

การพัฒนาอาหารสัตว์จากฟักทองและมันสำปะหลังหมัก  
เพื่อการนำไปเลี้ยงโคขุน



วิทยานิพนธ์เสนอมหาวิทยาลัยพะเยา เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา  
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ  
พฤษภาคม 2562  
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยพะเยา

การพัฒนาอาหารสัตว์จากฟักทองและมันสำปะหลังหมัก  
เพื่อการนำไปเลี้ยงโคขุน



ทศวรรษ อະโนราช

วิทยานิพนธ์เสนอมหาวิทยาลัยพะเยา เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

พฤษภาคม 2562

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยพะเยา

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การพัฒนาอาหารสัตว์จากฟักทองและมันสำปะหลังหมักเพื่อการนำไปเลี้ยงโคขุน

ของ ทศวรรต อະโนราช

ได้รับการพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

ของมหาวิทยาลัยพะเยา

..... ประธาน

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กิตติศักดิ์ โชติกเดชาณรงค์)

..... กรรมการ ..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.โชค โสรัจกุล)

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุภัค มหัทธนพรรค)

..... กรรมการ ..... กรรมการ

ดร.ขรรค์ชัย ตันเมฆ)

(ดร.รวิสร่า รื่นไวย์)

อนุมัติ

.....  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บุญฤทธิ์ สิ้นค้างาม)

คณบดีคณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ

พฤษภาคม 2562

## กิตติกรรมประกาศ

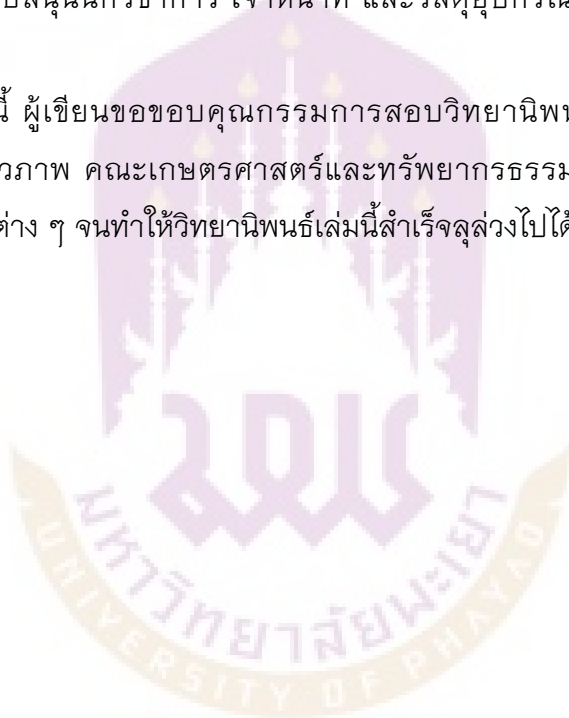
วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ด้วยการช่วยเหลือจากหลายฝ่าย ขอขอบคุณอาจารย์ที่ปรึกษา ดร.ขรรค์ชัย ตันเมฆ และรองศาสตราจารย์ ดร.โชค โสรัจกุล ที่ให้คำแนะนำในการวิจัย ตลอดจนการช่วยเหลือในด้านวิชาการและด้านอื่น ๆ ระหว่างการเรียนรู้มาโดยตลอด

ขอขอบคุณ โครงการวิจัยจากสำนักพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) งบประมาณปี พ.ศ. 2561 รหัสโครงการ NNR-RD-2559-01 ที่สนับสนุนการทำวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณ ศูนย์วิจัยและพัฒนาอาหารสัตว์เชียงใหม่ สำนักพัฒนาอาหารสัตว์กรมปศุสัตว์ ที่สนับสนุนนักวิชาการ เจ้าหน้าที่ และวัสดุอุปกรณ์ สำหรับใช้ดำเนินงานวิจัยในภาคสนาม

สุดท้ายนี้ ผู้เขียนขอขอบคุณกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ทุกท่าน ตลอดจนนิสิตสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา ที่ช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ จนทำให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ทศวรรษต อะโนราช



**เรื่อง:** การพัฒนาอาหารสัตว์จากฟักทองและมันสำปะหลังหมักเพื่อการนำไปเลี้ยงโคขุน

**ผู้วิจัย:** ทศวรรต อະโนราช, วิทยานิพนธ์: วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ), มหาวิทยาลัยพะเยา, 2562

**ประธานที่ปรึกษา:** ดร. ชรรค์ชัย ตันเมฆ, **กรรมการที่ปรึกษา:** รองศาสตราจารย์ ดร.โชค โสรัจกุล

**คำสำคัญ:** การเจริญ, คุณภาพซาก, โคเนื้อ, จุลินทรีย์กลุ่มที่ย่อยสลายชีวมวลพืช

### บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาผลของอาหารสัตว์ที่มีส่วนผสมของฟักทองและมันสำปะหลังหมักต่อสมรรถภาพการเจริญเติบโต การใช้อาหาร และลักษณะซากของโคเนื้อ กระบวนการหมักทำได้โดยนำฟักทองและมันสำปะหลัง ซึ่งเป็นวัตถุดิบหลัก (อัตราส่วนของแข็งต่อของเหลว 1:1) หมักร่วมกับกากน้ำตาล 1.0% และกลุ่มจุลินทรีย์ย่อยชีวมวลพืช 0.1% (*Aspergillus* spp.: *Rhizopus* spp.: *Trichoderma* spp.: and *Saccharomyces cerevisiae* in the ratio of 1:1:1:1) เป็นระยะเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิห้องเพื่อเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการและการย่อยได้ของผลิตภัณฑ์ ผลการทดลอง พบว่า อาหารหมักมีปริมาณโปรตีนสูงและสามารถเก็บไว้ได้นานกว่า 6 เดือน โดยไม่เน่าเสีย เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม เมื่อนำอาหารหมักไปพัฒนาเป็นอาหารชั้นมีปริมาณโปรตีน 12% สำหรับนำไปใช้เลี้ยงโคเนื้อ โดยใช้โคเนื้อสายพันธุ์ลูกผสมเพศผู้ตอน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ ชาร์โรเลส์ ซิมเมนทัล และแองกัส ที่มีน้ำหนักตัวเฉลี่ย  $350 \pm 50$  กก. โดยโคแต่ละตัวจะได้รับอาหารหยาบเป็นหญ้าเนเปียร์ปากช่อง 1 และเปลือกข้าวโพดแห้ง สำหรับอาหารชั้นจะใช้อาหารชั้นที่มีโปรตีน 12% ในอัตราส่วน 2% ของน้ำหนักตัวต่อวัน ทดลองเลี้ยงเป็นระยะเวลา 10 เดือน เมื่อสิ้นสุดการทดลอง พบว่าโคเนื้อลูกผสมสายพันธุ์ชาร์โรเลส์ มีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุด แต่มีอัตราการแลกเนื้อต่ำที่สุด เปอร์เซ็นต์ของซากตัดแต่งของโคเนื้อทั้งหมด มีค่าใกล้เคียงกัน (52-55%) ( $P > 0.05$ ) สำหรับเกรดไขมันแทรก พบว่าเนื้อโคลูกผสมสายพันธุ์แองกัส ได้คะแนน 3.5 จากคะแนนเต็ม 5.0

**Title:** DEVELOPMENT OF ANIMAL RATION FROM FERMENTED PUMPKIN AND CASSAVA FOR CATTLE PRODUCTION

**Author:** Tosawach Anorach, Thesis: M.S. (Biotechnology), University of Phayao, 2019.

**Advisor:** Dr.Kanchai Danmak, **Co–advisor:** Associate Professor.Dr.Choke Sorachakul

**Keywords:** Growth performances, carcass characteristics, beef cattle, biomass degrading microbial consortium

### ABSTRACT

This study was conducted to investigate the effect of concentrate feed containing fermented pumpkin and cassava on growth performance, feed utilization and carcass characteristic of beef cattles. The process was conducted by using raw material as pumpkin and cassava (solid/liquid ratio, 1:1) supplemented with 1.0% (w/v) of molasses and 0.1 % (w/v) of biomass degrading microbial consortium (*Aspergillus* spp.: *Rhizopus* spp.: *Trichoderma* spp.: and *Saccharomyces cerevisiae* in the ratio of 1:1:1:1) and then fermented for 7 days at room temperature in order to enhance the nutritive values and digestibility of their products. The results showed that fermented products had high protein content and could be persevered for more than 6 months when compared with control. The fermented products were formulated as 12% protein of fermented concentrate feed for beef cattle production. Three types of cattles including castrated male crossbred Charolais, Simmental and Angus with body weight of 350±50 kg were used. All cattle were fed with Napier Packchong 1 grass and maize husk as roughage. For concentrate feeds, 12% protein of fermented concentrate feed was fed in the ratio of 2% of body weight per day for 10 months. At the end of the experiment, crossbred Charolais showed the highest data of average daily gain (ADG) but the lowest of feed conversion rate (FCR). Dressing carcass percentage of all cattle was similar (52–55%) (P >0.05). In addition, crossbred Angus beef has got a marbling score as 3.5 out of 5.0.

# สารบัญ

บทที่	หน้า
<b>1 บทนำ</b> .....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา .....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย .....	2
สมมุติฐานของงานวิจัย.....	2
กรอบแนวคิดของแผนงานวิจัย .....	3
ขอบเขตของการวิจัย .....	3
ประโยชน์ที่จะได้รับจากการวิจัย .....	3
<b>2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง</b> .....	5
สถานการณ์การเลี้ยงโคเนื้อในประเทศไทย.....	5
การใช้อาหารหมักในการเลี้ยงโค .....	7
การหมัก (Fermentation).....	8
ลูกแป้งข้าวหมาก .....	10
ยีสต์ (Yeast) .....	10
อะไมเลส (Amylase) .....	11
เซลลูเลส (Cellulase).....	13
สตาร์ช (Starch).....	14
เซลลูโลส (Cellulose).....	15
เฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose) .....	16
ลิกนิน (Lignin) .....	17
แหล่งโภชนะที่สำคัญในอาหารโคขุน.....	18
สายพันธุ์โคเนื้อ .....	21
<b>3 วิธีดำเนินการวิจัย</b> .....	25
การเก็บตัวอย่างลูกแป้งข้าวหมาก .....	25
การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ย่อยชีวมวลจากลูกแป้งข้าวหมาก.....	25

## สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
<b>3</b>	<b>วิธีดำเนินการวิจัย (ต่อ)</b> .....
	การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราที่คัดแยกได้ .....
	29
	การผลิตเอนไซม์และการศึกษาลักษณะสมบัติบางประการของเอนไซม์ .....
	29
	การผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์ .....
	32
	การผลิตอาหารหมักและการศึกษาลักษณะทางกายภาพต่าง ๆ ของอาหารหมัก ...
	32
	การวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาของอาหารหมัก .....
	33
	การเตรียมสัต์ว์ทดลอง .....
	33
	การให้อาหารสัต์ว์ทดลอง .....
	33
	การวัดสมรรถภาพการการเจริญเติบโตและศึกษาลักษณะซากของ
	สัต์ว์ทดลอง .....
	35
	สถานที่ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัยและรวบรวมข้อมูล .....
	35
	การวิเคราะห์ทางสถิติ .....
	35
	ระยะเวลาดำเนินการวิจัย .....
	35
<b>4</b>	<b>ผลการทดลอง</b> .....
	36
	การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ย่อยชีวมวลจากลูกแป้งข้าวหมาก .....
	36
	การคัดแยกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลส .....
	36
	การคัดแยกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส .....
	37
	การวัดแอกติวิตีของเอนไซม์อะไมเลสและเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา
	ที่คัดแยกได้ .....
	37
	การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราที่คัดแยกได้ .....
	40
	การผลิตเอนไซม์และการศึกษาลักษณะสมบัติบางประการของเอนไซม์ .....
	42
	การผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์ .....
	53
	การผลิตอาหารหมัก .....
	55
	การทดสอบเชื้อในอาหารหมัก .....
	56

## สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
4 ผลการทดลอง (ต่อ).....	
การวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาของอาหารหมัก (proximate analysis) .....	56
การวัดสมรรถภาพการการเจริญเติบโตและศึกษาลักษณะซากของสัตว์ทดลอง .	57
5 บทสรุป .....	60
สรุปผลการวิจัย .....	60
อภิปรายผลการวิจัย .....	61
ข้อเสนอแนะ .....	65
บรรณานุกรม .....	66
ภาคผนวก .....	75
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ .....	76
ภาคผนวก ข การเตรียมสารละลายและการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ .....	80
ภาคผนวก ค กราฟมาตรฐานและการคำนวณค่าแอดติวิตีของเอนไซม์.....	91
ประวัติผู้วิจัย .....	95

## สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
1 แสดงคุณค่าทางโภชนาของมันสำปะหลัง ( <i>Cassava, Manihot esculenta</i> ).....	19
2 แสดงสัดส่วนของอาหารที่ให้โคทดลองในแต่ละวัน.....	34
3 แสดงอัตราส่วนของวงใส (clear zone) ต่อการเจริญและลักษณะพื้นฐานวิทยาของเชื้อราที่แยกได้จากลูกแป้งข้าวหมาก บนอาหาร SS medium ที่มี soluble starch เป็นแหล่งคาร์บอน.....	36
4 แสดงอัตราส่วนของวงใส (clear zone) ต่อการเจริญและลักษณะพื้นฐานวิทยาของเชื้อราที่แยกได้จากลูกแป้งข้าวหมาก บนอาหาร CMC agar .....	37
5 แสดงค่าแอกติวิตีจำเพาะของอะไมเลสที่ผลิตจากเชื้อราที่คัดแยกได้ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 50 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน (หน่วยเป็น Unit, U) .....	38
6 แสดงค่าแอกติวิตีจำเพาะของเซลลูเลสและไซแลนเนส ที่ผลิตจากเชื้อรา isolate UPO7 เมื่อเลี้ยงในอาหาร SS medium ที่มีกระดาษกรองเป็นแหล่งคาร์บอนแทนเซลลูโลส ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 50 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน (หน่วยเป็น Unit, U).....	39
7 แสดงค่าแอกติวิตีจำเพาะของอะไมเลสที่ผลิตจากเชื้อราที่คัดแยกได้ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน (หน่วยเป็น Unit, U) .....	42
8 แสดงค่าแอกติวิตีจำเพาะของเซลลูเลสที่ผลิตจากเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. UPO7เมื่อเลี้ยงในอาหาร SS medium ที่มีกระดาษกรองเป็นแหล่งคาร์บอนแทนเซลลูโลสที่อุณหภูมิตั้งแต่ 50 60 70 และ 80 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน (หน่วยเป็น Unit, U) .....	43
9 แสดงปริมาณคุณค่าทางโภชนาการของอาหารหมักจากฟักทองและมันสำปะหลัง.....	56
10 Growth performances crossbred beef cattle fed with fermented feed .....	58
11 Carcass characteristics of crossbred beef cattle fed with fermented feed.....	58
12 แสดงสูตรอาหารที่ใช้สำหรับเลี้ยงโคขุนในการทดลองนี้ .....	60
13 แสดงต้นทุนเมื่อเลี้ยงระยะเวลา 1 ปี .....	61
14 แสดงขั้นตอนการวัดปริมาณโปรตีน .....	89

## สารบัญภาพ

ภาพ	หน้า
1 แสดงกรอบแนวคิดของแผนงานวิจัย .....	3
2 แสดงสมการการย่อยสลายแป้งไปเป็นแอลกอฮอล์ .....	10
3 แสดงการทำงานของเอนไซม์ แอลฟา-อะไมเลส (ลูกครีสีน้ำเงิน).....	12
4 แสดงการทำงานของเอนไซม์ บีตา-อะไมเลส (ลูกครีสีแดง).....	12
5 แสดงการทำงานของเอนไซม์ แกมมา-อะไมเลส กลูโคอะไมเลสหรืออะไมโลกลูโคซิเดส (ลูกครีเหลือง) .....	13
6 แสดงโครงสร้างของอะไมโลส (amylose).....	14
7 แสดงโครงสร้างของไมโลเพกทิน (amylopectin) .....	15
8 แสดงการเชื่อมต่อกันของกลูโคสด้วยพันธะ $\beta$ -1, 4 glycosidic linkage .....	16
9 แสดงรูปแบบโมเลกุลของสายเซลลูโลส .....	16
10 แสดงรูปแบบโครงสร้างโมเลกุลของลิกนิน .....	17
11 แสดงโคลูกผสมสายพันธุ์ชาโรเลส์ (Charolais crossbred) .....	21
12 แสดงโคลูกผสมสายพันธุ์ซิมเมนทัล (Simmental crossbred).....	23
13 แสดงค่าแอกติวิตีจำเพาะของอะไมเลสที่ผลิตจากเชื้อราที่คัดแยกได้ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 50 องศาเซลเซียส .....	38
14 ค่าแอกติวิตีจำเพาะของเซลลูเลสและไซแลนเนสที่ผลิตจาก เชื้อรา IsolateUP07 เมื่อเลี้ยงในอาหาร SS medium ที่มีกระดาษกรองเป็นแหล่งคาร์บอนแทนเซลลูโลส ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 50 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน (หน่วยเป็น Unit, U).....	39
15 แสดงลักษณะการเจริญของ <i>Rhizopus</i> spp. UP01 ที่เจริญบนอาหาร PDA เป็นระยะเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 30 องศาเซลเซียส.....	40
16 แสดงลักษณะการเจริญของ <i>Trichoderma</i> spp. UP07 ที่เจริญบนอาหาร PDA เป็นระยะเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 30 องศาเซลเซียส.....	41
17 แสดงค่าแอกติวิตีจำเพาะของอะไมเลสที่ผลิตจากเชื้อราที่คัดแยกได้ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส.....	42

## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพ		หน้า
18	แสดงค่าแอกติวิตีจำเพาะของ Total cellulase ของเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. UP07 ที่คัดแยกได้ เมื่อเลี้ยงในอาหาร SS medium ที่มีกระดาษกรอง เป็นแหล่งคาร์บอนแทนเซลลูโลส.....	44
19	แสดงค่าแอกติวิตีจำเพาะของเอกโซกลูคาเนส ของเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. UP07 ที่คัดแยกได้ เมื่อเลี้ยงในอาหาร SS medium ที่มีกระดาษกรอง เป็นแหล่งคาร์บอนแทนเซลลูโลส.....	44
20	แสดงค่าแอกติวิตีจำเพาะของเอนโดกลูคาเนส ของเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. UP07 ที่คัดแยกได้เมื่อเลี้ยงในอาหาร SS medium ที่มีกระดาษกรอง เป็นแหล่งคาร์บอนแทนเซลลูโลส.....	45
21	แสดงค่าแอกติวิตีจำเพาะของเบตา-กลูโคซิเดส ของเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. UP07 ที่คัดแยกได้เมื่อเลี้ยงในอาหาร SS medium ที่มีกระดาษกรอง เป็นแหล่งคาร์บอนแทนเซลลูโลส.....	45
22	แสดงค่าแอกติวิตีจำเพาะของไซแลนเนส ของเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. UP07 ที่คัดแยกได้เมื่อเลี้ยงในอาหาร SS medium ที่มีกระดาษกรองเป็นแหล่งคาร์บอนแทนเซลลูโลส .....	46
23	แสดงค่าแอกติวิตีจำเพาะของเซลลูเลสและไซแลนเนสที่ผลิตจาก <i>Trichoderma</i> spp. UP07.....	46
24	แสดงผลของ pH ต่อค่าแอกติวิตีจำเพาะของเซลลูเลสและไซแลนเนสที่ผลิตจาก <i>Trichoderma</i> spp. UP07 .....	47
25	แสดงผลของ metal ion ต่อค่าแอกติวิตีจำเพาะของเซลลูเลสและไซแลนเนส ที่ผลิตจาก <i>Trichoderma</i> spp. UP07 .....	48
26	แสดงน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์อะไมเลส .....	48
27	แสดงน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยเปลือกข้าวโพดด้วยเอนไซม์เซลลูเลส .....	49
28	แสดงน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยซังข้าวโพดด้วยเอนไซม์เซลลูเลส .....	49
29	น้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยฟางข้าวด้วยเอนไซม์เซลลูเลส .....	50
30	แสดงความเสถียรของเอนไซม์อะไมเลสที่ช่วงเวลาต่าง ๆ.....	50

## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพ	หน้า
31 แสดงความเสถียรของเอนไซม์เซลลูเลส (Total cellulase) ที่ช่วงเวลาต่าง ๆ.....	51
32 แสดงความเสถียรของเอนไซม์เซลลูเลส (exoglucanase) ที่ช่วงเวลาต่าง ๆ.....	51
33 แสดงความเสถียรของเอนไซม์เซลลูเลส (endoglucanase) ที่ช่วงเวลาต่าง ๆ .....	52
34 แสดงความเสถียรของเอนไซม์เซลลูเลส (betaglucosidase) ที่ช่วงเวลาต่าง ๆ.....	52
35 แสดงความเสถียรของเอนไซม์ไซแลนเนส ที่ช่วงเวลาต่าง ๆ.....	53
36 แสดงหัวเชื้อจุลินทรีย์สำหรับใช้ผลิตอาหารหมักจากวัสดุทางการเกษตร.....	54
37 แสดงการทดสอบหัวเชื้อโดยใช้วิธีการ spread plate โดยทำการเจือจาง ความเข้มข้นที่ 10,000 เท่า ลงในอาหาร PDA.....	54
38 แสดงมันสำปะหลังที่ผ่านกระบวนการหมักร่วมกับหัวเชื้อจุลินทรีย์หมักไว้ เป็นระยะเวลา 15 วัน .....	55
39 แสดงผักทองที่ผ่านกระบวนการหมักร่วมกับหัวเชื้อจุลินทรีย์หมักไว้ เป็นระยะเวลา 15 วัน .....	55
40 แสดงคุณภาพซากและไขมันของโคขุนลูกผสมที่เลี้ยงด้วยขุ่นเป็นระยะเวลา 12 เดือน และบ่มไว้ในห้องเย็นอุณหภูมิ 4°C เป็นระยะเวลา 7 วัน.....	59
41 แสดงกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส .....	91
42 แสดงกราฟมาตรฐานน้ำตาลไซโลส .....	92
43 แสดงกราฟมาตรฐานโปรตีน.....	93

## บทที่ 1

### บทนำ

#### ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ประเทศไทยมีโคเนื้อ 4,407,108 ตัว จากเกษตรกร 764,668 ครัวเรือน และโคนม 509,524 ตัว จากเกษตรกร 16,248 ครัวเรือน ในเขตปศุสัตว์ที่ 5 ของส่วนจังหวัดพะเยา พบว่ามีการผลิตโคเนื้อและโคนมในปริมาณที่สูง คือ โคเนื้อ 36,961 ตัว จากเกษตรกร 4,010 ครัวเรือน และโคนม 244 ตัว จากเกษตรกร 22 ครัวเรือน ซึ่งในปี 2557 ที่ผ่านมามีปริมาณการส่งออกโคเนื้อ คิดเป็นมูลค่า 7,122,655,693 บาท (ศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร กรมปศุสัตว์, 2557)

จากสถิติของกรมปศุสัตว์ พบว่า การผลิตโคเนื้อและโคนม ตั้งแต่ช่วงปี พ.ศ. 2557 ที่ผ่านมามีอัตราการผลิตเพิ่มขึ้นประมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ อาจเป็นเพราะว่าราคาพืชผลทางการเกษตรที่ตกต่ำ เกษตรกรจึงหันมาเลี้ยงโคกันมากขึ้น และจากการลงพื้นที่สำรวจกลุ่มเกษตรกรผู้เลี้ยงโคเนื้อในพื้นที่จังหวัดพะเยา พบว่า ยังมีปัญหาอยู่หลายประการ เช่น ขาดความรู้ด้านการจัดการปัญหาโรคระบาด และโดยเฉพาะอย่างยิ่งปัญหาการขาดแคลนอาหารสัตว์ โดยเฉพาะหญ้าอาหารสัตว์ในช่วงฤดูแล้ง (ส่วนวิจัยเศรษฐกิจปศุสัตว์และประมง สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2549) และจากการสอบถามข้อมูล โดยการสัมภาษณ์ นายมานิต อินต๊ะสาร ประธานสหกรณ์โคขุนดอกคำใต้ ตำบลบ้านถ้ำ อำเภอดอกคำใต้ จังหวัดพะเยา พบว่า การผลิตโคเนื้อ โดยเฉพาะโคขุน ต้นทุนมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ จะอยู่ในส่วนของอาหารสัตว์และในฤดูแล้งมักจะมีปัญหาการขาดแคลนหญ้าอาหารสัตว์ และหญ้ามีราคาแพง ทำให้เกษตรกรแบกภาระต้นทุนมาก เกษตรกรจึงขาดแรงจูงใจในการเลี้ยงโค และหันไปประกอบอาชีพอื่นแทน ดังนั้นถ้ามีแนวทางนำวัสดุทางการเกษตรที่หาง่ายในท้องถิ่นมาผลิตเป็นอาหารสัตว์ และเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการเพื่อนำไปเลี้ยงโคขุน จะทำให้ช่วยแก้ไขปัญหาด้านต้นทุนอาหารสัตว์ และปัญหาการขาดแคลนอาหารสัตว์ได้อย่างยั่งยืน

ซึ่งในเบื้องต้นได้มีการแก้ไขปัญหาดังกล่าว คือ มีการใช้เศษเหลือจากการปลูกข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ มาผลิตเป็นอาหารหมักสำหรับทดแทนหญ้าอาหารสัตว์ในช่วงฤดูแล้ง แต่ก็ยังมีปริมาณโปรตีนในอาหารหมักที่ยังไม่เพียงพอต่อการผลิตโคขุน จึงได้หาวัสดุที่หาได้ง่ายในท้องถิ่นที่มีราคาถูก มาผลิตเป็นอาหารหมักที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง และต้นทุนต่ำเพื่อนำมาผลิตเป็นอาหารที่มีโปรตีนสูง สำหรับนำไปใช้เลี้ยงโคขุน และจากการสำรวจพื้นที่ในจังหวัดพะเยา พบว่า

ในจังหวัดพะเยามีการเพาะปลูกพืชทองและมันสำปะหลังจำนวนมาก อย่างเช่น พืชทองที่เกษตรกรเพาะปลูก จะเป็นพืชทองที่ขายเมล็ดให้กับโรงงาน ส่วนของเนื้อพืชทองก็จะทิ้งไป ซึ่งแต่ละวันจะมีปริมาณเนื้อพืชทองไม่ต่ำกว่า 1 ตัน ดังนั้น ถ้าหากมีการใช้ผลผลิตทางการเกษตรที่หาง่ายในท้องถิ่นและมีราคาถูก เช่น มันเส้น ซึ่งมีราคาประมาณ 2-5 บาทต่อกิโลกรัม และพืชทองราคา 1 บาทต่อกิโลกรัม มาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเป็นอาหารสัตว์ จะทำให้ช่วยแก้ไขปัญหาดังกล่าวได้ ซึ่งนอกจากเกษตรกรผู้เลี้ยงโคขุนจะได้วัตถุดิบมาผลิตเป็นอาหารสัตว์ที่มีราคาถูกแล้วเกษตรกรผู้ปลูกพืชทอง และเกษตรกรผู้ปลูกมันสำปะหลัง ยังได้กำไรจากการขายผลผลิตทางการเกษตรได้อีกช่องทางหนึ่ง โดยไม่ต้องกังวลเรื่องราคาของผลผลิตที่ตกต่ำ

ดังนั้น ในโครงการวิจัยนี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาอาหารหมักโดยใช้ผลผลิตทางการเกษตรในท้องถิ่น ได้แก่ มันสำปะหลัง และพืชทอง มาหมักร่วมกับหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตได้เพื่อนำไปใช้เป็นอาหารเลี้ยงโคขุน

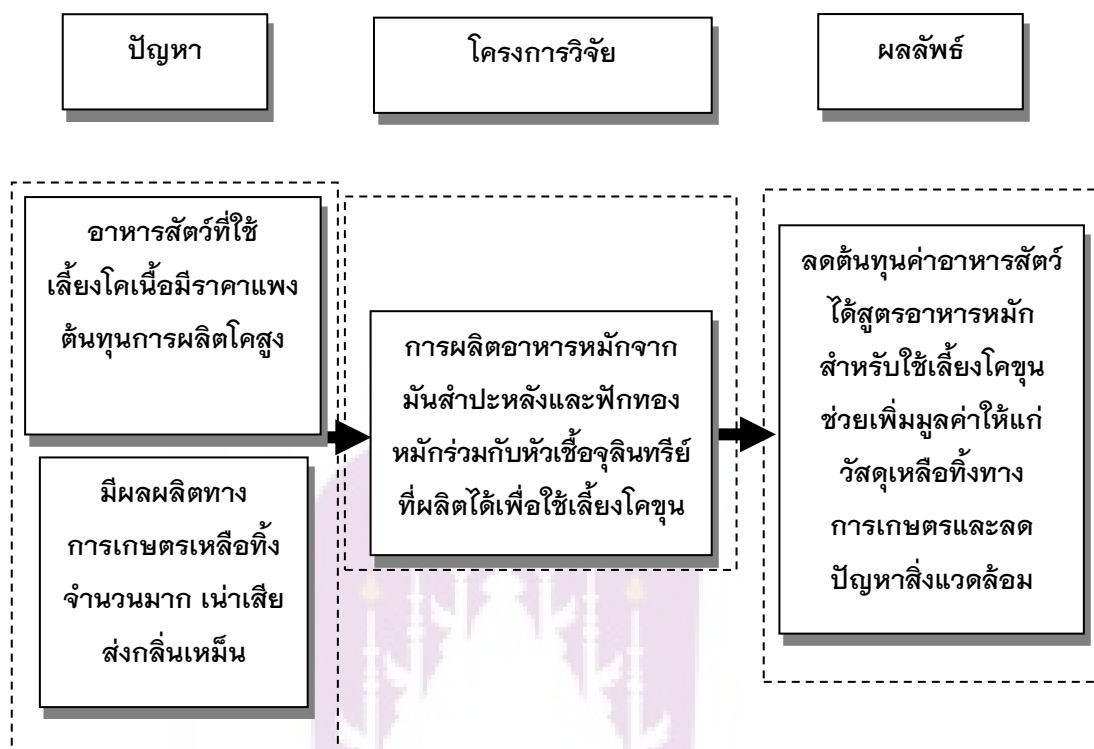
#### **วัตถุประสงค์ของการวิจัย**

1. เพื่อทำการคัดแยกจุลินทรีย์จากลูกแป้งหมัก แล้วนำมาศึกษาศักยภาพในกระบวนการหมัก และผลิตเป็นหัวเชื้อ
2. เพื่อศึกษาผลของการใช้มันสำปะหลัง และพืชทองหมักร่วมกับหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตได้ในการนำไปใช้เลี้ยงโคขุน

#### **สมมุติฐานของงานวิจัย**

การหมักมันสำปะหลังและพืชทองร่วมกับหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตได้สามารถเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการ โดยเฉพาะในส่วนของโปรตีน และสามารถนำไปผสมเป็นอาหารสำหรับนำไปใช้เลี้ยงโคขุนได้

## กรอบแนวคิดของแผนงานวิจัย



ภาพ 1 แสดงกรอบแนวคิดของแผนงานวิจัย

### ขอบเขตของการวิจัย

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นศึกษาจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการหมักที่ตัดแยกได้จากลูกแป้ง และนำมาผลิตเป็นหัวเชื้อสำหรับใช้ในการหมักมันสำปะหลังและฟักทอง และทำการศึกษาคุณค่าทางโภชนาการของอาหารหมักที่ผลิตได้ เพื่อนำไปใช้เลี้ยงโคเนื้อลูกผสมเลือดยุโรป (สายพันธุ์ชาร์โรเลส์ และซิมเมนทัล)

### ประโยชน์ที่จะได้รับการวิจัย

1. ได้อาหารหมักที่มีราคาถูกลง ทำให้ต้นทุนการผลิตโคขุนต่ำลง
2. เป็นแนวทางในการผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์เพื่อใช้ในการผลิตอาหารหมักและจำหน่ายแก่กลุ่มเกษตรกรเป้าหมาย
3. ช่วยลดปริมาณผลผลิตทางการเกษตรที่มีมากจนล้นตลาด
4. ช่วยแก้ไขปัญหามลพิษของเศษเหลือทิ้งทางการเกษตร

5. สามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อลดต้นทุนของการผลิตสัตว์อื่น ๆ เช่น กระบือ และโคขาวลำพูน ของศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์พะเยา รวมถึงโคเนื้อของเกษตรกรในพื้นที่



## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### สถานการณ์การเลี้ยงโคเนื้อในประเทศไทย

การเลี้ยงโคเนื้อเป็นอาชีพทางการเกษตรที่สำคัญอีกอาชีพหนึ่งในประเทศไทย ในแต่ละปีจะมีมูลค่าการซื้อขายไม่ต่ำกว่า 7 หมื่นล้านบาท และเกี่ยวข้องกับเกษตรกรไม่น้อยกว่า 1.3 ล้านครอบครัว (ศูนย์สารสนเทศ กรมปศุสัตว์, 2556) การเลี้ยงโคเนื้อของเกษตรกรไทยในอดีตจะเลี้ยงไว้เพื่อใช้แรงงานสำหรับทำการเกษตรเป็นหลัก ปัจจุบันรูปแบบการเลี้ยงโคเนื้อได้เปลี่ยนมาเป็นการเลี้ยงเพื่อจำหน่ายเป็นโคเนื้อเพื่อผลิตเนื้อโค เนื่องจากความต้องการบริโภคเนื้อสัตว์เพิ่มขึ้น ทั้งจากความต้องการของประชากรในประเทศเอง และนักท่องเที่ยวจากต่างประเทศ จากสถิติกรมปศุสัตว์ปี 2559 ประเทศไทยมีโคเนื้อ จำนวน 4.92 ล้านตัว สามารถผลิตลูกโคได้จำนวน 1.01 ล้านตัว (ศูนย์สารสนเทศ กรมปศุสัตว์, 2556) หรือ 20% ของโควัยเจริญพันธุ์เท่านั้น ซึ่งอาจสืบเนื่องมาจากเหตุผลหลายประการ เช่น ขาดความรู้ด้านการจัดการและดูแล ปัญหาโรคระบาด และโดยเฉพาะอย่างยิ่งราคาต้นทุนที่สูงของอาหารสัตว์ โดยเฉพาะอาหารชั้นซึ่งมีส่วนประกอบของกากเปียกที่มีราคาแพง

จากข้อมูลของสำนักงานปศุสัตว์จังหวัดพะเยา ว่าด้วยนโยบายเร่งด่วนของรัฐบาลในการยกระดับราคาสินค้าเกษตรเพื่อเพิ่มรายได้ให้แก่เกษตรกรในการดำรงชีพ และมีนโยบายสำคัญที่จะเพิ่มมูลค่าการส่งออกสินค้าเกษตรและอาหารไทย พัฒนาผู้ประกอบการด้านสินค้าปศุสัตว์อาหารฮาลาลให้ได้มาตรฐาน ซึ่งสอดคล้องกับยุทธศาสตร์การเข้าสู่ประชาคมอาเซียน ในด้านการเสริมสร้างความสามารถในการแข่งขันของสินค้าบริการ การค้า และการลงทุน และสอดคล้องกับยุทธศาสตร์กลุ่มภาคเหนือตอนบน 2: การสร้างความเข้มแข็งและเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตภาคเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตรเพื่อเพิ่มมูลค่าสินค้าเกษตรที่มีศักยภาพ กลุ่มจังหวัดภาคเหนือตอนบน 2 เป็นแหล่งผลิตการเลี้ยงโคเนื้อพื้นเมือง มาเป็นระยะเวลา ยาวนานหลาย 10 ปี แต่ต่อมาสถานการณ์ของเศรษฐกิจโลกเปลี่ยนแปลงไป และเกษตรกรผู้เลี้ยงโคเนื้อ มีปริมาณลดลงเรื่อย ๆ ทั้งนี้เนื่องมาจากปัจจัยหลายประการที่เป็นตัวแปร อาทิเช่น ประชากรของโลกและของประเทศไทยมีปริมาณเพิ่มขึ้น ทำให้อัตราการบริโภคไม่สอดคล้องกับปริมาณการผลิตโดยเฉพาะในประเทศไทย จึงเป็นผลให้ประชากรโคเนื้อในประเทศลดลงอย่างมหาศาล เกษตรกรผู้เลี้ยงแข่งขันด้านคุณภาพโคจากต่างประเทศไม่ได้ เนื่องจากโคเนื้อส่วนใหญ่เป็นโคพื้นเมือง จึงก่อให้เกิดการจำหน่ายโคที่เลี้ยงออกไป เพราะถูกกดราคาอยู่บ่อย ๆ

จึงเป็นวิกฤตการณ์ผันผวน ทำให้เกษตรกรเกิดความเชื่อมั่นน้อยลงกว่าเดิมในราคาตลาดโคพื้นเมืองประจำถิ่น และมีการจำหน่ายสู่ตลาดจีน และเวียดนามเป็นจำนวนมาก ทั้ง ๆ ที่สภาพพื้นที่ภูมิอากาศของกลุ่มภาคเหนือตอนบนมีศักยภาพในการผลิตสูง เนื่องจากมีสภาพพื้นที่กว้างใหญ่ มีพืชทางการเกษตรที่สามารถนำมาเป็นอาหารสัตว์ได้เป็นจำนวนมาก ตลอดจนมีแหล่งปลูกพืชอาหารสัตว์กว้างใหญ่ไพศาล ประชากรส่วนใหญ่ในภาคเหนือตอนบน ประกอบด้วยจังหวัดพะเยา แพร่ น่าน และเชียงราย มีการบริโภคโคเนื้อเป็นอาหารท้องถิ่นทุก ๆ จังหวัด และอัตราแนวโน้มเพิ่มขึ้นของประชากรมากขึ้นทุกปี จากแหล่งข้อมูลด้านเศรษฐกิจการเกษตรของสำนักงานเศรษฐกิจแห่งชาติ ปี 2552 มีการลดลงจำนวนประชากรในพื้นที่เขตภาคเหนือ ตอนบนทั้ง 4 จังหวัด ประมาณ 34% จากปี 2551 ซึ่งสถิติการเลี้ยงโคจากภาคเหนือตอนบนมีโคเนื้ออยู่เพียงจำนวน 353,167 ตัว และมีแนวโน้มจะลดลงเรื่อย ๆ หากไม่มีการสนับสนุนการเลี้ยงโคหรือการพัฒนาปรับปรุงด้านต่าง ๆ เช่น อาหารสัตว์ และสายพันธุ์โคให้ดีขึ้น จะทำให้ธุรกิจการเลี้ยงโคเนื้อลดปริมาณอย่างรวดเร็ว นอกจากนี้จะต้องเพิ่มองค์ความรู้ แนวทาง เทคโนโลยี แผนใหม่ ปรับปรุง องค์ความรู้แก่เกษตรกร และเพิ่มศักยภาพของกลุ่มเกษตรกรให้มีความเข้มแข็งยิ่งขึ้น ทันท่วงทีสถานการณ์ การตลาด และครัวโลกด้านอาหารปลอดภัย สามารถรองรับตลาดของครัวโลกด้านอาหารปลอดภัยในอนาคตได้ และจากสถิติของศูนย์สารสนเทศกรมปศุสัตว์ หากย้อนกลับไปดูข้อมูลจำนวนโคเนื้อ เมื่อปี พ.ศ. 2554-2555 ที่ผ่านมา พบว่าการผลิตโคเนื้อ มีอัตราการผลิตลดลงประมาณ 6-8 เปอร์เซ็นต์ (ศูนย์สารสนเทศ กรมปศุสัตว์, 2556) ซึ่งอาจสืบเนื่องมาจากเหตุผลหลายประการ เช่น ขาดความรู้ด้านการจัดการและดูแลปัญหาโรคระบาด และโดยเฉพาะอย่างยิ่งราคาต้นทุนที่สูงของอาหารสัตว์โดยเฉพาะอาหารข้นซึ่งมีส่วนประกอบของกากเป็ยร์มีราคาแพง ร่วมกับการสอบถามข้อมูลโดยการสัมภาษณ์นายมานิต อินดีะสาร ประธานสหกรณ์โคขุนดอกคำใต้ จำกัด และสอดคล้องกับการรายงานของส่วนวิจัยเศรษฐกิจปศุสัตว์และประมง สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร ซึ่งสรุปได้ว่า ต้นทุนการผลิตโคขุนจะอยู่ในส่วนของอาหารสัตว์ โดยเฉพาะอาหารสัตว์ซึ่งเป็นส่วนของต้นทุนผันแปรที่เป็นเงินสดมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ทำให้เกษตรกรแบกรับภาระต้นทุนมาก เกษตรกรจึงขาดแรงจูงใจในการเลี้ยงโค และหันไปประกอบอาชีพอื่นแทน และปัญหาอีกอย่างหนึ่งก็คือ ในช่วงฤดูแล้งมักจะขาดแคลนพืชอาหารสัตว์ซึ่งเป็นอาหารหยาบ ดังนั้น ถ้ามีแนวทางนำวัสดุทางการเกษตรที่หาง่ายในท้องถิ่นมาผลิตเป็นอาหารเพื่อเลี้ยงโคขุน ทั้งในส่วนของการอาหารข้น และอาหารหยาบ จะทำให้ช่วยแก้ไขปัญหาด้านต้นทุนอาหารสัตว์ได้อย่างยั่งยืน

## การใช้อาหารหมักในการเลี้ยงโค

ในต่างประเทศช่วงที่ขาดแคลนอาหารสัตว์มักจะมีการนำพืชและวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรต่าง ๆ มาหมัก เพื่อจำหน่ายเป็นอาหารสัตว์โปรตีนสูง (silage) เพื่อผสมในอาหารชั้นได้ เพราะจากรายงานวิจัยของ Bennett, et al. (1995) พบว่า การเลี้ยงโคด้วยอาหารชั้นที่ทำให้เนื้อโคมีรสชาติดีกว่าการเลี้ยงด้วยหญ้า และมีอัตราการเจริญและน้ำหนักซากที่ดีกว่า ในขณะที่อาหารผสมสำเร็จรูป (Total Mixed Ration: TMR) จะเป็นอาหารที่ผลิตขึ้นมาจากการนำอาหารหยาบ และอาหารชั้นมาผสมกันในอัตราส่วนที่เหมาะสม ดังเช่นในประเทศเนเธอร์แลนด์ ฝรั่งเศส และอิตาลี จะมีการใช้พืชอาหารหมักเพื่อเป็นอาหารสัตว์มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ (ดร.ณิ ศรีชนะ, 2550; วัชรวิทย์ มีหนองใหญ่ และคณะ, 2555)

สำหรับการนำวัสดุดังกล่าวมาผลิตเป็นอาหารหมักจำเป็นต้องคำนึงถึงองค์ประกอบต่าง ๆ ด้วย เช่น ปริมาณของวัตถุดิบ แหล่งไนโตรเจน โดยเฉพาะจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมัก ซึ่งจุลินทรีย์ที่ใช้ส่วนมากเป็นกลุ่มของเชื้อราที่มีความสามารถในการใช้คาร์โบไฮเดรตและผลิตเอนไซม์อะไมเลส เช่น *Rhizopus oryzae* และยีสต์ชนิดต่าง ๆ ซึ่งที่นิยมใช้กัน คือ *Saccharomyces* spp. (Saito, et al., 2004; Okine, et al., 2007)

คามินท์ ไชยมงคล และสุริยะ สะวานนท์ (2555) รายงานว่า ได้ศึกษาผลของการใช้ไบโมันสำปะหลังแห้ง และไบโมันสำปะหลังหมักเปรียบเทียบกับการใช้ใบกระถินในสูตรอาหารโคขุนต่อสมรรถภาพการผลิต ลักษณะซาก และผลตอบแทนทางเศรษฐกิจ โดยการใช้ไบโมันสำปะหลังหมักในสูตรอาหารผสมเสร็จ (TMR) ที่ระดับ 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ (วัตถุดิบแห้ง) พบว่า สมรรถภาพการผลิตของโคแต่ละกลุ่มไม่แตกต่างกันในทุกช่วงการทดลอง ส่วนลักษณะซากโคทดลองไม่แตกต่างกันในทางสถิติ

ศุภชัย อุดชาชน และคณะ (2558) รายงานว่า การใช้กากมันสำปะหลังหมักยีสต์ทดแทนอาหารชั้นในโคพันธุ์กบินทร์บุรี เพศผู้ไม่ต้อน พบว่า อัตราการเจริญเติบโต ปริมาณอาหารที่กินได้ ปริมาณโปรตีนที่ได้รับต่อวัน ลักษณะซาก ชิ้นส่วนของเนื้อหลัก ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเทียบกับโคกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับกากมันหมักยีสต์

สุริยะ สะวานนท์ และคณะ (2554) ศึกษาผลของการเสริมกระถินหมักต่อสมรรถภาพการผลิต คุณลักษณะซาก ของโคเนื้อลูกผสมเพศผู้ พบว่า การเสริมกระถินหมักที่ 3 กิโลกรัม น้ำหนักสดต่อตัวต่อวัน มีผลทำให้ปริมาณอาหารที่กิน อัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน น้ำหนักตัวเมื่อสิ้นสุดการทดลอง และน้ำหนักซาก สูงกว่าโคกลุ่มที่ไม่ได้เสริมกระถินหมัก (กลุ่มควบคุม) ในขณะที่ลักษณะซากในด้านอื่น ๆ แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

และจากผลของการเสริมกระถินหมักที่ทำให้โคมีอัตราการเจริญเติบโตดีกว่านั้น ส่งผลทำให้ได้รับผลตอบแทนทางเศรษฐกิจ (กำไร) จากการขุนโคสูงกว่ากลุ่มควบคุม (3,924 บาทต่อตัว)

## การหมัก (Fermentation)

การหมัก Fermentation มาจากภาษาละติน คือ Fervere หมายถึง การเดือด (Boil) ซึ่งสื่อถึงลักษณะของฟองก๊าซที่เกิดขึ้นจากการหมักผลไม้และข้าวมอลต์โดยยีสต์ โดยลักษณะของฟองที่เกิดขึ้น ก็เนื่องมาจากยีสต์ใช้น้ำตาลในผลไม้เป็นแหล่งอาหาร (แหล่งพลังงาน และแหล่งคาร์บอน) ทำให้ได้คาร์บอนไดออกไซด์และแอลกอฮอล์ ซึ่งฟองที่เกิดขึ้นมาจากก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

การหมัก เป็นกระบวนการชีวเคมีภายในเซลล์ เพื่อสร้างพลังงานจากการย่อยสลายสารอินทรีย์ หรือการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของสารประกอบอินทรีย์ โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์จากจุลินทรีย์

### ประเภทของการหมัก

#### 1. แบ่งตามผลผลิต

1.1 ผลผลิตเป็นตัวเซลล์ (Microbial cell) เช่น การผลิตยีสต์เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมขนมอบ (Bakers' yeast) การผลิตเซลล์จุลินทรีย์เพื่อใช้เป็นอาหารมนุษย์และสัตว์ (Single cell protein, SCP)

1.2 ผลผลิตเป็นเอนไซม์ (Microbial enzyme) ส่วนใหญ่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น เอนไซม์อะไมเลส (Amylase) เอนไซม์ไลเปส (Lipase) เอนไซม์โปรตีเอส (Proteases) เป็นต้น

1.3 ผลผลิตเป็นสารเมตาบอไลต์ (Microbial metabolite) อาจจะเป็นสารเมตาบอไลต์ปฐมภูมิ (Primary metabolite) เช่น เอทานอล บิวทานอล ไลซีน วิตามิน เป็นต้น จุลินทรีย์จะผลิตสารเหล่านี้ขึ้นในช่วง Log phase และสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ (Secondary metabolite) ซึ่งเป็นผลผลิตจากกระบวนการเมตาบอลิซึมปฐมภูมิ ซึ่งพบในจุลินทรีย์บางชนิดในช่วง Stationary phase ของการเจริญ แต่มีความสำคัญ เช่น ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ เป็นสารส่งเสริมการเจริญเติบโต (Growth promoter) หรือมีคุณสมบัติเป็นยารักษาโรค เป็นต้น

1.4 เกิดการเปลี่ยนรูปของสารประกอบที่เติมลงไป (Transformation process) เป็นกระบวนการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารประกอบให้อยู่ในรูปที่คล้ายกัน แต่มีราคาสูงขึ้น เช่น กระบวนการผลิตน้ำส้มสายชู (การเปลี่ยนเอทานอลไปเป็นกรดน้ำส้ม) การผลิตยาปฏิชีวนะ เป็นต้น

## 2. แบ่งตามความต้องการอากาศหรือออกซิเจน

2.1 Aerobic fermentation เป็นการหมักที่ต้องการอากาศ เช่น การหมักกรดซิตริก และกรดน้ำส้ม เป็นต้น

2.2 Anaerobic fermentation เป็นการหมักที่ไม่ต้องการออกซิเจน เช่น การหมัก อะซิโตน และบิวทานอล

## 3. แบ่งตามสภาพการควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อ

3.1 Septic fermentation เป็นการหมักในสภาพเปิด ไม่จำเป็นต้องฆ่าเชื้อจุลินทรีย์

3.2 Semi-septic fermentation เป็นการหมักในสภาพปิดเพื่อป้องกันการปนเปื้อนเชื้อ จากภายนอก แต่ไม่จำเป็นต้องฆ่าเชื้อที่ปนเปื้อนมากับวัตถุดิบ

3.3 Aseptic fermentation เป็นการหมักในสภาพปิดที่ปราศจากการปนเปื้อนเชื้อ ทั้งหมด

## 4. แบ่งตามลักษณะหรือปริมาณน้ำในอาหารเลี้ยงเชื้อ (วิเชียร ลีลาวัชรมาศ, 2553)

4.1 Solid state fermentation คือ กระบวนการหมักแบบแห้ง เป็นกระบวนการหมัก ที่ให้เชื้อจุลินทรีย์เจริญเติบโตบนอาหารที่มีลักษณะเป็นของแข็ง ได้แก่ การหมักโคจิต่าง ๆ อย่างเช่น ซีอิ๊ว ลูกแป้ง การหมักรำข้าว หรือกากมันสำปะหลัง ซึ่งการหมักในลักษณะนี้ เป็นการหมักที่มีประสิทธิภาพสูง มักจะใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์ เช่น การผลิต สารปฏิชีวนะ การผลิตโปรตีนในอาหารสัตว์ การผลิตเอนไซม์ การผลิต เอทานอล เป็นต้น

4.2 Submerge state fermentation คือ กระบวนการหมักแบบเปียกเป็นกระบวนการหมัก ที่มีการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารที่มีลักษณะเหลว ได้แก่ การผลิตเบียร์ การผลิตกรดมะนาว กรดแลกติก และกรดอะซิติก เป็นต้น

## 5. แบ่งตามลักษณะของกระบวนการที่ใช้

5.1 การหมักแบบไม่ต่อเนื่อง (Batch fermentation) ทำในระบบปิดที่มีสารอาหารเริ่มต้น ปริมาณจำกัด เมื่อใส่จุลินทรีย์เพาะเลี้ยงลงไปในระบบแบบต่อเนื่องแล้วจะไม่มี การเติมสารใด ๆ ลงไปอีก

5.2 การหมักแบบต่อเนื่อง (Continuous fermentation) เป็นโดยมีการเติมอาหารใหม่ และถ่ายอาหารเก่าออกจากระบบในอัตราเดียวกันตลอดเวลา

5.3 Fed-batch fermentation เป็นการหมักที่มีการเติมสารอาหารบางอย่างเพิ่มลงไป ในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นระยะ ๆ

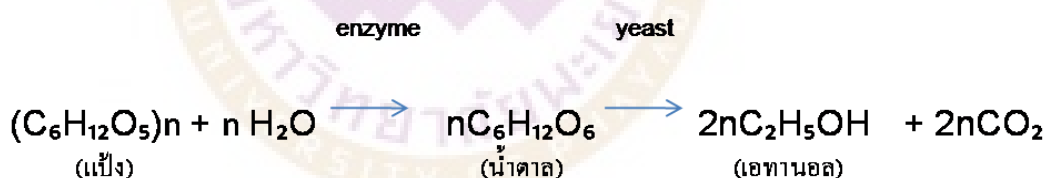
## ลูกแป้งข้าวหมาก

การทำลูกแป้งหมักเป็นภูมิปัญญาพื้นบ้านที่มีมายาวนาน ผู้ผลิตต้องมีความชำนาญ และจะมีการสืบทอดสูตรกรรมวิธีการผลิตภายในครอบครัว ลูกแป้งหมักเป็นกล้าเชื้อจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ ที่ได้จากการผสมแป้งข้าวเจ้ากับลูกแป้งเดิมที่สำเร็จแล้ว เพื่อเป็นการต่อเชื้อ และมีส่วนผสมของ กระเทียม ชিং ข่า ชะเอม ดีปลี และพริกไทย เป็นต้น เพื่อช่วยในการควบคุมเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการได้ คุณภาพของลูกแป้งหมักขึ้นอยู่กับวัตถุดิบและกรรมวิธีในการผลิต การนำลูกแป้งไปใช้ประโยชน์เพื่อการผลิตข้าวหมากหรือสาโทเป็นหลัก ซึ่งจะใช้ข้าวเป็นวัตถุดิบหลักในการหมัก ในลูกแป้งหมัก ประกอบด้วย จุลินทรีย์หลายชนิด ได้แก่ รากลุ่ม *Amylomyces* sp. *Rhizopus* sp. และ *Aspergillus* sp. ส่วนยีสต์เป็นกลุ่ม *Saccharomyces* sp. และยังมีแบคทีเรียแลคติก เป็นต้น ซึ่งบทบาทในกระบวนการหมักของเชื้อจุลินทรีย์ในลูกแป้งหมัก จะเป็นการเปลี่ยนแป้งไปเป็นน้ำตาล โดยกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์อะไมเลส และกลุ่มที่ใช้ น้ำตาลที่เกิดขึ้นได้เป็นเอทานอลและคาร์บอนไดออกไซด์

### บทบาทของจุลินทรีย์ในลูกแป้งข้าวหมากต่อกระบวนการหมัก

บทบาทของจุลินทรีย์ที่พบในลูกแป้งข้าวหมากนั้นมีอยู่ 2 ประเภท คือ

1. การเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาล โดยจุลินทรีย์ในกลุ่มที่สร้างเอนไซม์อะไมเลส
2. การหมักน้ำตาลที่เกิดขึ้นให้เป็นเอทานอลกับคาร์บอนไดออกไซด์โดยกลุ่มของยีสต์



ภาพ 2 แสดงสมการการย่อยสลายแป้งไปเป็นแอลกอฮอล์

## ยีสต์ (Yeast)

ยีสต์ เป็นสิ่งมีชีวิตในอาณาจักรเห็ดรา (Kingdom Fungi) แต่มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว (Unicellular) มีขนาด 5–10 ไมครอน มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส (eukaryotic micro-organisms) และมีรูปร่างหลายแบบ เช่น รูปร่างกลม รี สามเหลี่ยม เป็นต้น ส่วนใหญ่มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (asexual reproduction) โดยวิธีการแตกหน่อ (budding) พบทั่วไปในธรรมชาติในดิน ในน้ำ ในส่วนต่าง ๆ ของพืช ยีสต์บางชนิดพบอยู่กับแมลง และในกระเพาะของสัตว์บางชนิด แหล่งที่

มักจะพบยีสต์อยู่บ่อย ๆ คือ แหล่งที่มีน้ำตาลความเข้มข้นสูง เช่น น้ำผลไม้ที่มีรสหวาน ยีสต์เป็นสิ่งมีชีวิตที่มีขนาดเล็กมาก จัดอยู่ในกลุ่มจำพวกเห็ด รา (Fungi) ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่รู้จักกันมาตั้งแต่สมัยโบราณ มีการนำยีสต์มาใช้ประโยชน์นานมาแล้ว โดยเฉพาะการผลิตอาหารที่มีแอลกอฮอล์ แม้แต่คนไทยก็รู้จักใช้ประโยชน์จากยีสต์มาเป็นเวลานาน เช่น ในการทำอาหารหมักบางชนิด ได้แก่ ข้าวหมาก ปลาแจ่ว ของดองของเมาหลายชนิด เช่น อุ สาโท และกระแช่ เป็นต้น ปัจจุบันมีการนำยีสต์มาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมหลายประเภท ไม่ว่าจะเป็นการผลิตเครื่องดื่ม แอลกอฮอล์ชนิดต่าง ๆ เช่น เบียร์ ไวน์ และวิสกี้ การผลิตเซลล์ยีสต์ เพื่อใช้เป็นยีสต์ขนมปัง และเป็นโปรตีนเซลล์เดี่ยว (single cell protein) เนื่องจากคุณสมบัติที่มีขนาดเล็กมาก สามารถเพาะเลี้ยงขยายเพิ่มจำนวนได้ในระยะเวลาอันรวดเร็ว และมีวิธีการที่ไม่ยุ่งยาก โดยยีสต์มีคุณสมบัติในการเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นคาร์บอนไดออกไซด์และแอลกอฮอล์

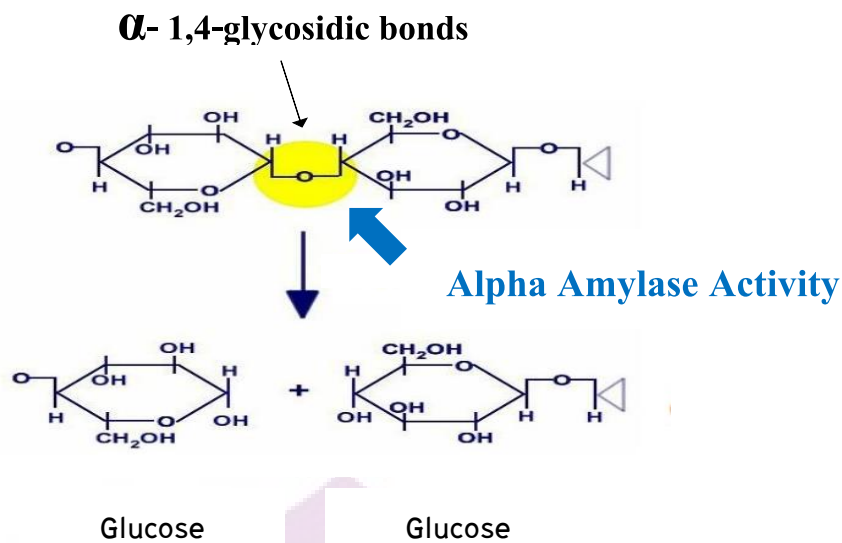
### อะไมเลส (Amylase)

เอนไซม์อะไมเลส (amylase or amylolytic enzyme) ถูกค้นพบขึ้นเป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1831 และในปี ค.ศ. 1833 นักเคมีชาวฝรั่งเศสชื่อ Anselme Payen และ Jean-Francois Persoz ก็สามารถแยกเอนไซม์อะไมเลสออกจากข้าวบาร์เลย์งอก

อะไมเลส (amylase) เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม Hydrolases และเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (Catalyst) ในการเปลี่ยนแปลงเป็นน้ำตาลโดยไฮโดรไลซ์พันธะ 1, 4-glycosidase bond ในโมเลกุลของสตาร์ช (starch) ให้มีขนาดของโมเลกุลเล็กลง ได้แก่ น้ำตาลมอลโตไตรโอส (maltotriose) มอลโตส (maltose) ซูโครส (sucrose) เด็กซ์ตริน (dextrin) กลูโคส (glucose) และฟรุคโตส (fructose) เอนไซม์อะไมเลสสามารถพบได้ทั้งใน พืช สัตว์ และจุลินทรีย์

#### เอนไซม์อะไมเลส แบ่งออกได้ 3 ชนิด คือ

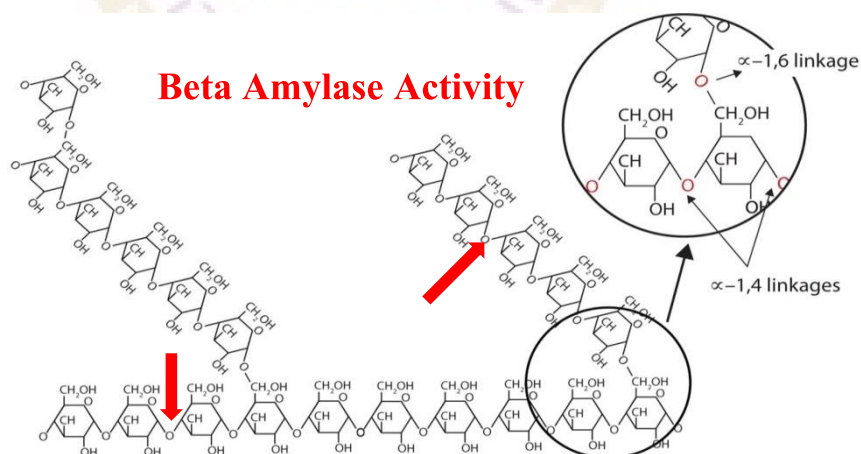
1. แอลฟา-อะไมเลส (alpha-amylase) เป็นเอนไซม์ที่ไฮโดรไลซ์พันธะไกลโคไซด์ภายในสายพอลิเมอร์ของโมเลกุลสตาร์ช (starch) และไกลโคเจน (glycogen) ที่ตำแหน่งแอลฟา 1-4 แบบสุ่ม ดังภาพ 3



ภาพ 3 แสดงการทำงานของเอนไซม์ แอลฟา-อะไมเลส (ลูกครสีน้ำเงิน)

ที่มา: Periyasamy, 2012

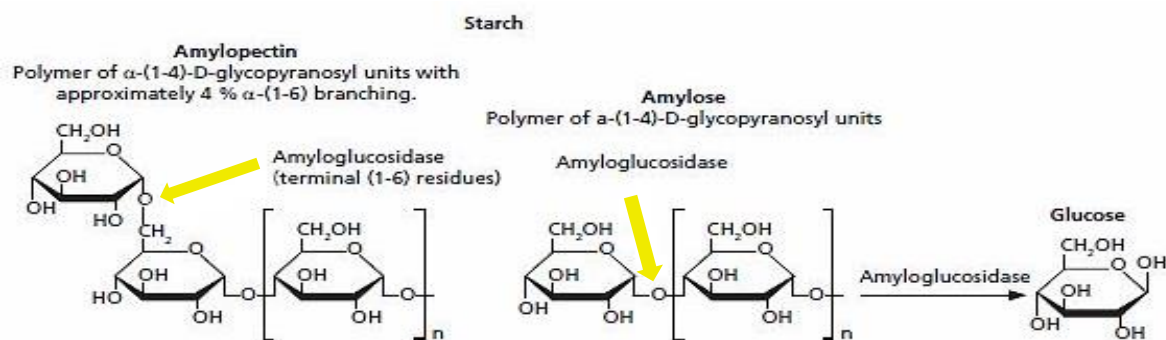
2. บีตา-อะไมเลส (beta-amylase) เป็นเอนไซม์ที่ไฮโดรไลซ์สตาร์ช (starch) ที่ตำแหน่งแอลฟา 1-4 ของพันธะไกลโคไซด์ที่เฉพาะส่วนปลายสายด้านที่เป็นนอนรีดิวซ์ (non reducing end) ดังภาพ 4



ภาพ 4 แสดงการทำงานของเอนไซม์ บีตา-อะไมเลส (ลูกครสีแดง)

ที่มา: Enevoldsen and Bathgate, 1969

3. แกมมา-อะไมเลส กลูโคอะไมเลส หรืออะไมโลกลูโคซิเดส ( $\gamma$ -1, 4-glucan glucohydrolase) เป็นเอนไซม์ที่ไฮโดรไลซ์สายพอลิเมอร์ของสตาร์ช (starch) ได้ทั้งที่พันธะไกลโคไซด์ที่ตำแหน่งแอลฟา 1-4 และแอลฟา 1-6 ดังภาพ 5



ภาพ 5 แสดงการทำงานของเอนไซม์ แกมมา-อะไมเลส กลูโคอะไมเลส หรืออะไมโลกลูโคซิเดส (ลูกศรสีเหลือง)

ที่มา: Siegrist, 2017

### เซลลูเลส (Cellulase)

เอนไซม์เซลลูเลส (cellulase or cellulolytic enzyme) เป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการย่อยสลายเซลลูโลสไปเป็นน้ำตาลกลูโคส ประกอบด้วยเอนไซม์หลายองค์ประกอบ (multicomponent enzymes) ทำงานร่วมกันอย่างน้อย 3 กลุ่ม คือ

1. บีตา-1, 4-กลูแคนกลูคาโนไฮโดรเลส ( $\beta$ -1, 4-glucan glucohydrolase: EC 3.2.1.4) หรือเรียกว่า เอนโดกลูคาเนส ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายเซลลูโลสบริเวณพันธะ  $\beta$ -1, 4-glycosidic linkage ของสายเซลลูโลสบริเวณ amorphous cellulose แบบสุ่ม ทำให้ได้เป็นน้ำตาลโมเลกุลสั้น ๆ เช่น เซลโลไบโอส และถ้าเกิดปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์จะได้เป็นน้ำตาลกลูโคส สามารถวิเคราะห์ได้จากปฏิกิริยาย่อยสลาย Carboxymethyl cellulose (CMC)
2. บีตา-1, 4-กลูแคนเซลโลไบโอไฮโดรเลส ( $\beta$ -1, 4-glucan cellobiohydrolase, CBH: EC 3.2.1.91) หรือเรียกว่า เอกโซกลูคาเนส ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายเซลลูโลสบริเวณพันธะ  $\beta$ -1, 4-glycosidic linkage ของสายเซลลูโลสบริเวณปลายด้าน non-reducing end ของ crystalline cellulose ทำให้ได้เป็นน้ำตาลโมเลกุลสั้น ๆ เช่น เซลโลไบโอส ถ้าปฏิกิริยา

เกิดอย่างสมบูรณ์จะได้เป็นน้ำตาลกลูโคส สามารถวิเคราะห์ได้จากการวัดแอกติวิตี โดยให้ทำปฏิกิริยากับ crystalline cellulose เช่น กระดาษกรอง Avicel เป็นต้น

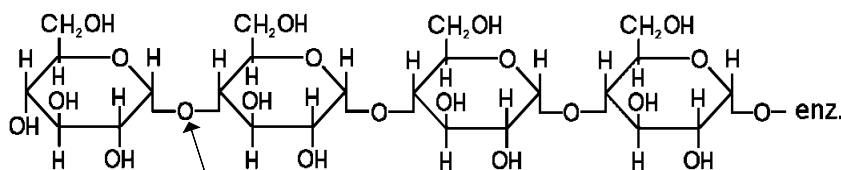
3. บีตา-กลูโคซิเดส ( $\beta$ -glucosidase: EC 3.2.1.21) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายเซลลูโลสไบโอสปริเวณพันธะ  $\beta$ -glucosidic bond ทำให้ได้เป็นน้ำตาลกลูโคส ( $\beta$ -D-glucose) 2 โมเลกุล สามารถวัดแอกติวิตีโดยให้ทำปฏิกิริยากับ cellobiose และ  $p$ -nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside ( $p$ -NPG) เป็นต้น (Wike, et al., 1983)

การย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเซลลูเลสจะสมบูรณ์เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นกลูโคสนั้น ต้องอาศัยการทำงานของ เอนโดกลูคาเนส เอ็กโซกลูคาเนส และบีตา-กลูโคซิเดส ร่วมกัน

### สตาร์ช (Starch)

สตาร์ช (Starch) เป็นส่วนประกอบสำคัญในอาหาร เช่น ขนม อาหารสำเร็จรูป และอาหารกึ่งสำเร็จรูป เป็นต้น สตาร์ชเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) ที่พบได้ในพืช เช่น เมล็ดธัญพืช พืชหัว และถั่วเมล็ดแห้ง มีน้ำตาลกลูโคส (glucose) เป็นมอนอเมอร์ ของน้ำตาลกลูโคส ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคไซด์ (glycosidic bond) ที่ตำแหน่ง  $\alpha$ -1, 4 มีโครงสร้างเป็นแบบอะไมโลส (amylose) ดังภาพ 6 ส่วนที่ตำแหน่ง  $\alpha$ -1, 4 และ แอลฟา  $\alpha$ -1, 6 มีโครงสร้างเป็นแบบอะไมโลเพกทิน (amylopectin) ดังภาพ 7

### Amylose

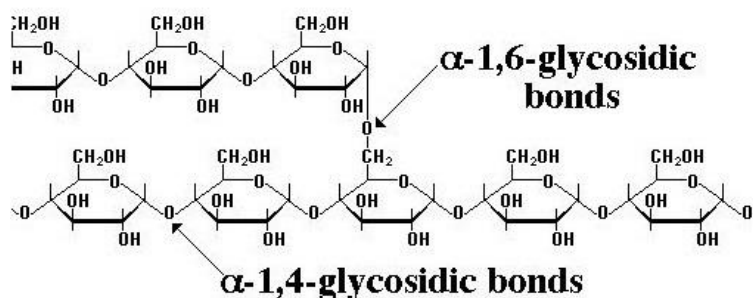


### $\alpha$ - 1, 4-glycosidic bonds

ภาพ 6 แสดงโครงสร้างของอะไมโลส (amylose)

ที่มา: Mann and Truswell, 2007

## Amylopectin

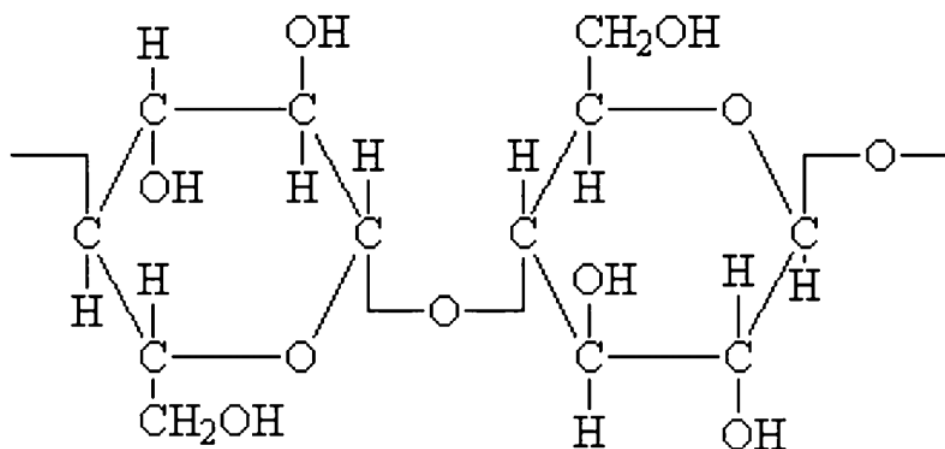


ภาพ 7 แสดงโครงสร้างของไมโลเพกติน (amylopectin)

ที่มา: Mann and Truswell, 2007

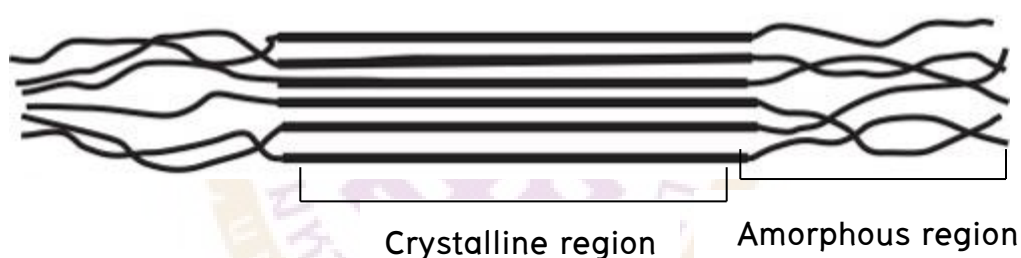
### เซลลูโลส (Cellulose)

เป็นคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) ที่มีมากที่สุดในธรรมชาติ เป็นองค์ประกอบหลักที่สำคัญของผนังเซลล์พืช เซลลูโลส ประกอบด้วย สายพอลิเมอร์ของกลูโคสที่เชื่อมกันแบบไม่มีกิ่งก้านสาขา (unbranched polymer) เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ  $\beta$ -1, 4 glycosidic linkage (ภาพ 8) เซลลูโลสมีลักษณะเรียงตัวเป็นสายยาว มีบริเวณที่มีพันธะไฮโดรเจนอยู่หนาแน่นทำให้โครงสร้างแข็งแรง เป็นระเบียบ ทำให้อยู่ยงสลายได้ยาก เรียงตัวแบบผลึก เรียกว่า Crystalline regions ซึ่งมีอยู่ประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ และบริเวณที่มีพันธะไฮโดรเจนน้อย ทำให้โครงสร้างเรียงตัวอย่างไม่เป็นระเบียบ จึงถูกย่อยสลายได้ง่ายกว่า บริเวณนี้เรียกว่า Amorphous regions ซึ่งมีอยู่ประมาณ 15 เปอร์เซ็นต์ (Voet, 1995) (ภาพ 9) ในธรรมชาติเซลลูโลสไม่ได้อยู่เป็นสายเดี่ยว ๆ แต่จะเรียงตัวกันเป็นไมโครไฟบริล (micro fibril) และจับกันเป็นกลุ่มที่มีความแข็งแรง และมีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ เนื่องจากมีพันธะไฮโดรเจนจำนวนมากที่ยึดระหว่างสายพอลิเมอร์ ทำให้น้ำไม่สามารถเข้าไปได้



ภาพ 8 แสดงการเชื่อมต่อกันของกลูโคสด้วยพันธะ  $\beta$ -1, 4 glycosidic linkage

ที่มา: Harane, et al., 2014



ภาพ 9 แสดงรูปแบบโมเลกุลของสายเซลลูโลส

ที่มา: Visakh and Thomas, 2010

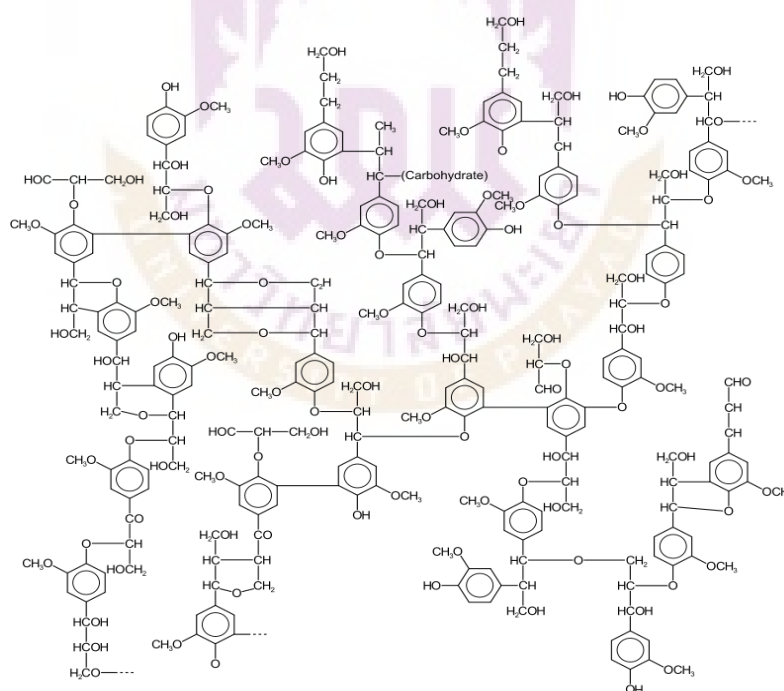
### เฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose)

เป็นคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) ประเภทพอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) พบมากเป็นอันดับสองรองจากเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสเป็นพอลิเมอร์ส่วนที่ยึดติดกับเซลลูโลสในผนังของเซลล์พืช มีหน้าที่ช่วยในการเสริมสร้างโครงสร้างของผนังเซลล์ให้หนา และแข็งแรงขึ้น ในระหว่างที่พืชมีการเจริญเติบโต โมเลกุลของเฮมิเซลลูโลสเป็นเฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ (heteropolysaccharide) ที่ประกอบด้วยน้ำตาลหลายชนิด องค์ประกอบหลัก คือน้ำตาล 5 โมเลกุล เช่น ไซโลส (xylose) หรือ ไซแลน (xylan) เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคไซด์ (glycosidic bond)

ที่ตำแหน่ง  $\beta$ -1, 4 เป็นโซ่หลัก อาจมีน้ำตาลแมนโนส (mannose) กาแล็กโทส (galactose) หรือกลูโคส (glucose) มาต่อกันเป็นโซ่หลักด้วย และมีน้ำตาลชนิดอื่นมาต่อกันเป็นกิ่งก้านสาขา หรือโซ่แขนง ได้แก่ น้ำตาลอะราบินอส์ (arabinose) กรดกลูคูโรนิก (glucuronic acid)

### ลิกนิน (Lignin)

เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์พืชที่มีมากเป็นอันดับ 3 รองจากเซลลูโลส และเฮมิ-เซลลูโลส โครงสร้างโมเลกุลของลิกนินเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) ที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ และจัดเป็นสารประกอบอะโรมาติก (aromatic compound) โครงสร้างประกอบด้วยหน่วยย่อยที่เรียกว่า ฟีนิลโพรเพน (phenyl propane) เป็นหน่วยโครงสร้างที่มีคาร์บอนหลัก 9 อะตอม มีหมู่ฟีนอลิกไฮดรอกซี (phenolic hydroxyl group) และส่วนที่มีหมู่เมทิล (methyl group) โดยที่หน่วยย่อยนี้จะเป็นโครงสร้างพื้นฐานของพารา-ไฮดรอกซีฟีนิล, ไกวาเอซิล และไซรินจิล ซึ่งจะมีการจับประสานกันเป็นพอลิเมอร์ และต่อกันเป็นเครือข่าย 3 มิติ ที่มีกิ่งก้านจำนวนมาก (ภาพ 10)



ภาพ 10 แสดงรูปแบบโครงสร้างโมเลกุลของลิกนิน

ที่มา: Glazer and Nikaido, 1995

## แหล่งโภชนะที่สำคัญในอาหารโคขุน

### 1. แหล่งของโปรตีน

สำหรับโคขุนที่มีอายุ 1 ปีขึ้นไป หรือน้ำหนักไม่ต่ำกว่า 200 กิโลกรัม จะต้องได้รับอาหารที่มีปริมาณโปรตีนไม่ต่ำกว่า 14 เปอร์เซ็นต์ แหล่งของโปรตีนในอาหารโคขุน คือ ฟักทองหมัก และมันสำปะหลังหมัก

ฟักทองหมัก (fermented pumpkin) เป็นฟักทองที่นำไปผ่านกระบวนการหมักร่วมกับจุลินทรีย์ ทำให้มีคุณค่าทางโภชนะเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะในส่วนของโปรตีนและไขมัน เพิ่มขึ้นเป็น 15.97 และ 7.12 เปอร์เซ็นต์วัตถุแห้ง ฟักทองที่ผ่านกระบวนการหมักจะมีเนื้อสัมผัสที่นุ่มขึ้น และเกิดกลิ่นหอม ส่วนประกอบของฟักทองหมัก จะประกอบด้วย ฟักทอง กากน้ำตาล หัวเชื้อจุลินทรีย์ และน้ำ

มันสำปะหลังหมัก (fermented cassava) มันสำปะหลังเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย โดยประเทศไทยสามารถส่งออกผลิตภัณฑ์มันสำปะหลังได้หลายรูปแบบ เช่น มันเส้น มันอัดเม็ด แป้งมันสำปะหลัง ทั้งในรูปของแป้งดิบและแป้งแปรรูป เป็นต้น ในปัจจุบันประเทศไทยเป็นผู้ส่งออกผลิตภัณฑ์มันสำปะหลังรายใหญ่ที่สุดของโลก โดยมีส่วนแบ่งตลาดสูงถึงร้อยละ 70 ส่วนในตลาด ASEAN นั้น ประเทศไทยสามารถครองอันดับ 1 ในการส่งออกมาเป็นเวลานานกว่า 10 ปี (สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ, 2559)

องค์ประกอบทางเคมีของมันสำปะหลัง ประกอบไปด้วย เส้นใย (fiber) และเถ้า (ash) ซึ่งอยู่ในช่วง 0.77–4.62 เปอร์เซ็นต์วัตถุแห้ง และ 0.7–2.2 เปอร์เซ็นต์วัตถุแห้ง ตามลำดับ (Apea-Bah, 2011) และมีปริมาณโปรตีน 2.50 เปอร์เซ็นต์วัตถุแห้ง (กรมปศุสัตว์, 2547) เนื่องจากมันสำปะหลังมีปริมาณโปรตีนอยู่น้อย ซึ่งไม่เพียงพอต่อความต้องการของโค เพราะฉะนั้นจึงต้องหาวิธีการในการเพิ่มปริมาณโปรตีนให้กับมันสำปะหลังให้เพิ่มสูงขึ้น โดยการนำมาผ่านกระบวนการหมักร่วมกับจุลินทรีย์ กระบวนการหมักมันสำปะหลังนั้นมีมานานแล้วทั้งในประเทศเองและต่างประเทศ ก็มีการนำมันสำปะหลังมาผ่านกระบวนการหมัก เพื่อเพิ่มโปรตีน อย่างเช่นในรายงานของ Muindi and Hanssen (1981); Mikami, et al. (1982) ได้ทำการศึกษา กระบวนการหมักมันสำปะหลังร่วมกับเชื้อรา acidophilic สองสายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อรา *Trichoderma harzianum* และ *Cephalosporium eichhorniae* ตามลำดับ พบว่า โปรตีนจาก 2.4% เพิ่มขึ้นเป็น 37.6% และ 41% สำหรับ *T.harzianum* และ *C.eichhorniae* ตามลำดับ

Nwafor and Ejukonemu (2004); Kompang, et al. (1994); Sukara and Doelle (1988); Brook, et al. (1969); Gray and Abou-El-Seoud (1966) รายงานว่า มันสำปะหลัง

ที่ผ่านกระบวนการหมัก พบว่า มีปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านกระบวนการหมัก

Steinkraus (1995) รายงานว่า การหมักจะช่วยขับสารพิษ หรือสารต้านการเจริญเติบโต ออกจากวัตถุดิบในระหว่างขั้นตอนของกระบวนการหมัก และยังเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการ ได้แก่ โปรตีน กรดอะมิโนที่จำเป็น กรดไขมันที่จำเป็นและวิตามิน นอกจากนี้การในกระบวนการหมักยังมีการผลิตกรดแลคติก กรดอะซิติก ซึ่งช่วยในการถนอมอาหารให้สามารถเก็บรักษาได้นานขึ้น

Varghese, et al. (1976) ทดลองหมักมันสำปะหลังกับเชื้อรา *Aspergillus Neurospora* และ *Rhizopus* spp. พบว่า มีปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้น 3% โดยมีการเสริมแหล่งไนโตรเจน เช่น รำข้าว สับปะรด และมูลไก่

ตาราง 1 แสดงคุณค่าทางโภชนาการของมันสำปะหลัง (*Cassava, Manihot esculenta*)

ชนิด วัตถุดิบ	% วัตถุดิบแห้ง											
	DM (%)	CP (%)	EE (%)	CF (%)	Ash (%)	NFE (%)	NDF (%)	ADF (%)	ADL (%)	TDN (%)	DE (Mcal/kg)	ME (Mcal/kg)
กากมัน (starch process residue)	88.3 (3.7)	1.9 (1.5)	0.2 (0.2)	11.6 (4.0)	2.6 (1.2)	72.0 -	24.5 (6.2)	18.3 (5.0)	-	65 <sup>4/</sup>	-	-
เปลือก หัวมัน แห้ง (peelings, dried)	88.5 (5.0)	3.7 (0.7)	0.7 (0.3)	17.9 (3.2)	6.7 (3.6)	59.5 -	27.2 (5.8)	21.4 (4.9)	1.4	60 <sup>4/</sup>	-	-
มันเส้น (cassava chips)	89.6 (3.1)	2.0 (0.5)	0.4 (0.2)	2.7 (1.2)	3.4 (2.0)	81.0 -	8.4 (3.8)	4.9 (2.9)	1.5 (0.3)	71 <sup>4/</sup>	3.51 <sup>1/</sup>	3.15 <sup>1/</sup>
มันยัดเม็ด (cassava tuber, pellet)	89.1 (0.7)	2.3 (0.4)	0.3 (1.6)	5.5 (1.5)	4.0 (0.6)	76.9 -	15.4 (6.1)	7.9 (1.5)	-	69 <sup>4/</sup>	-	-
กากมัน หลังหมัก	0.32 1.23	0.04 0.16	0.23 0.86	0.05 0.21	0.02 0.06	0.03 0.12	2.35 8.90	-	-	-	-	-
แอลกอฮอล์ สด (cassava pulp, ethanol process residue, wet)	(0.48)	(0.06)	(0.0)	(0.01)	-	(0.0)	(4.89)	-	-	-	-	-

หมายเหตุ: <sup>1/</sup> Harris et al., 1982

<sup>2/</sup> NRC, 1984

<sup>3/</sup> NARO, 2001

<sup>4/</sup> สำนักพัฒนาอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์ (ผลวิเคราะห์ตัวอย่างปี 2559)

ที่มา: สำนักพัฒนาอาหารสัตว์, 2559

นอกจากนี้ในมันสำปะหลัง ยังมีสารต้านการเจริญเติบโตอยู่ในระดับสูง ได้แก่ ไฮโดรเจนไซยาไนด์ (HCN) แทนนิน (tannins) และไฟเตท (Akpan and Ikenebomeh, 1995)

Padmaja, et al. (2009) รายงานว่า ในหัวมันสำปะหลังสดมีปริมาณไฮโดรเจนไซยาไนด์ (HCN) อยู่ 55.1-190.2 มิลลิกรัม/กิโลกรัม สารต้านการเจริญเติบโตเหล่านี้ จะทำให้ประสิทธิภาพการย่อยอาหารของสัตว์ที่ได้รับเข้าไปในร่างกายลดต่ำลง ทำให้สัตว์กินอาหารได้น้อยลง (Alawa and Amadi, 1991; Adegbola and Oduozo, 1992)

การทำมันสำปะหลังหมักเพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์มีมาเป็นเวลานานแล้ว ซึ่งเป็นการเพิ่มปริมาณสารอาหารโดยเฉพาะในส่วนของโปรตีนและไขมัน และยังช่วยลดปริมาณสารต้านการเจริญของสัตว์ รวมถึงลดปริมาณสารพิษกรดไฮโดรไซยานิค นอกจากนี้ยังถือเป็นการเก็บรักษามันสำปะหลังไว้ใช้ได้ยาวนาน ๆ อีกด้วย ในกระบวนการหมักตามธรรมชาติหรือการหมักร่วมกับเชื้อจุลินทรีย์ นอกจากจะช่วยเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการเช่นโปรตีน วิตามิน กรดอะมิโนที่จำเป็น และกรดไขมันที่จำเป็นแล้วยังช่วยให้เกิดกลิ่นหอม รสชาติ และเนื้อสัมผัสที่ดีขึ้น (Aro, et al., 2008) และนอกจากนี้ยังสามารถลดปริมาณกรดไฮโดรไซยานิค เนื่องจากในกระบวนการหมักจะทำให้ pH ลดลง ทำให้เกิดสภาวะเหมาะสมที่จะเกิดการไฮโดรไลซ์สารไซยาโนจีนิกกลูโคไซด์ ให้กรดไฮโดรไซยานิคไหลออกไปกับน้ำ (เจริญศักดิ์ โรจนฤทธิ์พิเชษฐ์, 2519)

## 2. แหล่งของพลังงาน

แหล่งของพลังงานที่มีความสามารถในการย่อยสลายได้รวดเร็วเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในกระบวนการสังเคราะห์ของจุลินทรีย์โปรตีนในกระเพาะรูเมน แหล่งพลังงานในอาหารสัตว์ที่มักจะนิยมใช้ ได้แก่ กากน้ำตาล

กากน้ำตาล (molasses) เป็นของเหลวที่มีลักษณะข้นและเหนียวมีสีน้ำตาลดำที่เป็นผลพลอยได้จากการผลิตน้ำตาลทรายจากอ้อย ซึ่งไม่สามารถตกผลึกน้ำตาลได้อีก กรรมวิธีการผลิตน้ำตาลทรายจากอ้อยจะเริ่มจากการนำอ้อยเข้าหีบได้น้ำอ้อย กรองเอากากออกจากน้ำอ้อยแล้วเคี่ยวจนได้ผลึกของน้ำตาลทรายตกตะกอนออกมา จากนั้นจะนำมาปั่น (centrifuge) แยกผลึกน้ำตาลทราย ผลพลอยได้จากการผลิตน้ำตาลทรายจากอ้อย ได้แก่ กากน้ำตาล (molasses) กากตะกอนโคลน (filter cake) และกากอ้อย (bagasses)

กากน้ำตาล มีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลซูโครสที่ไม่ตกผลึก ในการผลิตน้ำตาลทรายนั้น จะมีกากน้ำตาลซึ่งเป็นผลพลอยได้เกิดขึ้น ประมาณ 4-6 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณอ้อยที่ใช้ในการผลิต กากน้ำตาลสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ชนิด ตามกรรมวิธีในการผลิตน้ำตาลทราย คือ

2.1 กากน้ำตาลที่ได้จากการผลิตน้ำตาลทรายขาว (plantation white sugar) หรือที่เรียกว่า black-strap molasses จะมีปริมาณน้ำตาลอยู่ประมาณ 50-60 เปอร์เซ็นต์

2.2 กากน้ำตาลที่ได้จากการผลิตน้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์ (refine sugar) หรือที่เรียกว่า refinery molasses จะมีปริมาณน้ำตาลอยู่ประมาณ 48 เปอร์เซ็นต์

2.3 กากน้ำตาลที่ได้จากการทำบางส่วนของน้ำอ้อยแปรสภาพให้เข้มข้นโดยการระเหย (inverted can juice) ซึ่งเราเรียกว่า invert molasses หรือ highest molasses วิธีนี้เป็นการผลิต กากน้ำตาลโดยตรง

ในกากน้ำตาลนอกจากจะประกอบไปด้วย น้ำตาลประมาณ 50- 60 % ยังมีแร่ธาตุต่าง ๆ รวมอยู่ด้วย ได้แก่ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม

### สายพันธุ์โคเนื้อ

สำหรับสายพันธุ์โคเนื้อที่กำลังได้รับความนิยม และเป็นที่ยอมรับกันดีของเกษตรกร ในบ้านเรานั้น มีด้วยกันหลากหลายสายพันธุ์ โดยมีคุณลักษณะที่โดดเด่นทั้งข้อดีและข้อเสีย แตกต่างกันไป ในการทดลองนี้จะใช้สายพันธุ์โคเนื้อ 2 สายพันธุ์ด้วยกัน ดังนี้



ภาพ 11 แสดงโคลูกผสมสายพันธุ์ชาโรเลส์ (Charolais crossbred)

1. โคลูกผสมสายพันธุ์ชาโรเลส์ (Charolais crossbred) เช่น พันธุ์ตาก (tak beef cattle) เป็นโคลูกผสมระหว่าง ชาโรเลส์กับพันธุ์บราห์มัน โดยกรมปศุสัตว์ได้มอบหมายให้ศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์ตาก ทำการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์ให้เป็นโคเนื้อพันธุ์ใหม่ที่โตเร็ว เนื้อนุ่ม เพื่อทดแทนการนำเข้าพันธุ์โคและเนื้อโคคุณภาพดีจากต่างประเทศ การสร้างพันธุ์ในฝูงปรับปรุงพันธุ์ ดำเนินการโดยนำน้ำเชื้อโคพันธุ์ชาโรเลส์คุณภาพสูงจากประเทศฝรั่งเศสมาผสมกับแม่โคพันธุ์บราห์มันพันธุ์แท้ ได้โคลูกผสมชั่วที่ 1 (เรียกว่า โคพันธุ์ตาก 1) ที่มีเลือด 50% ชาโรเลส์ และ 50% บราห์มัน

จากนั้นผสมแม่โคเพศเมียชั่วที่ 1 ดังกล่าว ด้วยน้ำเชื้อหรือพ่อบราห์มันพันธุ์แท้ ได้ลูกโคชั่วที่ 2 (เรียกโคพันธุ์ตาก 2) ซึ่งมีสายเลือด 25% ชาโรเลส์ และ 75% บราห์มัน จากนั้นผสมแม่โคเพศเมียชั่วที่ 2 ด้วยน้ำเชื้อโคพันธุ์ชาโรเลส์คุณภาพสูง ได้ลูกชั่วที่ 3 (เรียกว่าโคพันธุ์ตาก) ซึ่งมีเลือด 62.5% ชาโรเลส์ และ 37.5% บราห์มัน แล้วนำโคชั่วที่ 3 ผสมกัน คัดเลือกปรับปรุงพันธุ์ให้เป็นโคเนื้อพันธุ์ใหม่ เรียกว่า โคพันธุ์ตาก ส่วนใหญ่ตัวผู้ที่โตเต็มที่จะมีน้ำหนักประมาณ 800-1,000 กิโลกรัม และตัวเมีย มีน้ำหนักประมาณ 500-600 กิโลกรัม

โคพันธุ์ตากมีข้อดี คือ เจริญเติบโตเร็ว เนื้อนุ่ม เนื้อสันมีไขมันแทรก (marbling) ซากมีขนาดใหญ่ที่สนองต่อความต้องการของตลาดเนื้อโคคุณภาพได้ดี เลี้ยงง่าย หากกินเก่ง ไม่เลือกกินหญ้า ทนทานต่อสภาพอากาศร้อนได้ดีพอสมควร ซึ่งเหมาะที่จะนำมาผสมกับแม่โคพื้นเมือง โคบราห์มัน และลูกผสมบราห์มันเพื่อนำลูกมาเลี้ยงเป็นโคขุนได้ โคแม่พันธุ์สามารถผสมพันธุ์ได้เร็ว ที่ศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์ตาก ผสมพันธุ์แม่โคที่อายุ 14 เดือน น้ำหนัก 280 กิโลกรัมขึ้นไป แต่ยังมีข้อเสีย คือ การเลี้ยงต้องอาศัยการดูแลเอาใจใส่พอสมควร ไม่เหมาะที่จะนำไปเลี้ยงแบบปล่อยทุ่ง แต่ถ้าหากจะเลี้ยงในสภาพปล่อยทุ่งควรใช้โคพันธุ์ตาก 1 หรือโคพันธุ์ตาก 2



ภาพ 12 แสดงโคลูกผสมสายพันธุ์ซิมเมนทัล (Simmental crossbred)

2. โคลูกผสมสายพันธุ์ซิมเมนทัล (Simmental crossbred) เช่น โคพันธุ์กบินทร์บุรี (kabinburi beef cattle) เป็นโคลูกผสมระหว่างพันธุ์ซิมเมนทัลกับพันธุ์บราห์มัน โดยกรมปศุสัตว์ได้มอบหมายให้ศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์ปราจีนบุรี (ซึ่งตั้งอยู่อำเภอกบินทร์บุรี) ทำการสร้างโคพันธุ์ใหม่ ให้เป็นโคเนื้อเนื้อนุ่ม โดยลูกโคเพศผู้ใช้เป็นโคขุน และแม่โคใช้รีดนมได้

การสร้างพันธุ์ในฝูงปรับปรุงพันธุ์ดำเนินการโดยนำน้ำเชื้อโคพันธุ์ซิมเมนทัลคุณภาพสูงจากประเทศเยอรมันผสมกับแม่โคบราห์มันพันธุ์แท้ ได้ลูกโคช่วงที่ 1 ที่มีสายเลือด 50% ซิมเมนทัล และ 50% บราห์มัน แล้วผสมโคช่วงที่ 1 เข้าด้วยกัน คัดเลือกปรับปรุงให้เป็นโคเนื้อพันธุ์ใหม่ เรียกว่า โคพันธุ์กบินทร์บุรี ส่วนใหญ่ตัวผู้โตเต็มที่ มีน้ำหนักประมาณ 800-900 กิโลกรัม และตัวเมีย มีน้ำหนักประมาณ 500-650 กิโลกรัม

สำหรับข้อดีของโคพันธุ์กบินทร์บุรี คือ เป็นโคเนื้อที่มีการเจริญเติบโตเร็ว ซากมีขนาดใหญ่ ซึ่งสนองความต้องการของตลาดเนื้อโคคุณภาพดีได้ ทนทานต่อสภาพอากาศร้อนได้ดีพอสมควร เหมาะที่จะนำมาผสมกับแม่โคพื้นเมือง โคบราห์มันและลูกผสมบราห์มัน เพื่อนำลูกเพศผู้มาเลี้ยงเป็นโคขุน ลูกเพศเมียใช้รีดนมได้มากพอสมควร แต่การเลี้ยงต้องอาศัยการดูแลเอาใจใส่พอสมควร ไม่เหมาะที่จะนำไปเลี้ยงแบบปล่อยทุ่ง หากใช้แม่โครีดนม ลูกโคที่เกิดออกมาต้องแยกเลี้ยงแบบลูกโคนม ดังนั้น ผู้เลี้ยงต้องมีความรู้ในการเลี้ยงโครีดนม

และต้องดูแลเอาใจใส่ให้ดี ส่วนเนื้อไม้สีแดงเข้ม อาจเป็นข้อเปรียบเทียบด้านความนิยมของตลาดเนื้อโคคุณภาพดี ระหว่างโคลูกผสมชาโรเลส์ เช่น โคพันธุ์ตาก และโคพันธุ์กำแพงแสน





## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### การเก็บตัวอย่างลูกแป้งข้าวหมาก

ทำการเก็บตัวอย่างลูกแป้งในพื้นที่ต่าง ๆ ในจังหวัดพะเยา โดยทำการสำรวจแหล่งชุมชนที่มีการผลิตสุรากลั่นชุมชน และนำลูกแป้งของแต่ละแหล่งมาเพื่อทำการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์

#### การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ย่อยชีวมวลจากลูกแป้งข้าวหมาก

ในวัตถุดิบอาหารสัตว์นั้นมีองค์ประกอบที่เป็นทั้งเส้นใยและคาร์โบไฮเดรต จึงต้องอาศัยเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติในการย่อยเส้นใย ที่ประกอบไปด้วยเซลลูโลส คือ เอนไซม์เซลลูเลส และส่วนที่เป็นคาร์โบไฮเดรต ซึ่งต้องอาศัยเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติในการย่อยแป้ง ซึ่งเป็นเอนไซม์อะไมเลส

##### 1. การคัดแยกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลส

นำหัวเชื้อจุลินทรีย์ท้องถิ่นซึ่งเป็นลูกแป้งข้าวหมาก 1.0 กรัม มาละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ (normal saline) ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ที่มีการเติมยาปฏิชีวนะ ampicillin ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที จากนั้นจึงใช้ปิเปตที่ฆ่าเชื้อแล้วดูดสารละลายปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ในจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร SS medium (Danmek, et al., 2014) (ภาคผนวก ก) ที่มีการเติม soluble starch แทนน้ำตาลกลูโคส ทำการแยกเชื้อโดยใช้วิธี Spread plate technique นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 วัน เมื่อเชื้อราเจริญทำการคัดแยกลงในอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) (ภาคผนวก ก) เพื่อแยกให้ได้เชื้อราที่บริสุทธิ์ ทำการตรวจสอบการผลิตอะไมเลสของเชื้อรา โดยการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยเพื่อดูการเจริญจากนั้น นำสารละลายไอโอดีน ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ และโพแทสเซียมไอโอไดด์ ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ มาราดทับเส้นใย ทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที เชื้อราที่เกิดวงใส (clear zone) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ คือ เชื้อราที่สามารถสร้างเอนไซม์อะไมเลส ทำการวัดขนาดของวงใสมาเปรียบเทียบกับขนาดของโคโลนี (Suyama, et al., 1993)

นำเชื้อราที่สามารถผลิตอะไมเลส ที่คัดแยกได้ มาทดสอบการผลิตอะไมเลส โดยทำการเลี้ยงเชื้อราบนอาหาร PDA เพื่อให้เส้นใยเจริญ จากนั้นใช้แท่งเจาะ (cork borer) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร เจาะที่ปลายเส้นใยเชื้อราจำนวน 5 ชิ้น นำมาใส่ลงในขวด

รูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร SS medium (Danmek, et al., 2014) (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่มีการเติม soluble starch 1.0 เปอร์เซ็นต์ แทนน้ำตาลกลูโคส เลี้ยงเชื้อราที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบของการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 7 วัน จากนั้นเก็บเอนไซม์โดยการนำมปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที เก็บเอนไซม์ส่วนใสเพื่อนำไปวัดค่าแอกติวิตีของเอนไซม์อะไมเลส (ดัดแปลงจาก Ghose (1987) โดยใช้ปิเปตดูดสารละลายเอนไซม์ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองแล้วเติมสารละลาย soluble starch ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ที่ละลายในสารละลายโซเดียมซिटเรตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดและด่าง เท่ากับ 5.0 นำไปป่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เติมสารละลาย 3,5-Dinitrosalicylic acid (DNS) (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 3.0 มิลลิลิตร (Miller, 1959) นำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายโซเดียมซिटเรตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดและด่าง เท่ากับ 5.0 แทนเอนไซม์เป็นหลอดควบคุม (blank) เพื่อนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาค่าแอกติวิตีจำเพาะ (Specific activity) ตามวิธีแสดงในภาคผนวก ค

1 ยูนิตของเอนไซม์ หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลาย substrate ให้เป็น น้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครโมล ภายใน 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ใช้ทดสอบ

## 2. การคัดแยกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

นำลูกแป้งข้าวหมาก 1.0 กรัม มาละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ (normal saline) ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ที่มีการเติมยาปฏิชีวนะ ampicillin ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที จากนั้นจึงใช้ปิเปตที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วดูดสารละลายปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ในจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร carboxymethyl cellulose agar (CMC agar) (ภาคผนวก ก) ทำการแยกเชื้อโดยใช้วิธี Spread plate technique นำไปป่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 วัน เมื่อเชื้อราเจริญทำการคัดแยกลงในอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) (ภาคผนวก ก) เพื่อแยกให้ได้เชื้อราที่บริสุทธิ์ ทำการตรวจสอบการผลิตเซลลูเลสของเชื้อรา โดยการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยเพื่อดูการเจริญ จากนั้นจึงนำสี Congo red ความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ มาราดทับเส้นใย ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที เทสีทิ้งและล้างสีส่วนเกินออกด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที สามารถสังเกตเห็นเชื้อราที่ผลิตเซลลูเลส ได้โดยดูวงใส (clear zone) ที่เกิดขึ้น ทำการวัดขนาดของวงใส เพื่อนำมาเปรียบเทียบกับขนาดของโคโลนี (Suyama, et al., 1993)

นำเชื้อราที่สามารถผลิตเซลลูเลส ที่ตัดแยกได้มาทดสอบการผลิตเซลลูเลส โดยทำการเลี้ยงเชื้อราบนอาหาร PDA เพื่อให้เส้นใยเจริญ จากนั้นใช้แท่งเจาะ (cork borer) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร เจาะที่ปลายเส้นใยเชื้อราจำนวน 5 ชิ้น นำมาใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร SS medium (Danmek, et al., 2014) (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่มีการเติมกระดาษกรอง Whatman No. 1 1.0 เพอร์เซ็นต์ แทนน้ำตาลกลูโคส เลี้ยงเชื้อราที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบของการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 7 วัน จากนั้นเก็บเอนไซม์โดยการนำมาปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที เก็บเอนไซม์ส่วนใสเพื่อนำไปวัดค่าแอกติวิตีของเอกโซกลูคาเนส (exoglucanase) (Ghose, 1987), เอนโดกลูคาเนส (endoglucanase) (Ghose, 1987), เบตา-กลูโคซิเดส ( $\beta$ -glucosidase) (Sternberg, et al., 1976), ไซแลนเนส (xylanase) (Ghose and Bisaria, 1987) เพื่อนำไปคำนวณหาค่าแอกติวิตีจำเพาะ (Specific activity) ตามวิธีแสดงในภาคผนวก ค

1 ยูนิตของเอนไซม์ หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลาย substrate ให้เป็น น้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครโมล ภายใน 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ใช้ทดสอบ

**การวัดปริมาณเซลลูเลสในกลุ่มเอกโซกลูคาเนส (exoglucanase) โดยการวิเคราะห์หา FPA (Ghose, 1987)**

นำเอนไซม์ที่ได้จากข้อ 2 ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมซัลเฟต 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดและด่าง เท่ากับ 5.0 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และกระดาษกรอง Whatman No.1 ขนาด 1.0×6.0 เซนติเมตร (50 มิลลิกรัม) เขย่าให้เข้ากัน นำไปอุ่นในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติมสารละลาย 3,5-Dinitrosalicylic acid (DNS) (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 3.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติมน้ำกลั่นหลอดละ 20 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 540 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายโซเดียมซัลเฟต 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดและด่าง เท่ากับ 5.0 แทนเอนไซม์เป็นหลอดควบคุม (blank) จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบหาน้ำตาลกลูโคส จากกราฟน้ำตาลมาตรฐาน เพื่อนำไปคำนวณหาค่า unit of enzyme จากสูตรมาตรฐาน (ภาคผนวก ค)

**การวัดปริมาณเซลลูเลสในกลุ่มเอนโดกลูคาเนส (endoglucanase) โดย  
การวิเคราะห์หา CMC<sub>Case</sub> (Ghose, 1987)**

นำเอนไซม์ที่ได้จากข้อ 2 ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติม Carboxymethyl cellulose (CMC) ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์กรัมต่อปริมาตร ที่ละลายในสารละลาย โซเดียมซิติเรตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 5.0 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปอุ่นในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เติมสารละลาย 3,5-Dinitrosalicylic acid (DNS) (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 3.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติมน้ำกลั่นหลอดละ 20 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่นแสง 540 นาโนเมตร โดยใช้สารละลาย โซเดียมซิติเรตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดและด่าง เท่ากับ 5.0 แทนเอนไซม์ เป็นหลอดควบคุม (blank) จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบหาปริมาณน้ำตาลกลูโคส จากกราฟน้ำตาลมาตรฐาน เพื่อนำไปคำนวณหาค่า unit of enzyme จากสูตรมาตรฐาน (ภาคผนวก ค)

**การวัดปริมาณเซลลูเลสในกลุ่มเบตาไกลูโคซิเดส ( $\beta$ -glucosidase) โดย  
การวิเคราะห์หา  $\beta$ -glucosidase ตามวิธีการของ Sternberg (et al., 1976)**

นำเอนไซม์ที่ได้จากข้อ 2 ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติม สารละลาย salicin ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ละลายในสารละลายโซเดียมซิติเรต บัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดและด่าง เท่ากับ 5.0 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปอุ่นในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เติมสารละลาย 3,5-Dinitrosalicylic acid (DNS) (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 3.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้ม ในน้ำเดือดนาน 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติมน้ำกลั่นหลอดละ 20 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่นแสง 540 นาโนเมตร โดยใช้สารละลาย โซเดียมซิติเรตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดและด่าง เท่ากับ 5.0 แทนเอนไซม์ เป็นหลอดควบคุม (blank) จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบหาปริมาณน้ำตาลกลูโคส จากกราฟน้ำตาลมาตรฐาน เพื่อนำไปคำนวณหาค่า unit of enzyme จากสูตรมาตรฐาน (ภาคผนวก ค)

**การวัดแอกติวิตีของไซแลนเนส (Ghose and Bisaria, 1987)**

นำเอนไซม์ที่ได้จากข้อ 2 ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติม สารละลาย Xylan ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์กรัมต่อปริมาตร ที่ละลายในสารละลายโซเดียม-ซิติเรตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดและด่าง เท่ากับ 5.0 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร

เขย่าให้เข้ากัน นำหลอดทดลองไปป่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติมน้ำละลาย Alkaline copper reagent (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 3.0 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงนำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติมน้ำกลั่นหลอดละ 20 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายโซเดียมซิติเรตบัพเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 5.0 แทนเอนไซม์ เป็นหลอดควบคุม (blank) จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบหาปริมาณน้ำตาลโซโลสจากกราฟมาตรฐาน เพื่อนำไปคำนวณหาค่า unit of enzyme จากสูตรมาตรฐาน (ภาคผนวก ค)

### การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราที่คัดแยกได้

นำเชื้อราที่ผลิตเซลลูเลสและเชื้อราที่ผลิตอะไมเลส ที่คัดแยกได้มาทำการจำแนกชนิด โดยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาบนอาหารแข็งตามวิธีการของ Klich (2002); Danmek, et al. (2011); Danmek, et al. (2014) โดยศึกษาลักษณะต่าง ๆ เช่น สี ขนาด และรูปร่างของสปอร์ เป็นต้น

### การผลิตเอนไซม์และการศึกษาลักษณะสมบัติบางประการของเอนไซม์

#### 1. การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์

##### 1.1 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของอะไมเลส

นำเชื้อราที่สามารถผลิตอะไมเลส ที่คัดแยกได้มาเลี้ยงบนอาหาร PDA เพื่อให้เส้นใยเจริญ จากนั้นใช้แท่งเจาะ (cork borer) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร เจาะที่ปลายเส้นใยเชื้อรา จำนวน 5 ชิ้น นำมาใส่ลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร SS medium (Danmek, et al., 2014) (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่มีการเติม soluble starch 1.0 เปอร์เซ็นต์ แทนน้ำตาลกลูโคส เลี้ยงเชื้อราที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบของการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 7 วัน จากนั้นเก็บเอนไซม์โดยการนำมามันเหวี่ยง (centrifuge) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที เก็บเอนไซม์ส่วนใส จากนั้นนำไปวัดค่าแอกติวิตีของเอนไซม์อะไมเลส ที่อุณหภูมิต่างกัน คือ 50 องศาเซลเซียส, 60 องศาเซลเซียส, 70 องศาเซลเซียส และ 80 องศาเซลเซียส เพื่อศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

## 1.2 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเซลล์ลูเลส

นำเชื้อราที่สามารถผลิตเซลล์ลูเลส มาเลี้ยงบนอาหาร PDA เพื่อให้เส้นใยเจริญ จากนั้นใช้แท่งเจาะ (cork borer) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร เจาะที่ปลายเส้นใยเชื้อรา จำนวน 5 ชิ้น นำมาใส่ลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร SS medium (Danmek, et al., 2014) (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่มีการเติม กระดาษกรอง Whatman No.1 1.0 เปอร์เซ็นต์ แทนน้ำตาลกลูโคส เลี้ยงเชื้อราที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบของการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 7 วัน จากนั้นเก็บเอนไซม์โดยการนำมาปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที เก็บเอนไซม์ส่วนใส จากนั้นนำไปวัดแอกติวิตีของเซลล์ลูเลสและไซแลนเนส ที่อุณหภูมิต่างกัน คือ 50 องศาเซลเซียส, 60 องศาเซลเซียส, 70 องศาเซลเซียส และ 80 องศาเซลเซียส เพื่อศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

## 2. การศึกษาผลของความเป็นกรดและด่างที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์

### 2.1 การศึกษาผลของความเป็นกรดและด่างที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์อะไมเลส

นำเอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตได้ มาวัดแอกติวิตีของอะไมเลสโดยปรับให้ภาวะการทำงานของเอนไซม์ให้มีค่าความเป็นกรดและด่าง ต่างๆ กัน คือ 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 และ 8.0 ตามลำดับ เพื่อศึกษาค่าความเป็นกรดและด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์อะไมเลส โดยมีสารละลายบัฟเฟอร์ต่าง ๆ เป็นตัวปรับค่าความเป็นกรดและด่าง (ภาคผนวก ข) ได้แก่ โซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดและด่าง เท่ากับ 4.0 โซเดียมซิเตรตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดและด่าง เท่ากับ 5.0 และโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดและด่าง เท่ากับ 6.0, 7.0 และ 8.0

### 2.2 การศึกษาผลของความเป็นกรดและด่างที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์เซลล์ลูเลสและไซแลนเนส

นำเอนไซม์เซลล์ลูเลสและไซแลนเนสที่ผลิตได้ มาวัดแอกติวิตีโดยปรับให้ภาวะการทำงานของเอนไซม์ให้มีค่าความเป็นกรดและด่าง ต่าง ๆ กัน คือ 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 และ 8.0 ตามลำดับ เพื่อศึกษาค่าความเป็นกรดและด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เซลล์ลูเลสและไซแลนเนส โดยมีสารละลายบัฟเฟอร์ต่าง ๆ เป็นตัวปรับค่าความเป็นกรดและด่าง (ภาคผนวก ข) ได้แก่ โซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดและด่าง เท่ากับ 4.0 โซเดียมซิเตรตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดและด่าง เท่ากับ 5.0 และโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดและด่าง เท่ากับ 6.0, 7.0 และ 8.0

### 3. การศึกษาผลของ Metal ions ต่อการทำงานของเอนไซม์

#### 3.1 การศึกษาผลของ Metal ions ต่อการทำงานของเอนไซม์อะไมเลส

ทำการทดสอบเอนไซม์อะไมเลสกับ Mg ( $MgSO_4$ ), Ca ( $CaCl_2$ ), Mn ( $MnSO_4$ ), Fe ( $FeSO_4$ ), Co ( $CoCl_2$ ), Cu ( $CuSO_4$ ), Zn ( $ZnSO_4$ ) และ ethylene-diaminetetra -acetic acid (Na-EDTA) ที่ความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ 0.1 โมลาร์ รวมเข้ากับเอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตได้แล้ว นำไปวัดค่าแอกติวิตีของเอนไซม์อะไมเลส

#### 3.2 การศึกษาผลของ Metal ions ต่อการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส

ทำการทดสอบเอนไซม์เซลลูเลสกับ Mg ( $MgSO_4$ ), Ca ( $CaCl_2$ ), Mn ( $MnSO_4$ ), Fe ( $FeSO_4$ ), Co ( $CoCl_2$ ), Cu ( $CuSO_4$ ), Zn ( $ZnSO_4$ ) และ ethylene-diaminetetra -acetic acid (Na-EDTA) ที่ความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ 0.1 โมลาร์ รวมเข้ากับเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้แล้ว นำไปวัดค่าแอกติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนส

### 4. การศึกษาการย่อยสลายด้วยเอนไซม์

#### 4.1 การศึกษาการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อะไมเลส

นำมันสำปะหลังที่บดละเอียดมา 0.5 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีสารละลายไซเตียมซีเตรตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดและด่าง เท่ากับ 5.0 ปริมาตร 45 มิลลิลิตร เติมเอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตได้ ลงไปปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นจึงนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องและบ่มไว้ที่อุณหภูมิที่เหมาะสมตามข้อมูลที่ได้จากข้อ 3.1 โดยนำมาวัดปริมาณน้ำตาลทุก ๆ 7 วัน เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

#### 4.2 การศึกษาการย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

นำเปลือกข้าวโพด ชั่งข้าวโพด และฟางข้าว มาบดละเอียดแล้ว นำมาอย่างละ 0.5 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีสารละลายไซเตียมซีเตรตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดและด่าง เท่ากับ 5.0 ปริมาตร 45 มิลลิลิตร เติมเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้ ลงไปปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นจึงนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องและบ่มไว้ที่อุณหภูมิที่เหมาะสมตามข้อมูลที่ได้จากข้อ 3.1 โดยนำมาวัดปริมาณน้ำตาลทุก ๆ 7 วัน เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

### 5. การศึกษาเสถียรภาพของเอนไซม์

#### 5.1 การศึกษาเสถียรภาพของเอนไซม์อะไมเลส

นำเอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตได้ มาทำการทดสอบโดยการเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำมาวัดค่าแอกติวิตี ที่อุณหภูมิที่เหมาะสมตามข้อมูลที่ได้จากข้อ 4.1 โดยนำมาวัดแอกติวิตี ที่ระยะเวลาในการเก็บที่ต่างกัน คือ 1 วัน, 7 วัน, 14 วัน, 21 วัน และ 28 วัน เพื่อศึกษาเสถียรภาพของเอนไซม์

## 5.2 การศึกษาเสถียรภาพของเอนไซม์เซลลูเลส

นำเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้ มาทำการทดสอบโดยการเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำมาวัดค่าแอกติวิตี ที่อุณหภูมิที่เหมาะสมตามข้อมูลที่ได้จากข้อ 4.1 โดยนำมาวัดแอกติวิตี ที่ระยะเวลาในการเก็บที่ต่างกัน คือ 1 วัน, 7 วัน, 14 วัน, 21 วัน และ 28 วัน เพื่อศึกษาเสถียรภาพของเอนไซม์

### การผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์

นำสปอร์ของเชื้อราที่ผลิตอะไมเลส และสปอร์ของเชื้อราที่ผลิตเซลลูเลส มาเลี้ยงในอาหาร V8 juice medium นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน เพื่อให้สปอร์เติบโตเต็มที่ เตรียมสารละลายสปอร์เชื้อราในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ (normal saline) ที่มีการเติม Tween 80 ปริมาตร 0.01 เปอร์เซ็นต์ และทำการปรับให้มีปริมาณของสปอร์ เท่ากับ 106 spore/ml จากนั้นนำสารละลายสปอร์เชื้อราที่มีการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและอะไมเลส ที่เตรียมไว้มาผสมกับแป้งข้าวเจ้า ที่อัตราส่วนเชื้อ 100 มิลลิลิตร ต่อปริมาตรแป้ง 1,000 กรัม เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ลงไปคลุกเคล้าให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 วัน จากนั้นนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส แล้วนำมาบดให้เป็นผงเก็บไว้เพื่อนำไปใช้ทดสอบต่อไป

### การผลิตอาหารหมักและศึกษาลักษณะทางกายภาพต่าง ๆ ของอาหารหมัก

อาหารหมักทำในถังพลาสติกแบบมีฝาปิดขนาดบรรจุ 120 ลิตร โดยภายในจะมีวัตถุดิบต่าง ๆ ซึ่งผสมเป็นอาหารหมัก ประกอบด้วยวัตถุดิบ 4 ชนิด ดังนี้ คือ พักทอง หรือมันสำปะหลัง 60 กิโลกรัม หัวเชื้อจุลินทรีย์ 0.1 กิโลกรัม กากน้ำตาล 1.0 กิโลกรัม และน้ำสะอาด 40 ลิตร ปิดฝาให้สนิทและนำไปหมักไว้ที่ร่ม เป็นระยะเวลาประมาณ 15 วัน แล้วจึงนำมาตรวจสอบลักษณะทางกายภาพ โดยทำการสุ่มตัวอย่างอาหารหมักจากส่วนบน กลาง และล่าง ของถังหมักนำมาผสมให้เข้ากัน และตรวจสอบลักษณะของอาหารหมัก เช่น กลิ่น สี และวัดอุณหภูมิภายในถังหมัก โดยให้ระดับคะแนนตามเกณฑ์ประเมินคุณภาพพีชหมักทางกายภาพของอาหารสัตว์ (กรมปศุสัตว์, 2547ก, 2547ข และ 2547ค) อบอุ่นหาวัตถุแห้ง (dry weight) ตามวิธีของ Akinfemi, et al. (2010) วัดค่าความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) (AOAC, 2006) และหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (DNS method: Miller, 1959) เป็นต้น

### การวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาของอาหารหมัก

ในการทดลองนี้จะใช้วิธีของ AOAC (2006) ทำการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการ 6 กลุ่มใหญ่ คือ ความชื้น (Moisture) เถ้า (Ash) โปรตีนรวม (Crude protein ,CP) ไขมัน (Crude fat หรือ Ether extract, EE) เยื่อใย (Crude fiber ,CF)

### การเตรียมสัตว์ทดลอง

ใช้โคเนื้อสายพันธุ์ลูกผสมชาโรเลส์ (charolais crossbred) ที่มีเลือดชาโรเลส์ ไม่ต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ เพศผู้ที่ทำการตอนแล้ว จำนวน 4 ตัว และสายพันธุ์ลูกผสมซิมเมนทอล (Simmental crossbred) เพศผู้ที่ทำการตอนแล้ว จำนวน 4 ตัว โดยมีอายุเฉลี่ย 2-3 ปี มีน้ำหนักตัวเฉลี่ย  $350 \pm 50$  กิโลกรัม โคทุกตัวได้รับการฉีดยาถ่ายพยาธิ (Ivermectin) วัคซีนป้องกันโรคปากเท้าเปื่อยและคอบวม ก่อนเข้าทดลอง อย่างน้อย 1 สัปดาห์ โดยเลี้ยงในคอกขังเดี่ยว ขนาด  $2 \times 4$  เมตร ที่มีรางอาหารและรางน้ำสะอาด แยกเฉพาะตัว มีน้ำและแร่ธาตุก่อนให้กินตลอดเวลาในแต่ละคอก

วางแผนการทดลองแบบเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของทรีทเมนต์ที่ประกอบด้วย 2 ทรีทเมนต์ (treatment) แต่ละทรีทเมนต์ (treatment) มี 4 ซ้ำ ดังนี้

ทรีทเมนต์ (treatment) 1 โคเนื้อลูกผสมสายพันธุ์ชาโรเลส์ (T1)

ทรีทเมนต์ (treatment) 2 โคเนื้อลูกผสมสายพันธุ์ซิมเมนทอล (T2)

โดยในแต่ละทรีทเมนต์ (treatment) จะได้รับเปลือกข้าวโพดหมักและอาหารสูตรผสมที่มีฟักทองหมักและมันสำปะหลังหมักเป็นส่วนประกอบ

### การให้อาหารสัตว์ทดลอง

ระยะปรับสภาพสัตว์ทดลอง (preliminary period) โดยให้อาหารหยาบ คือ เปลือกข้าวโพดหมักแก่โคทุกตัวแบบเต็มที (ad libitum) ร่วมกับการให้อาหารข้น โดยให้ตามสัดส่วนของอาหารข้น 1 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว และมีน้ำสะอาดให้กินตลอดเวลา เป็นระยะเวลา 28 วัน ก่อนที่จะเริ่มการทดลองและบันทึกข้อมูล

การให้อาหารสัตว์ทดลองจะทำการชั่งอาหารที่ให้รายตัว เก็บอาหารเหลือของแต่ละตัว ก่อนให้อาหารเข้าทุกวัน บันทึกข้อมูล น้ำหนักตัว ปริมาณอาหารหยาบ (เปลือกข้าวโพดหมัก) อาหารข้น และอาหารผสมที่มีฟักทองหมักและมันสำปะหลังหมักเป็นส่วนประกอบ ที่ให้กินและที่เหลือกินในแต่ละวัน โดยสัดส่วนของอาหารสัตว์ทดลอง ดังแสดงในตาราง 2

ตาราง 2 แสดงสัดส่วนของอาหารที่ให้โคทลดลงในแต่ละวัน

		โคเนื้อสายพันธุ์ ชาโรเลส์ (T1) กก.	โคเนื้อสายพันธุ์ซิมเมนทอล (T2) กก.
เดือนที่ 1-3	อาหารสูตรสำเร็จ	18	-
	ฟักทองหมัก	-	6
	มันสำปะหลังหมัก	-	6
	รำ หรือ ฟุนข้าวโพด	-	4
	กากน้ำตาล	-	2
	หญ้าสด	10	10
	เปลือกข้าวโพด	-	-
เดือนที่ 4-7	อาหารสูตรสำเร็จ	18	-
	ฟักทองหมัก	-	6
	มันสำปะหลังหมัก	-	6
	รำ หรือ ฟุนข้าวโพด	-	4
	กากน้ำตาล	-	2
	หญ้าสด	5	5
	เปลือกข้าวโพด	5	5
เดือนที่ 8-10	อาหารสูตรสำเร็จ	18	-
	ฟักทองหมัก	-	6
	มันสำปะหลังหมัก	-	6
	รำ หรือ ฟุนข้าวโพด	-	4
	กากน้ำตาล	-	2
	หญ้าสด	1	1
	เปลือกข้าวโพด	10	10

## การวัดสมรรถภาพการเจริญเติบโตและศึกษาลักษณะซากของสัตว์ทดลอง

### 1. การวัดการเจริญเติบโต

ทำการบันทึกน้ำหนักของสัตว์ทดลองเมื่อเริ่มต้น และสิ้นสุดการทดลอง โดยวัดน้ำหนักที่การเปลี่ยนแปลงทุก ๆ 4 สัปดาห์ ระยะเวลา 12 เดือน ตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน 2559 ถึง พฤศจิกายน 2560 เพื่อนำมาคำนวณหา

1.1 ปริมาณอาหารที่กินได้ (Feed intake, FI)

1.2 การเจริญเติบโตเฉลี่ย (Average daily gain, ADG)

1.3 ประสิทธิภาพการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนักตัว (Feed conversion ratio, FCR)

1.4 ต้นทุนค่าอาหารต่อการเพิ่มน้ำหนัก 1 กิโลกรัม (Feed cost for 1 kg. of weight gain, FCG)

### 2. การศึกษาลักษณะซาก

หลังสิ้นสุดการทดลอง จะทำการศึกษาลักษณะซากที่โรงชำแหละของบริษัท Premium Beef Co., Ltd ตำบลหนองหญ้าไซ อำเภอหนองหญ้าไซ จังหวัดสุพรรณบุรี 72240

## สถานที่ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัยและรวบรวมข้อมูล

1. การทดสอบเลี้ยงโคจะดำเนินการที่ ศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์พะเยา ตำบลแม่กา อำเภอเมือง จังหวัดพะเยา

2. ห้องปฏิบัติการ คณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา

## การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ค่าทางสถิติเพื่อหาค่าความแปรปรวน (Analysis of variance, ANOVA) โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design: CRD) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของแต่ละที่หมენท์ด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ กำหนดค่านัยสำคัญที่ใช้ในการทดสอบที่  $p < 0.05$

## ระยะเวลาดำเนินการวิจัย

ระยะเวลาประมาณ 12 เดือน ตั้งแต่เดือน พฤศจิกายน 2559 ถึง พฤศจิกายน 2560

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

#### การตัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ย่อยชีวมวลจากลูกแป้งข้าวหมาก

ในวัตถุดิบอาหารสัตว์นั้นมีองค์ประกอบที่เป็นทั้งเส้นใยและคาร์โบไฮเดรต จึงต้องอาศัยเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติในการย่อยเส้นใยที่ประกอบไปด้วยเซลลูโลส คือ เอนไซม์เซลลูเลส และส่วนที่เป็นคาร์โบไฮเดรต ซึ่งต้องอาศัยเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติในการย่อยแป้งซึ่งเป็นเอนไซม์อะไมเลส

#### การตัดแยกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลส

การตัดแยกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากลูกแป้งข้าวหมาก ด้วยอาหาร SS medium (Danmek, et al., 2014) (ภาคผนวก ค) โดยมี soluble starch เป็นแหล่งคาร์บอน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 วัน พบว่า มีเชื้อราหลายชนิดที่สามารถเจริญเติบโตได้ โดยเชื้อราที่มีการสร้างสปอร์และเส้นใยขึ้น ซึ่งสามารถแยกเชื้อราชนิดต่าง ๆ ได้ทั้งหมดจำนวน 6 ชนิด จากนั้นนำเชื้อราทั้ง 6 ชนิด ที่ตัดแยกได้มาเลี้ยงบนอาหาร SS medium ที่มี soluble starch เป็นแหล่งคาร์บอน เพื่อดูการเจริญและตรวจสอบการผลิตอะไมเลส โดยทำการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใย จากนั้นจึงใช้สารละลาย 0.1% (w/v) iodine และ 1.0% (w/v) potassium iodide ราดทับแล้วทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที เชื้อราที่เกิดวงใส (clear zone) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ คือ เชื้อราที่สามารถสร้างเอนไซม์อะไมเลสได้ โดยผลการทดลองดังแสดงในตาราง 3

ตาราง 3 แสดงอัตราส่วนของวงใส (clear zone) ต่อการเจริญและลักษณะสัญญาณวิทยาของเชื้อราที่แยกได้จากลูกแป้งข้าวหมาก บนอาหาร SS medium ที่มี soluble starch เป็นแหล่งคาร์บอน

Isolates	Colony diameter (cm)	Clear zone (cm)	Clear*ratio
1	3.2	4.0	1.28
2	3.5	4.3	1.22
3	3.7	4.4	1.21
4	3.7	4.3	1.16
5	3.7	4.4	1.20
6	3.6	4.5	1.23

หมายเหตุ: \* บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

จากตาราง 3 พบว่า เชื้อราที่คัดแยกได้ทั้งหมด 6 ชนิด มีเชื้อราที่สร้างวงใส (clear zone) ได้ทั้งหมด 6 ชนิด ได้แก่ เชื้อรา UP01, UP02, UP03, UP04, UP05, UP06

### การคัดแยกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

การคัดแยกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากลูกแป้งข้าวหมาก ด้วยอาหาร carboxymethyl cellulose agar (CMC agar) (ภาคผนวก ค) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 วัน พบว่า มีเชื้อราหลายชนิดที่สามารถเจริญเติบโตได้ โดยเชื้อรามีการสร้างสปอร์ และเส้นใยขึ้น ซึ่งสามารถแยกเชื้อราชนิดต่าง ๆ ได้ทั้งหมดจำนวน 3 ชนิด จากนั้นนำเชื้อราที่คัดแยกได้มาเลี้ยงบนอาหาร carboxymethyl cellulose agar (CMC agar) ทำการตรวจสอบการผลิตเซลลูเลสของเชื้อรา โดยการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยเพื่อดูการเจริญ จากนั้นจึงนำสี Congo red ความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ มาราดทับเส้นใย ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที เทลสีทิ้ง และล้างสีส่วนเกินออกด้วยสารละลาย NaCl 1 โมลาร์ ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที สามารถสังเกตเชื้อราที่ผลิตเซลลูเลสได้โดยดูวงใส (clear zone) ที่เกิดขึ้น ได้ผลการทดลองดังแสดงในตาราง 4

ตาราง 4 แสดงอัตราส่วนของวงใส (clear zone) ต่อการเจริญและลักษณะสัญญาณวิทยาของเชื้อราที่แยกได้จากลูกแป้งข้าวหมาก บนอาหาร CMC agar

Isolates	Colony diameter (cm)	Clear zone (cm)	Clear*ratio
1	1.1	1.9	1.72
2	3.0	5.2	1.73
3	5.5	6.7	1.21

หมายเหตุ: \* บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

จากตาราง 4 พบว่า เชื้อราที่คัดแยกได้ทั้งหมด 9 ชนิด มีเชื้อราที่สร้างวงใส (clear zone) ได้ทั้งหมด 3 ชนิด ได้แก่ UP07, UP08, UP09

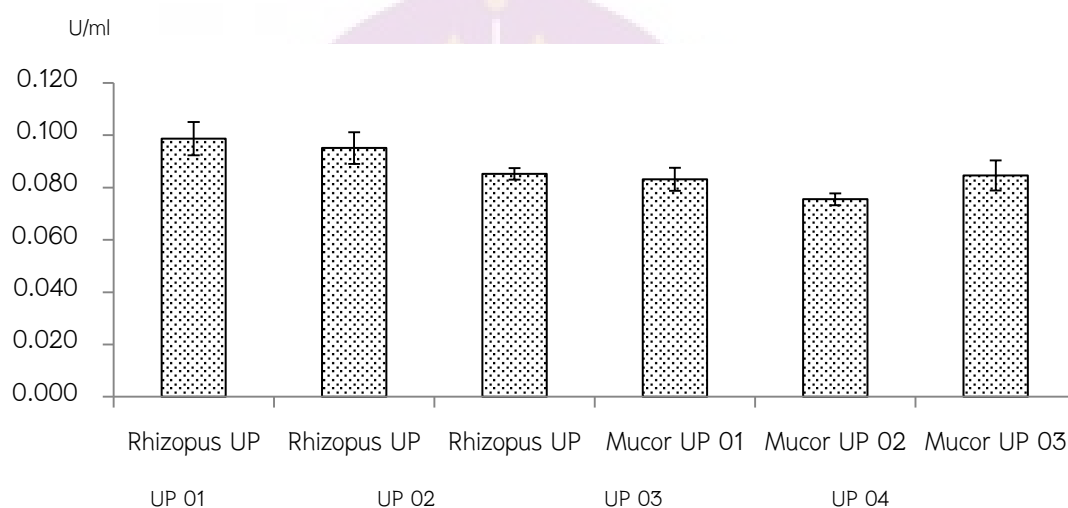
### การวัดแอกติวิตีของเอนไซม์อะไมเลสและเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อราที่คัดแยกได้

#### 1. การวัดแอกติวิตีของเอนไซม์อะไมเลส

ทำการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อราที่คัดแยกได้ ได้แก่ เชื้อรา UP01, UP02, UP03, UP04, UP05 และ UP06 ผลการทดลองแสดงในตาราง 5

ตาราง 5 แสดงค่าแอกติวิตีจำเพาะของอะไมเลสที่ผลิตจากเชื้อราที่คัดแยกได้  
ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน (หน่วยเป็น Unit, U)

Isolate	Activity of amylase (Unit)
UP 01	0.099
UP 02	0.095
UP 03	0.085
UP 04	0.083
UP 05	0.076
UP 06	0.085



ภาพ 13 แสดงค่าแอกติวิตีจำเพาะของอะไมเลสที่ผลิตจากเชื้อราที่คัดแยกได้  
ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

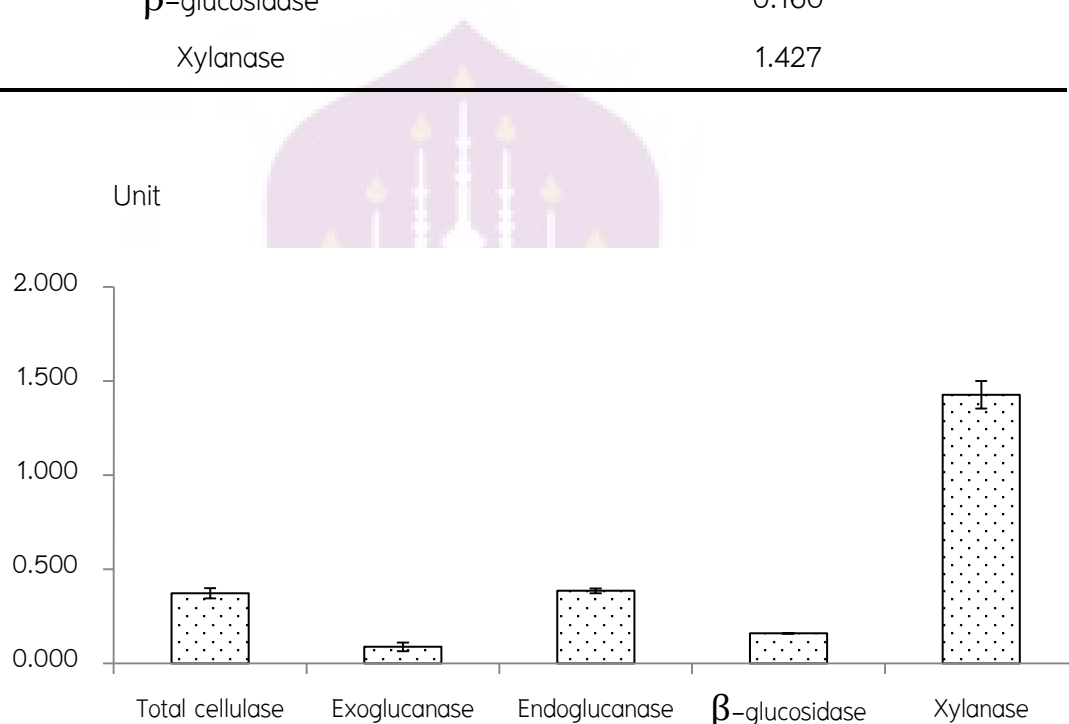
จากตาราง 5 และภาพ 13 สามารถคัดเลือกเชื้อราที่ผลิตอะไมเลสได้ดีที่สุดคือ เชื้อรา Isolate UP01 เนื่องจากสามารถผลิตอะไมเลสได้สูงสุด เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อรา Isolate อื่น ๆ โดยมีค่าแอกติวิตีของเอนไซม์ เท่ากับ 0.099 ยูนิต

## 2. การผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

ทำการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส จากเชื้อราที่คัดแยกได้ โดยทำการคัดเลือกเชื้อรา Isolate UP07 โดยผลการทดลองดังแสดงในตาราง 6 และภาพ 14

ตาราง 6 แสดงค่าแอกติวิตีจำเพาะของเซลลูเลสและไซแลนเนส ที่ผลิตจากเชื้อรา Isolate UP07 เมื่อเลี้ยงในอาหาร SS medium ที่มีกระดาษกรองเป็นแหล่งคาร์บอน แทนเซลลูโลส ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน (หน่วยเป็น Unit, U)

	Activity of cellulose (Unit)
Total cellulase	0.373
Exoglucanase	0.088
Endoglucanase	0.386
$\beta$ -glucosidase	0.160
Xylanase	1.427



ภาพ 14 ค่าแอกติวิตีจำเพาะของเซลลูเลสและไซแลนเนสที่ผลิตจาก เชื้อรา Isolate UP07 เมื่อเลี้ยงในอาหาร SS medium ที่มีกระดาษกรองเป็นแหล่งคาร์บอน แทนเซลลูโลส ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน (หน่วยเป็น Unit, U)

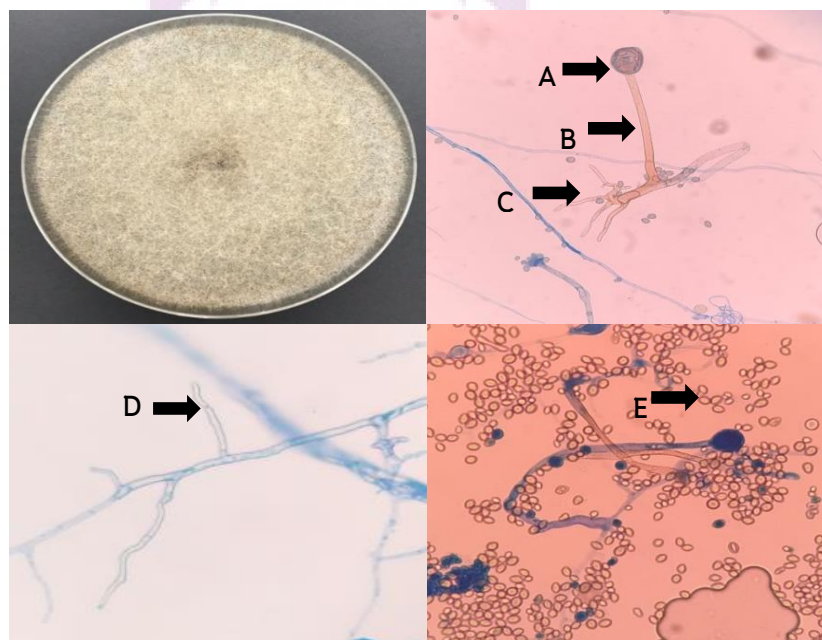
จากตาราง 6 และภาพ 14 พบว่า ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เชื้อรา Isolate UP07 สามารถผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสได้สูงสุด เท่ากับ 1.427 ยูนิต ซึ่งสูงกว่า Total cellulase, Exoglucanase, Endoglucanase,  $\beta$ -glucosidase ที่มีค่าเท่ากับ 0.373 0.088 0.386 0.160 ยูนิต ตามลำดับ

### การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราที่คัดแยกได้

นำเชื้อราที่ผลิตเซลลูเลสและเชื้อราที่ผลิตอะไมเลส ที่คัดแยกได้มาทำการจำแนกชนิด โดยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาบนอาหารแข็งตามวิธีการของ Klich (2002); Danmek, et al. (2011); Danmek, et al. (2014) โดยศึกษาลักษณะต่าง ๆ เช่น สี ขนาด และรูปร่างของสปอร์ เป็นต้น พบว่า เชื้อที่คัดแยกได้เป็นเชื้อที่อยู่ในกลุ่มที่ย่อยชีวมวลพืชที่มีองค์ประกอบเป็นแป้ง และเชื้อที่อยู่ในกลุ่มที่ย่อยชีวมวลพืชที่มีองค์ประกอบเป็นเยื่อใย โดยเชื้อที่อยู่ในกลุ่มที่ย่อยชีวมวลพืชที่มีองค์ประกอบเป็นแป้ง ได้แก่ เชื้อราสายพันธุ์ *Rhizopus* spp. และเชื้อที่อยู่ในกลุ่มที่ย่อยชีวมวลพืชที่มีองค์ประกอบเป็นเยื่อใย ได้แก่ เชื้อราสายพันธุ์ *Trichoderma* spp.

#### 1. เชื้อรา *Rhizopus* spp. UP01

ลักษณะของเชื้อราที่เจริญบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีการเจริญเติบโตที่ดี มีเส้นใยขาว สปอร์มีสีน้ำตาล ส่วนปลายมีคอกลูเมลลา รูปร่างกลม ลักษณะสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เป็นเชื้อราที่เส้นใยมีผนังกัน (septate hypha) สปอร์แรงจิโสปอร์ (sporangiospore) ซึ่งรวมกันอยู่ใน sporangium ที่มีรูปร่างกลม ที่ฐานของ sporangiophore ซึ่งเป็นก้านชูสปอร์ มีไรโซอิด (rhizoid) และสโตลอน (stolon) ซึ่งเป็นเส้นใยที่เชื่อม sporangiospore ดังภาพ 15

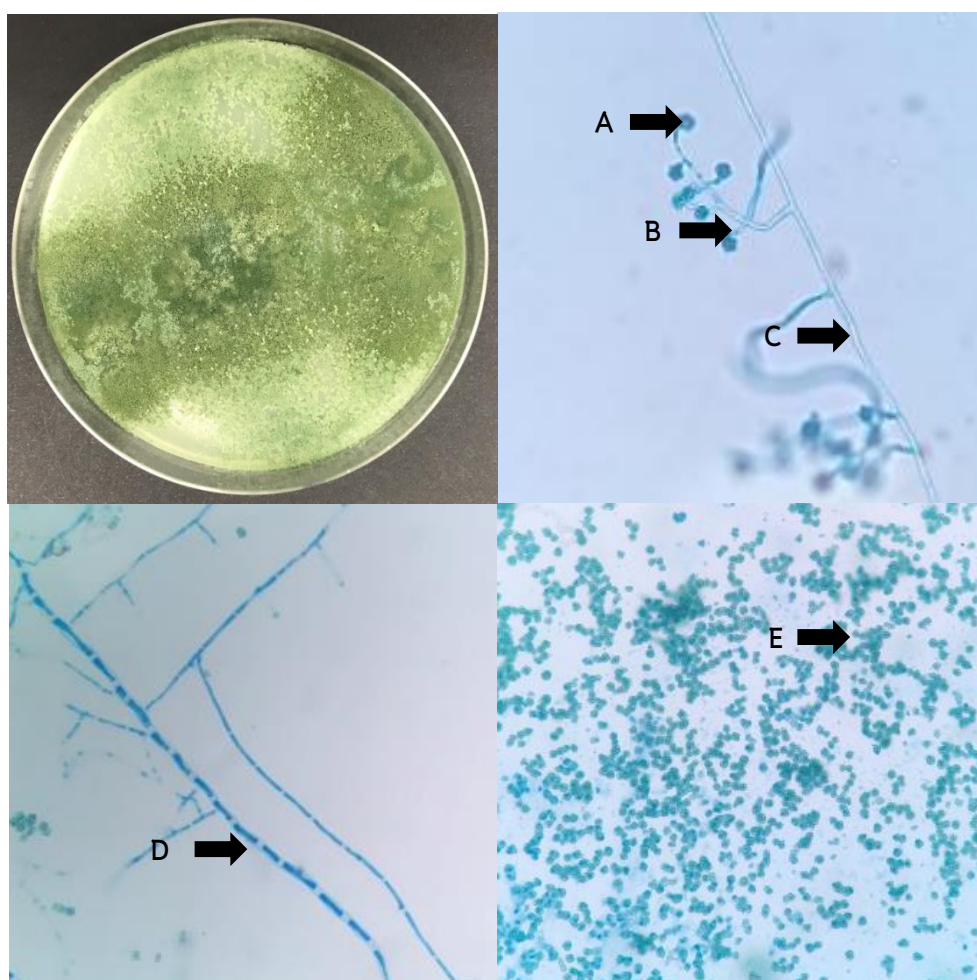


Sporangium (A), Sporangiphore (B), Rhizoids (C), Septum (D) and Sporangiospores (E)

ภาพ 15 แสดงลักษณะการเจริญของ *Rhizopus* spp. UP01 ที่เจริญบนอาหาร PDA เป็นระยะเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

## 2. เชื้อรา *Trichoderma* spp. UP07

ลักษณะของเชื้อราที่เจริญบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีการเจริญเติบโตที่ดี มีเส้นใยขาว สปอร์มีสีเหลืองและจะค่อย ๆ เปลี่ยนเป็นสีเขียวเมื่อเจริญเติบโตเต็มที่ ลักษณะสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เป็นเชื้อราที่เส้นใยมีผนังกัน (septate hypha) เส้นใยแตกกิ่งก้านสาขาออกหลายแขนง มีก้านชูสปอร์ (conidiophores) บริเวณตรงปลายเส้นใย มีการสร้าง conidia รูปร่างกลม สีเขียว ดังภาพ 16



Conidia (phialospore) (A) (E), Conidiophore (B), Hyphae (C) and Septum (D)

ภาพ 16 แสดงลักษณะการเจริญของ *Trichoderma* spp. UP07 ที่เจริญบนอาหาร PDA เป็นระยะเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

## การผลิตเอนไซม์และการศึกษาลักษณะสมบัติบางประการของเอนไซม์

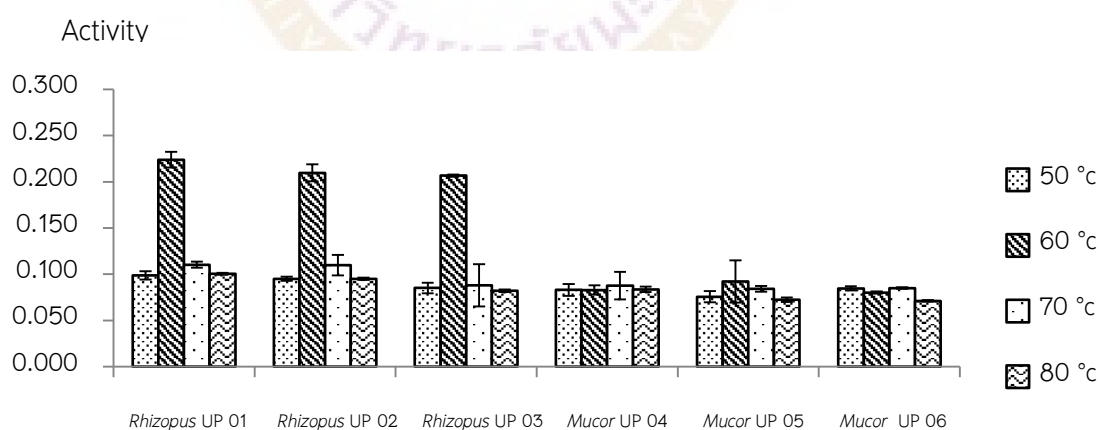
### 1. การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์

#### 1.1 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของอะไมเลส

ทำการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อราที่คัดแยกได้ ได้แก่ เชื้อรา *Rhizopus* spp. UP01, *Rhizopus* spp. UP02, *Rhizopus* spp. UP03, *Mucor* spp. UP04, *Mucor* spp. UP05 และ *Mucor* spp. UP06 ผลการทดลองแสดงในตาราง 7 และภาพ 17

ตาราง 7 แสดงค่าแอกติวิตีจำเพาะของอะไมเลสที่ผลิตจากเชื้อราที่คัดแยกได้ที่อุณหภูมิ 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน (หน่วยเป็น Unit, U)

Isolate	Temperature (°c)			
	50	60	70	80
<i>Rhizopus</i> UP 01	0.099	0.224	0.110	0.101
<i>Rhizopus</i> UP 02	0.095	0.210	0.110	0.095
<i>Rhizopus</i> UP 03	0.085	0.207	0.088	0.082
<i>Mucor</i> spp. UP 04	0.083	0.083	0.088	0.084
<i>Mucor</i> spp. UP 05	0.076	0.092	0.084	0.072
<i>Mucor</i> spp. UP 06	0.085	0.080	0.085	0.071



ภาพ 17 แสดงค่าแอกติวิตีจำเพาะของอะไมเลสที่ผลิตจากเชื้อราที่คัดแยกได้ที่อุณหภูมิ 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส

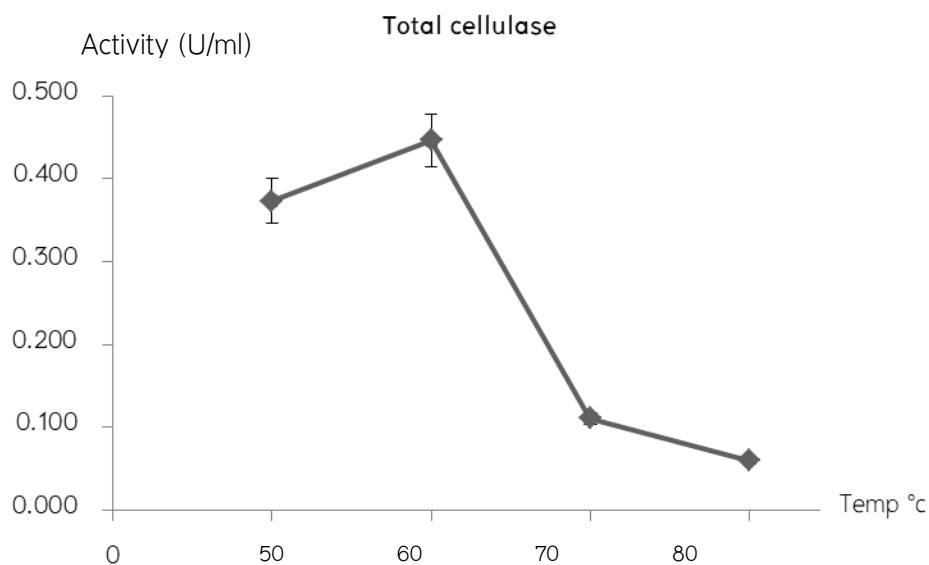
จากตาราง 7 และภาพ 17 สามารถคัดเลือกเชื้อราที่สามารถผลิตอะไมเลสได้ดี คือ *Rhizopus* spp. UP01 เนื่องจากสามารถผลิตอะไมเลสได้สูงสุด เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อรา Isolate อื่น ๆ และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คือ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส โดยมีค่าแอกติวิตีของเอนไซม์ เท่ากับ 0.224 ยูนิต

## 1.2 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเซลลูเลส

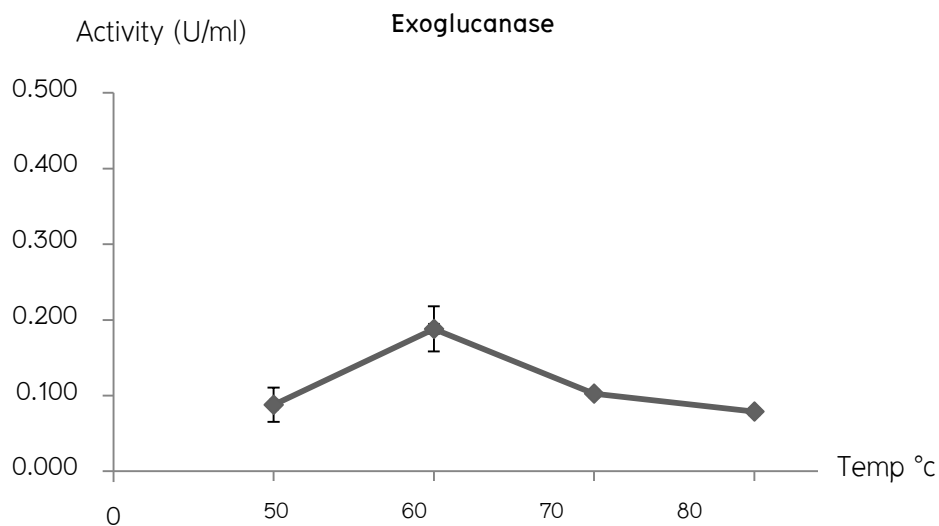
ทำการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส จากเชื้อราที่คัดแยกได้ โดยทำการคัดเลือกเชื้อรา *Trichoderma* spp. UP07 เนื่องจากเป็นเชื้อราสายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารพิษ เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้ออีกสองสายพันธุ์ที่คัดแยกได้ โดยผลการทดลองดังแสดงในตาราง 8 และภาพ 18

ตาราง 8 แสดงค่าแอกติวิตีจำเพาะของเซลลูเลสที่ผลิตจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. UP07 เมื่อเลี้ยงในอาหาร SS medium ที่มีกระดาษกรองเป็นแหล่งคาร์บอน แทนเซลลูโลสที่อุณหภูมิ 50 60 70 และ 80 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน (หน่วยเป็น Unit, U)

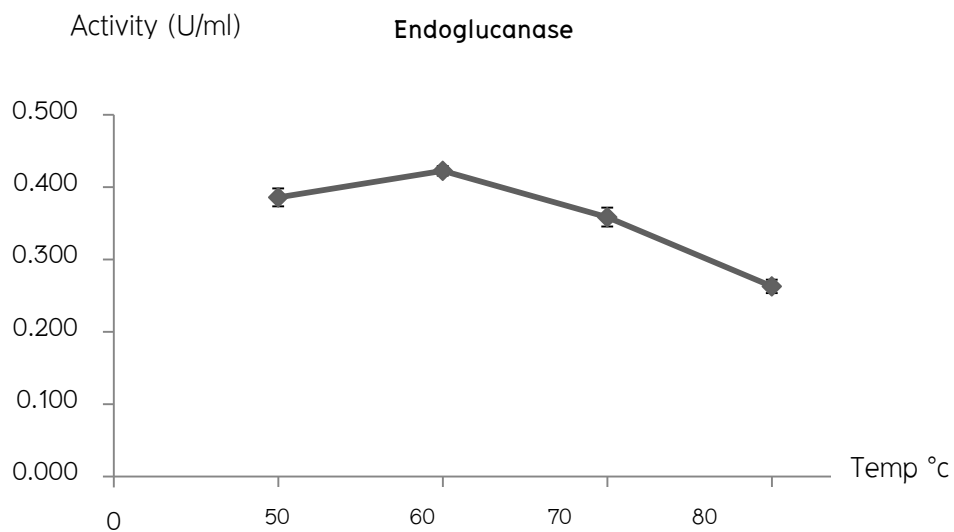
	Temperature (°c)			
	50	60	70	80
Total cellulase	0.373	0.447	0.111	0.060
Exoglucanase	0.088	0.188	0.103	0.079
Endoglucanase	0.386	0.422	0.358	0.263
$\beta$ -glucosidase	0.160	0.222	0.206	0.091
Xylanase	1.427	1.633	1.693	1.326



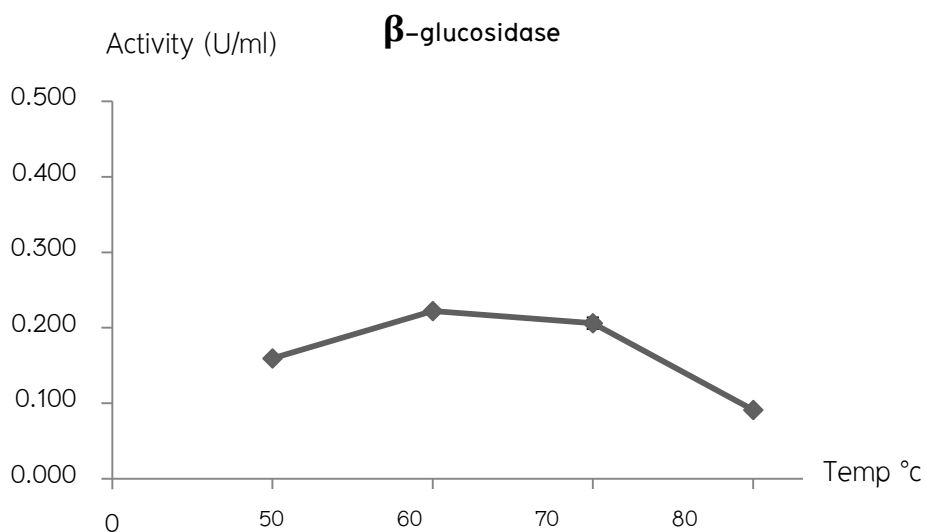
ภาพ 18 แสดงค่าแอกติวิตีจำเพาะของ Total cellulase ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. UPO7 ที่คัดแยกได้ เมื่อเลี้ยงในอาหาร SS medium ที่มีกระดาษกรอง เป็นแหล่งคาร์บอนแทนเซลลูโลส



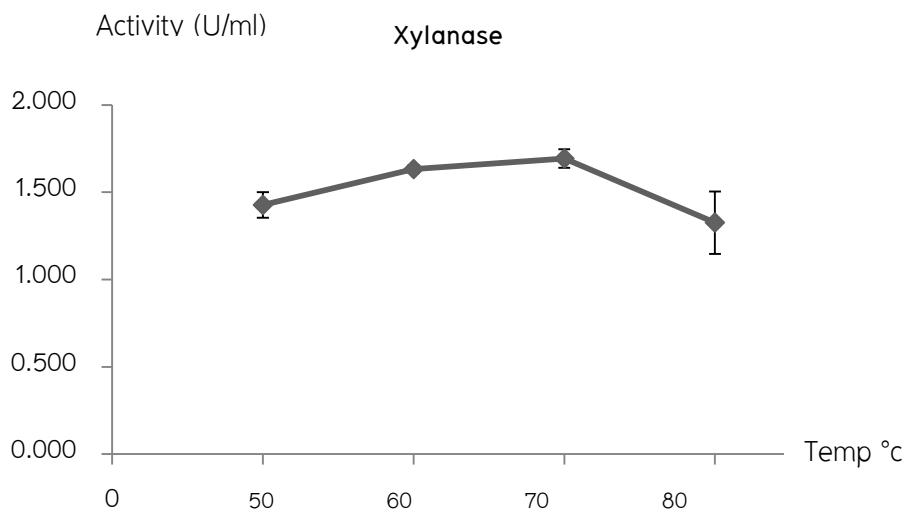
ภาพ 19 แสดงค่าแอกติวิตีจำเพาะของเอกโซกลูคาเนส ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. UPO7 ที่คัดแยกได้ เมื่อเลี้ยงในอาหาร SS medium ที่มีกระดาษกรอง เป็นแหล่งคาร์บอนแทนเซลลูโลส



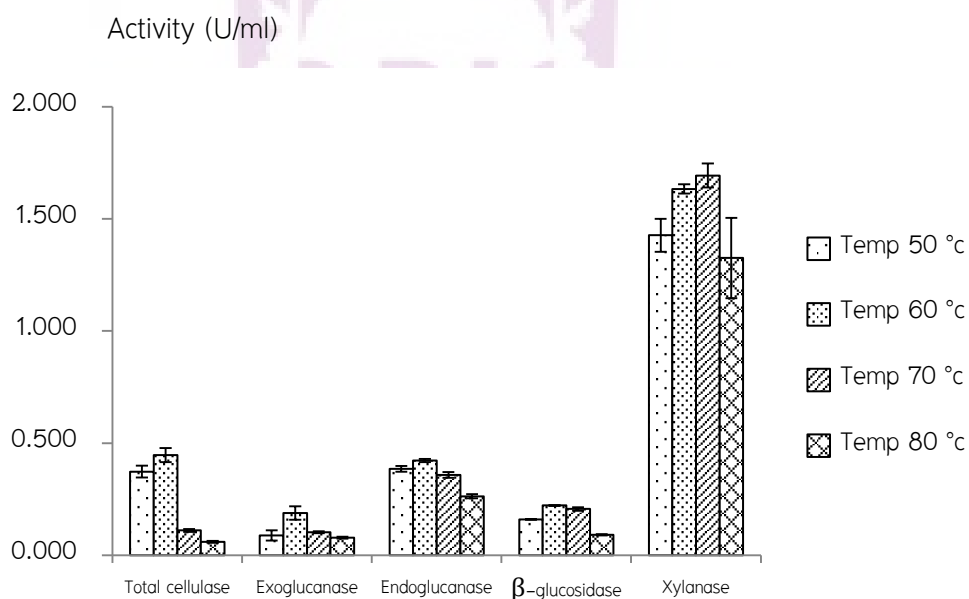
ภาพ 20 แสดงค่าแอกติวิตีจำเพาะของเอนโดกลูคาเนส ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. UP07 ที่คัดแยกได้เมื่อเลี้ยงในอาหาร SS medium ที่มีกระดาษกรองเป็นแหล่งคาร์บอนแทนเซลลูโลส



ภาพ 21 แสดงค่าแอกติวิตีจำเพาะของเบตา-กลูโคซิเดส ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. UP07 ที่คัดแยกได้เมื่อเลี้ยงในอาหาร SS medium ที่มีกระดาษกรองเป็นแหล่งคาร์บอนแทนเซลลูโลส

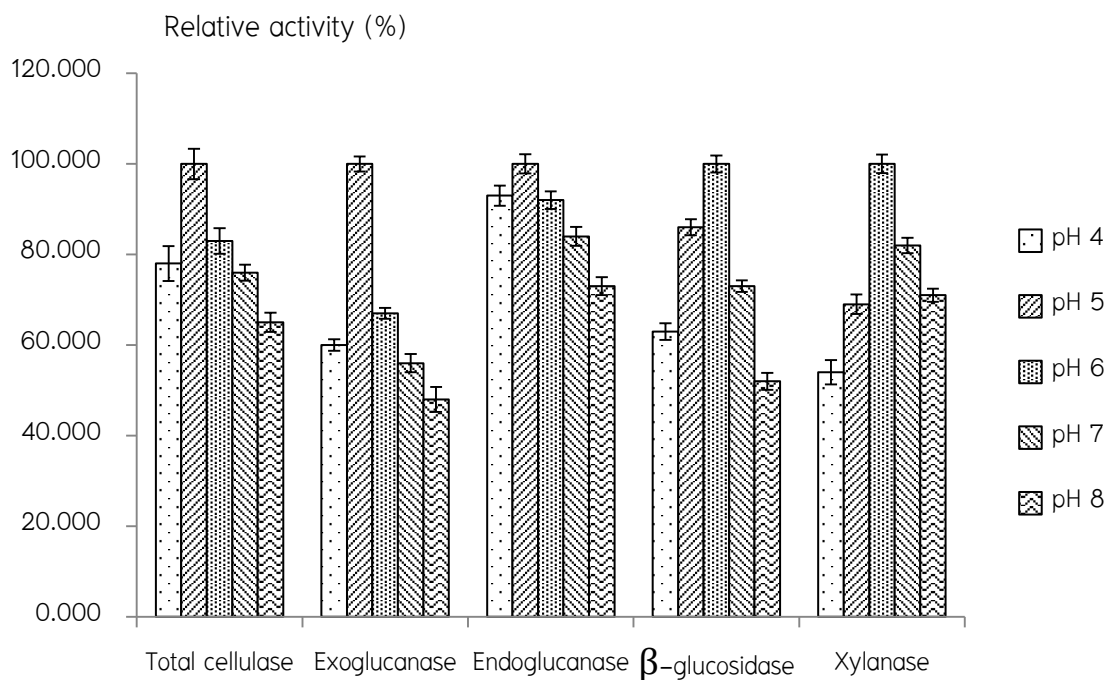


ภาพ 22 แสดงค่าแอกติวิตีจำเพาะของไซแลนเนส ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. UP07 ที่คัดแยกได้เมื่อเลี้ยงในอาหาร SS medium ที่มีกระดาษกรองเป็นแหล่งคาร์บอนแทนเซลลูโลส

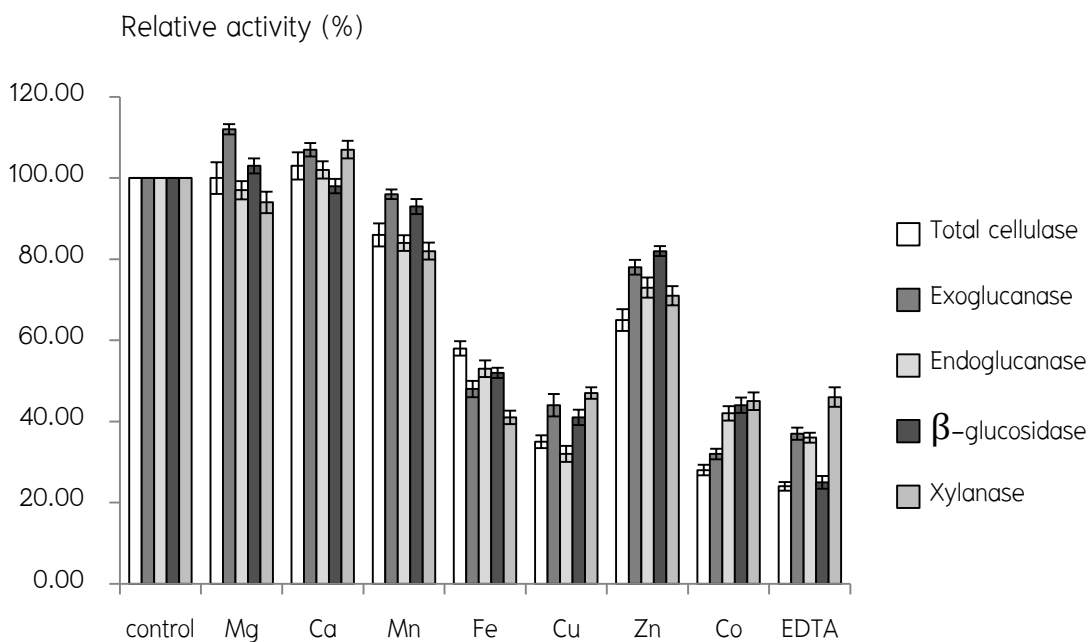


ภาพ 23 แสดงค่าแอกติวิตีจำเพาะของเซลลูเลสและไซแลนเนสที่ผลิตจาก *Trichoderma* spp. UP07

จากตาราง 8 และภาพ 21-22 พบว่า เอนไซม์เซลลูเลส (Total cellulose, Exoglucanase, Endoglucanase,  $\beta$ -glucosidase) ที่ผลิตโดยเชื้อรา *Trichoderma* spp. UP07 สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส คือ 0.447, 0.188, 0.422 และ 0.222 ยูนิตตามลำดับ และเอนไซม์ไซแลนเนส สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส คือ 1.693 ยูนิต

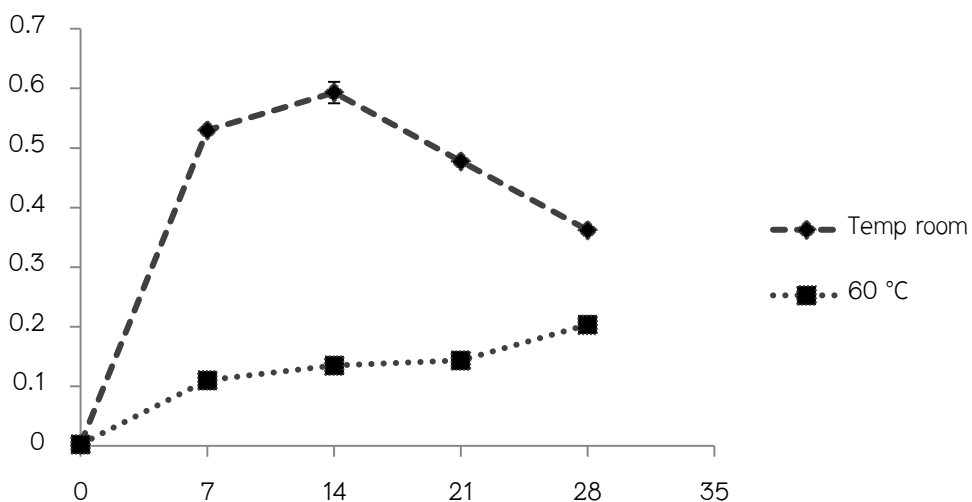


ภาพ 24 แสดงผลของ pH ต่อค่าแอกติวิตีจำเพาะของเซลลูเลสและไซแลนเนสที่ผลิตจาก *Trichoderma* spp. UP07

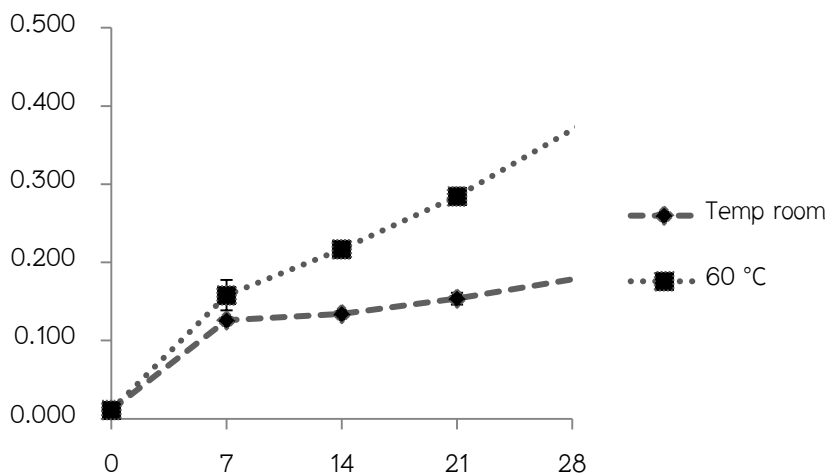


ภาพ 25 แสดงผลของ metal ion ต่อค่าแอกติวิตีจำเพาะของเซลลูเลสและไซแลนเนส ที่ผลิตจาก *Trichoderma* spp. UP07

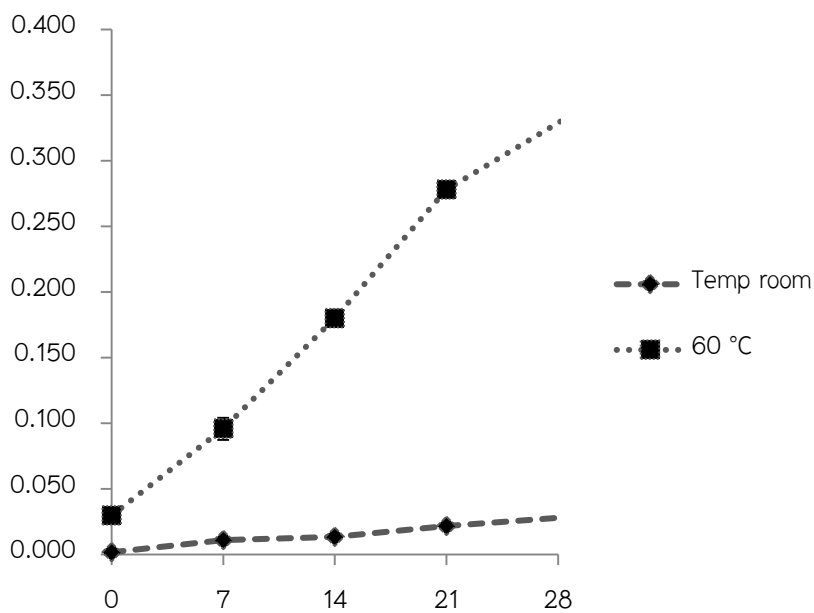
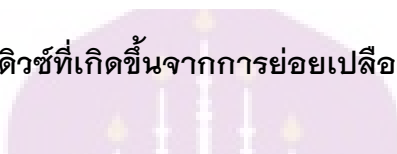
2. การศึกษาการย่อยสลายสเตอรอลด้วยเอนไซม์



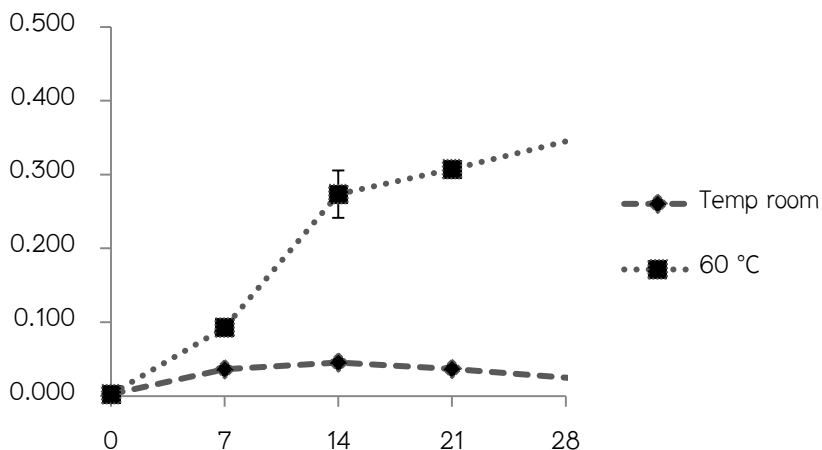
ภาพ 26 แสดงน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์อะไมเลส



ภาพ 27 แสดงน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยแป้งข้าวโพดด้วยเอนไซม์เซลลูเลส



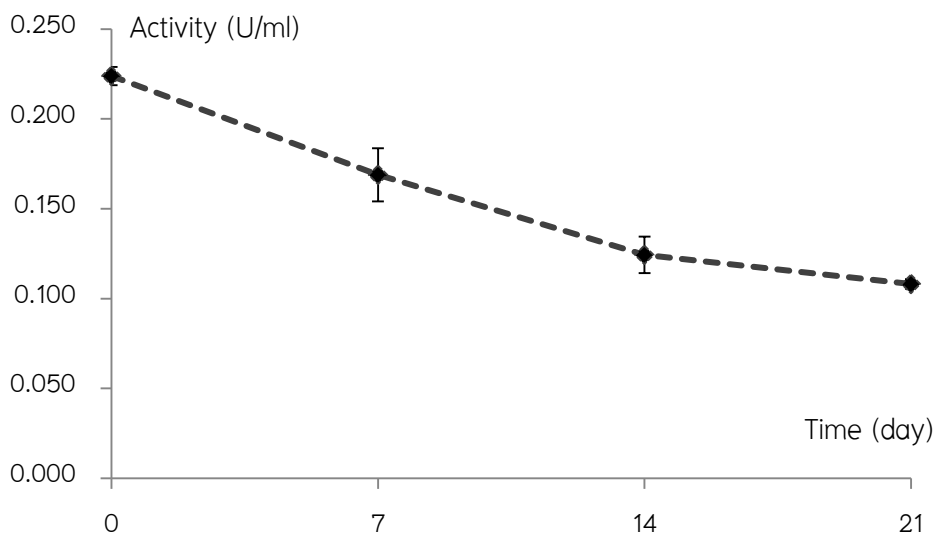
ภาพ 28 แสดงน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยแป้งข้าวโพดด้วยเอนไซม์เซลลูเลส



ภาพ 29 น้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยฟางข้าวด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

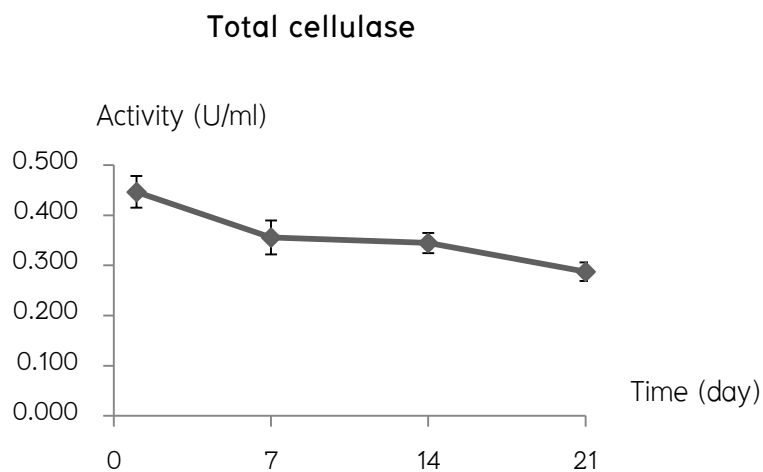
### 3. การศึกษาเสถียรภาพของเอนไซม์

#### 3.1 การศึกษาเสถียรภาพของเอนไซม์อะไมเลส

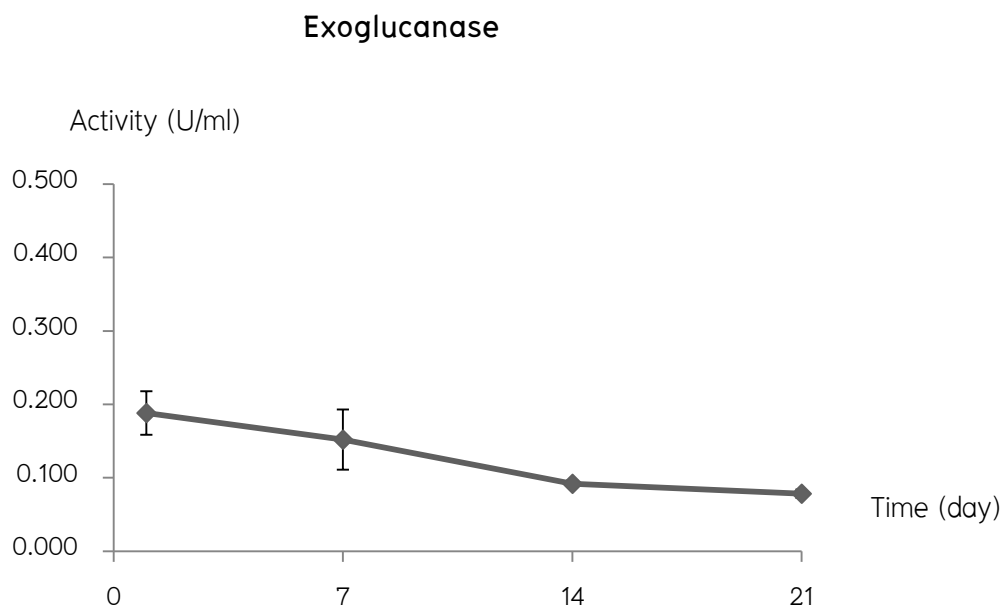


ภาพ 30 แสดงความเสถียรของเอนไซม์อะไมเลสที่ช่วงเวลาต่าง ๆ

### 3.2 การศึกษาเสถียรภาพของเอนไซม์เซลลูเลส

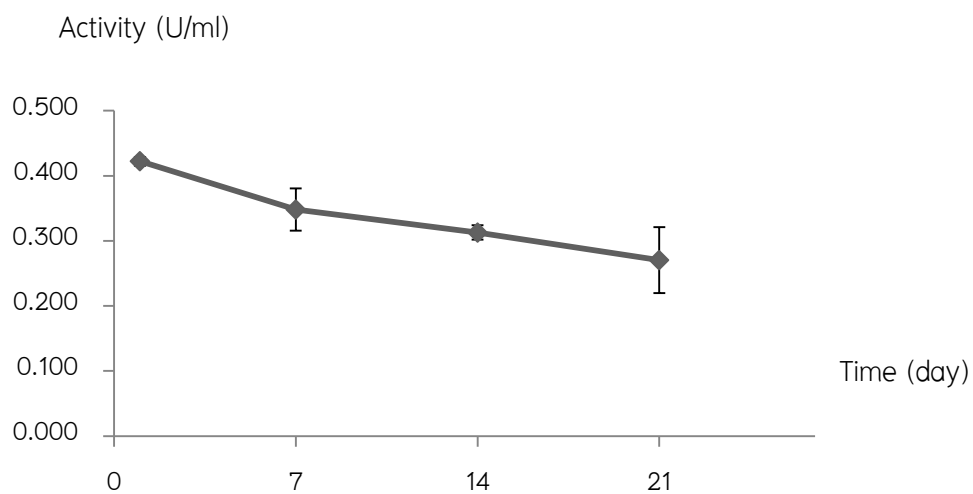


ภาพ 31 แสดงความเสถียรของเอนไซม์เซลลูเลส (Total cellulase) ที่ช่วงเวลาต่าง ๆ



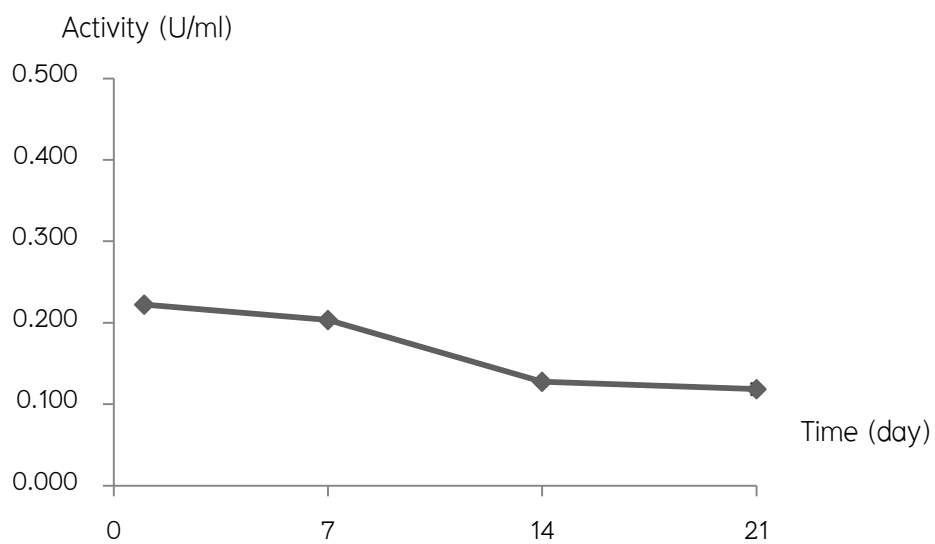
ภาพ 32 แสดงความเสถียรของเอนไซม์เซลลูเลส (exoglucanase) ที่ช่วงเวลาต่าง ๆ

### Endoglucanase

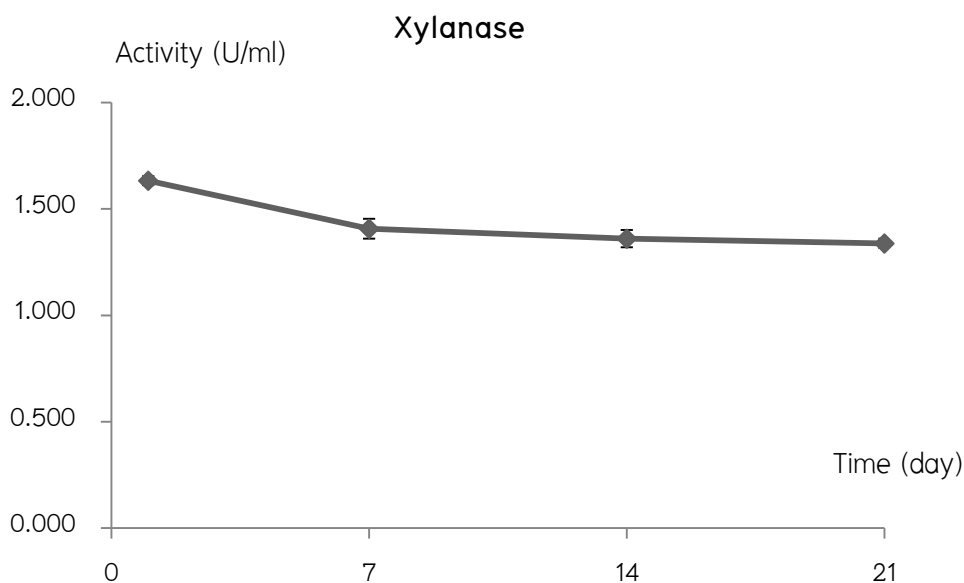


ภาพ 33 แสดงความเสถียรของเอนไซม์เซลลูเลส (endoglucanase) ที่ช่วงเวลาต่าง ๆ

### $\beta$ -glucosidase



ภาพ 34 แสดงความเสถียรของเอนไซม์เซลลูเลส (betaglucosidase) ที่ช่วงเวลาต่าง ๆ

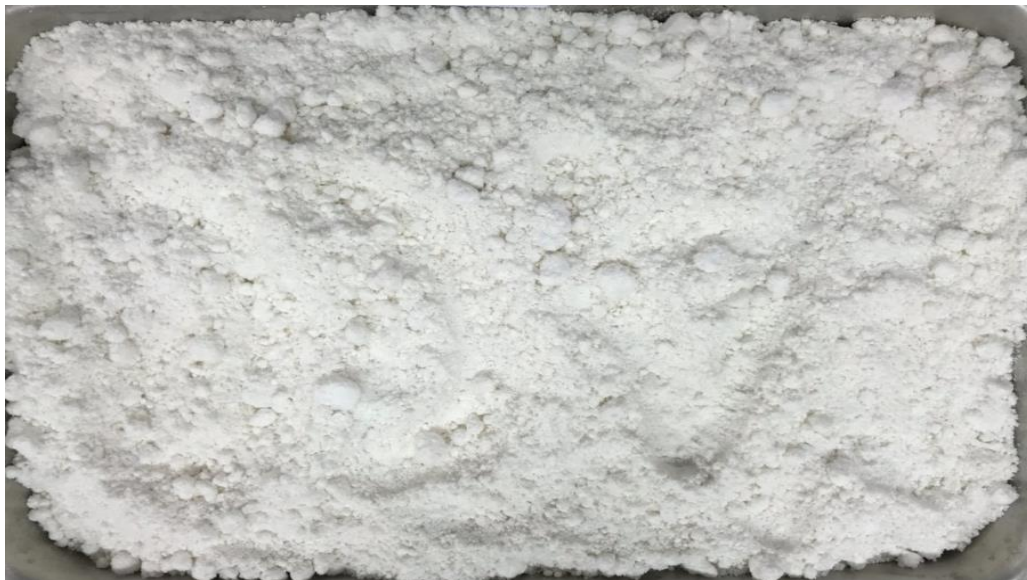


ภาพ 35 แสดงความเสถียรของเอนไซม์ไซแลนเนส ที่ช่วงเวลาต่าง ๆ

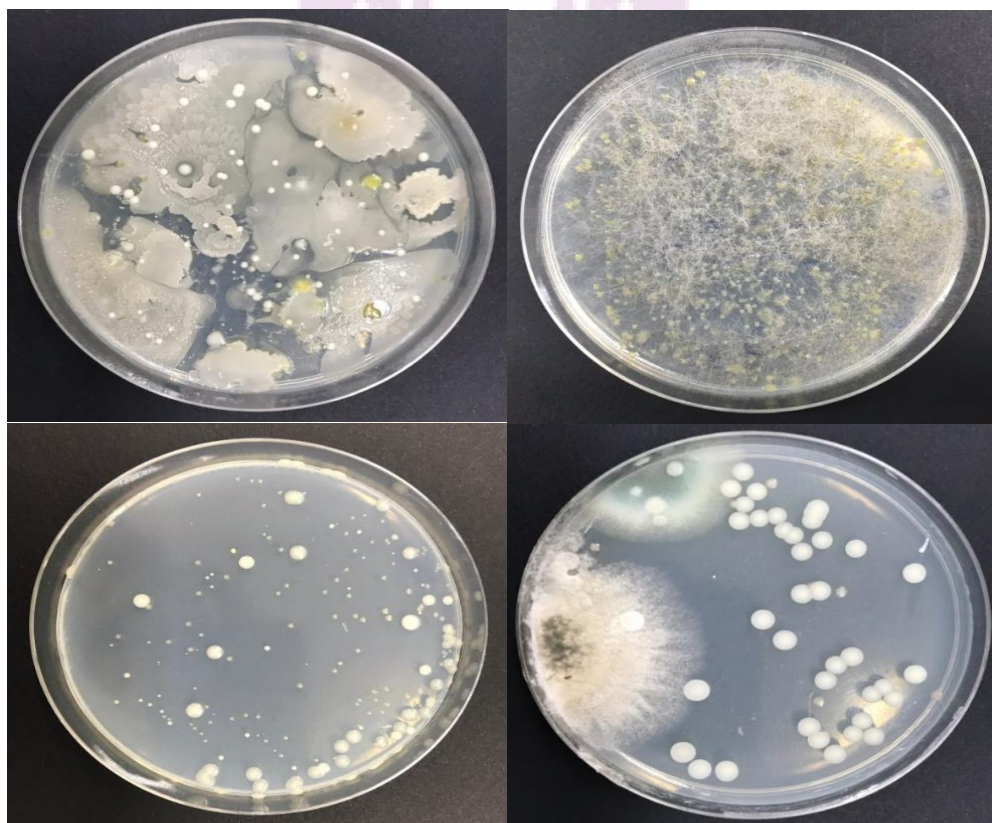
#### การผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์

นำเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้และมีการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและอะไมเลสมาเลี้ยงในอาหาร PDB ที่มีการเติมยาปฏิชีวนะลงไป ทำการเลี้ยงเชื้อราที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบของการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 3 วัน จากนั้นนำเชื้อจุลินทรีย์ที่เลี้ยงไว้ทำการผสมกับแป้งข้าวเจ้าที่อัตราส่วนเชื้อ 100 มิลลิลิตรต่อปริมาตรแป้ง 1,000 กรัม เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 500 มิลลิลิตร ลงไปคลุกเคล้าให้เข้ากัน แล้วนำไปปรมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 วัน จากนั้นนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 วัน แล้วนำมาบดให้เป็นผง ดังภาพ 36

การทดสอบหัวเชื้อโดยใช้วิธีการ spread plate โดยทำการเจือจางความเข้มข้นที่ 10,000 เท่า ลงในอาหาร PDA ผลการทดลองดังแสดงในภาพ 37



ภาพ 36 แสดงหัวเชื้อจุลินทรีย์สำหรับใช้ผลิตอาหารหมักจากวัสดุทางการเกษตร



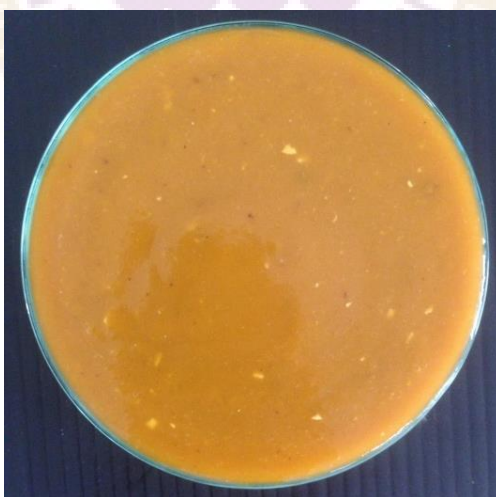
ภาพ 37 แสดงการทดสอบหัวเชื้อโดยใช้วิธีการ spread plate โดยทำการเจือจางความเข้มข้นที่ 10,000 เท่า ลงในอาหาร PDA

### การผลิตอาหารหมัก

ทำการวางแผนการทดลองแบบ CRD 3 ทรีทเมนต์ (treatment) ประกอบไปด้วยวัสดุทางการเกษตร 2 ชนิด คือ มันสำปะหลัง และฟักทอง ทำการหมักไว้เป็นระยะเวลา 15 วัน ตัวอย่างอาหารหมัก ดังภาพ 38-39



ภาพ 38 แสดงมันสำปะหลังที่ผ่านกระบวนการหมักร่วมกับหัวเชื้อจุลินทรีย์หมักไว้เป็นระยะเวลา 15 วัน



ภาพ 39 แสดงฟักทองที่ผ่านกระบวนการหมักร่วมกับหัวเชื้อจุลินทรีย์หมักไว้เป็นระยะเวลา 15 วัน

### การทดสอบเชื้อในอาหารหมัก

นำตัวอย่างอาหารหมักมาอย่างละ 1 กรัม มาใส่หลอดที่มีสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ (normal saline) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ เขย่าให้เข้ากัน ทำการเจือจางตัวอย่างต่อ ๆ ไปจนได้ระดับความเจือจางที่  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  และ  $10^{-4}$  ปิเปตต์ตัวอย่าง ที่ระดับความเจือจาง  $10^{-4}$  ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ในจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) (ภาคผนวก ก) ทำการแยกเชื้อโดยใช้วิธี Spread plate technique นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 วัน สังเกตและนับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น

### การวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาของอาหารหมัก (proximate analysis)

ในการทดลองนี้จะใช้วิธีของ AOAC (2006) ทำการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการ 5 กลุ่มใหญ่ คือ ความชื้น (Moisture) เถ้า (Ash) โปรตีนรวม (Crude protein ,CP) ไขมัน (Crude fat หรือ Ether extract, EE) เยื่อใย (Crude fiber ,CF) นำค่าที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติทำการตรวจสอบความถูกต้องของข้อมูล วิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) โดยใช้แผนการทดลองแบบบล็อกสมบูรณ์ (RCBD) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของแต่ละกลุ่มการทดลอง โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติกำหนดค่านัยสำคัญที่ใช้ในการทดสอบที่  $p < 0.05$  ผลการทดลองแสดงในตาราง 9

ตาราง 9 แสดงปริมาณคุณค่าทางโภชนาการของอาหารหมักจากฟักทอง และมันสำปะหลัง

วัตถุดิบ	วัตถุแห้ง (%)	โปรตีน (%)	ไขมัน (%)	เถ้า (%)	เยื่อใย (%)
ฟักทอง	13.15	12.85	3.15	0.67	12.31
ฟักทองหมัก	9.12	18.01	5.02	0.52	15.21
ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์	73.21	8.64	2.78	0.66	3.11
ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์หมัก	51.14	10.11	3.12	0.78	3.33
มันสำปะหลัง	55.12	2.22	1.85	0.95	2.45
มันสำปะหลังหมัก	36.85	4.14	1.81	0.88	2.63

## การวัดสมรรถภาพการเจริญเติบโตและศึกษาลักษณะซากของสัตว์ทดลอง

### 1. การวัดการเจริญเติบโต

ทำการบันทึกน้ำหนักของสัตว์ทดลองเมื่อเริ่มต้น และสิ้นสุดการทดลอง โดยวัดน้ำหนักที่การเปลี่ยนแปลงทุก ๆ 4 สัปดาห์ ระยะเวลา 12 เดือน ตั้งแต่เดือน พฤศจิกายน 2559 ถึง พฤศจิกายน 2560 เพื่อนำมาคำนวณหา

1.1 ปริมาณอาหารที่กินได้ (Feed intake, FI)

1.2 การเจริญเติบโตเฉลี่ย (Average daily gain, ADG)

1.3 ประสิทธิภาพการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนักตัว (Feed conversion ratio, FCR)

1.4 ต้นทุนค่าอาหารต่อการเพิ่มน้ำหนัก 1 กิโลกรัม (Feed cost for 1 kg. of weight gain, FCG)

### 2. การศึกษาลักษณะซาก

เมื่อนำอาหารที่หมักไปประกอบเป็นสูตรอาหารเปรียบเทียบกับเลี้ยงโคขุนลูกผสม 3 สายพันธุ์ ได้แก่ ชาร์โรเลส์ แองกัส และวากิว โดยใช้สูตรของวิสาหกิจชุมชนรวมพลคนดอยโตน จังหวัดพะเยา เพื่อเลี้ยงโคขุนระยะสุดท้าย (โปรตีนเฉลี่ย 10-12%) ซึ่งเป็นโคที่ผ่านการเลี้ยงมาเป็นระยะเวลา 2 ปี ทำการเลี้ยงต่อไปอีกเป็นระยะเวลา 12 เดือน เพื่อให้โคขุนอายุครบ 3 ปี พบว่า โคขุนทั้ง 3 กลุ่ม มีอัตราเจริญ และคุณภาพซากไม่แตกต่างกัน โดยมีอัตราการเจริญเฉลี่ย 0.5 กิโลกรัมต่อวัน น้ำหนักซากขุนเฉลี่ย 52-54% ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับรายงานของ ศุภชัย อุดชาชน และคณะ (2558) อย่างไรก็ตามสำหรับเกรดไขมันแทรก (Marbling Score) โดยใช้หลักการตัดเกรดไขมันแทรกในส่วนของเนื้อสันในเมื่อนับจากกระดูกสันหลังข้อที่ 12 และ 13 ตามมาตรฐานเนื้อโคของมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ (มกอช.) พบว่า เนื้อโคขุนที่ได้รับอาหารทั้งสองกลุ่มได้เกรดเฉลี่ย 3.25-3.50 ดังนั้นแสดงให้เห็นว่า อาหารผสมที่เกษตรกรพัฒนาขึ้นสามารถใช้ผลิตโคเนื้อคุณภาพให้เกิดไขมันแทรกได้ ทั้งนี้เกรดของไขมันนี้จะขึ้นอยู่กับชนิดพันธุ์ของโคที่นำเข้ามาด้วย เพราะ ถ้าใช้โคพันธุ์ลูกผสมที่มีไขมันแทรกสูง เช่น วากิว และแองกัส จะมีโอกาสที่ได้ไขมันแทรกเฉลี่ยมากขึ้น (ตาราง 10 และ 11)

ตาราง 10 Growth performances crossbred beef cattle fed with fermented feed

	T1	T2	T3	p-value
Number of cattle (head)	4	4	4	-
Initial weight (kg.)	355	267.5	268.6	0.120
Final weight (kg.)	680	562.5	557.25	0.111
Average daily gain (ADG, kg/d)	0.89	0.81	0.79	0.005
Feed intake (FI, kg/d)	15	15	15	0.000
- Silage*	2	2	2	0.000
- Concentrate	15	15	15	0.000
Feed conversion rate (FCR)	16.85	18.56	18.97	0.002
Feed cost for 1 kg of weight gain	67.38	74.24	75.87	0.015

หมายเหตุ: \* Napier Packchong 1 grass and maize husk

ชาโรเลส์ (T1) ซิมเมนทัล (T2) และแองกัส (T3)

ตาราง 11 Carcass characteristics of crossbred beef cattle fed with fermented feed

	T1	T2	T3
Hot carcass (kg./%)	378.38 / 55.64	311.00 / 55.29	309.38 / 55.52
Marbling Score	3.0	3.0	4.0
Chuck Shoulder	1.97±0.5	1.85±0.4	1.93±0.5
Chuck Arm	1.35±0.3	1.15±0.5	1.31±0.5
Chuck Tender	0.87±0.2	0.55±0.3	0.63±0.2
Chuck Eye	0.96±0.5	0.74±0.3	0.86±0.4
Brisket	2.33±0.3	2.48±0.6	2.23±0.5
Rib Set	2.88±0.5	2.53±0.2	2.97±0.3
Short Rib	1.07±0.2	1.24±0.3	1.08±0.2
Fringer	0.56±0.2	0.75±0.4	0.66±0.3
Shank	2.73±0.5	2.43±0.1	2.23±0.5
Hump	0.82±0.7	0.65±0.3	0.49±0.4
Skirt	0.38±0.5	0.48±0.6	0.38±0.3
Silver Shark	0.24±0.5	0.31±0.3	0.25±0.5
Lean Meat	6.05±0.4	5.99±0.2	5.31±0.1
T-Bone	4.62±0.5	4.36±0.5	4.17±0.3

ตาราง 11 (ต่อ)

	T1	T2	T3
Strip Loin	1.84±0.3	1.69±0.2	1.91±0.5
Tender Loin	1.07±0.2	1.04±0.3	1.14±0.5
Flank Steak	0.44±0.1	0.28±0.5	0.54±0.1
Sirloin	2.21±0.3	2.45±0.4	2.56±0.5
Bottom Round	2.85±0.3	2.79±0.2	2.95±0.1
Top Round	3.76±0.5	3.38±0.5	3.66±0.2
Aiguillette	0.85±0.1	0.57±0.3	0.84±0.5
Bavette	0.68±0.5	0.53±0.5	0.76±0.3
Marrow Bone	9.67±0.5	9.78±0.2	9.28±0.1
Scrap Meat Grade A	1.07±0.4	2.66±0.5	2.15±0.2
Scrap Meat Grade B	0.56±0.1	1.03±0.3	0.51±0.2
Knuckle	1.59±0.2	1.96±0.5	1.82±0.4

หมายเหตุ: \* ซาโรเลลล์ (T1) ซิมเมนทอลล์ (T2) และแองกัส (T3)



(ก)

(ข)

(ค)

ภาพ 40 แสดงคุณภาพซากและไขมันของโคขุนลูกผสมที่เลี้ยงด้วยขุนเป็นระยะเวลา 12 เดือน และบ่มไว้ในห้องเย็นอุณหภูมิ 4°C เป็นระยะเวลา 7 วัน

หมายเหตุ: (ก) ลูกผสมซาโรเลลล์ (เกรดไขมันแทรก 3.0) (ข) ลูกผสมซิมเมนทอลล์ (เกรดไขมันแทรก 3.5) (ค) ลูกผสมวากิว (เกรดไขมันแทรก 3.5)

## บทที่ 5

### บทสรุป

#### สรุปผลการวิจัย

1. สามารถคัดแยกจุลินทรีย์เพื่อใช้หมักเพิ่มโภชนะวัสดุการเกษตรเพื่อประกอบเป็นสูตรอาหารสัตว์ได้ คือ กลุ่มที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ได้แก่ *Trichoderma* spp. กลุ่มที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลส ได้แก่ *Rhizopus oryzae* และ ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*
2. วัสดุการเกษตรที่เหมาะสมสำหรับเป็นส่วนประกอบหลักในสูตรอาหารเลี้ยงโคขุนในพื้นที่จังหวัดพะเยา คือ พักทอง และมันสำปะหลัง เนื่องจากมีโภชนะสูง มีปริมาณมาก และมีราคาถูกโดยในช่วงเดือนมกราคม-เมษายน และสิงหาคม-พฤศจิกายน จะมีปริมาณมากในพื้นที่
3. สูตรอาหารที่ใช้สำหรับเลี้ยงโคขุนในการทดลองนี้

#### ตาราง 12 แสดงสูตรอาหารที่ใช้สำหรับเลี้ยงโคขุนในการทดลองนี้

สัดส่วน	โปรตีน	สัดส่วนที่ให้ต่อมือ (กก.)	สัดส่วน 100 (กก.)	โปรตีน คำนวณ %
อาหารสำเร็จรูป	12	1	13.33	1.60
มันสำปะหลังหมัก	10	3.5	46.67	4.67
พักทองหมัก	18	1	13.33	2.40
รำ	14	1	13.33	1.87
กากน้ำตาล	4.5	1	13.33	0.60
<b>รวม</b>		<b>7.5</b>	<b>100.00</b>	<b>11.13</b>

4. การให้อาหารโคขุนในอัตราเฉลี่ย 15 กิโลกรัมต่อตัวต่อวัน เป็นระยะเวลา 12 เดือน ซึ่งจากข้อมูลของคุณสุริยะ ทองสา (เบอร์โทรศัพท์ 0817066818) วิสาหกิจชุมชนผู้เลี้ยงโคขุนรวมพลคนดอยไตเนน เครือข่ายสหกรณ์โคขุนดอกคำใต้ จังหวัดพะเยา ซึ่งได้ใช้สูตรอาหารดังที่กล่าวมาเพื่อเลี้ยงโคขุน โดยใช้โคลูกผสมเพศผู้สายพันธุ์ลูกผสมวากิว แองกัส ซาโรเลส์

หรือซิมเมนทอล ที่มีเลือดผสม 50–75% อายุเฉลี่ย 2.0–2.5 ปี มีฟันแท้ 2 ซี่ ผ่านการตอนมาแล้ว น้ำหนักก่อนเข้าขุนเฉลี่ย 400–450 กิโลกรัม เมื่อเลี้ยงระยะเวลา 1 ปี จะมีค่าต้นทุนดังนี้ คือ

ตาราง 13 แสดงต้นทุนเมื่อเลี้ยงระยะเวลา 1 ปี

รายละเอียด	จำนวนเงิน (บาท/โค 1 ตัว)
<b>ต้นทุน</b>	
โคเนื้อลูกผสมเพศผู้สายพันธุ์ยุโรป อายุ 2 ปี	45,000
น้ำหนักเฉลี่ย 400–450 กิโลกรัม	
ค่าอาหารสัตว์ (ผลิตและผสมเองโดยใช้วัสดุการเกษตร)	20,000
ค่าวัคซีน และเวชภัณฑ์	600
ค่าสาธารณูปโภคอื่น ๆ	2,400
รวม	68,000 บาท
<b>กำไร</b>	
โคเนื้อลูกผสมเพศผู้สายพันธุ์ยุโรป อายุ 3 ปี	85,000
น้ำหนักเฉลี่ย 800 กิโลกรัม	
รายได้สุทธิ (85,000–68,000 บาท)	17,000

### อภิปรายผลการวิจัย

การใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่มีจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสและเซลลูเลส ยีสต์ และจุลินทรีย์กลุ่มที่ผลิตแลคติกหมักวัสดุการเกษตร พบว่า ทำให้สับประดหมักมีค่าโภชนะเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะค่าโปรตีนและกรดไขมันที่ระเหยได้ เมื่อเปรียบเทียบกับเปลือกสับประดสด เมื่อศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการหมัก โดยใช้วิธีการหมักแบบ Simultaneous Scarification and Fermentation (SSF) เปรียบเทียบกับกระบวนการหมักแบบไม่เติมเชื้อจุลินทรีย์ในสภาพไม่มีอากาศ (EN) พบว่า กระบวนการหมักแบบ SSF จะทำให้คุณค่าทางโภชนะของโปรตีน เท่ากับ 60.2 g/kg ซึ่งเพิ่มขึ้นมากกว่ากลุ่มทดลองอื่น ๆ ซึ่งอาจเป็นผลจากการโปรตีน (Single cell protein) ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการเจริญเติบโต และเพิ่มจำนวนเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ สอดคล้องกับ Zhang, et al. (2000) อีกทั้งจากกระบวนการหมักที่ทำให้สับประดมีค่า pH ต่ำ จะมีส่วนช่วยในการควบคุมประชากรของจุลินทรีย์ก่อโรคกลุ่ม *Enterobacter* spp. ซึ่งเป็นส่วนสำคัญที่ทำให้สามารถเก็บรักษาอาหารหมักไว้ได้นานในถังหมักที่ปิดฝาสนิทไว้ได้ถึง 3 เดือน โดยที่ไม่เน่าเสียและโภชนะมีการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก (ขรรค์ชัย ตันเมฆ และคณะ, 2558)

งานวิจัยนี้จะใช้จุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากลูกแป้งข้าวหมาก จังหวัดพะเยา ซึ่งเมื่อศึกษาจุลินทรีย์ พบว่า เป็นเชื้อราในกลุ่ม *Aspergillus* section *Nigri* *Mucor* spp. และ *Rhizopus* spp. เชื้อรา isolate ที่ 4 มีค่าแอกติวิตีสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับ isolates อื่น ๆ และเมื่อนำไปศึกษาชนิดของเชื้อราตามวิธีการของ Klich (2002); Danmek, et al. (2011); Danmek, et al. (2014) พบว่า เป็นเชื้อราสายพันธุ์ *Aspergillus* spp. UPO4 ซึ่งผลิตเอนไซม์อะไมเลสและทำงานได้ที่อุณหภูมิ 50–80 °C ส่วนเชื้อราในกลุ่มที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา พบว่า เป็นเชื้อราสายพันธุ์ *Trichoderma* spp. UPO9 โดยมีค่าแอกติวิตีทั้งเซลลูเลส และไซแลนเนส โดยมีค่าของ Xylanase สูงที่สุด ซึ่งเมื่อตรวจสอบในเอกสารรายงานวิจัย พบว่า เชื้อราทั้งสองสายพันธุ์ เป็นเชื้อราที่ใช้แพร่หลายในการผลิตอาหารหมักต่าง ๆ และไม่เป็นเชื้อราที่ผลิตสารพิษหรือก่อโรคในอาหารสัตว์

การนำพักทองและมันสำปะหลังมาหมักร่วมกับหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบ แสดงผลการวิเคราะห์ และคุณค่าทางโภชนาของอาหารหมัก ซึ่งประกอบไปด้วย โปรตีน, ไขมัน, เถ้า และเยื่อใย ซึ่งคุณค่าทางโภชนาเพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะโปรตีน ซึ่งอาจเป็นผลมาจากโปรตีนเซลล์เดี่ยว (Single cell protein) ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการเจริญเติบโต และเพิ่มจำนวนเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ สอดคล้องกับ Zhang, et al. (2013) แต่สิ่งที่พบจากการศึกษานี้ คือ อาหารหมักนอกจากจะมีโปรตีนเพิ่มขึ้นมาแล้ว จะมีการผลิตกรดอินทรีย์ที่สำคัญที่ช่วยลด pH ของอาหารหมัก ทำให้สามารถเก็บรักษาไว้ได้นานในถังหมักที่ปิดฝาสนิทไว้ได้ถึง 6 เดือน โดยที่โภชนามีการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก (Guyot, et al., 2000) สอดคล้องกับรายงานวิจัย เช่น Kompang, et al. (1994) ใช้เชื้อรา *Aspergillus niger* หมักมันสำปะหลังแบบ solid substrate fermentation (SSF) ที่เสริมด้วยยูเรียและเกลือแร่ ในอัตราส่วนเชื้อ 2.0 กรัม ต่อ มันสำปะหลัง 1.0 กิโลกรัม พบว่า ปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นจาก 3% เป็น 18–42% Kompang, et al. (1995); Nur (1995) ศึกษาการหมักกากแป้งมันสำปะหลังร่วมกับเชื้อ *A. niger* พบว่า ปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นจาก 1.55% เป็น 18.50% ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดวัตถุดิบ ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ วิธีการหมัก และระยะเวลาที่ใช้ นอกจากนี้เชื้อรา *Aspergillus* แล้วยังมีการศึกษาการนำเชื้อราสายพันธุ์อื่น ๆ มาใช้ในกระบวนการหมักอาหารสัตว์ เช่น Hachmeister and Fung (1993) ซึ่งได้ศึกษาและคัดแยก *Rhizopus oryzae* จากอาหารหมักจากถั่วและแป้ง และ Saito, et al. (2004) ซึ่งศึกษาและคัดแยก *R. oryzae* IFO 4707 เพื่อใช้ในการหมักมันฝรั่ง เป็นต้น

เมื่อนำอาหารหมักที่ผลิตได้เมื่อนำไปผสมเป็นอาหารชั้นเพื่อเลี้ยงโคเนื้อให้มีโปรตีนเฉลี่ย 12% พบว่า มีต้นทุน 4 บาท/กก และ ใช้เลี้ยงโคเนื้อสายพันธุ์ลูกผสมยุโรป 3 สายพันธุ์ คือ ซาโรเลส (T1), ซิมเมนทาล (T2) และแองกัส (T3) เพศผู้ที่ทำการตอนแล้ว ที่มีอายุเฉลี่ย 2–3 ปี

มีน้ำหนักตัวเฉลี่ย  $300 \pm 50$  กิโลกรัม เป็นระยะเวลา 10 เดือน พบว่า โดยโคลูกผสมยุโรป สายพันธุ์ซาโรเลส มีอัตราการเจริญสูงสุด รองลงมา คือ โคลูกผสมยุโรปสายพันธุ์ซิมเมนทาล และแองกัส ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.89, 0.81 และ 0.79 ตามลำดับ ในขณะที่ประสิทธิภาพการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนักตัว เท่ากับ 16.85, 18.56, 18.97 ตามลำดับ

เมื่อศึกษาคุณภาพซากของโคเนื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ พบว่า ซากอ่อน ซากตัดแต่ง (ซากเย็น) เปอร์เซ็นต์ซาก และชิ้นส่วนของเนื้อหลักของโคทั้งสามกลุ่ม มีค่าเฉลี่ย 52-55% และไม่แตกต่างกันทางสถิติ ( $P > 0.05$ ) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับรายงานของ ศุภชัย อุดชาชน และคณะ (2558) โดยศึกษาซากโคขุนกบินทร์บุรี พบว่า มีเปอร์เซ็นต์ซากอ่อน 55.64, 55.29 และ 55.52% ซากตัดแต่ง 53.42, 53.67 และ 52.62% ตามลำดับ อย่างไรก็ตามสำหรับเกรดไขมันแทรก (Marbling Score) โดยใช้หลักการตัดเกรดไขมันแทรกในส่วนของเนื้อสันใน (เมื่อนับจากกระดูกสันหลัง ข้อที่ 12 และ 13 ตามมาตรฐานเนื้อโคของมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ (มกอช.)) พบว่า เนื้อโคลูกผสมยุโรปสายพันธุ์แองกัส ได้เกรดเฉลี่ย 4.0 ในขณะที่โคอีก 2 สายพันธุ์ ได้เกรดไขมันแทรกเฉลี่ย 3.0 ดังนั้นแสดงให้เห็นว่า อาหารที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้ผลิตโคเนื้อคุณภาพให้เกิดไขมันแทรกได้ แต่เกรดของไขมันที่จะขึ้นอยู่กับชนิดพันธุ์ของโคที่นำเข้ามาขุนด้วย (Laorodphan, et al., 2012; Pilajun, et al., 2016) เมื่อพิจารณาถึงต้นทุนในการผลิตโคขุน พบว่า ค่าอาหารที่ผลิตได้ต้นทุน 4 บาทต่อกิโลกรัม หรือ 1,800 บาท/เดือน ซึ่งถูกกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับรายงานของ ศุภชัย อุดชาชน และคณะ (2558) ในการใช้กากมันสำปะหลังหมักเป็นอาหารเลี้ยงโคกบินทร์บุรี ซึ่งมีต้นทุนเท่ากับ 2,068 บาทต่อเดือน

ดังนั้น จากการศึกษาทั้งหมดนี้จึงสามารถสรุปเบื้องต้นได้ว่า พักทองและมันสำปะหลังสามารถนำหมักและประยุกต์ใช้เพื่อผลิตอาหารชั้นสำหรับเลี้ยงโคขุนทดแทนการใช้อาหารชั้นสำเร็จรูปได้ เมื่อนำวัตถุดิบมาหมักกับหัวเชื้อผสมที่มีส่วนผสมของจุลินทรีย์กลุ่มที่ย่อยสลายชีวมวลพืชและยีสต์จะทำให้อาหารหมักที่ได้มีโภชนะเพิ่มขึ้น เก็บรักษาได้นาน และเมื่อนำไปผสมเป็นอาหารชั้นสำหรับเลี้ยงโคเนื้อลูกผสมสายพันธุ์ยุโรป พบว่า สามารถให้โคเนื้อเจริญได้ดี และมีไขมันแทรกสูง ซึ่งจากผลงานวิจัยนี้ได้มีการขยายผลไปร่วมขับเคลื่อนเกษตรกรผู้เลี้ยงโคเนื้อให้มีการรวมตัวเกิดเป็นสหกรณ์โคขุนดอกคำใต้ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการเลี้ยงโคเนื้อคุณภาพของเกษตรกร บนองค์ความรู้ของการจัดการด้านอาหารที่ใช้วัตถุดิบอาหารสัตว์ในเบื้องต้นเพื่อลดปริมาณการใช้อาหารสำเร็จรูป โดยไม่กระทบต่อประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของโคเนื้อ ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์จากเนื้อโคที่ปลอดภัยผู้บริโภค และทำให้สามารถสร้างความมั่นคงในอาชีพเลี้ยงโคเนื้อแก่เกษตรกร มีการเผยแพร่เทคโนโลยีและการดำเนินงานจนเป็นที่ยอมรับระดับประเทศ โดยเฉพาะยุทธศาสตร์โคขุน ของจังหวัดภาคเหนือตอนบนสอง (พะเยา เชียงราย แพร่ น่าน)

มีการส่งเสริมและพัฒนาการเลี้ยงโคขุนของเกษตรกรในจังหวัดภาคเหนือตอนบน ภายใต้การตระหนักถึงความสำคัญของสิ่งแวดล้อม โดยการใช้วัสดุที่หาได้ในท้องถิ่นที่มีราคาถูก มาผลิตเป็นอาหารสัตว์ที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง และต้นทุนต่ำ จะทำให้เกิดการกระตุ้นให้เกษตรกรผลิตสินค้าปศุสัตว์เพื่อรองรับความต้องการของผู้บริโภคทั้งในและนอกประเทศได้อย่างยั่งยืน เช่น การนำวัสดุที่หาง่ายในท้องถิ่น เช่น เปลือกข้าวโพด มันสำปะหลัง และฟักทอง มาผลิตเป็นอาหารสัตว์ต้นทุนต่ำ ซึ่งจากการนำไปประยุกต์ใช้เลี้ยงโคขุนทำให้ โดยเฉลี่ยต้นทุน 40 ถึง 60 บาทต่อการผลิตโคขุน 1 ตัวต่อ 1 วัน (กรณีใช้อาหารสำเร็จรูปจะเสียค่าใช้จ่ายเฉลี่ย 90 บาทต่อตัวต่อวัน) และปัจจุบันทำให้มีการเพิ่มเกษตรกรจากผู้เลี้ยง 18 ราย เป็นกว่า 300 ราย (ข้อมูลจากสหกรณ์โคขุนดอกคำใต้) การขยายผลโดยมุ่งเน้นการใช้ผลผลิตทางการเกษตรที่เป็นพืชน้ำน้อย เช่น มันสำปะหลัง ฟักทอง และข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ มาผลิตเป็นอาหารสัตว์ต้นทุนต่ำ (ไม่เกิน 5 บาทต่อกิโลกรัม) พบว่า ผลผลิตทางการเกษตร เช่น มันสำปะหลัง ฟักทอง และข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ มีพลังงานสูงแต่โปรตีนต่ำ แต่เมื่อนำมาหมักร่วมกับจุลินทรีย์จะมีคุณค่าทางโภชนาการและโปรตีนเพิ่มขึ้น และสามารถนำไปเสริมอาหารหรือทดแทนชั้นสำหรับการเลี้ยงโคขุน ทำให้ลดต้นทุนลงได้กว่า 30 เปอร์เซ็นต์

ดังนั้น จากจากสภาพปัญหาการขาดแคลนจำนวนโคเนื้อและเนื้อโคคุณภาพดีของประเทศไทย เนื้อโคพื้นเมืองเหนียวไขมันแทรกน้อย ในขณะที่การขุนโคลูกผสมยุโรปต้องใช้ต้นทุนสูง การประยุกต์ใช้วัสดุอาหารสัตว์ในพื้นที่ที่มีโปรตีน และคาร์โบไฮเดรตที่สำคัญในภาคเหนือ ได้แก่ ข้าว ข้าวโพด ถั่วชนิดต่าง ๆ มันสำปะหลัง และฟักทองซึ่งมีมากในเขตภาคเหนือ สามารถนำมาหมักร่วมกับจุลินทรีย์เพื่อเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการ และใช้ผสมเป็นอาหารชั้นสำหรับเลี้ยงสัตว์ ต้นทุนต่ำ จะทำให้สามารถบริหารจัดการอาหารสัตว์ได้ ซึ่งในการวิจัยนี้มีแนวทางในการผสมจุลินทรีย์เพื่อเป็นสูตรการหมักวัสดุและพืชอาหารสัตว์จำเพาะโดยใช้จุลินทรีย์ผสม 3 กลุ่ม คือ

1. จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส เช่น *Trichoderma* spp.
2. จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลส เช่น *Rhizopus oryzae* และ *Mucor* spp.
3. จุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมัก เช่น *Saccharomyces cerevisiae* และ LAB

โดยระหว่างการหมัก เชื้อรา *Trichoderma* spp. *Rhizopus oryzae* และ *Mucor* spp. จะย่อยวัสดุทางการเกษตรส่วนที่เป็นเยื่อใยและแป้งเป็นน้ำตาล เพื่อให้พลังงานกับจุลินทรีย์สำหรับการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนมากขึ้น จากนั้น ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* จะเปลี่ยนน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์ และ *Acetobacter aceti* และจุลินทรีย์ที่เป็น probiotic เช่น *Lactobacillus lactis* จะผลิตกรดชนิดต่าง ๆ โดยเฉพาะ propionic acid ซึ่งเป็นส่วนสำคัญในการสร้าง

ไขมันแทรกในเนื้อโค และเมื่อนำอาหารหมักที่ได้มาประกอบเป็นสูตรอาหารที่มีโภชนะเหมาะสมกับการนำไปใช้เลี้ยงโคเนื้อพื้นเมืองเพื่อผลิตโคหนุ่มเนื้อนุ่มอายุไม่เกิน 2 ปี หรือโคลูกผสมยุโรปที่มีไขมันแทรกสูงอายุไม่เกิน 3 ปี ที่ตรงความต้องการของตลาดจะทำให้สามารถเพิ่มการแข่งขันในการตลาดทั้งด้านราคา และลักษณะเชิงคุณภาพของเนื้อสัตว์ที่ให้ผลตอบแทนที่ดีแก่เกษตรกรสร้างเป็นอาชีพทางเลือกแก่เกษตรกรในการนำวัตถุดิบที่มีอยู่ในพื้นที่มาผลิตเป็นอาหารสำหรับเลี้ยงสัตว์ได้ ซึ่งกลุ่มเป้าหมายของผู้ได้รับเทคโนโลยีในโครงการนี้ จะเป็นผู้นำชุมชนหรือผู้ที่สามารถใช้เทคโนโลยีที่ได้รับจากการวิจัยได้อย่างถูกต้อง โดยเบื้องต้นเน้นที่สหกรณ์โคขุนดอกคำใต้ ตำบลบ้านถ้ำ อำเภอดอกคำใต้ จังหวัดพะเยา ซึ่งเป็นแหล่งผลิตพืชอาหารสัตว์และผลิตสัตว์ที่สำคัญของจังหวัดพะเยา เพื่อให้แกนนำเกษตรกรสามารถกระจายความรู้ที่ได้รับต่อสมาชิกในชุมชน และพื้นที่ใกล้เคียงได้ รวมไปถึงนักเรียนและเยาวชนเกษตรกรที่มีความต้องการจะพัฒนาขีดความสามารถด้านการเกษตร โดยจะส่งเสริมการรวมตัวกันของเกษตรกรด้วยความสมัครใจให้ร่วมกันเรียนรู้และดำเนินกิจกรรมการเกษตรตามความสนใจจากการปฏิบัติจริง และการปฏิบัติงานพื้นฐานอาชีพด้านเกษตรกรรม เพื่อเตรียมความพร้อมให้เป็นเกษตรกรที่มีความพร้อมทั้งด้านความรู้ ความสามารถมีทักษะในการบริหารจัดการธุรกิจเกษตร ซึ่งเกษตรกรเหล่านี้จะเป็นพลังในการพัฒนาการเกษตรของประเทศไทยให้มีก้าวหน้าและเกิดความยั่งยืนตลอดไป

### ข้อเสนอแนะ

จากสภาพการเลี้ยงโคเนื้อในปัจจุบันซึ่งส่วนมากโคพันธุ์ที่เลี้ยงเป็นโคพันธุ์พื้นเมือง 60 เปอร์เซนต์ และการเลี้ยงโคเนื้อลูกผสมกับพันธุ์แท้ประมาณ 40 เปอร์เซนต์ และการที่มีความหลากหลายของพันธุกรรมสูงมาก ซึ่งเมื่อศึกษาข้อมูลของเกษตรกรที่ร่วมโครงการและให้อาหารหมักโคตามสูตรที่ได้รับ แม้ว่าจะมีอัตราการให้เนื้อดี แต่จะมีอัตราการให้ไขมันแทรกในเนื้อผันผวนจากการที่ไม่สามารถควบคุมพันธุกรรมของโคแม่พันธุ์ได้ หรือไม่ทราบชนิดของโคแม่พันธุ์ ทำให้การการผลิตเนื้อโคคุณภาพมีความผันผวนของคุณภาพเนื้อและไขมันแทรกที่ได้ อันเนื่องมาจากความหลากหลายทางพันธุกรรมของเนื้อโค แม้ว่าจะมีระบบการผลิตที่เหมือนกัน ดังนั้น การศึกษาทดลองเพื่อให้ทราบข้อมูลที่แน่ชัด ควรมีการศึกษาตั้งแต่การคัดเลือกน้ำเชื้อพ่อพันธุ์จากโคพ่อตัวเดียวกันมาผลิตลูก และศึกษาระยะยาวตั้งการแรกคลอดไปจนถึงอายุพร้อมฆ่าแล่ 3 ปี



บรรณานุกรม

## บรรณานุกรม

- กรมปศุสัตว์. (2547 ก). **ตารางคุณค่าทางโภชนาของวัตถุดิบอาหารสัตว์**. เอกสารคำแนะนำ กรมปศุสัตว์: กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- กรมปศุสัตว์. (2547 ข). **มาตรฐานพืชอาหารสัตว์หมัก กองอาหารสัตว์**. เอกสารคำแนะนำ กรมปศุสัตว์: กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- กรมปศุสัตว์. (2547 ค). **มาตรฐานพืชอาหารสัตว์แห้ง กองอาหารสัตว์**. เอกสารคำแนะนำ กรมปศุสัตว์: กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- กองอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์. (2559) **โภชนาอาหารสัตว์**. สืบค้นเมื่อ 9 ตุลาคม 2559, จาก <http://nutrition.dld.go.th/nutrition/images/knowledge/52.pdf>
- ขรรค์ชัย ดันเมฆ, โชค โสรัจกุล และชุตต ดงपालิธรรม. (2558). การประยุกต์ใช้เปลือกข้าวโพดหมัก เพื่อเลี้ยงโคเนื้อในจังหวัดพะเยา. **วารสารสัตวบาล**, 25(108), 22–25
- คามินท์ ไชยมงคล และสุริยะ สะวานนท์. (2555). สมรรถภาพการผลิต และลักษณะซากของโค เนื้อพันธุ์กำแพงแสน ที่ขุนด้วยอาหารผสมเสร็จ (TMR) ที่มีใบมันสำปะหลังเป็นแหล่ง อาหารหยาบ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์: ม.ป.ท.
- เจริญศักดิ์ โรจนฤทธิ์พิเชษฐ์. (2519). **มันสำปะหลัง**. กรุงเทพฯ: ภาควิชาพืชไร่ฯ คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์,
- จินดา สนิทวงศ์ ณ อยุธยา. (2539). ข้าวโพดและเศษเหลือจากข้าวโพดเป็นอาหารสัตว์. **กองอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์กระทรวงเกษตรและสหกรณ์**, 39(2), 0514–0585.
- ตรุณี ศรีชนะ. (2550). **การวิเคราะห์คุณภาพอาหารสัตว์**. ปทุมธานี: ภาควิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต.
- นิพัฒน์ สุขวิบูลย์. (2550). **ข้อมูลผลผลิตทางการเกษตร**. สืบค้นเมื่อ 9 ตุลาคม 2559, จาก [http://www.oae.go.th/oae\\_report/export\\_import/export\\_result.php](http://www.oae.go.th/oae_report/export_import/export_result.php).
- วิเชียร ลีลาวัชรมาศ. (2553). เทคโนโลยีการหมัก. **Food Focus Thailand**, 48(5), 36–37.
- วัชรวิทย์ มีหนองใหญ่, ภาณุวัฒน์ คัมภีร์วัฒน์, ศุภรินทร์ มหาสวัสดิ์ และวัชระ เมืองนาค. (2555). ผลของการใช้เปลือกมันสำปะหลังหมักเป็นแหล่งพลังงานและเชื้อใยในสูตร อาหารต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต และคุณภาพซากของแกะขุนในเขตร้อน. **วารสารวิจัย มช. (ฉบับบัณฑิตศึกษา)**, 17(2), 257–266.

- ศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์ตาก. (2559). **โคพันธุ์ตาก**. สืบค้นเมื่อ 29 ตุลาคม 2559, จาก [http://www.thaillivestock.com/cattle\\_handling/โคพันธุ์ตาก](http://www.thaillivestock.com/cattle_handling/โคพันธุ์ตาก).
- ศูนย์สารสนเทศ กรมปศุสัตว์. (2559). **ข้อมูลจำนวนโคเนื้อ**. สืบค้นเมื่อ 29 ตุลาคม 2559, จาก <http://www.dld.go.th/ict/th>.
- ศุภชัย อุดชาชน, วรณา อ่างทอง, พิสิษฐ์ วงศ์พาณิชย์ และอุดม ชัยนนท์. (2558). ผลของการใช้กากมันสำปะหลังหมักยีสต์ทดแทนอาหารชั้นในสูตรอาหารโคขุนพันธุ์กบินทร์บุรีต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต และลักษณะซาก. **วารสารแก่นเกษตร**, 43(1), 46-49.
- ส่วนวิจัยเศรษฐกิจปศุสัตว์และประมง สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. (2549). **ต้นทุนและผลตอบแทนในการเลี้ยงโคเนื้อ**. สืบค้นเมื่อ 9 ตุลาคม พ.ศ. 2559. จาก <http://planning.dld.go.th/th/images/stories/section-5/2561/strategy01.pdf>.
- สุริยะ สะวานนท์, คงปทุม กาญจนเสริม, วิเชษฐ์ พึ่งชัย, พีระพงษ์ เหมือนตา และปัฐนันท์ พันธุ์มาตร. (2554). ผลของการเสริมกระถินหมักและระยะเวลาในการตอนต่อสมรรถภาพการผลิต คุณลักษณะซาก และผลตอบแทนทางเศรษฐกิจจากการขุนโคเนื้อลูกผสมเพศผู้. **วิทยาสารกำแพงแสน**, 9(3), 28 -39.
- สำนักงานเกษตรจังหวัดพะเยา. (2559). **ข้อมูลข้าวโพดเลี้ยงสัตว์**. สืบค้นเมื่อ 9 ตุลาคม 2559, จาก <http://www.nfcpyo.com/uploads/news/3-khawphod-leiyng-satw-run-1-fn--3bddb7cd23.pdf>.
- สำนักงานเกษตรจังหวัดพะเยา. (2559). **ผลผลิตทางการเกษตรจังหวัดพะเยา**. สืบค้นเมื่อ 9 ตุลาคม 2559, จาก <http://www.phayao.doe.go.th/data/dataplant2558-2559.pdf>.
- สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.). (2559). **มันสำปะหลัง**. สืบค้นเมื่อ 9 ตุลาคม พ.ศ. 2559. จาก <https://www.nstda.or.th/industry/industry-casava>.
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. (2559). **ผลผลิตทางการเกษตร (ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์)**. สืบค้นเมื่อ 9 ตุลาคม 2559, จาก <http://www.oae.go.th/download/prcai/DryCrop/cassava.pdf>.
- สำนักพัฒนาอาหารสัตว์. (2559). **คุณค่าทางโภชนาของวัตถุดิบอาหารสัตว์**. สืบค้นเมื่อ 18 มกราคม 2560, จาก <http://nutrition.dld.go.th/nutrition/images/feedstuff/feed-table.pdf>
- Adegbola, T. A., and Oduozo, P. C. (1992). Nutrient intake, digestibility and performance of rabbits fed varying levels of fermented and unfermented cassava peel meal. **Journal of Animal Health and Production**, 12(1), 41-47.

- Akinfemi, A., Adu, O. A. and Doherty, F. (2010). Conversion of sorghum stover into animal feed with white-rot fungi: *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus pulmonarius*. **African Journal of Biotechnology**, 9(11), 1706–1712.
- Akinfala, E. O. and Tewe, O. O. (2001). Utilization of whole cassava plant in the diets of growing pigs in the tropics. **Livestock Res. for Rural Dev**, 13(5), 43.
- Akpan, I. and Ikenebomeh, M. J. (1995). Glutamic acid fermentation. **Nigerian Journal of Microbiology**, 10, 60–65.
- Alawa, J. P. and Amadi, C. (1991). Voluntary intake and digestibility of diets containing corn cobs, brewers dried grains and wheat bran by rabbits. **Journal of Animal Health and Production**, 11, 9–20.
- AOAC. (2006). **Animal feed**. Maryland: AOAC International.
- Apea-Bah, F. B., Oduro, I., Ellis, W. O. and Safo-Kantanka, O. (2011). Factor analysis and age at harvest effect on the quality of flour from four cassava varieties. **Journal of Dairy Food and Science**, 6, 43–54.
- Aro, S.O. (2008). Improvement in the nutritive quality of cassava and its by-products through microbial fermentation. **African Journal of Biotechnology**, 7(25), 4789–4797.
- Aro, S. O., Aletor, V. A., Tewe, O. O., Fajemisin, A. N., Usifo, B. and Adesida, J. A. (May 21<sup>st</sup>, 2008). Studies on the nutritional potentials of cassava tuber wastes (CTW) collected from a factory. In **4<sup>th</sup> Annual Conference. SAAT, Federal University of Technology Akure** (pp. 86–92). Akure: Federal University of Technology Akure.
- Aro, S. O., Aletor, V. A., Tewe, O. O., Fajemisin, A. N., Usifo, B., and Falowo, A. B. (2008). Preliminary investigation on the nutrients, anti-nutrients and mineral composition of microbially fermented cassava starch residues. In **33<sup>rd</sup> Annual Conference of Nigerian Society for Animal Production (NSAP)** (pp. 248–251). Ayetoro: Ogun State, Nigeria.

- Aravin Periyasamy. (2012). **Effect of physical properties of cotton on enzyme concentration**. Retrieved January 4, 2017, from <http://www.slideshare.net/abiramprince/effect-of-physical-properties-of-cotton-on-enzyme-concentration>.
- Barnhardt natural fibers group. (2015). **Know Your Fibers: Cotton vs. Viscose Rayon**. Retrieved January 4, 2017, from <http://www.barnhardtcotton.net/blog/know-fibers-cotton-vs-viscose-rayon>.
- Bayman, P. and Cotty, P. J. (1991) Vagatative compatibility and genetic diversity in the *Aspergillus flavus* population of a single field. **Canadian Journal of Botany**, 69, 1707–1711.
- Belewu, M. A. and Jimoh, N. O. (2005). Blood, carcass and organ measurement as influenced by *Aspergillus niger* treated cassava waste in the diets of West African Dwarf goats (WAD). **Global Journal of Agricultural Sciences**, 4(2), 125–128.
- Bennett, L. L., Hammond, A. C., Williams, M. J., Kunkle, W. E., Johnson, D. D., Preston, R.L., et al. (1995). Performane, carcass yield, and carcass quality characteristics of steers finished on Rhizoma Peanut (*Arachis glabrata*) Tropical grass pasture or concentrate. **Journal of Animal Science**, 73, 1881–1887.
- Brook, E. J., Stanton, W. R. and Wallbridge, A. (1969). Fermentation method for protein enrichment of cassava. **Biotechnology and Bioengineering**, 11, 1271–1284.
- Campbell–Platt, G. (1994). Fermented foods–A world perspective. **Food Research International**, 27, 253.
- Cotty, P. J. (1988). Aflatoxin and sclerotial production by *Aspergillus flavus*: Influence of pH. **Phytopathology**, 78, 1250–1253.
- Danmek, K., Prasongsuk, S., Lotrakul, P., Damann, K. E., Eveleigh, D. E. and Punnapayak, H. (2011). Effect of Avid® on the synnema–like formation of *Aspergillus flavus* grown on Czapek medium. **African Journal of Microbiology Research**, 5(18), 2812–2815.
- Danmek, K., Intawicha, P., Thana, S., Sorachakula, C., Meijer, M. and Samson, R. A. (2014). Characterization of cellulase producing from *Aspergillus melleus* by solid state fermentation using maize crop residues. **African Journal of Microbiology Research**, 8(24), 2397–2404.

- Enevoldsen, B. S. and Bathgate, G. N. (1969). Structural analysis of wort dextrans by means of  $\beta$ -amylase and the debranching enzyme, pullulanase. **Journal of the Institute of Brewing**, 75, 433–443.
- Fetuga, B. L. and Oluyemi, J. A. (1976). The metabolizable energy of some tropical tuber meals for chicks. **Poultry Science Journal**, 55, 868–873.
- Gornall, A. G., Bardawill, C. J. and David, M. M. (1949). Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. **Journal of Biological Chemistry**, 177(2), 751–766.
- Goering, H. K. and Van Soest, P.J. (1970). **Forage Fiber Analysis (apparatus, reagents, prosedures and some applications)**. USDA: Agricultural Handbook No. 379.
- Ghose, T. K. (1987). Measurement of cellulase activities. **Intetntional Union of Pure and Applied Chemistry**, 59, 257–268.
- Ghose, T. K., and Bisaria, V. S. (1987). Measurement of Hemicellulase activities Part 1: Xylanase. **Intenational Union of Pure and Applied Chemistry**, 59(2), 1739–1752.
- Gray, W. D. and Abou–El–Seoud, M. D., (1966). Fungal protein for food and feeds. 3. Manioc as a potential crude raw materials for tropical areas. **Economic Botany**, 20, 251–255.
- Glazer, A. W. and Nikaido, H. (1995). **Microbial Biotechnology: fundamentals of applied microbiology**. San Francisco: W. H. Freeman.
- Guyot, J. P., Calderon, M. and Morlon–Guyot, J. (2000). Effect of pH control on lactic acid fermentation of starch by *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18010T. **Journal of Applied Microbiology**, 88, 176–182.
- Hachmeister, K. A. and Fung, D. Y. C. (1993). Tempeh: a mold–modified indigenous fermented food made from soybean and/or cereal grains. **Critical Reviews in Microbiology**, 19, 137–188.
- Harris, L. E., Leche, T. F., Kearl, L. C., Fonnesbeck, P. V. and Lloyd, H. (1982). **Central and Southeast Asia Tables of Feed Composition**. Logan: Utah State University.

- Harane, R. S., Mehra, N. R., Tayade, P. B. and Adivarekar, R. V. (2014). A facile energy and water-conserving process for cotton dyeing. **International Journal of Energy and Environmental Engineering**, 5(96), 6–10.
- Jvo Siegrist Enzymatic Food Analysis. (2017). **food-analysis**. Retrieved January 4, 2017, from <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/analytix/enzymatic.html#materials>.
- Klich, M. A. (2002). Biogeography of *Aspergillus* species in soil and litter. **Mycologia**, 94(1), 21– 27.
- Kompiang, I. P., Sinurat, A. P., Supriyat, P. T. and Darma, J. (1992). Nutritive value of protein enriched cassava: cassapro. **Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan**, 7(2), 22–25.
- Kompiang, I. P., Sinurat, A. P. and Supriyat, P. T. (1995). The effect of using protein enriched Sago and its by-products in comparison with fermented cassava fiber in the rations on the performance of broiler chickens. Research Results on Poultry and Miscellaneous Animals. **Research Institute for Animal Production. Ciawi, Bogor**, 490–498.
- Laorodphan, N., Jaturasitha, S., Chongkasikit, N., Phatsara, C., Sirinupongsanun, V., and Waritthitham, A., et al. (2012). Effects of dried cassava pulp as a source of energy on growth performance and carcass quality in fattening beef cattle. **Chiang Mai University Journal of Natural Sciences**, 11, 309–314.
- Mann, J. and Truswell, S. (2007). **Essentials of Human Nutrition (3rd ed.)**. New York: Oxford University Press.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analysis of Chemistry**, 31, 426–428.
- Mikami, Y., Gregory, K. F., Levadoux, W. L., Balagopalan, C. and Whitwell, S. T. (1982). Factors affecting yield and protein production by *Cephalosporium eichhorniae*. **Applied and Environmental Microbiology**, 43, 403–411.
- Muindi, P. J. and Hanssen, J. F. (1981b). Protein enrichment of cassava meal by *Trichoderma harzianum* for animal feed. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 32, 655–661.

- National Research Council (NRC). (1984). **Nutrient Requirements of Beef Cattle**. Washington D.C: National Academy Press.
- National Agricultural Research Organization (NARO). (2001). **Standard Tables of Feed Composition in Japan (2001)**. National Agricultural Research Organization.
- Nwafor, O. E. and Ejukonemu, F. E. (2004). Bio-conversion of cassava wastes for protein enrichment using amylolytic fungi: a preliminary report. **Global Journal of Pure and Applied Sciences**, 10(4), 505–507.
- Nur, Y. S. (1995). The utilization of different levels of fermented cassava fibre in the diets of broiler chickens. Proceedings of the National Seminar on Science and Technology. **Research Institute for Animal Production, Ciawi, Bogor**, 244–248.
- Okine, A., Aibibula, Y., Hanada, M. and Okamoto, M. (2007). The use of fungal inoculants in the ensiling of potato pulp: effect of temperature and duration of storage on silage fermentation characteristics. **Asian–Australasian Journal of Animal Sciences**, 20(2), 214–219.
- Omole, T. A. and Sonaiya, E. B. (1981). The effect of protein sources and methionine supplementation of cassava peel meal utilization by growing rabbits. **Nutrition Reports International**, 23(4), 729–737.
- Padmaja, G., George, M. and Moorthy, S. N. (1993). Detoxification of cassava during fermentation with mixed culture. **Journal of the Science of Food and Agricultural**, 63, 473–481.
- Pilajun, R. and Wanapat, M. (2016). Growth performance and carcass characteristics of feedlot Thai native×Lowline Angus crossbred steer fed with fermented cassava starch residue. **Tropical Animal Health and Production**, 48, 719–726.
- Saito, K., Abe, A., Sujaya, I–N., Sone, T. and Oda, Y. (2004). Comparison of *Amylomyces rouxii* and *Rhizopus oryzae* in lactic acid fermentation of potato pulp. **Food Science and Technology Research**, 10(2), 224–226.
- Stephen, B., David, K. Chung, Y. Chang, B. Tume, K. and Zembayashi, M. (2006). Adiposity, fatty acid composition and delta-9- desaturase acitivity during growth in beef cattle. **Journal of Animal Science**, 77, 478–486

- Sternberg, D., Vijayakumar, P. and Reese, E. T. (1977).  **$\beta$ -glucosidase: microbial production and effect on enzymatic hydrolysis of cellulose.** **Canadian Journal of Microbiology**, 23, 139–147.
- Steinkraus, K. H. (1995). **Handbook of indigenous fermented foods.** New York, Marcel Dekker.
- Suyama, K., Hiroki, Y., Takahiko, N., Takashi, I. and Hajimu, K. (1993). A plate count method for aerobic cellulose decomposers in soil by congo red staining. **Soil Science and Plant Nutrition**, 39(2), 361–365.
- Sukara, E. and Doelle, H. W. (1988). Cassava starch fermentation pattern of *Rhizopus oligosporus* MIRCEN. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 4, 463–471.
- Varghese, G., Thambirajah, J. J. and Wong, F. M. (August 1–7, 1976). **Protein enrichment of cassava by fermentation with micro-fungi and the role of natural nitrogenous supplements.** In Cock, J., MacIntyre, R. and Graham, M. (Eds.). **Proceedings of the fourth International Symposium of the International Society for tropical root crops** (pp.250–255). Ottawa: CIAT, Colombia.
- Proceeding. 4th Int. Symposium of the International Society for Tropical Root Crops, CIAT. Cali, Colombia, 1st–7th August, 1976, IDRC, Ottawa, 8, 250–255.
- Visakh, P. M. and Thomas, S. (2010). Preparation of Bionanomaterials and their Polymer Nanocomposites from Waste and Biomass. **Waste and Biomass Valorization**, 1, 121–134.
- Voet, D. and Voet, J. G. (1995). **Biochemistry** (2<sup>nd</sup> ed.). New York: John Wiley and Sons.
- Wike, C. R., Maiorella, B., Sciamanna, A., Tangnu, K., Wiley, D. and Wong, H. (1983). **Enzymatic hydrolysis of cellulose.** Park Ridge, New Jersey, USA: Noyes Data Corporation.
- Zhang, J., Cai, Y., Kobayashi, R. and Kumai, S. (2000). Characteristics of lactic acid bacteria isolated from forage crops and their effects on silage fermentation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 80, 1455–1460.



## ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ

### การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

#### 1. Potato Dextrose Agar (PDA)

มันฝรั่ง	200 กรัม
น้ำตาลเดกโทรส (Dextrose)	20 กรัม
วุ้นผง (Agar)	20 กรัม
น้ำกลั่น	1 ลิตร

นำมันฝรั่งปอกเปลือก ล้างให้สะอาด และนำมาหั่นเป็นรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัสชิ้นเล็ก ๆ ขนาดประมาณ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร จำนวน 200 กรัม นำไปต้มในน้ำกลั่นประมาณ 700 มิลลิลิตร เพื่อให้สุก สังเกตได้จากการใช้มือบีบแล้วมันฝรั่งนุ่มแตกออกง่าย ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นนำมากรองแต่ส่วนน้ำ เติมน้ำตาลเดกโทรส 20 กรัม ลงไปผสมให้ละลาย เติมน้ำกลั่นลงไปเล็กน้อยให้มีปริมาตรของอาหารประมาณ 900 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดและด่างให้อยู่ในช่วง 5.5 – 6.0 ด้วย HCl 1 นอร์มอล หรือ NaOH 1 นอร์มอล เติมผงวุ้น 20 กรัม และนำไปต้มให้วุ้นละลาย ปรับปริมาตรสุดท้ายของอาหารให้เป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

#### 2. Potato Dextrose Broth (PDB)

มันฝรั่ง	200 กรัม
น้ำตาลเดกโทรส (Dextrose)	20 กรัม
น้ำกลั่น	1 ลิตร

นำมันฝรั่งปอกเปลือก ล้างให้สะอาด และนำมาหั่นเป็นรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัสชิ้นเล็ก ๆ ขนาดประมาณ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร จำนวน 200 กรัม นำไปต้มในน้ำกลั่นประมาณ 700 มิลลิลิตร เพื่อให้สุก สังเกตได้จากการใช้มือบีบแล้วมันฝรั่งนุ่มแตกออกง่าย ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นนำมากรองแต่ส่วนน้ำ เติมน้ำตาลเดกโทรส 20 กรัม ลงไปผสมให้ละลาย เติมน้ำกลั่นลงไปเล็กน้อยให้มีปริมาตรของอาหารประมาณ 900 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดและด่างให้อยู่ในช่วง 5.5 – 6.0 ด้วย HCl 1 นอร์มอล หรือ NaOH 1 นอร์มอล ปรับปริมาตรสุดท้ายของอาหารให้เป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

## 3. Carboxymethyl cellulose agar (CMC agar) (Hankin and Anagnostakis, 1977)

Carboxymethyl cellulose	5.0 กรัม
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.0 กรัม
Yeast extract	1.0 กรัม
วุ้นผง (Agar)	1.0 กรัม
น้ำกลั่น	1.0 ลิตร

ละลาย Carboxymethyl cellulose 5.0 กรัม ในน้ำร้อนประมาณ 500 มิลลิลิตร โดยค่อย ๆ ใส่พร้อมกับคนให้ละลายจนหมด เติมส่วนประกอบที่เหลือและปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

## 4. Czapek' s dox medium (Mandel and Sternberg, 1976)

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.0 กรัม
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.0 กรัม
Urea	0.3 กรัม
CaCl <sub>2</sub>	0.3 กรัม
MgSO <sub>4</sub>	0.3 กรัม
FeSO <sub>4</sub>	5.0 มิลลิกรัม
MnSO <sub>4</sub>	1.6 มิลลิกรัม
ZnSO <sub>4</sub>	1.4 มิลลิกรัม
CoCl <sub>2</sub>	2.0 มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	1.0 ลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น และนำไปใส่ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร ให้มีปริมาตรอาหารเท่ากับ 100 มิลลิลิตร จากนั้นใส่กระดาษกรอง Whatman No.1 ขนาดกว้าง 2.0 × 10.0 เซนติเมตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

## 5. SS medium (Danmek, et al., 2014)

Glucose	20.0 กรัม
Peptone	2.0 กรัม
Yeast extract	1.0 กรัม
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.0 กรัม

MgSO <sub>4</sub>	0.5 กรัม
CaCl <sub>2</sub>	0.1 กรัม
Tween 80	2.0 มิลลิลิตร
0.0005 % (w/v) ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.5 มิลลิลิตร
0.0005% (w/v) FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.5 มิลลิลิตร
0.005% (w/v) MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0.5 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

ละลาย Glucose, CaCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, yeast extract และ peptone ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นเติมสารละลาย MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O และ ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และปรับค่าความเป็นกรดและด่างให้อยู่ในช่วง 5.5 – 6.0 ด้วย HCl 1 นอร์มอล หรือ NaOH 1 นอร์มอล เติม Tween 80 ลงไป 2 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร แล้วนำไปใส่ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร ให้มีปริมาตรอาหารเท่ากับ 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

#### 6. V8 juice medium (Cotty, 1988)

น้ำผลไม้ V8	50 มิลลิลิตร
agar	20 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

ผสมน้ำผลไม้ V8 และน้ำกลั่นให้มีปริมาตรของอาหาร ประมาณ 900 มิลลิลิตร เติมผงวุ้น 20 กรัม และนำไปต้มให้วุ้นละลาย ปรับปริมาตรสุดท้ายของอาหารให้เป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

#### 7. Malt Extract Peptone Agar (MEA)

Malt Extract	20 กรัม
Peptone	10 กรัม
Glucose	20 กรัม
Agar	20 กรัม
น้ำกลั่น	1 ลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมด ยกเว้นผงวุ้น (Agar) ด้วยน้ำกลั่น ปรับค่าความเป็นกรดและด่าง ให้อยู่ในช่วง 5.5 – 6.0 ด้วย HCl 1 นอร์มอล หรือ NaOH 1 นอร์มอล ปรับปริมาตรให้เป็น

1 ลิตร เติมผงวุ้น 20 กรัม และนำไปต้มให้วุ้นละลาย นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที



## ภาคผนวก ข การเตรียมสารละลายและการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ

### การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์

1. การเตรียม 0.1 M Sodium Citrate

ชั่ง Tri-sodium Citrate dehydrate ( $C_6H_5O_7Na_2 \cdot 2H_2O$ ) จำนวน 29.41 กรัม ละลายน้ำ และปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

2. การเตรียม 0.1 M Citric acid

ชั่ง Citric acid monohydrate ( $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ ) จำนวน 21.01 กรัม ละลายน้ำ และปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

3. การเตรียม 0.025 M Citrate buffer pH 4.5

ชั่ง Tri-sodium Citrate dehydrate ( $C_6H_5O_7Na_2 \cdot 2H_2O$ ) จำนวน 1.3036 กรัม มาละลายในน้ำกลั่น 490 มิลลิลิตร แล้วเติม Citric acid monohydrate ( $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ ) ลงไป 1.6953 กรัม ปรับ pH ให้เป็น 4.5 เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร

4. การเตรียม 0.05 M Citrate buffer pH 4.8

ชั่ง Tri-sodium Citrate dehydrate ( $C_6H_5O_7Na_2 \cdot 2H_2O$ ) จำนวน 7.6466 กรัม มาละลายในน้ำกลั่น 990 มิลลิลิตร แล้วเติม Citric acid monohydrate ( $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ ) ลงไป 5.0434 กรัม ปรับ pH ให้เป็น 4.8 เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรเป็น 1 ลิตร

5. การเตรียม 0.05 M Citrate buffer pH 4.0

นำ 0.1 M Citric acid มา 59 มิลลิลิตร ผสมรวมกับ 0.1 M Sodium Citrate จำนวน 41 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย 0.1 M Citrate buffer pH 4.0 จากนั้นจึงทำการเจือจางลง 2 เท่า ด้วยน้ำกลั่น

6. การเตรียม 0.2 M  $NaH_2PO_4$

ชั่ง  $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$  จำนวน 15.60 กรัม เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร

7. การเตรียม 0.2 Sodium phosphate buffer pH 6.0

นำ 0.2 M  $NaH_2PO_4$  มา 87.7 มิลลิลิตร ผสมรวมกับ 0.2 M  $Na_2HPO_4$  จำนวน 12.3 มิลลิลิตร

8. การเตรียม 0.2 M Sodium phosphate buffer pH 7.0

นำ 0.2 M  $NaH_2PO_4$  มา 39 มิลลิลิตร ผสมรวมกับ 0.2 M  $Na_2HPO_4$  จำนวน 61 มิลลิลิตร

## 9. การเตรียม 20 mM Sodium acetate

ชั่ง Sodium acetate trihydrate ( $\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) จำนวน 2.721 กรัม ละลายน้ำกลั่น และปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

## 10. การเตรียม 20 mM Acetic acid

ตวง Acetic acid ปริมาตร 1.2 มิลลิลิตร ใส่ในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

## 11. การเตรียม 20 mM Sodium acetate buffer pH 5.0

นำ 20 mM Sodium acetate มาผสมรวมกับ 20 mM Acetic acid ในอัตราส่วน 70:30 โดยปริมาตร

**การเตรียมสารละลาย Dinitrosalicylic acid (DNS) (ดัดแปลงจาก Miller, 1959)**

1. เตรียมสารละลาย Dinitrosalicylic acid 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 880 มิลลิลิตร

2. ชั่ง Potassium sodium tartrate ( $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) จำนวน 255 กรัม ละลายในสารละลาย NaOH 4.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 300 มิลลิลิตร

3. เตรียมสารละลาย NaOH 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 22 มิลลิลิตร ใส่ลงในสารละลาย phenol 10 กรัม เติมน้ำให้ครบ 1 ลิตร ผสมให้เข้ากัน เทแบ่งออกมา 69 มิลลิลิตร ใส่  $\text{NaHSO}_3$  6.9 มิลลิลิตร

4. ผสมสารละลายจากข้อ 1 และ 2 ให้เข้ากัน จากนั้นจึงใส่สารละลายข้อ 3 ผสมให้เข้ากัน นำไปเก็บใส่ขวดสีชา และเก็บไว้ในตู้เย็นอย่างน้อย 1 คืน ก่อนนำมาใช้

**การเตรียมสารละลาย Biuret (Gornall, et al., 1949)**

1. ชั่ง  $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$  จำนวน 1.50 กรัม และ Potassium sodium tartrate จำนวน 6.0 กรัม ในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร

2. เตรียมสารละลาย NaOH 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 300 มิลลิลิตร

3. นำสารละลายจากข้อ 4.1 และ 4.2 มาผสมรวมกัน ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น เก็บไว้ในขวดสีชา

**การเตรียมสารละลายสำหรับวัดแอกติวิตีไซแลนเนส (Nelson, 1944; Somogyi, 1952)**

## 1. การเตรียม Alkali copper reagent

สารละลาย ก

$\text{Na}_2\text{CO}_3$  25 กรัม

Potassium sodium tartrate ( $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) 25 กรัม

$\text{NaHCO}_3$  20 กรัม

$\text{Na}_2\text{SO}_4$  200 กรัม

น้ำกลั่น 1 ลิตร

ละลายสารเคมีทั้งหมดให้เข้ากันด้วยน้ำกลั่น และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร  
สารละลาย ข

ชั่ง  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  จำนวน 15.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร  
จากนั้นเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นลงไป 2 หยด

สารละลาย Alkali copper reagent

เตรียมโดยผสมสารละลาย ก ปริมาตร 25 มิลลิลิตร และ สารละลาย ข ปริมาตร  
1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน (ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้)

## 2. การเตรียม Arsenomolybdate reagent

ชั่ง Ammonium molybdate 25.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 450 มิลลิลิตร  
จากนั้นค่อย ๆ เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นปริมาตร 21 มิลลิลิตร ลงไป แล้วจึงเติม  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$   
ที่ละลายอยู่ในน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชา และตั้งทิ้งไว้ 2 วันก่อนนำมาใช้

## การเตรียมสารละลายสำหรับวิเคราะห์องค์ประกอบของลิกโนเซลลูโลส

### 1. การเตรียมสารละลาย Neutral Detergent

Sodium lauryl sulphate	30 กรัม
Disodium ethylenediamine tetraacetate (EDTA) dihydrate	16.18 กรัม
Sodium borate decahydrate ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ )	6.81 กรัม
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	4.56 กรัม
2-Ethoxyethanol (ethylene glycol monoethyl ether)	10 มิลลิลิตร

นำ EDTA และ  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$  มาละลายในน้ำกลั่นพอประมาณ และนำไปต้มจนละลายหมด แล้วนำไปผสมกับ Sodium lauryl sulphate และ 2-Ethoxyethanol จากนั้นนำ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  มาละลายในน้ำกลั่นพอประมาณ และนำไปต้มจนละลายหมดแล้วนำไปผสมกับสารละลายข้างต้น ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร และ pH อยู่ในช่วง 6.9–7.1

### 2. การเตรียมสารละลาย Acid Detergent

Sulfuric acid (%assay=100)	49.04	กรัม
Cetyl trimethylammonium bromide	20	กรัม

นำกรดซัลฟูริกใส่ใน Volumetric flask ขนาด 1 ลิตร ที่มีน้ำกลั่นอยู่พอประมาณ ผสมให้เข้ากัน และปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร ตรวจสอบความเข้มข้นของสารละลายด้วยวิธีการไตเตรทให้ได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 1 N แล้วเติม Cetyltrimethylammonium bromide ผสมให้เข้ากัน

## 3. การเตรียมสารละลาย Saturated potassium permanganate

$\text{KMnO}_4$	50 กรัม
-----------------	---------

$\text{Ag}_2\text{SO}_4$	0.05 กรัม
--------------------------	-----------

ละลาย  $\text{KMnO}_4$  และ  $\text{Ag}_2\text{SO}_4$  ในน้ำกลั่น 1 ลิตร แล้วเก็บสารละลายไว้ในขวดแก้วสีชา เก็บไว้ในตู้เย็น อย่าให้โดนแสง

## 4. การเตรียมสารละลาย Lignin buffer

$\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	6	กรัม
--	---	------

$\text{AgNO}_3$	0.15	กรัม
-----------------	------	------

Potassium acetate	5	กรัม
-------------------	---	------

Acetic acid glacial	500	มิลลิลิตร
---------------------	-----	-----------

Tertiary butyl alcohol	400	มิลลิลิตร
------------------------	-----	-----------

ละลาย  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  และ  $\text{AgNO}_3$  ในน้ำกลั่น แล้วนำไปผสมกับ Acetic acid และ Potassium acetate แล้วเติม Tertiary butyl alcohol ผสมให้เข้ากัน

## 5. การเตรียมสารละลาย Combined permanganate

ผสม Saturated potassium permanganate กับ Lignin buffer ในอัตราส่วน 2:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เตรียมใหม่ก่อนใช้ โดยเก็บไว้ได้ไม่เกิน 1 สัปดาห์ ในตู้เย็นและไม่ให้ถูกแสง ถ้าสารละลายกลายเป็นสีแดงจะใช้ไม่ได้

## 6. การเตรียมสารละลาย Demineralizing

Oxalic acid dehydrate	50	กรัม
-----------------------	----	------

95% Ethanol	700	กรัม
-------------	-----	------

HCl	50	กรัม
-----	----	------

น้ำกลั่น	250	กรัม
----------	-----	------

ละลาย Oxalic acid ใน ethanol แล้วเติม HCl และน้ำกลั่น ตามลำดับ ผสมให้เข้ากัน

**การวิเคราะห์หา Acid Detergent Fiber (ADF)**

1. นำครุชิวเปิล (Fritted glass crucible) ที่ล้างสะอาดแล้วไปอบในตู้อบแห้ง (Hot air oven) ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเอาออกใส่โถอบแห้ง (Desiccator) ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น และนำไปชั่งน้ำหนัก

2. นำตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ ทำให้แห้งและบดละเอียดขนาดประมาณ 20–30 mesh หรือ 1 มิลลิเมตร จำนวน 0.5 ถึง 1.0 กรัม ใส่ในปิกรเกอร์ทรงสูงขนาด 600 มิลลิลิตร เพื่อใช้สำหรับวิเคราะห์เยื่อใย

3. เติมสารละลาย Acid Detergent Fiber (ADF) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และ Decahydronaphthalene 2 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน นำไปต้มให้เดือด แล้วปรับอุณหภูมิให้ลดลงเล็กน้อย จากนั้นจึง Reflux ต่อไปเป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยนับเวลาตั้งแต่เริ่มเดือด

4. ถ่ายสารละลายและตัวอย่างที่ต้องการทดสอบทั้งหมดที่อยู่ในปิกเกอร์ ลงในครุชีเบิลที่วางอยู่บนชุดกรอง แล้วทำการล้างตัวอย่างที่ติดอยู่ในครุชีเบิล ด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ 90 ถึง 100 องศาเซลเซียส ประมาณ 1200 มิลลิลิตร หรือจนกว่าจะใส่น้ำล้าง Acid Detergent Fiber (ADF) ออกจนหมด

5. ล้างตัวอย่างที่ต้องการทดสอบที่ติดอยู่ในครุชีเบิลอีกครั้งด้วย Acetone 2 ถึง 3 ครั้ง หรือจนกระทั่งสารละลายที่ไหลออกจากครุชีเบิลไม่มีสี

6. นำครุชีเบิลไปอบในตู้อบแห้ง (Hot air oven) ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 8 ชั่วโมง จากนั้นเอาออกใส่ในโถอบแห้ง (Desiccator) ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น และนำไปชั่งน้ำหนัก

7. น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นจากน้ำหนักของครุชีเบิล คือ ปริมาณ ADF

#### **การวิเคราะห์หา Neutral Detergent Fiber (NDF)**

1. นำครุชีเบิล (Fritted glass crucible) ที่ล้างสะอาดแล้วไปอบในตู้อบแห้ง (Hot air oven) ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเอาออกใส่ในโถอบแห้ง (Desiccator) ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น และนำไปชั่งน้ำหนัก

2. นำตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ ทำให้แห้งและบดละเอียดขนาดประมาณ 20–30 mesh หรือ 1 มิลลิเมตร จำนวน 0.5 ถึง 1.0 กรัม ใส่ในปิกเกอร์ทรงสูงขนาด 600 มิลลิลิตร เพื่อใช้สำหรับวิเคราะห์ย่อย

3. เติมสารละลาย Neutral Detergent Fiber (NDF) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร Sodium sulphite anhydrous 0.5 กรัม และ Decahydronaphthalene 2 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน นำไปต้มให้เดือด แล้วปรับอุณหภูมิให้ลดลงเล็กน้อย จากนั้นจึง Reflux ต่อไปเป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยเริ่มนับเวลาตั้งแต่เริ่มเดือด

4. ถ่ายสารละลายและตัวอย่างที่ต้องการทดสอบทั้งหมดที่อยู่ในปิกเกอร์ ลงในครุชีเบิลที่วางอยู่บนชุดกรอง แล้วทำการล้างตัวอย่างที่ติดอยู่ในครุชีเบิล ด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ 90 ถึง 100 องศาเซลเซียสประมาณ 1200 มิลลิลิตร หรือจนกว่าจะใส่น้ำล้าง Neutral Detergent Fiber (NDF) ออกจนหมด

5. ล้างตัวอย่างที่ต้องการทดสอบที่ติดอยู่ในครุชีเบิลอีกครั้งด้วย Acetone 2 ถึง 3 ครั้ง หรือจนกระทั่งสารละลายที่ไหลออกจากครุชีเบิลไม่มีสี

6. นำครุชิเปิลไปอบในตู้อบแห้ง (Hot air oven) ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 8 ชั่วโมง จากนั้นเอาออกใส่ในโถอบแห้ง (Desiccator) ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น และนำไปชั่งน้ำหนัก

7. น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นจากน้ำหนักของครุชิเปิล คือ ปริมาณ NDF

#### **การวิเคราะห์หา Permanganate lignin (PML)**

1. นำครุชิเปิลที่มีตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ ซึ่งวิเคราะห์ ADF แล้วมาวางในถาดโลหะสแตนเลส

2. เติมสารละลาย Combined permanganate ประมาณ 25 มิลลิลิตร หรือให้ท่วมตัวอย่างที่อยู่ในครุชิเปิล ใช้แท่งแก้วคนสารตัวอย่างให้กระจายไม่จับตัวเป็นก้อน เพื่อให้สารละลายซึมเข้าได้ทั่ว

3. ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 90 ถึง 100 นาที ระหว่างนี้คอยเติมสารละลายเรื่อย ๆ เพื่อไม่ให้สารละลายไหลออกนอกครุชิเปิลจนหมด และให้น้ำยาเป็นสีม่วงตลอดเวลา

4. นำครุชิเปิลไปวางบนชวดกรอง ดูดสารละลาย Combined permanganate ออกให้แห้ง แล้วเติมสารละลาย Demineralizing ลงไปให้ท่วมตัวอย่างที่ต้องการทดสอบในครุชิเปิล ระวังอย่าให้เป็นฟอง ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที ดูดสารละลายออกให้แห้ง ถ้าสารละลายที่อยู่ในครุชิเปิลยังเป็นสีน้ำตาลเข้ม ให้ทำซ้ำอีก จนกระทั่งล้างสารละลาย Combined permanganate ออกจากครุชิเปิลจนหมด

5. ล้างตัวอย่างในครุชิเปิลด้วยสารละลาย 80% Ethanol ประมาณ 2 ครั้ง

6. ล้างตัวอย่างในครุชิเปิลด้วย Acetone 2 ครั้ง และดูดสารละลายออกให้แห้ง

7. นำครุชิเปิลไปอบในตู้อบแห้ง (Hot air oven) ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 8 ชั่วโมง จากนั้นเอาออกใส่โถอบแห้ง (Desiccator) ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น และนำไปชั่งน้ำหนัก

8. น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของครุชิเปิล คือ ปริมาณ PML

#### **การหาปริมาณเถ้า**

นำตะกอนจากข้อ 8 มาเผาที่อุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 3 ชั่วโมง จากนั้นเอาใส่ในโถอบแห้ง (Desiccator) ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น และนำไปชั่งน้ำหนัก

#### **การคำนวณหาปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน และเถ้า**

ปริมาณ NDF (เปอร์เซ็นต์) เท่ากับ ((น้ำหนักตัวอย่างที่เหลือจากขั้นตอนวิเคราะห์ NDF – น้ำหนักเถ้า)/น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น) × 100

ปริมาณ ADF (เปอร์เซ็นต์) เท่ากับ ((น้ำหนักตัวอย่างที่เหลือจากขั้นตอนวิเคราะห์ ADF – น้ำหนักแก้ว)/น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น) × 100

ปริมาณเซลลูโลส (เปอร์เซ็นต์) เท่ากับ ((น้ำหนักตัวอย่างที่เหลือจากขั้นตอนวิเคราะห์ PML – น้ำหนักแก้ว)/น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น) × 100

ปริมาณเฮมิเซลลูโลส (เปอร์เซ็นต์) เท่ากับ ปริมาณ NDF (เปอร์เซ็นต์) – ปริมาณ ADF (เปอร์เซ็นต์)

ปริมาณลิกนิน (เปอร์เซ็นต์) เท่ากับ ((น้ำหนักตัวอย่างที่เหลือจากขั้นตอนวิเคราะห์ ADF – น้ำหนักตัวอย่างที่เหลือจากขั้นตอนวิเคราะห์ PML) – น้ำหนักแก้ว)/น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น) × 100

**การวัดปริมาณเซลลูเลสในกลุ่มเอกซิกลูคาเนส (exoglucanase) โดยการวิเคราะห์**  
**หา FPA (Ghose, 1987)**

1. นำเอนไซม์ที่ต้องการทดสอบปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง
2. เติมสารละลายไซเตียมซิติเรตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดและด่าง เท่ากับ 4.8 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และกระดาษกรอง Whatman No.1 ขนาด 1.0×6.0 เซนติเมตร (50 มิลลิกรัม) เขย่าให้เข้ากัน
3. นำไปอุ่นในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
4. เติมสารละลาย DNS reagent ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือด นาน 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง
5. เติมน้ำกลั่นหลอดละ 20 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่นแสง 540 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายไซเตียมซิติเรตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดและด่าง เท่ากับ 4.8 แทนเอนไซม์ เป็นหลอดควบคุม (blank) จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบหาน้ำตาลกลูโคส จากกราฟน้ำตามาตรฐานเพื่อนำไปคำนวณหาค่า unit of enzyme จากสูตรมาตรฐาน (ภาคผนวก ค)

**การวัดปริมาณเซลลูเลสในกลุ่มเอนโดกลูคาเนส (endoglucanase) โดยการวิเคราะห์**  
**หา CMC (Ghose, 1987)**

1. นำเอนไซม์ที่ต้องการทดสอบมา 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง
2. เติม CMC ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์กรัมต่อปริมาตร ที่ละลายในสารละลายไซเตียมซิติเรตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดและด่าง เท่ากับ 4.8 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน
3. นำไปอุ่นในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

4. เติมสารละลาย DNS reagent ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือด นาน 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

5. เติมน้ำกลั่นหลอดละ 20 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่นแสง 540 นาโนเมตร โดยสารละลายไซเดียมซิติเรตบัพเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดและด่าง เท่ากับ 4.8 แทนเอนไซม์เป็นหลอดควบคุม (blank) จากนั้นนำค่า การดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสจากกราฟน้ำตาลมาตรฐาน เพื่อนำไป คำนวณหาค่า unit of enzyme จากสูตรมาตรฐาน (ภาคผนวก ค)

#### **การวัดปริมาณเซลลูเลสในกลุ่มเบตาไกลูโคซิเดส ( $\beta$ -glucosidase) โดยการวิเคราะห์ หา $\beta$ -glucosidase ตามวิธีการของ (Sternberg, et al., 1976)**

1. นำเอนไซม์ที่ต้องการทดสอบมา 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง

2. เติมสารละลาย salicin ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ละลายในสารละลาย ไซเดียมซิติเรตบัพเฟอร์ 0.025 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดและด่าง เท่ากับ 4.5 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

3. นำไปอุ่นในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

4. เติมสารละลาย DNS reagent ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือด นาน 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

5. เติมน้ำกลั่นหลอดละ 20 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่นแสง 540 นาโนเมตร โดยสารละลายไซเดียมซิติเรตบัพเฟอร์ 0.025 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดและด่าง เท่ากับ 4.5 แทนเอนไซม์เป็นหลอดควบคุม (blank) จากนั้นนำค่า การดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสจากกราฟน้ำตาลมาตรฐาน เพื่อนำไปคำนวณ หาค่า unit of enzyme จากสูตรมาตรฐาน (ภาคผนวก ค)

#### **การวัดแอกติวิตีของไซแลนเนส (Ghose and Bisaria, 1987)**

1. นำไซแลนความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์กรัมต่อปริมาตร ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง

2. เติมสารละลายไซเดียมฟอสเฟตบัพเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ ค่าความเป็นกรดและด่าง เท่ากับ 7.0 ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร

3. เติมเอนไซม์ที่ต้องการทดสอบ ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

4. นำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

5. เติมสารละลาย Alkalinecopper reagent (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปให้ความร้อนโดยการต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 20 นาที แล้วจึงนำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็น

6. เติมสารละลาย Arsenomolybdate reagent (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

7. เติมน้ำกลั่นหลอดละ 5.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ pH 7.0 แทนเอนไซม์เป็นหลอดควบคุม (blank) จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบหาปริมาณน้ำตาลไซโลสจากกราฟมาตรฐาน เพื่อนำไปคำนวณหาค่า unit of enzyme จากสูตรมาตรฐาน (ภาคผนวก ค)

#### การวัดปริมาณโปรตีน (Lowry's method)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. Lowry's reagent

1.1 Lowry solution A: 2 % w/v  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ใน 0.1 N NaOH

1.2 Lowry solution B: 0.5 % w/v  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  และ Sodium potassium tartrate ใน 1 % w/v ผสมกันในอัตราส่วน 0.5:0.5

\*Lowry's reagent = Lowry solution A (50 ml): Lowry solution B (1 ml)

2. Folin – ciocalteu's Phenol reagent dilute กับน้ำอัตราส่วน 1:1

3. สารละลาย BSA 1000  $\mu\text{g/ml}$  (0.01 g/10 ml) (0.005 g/5 ml) (1.0 mg/ml) เก็บเป็น stock

4. Test tube 10 อัน

5. Spectrophotometer

6. Micropipette 100, 1000  $\mu\text{l}$

7. Vortex

## ขั้นตอนการวัดปริมาณโปรตีน

ตาราง 14 แสดงขั้นตอนการวัดปริมาณโปรตีน

สารละลาย (ml)	Standard						ตัวอย่าง	
	blank	1	2	3	4	5	1	2
BSA ( $\mu$ l)	-	50	100	150	200	250	-	-
น้ำกลั่น ( $\mu$ l)	1000	950	900	850	800	750	750	750
Crude enzyme	-	-	-	-	-	-	250	250
ความเข้มข้น ( $\mu$ g/ml)	0	50	100	150	200	250		

1. เติมสารละลาย Lowry หลอดละ 3 ml ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ 10 นาที
2. เติม Folin-ciocalteu ที่เจือจางอัตราส่วน 1:1 ปริมาตร 0.3 ml ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ 30 นาที
3. นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm

### การเตรียมสไลด์เพื่อศึกษาโครงสร้างของเชื้อรา

1. นำสไลด์ กระจกปิดสไลด์ และแท่นวางสไลด์ ใส่ลงในจารเพาะเชื้อ ปิดฝาและนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที
2. เตรียมอาหาร PDA เทใส่จานเพาะเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้วอีกชุดหนึ่ง ตั้งทิ้งไว้จนอาหารแข็ง จากนั้นใช้มีดผ่าตัด ตัดชิ้นวุ้นเป็นรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัส ขนาดประมาณ  $0.5 \times 0.5$  เซนติเมตร
3. ชิ้นอาหารที่ตัดได้มาวางไว้บนสไลด์ในจารเพาะเชื้อที่เตรียมจากข้อ 17.1
4. ใช้เข็มเย็บเชื้อลนไฟ ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นนำไปเชื่อมสปอร์ของเชื้อราที่ต้องการศึกษา มาแตะที่มุมทั้งสี่ด้านของชิ้นอาหาร
5. ปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ โดยต้องระวังไม่ให้กระจกปิดสไลด์เอียงมาแตะกับสไลด์ที่อยู่ด้านล่าง
6. เทน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วลงไปเล็กน้อย แต่ไม่ให้ท่วมสไลด์ เพื่อให้เกิดความชื้น
7. นำไปบ่มเลี้ยงเพื่อให้เชื้อราเจริญ สังเกตเชื้อราจะค่อย ๆ เจริญแผ่เส้นใยไปบนสไลด์ และกระจกปิดสไลด์

8. นำสไลด์ที่มีเส้นใยของเชื้อราเจริญอยู่มาเขี่ยขึ้นอาหารออก แต่ต้องระวังไม่ให้เส้นใยของเชื้อราติดมาด้วย ดังนั้นจะได้ส่วนที่มีเส้นใยของเชื้อราติดอยู่ 2 ส่วน คือ ที่สไลด์และกระจกปิดสไลด์

9. หยดแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ลงบนแผ่นสไลด์ หรือกระจกปิดสไลด์ที่มีเส้นใยของเชื้อราติดอยู่เพื่อให้เส้นใยของเชื้อราแผ่กระจาย ทิ้งไว้สักครู่เพื่อให้แอลกอฮอล์ระเหย

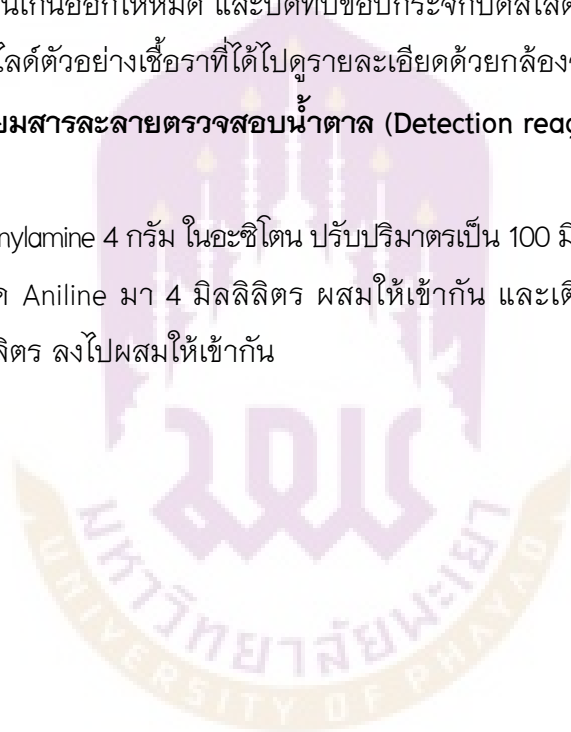
10. หยดสี Lactophenol-cotton blue หรือ Lactophenol-anelene blue ลงไปเพื่อย้อมเส้นใยเชื้อรา

11. นำกระจกปิดสไลด์ที่สะอาดแผ่นใหม่ปิดทับลงไป ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ ใช้กระดาษซับสีส่วนเกินออกให้หมด และปิดทับขอบกระจกปิดสไลด์ทั้ง 4 ด้านด้วยน้ำยาทาเล็บ

12. นำสไลด์ตัวอย่างเชื้อราที่ได้ไปดูรายละเอียดด้วยกล้องจุลทรรศน์

**การเตรียมสารละลายตรวจสอบน้ำตาล (Detection reagent) (Chaplin and Kennedy, 1994)**

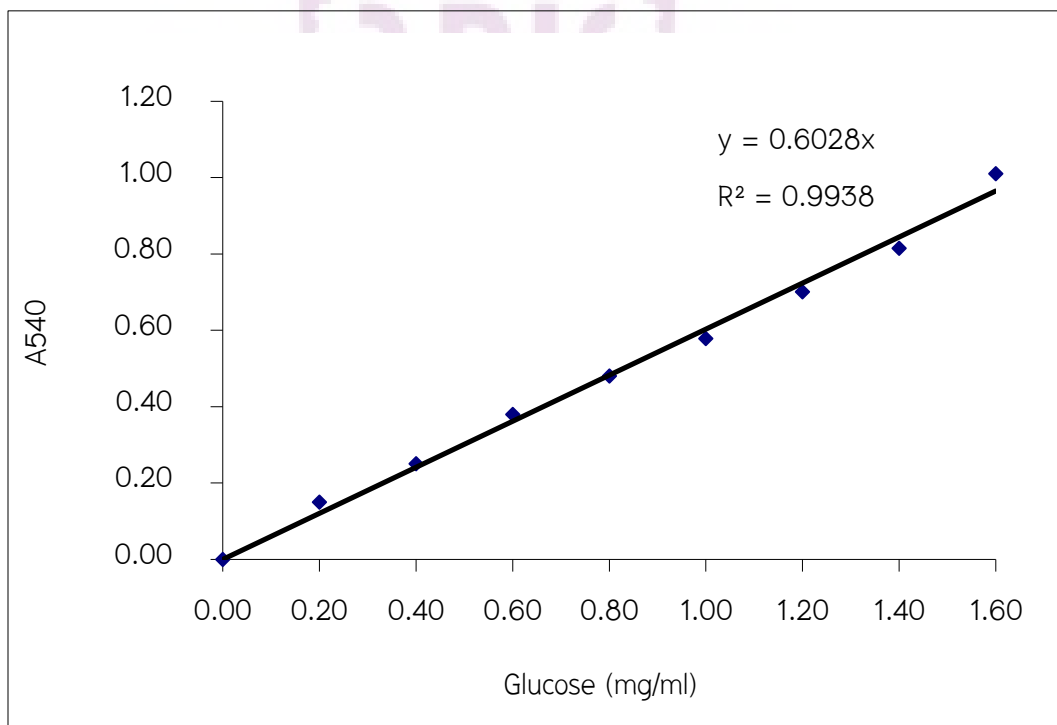
ชั่ง Diphenylamine 4 กรัม ในอะซิโตน ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร แบ่งมา 96 มิลลิลิตร จากนั้นใช้ปิเปตดูด Aniline มา 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และเติม ortho-phosphoric acid ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ลงไปผสมให้เข้ากัน



## ภาคผนวก ค กราฟมาตรฐานและการคำนวณค่าแอดคทีวิตีของเอนไซม์

### การทำกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

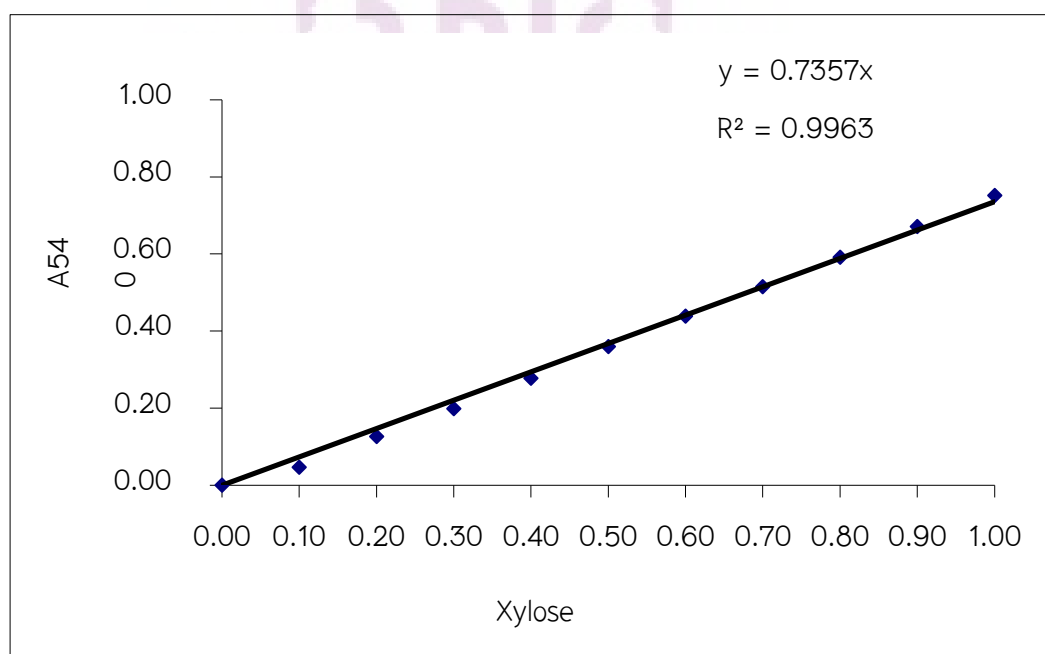
1. เตรียมสารละลายน้ำตาลกลูโคสที่ละลายในสารละลายซีเตรตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ค่าความเป็นกรดและด่าง เท่ากับ 5.0 โดยมีน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นต่าง ๆ กัน คือ 0.00, 0.20, 0.40, 0.60, 0.80, 1.00, 1.20, 1.40 และ 1.60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
2. ใส่สารละลายน้ำตาลความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เตรียมได้จากข้อ 1 ลงในหลอดทดลอง หลอดละ 1 มิลลิลิตร ทำความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ
3. ใส่สารละลาย DNS (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงในแต่ละหลอด
4. นำไปตั้งในอ่างน้ำเดือดเป็นระยะเวลา 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น
5. เติมน้ำกลั่นหลอดละ 20 มิลลิลิตร
6. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยหลอดควบคุมใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายน้ำตาลกลูโคส
7. นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าดูดกลืนแสงและปริมาณน้ำตาลกลูโคส



ภาพ 41 แสดงกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

### การทำกราฟมาตรฐานน้ำตาลไซโลส

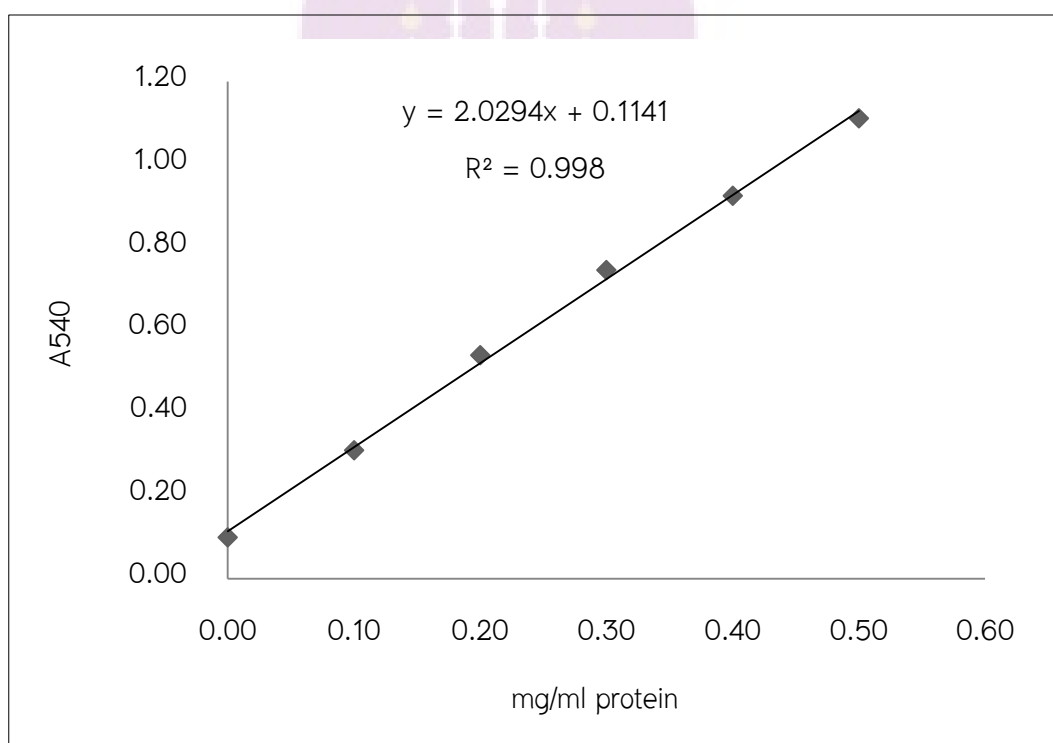
1. เตรียมสารละลายน้ำตาลไซโลสที่ละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ค่าความเป็นกรดและด่าง เท่ากับ 7.0 โดยมีน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นต่าง ๆ กัน คือ 0.000, 0.025, 0.050, 0.075, 0.100, 0.125, 0.150, 0.175 และ 2.000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
2. ใส่สารละลายน้ำตาลความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เตรียมได้จากข้อ 1 ลงในหลอดทดลอง หลอดละ 0.25 มิลลิลิตร ทำความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ
3. ใส่สารละลาย Alkali copper reagent (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในแต่ละหลอด
4. นำไปตั้งในอ่างน้ำเดือดเป็นระยะเวลา 20 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น
5. ใส่สารละลาย Arsenomolybdate reagent (ภาคผนวก ข) 20 มิลลิลิตร ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ลงในแต่ละหลอด
6. เติมน้ำกลั่นหลอดละ 10 มิลลิลิตร
7. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร โดยหลอดควบคุมใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายน้ำตาลไซโลส
8. นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟระหว่างค่าดูดกลืนแสงและปริมาณน้ำตาลไซโลส



ภาพ 42 แสดงกราฟมาตรฐานน้ำตาลไซโลส

### การทำกราฟมาตรฐานโปรตีน Bovine Serum Albumin (BSA)

1. เตรียมสารละลาย Bovine Serum Albumin (BSA) ให้มีความเข้มข้น 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
2. ใส่สารละลาย BSA ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เตรียมได้จากข้อ 1 ลงในหลอดทดลองหลอดละ 1 มิลลิลิตร ทำความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ
3. เติมสารละลาย Biuret (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ในแต่ละหลอด จากนั้นเขย่าให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ 30 นาที
4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 550 นาโนเมตร โดยหลอดควบคุมใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายโปรตีน BSA
5. นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าดูดกลืนแสงและปริมาณโปรตีน



ภาพ 43 แสดงกราฟมาตรฐานโปรตีน

### การคำนวณแอกติวิตีของเอกโซกลูคาเนส เอนโดกลูคาเนสและเบตาไกลูโคซิเดส

1 หน่วยของเอนไซม์ (ยูนิต) เท่ากับ ปริมาณของกลูโคส 1 ไมโครโมล ที่เกิดขึ้นภายใน 1 นาที ภายใต้ภาวะที่ใช้ทดสอบ เท่ากับ กลูโคส 0.180 มิลลิกรัม ที่เกิดขึ้น ภายใน 1 นาที ภายใต้ภาวะที่ใช้ทดสอบ กลูโคส 0.180 มิลลิกรัม เท่ากับ 1 ไมโครโมล กลูโคส A มิลลิกรัม เท่ากับ  $(1 \times A)/0.180$  ไมโครโมล ดังนั้นจึงเท่ากับ  $A \times 5.556$  ไมโครโมล

จากการทดลองน้ำตาลกลูโคส  $A \times 5.556$  ไมโครโมล เกิดขึ้นภายใน 30 นาที ที่เวลา 30 นาที มีน้ำตาลกลูโคส เท่ากับ  $A \times 5.556$  ไมโครโมล ถ้า 1 นาที มีน้ำตาลกลูโคส เท่ากับ  $(1 \times A \times 5.556)/30$  ไมโครโมลต่อนาที ดังนั้นจึง เท่ากับ  $A \times 0.185$  ไมโครโมลต่อนาที

จากการทดลองน้ำตาลกลูโคส  $A \times 0.185$  ไมโครโมลต่อนาที เกิดจากการใช้เอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร ใช้เอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร มีน้ำตาลกลูโคส เท่ากับ  $A \times 0.185$  ไมโครโมลต่อนาที ใช้เอนไซม์ 1.0 มิลลิลิตร มีน้ำตาลกลูโคส เท่ากับ  $(1 \times (A \times 0.185) / 0.5)$  ไมโครโมลต่อนาที ต่อ มิลลิลิตร เท่ากับ  $A \times 0.370$  ไมโครโมลต่อนาทีต่อ มิลลิลิตร ดังนั้นจึงเท่ากับ  $A \times 0.370$  ยูนิต ต่อ มิลลิลิตร

### การคำนวณแอกติวิตีของไซแลนเนส

1 หน่วยของเอนไซม์ (ยูนิต) เท่ากับปริมาณของไซโลส 1 ไมโครโมล ที่เกิดขึ้น ภายใน 1 นาที ภายใต้ภาวะที่ใช้ทดสอบ เท่ากับ ไซโลส 0.150 มิลลิกรัม ที่เกิดขึ้นภายใน 1 นาที ภายใต้ภาวะที่ใช้ทดสอบ ไซโลส 0.150 มิลลิกรัม เท่ากับ 1 ไมโครโมล ไซโลส A มิลลิกรัม เท่ากับ  $(1 \times A)/0.150$  ไมโครโมล ดังนั้นจึงเท่ากับ  $A \times 6.667$  ไมโครโมล

จากการทดลองน้ำตาลไซโลส  $A \times 6.667$  ไมโครโมล เกิดขึ้นภายใน 10 นาที โดยใน 10 นาที มีน้ำตาลไซโลส เท่ากับ  $A \times 6.667$  ไมโครโมล 1 นาที มีน้ำตาลไซโลสเท่ากับ  $(1 \times A \times 6.667)/30$  ไมโครโมลต่อนาที ดังนั้นจึงเท่ากับ  $A \times 0.667$  ไมโครโมลต่อนาที

จากการทดลองน้ำตาลไซโลส  $A \times 0.667$  ไมโครโมลต่อนาที เกิดจากการใช้เอนไซม์ 0.25 มิลลิลิตร ใช้เอนไซม์ 0.25 มิลลิลิตร มีน้ำตาลไซโลสเท่ากับ  $A \times 0.667$  ไมโครโมลต่อนาที ในการใช้เอนไซม์ 1.0 มิลลิลิตร มีน้ำตาลไซโลส เท่ากับ  $(1 \times (A \times 0.667) / 0.25)$  ไมโครโมลต่อนาที ต่อ มิลลิลิตร เท่ากับ  $A \times 2.668$  ไมโครโมลต่อนาทีต่อ มิลลิลิตร ดังนั้นจึงเท่ากับ  $A \times 2.668$  ยูนิต ต่อ มิลลิลิตร



ประวัติผู้วิจัย

## ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ นามสกุล	ทศวรรต อะโนราช
วัน เดือน ปี เกิด	19 ธันวาคม 2535
ที่อยู่ปัจจุบัน	39 หมู่ 4 ตำบลยางฮ่อม อำเภอขุนตาล จังหวัดเชียงราย
ที่ทำงานปัจจุบัน	-
ตำแหน่งหน้าที่ปัจจุบัน	-
ประสบการณ์การทำงาน	-
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2557	วท.บ. (เทคโนโลยีชีวภาพ), มหาวิทยาลัยพะเยา, จังหวัดพะเยา

### ผลงานตีพิมพ์

ที่เกี่ยวข้องกับวิทยานิพนธ์

ทศวรรต อะโนราช, สมชาติ ธนะ, ชัยณรงค์ วงศ์สรรคศรี, โชค โสรัจกุล และขรรค์ชัย ดันเมฆ (ผู้บรรยาย). (20 กรกฎาคม พ.ศ. 2560). การเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการของมันสำปะหลังด้วยการหมักแบบ solid state fermentation ร่วมกับเชื้อรา *Rhizopus* spp. UPO4 ที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลส. ใน **การประชุมวิชาการนำเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ เครือข่ายบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยราชภัฏภาคเหนือ ครั้งที่ 18 และลำปางวิจัย ครั้งที่ 4** (หน้า 63-73).  
ลำปาง: มหาวิทยาลัยราชภัฏลำปาง.

ผลงานตีพิมพ์อื่น ๆ

Thana, S., Anorach, T., Sorachakula, C. and Danmek, K. (2019). Nutritional composition of maize husk silage generated from solid state fermentation by *Trichoderma viride* UPO1. **Pakistan Journal of Botany**, 51(6), 2255-2260.