รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติคเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อราในไซเลจ

โดย รศ. ดร. สุนีย์ นิธิสินประเสริฐ

กุมภาพันธ์ 2546

สัญญาเลขที่ RDG4550015

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ
การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติคเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อราในไซเลจ

รศ. ดร. สุนีย์ นิธิสินประเสริฐ
ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

Executive Summary

Problem on fungal contamination after silage exposing to the air has been the big problem due to undesirable appearance and flavour to farmer and cows. The purposes of this project were the isolation of Lactic acid bacteria (LAB) producing antimicrobial substances and its effect against fungi contaminating in corn silage. The effective LAB isolate LS-2.19 was screened from 340 LAB isolates according to growth delay, growth inhibition and spore formation of two fungi with green spore (FG) and yellow spore (FY) existing in corn silage. Cell free culture fluid (CFC) at 48 h of LS-2.19 inhibited spore formation of both FG and FY at the concentration level up to 10^5 and 10^6 colonies/ml respectively. However, CFC adjusted to pH 6 inhibited the growth of FY at the condition of 10^5 spores per ml added while no inhibition to FG. Lactic acid, acetic acid and other compounds were play a role in inhibitory against these two fungi. Use of LAB in the form of CFC and starter for fermentation showed that silage-making with LAB starter of 10^6 colonies/ml exhibited no fungal apperance with higher lactic acid of 1.5 – 2.4 times and LAB of 0.2 – 0.6 log. Large scale corm silage-making with and without LAB used as an inoculum were performed. Lactic acid contents of 1.47 – 2.14% (of dry weight) from silage with LAB starter were detected while the one from silage without LAB (control) was not detected. However when both conditions exposed to the air, the contents of lactic acid was reduced and higher acetic acid contents appeared.

บทคัดย่อ

ได้ทำการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติค (LAB) จำนวน 340 ไอโซเลต พบไอโซเลต LS2-19 ผลิตน้ำเลี้ยงเชื้อ (CFC) อายุ 48 ชั่วโมง ยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อราสปอร์เขียวสูงถึง 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร และยับยั้งการเจริญของเชื้อราสปอร์เหลือง ที่ระดับปริมาณสปอร์ที่ใส่ลงไปสูงถึง 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร อย่างไรก็ตามเมื่อปรับค่าพีเอชของสาร CFC เป็น 6 พบว่าความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสปอร์เหลือง ที่ระดับปริมาณสปอร์ที่ใส่ลดลงเป็น 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ขณะที่ไม่มีผลต่อการยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อราสปอร์เขียว กิจกรรมการยับยั้งในน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซล เป็นผลจากสารประกอบจำพวกกรดอินทรีย์ ได้แก่กรดแลคติค กรดอะเซติค และสารประกอบอื่นที่ไม่ใช่กรด จากการศึกษาการใช้เชื้อ LAB ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ในรูปน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซล และในรูปการหมักด้วยเชื้อโดยใช้เป็นเชื้อเริ่มต้น พบว่าในลักษณะการหมักสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสปอร์เหลืองอย่างเห็นได้ชัด แสดงปริมาณ LAB รวมและกรดอินทรีย์สูงกว่าชุดควบคุม ประมาณ 0.2 – 0.6 log และ ในช่วง 1.5 – 2.4 เท่า ตามลำดับ ในการทดสอบการหมักภาคสนาม พบว่า ปริมาณกรดแลคติค จากการหมักโดยการใช้เชื้อ LAB อยู่ในช่วง 1.47 – 2.14% (ของน้ำหนักแห้ง) ขณะที่ชุดควบคุมไม่พบการผลิตกรดแลคติค อย่างไรก็ตามเมื่อเปิดถุงสัมผัสกับอากาศ พบว่า ปริมาณกรดแลคติคลดลง และปริมาณกรดอะเซติคของไซเลจทั้งสองสภาวะเพิ่มขึ้น

Abstract

Lactic acid bacteria (LAB) LS-2.19 was screened from 340 LAB isolates according to growth delay and inhibition of growth and spore formation of two fungi with green spore (FG) and yellow spore (FY) existing in corn silage. Cell free culture fluid (CFC) at 48 h of LS-2.19 inhibited spore formation of both FG and FY at the concentration level up to 10^5 and 10^6 colonies/ml respectively. However, CFC adjusted to pH 6 inhibited the growth of FY of 10^5 spores per ml while no inhibition to FG. Lactic acid, acetic acid and other compounds played a role in inhibitory against these two fungi. Use of LAB in the form of CFC and starter for fermentation showed that silage-making with LAB starter of 10^6 colonies/ml exhibited no fungal apperance with higher lactic acid of 1.5 – 2.4 times and LAB of approximately 0.2 – 0.6 log. Large scale corm silage-making with and without LAB used as an inoculum were performed. Lactic acid contents of 1.47 – 2.14% (of dry weight) from silage with LAB starter were detected while the one from silage without LAB (control) was not detected. However when both conditions exposed to the air, the contents of lactic acid was reduced and higher acetic acid contents appeared.

คำนำ

ในการเลี้ยงโคนมเพื่อให้ได้ผลผลิตสูง ทั้งในรูปของคุณภาพและปริมาณนั้น มีปัจจัยต่างๆเข้ามาเกี่ยวข้อง ได้แก่ พันธุ์ดี อาหารดี การจัดการดี สุขภาพดี และลักษณะนิสัยของคนเลี้ยง ในบรรดาปัจจัยทั้งหมดพบว่าต้นทุนในการเลี้ยงมาจากอาหารสัตว์สูงมากกว่าร้อยละ 70 ดังนั้นการที่ผู้เลี้ยงจะได้กำไรหรือขาดทุน ขึ้นอยู่กับการจัดการในด้านอาหาร (ปราโมทย์ 2544) โดยที่ความต้องการอาหารหยาบสูงถึงร้อยละ 85 ในรูปของหญ้า วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร เช่น ต้นข้าวโพด เปลือกและซังข้าวโพด ยอดอ้อย เป็นต้น ในแต่ละปีพบว่าเกษตรกรมีพืชอาหารหยาบใช้ไม่เพียงพอในช่วงฤดูแล้ง ตั้งแต่เดือนมกราคม – พฤษภาคม ส่งผลต่อปริมาณ และคุณภาพของน้ำนมดิบที่ได้

สหกรณ์โคนมบ้านบึง มีสมาชิกรวมทั้งสิ้น 140 ราย มีโคนมในความดูแลสูงถึง 3,000 ตัว โคที่อยู่ในระยะรีดนมประมาณ 800 – 900 ตัว ซึ่งสามารถให้ผลผลิตน้ำนมดิบเป็น 12 ตันต่อวันโดยเฉลี่ย ดังนั้นเพื่อให้สมาชิกของสหกรณ์มีอาหารหยาบสำหรับการเลี้ยงโคนมตลอดทั้งปี สหกรณ์จึงวางแผนการผลิตไซเลจข้าวโพดในเชิงพาณิชย์ โดยสหกรณ์รับซื้อต้นข้าวโพดพร้อมฝัก จากสหกรณ์ที่รับจ้างปลูกข้าวโพดปีละ 2 ครั้ง เพื่อทำไซเลจในไซโลขนาด 500ตัน จำนวน 2 ไซโล เมื่อได้ไซเลจตามคุณภาพที่ต้องการ จากนั้นทำการขายโดยการแบ่งใส่ถุงๆละ 30 กก. ทั้งในรูปไซเลจ และ TMR (Total mixed ration) หรืออาหารครบส่วน

ในอดีตสหกรณ์โคนมบ้านบึง ได้มีการทำไซเลตในลักษณะแบบขุดหลุมปูนซิเมน (Trend) จากนั้นนำมาบรรจุใหม่ในถุงพลาสติกเพื่อส่งออกจำหน่ายให้กับสมาชิก ปัญหาที่เกิดขึ้นคือการปนเปื้อนของเชื้อราในส่วนของผิวหน้า และเสียในที่สุด การนำมาบรรจุใหม่ ทำให้เกิดปัญหาการสัมผัสกับอากาศภายนอก ส่งผลต่อการเสียของไซเลจสูงถึง 30% (Honig 1975) ส่งผลต่อลักษณะที่ไม่ปรารถนาหลายประการ ได้แก่ ประการแรกการสูญเสียของน้ำหนักแห้ง เนื่องจากการใช้ของจุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศ ประการที่สองเป็นผลทำให้เกิดความร้อนสูง ทำให้เกิดไซเลจที่มีสีน้ำตาลไม่น่ากิน เนื่องจากปฏิกริยา browning หรือ Maillard reaction และประการสุดท้ายทำให้เกิดจุลินทรีย์ที่เป็นอันตรายต่อสัตว์ (Ruxton & Gibson, 1993) ปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นเหล่านี้เนื่องจาก การสูญเสียปริมาณกรดที่ได้จากการหมัก (fermentation acids) และปริมาณน้ำตาล พร้อมกับการเพิ่มขึ้นของค่าความเป็นกรดด่าง ทำให้จุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะเป็นกลาง และมีออกซิเจน เจริญอย่างรวดเร็ว ผลที่ตามมาคือน้ำหนักแห้งลดลง และอุณหภูมิสูงขึ้นตามที่ได้กล่าวข้างต้น (Woolford, 1985)

กระบวนการเมตาบอลิซึมในลักษณะแบบมีอากาศ เกิดขึ้นเนื่องจากการเจริญของจุลินทรีย์ ทั้งที่ต้องการและไม่ต้องการอากาศ Dutkiewicz และคณะ (1989) ได้ศึกษาปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ ที่ปนเปื้อนในไซเลจข้าวโพดที่สัมผัสกับอากาศ พบเชื้อราและแบคทีเรีย ในปริมาณสูงถึง 10^9 cfu/m^3 เชื้อราที่พบในปริมาณสูงจัดเป็น *Aspergillus fumigatus* ขณะที่แบคทีเรียจะเป็นกลุ่มจีนัส *Bacillus* นอกจากนั้นยังมีการพบยีสต์ ในไซเลจชนิดต่างๆอีกด้วย Woolford, 1985 พบว่าในเวลา2 – 3 วัน ปริมาณของยีสต์สูงขึ้นถึง 10^9 – 10^{12} cfu/g ของไซเลจแห้ง ขณะที่แบคทีเรียประมาณ 10^9 cfu/g ของไซเลจแห้ง ยีสต์ในปริมาณ 10^5

cfu/g ของไซเลจแห้งสูงเพียงพอ ที่สามารถทำให้เกิดการเน่าเสียในไซเลจได้ (Henderson, 1993) อย่างไรก็ตามในการเจริญของเชื้อราเหล่านี้ พบว่านอกจากทำให้เกิดการเน่าเสียแล้ว ยังพบว่าสามารถผลิตสาร mycotoxin อีกด้วย Ohmomo และคณะ (1994) ได้ศึกษา mycotoxin ที่ปนเปื้อนในไซเลจข้าวโพด พบว่าเป็นสารจำพวก roquefortine ซึ่งผลิตโดยเชื้อรา *Penicillium roqueforti*

สารประกอบที่มีบทบาทสำคัญในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ได้แก่กรดอินทรีย์ เช่น กรดอะเซติค กรดบิไทริค กรดโพรไพโอนิค กรดแคโพรอิค และกรดฟอร์มิค เป็นต้น (Corsetti *et al.*, 1998; Henderson, 1993) Setala และคณะ (1990) พบว่าการใช้สารประกอบ calcium formate หรือ sodium formate ร่วมกับการใช้หัวเชื้อ Lactic acid bacteria (LAB) สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งการเน่าเสียของไซเลจได้ Batis และคณะ (1997) ได้รวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับเชื้อ LAB ในการยับยั้งเชื้อราที่ปนเปื้อนในชีส พบว่าเชื้อ *L. plantarum* สามารถผลิตสารยับยั้งเชื้อรา *A. glaucus, P. glaucum* และ *Cladosporium herbareum* แต่ไม่แสดงผลในการยับยั้งการเจริญของ *Mucor plumbeus, M. racemosus, P. roqueforti* และ *Oospora lactis* ขณะที่ *L. helveticus* สามารถแสดงการยับยั้งเชื้อรา *P. roqueforti, P. glaucum* และ *M. plumbeus* นอกจากการยับยั้งเชื้อราชนิดต่างๆแล้ว ยังพบว่าเชื้อ LAB ยังแสดงความสามารถในการยับยั้งเชื้อยีสต์ได้ด้วย Driehuis และคณะ (1997) พบว่าเชื้อ LAB *L. buchneri* ซึ่งจัดเป็น heterofermentative lactic acid bacteria ซึ่งแยกได้จากไซเลจข้าวโพด แสดงความสามารถในการยับยั้งเชื้อยีสต์ที่ปนเปื้อนในไซเลจนั้น ดังนั้นจะเห็นว่าสารประกอบมี่ผลิตขึ้นโดยเชื้อ ลอบ แสดงคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อราได้ชัดเจน โดยเชื้อ ลอบ แต่ละสายพันธุ์มีความจำเพาะต่อเชื้อราแต่ละชนิดแตกต่างกันไป

นอกจากกรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ ยังพบว่าสารประกอบ siderophore และ reuterin แสดงความสามารถในการยับยั้งเชื้อราได้ด้วย Laine และคณะ (1996) ได้แยกสารตัวนี้จากเชื้อ *Pseudomonas* สารประกอบ siderophore สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. culmorum, F. oxysporum* และ *Aspergillus niger* นอกจากนั้นยังมีผลต่อแบคทีเรียบางชนิดเช่น *Salmonella typhimurium, Staphylococcus aureus* ซึ่งเป็นเชื้อที่ทำให้เกิดโรคด้วย ขณะที่สารประกอบ reuterin ซึ่งผลิตโดย *L. reuteri* สามารถยับยั้งเชื้อต่างๆได้หลายชนิดรวมทั้งเชื้อราด้วย (Florianiwicz, 2001)

ในการศึกษาการยับยั้งเชื้อราที่พบว่าปนเปื้อนในระดับสูงในไซเลจ เมื่อสัมผัสกับอากาศ จำเป็นต้องมีการคัดเลือกเชื้อที่สามารถแสดงการยับยั้งเชื้อเป้าหมายคือ เชื้อราที่ปนเปื้อนในไซเลจข้าวโพดซึ่งเป็นเป้าหมายที่ต้องการศึกษา การคัดเลือกเชื้อสามารถทำในหลายวิธีได้แก่ Deferred method (Hoover and Harlander, 1993) วิธี spot on lawn หรือ simultaneous method (Hoover and Harlander, 1994) และ liquid method ได้แก่ well diffusion (Benoit *et al.*, 1997) และ paper disc method (Ohmomo *et al.*, 2000) เป็นต้น วิธีที่ให้ผลชัดเจน เป็นการศึกษาในวิธีสุดท้ายซึ่งได้จากการยับยั้งของสารละลายที่ปราศจากเซล ต่อเซลเป้าหมายโดยตรง

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อแยกเชื้อ LAB ที่สามารถผลิตสารยับยั้งเชื้อรา ซึ่งปนเปื้อนในไซเลจโดยเฉพาะบริเวณผิวหน้าที่สัมผัสกับอากาศ เพื่อลดการสูญเสียเมื่อมีการเปิดถุง และนำไซเลจไปใช้

อุปกรณ์และวิธีการ

1. แหล่งไซเลจ

ไซเลจข้าวโพดจากสหกรณ์โคนมบ้านบึง ใช้ในการแยกเชื้อรา ต้นข้าวโพดเป็นวัตถุดิบในการศึกษาในห้องปฏิบัติการได้จากภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เปลือกข้าวโพดเป็นวัตถุดิบที่ใช้ในการทดสอบทำไซเลจในภาคสนาม ได้จากสหกรณ์โคนมบ้านบึง

2. แหล่งของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติค (LAB)

เชื้อ LAB จำนวน 340 ไอโซเลต จากแหล่งเก็บเชื้อภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และ ศูนย์เก็บเชื้อ สวทช

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS (Difco) ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ LAB เพื่อคัดเลือกเชื้อที่แสดงการยับยั้งเชื้อราและเตรียมเชื้อในการทดสอบภาคสนาม อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (Merck) ใช้ในการแยกและเตรียมเชื้อรา อาหารเลี้ยงเชื้อ VRB, sulfite agar, PDA และ MRS ใช้ในการหาปริมาณเชื้อโคลิฟอร์ม Clostridia, yeast mold และ LAB ตามลำดับ

4. การเตรียมน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซล (Cell free culture fluid, CFC)

ถ่ายน้ำเลี้ยงเชื้อ 1% อายุ 18 ชั่วโมง ที่ 37° ซ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS จากทำการบ่มที่ 37° ซ เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ทำการแยกเซลออกจากน้ำเลี้ยงเชื้อ โดยการแยกเหวี่ยง10 นาที ที่ 4° ซ ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เก็บส่วนใส (CFC) เพื่อใช้ในการคัดเลือกเชื้อต่อไป

5. การเตรียมเชื้อรา

เตรียมเชื้อราอายุ 4 วัน บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ในลักษณะ slant จากนั้นใส่น้ำกลั่น 5 มล เพื่อทำให้เกิดสปอร์แขวนลอย ตรวจสอบปริมาณสปอร์โดยใช้เครื่อง Haemacytometer เพื่อใช้เป็นเชื้อเป้าหมายในการคัดเลือกเชื้อ LAB ต่อไป

6. การคัดเลือกเชื้อ LAB ในขั้นปฐมภูมิ

หยดสารละลาย CFC ที่ได้จากเชื้อ LAB แต่ละไอโซเลต ลงบนตำแหน่งที่กำหนดไว้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA 10 ไมโครลิตร ปล่อยให้แห้ง จากนั้นตามด้วยสารละลายเชื้อราที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมปริมาณ 5 ไมโครลิตรในตำแหน่งเดียวกัน ทุกจานอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีชุดควบคุม ซึ่งประกอบด้วยสารละลายเชื้อราเท่านั้น ทำการตรวจสอบการเจริญของเชื้อราแต่ละชนิดในเวลาที่เหมาะสม

7. การคัดเลือกเชื้อ LAB ในขั้นทุติยภูมิ

เจือจางสารละลายสปอร์แขวนลอยของเชื้อราอายุ 4 วัน ที่ความเข้มข้น 10^4 สปอร์ต่อ มล จากนั้นเตรียมสารผสมประกอบด้วย สารแขวนลอยสปอร์ 100 ไมโครลิตร และสารละลาย CFC จาก LAB ที่คัดเลือกได้ ปริมาณ 100 และ 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 และ 21 ชั่วโมง จากนั้นตรวจสอบปริมาณเชื้อราที่เหลือ ขนาดโคโลนีของเชื้อรา และการสร้างสปอร์ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ประกอบด้วย Tween80 0.05%

8. การศึกษาการเจริญของเชื้อ LAB ในอาหารเหลว MRS

เขี่ยเชื้อ 1 โคโลนี ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 5 มล. บ่มที่ 37°ซ บ่มเชื้อเป็นเวลา 8 ชั่วโมง จากนั้นเตรียมหัวเชื้อโดยการถ่ายสารละลายเชื้อ 5% ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 50 มล. ทำการเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อที่เวลา 0, 1, 2, 3, 5, 7, 9, 11 และ 14 ชั่วโมง ศึกษาปริมาณเชื้อบนอาหารแข็ง MRS ด้วยวิธี spread plate

9. การหมักไซเลจข้าวโพดในระดับห้องปฏิบัติการ

9.1 **ในกรณีศึกษาผลการยับยั้งโดยการหมักด้วยstarter LAB**

ทำการสับต้นข้าวโพดขนาดประมาณ 1 นิ้ว ความชื้นอยู่ในช่วง 84-85% จากนั้นชั่งต้นข้าวโพดสับ 25 กรัมใส่ในถุงพลาสติค ไนล่อน ขนาด 17.5 x 24 ซม. ใส่สารละลายสปอร์แขวนลอยที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ และเชื้อ LAB อายุ ประมาณ 8 ชม. 1 มล. ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน ปิดปากถุงด้วยเครื่องปิดผนึก นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 21 วัน หลังจากนั้นทำการเปิดถุงเพื่อให้สัมผัสกับอากาศเป็นเวลา 7 วัน นำไซเลจที่ได้ไปตรวจสอบค่า pH ปริมาณกรดแลคติค กรดอเซติค กรดโพรไพโอนิค และกรดบิวไทริค และตรวจสอบปริมาณ LAB เชื้อยีสต์รา โคลิฟอร์ม และคลอสตริเดียม

9.2 ในกรณีใส่น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซล (CFC) หลังการหมักในสภาพไม่ใส่เชื้อ LAB

ดำเนินการเช่นเดียวกับวิธีข้างต้น แต่ไม่ใส่เชื้อ LAB ในระหว่างการหมัก หลังจาก 21 วันทำการเปิดปากถุง จากนั้นพ่นด้วยสารละลาย CFC ที่ระดับต่างๆ ทำการเปิดถุงเพื่อให้สัมผัสกับอากาศเป็นเวลา 7 วัน นำไซเลจที่ได้ไปตรวจสอบค่า pH ปริมาณกรดแลคติค กรดอเซติค กรดโพรไพโอนิค และกรดบิวไทริค และตรวจสอบ ปริมาณ LAB เชื้อยีสต์รา โคลิฟอร์ม และคลอสตริเดียม

10. การหมักไซเลจในภาคสนาม

ทำการสับเปลือกและซังข้าวโพด ให้ได้ขนาดประมาณ 1 นิ้ว บรรจุใส่ถุง 500 กก ใส่น้ำเลี้ยงเชื้ออายุ 8 ชั่วโมง ปริมาณ 10^6 cfu/g ของวัตถุดิบ โดยใส่ในส่วนกลาง และส่วนบนของถุง จากนั้นปิดผนึกทำการบ่นกลางแจ้ง หลังจาก 21 วัน นำไซเลจที่ได้ไปตรวจสอบค่า pH ปริมาณกรดแลคติค กรดอเซติค

กรดโพรไพโอนิด และกรดบิวไทริค และตรวจสอบปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติค เชื้อราและยีสต์ เชื้อโคลิฟอร์ม และเชื้อคลอสตริเดียม

11. การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดอินทรีย์

โดยวิธี HPLC ตามวิธีของ Nitisinprasert (2000)

12. การหาปริมาณจุลินทรีย์

ทำการวิเคราะห์ปริมาณ LAB ยีสต์รา โคลิฟอร์ม และคลอสตริเดียม ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS, PDA, VRB และ Sulfite agar ตามลำดับ โดยใช้วิธี plate count ที่ค่าความเจือจางที่เหมาะสม

ผลการทดลอง

1. การแยกเชื้อรา

ได้ทำการแยกเชื้อรา จากไซเลจข้าวโพด ซึ่งนำมาจากถุงไซเลจหมักขนาด ประมาณ 500 กก. พบเชื้อราปนเปื้อน 2 สายพันธ์ ที่แสดงสปอร์สีเขียว และสีเหลือง ดังแสดงใน**รูปที่ 1 และ 2**

2. การศึกษาค่าการเจือจาง และระยะเวลาที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อรา

ในการคัดเลือก LAB ที่แสดงความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อตามวิธี Spot on lawn (Tsai & Kondo, 2001) ต้องใช้สารประกอบ CFC ปริมาณ 50 – 100 ไมโครลิตร ซึ่งในปริมาณดังกล่าวจำเป็นต้องใช้ paper disc ที่เหมาะสม จากการที่มีข้อจำกัดในการหาขนาดของ paper disc ที่เหมาะสมในประเทศ ดังนั้นจึงต้องมีการปรับเปลี่ยนวิธีการทดลอง โดยศึกษาผลการยับยั้งจากการเจริญของเชื้อในปริมาณต่ำ และเวลาบ่มที่เหมาะสม

ได้ทำการเจือจางเชื้อราที่เตรียมขึ้นดังแสดงในอุปกรณ์และวิธีการข้อ 5 ที่ระดับความเข้มข้น 2, 5, 10, 20, 25, 50 และ 100 เท่าของสารละลายสปอร์เริ่มต้น จากนั้นถ่ายเชื้อ 5 ไมโครลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และทำการบ่ม ที่ 10, 13, 15, 20, 25, 30 และ 40 ชั่วโมง ผลการทดลองดังแสดงใน**ตารางที่ 1** พบว่า เชื้อราสปอร์เหลืองสามารถเจริญ แสดงเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี 1 มม. ที่ค่าการเจือจาง 2 เท่า ใช้เวลาในการบ่ม 25 ชั่วโมง ขณะที่เชื้อราเขียว แสดงเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี 7 มม. ที่สภาวะเดียวกัน แสดงให้เห็นว่าเชื้อราสปอร์เหลือง เจริญช้ากว่าเชื้อราเขียว ในการคัดเลือกเชื้อ LAB จะสังเกตุการยับยั้งโดยดูจากการเจริญของเชื้อราในระยะเริ่มต้น ดังนั้นจึงใช้เกณฑ์การเจริญของเชื้อที่ขนาดโคโลนีต่ำสุดที่ 1 มม. ผลจากการทดลองจึงเลือกทำการเจือจางที่ 2 และ 5 เท่า บ่มที่ 25 และ 13 ชั่วโมง สำหรับเชื้อราสปอร์เหลือง และราเขียวตามลำดับ

3. การคัดเลือกเชื้อ LAB ในขั้นปฐมภูมิ

จากการศึกษาเชื้อ LAB 340 ไอโซเลต พบว่าเชื้อ 7 ไอโซเลตที่แสดงผลการยับยั้งต่อเชื้อราสปอร์เหลือง และเชื้อราเขียวแตกต่างกันไป ดังแสดงใน**ตารางที่ 2** โดยพบว่าค่าพีเอชของเชื้อทั้ง 7 ไอโซเลตเป็น 4.03, 4.33, 3.88, 4.11, 4.88, 368 และ 3.75 จากไอโซเลต BT100, BT218, BT219, BT220, L-12, LS2-19 และ M1-10 ตามลำดับ

4. การคัดเลือกเชื้อ LAB ในขั้นทุติยภูมิ

ได้ทำการศึกษาผลของสาร CFC จากเชื้อ LAB ทั้ง 7 ไอโซเลต ต่อการเจริญของเชื้อรา ที่อัตราส่วนของสาร CFC ต่อสารละลายสปอร์แขวนลอย 10^4 สปอร์ต่อมล เท่ากับ 1:1 และ 2:1 ผลการทดลองดังแสดงใน**ตารางที่ 3** พบว่า ในการทดสอบกับเชื้อราเขียว ทุกสภาวะทั้งในลักษณะใส่ และไม่ใส่สาร CFC แสดงจำนวนโคโลนี 10^6 สปอร์ต่อมล เมื่อพิจารณาขนาดของโคโลนีที่เกิดขึ้นและการสร้างสปอร์ พบว่า ที่อัตราส่วน 2:1 เชื้อ LAB ไอโซเลต LS2-19 แสดงขนาดโคโลนีต่ำสุดเพียง 1 มม ไม่แสดงการสร้างสปอร์ ขณะที่ ในสภาวะที่ไม่ใส่สาร (control) แสดงขนาดสูงถึง 12 มม และมีการสร้างสปอร์อย่างเห็นได้ชัด แสดงให้เห็นว่าสาร CFC จากไอโซเลต LS2-19 สามารถชลอการเจริญของเชื้อราได้

สำหรับผลการยับยั้งเชื้อราสปอร์เหลือง ดังแสดงใน**ตารางที่ 4** พบว่า ที่อัตราส่วน 2:1 เชื้อ LAB ไอโซเลต LS2-19 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ ขณะที่ในสภาวะควบคุม และผลจากไอโซเลตอื่น แสดงการสร้งสปอร์ และ mycelium อย่างเห็นได้ชัด ดังนั้นจึงเลือกไอโซเลต LS2-19 เพื่อศึกษาสารยับยั้ง และทดสอบในการหมักไซเลจต่อไป

5. การศึกษาชนิดของสารยับยั้ง

สารที่ผลิตโดย LAB ที่แสดงความสามารถในการยับยั้งเชื้อราได้ สามารถอยู่ในรูปของกรดอินทรีย์ ได้แก่ กรดโพรไพโอนิค กรดแลคติค และกรดอะเซเติค นอกจากนั้นยังมีสารปรกอบชนิดอื่นเช่น Siderophores และ reuterin เป็นต้น ซึ่งผลิตโดยเชื้อ *Pseudomonas* sp. และ *L. reuteri* (Helander, *et al.,* 1997; Laine, *et al.,* 1996) จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา และคุณสมบัติทางชีวเคมี ของ LS2-19 พบว่าแสดงรูปร่างกลม ไม่ผลิตแกส และเอนไซม์ catalase สามารถเจริญที่อุณหภูมิสูงถึง 55° ซ เห็นได้ว่าเชื้อดังกล่าวจัดอยู่ในจีนัส *Pediococcus* (Wood and Holzapfel, 1995) เห็นได้ว่าสารดังกล่าวไม่จัดอยู่ในกลุ่ม Siderophores และ reuterin ดังนั้นจึงได้ศึกษาชนิดของกรดที่ผลิตขึ้นจากน้ำเลี้ยงเชื้อ 18 ชม. พบว่าประกอบด้วยกรดแลคติด และกรดอะเซติค ปริมาณ 5.19 และ 2.61% (น้ำหนักต่อปริมาตร) แต่ไม่พบกรดโพรไพโอนิค และกรดบิวไทริค เมื่อศึกษาสภาวะพีเอชเป็น 6 เปรียบเทียบกับสาร CFC ก่อนปรับพีเอช พบว่า ในกรณีผลการยับยั้งต่อเชื้อราเขียว ดังแสดงใน**ตารางที่ 5** น้ำเลี้ยงเชื้อ 24 และ 48 ชม ที่พีเอช 3.93 และ 3.87 ตามลำดับ แสดงความสามารถในการยับยั้งการสร้างสปอร์ ที่ระดับปริมาณสปอร์ที่ 10^3 - 10^5

สปอร์ต่อมิลลิลิตร เมื่อปรับค่าพีเอชเป็น 6 ไม่มีผลต่อการยับยั้งการสร้างสปอร์อย่างเห็นได้ชัด แสดงให้กรดที่ผลิตขึ้นมีผลต่อความสามารถในการสร้างสปอร์

ในกรณีผลการยับยั้งต่อราสปอร์เหลือง ดังแสดงใน**ตารางที่ 6** พบว่าสาร CFC ที่ 24 และ 48 ชม. แสดงค่าพีเอช 3.93 และ 3.87 ตามลำดับ แสดงความสามารถในการยับยั้งเชื้อราที่ปริมาณสปอร์ 10^3 – 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร แต่เมื่อปรับระดับพีเอชเป็น 6 เห็นได้ว่าสาร CFC ที่ 48 ชม. สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ระดับปริมาณสปอร์ 10^3 – 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร แต่สามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ได้ถึง 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร แสดงให้เห็นว่าสารอื่นนอกจากกรดมีผลต่อการยับยั้งการจริญของเชื้อรา

6. การศึกษาการเจริญของเชื้อ LAB LS2-19

ผลการทดลองดังแสดงใน**ภาพที่ 3** พบว่าเชื้อเจริญเข้าสู่ช่วง late log phase 8 ชั่วโมง ด้วยปริมาณ 10^9 cfu/ml

7. ผลของเชื้อราต่อการหมักไซเลจ

7.1 ผลของเชื้อราเขียวต่อการหมักไซเลจ

ได้มีการศึกษาปริมาณเชื้อรา ที่ปนเปื้อนในไซเลจข้าวโพดในประเทศไทย พบเชื้อราปนเปื้อนในระดับที่ไม่สูงกว่า 10^4 โคโลนีต่อกรัมของไซเลจ (สุนีย์ นิธิสินประเสริฐ 2543) ดังนั้นศึกษาเพิ่มปริมาณเชื้อรา ในต้นข้าวโพดธรรมชาติที่ระดับเชื้อ 10^2, 10^3 และ 10^4 โคโลนีต่อกรัม พบว่า การใส่เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติค แสดงระดับพีเอชเป็น 3.4 – 3.6 ซึ่งใกล้เคียงกับชุดควบคุม (3.6-3.7) ดังแสดงใน**ภาพที่ 4** เมื่อศึกษาปริมาณกรดอินทรีย์ พบว่าปริมาณกรดแลคติคในชุดใส่เชื้อสูงกว่าชุดควบคุมเป็น 1.4 เท่า ที่ระดับปริมาณเชื้อราใส่เพิ่ม 10^4 โคโลนีต่อกรัม ขณะที่ปริมาณเชื้อราที่ 10^2 และ10^3โคโลนีต่อกรัม แสดงปริมาณกรดแลคติคใกล้เคียงกัน ในทุกการทดลองไม่พบกรดอะเซติค กรดโพรไพโอนิค และกรดบิวไทริค ที่ระดับต่ำกว่า 0.01%

ทุกสภาวะไม่พบการเจริญของเชื้อราที่ระดับ < 10 โคโลนีต่อกรัมไซเลจ แต่พบเชื้อยีสต์ในช่วงประมาณ 10^5 – 10^6 โคโลนีต่อกรัมไซเลจ อย่างไรก็ตามพบว่าปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติคจากไซเลจชุดใส่เชื้อสูงกว่าชุดควบคุมประมาณ 0.2 - 0.6 log cycle ดังแสดงใน**ตารางที่ 7** ในขณะที่ตรวจไม่พบเชื้อกลุ่มโคลิฟอร์ม และกลุ่มคลอสตริเดียมที่ระดับ < 10 โคโลนีต่อกรัมไซเลจ

หลังจากการหมักครบ 21 วัน ได้ทำการเปิดถุงและบ่มต่อเป็นเวลา 7 วัน ผลการทดลองไม่พบการเจริญของเชื้อราในชุดที่ใส่เชื้อ LAB แต่พบการเจริญของเชื้อราเป็นหย่อมในชุดควบคุม

7.2 ผลของเชื้อราสปอร์เหลืองต่อการหมักไซเลจ

จากการศึกษาเพิ่มปริมาณเชื้อราสปอร์เหลือง ในต้นข้าวโพดธรรมชาติที่ระดับเชื้อรา 10^2, 10^3 และ 10^4 โคโลนีต่อกรัม พบว่า การใส่เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติค ส่งผลให้ระดับพีเอชต่ำกว่าชุดควบคุม เป็น 3.8 – 4 ดังแสดงใน**ภาพที่ 5** ขณะที่ชุดควบคุมแสดงในระดับประมาณ 4.3 ในทุกระดับของปริมาณเชื้อราที่ใส่เพิ่ม

เมื่อศึกษาปริมาณกรดอินทรีย์ พบว่าปริมาณกรดแลคติคในชุดใส่เชื้อสูงกว่าชุดควบคุมเป็น 2.4, 2.1 และ 1.5 เท่า ที่ระดับปริมาณเชื้อราใส่เพิ่ม 10^2, 10^3 และ 10^4 โคโลนีต่อกรัมตามลำดับ ในทุกการทดลองไม่พบกรดอะเซติค กรดโพรไพโอนิค และกรดบิวไทริค ที่ระดับต่ำกว่า 0.01%

ทุกสภาวะไม่พบการเจริญของเชื้อราที่ระดับ < 10 โคโลนีต่อกรัมไซเลจ ดังแสดงใน**ตารางที่ 8** แต่พบเชื้อยีสต์ในช่วงประมาณ 10^5 – 10^6 โคโลนีต่อกรัมไซเลจ อย่างไรก็ตามพบว่าปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติคจากไซเลจชุดใส่เชื้อสูงกว่าชุดควบคุม 0.25 – 0.39 log ในขณะที่ตรวจไม่พบเชื้อกลุ่มโคลิฟอร์ม และกลุ่มคลอสตริเดียมที่ระดับ < 10 โคโลนีต่อกรัมไซเลจ

หลังจากการหมักครบ 21 วัน ได้ทำการเปิดถุงและบ่มต่อเป็นเวลา 7 วัน ผลการทดลองไม่พบการเจริญของเชื้อราในชุดที่ใส่เชื้อ LAB แต่พบการเจริญของเชื้อราเป็นหย่อมในชุดควบคุม

8. ผลการพ่นน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซล (CFC) ที่ 48 ชั่วโมง ต่อเชื้อราในไซเลจ

จากปัญหาของฟาร์มในด้านการปนเปื้อนของเชื้อรา เมื่อมีการสัมผัสกับอากาศระหว่างการถ่ายบรรจุโดยทางสหกรณ์แก้ปัญหาด้วยการฉีดพ่นกรดน้ำส้ม ซึ่งส่งผลต่อกลิ่นรสที่ไม่พึงปรารถนาของวัว ดังนั้นจึงศึกษาการใช้สารละลาย CFC ฉีดพ่นบริเวณที่สัมผัสกับอากาศ ทำการทดสอบต่อเชื้อราทั้ง 2 ชนิด โดยพ่นสารประกอบ CFC ในปริมาณ 0, 0.5, 1 และ 2 มล บนผิวของไซเลจที่ใส่เชื้อรา ปริมาณ 10^2, 10^3 และ 10^4 โคโลนีต่อกรัม จากนั้นบ่มในลักษณะมีอากาศ พบว่าหลังการหมักเพียง 7 วัน พบเชื้อราขึ้นในส่วนต่างๆของไซเลจ ทั้งสภาวะควบคุม และใส่สาร CFC ระดับต่างๆ เห็นได้ว่าโดยวิธีนี้ เป็นไปได้ว่าการกระจายของสาร CFC ไม่สม่ำเสมอ ส่งผลต่อการยับยั้งการเจริญหรือการสร้างสปอร์ของเชื้อ

9. ผลการหมักไซเลจในสภาวะใส่เชื้อเปรียบเทียบกับสภาวะไม่ใส่เชื้อ

ได้ทำการทดสอบการใช้เชื้อ LAB ในภาคสนาม ด้วยปริมาณ 10^6 โคโลนีต่อกรัมของวัตถุดิบ จากปัญหาที่สหกรณ์ไม่สามารถจัดหาต้นข้าวโพดสำหรับการทดลอง ดังนั้นจึงได้ทดลองกับเปลือกข้าวโพดจากโรงงานซึ่งสามารถหาได้ในขณะนั้น โดยทำการหมัก ประมาณ 300 – 500 กก ต่อถุงดังแสดงใน**ภาพที่ 6** แบ่งเป็นชุดควบคุม 2 ถุง และใส่เชื้อ LAB 3 ถุง ผลการทดลองดังแสดงใน**ภาพที่ 7** พบว่าหลังการหมัก 21 วัน ระดับพีเอชในทุกการทดลองลดลงเป็น 3.7 – 3.8 พบการผลิตกรดแลคติคในถุงใส่เชื้อ LAB ปริมาณ 1.47 – 2.14 %(ของน้ำหนักแห้ง) ขณะที่ชุดควบคุมไม่สามารถตรวจพบกรดแลคติดที่ระดับความเข้มข้นต่ำกว่า 0.01% อย่างไรก็ตามปริมาณกรดอะเซติคค่อนข้างสูงในช่วง 4.6 – 4.8% และ 3.9 – 4% ของน้ำหนักแห้ง จากชุดใส่เชื้อ LAB และชุดควบคุมตามลำดับ เมื่อทำการศึกษาปริมาณจุลินทรีย์ในไซเลจดังแสดงใน**ตารางที่ 9** พบว่าปริมาณ LAB ในรูป active form หลังการหมัก 21 วันอยู่ในระดับสูง 3 –6 x 10^6 โคโลนีต่อกรับไซเลจ ขณะที่ชุดควบคุมแสดงค่าต่ำกว่าที่ 10^5 โคโลนีต่อกรัมไซเลจ ทุกการทดลองไม่พบการเจริญของเชื้อรา แต่ตรวจพบเชื้อยีสต์จากถุงทดลองใส่เชื้อ LAB 1 ถุง ปริมาณ 3.5 x 10^5 โคโลนีต่อกรับไซเลจ นอกจากนั้นในทุกการทดลองแสดงปริมาณจุลินทรีย์กลุ่มโคลิฟอร์ม และคลอสตริเดียม <10 โคโลนีต่อกรัมไซเลจ

ได้ทำการทดลองเปลี่ยนถ่ายถุงและบ่มไซเลจต่อในสภาวะมีอากาศ ผลการทดลองดังแสดงใน**รูปที่ 8** พบว่าค่าพีเอชยังคงแสดงที่ 3.8 แต่ปริมาณกรดแลคติคลดลงเป็น 0.3 ถึงไม่สามารถตรวจพบได้ ขณะที่ปริมาณกรดอะเซติคเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเป็น 5.7 –8.4 รวมทั้งกรดโพรไพโอนิค 1.4 – 4.72 และ0.47 – 0.68 % ของน้ำหนักแห้งในชุดใส่เชื้อ LAB และชุดควบคุมตามลำดับ เมื่อศึกษาปริมาณจุลินทรีย์ในไซเลจดังแสดงใน**ตารางที่ 10** พบว่าเชื้อ LAB แสดงในระดับสูง 10^6 โคโลนีต่อกรัมไซเลจ และไม่พบการเจริญของเชื้อโคลีฟอร์ม และคลอสตริเดียม อย่างไรก็ตามพบเชื้อยีสต์ในปริมาณสูงจากการทดลองที่ใส่เชื้อ LAB เช่นกัน ที่ 10^5 โคโลนีต่อกรัมไซเลจ

ได้ทำการศึกษาปริมาณโปรตีนจากไซเลจที่หมักได้ พบว่า ชุดควบคุม และถุงที่ใส่เชื้อ LAB แสดงปริมาณโปรตีนในช่วง 4.64 – 4.82 และ 5.24-5.36 ตามลำดับ จะเห็นว่าไซเลจที่ใส่เชื้อ LAB แสดงปริมาณโปรตีนสูงกว่าในช่วง 11.2 – 12.9% ของชุดควบคุม ซึ่งเป็นไปได้ว่าเนื่องจากปริมาณยีสต์ที่เพิ่มขึ้น ได้มีการศึกษาความสามารถในการใช้กรดแลคติคของยีสต์ปนเปื้อน พบว่าเชื้อยีสต์ดังกล่าวไม่สามารถใช้กรดแลคติคเป็นแหล่งคาร์บอน ดังนั้นการลดลงของกรดแลคติคอาจเป็นผลเนื่องมาจากเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น แต่เซลยีสต์มีผลต่อการเพิ่มปริมาณโปรตีน

10 ข้อสังเกตุลักษณะไซเลจทดลองภาคสนามอายุ 2 เดือน

หลังจากการทดลองประมาณ 2 เดือน ได้กลับไปสอบถามผลการเลี้ยงโคนมกับเกษตรกร ได้คำตอบว่า 1 ใน 3 ของถุงที่ใส่เชื้อ LAB (ถุงรหัส 2) ยกเว้นถุงควบคุมซึ่งแสดงกลิ่นกรดฉุน เกษตรขอนำไปเลี้ยงโคนม จากการสอบถามพบว่าโคชอบกินอย่างเห็นได้ชัดเมื่อทดสอบให้วัวกิน สำหรับ 2 ถุงที่เหลือ พบว่าถุงรหัส 1 ซึ่งมีปริมาณบรรจุถึง 500 กก แสดงการเน่าเสีย ขณะที่ถุงรหัส 3 บรรจุ 300 กก ยังคงแสดงกลิ่นดีและเมื่อนำไปเลี้ยงโคนม พบว่าโคแสดงการกินได้อย่างเห็นได้ชัด สำหรับถุงควบคุม 2 ถุงแสดงลักษณะการเน่าเสีย ดังนั้นจากการสังเกตุเบื้องต้น เห็นได้ว่าการใช้หัวเชื้อ LAB สามารถเพิ่มความน่ากินของไซเลจ และลดการเน่าเสีย อย่างไรก็ตามพบปัญหาในด้านการใส่เชื้อให้กระจายไปตามจุดต่างๆ เมื่อปริมาณวัตถุดิบสูง ซึ่งสังเกตุได้จากถุงที่1ปริมาณ 500 กก เกิดการเน่าเสีย ขณะที่ถุงที่ 3 ปริมาณประมาณ 300 กก สามารถควบคุมสภาวะไซเลจได้ดีกว่า

เห็นได้ว่าผลการทดลองข้างต้น สามารถตั้งเป็นข้อสังเกตุ เพื่อให้มีการศึกษาในระดับจำนวนการทดลองที่สามารถเปรียบเทียบได้ด้วยค่าทางสถิติต่อไปในอนาคต

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการคัดเลือกเชื้อ LAB จำนวน 340 ไอโซเลต พบ เชื้อ LAB 7 ไอโซเลตซึ่งแสดงผลการชลอยับยั้งการเจริญและการสร้างสปอร์ของเชื้อรา เชื้อไอโซเลต LS2-19 มีผลต่อการชลอการเจริญของเชื้อราสปอร์เขียว แสดงกิจกรรมในการยับยั้งในรูปของขนาดโคโลนีสูงกว่าชุดควบคุม 12 เท่า และยังสามารถยับยั้งการสร้างสปอร์อีกด้วย นอกจากนั้นยังแสดงผลในการยับยั้งการเจริญและการสร้างสปอร์ของเชื้อราสปอร์

เหลืองอีกด้วย ในการศึกษาสารยับยั้งจากน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลระดับพีเอชต่ำกว่า 4 พบว่าเกิดขึ้นเนื่องจากกรดแลคติค และกรดอะเซติด แต่ไม่พบกรดโพรไพโอนิค และกรดบิวไทริค Batish และคณะ (1997) ได้รวบรวมงานวิจัยเกี่ยวกับสารยับยั้งเชื้อรา พบว่า สารประกอบโพรไพโอนิค แสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราสูงสุด ที่ระดับความเข้มข้น 0.8% ของธัญญพืชระดับความชื้น 20% นอกจากนั้นมีรายงานว่ากรดแลคติค และกรดอะเซติค สามารถเกิดการทำงานร่วมกัน (Synergistic effect) ในการยับยั้งการเจริญของยีสต์และรา ในรูปไม่แตกตัว (undissociated form) Gorsetti และคณะ (1998) ได้แยกเชื้อ *L. sanfrancisco* CB1 จาก sourdough พบน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซล แสดงความสามารถในการยับยั้งเชื้อราที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ได้แก่ *Fusarium, Penicillium, Aspergillus* และ *Monillia* โดยน้ำเลี้ยงเชื้อประกอบด้วยส่วนผสมของกรดอะเซติค กรดโพรไพโอนิค กรดบิวไทริค กรดฟอร์มิค กรด n-valeric และ กรด caproic ดังนั้นจะเห็นว่าองค์ประกอบของกรดอินทรีย์จากน้ำเลี้ยงเชื้อ LS2-19 แตกต่างจากเชื้อที่มีการศึกษามาก่อน จากการกำจัดผลของกรดโดยการปรับระดับพีเอชของสารละลาย CFC เป็น 6 จะเห็นว่า สารประกอบ CFC สามารถแสดงการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสปอร์เหลือง ที่ระดับจำนวนสปอร์ 10^3 - 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร และชลอการเจริญเมื่อปริมาณสปอร์เพิ่มขึ้นเป็น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ดังนั้นเป็นไปได้ว่าการยับยั้งเชื้อรา ไม่ใช่เกิดขึ้นเนื่องจากกรดเพียงอย่างเดียว แต่ยังมีสารประกอบอื่นด้วย Laine และคณะ (1996) พบว่าเชื้อ *Pseudomonas spp.* จากอาหาร สามารถผลิตสารอินทรีย์ siderophores ซึ่งแสดงความสามารถในการยับยั้งทั้งเชื้อราและแบคทีเรีย ได้แก่ Salmonella Typhimurium, *Staphylococcus aureus, Fusarium culmorum, F. oxysporum* และ *Aspergillus niger* Niku-Paavola และคณะ (1999) รายงานการผลิตสารยับยั้งเชื้อราโมเลกุลขนาดเล็กจาก *L. plantarum* ซึ่งประกอบด้วย benzoic acid, methylhydantoin, mevalonolactone และ cyclo-(glycyl-L-leucyl) ซึ่งทำงานร่วมกับกรดแลคติคในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Fusarium avenacum* Lavermicocca และคณะ (2000) พบอนุพันธุ์ของกรดแลคติคในรูปของ phenyl-lactic acid และ 4-hydroxy-phenyl-lactic acid จากเชื้อ *L. plantarum* แสดงความสามารถในการยับยั้งเชื้อราเช่นกันนอกจากสารประกอบโครงสร้างสารประกอบอินทรีย์ขนากเล็กชนิดต่างๆแล้ว ยังพบว่าสารประกอบที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ผลิตจากเชื้อ LAB แสดงโครงสร้างโปรตีน Magnusson และ Schnurer (2001) ได้ศึกษาเชื้อ *L. coryniformis subsp. Coryniformis* จากไซเลจ พบว่าสามารถผลิตสารยับยั้งเชื้อรา ที่แสดงโครงสร้างโปรตีนขนาดประมาณ 3 kDa ซึ่งแสดงความสามารถในการยับยั้งเชื้อราหลายชนิดได้แก่ *A. fumigatus, A. nidulans, P. roqueforti, Mucor hiemalis, Talaromyces flavas, F. poae, F. graminearum, F. culmorum* และ *F. sporotrichoides* อย่างไรก็ตามเชื้อ LS2-19 จัดอยู่ในจีนัส *Pediococcus* ซึ่งแตกต่างจากเชื้อดังกล่าวข้างต้น ดังนั้นเป็นไปได้ว่าสารประกอบที่ผลิตขึ้นโดยเชื้อ LS2-19 นอกจากกรดอินทรีย์แล้ว อาจประกอบด้วยสารประกอบชนิดอื่นซึ่งแสดงโครงสร้างแตกต่างจากสารประกอบที่กล่าวข้างต้น งานในส่วนนี้จำเป็นต้องมีการศึกษาต่อไป

ในการศึกษาผลของสาร CFC ซึ่งพ่นไปยังผิวหน้าของไซเลจเพื่อยับยั้งเชื้อรา พบเชื้อราขึ้นอย่างเห็นได้ชัดใน 7 วัน เป็นไปได้ว่าสาร CFC ประกอบด้วยสารยับยั้งที่ระดับต่ำเกินไปในการยับยั้งปริมาณเชื้อราทั้ง

หมดบริเวณผิว เมื่อเปรียบเทียบกับการใส่เชื้อ LAB เพื่อทำการหมัก พบว่าวิธีการหมักส่งผลต่อการยับยั้งเชื้อราอย่างเห็นได้ชัด ดังนั้นจึงเลือกใช้วิธีการหมักในภาคสนามต่อไป

ผลการเปรียบเทียบการใช้เชื้อ LAB เป็นเชื้อเริ่มต้นในปริมาณ 10^5 CFU/g ในการหมักภาคสนาม เห็นได้ว่า การใช้เชื้อ ส่งผลต่อการผลิตกรดแลคติค ขณะที่ชุดควบคุมแสดงการผลิตกรดอะเซติคอย่างเดียว เป็นเหตุทำให้กลิ่นที่ได้ของไซเลจชุดควบคุมค่อนข้างฉุน อย่างไรก็ตามปริมาณกรดอะเซติดค่อนข้างสูงในช่วง 3.9 – 4.8% (โดยน้ำหนักแห้ง)จากทั้งชุดใส่เชื้อ LAB และชุดควบคุม ดังนั้นการศึกษาปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสม ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญของเปลือกข้าวโพดหวานผ่านการต้ม จึงเป็นสิ่งสำคัญที่ต้องศึกษาเพื่อปรับปรุงกระบวนการหมักต่อไป

เมื่อศึกษา aerobic stability หรือสภาวะการหมักในสภาพที่สัมผัสกับอากาศเป็นเวลา 7 วัน พบว่าปริมาณกรดแลคติคลดลงเป็น 0.3% ถึงไม่สามารถตรวจสอบได้ แสดงให้เห็นว่ามีการใช้กรดแลคติคเป็นแหล่งคาร์บอน โดยแบคทีเรียที่ต้องการอากาศในการเจริญ และยีสต์ ส่งผลให้ปริมาณกรดอะเซติคสูงขึ้น Woolford (1978) รายงานว่าการเสียของไซเลจในสภาวะที่มีอากาศ เป็นผลเนื่องจากเชื้อกลุ่ม acetic acid bacteria นอกจากนั้นยังพบว่าปริมาณเซลยีสต์สูงขึ้นในชุดการทดลองในลักษณะใส่เชื้อ LAB เป็นผลให้ปริมาณโปรตีนสูงกว่าชุดควบคุมมากกว่า 10% แสดงให้เห็นว่าภายใต้สภาวะการหมักด้วยเชื้อ LAB ส่งเสริมการเจริญของเชื้อยีสต์ จากการศึกษาความสามารถในการใช้กรดแลคติคเป็นแหล่งคาร์บอนของเชื้อยีสต์ที่แยกได้ ไม่พบการใช้กรดแลคติคเป็นแหล่งคาร์บอน ทำให้สรุปได้ว่าการลดลงของกรดแลคติคพร้อมกับการเพิ่มขึ้นของกรดอะเซติค เป็นไปได้ว่าเกิดจากแบคทีเรียที่ต้องการอากาศ แต่ไม่ใช้กลุ่มโคลิฟอร์ม

ผลการสังเกตุลักษณะภายนอกของไซเลจในภาคสนามหลังจาก 2 เดือน พบว่าถุงควบคุม และถุงใส่เชื้อ LAB ปริมาณ 500 กก มีการเจริญของเชื้อราอย่างเห็นได้ชัด ขณะที่ถุงขนาด 300 กก ไม่พบการปนเปื้อน และเมื่อนำไปเลี้ยงโคนม พบว่าสามารถกินได้ดี ดังนั้นทำให้เกิดแนวคิดว่า การใช้สารเร่งทางชีวภาพในรูป LAB LS2-19 ส่งผลต่อความน่ากินให้กับสัตว์ แสดงการยับยั้งการเจริญของเชื้อราในลักษณะไม่สม่ำเสมอ ซึ่งอาจเกิดเนื่องจากการกระจายของเชื้อ LAB ไม่สม่ำเสมอ เมื่อมีการเพิ่มปริมาณวัตถุดิบสูงขึ้น ดังสังเกตุได้จากการเปรียบเทียบผลของการหมักที่ 500 และ 300 กก

ในการทดลองในภาคสนามมีการใช้จำนวนตัวอย่างค่อนข้างน้อยเพียง 2 – 3 ซ้ำ นอกจากนั้นยังมีอุปสรรคเกี่ยวกับวัตถุดิบเป้าหมายคือ ต้นข้าวโพดซึ่งไม่สามารถหาได้ในขณะนั้น ทำให้ต้องเปลี่ยนเป็น by product ในรูปเปลือกข้าวโพดจากโรงงานทำข้าวโพดหวานกระป๋อง ซึ่งมีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นต่ำกว่า 1% อย่างไรก็ตามผลที่ได้ สามารถเห็นความแตกต่างได้ระหว่างการใช้ และไม่ใช้เชื้อ LAB อย่างไรก็ตามในด้านคุณภาพของไซเลจที่ได้จำเป็นต้องมีการศึกษาต่อไป

เอกสารอ้างอิง

ปราโมทย์ แพงคำ 2544. อาหารโคนมกับสิ่งแวดล้อม สัตวบาล สมาคมสัตวบาลแห่งประเทศไทย หจก. อำนวยรัตน์การพิมพ์ กรุงเทพฯ หน้า 20 - 24

สุนีย์ นิธิสินประเสริฐ 2543 "สารเร่งทางชีวภาพ ผลผลิตในประเทศ" ทางเลือกหนึ่งในการปรับปรุงคุณภาพไซเลจหรือหญ้าหมัก ข่าวสารพืชอาหารสัตว์ 5, 27 – 35

Batish, V.K., Roy, U., Lal, R. and Grover, S. 1997. Antifungal attributes of lactic acid bacteria – a review. Critical Reviews in Biotechnology. 17, 209 – 225.

Benoit, V., Lebrihi, A., Millere, J.B. and Lefebvre, G. 1997. Purification and partial amino acid sequence of Brevicin 27, a bacteriocin produced by *Lactobacillus brevis* SB27. Curr. Microbiol. 34, 173-179.

Corsetti, A., Gobbetti, M., Rossi, J. & Damiami, P. 1998. Antimould activity of sourdough lactic acid bacteria: identification of a mixture of organic acids produced by *Lactobacillus sanfrancisco* CB1. Applied Microbiology and Biotechnology

Driehuis, F., Oude Elferink, S. and Spoelstra S. 1997. Inoculation of silage with a strain of *Lactobacillus* buchneri inhibits yeast growth and improves aerobic stability. *In* An international symposium on lactic acid bacteria organized by ADRIA NORMANDIE, the TNO and the Caen University. Normandy. France.

Dutkiewicz, J., Olenchock, S.A., Sorenson, W.G., Gerencser, V.F., May, J.J., Pratt, D.S. and Robinson, V.A. 1989. Levels of bacteria, fungi and endotoxin in bulk and aerosolized corn silage. Appl. Environ. Microbiol. 55, 1093 – 1099.

Harlander, S.K. 1993. Regulatory aspects of bacteriocin use. Pp. 233-247. *In* D.G. Hoover and L.R. Steenson (eds). Bacteriocin of lactic acid bacteria. London: Academic Press, Inc. Helander, I.M., von wright, A. & Mattila-Sandholm, T-M. 1997. Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against gram-negative bacteria. Trends in Food Science &Technology. 6, 146- 149

Henderson, N. Silage additives. Animal Feed Science and Technology. 45, 35-56

Honig, H. 1975. Changes and losses from secondary fermentation. Das Wirstschaftseigene Futter. 21, 25-32. Sited by Ruxton, G.D and Gibson, G.J. 1993. A Critical introduction to mathematical modelling of the aerobic deterioration of silage. J. Sci. Food Agric. 62, 209-217

Hoover, D.G. and Harlander. 1994. Screening methods for detection bacteriocin activity, pp. 23-29. *In* D.G. Hoover and L.R. Steenson (eds.) Bacteriocins of lactic acid bacteria. London: Academic Press.

Kung Jr. L., Tung, R.S., Maciorowski, K. 1991. Effect of a microbial inoculant (Ecosyl) and or a glycopeptide antibiotic (vancomycin) on fermentation and aerobic stability of wilted alfalfa silage. Anim. Feed Sci. Technol. 35, 37-48.

Laine, M.H., Karwoski, M.T., Raaska, L.B. and Mattila-Sandholm, T.-M. 1996. Lett in Appl. Microbiol. 22, 214-218.

Lane, E.O., Thomas, J.W., Moore, K.J. and Huber, J.H. 1988. Silage preservatives and additive for corn. National Corn Handbook.

Magnusson, J. & Schnurer, J. 2001. *Lactobacillus coryniformis* subsp. *Coryniformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. Applied and Environmental Microbiology. 67, 1-5

Muck, R.E. 1991. Silage fermentation. Pp. 171-204. *In*: G. Zeikus and E.A. Johnson (eds.) Mixed culture in biotechnology. New york: McGraw – Hill Inc.

Nitisinprasert, S., Buajum, T., Saelao, S., Tabtong, T., Chatthong, R. and Jareerat, A. 2000. Screening of lactic acid bacteria local strains as biocatalysts for silage fermentation. The Journal of Science Khonkaen University. 28, 31-43.

Ohmomo, S. Kitamoto, H. K. and Nakajima, T. 1994. Detection of Roquefortines in *Penicillium roqueforti* isolated from moulded maize silage. J. Sci. Agric. 64, 211 – 215.

Rees, T.J. 1997. The development of a novel antifungal silage inoculant. Doctoral research thesis. Cranfield University Biotechnology Centre, UK. In Collaboration with the Ecosyl Products Ltd.

Setala, J., Rauramaa, A. and Sivela, S. 1990. The use of *Lactobacillus plantarum* cellulase and inhibitor in grass preservation. Proc. 9th silage conference. Newcastle upon Tyne, September 1990, pp. 25-26.

Tsai, C-E and Kondo, F. 2001. Improved agar diffusion method for detecting residual antimicrobial agents. J. Food Protection. 64, 361-366.

Wood, B.J.B. and Holzapfel, W.H. 1995. The genera of lactic acid bacteria. Vol. 2 London: Blackie Academic and Professional.398 p.

Woolford, M.K. 1990. The silage fermentation. Pp. 137-144. *In:* T.W. Fregel, G.thryn and Y. Yuthavong (eds.) Biotechnology for small industries. Proceeding of the International

Symposium on Application of Biotechnology for Small Industries, Text and Journal Corporation, Bangkok.

ตารางที่ 1 แสดงการเจริญของเชื้อรา ของสารแขวนลอยสปอร์ที่ระดับการเจือจาง และเวลาในการบ่มต่างๆ X, แทนค่าความเข้มข้นของสารละลายสปอร์แขวนลอย; ND ไม่ทำการทดสอบ

เวลาในการ	ขนาดโคโลนีของเชื้อราสปอร์เหลือง (มม)						ขนาดโคโลนีของเชื้อราเขียว (มม)					
บ่ม (ชม)	2X	5X	10X	20X	50X	100X	2X	5X	10X	20X	50X	100X
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	4.0	**1.0**	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	6.0	5.5	5.5	5.5	5.5	5.0
20	-	-	-	-	-	-	6.5	6.0	5.5	5.5	5.5	5.5
25	**1.0**	0.8	0.5	-	-	-	7.0	6.5	6.0	6.0	5.5	5.5
30	2.5	1.5	2.0	1.0	0.5	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
40	4.0	3.0	3.0	2.0	1.5	0.5	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ตารางที่ 2 แสดงผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ของสาร CFC จากเชื้อ LAB ไอโซเลตต่างๆ ในขั้นปฐมภูมิ + แสดงผลการยับยั้งเชื้อรา, - ไม่แสดงผลการยับยั้งเชื้อรา

ไอโซเลต	การยับยั้งเชื้อราสปอร์เหลือง	การยับยั้งเชื้อราสปอร์เขียว	ไอโซเลต	การยับยั้งเชื้อราสปอร์เหลือง	การยับยั้งเชื้อราสปอร์เขียว
BT100	**+**	**-**	BT213	-	-
BT101	-	-	BT214	-	-
BT102	-	-	BT215	-	-
BT103	-	-	BT216	-	-
BT104	-	-	BT217	-	-
BT105	-	-	**BT218**	**+**	+
BT106	-	-	**BT219**	**-**	**+**
BT107	-	-	**BT220**	**+**	**-**
BT108	-	-	BT221	-	-
BT109	-	-	BT222	-	-
BT110	-	-	BT223	-	-
BT111	-	-	BT224	-	-
BT112	-	-	BT225	-	-
BT113	-	-	BT226	-	-
BT114	-	-	BT227	-	-
BT200	-	-	BT230	-	-
BT201	-	-	BT232	-	-
BT202	-	-	BT233	-	-
BT203	-	-	BT234	-	-
BT204	-	-	BT235	-	-
BT205	-	-	BT236	-	-
BT206	-	-	BT237	-	-
BT207	-	-	BT239	-	-
BT208	-	-	BT300	-	-
BT209	-	-	BT303	-	-
BT210	-	-	BT304	-	-
BT211	-	-	BT306	-	-
BT212	-	-	BT402	-	-

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ไอโซเลต	การยับยั้งเชื้อราสปอร์เหลือง	การยับยั้งเชื้อราสปอร์เขียว	ไอโซเลต	การยับยั้งเชื้อราสปอร์เหลือง	การยับยั้งเชื้อราสปอร์เขียว
BT404	-	-	CS2-12	-	-
BT406	-	-	CS2-13	-	-
BT407	-	-	CS3-01	-	-
BT408	-	-	CS3-07	-	-
BT800	-	-	CS3-09	-	-
BT802	-	-	CS3-11	-	-
C1-1	-	-	CS3-12	-	-
C1-2	-	-	CS3-14	-	-
C1-3	-	-	CS4-01	-	-
C1-4	-	-	CS4-02	-	-
C1-5	-	-	CS4-03	-	-
C1-6	-	-	CS4-04	-	-
C1-7	-	-	CS4-05	-	-
C1-8	-	-	CS4-06	-	-
C1-9	-	-	CS4-07	-	-
C1-10	-	-	CS4-08	-	-
C—11	-	-	CS4-09	-	-
CS1-02	-	-	CS4-10	-	-
CS1-04	-	-	CS4-11	-	-
CS1-05	-	-	CS4-12	-	-
CS1-09	-	-	CS5-02	-	-
CS1-10	-	-	CS5-03	-	-
CS2-01	-	-	CS5-05	-	-
CS2-02	-	-	CS5-09	-	-
CS2-03	-	-	CS5-10	-	-
CS2-05	-	-	CS5-12	-	-
CS2-06	-	-	CS5-14	-	-
CS2-07	-	-	CS5-15	-	-
CS2-08	-	-	CS6-1	-	-

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ไอโซเลต	การยับยั้งเชื้อราสปอร์เหลือง	การยับยั้งเชื้อราสปอร์เขียว	ไอโซเลต	การยับยั้งเชื้อราสปอร์เหลือง	การยับยั้งเชื้อราสปอร์เขียว
CS6-2	-	-	FS1-25	-	-
CS6-3	-	-	FS1-27	-	-
CS6-4	-	-	FS1-28	-	-
CS6-5	-	-	FS1-30	-	-
CS6-6	-	-	FS1-31	-	-
CS7-1	-	-	FS7-2	-	-
CS7-2	-	-	FS9-1	-	-
CS7-3	-	-	FS31-1	-	-
CS7-4	-	-	FS42-1	-	-
CS7-5	-	-	FV1-1	-	-
CS7-6	-	-	FV1-2	-	-
CS8-1	-	-	FV1-3	-	-
CS8-2	-	-	FV1-4	-	-
CS8-3	-	-	FV2-1	-	-
FS1-00	-	-	FV2-2	-	-
FS1-01	-	-	FV2-4	-	-
FS1-02	-	-	FV3-2	-	-
FS1-03	-	-	FV4-1	-	-
FS1-04	-	-	FV4-2	-	-
FS1-05	-	-	FV4-3	-	-
FS1-06	-	-	FV4-4	-	-
FS1-07	-	-	L-01	-	-
FS1-08	-	-	L-02	-	-
FS1-10	-	-	L-03	-	-
FS1-12	-	-	L-04	-	-
FS1-15	-	-	L-05	-	-
FS1-18	-	-	L-06	-	-
FS1-21	-	-	L-07	-	-
FS1-23	-	-	L-08	-	-

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ไอโซเลต	การยับยั้งเชื้อราสปอร์เหลือง	การยับยั้งเชื้อราสปอร์เขียว	ไอโซเลต	การยับยั้งเชื้อราสปอร์เหลือง	การยับยั้งเชื้อราสปอร์เขียว
L-09	-	-	LS1-4	-	-
L-10	-	-	LS1-5	-	-
L-11	-	-	LS1-7	-	-
L-12	**+**	**-**	LS1-8	-	-
L-13	-	-	LS1-9	-	-
L-14	-	-	LS1-10	-	-
L-15	-	-	LS1-11	-	-
L-16	-	-	LS1-13	-	-
L-17	-	-	LS1-15	-	-
L-18	-	-	LS1-16	-	-
L-19	-	-	LS1-17	-	-
L-20	-	-	LS1-18	-	-
LG1-1	-	-	LS1-20	-	-
LG1-2	-	-	LS1-21	-	-
LG1-3	-	-	LS1-22	-	-
LG1-4	-	-	LS1-23	-	-
LG2-1	-	-	LS1-24	-	-
LG2-2	-	-	LS1-25	-	-
LG2-3	-	-	LS1-28	-	-
LG2-4	-	-	LS2-1	-	-
LG3-1	-	-	LS2-2	-	-
LG3-2	-	-	LS2-3	-	-
LG4-1	-	-	LS2-4	-	-
LG4-2	-	-	LS2-5	-	-
LG4-3	-	-	LS2-6	-	-
LS1-1	-	-	LS2-7	-	-
LS1-2	-	-	LS2-8	-	-
LS1-3	-	-	LS2-9	-	-

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ไอโซเลต	การยับยั้งเชื้อราสปอร์เหลือง	การยับยั้งเชื้อราสปอร์เขียว	ไอโซเลต	การยับยั้งเชื้อราสปอร์เหลือง	การยับยั้งเชื้อราสปอร์เขียว
LS2-10	-		N1-36	-	
LS2-11	-	-	N1-37	-	-
LS2-12	-	-	N1-38	-	-
LS2-13	-	-	N1-39	-	-
LS2-14	-	-	N1-40	-	-
LS2-15	-	-	M1-1	-	-
LS2-16	-	-	M1-2	-	-
LS2-17	-	-	M1-3	-	-
LS2-18	-	-	M1-4	-	-
LS2-19	**+**	**+**	M1-5	-	-
LS2-20	-	-	M1-6	-	-
LS2-21	-	-	M1-7	-	-
LS2-22	-	-	M1-8	-	-
LS2-23	-	-	M1-9	-	-
LS2-24	-	-	**M1-10**	**-**	**+**
LS2-26	-	-	M1-11	-	-
LS2-27	-	-	M1-12	-	-
LS2-28	-	-	SG1-1	-	-
LS2-30	-	-	SG1-2	-	-
LS2-32	-	-	SG1-3	-	-
LS2-34	-	-	SG1-4	-	-
LS2-35	-	-	SG1-5	-	-
LS3-15	-	-	SG2-1	-	-
LS3-16	-	-	SG2-2	-	-
LS3-17	-	-	SG2-3	-	-
N1-33	-	-	SG2-4	-	-
N1-34	-	-	SG2-5	-	-
N1-35	-	-	SG2-6	-	-

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ไอโซเลต	การยับยั้งเชื้อราสปอร์เหลือง	การยับยั้งเชื้อราสปอร์เขียว	ไอโซเลต	การยับยั้งเชื้อราสปอร์เหลือง	การยับยั้งเชื้อราสปอร์เขียว
SG2-7	-	-	V-09	-	-
SG2-8	-	-	SP1-9	-	-
SK1-1	-	-	SP2-3	-	-
SK1-3	-	-	SP2-4	-	-
SK1-4	-	-	SS3-1	-	-
SK1-5	-	-	SS3-2	-	-
SK1-6	-	-	SS3-3	-	-
SK1-7	-	-	SS4-1	-	-
SK1-9	-	-	SS4-2	-	-
SK1-10	-	-	SS4-3	-	-
SK1-11	-	-	SS4-4	-	-
SK1-12	-	-	V-01	-	-
SP1-1	-	-	V-02	-	-
SP1-2	-	-	V-03	-	-
SP1-3	-	-	V-04	-	-
SP1-4	-	-	V-05	-	-
SP1-5	-	-	V-06	-	-
SP1-6	-	-	V-07	-	-
SP1-7	-	-	V-08	-	-
SP1-8	-	-	V-09	-	-
SS4-3	-	-	W1-1	-	-
SS4-4	-	-	W1-2	-	-
V-01	-	-	W1-3	-	-
V-02	-	-	W1-4	-	-
V-03	-	-	W1-5	-	-
V-04	-	-	W1-6	-	-
V-05	-	-	W1-8	-	-
V-06	-	-	W1-9	-	-
V-07	-	-	W1-10	-	-
V-08	-	-	W1-11	-	-

ตารางที่ 3 แสดงผลของสาร CFC จากเชื้อ LAB ไอโซเลตต่างๆ ต่อการเจริญของเชื้อราสปอร์เขียว

Isolate	pH	Ratio of CFC and spore suspension			
		1:1		2:1	
		Size of colony (mm)	Spore formation	Size of colony (mm)	Spore formation
Control	-	13	+	12	+
BT-100	3.96	11	+	7.5	+
BT-218	4.33	7.5	+	7.5	+
BT-219	3.86	6.0	+	2.5	-, mycelium
BT-220	4.60	7.5	+	11	+
LS2-19	3.74	1.5	-, mycelium	1.0	-, mycelium
L-12	4.29	9.0	+	7.5	+
M1-10	3.78	9.0	+	3.0	-, mycelium

ตารางที่ 4 แสดงผลของสาร CFC จากเชื้อ LAB ไอโซเลตต่างๆ ต่อการเจริญของเชื้อราสปอร์เหลือง NG, ไม่เจริญ

Isolate	pH	Ratio of CFC and spore suspension			
		1:1		2:1	
		Size of colony (mm)	Spore formation	Size of colony (mm)	Spore formation
Control	-	8-16	+	4-15	+
BT-100	3.96	8-16	+	8-10	+
BT-218	4.33	10-15	+	8-15	+
BT-219	3.86	15	+	5	+
BT-220	4.60	4-10	+	5-12	+
LS2-19	3.74	4-13	-, mycelium	NG	-
L-12	4.29	8-10	+	4	+
M1-10	3.78	8	+	4-15	+

ตารางที่ 5 แสดงของสาร CFC จากเชื้อ LAB LS2-19 ต่อการเจริญของเชื้อราสปอร์สีเขียว ที่ระดับความเข้มข้นของสปอร์ต่างๆ ด้วยอัตราส่วนของ CFC ต่อ สารละลายสปอร์แขวนลอย 2:1

Control, สภาวะไม่ใส่สาร CFC; + แสดง การสร้างสปอร์; - แสดงไม่สร้างสปอร์; NG, ไม่เจริญ

CFC preparation	Spore formation at spore suspension (spores/ml)			
	10^6	10^5	10^4	10^3
Control	+	+	+	+
CFC				
1. at 24 h cultivation,	+	-	-	-
pH3.93	+	-	-	-
2. at 48 h cultivation,				
pH3.87				
CFC adjust pH to 6				
1. at 24 h cultivation	+	+	+	+
2. at 48 h cultivation	+	+	+	+

ตารางที่ 6 แสดงของสาร CFC จากเชื้อ LAB LS2-19 ต่อการเจริญของเชื้อราสปอร์สีเหลือง ที่ระดับความเข้มข้นของสปอร์ต่างๆ ด้วยอัตราส่วนของ CFC ต่อ สารละลายสปอร์แขวนลอย 2:1
Control, สภาวะไม่ใส่สาร CFC; + แสดง การสร้างสปอร์; - แสดงไม่สร้างสปอร์; NG, ไม่เจริญ

CFC preparation	Spore formation at various spore concentration (spores/ml)			
	10^6	10^5	10^4	10^3
Control	+	+	+	+
CFC 1. at 24 h cultivation, pH3.93 2. at 48 h cultivation, pH3.87	NG NG NG NG	NG NG 	NG NG 	
CFC adjust pH to 6 1 at 24 h cultivation 2 at 48 h cultivation	-,mycelium NG -,mycelium NG	-,mycelium NG 	NG NG 	

ตารางที่ 7 แสดงค่า pH และปริมาณกรดอินทรีย์ของไซเลจข้าวโพดอายุ 21 วัน ที่ระดับการใส่เชื้อราสปอร์เขียวระดับต่างๆ

การทดลอง	pH	กรดอินทรีย์ (% ของน้ำหนักแห้ง)			
		กรดแลคติค	กรดอะเซติค	กรดโพรไพโอนิค	กรดบิวไทริค
ชุดควบคุม					
10^2	3.66	4.21	ND	ND	ND
10^3	3.71	3.98	ND	ND	ND
10^4	3.62	3.9	ND	ND	ND
ใส่เชื้อ LAB					
10^2	3.50	4.62	ND	ND	ND
10^3	3.61	4.01	ND	ND	ND
10^4	3.45	5.3	ND	ND	ND

ตารางที่ 7 แสดงปริมาณจุลินทรีย์กลุ่มแบคทีเรีย ในไซเลจข้าวโพดอายุ 21 วัน ที่ระดับการใส่เชื้อราสปอร์เขียวระดับต่างๆ LAB, L; กลุ่มยีสต์รา (YM); กลุ่มโคลิฟอร์ม (Coli); กลุ่มคลอสตริเดียม (Clos)

การทดลอง	ปริมาณจุลินทรีย์ (โคโลนี ต่อกรัมของไซเลจ)			
	L	YM*	Coli	Clos
ชุดควบคุม				
10^2	3.75×10^6	3.15×10^5	<10	<10
10^3	5.3×10^6	1.2×10^6	<10	<10
10^4	4.54×10^6	1.97×10^6	<10	<10
ใส่เชื้อ LAB				
10^2	1.5×10^7	1.23×10^6	<10	<10
10^3	1.2×10^7	1.67×10^5	<10	<10
10^4	7.5×10^6	2.1×10^5	<10	<10

* พบเฉพาะยีสต์

ตารางที่ 8 แสดงค่า pH และปริมาณกรดอินทรีย์ของไซเลจข้าวโพดอายุ 21 วัน ที่ระดับการใส่เชื้อราสปอร์เหลืองระดับต่างๆ

การทดลอง	pH	กรดอินทรีย์ (% ของน้ำหนักแห้ง)			
		กรดแลคติค	กรดอะเซติค	กรดโพรไพโอนิค	กรดบิวไทริค
ชุดควบคุม					
10^2	4.38	2.23	ND	ND	ND
10^3	4.37	2.45	ND	ND	ND
10^4	4.37	3.18	ND	ND	ND
ใส่เชื้อ LAB					
10^2	3.85	5.36	ND	ND	ND
10^3	3.77	5.15	ND	ND	ND
10^4	4.05	4.82	ND	ND	ND

ตารางที่ 8 แสดงปริมาณจุลินทรีย์กลุ่มแบคทีเรีย ในไซเลจข้าวโพดอายุ 21 วัน ที่ระดับการใส่เชื้อราสปอร์เหลืองระดับต่างๆ LAB, L; กลุ่มยีสต์รา (YM); กลุ่มโคลิฟอร์ม (Coli); กลุ่มคลอสตริเดียม (Clos)

การทดลอง	ปริมาณจุลินทรีย์ (โคโลนี ต่อกรัมของไซเลจ)			
	L	YM*	Coli	Clos
ชุดควบคุม				
10^2	5.58×10^6	4.93×10^5	<10	<10
10^3	7.75×10^6	4.3×10^6	<10	<10
10^4	5.53×10^6	1.96×10^6	<10	<10
ใส่เชื้อ LAB				
10^2	1×10^7	5.0×10^5	<10	<10
10^3	1.38×10^7	3.9×10^5	<10	<10
10^4	1.35×10^7	5.14×10^6	<10	<10

* พบเฉพาะยีสต์

ตารางที่ 9 แสดงปริมาณจุลินทรีย์ จากไซเลจเปลือกข้าวโพดขนาด 300 – 500 กิโลกรัมอายุ 21 วัน ในสภาวะไม่ใส่เชื้อ LAB (ชุดควบคุม) และใส่เชื้อ LAB 10^6 โคโลนีต่อกรัมของไซเลจ LAB, L; กลุ่มยีสต์รา (YM); กลุ่มโคลิฟอร์ม (Coli); กลุ่มคลอสตริเดียม (Clos)

การทดลอง	ปริมาณจุลินทรีย์ (จำนวนโคโลนีต่อกรัม)			
	L	YM	Coli	Clos
ชุดควบคุม				
ถุงที่ 1	9.5×10^5	<10	<10	<10
ถุงที่ 2	1.1×10^5	<10	<10	<10
ใส่ LAB				
ถุงที่ 1	3.5×10^6	3.5×10^5	<10	<10
ถุงที่ 2	6.3×10^6	<10	<10	<10
ถุงที่ 3	3.3×10^6	<10	< 10	< 10

ตารางที่ 10 แสดงปริมาณจุลินทรีย์ จากไซเลจเปลือกข้าวโพดขนาด 300 – 500 กิโลกรัมอายุการหมัก 21 วัน และหมักในสภาวะสัมผัสอากาศเป็นเวลา 7 วัน ในสภาวะไม่ใส่เชื้อ LAB (ชุดควบคุม) และใส่เชื้อ LAB 10^6 โคโลนีต่อกรัมของไซเลจ LAB, L; กลุ่มยีสต์รา (YM); กลุ่มโคลิฟอร์ม (Coli); กลุ่มคลอสตริเดียม (Clos)

การทดลอง	ปริมาณจุลินทรีย์ (จำนวนโคโลนีต่อกรัม)			
	L	YM	Coli	Clos
ชุดควบคุม				
ถุงที่ 1	1.24×10^6	<10	<10	<10
ถุงที่ 2	1.02×10^6	<10	<10	<10
ใส่ LAB				
ถุงที่ 1	1.59×10^6	9.01×10^5	<10	<10
ถุงที่ 2	1.09×10^6	2.7×10^5	<10	<10
ถุงที่ 3	1.35×10^6	4.1×10^5	<10	<10

ตารางที่ 11 แสดงค่า pH และปริมาณกรดอินทรีย์ จากไซเลจเปลือกข้าวโพดขนาด 300 – 500 กิโลกรัมอายุการหมัก 21 วัน และหมักในสภาวะสัมผัสอากาศเป็นเวลา 5 วัน ในสภาวะไม่ใส่เชื้อ LAB (ชุดควบคุม) และใส่เชื้อ LAB 10^6 โคโลนีต่อกรัมของไซเลจ

การทดลอง	pH	กรดอินทรีย์ (% ของน้ำหนักแห้ง)			
		กรดแลคติค	กรดอะเซติค	กรดโพรไพโอนิค	กรดบิวไทริค
ชุดควบคุม					
ถุงที่ 1	3.88	ND	5.7	0.47	ND
ถุงที่ 2	3.83	ND	7.0	0.68	ND
ใส่ LAB					
ถุงที่ 1	3.97	0.3	6.41	2.23	ND
ถุงที่ 2	3.81	ND	8.36	4.72	ND
ถุงที่ 3	3.80	ND	6.94	1.41	ND

ตารางที่ 11 แสดงผลของน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซล (CFC) ที่ระดับต่างๆ ต่อการเปลี่ยนแปลงของค่า pH และปริมาณกรดอินทรีย์ของไซเลจข้าวโพดอายุ 21 วัน ที่ระดับการใส่เชื้อราสปอร์เขียวระดับต่างๆ

ปริมาณของเชื้อรา (cfu/g)	ปริมาณของ CFC (มล.)	pH	กรดอินทรีย์ (% ของน้ำหนักแห้ง)			
			กรดแลคติค	กรดอะเซติค	กรดโพรไพโอนิค	กรดบิวไทริค
10^3	0	4.65	2.94	ND	ND	ND
	0.5	5.09	2.6	ND	ND	ND
	1	4.03	3.64	ND	ND	ND
	2	4.05	3.74	ND	ND	ND
10^3	0	4.14	2.35	ND	ND	ND
	0.5	4.81	1.98	ND	ND	ND
	1	4.07	3.46	ND	ND	ND
	2	4.16	3.5	1.75	ND	ND
10^4	0	4.19	2.29	1.38	ND	ND
	0.5	4.13	2.87	ND	ND	ND
	1	4.14	2.7	0.92	ND	ND
	2	4.23	2.93	ND	ND	ND

ตารางที่ 12 แสดงผลของน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซล (CFC) ที่ระดับต่างๆ ต่อการเปลี่ยนแปลงของปริมาณจุลินทรีย์กลุ่มแบคทีเรีย ในไซเลจข้าวโพดอายุ 7 วัน ที่ระดับการใส่เชื้อราสปอร์เขียวระดับต่างๆ LAB, L; กลุ่มยีสต์รา (YM); กลุ่มโคลิฟอร์ม (Coli); กลุ่มคลอสตริเดียม (Clos)

ปริมาณของเชื้อรา (cfu/g)	ปริมาณของ CFC (มล.)	ปริมาณจุลินทรีย์ (cfu/g)			
		L	YM	Coli	Clos
10^3	0	6.07×10^7	2.6×10^7	< 10	< 10
	0.5	2.8×10^7	2.77×10^7	< 10	< 10
	1	6.76×10^7	8.55×10^7	< 10	< 10
	2	1.5×10^8	1.94×10^8	< 10	< 10
10^3	0	5.34×10^6	7×10^7	< 10	< 10
	0.5	8.0×10^7	3.23×10^7	< 10	< 10
	1	5.95×10^7	3.55×10^8	< 10	< 10
	2	6.75×10^7	2.33×10^8	< 10	< 10
10^4	0	2.98×10^7	2.09×10^7	< 10	< 10
	0.5	2.1×10^7	9.95×10^7	< 10	< 10
	1	2.8×10^7	8.7×10^7	< 10	< 10
	2	3.67×10^7	1.87×10^8	< 10	< 10

* พบเฉพาะยีสต์

ตารางที่ 13 แสดงผลของน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซล (CFC) ที่ระดับต่างๆ ต่อการเปลี่ยนแปลงของค่า pH และปริมาณกรดอินทรีย์ของไซเลจข้าวโพดอายุ 7 วัน ที่ระดับการใส่เชื้อราสปอร์เหลืองระดับต่างๆ

ปริมาณของเชื้อรา (cfu/g)	ปริมาณของ CFC (มล.)	pH	กรดอินทรีย์ (% ของน้ำหนักแห้ง)			
			กรดแลคติค	กรดอะเซติค	กรดโพรไพโอนิค	กรดบิวไทริค
10^3	0	5.83	ND	ND	ND	ND
	0.5	6.18	ND	ND	ND	ND
	1	5.16	ND	ND	ND	ND
	2	7.6	ND	ND	ND	ND
10^3	0	5.05	ND	ND	ND	ND
	0.5	7.3	ND	ND	ND	ND
	1	7.52	ND	ND	ND	ND
	2	6.36	ND	1.75	ND	ND
10^4	0	5.84	0.41	1.38	ND	ND
	0.5	7.47	ND	ND	ND	ND
	1	5.64	ND	0.92	ND	ND
	2	5.22	ND	ND	ND	ND

ตารางที่ 14 แสดงผลของน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซล (CFC) ที่ระดับต่างๆ ต่อการเปลี่ยนแปลงของปริมาณจุลินทรีย์กลุ่มแบคทีเรีย ในไซเลจข้าวโพดอายุ 7 วัน ที่ระดับการใส่เชื้อราสปอร์เหลืองระดับต่างๆ LAB, L; กลุ่มยีสต์รา (YM); กลุ่มโคลิฟอร์ม (Coli); กลุ่มคลอสตริเดียม (Clos)

ปริมาณของเชื้อรา (cfu/g)	ปริมาณของ CFC (มล.)	ปริมาณจุลินทรีย์ (cfu/g)			
		L	YM	Coli	Clos
10^3	0	1.93×10^8	+	< 10	< 10
	0.5	4.18×10^8	+	< 10	< 10
	1	3.75×10^8	+	< 10	< 10
	2	4.1×10^8	+	< 10	< 10
10^3	0	2.44×10^8	+	< 10	< 10
	0.5	1.81×10^8	+	< 10	< 10
	1	2.39×10^8	+	< 10	< 10
	2	2.96×10^8	+	< 10	< 10
10^4	0	2.08×10^8	+	< 10	< 10
	0.5	3.29×10^8	+	< 10	< 10
	1	3.11×10^8	+	< 10	< 10
	2	4.14×10^8	+	< 10	< 10

* พบเฉพาะยีสต์

ตารางที่ 15 แสดงค่า pH และปริมาณกรดอินทรีย์ จากไซเลจเปลือกข้าวโพดขนาด 300 – 500 กิโลกรัมอายุ 21 วัน ในสภาวะไม่ใส่เชื้อ LAB (ชุดควบคุม) และใส่เชื้อ LAB 10^6 โคโลนีต่อกรัมของไซเลจ

การทดลอง	pH	กรดอินทรีย์ (% ของน้ำหนักแห้ง)			
		กรดแลคติค	กรดอะเซติค	กรดโพรไพโอนิค	กรดบิวไทริค
ชุดควบคุม					
ถุงที่ 1	3.83	ND	4.04	ND	ND
ถุงที่ 2	3.89	ND	3.94	ND	ND
ใส่ LAB					
ถุงที่ 1	3.76	2.14	8.8	0.53	ND
ถุงที่ 2	3.88	1.47	6.24	ND	ND
ถุงที่ 3	3.88	2.07	4.6	ND	ND