โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การคัดแยก การคัดเลือก และการประเมินผลของแบคทีเรียกรดแลคติกที่เป็นปฏิปักษ์ต่อราที่ผลิตโอคราทอกซินเอในเมล็ดกาแฟหลังการเก็บเกี่ยว

Isolation, selection and evaluation of antagonistic activity of post-harvest lactic acid bacteria against ochratoxigenic fungi in coffee bean

ชื่อนิสิต นางสาวกาญจนาภรณ์ สุดเสงี่ยม **เลขประจำตัว** 5832303623

ภาควิชา จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา 2561

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานทางวิชาการที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานทางวิชาการที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of senior projects in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the senior project authors' files submitted through the faculty.

หัวข้อโครงงาน	การคัดแยก การคัดเลือก และการประเมินผลของแบคทีเรียกรดแลคติกที่เป็นปฏิปักษ์ต่อราที่ผลิตโอคราทอกซินเอในเมล็ดกาแฟหลังการเก็บเกี่ยว
โดย	นางสาวกาญจนาภรณ์ สุดเสงี่ยม รหัสประจำตัว 5832303623
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงาน	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชีวานันท์ เดชอุปการ ศิริสมบูรณ์
ปีการศึกษา	2561

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับโครงงานฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาบัณฑิต ในรายวิชา 2312499 โครงงานวิทยาศาสตร์

.....หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)

คณะกรรมการสอบโครงงาน

.....อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงาน

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชีวานันท์ เดชอุปการ ศิริสมบูรณ์)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธนียวัน)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุชาดา จันทร์ประทีป นภาธร)

ชื่อโครงการ : การคัดแยก การคัดเลือก และการประเมินผลของแบคทีเรียกรดแลคติกที่เป็นปฏิปักษ์ต่อราที่ผลิตโอคราทอกซินเอในเมล็ดกาแฟหลังการเก็บเกี่ยว

อาจารย์ที่ปรึกษา : ผศ.ดร.ชีวานันท์ เดชอุปการ ศิริสมบูรณ์

จัดทำโดย : นางสาวกาญจนาภรณ์ สุดเสงี่ยม รหัสประจำตัว 5832303623
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

ในเมล็ดกาแฟหลังการเก็บเกี่ยวมักพบการปนเปื้อนจากราและสารพิษจากรา โดยเฉพาะการปนเปื้อนจากโอคราทอกซินเอ ซึ่งพบปนเปื้อนในเมล็ดกาแฟทั้งก่อนและหลังการแปรรูป การควบคุมทางชีวภาพโดยใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์เป็นวิธีการควบคุมที่มีประสิทธิภาพที่ใช้ในการควบคุมการปนเปื้อนจากราและสารพิษจากรา แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นหนึ่งในตัวควบคุมทางชีวภาพที่น่าสนใจ โครงการนี้มีจุดประสงค์เพื่อคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกในตัวอย่างกาแฟหลังการเก็บเกี่ยว ได้แก่ ผลกาแฟสุก เมล็ดกาแฟหมัก เมล็ดกาแฟกะลา และน้ำหมักเมล็ดกาแฟจากสถานีวิจัยโครงการหลวงแม่หลอด ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงตีนตก และศูนย์พัฒนาโครงการหลวงป่าเมี่ยง จังหวัดเชียงใหม่ ประเทศไทย และประเมินผลการเป็นปฏิปักษ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกต่อราที่ผลิตโอคราทอกซินเอ พบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกได้ 62 ไอโซเลตจากตัวอย่างกาแฟทั้งหมด ยกเว้นในเมล็ดกาแฟกะลา และพบมากที่สุดในเมล็ดกาแฟหมัก จากนั้นจัดจำแนกกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ 6 กลุ่มตามลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS รูปร่างเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์จากการย้อมสีแกรม และคุณสมบัติทางชีวเคมี สำหรับการประเมินผลการเป็นปฏิปักษ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ต่อราที่ผลิตโอคราทอกซินเอด้วยวิธี Agar spot assay พบว่ามากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่นำมาทดสอบสามารถยับยั้งการเจริญของราที่ผลิตโอคราทอกซินเอได้ โดยไอโซเลท MW2A ให้ผลการยับยั้งดีที่สุด

Project Title : Isolation, selection and evaluation of antagonistic activity of post-harvest lactic acid bacteria against ochratoxigenic fungi in coffee beans

Advisor : Asst. Prof. Cheewanun Dachoupakan Sirisomboon, Ph.D.

Investigator : Miss Kanchanaporn Suedsahium Student ID 5832303623
Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University

---

Abstract

Post-havested coffee beans usually are contaminated by molds and mycotoxins, especially ochratoxin A (OTA) that found in both unprocessed and processed coffees. Biological control using antagonistic microorganisms is one of the effective methods to control fungal and mycotoxin contamination. Among the antagonistic microorganisms, lactic acid bacteria (LAB) are the good biological agents. The objective of this study was to; (a) isolate lactic acid bacteria from cherry coffee, fermented coffee, parchment coffee and fermented water from 3 stations of Royal Project Foundation (Mae Lod, Teen Tok and Pa Miang), Chiang Mai, Thailand, (b) to evaluate the antagonistic activity of isolated lactic acid bacteria against ochratoxigenic fungi. Sixty two lactic acid bacteria were found in all samples, particularly in fermented coffee sample (except in the parchment coffee). The isolated lactic acid bacteria cloud be divided into six groups depended on colony on MRS agar, Grams' stain, cell morphology and biochemical characteristics. For the evaluation of antagonistic activity against ochratoxigenic fungi by agar spot assay, more than 60% of selected lactic acid bacteria were able to inhibit growth of ochratoxigenic fungi with the greatest inhibitory activity of Mae Lod-MW2A isolate.

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยโครงการเสริมประสบการณ์นี้จะสำเร็จลุล่วงด้วยดีไม่ได้ หากไม่ได้รับความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจาก ผศ.ดร.ชีวานันท์ เดชอุปการ ศิริสมบูรณ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ที่กรุณาได้มอบความรู้ คำแนะนำ ข้อคิดเห็นต่างๆ พร้อมกับอบรมสั่งสอนและเป็นกำลังใจที่ดีตลอดการทำวิจัยในครั้งนี้ ตลอดจนได้ปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ทำให้รายงานฉบับนี้สมบูรณ์และสำเร็จตามวัตถุประสงค์ที่ได้ตั้งไว้

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ และเจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่านที่คอยให้ความรู้ คำแนะนำและอำนวยความสะดวกด้วยดีตลอดระยะเวลาการศึกษาและการทำวิจัย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ประจำสถานีวิจัยโครงการหลวงแม่หลอด เจ้าหน้าที่ประจำศูนย์พัฒนาโครงการหลวงตีนตก และเจ้าหน้าที่ประจำศูนย์พัฒนาโครงการหลวงป่าเมี่ยง จังหวัดเชียงใหม่ที่คอยอำนวยความสะดวกในการเก็บตัวอย่างกาแฟเพื่อนำมาใช้ในการทำวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณพี่ๆ และเพื่อนๆ ในห้องวิจัย 1904/14 สำหรับความช่วยเหลือ ความเมตตา คำแนะนำ กำลังใจ และแบ่งปันความสุขให้แก่ผู้วิจัยเสมอมา

ขอขอบคุณทั้งรุ่นพี่ เพื่อน รุ่นน้องทุกคนในภาคจุลชีววิทยาและคณะอื่น ๆ ที่คอยให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจที่ดีอย่างเสมอมา

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณบิดา มารดา และสมาชิกในครอบครัวทุกคนที่คอยให้ความช่วยเหลือ กำลังใจ และให้การสนับสนุนตลอดจนสำเร็จการศึกษา

นางสาวกาญจนาภรณ์ สุดเสงี่ยม
(Kanchanaporn Suedsahium)

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญภาพ	จ
สารบัญตาราง	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีการทดลอง	18
บทที่ 3 ผลการทดลอง	24
บทที่ 4 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง	37
เอกสารอ้างอิง	41
ภาคผนวก	47

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1.1 ภาพแสดงองค์ประกอบต่างๆ ของผลกาแฟ	3
1.2 กระบวนการผลิตเมล็ดกาแฟสาร (green coffee) หลังการเก็บเกี่ยว	4
1.3 ชนิดของกาแฟเมื่อแบ่งตามกระบวนการผลิต	5
1.4 โครงสร้างของโอคราทอกซินเอ	8
1.5 วิถีกระบวนการหมักน้ำตาลของแบคทีเรียกรดแลคติก	13
2.1 ตัวอย่างกาแฟที่เก็บจากพื้นที่โครงการหลวงในจังหวัดเชียงใหม่	20
3.1 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่มีวงใสเกิดขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS ที่มีแคลเซียมคาร์บอเนต บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีออกซิเจนจำกัด เป็นเวลา 2 วัน	24
3.2 ลักษณะโคโลนีรูปแบบที่ 1 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS ที่มีแคลเซียมคาร์บอเนต บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีออกซิเจนจำกัด เป็นเวลา 2 วัน และรูปร่างเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า	27
3.3 ลักษณะโคโลนีรูปแบบที่ 2 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS ที่มีแคลเซียมคาร์บอเนต บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีออกซิเจนจำกัด เป็นเวลา 2 วัน และรูปร่างเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า	27
3.4 ลักษณะโคโลนีรูปแบบที่ 3 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS ที่มีแคลเซียมคาร์บอเนต บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีออกซิเจนจำกัด เป็นเวลา 2 วัน และรูปร่างเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า	28
3.5 ลักษณะโคโลนีรูปแบบที่ 4 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS ที่มีแคลเซียมคาร์บอเนต บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีออกซิเจนจำกัด เป็นเวลา 2 วัน และรูปร่างเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า	28
3.6 ลักษณะโคโลนีรูปแบบที่ 5 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS ที่มีแคลเซียมคาร์บอเนต บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีออกซิเจนจำกัด เป็นเวลา 2 วัน และรูปร่างเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า	29
3.7 การทดสอบความสามารถเบื้องต้นของแบคทีเรียกรดแลคติกในการยับยั้งการเจริญของราที่ผลิตโอคราทอกซินเอด้วยวิธี Agar spot assay บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS ที่เททับด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งขณะเหลว PDA บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน (ก) ชุดควบคุม (ข) ชุดทดสอบที่มีการหยดแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ร่วมกับการเลี้ยง *A. carbonarius* TK4.2	33

สารบัญภาพ (ต่อ)

	หน้า
3.8 การทดสอบความสามารถเบื้องต้นของแบคทีเรียกรดแลคติกในการยับยั้งการเจริญของราที่ผลิตโอคราทอกซินเอด้วยวิธี Agar spot assay บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS ที่เททับด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งขณะเหลว PDA บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน (ก) ชุดควบคุม (ข) ชุดทดลองที่มีการหยดแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ร่วมกับการเลี้ยงราไอโซเลท TKI9	34
3.9 การยับยั้งการเจริญของราในแต่ละระดับที่กำหนดตามสัญลักษณ์	35
ค.1 ลักษณะโคโลนี และรูปร่างเซลล์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกมาใช้ในการทดสอบความสามารถเบื้องต้นในการเป็นปฏิปักษ์ต่อ *A. carbonarius* TK4.2 และราไอโซเลต TKI9 ด้วยวิธี Agar spot assay จำนวน 15 ไอโซเลต	52

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1.1 ราและสารพิษจากราที่พบบ่อยในอาหารและผลผลิตทางการเกษตร	6
1.2 การปนเปื้อนของสารพิษจากราในอาหารและผลผลิตทางการเกษตร	7
1.3 ข้อกำหนดปริมาณของโอคราทอกซินเอในอาหารและผลผลิตทางการเกษตร	11
1.4 สกุลต่างๆ ของแบคทีเรียกรดแลคติกและคุณสมบัติที่เกี่ยวข้อง	12
1.5 แบคทีเรียกรดแลคติกที่พบบ่อยในเมล็ดกาแฟหลังการเก็บเกี่ยว	16
3.1 จำนวนจุลินทรีย์ที่พบในตัวอย่างกาแฟจากพื้นที่โครงการหลวงในจังหวัดเชียงใหม่	25
3.2 จำนวนไอโซเลตแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากตัวอย่างกาแฟแต่ละชนิด	25
3.3 ลักษณะโคโลนี และรูปร่างเซลล์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้	26
3.4 กลุ่มของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จำแนกตามลักษณะโคโลนี รูปร่างเซลล์ และการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี	31
3.5 การยับยั้งการเจริญของราและขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ในการยับยั้งการเจริญของ *A. carbonarius* TK4.2 และราไอโซเลท TKI9	36
ค.1 ลักษณะโคโลนี รูปร่างเซลล์ และผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้	54
ค.2 เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ จากการทดสอบความสามารถเบื้องต้นในการเป็นปฏิปักษ์ต่อ *A. carbonarius* TK4.2 ด้วยวิธี Agar spot assay	59
ค.3 เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ จากการทดสอบความสามารถเบื้องต้นในการเป็นปฏิปักษ์ต่อราไอโซเลต TKI9 ด้วยวิธี Agar spot assay	60

บทที่ 1

บทนำ

กาแฟ

กาแฟ (Coffee) เป็นพืชในวงศ์ (Family) *Rubiaceae* สกุล (Genus) *Coffea* และมีมากกว่าร้อยสายพันธุ์ (Specie) (Batista และคณะ, 2016) เจริญได้ดีในสภาพอากาศค่อนข้างเย็นอุณหภูมิระหว่าง 17 - 22 องศาเซลเซียส จัดเป็นพืชกึ่งเมืองหนาว ถ้าปลูกในเขตร้อนต้องปลูกบนพื้นที่สูง (สุริยา ศรีแสง, 2555) โดยแหล่งกำเนิดแล้วเป็นพืชพื้นเมืองของอาบีซีเนียและอาราเบีย ในปี ค.ศ. 575 มีการค้นพบกาแฟในประเทศอาราเบีย และขณะเดียวกันมีบางข้อมูลกล่าวว่ากาแฟเป็นพืชพื้นเมืองที่พบในเมืองคัฟฟาของประเทศเอธิโอเปีย ทำให้กาแฟมีชื่อเรียกตามเมืองนี้ และยังมีการเรียกแตกต่างกันออกไปอีกมาก กาแฟเริ่มเป็นที่แพร่หลายเพิ่มขึ้นจากประเทศอาราเบียเข้าสู่ประเทศอิตาลี เนเธอร์แลนด์ เยอรมัน และฝรั่งเศส โดยชาวอาราเบียเรียกกาแฟว่า คะวาฮ์ (Kawah) หรือ คะเวฮ์ (Kaweh) ซึ่งแปลว่าพลัง หรือความกระปรี้กระเปร่า ในชาวตุรกีเรียกว่า คะเวฮ์ (Kaveh) เช่นเดียวกัน ต่อมาการเรียกชื่อกาแฟได้เปลี่ยนแปลงไปตามแหล่งผลิต เช่น คัฟฟี (Koffee) ในอังกฤษเรียกว่า คอฟฟี (Coffee) อันเป็นชื่อที่รู้จัก และใช้มาถึงในปัจจุบัน เมื่อมาถึงประเทศไทยคนไทยเรียกว่า โกปี๊ ข้าวแฝ่ และกลายเป็นกาแฟในที่สุด (สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร, 2552) กาแฟเป็นหนึ่งในเครื่องดื่มที่เป็นที่รู้จักและนิยมบริโภคของผู้คนทั่วโลก โดยมีปริมาณการจัดหาปีละประมาณ 7 ล้านตัน และถือเป็นหนึ่งในพืชเศรษฐกิจที่เป็นแหล่งรายได้สำคัญโดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศกำลังพัฒนา ซึ่งในบางประเทศการส่งออกกาแฟช่วยทำกำไรให้มากกว่าร้อยละ 50 ของรายได้ทั้งหมด (Garg, 2016)

สายพันธุ์กาแฟ

กาแฟในสกุล *Coffea* มีหลายสายพันธุ์ เช่น *Coffea arabica, C. canephora., C. dewevrei, C. congensis, C. eugenioides, C. kapakata, C. salvatrix, C. stenophylla, C. liberica, C. racemosa* และสายพันธุ์อื่นๆ ที่มีข้อมูลทางพันธุกรรม ความใกล้เคียงกัน แต่สายพันธุ์ที่เป็นที่รู้จักกันและมีการปลูกในเชิงการค้ามี 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์อะราบิกา (*Coffea arabica*; Arabica Coffee) และสายพันธุ์โรบัสตา (*Coffea canephora*; Robusta Coffee) (Batista และคณะ, 2016)

กาแฟอะราบิกา (Arabica Coffee)

กาแฟอะราบิกามีการพูดถึงครั้งแรกโดย Linnaeus ในปี ค.ศ. 1753 พันธุ์ที่รู้จักกันดี คือ สายพันธุ์ Typica และ Bourbon แต่ปัจจุบันได้มีการพัฒนาปรับปรุงพันธุ์ต่างๆ ขึ้นมา เช่น สายพันธุ์ Caturra นิยมปลูกในบราซิลและโคลัมเบีย สายพันธุ์ Mundo Novo นิยมปลูกในบราซิล สายพันธุ์ Tico นิยมปลูกใน

อเมริกากลาง และมีการพัฒนาให้เป็นไม้พุ่มเตี้ยสายพันธุ์ San Ramon และ Jamaican Blue Mountain ต้นกาแฟอะราบิกา เป็นไม้พุ่มขนาดใหญ่ที่มีใบรูปไข่สีเขียวเข้ม ลักษณะทางพันธุกรรมที่แตกต่างจากกาแฟสายพันธุ์อื่นๆ คือ กาแฟอะราบิกามี 4 ชุดโครโมโซม (4n) มากกว่า 2 ชุดโครโมโซม (2n) ผลเป็นรูปไข่และผลจะสุกในเวลาประมาณ 7-9 เดือน เมล็ดกาแฟอะราบิกามักจะมีสองเมล็ดแบน ส่วนที่เป็นเมล็ดเดี่ยวจะเรียกว่า peaberry เมื่อเปรียบเทียบกับต้นกาแฟโรบัสตา ต้นกาแฟอะราบิกาจะมีความแข็งแรงน้อยกว่าต้องการการดูแลอย่างดีจึงทำให้มีต้นทุนการผลิตสูงกว่า เนื่องจากกาแฟอะราบิกาไม่ต้านทานต่อศัตรูพืชและโรคต่างๆ จึงมีการปรับปรุงพันธุ์ขึ้น โดยสายพันธุ์ Catuai และ Mundo Novo เป็นพันธุ์ที่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์ให้ใกล้เคียง พันธุ์ดั้งเดิมของ *C. arabica* มากที่สุด กาแฟอะราบิกาสามารถปลูกได้ในอเมริกา แอฟริกากลาง แอฟริกาตะวันออก อินเดีย และในบางพื้นที่ของอินโดนีเซีย (Batista และคณะ, 2016)

ในประเทศไทยมีการปลูกกาแฟอะราบิกาในพื้นที่ภาคเหนือ เริ่มปลูกในพื้นที่จังหวัดแม่ฮ่องสอนโดยโครงการหลวงพัฒนาชาวเขา (มูลนิธิโครงการหลวง) ภายใต้ความช่วยเหลือของกระทรวงเกษตรของสหรัฐอเมริกา (USDA) ตั้งแต่ พ.ศ. 2517 เพื่อทดแทนการปลูกฝิ่นของชาวไทยภูเขาในภาคเหนือ หลังจากนั้นได้กระจายพันธุ์ไปตามแหล่งปลูกต่าง ๆ บนพื้นที่สูงทางภาคเหนือ เช่น มูลนิธิแม่ฟ้าหลวง ดอยช้าง ดอยวาวี จังหวัดเชียงราย เชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน ตาก น่าน และเพชรบูรณ์ ตามลำดับ (สุริยา ศรีแสง, 2555)

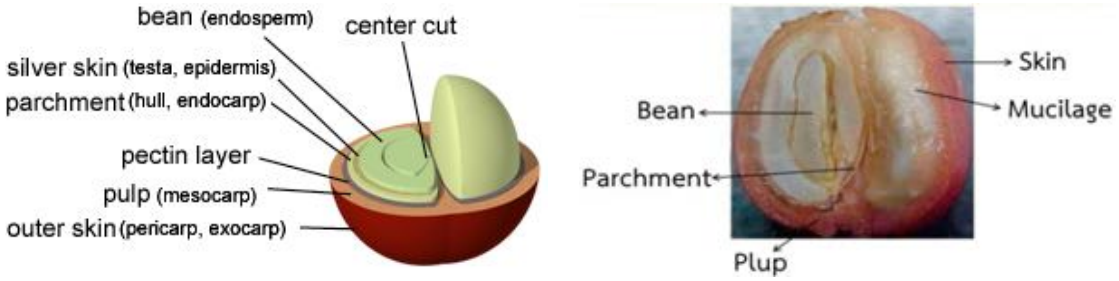
กาแฟโรบัสตา (Robusta Coffee)

กาแฟโรบัสตาเป็นสายพันธุ์ที่ปลูกกันอย่างแพร่หลายมากที่สุดของ *C. canephora* โดยเป็นไม้พุ่มหรือต้นไม้ขนาดเล็กที่มีความสูงได้ถึง 10 เมตร แต่มีระบบรากตื้น ผลจะกลมและใช้เวลากว่า 11 เดือน ผลถึงจะสุก เมล็ดมีรูปไข่และมีขนาดเล็กกว่า *C. arabica* กาแฟโรบัสตานิยมปลูกในแถบตะวันตก แอฟริกากลาง พื้นที่ส่วนใหญ่ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และบางพื้นที่ในบราซิล ซึ่งเป็นที่รู้จักกันในชื่อ Conilon (หรือเรียกว่า Kouillou) กาแฟโรบัสตาสามารถใช้สำหรับผลิตกาแฟที่ละลายน้ำได้ และใช้ผสมกับกาแฟอะราบิกา การวิจัยในปัจจุบันแสดงให้เห็นว่า กาแฟที่มาจากการผสมกันของกาแฟโรบัสตาและกาแฟอะราบิกานั้นจะให้รสสัมผัสที่แตกต่างไปจากรสสัมผัสของกาแฟอะราบิกาเพียงอย่างเดียว (Batista และคณะ, 2016)

กาแฟโรบัสตาเป็นพันธุ์ที่ทนต่อโรค แต่มีรสชาติกระด้างกว่าและไม่อ่อนละมุนเหมือนกาแฟอะราบิกา มีสารคาเฟอีนมากกว่าประมาณร้อยละ 2 ถึง 3 ต่อเมล็ด สามารถปลูกได้ในพื้นที่ตั้งแต่ระดับน้ำทะเลจนถึงระดับเหนือน้ำทะเล ประมาณ 2,000 ฟุต ในประเทศไทยปลูกมากในภาคใต้ เช่น จังหวัดชุมพร ระนอง และสุราษฎร์ธานี เป็นต้น สำหรับในตลาดโลก กาแฟโรบัสตาถือว่าเป็นกาแฟที่มีคุณภาพต่ำ เมล็ดดิบมีราคาไม่สูงนัก เนื่องจากวิธีการผลิตและเมล็ดที่ใช้ผลิตกาแฟพันธุ์โรบัสตานั้น มักไม่เป็นที่ยอมรับในตลาดกาแฟชนิดพิเศษ แต่อย่างไรก็ตามผลผลิตเกือบทั้งหมดของกาแฟพันธุ์โรบัสตามักถูกนำไปผลิตเป็นกาแฟสำเร็จรูป ซึ่งจะมีมูลค่าในตลาดเครื่องอุปโภคบริโภคสูง การผลิตกาแฟโรบัสตาจึงมีการผลิตเพื่อป้อนสู่ตลาดโลกอย่างต่อเนื่อง จึงมีการปรับปรุงพันธุ์ขึ้นเพื่อให้ได้กาแฟที่มีคุณภาพดี และเป็นที่ยอมรับในตลาดโลก (สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร, 2552)

องค์ประกอบของเมล็ดกาแฟ

ผลกาแฟ (coffee cherry) มีลักษณะคล้ายลูกหว้า รูปรี ก้านผลสั้น ผลดิบสีเขียว เมื่อเวลาผลสุกจะมีสีเหลือง สีส้ม หรือสีแดง เมื่อโตเต็มที่ผลกาแฟจะมีขนาดยาว 10-15 มิลลิเมตร ซึ่งภายในบรรจุเมล็ดกาแฟ (coffee bean) ผลกาแฟประกอบด้วยเนื้อเยื่อหลายชั้น (ภาพที่ 1.1) ได้แก่ 1) เปลือกหรือผนังผลชั้นนอก (skin หรือ pericarp หรือ exocarp) 2) เนื้อหรือผนังผลชั้นกลาง (pulp หรือ mesocarp) มีสีเหลือง เมื่อสุกมีรสหวาน และมีลักษณะเป็นเมือก (mucilage) 3) กะลาหรือผนังผลชั้นใน (parchment หรือ hull หรือ endocarp) จะห่อหุ้มเมล็ดไว้ 4) เยื่อหุ้มเมล็ด (silver skin หรือ testa หรือ epidermis) เป็นเยื่อบางๆ หุ้มเมล็ดที่อยู่ช่วงระหว่างเมล็ดกับกะลา 5) เมล็ด (bean หรือ endosperm) ซึ่งจะมี 2 เมล็ดประกบกัน ด้านที่ประกบกันจะอยู่ด้านในมีลักษณะแบน มีร่องบริเวณกลางเมล็ด 1 ร่อง ส่วนด้านนอกมีลักษณะโค้ง ในบางครั้งหากการผสมเกสรไม่สมบูรณ์ จะทำให้ผลติดเมล็ดเพียงเมล็ดเดียว ลักษณะเป็นเมล็ดเดี่ยวหรือเมล็ดโทน (peaberry) ผลกาแฟที่มีเมล็ดเดี่ยวจะรูปร่างกลมรีทั้งเมล็ด โดยมีร่องบริเวณกลางเม็ด 1 ร่อง (สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร, 2552; Batista และคณะ, 2016)



ก **ข**

ภาพที่ 1.1 ภาพแสดงองค์ประกอบต่างๆ ของผลกาแฟ

ก. ภาพจำลอง (ที่มา : http://www.ncausa.org/About-Coffee/What-is-Coffee)

ข. ภาพตัดขวาง (Batista และคณะ, 2016)

กระบวนการผลิตเมล็ดกาแฟ

ผลกาแฟหลังการเก็บเกี่ยวจะเข้าสู่กระบวนการแปรรูปให้อยู่ในสภาพที่เหมาะสม และสะดวกในการนำไปใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตผลิตภัณฑ์กาแฟต่อไป (สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร, 2552; De Bruyn และคณะ, 2016) โดยทั่วไปสามารถผลิตเมล็ดกาแฟสาร (green coffee) ได้ 2 กระบวนการ คือ

กระบวนการแบบแห้ง (Dry process) เป็นกระบวนการผลิตที่ง่าย มีขั้นตอนน้อย ประหยัดแรงงาน และไม่ต้องการเครื่องมือที่ซับซ้อน โดยการนำผลกาแฟที่เก็บเกี่ยวได้มาตากแดดบนตาข่ายประมาณ 15-20 วัน จนกาแฟแห้ง (ภาพที่ 2.1ก) ไม่ควรให้ชั้นผลกาแฟมีความหนาเกิน 3 เซนติเมตร และกลับเป็นระยะๆ เพื่อป้องกันการหมัก และสีของผลกาแฟไม่สม่ำเสมอ (สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร, 2552) หลังจากนั้นจึงนำผลกาแฟเข้าเครื่องสีกะเทาะเม็ดก็จะได้เมล็ดกาแฟสารที่ต้องการ วิธีนี้มีข้อเสีย คือ อาจ

เกิดกลิ่นจากการหมักที่เกิดจากเมือกหุ้มรอบกะลา ต้องรีบกะเทาะเปลือกทันทีก่อนที่จะเกิดการหมัก (พิมล วุฒิสินธุ์, 2553) ส่วนใหญ่ใช้กระบวนการผลิตแบบแห้งกับกาแฟโรบัสตา (Batista และคณะ, 2016)

กระบวนการแบบเปียก (Wet process) เป็นกระบวนการที่นิยมในการผลิตเมล็ดกาแฟสารอะราบิกา เพราะสามารถให้เมล็ดกาแฟที่มีกลิ่นและรสชาติดีกว่ากระบวนการแบบแห้ง แต่มีขั้นตอนมากกว่าและต้องมีน้ำในการทำความสะอาดอย่างเพียงพอ (ภาพที่ 2.1ข) มีขั้นตอนดังนี้ (พิมล วุฒิสินธุ์, 2553)

1. นำผลกาแฟสุกที่เก็บเกี่ยวได้แช่น้ำ เพื่อแยกผลที่ลอยน้ำออกจากผลกาแฟที่ดี

2. การปอกเปลือกผลกาแฟ (pulping) ทำได้โดยใช้เครื่องปอกเปลือกผลกาแฟทันทีหลังจากการเก็บเกี่ยวเพื่อป้องกันการหมักแล้วจะเกิดกลิ่นไม่ดีกับเมล็ดกาแฟสาร ถ้าหากไม่สามารถปอกเปลือกได้ทันทีก็เก็บผลกาแฟไว้ไม่เกิน 36 ชั่วโมง

3. การกำจัดเมือก (demulicaging) ต้องลอกเมือกออกเพื่อไม่ได้เกิดการหมัก

4. การล้างเมล็ดกาแฟ (washing) เป็นการล้างเมล็ดกาแฟกะลาที่ผ่านการหมักแล้วก่อนนำไปตาก

5. การแช่เมล็ดกาแฟ (water soaking) เป็นการแช่เมล็ดกาแฟกะลาที่ล้างเมือกออกแล้วประมาณ 12 ชั่วโมง ก่อนนำไปตากแดด เพื่อทำให้เมล็ดกาแฟมีสีสวยและรสชาติดี

6. การทำให้แห้ง (drying) โดยนำไปตากแดดให้ความชื้นลดลงอย่างพอเหมาะก่อนนำไปส่งขายหรือนำไปคั่ว การลดความชื้นที่พอเหมาะจะทำให้เมล็ดกาแฟมีสีสวยและคุณภาพดี

7. การสีเมล็ดกาแฟกะลา (hulling) เพื่อสีเอากะลาออกไปโดยใช้เครื่องสี ลักษณะเมล็ดกาแฟสารที่ดีต้องมีสีเขียวอมฟ้า และมีความชื้นประมาณร้อยละ 11-12

ก **ข**

ภาพที่ 1.2 กระบวนการผลิตเมล็ดกาแฟสาร (green coffee) หลังการเก็บเกี่ยว

ก. กระบวนการแบบแห้ง (ที่มา : http://www.madrascoffee.in/DryMethod.html)

ข. กระบวนการแบบเปียก (ที่มา : http://www.madrascoffee.in/WetMethod.html)

ชนิดของกาแฟเมื่อแบ่งตามกระบวนการผลิต สามารถแบ่งได้เป็น 3 ชนิด ดังนี้ (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2561)

1. ผลกาแฟ (coffee cherry) คือ ผลกาแฟสุกที่มีลักษณะเป็นสีแดง (ภาพที่ 1.3ก)

2. ผลกาแฟแห้ง (dried cherry) คือ ผลกาแฟที่ผ่านกระบวนการทำให้แห้งจนได้ผลกาแฟแห้งที่ไม่ได้เอาเปลือกออก รวมทั้งเมล็ดกาแฟที่มีเปลือกติดบางส่วน (ภาพที่ 1.3ข)

3. กาแฟกะลา (parchment coffee) คือ ผลกาแฟสุกที่เอาผนังผลชั้นนอกและผนังผลชั้นกลางออก แต่ยังคงเหลือผนังผลชั้นในหรือที่เรียกว่ากะลาติดอยู่ (ภาพที่ 1.3ค)

4. กาแฟสาร (green coffee) คือ ผลกาแฟสุกที่เอาส่วนของเปลือก ได้แก่ ผนังผลชั้นนอก ผนังผลชั้นกลางออก และผนังผลชั้นในหรือที่เรียกว่ากะลาออกแล้ว (ภาพที่ 1.3ง)

ก **ข** **ค** **ง**

ภาพที่ 1.3 ชนิดของกาแฟเมื่อแบ่งตามกระบวนการผลิต

ก. ผลกาแฟ (ที่มา : ตัวอย่างกาแฟที่เก็บจากพื้นที่โครงการหลวงในจังหวัดเชียงใหม่)

ข. ผลกาแฟแห้ง (ที่มา : https://www.sweetmarias.com/EthiopiaFeb2009-Pages/Image209.html)

ค. กาแฟกะลา (ที่มา : ตัวอย่างกาแฟที่เก็บจากพื้นที่โครงการหลวงในจังหวัดเชียงใหม่)

ง. กาแฟสาร (ที่มา : https://www.gettyimages.com/detail/photo/raw-green-coffee-beans.html)

จุลินทรีย์ประจำถิ่นที่พบในเมล็ดกาแฟหลังการเก็บเกี่ยว

ส่วนเนื้อผลกาแฟ (pulp) และเมือก (mucilage) สามารถเป็นสารตั้งต้นสำหรับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ทั้งแบคทีเรีย ยีสต์ และราที่มีส่วนเกี่ยวข้องในกระบวนการแปรรูปกาแฟโดยเฉพาะในระหว่างการหมักผลกาแฟ จุลินทรีย์สามารถย่อยเนื้อผลกาแฟและเมือกที่หุ้ม ทำให้เกิดการกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีที่จำเป็นต่อการหมักตามธรรมชาติ จุลินทรีย์ที่พบในกระบวนการแบบแห้ง และแบบเปียกมีความแตกต่างกัน และอาจเป็นประโยชน์หรือเป็นโทษต่อเมล็ดกาแฟก็ได้ (Hamdouche และคณะ, 2016)

แบคทีเรียส่วนใหญ่พบในผลกาแฟหลังการเก็บเกี่ยว และในระหว่างกระบวนการผลิตทั้งกระบวนการแบบแห้ง และแบบเปียก ได้แก่ Enterobacteriaceae เช่น *Klebsiella pneumoniae* แบคทีเรียกรดอะซิติก เช่น *Gluconobacter* spp. แบคทีเรียในดิน เช่น *Dyella kyungheensis* และแบคทีเรียกรดแลคติก เช่น lactobacilli, *Leuconostoc* spp., *Lactococcus* spp, *Weissella* spp. พบได้ในช่วงการหมักของกระบวนการแบบเปียกมากกว่ากระบวนการแบบแห้ง (De Bruyn และคณะ, 2017)

ยีสต์พบมากในผลกาแฟที่อยู่ในระหว่างการหมัก และเป็นเชื้อตั้งต้นในการผลิตเมล็ดกาแฟทั้งในกระบวนการแบบแห้ง และแบบเปียก ได้แก่ *Kluyveromyces marxianus, Pichia kluyveri*, *P. ohmeri*, *Candida* sp., *C. pseudointermedia, Issatchenkia orientalis, Torulaspora delbrueckii* และ

P. anomala ที่พบมากในกระบวนการแบบแห้ง (De Melo Pereira และคณะ, 2016; Masoud และคณะ, 2004)

ราที่พบส่วนใหญ่เป็นราสายใย มักพบบริเวณเปลือก และเนื้อของผลกาแฟหลังการเก็บเกี่ยวหรือที่ผ่านการล้างน้ำ ได้แก่ *Aspergillus* sp., *A. niger, A. ochraceus, Cladosporium* sp., *Eurotium chevalieri, Fusarium* sp., *F. chlamydosporum, F. solani, Geotrichum* sp., *Mucor hiemalis, Penicillium* sp., *P. fellutanum, P. roqueforti* (Batista และคณะ, 2016)

สารพิษจากรา

สารพิษจากรา (Mycotoxins) เป็นสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolites) ที่ผลิตขึ้นจากราสายใย เช่น *Aspergillus* sp., *Pencillium* sp., เป็นต้น (Alshannaq และ Yu, 2017) ในการจัดหมวดหมู่ของสารพิษจากรานั้นจะจัดจำแนกตามชนิด หรือลักษณะของราที่ผลิต หรือแบ่งตามกลไกการทำงานของสารพิษจากรา ราหนึ่งชนิด อาจจะผลิตสารพิษได้ชนิดเดียวหรือหลายชนิดก็ได้ รวมถึงราต่างชนิดกันอาจจะผลิตสารพิษที่เหมือนกันหรือต่างชนิดกันไป (Bennett และ Klich, 2003) โดยสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิที่ผลิตจากราสายใยมีเฉพาะบางตัวที่เป็นสารพิษ ตัวอย่างของสารพิษจากรา เช่น อะฟลาทอกซิน (aflatoxins) โอคราทอกซินเอ (ochratoxin A) ไตรโคทีซีน (trichothecenes) ซีราลีโนน (zearalenone) ดีออกซีนิวาลีนอล (deoxynivalenols) ที ทู ทอกซิน (T-2 toxins) ฟูโมนิซิน (fumonisins) และเออร์กอตอัลคาลอยด์ (ergot alkaloids) ที่ส่งผลต่อสุขภาพของคนและสัตว์ รวมถึงผลผลิตทางการเกษตร และมีส่วนสำคัญที่ทำให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจ (Haschek และคณะ, 2013) ราและสารพิษจากราที่พบบ่อยในอาหารและผลผลิตทางการเกษตรแสดงในตารางที่ 1.1

ตารางที่ 1.1 ราและสารพิษจากราที่พบบ่อยในอาหารและผลผลิตทางการเกษตร

ราที่ผลิตสารพิษ	**สารพิษจากรา**
Aspergillus parasiticus	อะฟลาทอกซิน บี 1, บี 2, จี 1, จี 2
A. flavus	อะฟลาทอกซิน บี 1, บี 2
Fusarium sporotrichioides, F. poae	ที ทู ทอกซิน
F. graminearum (roseum)	ดีออกซีนิวาลินอล, ซีราลีโนน
F. verticillioides, F. proliferatum	ฟูโมนิซิน
Penicillium verrucosum, A. ochracoeus	โอคราทอกซินเอ
Claviceps spp., *Neotyphodium coenophialum*	เออร์กอต อัลคาลอยด์
P. expansum	พาทูลิน

ที่มา : ดัดแปลงจาก Haschek และคณะ, 2013

ความอันตรายของสารพิษจากรา

สารพิษจากราสามารถจำแนกตามผลที่มีต่ออวัยวะเป้าหมาย เช่น สารพิษที่มีผลต่อตับ (hepatotoxins) สารพิษที่มีผลต่อไต (nephrotoxins) สารที่มีผลต่อระบบประสาท (neurotoxins) สารพิษที่มีผลต่อภูมิคุ้มกัน (immunotoxins) เป็นต้น หรือจำแนกตามผลที่มีต่อเซลล์หรือพันธุกรรม เช่น สารก่อวิรูปในทารก (teratogens) สารก่อกลายพันธุ์ (mutagens) สารก่อมะเร็ง (carcinogens) และสารก่อภูมิแพ้ (allergens) เมื่อร่างกายสัมผัสหรือได้รับสารพิษจากราเข้าไปก่อให้เกิดอันตรายแก่มนุษย์และสัตว์ได้อย่างฉับพลันหรือเรื้อรังต่อระบบต่างๆ ของร่างกาย (Bennett และ Klich, 2003)

การปนเปื้อนของสารพิษจากราในอาหารและผลผลิตทางการเกษตร

สารพิษจากราเป็นสารที่มีอยู่ทั่วโลกและพบการปนเปื้อนตามธรรมชาติในผลผลิตทางการเกษตรจำนวนมากโดยเฉพาะอย่างยิ่งในเมล็ดธัญพืช และพบปนเปื้อนอยู่ในถั่ว ผลไม้ ผลไม้แห้ง ผัก เมล็ดโกโก้ เมล็ดกาแฟ ไวน์ เบียร์ สมุนไพร และเครื่องเทศ (ตารางที่ 1.2) นอกจากนี้ ยังพบได้ในเนื้อ ไข่ นม และผลิตภัณฑ์จากนม เนื่องจากสัตว์กินอาหารที่มีการปนเปื้อนเข้าไป สารพิษจากราสามารถพบการปนเปื้อนได้ตั้งแต่การ เพาะปลูก ก่อนและหลังการเก็บเกี่ยว เช่น ในช่วงเพาะปลูกมักจะพบสกุล *Fusarium* หรือในระหว่างการเก็บรักษาผลผลิตจะพบสารพิษจากสกุล *Aspergillus* และ *Penicillium* เป็นชนิดแรก (Smith และคณะ, 2016)

ตารางที่ 1.2 การปนเปื้อนของสารพิษจากราในอาหารและผลผลิตทางการเกษตร

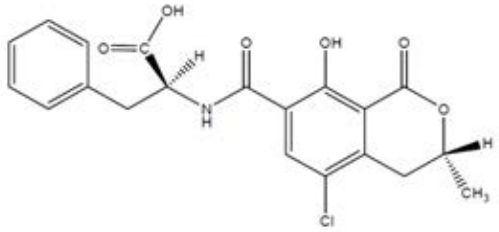
สารพิษจากรา	**อาหารและผลผลิตทางการเกษตรที่ปนเปื้อน**
อะฟลาทอกซิน (บี 1, บี 2, จี 1, จี 2, เอ็ม 1)	เมล็ดธัญพืช เมล็ดพืช ถั่ว เครื่องเทศ
โอคราทอกซิน (เอ, บี, ซี)	เมล็ดธัญพืช ผลไม้ เบียร์ ไวน์ น้ำผลไม้ กาแฟ
ที ทู ทอกซิน	เมล็ดพืช
ดีออกซีนิวาลินอล	เมล็ดพืช
ฟูโมนิซิน	ข้าวโพด ผลิตภัณฑ์จากข้าวโพด
ซีราลีโนน	เมล็ดพืช เมล็ดธัญพืช
เออร์กอต อัลคาลอยด์	เมล็ดข้าว หญ้า
พาทูลิน	แอปเปิ้ล น้ำแอปเปิ้ล ผลไม้ ผัก

ที่มา : ดัดแปลงจาก Hojnik และคณะ, 2017

โอคราทอกซินเอ

โอคราทอกซินเอ (Ochratoxin A) ถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1965 ว่าเป็นสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิที่ผลิตจาก *A. ochraceus* และถูกระบุว่าเป็นสารพิษจากราชนิดใหม่ โอคราทอกซินเอที่แยกได้จากข้าวโพดในสหรัฐอเมริกาได้ถูกระบุว่าเป็นสารพิษที่มีผลอันตรายต่อไต (nephrotoxin) หลังจากนั้นมีรายงานการค้นพบว่าโอคราทอกซินเอเป็นสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิที่ผลิตได้ราสายใยหลายสายพันธุ์ในสกุล *Aspergillus* และ *Penicillium* (Bennett และ Klich, 2003)

โอคราทอกซินเอ มีโครงสร้างเป็น pentaketide ที่เกิดจาก L-phenylalanine 2 โมเลกุลจับกันด้วยพันธะเอไมด์ (ภาพที่ 1.4) มีชื่อ IUPAC คือ L-phenylalanine-N-[(5-chloro-3,4-dihydro-8-hydroxy-3-methyl-1-oxo-1H-2-benzopyrane-7-yl) carbonyl]-(R)-isocoumarin (El Khoury และ Atoui, 2010) มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{20}H_{18}ClNO_6$ และมวลโมเลกุลเท่ากับ 403.8 โอคราทอกซินเอมีลักษณะเป็นผลึกสีขาว ไม่มีกลิ่น มีจุดหลอมเหลว 168 - 173 ºC และละลายน้ำได้ไม่ดี (Köszegi และ Poór, 2016)



ภาพที่ 1.4 โครงสร้างของโอคราทอกซินเอ (El Khoury และ Atoui, 2010)

ความเป็นพิษของโอคราทอกซินเอ

โอคราทอกซินเอมีความเป็นพิษต่อการทำงานของไตและตับทั้งในมนุษย์และสัตว์ นอกจากนี้ ยังเป็นสารกดภูมิคุ้มกัน สารก่อมะเร็ง และสารก่อให้เกิดทารกวิรูป และมีรายงานว่าโอคราทอกซินเอเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดภาวะไตอักเสบเรื้อรัง (Balkan endemic nephropathy; BEN) ของประชากรในแถบตะวันออกเฉียงใต้ของยุโรป (โครเอเชีย บอสเนีย บัลแกเรีย และโรมาเนีย) อีกทั้งยังเป็นสาเหตุสำคัญของโรคไต (Tunisian Nephropathy; TCIN) ของประชากรในตูนิเซีย และถูกจัดให้เป็นสารที่อาจก่อมะเร็งในกลุ่ม 2B เมื่อปี 1993 โดย IARC (International Agency for Research on Cancer) (El Khoury และ Atoui, 2010)

อวัยวะสำคัญที่เป็นเป้าหมายของโอคราทอกซินเอ คือ ไต เมื่อโอคราทอกซินเข้าสู่ร่างกาย จะไปรบกวนการทำงานของเอนไซม์ phenylalanine hydroxylase ในไต เนื่องจากมีโครงสร้างคล้ายกับโครงสร้างของ phenylalanine จึงไปยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ส่งผลให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีนที่ผิดปกติไป และกลายเป็นสาเหตุของความผิดปกติต่างๆ ตามมา เช่น เกิดการกลายพันธุ์ (Alshannaq และ Yu, 2017)

ราที่ผลิตโอคราทอกซินเอ

ราสำคัญที่ผลิตโอคราทอกซินเอ ได้แก่ ราในสกุล *Aspergillus* และ *Penicillium* โดยราทั้งสองสกุลถูกจัดเป็น storage fungi เนื่องจากมีการผลิตโอคราทอกซินเอในช่วงหลังการเก็บเกี่ยวหรือช่วงการเก็บรักษาผลผลิต แต่ถ้าอากาศร้อนและแห้ง *Aspergillus* และ *Penicillium* ก็สามารถผลิตโอคราทอกซินเอในช่วงการเพาะปลูกได้เช่นกัน (Pardo และคณะ, 2005)

ราในสกุล *Aspergillus* ที่ผลิตโอคราทอกซินเอมี 2 กลุ่ม (section) คือ *Circumdati* และ *Nigri* โดยราในกลุ่ม *Circumdati* ที่ผลิตโอคราทอกซิน ได้แก่ *A. ochraceus, A. sclerotiorum*, *A. steynii, A. westerdijkiae, A. melleus*, *A. auricomus, A. ostianus, A. petrakii, A. sulfurous, A. alliaceus* ส่วนใหญ่พบว่ามีการปนเปื้อนในเมล็ดกาแฟ เมล็ดโกโก้ องุ่น เป็นต้น (Pardo และคณะ, 2005; Alvindia และ Guzman, 2016)

ราในกลุ่ม *Nigri* ที่ผลิตโอคราทอกซินเอ ได้แก่ *A. niger* และ *A. carbonarius* พบว่ามีการปนเปื้อนในองุ่นและกาแฟเช่นกัน โดย *A. carbonarius* เป็นสายพันธุ์สำคัญในการผลิตโอคราทอกซินเอ เนื่องจากผลิตได้ในปริมาณที่สูงกว่า *A. niger* (Noonim และคณะ, 2008) นอกจากนี้ ยังมี *A. lacticoffeatus* และ *A. sclerotioniger* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากกาแฟ และพบว่ามีการผลิตโอคราทอกซินเอ ส่วน *A. heteromorphus, A. japonicas, A. ellipticus* และ *A. tubingensis* พบว่ามีการผลิตโอคราทอกซินเอเช่นเดียวกัน (Samson และคณะ, 2004)

ส่วนในสกุล *Penicillium* ที่ได้รับการยืนยันว่าผลิตโอคราทอกซินได้ ได้แก่ *P. verrucosum* ที่พบปนเปื้อนในธัญพืชในแถบยุโรป แคนาดา สหรัฐอเมริกา เนื่องจากเจริญได้ดีในแถบที่มีอุณหภูมิค่อนข้างต่ำ (Pardo และคณะ, 2005; Ilic และคณะ, 2007) *P. nordicum* มียีนที่แสดงออกว่าผลิตโอเคทอกซินเอได้เช่นเดียวกับ *A. niger*, *A. carbonarius, A. steynii* และ *A. westerdijkiae* (Gil-Serna และคณะ, 2018)

การปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอในเมล็ดกาแฟหลังการเก็บเกี่ยว

เมล็ดกาแฟหลังการเก็บเกี่ยวมีการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอมากกว่าก่อนการเก็บเกี่ยว ในเมล็ดกาแฟโรบัสตาพบการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอมากกว่าในเมล็ดกาแฟอะราบิกา เนื่องจากโดยทั่วไปเมล็ดกาแฟโรบัสตาจะใช้กระบวนการแบบแห้งที่ไม่ได้ผ่านการเอาเปลือก หรือเนื้อ หรือเมือกออก ซึ่งอาจเป็นสารตั้งต้นที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของราได้ ส่วนในเมล็ดกาแฟอะราบิกาผ่านกระบวนการแบบเปียกมีราเจริญน้อยกว่าจึงมีการปนเปื้อนน้อยกว่า (Culliao และ Barcelo, 2017; Noonim และคณะ, 2008)

Barcelo และ Barcelo (2018) ได้รายงานการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอในกาแฟหลังการเก็บเกี่ยวในประเทศฟิลิปปินส์ โดยศึกษาในสายพันธุ์โรบัสตา และสายพันธุ์อะราบิกาที่อยู่ระหว่างขั้นตอนการเก็บรักษา และการตากแห้ง ในสายพันธุ์โรบัสตาพบในผลกาแฟที่อยู่ระหว่างการตากแห้ง มีปริมาณโอคราทอกซินเอสูงถึง 120.2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ส่วนในสายพันธุ์อะราบิกาพบในผลกาแฟที่อยู่ระหว่างการเก็บรักษา มีปริมาณโอคราทอกซินเอเฉลี่ย 46.7 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

Chiotta และคณะ (2016) ได้รายงานถึงการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอในเมล็ดกาแฟสารและเมล็ดกาแฟที่ผ่านกระบวนการแปรรูปแล้วในกลุ่มประเทศละตินอเมริกา โดยมีรายงานในประเทศบราซิล พบการปนเปื้อนในเมล็ดกาแฟสาร 0.20 นาโนกรัมต่อกรัม และพบในเมล็ดกาแฟที่ผ่านการแปรรูปแล้ว 0.10 ถึง 0.30 นาโนกรัมต่อกรัม ส่วนในประเทศโคลัมเบีย พบการปนเปื้อนในเมล็ดกาแฟสาร 0.90 ถึง 19.40 นาโนกรัมต่อกรัม และพบในเมล็ดกาแฟที่ผ่านการแปรรูป 8.40 ถึง 13.90 นาโนกรัมต่อกรัม

Benites และคณะ (2017) ได้รายงานถึงการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอในเมล็ดกาแฟคั่วและเมล็ดกาแฟคั่วบดในประเทศโปรตุเกส โดยศึกษาในสายพันธุ์โรบัสตาและสายพันธุ์อะราบิกา พบว่าทั้งสองสายพันธุ์มีปริมาณโอคราทอกซินเอที่ปนเปื้อนแตกต่างกันเพียงเล็กน้อยและปริมาณโอคราทอกซินเอเฉลี่ยที่ตรวจพบในเมล็ดกาแฟคั่วมี 1.84 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมและในเมล็ดกาแฟคั่วบดมี 1.45 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

สำหรับในประเทศไทย ชวเลิศ ตรีกรุณาสวัสดิ์ และคณะ (2561) ได้รายงานถึงการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอในตัวอย่างกาแฟ สายพันธุ์โรบัสตาจากจังหวัดชุมพร และระนอง และสายพันธุ์อะราบิกาจากจังหวัดแม่ฮ่องสอน เชียงใหม่ และเชียงราย ได้แก่ ผลกาแฟแห้ง กาแฟกะลา กาแฟสาร กาแฟคั่ว กาแฟโบราณ และกาแฟสำเร็จรูป พบปริมาณโอคราทอกซินเอสูงสุดในผลกาแฟแห้งสายพันธุ์โรบัสตาอยู่ที่ 63.10 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ในกาแฟคั่วพบปริมาณโอคราทอกซินเอต่ำอยู่ที่ 0.2 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ส่วนในกาแฟโบราณและกาแฟสำเร็จรูปตรวจไม่พบปริมาณโอคราทอกซินเอ

จากรายงานของวิจัยเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าการติดตามและประเมินผลของปริมาณโอคราทอกซินเอที่ปนเปื้อนในกาแฟนั้นมีความสำคัญ เนื่องจากโอคราทอกซินเอมีการกระจายอย่างกว้างขวาง และปัจจุบันการควบคุมการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอในกาแฟนั้นยังไม่เป็นผลสำเร็จ (Benites และคณะ, 2017)

ข้อกำหนดปริมาณของโอคราทอกซินเอในอาหาร

ปัจจุบันองค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา (Food and Drug Administration of the United States; FDA) ยังไม่ได้กำหนดแนวทางหรือข้อกำหนดปริมานในการควบคุมโอคราทอกซินเอ (Alshannaq และ Yu, 2017) แต่สหภาพยุโรปได้กำหนดข้อจำกัดปริมาณของโอคราทอกซินเอไว้ในอาหารหลายประเภท (Commission Regulation (EC) No. 1881/2006, 2006) ข้อกำหนดปริมาณของโอคราทอกซินเอในอาหารและผลผลิตทางการเกษตรตามข้อกำหนดของสหภาพยุโรปแสดงในตารางที่ 1.3

สำหรับในประเทศไทย ประกาศมาตรฐานสินค้าเกษตร เรื่อง เมล็ดกาแฟอะราบิกา พ.ศ. 2561 และประกาศมาตรฐานสินค้าเกษตร เรื่อง เมล็ดกาแฟโรบัสตา พ.ศ. 2561 ได้กำหนดปริมาณสูงสุดของโอคราทอกซินเอพบได้ไม่เกิน 10 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2561)

ตารางที่ 1.3 ข้อกำหนดปริมาณของโอคราทอกซินเอในอาหารและผลผลิตทางการเกษตรของสหภาพยุโรป

สารพิษจากรา	ปริมาณปนเปื้อนสูงสุด (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)
เมล็ดธัญพืชที่ไม่ผ่านกระบวนการ	5.0
ผลิตภัณฑ์จากธัญพืชทุกชนิด	3.0
ผลไม้แห้ง (ลูกเกด องุ่นแห้ง)	10.0
เมล็ดกาแฟคั่ว	5.0
กาแฟผงสำเร็จรูป	10.0
เครื่องดื่มจากองุ่น	2.0
ผลิตภัณฑ์ธัญพืชสำหรับทารกและเด็ก	0.5
เมล็ดกาแฟสาร	10.0

ที่มา : ดัดแปลงจาก Commission Regulation (EC) No. 1881/2006, 2006

แบคทีเรียกรดแลคติก

แบคทีเรียกรดแลคติก (Lactic acid bacteria; LAB) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส ไม่เคลื่อนที่ และไม่สร้างสปอร์ ลักษณะทางสัณฐานวิทยามีทั้งรูปร่างแท่งและรูปร่างกลม เป็นแบคทีเรียที่ไม่ต้องการออกซิเจนหรือต้องการออกซิเจนในปริมาณน้อย สามารถหมักคาร์โบไฮเดรตได้เป็นกรดแลคติก การจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติกในสกุลต่างๆ ขึ้นอยู่กับรูปร่างหรือลักษณะเซลล์ รูปแบบของการหมักน้ำตาลกลูโคส การใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ การเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ (Teuber, 1993) รวมถึงการวิเคราะห์ในระดับพันธุกรรมโดยใช้เทคนิคในระดับโมเลกุล และการทำผังวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) (Stiles และ Holzapfel, 1997) สกุลที่มีการจัดจำแนก ได้แก่ *Lactobacillus, Carnobacterium, Streptococcus, Enterococcus, Lactococcus, Vagococcus, Leuconostoc, Oenococcus, Brochothix, Pediococcus*, *Weissella* และ *Tetragenococcus* (Stiles และ Holzapfel, 1997) สกุลต่างๆ ของแบคทีเรียกรดแลคติก และคุณสมบัติที่เกี่ยวข้องแสดงในตารางที่ 1.4

แบคทีเรียกรดแลคติกสร้างพลังงานจากการหมักคาร์โบไฮเดรต เกิดกรดแลคติกจากปฏิกิริยา 2 วิถีทาง คือ วิถีทางที่ได้กรดแลคติกเพียงอย่างเดียว เรียกว่า โฮโมเฟอร์เมนเททีฟ (homofermentative metabolism) และวิถีทางที่ได้กรดแลคติกร่วมกับสารอื่นในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน เรียกว่า เฮทเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ (heterofermentative metabolism) (อำพรรณ ชัยกุลเสรีวัฒน์, 2551; Gaenzle, 2015) (ภาพที่ 1.5)

โฮโมเฟอร์เมนเตทีฟแบคทีเรีย เป็นแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกได้ในปริมาณร้อยละ 85 หรือมากกว่าจากการหมักคาร์โบไฮเดรต ซึ่งพวกนี้จะหมักน้ำตาลกลูโคส (glucose) 1 โมล เป็นกรดแลคติก 2 โมล (ภาพที่ 1.5ก) และได้กรดอะซิติก (acetic acid) เอทานอล (ethanol) และคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2)

เล็กน้อย สายพันธุ์ที่นิยมใช้หมัก ได้แก่ *Lactobacillus acidophilus, L. delbruckii* และ *L. helveticus* (อำพรรณ ชัยกุลเสรีวัฒน์, 2551) และส่วนใหญ่ใช้ในการหมักเนื้อสัตว์ นม หรือการหมักในความเข้มข้นของเกลือสูง (Gaenzle, 2015)

เฮทเทอโรเฟอร์เมนเตทีฟแบคทีเรีย เป็นแบคทีเรียที่หมักคาร์โบไฮเดรต เช่น น้ำตาลกลูโคสให้กรดแลคติกประมาณร้อยละ 50 นอกนั้นให้กรดอะซิติก เอทานอล และคาร์บอนไดออกไซด์ (ภาพที่ 1.5ข) สายพันธุ์ที่นิยมใช้หมัก ได้แก่ *L. plantarum, L. casei* และ *L. sake* (อำพรรณ ชัยกุลเสรีวัฒน์, 2551) และส่วนใหญ่ใช้ในการหมักไวน์ ไซเดอร์ ข้าวโอ๊ต (cereal porridges) แป้งโดสำหรับทำขนมปัง กิมจิ (Gaenzle, 2015)

ตารางที่ 1.4 สกุลต่างๆ ของแบคทีเรียกรดแลคติกและคุณสมบัติที่เกี่ยวข้อง

สกุล	**รูปร่าง**	**Catalase**	**Nitrite reduction**	**การหมัก**
Lactobacillus	rod	-	-	Hetero-
Weissella	rod	-	-	Homo-/Hetero-
Streptococcus	coccus	-	-	Homo-
Carnobacterium	rod	-	-	Homo-
Enterococcus	coccus	-	-	Homo-
Lactococcus	coccus	-	-	Homo-
Vagococcus	coccus	-	-	Homo-
Leuconostoc	coccus	-	-	Hetero-
Oenonostoc	coccus	-	-	Hetero-
Brochothix	rod	+	+	Homo-
Pediococcus	coccus	+*	+	Homo-
Tetragenococcus	coccus	-	-	Homo-

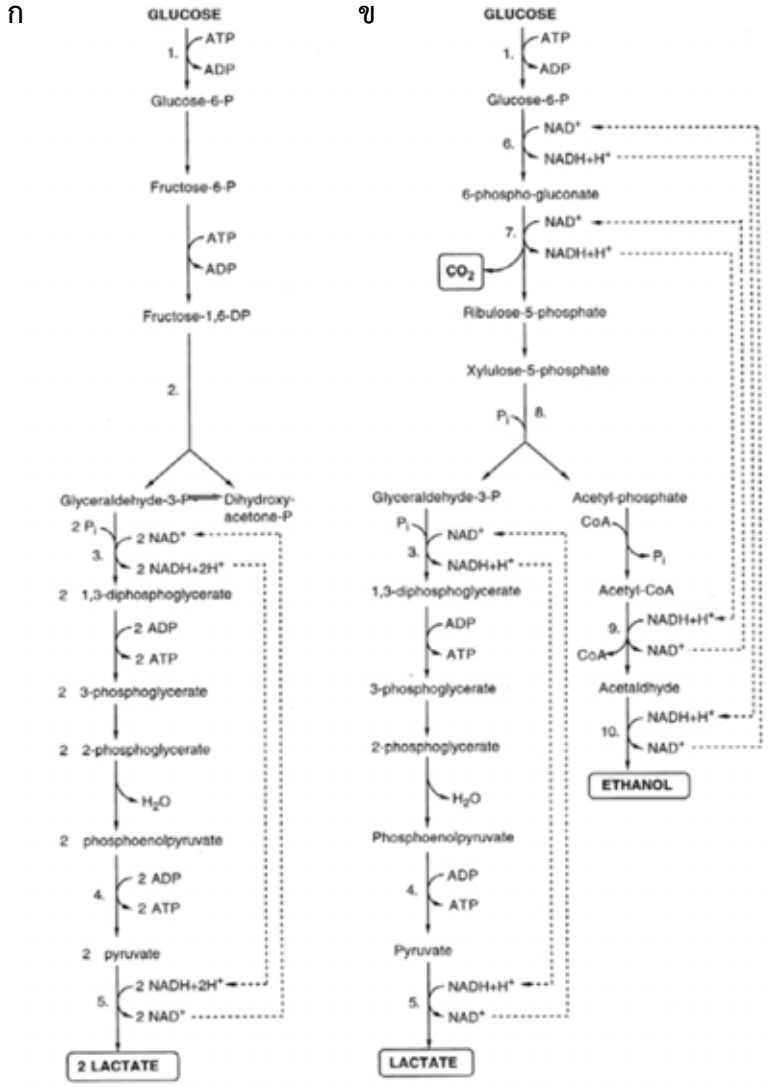
ที่มา : ดัดแปลงจาก Stiles และ Holzapfel, 1997

หมายเหตุ : สัญลักษณ์ - หมายถึงไม่พบการสร้างเอนไซม์คะตะเลสและไม่เกิดรีดักชันของไนไตรล์

* *Pediococcus* โดยปกติไม่สร้างคะตะเลสแต่มีบางสายพันธุ์ที่สร้าง pseudocatalase

Homo- : Homofermentative

Hetero- : Heterofermentative



ภาพที่ 1.5 วิถีกระบวนการหมักน้ำตาลของแบคทีเรียกรดแลคติก (Axelsson, 2004)
ก. โฮโมเฟอร์เมนเททีฟ (วิถีไกลโคไลซิส) ข. เฮเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ (วิถี 6-ฟอสฟอกลูโคเนต)

ความสำคัญของแบคทีเรียกรดแลคติก

แบคทีเรียกรดแลคติกมีความสำคัญทางเศรษฐกิจโดยเฉพาะในอุตสาหกรรมอาหาร บทบาทสำคัญคือ ใช้เป็นหัวเชื้อตั้งต้นสำหรับการหมัก ซึ่งมีบทบาทสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่น และป้องกันการเน่าเสียในอาหารหมักหลายชนิด ทั้งยังมีบทบาทสำคัญในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์และสัตว์โดยเฉพาะในวัยเด็ก และวัยรุ่น สามารถควบคุมเชื้อประจำถิ่นที่มีตามธรรมชาติใน นม เนื้อสัตว์ ผัก และผลิตภัณฑ์จากธัญพืชเมื่อมีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม (Gaenzle, 2015)

นอกจากนี้ แบคทีเรียกรดแลคติกยังถูกนำมาใช้เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพที่ปลอดภัยในการควบคุมการเจริญของราที่ปนเปื้อนหลังการเก็บเกี่ยว สามารถสร้างสารประกอบที่เป็นปฏิปักษ์ต่อรา หรือสารเมแทบอไลต์ไปยับยั้งการเจริญของราและการผลิตสารพิษจากรา (Lappa และคณะ, 2018)

ความสามารถของแบคทีเรียกรดแลคติกที่เป็นปฏิปักษ์ต่อราที่ผลิตสารพิษ

แบคทีเรียกรดแลคติกมีความสามารถในการควบคุมการเจริญเติบโต และยับยั้งการผลิตสารพิษของรา โดยทั่วไปแล้วเกิดจากสารประกอบที่เป็นปฏิปักษ์ต่อรา สารประกอบเหล่านี้มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ เช่น กรดอินทรีย์ (กรดอะซิติก และกรดแลคติก) ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (H_2O_2) สารประกอบประเภทโปรตีน รูเทอริน กรดไขมัน และสารประกอบฟีโนลิก (Perczak และคณะ, 2018) ทั้งนี้ ต้องคำนึงถึงปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างสารประกอบของแบคทีเรียแลคติกด้วย โดยมีปัจจัยสำคัญ ได้แก่ ระยะพักตัวของเชื้อ (incubation time) อุณหภูมิ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ ค่าความเป็นกรด-เบส (Dalié และคณะ, 2010)

กรดอินทรีย์ (organic acids) เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายจากการหมักคาร์โบไฮเดรต ผลิตภัณฑ์หลักของการหมัก คือ กรดแลคติก และกรดอะซิติก กรดเหล่านี้ได้รับการยอมรับว่ามีความปลอดภัยสำหรับใช้ในการเก็บรักษาอาหาร มีสมมติฐานว่าเมื่อกรดอินทรีย์แพร่เข้าไปในเยื่อหุ้มเซลล์ (plasma membrane) ของรา จะทำให้เกิดความเป็นกลางของศักย์ไฟฟ้าภายในเซลล์ และนำไปสู่การเกิด bacteriostasis ส่งผลให้กลไกต่างๆ ของราหยุดการทำงาน (Perczak และคณะ, 2018) กรดอะซิติกเป็นตัวยับยั้งการเติบโตของราที่ดีที่สุด สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *P. expansum* IDM / FS2, *A. niger* FTDC3227 และ IDM1, *A. flavus* FTDC3226 และ *F. graminearum* IDM623 ที่ความเข้มข้นประมาณ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Dalié และคณะ, 2010)

ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ส่วนใหญ่จะผลิตเมื่อมีออกซิเจน และเนื่องจากไม่สามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลสได้จึงมีการสะสมของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แล้วทำให้เกิดออกซิเดชันที่ลิพิดเมมเบรน (lipid membrane) และที่โปรตีนในเซลล์ของรา มีผลยับยั้งการเจริญของราได้ (Dalié และคณะ, 2010) และมีการเสนอให้ใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เคลือบบนผิวของแอปเปิ้ลเพื่อยับยั้งการเจริญของ *Penicillium expansum* (Perczak และคณะ, 2018)

กรดไขมัน สารประกอบที่แนะนำ คือ Antifungal 3-Hydroxy Fatty Acids (3-OH-FAs) ที่ผลิตจาก *Lactobacillus plantarum* MiLAB 14 โดยมีคุณสมบัติคล้ายผงซักฟอกหรือสารซักล้างต่างๆ ซึ่งมีผลต่อโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ของรา 3-OH-FAs ทำให้ lipid bilayers เปลี่ยนรูปร่างไป แบคทีเรียจึงสามารถซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ไปแล้วปล่อยพวกอิเล็กโทรไลต์และโปรตีนภายในเซลล์ ส่งผลให้เยื่อหุ้มเซลล์ของราแตก (Sjögren และคณะ, 2003)

รูเทอริน เป็นผลิตภัณฑ์จากการหมักกลีเซอรอลที่ผลิตโดย *Lactobacillus reuteri, L. brevis, L. buchneri, L. collinoides* และ *L. coryniformis* ภายใต้การหมักแบบไม่ใช้ออกซิเจน สารประกอบนี้สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ribonuclease ซึ่งเป็นเอนไซม์หลักที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (Perczak และคณะ, 2018) และมีรายงานว่าสามารถยับยั้งการเจริญของ *Candida* sp., *Torulopsis* sp., *Saccharomyces* sp., *Aspergillus* sp. และ *Fusarium* sp. (Dalié และคณะ, 2010)

สารประกอบฟีโนลิก เป็นสารประกอบฟีนอล และเป็นวงอะโรมาติกไม่อิ่มตัว Mandal และคณะ (2007) ศึกษาพบว่า *Pediococcus acidilactici* LAB 5 สามารถผลิตสารประกอบฟีโนลิกที่สามารถยับยั้งราที่ผลิตสารพิษได้ในปริมาณที่แตกต่างกันไปตามแหล่งอาหารที่พบรานั้นๆ เช่น *Alternaria solani,*

Aspergillus fumigatus, A. parasiticus, Cladosporium herbarum, Curvularia lunata, Fusarium oxysporum, Microsporium sp., *Mucor* sp. และ *Penicillium* sp.

สารประกอบประเภทโปรตีน ยังไม่มีหลักฐานชัดเจนว่าเป็นสารประกอบโปรตีนที่ยับยั้งการเติบโตของราจากการผลิตของแบคทีเรียกรดแลคติก แต่ก็ยังมีรายงานว่ามีบางสายพันธุ์ เช่น *Lactococcus lactis* subsp. *lactis, Lactobacillus casei* subsp. *pseudoplantarum* และ *Pediococcus pentosaceous* ที่ผลิตสารยับยั้งราที่ไวต่อเอนไซม์โปรติโอไลติก (proteolytic enzymes) (Perczak และคณะ, 2018)

Rouse และคณะ (2008) ได้ศึกษาคุณสมบัติการยับยั้งการเจริญของราและการผลิตสารพิษจากราของ *Pediococcus pentosaceus* ว่าสามารถยับยั้ง *Penicillium expansum* ที่เป็นสาเหตุทำให้แอปเปิ้ลเน่า พบว่า *P. pentosaceus* สร้างสารประกอบเปปไทด์ออกมา (antifungal peptides) และสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตและการผลิตพาทูลินของ *P. expansum* และลดการเน่าของแอปเปิ้ลได้

Kivanc และคณะ (2014) ได้ศึกษาและค้นพบเป็นครั้งแรกว่า *Enterococcus durans* มีคุณสมบัติสามารถยับยั้งการเจริญของราและการผลิตสารพิษจากราของ *P. chrysogenum, P. griseofulvum* และ *A. parasiticus* โดยผลิตสารประกอบประเภทโปรตีน และกรดอินทรีย์ แต่ต้องศึกษาเพิ่มเติมว่าสารประกอบนี้ของ *E. durans* สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้เลยหรือใช้ร่วมกับสารป้องกันแบบชีวภาพชนิดอื่นๆ และ *E. durans* สามารถใช้เป็นหัวเชื้อตั้งต้น (starter culture) ในอาหารได้ จึงทำให้สามารถใช้เป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์ในอาหารได้โดยตรง แต่ก็ยังต้องศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับ *E. durans* ด้วยเช่นกัน

Al-Haik และคณะ (2017) ได้ศึกษาคุณสมบัติการยับยั้งการเจริญของราและการผลิตสารพิษจากราของ *Lactobacillus bulgaricus* S2 ที่มีการใช้กันอย่างแพร่หลายในการหมักและการเก็บรักษาอาหารโดยแยกมาจากนมแกะ พบว่า *L. bulgaricus* S2 สร้างสารประกอบที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตและการผลิตอะฟลาทอกซินของ *Aspergillus flavus* ได้

แบคทีเรียกรดแลคติกที่พบในเมล็ดกาแฟหลังการเก็บเกี่ยว

แบคทีเรียกรดแลคติกพบได้ตั้งแต่ผิวของผลกาแฟสุก แต่พบได้มากที่สุดในกระบวนการผลิตเมล็ดกาแฟ โดยเฉพาะกระบวนการแบบเปียก ซึ่งพบมากที่สุดในขั้นตอนการแช่เมล็ดกาแฟ เนื่องจากแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถใช้ผนังผลชั้นกลาง และผนังผลชั้นในของผลกาแฟเป็นสารตั้งต้นในการหมัก ทำให้สามารถเจริญเติบโตได้ ส่วนในกระบวนการแบบแห้ง เนื่องจากมีความชื้นลดลงทำให้การหมักเกิดได้ไม่ดี เป็นผลให้พบแบคทีเรียกรดแลคติกได้น้อยกว่า (De Bruyn และคณะ, 2017) แบคทีเรียกรดแลคติกที่พบบ่อยในเมล็ดกาแฟหลังการเก็บเกี่ยวแสดงในตารางที่ 1.5

ตารางที่ 1.5 แบคทีเรียกรดแลคติกที่พบบ่อยในเมล็ดกาแฟหลังการเก็บเกี่ยว

สกุล	สายพันธุ์	ที่มา
Lactobacillus	*Lactobacillus plantarum*	Djossou และคณะ (2011)
	Lactobacillus brevis	De Melo Pereira และคณะ
	Lactobacillus paracasei	(2016)
Weissella	*Weissella confuse*	Leong และคณะ (2014)
	Weissella thailandensis	
Enterococcus	*Enterococcus faecalis*	Leong และคณะ (2014)
Lactococcus	*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*	Leong และคณะ (2014)
Leuconostoc	*Leuconostoc citreum*	Leong และคณะ (2014)
	Leuconostoc pseudomesenteroides	
	Leuconostoc mesenteroides	Vilela และคณะ (2010)

การออกฤทธิ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่เป็นปฏิปักษ์ต่อราที่ผลิตโอคราทอกซินเอ

Djossou และคณะ (2011) ได้ศึกษาแบคทีเรียกรดแลคติกในไซเลจกาแฟ และราที่ผลิตโอคราทอกซินเอในเมล็ดกาแฟโรบัสตา พบว่า *Lactobacillus plantarum* สามารถผลิตสารประกอบที่เป็นปฏิปักษ์ต่อรามายับยั้งการเจริญของ *A. carbonarius* ที่ปนเปื้อนในเมล็ดกาแฟโรบัสตาได้

Belkacem-Hanfi และคณะ (2014) ศึกษาแบคทีเรียกรดแลคติกจากข้าว มีรายงานว่า *L. plantarum* สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. carbonarius* ได้เช่นกัน และพบว่า *L. plantarum* ผลิตกรดอินทรีย์ คือ กรดอะซิติก และกรดโพรพิโอนิก

Leong และคณะ (2014) ได้ศึกษาแบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกจากผลกาแฟสด (coffee cherrys) สายพันธุ์อะราบิกาในไต้หวัน พบว่ามี *Weissella confusa, Leuconostoc pseudomesenteroides, Lactobacillus plantarum, Lactococcus lactis* subsp. *lactis, Leuconostoc citreum, Weissella thailandensis, Enterococcus faecalis* และ *Enterococcus* sp. และมีแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด 34 ไอโซเลทที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* ได้โดยการผลิตสารประกอบที่เป็นปฏิปักษ์ต่อรา นอกจากนี้ยังพบว่า *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* และ *Enterococcus faecalis* สามารถผลิตสารยับยั้งที่คล้ายกับแบคทีริโอซิน (bacteriocin-like)

De Melo Pereira และคณะ (2016) พบแบคทีเรียกรดแลคติกในเมล็ดกาแฟที่อยู่ในขั้นตอนการผลิต เช่น ในขั้นตอนการหมักได้แก่ *Lactobacillus* sp., *Lactobacillus brevis, Lactobacillus plantarum* และ *Lactobacillus paracasei* สามารถยั้งยั้งการเจริญของ *A. westerdijkiae* ได้ และยับยั้งได้มากขึ้นเมื่ออยู่ร่วมกับยีสต์ เช่น *Pichia fermentans* ในขณะที่ De Bruyn และคณะ (2017) พบแบคทีเรียกรดแลคติกในเมล็ดกาแฟหลังการเก็บเกี่ยวที่อยู่ในช่วงการผลิตแบบเปียก (Wet processing) ใน

ขั้นตอนการหมักของผลกาแฟที่ยังไม่ได้เอาเปลือกออก (depulping) โดยพบ *Leuconostoc* spp., *Lactococcus* spp. และ *Weissella* spp. และพบว่าสร้างสารเมแทบอไลต์ เช่น กรดอะซิติก เอทานอล กลีเซอรอล กรดแลคติก และแมนนิทอล เป็นต้น แต่เมื่อผ่านการหมัก การแช่ และการทำให้แห้งแล้วนั้นจะมีความเข้มข้นลดลง

ปัจจุบันนิยมใช้ตัวควบคุมทางชีวภาพมาเป็นทางเลือกในการควบคุมการเจริญของรา และการผลิตสารพิษจากราที่ปนเปื้อนในช่วงหลังการเก็บเกี่ยว แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นหนึ่งในตัวควบคุมทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพ สามารถสร้างสารประกอบที่เป็นปฏิปักษ์ต่อรา หรือสารเมแทบอไลต์ไปยับยั้งการเจริญของรา และการผลิตสารพิษจากรา (Lappa และคณะ, 2018) นอกจากนี้ แบคทีเรียกรดแลคติกยังถูกนำมาใช้ใน เชิงการค้า โดยถือว่าเป็นจุลินทรีย์ที่ปลอดภัย ไม่เป็นเชื้อก่อโรค (Generally recognized as safe; GRAS) (De Melo Pereira และคณะ, 2016) ด้วยประโยชน์เหล่านี้จึงทำให้แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการใช้ควบคุมการเจริญ และการผลิตสารพิษจากราในเมล็ดกาแฟหลังการเก็บเกี่ยวได้

ดังนั้น โครงการนี้มีจุดประสงค์เพื่อคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกในตัวอย่างกาแฟหลังการเก็บเกี่ยว ได้แก่ ผลกาแฟสุก เมล็ดกาแฟหมัก เมล็ดกาแฟกะลา และน้ำหมักเมล็ดกาแฟจากสถานีวิจัยโครงการหลวงแม่หลอด ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงตีนตก และศูนย์พัฒนาโครงการหลวงป่าเมี่ยง จังหวัดเชียงใหม่ ประเทศไทย และประเมินผลการเป็นปฏิปักษ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกต่อราที่มีความสามารถในการผลิตโอคราทอกซินเอ

บทที่ 2

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีการทดลอง

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงยี่ห้อ Olympus บริษัท Olympus, Japan
2. ขวดดูแรนขนาด 500 และ 1,000 มิลลิลิตร บริษัท SCOHTT, Germany
3. ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร บริษัท Pyrex, Germany
4. เครื่องชั่งรุ่น PG6002-S และ AG285 บริษัท Mettler Toledo, Switzerland
5. เครื่องดูดจ่ายสารละลาย (pipette aid) รุ่น YP17CAF0004076 บริษัท DLAB Scientific, China
6. เครื่องตีบดผสมอาหาร (stomacher) รุ่น Nr 397/520 บริษัท IUL Instruments, Spain
7. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อไอน้ำ รุ่น SS-325 และ ES-315 บริษัท Tomy Digital Biology, Japan
8. เครื่องปั่นผสมรุ่น Gene2 บริษัท Scientific Industries, USA
9. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-เบส รุ่น Seven Easy บริษัท Mettler Toledo, Switzerland
10. จานเลี้ยงเชื้อแก้ว ขนาด 15 x 100 มิลลิเมตร บริษัท Pyrex, England
11. จานเลี้ยงเชื้อพลาสติก ขนาด 15 x 94 มิลลิเมตร บริษัท Greiner bio-one, Thailand
12. ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส บริษัท Memmert, Thailand
13. ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บริษัท Memmert, Thailand
14. ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บริษัท Contherm Scientific Limited, New Zealand
15. ตู้เย็น อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส บริษัท Sandenintercool, Thailand
16. ตู้แช่จุดเยือกแข็งต่ำ อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส บริษัท Sandenintercool, Thailand
17. ตู้อบแห้ง บริษัท Contherm Scientific Limited, New Zealand
18. ถุงมือยาง ยี่ห้อ SemperGuard รุ่น 0537 บริษัท Siamsempermed, Thailand
19. ถุงใส่ตัวอย่างสำหรับตีบดผสมอาหาร (stomacher bag) บริษัท White group, Thailand
20. ที่วางหลอดทดลอง (test tube rack)
21. บีกเกอร์ ขนาด 250, 500 และ 1000 มิลลิลิตร บริษัท Pyrex, Germany
22. ปิเปตต์พลาสติกขนาด 10 มิลลิลิตร บริษัท Merck, Germany
23. แผ่นพาราฟิล์ม บริษัท Menasha, Thailand
24. ไมโครปิเปตต์ ขนาด 20, 200, 1000 ไมโครลิตร และขนาด 5 มิลลิลิตร บริษัท Eppendrof, Germany
25. หลอดดักแก๊ส (durham tube)
26. หลอดทดลองฝาเกลียว ขนาด 13 x 100 มิลลิลิตร บริษัท Pyrex, Germany

27. หลอดไมโครเซนติฟิวก์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร บริษัท Axygen, USA
28. ฮีโมไซโตมิเตอร์ (hemocytometer) บริษัท Precicolor, Germany

เคมีภัณฑ์

1. กลูโคส (glucose) บริษัท HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., India
2. แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) บริษัท Carlo Erba Reagent s.r.l., Italy
3. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) บริษัท Merck, Germany
4. น้ำกลั่น
5. น้ำปลอดประจุ
6. เปปโทน (peptone) บริษัท HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., India
7. ผงวุ้น (agar) บริษัท Difco Laboratories, USA
8. โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) บริษัท Merck, Germany
9. ฟีนอลเรด (phenol red) บริษัท May and Baker, England
10. เมทานอล (CH_3OH) บริษัท Merck, Germany
11. ราฟิโนส (raffinose) บริษัท Bio Basic, Canada
12. แลกโทส (lactose) บริษัท Oxoid Ltd., England
13. สารละลายไอโอดีน (Gram Iodine solution)
14. สีแกรมคริสตัลไวโอเลต (Gram Crytal Violet)
15. สีซาฟานิน โอ (Gram Safranin O)
16. เอทานอล 95% (CH_2OH)
17. ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (H_2O_2)
18. de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) Agar บริษัท Difco Laboratories, USA
19. N, N, N', N-Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochroride บริษัท Sigma, USA
20. Potato Dextrose Agar (PDA) บริษัท Difco Laboratories, USA
21. Potato Dextrose Broth บริษัท Difco Laboratories, USA
22. Tween 80 บริษัท Merck, Germany

วิธีดำเนินการทดลอง

2.1 การเก็บตัวอย่างกาแฟ

เก็บตัวอย่างเมล็ดกาแฟอะราบิกา 3 ชนิด ได้แก่ ผลกาแฟสุก เมล็ดกาแฟหมัก และเมล็ดกาแฟกะลา จำนวน 16 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 1 กิโลกรัม ประกอบด้วย ผลกาแฟสุก 6 ตัวอย่าง (ภาพที่ 2.1ก) เมล็ดกาแฟหมัก 6 ตัวอย่าง (ภาพที่ 2.1ข) เมล็ดกาแฟกะลา จำนวน 4 ตัวอย่าง (ภาพที่ 2.1ค) และเก็บตัวอย่างน้ำหมักเมล็ดกาแฟ จำนวน 5 ตัวอย่าง (ภาพที่ 2.1ข) ตัวอย่างละ 1 ลิตร ตัวอย่างทั้งหมดเก็บเมื่อเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2561 (ช่วงต้นฤดูการเก็บเกี่ยว) จากพื้นที่โครงการหลวง 3 โครงการในจังหวัดเชียงใหม่ ประเทศไทย ได้แก่ สถานีวิจัยโครงการหลวงแม่หลอด (ตั้งอยู่ที่ตำบลสบเปิง อำเภอแม่แตง มีพื้นที่ 5,226 ไร่ สูงจากระดับน้ำทะเล 600 - 1,000 เมตร อุณหภูมิเฉลี่ย 28 องศาเซลเซียส) ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงตีนตก (ตั้งอยู่ที่ตำบลห้วยแก้ว อำเภอแม่ออน มีพื้นที่ 75,506 ไร่ สูงจากระดับน้ำทะเล 650 - 1,500 เมตร อุณหภูมิเฉลี่ย 23 องศาเซลเซียส) และศูนย์พัฒนาโครงการหลวงป่าเมี่ยง (ตั้งอยู่ที่ตำบลเทพเสด็จ อำเภอดอยสะเก็ด มีพื้นที่ 21,656 ไร่ สูงจากระดับน้ำทะเล 750 - 1,300 เมตร อุณหภูมิเฉลี่ย 23 องศาเซลเซียส) (มูลนิธิโครงการหลวง, 2555) ในช่วงเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2561 จังหวัดเชียงใหม่มีอุณหภูมิต่ำสุดเฉลี่ย 19-21 องศาเซลเซียส อุณหภูมิสูงสุดเฉลี่ย 31-33 องศาเซลเซียส และมีปริมาณน้ำฝนเฉลี่ย 15-30 มิลลิเมตร (ศูนย์อุตุนิยมวิทยาภาคเหนือ, 2561)

ก **ข** **ค**

ภาพที่ 2.1 ตัวอย่างกาแฟที่เก็บจากพื้นที่โครงการหลวงในจังหวัดเชียงใหม่
ก. ผลกาแฟสุก ข. เมล็ดกาแฟหมักและน้ำหมัก ค. เมล็ดกาแฟกะลา

2.2 การนับจำนวนและคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากตัวอย่างกาแฟด้วยวิธีการ Dilution plating method

ชั่งตัวอย่างกาแฟจำนวน 50 กรัม ใส่ในถุงใส่ตัวอย่างสำหรับตีบดผสมอาหาร (stomacher bag) เติม 0.1 เปอร์เซ็นต์ peptone water (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 450 มิลลิลิตร แช่นาน 30 นาที แล้วตีผสมกันด้วยเครื่องตีบดผสมอาหาร (stomacher) นาน 2 นาที สำหรับตัวอย่างน้ำหมักเมล็ดกาแฟ นำน้ำหมักมา 1 มิลลิลิตร แล้วตัวอย่างทั้งหมดนำมาเจือจางด้วย 0.1 เปอร์เซ็นต์ peptone water 9 มิลลิลิตร จนมีความเจือจางที่เหมาะสม จากนั้น นำตัวอย่างที่ได้เจือจางให้เหมาะสมมา 0.1 มิลลิลิตร แล้ว spread plate โดยเกลี่ยให้ทั่วบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS (de Man, Rogosa and Sharpe) ที่มีแคลเซียมคาร์บอเนต (ภาคผนวก ก) ทำการทดลองทั้งหมด 2 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสในสภาวะที่มีออกซิเจนจำกัดเป็นเวลา 2 วัน ตรวจดูลักษณะโคโลนี และนับจำนวนโคโลนีที่มีวงใส (clear zone) เกิดขึ้น รายงานผลเป็นจำนวนโคโลนีต่อกรัมกาแฟ (Colony Forming Units (CFU)/g)

นำโคโลนีที่มีวงใสมา streak plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS ที่มีแคลเซียมคาร์บอเนต นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีออกซิเจนจำกัดเป็นเวลา 2 วัน เพื่อแยกให้เป็นโคโลนีเดี่ยวและแยกให้ได้สายพันธุ์บริสุทธิ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกมากขึ้น

2.3 การจำแนกกลุ่มของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และคุณสมบัติทางชีวเคมี โดยเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีออกซิเจนจำกัดเป็นเวลา 2 วัน แล้วจึงนำมาทดสอบดังนี้

2.3.1 การศึกษารูปร่างเซลล์ด้วยการย้อมติดสีแกรม (Gram stain)

กระจายเชื้อบนแผ่นสไลด์ ทำให้แห้งในอากาศ ผ่านเปลวไฟ ย้อมด้วยสีแกรมคริสตัลไวโอเลต (Crystal violet) นาน 1 นาที ล้างสีออก แล้วย้อมด้วยสารละลายไอโอดีนนาน 1 นาที ล้างด้วยน้ำประปา และล้างสีออกโดยใช้ 95% แอลกอฮอล์ สังเกตดูสีแกรมคริสตัลไวโอเลตที่ถูกชะออก พอเริ่มจางให้จุ่มแผ่นสไลด์ลงน้ำเพื่อหยุดปฏิกิริยา จากนั้น ย้อมด้วยสีซาฟานินโอ (Safanin O) นาน 30 วินาที ล้างน้ำและซับให้แห้ง ศึกษารูปร่างเซลล์ และการย้อมติดสีม่วงของคริสตัลไวโอเลตด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 1,000 เท่า

2.3.2 การทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (Catalase test)

กระจายเชื้อบนแผ่นสไลด์ แล้วหยดสารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ร้อยละ 3 จำนวน 1 หยด สังเกตการเกิดฟองแก๊ส โดยถ้าเกิดฟองแก๊ส แสดงว่ามีการสร้างคะตะเลสให้ผลการทดสอบเป็นบวก (Positive test; +) ถ้าไม่มีฟองก๊าซแสดงว่าไม่มีการสร้างคะตะเลส ให้ผลการทดสอบเป็นลบ (Negative test; -) ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกให้ผลการทดสอบเป็นลบ (เทพอัปสร แสนสุข และวรนุช ภักดีเดชาเกียรติ, 2555)

2.3.3 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ออกซิเดส (Oxidase test)

นำโคโลนีแบคทีเรียกรดแลคติกมา streak plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS ที่มีแคลเซียมคาร์บอเนต บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสในสภาวะที่มีออกซิเจนจำกัด เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นหยดสารละลาย Kovac's oxidase reagent (ภาคผนวก ข) 2-3 หยด ลงบนโคโลนีที่ต้องการทดสอบ สังเกตการเปลี่ยนแปลง ของโคโลนี โดยถ้าที่โคโลนีเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินเข้มภายใน 1 นาที แสดงว่ามีการสร้างออกซิเดสให้ผลการทดสอบเป็นบวก (Positive test; +) และถ้าโคโลนีไม่มีการเปลี่ยนแปลง แสดงว่าไม่มีการสร้างออกซิเดส ให้ผลการทดสอบเป็นลบ (Negative test; -) ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกจะให้ผลการทดสอบเป็นลบ (เทพอัปสร แสนสุข และวรนุช ภักดีเดชาเกียรติ, 2555)

2.3.4 การทดสอบการสร้างกรดและแก๊สจากการหมักน้ำตาล

นำแบคทีเรียกรดแลคติกมาเพาะเลี้ยงในอาหาร MRS ที่มีกลูโคส แลกโทส และราฟิโนส ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และมีฟีนอลเรด (Phenol red) ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวบ่งชี้ (Indicator) แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสในสภาวะที่มีออกซิเจน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการเกิดฟองแก๊สในหลอดดักแก๊ส และการเปลี่ยนสีของอาหารจากสีแดงเป็นสีเหลือง โดยถ้ามีฟองแก๊สในหลอดดักแก๊สแสดงว่ามีการสร้างแก๊ส ถ้าอาหารเปลี่ยนสีจากสีแดงเป็นสีเหลืองแสดงว่ามีการสร้างกรด และถ้าไม่มีแก๊ส และ/หรือสีอาหารไม่เปลี่ยนแปลงแสดงว่าไม่มีการสร้างแก๊ส และ/หรือไม่มีการสร้างกรด เทียบกับหลอดควบคุม (ไม่มีแบคทีเรียทดสอบ) (เทพอัปสร แสนสุข และวรนุช ภักดีเดชาเกียรติ, 2555)

2.4 การประเมินความเป็นปฏิปักษ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากตัวอย่างกาแฟต่อราที่มีความสามารถในการผลิตโอคราทอกซินเอ

2.4.1 การเตรียมสารแขวนลอยสปอร์รา (Sangmanee และ Hongpattarakere, 2014)

เลี้ยง *Aspergillus carbonarius* TK4.2 (พัณณ์ชิตา ธราดลศิริฐิติกุล, 2554) และราไอโซเลท TKI9 ที่คัดแยกจากเมล็ดกาแฟกะลา ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงตีนตก บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA (Potato dextrose agar) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้น ขูดสปอร์ราโดยใช้ Physiological water (ภาคผนวก ข) แล้วเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว PDB (Potato dextrose broth) (ภาคผนวก ก) และนับจำนวนสปอร์ราด้วยฮีโมไซโตมิเตอร์ (hemocytometer) ปรับความเข้มข้นของสารแขวนลอยสปอร์ราให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้น นำสารแขวนลอยสปอร์ราใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง PDA (วุ้น 0.8 เปอร์เซ็นต์) โดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

2.4.2 การเตรียมแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS

นำแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ ย้ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.4.3 การยับยั้งการเจริญของราด้วยวิธี Agar spot assay (Sangmanee และ Hongpattarakere, 2014)

หยดเชื้อที่เตรียมไว้ในข้อ 2.4.2 ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงตรงกลางอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS จำนวน 2 หยด แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากการบ่ม นำจานเลี้ยงเชื้อมาเททับด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง PDA (วุ้น 0.8 เปอร์เซ็นต์) (ภาคผนวก ก) ที่ผสมกับสารแขวนลอยสปอร์ราที่มีความเข้มข้น 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตรที่เตรียมไว้ในข้อ 2.4.1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร รอให้อาหารแข็ง บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ทำการทดลองทั้งหมด 2 ซ้ำ บันทึกผลความสามารถในการเป็นปฏิปักษ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกต่อราที่มีความสามารถในการผลิตโอคราทอกซินเอ โดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสที่เกิดขึ้นรอบโคโลนีของแบคทีเรียกรดแลคติก เทียบกับชุดควบคุม (ไม่มีแบคทีเรียทดสอบ)

บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 ผลการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกในตัวอย่างกาแฟ ด้วยวิธีการ Dilution plating method

จากการนับจำนวนจุลินทรีย์ที่คาดว่าเป็นแบคทีเรียกรดแลคติกในตัวอย่างกาแฟ ได้แก่ ผลกาแฟสุก เมล็ดกาแฟหมัก เมล็ดกาแฟกะลา และน้ำหมักเมล็ดกาแฟด้วยวิธีการ Dilution plating method บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS ที่มีแคลเซียมคาร์บอเนตที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน โดยนับจำนวนโคโลนีที่มีวงใสเกิดขึ้นบนอาหาร (ภาพที่ 3.1) พบว่า ในตัวอย่างกาแฟทุกชนิดพบโคโลนีที่มีวงใสบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS ที่มีแคลเซียมคาร์บอเนต ยกเว้นในเมล็ดกาแฟกะลา โดยในน้ำหมักเมล็ดกาแฟจากศูนย์พัฒนาโครงการหลวงป่าเมี่ยงพบจำนวนจุลินทรีย์มากที่สุดจำนวน 5.6×10^8 CFU/ml ส่วนในผลกาแฟสุกและน้ำหมักเมล็ดกาแฟตัวอย่างที่ 3 จากสถานีวิจัยโครงการหลวงแม่หลอดพบจำนวนจุลินทรีย์น้อยที่สุด จำนวนจุลินทรีย์ที่พบในตัวอย่างกาแฟจากพื้นที่โครงการหลวงในจังหวัดเชียงใหม่แสดงในตารางที่ 3.1

ภาพที่ 3.1 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่มีวงใสเกิดขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS ที่มีแคลเซียมคาร์บอเนต บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีออกซิเจนจำกัด เป็นเวลา 2 วัน

ตารางที่ 3.1 จำนวนจุลินทรีย์ที่พบในตัวอย่างกาแฟจากพื้นที่โครงการหลวงในจังหวัดเชียงใหม่

ตัวอย่าง	จำนวนจุลินทรีย์					
	ผลกาแฟสุก (C) (CFU/g)		เมล็ดกาแฟหมัก (F) (CFU/g)		น้ำหมักเมล็ดกาแฟ (W) (CFU/ml)	
แม่หลอด (M)	MC1	4.8×10^6	MF1	8.5×10^5	MW1	3.9×10^6
	MC2	5.3×10^6	MF2	7.5×10^7	MW2	8.9×10^7
	MC3	TFTC	MF3	7.5×10^7	MW3	TFTC
			MF4	1.0×10^8		
ป่าเมี่ยง (P)	PC1	8.4×10^7	PF1	1.9×10^8	PW1	5.6×10^8
ตีนตก (T)	TC1	3.4×10^7	TF1	4.7×10^7	TW1	9.0×10^7
	TC2	3.4×10^7				

หมายเหตุ : TFTC หมายถึง จำนวนโคโลนีที่มีวงใสมีจำนวนน้อยกว่า 30 โคโลนี

จากผลการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกในตัวอย่างกาแฟ โดยนับจำนวนโคโลนีที่มีวงใสเกิดขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS ที่มีแคลเซียมคาร์บอเนต พบว่า สามารถคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกได้ทั้งหมด 62 ไอโซเลต โดยพบในตัวอย่างเมล็ดกาแฟหมักมากที่สุดจำนวน 39 ไอโซเลต จำนวนไอโซเลตแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากตัวอย่างกาแฟแต่ละชนิดแสดงในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 จำนวนไอโซเลตแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากตัวอย่างกาแฟแต่ละชนิด

ตัวอย่าง	จำนวนไอโซเลตแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้					
	ผลกาแฟสุก (C)		เมล็ดกาแฟหมัก (F)		น้ำหมักเมล็ดกาแฟ (W)	
แม่หลอด (M)	MC1	4	MF1	10	MW1	1
	MC2	1	MF2	2	MW2	4
			MF3	10		
			MF4	2		
ป่าเมี่ยง (P)	PC1	5	PF1	7	PW1	2
ตีนตก (T)	TC1	1	TF1	8	TW1	3
	TC2	2				

3.2 ผลการจำแนกกลุ่มของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้

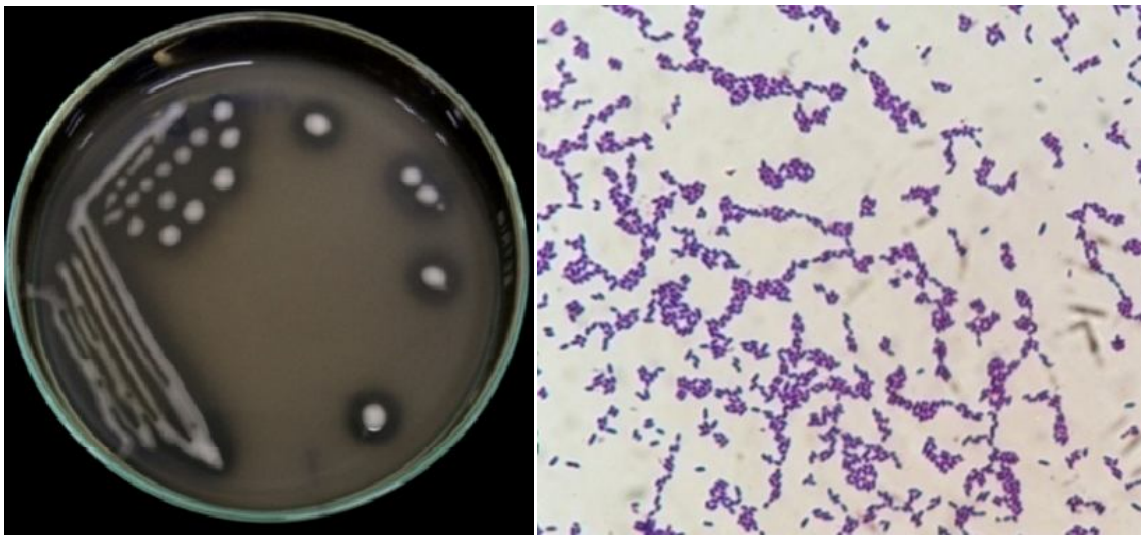
3.2.1 ผลการจำแนกกลุ่มเบื้องต้นโดยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ทุกไอโซเลตบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS ที่มีแคลเซียมคาร์บอเนต บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีออกซิเจนจำกัด เป็นเวลา 2 วัน แล้วสังเกตลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่เกิดขึ้น พบว่า มีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกัน จำนวน 5 รูปแบบ (ตารางที่ 3.3 และภาพที่ 3.2-3.6) และจากการศึกษารูปร่างเซลล์ด้วยการย้อมสีแกรม พบว่า เซลล์ของแบคทีเรียทุกไอโซเลตย้อมติดสีม่วงของสีแกรมคริสตัลไวโอเลต แสดงว่าเป็นแบคทีเรียแกรมบวก และรูปร่างเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 1,000 เท่า พบว่า เป็นเซลล์รูปแท่ง ขนาดสั้น (short rod) และรูปกลม (coccus) (ภาพที่ 3.2-3.6) โดยลักษณะโคโลนีแบบที่ 2 เป็นลักษณะที่พบได้มากที่สุด และพบได้ในตัวอย่างกาแฟทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ ผลกาแฟสุก เมล็ดกาแฟหมัก และน้ำหมักเมล็ดกาแฟ ลักษณะโคโลนี และรูปร่างเซลล์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้แสดงในตารางที่ 3.3

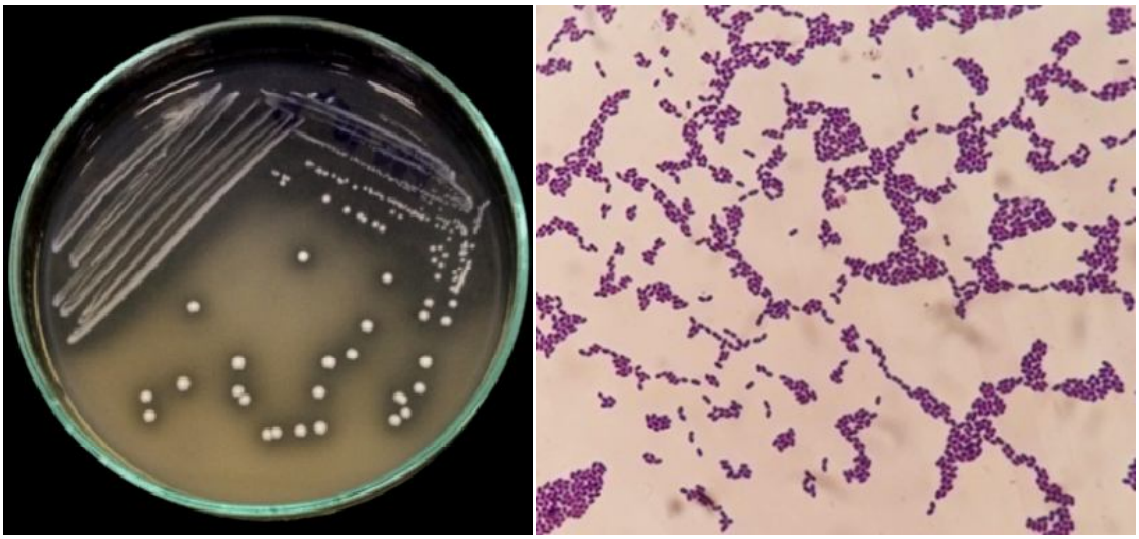
ตารางที่ 3.3 ลักษณะโคโลนีและรูปร่างเซลล์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้

รูปแบบ	ลักษณะโคโลนี	รูปร่างเซลล์	จำนวนไอโซเลต
1	กลม สีขาว เยิ้ม ขอบเรียบ ใส	แท่งสั้น	1
2	กลม สีขาวขุ่น นูน ขอบเรียบ	แท่งสั้น	36
3	กลม สีเหลืองขุ่น ใต้โคโลนีมีสีเหลือง นูน ขอบเรียบ	กลม	8
4	กลม สีเหลืองขุ่น เยิ้ม นูน ขอบเรียบ	กลม	12
5	กลางโคโลนีมีสีเหลือง ขอบเรียบ ใส แบนติดอาหาร	แท่งสั้น	5

หมายเหตุ : รูปร่างเซลล์ดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 1,000 เท่า

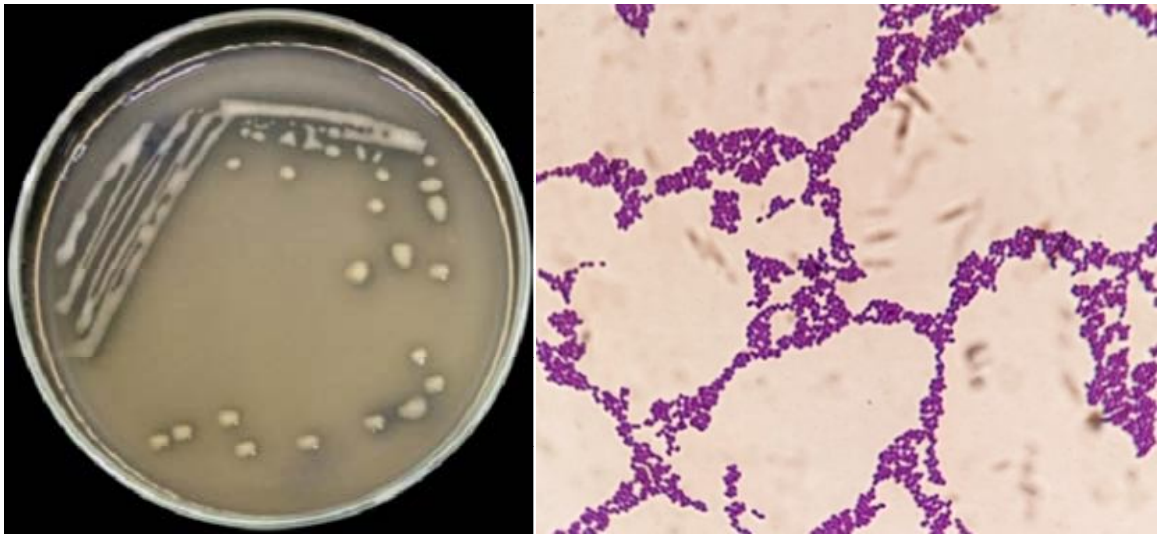


ภาพที่ 3.2 ลักษณะโคโลนีรูปแบบที่ 1 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS ที่มีแคลเซียมคาร์บอเนต บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีออกซิเจนจำกัด เป็นเวลา 2 วัน และรูปร่างเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า

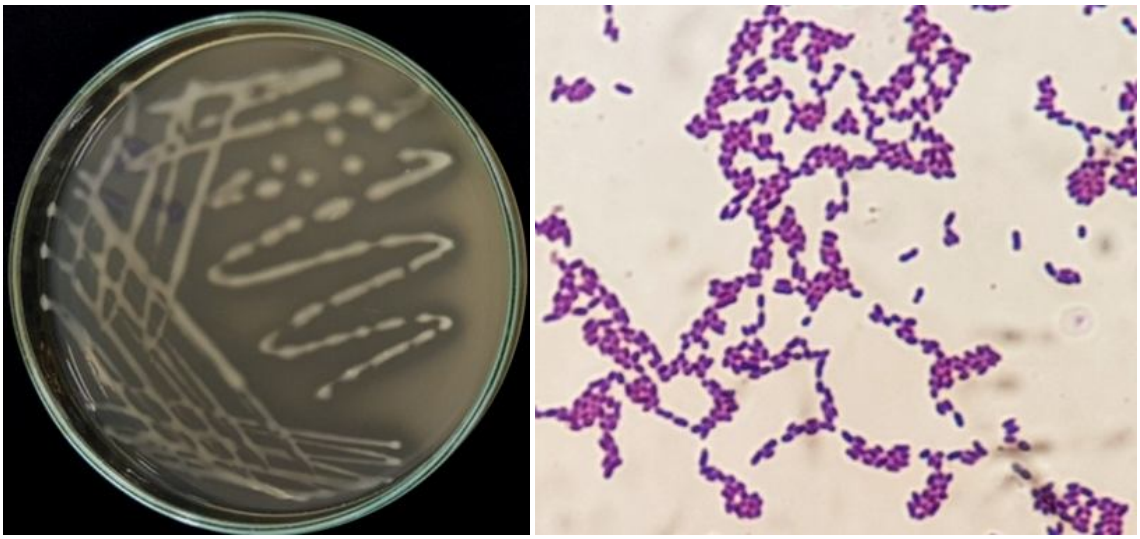


ภาพที่ 3.3 ลักษณะโคโลนีรูปแบบที่ 2 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS ที่มีแคลเซียมคาร์บอเนต บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีออกซิเจนจำกัด เป็นเวลา 2 วัน และรูปร่างเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า

ภาพที่ 3.4 ลักษณะโคโลนีรูปแบบที่ 3 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS ที่มีแคลเซียมคาร์บอเนต บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีออกซิเจนจำกัด เป็นเวลา 2 วัน และรูปร่างเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า



ภาพที่ 3.5 ลักษณะโคโลนีรูปแบบที่ 4 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS ที่มีแคลเซียมคาร์บอเนต บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีออกซิเจนจำกัด เป็นเวลา 2 วัน และรูปร่างเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า



ภาพที่ 3.6 ลักษณะโคโลนีรูปแบบที่ 5 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS ที่มีแคลเซียมคาร์บอเนต บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีออกซิเจนจำกัด เป็นเวลา 2 วัน และรูปร่างเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า

3.2.2 ผลการจำแนกกลุ่มเบื้องต้นโดยการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมี

จากการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมี โดยทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส การสร้างเอนไซม์ออกซิเดส และการสร้างกรดและแก๊สจากการหมักน้ำตาล 3 ชนิด ได้แก่ กลูโคส แลคโตส และราฟิโนส

ผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส ทำได้โดยกระจายเชื้อบนแผ่นสไลด์สะอาด แล้วหยดไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ร้อยละ 3 เนื่องจากแบคทีเรียกรดแลคติกเป็นแบคทีเรียที่ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส จึงให้ผลการทดสอบเป็นลบ พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ทั้ง 62 ไอโซเลต ให้ผลการทดสอบเป็นลบกับไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ร้อยละ 3 คือ ไม่เกิดฟองแก๊ส

ผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์ออกซิเดส ทำได้โดยหยดสารละลาย Kovac's oxidase reagent 2-3 หยด ลงบนโคโลนีที่ต้องการทดสอบ เนื่องจากแบคทีเรียกรดแลคติกส่วนใหญ่ไม่มีกิจกรรมไซโตโครม ซี ออกซิเดส (Cytochrom C oxidase) ซึ่งหากการทดสอบเป็นผลลบ แสดงว่าแบคทีเรียชนิดนั้นไม่สามารถใช้ออกซิเจนในการสร้างพลังงาน ซึ่งเกิดขึ้นในช่วงการถ่ายทอดอิเลคตรอน หรืออาจใช้ไซโตโครมชนิดอื่นในการถ่ายทอดอิเลคตรอน (เทพอัปสร แสนสุข และวรนุช ภักดีเดชาเกียรติ, 2555) พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ทั้ง 62 ไอโซเลต ให้ผลการทดสอบเป็นลบกับสารละลาย Kovac's oxidase reagent คือ โคโลนีไม่เปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินเข้มภายใน 1 นาที

ผลการทดสอบการสร้างกรด และแก๊สจากการหมักน้ำตาล โดยมีฟีนอลเรดเป็นตัวบ่งชี้ แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถหมักคาร์โบไฮเดรตได้ ผลิตภัณฑ์สุดท้ายของการหมักเป็นกรด หรือเป็นกรดและแก๊ส (เทพอัปสร แสนสุข และวรนุช ภักดีเดชาเกียรติ, 2555) หากมีการสร้างกรดสังเกตได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS เปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีแดง และหากมีการสร้างแก๊ส สังเกตได้จากฟองแก๊สที่เกิดในหลอดดักแก๊ส พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ จำนวน 56 ไอโซเลต สามารถสร้างกรด และแก๊สจากการหมักน้ำตาลทั้ง 3 ชนิด และจำนวน 6 ไอโซเลต สร้างเฉพาะกรดจากการหมักน้ำตาลทั้ง 3 ชนิด

จากผลการศึกษาลักษณะโคโลนี รูปร่างเซลล์ และผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ สามารถจำแนกกลุ่มเบื้องต้นได้ 6 กลุ่ม ดังแสดงในตารางที่ 3.4

ตารางที่ 3.4 กลุ่มของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จำแนกตามลักษณะโคโลนี รูปร่างเซลล์ และการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี

กลุ่ม	ลักษณะโคโลนี	รูปร่างเซลล์	แกรม	คะตะเลส	ออกซิเดส	การสร้างกรดและแก๊สจากการหมักน้ำตาล			จำนวนไอโซเลท
						กลูโคส	แลคโตส	ราฟิโนส	
1	กลม สีขาว เยิ้ม ขอบเรียบ ใส	แท่งสั้น	บวก	-	-	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส	1
2	กลม สีขาวขุ่น นูน ขอบเรียบ	แท่งสั้น	บวก	-	-	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส	30
3	กลม สีขาวขุ่น นูน ขอบเรียบ	แท่งสั้น	บวก	-	-	กรด	กรด	กรด	6
4	กลม สีเหลืองขุ่น ใต้โคโลนีมีสีเหลือง นูน ขอบเรียบ	กลม	บวก	-	-	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส	8
5	กลม สีเหลืองขุ่น เยิ้ม นูน ขอบเรียบ	กลม	บวก	-	-	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส	12
6	กลางโคโลนีมีสีเหลือง ขอบเรียบ ใส แบนติดอาหาร	แท่งสั้น	บวก	-	-	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส	5

หมายเหตุ : รูปร่างเซลล์ดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 1,000 เท่า

บวก หมายถึง แบคทีเรียแกรมบวกที่เซลล์ย้อมติดสีม่วงของสีแกรมคริสตัลไวโอเลท

สัญลักษณ์ - หมายถึง ไม่พบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส และออกซิเดส ให้ผลการทดสอบเป็นลบ คือ ไม่เกิดฟองแก๊ส

กรด/แก๊ส หมายถึง มีการสร้างกรดและแก๊สจากการหมักน้ำตาลแต่ละชนิด

กรด หมายถึง มีการสร้างเฉพาะกรดจากการหมักน้ำตาลแต่ละชนิด

ไอโซเลตแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ทั้ง 6 กลุ่ม มีดังนี้

กลุ่มที่ 1 โคโลนีกลม สีขาว เยิ้ม ขอบเรียบ ใส เซลล์รูปแท่งขนาดสั้น จัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยว และคู่ หมักน้ำตาลแบบเฮทเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ จำนวน 1 ไอโซเลต ประกอบด้วยไอโซเลตที่คัดแยกจากผลกาแฟสุกจากสถานีวิจัยโครงการหลวงแม่หลอด ได้แก่ ไอโซเลต MC1A

กลุ่มที่ 2 โคโลนีกลม สีขาวขุ่น นูน ขอบเรียบ เซลล์รูปแท่งขนาดสั้น จัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยว คู่ กลุ่ม และต่อกันเป็นสายโซ่ หมักน้ำตาลแบบเฮทเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ จำนวน 30 ไอโซเลต ประกอบด้วย ไอโซเลตที่คัดแยกจากผลกาแฟสุก เมล็ดกาแฟหมัก และน้ำหมักเมล็ดกาแฟจากสถานีวิจัยโครงการหลวงแม่หลอด ได้แก่ ไอโซเลต MC1B, MF1D, MF1E, MF2B, MF2C, MF3D, MF3E, MF4B, MF4C, MW2A, MW2B และ MW2D ไอโซเลตที่คัดแยกจากผลกาแฟสุก เมล็ดกาแฟหมัก และน้ำหมักเมล็ดกาแฟจากศูนย์พัฒนาโครงการหลวงป่าเมี่ยง ได้แก่ ไอโซเลต PC1A, PF1F, PF1G, PW1A และ PW1B ส่วนไอโซเลตที่คัดแยกจากผลกาแฟสุก เมล็ดกาแฟหมัก และน้ำหมักเมล็ดกาแฟจากศูนย์พัฒนาโครงการหลวงตีนตก ได้แก่ ไอโซเลต TC1A, TC2A, TC2B, TF1B, TF1C, TF1D, TF1E, TF1F, TF1G, TW1A, TW1B และ TW1C

กลุ่มที่ 3 โคโลนีกลม สีขาวขุ่น นูน ขอบเรียบ เซลล์รูปแท่งขนาดสั้น จัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยว คู่ กลุ่ม และต่อกันเป็นสายโซ่ หมักน้ำตาลแบบโฮโมเฟอร์เมนเททีฟ จำนวน 6 ไอโซเลต ประกอบด้วย ไอโซเลตที่คัดแยกจากเมล็ดกาแฟหมัก และน้ำหมักเมล็ดกาแฟจากสถานีวิจัยโครงการหลวงแม่หลอด ได้แก่ ไอโซเลต MF1A, MF1B, MF1C และ MF3B ไอโซเลตที่คัดแยกจากผลกาแฟสุกจากศูนย์พัฒนาโครงการหลวงป่าเมี่ยง ได้แก่ ไอโซเลต PC1B, PF1F, PF1G, PW1A และ PW1B ส่วนไอโซเลตที่คัดแยกจากเมล็ดกาแฟหมักจากศูนย์พัฒนาโครงการหลวงตีนตก ได้แก่ ไอโซเลต PF1H

กลุ่มที่ 4 โคโลนีกลม สีเหลืองขุ่น ใต้โคโลนีมีสีเหลือง นูน ขอบเรียบ เซลล์รูปกลม จัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยว คู่ กลุ่ม และต่อกันเป็นสายโซ่ หมักน้ำตาลแบบเฮทเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ ประกอบด้วย ไอโซเลตที่คัดแยกจากผลกาแฟสุก เมล็ดกาแฟหมัก และน้ำหมักเมล็ดกาแฟจากสถานีวิจัยโครงการหลวงแม่หลอด ได้แก่ ไอโซเลต MF3A, MF3C, MF3G, MF3H, MF3I, MF3J และ MW2C และไอโซเลตที่คัดแยกจากเมล็ดกาแฟหมักจากศูนย์พัฒนาโครงการหลวงตีนตก ได้แก่ ไอโซเลต TF1A

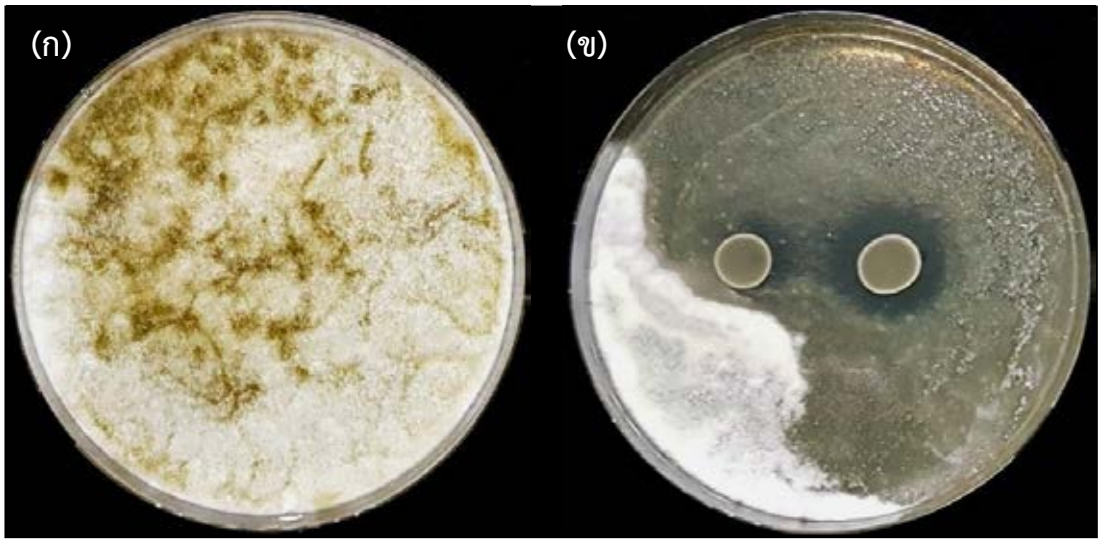
กลุ่มที่ 5 โคโลนีกลม สีเหลืองขุ่น เยิ้ม นูน ขอบเรียบ เซลล์รูปกลม จัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยว คู่ กลุ่ม และต่อกันเป็นสายโซ่ หมักน้ำตาลแบบเฮทเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ จำนวน 12 ไอโซเลต ประกอบด้วย ไอโซเลตที่คัดแยกจากผลกาแฟสุก เมล็ดกาแฟหมัก และน้ำหมักเมล็ดกาแฟจากสถานีวิจัยโครงการหลวงแม่หลอด ได้แก่ ไอโซเลต MC1C, MC1D, MC2A, MF1F, MF1G, MF1H, MF1I, MF1J, MF3F และ MW1A ไอโซเลตที่คัดแยกจากผลกาแฟสุกจากศูนย์พัฒนาโครงการหลวงป่าเมี่ยง ได้แก่ ไอโซเลต PC1C, PC1D และ PC1E

กลุ่มที่ 6 โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน กลางโคโลนีมีสีเหลือง ขอบเรียบ ใส แบนติดอาหาร เซลล์รูปแท่งขนาดสั้น จัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยว คู่ และกลุ่ม หมักน้ำตาลแบบเฮทเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ จำนวน 5 ไอโซเลต ประกอบด้วย ไอโซเลตที่คัดแยกจากเมล็ดกาแฟหมักจากศูนย์พัฒนาโครงการหลวงป่าเมี่ยง ได้แก่ ไอโซเลต PF1A, PF1B, PF1C, PF1D และ PF1E

3.3 ผลการประเมินความเป็นปฏิปักษ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ในการยับยั้งการเจริญของราที่ผลิตโอคราทอกซินเอด้วยวิธี Agar spot assay

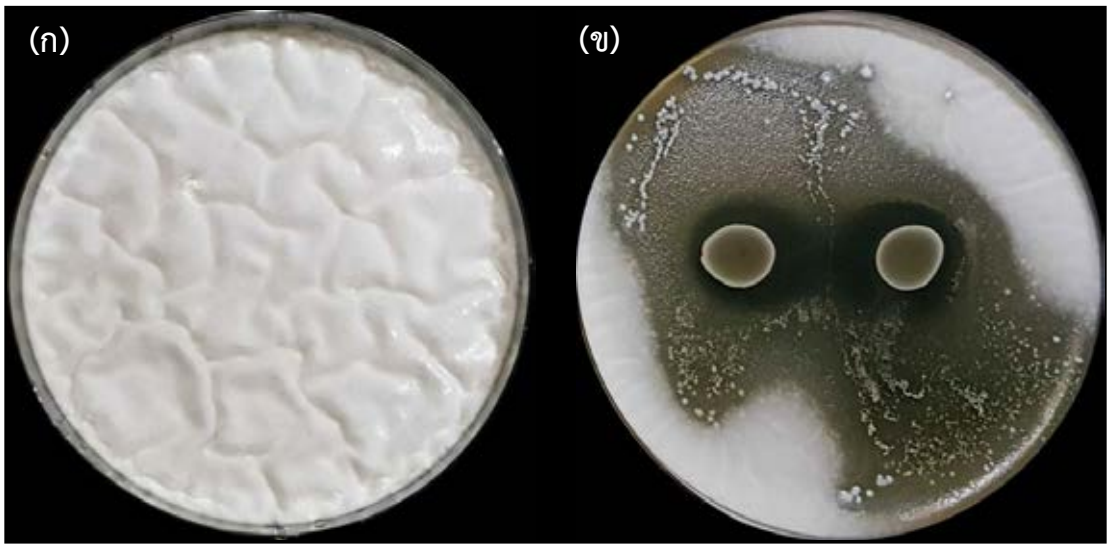
คัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 15 ไอโซเลต จาก 6 กลุ่ม โดยใช้หลักการจำนวน 5 ไอโซเลต เลือก 1 ไอโซเลต ประกอบด้วย ตัวแทนกลุ่มที่ 1 ได้แก่ ไอโซเลต MC1A ตัวแทนกลุ่มที่ 2 ได้แก่ ไอโซเลต MF1D, MF3D, MF4A, MW2A, PC1A, TF1B และ TW1B ตัวแทนกลุ่มที่ 3 ได้แก่ ไอโซเลต TF1H ตัวแทนกลุ่มที่ 4 ได้แก่ ไอโซเลต MW2C และ TF1A ตัวแทนกลุ่มที่ 5 ได้แก่ ไอโซเลต MF1G, MW1A และ PC1D และตัวแทนกลุ่มที่ 6 ได้แก่ ไอโซเลต PF1B จากนั้น นำแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้มาทดสอบความเป็นปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Aspergillus carbonarius* TK4.2 (พัณณ์ชิตา ธราดลศิริฐิติกุล, 2554) และราไอโซเลท TKI9 ที่คัดแยกได้จากเมล็ดกาแฟกะลา ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงตีนตก

จากการทดสอบความสามารถเบื้องต้นของแบคทีเรียกรดแลคติที่คัดแยกได้จากตัวอย่างกาแฟในการยับยั้งการเจริญของ *A. carbonarius* TK4.2 ด้วยวิธี Agar spot assay บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS ที่เททับด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งขณะเหลว PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน พบว่าในชุดควบคุม ราสามารถเจริญได้ดี สร้างเส้นใย และสร้างสปอร์เต็มพื้นที่บนจานเลี้ยงเชื้อ เมื่อเทียบกับในชุดทดสอบที่มีการหยดแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ พบว่าราเจริญเป็นเพียงเส้นใยสีขาว ไม่สร้างสปอร์ หรือสร้างสปอร์เพียงเล็กน้อย และเกิดวงใสบริเวณรอบหยดเชื้อ ดังแสดงในภาพที่ 3.7



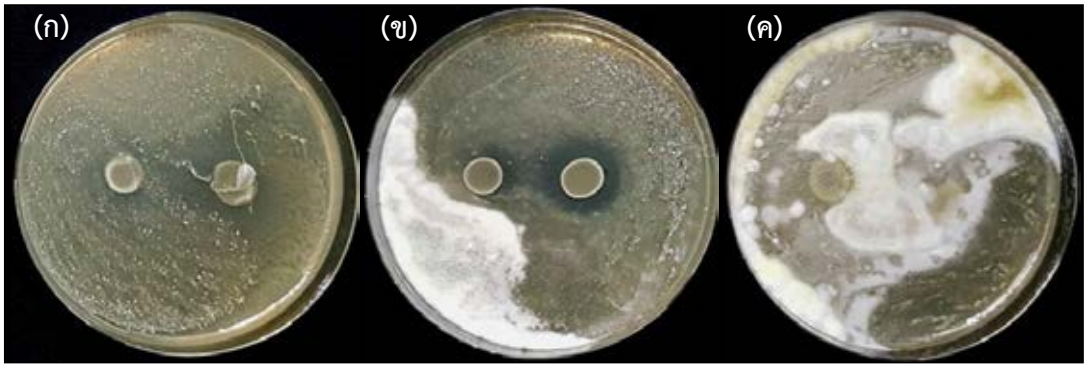
ภาพที่ 3.7 การทดสอบความสามารถเบื้องต้นของแบคทีเรียกรดแลคติกในการยับยั้งการเจริญของราที่ผลิตโอคราทอกซินเอด้วยวิธี Agar spot assay บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS ที่เททับด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งขณะเหลว PDA บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน (ก) ชุดควบคุม (ข) ชุดทดสอบที่มีการหยดแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ร่วมกับการเลี้ยง *A. carbonarius* TK4.2

จากการทดสอบความสามารถเบื้องต้นของแบคทีเรียกรดแลคติที่คัดแยกได้จากตัวอย่างกาแฟในการยับยั้งการเจริญของราไอโซเลท TKI9 ที่คัดแยกจากเมล็ดกาแฟกะลา ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงตีนตก ด้วยวิธี Agar spot assay บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS ที่เททับด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งขณะเหลว PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน พบว่า ในชุดควบคุม ราสามารถเจริญได้ดี สร้างเส้นใยได้เต็มพื้นที่บนจานเลี้ยงเชื้อ เมื่อเทียบกับในชุดทดสอบที่มีการหยดแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ พบว่า ราเจริญและสร้างเส้นใยสีขาวได้น้อย และเกิดวงใสบริเวณรอบหยดเชื้อ ดังแสดงในภาพที่ 3.8



ภาพที่ 3.8 การทดสอบความสามารถเบื้องต้นของแบคทีเรียกรดแลคติกในการยับยั้งการเจริญของราที่ผลิตโอคราทอกซินเอด้วยวิธี Agar spot assay บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS ที่เททับด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งขณะเหลว PDA บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน (ก) ชุดควบคุม (ข) ชุดทดลองที่มีการหยดแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ร่วมกับการเลี้ยงราไอโซเลท TKI9

ผลการทดสอบความสามารถเบื้องต้นของแบคทีเรียกรดแลคติที่คัดแยกได้จากตัวอย่างกาแฟในการยับยั้งการเจริญของ *A. carbonarius* TK4.2 และราไอโซเลท TKI9 โดยมีระดับการยับยั้งการเจริญ 3 ระดับ คือ การยับยั้งการเจริญมากที่สุดและไม่พบการสร้างเส้นใย (+++) (ภาพที่ 3.9ก) การยับยั้งการเจริญบางส่วน พบการสร้างเส้นใย และสปอร์เล็กน้อย (++) (ภาพที่ 3.9ข) และไม่มีการยับยั้งการเจริญ (-) (ภาพที่ 3.9ค)



ภาพที่ 3.9 การยับยั้งการเจริญของราในแต่ละระดับที่กำหนดตามสัญลักษณ์
ก. การยับยั้งมากที่สุด (+++) ข. การยับยั้งบางส่วน (++) ค. ไม่มีการยับยั้ง (-)

ผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญของ *A. carbonarius* TK4.2 พบว่ามีแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ จำนวน 8 ไอโซเลต จาก 15 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. carbonarius* TK4.2 ได้ ประกอบด้วย ตัวแทนกลุ่มที่ 2 ได้แก่ ไอโซเลต MF1D, MF4A และ MW2A ตัวแทนกลุ่มที่ 4 ได้แก่ ไอโซเลต MW2C ตัวแทนกลุ่มที่ 5 ได้แก่ ไอโซเลต MF1G, MW1A และ PC1D และตัวแทนกลุ่มที่ 6 ได้แก่ ไอโซเลต PF1B และพบว่าไอโซเลต MW2A มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญ และการสร้างสปอร์ของราสูงที่สุด เมื่อเทียบกับชุดควบคุม และแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถยับยั้งการเจริญได้อีก 7 ไอโซเลต โดย *A. carbonarius* TK4.2 เมื่อเลี้ยงร่วมกับไอโซเลต MW2A มีการเจริญน้อยมากจนมองไม่เห็นการสร้างเส้นใยบนจานเลี้ยงเชื้อ และมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง 1.95±0.48 เซนติเมตร

ผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญของราไอโซเลต TKI9 ที่คัดแยกจากเมล็ดกาแฟกะลา ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงตีนตก พบว่ามีแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ จำนวน 9 ไอโซเลต จาก 15 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้งการเจริญของราไอโซเลต TKI9 ได้ ประกอบด้วย ตัวแทนกลุ่มที่ 2 ได้แก่ ไอโซเลต MF1D, MF3D, MF4A, MW2A และ TW1B ตัวแทนกลุ่มที่ 4 ได้แก่ ไอโซเลต MW2C และ TF1A ตัวแทนกลุ่มที่ 5 ได้แก่ ไอโซเลต MF1G และตัวแทนกลุ่มที่ 6 ได้แก่ ไอโซเลต PF1B และพบว่าไอโซเลต MW2A มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของราสูงที่สุด เมื่อเทียบกับชุดควบคุม และแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถยับยั้งการเจริญได้อีก 8 ไอโซเลต โดยราไอโซเลต TKI9 เมื่อเลี้ยงร่วมกับไอโซเลต MW2A มีการเจริญน้อยมากจนมองไม่เห็นการสร้างเส้นใยบนจานเลี้ยงเชื้อ และมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง 1.88±0.58 เซนติเมตร

การยับยั้งการเจริญของราและขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวญยับยั้งของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ในการยับยั้งการเจริญของ *A. carbonarius* TK4.2 และราไอโซเลท TKI9 แสดงในตารางที่ 3.5

ตารางที่ 3.5 การยับยั้งการเจริญของราและขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ในการยับยั้งการเจริญของ *A. carbonarius* TK4.2 และราไอโซเลท TKI9

	***A. carbonarius* TK4.2**		**ราไอโซเลท TKI9**	
ไอโซเลต	**การยับยั้ง**	**เส้นผ่านศูนย์กลาง (ซม.)**	**การยับยั้ง**	**เส้นผ่านศูนย์กลาง (ซม.)**
MC1A	-	-	-	-
MF1D	++	1.92±0.35	++	1.15±0.81
MF3D	-	-	++	1.67±0.44
MF4A	++	1.89±0.28	+++	1.40±0.14
MW2A	+++	1.95±0.48	++	1.88±0.58
PC1A	-	-	-	-
TF1B	-	-	-	-
TW1B	-	-	++	1.10±0.74
TF1H	-	-	-	-
MW2C	++	1.39±0. 11	+++	1.31±0.25
TF1A	-	-	++	1.32±0.10
MF1G	++	1.79±0.25	++	1.25±0.08
MW1A	++	1.63±0.39	-	-
PC1D	++	1.75±0.21	-	-
PF1B	++	1.70±0.30	++	1.56±0.22

หมายเหตุ : สัญลักษณ์ +++ หมายถึง การยับยั้งการเจริญมากที่สุด และไม่พบการสร้างเส้นใย
สัญลักษณ์ ++ หมายถึง การยับยั้งการเจริญบางส่วน พบการสร้างเส้นใย และสปอร์เล็กน้อย
สัญลักษณ์ - หมายถึง ไม่มีการยับยั้งการเจริญ

บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาสามารถคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากตัวอย่างกาแฟจากพื้นที่โครงการหลวง 3 โครงการ ได้แก่ สถานีวิจัยโครงการหลวงแม่หลอด ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงตีนตก และศูนย์พัฒนาโครงการหลวงป่าเมี่ยง จังหวัดเชียงใหม่ ประเทศไทย โดยคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกด้วยวิธีการ Dilution plating method บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS ที่มีแคลเซียมคาร์บอเนต เนื่องจากแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถสร้างพลังงานจากการหมักคาร์โบไฮเดรตเกิดเป็นกรดแลคติกได้ (Gänzle, 2015) กรดแลคติกจึงทำปฏิกิริยากับแคลเซียมคาร์บอเนต เกิดเป็นอนุพันธ์เชิงซ้อนของ $Ca(C_3H_6O_3)_2$ น้ำ และคาร์บอนไดออกไซด์ (Moorehead และ Shumway, 2008) ซึ่งสารเชิงซ้อนของ $Ca(C_3H_6O_3)_2$ ทำให้เกิดวงใสบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS ดังนั้น โคโลนีของแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกที่เจริญบนอาหารจึงเกิดวงใสรอบโคโลนี ลักษณะวงใสที่เกิดขึ้นสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้สำหรับ การคัดเลือกเบื้องต้นเพื่อนำไปทดสอบด้วยวิธีอื่นๆ ในการพิสูจน์ว่าเป็นแบคทีเรียกรดแลคติก ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้มีทั้งหมด 62 ไอโซเลต โดยคัดแยกจากตัวอย่างเมล็ดกาแฟหมักได้มากที่สุดจำนวน 39 ไอโซเลต และพบในจำนวนที่ใกล้เคียงกันในพื้นที่โครงหลวงทั้ง 3 โครงการ ส่วนตัวอย่างผลกาแฟสุก และตัวอย่างน้ำหมักเมล็ดกาแฟสามารถคัดแยกได้จำนวน 13 ไอโซเลต และ 9 ไอโซเลต ตามลำดับ จากผลการศึกษาที่พบแบคทีเรียกรดแลคติกในเมล็ดกาแฟหมักได้มากที่สุดนั้น เนื่องจากในขั้นตอนการหมักเมล็ดกาแฟมีสารอาหารเพียงพอสำหรับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ และแบคทีเรียกรดแลคติกเป็นหนึ่งในจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีในขณะที่มีการหมัก และพื้นที่โครงการหลวงทั้ง 3 โครงการใช้กระบวนการแบบเปียกในการผลิตเมล็ดกาแฟ จึงทำให้พบแบคทีเรียกรดแลคติกได้ในเมล็ดกาแฟหมัก ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Batista และคณะ (2016) ที่ได้ศึกษาจุลินทรีย์ที่พบในกระบวนการผลิตเมล็ดกาแฟแบบเปียก และพบว่าจุลินทรีย์หลักที่พบในกระบวนการนี้ คือ แบคทีเรียกรดแลคติก เช่น *Lactobacillus* sp., *Leuconostoc* sp. และ *Weissella* sp. โดยพบมากในขั้นตอนการหมักเมล็ดกาแฟจากการใช้เมือกของเมล็ดกาแฟเป็นสารตั้งต้นในการหมัก และเช่นเดียวกันกับงานวิจัยของ De Bruyn และคณะ (2017) ที่พบแบคทีเรียกรดแลคติกได้มากที่สุดในกระบวนการผลิตเมล็ดกาแฟแบบเปียก และพบมากที่สุดในขั้นตอนการแช่เมล็ดกาแฟ เนื่องจากแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถใช้ผนังผลชั้นกลาง และผนังผลชั้นในของผลกาแฟเป็นสารตั้งต้นในการหมัก ทำให้สามารถเจริญเติบโตได้ดี

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยสังเกตลักษณะโคโลนี และรูปร่างเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ รวมทั้งศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมี แบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ทั้ง 62 ไอโซเลต เป็นแบคทีเรียแกรมบวก โดยพบเป็นเซลล์รูปแท่ง ขนาดสั้น จำนวน 42 ไอโซเลต และเซลล์รูปกลม จำนวน 20 ไอโซเลต ไม่พบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส และเอนไซม์ออกซิเดส จากกระบวนการหมักน้ำตาลพบ

แบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่มโฮโมเฟอร์เมนเททีฟ จำนวน 6 ไอโซเลต ที่สร้างเฉพาะกรด ไม่มีการสร้างแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ และพบแบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่มเฮทเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ จำนวน 56 ไอโซเลต โดยมีการสร้างกรดและแก๊สคาร์บอนได้ออกไซด์จากการหมัก โดยโฮโมเฟอร์เมนเททีฟ เป็นกระบวนการหมักที่ส่วนใหญ่ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นกรดแลคติก และไม่พบแก๊สในหลอดดักแก๊ส ส่วนการหมักน้ำตาลแบบเฮทเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ เป็นกระบวนการหมักน้ำตาลที่จะเกิดกรดแลคติก กรดอะซิติก เอทานอล และแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ โดยพบแก๊สในหลอดดักแก๊ส (Salminen และ Von Wright, 2004) จากผลการศึกษาจึงสามารถพิสูจน์ได้เบื้องต้นว่าเป็นแบคทีเรียกรดแลคติก และสามารถจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ตามลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS รูปร่างเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และคุณสมบัติทางชีวเคมีได้เป็น 6 กลุ่ม

จากการจำแนกกลุ่มของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ พบว่า กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มที่พบมากที่สุด และพบได้จากตัวอย่างกาแฟทุกตัวอย่างในพื้นที่โครงการหลวงทั้ง 3 โครงการ โดยจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา และคุณสมบัติทางชีวเคมีคาดว่ามีความใกล้เคียงกับ *Lactobacillus* sp. กลุ่มเฮทเทอโรเฟอร์เมนเททีฟที่สามารถหมักได้ทั้งน้ำตาลเฮกโซส คือ กลูโคส และแลคโตส และน้ำตาลเพนโตส คือ ราฟิโนส โดยลักษณะทางสัณฐานวิทยามีความใกล้เคียงกับลักษณะ โคโลนี และรูปร่างเซลล์ในงานวิจัยของ Boonma และคณะ (2014) ที่ศึกษาเกี่ยวกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา ของ *Lactobacillus rhamnosus* LR-L31, LR-L34 และ LR-35 พบว่าลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS เป็นโคโลนีกลม สีขาวขุ่น นูน ขอบเรียบ และเซลล์เป็นรูปแท่งสั้น จัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยว คู่ กลุ่ม และต่อกันเป็นสายโซ่ และใกล้เคียงกับงานวิจัยของสุพรรณิการ์ ศรีบัวทอง (2548) ที่คัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต PD55 จากข้าวหมัก พบลักษณะโคโลนี และรูปร่างเซลล์เช่นเดียวกันนี้ โดยผลการจำแนกระดับสปีชีส์ด้วยวิธี partial 16S rRNA sequence และชุดทดสอบสำเร็จรูป API 50CHL พบว่าเป็น *Lactobacillus cellobiosus* และอยู่ในกลุ่มเฮทเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ ส่วนคุณสมบัติทางชีวเคมีให้ผลทดสอบเช่นเดียวกันกับการจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติกของ Wood และ Holzepfel (1992) ที่กล่าวถึง *Lactobacillus* sp. ว่าไม่มีการสร้างเอนไซม์คะตะเลส และเอนไซม์ออกซิเดส รวมทั้งเกิดกระบวนการหมักแบบเฮทเทอโรเฟอร์เมนเททีฟได้ในน้ำตาลเฮกโซส และน้ำตาลเพนโตส

จากผลการศึกษาทั้งหมดสามารถคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกได้จากตัวอย่างผลกาแฟสุก เมล็ดกาแฟหมัก และน้ำหมักเมล็ดกาแฟ แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถพบได้ในทุกขั้นตอนการผลิต ตั้งแต่หลังการเก็บเกี่ยว หรือในระหว่างกระบวนการผลิตเมล็ดกาแฟ และแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ส่วนใหญ่เป็นกลุ่มเฮทเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ นอกจากนี้ แบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้บางกลุ่มสามารถพบได้เฉพาะในบางพื้นที่ เช่น กลุ่มที่ 6 คัดแยกได้จากศูนย์พัฒนาโครงการหลวงป่าเมี่ยงเพียงที่เดียว ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Leong และคณะ (2014) ได้ศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียกรดแลคติกจากผลกาแฟหลังการเก็บเกี่ยวในประเทศไต้หวัน สามารถคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกได้หลายชนิด โดยชนิดหลักที่พบเป็นกลุ่มเฮทเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ ได้แก่ *Leuconostoc* sp. และ *Weissella* sp. ที่ระดับความสูงเฉลี่ย 800 เมตร และคัดแยก *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ได้ที่ระดับความสูงเฉลี่ย

1,200 เมตร ซึ่งแสดงให้เห็นว่าระดับความสูง หรือสภาพอากาศของแต่ละสถานที่นั้นมีผลต่อการกระจายตัวของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แตกต่างกัน และเช่นเดียวกันกับงานวิจัยของ Avallone และคณะ (2001) ศึกษาจุลินทรีย์ประจำถิ่นในระหว่างที่เกิดกระบวนการหมักของเมล็ดกาแฟ พบแบคทีเรียกรดแลคติกเป็นจุลินทรีย์หลักที่พบได้ในกระบวนการนี้ คือ *Leuconostoc mesenteroides dextranicum* และ *Lactobacillus brevis* และพบว่าเป็นกลุ่มเฮทเทอโรเฟอร์เมนเททีฟที่ผลิตกรดแลคติก และกรดอะซิติก ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกถือว่าเป็นจุลินทรีย์ที่พบบ่อยในระหว่างการหมักตามธรรมชาติ

จากการศึกษาความเป็นปฏิปักษ์ของแบคทีเรียกรดแลคติที่คัดแยกได้จากตัวอย่างกาแฟทั้ง 3 ชนิด ในการยับยั้งการเจริญของราที่ผลิตโอคราทอกซินเอด้วยวิธี Agar spot assay พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต MW2A มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญ และการสร้างสปอร์ของราที่ผลิตโอคราทอกซินเอสูงที่สุด เมื่อเทียบกับชุดควบคุม และแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ไอโซเลตอื่น ผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยอื่นที่รายงานความสามารถของแบคทีเรียกรดแลคติกในการยับยั้งการเจริญของรา Djossou และคณะ (2011) ศึกษาความสามารถของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากไซเลจกาแฟในการยับยั้งการเจริญของราที่ปนเปื้อนในเมล็ดกาแฟด้วยวิธี Dual-culture agar plate พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 10 ไอโซเลตสามารถยับยั้งการเจริญของ *A. carbonarius* ได้ Essia Ngang และคณะ (2015) ศึกษาความสามารถของแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 13 สายพันธุ์ที่คัดแยกจากเมล็ดโกโก้หมักในการยับยั้งการเจริญของ *A. carbonarius* พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของ *A. carbonarius* ได้ และสามารถนำมาใช้เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพในระหว่างกระบวนการผลิตเมล็ดโกโก้ได้

แบคทีเรียกรดแลคติกมีกลไกที่สามารถยับยั้งการเจริญของรา เช่น การแย่งสารอาหาร การผลิตกรดอินทรีย์ และการผลิตสารเมแทบอไลต์อื่นที่ออกฤทธิ์เป็นปฏิปักษ์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของรา และบางชนิดมีผลต่อการสร้างสารพิษจากรา นอกจากนี้ ยังพบว่าผนังเซลล์ของแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถดูดซับสารพิษจากรา ทำให้ช่วยลดการปนเปื้อนสารพิษจากรา ในอาหารได้ (Holzer และคณะ, 2003) สารเมแทบอไลต์ที่ออกฤทธิ์เป็นปฏิปักษ์ต่อราที่แบคทีเรียกรดแลคติกสร้างขึ้น ส่วนใหญ่เป็นสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำและทนความร้อน และพบว่าสารเมแทบอไลต์เหล่านี้สร้างขึ้นในระหว่างที่แบคทีเรียกรดแลคติกมีการเจริญเติบโต (Dalié และคณะ, 2010)

Perczak และคณะ (2018) รายงานเกี่ยวกับสารเมแทบอไลต์ที่เป็นปฏิปักษ์ต่อราที่สร้างโดยแบคทีเรียกรดแลคติก ได้แก่ กรดอินทรีย์ เช่น กรดแลคติก กรดอะซิติก ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ สารประกอบประเภทโปรตีน รูเทอริน กรดไขมัน และสารประกอบฟีโนลิก ซึ่งสารเมแทบอไลต์เหล่านี้สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่น โดยออกฤทธิ์บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เซลล์ตายส่งผลให้ยับยั้งการเจริญได้ ในงานวิจัยของ Magnusson และคณะ (2003) ศึกษาการสร้างสารเมแทบอไลต์ที่เป็นปฏิปักษ์ต่อราของ *Lactobacillus coryniformis* Si3 พบการสร้างไซคลิกไดเปปไทด์ คือ cyclo(Phe-Pro) และ cyclo(Phe-4-OH-Pro) และกรดฟีนิลแลคติก ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของ *A. fumigatus* และ *A. nidulans* ได้

จากผลการศึกษาทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากผลกาแฟสุก เมล็ดกาแฟหมัก และน้ำหมักเมล็ดกาแฟจากสถานีวิจัยโครงการหลวงแม่หลอด ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงตีนตก และศูนย์พัฒนาโครงการหลวงป่าเมี่ยง จังหวัดเชียงใหม่ มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของราที่ผลิตโอคราทอกซินเอได้ ซึ่งอาจนำมาใช้เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพในการควบคุมการเจริญของราที่ผลิตโอคราทอกซินเอที่พบปนเปื้อนในเมล็ดกาแฟหลังการเก็บเกี่ยว เพื่อให้ได้เมล็ดกาแฟที่มีคุณภาพดีสำหรับการบริโภคต่อไป

เอกสารอ้างอิง

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2561. ประกาศมาตรฐานสินค้าเกษตร เรื่อง เมล็ดกาแฟอะราบิกา (มกษ. 5701-2561). ราชกิจจานุเบกษา. เล่มที่ 136, ตอนพิเศษ 6 ง, หน้า 5. (ออนไลน์). แหล่งที่มา : http://www.acfs.go.th/standard/download/Arabica_coffee_bean_2561.pdf. (วันที่ 8 เมษายน 2562).

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2561. ประกาศมาตรฐานสินค้าเกษตร เรื่อง เมล็ดกาแฟโรบัสตา (มกษ. 5701-2561). ราชกิจจานุเบกษา. เล่มที่ 135,ตอนพิเศษ 268ง,หน้า 4. (ออนไลน์). แหล่งที่มา: http:// www.acfs.go.th/ standard/ download/ ROBUSTA_ GREEN_ COFFEE_2561.pdf (วันที่ 8 เมษายน 2562).

ชวเลิศ ตรีกรุณาสวัสดิ์ และคณะ. 2561. การควบคุมการปนเปื้อนจุลินทรีย์ และสารพิษจากเชื้อราในกระบวนการผลิตผลิตผลเกษตรหลังการเก็บเกี่ยว (Control of Microbial and Mycotoxins Contamination in Agricultural Commodities During Post-Harvest Handling Processes). รายงานโครงการวิจัย. กรมวิชาการเกษตร. (ออนไลน์). แหล่งที่มา : http://www.doa.go.th/research/attachment.php?aid=2547. (วันที่ 8 เมษายน 2562).

เทพอัปสร แสนสุข และวรนุช ภักดีเดชาเกียรติ. 2555. การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกโปรไบโอติกในการยับยั้งการเจริญแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร (SCREENING OF PROBIOTIC LACTIC ACID BACTERIA FOR INHIBITING PATHOGENIC BACTERIA). สถาบันวิจัยและพัฒนามหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์.

พิมล วุฒิสินธุ์. 2553. วิจัย และพัฒนาเทคโนโลยีการแปรรูปกาแฟสดโรบัสต้าสำหรับกลุ่มเกษตรกรผู้ปลูกกาแฟ (Development of Robusta Washed Processing Technology for Farmer Group). งานวิจัยและวิชาการ. สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร. (ออนไลน์) แหล่งที่มา : http://www.doa.go.th/aeri/files/research/plan4953_chap16.pdf. (วันที่ 29 เมษายน 2561).

มูลนิธิโครงการหลวง. 2555. สถานีวิจัยโครงการหลวงแม่หลอด. (ออนไลน์). แหล่งที่มา: http://royalprojectthailand.com/maelod (วันที่ 6 เมษายน 2562).

มูลนิธิโครงการหลวง. 2555. ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงตีนตก. (ออนไลน์). แหล่งที่มา : http://royalprojectthailand.com/teentok. (วันที่ 6 เมษายน 2562).

มูลนิธิโครงการหลวง. 2555. ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงป่าเมี่ยง. (ออนไลน์). แหล่งที่มา : http://royalprojectthailand.com/pamieng. (วันที่ 6 เมษายน 2562).

ศูนย์อุตุนิยมวิทยาภาคเหนือ. 2561. การคาดหมายลักษณะอากาศของภาคเหนือรายเดือน เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2561. (ออนไลน์). แหล่งที่มา: http://www.cmmet.tmd.go.th/forecast/Nov.pdf. (วันที่ 6 เมษายน 2562).

สุพรรณิการ์ ศรีบัวทอง. 2548. การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแล็กทิกจากข้าวหมักเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อขนมจีนแป้งหมัก (Screening and Isolation of Lactic Acid Bacteria from Fermented Rice for Using as Thai Fermented Rice Noodle (Kanomjeen) Starter). วิทยานิพนธ์. บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุริยา ศรีแสง. 2555. การศึกษาภูมิปัญญาของเกษตรกรผู้ปลูกกาแฟอาราบิก้าในจังหวัดแม่ฮ่องสอน งานวิจัย. สาขาวิชาส่งเสริมการเกษตรและสหกรณ์ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช. (ออนไลน์). แหล่งที่มา : http://tar.thailis.or.th/bitstream/123456789/555/1/วิจัย%2016.pdf. (วันที่ 29 เมษายน 2561).

สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร. กาแฟ. (ออนไลน์). แหล่งที่มา : http://www.arda.or.th/kaset/info/south/coffee/history/index.php. (วันที่ 29 เมษายน 2561).

อำพรรณ ชัยกุลเสรีวัฒน์. 2551. การแยก และคัดแยกแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตสารยับยั้งแบคทีเรีย (Isolation and Screening of Antibacterial Substans of Lactic Acid Bacteria) รายงานการวิจัย. (ออนไลน์) แหล่งที่มา: http://newtdc.thailis.or.th/docview.aspx?tdcid=359979. (วันที่ 29 เมษายน 2561).

Alshannaq, A. and Yu, J.H., 2017. Occurrence, toxicity, and analysis of major mycotoxins in food. *International journal of environmental research and public health*, *14*(6), p.632.

Alvindia, D. G. and de Guzman, M. F., 2016. Survey of Philippine coffee beans for the presence of ochratoxigenic fungi. *Mycotoxin research*, *32*(2), pp.61-67.

Avallone, S., Guyot, B., Brillouet, J. M., Olguin, E. and Guiraud, J. P., 2001. Microbiological and biochemical study of coffee fermentation. *Current microbiology*, *42*(4), pp.252-256.

Axelsson, L., 2004. Lactic acid bacteria : classification and physiology. *FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY-NEW YORK-MARCEL DEKKER-*, *139*, pp.1-66.

Barcelo, J. M. and Barcelo, R. C., 2018. Post - harvest practices linked with ochratoxin A contamination of coffee in three provinces of Cordillera Administrative Region, Philippines. *Food Additives & Contaminants: Part A*, *35*(2), pp.328-340.

Batista, L. R., Chalfoun de Souza, S. M., Silva e Batista, C. F. and Schwan, R. F., 2016. Coffee: Types and Production, pp.244-251.

Belkacem-Hanfi, N., Fhoula, I., Semmar, N., Guesmi, A., Perraud-Gaime, I., Ouzari, H. I., Boudabous, A. and Roussos, S., 2014. Lactic acid bacteria against post-harvest moulds and ochratoxin A isolated from stored wheat. *Biological Control*, *76*, pp.52-59.

Benites, A. J., Fernandes, M., Boleto, A. R., Azevedo, S., Silva, S. and Leitão, A. L., 2017. Occurrence of ochratoxin A in roasted coffee samples commercialized in Portugal. *Food control*, *73*, pp.1223-1228.

Bennett, J., Klich M. 2003. Mycotoxins. *Clinical Microbioogy Review*, *16*(3), pp.497-516.

Boonma, P., Spinler, J.K., Qin, X., Jittaprasatsin, C., Muzny, D. M., Doddapaneni, H., Gibbs, R., Petrosino, J., Tumwasorn, S. and Versalovic, J., 2014. Draft genome sequences and description of *Lactobacillus rhamnosus* strains L31, L34, and L35. *Standards in genomic sciences*, *9*(3), p.744.

COMMISSION REGULATION (EC). No. 1881 / 2006 of 19 December 2006. Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs, page 17.

Culliao, A.G.L. and Barcelo, J.M., 2015. Fungal and mycotoxin contamination of coffee beans in Benguet province, Philippines. *Food Additives & Contaminants: Part A*, *32*(2), pp.250-260.

Chiotta, M. L., Ponsone, M. L., Combina, M. and Chulze, S. N., 2016. *Aspergillus* and ochratoxin A in Latin America. In *Microbes in food and health* (pp. 265-287). Springer, Cham.

Dalié, D. K. D., Deschamps, A. M. and Richard-Forget, F., 2010. Lactic acid bacteria–Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. *Food control*, *21*(4), pp.370-380.

De Bruyn, F., Zhang, S. J., Pothakos, V., Torres, J., Lambot, C., Moroni, A. V., Callanan, M., Sybesma, W., Weckx, S. and De Vuyst, L., 2017. Exploring the impacts of postharvest processing on the microbiota and metabolite profiles during green coffee bean production. *Appl. Environ. Microbiol.*, *83*(1), pp.e02398-16.

De Melo Pereira, G. V., Beux, M., Pagnoncelli, M. G. B., Soccol, V. T., Rodrigues, C. and Soccol, C. R., 2016. Isolation, selection and evaluation of antagonistic yeasts and lactic acid bacteria against ochratoxigenic fungus *Aspergillus westerdijkiae* on coffee beans. *Letters in applied microbiology*, *62*(1), pp.96-101.

Djossou, O., Perraud-Gaime, I., Mirleau, F. L., Rodriguez-Serrano, G., Karou, G., Niamke, S., Ouzari, I., Boudabous, A. and Roussos, S., 2011. Robusta coffee beans post-harvest microflora: *Lactobacillus plantarum* sp. as potential antagonist of *Aspergillus carbonarius*. *Anaerobe*, *17*(6), pp.267-272.

El Khoury, A. and Atoui, A., 2010. Ochratoxin A: general overview and actual molecular status. *Toxins*, *2*(4), pp.461-493.

Essia Ngang, J. J., Yadang, G., Sado Kamdem, S. L., Kouebou, C. P., Youte Fanche, S. A., Tsochi Kougan, D.L., Tsoungui, A. and Etoa, F.X., 2015. Antifungal properties of selected lactic acid bacteria and application in the biological control of ochratoxin A producing fungi during cocoa fermentation. *Biocontrol science and technology*, *25*(3), pp.245-259.

Gaenzle, M. G., 2015. Lactic metabolism revisited: metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. *Current Opinion in Food Science*, *2*, pp.106-117.

Garg, S.K., 2016. Green coffee bean. In *Nutraceuticals* (pp. 653-667). Academic Press.

Gil-Serna, J., García-Díaz, M., González-Jaén, M. T., Vázquez, C. and Patiño, B., 2018. Description of an orthologous clusters of ochratoxin A biosynthetic genes in *Aspergillus* and *Penicillium* species. A comparative analysis. *International journal of food microbiology*, *268*, pp.35-43.

Haschek, W. M., Rousseaux, C. G., Wallig, M. A., Bolon, B. and Ochoa, R. eds., 2013. *Haschek and Rousseaux's handbook of toxicologic pathology*. Academic Press.

Hamdouche, Y., Meile, J.C., Nganou, D.N., Durand, N., Teyssier, C. and Montet, D., 2016. Discrimination of post-harvest coffee processing methods by microbial ecology analyses. *Food Control*, *65*, pp.112-120.

Hojnik, N., Cvelbar, U., Tavčar-Kalcher, G., Walsh, J. and Križaj, I., 2017. Mycotoxin decontamination of food: Cold atmospheric pressure plasma versus "classic" decontamination. *Toxins*, *9*(5), p.151.

Holzer, M., Mayrhuber, E., Danner, H. and Braun, R., 2003. The role of *Lactobacillus buchneri* in forage preservation. *Trends in biotechnology*, *21*(6), pp.282-287.

Ilic, Z., Bui, T., Tran-Dinh, N., Dang, M. H. V., Kennedy, I. and Carter, D., 2007. Survey of Vietnamese coffee beans for the presence of ochratoxigenic Aspergilli. *Mycopathologia*, *163*(3), pp.177-182.

Kıvanc, M., Kıvanc, S. A. and Pektas, S., 2014. Screening of Lactic acid bacteria for antifungal activity against fungi. *Journal of Food Processing & Technology*, *5*(3), p.310.

Kőszegi, T. and Poór, M., 2016. Ochratoxin A: molecular interactions, mechanisms of toxicity and prevention at the molecular level. *Toxins*, *8*(4), p.111.

Lappa, I.K., Mparampouti, S., Lanza, B. and Panagou, E.Z., 2018. Control of *Aspergillus carbonarius* in grape berries by *Lactobacillus plantarum*: A phenotypic and gene transcription study. *International journal of food microbiology*, *275*, pp.56-65.

Leong, K.H., Chen, Y.S., Pan, S.F., Chen, J.J., Wu, H.C., Chang, Y.C. and Yanagida, F., 2014. Diversity of lactic acid bacteria associated with fresh coffee cherries in Taiwan. *Current microbiology*, *68*(4), pp.440-447.

Magnusson, J., Ström, K., Roos, S., Sjögren, J. and Schnürer, J., 2003. Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. *FEMS microbiology Letters*, *219*(1), pp.129-135.

Mandal, V., Sen, S. K. and Mandal, N. C., 2007. Detection, isolation and partial characterization of antifungal compound (s) produced by *Pediococcus acidilactici* LAB 5. *Natural Product Communications*, *2*(6), p.1934578.

Masoud, W., Bjørg Cesar, L., Jespersen, L. and Jakobsen, M., 2004. Yeast involved in fermentation of Coffea arabica in East Africa determined by genotyping and by direct denaturating gradient gel electrophoresis. *Yeast*, *21*(7), pp.549-556.

Moorehead, A. W. and Shumway, W. W., Halliburton Energy Services Inc, 2008. Methods and compositions relating to the control of the rates of acid-generating compounds in acidizing operations. U.S. Patent 7,455,112.

Noonim, P., Mahakarnchanakul, W., Nielsen, K. F., Frisvad, J. C. and Samson, R. A., 2008. Isolation, identification and toxigenic potential of ochratoxin A-producing Aspergillus species from coffee beans grown in two regions of Thailand. *International journal of food microbiology*, *128*(2), pp.197-202.

Pardo, E., Marin, S., Ramos, A. J. and Sanchis, V., 2006. Ecophysiology of ochratoxigenic *Aspergillus ochraceus* and *Penicillium verrucosum* isolates. Predictive models for fungal spoilage prevention–a review. *Food additives and contaminants*, *23*(4), pp.398-410.

Perczak, A., Goliński, P., Bryła, M. and Waśkiewicz, A., 2018. The efficiency of lactic acid bacteria against pathogenic fungi and mycotoxins. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, *69*(1), pp.32-45.

Rouse, S., Harnett, D., Vaughan, A. and Sinderen, D. V., 2008. Lactic acid bacteria with potential to eliminate fungal spoilage in foods. *Journal of Applied Microbiology*, *104*(3), pp.915-923.

Salminen, S. and Von Wright, A., 2004. *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*. CRC Press

Samson, R.A., Houbraken, J.A.M.P., Kuijpers, A.F., Frank, J.M. and Frisvad, J.C., 2004. New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Stud Mycol*, *50*, pp.45-61.

Sangmanee, P. and Hongpattarakere, T., 2014. Inhibitory of multiple antifungal component produced by *Lactobacillus plantarum* K35 on growth, aflatoxin production and ultrastructure alterations of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Food Control*, *40*, pp.224-233.

Sjögren, J., Magnusson, J., Broberg, A., Schnürer, J. and Kenne, L., 2003. Antifungal 3-hydroxyl fatty acids from *Lactobacillus plantarum* MiLAB 14. *Applied Environmental Microbiology*, *69*(12), pp.7554-7557.

Smith, M.C., Madec, S., Coton, E. and Hymery, N., 2016. Natural co - occurrence of mycotoxins in foods and feeds and their in vitro combined toxicological effects. *Toxins*, *8*(4), p.94.

Stiles, M.E. and Holzapfel, W.H., 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International journal of food microbiology*, *36*(1), pp.1-29.

Taradolsirithitikul, P., Sirisomboon, P. and Dachoupakan Sirisomboon, C., 2017. Qualitative and quantitative analysis of ochratoxin A contamination in green coffee beans using Fourier transform near infrared spectroscopy. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *97*(4), pp.1260-1266.

Teuber M., 1993). Lactic Acid Bacteria. *Biotechnology*, p.325-366.

Vilela, D.M., Pereira, G.V.D.M., Silva, C.F., Batista, L.R. and Schwan, R.F., 2010. Molecular ecology and polyphasic characterization of the microbiota associated with semi-dry processed coffee (Coffea arabica L.). *Food microbiology*, *27*(8), pp.1128-1135.

Al-Haik, W.M., Abdullah Bawazir, A.M., Aly, M.M., Al-Haddad, A.M. and Shantaram, M., 2017. Antimicrobial Activity of Lactic Acid Bacteria against Toxigenic Fungi. *International Journal of Current Research and Academic Review*, p.5.

Wood, B.J. and Holzapfel, W.H.N. eds., 1992. *The genera of lactic acid bacteria* (Vol. 2). Springer Science & Business Media.

.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS ที่มีแคลเซียมคาร์บอเนต (de Man, Rogosa and Sharpe)

อาหารสำเร็จรูป MRS	22	กรัม
แคลเซียมคาร์บอเนต	2	กรัม
ผงวุ้น	6	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้ง 3 ชนิด ในน้ำกลั่นปริมาตร 400 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS (de Man, Rogosa and Sharpe)

อาหารสำเร็จรูป MRS	5.5	กรัม

ละลายอาหารสำเร็จรูปในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

3. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA (Potato Dextrose Agar) ที่มีผงวุ้น 0.8%

อาหารสำเร็จรูป PDB	4.8	กรัม
ผงวุ้น	0.16	กรัม

ละลายอาหารสำเร็จรูปในน้ำกลั่นปริมาตร 200 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDB (Potato Dextrose Broth)

อาหารสำเร็จรูป PDB	2.4	กรัม

ละลายอาหารสำเร็จรูปในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. สารละลายที่ใช้เตรียมสปอร์ราแขวนลอย

ชั่งโซเดียมคลอไรด์ 0.85 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมกับ Tween 80 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ให้เข้ากัน นำไปฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. สารสะลายเปปโทน (Peptone water)

ชั่งเปปโทน 0.45 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 450 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. การทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (Catalase test) (เทพอัปสร แสนสุข และวรนุช ภักดีเดชาเกียรติ, 2555)

หลักการ ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้ (by-product) จากการหายใจระดับเซลล์ และเป็นพิษเมื่อสะสมในเซลล์ เอนไซม์คะตะเลสทำลาย H_2O_2 ก่อนที่สารนี้จะทำอันตรายต่อเซลล์ด้วยแยก H_2O_2 เป็นออกซิเจนอิสระ ซึ่งเกิดเป็นฟอง และน้ำ การทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลสจึงใช้สารละลาย H_2O_2 ทดสอบ ดังนั้น ถ้าเป็นแบคทีเรียที่สร้างคะตะเลสจึงแสดงการสลาย H_2O_2 ได้ และสังเกตเห็นมีฟองก๊าซเกิดขึ้น ซึ่งโดยทั่วไปปฏิกิริยาจะเกิดเร็วมาก และจะมีฟองปรากฏให้เห็น

สารละลายทดสอบ

3% ของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (H_2O_2)

วิธีการทดสอบ

นำเชื้อที่ต้องการทดสอบป้ายลงบนสไลด์ที่สะอาด หยดสารละลาย 3% ของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ลงบนเชื้อที่ป้ายไว้ก่อน แล้วอ่านผลทันที

Positive catalase test คือ เกิดฟองแก๊สทันที และเห็นได้ชัด

Negative catalase test คือ ไม่เกิดฟองแก๊สขึ้น

4. การทดสอบการสร้างเอนไซม์ออกซิเดส (Oxidase test) (เทพอัปสร แสนสุข และวรนุช ภักดีเดชาเกียรติ, 2555)

หลักการ Aerobic bacteria มีกระบวนการ Oxidative phosphorylation ในการหายใจระดับเซลล์เพื่อสร้างพลังงาน โดยระหว่างการเกิดขบวนการนี้ จะมีการถ่ายเทอิเล็กตรอนให้กับออกซิเจนโดยผ่านวิถีของการขนส่งอิเล็คตรอน ซึ่งจะอาศัยการทำงานของ Cytochrome ต่างๆ ซึ่งการทดสอบออกซิเดสนี้เป็นการทดสอบหา Cytochrome C oxidase ของแบคทีเรีย ซึ่งจะไปออกซิไดซ์สารเคมีทำให้เกิดสารประกอบสีม่วง

สารละลายทดสอบ (Oxidase regent)

Kovac' s oxidase reagent (1% tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochroride)

ชั่ง Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochroride 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปใช้ทดสอบทันที

วิธีการทดสอบ

วิธีที่ 1 Indirect paper procedures

1. วางกระดาษกรองลงในเพลต
2. หยด Kovac's oxidase reagent ลงบนกระดาษให้พอชื้น
3. ใช้ลูปเขี่ยเชื้อ แล้วป้ายลงในกระดาษกรอง ยาวประมาณ 3 เซนติเมตร
4. สังเกตการเปลี่ยนสีของเชื้อที่ป้ายลงในกระดาษกรอง
5. อ่านผล

Oxidase positive คือ มีการเปลี่ยนสีเป็นสีน้ำเงินเข้มภายใน 1 นาที

Oxidase negative คือ เชื้อที่ป้ายลงไปแล้วไม่มีการเปลี่ยนสี

วิธีที่ 2 Direct plate procedures

1. Streak เชื้อทดสอบลงบน agar plate ให้ได้โคโลนีเดี่ยว
2. หยด Kovac' s oxidase reagent 2-3 หยด ลงบนโคโลนีที่ต้องการทดสอบ
3. สังเกตการเปลี่ยนแปลงของโคโลนี
4. การอ่านผล

Oxidase positive : โคโลนีเปลี่ยนสีเป็นสีน้ำเงินเข้มภายใน 1 นาที

Oxidase negative : โคโลนีไม่เปลี่ยนสี

5. การทดสอบการสร้างกรด และแก๊สในกลูโคส 1 เปอร์เซ็นต์ (Acid and gas production from 1% glucose) (เทพอัปสร แสนสุข และวรนุช ภักดีเดชาเกียรติ, 2555)

หลักการ ระหว่างการหมัก สารอินทรีย์ถูกใช้เป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย ผลิตภัณฑ์สุดท้ายของการหมักเป็นกรด หรือ เป็นกรดและแก๊ส ปฏิกิริยาการหมักถูกตรวจสอบด้วยการเปลี่ยนสีของตัวบ่งชี้ค่าความเป็นกรด-เบส (pH indicator) โดยทั่วไปมีการใช้ฟีนอลเรด (Phenol red) เป็นตัวบ่งชี้การหมักคาร์โบไฮเดรต เนื่องจากผลิตภัณฑ์จากการหมักคาร์โบไฮเดรตเป็นกรดอินทรีย์ แต่มีตัวบ่งชี้ค่าความเป็นกรด-เบสอื่นๆ ที่สามารถใช้ได้ เช่น Bromocresol purple (หรือ Bromcresol purple) และ Bromothymol blue (หรือ Bomthymol blue)

การเตรียมอาหารทดสอบ

อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS	100	มิลลิลิตร
กลูโคส	1	กรัม
ฟีนอลเรด	0.02	กรัม

ถ่ายอาหารลงในหลอดปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่หลอดดักแก๊ส (Durham tube) นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที อาหารมีสีแดงของฟีนอลเรด มีค่าความเป็นกรด-เบสประมาณ 7.4 ± 0.2

วิธีการทดสอบ

เขี่ยแบคทีเรียกรดแลคติก ใส่ในหลอดอาหารที่เตรียมไว้ นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง นำมาตรวจผล เทียบกับหลอดควบคุม (ไม่มีแบคทีเรียทดสอบ) ดังนี้

ผลการทดสอบเป็นลบ (Negative test) อาหารไม่เปลี่ยนสี

หมักกลูโคสได้กรด (Acid production) อาหารเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเหลือง

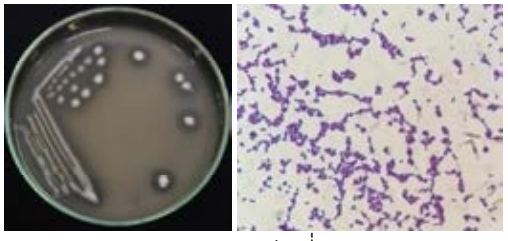
หมักกลูโคสได้กรดและแก๊ส (Acid and gas production) อาหารเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเหลืองและฟองแก๊สที่ด้านบนของหลอดดักแก๊ส

การทดสอบการสร้างกรดในน้ำตาล 1 เปอร์เซ็นต์ ใช้วิธีเดียวกับการทดสอบการหมักกลูโคสที่กล่าวในข้างต้น แต่เปลี่ยนชนิดน้ำตาลจากกลูโคสเป็นแลคโตส และราฟิโนส

ภาคผนวก ค

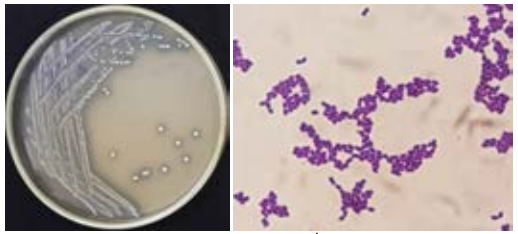
ข้อมูลดิบ

ภาพที่ ค.1 ลักษณะโคโลนี และรูปร่างเซลล์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกมาใช้ในการทดสอบความสามารถเบื้องต้นในการเป็นปฏิปักษ์ต่อ *A. carbonarius* TK4.2 และราไอโซเลต TKI9 ด้วยวิธี Agar spot assay จำนวน 15 ไอโซเลต

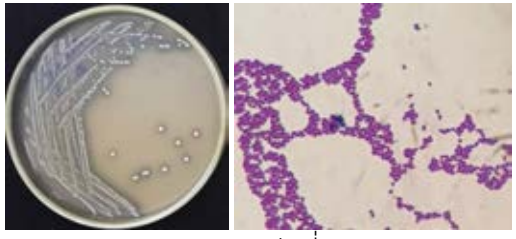


MC1A (กลุ่มที่ 1)

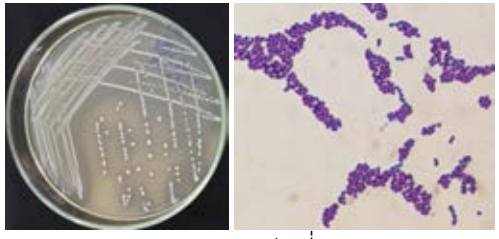
MF1D (กลุ่มที่ 2)



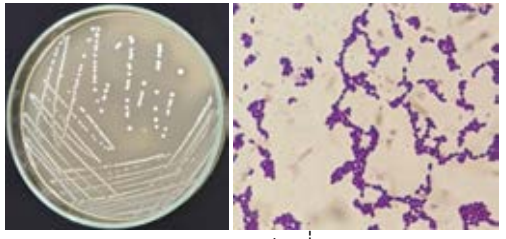
MF3D (กลุ่มที่ 2)



MF4A (กลุ่มที่ 2)

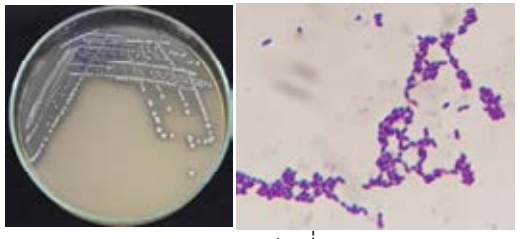


MW2A (กลุ่มที่ 2)

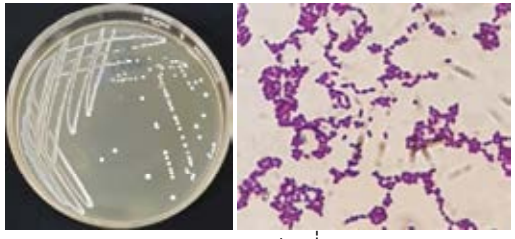


TW1B (กลุ่มที่ 2)

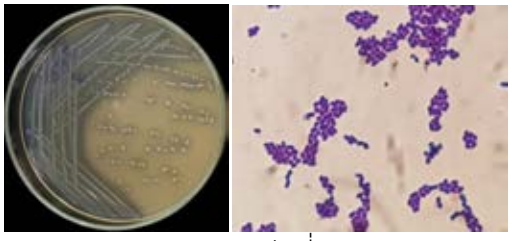
ภาพที่ ค.1 ลักษณะโคโลนี และรูปร่างเซลล์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกมาใช้ในการทดสอบความสามารถเบื้องต้นในการเป็นปฏิปักษ์ต่อ *A. carbonarius* TK4.2 และราไอโซเลต TKI9 ด้วยวิธี Agar spot assay จำนวน 15 ไอโซเลต



TF1B (กลุ่มที่ 2)



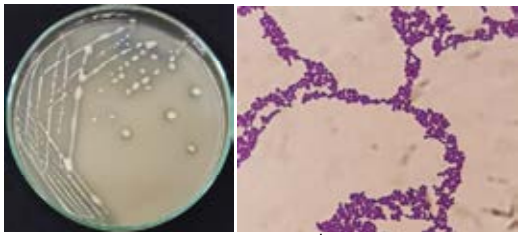
PC1A (กลุ่มที่ 2)



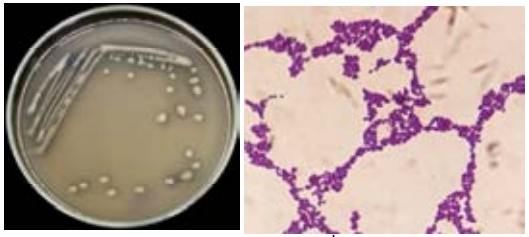
TF1H (กลุ่มที่ 3)

MW2C (กลุ่มที่ 4)

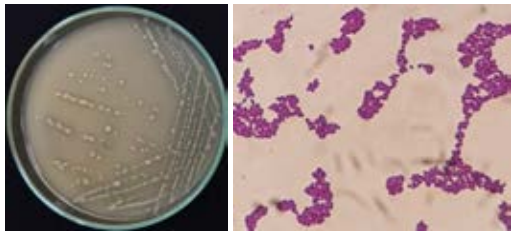
TF1A (กลุ่มที่ 4)



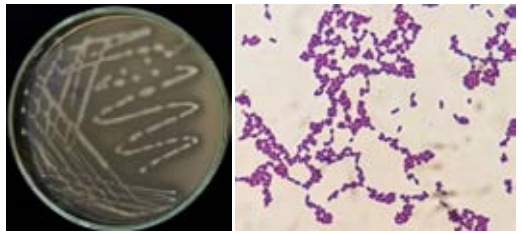
MF1G (กลุ่มที่ 5)



MW1A (กลุ่มที่ 5)



PC1D (กลุ่มที่ 5)



PF1B (กลุ่มที่ 6)

ตารางที่ ค.1 ลักษณะโคโลนี รูปร่างเซลล์ และผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้

ไอโซเลท	ลักษณะโคโลนี	รูปร่างเซลล์	คะตะเลส	ออกซิเดส	การสร้างกรดและแก๊สจากการหมักน้ำตาล		
					กลูโคส	แลคโตส	ราฟิโนส
MC1A	กลม สีขาว เยิ้ม ขอบเรียบ ใส	แท่ง	-	-	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส
MC1B	กลม สีขาวขุ่น นูน ขอบเรียบ	แท่งสั้น	-	-	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส
MC1C	กลม สีเหลืองขุ่น เยิ้ม นูน ขอบเรียบ	แท่งสั้น	-	-	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส
MC1D	กลม สีเหลืองขุ่น เยิ้ม นูน ขอบเรียบ	แท่งสั้น	-	-	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส
MC2A	กลม สีเหลืองขุ่น เยิ้ม นูน ขอบเรียบ	แท่งสั้น	-	-	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส
MF1A	กลม สีขาวขุ่น นูน ขอบเรียบ	แท่งสั้น	-	-	กรด	กรด	กรด
MF1B	กลม สีขาวขุ่น นูน ขอบเรียบ	แท่งสั้น	-	-	กรด	กรด	กรด
MF1C	กลม สีขาวขุ่น นูน ขอบเรียบ	แท่งสั้น	-	-	กรด	กรด	กรด
MF1D	กลม สีขาวขุ่น นูน ขอบเรียบ	แท่งสั้น	-	-	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส
MF1E	กลม สีขาวขุ่น นูน ขอบเรียบ	แท่งสั้น	-	-	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส
MF1F	กลม สีเหลืองขุ่น เยิ้ม นูน ขอบเรียบ	แท่งสั้น	-	-	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส
MF1G	กลม สีเหลืองขุ่น เยิ้ม นูน ขอบเรียบ	แท่งสั้น	-	-	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส
MF1H	กลม สีเหลืองขุ่น เยิ้ม นูน ขอบเรียบ	แท่งสั้น	-	-	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส
MF1I	กลม สีเหลืองขุ่น เยิ้ม นูน ขอบเรียบ	แท่งสั้น	-	-	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส
MF1J	กลม สีขาวขุ่น นูน ขอบเรียบ	แท่งสั้น	-	-	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส

หมายเหตุ : สัญลักษณ์ - หมายถึง ไม่พบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส และออกซิเดส ให้ผลการทดสอบเป็นลบ คือ ไม่เกิดฟองแก๊ส

กรด/แก๊ส หมายถึง มีการสร้างกรดและแก๊สจากการหมักน้ำตาลทั้ง 3 ชนิด / กรด หมายถึงมีการสร้างเฉพาะกรดจากการหมักน้ำตาลทั้ง 3 ชนิด

ตารางที่ ค.1 ลักษณะโคโลนี รูปร่างเซลล์ และผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ (ต่อ)

ไอโซเลท	ลักษณะโคโลนี	รูปร่างเซลล์	คะตะเลส	ออกซิเดส	การสร้างกรดและแก๊สจากการหมักน้ำตาล		
					กลูโคส	แลคโตส	ราฟิโนส
MF2A	กลม สีขาวขุ่น นูน ขอบเรียบ	แท่งสั้น	-	-	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส
MF2B	กลม สีขาวขุ่น นูน ขอบเรียบ	แท่งสั้น	-	-	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส
MF3A	กลม สีเหลืองขุ่น ใต้โคโลนีมีสีเหลือง นูน ขอบเรียบ	แท่งสั้น	-	-	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส
MF3B	กลม สีขาวขุ่น นูน ขอบเรียบ	แท่งสั้น	-	-	กรด	กรด	กรด
MF3C	กลม สีเหลืองขุ่น ใต้โคโลนีมีสีเหลือง นูน ขอบเรียบ	แท่งสั้น	-	-	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส
MF3D	กลม สีขาวขุ่น นูน ขอบเรียบ	แท่งสั้น	-	-	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส
MF3E	กลม สีขาวขุ่น นูน ขอบเรียบ	แท่งสั้น	-	-	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส
MF3F	กลม สีเหลืองขุ่น เยิ้ม นูน ขอบเรียบ	แท่งสั้น	-	-	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส
MF3G	กลม สีเหลืองขุ่น ใต้โคโลนีมีสีเหลือง นูน ขอบเรียบ	แท่งสั้น	-	-	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส
MF3H	กลม สีเหลืองขุ่น ใต้โคโลนีมีสีเหลือง นูน ขอบเรียบ	แท่งสั้น	-	-	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส
MF3I	กลม สีเหลืองขุ่น ใต้โคโลนีมีสีเหลือง นูน ขอบเรียบ	แท่งสั้น	-	-	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส
MF3J	กลม สีเหลืองขุ่น ใต้โคโลนีมีสีเหลือง นูน ขอบเรียบ	แท่งสั้น	-	-	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส
MF4A	กลม สีขาวขุ่น นูน ขอบเรียบ	แท่งสั้น	-	-	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส
MF4B	กลม สีขาวขุ่น นูน ขอบเรียบ	แท่งสั้น	-	-	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส
MW1A	กลม สีเหลืองขุ่น เยิ้ม นูน ขอบเรียบ	แท่งสั้น	-	-	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส

หมายเหตุ : สัญลักษณ์ - หมายถึง ไม่พบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส และออกซิเดส ให้ผลการทดสอบเป็นลบ คือ ไม่เกิดฟองแก๊ส

กรด/แก๊ส หมายถึง มีการสร้างกรดและแก๊สจากการหมักน้ำตาลทั้ง 3 ชนิด / กรด หมายถึงมีการสร้างเฉพาะกรดจากการหมักน้ำตาลแต่ละชนิด

ตารางที่ ค.1 ลักษณะโคโลนี รูปร่างเซลล์ และผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ (ต่อ)

ไอโซเลท	ลักษณะโคโลนี	รูปร่างเซลล์	คะตะเลส	ออกซิเดส	การสร้างกรดและแก๊สจากการหมักน้ำตาล		
					กลูโคส	แลคโตส	ราฟิโนส
MW2A	กลม สีขาวขุ่น นูน ขอบเรียบ	แท่งสั้น	-	-	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส
MW2B	กลม สีขาวขุ่น นูน ขอบเรียบ	แท่งสั้น	-	-	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส
MW2C	กลม สีเหลืองขุ่น ใต้โคโลนีมีสีเหลือง นูน ขอบเรียบ	แท่งสั้น	-	-	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส
MW2D	กลม สีขาวขุ่น นูน ขอบเรียบ	แท่งสั้น	-	-	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส
PC1A	กลม สีขาวขุ่น นูน ขอบเรียบ	แท่งสั้น	-	-	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส
PC1B	กลม สีขาวขุ่น นูน ขอบเรียบ	แท่งสั้น	-	-	กรด	กรด	กรด
PC1C	กลม สีเหลืองขุ่น เยิ้ม นูน ขอบเรียบ	แท่งสั้น	-	-	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส
PC1D	กลม สีเหลืองขุ่น เยิ้ม นูน ขอบเรียบ	แท่งสั้น	-	-	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส
PC1E	กลม สีเหลืองขุ่น เยิ้ม นูน ขอบเรียบ	แท่งสั้น	-	-	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส
PF1A	กลม กลางโคโลนีมีสีเหลือง ขอบเรียบ ใส แบนติดอาหาร	แท่งสั้น	-	-	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส
PF1B	กลม กลางโคโลนีมีสีเหลือง ขอบเรียบ ใส แบนติดอาหาร	แท่งสั้น	-	-	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส
PF1C	กลม กลางโคโลนีมีสีเหลือง ขอบเรียบ ใส แบนติดอาหาร	แท่งสั้น	-	-	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส
PF1D	กลม กลางโคโลนีมีสีเหลือง ขอบเรียบ ใส แบนติดอาหาร	แท่งสั้น	-	-	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส
PF1E	กลม กลางโคโลนีมีสีเหลือง ขอบเรียบ ใส แบนติดอาหาร	แท่งสั้น	-	-	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส
PF1F	กลม สีขาวขุ่น นูน ขอบเรียบ	แท่งสั้น	-	-	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส

หมายเหตุ : สัญลักษณ์ - หมายถึง ไม่พบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส และออกซิเดส ให้ผลการทดสอบเป็นลบ คือ ไม่เกิดฟองแก๊ส

กรด/แก๊ส หมายถึง มีการสร้างกรดและแก๊สจากการหมักน้ำตาลทั้ง 3 ชนิด / กรด หมายถึงมีการสร้างเฉพาะกรดจากการหมักน้ำตาลแต่ละชนิด

ตารางที่ ค.1 ลักษณะโคโลนี รูปร่างเซลล์ และผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ (ต่อ)

ไอโซเลท	ลักษณะโคโลนี	รูปร่างเซลล์	คะตะเลส	ออกซิเดส	การสร้างกรดและแก๊สจากการหมักน้ำตาล		
					กลูโคส	แลคโตส	ราฟิโนส
PF1G	กลม สีขาวขุ่น นูน ขอบเรียบ	แท่งสั้น	-	-	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส
PW1A	กลม สีขาวขุ่น นูน ขอบเรียบ	แท่งสั้น	-	-	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส
PW1B	กลม สีขาวขุ่น นูน ขอบเรียบ	แท่งสั้น	-	-	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส
TC1A	กลม สีขาวขุ่น นูน ขอบเรียบ	แท่งสั้น	-	-	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส
TC2A	กลม สีขาวขุ่น นูน ขอบเรียบ	แท่งสั้น	-	-	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส
TC2B	กลม สีขาวขุ่น นูน ขอบเรียบ	แท่งสั้น	-	-	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส
TF1A	กลม สีเหลืองขุ่น ใต้โคโลนีมีสีเหลือง นูน ขอบเรียบ	แท่งสั้น	-	-	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส
TF1B	กลม สีขาวขุ่น นูน ขอบเรียบ	แท่งสั้น	-	-	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส
TF1C	กลม สีขาวขุ่น นูน ขอบเรียบ	แท่งสั้น	-	-	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส
TF1D	กลม สีขาวขุ่น นูน ขอบเรียบ	แท่งสั้น	-	-	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส
TF1E	กลม สีขาวขุ่น นูน ขอบเรียบ	แท่งสั้น	-	-	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส
TF1F	กลม สีขาวขุ่น นูน ขอบเรียบ	แท่งสั้น	-	-	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส
TF1G	กลม สีขาวขุ่น นูน ขอบเรียบ	แท่งสั้น	-	-	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส
TF1H	กลม สีขาวขุ่น นูน ขอบเรียบ	แท่งสั้น	-	-	กรด	กรด	กรด
TW1A	กลม สีขาวขุ่น นูน ขอบเรียบ	แท่งสั้น	-	-	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส

หมายเหตุ : สัญลักษณ์ - หมายถึง ไม่พบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส และออกซิเดส ให้ผลการทดสอบเป็นลบ คือ ไม่เกิดฟองแก๊ส

กรด/แก๊ส หมายถึง มีการสร้างกรดและแก๊สจากการหมักน้ำตาลทั้ง 3 ชนิด / กรด หมายถึงมีการสร้างเฉพาะกรดจากการหมักน้ำตาลแต่ละชนิด

ตารางที่ ค.1 ลักษณะโคโลนี รูปร่างเซลล์ และผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ (ต่อ)

ไอโซเลท	ลักษณะโคโลนี	รูปร่างเซลล์	คะตะเลส	ออกซิเดส	การสร้างกรดและแก๊สจากการหมักน้ำตาล		
					กลูโคส	แลคโตส	ราฟิโนส
TW1B	กลม สีขาวขุ่น นูน ขอบเรียบ	แท่งสั้น	-	-	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส
TW1C	กลม สีขาวขุ่น นูน ขอบเรียบ	แท่งสั้น	-	-	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส	กรด/แก๊ส

หมายเหตุ : สัญลักษณ์ - หมายถึง ไม่พบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส และออกซิเดส ให้ผลการทดสอบเป็นลบ คือ ไม่เกิดฟองแก๊ส

กรด/แก๊ส หมายถึง มีการสร้างกรดและแก๊สจากการหมักน้ำตาลทั้ง 3 ชนิด / กรด หมายถึงมีการสร้างเฉพาะกรดจากการหมักน้ำตาลแต่ละชนิด

ตารางที่ ค.2 เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ จากการทดสอบความสามารถเบื้องต้นในการเป็นปฏิปักษ์ต่อ *A. carbonarius* TK4.2 ด้วยวิธี Agar spot assay

	***A. carbonarius* TK4.2 (เซนติเมตร)**							
	ซ้ำที่ 1				**ซ้ำที่ 2**			
ไอโซเลต	**(1) ซ้ายไปขวา**	**(1) บนลงล่าง**	**(2) ซ้ายไปขวา**	**(2) บนลงล่าง**	**(1) ซ้ายไปขวา**	**(1) บนลงล่าง**	**(2) ซ้ายไปขวา**	**(2) บนลงล่าง**
MC1A	ไม่มีการยับยั้งการเจริญ				ไม่มีการยับยั้งการเจริญ			
MF1D	1.8	1.9	2.1	2.5	1.6	1.6	วงใสไม่ชัดเจน	
MF3D	ไม่มีการยับยั้งการเจริญ				ไม่มีการยับยั้งการเจริญ			
MF4A	1.8	1.6	2.5	2.0	1.7	1.6	1.9	2.0
MW2A	2.8	2.5	1.5	1.7	1.7	1.7	1.7	2.0
PC1A	ไม่มีการยับยั้งการเจริญ				ไม่มีการยับยั้งการเจริญ			
TF1B	ไม่มีการยับยั้งการเจริญ				ไม่มีการยับยั้งการเจริญ			
TW1B	ไม่มีการยับยั้งการเจริญ				ไม่มีการยับยั้งการเจริญ			
TF1H	ไม่มีการยับยั้งการเจริญ				ไม่มีการยับยั้งการเจริญ			
MW2C	1.5	1.5	1.3	1.4	1.5	1.4	1.3	1.2
TF1A	ไม่มีการยับยั้งการเจริญ				ไม่มีการยับยั้งการเจริญ			
MF1G	2.2	1.8	1.8	2.2	1.8	1.6	1.5	1.6
MW1A	1.7	1.6	1.8	2.0	วงใสไม่ชัดเจน		วงใสไม่ชัดเจน	
PC1D	1.8	2.0	1.7	1.5	วงใสไม่ชัดเจน		วงใสไม่ชัดเจน	
PF1B	1.8	2.0	1.3	1.4	1.8	1.9	วงใสไม่ชัดเจน	

ตารางที่ ค.3 เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ จากการทดสอบความสามารถเบื้องต้นในการเป็นปฏิปักษ์ต่อราไอโซเลต TKI9 ด้วยวิธี Agar spot assay

	ราไอโซเลต TKI9 (เซนติเมตร)							
	ซ้ำที่ 1				**ซ้ำที่ 2**			
ไอโซเลต	**(1) ซ้ายไปขวา**	**(1) บนลงล่าง**	**(2) ซ้ายไปขวา**	**(2) บนลงล่าง**	**(1) ซ้ายไปขวา**	**(1) บนลงล่าง**	**(2) ซ้ายไปขวา**	**(2) บนลงล่าง**
MC1A	ไม่มีการยับยั้งการเจริญ				ไม่มีการยับยั้งการเจริญ			
MF1D	1.2	1. 1	วงใสไม่ชัดเจน		2.0	1.4	1.5	2.0
MF3D	2.3	1.7	2.0	2.2	1.5	1.2	1.3	1.2
MF4A	1.4	1.4	1.2	1.4	1.3	1.3	1.5	2.3
MW2A	1.5	1.3	2.5	2.3	2.0	2.3	1.4	1.3
PC1A	ไม่มีการยับยั้งการเจริญ				ไม่มีการยับยั้งการเจริญ			
TF1B	ไม่มีการยับยั้งการเจริญ				ไม่มีการยับยั้งการเจริญ			
TW1B	1.7	1.4	วงใสไม่ชัดเจน		1.5	1.4	1.2	1.6
TF1H	ไม่มีการยับยั้งการเจริญ				ไม่มีการยับยั้งการเจริญ			
MW2C	1.5	1.6	1.3	1.7	1. 1	1.0	1.5	1.8
TF1A	1.3	1.2	1.3	1.2	1.5	1.4	1.3	1.4
MF1G	1.4	1.3	1.2	1.3	1.2	1.1	1.3	1.2
MW1A	ไม่มีการยับยั้งการเจริญ				ไม่มีการยับยั้งการเจริญ			
PC1D	ไม่มีการยับยั้งการเจริญ				ไม่มีการยับยั้งการเจริญ			
PF1B	1.3	1.4	1.4	1.4	1.8	1.7	1.7	1.8