รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย เรื่อง การผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากกากมันสำปะหลังเพื่อทดแทนสารประกอบโปรตีนในอาหารแพะเนื้อ

(Single cell protein production from cassava pulp to replace protein in meat goat diets)

เอกรัฐ คำเจริญ หัวหน้าโครงการวิจัย

สุปรีณา ศรีใสคำ ผู้ร่วมโครงการวิจัย

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้

จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560

มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 545182

สัญญาเลขที่ 007/2560

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย เรื่อง การผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากกากมันสำปะหลัง เพื่อทดแทนสารประกอบโปรตีนในอาหารแพะเนื้อ

(Single cell protein production from cassava pulp to replace protein in meat goat diets)

เอกรัฐ คำเจริญ หัวหน้าโครงการวิจัย

สุปรีณา ศรีใสคำ ผู้ร่วมโครงการวิจัย

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ 2560 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 007/2560

Acknowledgment

This work was financially supported by the Research Grant of Burapha University through National Research Council of Thailand (Grant no. 007/2560)

บทคัดย่อ

กากมันสำปะหลังเป็นวัสดุเศษเหลือจากโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลังซึ่งสามารถใช้เป็นวัตถุดิบในสร้างผลิตภัณฑ์เพิ่มมูลค่าผ่านกระบวนการหมัก กากมันสำปะหลังประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรตซึ่งสามารถเปลี่ยนเป็นน้ำตาลด้วยการไฮโดรไลซิสและนำไปผลิตเป็นอาหารสัตว์โปรตีนสูงได้ การศึกษาความสามารถในการย่อยกากมันสำปะหลังภายใต้สภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบแห้งของ *Aspergillus oryzae* TISTR 3102 และ *Rhizopus oryzae* TISTR 3522 พบว่า *A. oryzae* สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลส 69.53 U/g CP เอนไซม์ย่อยแป้งดิบ 19.06 U/g CP โปรตีน 27.35 mg/g CP และน้ำตาลรีดิวซ์ 47.07 mg/g CP ซึ่งมากกว่า *R. oryzae* ซึ่งผลิตเอนไซม์อะไมเลส 17.89 U/g CP เอนไซม์ย่อยแป้งดิบ 6.60 U/g CP โปรตีน7.59 mg/g CP และน้ำตาลรีดิวซ์ 2.77 mg/g CP ตามลำดับ การศึกษาการเพิ่มปริมาณโปรตีนในกากมันสำปะหลังเพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์ด้วยการหมักแบบแห้งโดยการเลี้ยงรา *A. oryzae* ร่วมกับยีสต์ชนิดต่างๆ ได้แก่ *C. tropicalis* TISTR 5136, *C. utilis* TISTR 5032 and *S. cerevisiae* TISTR 5598 พบว่า การเลี้ยง *A. oryzae* ร่วมกับ *S. cerevisiae* ทำให้กากมันสำปะหลังมีปริมาณโปรตีนร้อยละ 2.9 ซึ่งมากกว่าการเลี้ยง *A. oryzae* ร่วมกับยีสต์ชนิดอื่น การเลือกปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณโปรตีนของการหมักมันสำปะหลังแบบแห้งด้วย *A. oryzae* ร่วมกับ *S. cerevisiae* โดยใช้การออกแบบการทดลองด้วย Plackett-Burman พบว่าระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ รำข้าว ยูเรีย แอมโมเนียมคลอไรด์ และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ให้ผลเชิงบวกต่อปริมาณโปรตีน จากการทดลองพบว่าปริมาณโปรตีนสูงสุดที่ได้คือร้อยละ 6.64 ซึ่งเพิ่มขึ้น 3.69 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับกากมันสำปะหลังแห้ง

การศึกษาเปรียบเทียบผลการทดแทนกากมันสำปะหลังหมักยีสต์ด้วยในสูตรอาหารข้น 16%CP ที่ระดับ 0, 10, 20 และ 30% (DM basis) ต่อกระบวนการหมักในรูเมนและสมรรถนะการผลิตของแพะเนื้อ การศึกษาครั้งนี้ประกอบด้วย 1 การศึกษาเบื้องต้น และ 1 การทดลอง คือ 1.1) การศึกษาเบื้องต้นถึงองค์ประกอบทางเคมี พบว่า คุณค่าทางโภชนะของกากมันสำปะหลังมีองค์ประกอบทางเคมีเหมาะสมที่จะนำมาเป็นวัตถุดิบแหล่งพลังงานในสูตรอาหารได้ 1.2) การทดลองที่ 1 ศึกษาผลการใช้กากมันสำปะหลังหมักที่มีคุณภาพในแต่ละระดับของสูตรอาหารข้นแพะเนื้อต่อกระบวนการหมักในรูเมนและสมรรถนะการผลิต จัดแผนการทดลองแบบ Random Complete Block Design (RCBD) ใช้แพะเนื้อลูกผสมพันธุ์พื้นเมืองและแองโกลนูเบียน จำนวน 16 ตัว อายุประมาณ 1-2 ปี น้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้นประมาณ 12-13 กิโลกรัม โดยมีการบันทึกน้ำหนักตัวก่อนเริ่มเข้างานทดลอง ระยะเวลาทดลอง 90 วัน ปรับสัตว์เป็นระยะเวลา 10 วัน โดยที่กลุ่มการทดลองที่ 1 (อาหารกลุ่มควบคุม) กลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรควบคุม (อาหารข้นผสมสำเร็จรูป 16% โปรตีน (CP)) ร่วมกับอาหารหยาบ คือ อัลฟาฟ่าแห้งชนิดอัดเม็ดแบบเต็มที่ โดยไม่มีการให้กากมันสำปะหลังโปรตีนสูง และกลุ่มที่ 2, 3 และ 4 (อาหารกลุ่มควบคุม) (อาหารข้นผสมสำเร็จรูป 16%CP) ทดแทนด้วยกากมันสำปะหลังโปรตีนสูงในสูตรที่ระดับ 10, 20 และ 30% (DM basis) ร่วมกับอาหารหยาบ คือ อัลฟา

ฟ่าแห้งชนิดอัดเม็ดแบบเต็มที่ พบว่า แพะกลุ่มที่ได้รับกากมันสำปะหลังหมักยีสต์ทดแทนในสูตรอาหารข้นเพียงระดับ 20% (DM basis) สามารถกระตุ้นการเพิ่มน้ำหนักตัวได้สูงกว่ากลุ่มที่ได้รับกากมันสำปะหลังหมักยีสต์ทดแทนในสูตรอาหารข้นที่ระดับ 30% (DM basis) กระตุ้นและปรับสมดุลจุลินทรีย์ในกระเพาะหมัก โดยไม่ส่งผลกระทบในเชิงลบต่อสมรรถนะการผลิต

คำสำคัญ: กากมันสำปะหลัง, การหมัก, การเพิ่มโปรตีนในอาหารสัตว์, *Aspergillus oryzae*, *Saccharomyces cerevisiae*

Abstract

Cassava pulp is the major solid residues as a byproduct of cassava starch manufacturing which was used as substrate for animal feedstock. The cassava pulp containing carbohydrate can be converted to sugar by hydrolysis process and further produced protein-enriched feed. In this study, *Aspergillus oryzae* TISTR 3102 and *Rhizopus oryzae* TISTR 3522 were compared for use in the hydrolysis process under solid state cultivation. The result showed that *A. oryzae* gave higher amylase (69.53 U/g CP), raw starch digesting enzyme (19.06 U/g CP), protein (27.35 mg/g CP), and reducing sugar yield (47.07 mg/g CP) than *R. oryzae* releasing of 17.89 U/g CP, 6.60 U/g CP, 7.59 mg/g CP and 2.77 mg/g CP, respectively. Evaluation of the protein-enrichment feed produced by solid state fermentation (SSF) of the cassava pulp using co-culture cultivation of *A. oryzae* and various yeasts (*C. tropicalis* TISTR 5136, *C. utilis* TISTR 5032 and *S. cerevisiae* TISTR 5598) was carried out. The protein content of the fermented cassava pulp from a co-culture of *A. oryzae* and *S. cerevisiae* was highest (2.9%, w/w) among the examined strains. The screening of ten factoring affecting on protein content through solid state co-fermentation of cassava pulp using *A. oryzae* and *S. cerevisiae* was achieved using Plackett-Burman design (PBD). The result showed that incubation time, rice bran, urea, NH_4Cl and KH_2PO_4 gave the positive effect on soluble and insoluble protein content. The maximum protein yield of 6.64% was achieved from the experiment which reflects about 3.69 fold comparing to dried cassava pulp.

The present research aimed to study the supplementation of fermented cassava pulp with yeast of concentrate for crossbred meat goats (Native x Anglo Nubian). This study comprised 1 sections and 1 research experiment. The first section was conducted to determine the preliminary study of chemical composition, increasing protein in cassava pulp using *A. oryzae* and *S. cerevisiae*. The latter section was designed to investigate in the experiments. The experiment aimed to determine a suitable method of fermenting cassava pulp using fungi and yeasts. The results showed that the nutritional value of fermented cassava pulp has the appropriate chemical composition to be used as a source of energy in the diet. The experiment was carried out to investigate the effect of different level of fermented cassava pulp in concentrates diets on rumen fermentation and productive performances of meat goat.

This experiment was designed in Random Complete Block Design. Sixteen crossbred meat goats (Native x Anglo Nubian), averaging 1 to 2 years old and average 12 to 13 kg body weight that was recorded live weight (LW) before the start of the trial. The experiment lasted 90 days that the first 10 days were considered as adaptation period. The first group was fed 0% fermenting cassava pulp concentrate, the second, third and fourth group were fed 10, 20 and 30% fermenting cassava pulp (DM basis) concentrate respectively. All goats received *ad libitum* alfalfa dehydrated pellet as roughage were individually fed each treatment. The present study clearly indicates that fed 20% fermented cassava pulp could effectively replace concentrate, significantly higher than that of 30% fermented cassava pulp (DM basis), and also stimulate and balance microorganisms in rumen ecology with negatively affect the productive performances.

Keywords: *Aspergillus oryzae*, cassava pulp, fermentation, protein enrichment, *Saccharomyces cerevisiae*

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง	ซ
สารบัญภาพ	ฌ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	6
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	17
บทที่ 4 ผลและอภิปรายผลการวิจัย	30
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	63
ผลผลิต (output) ที่เกิดขึ้นในช่วงที่ได้รับทุน	64
รายงานการเงิน	70
เอกสารอ้างอิง	71
ประวัตินักวิจัย	78

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	พื้นที่เพาะปลูก พื้นที่เก็บเกี่ยว ผลผลิต และผลผลิตต่อไร่ ระหว่าง พ.ศ. 2552-2560	8
2.2	องค์ประกอบของกากมันสำปะหลัง	10
2.3	แผนการทดลองมาตรฐานที่คัดเลือก N-1 ปัจจัยในการทดลอง N ครั้ง	16
3.1	การกำหนดระดับต่ำ (-) และระดับสูง (+) ของปัจจัยที่ศึกษาและชนิดสารอาหารเพื่อใช้วางแผนการทดลองแบบ Plackett-Burman	20
3.2	แผนการทดลองในการเจริญของจุลินทรีย์ ปริมาณโปรตีน การผลิตเอนไซม์ ปริมาณของแข็งทั้งหมด และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์	21
4.1	องค์ประกอบเบื้องต้นของกากมันสำปะหลังแห้ง	30
4.2	ผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน จากการเลี้ยงเชื้อราร่วมกับยีสต์ในแต่ละการทดลอง	36
4.3	ผลการวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้วิธี Plackett-Burman ออกแบบการทดลองต่อปริมาณโปรตีนจากการเลี้ยงเชื้อราร่วมกับยีสต์	38
4.4	องค์ประกอบทางเคมีของอาหารข้นและอาหารหยาบ (Mean ± SD)	45
4.5	ปริมาณการกินได้ของแพะเนื้อที่ได้รับอาหารข้น และอาหารหยาบ	47
4.6	น้ำหนักตัว และน้ำหนักตัวที่เปลี่ยนแปลงตลอดระยะเวลาช่วง 30 วันแรก (ก)	49
4.6	น้ำหนักตัว และน้ำหนักตัวที่เปลี่ยนแปลงตลอดระยะเวลาช่วง 60 วันแรก (ข)	50
4.7	ความสามารถในการย่อยได้ของโภชนะ	52
4.8	ประชากรจุลินทรีย์ในกระเพาะหมัก	53
4.9	ค่า Rumen-pH และปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจนในกระเพาะหมักของแพะเนื้อที่ได้รับกากมันสำปะหลังหมักยีสต์ทดแทนในสูตรอาหารข้นทั้ง 4 สูตร ณ เวลา 0 และ 4 ชั่วโมง หลังการให้อาหาร	55
4.10	ค่าความเข้มข้นของกรดไขมันระเหยได้ของของเหลวจากกระเพาะหมักของที่ได้รับกากมันสำปะหลังหมักยีสต์ทดแทนในสูตรอาหารข้นทั้ง 4 สูตร ณ เวลา 0 และ 4 ชั่วโมง หลังการให้อาหาร	58
4.11	ค่า Blood Urea Nitrogen ของแพะเนื้อที่ได้รับกากมันสำปะหลังหมักยีสต์ทดแทนในสูตรอาหารข้นทั้ง 4 สูตร ณ เวลา 0, 3, 6 และ 9 ชั่วโมง หลังการให้อาหาร	60

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz)	7
2.2	กระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลังแบบมาตรฐาน	9
3.1	ตัวอย่างกากมันสำปะหลัง	17
3.2	ตัวอย่างกากมันสำปะหลังภายหลังจากการหมักเป็นเวลา 7 วัน	18
3.3	วัตถุดิบและส่วนผสมที่ใช้สำหรับการหมักกากมันสำปะหลัง	22
3.4	ระแนงไม้ที่ใช้ตีผนังระหว่างคอก (ตีไม้ในแนวตั้ง) ห่างกัน 5 cm.	25
3.5	คอกทดลองเดี่ยวภายในฟาร์มแพะ มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสระแก้ว	25
3.6	ขนาดพื้นที่คอกเดี่ยวของแพะทดลอง	26
4.1	ผลของชนิดเชื้อราต่อการผลิตเอนไซม์ amylase	32
4.2	ผลของชนิดเชื้อราต่อการผลิต raw starch digesting enzyme	32
4.3	ผลของเชื้อราต่อการเปลี่ยนแปลงของน้ำตาลรีดิวซ์เมื่อบ่มเป็นเวลา 7 วัน	33
4.4	ผลของเชื้อราต่อการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนเมื่อบ่มเป็นเวลา 7 วัน	33
4.5	ผลของการเลี้ยงเชื้อเดี่ยวและการเลี้ยงเชื้อร่วมต่อการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนเมื่อบ่มเป็นเวลา 7 วัน (**AO**, *A. oryzae*; **CT**, *C. tropicalis*; **CU**, *C. utilis*; **SC**, *S. cerevisiae*; **AO-CT**, *A. oryzae* ร่วมกับ *C. tropicalis*; **AO-CU**, *A. oryzae* ร่วมกับ *C. utilis*; **AO-SC**, *A. oryzae* ร่วมกับ *S. cerevisiae*)	35
4.6	อิทธิพลของปัจจัยที่มีผลกระทบต่อปริมาณโปรตีนที่ไม่ละลาย (a) และโปรตีนที่ละลายได้ (b) เมื่อเลี้ยงรา *A. oryzae* ร่วมกับยีสต์ *S. cerevisiae* ตามแผนการทดลองแบบ Plackett-Burman (**A**, moisture content; **B**, inoculum size; **C**, yeast concentration; **D**, yeast inoculation time; **E**, time; **F**, rice bran; **G**, urea; **H**, NH_4Cl; **I**, $CaCl_2$; **J**, KH_2PO_4)	36
4.7	กากมันสำปะหลังก่อน (a) และหลังการหมักด้วยราร่วมกับยีสต์ (b)	41
4.8	ค่า Blood Urea Nitrogen ของแพะเนื้อ (รายตัว) ที่ได้รับกากมันสำปะหลังหมักยีสต์ทดแทนในสูตรอาหารข้น ณ เวลา 0, 3, 6 และ 9 ชั่วโมง หลังการให้อาหาร Z (BUN= Blood urea nitrogen, T= Treatment, R= Replication, mg/dl= milligram per deciliter)	61

บทที่ 1
บทนำ (Introduction)

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

เกษตรกรผู้เลี้ยงแพะเนื้อมักจะประสบปัญหาการขาดแคลนอาหารหยาบคุณภาพสูงในช่วงฤดูแล้ง ส่งผลกระทบอย่างรุนแรงต่อการให้ผลผลิต คุณภาพ ตลอดจนสุขภาพของแพะ ทั้งนี้ความต้องการในการให้ผลผลิตของแพะยังคงมีความต้องการโปรตีน และพลังงานที่เหมาะสม ในส่วนของโปรตีนนั้น จำเป็นต้องได้รับอาหารโปรตีน เพื่อย่อยและดูดซึมในสำไส้เล็ก ในระดับที่สูงเพื่อนำไปใช้เป็นการให้ผลผลิตที่มีคุณภาพต่อไป

ปัจจุบันพบว่าระบบการผลิตสัตว์เคี้ยวเอื้องในประเทศไทยตั้งแต่ต้นน้ำจนถึงปลายน้ำประสบกับปัญหาต้นทุนการผลิตมีแนวโน้มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง ส่วนหนึ่งมาจากราคาน้ำมันมีแนวโน้มพุ่งสูงขึ้นเรื่อยๆ ส่งผลให้วัตถุดิบที่ใช้เป็นอาหารสัตว์ถูกนำไปใช้เป็นแหล่งพลังงานทดแทนในภาคอุตสาหกรรม ส่งผลกระทบโดยตรงต่อเกษตรกรที่เลี้ยงสัตว์รายย่อยและรายกลางเป็นอย่างมาก จึงต้องปรับตัวเพื่อลดต้นทุนการผลิต โดยมุ่งเน้นที่การใช้วัตถุดิบที่มีอยู่ในปริมาณมาก หาง่ายในท้องถิ่น และราคาถูก โดยเฉพาะอย่างยิ่งกากมันสำปะหลัง ซึ่งเป็นวัสดุเศษเหลือทางอุตสาหกรรมเกษตรที่ได้จากมันสำปะหลัง ซึ่งมันสำปะหลังจัดเป็นกลุ่มพืชเศรษฐกิจที่มีการปลูกมากในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ แม้ว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากมันสำปะหลัง อาทิเช่น แป้งมันสำปะหลัง มันเส้น กากมันสำปะหลัง และเปลือกมันสำปะหลัง จะให้พลังงานเพียงพอ แต่คุณค่าทางโภชนะประเภทโปรตีนนั้นต่ำมาก กากสำปะหลังเป็นแหล่งอาหารพลังงานที่มีคุณภาพในการใช้ในสูตรอาหารทั้งแพะเนื้อ (ไพบูลย์, 2551) และโคนม (เมธา และคณะ, 2540) จักรกริช (2555) รายงานว่าในกระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลัง ถ้าใช้มันสำปะหลัง 100 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้ได้กากมันสำปะหลัง 7 เปอร์เซ็นต์ จากข้อมูลของสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร ปี 2558 มีผลผลิตมันสำปะหลัง 32.3 ล้านตัน นั่นคือ จะมีกากมันสำปะหลังประมาณ 2.3 ล้านตัน ที่สามารถใช้เพื่อเป็นแหล่งพลังงานในอาหารสัตว์ อย่างไรก็ตาม การใช้วัสดุเศษเหลือทางอุตสาหกรรมเกษตร อย่างกากมันสำปะหลังให้เป็นแหล่งอาหารโปรตีน เพื่อใช้เป็นอาหารหยาบให้มีคุณภาพสูงยังคงมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษา เพื่อเพิ่มศักยภาพการนำไปใช้ประโยชน์ต่อการให้ผลผลิต การผลิตโปรตีนเซลล์เดียวในกากมันสำปะหลังเพื่อใช้เป็นสูตรอาหารของแพะเนื้อ จึงมีความเป็นไปได้และสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้สูง เนื่องจากกากมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบที่หาได้ง่าย ราคาค่อนข้างถูก อย่างไรก็ตาม ปริมาณโปรตีนในกากมันสำปะหลังมีปริมาณต่ำ ดังนั้น การเพิ่มระดับของโปรตีนให้กับกากมันสำปะหลังด้วยกระบวนการหมักจุลินทรีย์ก่อนใช้เป็นแหล่งโปรตีน จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่จะเพิ่มมูลค่าของกากมัน เพื่อให้กากมันสำปะหลังมีระดับโปรตีนสูงขึ้น ดังนั้นการศึกษาวิจัยในครั้งนี้จึงมุ่งเน้นที่จะศึกษาเกี่ยวกับระดับการใช้กากมันสำปะหลังหมักยีสต์ในอาหารแพะเนื้อที่เหมาะสมต่อกระบวนการหมักในรูเมนและสมรรถนะการผลิต

2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

2.1 เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากกากมันสำปะหลัง

2.2 เพื่อศึกษาการใช้โปรตีนเซลล์เดียวจากกากมันสำปะหลังที่มีคุณภาพในแต่ละระดับของสูตรอาหารข้นแพะเนื้อ ต่อการกินได้และสมรรถนะการผลิต

3. ขอบเขตของโครงการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้มุ่งเน้นที่จะศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากกากมันสำปะหลัง และเพื่อเปรียบเทียบผลของระดับการใช้โปรตีนเซลล์เดียวในกากมันสำปะหลังที่ระดับ 0%, 25%, 50% และ 75% ในสูตรอาหารข้นต่อปริมาณการกินได้ (feed intake) อัตราการเจริญเติบโต (average daily gain, ADG) และค่าชีวเคมีในเลือด (blood metabolite) ในแพะเนื้อ (เพศผู้ลูกผสมพื้นเมืองและแองโกลนูเบียน ระดับเลือด 75% ขึ้นไป)

4. ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวคิดของการวิจัย

4.1 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

การใช้ประโยชน์จากกากมันสำปะหลังในกระบวนการผลิตทางชีวภาพจำเป็นต้องมีการเปลี่ยนโครงสร้างขนาดใหญ่ในรูปโพลิเมอร์ไปเป็นโครงสร้างขนาดเล็กในรูปของโมโนเมอร์เพื่อง่ายต่อการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพในกระบวนการต่อไป การใช้กรดในการย่อยวัสดุเศษเหลือเป็นวิธีหนึ่งที่นิยมใช้ เนื่องจากมีค่าใช้จ่ายในการดำเนินการ และใช้ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาน้อยกว่าวิธีการอื่น ปัจจัยที่มีผลกระทบต่อกระบวนการย่อยด้วยกรด ได้แก่ วิธีการทางกายภาพที่ใช้ร่วมกับกรด ชนิดของกรด ความเข้มข้น อุณหภูมิ และเวลาในการทำปฏิกิริยา

ในปัจจุบันธุรกิจการเลี้ยงแพะเนื้อภายในประเทศไทยกำลังกลับมาได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก อีกทั้งทางภาครัฐยังได้สนับสนุนให้เกษตรกรมีการเลี้ยงแพะเนื้อตามแนวแผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ ซึ่งมุ่งพัฒนาเกษตรตามแนวทฤษฎีคู่ขนาน โดยพัฒนาเศรษฐกิจรากหญ้าควบคู่ไปกับการพัฒนาเศรษฐกิจเพื่อการแข่งขัน เน้นเกษตรกรเป็นศูนย์กลางและเพื่อทดแทนการนำเข้าจากต่างประเทศเป็นมูลค่าหลายพันล้านบาทต่อปี สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร (2557) รายงานว่า มีการนำเข้าแพะในช่วงปี 2550-2554 คิดเป็นมูลค่านำเข้าเพิ่มขึ้น ร้อยละ 14.12 ต่อปี โดยเฉพาะอย่างยิ่งภาคใต้ของประเทศไทยซึ่งมีผู้นับถือศาสนาอิสลามร้อยละ 76.89 ของผู้นับถือศาสนาอิสลามในประเทศไทย ทำให้ภาคใต้เป็นแหล่งบริโภคแพะเนื้อที่สำคัญ นอกจากความต้องการบริโภคแพะเนื้อจะกระจายตามแหล่งที่อยู่อาศัยของผู้นับถือศาสนาอิสลามแล้ว ยังกระจายไปตามเมืองใหญ่ และแหล่งท่องเที่ยวที่สำคัญอีกด้วย ทำให้ปัจจุบันมีปริมาณแพะเนื้อไม่เพียงพอต่อความต้องการ โดยเฉพาะช่วงเดือนที่มีพิธีกรรมทางศาสนาอิสลามและฤดูกาลท่องเที่ยว ทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของธุรกิจการเลี้ยงแพะเนื้อ เมื่อมีธุรกิจการเลี้ยงแพะเนื้อเพิ่มขึ้น ส่งผลต่อความต้องการอาหารเพื่อเลี้ยงแพะเนื้อเพิ่มขึ้น

เช่นกัน จากปัญหาการขาดแคลนวัตถุดิบอาหารสัตว์ทำให้วัตถุดิบอาหารสัตว์หลายอย่างมีราคาที่สูงขึ้น เช่น ข้าวโพด และมันสำปะหลัง เพื่อเป็นการลดต้นทุนการผลิต จึงได้มีการนำเอาวัสดุเศษเหลือจากอุตสาหกรรมมาใช้เป็นวัตถุดิบอาหารสัตว์ อาทิเช่น กากหรือเปลือกมันสำปะหลัง เปลือกหุ้มเมล็ดถั่วเหลือง เป็นต้น กากมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบชนิดหนึ่งที่พบว่ามีศักยภาพเพียงพอที่จะนำมาเป็นแหล่งพลังงานในอาหารแพะเนื้อ

ในปัจจุบันมีการใช้วัสดุเศษเหลือทางการเกษตรเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว ได้แก่ การแปรรูปผลไม้ เช่น ส้ม มะม่วง กล้วย เป็นต้น ฟางต่างๆ เช่น ฟางข้างบาเล่ห์ ข้าวเจ้า ข้าวสาลี กากชานอ้อย และกากมันสำปะหลัง โดยการใช้จุลินทรีย์ต่างๆ เช่น ยีสต์ รา แบคทีเรีย และสาหร่าย (Nasseri *et al*., 2011) โดยเฉพาะยีสต์และรา มีข้อดีกว่าการใช้แบคทีเรียและสาหร่ายคือ มีองค์ประกอบของกรดนิวคลีอิกมากกว่า มีองค์ประกอบของกรดอะมิโนไลซีนสูง ไม่จำเป็นต้องมีการใช้แสง คาร์บอนไดออกไซด์ การควบคุมอุณหภูมิ (Hamdy, 2013) การเลี้ยงเชื้อแบบแห้ง หรือการเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง (Solid state fermentation, SFF) มีข้อดีเมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงเชื้อแบบเปียกหรือการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว (Submerged fermentation, SmF) คือ ไม่มีการปนเปื้อนจากแบคทีเรียชนิดอื่นเนื่องจากค่า water activity ที่ต่ำ กระบวนการผลิตจากกระบวนการหมักทำได้ง่ายเพราะมีความชื้นอยู่น้อย และมีของเสียที่ต้องกำจัดน้อยและใช้พลังงานน้อย (Sato and Sudo, 1999; Hosobuchi and Yoshikawa, 1999)

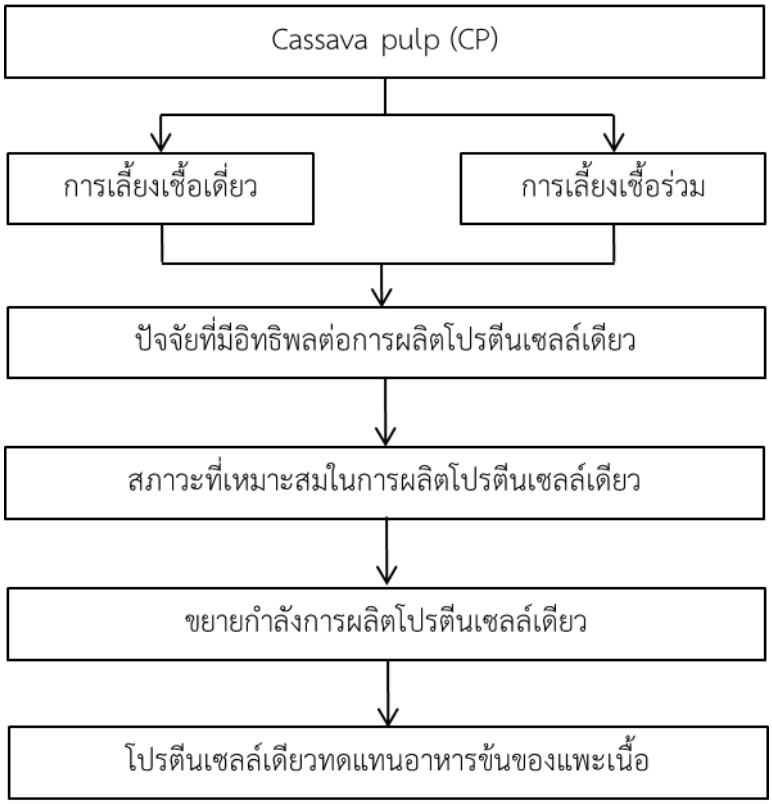
4.2 สมมุติฐาน

4.2.1 โปรตีนเซลล์เดียวในกากมันสำปะหลังภายหลังจากการหมักมีโปรตีนสูงขึ้น

4.2.2 โปรตีนเซลล์เดียวในกากมันสำปะหลังมีประสิทธิภาพเหมาะสมนำไปใช้เป็นวัตถุดิบโปรตีนและพลังงานในอาหารข้นสำหรับเลี้ยงแพะเนื้อ

4.2.3 โปรตีนเซลล์เดียวในกากมันสำปะหลังที่ทดแทนในสูตรอาหารข้นสามารถเพิ่มสมรรถนะการผลิตแพะเนื้อ

4.3 กรอบแนวคิดของการวิจัย



5. วิธีดำเนินการวิจัยโดยสรุป

5.1 การศึกษาการใช้กากมันสำปะหลังเป็น substrates ในการผลิต protein-enriched feed ระดับ lab-scale

5.1.1 เก็บตัวอย่างกากมันสำปะหลังเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการทดลอง โดยใช้ตัวอย่างกากมันสำปะหลัง จากโรงงานเอี่ยมบูรพา จำกัด

5.1.2 ศึกษาผลของการเลี้ยงเชื้อเดียวและการเลี้ยงเชื้อร่วมในกากมันสำปะหลังต่อปริมาณโปรตีน

5.1.3 ศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อปริมาณโปรตีน

5.1.4 เลือกปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว

5.1.5 ศึกษาผลของการขยายกำลังการผลิต

5.1.6 ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของกากมันสำปะหลังก่อนและหลังการ

5.2 การศึกษาการใช้กากมันสำปะหลังเป็น substrates ในการผลิต protein-enriched feed ระดับ farm-scale

5.2.1. สัตว์ทดลองและแผนการทดลอง

แพะเนื้อที่ใช้ในการทดลองเป็นแพะเนื้อลูกผสมพันธุ์พื้นเมืองและแองโกลนูเบียน จำนวน 16 ตัว ตัว เพศผู้ อายุ 2 ปี น้ำหนักเฉลี่ยประมาณ 25-30 กิโลกรัม วางแผนการทดลองสุ่มแบบบล็อก

(Random Complete Block Design, RCBD) โดยแบ่งแพะออกเป็น 4 กลุ่มการทดลอง กลุ่มละ 4 ตัว Block น้ำหนักตัวเริ่มต้นและสุ่มสิ่งทดลองทั้ง 4 กลุ่มการทดลอง ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ได้รับอาหารหยาบคุณภาพดี ร่วมกับอาหารข้นที่ไม่มีกากมันสำปะหลังโปรตีนสูง

กลุ่มที่ 2 ได้รับอาหารหยาบคุณภาพดี ร่วมกับอาหารข้นที่มีกากมันสำปะหลังโปรตีนสูงในสูตรที่ระดับ 10% (DM basis)

กลุ่มที่ 3 ได้รับอาหารหยาบคุณภาพดี ร่วมกับอาหารข้นที่มีกากมันสำปะหลังโปรตีนสูงในสูตรที่ระดับ 20% (DM basis)

กลุ่มที 4 ได้รับอาหารหยาบคุณภาพดี ร่วมกับอาหารข้นที่มีกากมันสำปะหลังโปรตีนสูงในสูตรที่ระดับ 30% (DM basis)

5.2.2 วิธีการเก็บรวบรวมขอมูล

1) ชั่งน้ำหนักแพะทดลองทุกๆ 2 สัปดาห์ของระยะทดลอง โดยบันทึกการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัว

2) บันทึกการใหอาหารหยาบและสวนที่เหลือในแตละวัน

3) สุมเก็บตัวอยางอาหารที่ให้และอาหารที่เหลือในแตละทรีตเมนตทุกๆ 2 สัปดาห ของการทดลอง

4) สุ่มเก็บมูลในสัปดาห์สุดท้ายของการทดลอง

5) การวัดและการสุมเก็บตัวอยางของเหลวจาก rumen fluid โดยวัดค่าความเปนกรด-ดาง (pH) วิเคราะหหาองคประกอบทางเคมีซึ่งเปนผลผลิตสุดท่ายที่ไดจากกระบวนการหมัก และตรวจนับประชากรจุลินทรีย

6) การเก็บตัวอยางเลือด เพื่อวิเคราะหหาคายูเรียในกระแสเลือด (blood urea nitrogen, BUN)

6. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

6.1 วิธีการและสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากกากมันสำปะหลัง

6.2 สามารถนำโปรตีนเซลล์เดียวจากกากมันสำปะหลังมาใชเปนวัตถุดิบแหลงพลังงานและโปรตีนในอาหารขนเลี้ยงแพะเนื้อได้

6.3 ทราบถึงประสิทธิภาพการใช้ประโยชน์ของโปรตีนเซลล์เดียวจากกากมันสำปะหลังในสูตรอาหารข้นที่มีคุณภาพเหมาะสมต่อกระบวนหมักในรูเมนและสมรรถนะการผลิตของแพะเนื้อ

6.4 เกษตรกรสามารถนำโปรตีนเซลล์เดียวจากกากมันสำปะหลังไปใช้ได้ในระดับฟาร์มแพะเนื้อได้จริงและต่อยอดองค์ความรู้นี้สู่ชุมชนใกล้เคียงได้

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. สถานการณ์การเลี้ยงแพะเนื้อในประเทศไทย

ในปัจจุบันธุรกิจการเลี้ยงแพะเนื้อภายในประเทศไทยกำลังกลับมาได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก อีกทั้งทางภาครัฐยังได้สนับสนุนให้เกษตรกรมีการเลี้ยงแพะเนื้อตามแนวแผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ ซึ่งมุ่งพัฒนาเกษตรตามแนวทฤษฎีคู่ขนาน โดยพัฒนาเศรษฐกิจรากหญ้าควบคู่ไปกับการพัฒนาเศรษฐกิจเพื่อการแข่งขัน เน้นเกษตรกรเป็นศูนย์กลางและเพื่อทดแทนการนำเข้าจากต่างประเทศเป็นมูลค่าหลายพันล้านบาทต่อปี สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร (2557) รายงานว่า มีการนำเข้าแพะในช่วงปี 2550-2554 คิดเป็นมูลค่านำเข้าเพิ่มขึ้น ร้อยละ 14.12 ต่อปี โดยเฉพาะอย่างยิ่งภาคใต้ของประเทศไทยซึ่งมีผู้นับถือศาสนาอิสลามร้อยละ 76.89 ของผู้นับถือศาสนาอิสลามในประเทศไทย ทำให้ภาคใต้เป็นแหล่งบริโภคแพะเนื้อที่สำคัญ นอกจากความต้องการบริโภคแพะเนื้อจะกระจายตามแหล่งที่อยู่อาศัยของผู้นับถือศาสนาอิสลามแล้ว ยังกระจายไปตามเมืองใหญ่ และแหล่งท่องเที่ยวที่สำคัญอีกด้วย ทำให้ปัจจุบันมีปริมาณแพะเนื้อไม่เพียงพอต่อความต้องการ โดยเฉพาะช่วงเดือนที่มีพิธีกรรมทางศาสนาอิสลามและฤดูกาลท่องเที่ยว ทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของธุรกิจการเลี้ยงแพะเนื้อ เมื่อมีธุรกิจการเลี้ยงแพะเนื้อเพิ่มขึ้น ส่งผลต่อความต้องการอาหารเพื่อเลี้ยงแพะเนื้อเพิ่มขึ้นเช่นกัน อย่างไรก็ตาม ในปัจจุบันพบว่าการผลิตสัตว์เคี้ยวเอื้อง อาทิ โคเนื้อ โคนม แพะและแกะในประเทศไทยในระยะหลังประสบกับปัญหาต้นทุนการผลิตมีแนวโน้มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากราคาน้ำมันยังคงสูงขึ้นเรื่อยๆ ส่งผลให้วัตถุดิบที่ใช้เป็นอาหารสัตว์หลายตัวมีราคาเพิ่มสูงขึ้น เช่น ข้าวโพด และมันสำปะหลัง และถูกนำไปใช้เป็นแหล่งพลังงานทดแทนประเภทอื่น ส่งผลให้เกษตรกรผู้เลี้ยงสัตว์ต้องปรับตัวเพื่อลดต้นทุนการผลิต โดยมุ่งเน้นที่การใช้วัตถุดิบที่มีมาก หาได้ง่ายในท้องถิ่นและมีราคาถูก เพื่อเป็นการลดต้นทุนการผลิต จึงได้มีการนำเอาวัสดุเศษเหลือจากอุตสาหกรรมมาใช้เป็นวัตถุดิบอาหารสัตว์ อาทิเช่น กากหรือเปลือกมันสำปะหลัง เปลือกหุ้มเมล็ดถั่วเหลือง เป็นต้น กากมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบชนิดหนึ่งที่พบว่ามีศักยภาพเพียงพอที่จะนำมาเป็นแหล่งพลังงานในอาหารแพะเนื้อ ซึ่งมันสำปะหลังถือเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีการปลูกมากในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือแม้ว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากมันสำปะหลัง ได้แก่ แป้งมันสำปะหลัง มันเส้น กากมันสำปะหลัง เปลือกมันสำปะหลัง จะให้พลังงานเพียงพอ แต่ยังมีคุณค่าทางอาหารต่ำ จึงจำเป็นต้องมีการพัฒนาเพื่อเพิ่มปริมาณโปรตีนในมันสำปะหลัง ซึ่งเป็นทางเลือกหนึ่งที่จะเพิ่มมูลค่าของผลิตภัณฑ์ protein - enriched feedstuffs เพื่อนำไปพัฒนาเป็นอาหารสัตว์ที่มีคุณค่าทางอาหารสูงแต่มีราคาต้นทุนต่ำ

ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้ จึงมีแนวคิดศึกษาใช้กากมันสำปะหลังหมักยีสต์ในระดับต่างๆ ในสูตรอาหารข้นของแพะเนื้อลูกผสมพันธุ์พื้นเมืองและแองโกลนูเบียนต่อการกินได้ กระบวนการหมักในกระเพาะรูเมน และสมรรถนะการผลิต ซึ่งเป็นการนำสิ่งเหลือทิ้งจากการภาคอุตสาหกรรมเกษตรใน

ท้องถิ่น มาใช้ประโยชน์ในการลดต้นทุนค่าอาหารและทดแทนการใช้วัตถุดิบประเภทพลังงานและโปรตีนที่มีราคาแพงอย่างกากถั่วเหลืองเพื่อแก้ไขปัญหาดังกล่าวโดยไม่ส่งผลอันตรายเชิงลบต่อการผลิตสัตว์

2. มันสำปะหลัง

มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz) (รูปที่ 2.1) เป็นผลิตผลทางการเกษตรที่สำคัญของประเทศไทย เนื่องจากสามารถแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ได้หลายชนิด สำหรับอุตสาหกรรมมันสำปะหลังของประเทศไทยแบ่งออกเป็น มันเส้น มันเม็ด และแป้งมัน ซึ่งการแปรรูปในอุตสาหกรรมการผลิตแป้งมันสำปะหลัง นอกจากจะมีการใช้น้ำในปริมาณมากในกระบวนการผลิตแล้ว ยังมีวัสดุเศษเหลือทั้งจากภาคเกษตรกรรมและภาคอุตสาหกรรม ได้แก่ เหง้า ใบ ลำต้น เปลือกดิน เปลือกล้าง และกากมันสำปะหลัง กากมันสำปะหลังเป็นวัสดุเศษเหลือที่มีปริมาณมากที่สุด สามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในกระบวนการผลิตทางชีวภาพ เช่น เอทานอล (Apiwatanapiwat *et al*., 2013; Virunanon *et al*., 2013; Poonsrisawat *et al*., 2014; Hermiati *et al*., 2014; Sudha *et al*., 2015) กรดแลกติก (Thongchul *et al*., 2010) โปรตีนเซลล์เดียว (Anbuselvi *et al*., 2014) และไฮโดรเจน (Phowan *et al*., 2014) เป็นต้น อย่างไรก็ตามการใช้ประโยชน์จากกากมันสำปะหลังในกระบวนการผลิตทางชีวภาพจำเป็นต้องมีการเปลี่ยนโครงสร้างขนาดใหญ่ในรูปโพลิเมอร์ไปเป็นโครงสร้างขนาดเล็กในรูปของโมโนเมอร์เพื่อง่ายต่อการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพในกระบวนการต่อไป

ภาพที่ 2.1 มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz)
ที่มา http://agropro.international/cassava/

3. อุตสาหกรรมผลิตแป้งมันสำปะหลัง

อุตสาหกรรมผลิตแป้งมันสำปะหลังเป็นอุตสาหกรรมการเกษตรประเภทหนึ่งที่มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจของประเทศไทย แป้งมันสำปะหลังสกัดจากหัวมันสำปะหลัง ซึ่งเป็นพืชที่ทนต่อความแห้งแล้งได้ดี และสามารถปลูกได้ในดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำซึ่งพืชชนิดอื่นๆ เติบโตได้ยาก หัวมัน

สำปะหลังสามารถเก็บไว้ในดินได้นานถึง 24 เดือน บางสายพันธุ์สามารถเก็บได้นานถึง 36 เดือน ดังนั้นเกษตรกรจึงสามารถขยายเวลาเก็บเกี่ยวได้นานถึงช่วงเวลาที่มีความเหมาะสมทางด้านการตลาดหรือการผลิต (กรมโรงงานอุตสาหกรรม, 2549) จากข้อมูลของสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร ปี 2558 มีผลผลิตมันสำปะหลัง 32.3 ล้านตัน มูลค่า 68,922 ล้านบาท นั่นคือ จะมีกากมันสำปะหลังประมาณ 2.3 ล้านตัน ดังแสดงในตารางที่ 2.1

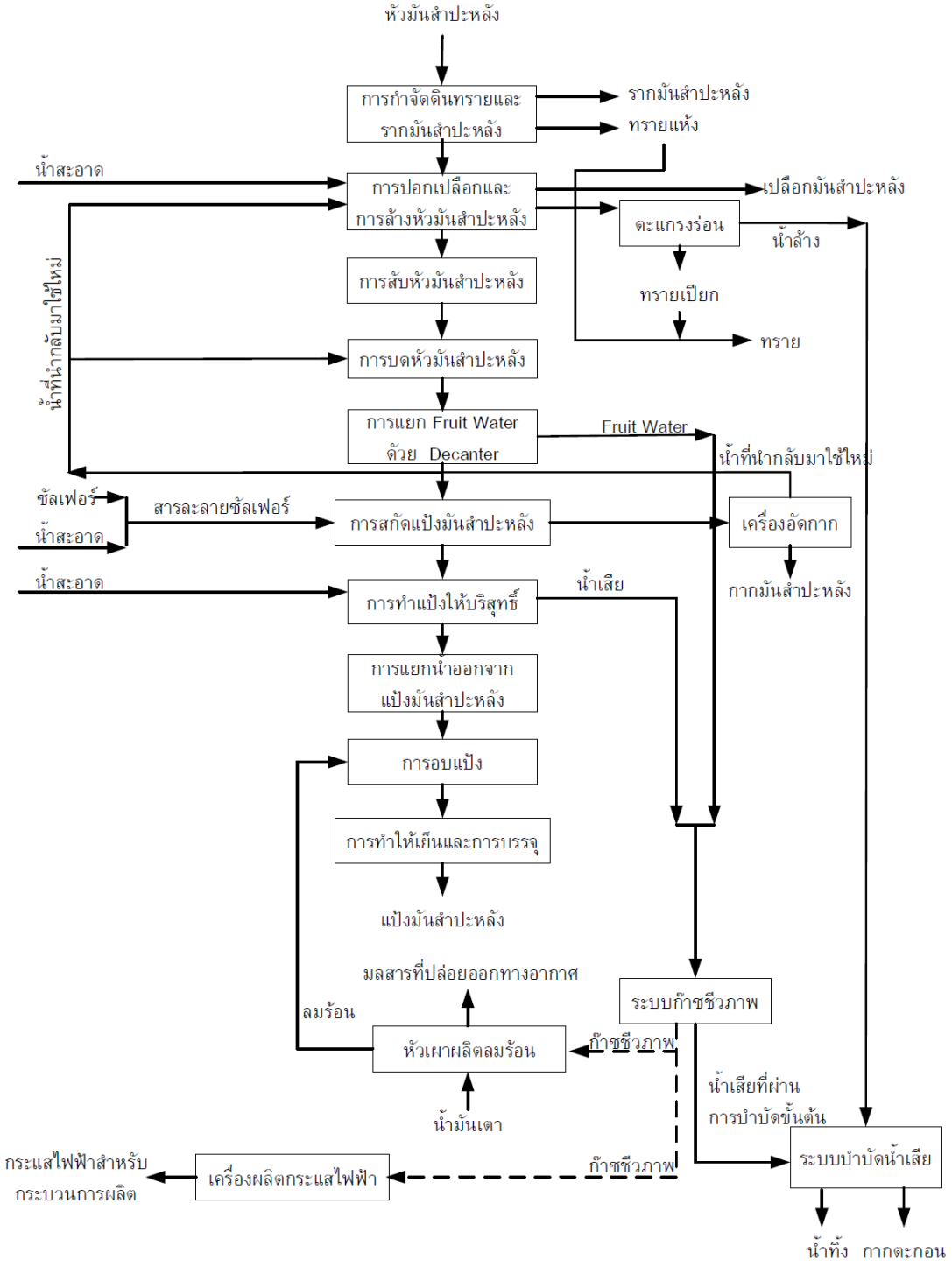
ตารางที่ 2.1 พื้นที่เพาะปลูก พื้นที่เก็บเกี่ยว ผลผลิต และผลผลิตต่อไร่ ระหว่าง พ.ศ. 2552-2560

ปี	เนื้อที่เพาะปลูก (ไร่)	เนื้อที่เก็บเกี่ยว (ไร่)	ผลผลิต (ตัน)	ผลผลิตต่อไร่ (กก.)	ราคาต่อกิโลกรัม (บาทต่อ กก.)	มูลค่า (ล้านบาท)
2551	7,750,413	7,397,098	25,155,797	3,401	1.73	43,520
2552	8,583,557	8,292,146	30,088,024	3,628	1.32	39,716
2553	7,668,659	7,405,168	22,005,740	2,972	2.25	49,513
2554	7,400,148	7,096,173	21,912,416	3,088	2.53	55,438
2555	9,242,398	8,513,242	29,848,491	3,506	2.07	61,786
2556	9,037,273	8,656,942	30,227,542	3,492	2.10	63,478
2557	8,975,865	8,431,223	30,022,052	3,561	2.18	65,448
2558	9,319,718	8,961,344	32,357,741	3,611	2.13	68,922
2559	9,315,012	9,065,277	31,161,103	3,437	1.59	48,587
2560	8,918,392	8,714,471	30,495,190	3,419	-	-

ที่มา: สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ (2552-2560)

4. กระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลัง

การสกัดแป้งจากหัวมันสำปะหลังโดยใช้น้ำเป็นตัวสกัด ซึ่งน้ำจะถูกแยกออกหรือระเหยไป คุณภาพของแป้งมันสำปะหลังจะขึ้นอยู่กับขั้นตอนการสกัดแป้งเป็นสำคัญ แผนผังกระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลังแสดงในรูปที่ 2.2 จากกระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลังจะได้วัสดุเศษเหลือที่เป็นของแข็ง ได้แก่ เปลือกมันสำปะหลัง (เปลือกล้าง เปลือกดิน) รากและเหง้ามันสำปะหลัง สามารถนำไปใช้เป็นปุ๋ย กากมันสำปะหลังซึ่งมีปริมาณมากที่สุดสามารถใช้เป็นอาหารสัตว์ และส่วนที่เป็นของเหลวได้แก่ น้ำล้างมันสำปะหลัง ซึ่งสามารถนำไปใช้เป็นแหล่งวัตถุดิบในการผลิตแก๊สชีวภาพได้



ภาพที่ 2.2 กระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลังแบบมาตรฐาน

ที่มา: กรมโรงงานอุตสาหกรรม (2549)

5. กากมันสำปะหลัง

จักรกริช (2555) รายงานว่าในกระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลังถ้าใช้มันสำปะหลัง 100 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้ได้กากมันสำปะหลัง 7 เปอร์เซ็นต์ จากข้อมูลของสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร ปี 2558 มีผลผลิตมันสำปะหลัง 32.3 ล้านตัน นั่นคือ จะมีกากมันสำปะหลังประมาณ 2.3 ล้านตัน ที่สามารถใช้เพื่อเป็นแหล่งวัตถุดิบในการผลิตผลิตภัณฑ์เพิ่มมูลค่าได้ จากตารางที่ 2.2 พบว่าในกากมันสำปะหลังมีปริมาณแป้งประมาณร้อยละ 56.00-79.45 เซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสประมาณร้อยละ 4.10-17.13 ซึ่งส่วนของแป้ง เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลสซึ่งเป็นพอลิแซกคาไรด์สามารถเปลี่ยนให้เป็นน้ำตาลเพื่อใช้ในกระบวนการหมักต่อไปได้

ตารางที่ 2.2 องค์ประกอบของกากมันสำปะหลัง

องค์ประกอบ (%)								เอกสารอ้างอิง
แป้ง	เซลลูโลส	เฮมิเซลลูโลส	ลิกนิน	โปรตีน	ไขมัน	เถ้า	เยื่อใย	
68.89	-	-	-	1.55	0.12	1.70	27.75	Sriroth *et al*., 2000
62.87	17.13	5.40	3.43	1.50	-	1.84	-	Poonsrisawat *et al*., 2014
75	4.1	4.2	1.15	-	-	-	-	Virunanon *et al*., 2013
56.0	-	-	-	5.3	0.1	1.2	35.9	Thongchul *et al*., 2010
-	-	-	-	2.03	0.13	7.38	12.28	เมฆ และคณะ 2553

กากมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบชนิดหนึ่งซึ่งมีรายงานว่าเป็นวัตถุดิบที่มีศักยภาพเพียงพอที่จะนำมาทำเป็นแหล่งพลังงานในอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้องได้ ยกตัวอย่างเช่น โคนม เนื่องจากกากมันสำปะหลังเป็นผลิตภัณฑ์หนึ่งที่ได้จากกระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลังเป็นปริมาณถึง 2.03-2.9 ล้านตัน/ปี ซึ่งถือว่ามีปริมาณมากพอจะนำมาใช้เป็นวัตถุดิบอาหารโคนมได้ นอกจากนี้ยังมีราคาถูกกว่าวัตถุดิบอาหารประเภทใกล้เคียงกัน เช่น รำข้าว ข้าวโพด เป็นต้น โดยคุณสมบัติของกากมันสำปะหลังที่ผ่านกระบวนการสกัดแป้งออกแล้วจะยังคงมีแป้งเหลืออยู่ประมาณ 64.6% ของน้ำหนักแห้ง ซึ่งตัวสัตว์จะสามารถย่อยและใช้ประโยชน์ได้ถึง 74% (สมเจต, 2530) นอกจากนี้ ชวนิศนดากร (2500) รายงานว่า กากมันสำปะหลังมีส่วนประกอบของคาร์โบไฮเดรตมากถึง 81% สามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบอาหารสัตว์ชนิดอื่นๆ ได้สูงถึง 20% อย่างไรก็ตาม ปริมาณแป้งที่เหลืออยู่สูงนั้นอาจส่งผลกระทบต่อสุขภาพของโคนม ซึ่งการที่โคนมได้รับอาหารประเภทแป้งและน้ำตาลในปริมาณที่สูงอาจจะส่งผลให้เกิดโรค Rumen acidosis (Hutjens, 1996) โดยจากรายงานของ Preston (2002) พบว่า

กากมันสำปะหลังมีคุณค่าทางโภชนะดังนี้ 2% Crude protein, 5% Crude fiber, 34% Neutral detergent fiber, 8% Acid detergent fiber, 0.8% ether extract และ 83% total digestibility nutrient ส่วนแป้งในมันสำปะหลังมีลักษณะเป็นแป้งอ่อนและมีอะไมโลเพคติน (amylopectin) เป็นองค์ประกอบมากกว่า 80% คุณสมบัติของแป้งอ่อนจะดูดซับน้ำไว้ในโมเลกุลอย่างรวดเร็ว (Reas, 1996) มีผนังเซลล์ต่ำไม่มีปัญหาเรื่องเยื่อใย หากใช้ในอาหารโคสามารถลดความเครียดเนื่องจากความร้อนได้ เนื่องจากกากมันสำปะหลังมีผนังเซลล์ที่ต่ำ ดังนั้นความร้อนที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมักโดยจุลินทรีย์ในกระเพาะหมักจะมีค่าต่ำไปด้วย กากมันสำปะหลังจัดว่าเป็นวัตถุดิบประเภทพลังงานเช่นเดียวกับข้าวโพด เพียงแต่กากมันสำปะหลังมีโปรตีนและไขมันอยู่ในระดับต่ำ (Khajarern et al., 1979) นอกจากนี้กากมันสำปะหลังนั้นมีลักษณะฟ่าม เมื่อผสมในสูตรอาหารเพิ่มขึ้นอาจทำให้สัตว์กินได้น้อยลง อาจส่งผลให้อัตราการเจริญเติบโตหรือผลผลิตลดลง แต่สามารถแก้ไขได้โดยใช้ร่วมกับกากน้ำตาล ซึ่งจะสามารถลดความเป็นฝุ่นได้

ขณะที่ Suksombat et al. (2006) ได้ทำการทดลองใช้กากมันสำปะหลังแห้งในการเลี้ยงโคนมลูกผสมโฮลสไตลน์ฟรีเซียนในระยะกลางของการให้นม 24 ตัว ออกเป็น 3 กลุ่มการทดลองโดยทุกกลุ่มการทดลองจะได้รับหญ้าหมักและอาหารอาหารข้นที่มีกากมันสำปะหลังในสูตร 35, 40 และ 45% ตามลำดับ และทำการบันทึกการกินได้ของโค การให้ผลผลิตน้ำนมของโคนม และสุ่มเก็บตัวอย่างน้ำนม นำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำนม พบว่า ปริมาณการกินได้ของโคนม พบว่าปริมาณการกินได้วัตถุแห้ง, ปริมาณการกินได้โปรตีน ปริมาณน้ำนม และองค์ประกอบทางเคมีของน้ำนมและน้ำหนักตัวและน้ำหนักตัวที่เปลี่ยนแปลง จากผลการทดลองพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้ง 3 กลุ่มการทดลอง ดังนั้นการใช้กากมันสำปะหลังในสูตรอาหารข้นจึงสามารถใช้ได้ในระดับที่สูงสุด คือ ระดับ 45 % อย่างไรก็ตามกากมันสำปะหลังนั้นมีโปรตีนที่ค่อนข้างต่ำ ทำให้การนำไปใช้นั้นควรคำนึงถึงแหล่งโปรตีนในสูตรอาหารควบคู่ไปด้วย Wanapat (2000) รายงานว่า มันกากสำปะหลังเป็นแหล่งของพลังงานที่สำคัญสำหรับจุลินทรีย์ที่จะนำไปใช้เป็นแหล่งของพลังงาน ซึ่งมีคุณสมบัติที่สามารถถูกย่อยสลายได้เร็วในกระเพาะหมักและสามารถใช้ประโยชน์ได้สูงสุดเมื่อใช้ร่วมกับแหล่งโปรตีนที่ถูกย่อยสลายได้เร็วส่งผลให้จุลินทรีย์ได้รับพลังงานและไนโตรเจนเพียงพอที่จะนำไปใช้ในกระบวนการสังเคราะห์เซลล์ของจุลินทรีย์ต่อไป นอกจากนี้ Martin et al., (2000) ยังพบว่า การเสริมสารอินทรีย์ Malate ร่วมในสูตรอาหารที่มีคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ใช่โครงสร้างเป็น องค์ประกอบในระดับสูงนั้นสามารถป้องกันความเป็นกรด-ด่าง ภายในกระเพาะหมักไม่ให้ต่ำเกินไป ช่วยทำให้จุลินทรีย์สามารถดำรงชีพและสังเคราะห์กรดไขมันระเหยได้เพิ่มขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่ง propionic acid ซึ่งมีความสำคัญต่อร่างกายสัตว์เพื่อนำไปใช้ในกระบวนการสร้างผลผลิต

ข้อจำกัดในการใช้วัตถุดิบจากมันสำปะหลังคือ มันสำปะหลังจะมีสารพิษลักษณะเป็นของเหลวสีขาวคล้ายนมในส่วนต่างๆ เช่นในกะเปาะใต้ผิวหรือใต้เปลือก สารพิษพวกนี้เป็นสารพิษจำพวกกรดไฮโดรไซยานิค (hydrocyanic acid, HCN) ความเป็นพิษของ HCN คือการเพิ่มอัตราการ

หายใจ การกระตุ้นการเต้นของชีพจร การกระตุกของกล้ามเนื้อ การเกิดความผิดปกติทางเคมีที่เกิดขึ้นจะกดประสาททำให้ระบบการหายใจบกพร่อง และทำให้ตายได้ โดย Sandage and Davis (1964) ได้รายงานระดับความเป็นพิษโดยทั่วๆ ไปของ HCN ไว้ดังนี้ HCN ที่ระดับ 0-250, 250-500, 500-750, 750-1000 และมากกว่า 1000 ppm (dry matter (DM) basis) พบว่า ความเป็นพิษอยู่ในระดับต่ำมาก, ต่ำ, กลางและการแสดงอาการของสัตว์ยังไม่เป็นที่แน่ชัด, สูง เป็นอันตรายต่อสัตว์ และสูงมาก เป็นอันตรายอย่างมากต่อตัวสัตว์ ตามลำดับ สำหรับวิธีการที่จะลดระดับ HCN ลงนั้น สามารถทำได้โดยการแปรรูปมันสำปะหลังโดยการฝานหัวมันให้เป็นชิ้นเล็กๆ แล้วผึ่งแดดประมาณ 2-3 แดด อบ คั่ว ต้ม แช่น้ำหรือหมัก ซึ่งในจำนวนวิธีการแปรรูปเหล่านี้การฝานมันให้เป็นแผ่นหรือนำกากมันสำปะหลังสดจากโรงงานมาผึ่งแดดให้แห้งเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพที่สุด เพราะที่อุณหภูมิต่ำกว่า 70ºC จะไม่ทำลายเอ็นไซม์เหมือนกับการอบ หรือต้มที่อุณหภูมิสูง เอ็นไซม์จึงยังสามารถทำปฏิกิริยากับไกลโคไซด์ได้นานกว่า และปลดปล่อย HCN ออกมาได้ปริมาณที่มากกว่าการอบหรือต้ม การตากมันสำปะหลังฝานหรือกากมันสำปะหลังสดบนลานตากให้ค่อยๆ แห้งอย่างช้าๆ จะช่วยปลดปล่อย HCN ออกไปได้มากกว่าทำให้มี HCN ในมันสำปะหลังแห้งต่ำกว่าการตากให้แห้งเร็ว (สาโรช, 2542)

6. โปรตีนเซลล์เดียว หรือ single cell protein (SCP)

SCP ถูกนำมาใช้ครั้งแรกในปี 1966 บัญญัติขึ้นโดยศาสตราจารย์ Wilson เป็นโปรตีนจากจุลินทรีย์ที่มีเซลล์เดียว (unicellular cell) (แบคทีเรีย ยีสต์ สาหร่าย บางชนิด) แต่ SCP รวมถึงจุลินทรีย์ที่มีหลายเซลล์ (multicellular cell) ได้แก่ สาหร่าย และรา โดย SCP ในอาหารสัตว์หลังช่วงคริสต์ทศวรรษที่ 1960–1970 ถูกลดความน่าสนในลงมาในระดับหนึ่ง เนื่องจากไม่คุ้มค่าทางเศรษฐกิจ และเทคโนโลยีในการสังเคราะห์ amino acid ชนิดต่างๆ มีความก้าวหน้ามากขึ้น ทำให้ช่วยประหยัดโปรตีนจากแหล่งธรรมชาติได้มากขึ้น อย่างไรก็ตามกระแสความตื่นตัวทางด้านสุขภาพของมนุษย์และแนวโน้มการเพิ่มความต้องการของโปรตีนสำหรับสัตว์เลี้ยงยังมีอยู่อย่างต่อเนื่อง จึงยังคงหันกลับมาใช้โปรตีนเซลล์เดียวในอุตสาหกรรมการผลิตอาหารเพิ่มขึ้นอย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้ และด้วยคุณสมบัติที่เหมาะสมของ SCP ในการนำมาใช้เป็นแหล่งโปรตีนให้กับอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้องนั้นตอบโจทย์ในยุคปัจจุบันอย่างมาก ดุษณี (2538) รายงานว่า การใช้โปรตีนเซลล์เดียวในอาหารสัตว์เป็นแหล่งโปรตีนนั้นจะต้องมีคุณสมบัติที่เหมาะสม เช่น สามารถเจริญได้เร็วในอาหารที่มีราคาถูกซึ่งเป็นวัตถุดิบที่หาได้ในท้องถิ่นนั้นๆ หรือเจริญได้ดีในอาหารที่มีองค์ประกอบไม่ซับซ้อน มีความต้องการวิตามินและปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญต่างๆ น้อยหรือไม่ต้องการเลยและให้ผลผลิตสูง การแยกและเก็บเกี่ยวเซลล์ทำได้ง่ายและต้องมีความต้านทานต่อการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่นๆ และใช้กระบวนการหมักง่ายๆ ในการเจริญในถังหมัก ควรใช้แหล่งพลังงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ และที่สำคัญอย่างมากคือ ควรให้ปริมาณโปรตีนสูง โดยเฉพาะโปรตีนจะต้องมีกรดอะมิโนที่มีคุณค่า สิ่งมีชีวิตเซลล์เดียวที่คุณสมบัติเข้าข่ายที่จะใช้ในการผลิต SCP มีสาหร่าย ยีสต์ รา และแบคทีเรีย Waterworth (1990)

รายงานถึงองค์ประกอบทางโภชนาการของ SCP บางชนิด โดยรวมสรุปได้ว่า SCP จากรา ยีสต์ และสาหร่าย มีโปรตีนหยาบสูงกว่ากากถั่วเหลือง คือ มีโปรตีนอยู่ระหว่าง 53.5–55.9 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ SCP จากแบคทีเรียมีโปรตีนอยู่ 74 เปอร์เซ็นต์ มีไขมันอยู่ในช่วง 1.1–4.7 เปอร์เซ็นต์ เยื่อใยใกล้เคียงกับกากถั่วเหลือง มีแคลเซียมต่ำ และฟอสฟอรัสสูงกว่ากากถั่วเหลือง คุณภาพของโปรตีนการย่อยได้และสมดุล amino acid ของ SCP ผันแปรไปอย่าง broad spectrum กับชนิดของจุลินทรีย์ และแม้แต่ในจุลินทรีย์ชนิดเดียวกันคุณค่าของโปรตีนก็ยังผันแปรไปกับทั้งสกุล (genus) และชนิด (species) อีกด้วย

สาหร่ายพบว่า มีคาร์โบไฮเดรตที่ย่อยได้ยากในคน มีโปรตีนน้อยแต่มีแร่ธาตุและวิตามินหลายชนิด ปัจจุบันนิยมนำมาประกอบเป็นอาหารสัตว์ ผลิตปุ๋ย และยา และสามารถเพาะเลี้ยงโดยเกือบจะไม่ต้องเติม substrate ประเภทคาร์บอนเพิ่มเติมจากที่ได้รับในแหล่งน้ำเลย สาหร่ายมีศักยภาพในการผลิตโปรตีนต่อหน่วยพื้นที่ได้สูงกว่าถั่วเหลืองถึง 10 เท่า แต่การเก็บเกี่ยวถือเป็นอุปสรรคสำคัญในการผลิต SCP เพื่อใช้ในเชิงการค้า สาหร่ายที่ได้รับการสนใจศึกษาในแง่การผลิต SCP มีสาหร่ายสีเขียว (green algae) เช่น *Scenedesmus acutus* และ *Chlorella pyrendinosa* เป็นต้น และสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน เช่น *Arthrospira platensis* และ *Spirulina maxima* โดยใช้น้ำเสียจากคอกสัตว์หรือจากการผลิตก๊าซมีเทน (biogas) และน้ำเสียอื่นเป็นแหล่งธาตุอาหาร จักรกริช (2555) กล่าวว่าสาหร่ายสีเขียวมีผนังเซลล์ที่ทนทานต่อการย่อยของเอนไซม์ของสัตว์ไม่เคี้ยวเอื้อง จึงมีโปรตีนที่ย่อยได้ต่ำ คือ 66-72 เปอร์เซ็นต์ ในสุกรมีคุณค่าทางชีววิทยา (BV) ต่ำและมีพลังงานที่ย่อยได้ 1.57 McalDE/กก. SCP จากสาหร่ายสีเขียวในสุกรจึงจำกัดไว้ที่ระดับไม่เกิน 10 เปอร์เซ็นต์ในอาหารสุกรรุ่น-ขุน (Pond and Maner,1984) ส่วนสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมี โปรตีนหยาบ 50-61 เปอร์เซ็นต์ ที่ย่อยได้ประมาณ 77 เปอร์เซ็นต์ และมีคุณค่าทางชีววิทยา 68 เปอร์เซ็นต์ (Pond and Maner,1984) เมื่อนำไปเลี้ยงสัตว์ในระดับ 10-15 เปอร์เซ็นต์ ของอาหาร ไม่ปรากฏความผิดปกติหรือผลเสียหายในเลือดหรือเนื้อเยื่อ ยกเว้นระดับของ arsenic ในตับไก่ที่เพิ่มสูงขึ้นในกลุ่มกินสาหร่าย

รา (fungi) เป็นจุลินทรีย์เป็นเซลล์ยูแคริโอตที่อยู่ในอาณาจักรเห็ดรา พบทั้งที่สิ่งมีชีวิตเซลล์เดียว เช่น ยีสต์ เส้นใย (hypha) และ ดอกเห็ด (mushroom) ราหลายชนิดที่เจริญอยู่ตามแหล่งธรรมชาติสามารถนำมาเลี้ยงให้เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีคุณสมบัติผลิตเป็นโปรตีน SCP ได้ Pond and Maner (1984) รายงานว่า SCP จากรา *Parcilomyces variottii* มีโปรตีนและความน่ากินสูง และสามารถใช้ในอาหารสุกรได้ในระดับสูง และมีโปรตีนที่ย่อยได้ประมาณ 78 เปอร์เซ็นต์ สมดุล amino acid คล้ายคลึงกับกากถั่วเหลืองมากแต่อาจมีซิสไตน์ต่ำกว่าเล็กน้อย

ยีสต์ (yeast) คือรากลุ่มหนึ่งที่ส่วนใหญ่เป็นเซลล์เดี่ยว ปัจจุบันนิยมนำมาผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ การผลิต เอทิลแอลกอฮอล์เพื่อใช้เป็นพลังงาน ขนมปัง โดย Saccharomyces เป็นยีสต์ที่สามารถนำใช้เป็นอาหารสัตว์ได้ ในระยะหลังได้มีการพัฒนาการเลี้ยงยีสต์ตระกูล *Candida lipolytica, C.boidinii* และ *Pichia agonobii* โดยใช้ไฮโดรคาร์บอนจากอุตสาหกรรมปิโตรเลียมผสม

กับไนโตรเจน และ *Candida utilis* จากน้ำทิ้งของโรงงานผลิตเยื่อกระดาษ อย่างไรก็ตาม SCP จากยีสต์ที่ผลิตโดยกรรมวิธีที่แตกต่างกันอาจทำให้ระดับโปรตีนที่ผลิตได้ต่างกันบ้าง แต่ลักษณะเด่นที่เหมือนกันคือ SCP จากยีสต์ขาดเมทไธโอนีนและซิสไตน์ จากการศึกษาทดลองของ Pond and Maner (1984) พบว่า การเพาะเลี้ยง SCP จากยีสต์ในอาหารสุกรที่มีขนาด 9-155 กิโลกรัม สามารถใช้ได้ที่ระดับ 5-15 เปอร์เซ็นต์ ของอาหาร โดยไม่ส่งผลกระทบเชิงลบต่อสมรรถนะการผลิต และถึงแม้ว่าสมรรถนะการเติบโตของสุกรรุ่นที่ได้รับอาหารที่มียีสต์ (ที่เลี้ยงด้วยไฮโดรคาร์บอนหรือ methanol หรือ sulphite liquor ในระดับ 6-6.1 เปอร์เซ็นต์ ของอาหาร) จะต่ำกว่ากลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีโปรตีนจากพืชผสมกับจากสัตว์เป็นหลัก แต่อาหารในกลุ่มดังกล่าวสามารถปรับปรุงให้ดีเท่าเทียมกับกลุ่มควบคุมได้โดยการเสริมไลซีน เมทไธโอนีน และไอโซลูซีน (Beck and Handwerker, 1974 และ Frydrych et al., 1983) ทั้งนี้วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิต SCP ถูกแบ่งเป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ คือ ไฮโดรคาร์บอน ที่อยู่ทั้งในสภาพของเหลวและแก๊ส และคาร์โบไฮเดรต ที่ได้แก่ น้ำตาล แป้ง เซลลูโลสรวมถึงของเหลือใช้จากการเกษตร อาทิ กากน้ำตาล (molass), น้ำทิ้งจากโรงงงานมันฝรั่ง (Potato waste water), เมล็ดธัญพืชจะมีแป้งเป็นส่วนใหญ่โปรตีนมีเล็กน้อย, มันสำปะหลัง มีแป้งเป็นส่วนใหญ่ มีโปรตีนเพียง 1 เปอร์เซ็นต์ในหัวมันสำปะหลัง หรือเซลลูโลส (Gaden, 1974)

ในปัจจุบันมีการใช้วัสดุเศษเหลือทางการเกษตรเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว ได้แก่ การแปรรูปผลไม้ เช่น ส้ม มะม่วง กล้วย เป็นต้น ฟางต่างๆ เช่น ฟางข้างบาเล่ห์ ข้าวเจ้า ข้าวสาลี กากชานอ้อย และกากมันสำปะหลัง โดยการใช้จุลินทรีย์ต่างๆ เช่น ยีสต์ รา แบคทีเรีย และสาหร่าย (Nasseri et al., 2011) โดยเฉพาะยีสต์และรา มีข้อดีกว่าการใช้แบคทีเรียและสาหร่ายคือ มีองค์ประกอบของกรดนิวคลีอิกมากกว่า มีองค์ประกอบของกรดอะมิโนไลซีนสูง ไม่จำเป็นต้องมีการใช้แสง คาร์บอนไดออกไซด์ การควบคุมอุณหภูมิ (Hamdy, 2013) โดยวิธีการหมักเพื่อเพิ่มปริมาณโปรตีนในมันสำปะหลังและผลพลอยได้จากมันสำปะหลังที่นิยมมี 2 วิธี คือ liquid substrate หรือ submerged fermentation technique (SMF) และ solid substrate fermentation technique หรือ Solid state fermentation, SFF) (Waterworth, 1990) การเลี้ยงเชื้อแบบแห้ง หรือการเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง มีข้อดีเมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงเชื้อแบบเปียกหรือการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว คือ ไม่มีการปนเปื้อนจากแบคทีเรียชนิดอื่นเนื่องจากค่า water activity ที่ต่ำ กระบวนการผลิตจากกระบวนการหมักทำได้ง่ายเพราะมีความชื้นอยู่น้อย และมีของเสียที่ต้องกำจัดน้อยและใช้พลังงานน้อย (Sato and Sudo, 1999; Hosobuchi and Yoshikawa, 1999)

การเพิ่มปริมาณโปรตีนในผลิตภัณฑ์ที่ได้จากมันสำปะหลัง Zvauya and Muzondo (1994) ได้ทำการศึกษาการเพิ่มโปรตีนในมันสำปะหลังโดยใช้ *A. oryzae* ใน solid state fermentation ในระหว่างเริ่มกระบวนการหมักทำการเพิ่มระดับ pH ให้เป็น 5หลังจาก 10 ชั่วโมง ค่อยๆ ลดระดับ pH ลงเหลือ 3.1 ในช่วงแรก yeasts และ lactic acid bacteria จะเพิ่มขึ้น หลังจากนั้นจะลดลง เมื่อผ่านระยะเวลาของการหมัก 50 ชั่วโมง องค์ประกอบโปรตีนเพิ่มขึ้นจาก <2 เปอร์เซ็นต์ เป็น 19

เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่องค์ประกอบของแป้งลดลงจาก 80g/100g substrate เป็น 4g/100g substrate ขณะที่เมื่อใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนจะทำให้การเจริญของ *C. eichhorniae* ใน solid state process สูงสุด (Yuthavong and Gibbons, 1994) ในงานทดลองดังกล่าวใช้ซังข้าวโพดผสมเพื่อเป็นการระบายอากาศภายในภาชนะหมัก หลังจากการบ่มเป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ ผลผลิตโปรตีนเพิ่มเป็น 12-19 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ Reade and Gregory (1975) พบว่าการใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยไม่จำเป็นต้องมีการควบคุมระดับ pH ไม่ต้องทำให้ปลอดเชื้อ ใช้กระบวนการต้นทุนต่ำในการเปลี่ยนมันสำปะหลังโดยใช้ *Aspergillus fumigatus* ใน submerged fermentation ผลสรุปได้ว่า *Aspergillus sp.* เป็นราที่ให้ผลผลิตโปรตีนดีที่สุด (Tani, Vongsuvanleri and Kumnuanta. 1986) Daubresse et al. (1987) ศึกษาการเพิ่มโปรตีนในมันสำปะหลังโดยกระบวนการ solid state fermentation นำมันสำปะหลังตากแห้งมาบดให้มีขนาดเส้นผ่านสูนย์กลางประมาณ 2-4 มิลลิเมตร เพิ่มความชื้นให้เป็น 40 เปอร์เซ็นต์หลังการอบไอน้ำทำให้เย็นลงที่ 40°C ผสมสารละลายอาหาร (100 g dry matter: 3.4 g urea, 1.5 g KH_2PO_4, 0.8g $MgSO_4.7H_2O$, และ 22.7g citric acid) ที่มี *Rhizopus oryzae* เป็น inoculum นำส่วนผสมมันสำปะหลัง สารละลายอาหารและ inoculum ไปเกลี่ยเป็นชั้นบางๆ (2-3 cm) บนถาด นำไปใส่ในตู้ที่ควบคุมความชื้นสัมพัทธ์เป็นระยะเวลา 65 ชั่วโมง พบว่าโปรตีนเพิ่มขึ้นจาก 1 เปอร์เซ็นต์ก่อนการหมัก เป็น 10.7 เปอร์เซ็นต์ หลังการหมัก ทำนองเดียวกัน Soccol et al. (1994) ศึกษากระบวนการ solid state fermentation ในมันสำปะหลังโดยใช้ *Rhizopus* spp. พบว่าองค์ประกอบโปรตีนเพิ่มจาก 1.75 เปอร์เซ็นต์เป็น 11.3 เปอร์เซ็นต์ Charoensiri et al. (1990) รายงานว่า ราที่พบในดิน *Cephalosporium eichhorniae* 152 ที่มีคุณสมบัติทนต่อความร้อนและความเป็นกรด สามารถเพิ่มโปรตีนในอาหารสัตว์และเพิ่มโปรตีนในมันสำปะหลังได้ Zvauya and Muzondo (1994) ทดลองใช้ระดับความชื้นเริ่มต้นที่ 400, 450, 500 และ 600 g/kg บ่มที่อุณหภูมิ 30, 35, 40 และ 45°C และจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้ $2x10^6$, $2x10^7$และ $2x10^8$spores/g ชนิดของราที่ใช้ได้แก่ *Aspergillus* spp ชนิด (*A. niger*, *A. oryzae* and *A. hennbergii*) พบว่า สภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการเจริญของราเพื่อเพิ่มโปรตีนในมันสำปะหลัง คือ ความชื้นเริ่มต้นที่ 550g/kg อุณหภูมิ 40°C และจำนวนสปอร์ของรา $2x10^7$ spores/g substrate

Oboh and Akindahunsi. (2003), Aro et al. (2008) และOboh and Elusiyan. (2007) รายงานไปในทางสอดคล้องกันว่า มันสำปะหลังที่ผ่านกระบวนการหมักด้วยจุลินทรีย์นั้นสามารถเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบเคมีได้ โดยพบว่า ปริมาณโปรตีนในมันสำปะหลังที่หมักโดยการเสริมจุลินทรีย์มีสูงกว่าการหมักโดยไม่ใช้จุลินทรีย์ และมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการหมักตามลำดับ เนื่องจากจุลินทรีย์ที่เสริมลงไปนั้นไปเปลี่ยนแป้งในมันสำปะหลังเป็นโปรตีนในร่างกายของจุลินทรีย์ แต่ในขนะเดียวกันปริมาณ Crude fibre ในมันสำปะหลังที่หมักโดยไม่เสริมจุลินทรีย์นั้นต่ำกว่าการหมักโดยการเสริมจุลินทรีย์ และมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการหมักตามลำดับ เนื่องจากการหมักแบบธรรมดานั้นมีจุลินทรีย์ที่อาศัยในธรรมชาติอยู่หลายชนิดทำให้สามารถย่อยเยื่อใยในมันสำปะหลังได้ดีกว่า

นอกจากนี้การให้อาหารที่มีส่วนผสมของมันสำปะหลังที่มีการหมักด้วยยีสต์นั้น ทำให้ค่า pH ในกระเพาะหมักอยู่ในสภาวะที่เกือบเป็นกลาง ซึ่งต่างจากอาหารที่ไม่ได้เสริมมันสำปะหลังที่หมักด้วยยีสต์ที่มีค่า pH ต่ำกว่า ซึ่งเสี่ยงกับสภาวะการเป็นกรดในกระเพาะ (rumen acidosis) ที่จะทำให้เป็นอันตรายต่อจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในกระเพาะอาหารได้ เนื่องจากกระบวนการย่อยสลายของอาหารประเภทเยื่อใยในกระเพาะรูเมนจำเป็นต้องใช้จุลินทรีย์ชนิดต่างๆ (แบคทีเรียโปรโตซัวและรา) (ทวีพร, 2544) ที่อยู่ภายในกระเพาะรูเมนเพื่อช่วยในกระบวนการเมแทบอลิซึม นอกจากนั้นค่า ammonia nitrogen (NH_3-N) ยังมีระดับสูงกว่าด้วยเช่นกัน ซึ่ง NH_3-N นี้จุลินทรีย์ในกระเพาะหมักสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการสังเคราะห์ Volatile fatty acids (VFAs) ได้ อย่างไรก็ตาม การให้อาหารที่มีส่วนผสมของมันสำปะหลังที่มีการหมักด้วยจุลินทรีย์นั้น มีปริมาณของ Urea nitrogen ในเลือดสูงซึ่งอาจทำให้เป็นพิษต่อร่างกายได้

7. การคัดเลือกปัจจัยโดยออกแบบการทดลองแบบ Plackett-Burman

Plackett และ Burman (1946) อธิบายหลักการสร้างชุดทดลองที่ใช้ทรัพยากรน้อยด้วยการสร้างชุดทดลองที่เป็นจำนวนเท่าของ 4 แทนที่จะเป็น 2 เรียกว่า Plackett-Burman design (PBD) ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพในการคัดเลือกปัจจัยจาก 10-20 ปัจจัยที่ได้จากการทดสอบเบื้องต้นให้เหลือ 1-4 ปัจจัย โดยไม่ทำการทดลองจำนวนมาก ทำให้สามารถลดจำนวนการทดลองได้ โดยจะมีแบบแผนมาตรฐาน ดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 แผนการทดลองมาตรฐานที่คัดเลือก N-1 ปัจจัยในการทดลอง N ครั้ง

N	ปัจจัย k=N-1																						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
8	+	+	+	-	+	-	-																
12	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-												
16	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-								
24	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

1. วัตถุดิบและการเตรียมวัตถุดิบ

1.1 กากมันสำปะหลัง

กากมันสำปะหลังจากบริษัท เอี่ยม บูรพา จำกัด เลขที่ 98 หมู่ 2 ตำบลหนองน้ำใน อำเภอวัฒนานคร จังหวัดสระแก้ว 27160 ตัวอย่างกากมันสำปะหลังจากโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลัง ดังแสดงในภาพที่ 3.1

ภาพที่ 3.1 ตัวอย่างกากมันสำปะหลัง

1.2 จุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษา คือ เชื้อรา *Aspergillus oryzae* TISTR 3102 และ *Rhizopus oryzae* TISTR 3522 และเชื้อยีสต์ *Candida tropicalis* TISTR 5136, *Candida utilis* TISTR 5032 และ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5598 โดยซื้อเชื้อจุลินทรีย์จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

1.3 การเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้น

รา *A. oryzae* TISTR 3102 และ *R. oryzae* TISTR 3522 เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง Potato Dextrose agar (PDA) เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นเติมน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อลงในขวดแบน นำสปอร์ที่ได้ไปนับโดยใช้ haemacytometer และเจือจางให้มีสปอร์ $1x10^8$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้น

ยีสต์ *C. tropicalis* TISTR 5136, *C. utilis* TISTR 5032 และ *S. cerevisiae* TISTR 5598 เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Yeast Mold broth (YMB) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปปั่นแยกเซลล์ ล้างด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.85% จำนวน 2 ครั้ง นับเซลล์ที่ได้โดยใช้ haemacytometer และเจือจางให้มีจำนวนเซลล์ $1x10^8$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้น

2. วิธีการดำเนินการวิจัยในห้องปฏิบัติการ

2.1 ศึกษาองค์ประกอบเบื้องต้นของกากมันสำปะหลัง

นำตัวอย่างกากมันสำปะหลังแห้งมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้น ได้แก่ ความชื้น เถ้า ไขมัน และโปรตีน ตามวิธีการ Association of Official Analysis Chemists (2016) วิเคราะห์ปริมาณแป้งวิธี Polarimetric method

2.2 ผลของการเลี้ยงราต่อการผลิตเอนไซม์ น้ำตาลรีดิวซ์ และโปรตีน

โดยการเลี้ยงรา *A. oryzae* TISTR 3102 และ *R. oryzae* TISTR 3522 ร้อยละ 10 ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีกากมันสำปะหลัง 5 กรัม ปรับความชื้นให้ได้ร้อยละ 65 โดยใช้น้ำกลั่น และนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 องศาเซลเซียส ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และการเก็บตัวอย่างทุกวันเป็นเวลา 7 วัน (ภาพที่ 3.2) โดยเติมสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 โมลาร์ พีเอช 5.0 นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำตัวอย่างมากรองด้วย กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 นำส่วนใสที่ได้ไปหากิจกรรมของเอนไซม์ amylase และ Raw starch digesting enzyme (RSD) (Bunterngsook et. al., 2017) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS (Ghose, 1987) และปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry

ภาพที่ 3.2 ตัวอย่างกากมันสำปะหลังภายหลังจากการหมักเป็นเวลา 7 วัน

2.3 ผลของการเลี้ยงเชื้อเพียงชนิดเดียวและการเลี้ยงรา *A. oryzae* TISTR 3102 ร่วมกับยีสต์ต่อการเพิ่มปริมาณโปรตีน

เลี้ยงรา *A. oryzae* TISTR 3102 ร้อยละ 5 และยีสต์ *C. tropicalis* TISTR 5136, *C. utilis* TISTR 5032 และ *S. cerevisiae* TISTR 5598 ร้อยละ 5 โดยแบ่งเป็น 7 การทดลอง ดังนี้

การทดลองที่ 1 ชุดควบคุมไม่มีการเติมเชื้อจุลินทรีย์

การทดลองที่ 2 เลี้ยงยีสต์ *C. tropicalis* TISTR 5136

การทดลองที่ 3 เลี้ยงยีสต์ *C. utilis* TISTR 5032

การทดลองที่ 4 เลี้ยงยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5598

การทดลองที่ 5 เลี้ยงรา *A. oryzae* TISTR 3102 ร่วมกับยีสต์ *C. tropicalis* TISTR 5136

การทดลองที่ 6 เลี้ยงรา *A. oryzae* TISTR 3102 ร่วมกับยีสต์ *C. utilis* TISTR 5032

การทดลองที่ 7 เลี้ยงรา *A. oryzae* TISTR 3102 ร่วมกับยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5598

โดยทำการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีกากมันสำปะหลัง 5 กรัม ปรับความชื้นให้ได้ร้อยละ 65 โดยใช้น้ำกลั่น นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 องศาเซลเซียส ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และเก็บตัวอย่างทุกวันเป็นเวลา 7 วัน โดยเติมสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 โมลาร์ พีเอช 5.0 นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำตัวอย่างโดยนำมากรองด้วย Whatman เบอร์ 1 และนำส่วนใสที่ได้ไปหากิจกรรมของเอนไซม์ amylase และ RSD หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry ส่วนของแข็งที่ได้นำไปหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Kjeldahl

2.4 การคัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ ผลิตเอนไซม์ ของแข็งทั้งหมด น้ำตาลรีดิวซ์ และโปรตีนจากการเลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus oryzae* ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* โดยออกแบบการทดลองแบบ Plackett-Burman

ทำการคัดเลือกปัจจัยและชนิดของสารอาหารที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ และปริมาณโปรตีน รวมถึงการผลิตเอนไซม์ ปริมาณของแข็งทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวซ์ จากการเลี้ยงรา *A. oryzae* ร่วมกับ *S. cerevisiae* โดยวางแผนการทดลองแบบ Plackett-Burman ปัจจัยที่ทำการศึกษามีทั้งหมด 10 ปัจจัย ได้แก่ ปริมาณความชื้น (A), ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น (B), ความเข้มข้นของยีสต์ (C), ระยะเวลาระหว่างการหมักที่เติมเชื้อยีสต์ (D), ระยะเวลาที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อทั้งหมด (E), รำข้าว (F), ยูเรีย (G), แอมโมเนียมคลอไรด์ (H), แคลเซียมคลอไรด์ (I) และ โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (J) โดยแต่ละปัจจัยทำการศึกษา 2 ระดับ ได้แก่ ระดับต่ำ (-1) และระดับสูง (+1) ดังแสดงในตารางที่ 3.1

เมื่อนำปัจจัยที่ต้องการศึกษาในระดับต่ำ (-) และระดับสูง (+) ที่กำหนดได้ไปออกแบบการทดลองโดยใช้วิธี Plackett-Burman ซึ่งสามารถออกแบบการทดลองได้ทั้งหมด 12 การทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 3.2 โดยทำการเพาะเลี้ยงรา *A. oryzae* TISTR 3102 ร่วมกับ *S. cerevisiae* TISTR

5598 ตามแผนการทดลองที่ได้ออกแบบไว้ โดยเพาะเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีกากมันสำปะหลัง 5 กรัม และนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 องศาเซลเซียส โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ และทำการเก็บตัวอย่างโดยเติมสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 โมลาร์ พีเอช 5.0 นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด ยีสต์และรา โดยการ spread plate และนำตัวอย่างโดยนำมากรองด้วย Whatman เบอร์ 1 เพื่อแยกส่วนของของแข็งไปหาปริมาณของแข็งทั้งหมดและปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Kjeldahl หลังจากนั้นนำส่วนใสที่ได้ไปหากิจกรรมของเอนไซม์ amylase และ RSD หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry นำผลการทดลองที่ได้ไปวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้โปรแกรมทางสถิติ SPSS Version 17.0 และนำตัวแปรที่มีผลต่อปริมาณโปรตีนไปศึกษาต่อไป

ตารางที่ 3.1 การกำหนดระดับต่ำ (-) และระดับสูง (+) ของปัจจัยที่ศึกษาและชนิดสารอาหารเพื่อใช้วางแผนการทดลองแบบ Plackett-Burman

Variables	Codes	Unit	-1	+1
Moisture content	A	%	55	75
Inoculum size	B	%	5	15
Yeast concentration	C	%	25	75
Yeast inoculation time	D	day	0	3
Time	E	day	5	9
Rice bran	F	%, g/g CP	0	3
Urea	G	%, g/g CP	0	0.4
NH_4Cl	H	%, g/g CP	0	0.4
$CaCl_2$	I	%, g/g CP	0	0.2
KH_2PO_4	J	%, g/g CP	0	0.2

ตารางที่ 3.2 แผนการทดลองในการเจริญของจุลินทรีย์ ปริมาณโปรตีน การผลิตเอนไซม์ ปริมาณของแข็งทั้งหมด และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

Run no.	Variables									
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1
2	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1
3	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1
4	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1
5	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1
6	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1
7	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1
8	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1
9	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1
10	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1
11	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1

ผลการทดลองที่ได้จากการทำซ้ำ 3 ซ้ำ และหาค่าเฉลี่ย นำค่าเฉลี่ยมาคำนวณหาอิทธิพลหลัก (main effect) ที่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณโปรตีนทั้งในส่วนที่ละลายน้ำและไม่ละลายน้ำในกากมันสำปะหลังตามสมการที่ (1):

$$\boldsymbol{E(x_i) = \frac{\sum M_{i+} - \sum M_{i-}}{N}} \quad (1)$$

โดย $E(x_i)$ คือ อิทธิพลหลักที่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณโปรตีน M_{i+} และ M_{i-} คือ ปริมาณโปรตีนจากชุดการทดลองของตัวแปร (x_i) ที่ระดับสูง (+1) และต่ำ (-1), N คือจำนวนชุดการทดลอง การวิเคราะห์ความแตกต่างของแต่ละตัวแปรใช้ *t*-test การวิเคราะห์ค่าทางสถิติของโปรตีน

2.5 การเพิ่มขนาดการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากกากมันสำปะหลังเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบเพื่อทดแทนสารประกอบโปรตีนในอาหารข้นของแพะเนื้อ

โดยทำการทดลองในกล่องพลาสติกซึ่งบรรจุกากมันสำปะหลัง 2.5 กิโลกรัม ใช้เชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดคิดเป็นร้อยละ 5, เชื้อราร้อยละ 25, ยีสต์ร้อยละ 75, ยูเรียและ NH_4Cl ร้อยละ 0.4 (g/g CP), KH_2PO_4 ร้อยละ 0.2 และปรับปริมาณความชื้นให้ได้ร้อยละ 55 บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 9 วัน (ภาพที่ 3.3)

ภาพที่ 3.3 วัตถุดิบและส่วนผสมที่ใช้สำหรับการหมักกากมันสำปะหลัง

3. วิธีการดำเนินการวิจัยภาคสนาม

3.1 การเตรียมกากมันสำปะหลังสด

นำตัวอย่างส่วนของกากมันสำปะหลังในรูปแบบสดโดยการสุ่มจากโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลัง บริษัทเอี่ยมบูรพา จำกัด เลขที่ 98 หมู่ 2 ถนน วัฒนานคร-แชร์ออ ตำบล หนองน้ำใส อำเภอ วัฒนานคร จังหวัด สระแก้ว แล้วนำตัวอย่างที่ได้เก็บไว้ในภาชนะที่ปิดสนิท เก็บในตู้แช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีต่อไป

3.2 ขั้นตอนการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

นำตัวอย่างกากมันสำปะหลังสดจากข้อ 3.1 มาวิเคราะห์เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมี โดยการใช้วิธีการวิเคราะห์แบบประมาณ (Proximate analysis) (AOAC, 2010) ซึ่งวิเคราะห์วัตถุแห้งโดยเครื่อง Hot air oven ที่อุณหภูมิ 100±5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง, โปรตีนหยาบ (Crude protein, CP (AOAC 18th ed., 2010, Method 984.13)) โดยเครื่อง Kjeltec auto analyzer, ไขมัน (Ether extract) โดยเครื่อง Automatic Soxhlet extraction (AOAC 18th ed., 2010, Method 2003.05), เถ้า (Ash) โดยการเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ส่วนเยื่อใยหยาบ (Crude fiber, CF (AOAC 18th ed., 2010, Method 962.09)) เถ้าที่ไม่ละลายในกรด (Acid insoluble ash, AIA (AOAC 18th ed., 2010, Method 942.05) และการวิเคราะห์เยื่อใยโดย Detergent analysis (Goering and VanSoest, 1970) ได้แก่ เยื่อใยที่ไม่ละลายในดีเทอเจนที่เป็นกลาง (Neutral detergent fiber, NDF) เยื่อใยที่ไม่ละลายในดีเทอเจนที่เป็นกรด (Acid detergent fiber, ADF) และ Acid detergent lignin (ADL) โดยเครื่อง Fibertec auto analyser โดยตัวอย่างกากมันสำปะหลังสดได้รับการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยวิธีการดังกล่าวจากห้องปฏิบัติการวิเคราะห์อาหารสัตว์ ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน จำนวน 2 ซ้ำต่อหนึ่งตัวอย่างทดลอง

เปรียบเทียบข้อมูลของกากมันสำปะหลังสดก่อนและหลังการหมักยีสต์ที่ได้จากการศึกษาระดับ lab scale (งานทดลองที่ 1 ดังแสดงในตารางที่ 3.1) มีค่าเปอร์เซ็นต์โปรตีนเริ่มต้นเท่ากับ 0.95±0.1 เชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 1.5x10^{6} CFU/ml และเชื้อวันที่เสร็จสิ้นการทดลองเท่ากับ 3.7x10^{7} CFU/ml

3.3 ผลการใช้กากมันสำปะหลังหมักยีสต์ในระดับต่างๆ ในสูตรอาหารข้นของแพะเนื้อลูกผสมพันธุ์พื้นเมืองและแองโกลนูเบียนต่อการกินได้ กระบวนการหมักในกระเพาะรูเมน และสมรรถนะการผลิต

3.3.1 สัตว์ทดลอง

แพะที่ใช้ในการทดลองเป็นแพะเนื้อลูกผสมพันธุ์พื้นเมืองและแองโกลนูเบียน จำนวน 16 ตัว เพศผู้และเพศเมีย อย่างละ 8 ตัว อายุประมาณ 1-2 ปี น้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้นประมาณ 12-13 กิโลกรัม

แพะทดลองทุกตัวจะได้รับการฉีดยาถ่ายพยาธิชนิด Ivermectin และวิตามิน A, D_3 และ E ตามน้ำหนักตัวสัตว์ก่อนเข้าการทดลอง แบ่งตามน้ำหนักแพะเป็น 2 กลุ่ม แพะรุ่นน้ำหนักเฉลี่ย 10 กิโลกรัม และแพะเนื้อน้ำหนักเฉลี่ย 25 กิโลกรัม (แพะรุ่นและแพะเนื้ออย่างละ 8 ตัว) ชั่งน้ำหนักเริ่มต้นและทำเครื่องหมาย ทำการคัดเลือกตามกลุม แผนการทดลองแล้วทำการสุ่มแพะเข้าคอกทดลอง ทำการให้อาหารและใช้เวลาในการปรับสัตวทดลอง เพื่อให้สัตวคุ้นเคยกับสภาพคอกทดลองและอาหารทดลอง และวัดปริมาณการกินเพื่อปรับปริมาณอาหารที่ให้สัตว์กินก่อนการการทดลองจริงเป็นเวลา 10 วัน ระยะเวลาทดลอง 90 วัน รวมระยะเวลาทดลองทั้งสิ้น 100 วัน การให้อาหารแพะจะให้อาหาร 2 ครั้ง คือเวลา 08.00 น. และ 15.30 น. แพะทุกตัวถูกเลี้ยงโดยขังในคอกเดี่ยวขนาดประมาณ 2x2 เมตร ในแต่ละคอกจะมีอ่างน้ำพลาสติกสำหรับใส่น้ำสะอาดและก้อนแร่ธาตุให้กินตลอดเวลา แพะทดลองทุกกลุ่มจะได้รับอาหารข้นสำเร็จรูปชนิดอัดเม็ด 1 เปอรเซ็นตของน้ำหนักตัว และให้อัลฟาฟ่าแห้งชนิดอัดเม็ดเป็นอาหารหยาบแบบ *ad libitum* โดยในแต่ละกลุ่มได้รับการทดแทนกากมันสำปะหลังสดหมักยีสต์ในสัดส่วนที่แตกต่างกัน โดยวางแผนการทดลองแบบ Random Complete Block Design (RCBD) จัดแบ่งแพะออกเป็น 4 กลุ่มการทดลอง กลุ่มละ 4 ตัว Block อายุแพะ และสุ่มสิ่งทดลองทั้ง 4 กลุ่มการทดลอง ดังนี้

กลุ่มที่ 1 (อาหารกลุ่มควบคุม) กลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรควบคุม (อาหารข้นผสมสำเร็จรูป 16% โปรตีน (CP)) ร่วมกับอาหารหยาบ คือ อัลฟาฟ่าแห้งชนิดอัดเม็ดแบบเต็มที่ โดยไม่มีการให้กากมันสำปะหลังโปรตีนสูง

กลุ่มที่ 2 (อาหารกลุ่มควบคุม) (อาหารข้นผสมสำเร็จรูป 16%CP) ทดแทนด้วยกากมันสำปะหลังโปรตีนสูงในสูตรที่ระดับ 10% (DM basis) ร่วมกับอาหารหยาบ คือ อัลฟาฟ่าแห้งชนิดอัดเม็ดแบบเต็มที่

กลุ่มที่ 3 (อาหารกลุ่มควบคุม) (อาหารข้นผสมสำเร็จรูป 16%CP) ทดแทนด้วยกากมันสำปะหลังโปรตีนสูงในสูตรที่ระดับ 20% (DM basis) ร่วมกับอาหารหยาบ คือ อัลฟาฟ่าแห้งชนิดอัดเม็ดแบบเต็มที่

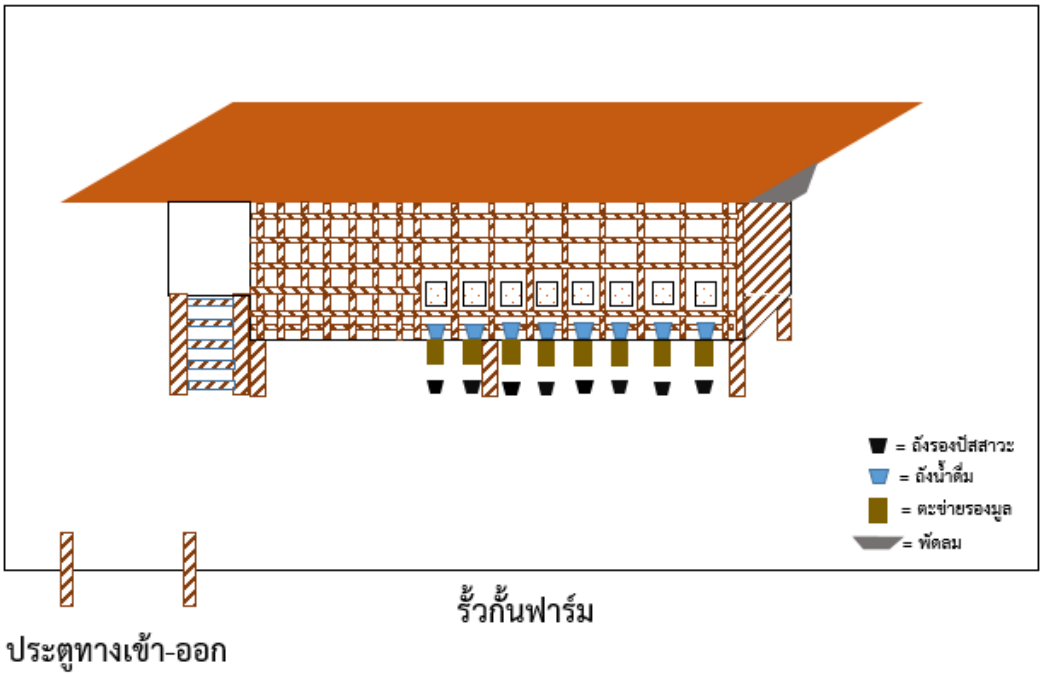
กลุ่มที่ 4 (อาหารกลุ่มควบคุม) (อาหารข้นผสมสำเร็จรูป 16%CP) ทดแทนด้วยกากมันสำปะหลังโปรตีนสูงในสูตรที่ระดับ 30% (DM basis) ร่วมกับอาหารหยาบ คือ อัลฟาฟ่าแห้งชนิดอัดเม็ดแบบเต็มที่

3.3.2 คอกทดลอง

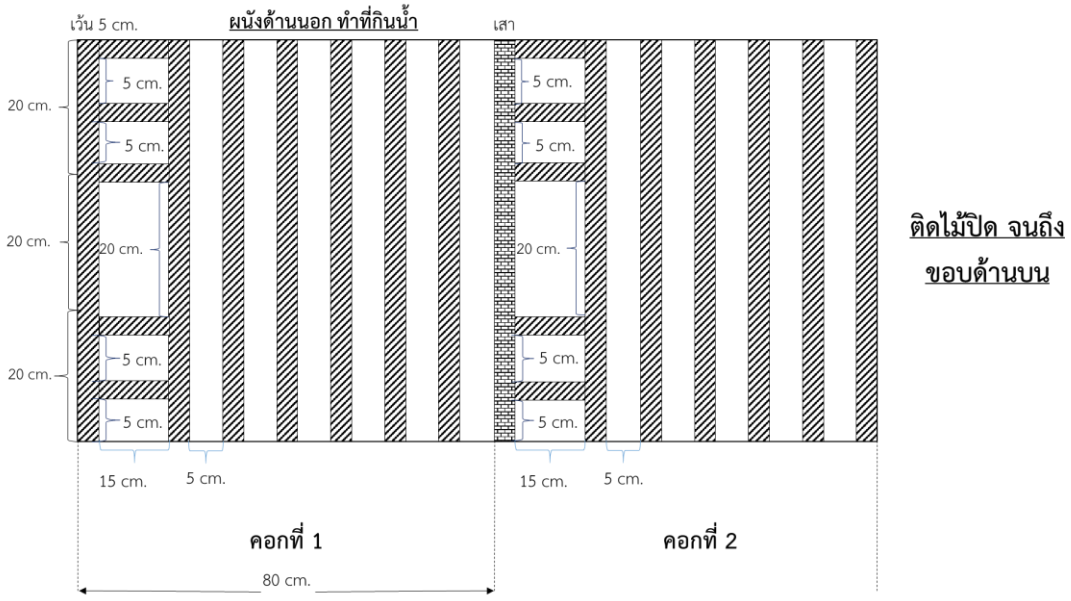
ใช้โรงเรือนถาวร 2 ชั้น สูง 1.5 เมตร ขนาดโรงเรือนทั้งหมดเท่ากับ 5 x 15 เมตร โรงเรือนมีบันไดขึ้นด้านซ้ายและมีถังน้ำยาฆ่าเชื้ออยู่ด้านหน้าบริเวณก่อนทางขึ้นโรงเรือน ซึ่งมีทางขึ้นและประตูเปิด-ปิดเพื่อเข้าออกทางเดียว ด้านบนประกอบไปด้วย 1) พื้นที่เก็บอาหารข้นคุณภาพดี อาหารหยาบคุณภาพดี และอุปกรณ์อื่นๆ 2) พื้นที่คอกแพะ 16 คอก ขนาดคอกล่ะ 60 x 120 cm. ภายในแต่ละ

คอก มีแร่ธาตุก้อนและถังน้ำที่เปลี่ยนน้ำสะอาดให้ทุกวันในทุกคอก ลมสามารถผ่านเข้าออกได้ ส่วนด้านล่างเป็นพื้นที่ชั้นล่างเทคอนกรีต มีที่รองมูลแล้วถังรองปัสสาวะวางใต้คอกแพะทุกตัว

ภาพที่ 3.4 ระแนงไม้ที่ใช้ตีผนังระหว่างคอก (ตีไม้ในแนวตั้ง) ห่างกัน 5 cm.



ภาพที่ 3.5 คอกทดลองเดี่ยวภายในฟาร์มแพะ มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสระแก้ว



ภาพที่ 3.6 ขนาดพื้นที่คอกเดี่ยวของแพะทดลอง

3.4 วิธีการเก็บรวบรวมขอมูล

3.4.1. การศึกษาหาการย่อยได้และปริมาณการกินได้ทั้งหมด

การกินได้ (feed intake)

ชั่งและบันทึกข้อมูลปริมาณการกินอาหาร จากการชั่งอาหารที่ให้สัตว์กิน และส่วนที่เหลือจากการกิน โดยทำการวัดการกินได้ทุกสัปดาห์ สัปดาห์ละครั้ง 2 วันติดต่อกันตลอดช่วงการทดลอง (period) โดยสุ่มเก็บตัวอย่างอาหารแต่ละชนิด (อาหารข้นกลุ่มควบคุม อาหารข้นกลุ่มทดลองและอาหารหยาบ) ก่อนกินและหลังกิน 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นรายตัวตลอดการทดลอง แล้วนำไปอบที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยวิธี Proximate analysis ได้แก่ DM, CP, ash, AIA ตามวิธีการ AOAC (2010) CF และ NDF, ADF และ ADL ตามวิธีการของ Goering and Van Soest (1970) จากนั้นการสุ่มเก็บตัวอย่างมูลและปัสสาวะทำการศึกษาหาการย่อยได้และปริมาณการกินได้ทั้งหมดโดยใช้วิธีการเก็บมูลที่สัตว์ขับถ่ายออกมาภายนอกแล้วดังนี้

การสุ่มเก็บตัวอย่างมูล (Feces) เพื่อศึกษาการย่อยได้

โดยมีถาดรองรับมูลวางอยู่ใต้กรงเมแทบอลิซึม ทำการชั่งมูลทั้งหมดในถาดรองรับใต้กรงจากแพะเนื้อทุกตัวทุกวัน ในช่วง 2 วันสุดท้ายของแต่ละระยะการทดลองทั้ง 5 ช่วงการทดลอง ทำการคลุกเคล้ามูลในถาดรองรับให้ผสมกัน โดยทำการสุ่มเก็บมูล 10 เปอร์เซ็นต์ ของมูลที่ขับถ่ายออกมาในแพะทดลองแต่ละตัว ทำการคลุกเคล้ามูลให้ผสมกัน (pool) แบ่งมูลออกเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกสุ่มมาร้อยละ 50 นำไปอบที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อนำไปคำนวณหาวัตถุแห้ง ส่วนที่ 2 สุ่มมาร้อยละ 50 และนำไปอบที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำไปบดผ่านตะแกรง

ขนาด 1 มิลลิเมตร เพื่อนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและนำไปคำนวณความสามารถในการย่อยได้ของอาหารนั้น ตามวิธีการของ Schnieder and Flatt (1975) โดยการใช้ตัวชี้บ่งภายใน (internal indicator) คือ เถ้าที่ไม่ละลายในกรด (acid insoluble ash, AIA) ปริมาณอาหารที่กินและขับออกมาจะต้องปรับให้เป็นอาหารแห้งเสียก่อน แล้วจึงนำมาเข้าสูตรคำนวณดังนี้

$$\text{Apparent digestibility (\%)} = \frac{\text{100 x DMI or nutrient intake – DMI or nutrient in feces}}{\text{DMI or nutrient intake}}$$

3.4.2. น้ำหนักตัว (body weight)

ทำการชั่งก่อนและหลังการทดลองและบันทึกน้ำหนักแพะแต่ละกลุ่มทดลองเป็นรายตัว โดยชั่งน้ำหนักทุก 3 สัปดาห์ของทุกช่วงการทดลอง (5 ช่วงการทดลอง) โดยอดอาหารก่อนชั่งอย่างน้อย 12 ชั่วโมง

3.4.3. สมรรถภาพการผลิต

$$\text{อัตราการเจริญเติบโต (average daily gain, ADG)} = \frac{\text{น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น (กรัม)}}{\text{จำนวนวัน}}$$

3.4.4. การสุ่มเก็บตัวอย่างปัสสาวะ (Urine)

มีถังรองรับปัสสาวะวางอยู่ใต้กรงเลี้ยงแพะแบบขังเดี่ยว เติมกรดซัลฟูริก เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (10 เปอร์เซ็นต์ของ H_2SO_4) ประมาณ 10-20 มิลลิลิตร ในถังเก็บปัสสาวะไว้ก่อนในช่วงเย็นก่อนการเก็บตัวอย่างปัสสาวะ 1 วัน เพื่อปรับให้ปัสสาวะมีค่าความเป็นกรด-ด่าง ต่ำกว่า 2 เพื่อป้องกันการสูญเสียของแอมโมเนีย ทำการวัดปริมาตรของปัสสาวะในถังรองรับอยู่ใต้กรงเลี้ยงแบบขังเดี่ยวจากแพะทุกตัว 2 วันติดต่อกัน ในแต่ละระยะการทดลอง (Period) และสุ่มเก็บปัสสาวะ 10 เปอร์เซ็นต์ของที่ขับถ่ายในแพะแต่ละตัว แล้วนำไปเก็บในตู้แช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อครบ 2 วันนำปัสสาวะที่เก็บเอาไว้ในแต่ละวันมาผสมกัน (Pool) จากนั้นสุ่มเก็บไว้เพียง 10 เปอร์เซ็นต์ของปัสสาวะที่ทำการผสมแล้วนำมาเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำมาวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจน โดยวิธี Kjedahl method (AOAC, 1990) ต่อไป

3.4.5. การศึกษาเกี่ยวกับของเหลวและนิเวศวิทยาในกระเพาะหมัก

3.4.5.1 การเปลี่ยนแปลงประชากรของจุลินทรีย์ (แบคทีเรียและโปรโตซัว) ในกระเพาะหมัก

โดยการเก็บตัวอย่างของเหลวในกระเพาะหมัก (rumen fluid) (collection of rumen fluid samples) ใช้เครื่องมือเก็บตัวอย่างสุ่มดูดเอาของเหลวในกระเพาะหมักออกมาประมาณ 100-150 มิลลิลิตร/ตัว โดยจะเก็บชั่วโมงที่ 0 และ 4 ตามลำดับ หลังจากนั้นนำตัวอย่างดังกล่าวเพื่อมาศึกษาการเปลี่ยนแปลงประชากรของจุลินทรีย์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง แอมโมเนีย-ไนโตรเจนและกรดไขมันระเหยได้ในกระเพาะหมัก โดยจะทำการศึกษาทุกช่วงการทดลอง (2 ช่วงการทดลอง) ดังต่อไปนี้ การเปลี่ยนแปลงประชากรของจุลินทรีย์สุ่มเก็บตัวอย่างของเหลวในกระเพาะหมัก 1 มิลลิลิตร ใส่ใน

หลอดทดลองชนิดมีฝาจุก ขนาด 25 มิลลิลิตร บรรจุด้วย formaldehyde 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 9 มิลลิลิตร เพื่อนำไปตรวจนับประชากรจุลินทรีย์ (total direct count) ได้แก่ แบคทีเรีย (Bacteria) และโปรโตซัว (Protozoa) โดยใช้ Haemacytometer ทำการนับด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่าสำหรับแบคทีเรีย และ 100 เท่าสำหรับโปรโตซัวหรือศึกษาเกี่ยวกับ Microscopic direct count (Galyean, 1989) ซึ่งได้แก่ Bacteria และ Protozoa count

3.4.5.2 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในของเหลวในกระเพาะหมัก

สุ่มเก็บตัวอย่างของเหลวในกระเพาะหมักประมาณ 50 มิลลิลิตร ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร เพื่อวัดค่าความเป็นกรดเป็นด่างทันทีหลังจากเก็บตัวอย่าง โดยใช้เครื่อง pH meter และเครื่องวัด pH จะต้องได้รับการปรับ (calibrate) ด้วยการใช้ buffers ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.0 และ 4.0 ก่อน

3.4.5.3 แอมโมเนีย-ไนโตรเจน (NH_3-N) ในของเหลวในกระเพาะหมัก

สุ่มเก็บตัวอย่างของเหลวในกระเพาะหมักปริมาตร 20 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองชนิดมีฝาจุก (test tube with cap) ขนาด 25 มิลลิลิตร บรรจุด้วย 6N HCL ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เพื่อหยุดการทำงานของจุลินทรีย์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที เก็บเอาส่วนที่ใส (supernatant) ลงในขวดขนาด 25 มิลลิลิตร ปิดด้วยฝาจุกเกลียว แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปวิเคราะห์แอมโมเนีย-ไนโตรเจน โดยวิธีการกลั่นของ Bromner and Keeney (1965)

3.4.5.4 กรดไขมันระเหยได้ (VFAs) ในของเหลวในกระเพาะหมัก

สุ่มเก็บตัวอย่าง rumen fluid ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองชนิดมีฝาจุกขนาด 25 มิลลิลิตร บรรจุด้วย 25 เปอร์เซ็นต์ H_2PO_3 จากนั้นนำหลอดตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ 3000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที เก็บเฉพาะส่วนของเหลวใส (supernatant) ลงในขวดขนาด 25 มิลลิลิตร ปิดด้วยฝาจุกเกลียวเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดไขมันระเหยได้ ที่สำคัญ ได้แก่ acetic acid, propionic acid และ butyric acid ด้วยเครื่อง Gas Chromatography; Hewlett Packard GC system HP 6890) (GC)

3.4.5.5 การวิเคราะห์หาปริมาณของไนโตรเจนในกระแสเลือด (blood urea nitrogen, BUN)

สุ่มเก็บตัวอย่างเลือดแพะตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 (ก่อนให้อาหาร), 3, 6 และ 9 ใส่ในหลอดเก็บเลือดชนิดมีฝาจุกชนิดที่มี heparin เก็บไว้ในความเย็นที่ 4 องศาเซลเซียล ก่อนนำไปเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยง ใช้ปิเปตดูดน้ำกลั่น 0.75 ml ใส่ในหลอดทดลองที่แห้งและสะอาด จากนั้นเติมสารตัวอย่าง (ซีรั่มหรือพลาสม่า) ที่เตรียมไว้แล้ว ควรจะมีลักษณะใสไม่มีสี และไม่มีตะกอน จำนวน 0.25 ml ลงในหลอดทดลอง และเติมสารละลายไธโอเซมิคาร์บาไซด์ ไดอะซิทิล โมโนซิม (Thiosemicar bazide diacetyl monxime) 0.4 มิลลิลิตร เติมสารละลายกรดของเกลือเฟอริคลอไรด์ (ferric chloride) 4.0 ml ลง

ในส่วนผสมดังกล่าว แล้วปั่นหลอดทดลองนี้ให้มีส่วนผสมเข้าดีโดยใช้เครื่องเขย่า (mixer) เตรียม blank โดยใช้น้ำกลั่น 1.0 มิลลิลิตร รวมกับ สารละลายในข้อ 1 และ 2 อย่างละ 4.0 มิลลิลิตรเตรียมชุดของสารละลายมาตรฐานยูเรียไนโตรเจนดังนี้ 0.5, 1.0, 1.5, 2.5, 3.5 และ 5.0 มิลลิกรัม / 100 มิลลิลิตร โดยใช้สารละลายมาตรฐานแต่ละความเข้มข้น 1.0 มิลลิลิตร แทนสารตัวอย่างทำเหมือนข้อ 5 และนำหลอดทดลองลงแช่ในอ่างน้ำเดือด (boiling bath) เป็นเวลา 10 นาที แล้วทิ้งให้เย็นประมาณ 3 นาที ที่อุณหภูมิห้องโดยใช้น้ำ เพื่อไปวัดหาค่าปริมาณของไนโตรเจนในกระแสเลือด ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ wave length 550 นาโนเมตร ตามวิธีการของ Mackay and Mackay (1972) ทั้งนี้ตัวอย่างเลือดแพะใน Period ที่ 1 ได้รับการวิเคราะห์ผ่านห้องปฏิบัติการชัยพฤกษ์คลีนิค อำเภอเมือง จังหวัดสระแก้ว แล้วจงนำค่าไนโตรเจนในกระแสเลือดทั้ง 2 Periods มาทำการหาค่าเฉลี่ย

3.5 การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance, ANOVA) ของข้อมูลที่ได้ หากผลมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจะทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มการทดลองโดยการใช้ Duncan’s new multiple-range test ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SAS (SAS, 2004)

4. สถานที่ทำการวิจัย

อาคารวิจัยการเกษตรและเทคโนโลยี คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสระแก้ว

บทที่ 4
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การเพิ่มปริมาณโปรตีนในกากมันสำปะหลังหมักในห้องปฏิบัติการ (Lab-scale)

1.1 องค์ประกอบเบื้องต้นของกากมันสำปะหลัง

เมื่อศึกษาองค์ประกอบเบื้องต้นของกากมันสำปะหลัง พบว่ามีปริมาณความชื้น เถ้า โปรตีน ไขมัน เยื่อใย แป้ง และคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 7.93±0.05, 1.65±0.03, 1.80±0.12, 0.18±0.03, 13.70±0.13 และ 46.72±0.18 ตามลำดับ (ตารางที่ 1) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับการทดลองก่อนหน้า อย่างไรก็ตาม ปริมาณโปรตีนในกากมันสำปะหลังแห้งมีเพียงร้อยละ 1.8 ซึ่งมีปริมานน้อยมากหากนำมาใช้เป็นแหล่งอาหารสัตว์ ดังนั้น จึงต้องเพิ่มปริมาณโปรตีนในกากมันสำปะหลังก่อนการนำไปใช้ในอาหารสัตว์ จากการวิเคราะห์องค์ประกอบเบื้องต้นโดยประมาณของกากมันสำปะหลัง พบว่ามีประมาณคาร์โบไฮเดรตสูงถึงร้อยละ 88.44 ในจำนวนนี้มีปริมาณแป้งสูงถึงร้อยละ 46.72 ซึ่งสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ได้ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องศึกษาจุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายแป้งที่มีอยู่ในกากมันสำปะหลัง ได้แก่ เอนไซม์ amylase และ raw starch digesting enzyme (RSD)

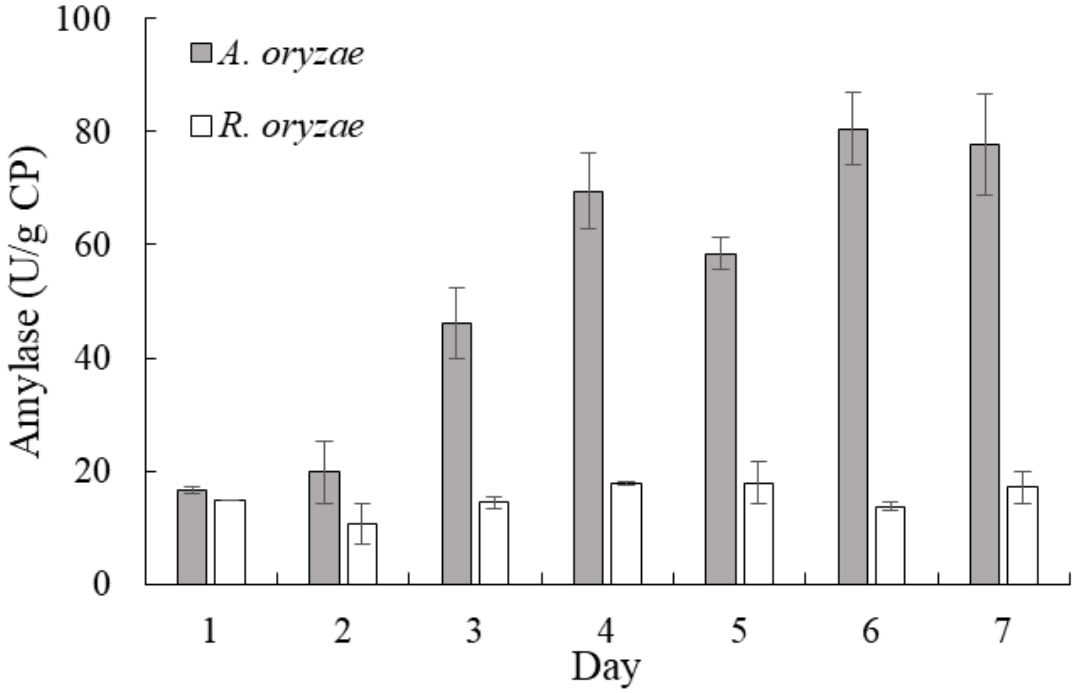
ตารางที่ 4.1 องค์ประกอบเบื้องต้นของกากมันสำปะหลังแห้ง

Chemical composition	%
Moisture content	7.93 ± 0.05
Ash	1.65 ± 0.03
Protein	1.80 ± 0.12
Fat	0.18 ± 0.03
Fiber	13.70 ± 0.13
Starch	46.72 ± 0.18
Carbohydrate	88.44

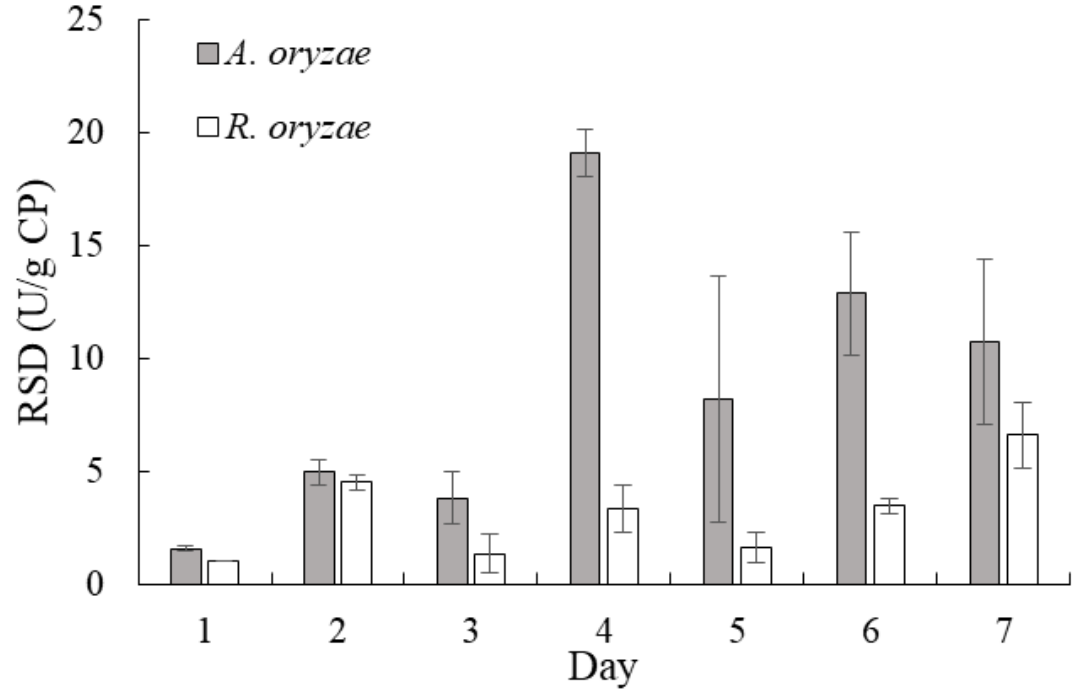
1.2 ผลของชนิดของเชื้อราต่อการผลิตเอนไซม์ น้ำตาลรีดิวซ์ และโปรตีน

เมื่อศึกษาผลของชนิดของเชื้อรา ได้แก่ *Aspergillus oryzae* TISTR 3102 และ *Rhizopus oryzae* TISTR 3522 ต่อการผลิตเอนไซม์ amylase, RSD และโปรตีน โดยการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 เป็นเวลา 7 วัน พบว่า *A. oryzae* TISTR 3102 มีการสร้างเอนไซม์ amylase ที่มากกว่า *R. oryzae* TISTR 3522 ตั้งแต่วันที่ 2 ของการบ่ม โดยมีปริมาณเอนไซม์ amylase สูงสุดในวันที่ 4 ของการบ่มเท่ากับ 69.53±2.85 ยูนิตต่อกรัมกากมันแห้ง (ภาพที่ 4.1) และมีการสร้างเอนไซม์ RSD ที่มากกว่า *R. oryzae* TISR 3522 ตั้งแต่วันที่ 3 ของการเลี้ยงเชื้อ (ภาพที่ 4.2) โดยมีปริมาณเอนไซม์ RSD สูงสุดในวันที่ 4 ของการบ่มเท่ากับ 19.06±5.44 ยูนิตต่อกรัมกากมันแห้ง การที่ *A. oryzae* TISTR 3102 ผลิตเอนไซม์ที่สามารถย่อยส่วนของแป้งในกากมันสำปะหลังได้มากกว่า *R. oryzae* TISTR 3522 ส่งผลให้ *A. oryzae* TISTR 3102 สามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ (ภาพที่ 4.3) และปริมาณโปรตีนที่วิเคราะห์ด้วยวิธี Lowy (ภาพที่ 4.4) มากกว่า *R. oryzae* TISTR 3522 โดยพบว่า *R. oryzae* TISTR 3522 สามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์และโปรตีนสูงสุดเท่ากับ 47.07±1.73 และ 27.5±3.52 มิลลิกรัมต่อกรัมกากมันแห้ง ตามลำดับ

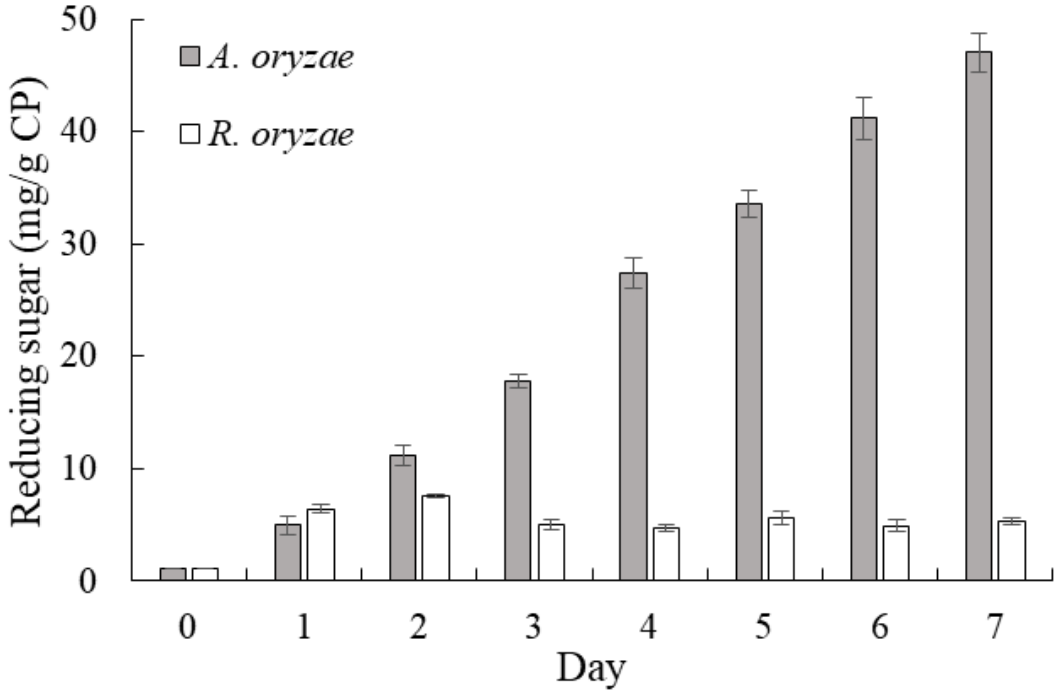
Jin *et al*. (2016) ที่ศึกษาเปรียบเทียบชนิดและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ (*A. oryzae*, *R. oryzae* และ *T. viride*) ในการเพิ่มปริมาณโปรตีนในวัสดุเศษเหลือจากการผลิตไวน์ภายใต้สภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบแห้ง พบว่า *A. oryzae* สามารถเพิ่มปริมาณโปรตีนในวัสดุเศษเหลือที่ผ่านกระบวนการหมักได้ดีกว่า *R. oryzae* และ *T. viride* ขณะที่ Xie et al. (2016) ศึกษาชนิดของเชื้อราและยีสต์ ได้แก่ *A. niger*, *A. oryzae*, *Trichoderma viride*, *Geotrichum candidum*, *Candida utilis* และ *C. tropicalis* ในการย่อยใบมะกอกเพื่อเพิ่มปริมาณโปรตีนภายใต้สภาวะการหมักแบบแห้ง พบว่า *A. niger* สามารถผลิตเอนไซม์ FPAse, CMCase และ β-glucosidase ได้มากกว่าจุลินทรีย์อื่น ส่งผลให้ปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นเป็น 15.68% หลังจากการหมักเป็นระยะเวลา 5 วัน Xiao *et al*. (2009) เปรียบเทียบชนิดของรา (*A. niger*, *T. koningii* และ *T. viride*) ในการเพิ่มปริมาณโปรตีนในพืชน้ำสามชนิดได้แก่ *Elodea nuttalli*, *Vallisneria natans* และ *Alterranthera philoxerides* พบว่านอกจาก *A. niger* จะสามารถเพิ่มปริมาณโปรตีนในพืชน้ำทั้งสามชนิดแล้ว ยังมีปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสมากกว่า *T. viride* และ *T. koningii* ด้วยเหตุนี้ ความสามารถในการสร้างเอนไซม์ของจุลินทรีย์เพื่อย่อยวัสดุเศษเหลือจึงเป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อการเพิ่มปริมาณโปรตีน ดังนั้น จึงใช้เชื้อรา *A. oryzae* TISTR 3102 ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและ RSD ได้มากกว่า *R. oryzae* ทำหน้าที่ในการย่อยกากมันสำปะหลังให้เป็นน้ำตาลให้ยีสต์ใช้น้ำตาลในการเจริญเติบโตเพื่อเพิ่มปริมาณโปรตีนในกากมันสำปะหลังต่อไป



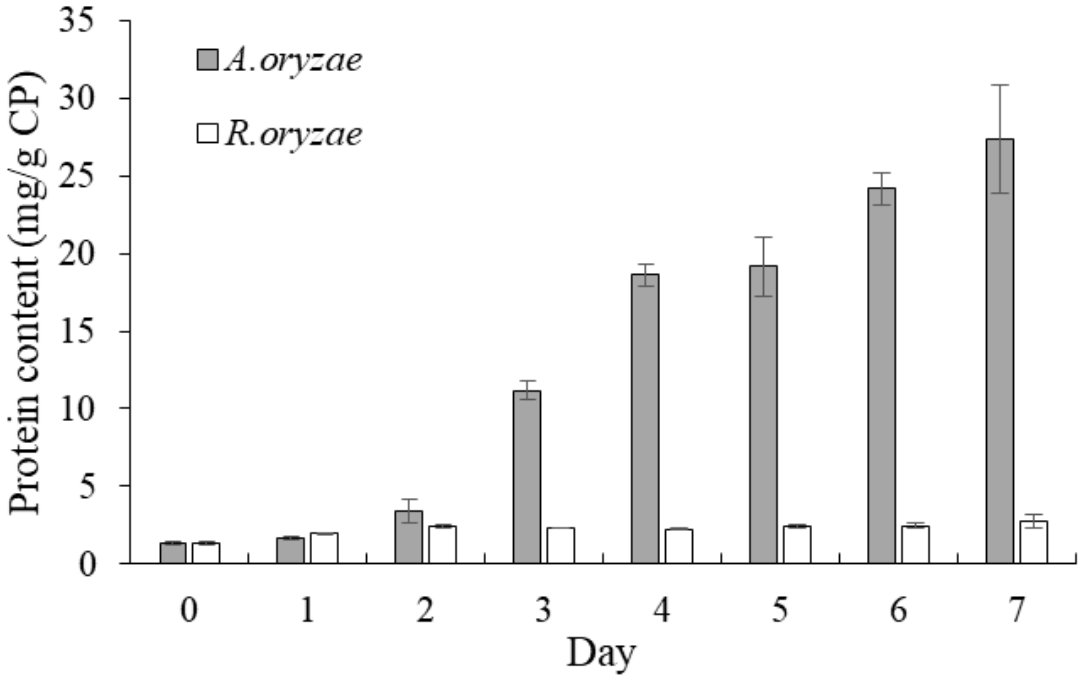
ภาพที่ 4.1 ผลของชนิดเชื้อราต่อการผลิตเอนไซม์ amylase



ภาพที่ 4.2 ผลของชนิดเชื้อราต่อการผลิต raw starch digesting enzyme



ภาพที่ 4.3 ผลของเชื้อราต่อการเปลี่ยนแปลงของน้ำตาลรีดิวซ์เมื่อบ่มเป็นเวลา 7 วัน

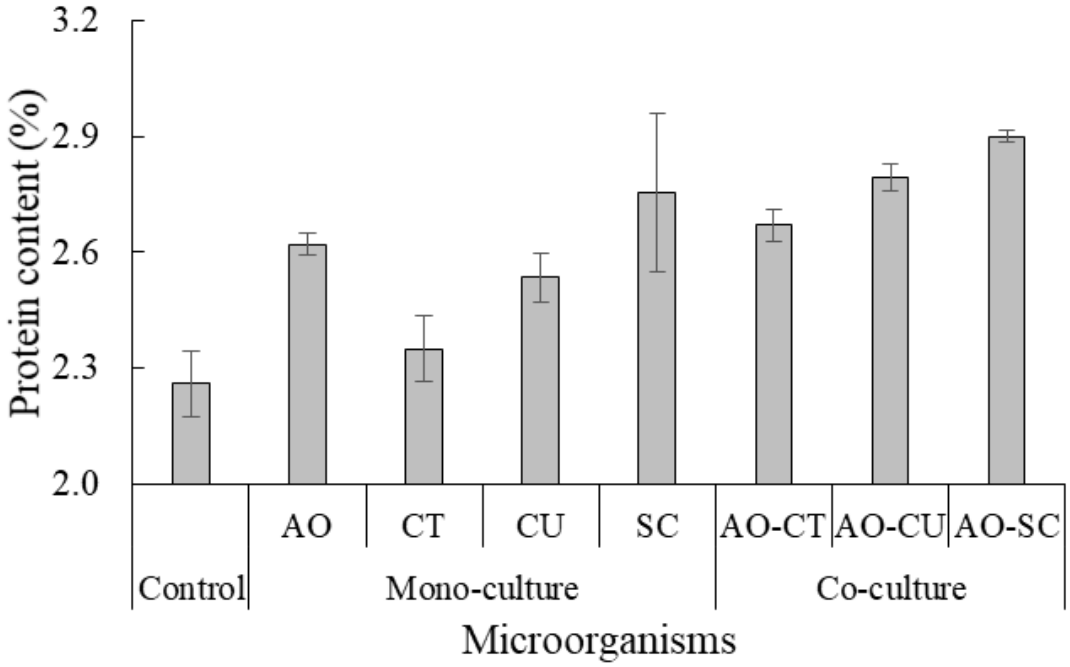


ภาพที่ 4.4 ผลของเชื้อราต่อการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนเมื่อบ่มเป็นเวลา 7 วัน

1.3 ผลของการเลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus oryzae* ร่วมกับยีสต์ (*C. tropicalis*, *C. utilis*, *S. cerevisiae*) ต่อการเพิ่มปริมาณโปรตีน

จากการศึกษาผลของการเลี้ยงเชื้อเดี่ยว (mono-culture) และการเลี้ยงเชื้อร่วม (co-culture) ต่อการเพิ่มปริมาณโปรตีนในกากมันสำปะหลัง โดยการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิห้อง มีปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 65 เป็นระยะเวลา 7 วัน และวัดปริมาณโปรตีน จากการเลี้ยงเชื้อเดี่ยว (mono-culture) ได้แก่ *A. oryzae* TISTR 3102, *C. tropicalis* TISTR 5136, *C. utilis* TISTR 5032 และ *S. cerevisiae* TISTR 5598 เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (control) ซึ่งไม่มีการเติมเชื้อจุลินทรีย์ พบว่า กากมันสำปะหลังที่มีการเติมเชื้อยีสต์ด้วย *S. cerevisiae* TISTR 5598 มีปริมาณโปรตีนร้อยละ 2.76±0.21 ซึ่งมากกว่ากากมันสำปะหลังที่มีการเติมเชื้อ *A. oryzae* TISTR 3102, *C. utilis* TISTR 5032, *C. tropicalis* TISTR 5136 และชุดควบคุม ซึ่งมีปริมาณโปรตีนร้อยละ 2.62±0.03, 2.54±0.06, 2.35±0.08 และ 2.26±0.08 ตามลำดับ (ภาพที่ 4.5) Hamdy *et al*. (2013) ศึกษาการเพิ่มปริมาณโปรตีนในเปลือกส้มโดยการหมักแบบแห้ง (solid state fermentation, SSF) ด้วย *Aspergillus niger*, *Rhizopus oryzae* และ *Saccharomyces cerevisiae* พบว่า *R. oryzae* สามารถเพิ่มปริมาณโปรตีนในเปลือกส้มได้ 1.8 เท่า (จากร้อยละ 34 เป็นร้อยละ 56.11) Xie *et al*. (2016) เปรียบเทียบจุลินทรีย์ ได้แก่ *A. niger*, *A. oryzae*, *Trichoderma viride*, *C. utilis*, *C. tropicalis* และ *Geotrichum candidum* ต่อการเพิ่มปริมาณโปรตีนในใบมะกอกภายใต้สภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบแห้ง พบว่า *A. niger* มีการสร้างไฮโดรไลติกเอนไซม์ ได้แก่ β-glucosidase, CMCase, FPase และ cellulase ซึ่งมีปริมาณเซลลูเลสมากที่สุดส่งผลให้ *A. niger* สามารถใช้ใบมะกอกเป็นแหล่งอาการและเพิ่มโปรตีนสูงที่สุด (ร้อยละ 15.68) มากกว่าจุลินทรีย์อื่น

สำหรับการเลี้ยงเชื้อร่วม (co-culture) ของรา *A. oryzae* TISTR 3102 ร่วมกับยีสต์ *C. tropicalis* TISTR 5136, *C. utilis* TISTR 5032 และ *S. cerevisiae* TISTR 5598 พบว่าการเลี้ยงยีสต์ที่มีการเติมเชื้อรา *A. oryzae* TISTR 3102 ในอัตราส่วน 1 : 1 โดยมีปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นคงที่ร้อยละ 10 มีปริมาณโปรตีนมากกว่าการเลี้ยงเชื้อยีสต์เพียงอย่างเดียวภายหลังจากการหมักเป็นระยะเวลา 7 วัน (ภาพที่ 4.5) นอกจากนี้ การเลี้ยงยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5598 ที่มีการเติมรา *A. oryzae* TISTR 3102 มีปริมาณโปรตีนมากที่สุดร้อยละ 2.87±0.06 ซึ่งมากกว่าการเลี้ยงยีสต์ชนิดอื่นร่วมกับรา และการเลี้ยงยีสต์หรือราเพียงชนิดเดียว ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Jin *et al*. (2016), Li *et al*. (2013) และ Xie *et al*. (2016) ที่พบว่าการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ร่วมกันสามารถเพิ่มปริมาณโปรตีนในวัสดุเศษเหลือจากอุตสาหกรรมเกษตรได้มากกว่าการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เพียงชนิดเดียวหรือสายพันธุ์เดียว



ภาพที่ 4.5 ผลของการเลี้ยงเชื้อเดี่ยวและการเลี้ยงเชื้อร่วมต่อการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน เมื่อบ่มเป็นเวลา 7 วัน (**AO**, *A. oryzae*; **CT**, *C. tropicalis*; **CU**, *C. utilis*; **SC**, *S. cerevisiae*; **AO-CT**, *A. oryzae* ร่วมกับ *C. tropicalis*; **AO-CU**, *A. oryzae* ร่วมกับ *C. utilis*; **AO-SC**, *A. oryzae* ร่วมกับ *S. cerevisiae*)

1.4 ผลของปัจจัยที่มีอิทธิผลต่อปริมาณโปรตีนจากการเลี้ยงเชื้อรา *A. oryzae* ร่วมกับยีสต์ *S. cerevisiae* ตามแผนการทดลองที่ออกแบบโดยวิธี Plackett-Burman

เมื่อศึกษาปัจจัยทางกายภาพ ได้แก่ ปริมาณความชื้น (A), ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น (B), ความเข้มข้นของยีสต์ (C), ระยะเวลาระหว่างการหมักที่เติมเชื้อยีสต์ (D), ระยะเวลาที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อทั้งหมด (E) และชนิดของสารอาหาร ได้แก่ รำข้าว (F), ยูเรีย (G), แอมโมเนียมคลอไรด์ (H), แคลเซียมคลอไรด์ (I) และ โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (J) ที่มีผลต่อปริมาณโปรตีนทั้งส่วนที่ละลายซึ่งวัดโดยวิธี Lowry และส่วนที่ไม่ละลายซึ่งวัดด้วยวิธี Kjeldahl จากการเลี้ยงรา *A. oryzae* TISTR 3102 ร่วมกับยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5598 ที่อุณหภูมิห้องโดยออกแบบการทดลองด้วยวิธี Plackett-Burman ซึ่งมีการทดลองทั้งหมด 12 การทดลอง (ตารางที่ 3.1) พบว่า แต่ละการทดลองมีปริมาณโปรตีนที่เกิดขึ้นจากการหมักกากมันสำปะหลังหลังจากการเลี้ยงเชื้อร่วมที่แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 4.2 โดยการทดลองที่ 8 ที่ทำการเลี้ยงเชื้อที่ระดับความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 55, ปริมาณหัวเชื้อทั้งหมดร้อยละ 5, ปริมาณยีสต์ร้อยละ 75, เติมยีสต์ในวันที่ 3, บ่มเป็นระยะเวลา 9 วัน, Urea และ NH_4Cl ร้อยละ 0.4, KH_2PO_4 ร้อยละ 0.2 และไม่มีการเติม Rice bran และ $CaCl_2$ ให้ปริมาณโปรตีนที่ละลายและไม่ละลายสูงสุดเท่ากับ 6.64±0.13 เปอร์เซ็นต์ และ 136.04±0.10 (mg/g CP) ตามลำดับ

ตารางที่ 4.2 ผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน จากการเลี้ยงเชื้อราร่วมกับยีสต์ในแต่ละการทดลอง

Run	Variables										Responses	
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	Insoluble protein (%)	Soluble protein (mg/g CP)
1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	4.78±0.33	12.34±0.16
2	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	3.41±0.08	26.95±0.14
3	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	2.47±0.14	86.78±1.52
4	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	2.60±0.19	28.36±0.03
5	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	5.27±0.21	41.35±0.10
6	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	4.64±0.35	103.20±0.49
7	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	4.37±0.18	38.08±0.00
8	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	6.64±0.13	136.04±0.10
9	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	4.14±0.10	92.17±0.21
10	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	5.46±0.10	66.59±0.49
11	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	5.79±0.03	96.85±0.30
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	2.42±0.17	41.66±0.89

เมื่อนำผลการดลองที่ได้ทั้ง 12 การทดลองไปวิเคราะห์ผลทางสถิติ โดยใช้โปรแกรม SPSS Version 17 เพื่อคัดเลือกปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการเพิ่มปริมาณโปรตีนในกากมันสำปะหลังหมักด้วยรา *A. oryzae* TISTR 3102 ร่วมกับยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5598 โดยในตารางที่ 4.3 แสดงค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (coefficient estimate) ค่าสถิติ (*t*-value) ค่านัยสำคัญของการทดสอบ (*P*-value) และค่าความเชื่อมั่น (Confidence) จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติยังพบว่า ระยะเวลาในการหมัก รำข้าว Urea NH_4Cl และ KH_2PO_4 ยังส่งผลเชิงบวกต่อปริมาณโปรตีนที่ไม่ละลายและโปรตีนที่ละลาย (ภาพที่ 4.6) กล่าวคือ การเพิ่มระดับของปัจจัยเหล่านี้จะส่งผลให้ปริมาณโปรตีนที่ไม่ละลายและโปรตีนที่ละลายในกากมันสำปะหลังหมักเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากการเพิ่มระยะเวลาในการหมักจะทำให้จุลินทรีย์สามารถใช้สารอาหารและเจริญเติบโตมากขึ้นส่งผลให้ปริมาณโปรตีนเพิ่มสูงขึ้น Jia *et al.* (2017) ศึกษาระยะเวลาในการเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อเพิ่มปริมาณโปรตีนในฟางข้าว โดยการเลี้ยงเชื้อ *Neurospora crassa* 14-8 และ *Candida utilis* CGMCC2.1180 ที่ระยะเวลา 0, 12, 24, 26, 48, 60, 72, 84 และ 96 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่า การเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 60 ชั่วโมง (5 วัน) มีปริมาณโปรตีนมากที่สุด 6.49% Xie *et al*. (2016) ศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยงรา *A. niger* และยีสต์ *C. tropicalis* โดยออกแบบการทดลองแบบ Central composite

design (CCD) พบว่า ระยะเวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยงจุลินทรีย์ร่วมคือ 87 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30.8 องศาเซลเซียส ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 59.7 ซึ่งจะให้ปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นร้อยละ 79.85 รำข้าวเป็นวัสดุเศษเหลือจากกระบวนการแปรรูปข้าวมีแหล่งของไนโตรเจนและแร่ธาตุที่สำคัญ (Faria *et al*., 2012) เมื่อเติมในระหว่างการหมักทำให้จุลินทรีย์มีสารอาหารเพื่อใช้ในการเจริญเติมโตมากขึ้น ซึ่งนอกจากรำข้าวแล้วยังมีผลพลอยได้ทางการเกษตรอื่นที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้เพื่อเพิ่มปริมาณโปรตีนในวัสดุเศษเหลือทางอุตสาหกรรมเกษตร เช่น รำข้าว (Xiao *et al*., 2009) น้ำทิ้ง (Oboh *et al*., 2006) เป็นต้น ยูเรียและแอมโมเนียมคลอไรด์ (Urea และ NH_4Cl) ซึ่งเป็นแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน ซึ่งนอกจากจะเป็นแหล่งไนโตรเจนซึ่งในในการสร้างโปรตีนในกากมันสำปะหลังหมักแล้ว ยูเรียและแอมโมเนียมคลอไรด์ยังกระตุ้นการสร้างเอนไซม์อะไมเลส (Afrisham *et al*., 2016) ส่งผลให้จุลินทรีย์สามารถย่อยกากมันสำปะหลังและใช้เป็นแหล่งอาหารเพื่อการเจริญ ส่งผลให้โปรตีนในกากมันสำปะหลังหมักเพิ่มขึ้น จึงได้มีการศึกษาวิจัยที่เติมยูเรียลงไปในกระบวนการหมักวัสดุเศษเหลือทางอุตสาหกรรมเกษตรเพื่อเพิ่มปริมาณโปรตีนให้เหมาะสมต่อการใช้เป็นอาหารสัตว์ (Jia *et al*., 2017; Villas-Boas *et al*., 2003; Lei *et al*., 2012) โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) เป็นปัจจัยที่มีส่วนในการควบคุมการสร้างเอนไซม์ระหว่างการเจริญของจุลินทรีย์ (Prakasham *et al*. 2007) การเติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตจะส่งผลให้จุลินทรีย์เจริญเติบโตดีขึ้น

ในทางตรงข้าม $CaCl_2$ ส่งผลเชิงลบต่อปริมาณโปรตีนที่ไม่ละลายและโปรตีนที่ละลาย กล่าวคือ การเพิ่มระดับของ $CaCl_2$ จะส่งผลให้ปริมาณโปรตีนที่ไม่ละลายและโปรตีนที่ละลายในกากมันสำปะหลังหมักลดน้อยลง ถึงแม้ว่า $CaCl_2$ จะมีผลในการเพิ่มการสร้าง raw starch digesting enzyme (Sun *et al*., 2009) เมื่อพิจารณาคัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการหมักกากมันสำปะหลังเพื่อเพิ่มปริมาณโปรตีนส่วนที่ไม่ละลาย โดยจะพิจารณาจากค่าความเชื่อมั่นที่มากกว่าร้อยละ 90 ซึ่งจากการวิเคราะห์พบว่า มีเพียง 1 ตัวแปร ซึ่งได้แก่ ยูเรีย (G) เป็นปัจจัยที่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณโปรตีนอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 90 (P<0. 1)

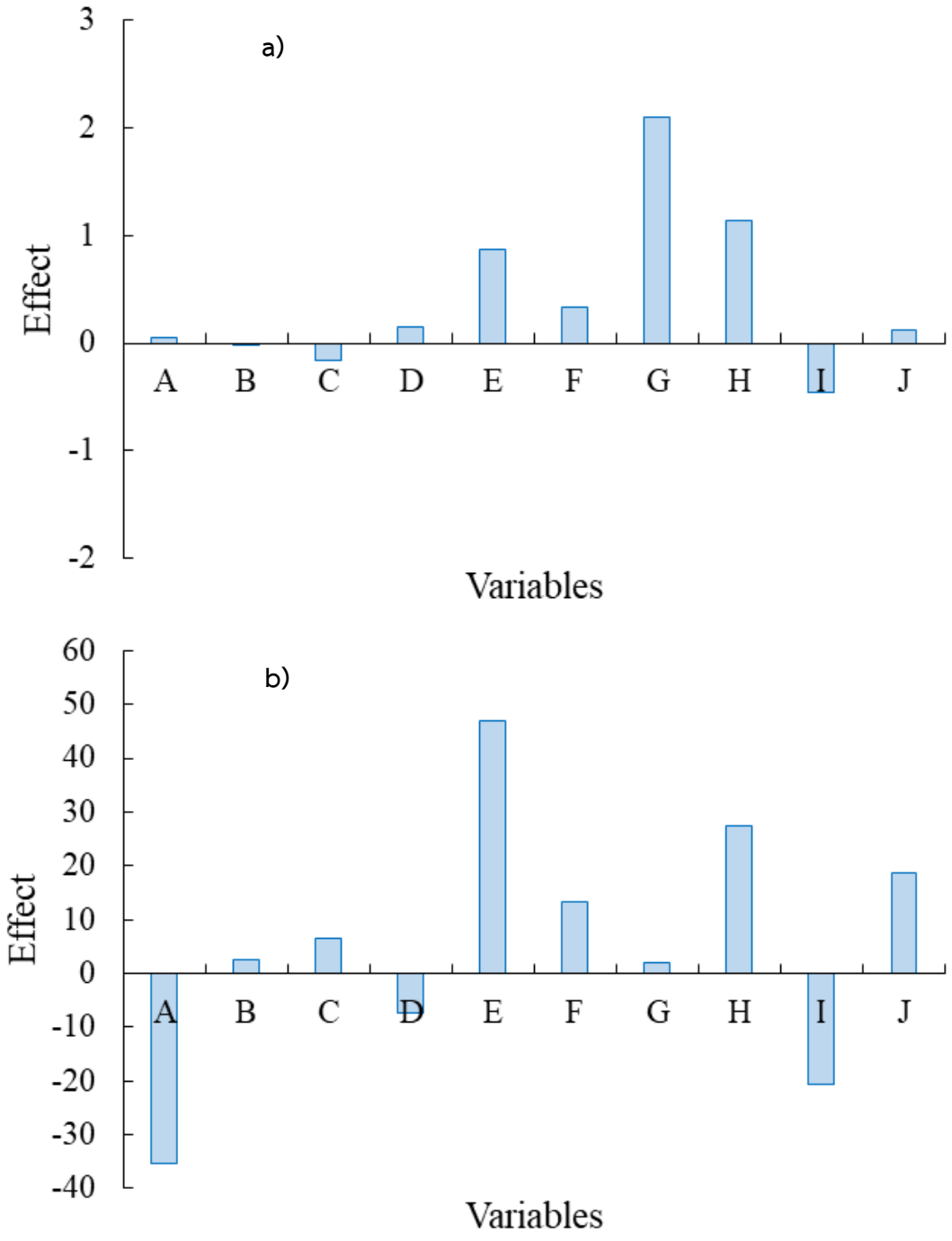
ตารางที่ 4.3 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้วิธี Plackett-Burman ออกแบบการทดลองต่อปริมาณโปรตีนจากการเลี้ยงเชื้อราร่วมกับยีสต์

Variables	Code	Coefficient	*t*-value	Sig.	Confidence (%)
Insoluble protein [b]					
Moisture content	A	0.028	0.175	0.890	11.0
Inoculum size	B	-0.007	-0.048	0.970	3.0
Yeast concentration	C	-0.082	-0.524	0.693	30.7
Yeast inoculation time	D	0.072	0.460	0.725	27.5
Time	E	0.438	2.778	0.220	78.0
Rice bran	F	0.168	1.063	0.480	52.0
Urea	G	1.053	6.683	0.095	90.5[a]
NH_4Cl	H	0.568	3.603	0.172	82.8
$CaCl_2$	I	-0.228	-1.444	0.386	61.4
KH_2PO_4	J	0.063	0.397	0.760	24.0
Soluble protein [c]					
Moisture content	A	-17.733	-3.892	0.160	84.0
Inoculum size	B	1.338	0.294	0.818	18.2
Yeast concentration	C	3.269	0.718	0.604	39.6
Yeast inoculation time	D	-3.706	-0.813	0.565	43.5
Time	E	23.491	5.156	0.122	87.8
Rice bran	F	6.678	1.466	0.381	61.9
Urea	G	1.011	0.222	0.861	13.9
NH_4Cl	H	13.728	3.013	0.204	79.6
$CaCl_2$	I	-10.379	-2.278	0.263	73.7
KH_2PO_4	J	9.398	2.063	0.287	71.3

[a] มีนัยสำคัญที่ระดับ 90% ($P<0.1$)

[b] R^2 = 0.986, Adjusted R^2 = 0.843

[c] R^2 = 0.985, Adjusted R^2 = 0.830



ภาพที่ 4.6 อิทธิพลของปัจจัยที่มีผลกระทบต่อปริมาณโปรตีนที่ไม่ละลาย (a) และโปรตีนที่ละลายได้ (b) เมื่อเลี้ยงรา *A. oryzae* ร่วมกับยีสต์ *S. cerevisiae* ตามแผนการทดลองแบบ Plackett-Burman (**A**, moisture content; **B**, inoculum size; **C**, yeast concentration; **D**, yeast inoculation time; **E**, time; **F**, rice bran; **G**, urea; **H**, NH_4Cl; **I**, $CaCl_2$; **J**, KH_2PO_4)

จากการทดสอบค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) ของการเพิ่มปริมาณโปรตีนทั้งส่วนที่ละลายจากการเลี้ยงรา *A. oryzae* TISTR 3102 ร่วมกับยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5598 พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.986 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสามารถใช้อธิบายการเพิ่มปริมาณโปรตีนได้ร้อยละ 98.6 ส่วนที่เหลืออีกร้อยละ 1.4 ไม่สามารถอธิบายได้ ซึ่งเป็นผลจากตัวแปรอื่นที่ไม่สามารถควบคุมได้ ส่วนสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) ของการเพิ่มปริมาณโปรตีนทั้งส่วนที่ไม่ละลายจากการเลี้ยงรา *A. oryzae* TISTR 3102 ร่วมกับยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5598 พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.985 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสามารถใช้อธิบายการเพิ่มปริมาณโปรตีนได้ร้อยละ 98.5 ส่วนที่เหลืออีกร้อยละ 1.5 ไม่สามารถอธิบายได้ ซึ่งเป็นผลจากตัวแปรอื่นที่ไม่สามารถควบคุมได้ จากผลการทดลองเบื้องต้นจึงเลือกทำการทดลองโดยการหมักกากมันสำปะหลังด้วยราร่วมกับยีสต์ โดยมีปริมาณหัวเชื้อทั้งหมดร้อยละ 5, ปริมาณยีสต์ร้อยละ 75, เติมยีสต์ในวันที่ 3, ปรับระดับความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 55, บ่มเป็นระยะเวลาทั้งหมด 9 วัน, เติม Urea และ NH_4Cl ร้อยละ 0.4, KH_2PO_4 ร้อยละ 0.2 และไม่มีการเติม Rice bran และ $CaCl_2$ นำวิธีการเพิ่มปริมาณโปรตีนที่ได้ไปผลิตเป็นกากมันสำปะหลังโปรตีนสูง (ภาพที่ 4.7)

ภาพที่ 4.7 กากมันสำปะหลังก่อน (a) และหลังการหมักด้วยราร่วมกับยีสต์ (b)

2. การนำกากมันสำปะหลังเพิ่มโปรตีนไปใช้ทดแทนอาหารข้นในแพะเนื้อ

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของอาหารข้น กากมันสำปะหลังหมักยีสต์และอาหารหยาบ ที่ใช้ในการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.4 คือ อาหารข้น 16% CP, กากมันสำปะหลังหมักยีสต์และอัลฟาฟ่าแห้งชนิดอัดเม็ด พบว่า องค์ประกอบทางเคมีที่เป็นวัตถุแห้งเท่ากับ 95.92, 83.14 และ 96.56 ตามลำดับ และโปรตีนหยาบเท่ากับ 17.66, 1.41 และ 18.72 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ไขมัน มีค่าเป็น 4.16, 0.45 และ 1.82 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เถ้า มีค่าเป็น 6.24, 8.05 และ 17.68 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เถ้าที่ไม่ละลายในกรด (AIA) มีค่าเป็น 0.53, 0.44 และ 5.43 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เยื่อใยหยาบ มีค่าเป็น10.92, 4.51 และ 23.73 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เยื่อใยที่ไม่ละลายในสารฟอกที่เป็นกลาง (NDF) มีค่าเป็น 34.67, 7.79 และ 39.61 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เยื่อใยที่ไม่ละลายในสารฟอกที่เป็นกรด (ADF) มีค่าเป็น 14.57, 7.06 และ 31.57 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนลิกนิน (ADL) มีค่าเป็น 2.96, 1.41 และ 6.90 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และพลังงานรวม มีค่าเป็น 3,657.15, 808.14 และ 3,369.10 แคลอรี่/กรัม ตามลำดับ

อาหารข้นผสมสำเร็จรูป 16%CP (ซีพี 991-16 บริษัท ซีพีเอฟ (ประเทศไทย) จำกัด (มหาชน)) มีวัตถุดิบที่ใช้เป็นส่วนผสมอาหารแพะทดลอง ดังนี้ ปลาป่น, กากถั่วเหลืองหรือกากถั่วลิสงและหรือกากเมล็ดทานตะวัน, กากเรปซีด, กากมะพร้าว, ใบกระถินป่น, ข้าวโพดป่น, มันสำปะหลัง, รำข้าวสาลี และหรือรำละเอียดและหรือรำสกัดน้ำมัน, กากข้าวมอลล์ และหรือกากข้าวบาร์เลย์, กากน้ำตาล, น้ำมันพืช, ไดแคลเซียมฟอสเฟส, เกลือ, วิตามิน, แร่ธาตุและสารถนอมคุณภาพอาหาร (ที่ไม่ระบุ) ระบุคุณภาพทางเคมีของอาหารสัตว์ตามฉลากดังนี้ โปรตีน ไม่น้อยกว่า 16%, ไขมัน ไม่น้อยกว่า 2.5%, กากไม่น้อยกว่า 10% และความชื้นไม่มากกว่า 13% สอดคล้องและเป็นไปตามผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีที่ได้จริงจากห้องปฏิบัติการวิเคราะห์อาหารสัตว์ ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน (ดังตารางที่ 4.4) โดยพบว่าอาหารข้นผสมสำเร็จรูป 16%CP มีองค์ประกอบทางเคมีแตกต่างกันเล็กน้อยจากฉลากและจากรายงานผลบริษัทห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด จังหวัดขอนแก่น ในงานทดลองที่ผ่านมาที่ใช้อาหารข้นสำเร็จรูปชนิดอัดเม็ด ณ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีและมหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสระแก้วที่ระดับโปรตีนเท่ากัน พบว่า อาหารข้นสำเร็จรูปชนิดเม็ดโปรตีน 16% นี้มีเปอร์เซ็นต์เถ้า, CP, CF และ total fat เท่ากับ 6.24, 16.23, 10.05 และ 4.20 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สรุปได้ว่า องค์ประกอบทางเคมีของอาหารข้นผสมสำเร็จรูป 16%CP ที่ใช้ทดลองพบว่า มีค่าใกล้เคียงกับผลรายงานอื่น และมีคุณสมบัติตรงตามคุณค่าทางโภชนะของอาหารข้นผสมสำเร็จรูป 16%CP

ผลการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของกากมันสำปะหลังก่อนและหลังการหมักด้วย *A. oryzae* และ *S. cerevisiae* พบว่า กากมันสำปะหลังก่อนและหลังการหมัก มีคุณค่าทางโภชนะแตกต่างกันเล็กน้อย ดังนี้ วัตถุแห้งมีค่าเท่ากับ 96 และ 83.14 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ความชื้นมีค่าเท่ากับ 4 และ 16.86 ตามลำดับ เปอร์เซ็นต์โปรตีนมีค่าเท่ากับ 0.95 และ 1.41 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ไขมันมีค่าเท่ากับ 1.33 และ 0.45 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เถ้ามีค่าเท่ากับ 1.97 และ 1.32 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เยื่อใยมีค่าเท่ากับ 17.63 และ 4.51 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ AIA มีค่าเท่ากับ 53.20 และ 0.44 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ NDF มีค่าเท่ากับ 53.20 และ 7.79 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ADF มีค่าเท่ากับ 46.15 และ 7.06 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ADL มีค่าเท่ากับ 2.41 และ 1.41 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ องค์ประกอบทางเคมีของกากมันสำปะหลังก่อนการหมักมีระดับของเปอร์เซ็นต์โปรตีนและไขมันต่ำ แต่อยู่ในช่วงที่มีการรายงานข้อมูลวิจัยไว้โดยผู้วิจัยและสถาบันต่างๆ (Khang et al., 2000; Preston, 2004, Suksombat et al., 2006, Thanh and Suksombat, 2015 และ Srisaikham et al. 2018) ทั้งนี้เปอร์เซ็นต์วัตถุแห้ง ไขมัน และโปรตีนขึ้นอยู่กับกรรมวิธีการผลิตของโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลังและอายุของมันสำปะหลัง โดยเฉพาะอย่างยิ่งเปอร์เซ็นต์วัตถุแห้งที่สูงหรือต่ำลงอาจเกิดจากอุณหภูมิของสภาพแวดล้อมในขณะตากกากมันสำปะหลังให้แห้ง รวมถึงสายพันธุ์ กระบวนการเก็บเกี่ยว ชนิดของดิน การใส่ปุ๋ย ฤดูกาลและสถานที่เพาะปลูกมันสำปะหลัง ทำให้องค์ประกอบทางเคมีของกากมันสำปะหลังมีคุณค่าทางโภชนะแตกต่างกัน (Srisaikham et al., 2018) ขณะที่เปอร์เซ็นต์เถ้าค่อนข้างผันผวนไปตามปริมาณการปนเปื้อนของดินหรือทรายขณะตากกากมันสำปะหลัง (ปิตุนาถ, 2547) สอดคล้องกับการศึกษาของจักรกริช (2555) ระบุว่ากระบวนการหมักเปลือกมันสำปะหลังด้วย *A. oryzae* และ *S. cerevisiae* พบว่า องค์ประกอบทางเคมีของเปลือกมันสำปะหลังก่อนและหลังหมักมีค่าวัตถุแห้งเยื่อใย, NDF, ADF, ADL, Neutral detergent insoluble nitrogen (NDIN), Neutral detergent insoluble crude protein (NDIN), NDINCP, Acid detergent insoluble nitrogen (ADIN) และ Acid detergent insoluble crude protein (ADINCP) ใกล้เคียงกัน ดังนี้คือ กากมันสำปะหลังก่อนและหลังหมักด้วย *A. oryzae* และ *S. cerevisiae* มีค่าวัตถุแห้งเท่ากับ 96 และ 94 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ กล่าวคือความชื้นมีค่าเท่ากับ 4 และ 6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โปรตีนมีค่าเท่ากับ 2.87 และ 23.02 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ไขมันมีค่าเท่ากับ 1.33 และ 2.65 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เถ้ามีค่าเท่ากับ 12.97 และ 13.73 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เยื่อใยมีค่าเท่ากับ 17.63 และ 18.95เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ NDF มีค่าเท่ากับ 53.20 และ 54.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ADF มีค่าเท่ากับ 46.15 และ 45.39 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ADL มีค่าเท่ากับ 12.41 และ 9.38 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ NDIN มีค่าเท่ากับ 0.36 และ 0.35 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ NDINCP มีค่าเท่ากับ 1.01และ 2.21 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ADIN มีค่าเท่ากับ 0.14 และ 0.18เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ADINCP มีค่าเท่ากับ 0.87 และ 1.11 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม เปอร์เซ็นต์โปรตีนหยาบและไขมันของเปลือกมันสำปะหลังหมักมีค่าสูงกว่าเปลือกมันสำปะหลังก่อนหมักอย่างชัดเจน ผลการศึกษาดังกล่าวยังสัมพันธ์กับข้อมูลของส่วนประกอบทางโภชนาการหลักๆ ของโปรตีนเซลล์เดียว (Single cell protein (SCP)) บางชนิด ที่ระบุว่าโดยทั่วไปแล้วจะมีโปรตีนหยาบสูงกว่ากากถั่วเหลืองคือ รา ยีสต์และสาหร่ายมีโปรตีนอยู่ระหว่าง 53–56% ในขณะที่ SCP จากแบคทีเรียมีโปรตีนอยู่ 74% มีไขมันอยู่ในช่วง 1–5% เยื่อใยใกล้เคียงกับกากถั่วเหลือง มี

แคลเซียมต่ำและฟอสฟอรัสสูงกว่ากากถั่วเหลือง คุณภาพของโปรตีน การย่อยได้และสมดุล amino acid ของ SCP ผันแปรไปตามชนิดของจุลินทรีย์และแม้แต่ในจุลินทรีย์ชนิดเดียวกัน คุณค่าของโปรตีนก็ยังผันแปรไปกับ genus และ species ด้วย (Waterworth, 1990) สอดคล้องกับ Oboh (2006), Oboh and Akindahunsi (2003), Aro et al. (2008) และ Oboh and Elusiyan (2007) พบว่า มันสำปะหลังที่หมักโดยการเสริมจุลินทรีย์มีปริมาณโปรตีนสูงกว่าการหมักโดยไม่ใช้จุลินทรีย์ และมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการหมักตามลำดับ เนื่องจากจุลินทรีย์ที่เสริมลงไป จะเข้าไปเปลี่ยนแป้งในมันสำปะหลังให้เป็นโปรตีนในร่างกายของจุลินทรีย์ ขณะเดียวกัน Crude fibre ในมันสำปะหลังที่หมักโดยไม่เสริมจุลินทรีย์นั้นจะต่ำกว่าการหมักโดยการเสริมจุลินทรีย์ และมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการหมักตามลำดับด้วย เนื่องจากการหมักแบบธรรมดานั้นมีจุลินทรีย์ที่อาศัยในธรรมชาติอยู่หลายชนิด ทำให้สามารถย่อยเยื่อใยในมันสำปะหลังได้ดีกว่า โดยปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในกระบวนการหมักนั้นขึ้นอยู่กับอาหาร อากาศ น้ำ อุณหภูมิ ความเป็นกรดด่าง (pH) เป็นต้น ซึ่งปัจจัยด้านอาหารประกอบด้วยคาร์บอน ไนโตรเจน และแร่ธาตุ เนื่องจาก Reducing sugar เป็นแหล่งคาร์บอน จึงจำเป็นต้องมีการเติมแหล่งไนโตรเจน อาทิเช่น ยูเรีย ไบยูเรท ลงไปในผลิตภัณฑ์ที่ได้จากมันสำปะหลังเพื่อนำไปเป็นแหล่งอาหารของยีสต์ ซึ่งยูเรียจัดเป็นสารเคมีที่มักถูกนำมาผสมลงไปในอุตสาหกรรมของอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้อง เพื่อยกระดับโปรตีนให้สูงขึ้นด้วยวิธีการทดแทนลงในสูตรอาหารหรือปรุงแต่งวัตถุดิบอาหารสัตว์ประเภทโปรตีนที่มีราคาแพงอย่างกากถั่วเหลือง เนื่องจากเมื่อยูเรียถูกย่อยในกระเพาะหมักของสัตว์เคี้ยวเอื้องแล้วนั้น จะให้ไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียเช่นเดียวกับโปรตีน แต่ให้ในปริมาณที่สูงกว่าโปรตีน คือ ยูเรียสามารถให้ไนโตรเจนได้ถึง 46% ซึ่งเมื่อคิดเป็นโปรตีนจะได้ 287.5% ซึ่งทำให้ต้นทุนค่าอาหารสัตว์ต่ำลงได้มาก (Chalmers, and While, 1969) อย่างไรก็ตาม การใช้ยูเรียต้องคำนึงถึงระดับความเป็นพิษด้วย (Osweiler, Carson, and Buck, 1985) นอกจากนี้องค์ประกอบทางเคมีต่างๆ เช่น วัตถุแห้ง โปรตีน เถ้า และเยื่อใยของกากมันสำปะหลังขึ้นอยู่กับกรรมวิธีและขั้นตอนในการเก็บตัวอย่าง หรือสุ่มเก็บตัวอย่าง อายุและการจัดเก็บรักษาในโรงงาน จากรายงานวิจัยจำนวนมากที่ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของพืชอาหารสัตว์ชนิดอื่นให้ผลสอดคล้องไปในทางเดียวกัน คือ ส่วนของลำต้นหรือก้านของพืชอาหารสัตว์จะมีองค์ประกอบที่เป็นเยื่อใยในปริมาณที่สูงกว่าใบ ทั้งนี้เนื่องจากพืชที่มีอายุมากจะมีผนังเซลล์หนาและย่อยได้ยาก และส่วนของกิ่งก้านจะมีองค์ประกอบที่เป็นลิกนินสูง ซึ่งย่อยไม่ได้ ดังนั้นพืชที่มีอายุมาก คุณค่าทางอาหารจะลดลง (ชวนิศนดากร, 2534)

ตารางที่ 4.4 องค์ประกอบทางเคมีของอาหารข้นและอาหารหยาบ (Mean ± SD)

องค์ประกอบทางเคมี	อาหารข้น	กากมันสำปะหลังสด	กากมันสำปะหลังหมักยีสต์	อัลฟาฟ่าแห้งชนิดอัดเม็ด
DM (%)	95.92±0.02	-	83.14±0.03	5.24±0.03
CP (%)	17.66±0.07	0.95±0.1	1.41±0.03	18.72±0.04
EE (%)	4.16±0.03	-	0.45±0.01	1.82±0.05
Ash	6.24±0.16	-	1.32±0.03	17.62±0.14
AIA	0.53±0.08	-	0.44±0.01	5.43±0.09
CF (%)	10.92±0.12	-	4.51±0.12	23.73±0.10
NDF (%)	34.67±0.10	-	7.79±0.03	39.61±0.12
ADF (%)	14.79±0.10	-	7.06±0.02	31.57±0.26
ADL (%)	2.96±0.06	-	1.41±0.08	6.9±0.15
พลังงานรวม (แคลอรี่/กรัม)	3,657.15±13.64	-	808.14±8.11	3,369.10±15.14

หมายเหตุ: DM= Dry matter, CP= Crude protein, EE= Ether extract, AIA= Acid insoluble ash, NDF=Neutral-detergent fiber, ADF = Acid-detergent fiber และ ADL=Acid-detergent lignin

องค์ประกอบทางเคมีของอัลฟาฟ่าแห้งชนิดอัดเม็ดครั้งนี้เป็นผลิตภัณฑ์นำเข้าจากประเทศสเปน โดยห้างหุ้นส่วนจำกัด พรชัย อินเตอร์เทรด ตำบลโพธาราม อำเภอโพธาราม จังหวัดราชบุรี พบว่า มีค่าใกล้เคียงกับการรายงานผลจากห้องปฏิบัติการ Laboratoris CONVET, S.L. (Laboratori Analisis Veterinaries) ที่ระบุว่า Dehydrated alfalfa pellets มีความชื้น, CP, Ash, NDF, ADF, Metabolisable energy (ME), Dry mater digestibility (DMD), water soluble carbohydrates (WSC) และ Relative Feed Value (RFV) มีค่าเท่ากับ 7.36%, 14.13%, 13.05%, 46.90%, 33.82%, 2.40 Kcal/g, 1.07%, 63.0 และ 124 ตามลำดับ ขณะที่ค่า Alfalfa ชนิด dehydrated pellets มีค่า 5.55%, 17.27%, 12.54%, 39.75%, 28.11%, 2.75 Kcal/g, 3.97%, 69.0, 157 และมี CF, EE และ lignin เท่ากับ 25.03%, 1.85% และ 3.97% ตามลำดับ DAIRYLAND Laboratories, Inc. ในสหรัฐอเมริกา รายงานถึง Great lake alfalfa แบบสดไว้แตกต่างกัน ดังนี้ ความชื้นเท่ากับ 56.64%, 43.36%DM, 3.74%EE, Ash เท่ากับ 11.36%, pH 4.68, 18.67%CP, 34.17%ADF, lignin เท่ากับ 19.01%, 40.48%NDFD, 1.92%ADICP, 3.11%NDICP, WSC เท่ากับ 4.19% และ Calcium, Phosphorus, Magnesium และ Potassium เท่ากับ 1.27, 0.36, 0.33 และ 0.36% ตามลำดับ ขณะที่ Collins (1998) รายงานว่า อัลฟาฟ่ามีเปอร์เซ็นต์โปรตีนเท่ากับ 16, NDF เท่ากับ 49%, ADF เท่ากับ 34%, lignin เท่ากับ 7% และ cell wall digestibility เท่ากับ 46% ทั้งนี้ผลการ

ประเมินคุณภาพของ RFV พบว่า อัลฟาฟ่าแห้งชนิดอัดเม็ดในครั้งนี้มีค่าอยู่ที่ระดับ 124 ซึ่งเป็นระดับที่เหมาะจะนำมาใช้ในการเลี้ยงสัตว์เคี้ยวเอื้อง และอยู่ในค่ามาตรฐาน RFV ของถั่วอัลฟาฟ่า เช่นเดียวกับ Dunham (1998) ที่รายงานว่า อัลฟาฟ่าในระยะ pre-bud, bud, early bloom, full bloom และ seed pod มีค่า RFV เท่ากับ 164, 152, 138 100 และ 92 ตามลำดับ ทั้งนี้การศึกษาคุณค่าทางโภชนะของอัลฟาฟ่าในประเทศไทยยังมีอยู่อย่างจำกัด เนื่องจากจัดเป็นถั่วอาหารสัตว์คุณภาพดี ที่ปลูกได้ยากในเมืองไทยและมีราคาค่อนข้างสูง

2.1 ปริมาณการกินได้วัตถุแห้งและโปรตีนของอาหาร

การกินได้ของวัตถุแห้งและโปรตีน แสดงไว้ในตารางที่ 4.5 ผลการทดลองพบว่า การกินได้โดยอิสระของแพะเนื้อทั้ง 4 กลุ่มการทดลอง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยปริมาณการกินได้วัตถุแห้งของอาหารข้นมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 311.4 กรัมวัตถุแห้งต่อตัวต่อวันทั้งสี่กลุ่ม ปริมาณการกินได้วัตถุแห้งของกากมันสำปะหลังหมักยีสต์มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0, 3.57, 7.14 และ 10.70 กรัมวัตถุแห้งต่อตัวต่อวัน ตามลำดับ และปริมาณการกินได้วัตถุแห้งของอาหารหยาบมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 389.1, 434.6, 542.7 และ 770.7 กรัมวัตถุแห้งต่อตัวต่อวัน ตามลำดับ และการกินได้ของอาหารรวมเฉลี่ยต่อตัวต่อวันเท่ากับ 755.5, 767.9, 842.9 และ 1037.8 กรัมต่อตัวต่อวัน ตามลำดับ การกินได้ของโปรตีนต่อวันพบว่าแพะทดลองกลุ่มที่ได้รับ กลุ่มที่ได้รับกากมันสำปะหลังหมักยีสต์ทดแทนในสูตรอาหารข้นที่ระดับ 30% (DM basis) สูงกว่าทุกกลุ่มการทดลอง ($P<0.05$)

ตารางที่ 4.5 ปริมาณการกินได้ของแพะเนื้อที่ได้รับอาหารข้น และอาหารหยาบ

	ระดับใช้กากมันสำปะหลังหมักยีสต์ทดแทนในสูตรอาหารข้น				SEM	P value
	0%[1]	10%FC[2]	20%FC[3]	30%FC[4]		
จำนวนสัตว์	4	4	4	4		
ปริมาณการกินได้วัตถุแห้ง (กรัม/วัน)						
อาหารข้น	366.4^{a}	329.7^{b}	293.1^{c}	256.4^{d}	2.64	0.12
กากมันสำปะหลังหมักยีสต์	0^{d}	3.57^{c}	7.14^{b}	10.70^{a}	0.26	0.24
อัลฟาฟ่าแห้งชนิดอัดเม็ด	389.1^{c}	434.6^{c}	542.7^{b}	770.7^{a}	20.2	2.33
รวมทั้งหมด	755.5^{c}	767.9^{c}	842.9^{b}	1037.8^{a}	19.24	0.24
ปริมาณการกินได้โปรตีน(กรัม/วัน)						
อาหารข้น	64^{a}	58^{b}	52^{c}	45^{d}	0.47	0.02
กากมันสำปะหลังหมักยีสต์	0^{d}	0.05^{c}	0.10^{b}	0.15^{a}	0.004	0.01
อัลฟาฟ่าแห้งชนิดอัดเม็ด	73^{d}	81^{c}	101^{b}	144^{a}	3.77	0.11
รวมทั้งหมด	137^{c}	139^{c}	153^{b}	189^{a}	3.59	0.23

หมายเหตุ: $^{a, b, c, d}$ Means within a row with different superscripts are significantly different ($P<0.05$).

SEM = Standard error of mean

[1]/ กลุ่มที่ 1 (อาหารกลุ่มควบคุม) กลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรควบคุม (อาหารข้นผสมสำเร็จรูป 16% โปรตีน (CP)) ร่วมกับอาหารหยาบ คือ อัลฟาฟ่าแห้งชนิดอัดเม็ดแบบเต็มที่ โดยไม่มีการให้กากมันสำปะหลังโปรตีนสูง

[2]/กลุ่มที่ 2 (อาหารกลุ่มควบคุม) (อาหารข้นผสมสำเร็จรูป 16%CP) ทดแทนด้วยกากมันสำปะหลังโปรตีนสูงในสูตรที่ระดับ 10% (DM basis) ร่วมกับอาหารหยาบ คือ อัลฟาฟ่าแห้งชนิดอัดเม็ดแบบเต็มที่

[3]/กลุ่มที่ 3 (อาหารกลุ่มควบคุม) (อาหารข้นผสมสำเร็จรูป 16%CP) ทดแทนด้วยกากมันสำปะหลังโปรตีนสูงในสูตรที่ระดับ 20% (DM basis) ร่วมกับอาหารหยาบ คือ อัลฟาฟ่าแห้งชนิดอัดเม็ดแบบเต็มที่

[4]/กลุ่มที่ 4 (อาหารกลุ่มควบคุม) (อาหารข้นผสมสำเร็จรูป 16%CP) ทดแทนด้วยกากมันสำปะหลังโปรตีนสูงในสูตรที่ระดับ 30% (DM basis) ร่วมกับอาหารหยาบ คือ อัลฟาฟ่าแห้งชนิดอัดเม็ดแบบเต็มที่

จากการทดลองพบความสัมพันธ์ที่ไปในทิศทางร่วมกันของการกินได้วัตถุแห้งและการกินได้ของโปรตีน ทั้งนี้เนื่องจากในการทดลองได้ทำการทดแทนกากมันสำปะหลังหมักยีสต์ในสูตรอาหารข้นในระดับ 10, 20 และ 30% (DM basis) ซึ่งส่งผลให้การกินได้ของแพะเนื้อเพิ่มขึ้นตามสัดส่วนการทดแทนกากมันสำปะหลังหมักยีสต์ เนื่องจากมีปริมาณการกินได้ของอาหารหยาบสูงขึ้น Wanapat et al. (2000) ระบุว่า มันสำปะหลังนอกจากจะจัดเป็นแหล่งของอาหารพลังงานที่สำคัญสำหรับจุลินทรีย์ในกระเพาะหมักที่จะนำไปใช้เป็นแหล่งพลังงาน ยังพบว่ามีคุณสมบัติที่สามารถถูกย่อยสลายได้ของอาหารภายในกระเพาะหมักด้วย ทำให้อาหารสามารถย่อยสลายได้ในกระเพาะหมักสูง ส่งผลทำให้อัตราการกินได้สูงตามไปด้วย (Timminga, 1979) ซึ่งจากการทดลองพบว่า แพะกลุ่มที่ได้รับกากมันสำปะหลังหมักยีสต์ทดแทนในสูตรอาหารข้นที่ระดับสูงขึ้นจะมีปริมาณการกินได้วัตถุแห้งและการกินได้ของโปรตีนมากขึ้นกว่ากลุ่มที่ให้อาหารควบคุม และจากรายงานของ Martin – Orue et al. (2000) พบว่า อาหารข้นที่มีแหล่งของคาร์โบไฮเดรตที่สามารถถูกย่อยสลายได้เร็ว และมีแหล่งไนโตรเจนที่สามารถย่อยได้รวดเร็วนั้น จะทำให้จุลินทรีย์สามารถใช้ประโยชน์จากสารอาหารและนำมาใช้ในการเจริญเติบโตของเซลล์ตนเองได้รวดเร็ว ส่งผลให้กระบวนการย่อยสลายอาหารเพิ่มขึ้น สอดคล้องกับ Tedeschi et al. (2000) รายงานว่า ในสัตว์เคี้ยวเอื้องที่ได้รับโปรตีนที่สามารถถูกย่อยสลายได้เร็วในกระเพาะหมักร่วมกับแหล่งพลังงานในระดับสูงสามารถเพิ่มการสังเคราะห์จุลินทรีย์และสามารถเพิ่มการย่อยสลายของอินทรีย์วัตถุอาหารประเภทแป้งได้สูงขึ้น ทั้งนี้ไม่พบความสัมพันธ์ว่าอาหารที่มีแป้งที่สามารถย่อยสลายได้ในกระเพาะหมักมีผลต่อการนำใช้ประโยชน์ของไนโตรเจน สอดคล้องกับปิตุนาถ (2547) รายงานว่า อัตราการกินได้ของโคนมที่ได้รับกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งวัตถุดิบพลังงานในอาหารข้น 45% ร่วมกับหญ้าหมักมีค่าสูงที่สุด เนื่องจากมีอัตราการย่อยสลายของวัตถุแห้งหรือค่า Effective degradability of dry matter (DM) สูงที่สุด เท่ากับ 66.40 เมื่อเทียบกับโคนมในกลุ่มที่ได้รับกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งวัตถุดิบพลังงานในอาหารข้น 35 และ 40% ซึ่งพบว่า มีอัตราการย่อยสลายต่ำกว่าที่ระดับ 65.90 และ 66.10 ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม Nitipot et al. (2004) ได้ทดแทนมันสำปะหลังด้วยกากมันสำปะหลังที่ระดับ 0, 50 และ 100% ในอาหารข้นของโคนมลูกผสมพันธุ์โฮสไตน์ฟรีเชียน (Crossbred Holstein Friesian) ระดับเลือดมากกว่า 87.5% และอยู่ในระยะให้นม ที่ 2% ของน้ำหนักตัว ร่วมกับการให้ฟางข้าวแบบเต็มที่ ไม่ส่งผลต่อปริมาณการกินได้ทั้งหมด พฤติกรรมการกิน การย่อยได้ของเยื่อใย ผลผลิตสุดท้ายของกระบวนการหมักในกระเพาะหมัก ค่าเมทาบอไลท์ในเลือด และน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น ($P>0.05$) เช่นเดียวกับ Suksombat et al. (2006) พบว่าการใช้กากมันสะปะหลังทดแทนในอาหารข้นที่ระดับ 35, 40 และ 45% ในโคลูกผสมพันธุ์โฮสไตน์ฟรีเชียนระยะให้นมไม่มีผลทำให้ปริมาณการกินได้วัตถุแห้ง ปริมาณน้ำนม องค์ประกอบทางเคมีในน้ำนมหรือน้ำหนักตัวเปลี่ยนแปลงทุกกลุ่มการทดลอง และ Promkot et al. (2010) ไม่พบความแตกต่างของการกินได้ ปริมาณน้ำนม และองค์ประกอบน้ำนมในการให้อาหารที่มีส่วนผสมของมันสำปะหลังที่มีการหมักด้วยจุลินทรีย์

2.2 อัตราการเจริญเติบโต

น้ำหนักตัว (กิโลกรัม) และน้ำหนักตัวที่เปลี่ยนแปลง (กรัม/วัน) ของแพะเนื้อที่ได้รับจากอาหารทดลองทั้ง 4 สูตร และให้อัลฟาฟ่าแห้งชนิดอัดเม็ดเป็นแหล่งของอาหารหยาบ แสดงไว้ในตารางที่ 4.6 พบว่า น้ำหนักตัวของแพะเนื้อก่อนการทดลอง (12.27, 12.88, 12.00 และ 12.88 กิโลกรัม ตามลำดับ) มีค่าใกล้เคียงกัน (ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) ทั้ง 4 กลุ่มการทดลอง), น้ำหนักตัวหลังสิ้นสุดการทดลองตลอดระยะเวลาช่วง 30 วันแรก (17.00, 17.75, 17.88 และ 17.13 กิโลกรัม ตามลำดับ) และน้ำหนักตัวที่เปลี่ยนแปลง (142, 163, 192 และ 142 กรัม/วัน ตามลำดับ) มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ทั้ง 4 กลุ่มการทดลอง การเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักตัวแพะเนื้อทดลองในกลุ่มที่ได้รับกากมันสำปะหลังหมักยีสต์ทดแทนในสูตรอาหารข้นที่ระดับ 20% (DM basis) สูงกว่าทุกกลุ่มการทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) โดยที่กลุ่มควบคุมไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มที่ได้รับกากมันสำปะหลังหมักยีสต์ทดแทนในสูตรอาหารข้นที่ระดับ 30% (DM basis) โดยมีค่าเฉลี่ยเป็น 4.25, 4.88, 5.88 และ 4.25 กิโลกรัม ตามลำดับ โดยสรุปการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักตัวและอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน มีแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงที่เพิ่มขึ้น เมื่อสัดส่วนการใช้กากมันสำปะหลังหมักยีสต์ที่ระดับ 10 และ 20% (DM basis) ทดแทนในสูตรอาหารข้นตามลำดับ ส่งผลให้น้ำหนักเฉลี่ยเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (final weight) มีแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ขณะที่เมื่อทำการชั่งน้ำหนักหลังการทดลองผ่านไปแล้ว 60 วัน น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นและน้ำหนักตัวเฉลี่ยต่อวันของแพะ ยังคงพบว่าแพะกลุ่มที่ได้รับกากมันสำปะหลังหมักยีสต์ทดแทนในสูตรอาหารข้นที่ระดับ 20% (DM basis) สูงกว่าทุกกลุ่มการทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) (ดังตารางที่ 4.6 (ข))

ตารางที่ 4.6 น้ำหนักตัว และน้ำหนักตัวที่เปลี่ยนแปลงตลอดระยะเวลาช่วง 30 วันแรก

Item	ระดับใช้กากมันสำปะหลังหมักยีสต์ทดแทนในสูตรอาหารข้น				SEM	P value
	0%[1]	10%FC[2]	20%FC[3]	30%FC[4]		
ก่อนการทดลอง (กิโลกรัม)	12.75	12.88	12.00	12.88	0.32	0.62
หลังการทดลอง (กิโลกรัม)	17.00^{b}	17.75^{b}	17.88^{a}	17.13^{b}	0.26	0.03
น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น (กิโลกรัม)	4.25^{c}	4.88^{b}	5.88^{a}	4.25^{c}	0.20	0.04
น้ำหนักตัวเฉลี่ยต่อวัน (กรัม)	142^{c}	163^{b}	196^{a}	142^{c}	6.59	0.03

หมายเหตุ: $^{a, b, c}$ Means within a row with different superscripts are significantly different (P<0.05).

SEM = Standard error of the mean

ตารางที่ 4.6 (ข) น้ำหนักตัว และน้ำหนักตัวที่เปลี่ยนแปลงตลอดระยะเวลาช่วง 60 วันแรก

Item	ระดับใช้กากมันสำปะหลังหมักยีสต์ทดแทนในสูตรอาหารข้น				SEM	P value
	0%[1]	10%FC[2]	20%FC[3]	30%FC[4]		
ก่อนการทดลอง (กิโลกรัม)	12.75	12.88	12.00	12.88	0.32	0.62
หลังการทดลอง (กิโลกรัม)	20.25[c]	19.75[b]	22.38[a]	20.13[c]	0.30	0.03
น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น (กิโลกรัม)	7.50[b]	6.88[c]	10.38[a]	7.25[b]	0.24	0.03
น้ำหนักตัวเฉลี่ยต่อวัน (กรัม)	250[b]	230[b]	346[a]	242[b]	8.16	0.06

หมายเหตุ: [a, b, c] Means within a row with different superscripts are significantly different (P<0.05).

SEM = Standard error of the mean

[1]/ กลุ่มที่ 1 (อาหารกลุ่มควบคุม) กลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรควบคุม (อาหารข้นผสมสำเร็จรูป 16% โปรตีน (CP)) ร่วมกับอาหารหยาบ คือ อัลฟาฟ่าแห้งชนิดอัดเม็ดแบบเต็มที่ โดยไม่มีการให้กากมันสำปะหลังโปรตีนสูง

[2]/กลุ่มที่ 2 (อาหารกลุ่มควบคุม) (อาหารข้นผสมสำเร็จรูป 16%CP) ทดแทนด้วยกากมันสำปะหลังโปรตีนสูงในสูตรที่ระดับ 10% (DM basis) ร่วมกับอาหารหยาบ คือ อัลฟาฟ่าแห้งชนิดอัดเม็ดแบบเต็มที่

[3]/กลุ่มที่ 3 (อาหารกลุ่มควบคุม) (อาหารข้นผสมสำเร็จรูป 16%CP) ทดแทนด้วยกากมันสำปะหลังโปรตีนสูงในสูตรที่ระดับ 20% (DM basis) ร่วมกับอาหารหยาบ คือ อัลฟาฟ่าแห้งชนิดอัดเม็ดแบบเต็มที่

[4]/กลุ่มที่ 4 (อาหารกลุ่มควบคุม) (อาหารข้นผสมสำเร็จรูป 16%CP) ทดแทนด้วยกากมันสำปะหลังโปรตีนสูงในสูตรที่ระดับ 30% (DM basis) ร่วมกับอาหารหยาบ คือ อัลฟาฟ่าแห้งชนิดอัดเม็ดแบบเต็มที่

จากการศึกษาของ เวชสิทธิ์และคณะ (2541) ทดสอบใช้มันสำปะหลังเป็นแหล่งของพลังงานทดแทนข้าวโพดที่ระดับ 25 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารของลูกโคนมเพศผู้ พบว่าน้ำหนักตัวมีแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงดีกว่าการใช้มันสำปะหลังทดแทนข้าวโพดที่ระดับ 50 และ 75 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักสุดท้าย น้ำหนักเพิ่มทั้งหมด และน้ำหนักเพิ่มเฉลี่ยต่อวันสูงกว่าโคนมกลุ่มอื่นๆ อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) จากการศึกษาทดลองในครั้งนี้ ถึงแม้ว่าน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น (กิโลกรัม) และน้ำหนักตัวเฉลี่ยที่เปลี่ยนแปลงต่อวัน (กรัม/วัน) มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ในทิศทางเดียวกัน คือกลุ่มแพะทดลองที่ได้รับกากมันสำปะหลังหมักยีสต์ทดแทนในสูตรอาหารข้นที่ระดับ 20% (DM basis) ต่อตัวต่อวันและอัลฟาฟ่าแห้งชนิดอัดเม็ดเป็นแหล่งของอาหารหยาบมีค่าสูงสุด รองลงมาคือที่ระดับ 10% (DM basis) และ 30% (DM basis) ไม่มีความแตกต่างจากกลุ่ม

ควบคุม แต่มีเพียงกลุ่มแพะทดลองที่ได้รับกากมันสำปะหลังหมักยีสต์ทดแทนในสูตรอาหารข้นที่ระดับ 20% (DM basis) ต่อตัวต่อวันกลุ่มเดียวที่มีน้ำหนักตัวหลังสิ้นสุดการทดลองสูงสุด โดยทั่วไปแล้วปริมาณการกินได้โปรตีนที่เพิ่มขึ้นจากอาหารที่สัตว์ได้รับนั้นจะส่งผลการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัวสัตว์ในระยะหลังสิ้นสุดการทดลอง จากรายงานการศึกษาของ Claypool et al. (1980) พบว่าโปรตีนมีผลต่อปริมาณการกินได้เนื่องจากอาหารที่มีโปรตีนสูงจะทำให้จุลินทรีย์ที่อยู่ในกระเพาะหมักได้รับไนโตรเจนเพียงพอต่อการเจริญเติบโต ซึ่งจะส่งผลให้การย่อยได้สูงขึ้น เมื่อการย่อยได้สูงขึ้นการไหลผ่านของอาหารจากกระเพาะหมักก็เพิ่มสูงขึ้น ทำให้โคสามารถกินอาหารได้มากขึ้น แต่อย่างไรก็ตาม Srisaikham et al. (2018) รายงานว่า ปริมาณการกินได้ของโปรตีนในการเสริมกากมันสำปะหลังสดที่ระดับ 3.5 และ 7 กิโลกรัมต่อตัวต่อวัน ร่วมกับอาหารข้นและหญ้าสดแบบเต็มที่ในโคนมลูกผสมพันธุ์โฮสไตน์ฟรีเซียนในระยะ early-mid lactation, จำนวนวันเฉลี่ยของการให้นมที่ 50$\pm$27 days in milk (DIM) และมีน้ำหนักตัวเฉลี่ยที่ 394$\pm$40 กิโลกรัม จะเพิ่มขึ้นตามสัดส่วนดังกล่าว แต่ในทางตรงกันข้ามกลับไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงต่อผลผลิตและองค์ประกอบของนมในกลุ่มที่ได้รับการเสริมกากมันสำปะหลังสดอย่างชัดเจน นอกจากนี้ยังพบว่า ปริมาณการเสริมกากมันสำปะหลังสดทั้ง 2 ระดับไม่ส่งผลกระทบต่อน้ำหนักตัวของวัวตลอดช่วงการทดลอง ($P>0.05$) ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากระดับของกรดไฮโดรไซยานิคในกากมันปะหลังสด การศึกษาจำนวนมากแนะนำให้ลดระดับการทดแทนมันสำปะหลังที่มี HCN สูงในอาหารข้นลงเพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาปริมาณการกินได้ที่ต่ำลงและผลกระทบเชิงลบต่อการผลิตน้ำนมในสัตว์เคี้ยวเอื้อง (Suranindyah and Astuti, 2012; Ukanwoko and Ibeawuchi, 2014) อย่างไรก็ตาม การศึกษาทดลองในครั้งนี้ ใช้ระดับการทดแทนกากมันสำปะหลังหมักยีสต์ในอาหารข้นในปริมาณที่ระดับต่ำมาก จึงไม่พบว่ามีแพะกลุ่มใดน้ำหนักตัวลด

2.3 ความสามารถในการย่อยได้ของอาหาร

จากการศึกษาโดยวิธีเก็บตัวอย่างทั้งหมด (total collection method) เพื่อศึกษาค่าความสามารถในการย่อยได้ของอาหารทดลองนั้น พบว่า ความสามารถในการย่อยได้ของวัตถุแห้ง ความสามารถในการย่อยได้ของอินทรีย์วัตถุ (organic matter digestibility, OMD) ความสามารถในการย่อยได้ของโปรตีนหยาบ (crude protein digestibility, DCP), NDFD (neutral detergent fiber digestibility) และ ADFD (acid detergent fiber digestibility) ของแพะกลุ่มที่ไม่ได้รับกากมันสำปะหลังหมักยีสต์และกลุ่มที่ได้รับกากมันสำปะหลังหมักยีสต์ทดแทนในสูตรอาหารข้นที่ระดับ 10, 20 และ 30% (DM basis) ต่อตัวต่อวัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) พบว่า ความสามารถในการย่อยได้ของวัตถุแห้งและโปรตีนของแพะกลุ่มที่ได้รับกากมันสำปะหลังหมักยีสต์ทดแทนในสูตรอาหารข้นที่ระดับ 30% (DM basis) ต่อตัวต่อวัน มีค่าสูงที่สุดเท่ากับ 65.3 และ 69.8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ขณะที่ NDFD และ ADFD ไม่พบความแตกต่างทางสถิติในทุกกลุ่มการทดลอง (ตารางที่ 4.7)

ตารางที่ 4.7 ความสามารถในการย่อยได้ของโภชนะ

การย่อยได้ของโภชนะ	ระดับใช้กากมันสำปะหลังหมักยีสต์ทดแทนในสูตรอาหารข้น				SEM	P value
	0%[1]	10%FC[2]	20%FC[3]	30%FC[4]		
DMD	62.2[c]	62.0[c]	64.1[b]	65.3[a]	0.21	0.02
OMD	62.7[c]	62.5[c]	66.2[b]	68.0[a]	0.40	0.03
CPD	67.0[c]	66.8[c]	70.8[b]	72.0[a]	0.12	0.01
NDFD	54.2	54.7	55.0	54.9	0.29	0.06
ADFD	47.3	46.4	45.6	45.1	0.47	0.09

หมายเหตุ: [a, b, c, d] Means within a row with different superscripts are significantly different ($P<0.05$)

SEM = Standard error of the mean

[1]/ กลุ่มที่ 1 (อาหารกลุ่มควบคุม) กลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรควบคุม (อาหารข้นผสมสำเร็จรูป 16% โปรตีน (CP)) ร่วมกับอาหารหยาบ คือ อัลฟาฟ่าแห้งชนิดอัดเม็ดแบบเต็มที่ โดยไม่มีการให้กากมันสำปะหลังโปรตีนสูง

[2]/กลุ่มที่ 2 (อาหารกลุ่มควบคุม) (อาหารข้นผสมสำเร็จรูป 16%CP) ทดแทนด้วยกากมันสำปะหลังโปรตีนสูงในสูตรที่ระดับ 10% (DM basis) ร่วมกับอาหารหยาบ คือ อัลฟาฟ่าแห้งชนิดอัดเม็ดแบบเต็มที่

[3]/กลุ่มที่ 3 (อาหารกลุ่มควบคุม) (อาหารข้นผสมสำเร็จรูป 16%CP) ทดแทนด้วยกากมันสำปะหลังโปรตีนสูงในสูตรที่ระดับ 20% (DM basis) ร่วมกับอาหารหยาบ คือ อัลฟาฟ่าแห้งชนิดอัดเม็ดแบบเต็มที่

[4]/กลุ่มที่ 4 (อาหารกลุ่มควบคุม) (อาหารข้นผสมสำเร็จรูป 16%CP) ทดแทนด้วยกากมันสำปะหลังโปรตีนสูงในสูตรที่ระดับ 30% (DM basis) ร่วมกับอาหารหยาบ คือ อัลฟาฟ่าแห้งชนิดอัดเม็ดแบบเต็มที่

พบความแตกต่างของความสามารถในการย่อยได้ของวัตถุแห้ง (DMD) อินทรีย์วัตถุ (OMD) และโปรตีนหยาบ (CPD) ในทุกกลุ่มทดลอง ($P<0.05$) เนื่องจากสูตรอาหารทดลองในครั้งนี้มีระดับโปรตีนที่แตกต่างกันจากการได้รับกากมันสำปะหลังหมักยีสต์ทดแทนในสูตรอาหารข้นและอัลฟาฟ่าแห้งชนิดอัดเม็ดแบบเต็มที่ ส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพของการย่อยได้โภชนะตามปริมาณการกินได้วัตถุแห้งและโปรตีน เนื่องจากสัตว์จะอาศัยความสามารถในการย่อยจากจุลินทรีย์ภายในกระเพาะหมัก เข้าย่อยสลายอาหารที่ผ่านไปในกระเพาะหมัก ซึ่งความสามารถในการย่อยอาหารได้ของจุลินทรีย์จะสัมพันธ์กับจำนวนจุลินทรีย์ในเชิงบวก สอดคล้องกับ Song and Kenelly (1990) พบว่าระดับแอมโมเนียไนโตรเจนในกระเพาะหมักก็มีส่วนช่วยในการย่อยได้ของโภชนะด้วย พบว่า เมื่อ

ระดับแอมโมเนียไนโตรเจนเพิ่มขึ้นจะทำให้การย่อยได้ของวัตถุแห้งเพิ่มขึ้นสัตว์ ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ถึงแม้ว่าในการทดลองครั้งนี้ค่าแอมโมเนียไนโตรเจนในกระเพาะหมักของแพะทดลองจะไม่พบความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มทดลองทั้ง 4 กลุ่ม แต่พบแนวโน้มของค่าแอมโมเนียไนโตรเจนในกระเพาะหมักในแพะกลุ่มที่ได้รับกากมันสำปะหลังหมักยีสต์ทดแทนในสูตรอาหารข้นที่ระดับ 30% (DM basis) ต่อตัวต่อวัน สูงขึ้นหลังจากได้รับอาหาร ทำให้ความสามารถในการย่อยได้ของวัตถุแห้งและโปรตีนสูงกว่ากลุ่มอื่น สอดคล้องกับรายงานของ Schnieder and Flatt (1975) ระบุว่า การย่อยได้ของโปรตีนนั้นขึ้นอยู่กับระดับของโปรตีนในอาหารอีกด้วย ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบการย่อยได้ในแพะเนื้อกลุ่มที่ได้รับกากมันสำปะหลังหมักยีสต์ทดแทนในสูตรอาหารข้นที่ระดับ 30% (DM basis) จึงมีความเป็นไปได้ว่า ค่าการย่อยได้ของโภชนะและปริมาณการกินได้ของโภชนะจึงควรอยู่ในเกณฑ์สูงกว่าทุกกลุ่มการทดลอง

2.4 ประชากรจุลินทรีย์ในกระเพาะหมัก

ประชากรแบคทีเรียในกระเพาะหมักในชั่วโมงสุดท้ายหลังการให้อาหาร แพะกลุ่มที่ได้รับกากมันสำปะหลังหมักยีสต์ทดแทนในสูตรอาหารข้นที่ระดับ 10% (DM basis) ต่อตัวต่อวัน สูงกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับกากมันสำปะหลังหมักยีสต์และกลุ่มที่ได้รับกากมันสำปะหลังหมักยีสต์ทดแทนในสูตรอาหารข้นที่ระดับ 20 และ 30% (DM basis) ต่อตัวต่อวัน ($P<0.05$) มีค่าเฉลี่ยเป็น 4.05 และ 3.67×10^{11} cells/ml ในชั่วโมงที่ 0 และ 4 ตามลำดับ โปรโตซัวลดลงต่ำสุดในแพะกลุ่มที่ไม่ได้รับกากมันสำปะหลังหมักยีสต์ทดแทนในสูตรอาหารข้น ($P<0.05$) ในชั่วโมงสุดท้ายหลังการให้อาหาร และมีค่าเฉลี่ยเป็น 3.66 และ 6.13×10^{6} cells/ml ณ ชั่วโมงที่ 0 และ 4 หลังการให้อาหาร ตามลำดับ (ตารางที่ 4.8)

ตารางที่ 4.8 ประชากรจุลินทรีย์ในกระเพาะหมัก

จุลินทรีย์	ระดับใช้กากมันสำปะหลังหมักยีสต์ทดแทนในสูตรอาหารข้น				SEM	P value
	0%[1]	10%FC[2]	20%FC[3]	30%FC[4]		
แบคทีเรีย, $\times 10^{11}$ cells/ml						
ชั่วโมงที่ 0	6.36^{a}	3.30^{c}	2.72^{d}	3.81^{b}	0.10	0.61
ชั่วโมงที่ 4	3.59^{c}	3.92^{a}	3.55^{c}	3.63^{b}	0.02	0.39
โปรโตซัว, $\times 10^{6}$ cells/ml						
ชั่วโมงที่ 0	6.25^{a}	2.75^{c}	1.88^{d}	3.75^{b}	0.10	0.47
ชั่วโมงที่ 4	0.75^{d}	2.25^{a}	1.88^{b}	1.25^{c}	0.07	0.82

$^{a, b, c \text{ and } d}$ = Means within a row with different superscripts are significantly different ($P<0.05$)

เมื่อพิจารณาจาก Rumen-pH จะมีผลกระทบต่อทั้งชนิดและจำนวนประชากรของจุลินทรีย์ในกระเพาะหมักเนื่องจากมีความสัมพันธ์ต่อการทำงานของเอนไซม์ภายในเซลล์ของแบคทีเรีย (Moat, and Foster, 1995) ฉะนั้นความแตกต่างของอาหารและโภชนะที่สัตว์ได้รับจะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงจำนวนประชากรจุลินทรีย์ภายในกระเพาะหมักด้วย ซึ่งจากการทดลองครั้งนี้ พบว่าแบคทีเรียในแพะกลุ่มที่ได้รับกากมันสำปะหลังหมักยีสต์ทดแทนในสูตรอาหารข้นที่ระดับ 20 และ 30% (DM basis) ต่อตัวต่อวัน ให้ผลสอดคล้องไปในทางเดียวกันกับทฤษฎี ดังนี้ เมื่อหลังจากการให้อาหารที่ชั่วโมงที่ 4 ระดับ Rumen pH ลดต่ำลงตามระดับของกากมันสำปะหลังหมักยีสต์ที่มีองค์ประกอบของคาร์โบไฮเดรตที่ละลายได้ง่ายสูง และยังคงมีปริมาณโปรตีนต่ำ ไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงแอมโมเนียไนโตรเจนในกระเพาะหมัก สอดคล้องกับ Merten and Loften (1980) เมื่อเพิ่มปริมาณแป้งในสูตรอาหารไปมีผลในการลดการทำงานของ cellulolytic bacteria เมื่ออยู่ในสภาวะการเป็นกรดอันเนื่องมาจากการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตอย่างรวดเร็ว ทำให้พบอิทธิพลในการปรับสภาพนิเวศวิทยาในกระเพาะหมักต่อการเพิ่มขึ้นของจำนวนประชากรโปรโตซัวและลดจำนวนประชากรแบคทีเรียในแพะกลุ่มที่ได้รับกากมันสำปะหลังหมักยีสต์ทดแทนในสูตรอาหารข้นที่ระดับ 20% (DM basis) ต่อตัวต่อวัน ถึงแม้ว่ากลไกที่เกิดขึ้นยังไม่ทราบแน่ชัด แต่พบลู่ทางในการเพิ่มประสิทธิภาพกระบวนการหมักในกระเพาะหมักได้และสามารถเพิ่มการผลิตจุลินทรีย์โปรตีนได้สูงขึ้นในแพะกลุ่มที่ได้รับกากมันสำปะหลังหมักยีสต์ทดแทนในสูตรอาหารข้นที่ระดับ 10 และ 30% (DM basis) ต่อตัวต่อวัน ขึ้นอยู่กับระดับของจุลินทรีย์เริ่มต้นและสภาพแวดล้อมของนิเวศวิทยาของจุลินทรีย์ในกระเพาะหมักด้วย และเนื่องจากการทดลองครั้งนี้ไม่ได้ทำการแยกชนิดของกลุ่มจุลินทรีย์ คือ แบคทีเรียที่สามารถใช้ประโยชน์จากอาหารโปรตีนได้ ซึ่งอาจเห็นความแตกต่างของจำนวนประชากรได้อย่างชัดเจนมากขึ้น

โปรโตซัวส่วนใหญ่จะกินแบคทีเรียเป็นอาหาร และอาศัยอยู่กันแบบ symbiosis โดยโปรโตซัวจะช่วยให้กระบวนการหมัก-ย่อยสลายเยื่อใย คาร์โบไฮเดรตที่ละลายได้ และแป้งจากธัญพืช ภายในกระเพาะหมักสมดุล ป้องกันการเกิดกรดที่รวดเร็วจากการที่สัตว์ได้รับอาหารจำพวกแป้งหรือพลังงานสูงๆ ที่ย่อยสลายได้รวดเร็ว เนื่องจากแป้งถูกแบคทีเรียหมักอย่างรวดเร็ว (Dehority, 1993) จะเห็นได้ว่าจากการทดลองในครั้งนี้ หลังการให้อาหารในชั่วโมงที่ 4 จำนวนโปรโตซัวในแพะกลุ่มที่ได้รับกากมันสำปะหลังหมักยีสต์ทดแทนในสูตรอาหารข้นลดลงตามระดับกากมันสำปะหลังหมักยีสต์ที่สูงขึ้นและลดลงต่ำสุดในกลุ่มที่ไม่ได้รับกากมันสำปะหลังหมักยีสต์ทดแทนในสูตรอาหารข้น อาจเป็นอีกสาเหตุที่ทำให้จำนวนแบคทีเรียในกระเพาะหมักมากขึ้น แต่กลไกสมดุลของจุลินทรย์ในกระเพาะหมักที่เกิดขึ้นมีความสลับซับซ้อนมาก ขึ้นอยู่กับระดับของกากมันสำปะหลังหมักยีสต์ทดแทนในสูตรอาหารข้นและสภาพแวดล้อมของนิเวศวิทยาของจุลินทรีย์ในกระเพาะหมักเริ่มต้น การเพาะแยกชนิดของแบคทีเรีย เช่น กลุ่มแบคทีเรียที่สามารถใช้ประโยชน์จากอาหารโปรตีนได้ (proteolytic bacteria) หรือ cellulolytic bacteria เป็นจุลินทรีย์กลุ่มที่ใช้ cellulose ที่เข้าย่อย cellulose และ hemicellulose

ทั้งนี้ด้วยการใช้กากมันสำปะหลังหมักยีสต์ทดแทนในสูตรอาหารข้นที่ระดับ 30 เปอร์เซ็นต์ จึงเป็นระดับที่มีอิทธิพลต่อการลดลงของจำนวนประชากรโปรโตซัวและเพิ่มจำนวนประชากรแบคทีเรีย

2.5 ค่านิเวศวิทยาภายในกระเพาะหมัก

ค่านิเวศวิทยาภายในกระเพาะหมักที่ทำการวิเคราะห์ศึกษา คือ ค่าความเป็นกรด-ด่าง (Rumen pH) และแอมโมเนียไนโตรเจน (ตารางที่ 4.9) ของแพะที่ได้รับอาหารข้นทดลองทั้ง 4 สูตรทดลอง ค่าเฉลี่ยความเป็นกรด-ด่าง หลังการให้อาหารชั่วโมงที่ 0 และ 4 เท่ากับ 7.29 และ 6.18 และจากการศึกษาทดลองการเปลี่ยนแปลงของระดับแอมโมเนียไนโตรเจนภายในกระเพาะหมักในแพะเนื้อทดลองโดยวิธีการ suction pump เพื่อดูดเอาของเหลวภายในกระเพาะหมักจากทางปาก ที่ได้รับกากมันสำปะหลังหมักยีสต์ทดแทนอาหารข้นที่ระดับ 0, 10, 20 และ 30 เปอร์เซ็นต์ มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับแอมโมเนียไนโตรเจนในของเหลวจากกระเพาะหมักที่เวลา 0 และ 4 ชั่วโมงหลังจากการให้อาหาร ดังนี้ กลุ่มควบคุม มีระดับของแอมโมเนียไนโตรเจนในของเหลวจากกระเพาะหมักเท่ากับ 9.4, 9.1, 9.3 และ 9.7 mg% และ 15.3, 15.3, 15.4 และ 15.8 mg% หลังจากให้อาหารที่ระยะเวลา 4 ชั่วโมงตามลำดับ ดังตารางที่ 4.9

ตารางที่ 4.9 ค่า Rumen-pH และปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจนในกระเพาะหมักของแพะเนื้อที่ได้รับกากมันสำปะหลังหมักยีสต์ทดแทนในสูตรอาหารข้นทั้ง 4 สูตร ณ เวลา 0 และ 4 ชั่วโมง หลังการให้อาหาร

ปัจจัย	ระดับใช้กากมันสำปะหลังหมักยีสต์ทดแทนในสูตรอาหารข้น				SEM	P value
	0%[1]	10%FC[2]	20%FC[3]	30%FC[4]		
pH (h, Post-feeding)						
ชั่วโมงที่ 0	7.34^{b}	7.13^{d}	7.27^{c}	7.40^{a}	0.02	0.02
ชั่วโมงที่ 4	6.15^{c}	6.30^{b}	5.87^{d}	6.40^{a}	0.02	0.01
NH_3-N, mg%						
ชั่วโมงที่ 0	9.4	9.1	9.3	9.7	1.27	0.54
ชั่วโมงที่ 4	15.3	15.3	15.4	15.8	1.68	0.64

หมายเหตุ: $^{a, b, c, d}$ Means within a row with different superscripts are significantly different ($P<0.05$)

FC= Fermented cassava pulp, SEM = Standard error of the mean

[1]/ กลุ่มที่ 1 (อาหารกลุ่มควบคุม) กลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรควบคุม (อาหารข้นผสมสำเร็จรูป 16% โปรตีน (CP)) ร่วมกับอาหารหยาบ คือ อัลฟาฟ่าแห้งชนิดอัดเม็ดแบบเต็มที่ โดยไม่มีการให้กากมันสำปะหลังโปรตีนสูง

[2]/กลุ่มที่ 2 (อาหารกลุ่มควบคุม) (อาหารข้นผสมสำเร็จรูป 16%CP) ทดแทนด้วยกากมันสำปะหลังโปรตีนสูงในสูตรที่ระดับ 10% (DM basis) ร่วมกับอาหารหยาบ คือ อัลฟาฟ่าแห้งชนิดอัดเม็ดแบบเต็มที่

[3]/กลุ่มที่ 3 (อาหารกลุ่มควบคุม) (อาหารข้นผสมสำเร็จรูป 16%CP) ทดแทนด้วยกากมันสำปะหลังโปรตีนสูงในสูตรที่ระดับ 20% (DM basis) ร่วมกับอาหารหยาบ คือ อัลฟาฟ่าแห้งชนิดอัดเม็ดแบบเต็มที่

[4]/กลุ่มที่ 4 (อาหารกลุ่มควบคุม) (อาหารข้นผสมสำเร็จรูป 16%CP) ทดแทนด้วยกากมันสำปะหลังโปรตีนสูงในสูตรที่ระดับ 30% (DM basis) ร่วมกับอาหารหยาบ คือ อัลฟาฟ่าแห้งชนิดอัดเม็ดแบบเต็มที่

ระดับความเป็นกรด-ด่าง (Rumen pH) ภายในกระเพาะหมัก ตามระยะเวลาต่างๆ ภายหลังจากการให้อาหารโคเจาะกระเพาะตามกลุ่มการทดลอง แสดงไว้ดังตารางที่ 4.9 พบว่า ระดับ Rumen pH ภายในกระเพาะหมักลดลงทุกกลุ่มการทดลองตามระยะเวลาการหมักที่เพิ่มขึ้น สอดคล้องกับรายงานของปิตุนาถ (2547) เมื่อโคนมกินอาหารที่มีกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งวัตถุดิบพลังงานในอาหารข้นที่ระดับ 35, 40 และ 45% จะมีระดับ pH ภายในกระเพาะหมักลดลงตามชั่วโมงที่เพิ่มขึ้น แต่เมื่อถึงชั่วโมงที่ 5 ระดับ pH ภายในกระเพาะหมักจะค่อยๆ เพิ่มขึ้นเป็นลำดับ เช่นเดียวกับ Puchala et al. (2005) พบว่า ค่าความเป็นกรด-ด่าง ณ เวลาต่างๆ คือ 0, 3, 6 และ 9 ชั่วโมงมีค่าเฉลี่ยลดลงหลังการให้อาหาร และในชั่วโมงที่ 4 หลังการให้อาหารพบว่ากลุ่มแพะทดลองที่ได้รับกากมันสำปะหลังหมักยีสต์ทดแทนในสูตรอาหารข้นที่ระดับ 20% (DM basis) ต่อตัวต่อวัน (มีปริมาณการกินได้โปรตีนสูงที่สุดเมื่อเทียบกับทุกกลุ่มการทดลองอื่น) มี Rumen pH ลดลงต่ำที่สุด สอดคล้องกับ Bunting et al. (1989) พบว่า เมื่อระดับโปรตีนสูงขึ้นในอาหาร มีผลทำให้ค่า Rumen pH ลดลง เนื่องจากการเกิดกระบวนการหมักสูงสุดประมาณชั่วโมงที่ 3-4 หลังจากการให้อาหาร นอกจากนี้ Merten and Loften (1980) ยังระบุว่า สภาวะความเป็นกรดในกระเพาะหมักจะเกิดขึ้นอันเนื่องจากการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตอย่างรวดเร็ว เมื่อเพิ่มปริมาณแป้งในสูตรอาหาร ซึ่งจะมีผลไปลดการทำงานของ cellulolytic bacteria ลง สอดคล้องกับการทดลองในครั้งนี้ที่มีการทดแทนอาหารข้นด้วยกากมันสำปะหลัง ขณะที่ Khampa et al. (2009) พบว่า การให้อาหารสัตว์เคี้ยวเอื้องที่มีส่วนผสมของมันสำปะหลังที่ผ่านกระบวนการหมักด้วยยีสต์นั้น ทำให้ค่า Rumen pH อยู่ในสภาวะที่เกือบเป็นกลาง ซึ่งต่างจากอาหารที่ไม่ได้เสริมมันสำปะหลังที่หมักด้วยยีสต์ที่มีค่า pH ต่ำกว่าซึ่งเสี่ยงกับสภาวะการเป็นกรดในกระเพาะหมักที่จะทำให้เป็นอันตรายต่อกระบวนการย่อยอาหารประเภทเยื่อใยของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในกระเพาะอาหารได้ แต่อย่างไรก็ตามจะเห็นได้ว่าค่า Rumen pH จากการทดลองครั้งนี้ยังอยู่ในเกณฑ์ปกติ (ไม่ต่ำกว่า 5.9 ที่จะบ่งบอกถึงการเกิดโรค Rumen acidosis ได้) (Garrett et al., 1999 และ The Pennsylvania State University, 2001) เช่นเดียวกับเมธา

(2533) กล่าวว่า ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในกระเพาะหมักอยู่ในช่วง 6.5-7.0 จึงส่งผลทำให้ Rumen pH ของแพะเนื้อทดลองทั้ง 4 กลุ่มการทดลอง ไม่ได้รับผลกระทบเชิงลบที่จะมีความเป็นไปได้ที่จะเกิดโรค Rumen acidosis จากการใช้กากมันสำปะหลังหมักยีสต์ทดแทนในสูตรอาหารข้น

จากการทดลองครั้งนี้ พบปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจนในกระเพาะหมัก ณ ชั่วโมงที่ 0 และ 4 หลังการให้อาหารระหว่างแพะกลุ่มที่ได้รับอาหารข้นที่ไม่ได้รับกากมันสำปะหลังหมักยีสต์และกลุ่มที่ได้รับกากมันสำปะหลังหมักยีสต์ทดแทนในสูตรอาหารข้นที่ระดับ 10, 20 และ 30% (DM basis) ต่อตัวต่อวันในสูตรอาหาร ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) โดยมีค่าเฉลี่ย ณ เวลาต่างๆ คือ 9.38 และ 15.45 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ ระดับดังกล่าวอยู่ในเกณฑ์ที่ Wallace (1979) รายงานว่า เป็นระดับแอมโมเนียไนโตรเจนที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 9.7-21.4 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นสภาวะที่แบคทีเรียในกระเพาะหมักสามารถใช้ประโยชน์จากแอมโมเนียไนโตรเจนเพื่อใช้ในการเจริญเติบโตได้ สอดคล้องกับจักรกริช (2555) รายงานว่า การใช้เปลือกมันสำปะหลังโปรตีนสูงทดแทนอาหารข้นของในโคเจาะกระเพาะลูกผสม (พันธุ์โฮลสไตน์ฟรีเชียนที่มีระดับเลือด 50 เปอร์เซ็นต์และพันธุ์บรามันที่มีระดับเลือด 50 เปอร์เซ็นต์) ที่ระดับ 0, 20 และ 40 เปอร์เซ็นต์ ไม่มีผลต่อแอมโมเนียไนโตรเจนหลังจากให้อาหารที่ระยะเวลา 0, 3 และ 6 ชั่วโมง เช่นเดียวกับ Puchala et al. (2005) พบว่า เวลาที่ใช้ในการย่อยเพิ่มมากขึ้น คือ ณ เวลา 3, 6 และ 9 ชั่วโมงหลังการให้อาหาร ปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจนในกระเพาะหมักไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเช่นเดียวกัน ถึงแม้ว่าโดยทั่วไปปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจนในกระเพาะหมักจะเพิ่มสูงขึ้นในชั่วโมงที่ 3 จากกระบวนการหมักที่เพิ่มสูงขึ้นภายหลังที่สัตว์ได้รับอาหารข้นและจะลดลงในชั่วโมงที่ 6 จากการใช้ประโยชน์ของจุลินทรีย์ในกระเพาะหมัก และถูกดูดซึมผ่านผนังกระเพาะหมักเข้าสู่กระแสเลือด ผ่านไปยังตับเพื่อเข้าสู่วัฏจักรยูเรีย แอมโมเนียไนโตรเจนในกระเพาะหมักที่เพิ่มสูงขึ้นจะส่งผลให้ค่าแอมโมเนียไนโตรเจนในกระแสเลือดเพิ่มขึ้นด้วย จึงเห็นได้ว่าระดับแอมโมเนียไนโตรเจนในกระเพาะหมักมีความสัมพันธ์กับระดับไนโตรเจนในกระแสเลือด (Church, 1979) รวมถึงระดับแอมโมเนียไนโตรเจนในกระเพาะหมักที่เพิ่มขึ้นนี้จะมีความสัมพันธ์กับระดับไนโตรเจนในกระแสเลือดที่เพิ่มขึ้น Khampa et al. (2009a, b) ซึ่งเป็นผลมาจากแหล่งโปรตีนจากอาหารที่ย่อยสลายได้ในกระเพาะหมักในปริมาณที่แตกต่างกัน (Wanapat and Pimpa, 1999) แต่ค่ายูเรียไนโตรเจนในเลือดมีค่าผันแปรออกไปอยู่ตลอด โดยขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย (โชคชัย, 2536) เช่น ระดับโปรตีนที่สัตว์ได้รับ การย่อยได้โปรตีน (เมธา, 2529) ระดับพลังงาน การย่อยสลายโปรตีนในร่างกาย (proteolysis) เพื่อใช้ในการสร้างพลังงานในขณะอดอาหาร รวมถึง amino acid ที่ไม่ได้ถูกใช้ในการสังเคราะห์โปรตีนก็จะถูกเปลี่ยนเป็นยูเรียไนโตรเจนในเลือด ดังตารางที่ 4.11 จึงมีความเป็นไปได้ที่ยูเรียไนโตรเจนในเลือดจากการทดลองในครั้งนี้จะไม่สัมพันธ์กับระดับแอมโมเนียไนโตรเจนในกระเพาะหมักทุกกลุ่มการทดลอง เช่นเดียวกันกับความเข้มข้นของสารประกอบไนโตรเจนในกระเพาะหมักที่มีความผันแปรไปกับปัจจัย เช่น ระดับการให้อาหาร ความสามารถในการละลายได้

ของโปรตีนในอาหาร แหล่งของคาร์โบไฮเดรทที่มีและแหล่งของแร่ธาตุ ความถี่ของการให้อาหาร (เมธา, 2533)

ค่าเฉลี่ยจากทุกกลุ่มของแพะที่ได้รับอาหารข้นทั้ง 4 สูตรทดลอง หลังการให้อาหารชั่วโมงที่ 0 และ 4 ของความเข้มข้นของกรดอะซิติก (acetic acid, C_2) เท่ากับ 73.9, 74.7, 73.0 และ71.8 mol/100 mol ตามลำดับ ความเข้มข้นของกรดโพรพิโอนิก (propionic acid, C_3) ค่าเฉลี่ยจากทุกกลุ่ม เท่ากับ 18.0, 17.3, 19.1 และ 19.4 mol/100 mol ตามลำดับ ส่วนความเข้มข้นของกรดบิวทีริก (butyric acid, C_4) เท่ากับ 8.2, 8.0, 8.0 และ 8.9 mol/100 mol ตามลำดับ และสัดส่วนของกรดอะซิติกต่อกรดโพรพิโอนิก เท่ากับ 4.2, 4.3, 3.8 และ 3.7 mol/100 mol ตามลำดับ (ดังตารางที่ 4.10)

ตารางที่ 4.10 ค่าความเข้มข้นของกรดไขมันระเหยได้ของของเหลวจากกระเพาะหมักของที่ได้รับกากมันสำปะหลังหมักยีสต์ทดแทนในสูตรอาหารข้นทั้ง 4 สูตร ณ เวลา 0 และ 4 ชั่วโมง หลังการให้อาหาร

Parameters	ระดับใช้กากมันสำปะหลังหมักยีสต์ทดแทนในสูตรอาหารข้น				SEM	P Value
	0%[1]	10%FC[2]	20%FC[3]	30%FC[4]		
Acetic acid, mol/100 mol						
0	73.6	74.1	72.4	71.4	1.40	2.21
4	74.2	75.3	73.5	72.2	1.62	1.70
Propionic acid, mol/100 mol						
0	18.6	17.5	19.1	19.1	1.51	1.90
4	17.3	17.1	19.1	19.6	1.36	2.54
Butyric acid, mol/100 mol						
0	7.8	8.4	8.5	9.5	1.10	2.44
4	8.5	7.6	7.4	8.2	0.88	3.21
C_2/C_3 (ratio)						
0	4.0	4.2	3.8	3.7	0.49	2.29
4	4.3	4.4	3.8	3.7	0.33	3.46

C_2/C_3 = acetic acid/propionic acid ratio

เมื่อพิจารณาถึงกรดไขมันที่ระเหยได้ที่สำคัญ ได้แก่ กรดอะซิติก กรดโพรพิออนิก กรดบิวทีริค และสัดส่วนของกรดอะซิติกต่อกรดโพรพิออนิกไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

(P>0.05) ทุกกลุ่มการทดลอง จากการศึกษาของ Bunting et al. (1989) พบว่า เมื่อระดับโปรตีนสูงขึ้นในอาหาร มีผลทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างลดลง เนื่องจากการเกิดกระบวนการหมักสูงสุดประมาณชั่วโมงที่ 3-4 หลังจากการให้อาหาร ซึ่งกระบวนการนี้จะสัมพันธ์กับความเข้มข้นของกรดไขมันระเหยได้ที่เพิ่มขึ้นสูงขึ้นในชั่วโมงที่ 3-4 หลังจากการให้อาหารเช่นเดียวกัน ซึ่งอาจจะมีผลกระทบต่อค่าความเป็นกรด-ด่าง ทำให้มีค่าลดลง แสดงให้เห็นว่า ณ ชั่วโมงที่ 3-4 หลังจากการให้อาหาร จะมีผลผลิตจากกระบวนการหมักในกระเพาะหมักเกิดอยู่ในปริมาณมาก ขณะที่จักรกริช (2555) ระบุว่า การปลดปล่อย VFAs ออกมาภายนอกเซลล์ได้นั้นเกิดจากหลังที่กระบวนการหมักย่อยของจุลินทรีย์นำ NH_3-N ไปใช้ประโยชน์ในการสังเคราะห์เซลล์แล้ว และยังพบว่าการใช้เปลือกมันสำปะหลังหมักทดแทนอาหารข้นทั้งระดับที่ 0.8 และ 1.6 กิโลกรัม ต่อตัวต่อวัน ไม่ได้ส่งกระทบต่อการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของกรดอะซิติก กรดโพรพิออนิก กรดบิวทีริกและอัตราส่วนกรดอะซิติกต่อโพรพิออนิก หลังการให้อาหารที่ชั่วโมงที่ 0, 3 และ 6 (P<0.05) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับ Khampa et al. (2009) โดยความเข้มข้นของกรดไขมันระเหยได้ในกระเพาะหมักจะมีความสัมพันธ์กับการทำงานของจุลินทรีย์ในกระเพาะหมัก นอกจากปริมาณของกรดไขมันระเหยได้จะมีผลต่อการให้ผลผลิตของโคแล้ว คือ กรดอะซิติกและกรดบิวทิริกจะมีผลต่อปริมาณไขมันในน้ำนม ส่วนกรดโพรพิออนิกนั้นจะมีผลต่อปริมาณผลผลิตของโคนม (Gransworthy, 1988) ปริมาณของกรดอะซิติก กรดโพรพิออนิกและสัดส่วนของกรดอะซิเตทต่อโพรพิออนิกยังสามารถที่จะบ่งบอกถึงการเกิดโรค rumen acidosis ได้ จากการรายงานของ Hutjens (1996) พบว่า โคที่มีร่างกายปกตินั้นจะมีการผลิตสัดส่วนของกรดอะซิเตทต่อโพรพิออนิก ในอัตราส่วนที่มากกว่า 2.2:1 การผลิตต่ำกว่านี้จะส่งผลทำให้โคเกิดโรคได้ ซึ่งจากการทดลองนี้พบว่าแพะที่ได้รับกากมันสำปะหลังหมักยีสต์ทดแทนในสูตรอาหารข้นยังมีการผลิตสัดส่วนของกรดอะซิเตทต่อโพรพิออนิกในอัตราส่วนที่ปกติและแพะที่ใช้ในงานทดลองไม่มีอาการเกิดโรคดังกล่าวแต่อย่างใด

2.6 ค่าชีวเคมีในเลือด

ค่าชีวเคมีในกระแสเลือดที่ทำการวิเคราะห์ศึกษา คือ ความเข้มข้นของยูเรียไนโตรเจนในกระแสเลือด (Blood Urea Nitrogen; BUN) (ตารางที่ 4.11 และภาพที่ 4.8) ของแพะทั้ง 4 กลุ่มการทดลอง มีค่าเฉลี่ยความเข้มข้นยูเรียไนโตรเจนในเลือดหลังการให้อาหารชั่วโมงที่ 0, 3, 6 และ 9 เท่ากับ 27.3, 30.7, 27.9 และ 25.8 มิลลิกรัมเดซิลิตร ตามลำดับ โดยพบว่า ความเข้มข้นยูเรียไนโตรเจนในเลือดในชั่วโมงเริ่มต้นของแพะกลุ่มที่ได้รับกากมันสำปะหลังหมักยีสต์ทดแทนในสูตรอาหารข้นที่ระดับ 30% (DM basis) ต่อตัวต่อวันสูงกว่าทุกกลุ่มการทดลองจนถึงหลังการให้อาหารชั่วโมงที่ 3 และ 6 ซึ่งทำให้ความเข้มข้นยูเรียไนโตรเจนในเลือดหลังการให้อาหารชั่วโมงที่ 3 ยังคงมีระดับสูงกว่ากลุ่มอื่นๆ และพบแนวโน้มความเข้มข้นยูเรียไนโตรเจนในเลือดหลังการให้อาหารชั่วโมงที่ 3 และ 6 ของแพะกลุ่มที่ได้รับกากมันสำปะหลังหมักยีสต์ทดแทนในสูตรอาหารข้นเพิ่มสูงขึ้นตามระดับการทดแทนกากมันสำปะหลังหมักยีสต์ อย่างไรก็ตาม ภายหลังจากการให้อาหารชั่วโมงที่ 6

และ 9 แล้ว พบว่า ระดับความเข้มข้นยูเรียไนโตรเจนในเลือดของกลุ่มควบคุมกลับมาสูงที่สุดเมื่อเทียบกับกลุ่มการทดลองทั้งหมด

ตารางที่ 4.11 ค่า Blood Urea Nitrogen ของแพะเนื้อที่ได้รับกากมันสำปะหลังหมักยีสต์ทดแทนในสูตรอาหารข้นทั้ง 4 สูตร ณ เวลา 0, 3, 6 และ 9 ชั่วโมง หลังการให้อาหาร

ปัจจัย	ระดับใช้กากมันสำปะหลังหมักยีสต์ทดแทนในสูตรอาหารข้น				SEM	P value
	0%[1]	10%FC[2]	20%FC[3]	30%FC[4]		
BUN, mg/dl						
ชั่วโมงที่ 0	26.5^{c}	27.3^{b}	25.8^{c}	29.5^{a}	0.22	0.17
ชั่วโมงที่ 3	30.5^{c}	27.8^{d}	31.3^{b}	33.0^{a}	0.22	0.04
ชั่วโมงที่ 6	30.3^{a}	24.8^{d}	27.3^{c}	29.3^{b}	0.21	0.05
ชั่วโมงที่ 9	27.3^{a}	26.3^{b}	23.3^{c}	26.3^{b}	0.26	0.03

หมายเหตุ: $^{a, b, c, d}$ Means within a row with different superscripts are significantly different ($P<0.05$)

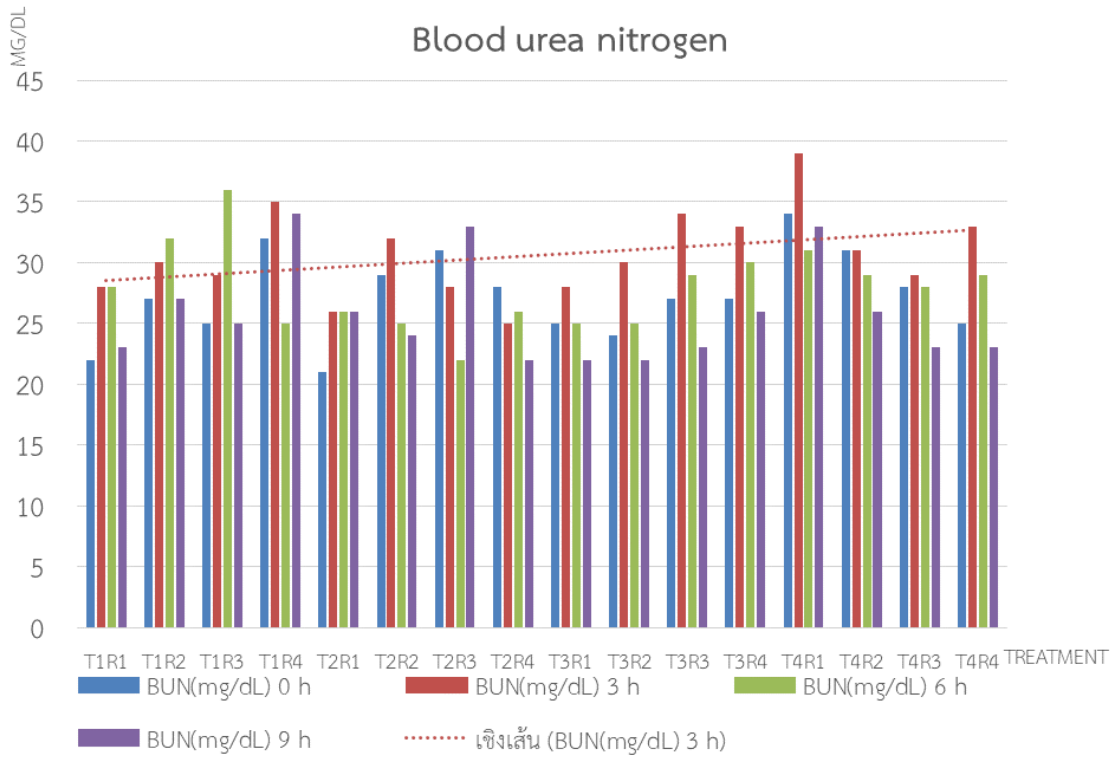
FC= Fermented cassava pulp, SEM = Standard error of the mean

[1]/ กลุ่มที่ 1 (อาหารกลุ่มควบคุม) กลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรควบคุม (อาหารข้นผสมสำเร็จรูป 16% โปรตีน (CP)) ร่วมกับอาหารหยาบ คือ อัลฟาฟ่าแห้งชนิดอัดเม็ดแบบเต็มที่ โดยไม่มีการให้กากมันสำปะหลังโปรตีนสูง

[2]/กลุ่มที่ 2 (อาหารกลุ่มควบคุม) (อาหารข้นผสมสำเร็จรูป 16%CP) ทดแทนด้วยกากมันสำปะหลังโปรตีนสูงในสูตรที่ระดับ 10% (DM basis) ร่วมกับอาหารหยาบ คือ อัลฟาฟ่าแห้งชนิดอัดเม็ดแบบเต็มที่

[3]/กลุ่มที่ 3 (อาหารกลุ่มควบคุม) (อาหารข้นผสมสำเร็จรูป 16%CP) ทดแทนด้วยกากมันสำปะหลังโปรตีนสูงในสูตรที่ระดับ 20% (DM basis) ร่วมกับอาหารหยาบ คือ อัลฟาฟ่าแห้งชนิดอัดเม็ดแบบเต็มที่

[4]/กลุ่มที่ 4 (อาหารกลุ่มควบคุม) (อาหารข้นผสมสำเร็จรูป 16%CP) ทดแทนด้วยกากมันสำปะหลังโปรตีนสูงในสูตรที่ระดับ 30% (DM basis) ร่วมกับอาหารหยาบ คือ อัลฟาฟ่าแห้งชนิดอัดเม็ดแบบเต็มที่



ภาพที่ 4.8 ค่า Blood Urea Nitrogen ของแพะเนื้อ (รายตัว) ที่ได้รับกากมันสำปะหลังหมักยีสต์ทดแทนในสูตรอาหารข้น ณ เวลา 0, 3, 6 และ 9 ชั่วโมง หลังการให้อาหาร Z (BUN= Blood urea nitrogen, T= Treatment, R= Replication, mg/dl= milligram per deciliter)

โดยทั่วไป ระดับไนโตรเจนในกระแสเลือดที่เพิ่มขึ้นนี้จะสัมพันธ์กับระดับแอมโมเนียไนโตรเจนในกระเพาะหมักที่เพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นผลมาจากแหล่งโปรตีนที่ได้จากอาหารที่ย่อยสลายได้ในกระเพาะหมักที่ปริมาณแตกต่างกัน โดยหลังจากที่สัตว์เคี้ยวเอื้องกินอาหารเข้าไปแล้ว แอมโมเนียไนโตรเจนจะเพิ่มสูงขึ้นตามเวลาที่ใช้ในการย่อยอาหารโดยจุลินทรีย์เพิ่มมากขึ้น โดยระดับยูเรียไนโตรเจนในกระแสเลือดจากการทดลองครั้งนี้อยู่ในช่วง 23.3-33.0 มิลลิกรัมเดซิลิตร ซึ่งมีแนวโน้มค่อนข้างสูงเกินช่วงค่ามาตรฐานของปริมาณยูเรียไนโตรเจนในเลือดของแพะที่ควรมีค่าอยู่ในช่วง 12.6-28 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตรพลาสมา (Plumb, 1999) อาจเนื่องจากอาหารที่ใช้ทดลองทั้งอาหารข้นและอาหารหยาบเป็นอาหารโปรตีนสูงคุณภาพดี Puchala et al. (2005) รายงานว่า ระดับของแอมโมเนียไนโตรเจนจะเพิ่มสูงขึ้นหลังการให้อาหาร ณ ชั่วโมงที่ 3 จากกระบวนการหมักที่เพิ่มสูงขึ้นภายหลังที่ได้รับอาหารข้นและจะลดลงในชั่วโมงที่ 6 จากการใช้ประโยชน์ของจุลินทรีย์ในกระเพาะหมัก และถูกดูดซึมผ่านผนังกระเพาะหมักเข้าสู่กระแสเลือด สอดคล้องกับ Church (1979) ได้อธิบายการใช้ประโยชน์ของไนโตรเจนในสัตว์เคี้ยวเอื้องเช่นเดียวกันว่า โดยทั่วไปยูเรียจะถูกย่อยสลายอย่างรวดเร็วในกระเพาะหมักโดยการทำงานของจุลินทรีย์ ได้ผลผลิตสุดท้ายคือ แอมโมเนีย โดยประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์จะถูกใช้ไปในการสังเคราะห์โปรตีนจากจุลินทรีย์ ส่วนแอมโมเนียที่เหลือจะถูกดูดซึมผ่านผนังกระเพาะหมักเข้าสู่กระแสเลือด ผ่านไปยังตับเพื่อเข้าสู่วัฏจักรยูเรีย แอมโมเนียไนโตรเจนในกระเพาะหมักที่เพิ่ม

สูงขึ้นจะส่งผลให้ค่าแอมโมเนียไนโตรเจนในกระแสเลือดเพิ่มขึ้นด้วย และเมื่ออาหารมีระยะเวลาอยู่ในกระเพาะหมักนานขึ้น กากมันสำปะหลังหมักยีสต์ทดแทนในสูตรอาหารข้นที่ระดับ 30% (DM basis) จะมีอัตราการย่อยสลายได้ในกระเพาะหมักเพิ่มขึ้นตามเวลา และเนื่องมาจากมันสำปะหลังมีคุณสมบัติที่สามารถถูกย่อยสลายได้เร็วในกระเพาะรูเมน (Wanapat et al., 2000) ซึ่งในกากมันสำปะหลังหมักยีสต์ทดแทนในสูตรอาหารข้นที่ระดับ 30% (DM basis) ประกอบด้วยกากมันสำปะหลังที่เป็นผลผลิตจากมันสำปะหลังในระดับสูงที่สุด จึงมีความเป็นไปได้ที่การทดลองนี้จะสังเกตพบระดับของไนโตรเจนในกระแสเลือดของแพะที่ได้รับกากมันสำปะหลังหมักยีสต์ทดแทนในสูตรอาหารข้นที่ระดับ 30% (DM basis) เพิ่มสูงขึ้นในชั่วโมงที่ 3 และ 6 เพราะเป็นช่วงที่เกิดกระบวนการย่อยสลายอาหารโปรตีนได้ในระดับสูง และลดลงในชั่วโมงที่ 9

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

1. *A. oryzae* TISTR 3102 ผลิตเอนไซม์อะไมเลส RSD น้ำตาลรีดิวซ์ และโปรตีน มากกว่า *R. oryzae* TISTR 3522

2. การเลี้ยงยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5598 ร่วมกับรา *A. oryzae* TISTR 3102 สามารถเพิ่มปริมาณโปรตีนในกากมันสำปะหลังหมักมากกว่าการเลี้ยง *C. tropicalis* TISTR 5136 ร่วมกับรา *A. oryzae* TISTR 3102 และ *C. utilis* TISTR 5032 ร่วมกับรา *A. oryzae* TISTR 3102

3. ระยะเวลาในการหมัก, รำข้าว, ยูเรีย, แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ยังส่งผลเชิงบวกต่อปริมาณโปรตีนภายหลังจากการหมักกากมันสำปะหลังด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5598 ร่วมกับรา *A. oryzae* TISTR 3102

4. การเลี้ยงยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5598 ร่วมกับรา *A. oryzae* TISTR 3102 ปริมาณหัวเชื้อทั้งหมดร้อยละ 5, ปริมาณยีสต์ร้อยละ 75, เติมยีสต์ในวันที่ 3,ปรับความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 55, บ่มเป็นระยะเวลา 9 วัน, เติมยูเรียและแอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) ร้อยละ 0.4, เติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ร้อยละ 0.2 ให้ปริมาณโปรตีนที่ละลายและไม่ละลายสูงสุดเท่ากับ 6.64±0.13 เปอร์เซ็นต์ และ 136.04±0.10 (mg/g CP)

5. ถึงแม้ว่าแพะกลุ่มที่ได้รับกากมันสำปะหลังหมักยีสต์ทดแทนในสูตรอาหารข้นเพียงระดับ 30% (DM basis) จะมีปริมาณการกินได้โปรตีนที่สูงกว่าทุกกลุ่มการทดลอง แต่แพะกลุ่มที่ได้รับกากมันสำปะหลังหมักยีสต์ทดแทนในสูตรอาหารข้นเพียงระดับ 20% (DM basis) สามารถกระตุ้นการเพิ่มน้ำหนักตัวได้สูงกว่ากลุ่มที่ได้รับกากมันสำปะหลังหมักยีสต์ทดแทนในสูตรอาหารข้นที่ระดับ 30% (DM basis) ทำให้การใช้กากมันสำปะหลังหมักยีสต์ที่ระดับ 20% (DM basis) เหมาะสมที่นำมาทดแทนในสูตรอาหารข้นมากกว่า เพราะจะช่วยลดต้นทุนค่าอาหารสัตว์ และน่าจะเป็นทางเลือกที่ดีทางหนึ่งให้เกษตรกรผู้เลี้ยงแพะเนื้อรุ่น

6. กากมันสำปะหลังหมักยีสต์ทดแทนในสูตรอาหารข้นกระตุ้นและปรับสมดุลจุลินทรีย์ในกระเพาะหมัก

7. กากมันสำปะหลังหมักยีสต์ทดแทนในสูตรอาหารข้นไม่มีผลกระทบในเชิงลบต่อสมรรถนะการผลิต

ผลผลิต (Output)

การนำเสนอผลงานและวารสารสืบเนื่องจากการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ:

Kamonwannasit, S., Srisaikham, S., Rattanachitthawat, S. and **Kamcharoen, A.** 2018. Screening factors affecting on reducing sugar production by statistical design during solid state cultivation of cassava pulp. *In* Proceeding of the International Conference of Pharmaceutical Sciences and Medicines: Health Innovation for Aging Society (ICPAM 2018). August 3rd, 2018. Faculty of Pharmaceutical Sciences, Burapha University, Chonburi, Thailand. pp 35-38.

Screening factors affecting on reducing sugar production by statistical design during solid state cultivation of cassava pulp

Sirilak Kamonwannasit [1], Supreena Srisaikham [1], Sirichet Rattanachitthawat [1] and Agarat Kamcharoen [1,*]

Faculty of Agricultural Technology, Burapha University Sakaeo Campus 254, Watthananakhon, Sakaeo, 27160, Thailand.

**E-mail: agratk@go.buu.ac.th (Corresponding author)*

Abstract

The fungal biopolymer chitin and chitosan can be applied for biomedical and pharmaceutical applications as wound dressing and carriers of drugs, and can be produced from agricultural by-product. For this reason, bioconversion of cassava pulp into fermentable sugar using starch-digesting fungi for further chitin and chitosan production was studied. In this study, the screening of ten factors affecting on reducing sugar production through solid state cultivation using *A. oryzae* was achieved using Plackett-Burman design. The result showed that moisture content, rice bran, inoculum size, yeast extract and peptone gave the negative effect on sugar yield. In contrast, incubation time $CaCl_2$, KH_2PO_4, NH_4Cl and urea gave the positive effect on sugar yield, which were selected for further optimization process.

Introduction

The biopolymer chitin and chitosan show excellent biological properties such as non-toxicity, biodegradation in the human body, anticancer, wound healing, haemostatic activity in cell culture, tissue engineering and drug delivery [1]. The chitin is in the fungal cell wall and septa of *Ascomycete*, *Zygomycete*, *Basidiomycete* and *Deuteromycatas* thus serving as a strengthening fibrous element responsible for cell wall rigidity. Solid state fermentation (SSF) is an alternative technology for chitin and chitosan production. The SSF provides an environment to support growth of fungi on solid substrates, and is a cost-effective process for the bioconversion [2]. Cassava pulp (CP) is a global crop of economic importance containing an amount of starch and cellulose about 60%, which are biodegradable and can be a substrate to produce the value-added products. Therefore, conversion of CP is the important step to produce the sugars and further ferment to the chitin and chitosan. There are a few of studies which were conducted to use fungi for degrading starch-based materials under SSF. There is need to develop a technology for conversion of these material into products, such as sugars, leading to sustainable waste management strategy. Plackett-Burman design (PBD) is used for rapid screening multifactor to find the most significant factors [3]. Therefore, this work aims to screen variables using PBD, including moisture content, time, rice bran, inoculum size, $CaCl_2$, KH_2PO_4, NH_4Cl, urea, yeast extract and peptone for sugar production during SSF.

Materials and methods

Table 1 Variables for screening using Plackett-Burman design

Variables	Codes	Low level (-1)	High level (+1)
Moisture content (%)	*A*	55	75
Time (day)	*B*	3	5
Rice bran (g/g CP)	*C*	0	1
Inoculum size (%)	*D*	5	15
$CaCl_2$ (g/g CP)	*E*	0	0.1
KH_2PO_4 (g/g CP)	*F*	0	0.2
NH_4Cl (g/g CP)	*G*	0	0.2
Urea (g/g CP)	*H*	0	0.2
Yeast extract (g/g CP)	*I*	0	0.2
Peptone (g/g CP)	*J*	0	0.2

Acknowledgement: The authors gratefully acknowledge Burapha University (Grant No: 7/2560) for financial support.

References

[1] Dash M, Chiellini F, Ottenbrite R.M. Chiellini E. Chitosan – A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. Prog Polym Sci. 2011 (36) 981-1014.

[2] Li F, Li F, Zhao T, Mao G, Zou Y, Zheng D, Takase M, Feng W, Wu X, Yang L. Solid-state fermentation of industrial solid waste from the fruits of milk thistle *Silybum marianum* for feed quality improvement. Appl Microbio Biotechnol. 2013 (97) 6725-6737.

[3] Plackett R.L, Burman J.P, The design of optimum multifactorial experiments. Biometrika. 1946 (33) 305-325.

Results

Table 2 Plackett-Burman design for evaluation of factors affecting on RS production

Std.	Variable in actual value (code value)										RS yield (mg/g CP)
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	
1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	20.76 ± 0.67
2	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	13.82 ± 2.39
3	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	34.97 ± 3.85
4	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	12.98 ± 0.87
5	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	23.15 ± 1.03
6	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	31.20 ± 0.57
7	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	32.88 ± 3.12
8	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	36.45 ± 0.92
9	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	34.08 ± 1.74
10	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	22.92 ± 0.62
11	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	46.46 ± 1.81
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	35.81 ± 0.70

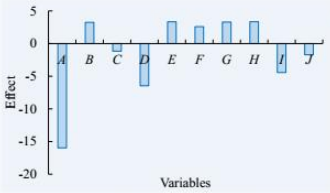


Fig. 1 Main effects of variables on reducing sugar production to the Plackett-Burman experimental results (*A*, moisture content; *B*, incubation time; *C*, rice straw; *D*, inoculum size; *E*, $CaCl_2$; *F*, KH_2PO_4; *G*, NH_4Cl; *H*, urea; *I*, yeast extract; *J*, peptone)

Table 3 Analysis of variance for Plackett-Burman model with RS yield as response

Variables	Coefficients	t-value	Sig.	Confidence (%)
Constant	28.79	508.059	0.001	
Moisture content	-7.98	-140.912	0.005*	99.5
Time	1.62	28.647	0.022*	97.8
Rice bran	-0.58	-10.294	0.062	93.8
Inoculum size	-3.23	-57.000	0.011*	98.9
$CaCl_2$	1.67	29.500	0.022*	97.8
KH_2PO_4	1.30	22.882	0.028*	97.2
NH_4Cl	1.64	29.059	0.022*	97.8
Urea	1.67	29.500	0.022*	97.8
Yeast extract	-2.22	-39.147	0.016*	98.4
Peptone	-0.86	-15.118	0.042*	95.8

Conclusion

From parameter screening by PBD during solid state cultivation of CP with *A. oryzae*, the results showed that, the important parameter affecting on RS production were incubation time, $CaCl_2$, KH_2PO_4, NH_4Cl and Urea. These parameters were selected for optimization of RS production and further chitin/chitosan production.

The International Conference of Pharmaceutical Sciences and Medicines 2018 (ICPAM 2018)

Screening factors affecting on reducing sugar production by statistical design during solid state cultivation of cassava pulp

Sirilak Kamonwannasit, Supreena Srisaikham, Sirichet Rattanachitthawat and Agarat Kamcharoen*
Faculty of Agricultural Technology, Burapha University Sakaeo Campus, Sakaeo, 27160, Thailand
*Corresponding author: agratk@go.buu.ac.th; Tel.: +66 98 6700389

Abstract

The fungal biopolymer chitin and chitosan can be applied for biomedical and pharmaceutical applications as wound dressing and carriers of drugs, and can be produced from agricultural by-product. For this reason, bioconversion of cassava pulp into fermentable sugar using starch-digesting fungi for further chitin and chitosan production was studied. In this study, the screening of ten factors affecting on reducing sugar production through solid state cultivation using *A. oryzae* was achieved using Plackett-Burman design. The result showed that moisture content, rice bran, inoculum size, yeast extract and peptone gave the negative effect on sugar yield. In contrast, incubation time $CaCl_2$, KH_2PO_4, NH_4Cl and urea gave the positive effect on sugar yield, which were selected for further optimization process.

Keywords: *Aspergillus oryzae*, Cassava pulp, Plackett-Burman design, Reducing sugar

1. Introduction

The biopolymer chitin and chitosan show excellent biological properties such as non-toxicity, biodegradation in the human body, anticancer, wound healing, haemostatic activity in cell culture, tissue engineering and drug delivery [1]. The chitin is in the fungal cell wall and septa of *Ascomycete*, *Zygomycete*, *Basidiomycete* and *Deuteromycatas* thus serving as a strengthening fibrous element responsible for cell wall rigidity [2]. Solid state fermentation (SSF) is an alternative technology for chitin and chitosan production. The SSF provides an environment to support growth of fungi on solid substrates, and is a cost-effective process for the bioconversion [3]. Cassava pulp (CP) is a global crop of economic importance containing an amount of starch and cellulose about 60%, which are biodegradable and can be a substrate to produce the value-added products [4]. Therefore, conversion of CP is the important step to produce the sugars and further ferment to the chitin and chitosan. There are a few of studies which were conducted to use fungi for degrading starch-based materials under SSF. There is need to develop a technology for conversion of these material into products, such as sugars, leading to sustainable waste management strategy. However, there are many variables for sugar production under SSF. Therefore, Plackett-Burman design (PBD) is used for rapid screening multifactor to find the most significant factors [5]. Therefore, this work aims to screen variables using PBD, including moisture content, time, rice bran, inoculum size, $CaCl_2$, KH_2PO_4, NH_4Cl, urea, yeast extract and peptone for sugar production during SSF.

2. Materials and Methods

The strain *Aspergillus oryzae* TISTR 3102 was propagated onto potato dextrose agar for 3 days at 30°C. Cassava pulp (CP) was dried in hot air oven at 50°C for 48 h. The experimental design used in this step was the matrix of Plackett-Burman design [5]. The variables were selected from the previous research studied [6-8]. Each variable was examined at two levels: -1 for a low level and +1 for a high level (Table 1). The medium were conducted in 250 ml Erlenmeyer flasks according to the statistical design as showed in Table 1. Then, the medium were autoclaved at 121°C for 15 min, cooled at the room temperature. The medium were inoculated with spore suspension, soaked with distilled water to the desired moisture content, and incubated at room temperature. The samples were withdrawn after finish the fermentation. The crude extract was obtained by the addition of acetate buffer (50 mM, pH 5.0) for 1 h at 200 rpm. The solids were removed by filtration and the filtrate was measured the RS concentration by the dinitrosalicylic acid (DNS) method [9]. All experiments were performed in triplicates and the average of the observations was used. The main effects of each variable on RS yield were estimated as the difference between both averages of measurements made at the higher level and at the lower level. The software SPSS version 17 was used for statistical and linear regression analysis. The analysis of variance (ANOVA) was used to estimate the statistical parameters.

3. Results and discussion

The response listed in Table 1 indicated a variation in RS yield from 12.98-46.46 g/g CP. The analysis showed that standard run no. 11 gave the maximum yield of RS (46.46 g/g CP). The *t*-test was used to identify the effect of variables on RS yield. The effects of variables, coefficient, *t*-value and significance for the design are showed in Table 2.

Table 1 Plackett-Burman design for evaluation of factors affecting on RS production

Std.	Variable in actual value (code value)										RS yield (mg/g CP)
	A	*B*	*C*	*D*	*E*	*F*	*G*	*H*	*I*	*J*	
1	75 (1)	3 (-1)	1 (1)	5 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	0.2 (1)	0.2 (1)	0.2 (1)	0 (-1)	20.76 ± 0.67
2	75 (1)	5 (1)	0 (-1)	15 (1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	0.2 (1)	0.2 (1)	0.2 (1)	13.82 ± 2.39
3	55 (-1)	5 (1)	1 (1)	5 (-1)	0.1 (1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	0.2 (1)	0.2 (1)	34.97 ± 3.85
4	75 (1)	3 (-1)	1 (1)	15 (1)	0 (-1)	0.2 (1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	0.2 (1)	12.98 ± 0.87
5	75 (1)	5 (1)	0 (-1)	15 (1)	0.1 (1)	0 (-1)	0.2 (1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	23.15 ± 1.03
6	75 (1)	5 (1)	1 (1)	5 (-1)	0.1 (1)	0.2 (1)	0 (-1)	0.2 (1)	0 (-1)	0 (-1)	31.20 ± 0.57
7	55 (-1)	5 (1)	1 (1)	15 (1)	0 (-1)	0.2 (1)	0.2 (1)	0 (-1)	0.2 (1)	0 (-1)	32.88 ± 3.12
8	55 (-1)	3 (-1)	1 (1)	15 (1)	0.1 (1)	0 (-1)	0.2 (1)	0.2 (1)	0 (-1)	0.2 (1)	36.45 ± 0.92
9	55 (-1)	3 (-1)	0 (-1)	15 (1)	0.1 (1)	0.2 (1)	0 (-1)	0.2 (1)	0.2 (1)	0 (-1)	34.08 ± 1.74
10	75 (1)	3 (-1)	0 (-1)	5 (-1)	0.1 (1)	0.2 (1)	0.2 (1)	0 (-1)	0.2 (1)	0.2 (1)	22.92 ± 0.62
11	55 (-1)	5 (1)	0 (-1)	5 (-1)	0 (-1)	0.2 (1)	0.2 (1)	0.2 (1)	0 (-1)	0.2 (1)	46.46 ± 1.81
12	55 (-1)	3 (-1)	0 (-1)	5 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	35.81 ± 0.70

A, moisture content (%); *B*, time (days); *C*, rice straw (g/g CP); *D*, inoculum size (%); *E*, $CaCl_2$ (g/g CP); *F*, KH_2PO_4 (g/g CP); *G*, NH_4Cl (g/g CP); *H*, urea (g/g CP); *I*, yeast extract (g/g CP); *J*, peptone (g/g CP)

Table 2 Analysis of variance for Plackett-Burman model with RS yield as response

Variables	Effects	Coefficients	*t*-value	*Sig.*	Confidence (%)
Constant		28.79	508.059	0.001	
Moisture content	-16.0	-7.98	-140.912	0.005*	99.5
Time	3.2	1.62	28.647	0.022*	97.8
Rice bran	-1.2	-0.58	-10.294	0.062	93.8
Inoculum size	-6.5	-3.23	-57.000	0.011*	98.9
$CaCl_2$	3.3	1.67	29.500	0.022*	97.8
KH_2PO_4	2.6	1.30	22.882	0.028*	97.2
NH_4Cl	3.3	1.64	29.059	0.022*	97.8
Urea	3.3	1.67	29.500	0.022*	97.8
Yeast extract	-4.4	-2.22	-39.147	0.016*	98.4
Peptone	-1.7	-0.86	-15.118	0.042*	95.8

*Statistically significant 95% of confidence level.

The positive sign of the effect (Ex_i) means that an increasing of the level of the variable causes an increase in RS yield; whereas, the negative sign means that an increasing of variable level causes decrease in RS yield. Reducing sugar production of cassava pulp for further chitin and chitosan production require maximum RS yield. Therefore, the positive effect of RS yield was selected. As showed in Table 2, the positive effects of time (3.2), $CaCl_2$ (3.3), KH_2PO_4 (2.6), NH_4Cl (3.3) and urea (3.3) were significant variables for increasing of RS yield. This result implied that an increase in these variables resulted in inducing the secretion of hydrolytic enzymes from fungi such as amylase, cellulase and raw starch degrading enzyme leading to increasing of RS yield [7, 10-12].

In contrast, the negative effects of moisture content (-16), inoculum size (-6.5), yeast extract (-4.4) and peptone (-1.7) were significant variables for decreasing of RS yield. This result indicated that higher moisture level may be decrease porosity, changes particle structure, promotes development of stickiness, reduces gas volume and exchange, and decreases diffusion which results in lowered oxygen transfer leading to reduce RS yield. Moreover, a small quantity of mycelium was enough to inoculate the substrate for RS production. Furthermore, organic nitrogen sources induced the formation of protease resulted in the proteolysis of hydrolytic enzyme [12].

4. Conclusions

From parameter screening by PBD during solid state cultivation of CP with *A. oryzae*, the results showed that, the important parameter affecting on RS production were incubation time, $CaCl_2$, KH_2PO_4, NH_4Cl and Urea. These parameters were selected for optimization of RS production and further chitin/chitosan production.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge Burapha University (Grant No: 7/2560) for financial support.

References

[1] Dash M, Chiellini F, Ottenbrite R.M. Chiellini E. Chitosan – A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. Prog Polym Sci. 2011 (36) 981-1014.

[2] Philibert T, Lee B.H, Fabien N. Current status and new perspectives on chitin and chitosan as functional biopolymers. Appl Biochem Biotechnol. 2017 (181) 1314-1337.

[3] Li F, Li F, Zhao T, Mao G, Zou Y, Zheng D, Takase M, Feng W, Wu X, Yang L. Solid-state fermentation of industrial solid waste from the fruits of milk thistle *Silybum marianum* for feed quality improvement. Appl Microbio Biotechnol. 2013 (97) 6725-6737.

[4] Sriroth K, Chollakum R, Chotineeranat S, Piyachomkwan K, Oates C.G. Processing of cassava waste for improved biomass utilization. Bioresour Technol. 2000 (71) 63-69.

[5] Plackett R.L, Burman J.P, The design of optimum multifactorial experiments. Biometrika. 1946 (33) 305-325.

[6] Kammoun R, Naili B, Bejar S. Application of a statistical design to the optimization of parameters and culture medium for α-amylase production by *Aspergillus oryzae* CBS 819.72 grown on gruel (wheat grinding by-product). Bioresour Technol. 2008 (99) 5602-5609.

[7] Francis F, Sabu A, Nampoothiri K, Ramachandran S, Ghosh S, Szakacs G, Pandey A. Use of response surface methodology for optimizing process parameters for the production of α-amylase by *Aspergillus oryzae*. Biochem Eng J. 2003 (15) 107-115.

[8] Hamdy H.S, Production of mini-food by *Aspergillus niger*, *Rhizopus oryzae* and *Saccharomyces cerevisiae* using orange peels. Rom Biotechnol Lett. 2013 (18) 7929-7946.

[9] Ghose K. Measurement of celluase activites. Pure Appl Chem. 1987 (59) 257-268.

[10] Poonsrisawat A, Wanlapatit S, Paemanee A, Eurwilaichitr L, Piyachonkwan K, Champreda V. Viscosity reduction of cassava for very high gravity ethanol fermentation using cell wall degrading enzymes from *Aspergillus aceleatus*. Process Biochem. 2014 (49) 1950-1957.

[11] De Castro R.J.S, Sato H.H. Synergistic effects of agro-industrial wastes on simultaneous production of protease and α-amylase under solid state fermentation using a simplex centroid mixture design. Ind Crops Prod. 2013 (49) 8131-821.

[12] Sun H, Ge X, Wang L, Zhao P, Peng M. Microbial production of raw starch digesting enzymes. Afri J Biotechnol. 2009 (8) 1734-1739.

รายงานสรุปการเงิน

เลขที่โครงการระบบบริหารงานวิจัย 2560A10802238 สัญญาเลขที่ 007/2560

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560 มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ การผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากกากมันสำปะหลังเพื่อทดแทนสารประกอบโปรตีนในอาหารแพะเนื้อ

ชื่อหัวหน้าโครงการ ดร.เอกรัฐ คำเจริญ

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2559 ถึงวันที่ 30 กันยายน 2561

<u>รายรับ</u>

จำนวนเงินที่ได้รับ

งวดที่ 1 (50%)	200,000	บาท	เมื่อวันที่ 20 มิถุนายน พ.ศ. 2560
งวดที่ 2 (40%)	160,000	บาท	เมื่อวันที่ 15 สิงหาคม พ.ศ. 2560
งวดที่ 3 (10%)	40,000	บาท	เมื่อวันที่ กันยายน พ.ศ. 2561
รวม	400,000	บาท	

<u>รายจ่าย</u>

รายการ	งบประมาณที่ตั้งไว้	งบประมาณที่ใช้จริง	จำนวนเงินคงเหลือ/เกิน
1. ค่าตอบแทน	0	0	0
2. ค่าจ้าง	80,400	80,400	0
3. ค่าวัสดุ	200,200	200,200	0
4. ค่าใช้สอย	79,400	79,400	0
5. ค่าครุภัณฑ์	0	0	0
4. ค่าใช้จ่ายอื่นๆ - สาธารณูปโภค	40,000	40,000	0
รวม	400,000	400,000	0

เอกรัฐ คำเจริญ

นาย เอกรัฐ คำเจริญ

หัวหน้าโครงการผู้รับทุน

เอกสารอ้างอิง

กรมปศุสัตว์. (2549). ปริมาณน้ำนมดิบในประเทศ. URL. http://www.dld.go.th.

กรมโรงงานอุตสาหกรรม. 2549. การประยุกต์ใช้ระบบสารสนเทศเพื่อการพัฒนาประสิทธิภาพเชิงเศรษฐนิเวศน์อุตสาหกรรมผลิตแป้งมันสำปะหลัง. [วันที่ 24 มีนาคม 2560]

จักรกริช หอมขาว. (2555). การเพิ่มโปรตีนในผลิตภัณฑ์มันสำปะหลังโดยใช้จุลินทรีย์ และผลการใช้ผลิตภัณฑ์มันสำปะหลังทดแทนอาหารข้นในโคเจาะกระเพาะต่อการหมักย่อยในกระเพาะหมัก. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ชวนิศนดากร วรวรรณ. (2534). การเลี้ยงโคนม (พิมพ์ครั้งที่ 4). สำนักพิมพ์ไทยวัฒนาพานิช.

ชวนิศนดากร วรวรรณ, ม.ร.ว. (2500). หลักการอาหารสัตว์. หนังสือประกอบการบรรยาย. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

โชคชัย ตรีวิโรจน์. (2536). ภาวะยูเรียในเลือดของโคนมที่อยู่ระหว่างการให้นม. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ปิตุนาถ หนูเสน. (2547). การใช้กากมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบแหล่งพลังงานในอาหารข้นต่อการให้ผลผลิตของโคนมลูกผสมพันธุ์โฮลสไตน์ฟรีเชียน. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 183 น.

เมธา วรรณพัฒน์ (2529). โภชนศาสตร์สัตว์เคี้ยวเอื้อง. ขอนแก่น: ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตร มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

เมธา วรรณพัฒน์. (2533). โภชนาศาสตร์สัตว์เคี้ยวเอื้อง. ฟันนี่พับบลิชชิ่ง กรุงเทพฯ. 473 หน้า

สาโรช ค้าเจริญ. (2542). อาหารและการให้อาหารสัตว์ไม่เคี้ยวเอื้อง. ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 13-114 น.

สมเจต ใจภักดี. (2530). การศึกษาวิธีการหมักมันสำปะหลังและการนำมันสำปะหลังมาใช้ในอาหารไก่กระทง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. สาขาสัตวศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

Afrisham S, Badoei-Dalfard A, Namaki-Shoushtari A, Karami Z. 2016. Characterization of a thermostable, $CaCl_2$-activated and raw-starch hydrolyzing alpha-amylase from *Bacillus licheniformis* AT70: Production under solid fermentation by utilizing agricultural wastes. J. Mol. Catal. B Enzym. 132: 98-106.

AOAC. (2010). Official Methods of Analysis. 18th ed. Association of Official Analytical Chemists. Washington D.C.

Anbuselvi, S., Jha, M., and Aneesh. 2014. Optimization of single cell protein using cassava waste by yeast. Int. J. Pharm. Tech. 6: 6490-6494.

Apiwatanapiwat, W., Rugthaworn, P., Vaithanomsat, P., Thanapase, W., Kosugi, A., Arai, T., Mori, Y. and Murata, Y. 2013. Ethanol production at high temperature from cassava pulp by newly isolated *Kluyveromeces marxianus* strain, TISTR 5925. AIMS Energy. 1: 3-16.

Aro, S.O., Aletor, V.A., Tewe, O.O., Fajemisin, A.N., Usifo, B., & Adesida, J.A. (2008). Studies on the nutritional potentials of cassava tuber wastes (CTW) collected from a factory. Proc. 4th Annual Conf. SAAT, Federal University of Technology, Akure, Nigeria. 21st May, 2008: 86-92.

Bunterngsook, B., Laothanachareon, T., Natrchalayuth, S., Lertphanich, S., Fujii, T., Inoue, H., Youngthong, C., Chantasingh, D., Eurwilaichitr, L. and Champreda, V. 2017. Optimization a minimal synergistic enzyme system for hydrolysis of raw cassava pulp. RSC Adv. 7: 48444-48453.

Chalmers, M.I., & White, F. (1969). Urea and other substitutes for natural protein sources. Lecture given at the symposium of the European Feed Industry. F. Hoffman-La Roche & Co. Ltd, Basle, Switzerland.

Collins, M. (1988). Composition and fiber digestion in morphological components of alfalfa- timothy sward. Animal Feed Science and Technology 19: 135-143.

Church, D.C. (1979). Digestive Physiology and Nutrition of Ruminants. Vol. I. Oregon, USA: O&B Book, Corvallis.

Dunham, J.R. (1998). Relative feed value measures forage quality. Forage Facts# 41. KState AES and CES.

Faria S.A.S.C, Bassinello P.Z, Penteado M.V.C. 2012. Nutritional compotition of rice bran submitted to different stabilization procedures. Braz. J. Pharm. Sci. 48: 651-657.

Garnsworthy, P.C. (1988). Nutrition and Lactation in the Diary Cow. Anchor-Brender Butterworths Press. Nottingham. England.

Garrett, E.F., M.N. Pereira, K.V. Nordlund, L.E. Armentano, W.J. Goodger & G.R. Oetzel. (1999). Diagnostic methods for the detection of subacute ruminal acidosis in dairy cows. Journal of Dairy Science. 82: 1170-1178.

Ghose, T.K. 1987. Measurement of cellulase activities. Pure and Applied Chemistry. 59: 257-268.

Hamdy, H.S. 2013. Production of mini-food by *Aspergillus niger*, *Rhizopus oryzae* and *Saccharomyces cerevisiae* using orange peels. Rom. Biotechnol. Lett. 18: 7929-7944.

Hermiati, E., Tsubaki, S. and Azuma, J. 2014. Cassava pulp hydrolysis under microwave irradiation with oxalic acid catalyst for ethanol production. J. Math. Fund. Sci. 46: 125-139.

Hutjens, M.F. (1996). Rumen acidosis. Available online: URL.Http://dairynet.outreach.uiuc.edo/fulltex.cfmSection.

Jin, B., Zepf, F., Bai, Z., Gao, B. and Zhu, N. 2016. A biotech-systematic approach to select fungi from bioconversion of winery biomass wastes to nutrient-rich feed. Process Saf. Enrivon. 103: 60-68.

Jia, J., Chen, H., Wu, B. and Ni, Z. 2017. Cations optimization for protein enrichments in rice straw by mixed cultures of *Neurospora crassa* 14-8 and *Candida utilis* using response surface methodology. Appl. Biochem. Biotechnol. 182: 804-817.

Khajarern, J., S. Khajarern, K. Bunsiddhi & P. Sakiya. (1979). Determination of basic chemical parameters of cassava root products of different origin, processing technology and quality. pp 13-32. In KKU-IDRC cassava/Nutrition Project 1978 Annual Report, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand.

Khampa, S., Chaowarat, P., Singhalert, R. & Wanapat, M. (2009). Supplementation of Malate and Yeast in Concentrate Containing High Cassava Chip on Rumen Ecology in Dairy Steers. Pakistan Journal of Nutrition 8 (5): 592-596.

Khampa, S., Chaowarat, P., Singhalert, R. & Wanapat, M. (2009). Supplementation of Yeast Fermented Cassava Chip (YFCC) as a Replacement Concentrate and Ruzi Grass on Rumen Ecology in Native Cattle. Pakistan Journal of Nutrition 8 (5): 597-600.

Khang, Z., K.C. Chon & K.C. Nah. (2000). Cassava, a total substitute for cereals in livestock and poultry ratios. Ruminant Nutrition: selected articles from World Animal Review, FAO. 155-160 p.

Lei, H., Wang, H., Ning, T., Hao, W. and Xu, C. 2012. Protein enrichment of patato starch residue by solid state fermentation with mixed strains. J. Anim. Vet. Adv. 11: 2700-2705.

Li, F., Li, F., Zhao, T., Mao, G., Zou, Y., Zheng, D., Takase, M., Feng, W., Wu, X. and Yang L. 2013. Solid-state fermentation of industrial solid wastes from the fruits of milk thistle *Silibum marianum* for feed quality improvement. Appl. Microbiol. Biotechnol. 97: 6725-6737.

Martin, O., S. M. Balcells, J. Vicente & F. Castrillo. 2000. Influence of dietary rumen degradable protein supply on rumen characteristic and carbohydrate fermentation in cattle offered high- grain diets. Animal Feed Science and Technology. 88: 59-77.

Merten, D.R. & J.R. Loften. (1980). The effect of starch on forage fiber digestion kinetics *in vitro*. Journal of Dairy Science. 63: 1437-1445.

Moat, A.G., & J.W. Foster. (1995). Microbial Physiology. Wiley-LissPulisher. New York. USA.580 p.

Nasseri, A.T., Rasoul-Amini, S., Morowvat, M.H. and Ghasemi, Y. 2011. Single cell protein: Production and process. Am. J. Food Technol. 6: 103-116.

Nitipot, P., Sommart, K., Kongminila, D., Pattarajinda, V., & Vongpralup, T. (2004). Effects of replaced cassava chip by cassava pulp on eating behavior, ruminal fermentation and growth in heifer ration. *In Proceedings* of the Agricultural Seminar. Animal Science/ Animal Husbandry. Sofitel Raja Orchid Hotel. Khon Kaen, Thailand. 156 p.

Oboh, G. (2006). Nutrient enrichment of cassava peels using a mixed culture of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus spp*. solid media fermentation techniques. Electronic Journal of Biotechnology ISSN: 0717-3458

Oboh, G, & Akindahunsi, A.A (2003). Chemical changes in cassava peels fermented with mixed culture of *Aspergillus niger* and two species of *Lactobacillus* integrated bio-system. Appl. Trop. Agric. 8: 63-68.

Oboh, G. & Elusiyan, C.A. (2007). Changes in the nutrient and anti-nutrient content of micro- fungi fermented cassava flour produced from low- and medium-cyanide variety of cassava tubers. African Journal of Biotechnology. 2150-2157.

Osweiler, G.D., Carson, T.L., & Buck, W.B. (1985). Clinical and Diagnostic Veterinary Toxicology.3rd ed. Dubuque, Iowa; Kendal Hunt Publishing Co, p. 160-166.

Phowan, P. and Danvirutai, P. 2014. Hydrogen production from cassava pulp hydrolysate by mixed seed cultures: Effects of initial pH, substrate and biomass concentrations. Biomass Bioenerg. 64: 1-10.

Plackett R.L. and Burman J.P. 1946. The design of optimum multifactorial experiments. Biometrika. 33: 305-325.

Prakasham, R.S. Rao C.S, Rao S.R, Sarma P.N. 2007. Enhancement of acid amylase production by an isolated *Aspergillus awamori*. J. Appl. Microbiol. 102: 204-211.

Preston, R.L. (2002). Typical composition of commonly used feeds for sheep and cattle. URL. http://www.vcn.vnn.

Preston, R.L. (2004). Typical composition of feeds for cattle and sheep [On-line]. Available: http://images.industryclick.com. Accessed date: Feb 24, 2004.

Puchala, R., Min, B.R., Goetsch, A.L., & Sahlu, T. (2005). The effect of a condensed tannin-containing forage on methane emission by goats. Journal of Animal. Science. 83: 182-186.

Reas, B.P. (1996). A study on the comparative digestibility of cassava, maize, sorghum and barley in growing pigs. Master of Veterinary Studies Thesis, University of Queensland, Australia.

Sandage, J.L. & V. Davis. (1964). Prussic Acid. Agriculture and Natural Resources. University of Arkansas. [On-line]. Available: http://www.uaex.edu.

SAS. (2004). User'Guide: Statistics. Version 5 Edition. SAS Institute Inc., North Carolina. 231p.

Srisaikham, S., Isobe, N., & Suksombat, W. (2018). Effects of dietary levels of fresh cassava pulp in dairy cattle diet on productive performance and keeping quality of raw milk. Songklanakarin Journal of Science and Technology. 40 (2), 278-289. DOI: 10.14456/sjst-psu.2018.39.

Sudha, A., Sivakumar, V., Sangeetha, V. and Priyenka Devi, K.S. 2015. Enhancing fermetable sugar yield from cassava pulp for bioethanol production: microwave-coupled enzymatic hydrolysis approach. Bioprocess Biosyst. Eng. 38: 1509-1515.

Suksombat, W., Lounglawan, P., & Noosen, P. (2006). Energy and protein evaluation of five feedstuffs used in diet in which cassava pulp as main energy source for

lactating dairy cows. Suranaree Journal of Science and Technology. 14(1), 99-107.

Suksombat, W., Lounglawan, P., & Noosen. P. (2006). Energy evaluation and utilization of cassava pulp for lactating dairy cows. In: Proc. 12th AAAP Conference, Busan, Korea.

Sun, H., Ge, X., Wang, L., Zhao, P. and Peng, M. Microbial production of raw starch digesting enzymes. Afr. J. Biotechnol. 8: 1734-1739.

Suranindyah, Y., & Astuti, A. (2012). The effects of feeding dried fermented cassava peel on milk production and composition of Etawah crossedbred goat. Int. J. 6(10): 902-905.

Thanh, L.P. & Suksombat, W. (2015). Milk production and income over feed costs in dairy cows fed medium-roasted soybean meal and corn dried distiller's grains with solubles. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences. 28(4), 519-529.

Thongchul, N., Navankasattusas, S. and Yang, S.T. 2010. Production of lactic acid and ethanol by *Rhizopus oryzae* intergrated with cassava pulp hydrolysis. Bioprocess. Biosyst. Eng. 33: 407-416.

The Pennsylvania State University. (2001). Carbohydrate nutrition for lactating dairy cattle. URL. Available online: Http://www.das.psu.edu

Ukanwoko, A.I., & Ibeawuchi, J.A. (2014). Evaluation of cassava peel-cassava leaf meal based diets for milk production by the West African Dwarf goats in South Eastern Nigeria. IOSR, Journal of Veterinary Science. 7(5): 27-30.

Van Soest, P.J., Robertson, J.B., & Lewis, B.A. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and non- starch polysaccharides in relation to animal production. Journal of Dairy Science. 74, 3583-3597.

Villas-Boas, S.G., Esposito, E. and de Mendonca, M.M. 2003. Bioconversion of apple pomace into a nutritionally enriched substrate by *Candida utilis* and *Pleurotus ostreatus*. World J. Microbiol. Biotechnol. 19: 461-467.

Virunnanon, C., Ouephanit, C., Burapatana, V. and Chulalaksananukul, W. 2013. Cassava pulp enzymatic hydrolysis process as a preliminary step in bio-alcohols production from waste starchy resources. J. Clean. Prod. 39: 273-279

Wanapat, M. (2000). Rumen manipulation to increase the efficiency use of local feed resources and productivity of ruminants in topics. Asian-Aus. Journal of Animal Science. 13 (Suppl.), 59-67.

Wanapat, M., Polthanee, A., Wachirapakorn, C., Anekuit, T., & Mattarat, S. (2001). Crop-animal system research network (CASREN). Progess Report Report-Thailand, ILRI Paper.

Waterworth, J.A. (1990). Hypermedia Documents and Information Tools. Contribution to Panel on' What's Specific about User-Interfaces for Hypertext Systems?. In Proceedings of European Conference on Hypertext (ECHT'90), Paris, France, 1990. Cambridge University Press.

Xiao, L., Yang, L., Zhang, Y., Gu, Y., Jiang, L. and Qin, B. Solid state fermentation of aquatic macrophytes for crude protein extraction. Ecol. Eng. 35: 1668-1676.

Xie, P.J., Huang, L.X., Zhang, C.H. and Zhang, Y.I. 2016. Nutrient assessment of olive leaf residues processed by solid-state fermentation as an innovative feedstuff additive. J. Appl. Microbiol. 121: 28-40.