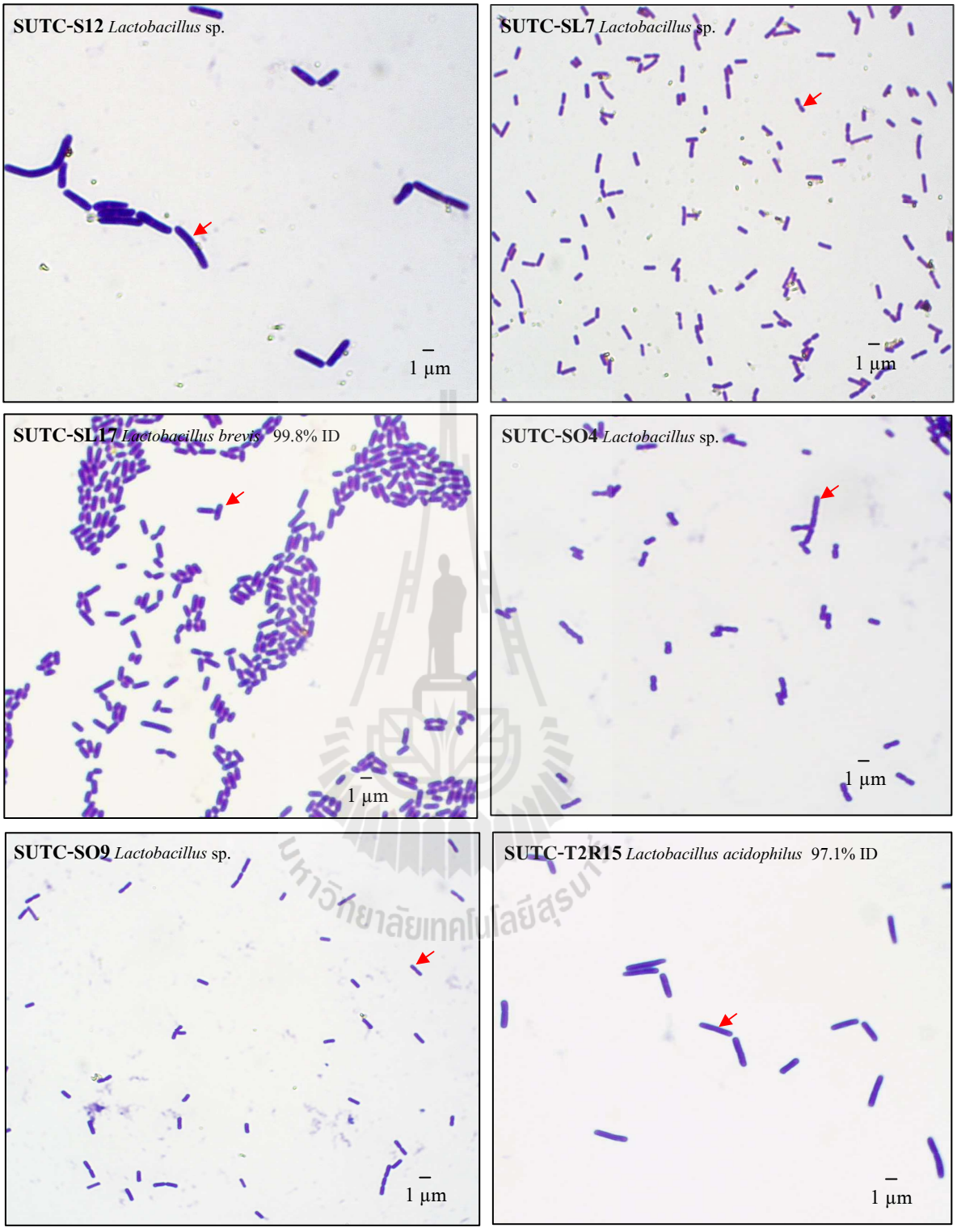
รูปที่ 3.1 (ต่อ) ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่เลือกเพื่อทดลองพัฒนาเป็นกล้าเชื้อเพื่อผลิตหญ้าหมัก (A) *Lactobacillus acidophilus* SUTC-T2R15, (B) *L. brevis* SUTC-SL17, (C) *L. fermentum* SUTC-P46, (D) *L. paracasei* SUTC-T1R18, (E) *L. plantarum* SUTC-T1R28, (F) *L. rhamnosus* SUTC-T8F1, (G) *Lactococcus lactis* SUTC-D44, (H) *Leuconostoc mesenteroides* SUTC-FL36, (I) *Pediococcus pentosaceus* SUTC-M2D3, (J) *Pediococcus damnosus* SUTC-MCN23 และ (K) *Pediococcus* sp. SUTC-F20 แบคทีเรียเจริญบนอาหาร MRS agar (ที่เติม 0.5% $CaCO_3$ ในอาหารบางจานเลี้ยงเชื้อ) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง



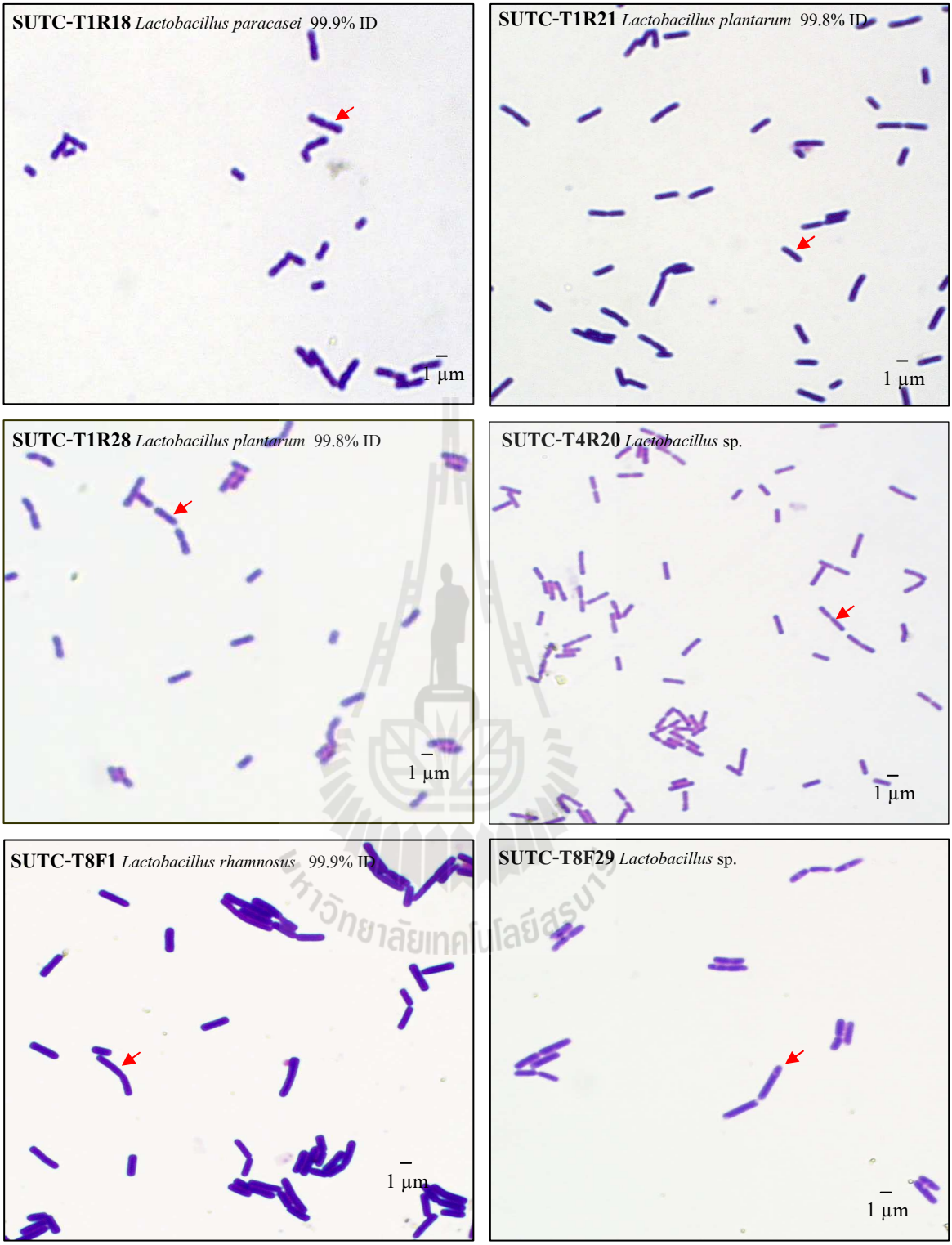
รูปที่ 3.2 รูปร่างและการเรียงตัวของเซลล์ (ลูกศร) ของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่คัดเลือกเพื่อทดลองพัฒนาเป็นกล้าเชื้อหญ้าหมัก (ย้อมสีเซลล์แบคทีเรียแบบแกรม และถ่ายภาพจาก Light microscope)



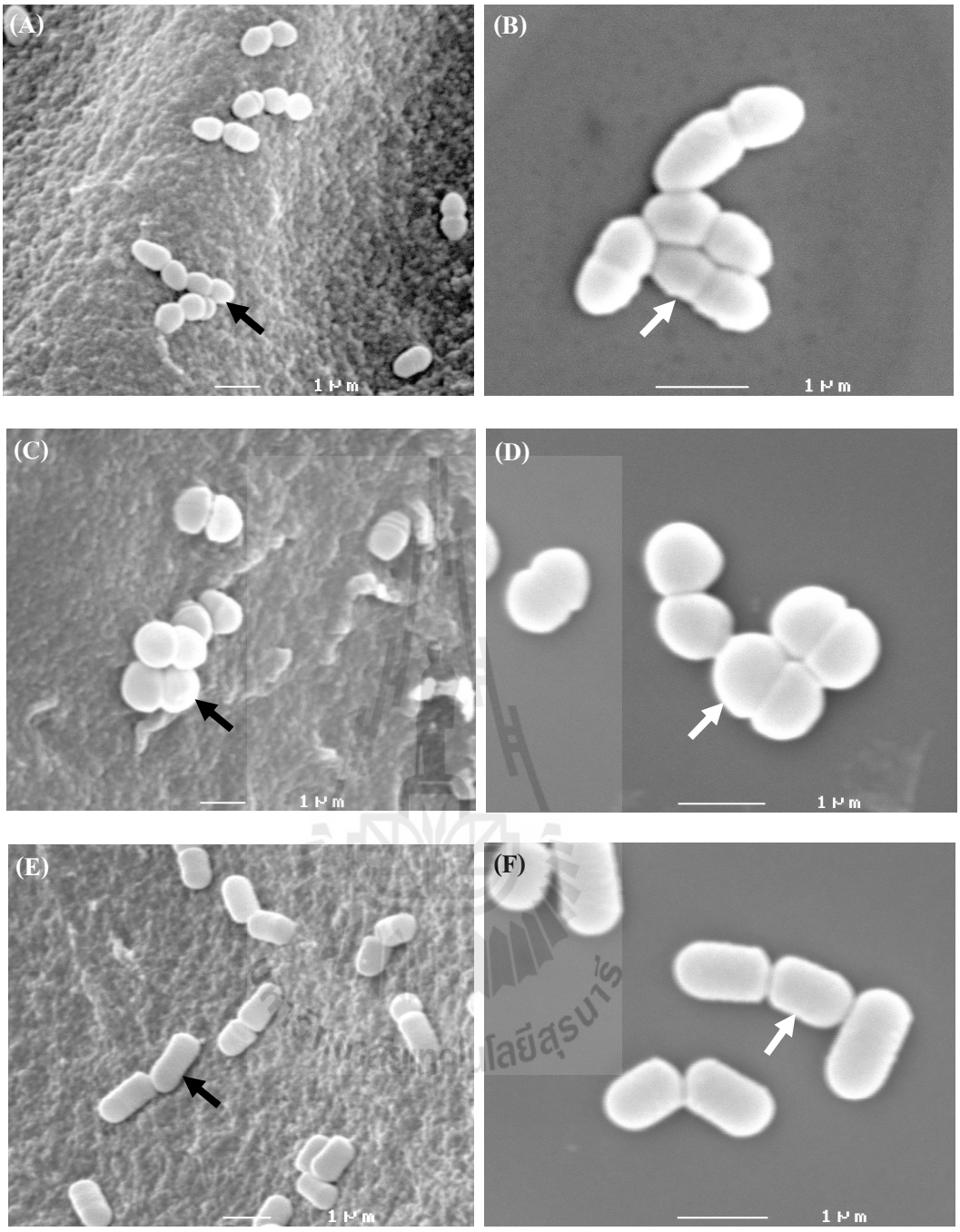
รูปที่ 3.2 รูปร่างและการเรียงตัวของเซลล์ (ลูกศร) ของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่คัดเลือกเพื่อทดลองพัฒนา (ต่อ) เป็นกล้าเชื้อหญ้าหมัก (ย้อมสีเซลล์แบคทีเรียแบบแกรม และถ่ายภาพจาก Light microscope)



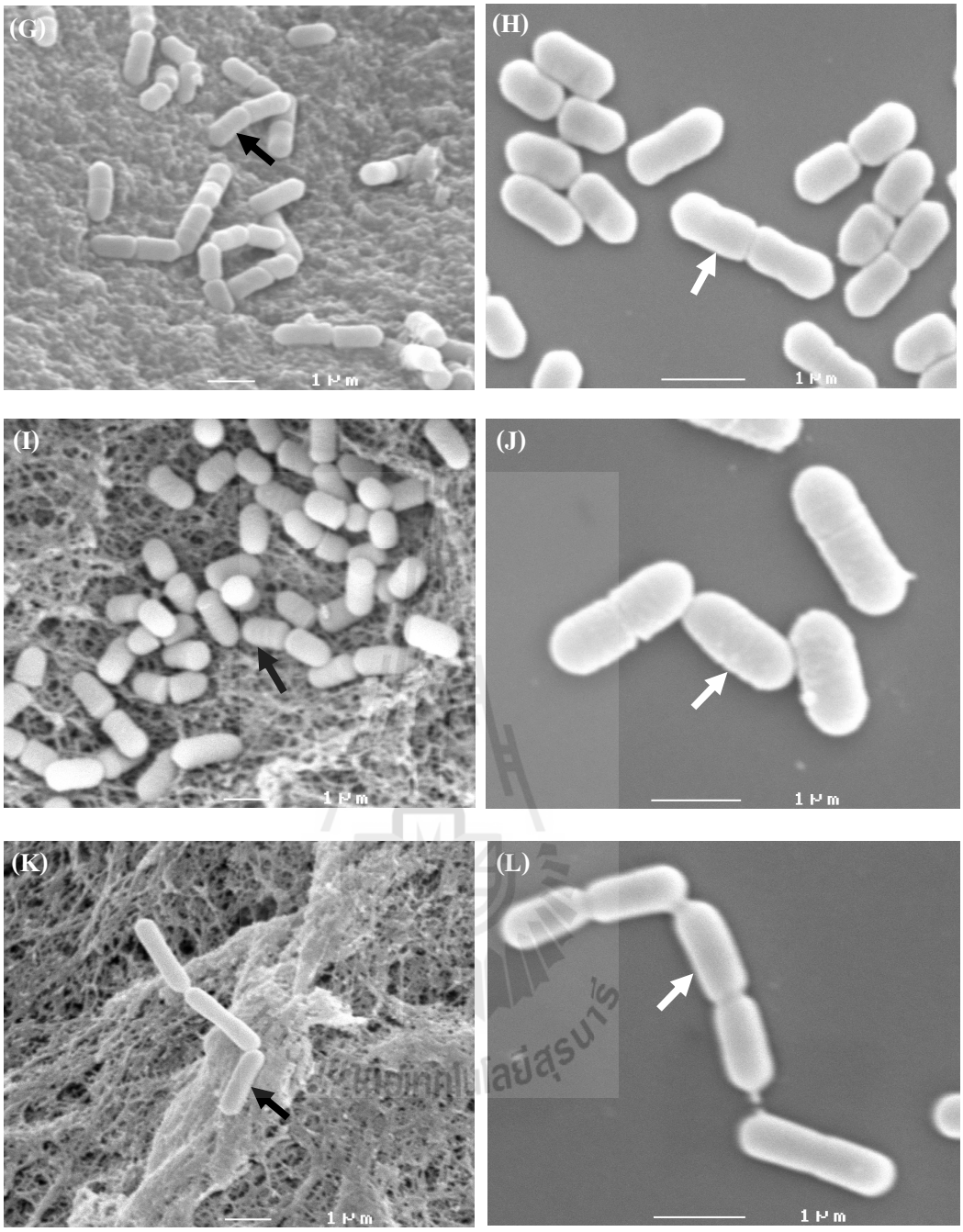
รูปที่ 3.2 รูปร่างและการเรียงตัวของเซลล์ (ลูกศร) ของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่คัดเลือกเพื่อทดลองพัฒนา (ต่อ) เป็นกล้าเชื้อหญ้าหมัก (ย้อมสีเซลล์แบคทีเรียแบบแกรม และถ่ายภาพจาก Light microscope)



รูปที่ 3.2 รูปร่างและการเรียงตัวของเซลล์ (ลูกศร) ของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่คัดเลือกเพื่อทดลองพัฒนา (ต่อ) เป็นกล้าเชื้อหญ้าหมัก (ย้อมสีเซลล์แบคทีเรียแบบแกรม และถ่ายภาพจาก Light microscope)



รูปที่ 3.3 รูปร่างและการเรียงตัวของเซลล์แบคทีเรียกรดแล็กติกที่คัดเลือกเพื่อพัฒนาเป็นกล้าเชื้อเมื่อเจริญบนอาหาร MRS agar เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (Scanning electron microscope; SEM) (A และ B) *Lactococcus lactis* SUTC-D44, (A และ B), *Pediococcus pentosaceus* SUTC-M2D3 (C และ D), *Lactobacillus plantarum* SUTC-T1R28 (E และ F), *L. paracasei* SUTC-T1R18 (G และ H), *L. acidophilus* SUTC-T2R15 (I และ J) และ *Pediococcus damnosus* SUTC-MCN23 (K และ L)



รูปที่ 3.3 (ต่อ) รูปร่างและการเรียงตัวของเซลล์แบคทีเรียกรดแล็กติกที่คัดเลือกเพื่อพัฒนาเป็นกล้าเชื้อเมื่อเจริญบนอาหาร MRS agar เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (Scanning electron microscope; SEM) (A และ B) *Lactococcus lactis* SUTC-D44, (A และ B), *Pediococcus pentosaceus* SUTC-M2D3 (C และ D), *Lactobacillus plantarum* SUTC-T1R28 (E และ F), *L. paracasei* SUTC-T1R18 (G และ H), *L. acidophilus* SUTC-T2R15 (I และ J) และ *Pediococcus damnosus* SUTC-MCN23 (K และ L)

api® 50 CH

Carbohydrates

COMPOSITION OF THE STRIP

The composition of the API 50 CH strip is given below in the list of tests :

Strip 0 - 9

Tube	Test	Active ingredients	QTY (mg/cup.)
0		CONTROL	-
1	GLY	GLYcerol	1.64
2	ERY	ERYthritol	1.44
3	DARA	D-ARAbinose	1.4
4	LARA	L-ARAbinose	1.4
5	RIB	D-RIBose	1.4
6	DXYL	D-XYLose	1.4
7	LXYL	L-XYLose	1.4
8	ADO	D-ADOnitol	1.36
9	MDX	Methyl-ßD-Xylopyranoside	1.28

Strip 10 - 19

Tube	Test	Active ingredients	QTY (mg/cup.)
10	GAL	D-GALactose	1.4
11	GLU	D-GLUcose	1.56
12	FRU	D-FRUctose	1.4
13	MNE	D-MaNnosE	1.4
14	SBE	L-SorBosE	1.4
15	RHA	L-RHAmnose	1.36
16	DUL	DULcitol	1.36
17	INO	INOsitol	1.4
18	MAN	D-MANnitol	1.36
19	SOR	D-SORbitol	1.36

Strip 20 - 29

Tube	Test	Active ingredients	QTY (mg/cup.)
20	MDM	Methyl-αD-Mannopyranoside	1.28
21	MDG	Methyl-αD-Glucopyranoside	1.28
22	NAG	N-AcetylGlucosamine	1.28
23	AMY	AMYgdalin	1.08
24	ARB	ARButin	1.08
25	ESC	ESCulin ferric citrate	1.16 0.152
26	SAL	SALicin	1.04
27	CEL	D-CELlobiose	1.32
28	MAL	D-MALtose	1.4
29	LAC	D-LACtose (bovine origin)	1.4

Strip 30 - 39

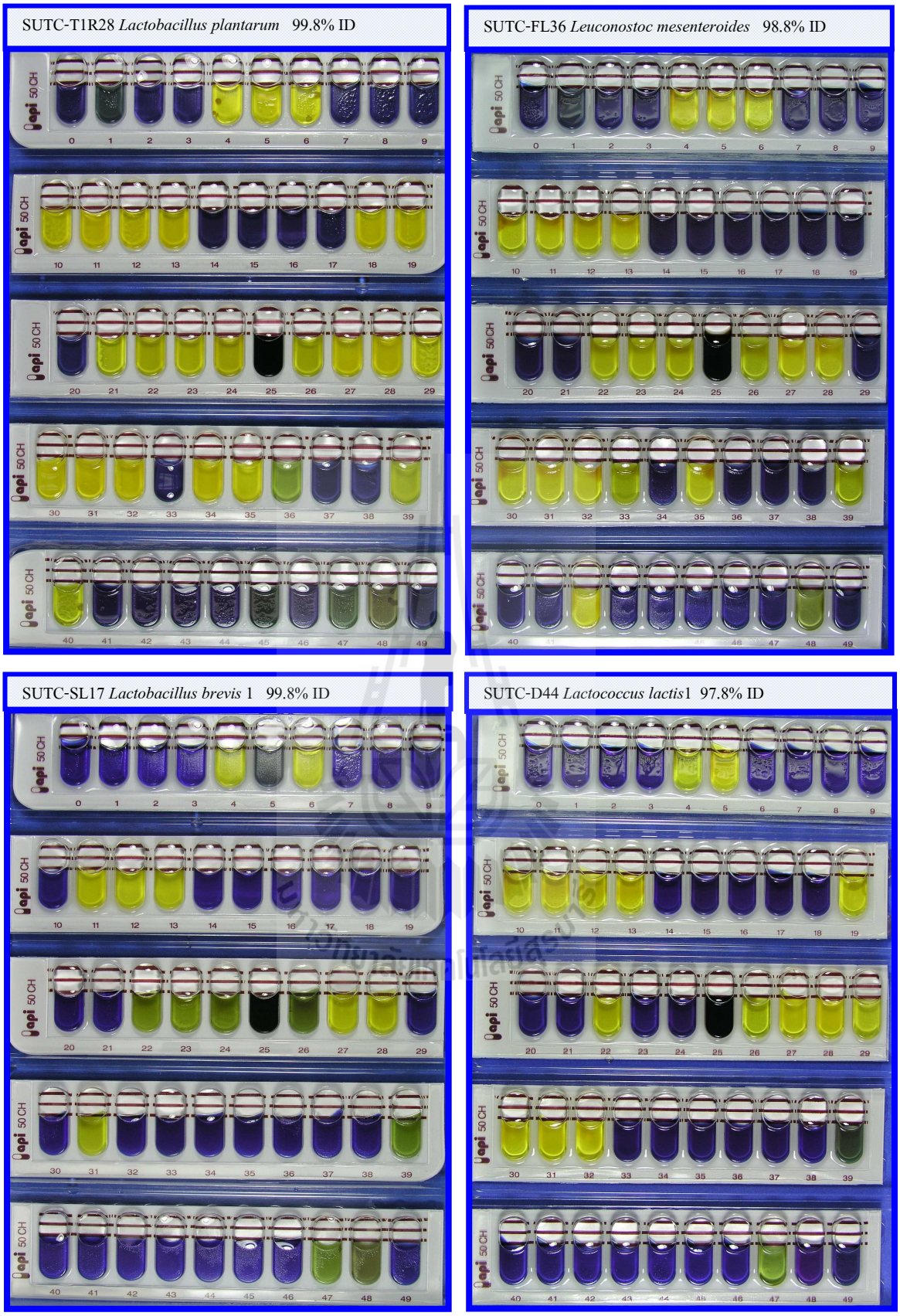
Tube	Test	Active ingredients	QTY (mg/cup.)
30	MEL	D-MELibiose	1.32
31	SAC	D-SACcharose (sucrose)	1.32
32	TRE	D-TREhalose	1.32
33	INU	INUlin	1.28
34	MLZ	D-MeLeZitose	1.32
35	RAF	D-RAFfinose	1.56
36	AMD	AmiDon (starch)	1.28
37	GLYG	GLYcoGen	1.28
38	XLT	XyLiTol	1.4
39	GEN	GENtiobiose	0.5

Strip 40 - 49

Tube	Test	Active ingredients	QTY (mg/cup.)
40	TUR	D-TURanose	1.32
41	LYX	D-LYXose	1.4
42	TAG	D-TAGatose	1.4
43	DFUC	D-FUCose	1.28
44	LFUC	L-FUCose	1.28
45	DARL	D-ARabitoL	1.4
46	LARL	L-ARabitoL	1.4
47	GNT	potassium GlucoNaTe	1.84
48	2KG	potassium 2-KetoGluconate	2.12
49	5KG	potassium 5-KetoGluconate	1.8

The quantities indicated may be adjusted depending on the titer of the raw materials used.

รูปที่ 3.4 ตัวอย่างผลการทดสอบสมบัติทางชีวเคมีตามระบบ API 50 CH/CHL (bioMèrieux, France) ของแบคทีเรียกรดแล็กติกสายพันธุ์ที่คัดเลือก ผลบวกสังเกตจากสีของอาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลือง ยกเว้นหลอดที่ 25 เปลี่ยนเป็นสีดำ



รูปที่ 3.4 (ต่อ) ตัวอย่างผลการทดสอบสมบัติทางชีวเคมีตามระบบ API 50 CH/CHL (bioMèrieux, France) ของแบคทีเรียกรดแล็กติกสายพันธุ์ที่คัดเลือก ผลบวกสังเกตจากสีของอาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลือง ยกเว้นหลอดที่ 25 เปลี่ยนเป็นสีดำ

แบคทีเรียกรดแล็กติกในสกุล *Lactobacillus* และ *Pediococcus* มีบทบาทสำคัญในการผลิต Silage (Hill and Hill, 1986; Cai *et al*., 1999) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Lactobacillus* และที่มีรายงานการใช้มากคือ *Lactobacillus plantarum* (Hill and Hill, 1986; Cocconcelli *et al*., 1991; Flores, 1991; Rooke, 1991; Fitzsimons *et al*., 1992; Sharp *et al*., 1992; Weinberg *et al*., 1993) ส่วน *Lactobacillus rhamnosus* มีรายงานการใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิต Silage ในประเทศญี่ปุ่น (Ohmomo *et al*., 2004) นอกจากนี้บริษัท Pioneer Hi-Bred Japan, Co., Tokyo ประเทศญี่ปุ่น ยังผลิตแบคทีเรียกรดแล็กติกชนิด *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum* และ *L. buchneri* เป็นกล้าเชื้อสำหรับผลิต Maize silage ในฟาร์มโคนม โดยที่ *Enterococcus faecium* และ *Lactobacillus plantarum* สายพันธุ์ที่ใช้เป็น Homofermentatives ที่สามารถผลิตกรดแล็กติกให้ได้ pH ของวัสดุหมักลดลงตามต้องการ และสายพันธุ์ *Lactobacillus buchneri* ที่ใช้เป็น Heterofermentatives ที่ผลิตกรดแล็กติกและกรดอะซิติก ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของยีสต์ช่วยลดการเสียของ Silage ในสภาวะที่มีออกซิเจน (Li and Nishino, 2011)

แบคทีเรียกรดแล็กติกในสกุล *Lactobacillus* เป็นแบคทีเรียแกรมบวกกลุ่มใหญ่ที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียกรดแล็กติกกลุ่มอื่น มีรูปร่างเซลล์เป็นท่อน (rod-shaped cell) ที่มีขนาดโดยปกติอยู่ในช่วง 0.5-1.2×1.0-10.0 ไมโครเมตร และมักพบเซลล์เป็นท่อนยาว แต่อาจพบเซลล์สั้นเกือบกลมก็ได้ เซลล์เรียงตัวเป็นสายสั้นๆ เป็นส่วนใหญ่ ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ แต่อาจพบบ้างที่เซลล์เคลื่อนที่ด้วย Peritrichous flagella พบทั้ง Microaerophiles, Facultative anaerobes และ Anaerobes การเจริญมักกระตุ้นด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ปริมาณ 5% อุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญอยู่ในช่วง 30-40 องศาเซลเซียส เป็นพวก Chemoorganotrophs ที่ต้องการธาตุอาหารสมบูรณ์ และสร้างกรดแล็กติกเป็นผลผลิตหลัก (อย่างน้อย 50%) จากกลูโคส มีบทบาทสำคัญในการผลิต Silage สำหรับใช้เป็นอาหารสัตว์ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Lactobacillus brevis*, *L. buchneri*, *L. casei*, *L. coryniformis*, *L. curvatus*, *L. fermentum*, *L. plantarum* (Kandler and Weiss, 1986; Brookes and Buckle, 1992) แบคทีเรียในสกุล *Lactobacillus* ยังเป็นจุลินทรีย์กลุ่มที่สำคัญกลุ่มหนึ่งที่นิยมใช้ผลิต Probiotics ที่นิยมใช้กันมากคือ *Lactobacillus acidophilus* ซึ่งมีหลายสายพันธุ์และแต่ละสายพันธุ์ก็มีความจำเพาะต่อชนิดของสัตว์ ส่วน *Lactobacillus* species อื่นที่มีรายงานการใช้อยู่บ้างเช่น *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. casei* และ *L. helviticus* (Fuller, 1992, 1995)

นอกจากการตรวจสอบสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่คัดเลือกด้วยสมบัติทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีแล้ว ยังได้ใช้วิธี Random amplified polymorphic DNA (RAPD) ที่ใช้ Primer 3 (5'-GTAGACCCGT-3'; RAPD Analysis Primer Set, Pharmacia Biotech) ซึ่งแบคทีเรียกรดแล็กติกแต่ละสายพันธุ์มีแบบแผน RAPD ที่เฉพาะมีความแตกต่างกันเอง (รูปที่ 3.5) แบคทีเรียกรดแล็กติกไอโซเลตที่คัดแยกได้จากหญ้าหมักและทางเดินอาหารของโค ที่ระบุชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานและสรีรวิทยาได้ว่าเป็น *Lactobacillus fermentum* ต่างไอโซเลตกันยังมีความแตกต่างของ แบบแผน RAPD (ช่องที่ 1, 2, 3, 6, 8

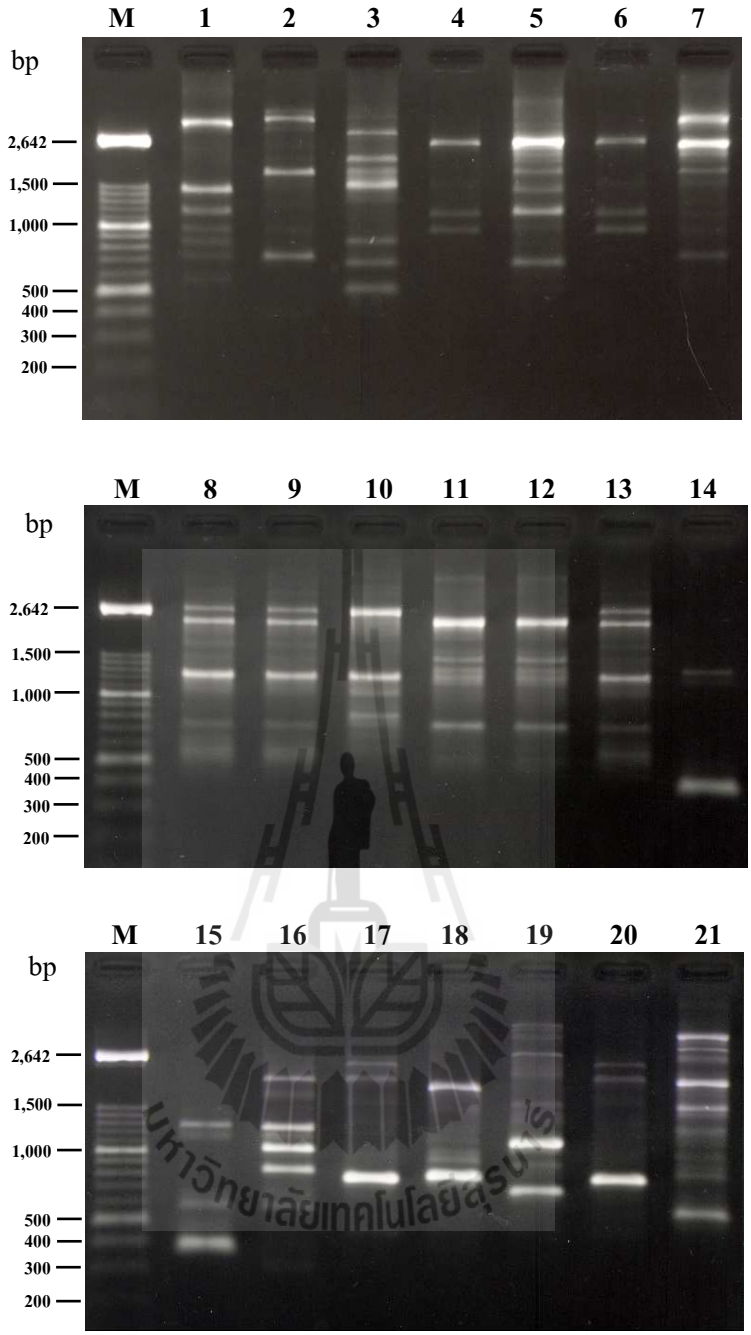
และ 9 รูปที่ 3.5) และยังแตกต่างจาก Type culture strain คือ *L. fermentum* ATCC 14931 (ช่องที่ 41 รูปที่ 3.5) ทำนองเดียวกับ *Lactobacillus plantarum* ที่คัดแยกได้จากหญ้าหมักและทางเดินอาหารของโค (ช่องที่ 10 ถึง 13, 16 ถึง 20, 37 และ 38 รูปที่ 3.5) ที่แตกต่างจาก Type culture strain คือ *L. plantarum* ATCC 14917 (ช่องที่ 40 รูปที่ 3.5)

กรณีแบบแผน RAPD ของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่เลือกเพื่อทดลองพัฒนาเป็นกล้าเชื้อเพื่อผลิตหญ้าหมักจำนวน 11 ไอโซเลท คือ *Lactobacillus plantarum* SUTC-T1R28, *L. brevis* SUTC-SL17, *L. fermentum* SUTC-P46, *L. paracasei* SUTC-T1R18, *Lactococcus lactis* SUTC-D44, *Pediococcus* sp. SUTC-F20, *L. acidophilus* SUTC-T2R15, *Pediococcus pentosaceus* SUTC-M2D3, *Pediococcus damnosus* SUTC-MCN23, *Leuconostoc mesenteroides* SUTC-FL36 และ *Lactobacillus rhamnosus* SUTC-T8F1 (ช่องที่ 22, 23 และ 34, 24, 25, 26 และ 29, 27, 28, 31, 32, 33 และ 35 ตามลำดับ รูปที่ 3.5) มีแบบแผนเฉพาะที่แตกต่างกัน

Lactobacillus plantarum SUTC-T1R28 (ช่องที่ 22 รูปที่ 3.5) มีแบบแผน RAPD ที่มีแถบ DNA หลัก 3 แถบ ซึ่งมีขนาดในช่วง 500-3,000 bp ใกล้เคียงกับ *Lactobacillus brevis* SUTC-SL17 (ช่องที่ 23 และ 34 รูปที่ 3.5) แต่มีความแตกต่างของแถบ DNA ตำแหน่งที่ 4 และแตกต่างจาก *L. plantarum* ATCC 14917 ที่แบบแผน RAPD มีแถบ DNA หลัก 4 แถบ (ช่องที่ 40 รูปที่ 3.5)

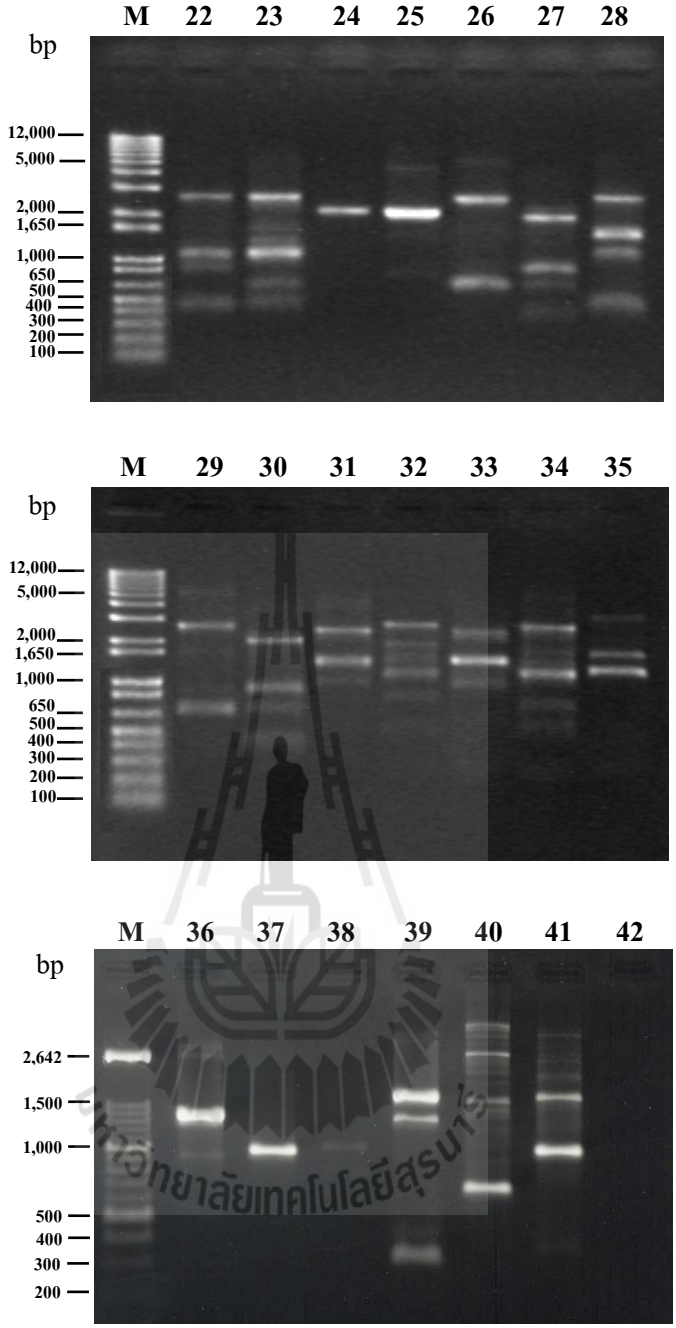
สำหรับ *Lactobacillus fermentum* SUTC-P46 ที่เลือกเพื่อทดลองพัฒนาเป็นกล้าเชื้อเพื่อผลิตหญ้าหมัก พบว่าแบบแผน RAPD ที่ได้จากการใช้ Primer 3 มีเพียงแถบ DNA หลัก 1 แถบ ที่มีขนาดประมาณ 2,000 bp (ช่องที่ 24 รูปที่ 3.5) แตกต่างจาก *L. fermentum* ATCC 14931 ที่มีแถบ DNA หลัก 5 แถบ มีขนาดประมาณ 2,600, 2,000, 1,800, 1,500 และ 900 bp (ช่องที่ 41 รูปที่ 3.5) และแตกต่างจาก *L. fermentum* ไอโซเลตที่คัดแยกได้จากหญ้าหมักและทางเดินอาหารของโคที่ไม่ได้เลือกเพื่อทดลองพัฒนาเป็นกล้าเชื้อ (ช่องที่ 1, 2, 3, 6, 8 และ 9 รูปที่ 3.5)

แบบแผน RAPD ที่เฉพาะมีความแตกต่างกันเหล่านี้ สามารถใช้แบบแผนนี้เป็นสิ่งบ่งบอกสายพันธุ์ของแบคทีเรียกล้าเชื้อในขณะติดตามการใช้ประโยชน์แบคทีเรียได้



รูปที่ 3.5 แบบแผน RAPD ของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่นำมาคัดเลือกเป็นกล้าเชื้อเมื่อใช้ Primer 3 (RAPD Analysis Primer Set, Pharmacia Biotech)

ช่องที่: M, DNA Molecular weight markers (100 bp DNA Ladder, Boehringer Mannheim สำหรับเทียบช่องที่ 1-21 และ 1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen สำหรับเทียบช่องที่ 22-42); 1 ถึง 24, แบคทีเรียกรดแล็กติกที่แยกจาก Silage (ช่องที่ 1, 2, 3, 6, 8 และ 9; *Lactobacillus fermentum* ต่างไอโซเลต (สายพันธุ์); 4 และ 5, *L. delbrueckii* ต่างไอโซเลต; 7, 15, และ 36, *L. gasseri* ต่างไอโซเลต; 9, *L. farciminis*; 10 ถึง 13, 16 ถึง 20, 37 และ 38, *L. plantarum* ต่างไอโซเลต; 14 และ 21, *L. acidophilus* ต่างไอโซเลต; 22, SUTC-T1R28; 23, SUTC-SL17; 24, SUTC-P46; 25, SUTC-T1R18; 26, SUTC-D44; 27, SUTC-F20; 28, SUTC-T2R15; 29, SUTC-D44; 30, SUTC-F20; 31, SUTC-M2D3; 32, SUTC-MCN23; 33, SUTC-FL36; 34, SUTC-SL17; 35, SUTC-T8F1; 39, *L. reuteri* DSM 20016; 40, *L. plantarum* ATCC 14917; 41, *L. fermentum* ATCC 14931 และ 42, Negative control



รูปที่ 3.5 แบบแผน RAPD ของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่นำมาคัดเลือกเป็นกล้าเชื้อเมื่อใช้ Primer 3 (RAPD (ต่อ) Analysis Primer Set, Pharmacia Biotech)

ช่องที่: M, DNA Molecular weight markers (100 bp DNA Ladder, Boehringer Mannheim สำหรับเทียบช่องที่ 1-21 และ 1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen สำหรับเทียบช่องที่ 22-42); 1 ถึง 24, แบคทีเรียกรดแล็กติกที่แยกจาก Silage (ช่องที่ 1, 2, 3, 6, 8 และ 9; *Lactobacillus fermentum* ต่างไอโซเลต (สายพันธุ์); 4 และ 5, *L. delbrueckii* ต่างไอโซเลต; 7, 15, และ 36, *L. gasseri* ต่างไอโซเลต; 9, *L. farciminis*; 10 ถึง 13, 16 ถึง 20, 37 และ 38, *L. plantarum* ต่างไอโซเลต; 14 และ 21, *L. acidophilus* ต่างไอโซเลต; 22, SUTC-T1R28; 23, SUTC-SL17; 24, SUTC-P46; 25, SUTC-T1R18; 26, SUTC-D44; 27, SUTC-F20; 28, SUTC-T2R15; 29, SUTC-D44; 30, SUTC-F20; 31, SUTC-M2D3; 32, SUTC-MCN23; 33, SUTC-FL36; 34, SUTC-SL17; 35, SUTC-T8F1; 39, *L. reuteri* DSM 20016; 40, *L. plantarum* ATCC 14917; 41, *L. fermentum* ATCC 14931 และ 42, Negative control

3.2. การศึกษาส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแล็กติกที่คัดเลือกได้ เพื่อลดต้นทุนการผลิตกล้าเชื้อ

ด้วยมุ่งหวังให้ได้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบไม่ซับซ้อนและราคาถูกที่ส่งเสริมการเจริญที่ดีที่สุดของแบคทีเรียกรดแล็กติกสายพันธุ์ที่คัดเลือกเป็นกล้าเชื้อ เพื่อพัฒนารูปแบบของการเตรียมกล้าเชื้อนั้นเพื่อผลิตหญ้าหมักที่เป็นอาหารสัตว์ ในขั้นตอนนี้ได้คัดเลือกแบคทีเรียกรดแล็กติกไว้จำนวน 11 ไอโซเลต (สายพันธุ์) คือ *Lactobacillus acidophilus* SUTC-T2R15, *L. brevis* SUTC-SL17, *L. fermentum* SUTC-P46, *L. paracasei* SUTC-T1R18, *L. plantarum* SUTC-T1R28, *L. rhamnosus* SUTC-T8F1, *Lactococcus lactis* SUTC-D44, *Leuconostoc mesenteroides* SUTC-FL36, *Pediococcus pentosaceus* SUTC-M2D3, *Pediococcus damnosus* SUTC-MCN23 และ *Pediococcus* sp. SUTC-F20 ซึ่งทุกไอโซเลตเจริญได้ดีในอาหาร MRS medium (MERCK, Merck KgaA, Germany) (ตารางที่ 3.4) จึงเริ่มพัฒนาส่วนประกอบของอาหารจากสูตรอาหารดังกล่าว เพื่อให้ได้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบที่เตรียมง่ายและมีต้นทุนต่ำกว่าอาหารสมบูรณ์เริ่มต้น ดังนี้

3.2.1 ชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอน

ก. ชนิดของแหล่งคาร์บอน

จากส่วนประกอบเริ่มต้นตาม MRS medium ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ได้เปลี่ยนชนิดของแหล่งคาร์บอนเป็นชนิดที่มีราคาถูกกว่ากลูโคส คือ ซูโครส (Sucrose; AR grade, Carlo Erba, Italy) น้ำตาลทรายหรือน้ำตาลที่ผลิตจากอ้อย (Cane sugar; น้ำตาลทรายบริสุทธิ์มิตรผล บริษัท รวมเกษตรกรอุตสาหกรรม จำกัด) กากน้ำตาลจากอ้อย (Molasses; โรงงานผลิตน้ำตาลจากอ้อยในพื้นที่จังหวัดนครราชสีมา) แป้งข้าวเจ้า (Rice flour, Food grade ตราช้างสามเศียร บริษัท โรงเส้นหมี่ชอเฮง จำกัด ประเทศไทย) และแป้งมันสำปะหลัง (Tapioca starch, Edible grade, Sanguan Wongse Industries Co., Ltd., Thailand) ในปริมาณ 2% (น้ำหนักต่อปริมาตร) เท่ากับกลูโคสที่ใช้ในสูตรเริ่มต้น กรณีกากน้ำตาลจากอ้อยมีส่วนประกอบที่สำคัญคือ น้ำตาลทั้งหมด (Total sugars) 48.3% ซูโครส 35.9% ฟรุกโทส 5.6% กลูโคส 2.6% โปรตีนหยาบ 6.30% และมีเกลือแร่และวิตามิน (Biotin, Riboflavin, Thaiamine, Niacin) ในปริมาณที่น้อย (Molasses & Liquid Feeds Division, United States Sugar) เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียกรดแล็กติกเป็นเวลา 20 ชั่วโมง พบว่าทุกไอโซเลตมีการเจริญได้ดีมากในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีซูโครส ตรวจนับจำนวนเซลล์ได้สูงสุดในช่วง 1.40×10^{9} ถึง 6.60×10^{9} CFU ต่อมิลลิลิตร ที่สามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนทดแทนกลูโคสได้ถึงแม้จะส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียบางไอโซเลทได้ด้อยกว่ากลูโคสเล็กน้อย (ตารางที่ 3.5) รองลงมา คือ อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลที่ผลิตจากอ้อย (ตรวจนับจำนวนเซลล์ได้สูงสุดในช่วง 3.80×10^{8} ถึง 2.10×10^{9} CFU ต่อมิลลิลิตร) และกากน้ำตาล (ตรวจนับจำนวนเซลล์ได้สูงสุดในช่วง 1.36×10^{7} ถึง 1.95×10^{8} CFU ต่อมิลลิลิตร) ตามลำดับ แบคทีเรียกรดแล็กติกทั้ง 11 ไอโซเลต ที่ทดสอบเจริญได้น้อยในอาหารที่มีแป้งเป็นแหล่งคาร์บอนหลัก เนื่องจากแบคทีเรียเหล่านี้ไม่

สามารถย่อยแป้งได้ แต่ยังสามารถใช้ Peptone, Beef extract และ Yeast extract ซึ่งเป็นส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ (ตารางที่ 3.4) ในการเจริญที่สามารถตรวจนับจำนวนได้ การศึกษาครั้งนี้จึงเลือกใช้น้ำตาลทราย (น้ำตาลที่ผลิตจากอ้อย) และกากน้ำตาล เนื่องจากมีราคาถูกกว่าซูโครสราว 20 เท่า มาพัฒนาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนหลักและศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสม เพื่อเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดเลือก

ตารางที่ 3.4 ส่วนประกอบของอาหาร MRS (DeMan, Rogosa, Sharpe; Atlas, 2000) ที่ใช้ศึกษาชนิดและแหล่งสารอาหารที่เหมาะสม

Component	Concentration (%)
Glucose	2.0
Tryptone (Pancreatic digest of casein)	1.0
Meat extract	0.8
Yeast extract	0.4
Sodium acetate tri-hydrate	0.5
Di-potassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4)	0.2
Tri-ammonium citrate	0.2
Magnesium sulfate ($MgSO_4.7H_2O$)	0.02
Manganese sulfate ($MnSO_4.4H_2O$)	0.004
Tween 80	0.1
Initial pH 7.0	

ข. ความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอน

จากที่ได้เลือกน้ำตาลทรายที่ผลิตจากอ้อยและกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับเลี้ยงแบคทีเรียกล้าเชื้อ ได้ศึกษาความเข้มข้นของน้ำตาลทรายในช่วง 0.5-6.0% และกากน้ำตาลที่ความเข้มข้นในช่วง 0.5-4.0% พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 20 ชั่วโมง แบคทีเรียกล้าเชื้อเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลทรายที่ผลิตจากอ้อยในช่วง 1.0-4.0% แตกต่างกันตามสายพันธุ์ โดยที่ความเข้มข้นของน้ำตาลทราย 2.0% สนับสนุนการเจริญของแบคทีเรียกล้าเชื้อส่วนใหญ่ได้ดี คือ *Pediococcus* sp. SUTC-F20 มีการเจริญที่ตรวจนับจำนวนได้สูงสุด 3.09×10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร (จำนวนแบคทีเรียที่เพิ่มขึ้นจากชั่วโมงที่ 0 เมื่อเริ่มเลี้ยงเชื้อ 3.09×10^3 CFU ต่อมิลลิลิตร) *Leuconostoc mesenteroides* SUTC-FL36 จำนวนสูงสุด 2.70×10^7 CFU ต่อมิลลิลิตร (จำนวนแบคทีเรียที่เพิ่มขึ้นจากชั่วโมงที่ 0 เมื่อเริ่มเลี้ยงเชื้อ 2.67×10^2 CFU ต่อมิลลิลิตร) สำหรับกลุ่ม Lactobacilli นั้น *Lactobacillus brevis* SUTC-SL17 จำนวนสูงสุด 6.18×10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร *L. paracasei* SUTC-T1R18 จำนวนสูงสุด 5.75×10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร *L. plantarum* SUTC-T1R28 จำนวนสูงสุด 8.69×10^9 CFU ต่อมิลลิลิตร และ *L. rhamnosus* SUTC-T8F1 จำนวนสูงสุด 5.80×10^9 CFU ต่อ

มิลลิลิตร ซึ่งมีจำนวนแบคทีเรียที่เพิ่มขึ้นจากชั่วโมงที่ 0 เมื่อเริ่มเลี้ยงเชื้อ 6.18×10^{3}, 5.75×10^{3}, 8.69×10^{4}และ 5.80×10^{4} CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 3.6)

ในขณะที่ *Lactococcus lactis* SUTC-D44 เจริญได้ดีในอาหารที่เติมน้ำตาลทรายระดับความเข้มข้น 1.0-4.0% ได้จำนวนสูงสุด 8.29×10^{8} CFU ต่อมิลลิลิตร (จำนวนแบคทีเรียที่เพิ่มขึ้นจากชั่วโมงที่ 0 เมื่อเริ่มเลี้ยงเชื้อ 8.28×10^{3} CFU ต่อมิลลิลิตร) ในอาหารที่เติมน้ำตาลทราย 1.0% (ตารางที่ 3.6) และ *Lactobacillus fermentum* SUTC-P46 และ *L. acidophilus* SUTC-T2R15 เจริญที่ตรวจนับจำนวนได้สูงสุด 7.96×10^{7} และ 1.83×10^{8} CFU ต่อมิลลิลิตร จำนวนแบคทีเรียที่เพิ่มขึ้นจากชั่วโมงที่ 0 เมื่อเริ่มเลี้ยงเชื้อ 7.90×10^{2} และ 1.82×10^{3} CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในอาหารที่เติมน้ำตาลทรายระดับความเข้มข้น 4.0% (ตารางที่ 3.6)

ตารางที่ 3.5 การเจริญของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่คัดเลือกเพื่อพัฒนาเป็นกล้าเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบพื้นฐานตาม MRS medium แต่มีชนิดของแหล่งคาร์บอนต่างกัน 6 แหล่ง เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียเป็นเวลา 20 ชั่วโมง

Bacterial isolate code[a]	**Total bacterial counts (CFU/ml)**					
	Glucose	Sucrose	Cane sugar	Molasses	Tapioca starch	Rice flour
SUTC-D44	8.29×10^{9}	4.54×10^{9}	5.50×10^{8}	5.30×10^{7}	6.40×10^{2}	7.10×10^{2}
SUTC-F20	3.20×10^{9}	1.89×10^{9}	3.80×10^{8}	2.10×10^{7}	1.80×10^{3}	1.19×10^{3}
SUTC-FL36	4.20×10^{9}	1.48×10^{9}	5.70×10^{8}	1.95×10^{8}	1.02×10^{3}	1.37×10^{3}
SUTC-MCN23	6.10×10^{9}	5.50×10^{9}	6.50×10^{8}	1.31×10^{8}	1.47×10^{3}	1.10×10^{3}
SUTC-M2D3	3.45×10^{9}	3.40×10^{9}	6.10×10^{8}	1.24×10^{8}	6.40×10^{2}	1.04×10^{3}
SUTC-P46	6.55×10^{9}	1.46×10^{9}	5.60×10^{8}	1.36×10^{7}	2.40×10^{3}	1.03×10^{3}
SUTC-SL17	5.68×10^{9}	4.86×10^{9}	6.10×10^{8}	7.30×10^{7}	7.78×10^{2}	2.25×10^{2}
SUTC-T1R18	4.30×10^{9}	1.40×10^{9}	8.80×10^{8}	8.55×10^{7}	5.60×10^{2}	4.58×10^{2}
SUTC-T1R28	7.40×10^{9}	6.60×10^{9}	9.10×10^{8}	1.91×10^{8}	9.70×10^{2}	1.44×10^{3}
SUTC-T2R15	9.40×10^{9}	6.20×10^{9}	5.40×10^{8}	1.67×10^{8}	3.96×10^{3}	2.39×10^{3}
SUTC-T8F1	4.47×10^{9}	4.62×10^{9}	2.10×10^{9}	1.34×10^{8}	7.60×10^{2}	1.26×10^{3}

[a] *Lactococcus lactis* SUTC-D44, *Pediococcus* sp. SUTC-F20, *Leuconostoc mesenteroides* SUTC-FL36, *Pediococcus damnosus* SUTC-MCN23, *Pediococcus pentosaceus* SUTC-M2D3, *Lactobacillus fermentum* SUTC-P46, *L. brevis* SUTC-SL17, *L. paracasei* SUTC-T1R18, *L. plantarum* SUTC-T1R28, *L. acidophilus* SUTC-T2R15, and *L. rhamnosus* SUTC-T8F1

ตารางที่ 3.6 การเจริญของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่คัดเลือกเป็นกล้าเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมน้ำตาลทรายที่ผลิตจากอ้อยความเข้มข้น 0.5-6.0% เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 20 ชั่วโมง

Bacterial isolate code[a]	Total bacterial counts (CFU/ml) in the medium containing different concentration of cane sugar (%)											
	0.5			1.0			2.0			3.0		
	0 h	20 h	Δ	0 h	20 h	Δ	0 h	20 h	Δ	0 h	20 h	Δ
SUTC-D44	6.20×10^{5}	1.29×10^{8}	1.28×10^{3}	6.29×10^{5}	8.29×10^{8}	8.28×10^{3}	5.54×10^{5}	4.54×10^{8}	4.53×10^{3}	6.40×10^{5}	6.40×10^{8}	6.39×10^{3}
SUTC-F20	2.20×10^{5}	2.10×10^{8}	2.10×10^{3}	3.30×10^{5}	2.20×10^{8}	2.20×10^{3}	2.80×10^{5}	3.09×10^{8}	3.09×10^{3}	2.65×10^{5}	1.20×10^{8}	1.20×10^{3}
SUTC-FL36	2.94×10^{5}	1.35×10^{7}	1.32×10^{2}	2.37×10^{5}	1.64×10^{7}	1.62×10^{2}	3.39×10^{5}	2.70×10^{7}	2.67×10^{2}	2.70×10^{5}	1.52×10^{7}	1.49×10^{2}
SUTC-P46	5.82×10^{5}	3.12×10^{6}	25.4	6.01×10^{5}	6.33×10^{6}	57.3	5.80×10^{5}	5.00×10^{7}	4.94×10^{2}	5.87×10^{5}	4.50×10^{7}	4.44×10^{2}
SUTC-SL17	1.24×10^{6}	2.44×10^{8}	2.43×10^{2}	1.09×10^{6}	4.10×10^{8}	4.09×10^{2}	4.69×10^{5}	6.18×10^{8}	6.18×10^{3}	9.17×10^{5}	5.15×10^{8}	5.14×10^{3}
SUTC-T1R18	1.20×10^{6}	2.77×10^{8}	2.76×10^{2}	1.35×10^{6}	4.14×10^{8}	4.13×10^{2}	5.11×10^{5}	5.75×10^{8}	5.75×10^{3}	1.16×10^{6}	5.21×10^{8}	5.20×10^{2}
SUTC-T1R28	4.72×10^{5}	6.49×10^{8}	6.48×10^{3}	3.96×10^{5}	1.01×10^{9}	1.01×10^{4}	3.92×10^{5}	8.69×10^{9}	8.69×10^{4}	4.33×10^{5}	7.31×10^{9}	7.31×10^{4}
SUTC-T2R15	5.97×10^{5}	1.16×10^{8}	1.15×10^{3}	6.00×10^{5}	1.51×10^{8}	1.50×10^{3}	5.47×10^{5}	1.69×10^{8}	1.68×10^{3}	5.85×10^{5}	1.73×10^{8}	1.72×10^{3}
SUTC-T8F1	1.23×10^{6}	2.29×10^{8}	2.28×10^{2}	1.44×10^{6}	3.37×10^{9}	3.37×10^{3}	6.37×10^{5}	5.80×10^{9}	5.80×10^{4}	1.00×10^{6}	3.42×10^{9}	3.42×10^{3}

[a] *Lactococcus lactis* SUTC-D44, *Pediococcus* sp. SUTC-F20, *Leuconostoc mesenteroides* SUTC-FL36, *Lactobacillus fermentum* SUTC-P46, *L. brevis* SUTC-SL17, *L. paracasei* SUTC-T1R18, *L. plantarum* SUTC-T1R28, *L.acidophilus* SUTC-T2R15, and *L. rhamnosus* SUTC-T8F1

ตารางที่ 3.6 การเจริญของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่คัดเลือกเป็นกล้าเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมน้ำตาลทรายที่ผลิตจากอ้อยความเข้มข้น 0.5-6.0% เลี้ยงเชื้อ (ต่อ) เป็นเวลา 20 ชั่วโมง

Bacterial isolate code[a]	Total bacterial counts (CFU/ml) in the medium containing different concentration of cane sugar (%)								
	4.0			5.0			6.0		
	0 h	20 h	Δ	0 h	20 h	Δ	0 h	20 h	Δ
SUTC-D44	6.10×10^{5}	6.10×10^{8}	6.09×10^{3}	5.25×10^{5}	7.25×10^{7}	7.20×10^{2}	5.30×10^{5}	2.30×10^{7}	2.25×10^{2}
SUTC-F20	2.15×10^{5}	1.30×10^{8}	1.30×10^{3}	3.20×10^{5}	1.10×10^{8}	1.10×10^{3}	3.15×10^{5}	3.10×10^{7}	3.07×10^{2}
SUTC-FL36	2.70×10^{5}	1.59×10^{7}	1.56×10^{2}	5.13×10^{5}	9.63×10^{6}	91.2	3.72×10^{5}	1.45×10^{7}	1.41×10^{2}
SUTC-P46	5.87×10^{5}	7.96×10^{7}	7.90×10^{2}	6.06×10^{5}	1.33×10^{7}	1.30×10^{2}	5.93×10^{5}	4.85×10^{7}	4.79×10^{2}
SUTC-SL17	1.01×10^{6}	5.59×10^{8}	5.58×10^{2}	1.40×10^{6}	3.84×10^{7}	37.0	1.27×10^{6}	4.77×10^{7}	46.4
SUTC-T1R18	1.26×10^{6}	5.26×10^{8}	5.25×10^{2}	1.38×10^{6}	3.54×10^{8}	3.53×10^{2}	1.62×10^{6}	4.16×10^{8}	4.14×10^{2}
SUTC-T1R28	4.26×10^{5}	6.50×10^{8}	6.50×10^{3}	4.54×10^{5}	4.27×10^{8}	4.27×10^{3}	4.14×10^{5}	3.89×10^{7}	3.89×10^{2}
SUTC-T2R15	5.89×10^{5}	1.83×10^{8}	1.82×10^{3}	5.84×10^{5}	7.06×10^{7}	7.05×10^{2}	5.71×10^{5}	1.56×10^{7}	1.55×10^{2}
SUTC-T8F1	1.17×10^{6}	3.77×10^{9}	3.77×10^{3}	1.59×10^{6}	3.68×10^{8}	3.66×10^{2}	1.27×10^{6}	4.36×10^{8}	4.35×10^{2}

[a] *Lactococcus lactis* SUTC-D44, *Pediococcus* sp. SUTC-F20, *Leuconostoc mesenteroides* SUTC-FL36, *Lactobacillus fermentum* SUTC-P46, *L. brevis* SUTC-SL17, *L. paracasei* SUTC-T1R18, *L. plantarum* SUTC-T1R28, *L.acidophilus* SUTC-T2R15, and *L. rhamnosus* SUTC-T8F1

ส่วนการเจริญของแบคทีเรียกล้าเชื้อที่คัดเลือกในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกากน้ำตาล ความเข้มข้นในช่วง 0.5-4.0% เป็นแหล่งคาร์บอนนั้น เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 20 ชั่วโมง พบว่ากากน้ำตาลความเข้มข้น 1-3% สนับสนุนการเจริญของแบคทีเรียกล้าเชื้อส่วนใหญ่ กล่าวคือ *Lactococcus lactis* SUTC-D44, *Pediococcus* sp. SUTC-F20 และ *Lactobacillus paracasei* SUTC-T1R18 มีการเจริญในอาหารที่เติมกากน้ำตาลระดับความเข้มข้น 1.0% ที่ตรวจนับจำนวนได้สูงสุด 4.45×10^{7}, 3.20×10^{7} และ 1.35×10^{8} CFU ต่อมิลลิลิตร (จำนวนแบคทีเรียที่เพิ่มขึ้นจากชั่วโมงที่ 0 เมื่อเริ่มเลี้ยงเชื้อ 4.39×10^{2}, 3.17×10^{2} และ 1.23×10^{2} CFU ต่อมิลลิลิตร) ตามลำดับ

แต่แบคทีเรียกล้าเชื้อสายพันธุ์ *Leuconostoc mesenteroides* SUTC-FL36, *Lactobacillus fermentum* SUTC-P46 และ *L. plantarum* SUTC-T1R28 มีการเจริญที่ตรวจนับจำนวนได้สูงสุด 1.39×10^{9}, 6.58×10^{7} และ 1.92×10^{8} CFU ต่อมิลลิลิตร (จำนวนแบคทีเรียที่เพิ่มขึ้นจากชั่วโมงที่ 0 เมื่อเริ่มเลี้ยงเชื้อ 1.39×10^{4}, 6.52×10^{2} และ 1.91×10^{3} CFU ต่อมิลลิลิตร) ตามลำดับ ในอาหารที่เติมกากน้ำตาลระดับความเข้มข้น 2.0% และ *Lactobacillus brevis* SUTC-SL17, *L. acidophilus* SUTC-T2R15 และ *L. rhamnosus* SUTC-T8F1 มีการเจริญที่ตรวจนับจำนวนได้สูงสุด 3.89×10^{7}, 3.25×10^{8} และ 4.25×10^{8} CFU ต่อมิลลิลิตร (จำนวนแบคทีเรียที่เพิ่มขึ้นจากชั่วโมงที่ 0 เมื่อเริ่มเลี้ยงเชื้อ 3.79×10^{2}, 3.24×10^{3} และ 4.24×10^{2} CFU ต่อมิลลิลิตร) ตามลำดับ ในอาหารที่เติมกากน้ำตาลระดับความเข้มข้น 3.0% (ตารางที่ 3.7) ทำนองเดียวกับ Paviz *et al.* (2011) ที่รายงานถึงกากน้ำตาลซึ่งมีผลกระตุ้นการเจริญของ Bacterial inoculant ชนิด *Lactobacillus plantarum* ในการผลิต Sorghum silage

เมื่อประมวลผลการศึกษาที่ได้ ทั้งน้ำตาลทรายที่ผลิตจากอ้อยและกากน้ำตาลเป็นทางเลือกของแหล่งอาหารคาร์บอนเพื่อการผลิตกล้าเชื้อหญ้าหมักที่เป็นแบคทีเรียกรดแล็กติกสายพันธุ์เฉพาะ และเมื่อพิจารณาผลที่ได้ดังกล่าว และจำนวนไอโซเลตของแบคทีเรียกล้าเชื้อที่อยู่ในความสนใจที่ควรศึกษาให้ได้ข้อมูลรูปแบบของกล้าเชื้อ ประกอบกับระยะเวลาการดำเนินงานและงบประมาณที่จำกัด จึงเลือกน้ำตาลทรายที่ผลิตจากอ้อยในปริมาณ 2.0% (น้ำหนักต่อปริมาตร) เพื่อการศึกษาชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจนในขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 3.7 การเจริญของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อตามส่วนประกอบ MRS medium ที่เติมกากน้ำตาลความเข้มข้น 0.5-4.0% แทนกลูโคส เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 20 ชั่วโมง

Bacterial isolate code[a]	Total bacterial counts (CFU/ml) in the medium containing different concentration of sugar cane molasses (%)														
	0.5			1.0			2.0			3.0			4.0		
	0 h	20 h	Δ	0 h	20 h	Δ	0 h	20 h	Δ	0 h	20 h	Δ	0 h	20 h	Δ
SUTC-D44	6.20×10^{5}	1.30×10^{7}	1.24×10^{2}	6.29×10^{5}	4.45×10^{7}	4.39×10^{2}	5.54×10^{5}	3.50×10^{7}	3.44×10^{2}	6.40×10^{5}	4.40×10^{7}	4.34×10^{2}	6.10×10^{5}	4.10×10^{7}	4.04×10^{2}
SUTC-F20	2.20×10^{5}	2.20×10^{7}	2.18×10^{2}	3.30×10^{5}	3.20×10^{7}	3.17×10^{2}	2.80×10^{5}	2.68×10^{7}	2.65×10^{2}	2.65×10^{5}	1.50×10^{7}	1.47×10^{2}	2.15×10^{5}	2.10×10^{7}	2.08×10^{2}
SUTC-FL36	4.26×10^{5}	5.16×10^{7}	5.12×10^{2}	3.78×10^{5}	1.27×10^{9}	1.27×10^{4}	4.38×10^{5}	1.39×10^{9}	1.39×10^{4}	2.82×10^{5}	1.00×10^{9}	1.00×10^{4}	5.37×10^{5}	8.52×10^{6}	79.8
SUTC-P46	6.09×10^{5}	1.72×10^{7}	1.66×10^{2}	5.87×10^{5}	4.70×10^{7}	4.64×10^{2}	5.91×10^{5}	6.58×10^{7}	6.52×10^{2}	5.82×10^{5}	3.03×10^{7}	2.97×10^{2}	6.43×10^{5}	8.52×10^{6}	78.8
SUTC-SL17	1.27×10^{6}	1.78×10^{7}	16.5	1.58×10^{6}	3.25×10^{7}	30.9	1.11×10^{6}	4.06×10^{7}	39.5	9.66×10^{5}	3.89×10^{7}	3.79×10^{2}	1.59×10^{6}	3.34×10^{6}	1.74
SUTC-T1R18	7.98×10^{5}	1.78×10^{7}	1.70×10^{2}	1.19×10^{6}	1.35×10^{8}	1.34×10^{2}	1.10×10^{6}	1.28×10^{8}	1.27×10^{2}	9.38×10^{5}	1.23×10^{8}	1.22×10^{3}	6.22×10^{5}	9.11×10^{6}	84.9
SUTC-T1R28	3.95×10^{5}	1.51×10^{7}	1.47×10^{2}	4.06×10^{5}	8.74×10^{7}	8.70×10^{2}	4.90×10^{5}	1.92×10^{8}	1.91×10^{3}	4.48×10^{5}	1.22×10^{8}	1.22×10^{3}	5.69×10^{5}	1.89×10^{7}	1.83×10^{2}
SUTC-T2R15	5.57×10^{5}	4.86×10^{7}	4.80×10^{2}	5.67×10^{5}	2.20×10^{8}	2.19×10^{3}	6.18×10^{5}	2.76×10^{8}	2.75×10^{3}	6.05×10^{5}	3.25×10^{8}	3.24×10^{3}	6.48×10^{5}	2.96×10^{7}	2.90×10^{2}
SUTC-T8F1	9.45×10^{5}	1.74×10^{7}	1.65×10^{2}	8.96×10^{5}	2.70×10^{8}	2.69×10^{2}	1.01×10^{6}	3.06×10^{8}	3.06×10^{2}	1.48×10^{6}	4.25×10^{8}	4.24×10^{2}	1.60×10^{6}	4.09×10^{6}	2.49

[a] *Lactococcus lactis* SUTC-D44, *Pediococcus* sp. SUTC-F20, *Leuconostoc mesenteroides* SUTC-FL36, *Lactobacillus fermentum* SUTC-P46, *L. brevis* SUTC-SL17, *L. paracasei* SUTC-T1R18, *L. plantarum* SUTC-T1R28, *L.acidophilus* SUTC-T2R15, and *L. rhamnosus* SUTC-T8F1

3.2.2 ชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจน

เมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกที่มีน้ำตาลทรายที่ผลิตจากอ้อยความเข้มข้น 2% (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอนทดแทนกลูโคสในส่วนประกอบของ MRS medium มาศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจน 3 ชนิด คือ แอมโมเนียมซัลเฟต (Ammonium sulphate, AR grade, Carlo Erba Reagenti, Italy) กากถั่วเหลือง (Soybean meal จากโรงผลิตอาหารสัตว์ ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี) และยูเรีย (Urea, AR grade, Carlo Erba Reagenti) ความเข้มข้นเท่ากับปริมาณ Tryptone และ Meat extract (MERCK, Merck KgaA, Germany) ในสูตร MRS medium (ตารางที่ 3.4) เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ไม่มีการกวนใน Anaerobic chamber เป็นเวลา 20 ชั่วโมง พบว่าแบคทีเรียทุกไอโซเลตที่ทดสอบเจริญได้ดีที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกากถั่วเหลือง รองลงมาคือ แอมโมเนียมซัลเฟต และยูเรีย ตามลำดับ (ตารางที่ 3.8) ทั้งนี้ในส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อยังคงมี Yeast extract 0.4% ที่แบคทีเรียกรดแล็กติกสามารถใช้เป็นแหล่ง Organic nitrogen ร่วมกับ Inorganic nitrogen (แอมโมเนียมซัลเฟต และยูเรีย) ดังที่มีรายงานการศึกษา (Calderon *et al*., 2001)

เนื่องจากในขั้นตอนต่อไปต้องการพัฒนารูปแบบของกล้าเชื้อ ที่เปรียบเทียบรูปแบบเชื้อแห้งบรรจุถุงพลาสติกและรูปแบบลูกแป้ง เพื่อมิให้มีส่วนคงเหลือของกากถั่วเหลืองในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการศึกษาครั้งนี้ จึงเลือกแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนหลักในการเตรียมเซลล์แบคทีเรียกล้าเชื้อ แต่กากถั่วเหลืองก็ยังมีประโยชน์และเป็นทางเลือกที่ดีของแหล่งไนโตรเจนราคาถูก ในกรณีผลิตรูปแบบเชื้อแห้งบรรจุถุงพลาสติก

จากนั้นได้ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอมโมเนียมซัลเฟต โดยใช้ความเข้มข้นต่างกันในช่วง 1.0-5.0% เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 20 ชั่วโมง พบว่าแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 3.0% สนับสนุนการเจริญของแบคทีเรียส่วนใหญ่ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Lactococcus lactis* SUTC-D44, *Leuconostoc mesenteroides* SUTC-FL36, *Lactobacillus fermentum* SUTC-P46, *L. plantarum* SUTC-T1R28, *L. brevis* SUTC-SL17, *L. paracasei* SUTC-T1R18 และ *L. rhamnosus* SUTC-T8F1 ที่เจริญได้ดี ตรวจนับจำนวนได้สูงสุด 5.50×10^{7}, 3.47×10^{7}, 3.23×10^{7}, 1.67×10^{8}, 1.85×10^{8}, 1.24×10^{8} และ 3.77×10^{7} CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 3.9 และรูปที่ 3.6) การทดลองในขั้นตอนนี้ไม่ได้ศึกษาปริมาณของแอมโมเนียมซัลเฟตที่ 0% (อาหารที่ไม่เติมแอมโมเนียมซัลเฟต) เนื่องจากเห็นความแตกต่างของการเจริญของแบคทีเรียที่ทดสอบเมื่อใช้อาหารที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วง 1.0-5.0%

ส่วน *Pediococcus* sp. SUTC-F20 และ *Lactobacillus acidophilus* SUTC-T2R15 เจริญได้ดีในอาหารที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 2.0-4.0% ตรวจนับจำนวนได้สูงสุดโดยเฉลี่ย 1.80×10^{7} และ 1.80×10^{8} CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 3.9 และรูปที่ 3.6)

ในการศึกษาขั้นต่อไปจึงเลือกแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 3.0% (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งไนโตรเจนหลักในอาหารเลี้ยงแบคทีเรียกล้าเชื้อทุกไอโซเลตที่ศึกษา ที่มีน้ำตาลทรายที่ผลิตจากอ้อยความเข้มข้น 2.0% เป็นแหล่งคาร์บอนทดแทนกลูโคสในส่วนประกอบของ MRS medium

ตารางที่ 3.8 การเจริญของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลทรายที่ผลิตจากอ้อย 2% เป็นแหล่งคาร์บอนหลัก และมีแหล่งไนโตรเจนต่างกันคือ แอมโมเนียมซัลเฟต กากถั่วเหลือง และยูเรีย เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 20 ชั่วโมง

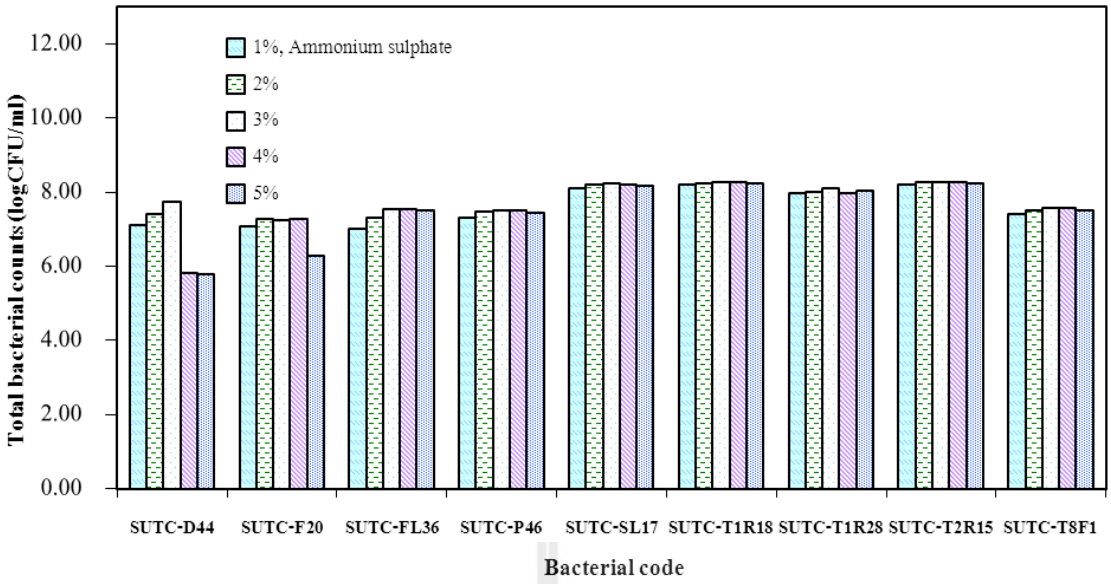
Bacterial isolate code[a]	Total bacterial counts (CFU/ml) in the medium containing N-source:								
	Ammonium sulphate			Soybean meal			Urea		
	0 h	20 h	Δ	0 h	20 h	Δ	0 h	20 h	Δ
SUTC-D44	1.05×10^{6}	1.25×10^{7}	11.4	4.10×10^{5}	2.50×10^{7}	2.46×10^{2}	4.10×10^{5}	1.50×10^{7}	1.46×10^{2}
SUTC-F20	1.20×10^{6}	1.20×10^{7}	10.8	1.65×10^{6}	1.80×10^{7}	1.63×10	1.30×10^{6}	1.70×10^{7}	1.57×10
SUTC-FL36	5.55×10^{5}	2.21×10^{7}	2.15×10^{2}	4.32×10^{5}	1.01×10^{8}	1.01×10^{3}	4.77×10^{5}	3.18×10^{7}	3.13×10^{2}
SUTC-P46	6.09×10^{5}	1.26×10^{8}	1.25×10^{3}	6.13×10^{5}	7.85×10^{8}	7.84×10^{3}	6.01×10^{5}	3.66×10^{7}	3.60×10^{2}
SUTC-SL17	1.50×10^{6}	2.93×10^{8}	2.91×10^{2}	7.91×10^{5}	4.40×10^{8}	4.39×10^{3}	1.46×10^{6}	1.29×10^{7}	1.14×10
SUTC-T1R18	1.25×10^{6}	6.96×10^{7}	6.83×10	9.45×10^{5}	1.81×10^{8}	1.80×10^{3}	1.30×10^{6}	1.61×10^{7}	1.48×10
SUTC-T1R28	4.16×10^{5}	4.33×10^{7}	4.29×10^{2}	4.05×10^{5}	7.03×10^{7}	6.99×10^{2}	4.20×10^{5}	1.28×10^{7}	1.24×10^{2}
SUTC-T2R15	1.30×10^{6}	2.51×10^{8}	2.50×10^{2}	6.11×10^{5}	2.67×10^{8}	2.66×10^{3}	9.94×10^{5}	1.96×10^{7}	1.86×10^{2}
SUTC-T8F1	5.47×10^{5}	2.67×10^{7}	2.62×10^{2}	5.67×10^{5}	6.76×10^{7}	6.70×10^{2}	5.79×10^{5}	3.83×10^{7}	3.77×10^{2}

[a] *Lactococcus lactis* SUTC-D44, *Pediococcus* sp. SUTC-F20, *Leuconostoc mesenteroides* SUTC-FL36, *Lactobacillus fermentum* SUTC-P46, *L. brevis* SUTC-SL17, *L. paracasei* SUTC-T1R18, *L. plantarum* SUTC-T1R28, *L.acidophilus* SUTC-T2R15, and *L. rhamnosus* SUTC-T8F1

ตารางที่ 3.9 การเจริญของแบคทีเรียกล้าเชื้อในอาหารที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 1.0-5.0% ทดแทนแหล่งไนโตรเจนหลักใน MRS medium เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 20 ชั่วโมง

Bacterial isolate code[a]	Total bacterial counts (CFU/ml) in the medium containing ammonium sulphate (%)				
	1.0	**2.0**	**3.0**	**4.0**	**5.0**
0-h cultivation					
SUTC-D44	4.20×10^{5}	4.44×10^{5}	4.30×10^{5}	4.50×10^{5}	3.10×10^{5}
SUTC-F20	1.20×10^{5}	1.65×10^{5}	1.30×10^{5}	1.50×10^{5}	1.15×10^{5}
SUTC-FL36	7.80×10^{4}	3.18×10^{5}	1.50×10^{5}	2.91×10^{5}	3.66×10^{5}
SUTC-P46	5.69×10^{5}	6.00×10^{5}	5.99×10^{5}	5.86×10^{5}	5.90×10^{5}
SUTC-SL17	6.86×10^{5}	1.14×10^{6}	1.02×10^{6}	1.04×10^{6}	1.23×10^{6}
SUTC-T1R18	8.40×10^{5}	1.51×10^{6}	1.08×10^{6}	1.17×10^{6}	1.86×10^{6}
SUTC-T1R28	3.90×10^{5}	4.19×10^{5}	4.03×10^{5}	4.29×10^{5}	4.49×10^{5}
SUTC-T2R15	1.37×10^{5}	1.34×10^{5}	1.19×10^{5}	1.29×10^{5}	1.16×10^{5}
SUTC-T8F1	5.77×10^{5}	5.71×10^{5}	5.72×10^{5}	5.87×10^{5}	5.69×10^{5}
20-h cultivation					
SUTC-D44	1.25×10^{7}	2.50×10^{7}	5.50×10^{7}	6.50×10^{5}	6.10×10^{5}
SUTC-F20	1.20×10^{7}	1.80×10^{7}	1.70×10^{7}	1.80×10^{7}	1.90×10^{6}
SUTC-FL36	1.01×10^{7}	1.96×10^{7}	3.47×10^{7}	3.44×10^{7}	3.24×10^{7}
SUTC-P46	2.05×10^{7}	2.83×10^{7}	3.23×10^{7}	3.08×10^{7}	2.77×10^{7}
SUTC-SL17	1.29×10^{8}	1.51×10^{8}	1.67×10^{8}	1.57×10^{8}	1.50×10^{8}
SUTC-T1R18	1.58×10^{8}	1.70×10^{8}	1.85×10^{8}	1.78×10^{8}	1.67×10^{8}
SUTC-T1R28	8.97×10^{7}	1.02×10^{8}	1.24×10^{8}	9.46×10^{7}	1.06×10^{8}
SUTC-T2R15	1.51×10^{8}	1.79×10^{8}	1.78×10^{8}	1.80×10^{8}	1.67×10^{8}
SUTC-T8F1	2.44×10^{7}	3.05×10^{7}	3.77×10^{7}	3.57×10^{7}	3.03×10^{7}

[a] *Lactococcus lactis* SUTC-D44, *Pediococcus* sp. SUTC-F20, *Leuconostoc mesenteroides* SUTC-FL36, *Lactobacillus fermentum* SUTC-P46, *L. brevis* SUTC-SL17, *L. paracasei* SUTC-T1R18, *L. plantarum* SUTC-T1R28, *L. acidophilus* SUTC-T2R15, and *L. rhamnosus* SUTC-T8F1



รูปที่ 3.6 การเจริญของแบคทีเรียกล้าเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* SUTC-T2R15, *L. brevis* SUTC-SL17, *L. fermentum* SUTC-P46, *L. paracasei* SUTC-T1R18, *L. plantarum* SUTC-T1R28, *L. rhamnosus* SUTC-T8F1, *Lactococcus lactis* SUTC-D44, *Leuconostoc mesenteroides* SUTC-FL36, *Pediococcus pentosaceus* SUTC-M2D3, *Pediococcus damnosus* SUTC-MCN23 และ *Pediococcus* sp. SUTC-F20 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่มีน้ำตาลทรายแทนกลูโคส และเติมแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 1.0-5.0% ทดแทนแหล่งไนโตรเจนหลัก

3.2.3. Essential element และ Growth factor ในส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

ศึกษาความจำเป็นที่ต้องเติมและปริมาณที่พอเพียง (เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อในปริมาณที่ไม่เกินปริมาณที่จำเป็น) ของ Essential element และ/หรือ Growth factor ในส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นผลจากการศึกษาในข้อ 3.2.2 คืออาหารที่มีน้ำตาลทราย 2.0% เป็นแหล่งคาร์บอน แอมโมเนียมซัลเฟต 3.0% เป็นแหล่งไนโตรเจน และเติม Yeast extract ซึ่งเป็นแหล่ง Growth factor ปริมาณแตกต่างกันในช่วง 0.3-1.0% เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกเป็นกล้าเชื้อเป็นเวลา 20 ชั่วโมง พบว่าในอาหารที่เติม Yeast extract เข้มข้น 0.5-1.0% ส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียทดสอบส่วนใหญ่ได้ใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 3.10) ในอาหารที่เติม Yeast extract เข้มข้น 1.0% มีผลให้ *Lactococcus lactis* SUTC-D44, *Leuconostoc mesenteroides* SUTC-FL36, *Lactobacillus fermentum* SUTC-P46, *L. brevis* SUTC-SL17, *L. paracasei* SUTC-T1R18, *L. plantarum* SUTC-T1R28, *L. acidophilus* SUTC-T2R15 และ *L. rhamnosus* SUTC-T8F1 มีการเจริญที่ตรวจนับจำนวนได้สูงสุด 3.20×10^{8}, 5.61×10^{8}, 1.92×10^{9}, 2.90×10^{9}, 2.86×10^{9}, 1.53×10^{9}, 2.93×10^{9} และ 2.66×10^{9} CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

ส่วน *Pediococcus* sp. SUTC-F20 มีการเจริญที่ตรวจนับจำนวนได้สูงสุดได้ใกล้เคียงกัน (3.20×10^8 และ 3.15×10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) ในอาหารที่เติม Yeast extract เข้มข้น 0.5 และ 1.0%

ในขั้นตอนนี้จึงได้เลือกความเข้มข้นของ Yeast extract 0.5% เป็นส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเพียงพอต่อการเตรียมเซลล์แบคทีเรียให้ได้ปริมาณ 10^8-10^9 CFU ต่อมิลลิลิตร เพื่อพัฒนารูปแบบของกล้าเชื้อที่สามารถรักษาการมีชีวิตของเชื้อได้นานและเหมาะสมต่อการใช้ประโยชน์ต่อไป

ตารางที่ 3.10 การเจริญของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลทราย 2.0% เป็นแหล่งคาร์บอน แอมโมเนียมซัลเฟต 3.0% และเติม Yeast extract ปริมาณแตกต่างกันในช่วง 0.3-1.0% เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 20 ชั่วโมง

Bacterial isolate code[a]	**Total bacterial counts (CFU/ml) in the medium containing yeast extract (%)**							
	0 h				**20 h**			
	0.3	**0.4**	**0.5**	**1.0**	**0.3**	**0.4**	**0.5**	**1.0**
SUTC-D44	1.29×10^6	8.29×10^5	6.54×10^5	6.40×10^5	1.10×10^8	1.25×10^8	3.10×10^8	3.20×10^8
SUTC-F20	2.05×10^5	1.20×10^6	1.10×10^6	1.80×10^6	1.19×10^8	1.20×10^8	3.20×10^8	3.15×10^8
SUTC-FL36	4.17×10^5	4.46×10^5	2.37×10^6	2.40×10^6	9.30×10^7	2.43×10^8	2.49×10^8	5.61×10^8
SUTC-P46	5.97×10^5	5.86×10^5	5.80×10^5	5.94×10^5	3.19×10^8	3.92×10^8	7.80×10^8	1.92×10^9
SUTC-SL17	8.47×10^5	1.28×10^6	1.41×10^6	1.13×10^6	1.44×10^8	7.53×10^8	2.34×10^9	2.90×10^9
SUTC-T1R18	7.56×10^5	1.09×10^6	1.21×10^6	1.17×10^6	5.74×10^8	9.21×10^8	2.14×10^9	2.86×10^9
SUTC-T1R28	4.11×10^5	4.18×10^5	4.06×10^5	5.29×10^5	1.67×10^8	6.42×10^8	6.95×10^8	1.53×10^9
SUTC-T2R15	8.19×10^5	1.14×10^6	8.89×10^5	1.41×10^6	8.19×10^8	8.67×10^8	2.47×10^9	2.93×10^9
SUTC-T8F1	9.45×10^5	9.66×10^5	1.16×10^6	1.17×10^6	9.52×10^8	8.10×10^8	2.12×10^9	2.66×10^9

[a] *Lactococcus lactis* SUTC-D44, *Pediococcus* sp. SUTC-F20, *Leuconostoc mesenteroides* SUTC-FL36, *Lactobacillus fermentum* SUTC-P46, *L. brevis* SUTC-SL17, *L. paracasei* SUTC-T1R18, *L. plantarum* SUTC-T1R28, *L. acidophilus* SUTC-T2R15, and *L. rhamnosus* SUTC-T8F1

3.3 การศึกษาสภาวะที่เหมาะต่อการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือก

ศึกษาสภาวะที่เหมาะต่อการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือก ดังนี้

3.3.1 อุณหภูมิ

ทดสอบความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิ 4 และ 25 ถึง 50 องศาเซลเซียส ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบเหมาะสมตามที่พัฒนาได้ (ประกอบด้วยน้ำตาลทรายที่ผลิตจากอ้อย 2.0% แอมโมเนียมซัลเฟต 3.0%, Yeast extract 0.5%, Sodium acetate tri-hydrate 0.5%, Di-potassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4) 0.2%, Tri-ammonium citrate 0.2%, Magnesium sulfate ($MgSO_4.7H_2O$) 0.02%, Manganese sulfate ($MnSO_4.4H_2O$) 0.004% และ Tween 80 0.1%) เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 20 ชั่วโมง พบว่าไม่มีการเจริญของแบคทีเรียทั้ง 11 ไอโซเลต ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และพบว่าที่อุณหภูมิ 25-35 องศาเซลเซียส เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบ (ตารางที่ 3.11) กล้าเชื้อ 3 สายพันธุ์ คือ *Lactobacillus brevis* SUTC-SL17, *L. paracasei* SUTC-T1R18 และ *L. plantarum* SUTC-T1R28 มีการเจริญที่ตรวจนับจำนวนได้สูงสุดถึง 10^9 CFU ต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส พบการเจริญของแบคทีเรียกล้าเชื้อ *Lactococcus lactis* SUTC-D44, *Pediococcus* sp. SUTC-F20, *Leuconostoc mesenteroides* SUTC-FL36, *L. fermentum* SUTC-P46, *L. acidophilus* SUTC-T2R15, และ *L. rhamnosus* SUTC-T8F1 มีการเจริญที่ตรวจนับจำนวนได้สูงสุด 6.54×10^8, 5.43×10^8, 2.23×10^9, 2.35×10^9, 1.50×10^9 และ 1.84×10^9 CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 3.11)

ในขั้นตอนนี้จึงได้เลือกอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เพื่อเลี้ยงกล้าเชื้อเนื่องจากเป็นอุณหภูมิที่แบคทีเรียที่คัดเลือกเป็นกล้าเชื้อทุกไอโซเลตเจริญได้ดี และเป็นอุณหภูมิใกล้อุณภูมิห้องของประเทศไทย

3.3.2 สภาพที่มีออกซิเจน

เนื่องจากแบคทีเรียกรดแล็กติกมีทั้ง Microaerophiles และ Anaerobes ซึ่งถ้าเป็นพวกที่ทนออกซิเจนได้จะเป็นประโยชน์ในการเลี้ยงและนำกล้าเชื้อไปใช้ประโยชน์มากขึ้น เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียกรดแล็กติกที่คัดเลือกในอาหารเหมาะสมที่พัฒนาได้ดังกล่าวข้างต้น (ข้อ 3.3.1) พร้อมทั้งทดลองไม่เติม Tri-ammonium citrate และ Tween 80 ตามส่วนประกอบของ MRS medium ให้เจริญในสองสภาวะเปรียบเทียบกันคือ ตู้บ่มในสภาวะปกติ (มีออกซิเจน) และ Anaerobic chamber ไร้ออกซิเจน มีเพียงส่วนผสมของคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ไฮโดรเจน 5% และสมดุลด้วยแก๊สไนโตรเจน ควบคุมอุณหภูมิที่ 35 องศาเซลเซียส ไม่มีการกวนหรือเขย่า เป็นเวลา 20 ชั่วโมง พบว่าแบคทีเรียเจริญดีใกล้เคียงกันทั้งในตู้บ่มภายใต้สภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน (ตารางที่ 3.12) โดยส่วนใหญ่ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนให้ปริมาณเซลล์ที่สูงกว่าที่มีออกซิเจนเล็กน้อย ผลที่ได้จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียกล้าเชื้อที่คัดเลือกได้เหล่านี้ทนต่อสภาวะที่มีออกซิเจนในช่วงเวลาที่เลี้ยงเชื้อถึง Stationary

phase และไม่จำเป็นต้องมี Tri-ammonium citrate และ Tween 80 เป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อตาม MRS medium ซึ่งเป็นอาหารสูตรมาตรฐานสำหรับแบคทีเรียกรดแล็กติกโดยเฉพาะอย่างยิ่ง Lactobacilli

ตารางที่ 3.11 การเจริญของแบคทีเรียในสภาวะควบคุมอุณหภูมิที่ 25-50 องศาเซลเซียส เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 20 ชั่วโมง

Bacterial isolate code[a]	Total bacterial counts (CFU/ml) at temperature (°C)					
	25	30	35	40	45	50
0-h cultivation						
SUTC-D44	2.10×10^{6}	1.25×10^{6}	1.54×10^{6}	1.40×10^{6}	1.10×10^{6}	1.25×10^{6}
SUTC-F20	1.20×10^{6}	2.20×10^{6}	1.60×10^{6}	1.70×10^{6}	1.84×10^{6}	1.20×10^{6}
SUTC-FL36	3.69×10^{5}	3.36×10^{5}	3.90×10^{5}	3.66×10^{5}	3.36×10^{5}	4.59×10^{5}
SUTC-P46	6.29×10^{5}	6.01×10^{5}	6.00×10^{5}	6.13×10^{5}	5.88×10^{5}	6.19×10^{5}
SUTC-SL17	1.59×10^{6}	1.25×10^{6}	1.44×10^{6}	1.24×10^{6}	1.33×10^{6}	1.46×10^{6}
SUTC-T1R18	1.32×10^{6}	1.39×10^{6}	1.42×10^{6}	1.27×10^{6}	1.55×10^{6}	1.30×10^{6}
SUTC-T1R28	4.33×10^{5}	4.16×10^{5}	4.34×10^{5}	4.36×10^{5}	4.25×10^{5}	4.53×10^{5}
SUTC-T2R15	1.09×10^{6}	1.40×10^{6}	1.42×10^{6}	1.42×10^{6}	1.10×10^{6}	1.44×10^{6}
SUTC-T8F1	6.18×10^{5}	6.00×10^{5}	6.18×10^{5}	6.08×10^{5}	6.04×10^{5}	6.29×10^{5}
20-h cultivation						
SUTC-D44	8.29×10^{7}	4.29×10^{8}	6.54×10^{8}	7.20×10^{6}	NG	NG
SUTC-F20	6.20×10^{7}	4.20×10^{8}	5.43×10^{8}	3.80×10^{6}	9.19×10^{5}	NG
SUTC-FL36	1.76×10^{9}	1.94×10^{9}	2.23×10^{9}	2.14×10^{6}	NG	NG
SUTC-P46	2.16×10^{9}	2.29×10^{9}	2.35×10^{9}	1.27×10^{7}	1.89×10^{5}	NG
SUTC-SL17	1.05×10^{9}	1.79×10^{9}	1.06×10^{9}	6.82×10^{6}	2.88×10^{5}	NG
SUTC-T1R18	1.30×10^{9}	1.71×10^{9}	1.27×10^{9}	2.24×10^{6}	1.54×10^{5}	NG
SUTC-T1R28	1.20×10^{9}	1.41×10^{9}	1.17×10^{9}	1.74×10^{6}	2.90×10^{5}	NG
SUTC-T2R15	1.05×10^{9}	1.04×10^{9}	1.50×10^{9}	6.06×10^{6}	3.54×10^{5}	NG
SUTC-T8F1	1.24×10^{9}	1.18×10^{9}	1.84×10^{9}	8.47×10^{6}	3.21×10^{5}	NG

[a] *Lactococcus lactis* SUTC-D44, *Pediococcus* sp. SUTC-F20, *Leuconostoc mesenteroides* SUTC-FL36, *Lactobacillus fermentum* SUTC-P46, *L. brevis* SUTC-SL17, *L. paracasei* SUTC-T1R18, *L. plantarum* SUTC-T1R28, *L. acidophilus* SUTC-T2R15, and *L. rhamnosus* SUTC-T8F1

NG, No growth.

ตารางที่ 3.12 การเจริญของแบคทีเรียในสภาวะมีและไม่มีออกซิเจน ไม่มีการกวน (หรือเขย่า) ควบคุมอุณหภูมิที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง ในอาหารที่มี Yeast extract 0.5% และไม่เติม Tri-ammonium citrate และ Tween 80

Bacterial isolate code[a]	Total bacterial counts (CFU/ml) at cultivation time (h)			
	Aerobic condition		Anaerobic condition	
	0	20	0	20
SUTC-D44	1.20×10^{6}	8.20×10^{7}	4.50×10^{5}	6.40×10^{8}
SUTC-F20	6.20×10^{5}	3.20×10^{8}	1.80×10^{6}	1.80×10^{9}
SUTC-FLB36	6.81×10^{5}	3.45×10^{8}	4.80×10^{5}	3.90×10^{8}
SUTC-P46	6.06×10^{5}	3.33×10^{8}	6.07×10^{5}	3.25×10^{8}
SUTC-SL17	1.36×10^{6}	1.50×10^{9}	1.37×10^{6}	1.62×10^{9}
SUTC-T1R18	1.80×10^{6}	1.47×10^{9}	1.47×10^{6}	1.84×10^{9}
SUTC-T1R28	6.06×10^{5}	2.70×10^{8}	3.86×10^{5}	3.06×10^{8}
SUTC-T2R15	8.40×10^{5}	1.09×10^{9}	5.25×10^{5}	1.56×10^{9}
SUTC-T8F1	6.11×10^{5}	2.32×10^{8}	6.07×10^{5}	3.73×10^{8}

[a] *Lactococcus lactis* SUTC-D44, *Pediococcus* sp. SUTC-F20, *Leuconostoc mesenteroides* SUTC-FL36, *Lactobacillus fermentum* SUTC-P46, *L. brevis* SUTC-SL17, *L. paracasei* SUTC-T1R18, *L. plantarum* SUTC-T1R28, *L. acidophilus* SUTC-T2R15, and *L. rhamnosus* SUTC-T8F1

3.4 การศึกษาวัฏภาคของการเจริญของแบคทีเรียและความจำเป็นและต้องการทำให้เซลล์ของเชื้อเข้มข้นขึ้น

เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดเลือกเป็นกล้าเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ (ตารางที่ 3.13) และสภาวะที่เหมาะสม (ข้อ 3.2 และ 3.3) คือที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้ออกซิเจน ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ไฮโดรเจน 5% และสมดุลด้วยไนโตรเจน โดยเพิ่มปริมาณอาหารเป็น 1 ลิตร ใน Erlenmeyer flask ขนาดบรรจุ 2 ลิตร เก็บตัวอย่างจากการเจริญที่ระยะเวลาต่างๆ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และเขียนกราฟของการเจริญ (Growth curve) ของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือก ได้กราฟการเจริญของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่คัดเลือกเพื่อทดลองพัฒนาเป็นกล้าเชื้อหญ้าหมักทั้ง 11 สายพันธุ์ ในรูปแบบคล้ายคลึงกัน และมี Late log phase (ระยะที่จะนำกล้าเชื้อไปใช้ประโยชน์) เมื่อเจริญได้ 18-20 ชั่วโมง โดยเฉลี่ย สามารถให้ปริมาณเซลล์สูงสุด โดยเฉลี่ย 10^{8}-10^{9} CFU ต่อมิลลิลิตร จากปริมาณเซลล์เริ่มต้นโดยเฉลี่ย 10^{5} CFU ต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 20 ชั่วโมง (ตารางที่ 3.14 และ รูปที่ 3.7) ทั้งนี้มีความแตกต่างกันตามสายพันธุ์ของแบคทีเรียสำหรับช่วงเวลาที่สามารถเลี้ยงได้ปริมาณ

เซลล์สูงสุด กล่าวคือ *Lactococcus lactis* SUTC-D44 มีการเจริญที่ตรวจนับจำนวนได้สูงสุด 7.25×10^{8} CFU ต่อมิลลิลิตร ที่ระยะเวลาเลี้ยงเชื้อ 26 ชั่วโมง ส่วน *Pediococcus* sp. SUTC-F20, *Leuconostoc mesenteroides* SUTC-FL36, *Pediococcus damnosus* SUTC-MCN23, *Pediococcus pentosaceus* SUTC-M2D3, *Lactobacillus fermentum* SUTC-P46, *L. brevis* SUTC-SL17, *L. paracasei* SUTC-T1R18 และ *L. rhamnosus* SUTC-T8F1 มีการเจริญที่ตรวจนับจำนวนได้สูงสุด 1.89×10^{9}, 1.48×10^{9}, 8.50×10^{8}, 8.40×10^{8}, 1.46×10^{9}, 8.80×10^{8}, 1.40×10^{9} และ 1.60×10^{9} CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ที่ระยะเวลาเลี้ยงเชื้อ 20 ชั่วโมง (ตารางที่ 3.14 และรูปที่ 3.7) ในขณะที่ *L. plantarum* SUTC-T1R28 มีการเจริญตรวจนับจำนวนได้สูงสุด 3.70×10^{9} CFU ต่อมิลลิลิตร และ *L. acidophilus* SUTC-T2R15 จำนวนสูงสุด 4.38×10^{8} CFU ต่อมิลลิลิตร ที่ระยะเวลาเลี้ยงเชื้อ 22 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ

ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญที่ได้จากการศึกษา พบว่าวัฏภาคของการเจริญของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่คัดเลือกมี Log phase จากเมื่อเริ่มเลี้ยงเชื้อถึงราว 20 ชั่วโมง Stationary phase ในช่วง 20-26 ชั่วโมง ของการเลี้ยงเชื้อ แบคทีเรียเริ่มเข้าสู่ระยะ Death phase ภายหลัง 26 ชั่วโมง ข้อมูลเหล่านี้มีประโยชน์อย่างยิ่งในการเตรียมกล้าเชื้อเพื่อใช้ประโยชน์

ส่วนความจำเป็นและต้องการทำให้เซลล์ของเชื้อเข้มข้นขึ้น อาจใช้วิธีปั่นแยกหรือวิธีทำให้เป็นผงแห้งด้วยเทคนิคการทำแห้งเยือกแข็ง (Lyophilization) ด้วยเครื่อง Freeze dryer นั้น พบว่าไม่จำเป็น เนื่องจากสามารถเลี้ยงแบคทีเรียกรดแล็กติกที่คัดเลือกเพื่อทดลองพัฒนาเป็นกล้าเชื้อหญ้าหมักให้ได้ปริมาณเซลล์สูงสุด 10^{8}-10^{9} CFU ต่อมิลลิลิตร ในเวลา 20-24 ชั่วโมง ซึ่งเพียงพอต่อการใช้พัฒนารูปแบบของกล้าเชื้อ แบคทีเรียกล้าเชื้อเหล่านี้ได้เก็บรักษาการมีชีวิตในรูปเซลล์แห้งด้วยเทคนิคการทำแห้งเยือกแข็ง ภายหลังการเลี้ยงถึงช่วงกลางของ Stationary phase (รูปที่ 3.7 และ 3.8)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

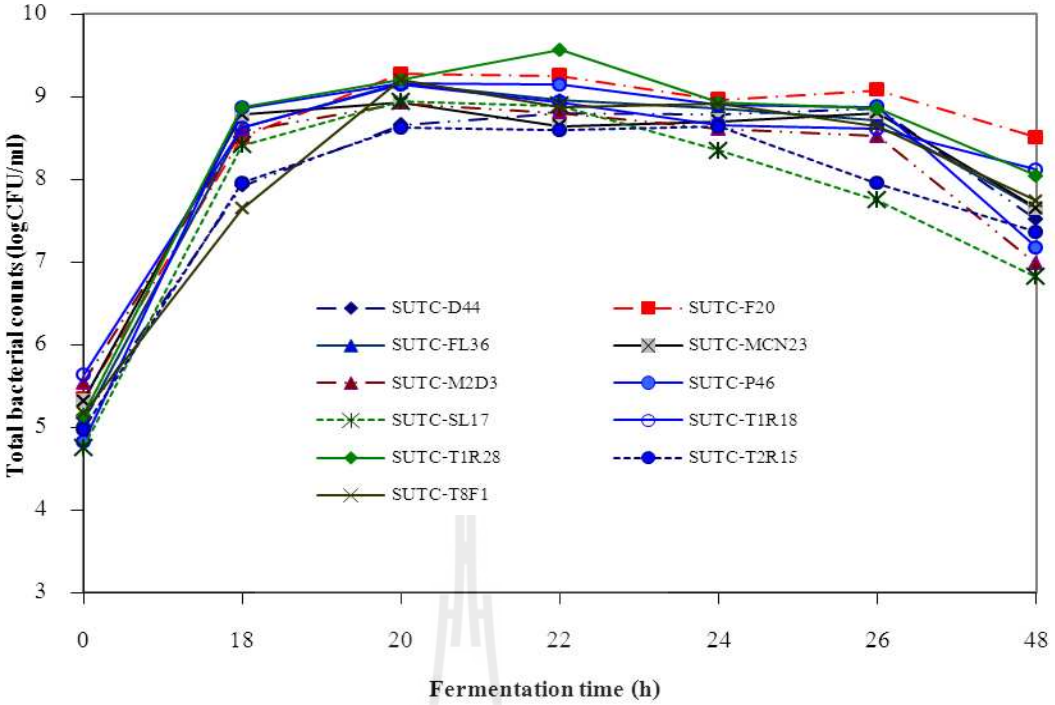
ตารางที่ 3.13 ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมที่พัฒนาได้

Component	Concentration (%)
Cane sugar	2.0
Ammonium sulphate	3.0
Yeast extract	0.5
Sodium acetate tri-hydrate	0.5
Di-potassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4)	0.2
Magnesium sulfate ($MgSO_4.7H_2O$)	0.02
Manganese sulfate ($MnSO_4.4H_2O$)	0.004
Initial pH 7.0	

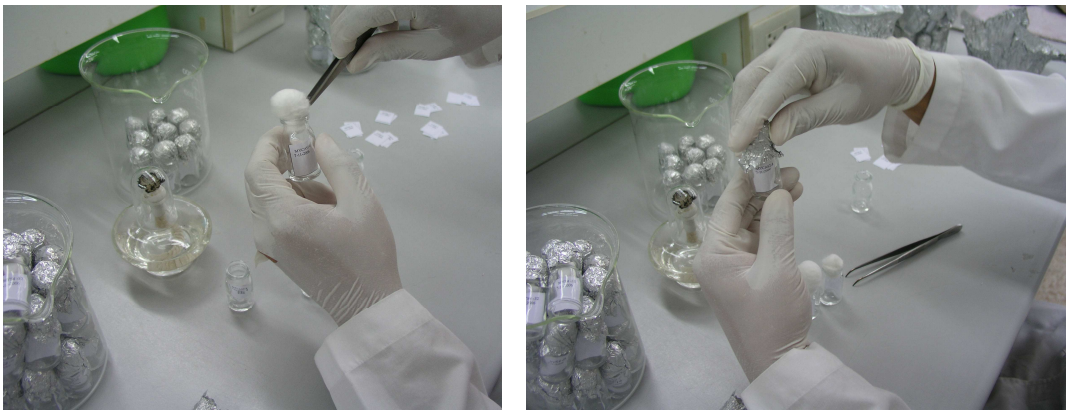
ตารางที่ 3.14 การเจริญของแบคทีเรียที่คัดเลือกเพื่อพัฒนาเป็นกล้าเชื้อหญ้าหมัก ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

Bacterial isolate code[a]	Total bacterial counts (CFU/ml) at cultivation time (h)						
	0	18	20	22	24	26	48
SUTC-D44	1.29×10^{5}	8.29×10^{7}	4.54×10^{8}	6.40×10^{8}	6.10×10^{8}	7.25×10^{8}	3.30×10^{7}
SUTC-F20	2.20×10^{5}	3.20×10^{8}	1.89×10^{9}	1.80×10^{9}	9.19×10^{8}	1.20×10^{9}	3.20×10^{8}
SUTC-FL36	1.20×10^{5}	4.20×10^{8}	1.48×10^{9}	9.02×10^{8}	7.30×10^{8}	5.20×10^{8}	4.40×10^{7}
SUTC-MCN23	2.10×10^{5}	6.10×10^{8}	8.50×10^{8}	4.45×10^{8}	5.10×10^{8}	6.35×10^{8}	4.50×10^{7}
SUTC-M2D3	3.45×10^{5}	3.85×10^{8}	8.40×10^{8}	6.40×10^{8}	4.05×10^{8}	3.35×10^{8}	9.45×10^{6}
SUTC-P46	6.55×10^{4}	7.25×10^{8}	1.46×10^{9}	1.40×10^{9}	8.06×10^{8}	7.55×10^{8}	1.50×10^{7}
SUTC-SL17	5.68×10^{4}	2.60×10^{8}	8.80×10^{8}	7.78×10^{8}	2.25×10^{8}	5.60×10^{7}	6.65×10^{6}
SUTC-T1R18	4.30×10^{5}	4.20×10^{8}	1.40×10^{9}	8.60×10^{8}	4.58×10^{8}	4.10×10^{8}	1.30×10^{8}
SUTC-T1R28	1.40×10^{5}	7.40×10^{8}	1.60×10^{9}	3.70×10^{9}	8.44×10^{8}	7.20×10^{8}	1.10×10^{8}
SUTC-T2R15	9.40×10^{4}	9.10×10^{7}	4.20×10^{8}	3.96×10^{8}	4.38×10^{8}	8.90×10^{7}	2.30×10^{7}
SUTC-T8F1	1.47×10^{5}	4.40×10^{7}	1.60×10^{9}	7.60×10^{8}	8.26×10^{8}	4.45×10^{8}	5.50×10^{7}

[a] *Lactococcus lactis* SUTC-D44, *Pediococcus* sp. SUTC-F20, *Leuconostoc mesenteroides* SUTC-FL36, *Pediococcus damnosus* SUTC-MCN23, *Pediococcus pentosaceus* SUTC-M2D3, *Lactobacillus fermentum* SUTC-P46, *L. brevis* SUTC-SL17, *L. paracasei* SUTC-T1R18, *L. plantarum* SUTC-T1R28, *L. acidophilus* SUTC-T2R15, and *L. rhamnosus* SUTC-T8F1



รูปที่ 3.7 กราฟการเจริญ (Growth curve) ของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่คัดเลือกเพื่อทดลองพัฒนาเป็นกล้าเชื้อหญ้าหมักสายพันธุ์ *Lactococcus lactis* SUTC-D44, *Pediococcus pentosaceus* SUTC-FL36, *Leuconostoc mesenteroides* SUTC-M2D3, *Pediococcus damnosus* SUTC-MCN23, *Pediococcus* sp. SUTC-F20, *Lactobacillus brevis* SUTC-SL17, *L. plantarum* SUTC-T1R28, *L. rhamnosus* SUTC-T8F1, *L. fermentum* SUTC-P46, *L. paracasei* SUTC-T1R18 และ *L. acidophilus* SUTC-T2R15



รูปที่ 3.8 การเก็บรักษาการมีชีวิตของแบคทีเรียที่คัดเลือกด้วยเทคนิคการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Lyophilization)

3.5 การทดลองหารูปแบบของกล้าเชื้อเพื่อการใช้ประโยชน์

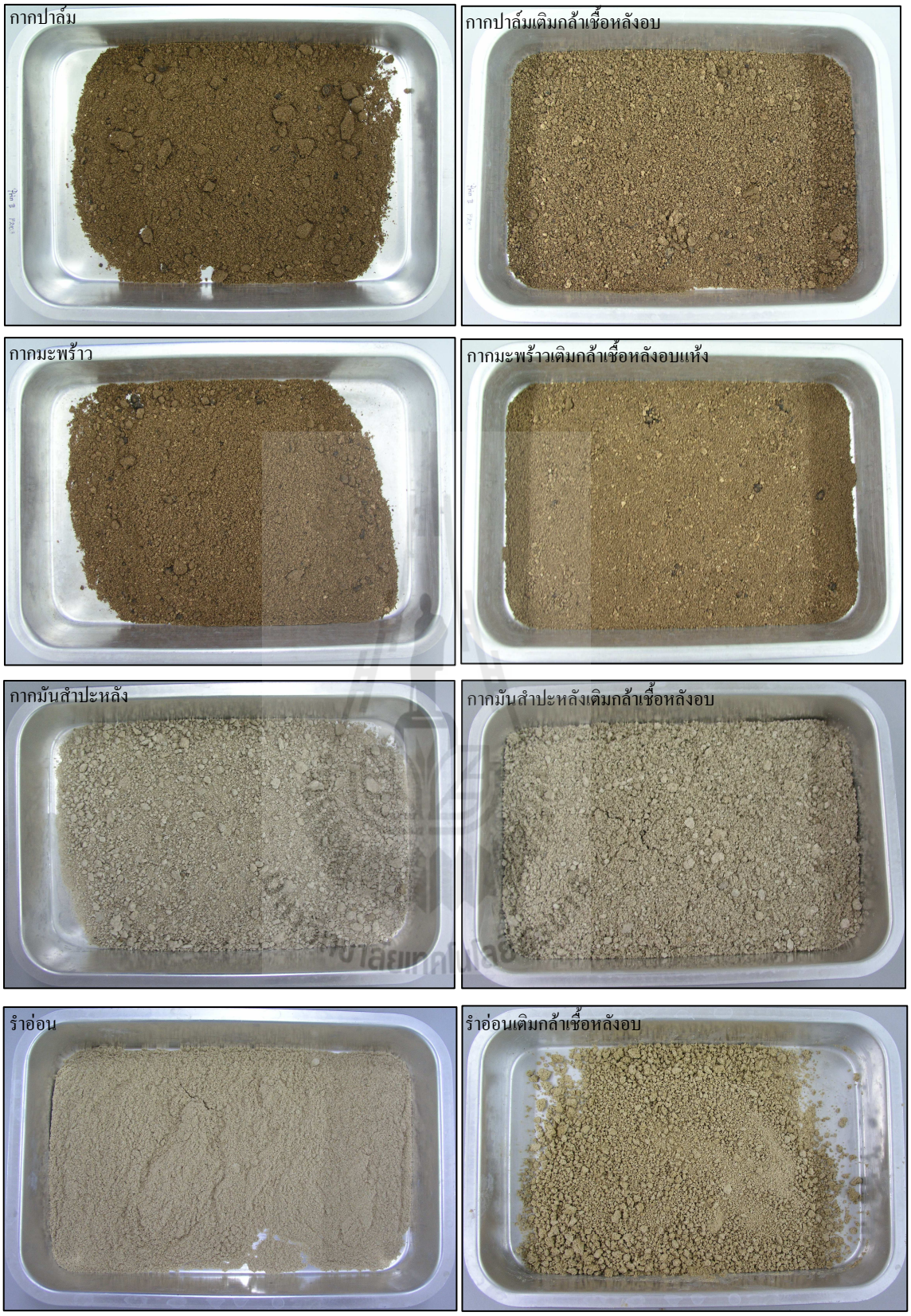
รูปแบบกล้าเชื้อที่พร้อมใช้ประโยชน์ที่ได้ศึกษา ได้เตรียมเป็นกล้าเชื้อเดี่ยว เนื่องจากสามารถใช้หมักหญ้าได้ทั้งที่เป็นกล้าเชื้อชนิดเดียวและนำมาผสมเป็นกล้าเชื้อผสมก่อนใช้งานได้ง่าย โดยทดลองในรูปแบบที่มีวิธีการไม่ยุ่งยากต้นทุนการผลิตต่ำ เป็นแบบเชื้อแห้งบรรจุในถุงพลาสติกและแบบลูกแป้ง ดังนี้

3.5.1 รูปแบบเชื้อแห้งบรรจุในถุงพลาสติก

การผลิตกล้าเชื้อแบคทีเรียแล็กติกรูปแบบเชื้อแห้งบรรจุในถุงพลาสติกนี้ ใช้วิธีการที่ดัดแปลงจากวิธีการผลิตกล้าเชื้อแบคทีเรียแล็กติกที่ใช้หมักแหนม (นภา โล่ห์ทอง, 2535) ที่มีการเพาะเลี้ยงแบบแห้งในถุงพลาสติก ที่มีแหล่งอาหารที่สมบูรณ์จากอาหารเหลวที่เหมาะสม และผสมกับสารตัวกลางซึ่งได้แก่ผลิตภัณฑ์จำพวกแป้งให้ได้ค่า Available water ที่แบคทีเรียเจริญได้ดี ภายหลังการบ่มให้เจริญประมาณปลาย Log phase จึงเติมสารตัวกลางให้ได้ผงเชื้อที่ความชื้นประมาณ 13% และทดลองใช้สารตัวกลางชนิดต่างๆ ที่เป็นผลิตผลทางการเกษตรที่มีมูลค่าต่ำในประเทศไทย คือ กากปาล์ม กากมะพร้าว กากมันสำปะหลัง กากถั่วเหลือง รำอ่อน และ รำหยาบ โดยเลือกแบคทีเรียไอโซเลตที่คัดเลือกมาทดสอบ คือ *Lactobacillus brevis* SUTC-SL17 และ *Lactobacillus plantarum* SUTC-T1R28 เนื่องจากเป็นไอโซเลตที่แยกได้จาก Sorghum silage และเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้พัฒนาเพื่อการผลิตกล้าเชื้อ

เมื่อทดลองผลิตกล้าเชื้อในรูปแบบเชื้อแห้งบรรจุในถุงพลาสติกดังกล่าวข้างต้น พบปัญหาการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในระหว่างการผลิตเนื่องจากมีสารอาหารสมบูรณ์ และปัญหาที่ไม่สามารถทำผงเชื้อแห้งได้ในระดับที่มีความชื้นประมาณ 13% จึงได้ทดลองผลิตด้วยการเลี้ยงแบคทีเรียกล้าเชื้อในอาหารเหลวที่พัฒนาได้ให้ได้ปริมาณเซลล์ประมาณ 10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร ซึ่งปฏิบัติได้ง่ายและใช้เวลาสั้นประมาณ 18 ชั่วโมง จากนั้นปั่นแยกเซลล์แบคทีเรียออกจากอาหารเหลว ล้างเซลล์ด้วยน้ำเกลือปลอดเชื้อ (0.85% NaCl) 1 ครั้ง เตรียมเซลล์แขวนลอยในน้ำเกลือ ผสมลงในสารตัวกลาง (ที่ผ่านการอบแห้งให้มีความชื้นประมาณ 13-16%) ให้ได้ปริมาณเซลล์ 10^8 เซลล์ต่อกรัม โดยประมาณ นำเข้าอบแห้งในตู้อบอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ประมาณ 6 ชั่วโมง แล้วเก็บเข้าถุงพลาสติกปิดสนิทปริมาณ 500 กรัมต่อถุง (รูปที่ 3.9) ศึกษาการอยู่รอดและการใช้ประโยชน์กล้าเชื้อในรูปแบบที่เตรียมได้ในขั้นตอนต่อไป

รูปที่ 3.9 การเตรียมกล้าเชื้อในรูปแบบเชื้อแห้งบรรจุในถุงพลาสติก



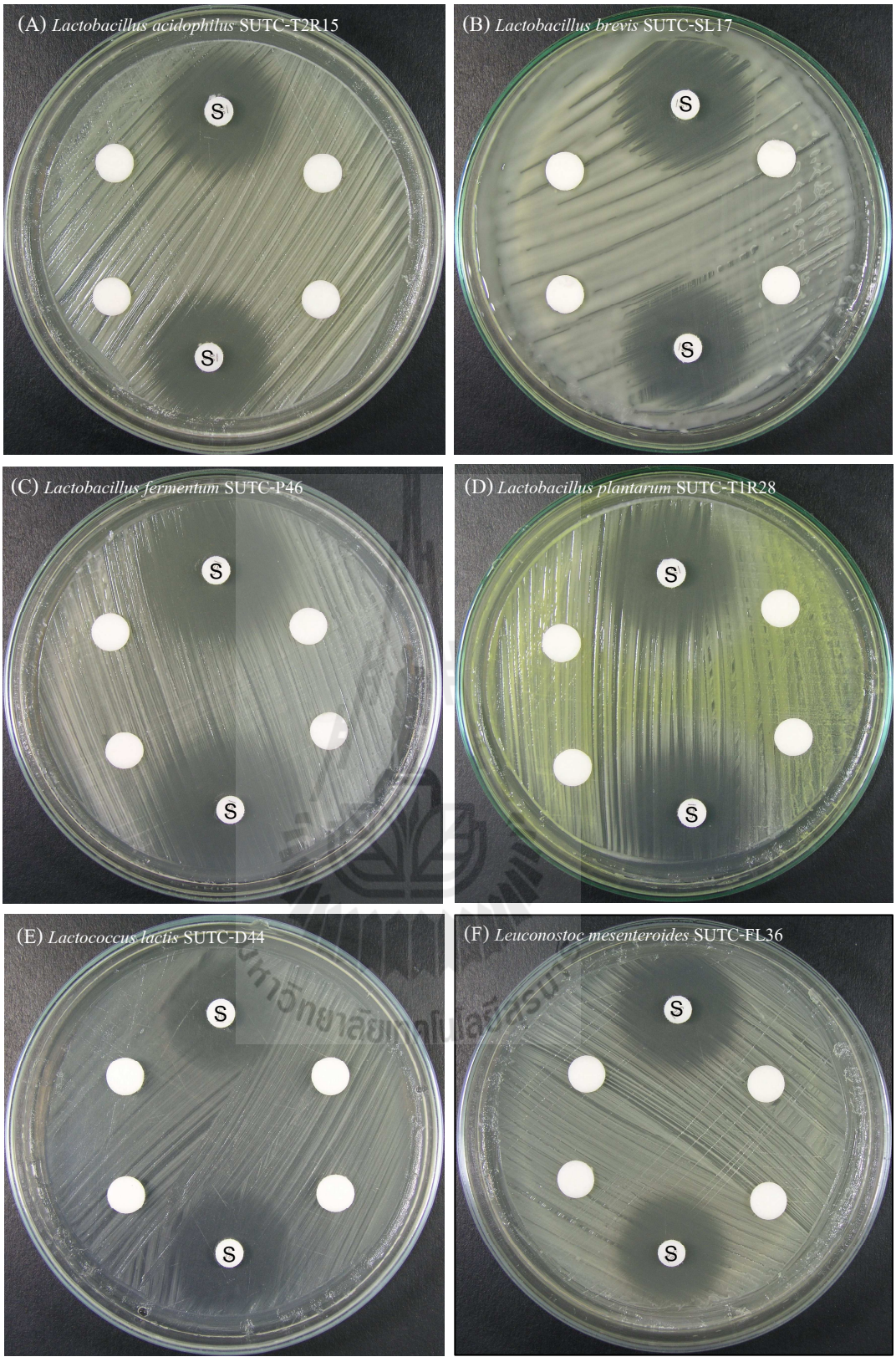
รูปที่ 3.9 การเตรียมกล้าเชื้อในรูปแบบเชื้อแห้งบรรจุในถุงพลาสติก (ต่อ)

รูปที่ 3.9 การเตรียมกล้าเชื้อในรูปแบบเชื้อแห้งบรรจุในถุงพลาสติก (ต่อ)

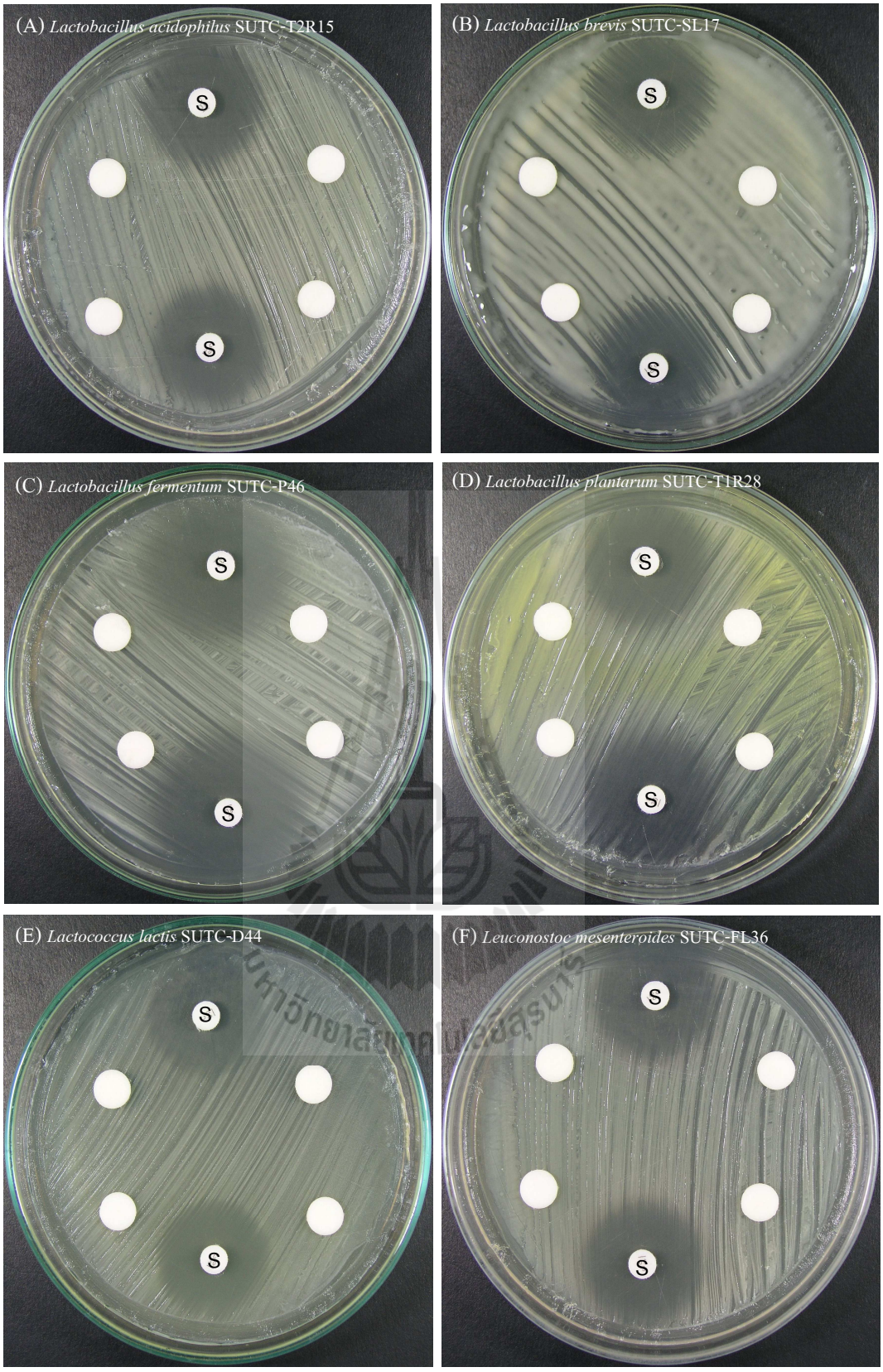
3.5.2 รูปแบบเชื้อแห้งแบบลูกแป้ง

การเตรียมรูปแบบเชื้อแห้งแบบลูกแป้งทำนองเดียวกับที่มีการผลิตลูกแป้งที่ใช้ในการหมักข้าวหมากหรือเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์พื้นบ้านของไทย (พิไลพรรณ พงษ์บูล, 2523) ซึ่งใช้เครื่องเทศหรือสมุนไพรไทยมาเป็นองค์ประกอบของการทำลูกแป้งข้าวหมาก และตามที่ผู้วิจัยได้มีส่วนร่วมในการพัฒนาหัวเชื้อเพื่อการผลิตอาหารสัตว์โปรตีนสูงจากวัสดุเหลือทิ้งจากโรงงานแป้งมันสำปะหลังมาแล้ว (Chumkhunthod *et al*., 2001) การศึกษานี้ได้เตรียมลูกแป้งของกล้าเชื้อหญ้าหมักโดยใช้เครื่องเทศ 5 ชนิด คือ กระเทียม กระชาย พริกไทย ขิง และข่า มาเป็นองค์ประกอบหนึ่งของลูกแป้ง ที่อาจช่วยยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่นและปรับส่วนประกอบของแป้งให้มีความเหมาะสมที่จะใช้เป็นการตัวกลางของกล้าเชื้อ ก่อนการเตรียมลูกแป้งจึงได้ทดสอบฤทธิ์ของเครื่องเทศดังกล่าวต่อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือก โดยนำเครื่องเทศมาอบแห้ง (มีความชื้น 16% โดยเฉลี่ย) แล้วเตรียมสารละลายที่มีความเข้มข้นของเครื่องเทศ 1.0% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ทดสอบฤทธิ์ของสารละลายที่เตรียมในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกล้าเชื้อด้วยวิธี Agar disc diffusion ตามวิธี Murray *et al*. (1999) พบว่าเครื่องเทศทั้ง 5 ชนิดในระดับความเข้มข้นที่ใช้ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียกล้าเชื้อที่คัดเลือก (ตัวอย่างรูปที่ 3.10-3.12)

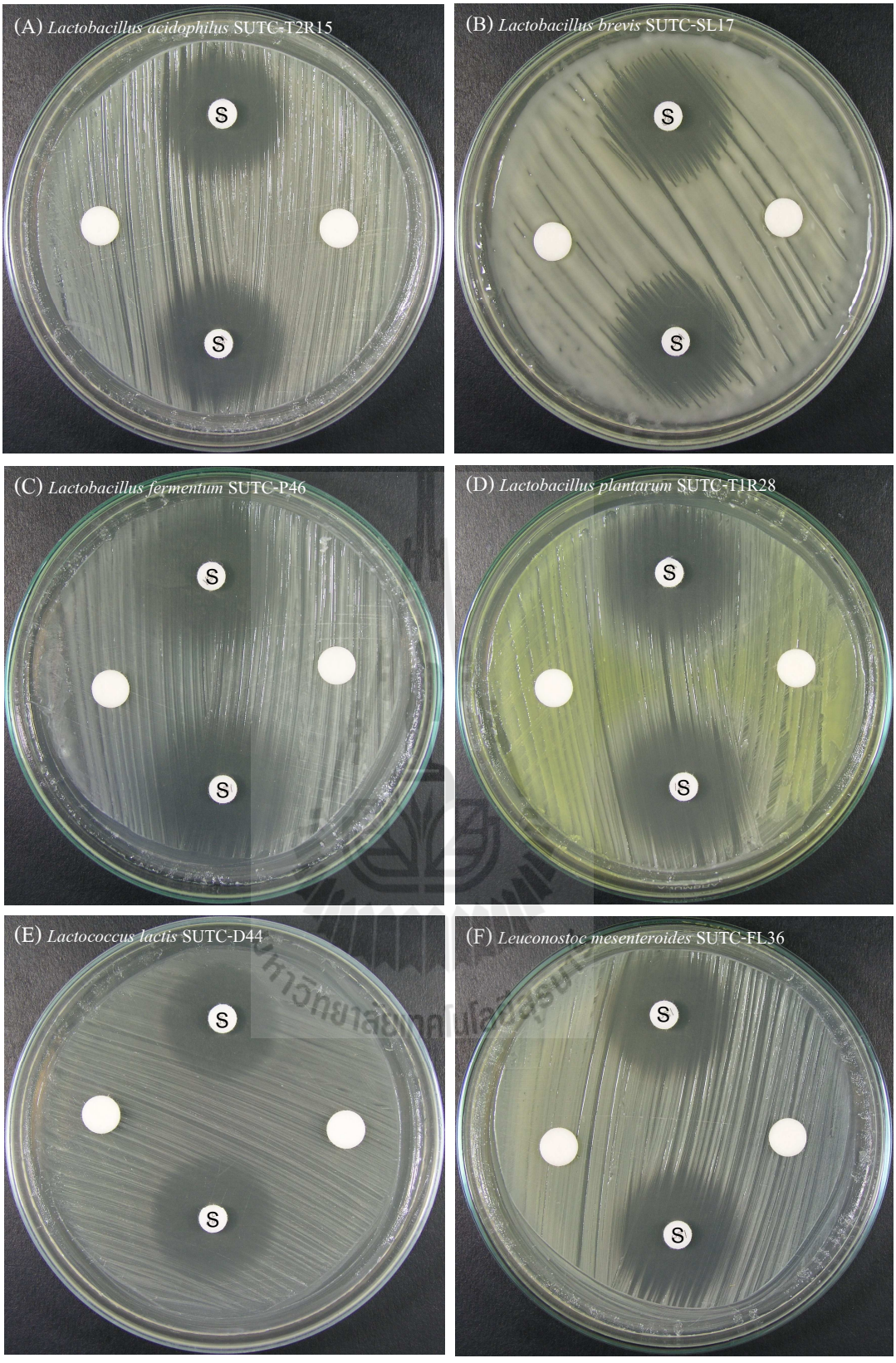
จากนั้นเตรียมลูกแป้งโดยผสมเครื่องเทศชนิดละ 1 กรัม ต่อแป้ง 500 กรัม เปรียบเทียบการใช้แป้งข้าวเจ้าและแป้งมันสำปะหลัง โดยให้มีเซลล์แบคทีเรียกล้าเชื้อในลูกแป้ง 10^8 เซลล์ต่อกรัมโดยเฉลี่ย เตรียมลูกแป้งที่มีขนาดต่างกัน 2 ขนาด คือ ลูกแป้งขนาดเล็กที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางโดยเฉลี่ย 2 เซนติเมตร และลูกแป้งขนาดเล็กที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางโดยเฉลี่ย 4 เซนติเมตร (รูปที่ 3.13) การผลิตกล้าเชื้อแบบเชื้อแห้งแบบลูกแป้งนี้เน้นการผลิตแบบกล้าเชื้อเดี่ยวเป็นหลักดังกล่าวข้างต้น ซึ่งสามารถใช้ประโยชน์ได้ง่ายในรูปแบบของกล้าเชื้อผสม จากนั้นศึกษาการอยู่รอดและการใช้ประโยชน์กล้าเชื้อในรูปแบบที่เตรียมได้ในขั้นตอนต่อไป



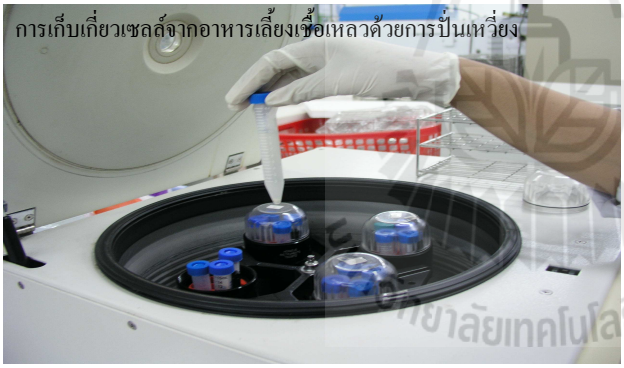
รูปที่ 3.10 ฤทธิ์ของเครื่องเทศกระเทียมต่อกล้าเชื้อ (A) *Lactobacillus acidophilus* SUTC-T2R15, (B) *L. brevis* SUTC-SL17, (C) *L. fermentum* SUTC-P46, (D) *L. plantarum* SUTC-T1R28, (E) *Lactococcus lactis* SUTC-D44, และ (F) *Leuconostoc mesenteroides* SUTC-FL36 บริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้นเกิดจาก Streptomycin (S) 30 ไมโครกรัม ซึ่งใช้เป็น Positive control

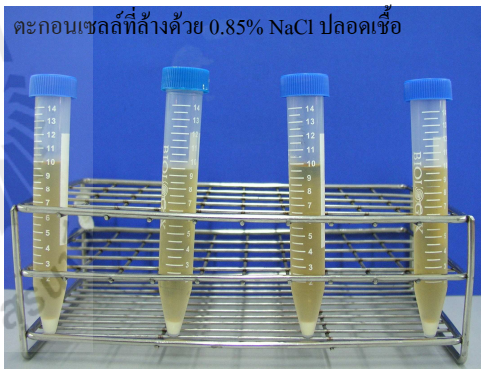


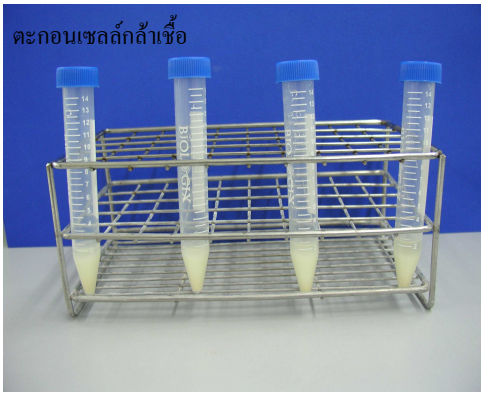
รูปที่ 3.11 ฤทธิ์ของเครื่องเทศขิงต่อกล้าเชื้อ (A) *Lactobacillus acidophilus* SUTC-T2R15, (B) *L. brevis* SUTC-SL17, (C) *L. fermentum* SUTC-P46, (D) *L. plantarum* SUTC-T1R28, (E) *Lactococcus lactis* SUTC-D44, และ (F) *Leuconostoc mesenteroides* SUTC-FL36 บริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้นเกิดจาก Streptomycin (S) 30 ไมโครกรัม ซึ่งใช้เป็น Positive control



รูปที่ 3.12 ฤทธิ์ของเครื่องเทศข่าต่อกล้าเชื้อ (A) *Lactobacillus acidophilus* SUTC-T2R15, (B) *L. brevis* SUTC-SL17, (C) *L. fermentum* SUTC-P46, (D) *L. plantarum* SUTC-T1R28, (E) *Lactococcus lactis* SUTC-D44, และ (F) *Leuconostoc mesenteroides* SUTC-FL36 บริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้นเกิดจาก Streptomycin (S) 30 ไมโครกรัม ซึ่งใช้เป็น Positive control







รูปที่ 3.13 การเตรียมกล้าเชื้อในรูปแบบแห้งแบบลูกแป้ง

รูปที่ 3.13 การเตรียมกล้าเชื้อในรูปแบบแห้งแบบลูกแป้ง (ต่อ)

3.6 การศึกษาการอยู่รอดในเบื้องต้นของกล้าเชื้อในรูปแบบที่พัฒนาได้

กล้าเชื้อที่ผลิตขึ้นใช้ประโยชน์ จำเป็นต้องมีอายุการเก็บนานได้ และอยู่รอดในระหว่างการขนส่ง จึงทดลองเก็บกล้าเชื้อในรูปแบบที่ผลิตที่อุณหภูมิห้องและ 4 องศาเซลเซียส ดังนี้

3.6.1 การอยู่รอดของแบคทีเรียกล้าเชื้อในรูปแบบเชื้อแห้งบรรจุในถุงพลาสติก

แบคทีเรียกล้าเชื้อในรูปแบบเชื้อแห้งบรรจุในถุงพลาสติก ที่ใช้สารตัวกลางต่างกัน 6 ชนิด คือ กากปาล์ม กากมะพร้าว กากมันสำปะหลัง กากถั่วเหลือง รำอ่อน (ข้าวเจ้า) และรำหยาบ ในช่วงเริ่มเตรียมกล้าเชื้อลงในสารตัวกลาง ได้เติมเซลล์แบคทีเรียให้มีจำนวนโดยเฉลี่ย 10^8 CFU ต่อกรัม แต่ภายหลังการทำแห้งที่ 40 องศาเซลเซียส (ใช้เวลาอบประมาณ 6 ชั่วโมง) เซลล์แบคทีเรียกล้าเชื้อส่วนหนึ่ง (ประมาณ 1-3 logCFU ต่อกรัม) ตายไป สารตัวกลางที่เป็นกากมะพร้าว กากถั่วเหลือง และรำ สามารถช่วยรักษาการมีชีวิตของแบคทีเรียทำให้มีจำนวนเซลล์อยู่รอดสูงกว่าการใช้สารตัวกลางที่เป็นกากปาล์มและกากมันสำปะหลัง (ตารางที่ 3.15 และรูปที่ 3.14) จากนั้นเมื่อเก็บกล้าเชื้อในรูปแบบเชื้อแห้งบรรจุในถุงพลาสติกไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 วัน พบว่า *Lactobacillus brevis* SUTC-SL17 มีจำนวนที่ตรวจนับได้ลดลงเท่ากับ 3.46×10^4, 2.92×10^2, 2.44×10^4, 27.8, 89.8 และ 12.6 CFU ต่อกรัม ตามลำดับ ในขณะที่ *L. plantarum* SUTC-T1R28 มีจำนวนที่ตรวจนับได้ลดลงเท่ากับ 7.08×10^5, 1.18×10^2, 2.96×10^5, 1.29×10^2, 1.01×10^3 และ 1.66×10^3 CFU ต่อกรัม ตามลำดับ (ตารางที่ 3.15 และรูปที่ 3.14)

Lactobacillus brevis SUTC-SL17 อยู่รอดได้ดีที่สุดในรำหยาบ (3.30×10^7 CFU ต่อกรัม) และ *L. plantarum* SUTC-T1R28 อยู่รอดได้ดีที่สุดในกากมะพร้าว (1.47×10^6 CFU ต่อกรัม) แบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลต อยู่รอดได้ดีในกากถั่วเหลือง (1.23×10^8 และ 1.14×10^7 CFU ต่อกรัม ตามลำดับ) จึงได้นำกากถั่วเหลืองมาเตรียมกล้าเชื้อเดี่ยวจำนวน 11 ไอโซเลต ในรูปแบบเชื้อแห้งบรรจุในถุงพลาสติก และทดสอบการอยู่รอดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน

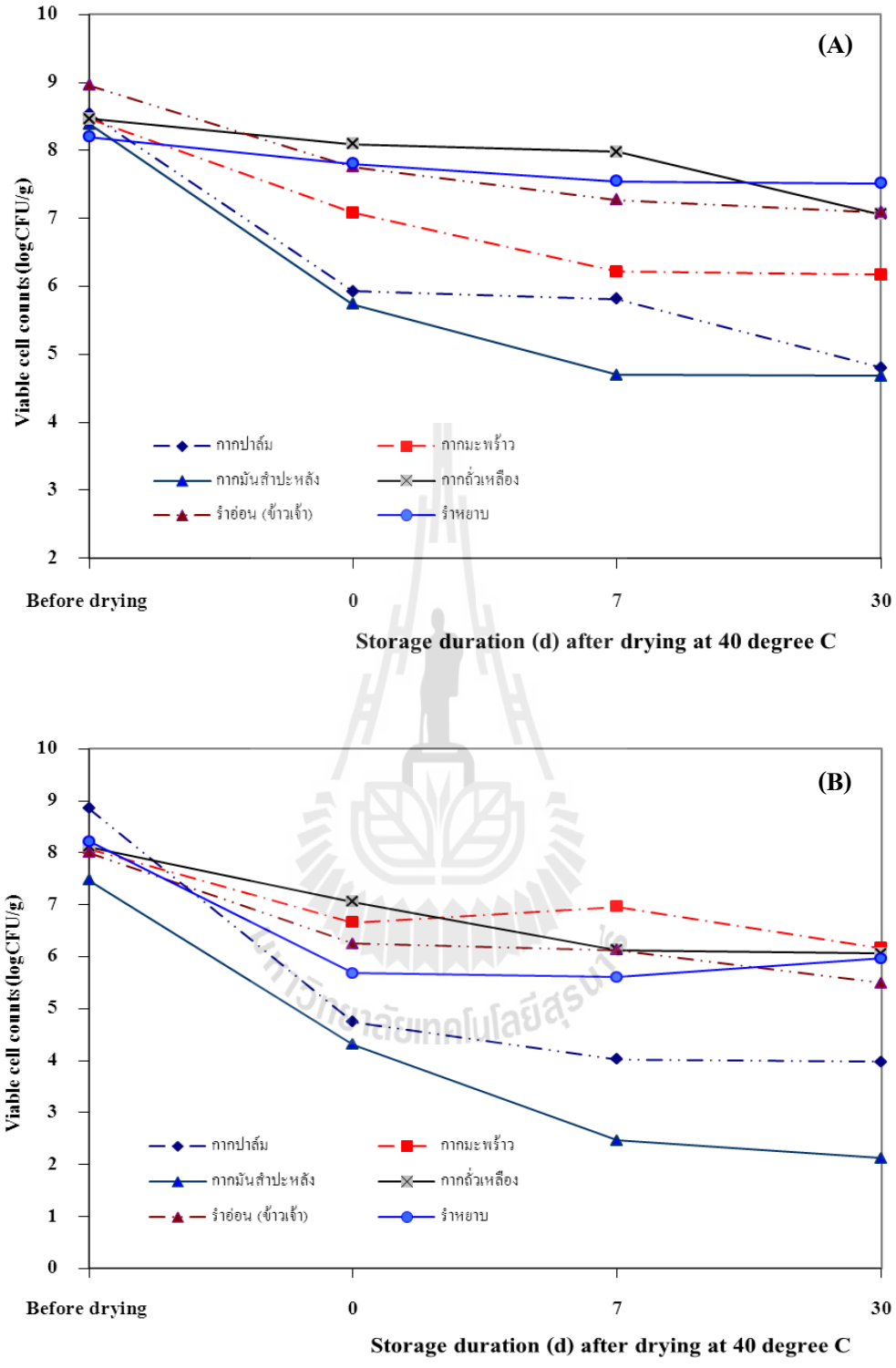
จากการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียกล้าเชื้อในสารตัวกลางที่เป็นกากถั่วเหลือง รูปแบบเชื้อแห้งบรรจุในถุงพลาสติก ที่เตรียมโดยให้มีจำนวนเซลล์เริ่มต้น 10^8 CFU ต่อกรัม และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน พบว่าแบคทีเรีย 3 ไอโซเลต (*Lactococcus lactis* SUTC-D44, *Leuconostoc mesenteroides* SUTC-FL36 และ *Lactobacillus plantarum* SUTC-T1R28) มีชีวิตอยู่รอดมากที่สุด (มากกว่า 10^7 CFU ต่อกรัม) เมื่อที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน ส่วนอีก 8 ไอโซเลต (*Pediococcus* sp. SUTC-F20, *Pediococcus damnosus* SUTC-MCN23, *Pediococcus pentosaceus* SUTC-M2D3, *Lactobacillus fermentum* SUTC-P46, *L. brevis* SUTC-SL17, *L. paracasei* SUTC-T1R18, *L. acidophilus* SUTC-T2R15, and *L. rhamnosus* SUTC-T8F1) อยู่รอดได้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 2-3 เดือน (ตารางที่ 3.16 และรูปที่ 3.15)

รูปแบบของกล้าเชื้อสายพันธุ์ที่คัดเลือกเพื่อผลิตหญ้าหมักที่พัฒนาได้ในรูปแบบกล้าเชื้อแห้งบรรจุในถุงพลาสติก ที่ใช้กากถั่วเหลืองเป็นสารตัวกลาง เป็นรูปแบบที่ง่ายลงทุนต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับ

รูปแบบกล้าเชื้อบางชนิดตามที่มีรายงาน ดังเช่น สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ได้วิจัยการใช้กล้าเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความบริสุทธิ์ ผลิตอาหารหมักตามโครงการ “ผลิตกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกในสภาพแห้ง” ผลิตกล้าเชื้อแหนม และ ผักดอง การหมักดองเป็นการถนอมอาหารอีกหนึ่งวิธีที่นิยมกันโดยทั่วไป ซึ่งอาศัยกิจกรรมของจุลินทรีย์เข้าปรับสภาพวัตถุดิบอาหารเพื่อให้เกิดความเหมาะสมกับการเจริญของจุลินทรีย์ที่ดี ดั้งเดิมผู้แปรรูปอาหารมักจะใช้จุลินทรีย์ประจำถิ่น (Normal microflora) ที่อยู่ในวัตถุดิบของกระบวนการหมักตามธรรมชาติ ผลิตภัณฑ์ที่ได้จึงไม่มีความสม่ำเสมอทั้งกลิ่น รสชาติ ส่งผลให้คุณภาพอาหารไม่ได้มาตรฐาน จากที่สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ได้ผลิตกล้าเชื้อในสภาพแห้งเพื่อจำหน่าย แบคทีเรียกรดแล็กติกที่ใช้สำหรับเป็นกล้าเชื้อผักดอง คือ *Lactobacillus plantarum* ส่วนกล้าเชื้อแหนม คือ *L. johnsonii* และ *Pediococcus* sp. แบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์นี้คัดแยกจากผักดองและแหนม วิธีการทำแห้งผงกล้าเชื้อนั้นใช้วิธี Spray dry และ Freeze dry กล้าเชื้อที่ได้ มีอายุในตู้เย็นนานถึง 3 เดือน โดยจำนวนแบคทีเรียประมาณ 10^7-10^8 CFU ต่อกรัม ซึ่งเหมาะสมสำหรับการผลิตอาหารหมัก เมื่อนำกล้าเชื้อที่ได้ไปผลิตผักดองและแหนม พบว่า ผักดองที่ได้มีค่า pH อยู่ในช่วง 3.0-4.5 และค่าความเป็นกรดในรูปกรดแล็กติกอยู่ในช่วง 0.9-1.2% ส่วนแหนมมีค่า pH อยู่ในช่วง 4.6-5.0 และค่าความเป็นกรดในรูปกรดแล็กติกออยู่ในช่วง 0.6-1.1% (สิรินันท์ ชมภูแสง และคณะ, 2551)

ตารางที่ 3.15 การอยู่รอดของแบคทีเรียกล้าเชื้อในรูปแบบเชื้อแห้งบรรจุในถุงพลาสติก ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 วัน

Bacterial isolate	Silage inoculant formula	Total viable counts (CFU/g dry weight)			
		Before drying at 40°C	After drying at 40°C (0 d)	7 d	30 d
Lactobacillus	กากปาล์ม	3.46×10^8	8.50×10^5	6.50×10^5	6.30×10^4
brevis	กากมะพร้าว	2.93×10^8	1.21×10^7	1.64×10^6	1.47×10^6
SUTC-SL17	กากมันสำปะหลัง	2.44×10^8	5.50×10^5	4.95×10^4	4.80×10^4
	กากถั่วเหลือง	2.89×10^8	1.23×10^8	9.45×10^7	1.14×10^7
	รำอ่อน (ข้าวเจ้า)	9.10×10^8	5.75×10^7	1.86×10^7	1.24×10^7
	รำหยาบ	1.59×10^8	6.35×10^7	3.54×10^7	3.30×10^7
Lactobacillus	กากปาล์ม	7.08×10^8	5.50×10^4	1.07×10^4	9.50×10^3
plantarum	กากมะพร้าว	1.19×10^8	4.50×10^6	9.04×10^6	1.47×10^6
SUTC-T1R28	กากมันสำปะหลัง	2.96×10^7	2.02×10^4	2.90×10^2	1.32×10^2
	กากถั่วเหลือง	1.30×10^8	1.14×10^7	1.33×10^6	1.14×10^6
	รำอ่อน (ข้าวเจ้า)	1.01×10^8	1.78×10^6	1.34×10^6	3.12×10^5
	รำหยาบ	1.67×10^8	4.80×10^5	4.01×10^5	9.20×10^5

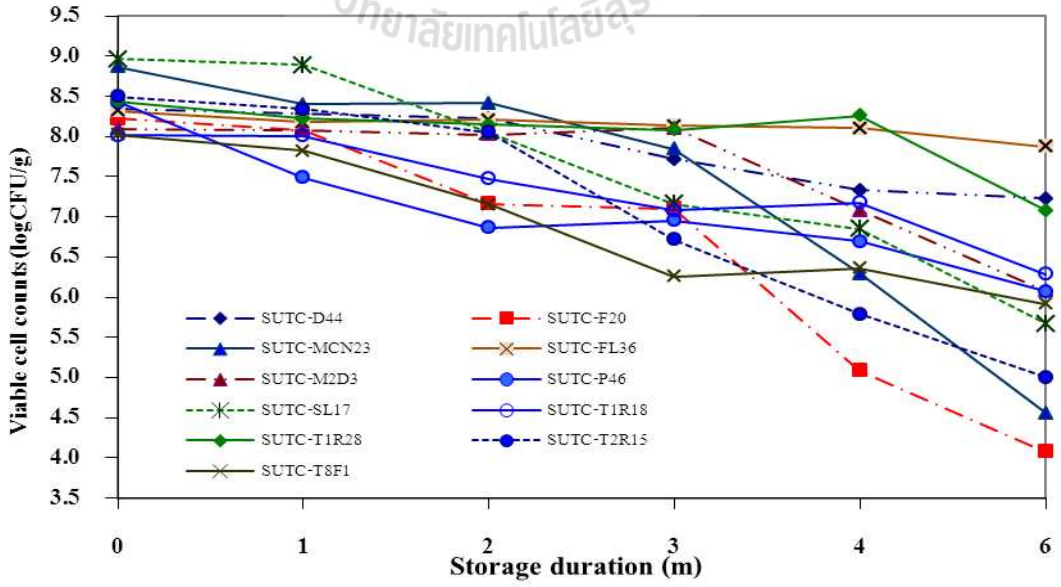


รูปที่ 3.14 การอยู่รอดของแบคทีเรียกล้าเชื้อ *Lactobacillus brevis* SUTC-SL17 (A) และ *L. plantarum* SUTC-T1R28 (B) ในรูปแบบเชื้อแห้งบรรจุในถุงพลาสติก ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 วัน

ตารางที่ 3.16 การทดสอบการอยู่รอดของแบคทีเรียกล้าเชื้อในรูปแบบเชื้อแห้งที่มีกากถั่วเหลืองเป็นสารตัวกลาง บรรจุในถุงพลาสติก เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน

Bacterial isolate code[a]	Viable cell counts (CFU/ml) during storage duration (m)					
	0	1	2	3	4	6
SUTC-D44	2.19×10^{8}	1.90×10^{8}	1.68×10^{8}	5.20×10^{7}	2.15×10^{7}	1.68×10^{7}
SUTC-F20	1.80×10^{8}	1.20×10^{8}	1.46×10^{7}	1.27×10^{7}	1.21×10^{5}	1.19×10^{4}
SUTC-MCN23	7.40×10^{8}	2.53×10^{8}	2.60×10^{8}	7.00×10^{7}	1.98×10^{6}	3.60×10^{4}
SUTC-FL36	2.09×10^{8}	1.51×10^{8}	1.62×10^{8}	1.36×10^{8}	1.27×10^{8}	7.45×10^{7}
SUTC-M2D3	1.24×10^{8}	1.20×10^{8}	1.06×10^{8}	1.27×10^{8}	1.21×10^{7}	1.19×10^{6}
SUTC-P46	2.67×10^{8}	3.04×10^{7}	7.35×10^{6}	8.95×10^{6}	4.93×10^{5}	1.18×10^{6}
SUTC-SL17	9.15×10^{8}	7.70×10^{8}	1.13×10^{8}	1.44×10^{7}	7.05×10^{6}	4.55×10^{5}
SUTC-T1R18	1.04×10^{8}	1.02×10^{8}	2.98×10^{7}	1.21×10^{7}	1.51×10^{7}	1.92×10^{6}
SUTC-T1R28	2.76×10^{8}	1.68×10^{8}	1.40×10^{8}	1.20×10^{8}	1.81×10^{8}	1.21×10^{7}
SUTC-T2R15	3.15×10^{8}	2.18×10^{8}	1.12×10^{8}	5.25×10^{6}	6.20×10^{5}	1.01×10^{5}
SUTC-T8F1	1.06×10^{8}	6.67×10^{7}	1.43×10^{7}	1.82×10^{6}	2.29×10^{6}	8.30×10^{5}

[a] *Lactococcus lactis* SUTC-D44, *Pediococcus* sp. SUTC-F20, *Leuconostoc mesenteroides* SUTC-FL36, *Pediococcus damnosus* SUTC-MCN23, *Pediococcus pentosaceus* SUTC-M2D3, *Lactobacillus fermentum* SUTC-P46, *L. brevis* SUTC-SL17, *L. paracasei* SUTC-T1R18, *L. plantarum* SUTC-T1R28, *L. acidophilus* SUTC-T2R15, and *L. rhamnosus* SUTC-T8F1



รูปที่ 3.15 การทดสอบการอยู่รอดของแบคทีเรียกล้าเชื้อในรูปแบบเชื้อแห้งที่มีกากถั่วเหลืองเป็นสารตัวกลาง บรรจุในถุงพลาสติก เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน

3.6.2 การอยู่รอดของแบคทีเรียกล้าเชื้อในรูปแบบลูกแป้ง

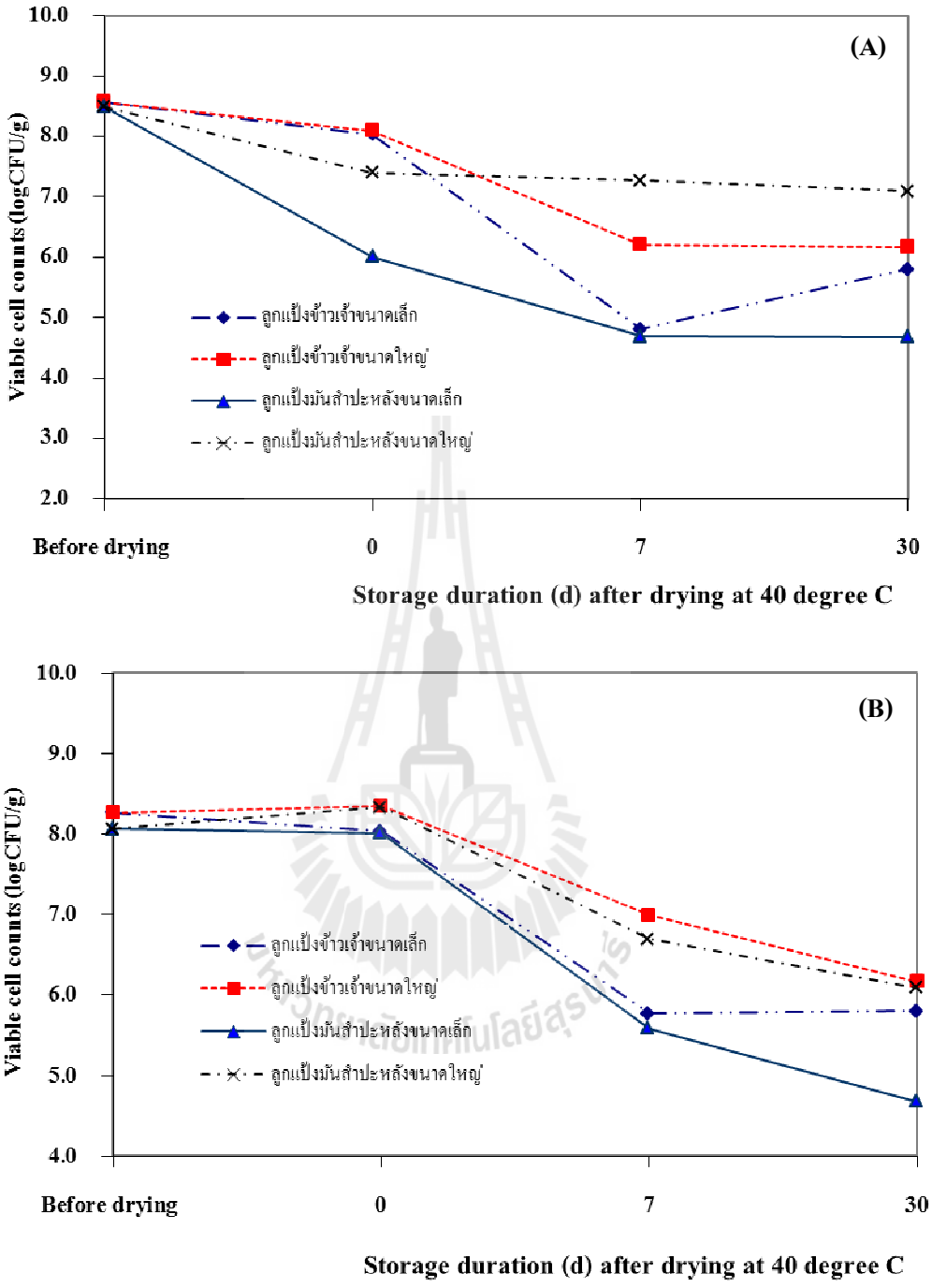
แบคทีเรียกล้าเชื้อที่เตรียมในรูปแบบลูกแป้ง 2 ขนาด คือ ลูกแป้งขนาดเล็กและลูกแป้งขนาดใหญ่ ซึ่งมีเส้นผ่าศูนย์กลางโดยเฉลี่ย 2 และ 4 เซนติเมตร ตามลำดับ นั้นในช่วงเริ่มเตรียมกล้าเชื้อลงในลูกแป้ง ได้เติมเซลล์แบคทีเรียให้มีจำนวนโดยเฉลี่ย 10^8 CFU ต่อกรัม ภายหลังการทำแห้งที่ 40 องศาเซลเซียส (ใช้เวลาอบประมาณ 6 ชั่วโมง) เซลล์แบคทีเรียกล้าเชื้อในลูกแป้งยังคงรอดชีวิตเช่นเดียวกับที่เติมลงในลูกแป้ง (ตารางที่ 3.17 และรูปที่ 3.16) จากนั้นเมื่อเก็บลูกแป้งแห้งบรรจุในถุงพลาสติกไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 วัน พบการอยู่รอดแตกต่างกันตามสายพันธุ์ของแบคทีเรียและชนิดของแป้งที่นำมาเตรียมลูกแป้ง กล่าวคือ *Lactobacillus brevis* SUTC-SL17 อยู่รอดได้ดีที่สุดในลูกแป้งมันสำปะหลังขนาดใหญ่ (1.24×10^7 CFU ต่อกรัม) และ *L. plantarum* SUTC-T1R28 อยู่รอดได้ดีที่สุดในลูกแป้งข้าวเจ้าขนาดใหญ่ (1.47×10^6 CFU ต่อกรัม) ขนาดของลูกแป้งนอกจากจะมีผลต่อการอบแห้งแล้วยังมีผลต่อการอยู่รอดของกล้าเชื้อ

ตารางที่ 3.17 การอยู่รอดของแบคทีเรียกล้าเชื้อในรูปแบบลูกแป้งที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 วัน

Bacterial isolate code[a]	Silage inoculant formula[b]	Total viable counts (CFU/g)			
		Before drying at 40°C	After drying at 40°C (0 d)	7 d	30 d
SUTC-SL17	ลูกแป้งข้าวเจ้าขนาดเล็ก	3.74×10^8	1.08×10^8	6.50×10^4	6.30×10^5
	ลูกแป้งข้าวเจ้าขนาดใหญ่	3.74×10^8	1.24×10^8	1.64×10^6	1.47×10^6
	ลูกแป้งมันสำปะหลังขนาดเล็ก	3.09×10^8	1.02×10^6	4.95×10^4	4.80×10^4
	ลูกแป้งมันสำปะหลังขนาดใหญ่	3.09×10^8	2.50×10^7	1.86×10^7	1.24×10^7
SUTC-T1R28	ลูกแป้งข้าวเจ้าขนาดเล็ก	1.84×10^8	1.09×10^8	5.95×10^5	6.30×10^5
	ลูกแป้งข้าวเจ้าขนาดใหญ่	1.84×10^8	2.21×10^8	9.80×10^6	1.47×10^6
	ลูกแป้งมันสำปะหลังขนาดเล็ก	1.16×10^8	1.02×10^8	3.85×10^5	4.80×10^4
	ลูกแป้งมันสำปะหลังขนาดใหญ่	1.16×10^8	2.15×10^8	4.95×10^6	1.24×10^6

[a] *Lactobacillus brevis* SUTC-SL17, *L. plantarum* SUTC-T1R28

[b] ลูกแป้งขนาดเล็ก และลูกแป้งขนาดใหญ่ มีเส้นผ่าศูนย์กลางโดยเฉลี่ย 2 และ 4 เซนติเมตร ตามลำดับ



รูปที่ 3.16 การอยู่รอดของแบคทีเรียกล้าเชื้อ *Lactobacillus brevis* SUTC-SL17 (A) และ *L. plantarum* SUTC-T1R28 (B) ในรูปแบบลูกแป้ง (ลูกแป้งขนาดเล็กและลูกแป้งขนาดใหญ่ มีเส้นผ่าศูนย์กลางโดยเฉลี่ย 2 และ 4 เซนติเมตร ตามลำดับ) ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 วัน

3.7 การทดลองผลิตหญ้าหมักโดยใช้กล้าเชื้อในรูปแบบที่พัฒนาได้

เมื่อทดลองผลิตหญ้าหมักจากหญ้าเนเปียร์ (รูปที่ 3.18) ที่เติมกล้าเชื้อ (Inoculant หรือ Starter culture) แบคทีเรียกรดแล็กติกที่คัดเลือกจำนวน 11 ไอโซเลต (*Lactococcus lactis* SUTC-D44, *Pediococcus* sp. SUTC-F20, *Leuconostoc mesenteroides* SUTC-FL36, *Pediococcus damnosus* SUTC-MCN23, *Pediococcus pentosaceus* SUTC-M2D3, *Lactobacillus fermentum* SUTC-P46, *L. brevis* SUTC-SL17, *L. paracasei* SUTC-T1R18, *L. plantarum* SUTC-T1R28, *L. acidophilus* SUTC-T2R15 และ *L. rhamnosus* SUTC-T8F1) แบบเชื้อเดี่ยว ที่เตรียมกล้าเชื้อในรูปแบบเชื้อแห้ง มีกากถั่วเหลืองเป็นสารตัวกลาง เปรียบเทียบกับการหมักโดยอาศัยจุลินทรีย์ในธรรมชาติที่มีหรือปนเปื้อนในวัตถุดิบที่ใช้ผลิต ณ ฟาร์มเกษตรกรผู้เลี้ยงโค (รูปที่ 3.18) โดยให้มีเชื้อเริ่มต้นในวัสดุหมักประมาณ 10^5-10^6 เซลล์ต่อกรัม ทำนองเดียวกับที่มีรายงานการใช้เพื่อให้กล้าเชื้อเจริญและได้ปริมาณที่มีประชากรเด่นกว่าจุลินทรีย์ที่มีหรือปนเปื้อนอยู่ในพืชวัตถุดิบ (Rooke, 1991) หากประสงค์จะเน้นการผลิต Silage จำเป็นต้องมีการศึกษาชนิดและปริมาณกล้าเชื้อจุลินทรีย์ที่สอดคล้องกับชนิดและปริมาณของพืชวัตถุดิบ เพื่อให้ได้กระบวนการผลิตที่มีประสิทธิภาพและคุ้มทุนหรือมีผลกำไรที่สุด

ผลผลิต silage ที่ได้จากการหมักเป็นเวลา 21 วัน ทั้งจากการหมักที่ไม่เติม (Control) และเติมกล้าเชื้อ มีลักษณะทางกายภาพคล้ายคลึงกัน (รูปที่ 3.19) และมีกลิ่นหอมของการหมัก มีความเป็นกรด-ด่าง (pH) 4.2-4.5 หญ้าหมักที่เติมกล้าเชื้อมี pH ต่ำกว่าการหมักที่ไม่เติมกล้าเชื้อ (ตารางที่ 3.18) จัดได้ว่าเป็นผลิตภัณฑ์ Silage ที่มีคุณภาพดี (Allen, 1990)

กล้าเชื้อ *Lactococcus lactis* SUTC-D44, *Lactobacillus paracasei* SUTC-T1R18, *L. plantarum* SUTC-T1R28, *L. acidophilus* SUTC-T2R15 และ *L. rhamnosus* SUTC-T8F1 มีศักยภาพในการใช้ผลิตหญ้าหมักจากหญ้าเนเปียร์ มากกว่าแบคทีเรียอีก 6 สายพันธุ์ ดังกล่าวข้างต้น เนื่องจากสามารถเจริญได้ดีให้ปริมาณเซลล์มาก (10^9 เซลล์ต่อกรัม โดยเฉลี่ย) ในผลิตภัณฑ์อาหารสัตว์ที่สัตว์สามารถบริโภคอาหารพร้อมแบคทีเรียกล้าเชื้อที่มีชีวิต ที่สามารถให้ประโยชน์ต่อในด้านสารเสริมชีวนะ (Probiotics)

จากการแยกและตรวจนับแบคทีเรียกรดแล็กติกในตัวอย่างหญ้าหมักโดยวิธี Standard plate count เมื่อเลี้ยงเชื้อด้วยอาหาร MRS agar, MRS agar ที่เติม 0.5% $CaCO_3$ และ Rogosa agar เพื่อให้สามารถตรวจพบแบคทีเรียกรดแล็กติกที่มีหลากหลายชนิดมากที่สุด บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ในสภาพไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจพบแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวในหญ้าหมักที่ผลิตโดยการเติมกล้าเชื้อ ซึ่งมีจำนวน 10^7-10^9 CFU ต่อกรัม น้ำหนักเปียก โดยเฉลี่ย เป็นปริมาณที่สูงกว่าหญ้าหมักที่ผลิตโดยไม่เติมหัวเชื้อซึ่งพบ 10^6 CFU ต่อกรัม น้ำหนักเปียก (ตารางที่ 3.18) หญ้าเนเปียร์ที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ มีแบคทีเรียกรดแล็กติกที่อาจทั้งปนเปื้อนและเป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่น (Normal flora) ในปริมาณ 10^4 CFU ต่อกรัม น้ำหนักเปียก และเพิ่มถึง 10^6 CFU ต่อกรัม เมื่อหมักหญ้าโดยธรรมชาติได้ 21 วัน พบความแตกต่างของโคโลนีของแบคทีเรียอายุ 48 ชั่วโมง ที่แยกจากหญ้า

เนเปียร์ที่เริ่มหมัก (วันที่ 0) และหมักได้ 21วัน ที่ผลิตโดยไม่เติมกล้าเชื้อและเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกต่างไอโซเลตกัน (รูปที่ 3.20)

เมื่อเลือกโคโลนีของแบคทีเรียที่ตรวจพบจากการตรวจนับในตัวอย่างหญ้าหมัก โดยเฉลี่ย 5 ไอโซเลต ต่อตัวอย่าง มาเตรียมเชื้อบริสุทธิ์ ตรวจสอบสัณฐานวิทยาของเซลล์โดยย้อมสีเซลล์แบบแกรม และทดสอบ Carbohydrate fermentation เพื่อการจัดจำแนกชนิดนั้น ยังคงพบสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่ใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตหญ้าหมัก รวมทั้งได้วิเคราะห์สายพันธุ์ของแบคทีเรียที่แยกได้ด้วยวิธี Random amplified polymorphic DNA (RAPD) ได้ผลที่แสดงถึงความหลากหลายของสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแล็กติกตามแบบแผน RAPD ที่แตกต่างกัน (รูปที่ 3.21) และยังคงพบสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่ใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตหญ้าหมักเช่นกัน

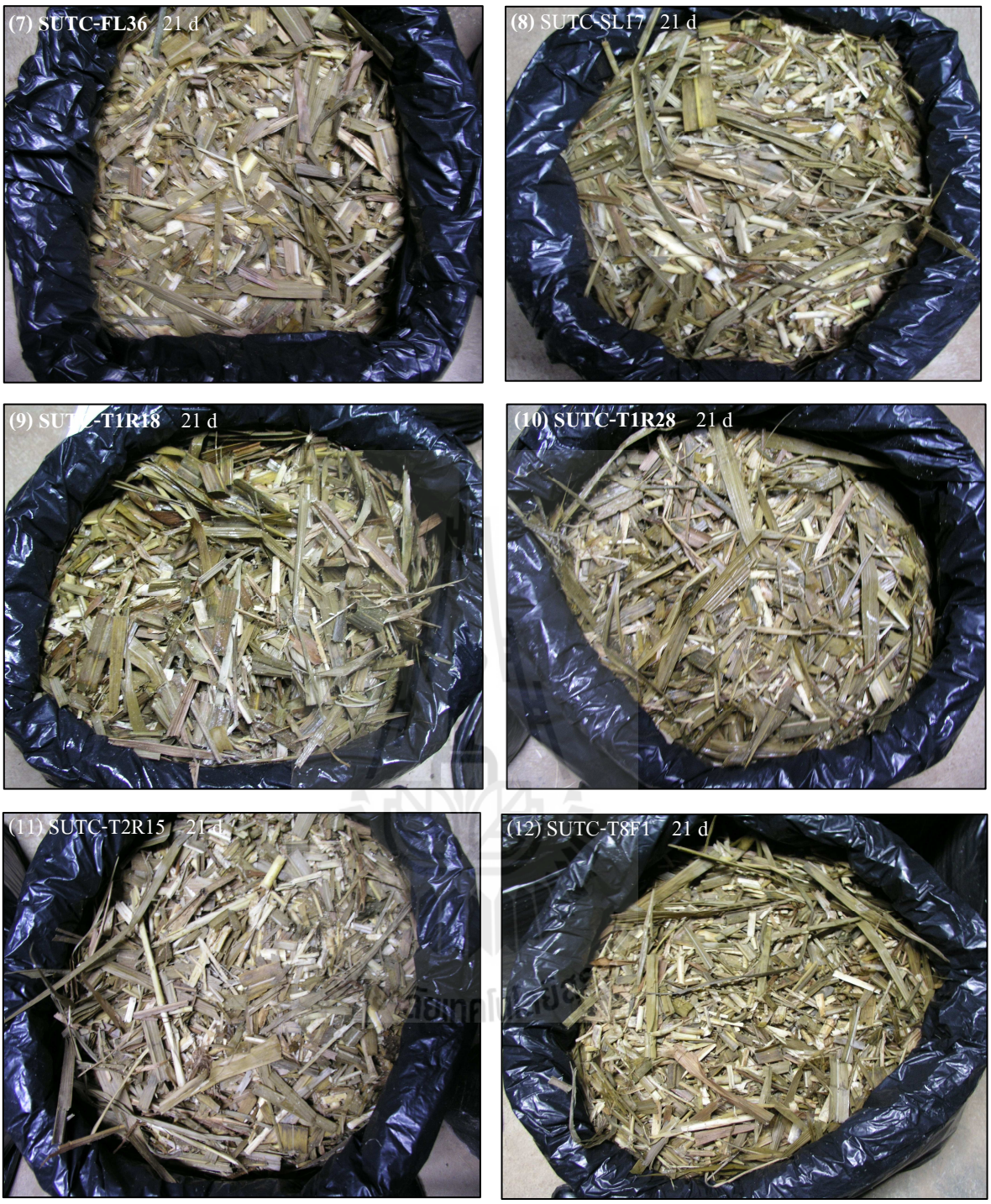
RAPD เป็นวิธีการที่รวดเร็วในการตรวจจับแบคทีเรียใน Silage แต่ต้องอาศัยเชื้อบริสุทธิ์ และอาจพบความผันแปรของแบบแผน RAPD ได้ รวมทั้งความไม่สม่ำเสมอของปริมาณผลผลิต DNA ที่มีผลกับความคมชัดของแบบแผน RAPD ปัจจุบันมีวิธีการทางชีววิทยาระดับโมเลกุลเช่นเดียวกันที่ให้รวดเร็วและน่าเชื่อถือมากขึ้นในการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพและประชากรของจุลินทรีย์ใน Silage ได้แก่ วิธี Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) ของ PCR-Amplified 16S rRNA gene fragments (Wang and Nishino, 2008, 2009; Parvin and Nishino, 2009, 2010; Li and Nishino, 2011) แต่จำเป็นต้องอาศัยเครื่องมือและเทคนิคที่ซับซ้อนกว่า RAPD

กล่าวโดยสรุปได้ว่ากล้าเชื้อรูปแบบแห้งบรรจุถุงพลาสติกที่ใช้กากถั่วเหลืองเป็นสารตัวกลางนี้นอกจากสามารถรักษาการมีชีวิตของกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกสายพันธุ์เฉพาะที่คัดเลือกใน 4 สกุล (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* และ *Pediococcus*) ภายหลังการเลี้ยงให้ได้ปริมาณเซลล์ตามต้องการที่รอใช้ประโยชน์ ยังให้ความสะดวกในการใช้ผลิตหญ้าหมัก เนื่องจากสามารถใส่เชื้อให้กระจายในวัสดุหมักอย่างทั่วถึงได้ง่าย

รูปที่ 3.17 หญ้าเนเปียร์สดใช้ทดลองหมักหญ้า

รูปที่ 3.18 การทดลองหมักหญ้าโดยใช้หญ้าเนเปียร์และกล้าเชื้อแบคทีเรียในรูปแบบที่พัฒนาได้

รูปที่ 3.19 ลักษณะของหญ้าเนเปียร์หมัก 21 วัน ที่ทดลองผลิตในฟาร์มเกษตรกรผู้เลี้ยงโค จากการหมักที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อ (1, Control) และเติมกล้าเชื้อแบคทีเรีย (2) *Lactococcus lactis* SUTC-D44, (3) *Pediococcus* sp. SUTC-F20, (4) *Leuconostoc mesenteroides* SUTC-FL36, (5) *Pediococcus damnosus* SUTC-MCN23, (6) *Pediococcus pentosaceus* SUTC-M2D3, (7) *Lactobacillus fermentum* SUTC-P46, (8) *L. brevis* SUTC-SL17, (9) *L. paracasei* SUTC-T1R18, (10) *L. plantarum* SUTC-T1R28, (11) *L. acidophilus* SUTC-T2R15 และ (12) *L. rhamnosus* SUTC-T8F1



รูปที่ 3.19 (ต่อ) ลักษณะของหญ้าเนเปียร์หมัก 21 วัน ที่ทดลองผลิตในฟาร์มเกษตรกรผู้เลี้ยงโค จากการหมักที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อ (1, Control) และเติมกล้าเชื้อแบคทีเรีย (2) *Lactococcus lactis* SUTC-D44, (3) *Pediococcus* sp. SUTC-F20, (4) *Leuconostoc mesenteroides* SUTC-FL36, (5) *Pediococcus damnosus* SUTC-MCN23, (6) *Pediococcus pentosaceus* SUTC-M2D3, (7) *Lactobacillus fermentum* SUTC-P46, (8) *L. brevis* SUTC-SL17, (9) *L. paracasei* SUTC-T1R18, (10) *L. plantarum* SUTC-T1R28, (11) *L. acidophilus* SUTC-T2R15 และ (12) *L. rhamnosus* SUTC-T8F1

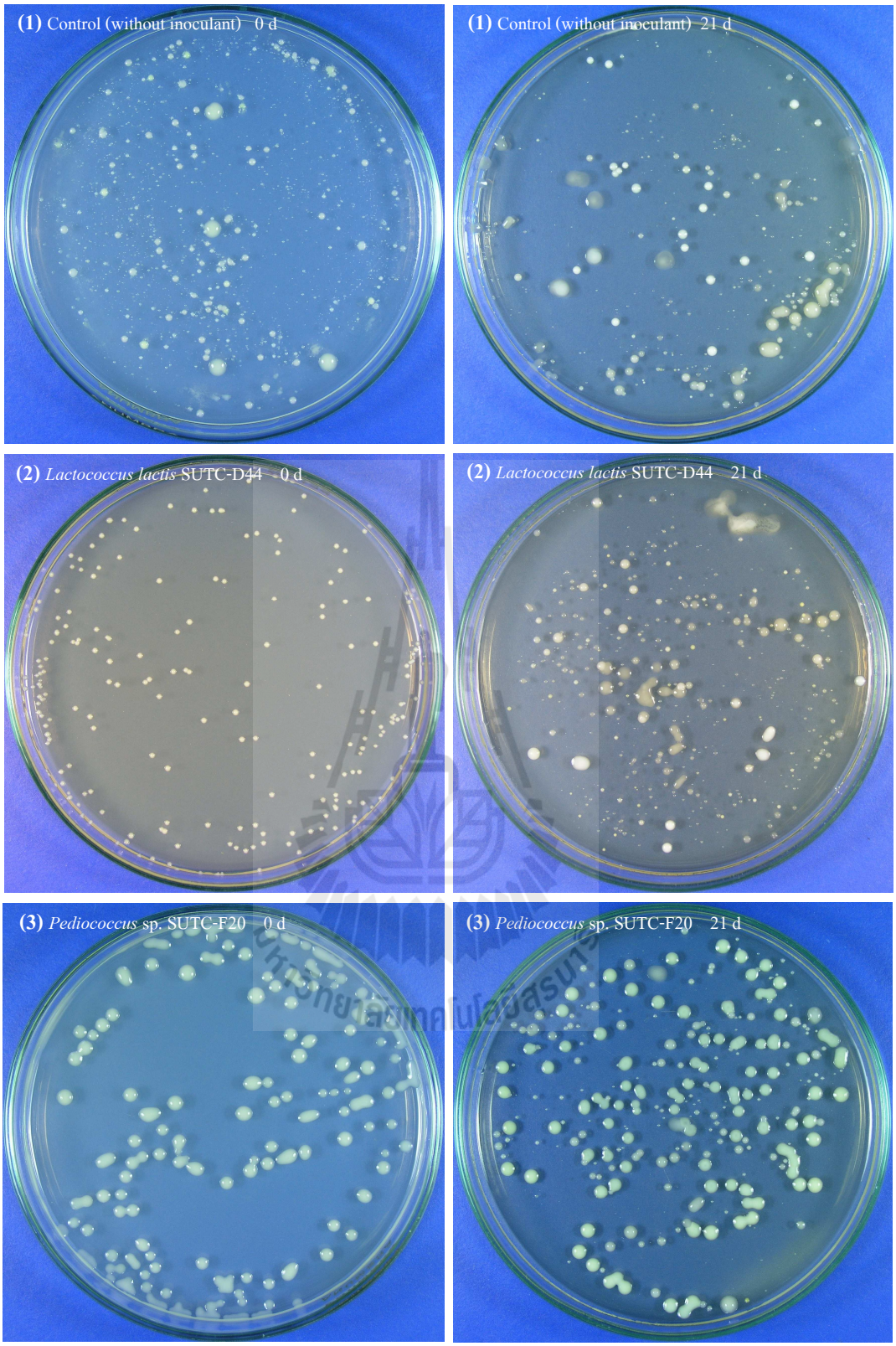
ตารางที่ 3.18 ผลผลิตหญ้าเนเปียร์หมักที่ไม่เติมและที่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกแตกต่างกัน 11 สายพันธุ์ ณ เวลาหมักที่ 0 และ 21 วัน

Silage code[a]	Apparance: Colour		Sour odour		pH		Viable cell counts (CFU/g) using medium:					
	0 d	21 d	0 d	21 d	0 d	21 d	0 day			21 days		
							MRS	MRS+0.5% $CaCO_3$	ROGOZA	MRS	MRS+0.5% $CaCO_3$	ROGOZA
Control	Green	Light brown-green	-	+	5.02	4.71	8.80×10^{3}	5.80×10^{4}	5.00×10^{3}	6.40×10^{6}	8.40×10^{6}	4.80×10^{6}
SUTC-D44	Green	Light yellow-green	-	++	5.43	4.54	1.49×10^{6}	1.20×10^{6}	2.24×10^{6}	7.80×10^{9}	8.60×10^{9}	8.40×10^{9}
SUTC-F20	Green	Light yellow-green	-	+++	5.03	4.53	2.51×10^{6}	9.50×10^{5}	5.20×10^{5}	1.06×10^{7}	2.40×10^{7}	2.30×10^{7}
SUTC-FL36	Green	Light brown-green	-	+++	5.02	4.51	4.20×10^{5}	4.10×10^{5}	4.05×10^{5}	1.00×10^{7}	1.20×10^{7}	1.10×10^{7}
SUTC-MCN23	Green	Light brown-green	-	+++	5.63	4.25	8.50×10^{5}	6.55×10^{5}	8.90×10^{5}	4.05×10^{7}	4.20×10^{7}	3.10×10^{7}
SUTC-M2D3	Green	Light yellow-green	-	++	5.86	4.40	2.39×10^{6}	1.21×10^{6}	2.58×10^{6}	1.02×10^{9}	9.60×10^{8}	1.28×10^{9}
SUTC-P46	Green	Light brown-green	-	+	5.12	4.58	9.60×10^{5}	6.40×10^{5}	4.25×10^{5}	3.00×10^{7}	2.90×10^{7}	7.20×10^{7}
SUTC-SL17	Green	Light yellow-green	-	+	5.81	4.23	8.40×10^{5}	1.55×10^{6}	4.20×10^{5}	8.50×10^{6}	1.80×10^{7}	1.25×10^{7}
SUTC-T1R18	Green	Light yellow-green	-	+++	5.37	4.45	1.24×10^{6}	7.85×10^{5}	1.29×10^{6}	7.50×10^{9}	1.36×10^{8}	8.30×10^{9}
SUTC-T1R28	Green	Light yellow-green	-	+++	5.85	4.33	1.50×10^{6}	1.31×10^{6}	1.32×10^{6}	7.55×10^{9}	7.15×10^{9}	7.40×10^{9}
SUTC-T2R15	Green	Light brown-green	-	++	5.01	4.30	1.61×10^{6}	9.00×10^{5}	1.97×10^{6}	1.00×10^{9}	9.05×10^{9}	1.11×10^{10}
SUTC-T8F1	Green	Light yellow-green	-	++	5.16	4.24	2.46×10^{6}	1.05×10^{6}	2.07×10^{6}	5.95×10^{9}	6.25×10^{9}	3.35×10^{9}

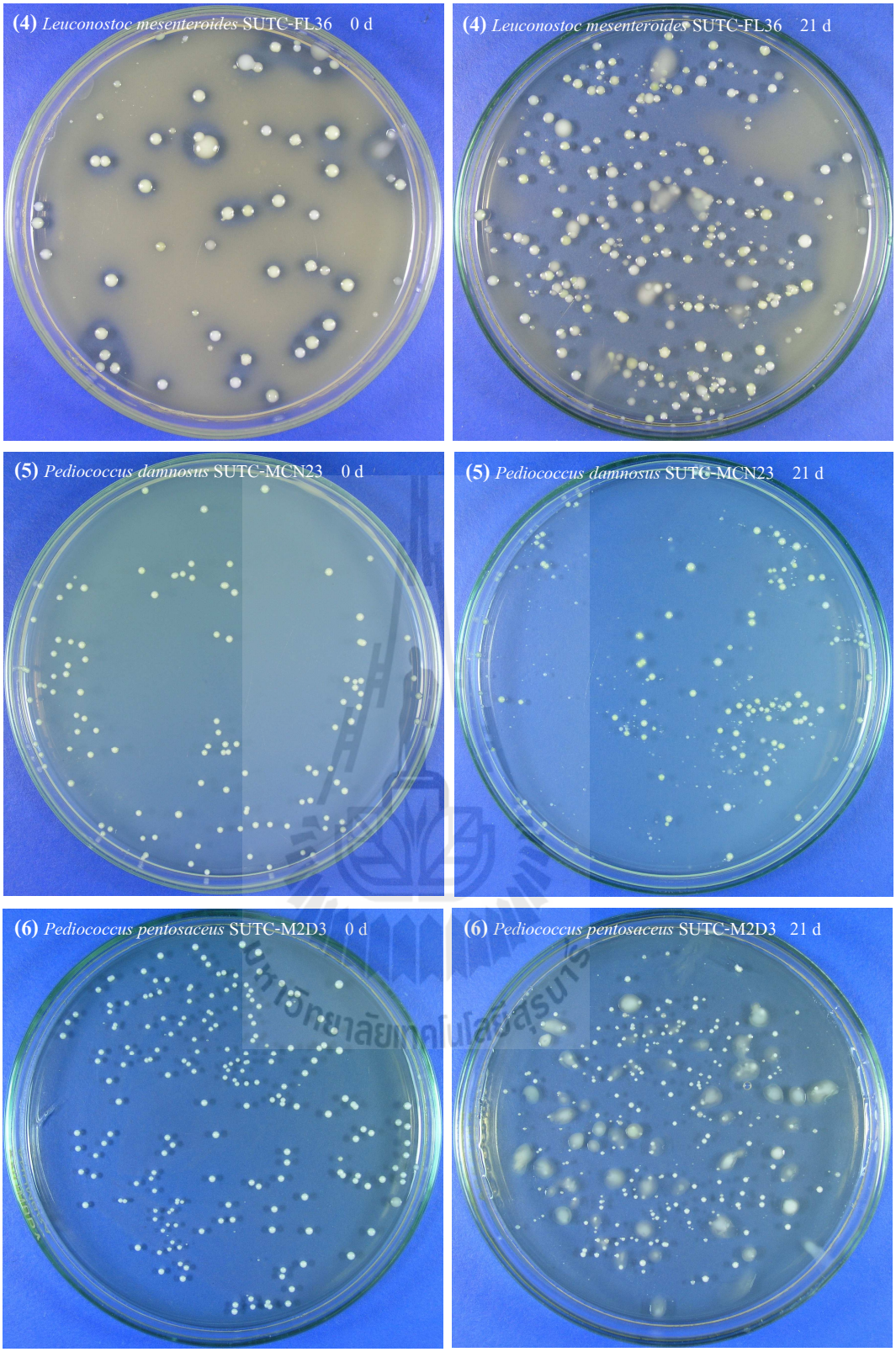
Note : + Sour odour compared to control

-, No sour odour

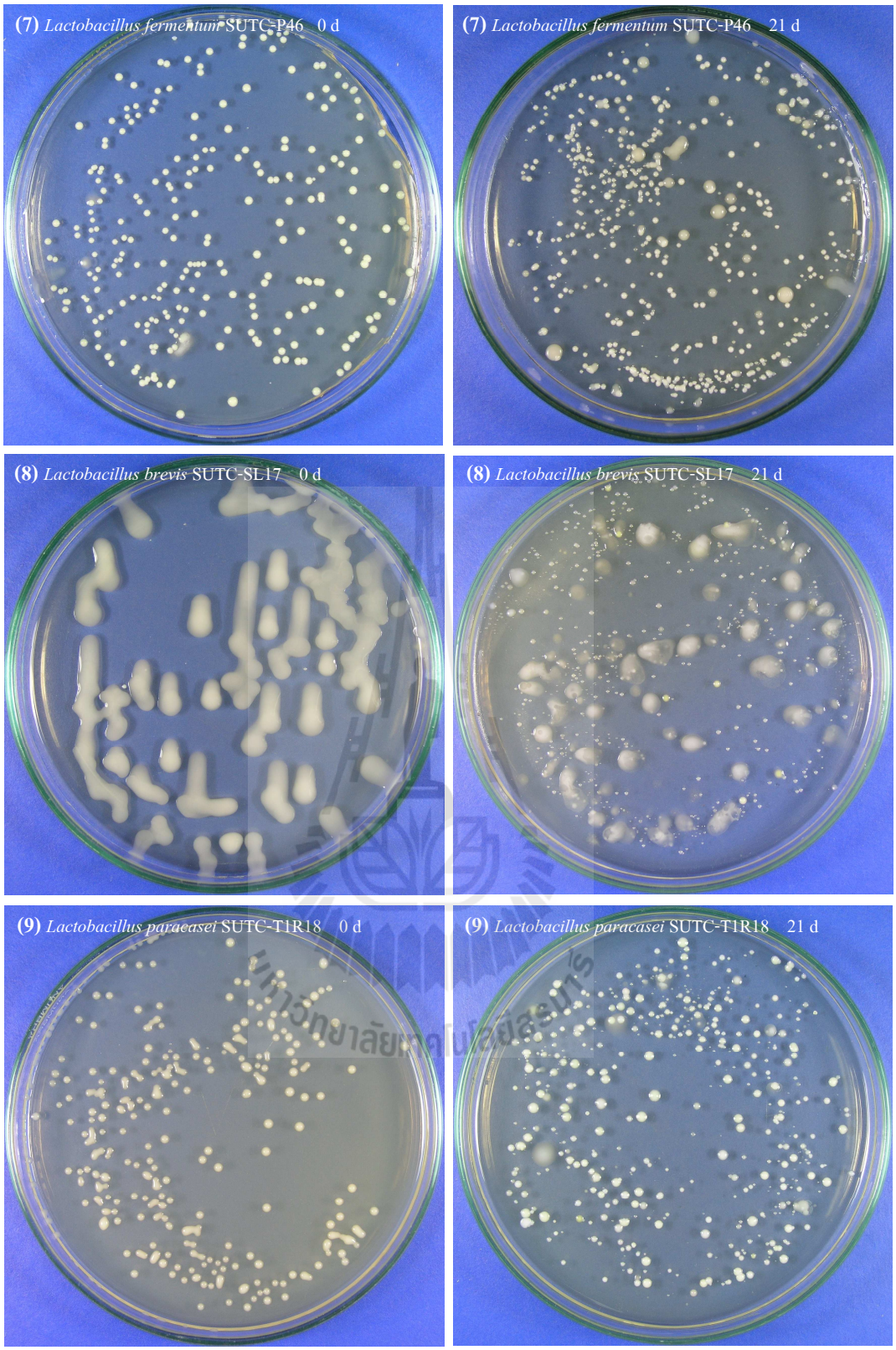
[a] Silage code as bacterial isolate code: *Lactococcus lactis* SUTC-D44, *Pediococcus* sp. SUTC-F20, *Leuconostoc mesenteroides* SUTC-FL36, *Pediococcus damnosus* SUTC-MCN23, *Pediococcus pentosaceus* SUTC-M2D3, *Lactobacillus fermentum* SUTC-P46, *L. brevis* SUTC-SL17, *L. paracasei* SUTC-T1R18, *L. plantarum* SUTC-T1R28, *L. acidophilus* SUTC-T2R15, and *L. rhamnosus* SUTC-T8F1



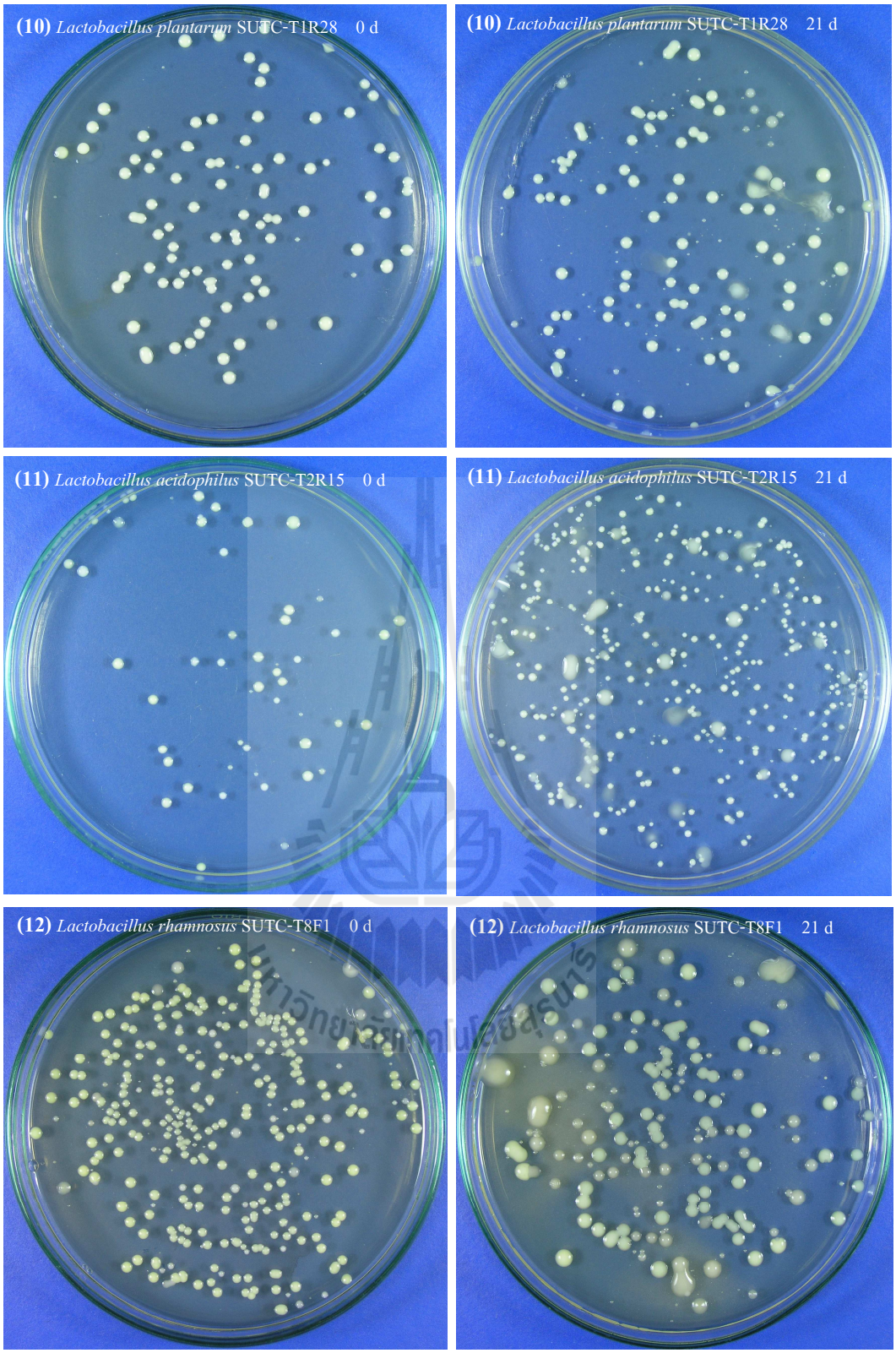
รูปที่ 3.20 โคโลนีของแบคทีเรียอายุ 48 ชั่วโมง แยกจากหญ้าเนเปียร์หมัก 21 วัน ที่ผลิตโดยไม่เติมกล้าเชื้อ (1, Control) และเติมกล้าเชื้อแบคทีเรีย (2) *Lactococcus lactis* SUTC-D44, (3) *Pediococcus* sp. SUTC-F20, (4) *Leuconostoc mesenteroides* SUTC-FL36, (5) *Pediococcus damnosus* SUTC-MCN23, (6) *Pediococcus pentosaceus* SUTC-M2D3, (7) *Lactobacillus fermentum* SUTC-P46, (8) *L. brevis* SUTC-SL17, (9) *L. paracasei* SUTC-T1R18, (10) *L. plantarum* SUTC-T1R28, (11) *L. acidophilus* SUTC-T2R15 และ (12) *L. rhamnosus* SUTC-T8F1



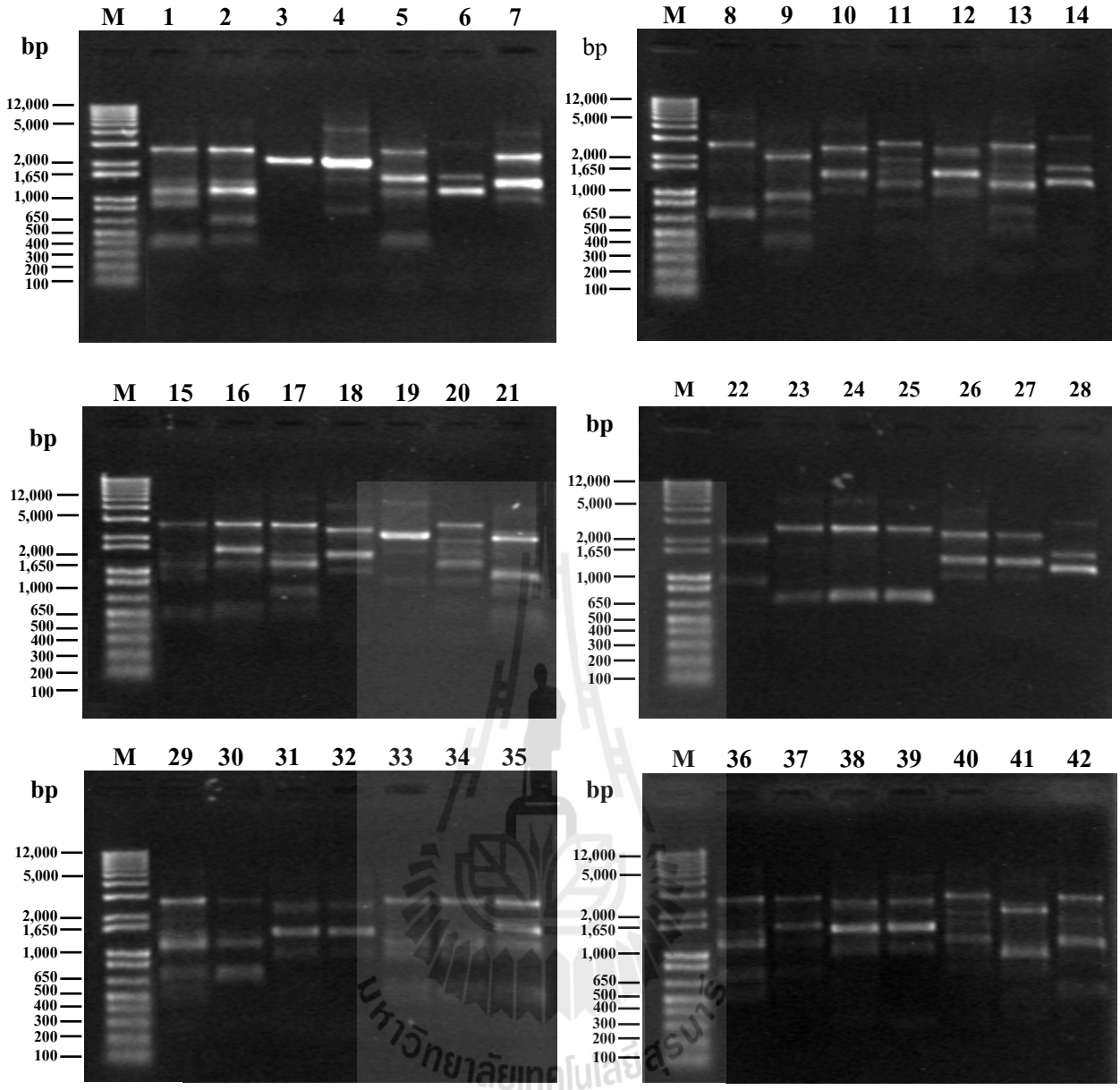
รูปที่ 3.20 (ต่อ) โคโลนีของแบคทีเรียอายุ 48 ชั่วโมง แยกจากหญ้าเนเปียร์หมัก 21 วัน ที่ผลิตโดยไม่เติมกล้าเชื้อ (1, Control) และเติมกล้าเชื้อแบคทีเรีย (2) *Lactococcus lactis* SUTC-D44, (3) *Pediococcus* sp. SUTC-F20, (4) *Leuconostoc mesenteroides* SUTC-FL36, (5) *Pediococcus damnosus* SUTC-MCN23, (6) *Pediococcus pentosaceus* SUTC-M2D3, (7) *Lactobacillus fermentum* SUTC-P46, (8) *L. brevis* SUTC-SL17, (9) *L. paracasei* SUTC-T1R18, (10) *L. plantarum* SUTC-T1R28, (11) *L. acidophilus* SUTC-T2R15 และ (12) *L. rhamnosus* SUTC-T8F1



รูปที่ 3.20 (ต่อ) โคโลนีของแบคทีเรียอายุ 48 ชั่วโมง แยกจากหญ้าเนเปียร์หมัก 21 วัน ที่ผลิตโดยไม่เติมกล้าเชื้อ (1, Control) และเติมกล้าเชื้อแบคทีเรีย (2) *Lactococcus lactis* SUTC-D44, (3) *Pediococcus* sp. SUTC-F20, (4) *Leuconostoc mesenteroides* SUTC-FL36, (5) *Pediococcus damnosus* SUTC-MCN23, (6) *Pediococcus pentosaceus* SUTC-M2D3, (7) *Lactobacillus fermentum* SUTC-P46, (8) *L. brevis* SUTC-SL17, (9) *L. paracasei* SUTC-T1R18, (10) *L. plantarum* SUTC-T1R28, (11) *L. acidophilus* SUTC-T2R15 และ (12) *L. rhamnosus* SUTC-T8F1



รูปที่ 3.20 (ต่อ) โคโลนีของแบคทีเรียอายุ 48 ชั่วโมง แยกจากหญ้าเนเปียร์หมัก 21 วัน ที่ผลิตโดยไม่เติมกล้าเชื้อ (1, Control) และเติมกล้าเชื้อแบคทีเรีย (2) *Lactococcus lactis* SUTC-D44, (3) *Pediococcus* sp. SUTC-F20, (4) *Leuconostoc mesenteroides* SUTC-FL36, (5) *Pediococcus damnosus* SUTC-MCN23, (6) *Pediococcus pentosaceus* SUTC-M2D3, (7) *Lactobacillus fermentum* SUTC-P46, (8) *L. brevis* SUTC-SL17, (9) *L. paracasei* SUTC-T1R18, (10) *L. plantarum* SUTC-T1R28, (11) *L. acidophilus* SUTC-T2R15 และ (12) *L. rhamnosus* SUTC-T8F1



รูปที่ 3.21 แบบแผน RAPD ของแบคทีเรียกล้าเชื้อและแบคทีเรียที่ตรวจพบในหญ้าหมักเมื่อใช้ Primer 3 (RAPD Analysis Primer Set, Pharmacia Biotech)

ช่องที่: M, DNA Molecular weight markers (1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen);

กล้าเชื้อ: 1, *Lactobacillus plantarum* SUTC-T1R28; 2, *L. brevis* SUTC-SL17; 3, *L. fermentum* SUTC-P46; 4, *L. paracasei* SUTC-T1R18; 5, *L. acidophilus* SUTC-T2R15; 6, *L. rhamnosus* SUTC-T8F1; 7 และ10, *Pediococcus pentosaceus* SUTC-M2D3; 8, *Lactococcus lactis* SUTC-D44; 9, *Pediococcus* sp. SUTC-F20; 11, *Pediococcus damnosus* SUTC-MCN23; 12, *Leuconostoc mesenteroides* SUTC-FL36;

ไอโซเลทที่แยกได้จากหญ้าหมักที่เติมกล้าเชื้อ: 13, 17, 29, 30 และ 36, SUTC-SL17; 14 และ 28, SUTC-T8F1; 15, 33, 34 และ 40, SUTC-T1R28; 16, 35, และ 37, SUTC-T2R15; 18, 26 และ 27, SUTC-M2D3; 19, SUTC-T1R18; 20 และ 42, SUTC-MCN23; 21, 22 และ 41, SUTC-F20; 23, 24 และ 25, SUTC-D44; 31, 32, 38 และ 39, SUTC-FL36

บทที่ 4
บทสรุป

4.1 สรุปผลการวิจัย

การดำเนินงานของโครงการวิจัย การพัฒนารูปแบบของกล้าเชื้อหญ้าหมัก เพื่อใช้ประโยชน์ในประเทศไทยหรือในเขตร้อนได้ง่าย ต้นทุนการผลิตต่ำ โดยเลือกกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกสายพันธุ์ธรรมชาติที่สามารถเจริญได้ดีในสิ่งแวดล้อมที่เอื้ออำนวยต่อการผลิตหญ้าหมัก ในสภาวะที่ไม่ต้องควบคุมอุณหภูมิ และศึกษาเพื่อให้ได้สภาวะที่เหมาะในการเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณกล้าเชื้อและพัฒนารูปแบบของกล้าเชื้อหญ้าหมักที่สามารถใช้สำหรับการผลิตหญ้าหมักที่มีคุณภาพเพื่อเป็นอาหารสัตว์ได้ง่าย สายพันธุ์แบคทีเรียดังกล่าวควรมีแนวโน้มในการผลิต Probiotics (จุลินทรีย์ที่มีชีวิตที่ให้กับสัตว์เพื่อประโยชน์ในแง่การปรับปรุงสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารให้ดีขึ้น ซึ่งส่งผลให้สัตว์นั้นมีสุขภาพดีขึ้น) ด้วยในผลผลิตอาหารสัตว์ชนิดเดียว

สายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่นำมาคัดเลือกเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อเป็นสายพันธุ์เด่นที่พบในหญ้าหมักที่ผลิตในประเทศไทย และแยกได้จากทางเดินอาหารของโค ที่มีแนวโน้มด้านการใช้เป็น Probiotics สำหรับโค ซึ่งเป็นผลจากที่ได้มีการศึกษาของผู้วิจัยและคณะที่ได้ดำเนินเสร็จสิ้นแล้ว จำนวนทั้งสิ้น 191 ไอโซเลต ที่ส่วนใหญ่เป็น Lactobacilli ซึ่งแยกและเลือกเก็บทั้งจากตัวอย่างอาหารโคและตัวอย่างจากโคทดลอง (โดยเจาะกระเพาะ) ที่มีสมบัติทางสัณฐานวิทยาและทางชีวเคมีที่เป็น Lactobacilli ชนิดเด่น 11 ชนิด คือ *Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. delbrueckii*, *L. fermentum*, *L. fructosus*, *L. hilgardii* และ *L. rhamnosus* โดยที่สายพันธุ์เฉพาะของ *Lactobacillus plantarum* ได้ทดลองใช้เป็นหัวเชื้อในการผลิต Sorghum silage และผ่านการทดสอบความสามารถด้าน colonization ในระบบทางเดินอาหารของโค และมีความเป็นไปได้สำหรับการใช้เป็นหัวเชื้อ (Inoculant) ที่เหมาะสมในการผลิต Silage

เมื่อทดสอบแบคทีเรียกรดแล็กติกเหล่านี้ด้านความสามารถในการเจริญที่ดีและเร็วในอาหารเลี้ยงเชื้อ และรูปแบบเมแทบอลิซึมของกระบวนการหมักที่เป็น Homo- และ Hetero-lactic fermentation ประกอบกับข้อมูลที่ระบุถึงสมบัติของแบคทีเรียที่มีศักยภาพที่มีแนวโน้มด้านการใช้เป็น Probiotics สำหรับโค รวมทั้งเป็นชนิดเดียวกับที่มีการรายงานถึงสมบัติ Probiotics คัดเลือกเชื้อได้ 11 ไอโซเลต (สายพันธุ์) ที่จัดอยู่ใน 4 สกุล คือ *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* และ *Pediococcus* ที่เมื่อตรวจสอบสายพันธุ์ของแบคทีเรียนั้นด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสมบัติทางชีวเคมี สามารถระบุชนิดได้แตกต่างกันคือ *Lactobacillus acidophilus* SUTC-T2R15, *L. brevis* SUTC-SL17, *L. fermentum* SUTC-P46, *L. paracasei* SUTC-T1R18, *L. plantarum* SUTC-T1R28, *L. rhamnosus* SUTC-T8F1,

Lactococcus lactis SUTC-D44, *Pediococcus pentosaceus* SUTC-M2D3, *Leuconostoc mesenteroides* SUTC-FL36, *Pediococcus damnosus* SUTC-MCN23 และ *Pediococcus* sp. SUTC-F20

อย่างไรก็ตามการระบุชนิดของแบคทีเรียกรดแล็กติกของโครงการนี้ อาศัยสมบัติทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีเป็นหลัก หลายไอโซเลตมีค่าความเหมือนกับสายพันธุ์อ้างอิงต่ำกว่า 99% โดยเฉพาะอย่างยิ่งไอโซเลต SUTC-D44 เหมือนกับ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 1 97.8%, SUTC-F20 ไม่สามารถระบุค่าความเหมือนกับชนิดใดในสกุล *Pediococcus* และ SUTC-FL36, SUTC-MCN23 และ SUTC-T2R15 ที่มีค่าความเหมือน 98.8, 93.8 และ 97.1% กับแบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิง *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus damnosus* และ *Lactobacillus acidophilus* ตามลำดับ แบคทีเรียที่แยกได้จากแหล่งธรรมชาติเหล่านี้อาจเป็นชนิดใหม่ จึงควรมีการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene ต่อไป

แบคทีเรียที่คัดเลือกเพื่อพัฒนาเป็นกล้าเชื้อหญ้าหมักจำนวน 11 สายพันธุ์ นี้มีทั้งที่จัดเป็น Homofermentatives และ Heterofermentatives เมื่อคำนึงถึง Fermentation pathway ของการใช้สารประกอบคาร์โบไฮเดรท ซึ่ง *Lactobacillus acidophilus*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus, Lactococcus lactis* และ *Pediococcus* sp. สายพันธุ์ที่คัดเลือกเป็น Homofermentatives ที่มี Homolactic fermentation สามารถผลิตกรดแล็กติกเท่านั้นเป็นผลผลิตจากการใช้น้ำตาลสำหรับ *Lactobacillus paracasei*, *L. plantarum* และ *L. rhamnosus* อาจจัดเป็น Facultative heterofermentatives ในขณะที่ *Lactobacillus brevis*, *L. fermentum* (ในบางสภาวะของการเจริญ) และ *Leuconostoc mesenteroides* เป็น Heterofermentatives เมื่อใช้น้ำตาลแล้วเกิดกรดแล็กติกและผลผลิตอื่นด้วย ได้แก่ Acetic acid, Ethanol, Formic acid และคาร์บอนไดออกไซด์

นอกจากการตรวจสอบสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่คัดเลือกด้วยสมบัติทางชีวเคมีแล้วยังได้ใช้วิธี Random amplified polymorphic DNA (RAPD) ซึ่งแบคทีเรียกรดแล็กติกแต่ละสายพันธุ์มีแบบแผน RAPD เฉพาะ ซึ่งสามารถใช้แบบแผนนี้เป็นสิ่งบ่งบอกสายพันธุ์ของแบคทีเรียกล้าเชื้อในขณะติดตามการใช้ประโยชน์แบคทีเรียได้

การศึกษาส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม สำหรับเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแล็กติกที่คัดเลือกได้ เพื่อลดต้นทุนการผลิตกล้าเชื้อ ด้วยมุ่งหวังให้ได้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบไม่ซับซ้อนและราคาถูกที่ส่งเสริมการเจริญที่ดีที่สุดของแบคทีเรียกรดแล็กติกสายพันธุ์ที่คัดเลือกเป็นกล้าเชื้อ เพื่อพัฒนารูปแบบของการเตรียมกล้าเชื้อนั้นเพื่อผลิตหญ้าหมักที่เป็นอาหารสัตว์ จากแบคทีเรียกรดแล็กติกที่คัดเลือกไว้จำนวน 11 ไอโซเลต (สายพันธุ์) ทุกไอโซเลตเจริญได้ดีในอาหาร MRS medium (MERCK, Merck KgaA, Germany) จึงเริ่มพัฒนาส่วนประกอบของอาหารจากสูตรอาหารดังกล่าวเพื่อให้ได้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบที่เตรียมง่ายและมีต้นทุนต่ำกว่าอาหารสมบูรณ์เริ่มต้น

เมื่อคำนึงถึงชนิดของแหล่งคาร์บอน จากส่วนประกอบเริ่มต้นตาม MRS medium ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ได้เปลี่ยนชนิดของแหล่งคาร์บอนเป็นชนิดที่มีราคาถูกกว่ากลูโคส คือ ซูโครส

(Sucrose; AR grade, Carlo Erba, Italy) น้ำตาลทรายหรือน้ำตาลที่ผลิตจากอ้อย (Cane sugar; น้ำตาลทรายบริสุทธิ์มิตรผล บริษัท รวมเกษตรกรอุตสาหกรรม จำกัด) กากน้ำตาลจากอ้อย (Molasses; โรงงานผลิตน้ำตาลจากอ้อยในพื้นที่จังหวัดนครราชสีมา) แป้งข้าวเจ้า (Rice flour, Food grade ตราช้างสามเศียร บริษัท โรงเส้นหมี่ชอเฮง จำกัด ประเทศไทย) และแป้งมันสำปะหลัง (Tapioca starch, Edible grade, Sanguan Wongse Industries Co., Ltd., Thailand) ในปริมาณ 2% (น้ำหนักต่อปริมาตร) เท่ากับกลูโคสที่ใช้ในสูตรเริ่มต้น เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียกรดแล็กติกเป็นเวลา 20 ชั่วโมง พบว่าทุกไอโซเลตมีการเจริญได้ดีมากในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีซูโครส (ตรวจนับจำนวนเซลล์ได้สูงสุดในช่วง 1.40×10^{9} ถึง 6.60×10^{9} CFU ต่อมิลลิลิตร) ที่สามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนทดแทนกลูโคสได้ถึงแม้จะส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียบางไอโซเลทได้ด้อยกว่ากลูโคสเล็กน้อย รองลงมา คือ อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลที่ผลิตจากอ้อย (ตรวจนับจำนวนเซลล์ได้สูงสุดในช่วง 3.80×10^{8} ถึง 2.10×10^{9} CFU ต่อมิลลิลิตร) และกากน้ำตาล (ตรวจนับจำนวนเซลล์ได้สูงสุดในช่วง 1.36×10^{7} ถึง 1.95×10^{8} CFU ต่อมิลลิลิตร) ตามลำดับ แบคทีเรียกรดแล็กติกทั้ง 11 ไอโซเลต ที่ทดสอบเจริญได้น้อยในอาหารที่มีแป้งเป็นแหล่งคาร์บอนหลัก เนื่องจากแบคทีเรียเหล่านี้ไม่สามารถย่อยแป้งได้ แต่ยังสามารถใช้ Peptone, Beef extract และ Yeast extract ซึ่งเป็นส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ในการเจริญที่สามารถตรวจนับจำนวนได้ การศึกษาครั้งนี้จึงเลือกใช้น้ำตาลทราย (น้ำตาลที่ผลิตจากอ้อย) และกากน้ำตาลเนื่องจากมีราคาถูกกว่าซูโครสราว 20 เท่า มาพัฒนาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนหลักและศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสม เพื่อเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดเลือก

ด้านความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอน จากที่ได้เลือกน้ำตาลทรายที่ผลิตจากอ้อยและกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับเลี้ยงแบคทีเรียกล้าเชื้อ ได้ศึกษาความเข้มข้นของน้ำตาลทรายในช่วง 0.5-6.0% และกากน้ำตาลที่ความเข้มข้นในช่วง 0.5-4.0% พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 20 ชั่วโมง แบคทีเรียกล้าเชื้อเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลทรายที่ผลิตจากอ้อยในช่วง 1.0-4.0% แตกต่างกันตามสายพันธุ์ โดยที่ความเข้มข้นของน้ำตาลทราย 2.0% สนับสนุนการเจริญของแบคทีเรียกล้าเชื้อส่วนใหญ่ได้ดี ที่ได้จำนวนเซลล์ 10^{7}-10^{8} CFU ต่อมิลลิลิตร

ส่วนการเจริญของแบคทีเรียกล้าเชื้อที่คัดเลือกในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน ความเข้มข้นในช่วง 0.5-4.0% นั้น เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 20 ชั่วโมง พบว่ากากน้ำตาลความเข้มข้น 1.0-3.0% สนับสนุนการเจริญของแบคทีเรียกล้าเชื้อส่วนใหญ่ แต่ได้จำนวนเซล์ที่ค่อนข้างน้อยกว่าน้ำตาลทราย ได้เลือกน้ำตาลทรายที่ผลิตจากอ้อยในปริมาณ 2.0% (น้ำหนักต่อปริมาตร) เพื่อการศึกษาชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจน

เมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกที่มีน้ำตาลทรายที่ผลิตจากอ้อยความเข้มข้น 2.0% (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอนทดแทนกลูโคสในส่วนประกอบของ MRS medium มาศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจน 3 ชนิด คือ แอมโมเนียมซัลเฟต (Ammonium sulphate, AR grade, Carlo Erba Reagenti, Italy) กากถั่วเหลือง (Soybean meal จากโรงผลิตอาหารสัตว์ ฟาร์มมหาวิทยาลัย

เทคโนโลยีสุรนารี) และยูเรีย (Urea, AR grade, Carlo Erba Reagenti) ความเข้มข้นเท่ากับปริมาณ Tryptone และ Meat extract (MERCK, Merck KgaA, Germany) ในสูตร MRS medium เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ไม่มีการกวนใน Anaerobic chamber เป็นเวลา 20 ชั่วโมง พบว่าแบคทีเรียทุกไอโซเลตที่ทดสอบเจริญได้ดีที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกากถั่วเหลือง รองลงมาคือแอมโมเนียมซัลเฟต และยูเรีย ตามลำดับ เนื่องจากในขั้นตอนต่อไปต้องการพัฒนารูปแบบของกล้าเชื้อ ที่เปรียบเทียบรูปแบบเชื้อแห้งบรรจุถุงพลาสติกและรูปแบบลูกแป้ง เพื่อมิให้มีส่วนคงเหลือของกากถั่วเหลืองในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการศึกษาครั้งนี้ จึงเลือกแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนหลักในการเตรียมเซลล์แบคทีเรียกล้าเชื้อ แต่กากถั่วเหลืองก็ยังมีประโยชน์และเป็นทางเลือกที่ดีของแหล่งไนโตรเจนราคาถูก ในกรณีผลิตรูปแบบเชื้อแห้งบรรจุถุงพลาสติก

จากนั้นได้ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอมโมเนียมซัลเฟต โดยใช้ความเข้มข้นต่างกันในช่วง 1.0-5.0% เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 20 ชั่วโมง พบว่าแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 3.0% สนับสนุนการเจริญของแบคทีเรียส่วนใหญ่ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Lactococcus lactis* SUTC-D44, *Leuconostoc mesenteroides* SUTC-FL36, *Lactobacillus fermentum* SUTC-P46, *L. plantarum* SUTC-T1R28, *L. brevis* SUTC-SL17, *L. paracasei* SUTC-T1R18 และ *L. rhamnosus* SUTC-T8F1 ที่เจริญได้ดี ตรวจนับจำนวนได้สูงสุด 5.50×10^{7}, 3.47×10^{7}, 3.23×10^{7}, 1.67×10^{8}, 1.85×10^{8}, 1.24×10^{8} และ 3.77×10^{7} CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วน *Pediococcus* sp. SUTC-F20 และ *Lactobacillus acidophilus* SUTC-T2R15 เจริญได้ดีในอาหารที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 2.0-4.0% ตรวจนับจำนวนได้สูงสุดโดยเฉลี่ย 1.80×10^{7} และ 1.80×10^{8} CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จึงเลือกแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 3.0% (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งไนโตรเจนหลักในอาหารเลี้ยงแบคทีเรียกล้าเชื้อทุกไอโซเลตที่ศึกษา ที่มีน้ำตาลทรายที่ผลิตจากอ้อยความเข้มข้น 2.0% เป็นแหล่งคาร์บอนทดแทนกลูโคสในส่วนประกอบของ MRS medium

จากนั้นได้ศึกษาความจำเป็นที่ต้องเติมและปริมาณที่พอเพียงของ Essential element และ/หรือ Growth factor ในส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลทราย 2.0% เป็นแหล่งคาร์บอน แอมโมเนียมซัลเฟต 3.0% เป็นแหล่งไนโตรเจน และเติม Yeast extract ซึ่งเป็นแหล่ง Growth factor ปริมาณแตกต่างกันในช่วง 0.3-1.0% เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกเป็นกล้าเชื้อเป็นเวลา 20 ชั่วโมง พบว่าในอาหารที่เติม Yeast extract เข้มข้น 0.5-1.0% ส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียทดสอบส่วนใหญ่ได้ใกล้เคียงกัน ในอาหารที่เติม Yeast extract เข้มข้น 1.0% มีผลให้ *Lactococcus lactis* SUTC-D44, *Leuconostoc mesenteroides* SUTC-FL36, *Lactobacillus fermentum* SUTC-P46, *L. brevis* SUTC-SL17, *L. paracasei* SUTC-T1R18, *L. plantarum* SUTC-T1R28, *L. acidophilus* SUTC-T2R15 และ *L. rhamnosus* SUTC-T8F1 มีการเจริญที่ตรวจนับจำนวนได้สูงสุด 3.20×10^{8}, 5.61×10^{8}, 1.92×10^{9}, 2.90×10^{9}, 2.86×10^{9}, 1.53×10^{9}, 2.93×10^{9} และ 2.66×10^{9} CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วน *Pediococcus* sp. SUTC-F20 มีการเจริญที่ตรวจนับจำนวนได้สูงสุดได้ใกล้เคียงกัน

(3.20×10^8 และ 3.15×10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) ในอาหารที่เติม Yeast extract เข้มข้น 0.5 และ 1.0% ในขั้นตอนนี้จึงได้เลือกความเข้มข้นของ Yeast extract 0.5% เป็นส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเพียงพอต่อการเตรียมเซลล์แบคทีเรียให้ได้ปริมาณ 10^8-10^9 CFU ต่อมิลลิลิตร เพื่อพัฒนารูปแบบของกล้าเชื้อที่สามารถรักษาการมีชีวิตของเชื้อได้นานและเหมาะสมต่อการใช้ประโยชน์

การศึกษาสภาวะที่เหมาะต่อการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือก ศึกษาสภาวะที่เหมาะต่อการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือก อุณหภูมิ ทดสอบความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิ 4 และ 25 ถึง 50 องศาเซลเซียส ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบเหมาะสมตามที่พัฒนาได้ (ประกอบด้วยน้ำตาลทรายที่ผลิตจากอ้อย 2.0% แอมโมเนียมซัลเฟต 3.0%, Yeast extract 0.5%, Sodium acetate tri-hydrate 0.5%, Di-potassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4) 0.2%, Tri-ammonium citrate 0.2%, Magnesium sulfate ($MgSO_4.7H_2O$) 0.02%, Manganese sulfate ($MnSO_4.4H_2O$) 0.004% และ Tween 80 0.1%) เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 20 ชั่วโมง พบว่าไม่มีการเจริญของแบคทีเรียทั้ง 11 ไอโซเลต ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิ 25-35 องศาเซลเซียส เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบ กล้าเชื้อ 3 สายพันธุ์ คือ *Lactobacillus brevis* SUTC-SL17, *L. paracasei* SUTC-T1R18 และ *L. plantarum* SUTC-T1R28 มีการเจริญที่ตรวจนับจำนวนได้สูงสุดถึง 10^9 CFU ต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส พบการเจริญของแบคทีเรียกล้าเชื้อ *Lactococcus lactis* SUTC-D44, *Pediococcus* sp. SUTC-F20, *Leuconostoc mesenteroides* SUTC-FL36, *L. fermentum* SUTC-P46, *L. acidophilus* SUTC-T2R15, และ *L. rhamnosus* SUTC-T8F1 มีการเจริญที่ตรวจนับจำนวนได้สูงสุด 6.54×10^8, 5.43×10^8, 2.23×10^9, 2.35×10^9, 1.50×10^9 และ 1.84×10^9 CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในขั้นตอนนี้จึงได้เลือกอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เพื่อเลี้ยงกล้าเชื้อเนื่องจากเป็นอุณหภูมิที่แบคทีเรียที่คัดเลือกเป็นกล้าเชื้อทุกไอโซเลตเจริญได้ดี และเป็นอุณหภูมิใกล้อุณภูมิห้องของประเทศไทย

สภาพที่มีออกซิเจน เนื่องจากแบคทีเรียกรดแล็กติกมีทั้ง Microaerophiles และ Anaerobes ซึ่งถ้าเป็นพวกที่ทนออกซิเจนได้จะเป็นประโยชน์ในการเลี้ยงและนำกล้าเชื้อไปใช้ประโยชน์มากขึ้น เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียกรดแล็กติกที่คัดเลือกในอาหารเหมาะสมที่พัฒนาได้ดังกล่าวข้างต้น พร้อมทั้งทดลองไม่เติม Tri-ammonium citrate และ Tween 80 ตามส่วนประกอบของ MRS medium ให้เจริญในสองสภาวะเปรียบเทียบกันคือ ตู้บ่มในสภาวะปกติ (มีออกซิเจน) และ Anaerobic chamber ไร้ออกซิเจน มีเพียงส่วนผสมของคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ไฮโดรเจน 5% และสมดุลด้วยแก๊สไนโตรเจน ควบคุมอุณหภูมิที่ 35 องศาเซลเซียส ไม่มีการกวนหรือเขย่า เป็นเวลา 20 ชั่วโมง พบว่าแบคทีเรียเจริญดีใกล้เคียงกันทั้งในตู้บ่มภายใต้สภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน โดยส่วนใหญ่ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนให้ปริมาณเซลล์ที่สูงกว่าที่มีออกซิเจนเล็กน้อย ผลที่ได้จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียกล้าเชื้อที่คัดเลือกได้เหล่านี้ทนต่อสภาวะที่มีออกซิเจนในช่วงเวลาที่เลี้ยงเชื้อถึง Stationary phase และไม่

จำเป็นต้องมี Tri-ammonium citrate และ Tween 80 เป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อตาม MRS medium ซึ่งเป็นอาหารสูตรมาตรฐานสำหรับแบคทีเรียกรดแล็กติกโดยเฉพาะอย่างยิ่ง Lactobacilli

การศึกษาวัฏภาคของการเจริญของแบคทีเรียและความจำเป็นและต้องการทำให้เซลล์ของเชื้อเข้มข้นขึ้น เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดเลือกเป็นกล้าเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ และสภาวะที่เหมาะสม คือที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้ออกซิเจน ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ไฮโดรเจน 5% และสมดุลด้วยไนโตรเจน โดยเพิ่มปริมาณอาหารเป็น 1 ลิตร ใน Erlenmeyer flask ขนาดบรรจุ 2 ลิตร แบคทีเรียกรดแล็กติกที่คัดเลือกเพื่อทดลองพัฒนาเป็นกล้าเชื้อหญ้าหมักทั้ง 11 สายพันธุ์ มีการเจริญในรูปแบบคล้ายคลึงกัน และมี Late log phase ซึ่งระยะที่จะนำกล้าเชื้อไปใช้ประโยชน์ เมื่อเจริญได้ 18-20 ชั่วโมง โดยเฉลี่ย สามารถให้ปริมาณเซลล์สูงสุด โดยเฉลี่ย 10^{8}-10^{9} CFU ต่อมิลลิลิตร จากปริมาณเซลล์เริ่มต้นโดยเฉลี่ย 10^{5} CFU ต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 20 ชั่วโมง ทั้งนี้มีความแตกต่างกันตามสายพันธุ์ของแบคทีเรียสำหรับช่วงเวลาที่สามารถเลี้ยงได้ปริมาณเซลล์สูงสุด กล่าวคือ *Lactococcus lactis* SUTC-D44 มีการเจริญที่ตรวจนับจำนวนได้สูงสุด 7.25×10^{8} CFU ต่อมิลลิลิตร ที่ระยะเวลาเลี้ยงเชื้อ 26 ชั่วโมง ส่วน *Pediococcus* sp. SUTC-F20, *Leuconostoc mesenteroides* SUTC-FL36, *Pediococcus damnosus* SUTC-MCN23, *Pediococcus pentosaceus* SUTC-M2D3, *Lactobacillus fermentum* SUTC-P46, *L. brevis* SUTC-SL17, *L. paracasei* SUTC-T1R18 และ *L. rhamnosus* SUTC-T8F1 มีการเจริญที่ตรวจนับจำนวนได้สูงสุด 1.89×10^{9}, 1.48×10^{9}, 8.50×10^{8}, 8.40×10^{8}, 1.46×10^{9}, 8.80×10^{8}, 1.40×10^{9} และ 1.60×10^{9} CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ที่ระยะเวลาเลี้ยงเชื้อ 20 ชั่วโมง ในขณะที่ *L. plantarum* SUTC-T1R28 มีการเจริญตรวจนับจำนวนได้สูงสุด 3.70×10^{9} CFU ต่อมิลลิลิตร และ *L. acidophilus* SUTC-T2R15 จำนวนสูงสุด 4.38×10^{8} CFU ต่อมิลลิลิตร ที่ระยะเวลาเลี้ยงเชื้อ 22 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ

ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญที่ได้จากการศึกษา พบว่าวัฏภาคของการเจริญของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่คัดเลือกมี Log phase จากเมื่อเริ่มเลี้ยงเชื้อถึงราว 20 ชั่วโมง Stationary phase ในช่วง 20-26 ชั่วโมง ของการเลี้ยงเชื้อ แบคทีเรียเริ่มเข้าสู่ระยะ Death phase ภายหลัง 26 ชั่วโมง ข้อมูลเหล่านี้มีประโยชน์อย่างยิ่งในการเตรียมกล้าเชื้อเพื่อใช้ประโยชน์

ส่วนความจำเป็นและต้องการทำให้เซลล์ของเชื้อเข้มข้นขึ้น อาจใช้วิธีปั่นแยกหรือวิธีทำให้เป็นผงแห้งด้วยเทคนิคการทำแห้งเยือกแข็งด้วยเครื่อง Freeze dryer นั้น ไม่จำเป็น เนื่องจากสามารถเลี้ยงแบคทีเรียกรดแล็กติกที่คัดเลือกเพื่อทดลองพัฒนาเป็นกล้าเชื้อหญ้าหมัก ให้ได้ปริมาณเซลล์สูงสุด 10^{8}-10^{9} CFU ต่อมิลลิลิตร ในเวลา 20-24 ชั่วโมง ซึ่งเพียงพอต่อการใช้พัฒนารูปแบบของกล้าเชื้อ

การทดลองหารูปแบบของกล้าเชื้อเพื่อการใช้ประโยชน์ รูปแบบกล้าเชื้อที่พร้อมใช้ประโยชน์ที่ได้ศึกษา ได้เตรียมเป็นกล้าเชื้อเดี่ยว เนื่องจากสามารถใช้หมักหญ้าได้ทั้งที่เป็นกล้าเชื้อชนิดเดียวและนำมาผสมเป็นกล้าเชื้อผสมก่อนใช้งานได้ง่าย โดยทดลองในรูปแบบที่มีวิธีการไม่ยุ่งยากต้นทุนการผลิตต่ำ เป็นแบบเชื้อแห้งบรรจุในถุงพลาสติกและแบบลูกแป้ง โดยเลือกแบคทีเรียไอโซเลตที่คัดเลือก

มาทดสอบ คือ *Lactobacillus brevis* SUTC-SL17 และ *Lactobacillus plantarum* SUTC-T1R28 เนื่องจากเป็นไอโซเลตที่แยกได้จาก Sorghum silage และเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้พัฒนาเพื่อการผลิตกล้าเชื้อ

กล้าเชื้อในรูปแบบเชื้อแห้งบรรจุในถุงพลาสติก ผลิตได้ด้วยการเลี้ยงแบคทีเรียกล้าเชื้อในอาหารเหลวที่พัฒนาได้ ให้ได้ปริมาณเซลล์ประมาณ 10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร ซึ่งปฏิบัติได้ง่ายและใช้เวลาสั้นประมาณ 18 ชั่วโมง จากนั้นปั่นแยกเซลล์แบคทีเรียออกจากอาหารเหลว ล้างเซลล์ด้วยน้ำเกลือปลอดเชื้อ (0.85% NaCl) 1 ครั้ง เตรียมเซลล์แขวนลอยในน้ำเกลือ ผสมลงในสารตัวกลาง (ที่ผ่านการอบแห้งให้มีความชื้นประมาณ 13-16%) ให้ได้ปริมาณเซลล์ 10^8 เซลล์ต่อกรัม โดยประมาณ นำเข้าอบแห้งในตู้อบอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ประมาณ 6 ชั่วโมง แล้วเก็บเข้าถุงพลาสติกปิดสนิทปริมาณ 500 กรัมต่อถุง แบคทีเรียกล้าเชื้อในรูปแบบเชื้อแห้งบรรจุในถุงพลาสติก ที่ใช้สารตัวกลางต่างกัน 6 ชนิดคือ กากปาล์ม กากมะพร้าว กากมันสำปะหลัง กากถั่วเหลือง รำอ่อน (ข้าวเจ้า) และรำหยาบ ในช่วงเริ่มเตรียมกล้าเชื้อลงในสารตัวกลาง ได้เติมเซลล์แบคทีเรียให้มีจำนวนโดยเฉลี่ย 10^8 CFU ต่อกรัม แต่ภายหลังการทำแห้งที่ 40 องศาเซลเซียส (ใช้เวลาอบประมาณ 6 ชั่วโมง) เซลล์แบคทีเรียกล้าเชื้อส่วนหนึ่ง (ประมาณ 1-3 logCFU ต่อกรัม) ตายไป สารตัวกลางที่เป็นกากมะพร้าว กากถั่วเหลือง และรำ สามารถช่วยรักษาการมีชีวิตของแบคทีเรียทำให้มีจำนวนเซลล์อยู่รอดสูงกว่าการใช้สารตัวกลางที่เป็นกากปาล์มและกากมันสำปะหลัง กล้าเชื้อที่ผลิตขึ้นใช้ประโยชน์ จำเป็นต้องมีอายุการเก็บนานได้ และอยู่รอดในระหว่างการขนส่ง จึงทดลองเก็บกล้าเชื้อในรูปแบบที่ผลิตที่อุณหภูมิห้องและ 4 องศาเซลเซียส เมื่อเก็บกล้าเชื้อในรูปแบบเชื้อแห้งบรรจุในถุงพลาสติกไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 วัน พบว่า *Lactobacillus brevis* SUTC-SL17 อยู่รอดได้ดีที่สุดในรำหยาบ (3.30×10^7 CFU ต่อกรัม) และ *L. plantarum* SUTC-T1R28 อยู่รอดได้ดีที่สุดในกากมะพร้าว (1.47×10^6 CFU ต่อกรัม) แบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลต อยู่รอดได้ดีในกากถั่วเหลือง (1.23×10^8 และ 1.14×10^7 CFU ต่อกรัม ตามลำดับ) จึงได้นำกากถั่วเหลืองมาเตรียมกล้าเชื้อเดี่ยวจำนวน 11 ไอโซเลต ในรูปแบบเชื้อแห้งบรรจุในถุงพลาสติก และทดสอบการอยู่รอดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน จากที่เตรียมเชื้อแห้งโดยให้มีจำนวนเซลล์เริ่มต้น 10^8 CFU ต่อกรัม และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน พบว่าแบคทีเรีย 3 ไอโซเลต (*Lactococcus lactis* SUTC-D44, *Leuconostoc mesenteroides* SUTC-FL36 และ *Lactobacillus plantarum* SUTC-T1R28) มีชีวิตอยู่รอดมากที่สุด (มากกว่า 10^7 CFU ต่อกรัม) เมื่อที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน ส่วนอีก 8 ไอโซเลต (*Pediococcus* sp. SUTC-F20, *Pediococcus damnosus* SUTC-MCN23, *Pediococcus pentosaceus* SUTC-M2D3, *Lactobacillus fermentum* SUTC-P46, *L. brevis* SUTC-SL17, *L. paracasei* SUTC-T1R18, *L. acidophilus* SUTC-T2R15, and *L. rhamnosus* SUTC-T8F1) อยู่รอดได้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 2-3 เดือน รูปแบบของกล้าเชื้อสายพันธุ์ที่คัดเลือกเพื่อผลิตหญ้าหมักที่พัฒนาได้ในรูปแบบกล้าเชื้อแห้งบรรจุในถุงพลาสติก ที่ใช้กากถั่วเหลืองเป็นสารตัวกลาง เป็น

รูปแบบที่ง่ายลงทุนต่ำ ไม่ต้องใช้วิธี Spray dry หรือ Freeze dry ดังที่มีรายงานการผลิตกล้าเชื้ออาหารหมักดองบางชนิด

ด้านการเตรียมรูปแบบเชื้อแห้งแบบลูกแป้ง ได้ทดลองผลิตทำนองเดียวกับที่มีการผลิตลูกแป้งที่ใช้ในการหมักข้าวหมากหรือเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์พื้นบ้านของไทย ซึ่งใช้เครื่องเทศหรือสมุนไพรไทยมาเป็นองค์ประกอบของการทำลูกแป้งข้าวหมาก การเตรียมลูกแป้งของกล้าเชื้อหญ้าหมักนี้ใช้เครื่องเทศ 5 ชนิด คือ กระเทียม กระชาย พริกไทย ขิง และข่า มาเป็นองค์ประกอบหนึ่งของลูกแป้ง ที่อาจช่วยยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่นและปรับส่วนประกอบของแป้งให้มีความเหมาะสมที่จะใช้เป็นการตัวกลางของกล้าเชื้อ ก่อนการเตรียมลูกแป้งจึงจึงได้ทดสอบฤทธิ์ของเครื่องเทศดังกล่าวต่อแบคทีเรียกล้าเชื้อ 11 สายพันธุ์ที่คัดเลือก พบว่าเครื่องเทศทั้ง 5 ชนิดในระดับความเข้มข้นที่ใช้ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียกล้าเชื้อดังกล่าว ลูกแป้งที่เตรียมมีเครื่องเทศผสมชนิดละ 1 กรัม ต่อแป้ง 500 กรัม เปรียบเทียบการใช้แป้งข้าวเจ้าและแป้งมันสำปะหลัง โดยให้มีเซลล์แบคทีเรียกล้าเชื้อในลูกแป้ง 10^8 เซลล์ต่อกรัม การผลิตกล้าเชื้อแบบเชื้อแห้งแบบลูกแป้งนี้เน้นการผลิตแบบกล้าเชื้อเดี่ยวเป็นหลักดังกล่าวข้างต้น ซึ่งสามารถใช้ประโยชน์ได้ง่ายในรูปแบบของกล้าเชื้อผสม แบคทีเรียกล้าเชื้อที่เตรียมในรูปแบบลูกแป้ง 2 ขนาด คือ ลูกแป้งขนาดเล็กและลูกแป้งขนาดใหญ่ ซึ่งมีเส้นผ่าศูนย์กลางโดยเฉลี่ย 2 และ 4 เซนติเมตร ตามลำดับ นั้นในช่วงเริ่มเตรียมกล้าเชื้อลงในลูกแป้ง ได้เติมเซลล์แบคทีเรียให้มีจำนวนโดยเฉลี่ย 10^8 CFU ต่อกรัม ภายหลังการทำแห้งที่ 40 องศาเซลเซียส (ใช้เวลาอบประมาณ 6 ชั่วโมง) เซลล์แบคทีเรียกล้าเชื้อในลูกแป้งยังคงรอดชีวิตเช่นเดียวกับที่เติมลงในลูกแป้ง จากนั้นเมื่อเก็บลูกแป้งแห้งบรรจุในถุงพลาสติกไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 วัน พบการอยู่รอดแตกต่างกันตามสายพันธุ์ของแบคทีเรียและชนิดของแป้งที่นำมาเตรียมลูกแป้ง กล่าวคือ *Lactobacillus brevis* SUTC-SL17 อยู่รอดได้ดีที่สุดในลูกแป้งมันสำปะหลังขนาดใหญ่ (1.24×10^7 CFU ต่อกรัม) และ *L. plantarum* SUTC-T1R28 อยู่รอดได้ดีที่สุดในลูกแป้งข้าวเจ้าขนาดใหญ่ (1.47×10^6 CFU ต่อกรัม) ขนาดของลูกแป้งนอกจากจะมีผลต่อการอบแห้งแล้วยังมีผลต่อการอยู่รอดของกล้าเชื้อ

เมื่อทดลองผลิตหญ้าหมักโดยใช้กล้าเชื้อในรูปแบบที่พัฒนาได้ จากหญ้าเนเปียร์ที่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกที่คัดเลือกจำนวน 11 ไอโซเลต แบบเชื้อเดี่ยวในรูปแบบเชื้อแห้งที่มีกากถั่วเหลืองเป็นสารตัวกลาง เปรียบเทียบกับการหมักโดยอาศัยจุลินทรีย์ในธรรมชาติที่มีในหญ้าเนเปียร์ที่ใช้ผลิต ณ ฟาร์มเกษตรกรผู้เลี้ยงโค โดยให้มีเชื้อเริ่มต้นในวัสดุหมักประมาณ 10^5-10^6 เซลล์ต่อกรัม เพื่อให้กล้าเชื้อเจริญและได้ปริมาณเป็นสายพันธุ์ที่มีประชากรเด่นกว่าจุลินทรีย์ที่มีหรือปนเปื้อนอยู่ในพืชวัตถุดิบ ผลผลิต silage ที่ได้จากการหมักเป็นเวลา 21 วัน ทั้งจากการหมักที่ไม่เติมและเติมกล้าเชื้อมีลักษณะทางกายภาพคล้ายคลึงกัน และมีกลิ่นหอมของการหมัก มีความเป็นกรด-ด่าง (pH) 4.2-4.5 หญ้าหมักที่เติมกล้าเชื้อมี pH ต่ำกว่าการหมักที่ไม่เติมกล้าเชื้อ จัดได้ว่าเป็นผลิตภัณฑ์ Silage ที่มีคุณภาพดี

กล้าเชื้อ *Lactococcus lactis* SUTC-D44, *Lactobacillus paracasei* SUTC-T1R18, *L. plantarum* SUTC-T1R28, *L. acidophilus* SUTC-T2R15 และ *L. rhamnosus* SUTC-T8F1 มีศักยภาพในการใช้ผลิตหญ้าหมักจากหญ้าเนเปียร์ มากกว่าแบคทีเรียอีก 6 สายพันธุ์ ดังกล่าวข้างต้น เนื่องจากสามารถเจริญได้ดีให้ปริมาณเซลล์มาก (10^9 เซลล์ต่อกรัม โดยเฉลี่ย) ในผลิตภัณฑ์อาหารสัตว์ ที่สัตว์สามารถบริโภคอาหารพร้อมแบคทีเรียกล้าเชื้อที่มีชีวิต ที่สามารถให้ประโยชน์ต่อในด้าน Probiotics กล้าเชื้อรูปแบบแห้งบรรจุถุงพลาสติกที่ใช้กากถั่วเหลืองเป็นสารตัวกลางนี้นอกจากสามารถรักษาการมีชีวิตของกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกสายพันธุ์ที่คัดเลือกใน 4 สกุล (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* และ *Pediococcus*) ภายหลังการเลี้ยงให้ได้ปริมาณเซลล์ตามต้องการที่รอใช้ประโยชน์ ยังให้ความสะดวกในการใช้ผลิตหญ้าหมัก เนื่องจากสามารถใส่เชื้อให้กระจายในวัสดุหมักอย่างทั่วถึงได้ง่าย

การใช้จุลินทรีย์ซึ่งพบเป็นปกติในอาหารสัตว์ เพื่อช่วยในการปรับสภาพของระบบทางเดินอาหารของสัตว์และเพิ่มศักยภาพของจุลินทรีย์ที่เป็น Normal microflora ของสัตว์อยู่แล้ว จะช่วยลดการใช้สารเคมี ทั้งเป็นการลงทุนต่ำ ลดสารตกค้างทั้งในเนื้อสัตว์และผลผลิตน้ำนม (กรณีโคนม) ลดการเกิดโรคเนื่องจากจุลินทรีย์ก่อโรคซึ่งเกิดจากอาหาร และเป็นประโยชน์ต่อเกษตรกรโดยตรง

4.2 ข้อเสนอแนะ

โครงการวิจัยนี้มีผลสำเร็จตามวัตถุประสงค์ ที่เป็นพื้นฐานสำคัญของการผลิตอาหารสัตว์จากกระบวนการหมักพืชสดโดยกิจกรรมของจุลินทรีย์ อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาต่อในเชิงลึกในส่วนที่เกี่ยวข้องในประเด็นดังต่อไปนี้

1) การทดลองเพิ่มกำลังการผลิตเซลล์กล้าเชื้อด้วยระบบถังปฏิกรณ์ควบคุมสภาวะ

2) การพัฒนาวิธีการทำแห้งเซลล์กล้าเชื้อในสารตัวกลางที่เหมาะสมทั้งรำข้าว กากมะพร้าว และกากถั่วเหลือง เพื่อให้มีการอยู่รอดของเซลล์ภายหลังการเตรียมรูปแบบของกล้าเชื้อให้มากขึ้นและประหยัดพลังงานกว่าการอบแห้งในตู้อบ

3) การศึกษาความจำเพาะของสายพันธุ์กล้าเชื้อกับสายพันธุ์พืชที่เป็นวัสดุหมัก รวมถึงปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการหมัก Silage เพื่อให้สามารถใช้ทั้งกล้าเชื้อและพืชอาหารสัตว์ได้อย่างมีประสิทธิภาพและคุ้มทุนหรือมีผลกำไรที่สุด

4) การจัดจำแนกและระบุชนิด/สายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่คัดเลือกได้ให้ได้ชนิดหรือสายพันธุ์ที่แน่นอน ด้วยการศึกษาสารพันธุกรรม เพื่อแก้ปัญหาการระบุชนิดและจำแนกสายพันธุ์ตามวิธีมาตรฐานที่อาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นหลัก แบคทีเรียกรดแล็กติกสายพันธุ์ธรรมชาติที่ศึกษาอาจเป็นชนิดหรือสายพันธุ์ใหม่

บรรณานุกรม

นภา โล่ห์ทอง. 2535. *กล้าเชื้ออาหารหมักและเทคโนโลยีการผลิต*. กรุงเทพฯ: หจก. ฟันนี่ พับบลิชชิ่ง. 159 หน้า.

บุญล้อม ชีวะอิสระกุล. 2541. โภชนศาสตร์สัตว์. เชียงใหม่: ธนบรรณการพิมพ์.

พิไลพรรณ พงษ์บูล. 2523. *การศึกษาชีววิทยาของลูกแป้งข้าวหมาก*. กรุงเทพมหานคร: สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2547. *สถิติการเกษตรของประเทศไทยปีเพาะปลูก 2545/46*. กรุงเทพมหานคร: กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2552. *ข้อมูลพื้นฐานเศรษฐกิจการเกษตร ปี 2552*. กรุงเทพมหานคร: กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

สุรีลักษณ์ รอดทอง พงษ์ฤทธิ์ ครบปรัชญา และ หนึ่ง เตียอำรุง. 2545. *ความหลากหลายของสายพันธุ์แลคโตแบซิลลัสในหญ้าหมักของไทย*. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์. นครราชสีมา: มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 68 หน้า.

สุรีลักษณ์ รอดทอง และ วิศิษฐิพร สุขสมบัติ. 2545. *การอยู่รอดของแลคโตแบซิลไลจากหญ้าหมักในทางเดินอาหารของโค*. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์. นครราชสีมา: มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 63 หน้า.

Allen, D. 1990. *Planned Beef Production and Marketing*. Oxford: BSP Professional Books.

Atlas, R.M. 2000. Handbook of Microbiological Media. 3rd Edition. CRC press, Boca Raton, U.S.A.

Auerbach, H., Oldenburg, E., and Weissbach, F. 1998. Incidence of *Penicillium roqueforti* and roquefortine C in silage. *Journal of Scientific and Food Agriculture*. 76: 565-572.

Axelsson, L. 1998. Lactic acid bacteria: classification and physiology, pp. 1-72. In, S. Salminen and A. Von Wright (eds). Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects. 2nd Edition. Marcel Dekker, Inc, New York.

Bartley, E.E., Herod, E.L., Bethtle, R.M., Sapienza, D.A., and Brent, B.E. 1979. Effect of monensin and lasalocid with and without niacin or amicloral on rumentation and feed efficiency. *Journal of Animal Science*. 49: 1066-1074.

Bates, E.E., Gilbert, H.J., Hazlewood, G.P., Huckle, J., Laurie, J.I., and Mann, S.P. 1989. Expression of *Clostridium thermocellum* endoglucanase gene in *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology*. 55: 2095-2097.

Biavati, B. and Mattarelli, P. 1991. *Bifidobacterium ruminantium* sp. nov. and *Bifidobacterium merycicum* sp. nov. from the rumens of cattle. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 41: 163-168.

Bozzola, J.J. and Russell, L.D. 1992. *Electron Microscopy: Principles and Techniques for Biologists*. Boston, Jones and Bartlett Publishers.

Brookes, R.M. and Buckle, A.E. 1992. Lactic acid bacteria in plant silage. *In* Wood, B.J.B. (ed.). 1992. The Lactic Acid Bacteria: *The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease*. Volume 1, pp. 363-386. London: Elsevier Applied Science.

Calderon, M., Loiseau, G., and Guyot, J.P. 2001. Nutritional requirements and simplified cultivation medium to study growth and energetics of a sourdough lactic acid bacterium *Lactobacillus fermentum* Ogi E1 during heterolactic fermentation of starch. *Journal of Applied Microbiology*. 90: 508-516.

Cai, Y., Ohmomo, S., Ogawa, M., and Kumai, S. 1997. Effect of NaCl-tolerant lactic acid bacteria and NaCl on the fermentation characteristics and aerobic stability of silage. *Journal of Applied Microbiology*. 83: 307-313.

Cai, Y., Kumai, S., Ogawa, M., Benno, Y., and Nakase, T. 1999. Characterization and identification of *Pediococcus* species isolated from forage crops and their application for silage preparation. *Applied and Environmental Microbiology*. 65(7): 2901-2906.

Chumkhunthod, P., Rodtong, S., Teaumroong, N., and Boonkerd, N. 2001. Bioconversion of cassava roots to high protein product for animal feed. *Thai Journal of Biotechnology*. 3(1): 17-25.

Cintas, L.M., Casaus, M.P., Herranz, C., Nes, I.F., and Hernández, P.E. 2001. Review: bacteriocins of lactic acid bacteria. *Food Science and Technology International*. 7(4): 281-305.

Cocconcelli, P.S., Triban, E., Basso, M., and Bottazzi, V. 1991. Use of DNA probes in the study of silage colonization by *Lactobacillus* and *Pediococcus* strains. *Journal of Applied Bacteriology*. 71: 296-301.

Cocconcelli, P.S., Porro, D., Galandini, S., and Senini, L. 1995. Development of RAPD protocol for typing of strains of lactic acid bacteria and enterococci. *Letters in Applied Microbiology*. 21: 376-379.

Cole, R.J. and Cox, R.H. 1981. *Handbook of Toxic Fungal Metabolites*. New York: Academic Press, Inc.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Diep, D.B., Håvarstein, L.S., and Nes, I.F. 1996. Characterization of the locus responsible for the bacteriocin production in *Lactobacillus plantarum* C11. *Journal of Bacteriology*. 178: 4472-4483.

Ehrmann, M.A., Remiger, A., Eijsink, V.G., and Vogel, R. 2000. A gene cluster encoding plantaricin 1.25β and other bacteriocin-like peptides in *Lactobacillus plantarum* TMW1.25. *Biochemia et Biophysica Acta*. 1490: 355-361.

Emanuel, V., Adrian, V., Ovidiu, P., and Gheorghe, C. 2005. Isolation of a *Lactobacillus plantarum* strain used for obtaining a product for the preservation of fodders. *African Journal of Biotechnology*. 4(5): 403-408.

Fitzsimons, A., Duffner, F., Curtin, D., Brophy, G., O'Kiely, P., and O'Connell, M. 1992. Assessment of *Pediococcus acidilactici* as a potential silage inoculant. *Applied and Environmental Microbiology*. 58: 3047-3052.

Flores, D.A. 1991. Biotechnology and the improvement of silage (tropical and temperate) rumen digestion: A mini-review. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 35: 277-281.

Ford, J.E., Perry, K.D., and Briggs, C.A.E. 1958. Nutrition of lactic acid bacteria isolated from the rumen. *Journal of General Microbiology*. 18: 273-274.

Frisvad, J.C. and Thrane, U. 1996. Mycotoxin production by food-borne fungi. *In* Samson, R.A., Hoekstra, E.S., Frisvad, J.C., and Filtenborg, O. (eds.). *Introduction to Food-borne Fungi*, pp. 251-260. Baarn, The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures.

Fuller, R. 1992. *Probiotics: The Scientific Basis*. London: Chapman & Hall.

Fuller, R. 1995. Probiotics: Their development and use. *In* Fuller, R., Heidt, P.J., Rusch, V., and Van der Waaij, D. (eds.). *Probiotics: Prospects of Use in Opportunistic Infections*, pp. 1-8. Herborn Dill: Institute for Microbiology and Biochemistry, Old Herborn University.

Gillespie, J.R. 1992. *Modern Livestock and Poultry Production*. 4th Edtion. Neison: Delmar Publishers, Inc.

Gilliand, S.E., Bruce, B.B., Bush, L.J., and Staley, T.E. 1980. Comparison of two strains of *Lactobacillus acidophilus* as dietary adjuncts for young calves. *Journal of Dairy Science*. 63: 964-972.

Häggblom, P. 1990. Isolation of roquefortine C from feed grain. *Applied and Environmental Microbiology*. 56: 2924-2926.

Henderson, C., Stewart, C.S., and Nekrep, F.V. 1981. The effects of monensin on pure and mixed culture of rumen bacteria. *Journal of Applied Bacteriology*. 51: 159.

Hill, H.A. and Hill, J.E. 1986. The value of plasmid profiling in monitoring *Lactobacillus plantarum* in silage fermentation. *Current Microbiology*. 13: 91-94.

Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., and Williams, S.T. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th Edition. Baltimore: Williams & Wilkins.

Hoover, D.G. and Steenson, L.R. 1993. *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria*. California: Academic Press.

Huber, J.T. 1997. Probiotics in cattle. *In* R. Fuller. *Probiotics 2: Application and Practical Aspects*, pp. 162-186. London: Chapman & Hall.

Hungate , R.E. 1966. *The Rumen and Its Microbes*. New York: Academic Press.

Li, Y. and Nishino, N. 2011. Monitoring the bacterial community of maize silage stored in a bunker silo inoculated with *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus buchneri*. *Journal of Applied Microbiology*. 110: 1561-1570.

Jayne-Williams, D.J. 1979. The bacterial flora of the rumen of healthy and bloating calves. *Journal of Applied Bacteriology*. 47: 271-284.

Jiménez-Díaz, R., Ruiz-Barba, J.L., Cathcart, D.P., Holo, H., Nes, I.F., Sletten, K.H., and Warner, P.J. 1995. Purification and partial amino acid sequence of plantaricin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO 10, the activity of which depends on the complementary action of two peptides. *Applied and Environmental Microbiology*. 61: 4459-4463.

Jones, S. and Warner, P.J. 1990. Cloning and expression of alpha amylase from *Bacillus amyloliquefaciens* in a stable plasmid vector in *Lactobacillus plantarum*. *Letters in Applied Microbiology*. 11: 214-219.

Kandler, O. and Weiss, N. 1986. Regular, nonsporing gram-positive rods. *In* Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E., and Holt, J.G. (eds.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Volume 2, pp. 1208-1234. Baltimore: Williams & Wilkins.

Karney, T.L., Johnson, M.C., and Ray, B. 1986. Changes in the lactobacilli and coliform populations in the intestinal contents of calves from birth to weaning. *Journal of Animal Science*. 63 (Suppl. 1): 447.

Kato, T., Matsuda, T., Ogawa, E., Ogawa, H., Kato, H., Doi, U., and Nakamura, R. 1994. Plantaricin-149, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* NRIC 149. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 77: 277-282.

Kemin. 2004. Kem Lac brand silage inoculant. Available: http://www.kemlac.com

Klaenhammer, T.R. 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*. 70: 337-349.

Klaenhammer, T.R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 12: 39-86.

Krogh, N. 1963. Identification of the Gram-positive rumen flora of cattle and sheep in clinical cases of acute indigestion. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 4: 41-51.

Kung, L., Robinson, Jr., J.R., Ranjit, N.K., Chen, J.H., Golt, C.M., and Pesek, J.D. 2000. Microbial populations, fermentation end-products, and aerobic stability of corn silage treated with ammonia or a propionic acid-based preservative. *Journal of Dairy Science*. 83: 1479-1486.

Latham, M.J., Sharpe, M.E., and Weiss, N. 1979. Anaerobic cocci from the bovine alimentary tract, the amino acid of their cell wall peptidoglycans and those of various species of anaerobic *Streptococcus*. *Journal of Applied Bacteriology*. 47: 209-221.

Livestock Nutritional Services. 2011. Sila-Prime "S" 4X Water Soluble (10lb Pail) starter culture. Available: http://www.backyardfarmerdirect.com

Luchansky, J.B., Tennant, M.C., and Klaenhammer, T.R. 1991. Molecular cloning and deoxyribonucleic acid polymorphisms in *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus gasseri. Journal of Dairy Science*. 74: 3293-3302.

Murray, P.R., Baron, E.J., Pfaller, M.A., Tenover, F.C., and Yolke, R.H. 1999. *Manual of Clinical Microbiology*, 7th edition. Washington: American Society for Microbiology.

Nadeau, E.M.G., Buxton, D.R., Russell, J.R., Allison, M.J., and Young, J.W. 2000. Enzyme, bacterial inoculant, and formic acid effects on silage composition of orchardgrass and alfalfa. *Journal of Dairy Science*. 83: 1487-1502.

Nout, M.J.R., Bouwmeester, H.M., Haaksma, J., and van Dyke, H. 1993. Fungal growth in silages of sugarbeet press pulp and maize. *Journal of Agricultural Science*. 121: 323-326.

Ohmomo, S., Odai, M., Pholsen, P., Nitisinprasert, S., Kraykaw, D., and Hiranpradit, S. 2004a. Effect of a commercial inoculant on the fermentation quality of ABP silage in Thailand. *Japan Agricultural Research Quarterly*. 38(2): 125-128.

Ohmomo, S., Nitisinprasert, S., Kraykaw, D., Laemkorn, P., Tanomwongwattana, S., and Hiranpradit, S. 2004b. Evaluation of lactic acid bacteria isolates for silage fermentation inoculant in Thailand by using a modified pouch method. *Japan Agricultural Research Quarterly*. 38(3): 199-208.

Parvin, S. and Nishino, N. 2009. Bacterial community associated with ensilage process of wilted guinea grass. *Journal of Applied Microbiology*. 107: 2029–2036.

Parvin, S. and Nishino, N. 2010. Succession of lactic acid bacteria in wilted rhodesgrass silage assessed by plate culture and denaturing gradient gel electrophoresis. *Grassland Science*. 56: 51–55.

Paviz, M.M., Ghoorchi, T., and Ghanbari, F. 2011. Effects of molasses and bacterial inoculant on chemical composition and aerobic stability of sorghum silage. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances. 6: 385-390.*

Pelhate, J. 1977. Maize silage: Incidence of moulds during conservation. *Folia Veterinaria Latina*. 7: 1-16.

Piard, J.C. and Desmazeaud, M. 1991. Inhibition factors produced by lactic acid bacteria. 1. Oxygen metabolites and catabolism end-products. *Lait*. 71: 525-541.

Piard, J.C. and Desmazeaud, M. 1992. Inhibition factors produced by lactic acid bacteria. 2. Bacteriocins and other antibacterial substances. *Lait*. 72: 113-142.

Remiger, A., Eijsink, V.-G.-H., Ehrmann, M.A., Sletten, K., Nes, I.F., and Vogel, R.F. 1999. Purification and partial amino acid sequence of plantaricin 1.25α and 1.25β, two bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* TMW1.25. *Journal of Applied Microbiology*. 86: 1053-1058.

Rooke, J.A. 1991. Lactic acid bacteria and silage fermentations. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 51: 560-562.

Salminen, S. and von Wright, A. 1998. *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects*. 2nd Edition. New York: Marcel Dekker, Inc.

Sambrook, J. and Russell, D.W. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd Edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Scardovi, V. 1981. The genus Bifidobacterium. In M.P. Starr, H. Stolp, H.G. Truper, A. Balows, and H.G. Schlegel (eds.). *The Prokaryotes: A Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria*, Volume 2 (pp. 1951-1961). Berlin: Springer Verlag.

Scardovi, V., Trovatelli, L.D., Crociani, F., and Sgorbati, B. 1969. Bifidobacteria in bovine rumen. New species of the genus *Bifidobacterium*: *B. globosum* n.sp. and *B. ruminale* n.sp. *Archives of Microbiology*. 68: 278-294.

Scheirlinck, T., Mahillon, J., Joos, H., Dhase, P., and Michels, P. 1989. Integration and expression of alpha amylase and endoglucanase genes in the *Lactobacillus plantarum* chromosome. *Applied and Environmental Microbiology*. 55: 2130-2137.

Sharp, R., O'Donnell, A.G., Gilbert, H.G., and Hazlewood, G.P. 1992. Growth and survival of genetically manipulated *Lactobacillus plantarum* in silage. *Applied and Environmental Microbiology*. 58: 2517-2522.

Stiles, M.E. and Hastings, J.W. 1991. Bacteriocin production by lactic acid bacteria: Potential for use in meat preservation. *Trend in Food Science and Technology*. 2: 247-251.

Stewart, C.S. 1992. Lactic acid bacteria in the rumen. *In* B.J.B. Wood (ed.). *The Lactic Acid Bacteria. Volume 1: The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease* (pp. 49-68). London: Elsevier Applied Science.

Tannock, G.W. 1992. Molecular genetic and probiotics. *In* Leger, D.A. and Ho, S.K. (eds.). *Proceedings of the International Roundtable on Animal Feed Biotechnology-Research and Scientific Regulation*, Ottawa, Canada. February 1992, pp. 111-119.

Trovatelli, M.D. and Matteuzzi, D. 1976. Presence of bifidobacteria in the rumen of calves fed different rations. *Applied and Environmental Microbiology*. 32: 470-473.

Tüller, G., Armbruster, G., Wiedenmann, S., Hänichen, T., Schams, D., and Bauer, J. 1998. Occurrence of roquefortine in silage-toxicological relevance to sheep. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 80: 246-249.

Vázquez, J.A., Rodrigues, A.C., Fuciños, P., Pastrana, L., and Murado, M.A. 2010. Bio-silage of mussel work-processing wastes by lactobacilli on semi-solid culture. *Journal of Food Engineering*. 97: 355-359.

Wang, F. and Nishino, N. 2008. Ensiling of soybean curd residue and wet brewers grains with or without other feeds as a total mixed ration. *Journal of Dairy Science*. 91: 2380-2387.

Wang, F. and Nishino, N. 2009. Association of *Lactobacillus buchneri* with aerobic stability of total mixed ration containing wet brewers grains preserved as a silage. *Animal Feed Science and Technology*. 149: 265-274.

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

Weinberg, Z.G., Muck, R.E., and Weimer, P.J. 2003. The survival of silage inoculant lactic acid bacteria in remen fluid. *Journal of Applied Microbiology*. 94: 1066-1071.

West, C.A. and Warner, P.J. 1988. Plantacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* NCDO 1193. *FEMS Microbiology Letters*. 49: 163-165.

Woolford, M.K. 1984. Techniques employed in the analysis of silage. *In* Woolford, M.K. (ed.). *The Silage Fermentation*, pp. 299-323. New York: Marcel Dekker, Inc.

Ziolecki, A., and C.A.E. Briggs. 1961. The microflora of the rumen of the young calf: II. Source, nature and development. *Journal of Applied Bacteriology*. 24: 148-163.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก สีย้อมจุลินทรีย์

1. Crystal violet (Gram stain)

Crystal violet	2.0	กรัม
Ethanol (95%)	20.0	มิลลิลิตร
ละลายให้เข้ากัน แล้วจึงเติม		
Ammonium oxalate (1% Aqueous solution)	80.0	มิลลิลิตร

2. Safranin (Gram stain)

Safranin O (2.5% solution ใน 95% Ethanol)	10.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	90.0	มิลลิลิตร
ถ้ามีตะกอนให้กรองก่อนใช้ทุกครั้ง		

ภาคผนวก ข น้ำยาเคมี

1. Acetone alcohol

Alcohol (95%)	700.0	มิลลิลิตร
Acetone	300.0	มิลลิลิตร
ผสมให้เข้ากัน		

2. Bufferfield's buffered phosphate diluent (Phosphate-buffered solution)

Stock solution:

Potassium di-hydrogen phosphate	34.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ	500.0	มิลลิลิตร

ปรับ pH เท่ากับ 7.2 ด้วย 175 มิลลิลิตร ของ 1 N NaOH จากนั้นปรับปริมาตร ให้เท่ากับ1,000 มิลลิลิตร เก็บ Stock solution ในตู้เย็น

ใช้ Stock solution 1.25 มิลลิลิตร เติมในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส (15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) เป็นเวลา 15 นาที

3. Cacodylate buffer (pH 7.2)

Solution A: 0.2 M Sodium cacodylate

Sodium cacodylate	42.8	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ	1,000.0	มิลลิลิตร

Solution B: 0.2 M Hydrochloric acid

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Hydrochloric acid	16.5	มิลลิลิตร
เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ	1,000.0	มิลลิลิตร

เตรียมสารละลาย 0.1 M Cacodylate buffer ดังนี้

Solution A	50.0	มิลลิลิตร
Solution B	4.2	มิลลิลิตร

4. Glutaraldehyde (2%) ใน 0.1 M Cacodylate buffer

Glutaraldehyde (25%)	8.0	มิลลิลิตร
0.1 M Cacodylate buffer	92.0	มิลลิลิตร

5. Iodine solution (Gram's iodine)

Iodine	1.0	กรัม
Potassium iodide	2.0	กรัม

ละลายสารทั้งสองชนิดในน้ำ โดยค่อยๆ เติมน้ำทีละน้อยจนกระทั่ง Iodine ละลายหมด

เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ	300.0	มิลลิลิตร

เก็บไว้ในขวดสีชา

6. Loading buffer

Sucrose	4.0	กรัม
Bromophenol blue	0.25	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

7. McFarland turbidity standards (Murray *et al*., 2009)

เตรียม McFarland nephelometer scale ดังนี้

McFarland standard	Sulfuric acid 1% aqueous solution (ml)	Barium chloride 1% aqueous solution (ml)	Corresponding density of bacteria (10^8 cell/ml)
0.5	9.95	0.05	1.5
1	9.9	0.1	3
2	9.8	0.2	6
3	9.7	0.3	9
4	9.6	0.4	12
5	9.5	0.5	15

8. Osmium tetroxide (2%)

Osmium tetroxide	0.5	กรัม
0.1 M Phosphate buffer	25.0	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากันบรรจุสารละลายไว้ในขวดแก้ว ปิดฝาให้แน่นและหุ้มฝาด้วยพาราฟิล์ม เก็บสารละลายในตู้เย็น

9. Sodium chloride solution (NaCl) 0.85%

Sodium chloride	85.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ	1,000.0	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส (15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) เป็นเวลา 15 นาที

10. Sodium dodecylsulfate (SDS) (10% w/v)

Sodium dodecylsulfate (SDS)	100.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ	1,000.0	มิลลิลิตร

11. TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA)

Tris-HCl	0.79	กรัม
EDTA (di-Sodium salt)	0.37	กรัม
Boric acid	5.54	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ	1,000.00	มิลลิลิตร

12. TES buffer

5 mM Tris-HCl (pH 8.0)

5 mM Sodium chloride

0.5 mM EDTA

13. Tris-Borate (TBE) buffer (pH 8.0)

Tris-Base	10.77	กรัม
EDTA (di-Sodium salt)	0.93	กรัม
Boric acid	5.54	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ	1,000.00	มิลลิลิตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาคผนวก ค อาหารเลี้ยงจุลินทรีย์

1. MRS broth / MRS agar

Tryptone (Pancreatic digest of casein)	10.00	กรัม
Meat extract	10.00	กรัม
Yeast extract	4.00	กรัม
D(+)-Glucose	20.00	กรัม
Di-potassium hydrogen phosphate	2.00	กรัม
Tween 80	1.00	กรัม
Tri-ammonium citrate	2.00	กรัม
Sodium acetate tri-hydrate	5.00	กรัม
Magnesium sulfate ($MgSO_4.7H_2O$)	0.20	กรัม
Manganese sulfate ($MnSO_4.4H_2O$)	0.04	กรัม
น้ำกลั่น	1000.00	มิลลิลิตร

pH 6.5

กรณี MRS agar ให้เติม Agar 15.0 กรัม ละลายส่วนผสมและฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 118 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สามารถเตรียมได้จากอาหารมีส่วนผสมที่ผู้ผลิตผลิตเพื่อจำหน่าย เช่น Rogosa agar (MERCK, Merck KGaA, Germany)

2. Rogosa agar (Lactobacillus selective agar)

Tryptone (Pancreatic digest of casein))	10.00	กรัม
Yeast extract	5.00	กรัม
D(+)-Glucose	20.00	กรัม
Potassium di-hydrogen phosphate	6.00	กรัม
Ammonium citrate	2.00	กรัม
Tween 80	1.00	กรัม
Sodium acetate	15.00	กรัม
Magnesium sulfate	0.575	กรัม
Fer(II) sulfate	0.034	กรัม
Manganese sulfate	0.12	กรัม
Agar	15.00	กรัม

น้ำกลั่น 1000.00 มิลลิลิตร

pH 6.5

ละลายส่วนผสมและหลอม Agar ให้ความร้อนใน Water bath น้ำเดือดหรือไอน้ำร้อน ห้ามนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) จากนั้นปรับ pH ให้เท่ากับ 6.5 ด้วย Acetic acid (96%) แล้วแบ่งบรรจุในจานเลี้ยงเชื้อปลอดเชื้อ

สามารถเตรียมได้จากอาหารมีส่วนผสมที่ผู้ผลิต ผลิตเพื่อจำหน่าย เช่น Rogosa agar (MERCK, Merck KGaA, Germany)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สุรีลักษณ์ รอดทอง

หน่วยงานที่สังกัดและที่อยู่

สาขาวิชาจุลชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

111 ถนนมหาวิทยาลัย ตำบลสุรนารี อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา 30000

โทรศัพท์ 044-22 4297, 044-22 4633 โทรสาร 044-22 4633

e-mail sureelak@sut.ac.th

ประวัติการศึกษา

วท.บ. (ชีววิทยา เลือกจุลชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	ประเทศไทย
วท.ม. (จุลชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	ประเทศไทย
PGDip. Sc. with Credit (Biotechnology)	University of Otago	New Zealand
Ph.D. (Microbiology)	University of Otago	New Zealand

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญ

พันธุศาสตร์และสรีรวิทยาของจุลินทรีย์ การหมักของจุลินทรีย์ (แบคทีเรียและเชื้อรา) และความหลากหลายของชนิดและการใช้ประโยชน์ของแบคทีเรียกรดแล็กติกและเชื้อรา

ผลงานทางวิชาการ

1. ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ
   วารสารระดับชาติ จำนวน 16 เรื่อง และวารสารระดับนานาชาติ จำนวน 25 เรื่อง
2. ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ใน Proceedings จำนวน 25 เรื่อง
3. ผลงานที่เผยแพร่ในการประชุมวิชาการระดับชาติ จำนวน 77 เรื่อง
4. ผลงานที่เผยแพร่ในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ จำนวน 82 เรื่อง
5. สิทธิบัตรที่ยื่นคำขอจดทะเบียน จำนวน 4 คำขอ

เอกสารแนบ

ผลงานวิจัยของโครงการที่ได้เผยแพร่

1. ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ

Rodtong, S., Nunthisa, M., and Ratanachai, K. 2007. Characterization of selected lactic acid bacterial strains for applying as potential silage inoculants. *Journal of Microscopy Society of Thailand*. 21(1): 230-234.

2. ผลงานวิจัยที่เผยแพร่ในการประชุมวิชาการ

Rodtong, S., Nunthisa, M., and Ratanachai, K. 2007. Characterization of selected lactic acid bacterial strains for applying as potential silage inoculants. *The 24th Microscopy Society of Thailand Annual Conference, 14-16 February 2007*, *Bangkok*, *Thailand*.

3. เอกสารผลงานวิจัยของโครงการที่ได้เผยแพร่

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

24th MST Annual Conference Journal of Microscopy Society of Thailand 2007, 21(1):230-234

Poster presentation

Characterization of Selected Lactic Acid Bacterial Strains for Applying as Potential Silage Inoculants

Sureelak Rodtong, Maysa Nunthisa, Korawan Ratanachai
School of Microbiology, Institute of Science, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand

Abstract

Lactic acid bacteria are central to the silage fermentation. The production of acids, principally lactic acid, by lactic acid bacteria from the anaerobic fermentation of forage carbohydrate is responsible for the acidification of the forage and its subsequent preservation. Successful inoculation of the plant with lactic acid bacteria is one of the principal factors to achieve the successful preservation. In this study, six strains of lactic acid bacteria were selected from the total of 370 isolates obtained from silage samples produced in Thailand, for applying as potential silage inoculants in local areas. These selected isolates were dominant strains inhabiting the natural silage samples. Phenotypic and physiological properties of the six strains were characterized. Scanning electron microscopy (SEM) was introduced for certain characterization of bacterial cell morphology. The six strains had their characteristics which could be differentiated from each other, and were identified as belonging to *Lactococcus lactis*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, and *Lactobacillus rhamnosus*. These dominant strains were also successfully tested for applying as silage inoculants.

Background

Lactic acid bacteria comprising a diverse group of Gram-positive, non-spore forming bacteria, are central to the silage fermentation (1). The bacteria have non-aerobic habit, but are aerotolerant, fastidious, acid-tolerant, and strictly fermentative with lactic acid as the major end-product during sugar fermentation. The classification of lactic acid bacteria into different genera is largely based on morphology, mode of glucose fermentation, growth at different temperatures, configuration of the lactic acid produced, ability to grow at high salt concentration, and acid or alkaline tolerance.

Two main sugar fermentation pathways can be distinguished among lactic acid bacteria. Glycolysis results in almost exclusively lactic acid as end product under standard conditions, and the metabolism is referred to as homolactic fermentation. The 6-phosphogluconate/phosphoketolase pathway results in significant amounts of other end-products such as ethanol, acetate, and carbon dioxide in addition to lactic acid, and the metabolism is referred to as heterolactic fermentation. The production of acids, principally lactic acid, by lactic acid bacteria from the anaerobic fermentation of forage carbohydrate, is responsible for the acidification of the forage and its subsequent preservation (2). Successful inoculation of the plant with lactic acid bacteria is one of the principal factors to achieve the successful preservation. Some species of lactic acid bacteria particularly *Lactobacillus plantarum, Pedicoccus* species and *Lactobacillus rhamnosus*, have been reported to be used as a plant silage inoculant (3, 4, 5). Also, some species, such as *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, and *Lactobacillus reuteri*, have been reported to be probiotic lactic acid bacteria (2, 6). Probiotics refer to a live microbial feed supplement which beneficially affects the host animal by improving its intestinal microbial balance (6).

This study aims to characterize dominant lactic acid bacterial strains, which were found in natural Thai silage and selected for applying as potential silage inoculants in local areas. Some lactic acid bacterial strains could play their roles as probiotics.

Materials and Methods

Dominant strains of lactic acid bacteria inhabiting natural silage produced in Thailand, were selected from a number of bacterial isolates according to the frequency of finding during isolation and enumeration of the lactic acid bacteria from silage samples as well as species reported as probiotics in literatures (2, 6). The selected lactic acid bacteria were cultivated using MRS medium (Merck, Germany) with and without the addition of calsium carbonate (0.5% w/v) and incubating under anaerobic condition at 35°C for 48 h. Phenotypic and physiological properties (1) of these strains were then characterized. Cell morphology of 48-h cultures grown on MRS agar, was also observed using scanning electron microscopy (SEM; JSM-6400, JEOL Ltd., Japan) for certain characterization of the bacterial cell morphology. The bacterial cells were prepared for the SEM observation according to the methods as described by Bozzola and Russell (7).

API 50CH/CHL system (Biomérieux, France) was used for bacterial biochemical characterization of selected lactic acid bacteria. These strains were also tested for applying as potential silage inoculants using 20 kg of fresh Napier grass (*Pennisetum purpureum* cv. Mott) in the closed container without and with adding inoculants. The silage without the addition of inoculant was performed as the control. Each bacterial starter culture was inoculated separately to the silage raw material with 1% inoculum size containing approximately 10^7 cell/g of inoculum, and incubated at room temperature for 21 days. The inoculum was prepared using dry soybean meal as the supporting material for bacterial cells. Lactic acid bacteria in 21-day grass silage were enumerated using the standard plate count method, and Rogosa SL agar (Lactobacillus selective agar, Merck, Germany) and MRS agar with and without the addition of calsium carbonate (0.5%) and incubating under anaerobic condition at 35°C for 48 h. pH of the grass silage was also determined using pH meter (CCMD 510, Biochrom, UK).

Results and Discussion

Six strains of lactic acid bacteria were selected from the total of 370 isolates obtained from silage samples produced in Thailand. Phenotypic and physiological properties of the six strains were characterized. SEM was introduced for certain characterization of bacterial cell morphology. The SEM micrographs clearly exhibited morphology of lactic acid bacterial cells. All strains had regular cell shapes with smooth surface (Fig. 1). The six strains; SUT-D44, SUT-M2D3, SUT-T1R28, SUT-T1R18, SUT-T2R15 and SUT-T8F1, had their characteristics which could be differentiated from each other, and were identified as belonging to *Lactococcus lactis*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus acidophilus*, and *Lactobacillus rhamnosus*, respectively.

Lactococcus lactis SUT-D44 had its cell intermediate in morphology between a coccus and a bacillus, which was referred to coccobacillus, 0.5-0.7x0.8-1.0 µm, occurring in pairs and short chains (Fig. 1, A and B). *Pediococcus pentosaceus* SUT-M2D3 was the tetra-forming strain which had cell division in two perpendicular directions in a single plane (Fig. 1, C and D). Cell was spherical, 0.9-1.0 µm in diameter.

Cells of *Lactobacillus plantarum* SUT-T1R28 were rod-shaped, and usually regular, 0.5-0.8x01.0-1.2 µm (Fig. 1, E and F). They were usually long rods and commonly in short chains. *Lactobacillus paracasei* SUT-T1R18 had rod-shaped cell and usually regular, 0.5-0.8x01.0-1.5 µm (Fig. 1, G and H). They were also long rods and commonly in short chains.

Cells of *Lactobacillus acidophilus* SUT-T2R15 were rod-shaped and usually regular, 0.5-0.8x01.0-1.5 μm (Fig. 1, I and J). They were usually long rods and commonly in short chains. And *Lactobacillus rhamnosus* SUT-T8F1 had rod-shaped cell and regular, 0.5-0.6x01.0-2.0 μm (Fig. 1, K and L). The cells were long rods and commonly in short chains.

The production of silage both with and without the addition of bacterial inoculants was carried out. This study would be benefit to the preservation and production of cattle feed. The six dominant strains were tested for applying as silage inoculants and possibly as probiotics for the same strain. Lactic acid bacterial populations in 21-day grass silage with inoculating *Lactococcus lactis* SUT-D44, *Pediococcus pentosaceus* SUT-M2D3, *Lactobacillus plantarum* SUT-T1R28, *Lactobacillus paracasei* SUT-T1R18, *Lactobacillus acidophilus* SUT-T2R15, and *Lactobacillus rhamnosus* SUT-T8F1, were approximately $7.80x10^9$, $1.02x10^9$, $7.55x10^9$, $7.50x10^9$, $9.05x10^9$ and $5.95x10^9$ CFU/g respectively, which were high compared to the control silage containing total lactic acid bacteria at the average of $8.40x10^6$ CFU/g. And the average pHs of the grass silage were 4.54, 4.40, 4.53, 4.34, 4.30, and 4.24 respectively, which were lower than the control silage having the average pH of 4.70.

Lactobacillus plantarum has been reported to be frequently used for adding to crops at ensilage to stimulate a rapid lactate fermentation (4). *Lactobacillus acidophilus* and *L. plantarum*, could have their potential as probiotics since they been so-called probiotic lactic acid bacteria (2).

Conclusions

Six strains of lactic acid bacteria isolated from silage produced in Thailand, were selected as dominant strains inhabiting the natural silage samples. When phenotypic and physiological properties of these strains were characterized, the six strains; SUT-D44, SUT-M2D3, SUT-T1R28, SUT-T1R18, SUT-T2R15 and SUT-T8F1, had their characteristics which could be differentiated from each other, and were identified as belonging to *Lactococcus lactis*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus acidophilus*, and *Lactobacillus rhamnosus*. These dominant strains were also successfully applied for testing as silage inoculants and possibly as probiotics for the same strains, particularly *Lactobacillus acidophilus* SUT-T2R15 and *Lactobacillus plantarum* SUT-T1R28.

Acknowledgements

This work was supported by Suranaree University of Technology, Thailand.

References

1. Kandler O, Weiss N.1986. **Regular, Nonsporing Gram-positive Rods**. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol 2 (Edited by Sneath PHA et al) Baltimore, Williams&Wilkins* 1986, 1208-1234.
2. Brookes RM, Buckle AE. **Lactic Acid Bacteria in Plant Silage**. In: *The Lactic Acid Bacteria: The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease, Vol 1 (Edited by Wood BJB) London, Elsevier Applied Science* 1992, 363-386.
3. Cai Y, Kumai S, Ogawa M, Benno Y, Nakase T. Characterization and identification of *Pediococcus* species isolated from forage crops and their application for silage preparation. *Appl Environ Microbiol* 1999, 65: 2901-2906.
4. Weinberg ZG, Muck RE, Weimer PJ. 2003. The survival of silage inoculant lactic acid bacteria in remen fluid. *J Appl Microbiol* 2003, 94: 1066-1071.
5. Ohmomo S, Nitisinprasert S, Kraykaw D, Laemkorn P, Tanomwongwattana S, Hiranpradit S. Evaluation of lactic acid bacteria isolated for silage fermentation inoculant in Thailand by using a modified pouch method. *JARQ* 2004, 38:199-208.
6. Fuller R. **Probiotics: The Scientific Basis** *London, Chapman & Hall* 1992.
7. Bozzola JJ, Russell LD. **Electron Microscopy: Principles and Techniques for Biologists**. *Boston, Jones and Bartlett Publishers* 1992.

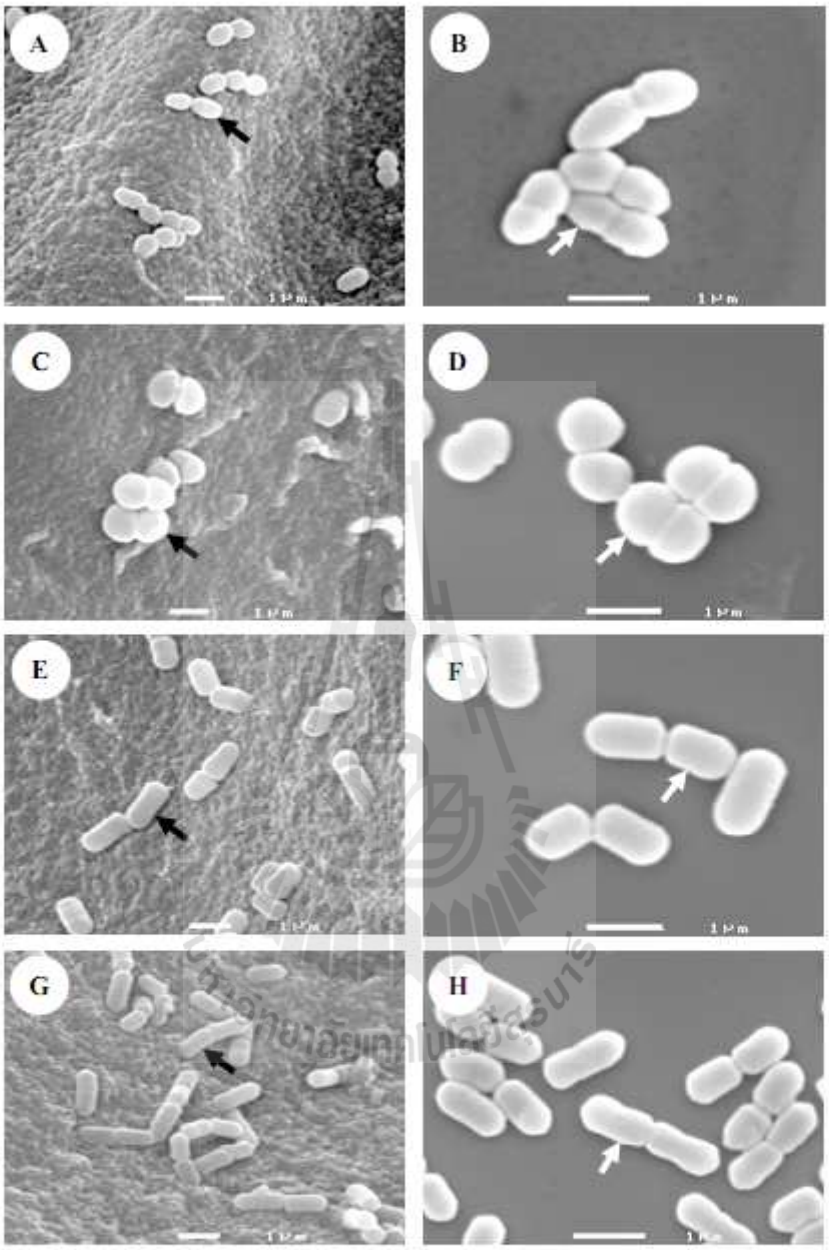


Fig. 1 SEM micrographs illustrate cell morphology (arrows) of potential silage inoculant lactic acid bacteria; Lactococcus lactis SUT-D44 (A and B), Pediococcus pentosaceus SUT-M2D3 (C and D), Lactobacillus plantarum SUT-T1R28 (E and F), Lactobacillus paracasei SUT-T1R18 (G and H), Lactobacillus acidophilus SUT-T2R15 (I and J), and Lactobacillus rhamnosus SUT-T8F1 (K and L), cultured on MRS agar for 48 h. Bars equal 1 µm.

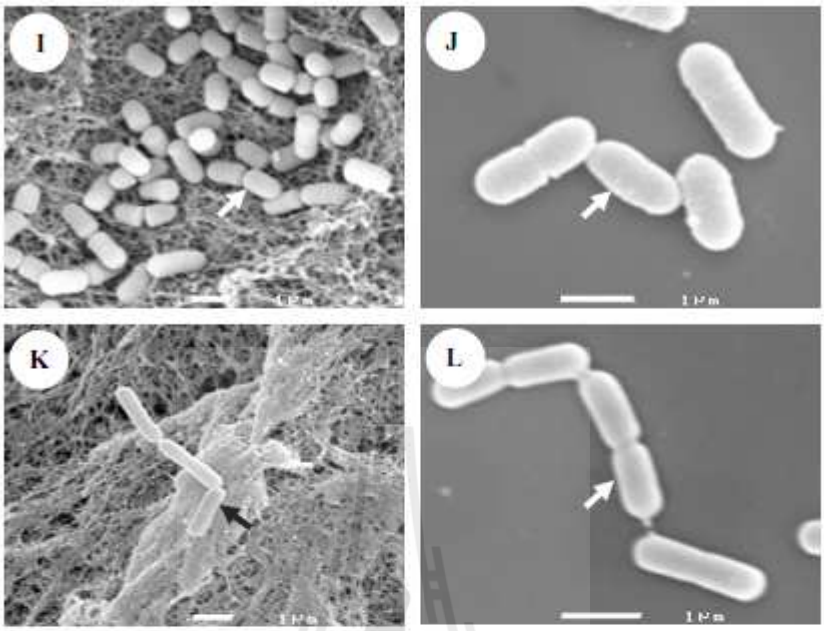


Fig. 1 (Continued) SEM micrographs illustrate cell morphology (arrows) of potential silage inoculant lactic acid bacteria; Lactococcus lactis SUT-D44 (A and B), Pediococcus pentosaceus SUT-M2D3 (C and D), Lactobacillus plantarum SUT-T1R28 (E and F), Lactobacillus paracasei SUT-T1R18 (G and H), Lactobacillus acidophilus SUT-T2R15 (I and J), and Lactobacillus rhamnosus SUT-T8F1 (K and L), cultured on MRS agar for 48 h. Bars equal 1 μm.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี