



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การใช้ประโยชน์มะพร้าวอ่อนเหลือทิ้งจากการผลิตน้ำมะพร้าวกระป๋อง

โครงการย่อยที่ 4

การใช้เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกในการทำไซเลจเปลือกมะพร้าว

โดย

ผศ. ดร. สุนัย นิธิสินประเสริฐ

เมษายน 2543

สัญญาเลขที่ RDG5/0020/2542

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การใช้ประโยชน์มะพร้าวอ่อนเหลือทิ้งจากการผลิตน้ำมันมะพร้าวกระป๋อง

โครงการย่อยที่ 4

การใช้เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกในการทำไซเลจเปลือกมะพร้าว

คณะผู้วิจัย

1. ผศ. ดร. สุนีย์ นิธิสินประเสริฐ

สังกัด

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรม
เกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

ชุดโครงการ

บทคัดย่อ

ได้ทำการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติก 18 ไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพ จากความสามารถในการผลิตกรดแลคติกระหว่างกระบวนการหมักไซเลจจากเปลือกมะพร้าว พบเชื้อไอโซเลต KUB-ST10-1 แสดงความสามารถในการผลิตกรดแลคติกสูงสุดเป็น 2.18% โดยน้ำหนักแห้ง จากการศึกษาการเจริญและปริมาณของหัวเชื้อที่เหมาะสม พบว่าเชื้อไอโซเลต KUB-ST10-1 สามารถเจริญเข้าสู่ late log phase ในช่วง 8 - 9 ชั่วโมง และปริมาณหัวเชื้อที่เหมาะสมในการหมักไซเลจคือ 10^5 โคโลนีต่อกรัมของไซเลจ (โดยน้ำหนักแห้ง) เมื่อทำการศึกษาการหมักเปลือกมะพร้าวที่มีขนาดประมาณ 2 เซนติเมตรในถุงพลาสติก โดยวิธีการเสริมด้วยกากน้ำตาลอย่างเดียว หัวเชื้ออย่างเดียว และกากน้ำตาลร่วมกับหัวเชื้อ เปรียบเทียบกับชุดควบคุม ผลการทดลองพบว่า ไซเลจอายุ 14 วัน จากทุกการทดลองแสดงค่าพีเอช 3.71 - 3.78 นอกจากนั้นยังไม่พบ *Clostridium* อีกด้วย อย่างไรก็ตามพบว่าวิธีการใช้กากน้ำตาลร่วมกับหัวเชื้อ สามารถผลิตกรดแลคติกสูงสุด 2.3% ของไซเลจโดยน้ำหนักแห้ง และแสดงปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกชนิด homofermentative สูงสุด 10^5 โคโลนี ต่อกรัมของไซเลจ ขณะที่พบจุลินทรีย์ในกลุ่ม แบคทีเรียกรดแลคติกชนิด heterofermentative, enterobacteria และยีสต์รา ต่ำเพียง <10, <10 และ 70 โคโลนีต่อไซเลจ 1 กรัม โดยน้ำหนักแห้ง

Abstract

18 Effective lactic acid bacteria were screened according to lactic acid production during coconut shell silage - making. The isolate KUB-ST10-1 producing the highest lactic acid contents of 2.18% by dry basis was selected. Study on the growth culture and inoculum contents, 10^5 cfu/g of silage (as dry basis) growing at the late log phase of 8 - 9 h was obtained and used as an inoculum preparation. To study ensiling, about 2 cm chopped coconut husk was ensiled by pouch method. Then, the designed treatments were performed as control, ensiling alone with 1:10 molass or inoculum, and ensiling with the combination treatment of molass and inoculum. The results showed that pH values obtained from all treatment of 14 days coconut shell silage were 3.71 - 3.78. In addition, *Clostridium* was not found as well. However, only the combination treatment exhibited high contents of both lactic acid of 2.3% and homofermentative lactic acid bacteria of 10^5 cfu/g of silage (as dry basis) and low amounts of heterofermentative lactic acid bacteria, enterobacteria and yeast mold of <10, <10 and 70 cfu/g of silage (as dry basis) respectively.

คำนำ

เปลือกมะพร้าวอ่อนเหลือทิ้งประมาณ 10 - 15 คันรถสับลื้อต่อวัน เป็นปัญหาใหญ่ของโรงงานผลิตน้ำมะพร้าวอ่อนอย่างรุนแรงในปัจจุบัน ดังนั้นจึงได้มีแนวคิดในการนำเปลือกมะพร้าวอ่อนมาใช้เป็นอาหารสัตว์ โดยใช้ในรูปของอาหารหยาบสำหรับสัตว์เคี้ยวเอื้อง ซึ่งสามารถทำได้ในรูปแห้ง หรือไซเลจ

ไซเลจหรือพืชอาหารสัตว์หมัก เกิดขึ้นโดยกระบวนการหมักด้วยแบคทีเรียในกลุ่มแลคติกแอซิดแบคทีเรีย (ลอบ.) ในสภาพที่มีออกซิเจนน้อย ได้สารประกอบกรดแลคติกเป็นหลัก ทำให้เกิดกลิ่นเฉพาะสำหรับการกินได้ของสัตว์ อีกทั้งยังส่งผลให้ค่าพีเอชลดลง ลดการปนเปื้อนของเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคต่างๆ จากการศึกษาการทำ corn silage และ grass silage โดยการใช้หัวเชื้อพบว่าเชื้อ ลอบ. ที่เหมาะสมสำหรับพืชทั้งสองแตกต่างกัน (Nitisinprasert *et al.*, in preparation) ดังนั้นสายพันธุ์และปริมาณเริ่มต้นของ ลอบ. จึงเป็นสิ่งสำคัญในการได้มาซึ่งไซเลจที่มีคุณภาพสูง

อุปกรณ์และวิธีการ

I. การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่เหมาะสมสำหรับการหมักไซเลจจากเปลือกมะพร้าวอ่อน

1.1 เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก (LAB) ประสิทธิภาพ

คัดเลือกได้จากโครงการวิจัย “การคัดเลือกเชื้อ Lactic acid bacteria และจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ย่อยเพื่อใช้เป็นสารเร่งในกระบวนการทำอาหารสัตว์หมัก” ภายใต้การสนับสนุนจาก สวทช. จำนวน 18 ไอโซเลตซึ่งคัดเลือกจาก ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิช่วงกว้าง 30° - 50°ซ ความสามารถในการเจริญที่ระดับความเป็นกรดต่าง 4-8 การผลิตกรดแลคติก และความสามารถในการเจริญในสภาพที่มี และไม่มีออกซิเจน

1.2 วิธีการทดสอบการหมักไซเลจ

1.2.1 การเตรียมวัตถุดิบ

ทำการตัดเปลือกมะพร้าวอ่อน ให้มีขนาดประมาณ 2 ซม. ความชื้นอยู่ในช่วง 84-85% ซึ่งใช้มะพร้าวอ่อนจำนวน 25 กรัมใส่ในถุงพลาสติกขนาด 17.5 x 24 ซม.

1.2.2 การเตรียมเชื้อ

เชื้อเชื้อ LAB 1 โคโลนี ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาณ 5 มล. ปั่นที่ 37° ซ เป็นเวลา 16 ชม. เตรียมหัวเชื้อโดยถ่ายเชื้อ 5% ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 50 มล. ปั่นที่ 37° ซ เป็นเวลา 16 ชม. ปรับความเข้มข้นของน้ำเชื้อที่ได้ด้วยสารละลายที่ประกอบด้วย 10% MRS และ 0.85% NaCl ให้มีค่าการดูดกลืนแสง ที่ 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.5 หลังจากนั้นดูดน้ำเชื้อที่ปรับความเข้มข้นแล้ว จำนวน 1 มล.ใส่ในถุงโยมะพร้าวที่เตรียมใน

ข้อ 1.2.1 ใช้มีอริตดากาตออกและทำการปิดปากถุงโดยเครื่องปิดผนึก หมักเป็นเวลา 20 วันจากนั้นนำตัวอย่างที่ได้มาวิเคราะห์ ค่าความเป็นกรดต่าง และปริมาณกรดแลคติก กรดอะเซติก กรดโพรไพโอนิก และการดิวไฮดร

1.3 การวิเคราะห์ความเป็นกรดต่าง

ดัดแปลงจากวิธีของ Bolsen และคณะ (1990) ใช้ตัวอย่าง 25 กรัม ผสมรวมกับน้ำ 75 มล. จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 2 ชม. นำส่วนใสที่ได้วัดความเป็นกรดต่าง

1.4 การวิเคราะห์ปริมาณกรดแลคติก กรดอะเซติก กรดโพรไพโอนิก และการดิวไฮดร

นำส่วนใสที่ได้จากข้อ 1.3 ไปวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง HPLC ด้วยคอลัมน์ Sulfonate divinyl benzene-styrene copolymer HPX-87H 300 x 7.8 mm ของบริษัท BIO-RAD ใช้ tartaric acid เป็น internal standard และ 0.008 N H₂SO₄ เป็น mobile phase

II. การศึกษาการเจริญของเชื้อที่คัดเลือกได้

2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

MRS น้ำมะพร้าว กากน้ำตาลที่อัตราส่วน 1:5, 1:10 และ 1:20

2.2 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด โดยวิธีของ Dubois และคณะ (1956)

2.3 การศึกษาการเจริญของเชื้อ

2.3.1 การศึกษาการเจริญของเชื้อ 1 โคโลนี

เชื้อเชื้อ 1 โคโลนีลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 50 มล. บ่มที่ 37°C ทำการเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อที่เวลา 0, 1, 2, 3, 5, 7, 9, 11 และ 14 ชั่วโมง จากนั้นนำไปหาปริมาณเชื้อบนอาหารแข็ง MRS ด้วยวิธี spread plate

2.3.2 การศึกษาการเจริญของเชื้อในอาหารเหลว MRS น้ำมะพร้าว และกากน้ำตาลที่ความเข้มข้น 1:5, 1:10 และ 1:20

เชื้อเชื้อ 1 โคโลนี ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 5 มล. บ่มที่ 37°C บ่มเชื้อเป็นเวลา 8 - 9 ชั่วโมง จากนั้นเตรียมหัวเชื้อโดยการถ่ายสารละลายเชื้อ 5% ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 50 มล. บ่มเป็นเวลา 8-9 ชั่วโมง นำหัวเชื้อ 5% ที่เตรียมได้ถ่ายลงในอาหารเหลว ปริมาตร 50 มล. ชนิดต่างๆ ดังนี้ อาหารเหลว MRS น้ำมะพร้าว กากน้ำตาลความเข้มข้น 1:5 กากน้ำตาลความเข้มข้น 1:10 กากน้ำตาลความเข้มข้น 1:20 บ่มที่ 37°C และทำการเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อที่เวลา 0, 1, 2, 3, 5, 7, 9, 11 และ 14 ชั่วโมง จากนั้นนำไปหาปริมาณเชื้อบนอาหารแข็ง MRS ด้วยวิธี spread plate

III. การศึกษาปริมาณของหัวเชื้อที่เหมาะสมในการหมัก

3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

MRS น้ำมะพร้าว กากน้ำตาลที่อัตราส่วน 1:5, 1:10 และ 1:20

3.2 การเตรียมเชื้อ

ทำการ cấyเชื้อ 1 โคโลนี ลงในอาหารเหลว MRS 5 มล. บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 8-9 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อ 5 % ลงในอาหารเหลวกากน้ำตาล 1:10 ปริมาณ 100 มล. บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 8-9 ชั่วโมง หลังจากการทดลองหาปริมาณเชื้อบนอาหารแข็ง MRS พบว่าได้เชื้อ 10^8 โคโลนีต่อมล.

3.3 การหมักโยมะพร้าวอ่อน

ใส่โยมะพร้าวอ่อน 25 กรัมในถุงขนาด Polypropylene จากนั้นใส่หัวเชื้อที่เจือจางแล้ว ณ ความเข้มข้น 10^4 10^5 และ 10^6 ในปริมาณ 1 มล. จากนั้นรีดอากาศออกด้วยมือ และปิดปากถุงด้วยเครื่องปิดผนึก อุ่นหมักขณะหมักภายนอก อยู่ในช่วงระหว่าง 30 - 42.5 °C ทำการเก็บตัวอย่างที่ 0 และ 10 วัน และวิเคราะห์ค่าความเป็นกรดต่าง ปริมาณกรดอินทรีย์

3.4 การศึกษาทางจุลชีววิทยา โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อดังต่อไปนี้

กลุ่มเชื้อที่ต้องการศึกษา	อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้
1. Homofermentative LAB (HO)	MRS
2. Heterofermentative LAB (HE)	Gibson
3. Enterobacteria (E)	VRB + 1% glucose
4. Yeast Mold (YM)	PDA + tartaric acid
5. Clostridium (C)	Sulfite agar

IV. การเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ ST10-1 ในรูปแห้ง เมื่อใช้อาหารแตกต่างกัน

4.1 วิธีการเตรียมเชื้อโดยวิธี Lyophilization

ทำการถ่ายเชื้อ จำนวน 1 โคโลนี ใส่ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาณ 5 มล. จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 8-9 ชั่วโมง ทำการถ่ายหัวเชื้อที่เตรียมได้จำนวน 5% ลงในอาหารเหลว MRS 285 มล. บ่ม 37°C เป็นเวลา 8-9 ชั่วโมง จากนั้นแยกเซลล์ออกจากน้ำเชื้อที่เตรียมได้ โดยการใช้เครื่องเหวี่ยง ใส่อาหารเหลว MRS ที่

มี skim milk 10% ในปริมาณ 50 มล. ผสมให้เข้ากัน นำสารละลายเซลล์ที่ได้ไปทำให้แห้งโดยใช้เครื่อง Lyophilizer ความชื้นสุดท้ายที่ได้ประมาณ 8-9%

4.2 วิธีการเลี้ยงเชื้อ และตรวจสอบการเจริญในอาหารชนิดต่างๆ

ทำการขังเชื้อ 2 กรัม ใส่ลงในอาหารเหลว MRS น้ามะพร้าว และกากน้ำตาลเจือจาง 1:10 ปริมาณ 1000 มล. (ในกรณีน้ามะพร้าว และกากน้ำตาล ทำการต้มฆ่าเชื้อนับจากจุดเดือด เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทิ้งให้เย็น ก่อนการใส่เชื้อ) ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 8-9 ชั่วโมง จากนั้นนำไปหาปริมาณเชื้อโดยวิธี spread plate

V. การหมักไซเลจระดับ 20 กก โดยใช้หัวเชื้อในลักษณะแห้ง

5.1 การเตรียมหัวเชื้อ

ขังเชื้อแห้ง ST10-1 จำนวน 0.2 กรัม ใส่ลงในน้ามะพร้าวที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 100 มล. (โดยการต้มเดือดเป็นเวลา 5 นาที) จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 8 ชั่วโมง

5.2 การหมักไซเลจ

5.2.1 เพื่อให้ได้เชื้อ 10^6 cfu/g ดังนั้นจะใช้หัวเชื้อที่เตรียมในข้อ 5.1 ปริมาณ 10 มล. ต่อยมะพร้าว 20 กก. อย่างไรก็ตามเพื่อให้เชื้อกระจายทั่ววัตถุดิบ จึงปรับปริมาตรของหัวเชื้อ โดยใช้อัตราส่วนเช่นเดียวกับการทดลองในหัวข้อที่ I

5.2.2 ขังโยมะพร้าวที่เตรียมขึ้นโดยโครงการที่ 2 ปริมาณ 20 กิโลกรัม จากนั้นแบ่งใส่ครึ่งหนึ่งลงในถุง Polypropylene เคลือบด้านในลอน ตามด้วยหัวเชื้อที่เตรียมในข้อ 5.2.1 ปริมาณครึ่งหนึ่งเช่นกัน โดยใช้ฝักบัว จากนั้นใส่ส่วนที่เหลือลงไป ทำการอัดโยมะพร้าวพอประมาณ และปิดปากถุง

ทำการบ่มไว้กลางแจ้ง อุณหภูมิที่วัดได้ อยู่ระหว่าง 30.5°C - 34°C โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 4 สภาวะๆละ 3 ซ้ำดังนี้ สภาวะที่ 1 Control (C) สภาวะที่ 2 การใช้หัวเชื้อเพียงอย่างเดียว (I) สภาวะที่ 3 การใช้กากน้ำตาลอย่างเดียว (M) และสภาวะที่ 4 การใช้กากน้ำตาลร่วมกับหัวเชื้อ (I + M)

5.2.3 การศึกษาทางจุลชีววิทยา

โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อดังแสดงในหัวข้อ 3.4

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

I. การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่เหมาะสมสำหรับการหมักโซลเจจากเปลือกมะพร้าวอ่อน

จากการเปรียบเทียบความสามารถในการหมักโซลเจ อุณหภูมิภายนอกอยู่ในช่วง $25.5^{\circ} - 32^{\circ} \text{C}$ โดยเชื้อ LAB ทั้ง 18 ไอโซเลต เปรียบเทียบกับการหมักแบบไม่ใส่หัวเชื้อ พบว่าระดับพีเอชลดลงจาก 5.48 เป็น 3.6 - 4.8 โดยพบว่าไอโซเลต K7, M3, SM2-2, SM10-1, SM16-1 และ ST10-1 แสดงค่าพีเอชต่ำกว่า 4 ดังแสดงในรูปที่ 1 อย่างไรก็ตามเมื่อศึกษาการดอินทรีย์ที่ผลิตได้ ดังแสดงในรูปที่ 2 พบว่าไอโซเลต ST10-1 ผลิตกรดแลคติกสูงสุดถึง 2.18% (โดยน้ำหนักแห้ง) โดยผลิตกรดอะเซติก และกรดไพรูโวนิก 0.11 และ 0.12% (โดยน้ำหนักแห้ง) แต่ไม่พบการผลิตกรดบิวไทรค ส่งผลให้อัตราส่วนของกรดแลคติกต่ออะเซติกสูงถึง 20 ถึงแม้ว่าอัตราส่วนที่ได้จะต่ำกว่าค่าที่ได้จากการหมักโดยไอโซเลต SM3-2 แต่จากการศึกษาการผลิตของไอโซเลต SM3-2 พบว่าส่งเสริมทำให้เกิดสภาวะการผลิตกรดบิวไทรคสูงถึง 0.3% (โดยน้ำหนักแห้ง) นอกจากนั้นยังพบว่าสามารถผลิตกรดแลคติกเพียง 0.23% (โดยน้ำหนักแห้ง) เท่านั้น ดังนั้นเชื้อ LAB ST10-1 จึงถูกคัดเลือกเพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

II การศึกษาการเจริญของเชื้อ LAB ST10-1

2.1 การเจริญของเชื้อจาก 1 โคโลนี ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS

ดังแสดงในรูปที่ 3 พบว่าเชื้อเริ่มต้นที่ความเข้มข้น $8 \times 10^5 \text{ cfu/ml}$ จากนั้นเชื้อเจริญอย่างรวดเร็วเข้าสู่ log phase ทันที โดยไม่ผ่าน lag phase และเจริญสู่ late log phase ภายใน 8 - 9 ชั่วโมง ด้วยความเข้มข้นของเชื้อ 10^9 cfu/ml

2.2 การเจริญของเชื้อในอาหารชนิดต่างๆ

ได้ทำการศึกษการเจริญของเชื้อ ในของเหลวใช้จากโรงงาน ได้แก่ น้ำมะพร้าว และกากน้ำตาลที่ความเข้มข้น 1:5, 1:10 และ 1:20 ซึ่งแสดงปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด 16.9, 9.2 และ 5.6% ตามลำดับ โดยทำการเปรียบเทียบกับอาหาร MRS ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4 พบว่าจากการใช้หัวเชื้อ 5% ส่งผลให้ได้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น $7 \times 10^7 - 1.5 \times 10^8 \text{ cfu/ml}$ ในการหมักใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS และน้ำมะพร้าว พบว่าเชื้อเข้าสู่ช่วง late log phase ภายในเวลา 8 - 9 ชั่วโมง ด้วยความเข้มข้นของเชื้อ 2.7×10^9 และ $1.6 \times 10^9 \text{ cfu/ml}$ แต่เมื่อใช้กากน้ำตาลที่ความเข้มข้น 1:5, 1:10 และ 1:20 พบว่าการเจริญของเชื้อเป็นไปในลักษณะที่ช้ากว่า ส่งผลให้เชื้อเข้าสู่ late log phase ในช่วง 8-9 ชั่วโมง ด้วยความเข้มข้น 7.6×10^8 , 7.15×10^8 และ $5.7 \times 10^8 \text{ cfu/ml}$ ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นว่าการเตรียมหัวเชื้อโดยใช้กากน้ำตาล ได้ปริมาณเชื้อต่ำกว่าการใช้ MRS ประมาณเกือบ 1 log cycle

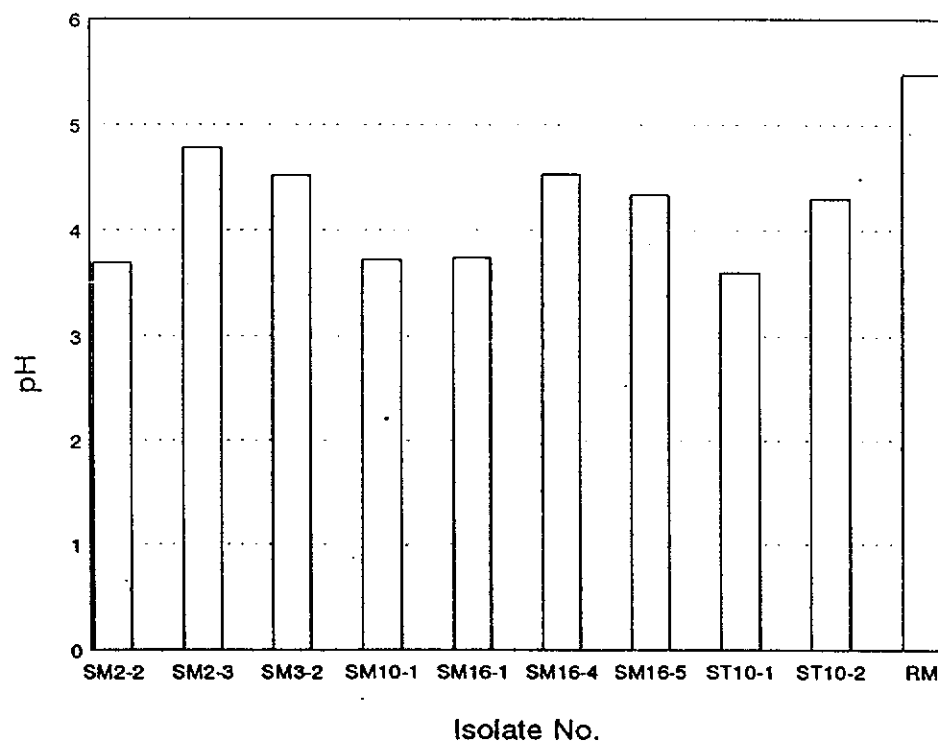
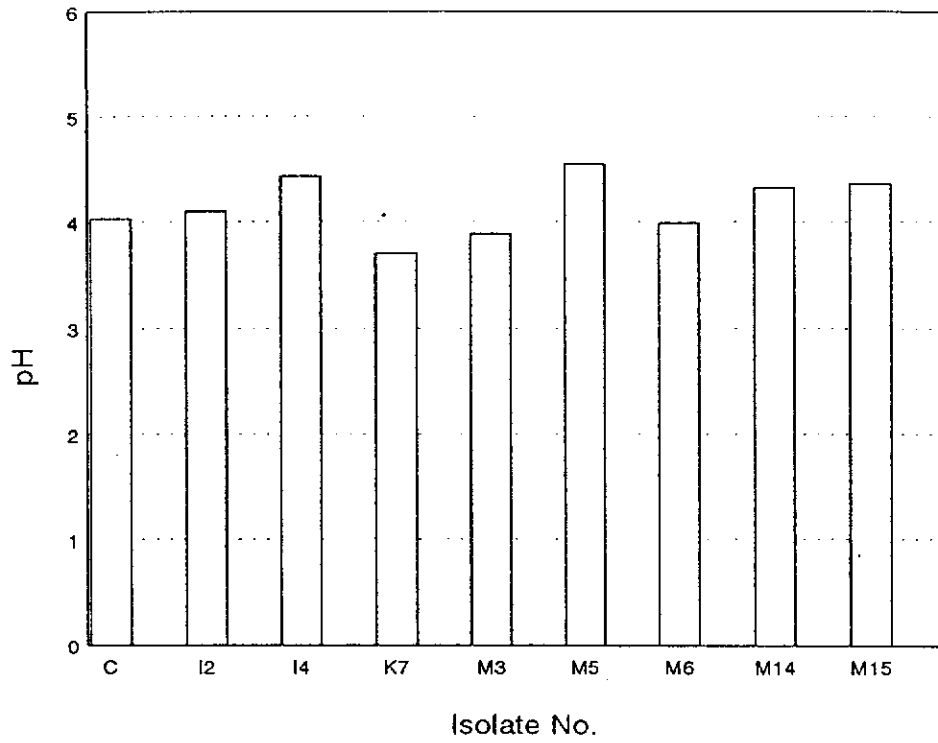


Fig.1 pH values obtained from 20d silage. C, fermentation without inoculum; RM, fresh coconut fiber.

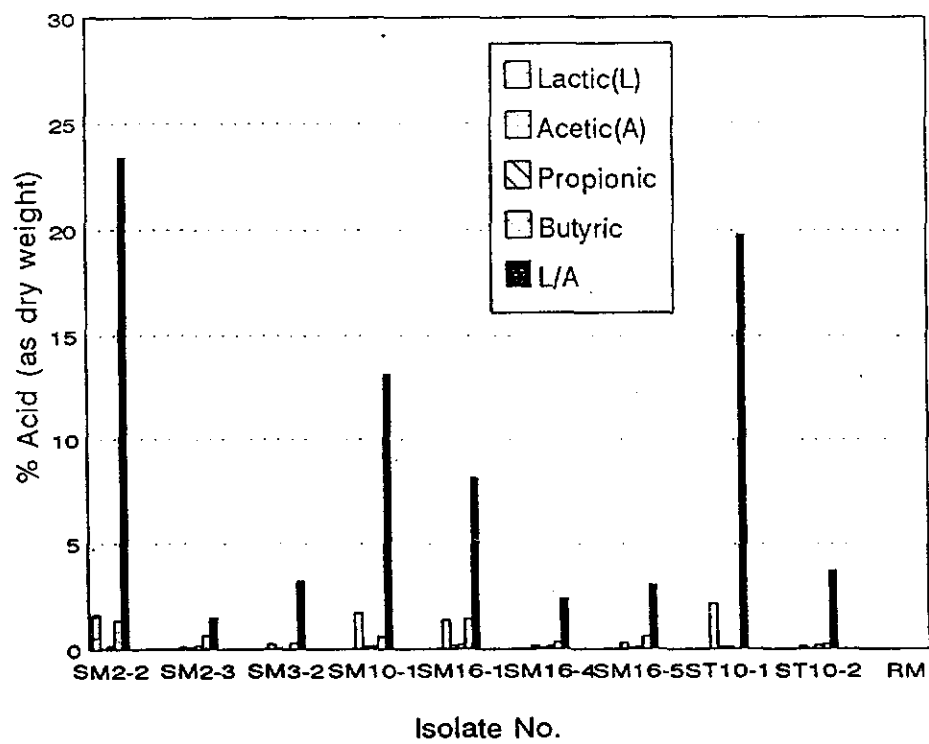
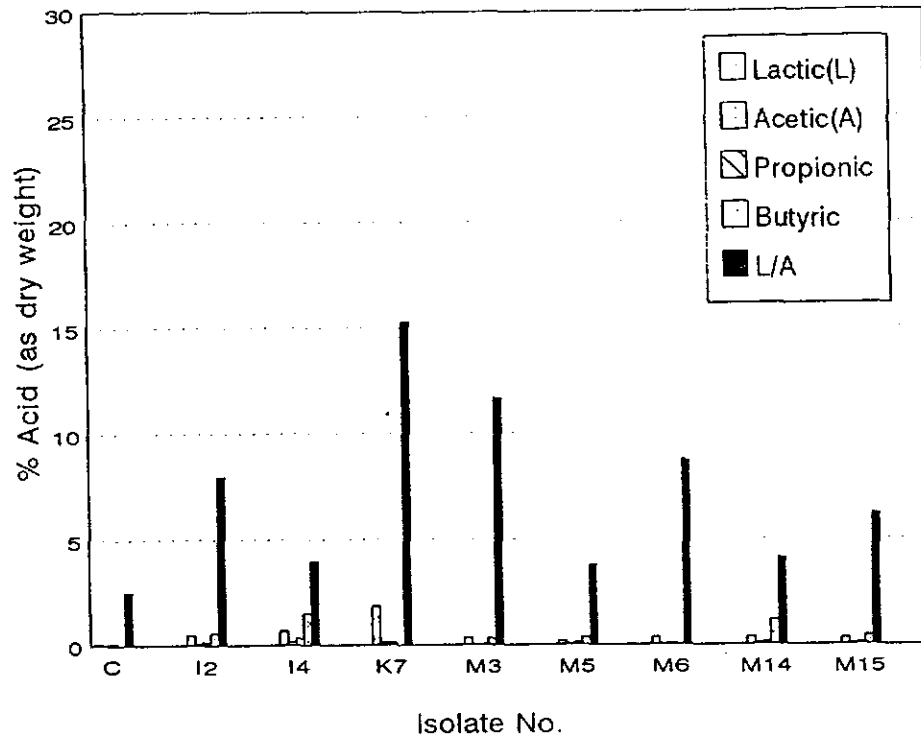


Fig.2 The amounts of acids from 20d silage. C fermentation without inoculum; RM, fresh coconut fiber; L/A, ratio of lactic acid and acetic acid.

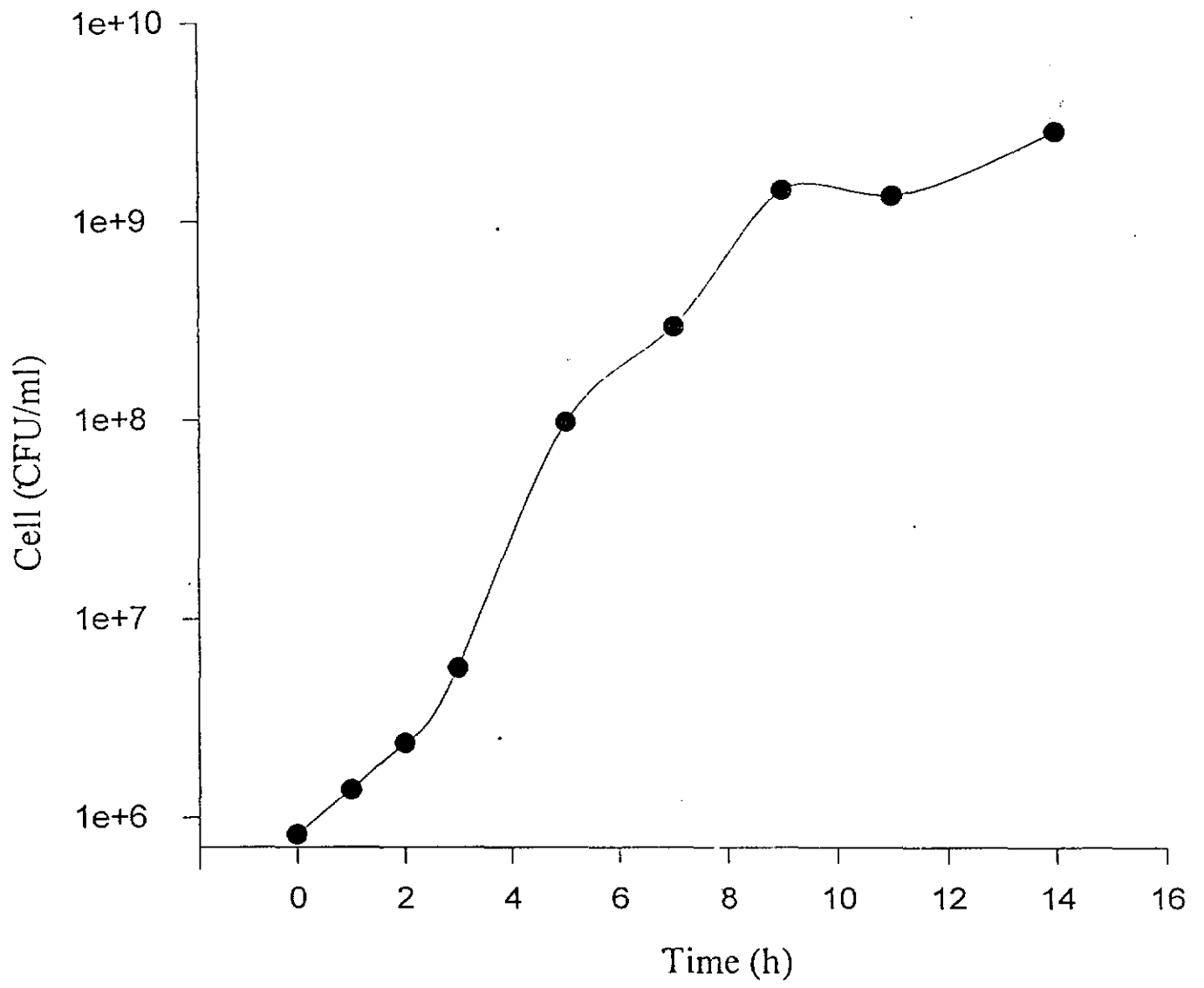


Fig.3 Growth of isolate ST10-1 in MRS medium.

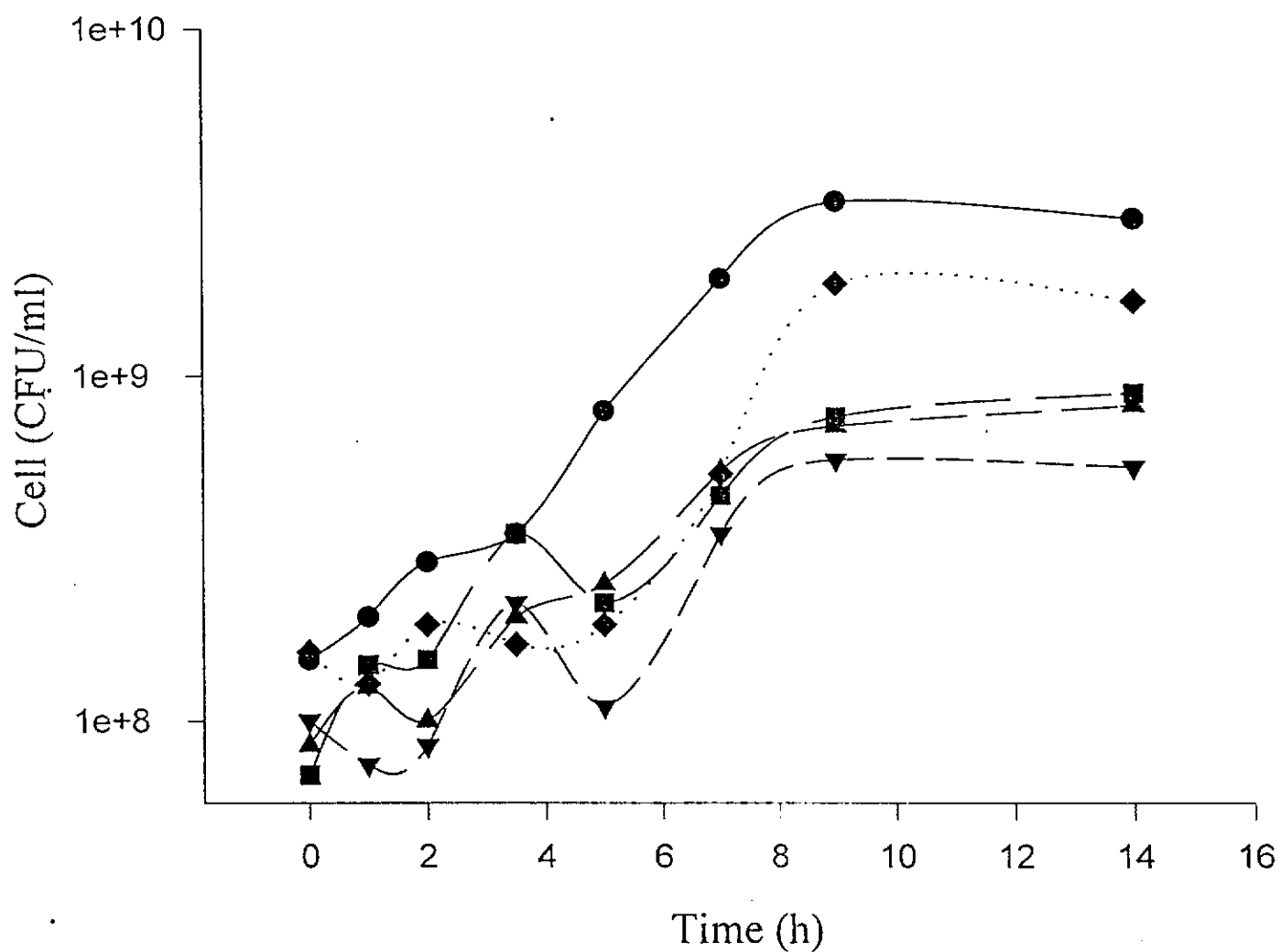


Fig.4 Comparison on growth of the isolate in MRS, coconut juice, Molass at dilution of 1:5, 1:10 and 1:20. 5% of inoculum were used.

● MRS, ■ Molass 1:5, ▲ Molass 1:10 and
▼ Molass 1:20 ◆ Coconut juice

III การศึกษาปริมาณของหัวเชื้อที่ใช้ในการหมักเบื้องต้น

เนื่องจากปริมาณน้ำตาลในโยมะพร้าวต่ำ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องใส่น้ำตาล ในรูปของกากน้ำตาลเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนของจุลินทรีย์ จากการศึกษาความสามารถในการเจริญของ LAB ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS โยมะพร้าว และกากน้ำตาล ดังแสดงในหัวข้อที่ 2 พบว่าการเจริญในกากน้ำตาลต่ำกว่าอาหารอื่นๆ เป็นไปได้ว่า สารประกอบในกากน้ำตาล มีผลต่อการเจริญ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องศึกษาปริมาณเชื้อที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยทำการเลี้ยงในกากน้ำตาลโดยตรง เพื่อหาปริมาณที่เหมาะสมเมื่อจำเป็นต้องเจริญในสภาพที่มีกากน้ำตาล

ได้มีการใช้แบคทีเรียกรดแลคติกในการทำไซเลจ พบว่าที่ปริมาณ $10^4 - 10^6$ cfu/กรัม สามารถปรับปรุงคุณภาพของไซเลจได้ (Chen และคณะ 1994, Stroke, 1992) ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาค้นหาการทดลอง 5 สมการดังนี้ สมการที่ 1 ชุดควบคุม (control) ไม่ใส่หัวเชื้อ และกากน้ำตาล สมการที่ 2 การใส่กากน้ำตาลเข้มข้น 1:10 (M) สมการที่ 3 การใส่หัวเชื้อ 10^4 โคโลนีต่อกรัมของวัตถุดิบ (MI4) สมการที่ 4 การใส่หัวเชื้อ 10^5 โคโลนีต่อกรัมของวัตถุดิบ (MI5) และสมการที่ 5 การใส่หัวเชื้อ 10^6 โคโลนีต่อกรัมของวัตถุดิบ (MI6)

3.1 ผลของหัวเชื้อที่ระดับต่างๆต่อการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช

พบว่าเมื่อทำการหมักเป็นเวลา 10 วัน ระดับพีเอชลดลงจาก 5.4 เป็น 4.83, 4.88, 4.92, 5.07, 3.79 ในสมการ 1, 2, 3, 4 และ 5 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 5 ดังนั้นจะเห็นว่า การใช้หัวเชื้อในระดับ 10^6 cfu/g ส่งผลต่อการหมักทำให้ระดับพีเอชลดลงอย่างรวดเร็วเป็น 3.79

3.2 ผลของหัวเชื้อที่ระดับต่างๆต่อการเปลี่ยนแปลงของกรดอินทรีย์

จากการศึกษาปริมาณกรดที่ผลิตได้ดังแสดงในรูปที่ 5 พบว่าในสมการการหมักโดยใช้หัวเชื้อระดับ 10^6 cfu/g ส่งผลให้การผลิตกรดแลคติกสูงสุดเป็น 2.1% (โดยน้ำหนักแห้ง) ดังนั้นจะเห็นว่า การลดปริมาณการใช้เชื้อลงจาก 10^6 cfu/g ส่งผลต่อการผลิตกรดแลคติกในการหมักไซเลจ นอกจากนั้นยังพบว่า การใส่หัวเชื้อส่งผลให้ไม่พบการผลิตกรดบิวไทริกอีกด้วย ขณะที่ในสมการการหมักโดยไม่ใส่หัวเชื้อพบว่าการผลิตกรดบิวไทริกสูงถึง 0.3% (โดยน้ำหนักแห้ง)

3.3 ผลการศึกษาทางจุลชีววิทยา

จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการหมักไซเลจ ได้แก่กลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งชนิด

Homofermentative (HO) และ Heterofermentative (HE) ซึ่งชนิดแรกเป็นกลุ่มสามารถผลิตกรดแลคติกที่ต้องการในปริมาณสูง นอกจากนั้นยังมีกลุ่ม Clostridia (C), Enterobacteria (E) และยีสต์รา (YM) เชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มเหล่านี้ก่อปัญหาในการหมักไซเลจ ได้แก่การเปลี่ยนกรดอะมิโนให้กลายเป็นเอมีนและแอมโมเนีย การใช้กรดแลคติก การผลิตกรดอะซิติกในปริมาณสูง หรือการเปลี่ยนกรดอะซิติกไปเป็นกรดบิวไทริก ซึ่งมีผลต่อกลิ่นรสที่ไม่ต้องการของไซเลจ รวมทั้งคุณค่าทางอาหารอีกด้วย (McDonald และคณะ 1991; Muck, 1991) จากการศึกษาปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ พบจุลินทรีย์ปนเปื้อนในรูปของ HE, E, YM และ C (ตารางที่ 1) พบว่า

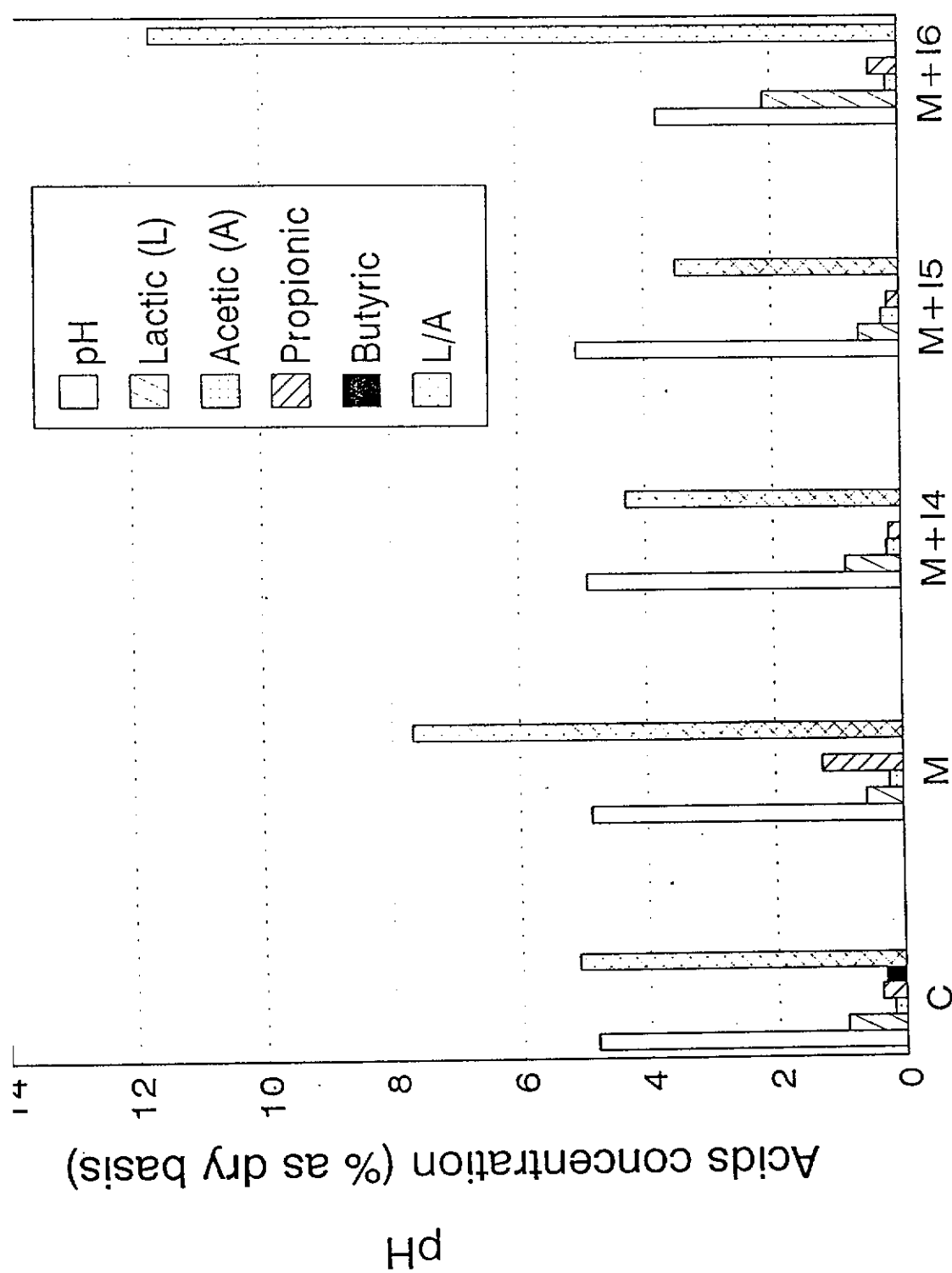


Fig.5 pH and acid contents obtained from 10d silage at various condition. C, control without inoculum; M, with molass 1:10; M+I4, with molass and Inoculum at 10 ; M+I5, with molass and inoculum at 10 ; M+I6, with molass and inoculum at 10 .

สภาวะที่มีการใช้หัวเชื้อในระดับ 10^6 cfu/g ส่งผลให้ปริมาณเชื้อปนเปื้อนต่ำกว่าทุกสภาวะอย่างเห็นได้ชัด ในขณะที่เชื้อในกลุ่ม HO หรือแบคทีเรียกรดแลคติกชนิด Homofermentative สูงถึง 10^9 cfu/g แสดงให้เห็นว่า การใช้หัวเชื้อที่ความเข้มข้น 10^6 cfu/g ส่งเสริมการหมักไซเลจโดยเชื้อในกลุ่ม HO และยับยั้งเชื้อในกลุ่มอื่น

ตารางที่ 1 แสดงปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ในไซเลจ ที่ได้จากการหมักในสภาวะต่างๆ

สภาวะในการทดลอง	ปริมาณเชื้อ (cfu/g ของไซเลจ)				
	HO	HE	E	YM	C
1. Control	1.05×10^7	3.3×10^3	$> 3 \times 10^3$	8.45×10^5	-
2. M	1×10^7	4.05×10^3	$> 3 \times 10^3$	9.5×10^4	-
3. MI4	4.4×10^7	9.43×10^3	$> 3 \times 10^3$	1.5×10^4	-
4. MI5	5.36×10^7	6.7×10^3	$> 3 \times 10^3$	6×10^4	-
5. MI6	1×10^9	1.45×10^3	2.4×10^2	5.3×10^3	-

IV การเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ ST10-1 ในรูปแห้ง โดยใช้อาหารแตกต่างกัน

ในการนำเชื้อไปใช้ในอุตสาหกรรม จำเป็นต้องทำให้อยู่ในรูปที่สะดวกใช้ที่สุด การเตรียมเชื้อในรูปแห้งเป็นวิธีที่สะดวกที่สุด ดังนั้นจึงเตรียมเชื้อในลักษณะแห้ง โดยใช้วิธี Lyophilization และทำการศึกษาริมาณเชื้อและเวลาในการเจริญ เพื่อให้ได้ปริมาณเชื้อตามต้องการ ดังแสดงในตารางที่ 2 พบว่า การเจริญของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS สูงสุดโดยผลิตเซลล์สูงกว่า การใช้นมมะพร้าว และกากน้ำตาลเป็น 2.7 และ 10 เท่า และการใช้นมมะพร้าวสามารถผลิตเซลล์ปริมาณสูงกว่ากากน้ำตาลเป็น 3.75 เท่า

อย่างไรก็ตามการใช้ MRS จำเป็นต้องลงทุนสูง ประกอบกับนมมะพร้าว และกากน้ำตาลมีศักยภาพในการเตรียมเชื้อได้ในระดับหนึ่ง จึงพิจารณาการนำของเหลือใช้เหล่านี้มาใช้ประโยชน์ จากผลการทดลองในหัวข้อที่ 3 พบว่า การใช้หัวเชื้อในระดับ 10^6 cfu/g ของวัตถุดิบ สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการหมักอย่างเห็นได้ชัด ดังนั้นจึงคำนวณสูตรในการใช้เชื้อแห้งดังนี้

ตารางที่ 2 แสดงปริมาณเชื้อ ST10-1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ

ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ	ปริมาณเซลล์ (CFU/ml)
1. MRS	3.25×10^9
2. นมมะพร้าว	1.3×10^9
3. กากน้ำตาล 1:10	3.2×10^8

สำหรับการหมัก 1 วัน

1. การเตรียมหัวเชื้อจากน้ำมะพร้าว

ชั่ง เชื้อแห้ง 2 กรัม ลงในน้ำมะพร้าว 1 ลิตร ที่ต้มฆ่าเชื้อแล้ว และทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิประมาณ 50 °C ก่อนการใส่เชื้อ จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 8 - 9 ชั่วโมง จะได้หัวเชื้อเพื่อใช้ในปริมาณ 10^6 cfu/g ของวัตถุดิบ ตามต้องการ

2. การเตรียมหัวเชื้อจากกากน้ำตาล

ชั่ง เชื้อแห้ง 8 กรัม ลงในกากน้ำตาลที่เจือจาง 1:10 ปริมาณ 4 ลิตร ที่ต้มฆ่าเชื้อแล้ว และทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิประมาณ 50 °C ก่อนการใส่เชื้อ จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 8 - 9 ชั่วโมง จะได้หัวเชื้อเพื่อใช้ในปริมาณ 10^6 cfu/g ของวัตถุดิบ ตามต้องการ

V การศึกษาการหมักไซเลจในระดับ 20 กก. โดยใช้เชื้อแห้ง

เพื่อทำการทดสอบเปรียบเทียบการหมักไซเลจ ในลักษณะการใส่หัวเชื้อและไม่ใส่หัวเชื้อในระดับใหญ่ขึ้นขนาด 20 กก. โดยทำการศึกษาคูณภาพของไซเลจในด้านเคมี และจุลชีววิทยา

5.1 ค่า pH

จากการศึกษาค่า pH ของวัตถุดิบที่ได้ พบว่ามีการหมักในระหว่างการเคลื่อนย้าย ส่งผลให้ค่าพีเอชลดลงอยู่ในช่วงประมาณ 3.9 และกลิ่นที่แสดงเหมือนอาหารบูด อย่างไรก็ตามเมื่อทำการหมักโดยทำการเปรียบเทียบในสภาวะทั้ง 4 ดังแสดงในหัวข้ออุปกรณ์และวิธีการ 5.2.2 พบว่าค่าพีเอชหลังจากการหมัก 14 วัน ส่งผลให้ค่าพีเอชลดลงอยู่ในช่วง 3.71 - 3.78 ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงค่าพีเอช ของไซเลจที่ได้จากการหมักในสภาวะต่างๆ เมื่อทำการหมัก 14 วัน

สภาวะในการทดลอง	ค่าพีเอช
1. Control	3.78
2. I	3.71
3. M	3.78
4. I + M	3.72

5.2 ปริมาณกรดที่ผลิตได้

วัตถุดิบเปลือก และโยมะพร้าวที่ได้มาจากการหมักมาก่อนในระหว่างการขนส่งจากกำแพงแสนมายังบางเขน ส่งผลให้ระดับพีเอชลดลงเป็น 3.9 และเมื่อเก็บวัตถุดิบในลักษณะกองสุ่มไว้ในลานกว้าง พบว่าระดับพีเอชลดลงเป็น 3.5 ดังแสดงในรูปที่ 6 เมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณกรด พบเฉพาะกรดอะซิติกสูงถึง 0.6 - 1.4% (โดยน้ำหนักแห้ง) แต่ไม่พบกรดแลคติก อย่างไรก็ตามเมื่อทำการหมักในถุงพลาสติก พบว่าหลังการหมัก 14 วัน ทุกสภาวะแสดง ระดับพีเอชเป็น 3.71 - 3.78 และไม่พบการผลิตกรดบิวไทริก อย่างไรก็ตามในสภาวะต่างๆแสดง การผลิตกรดแลคติก กรดอะซิติก และกรดโพรไพโอนิกแตกต่างกันไป โดยการหมักในสภาวะใส่หัวเชื้อร่วม แสดงระดับกรดแลคติกสูงสุดเป็น 2.3% (โดยน้ำหนักแห้ง) และกรดอะซิติก 0.9% (โดยน้ำหนักแห้ง)

5.3 การศึกษาทางจุลชีววิทยา

จากการศึกษาเชื้อในไซเลจ โดยทำการศึกษาเชื้อกลุ่ม Homofermentative Lactic acid bacteria (HO), Heterofermentative Lactic acid bacteria (HE), Enterobacteria (E), Yeast mould (YM), และ Clostridium (C) ดังแสดงในตารางที่ 4 พบว่า การใส่หัวเชื้อร่วมกับกากน้ำตาลส่งผลให้เชื้อในกลุ่ม HO ซึ่งเป็นกลุ่มที่ผลิตกรดแลคติก แสดงปริมาณสูงถึง 10^5 cfu/กรัมไซเลจ ขณะที่ลักษณะชุดควบคุม การใส่หัวเชื้ออย่างเดียว และการใส่กากน้ำตาลอย่างเดียว แสดงค่าอยู่ในช่วง $10^3 - 10^4$ cfu/กรัมไซเลจ สำหรับปริมาณเชื้อในกลุ่ม HE ค่อนข้างต่ำ รวมทั้งไม่พบ Clostridium ในทุกการทดลอง เมื่อพิจารณาเชื้อในกลุ่ม E และ YM พบว่าในสภาวะ การใส่หัวเชื้อ ช่วยควบคุมระดับเชื้อในกลุ่มนี้ต่ำกว่าทุกสภาวะการทดลอง ประมาณ 2 - 100 เท่า นอกจากนั้นยังสังเกตพบว่า มีเชื้อราขึ้นบริเวณผิวบนของโยมะพร้าว เมื่อเปิดถุงทดสอบในสภาวะควบคุม การใส่กากน้ำตาลอย่างเดียว และการใส่หัวเชื้ออย่างเดียว แต่ไม่พบในลักษณะการใช้กากน้ำตาลร่วมกับหัวเชื้อ

ตารางที่ 4 แสดงปริมาณเชื้อในกลุ่มต่างๆของไซเลจที่ได้จากการหมักในสภาวะต่างๆ เมื่อทำการหมัก 14 วัน HO, Homofermentative Lactic acid bacteria; HE, Heterofermentative Lactic acid bacteria; E, Enterobacteria; YM, Yeast mould; C, Clostridium.

สภาวะในการทดลอง	ปริมาณเชื้อ (cfu/g ของไซเลจ)				
	HO	HE	E	YM	C
1. Control	4×10^4	< 10	1.5×10^2	2×10^3	—
2. I	8.8×10^4	< 10	< 10	3×10^3	—
3. M	1.3×10^3	< 10	20	5.3×10^3	—
4. I+M	1.5×10^5	< 10	< 10	70	—

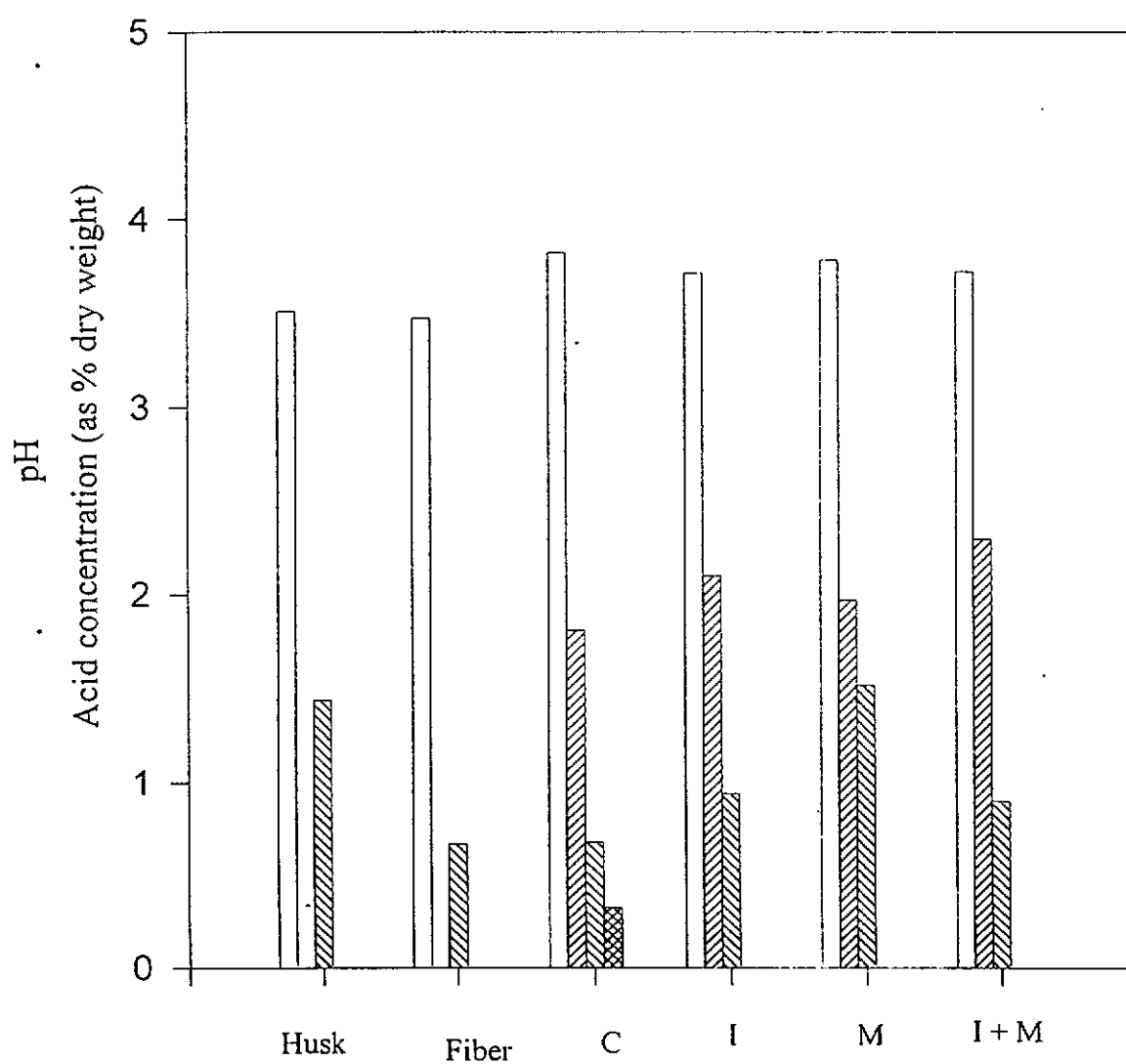


Fig. 6 shown pH and acid contents from husk and fiber coconut in both aspects of before and after 14 days fermentation under condition C, control; I, with inoculum ST10-1;

M, with molass, and I +M, with both inoculum and molass. pH 

Lactic acid  Acetic acid  Propionic acid 

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาความสามารถในการผลิตกรดแลคติกในระหว่างการหมักไซเลจจากเปลือกมะพร้าว ของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก 18 ไอโซเลตที่แสดงประสิทธิภาพสูงในการเจริญภายใต้สภาวะอุณหภูมิสูง พีเอชกว้าง และมีไม่มีอากาศ รวมทั้งการผลิตกรดแลคติกสูง พบว่าไอโซเลต KUB-ST10-1 สามารถผลิตกรดแลคติกสูงสุดในสภาวะการใช้เปลือกมะพร้าวเป็นวัตถุดิบ เมื่อศึกษาการเจริญของเชื้อพบว่า สามารถเจริญอย่างรวดเร็วทั้งในสภาวะการใช้ MRS น้ำมะพร้าว และ 1:10 กากน้ำตาลเป็นแหล่งอาหาร โดยการเจริญเข้าสู่ช่วง late log phase ภายใน 8 – 9 ชั่วโมง ด้วยปริมาณเชื้อแตกต่างกันเป็น 2.7×10^9 , 1.6×10^9 และ 7×10^8 โคโลนีต่อกรัมไซเลจ ในการศึกษาปริมาณหัวเชื้อที่เหมาะสม พบว่า ระดับความเข้มข้น 10^5 โคโลนีต่อกรัมไซเลจ แสดงความสามารถในการผลิตกรดแลคติกสูงสุดเป็น 2.1% จากไซเลจอายุ 10 วัน นอกจากนั้นจากการศึกษาทางจุลชีววิทยายังพบว่า ปริมาณของแบคทีเรียในกลุ่ม HO สูงถึง 10^9 โคโลนีต่อกรัมไซเลจ ในขณะที่เชื้อปนเปื้อนอื่นๆ HE, E, YM และ C พบในปริมาณต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะอื่นๆ เมื่อทดสอบการหมักไซเลจในระดับ 20 กิโลกรัม โดยใช้หัวเชื้อแห้งที่เตรียมโดยวิธี lyophilization พบว่าระดับพีเอชจากการทดลองในชุดควบคุม การใช้กากน้ำตาลอย่างเดียว หัวเชื้ออย่างเดียว และหัวเชื้อผสมกับกากน้ำตาล ใกล้เคียงกันในช่วง 3.71 – 3.78 แต่เมื่อศึกษาปริมาณกรดแลคติกที่ผลิตได้ และปริมาณจุลินทรีย์ชนิด HO พบว่าการใช้หัวเชื้อร่วมกับกากน้ำตาลให้ค่าสูงสุดเป็น 2.3% และ 1.5×10^5 โคโลนีต่อกรัมไซเลจตามลำดับ นอกจากนั้นยังพบว่าเชื้อปนเปื้อนในกลุ่ม HE, E และ YM ต่ำกว่าทุกการทดลองด้วย

เอกสารอ้างอิง

- Bolsen, K.K., Lin, C. and Brent, B.E. 1992. Effect of silage additives on the microbial succession and fermentation process of alfalfa and corn silages. *J. Dairy Sci.* 75, 3066 – 3083.
- Chen, J., Strokes, M. R. and Wallace, C.R. 1994. Effect of enzyme-inoculant systems on preservation and nutritive value of haycrop and corn silages. *J. Dairy Sci.* 77, 501- 512.
- McDonald, P., Henderson, N. and Heron, S. 1991. *The biochemistry of silage*. Chalcombe publications, Aberystwyth. 340p.
- Muck, R.E. 1991. Silage fermentation, pp. 171-204. In J.G. Zeikus and E.A. Johnson (eds.). *Mixed cultures in Biotechnology*. McGraw-Hill, New York.
- Strokes, M. R. 1992. Effect of enzyme and bacteria treatments on the fermentation and composition of corn stover silage. *J. Anim. Sci.* 70(suppl.1), 191.

สัญญาเลขที่ RDG5/0020/2542

โครงการ “การใช้ประโยชน์มะพร้าวอ่อนเหลือทิ้งจากการผลิตน้ำมะพร้าวกระป๋อง”

โครงการย่อย “การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่เหมาะสมสำหรับการหมักไซเลจจากเปลือกมะพร้าวอ่อน”

สรุปรายงานฉบับสมบูรณ์

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 สิงหาคม 2542 ถึงวันที่ 31 มกราคม 2543

ชื่อหัวหน้าโครงการ : ผศ. ดร. สุนีย์ นิธิสินประเสริฐ

หน่วยงาน : ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วัตถุประสงค์ของโครงการ

- 1) การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก (ลอบ.) ที่เหมาะสม สำหรับการหมักไซเลจเปลือกมะพร้าว
- 2) การศึกษาการเตรียมหัวเชื้อ
- 3) การทดสอบการหมักในระดับ Lab scale

รายละเอียดผลการดำเนินงานของโครงการตามแผนงานโดยสรุป

กิจกรรม (ตามแผน)	ผลที่คาดว่าจะได้รับ (ตามแผน)	ผลการดำเนินงาน	หมายเหตุ
1. คัดเลือกเชื้อ ลอบ. จากเชื้อที่แสดงคุณสมบัติดีในการหมักไซเลจมะพร้าวอ่อน	ได้เชื้อที่เหมาะสมในการหมัก	เป็นไปตามวัตถุประสงค์ในข้อที่ 1 เกี่ยวกับการคัดเลือกเชื้อ	
2. การศึกษาการเตรียมหัวเชื้อ	ทราบอายุ และปริมาณเชื้อที่เหมาะสม	เป็นไปตามวัตถุประสงค์ในข้อที่ 2 เกี่ยวกับการเตรียมหัวเชื้อ	มีอุปสรรคจากเครื่องวิเคราะห์ HPLC และไม่สามารถดำเนินการตามเวลาที่วางไว้ จึงจำเป็นต้องยืมเครื่องจากหน่วยงานอื่น และจ้างเจ้าหน้าที่เพิ่มเติม
3. การทดสอบการหมักในถุงบรรจุขนาด 20 กก.	ทราบคุณภาพของไซเลจที่ได้จากการหมักแบบใส่และไม่ใส่หัวเชื้อ	เป็นไปตามวัตถุประสงค์ในข้อที่ 3 เกี่ยวกับการหมักไซเลจในระดับ Lab scale	มีปัญหาในการเตรียมโดยใช้เชื้อสดเพื่อใช้กับโครงการย่อยที่ 3 ดังนั้นจึงเพิ่มการศึกษาการ

			เตรียมหัวเชื้อ โดยใช้เชื้อ แห้งในลักษณะ Lyophilization
4. จัดทำรายงานการวิจัย	นำเสนอรายงาน	งานทั้งหมดเป็นไปตาม แผน และมีการเพิ่มหัวข้อ ในการศึกษาเบื้องต้นเกี่ยว กับการเตรียมเชื้อใน ลักษณะแห้ง	เนื่องจากมีการเพิ่มหัวข้อ ในการศึกษา และปัญหา ด้านเครื่องมือ ทำให้งานช้า กว่าที่กำหนดโดยเปลี่ยน จาก 4 เดือน เป็น 6 เดือน

ข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะอื่นๆ ต่อสกว.

ไม่มี

ลงนาม

(หัวหน้าโครงการ)

วันที่