

การควบคุมการเจริญและการผลิตสารพิษของราในข้าวโพดหมักด้วยแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย



นางสาวชาลิสา แสงบัว

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR) are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2558

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CONTROL OF MOLD GROWTH AND MYCOTOXIN PRODUCTION IN CORN SILAGE USING
LACTIC ACID BACTERIA

Miss Chalisa Sangbua



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Microbiology and Microbial Technology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2015

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การควบคุมการเจริญและการผลิตสารพิษของราในข้าวโพดหมักด้วยแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย
โดย	นางสาวชาลิสา แสงบัว
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชีวานันท์ เดชอุปการ ศิริสมบุญ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร. พลกฤษณ์ แสงวณิช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปาหนัน เรืองสำราญ)
.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา)
.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชีวานันท์ เดชอุปการ ศิริสมบุญ)
.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธนียวัน)
.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุริยะ สะวานนท์)

ชาลิสา แสงบัว : การควบคุมการเจริญและการผลิตสารพิษของราในข้าวโพดหมักด้วยแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย (CONTROL OF MOLD GROWTH AND MYCOTOXIN PRODUCTION IN CORN SILAGE USING LACTIC ACID BACTERIA) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ผศ. ดร. ชีวานันท์ เดชอุปกการ ศิริสมบุรณ์, 101 หน้า.

การทดสอบความสามารถของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษจากราบนานอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *Lactobacillus paracasei* AN3 มีความสามารถสูงสุดในการยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ของ *Aspergillus flavus* และโอคราทอกซินเอ ของ *A. carbonarius* เมื่อเทียบกับ *L. casei* AN2 และ *L. casei* AN2 ร่วมกับ *L. paracasei* AN3 โดยพบว่าเมื่อเลี้ยงราร่วมกับ *L. paracasei* AN3 รามีการเจริญได้เพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับชุดควบคุม และสามารถสร้างอะฟลาทอกซินบี 1 และโอคราทอกซินเอได้ลดลง 100% และ 97.56% ตามลำดับ จึงเลือกใช้ *L. paracasei* AN3 ในการทดลองเพื่อศึกษาผลของอุณหภูมิและค่าความเป็นกรด-เบสต่อความสามารถของ *L. paracasei* AN3 โดยปรับค่าความเป็นกรด-เบสของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เท่ากับ 3, 4 และ 5 และแต่ละค่าความเป็นกรด-เบส บ่มที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียสตามลำดับ ผลการทดลองพบว่าที่ค่าความเป็น กรด-เบส เท่ากับ 3 และ 4 ในทุกอุณหภูมิที่แปรผัน ทั้ง *A. flavus* และ *A. carbonarius* ไม่สามารถเจริญได้รวมถึงในชุดควบคุม ขณะที่ค่าความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 5 ที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส ราทั้งสองสายพันธุ์ที่ใช้ทดสอบสามารถเจริญได้ดีในชุดควบคุม อย่างไรก็ตามเมื่อเลี้ยงร่วมกับแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย ไม่พบการเจริญของ *A. flavus* ในขณะที่ *A. carbonarius* สามารถเจริญได้เพียงเล็กน้อยและสร้างโอคราทอกซินเอได้ลดลง 88.44% เมื่อเทียบกับชุดควบคุม เมื่อทดสอบความสามารถของ *L. paracasei* AN3 ในการยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ในข้าวโพดที่ผ่านการฆ่าเชื้อ พบว่าเมื่อครบ 21 วันของการหมักสามารถยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* ได้ 100% และสามารถลดปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 ได้ 66.95% และเมื่อทดสอบความสามารถของ *L. paracasei* AN3 ร่วมกับจุลินทรีย์ที่มีอยู่ตามธรรมชาติในข้าวโพด พบว่าเมื่อครบ 21 วันของการหมักสามารถยับยั้งการเจริญของราได้ 100% และลดปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 ได้ 72.52% เช่นเดียวกับเมื่อทดสอบความสามารถของ *L. paracasei* AN3 ในการยับยั้งการเจริญและการผลิตโอคราทอกซินเอ ในข้าวโพดที่ผ่านการฆ่าเชื้อ พบว่าเมื่อครบ 21 วันของการหมักสามารถยับยั้งการเจริญของ *A. carbonarius* ได้ 3.06% และสามารถลดปริมาณโอคราทอกซินเอได้ 17.20% และเมื่อทดสอบความสามารถของ *L. paracasei* AN3 ร่วมกับจุลินทรีย์ชนิดอื่นในข้าวโพดหมัก พบว่าเมื่อครบ 21 วันของการหมักสามารถยับยั้งการเจริญของราได้ 52.44% และลดปริมาณโอคราทอกซินเอ ได้ 72.52% นอกจากนี้ข้าวโพดหมักในชุดทดสอบที่เติมหัวเชื้อแล็กติกแอซิดแบคทีเรียยังมีโภชนะใกล้เคียงกับข้าวโพดสด จากผลการทดลองจึงสามารถสรุปได้ว่า *L. paracasei* AN3 เป็นแล็กติกแอซิดแบคทีเรียที่มีศักยภาพที่จะนำมาใช้เป็นตัวควบคุมชีวภาพเพื่อยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ของ *A. flavus* และโอคราทอกซินเอ ของ *A. carbonarius* สามารถนำไปพัฒนาเป็นหัวเชื้อตั้งต้นในการผลิตพืชหมักให้มีคุณภาพต่อไป

ภาควิชา จุลชีววิทยา

สาขาวิชา จุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์

ปีการศึกษา 2558

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

5671944023 : MAJOR MICROBIOLOGY AND MICROBIAL TECHNOLOGY

KEYWORDS: LACTIC ACID BACTERIA / AFLATOXIN B1 / OCHRATOXIN A / SILAGE / ANTIFUNGAL

CHALISA SANGBUA: CONTROL OF MOLD GROWTH AND MYCOTOXIN PRODUCTION IN CORN SILAGE USING LACTIC ACID BACTERIA. ADVISOR: ASST. PROF. SUPAT CHAREONPORNWATTANA, Ph.D., CO-ADVISOR: ASST. PROF. CHEEWANUN DACHOUPAKAN SIRISOMBOON, Ph.D., 101 pp.

In this study, *Lactobacillus casei* AN2 and *L. paracasei* AN3 were tested for their ability to inhibit fungal growth, and aflatoxin B1 production of *Aspergillus flavus* and ochratoxin A production of *A. carbonarius*. The results showed that *L. paracasei* AN3 showed the greatest inhibitory activity by decreasing the growth rate compared to *L. casei* AN2 and mixed culture, consisting of *L. casei* AN2, and *L. paracasei* AN3 and the reduction of mycotoxin production by 100% and 97.56% for aflatoxin B1 and ochratoxin A, respectively. *L. paracasei* AN3 was selected for further determination of the biocontrol activity under different temperatures (25, 30 and 35 °C) and pHs (3, 4 and 5). Both fungi could not grow at pH 3 and 4 at all temperatures tested even in the absence of lactic acid bacteria. However, at pH 5 and 25 °C, both fungi could grow well in the control but when cultured with lactic acid bacteria, no *A. flavus* growth was observed whereas *A. carbonarius* growth was retarded and ochratoxin A production was decreased compared to the control by 88.44%. When testing the ability of *L. paracasei* AN3 to inhibit the growth of *A. flavus* and aflatoxin B1 production in sterilized corn silage, *L. paracasei* AN3 inoculant could suppress the growth and aflatoxin B1 production by 100% and 66.95%, respectively after 21 days of ensiling compared with control silage. In addition, the ability of *L. paracasei* AN3 with presence of indigenous microorganisms could inhibit the growth and aflatoxin B1 production with 52.44% and 72.52%, respectively. Furthermore, the inhibition of growth and ochratoxin A production of *A. carbonarius* in sterilized corn silage was also studied. *L. paracasei* AN3 could reduce the growth and ochratoxin A production by 3.06% and 17.20%, respectively after 21 days of ensiling compared to the control. In non-sterile conditions, *L. paracasei* AN3 could inhibit the growth of *A. carbonarius* and ochratoxin A production by 52.44% and 72.52%, respectively. Moreover, the silages inoculated with *L. paracasei* AN3 had overall nutrient compositions comparable to those of fresh feed corn. These results revealed that the inhibition of both fungal growth and mycotoxin production by lactic acid bacteria used in this study were effective and showed their potential as biocontrol agent in silage.

Department: Microbiology

Student's Signature

Field of Study: Microbiology and Microbial
Technology

Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature

Academic Year: 2015

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างยิ่งจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุปัทม์ เจริญพรวัฒนา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชีวานันท์ เดชอุปกาล ศิริสมบุญ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำในทุกขั้นตอนการทำวิจัย อีกทั้งยังกรุณาตรวจทาน แก้ไข และปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์ ซึ่งผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ด้วย

กราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปาหนัน เรืองสำราญ รองศาสตราจารย์ ดร. สุริยะ สะวานนท์ และ รองศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธนียวัน ที่กรุณาเป็นประธานกรรมการ และ กรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ ตลอดจนให้ความรู้ และคำแนะนำต่าง ๆ รวมถึงตรวจทาน แก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณคณาจารย์และเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือ รวมถึงคำแนะนำต่าง ๆ ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณพรีเมียร์ฟาร์ม อำเภอบางเลน จังหวัดนครปฐม ที่กรุณาเอื้อเพื่อข้าวโพดเลี้ยงสัตว์สำหรับใช้ในงานวิจัย

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณเพื่อนๆ และครอบครัว ที่คอยสนับสนุนและช่วยเหลือตลอดจนให้กำลังใจ จนทำให้งานวิจัยและวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญภาพ	ฑ
สารบัญตาราง.....	ด
บทที่ 1	1
บทนำ.....	1
บทที่ 2	5
ปริทัศน์วรรณกรรม.....	5
2.1 พืชอาหารสัตว์.....	5
2.1.1 โภชนะในอาหารสัตว์.....	5
2.1.2 การวิเคราะห์โภชนะในอาหารสัตว์.....	6
2.1.2.1 การวิเคราะห์โดยวิธี proximate.....	6
2.1.2.1.1 การวิเคราะห์ความชื้น	6
2.1.2.1.2 การวิเคราะห์โปรตีนรวม.....	6
2.1.2.1.3 การวิเคราะห์ไขมัน	7
2.1.2.1.4 การวิเคราะห์เยื่อใย	7
2.1.2.1.5 การวิเคราะห์เถ้า	7
2.1.2.1.6 การวิเคราะห์คาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำได้ง่าย	7
2.1.2.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบเยื่อใยแบบ Van Soest System	7
2.1.2.2.1 องค์ประกอบภายในเซลล์.....	8

2.1.2.2.2 องค์ประกอบของผนังเซลล์.....	8
2.1.2.3 การวิเคราะห์หาแร่ธาตุและพลังงาน	8
2.1.3 ข้าวโพด.....	9
2.2 พืชหมัก.....	9
2.2.1 กระบวนการหมัก	10
2.2.1.1 ระยะมีอากาศ (aerobic phase)	10
2.2.1.2 ระยะการหมัก (fermentation phase).....	10
2.2.1.3 ระยะคงตัว (stable phase)	10
2.2.1.4 ระยะการนำไปใช้ (feed out phase).....	10
2.2.2 จุลินทรีย์ในพืชหมัก	11
2.2.2.1 แล็กติกแอซิดแบคทีเรีย	11
2.2.2.2 เอนเทอโรแบคทีเรีย	11
2.2.2.3 แบคทีเรียสกุล <i>Clostridium</i>	12
2.2.2.4 <i>Bacillus</i>	12
2.2.2.5 แบคทีเรียสกุล <i>Listeria</i>	13
2.2.2.6 ยีสต์	13
2.2.2.7 รา.....	13
2.2.3 คุณภาพและปัจจัยที่มีผลต่อคุณภาพของพืชหมัก (Muck, 1988).....	14
2.2.3.1 อายุของพืชที่ใช้หมัก.....	14
2.2.3.2 ขนาดของพืชที่ใช้หมัก	14
2.2.3.3 การจัดการก่อนการหมัก.....	14
2.2.3.4 การบรรจุพืชหมัก	14
2.2.3.5 ค่าความเป็นกรด-เบส.....	14

2.2.4 การใช้สารเติมแต่งในพืชหมัก.....	15
2.2.4.1 สารเติมแต่งเพื่อกระตุ้นการหมัก (fermentation stimulant)	15
2.2.4.1.1 หัวเชื้อจุลินทรีย์.....	15
2.2.4.1.2 คาร์โบไฮเดรตที่หมักได้.....	15
2.2.4.1.3 เอนไซม์.....	15
2.2.4.2 สารเติมแต่งเพื่อยับยั้งการหมัก (fermentation inhibitors).....	16
2.2.4.3 สารเติมแต่งเพื่อป้องกันการเน่าเสียของพืชหมัก (aerobic spoilage inhibitor).....	16
2.2.4.4 สารเติมแต่งเพื่อเพิ่มโภชนะในพืชหมัก	17
2.2.4.4.1 แอมโมเนีย และยูเรีย.....	17
2.2.4.4.2 แร่ธาตุ.....	17
2.2.4.4.3 สารเติมแต่งเพื่อการดูดซับ	17
2.3 ราและสารพิษจากรา.....	17
2.3.1 ราและสารพิษจากราที่มักพบในพืชหมัก	17
2.3.2 อะฟลาทอกซินบี 1.....	21
2.3.2.1 ลักษณะทางกายภาพและทางเคมีทั่วไป.....	21
2.3.2.2 ความเป็นพิษ.....	22
2.3.2.3 การปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในอาหารสัตว์.....	22
2.2.2.4 อะฟลาทอกซินเอ็ม 1	23
2.3.3 โอคราทอกซินเอ	24
2.3.3.1 ลักษณะทางกายภาพและทางเคมีทั่วไป.....	24
2.3.3.2 ความเป็นพิษ.....	25
2.3.3.3 การปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอในอาหารสัตว์.....	25

2.4	แล็กติกแอซิดแบคทีเรีย.....	26
2.4.1	การใช้แล็กติกแอซิดแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษจากรา.....	28
2.4.1.1	เมแทบอลิต์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของรา.....	28
2.4.1.1.1	กรดอินทรีย์.....	28
2.4.1.1.2	สารประกอบประเภทโปรตีน.....	28
2.4.1.1.3	กรดไขมัน.....	29
2.4.1.1.4	ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์.....	30
2.4.1.1.5	สารประกอบฟีนอลิก.....	30
2.4.1.1.6	รูเทอริน.....	30
2.4.1.1.7	ไดอะเซทิล.....	31
2.4.1.2	ปัจจัยที่มีผลต่อฤทธิ์ของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในยับยั้งการเจริญของรา.....	31
2.4.1.2.1	อุณหภูมิและระยะเวลาในการบ่ม.....	31
2.4.1.2.2	ค่าความเป็นกรด-เบส.....	32
2.4.1.2.3	สารอาหาร.....	32
2.4.1.3	การยับยั้งการผลิตสารพิษจากรา.....	33
2.4.1.4	การดูดซับสารพิษจากราโดยแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย.....	33
2.4.1.4.1	การดูดซับอะฟลาทอกซินปี 1.....	34
2.4.1.4.2	การดูดซับโอคราทอกซินเอ.....	34
บทที่ 3	36
อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย.....		36
3.1	อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง.....	36
3.2	เคมีภัณฑ์.....	37
3.3	จุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ.....	37

3.4	วิธีดำเนินงานวิจัย.....	38
3.4.1	เตรียมจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย	38
3.4.1.1	เตรียมหัวเชื้อแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย	38
3.4.1.2	เตรียมสปอร์ราแวนลอย	38
3.4.2	ทดสอบความสามารถของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญและการ ผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 ของ <i>A. flavus</i> และการผลิตโอคราทอกซินเอของ <i>A.</i> <i>carbonarius</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อ	38
3.4.2.1	ทดสอบความสามารถของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญ ของรา.....	38
3.4.2.2	ทดสอบความสามารถของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในการยับยั้งการ ผลิตสารพิษจากรา	39
3.4.3	ทดสอบผลของอุณหภูมิและค่าความเป็นกรด-เบสต่อการยับยั้งการเจริญและการ ผลิตสารพิษจากรา.....	40
3.4.4	ทดสอบความสามารถของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญและการ ผลิตสารพิษจากราในข้าวโพดหมัก	40
3.4.4.1	หมักข้าวโพด	40
3.4.4.2	ติดตามความเป็นกรด-เบส.....	41
3.4.4.3	ติดตามการเจริญของจุลินทรีย์.....	41
3.4.4.4	ตรวจหาปริมาณสารพิษจากรา	41
3.4.5	ทดสอบความสามารถของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญและการ ผลิตสารพิษจากราในข้าวโพดหมักร่วมกับจุลินทรีย์ชนิดอื่น	42
3.4.5.1	หมักข้าวโพด	42
3.4.5.2	ติดตามความเป็นกรด-เบส.....	42
3.4.5.2	ติดตามการเจริญของจุลินทรีย์.....	42
3.4.5.3	ตรวจหาปริมาณสารพิษจากรา	42

3.4.6 ทดสอบผลของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียต่อคุณค่าทางโภชนาของข้าวโพดหมัก	42
บทที่ 4	43
ผลการทดลอง	43
4.1 การเจริญของแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย	43
4.1.1 การติดตามการเจริญของ <i>L. casei</i> AN2	43
4.1.2 การติดตามการเจริญของ <i>L. paracasei</i> AN3	44
4.2 ความสามารถของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอก ซินบี 1 ของ <i>A. flavus</i>	44
4.3 ความสามารถของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญและการผลิตโอคราทอก ซินเอ ของ <i>A. carbonarius</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อ	47
4.4 ผลของอุณหภูมิและค่าความเป็นกรด-เบสต่อการยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษจาก รา 51	
4.4.1 ผลของอุณหภูมิและค่าความเป็นกรด-เบสต่อการยับยั้งการเจริญและการผลิต อะฟลาทอกซินบี 1 ของ <i>A. flavus</i>	51
4.4.2 ผลของอุณหภูมิและค่าความเป็นกรด-เบสต่อการยับยั้งการเจริญและการผลิตโอ คราทอกซินเอของ <i>A. carbonarius</i>	55
4.5 ความสามารถของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอก ซินบี 1 ของ <i>A. flavus</i> ในข้าวโพดหมัก	60
4.5.1 ความเป็นกรด-เบส	60
4.5.2 จำนวนแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย <i>L. paracasei</i> AN3	61
4.5.3 จำนวน <i>A. flavus</i>	62
4.5.4 ปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1	63
4.6 ความสามารถของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอก ซินบี 1 ของ <i>A. flavus</i> ในข้าวโพดหมักร่วมกับจุลินทรีย์ชนิดอื่น	64
4.6.1 ความเป็นกรด-เบส	65

4.6.2	จำนวนคอลีฟอร์มแบคทีเรีย	65
4.6.3	จำนวนราทั้งหมด.....	66
4.6.4	ปริมาณอะฟลาทอกซินปี 1.....	67
4.7	ความสามารถของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญและการผลิตโอคราทอก ซินเอ ของ <i>A. carbonarius</i> ในข้าวโพดหมัก.....	68
4.7.1	ความเป็นกรด-เบส	69
4.7.2	จำนวนแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย <i>L. paracasei</i> AN3.....	69
4.7.3	จำนวน <i>A. carbonarius</i>	70
4.7.4	ปริมาณโอคราทอกซินเอ.....	71
4.8	ความสามารถของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญและการผลิตโอคราทอก ซินเอ ของ <i>A. carbonarius</i> ในข้าวโพดหมักร่วมกับจุลินทรีย์ชนิดอื่น	72
4.8.1	ความเป็นกรด-เบส	73
4.8.2	จำนวนคอลีฟอร์มแบคทีเรีย	73
4.8.3	จำนวนราทั้งหมด.....	74
4.8.4	ปริมาณโอคราทอกซินเอ.....	75
4.9	ผลของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียต่อคุณค่าทางโภชนาของข้าวโพดหมัก	77
บทที่ 5	78
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	78
รายการอ้างอิง	85
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	101

สารบัญญภาพ

รูปที่ 2.1	โครงสร้างทางเคมีของอะฟลาทอกซินบี 1	21
รูปที่ 2.2	โครงสร้างทางเคมีของอะฟลาทอกซิน เอ็ม 1.....	24
รูปที่ 2.3	โครงสร้างทางเคมีของโอคราทอกซินเอ	25
รูปที่ 2.4	วิถีกระบวนการหมักน้ำตาลของแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย	27
รูปที่ 4.1	กราฟแสดงการเจริญของ <i>L. casei</i> AN2 โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร เป็นเวลา 36 ชั่วโมง.....	43
รูปที่ 4.2	กราฟแสดงการเจริญของ <i>L. paracasei</i> AN3 โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร เป็นเวลา 25 ชั่วโมง	44
รูปที่ 4.3	กราฟแสดงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ <i>A. flavus</i> เมื่อเลี้ยงร่วมกับแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย <i>L. casei</i> AN2, <i>L. paracasei</i> AN3 และ <i>L. casei</i> AN2 ร่วมกับ <i>L. paracasei</i> AN3 เทียบกับชุดควบคุม	45
รูปที่ 4.4	การเจริญของ <i>A. flavus</i> ในวันที่ 7 เมื่อเลี้ยงร่วมกับแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย <i>L. casei</i> AN2, <i>L. paracasei</i> AN3, <i>L. casei</i> AN2 ร่วมกับ <i>L. paracasei</i> AN3 และชุดควบคุม	46
รูปที่ 4.5	กราฟแสดงผลการยับยั้งการสร้างอะฟลาทอกซินบี 1 ของ <i>A. flavus</i> โดยแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย <i>L. casei</i> AN2, <i>L. paracasei</i> AN3, <i>L. casei</i> AN2 ร่วมกับ <i>L. paracasei</i> AN3 และชุดควบคุม	47
รูปที่ 4.6	กราฟแสดงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ <i>A. carbonarius</i> เมื่อเลี้ยงร่วมกับแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย <i>L. casei</i> AN2, <i>L. paracasei</i> AN3, <i>L. casei</i> AN2 ร่วมกับ <i>L. paracasei</i> AN3 เทียบกับชุดควบคุม.....	48
รูปที่ 4.7	การเจริญของ <i>A. carbonarius</i> ในวันที่ 7 เมื่อเลี้ยงร่วมกับร่วมกับแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย <i>L. casei</i> AN2, <i>L. paracasei</i> AN3, <i>L. casei</i> AN2 ร่วมกับ <i>L. paracasei</i> AN3 และชุดควบคุม	49
รูปที่ 4.8	กราฟแสดงผลการยับยั้งการสร้างโอคราทอกซินเอของ <i>A. carbonarius</i> โดยแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย <i>L. casei</i> AN2, <i>L. paracasei</i> AN3, <i>L. casei</i> AN2 ร่วมกับ <i>L. paracasei</i> AN3 และชุดควบคุม	50
รูปที่ 4.9	กราฟแสดงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ <i>A. flavus</i> เมื่อเลี้ยงร่วมกับแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย <i>L. paracasei</i> AN 3 เทียบกับชุดควบคุม ที่ค่าความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 5 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส..	51

รูปที่ 4.32 กราฟแสดงจำนวน <i>A. carbonarius</i> ของข้าวโพดปลูกต่อเนื่องหมักในชุดทดสอบเทียบกับชุดควบคุม ในการทดสอบความสามารถของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญและการผลิตโอคราทอกซินเอของ <i>A. carbonarius</i>	71
รูปที่ 4.33 กราฟแสดงปริมาณโอคราทอกซินเอ ที่ทำให้เป็นบรรทัดฐานของข้าวโพดปลูกต่อเนื่องหมักในชุดทดสอบเทียบกับชุดควบคุม ในการทดสอบความสามารถของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญและการผลิตโอคราทอกซินเอของ <i>A. carbonarius</i>	72
รูปที่ 4.34 กราฟแสดงค่าความเป็นกรด-เบสของข้าวโพดหมักโดยแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย <i>L. paracasei</i> AN3 เทียบกับชุดควบคุม ในการทดสอบความสามารถของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญและการผลิตโอคราทอกซินเอของ <i>A. carbonarius</i>	73
รูปที่ 4.35 กราฟแสดงจำนวนคอลิฟอร์มแบคทีเรียของข้าวโพดหมักในชุดทดสอบเทียบกับชุดควบคุมในการทดสอบความสามารถของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญและการผลิตโอคราทอกซินเอของ <i>A. carbonarius</i>	74
รูปที่ 4.36 กราฟแสดงจำนวนราทั้งหมดของข้าวโพดหมักในชุดทดสอบเทียบกับชุดควบคุม ในการทดสอบความสามารถของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญและการผลิตโอคราทอกซินเอของ <i>A. carbonarius</i>	75
รูปที่ 4.37 กราฟแสดงปริมาณโอคราทอกซินเอ ที่ทำให้เป็นบรรทัดฐานของข้าวโพดหมักในชุดทดสอบเทียบกับชุดควบคุม ในการทดสอบความสามารถของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญและการผลิตโอคราทอกซินเอของ <i>A. carbonarius</i>	76
รูปที่ ค.1 กราฟมาตรฐานอะฟลาทอกซินบี 1.....	98
รูปที่ ค.2 กราฟมาตรฐานโอคราทอกซินเอ.....	98

สารบัญตาราง

ตารางที่ 2.1 เอนไซม์ที่นิยมใช้เป็นสารเติมแต่งในพืชหมัก.....	16
ตารางที่ 2.2 ราและสารพิษจากราที่มักพบในพืชหมัก.....	18
ตารางที่ 4.1 คุณค่าทางโภชนาของข้าวโพดหมักในวันที่ 7, 14 และ 21 เทียบกับชุดควบคุมและข้าวโพดสด	77



บทที่ 1

บทนำ

ปัจจุบันปัญหาการขาดแคลนพืชอาหารสัตว์ เช่น หญ้า พืชตระกูลถั่ว และข้าวโพด อันเนื่องมาจากผลของสภาพภูมิอากาศหรือฤดูกาล เป็นปัญหาที่สำคัญของเกษตรกรผู้เลี้ยงปศุสัตว์เป็นอย่างมาก เนื่องจากส่งผลกระทบต่อปริมาณและคุณภาพของปศุสัตว์โดยตรงจึงมีการคิดค้นวิธีที่จะช่วยแก้ปัญหาดังกล่าว โดยการเก็บรักษาพืชอาหารสัตว์ที่มีมากในฤดูฝนไว้ใช้ในยามขาดแคลนในรูปแบบของพืชหมัก

พืชหมักหรือไซเลจ (silage) คือการเก็บรักษาพืชอาหารสัตว์ให้อยู่ในรูปแบบของพืชหมัก โดยการนำพืชอาหารสัตว์ที่มีอายุและความชื้นที่เหมาะสม มาผ่านกระบวนการหมักในภาวะไร้อากาศ (anaerobic fermentation) ทำให้สามารถคงสภาพและคุณค่าทางอาหารของพืชอาหารสัตว์เพื่อเก็บไว้ใช้ในฤดูขาดแคลนพืชสดได้ กระบวนการหมักในพืชหมักเกิดจากการทำงานของแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย (lactic acid bacteria) ซึ่งจะใช้คาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำได้ (water-soluble carbohydrate) เป็นซับสเตรตเพื่อผลิตกรดแล็กติก ส่งผลให้ค่าความเป็นกรด-เบสของพืชหมักลดลงและเมื่ออยู่ในภาวะไร้อากาศ ทำให้สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ใช้อากาศที่ไม่เป็นประโยชน์หรือทำให้เกิดการเน่าเสียของพืชหมักได้ (Bolsen และคณะ, 1996) แต่อย่างไรก็ตามในทางปฏิบัตินั้นการจัดการพืชหมักให้อยู่ในภาวะไร้อากาศโดยสมบูรณ์ทำได้ยาก ยิ่งไปกว่านั้นหากมีการจัดการพืชหมักอย่างไม่เหมาะสม เช่น มีรอยร้าวที่ทำให้อากาศสามารถผ่านเข้าไปสัมผัสกับพืชหมัก หรือมีการปนเปื้อนของแมลง จะทำให้มีโอกาสเกิดการปนเปื้อนของกลุ่มจุลินทรีย์ใช้อากาศ เช่น ราและยีสต์ที่มักพบการปนเปื้อนบริเวณผิวหน้าของพืชหมักที่สัมผัสกับอากาศได้ (Driehuis, 2013) ปัญหาการปนเปื้อนราเป็นปัญหาที่สำคัญในการรักษาคุณภาพของพืชหมัก โดยเฉพาะราบางชนิดนั้นสามารถสร้างสารพิษจากรา (mycotoxin) ซึ่งนอกจากจะส่งผลกระทบต่อสุขภาพรวมถึงผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปศุสัตว์โดยตรงแล้ว ยังมีผลกระทบต่อสุขภาพของมนุษย์อีกด้วย สารพิษจากราที่สามารถพบได้ในพืชหมักได้แก่ อะฟลาทอกซินบี 1 (aflatoxin B1), โอคราทอกซินเอ (ochratoxin A) และฟูโมนิซินบี (fumonisin B) เป็นต้น (Alonso และคณะ, 2013)

อะฟลาทอกซินเป็นกลุ่มของสารพิษที่เกิดจากราในสกุล *Aspergillus* โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *A. flavus* และ *A. parasiticus* ซึ่งมักพบปนเปื้อนในพืชและผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร เช่น ข้าวโพด แบ่งออกได้เป็น 4 ชนิด คือ อะฟลาทอกซินบี 1 อะฟลาทอกซินบี 2 อะฟลาทอกซินจี 1 และอะฟลาทอกซินจี 2 ซึ่ง *A. flavus* จะสร้างเฉพาะอะฟลาทอกซินบีเท่านั้น ในขณะที่ *A. parasiticus*

จะสร้างทั้งอะฟลาทอกซินบีและจี (Martins และคณะ, 2007) สารพิษในกลุ่มนี้ อะฟลาทอกซินบี 1 มีความเป็นพิษสูงที่สุดและยังถูกจัดให้เป็นสารก่อมะเร็ง กลุ่ม 1 โดยองค์การ International Agency for Research on Cancer (IARC) (Ghonaimy และคณะ, 2007) สำหรับในประเทศไทยนั้นได้กำหนดให้มีการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินได้ไม่เกิน 20 ไมโครกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม หรือ 20 พีพีบี ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 98 พ.ศ. 2529 ในส่วนของปศุสัตว์พบว่าสัตว์ที่กินอาหารที่มีการปนเปื้อนของ อะฟลาทอกซินบี 1 จะทำให้เกิดอาการเบื่ออาหาร การเจริญเติบโตลดลง ส่งผลให้ได้ผลผลิตลดลง โดยเฉพาะในปศุสัตว์ที่ให้น้ำนมเมื่อได้รับสารพิษประเภทนี้เข้าไปจะได้สารอนุพันธ์ที่เกิดจากแมแทบอลิซึมของอะฟลาทอกซินบี 1 เกิดเป็นอะฟลาทอกซินเอ็ม 1 ซึ่งสามารถปนเปื้อนได้ในน้ำนมและผลิตภัณฑ์จากนม ส่งผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภคโดยตรง (Prandini และคณะ, 2009)

โอคราโทอกซิน (Orchratoxins) เป็นกลุ่มของสารพิษที่เกิดจากราในสกุล *Aspergillus* และ *Penicillium* เช่น *A. ochraceus*, *A. carbonarius*, *Penicillium verrucosum* และ *P. viridicatum* แบ่งออกได้เป็นหลายชนิด เช่น โอคราโทอกซินเอ โอคราโทอกซินบี และ โอคราโทอกซินซี เป็นต้น โดยชนิดที่พบส่วนใหญ่ในธรรมชาติ คือ โอคราโทอกซินเอ มักพบปนเปื้อนในธัญพืช เช่น ข้าว ข้าวโพด กาแฟ รวมถึง องุ่น เป็นต้น องค์การ IARC จัดให้เป็นสารที่อยู่ในกลุ่ม 2B เป็นสารที่อาจจะก่อให้เกิดมะเร็งได้ในมนุษย์ และมีพิษต่อไต (Amézqueta และคณะ, 2009) ในส่วนของปศุสัตว์พบว่าหากได้รับโอคราโทอกซินเอ เป็นเวลานานจะทำให้เกิดพิษสะสมเรื้อรัง มีเลือดออกในอวัยวะภายใน เกิดโรคไตอักเสบ รวมถึงเกิดเนื้องอกในตับและเนื้อเยื่อน้ำเหลือง ส่วนในสัตว์เคี้ยวเอื้องพบว่ามักทนต่อโอคราโทอกซินเอ เนื่องจากสามารถถูกย่อยสลายได้โดยโปรโตซัวและเอนไซม์จากแบคทีเรียที่อยู่ในกระเพาะอาหาร แต่อย่างไรก็ตามยังสามารถพบสารพิษตกค้างได้ในผลิตภัณฑ์ที่ได้จากสัตว์ซึ่งส่งผลกระทบต่อผู้บริโภคโดยตรง (Scudamore และ Livesey, 1998) Galvano และคณะ (2008) ได้ศึกษาพฤติกรรมกรรมการบริโภคของมารดาและการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินเอ็ม 1 และโอคราโทอกซินเอ ในน้ำนม โดยเก็บตัวอย่างน้ำนมของหญิงให้นมบุตร จำนวน 82 คน ที่มีพฤติกรรมกรรมการบริโภคอาหารที่มีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนของสารพิษจากราจำพวกผลิตภัณฑ์จากธัญพืชต่าง ๆ เช่น ขนมปัง รวมถึงผลิตภัณฑ์จากสัตว์ เช่น นม เนื้อหมู และเนื้อวัว เป็นต้น ซึ่งผลการศึกษาพบการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินเอ็ม 1 ในน้ำนมทั้งหมด 4 คน คิดเป็นร้อยละ 5 ของตัวอย่างทั้งหมด และพบการปนเปื้อนของโอคราโทอกซินเอ ในน้ำนมถึง 61 คน คิดเป็นร้อยละ 74 ของตัวอย่างทั้งหมด จากงานวิจัยดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงอันตรายของการปนเปื้อนสารพิษจากราในห่วงโซ่อาหาร ที่สามารถส่งผ่านมายังผู้บริโภคได้ ดังนั้น การควบคุมการปนเปื้อนจากราและสารพิษจากราในอาหารสัตว์จะช่วยลดปริมาณสารพิษที่ปนเปื้อนในห่วงโซ่อาหารได้

การควบคุมการเจริญของราและสารพิษจากราในระหว่างกระบวนการหมักของพืชหมักสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การเติมสารเพื่อปรับค่าความเป็นกรด-เบสของพืชหมักให้ลดลง เช่น กรดโพรพิโอนิก (propionic acid) และกรดแอสติติก (acetic acid) เป็นต้น ซึ่งจะสามารถช่วยยับยั้งการเจริญของราได้ แต่การเติมสารจำพวกกรดยังมีข้อจำกัด คือ หากใช้ในปริมาณมาก จะไปยับยั้งกระบวนการหมักของพืชหมัก รวมถึงอาจทำให้ภาชนะที่บรรจุพืชหมักผุร่อนได้ (Yitbarek และ Tamir, 2014) ดังนั้นการใช้วิธีการควบคุมทางชีวภาพจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจในการยับยั้งการเจริญของรารวมถึงสารพิษจากราในพืชหมัก

แล็กติกแอซิดแบคทีเรีย (Lactic acid bacteria) เป็นจุลินทรีย์กลุ่มหนึ่งที่มีความสามารถในการเป็นตัวควบคุมทางชีวภาพ แบคทีเรียกลุ่มนี้มีความสามารถในการผลิตเมแทบอลิต์ เช่น กรดอินทรีย์ หรือ เพปไทด์ ที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของรารวมถึงการผลิตสารพิษจากรา นอกจากนี้ผนังเซลล์ของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียยังมีโครงสร้างที่สามารถดูดซับสารพิษจากรา จึงสามารถช่วยลดการสะสมสารพิษในอาหารได้เช่นเดียวกัน (Dalié และคณะ, 2010) Piotrowska และ Zakowska (2005) ได้ทดสอบความสามารถของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียที่อยู่ในสกุล *Lactobacillus* และ *Lactococcus* จำนวน 29 สายพันธุ์ ในการลดปริมาณของโอคราทอกซินเอ ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ผลการทดสอบพบว่าทุกสายพันธุ์สามารถลดปริมาณของโอคราทอกซินได้ โดย *Lactobacillus acidophilus* CH-5 มีความสามารถสูงสุด โดยสามารถลดปริมาณโอคราทอกซินได้มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับปริมาณเริ่มต้น คณะผู้วิจัยยังได้ตั้งสมมติฐานของกลไกที่แล็กติกแอซิดแบคทีเรียใช้ในการลดปริมาณสารพิษว่าเกิดจากกระบวนการจับกัน (binding process) ของผนังเซลล์แบคทีเรียและโอคราทอกซิน เนื่องจากตรวจไม่พบผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการย่อยสลายของโอคราทอกซินในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ใช้ทดสอบ Magnusson และ Schnurer (2001) ได้ศึกษาพบว่า *L. coryniformis* subsp. *coryniformis* Si3 ที่คัดแยกได้จากพืชหมัก สามารถผลิตสารประเภทโปรตีนขนาดเล็ก (3 kDa) ที่มีสมบัติในการยับยั้งราที่สร้างสารพิษได้หลายชนิด เช่น *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *P. roqueforti* และ *Fusarium poae* เป็นต้น Chang และ Kim (2007) ได้ศึกษาการยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินของ *A. flavus* โดยใช้แล็กติกแอซิดแบคทีเรียสายพันธุ์ *L. casei* KC-324 พบว่าแบคทีเรียสามารถสร้างเมแทบอลิต์เป็นเพปไทด์ขนาดเล็กที่สามารถยับยั้งการเจริญของรารวมถึงการสร้างสารพิษของราที่ใช้ทดสอบได้ นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับการใช้แล็กติกแอซิดแบคทีเรียอีกหลายสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญและการสร้างสารพิษจากรา เช่น *L. plantarum* (Suzuki และคณะ, 1991, Lavermicocca และคณะ, 2003, Sathe และคณะ, 2007), *L. rhamnosus* (Stiles และคณะ, 2002) *Pediococcus pentosaceus* (Rouse และคณะ, 2008) เป็นต้น ยิ่งไปกว่านั้นแล็กติกแอซิดแบคทีเรียยังมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคและได้รับการ

ยอมรับจากองค์การอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกา (FDA) ให้เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถใช้เติมลงในอาหารได้อย่างปลอดภัย (GRAS: Generally Regconized as Safe) และบางชนิดยังมีสมบัติเป็นโพรไบโอติก (probiotic) ที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพช่วยยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร (Gildberg และคณะ, 1997) ดังนั้น แล็กติกแอซิดแบคทีเรียจึงเป็นจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการนำมาใช้ควบคุมการเจริญและการผลิตสารพิษจากราในพืชหมักได้

กวิน เจริญยงค์ (2556) ได้คัดแยกสายพันธุ์แล็กติกแอซิดแบคทีเรียจากข้าวโพดหมักซึ่งสามารถทนต่อความเป็นกรด-เบสต่ำ และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ที่เป็นภาวะในการหมักไซเลจได้สองสายพันธุ์ ได้แก่ *L. casei* AN2 และ *L. paracasei* AN3 ซึ่งสามารถผลิตกรดแล็กติกได้ในปริมาณที่สูง มีศักยภาพในการนำมาใช้หมักพืช และการควบคุมการเจริญและการผลิตสารพิษจากรา

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อทดสอบความสามารถของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในการควบคุมการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ของ *A. flavus* และโอคราทอกซินเอของ *A. carbonarius* ในข้าวโพดหมัก ผลจากงานวิจัยนี้จะช่วยเป็นแนวทางในการพัฒนาการทำพืชหมักให้มีคุณภาพดีต่อไป

บทที่ 2

ปรีทัศน์วรรณกรรม

2.1 พืชอาหารสัตว์

พืชอาหารสัตว์ หมายถึง พืชที่ปลูกขึ้นโดยมีจุดประสงค์หลักในการใช้ลำต้นและใบ ในสภาพสดหรือแห้งหรือหมักเป็นอาหารสัตว์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเป็นอาหารหลักสำหรับสัตว์กินพืช (กมลทิพย์ ประสมเพชร, 2554) เช่น ข้าวโพด หญ้า และถั่ว เป็นต้น

2.1.1 โภชนะในอาหารสัตว์

ในทางโภชนศาสตร์ ได้จัดสารประกอบต่าง ๆ ในอาหาร ออกเป็น 6 กลุ่ม ได้แก่ (ฉลอง วชิราภากร, 2541)

น้ำ ซึ่งเป็นส่วนประกอบของเซลล์ในร่างกาย อีกทั้งยังช่วยควบคุมกลไกการทำงานต่าง ๆ ของร่างกายให้เป็นปกติ

โปรตีน จำเป็นต่อการเจริญเติบโต เป็นส่วนประกอบของโครงสร้างทั้งยังให้พลังงาน และช่วยซ่อมแซมส่วนที่สึกหรอ จำเป็นต่อการสร้างน้ำนมและสารภูมิคุ้มกันและยังช่วยรักษาสมดุลของน้ำในร่างกายได้อีกด้วย ไขมัน เป็นสารประกอบที่ให้พลังงานมากที่สุด และยังเป็นตัวช่วยในการดูดซึมวิตามินบางชนิดที่ละลายได้ในไขมัน

คาร์โบไฮเดรต ทำหน้าที่ให้พลังงาน โดยในสัตว์เคี้ยวเอื้องนอกจากจะให้พลังงานแก่ตัวสัตว์แล้ว ยังเป็นแหล่งพลังงานของจุลินทรีย์ในกระเพาะหมักและยังช่วยรักษาสมดุลในระบบทางเดินอาหาร คาร์โบไฮเดรตในพืชอาหารสัตว์แบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท ได้แก่ คาร์โบไฮเดรตชนิดที่ไม่เป็นโครงสร้าง (non-structural carbohydrates : NSC) หมายถึง ส่วนประกอบของพืชที่ไม่ได้อยู่ในโครงสร้างค้ำจุน ได้แก่ แป้ง น้ำตาล เพกทิน และกรดอินทรีย์ต่าง ๆ และคาร์โบไฮเดรตชนิดที่เป็นโครงสร้าง (structural carbohydrates : SC) หมายถึง ส่วนประกอบของพืชที่เป็นโครงสร้างค้ำจุนต้นพืช หรือเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์พืช ได้แก่ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน

แร่ธาตุ เป็นสารอนินทรีย์ที่มีความจำเป็นต่อร่างกาย แร่ธาตุที่สำคัญ เช่น แคลเซียม และฟอสฟอรัส เป็นส่วนประกอบของเนื้อเยื่อกระดูก นอกจากนี้แร่ธาตุยังทำหน้าที่รักษาสสมดุลของเหลวต่างๆให้อยู่ในภาวะปกติ ในสัตว์เคี้ยวเอื้องแร่ธาตุบางชนิด เช่น ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม เหล็ก และสังกะสี ยังจำเป็นต่อการย่อยอาหารของจุลินทรีย์ในกระเพาะสัตว์เคี้ยวเอื้องอีกด้วย

วิตามิน เป็นสารประกอบที่พบน้อยมากในอาหารแต่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโต และสุขภาพของสัตว์ ในสัตว์เคี้ยวเอื้องวิตามินบางชนิดสามารถถูกสังเคราะห์ได้โดยจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร แม้ร่างกายจะต้องการวิตามินในปริมาณน้อย การขาดวิตามินบางชนิดจะก่อให้เกิดปัญหาด้านสุขภาพตามมา เช่น ปัญหาด้านการมองเห็นจากการขาดวิตามินเอ เป็นต้น

2.1.2 การวิเคราะห์โภชนะในอาหารสัตว์

การวิเคราะห์โภชนะในอาหารสัตว์ เป็นการตรวจสอบคุณภาพของอาหารเพื่อใช้ในการปรับปรุงสูตรอาหาร ให้เหมาะสมต่อความต้องการโภชนะของสัตว์แต่ละชนิด

2.1.2.1 การวิเคราะห์โดยวิธี proximate analysis

เป็นการวิเคราะห์ส่วนประกอบทางเคมี ได้แก่ ความชื้น โปรตีน ไขมัน เยื่อใย ฝ้าย และคาร์โบไฮเดรต (กมลทิพย์ ประสมเพชร, 2554)

2.1.2.1.1 การวิเคราะห์ความชื้น

มักวิเคราะห์โดยการนำตัวอย่างอาหารสัตว์ไปอบแห้งจนได้น้ำหนักคงที่ แล้วนำมาคำนวณหาน้ำหนักที่หายไป คือ ความชื้น

2.1.2.1.2 การวิเคราะห์โปรตีนรวม

วิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจน โดยวิธีต่างๆ เช่น การวิเคราะห์ไนโตรเจนโดยวิธีเคลดาล์ (Kjeldahl methods) และการวิเคราะห์ไนโตรเจนโดยวิธีเผาไหม้ (combustion methods) เป็นต้น

2.1.2.1.3 การวิเคราะห์ไขมัน

วิเคราะห์ไขมันในอาหารสัตว์ โดยการสกัดด้วยสารละลายอินทรีย์ เช่น ปีโตรเลียมอีเธอร์ เป็นต้น

2.1.2.1.4 การวิเคราะห์เยื่อใย

ปริมาณเยื่อใยในอาหารสัตว์สามารถใช้บอกคุณค่าทางโภชนาการของอาหารได้ โดยอาหารที่มีเยื่อใยต่ำจะจัดเป็นอาหารที่มีคุณค่าสูง เนื่องจากสัตว์สามารถย่อยได้ง่าย โดยในการวิเคราะห์หาปริมาณเยื่อใยทำโดยนำตัวอย่างอาหารสัตว์ไปต้มด้วยกรดและต่างตามลำดับ จากนั้น นำไปหาน้ำหนักแห้งซึ่งจะเป็นส่วนของเยื่อใย

2.1.2.1.5 การวิเคราะห์เถ้า

เถ้า คือ ส่วนของแร่ธาตุ (สารอนินทรีย์) ที่เหลือจากการเผาอาหารที่อุณหภูมิสูง ซึ่งสามารถใช้บอกคุณภาพของอาหารได้ โดยถ้ามีค่าสูงกว่าปกติ อาจหมายถึงมีการปนเปื้อนดินและทรายในอาหารสัตว์นั้น แต่หากอาหารสัตว์นั้นไม่มีการปนเปื้อนของดิน อาจบ่งบอกได้ว่ามีแร่ธาตุ เช่น แคลเซียมและฟอสฟอรัสในปริมาณที่สูงได้เช่นกัน

2.1.2.1.6 การวิเคราะห์คาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำได้ง่าย

หมายถึง คาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำได้ง่ายจำพวกแป้งและน้ำตาล เป็นต้น วิเคราะห์ผ่านการคำนวณ โดยนำเปอร์เซ็นต์ความชื้น เถ้า ไขมัน และเยื่อใยรวมกัน แล้วนำไปหักออกจาก 100 จะได้เป็นเปอร์เซ็นต์ของคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำได้ง่าย

2.1.2.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบเยื่อใยแบบ Van Soest System

เป็นการวิเคราะห์พืชอาหารสัตว์ โดยแบ่งองค์ประกอบพืชอาหารสัตว์ออกเป็น 2 ส่วน ได้แก่ (เมธา วรรณพัฒน์, 2533)

2.1.2.2.1 องค์ประกอบภายในเซลล์

เป็นส่วนประกอบของพืชที่สัตว์มีอัตราการย่อยได้สูง ประกอบไปด้วย แป้ง น้ำตาล โปรตีน ไขมัน และแร่ธาตุ เป็นต้น สามารถละลายได้ดีในสารละลายที่เป็นกลาง จึงเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า Neutral detergent soluble หรือ NDS

2.1.2.2.2 องค์ประกอบของผนังเซลล์

เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์พืชที่สัตว์มีอัตราการย่อยได้ต่ำ แต่สามารถย่อยได้โดยจุลินทรีย์ที่อยู่ในระบบทางเดินอาหาร ประกอบไปด้วย เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน และ ซิลิกา เป็นต้น ส่วนประกอบของผนังเซลล์พืช เรียกอีกอย่างหนึ่งว่า Neutral detergent fiber หรือ NDF ซึ่งเมื่อนำไปละลายในสารละลายที่เป็นกรด จะทำให้สามารถแยกส่วนของ เฮมิเซลลูโลสออกไป ส่วนที่เหลือ คือ เซลลูโลส ลิกนิน คิวติน และซิลิกา เรียกส่วนที่เหลือนี้ว่า acid detergent fiber หรือ ADF โดยเมื่อนำส่วน ADF นี้ไปย่อยด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น จะสามารถแยกเซลลูโลสออกไปได้ ส่วนที่เหลือ คือ ลิกนิน คิวติน และซิลิกา เรียกว่า acid detergent lignin หรือ ADL สามารถนำไปหาปริมาณของลิกนินได้โดยการเผาที่อุณหภูมิสูง

2.1.2.3 การวิเคราะห์หาแร่ธาตุและพลังงาน

แร่ธาตุที่สำคัญในอาหารสัตว์ ได้แก่ แคลเซียมและฟอสฟอรัส โดยแคลเซียมเป็นแร่ธาตุที่มีมากที่สุดในร่างกาย เป็นส่วนประกอบของกระดูกและฟัน หลักการในวิเคราะห์หาปริมาณแคลเซียมในอาหารสัตว์ โดยการเปลี่ยนแคลเซียมในสารประกอบต่างๆ ให้อยู่ในรูปของออกไซด์ (oxide) จากนั้นตกตะกอนออกมาในรูปของออกซาเลต (oxalate) แล้วนำไปไทเทรตด้วยสารละลายมาตรฐานโบแทสเซียมเพอร์แมงกานेट

ฟอสฟอรัสเป็นแร่ธาตุที่พบเป็นส่วนประกอบในทุกเซลล์ของร่างกาย การวิเคราะห์หาปริมาณฟอสฟอรัสโดยใช้เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์

(spectrophotometer) มีหลักการ คือ การเปลี่ยนฟอสฟอรัสในสารประกอบต่าง ๆ ให้อยู่ในรูปของกรดออร์โธฟอสฟอริก (orthophosphoric acid) แล้วตกตะกอนฟอสฟอรัสให้อยู่ในรูปของแอมโมเนียมฟอสโฟมอลิบเดต (ammonium phosphomolybdate) นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

การวิเคราะห์หาพลังงานในอาหารสัตว์ สามารถทำได้โดยใช้เครื่องมือหาพลังงาน (bomb calorimeter) โดยใช้หลักการ วัดความร้อนของอาหารที่เกิดจากการเผาไหม้ โดยค่าที่ได้ คือ พลังงานทั้งหมดของอาหาร (gross energy) (กมลทิพย์ ประสมเพชร, 2554)

2.1.3 ข้าวโพด

ในประเทศไทยมีพื้นที่เพาะปลูกข้าวโพดเลี้ยงสัตว์กว่า 7 ล้านไร่ ได้ผลผลิตอยู่ที่ประมาณ 4 ล้านตันต่อปี โดยช่วงที่ได้ผลผลิตมากที่สุดอยู่ในเดือนกันยายน ถึง ตุลาคม ซึ่งเป็นช่วงฤดูฝน (ศูนย์สารสนเทศการเกษตร, 2558) การได้ผลผลิตปริมาณมากเกินความต้องการของสัตว์อาจก่อให้เกิดการสูญเสียไปโดยเปล่าประโยชน์ ดังนั้นการเก็บรักษาข้าวโพดสดให้อยู่ในรูปของพืชหมักจะช่วยยืดอายุการเก็บรักษาได้ ยิ่งไปกว่านั้น ข้าวโพดยังมีคุณค่าทางโภชนาการสูง ให้พลังงานมากกว่าพืชชนิดอื่น รวมถึงมีปริมาณแป้งและน้ำตาลมาก และยังสามารถเป็นบัฟเฟอร์ได้ต่ำ (buffering capacity) ทำให้สามารถเกิดกระบวนการได้ดีและสามารถลดค่าความเป็นกรด-เบสของพืชหมักได้อย่างรวดเร็ว จึงเหมาะแก่การนำมาทำเป็นพืชหมักได้ดี (Loucka และคณะ, 2014)

2.2 พืชหมัก

พืชหมัก (silage) คือ พืชอาหารสัตว์ที่ผ่านกระบวนการหมักโดยการทำงานของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในสภาพไร้อากาศ ทำให้สามารถคงสภาพและคุณค่าทางอาหาร เพื่อเก็บไว้ใช้ในช่วงฤดูกลางขาดแคลนพืชสดได้ โดยในกระบวนการหมักนั้น แล็กติกแอซิดแบคทีเรียจะใช้คาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำได้เป็นซับสเตรตเพื่อผลิตกรดอินทรีย์ เช่น กรดแล็กติก ส่งผลให้ค่าความเป็นกรด-เบสของพืชหมัก

ลดลง อีกทั้งกระบวนการหมักนั้นเกิดในภาวะไร้อากาศ ทำให้สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ใช้อากาศที่ไม่เป็นประโยชน์หรือก่อให้เกิดการเน่าเสียของพืชหมักได้ (Bolsen และคณะ, 1996)

2.2.1 กระบวนการหมัก

กระบวนการหมักในพืชหมักแบ่งออกได้เป็น 4 ระยะ (Weinberg และ Muck, 1996) ได้แก่

2.2.1.1 ระยะมีอากาศ (aerobic phase)

ในระยะนี้พืชหมักยังมีออกซิเจนหลงเหลืออยู่หลังจากการเก็บในไซโล (silo) ทำให้ยังมีกระบวนการหายใจของพืช (plant respiration) และมีการทำงานของเอนไซม์พืช เช่น โพรทีเอส (protease) ซึ่งหากมีออกซิเจนหลงเหลืออยู่มากเกินไป อาจทำให้เกิดความร้อนจากกระบวนการหายใจของพืช และเกิดการสลายของโปรตีน รวมถึงการเจริญของจุลินทรีย์ใช้อากาศที่ไม่ต้องการ เช่น ราและยีสต์ เป็นต้น

2.2.1.2 ระยะการหมัก (fermentation phase)

ในระยะนี้จะเข้าสู่กระบวนการหมักในภาวะไร้อากาศ โดยแล็กติกแอซิดแบคทีเรียจะใช้คาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำได้เป็นซับสเตรตเพื่อผลิตกรดอินทรีย์ ส่งผลให้ค่าความเป็นกรด-เบสของพืชหมักลดลง ช่วยยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ใช้อากาศ และจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการอื่นๆ ได้

2.2.1.3 ระยะคงตัว (stable phase)

พืชหมักยังอยู่ในภาวะที่ขาดออกซิเจนและมีค่าความเป็นกรด-เบสที่ต่ำทำให้กลุ่มจุลินทรีย์ในระยะที่สองเริ่มลดจำนวนลง ซึ่งในระยะนี้หากมีการจัดการที่ดี ไม่ปล่อยให้พืชหมักมีการปนเปื้อนหรือสัมผัสกับอากาศ จะทำให้สามารถเก็บรักษาสภาพของพืชหมักไว้ได้นาน

2.2.1.4 ระยะการนำไปใช้ (feed out phase)

ระยะนี้เกิดขึ้นเมื่อพืชหมักถูกเปิดให้สัมผัสกับอากาศ ในระยะนี้มีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนจุลินทรีย์ใช้อากาศที่ทำให้เกิดการเน่าเสียของพืชหมัก เช่น รา

ที่มักพบปนเปื้อนบริเวณผิวหน้าของพืชหมักที่สัมผัสกับอากาศ ซึ่งสามารถแก้ปัญหาได้ โดยทำให้พืชหมักกลับไปอยู่ในภาวะไร้อากาศอย่างรวดเร็ว หรือการใช้สารเติมแต่ง (additive) เพื่อช่วยควบคุมจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ

2.2.2 จุลินทรีย์ในพืชหมัก

2.2.2.1 แล็กติกแอซิดแบคทีเรีย

แล็กติกแอซิดแบคทีเรียที่พบในพืชหมัก เป็นจุลินทรีย์ชนิดอิงอาศัย (epiphytic microflora) ที่พบได้ตามส่วนต่าง ๆ ของพืช สามารถเจริญได้ทั้งในภาวะที่มีอากาศหรือไม่มีอากาศ (facultative anaerobe) สกุลที่พบได้บ่อยในพืชหมัก ได้แก่ *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* และ *Enterococcus* สามารถแบ่งออกได้เป็นสองกลุ่มใหญ่ ตามกระบวนการหมักน้ำตาล ได้แก่ Homofermentative lactic acid bacteria สามารถผลิตกรดแล็กติกได้มากกว่า 85 เปอร์เซ็นต์ จากน้ำตาลเฮกโซสแต่ไม่สามารถย่อยสลายน้ำตาลเพนโทสได้ และ Heterofermentative lactic acid bacteria สามารถย่อยสลายน้ำตาลเฮกโซส และเพนโทสได้ผลิตภัณฑ์หลายชนิด เช่น กรดแล็กติก กรดอะซีติก แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ และเอทานอล (Muck, 2013)

2.2.2.2 เอนเทอโรแบคทีเรีย

เอนเทอโรแบคทีเรีย เมื่อเจริญในพืชหมักสามารถแย่งสารอาหารกับแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย ทำให้เกิดกระบวนการหมักได้ไม่สมบูรณ์ และบางชนิดสามารถก่อโรคได้ (pathogenic bacteria) นอกจากนี้ยังสามารถย่อยสลายโปรตีนซึ่งนอกจากจะส่งผลเสียต่อโภชนะของพืชหมักแล้ว ยังก่อให้เกิดสารประเภทไบโอเจนิคเอมีน (biogenic amine) ซึ่งเป็นสารประกอบไนโตรเจนที่เป็นพิษ ก่อให้เกิดอาการแพ้ได้หลายรูปแบบ เอนเทอโรแบคทีเรียสามารถถูกยับยั้งได้ในภาวะที่มีค่าความเป็นกรด-เบสต่ำ ดังนั้นการทำให้พืชหมักอยู่ในภาวะที่มีค่าความเป็นกรด-เบสต่ำได้อย่างรวดเร็ว จะช่วยลดการเพิ่มจำนวนของเอนเทอโรแบคทีเรียได้ (Scherer และคณะ, 2015)

2.2.2.3 แบคทีเรียสกุล *Clostridium*

แบคทีเรียในสกุล *Clostridium* สามารถเจริญได้ดีในภาวะไร้อากาศ เกิดการหมักคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนได้หลายชนิด ก่อให้เกิดผลเสียต่อคุณค่าทางโภชนาการของพืชหมัก นอกจากนี้ยังเป็นแบคทีเรียที่สร้างสปอร์ (endospore forming bacteria) ที่พบปนเปื้อนได้ในน้ำนมของปศุสัตว์ มีผลกระทบต่อคุณภาพของน้ำนมโดยตรง สายพันธุ์ที่มักพบเกี่ยวข้องกับพืชหมัก คือ *Clostridium tyrobutyricum* ที่สามารถทนต่อภาวะความเป็นกรด-เบสต่ำได้ดี ทั้งยังเกิดการหมักกรดแล็กติกได้เป็นกรดบิวทริก และแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ส่งผลเสียต่อคุณภาพ สารอาหาร รวมถึงรสชาติของพืชหมัก (Scherer และคณะ, 2015) ยิ่งไปกว่านั้นยังมีสายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารพิษ คือ *C. botulinum* สร้างสารพิษโบทูลินัม (botulinum toxin) ที่ก่อให้เกิดโรคโบทูลิซึม (botulism) มีผลให้เกิดความผิดปกติทางระบบประสาทได้ แบคทีเรียในสกุล *Clostridium* ส่วนใหญ่สามารถถูกยับยั้งได้ในภาวะที่มีค่าความเป็นกรด-เบส ต่ำกว่า 5 และในภาวะที่มีความชื้นต่ำ ดังนั้นการลดความชื้นในพืชโดยการทำให้เหี่ยว (wilting) ก่อนเริ่มกระบวนการหมักพืชจะสามารถช่วยลดการเจริญของแบคทีเรียในสกุล *Clostridium* ได้ (Kalač, 2011)

2.2.2.4 *Bacillus*

Bacillus เป็นแบคทีเรียสร้างเอนโดสปอร์ที่จัดอยู่ในประเภทต้องการอากาศ ในการเจริญ (aerobe) สามารถเกิดการหมักคาร์โบไฮเดรตได้ผลิตภัณฑ์หลายชนิด เช่น กรดบิวทริก กรดอะซีติก และเอทานอล เป็นต้น นอกจากนี้ สปอร์ของ *Bacillus* ยังสามารถพบปนเปื้อนได้ในน้ำนมของปศุสัตว์เช่นเดียวกับสปอร์ของ *Clostridium* สายพันธุ์ที่สำคัญ คือ *Bacillus cereus* ที่สามารถเจริญได้ในที่เย็น (psychrotrophic strain) มักพบปนเปื้อนในนมพาสเจอร์ไรส์ และผลิตภัณฑ์จากนมอื่นๆ การกำจัดอากาศและทำให้ค่าความเป็นกรด-เบสของพืชหมักลดลงอย่างรวดเร็วจะช่วยลดการเจริญของ *Bacillus* ได้ (Kalač, 2011)

2.2.2.5 แบคทีเรียสกุล *Listeria*

สายพันธุ์ที่สำคัญ คือ *Listeria monocytogenes* เป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ในภาวะที่มีหรือไม่มีอากาศก็ได้ ก่อให้เกิดโรคลิสเทอริโอซิส (listeriosis) สามารถทนต่อค่าความเป็น-เบสต่ำได้ดี และเจริญได้ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส แต่อย่างไรก็ตาม ในภาวะไร้อากาศ การเจริญจะถูกยับยั้งอย่างรวดเร็วในภาวะที่มีค่าความเป็นกรด-เบสต่ำ ดังนั้น การควบคุมปริมาณออกซิเจนและค่าความเป็นกรด-เบสของพืชหมักให้ต่ำ จะช่วยลดจำนวนของแบคทีเรียดังกล่าวได้ (Kalač, 2011)

2.2.2.6 ยีสต์

ยีสต์ จัดเป็นจุลินทรีย์ที่อยู่ในกลุ่มยูแคริโอต (eukaryote) สามารถเจริญได้ในภาวะที่มีหรือไม่มีอากาศก็ได้ โดยในภาวะที่ไม่มีอากาศ ยีสต์จะหมักน้ำตาลได้ผลผลิตเป็นเอทานอลและแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งนอกจากจะลดน้ำตาลสำหรับกระบวนการหมักของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียแล้ว เอทานอลยังมีผลต่อกลิ่นน้ำนมของปศุสัตว์อีกด้วย สำหรับในภาวะมีอากาศ ยีสต์บางสายพันธุ์สามารถใช้กรดแล็กติกเพื่อผลิตแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ ส่งผลให้ค่าความเป็นกรด-เบสสูงขึ้น ทำให้จุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดการเน่าเสียที่ไม่ต้องการเจริญได้ (Muck, 2013)

2.2.2.7 รา

รา เป็นจุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศในการเจริญ ดังนั้นจึงมักพบการเจริญของราบริเวณผิวหน้าของพืชหมักหรือบริเวณที่สัมผัสกับอากาศ ซึ่งนอกจากจะส่งผลเสียต่อคุณภาพของพืชหมักโดยตรงแล้ว สปอร์ของรายังสามารถก่อให้เกิดอันตรายต่อปอดและเกิดอาการแพ้ได้อีกด้วย ยิ่งไปกว่านั้นราบางชนิดสามารถสร้างสารพิษ (mycotoxin) ซึ่งเป็นอันตรายต่อสุขภาพสัตว์รวมถึงสุขภาพของผู้บริโภคได้ด้วยเช่นกัน การป้องกันไม่ให้พืชหมักสัมผัสกับอากาศในระหว่างกระบวนการหมัก รวมถึงการใช้สารยับยั้งการเจริญของรา เป็นแนวทางที่จะช่วยป้องกันการปนเปื้อนราในพืชหมักได้ (Driehuis, 2013)

2.2.3 คุณภาพและปัจจัยที่มีผลต่อคุณภาพของพีชหมัก (Muck, 1988)

2.2.3.1 อายุของพีชที่ใช้หมัก

ควรใช้พีชที่เก็บเกี่ยวในช่วงอายุเหมาะสม เพื่อรักษาโภชนะในพีช พีชอายุน้อยเกินไป จะมีความชื้นสูงและโภชนะต่ำ พีชที่มีอายุมากไป จะมีปริมาณเยื่อใยมาก ให้พลังงานและโปรตีนน้อย

2.2.3.2 ขนาดของพีชที่ใช้หมัก

ขนาดของพีชที่ใช้ในการหมักควรตัดให้มีขนาดเล็ก (ประมาณ 1-3 เซนติเมตร) ทำให้สามารถบรรจุพีชหมักได้แน่น ไล่อากาศออกได้ดี นอกจากนี้พีชหมักที่มีขนาดเล็กยังส่งผลต่อการกินและการย่อยสารอาหาร ทำให้กินได้ง่าย และย่อยสารอาหารได้ดียิ่งขึ้น

2.2.3.3 การจัดการก่อนการหมัก

การทำให้เหี่ยว (wilting) จะช่วยลดความชื้นและยังช่วยลดความเป็นบัพเฟอร์ของพีชหมักทำให้เมื่อเกิดกระบวนการหมักจะสามารถลดค่าความเป็นกรด-เบส ได้อย่างรวดเร็ว นอกจากนี้ยังช่วยลดอัตราการหายใจของพีช ลดการสูญเสียโภชนะในรูปของเหลว และลดการเจริญของจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการได้อีกด้วย

2.2.3.4 การบรรจุพีชหมัก

การบรรจุพีชหมัก ควรบรรจุให้แน่นเพื่อให้เกิดภาวะไร้อากาศ จะช่วยทำให้กระบวนการหมักเกิดได้อย่างสมบูรณ์ นอกจากนี้การป้องกันพีชหมักไม่ให้สัมผัสกับอากาศในระหว่างกระบวนการหมักจะช่วยคงสภาพของพีชหมักให้เก็บไว้ได้นานยิ่งขึ้น

2.2.3.5 ค่าความเป็นกรด-เบส

ค่าความเป็นกรด-เบสของพีชหมักควรมีค่าประมาณ 3.5-4.5 ค่าความเป็นกรด-เบสต่ำ จะสามารถยับยั้งจุลินทรีย์อื่นที่ไม่ต้องการ รวมถึงยับยั้งแอกทิวิตีของเอนไซม์พีชได้

2.2.4 การใช้สารเติมแต่งในพืชหมัก

การใช้สารเติมแต่งในพืชหมักมีจุดประสงค์เพื่อปรับปรุงพืชหมักให้ได้คุณภาพดีขึ้น ช่วยเพิ่มสารอาหาร อีกทั้งช่วยลดจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการในระหว่างกระบวนการหมักและบางชนิดยังสามารถส่งผลต่อการเติบโตและเพิ่มผลผลิตของปศุสัตว์ให้ดีขึ้นอีกด้วย สารเติมแต่งที่ใช้ในพืชหมักนั้นสามารถแบ่งได้ 5 ประเภทตามวัตถุประสงค์ที่ได้ดังนี้ (Yitbarek และ Tamir, 2014)

2.2.4.1 สารเติมแต่งเพื่อกระตุ้นการหมัก (fermentation stimulant)

2.2.4.1.1 หัวเชื้อจุลินทรีย์

แล็กติกแอซิดแบคทีเรียที่พบตามธรรมชาติ พบว่ามีจำนวนน้อย ทำให้เกิดการหมักได้ช้า การเพิ่มจำนวนหัวเชื้อแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย จะช่วยให้สามารถเกิดกระบวนการหมักได้อย่างรวดเร็ว ส่งผลให้สามารถลดค่าความเป็นกรด-เบสของพืชหมักได้อย่างรวดเร็ว ช่วยลดอัตราการหายใจของพืช รวมถึงยับยั้งการทำงานของเอนไซม์พืช และลดจำนวนจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการได้ ยิ่งไปกว่านั้น ยังมีรายงานว่า การเติมหัวเชื้อแล็กติกแอซิดแบคทีเรียบางชนิดนั้น จะช่วยส่งเสริมให้สัตว์สามารถกินอาหารได้มากขึ้น ทำให้มีการเจริญเติบโตมากขึ้น และยังช่วยเพิ่มคุณภาพและผลผลิตของน้ำนมให้มากขึ้นด้วย (Holzer และคณะ, 2003)

2.2.4.1.2 คาร์โบไฮเดรตที่หมักได้

การเติมคาร์โบไฮเดรตบางชนิด จะช่วยเพิ่มปริมาณซัคเซอรตสำหรับกระบวนการหมักของแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย ตัวอย่างเช่น กากน้ำตาล, หางนม, เมล็ดธัญพืชและรำข้าว เป็นต้น (Qamar, 2009)

2.2.4.1.3 เอนไซม์

การใช้เอนไซม์เป็นสารเติมแต่งในพืชหมัก มีวัตถุประสงค์หลักคือ ช่วยย่อยสลายผนังเซลล์พืช ทำให้เพิ่มปริมาณของน้ำตาล (soluble sugar) เพื่อใช้เป็นซัคเซอรตในกระบวนการหมักของแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย

ได้มากขึ้น ช่วยส่งเสริมกระบวนการหมักให้ดียิ่งขึ้น นอกจากนี้ ผนังเซลล์พืชที่ ถูกย่อยบางส่วนโดยเอนไซม์นั้นจะช่วยเพิ่มอัตราการย่อยในกระเพาะสัตว์ได้ มากยิ่งขึ้น (Dehghani และคณะ, 2012) ตัวอย่างเอนไซม์ที่นิยมใช้เป็น สารเติมแต่งในพืชหมัก แสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 เอนไซม์ที่นิยมใช้เป็นสารเติมแต่งในพืชหมัก (Dehghani และคณะ, 2012)

เอนไซม์	ข้อเสียดรต	ผลิถภณัถ์
เซลลูเลส	เซลลูโลส	กลูโคส มอสโทส
เฮมิเซลลูเลส	เฮมิเซลลูโลส	ไซโลส ไซแลน อะราบิโนส
อะไมเลส	แป้ง	กลูโคส มอลโทส

2.2.4.2 สารเติมแต่งเพื่อยับยั้งการหมัก (fermentation inhibitors)

กรดหลายชนิดถูกนำมาใช้เป็นสารเติมแต่งในพืชหมักเพื่อช่วยป้องกันการ เจริญของยีสต์และรา เช่น กรดโพรพิโอนิก กรดฟอร์มิก กรดเบนโซอิก กรดซอร์บิก และกรดซิตริก เป็นต้น แต่หากใช้ในปริมาณมากเกินไป จะทำให้ยับยั้งกระบวนการ หมักของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียได้ แต่อย่างไรก็ตามการใช้กรดที่มีฤทธิ์กัดกร่อนจะทำ ให้อายุการควบคุม และอาจเป็นอันตรายได้ ดังนั้นจึงนิยมใช้ในรูปเกลือของกรด เช่น แคลเซียมโพรพิโอเนต เป็นต้น (Yitbarek และ Tamir, 2014)

2.2.4.3 สารเติมแต่งเพื่อป้องกันการเน่าเสียของพืชหมัก (aerobic spoilage inhibitor)

การใช้สารเติมแต่งเพื่อป้องกันการเน่าเสียของพืชหมักมีวัตถุประสงค์เพื่ อยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ใช้อากาศ มีทั้งประเภทที่เป็นสารเคมี เช่น กรด โพรพิโอนิก กรดฟอร์มิก และเกลือไนไตรท์ เป็นต้น และประเภทสารชีวภาพ เช่น แบคทีริโอซิน (bacteriocin) เป็นต้น (Filya และ Sucu, 2007)

2.2.4.4 สารเติมแต่งเพื่อเพิ่มโภชนาในพืชหมัก

2.2.4.4.1 แอมโมเนีย และยูเรีย

การเติมแอมโมเนีย และยูเรีย จะช่วยเพิ่มแหล่งโปรตีนในพืชหมัก อีกทั้งยังมีรายงานถึงความสามารถในการเพิ่มความคงสภาพของพืชหมักหลังสัมผัสอากาศ (aerobic stability) และลดการสลายของโปรตีนในพืชหมัก (Johnson และคณะ, 1982)

2.2.4.4.2 แร่ธาตุ

แร่ธาตุที่มักใช้เติมเพื่อเพิ่มสารอาหารลงในพืชหมัก เช่น แคลเซียม ฟอสฟอรัส และแมกนีเซียม เป็นต้น (Yitbarek และ Tamir, 2014)

2.2.4.4.3 สารเติมแต่งเพื่อการดูดซับ

มักใช้เติมลงในพืชหมักที่มีความชื้นมาก มีเปอร์เซ็นต์ของวัตถุดิบแห้งต่ำ เพื่อลดการสูญเสียโภชนาในรูปของเหลว สารที่ใช้เติม เช่น ฟางข้าว และ เส้นใยจากพืชต่างๆ เป็นต้น (Qamar, 2009)

2.3 ราและสารพิษจากรา

2.3.1 ราและสารพิษจากราที่มักพบในพืชหมัก

ปัญหาการปนเปื้อนราในพืชหมัก เป็นปัญหาที่สำคัญในการรักษาคุณภาพของพืชหมัก โดยจะส่งผลให้สูญเสียสารอาหารในรูปของวัตถุดิบ ลดความน่ากิน ทำให้สัตว์กินอาหารได้น้อยลง และโดยเฉพาะอย่างยิ่งราบางชนิดนั้นสามารถสร้างสารพิษจากรา ที่เมื่อพบปนเปื้อนในพืชหมักจะส่งผลต่อสุขภาพของปศุสัตว์โดยตรง ราและสารพิษจากราที่มักพบในพืชหมักดังแสดงในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 ราและสารพิษจากราที่มักพบในพืชหมัก (Aragon และคณะ, 2011)

ราที่ผลิตสารพิษ	สายพันธุ์ของรา	สารพิษจากรา		
<i>Aspergillus</i>	<i>A. flavus</i> <i>A. parasiticus</i> <i>A. nomius</i> <i>A. pseudotamarii</i>	อะฟลาทอกซิน (บี 1 บี 2 จี 1 และจี 2)		
	<i>A. ochraceus</i> <i>A. carbonarius</i>	โอคราทอกซิน (โอคราทอกซินเอ)		
	<i>A. clavatus</i> <i>A. terreus</i>	พาทุลิน		
	<i>A. flavus</i> <i>A. versicolor</i>	กรดไซโคลเพียโซนิก		
<i>Claviceps</i>	<i>C. purpurea</i> <i>C. fusiformis</i> <i>C. paspali</i> <i>C. africana</i>	กรดไลเซอร์จิก เออร์จิน เออร์โกเพปไทด์		
	<i>Fusarium</i>	<i>F. verticillioides</i> <i>F. proliferatum</i> <i>F. graminearum</i> <i>F. avenaceum</i> <i>F. culmorum</i> <i>F. poae</i>	ฟูโมนิซิน (บี 1 บี 2 และบี 3) ที-2 ทอกซิน นิวาลินอล ดีออกซินิวาลินอล ฟูซารีโนน	
		<i>Penicillium</i>	<i>P. verrucosum</i> <i>P. viridicatum</i>	โอคราทอกซิน (โอคราทอกซินเอ)
			<i>P. citrinum</i> <i>P. verrucosum</i>	ซีทรินิน
<i>P. roqueforti</i>			โรควอร์ไธน	
<i>P. expansum</i> <i>P. claviforme</i> <i>P. roqueforti</i>			พาทุลิน	

เมื่อเกิดกระบวนการหมักโดยแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย จะทำให้พืชหมักอยู่ในภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของรา แต่อย่างไรก็ตามหากมีการจัดการพืชหมักไม่ดี บรรจุพืชหมักไม่แน่น หรือเกิดรอยรั่วทำให้อากาศสามารถผ่านเข้าไปสัมผัสกับพืชหมักได้ ก็อาจจะทำให้เกิดการเจริญของราขึ้นได้ ยิ่งไปกว่านั้นรบบางชนิดสามารถเจริญได้ในภาวะที่มีออกซิเจนน้อยและมีค่าความเป็นกรด-เบสต่ำ เช่น *A. fumigatus*, *P. roqueforti* และ *Trichoderma* spp. เป็นต้น ราที่สร้างสารพิษที่มักพบได้บ่อยในพืชหมักได้แก่ ราในสกุล *Fusarium*, *Penicillium* และ *Aspergillus* (Dunière และคณะ, 2013)

ราในสกุล *Fusarium* มักพบปนเปื้อนในข้าวโพด ก่อให้เกิดโรคฝักและเมล็ดเน่า รวมถึงสามารถสร้างสารพิษได้หลายชนิด เช่น ซีราลีโนน ฟูโมนิซิน และไทรโคทีซิน โดยเฉพาะอย่างยิ่งคือออกซินิวาลีนอล (deoxynivalenol) และ ไดอะอะซิรเพนอล (diacetoxiscirpenol) เป็นต้น (Cheli และคณะ, 2013) การเจริญของราในสกุล *Fusarium* มักถูกยับยั้งเมื่ออยู่ในกระบวนการหมักพืชหมัก ที่ไม่มีออกซิเจนและมีค่าความเป็นกรด-เบสต่ำ แต่อย่างไรก็ตามพบว่าสารพิษจากราที่เกิดขึ้นยังสามารถพบปนเปื้อนในพืชหมักได้ ซึ่งสารพิษเหล่านี้จะทำให้สัตว์บริโภคอาหารได้น้อยลง เกิดความผิดปกติของเม็ดเลือด เซลล์ ระบบภูมิคุ้มกัน และบางชนิดก่อให้เกิดภาวะเอสโตรเจนสูงเกิน (hyperestrogenism) ส่งผลต่อระบบการสืบพันธุ์ของสัตว์ (Zinedine และคณะ, 2007) Mansfield และ Kuldau (2007) คัดแยกราที่สร้างสารพิษจากข้าวโพดหมัก พบว่ามากกว่าร้อยละ 50 เป็นราในสกุล *Fusarium* โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *F. graminearum* Richard และคณะ (2009) ศึกษาการเจริญของราและการสร้างสารพิษจากราในข้าวโพดหมัก โดยตรวจพบการเจริญของราในสกุล *Fusarium* และสารพิษคือออกซินิวาลีนอล มากถึง 145.79 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม Eckard และคณะ (2011) คัดแยกราในสกุล *Fusarium* จากข้าวโพดหมักจำนวน 20 ตัวอย่าง พบว่าสายพันธุ์ที่พบมากที่สุดได้แก่ *F. sporotrichioides*, *F. verticillioides* และ *F. graminearum* และยังคงตรวจพบสารพิษคือออกซินิวาลีนอลอยู่ระหว่าง 780 ถึง 2,990 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

ราในสกุล *Penicillium* ที่มักพบในพืชหมัก ได้แก่ *P. roqueforti*, *P. paneum*, *P. carneum* และ *P. citrinum* เป็นต้น โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *P. roqueforti* ที่สามารถทนต่อภาวะขาดออกซิเจน และค่าความเป็นกรด-เบสต่ำในพืชหมักได้ดี (Boysen และคณะ, 2000)

ราในสกุล *Penicillium* สามารถสร้างสารพิษได้หลายชนิด เช่น กรดไซโคลเพียโซนิค (cyclopiazonic acid) พาทุลิน (patulin) กรดไมโคฟีโนลิก (mycophenolic acid) โอคราทอกซิน (ochratoxin) และ โรควอร์ไทม์ซี (roquefortine C) เป็นต้น ก่อให้เกิดพิษต่อระบบประสาท ทำให้เกิดอาการกล้ามเนื้ออ่อนแรง และบางชนิดมีผลต่อ ตับ ไต และ ก่อให้เกิดแผลในทางเดินอาหาร (Sweeney และ Dobson, 1998) Schneweis และคณะ (2000) ศึกษาการปนเปื้อนของกรดไมโคฟีโนลิกซึ่งเป็นสารพิษที่ผลิตโดยราในสกุล *Penicillium* ในพืชหมัก จำนวน 233 ตัวอย่าง พบว่ามีการปนเปื้อนสารพิษดังกล่าว คิดเป็นร้อยละ 32 ของตัวอย่างทั้งหมด โดยมีค่าความเข้มข้นของสารพิษอยู่ระหว่าง 20 ถึง 35,000 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม Mansfield และ Kuldau (2007) ศึกษาการปนเปื้อนราและสารพิษจากราในสกุล *Penicillium* ในข้าวโพดหมักจำนวน 120 ตัวอย่าง พบว่า *P. roqueforti* ถูกพบมากที่สุด ส่วนสารพิษที่ตรวจพบมากที่สุด ได้แก่ โรควอร์ไทม์ซี กรดไมโคฟีโนลิก กรดไซโคลเพียโซนิค และพาทุลิน ตามลำดับ Boudra และคณะ (2015) ศึกษาการปนเปื้อนสารพิษจากราชนิดต่าง ๆ ในพืชหมัก จำนวน 40 ตัวอย่าง พบว่าสารพิษจากราในสกุล *Penicillium* คือ กรดไมโคฟีโนลิกถูกพบมากที่สุด โดยตรวจพบความเข้มข้นมากที่สุดถึง 1,436 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

ราที่สร้างสารพิษในสกุล *Aspergillus* ที่มักพบในพืชหมัก เช่น *A. flavus* และ *A. parasiticus* สร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง อะฟลาทอกซินบี 1 ซึ่งมีความเป็นพิษสูงที่สุดและยังถูกจัดให้เป็นสารก่อมะเร็งในมนุษย์อีกด้วย (Martins และคณะ, 2007) *A. niger* และ *A. ochraceus* สร้างสารพิษโอคราทอกซิน ก่อให้เกิดพิษสะสมเรื้อรังในสัตว์ และ *A. fumigatus* สร้างสารพิษไกลโอทอกซิน ซึ่งมีความเป็นพิษต่อเซลล์และระบบภูมิคุ้มกัน เป็นต้น (Alonso และคณะ, 2013) Gonzalez Pereyra และคณะ (2008) ศึกษาการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินในข้าวโพดหมัก พบว่ามีการปนเปื้อนร้อยละ 17 ของตัวอย่างทั้งหมด โดยร้อยละ 67 ของตัวอย่างที่ปนเปื้อนมีความเข้มข้นของอะฟลาทอกซินบี 1 สูงเกินเกณฑ์ที่กฎหมายกำหนด (20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) Pena และคณะ (2010) ศึกษาการปนเปื้อนของ *A. fumigatus* ในอาหารสัตว์จำนวน 150 ตัวอย่าง โดยพบว่าการปนเปื้อนของ *A. fumigatus* ในทุกตัวอย่าง และมีการปนเปื้อนของไกลโอทอกซินอยู่ในช่วงความเข้มข้น 29 ถึง 209 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม Keller และคณะ (2012) ศึกษาการปนเปื้อน

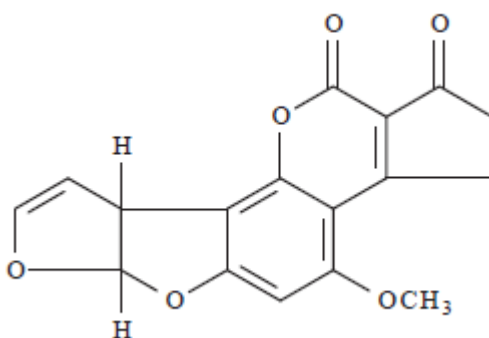
ของราและสารพิษจากราในพืชหมัก โดยพบว่าราในสกุล *Aspergillus* ถูกพบมากที่สุด โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *A. fumigatus* นอกจากนี้ยังพบว่าร้อยละ 50 ของตัวอย่างทั้งหมดปนเปื้อนไกลโคทอกซินอีกด้วย

2.3.2 อะฟลาทอกซินบี 1

อะฟลาทอกซินบี 1 เป็นเมแทบอไลต์ทุติยภูมิที่มีความเป็นพิษร้ายแรงที่สุดในกลุ่มอะฟลาทอกซิน (aflatoxin) สร้างโดยราในสกุล *Aspergillus* โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *A. flavus*, *A. parasiticus* และ *A. nomius* มักพบปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร เช่น ข้าว ข้าวโพด ถั่ว ฝ้าย และ บาร์เลย์ เป็นต้น (Martins และคณะ, 2007)

2.3.2.1 ลักษณะทางกายภาพและทางเคมีทั่วไป

อะฟลาทอกซินบี 1 มีลักษณะเป็นผลึกใส เรืองแสงสีฟ้าภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต มีสูตรทางเคมี คือ $C_{17}H_{12}O_6$ โครงสร้างทางเคมีดังแสดงในรูปที่ 2.1 มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 312.27 กรัมต่อโมล สามารถทนความร้อนได้สูง มีจุดหลอมเหลวอยู่ที่ 268 องศาเซลเซียส ความสามารถในการละลายน้ำเท่ากับ 16.14 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส สามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น คลอโรฟอร์ม และเมทานอล เป็นต้น (IARC, 2002)



รูปที่ 2.1 โครงสร้างทางเคมีของอะฟลาทอกซินบี 1 (IARC, 2002)

2.3.2.2 ความเป็นพิษ

อะฟลาทอกซินบี 1 เป็นสารพิษจากราที่ก่อให้เกิดความเป็นพิษมากที่สุด โดยองค์การ International Agency for Research on Cancer (IARC) จัดให้เป็นสารก่อมะเร็งกลุ่มที่ 1 มีความเป็นพิษต่อดับ (Cho และคณะ, 2008) Asim และคณะ (2011) ศึกษาผลของอะฟลาทอกซินบี 1 ต่อความเสี่ยงของการเป็นมะเร็งตับ โดยพบว่าผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบี ในเขตภาคเหนือของประเทศไทย มีความเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งตับเพิ่มขึ้น 3 เท่า และมีความเสี่ยง 5 เท่า เมื่อตรวจพบการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในอาหารและตัวอย่างปัสสาวะ นอกจากนี้ ผลของอะฟลาทอกซินบี 1 ในระดับเซลล์ยังก่อให้เกิดการยับยั้งการสังเคราะห์ ดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ และโปรตีน ลดการสังเคราะห์ไขมันต่างๆ รวมถึงยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ต่าง ๆ (Ghonaimy และคณะ, 2007) ในส่วนของปศุสัตว์พบว่า เมื่อได้รับอาหารที่มีการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 จะทำให้มีอัตราการเจริญเติบโตลดลง และทำให้ระบบภูมิคุ้มกันต่ำลง ยิ่งไปกว่านั้นอาจพบการตกค้างของสารพิษในผลิตภัณฑ์จากสัตว์ เช่น เนื้อสัตว์และน้ำมัน เป็นต้น (Kang' 'ethe และ Lang' a, 2009)

2.3.2.3 การปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในอาหารสัตว์

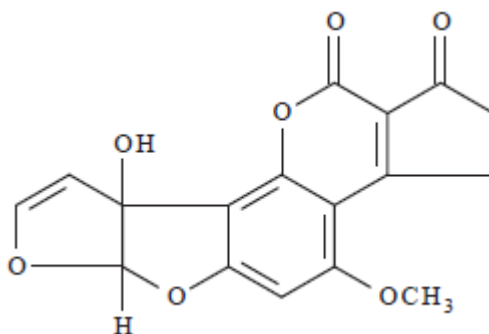
การปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในอาหารสัตว์นอกจากจะส่งผลกระทบต่อสุขภาพของปศุสัตว์แล้ว ในสัตว์เคี้ยวเอื้องหากได้รับอาหารที่มีการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 เข้าไปจะเกิดเมแทบอลิซึมของอะฟลาทอกซินบี 1 เกิดเป็นอะฟลาทอกซินเอ็ม 1 ซึ่งสามารถพบปนเปื้อนอยู่ในน้ำนมได้ ทำให้ส่งผลกระทบต่อความปลอดภัยของผู้บริโภคได้ด้วยเช่นกัน (Prandini และคณะ, 2009) ดังนั้น การควบคุมการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในอาหารสัตว์ จึงเป็นปัญหาสำคัญในการควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปศุสัตว์ อย่างไรก็ตามยังพบรายงานการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในอาหารสัตว์ตามประเทศต่าง ๆ ทั่วโลก Kang' 'ethe และ Lang' a (2009) ศึกษาการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในอาหารสัตว์ จำนวน 830 ตัวอย่างในประเทศเคนย่า พบว่ามีการปนเปื้อนร้อยละ 68 ของตัวอย่างทั้งหมด Keller และคณะ (2012) ศึกษาการปนเปื้อนของอะฟลา

ทอกซินปี 1 ในพืชหมัก จำนวน 120 ตัวอย่างในประเทศบราซิล พบการปนเปื้อนถึง ร้อยละ 32 ของตัวอย่างทั้งหมด Han และคณะ (2013) ศึกษาการปนเปื้อนของ อะฟลาทอกซินในอาหารสัตว์ จำนวน 200 ตัวอย่างในประเทศจีน พบว่าร้อยละ 42 ของตัวอย่างมีการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินปี 1 โดยมีความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 0.05 ถึง 3.53 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม Bagheri และคณะ (2014) ศึกษาการปนเปื้อนของ อะฟลาทอกซินปี 1 ในอาหารสัตว์ต่าง ๆ ในประเทศอิหร่าน พบว่าในตัวอย่างฟางข้าว และหญ้าแอลฟาฟา พบการปนเปื้อนทั้งหมด 100 เปอร์เซ็นต์ และในตัวอย่างข้าวโพด พบการปนเปื้อน 95 เปอร์เซ็นต์

ในสหภาพยุโรปได้กำหนดให้มีการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินปี 1 ในอาหาร สัตว์ได้ไม่เกิน 5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ส่วนในสหรัฐอเมริกากำหนดให้มีการปนเปื้อน ไม่เกิน 20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (Han และคณะ, 2013) เช่นเดียวกับในประเทศไทย ได้กำหนดให้มีการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินปี 1 ได้ไม่เกิน 20 ไมโครกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม หรือ 20 พีพีบี ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 98 พ.ศ. 2529

2.2.2.4 อะฟลาทอกซินเอ็ม 1

เมื่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ได้รับสารพิษอะฟลาทอกซินปี 1 เข้าไปจะเกิดสาร อนุพันธ์ที่เกิดจากเมแทบอลิซึมของอะฟลาทอกซินปี 1 เกิดเป็นอะฟลาทอกซินเอ็ม 1 และถูกขับออกมาทางน้ำนม โครงสร้างทางเคมีของอะฟลาทอกซินเอ็ม 1 ดังแสดงใน รูปที่ 2.2 โดยสำหรับมนุษย์และปศุสัตว์ที่ให้น้ำนมเมื่อกินอาหารที่มีการปนเปื้อน ของอะฟลาทอกซินปี 1 เข้าไปในร่างกาย จะมีอัตราการเปลี่ยนเป็น อะฟลาทอกซิน เอ็ม 1 อยู่ในช่วง 0.5 ถึง 5 เปอร์เซ็นต์ (Neal และคณะ, 1998)



รูปที่ 2.2 โครงสร้างทางเคมีของอะฟลาทอกซิน เอ็ม 1 (Neal และคณะ, 1998)

องค์การ IARC จัดให้อะฟลาทอกซินเอ็ม 1 เป็นสารที่อยู่ในกลุ่ม 2B เป็นสารที่อาจจะก่อให้เกิดมะเร็งได้ในมนุษย์ ผลของอะฟลาทอกซินเอ็ม 1 ต่อมนุษย์และสัตว์มีความใกล้เคียงกับผลของอะฟลาทอกซินบี 1 เพียงแต่มีความเป็นพิษน้อยกว่า (Prandini และคณะ, 2009) กลุ่มสหภาพยุโรปได้กำหนดให้มีการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซิน เอ็ม 1 ในน้ำมันได้ไม่เกิน 50 นาโนกรัมต่อลิตร ส่วนในสหรัฐอเมริกา กำหนดให้มีการปนเปื้อนได้ไม่เกิน 500 นาโนกรัมต่อลิตร (Zheng และคณะ, 2013)

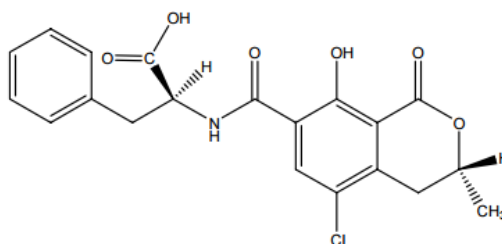
2.3.3 โอคราทอกซินเอ

โอคราทอกซินเอ เป็นสารพิษที่เกิดจากราในสกุล *Aspergillus* และ *Penicillium* เช่น *A. ochraceus*, *A. carbonarius*, *P. verrucosum* และ *P. viridicatum* เป็นต้น มักพบปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรหลายชนิด โดยเฉพาะ ธัญพืช เช่น ข้าว ข้าวโพด กาแฟ รวมถึง องุ่น เป็นต้น (Azizi และคณะ, 2012)

2.3.3.1 ลักษณะทางกายภาพและทางเคมีทั่วไป

โอคราทอกซินเอ มีลักษณะเป็นผลึกขาว-ใส เมื่ออยู่ในภาวะที่เป็นกรดจะเรืองแสงสีเขียวภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต และเรืองแสงสีฟ้าเมื่ออยู่ในภาวะที่เป็นเบส มีสูตรทางเคมี คือ $C_{20}H_{18}ClNO_6$ โครงสร้างทางเคมีดังแสดงในรูปที่ 2.3

มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 403.8 กรัมต่อโมล มีจุดหลอมเหลวที่อยู่ที่ 169 องศาเซลเซียส สามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น แอลกอฮอล์, คีโตน และ คลอโรฟอร์ม เป็นต้น (Khoury และ Atoui, 2010)



รูปที่ 2.3 โครงสร้างทางเคมีของโอคราทอกซินเอ (Khoury และ Atoui, 2010)

2.3.3.2 ความเป็นพิษ

โอคราทอกซินเอ เป็นสารพิษจากราที่มีความเป็นพิษต่อไต ระบบภูมิคุ้มกัน และทำให้ตัวอ่อนในครรภ์ผิดปกติ องค์การ IARC จัดให้เป็นสารที่อยู่ในกลุ่ม 2B เป็นสารที่อาจจะก่อให้เกิดมะเร็งได้ในมนุษย์ (Armando และคณะ, 2013) ในส่วนของปศุสัตว์พบว่าหากได้รับอาหารที่มีการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอ เป็นเวลานาน จะทำให้เกิดพิษสะสมเรื้อรัง เกิดโรคไตอักเสบ อาจทำให้มีเลือดออกในอวัยวะภายใน นอกจากนี้ยังสามารถพบสารพิษตกค้างได้ในผลิตภัณฑ์จากสัตว์ได้ด้วยเช่นกัน (Scudamore และ Livesey, 1998)

2.3.3.3 การปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอในอาหารสัตว์

โอคราทอกซินเอ มักพบปนเปื้อนในเมล็ดธัญพืช เช่น ข้าวโพด บาร์เลย์ ข้าวสาลี และข้าวโอ๊ต เป็นต้น และยังพบรายงานการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอ ในอาหารสัตว์ตามประเทศต่าง ๆ ทั่วโลก Riba และคณะ (2008) ศึกษาการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอ ในข้าวสาลี จำนวน 85 ตัวอย่างในประเทศอัลจีเรีย พบการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอ ร้อยละ 40 ของตัวอย่างทั้งหมด โดยมีความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 0.21 ถึง 41.55 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม Rosa และคณะ (2009) ศึกษา

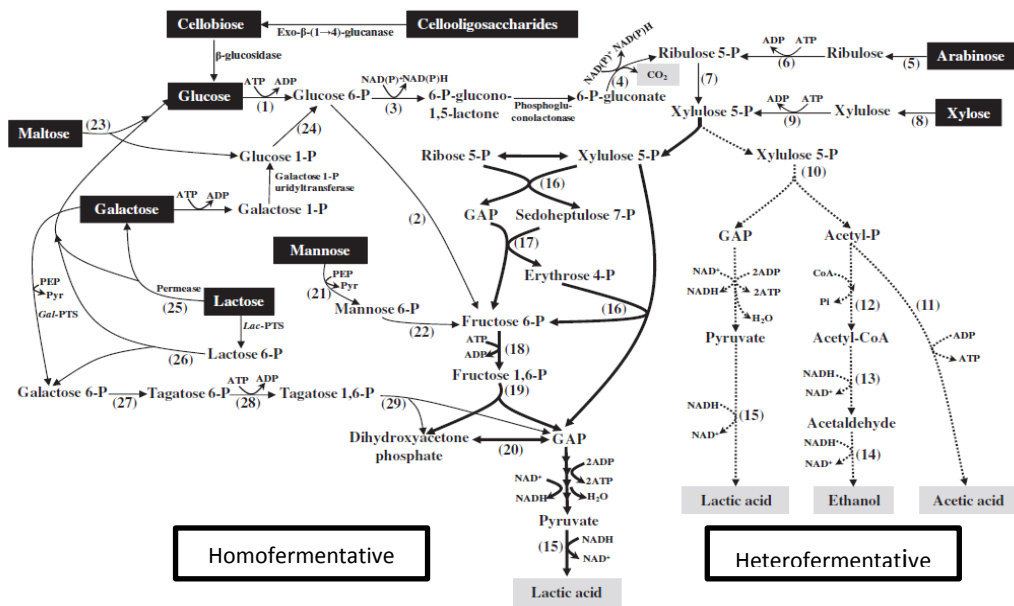
การปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอ ในอาหารสัตว์ ในประเทศบราซิลพบว่า ร้อยละ 44 ของตัวอย่างข้าวโพดมีการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอ โดยมีความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 42 ถึง 224 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (Keller และคณะ, 2013) ศึกษาการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอ ในข้าวโพดหมัก จำนวน 464 ตัวอย่าง ในประเทศบราซิล พบว่ามีการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอ ร้อยละ 29 ของตัวอย่างทั้งหมด อยู่ในช่วงความเข้มข้น 1 ถึง 40 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม โดยในกลุ่มสหภาพยุโรปได้กำหนดให้มีการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอ ในอาหารสัตว์ได้ไม่เกิน 250 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (Boudra และคณะ, 2015)

2.4 แล็กติกแอซิดแบคทีเรีย

แล็กติกแอซิดแบคทีเรีย เป็นแบคทีเรียแกรมบวก สามารถเจริญได้ในภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน นิยมใช้เป็นหัวเชื้อในอาหารหมักดอง เช่น ซีส นมเปรี้ยว ผักและผลไม้ดอง เป็นต้น (Carr และคณะ, 2002) แล็กติกแอซิดแบคทีเรียสามารถแบ่งออกได้เป็นสองกลุ่มใหญ่ตามกระบวนการหมักน้ำตาล ได้แก่กลุ่ม Homofermentative เช่น *Lactobacillus lactis*, *L. acidophilus*, *Pediococcus acidilactici*, *P. pentaceus* และ *Enterococcus faecium* เป็นต้น และกลุ่ม Heterofermentative เช่น *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. buchneri* และ *Leuconostoc mesenteroides* เป็นต้น (Yitbarek และ Tamir, 2014)

ในกระบวนการหมักพืช การใช้แล็กติกแอซิดแบคทีเรีย กลุ่ม Homofermentative จะทำให้เกิดกระบวนการหมักได้อย่างรวดเร็ว เกิดกรดแล็กติกมาก ทำให้ค่าความเป็นกรด-เบสของพืชหมักลดลงอย่างรวดเร็ว ลดการสลายของโปรตีน รวมถึงลดการสูญเสียของวัตถุดิบ และให้พลังงานมากขึ้น การใช้แล็กติกแอซิดแบคทีเรียกลุ่ม Heterofermentative จะใช้น้ำตาลเอทิลแอลกอฮอล์และเพนโทสเป็นซับสเตรตในการหมักได้ผลิตภัณฑ์หลายชนิด เช่น กรดแล็กติก เอทานอล คาร์บอนไดออกไซด์ และกรดอะซิติกที่มีสมบัติในการยับยั้งการเจริญของยีสต์และราในพืชหมักได้ Kristensen และคณะ (2010) ศึกษาพบว่าการใช้แล็กติกแอซิดแบคทีเรียกลุ่มที่เป็น Heterofermentative เป็นหัวเชื้อในการหมักพืชจะช่วยปรับปรุงความคงสภาพเมื่อสัมผัสกับอากาศ ได้มากกว่าการใช้แล็กติกแอซิดแบคทีเรียในกลุ่ม Homofermentative เนื่องจากสามารถผลิตเมแทบอลิต์ เช่น กรดอะซิติก และ

กรดโพรพิโอนิก ที่มีสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์กลุ่มใช้อากาศได้ดีกว่ากรดแล็กติก (Abdel-Rahman และคณะ, 2013) วิธีการบวนการหมักน้ำตาลของแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย ดังแสดงในรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 วิธีการบวนการหมักน้ำตาลของแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย (Abdel-Rahman และคณะ, 2013)

Meeske และคณะ (2002) ศึกษาผลของการใช้ *L. plantarum* และ *P. acidilactici* เป็นหัวเชื้อในการหมักข้าวโพด พบว่า ข้าวโพดหมักที่ใช้แล็กติกแอซิดแบคทีเรียดังกล่าวเป็นหัวเชื้อในการหมัก จะช่วยปรับปรุงความคงสภาพเมื่อสัมผัสกับอากาศ และยังช่วยให้สัตว์กินอาหารได้มากขึ้นเมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมหัวเชื้อลงไป Kung และคณะ (2003) ศึกษาการใช้ *L. buchneri* 40788 เป็นหัวเชื้อในการหมักพืช พบว่าสามารถช่วยเพิ่มความคงสภาพเมื่อสัมผัสกับอากาศของพืชหมักและเพิ่มผลผลิตน้ำนมของปศุสัตว์ได้มากขึ้น

2.4.1 การใช้แล็กติกแอซิดแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษจากรา

แล็กติกแอซิดแบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์กลุ่มหนึ่งที่มีรายงานถึงการใช้เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพในการยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษจากรา โดยมีกลไกที่สามารถยับยั้งการเจริญของรา ได้แก่ การแย่งสารอาหาร การผลิตกรดอินทรีย์ และการผลิตเมแทบอไลต์อื่นที่มีฤทธิ์ต้านหรือยับยั้งการเจริญของรา และบางชนิดมีผลต่อการสร้างสารพิษจากรา นอกจากนี้ยังพบว่าผนังเซลล์ของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียยังสามารถดูดซับสารพิษจากรา ทำให้ช่วยลดการปนเปื้อนของสารพิษในอาหารได้เช่นเดียวกัน (Holzer และคณะ, 2003)

2.4.1.1 เมแทบอไลต์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของรา

2.4.1.1.1 กรดอินทรีย์

แล็กติกแอซิดแบคทีเรียสามารถผลิตเมแทบอไลต์ได้กรดอินทรีย์หลายชนิด เช่น กรดแล็กติก กรดอะซิติก และกรดโพรพิโอนิก เป็นต้น โดยกรดอินทรีย์จะออกฤทธิ์บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เกิดความเป็นกลางของ ความเข้มข้นของโปรตอน ส่งผลให้สารต่างๆ สามารถผ่านเข้าออกเยื่อหุ้มเซลล์ได้มากขึ้น ทำให้สามารถยับยั้งการเจริญหรือทำให้เซลล์ตายได้ (Batish และคณะ, 1997) Lavermicocca และคณะ (2003) คัดแยกกรดฟีนิลแล็กติกจาก *L. plantarum* 21B ได้เป็นครั้งแรกจากขนมปังแปงเปรี๊ยว (sourdough bread) และพบว่ากรดดังกล่าวมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของราได้หลายชนิด Strom และคณะ (2005) คัดแยกแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. plantarum* สายพันธุ์ MiLAB 393 ได้จากพืชหมัก โดยพบว่าแล็กติกแอซิดแบคทีเรียดังกล่าวสามารถผลิตกรดฟีนิลแล็กติกที่สามารถยับยั้งการเจริญของราได้

2.4.1.1.2 สารประกอบประเภทโปรตีน

Magnusson และ Schnurer (2001) ได้ศึกษาพบว่า *L. coryniformis* subsp. *Coryniformis* Si3 ที่คัดแยกได้จากพืชหมักสามารถผลิตสารประเภทโปรตีนขนาดเล็ก (3 KDa) ที่มีสมบัติในการยับยั้งราได้หลายชนิด เช่น *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *P. roqueforti* และ

F. poae เป็นต้น โปรตีนดังกล่าวสามารถทนความร้อนได้ดี ออกฤทธิ์ในช่วงค่าความเป็นกรด-เบสที่ 3 ถึง 6 และถูกยับยั้งได้โดยเอนไซม์สลายโปรตีน Atanassova (2003) ได้ศึกษาพบว่า *L. paracasei* supsp. *paracasei* M3 สามารถผลิตสารประเภทโปรตีน (43 KDa) ที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์อื่นได้ ทั้งแบคทีเรีย ยีสต์และราหลายชนิด Gerez และคณะ (2013) ได้ศึกษาพบว่า *L. fermentum* CRL 251 สามารถผลิตสารประเภทโปรตีนขนาดเล็ก (น้อยกว่า 10 KDa) ที่มีสมบัติในการยับยั้งการเจริญของรา โดยออกฤทธิ์ได้ในช่วงค่าความเป็นกรด-เบสที่ 4 ถึง 7 และสามารถถูกยับยั้งได้โดยเอนไซม์ทริปซิน นอกจากนี้ยังพบว่าสารประกอบโปรตีนประเภทไซคลิกไดเพปไทด์ (cyclic dipeptide) ที่ผลิตโดยแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย มีรายงานความสามารถในการยับยั้งการเจริญของราได้เช่นเดียวกัน Strom และคณะ (2002) ศึกษาพบว่าไซคลิกไดเพปไทด์ cyclo(Phe-Pro) และ cyclo(Phe-4-OH-Pro) ที่ผลิตโดย *L. plantarum* MiLAB393 มีสมบัติยับยั้งราได้หลายชนิด Magnusson และคณะ (2003) ศึกษาพบว่า *L. plantarum*, *L. sakei*, *L. coryniformis* และ *P. pentosaceus* สามารถผลิต cyclo(Phe-Pro) และ cyclo(Phe-4-OH-Pro) ที่มีสมบัติในการยับยั้งราได้เช่นกัน

2.4.1.1.3 กรดไขมัน

แล็กติกแอซิดแบคทีเรียบางชนิดสามารถผลิตกรดไขมันที่ช่วยปรับปรุงคุณภาพด้านกลิ่นของการหมักและยังมีสมบัติในการยับยั้งการเจริญของรา โดยออกฤทธิ์กับเยื่อหุ้มเซลล์รา (Avis และ Belanger, 2001) โดยพบว่าความยาวของกรดไขมัน (chain length) มีผลต่อฤทธิ์ในการยับยั้ง โดยกรดไขมันที่มีความยาวมากจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งมาก แต่อย่างไรก็ตาม กรดไขมันที่มีความยาวเกิน 10 คาร์บอน (C₁₀) จะมีความสามารถในการละลายน้ำต่ำ จึงไม่เหมาะนำมาใช้ในการเป็นสารยับยั้งรา (Schnürer และ Magnusson, 2005) Sjogren และคณะ (2003) ศึกษาพบว่ากรดไขมันไฮดรอกซีที่ผลิตจาก *L. plantarum* MiLAB 14 มีสมบัติในการยับยั้งการ

เจริญของยีสต์และราหลายชนิด โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ใช้ในการยับยั้งการเจริญอยู่ที่ 10 ถึง 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร Black และคณะ (2013) ศึกษาพบว่าเมื่อเติมกรดไขมันลิโนเลอิก (linoleic acid) ในกระบวนการหมักแป้งขนมปัง ซึ่งมี *L. hammesii* เป็นหัวเชื้อจะสามารถยับยั้งการเจริญของราได้ โดยผู้วิจัยพบว่า *L. hammesii* สามารถเปลี่ยนกรดไขมันลิโนเลอิกเป็นกรดไขมัน ไฮดรอกซีจำนวน 8 คาร์บอน (monohydroxy octadecenoic acid) ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของรา

2.4.1.1.4 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

แอลกอฮอล์และกรดไขมันที่เรียสามารถสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ในภาวะที่มีออกซิเจน ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์อื่นโดยการเกิดปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชัน (peroxidation) ของไขมันที่อยู่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้ความสามารถในการเป็นเยื่อเลือกผ่านสูญเสียไป และยังทำลายโครงสร้างโมเลกุลของโปรตีนภายในเซลล์ได้เช่นกัน (Schnürer และ Magnusson, 2005) Venturini และคณะ (2002) ศึกษาพบว่าไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สามารถต้านการเจริญของ *P. expansum* ได้ Ponts และคณะ (2006) ศึกษาพบว่าไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มีผลต่อการงอกของสปอร์ของ *F. graminearum*

2.4.1.1.5 สารประกอบฟีนอลิก

Mandal และคณะ (2007) ศึกษาพบว่า *Pediococcus acidilactici* LAB 5 สามารถผลิตสารประกอบฟีนอลิกที่สามารถยับยั้งราได้หลายชนิด เช่น *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Cladosporium* sp. และ *Microsporium* sp. เป็นต้น

2.4.1.1.6 รูเทอริน

รูเทอริน หรือ 3-ไฮดรอกซีโพรพิโอนาลดีไฮด์ (3-hydroxypropionaldehyde) เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักกลีเซอรอล

โดยแล็กติกแอซิดแบคทีเรียบางชนิด ได้แก่ *L. reuteri*, *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. collinoides* และ *L. coryniformis* มีสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์อื่น โดยการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์นิวคลีเอสที่เป็นเอนไซม์สำคัญที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารพันธุกรรม Chung และคณะ (1989) ศึกษาพบว่า *L. reuteri* สามารถผลิตสารรูเทอริน ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Aspergillus* และ *Fusarium* ได้ Magnusson และคณะ (2003) ศึกษาพบว่า การเติมกลีเซอรอลลงในหัวเชื้อแล็กติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารรูเทอรินได้ จะช่วยเพิ่มความสามารถในการยับยั้งการเจริญของราได้ดีมากยิ่งขึ้น

2.4.1.1.7 ไดอะเซทิล

ไดอะเซทิล หรือ 2,3-บิวเทนไดโอน (2,3-butanedione) คือผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักซิเตรทโดยแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย เป็นสารให้กลิ่นหอมในอาหารหมักหลายชนิด เช่น เนย และ ชีส สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ทั้งแบคทีเรีย ยีสต์ และรา แต่เนื่องจากเป็นสารที่ให้กลิ่นหอมและต้องใช้ในปริมาณมากในการยับยั้งจุลินทรีย์อื่น จึงไม่นิยมใช้เป็นสารถนอมอาหาร (Schnürer และ Magnusson, 2005)

2.4.1.2 ปัจจัยที่มีผลต่อฤทธิ์ของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในยับยั้งการเจริญของรา

2.4.1.2.1 อุณหภูมิและระยะเวลาในการบ่ม

อุณหภูมิและระยะเวลาในการบ่มแล็กติกแอซิดแบคทีเรียมีผลต่อปริมาณและเมแทบอลิต์ที่ส่งผลต่อความสามารถในการยับยั้งการเจริญของรา Batish และคณะ (1997) ศึกษาพบว่าแล็กติกแอซิดแบคทีเรียจะออกฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของรามากที่สุดเมื่ออยู่ในช่วงการเจริญระยะเอกซ์โพเนนเชียล (exponential phase) และจะมีฤทธิ์ลดลงเมื่อเข้าสู่ช่วงการเจริญระยะคงที่ (stationary phase) Rouse และคณะ (2008) ศึกษาความสามารถของ *L. plantarum* CM8 และ *P. pentosaceus* R47 ในการ

ยับยั้ง *Penicillium notatum* พบว่าที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส แล็กติกแอซิดแบคทีเรียมีแอกทิวิตีในการยับยั้งราสูงที่สุด Sathe และคณะ (2007) ศึกษาความสามารถของ *L. plantarum* CUK501 ในการยับยั้งการเจริญของรา พบว่าแล็กติกแอซิดแบคทีเรียดังกล่าวสามารถผลิตสารเมแทบอไลต์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งราปริมาณมากที่สุด เมื่ออยู่ในช่วงการเจริญระยะเอกซ์โพเนนเชียล ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

2.4.1.2.2 ค่าความเป็นกรด-เบส

ผลของค่าความเป็นกรด-เบสต่อความสามารถของแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย ขึ้นอยู่กับปัจจัยร่วมหลายประการ เช่น ซับสเตรต สายพันธุ์ของรา อุณหภูมิและระยะเวลาในการบ่ม เป็นต้น Falguni และคณะ (2010) ศึกษาพบว่า *L. brevis* NCDC มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Fusarium* ดีที่สุดที่ค่าความเป็นกรด-เบสอยู่ในช่วง 5 ถึง 7 Magnusson และ Schnurer (2001) ศึกษาพบว่า *L. coryniformis* subsp. *Coryniformis* มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของรามากที่สุด ที่ค่าความเป็นกรด-เบสอยู่ในช่วง 3 ถึง 4.5 และจะลดลงเมื่อมีค่าความเป็นกรด-เบสมากกว่า 6 Laref และคณะ (2013) ศึกษาพบว่า *L. plantarum* และ *L. farciminis* มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Aspergillus* มากที่สุดเมื่อมีค่าความเป็นกรด-เบสในช่วง 3 ถึง 4 และจะลดลงเมื่อมีค่าความเป็นกรด-เบสที่ 5 ถึง 6 Rouse และคณะ (2008) ศึกษาความสามารถของ *L. plantarum* CM8 และ *P. pentosaceus* R47 ในการยับยั้ง *Penicillium notatum* พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งดีในช่วงค่าความเป็นกรด-เบสต่ำในช่วง 4 ถึง 5 และจะลดลงเมื่อมีค่าความเป็นกรด-เบสสูงขึ้น

2.4.1.2.3 สารอาหาร

Jones (1988) ศึกษาพบว่า การเติม ข้าวโอ๊ตและบาร์เลย์ในการหมักหญ้าจะช่วยเพิ่มคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำได้ 3 ถึง 4 เปอร์เซ็นต์ ทำให้มีประสิทธิภาพการหมักดีขึ้น ค่าความเป็นกรด-เบสลดลงเร็ว ช่วยยับยั้ง

จุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการได้ดีขึ้น Rouse และคณะ (2008) ศึกษาพบว่าการใช้
กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนจะทำให้แล็กติกแอซิดแบคทีเรียมีฤทธิ์ในการยับยั้ง
รามากขึ้น

2.4.1.3 การยับยั้งการผลิตสารพิษจากรา

Gournama และ Bullerman (1995) ศึกษาความสามารถของแล็กติกแอซิด
แบคทีเรียสกุล *Lactobacillus* ในการยับยั้งการสร้างสารพิษจากราด้วยวิธีไดอะลิซิส
(dialysis assay) พบว่าแล็กติกแอซิดแบคทีเรียสามารถยับยั้งการสร้างสารพิษจากรา
ได้โดยเมแทบอลิต์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ Ghonaimy และคณะ (2007) ศึกษา
พบว่า *L. acidophilus* สามารถยับยั้งการผลิตอะฟลาทอกซินของ *A. flavus* และ
A. parasiticus ในเมล็ดข้าวโพด ได้ 99.8 และ 99.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ
Dogi และคณะ (2013) ศึกษาความสามารถของ *L. plantarum* ในการยับยั้งการ
ผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 ของ *A. flavus* และ ซีราลีโนน ของ *F. gramineum* ใน
ภาวะที่มีการแปรผันค่าความเป็นกรด-เบสและอุณหภูมิต่าง ๆ กัน พบว่าแล็กติกแอซิด
แบคทีเรียมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างสารพิษจากราอยู่ระหว่าง 53 ถึง 95
เปอร์เซ็นต์ Gomah และ Zohri (2015) ศึกษาพบว่า *L. paracasei* subsp.
paracasei สามารถยับยั้งการผลิตสารพิษจาก *Fusarium* ได้แก่ ไดออกซินิวาสินอล
ซีลารีโนน และ ฟูโมนิซินปี มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 56.8 เปอร์เซ็นต์, 73.0
เปอร์เซ็นต์ และ 76.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

2.4.1.4 การดูดซับสารพิษจากราโดยแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย

แล็กติกแอซิดแบคทีเรียสามารถดูดซับสารพิษจากรา เช่น อะฟลาทอกซิน
โอคราทอกซิน ฟูโมนิซิน และโทรโคธีซิน เป็นต้น โดยอาศัยส่วนประกอบของชั้นผนัง
เซลล์ ซึ่งกระบวนการนี้เป็นกระบวนการที่ผันกลับได้โดยประสิทธิภาพในการดูดซับจะ
ขึ้นอยู่กับปัจจัย เช่น สายพันธุ์ของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียและภาวะแวดล้อมที่
แบคทีเรียเจริญอยู่ (Dalié และคณะ, 2010)

2.4.1.4.1 การดูดซับอะฟลาทอกซินปี 1

กระบวนการดูดซับของผนังเซลล์ของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียกับอะฟลาทอกซินปี 1 เป็นกระบวนการแบบย้อนกลับได้ ความสามารถในการดูดซับขึ้นอยู่กับสายพันธุ์และจำนวนของแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย ปริมาณสารพิษที่สะสมอยู่ในสิ่งแวดล้อม รวมถึงภาวะแวดล้อมต่างๆ (Bueno และคณะ, 2007) Haskard และคณะ (2001) ศึกษาความสามารถของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในการดูดซับอะฟลาทอกซินปี 1 ในภาวะต่าง ๆ พบว่าเมื่อเซลล์ถูกกระทำด้วยความร้อนหรือกรดจะทำให้มีเปอร์เซ็นต์การดูดซับมากขึ้น Fazeli และคณะ (2009) ศึกษาความสามารถของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่คัดแยกได้จากแป้งหมักขนมปังเปรี้ยว พบว่า *L. fermentum* มีประสิทธิภาพในการดูดซับอะฟลาทอกซินปี 1 ได้ 61 เปอร์เซ็นต์ มากที่สุดเมื่อเทียบกับสายพันธุ์อื่นที่คัดแยกได้ และ *L. casei* มีความสามารถในการดูดซับสารพิษนานที่สุดมากกว่า 24 ชั่วโมงเมื่อเทียบกับสายพันธุ์อื่นๆ Rahaie และคณะ (2012) ศึกษาความสามารถในการดูดซับอะฟลาทอกซินปี 1 ของ *L. rhamnosus* GG ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของสารพิษต่างๆ โดยสามารถดูดซับอะฟลาทอกซินปี 1 ได้ 35 และ 60 เปอร์เซ็นต์ เมื่อมีความเข้มข้นเริ่มต้นของอะฟลาทอกซินปี 1 เท่ากับ 10 พีพีบี และ 20 พีพีบี ตามลำดับ Bovo และคณะ (2014) ศึกษาความสามารถในการดูดซับอะฟลาทอกซินปี 1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวพบว่า มีเปอร์เซ็นต์การดูดซับที่ 46 เปอร์เซ็นต์ และ 35.8 เปอร์เซ็นต์ ในภาวะที่มีค่าความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 6 และ 3 ตามลำดับ

2.4.1.4.2 การดูดซับโอคราทอกซินเอ

การดูดซับโอคราทอกซินเอของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียสามารถเกิดกระบวนการเช่นเดียวกับการดูดซับอะฟลาทอกซินปี 1 Piotrowska และ Zakowska (2005) ศึกษาความสามารถของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียจำนวน 29 สายพันธุ์ ในการดูดซับโอคราทอกซินเอ ในอาหารเลี้ยง

เชื้อเหลว พบว่าทุกสายพันธุ์สามารถดูดซับสารพิษได้ โดย *L. acidophilus* มีความสามารถสูงสุด โดยเมื่อเวลาผ่านไป 5 ชั่วโมง สามารถลดปริมาณของโอคราทอกซินได้ 85 เปอร์เซ็นต์ และลดปริมาณสารพิษได้สูงสุด 88 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเวลาผ่านไป 10 ชั่วโมง Mateo และคณะ (2010) ศึกษาความสามารถของ *Oenococcus oeni* สายพันธุ์ต่างๆ ที่คัดแยกได้จากไวน์ ในการดูดซับโอคราทอกซินเอ โดยพบว่ามีเปอร์เซ็นต์การดูดซับอยู่ระหว่าง 0.88 เปอร์เซ็นต์ ถึง 63.14 เปอร์เซ็นต์ เมื่อมีความเข้มข้นของโอคราทอกซินเอในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเท่ากับ 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 1.75 ถึง 57.53 เปอร์เซ็นต์ เมื่อมีความเข้มข้นของโอคราทอกซินเอในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเท่ากับ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ยังพบว่าประสิทธิภาพของการดูดซับขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของแบคทีเรีย ความเข้มข้นของสารพิษ และระยะเวลาในการบ่ม Piotrowska (2014) ศึกษาความสามารถของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในสกุล *Lactobacillus* ได้แก่ *L. plantarum*, *L. brevis* และ *L. sanfranciscensis* พบว่าสามารถลดปริมาณโอคราทอกซินได้ 16.9 ถึง 35 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS และ 14.8 ถึง 26.4 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และยังพบว่าเมื่อเซลล์ถูกกระทำด้วยความร้อนจะทำให้มีความสามารถในการดูดซับสารพิษได้มากยิ่งขึ้น

บทที่ 3

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. กระจกครอบชนิดใยแก้ว (GF/C) ขนาด 1.5 ไมโครเมตร ของบริษัท Vicam, สวีเดน
2. กระจกกรองเบอร์ 1 (filter paper) ขนาด 110 มิลลิเมตร ของบริษัท Whatman, สหราชอาณาจักร
3. กระจกฉีดยา (syringe) ขนาด 1 มิลลิลิตร และ 10 มิลลิลิตร ของบริษัท Nipro, ไทย
4. เครื่องโครมาโตกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography, HPLC)
 - คอลัมน์ (column) Luna C18 ขนาด 250 x 4.6 มิลลิเมตร, 5 ไมโครเมตร และขนาด 150 x 4.6 มิลลิเมตร, 5 ไมโครเมตร ของบริษัท Phenomenex, สหรัฐอเมริกา
 - ลิควิดโครมาโทกราฟี (liquid chromatography) รุ่น prostar ของบริษัท Varian, สหรัฐอเมริกา
5. เครื่องชั่ง รุ่น AG285 ของบริษัท Mettler Toledo, สวิสเซอร์แลนด์
6. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) รุ่น ES-215 ของบริษัท Tomy, ญี่ปุ่น
7. เครื่องปั่น (dry blending) รุ่น SS115 ของบริษัท Warning commercial, สหรัฐอเมริกา
8. เครื่องปั่นผสม (vortex mixer) รุ่น G-560E ของบริษัท Scientific Industries, สหรัฐอเมริกา
9. เครื่องเปลี่ยนอากาศเป็นแก๊สไนโตรเจน ยี่ห้อ Peak
10. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-เบส (pH meter) รุ่น SevenEasy ของบริษัท Mettler Toledo, ไทย
11. จานเลี้ยงเชื้อพลาสติกปราศจากเชื้อ (sterile petridish) ของบริษัท Greiner bio-one, ออสเตรีย
12. ตู้เขี่ยเชื้อ (laminar flow) CLEAN model. V4 ของบริษัท Lab Service, ไทย
13. ตู้แช่จุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ของบริษัท Sandenintercool, ไทย
14. ตู้บ่มเชื้อ (incubator) รุ่น D06064 ของบริษัท Memmert, เยอรมนี
15. ตู้อบลมร้อน (hot air oven) รุ่น model 006 ของบริษัท Memmert, เยอรมนี

16. ฟลาสก์ (flask) ขนาด 250, 500 และ 1000 มิลลิลิตร ของบริษัท Pyrex เยอรมนี
17. ไมโครปิเปตต์ (micropipette) รุ่น P20, P200, P1000 ของบริษัท Gilson, ฝรั่งเศส
18. หัวกรองสำเร็จ (syringe filter) ขนาด 0.22 ไมโครเมตร ของบริษัท Lubitech, จีน
19. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น WB14 ของบริษัท Memmert, เยอรมนี
20. อ่างอัลตราโซนิก (ultrasonic bath) รุ่น SONOREX RX 100 ของบริษัท Bandelin Electronic, เยอรมนี
21. อิมมูโนแอฟฟินิตีคอลัมน์ (immunoaffinity column) Afla Test, Ochra Test ของบริษัท Vicam, สหรัฐอเมริกา

3.2 เคมีภัณฑ์

1. Lactobacilli MRS Broth ของบริษัท Difco, สหรัฐอเมริกา
2. MacConkey Agar ของบริษัท Difco, สหรัฐอเมริกา
3. Potato Dextrose Agar ของบริษัท Difco, สหรัฐอเมริกา
4. Tween 80 ของบริษัท Merck, เยอรมนี
5. เมทานอล (Methanol) gradient grade for liquid chromatography ของบริษัท Merck, เยอรมนี
6. เฮกเซน (Hexane) ของบริษัท J.T. Baker, สหรัฐอเมริกา
7. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท Merck, เยอรมนี
8. กรดไตรฟลูออโรแอซีติก (Trifluoroacetic acid) HPLC grade ของบริษัท Fisher Scientific, สหราชอาณาจักร
9. อะซิโตนไนไตรล์ (Acetonitrile) HPLC grade ของบริษัท RCI Labscan, ไทย

3.3 จุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ

จุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบจากคลังจุลินทรีย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1. *Aspergillus carbonarius* TK 4.2
2. *Aspergillus flavus* M3T8R4G3
3. *Lactobacillus casei* AN2
4. *Lactobacillus paracasei* AN3

3.4 วิธีดำเนินงานวิจัย

3.4.1 เตรียมจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

3.4.1.1 เตรียมหัวเชื้อแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย

นำเชื้อแบคทีเรีย *L. casei* AN2 และ *L. paracasei* AN3 จากคลังจุลินทรีย์ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง de Man Rogosa Sharpe (MRS) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อให้ได้โคลนเดี่ยว จากนั้น นำโคลนเดี่ยวมาเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ติดตามการเจริญของแบคทีเรียโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตรทุก 20 นาทีใน 4 ชั่วโมงแรก หลังจากนั้นวัดทุก 1 ชั่วโมง ใช้แบคทีเรียที่อยู่ในช่วง mid log phase เป็นหัวเชื้อสำหรับการทดลองขั้นต่อไป

3.4.1.2 เตรียมสปอร์ราแว่นลอย

นำ *A. flavus* M3T8R4G3 และ *A. carbonarius* TK4.2 จากคลังจุลินทรีย์ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง Potato dextrose agar (PDA) บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้น เก็บสปอร์โดยใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับ Tween 80 0.01 เปอร์เซ็นต์ ที่ปราศจากเชื้อ เจือจางให้มีจำนวนประมาณ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

3.4.2 ทดสอบความสามารถของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 ของ *A. flavus* และการผลิตโอคราทอกซินเอของ *A. carbonarius* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.4.2.1 ทดสอบความสามารถของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญ

ของรา

แบ่งชุดทดสอบออกเป็น 6 ชุด ดังนี้

- *A. flavus* เลี้ยงร่วมกับ *L. casei* AN2
- *A. flavus* เลี้ยงร่วมกับ *L. paracasei* AN3
- *A. flavus* เลี้ยงร่วมกับ *L. casei* AN2 และ *L. paracasei* AN3
- *A. carbonarius* เลี้ยงร่วมกับ *L. casei* AN2

- *A. carbonarius* เลี้ยงร่วมกับ *L. paracasei* AN3
- *A. carbonarius* เลี้ยงร่วมกับ *L. casei* AN2 และ *L. paracasei* AN3
- ชุดควบคุม (*A. flavus* หรือ *A. carbonarius*)

นำหัวเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากการเตรียมในข้อ 3.4.1.1 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เกลี่ยลงบนอาหารแข็ง MRS จากนั้นหยดสปอร์ราแขวนลอยที่ได้จากการเตรียมในข้อ 3.4.1.2 ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงบนกลางอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้เกลี่ยแบคทีเรียไว้ บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีทุกวันจนครบ 7 วัน ทำการทดลอง 5 ซ้ำ (Armando และคณะ, 2013)

3.4.2.2 ทดสอบความสามารถของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในการยับยั้งการผลิต

สารพิษจากรา

จากการทดลองข้อ 3.4.2.1 หลังจากบ่มครบ 7 วัน เจาะตรงกลางโคโลนีของราในแต่ละชุดทดสอบ ให้เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5 มิลลิเมตร จำนวน 3 ชิ้น ใส่ลงในขวดสีกัด แล้วชั่งน้ำหนัก จากนั้นเติมเมทานอลสำหรับสกัดอะฟลาทอกซินบี1 และเมทานอลผสมกรดฟอร์มิกในอัตราส่วน 25:1 สำหรับสกัดโอคราทอกซินเอ ปริมาตร 2.5 มิลลิตร สกัดในอ่างอัลตราโซนิกเป็นเวลา 15 นาที กรองสารสกัดที่ได้ด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 แล้วระเหยสารละลายด้วยแก๊สไนโตรเจนที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เติมเฟสเคลื่อนที่ (อะซีโทไนไตรล์ : น้ำปราศจากไอออน : เมทานอล ; 20 : 60 : 20 สำหรับอะฟลาทอกซินบี1 และ อะซีโทไนไตรล์ : น้ำปราศจากไอออน : กรดอะซิติก; 49.5 : 49.5 : 1 สำหรับโอคราทอกซินเอ) แล้วส่งวิเคราะห์ปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 หรือ โอคราทอกซินเอ โดยเครื่องโครมาโตกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) (Dachoupakan และคณะ, 2009) ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับโอคราทอกซินเอ วิเคราะห์ผ่านคอลัมน์ C18 (250 × 4.60 มิลลิเมตร, 5 ไมโครเมตร) โดยใช้เครื่องตรวจวัดชนิดฟลูออเรสเซนซ์ excitation wavelength (λ_{exc}) เท่ากับ 333 นาโนเมตร และ emission wavelength (λ_{em}) เท่ากับ 477 นาโนเมตร ควบคุมให้มีอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 1 มิลลิิตรต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เวลาที่คงอยู่ (retention time) ของโอคราทอกซินเอ เท่ากับ 10 นาที สำหรับอะฟลาทอกซินบี 1 วิเคราะห์ผ่านคอลัมน์ C18 (150 × 4.60 มิลลิเมตร, 5 ไมโครเมตร) โดยใช้เครื่องตรวจวัดชนิดฟลูออเรสเซนซ์ excitation wavelength

(λ_{exc}) เท่ากับ 365 นาโนเมตร และ emission wavelength (λ_{em}) เท่ากับ 435 นาโนเมตร ควบคุมให้มีอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เวลาที่คงอยู่ของอะฟลาทอกซินบี 1 เท่ากับ 7 นาที

3.4.3 ทดสอบผลของอุณหภูมิและค่าความเป็นกรด-เบสต่อการยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษจากรา

ทดลองโดยเลือกชุดทดสอบที่ดีที่สุดที่ให้ผลการยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ของ *A. flavus* และการผลิตโอคราทอกซินเอของ *A. carbonarius* มาแปรผัน 2 ภาวะ คือ ค่าความเป็นกรด-เบส และอุณหภูมิ ทดสอบตามข้อ 3.4.2.1 และ 3.4.2.2 โดยปรับค่าความเป็นกรด-เบส ของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เท่ากับ 3, 4 และ 5 ก่อนลงหัวเชื้อแบคทีเรีย และแต่ละค่าความเป็นกรด-เบส บ่มที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส ซึ่งภาวะดังกล่าวเป็นภาวะที่พบได้ในพืชหมัก ทำการทดลอง 5 ซ้ำ

3.4.4 ทดสอบความสามารถของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษจากราในข้าวโพดหมัก

3.4.4.1 หมักข้าวโพด

นำข้าวโพดสับสำหรับเลี้ยงสัตว์ (ต้นพร้อมฝักที่มีอายุปลูกประมาณ 70 วัน จากพรีเมียร์ฟาร์ม จังหวัดนครปฐม) มาทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วเติมหัวเชื้อแบคทีเรียจากชุดทดสอบที่ให้ผลดีที่สุด ในข้อ 3.4.2 จำนวน 10^7 CFU ต่อกรัมของข้าวโพดและสปอร์ราแขวนลอยจำนวนประมาณ 10^6 สปอร์ต่อกรัมของข้าวโพด จากนั้น นำข้าวโพดที่ใส่เชื้อแล้ว 1 กิโลกรัม ใส่ในถุงพลาสติก นำไปหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน โดยติดตามผลการทดลอง ได้แก่ ค่าความเป็นกรด-เบส และการติดตามการเจริญของจุลินทรีย์ ทุกวันที่ 0, 1, 3, 5, 7, 14 และ 21 วัน และตรวจหาปริมาณสารพิษจากรา ทุกวันที่ 0, 7, 14 และ 21 วัน ทำการทดลอง 5 ซ้ำ วิธีการเก็บตัวอย่างทำโดยนำข้าวโพดหมักแต่ละถุงมาผสมให้เข้ากันโดยการเขย่า จากนั้นเก็บตัวอย่างในแต่ละถุงนำไปวิเคราะห์ (Ohmomo และคณะ, 2004)

3.4.4.2 ติดตามความเป็นกรด-เบส

นำตัวอย่างข้าวโพดหมัก 10 กรัม จากแต่ละถุงมาวิเคราะห์หาค่าความเป็นกรด-เบส โดยเติมน้ำกลั่น 30 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วบิบเฉพาะส่วนนำนำมาวิเคราะห์ด้วยเครื่องวัดค่าความเป็นกรด-เบส

3.4.4.3 ติดตามการเจริญของจุลินทรีย์

หาจำนวนแล็กติกแอซิดแบคทีเรียและรา โดยการนำตัวอย่างข้าวโพดหมัก 10 กรัม จากแต่ละถุงทำการเจือจางในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ แล้วเกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS (สำหรับแบคทีเรีย) และอาหารแข็ง PDA (สำหรับรา) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง (สำหรับแบคทีเรีย) และบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 วัน (สำหรับรา) รายงานผลเป็น log (CFU/g)

3.4.4.4 ตรวจหาปริมาณสารพิษจากรา

ชั่งตัวอย่างข้าวโพดหมักที่ปั่นละเอียดแล้ว 50 กรัม ผสมกับโซเดียมคลอไรด์ 5 กรัม และสารละลายผสม เมทานอล : น้ำปราศจากไอออน ในอัตราส่วน 80 : 20 ปั่นที่ความเร็วสูงเป็นเวลา 1 นาที แล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 จากนั้นดูดสารละลายตัวอย่างปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำปราศจากไอออน สำหรับการตรวจหาปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 หรือ สารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์สำหรับการตรวจหาปริมาณโอคราทอกซินเอ ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วกรองด้วยกระดาษกรองชนิดใยแก้ว ดูดสารละลายที่กรองได้ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในกระบอกฉีดยาที่ต่อกับอิมมูโนแอฟฟินิตีคอลัมน์ โดยปรับให้มีอัตราการไหล 1 หยดต่อวินาที ล้างด้วยน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 10 มิลลิลิตรสองครั้ง สำหรับอะฟลาทอกซินบี 1 หรือ ล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ 10 มิลลิลิตร แล้วตามด้วยน้ำปราศจากไอออน 10 มิลลิลิตร สำหรับโอคราทอกซินเอ จากนั้นเติมเมทานอล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อชะสารพิษจากราออกจากคอลัมน์ ตามวิธีของบริษัทผู้ผลิต (VICAM, 2003) เก็บสารสกัดที่ได้นำมาระเหยให้แห้งด้วยแก๊สไนโตรเจนที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เติมน้ำเกลือที่ เช่นเดียวกับข้อ 3.4.2.2 แล้วส่งวิเคราะห์หาปริมาณสารพิษด้วย HPLC ตามภาวะในข้อ 3.4.2.2

3.4.5 ทดสอบความสามารถของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษจากราในข้าวโพดหมักร่วมกับจุลินทรีย์ชนิดอื่น

3.4.5.1 หมักข้าวโพด

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.4.4.1 โดยใช้ข้าวโพดที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ

3.4.5.2 ติดตามความเป็นกรด-เบส

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.4.4.2

3.4.5.2 ติดตามการเจริญของจุลินทรีย์

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.4.4.3 โดยติดตามจำนวนคอลิฟอร์มแบคทีเรียเพิ่มเติม โดยนำตัวอย่างข้าวโพดหมัก 10 กรัม เจือจางในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ แล้ว drop plate ลงบนอาหารแข็ง MacConkey บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.4.5.3 ตรวจหาปริมาณสารพิษจากรา

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.4.4.4

3.4.6 ทดสอบผลของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียต่อคุณค่าทางโภชนาของข้าวโพดหมัก

นำข้าวโพดสำหรับเลี้ยงสัตว์ (ต้นพร้อมฝักที่มีอายุปลูกประมาณ 70 วัน) ปริมาณ 1 กิโลกรัม เติมหัวเชื้อแบคทีเรียจากชุดทดสอบที่ให้ผลดีที่สุด ในข้อ 3.4.2 จำนวน 10^7 CFU ต่อกรัมของข้าวโพดใส่ในถุงพลาสติก ไล่อากาศแล้วมัดให้แน่น นำไปหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เมื่อหมักได้นาน 0, 7, 14 และ 21 วัน ส่งวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาของข้าวโพดหมักได้แก่ ความเป็นกรด-เบส ความชื้น วัตถุแห้ง เถ้า โปรตีนรวม ไขมัน เยื่อใยรวม พลังงานรวม แคลเซียมและฟอสฟอรัส และวิเคราะห์ผนังเซลล์พืชในรูปของ neutral detergent fiber (NDF) และ กรดเดเทอร์จेंटไฟเบอร์ (acid detergent fiber, ADF) เทียบกับชุดควบคุมได้แก่ ข้าวโพดสดและข้าวโพดหมักที่ไม่ได้เติมหัวเชื้อแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย (Ohmomo และคณะ, 2004) ส่งวิเคราะห์ที่ฝ่ายปฏิบัติการวิเคราะห์อาหารสัตว์ ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน

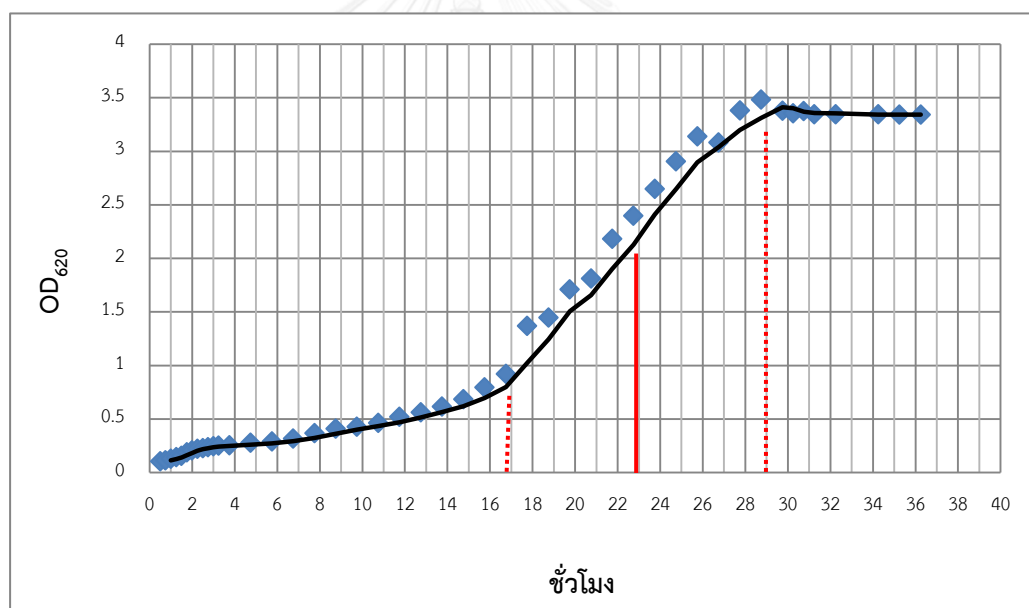
บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การเจริญของแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย

4.1.1 การติดตามการเจริญของ *L. casei* AN2

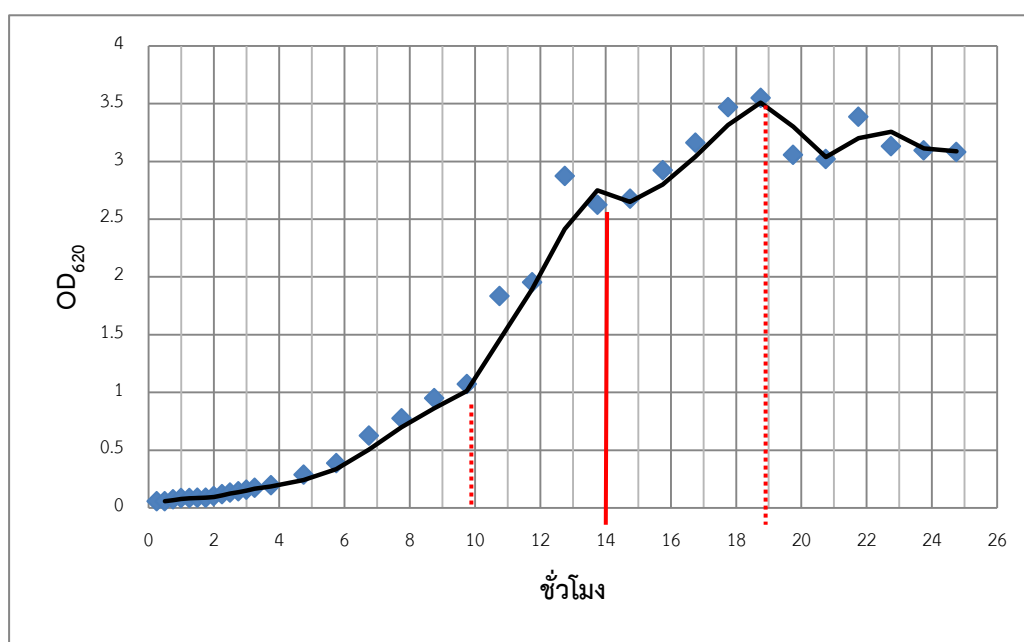
จากการติดตามการเจริญของ *L. casei* AN2 โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร เป็นเวลา 36 ชั่วโมง พบว่าแบคทีเรียมีช่วงการเจริญในระยะเอกซ์โพเนนเชียลอยู่ในช่วงชั่วโมงที่ 17-29 และระยะ mid log phase ของ *L. casei* AN2 คือ ชั่วโมงที่ 23 ดังแสดงในรูปที่ 4.1



รูปที่ 4.1 กราฟแสดงการเจริญของ *L. casei* AN2 โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

4.1.2 การติดตามการเจริญของ *L. paracasei* AN3

จากการติดตามการเจริญของ *L. paracasei* AN3 โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร เป็นเวลา 25 ชั่วโมง พบว่าแบคทีเรียมีช่วงการเจริญในระยะเอกซ์โพเนนเชียลอยู่ในช่วงชั่วโมงที่ 10-19 และระยะ mid log phase ของ *L. paracasei* AN3 คือ ชั่วโมงที่ 14 ดังแสดงในรูปที่ 4.2



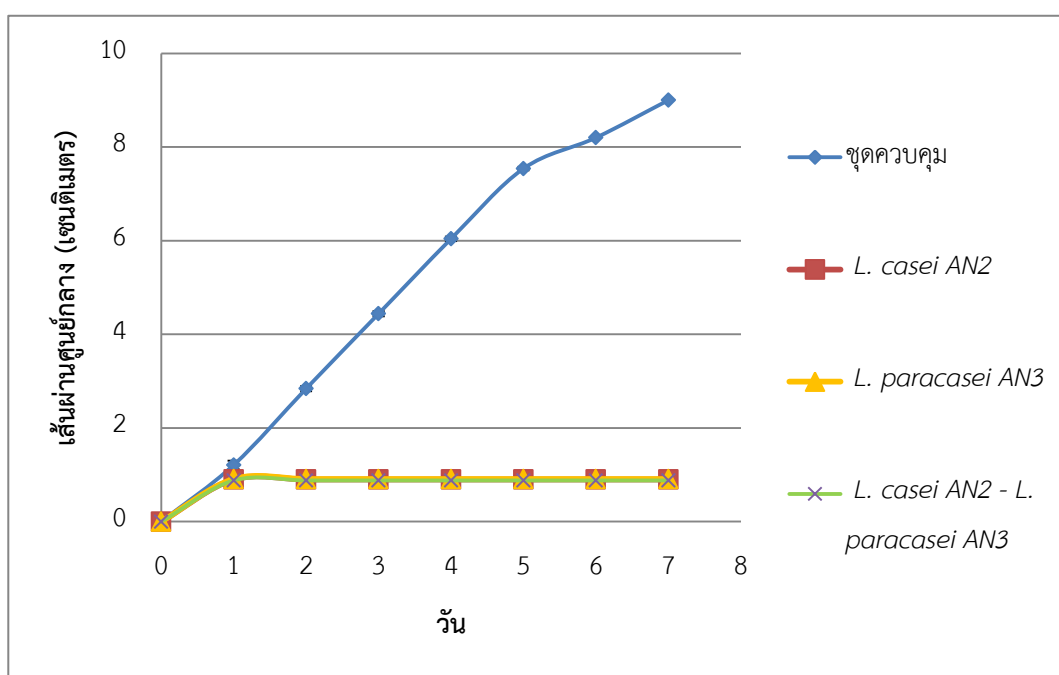
รูปที่ 4.2 กราฟแสดงการเจริญของ *L. paracasei* AN3 โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร เป็นเวลา 25 ชั่วโมง

4.2 ความสามารถของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 ของ *A. flavus*

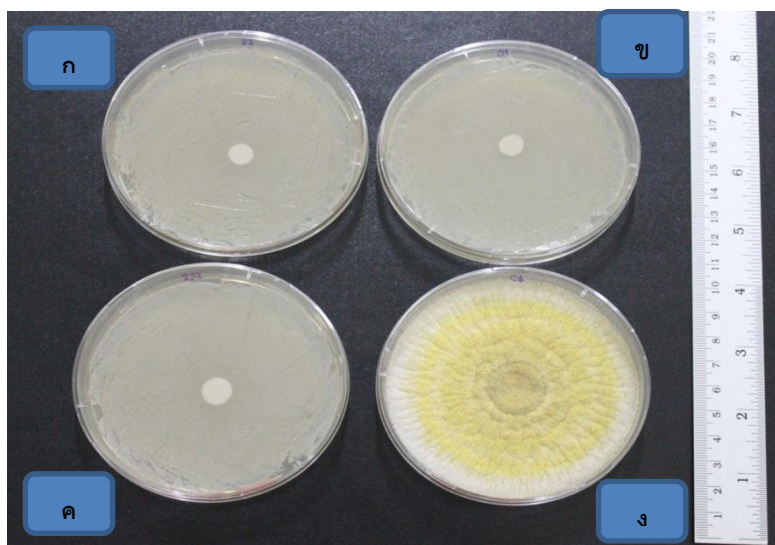
ความสามารถของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 ของ *A. flavus* ได้แบ่งชุดทดสอบออกเป็น 4 ชุด ดังนี้ (ก) *A. flavus* เลี้ยงร่วมกับ *L. casei* AN2, (ข) *A. flavus* เลี้ยงร่วมกับ *L. paracasei* AN3, (ค) *A. flavus* เลี้ยงร่วมกับ *L. casei* AN2 และ *L. paracasei* AN3 และ (ง) ชุดควบคุม (*A. flavus*)

การยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* ในแต่ละชุดทดสอบ ทำได้โดยการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของรา พบว่าในการทดลองชุดควบคุม ราสามารถเจริญได้อย่างดี โดยเมื่อครบ 7 วัน สามารถสร้างเส้นใยและสปอร์เต็มพื้นที่บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ

โคโลนีรามีได้ 9.00 ± 0.00 เซนติเมตร ซึ่งเมื่อเทียบกับชุดทดสอบที่เลี้ยงราร่วมกับแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย พบว่ารามีการเจริญที่จำกัดวงอยู่ตรงตำแหน่งที่หยุดสปอร์ไว้เท่านั้น โดยสามารถวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางได้ 0.90 ± 0.00 เซนติเมตร ลักษณะการเจริญเป็นเพียงสายราสีขาวและไม่มีการสร้างสปอร์ ดังแสดงในรูปที่ 4.3 และ 4.4

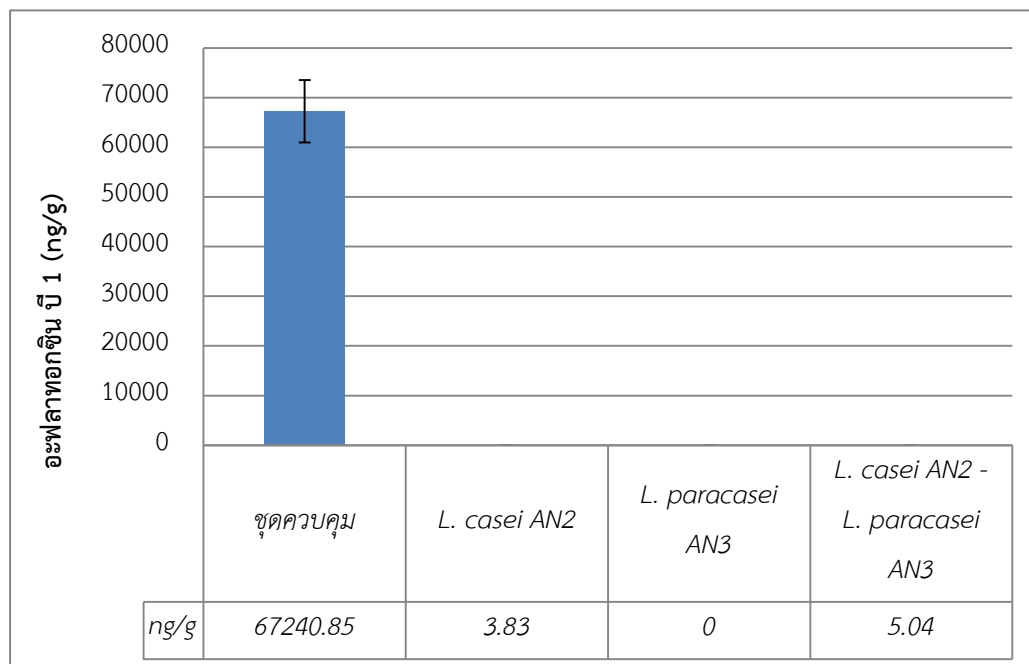


รูปที่ 4.3 กราฟแสดงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ *A. flavus* เมื่อเลี้ยงร่วมกับแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. casei* AN2, *L. paracasei* AN3 และ *L. casei* AN2 ร่วมกับ *L. paracasei* AN3 เทียบกับชุดควบคุม



รูปที่ 4.4 การเจริญของ *A. flavus* ในวันที่ 7 เมื่อเลี้ยงร่วมกับแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. casei* AN2 (ก), *L. paracasei* AN3 (ข), *L. casei* AN2 ร่วมกับ *L. paracasei* AN3 (ค) และชุดควบคุม (ง)

การทดสอบความสามารถของ *L. casei* AN2, *L. paracasei* AN3 และ *L. casei* AN2 ร่วมกับ *L. paracasei* AN3 ในการยับยั้งการผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ของ *A. flavus* โดยการเจาะตรงกลางโคโลนีของราในแต่ละชุดทดสอบมาวิเคราะห์หาปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 พบว่าในการทดลองชุดควบคุม *A. flavus* สามารถสร้างอะฟลาทอกซินบี 1 ได้สูงถึง $67,240.00 \pm 6,286.96$ นาโนกรัมต่อกรัม เมื่อเทียบกับชุดทดสอบที่เลี้ยงร่วมกับแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย โดยเมื่อเลี้ยงร่วมกับ *L. casei* AN2 สามารถสร้างอะฟลาทอกซินบี 1 ได้เพียง 3.83 ± 2.64 นาโนกรัมต่อกรัม คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การลดลงเท่ากับ 99.99 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเลี้ยงร่วมกับ *L. paracasei* AN 3 ตรวจไม่พบการสร้างอะฟลาทอกซินบี 1 คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การลดลงเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเลี้ยงกับ *L. casei* AN2 ร่วมกับ *L. paracasei* AN3 สามารถสร้างอะ ฟลาทอกซินบี 1 ได้ 5.04 ± 0.86 นาโนกรัมต่อกรัม คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การลดลง เท่ากับ 99.99 เปอร์เซ็นต์ ดังที่แสดงในรูปที่ 4.5



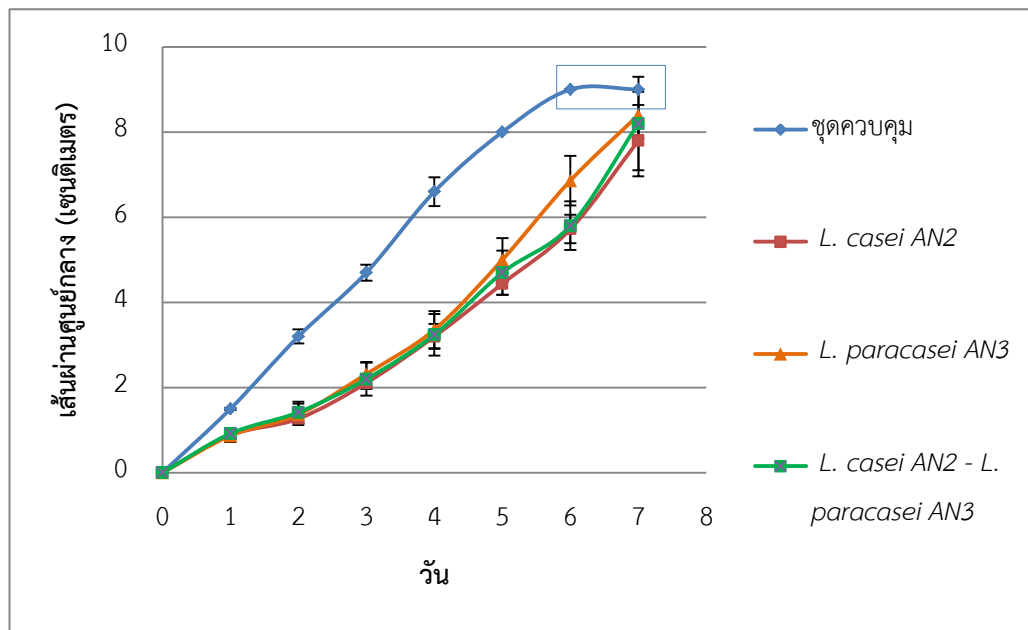
รูปที่ 4.5 กราฟแสดงผลการยับยั้งการสร้างอะฟลาทอกซินบี 1 ของ *A. flavus* โดยแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. casei* AN2, *L. paracasei* AN3, *L. casei* AN2 ร่วมกับ *L. paracasei* AN3 และชุดควบคุม

4.3 ความสามารถของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญและการผลิตโอคราทอกซินเอของ *A. carbonarius* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ

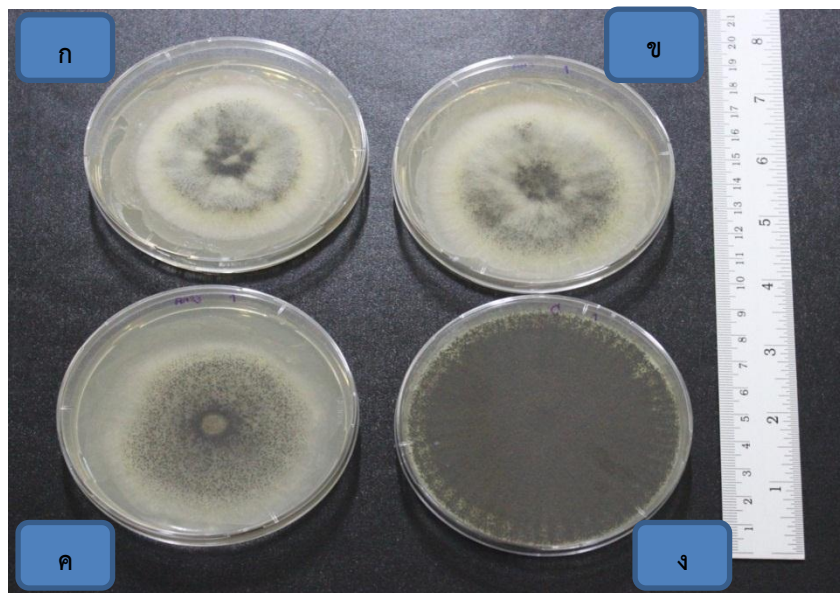
ความสามารถของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของราและการผลิตโอคราทอกซินเอของ *A. carbonarius* ได้แบ่งชุดทดสอบออกเป็น 4 ชุด ดังนี้ (ก) *A. carbonarius* เลี้ยงร่วมกับ *L. casei* AN2, (ข) *A. carbonarius* เลี้ยงร่วมกับ *L. paracasei* AN3, (ค) *A. carbonarius* เลี้ยงร่วมกับ *L. casei* AN2 และ *L. paracasei* AN3 และ (ง) ชุดควบคุม (*A. carbonarius*)

การยับยั้งการเจริญของ *A. carbonarius* ในแต่ละชุดทดสอบ ทำโดยการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของรา พบว่าในการทดลองชุดควบคุมราสามารถเจริญได้อย่างดี โดยเมื่อบ่มครบ 7 วัน ราสามารถสร้างเส้นใยและสปอร์เต็มพื้นที่บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีราได้ 9.00 ± 0.00 เซนติเมตร ซึ่งเมื่อเทียบกับชุดทดสอบที่เลี้ยงราร่วมกับแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย พบว่าโคโลนีของรามีขนาดเล็กกว่าเมื่อเทียบกับชุดควบคุม โดยเมื่อบ่มครบ 7 วันสามารถวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีราได้เท่ากับ 7.80 ± 0.84 , 8.40 ± 0.54 และ

8.20±1.09 เซนติเมตร เมื่อเลี้ยงร่วมกับ *L. casei* AN2, *L. paracasei* AN3 และ *L. casei* AN2 ร่วมกับ *L. paracasei* AN3 ตามลำดับ ลักษณะการเจริญของราเมื่อเลี้ยงร่วมกับแล็กติกแอซิดแบคทีเรียพบว่า มีการสร้างเส้นใยเจริญขึ้นไปด้านบนมากและมีการสร้างสปอร์ได้เล็กน้อยเทียบกับการทดลองชุดควบคุม ดังแสดงในรูปที่ 4.6 และ 4.7

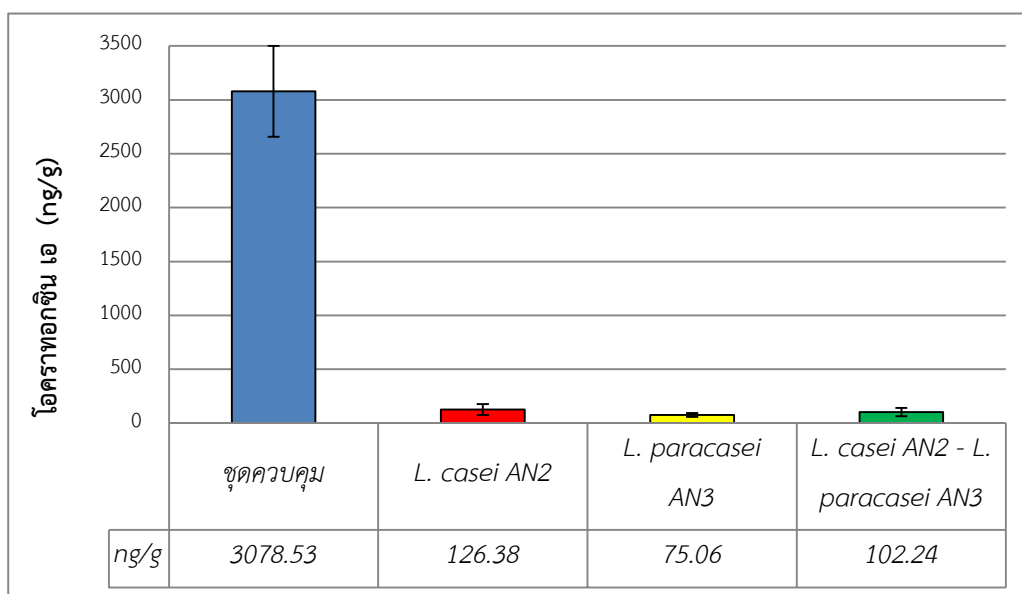


รูปที่ 4.6 กราฟแสดงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ *A. carbonarius* เมื่อเลี้ยงร่วมกับแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. casei* AN2, *L. paracasei* AN3, *L. casei* AN2 ร่วมกับ *L. paracasei* AN3 เทียบกับชุดควบคุม แสดงเส้นผ่านศูนย์กลางของราเมื่อเจริญจนเต็มพื้นที่บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ



รูปที่ 4.7 การเจริญของ *A. carbonarius* ในวันที่ 7 เมื่อเลี้ยงร่วมกับร่วมกับแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. casei* AN2 (ก), *L. paracasei* AN3 (ข), *L. casei* AN2 ร่วมกับ *L. paracasei* AN3 (ค) และชุดควบคุม (ง)

การทดสอบความสามารถของ *L. casei* AN2, *L. paracasei* AN3 และ *L. casei* AN2 ร่วมกับ *L. paracasei* AN3 ในการยับยั้งการผลิตโอคราทอกซินเอของ *A. carbonarius* โดยการเจาะตรงกลางโคโลนีของราในแต่ละชุดทดสอบมาวิเคราะห์หาปริมาณโอคราทอกซินเอ พบว่าในการทดลองชุดควบคุม *A. carbonarius* สามารถสร้างโอคราทอกซินเอ ได้สูงถึง $3,078.53 \pm 422.27$ นาโนกรัมต่อกรัม เมื่อเทียบกับชุดทดสอบที่เลี้ยงร่วมกับแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย โดยเมื่อเลี้ยงร่วมกับ *L. casei* AN2 สามารถสร้างโอคราทอกซินเอ ได้ 126.38 ± 51.60 นาโนกรัมต่อกรัม คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การลดลงเท่ากับ 95.89 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเลี้ยงร่วมกับ *L. paracasei* AN 3 สามารถสร้างโอคราทอกซินเอ ได้เพียง 75.06 ± 17.12 นาโนกรัมต่อกรัม คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การลดลงเท่ากับ 97.56 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเลี้ยงร่วมกับ *L. casei* AN2 และ *L. paracasei* AN3 สามารถสร้างโอคราทอกซินเอ ได้ 102.24 ± 37.89 นาโนกรัมต่อกรัม คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การลดลง เท่ากับ 96.67 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในรูปที่ 4.8



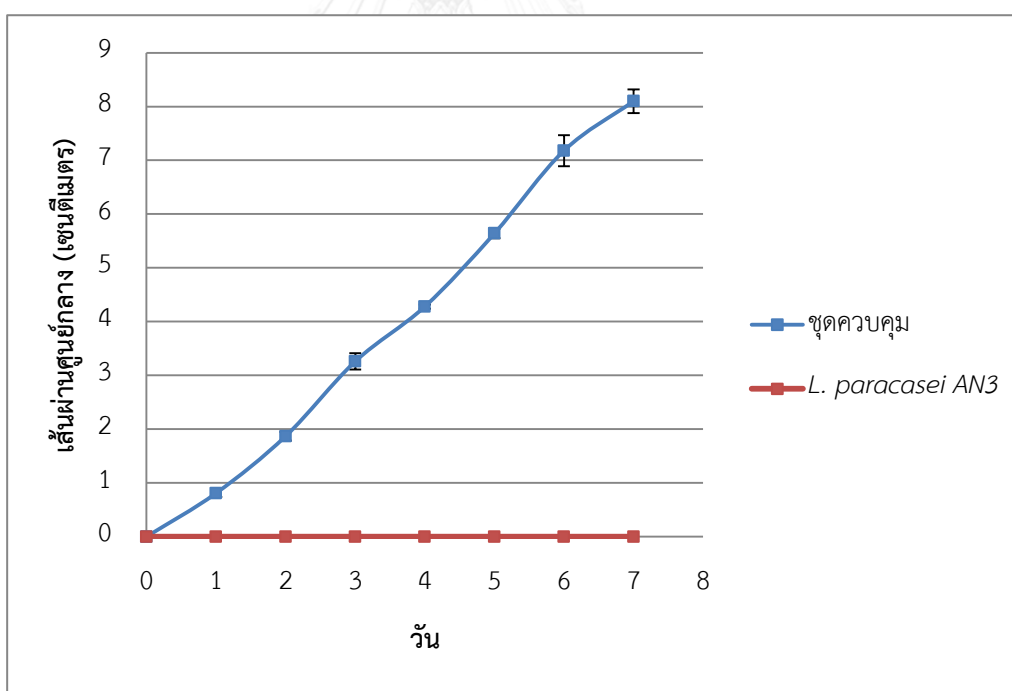
รูปที่ 4.8 กราฟแสดงผลการยับยั้งการสร้างโอคราทอกซินเอของ *A. carbonarius* โดยแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. casei* AN2, *L. paracasei* AN3, *L. casei* AN2 ร่วมกับ *L. paracasei* AN3 และชุดควบคุม

จากผลการทดสอบความสามารถของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญและการสร้างสารพิษจากรา พบว่า *L. paracasei* AN3 มีความสามารถสูงที่สุดในการยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษจากราที่ใช้ทดสอบ เมื่อเทียบกับ *L. casei* AN2 และ *L. casei* AN2 ร่วมกับ *L. paracasei* AN3 โดยพบว่า *L. paracasei* AN3 สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* และ *A. carbonarius* ได้ดีเมื่อเทียบกับชุดควบคุม และสามารถลดปริมาณการสร้างอะฟลาทอกซินปี 1 ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ และลดปริมาณการสร้างโอคราทอกซินเอ ได้ 97.56 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น *L. paracasei* AN 3 จึงมีประสิทธิภาพมากที่สุดในการยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษจากรา จึงเลือกใช้ *L. paracasei* AN3 ในการทดลองขั้นต่อไป

4.4 ผลของอุณหภูมิและค่าความเป็นกรด-เบสต่อการยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษจากรา

4.4.1 ผลของอุณหภูมิและค่าความเป็นกรด-เบสต่อการยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 ของ *A. flavus*

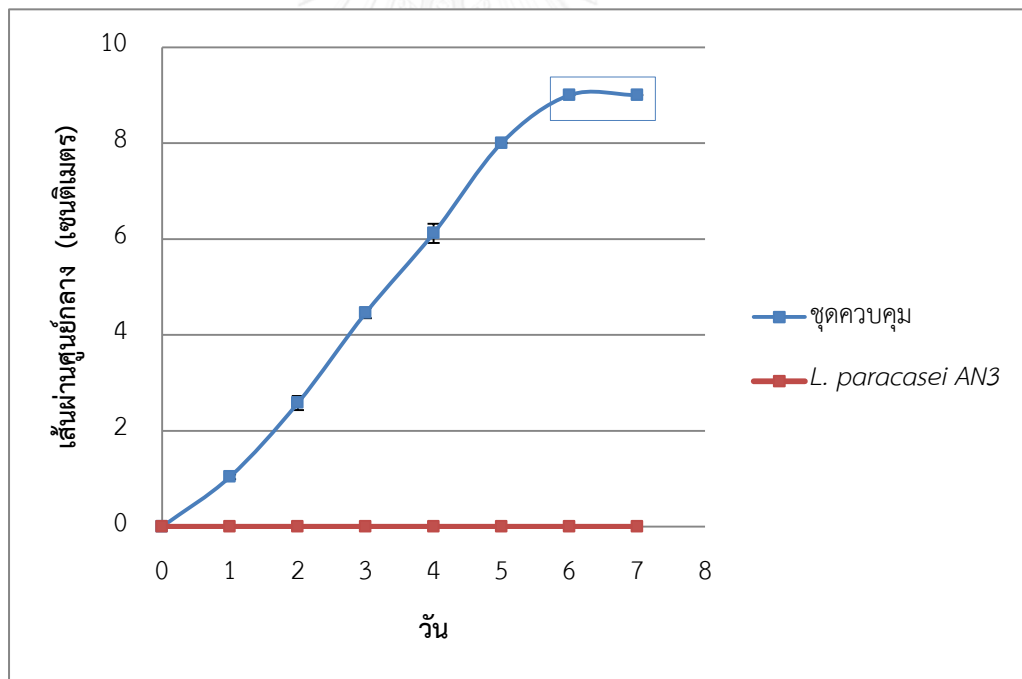
ทดสอบความสามารถของ *L. paracasei* AN3 ในการยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 ของ *A. flavus* โดยแปรผันสองภาวะได้แก่ อุณหภูมิ และค่าความเป็นกรด-เบส โดยปรับค่าความเป็นกรด-เบสของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เท่ากับ 3, 4 และ 5 ก่อนลงหัวเชื้อแบคทีเรีย และแต่ละค่าความเป็นกรด-เบส บ่มที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส ตามลำดับ โดยพบว่าที่ค่าความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 3 และ 4 ในทุกอุณหภูมิที่แปรผัน *A. flavus* ไม่สามารถเจริญได้แม้ในชุดควบคุม แต่อย่างไรก็ตามที่ค่าความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 5 ที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส *A. flavus* สามารถเจริญได้ดีในชุดควบคุมโดยโคโลนีมีขนาดใหญ่ขึ้นตามเวลาที่บ่ม แต่ไม่พบการเจริญของราเมื่อเลี้ยงร่วมกับแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย ดังแสดงในรูปที่ 4.9-4.14



รูปที่ 4.9 กราฟแสดงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ *A. flavus* เมื่อเลี้ยงร่วมกับแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN 3 เทียบกับชุดควบคุม ที่ค่าความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 5 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส



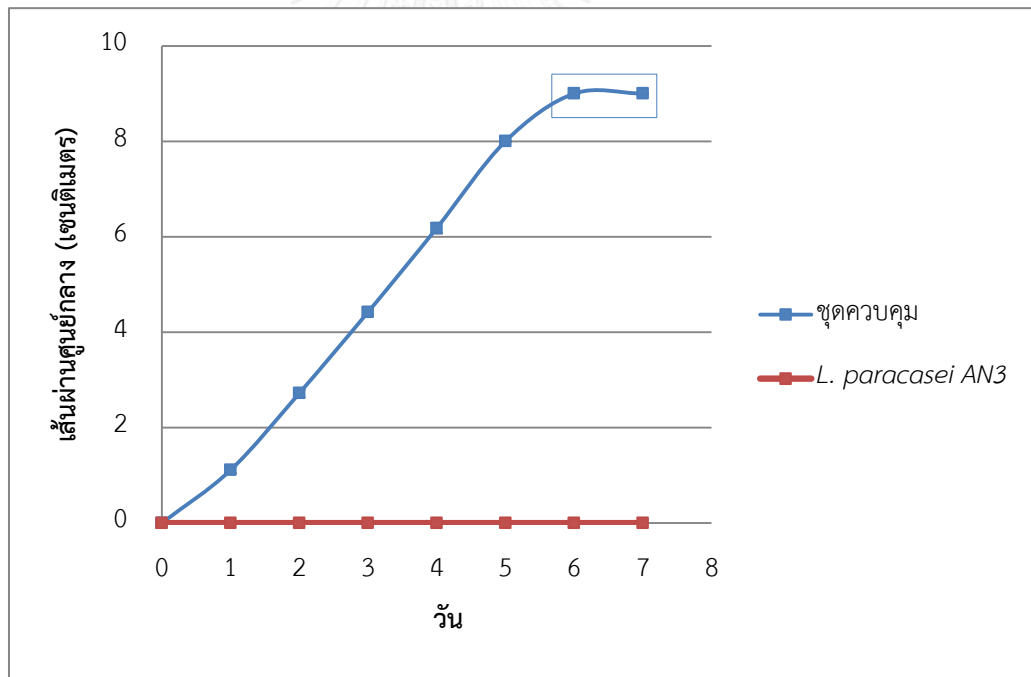
รูปที่ 4.10 การเจริญของ *A. flavus* ในวันที่ 7 ที่ค่าความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 5 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เมื่อเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 (ก) และชุดควบคุม (ข)



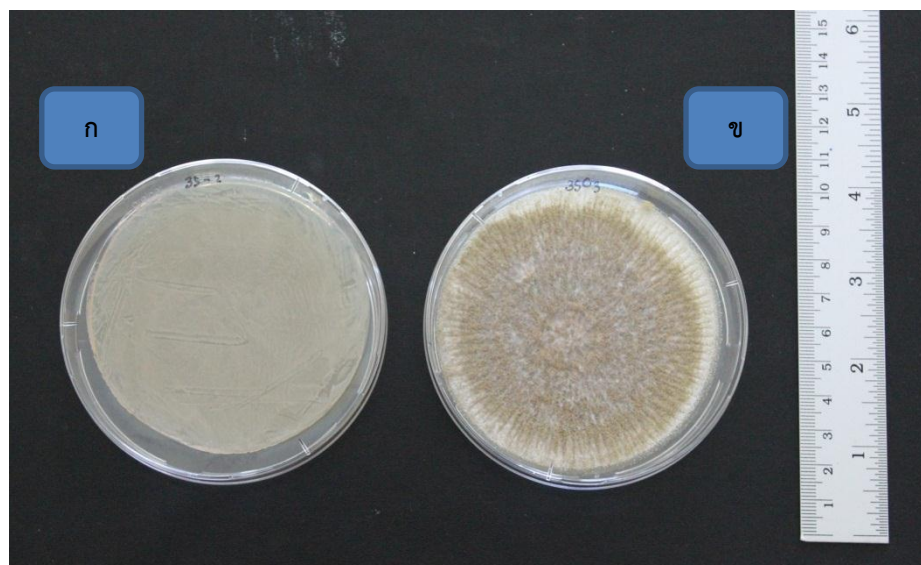
รูปที่ 4.11 กราฟแสดงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ *A. flavus* เมื่อเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรีย *L. paracasei* AN 3 เทียบกับชุดควบคุม ที่ค่าความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แสดงเส้นผ่านศูนย์กลางของราเมื่อเจริญจนเต็มพื้นที่บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ



รูปที่ 4.12 การเจริญของ *A. flavus* ในวันที่ 7 ที่ค่าความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เมื่อเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 (ก) และชุดควบคุม (ข)



รูปที่ 4.13 กราฟแสดงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ *A. flavus* เมื่อเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรีย *L. paracasei* AN 3 เทียบกับชุดควบคุม ที่ค่าความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 5 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส แสดงเส้นผ่านศูนย์กลางของราเมื่อเจริญจนเต็มพื้นที่บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

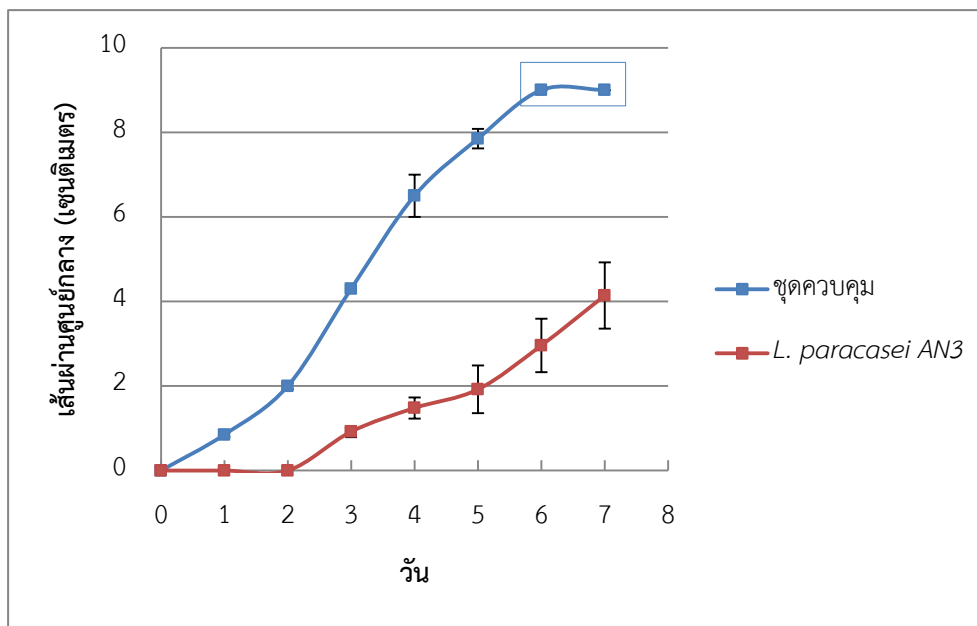


รูปที่ 4.14 การเจริญของ *A. flavus* ในวันที่ 7 ที่ค่าความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 5 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เมื่อเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 (ก) และชุดควบคุม (ข)

ในการทดสอบความสามารถของ *L. paracasei* AN3 ในการยับยั้งการสร้างอะฟลาทอกซินปี 1 ที่ค่าความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 3 และ 4 ในทุกอุณหภูมิพบว่าไม่มีการเจริญของราจึงไม่สามารถวิเคราะห์ปริมาณสารพิษได้ ส่วนที่ค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 5 พบว่าเมื่อเลี้ยงราพร้อมกับแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ราไม่มีการเจริญ ดังนั้น จึงไม่สามารถวิเคราะห์สารพิษจากราด้วยเช่นกัน อย่างไรก็ตามในชุดควบคุมที่ค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 5 ที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส *A. flavus* สร้างอะฟลาทอกซินปี 1 เท่ากับ $27,930.22 \pm 1,153.26$, $4,564.80 \pm 1,063.21$ และ 350.37 ± 75.18 นาโนกรัมต่อกรัม ตามลำดับ

4.4.2 ผลของอุณหภูมิและค่าความเป็นกรด-เบสต่อการยับยั้งการเจริญและการผลิตโอคราทอกซินเอของ *A. carbonarius*

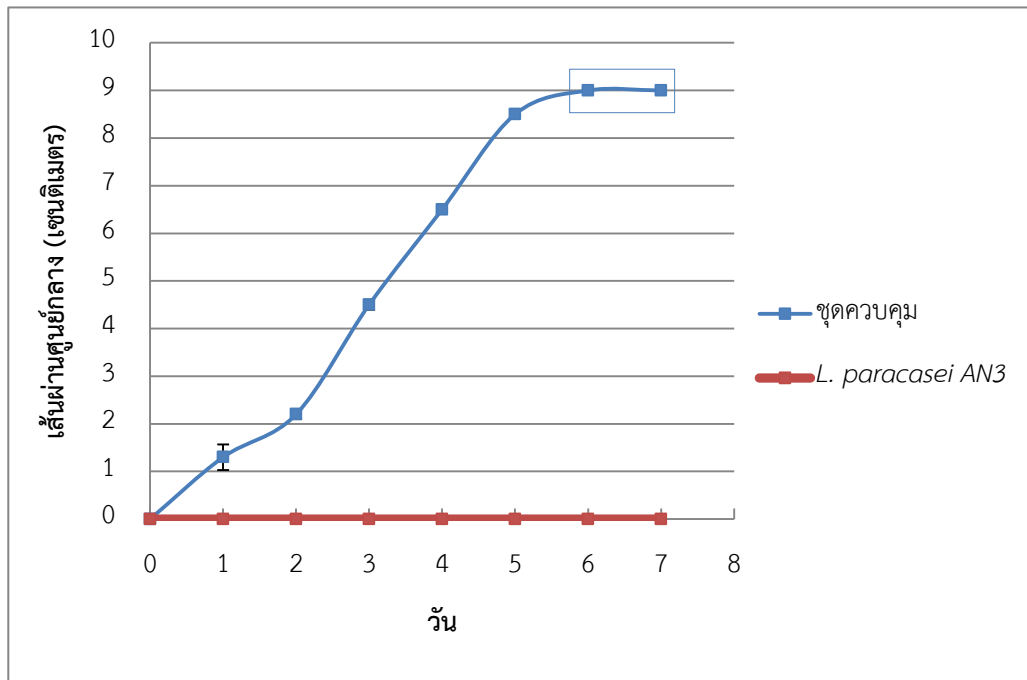
ทดสอบความสามารถของ *L. paracasei* AN3 ในการยับยั้งการเจริญและการผลิตโอคราทอกซินเอของ *A. carbonarius* โดยแปรผันสองภาวะ ได้แก่อุณหภูมิ และค่าความเป็นกรด-เบส โดยปรับค่าความเป็นกรด-เบสของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เท่ากับ 3, 4 และ 5 ก่อนลงหัวเชื้อแบคทีเรีย และแต่ละค่าความเป็นกรด-เบส บ่มที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียสตามลำดับ โดยพบว่าที่ค่าความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 3 และ 4 ในทุกอุณหภูมิที่แปรผัน *A. carbonarius* ไม่สามารถเจริญได้แม้ในชุดควบคุม แต่อย่างไรก็ตามที่ค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 5 ที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส *A. carbonarius* สามารถเจริญได้ดีในชุดควบคุม โดยพบว่าโคโลนีมีขนาดใหญ่ขึ้นตามเวลาที่บ่ม ซึ่งเมื่อบ่มครบ 7 วัน สามารถวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีได้ 9.00 ± 0.00 เซนติเมตร ตรงข้ามกับเมื่อเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียแอซิดแบคทีเรีย โดยที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส *A. carbonarius* สามารถเจริญได้น้อยกว่าชุดควบคุม โดยลักษณะการเจริญมีการสร้างเส้นใยมากขึ้นไปด้านบนและสร้างสปอร์เพียงเล็กน้อย เมื่อบ่มครบ 7 วัน สามารถวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีได้เพียง 4.14 ± 0.79 เซนติเมตร ดังแสดงในรูปที่ 4.15 และ 4.16 ในขณะที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส ไม่พบการเจริญของรา ดังแสดงในรูปที่ 4.17 – 4.20



รูปที่ 4.15 กราฟแสดงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ *A. carbonarius* เมื่อเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN 3 เทียบกับชุดควบคุม ที่ค่าความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 5 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แสดงเส้นผ่านศูนย์กลางของราเมื่อเจริญจนเต็มพื้นที่บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ



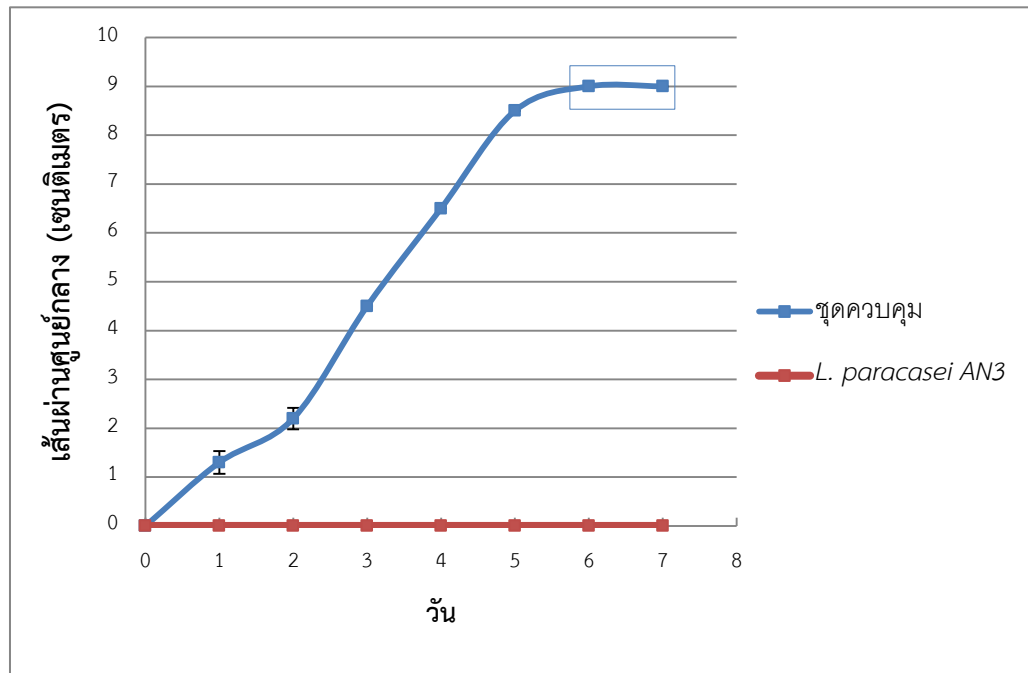
รูปที่ 4.16 การเจริญของ *A. carbonarius* ในวันที่ 7 ที่ค่าความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 5 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เมื่อเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 (ก) และชุดควบคุม (ข)



รูปที่ 4.17 กราฟแสดงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ *A. carbonarius* เมื่อเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 เทียบกับชุดควบคุม ที่ค่าความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แสดงเส้นผ่านศูนย์กลางของราเมื่อเจริญจนเต็มพื้นที่บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ



รูปที่ 4.18 การเจริญของ *A. carbonarius* ในวันที่ 7 ที่ค่าความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เมื่อเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 (ก) และชุดควบคุม (ข)

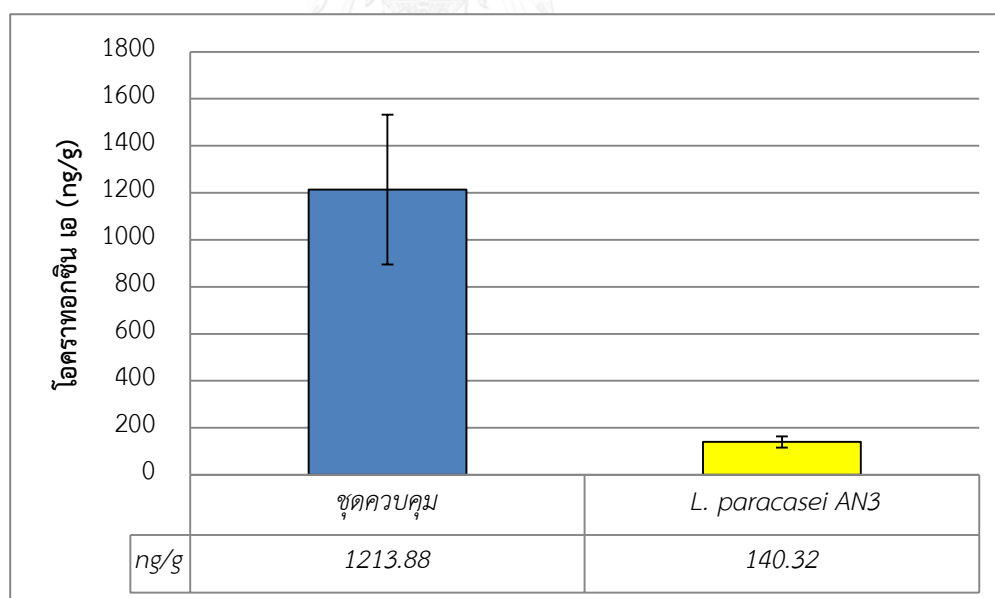


รูปที่ 4.19 กราฟแสดงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ *A. carbonarius* เมื่อเลี้ยงร่วมกับแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN 3 เทียบกับชุดควบคุม ที่ค่าความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 5 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส แสดงเส้นผ่านศูนย์กลางของราเมื่อเจริญจนเต็มพื้นที่บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ



รูปที่ 4.20 การเจริญของ *A. carbonarius* ในวันที่ 7 ที่ค่าความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 5 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เมื่อเลี้ยงร่วมกับแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 (ก) และชุดควบคุม (ข)

การทดสอบความสามารถของ *L. paracasei* AN3 ในการยับยั้งการสร้างโอคราทอกซินเอ ที่ค่าความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 3 และ 4 ในทุกอุณหภูมิไม่พบการเจริญของรา จึงไม่สามารถทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารพิษได้ ส่วนที่ค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 5 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่า *A. carbonarius* มีการเจริญได้ดีในชุดควบคุม และสามารถสร้างโอคราทอกซินเอ ได้เท่ากับ $1,213.88 \pm 318.36$ นาโนกรัมต่อกรัม แต่เมื่อเลี้ยงร่วมกับแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย พบว่ารามีการเจริญเพียงเล็กน้อยและสามารถสร้างโอคราทอกซินเอ ได้เพียง 140.32 ± 23.82 นาโนกรัมต่อกรัม คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 88.44 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 4.21) ส่วนในชุดการทดสอบที่มีค่าความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 5 อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส ในการทดลองชุดควบคุม *A. carbonarius* สามารถสร้างโอคราทอกซินเอ ได้เท่ากับ $1,067.76 \pm 229.07$ และ $2,234.45 \pm 705.65$ นาโนกรัมต่อกรัม ที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียสตามลำดับ แต่เมื่อเลี้ยงร่วมกับแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย ราไม่มีการเจริญ จึงไม่สามารถวิเคราะห์ปริมาณสารพิษจากราได้ด้วยเช่นกัน



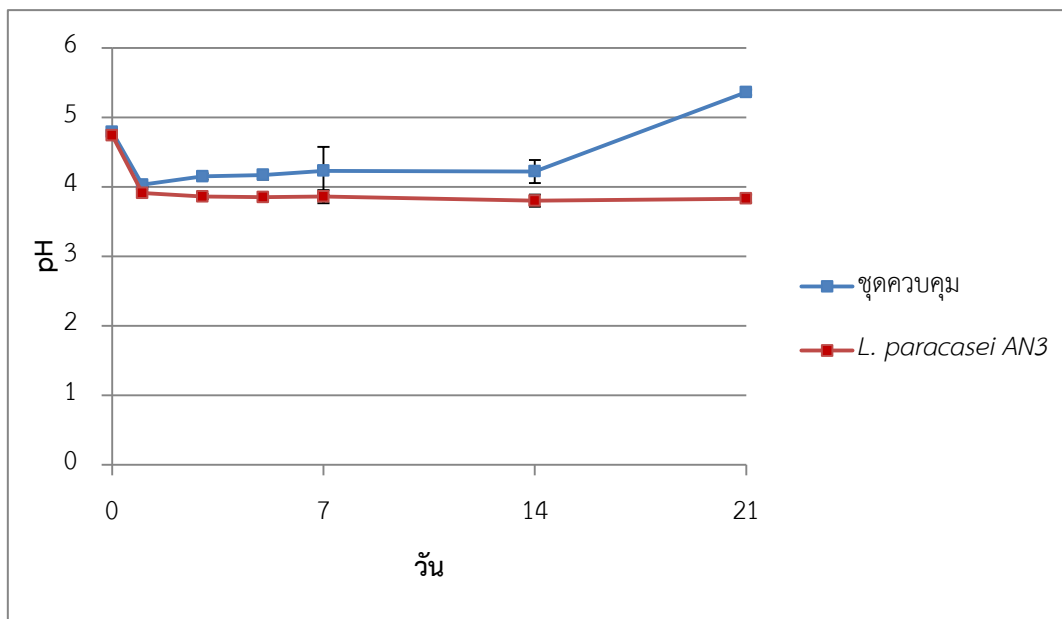
รูปที่ 4.21 กราฟแสดงผลการยับยั้งการสร้าง โอคราทอกซินเอของ *A. carbonarius* โดยแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 เทียบกับชุดควบคุม ที่ค่าความเป็นกรด-เบส 5 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

4.5 ความสามารถของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซิน ปี 1 ของ *A. flavus* ในข้าวโพดหมัก

นำข้าวโพดสับสำหรับเลี้ยงสัตว์มาทำให้ปราศจากเชื้อด้วยวิธีการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้น เติมสปอร์ราแขวนลอย 10^6 สปอร์ต่อกรัมของข้าวโพด ในชุดทดสอบเติมหัวเชื้อแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 10^7 CFU ต่อกรัมของข้าวโพด แล้วนำข้าวโพดที่ใส่เชื้อแล้ว 1 กิโลกรัม ใส่ในถุงพลาสติกนำไปหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน เทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมหัวเชื้อแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย ติดตามค่าความเป็นกรด-เบส จำนวนแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 และจำนวน *A. flavus* ในวันที่ 0, 1, 3, 5, 7, 14 และ 21 และติดตามปริมาณของอะฟลาทอกซินปี 1 ในวันที่ 0, 7, 14 และ 21 ทำการทดลอง 5 ซ้ำ โดยผลที่ได้เป็นดังนี้

4.5.1 ความเป็นกรด-เบส

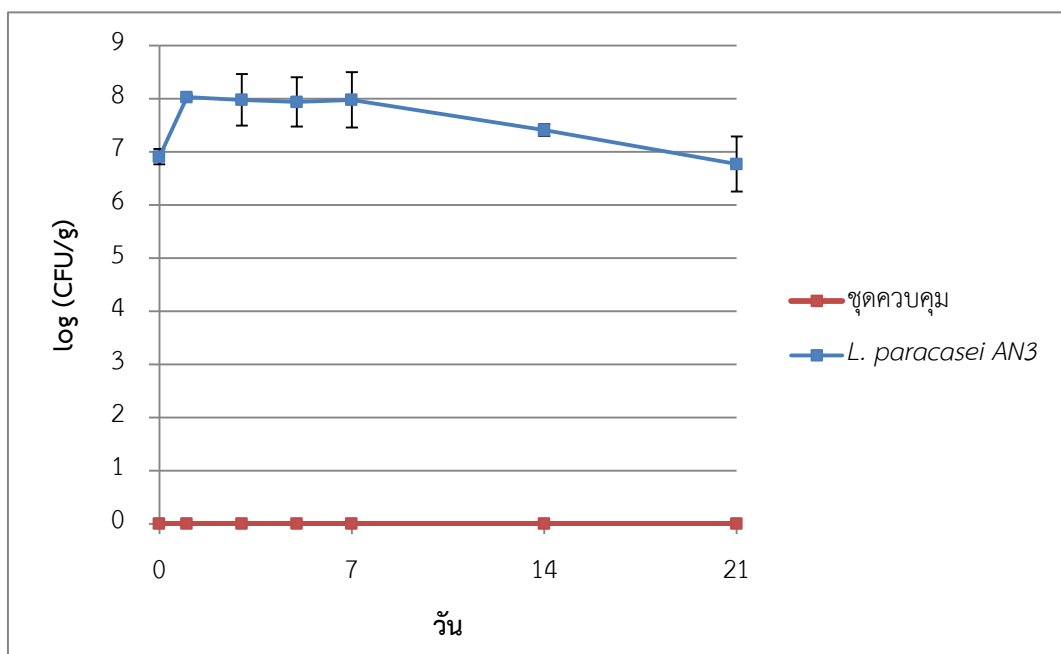
จากการนำตัวอย่างข้าวโพดปลอดเชื้อหมักเมื่อวันที่ 0, 1, 3, 5, 7, 14 และ 21 มาวัดค่าความเป็นกรด-เบส พบว่าค่าความเป็นกรด-เบสเริ่มต้นในวันที่ 0 ของชุดทดสอบที่เติมแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 และชุดควบคุมมีค่าเท่ากับ 4.74 ± 0.01 และ 4.79 ± 0.04 ตามลำดับ เมื่อเวลาผ่านไป 1 วัน ค่าความเป็นกรด-เบสในชุดทดสอบและชุดควบคุมต่างก็มีค่าลดลง เท่ากับ 3.91 ± 0.00 ในชุดทดสอบ และ 4.01 ± 0.03 ในชุดควบคุม จากนั้นมีค่าค่อนข้างคงที่จนถึงวันที่ 14 จนเมื่อหมักครบ 21 วัน ค่าความเป็นกรด-เบสของชุดทดสอบมีค่าเท่ากับ 3.83 ± 0.06 ส่วนในการทดลองชุดควบคุมมีค่าความเป็นกรด-เบสเพิ่มขึ้นเท่ากับ 5.33 ± 0.04 เมื่อวัดในวันที่ 21 ดังแสดงในรูปที่ 4.22



รูปที่ 4.22 กราฟแสดงค่าความเป็นกรด-เบสของข้าวโพดปลอดเชื้อหมักโดยแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 เทียบกับชุดควบคุม ในการทดสอบความสามารถของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 ของ *A. flavus*

4.5.2 จำนวนแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3

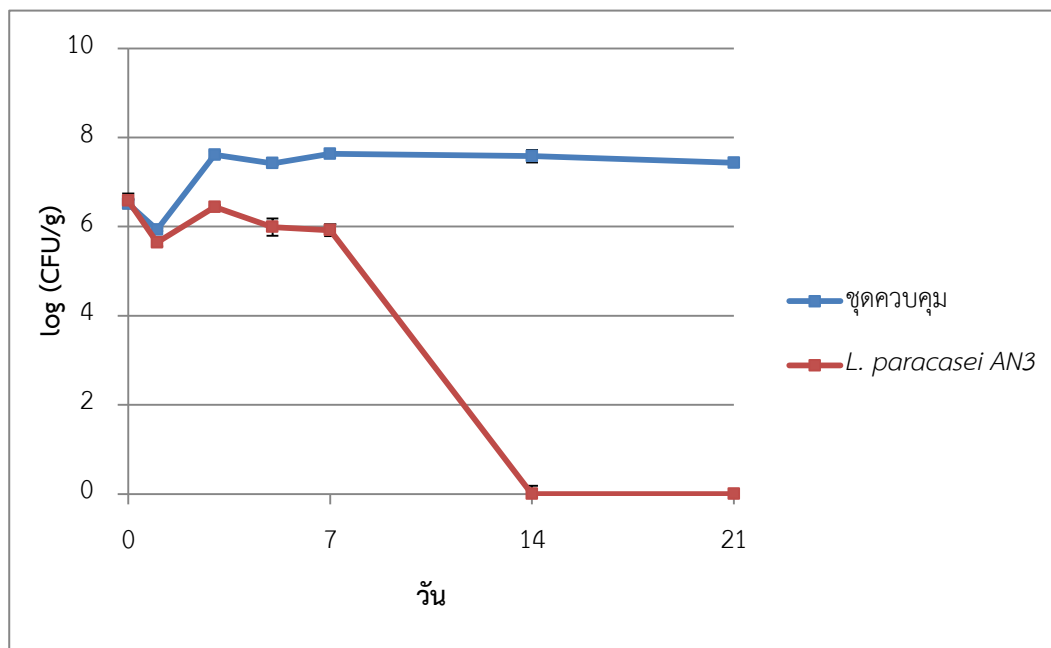
นำตัวอย่างข้าวโพดปลอดเชื้อหมัก 10 กรัม เจือจางในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำมาวิเคราะห์ปริมาณของแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ติดตามจำนวนแล็กติกแอซิดแบคทีเรียของข้าวโพดปลอดเชื้อหมักทุกวันที่ 0, 1, 3, 5, 7, 14 และ 21 วัน โดยพบว่าจำนวนแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ของข้าวโพดปลอดเชื้อหมักในชุดทดสอบ ในวันที่ 0 มีจำนวนเริ่มต้นเท่ากับ 6.91 ± 0.14 log (CFU/g) เมื่อผ่านไป 1 วัน แล็กติกแอซิดแบคทีเรียมีจำนวนเพิ่มขึ้นเป็น 8.03 ± 0.03 log (CFU/g) หลังจากนั้นจำนวนคงที่จนถึงวันที่ 14 จึงมีจำนวนลดลงเหลือ 7.41 ± 0.10 log (CFU/g) และเมื่อหมักครบ 21 วัน จำนวนแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ลดลงมีจำนวนเท่ากับ 6.77 ± 0.51 log (CFU/g) ส่วนในการทดลองชุดควบคุมไม่ได้เติมหัวเชื้อแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย ดังแสดงในรูปที่ 4.23



รูปที่ 4.23 กราฟแสดงจำนวนแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ของข้าวโพดปลอดเชื้อหมักในชุดทดสอบเทียบกับชุดควบคุม ในการทดสอบความสามารถของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 ของ *A. flavus*

4.5.3 จำนวน *A. flavus*

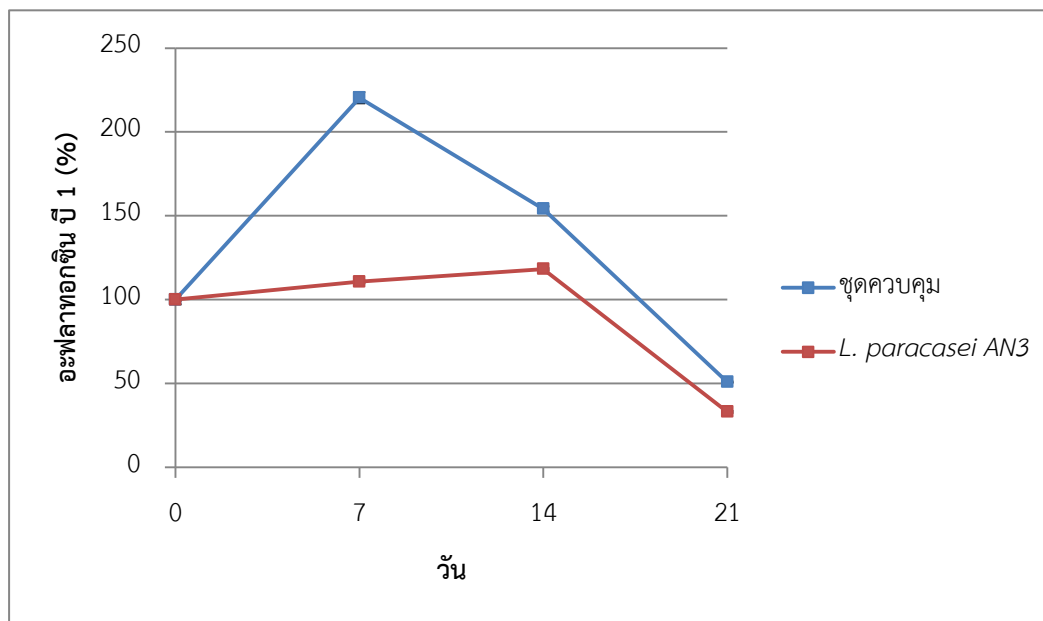
นำตัวอย่างข้าวโพดปลอดเชื้อหมัก 10 กรัม ทำการเจือจางในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำมาวิเคราะห์ปริมาณของ *A. flavus* โดยติดตามผลทุกวันที่ 0, 1, 3, 5, 7, 14 และ 21 วัน โดยพบว่าจำนวน *A. flavus* ของข้าวโพดปลอดเชื้อหมักในชุดทดสอบวันที่ 0 มีจำนวนเริ่มต้นเท่ากับ 6.58 ± 0.16 log (CFU/g) เมื่อผ่านไป 1 วัน มีจำนวนลดลงเหลือ 5.64 ± 0.08 log (CFU/g) จากนั้นมีจำนวนเพิ่มขึ้นในวันที่ 3 มีค่าเท่ากับ 6.44 ± 0.04 log (CFU/g) และลดลงอย่างต่อเนื่องจนไม่สามารถตรวจพบได้ในวันที่ 14 และ 21 ส่วนในการทดลองชุดควบคุม *A. flavus* มีจำนวนเริ่มต้นในวันที่ 0 เท่ากับ 6.51 ± 0.09 log (CFU/g) เมื่อผ่านไป 1 วัน มีจำนวนลดลงเหลือ 5.93 ± 0.03 log (CFU/g) จากนั้นมีจำนวนเพิ่มขึ้นในวันที่ 3 มีค่าเท่ากับ 7.61 ± 0.07 log (CFU/g) และมีจำนวนค่อนข้างคงที่จนเมื่อหมักครบ 21 วัน มีจำนวน *A. flavus* เท่ากับ 7.43 ± 0.03 log (CFU/g) ดังแสดงในรูปที่ 4.24



รูปที่ 4.24 กราฟแสดงจำนวน *A. flavus* ของข้าวโพดปลอดเชื้อหมักในชุดทดสอบเทียบกับชุดควบคุม ในการทดสอบความสามารถของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 ของ *A. flavus*

4.5.4 ปริมาณอะฟลาทอกซินปี 1

นำตัวอย่างข้าวโพดปลอดเชื้อหมักที่ปั่นละเอียดแล้วจำนวน 50 กรัม มาวิเคราะห์หาปริมาณอะฟลาทอกซินปี 1 ในทุกวันที่ 0, 7, 14 และ 21 ของการทดลอง โดยพบว่าปริมาณอะฟลาทอกซินปี 1 ที่ทำให้เป็นบรรทัดฐานของชุดทดสอบในวันที่ 7 ของการหมักมีค่าเพิ่มขึ้นจาก 100 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 0 เป็น 110.68 ± 0.90 เปอร์เซ็นต์ และในวันที่ 14 มีค่าเพิ่มขึ้นเป็น 118.23 ± 0.62 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อหมักครบ 21 วัน ปริมาณอะฟลาทอกซินปี 1 ลดลงเหลือเพียง 33.05 ± 0.49 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเมื่อเทียบกับชุดควบคุม ปริมาณอะฟลาทอกซินปี 1 ที่ทำให้เป็นบรรทัดฐานของชุดควบคุมในวันที่ 7 ของการหมักมีค่าเพิ่มขึ้นจาก 100 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 0 เป็น 220.39 ± 3.37 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นลดลงเหลือ 154.12 ± 1.49 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 14 และ 50.82 ± 0.32 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 21 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.25



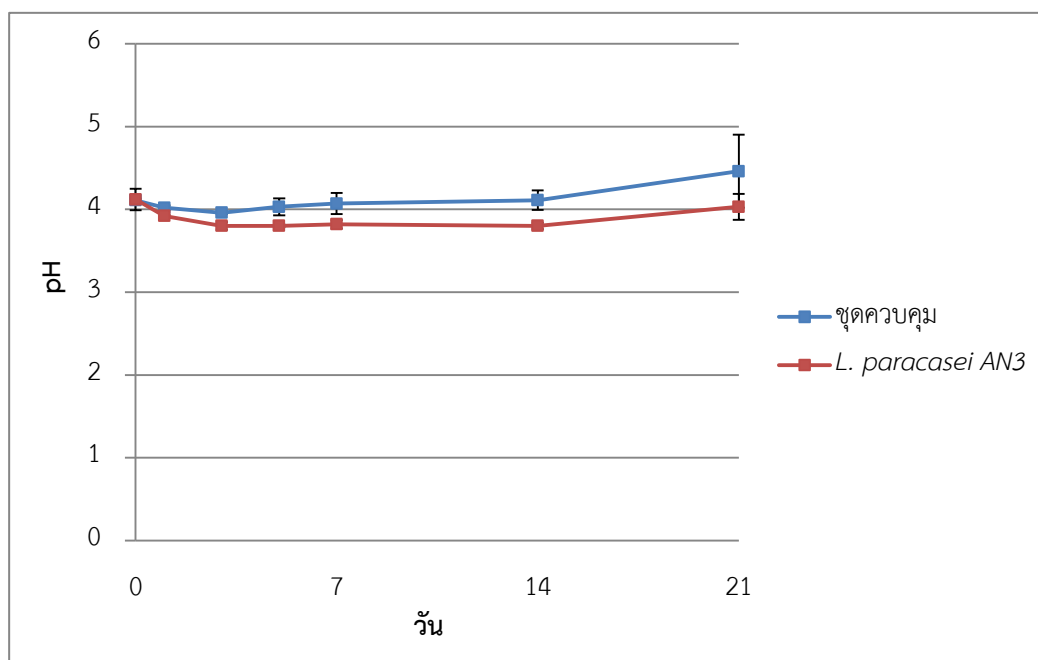
รูปที่ 4.25 กราฟแสดงปริมาณอะฟลาทอกซิน บี 1 ที่ทำให้เป็นบรรทัดฐานของข้าวโพดปลอดเชื้อหมัก ในชุดทดสอบเทียบกับชุดควบคุม ในการทดสอบความสามารถของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซิน บี 1 ของ *A. flavus*

4.6 ความสามารถของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซิน บี 1 ของ *A. flavus* ในข้าวโพดหมักร่วมกับจุลินทรีย์ชนิดอื่น

นำข้าวโพดสับสำหรับเลี้ยงสัตว์มาเติมสปอร์ราแชนลอย 10^6 สปอร์ต่อกรัมของข้าวโพด ในชุดทดสอบเติมหัวเชื้อแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 10^7 CFU ต่อกรัมของข้าวโพด แล้วนำข้าวโพดที่ใส่เชื้อแล้ว 1 กิโลกรัม ใส่ในถุงพลาสติกนำไปหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน เทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมหัวเชื้อแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย ติดตามค่าความเป็นกรด-เบส จำนวนคอลิฟอร์มแบคทีเรีย จำนวนแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 และจำนวนราทั้งหมดในวันที่ 0, 1, 3, 5, 7, 14 และ 21 และติดตามปริมาณของอะฟลาทอกซิน บี 1 ในวันที่ 0, 7, 14 และ 21 ทำการทดลอง 5 ซ้ำ โดยผลที่ได้เป็นดังนี้

4.6.1 ความเป็นกรด-เบส

จากการนำตัวอย่างข้าวโพดหมักเมื่อวันที่ 0, 1, 3, 5, 7, 14 และ 21 มาวัดค่าความเป็นกรด-เบสพบว่า ค่าความเป็นกรด-เบสเริ่มต้นในวันที่ 0 ของชุดทดสอบที่เติมแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 และชุดควบคุม มีค่าเท่ากับ 4.12 ± 0.13 และ 4.11 ± 0.02 ตามลำดับ จากนั้นมีค่าค่อนข้างคงที่จนถึงวันที่ 14 จนเมื่อหมักครบ 21 วัน ค่าความเป็นกรด-เบสของชุดทดสอบมีค่าเท่ากับ 4.03 ± 0.16 ส่วนในการทดลองชุดควบคุมมีค่าความเป็นกรด-เบสเพิ่มขึ้นเท่ากับ 4.46 ± 0.44 ดังแสดงในรูปที่ 4.26

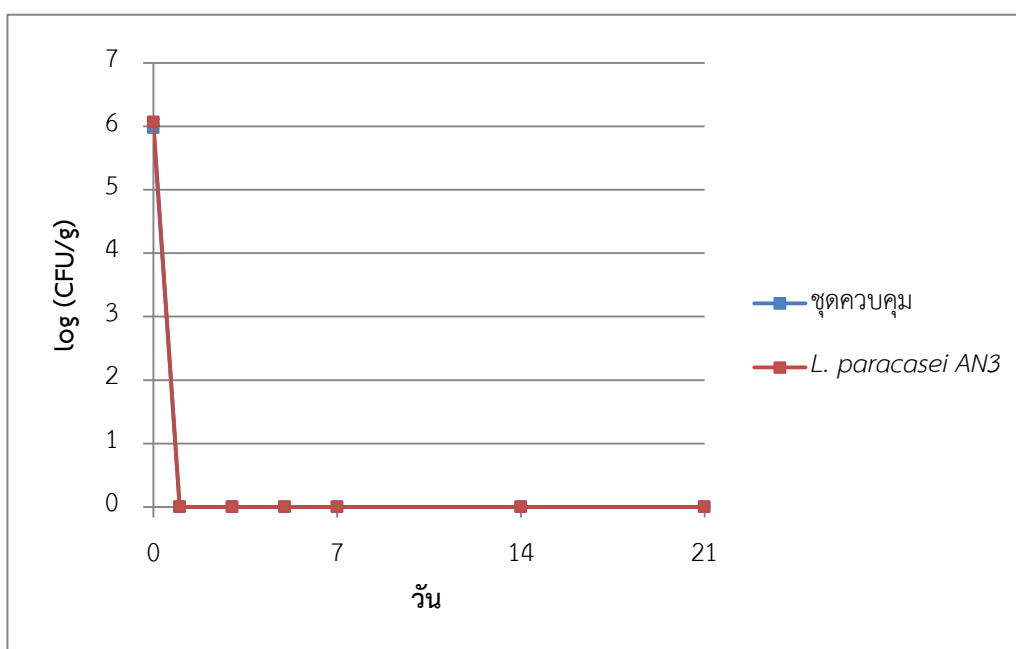


รูปที่ 4.26 กราฟแสดงค่าความเป็นกรด-เบสของข้าวโพดหมักโดยแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 เทียบกับชุดควบคุม ในการทดสอบความสามารถของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 ของ *A. flavus*

4.6.2 จำนวนคอลิฟอร์มแบคทีเรีย

นำตัวอย่างข้าวโพดหมัก 10 กรัม ทำการเจือจางในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำมาวิเคราะห์ปริมาณของคอลิฟอร์มแบคทีเรีย ติดตามจำนวนคอลิฟอร์ม

แบคทีเรียของข้าวโพดหมักทุกวันที่ 0, 1, 3, 5, 7, 14 และ 21 วัน โดยพบว่าจำนวนคอลิฟอร์มแบคทีเรียของชุดทดสอบในวันที่ 0 มีจำนวนเริ่มต้นเท่ากับ $6.06 \pm 0.05 \log$ (CFU/g) แต่เมื่อผ่านไป 1 วัน มีจำนวนลดลงจนไม่สามารถตรวจพบได้จนถึงวันที่ 21 ของการหมัก เช่นเดียวกับการทดลองในชุดควบคุมที่มีจำนวนคอลิฟอร์มแบคทีเรียเริ่มต้นในวันที่ 0 เท่ากับ $5.97 \pm 0.16 \log$ (CFU/g) และเมื่อผ่านไป 1 วัน มีจำนวนลดลงจนไม่สามารถตรวจพบได้จนถึงวันที่ 21 ของการหมักเช่นกัน ดังแสดงในรูปที่ 4.27

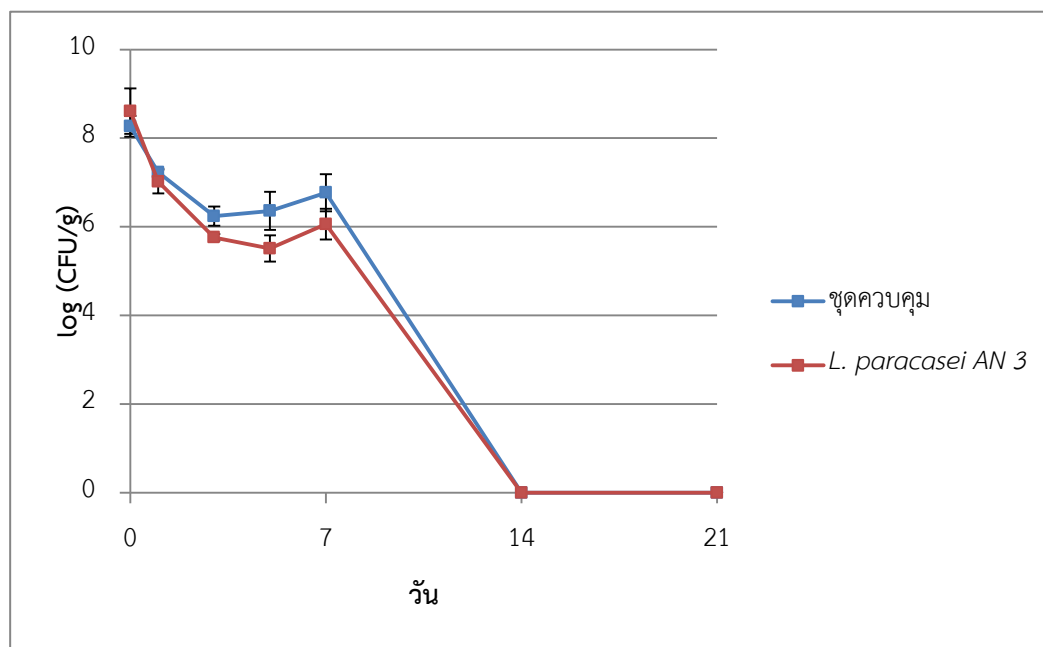


รูปที่ 4.27 กราฟแสดงจำนวนคอลิฟอร์มแบคทีเรียของข้าวโพดหมักในชุดทดสอบเทียบกับชุดควบคุมในการทดสอบความสามารถของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ของ *A. flavus*

4.6.3 จำนวนราทั้งหมด

นำตัวอย่างข้าวโพดหมัก 10 กรัม เจือจางในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำมาวิเคราะห์ปริมาณของจำนวนราทั้งหมดโดยติดตามผลทุกวันที่ 0, 1, 3, 5, 7, 14 และ 21 วัน โดยพบว่าจำนวนราทั้งหมดในข้าวโพดหมักของชุดทดสอบในวันที่ 0 มีจำนวนเริ่มต้นเท่ากับ $8.61 \pm 0.51 \log$ (CFU/g) จากนั้นมีจำนวนลดลงเรื่อย ๆ จนถึงวันที่ 7 มีจำนวนลดลงเหลือ $6.06 \pm 0.27 \log$ (CFU/g) และลดลงจนไม่สามารถตรวจพบได้ในวันที่ 14 และ 21 ของการทดลอง ส่วนในการทดลองชุดควบคุม *A. flavus* มีจำนวนเริ่มต้นในวันที่

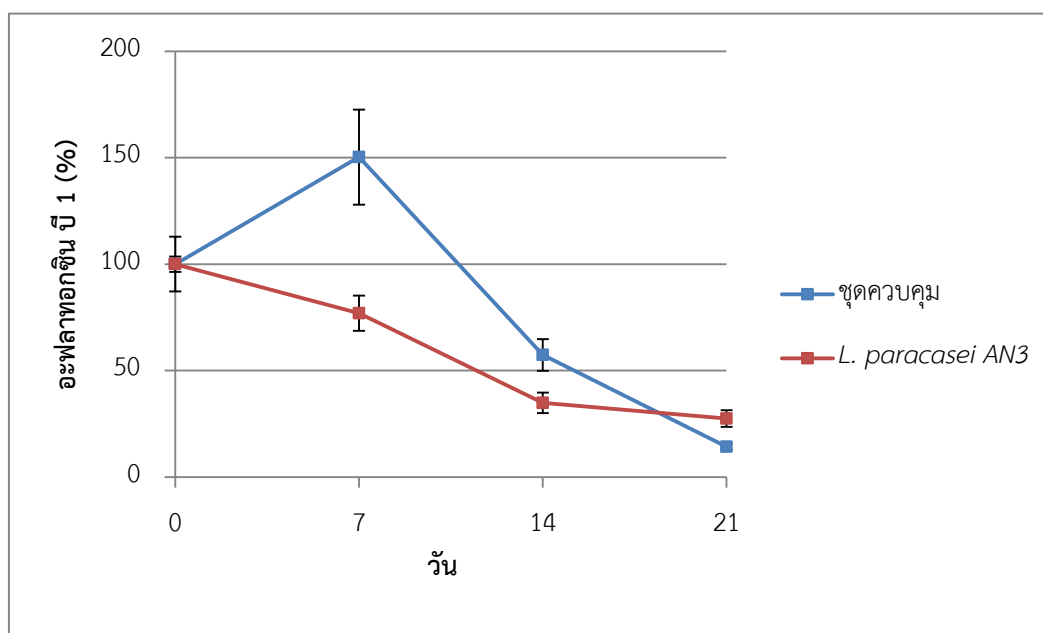
0 เท่ากับ $8.27 \pm 0.24 \log$ (CFU/g) จากนั้นมีจำนวนลดลงเรื่อย ๆ จนไม่สามารถตรวจสอบได้ในวันที่ 14 และ 21 เช่นกัน ดังแสดงในรูปที่ 4.28



รูปที่ 4.28 กราฟแสดงจำนวนราทั้งหมดของข้าวโพดหมักในชุดทดสอบเทียบกับชุดควบคุม ในการทดสอบความสามารถของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ของ *A. flavus*

4.6.4 ปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1

นำตัวอย่างข้าวโพดหมักที่ปั่นละเอียดแล้วจำนวน 50 กรัม มาวิเคราะห์หาปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 ในทุกวันที่ 0, 7, 14 และ 21 ของการทดลอง ปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 ที่ทำให้เป็นบรรทัดฐานของชุดทดสอบในวันที่ 7 ของการหมักมีค่าลดลงจาก 100 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 0 เหลือ 76.96 ± 8.23 เปอร์เซ็นต์ และในวันที่ 14 ลดลงเหลือ 34.85 ± 4.87 เปอร์เซ็นต์ เมื่อหมักครบ 21 วัน ปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 ลดลงเหลือเพียง 27.48 ± 3.94 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเมื่อเทียบกับชุดควบคุม ปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 ที่ทำให้เป็นบรรทัดฐานของชุดควบคุมในวันที่ 7 ของการหมักมีค่าเพิ่มขึ้นจาก 100 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 0 เป็น 150.27 ± 22.36 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นลดลงเหลือ 57.39 ± 7.42 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 14 และ 14.25 ± 1.43 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 21 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.29



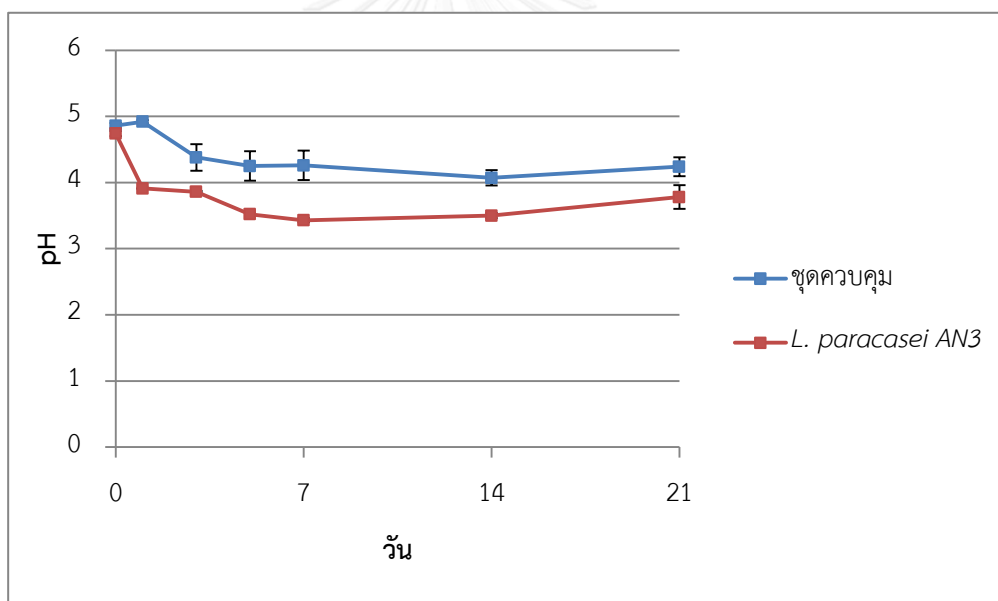
รูปที่ 4.29 กราฟแสดงปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 ที่ทำให้เป็นบรรทัดฐานของข้าวโพดหมักในชุดทดสอบเทียบกับชุดควบคุม ในการทดสอบความสามารถของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ของ *A. flavus*

4.7 ความสามารถของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญและการผลิตโอคราทอกซินเอของ *A. carbonarius* ในข้าวโพดหมัก

นำข้าวโพดสับสำหรับเลี้ยงสัตว์มาทำให้ปราศจากเชื้อด้วยวิธีอโตเคลฟ จากนั้นเติมสปอร์ราแชนลอย 10^6 สปอร์ต่อกรัมของข้าวโพด ในชุดทดสอบเติมหัวเชื้อแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 10^7 CFU ต่อกรัมของข้าวโพด แล้วนำข้าวโพดที่ใส่เชื้อแล้ว 1 กิโลกรัม ใส่ในถุงพลาสติกนำไปหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน เทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมหัวเชื้อแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย ติดตามค่าความเป็นกรด-เบส จำนวนแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 และจำนวน *A. carbonarius* ในวันที่ 0, 1, 3, 5, 7, 14 และ 21 และติดตามปริมาณของโอคราทอกซินเอ ในวันที่ 0, 7, 14 และ 21 ทำการทดลอง 5 ซ้ำ โดยผลที่ได้เป็นดังนี้

4.7.1 ความเป็นกรด-เบส

จากการนำตัวอย่างข้าวโพดปลอดเชื้อหมักเมื่อวันที่ 0, 1, 3, 5, 7, 14 และ 21 มาวัดค่าความเป็นกรด-เบส พบว่าค่าความเป็นกรด-เบสเริ่มต้นในวันที่ 0 ของชุดทดสอบที่เติมแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 และชุดควบคุมมีค่าเท่ากับ 4.74 ± 0.04 และ 4.86 ± 0.04 ตามลำดับ เมื่อผ่านไป 1 วัน ค่าความเป็นกรด-เบสในชุดทดสอบ มีค่าลดลงเป็น 3.91 ± 0.01 หลังจากนั้นแนวโน้มลดลงเรื่อย ๆ จนเมื่อหมักครบ 21 วัน ค่าความเป็นกรด-เบสของชุดทดสอบมีค่าเท่ากับ 3.78 ± 0.18 ส่วนในการทดลองชุดควบคุมมีค่าความเป็นกรด-เบสเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเป็น 4.92 ± 0.02 ในวันที่ 1 หลังจากนั้นจึงมีค่าลดลงและค่อนข้างคงที่จนถึงวันที่ 21 ของการหมัก ค่าความเป็นกรด-เบสในชุดควบคุมมีค่าเท่ากับ 4.24 ± 0.14 ดังแสดงในรูปที่ 4.30

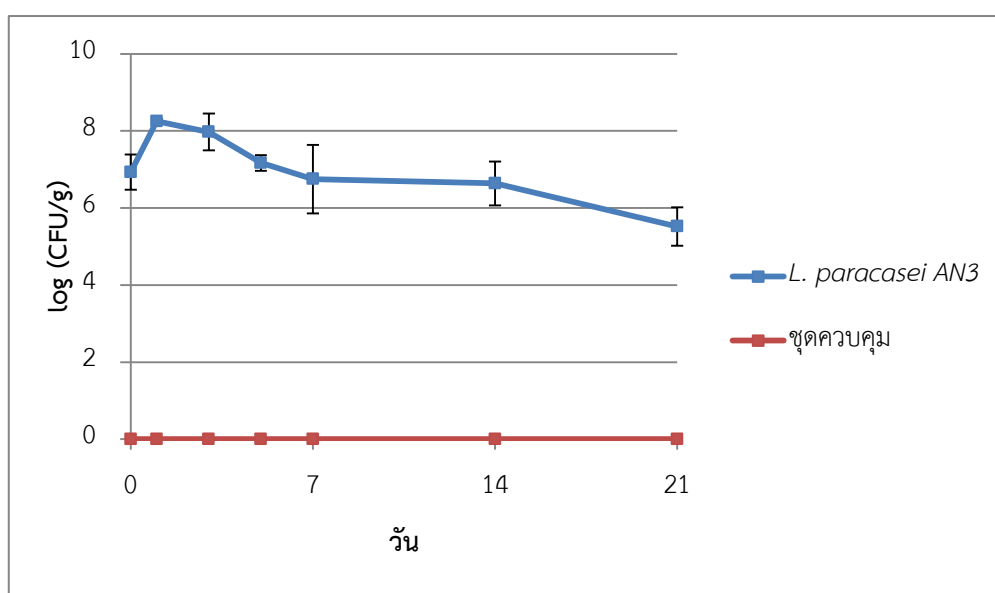


รูปที่ 4.30 กราฟแสดงค่าความเป็นกรด-เบสของข้าวโพดปลอดเชื้อหมักโดยแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 เทียบกับชุดควบคุม ในการทดสอบความสามารถของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญและการผลิตโอคราทอกซินเอของ *A. carbonarius*

4.7.2 จำนวนแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3

นำตัวอย่างข้าวโพดปลอดเชื้อหมัก 10 กรัม ทำการเจือจางในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำมาวิเคราะห์ปริมาณของแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย

L. paracasei AN3 ติดตามจำนวนแล็กติกแอซิดแบคทีเรียของข้าวโพดปลอดเชื้อหมักทุกวันที่ 0, 1, 3, 5, 7, 14 และ 21 วัน โดยพบว่าจำนวนแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ของข้าวโพดปลอดเชื้อหมักในชุดทดสอบ ในวันที่ 0 มีจำนวนเริ่มต้นเท่ากับ 6.93 ± 0.45 log (CFU/g) เมื่อผ่านไป 1 วัน แล็กติกแอซิดแบคทีเรียมีจำนวนเพิ่มขึ้นเป็น 8.25 ± 0.06 log (CFU/g) หลังจากนั้นจำนวนลดลงเรื่อยๆ จนเมื่อหมักครบ 21 วัน จำนวนแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ลดลงมีจำนวนเท่ากับ 5.52 ± 0.49 log (CFU/g) ส่วนในการทดลองชุดควบคุม ไม่ได้เติมหัวเชื้อแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย ดังแสดงในรูปที่ 4.31

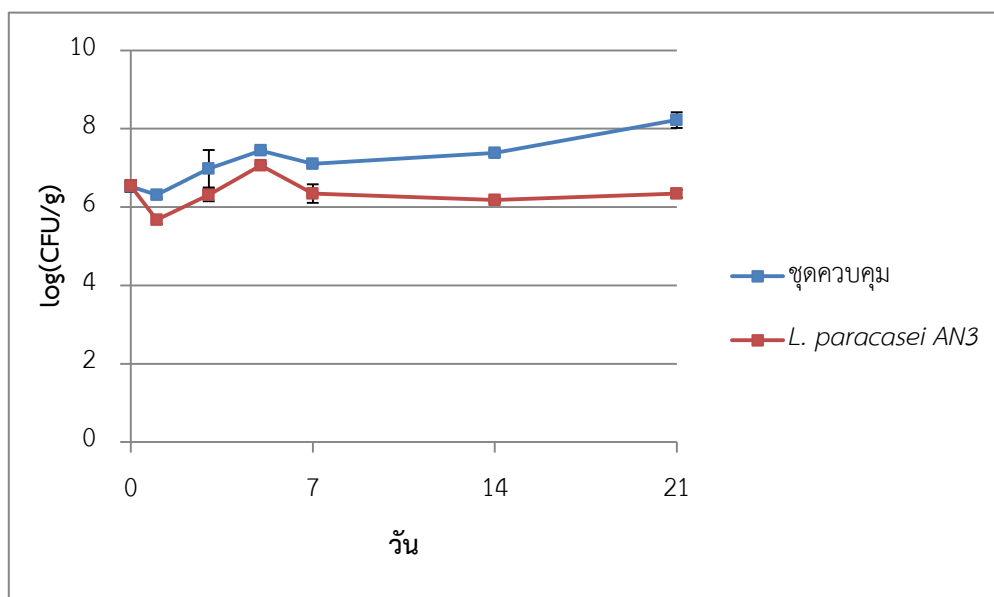


รูปที่ 4.31 กราฟแสดงจำนวนแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ของข้าวโพดปลอดเชื้อหมักในชุดทดสอบเทียบกับชุดควบคุม ในการทดสอบความสามารถของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญและการผลิตโอคราทอกซินเอของ *A. carbonarius*

4.7.3 จำนวน *A. carbonarius*

นำตัวอย่างข้าวโพดปลอดเชื้อหมัก 10 กรัม เจือจางในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำมาวิเคราะห์ปริมาณของ *A. carbonarius* โดยติดตามผลทุกวันที่ 0, 1, 3, 5, 7, 14 และ 21 วัน โดยพบว่าจำนวน *A. carbonarius* ของข้าวโพดปลอดเชื้อหมักในชุดทดสอบวันที่ 0 มีจำนวนเริ่มต้นเท่ากับ 6.54 ± 0.15 log (CFU/g) เมื่อผ่านไป 1 วัน มีจำนวนลดลงเหลือ 5.67 ± 0.10 log (CFU/g) จากนั้นมีจำนวนเพิ่มขึ้นจนถึงวันที่ 5 มีจำนวนเท่ากับ 7.06 ± 0.04 log (CFU/g) และลดลงอีกครั้งจนเมื่อหมักครบ 21 วัน *A. carbonarius*

มีจำนวนเท่ากับ $6.34 \pm 0.10 \log$ (CFU/g) ส่วนในการทดลองชุดควบคุม *A. carbonarius* มีจำนวนเริ่มต้นในวันที่ 0 เท่ากับ $6.52 \pm 0.12 \log$ (CFU/g) เมื่อผ่านไป 1 วัน มีจำนวนลดลงเหลือ $6.31 \pm 0.09 \log$ (CFU/g) จากนั้นมีจำนวนเพิ่มขึ้นเรื่อยๆจนเมื่อหมักครบ 21 วัน มีจำนวน *A. carbonarius* เท่ากับ $8.22 \pm 0.20 \log$ (CFU/g) ดังแสดงในรูปที่ 4.32

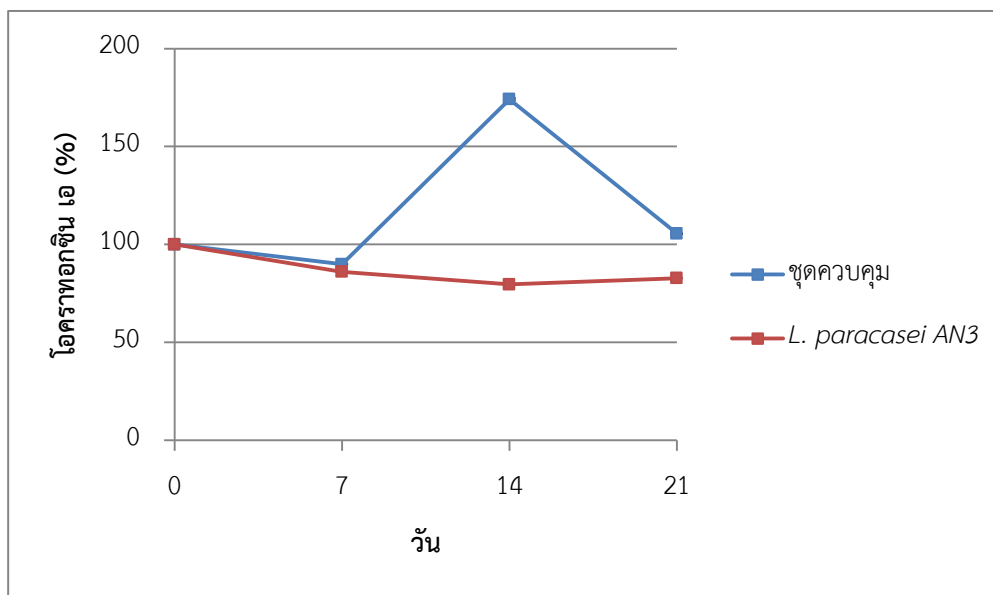


รูปที่ 4.32 กราฟแสดงจำนวน *A. carbonarius* ของข้าวโพดปลอดเชื้อหมักในชุดทดสอบเทียบกับชุดควบคุม ในการทดสอบความสามารถของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญและการผลิตโอคราทอกซินเอของ *A. carbonarius*

4.7.4 ปริมาณโอคราทอกซินเอ

นำตัวอย่างข้าวโพดปลอดเชื้อหมักที่ปั่นละเอียดแล้วจำนวน 50 กรัม มาวิเคราะห์หาปริมาณโอคราทอกซินเอ ในทุกวันที่ 0, 7, 14 และ 21 ของการทดลอง โดยพบว่าปริมาณโอคราทอกซินเอ ที่ทำให้เป็นบรรทัดฐานของชุดทดสอบในวันที่ 7 ของการหมักมีค่าลดลงจาก 100 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 0 เป็น 86.02 ± 0.03 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นมีปริมาณลดลงเรื่อยๆจนเมื่อหมักครบ 21 วัน ปริมาณโอคราทอกซินเอ ลดลงจากวันที่ 0 มีค่าเท่ากับ 82.80 ± 0.01 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเมื่อเทียบกับชุดควบคุม ปริมาณโอคราทอกซินเอ ที่ทำให้เป็นบรรทัดฐานของชุดควบคุมในวันที่ 7 ของการหมักมีค่าลดลงจาก 100 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 0 เป็น 89.89 ± 0.03 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นเพิ่มขึ้นในวันที่ 14 มีค่าเท่ากับ 174.16 ± 0.57 เปอร์เซ็นต์

และเมื่อหมักครบ 21 วัน ปริมาณโอคราทอกซินเอ เพิ่มขึ้นจากวันที่ 0 มีค่าเท่ากับ 105.62 ± 0.08 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในรูปที่ 4.33



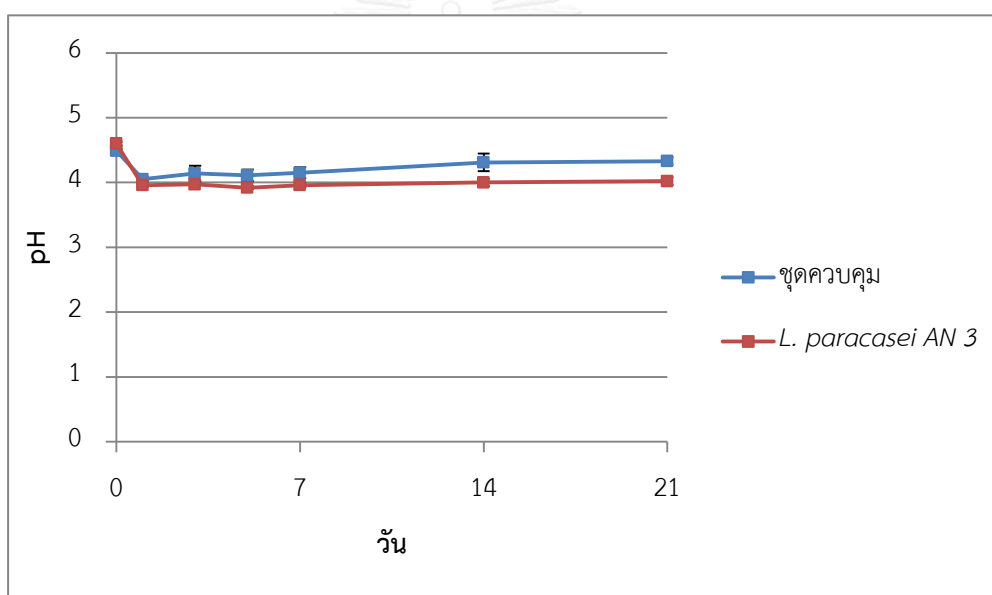
รูปที่ 4.33 กราฟแสดงปริมาณโอคราทอกซินเอ ที่ทำให้เป็นบรรทัดฐานของข้าวโพดปลอดเชื้อหมักในชุดทดสอบเทียบกับชุดควบคุม ในการทดสอบความสามารถของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญและการผลิตโอคราทอกซินเอของ *A. carbonarius*

4.8 ความสามารถของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญและการผลิตโอคราทอกซินเอของ *A. carbonarius* ในข้าวโพดหมักร่วมกับจุลินทรีย์ชนิดอื่น

นำข้าวโพดสับสำหรับเลี้ยงสัตว์มาเติมสปอร์ราแขวนลอย 10^6 สปอร์ต่อกรัมของข้าวโพด ในชุดทดสอบเติมหัวเชื้อแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 10^7 CFU ต่อกรัมของข้าวโพด แล้วนำข้าวโพดที่ใส่เชื้อแล้ว 1 กิโลกรัม ใส่ในถุงพลาสติกนำไปหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน เทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมหัวเชื้อแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย ติดตามค่าความเป็นกรด-เบส จำนวนคอลิฟอร์มแบคทีเรีย จำนวนแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 และจำนวน *A. carbonarius* ในวันที่ 0, 1, 3, 5, 7, 14 และ 21 และติดตามปริมาณของโอคราทอกซินเอ ในวันที่ 0, 7, 14 และ 21 ทำการทดลอง 5 ซ้ำ โดยผลที่ได้เป็นดังนี้

4.8.1 ความเป็นกรด-เบส

จากการนำตัวอย่างข้าวโพดหมักเมื่อวันที่ 0, 1, 3, 5, 7, 14 และ 21 มาวัดค่าความเป็นกรด-เบสพบว่า ค่าความเป็นกรด-เบสเริ่มต้นในวันที่ 0 ของชุดทดสอบที่เติมแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 และชุดควบคุม มีค่าเท่ากับ 4.60 ± 0.03 และ 4.49 ± 0.02 ตามลำดับ เมื่อผ่านไป 1 วัน ต่างก็มีค่าลดลงเท่ากับ 3.96 ± 0.03 ในชุดทดสอบ และ 4.05 ± 0.03 ในชุดควบคุม จากนั้นค่าความเป็นกรด-เบส ในชุดทดสอบมีค่าค่อนข้างคงที่จนถึงวันที่ 21 ของการหมัก มีค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 4.02 ± 0.06 ส่วนในการทดลองชุดควบคุมมีค่าความเป็นกรด-เบสเพิ่มขึ้นเรื่อยๆจนเมื่อหมักครบ 21 วัน มีค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 4.33 ± 0.06 ดังแสดงในรูปที่ 4.34

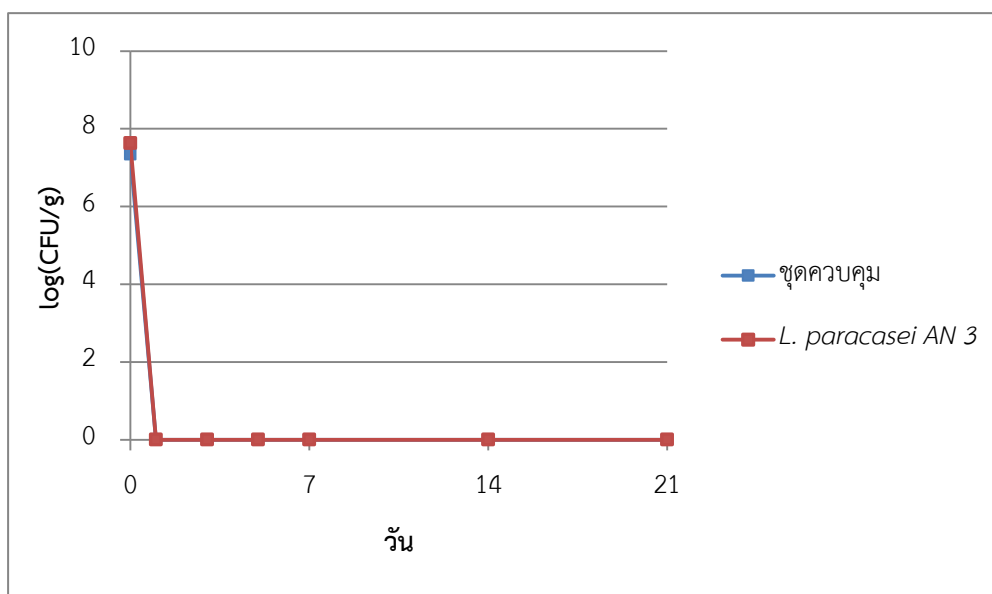


รูปที่ 4.34 กราฟแสดงค่าความเป็นกรด-เบสของข้าวโพดหมักโดยแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 เทียบกับชุดควบคุม ในการทดสอบความสามารถของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญและการผลิตโอคราทอกซินเอของ *A. carbonarius*

4.8.2 จำนวนคอลิฟอร์มแบคทีเรีย

นำตัวอย่างข้าวโพดหมัก 10 กรัม เจือจางในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำมาวิเคราะห์ปริมาณของคอลิฟอร์มแบคทีเรีย ติดตามจำนวนคอลิฟอร์ม

แบคทีเรียของข้าวโพดหมักทุกวันที่ 0, 1, 3, 5, 7, 14 และ 21 วัน โดยพบว่าจำนวนคอลิฟอร์มแบคทีเรียของชุดทดสอบในวันที่ 0 มีจำนวนเริ่มต้นเท่ากับ $7.62 \pm 0.02 \log$ (CFU/g) แต่เมื่อผ่านไป 1 วัน มีจำนวนลดลงจนไม่สามารถตรวจพบได้จนถึงวันที่ 21 ของการหมัก เช่นเดียวกับการทดลองในชุดควบคุมที่มีจำนวนคอลิฟอร์มแบคทีเรียเริ่มต้นในวันที่ 0 เท่ากับ $7.33 \pm 0.04 \log$ (CFU/g) และเมื่อผ่านไป 1 วัน มีจำนวนลดลงจนไม่สามารถตรวจพบได้จนถึงวันที่ 21 ของการหมักเช่นกัน ดังแสดงในรูปที่ 4.35

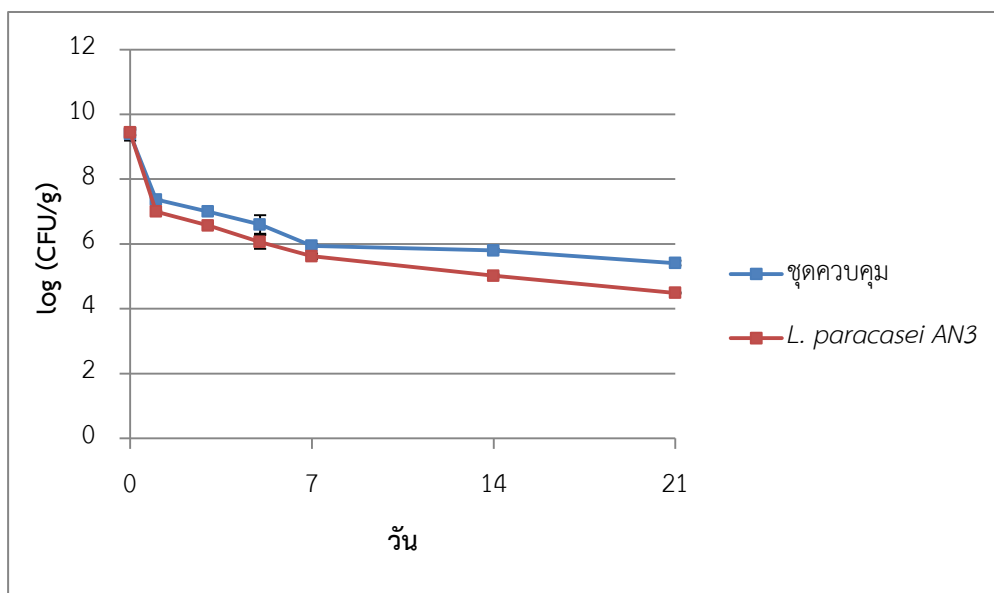


รูปที่ 4.35 กราฟแสดงจำนวนคอลิฟอร์มแบคทีเรียของข้าวโพดหมักในชุดทดสอบเทียบกับชุดควบคุมในการทดสอบความสามารถของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญและการผลิตโอคราทอกซินเอของ *A. carbonarius*

4.8.3 จำนวนราทั้งหมด

นำตัวอย่างข้าวโพดหมัก 10 กรัม เจือจางในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำมาวิเคราะห์ปริมาณของจำนวนราทั้งหมดโดยติดตามผลทุกวันที่ 0, 1, 3, 5, 7, 14 และ 21 วัน โดยพบว่าจำนวนราทั้งหมดในข้าวโพดหมักของชุดทดสอบในวันที่ 0 มีจำนวนเริ่มต้นเท่ากับ $9.44 \pm 0.08 \log$ (CFU/g) จากนั้นมีจำนวนลดลงเรื่อย ๆ จนเมื่อหมักครบ 21 วันมีจำนวนลดลงเหลือ $4.49 \pm 0.02 \log$ (CFU/g) เช่นเดียวกับในการทดลองชุด

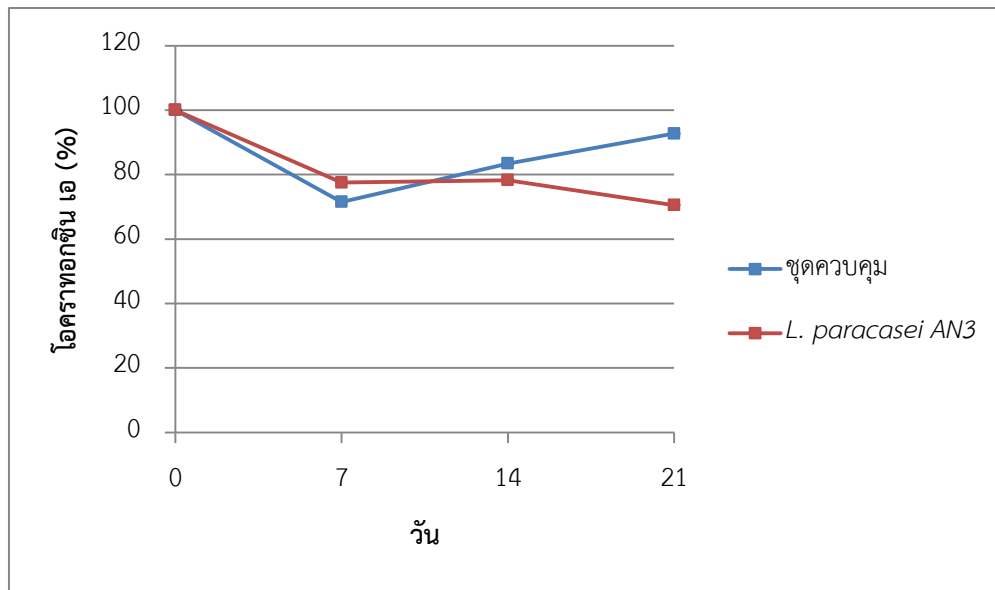
ควบคุมจำนวนราทั้งหมดมีจำนวนเริ่มต้นในวันที่ 0 เท่ากับ 9.39 ± 0.20 log (CFU/g) จากนั้นมีจำนวนลดลงเรื่อย ๆ จนเมื่อหมักครบ 21 วัน มีจำนวนลดลงเหลือ 5.41 ± 0.07 log (CFU/g) ดังแสดงในรูปที่ 4.36



รูปที่ 4.36 กราฟแสดงจำนวนราทั้งหมดของข้าวโพดหมักในชุดทดสอบเทียบกับชุดควบคุม ในการทดสอบความสามารถของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญและการผลิตโอคราทอกซินเอของ *A. carbonarius*

4.8.4 ปริมาณโอคราทอกซินเอ

นำตัวอย่างข้าวโพดหมักที่ปั่นละเอียดแล้วจำนวน 50 กรัม มาวิเคราะห์หาปริมาณโอคราทอกซินเอ ในทุกวันที่ 0, 7, 14 และ 21 ของการทดลอง ปริมาณโอคราทอกซินเอ ที่ทำให้เป็นบรรทัดฐานของชุดทดสอบในวันที่ 7 ของการหมักมีค่าลดลงจาก 100 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 0 เหลือ 76.96 ± 0.03 เปอร์เซ็นต์ และในวันที่ 14 ลดลงเหลือ 34.85 ± 0.06 เปอร์เซ็นต์ เมื่อหมักครบ 21 วัน ปริมาณโอคราทอกซินเอ ลดลงเหลือเพียง 27.48 ± 0.02 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเมื่อเทียบกับชุดควบคุม ปริมาณโอคราทอกซินเอ ที่ทำให้เป็นบรรทัดฐานของชุดควบคุมในวันที่ 7 ของการหมักมีค่าลดลงจาก 100 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 0 เป็น 71.15 ± 0.02 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นมีค่าเพิ่มขึ้นเป็น 83.44 ± 0.04 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 14 และ 92.72 ± 0.14 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 21 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.37



รูปที่ 4.37 กราฟแสดงปริมาณโอคราทอกซินเอ ที่ทำให้เป็นบรรทัดฐานของข้าวโพดหมักในชุดทดสอบเทียบกับชุดควบคุม ในการทดสอบความสามารถของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญและการผลิตโอคราทอกซินเอของ *A. carbonarius*

4.9 ผลของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียต่อคุณค่าทางโภชนาของข้าวโพดหมัก

นำข้าวโพดสับสำหรับเลี้ยงสัตว์ ปริมาณ 1 กิโลกรัม เติมหัวเชื้อแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 จำนวน 10^7 CFU ต่อกรัมของข้าวโพด ใส่ในถุงพลาสติก ไล่อากาศแล้วมัดให้แน่น นำไปหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เมื่อหมักได้นาน 0, 7, 14 และ 21 วัน ส่งวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาของข้าวโพดหมักได้แก่ ความเป็นกรด-เบส, ความชื้น, วัตถุแห้ง, เถ้า, โปรตีนรวม, ไขมัน, เยื่อใยรวม, พลังงานรวม, แคลเซียมและฟอสฟอรัส และวิเคราะห์ผนังเซลล์พืชในรูปของ Neutral detergent fiber (NDF) และ Acid detergent fiber (ADF) จากผลการทดสอบพบว่าเมื่อหมักได้ 7, 14 และ 21 วัน โภชนาข้าวโพดหมักในชุดทดสอบที่เติมหัวเชื้อแล็กติกแอซิดแบคทีเรียมีค่าใกล้เคียงกันเมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมหัวเชื้อแล็กติกแอซิดแบคทีเรียและข้าวโพดสด ดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 คุณค่าทางโภชนาของข้าวโพดหมักในวันที่ 7, 14 และ 21 เทียบกับชุดควบคุมและข้าวโพดสด

โภชนา (เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักแห้ง)	ตัวอย่าง						
	ข้าวโพดสด	วันที่ 7		วันที่ 14		วันที่ 21	
		ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ	ชุด ควบคุม	ชุด ทดสอบ	ชุด ควบคุม	ชุด ทดสอบ
วัตถุแห้ง	23.38	20.58	17.84	20.96	18.46	19.25	19.21
โปรตีน	8.38	8.31	10.53	8.31	10.35	9.09	9.21
ไขมัน	2.23	3.01	3.42	3.29	3.14	3.17	3.54
เยื่อใย	26.30	30.81	29.54	29.96	29.53	30.39	30.92
เถ้า	6.63	7.24	7.17	7.49	7.04	7.84	7.08
NDF	63.31	68.07	65.59	69.03	68.52	66.38	65.80
ADF	33.79	36.54	37.63	39.60	37.00	38.49	36.90
แคลเซียม	0.39	0.30	0.46	0.48	0.47	0.48	0.44
ฟอสฟอรัส	0.21	0.26	0.25	0.27	0.21	0.29	0.23
พลังงาน (Cal/gDM)	3,962.02	3,993.20	3,828.42	3,988.45	3,967.28	3,954.18	3,968.30

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

แล็กติกแอซิดแบคทีเรีย เป็นจุลินทรีย์ที่นิยมใช้เป็นหัวเชื้อตั้งต้นในอุตสาหกรรมอาหารหลากหลายประเภท เช่น อุตสาหกรรมอาหารหมักดอง อุตสาหกรรมนมและผลิตภัณฑ์ที่เกี่ยวข้อง รวมถึงอุตสาหกรรมเครื่องดื่มประเภทเบียร์และไวน์ เป็นต้น นอกจากนี้ในส่วนของปศุสัตว์ยังพบว่าแล็กติกแอซิดแบคทีเรียสามารถทำให้เกิดกระบวนการหมักในพืช ทำให้สามารถเก็บรักษาพืชอาหารสัตว์ให้อยู่ในรูปของพืชหมัก โดยแล็กติกแอซิดแบคทีเรียจะผลิตเมแทบอลิต์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์อื่นที่ทำให้เกิดการเน่าเสีย ด้วยเหตุนี้แล็กติกแอซิดแบคทีเรียจึงมีความสามารถในการใช้เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพ มีศักยภาพที่จะนำมาใช้ในการควบคุมการเจริญและการผลิตสารพิษจากราในพืชหมักได้

ในการทดลองนี้ได้ศึกษาความสามารถของแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. casei* AN2, *L. paracasei* AN3 และ *L. casei* AN2 ร่วมกับ *L. paracasei* AN3 ในการยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 ของ *A. flavus* และ โอคราทอกซินเอของ *A. carbonarius* โดยพบว่าในการทดสอบความสามารถของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษจากราบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ แล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 มีความสามารถสูงที่สุดในการยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษจากราที่ใช้ทดสอบ เมื่อเทียบกับ *L. casei* AN2 และ *L. casei* AN2 ร่วมกับ *L. paracasei* AN3 โดยเมื่อเลี้ยง *A. flavus* ร่วมกับแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย พบว่าเราสามารถเจริญได้เพียงเล็กน้อย จำกัดวงอยู่เฉพาะในบริเวณที่หยดสปอร์เท่านั้น ลักษณะการเจริญเป็นเพียงสายราสีขาว และไม่มีการสร้างสปอร์ ซึ่งมีผลทำให้ตรวจไม่พบอะฟลาทอกซินปี 1 เมื่อเลี้ยงร่วมกับ *L. paracasei* AN3 ในขณะที่เมื่อเลี้ยงร่วมกับ *L. casei* AN2 หรือ *L. casei* AN2 ร่วมกับ *L. paracasei* AN3 พบว่า *A. flavus* สามารถผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 ได้ลดลง 99.99 เปอร์เซ็นต์ ในส่วนของการยับยั้งการเจริญและการผลิตโอคราทอกซินเอของ *A. carbonarius* พบว่า เมื่อเลี้ยงร่วมกับแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย โคโลนีของรามีขนาดเล็กกว่าเมื่อเทียบกับชุดควบคุม ลักษณะการเจริญของราเมื่อเลี้ยงร่วมกับแล็กติกแอซิดแบคทีเรียมีการสร้างเส้นใยเจริญขึ้นไปด้านบนมาก และสร้างสปอร์ได้เพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับชุดควบคุม นอกจากนี้เมื่อติดตามผลการยับยั้งการผลิตโอครา

ทอกซินเอ พบว่าเมื่อเลี้ยง *A. carbonarius* ร่วมกับแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 สามารถผลิตโอคราทอกซินเอ ได้น้อยลง 97.56 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เมื่อเลี้ยงร่วมกับ *L. casei* AN2 และ *L. casei* AN2 ร่วมกับ *L. paracasei* AN3 พบว่า *A. carbonarius* สามารถผลิตโอคราทอกซินเอ ได้ลดลง 95.89 เปอร์เซ็นต์ และ 96.67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานผลการวิจัยอื่นที่เกี่ยวข้องกับความสามารถของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษจากรา เช่นการรายงานของ Chang และ Kim (2007) ที่รายงานถึงความสามารถของ *L. casei* KC-324 ในการยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินของ *A. flavus* โดยพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของสายใยราได้ 34.4 เปอร์เซ็นต์ และสามารถลดการผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 ได้ 99.2 เปอร์เซ็นต์ Gomah และคณะ (2010) รายงานถึงความสามารถของ *L. paracasei* LMG13552 โดยพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 ของ *A. flavus* ได้ 85 เปอร์เซ็นต์ Dogi และคณะ (2013) รายงานความสามารถของ *L. rhamnosus* RC007 และ *L. plantarum* RC009 พบว่าแล็กติกแอซิดแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์สามารถยับยั้งการเจริญของ *F. graminearum* และ *A. parasiticus* รวมถึงสามารถลดการผลิตซีราลีโนนและอะฟลาทอกซินปี 1 ได้ Ngang และคณะ (2014) ศึกษาความสามารถของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียจำนวน 13 สายพันธุ์ในการยับยั้งการเจริญของ *A. carbonarius* พบว่าแล็กติกแอซิดแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *A. carbonarius* อยู่ระหว่าง 15-35 เปอร์เซ็นต์ Abrunhosa และคณะ (2014) ศึกษาความสามารถของแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *P. pavulus* ที่คัดแยกได้จากไวน์ พบว่ามีความสามารถในการลดปริมาณของโอคราทอกซินเอ ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวได้ 50 เปอร์เซ็นต์ และ 90 เปอร์เซ็นต์ เมื่อผ่านไป 6 และ 19 ชั่วโมงตามลำดับ

ในการยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษจากรานั้นพบว่าแล็กติกแอซิดแบคทีเรียมีกลไกที่สามารถยับยั้งการเจริญของรา เช่น การแย่งสารอาหาร การผลิตกรดอินทรีย์ และการผลิตเมแทบอลิต์อื่นที่มีฤทธิ์ต้านหรือยับยั้งการเจริญของรา และบางชนิดยังมีผลต่อการสร้างสารพิษจากรา นอกจากนี้ ยังพบว่าผนังเซลล์ของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียยังสามารถดูดซับสารพิษจากราทำให้ช่วยลดการปนเปื้อนของสารพิษในอาหารได้เช่นเดียวกัน (Holzer และคณะ, 2003) Coallier-Aschah และ Idziak (1985) รายงานว่าแล็กติกแอซิดแบคทีเรียสามารถผลิตเมแทบอลิต์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำและทนความร้อนที่สามารถยับยั้งการผลิตสารพิษจากราที่ใช้ทดสอบได้ เช่นเดียวกับ

Gournama และ Bullerman (1995) ที่รายงานว่าแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในสกุล *Lactobacillus* ผลิตเมแทบอลิต์ที่มีน้ำหนักรวมโมเลกุลต่ำที่สามารถยับยั้งการสังเคราะห์สารพิษจากราได้ Batish และคณะ (1997) รายงานว่าแล็กติกแอซิดแบคทีเรียสามารถผลิตเมแทบอลิต์ได้กรดอินทรีย์หลายชนิด เช่น กรดแล็กติก กรดอะซิติก และกรดโพรพิโอนิก เป็นต้น ซึ่งกรดอินทรีย์เหล่านี้สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่นโดยจะออกฤทธิ์บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้สามารถยับยั้งการเจริญหรือทำให้เซลล์อื่นตายได้ Magnusson และ Schnurer (2001) รายงานว่าแล็กติกแอซิดแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากพืชหมักสามารถผลิตเมแทบอลิต์ ประเภทโปรตีนขนาดเล็กที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของราได้หลายชนิด นอกจากนี้ยังมีเมแทบอลิต์อื่นที่ผลิตโดยแล็กติกแอซิดแบคทีเรียที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญและบางชนิดมีผลต่อการผลิตสารพิษจากรา เช่น ไซคลิกไดเพปไทด์ กรดไขมัน สารประกอบฟีนอลิก และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เป็นต้น (Strom และคณะ, 2002, Ponts และคณะ, 2006, Mandal และคณะ, 2007, Black และคณะ, 2013)

จากผลการทดสอบความสามารถของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญและการสังเคราะห์สารพิษจากราในงานอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า *L. paracasei* AN3 มีความสามารถสูงสุดในการยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษจากราที่ใช้ทดสอบ จึงเลือกใช้ *L. paracasei* AN3 ในการทดลองขั้นต่อไป โดยศึกษาผลของอุณหภูมิและค่าความเป็นกรด-เบสต่อความสามารถของ *L. paracasei* AN3 ในการยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 ของ *A. flavus* และโอคราทอกซินเอของ *A. carbonarius* โดยปรับค่าความเป็นกรด-เบสของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เท่ากับ 3, 4 และ 5 ก่อนลงหัวเชื้อแบคทีเรีย และแต่ละค่าความเป็นกรด-เบส บ่มที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่าที่ค่าความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 3 และ 4 ในทุกอุณหภูมิที่แปรผัน *A. flavus* ไม่สามารถเจริญได้แม้ในชุดควบคุม แต่ที่ค่าความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 5 ที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส *A. flavus* สามารถเจริญได้ดีในชุดควบคุมโดยโคโลนีมีขนาดใหญ่ขึ้นตามเวลาที่บ่ม แต่ไม่พบการเจริญของราเมื่อเลี้ยงร่วมกับแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย ดังนั้นจึงไม่สามารถวิเคราะห์สารพิษจากราได้ด้วยเช่นกัน ในส่วนผลของอุณหภูมิและค่าความเป็นกรด-เบสต่อการยับยั้งการเจริญและการผลิตโอคราทอกซินเอของ *A. carbonarius* พบว่าผลการทดลองเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับชุดการทดลองที่ใช้ *A. flavus* โดยพบว่าที่ค่าความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 3 และ 4 ในทุกอุณหภูมิที่แปรผัน *A. carbonarius* ไม่สามารถเจริญได้แม้ในชุดควบคุม

แต่ที่ค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 5 ที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส *A. carbonarius* สามารถเจริญได้ดีในชุดควบคุม โดยพบว่าโคโลนีมีขนาดใหญ่ขึ้นตามเวลาที่บ่ม ตรงข้ามกับเมื่อเลี้ยงร่วมกับแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย โดยที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส *A. carbonarius* สามารถเจริญได้น้อยกว่าชุดควบคุม โดยลักษณะการเจริญมีการสร้างเส้นใยมากขึ้นไปด้านบน สร้างสปอร์เพียงเล็กน้อย และยังพบว่าสามารถสร้างโอคราทอกซินเอ ได้น้อยกว่าชุดควบคุม 88.44 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส ไม่พบการเจริญของราเมื่อเลี้ยงร่วมกับแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย ดังนั้นจึงไม่สามารถวิเคราะห์ปริมาณสารพิษจากราได้ด้วยเช่นกัน จากผลการทดลองดังกล่าวพบว่าแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 สามารถยับยั้งการเจริญของราและการสร้างสารพิษของราที่ใช้ทดสอบได้ดีในทุกภาวะที่ใช้ทดสอบ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการวิจัยอื่นที่พบว่าแล็กติกแอซิดแบคทีเรียมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของราเมื่ออยู่ในภาวะที่มีค่าความเป็นกรด-เบสต่ำ และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ เช่น รายงานการวิจัยของ Magnusson และ Schnurer (2001) ที่รายงานว่า *L. coryniformis* subsp. *coryniformis* สามารถผลิตเมแทบอลิต์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งรามากที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียและการผลิตเมแทบอลิต์ที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของรามากที่สุด เช่นเดียวกับ Rouse และคณะ (2008) ที่ศึกษาความสามารถของแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *Pediococcus pentosaceus* ในการยับยั้งการเจริญของ *Penicillium expansum* พบว่าแล็กติกแอซิดแบคทีเรียดังกล่าวมีฤทธิ์ยับยั้งราได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส ในภาวะที่มีค่าความเป็นกรด-เบสต่ำเท่ากับ 4-5 Bianchini (2011) ศึกษาพบว่าแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. plantarum* มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของราในสกุล *Aspergillus* มากที่สุดเมื่ออยู่ในภาวะที่มีค่าความเป็นกรด-เบสต่ำ (น้อยกว่า 6) ที่อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตาม จากผลการทดลองนี้พบว่าราไม่สามารถเจริญได้ในภาวะที่มีค่าความเป็นกรด-เบสต่ำกว่า 4 แม้ในชุดควบคุม ซึ่งอาจเป็นผลมาจากอาหารเลี้ยงเชื้อ de Man Rogosa Sharpe (MRS) ที่มีโซเดียมอะซิเตตเป็นส่วนประกอบ ซึ่งสามารถออกฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของราได้ดี เมื่ออยู่ในภาวะที่มีค่าความเป็นกรด-เบสต่ำ แต่ทั้งนี้ผลของโซเดียมอะซิเตตต่อการเจริญยับยั้งการเจริญขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของราด้วยเช่นกัน (Stiles และคณะ, 2002)

จากผลการทดลองการศึกษาศักยภาพของแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ในการยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 ของ *A. flavus* และโอคราทอกซินเอของ *A. carbonarius* ในข้าวโพดที่ผ่านการฆ่าเชื้อ พบว่าในชุดทดสอบที่เติมแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย

L. paracasei AN3 เป็นหัวเชื้อในการหมัก สามารถลดค่าความเป็นกรด-เบสในข้าวโพดหมักได้อย่างรวดเร็วตั้งแต่วันแรก และควบคุมให้มีค่าต่ำจนถึงวันที่ 21 ของการหมัก และเมื่อติดตามจำนวนแบคทีเรียในชุดทดสอบที่มีค่าเพิ่มขึ้นในวันที่ 1 หลังจากนั้นก็มีแนวโน้มลดลงจนถึงวันที่ 21 ของการหมัก จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงความสามารถของแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ในการลดค่าความเป็นกรด-เบสของข้าวโพดปลูกหมักได้อย่างรวดเร็ว และควบคุมค่าความเป็นกรด-เบสให้ต่ำตลอดช่วงระยะเวลาในการหมัก ซึ่งค่าความเป็นกรด-เบสที่ต่ำจะสามารถช่วยยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่นที่ทำให้เกิดการเน่าเสียของพืชหมัก รวมถึงยับยั้งแอกทิวิตีของเอนไซม์ฟิซซึ่งทำให้ช่วยลดการสูญเสียของโภชนะในรูปของเหลวได้ (Driehuis, 2013) เมื่อติดตามผลการยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* และ *A. carbonarius* พบว่าในชุดทดสอบที่เติมแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 เป็นหัวเชื้อในการหมัก สามารถยับยั้งการเจริญของราที่ใช้ทดสอบได้ โดยจำนวน *A. flavus* มีจำนวนลดลงจากวันที่ 0 จนไม่สามารถตรวจพบได้ในวันที่ 14 และ 21 ของการหมัก และสามารถยับยั้งการเจริญของ *A. carbonarius* ได้ 3.06 เปอร์เซ็นต์เมื่อครบ 21 วันของการหมัก นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถลดปริมาณของอะฟลาทอกซินบี 1 และโอคราทอกซินเอ ในข้าวโพดปลูกหมักได้ 66.95 เปอร์เซ็นต์ และ 17.20 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับเมื่อเทียบกับวันที่ 0 ของการทดลอง

จากผลการทดลองการศึกษาความสามารถของแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ในการยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ของ *A. flavus* และโอคราทอกซินเอของ *A. carbonarius* ในข้าวโพดที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อร่วมกับจุลินทรีย์ชนิดอื่นพบว่าในชุดทดสอบที่เติมแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 เป็นหัวเชื้อในการหมัก สามารถควบคุมให้ค่าความเป็นกรด-เบสของข้าวโพดหมักมีค่าต่ำและค่อนข้างคงที่ไปจนถึงวันที่ 21 ของการหมัก เมื่อติดตามจำนวนคอลิฟอร์มแบคทีเรียในข้าวโพดหมักพบว่า ข้าวโพดหมักในชุดทดสอบและชุดควบคุมสามารถยับยั้งการเจริญของคอลิฟอร์มแบคทีเรียได้ตั้งแต่วันที่ 1 และไม่พบการเจริญของคอลิฟอร์มแบคทีเรียจนถึงวันที่ 21 ของการหมัก สอดคล้องกับการรายงานของ Muck (2010) ซึ่งพบว่าคอลิฟอร์มแบคทีเรียสามารถถูกยับยั้งได้เมื่อพืชหมักอยู่ในภาวะที่มีค่าความเป็นกรด-เบสต่ำ หากสามารถทำให้พืชหมักอยู่ในภาวะที่มีค่าความเป็นกรด-เบสต่ำได้อย่างรวดเร็ว จะสามารถช่วยลดการเจริญของคอลิฟอร์มแบคทีเรียในพืชหมักได้ เช่นเดียวกับ Driehuis (2013) รายงานว่าเมื่อพืชหมักอยู่ในภาวะที่มีค่าความเป็นกรด-เบสต่ำกว่า 4.5 จะสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียอื่นที่ปนเปื้อนอยู่ในพืชหมัก

เช่น คอลิฟอร์มแบคทีเรีย รวมถึงแบคทีเรียในสกุล *Listeria* และ *Clostridium* เป็นต้น เมื่อติดตามผลการยับยั้งการเจริญของราในข้าวโพดหมักพบว่าในชุดทดสอบที่เติมแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 เป็นหัวเชื้อในการหมัก สามารถยับยั้งการเจริญของราทั้งหมดได้ดีกว่าเมื่อเทียบกับพืชหมักชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมหัวเชื้อแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย และยังสามารถลดปริมาณของอะฟลาทอกซินปี 1 และโอคราทอกซินเอ ในข้าวโพดหมัก โดยพบว่าในชุดทดสอบที่เติมแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 เป็นหัวเชื้อในการหมัก ปริมาณอะฟลาทอกซินปี 1 และโอคราทอกซินเอ ที่ทำให้เป็นบรรทัดฐาน มีค่าลดลงอย่างต่อเนื่องในวันที่ 7, 14 และ 21 ของการหมัก โดยเมื่อหมักครบ 21 วัน สามารถลดปริมาณอะฟลาทอกซินปี 1 และโอคราทอกซินเอ ได้ 72.52 เปอร์เซ็นต์

จากผลการทดสอบความสามารถของแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 เป็นหัวเชื้อในการหมักพบว่า *L. paracasei* AN3 มีความสามารถในการลดค่าความเป็นกรด-เบส ของข้าวโพดหมักได้อย่างรวดเร็วตั้งแต่วันแรก และควบคุมให้มีค่าต่ำตลอดระยะเวลาในการหมัก ซึ่งมีผลทำให้สามารถยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 ของ *A. flavus* และโอคราทอกซินเอของ *A. carbonarius* รวมถึงคอลิฟอร์มแบคทีเรียที่ปนเปื้อนอยู่ในข้าวโพดหมักได้เป็นอย่างดี ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Filya และ Sucu (2007) ที่พบว่า การเติมหัวเชื้อแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. plantarum* และ *L. buchneri* ลงในพืชหมักสามารถช่วยลดปริมาณการปนเปื้อนของยีสต์และรา และทำให้พืชหมักมีความคงสภาพเมื่อสัมผัสกับอากาศมากยิ่งขึ้น (aerobic stability) Jatkauskas และ Vrotniakiene (2011) รายงานว่า การใช้แล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. lactis*, *L. plantarum*, *L. buchneri* และ *E. faecium* เป็นหัวเชื้อในการหมักหญ้าอาหารสัตว์ สามารถช่วยลดการสูญเสียวัตถุแห้ง และสามารถยับยั้งการเจริญของยีสต์และรา รวมถึงเพิ่มความคงสภาพของพืชหมักเมื่อสัมผัสกับอากาศให้ดียิ่งขึ้น Dogi และคณะ (2015) รายงานประสิทธิภาพของแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. rhamnosus* R007 และ *L. plantarum* R009 เมื่อใช้เป็นหัวเชื้อของข้าวโพดหมัก โดยพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของและการสร้างสารพิษของราในสกุล *Aspergillus* ได้ดี รวมถึงสามารถยับยั้งยีสต์ และจุลินทรีย์อื่นที่ปนเปื้อนอยู่ในพืชหมักได้ด้วยเช่นกัน นอกจากนี้จากผลการทดลองยังพบว่าเมื่อใช้แล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 เป็นหัวเชื้อในการหมัก โภชนะของข้าวโพดหมักมีค่าใกล้เคียงกับข้าวโพดสด และยังสามารถลดปริมาณของเยื่อใย ถ้ำ NDF และ ADF ให้ต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมหัวเชื้อแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย

ซึ่งปริมาณของเยื่อใย NDF และ ADF ที่เป็นส่วนโครงสร้างของพืชอาหารสัตว์ เมื่อมีปริมาณต่ำจะช่วยทำให้เกิดศักยภาพในด้านการย่อยได้สูงกว่าอาหารที่มีปริมาณเยื่อใยมาก (Khan และคณะ, 2015) สอดคล้องกับการรายงานของ Aksu และคณะ (2004) ซึ่งรายงานว่าในข้าวโพดหมักที่เติมหัวเชื้อแล็กติกแอซิดแบคทีเรียสามารถลดการสูญเสียของวัตถุแห้งได้มากกว่า และมีร้อยละของ ADF และ NDF น้อยกว่าเมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมหัวเชื้อแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย เช่นเดียวกับ Jatkauskas และ Vrotniakiene (2011) ซึ่งรายงานว่าการเติมหัวเชื้อแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในการทำพืชหมัก จะช่วยปรับปรุงการหมัก ลดค่าความเป็นกรด-เบสของพืชหมักได้อย่างรวดเร็วและช่วยลดการสูญเสียวัตถุแห้ง จากผลการทดลองทั้งหมดนี้จึงสามารถสรุปผลได้ว่า *L. paracasei* AN3 เป็นแล็กติกแอซิดแบคทีเรียที่มีศักยภาพที่จะนำมาใช้เป็นตัวควบคุมชีวภาพเพื่อยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ของ *A. flavus* และ โอคราทอกซินเอของ *A. carbonarius* อีกทั้งยังมีประสิทธิภาพในการปรับปรุงคุณภาพของการหมักรวมถึงโภชนะของพืชหมัก ทำให้สามารถนำไปพัฒนาเป็นหัวเชื้อตั้งต้นในการผลิตพืชหมักให้มีคุณภาพต่อไป

รายการอ้างอิง

- Abdel-Rahman MA, Tashiro Y & Sonomoto K (2013) Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. *Biotechnol Adv* 31: 877-902.
- Abrunhosa L, Ines A, Rodrigues AI, Guimaraes A, Pereira VL, Parpot P, Mendes-Faia A & Venancio A (2014) Biodegradation of ochratoxin A by *Pediococcus parvulus* isolated from Douro wines. *Int J Food Microbiol* 188: 45-52.
- Aksu T, Baytok E & Bolat D (2004) Effects of a bacterial silage inoculant on corn silage fermentation and nutrient digestibility. *Small Ruminant Research* 55: 249-252.
- Alonso VA, Pereyra CM, Keller LAM, Dalcerro AM, Rosa CAR, Chiacchiera SM & Cavaglieri LR (2013) Fungi and mycotoxins in silage: an overview. *J Appl Microbiol* 115: 637-643.
- Amézqueta S, González-Peñas E, Murillo-Arbizu M & López de Cerain A (2009) Ochratoxin A decontamination: A review. *Food Control* 20: 326-333.
- Aragon YA, Rodrigues I, Hofstetter U & Binder EM (2011) Mycotoxins in silages: Occurrence and prevention. *Iran J Appl Anim Sci* 1: 1-10.
- Armando MR, Dogi CA, Poloni V, Rosa CA, Dalcerro AM & Cavaglieri LR (2013) In vitro study on the effect of *Saccharomyces cerevisiae* strains on growth and mycotoxin production by *Aspergillus carbonarius* and *Fusarium graminearum*. *Int J Food Microbiol* 161: 182-188.
- Asim M, Sarma MP, Thayumanavan L & Kar P (2011) Role of aflatoxin B1 as a risk for primary liver cancer in north Indian population. *Clin Biochem* 44: 1235-1240.
- Atanassova M (2003) Isolation and partial biochemical characterization of a proteinaceous anti-bacteria and anti-yeast compound produced by *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* strain M3. *Int J Food Microbiol* 87: 63-73.
- Avis TJ & Belanger RR (2001) Specificity and mode of action of the antifungal fatty acid cis-9-heptadecenoic acid produced by *Pseudozyma flocculosa*. *Appl Environ Microbiol* 67: 956-960.

- Azizi IG, Rahimi K & Shateri S (2012) Ochratoxin: contamination and toxicity (a review). *Global Vet* 8: 519-524.
- Bagheri T, Moshtaghi H & Boniadian M (2014) Aflatoxin B1 in feed stuffs of dairy farms in Shahrekord, Iran. *J Nov Appl Sci* 3: 1312-1316.
- Batish VK, Roy U, Lal R & Grover S (1997) Antifungal attributes of lactic acid bacteria-- a review. *Crit Rev Biotechnol* 17: 209-225.
- Bianchini A (2011) *Antifungal activity of lactic acid bacteria: Factors affecting production and stability of antifungal compounds of Lactobacillus plantarum and effects of the antifungal compounds on growth and aflatoxin production by Aspergillus sp.* Nebraska University.
- Black BA, Zannini E, Curtis JM & Gänzle MG (2013) Antifungal hydroxy fatty acids produced during sourdough fermentation: microbial and enzymatic pathways, and antifungal activity in bread. *Appl Environ Microbiol* 79: 1866-1873.
- Bolsen KK, Ashbell G & Weinberg ZG (1996) Silage fermentation and silage additives: a review. *AJAS* 9: 483-494.
- Boudra H, Rouillé B, Lyan B & Morgavi DP (2015) Presence of mycotoxins in sugar beet pulp silage collected in France. *Anim Feed Sci Technol* 205: 131-135.
- Bovo F, Franco LT, Rosim RE & Oliveira CAFd (2014) Ability of a *Lactobacillus rhamnosus* strain cultured in milk whey based medium to bind aflatoxin B1. *Food Sci Technol* 34: 566-570.
- Boysen ME, Jacobsson KG & Schnurer J (2000) Molecular identification of species from the *Penicillium roqueforti* group associated with spoiled animal feed. *Appl Environ Microbiol* 66: 1523-1526.
- Bueno D, Casale C, Pizzolitto R, Salvano M & Oliver G (2007) Physical adsorption of aflatoxin B1 by lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae*: A theoretical model. *J Food Prot* 7: 2148-2154.
- Carr FJ, Chill D & Maida N (2002) The lactic acid bacteria: a literature survey. *Crit Rev Microbiol* 28: 281-370.
- Chang I & Kim JD (2007) Inhibition of aflatoxin production of *Aspergillus flavus* by *Lactobacillus casei*. *Mycobiology* 35: 76-81.

- Cheli F, Campagnoli A & Dell'Orto V (2013) Fungal populations and mycotoxins in silages: From occurrence to analysis. *Anim Feed Sci Technol* 183: 1-16.
- Cho S, Lee C, Jang M, Son Y, Lee S, Choi I, Kim S & Kim D (2008) Aflatoxins contamination in spices and processed spice products commercialized in Korea. *Food Chem* 107: 1283-1288.
- Chung TC, Axelsson L, Lindgren SE & Dobrogosz WJ (1989) In vitro studies on reuterin synthesis by *Lactobacillus reuteri*. *Microb Ecol Health Dis* 2: 137-144.
- Coallier-Ascah J & Idziak ES (1985) Interaction between *Streptococcus lactis* and *Aspergillus flavus* on production of aflatoxin. *Appl Environ Microbiol* 49: 163-167.
- Dachoupakan C, Ratomahenina R, Martinez V, Guiraud JP, Baccou JC & Schorr-Galindo S (2009) Study of the phenotypic and genotypic biodiversity of potentially ochratoxigenic black aspergilli isolated from grapes. *Int J Food Microbiol* 132: 14-23.
- Dalié DKD, Deschamps AM & Richard-Forget F (2010) Lactic acid bacteria – Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. *Food Control* 21: 370-380.
- Dehghani MR, Weisbjerg MR, Hvelplund T & Kristensen NB (2012) Effect of enzyme addition to forage at ensiling on silage chemical composition and NDF degradation characteristics. *Livestock Sci* 150: 51-58.
- Dogi CA, Fochesato A, Armando R, Pribull B, de Souza MM, da Silva Coelho I, Araujo de Melo D, Dalcerro A & Cavaglieri L (2013) Selection of lactic acid bacteria to promote an efficient silage fermentation capable of inhibiting the activity of *Aspergillus parasiticus* and *Fusarium graminearum* and mycotoxin production. *J Appl Microbiol* 114: 1650-1660.
- Dogi CA, Pellegrino M, Poloni V, Poloni L, Pereyra CM, Sanabria A, Pianzola MJ, Dalcerro A & Cavaglieri L (2015) Efficacy of corn silage inoculants on the fermentation quality under farm conditions and their influence on *Aspergillus parasiticus*, *A. flavus* and *A. fumigatus* determined by q-PCR. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 32: 229-235.

- Driehuis F (2013) Silage and the safety and quality of dairy foods: a review. *Agric Food Sci* 22: 16-34.
- Dunière L, Sindou J, Chaucheyras-Durand F, Chevallier I & Thévenot-Sergentet D (2013) Silage processing and strategies to prevent persistence of undesirable microorganisms. *Anim Feed Sci Technol* 182: 1-15.
- Eckard S, Wettstein FE, Forrer HR & Vogelgsang S (2011) Incidence of *Fusarium* species and mycotoxins in silage maize. *Toxins (Basel)* 3: 949-967.
- Falguni P, Shilpa VIJ & Mann B (2010) Production of proteinaceous antifungal substances from *Lactobacillus brevis* NCDC 02. *Int J Dairy Technol* 63: 70-76.
- Fazeli M, Hajimohammadali M, Moshkani A, Samadi N, Jamalifar H, Khoshayand M, Vaghari E & Pouragahi S (2009) Aflatoxin B1 binding capacity of autochthonous strains of lactic acid bacteria. *J Food Prot* 4: 189-192.
- Filya I & Sucu E (2007) The effect of bacterial inoculants and a chemical preservative on the fermentation and aerobic stability of whole-crop cereal silages. *Asian-Aust J Anim Sci* 20: 378-384.
- Galvano F, Pietri A, Bertuzzi T, *et al.* (2008) Maternal dietary habits and mycotoxin occurrence in human mature milk. *Mol Nutr Food Res* 52: 496-501.
- Gerez CL, Torres MJ, Font de Valdez G & Rollán G (2013) Control of spoilage fungi by lactic acid bacteria. *Biol Control* 64: 231-237.
- Ghonaimy GA, Yonis AAM & Abol-Ela MF (2007) Inhibition of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* fungal growth and its aflatoxins (B1, B2, G1 and G2) production by *Lactobacillus acidophilus*. *J Egypt Soc Toxicol* 37: 53-60.
- Gildberg A, Mikkelsen H, Sandaker E & Ringo E (1997) Probiotic effect of lactic acid bacteria in the feed on growth and survival of fry of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Hydrobiologia* 352: 279-285.
- Gomah H & Zohri ANA (2015) Inhibition of fungal growth and *Fusarium* toxins by selected cultures of lactic acid bacteria. *J Microbial Biochem Technol* 7: 1-7.
- Gomah NH, Ragab WS & Bullerman LB (2010) Inhibition of fungal growth and aflatoxin B1 production by some *Lactobacillus* strains. *Assiut J of Agric Sci* 40: 27-36.
- Gonzalez Pereyra ML, Alonso VA, Sager R, Morlaco MB, Magnoli CE, Astoreca AL, Rosa CA, Chiacchiera SM, Dalcerro AM & Cavaglieri LR (2008) Fungi and selected

- mycotoxins from pre- and postfermented corn silage. *J Appl Microbiol* 104: 1034-1041.
- Gournama H & Bullerman LB (1995) *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*: aflatoxigenic fungi of concern in foods and feeds: a review. *J Food Prot* 58: 1395–1404.
- Han RW, Zheng N, Wang JQ, Zhen YP, Xu XM & Li SL (2013) Survey of aflatoxin in dairy cow feed and raw milk in China. *Food Control* 34: 35-39.
- Haskard CA, El-Nezami HS, Kankaanpaa PE, Salminen S & Ahokas JT (2001) Surface binding of aflatoxin B1 by lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol* 67: 3086-3091.
- Holzer M, Mayrhuber E, Danner H & Braun R (2003) The role of *Lactobacillus buchneri* in forage preservation. *Trends Biotechnol* 21: 282-287.
- IARC (2002) Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 82: 1-556.
- Jatkauskas J & Vrotniakiene V (2011) The effects of silage inoculants on the fermentation and aerobic stability of legume-grass silage. *Žemdirbyste-Agriculture* 98: 367-374.
- Johnson C, Huber JT & Bergen WG (1982) Influence of ammonia treatment and time of ensiling on proteolysis in corn silage. *J Dairy Sci* 65: 1740-1747.
- Jones DJH (1988) The effect of cereal incorporation on the fermentation of spring- and autumn- cut silages in laboratory silos. *Grass Forage Sci* 43: 167-172.
- Kalač P (2011) The effects of silage feeding on some sensory and health attributes of cow's milk: A review. *Food Chem* 125: 307-317.
- Kang'ethe EK & Lang'at KA (2009) Aflatoxin B1 and M1 contamination of animal feeds and milk from urban centers in Kenya. *Afr Health Sci* 9: 218-226.
- Keller LA, Keller KM, Monge MP, Pereyra CM, Alonso VA, Cavaglieri LR, Chiacchiera SM & Rosa CA (2012) Gliotoxin contamination in and pre- and postfermented corn, sorghum and wet brewer's grains silage in Sao Paulo and Rio de Janeiro State, Brazil. *J Appl Microbiol* 112: 865-873.
- Keller LAM, Pereyra CM, Cavaglieri LR, Keller KM, Almeida TX, Deveza MV, Assad RQ & Rosa CAR (2012) Fungi and aflatoxin B1 in pre and post-fermented sorghum

- trench type silos destined To bovine intensive-rearing in Brazil. *Rev Bio Ciencias* 2: 81-91.
- Keller LAM, González Pereyra ML, Keller KM, Alonso VA, Oliveira AA, Almeida TX, Barbosa TS, Nunes LMT, Cavaglieri LR & Rosa CAR (2013) Fungal and mycotoxins contamination in corn silage: Monitoring risk before and after fermentation. *J Stored Prod Res* 52: 42-47.
- Khan AN, Yu P, Ali M, Cone JW & Hendriks WH (2015) Nutritive value of maize silage in relation to dairy cow performance and milk quality. *J Sci Food Agric* 95: 238-252.
- Khoury Ae & Atoui A (2010) Ochratoxin A: general overview and actual molecular status. *Toxins (Basel)* 2: 461-493.
- Kristensen NB, Sloth KH, Hojberg O, Spliid NH, Jensen C & Thogersen R (2010) Effects of microbial inoculants on corn silage fermentation, microbial contents, aerobic stability, and milk production under field conditions. *J Dairy Sci* 93: 3764-3774.
- Kung L, Taylor CC, Lynch MP & Neylon4 JM (2003) The effect of treating alfalfa with *Lactobacillus buchneri* 40788 on silage fermentation, aerobic stability, and nutritive value for lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 86: 336-343.
- Laref N, Guessas B & Kihal M (2013) Antifungal compounds production in different temperatures, pH and on modified MRS agar by *Lactobacillus* strains. *J Biol Sci* 13: 94-99.
- Lavermicocca P, Valerio F & Visconti A (2003) Antifungal activity of phenyllactic acid against molds isolated from bakery products. *Appl Environ Microbiol* 69: 634-640.
- Loucka R, Hakl J, Jirmanova J & Tyrolova Y (2014) Yearly variation in maize silage fermentation and nutritive quality. *Grass Forage Sci* 70: 674-681.
- Magnusson J & Schnurer J (2001) *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. *Appl Environ Microbiol* 67: 1-5.

- Magnusson J, Strom K, Roos S, Sjogren J & Schnurer J (2003) Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 219: 129-135.
- Mandal V, Senb SK & Mandalb NC (2007) Detection, isolation and partial characterization of antifungal compound(s) produced by *Pediococcus acidilactici* LAB 5. *Nat Prod Commun* 2: 671-674.
- Mansfield MA & Kulda GA (2007) Microbiological and molecular determination of mycobiota in fresh and ensiled maize silage. *Mycologia* 99: 269-278.
- Martins HM, Guerra MMM & Bernardo FMdA (2007) Occurrence of aflatoxin B1 in dairy cow's feed over 10 years in Portugal (1995-2004). *Rev Iberoam Micol* 24: 69-71.
- Mateo EM, Medinaa A, Valle-Algarra FM, Mateoc F, Pardo I & Jiménez M (2010) Ochratoxin A removal in synthetic media by living and heat inactivated cells of *Oenococcus oeni* isolated from wines. *Food Control* 21: 23-28.
- Meeske R, Merwe GDvd, Greyling JF & Cruywagen CW (2002) The effect of the addition of a lactic acid bacterial inoculant to maize at ensiling on silage composition, silage intake, milk production and milk composition. *S Afr J Anim Sci* 32: 263-270.
- Muck R (1988) Factors influencing silage quality and their implications for management. *J Dairy Sci* 71: 2992-3002.
- Muck R (2013) Recent advances in silage microbiology. *Agric Food Sci* 22: 3-15.
- Muck RE (2010) Silage microbiology and its control through additives. *R Bras Zootec* 39: 183-191.
- Neal GE, Eaton DL, Judah DJ & Verma A (1998) Metabolism and toxicity of aflatoxins M1 and B1 in human-derived in vitro systems. *Toxicol Appl Pharmacol* 151: 152-158.
- Ngang E, Yadang JJ, Kamdem GS, *et al.* (2014) Antifungal properties of selected lactic acid bacteria and application in the biological control of ochratoxin A producing fungi during cocoa fermentation. *Biocontrol Sci Technol* 25: 245-259.

- Ohmomo S, Nitisinprasert S, Kraykaw D, Laemkorn P, Tanomwongwattana S & Hiranpradit S (2004) Evaluation of lactic acid bacteria isolates for silage fermentation inoculant in Thailand by using a modified pouch method. *JARQ* 38: 199-208.
- Pena GA, Pereyra CM, Armando MR, Chiacchiera SM, Magnoli CE, Orlando JL, Dalcero AM, Rosa CA & Cavaglieri LR (2010) *Aspergillus fumigatus* toxicity and gliotoxin levels in feedstuff for domestic animals and pets in Argentina. *Lett Appl Microbiol* 50: 77-81.
- Piotrowska M (2014) The adsorption of ochratoxin a by *Lactobacillus* species. *Toxins* 6: 2826-2839.
- Piotrowska M & Zakowska Z (2005) The elimination of ochratoxin A by lactic acid bacteria strain. *Pol J Microbiol* 54: 279-286.
- Ponts N, Pinson-Gadais L, Verdal-Bonnin MN, Barreau C & Richard-Forget F (2006) Accumulation of deoxynivalenol and its 15-acetylated form is significantly modulated by oxidative stress in liquid cultures of *Fusarium graminearum*. *FEMS Microbiol Lett* 258: 102-107.
- Prandini A, Tansini G, Sigolo S, Filippi L, Laporta M & Piva G (2009) On the occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products. *Food Chem Toxicol* 47: 984-991.
- Qamar BM (2009) Effect of molasses and corn as silage additives on the characteristics of mott dwarf elephant grass silage at different fermentation periods *Pak Vet J* 29: 19-23.
- Rahaie S, Emam-Djomeh Z, Razavi SH & Mazaheri M (2012) Evaluation of aflatoxin decontaminating by two strains of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus rhamnosus* strain GG in pistachio nuts. *Int J Food Sci Technol* 47: 1647-1653.
- Riba A, Mokrane S, Mathieu F, Lebrihi A & Sabaou N (2008) Mycoflora and ochratoxin A producing strains of *Aspergillus* in Algerian wheat. *Int J Food Microbiol* 122: 85-92.
- Richard E, Heutte N, Bouchart V & Garon D (2009) Evaluation of fungal contamination and mycotoxin production in maize silage. *Anim Feed Sci Technol* 148: 309-320.

- Rosa CA, Keller KM, Keller LA, Gonzalez Pereyra ML, Pereyra CM, Dalcero AM, Cavaglieri LR & Lopes CW (2009) Mycological survey and ochratoxin A natural contamination of swine feedstuffs in Rio de Janeiro State, Brazil. *Toxicon* 53: 283-288.
- Rouse S, Harnett D, Vaughan A & van Sinderen D (2008) Lactic acid bacteria with potential to eliminate fungal spoilage in foods. *J Appl Microbiol* 104: 915-923.
- Sathe SJ, Nawani NN, Dhakephalkar PK & Kapadnis BP (2007) Antifungal lactic acid bacteria with potential to prolong shelf-life of fresh vegetables. *J Appl Microbiol* 103: 2622-2628.
- Scherer R, Gerlach K & Südekum KH (2015) Biogenic amines and gamma-amino butyric acid in silages: Formation, occurrence and influence on dry matter intake and ruminant production. *Anim Feed Sci Technol* 210: 1-16.
- Schneweis I, Meyer K, Hormansdorfer S & Bauer J (2000) Mycophenolic acid in silage. *Appl Environ Microbiol* 66: 3639-3641.
- Schnürer J & Magnusson J (2005) Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Trends Food Sci Technol* 16: 70-78.
- Scudamore KA & Livesey CT (1998) Occurrence and significance of mycotoxins in forage crops and silage: a review. *J Sci Food Agric* 77: 1-17.
- Sjogren J, Magnusson J, Broberg A, Schnurer J & Kenne L (2003) Antifungal 3-hydroxy fatty acids from *Lactobacillus plantarum* MiLAB 14. *Appl Environ Microbiol* 69: 7554-7557.
- Stiles J, Penkar S, Plockava N, Chumchalova J & Bullerman IB (2002) Antifungal activity of sodium acetate and *Lactobacillus rhamnosus*. *J Food Prot* 65: 1188-1191.
- Strom K, Schnurer J & Melin P (2005) Co-cultivation of antifungal *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 and *Aspergillus nidulans*, evaluation of effects on fungal growth and protein expression. *FEMS Microbiol Lett* 246: 119-124.
- Strom K, Sjogren J, Broberg A & Schnurer J (2002) *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo(L-Phe-L-Pro) and cyclo(L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) and 3-phenyllactic acid. *Appl Environ Microbiol* 68: 4322-4327.

- Suzuki I, Nomura M & Morichi T (1991) Isolation of lactic acid bacteria which suppress mold growth and show antifungal action. *Milchwissenschaft* 46: 534-639.
- Sweeney MJ & Dobson ADW (1998) Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *Int J Food Microbiol* 43: 141-158.
- Venturini ME, Blanco D & Oria R (2002) In vitro antifungal activity of several antimicrobial compounds against *Penicillium expansum*. *J Food Prot* 6: 834-839.
- VICAM (2003) *AflaTest HPLC procedure for feed ;Instruction manual*. watertown.
- Weinberg ZG & Muck RE (1996) New trends and opportunities in the development and use of inoculants for silage. *FEMS Microbiol Rev* 19: 53-68.
- Yitbarek MB & Tamir B (2014) Silage additives: Review. *Open J Appl Sci* 04: 258-274.
- Zheng N, Wang JQ, Han RW, Zhen YP, Xu XM & Sun P (2013) Survey of aflatoxin M1 in raw milk in the five provinces of China. *Food Addit Contam Part B Surveill* 6: 110-115.
- Zinedine A, Soriano JM, Molto JC & Manes J (2007) Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: an oestrogenic mycotoxin. *Food Chem Toxicol* 45: 1-18.
- กมลทิพย์ ประสมเพชร (2554) คู่มือปฏิบัติการวิเคราะห์อาหารสัตว์. ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน, เท็กซ์ แอนด์ เจอร์นัล พับลิเคชั่น จำกัด.
- กวิณ เจริญยงค์ (2556) การคัดแยกและจำแนกแลคติกแอซิดแบคทีเรียในข้าวโพดสายพันธุ์ CP-KKK หมัก จากประเทศไทยและข้าวโพดหมักเชิงพาณิชย์จากประเทศจีน. โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์, ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ฉลอง วชิราภกร (2541) โภชนศาสตร์และการให้อาหารสัตว์เคี้ยวเอื้องเบื้องต้น. ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- เมธา วรณพัฒน์ (2533) โภชนศาสตร์สัตว์เคี้ยวเอื้อง. ฟันนี่ พลัทธิซิง.
- ศูนย์สารสนเทศการเกษตร (2558) วารสารการพยากรณ์ผลผลิตการเกษตร ฉบับที่ 1 เดือนมีนาคม 2558.



ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารและวิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหาร MRS (de Man Rogosa and Sharpe)

อาหารสำเร็จรูป MRS (บริษัท Difco, สหรัฐอเมริกา)	55	กรัม
ผงวุ้น (สำหรับทำอาหารแข็ง)	1.5	กรัม

ละลายอาหารสำเร็จรูปในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

2. อาหารแข็ง PDA (potato dextrose agar)

อาหารสำเร็จรูป PDA (บริษัท Difco, สหรัฐอเมริกา)	39	กรัม
---	----	------

ละลายอาหารสำเร็จรูปในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. อาหารแข็ง MacConkey

อาหารสำเร็จรูป MacConkey (บริษัท Difco, สหรัฐอเมริกา)	50	กรัม
---	----	------

ละลายอาหารสำเร็จรูปในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

โซเดียมคลอไรด์	8	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4)	1.2	กรัม
ไดไฮโดรเจนโปแทสเซียมฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.2	กรัม
โปแทสเซียมคลอไรด์	0.2	กรัม

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

2. เฟสเคลื่อนที่สำหรับอะพลาทอกซินบี 1

อะซีโทไนไตรล์ (HPLC grade)	200	มิลลิลิตร
น้ำปราศจากไอออน	600	มิลลิลิตร
อะซีโทไนไตรล์ (HPLC grade)	200	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน จากนั้นกรองด้วยชุดกรองผ่านกระดาษกรอง

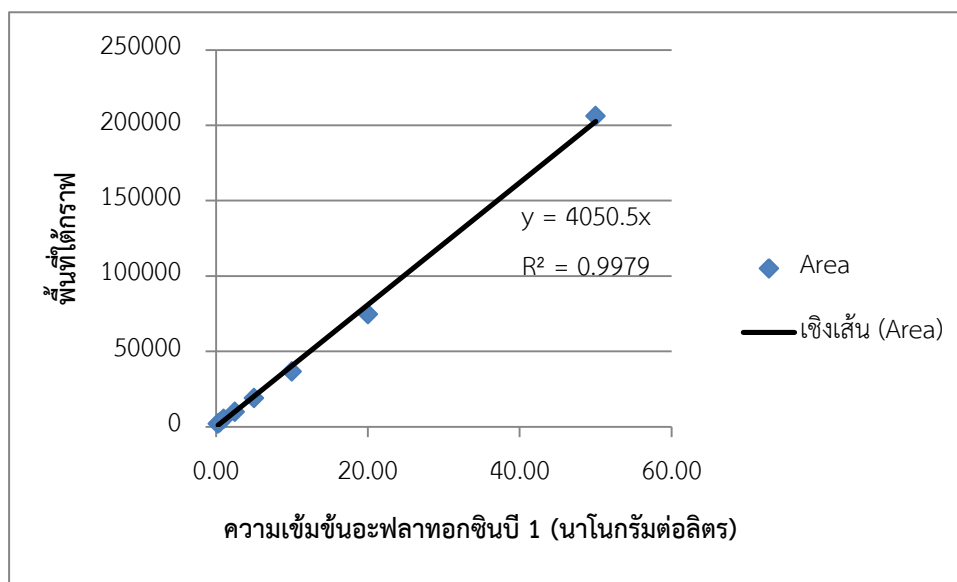
3. เฟสเคลื่อนที่สำหรับโอคราทอกซินเอ

อะซีโทไนไตรล์ (HPLC grade)	495	มิลลิลิตร
น้ำปราศจากไอออน	495	มิลลิลิตร
กรดอะซิติก	1	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน จากนั้นกรองด้วยชุดกรองผ่านกระดาษกรอง

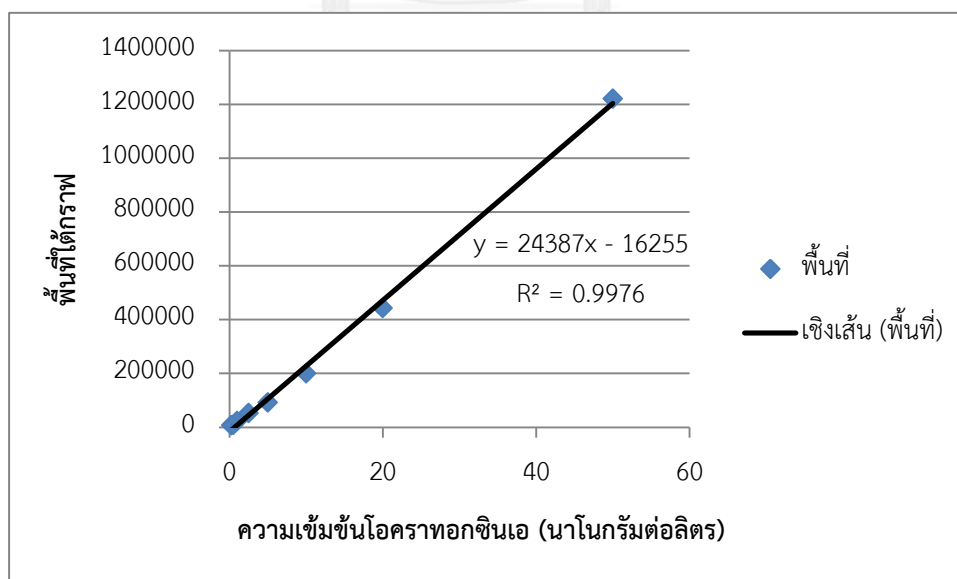
ภาคผนวก ค

1. กราฟมาตรฐานอะฟลาทอกซินบี 1



รูปที่ ค.1 กราฟมาตรฐานอะฟลาทอกซินบี 1

2. กราฟมาตรฐานโอคราทอกซินเอ



รูปที่ ค.2 กราฟมาตรฐานโอคราทอกซินเอ

3. สูตรคำนวณปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1

อะฟลาทอกซินบี 1 =

A

$$B \times 2.5 \times (\text{ปริมาตรเมทานอลที่ใช้ในการสกัด หน่วยมิลลิลิตร}) \times C \times (1/D)$$

เมื่อ

A คือ พื้นที่ใต้กราฟ

B คือ สัมประสิทธิ์หน้าตัวแปร X ของกราฟมาตรฐานอะฟลาทอกซินบี 1

C คือ ปริมาตรเฟสเคลื่อนที่ ที่เติมลงในอะฟลาทอกซินบี 1 ที่สกัดได้ (เท่า)

D คือ น้ำหนักวุ้น (กรัม)

4. สูตรคำนวณปริมาณโอคราทอกซินเอ

โอคราทอกซินเอ =

A

$$B \times 2.5 \times (\text{ปริมาตรเมทานอลผสมกับกรดฟอร์มิกที่ใช้ในการสกัด หน่วยมิลลิลิตร}) \times C \times (1/D)$$

เมื่อ

A คือ พื้นที่ใต้กราฟ

B คือ สัมประสิทธิ์หน้าตัวแปร X ของกราฟมาตรฐานโอคราทอกซินเอ

C คือ ปริมาตรเฟสเคลื่อนที่ ที่เติมลงในโอคราทอกซินเอ ที่สกัดได้ (เท่า)

D คือ น้ำหนักวุ้น (กรัม)

5. สูตรคำนวณปริมาณอะฟลาทอกซินปี 1 (อิมมูโนแอฟฟินีตี้คอลลัมน์)

$$\text{อะฟลาทอกซินปี 1} = \frac{\text{พื้นที่ใต้กราฟ}}{\text{สัมประสิทธิ์หน้าตัวแปร X ของกราฟมาตรฐานอะฟลาทอกซินปี 1}}$$

6. สูตรคำนวณปริมาณโอคราทอกซินเอ (อิมมูโนแอฟฟินีตี้คอลลัมน์)

$$\text{โอคราทอกซินเอ} = \frac{\text{(พื้นที่ใต้กราฟ + 16255)}}{\text{สัมประสิทธิ์หน้าตัวแปร X ของกราฟมาตรฐานโอคราทอกซินเอ}}$$

7. สูตรคำนวณปริมาณสารพิษจากราที่ให้เป็นบรรทัดฐาน

$$\text{ปริมาณสารพิษที่ทำให้เป็นบรรทัดฐาน(เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{ปริมาณสารพิษเริ่มต้น (วันที่ 0)} \times 100 \text{ เปอร์เซ็นต์}}{\text{ปริมาณสารพิษ}}$$

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวชาลิสา แสงบัว เกิดเมื่อวันที่ 10 พฤศจิกายน พ.ศ. 2533 ที่จังหวัด กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาในระดับปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา จาก ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2555 และเข้ารับ การศึกษาต่อในระดับปริญญาโทบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาและเทคโนโลยีทางจุลินทรีย์ ภาควิชา จุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยในปีการศึกษา 2556

ผลงานเผยแพร่

ส่วนหนึ่งของงานวิจัยนี้ได้เข้าร่วมนำเสนอผลงานในการประชุมทางวิชาการ ระดับนานาชาติ The 27th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference : TSB 2015 ระหว่างวันที่ 17-20 พฤศจิกายน 2558 ณ โรงแรม แมนดารีน กรุงเทพมหานคร ในหัวข้อเรื่อง Control of fungal growth and mycotoxin production of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus carbonarius* by using lactic acid bacteria: an in vitro study

รางวัลที่ได้รับ

รางวัลชนะเลิศประเภทโปสเตอร์ดีเด่น ในการประชุมทางวิชาการระดับนานาชาติ The 27th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference : TSB 2015 ระหว่างวันที่ 17-20 พฤศจิกายน 2558 ณ โรงแรมแมนดารีน กรุงเทพมหานคร ในหัวข้อเรื่อง Control of fungal growth and mycotoxin production of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus carbonarius* by using lactic acid bacteria: an in vitro study