

การยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินของ *Aspergillus flavus* ในไซเลจข้าวโพดโดยใช้ยีสต์
และแก๊กติกแอซิดแบคทีเรียปฏิปักษ์



นางสาวทรงศรณ รุ่งชัยวัฒนกุล

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

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

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2560

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

INHIBITION OF GROWTH AND AFLATOXIN PRODUCTION OF *Aspergillus flavus* IN

CORN SILAGE USING ANTAGONISTIC YEASTS AND LACTIC ACID BACTERIA

Miss Tassaporn Rungchaiwattanakul



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

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2017

Copyright of Chulalongkorn University



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินของ
Aspergillus flavus ในไซเลจข้าวโพดโดยใช้ยีสต์และแล็ก
ติกแอซิดแบคทีเรียปฏิบั้กซ์

โดย

นางสาวทรงศรณ รุ่งชัยวัฒนกุล

สาขาวิชา

จุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชิวานันท์ เดชอุปการ ศิริสมบูรณ์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวงษ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน เรืองสำราญ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชิวานันท์ เดชอุปการ ศิริสมบูรณ์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธนียวัน)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุริยะ สะวานนท์)

ทรศกรณ รุ่งชัยวัฒนกุล : การยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินของ *Aspergillus flavus* ใน
 ไซเลจข้าวโพดโดยใช้ยีสต์และแล็กติกแอซิดแบคทีเรียปฏิปักษ์ (INHIBITION OF GROWTH AND
 AFLATOXIN PRODUCTION OF *Aspergillus flavus* IN CORN SILAGE USING ANTAGONISTIC
 YEASTS AND LACTIC ACID BACTERIA) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร.ชีวานันท์ เดชอุปการ ศิ
 ริสมบุรณ์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ผศ. ดร.สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา, หน้า.

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาความสามารถของยีสต์และแล็กติกแอซิดแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการ
 ยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินรวมของ *Aspergillus flavus* บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อและในไซเลจ
 ข้าวโพด และเพื่อหาปริมาณความเข้มข้นและอัตราส่วนของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียและยีสต์ผสมที่ให้ผลการยับยั้ง
 สูงสุดในไซเลจข้าวโพด โดยเริ่มจากการทดสอบประสิทธิภาพของยีสต์ (*Wickerhamomyces anomalus* MSCU
 0652 และ *Kluyveromyces marxianus* MSCU 0655) และแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย (*Lactobacillus casei* AN2
 และ *Lactobacillus paracasei* AN3) ในการยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินของ *A. flavus* บน
 อาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ใช้ทดสอบทั้งหมดให้ผลการยับยั้งการเจริญของราค่อนข้างต่ำ (10-20
 เปอร์เซ็นต์) อย่างไรก็ตาม ยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 และ
L. paracasei AN3 แบบเดี่ยวมีประสิทธิภาพในการลดการผลิตอะฟลาทอกซินรวมสูงสุด (43.25 และ 35.64
 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) ดังนั้น จึงนำยีสต์ผสมและ *L. paracasei* AN3 มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการ
 เจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินรวมของ *A. flavus* ในไซเลจข้าวโพดปลอดเชื้อและไซเลจข้าวโพดร่วมกับจุลินทรีย์
 ประจำถิ่น พบว่า การใช้ *L. paracasei* AN3 ร่วมกับยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K.*
marxianus MSCU 0655 สามารถยับยั้งการเจริญและลดปริมาณอะฟลาทอกซินรวมของราได้ดีทั้งในไซเลจข้าวโพด
 ปลอดเชื้อและไซเลจข้าวโพดที่หมักร่วมกับจุลินทรีย์ประจำถิ่น จากนั้น เมื่อทดสอบความเข้มข้นและอัตราส่วนของ
L. paracasei AN3 ร่วมกับยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 ที่
 เหมาะสม พบว่า การเติม *L. paracasei* AN3 ที่ความเข้มข้นมากกว่ายีสต์ผสม ($10^8:10^6$) มีประสิทธิภาพในการ
 ยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินรวมของราดีที่สุด โดยไม่พบการเจริญของราตั้งแต่วันที่ 5 จนถึงสิ้นสุดการ
 บ่ม และสามารถลดปริมาณอะฟลาทอกซินได้ดีที่สุดในวันที่ 7 ของการบ่ม เท่ากับ 63.94 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับชุด
 ควบคุม และเมื่อสิ้นสุดการบ่ม สามารถลดปริมาณอะฟลาทอกซินได้เท่ากับ 23.22 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับชุด
 ควบคุม และเท่ากับ 45.23 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับปริมาณอะฟลาทอกซินรวมเริ่มต้น นอกจากนี้ การใช้แล็กติก
 แอซิดแบคทีเรียร่วมกับยีสต์ผสมที่คัดเลือกได้ไม่มีผลกระทบต่อคุณค่าโภชนะของไซเลจข้าวโพด จากผลการทดลอง
 ทั้งหมดแสดงให้เห็นว่า แล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ร่วมกับยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalus*
 MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 มีศักยภาพในการนำไปพัฒนาเป็นหัวเชื้อในการหมักไซเลจข้าวโพด
 ต่อไป

ภาควิชา	จุลชีววิทยา	ลายมือชื่อนิสิต
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก
ปีการศึกษา	2560	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

5871960223 : MAJOR MICROBIOLOGY AND MICROBIAL TECHNOLOGY

KEYWORDS: AFLATOXINS / ASPERGILLUS FLAVUS / YEASTS / LACTIC ACID BACTERIA / CORN SILAGE
TASSAPORN RUNGCHAIWATTANAKUL: INHIBITION OF GROWTH AND AFLATOXIN
PRODUCTION OF *Aspergillus flavus* IN CORN SILAGE USING ANTAGONISTIC YEASTS AND
LACTIC ACID BACTERIA. ADVISOR: ASST. PROF. CHEEWANUN DACHOUPAKAN
SIRISOMBOON, Ph.D., CO-ADVISOR: ASST. PROF. SUPAT CHAREONPORNWATTANA, Ph.D.,
pp.

The objectives of this research were to determine the antagonistic activity of yeasts and lactic acid bacteria against growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* in *in vitro* and in corn silage and to determine the concentration and ratio between lactic acid bacteria and yeasts conferring the highest activity in corn silage. Firstly, the antagonistic yeasts (*Wickerhamomyces anomalus* MSCU 0652 and *Kluyveromyces marxianus* MSCU 0655) and lactic acid bacteria (*Lactobacillus casei* AN2 and *L. paracasei* AN3) were evaluated for their antagonistic activity against growth and aflatoxin production of *A. flavus* in *in vitro* assay. Both of yeasts and lactic acid bacteria tested showed low efficiency against fungal growth (10-20%). However, mixed culture of yeasts (*W. anomalus* MSCU 0652 and *K. marxianus* MSCU 0655) and the single culture of *L. paracasei* AN3 showed the highest inhibition against aflatoxin production (43.25% and 35.64% of reduction, respectively). *L. paracasei* AN3 and mixed culture of yeasts were selected for further study on their inhibition against growth and aflatoxin production of *A. flavus* in autoclaved and non-autoclaved corn silage. *L. paracasei* AN3 and mixed culture of yeasts (*L. paracasei* AN3 + *W. anomalus* MSCU 0652 + *K. marxianus* MSCU 0655) showed the highest inhibition on fungal growth and aflatoxin production in both autoclaved and non-autoclaved silages. Moreover, the ratio of *L. paracasei* AN3 and mixed yeast culture at $10^8:10^6$ showed the highest inhibition on fungal growth (completely inhibited in 5 days) and on aflatoxin reduction (63.94% in 7 days). At the end of ensiling, aflatoxin level was reduced 23.22% and 45.23% as compared with the control and with the initial aflatoxin content, respectively. In addition, the selected microorganisms did not affect the nutritive values of corn silage. These results indicate the potential of *L. paracasei* AN3 and mixed culture of yeasts of *W. anomalus* MSCU 0652 and *K. marxianus* MSCU 0655 as the starter culture of corn silage.

Department:	Microbiology	Student's Signature
Field of Study:	Microbiology and Microbial Technology	Advisor's Signature
		Co-Advisor's Signature

Academic Year: 2017

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้รับทุนสนับสนุน จากทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุน รัชดาภิเษกสมโภช รุ่นที่ 39 และสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจาก ผู้ช่วย ศาสตราจารย์ ดร. ชีวานันท์ เดชอุปการ ศิริสมบุรณ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ ผู้ช่วย ศาสตราจารย์ ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาถ่ายทอด ความรู้ ให้คำปรึกษา คำแนะนำ ที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัยนี้ อีกทั้งยังดูแลเอาใจใส่ และเป็น กำลังใจที่ดีเสมอ รวมถึงกรุณาตรวจทาน แก้ไข และปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้เสร็จสมบูรณ์ ผู้วิจัยจึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปาหนัน เรืองสำราญ ที่กรุณาได้รับเป็น ประธานกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ กราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธนียวัน และ รองศาสตราจารย์ ดร. สุริยะ สะวานนท์ ที่กรุณาได้รับเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ ตลอดจนให้ความรู้และคำแนะนำต่างๆ รวมถึงตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความ สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณคุณคณาจารย์และเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา คณะ วิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือ ความรู้ รวมถึงคำแนะนำต่างๆ ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณพรีเมียร์ฟาร์ม อำเภอบางเลน จังหวัดนครปฐม ที่ให้ความอนุเคราะห์ ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์สำหรับใช้ในงานวิจัยในครั้งนี้

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณ สมาชิกห้องวิจัย 1904/14 ทุกคน รวมถึงเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ และ ครอบครัว ที่คอยสนับสนุนและช่วยเหลือตลอดจนให้กำลังใจ จนทำให้งานวิจัยและวิทยานิพนธ์ ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	1
สารบัญภาพ	4
บทที่ 1	10
บทนำ.....	10
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	10
1.2 วัตถุประสงค์	14
บทที่ 2	15
ปรีทัศน์วรรณกรรม.....	15
2.1 การถนอมพืชอาหารสัตว์.....	15
2.2 การทำพืชหมัก หรือ ไซเลจ (silage).....	16
2.2.1 ปัจจัยที่ส่งผลต่อคุณภาพของไซเลจ.....	16
2.2.2 ไซเลจข้าวโพด	20
2.2.3 กระบวนการหมักไซเลจ	22
2.2.4 จุลินทรีย์ในไซเลจ	25
2.3 ราและสารพิษจากรา.....	29
2.3.1 ราและสารพิษจากราในไซเลจ.....	32
2.4 อะฟลาทอกซิน.....	35
2.5 การป้องกันการเจริญของราและการกำจัดสารพิษจากรา.....	41

2.5.1 การป้องกันการเจริญของรา.....	42
2.5.2 การกำจัดสารพิษจากรา.....	43
2.6 การควบคุมทางชีวภาพ	45
2.7 การควบคุมทางชีวภาพโดยใช้ยีสต์.....	46
2.7.1 ยีสต์กับการยับยั้งการเจริญของรา.....	46
2.7.2 ยีสต์กับการลดหรือกำจัดสารพิษจากรา	51
2.7.3 <i>Wickerhamomyces anomalus</i> และ <i>Kluyvermyces marxianus</i>	53
2.8 การควบคุมทางชีวภาพโดยใช้แล็กติกแอซิดแบคทีเรีย	54
2.8.1 แล็กติกแอซิดแบคทีเรียกับการยับยั้งการเจริญของรา	54
2.8.2 แล็กติกแอซิดแบคทีเรียกับการลดหรือกำจัดสารพิษจากรา	59
2.8.3 <i>Lactobacillus casei</i> และ <i>Lactobacillus paracasei</i>	60
บทที่ 3	62
อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย.....	62
3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง.....	62
3.2 เคมีภัณฑ์.....	64
3.3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	65
3.3.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	65
3.3.2 เตรียมจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย	65
3.3.2.1 เตรียมหัวเชื้อยีสต์.....	65
3.3.2.2 เตรียมหัวเชื้อแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย	65
3.3.2.3 เตรียมสปอร์ราแขวนลอย	66
3.3.3 ทดสอบประสิทธิภาพของยีสต์และแล็กติกแอซิดแบคทีเรียปฏิบัติการยับยั้งการ เจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินรวมของ <i>A. flavus</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	66

3.3.3.1 การยับยั้งการเจริญ.....	66
3.3.3.2 การยับยั้งการผลิโอะฟลาทอกซินรวม	68
3.3.4 ทดสอบความสามารถของยีสต์และแก๊กติกแอซิดแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญ และการผลิโอะฟลาทอกซินรวมของ <i>A. flavus</i> ในไซเลจข้าวโพดตลอดเชื้อ	69
3.3.4.1 การหมักข้าวโพด	69
3.3.4.2 ค่าความเป็นกรด-เบส	71
3.3.4.3 จำนวนจุลินทรีย์	71
3.3.4.4 ปริมาณโอะฟลาทอกซินรวม	71
3.3.5 ทดสอบความสามารถของยีสต์และแก๊กติกแอซิดแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญ และการผลิโอะฟลาทอกซินรวมของราในไซเลจข้าวโพดร่วมกับจุลินทรีย์ประจำถิ่น ..	72
3.3.5.1 การหมักข้าวโพด	72
3.3.5.2 ค่าความเป็นกรด-เบส	72
3.3.5.3 จำนวนจุลินทรีย์	72
3.3.5.4 ปริมาณโอะฟลาทอกซินรวม	73
3.3.6 ทดสอบผลของปริมาณความเข้มข้นและอัตราส่วนของแก๊กติกแอซิดแบคทีเรียและ ยีสต์ผสมต่อการยับยั้งการเจริญและการผลิโอะฟลาทอกซินรวมของราในไซเลจ ข้าวโพด.....	73
3.3.6.1 การหมักข้าวโพด	73
3.3.6.2 ค่าความเป็นกรด-เบส	74
3.3.6.3 จำนวนจุลินทรีย์	74
3.3.6.4 ปริมาณโอะฟลาทอกซินรวม	74
3.3.7 ทดสอบผลของแก๊กติกแอซิดแบคทีเรียและยีสต์ต่อคุณค่าทางโภชนะของไซเลจ ข้าวโพด.....	74
บทที่ 4	76

ผลการทดลอง	76
4.1 การทดสอบประสิทธิภาพของยีสต์ปฏิทินในการยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินรวมของ <i>A. flavus</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อ	76
4.1.1 การยับยั้งการเจริญ.....	76
4.1.2 การยับยั้งการผลิตอะฟลาทอกซินรวม	78
4.2 การทดสอบประสิทธิภาพของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียปฏิทินในการยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินรวมของ <i>A. flavus</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	79
4.2.1 การยับยั้งการเจริญ.....	79
4.2.2 การผลิตอะฟลาทอกซินรวม.....	80
4.3 การทดสอบความสามารถของยีสต์และแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินรวมของ <i>A. flavus</i> ในไซเลจข้าวโพดตลอดเชื้อ	82
4.3.1 การทดสอบความสามารถของแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย <i>L. paracasei</i> AN3.....	83
4.3.2 การทดสอบความสามารถของยีสต์ผสมระหว่าง <i>W. anomalus</i> MSCU 0652 และ <i>K. marxianus</i> MSCU 0655.....	87
4.3.3 การทดสอบความสามารถของแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย <i>L. paracasei</i> AN3 ร่วมกับยีสต์ผสมระหว่าง <i>W. anomalus</i> MSCU 0652 และ <i>K. marxianus</i> MSCU 0655.....	91
4.4 การทดสอบความสามารถของยีสต์และแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินรวมในไซเลจของ <i>A. flavus</i> ข้าวโพดร่วมกับจุลินทรีย์ประจำถิ่น.....	99
4.4.1 การทดสอบความสามารถของแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย <i>L. paracasei</i> AN3.....	100
4.4.2 การทดสอบความสามารถของยีสต์ผสมระหว่าง <i>W. anomalus</i> MSCU 0652 และ <i>K. marxianus</i> MSCU 0655.....	106
4.4.3 การทดสอบความสามารถของแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย <i>L. paracasei</i> AN3 ร่วมกับยีสต์ผสมระหว่าง <i>W. anomalus</i> MSCU 0652 และ <i>K. marxianus</i> MSCU 0655.....	112

4.5 การทดสอบผลของปริมาณความเข้มข้นและอัตราส่วนของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียและ ยีสต์ผสมต่อการยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินรวมในไซเลจข้าวโพดร่วมกับ จุลินทรีย์ประจำถิ่น	121
4.5.1 <i>L. paracasei</i> AN3 ต่อยีสต์ผสมระหว่าง <i>W. anomalus</i> MSCU 0652 และ <i>K.</i> <i>marxianus</i> MSCU 0655 เท่ากับ $10^8:10^6$	121
4.5.2 <i>L. paracasei</i> AN3 ต่อยีสต์ผสมระหว่าง <i>W. anomalus</i> MSCU 0652 และ <i>K.</i> <i>marxianus</i> MSCU 0655 เท่ากับ $10^6:10^8$	127
4.6 ทดสอบผลของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียและยีสต์ต่อคุณค่าทางโภชนะของไซเลจข้าวโพด	136
บทที่ 5	138
วิจารณ์	138
5.1. การทดสอบประสิทธิภาพของยีสต์และแล็กติกแอซิดแบคทีเรียปฏิบั้กษณ์ในการยับยั้งการ เจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินรวมของ <i>A. flavus</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อ	138
5.2 การทดสอบความสามารถของยีสต์และแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญและ การผลิตอะฟลาทอกซินรวมในไซเลจข้าวโพดปลอดเชื้อ	141
5.3 การทดสอบความสามารถของยีสต์และแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญและ การผลิตอะฟลาทอกซินรวมในไซเลจข้าวโพดร่วมกับจุลินทรีย์ประจำถิ่น	145
5.4 การทดสอบผลของปริมาณความเข้มข้นและอัตราส่วนของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียและ ยีสต์ผสมต่อการยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินรวมในไซเลจข้าวโพดร่วมกับ จุลินทรีย์ประจำถิ่น	149
5.5 ทดสอบผลของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียและยีสต์ต่อคุณค่าทางโภชนะของไซเลจข้าวโพด	151
รายการอ้างอิง	154
ภาคผนวก ก	179
ภาคผนวก ข	181
ภาคผนวก ค	182
ภาคผนวก ง	183

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 196



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญตาราง

ตารางที่ 2.1	มาตรฐานของไซเลจที่มีคุณภาพดี.....	17
ตารางที่ 2.2	ประเภทของสารเติมแต่งสำหรับไซเลจ	20
ตารางที่ 2.3	พื้นที่เพาะปลูกข้าวโพด ผลผลิต และผลผลิตต่อไร่ของไทย ปี 2555/56-2560/61.....	21
ตารางที่ 2.4	คุณค่าทางโภชนาของข้าวโพดสดและไซเลจข้าวโพด	22
ตารางที่ 2.5	ปริมาณผลผลิตสุดท้ายในไซเลจที่มีกระบวนการหมักไซเลจที่ดี.....	24
ตารางที่ 2.6	แล็กติกแอซิดแบคทีเรียที่สำคัญในกระบวนการผลิตไซเลจ	26
ตารางที่ 2.7	ตัวอย่างราและสารพิษจากราที่ปนเปื้อนในอาหาร.....	31
ตารางที่ 2.8	ตัวอย่างราและสารพิษจากราที่พบปนเปื้อนในไซเลจ.....	35
ตารางที่ 2.9	สมบัติทางเคมีและทางกายภาพของอะฟลาทอกซินชนิดต่างๆ.....	37
ตารางที่ 2.10	ข้อกำหนดปริมาณอะฟลาทอกซินในอาหารสัตว์และผลิตภัณฑ์อาหารสัตว์ในประเทศต่างๆ	41
ตารางที่ 3.1	ชุดทดสอบประสิทธิภาพของยีสต์ปลูกซ์ในการยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินรวมของ <i>A. flavus</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	67
ตารางที่ 3.2	ชุดทดสอบประสิทธิภาพของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียปลูกซ์ในการยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินรวมของ <i>A. flavus</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	67
ตารางที่ 3.3	กรรมวิธีในการทดสอบความสามารถของยีสต์และแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินของ <i>A. flavus</i> ในไซเลจข้าวโพดปลอดเชื้อและในไซเลจข้าวโพดร่วมกับจุลินทรีย์อื่น	70
ตารางที่ 3.4	กรรมวิธีในการทดสอบผลของปริมาณความเข้มข้นและอัตราส่วนของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียและยีสต์ผสมต่อการยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินรวมของราในไซเลจข้าวโพด.....	73
ตารางที่ 3.5	วิธีการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนา	75
ตารางที่ 4.1	ประสิทธิภาพของยีสต์ปลูกซ์ในการยับยั้งการเจริญของ <i>A. flavus</i> โดยวิธี Dual Culture Technique บนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน.....	77

- ตารางที่ 4.2** ประสิทธิภาพของยีสต์ปฏิบั้กซ์ในการยับยั้งการผลิตอะฟลาทอกซินรวมของ *A. flavus* บนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน..... 78
- ตารางที่ 4.3** ประสิทธิภาพของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* โดยวิธี Dual Culture Technique บนอาหาร MRS ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน 80
- ตารางที่ 4.4** ประสิทธิภาพของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในการยับยั้งการผลิตอะฟลาทอกซินรวมของ *A. flavus* บนอาหาร MRS ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน..... 80
- ตารางที่ 4.5** จำนวน *A. flavus* ในไซเลจข้าวโพดปลอดเชื้อเมื่อเติมแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย (*L. paracasei* AN3) ยีสต์ผสม (*W. anomalous* MSCU 0652 + *K. marxianus* MSCU 0655) และแล็กติกแอซิดแบคทีเรียร่วมกับยีสต์ผสม (*L. paracasei* AN3 + *W. anomalous* MSCU 0652 + *K. marxianus* MSCU 06525) (ชุดทดสอบ) เปรียบเทียบกับไซเลจข้าวโพดปลอดเชื้อที่เติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 21 วัน..... 96
- ตารางที่ 4.6** ปริมาณอะฟลาทอกซินรวมในไซเลจข้าวโพดปลอดเชื้อเมื่อเติมแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย (*L. paracasei* AN3) ยีสต์ผสม (*W. anomalous* MSCU 0652 + *K. marxianus* MSCU 0655) และแล็กติกแอซิดแบคทีเรียร่วมกับยีสต์ผสม (*L. paracasei* AN3 + *W. anomalous* MSCU 0652 + *K. marxianus* MSCU 06525) (ชุดทดสอบ) เปรียบเทียบกับไซเลจข้าวโพดปลอดเชื้อที่เติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 21 วัน..... 97
- ตารางที่ 4.7** ปริมาณอะฟลาทอกซินรวมที่ทำให้เป็นบรรทัดฐานในไซเลจข้าวโพดปลอดเชื้อเมื่อเติมแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย (*L. paracasei* AN3) ยีสต์ผสม (*W. anomalous* MSCU 0652 + *K. marxianus* MSCU 0655) และแล็กติกแอซิดแบคทีเรียร่วมกับยีสต์ผสม (*L. paracasei* AN3 + *W. anomalous* MSCU 0652 + *K. marxianus* MSCU 06525) (ชุดทดสอบ) เปรียบเทียบกับไซเลจข้าวโพดปลอดเชื้อที่เติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 21 วัน..... 98
- ตารางที่ 4.8** จำนวนราทั้งหมดในไซเลจข้าวโพดเมื่อเติมแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย (*L. paracasei* AN3) ยีสต์ผสม (*W. anomalous* MSCU 0652 + *K. marxianus* MSCU 0655) และแล็กติกแอซิดแบคทีเรียร่วมกับยีสต์ผสม (*L. paracasei* AN3 + *W. anomalous* MSCU 0652 + *K. marxianus* MSCU 0655) (ชุดทดสอบ) เปรียบเทียบกับไซเลจข้าวโพดที่เติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 21 วัน..... 118

- ตารางที่ 4.9** ปริมาณอะพลาทอกซินรวมในไซเลจข้าวโพดเมื่อเติมแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย (*L. paracasei* AN3) ยีสต์ผสม (*W. anomalus* MSCU 0652 + *K. marxianus* MSCU 0655) และแล็กติกแอซิดแบคทีเรียร่วมกับยีสต์ผสม (*L. paracasei* AN3 + *W. anomalus* MSCU 0652 + *K. marxianus* MSCU 0655) (ชุดทดสอบ) เปรียบเทียบกับไซเลจข้าวโพดที่เติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 21 วัน..... 119
- ตารางที่ 4.10** ปริมาณอะพลาทอกซินรวมที่ทำให้เป็นบรรทัดฐานในไซเลจข้าวโพดเมื่อเติมแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย (*L. paracasei* AN3) ยีสต์ผสม (*W. anomalus* MSCU 0652 + *K. marxianus* MSCU 0655) และแล็กติกแอซิดแบคทีเรียร่วมกับยีสต์ผสม (*L. paracasei* AN3 + *W. anomalus* MSCU 0652 + *K. marxianus* MSCU 0655) (ชุดทดสอบ) เปรียบเทียบกับไซเลจข้าวโพดที่เติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 21 วัน.. 120
- ตารางที่ 4.11** จำนวนราทั้งหมดของไซเลจข้าวโพดที่เติม *A. flavus* และแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ร่วมกับยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 มีความเข้มข้นเท่ากับ $10^6:10^6$, $10^8:10^6$ และ $10^6:10^8$ CFU/กรัม (ชุดทดสอบ) เทียบกับไซเลจข้าวโพดที่เติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม) 133
- ตารางที่ 4.12** ปริมาณอะพลาทอกซินรวมในไซเลจข้าวโพดที่เติม *A. flavus* และแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ร่วมกับยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 มีความเข้มข้นเท่ากับ $10^6:10^6$, $10^8:10^6$ และ $10^6:10^8$ CFU/กรัม (ชุดทดสอบ) เทียบกับไซเลจข้าวโพดที่เติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม)..... 134
- ตารางที่ 4.13** ปริมาณอะพลาทอกซินรวมที่ทำให้เป็นบรรทัดฐานในไซเลจข้าวโพดที่เติม *A. flavus* และแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ร่วมกับยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 มีความเข้มข้นเท่ากับ $10^6:10^6$, $10^8:10^6$ และ $10^6:10^8$ CFU/กรัม (ชุดทดสอบ) เทียบกับไซเลจข้าวโพดที่เติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม) 135
- ตารางที่ 4.14** คุณค่าทางโภชนาของไซเลจข้าวโพดที่เติมแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ร่วมกับยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 (ชุดทดสอบ) เทียบกับไซเลจข้าวโพดที่ไม่มีการเติมหัวเชื้อ (ชุดควบคุม) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 21 วัน..... 137

สารบัญภาพ

ภาพที่ 2.1 การเปลี่ยนแปลงค่าออกซิเจน ความเป็นกรด-เบส และจำนวนจุลินทรีย์ใน กระบวนการหมักไซเลจ.....	22
ภาพที่ 2.2 โครงสร้างทางเคมีของอะพลาทอกซินชนิดต่างๆ.....	36
ภาพที่ 3.1 (ก) ลักษณะการเลี้ยงเชื้อด้วยวิธี Dual Culture Technique (ข) วิธีการวัดเส้นผ่าน ศูนย์กลางโคโลนีราหลังจากบ่มครบ 7 วัน.....	67
ภาพที่ 3.2 วิธีการเจาะรูบนบริเวณโคโลนีราเพื่อนำมาวิเคราะห์ปริมาณอะพลาทอกซินรวม	69
ภาพที่ 3.3 (ก) ต้นข้าวโพดพร้อมฝักอายุ 70 วัน จากพื้นที่เพาะปลูกในอำเภอบางเลน จังหวัด นครปฐม (ข) ข้าวโพดสับก่อนหมัก.....	70
ภาพที่ 3.4 การบ่มไซเลจถุงละ 1 กิโลกรัม.....	71
ภาพที่ 4.1 การเจริญของ <i>A. flavus</i> เมื่อเลี้ยงร่วมกับยีสต์ปฏิปักษ์โดยวิธี Dual Culture Technique บนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน ก. ชุดควบคุม, ข. <i>W. anomalous</i> MSCU 0652, ค. <i>K. marxianus</i> MSCU 0655 และ ง. <i>W. anomalous</i> MSCU 0652 + <i>K. marxianus</i> MSCU 0655.....	77
ภาพที่ 4.2 การยับยั้งการเจริญของ <i>A. flavus</i> เมื่อเลี้ยงร่วมกับแล็กติกแอซิดแบคทีเรียปฏิปักษ์ โดยวิธี Dual Culture Technique บนอาหาร MRS เป็นเวลา 7 วัน ก. ชุดควบคุม, ข. <i>L. casei</i> AN2, ค. <i>L. paracasei</i> AN3 และ ง. <i>L. casei</i> AN2 + <i>L. paracasei</i> AN3.....	79
ภาพที่ 4.3 ค่าความเป็นกรด-เบสของไซเลจข้าวโพดปลอดเชื้อที่เติม <i>A. flavus</i> ร่วมกับแล็กติก แอซิดแบคทีเรีย <i>L. paracasei</i> AN3 (ชุดทดสอบ) และเติม <i>A. flavus</i> เพียงอย่างเดียว (ชุด ควบคุม) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 21 วัน	83
ภาพที่ 4.4 จำนวนแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย <i>L. paracasei</i> AN3 ในไซเลจข้าวโพดปลอดเชื้อที่ เลี้ยงร่วมกับ <i>A. flavus</i> (ชุดทดสอบ) และเติม <i>A. flavus</i> เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม)	84
ภาพที่ 4.5 จำนวน <i>A. flavus</i> ในไซเลจข้าวโพดปลอดเชื้อที่เติม <i>A. flavus</i> และแล็กติกแอซิด แบคทีเรีย <i>L. paracasei</i> AN3 (ชุดทดสอบ) และเติม <i>A. flavus</i> เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม).....	85

<p>ภาพที่ 4.6 ปริมาณอะฟลาทอกซินรวมที่ทำให้เป็นบรรทัดฐานในไซเลจข้าวโพดปลูกเชื้อที่เติม <i>A. flavus</i> ร่วมกับแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย <i>L. paracasei</i> AN3 (ชุดทดสอบ) และเติม <i>A. flavus</i> เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม).....</p>	86
<p>ภาพที่ 4.7 ค่าความเป็นกรด-เบสของไซเลจข้าวโพดปลูกเชื้อที่เติม <i>A. flavus</i> ร่วมกับยีสต์ <i>W. anomalous</i> MSCU 0652 และ <i>K. marxianus</i> MSCU 0655 (ชุดทดสอบ) และเติม <i>A. flavus</i> เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม).....</p>	87
<p>ภาพที่ 4.8 จำนวนยีสต์ <i>W. anomalous</i> MSCU 0652 และ <i>K. marxianus</i> MSCU 0655 ในไซเลจข้าวโพดปลูกเชื้อที่เติม <i>A. flavus</i> ร่วมกับยีสต์ <i>W. anomalous</i> MSCU 0652 และ <i>K. marxianus</i> MSCU 0655 (ชุดทดสอบ).....</p>	88
<p>ภาพที่ 4.9 จำนวน <i>A. flavus</i> ในไซเลจข้าวโพดปลูกเชื้อที่เติม <i>A. flavus</i> ร่วมกับยีสต์ <i>W. anomalous</i> MSCU 0652 และ <i>K. marxianus</i> MSCU 0655 (ชุดทดสอบ) และเติม <i>A. flavus</i> เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม).....</p>	89
<p>ภาพที่ 4.10 ปริมาณอะฟลาทอกซินรวมที่ทำให้เป็นบรรทัดฐานของไซเลจข้าวโพดปลูกเชื้อที่เติม <i>A. flavus</i> ร่วมกับยีสต์ <i>W. anomalous</i> MSCU 0652 และ <i>K. marxianus</i> MSCU 0655 (ชุดทดสอบ) และเติม <i>A. flavus</i> (ชุดควบคุม).....</p>	90
<p>ภาพที่ 4.11 ค่าความเป็นกรด-เบสของไซเลจข้าวโพดปลูกเชื้อที่เติม <i>A. flavus</i> ร่วมกับแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย <i>L. paracasei</i> AN3 และยีสต์ผสมระหว่าง <i>W. anomalous</i> MSCU 0652 และ <i>K. marxianus</i> MSCU 0655 (ชุดทดสอบ) และเติม <i>A. flavus</i> เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม).....</p>	91
<p>ภาพที่ 4.12 จำนวนแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย <i>L. paracasei</i> AN3 ในไซเลจข้าวโพดปลูกเชื้อที่เติม <i>A. flavus</i> ร่วมกับแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย <i>L. paracasei</i> AN3 และยีสต์ผสมระหว่าง <i>W. anomalous</i> MSCU 0652 และ <i>K. marxianus</i> MSCU 0655 (ชุดทดสอบ) และเติม <i>A. flavus</i> เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม).....</p>	92
<p>ภาพที่ 4.13 จำนวนยีสต์ <i>W. anomalous</i> MSCU 0652 และ <i>K. marxianus</i> MSCU 0652 ในไซเลจข้าวโพดปลูกเชื้อที่เติม <i>A. flavus</i> ร่วมกับแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย <i>L. paracasei</i> AN3 และยีสต์ผสมระหว่าง <i>W. anomalous</i> MSCU 0652 และ <i>K. marxianus</i> MSCU 0655 (ชุดทดสอบ) และเติม <i>A. flavus</i> เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม).....</p>	93

- ภาพที่ 4.14 จำนวน *A. flavus* ในไซเลจข้าวโพดปลอดเชื้อที่เติม *A. flavus* ร่วมกับแกล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 และยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 (ชุดทดสอบ) และเติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม)..... 94
- ภาพที่ 4.15 ปริมาณอะฟลาทอกซินรวมที่ทำให้เป็นบรรทัดฐานในไซเลจข้าวโพดปลอดเชื้อที่เติม *A. flavus* ร่วมกับแกล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 และยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 (ชุดทดสอบ) และที่เติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม) 95
- ภาพที่ 4.16 ค่าความเป็นกรด-เบสของไซเลจข้าวโพดที่เติม *A. flavus* ร่วมกับแกล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 (ชุดทดสอบ) และที่เติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม) .. 100
- ภาพที่ 4.17 จำนวนคอลีฟอร์มแบคทีเรียในไซเลจข้าวโพดที่เติม *A. flavus* ร่วมกับแกล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 (ชุดทดสอบ) และที่เติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม) .. 101
- ภาพที่ 4.18 จำนวนแกล็กติกแอซิดแบคทีเรียทั้งหมดในไซเลจข้าวโพดที่เติม *A. flavus* ร่วมกับแกล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 (ชุดทดสอบ) และที่เติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม)..... 102
- ภาพที่ 4.19 จำนวนยีสต์ทั้งหมดในไซเลจข้าวโพดที่เติม *A. flavus* ร่วมกับแกล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 (ชุดทดสอบ) และที่เติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม) .. 103
- ภาพที่ 4.20 จำนวนราทั้งหมดในไซเลจข้าวโพดที่เติม *A. flavus* ร่วมกับแกล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 (ชุดทดสอบ) และที่เติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม)..... 104
- ภาพที่ 4.21 ปริมาณอะฟลาทอกซินรวมที่ทำให้เป็นบรรทัดฐานในไซเลจข้าวโพดที่เติม *A. flavus* ร่วมกับแกล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 (ชุดทดสอบ) และที่เติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม) 105
- ภาพที่ 4.22 ค่าความเป็นกรด-เบสของไซเลจข้าวโพดที่เติม *A. flavus* ร่วมกับยีสต์ *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 (ชุดทดสอบ) และเติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม) 106
- ภาพที่ 4.23 จำนวนคอลีฟอร์มแบคทีเรียทั้งหมดในไซเลจข้าวโพดที่เติม *A. flavus* ร่วมกับยีสต์ *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 (ชุดทดสอบ) และเติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม)..... 107

- ภาพที่ 4.24 จำนวนยีสต์ทั้งหมดในไซเลจข้าวโพดที่เติม *A. flavus* ร่วมกับยีสต์ *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 (ชุดทดสอบ) และเติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม)..... 108
- ภาพที่ 4.25 จำนวนแล็กติกแอซิดแบคทีเรียทั้งหมดในไซเลจข้าวโพดที่เติม *A. flavus* ร่วมกับยีสต์ *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 (ชุดทดสอบ) และเติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม)..... 109
- ภาพที่ 4.26 จำนวนราทั้งหมดในไซเลจข้าวโพดที่เติม *A. flavus* ร่วมกับยีสต์ *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 (ชุดทดสอบ) และเติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม)..... 110
- ภาพที่ 4.27 ปริมาณอะฟลาทอกซินรวมที่ทำให้เป็นบรรทัดฐานในไซเลจข้าวโพดที่เติม *A. flavus* ร่วมกับยีสต์ *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 (ชุดทดสอบ) และเติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม)..... 111
- ภาพที่ 4.28 ค่าความเป็นกรด-เบสของไซเลจข้าวโพดที่เติม *A. flavus* และแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ร่วมกับยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 (ชุดทดสอบ) และเติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม)..... 112
- ภาพที่ 4.29 จำนวนคอลิฟอร์มแบคทีเรียในไซเลจข้าวโพดที่เติม *A. flavus* และแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ร่วมกับยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 (ชุดทดสอบ) และเติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม)..... 113
- ภาพที่ 4.30 จำนวนแล็กติกแอซิดแบคทีเรียทั้งหมดในไซเลจข้าวโพดที่เติม *A. flavus* และแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ร่วมกับยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 (ชุดทดสอบ) และเติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม)..... 114
- ภาพที่ 4.31 จำนวนยีสต์ทั้งหมดในไซเลจข้าวโพดที่เติม *A. flavus* และแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ร่วมกับยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 (ชุดทดสอบ) และเติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม)..... 115
- ภาพที่ 4.32 จำนวนราทั้งหมดในไซเลจข้าวโพดที่เติม *A. flavus* และแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ร่วมกับยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 (ชุดทดสอบ) และเติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม)..... 116

- ภาพที่ 4.33** ปริมาณอะฟลาทอกซินรวมที่ทำให้เป็นบรรทัดฐานในไซเลจข้าวโพดที่เติม *A. flavus* และแกล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ร่วมกับยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 (ชุดทดสอบ) และเติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม)..... 117
- ภาพที่ 4.34** ค่าความเป็นกรด-เบสของไซเลจข้าวโพดที่เติม *A. flavus* และแกล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ร่วมกับยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 ($10^8:10^6$) (ชุดทดสอบ) และเติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม)..... 121
- ภาพที่ 4.35** จำนวนคอลิฟอร์มแบคทีเรียในของไซเลจข้าวโพดที่เติม *A. flavus* และแกล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ร่วมกับยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 ($10^8:10^6$) (ชุดทดสอบ) และเติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม)..... 122
- ภาพที่ 4.36** จำนวนแกล็กติกแอซิดแบคทีเรียทั้งหมดในของไซเลจข้าวโพดที่เติม *A. flavus* และแกล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ร่วมกับยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 ($10^8:10^6$) และเติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม)..... 123
- ภาพที่ 4.37** จำนวนยีสต์ทั้งหมดในของไซเลจข้าวโพดที่เติม *A. flavus* และแกล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ร่วมกับยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 ($10^8:10^6$) (ชุดทดสอบ) และเติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม)..... 124
- ภาพที่ 4.38** จำนวนราทั้งหมดในของไซเลจข้าวโพดที่เติม *A. flavus* และแกล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ร่วมกับยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 ($10^8:10^6$) (ชุดทดสอบ) และเติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม)..... 125
- ภาพที่ 4.39** ปริมาณอะฟลาทอกซินรวมของไซเลจข้าวโพดที่เติม *A. flavus* และแกล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ร่วมกับยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 ($10^8:10^6$) (ชุดทดสอบ) และเติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม)..... 126

- ภาพที่ 4.40** ค่าความเป็นกรด-เบสของไซเลจข้าวโพดที่เติม *A. flavus* และแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ร่วมกับยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 ($10^6:10^8$) (ชุดทดสอบ) และเติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม)..... 127
- ภาพที่ 4.41** จำนวนคอลิฟอร์มแบคทีเรียในของไซเลจข้าวโพดที่เติม *A. flavus* และแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ร่วมกับยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 ($10^6:10^8$) (ชุดทดสอบ) และเติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม)..... 128
- ภาพที่ 4.42** จำนวนแล็กติกแอซิดแบคทีเรียทั้งหมดในของไซเลจข้าวโพดที่เติม *A. flavus* และแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ร่วมกับยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 ($10^6:10^8$) (ชุดทดสอบ) และเติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม) 129
- ภาพที่ 4.43** จำนวนยีสต์ทั้งหมดในของไซเลจข้าวโพดที่เติม *A. flavus* และแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ร่วมกับยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 ($10^6:10^8$) (ชุดทดสอบ) และเติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม)..... 130
- ภาพที่ 4.44** จำนวนราทั้งหมดในของไซเลจข้าวโพดที่เติม *A. flavus* และแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ร่วมกับยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 ($10^6:10^8$) (ชุดทดสอบ) และเติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม)..... 131
- ภาพที่ 4.45** ปริมาณอะฟลาทอกซินรวมของไซเลจข้าวโพดที่เติม *A. flavus* และแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ร่วมกับยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 ($10^6:10^8$) (ชุดทดสอบ) และเติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม)..... 132

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ไซเลจ (silage) คือ อาหารสัตว์ที่เก็บรักษาในรูปของพืชหมัก เพื่อแก้ปัญหาการขาดแคลนพืชอาหารสัตว์ เช่น หญ้า ฟางข้าว และข้าวโพด ที่เกิดขึ้นจากสภาพภูมิอากาศตามฤดูกาล ปัญหาดังกล่าวส่งผลกระทบต่อปริมาณและคุณภาพของอาหารสัตว์ที่ใช้ทำปศุสัตว์ โดยเฉพาะข้าวโพดที่นิยมใช้เป็นอาหารสัตว์ เนื่องจากให้พลังงานสูง มีการเพาะปลูกปริมาณมาก เก็บเกี่ยวง่าย และเป็นพืชที่เหมาะสมจะนำมาหมักเป็นไซเลจ เนื่องจากมีปริมาณน้ำหนักรักษา (dry matter; DM) สูง เมื่อนำมาหมักสามารถเก็บไว้ได้ระยะเวลานาน (Santos และคณะ, 2013; Titterton และ Bareeba, 2000) การหมักไซเลจเป็นการเก็บรักษาสภาพอวบน้ำและภาวะไร้อากาศ (anaerobic fermentation) เพื่อคงสภาพและรักษาคุณค่าของพืชอาหารสัตว์ไว้คงเดิม เมื่อเกิดภาวะไร้อากาศในการหมัก แล็กติกแอซิดแบคทีเรียจะใช้คาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำได้ (water-soluble carbohydrate; WSC) ในการผลิตกรดแล็กติก ทำให้ค่ากรด-เบสของไซเลจต่ำลงอยู่ในช่วง 3.6-4.5 (Kung, 2001) ซึ่งช่วยรักษาปริมาณน้ำหนักรักษาและสารอาหารของไซเลจ (Rowghani และคณะ, 2008) และช่วยยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่นๆ ที่ทำให้เกิดการเน่าเสียของไซเลจ เช่น clostridia, enterobacteria และรา เป็นต้น จึงสามารถยืดระยะเวลาการเก็บรักษาพืชอาหารสัตว์ไว้เลี้ยงปศุสัตว์ในฤดูขาดแคลนได้ (Cheli และคณะ, 2013)

อะฟลาทอกซิน (aflatoxin) เป็นสารพิษจากรา (mycotoxin) ที่ผลิตโดยราสายใยในสกุล *Aspergillus* section *Flavi* โดยเฉพาะ *A. flavus* และ *A. paraciticus* ซึ่งเป็นราที่พบได้ทั่วไปในธรรมชาติและในผลผลิตทางการเกษตรต่างๆ (Zain, 2011) อะฟลาทอกซินที่พบในธรรมชาติ แบ่งเป็น 4 ชนิด ได้แก่ อะฟลาทอกซินบี 1 (aflatoxin B1) อะฟลาทอกซินบี 2 (aflatoxin B2) อะฟลาทอกซินจี 1 (aflatoxin G1) และอะฟลาทอกซินจี 2 (aflatoxin G2) โดยอะฟลาทอกซินบี 1 มีความเป็นพิษมากที่สุด รองลงมา คือ อะฟลาทอกซินจี 1 อะฟลาทอกซินบี 2 และอะฟลาทอกซินจี 2 ตามลำดับ (Blankson และ Mill-Robertson, 2016) อะฟลาทอกซินบี 1 สามารถก่อให้เกิดมะเร็งในสัตว์หลายชนิดโดยมีตับเป็นเซลล์เป้าหมายที่สำคัญในการเกิดมะเร็ง (Baird และคณะ, 2006) International Agency for Research on Cancer (IARC) ได้จัดให้อะฟลาทอกซินบี 1 เป็นสารก่อมะเร็งในมนุษย์ ในประเทศไทย กระทรวงสาธารณสุขได้ออกประกาศฉบับที่ 98 พ.ศ. 2529 เรื่องมาตรฐานอาหารที่มี

สารปนเปื้อน กำหนดให้มีการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินในอาหารทุกชนิดได้ไม่เกิน 20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (กระทรวงสาธารณสุข, 2529) กระทรวงเกษตรและสหกรณ์กำหนดให้มีการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินในอาหารผสมสำเร็จรูปสำหรับโคอายุไม่เกิน 1 ปี ไม่เกิน 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และกำหนดให้มีการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินในข้าวโพดปนและข้าวโพดเมล็ดที่ใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับอาหารสัตว์ได้ไม่เกิน 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2537)

ในกระบวนการหมักไซเลจข้าวโพด อาจมีการปนเปื้อนราและสารพิษจากราในข้าวโพดจากแปลงปลูกก่อนนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการหมักไซเลจข้าวโพด และอาจพบการปนเปื้อนราและสารพิษจากราในกระบวนการหมักที่ไม่ดี (Cheli และคณะ, 2013; Garon และคณะ, 2006) เช่น มีอากาศทำให้ราเจริญเติบโตและสร้างสารพิษได้ ซึ่งการปนเปื้อนราและสารพิษจากราในไซเลจข้าวโพดจะทำให้คุณค่าทางโภชนาการของอาหารสัตว์ลดลง ส่งผลต่อการทำปศุสัตว์จากการสูญเสียวัตถุดิบในการผลิตอาหารสัตว์และส่งผลต่อสุขภาพของสัตว์อีกด้วย สารพิษของราที่พบในไซเลจข้าวโพด ได้แก่ อะฟลาทอกซิน โอคราทอกซินเอ (ochratoxin A) และซีราลีโนน (zearalenone) เป็นต้น (Driehuis, 2013) Gonzalez Pereyra และคณะ (2008) พบว่า ในตัวอย่างไซเลจข้าวโพดมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์มีการปนเปื้อน *Aspergillus* และ *Fusarium* มากกว่า 1×10^4 CFU/กรัม ราส่วนใหญ่ที่พบ คือ *A. flavus*, *A. fumigatus* และ *F. verticillioides* และพบการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซิน ไดออกซินิวาลินอล (deoxynivalenol) ซีราลีโนน และฟูโมนิซิน (fumonisin) ในไซเลจข้าวโพดอีกด้วย Richard และคณะ (2007) ศึกษาการปนเปื้อนของราและสารพิษจากราในไซเลจที่เก็บรักษาเป็นระยะเวลา 11 เดือน พบว่า *Aspergillus* และ *Fusarium* เป็นราที่พบมากในไซเลจข้าวโพด และพบสารพิษจากรา ได้แก่ อะฟลาทอกซินบี 1 โอคราทอกซินเอ ซีราลีโนน และฟูโมนิซินบี 1 เป็นต้น Keller และคณะ (2013) พบการปนเปื้อนของราและสารพิษจากราในไซเลจข้าวโพดทั้งก่อนและหลังกระบวนการหมัก โดยพบการปนเปื้อนของ *A. flavus*, *Penicillium citrinum* และ *F. verticillioides* ในปริมาณสูง และตรวจพบอะฟลาทอกซินบี 1 ในข้าวโพดก่อนหมักอยู่ในช่วง 2-45 ไมโครกรัมต่อกรัม และข้าวโพดหลังหมักอยู่ในช่วง 2-100 ไมโครกรัมต่อกรัม ซึ่งสามารถตรวจพบปริมาณอะฟลาทอกซินได้ทั้งบริเวณด้านบน ด้านล่าง และตรงกลางของไซโลที่ใช้หมักไซเลจข้าวโพด นอกจากนั้น มีรายงานพบการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินบี 1 ในอาหารสัตว์ที่ผลิตนํ้านม เมื่อสัตว์ได้รับสารพิษจากรานี้เข้าไป กระบวนการเมแทบอลิซึมของสัตว์จะเปลี่ยนอะฟลาทอกซินบี 1 เป็นอะฟลาทอกซินเอ็ม 1 ปนเปื้อนในนํ้านม และส่งผลต่อสุขภาพของผู้บริโภคได้ (Prandini และคณะ, 2009)

จากปัญหาการปนเปื้อนราและสารพิษจากราในไซเลจข้าวโพด จึงควรมีการควบคุมการเจริญของราและสารพิษจากราก่อนและในระหว่างกระบวนการหมักไซเลจข้าวโพด เช่น การเติมสารลดค่ากรด-เบส เช่น กรดฟอร์มิก (formic acid) กรดโพรพิโอนิก (propionic acid) และกรดอะซีติก (acetic acid) เป็นต้น ที่สามารถช่วยลดการเจริญของราในไซเลจข้าวโพดได้ (Zhang และคณะ, 2011) แต่การเติมกรดในปริมาณมากเกินไปอาจส่งผลกระทบต่อคุณค่าทางโภชนาการของไซเลจข้าวโพดและส่งผลต่อสุขภาพของสัตว์ (Yitbarek และ Tamir, 2014) นอกจากนี้ กรดยังมีฤทธิ์เป็นสารกัดกร่อนทำให้บรรจุภัณฑ์และเครื่องมือผู้กร่อนได้และใช้ต้นทุนสูง การควบคุมทางชีวภาพโดยใช้จุลินทรีย์ที่เป็นปฏิปักษ์เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพและได้รับยอมรับมากขึ้นในปัจจุบัน จุลินทรีย์หลายชนิดสามารถใช้เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพ สามารถยับยั้งการเจริญและการสร้างสารพิษจากราและมีความปลอดภัยกับมนุษย์และสัตว์ (Shetty และ Jespersen, 2006)

ยีสต์เป็นหนึ่งในจุลินทรีย์ที่นิยมใช้เป็นตัวควบคุมชีวภาพ เนื่องจากยีสต์มีสมบัติในการอยู่รอดได้ในภาวะแวดล้อมที่หลากหลาย พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ ทนกรดได้ เจริญได้เร็ว ต้องการสารอาหารที่ง่ายและราคาถูก (Bleve และคณะ, 2006; Parafati และคณะ, 2015; Zhu และคณะ, 2015) มีงานวิจัยก่อนหน้านี้หลายฉบับพบว่า ยีสต์สามารถผลิตสารที่มีความสามารถในการยับยั้งราและสารพิษจากราได้ Armando และคณะ (2013) พบว่า *Saccharomyces cerevisiae* RC008 และ RC016 สามารถยับยั้งการเจริญและการผลิตโอคราทอกซินเอ ซีราลีโนน และดีออกซีนิวาสิโนลของ *A. carbonarius* และ *F. graminearum* Parafati และคณะ (2015) ศึกษาความสามารถในการเป็นตัวควบคุมทางชีวภาพของ *S. cerevisiae*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Metschnikowia pulcherrima* และ *Aureobasidium pullulans* ที่คัดแยกได้จากอาหารหลายชนิดต่อการเจริญของ *B. cinerea* ที่ทำให้เกิดโรคก้านเน่าในองุ่นหลังการเก็บเกี่ยว พบว่า ยีสต์แต่ละชนิดสามารถยับยั้งราได้ในภาวะที่แตกต่างกัน โดย *A. pullulans* และ *W. anomalus* สามารถสร้างปีตา 1,3-กลูคาเนส ซึ่งมีสมบัติในการย่อยองค์ประกอบของผนังเซลล์ของราและผลิตไบโอฟิล์ม นอกจากนี้ *S. cerevisiae*, *W. anomalus* และ *M. pulcherrima* สามารถผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายได้ เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Medina-Córdova และคณะ (2016) รายงานว่า ยีสต์สายพันธุ์ *Debaryomyces hansenii* สามารถยับยั้งการเจริญของ *Mucor circinelloides*, *Aspergillus* sp., *F. proliferatum* และ *F. subglutinans* ในเมล็ดข้าวโพดได้ และสามารถลดการผลิตสารฟูโมนิซินจาก *F. subglutinans* ได้โดยไม่ส่งผลกระทบต่อองค์ประกอบทางเคมีและสารอาหารของเมล็ดข้าวโพด Niba และคณะ (2014) พบว่า *W. anomalus* สามารถยับยั้งการเจริญของราในเมล็ดข้าวโพดในระหว่างการ

เก็บรักษาได้ในระยะเวลา 2 เดือน และเมื่อทดสอบเป็นเวลา 8 เดือน พบว่า ไม่ส่งผลกระทบต่อคุณค่าทางโภชนาการของเมล็ดข้าวโพด

แล็กติกแอซิดแบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่งที่มีประสิทธิภาพเป็นตัวควบคุมชีวภาพสามารถผลิตเมแทบอลิต์ที่มีฤทธิ์ต้านราได้ เช่น กรดอินทรีย์ โปรตีน และสารประกอบโมเลกุลต่ำ เช่น กรดแล็กติก กรดโอเลอิก เป็นต้น (Sangmanee และ Hongpattarakere, 2014) Yang และ Chang (2010) พบว่า *Lactobacillus plantarum* AF1 ที่แยกได้จากกิมจิสามารถผลิตกรดอินทรีย์ ได้แก่ กรดแล็กติก กรดออกซาลิก และกรดอะซีติก ที่มีประสิทธิภาพในการต้านราได้ Lavermicocca และคณะ (2000) พบว่า *L. plantarum* 20B ที่แยกได้จากกิมจิสามารถผลิตกรดอินทรีย์ กรดฟีนิลแล็กติก และกรด 4-ไฮดรอกซี-ฟีนิลแล็กติก ที่มีประสิทธิภาพในการต้านรา โดยแล็กติกแอซิดแบคทีเรียดังกล่าวสามารถชะลอการเจริญของราในขนมปังที่ใช้ทำการทดลองได้ถึง 7 วัน เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่เติมเพียงหัวเชื้อขนมปังเพียงอย่างเดียว Prema และคณะ (2008) สามารถแยก *L. plantarum* จากหน้่าหมักที่สามารถผลิตกรด 3-ฟีนิลแล็กติก ซึ่งมีประสิทธิภาพในการต้าน *A. fumigatus* และ *Rhizopus stolonifer* นอกจากนี้ ผนังเซลล์ของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียสามารถจับกับสารพิษจากราช่วยลดการปนเปื้อนสารพิษจากราในอาหารได้ (Haskard และคณะ, 2001) Peltonen และคณะ (2001) พบว่า *L. amylovorus* และ *L. rhamnosus* สามารถจับกับอะฟลาทอกซินบี 1 ในสารละลายได้มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 72 ชั่วโมง

กวิณ เจริญรงค์ (2556) คัดแยกแล็กติกแอซิดแบคทีเรียจากไซเลจข้าวโพด ที่สามารถทนต่อความเป็นกรด-เบสต่ำ และทนความร้อนที่เกิดจากภาวะในการหมัก ได้ 2 ชนิด ได้แก่ *L. casei* AN2 และ *L. paracasei* AN3 และพบยีสต์ 3 ชนิด ซึ่งระบุสายพันธุ์โดย พิระพล มารุ่งเรือง (2559) ได้แก่ *W. anomalus* MSCU 0652, *S. cerevisiae* MSCU 0654 และ *K. marxianus* MSCU 0655 ต่อมา ชาลิสสา แสงบัว (2558) ได้ทดสอบความสามารถของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียทั้งสองชนิด และ พิระพล มารุ่งเรือง (2559) ได้ทดสอบความสามารถของยีสต์ทั้งสามชนิด ในการยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษจากราบนานอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนั้น ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาความสามารถของยีสต์ *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 และแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. casei* AN2 และ *L. paracasei* AN3 ในการควบคุมการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินของ *A. flavus* บนานอาหารเลี้ยงเชื้อและในการหมักไซเลจข้าวโพด โดยศึกษาประสิทธิภาพของการใช้ยีสต์เดี่ยวและยีสต์ผสม แล็กติกแอซิดแบคทีเรียเดี่ยวและแล็กติกแอซิดแบคทีเรียผสม การใช้แล็กติกแอซิดแบคทีเรียร่วมกับยีสต์ผสม และศึกษาปริมาณความเข้มข้นและสัดส่วนของยีสต์ต่อแล็กติกแอซิด

แบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการควบคุมการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินของ *A. flavus* ในไซเลจข้าวโพด ซึ่งผลที่ได้จากงานวิจัยนี้จะเป็นแนวทางในการพัฒนาการผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์ในการผลิตไซเลจข้าวโพดต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์

1) เพื่อศึกษาความสามารถของยีสต์ *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 และแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. casei* AN2 และ *L. paracasei* AN3 ในการยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินรวมของ *Aspergillus flavus* บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

2) เพื่อทดสอบความสามารถของยีสต์และแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินรวมของ *A. flavus* ในไซเลจข้าวโพดปลอดเชื้อและในไซเลจข้าวโพดร่วมกับจุลินทรีย์ประจำถิ่น

3) เพื่อทดสอบผลของปริมาณความเข้มข้นและอัตราส่วนของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียและยีสต์ผสมต่อการยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินรวมของราในไซเลจข้าวโพดร่วมกับจุลินทรีย์ประจำถิ่น

บทที่ 2

ปรีทัศน์วรรณกรรม

2.1 การถนอมพืชอาหารสัตว์

ปัญหาการขาดแคลนพืชอาหารสัตว์เป็นปัญหาหนึ่งที่เกิดขึ้นในประเทศไทยอย่างต่อเนื่อง ซึ่งพืชอาหารสัตว์เหล่านี้มีไว้สำหรับการเลี้ยงสัตว์ต่างๆ เช่น โค กระบือ แพะ และแกะ เป็นต้น เนื่องจาก มีปริมาณการเลี้ยงปศุสัตว์สูงขึ้นแต่ปริมาณการผลิตพืชอาหารสัตว์ต่ำลง เพราะพื้นที่ในการเพาะปลูกลดลงและผลกระทบจากสภาพอากาศ โดยเฉพาะหน้าแล้งที่ทำให้พืชอาหารสัตว์เจริญเติบโตไม่ดีและมีคุณภาพที่ไม่ดี ในขณะที่พืชเหล่านี้สามารถเจริญเติบโตได้ดีเกินความต้องการของสัตว์ในหน้าฝน ปัญหาดังกล่าวส่งผลต่อปริมาณและคุณภาพของอาหารสัตว์ที่ใช้ทำปศุสัตว์ ทำให้ปริมาณและคุณภาพของสินค้าจากปศุสัตว์ลดลงไปด้วย อาจส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจของประเทศได้ ดังนั้น เกษตรกรจึงต้องหาวิธีการถนอมพืชอาหารสัตว์เพื่อเก็บไว้ใช้ในเวลาที่ขาดแคลน โดยการจัดการพืชอาหารสัตว์ทำได้หลายวิธี เช่น การทำพืชแห้ง การทำพืชหมัก การปลูกพืชอาหารเสริม การนำเศษเหลือใช้หรือผลพลอยได้ทางการเกษตรมาแปรรูปนำมาเป็นอาหารสัตว์ เป็นต้น (สายัณห์ ทัดศรี, 2547) ซึ่งวิธีการจัดการอาหารสัตว์ที่นิยม ได้แก่ 1) การทำพืชแห้ง คือ การนำพืชอาหารสัตว์แบบทั้งต้น แบบสับ แบบอัดฟ่อน และแบบอัดเม็ด มาทำให้แห้งอย่างรวดเร็ว เพื่อลดการสูญเสียคุณค่าทางโภชนาการของพืชอาหารสัตว์ ซึ่งทำได้โดยวิธีการผึ่งแดด ผึ่งในร่ม การใช้เครื่องอบ การใช้อุณหภูมิต่ำ เพื่อให้เหลือความชื้นของพืชอาหารสัตว์น้อยกว่า 15 เปอร์เซ็นต์ โดยแต่ละวิธีจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับคุณภาพและชนิดของพืชอาหารสัตว์ ค่าใช้จ่าย ระยะเวลา และสภาพอากาศ (Pitt, 1990; ภัทรภร ทศพงษ์, 2556) 2) การทำพืชหมัก หรือ ไซเลจ คือ พืชอาหารสัตว์ที่เก็บรักษาในรูปของพืชหมัก เพื่อแก้ปัญหาการขาดแคลนพืชอาหารสัตว์ที่เกิดขึ้นจากสภาพภูมิอากาศตามฤดูกาล การทำไซเลจเป็นการเก็บรักษาสภาพอวบน้ำและภาวะไร้อากาศ (anaerobic fermentation) เพื่อคงสภาพและรักษาคุณค่าของพืชอาหารสัตว์ไว้คงเดิม ทำให้พืชอาหารสัตว์มีลักษณะเนื้อสัมผัสอ่อนนุ่ม น่ากินมากยิ่งขึ้น เป็นวิธีการถนอมพืชอาหารสัตว์ที่สามารถทำได้ทุกฤดูกาลและเป็นวิธีที่นิยมในประเทศไทย (สายัณห์ ทัดศรี, 2547)

2.2 การทำพืชหมัก หรือ ไซเลจ (silage)

การทำพืชหมัก หรือ ไซเลจ (silage) คือ พืชอาหารสัตว์ที่เก็บรักษาในรูปของพืชหมัก เพื่อแก้ปัญหาการขาดแคลนพืชอาหารสัตว์ เช่น หญ้า ฟางข้าว และข้าวโพด ที่เกิดขึ้นจากสภาพภูมิอากาศตามฤดูกาล การทำไซเลจเป็นการเก็บรักษาสภาพอวบน้ำและภาวะไร้อากาศ เพื่อคงสภาพและรักษาคุณค่าของพืชอาหารสัตว์ไว้คงเดิม เมื่อเกิดภาวะไร้อากาศในการหมัก แล็กติกแอซิดแบคทีเรียจะใช้คาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำได้ (water-soluble carbohydrate; WSC) ในการผลิตกรดแล็กติก ทำให้ค่ากรด-เบสของไซเลจต่ำลงอยู่ในช่วง 3.6-4.5 (Kung, 2001) ซึ่งช่วยรักษาปริมาณน้ำหนักรวมและสารอาหารของไซเลจ (Rowghani และคณะ, 2008) และช่วยยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่นๆ ที่ทำให้เกิดการเน่าเสียของไซเลจ เช่น clostridia, enterobacteria และรา เป็นต้น จึงสามารถยืดระยะเวลาการเก็บรักษาพืชอาหารสัตว์ไว้เลี้ยงปศุสัตว์ในฤดูขาดแคลนได้ (Cheli และคณะ, 2013) นอกจากนี้ การทำไซเลจยังเป็นวิธีการถนอมพืชอาหารสัตว์ที่นิยมมากที่สุดและเหมาะสมสำหรับสภาพภูมิอากาศของประเทศไทย เนื่องจาก เป็นวิธีที่สามารถทำได้ทุกฤดูกาล หากมีวิธีการเก็บรักษาไซเลจที่ดีจะสามารถมีอาหารสัตว์ที่คุณภาพดีใช้ได้เป็นเวลานาน โดยสามารถคงคุณค่าทางโภชนาการของพืชอาหารสัตว์ได้และยังทำให้ลักษณะเนื้อสัมผัสอ่อนนุ่ม น่ากินมากยิ่งขึ้น ส่งผลต่อปริมาณการกินได้ของสัตว์ ช่วยเพิ่มปริมาณการกินและน้ำหนักตัวของสัตว์ รวมถึงผลผลิตจากสัตว์ เช่น นม ไข่ แต่เกษตรกรที่ทำไซเลจควรมีความรู้ความชำนาญเกี่ยวกับกระบวนการหมัก มีการลงทุนที่ค่อนข้างสูงเพื่อสร้างหลุมหมักหรืออุปกรณ์การหมักในขั้นแรก นอกจากนี้ กระบวนการทำไซเลจอาจเกิดความเสียหายต่ออุปกรณ์การหมักจากความเป็นกรดสูง และถ้าหากไม่สามารถรักษาภาวะไร้อากาศได้ตลอดการหมักหรือเกิดการสัมผัสกับอากาศระหว่างนำไซเลจออกจากถังหมัก อาจทำให้เกิดความเสียหายต่อคุณภาพไซเลจได้ เมื่อไซเลจสัมผัสอากาศทำให้จุลินทรีย์ที่เจริญได้โดยใช้อากาศ เช่น ยีสต์และราสามารถเจริญเติบโตและก่อให้เกิดความเน่าเสียต่อไซเลจได้ (Dunière และคณะ, 2013)

2.2.1 ปัจจัยที่ส่งผลต่อคุณภาพของไซเลจ

มาตรฐานของไซเลจข้าวโพดที่มีคุณภาพดีแสดงในตารางที่ 2.1 ซึ่งในกระบวนการถนอมพืชอาหารสัตว์ให้อยู่ในรูปไซเลจ มีหลากหลายปัจจัยที่ส่งผลต่อคุณภาพของไซเลจ ตั้งแต่พืชที่ใช้หมัก ภาวะในการหมัก รวมทั้งสารต่างๆ ที่เติมลงไปในการหมัก

ตารางที่ 2.1 มาตรฐานของไซเลจที่มีคุณภาพดี

มาตรฐานของไซเลจที่มีคุณภาพดี	
มาตรฐานทางเคมี	<ul style="list-style-type: none"> - ควรมีค่าความเป็นกรด-เบส 3.5-4.2 ควรมีปริมาณกรดแล็กติกมาก กรดอะซิติกเป็นส่วนน้อย ไม่ควรมีกรดบิวทีริก หรือมีให้น้อยที่สุด - กรดแล็กติก 3-13 เปอร์เซ็นต์ กรดอะซิติก 0.5-0.8 เปอร์เซ็นต์ กรดบิวทีริกไม่เกิน 0.2 เปอร์เซ็นต์ - แอมโมเนียมไนโตรเจนไม่เกิน 11 เปอร์เซ็นต์ของไนโตรเจนทั้งหมด
มาตรฐานทางกายภาพ	<ul style="list-style-type: none"> - ควรมีกลิ่นหอมเปรี้ยวอ่อนๆ คล้ายผลไม้ดอง ไม่เหม็นเน่าหรือฉุนแอมโมเนีย - เนื้อสัมผัสต้องไม่เป็นเมือกใส หรือไม่เกิดเส้นใยสีขาวจากรากระจายที่ผิวไซเลจ - ควรมีสีเหลืองอมเขียว ไม่เป็นสีน้ำตาลไหม้หรือดำที่เกิดจากความร้อนในการหมักมากเกินไป ทำให้เสียคุณค่าทางโภชนาการไป

ที่มา: ดัดแปลงจาก กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ (2547); สายัณห์ ทัดศรี (2547)

ชนิดของพืชที่เหมาะสมสำหรับการทำไซเลจ ต้องเป็นพืชอาหารสัตว์ที่มีคุณค่าทางโภชนาการที่เหมาะสม เป็นพืชที่มีปริมาณวัตถุแห้งมากกว่า 25 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำได้เพียงพอ (ไม่น้อยกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ของวัตถุแห้ง) สำหรับการทำงานของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียที่จะใช้คาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำได้ในพืชอาหารสัตว์เพื่อผลิตกรดช่วยในกระบวนการหมัก (สายัณห์ ทัดศรี, 2547)

อายุของพืชอาหารสัตว์ที่เหมาะสมในการทำไซเลจ ควรตัดในช่วงที่พืชไม่อ่อนหรือแก่เกินไป เป็นช่วงที่ให้ผลผลิตและคุณค่าทางอาหารเพียงพอ โดยพืชอาหารสัตว์แต่ละชนิดมีช่วงระยะเวลาที่เหมาะสมแตกต่างกัน (McAllister และ Hristov, 2000) เช่น ข้าวโพดควรตัดในช่วงที่เมล็ดฝักเริ่มเป็นแป้งประมาณ 25-30 เปอร์เซ็นต์ หรือช่วงที่ระยะฝักเป็นน้ำนมและก่อนเมล็ดจะแข็ง เพราะมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตสูง ส่วนข้าวฟ่างควรตัดระยะใกล้มีดอกหรือประมาณ 70-84 วัน (สายัณห์ ทัดศรี, 2547)

ขนาดของชิ้นพืชที่หมัก โดยการตัดชิ้นของพืชหมักจะทำให้ชิ้นพืชอัดแน่นมากขึ้นและเกิดกระบวนการหมักได้ดียิ่งขึ้น (Mohd-Setapar และคณะ, 2012) หากพืชที่ใช้ทำไซเลจมีขนาดยาว

เกินไป เมื่ออัดแน่นจะเกิดช่องว่างและทำให้มีอากาศอยู่ในถุงหมัก เกิดการเจริญของจุลินทรีย์ที่ใช้
 อากาศและก่อให้เกิดกระบวนการหมักที่ไม่ดีได้ จึงควรสับให้พีชมีขนาดของชิ้นที่เหมาะสมประมาณ
 1-3 เซนติเมตร ขึ้นอยู่กับความชื้นและชนิดของพีช หากพีชมีความชื้นน้อยกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ ควรสับ
 ให้พีชมีขนาดเล็กลงอีก ให้มีขนาด 0.5-1.5 เซนติเมตร (สายัณห์ ทัดศรี, 2547) ซึ่งอาจส่งผลต่อคุณค่า
 ทางโภชนาการของไซเลจและการย่อยได้ของสัตว์ที่บริโภค (Mohd-Setapar และคณะ, 2012)

ปริมาณออกซิเจนส่งผลต่อกระบวนการหมักไซเลจ เนื่องจาก เมื่ออัดพีชหมักลงในถัง
 หมักให้แน่นมากพอ ไล่อากาศออกไปทั้งหมด และรักษาภาวะไร้อากาศไว้ได้ตลอดการหมัก แล็กติก
 แอซิดแบคทีเรียในไซเลจจะสามารถผลิตกรดแล็กติกได้มาก ทำให้มีกระบวนการหมักที่ดี แต่ถ้าหากมี
 ออกซิเจนหลงเหลือในกระบวนการหมักจะทำให้จุลินทรีย์ที่เจริญในภาวะมีอากาศได้ เช่น ราและยีสต์
 เจริญเติบโตขึ้น เกิดเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และความร้อน มีปริมาณกรดแล็กติกลดลง เกิดกระบวนการ
 หมักที่ไม่ดี ส่งผลให้ได้ไซเลจที่คุณภาพไม่ดี (Bolsen และคณะ, 1996)

ระดับความชื้นของพีชที่นำมาทำไซเลจควรมีปริมาณความชื้น 65-70 เปอร์เซ็นต์ หาก
 มีความชื้นน้อยเกินไป อาจทำให้เกิดกระบวนการหมักที่ไม่ดี เนื่องจาก การอัดแน่นของพีชหมักจะทำ
 ได้ยาก เกิดช่องว่างและมีอากาศหลงเหลือในถังหมักได้ แก๊ซโดยสับให้พีชมีขนาดที่สั้นลงหรือพรมน้ำ
 ก่อนบรรจุลงถังหมัก และถ้าหากพีชมีความชื้นสูงเกินไปจะทำให้ไซเลจมีปริมาณของเหลวมาก จะทำ
 ให้ปริมาณกรดในกระบวนการหมักเจือจาง เกิดความเป็นกรดได้ช้า ทำให้สูญเสียคุณค่าทางโภชนาการ
 ของพีชหมักในการนำมาผลิตกรดมากยิ่งขึ้น และทำให้ไซเลจเกิดการเน่าเสีย มีกลิ่นเหม็นได้ จึงควรนำ
 พืชอาหารสัตว์ที่สับแล้วมาผึ่งแดดเพื่อลดความชื้นก่อนนำไปทำไซเลจ (สายัณห์ ทัดศรี, 2547)

สารเติมแต่งสำหรับไซเลจ (silage additive) มีหน้าที่เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพ
 กระบวนการหมักและช่วยให้ไซเลจมีคุณภาพดีขึ้น กระตุ้นการเจริญของจุลินทรีย์ที่ช่วยผลิตกรดใน
 กระบวนการหมักช่วยให้เกิดการหมักดองได้เร็วขึ้น ช่วยลดการสูญเสียคุณค่าทางโภชนาการของพืชอาหาร
 สัตว์ และช่วยยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดความเน่าเสียในกระบวนการหมัก สารเติมแต่งที่
 ใช้ในพีชหมักนั้นสามารถแบ่งได้ 2 ประเภทหลักๆ ดังนี้ (ตารางที่ 2.2)

สารเติมแต่งกระตุ้นการหมัก

สารเติมแต่งกระตุ้นการหมักใช้เพื่อส่งเสริมการเจริญของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียที่เป็น
 จุลินทรีย์หลักในกระบวนการหมัก เช่น กากน้ำตาลซึ่งเป็นผลพลอยได้จากการผลิตน้ำตาลทราย ใช้
 เพิ่มปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำได้ในไซเลจ เพิ่มปริมาณวัตถุดิบ และเพิ่มการผลิตกรดแล็กติก

ในไซเลจ (MacDonald และคณะ, 2002) จากรายงานของ Baytok และคณะ (2005) พบว่า การเติมน้ำตาลลงในไซเลจข้าวโพด ช่วยให้ไซเลจข้าวโพดมีปริมาณวัตถุแห้งและโปรตีนรวมมากขึ้นและทำให้มีปริมาณกรดแล็กติกสูงขึ้น ซึ่งเป็นสมบัติของไซเลจที่มีคุณภาพดี นอกจากนี้ การเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดแล็กติกได้หรือการเติมเอนไซม์ เป็นอีกวิธีหนึ่งที่จะช่วยส่งเสริมกระบวนการหมัก โดยกรดที่จุลินทรีย์ผลิตได้จะช่วยลดค่าความเป็นกรด-เบสของไซเลจได้เร็วยิ่งขึ้น และหัวเชื้อจุลินทรีย์บางชนิดยังสามารถใช้เป็นโพรไบโอติกที่มีประโยชน์ต่อการย่อยได้ของสัตว์อีกด้วย เช่น *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus faecium*, *L. plantarum*, *Pediococcus* spp. เป็นต้น (da Silva และคณะ, 2017) ซึ่งสามารถนำมาใช้ในกระบวนการหมักได้อย่างปลอดภัย ใช้งานง่าย ไม่กัดกร่อนเครื่องมือและเป็นผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ (Ashbell และ Weinberg, 2006; Henderson, 1993) และการเติมเอนไซม์ เช่น เซลลูเลส และเฮมิเซลลูเลส เป็นต้น จะช่วยย่อยผนังเซลล์พืชให้กลายเป็นน้ำตาลที่แล็กติกแอซิดแบคทีเรียสามารถนำไปใช้ในการเจริญได้และผลิตกรดแล็กติกได้มากขึ้น (da Silva และคณะ, 2017; MacDonald และคณะ, 2002)

สารเติมแต่งยับยั้งจุลินทรีย์ในกระบวนการหมัก

กรดต่างๆ สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์บางชนิด นอกจากนี้ ยังช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการหมักไซเลจ ทำให้มีความเป็นกรดเร็วขึ้น ทั้งกรดอินทรีย์และกรดอนินทรีย์ เช่น กรดเบนโซอิก กรดซिटริก กรดซอร์บิก กรดฟอร์มิก และกรดอะซิติค เป็นต้น (da Silva และคณะ, 2017) เมื่อไซเลจมีค่าความเป็นกรด-เบสลดลงเร็วขึ้น จะสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ เช่น แบคทีเรีย ยีสต์และราได้ นอกจากนี้ ฟอร์มาลิน ส่วนใหญ่จะใช้ร่วมกับกรดฟอร์มิก ช่วยยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการและสามารถป้องกันการสูญเสียโปรตีนจากการย่อยโดยเอนไซม์ของพืชและสัตว์ได้ แต่กรดเหล่านี้มีข้อจำกัดในการใช้งาน คือ ต้องใช้ในปริมาณที่กำหนด เนื่องจาก กรดเหล่านี้มีฤทธิ์ในการกัดกร่อนและส่งผลกระทบต่อสุขภาพได้ (MacDonald และคณะ, 2002)

ตารางที่ 2.2 ประเภทของสารเติมแต่งสำหรับไซเลจ

ประเภท	กลไก	ตัวอย่าง
สารเติมแต่งกระตุ้นการหมัก	ส่งเสริมการเจริญของ แล็กติกแอซิดแบคทีเรีย	- ผลพลอยได้จากการเกษตร เช่น กากน้ำตาล หัวบีท เปลือกส้ม จมูกข้าว หางนม - เอนไซม์ เช่น อะไมเลส เซลลูเลส เพกทิเนส - หัวเชื้อแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย
สารเติมแต่งยับยั้งจุลินทรีย์ในกระบวนการหมัก	ยับยั้งการเจริญของ จุลินทรีย์ที่ไม่จำเป็นใน ไซเลจ เช่น ยีสต์ รา แบคทีเรีย (clostridia, enterobacteria)	กรดซัลฟูริก กรดฟอร์มิก พอร์มาลดีไฮด์ โซเดียม ไนไตรต์ ยูเรีย

ที่มา: ดัดแปลงจาก MacDonald และคณะ (2002); Bolsen และคณะ (1996)

2.2.2 ไซเลจข้าวโพด

ปี พ.ศ. 2559/60 ประเทศไทยมีพื้นที่เพาะปลูกข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ประมาณ 6.44 ล้านไร่ ผลผลิตรวมทั้งประเทศในปี 2559/60 ประมาณ 4.34 ล้านตัน (ตารางที่ 2.3) และผลผลิตข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ 94 เปอร์เซ็นต์ของประเทศถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ นอกจากนี้ ความต้องการในการใช้ข้าวโพดอาหารสัตว์มีมากขึ้นในทุกๆ ปี ในปี 2560/61 มีอัตราความต้องการข้าวโพดอาหารสัตว์เพิ่มมากขึ้นจากปี 2559/60 ร้อยละ 3.53 เนื่องจาก อุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์มีมากขึ้น แต่พื้นที่เพาะปลูกและผลผลิตต่อไร่มีปริมาณลดลง เกษตรกรเปลี่ยนไปทำการเพาะปลูกพืชชนิดอื่นมากขึ้นสำหรับในต่างประเทศ เช่น เนเธอร์แลนด์ เยอรมัน และเดนมาร์ก ประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ ของพืชอาหารสัตว์ เช่น ข้าวโพด หญ้า ข้าวสาลี ถูกนำไปทำไซเลจเพื่อถนอมพืชอาหารสัตว์เก็บไว้ใช้ในฤดูแล้งที่ขาดแคลนอาหารสัตว์ (Elferink และคณะ, 2000)

ตารางที่ 2.3 พื้นที่เพาะปลูกข้าวโพด ผลผลิต และผลผลิตต่อไร่ของไทย ปี 2555/56-2560/61

ปี	พื้นที่เพาะปลูก (ล้านไร่)	ผลผลิต (ล้านตัน)	ผลผลิตต่อไร่ (กิโลกรัม)
2555/56	7.53	4.95	657
2556/57	7.43	4.88	657
2557/58	7.23	4.73	654
2558/59	6.59	4.03	612
2559/60	6.44	4.34	674
2560/61*	6.46	4.49	694

* ประมาณการ

ที่มา: สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร (2560)

ข้าวโพดเป็นพืชอาหารสัตว์ที่ให้พลังงานสูง มีการเพาะปลูกปริมาณมาก เก็บเกี่ยวง่าย สามารถนำมาใช้ได้ทั้งฝัก ต้น และใบ เป็นพืชที่เหมาะสมที่จะนำมาหมักเพื่อทำไซเลจเพราะมีปริมาณ น้ำหนักแห้งสูง มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำได้เหมาะสม และมีค่าความต้านทานต่อค่าความเป็นกรด-เบสต่ำได้ดี (Santos และคณะ, 2013; Titterton และ Bareeba, 2000) เมื่อนำมาหมักจะ สับข้าวโพดเป็นชิ้นๆ เก็บในไซโลที่ปิดสนิท จะมีค่าความเป็นกรดได้เร็วขึ้น เก็บไว้ได้ระยะเวลานาน และมีคุณภาพไซเลจที่ดี ได้ไซเลจที่มีพลังงานรวมสูง ซึ่งคุณภาพของข้าวโพดที่นำมาหมักขึ้นอยู่กับ การดำเนินการปลูก การเก็บเกี่ยวที่ดี และระยะเวลาที่เหมาะสม (Bates, 2009) นอกจากข้าวโพดอาหาร สัตว์แล้ว ต้นข้าวโพดหวานหลังเก็บฝักแล้วก็เป็นเศษเหลือใช้ทางการเกษตรที่น่าสนใจ เนื่องจากมี คุณสมบัติที่เหมาะสม โดยมีองค์ประกอบทางเคมีเฉลี่ยจากกลุ่มตัวอย่าง ดังนี้ วัตถุแห้งเฉลี่ย 27.1 เปอร์เซ็นต์ โปรตีนเฉลี่ย 7.2 เปอร์เซ็นต์ เยื่อใยเฉลี่ย 28.3 เปอร์เซ็นต์ และคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำ ง่าย 52.7 เปอร์เซ็นต์ หากข้าวโพดมีความฉ่ำน้ำมาก อาจทำให้มีปริมาณความชื้นสูงเกินไป สามารถ เสริมด้วยวัสดุคูดซับเพื่อช่วยลดปริมาณความชื้นได้ เมื่อนำต้นข้าวโพดหวานมาทำไซเลจโดยผสมกับ ข้าวโพดบดเพื่อช่วยลดความชื้น พบว่า ไซเลจมีคุณภาพที่ดี มีคุณค่าทางโภชนาที่เหมาะสมและมีค่า การย่อยได้ดี (บุญล้อม ชีวะอิสระกุล, 2531) คุณค่าทางโภชนาของข้าวโพดสดและไซเลจข้าวโพด แสดงในตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 คุณค่าทางโภชนาของข้าวโพดสดและไซเลจข้าวโพด

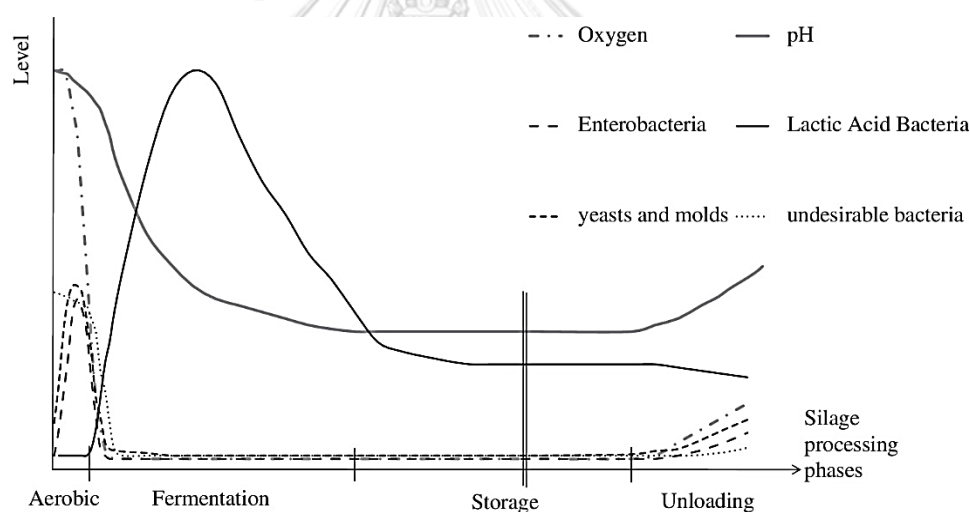
องค์ประกอบทางเคมี (เปอร์เซ็นต์)	ข้าวโพดสดอายุ 70 วัน	ไซเลจข้าวโพด
วัตถุแห้ง (dry matter)	21.0	26.2
โปรตีนหยาบ (crude protein)	1.7	2.0
ไขมัน (ether extract)	0.4	0.6
เยื่อใยหยาบ (crude fiber)	6.0	6.3

ที่มา : ดัดแปลงจาก คณะทำงานจัดทำมาตรฐานอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้องของประเทศไทย (2551)

2.2.3 กระบวนการหมักไซเลจ

กระบวนการหมักไซเลจแบ่งออกได้เป็น 4 ระยะ และในแต่ละระยะของกระบวนการหมักไซเลจมีการเปลี่ยนแปลงค่าออกซิเจน ความเป็นกรด-เบส และจำนวนจุลินทรีย์ดังแสดงในภาพที่

2.1



ภาพที่ 2.1 การเปลี่ยนแปลงค่าออกซิเจน ความเป็นกรด-เบส และจำนวนจุลินทรีย์ในกระบวนการหมักไซเลจ (Dunière และคณะ, 2013)

ระยะที่ 1 นำพืชอาหารสัตว์ใส่ถังหมัก (aerobic phase)

ระยะนี้เป็นระยะที่นำพืชอาหารสัตว์ที่เก็บเกี่ยวแล้วมาสับให้เป็นท่อนที่มีขนาดพอเหมาะและบรรจุลงในถังหมัก พืชอาหารสัตว์ในระยะนี้ยังคงสดใหม่ ซึ่งยังคงมีกระบวนการหายใจโดยใช้ออกสาคที่ที่ยังหลงเหลืออยู่ในถังหมัก และจุลินทรีย์ที่ใช้ออกสาคได้จะสามารถเจริญโดยใช้ออกสาคที่อยู่ในถังหมักได้ เช่น แบคทีเรีย รา และยีสต์ มีการย่อยสลายโปรตีนและใช้คาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำ

ได้เป็นแหล่งคาร์บอน เปลี่ยนเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ กรดอะมิโน และแอมโมเนีย ซึ่งจะใช้ออกซิเจนในถังหมักจนหมดเกิดภาวะไร้ออกซิเจน (da Silva และคณะ, 2017) มีค่าความเป็นกรด-เบสประมาณ 6.0-6.5 (Elferink และคณะ, 2000) หากไซเลจในถังหมักมีอุณหภูมิสูงขึ้นมากกว่า 42-44 องศาเซลเซียส อาจเกิดปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาล (browning reaction) ทำให้ไซเลจมีคุณภาพลดลง ดังนั้น ควรอัดพืชอาหารสัตว์ลงในถังหมักให้แน่นเพื่อไล่อากาศออกให้มากที่สุด และใช้ภาชนะหรือถังหมักที่มิดชิดไม่มีการซึมผ่านของอากาศได้ (Bolsen และคณะ, 1996)

ระยะที่ 2 การหมัก (fermentation phase)

เมื่ออากาศในถังหมักถูกใช้จนหมด ภาวะในถังหมักจะเข้าสู่ระยะไร้อากาศและเกิดกระบวนการหมัก โดยแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย ซึ่งเป็นจุลินทรีย์หลักในกระบวนการหมักไซเลจ แล็กติกแอซิดแบคทีเรียจะใช้คาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำได้เป็นสับสเตรตเพื่อผลิตกรดแล็กติก และกรดอื่นๆ ส่งผลให้ค่าความเป็นกรด-เบสของไซเลจลดลงอย่างรวดเร็ว (ประมาณ 3.8-5.0) (Elferink และคณะ, 2000) เมื่อค่าความเป็นกรด-เบสต่ำกว่า 5.0 จุลินทรีย์ที่ใช้อากาศได้ในไซเลจ เช่น จุลินทรีย์ในกลุ่ม *Enterobacteriaceae* รา และยีสต์จะถูกยับยั้ง (Bolsen และคณะ, 1996)

ระยะที่ 3 ระยะคงตัว (stable phase)

หลังจากแล็กติกแอซิดแบคทีเรียเจริญอย่างต่อเนื่องและผลิตกรดแล็กติกในภาวะไร้อากาศของกระบวนการหมัก ในระยะนี้ภายในถังหมักจะคงภาวะค่าความเป็นกรด-เบสต่ำและภาวะไร้อากาศ มีการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้น้อย (da Silva และคณะ, 2017) และมีการทำงานของเอนไซม์ย่อยโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตที่ทนกรด (Elferink และคณะ, 2000) หากภาชนะที่ใช้หมักมีการปิดที่มิดชิด ไม่เกิดการรั่วหรือสัมผัสกับอากาศได้ จะทำให้เก็บรักษาไซเลจไว้ได้นาน เพราะถ้าเกิดการสัมผัสกับอากาศจะทำให้ยีสต์และราเจริญได้ และทำให้ค่าความเป็นกรด-เบสสูงขึ้น กรดบิวทีริก และแอมโมเนียจะถูกสร้างขึ้น เป็นสาเหตุของการสูญเสียคุณค่าของไซเลจและทำให้ไซเลจเน่าเสียได้ ดังนั้น ในระยะนี้ควรมีการจัดการที่ดี จะช่วยให้ไซเลจอยู่ในรูปหมักได้นาน (Bolsen และคณะ, 1996)

ระยะที่ 4 การนำไปใช้ (feed out phase)

เมื่อเปิดภาชนะในการหมักออกเพื่อนำไซเลจออกไปใช้ ทำให้ไซเลจจะต้องสัมผัสกับอากาศอีกครั้ง ซึ่งระยะนี้เป็นระยะที่อาจทำให้ไซเลจสูญเสียคุณค่าและมีคุณภาพลดลง (Bolsen และคณะ, 1996; da Silva และคณะ, 2017) เกิดการเจริญของจุลินทรีย์ที่ใช้อากาศได้ง่าย ซึ่งอาจทำ

ให้เกิดความเสียหายได้เช่นเดียวกับระยะคงตัว แต่ในระยะนี้ไซเลจจะสัมผัสกับอากาศในปริมาณมากกว่า อาจทำให้จุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการสามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว เช่น แบคทีเรียกลุ่ม *Enterobacteriaceae* และ *Bacillus* และรา โดยเฉพาะราที่สร้างสารพิษ (mycotoxigenic fungi) ซึ่งส่งผลกระทบต่อสุขภาพของคนและสัตว์ได้ โดยการเจริญของจุลินทรีย์เหล่านี้ขึ้นอยู่กับปริมาณจุลินทรีย์ที่มีในไซเลจ ระยะเวลาที่สัมผัสกับอากาศในระหว่างการนำไซเลจไปใช้ การจัดการไซเลจในระหว่างกระบวนการหมัก และอุณหภูมิ (Bolsen และคณะ, 1996)

ดังนั้น ในทุกระยะในทุกขั้นตอนควรมีการจัดการที่ดี การนำไซเลจออกไปใช้ควรใช้ระยะเวลาให้น้อยที่สุด เพื่อลดระยะเวลาการสัมผัสกับอากาศและลดการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ ไซเลจที่ผ่านกระบวนการหมักที่ดีควรมีปริมาณผลผลิตสุดท้ายดังแสดงในตารางที่ 2.5 ซึ่งพบว่า แล็กติกแอซิดแบคทีเรียในไซเลจข้าวโพดสามารถใช้คาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำได้ในข้าวโพดผลิตเป็นกรดแล็กติก และลดช่วยค่าความเป็นกรด-เบสได้ดีกว่าไซเลจหญ้า

ตารางที่ 2.5 ปริมาณผลผลิตสุดท้ายในไซเลจที่มีกระบวนการหมักไซเลจที่ดี

ปริมาณผลผลิต (เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง)	ชนิดของไซเลจและปริมาณน้ำหนักแห้ง (เปอร์เซ็นต์)			
	หญ้าแอลฟัลฟา (50.0)	หญ้า (30.0)	ข้าวโพด (37.5)	ข้าวโพดที่มีความชื้นสูง (75.0)
ความเป็นกรด-เบส	4.7-5.0	4.3-4.7	3.7-4.2	4.0-4.5
กรดแล็กติก	2.0-4.0	6.0-10.0	4.0-7.0	0.5-2.0
กรดอะซีติก	0.5-2.0	1.0-3.0	1.0-3.0	<0.5
กรดโพรพิโอนิก	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
กรดบิวทีริก	0	<0.5	0	0
เอทานอล	0.5	0.5-1.0	1.0-3.0	0.2-2.0
แอมโมเนีย	<12	8.0-12.0	5.0-7.0	<10.0

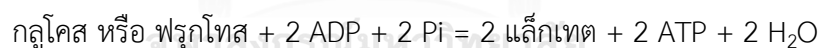
ที่มา: ดัดแปลงจาก da Silva และคณะ (2017)

2.2.4 จุลินทรีย์ในไซเลจ

จุลินทรีย์ที่พบในไซเลจมาจากจุลินทรีย์ประจำถิ่นในพืชอาหารสัตว์ก่อนนำมาหมักเป็นไซเลจ เช่น *Pseudomonas*, *Actinomyces*, *Listeria* รา ยีสต์ และแบคทีเรียแบบที่เรีย เป็นต้น โดยมีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดประมาณ 10^7 CFU/กรัมของพืชอาหารสัตว์ (da Silva และคณะ, 2017) จุลินทรีย์ทั้งหมดที่อยู่รอดในกระบวนการหมักไซเลจเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่ส่งผลต่อคุณภาพของไซเลจ โดยเฉพาะแบคทีเรียแบบที่เรียที่มีความสำคัญในกระบวนการหมักไซเลจ (Muck, 2010)

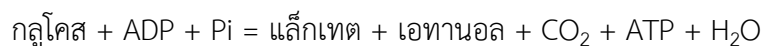
แบคทีเรียแบบที่เรีย

แบคทีเรียแบบที่เรียเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้ในที่มีออกซิเจนน้อย และบางชนิดเจริญในที่ไม่มีออกซิเจน จุลินทรีย์ที่ส่งเสริมกระบวนการหมักของไซเลจ เนื่องจาก สามารถผลิตกรดต่างๆ ทำให้ไซเลจมีค่าความเป็นกรด-เบสต่ำลงอย่างรวดเร็ว แบคทีเรียแบบที่เรียสามารถเจริญได้ในอุณหภูมิ 5-50 องศาเซลเซียส เจริญเติบโตได้ดีในอุณหภูมิ 25-40 องศาเซลเซียส แบคทีเรียแบบที่เรียที่มักพบในไซเลจ เช่น *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Lactococcus* และ *Streptococcus* เป็นต้น (Muck, 2010) โดยแบคทีเรียแบบที่เรียแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ตามกระบวนการหมักน้ำตาล ดังแสดงในตารางที่ 2.6 ได้แก่ กลุ่ม homofermentative bacteria (da Silva และคณะ, 2017) ซึ่งสามารถผลิตกรดแล็กติกได้มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ สามารถหมักน้ำตาลเป็นกรดแล็กติกได้ดังนี้

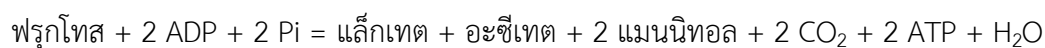


(da Silva และคณะ, 2017)

และ heterofermentative bacteria ซึ่งสามารถใช้น้ำตาลในไซเลจผลิตกรดแล็กติก กรดอะซีติก เอทานอล และคาร์บอนไดออกไซด์ ได้ดังนี้



หรือ



(da Silva และคณะ, 2017)

ตารางที่ 2.6 แล็กติกแอซิดแบคทีเรียที่สำคัญในกระบวนการผลิตไซเลจ

กระบวนการหมักน้ำตาล	สกุล	สปีชีส์
Homofermentive	<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i>
		<i>casei</i>
		<i>corynefor</i>
		<i>mis</i>
		<i>curvatus</i>
		<i>plantarum</i>
		<i>salivarius</i>
		<i>acidlactici</i>
		<i>cerevisiae</i>
		<i>pentosaceus</i>
		<i>faecalis</i>
		<i>faecium</i>
		<i>lactic</i>
		<i>bovis</i>
Heterofermentative	<i>Lactobacillus</i>	<i>brevis</i>
		<i>buchneri</i>
		<i>fermentum</i>
		<i>viridescens</i>
		<i>Leuconostoc mesenteroides</i>

ที่มา: ดัดแปลงจาก Bolsen และคณะ (1996); MacDonald และคณะ (2002)

ยีสต์

ยีสต์ เป็นจุลินทรีย์ในกลุ่มยูแคริโอต ใช้แหล่งคาร์บอนจากอินทรีย์คาร์บอนหรือสารประกอบอินทรีย์ เจริญได้ทั้งที่มีอากาศและไม่มีอากาศ มีอัตราการเจริญเติบโตช้ากว่าแบคทีเรีย ยีสต์บางชนิดทนต่อค่าความเป็นกรด-เบสต่ำได้ มีผลกระทบต่อกระบวนการหมักทั้งในระยที่มีอากาศและไม่มีอากาศ ในภาวะที่ไม่มีอากาศ ยีสต์จะหมักน้ำตาลผลิตเป็นเอทานอลและคาร์บอนไดออกไซด์ ในภาวะมีอากาศ ยีสต์บางชนิดสามารถใช้กรดแล็กติกได้ผลผลิตเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ ส่งผลต่อปริมาณกรดแล็กติกในไซเลจ ทำให้ค่าความเป็นกรด-เบสสูงขึ้น ส่งผลให้จุลินทรีย์อื่นๆ ที่ไม่ต้องการไนไซเลจสามารถเจริญได้และทำให้ไซเลจเน่าเสีย (Henderson, 1993) นอกจากนี้ เอทานอลยังส่งผลต่อคุณภาพของน้ำนมของปศุสัตว์อีกด้วย ปัจจัยที่ส่งผลต่อการอยู่รอดของยีสต์ในการเก็บรักษาไซเลจคือ ปริมาณกรดอินทรีย์และการรักษาภาวะไร้อากาศในไซเลจ การใช้สารเติมแต่งในไซเลจ ได้แก่ สารประกอบอินทรีย์ระเหยง่าย เช่น กรดโพรพิโอนิก และกรดอะซิติก ที่สามารถยับยั้งการเจริญของยีสต์ได้ (Muck, 2010) ยีสต์ที่พบในไซเลจ เช่น *S. cerevisiae*, *Pichia anomala* และ *Kazachstania unispora* รวมทั้งยีสต์ในสกุล *Torulopsis*, *Candida*, *Issatchenkia*, *Hansenula* และ *Endomycopsi* เป็นต้น (Santos และคณะ, 2017)

รา

รา เป็นจุลินทรีย์อีกชนิดที่อยู่ในกลุ่มยูแคริโอต เจริญในภาวะมีอากาศ จึงมักพบปัญหาการปนเปื้อนของเส้นใยและสปอร์ของราบนผิวหน้าและด้านล่างของไซเลจ และในไซเลจที่สัมผัสกับอากาศ (Alonso และคณะ, 2011) การปนเปื้อนของราส่งผลเสียต่อคุณภาพของไซเลจและก่อให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพของคนและสัตว์ จากสปอร์ของราที่ทำให้เกิดอาการแพ้และส่งผลเสียต่อกอด และราบางชนิดสามารถผลิตสารพิษจากรา (mycotoxin) ได้ สารพิษจากราสามารถส่งผลเสียต่อระบบภูมิคุ้มกัน เกิดความเสียหายร้ายแรงต่อตับหรือไตและทำให้เกิดภาวะแท้งได้ (Muck, 2010) ราที่สามารถผลิตสารพิษที่มักพบในไซเลจ เช่น *Penicillium roqueforti*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *Fusarium culmorum* เป็นต้น (MacDonald และคณะ, 2002)

Clostridium

แบคทีเรียในกลุ่ม clostridia ที่พบในไซเลจเป็นจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนจากดินที่ใช้เพาะปลูกพืชอาหารสัตว์ สามารถสร้างสปอร์และเจริญได้ในภาวะไร้อากาศ (obligate anaerobe) เจริญได้ดีที่ค่าความเป็นกรด-เบส 7.0-7.4 และที่มีความชื้นสูง ไม่สามารถทนภาวะความเป็นกรดได้

(ค่าความเป็นกรด-เบสต่ำกว่า 4.2) หากนำพืชที่มีความชื้นสูงมากมาทำไซเลจ แม้ว่าค่าความเป็นกรด-เบสในไซเลจจะต่ำ แต่มีความชื้นสูง แบคทีเรียกลุ่มนี้ก็อาจจะยังเจริญเติบโตได้ ดังนั้น ความชื้นของพืชอาหารสัตว์ที่นำมาทำไซเลจจึงมีความสำคัญ ควรมีปริมาณความชื้นที่เหมาะสม และมีกระบวนการหมักที่ดี จะช่วยยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้ (MacDonald และคณะ, 2002) แบคทีเรียในสกุล *Clostridium* แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม proteolytic clostridia เช่น *Clostridium bifermentans* และ *C. sporogenes* เป็นต้น สามารถเปลี่ยนกรดอะมิโนเป็นสารประกอบอื่น เช่น แอมโมเนีย เอมีน และคาร์บอนไดออกไซด์ ต่อไปเป็นกลุ่ม *C. butyricum* สามารถหมักคาร์โบไฮเดรตได้ และสุดท้าย คือ กลุ่ม *C. tyrobutyricum* สามารถหมักน้ำตาลและกรดแล็กติกได้ 2 กลุ่มสุดท้ายนี้จะหมักสารประกอบดังกล่าวผลิตเป็นกรดบิวทีริก กรดอะซิติก ไฮโดรเจน และคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งทั้ง 2 กลุ่มนี้จัดอยู่ในกลุ่ม saccharolytic clostridia (Driehuis, 2013; MacDonald และคณะ, 2002) การปนเปื้อนแบคทีเรียสกุล *Clostridium* ส่งผลเสียต่อคุณภาพของไซเลจ เนื่องจาก สามารถหมักกรดแล็กติกได้เป็นกรดบิวทีริก ทำให้ปริมาณกรดแล็กติกในไซเลจลดลง และส่งผลต่อรสชาติของไซเลจ ทำให้สัตว์กินได้น้อยลง นอกจากนี้ การปนเปื้อน *C. butolinum* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคโบ툴ิซึม ซึ่งส่งผลเสียต่อสุขภาพของสัตว์ เช่น โค กระบือ และม้า เป็นต้น (Muck, 2010)

Enterobacteriaceae

เอนเทอโรแบคทีเรีย สามารถเจริญได้ทั้งภาวะมีอากาศและไม่มีอากาศ เจริญได้ดีที่ค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 7.0 และไม่ทนภาวะความเป็นกรดสูง (MacDonald และคณะ, 2002) แบคทีเรียชนิดนี้มักเจริญได้ดีในระยะแรกของกระบวนการหมัก สามารถแย่งอาหารกับแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย โดยใช้คาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำได้ผลิตเป็นกรดอะซิติก เอทานอล และไฮโดรเจน และยังสามารถึงหมักคาร์บอกซิลและหมู่อะมิโนออกจากสาร ทำให้เกิดแอมโมเนียและสารพิษ เช่น สารประกอบประเภทไบโอจีนิกเอมีน (biogenic amine) ซึ่งส่งผลเสียต่อสุขภาพของสัตว์ได้ ความสามารถในการเปลี่ยนกรดแล็กติกให้เป็นสารประกอบอื่นนี้ เป็นสาเหตุหลักที่ทำให้ค่าความเป็นกรด-เบสในไซเลจสูงขึ้น ทำให้สูญเสียคุณภาพและคุณค่าของไซเลจไป (Muck, 2010) ตัวอย่างของเอนเทอโรแบคทีเรียที่พบในไซเลจ ได้แก่ *Escherichia coli* และ *Erwinia herbicola* กระบวนการจัดการไซเลจที่ดี ทำให้ไซเลจมีภาวะไร้อากาศและค่าความเป็นกรด-เบสต่ำอย่างรวดเร็วจะสามารถยับยั้งแบคทีเรียกลุ่มนี้ในไซเลจได้ (Henderson, 1993)

Listeria

Listeria เป็นแบคทีเรียที่มักพบในพืชอาหารสัตว์ที่มีปริมาณวัตถุแห้งต่ำ สามารถเจริญได้ทั้งในที่ที่มีอากาศและไม่มีอากาศ และไม่พบการเจริญในไซเลจที่มีค่าความเป็นกรด-เบสต่ำกว่า 4.7 (MacDonald และคณะ, 2002) สำหรับ *Listeria monocytogenes* เป็นแบคทีเรียที่ก่อโรคทั้งในสัตว์และมนุษย์ เช่น โรคสมองอักเสบ โรคกระเพาะปัสสาวะอักเสบ และกตภูมิคุ้มกันในหญิงตั้งครรภ์ และทารกแรกเกิด นอกจากนี้ ยังก่อให้เกิดโรคลิสเทอริโอซิสในสัตว์เคี้ยวเอื้องได้โดยเฉพาะแกะ สามารถทนต่อค่าความเป็นกรด-เบส 3.8-4.2 ได้หากอยู่ในที่มีอากาศ ในไซเลจที่หมักในปริมาณมาก เป็นก้อนไซเลจขนาดใหญ่จะมีความเสี่ยงในการปนเปื้อนจุลินทรีย์ชนิดนี้มาก เนื่องจาก มีพื้นที่ผิวหน้าที่อาจจะสัมผัสกับอากาศมาก ดังนั้น การรักษาก๊าซไร้อากาศในกระบวนการหมักไซเลจที่ดีจะช่วยยับยั้งการเจริญของ *Listeria* ได้ (Driehuis, 2013)

Bacillus

Bacillus เป็นแบคทีเรียอีกชนิดหนึ่งที่พบในไซเลจ สามารถเจริญได้ในที่มีอากาศและไม่มีอากาศ (Muck, 2010) เช่น *B. cereus* สามารถหมักคาร์โบไฮเดรตผลิตเป็นสารต่างๆ เช่น กรดอินทรีย์ (กรดบิวทิริก กรดอะซิติก) เอทานอล 2,3-บิวตาไดออล และกลีเซอรอล เป็นต้น (Elferink และคณะ, 2000) นอกจากนี้ เอนโดสปอร์ของ *Bacillus* ยังสามารถตกค้างและเกิดการปนเปื้อนในน้ำนมของสัตว์ได้อีกด้วย การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียในกลุ่มนี้ทำได้โดยทำให้กระบวนการหมักไซเลจมีประสิทธิภาพที่ดี มีค่าความเป็นกรด-เบสต่ำและมีภาวะไร้อากาศตลอดการหมัก (Driehuis, 2013)

2.3 ราและสารพิษจากรา

ราเป็นจุลินทรีย์ในกลุ่มยูแคริโอต ไม่มีคลอโรฟิลล์ สร้างอาหารเองไม่ได้ ดำรงชีวิตโดยการย่อยสลายสารอินทรีย์เพื่อสร้างพลังงานและเจริญเติบโต สามารถพบได้ทั่วไปตามธรรมชาติ โดยเฉพาะในผลผลิตทางการเกษตรหรือวัตถุดิบจากธรรมชาติ เส้นใยของราประกอบด้วยหลายเซลล์มาต่อกันจนกลายเป็นกลุ่มของเส้นใย (mycelium) เพื่อยึดเกาะกับอาหารเพื่อดูดซึมสารอาหารและทำหน้าที่สร้างสปอร์เพื่อสืบพันธุ์ (Dube, 2013) ราบางชนิดสามารถนำไปใช้ประโยชน์ทางอุตสาหกรรมได้ เช่น การหมักโคจิ เต้าเจี้ยว ซีอิ๊ว ผลิตเอนไซม์ และการทำยาปฏิชีวนะ ราบางชนิดก่อให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพของคนและสัตว์ ทำให้อาหารเน่าเสียและสร้างสารพิษ (Zain, 2011)

สารพิษจากรา (mycotoxin) เป็นหนึ่งในเมแทบอไลต์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ผลิตจากกระบวนการเมแทบอลิซึมทุติยภูมิ (secondary metabolism) ของราที่ผลิตสารพิษได้ (mycotoxigenic fungi) โดยไม่มีความสำคัญต่อการเจริญและการพัฒนาของรา ราที่ผลิตสารพิษได้ เช่น *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* และ *Alternaria* เป็นต้น (Dunière และคณะ, 2013; Keller และคณะ, 2013) การปนเปื้อนของสารพิษจากราในอาหารทั้งอาหารคนและอาหารสัตว์ เป็นปัญหาที่เกิดขึ้นทั่วโลก ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการสร้างสารพิษจากรา ได้แก่ ชนิดของรา สารอาหารในอาหารที่ราปนเปื้อน อุณหภูมิ ความชื้นสัมพัทธ์ แสง ปริมาณออกซิเจน และระยะเวลาที่ปนเปื้อน เป็นต้น (Dhanasekaran และคณะ, 2011; Zain, 2011) ตัวอย่างราและสารพิษจากราที่ปนเปื้อนในอาหารแสดงในตารางที่ 2.7

โรคที่เกิดจากการสัมผัสหรือได้รับสารพิษจากรา (mycotoxicoses) จะแตกต่างจากราก่อโรค (mycoses) เนื่องจาก ราก่อโรคจะส่งผลกระทบต่อสุขภาพมนุษย์หรือสัตว์โดยก่อโรคจากราโดยตรง ราก่อโรคจะไม่ผลิตสารพิษ ความรุนแรงของสารพิษจากราขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น เพศ อายุ ปริมาณที่ได้รับสารพิษจากรา เป็นต้น (Bennett และ Klich, 2003; D'Mello และ Macdonald, 1997; Hussein และ Brasel, 2001) การก่อโรคของสารพิษจากรามีทั้งแบบเรื้อรังและแบบเฉียบพลันในคนและสัตว์ที่บริโภคอาหารที่ปนเปื้อนสารพิษจากรา การก่อโรคแบบเฉียบพลันเกิดขึ้นเมื่อได้รับสารพิษจากราในปริมาณมากในเวลาสั้น อาการของโรคจะแสดงให้เห็นอย่างชัดเจน เช่น อาเจียน ท้องร่วง ตกลีือด หายใจลำบาก เจ็บหน้าอก ปวดศีรษะ และเมื่อยล้า เป็นต้น ส่วนการก่อโรคแบบเรื้อรัง คือ การได้รับสารพิษในปริมาณน้อยเป็นระยะเวลานาน ก่อให้เกิดความผิดปกติของร่างกาย ทำให้ภูมิคุ้มกันบกพร่องและก่อให้เกิดโรคมะเร็งได้ นอกจากนี้ สารพิษจากราแต่ละชนิดยังมีผลต่อร่างกายคนและสัตว์แตกต่างกัน เช่น อะฟลาทอกซินเป็นสารก่อมะเร็ง โดยมีตับเป็นอวัยวะเป้าหมาย และสามารถตกค้างในน้ำนมของสัตว์ได้ ไทโรโคทีซิน โอคราทอกซินเอ และซีราลีโนน ทำให้ภูมิคุ้มกันบกพร่องและโครโมโซมผิดปกติ ฟุโมนิซิน ทำให้เกิดการปอดบวมน้ำในสุกร เกิดความผิดปกติของสมองในม้า เกิดโรคมะเร็งตับในหนู และมะเร็งหลอดอาหารในคน เป็นต้น (Keller และคณะ, 2013)

ตารางที่ 2.7 ตัวอย่างราและสารพิษจากราที่ปนเปื้อนในอาหาร

กลุ่มสารพิษ จากรา	สายพันธุ์ราที่ผลิต สารพิษ	อาหารที่พบการปนเปื้อน
อะฟลาทอกซิน	<i>A. flavus</i> <i>A. parasiticus</i> <i>A. nominus</i>	นมและผลิตภัณฑ์จากนม ถั่ว มะเดื่อ ผลไม้แห้ง เครื่องเทศ และธัญพืช
โอคราทอกซิน	<i>A. ochraceus</i> <i>A. alliaceus</i> <i>A. mellus</i> <i>A. niger</i> <i>A. carbonarius</i>	ธัญพืช เช่น ข้าวบาร์เลย์ ข้าวโอ๊ต ข้าวไรย์ เมล็ด โกโก้ เมล็ดกาแฟ เครื่องเทศ องุ่นสด องุ่นแห้ง น้ำองุ่น ไวน์
พาทูลิน	<i>P. claviforme</i> <i>P. expansum</i> <i>P. patulum</i> <i>A. clavatus</i>	แอปเปิ้ล ลูกแพร์ เซอร์รี่
ฟูโมนิซิน	<i>F. moniforme</i>	ธัญพืช เช่น ข้าวฟ่าง ข้าวสาลี และข้าวโพด
ดีออกซินิวาลีนอล และ ซีราลีโนน	<i>F. culmorum</i> <i>F. graminearum</i> <i>F. sporotrichioides</i>	ธัญพืช เช่น ข้าวฟ่าง ข้าวสาลี ข้าวโอ๊ต ข้าวไรย์ ข้าวบาร์เลย์ และข้าวโพด
ซีทรินิน	<i>P. citrinum</i> <i>P. viridicatum</i>	เมล็ดโกโก้และกาแฟ ข้าวขัดสี ขนมปัง แฮม ข้าวสาลี ข้าวโอ๊ต ข้าวไรย์ ข้าวโพด ข้าวบาร์เลย์

ที่มา: ดัดแปลงจาก D'Mello และ Macdonald (1997); Bennett และ Klich (2003); Zhao และคณะ (2015)

2.3.1 ราและสารพิษจากราในไซเลจ

การทำไซเลจข้าวโพดเป็นวิธีในการถนอมพืชอาหารสัตว์โดยใช้กระบวนการหมักตามธรรมชาติ หากมีการจัดการไซเลจที่ดีทำให้กระบวนการหมักไซเลจอยู่ในภาวะไร้อากาศจะช่วยส่งเสริมการทำงานของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียที่ใช้คาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำได้ในไซเลจข้าวโพดเพื่อผลิตเป็นกรดแล็กติกทำให้ไซเลจมีค่าความเป็นกรด-เบสต่ำ ซึ่งจะช่วยยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ เช่น แบคทีเรียในกลุ่ม clostridia, enterobacteria ราและยีสต์ เป็นต้น แต่ถ้ามมีการจัดการไซเลจที่ไม่ดี พืชหมักที่ใช้มีปริมาณความชื้นไม่เหมาะสม มีการอัดบรรจุไซเลจไม่แน่น เกิดการรั่วไหลของน้ำหรืออากาศ อาจทำให้จุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการสามารถเจริญได้ และทำให้ค่าความเป็นกรด-เบสในไซเลจสูงขึ้น รวมถึงทำให้ราสามารถเจริญได้โดยเฉพาะราที่สร้างสารพิษ (Garon และคณะ, 2006) นอกจากนี้การปนเปื้อนของราและสารพิษจากราสามารถปนเปื้อนจากขั้นตอนก่อนทำไซเลจได้ โดยปนเปื้อนในข้าวโพดจากแปลงปลูกก่อนนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการหมักไซเลจข้าวโพด ราสร้างสารพิษที่มักพบในไซเลจข้าวโพด ได้แก่ *Aspergillus*, *Fusarium* และ *Penicillium* (Cheli และคณะ, 2013; Garon และคณะ, 2006; Roige และคณะ, 2009)

ราในสกุล *Aspergillus* เป็นราที่ผลิตสารพิษที่มักพบในไซเลจ เช่น *A. flavus* และ *A. parasiticus* ผลิตสารพิษสำคัญ คือ อะฟลาทอกซินบี 1 ซึ่งมีความเป็นพิษสูงและเป็นสารก่อมะเร็งในสัตว์และมนุษย์อีกด้วย (Driehuis, 2013) นอกจากนี้ยังพบ โอคราทอกซินที่ผลิตโดย *A. niger* และ *A. ochraceus* มีความเป็นพิษต่อไต ตับ ส่งผลกระทบต่อระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ และเป็นสารก่อมะเร็งได้หากสะสมเป็นระยะเวลานาน รวมถึง *A. fumigatus* ที่สามารถเจริญในที่ที่ไร้อากาศและค่าความเป็นกรด-เบสต่ำได้ และสามารถสร้างสารพิษไกลโอทอกซิน (gliotoxin) ซึ่งก่อให้เกิดโรคเกี่ยวกับปอดและโรคเกี่ยวกับระบบหายใจในมนุษย์และสัตว์ (Alonso และคณะ, 2013)

ราในสกุล *Fusarium* มักพบการปนเปื้อนในพืชอาหารสัตว์ก่อนนำมาทำเป็นไซเลจ (field derived mycotoxins) โดยปนเปื้อนจากดินเข้าสู่พืชอาหารสัตว์ เช่น *F. graminearum*, *F. verticillioides* และ *F. culmorum* ก่อให้เกิดโรคฝักและเมล็ดเน่าและโรคต้นเน่าในข้าวโพด ราดังกล่าวสามารถสร้างสารพิษได้ เช่น ซีราลีโนน ฟุโมนิซิน และไทรโคทีซิน หลายชนิด ได้แก่ ไดออกซินิ วาลีนอล ไดอะซีทอกซิเซอร์พินอล (diacetoxyscirpenol) และที-2 ทอกซิน (T-2 toxin) เป็นต้น โดยสารพิษดังกล่าวสามารถปนเปื้อนในส่วนฝักและต้นของพืช เป็นสาเหตุทำให้ไซเลจปนเปื้อนสารพิษดังกล่าวได้ ราในสกุล *Fusarium* ไม่สามารถเจริญในภาวะไม่มีอากาศและมีค่าความเป็นกรด-เบสต่ำ

ของกระบวนการหมักไซเลจ (Driehuis, 2013) แต่สารพิษของราในสกุลนี้ยังสามารถปนเปื้อนในไซเลจได้ การปนเปื้อนของสารพิษจากราที่ผลิตโดยราในสกุล *Fusarium* นี้ ส่งผลต่อคุณภาพของไซเลจและสุขภาพของสัตว์ได้ ทำให้เกิดความผิดปกติของของเหลวในสมองสัตว์ สัตว์บริโภคอาหารได้น้อยลง ทำให้น้ำหนักตัวของสัตว์ลดลง ร่างกายสัตว์อ่อนแอ ผลิตน้ำนมได้น้อย ตับถูกทำลาย ระบบภูมิคุ้มกันผิดปกติ กระตุ้นการเกิดมะเร็งในสัตว์และมนุษย์ (Alonso และคณะ, 2013; Zain, 2011)

ราในสกุล *Penicillium* เป็นราที่มักพบในไซเลจ เช่น *P. roqueforti*, *P. paneum*, *P. carneum* และ *P. citrinum* เป็นต้น โดยเฉพาะ *P. roqueforti* ที่สามารถเจริญได้ในภาวะไร้ออกซิเจนและค่าความเป็นกรด-เบสต่ำของไซเลจ (Alonso และคณะ, 2013; Cheli และคณะ, 2013) *Penicillium* สามารถสร้างสารพิษได้หลายชนิด เช่น โรควิวอร์ไทนินซี (roquefortine C) กรดไมโคฟีโนลิก (mycophenolic acid) พาทุลิน (patulin) เป็นต้น ก่อให้เกิดพิษต่อระบบประสาท ทำให้เกิดอาการกล้ามเนื้ออ่อนแรง เกิดความผิดปกติต่อระบบภูมิคุ้มกัน มีผลต่อดับ ไต และหัวใจ เกิดการกลายพันธุ์ได้ (Malekinejad และคณะ, 2015)

จากงานวิจัยของ El-Shanawany และคณะ (2005) ที่คัดแยกราจากไซเลจในประเทศอียิปต์ พบการเจริญของ *Aspergillus* และ *Penicillium* เป็นส่วนใหญ่ และพบการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินมากที่สุดในทุกตัวอย่างไซเลจ Richard และคณะ (2007) ศึกษาการปนเปื้อนของราและสารพิษจากราในไซเลจที่เก็บรักษาเป็นระยะเวลา 11 เดือน พบว่า *Aspergillus* และ *Fusarium* เป็นราที่พบมากในไซเลจข้าวโพด และพบสารพิษจากรา ได้แก่ อะฟลาทอกซินบี 1 โอคราทอกซินเอ ซีราลีโนน และฟูโมนิซินบี 1 และไกลโอทอกซิน เป็นต้น โดยพบการปนเปื้อนของไกลโอทอกซินในตัวอย่างไซเลจด้านล่างในปริมาณที่สูงถึง 877 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งเป็นสารพิษที่ผลิตโดย *A. fumigatus* Gonzalez Pereyra และคณะ (2008) พบว่า ในตัวอย่างไซเลจข้าวโพดมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ มีการปนเปื้อน *Aspergillus* และ *Fusarium* มากกว่า 1×10^4 CFU/กรัม ราส่วนใหญ่ที่พบ คือ *A. flavus* *A. fumigatus* และ *F. verticillioides* และพบการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซิน ไดออกซินิวาลีนอล ซีราลีโนน และฟูโมนิซินในไซเลจข้าวโพดอีกด้วย Mansfield และคณะ (2008) รายงานว่า ราในกลุ่ม *Penicillium* สามารถสร้างสารพิษได้ทั้งในข้าวโพดสดและไซเลจข้าวโพด โดยสารพิษที่พบมากที่สุด ได้แก่ โรควิวอร์ไทนินซี กรดไมโคฟีโนลิก กรดไซโคลปิอะโซนิค (cyclopiazonic acid) และพาทุลิน ตามลำดับ Keller และคณะ (2013) พบการปนเปื้อนของราและสารพิษจากราในไซเลจข้าวโพดทั้งก่อนและหลังกระบวนการหมัก โดยพบการปนเปื้อนของ *A. flavus*, *P. citrinum* และ *F. verticillioides* ในปริมาณสูงและตรวจพบอะฟลาทอกซินบี 1 ในข้าวโพดก่อนหมักอยู่ในช่วง 2-45

ไมโครกรัมต่อกรัม และข้าวโพดหลังหมักอยู่ในช่วง 2-100 ไมโครกรัมต่อกรัม ซึ่งสามารถตรวจพบปริมาณอะฟลาทอกซินได้ทั้งบริเวณด้านบน ด้านล่าง และตรงกลางของไซโลที่ใช้หมักไซเลจข้าวโพด งานวิจัยของ Malekinejad และคณะ (2015) รายงานว่า พบการปนเปื้อนของ *P. roqueforti* ในทุกตัวอย่างไซเลจข้าวโพดและไซเลจหญ้า และพบการปนเปื้อนของสารพิษจากรา ได้แก่ พาทุลิน กรดไมโคพีนอลิก และโรควอร์ไทม์ซินี เป็นต้น นอกจากนี้ Del Palacio และคณะ (2016) พบการปนเปื้อนของ *Fusarium* (43 เปอร์เซ็นต์) และ *Aspergillus* (36 เปอร์เซ็นต์) มากที่สุดในไซเลจข้าวสาลี โดยเฉพาะ *F. graminearum sensu lato* และ *Aspergillus* section *Flavi* พบการปนเปื้อนของดีออกซินิวาลีนอลในช่วง 3000-12,400 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และพบอะฟลาทอกซินในช่วง 6.1-23.3 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ที่ผลิตโดยราดังกล่าว ตามลำดับ Oliveira และคณะ (2017) พบการปนเปื้อนของฟูซารินซี (fusarin C) สูงถึง 54.2 เปอร์เซ็นต์ ผลิตโดยราในสกุล *Fusarium* ในตัวอย่างข้าวโพดในประเทศบราซิล ซึ่งเป็นสารพิษที่ก่อให้เกิดมะเร็งในมนุษย์ นอกจากนี้ ราบางชนิดสามารถเจริญในภาวะความเป็นกรด-เบสต่ำและที่ที่มีอากาศน้อยของกระบวนการหมักไซเลจได้ เช่น *A. fumigatus*, *Byssochlamys nivea*, *Monascus* spp., *P. roqueforti* และ *Trichoderma* spp. เป็นต้น (Cheli และคณะ, 2013; Nout และคณะ, 1993) ตัวอย่างราและสารพิษจากราที่ปนเปื้อนในไซเลจแสดงในตารางที่ 2.8

ตารางที่ 2.8 ตัวอย่างราและสารพิษจากราที่พบปนเปื้อนในไซเลจ

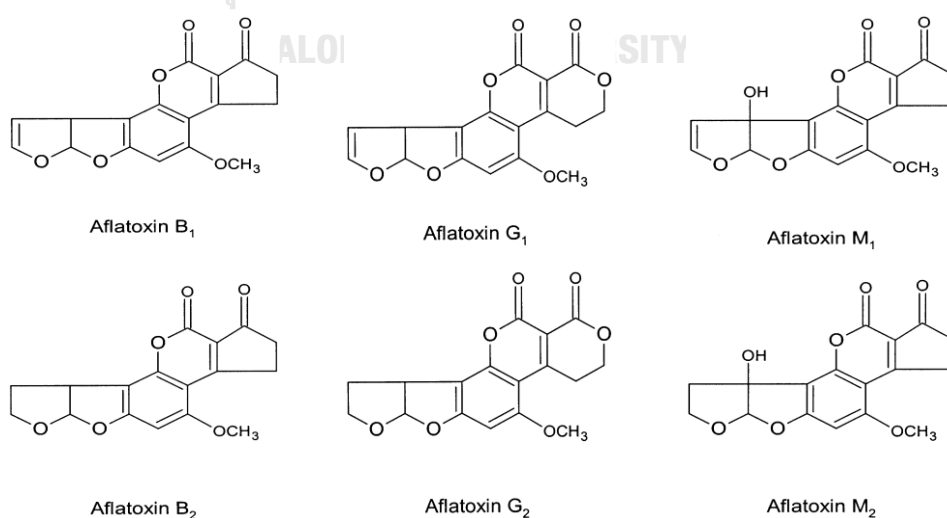
รา	สารพิษจากรา	ชนิดไซเลจ	ประเทศ
<i>Penicillium roqueforti</i>	โรควอร์ไท์ ซี กรดไมโคพีนอลิค	หญ้า	ไอร์แลนด์
<i>Penicillium expansum</i>	พาทุลิน	หญ้า	สวีเดน
<i>Byssochlamys nivea</i>	พาทุลิน	ข้าวโพด	ฝรั่งเศส
<i>Paecilomyces variotii</i>	พาทุลิน	ข้าวโพด	สโลวาเกีย
<i>Aspergillus fumigatus</i>	ฟูมิคราไวท์เอ ซี	ข้าวโพด	อาร์เจนตินา อียิปต์
<i>Aspergillus flavus</i>	อะฟลาทอกซิน กรดไซโคลเพียโซนิค		ฝรั่งเศส โปรตุเกส
<i>Aspergillus parasiticus</i>	อะฟลาทอกซิน	ข้าวโพด	อิหร่าน ฝรั่งเศส อาร์เจนตินา
<i>Aspergillus ochraceus</i>	โอคราทอกซินเอ	ข้าวสาลี ข้าวบาร์เลย์	บราซิล อียิปต์
<i>Fusarium culmorum</i>	ดีออกซินิวาลีนอล ซีราลีโนน	ข้าวโพด	ฝรั่งเศส
<i>Fusarium verticillioides</i>	ฟูโมนิซิน	ข้าวโพด	บราซิล

ที่มา: ดัดแปลงจาก MacDonald และคณะ (2002); Cheli และคณะ (2013); Alonso และคณะ (2013); Driehuis (2013)

2.4 อะฟลาทอกซิน

อะฟลาทอกซิน (aflatoxin) เป็นสารพิษที่ถูกพบครั้งแรกในปี 1962 จากการเกิดโรค Turkey X disease ระบาดในไก่วงโดยไม่ทราบสาเหตุที่ประเทศอังกฤษ ต่อมาพบว่า เกิดจากการปนเปื้อนรา *A. flavus* ซึ่งสามารถผลิตสารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิชื่อว่า อะฟลาทอกซิน (Zain, 2011) เมื่อนำไปศึกษาในสัตว์ทดลองพบว่า ทำให้สัตว์ทดลองตายและเป็นสาเหตุของโรคมะเร็งในไก่วง โดยการตั้ง

ชื่อสารพิษนี้ว่า aflatoxin นี้ ตัวอักษร “a” มาจาก “*Aspergillus*” และ “fla” มาจาก “*flavus*” และเติมคำว่า “toxin” ที่แปลว่าสารพิษ (เขาวมาลย์ คำเจริญ, 2545) อะฟลาทอกซิน เป็นสารพิษที่ผ่านการชีวสังเคราะห์โดยวิถีพอลิคีไทต์ของราสกุล *Aspergillus* section *Flavi* โดยเฉพาะ *A. flavus* และ *A. paraciticus* ที่พบมากในผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร เช่น ข้าวโพด ถั่วลิสง ถั่วเปลือกแข็ง เป็นต้น และเจริญได้ดีในที่ที่มีอากาศอบอุ่นจนถึงร้อนชื้นและอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 25-32 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ *A. bombycis*, *A. ochraceoroseus*, *A. nomius* และ *A. pseudotamari* ก็ สามารถผลิตอะฟลาทอกซินได้แต่พบการปนเปื้อนน้อย (Bennett และ Klich, 2003; Zain, 2011) อะฟลาทอกซินแบ่งได้หลายชนิดตามสมบัติการเรืองแสง ได้แก่ อะฟลาทอกซินบี 1 และอะฟลาทอกซินบี 2 สามารถเรืองแสงสีน้ำเงิน (blue fluorescent) ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต แต่อะฟลาทอกซินบี 1 มีพันธะคู่ที่วงแหวนวงที่ 1 (ภาพที่ 2.2) ส่วนอะฟลาทอกซินจี 1 และอะฟลาทอกซินจี 2 สามารถเรืองแสงสีเขียวแกมเหลือง (yellowish green fluorescent) ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต แต่อะฟลาทอกซินจี 1 มีพันธะคู่ที่วงแหวนวงที่ 1 (เขาวมาลย์ คำเจริญ, 2545) นอกจากนี้ เมื่อสัตว์ได้รับอะฟลาทอกซินบี 1 และอะฟลาทอกซินบี 2 เข้าสู่ร่างกาย กระบวนการเมแทบอลิซึมของสัตว์จะเปลี่ยนสารพิษดังกล่าวเป็น อะฟลาทอกซินเอ็ม 1 และ อะฟลาทอกซินเอ็ม 2 ตามลำดับ ซึ่งจะพบการปนเปื้อนในน้ำนมของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและผลิตภัณฑ์จากนม (Hussein และ Brasel, 2001; Zain, 2011) โครงสร้างของอะฟลาทอกซินชนิดต่างๆ แสดงในภาพที่ 2.2 โดยอะฟลาทอกซินสามารถละลายได้ในตัวทำละลายที่มีขั้วและทนต่อความร้อนสูง และอะฟลาทอกซินแต่ละชนิดมีสมบัติทางเคมีและทางกายภาพที่แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 2.9



ภาพที่ 2.2 โครงสร้างทางเคมีของอะฟลาทอกซินชนิดต่างๆ (Hussein และ Brasel, 2001)

ตารางที่ 2.9 สมบัติทางเคมีและทางกายภาพของอะฟลาทอกซินชนิดต่างๆ

ชนิดของอะฟลาทอกซิน	น้ำหนัก	สูตรโมเลกุล	จุดหลอมเหลว (°C)	ตัวทำละลาย
B ₁	312	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	268-269	
B ₂	314	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	286-289	เมทานอล
G ₁	328	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	244-246	เอทานอล
G ₂	330	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	237-240	คลอโรฟอร์ม
M ₁	328	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	299	
M ₂	330	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	293	

ที่มา: ดัดแปลงจาก เยววมาลัย คำเจริญ (2545); Dhanasekaran และคณะ (2011)

อะฟลาทอกซินบี 1 มีความเป็นพิษสูงสุด รองลงมา คือ อะฟลาทอกซินจี 1 อะฟลาทอกซินบี 2 และอะฟลาทอกซินจี 2 ตามลำดับ ซึ่งอะฟลาทอกซินบี 1 สามารถก่อให้เกิดมะเร็งในตับ เกิดการกลายพันธุ์ และความผิดปกติของพัฒนาการร่างกายของทารกในครรภ์ในมนุษย์และสัตว์ (Blankson และ Mill-Robertson, 2016) โดยองค์การวิจัยโรคมะเร็งนานาชาติ (International Agency for Research on Cancer) จัดให้อะฟลาทอกซินบี 1 เป็นสารกลุ่มที่ 1 ที่สามารถก่อให้เกิดมะเร็งในตับ นอกจากนี้ อะฟลาทอกซินเอ็ม 1 ที่มีกพบการปนเปื้อนในน้ำมันของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น โคน และ กระบือ เป็นสารพิษที่ถูกจัดเป็นสารก่อมะเร็งเช่นกัน (IARC, 1993) ความเป็นพิษของอะ ฟลาทอกซิน เกิดจากการได้รับสารพิษเข้าสู่ร่างกายทั้งคนและสัตว์ (aflatoxicosis) ความรุนแรงของความเป็นพิษของอะฟลาทอกซินขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น เพศ อายุ และขนาดของสัตว์ที่ได้รับอะ ฟลาทอกซิน ความเป็นพิษของอะฟลาทอกซินมีทั้งแบบเป็นพิษเรื้อรัง (chronic aflatoxicosis) และแบบเป็นพิษเฉียบพลัน (acute aflatoxicosis) สำหรับความเป็นพิษแบบเรื้อรังจะไม่แสดงอาการของโรค จำแนกโรคได้ยาก เกิดจากการได้รับสารพิษในปริมาณต่ำถึงปานกลางเป็นระยะเวลาานาน มักมีอาการย่อยอาหารได้น้อยลง มีการเจริญเติบโตช้า ส่งผลต่อระบบสืบพันธุ์ของสัตว์ (D'Mello และ Macdonald, 1997) ตัวอ่อนในครรภ์มีการพัฒนาผิดปกติ ทำให้ทารกพิการตั้งแต่แรกเกิด เกิดการกลายพันธุ์จากการเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรม และเป็นสารก่อมะเร็งตับได้ สำหรับความเป็นพิษแบบเฉียบพลัน จะมีอาการรุนแรงและเฉียบพลันเมื่อได้รับอะฟลาทอกซินในปริมาณปานกลางถึงมากและอาจทำให้เสียชีวิตได้ เช่น การตกเลือด ตับวายเฉียบพลัน บวมหน้า การย่อยอาหารและดูดซึมอาหารผิดปกติ เป็นต้น (Bbosa และคณะ, 2013)

การปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินสามารถปนเปื้อนในอาหารได้หลายชนิด เช่น ข้าวโพด ข้าว ฟาง ข้าวสาลี เมล็ดกาแฟ ถั่วลิสง เครื่องเทศ อัลมอนต์ วอลนัท มะเดื่อ น้ำผึ้ง น้ำผลไม้ ไวน์ นม และผลิตภัณฑ์จากนม (Bbosa และคณะ, 2013; Johnston และคณะ, 2012) สามารถพบการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินได้ทั่วโลก โดยเฉพาะในประเทศที่มีภูมิอากาศร้อนชื้น และพบการปนเปื้อนได้ในทุกกระบวนการตั้งแต่การเพาะปลูก การเก็บเกี่ยว การจัดเก็บ จนถึงการขนส่ง (Bbosa และคณะ, 2013) จากหลายงานวิจัยก่อนหน้านี้พบการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินในประเทศแถบยุโรป De Roma และคณะ (2017) ได้วิเคราะห์ปริมาณอะฟลาทอกซินเอ็ม 1 ในน้ำมันของโคและกระบือในประเทศอิตาลี เมื่อสัตว์ได้รับอะฟลาทอกซินปี 1 เข้าสู่ร่างกายและผ่านกระบวนการเมแทบอลิซึมของสัตว์เปลี่ยนเป็นอะฟลาทอกซินเอ็ม 1 ที่สามารถพบการปนเปื้อนในน้ำมันและผลิตภัณฑ์จากนม พบว่า มีการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินเอ็ม 1 ในตัวอย่างนมทั้ง 2 ชนิด แต่มีปริมาณไม่เกินข้อกำหนดของสหภาพยุโรป (0.05 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) ทั้งนี้ การปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินเอ็ม 1 ในน้ำมันขึ้นอยู่กับคุณภาพและการจัดการอาหารสัตว์ทั้งแบบพืชอาหารสดและไซเลจ นอกจากนี้ จากการวิเคราะห์ปริมาณการปนเปื้อนราและสารพิษจากราในตัวอย่างธัญพืช เช่น ถั่ว เครื่องเทศ และอาหารแห้ง ของประเทศสก็อตแลนด์ พบว่า ราส่วนใหญ่ที่พบในข้าวเมล็ดยาว ข้าวหอม ถั่วลิสง ถั่วสีดำและพริกไทยดำ คือ ราในสกุล *Aspergillus* แต่ไม่พบการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซิน ในตัวอย่างข้าวกล้องหอมมะลิและพริกชี้หนู พบการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซิน 14.7 และ 11.4 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ แต่ไม่พบการเจริญของรา *Aspergillus* ซึ่งจะพบการเจริญของราสกุลนี้ในบางขั้นตอนของกระบวนการผลิตอาหาร (Ruadrew และคณะ, 2013) Singh และ Cotty (2017) พบว่า 2 เพอร์เซ็นต์ของตัวอย่างพริกประเทศอเมริกามีปริมาณอะฟลาทอกซินปนเปื้อนสูงกว่าข้อกำหนด (20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) และพบการปนเปื้อนของ *Aspergillus* และอะฟลาทอกซินในตัวอย่างพริกในประเทศไนจีเรียสูงกว่าประเทศอเมริกาอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งมีการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินรวมสูงสุดถึง 156 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม มีหลายงานวิจัยพบการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินในประเทศแถบแอฟริกา Kumi และคณะ (2014) พบว่า 83.3 เปอร์เซ็นต์ของอาหารพื้นบ้านสำหรับเด็กที่ทำจากธัญพืชและถั่วในประเทศกานา มีการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินสูงเกินปริมาณอะฟลาทอกซินที่กำหนด โดยมีการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินเฉลี่ยเท่ากับ 145.2 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม Kamika และคณะ (2016) วิเคราะห์การปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินในตัวอย่างข้าวโพดในขั้นตอนต่างๆ ในประเทศคองโก พบว่า 32 เปอร์เซ็นต์ของข้าวโพดก่อนเก็บเกี่ยวมีการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินรวม 3.1-103.89 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และในระหว่างการเก็บเกี่ยวข้าวโพดมีปริมาณอะฟลาทอกซินสูงขึ้นเท่ากับ 3.03-165.2 ไมโครกรัมต่อ

กิโลกรัม นอกจากนี้ การปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินยังคงมีปริมาณสูงขึ้นไประหว่างการจัดเก็บในฟาร์มและในการจัดเก็บในตลาดก่อนมีการซื้อขาย พบว่า 100 เปอร์เซ็นต์ของตัวอย่างข้าวโพดในตลาดมีการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินในปริมาณที่สูงถึง 2806.5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม Gizachew และคณะ (2016) พบการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินเอ็ม 1 ในทุกตัวอย่างน้ำนมในประเทศอียิปต์ ปริมาณการปนเปื้อนเฉลี่ยเท่ากับ 0.028 ถึง 4.98 ไมโครกรัมต่อลิตร และพบการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในอาหารสัตว์อีกด้วย นอกจากนี้ ในแถบเอเชียก็สามารถพบการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินได้ งานวิจัยของ Ruadrew และคณะ (2013) รายงานว่า ในตัวอย่างผลผลิตทางการเกษตรจากแถบเอเชียได้แก่ ข้าวขาว ข้าวหอม ถั่วลิสง ถั่วดำ และพริกไทยดำ มีการปนเปื้อนของรา โดยเฉพาะ *A. parasiticus* ที่มีการปนเปื้อนถึง 61 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ ยังพบการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินในตัวอย่างข้าวกล้องหอมมะลิและพริกป่น 14.7 และ 11.4 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ

นอกจากปัญหาการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินในอาหารมนุษย์แล้ว การปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินในอาหารสัตว์ก็เป็นอีกปัญหาหนึ่งที่สำคัญ ส่งผลเสียต่ออุตสาหกรรมอาหารสัตว์และการเลี้ยงปศุสัตว์ รวมทั้งการทำไซเลจ เช่น ไซเลจข้าวโพด ไซเลจข้าวสาลี ไซเลจหญ้า เป็นต้น ไซเลจเป็นแหล่งอาหารสัตว์ที่สำคัญในฤดูที่ขาดแคลนพืชอาหารสัตว์ มักพบการปนเปื้อนของราและสารพิษจากราซึ่งอาจมีการปนเปื้อนราและสารพิษจากราในข้าวโพดจากแปลงปลูกก่อนนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการหมัก ไซเลจข้าวโพด (Garon และคณะ, 2006; Richard และคณะ, 2007) และอาจพบการปนเปื้อนราและสารพิษจากราในกระบวนการหมักที่ไม่ดี (Cheli และคณะ, 2013) งานวิจัยของ da Silva และคณะ (2000) รายงานว่า *A. flavus* และ *F. moniliforme* เป็นราส่วนใหญ่ที่พบในตัวอย่างข้าวฟ่างที่ใช้เป็นอาหารสัตว์และอาหารมนุษย์ในประเทศบราซิล และใน 12.8 เปอร์เซ็นต์ของตัวอย่าง มีการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 เฉลี่ยเท่ากับ 7-33 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม Del Palacio และคณะ (2016) พบการปนเปื้อนของ *Fusarium* และ *Aspergillus* ในตัวอย่างไซเลจข้าวสาลี และพบการปนเปื้อนของดีออกซินิวาลีนอลในช่วง 3000-12,400 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และอะฟลาทอกซินในช่วง 6.1-23.3 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ที่ผลิตโดยราดังกล่าว ตามลำดับ เช่นเดียวกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ การปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินในไซเลจข้าวโพดก็เป็นปัญหาที่เกิดขึ้นในหลายประเทศ เช่น อาร์เจนตินา ฝรั่งเศส อียิปต์ (Alonso และคณะ, 2013; El-Shanawany และคณะ, 2005; Garon และคณะ, 2006; Gonzalez Pereyra และคณะ, 2008; Richard และคณะ, 2009) นอกจากนี้ ยังมีรายงานการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินในไซเลจชนิดอื่นๆ อีก เช่น ไซเลจหญ้า และไซเลจข้าวฟ่าง เป็นต้น (Amigot และคณะ, 2006; O'Brien และคณะ, 2008; Sassahara และคณะ, 2005)

หลายประเทศมีการตั้งข้อกำหนดปริมาณการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินที่อนุญาตให้มีในอาหารคนและอาหารสัตว์ เช่น ประเทศสหรัฐอเมริกา กำหนดปริมาณอะฟลาทอกซินรวมสูงสุดที่อนุญาตให้มีอยู่ในอาหารคนและอาหารสัตว์ได้ไม่เกิน 20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (CAST, 2003) คณะกรรมาธิการยุโรป (European Commission) กำหนดให้มีปริมาณอะฟลาทอกซินรวมและอะฟลาทอกซินบี 1 ที่อนุญาตให้มีอยู่ในข้าวโพดและข้าวที่ใช้เป็นอาหารคนและสัตว์ได้ไม่เกิน 10 และ 5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ (Regulation, (EU) 1881/2006) รวมถึงประเทศไทย ตามประกาศจากกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 98 พ.ศ. 2529 เรื่องมาตรฐานอาหารที่มีสารปนเปื้อน กำหนดให้มีการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินรวมในอาหารทุกชนิดได้ไม่เกิน 20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (กระทรวงสาธารณสุข, 2529) และตามประกาศจากกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่องกำหนดลักษณะของอาหารสัตว์เสื่อมคุณภาพ (ฉบับที่ 1) พ.ศ. 2531 กำหนดให้มีอะฟลาทอกซินในข้าวโพดปนและข้าวโพดเมล็ดที่ใช้เป็นวัตถุดิบอาหารสัตว์ได้ไม่เกิน 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2537) ข้อกำหนดของปริมาณการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินที่อนุญาตให้มีในอาหารคนและอาหารสัตว์ในประเทศต่างๆ แสดงในตารางที่ 2.10

ตารางที่ 2.10 ข้อกำหนดปริมาณอะฟลาทอกซินในอาหารสัตว์และผลิตภัณฑ์อาหารสัตว์ในประเทศต่างๆ

ประเทศ	อาหารสัตว์	ปริมาณอะฟลาทอกซินรวมสูงสุด*	ที่มา
ไทย	ข้าวโพดป่น	100	(กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2537)
	ข้าวโพดเมล็ด	100	(กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2537)
จีน	ข้าวโพดและผลิตภัณฑ์จากข้าวโพด	20	MoH (2011)
สหรัฐอเมริกา	ข้าวโพดอาหารสัตว์	20	(CAST, 2003)
	น้ำนม	0.5	(CAST, 2003)
บราซิล	อาหารสัตว์	50	(MAPA, 1988)
สหภาพยุโรป	น้ำนม	0.05	(Regulation, (EU) 1881/2006)
	ข้าวโพดและข้าว	10	
อียิปต์	ข้าวโพด	10**	(FAO, 2004)
		20	
สวีเดน	อาหารสำหรับโคนม	1.5**	(FAO, 2004)
	เมล็ดธัญพืช	1**	
	อาหารสัตว์		

*ไม่โครกรัมต่อกิโลกรัม, **ปริมาณอะฟลาทอกซินปี 1 สูงสุด (ไม่โครกรัมต่อกิโลกรัม)

2.5 การป้องกันการเจริญของราและการกำจัดสารพิษจากรา

สารพิษจากราสามารถปนเปื้อนในผลผลิตทางการเกษตรที่จะนำมาเป็นอาหารคนและอาหารสัตว์ได้หลายชนิด และในอาหารคนและอาหารสัตว์มักมีการปนเปื้อนสารพิษจากรามากกว่า 1 ชนิด ซึ่งทำให้เกิดความเสียหายต่อคุณภาพสินค้าและสุขภาพของผู้บริโภคทั้งคนและสัตว์ การกำจัดสารพิษจากราที่ปนเปื้อนนี้ไม่สามารถกำจัดให้หมดไปได้ด้วยวิธีใดวิธีหนึ่ง เนื่องจาก สารพิษจากราสามารถปนเปื้อนได้จากทุกขั้นตอน ควรมีการเฝ้าระวังในทุกขั้นตอนการผลิต โดยวิธีการป้องกันการเจริญของราที่ผลิตสารพิษ จะช่วยลดการปนเปื้อนสารพิษจากราในอาหารคนและอาหารสัตว์ได้มากที่สุด (Tola และคณะ, 2016)

2.5.1 การป้องกันการเจริญของรา

เราสามารถเจริญและสร้างสารพิษจากราได้ในผลผลิตทางการเกษตร ตั้งแต่ขั้นตอนการเพาะปลูก การเก็บเกี่ยว จนถึงขั้นตอนการจัดเก็บผลผลิต ขึ้นอยู่กับภาวะแวดล้อม การเพาะปลูกที่เหมาะสมควรใช้หลักการปฏิบัติที่ดีทางการเกษตร (Good Agriculture Practices: GAPs) เป็นขั้นตอนสำคัญที่จะช่วยลดโอกาสการปนเปื้อนของราในผลผลิตทางการเกษตรได้ ตั้งแต่การจัดการแปลงปลูกที่เหมาะสม การเลือกเมล็ดที่นำมาเพาะปลูก ควรเป็นเมล็ดที่ปราศจากโรค เป็นเมล็ดที่สมบูรณ์ ด้านทานต่อสภาพอากาศระหว่างเพาะปลูกและไม่มีการปนเปื้อนของรา จะช่วยลดการปนเปื้อนของราในระหว่างกระบวนการเพาะปลูกได้ นอกจากนี้ ควรหว่านเมล็ดในวันที่สภาพอากาศเหมาะสม หลีกเลี่ยงวันที่อุณหภูมิสูงและภาวะแห้งแล้ง (Jard และคณะ, 2011) มีการเพาะปลูกที่เหมาะสม ทำได้โดยการกำจัดวัชพืช ปลูกพืชหมุนเวียน เช่น การปลูกมันฝรั่ง หลุมอัลฟัลฟา หรือผักอื่นๆ เพื่อลดการปนเปื้อนราในแหล่งเพาะปลูก การรดน้ำ การกำจัดแมลงที่เป็นพาหะของสปอร์รา เป็นต้น นอกจากนี้ ควรใช้หลักการปฏิบัติที่ดีในการจัดเก็บ (Good Storage Practices: GSPs) เพื่อจัดเก็บผลผลิตที่ได้จากการเก็บเกี่ยว ก่อนเก็บผลผลิตควรมีการคัดแยกผลผลิตที่ปนเปื้อนออกก่อน โรงเก็บที่เหมาะสมควรมีปริมาณความชื้นที่เหมาะสม (ไม่เกิน 15 เปอร์เซ็นต์) ปริมาณออกซิเจนไม่เกิน 1 เปอร์เซ็นต์ เก็บในที่อุณหภูมิต่ำ รักษาความสมบูรณ์ของผลผลิตทางการเกษตร ที่เก็บควรปิดมิดชิด ป้องกันแมลงและสัตว์ ไม่เก็บในปริมาณที่มากและระยะเวลาสั้นเกินไป เป็นต้น เพื่อลดความเสี่ยงในการปนเปื้อนราและการเจริญของราซึ่งเป็นสาเหตุของการปนเปื้อนสารพิษจากราต่อไปได้ (Kabak และคณะ, 2006)

เมื่อพบการปนเปื้อนราในผลผลิตทางการเกษตร วิธีการทางกายภาพ วิธีทางเคมี และวิธีทางชีวภาพ สามารถช่วยลดการปนเปื้อนของราในผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรทั้งก่อนและหลังเพาะปลูกได้ วิธีการทางกายภาพ เช่น การคัดเลือกเมล็ด การลอยตัวและความหนาแน่น (flotation and density segregation) เป็นวิธีที่สามารถคัดแยกเมล็ดที่ไม่สมบูรณ์ออกโดยใช้ความแตกต่างทางกายภาพของเมล็ดที่ไม่สมบูรณ์และเมล็ดที่สมบูรณ์ สามารถคัดแยกเมล็ดธัญพืชที่ปนเปื้อนและช่วยลดการปนเปื้อนไดออกซินิวาลีนอล ซีราลีโนน และอะฟลาทอกซิน ในเมล็ดธัญพืชได้ (Shetty และ Bhat, 1999) การล้างเมล็ดธัญพืช (washing) จะช่วยชะราและสารพิษจากราออกจากผิวของเมล็ดธัญพืชได้ (Sydenham และคณะ, 1995; Trenholm และคณะ, 1992) การสีเมล็ด (milling) เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ช่วยลดการปนเปื้อนสารพิษจากราในผลิตภัณฑ์อาหาร เช่น แป้งสาลี แป้งข้าวโพด ที่อาจปนเปื้อนสารพิษจากราที่มักพบอยู่บริเวณเปลือกเมล็ดธัญพืชได้ (Bennett และ Richard, 1996; Collins และ

Rosen, 1981) นอกจากนี้ การให้ความร้อน การให้ความเย็น การใช้คลื่นความถี่สูง คลื่นไมโครเวฟ การใช้ความดัน และการใช้แสงอัลตราไวโอเล็ต สามารถลดการปนเปื้อนของราหลังการเก็บเกี่ยวได้ โดยวิธีดังกล่าวจะส่งผลต่อเส้นใยและการสร้างสปอร์ของรา (Usall และคณะ, 2016) วิธีทางเคมีและ สารสกัดจากพืช เป็นอีกวิธีหนึ่งที่สามารถลดการปนเปื้อนของราได้ เช่น การใช้สารเคมีที่เป็นสารฆ่ารา การใช้สารออกซิไดซ์ กรดซัลฟูริก กรดไฮโดรคลอริก และสารเคมีอื่นๆ เช่น พอร์มาดีไฮด์ คลอรีน และ โซเดียมไบซัลเฟต เป็นต้น (Jard และคณะ, 2011) สารสกัดจากพืช เช่น หัวหอม อบเชย ยูจีนอล ตะไคร้ และสะระแหน่ สามารถใช้เป็นสารยับยั้งการเจริญของราได้ (Kabak และคณะ, 2006) สุดท้าย เป็นวิธีทางชีวภาพ คือ การใช้จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของรามารมาเป็นตัวควบคุม ทางชีวภาพในผลผลิตทางการเกษตร งานวิจัยของ Nourozian และคณะ (2006) *Streptomyces* sp. Strain 3 สามารถยับยั้งการเกิดโรค fusarium head blight (FHB) ของ *F. graminearum* ใน เมล็ดข้าวสาลีได้ดีที่สุดภายใน 21 วัน และทำให้ได้ผลผลิตของเมล็ดข้าวสาลีมากขึ้น Santos และ Marquina (2004) รายงานว่า *Pichia membranifaciens* CYC 1106 สามารถใช้เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพได้ เนื่องจาก สามารถต้านการเจริญของ *Botrytis cinerea* ในเมล็ดองุ่นแดงได้ดีในภาวะค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 4 และในอุณหภูมิสูงกว่า 25 องศาเซลเซียส โดยที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสสามารถยับยั้งการเจริญของราชนิดนี้ได้ถึง 70 เปอร์เซ็นต์ Dogi และคณะ (2015) รายงานว่า *L. rhamnosus* RC007 สามารถยับยั้งการเจริญของราที่สร้างสารพิษ ได้แก่ *A. fumigatus*, *A. flavus* และ *A. parasiticus* ในไซเลจข้าวโพด

2.5.2 การกำจัดสารพิษจากรา

การกำจัดสารพิษจากราด้วยวิธีทางเคมี เช่น การใช้กรด การใช้เบส การใช้ตัวออกซิไดส์ การใช้ตัวรีดิวซ์ การใช้สารประกอบคลอรีน และสารอื่นๆ (Kabak และคณะ, 2006) โดยสารเคมีที่ใช้จะต้องเปลี่ยนแปลงสารพิษจากราให้เป็นสารที่ไม่เกิดอันตรายต่อมนุษย์และสัตว์ ไม่ส่งผลต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์ ทั้งคุณค่าทางโภชนาการ เนื้อสัมผัส และรสชาติ ตัวอย่างสารเคมีที่ใช้ในการกำจัดสารพิษจากรา เช่น กรดซัลฟูริก กรดฟอสฟอริก แก๊สแอมโมเนีย แคลเซียมไฮดรอกไซด์ พอร์มาดีไฮด์ โซเดียมไบซัลเฟต โซเดียมไฮโปคลอไรต์ เป็นต้น (Pitt, 1990) จากงานวิจัยของ Pons และคณะ (1972) รายงานว่า เมื่อปรับในสารละลายที่มีอะฟลาทอกซินมีค่าความเป็นกรด-เบสต่ำลง โดยใช้กรดซัลฟูริก และทดสอบในอุณหภูมิ 40-100 องศาเซลเซียส พบว่า สามารถย่อยสลายอะฟลาทอกซินปี 1 และ อะฟลาทอกซินจี 1 ได้ นอกจากนี้ Mann และคณะ (1970) พบว่า แก๊สแอมโมเนีย เมทิลาไมน์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ และพอร์มาดีไฮด์ สามารถลดการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินใน

กากถั่วลิสงและกากเมล็ดฝ้ายได้ โดยประสิทธิภาพในการลดปริมาณอะฟลาทอกซินของสารเคมีเหล่านี้ขึ้นอยู่กับ เวลา อุณหภูมิ และปริมาณความชื้น เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Gardner และคณะ (1971) พบว่า การใช้แก๊สแอมโมเนียสามารถลดปริมาณการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินในกากถั่วลิสงและกากเมล็ดฝ้ายได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่สารเคมีส่วนใหญ่ที่ใช้ในการลดปริมาณการปนเปื้อนของสารพิษจากรา อาจทำให้คุณค่าทางโภชนาการของอาหารลดลงหรืออาจเปลี่ยนสารพิษจากราเป็นสารพิษอื่นๆ และปนเปื้อนในอาหารต่อไปได้ การใช้วิธีทางเคมีจึงมีข้อจำกัดของปริมาณความเข้มข้นในการใช้งาน และในบางประเทศ เช่น สหภาพยุโรป ไม่อนุญาตให้ใช้สารเคมีเพื่อลดการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆ (Kabak และคณะ, 2006)

วิธีทางกายภาพเป็นอีกวิธีหนึ่งที่สามารถกำจัดสารพิษจากราในผลผลิตทางการเกษตร ซึ่งวิธีทางกายภาพสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การคัดแยกผลผลิตทางการเกษตรที่ปนเปื้อนสารพิษจากราได้โดยใช้แสงอัลตราไวโอเล็ต ซึ่งตัวอย่างของผลผลิตทางการเกษตรที่ปนเปื้อนสารพิษจากราจะมีการเรืองแสง (Heathcote และ Hibbert, 1978; Pearson และคณะ, 2004; Scott, 2001) วิธีทางกายภาพยังสามารถทำลายสารพิษจากราที่ปนเปื้อนในผลผลิตทางการเกษตรและอาหารได้อีกด้วย เช่น การใช้ความร้อน สารพิษจากราส่วนใหญ่สามารถทนความร้อน (80-121 องศาเซลเซียส) ที่ใช้ในกระบวนการผลิตอาหารได้ ซึ่งประสิทธิภาพในการลดปริมาณสารพิษในอาหารขึ้นอยู่กับความชื้น ค่าความเป็นกรด-เบส ความแรงไอออนของอาหาร ชนิดและความเข้มข้นของสารพิษ รวมถึงอุณหภูมิ และระยะเวลาที่ได้รับความร้อน จากงานวิจัยของ Scott (1998) รายงานว่า วิธีทางกายภาพ ได้แก่ การคัดเลือกและการคัดแยกวัตถุดิบอาหารสัตว์ที่ปนเปื้อน และการให้ความร้อน (150-200 องศาเซลเซียส) สามารถกำจัดสารพิษจากราที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหารสัตว์ได้ Cazzaniga และคณะ (2001) ทดสอบการให้ความร้อนสูงในระยะสั้น (150-180 องศาเซลเซียส) กับตัวอย่างเมล็ดข้าวโพด พบว่า สามารถลดปริมาณไดออกซีนิวาลินอลในตัวอย่างแบ่งข้าวโพดได้สูงกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ แต่สามารถลดปริมาณอะฟลาทอกซินได้เพียงเล็กน้อย นอกจากนี้ การฉายรังสีเป็นอีกหนึ่งวิธีทางกายภาพที่ช่วยกำจัดสิ่งมีชีวิตอื่นๆ เช่น รา แมลง หนู เป็นต้น ที่ทำให้เกิดความเสียหายต่อผลิตภัณฑ์ได้โดยไม่ใช้ความร้อน Shantha และ Sreenivasa Murthy (1977) พบว่า รังสีอัลตราไวโอเล็ตสามารถทำลายโครงสร้างของอะฟลาทอกซินที่ปนเปื้อนในน้ำมันถั่วลิสงได้ถึง 40-45 เปอร์เซ็นต์ภายในเวลา 2 ชั่วโมง เช่นเดียวกับรายงานของ Ozer และ Altuğ (1995) พบว่า พลังงานแสงอาทิตย์สามารถทำลายอะฟลาทอกซินปี 1 ที่ปนเปื้อนในน้ำมันมะพร้าวได้ถึง 70 เปอร์เซ็นต์

วิธีลดปริมาณสารพิษจากราในอาหารคนและอาหารสัตว์ด้วยวิธีทางชีวภาพเป็นวิธีที่ได้รับการสนใจ เนื่องจาก การใช้วิธีทางกายภาพและวิธีทางเคมีในการกำจัดราและสารพิษจากราในผลผลิตทางการเกษตรต่างๆ มีข้อจำกัดหลายประการและอาจส่งผลกระทบต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์ เช่น การสูญเสียคุณค่าทางโภชนาการ มีสารเคมีตกค้าง รวมถึงมีค่าใช้จ่ายที่สูง (Kabak และคณะ, 2006; Reddy และคณะ, 2010) ซึ่งวิธีทางชีวภาพเป็นวิธีที่มีความปลอดภัยและไม่ทำลายคุณค่าทางโภชนาการของอาหาร (Kumar และคณะ, 2013) เช่น การใช้สารที่จุลินทรีย์ผลิต ได้แก่ เอนไซม์หรือสารประกอบอื่นๆ (Alberts และคณะ, 2006; Lu และคณะ, 2013; Sangmanee และ Hongpattarakere, 2014; Teniola และคณะ, 2005) โดยสารเหล่านี้ต้องมีการตรวจสอบความปลอดภัยและการส่งผลกระทบต่อคุณค่าทางอาหารเมื่อใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร (EFSA, 2009) และยังมีการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์และการใช้จุลินทรีย์เป็นตัวดูดซับ จากรายงานของ Stiles และ Bullerman (2002) พบว่า *L. rhamnosus* สามารถยับยั้งการเจริญและการผลิตฟูโมนิซินบี 1 ฟูโมนิซินบี 2 ของ *F. proliferatum*, *F. verticillioides* และ *F. graminearum* ได้มากกว่า 63.2 และ 43.4 เปอร์เซ็นต์ และยับยั้งการผลิตไดออกซินิวาลีนอลและซีราลีโนนได้มากกว่า 92 เปอร์เซ็นต์ และ 87.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เช่นเดียวกับงานวิจัยของ El-Nezami และคณะ (1998) รายงานว่า *L. rhamnosus* strain GG และ *L. rhamnosus* strain LC-705 สามารถกำจัดอะฟลาทอกซินบี 1 ที่ปนเปื้อนในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลาไม่ถึง 1 ชั่วโมง นอกจากนี้ Patharajan และคณะ (2011) ได้ศึกษาการย่อยสลายโอคราทอกซินเอโดย *M. pulcherrima* (MACH1) พบว่า ยีสต์สามารถย่อยสลายโอคราทอกซินเอได้มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใน 15 วัน โดยสารที่ได้จากการย่อยสลายไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษ และยังมีกลไกในการดูดซับสารพิษด้วยผนังเซลล์ยีสต์

2.6 การควบคุมทางชีวภาพ

การควบคุมทางชีวภาพ (biocontrol) คือ การใช้สิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งควบคุมสิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่ง เป็นการใช้พืช สัตว์ หรือสารที่สิ่งมีชีวิตผลิต รวมถึงจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่างๆ ด้วย (Druvefors, 2004) ในปัจจุบัน ได้นำประโยชน์ของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มาใช้เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพเพื่อควบคุมการเจริญและการผลิตสารพิษจากราแทนการใช้วิธีทางเคมี และวิธีทางกายภาพ ที่อาจมีข้อจำกัดและอาจก่อให้เกิดความเสียหายต่อคุณภาพของผลผลิตทางการเกษตร นอกจากการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์จะมีประสิทธิภาพในการควบคุมราและสารพิษจากราแล้ว ยังมีความปลอดภัยต่อมนุษย์และสัตว์อีกด้วย จุลินทรีย์หลายชนิดมีความสามารถเป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ได้ เช่น แบคทีเรีย รา และยีสต์ เป็นต้น โดยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เหล่านี้มีกลไกที่หลากหลาย เช่น การแย่งสารอาหารและพื้นที่ในการเจริญของรา

การเป็นปรสิต การเหนี่ยวนำให้พืชมีความต้านทาน การผลิตเมแทบอไลต์ เช่น เอนไซม์ สารปฏิชีวนะ เป็นต้น (Janisiewicz และ Korsten, 2002; Sharma และคณะ, 2009) การใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมการเจริญของราก่อโรค เช่น งานวิจัยของ Obagwu และ Korsten (2003) รายงานว่า *Bacillus subtilis* F1 สามารถยับยั้งการเจริญของ *P. digitatum* และ *P. italicum* ซึ่งเป็นราก่อโรคในมะนาว และสามารถยับยั้งการเจริญของราก่อโรคได้อย่างสมบูรณ์เมื่อใช้ร่วมกับการล้างเมล็ดด้วยน้ำร้อนและโซเดียมไบคาร์บอเนต งานวิจัยของ Guijarro และคณะ (2007) พบว่า *P. frequentans* สามารถยับยั้งการเกิดโรคราสน้ำตาลจาก *Monilinia* sp. ในลูกพีชได้ และมีประสิทธิภาพดีกว่าการใช้สารฆ่ารา และงานวิจัยของ Fan และ Tian (2001) พบว่า *Cryptococcus albidus* สามารถยับยั้ง *B. cinerea* และ *P. expansum* ที่ก่อโรคในแอปเปิ้ลได้ Hamed และคณะ (2011) รายงานว่า *Lactobacillus* sp. สามารถยับยั้งการเจริญของ *F. oxysporem* ในต้นมะเขือเทศได้ และช่วยส่งเสริมการเจริญของต้นมะเขือเทศอีกด้วย และจุลินทรีย์ปฏิปักษ์สามารถยับยั้งการผลิตสารพิษได้เช่นกัน Morales และคณะ (2008) รายงานว่า *M. pulcherrima* AL27 สามารถยับยั้งการเจริญและการผลิตพาทูลินของ *P. expansum* ในแอปเปิ้ลได้ ดังนั้น การควบคุมทางชีวภาพโดยใช้จุลินทรีย์ที่เป็นปฏิปักษ์จึงเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพและได้รับการยอมรับ โดยสามารถใช้ควบคุมได้ทั้งก่อนและหลังการเก็บเกี่ยว (Janisiewicz และ Korsten, 2002) โดยเฉพาะ แล็กติกแอซิดแบคทีเรีย และยีสต์ ที่ใช้เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพสามารถยับยั้งการเจริญและการสร้างสารพิษจากราได้ และมีความปลอดภัยกับมนุษย์และสัตว์ (Shetty และ Jespersen, 2006)

2.7 การควบคุมทางชีวภาพโดยใช้ยีสต์

2.7.1 ยีสต์กับการยับยั้งการเจริญของรา

ยีสต์เป็นหนึ่งในจุลินทรีย์ที่นิยมใช้เป็นตัวควบคุมชีวภาพ เนื่องจากยีสต์มีสมบัติในการอยู่รอดได้ในภาวะแวดล้อมที่หลากหลาย เป็นจุลินทรีย์ที่พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ ทนต่อภาวะแวดล้อมเจริญเติบโตได้เร็ว ต้องการสารอาหารที่ง่ายและราคาถูก (Bleve และคณะ, 2006; Parafati และคณะ, 2015; Zhu และคณะ, 2015) นอกจากนี้ ยีสต์ยังเป็นจุลินทรีย์ที่ไม่สร้างสปอร์ที่ก่อให้เกิดการแพ้ ไม่สร้างสารพิษ และสามารถผลิตสารต้านแบคทีเรียได้ ไม่เป็นอันตรายกับสิ่งแวดล้อม ไม่ก่อให้เกิดโรคในพืช ไม่ผลิตสารที่เป็นอันตรายกับมนุษย์ และยีสต์ส่วนใหญ่ไม่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อของมนุษย์ (Droby และ Chalutz, 1994) นอกจากนี้ ยีสต์บางชนิดสามารถเจริญในที่ที่มีออกซิเจนน้อย ค่าความเป็นกรด-เบสต่ำ และสามารถใช้แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนได้หลากหลาย ซึ่งเป็นภาวะของกระบวนการหมักไซเลจ ยีสต์จึงสามารถใช้เป็นตัวควบคุมในกระบวนการเก็บรักษาผลผลิตทางการ

เกษตร กระบวนการหมักไซเลจ และใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารคนและสัตว์ได้ (Niba และคณะ, 2014) ปัจจัยที่มีผลต่อการควบคุมราโดยยีสต์ ได้แก่ สารอาหาร อุณหภูมิ ปริมาณหัวเชื้อตั้งต้น ค่าความเป็นกรด-เบส ความชื้น และปริมาณออกซิเจน (Medeiros และคณะ, 2012)

ยีสต์ปฏิภักษ์สามารถใช้เป็นตัวควบคุมราผลิตสารพิษที่ปนเปื้อนในผลผลิตทางการเกษตรได้ จากงานวิจัยก่อนหน้านี้ Armando และคณะ (2013) พบว่า *S. cerevisiae* RC008 และ RC016 ยับยั้งการเจริญและการผลิตโอคราทอกซินเอ ซีราลีโนน และดีออกซีนิวาลินอลของ *A. carbonarius* และ *F. gramineorum* ได้ในภาวะที่แตกต่างกัน และงานวิจัยก่อนหน้านี้หลายฉบับพบว่า ยีสต์สามารถผลิตสารที่มีความสามารถในการยับยั้งราและสารพิษจากราได้ Repečkienė และคณะ (2013) พบว่า *S. cerevisiae*, *Geotrichum fermentans*, *K. marxianus* และ *M. pulcherrima* มีประสิทธิภาพในการลดปริมาณสารพิษจากราในแป้งสาลีได้ดีกว่าตัวอย่างชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมยีสต์ Medina-Córdova และคณะ (2016) รายงานว่า ยีสต์สายพันธุ์ *D. hansenii* มีกลไกในการยับยั้งการเจริญของ *Mucor circinelloides*, *Aspergillus* sp., *F. proliferatum* และ *F. subglutinans* ในเมล็ดข้าวโพดได้ และสามารถลดการผลิตสารฟูโมนิซินจาก *F. subglutinans* ได้โดยไม่ส่งผลกระทบต่อองค์ประกอบทางเคมีและแร่ธาตุของเมล็ดข้าวโพด Petruzzi และคณะ (2013) ทดสอบประสิทธิภาพของ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ W47 และ Y28 ในการลดปริมาณโอคราทอกซินเอที่ปนเปื้อนในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวในภาวะแวดล้อมต่างๆ พบว่า ยีสต์สามารถลดการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอได้ดีที่สุดเท่ากับ 42.01 และ 36.96 เปอร์เซ็นต์ สำหรับ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ W47 และ Y28 ตามลำดับ นอกจากนี้ ยีสต์ปฏิภักษ์สามารถใช้เป็นตัวควบคุมราที่ผลิตอะฟลาทอกซินในผลผลิตทางการเกษตรได้อีกด้วย Armando และคณะ (2012a) พบว่า *S. cerevisiae* RC008 และ RC016 มีความสามารถในการเป็นจุลินทรีย์ปฏิภักษ์ได้ในภาวะความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 4 และ *S. cerevisiae* RC008 ยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 ของ *A. paraciticus* ได้ดีในทุกภาวะทดสอบเมื่อเทียบกับชุดควบคุม

ยีสต์สามารถยับยั้งการเจริญของราและสารพิษจากราโดยอาศัยกลไกในการควบคุมหลายรูปแบบ เช่น การแข่งขันเพื่อแย่งพื้นที่และสารอาหารเป็นกลไกแรกของยีสต์ในการยับยั้งการเจริญของรา เนื่องจาก ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่เจริญเติบโตได้ง่าย เพิ่มจำนวนได้รวดเร็ว สามารถเจริญได้ในแหล่งอาหารที่หลากหลาย ทำให้ยีสต์สามารถนำสารอาหารไปใช้ได้รวดเร็วกว่ารา ยีสต์บางชนิดสามารถผลิตไบโอฟิล์มเพื่อแย่งพื้นที่ของราในการเจริญได้อีกด้วย (Li และคณะ, 2008; Spadaro และ Droby, 2016) และยังสามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของราและการผลิตสารพิษจากราได้ เช่น

เอนไซม์ และสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่าย นอกจากนี้ ยีสต์สามารถลดการปนเปื้อนของสารพิษจากราด้วยวิธีการดูดซับสารพิษโดยอาศัยองค์ประกอบของผนังเซลล์

การแย่งชิงพื้นที่และสารอาหารสำหรับการเจริญเป็นกลไกสำคัญของยีสต์ปฏิปักษ์ที่ใช้ยับยั้งการเจริญของรา เมื่อยีสต์ใช้สารอาหารในการเจริญได้หลากหลาย ทนต่อภาวะแวดล้อมได้ดี และสามารถเพิ่มจำนวนได้รวดเร็ว และราเป็นจุลินทรีย์ที่เจริญได้ช้าและมีความต้านทานต่ำกว่ายีสต์ ทำให้ยีสต์มีความสามารถในการแย่งชิงสารอาหารและพื้นที่ในการเจริญของราได้ (Spadaro และคณะ, 2002) จากงานวิจัยของ Qin และคณะ (2004) รายงานว่า *Cryptococcus laurentii* และ *Rhodotorula glutinis* สามารถลดการเกิดโรคในผลเชอร์รี่ของ *Penicillium* จากทั้งหมด 100 เปอร์เซ็นต์ เหลือเพียง 20 เปอร์เซ็นต์ และพบว่ายีสต์ทั้ง 2 ชนิดสามารถเจริญบนบาดแผลของผลเชอร์รี่ได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งสามารถแย่งพื้นที่และอาหารในการเจริญของราได้ เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Blevé และคณะ (2006) ได้ศึกษาความสามารถของยีสต์หลายชนิดในการต้าน *A. carbonarius* และ *A. niger* ที่สร้างสารพิษได้บนเมล็ดองุ่น พบว่า *Issatchenkia terricola* มีประสิทธิภาพในการต้านรามากที่สุด โดยตั้งสมมติฐานว่า การแข่งขันเพื่อแย่งพื้นที่ในการเจริญของราอาจเป็นปัจจัยหนึ่งของยีสต์ปฏิปักษ์ดังกล่าว Zhu และคณะ (2015) พบว่า *S. cerevisiae* M114 สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. carbonarius* และ *A. ochraceus* ได้ 80 และ 40 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้ ยีสต์สามารถยับยั้งการเจริญของราได้ดีเมื่อเลี้ยงราร่วมกับยีสต์มีชีวิต และยีสต์สามารถเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วภายใน 72 ชั่วโมง ผู้วิจัยจึงรายงานว่า การแย่งพื้นที่และอาหารในการเจริญอาจเป็นปัจจัยหนึ่งในการยับยั้งรา Spadaro และคณะ (2002) พบว่า *M. pulcherrima* สามารถลดการเจริญของ *B. cinerea* และ *P. expansum* ในบาดแผลของแอปเปิ้ลได้ โดยการแย่งพื้นที่และอาหารในการเจริญอาจเป็นกลไกหนึ่งในการยับยั้งราดังกล่าว งานวิจัยของ Zhang และคณะ (2011) พบว่า *P. guilliermondii* M8 สามารถยับยั้งการเจริญของ *B. cinerea* ได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อผสมน้ำแอปเปิ้ลและในบาดแผลบนผลแอปเปิ้ล โดยสามารถยับยั้งราดังกล่าวได้ดีเมื่อเติม 1 เปอร์เซ็นต์ กลูโคส ซูโครส และฟรุกโทส หรือแหล่งไนโตรเจนอื่นๆ และงานวิจัยของ Chanchaichaovivat และคณะ (2008) รายงานว่า *P. guilliermondii* R13 สามารถยับยั้ง *Colletotrichum capsici* ที่ก่อในเกิดโรคแอนแทรกคโนส (anthracnose) ในพริก และสามารถยับยั้งการเจริญของราและการสร้างสปอร์ได้อย่างสมบูรณ์เมื่อเติมกลูโคส 0.05 เปอร์เซ็นต์ ซูโครส 0.05 เปอร์เซ็นต์ หรือ แหล่งไนโตรเจน 1 เปอร์เซ็นต์ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Bautista-Rosales และคณะ (2013) พบว่า *Meyerozyma caribbica* สามารถยับยั้ง *C. capsici* ที่ก่อในเกิดโรคแอนแทรกคโนสในมะม่วงได้เช่นกัน มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ

86.7 เปอร์เซ็นต์ โดยกลไกการแย่งชิงสารอาหารได้แก่ ซูโครส และฟรุกโทส สามารถแย่งชิงพื้นที่ในการเจริญและเกิดภาวะปรสิตราก่อโรคได้อีกด้วย แต่การยับยั้งการเจริญของราด้วยกลไกของยีสต์ในการแย่งชิงอาหารและพื้นที่ในการเจริญ เป็นเพียงการยับยั้งไม่ให้เกิดการเจริญมากยิ่งขึ้นแต่อาจมีการปนเปื้อนของราในพืชผลทางการเกษตรได้อยู่ ซึ่งยีสต์ยังมีกลไกอื่นๆ ในการลดการปนเปื้อนของราและสารพิษจากราได้อีกหลายวิธี (Janisiewicz และคณะ, 2000; Spadaro และ Droby, 2016)

ยีสต์มีความสามารถในการผลิตไบโอฟิล์มซึ่งเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตออกมานอกเซลล์เพื่อยึดเกาะพื้นผิว ครอบคลุมพื้นผิวเพื่อทำให้เกิดภาวะที่เหมาะสมในการเจริญ ทำให้ยีสต์สามารถยึดครองพื้นที่เพื่อใช้สารอาหาร มีการแสดงออกของยีน และปกป้องเซลล์ให้ทนต่อภาวะเครียด นอกจากนี้ การครอบคลุมพื้นที่ของยีสต์โดยการผลิตไบโอฟิล์มยังสามารถเป็นกลไกในการแย่งพื้นที่ในการเจริญของราก่อโรคต่างๆ บนพื้นผิวของผลไม้ เพื่อแย่งชิงสารอาหารและอยู่ในภาวะปรสิตรได้ (Spadaro และ Droby, 2016) Parafati และคณะ (2015) ศึกษาความสามารถในการต้าน *B. cinerea* ของ *S. cerevisiae*, *W. anomalus*, *M. pulcherrima* และ *A. pullulans* พบว่า *M. pulcherrima* และ *W. anomalus* สามารถผลิตไบโอฟิล์มและมีความสามารถในการยึดเกาะบาดแผลได้ดี และ *S. cerevisiae* สามารถยึดเกาะกับพื้นผิวได้น้อยและไม่สามารถผลิตไบโอฟิล์มได้ แตกต่างกับงานวิจัยของ Scherm และคณะ (2003) ที่รายงานว่า *S. cerevisiae* มีประสิทธิภาพในการผลิตไบโอฟิล์มที่มีความสามารถในการลดการปนเปื้อนของรา *P. expansum* ที่ก่อให้เกิดโรคในแอปเปิ้ลบริเวณบาดแผลของผลแอปเปิ้ลระหว่างการเก็บรักษาได้ นอกจากนี้ Giobbe และคณะ (2007) ได้ศึกษาความสามารถของไบโอฟิล์มที่ผลิตโดย *P. fermentans* ในการต้าน *Monilinia fructicola* บนผลแอปเปิ้ล พบว่า ยีสต์ดังกล่าวสามารถสร้างไบโอฟิล์มที่ผิวของผลแอปเปิ้ลได้ และสามารถเจริญและผลิตไบโอฟิล์มทั่วบริเวณเนื้อของแอปเปิ้ลที่เกิดบาดแผลได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของ *M. fructicola* ได้สมบูรณ์ งานวิจัยของ Bautista Bautista-Rosales และคณะ (2013) พบว่า นอกจากยีสต์ *M. caribbica* จะสามารถยับยั้ง *C. capsici* ที่ก่อให้เกิดโรคแอนแทรคโนสในมะม่วงได้โดยกลไกการแย่งชิงสารอาหารแล้ว ยังสามารถผลิตไบโอฟิล์มเพื่อใช้ในการยึดเกาะพื้นผิวเพื่อแย่งชิงพื้นที่ในการเจริญของราได้อย่างรวดเร็ว และเกิดภาวะปรสิตราก่อโรคได้ Pu และคณะ (2014) รายงานว่า *Kloeckera apiculata* มีความสามารถในการผลิตไบโอฟิล์มปล่อยออกมานอกเซลล์ ช่วยในการยึดเกาะพื้นผิวของส้ม และช่วยเป็นเกาะป้องกันระหว่างบาดแผลของส้มกับราก่อโรค

ยีสต์สามารถผลิตสารเมแทบอลิต์ที่ใช้เป็นสารต้านราได้หลายชนิด เช่น สารประกอบอินทรีย์ระเหยง่าย (volatile organic compound) สารประกอบเพปไทด์ และเอนไซม์ เป็นต้น ประสิทธิภาพในการผลิตสารเมแทบอลิต์ที่ต้านราได้ของยีสต์ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น สายพันธุ์ของยีสต์ สารอาหาร รวมถึงภาวะในการเจริญ ค่าความเป็นกรด-เบส อุณหภูมิ ระยะเวลาในการบ่ม ปริมาณของยีสต์และปริมาณของเมแทบอลิต์ที่ยีสต์ผลิต เป็นต้น (Di Francesco และคณะ, 2015; Parafati และคณะ, 2015) โดยสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายเป็นสารที่มีความเป็นขี้้นน้อย มีน้ำหนักโมเลกุลน้อย และมีความดันไอสูง มีประสิทธิภาพในการเป็นตัวควบคุมชีวภาพและใช้เป็นสารต้านราในพืชและผลผลิตทางการเกษตรได้ (Huang และคณะ, 2011) Etschmann และคณะ (2003) รายงานว่า *K. marxianus* สามารถผลิต 2-ฟีนิลเอทานอล (2 phenylethanol) โดยใช้กากน้ำตาลเป็นคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส Hua และคณะ (2014) พบว่า *P. anomala* WRL-076 สามารถผลิต 2-ฟีนิลเอทานอล ที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญ การสร้างสปอร์ การผลิตสารพิษ และการแสดงออกของยีนของ *A. flavus* เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Liu และคณะ (2014) ทดสอบกลไกของ *Kloeckera apiculata* ในการยับยั้ง *P. digitatum* และ *P. italicum* ที่ก่อโรคในส้ม พบว่า ยีสต์ดังกล่าวสามารถผลิต 2-ฟีนิลเอทานอล ซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งราได้ นอกจากนี้ Masoud และคณะ (2005) รายงานว่า *P. anomala*, *P. kluyveri* และ *Hanseniaspora uvarum* สามารถผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายที่ได้แก่ สารในกลุ่มเอสเทอร์และแอลกอฮอล์ โดยพบว่า 2-ฟีนิลเอทิลอะซิเตท สามารถยับยั้ง *A. ochraceus* ได้อย่างสมบูรณ์และสามารถลดปริมาณการผลิตโอคราทอกซินเอได้อีกด้วย Oro และคณะ (2018) พบว่า เอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) เป็นสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายที่ผลิตโดย *W. anomalus*, *M. pulcherrima* และ *S. cerevisiae* ซึ่งมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *B. cinerea* ได้อย่างสมบูรณ์ Parafati และคณะ (2015) ศึกษากลไกของ *S. cerevisiae*, *W. anomalus*, *M. pulcherrima* และ *A. pullulans* ในการยับยั้ง *B. cinerea* ที่ก่อโรคในองุ่น พบว่า *S. cerevisiae*, *W. anomalus* และ *M. pulcherrima* สามารถผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายที่สามารถยับยั้งการเจริญของราได้ทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อและเมล็ดองุ่น Zhang และคณะ (2017b) รายงานว่า สารอินทรีย์ระเหยง่ายที่ผลิตโดย *P. membranaefaciens* และ *K. apiculata* สามารถยับยั้งการสร้างสปอร์และเส้นใยของ *M. fructicola* ได้ทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อและในผลพลัม นอกจากนี้ Zhu และคณะ (2015) รายงานว่า *S. cerevisiae* สามารถยับยั้งการเจริญของรา *A. ochraceus* ได้ โดยสันนิษฐานว่ายีสต์ดังกล่าวมีกลไกในการผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายในการยับยั้งรา เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Fialho และคณะ

(2009) พบว่า *S. cerevisiae* สามารถยับยั้งการเจริญของราก่อโรคในส้มได้ถึง 87.2 เปอร์เซ็นต์ โดยการผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่าย ได้แก่ สารในกลุ่มแอลกอฮอล์ และกลุ่มเอสเทอร์ Medina-Córdoba และคณะ (2016) รายงานว่า *D. hansenii* สามารถยับยั้งการสร้างเส้นใยของ *Mucor circinelloides*, *Aspergillus* sp., *F. proliferatum* และ *F. subglutinans* ในเมล็ดข้าวโพดได้ และทำให้เกิดการก่อโรคของราดังกล่าวช้าลง 24 ชั่วโมง โดยสันนิษฐานว่า ยีสต์ดังกล่าวมีกลไกในการผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายและสารประกอบอื่นๆ ออกมานอกเซลล์

เอนไซม์ที่ยีสต์ผลิตก็มีความสามารถในการต้านราและการผลิตสารพิษจากราได้ Chanchaichaovivat และคณะ (2008) รายงานว่า *P. guilliermondii* สามารถยับยั้ง *C. capsici* ที่ก่อโรคแอนแทรคโนสในพริกได้หลายกลไก ซึ่งการผลิตเอนไซม์ไคติเนส และบีตา-1,3-กลูคาเนส เป็นหนึ่งในกลไกสำคัญที่สามารถย่อยผนังเซลล์ของราได้ ทำให้ราไม่สามารถสร้างเส้นใยได้ Friel และคณะ (2007) ได้ทดสอบยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์บีตา-1,3-กลูคาเนสของ *P. anomala* K พบว่า เอนไซม์นี้เป็นกลไกหลักที่ทำให้ *P. anomala* K สามารถยับยั้ง *B. cinerea* ได้ และพบว่า สายพันธุ์ที่ไม่มียีนควบคุมการผลิตเอนไซม์ดังกล่าวมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของราลดลง ดังนั้น จึงยืนยันได้ว่า เอนไซม์ดังกล่าวเป็นกลไกของยีสต์ในการยับยั้งการเจริญของรา ต่อมา Bautista-Rosales และคณะ (2013) พบว่า *M. caribbica* สามารถผลิตเอนไซม์ เช่น ไคติเนส, เอ็น-อะเซทิล-บีตา-ดี-กลูโคซามินิเดส และบีตา-1,3-กลูคาเนส ซึ่งทำให้เส้นใยของราเจริญผิดปกติและยับยั้งการเจริญของ *C. gloeosporioides* Lima และคณะ (2013) ศึกษาการยับยั้ง *C. gloeosporioides* ที่ก่อโรคแอนแทรคโนสในมะละกอ โดยยีสต์ *W. anomalus* 442 และ *M. guilliermondii* 443 พบว่า ยีสต์สามารถสร้างเอนไซม์ไคติเนส และบีตา-1,3-กลูคาเนส ซึ่งทำให้เกิดความเสียหายของเส้นใยและผนังเซลล์ราที่เกิดจากการแทรกซึมของยีสต์ เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Parafati และคณะ (2015) พบว่า *A. pullulans* และ *W. anomalus* สามารถสร้างเอนไซม์บีตา-1,3-กลูคาเนส ซึ่งมีสมบัติในการย่อยองค์ประกอบของผนังเซลล์ของ *B. cinera* ที่ทำให้เกิดโรคก้านเน่าในองุ่น นอกจากนี้ Zhang และคณะ (2017a) รายงานว่า *P. membranaefaciens* และ *Kloeckera apiculata* สามารถควบคุม *M. fructicola* ที่ก่อโรคในลูกพลัมได้โดยสร้างเอนไซม์ไคติเนส และบีตา-1,3-กลูคาเนส

2.7.2 ยีสต์กับการลดหรือกำจัดสารพิษจากรา

ยีสต์ปฏิปักษ์มีความสามารถในการลดหรือกำจัดสารพิษจากราได้โดยกลไกการย่อยสลายสารพิษจากราและการดูดซับสารพิษโดยใช้ผนังเซลล์

ยีสต์มีความสามารถในการลดสารพิษจากราได้โดยการย่อยสลายสารพิษจากรา Peteri และคณะ (2007) พบว่า *Phaffia rhodozyma* และ *Xanthophyllomyces dendrorhous* สามารถลดโอคราทอกซินเอในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ โดยการสร้างเอนไซม์คาร์บอกซีเพปติเดส (carboxypeptidase) ซึ่งสามารถเปลี่ยนโอคราทอกซินเอให้เป็นโอคราทอกซินแอลฟา (ochratoxin α) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของโอคราทอกซินที่มีความเป็นพิษน้อยกว่าโอคราทอกซินเอ Patharajan และคณะ (2011) ศึกษาความสามารถในการย่อยสลายโอคราทอกซินของยีสต์ *M. pulcherrima* MACH1, *P. guillieumonodii* M8 และ *R. erythropolis* AR14 ในภาวะต่างๆ พบว่า *M. pulcherrima* MACH1 สามารถย่อยสลายโอคราทอกซินเอได้มากที่สุด (มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในเวลา 15 วัน เมื่อเทียบกับยีสต์ชนิดอื่น และพบว่า ยีสต์ดังกล่าวมีกลไกในการดูดซับโอคราทอกซินได้เล็กน้อยเท่านั้น จึงสันนิษฐานว่า ยีสต์อาจผลิตเอนไซม์ในการย่อยสลายสารพิษดังกล่าวได้ นอกจากนี้ Zhang และคณะ (2017b) รายงานว่า *C. podzolicus* มีกลไกอื่นในการลดปริมาณซิทรินิน (citrinin) นอกจากกลไกการดูดซับด้วยผนังเซลล์ยีสต์ ยีสต์ดังกล่าวสามารถผลิตเอนไซม์ภายในเซลล์เพื่อย่อยสลายซิทรินินให้เปลี่ยนเป็นสารที่มีความเป็นพิษต่ำกว่า โดยมีเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายเท่ากับ 98 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งกลไกในการย่อยสลายสารพิษจากราขึ้นอยู่กับปัจจัย ได้แก่ ชนิดของสารอาหาร ความเข้มข้นของยีสต์ อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-เบส และปริมาณความเข้มข้นเริ่มต้นของสารพิษที่ปนเปื้อน

นอกจากยีสต์จะสามารถย่อยสลายสารพิษจากราเพื่อลดปริมาณการปนเปื้อนและความเป็นพิษของสารพิษจากราแล้ว ผนังเซลล์ของยีสต์บางชนิดมีความสามารถในการดูดซับสารพิษจากราได้ ซึ่งเป็นกลไกที่ช่วยลดปริมาณการปนเปื้อนสารพิษจากรา Bejaoui และคณะ (2004) ทดสอบประสิทธิภาพในการกำจัดโอคราทอกซินเอในอาหารต่างๆ ของยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces* ที่มีชีวิตและไม่มีชีวิต (ให้ความร้อนและกรด) พบว่า ยีสต์ที่ผ่านการให้ความร้อนและกรดมีประสิทธิภาพในการดูดซับโอคราทอกซินเอมากกว่ายีสต์ที่มีชีวิต และมีประสิทธิภาพในการดูดซับสารพิษมากขึ้นเมื่อความเข้มข้นของยีสต์มากขึ้นและเลี้ยงในอาหารที่มีค่าความเป็นกรด-เบสต่ำ โดยยีสต์ไม่มีชีวิตสามารถดูดซับโอคราทอกซินเอได้ประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 5 นาที และคงการดูดซับไว้ได้ถึง 72 ชั่วโมง เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Peteri และคณะ (2007) พบว่า *P. rhodozyma* และ *X. dendrorhous* ที่มีชีวิตและเซลล์ยีสต์ที่ได้รับความร้อนสามารถลดโอคราทอกซินเอในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ โดยการให้ความร้อนจะทำให้ยีสต์มีประสิทธิภาพในการดูดซับโอคราทอกซินเอได้มากยิ่งขึ้น Gil-Serna และคณะ (2011) รายงานว่า ผนังเซลล์ของ *D. hansenii* CYC 1244

สามารถดูดซับโอคราทอกซินเอได้ 98 เปอร์เซ็นต์ ที่ค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 3 Shetty และคณะ (2007) รายงานว่า *S. cerevisiae* มีความสามารถดูดซับอะฟลาทอกซินบี 1 ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ได้แก่ ระยะในการเจริญของยีสต์ ความเข้มข้นของสารพิษ อุณหภูมิ ชนิดของยีสต์ นอกจากนี้ยังพบว่าการให้ความร้อนและการเติมกรดทำให้ *S. cerevisiae* มีประสิทธิภาพในการดูดซับอะฟลาทอกซินได้ดียิ่งขึ้น Armando และคณะ (2012b) พบว่า ความหนาของเส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์และความหนาของผนังเซลล์ที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้ผนังเซลล์ของ *S. cerevisiae* มีความสามารถในการจับกับสารพิษได้มากยิ่งขึ้น Fiori และคณะ (2014) พบว่า *C. intermedia* 253, *L. thermotolerans* 751 และ *C. friedrichii* 778 สามารถลดปริมาณของโอคราทอกซินเอจากน้ำองุ่นได้ และพบว่า การให้ความร้อนจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการจับกับโอคราทอกซินเอได้ ยีสต์มีกลไกในการจับสารพิษที่บริเวณผนังเซลล์ได้แก่ บริเวณพอลิแซ็กคาไรด์ (กลูแคน แมนแนน) เพปทิโดไกลแคน โพรตีน และไขมัน โดยจับด้วยพันธะไฮโดรเจน พันธะไอออนิก หรือเกิดแรงดึงดูดของโมเลกุลที่ไม่ชอบน้ำ ซึ่งการให้ความร้อนและการเติมกรด จะทำให้ผนังเซลล์ของยีสต์มีประสิทธิภาพในการดูดซับสารพิษได้มากขึ้น เนื่องจากการให้ความร้อนและการเติมกรดจะทำลายส่วนของโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์และย่อยพันธะไกลโคซิดิกที่เป็นพันธะที่เชื่อมหน่วยย่อยของพอลิแซ็กคาไรด์ ทำให้เพิ่มพื้นที่ผิวและส่วนที่จับกับสารพิษได้มากขึ้น (Bejaoui และคณะ, 2004)

2.7.3 *Wickerhamomyces anomalus* และ *Kluyveromyces marxianus*

W. anomalus (*Pichia anomala*, *Hansenula anomala*, *Willia anomala*, *Endomyces anomalus*) เป็นยีสต์ที่จัดอยู่ในไฟลัม Ascomycota มีโคลนีสีครีม รูปร่างแบน เรียบ มีความหลากหลายทางสัณฐานวิทยา สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อ (budding) และสร้างเส้นใยเทียม และสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยการสร้างสปอร์ เจริญได้ในแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่หลากหลาย หมักน้ำตาลกลูโคส ซูโครส กาแลคโทส ทนต่อภาวะเครียด เช่น ความเป็นกรด-เบสต่ำ แรงดันออสโมติกสูง และออกซิเจนต่ำ เป็นต้น (Kurtzman, 2011) และสามารถเจริญได้ทั้งที่มีอากาศและไม่มีอากาศ มักพบในไซเลจ พืช และดิน และปนเปื้อนในโยเกิร์ต อาหารหมัก และขนมปัง เป็นต้น (Nybogård, 2016; Walker, 2011) นอกจากนี้ *W. anomalus* ยังสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม เช่น ใช้ในการหมักแป้งเปรี๊ยะ ผลิตภัณฑ์เหย ผลิตภัณฑ์นมในกระบวนการทำอาหาร ใช้ในการหมักเครื่องดื่ม เช่น สุรา ไวน์ และยังสามารถผลิตสารประกอบอื่นๆ ที่มีประสิทธิภาพในการต้านจุลินทรีย์ เช่น รา แบคทีเรีย เป็นต้น (Walker, 2011)

K. marxianus (*Saccharomyces vanudenii*, *Kluyveromyces vanudenii*) เป็นยีสต์ที่จัดอยู่ในไฟลัม Ascomycota โคลนีสีครีม-น้ำตาล รูปร่างแบน นูน สีสันแบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อ (budding) และสร้างเส้นใยเทียม และสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยการสร้างสปอร์ (Fonseca และคณะ, 2008) เจริญได้ในแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่หลากหลาย และหมักน้ำตาลได้หลายชนิด รวมถึงแลคโตสและมอลโทส และเจริญได้ในอุณหภูมิสูง *K. marxianus* สามารถผลิตเอนไซม์ได้หลายชนิด นำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหารได้ เช่น บัตทิงแอลกอฮอล์ คาร์บอกซีเพปติเดส เพกทิเนส เป็นต้น มักพบการปนเปื้อนในน้ำอุนุ่น นม และผลิตภัณฑ์จากนม นอกจากนี้ ยังสามารถผลิต 2-ฟีนิลเอทานอล ที่มีความสำคัญในการทำไวน์ น้ำกลั่น และอาหารหมัก (Fonseca และคณะ, 2007; Rocha และคณะ, 2011) นอกจากนี้ *K. marxianus* ยังมีประสิทธิภาพในการผลิตสารต้านรา เช่น 2-ฟีนิลเอทานอล เป็นต้น (Gao และ Daugulis, 2009; Hua และคณะ, 2014)

W. anomalous และ *K. marxianus* เป็นยีสต์ที่มีความปลอดภัยสามารถใช้เติมลงในอาหารได้ (GRAS; Generally Recognized as Safe) ไม่ก่อโรคในมนุษย์ (Muccilli และคณะ, 2013) เนื่องจากได้รับการรับรองจาก EFSA (European Food Safety Authority) และสามารถใช้ในอุตสาหกรรมอาหารคนและสัตว์ได้ (Fonseca และคณะ, 2008; Walker, 2011)

2.8 การควบคุมทางชีวภาพโดยใช้แบคทีเรีย

2.8.1 แบคทีเรียที่เรียกับการยับยั้งการเจริญของรา

แบคทีเรียที่เรียเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้ทั้งที่มีอากาศและไม่มีอากาศ และเป็นจุลินทรีย์ที่ส่งเสริมกระบวนการหมัก ทั้งในอาหารคน เช่น ซีส โยเกิร์ต กิมจิ ซิว๊ว เป็นต้น และในอาหารสัตว์ เช่น ไส้เลงหญ้า ไส้เลงข้าวโพด เป็นต้น เนื่องจาก แบคทีเรียที่เรียจะใช้คาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำได้ (water-soluble carbohydrate; WSC) ในการผลิตกรดต่างๆ เมื่อเกิดภาวะไร้อากาศในการหมัก ทำให้ค่าความเป็นกรด-เบสของไส้เลงต่ำลงอย่างรวดเร็ว ช่วยรักษาปริมาณน้ำหนักแห้งและสารอาหารของไส้เลง ลดการสลายของโปรตีน และให้พลังงานมากขึ้น ช่วยยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการและยืดอายุการเก็บรักษาอาหารหมักต่างๆ ได้ (Cheli และคณะ, 2013; Rowghani และคณะ, 2008)

แบคทีเรียที่เรียปฏิภักมีประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของราผลิตสารพิษในผลผลิตทางการเกษตรได้ งานวิจัยของ Lavermicocca และคณะ (2000) พบว่า *L. plantarum* 20B ที่แยกได้จากกิมจิ สามารถผลิตสารได้หลายชนิดที่มีประสิทธิภาพในการต้านราที่ปนเปื้อนในแป้ง

สาาลี โดยเฉพาะ *A. niger*, *A. flavus* และ *P. expansum* เป็นต้น โดยแล็กติกแอซิดแบคทีเรียดังกล่าวสามารถชะลอการเจริญของราในขนมปังที่ใช้ทำการทดลองได้ถึง 7 วัน เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่เติมเพียงหัวเชื้อขนมปังเพียงอย่างเดียว Strom และคณะ (2002) รายงานว่า *L. plantarum* MiLAB 393 ที่แยกได้จากหญ้าหมักสามารถผลิตสารต้านราได้หลายชนิด และสารต้านราที่แล็กติกแอซิดแบคทีเรียนี้ผลิตมีประสิทธิภาพในการต้าน *A. fumigatus* และ *P. roqueforti* เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Khanafari และคณะ (2007) รายงานว่า *L. plantarum* สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* โดยการยับยั้งการเจริญของสปอร์ราในข้าวโพด Prema และคณะ (2008) สามารถแยก *L. plantarum* จากหญ้าหมักที่สามารถผลิตกรด 3-ฟีนิลแล็กติก ซึ่งมีประสิทธิภาพในการต้าน *A. fumigatus* และ *R. stolonifera* Mauch และคณะ (2010) พบว่า *L. brevis* สามารถยับยั้งการเจริญของ *F. culmorum* ได้ Yang และ Chang (2010) ทดสอบประสิทธิภาพในการต้านราของ *L. plantarum* AF1 ที่แยกได้จากกิมจิที่สามารถผลิตกรดอินทรีย์ ได้แก่ กรดแล็กติก กรดออกซาลิก และกรดอะซีติก และสารต้านราอื่นๆ พบว่า เมื่อทำการทดสอบในถั่วเหลือง แล็กติกแอซิดแบคทีเรียดังกล่าวมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* ได้ Rizzello และคณะ (2011) พบว่า สารประกอบที่ได้จากแบ่งเปรี้ยวที่หมักโดย *L. plantarum* LB1 และ *L. rossiae* LB5 สามารถยับยั้งการเจริญของ *P. roqueforti* ได้ และขนมปังที่ผลิตจากแบ่งเปรี้ยวดังกล่าวไม่พบการเจริญของราตลอดระยะเวลาอย่างน้อย 28 วัน Choi และคณะ (2012) พบว่า *Leuconostoc citreum* HO12 และ *Weissella koreensis* HO20 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *P. roqueforti* และ *A. niger* ที่ทำให้ขนมปังเน่าเสีย และช่วยยืดอายุการเก็บรักษาขนมปังได้ นอกจากนี้ แล็กติกแอซิดแบคทีเรียปฏิบัคษ์ที่มีประสิทธิภาพการยับยั้งราที่ผลิตอะพลาทอกซินได้อีกด้วย Sangmanee และ Hongpattarakere (2014) พบว่า *L. plantarum* K35 ที่แยกได้จากขนมจีน มีประสิทธิภาพในการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์และเส้นใยของ *A. flavus* และ *A. parasiticus* ได้ Suphamid และคณะ (2018) รายงานว่า น้ำเลี้ยงเซลล์ *L. plantarum* เมื่อทดสอบร่วมกับน้ำมันหอมระเหยไทม์ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *Penicillium* ในเมล็ดข้าวได้อย่างสมบูรณ์

กลไกของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษจากรา ได้แก่ การแย่งสารอาหาร การผลิตสารเมแทบอลิต์ เช่น กรดอินทรีย์ สารประกอบประเภทโปรตีน กรดไขมัน เป็นต้น Gomah และ Zohri (2014) พบว่า *L. paracasei* subsp. *paracasei* สามารถลดปริมาณการผลิตสารพิษจาก *Fusarium* ได้แก่ ไดออกซินิวาสินอล ซีราลีโนน และฟูโมนิซินบี มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 56.8 เปอร์เซ็นต์ 73.0 เปอร์เซ็นต์ และ 76.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่

ไม่ยับยั้งการเจริญของรา และพบว่า *L. rhamnosus* สามารถยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษจากราได้อย่างสมบูรณ์ Karunaratne และคณะ (1990) รายงานว่า การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-เบสและการแย่งชิงสารอาหารในการเจริญและการผลิตเมแทบอลิต์ของ *L. acidophilus*, *L. bulgaricus* และ *L. plantarum* สามารถยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษของ *A. flavus* subsp. *parasiticus* NRRL 2999 ได้ Dogi และคณะ (2013) ศึกษาความสามารถของ *L. plantarum* ในการยับยั้ง *A. parasiticus* และ *F. gramineum* ในภาวะต่างๆ ที่ พบว่า *L. plantarum* RC007 สามารถยับยั้งการเจริญและการผลิตซีราลีโนนของ *F. gramineum* ได้ทุกภาวะ ผู้วิจัยสันนิษฐานว่าการยับยั้งเกิดจากการผลิตเมแทบอลิต์ที่สามารถต้านรา การผลิตกรดอินทรีย์ทำให้ค่าความเป็นกรด-เบสต่ำลงอย่างรวดเร็ว และกลไกในการแย่งชิงสารอาหารในการเจริญของ *L. plantarum* Gomah และคณะ (2009) ศึกษาความสามารถของ *L. plantarum* ATCC 4008, *L. plantarum* 12006, *L. plantarum* 299V, *L. paracasei* subsp. *paracasei* LMG 13552 และ *L. rhamnosus* VT1 พบว่า *L. rhamnosus* VT1 สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. versicolor* ได้ดีที่สุด และพบว่า แล็กติกแอซิดแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบ สามารถลดการผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ของ *A. parasiticus* ได้ถึง 98.99-99.99 เปอร์เซ็นต์

แล็กติกแอซิดแบคทีเรียสามารถผลิตกรดอินทรีย์ที่สามารถต้านราได้ ซึ่งกรดอินทรีย์สามารถผ่านเข้าสู่เยื่อหุ้มเซลล์โดยการทำให้ค่าความต่างศักย์ของโปรตอนเป็นกลางมากขึ้น เมื่อผ่านเข้าไปภายในเซลล์แล้ว จะทำให้ค่าความเป็นกรด-เบสของของเหลวภายในเซลล์ต่ำลง ยับยั้งการทำงานภายในเซลล์ (Dalié และคณะ, 2010) Lavermicocca และคณะ (2000) ศึกษาการยับยั้งราในแป้งสาลีของ *L. plantarum* 21B ที่คัดแยกได้จากแป้งเปรี้ยว (sourdough) พบว่า แล็กติกแอซิดแบคทีเรียดังกล่าวสามารถผลิตกรดอินทรีย์ ได้แก่ กรดฟีนิลแล็กติกและกรด 4-ไฮดรอกซีฟีนิลแล็กติกที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งราได้อย่างสมบูรณ์ Strom และคณะ (2002) พบว่า *L. plantarum* MiLAB 393 ที่คัดแยกได้จากไซเลจหญ้า สามารถผลิตเมแทบอลิต์ได้หลายชนิดที่สามารถต้าน *F. sporotrichioides* และ *A. fumigatus* ซึ่งหนึ่งในนั้น คือ กรด 3-ฟีนิลแล็กติก Dal Bello และคณะ (2007) รายงานว่า *L. plantarum* FST 1.7 สามารถผลิตกรดแล็กติก กรดฟีนิลแล็กติก และสารประเภทเพปไทด์ ที่สามารถชะลอการเจริญของ *Fusarium* ในระหว่างกระบวนการหมักแป้งหมักได้ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม Prema และคณะ (2008) พบว่า *L. plantarum* ที่คัดแยกได้จากไซเลจหญ้า สามารถผลิตกรด 3-ฟีนิลแล็กติก กรดแล็กติก และกรดอะซีติกที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญและชะลอการปนเปื้อนของ *A. fumigatus* และ *R. stolonifer* Ndagano และคณะ (2011) รายงาน

ว่า *L. plantarum* VE56, *Weissella cibaria* FMF4B16 และ *W. paramesenteroides* LC11 สามารถผลิตกรด 3-ฟีนิลแล็กติก และกรดอินทรีย์อื่นๆ ที่มีฤทธิ์ในการต้านราได้ Wang และคณะ (2012) พบว่า *L. plantarum* IMAU10014 สามารถผลิตกรด 3-ฟีนิลแล็กติก กรดเบนซีนอะซีติก และ 2-โพรพินิลเอสเทอร์ ที่สามารถต้านราได้หลายชนิด โดยเฉพาะ *F. oxysporum*, *P. citrinum* และ *P. drechsleri* นอกจากนี้ *L. rhamnosus*, *L. fermentum*, *L. acidophilus*, *L. plantarum* *L. sakei* และ *L. reuteri* สามารถผลิต กรด 3-ฟีนิลแล็กติก กรดแล็กติก และกรดอินทรีย์ ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญและชะลอการปนเปื้อนของราในอาหารคนและอาหารสัตว์ได้หลายชนิด (Cortes-Zavaleta และคณะ, 2014; Russo และคณะ, 2017; Valan Arasu และคณะ, 2013)

กรดไขมันเป็นเมแทบอไลต์อีกหนึ่งชนิดของแล็กติกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลชีพ Sjogren และคณะ (2003) รายงานว่า สามารถคัดแยกกรดไขมันไฮดรอกซีได้จาก *L. plantarum* MiLAB 14 ซึ่งสารดังกล่าวมีความสามารถต้านราได้เมื่อมีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 10-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Ndagano และคณะ (2011) รายงานว่า *L. plantarum* VE56 และ *W. paramesenteroides* LC11 สามารถผลิตกรดไขมันไฮดรอกซี เช่น กรด 2-ไฮดรอกซี-4-เมทิลเพนทาโนอิก เป็นต้น Sangmanee และ Hongpattarakere (2014) พบว่า *L. plantarum* K35 ที่แยกได้จากขนมจีน สามารถยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินของ *A. flavus* TISTR304 และ *A. flavus* TISTR3276 ได้ โดยผลิตสารต้านราหลายชนิดได้แก่ 2-บิวทิล-4-เฮกซิลออกตาไฮโดร-1-เอช-อินดิน (19.55 เปอร์เซ็นต์) กรดโอเลอิก (10.52 เปอร์เซ็นต์) และกรดพาลมิติก (7.27 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งสารดังกล่าวทำลายโครงสร้างของราได้หลายรูปแบบ ทำให้ผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์เสียหาย ส่งผลให้สูญเสียปริมาณไซโทพลาสซึมและส่งผลต่อเยื่อหุ้มออร์แกเนลล์ ได้แก่ ไมโทคอนเดรียและนิวเคลียส Deepthi และคณะ (2016) ทดสอบความสามารถของ *L. plantarum* MYS6 ในการยับยั้ง *F. proliferatum* MYS9 ที่ผลิตสารพิษฟูโมนิซิน พบว่า *L. plantarum* MYS6 สามารถผลิตกรดไขมันหลายชนิด ซึ่งทำให้โครงสร้างของเส้นใยราบิดเบี้ยว เส้นใยบวมและเกิดการกระจายตัวของโคนิเดีย ซึ่งจากรายงานก่อนหน้านี้โดย Walters และคณะ (2004) พบว่า กรดลิกโนเลนิก กรดลิกโนเลอิก และกรดโอเลอิก เป็นกรดไขมันที่มีประสิทธิภาพในการต้านราก่อโรคนในพืช ได้แก่ *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum*, *Pyrenophora avenae* และ *Crinipellis pernicioso*

แล็กติกติกแอซิดแบคทีเรียสามารถผลิตสารประกอบประเภทโพรตีนที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของราได้เช่นกัน Strom และคณะ (2002) ศึกษาการยับยั้งราของ *L.*

plantarum MiLAB 393 ที่คัดแยกได้จากไซเลจหญ้า พบว่า แล็กติกแอซิดแบคทีเรียดังกล่าวสามารถผลิตสารต้านราได้หลายชนิด รวมทั้งสามารถผลิต cyclo (L-Phe-L-Pro) และ cyclo (L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *A. fumigatus* และ *P. roqueforti* Magnusson และ Schnurer (2001) ศึกษาพบว่า สารต้านราที่ผลิตโดย *L. coryniformis* subsp. *coryniformis* Si3 เป็นสารประเภทโปรตีนขนาดเล็ก (3 kDa) ทนความร้อนได้ดี และมีประสิทธิภาพในการยับยั้งราดีที่สุดในช่วงค่าความเป็นกรด-เบสที่ 3 ถึง 6 และสามารถยับยั้งราได้หลายชนิด เช่น *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *P. roqueforti* และ *M. hiemalis* เป็นต้น ต่อมา Magnusson และคณะ (2003) ทดสอบการยับยั้งราของแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย พบว่า แล็กติกแอซิดแบคทีเรียหลักที่สามารถยับยั้ง *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *P. commune* และ *F. sporotrichioides* คือ *L. coryniformis* รองลงมาคือ *L. plantarum* และ *P. pentosaceus* และพบว่า แล็กติกแอซิดแบคทีเรียดังกล่าวสามารถผลิตสารต้านราที่นอกจากกรดแล็กติกและกรดอะซิติกแล้ว ยังสามารถผลิต cyclo (Phe-Pro) และ cyclo (Phe-4-OH-Pro) ได้อีกด้วย Dal Bello และคณะ (2007) รายงานว่า *L. plantarum* FST 1.7 สามารถผลิตสารไซคลิกไดเพปไทด์ ได้แก่ cyclo (L-Leu-L-Pro) และ cyclo (L-Phe-L-Pro) เป็นหนึ่งในเมแทบอลิต์หลักที่สามารถยับยั้งและชะลอการเจริญของ *Fusarium* ในระหว่างกระบวนการหมักแป้งหมักได้เมื่อเทียบกับชุดควบคุม Yang และ Chang (2010) พบว่า *L. plantarum* AF1 ที่คัดแยกได้จากกิมจิ สามารถผลิต cyclo (Leu-Leu) ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการปนเปื้อนของราที่ทำให้เกิดการเน่าเสียในอาหารคนและสัตว์ Gerez และคณะ (2013) พบว่า *L. fermentum* CRL 251 สามารถยับยั้งการเจริญของราโดยการผลิตสารประกอบประเภทโปรตีนขนาดเล็กกว่า 10 kDa ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งราดีที่สุดในช่วงค่าความเป็นกรด-เบสที่ 4 ถึง 7 และไม่ต้านทานต่อทริปซิน Rather และคณะ (2013) ทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งของ *L. plantarum* YML007 ที่คัดแยกได้จากกิมจิ ซึ่งสามารถยับยั้ง *A. oryzae*, *A. flavus* และ *F. oxysporum* แล็กติกแอซิดแบคทีเรียดังกล่าวสามารถผลิตสารประกอบประเภทโปรตีนขนาดเล็กกว่า 1256.617 Da ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของราโดยการทำลายเส้นใยของรา ทำลายผนังเซลล์ และทำให้ขนาดเส้นใยของราเล็กลง

นอกจากนี้ แล็กติกแอซิดแบคทีเรียสามารถผลิตสารต้านราอื่นๆ ได้อีกด้วย Schütz และ Radler (1984) รายงานว่า *L. brevis* และ *L. buchneri* สามารถเจริญได้ดีเมื่อเติมกลูโคสและกลีเซอรอล และสามารถผลิตรูเทอรินได้ Chung และคณะ (2009) รายงานว่า *L. reuteri* สามารถเปลี่ยนกลีเซอรอลให้เป็นรูเทอริน (reuterin) ได้ในภาวะความเป็นกรด-เบส อุณหภูมิ และในภาวะไร้อากาศ ซึ่งเป็นภาวะที่ใกล้เคียงกับระบบทางเดินอาหารของสิ่งมีชีวิต และสารดังกล่าวมีประสิทธิภาพ

ในการยับยั้งแบคทีเรียและรา เช่น *Candida*, *Torulopsis*, *Saccharomyces*, *Aspergillus* และ *Fusarium* เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Magnusson (2003) ศึกษาพบว่า การเติมกลีเซอรอลลงในหัวเชื้อแล็กติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารรูเทอรินและ 1,3-โพรเพนไดออล จะช่วยเพิ่มความสามารถในการยับยั้งการเจริญของราได้ดีมากยิ่งขึ้น

2.8.2 แล็กติกแอซิดแบคทีเรียกับการลดหรือกำจัดสารพิษจากรา

ผนังเซลล์ของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียเป็นอีกหนึ่งกลไกสำคัญในการลดปริมาณการปนเปื้อนสารพิษจากรา เนื่องจาก ผนังเซลล์ของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียสามารถจับกับสารประกอบต่างๆ รวมถึงสารพิษจากราได้ โดยไม่ทำให้สมบัติทางเคมีของสารพิษจากราเปลี่ยนไป เป็นกลไกที่ลดการปนเปื้อนสารพิษจากราได้รวดเร็ว ประสิทธิภาพการจับกับสารพิษจากราขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารพิษและเซลล์แล็กติกแอซิดแบคทีเรีย สายพันธุ์ของจุลินทรีย์ และภาวะแวดล้อมต่างๆ (Dalié และคณะ, 2010; Pizzolitto และคณะ, 2011) El-Nezami และคณะ (1998) ศึกษาประสิทธิภาพของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในการกำจัดอะฟลาทอกซินบี 1 ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อเห็ด พบว่า *L. rhamnosus* GG และ *L. rhamnosus* LC-705 สามารถกำจัดสารพิษออกได้ประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ ในเวลาไม่ถึง 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความสามารถในการกำจัดอะฟลาทอกซินบี 1 ของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดนี้ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียและอุณหภูมิ ต่อมา Haskard และคณะ (2001) ได้ศึกษาการจับกับสารพิษของผนังเซลล์ *L. rhamnosus* GG และ *L. rhamnosus* LC-705 โดยทดสอบในเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ที่ไม่มีชีวิต (ผ่านการให้ความร้อน) พบว่า เซลล์ที่ไม่มีชีวิตมีประสิทธิภาพในการจับกับอะฟลาทอกซินบี 1 ได้มากกว่าเซลล์มีชีวิต ซึ่งสามารถจับกับอะฟลาทอกซินบี 1 ได้ถึง 90 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทดสอบความคงทนในภาวะแวดล้อมต่างๆ ผ่านการนึ่งด้วยความดันสูง การสั่นสะเทือนด้วยคลื่นอัลตราโซนิก อุณหภูมิ และค่าความเป็นกรด-เบสที่เปลี่ยนแปลง พบว่า ไม่ส่งผลต่อการจับกันระหว่างอะฟลาทอกซินบี 1 และผนังเซลล์ของแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย Peltonen และคณะ (2001) พบว่า *L. amylovorus* และ *L. rhamnosus* สามารถจับกับอะฟลาทอกซินบี 1 ในสารละลายได้มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลาอันรวดเร็ว และสามารถคงประสิทธิภาพในการจับกับสารพิษได้เป็นเวลา 72 ชั่วโมง Zinedine และคณะ (2005) ทดสอบความสามารถของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากแป้งเปรี้ยวในการลดปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 จากอาหารเลี้ยงเชื้อเห็ด พบว่า *Lactobacillus* สามารถจับกับอะฟลาทอกซินบี 1 ได้ดีกว่า *Pediococcus* และ *Leuconostoc* สามารถลดปริมาณอะฟลาทอกซินได้ 1.80 ถึง 44.89 เปอร์เซ็นต์ และ *L. rhamnosus* Lb50 มีประสิทธิภาพมากที่สุด เท่ากับ 45 เปอร์เซ็นต์ Lahtinen

และคณะ (2004) รายงานว่า *L. rhamnosus* GG สามารถจับกับอะพลาทอกซินบี 1 ได้ โดยพบว่า อะพลาทอกซินบี 1 จับกับผนังเซลล์แล็กติกแอซิดแบคทีเรียในส่วนเพปติโดไกลแคน นอกจากนี้ *Leuconostoc* และ *Streptococcus* สามารถจับกับสารประกอบบางชนิดได้ ซึ่งสามารถใช้กลไกนี้ของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในการกำจัดสิ่งปนเปื้อนในอาหารรวมถึงสารพิษจากราได้ (Dalié และคณะ, 2010) Abrunhosa และคณะ (2014) พบว่า ผนังเซลล์เซลล์ไม่มีชีวิตของ *P. parvulus* ที่คัดแยกได้จากไวน์ สามารถดูดซับโอคราทอกซินเอได้ Assaf และคณะ (2018) พบว่า *L. rhamnosus* GG สามารถจับกับอะพลาทอกซินเอ็ม 1 ได้ดีมากขึ้นเมื่อผ่านการให้ความร้อน และพบว่า การชะล้างส่งผลต่อการจับของอะพลาทอกซินเอ็ม 1 กับผนังเซลล์แล็กติกแอซิดแบคทีเรีย จึงสรุปว่า อะพลาทอกซินเอ็ม 1 กับผนังเซลล์แล็กติกแอซิดแบคทีเรียไม่ได้จับกันด้วยพันธะโควาเลนต์ อาจจะจับกันด้วยพันธะไฮโดรเจนหรือแรงแวนเดอร์วาลส์

2.8.3 *Lactobacillus casei* และ *Lactobacillus paracasei*

L. casei และ *L. paracasei* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ย้อมแกรมติดสีน้ำเงิน มีรูปท่อน ไม่สร้างสปอร์ ไม่สร้างเอนไซม์แคทาเลส โคโลนีสีครีม-เหลือง ลักษณะกลม และเรียบ (Zhou และ Li, 2015) เจริญได้ทั้งที่มีอากาศและไม่มีอากาศ แต่เจริญเติบโตได้ดีในภาวะไร้อากาศ ทนภาวะความเป็นกรดสูงได้ (Klein และคณะ, 1998) Klein และคณะ (1998) รายงานว่า *L. casei* เป็นแล็กติกแอซิดแบคทีเรียประเภท facultative homofermentive bacteria และ *L. paracasei* เป็นแล็กติกแอซิดแบคทีเรียประเภท facultative heterofermentive bacteria แต่ Zhou และ Li (2015) รายงานว่า ทั้ง *L. casei* และ *L. paracasei* เป็นแล็กติกแอซิดแบคทีเรียประเภท facultative heterofermentive bacteria โดยแล็กติกแอซิดแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด ผลิตกรดแล็กติกเป็นส่วนใหญ่ นอกจากนี้ ยังสามารถผลิตเมแทบอลิต์ได้หลายชนิด สารต้านแบคทีเรีย เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และแบคทีริโอซิน (Mesquita และคณะ, 2017) และสามารถผลิตสารต้านราและสารพิษจากราได้หลายชนิด เช่น กรดอินทรีย์ สารประกอบฟีนอลิก สารประกอบประเภทโปรตีน กรดไขมัน เป็นต้น (Dalié และคณะ, 2010) มักพบในลำไส้และปากของมนุษย์ อาหารหมัก ไวน์ กิมจิ นม และผลิตภัณฑ์จากนม (Kask และคณะ, 2003; Klein และคณะ, 1998)

แล็กติกแอซิดแบคทีเรีย เป็นจุลินทรีย์ที่มีความปลอดภัยและสามารถใช้เติมลงในอาหารได้อย่างปลอดภัย (GRAS; Generally Recognized as Safe) เนื่องจาก ได้รับการยอมรับจากองค์การอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกา (FDA) และยังมีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก เป็นประโยชน์ต่อ

สุขภาพอีกด้วย สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหารได้ เช่น โยเกิร์ต ซีส นม และนมเปรี้ยว เป็นต้น (Mesquita และคณะ, 2017)

มีหลายงานวิจัยก่อนหน้านี้ศึกษาประสิทธิภาพของยีสต์ *W. anomalus* และ *K. marxianus* และแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. casei* และ *L. paracasei* เช่น งานวิจัยของ Niba และคณะ (2014) พบว่า *W. anomalus* สามารถยับยั้งการเจริญของราในเมล็ดข้าวโพดในระหว่างการเก็บรักษาได้ในระยะเวลา 2 เดือน และเมื่อทดสอบเป็นเวลา 8 เดือน พบว่า ไม่ส่งผลต่อคุณค่าทางโภชนาการของเมล็ดข้าวโพด Laitila และคณะ (2007) รายงานว่า *P. anomala* สามารถจำกัดการเจริญของ *Fusarium* ในระยะ malting ของการผลิตเบียร์ งานวิจัยของ Gao และ Daugulis (2009) และ Hua และคณะ (2014) พบว่า *K. marxianus* และ *P. anomala* สามารถผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายได้แก่ 2-ฟีนิลเอทานอล ซึ่งเป็นสารที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญและการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ของ *A. flavus* ได้ นอกจากนี้ Gomah และ Zohri (2014) พบว่า *L. paracasei* subsp. *paracasei* สามารถลดปริมาณการผลิตสารพิษจาก *Fusarium* ได้แก่ ตีออกซินิวาลีนอล ซีราลีโนน และ ฟูโมนิซินบี มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 56.8 เปอร์เซ็นต์ 73.0 เปอร์เซ็นต์ และ 76.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ งานวิจัยของ Li และคณะ (2014) รายงานว่า *L. casei* AST18 สามารถยับยั้งการเจริญของ *P. chrysogenum* ที่ทำให้ซีสเน่าเสียได้ โดยสามารถผลิตสารต้านราที่ส่งผลต่อองค์ประกอบของเซลล์และเส้นใยของรา ซึ่งในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยสนใจที่จะศึกษาความสามารถของยีสต์ *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 และแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. casei* AN2 และ *L. paracasei* AN3 ที่คัดแยกได้จากไซเลจข้าวโพด (กวิน เจริญรงค์, 2556) มาศึกษาประสิทธิภาพในการควบคุมการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินของ *A. flavus* บนงานอาหารเลี้ยงเชื้อและในการหมักไซเลจข้าวโพด โดยศึกษาประสิทธิภาพของการใช้ยีสต์เดี่ยวและยีสต์ผสม แล็กติกแอซิดแบคทีเรียเดี่ยวและแล็กติกแอซิดแบคทีเรียผสม การใช้แล็กติกแอซิดแบคทีเรียร่วมกับยีสต์ผสม และศึกษาปริมาณความเข้มข้นและสัดส่วนของยีสต์ต่อแล็กติกแอซิดแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการควบคุมการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินของ *A. flavus* ในไซเลจข้าวโพด ซึ่งผลที่ได้จากงานวิจัยนี้จะเป็นแนวทางในการพัฒนาการผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์ในการผลิตไซเลจข้าวโพดต่อไป

บทที่ 3

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. กรวยกรอง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 50 มิลลิเมตร บริษัท Pyrex, Germany
2. กระดาษกรอง เบอร์ 1 ขนาด 110 มิลลิเมตร ยี่ห้อ Whatman, USA
3. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง บริษัท Olympus, Japan
4. ขวดดูแรน ขนาด 500 และ 1000 มิลลิลิตร บริษัท Pyrex, Germany
5. ขวดรูปหม้อ ขนาด 250, 500 และ 1000 มิลลิลิตร บริษัท Pyrex, Germany
6. ขวดวัดปริมาตร ขนาด 100 มิลลิลิตร บริษัท Duran, Germany
7. เครื่องชั่ง รุ่น PG6002-S และ AG285 บริษัท Mettler Toledo, Switzerland
8. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อไอน้ำ รุ่น SS-325 และ ES-315 บริษัท Tomy Digital Biology, Japan
9. เครื่องปั่น (dry blending) รุ่น SS115 บริษัท Warning commercial, USA
10. เครื่องปั่นผสม (vortex mixer) รุ่น G-560E บริษัท Scientific Industries, USA
11. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-เบส รุ่น SevenEasy บริษัท Mettler Toledo, Thailand
12. เครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท (micro plate reader) A บริษัท Neogen, USA/Canada จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
13. จานเพาะเชื้อแก้ว บริษัท Pyrex, England
14. จานเพาะเชื้อพลาสติกปลอดเชื้อ บริษัท Greiner bio-one, Austria
15. ตู้เขี่ยเชื้อ รุ่น Mark II ยี่ห้อ Clean บริษัท Lab service, Thailand
16. ตู้เขี่ยเชื้อ รุ่น V6-T ขนาด 2 x 4 ฟุต บริษัท Lab micro และ Clean รุ่น Mark 11 บริษัท Lab service, Thailand
17. ตู้บ่มเชื้อ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส, Thailand
18. ตู้บ่มเชื้อ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บริษัท Memmert, Thailand
19. ตู้บ่มเชื้อ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส รุ่น ISSCO บริษัท Contherm Scientific, New Zealand
20. ตู้เย็น อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส Sandenintercool, Thailand

21. ตู้อบลมร้อน รุ่น D06063 บริษัท Memmert, Thailand
22. ตู้อบแห้ง บริษัท Contherm Scientific, New Zealand
23. ตู้แช่จุดเยือกแข็งต่ำ อุณหภูมิต่ำ -20 องศาเซลเซียส บริษัท Sandenintercool, Thailand
24. ถุงมือยาง ยี่ห้อ SemperGuard รุ่น 0537 บริษัท SemperMed, USA
25. ที่วางหลอดทดลอง (test tube rack)
26. ปีกเกอร์ ขนาด 250, 500 และ 1000 มิลลิลิตร บริษัท Pyrex, Germany
27. ปิเปตต์แก้ว ขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร บริษัท Qualicolor, Germany
28. แผ่นพาราฟิล์ม บริษัท Menasha, Thailand
29. ไมโครปิเปตต์ ขนาด 20, 200, 1000 ไมโครลิตร และขนาด 5 มิลลิลิตร บริษัท Eppendorf, Germany
30. ไมโครปิเปตต์ทิป (Micropipette tip) ขนาด 200, 1000 ไมโครลิตร ยี่ห้อ Hycon บริษัท Biomed, Thailand
31. หลอดทดลอง ขนาด 10 x 100 มิลลิลิตร และ 22 x 200 มิลลิลิตร บริษัท Pyrex, Germany
32. หลอดไมโครเซนทริฟิวก์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร บริษัท Axygen, USA
33. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ รุ่น WB14 บริษัท Memmert, Germany
34. อ่างอัลตราโซนิก รุ่น SONOREX RX 100 บริษัท Bandelin Electronic, Germany
35. ซีมาไซโทมิเตอร์ บริษัท Boeco, Germany

3.2 เคมีภัณฑ์

1. กรดทาร์ทาริก ($C_4H_6O_6$) บริษัท Merck, Germany
2. ชุดวิเคราะห์อะฟลาทอกซิน (Veratox Aflatoxin Quantitative test kit) บริษัท Neogen, USA ใช้ชุดวิเคราะห์อะฟลาทอกซิน ประกอบด้วย
 - อะฟลาทอกซินกับเอนไซม์ (conjugate solution)
 - สารละลายสับสเตรต (substrate solution)
 - สารละลายหยุดปฏิกิริยา (stop solution)
 - สารมาตรฐานอะฟลาทอกซินรวมที่มีความเข้มข้น 0, 5, 15 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
3. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) บริษัท Merck, Germany
4. ผงวุ้น (agar) บริษัท Difco Laboratories, USA
5. เมทานอล (CH_3OH) บริษัท Merck, Germany
6. D-Glucose anhydrous บริษัท HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., India
7. de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) Agar บริษัท Difco Laboratories, USA
8. MacConkey Agar บริษัท Difco Laboratories, USA
9. Malt extract บริษัท HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., India
10. Peptone บริษัท HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., India
11. Potato Dextrose Agar (PDA) บริษัท Difco Laboratories, USA
12. Tween 80 บริษัท Merck, Germany
13. Yeast extract บริษัท HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., India

3.3 วิธีดำเนินงานวิจัย

3.3.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

- *Aspergillus flavus* M3T8R4G3 ที่มีความสามารถในการผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 คัดแยกได้จากข้าวไทย (โนทัย กิตติกำแหง, 2554)

- *Wickerhamomyces anomalus* MSCU 0652 และ *Kluyveromyces marxianus* MSCU 0655 คัดแยกได้จากไซเลจข้าวโพด (กวิน เจริญยงค์, 2556; พิระพล มารุ่งเรือง, 2559)

- แล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *Lactobacillus casei* AN2 และ *Lactobacillus paracasei* AN3 ที่คัดแยกจากไซเลจข้าวโพด (กวิน เจริญยงค์, 2556)

จุลินทรีย์ทั้งหมดที่ใช้ในงานวิจัยฉบับนี้มาจากคลังจุลินทรีย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3.2 เตรียมจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

3.3.2.1 เตรียมหัวเชื้อยีสต์

นำยีสต์ *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 จากคลังจุลินทรีย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง Yeast Extract Peptone Dextrose (YPD) (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้น นำโคโลนีเดี่ยวที่แยกได้มาเตรียมเป็น working culture ในอาหารเหลว Yeast Malt extract (YM) (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ต่อมา ถ่ายหัวเชื้อยีสต์ที่ได้ลงในอาหารเหลว YM 5 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 ชั่วโมง 30 นาที เพื่อให้เซลล์ยีสต์เจริญอยู่ในช่วง mid log phase (พิระพล มารุ่งเรือง, 2559) และนับจำนวนเซลล์ยีสต์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์

3.3.2.2 เตรียมหัวเชื้อแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย

นำแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *Lactobacillus casei* AN2 และ *Lactobacillus paracasei* AN3 จากคลังจุลินทรีย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง de Man Pogosa Sharpe (MRS) (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว จากนั้น นำโคโลนีเดี่ยวที่แยกได้มาเตรียมเป็น working culture ในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ต่อมา ถ่ายหัวเชื้อแล็กติกแอซิดแบคทีเรียที่ได้ลงในอาหารเหลว MRS 5 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เป็นเวลา 23 และ 14 ชั่วโมง ตามลำดับ เพื่อให้เซลล์เล็กติกแอซิดแบคทีเรียเจริญอยู่ในช่วง mid log phase (ชาลีสา แสงบัว, 2558) และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร

3.3.2.3 เตรียมสปอร์ราแขวนลอย

นำ *A. flavus* M3T8R4G3 จากคลังจุลินทรีย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง Potato dextrose agar (PDA) (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้น เก็บสปอร์โดยใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับ Tween 80 0.01 เปอร์เซ็นต์ ที่ปราศจากเชื้อ (ภาคผนวก ข) นับจำนวนสปอร์ด้วยฮีมาไซโทมิเตอร์และปรับให้มีความเข้มข้นของสปอร์ตามที่กำหนดไว้ในแต่ละการทดลองด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับ Tween 80 0.01 เปอร์เซ็นต์ ที่ปราศจากเชื้อ

3.3.3 ทดสอบประสิทธิภาพของยีสต์และเล็กติกแอซิดแบคทีเรียปฏิบัฏษาในการยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินรวมของ *A. flavus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.3.3.1 การยับยั้งการเจริญ

ทดสอบประสิทธิภาพของยีสต์แต่ละชนิดและยีสต์ผสม (ตารางที่ 3.1) และทดสอบประสิทธิภาพของเล็กติกแอซิดแบคทีเรียแต่ละชนิดและเล็กติกแอซิดแบคทีเรียผสม (ตารางที่ 3.2) ในการยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* ด้วยวิธี Dual cultures ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Pantelides และคณะ (2015) โดยหดยีสต์ราแขวนลอยความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ที่เตรียมได้จากข้อ 3.3.2.3 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA สำหรับทดสอบยีสต์ และอาหาร MRS สำหรับทดสอบเล็กติกแอซิดแบคทีเรีย จากนั้น ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อขีดหัวเชื้อยีสต์หรือเล็กติกแอซิดแบคทีเรียที่เตรียมได้จากข้อ 3.3.2 ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อเดียวกันโดยขีดเป็นเส้นตรงให้ห่างจากจุดที่หดยีสต์ราแขวนลอยสปอร์ราเป็นระยะ 2.5 เซนติเมตร (ภาพที่ 3.1) รอให้แห้งสนิท โดยมีจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และ MRS ที่เลี้ยงราเพียงอย่างเดียวเป็นชุดควบคุม บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของรา รายงานผลเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเทียบกับชุดควบคุมตามสูตร ทำการทดลองทั้งหมด 5 ซ้ำ

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง} = \frac{(\text{เส้นผ่านศูนย์กลางราชูดควบคุม} - \text{เส้นผ่านศูนย์กลางราชูดทดสอบ}) \times 100}{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีราชูดควบคุม}}$$

ตารางที่ 3.1 ชุดทดสอบประสิทธิภาพของยีสต์ปฏิบั้กษีในการยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินรวมของ *A. flavus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ

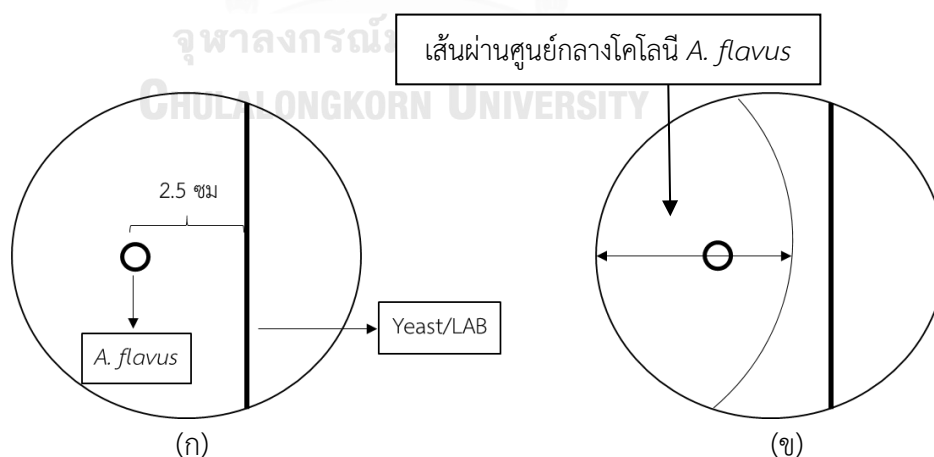
ชุดทดสอบ	ยีสต์
1	<i>W. anomalus</i> MSCU 0652
2	<i>K. marxianus</i> MSCU 0655
3	<i>W. anomalus</i> MSCU 0652 และ <i>K. marxianus</i> MSCU 0655

หมายเหตุ: ชุดทดสอบที่ 3 ใช้อัตราส่วนของยีสต์แต่ละชนิดเท่ากับ 1:1

ตารางที่ 3.2 ชุดทดสอบประสิทธิภาพของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียปฏิบั้กษีในการยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินรวมของ *A. flavus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ชุดทดสอบ	แล็กติกแอซิดแบคทีเรีย
1	<i>L. casei</i> AN2
2	<i>L. paracasei</i> AN3
3	<i>L. casei</i> AN2 และ <i>L. paracasei</i> AN3

หมายเหตุ: ชุดทดสอบที่ 3 ใช้อัตราส่วนของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียแต่ละชนิดเท่ากับ 1:1

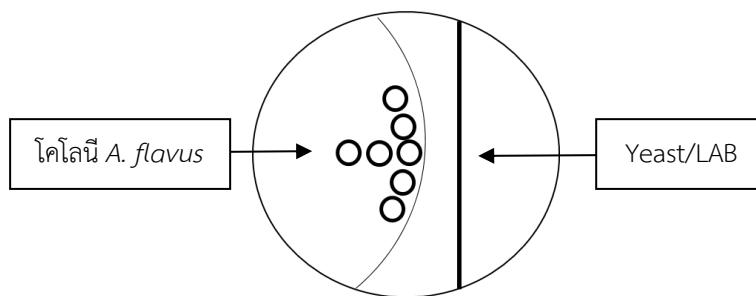


ภาพที่ 3.1 (ก) ลักษณะการเลี้ยงเชื้อด้วยวิธี Dual Culture Technique (ข) วิธีการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีราหลังจากบ่มครบ 7 วัน

3.3.3.2 การยับยั้งการผลิตอะฟลาทอกซินรวม

จากการทดลองข้อ 3.3.3.1 หลังจากบ่มครบ 7 วัน เจาะวุ้นบริเวณขอบโคโลนีของราที่บริเวณยังยั้งในแต่ละชุดทดสอบ (ภาพที่ 3.2) (Kogkaki และคณะ, 2015) ใส่ลงในขวดสกัด แล้วชั่งน้ำหนักให้ได้ 1 กรัม จากนั้น เติมสารละลายเมทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ สำหรับใช้สกัดอะฟลาทอกซิน ปริมาตร 5 มิลลิลิตร สกัดในอ่างอัลตราโซนิกเป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปปั่นผสมด้วยเครื่อง Vortex เป็นเวลา 10 วินาที จากนั้น เจือจางสารสกัดโดยเติมเมทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ให้อยู่ในช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบตามความสามารถในการตรวจวัดของชุดทดสอบ ซึ่งอยู่ในช่วง 2-50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม นำสารสกัดที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณอะฟลาทอกซินรวมด้วยวิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) โดยใช้ชุดวิเคราะห์อะฟลาทอกซิน (Neogen's Veratox® for aflatoxin, USA) ที่ได้รับการยอมรับจาก AOAC Research Institute (AOAC-RI050901) (Lupo และคณะ, 2010) โดยนำสารสกัดปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาผสมกับสารคอนจูเกตระหว่างอะฟลาทอกซินกับเอนไซม์ (horseradish peroxidase, HRP) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วดูดสารผสมปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลุมที่เคลือบด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะกับอะฟลาทอกซิน จากนั้น บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 5 ครั้ง เคาะน้ำที่อยู่ในหลุมออกจนหมดแล้วเติมสารละลายสับสเตรตที่จะทำปฏิกิริยาเฉพาะกับเอนไซม์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เขย่านาน 10-20 วินาที บ่มที่อุณหภูมิห้อง 3 นาที แล้วเติมสารละลายหยุดปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรตปริมาตร 100 ไมโครลิตร อ่านค่าความเข้มข้นของแสงผ่านเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท (micro plate reader) (Neogen, USA/Canada) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เปรียบเทียบค่าความเข้มข้นของแสงของตัวอย่างกับชุดควบคุม (สารมาตรฐานอะฟลาทอกซินรวมที่ความเข้มข้น 0, 5, 15 และ 50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) ชีตความสามารถในการตรวจวัดของชุดทดสอบอยู่ในช่วง 2-50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม หากความเข้มข้นของอะฟลาทอกซินรวมในตัวอย่างสูงเกินช่วงดังกล่าวต้องทำการเจือจางก่อนการวิเคราะห์ ทำการทดลองทั้งหมด 5 ซ้ำ

จากนั้น เลือกยีสต์และแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในชุดทดสอบที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินรวมที่ดีที่สุดเพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป



ภาพที่ 3.2 วิธีการเจาะวุ้นบริเวณโคโลนีราเพื่อนำมาวิเคราะห์ปริมาณอะฟลาทอกซินรวม

3.3.4 ทดสอบความสามารถของยีสต์และแบคทีเรียแอซิดแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินรวมของ *A. flavus* ในไซเลจข้าวโพดตลอดเชื้อ

นำยีสต์และแบคทีเรียแอซิดแบคทีเรียจากชุดทดสอบที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินรวมของ *A. flavus* ที่ดีที่สุดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (จากผลการทดลองข้อ 3.3.3) มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินรวมของ *A. flavus* ในไซเลจข้าวโพดตลอดเชื้อ เพื่อทดสอบความสามารถของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่คัดเลือกได้ในสับสเตรตที่ต่างกันออกไป

3.3.4.1 การหมักข้าวโพด

นำข้าวโพดสำหรับเลี้ยงสัตว์ (ต้นพร้อมฝักที่มีอายุปลูกประมาณ 70 วัน) (ภาพที่ 3.3) จากพื้นที่เพาะปลูกใน อำเภอบางเลน จังหวัดนครปฐม บรรจุลงในถุงพลาสติกและซังน้ำหนักให้ได้ 1 กิโลกรัม ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยวิธีนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ ที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จำนวน 3 รอบ แล้วเติมหัวเชื้อตามการทดลองดังแสดงในตารางที่ 3.3 โดยกรรมวิธีที่ 1 เป็นการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ร่วมกับ *A. flavus* กรรมวิธีที่ 2 เป็นการทดสอบประสิทธิภาพของยีสต์ผสม (*W. anomalous* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655) ร่วมกับ *A. flavus* และกรรมวิธีที่ 3 เป็นการทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อผสมระหว่าง *L. paracasei* AN3 ร่วมกับยีสต์ผสม (*W. anomalous* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655) ร่วมกับ *A. flavus* โดยใช้ *A. flavus* เพียงอย่างเดียวเป็นชุดควบคุม



(ก)



(ข)

ภาพที่ 3.3 (ก) ต้นข้าวโพดพร้อมฝักอายุ 70 วัน จากพื้นที่เพาะปลูกในอำเภอบางเลน จังหวัดนครปฐม (ข) ข้าวโพดสับก่อนหมัก

ตารางที่ 3.3 กรรมวิธีในการทดสอบความสามารถของยีสต์และแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินของ *A. flavus* ในไซเลจข้าวโพดปลอดเชื้อและในไซเลจข้าวโพดร่วมกับจุลินทรีย์อื่น

กรรมวิธี	แล็กติกแอซิดแบคทีเรีย		ยีสต์ผสม		<i>A. flavus</i>	
	ความเข้มข้น*	ปริมาณ**	ความเข้มข้น*	ปริมาณ**	ความเข้มข้น*	ปริมาณ**
1 ชุดทดสอบ	10^7	10	-	-	10^6	10
ชุดควบคุม	-	-	-	-	10^6	10
2 ชุดทดสอบ	-	-	10^7	10	10^6	10
ชุดควบคุม	-	-	-	-	10^6	10
3 ชุดทดสอบ	10^6	5	10^6	5	10^6	10
ชุดควบคุม	-	-	-	-	10^6	10

* CFU/กรัม

** มิลลิลิตร

จากนั้น ใช้มือกดเพื่อไล่อากาศออกจากถุงและมัดถุงให้แน่น (ภาพที่ 3.4) นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 21 วัน จากนั้น เก็บตัวอย่างทุกวันที่ 0, 1, 3, 5, 7, 14 และ 21 ของการบ่ม โดยการคลุกตัวอย่างให้เข้ากันทั่วทั้งถุง สำหรับนำมาวัดค่าความเป็นกรด-เบสและจำนวนจุลินทรีย์ และทุกวันที่ 0, 7, 14 และ 21 ของการบ่ม สำหรับวิเคราะห์ปริมาณอะฟลาทอกซินรวม โดยสุ่ม

ตัวอย่างครั้งเดียวสำหรับการวิเคราะห์ทั้ง 3 อย่าง ทำการทดลอง 5 ซ้ำ โดยเตรียมตัวอย่างในแต่ละถุง ครอบคลุมจำนวนกรรมวิธี ซ้ำของการทดลอง และครบตามวันที่สุ่มมาวิเคราะห์



ภาพที่ 3.4 การบ่มไซเลจถุงละ 1 กิโลกรัม

3.3.4.2 ค่าความเป็นกรด-เบส

นำตัวอย่างไซเลจข้าวโพด 50 กรัม มาวิเคราะห์หาค่าความเป็นกรด-เบส โดยเติมสารละลายเพปโทน 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 450 มิลลิลิตร ตีผสมโดยใช้เครื่อง stomacher เป็นเวลา 2 นาที จากนั้น นำเฉพาะส่วนน้ำมาวิเคราะห์ด้วยเครื่องวัดค่าความเป็นกรด-เบส

3.3.4.3 จำนวนจุลินทรีย์

หาจำนวนแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย ยีสต์ และรา โดยการนำตัวอย่าง 50 กรัม มาเจือจางในสารละลายเพปโทน 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 450 มิลลิลิตร ตีผสมโดยใช้เครื่อง stomacher เป็นเวลา 2 นาที จากนั้น เจือจางเป็นลำดับด้วยวิธี serial dilution (10^{-1} - 10^{-8}) ใช้ปิเปตต์ดูดตัวอย่าง ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร มาเกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS (สำหรับแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย) อาหารแข็ง PDA (สำหรับยีสต์และ *A. flavus*) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สำหรับแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย และบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 และ 5 วัน สำหรับยีสต์และ *A. flavus* ตามลำดับ ตรวจดูลักษณะโคโลนีและนับจำนวนโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วรายงานผลในหน่วยของ Colony Forming Unit (CFU) บนอาหาร MRS นับโคโลนีที่มีบริเวณใสรอบโคโลนี บนอาหาร PDA นับจำนวนยีสต์ทั้งหมดและนับจำนวน *A. flavus*

3.3.4.4 ปริมาณอะฟลาทอกซินรวม

นำตัวอย่างที่สุ่มมาจำนวน 20 กรัม มาปั่นให้ละเอียด แล้วนำตัวอย่างที่ปั่นละเอียด 10 กรัม มาสกัดอะฟลาทอกซินรวมโดยเติมสารละลายเมทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วน 1:5

และเขย่าเป็นเวลา 5 นาที จากนั้น กรองสารสกัดด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 และเจือจางสารสกัดโดยเติมเมทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ให้อยู่ในช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบตามความสามารถในการตรวจวัดของชุดทดสอบ ซึ่งอยู่ในช่วง 2-50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม นำสารสกัดที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณอะฟลาทอกซินรวมด้วยวิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) โดยใช้ชุดวิเคราะห์อะฟลาทอกซิน (Neogen's Veratox® for aflatoxin, USA) ตามวิธีในข้อ 3.3.3.2 ทำการทดลองทั้งหมด 5 ซ้ำ คำนวณค่าปริมาณอะฟลาทอกซินรวมที่ได้เป็นเปอร์เซ็นต์ บรรทัดฐานตามสูตรดังนี้

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

3.3.5 ทดสอบความสามารถของยีสต์และแบคทีเรียแอซิดแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินรวมของราในไซเลจข้าวโพดร่วมกับจุลินทรีย์ประจำถิ่น

นำยีสต์และแบคทีเรียแอซิดแบคทีเรียจากชุดทดสอบที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินของ *A. flavus* ที่ดีที่สุดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (จากผลการทดลองข้อ 3.3.3) มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินของ *A. flavus* ในไซเลจข้าวโพดปกติเพื่อทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกเมื่อมีจุลินทรีย์ประจำถิ่นเข้ามาพร้อมกับ

3.3.5.1 การหมักข้าวโพด

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.3.4.1 โดยใช้ข้าวโพดที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ

3.3.5.2 ค่าความเป็นกรด-เบส

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.3.4.2

3.3.5.3 จำนวนจุลินทรีย์

หาจำนวนแบคทีเรียแอซิดแบคทีเรีย ยีสต์ และรา โดยการนำตัวอย่าง 50 กรัม มาเจือจางในสารละลายเพปโทน 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 450 มิลลิลิตร ตีผสมโดยใช้เครื่อง stomacher เป็นเวลา 2 นาที จากนั้น เจือจางเป็นลำดับด้วยวิธี serial dilution (10^{-1} - 10^{-8}) ใช้ปิเปตต์ดูดตัวอย่าง ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร มาเกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS (สำหรับแบคทีเรียแอซิดแบคทีเรีย) อาหารแข็ง PDA (สำหรับยีสต์และราทั้งหมด) และอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MacConkey agar (ภาคผนวก ก) (สำหรับคอลลีฟอร์มแบคทีเรีย) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (สำหรับแบค

ดิกแอซิดแบคทีเรีย) บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 และ 5 วัน (สำหรับยีสต์และรา ทั้งหมดตามลำดับ) และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (สำหรับคอลลีฟอร์ม แบคทีเรีย) ตรวจสอบลักษณะโคโลนีและนับจำนวนโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วรายงานผลในหน่วย ของ Colony Forming Unit (CFU)

3.3.5.4 ปริมาณอะพลาทอกซินรวม

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.3.4.4

3.3.6 ทดสอบผลของปริมาณความเข้มข้นและอัตราส่วนของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียและยีสต์ผสมต่อ การยับยั้งการเจริญและการผลิตอะพลาทอกซินรวมของราในไซเลจข้าวโพด

3.3.6.1 การหมักข้าวโพด

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.3.4.1 โดยใช้ข้าวโพดที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ มาเติมหัวเชื้อตามกรรมวิธีดังแสดงในตารางที่ 3.4 โดยกรรมวิธีที่ 1 เติมหัวเชื้อผสมระหว่าง *L. paracasei* AN3 ร่วมกับยีสต์ผสม (*W. anomalous* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655) ที่ความเข้มข้น เท่ากับ $10^8:10^6$ ร่วมกับ *A. flavus* และกรรมวิธีที่ 2 เติมหัวเชื้อผสมระหว่าง *L. paracasei* AN3 ร่วมกับยีสต์ผสม (*W. anomalous* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655) ที่ความเข้มข้น เท่ากับ $10^6:10^8$ ร่วมกับ *A. flavus* โดยใช้ *A. flavus* เพียงอย่างเดียวเป็นชุดควบคุม

ตารางที่ 3.4 กรรมวิธีในการทดสอบผลของปริมาณความเข้มข้นและอัตราส่วนของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียและยีสต์ผสมต่อการยับยั้งการเจริญและการผลิตอะพลาทอกซินรวมของราในไซเลจข้าวโพด

กรรมวิธี	แล็กติกแอซิดแบคทีเรีย		ยีสต์ผสม		<i>A. flavus</i>	
	ความเข้มข้น*	ปริมาตร**	ความเข้มข้น*	ปริมาตร**	ความเข้มข้น*	ปริมาตร**
1 ชุดทดสอบ	10^8	5	10^6	5	10^6	10
ชุดควบคุม	-	-	-	-	10^6	10
2 ชุดทดสอบ	10^6	5	10^8	5	10^6	10
ชุดควบคุม	-	-	-	-	10^6	10

* CFU/กรัม

** มิลลิลิตร

3.3.6.2 ค่าความเป็นกรด-เบส

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.3.4.2

3.3.6.3 จำนวนจุลินทรีย์

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.3.5.3

3.3.6.4 ปริมาณอะพลาทอกซินรวม

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.3.4.4

3.3.7 ทดสอบผลของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียและยีสต์ต่อคุณค่าทางโภชนาของไซเลจข้าวโพด

นำข้าวโพดสับสำหรับเลี้ยงสัตว์ (ต้นพร้อมฝักที่มีอายุปลูกประมาณ 70 วัน) 1 กิโลกรัม เติมหัวเชื้อยีสต์และแบคทีเรียจากชุดทดสอบที่ให้ผลดีที่สุดในข้อ 3.3.6 ใส่ในถุงพลาสติก ไล่อากาศแล้วมัดให้แน่น นำไปหมักที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 21 วัน และเก็บตัวอย่างทุกวันที่ 0, 7, 14 และ 21 วัน ส่งวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาของไซเลจข้าวโพด ได้แก่ ความเป็นกรด-เบส ความชื้น วัตถุแห้ง ถ้ำโปรตีนรวม ไขมัน เยื่อใยรวม พลังงานรวม แคลเซียมและฟอสฟอรัส และวิเคราะห์ผนังเซลล์พืชในรูปของ neutral detergent fiber (NDF) และลิกโนเซลลูโลส (acid detergent fiber, ADF) (Ohmomo และคณะ, 2004) ดังแสดงในตาราง 3.5 เทียบกับชุดควบคุม ได้แก่ ข้าวโพดสด และไซเลจข้าวโพดที่ไม่มีการเติมหัวเชื้อ โดยส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ที่ฝ่ายปฏิบัติการวิเคราะห์อาหารสัตว์ ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน

ตารางที่ 3.5 วิธีการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนา

โภชนา (เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง)	วิธีวิเคราะห์
ความชื้น	AOAC 18 th ed.,2010, Method 934.01
โปรตีน	AOAC 18 th ed.,2010, Method 984.13
ไขมัน	AOAC 18 th ed.,2010, Method 2003.05
เยื่อใย	AOAC 18 th ed.,2010, Method 962.09
เถ้า	AOAC 18 th ed.,2010, Method 942.05
NDF	Neutral Detergent Fiber/ Forage Fiber Analysis. Goering and Van Soest, 1970
ADF	Acid Detergent Fiber/ Forage Fiber Analysis. Goering and Van Soest, 1970
แคลเซียม	AOAC 18 th ed.,2010, Method 935.13
ฟอสฟอรัส	AOAC 18 th ed.,2010, Method 965.17
พลังงานรวม (แคลอรี/กรัม)	Analytical Method/ Bomb Calorimeter

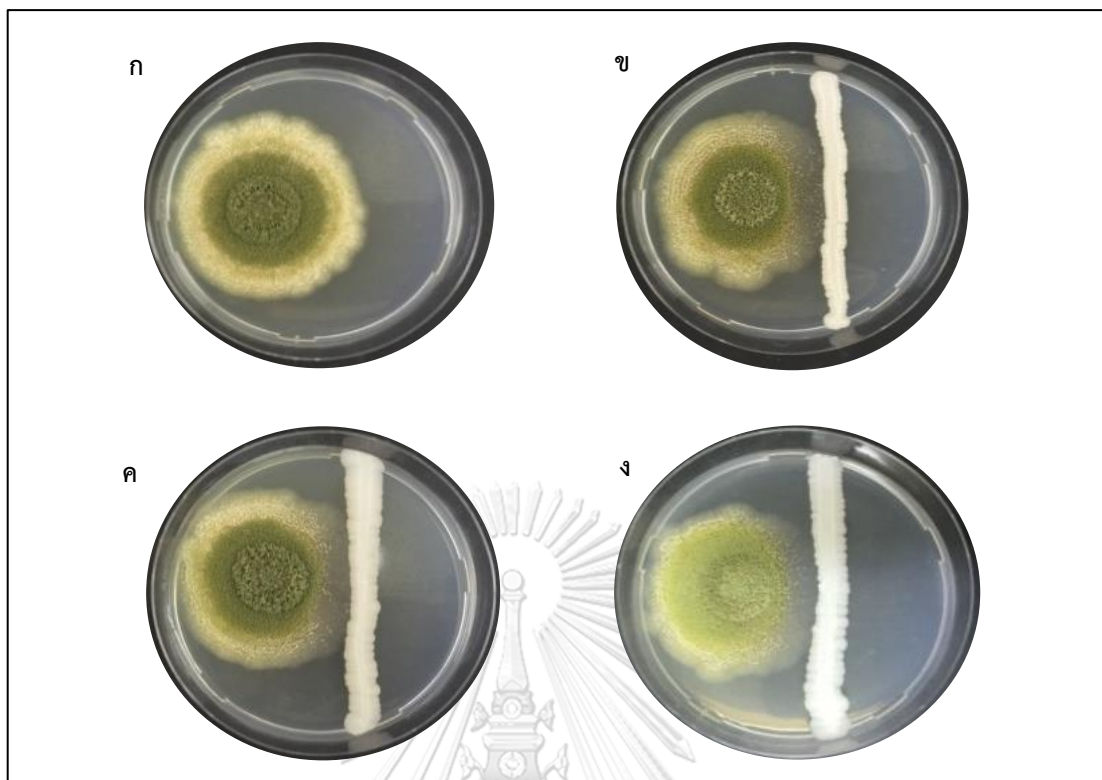
บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การทดสอบประสิทธิภาพของยีสต์ปฏิบั้กซ์ในการยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินรวมของ *A. flavus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ

4.1.1 การยับยั้งการเจริญ

จากการทดสอบประสิทธิภาพของยีสต์ปฏิบั้กซ์แต่ละชนิดและยีสต์ผสมในการยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* ตามชุดการทดลองในตารางที่ 3.1 (บทที่ 3 ข้อ 3.3.3.1) ด้วยวิธี Dual Culture Technique บนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน พบว่า ในชุดทดสอบที่เลี้ยงร่วมกับยีสต์ รามีขนาดโคโลนีเล็กลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุม และไม่พบการเจริญของเส้นใยราที่บริเวณใกล้กับรอยเจริญของยีสต์ (ภาพที่ 4.1) นอกจากนี้ โคโลนีราที่เลี้ยงร่วมกับยีสต์เดี่ยว (ภาพที่ 4.1ข, 4.1ค) มีสีของสปอร์ที่เข้มใกล้เคียงกับชุดควบคุม (ภาพที่ 4.1ก) ในขณะที่ราที่เลี้ยงร่วมกับยีสต์ผสม (ภาพที่ 4.1ง) มีสีสปอร์ที่อ่อนกว่า เมื่อพิจารณาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญจากตารางที่ 4.1 พบว่า ยีสต์ทั้ง 2 ชนิด ทั้งยีสต์เดี่ยวและยีสต์ผสมให้ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของราค่อนข้างต่ำ คือ มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ในช่วง 14-17 เปอร์เซ็นต์ โดยชุดทดสอบที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงสุดคือ ชุดทดสอบยีสต์เดี่ยว *K. marxianus* MSCU 0655 ให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* เท่ากับ 16.99 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ ชุดทดสอบยีสต์เดี่ยว *W. anomalous* MSCU 0652 และชุดทดสอบยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalous* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Least Significant Difference (LSD) เพื่อหาค่าเฉลี่ยคู่ใดบ้างที่แตกต่างกัน โดยใช้โปรแกรม SPSS พบว่า ชุดทดสอบทั้งหมดให้ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 4.1 การเจริญของ *A. flavus* เมื่อเลี้ยงร่วมกับยีสต์ปฏิปักษ์โดยวิธี Dual Culture Technique บนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน ก. ชุดควบคุม, ข. *W. anomalous* MSCU 0652, ค. *K. marxianus* MSCU 0655 และ ง. *W. anomalous* MSCU 0652 + *K. marxianus* MSCU 0655

ตารางที่ 4.1 ประสิทธิภาพของยีสต์ปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* โดยวิธี Dual Culture Technique บนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

ชุดทดสอบ	ยีสต์	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ*
1	<i>W. anomalous</i> MSCU 0652	14.41 ^a
2	<i>K. marxianus</i> MSCU 0655	16.99 ^a
3	<i>W. anomalous</i> MSCU 0652 + <i>K. marxianus</i> MSCU 0655	15.11 ^a

*ค่าเฉลี่ยจาก 5 ซ้ำ

**อักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี LSD

4.1.2 การยับยั้งการผลิตอะฟลาทอกซินรวม

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของยีสต์ปฏิปักษ์แต่ละชนิดและยีสต์ผสมในการยับยั้งการผลิตอะฟลาทอกซินรวมของ *A. flavus* ตามชุดการทดลองในตารางที่ 3.1 (บทที่ 3 ข้อ 3.3.3) พบว่าชุดทดสอบของยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 (ชุดที่ 3) มีประสิทธิภาพในการลดปริมาณอะฟลาทอกซินรวมได้ดีกว่าชุดทดสอบของยีสต์เดี่ยว (ชุดที่ 1-2) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยชุดทดสอบที่ให้เปอร์เซ็นต์การลดลงของอะฟลาทอกซินรวมมากที่สุดเท่ากับ 43.25 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ราในชุดทดสอบยีสต์เดี่ยวผลิตอะฟลาทอกซินรวมลดลงเพียงเล็กน้อย (3-5 เปอร์เซ็นต์) ดังแสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ประสิทธิภาพของยีสต์ปฏิปักษ์ในการยับยั้งการผลิตอะฟลาทอกซินรวมของ *A. flavus* บนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

ชุดทดสอบ	ยีสต์	เปอร์เซ็นต์การลดลงของอะฟลาทอกซินรวม*
1	<i>W. anomalus</i> MSCU 0652	5.20 ^a
2	<i>K. marxianus</i> MSCU 0652	2.93 ^a
3	<i>W. anomalus</i> MSCU 0652 + <i>K. marxianus</i> MSCU 0652	43.25 ^b

*ค่าเฉลี่ยจาก 5 ซ้ำ

**อักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี LSD

4.2 การทดสอบประสิทธิภาพของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียปฏิบั้กษาในการยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินรวมของ *A. flavus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ

4.2.1 การยับยั้งการเจริญ

จากการทดสอบประสิทธิภาพของ *L. casei* AN2, *L. paracasei* AN3 และ *L. casei* AN2 ร่วมกับ *L. paracasei* AN3 ในการยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* ด้วยวิธี Dual Culture Technique บนอาหาร MRS เป็นเวลา 7 วัน พบว่า ในชุดควบคุม มีการเจริญของราเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ในขณะที่ ในชุดทดสอบที่เลี้ยงร่วมกับแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย พบการเจริญของเส้นใยราลดลงในบริเวณใกล้กับรอยเจริญของแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย (ภาพที่ 4.2) และในชุดทดสอบที่เลี้ยงรา ร่วมกับแล็กติกแอซิดแบคทีเรียแบบผสม มีเส้นใยของราเป็นสีขาว สปอร์สีขาว-สีเหลืองอ่อน (ภาพที่ 4.2ง) ในขณะที่ชุดควบคุมและชุดทดสอบที่เลี้ยงราร่วมกับแล็กติกแอซิดแบคทีเรียเดียว มีเส้นใยของราเป็นสีขาวและสร้างสปอร์เหลือง-น้ำตาล (ภาพที่ 4.2ข, 4.2ค) โดยแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด ให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของราต่ำทั้งการทดสอบแบบเดี่ยวและผสม โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของราใกล้เคียงกัน อยู่ในช่วง 18-21 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.3)



ภาพที่ 4.2 การยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* เมื่อเลี้ยงร่วมกับแล็กติกแอซิดแบคทีเรียปฏิบั้กษาโดยวิธี Dual Culture Technique บนอาหาร MRS เป็นเวลา 7 วัน ก. ชุดควบคุม, ข. *L. casei* AN2, ค. *L. paracasei* AN3 และ ง. *L. casei* AN2 + *L. paracasei* AN3

ตารางที่ 4.3 ประสิทธิภาพของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* โดยวิธี Dual Culture Technique บนอาหาร MRS ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

ชุดทดสอบ	แล็กติกแอซิดแบคทีเรีย	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ*
1	<i>L. casei</i> AN2	20.23 ^a
2	<i>L. paracasei</i> AN3	17.83 ^a
3	<i>L. casei</i> AN2 + <i>L. paracasei</i> AN3	20.65 ^a

*ค่าเฉลี่ยจาก 5 ซ้ำ

**อักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี LSD

4.2.2 การผลิตอะฟลาทอกซินรวม

สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียแต่ละชนิดและแล็กติกแอซิดแบคทีเรียผสมในการยับยั้งการผลิตอะฟลาทอกซินรวมของ *A. flavus* พบว่า ราที่เลี้ยงร่วมกับแล็กติกแอซิดแบคทีเรียทั้งแบบเดี่ยวและแบบผสมผลิตอะฟลาทอกซินรวมลดลง 5-36 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม โดยราที่เลี้ยงร่วมกับ *L. paracasei* AN3 ผลิตอะฟลาทอกซินรวมลดลงมากที่สุด (35.64 เปอร์เซ็นต์) ในขณะที่ราที่เลี้ยงร่วมกับแล็กติกแอซิดแบคทีเรียผสมทั้ง 2 ชนิด ผลิตอะฟลาทอกซินรวมลดลงน้อยที่สุด เพียง 5.28 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.4)

ตารางที่ 4.4 ประสิทธิภาพของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในการยับยั้งการผลิตอะฟลาทอกซินรวมของ *A. flavus* บนอาหาร MRS ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

ชุดทดสอบ	แล็กติกแอซิดแบคทีเรีย	เปอร์เซ็นต์การลดลงของอะฟลาทอกซินรวม*
1	<i>L. casei</i> AN2	20.67 ^a
2	<i>L. paracasei</i> AN3	35.64 ^a
3	<i>L. casei</i> AN2 + <i>L. paracasei</i> AN3	5.28 ^b

*ค่าเฉลี่ยจาก 5 ซ้ำ

**อักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี LSD

จากผลการทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (ยีสต์และแบคทีเรีย) ในการยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินรวมของ *A. flavus* ด้วยวิธี Dual Culture Technique พบว่า ทั้งยีสต์และแบคทีเรียในทุกชุดทดสอบให้ผลการยับยั้งการเจริญของราค่อนข้างต่ำ (10-20 เปอร์เซ็นต์) ในขณะที่ลดการผลิตอะฟลาทอกซินรวมได้มากกว่า โดยเมื่อใช้ยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 (ในชุดทดสอบที่ 3) และแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 เดี่ยว สามารถลดการผลิตอะฟลาทอกซินรวมได้มากที่สุด ดังนั้น จึงเลือกยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 (ในชุดทดสอบที่ 3) และ *L. paracasei* AN3 ในการทดลองขั้นต่อไป



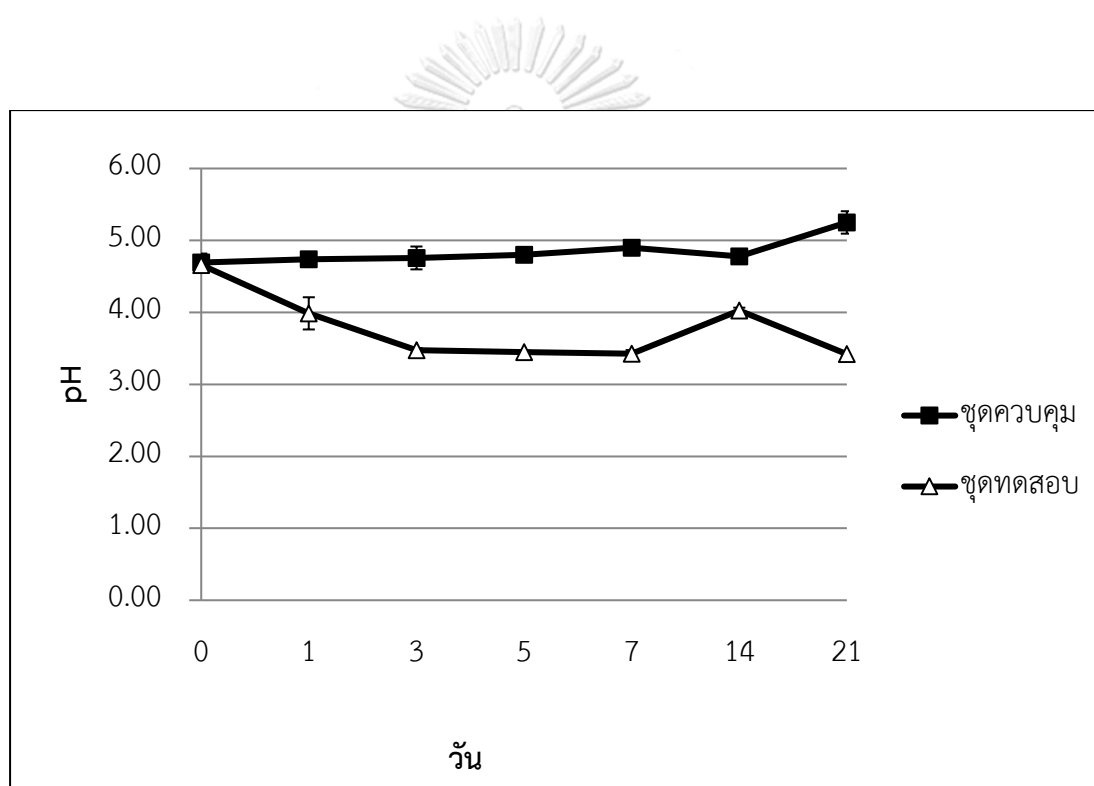
4.3 การทดสอบความสามารถของยีสต์และแบคทีเรียแอซิดแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินรวมของ *A. flavus* ในไซเลจข้าวโพดปลอดเชื้อ

จากผลการทดลองในข้อที่ 4.1 และ 4.2 พบว่า แบคทีเรียแอซิดแบคทีเรียที่เรีย *L. paracasei* AN3 และยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalous* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 เป็นจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งการผลิตอะฟลาทอกซินรวมของ *A. flavus* จึงถูกคัดเลือกมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินรวมของ *A. flavus* ในไซเลจข้าวโพดปลอดเชื้อเพื่อทดสอบความสามารถของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ในสัปดาห์จริง โดยทดสอบตามกรรมวิธีในตารางที่ 3.3 (บทที่ 3 ข้อ 3.3.4) ได้แก่ การทดสอบประสิทธิภาพของ 1) แบคทีเรียแอซิดแบคทีเรียที่เรีย *L. paracasei* AN3 2) ยีสต์ผสม *W. anomalous* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 และ 3) หัวเชื้อผสมระหว่าง *L. paracasei* AN3 ร่วมกับยีสต์ผสม *W. anomalous* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655

4.3.1 การทดสอบความสามารถของแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3

ความเป็นกรด-เบส

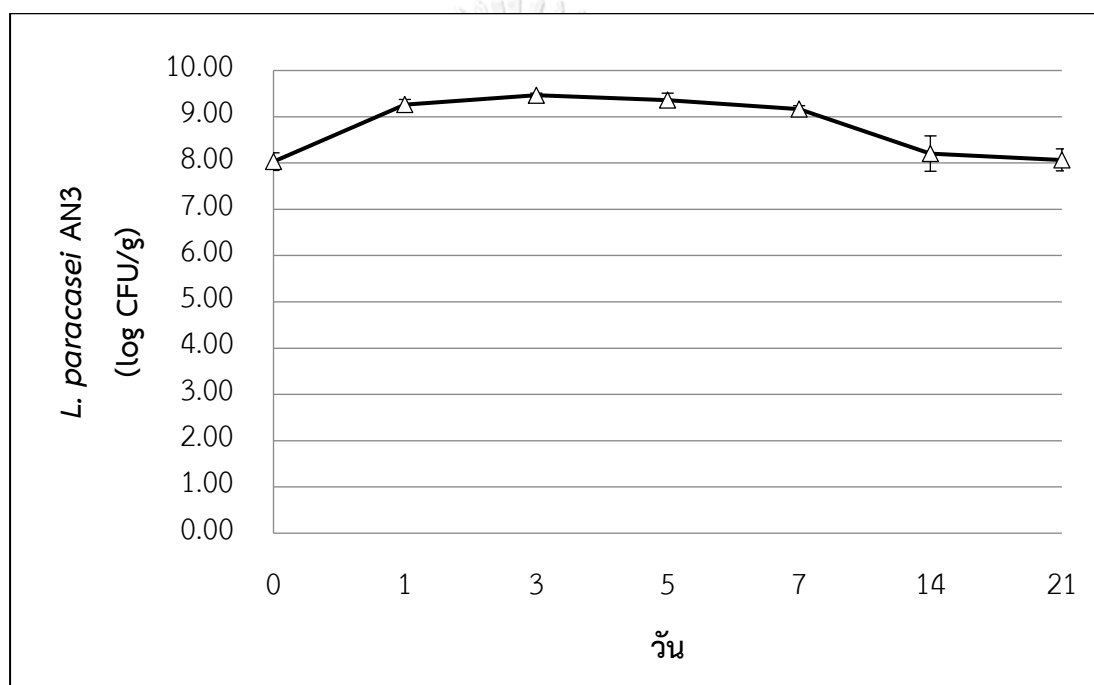
ค่าความเป็นกรด-เบสเริ่มต้นของไซเลจข้าวโพดปลอดเชื้อชุดทดสอบและชุดควบคุมเท่ากับ 4.66 ± 0.10 และ 4.69 ± 0.12 ตามลำดับ จากนั้น ค่าความเป็นกรด-เบสในชุดทดสอบลดลงอย่างรวดเร็วตั้งแต่วันที่ 1 มีค่าเท่ากับ 3.99 ± 0.22 และลดลงมากที่สุดในวันที่ 21 ของการบ่ม มีค่าเท่ากับ 3.42 ± 0.03 ในขณะที่ชุดควบคุมมีค่าความเป็นกรด-เบสคงที่ตลอดระยะเวลาการบ่ม และมีค่าเท่ากับ 5.25 ± 0.16 ในวันที่ 21 ของการบ่ม ดังแสดงในภาพที่ 4.3



ภาพที่ 4.3 ค่าความเป็นกรด-เบสของไซเลจข้าวโพดปลอดเชื้อที่เติม *A. flavus* ร่วมกับแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 (ชุดทดสอบ) และเติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 21 วัน

จำนวนแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3

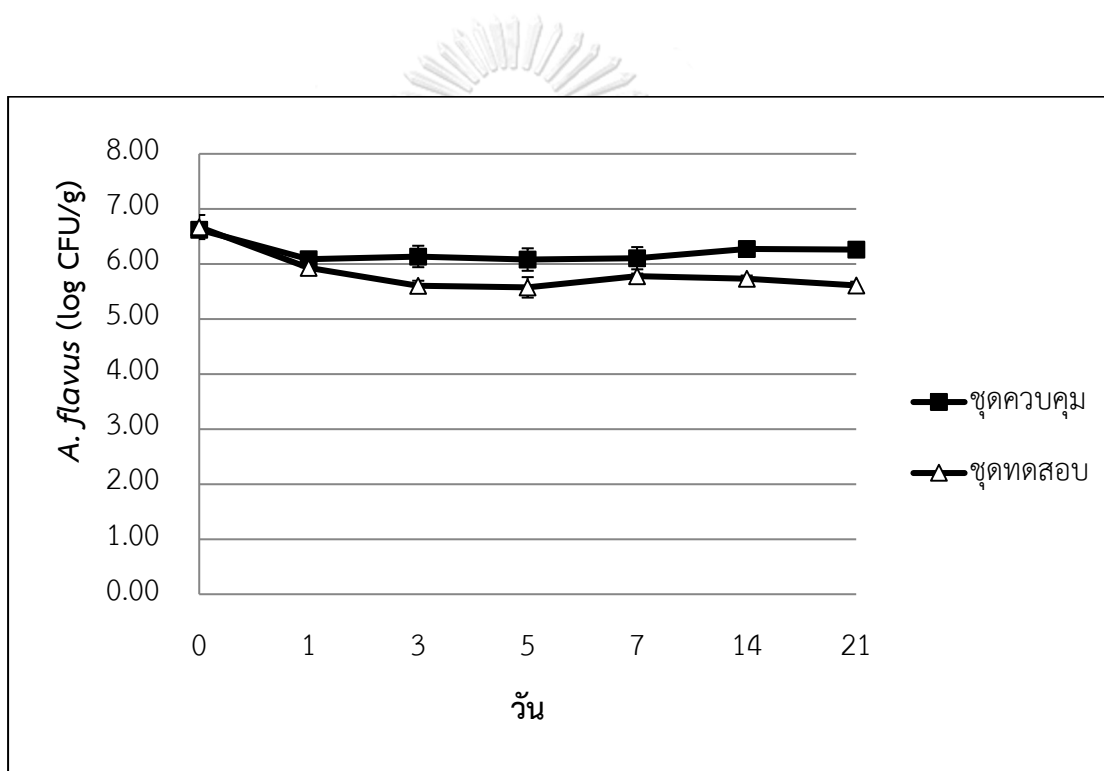
ตัวอย่างไซเลจข้าวโพดปลอดเชื้อในชุดทดสอบมีจำนวนแล็กติกแอซิดแบคทีเรียเพิ่มขึ้นในวันที่ 1 (9.27 ± 0.11 log CFU/กรัม) จากจำนวนเริ่มต้นในวันที่ 0 ซึ่งมีจำนวนเท่ากับ 8.03 ± 0.19 log CFU/กรัม และมีจำนวนค่อนข้างคงที่ตลอดระยะเวลาในการบ่ม (9 log CFU/กรัม) และเมื่อสิ้นสุดการบ่ม (วันที่ 21) มีจำนวนลดลงเล็กน้อยเหลือ 8.07 ± 0.24 log CFU/กรัม (ภาพที่ 4.4) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า *L. paracasei* AN3 สามารถเจริญและเพิ่มจำนวนได้ในไซเลจข้าวโพด



ภาพที่ 4.4 จำนวนแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ในไซเลจข้าวโพดปลอดเชื้อที่เลี้ยงร่วมกับ *A. flavus* (ชุดทดสอบ) และเติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม)

จำนวน *A. flavus*

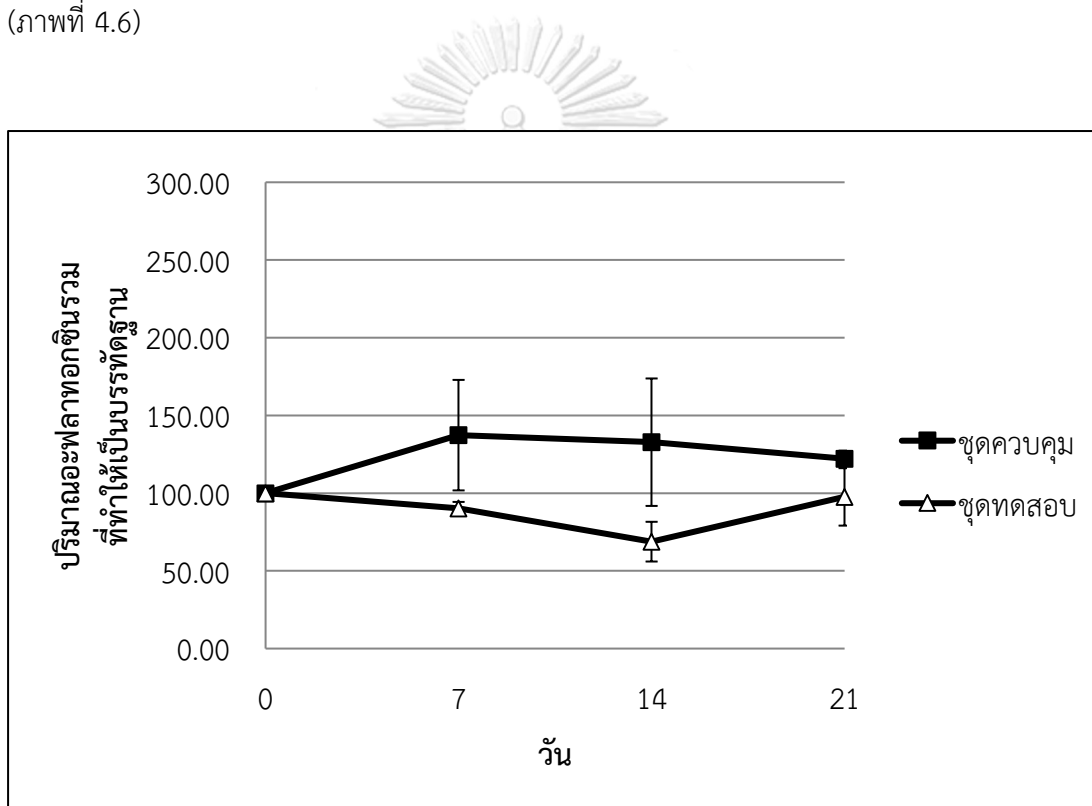
จากภาพที่ 4.5 แสดงจำนวน *A. flavus* ในไซเลจข้าวโพดปลอดเชื้อ พบว่า จำนวนราในชุดทดสอบมีน้อยกว่าชุดควบคุมตลอดระยะเวลาการบ่ม โดยจำนวนราในชุดทดสอบที่เลี้ยงรา ร่วมกับแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในวันที่ 0 เท่ากับ 6.67 ± 0.22 log CFU/กรัม และลดลงในช่วง 3 วันแรกของการบ่ม เมื่อสิ้นสุดการบ่มมีจำนวนราเท่ากับ 5.61 ± 0.07 log CFU/กรัม ในขณะที่ชุดควบคุมมีจำนวนราคงที่ตลอดการบ่ม โดยจำนวนราในชุดควบคุมในวันที่ 0 และ 21 ของการบ่มมีค่า เท่ากับ 6.62 ± 0.11 และ 6.26 ± 0.11 log CFU/กรัม ตามลำดับ (ภาพที่ 4.5)



ภาพที่ 4.5 จำนวน *A. flavus* ในไซเลจข้าวโพดปลอดเชื้อที่เติม *A. flavus* และแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 (ชุดทดสอบ) และเติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม)

ปริมาณอะฟลาทอกซินรวม

เมื่อวิเคราะห์หาปริมาณอะฟลาทอกซินรวมในวันที่ 0, 7, 14 และ 21 ของตัวอย่างไซเลจข้าวโพดปลอดเชื้อในชุดทดสอบและชุดควบคุม แล้วนำค่าปริมาณอะฟลาทอกซินรวมที่ได้มาปรับให้เป็นบรรทัดฐาน (normalization) พบว่า ชุดทดสอบมีปริมาณอะฟลาทอกซินรวมมีแนวโน้มลดลงจากวันแรกที่ทำกรทดลองและเมื่อสิ้นสุดการทดลองมีค่าเท่ากับ 97.58 ± 18.48 แตกต่างกับชุดควบคุมที่มีปริมาณอะฟลาทอกซินรวมที่ทำให้เป็นบรรทัดฐานเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ตลอดการบ่ม และในวันที่ 21 ของการบ่ม ชุดควบคุมมีปริมาณอะฟลาทอกซินรวมที่ทำให้เป็นบรรทัดฐานเท่ากับ 122.09 ± 5.24 (ภาพที่ 4.6)

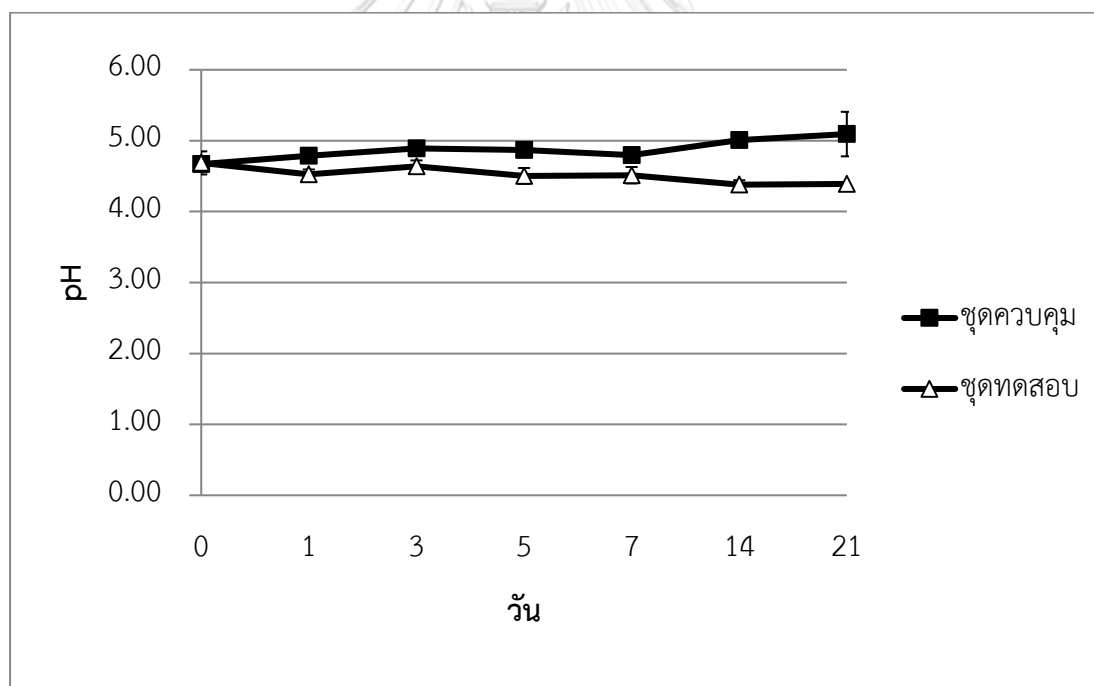


ภาพที่ 4.6 ปริมาณอะฟลาทอกซินรวมที่ทำให้เป็นบรรทัดฐานในไซเลจข้าวโพดปลอดเชื้อที่เติม *A. flavus* ร่วมกับแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 (ชุดทดสอบ) และเติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม)

4.3.2 การทดสอบความสามารถของยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655

ความเป็นกรด-เบส

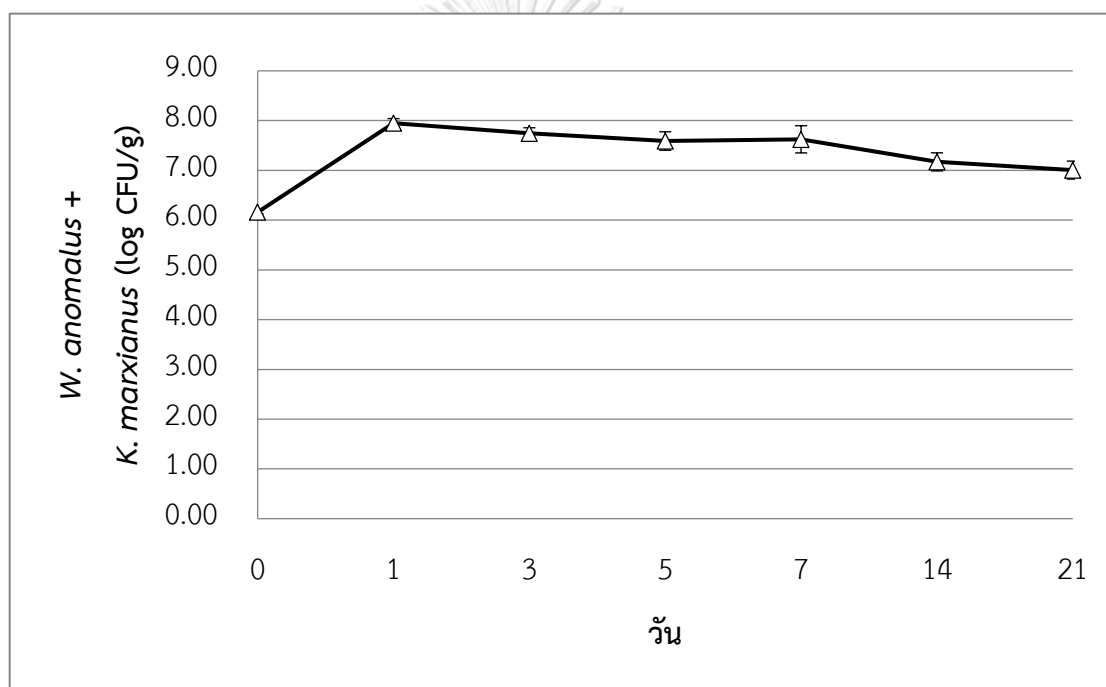
เมื่อนำตัวอย่างไซเลจข้าวโพดปลอดเชื้อของชุดทดสอบและชุดควบคุมมาวัดค่าความเป็นกรด-เบส พบว่า ในช่วงแรกของการบ่มค่าความเป็นกรด-เบสของชุดทดสอบและชุดควบคุมมีค่าค่อนข้างใกล้เคียงกัน โดยวันที่ 0 ของการบ่ม ค่าความเป็นกรด-เบสของชุดทดสอบและชุดควบคุมมีค่าเท่ากับ 4.69 ± 0.16 และ 4.67 ± 0.05 ตามลำดับ เมื่อเวลาผ่านไป 1 วัน ค่าความเป็นกรด-เบสในชุดทดสอบมีค่าลดลงเล็กน้อย (4.52 ± 0.07) และเมื่อสิ้นสุดการบ่มชุดทดสอบมีค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 4.39 ± 0.01 ในขณะที่ ในชุดควบคุมค่าความเป็นกรด-เบสเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเท่ากับ 5.09 ± 0.31 ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 4.7



ภาพที่ 4.7 ค่าความเป็นกรด-เบสของไซเลจข้าวโพดปลอดเชื้อที่เติม *A. flavus* ร่วมกับยีสต์ *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 (ชุดทดสอบ) และเติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม)

จำนวนยีสต์ *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655

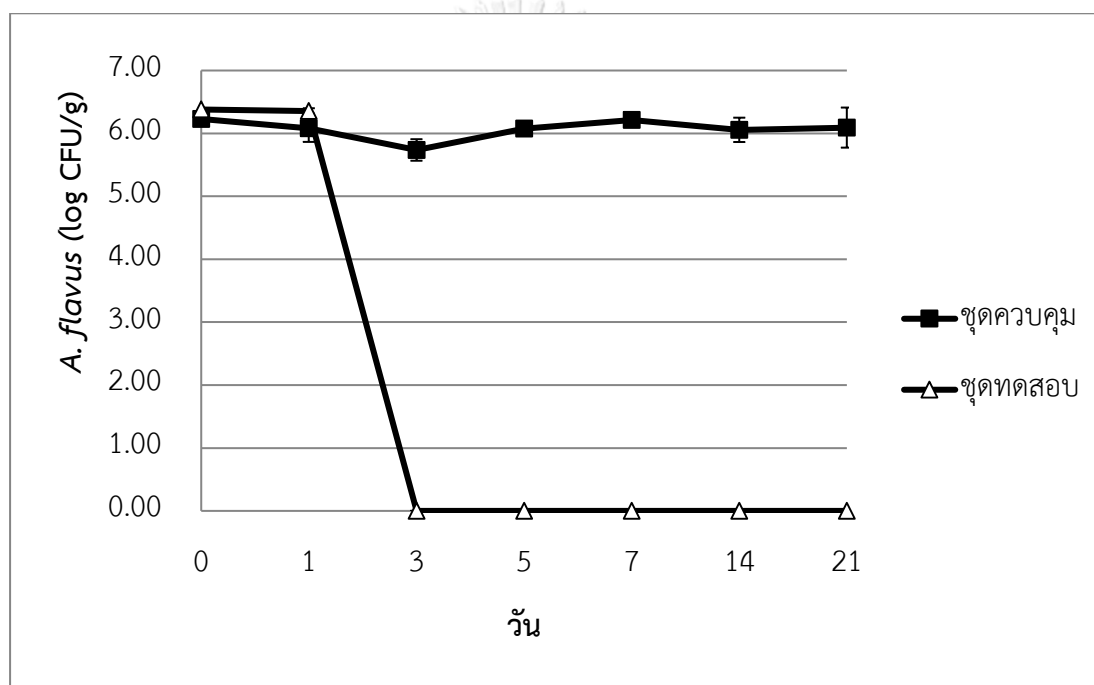
จากผลการนับจำนวนยีสต์ *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 ในไซเลจข้าวโพดปลอดเชื้อที่หมักร่วมกับรา พบว่า จำนวนยีสต์เริ่มต้นในวันที่ 0 ของการบ่มเท่ากับ 6.16 ± 0.04 log CFU/กรัม แล้วเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วในช่วง 24 ชั่วโมงแรกของการบ่ม (7.95 ± 0.09 log CFU/กรัม) จากนั้น มีจำนวนลดลงเล็กน้อยและเมื่อสิ้นสุดการบ่มมีจำนวนยีสต์เท่ากับ 7.01 ± 0.18 log CFU/กรัม (ภาพที่ 4.8) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ายีสต์ทั้ง 2 ชนิดสามารถเจริญและเพิ่มจำนวนในไซเลจข้าวโพดได้



ภาพที่ 4.8 จำนวนยีสต์ *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 ในไซเลจข้าวโพดปลอดเชื้อที่เติม *A. flavus* ร่วมกับยีสต์ *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 (ชุดทดสอบ)

จำนวน *A. flavus*

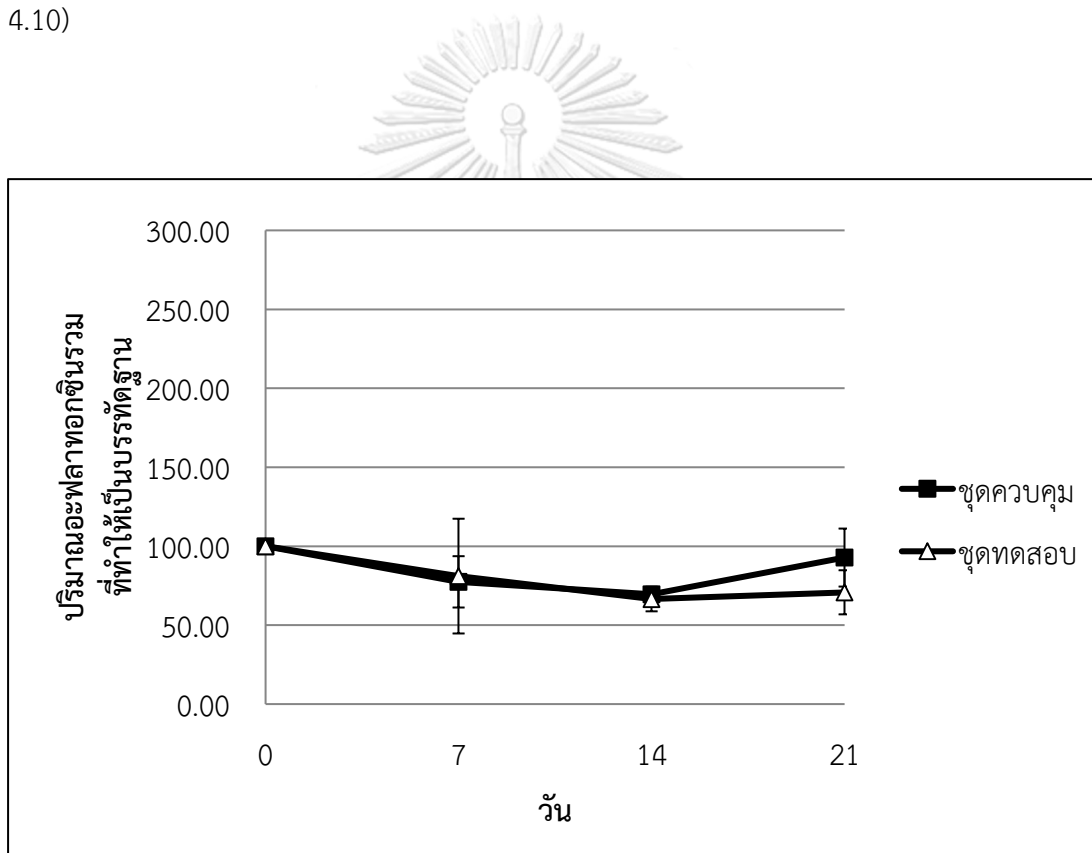
เมื่อนับจำนวนรา *A. flavus* ในไซเลจข้าวโพดปลอดเชื้อทั้งชุดทดสอบและชุดควบคุม พบว่า จำนวนราในชุดควบคุมมีจำนวนคงที่ตั้งแต่วันที่ 0 (6.23 ± 0.08 log CFU/กรัม) จนถึงสิ้นสุดการบ่ม (6.09 ± 0.32 log CFU/กรัม) สำหรับชุดทดสอบ พบว่า มีจำนวนราเริ่มต้นในวันที่ 0 เท่ากับ 6.38 ± 0.01 log CFU/กรัม จากนั้น จำนวนราลดลงอย่างเห็นได้ชัดในวันที่ 3 และไม่พบการเจริญของราจนสิ้นสุดการบ่ม (ภาพที่ 4.9)



ภาพที่ 4.9 จำนวน *A. flavus* ในไซเลจข้าวโพดปลอดเชื้อที่เติม *A. flavus* ร่วมกับยีสต์ *W. anomalous* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 (ชุดทดสอบ) และเติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม)

ปริมาณอะฟลาทอกซินรวม

เมื่อวัดปริมาณอะฟลาทอกซินรวมในตัวอย่างไซเลจข้าวโพดปลูกเชื้อทั้งในชุดทดสอบและชุดควบคุม แล้วนำค่าปริมาณอะฟลาทอกซินรวมมาทำให้เป็นบรรทัดฐาน พบว่า ปริมาณอะฟลาทอกซินรวมทั้งในชุดทดสอบและชุดควบคุมมีค่าใกล้เคียงกันในช่วง 14 วันแรกของการบ่ม โดยมีปริมาณอะฟลาทอกซินรวมบรรทัดฐานลดลงจากวันแรกของการบ่มและมีค่าต่ำสุดในวันที่ 14 (66.55 ± 7.79 และ 69.54 ± 4.25 ตามลำดับ) และเมื่อสิ้นสุดการบ่ม ปริมาณอะฟลาทอกซินรวมบรรทัดฐานในชุดทดสอบ (70.80 ± 13.96) มีค่าต่ำกว่าชุดควบคุมเล็กน้อย (92.79 ± 18.37) (ภาพที่ 4.10)

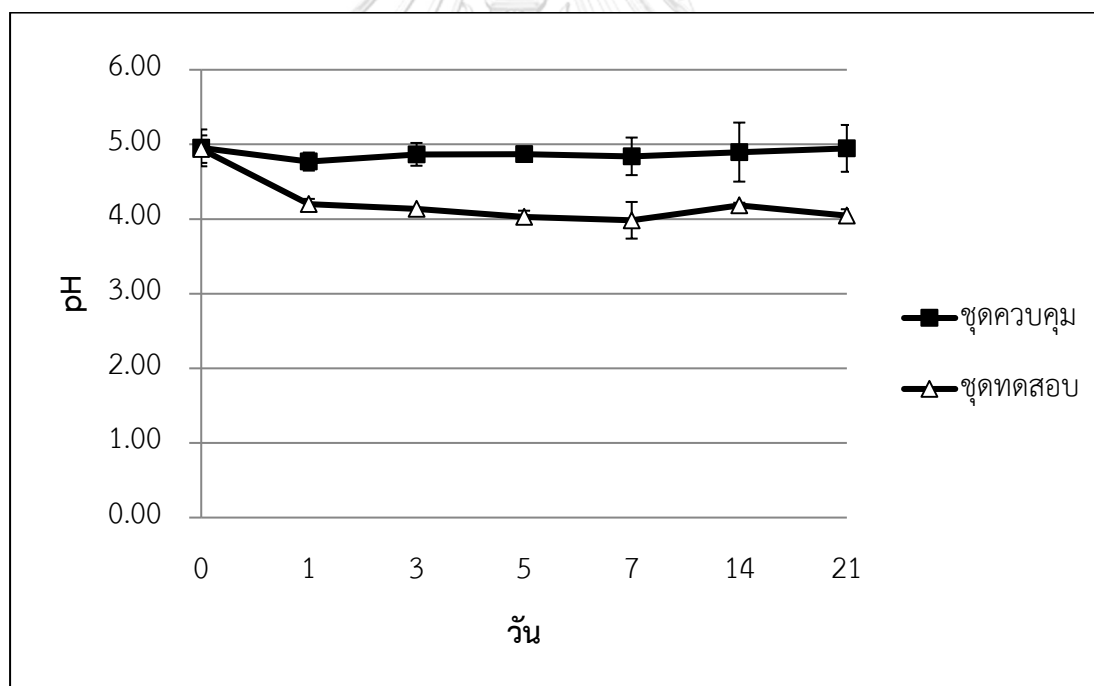


ภาพที่ 4.10 ปริมาณอะฟลาทอกซินรวมที่ทำให้เป็นบรรทัดฐานของไซเลจข้าวโพดปลูกเชื้อที่เดิม *A. flavus* ร่วมกับยีสต์ *W. anomalous* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 (ชุดทดสอบ) และเดิม *A. flavus* (ชุดควบคุม)

4.3.3 การทดสอบความสามารถของแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ร่วมกับ ยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655

ความเป็นกรด-เบส

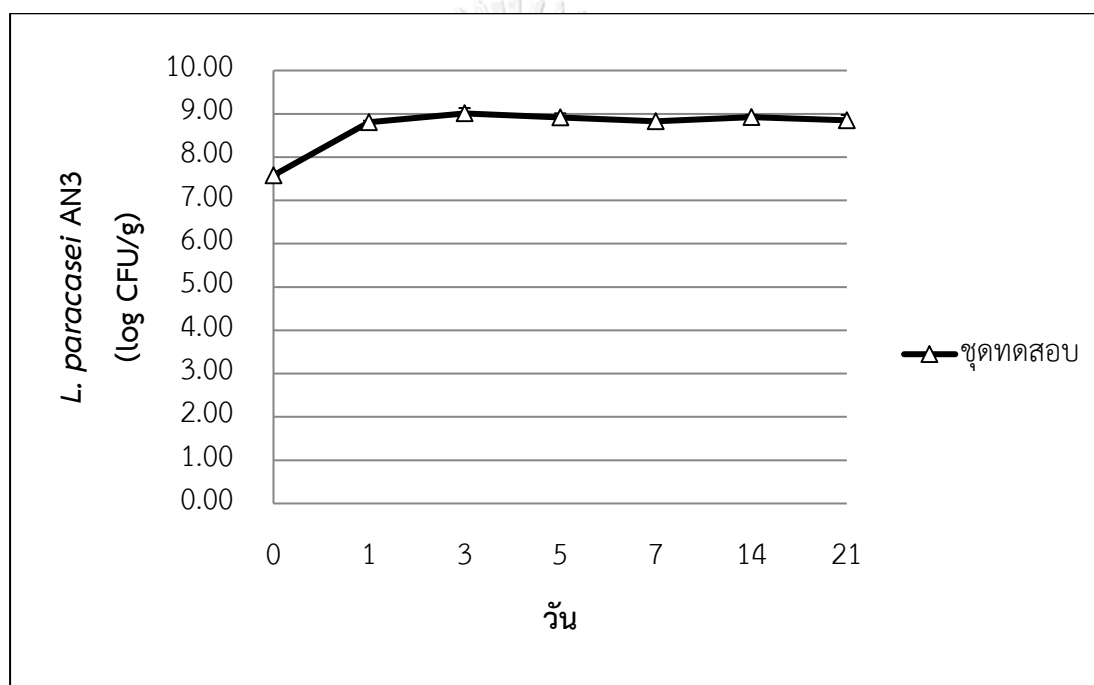
เมื่อนำตัวอย่างไซเลจข้าวโพดปลอดเชื้อของชุดทดสอบและชุดควบคุมมาวัดค่าความเป็นกรด-เบส พบว่า ค่าความเป็นกรด-เบสของชุดทดสอบและชุดควบคุมในวันที่ 0 มีค่าใกล้เคียงกันเท่ากับ 4.94 ± 0.18 และ 4.95 ± 0.25 ตามลำดับ หลังจากนั้น ค่าความเป็นกรด-เบสในชุดทดสอบลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 1 ของการบ่ม (4.20 ± 0.07) และคงที่ไปตลอดจนถึงวันที่ 21 ของการบ่ม (4.05 ± 0.09) ในขณะที่ ในชุดควบคุมที่มีค่าความเป็นกรด-เบสคงที่ตลอดการทดลอง และมีค่าความเป็นกรด-เบสในวันที่ 21 เท่ากับ 4.95 ± 0.31 ทั้งนี้ ค่าความเป็นกรด-เบสของชุดทดสอบมีค่าต่ำกว่าชุดควบคุมตลอดการบ่ม (ภาพที่ 4.11)



ภาพที่ 4.11 ค่าความเป็นกรด-เบสของไซเลจข้าวโพดปลอดเชื้อที่เติม *A. flavus* ร่วมกับแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 และยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 (ชุดทดสอบ) และเติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม)

จำนวนแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3

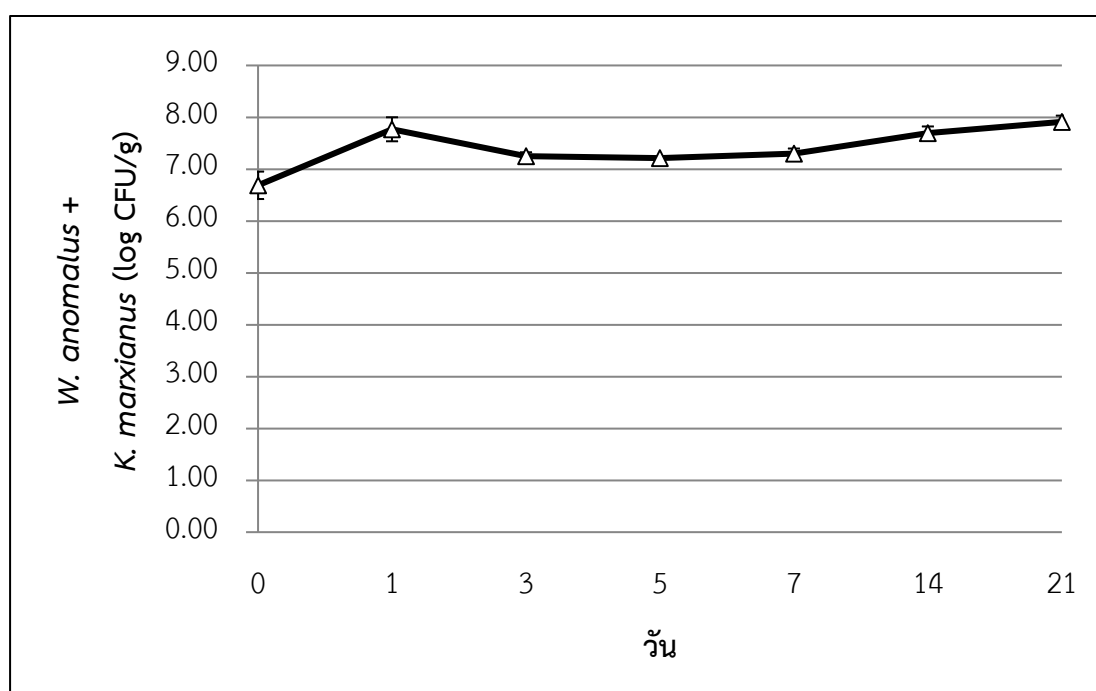
จากผลการนับจำนวนแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ในไซเลจข้าวโพดปลอดเชื้อที่เลี้ยงราร่วมกับยีสต์และแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย พบว่า จำนวนแล็กติกแอซิดแบคทีเรียเริ่มต้นเท่ากับ 7.58 ± 0.02 log CFU/กรัม และเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดในวันที่ 1 (8.81 ± 0.03 log CFU/กรัม) และคงที่จนถึงสัปดาห์การบ่ม ซึ่งมีจำนวนแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในวันที่ 21 ของการบ่มเท่ากับ 8.85 ± 0.13 log CFU/กรัม (ภาพที่ 4.12)



ภาพที่ 4.12 จำนวนแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ในไซเลจข้าวโพดปลอดเชื้อที่เติม *A. flavus* ร่วมกับแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 และยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalous* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 (ชุดทดสอบ) และเติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม)

จำนวนยีสต์ *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0652

ผลการนับจำนวนยีสต์ *W. anomalus* และ *K. marxianus* ในไซเลจข้าวโพดปลอดเชื้อที่เลี้ยงราร่วมกับยีสต์และแบคทีเรียพบว่า ยีสต์ในวันที่ 0 ของการบ่มมีจำนวนยีสต์เริ่มต้นเท่ากับ 6.69 ± 0.26 log CFU/กรัม และมีจำนวนเพิ่มขึ้นในวันที่ 1 (7.77 ± 0.23 log CFU/กรัม) และเมื่อสิ้นสุดการบ่มมีจำนวนยีสต์เท่ากับ 7.91 ± 0.12 log CFU/กรัม (ภาพที่ 4.13)

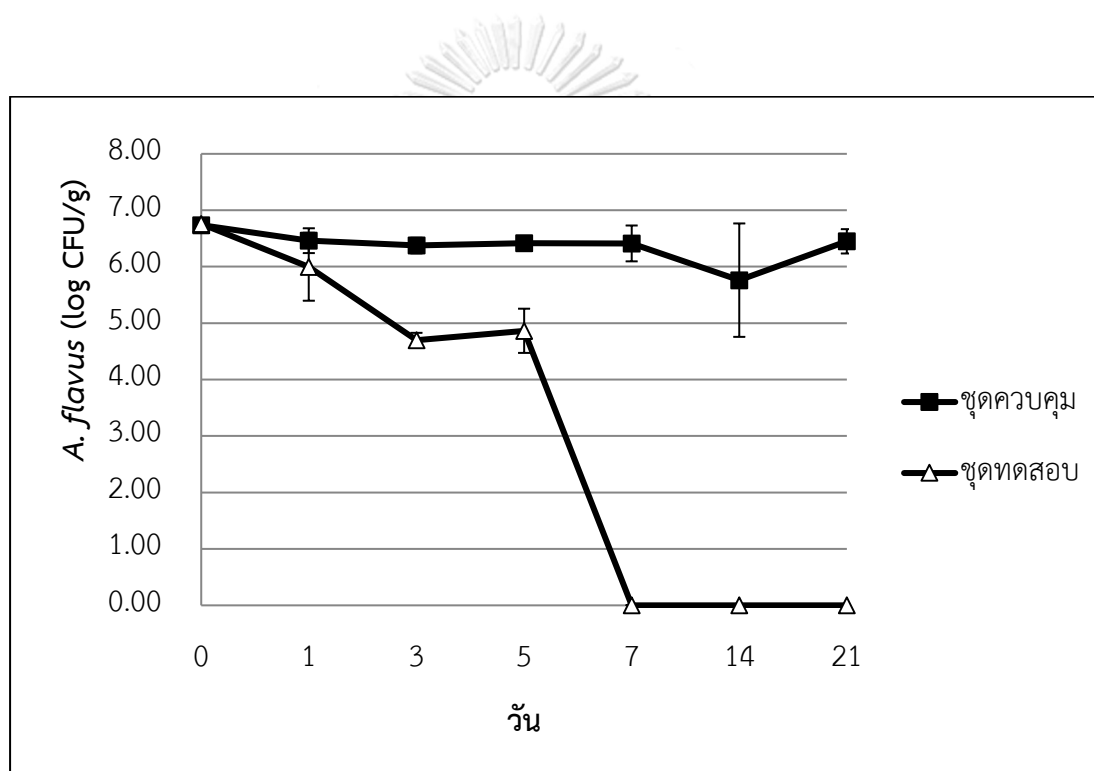


CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาพที่ 4.13 จำนวนยีสต์ *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0652 ในไซเลจข้าวโพดปลอดเชื้อที่เติม *A. flavus* ร่วมกับแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 และยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 (ชุดทดสอบ) และเติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม)

จำนวน *A. flavus*

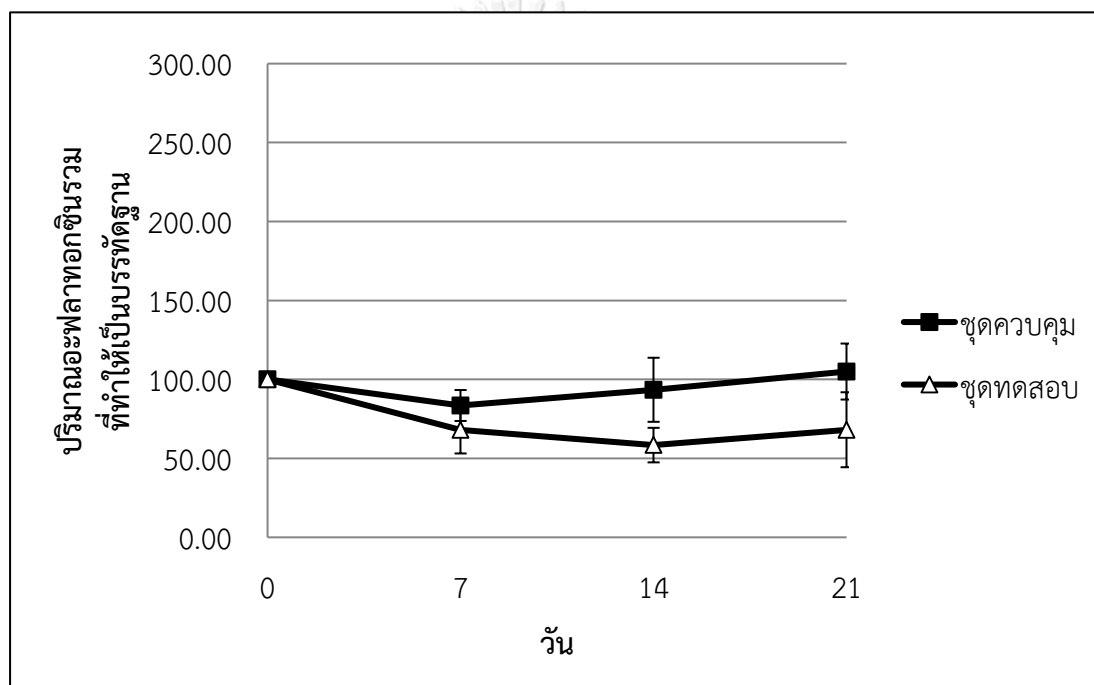
ผลการนับจำนวนรา *A. flavus* ในไซเลจข้าวโพดปลอดเชื้อทั้งชุดทดสอบและชุดควบคุม พบว่า ในชุดทดสอบมีจำนวนราเริ่มต้นเท่ากับ 6.76 ± 0.02 log CFU/กรัม และมีจำนวนลดลงอย่างต่อเนื่องจนกระทั่งไม่พบการเจริญของราในวันที่ 7 จนถึงสิ้นสุดระยะเวลาของการบ่ม ซึ่งแตกต่างกับชุดควบคุมที่มีจำนวนราเริ่มต้นเท่ากับ 6.74 ± 0.05 log CFU/กรัม หลังจากนั้น มีจำนวนราคงที่จนถึงสิ้นสุดระยะเวลาการบ่ม ซึ่งมีจำนวนราในวันที่ 21 ของการบ่มเท่ากับ 6.45 ± 0.22 log CFU/กรัม (ภาพที่ 4.14)



ภาพที่ 4.14 จำนวน *A. flavus* ในไซเลจข้าวโพดปลอดเชื้อที่เติม *A. flavus* ร่วมกับแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 และยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalous* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 (ชุดทดสอบ) และเติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม)

ปริมาณอะฟลาทอกซินรวม

จากการวิเคราะห์ปริมาณอะฟลาทอกซินรวมในวันที่ 0, 7, 14 และ 21 แล้วนำค่าปริมาณอะฟลาทอกซินรวมมาทำให้เป็นบรรทัดฐานพบว่า ในชุดควบคุมมีปริมาณอะฟลาทอกซินรวม บรรทัดฐานค่อนข้างคงที่จนถึงสิ้นสุดการบ่ม โดยในวันที่ 21 มีปริมาณอะฟลาทอกซินรวมบรรทัดฐาน เท่ากับ 104.99 ± 17.73 สำหรับชุดทดสอบมีปริมาณอะฟลาทอกซินรวมลดลงอย่างต่อเนื่องจนถึง สิ้นสุดระยะการบ่มเท่ากับ 68.13 ± 23.73 (ภาพที่ 4.15)



ภาพที่ 4.15 ปริมาณอะฟลาทอกซินรวมที่ทำให้เป็นบรรทัดฐานในไซเลจข้าวโพดปลูกเชื้อที่เติม *A. flavus* ร่วมกับแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 และยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalous* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 (ชุดทดสอบ) และที่เติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม)

จากการทดสอบความสามารถของยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 และแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ต่อการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินรวมของ *A. flavus* ในไซเลจข้าวโพดปลอดเชื้อตามกรรมวิธีในตาราง 3.3 (บทที่ 3 ข้อ 3.3.4.1) (ผลการทดลองข้อ 4.2.1-4.2.3) เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองดังกล่าว พบว่า การใช้ยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของราได้ดีที่สุด ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของราได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 3 จนกระทั่งสิ้นสุดระยะเวลาการบ่ม รองลงมาได้แก่ การใช้แล็กติกแอซิดแบคทีเรียร่วมกับยีสต์ผสม (*L. paracasei* AN3 + *W. anomalus* MSCU 0652 + *K. marxianus* MSCU 0655) โดยไม่พบการเจริญของราในชุดทดสอบตั้งแต่วันที่ 7 ของการบ่มจนกระทั่งสิ้นสุดระยะเวลาการบ่ม ในขณะที่การใช้ *L. paracasei* AN3 สามารถลดการเจริญของราได้เพียงเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ตารางที่ 4.5)

ตารางที่ 4.5 จำนวน *A. flavus* ในไซเลจข้าวโพดปลอดเชื้อเมื่อเติมแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย (*L. paracasei* AN3) ยีสต์ผสม (*W. anomalus* MSCU 0652 + *K. marxianus* MSCU 0655) และแล็กติกแอซิดแบคทีเรียร่วมกับยีสต์ผสม (*L. paracasei* AN3 + *W. anomalus* MSCU 0652 + *K. marxianus* MSCU 06525) (ชุดทดสอบ) เปรียบเทียบกับไซเลจข้าวโพดปลอดเชื้อที่เติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 21 วัน

วัน	แล็กติกแอซิดแบคทีเรีย			ยีสต์ผสม			แล็กติกแอซิดแบคทีเรียและยีสต์ผสม		
	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ	%ยับยั้ง*	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ	%ยับยั้ง*	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ	%ยับยั้ง*
0	6.62±0.11	6.67±0.22	-0.76	6.23±0.08	6.38±0.01	-2.41	6.74±0.05	6.76±0.02	-0.30
1	6.09±0.10	5.93±0.13	2.63	6.08±0.21	6.36±0.04	-4.61	5.46±0.22	4.00±0.60	26.74
3	6.14±0.19	5.60±0.09	8.79	5.74±0.17	0.00	100	6.37±0.14	4.07±0.13	36.11
5	6.08±0.20	5.57±0.19	8.39	6.08±0.08	0.00	100	6.42±0.04	4.86±0.39	24.30
7	6.10±0.20	5.78±0.05	5.25	6.21±0.07	0.00	100	6.41±0.32	0.00	100
14	6.27±0.05	5.73±0.06	8.61	6.06±0.19	0.00	100	5.76±1.00	0.00	100
21	6.26±0.11	5.61±0.07	10.38	6.09±0.32	0.00	100	6.45±0.22	0.00	100

* เมื่อเทียบกับชุดควบคุมในวันเดียวกัน

เมื่อพิจารณาปริมาณอะฟลาทอกซินรวมพบว่า ปริมาณอะฟลาทอกซินรวมในทุกชุดทดสอบจากกรรมวิธีต่างๆ มีค่าลดลงจากชุดทดสอบในวันแรกจนถึงสิ้นสุดระยะเวลาการบ่ม โดยชุดทดสอบในการใช้แล็กติกแอซิดแบคทีเรียร่วมกับยีสต์ผสมมีแนวโน้มในการลดลงของอะฟลาทอกซินรวมมากที่สุดจากวันแรกของการบ่ม โดยมีปริมาณอะฟลาทอกซินรวมลดลงตลอดการทดลอง และมีเปอร์เซ็นต์การลดลงของปริมาณอะฟลาทอกซินรวมสูงสุดเท่ากับ 54.82 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 21 ของการบ่ม เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมในวันเดียวกัน (ตารางที่ 4.6)

ตารางที่ 4.6 ปริมาณอะฟลาทอกซินรวมในไซเลจข้าวโพดปลอดเชื้อเมื่อเติมแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย (*L. paracasei* AN3) ยีสต์ผสม (*W. anomalous* MSCU 0652 + *K. marxianus* MSCU 0655) และแล็กติกแอซิดแบคทีเรียร่วมกับยีสต์ผสม (*L. paracasei* AN3 + *W. anomalous* MSCU 0652 + *K. marxianus* MSCU 06525) (ชุดทดสอบ) เปรียบเทียบกับไซเลจข้าวโพดปลอดเชื้อที่เติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 21 วัน

วัน	ปริมาณอะฟลาทอกซินรวมในกรรมวิธีต่างๆ (นาโนกรัมต่อกรัม)								
	แล็กติกแอซิดแบคทีเรีย			ยีสต์ผสม			แล็กติกแอซิดแบคทีเรียและยีสต์ผสม		
	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ	% ลดลง*	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ	% ลดลง*	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ	% ลดลง*
0	113.50±16.53	163.00±20.13	-43.61	190.17±41.60	206.00±47.49	-8.32	156.00±59.26	137.33±38.02	11.97
7	149.33±21.10	152.33±18.77	-2.01	168.00±13.61	171.67±36.49	-2.18	162.00±51.40	88.83±37.54	45.17
14	164.17±32.47	118.83±19.66	25.61	129.00±14.76	147.67±28.82	-14.47	159.33±30.03	75.17±64.82	52.82
21	189.00±52.37	123.67±12.00	34.57	169.83±39.47	167.00±39.63	1.67	159.00±23.47	71.83±45.26	54.82

* เมื่อเทียบกับชุดควบคุมในวันเดียวกัน

แต่เนื่องจากปริมาณอะฟลาทอกซินรวมของทุกกรรมวิธีในวันที่ 0 ของการบ่ม มีปริมาณอะฟลาทอกซินรวมตั้งต้นทั้งในชุดทดสอบและชุดควบคุมที่ไม่เท่ากัน ทำให้การนำมาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของยีสต์และแล็กติกแอซิดแบคทีเรียต่อการลดการผลิตอะฟลาทอกซินรวมของเราเป็นไปได้ยาก (ตารางที่ 4.6) ดังนั้น เพื่อให้ค่าเริ่มต้นของอะฟลาทอกซินรวมเท่ากันและนำไปเปรียบเทียบกับกรรมวิธีต่างๆ ได้ จึงใช้วิธีเทียบปริมาณอะฟลาทอกซินรวมให้เป็นบรรทัดฐานดังแสดงในตารางที่ 4.7 พบว่า การใช้แล็กติกแอซิดแบคทีเรียสามารถลดปริมาณอะฟลาทอกซินรวมบรรทัดฐานได้มากที่สุดในวันที่ 14 ของการบ่ม เท่ากับ 48.20 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม และเมื่อสิ้นสุดการบ่ม การใช้แล็กติกแอซิดแบคทีเรียสามารถลดปริมาณอะฟลาทอกซินรวมบรรทัดฐานเท่ากับ 20.08 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับชุดควบคุมในวันเดียวกัน และเท่ากับ 2.42 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับปริมาณอะฟลาทอกซินรวมเริ่มต้น การใช้ยีสต์ผสมสามารถลดปริมาณอะฟลาทอกซินรวม

บรรทัดฐานเท่ากับ 23.07 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับชุดควบคุมในวันเดียวกัน และเท่ากับ 29.20 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับปริมาณอะพลาทอกซินรวมเริ่มต้น และการใช้แล็กติกแอซิดแบคทีเรียร่วมกับ ยีสต์ผสมสามารถลดปริมาณอะพลาทอกซินรวมบรรทัดฐานเท่ากับ 35.11 เปอร์เซ็นต์ และเท่ากับ 31.87 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.7)

ตารางที่ 4.7 ปริมาณอะพลาทอกซินรวมที่ทำให้เป็นบรรทัดฐานในไซเลจข้าวโพดปลอดเชื้อเมื่อเติม แล็กติกแอซิดแบคทีเรีย (*L. paracasei* AN3) ยีสต์ผสม (*W. anomalous* MSCU 0652 + *K. marxianus* MSCU 0655) และแล็กติกแอซิดแบคทีเรียร่วมกับยีสต์ผสม (*L. paracasei* AN3 + *W. anomalous* MSCU 0652 + *K. marxianus* MSCU 06525) (ชุดทดสอบ) เปรียบเทียบกับไซเลจ ข้าวโพดปลอดเชื้อที่เติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 21 วัน

ปริมาณอะพลาทอกซินรวมที่ทำให้เป็นบรรทัดฐานในกรรมวิธีต่างๆ									
วัน	แล็กติกแอซิดแบคทีเรีย			ยีสต์ผสม			แล็กติกแอซิดแบคทีเรียและยีสต์ผสม		
	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ	% ลดลง*	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ	% ลดลง*	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ	% ลดลง*
0	100.00±0.00	100.00±0.00	0.00	100.00±0.00	100.00±0.00	0.00	100.00±0.00	100.00±0.00	0.00
7	137.30±35.54	90.21±4.13	34.30	77.42±16.25	81.06±36.33	-4.70	83.49±9.80	68.07±14.96	18.47
14	132.77±41.00	68.78±12.79	48.20	69.54±4.25	66.55±7.79	4.29	93.44±20.29	58.41±10.94	37.49
21	122.09±5.24	97.58±18.48	20.08	92.79±18.37	70.80±13.96	23.70	104.99±17.73	68.13±23.73	35.11

* เมื่อเทียบกับชุดควบคุมในวันเดียวกัน

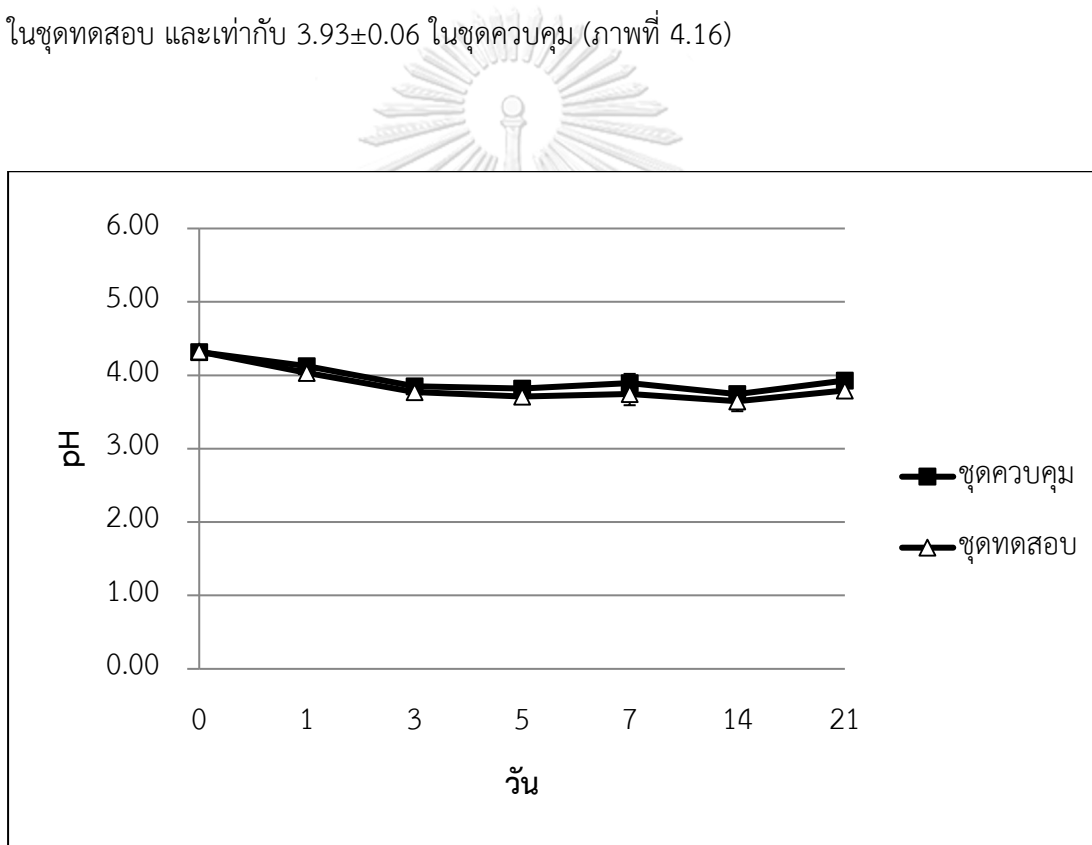
4.4 การทดสอบความสามารถของยีสต์และแบคทีเรียแอซิดแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินรวมในไซเลจของ *A. flavus* ข้าวโพดร่วมกับจุลินทรีย์ประจำถิ่น

จากผลการทดลองในข้อที่ 4.3 พบว่า แบคทีเรียแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 และยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 สามารถเจริญและเพิ่มจำนวนได้ในไซเลจข้าวโพด และยังคงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินรวมของ *A. flavus* จึงนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินรวมของ *A. flavus* ในไซเลจข้าวโพดปกติ เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกเมื่อมีจุลินทรีย์ประจำถิ่นเข้ามาร่วมในกระบวนการหมักไซเลจข้าวโพดด้วย โดยทดสอบตามกรรมวิธีในตารางที่ 3.3 (บทที่ 3 ข้อ 3.3.4) ได้แก่ การทดสอบประสิทธิภาพในการหมักไซเลจข้าวโพดของ 1) แบคทีเรียแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 2) ยีสต์ผสม *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 และ 3) หัวเชื้อผสมระหว่าง *L. paracasei* AN3 ร่วมกับยีสต์ผสม *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655

4.4.1 การทดสอบความสามารถของแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3

ความเป็นกรด-เบส

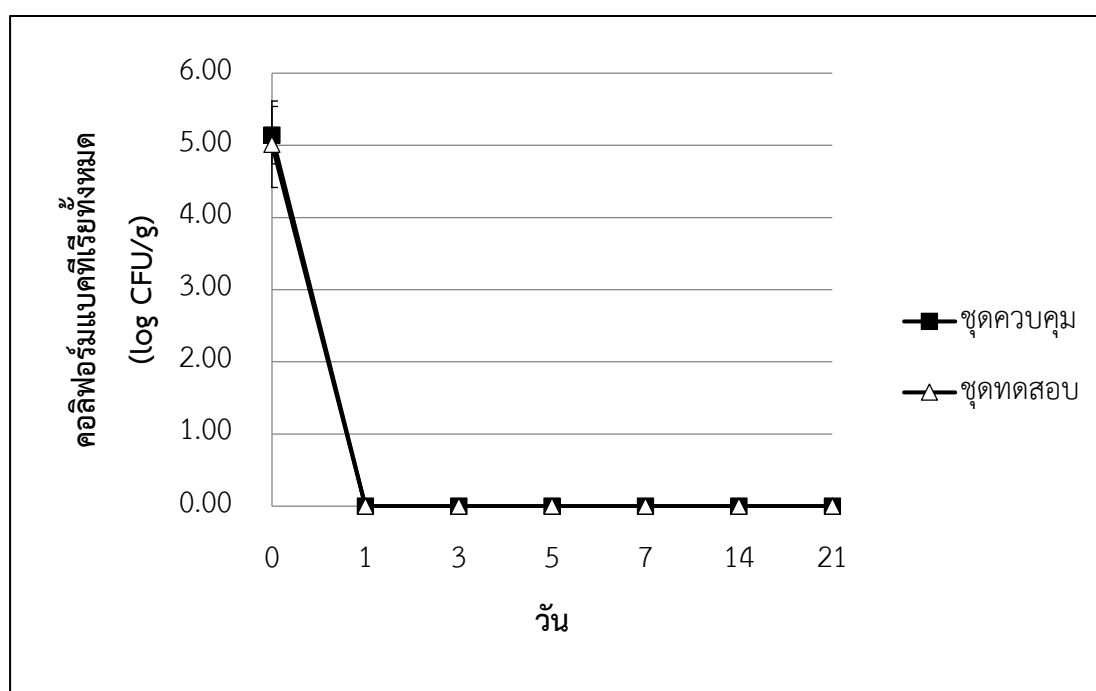
ค่าความเป็นกรด-เบสของตัวอย่างไซเลจข้าวโพดทั้งในชุดทดสอบที่เติม *A. flavus* ร่วมกับแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 และชุดควบคุมที่เติมราเพียงอย่างเดียว มีค่าใกล้เคียงกันและมีแนวโน้มลดลงตลอดระยะเวลาของการบ่ม โดยค่าความเป็นกรด-เบสของชุดทดสอบและชุดควบคุมในวันที่ 0 มีค่าเท่ากับ 4.32 ± 0.06 และ 4.32 ± 0.05 ตามลำดับ หลังจากนั้น มีค่าความเป็นกรด-เบสลดลงเรื่อยๆ จนกระทั่งในวันที่ 21 ของการบ่ม มีค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 3.79 ± 0.05 ในชุดทดสอบ และเท่ากับ 3.93 ± 0.06 ในชุดควบคุม (ภาพที่ 4.16)



ภาพที่ 4.16 ค่าความเป็นกรด-เบสของไซเลจข้าวโพดที่เติม *A. flavus* ร่วมกับแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 (ชุดทดสอบ) และที่เติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม)

จำนวนคอลิฟอร์มแบคทีเรีย

ผลการนับจำนวนคอลิฟอร์มแบคทีเรียในตัวอย่างไซเลจข้าวโพดชุดทดสอบและชุดควบคุม พบว่า มีจำนวนคอลิฟอร์มแบคทีเรียเริ่มต้นในชุดทดสอบเท่ากับ 5.14 ± 0.40 และในชุดควบคุมเท่ากับ 5.02 ± 0.60 log CFU/กรัม หลังจากนั้น ไม่พบการเจริญของคอลิฟอร์มแบคทีเรียตั้งแต่วันที่ 1 จนถึงสิ้นสุดระยะเวลาการบ่มทั้งในชุดทดสอบและชุดควบคุม (ภาพที่ 4.17)

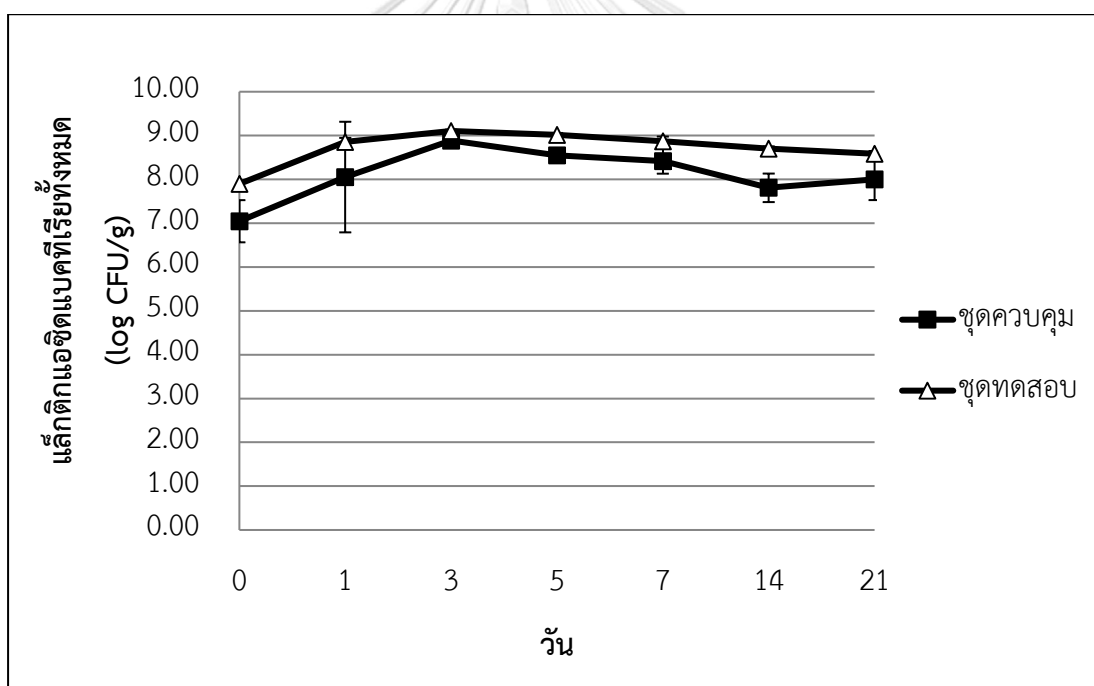


CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาพที่ 4.17 จำนวนคอลิฟอร์มแบคทีเรียในไซเลจข้าวโพดที่เติม *A. flavus* ร่วมกับเล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 (ชุดทดสอบ) และที่เติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม)

จำนวนแล็กติกแอซิดแบคทีเรียทั้งหมด

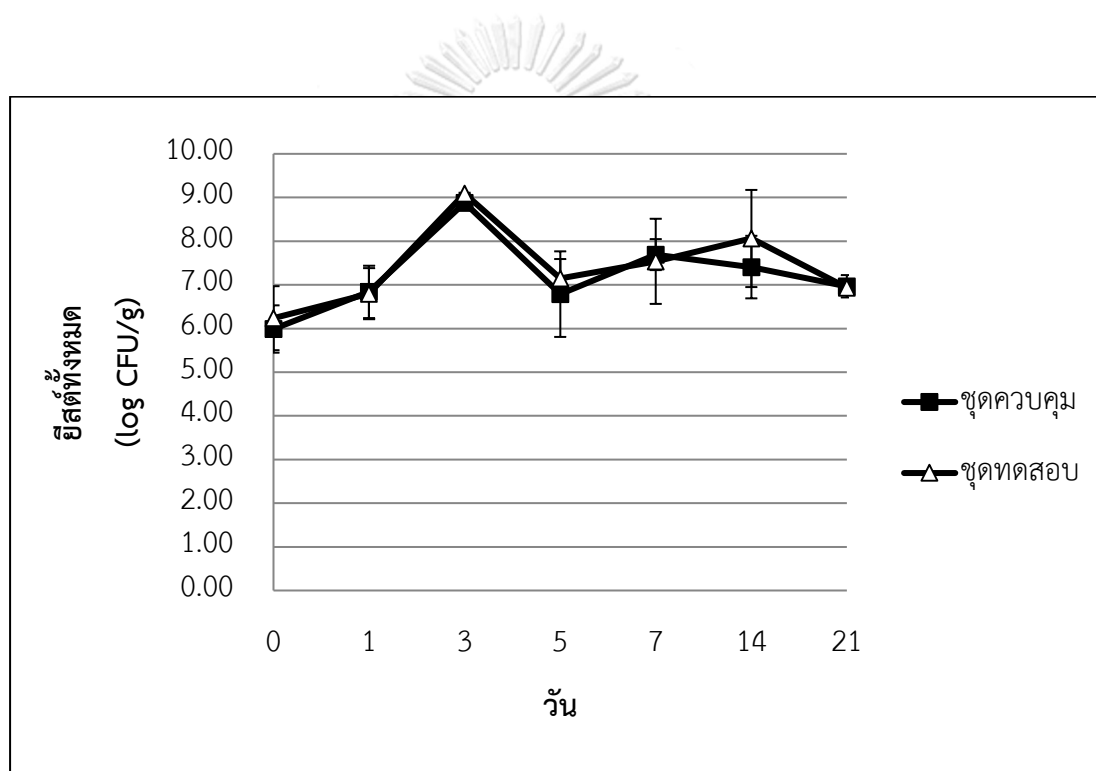
จากผลการนับจำนวนแล็กติกแอซิดแบคทีเรียทั้งหมดในชุดทดสอบและชุดควบคุมของตัวอย่างไซเลจข้าวโพด พบว่า ในชุดทดสอบมีจำนวนแล็กติกแอซิดแบคทีเรียทั้งหมดมากกว่าชุดควบคุมตลอดระยะเวลาการบ่ม โดยชุดทดสอบมีจำนวนแล็กติกแอซิดแบคทีเรียทั้งหมดเพิ่มขึ้นสูงสุดในวันที่ 3 เท่ากับ 9.10 ± 0.03 log CFU/กรัม หลังจากนั้น มีจำนวนแล็กติกแอซิดแบคทีเรียทั้งหมดค่อนข้างคงที่และลดลงเล็กน้อยเมื่อสิ้นสุดการบ่ม (8.58 ± 0.6 log CFU/กรัม) สำหรับในชุดควบคุมที่เติมราเพียงอย่างเดียวพบว่า มีจำนวนแล็กติกแอซิดแบคทีเรียทั้งหมดเพิ่มขึ้นในวันที่ 3 เท่ากับ 8.89 ± 0.04 log CFU/กรัม และเมื่อสิ้นสุดการบ่มมีจำนวนแล็กติกแอซิดแบคทีเรียทั้งหมดเท่ากับ 8.00 ± 0.48 log CFU/กรัม (ภาพที่ 4.18)



ภาพที่ 4.18 จำนวนแล็กติกแอซิดแบคทีเรียทั้งหมดในไซเลจข้าวโพดที่เติม *A. flavus* ร่วมกับแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 (ชุดทดสอบ) และที่เติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม)

จำนวนยีสต์ทั้งหมด

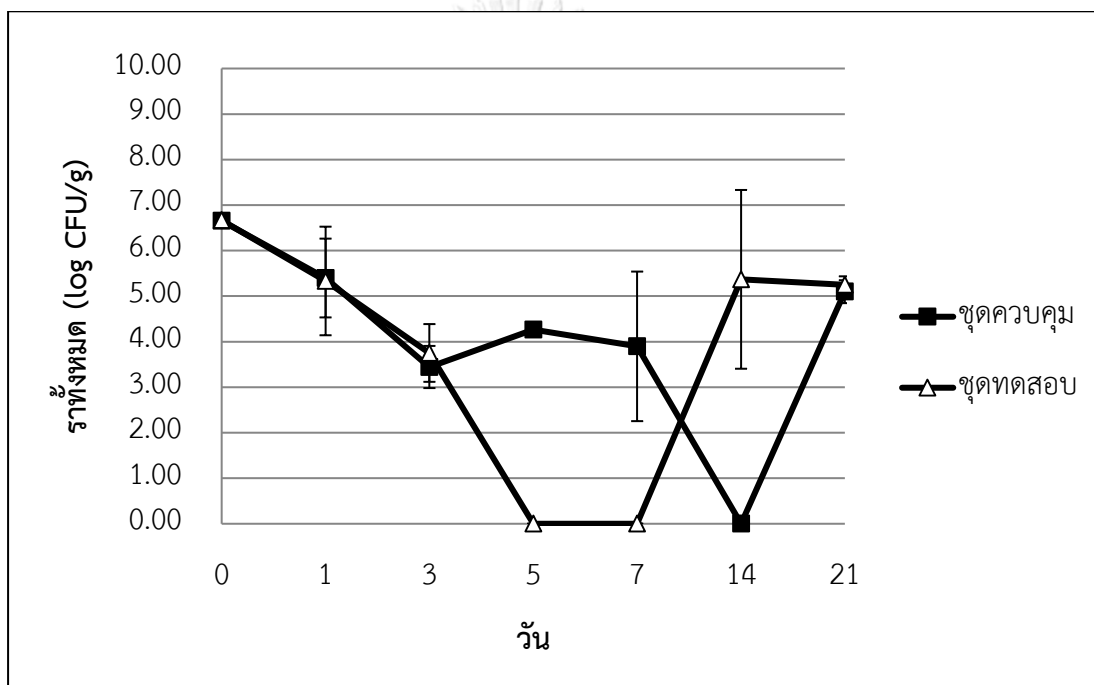
ผลการนับจำนวนยีสต์ทั้งหมดพบว่า ยีสต์ในชุดทดสอบและชุดควบคุมมีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกันตลอดระยะเวลาการบ่ม โดยในชุดทดสอบและชุดควบคุมมีจำนวนยีสต์เริ่มต้นเท่ากับ 6.42 ± 0.73 log CFU/กรัม และ 5.99 ± 0.54 log CFU/กรัม ตามลำดับ และมีจำนวนสูงสุดในวันที่ 3 ของการบ่มเท่ากับ 9.09 ± 0.02 log CFU/กรัม และ 8.88 ± 0.03 log CFU/กรัม ตามลำดับ หลังจากนั้น จำนวนยีสต์มีแนวโน้มลดลงเพียงเล็กน้อยจนสิ้นสุดการบ่ม (6.94 ± 0.08 log CFU/กรัม และ 6.97 ± 0.26 log CFU/กรัม ตามลำดับ) (ภาพที่ 4.19)



ภาพที่ 4.19 จำนวนยีสต์ทั้งหมดในไซเลจข้าวโพดที่เติม *A. flavus* ร่วมกับแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 (ชุดทดสอบ) และที่เติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม)

จำนวนราทั้งหมด

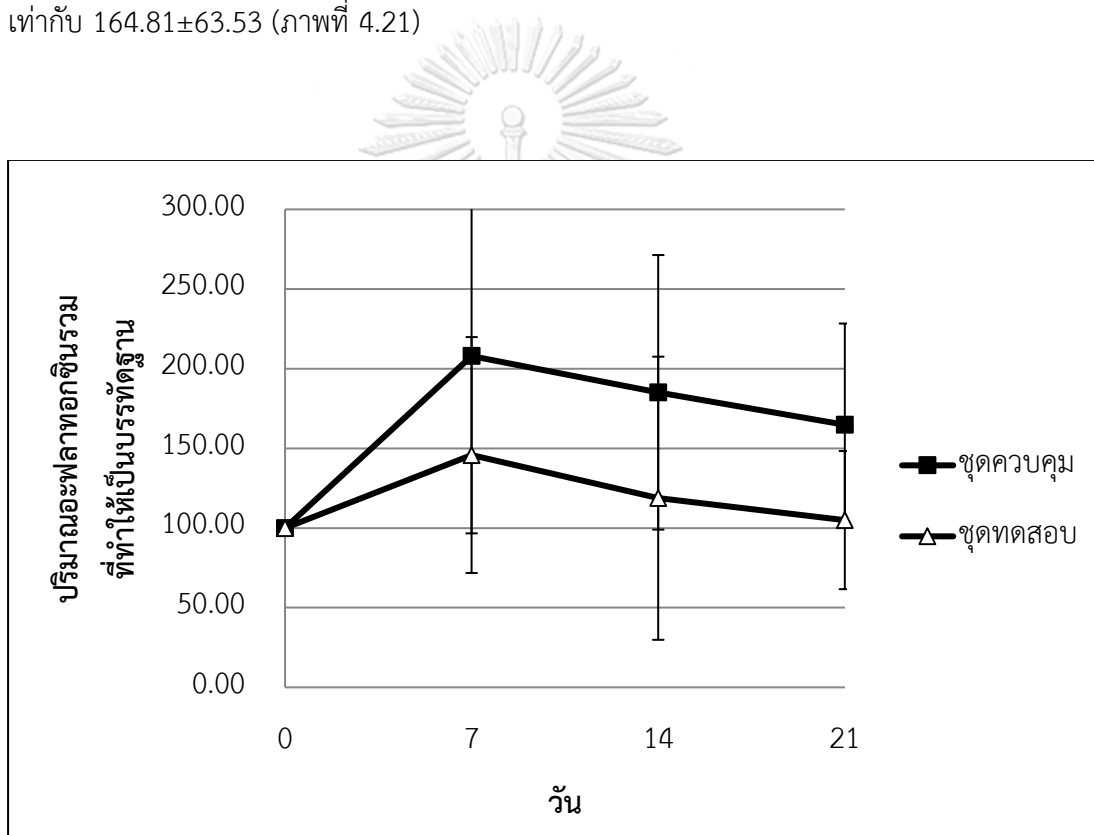
จากการนับจำนวนราทั้งหมดในตัวอย่างไซเลจข้าวโพดพบว่า จำนวนราเริ่มต้นในชุดทดสอบและชุดควบคุมเท่ากับ 6.67 ± 0.04 log CFU/กรัม และ 6.65 ± 0.06 log CFU/กรัม ตามลำดับ หลังจากนั้น ในชุดทดสอบมีจำนวนราลดลงอย่างเห็นได้ชัดในช่วงแรกของการบ่มและไม่พบการเจริญของราในวันที่ 5 อย่างไรก็ตาม ปริมาณราทั้งในชุดทดสอบและชุดควบคุมมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในช่วงท้ายของการทดลอง (ภาพที่ 4.20)



ภาพที่ 4.20 จำนวนราทั้งหมดในไซเลจข้าวโพดที่เติม *A. flavus* ร่วมกับแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 (ชุดทดสอบ) และที่เติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม)

ปริมาณอะฟลาทอกซินรวม

เมื่อวัดปริมาณอะฟลาทอกซินรวมในวันที่ 0, 7, 14 และ 21 แล้วนำค่าปริมาณอะฟลาทอกซินรวมมาทำให้เป็นบรรทัดฐานพบว่า ทั้งในชุดทดสอบและชุดควบคุมมีแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของปริมาณอะฟลาทอกซินรวมบรรทัดฐานไปในทิศทางเดียวกัน โดยในชุดทดสอบมีปริมาณอะฟลาทอกซินรวมบรรทัดฐานเพิ่มขึ้นในช่วงแรก และลดลงต่ำสุดในวันที่ 14 ของการบ่ม ซึ่งปริมาณอะฟลาทอกซินรวมบรรทัดฐานของชุดทดสอบมีปริมาณน้อยกว่าชุดควบคุมตลอดการบ่ม เมื่อสิ้นสุดการบ่มในชุดทดสอบมีปริมาณอะฟลาทอกซินรวมบรรทัดฐานเท่ากับ 104.97 ± 43.35 และในชุดควบคุมมีค่าเท่ากับ 164.81 ± 63.53 (ภาพที่ 4.21)

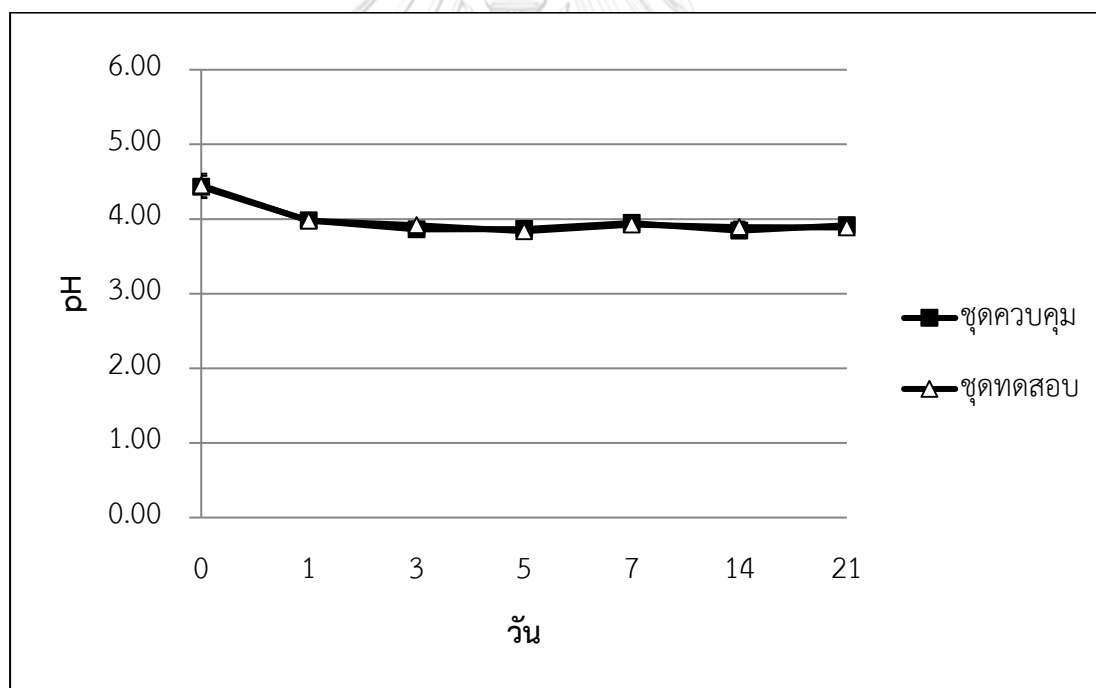


ภาพที่ 4.21 ปริมาณอะฟลาทอกซินรวมที่ทำให้เป็นบรรทัดฐานในไซเลจข้าวโพดที่เติม *A. flavus* ร่วมกับแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 (ชุดทดสอบ) และที่เติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม)

4.4.2 การทดสอบความสามารถของยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalous* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655

ความเป็นกรด-เบส

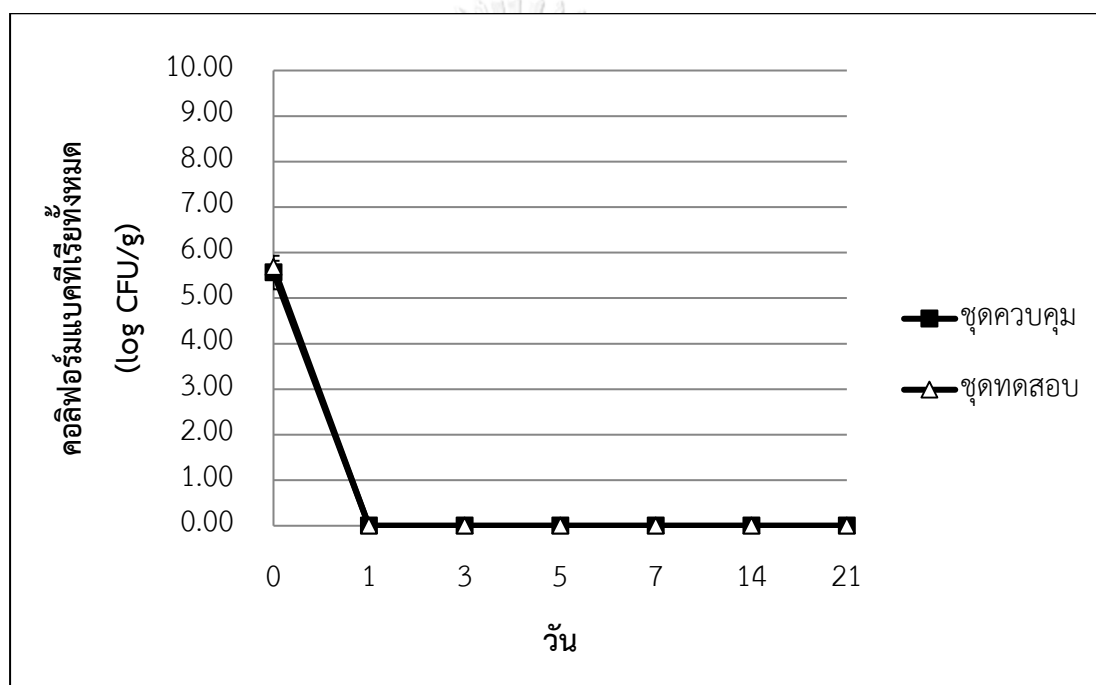
ค่าความเป็นกรด-เบสเริ่มต้นของชุดทดสอบที่เติม *A. flavus* ร่วมกับยีสต์ *W. anomalous* และ *K. marxianus* ในวันที่ 0 มีค่าเท่ากับ 4.45 ± 0.16 หลังจากนั้น มีค่าลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 1 และคงที่จนถึงสิ้นสุดการบ่ม ซึ่งในชุดทดสอบมีค่าความเป็นกรด-เบสใกล้เคียงกับชุดควบคุมตลอดระยะเวลาการบ่ม โดยชุดควบคุมที่เติมราเพียงอย่างเดียวมีค่าความเป็นกรด-เบสเริ่มต้นเท่ากับ 4.43 ± 0.15 และมีค่าลดลงในวันที่ 1 และคงที่จนถึงสิ้นสุดระยะเวลาการบ่ม ชุดทดสอบและชุดควบคุมมีค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 3.89 ± 0.09 และ 3.92 ± 0.07 ตามลำดับ ดังแสดงในภาพ 4.22



ภาพที่ 4.22 ค่าความเป็นกรด-เบสของไซเลจข้าวโพดที่เติม *A. flavus* ร่วมกับยีสต์ *W. anomalous* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 (ชุดทดสอบ) และเติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม)

จำนวนคอลิฟอร์มแบคทีเรีย

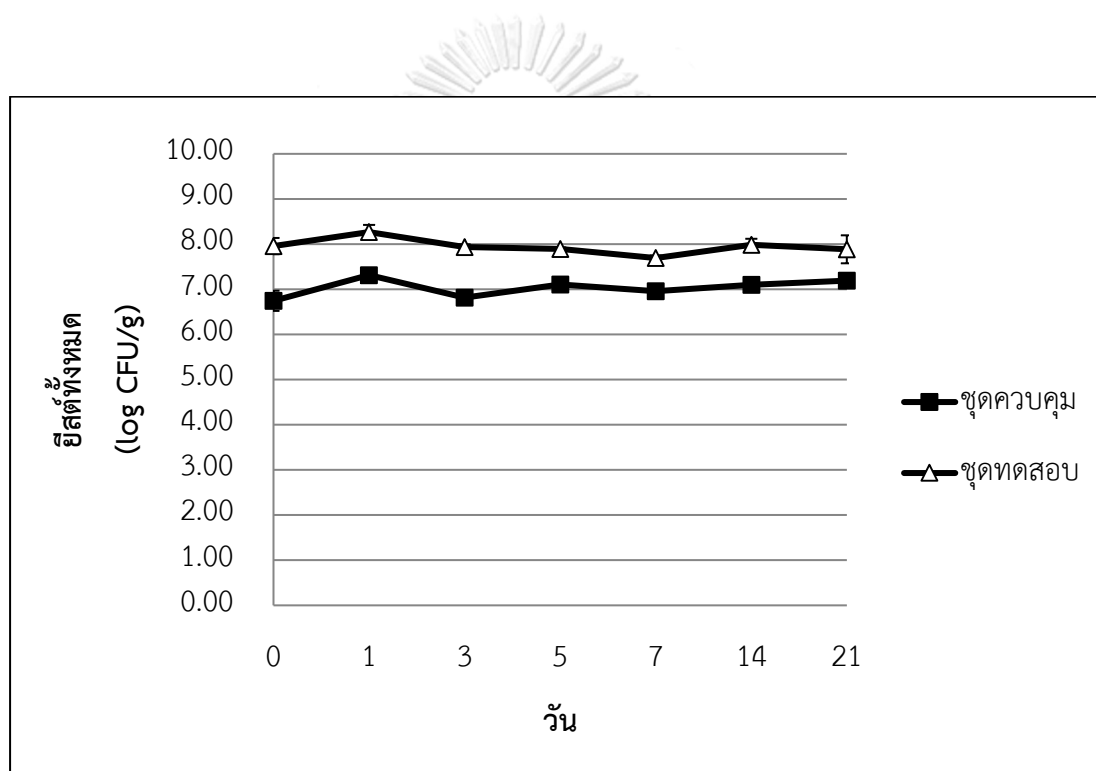
ผลการนับจำนวนคอลิฟอร์มแบคทีเรียในตัวอย่างไซเลจข้าวโพดชุดทดสอบและชุดควบคุม พบจำนวนคอลิฟอร์มแบคทีเรียในไซเลจข้าวโพดในวันที่ 0 เท่านั้น โดยมีจำนวนคอลิฟอร์มแบคทีเรียเท่ากับ 5.68 ± 0.14 log CFU/กรัม ในชุดทดสอบ และ 5.56 ± 0.37 log CFU/กรัม ในชุดควบคุม หลังจากนั้น ไม่พบการเจริญของคอลิฟอร์มแบคทีเรียตั้งแต่วันที่ 1 จนถึงสิ้นสุดการบ่ม (ภาพที่ 4.23)



ภาพที่ 4.23 จำนวนคอลิฟอร์มแบคทีเรียทั้งหมดในไซเลจข้าวโพดที่เติม *A. flavus* ร่วมกับยีสต์ *W. anomalous* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 (ชุดทดสอบ) และเติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม)

จำนวนยีสต์ทั้งหมด

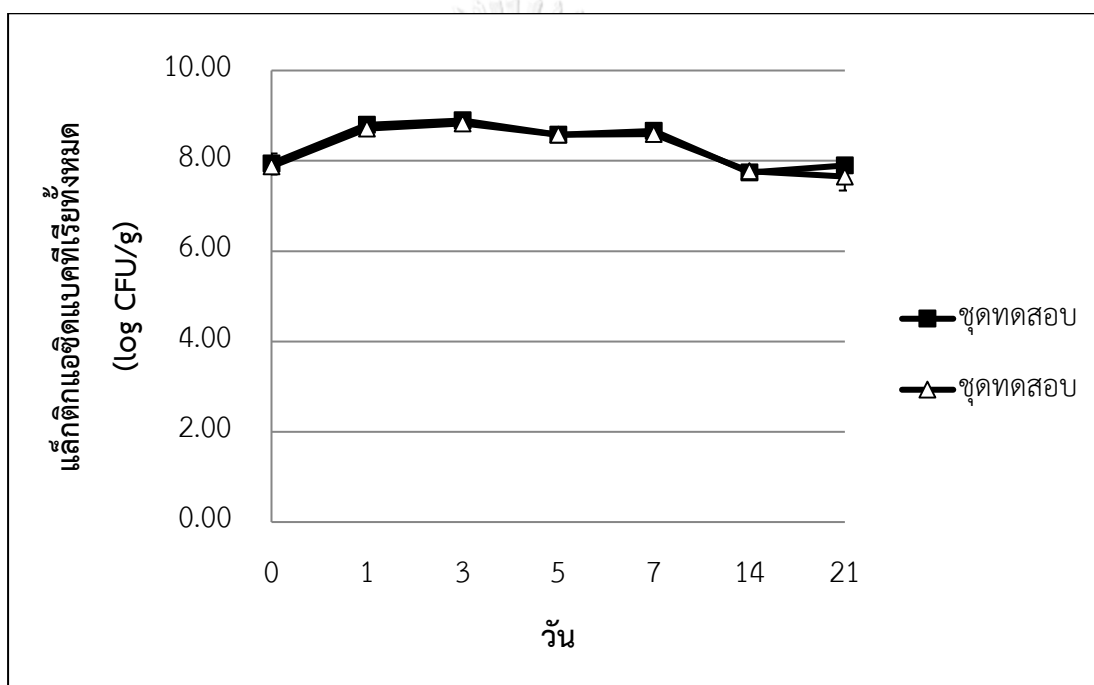
จำนวนยีสต์ในตัวอย่างไซเลจข้าวโพดชุดทดสอบที่มีการเติม *A. flavus* ร่วมกับยีสต์ *W. anomalous* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 มีมากกว่าจำนวนยีสต์ในชุดควบคุมตลอดการทดลอง โดยจำนวนยีสต์เริ่มต้นในชุดทดสอบและชุดควบคุมเท่ากับ 7.96 ± 0.09 และ 6.74 ± 0.25 log CFU/กรัม จากนั้น มีจำนวนคงที่จนถึงสิ้นสุดระยะเวลาการบ่ม ในวันที่ 21 ของการบ่มชุดทดสอบมีจำนวนยีสต์เท่ากับ 7.89 ± 0.06 log CFU/กรัม และชุดควบคุมมีจำนวนยีสต์เท่ากับ 7.19 ± 0.38 log CFU/กรัม ตามลำดับ (ภาพที่ 4.24)



ภาพที่ 4.24 จำนวนยีสต์ทั้งหมดในไซเลจข้าวโพดที่เติม *A. flavus* ร่วมกับยีสต์ *W. anomalous* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 (ชุดทดสอบ) และเติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม)

จำนวนแล็กติกแอซิดแบคทีเรียทั้งหมด

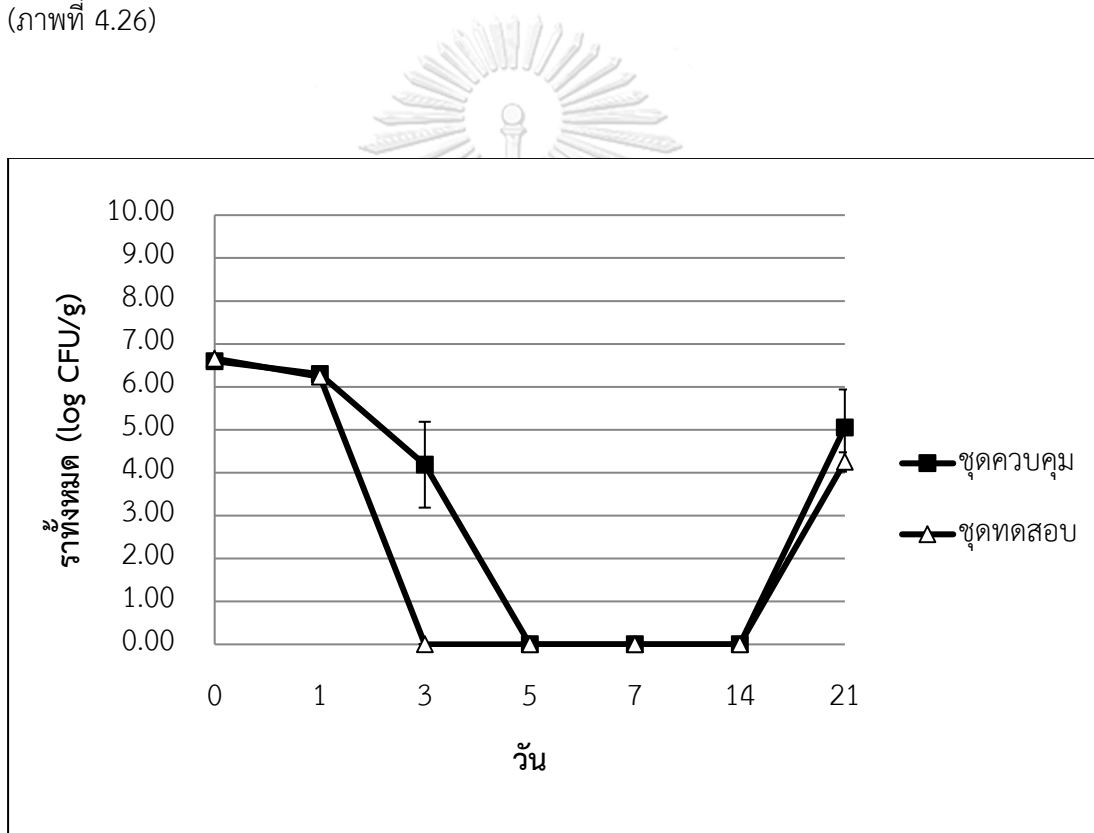
จากการนับจำนวนแล็กติกแอซิดแบคทีเรียทั้งหมดในชุดทดสอบและชุดควบคุม พบว่ามีจำนวนแล็กติกแอซิดแบคทีเรียใกล้เคียงกันตลอดการบ่ม ในชุดทดสอบและชุดควบคุมมีจำนวนแล็กติกแอซิดแบคทีเรียเริ่มต้นเท่ากับ 7.88 ± 0.18 และ 7.94 ± 0.22 log CFU/กรัม ตามลำดับ หลังจากนั้น มีจำนวนเพิ่มขึ้นในวันที่ 1 และมีจำนวนค่อนข้างคงที่จนถึงสิ้นสุดการบ่ม (7.65 ± 0.31 log CFU/กรัม สำหรับชุดทดสอบ และ 7.90 ± 0.05 log CFU/กรัม สำหรับชุดควบคุม) (ภาพที่ 4.25)



ภาพที่ 4.25 จำนวนแล็กติกแอซิดแบคทีเรียทั้งหมดในไซเลจข้าวโพดที่เติม *A. flavus* ร่วมกับยีสต์ *W. anomalous* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 (ชุดทดสอบ) และเติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม)

จำนวนราทั้งหมด

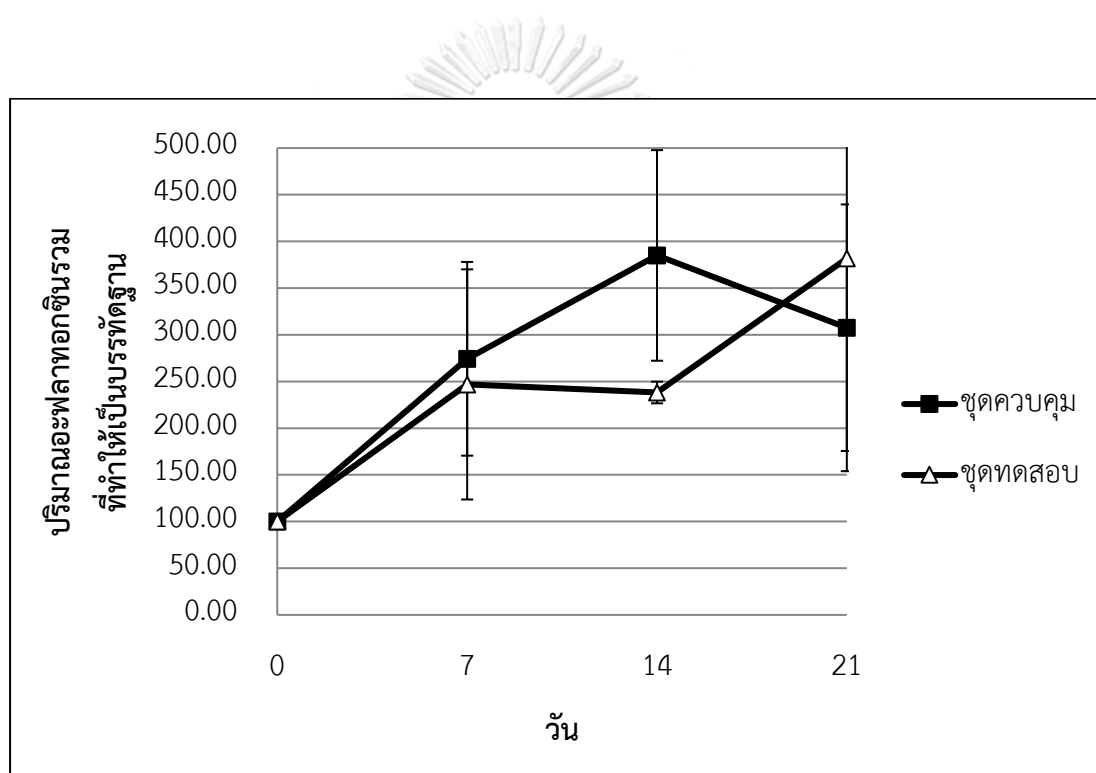
ผลการนับจำนวนราทั้งหมดในตัวอย่างไซเลจข้าวโพดชุดทดสอบและชุดควบคุมพบว่าจำนวนราในชุดทดสอบที่มีการเติมยีสต์มีค่าเริ่มต้นเท่ากับ 6.66 ± 0.01 log CFU/กรัม และมีจำนวนลดลงอย่างรวดเร็วจนไม่พบการเจริญของราในวันที่ 3 และมีจำนวนเพิ่มขึ้นอีกครั้งในช่วงสุดท้ายของการบ่ม ซึ่งมีจำนวนราเท่ากับ 4.25 ± 0.22 log CFU/กรัม เช่นเดียวกับในชุดควบคุมมีจำนวนราเริ่มต้นเท่ากับ 6.60 ± 0.09 log CFU/กรัม และมีจำนวนราลดลงเรื่อยๆ จนกระทั่งไม่พบการเจริญของราในวันที่ 5 หลังจากนั้น พบการเจริญของราเพิ่มขึ้นอีกครั้งเมื่อสิ้นสุดการบ่ม (5.05 ± 0.89 log CFU/กรัม) (ภาพที่ 4.26)



ภาพที่ 4.26 จำนวนราทั้งหมดในไซเลจข้าวโพดที่เติม *A. flavus* ร่วมกับยีสต์ *W. anomalous* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 (ชุดทดสอบ) และเติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม)

ปริมาณอะฟลาทอกซินรวม

จากวิเคราะห์ปริมาณอะฟลาทอกซินรวมในวันที่ 0, 7, 14 และ 21 แล้วทำให้เป็นค่าบรรทัดฐานพบว่า ทั้งชุดทดสอบและชุดควบคุมมีปริมาณอะฟลาทอกซินรวมเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนสิ้นสุดการบ่ม โดยในชุดทดสอบมีปริมาณอะฟลาทอกซินรวมเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการบ่ม โดยมีค่าเท่ากับ 381.80 ± 227.88 ในวันที่ 21 ของการบ่ม สำหรับชุดควบคุมมีแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของอะฟลาทอกซินรวมอย่างต่อเนื่องและมีปริมาณลดลงเล็กน้อยเมื่อสิ้นสุดการบ่ม ซึ่งมีค่าเท่ากับ 307.59 ± 132.05 (ภาพที่ 4.27)

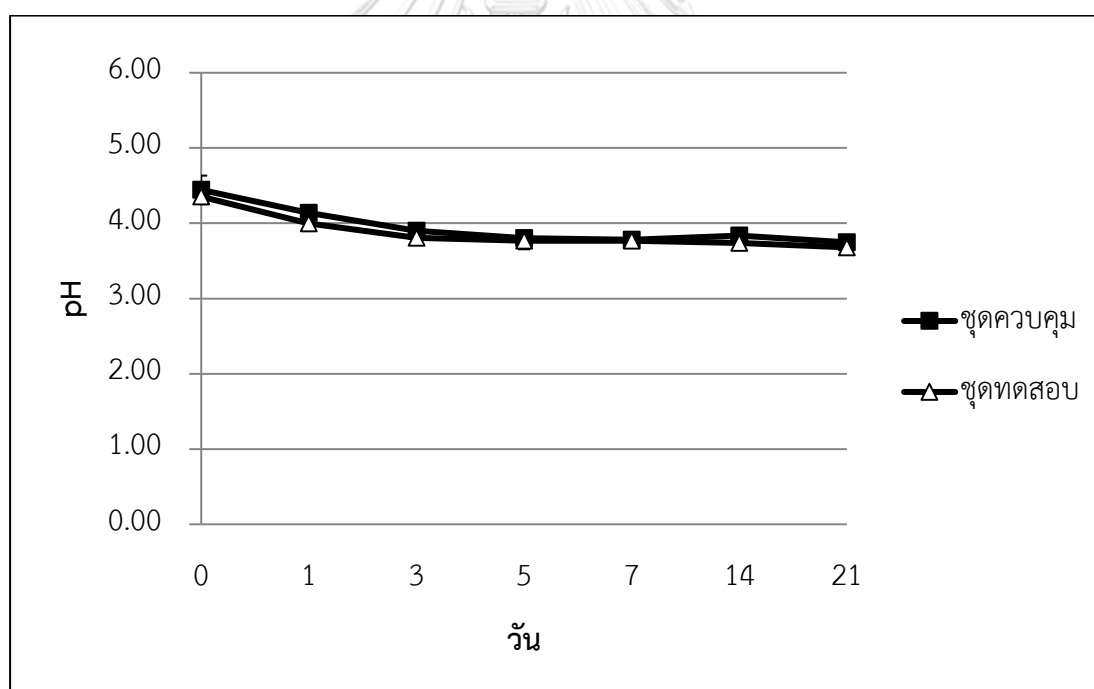


ภาพที่ 4.27 ปริมาณอะฟลาทอกซินรวมที่ทำให้เป็นบรรทัดฐานในไซเลจข้าวโพดที่เติม *A. flavus* ร่วมกับยีสต์ *W. anomalous* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 (ชุดทดสอบ) และเติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม)

4.4.3 การทดสอบความสามารถของแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ร่วมกับ ยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalous* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655

ความเป็นกรด-เบส

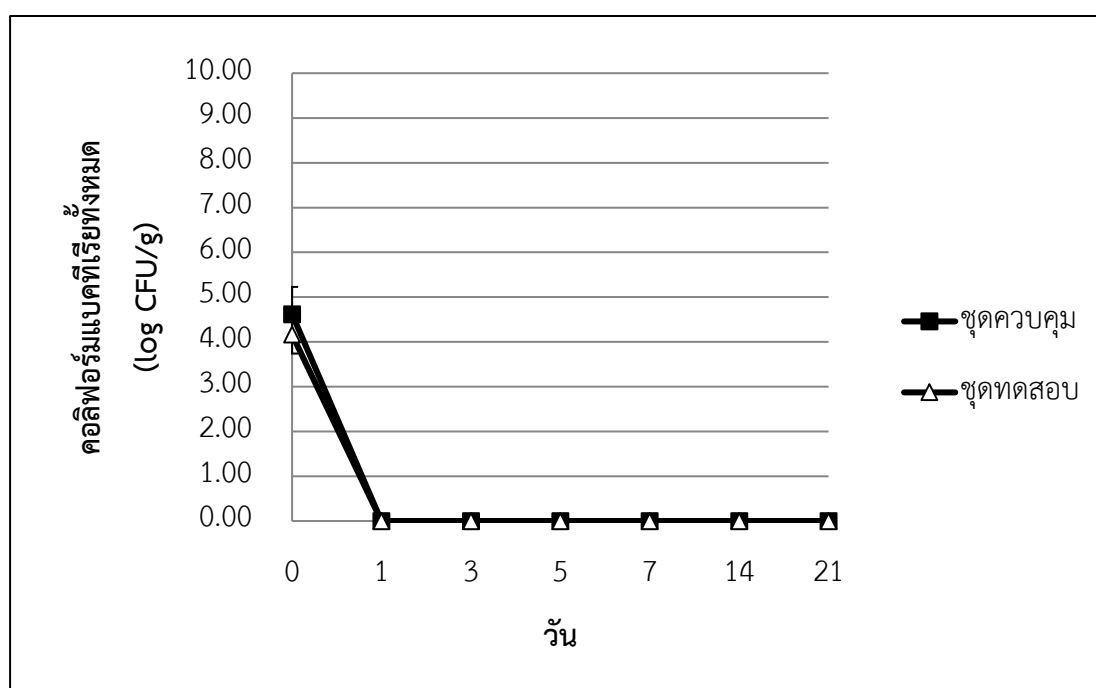
ค่าความเป็นกรด-เบสของชุดทดสอบและชุดควบคุมมีค่าใกล้เคียงกันตลอดการบ่ม โดยมีค่าเริ่มต้นในวันที่ 0 ของชุดทดสอบที่มีการเติม *A. flavus* และแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ร่วมกับยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalous* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 และชุดควบคุมที่เติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว เท่ากับ 4.35 ± 0.08 และ 4.44 ± 0.19 ตามลำดับ และค่าความเป็นกรด-เบสมีแนวโน้มลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 1-3 วัน โดยค่าความเป็นกรด-เบสในวันที่ 21 เท่ากับ 3.68 ± 0.08 สำหรับชุดทดสอบ และ 3.75 ± 0.06 สำหรับชุดควบคุม ดังแสดงในภาพที่ 4.28



ภาพที่ 4.28 ค่าความเป็นกรด-เบสของไซเลจข้าวโพดที่เติม *A. flavus* และแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ร่วมกับยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalous* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 (ชุดทดสอบ) และเติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม)

จำนวนคอลิฟอร์มแบคทีเรีย

ผลการนับจำนวนคอลิฟอร์มแบคทีเรียในไซเลจข้าวโพดทั้งในชุดทดสอบและชุดควบคุม พบจำนวนคอลิฟอร์มแบคทีเรียก่อนการบ่มเท่านั้น โดยมีจำนวนคอลิฟอร์มแบคทีเรียในชุดทดสอบเท่ากับ 4.16 ± 0.42 log CFU/กรัม และในชุดควบคุมเท่ากับ 4.62 ± 0.61 log CFU/กรัม หลังจากนั้นไม่พบการเจริญของคอลิฟอร์มแบคทีเรียจนสิ้นสุดการบ่ม (ภาพที่ 4.29)

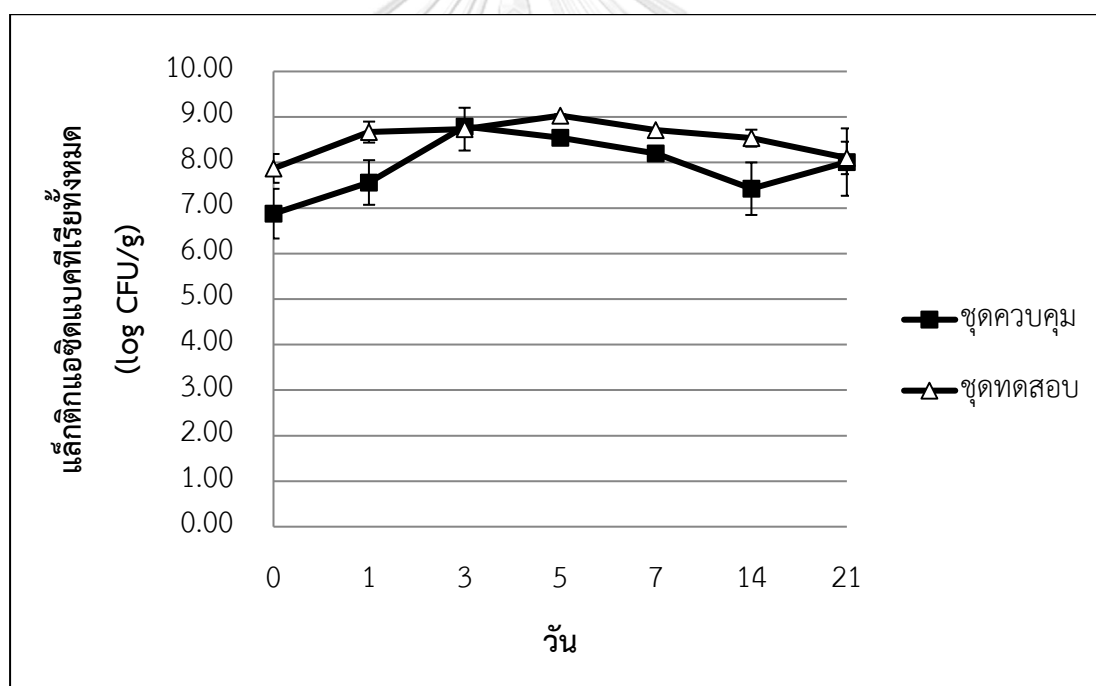


CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาพที่ 4.29 จำนวนคอลิฟอร์มแบคทีเรียในไซเลจข้าวโพดที่เติม *A. flavus* และแกล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ร่วมกับยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 (ชุดทดสอบ) และเติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม)

จำนวนแล็กติกแอซิดแบคทีเรียทั้งหมด

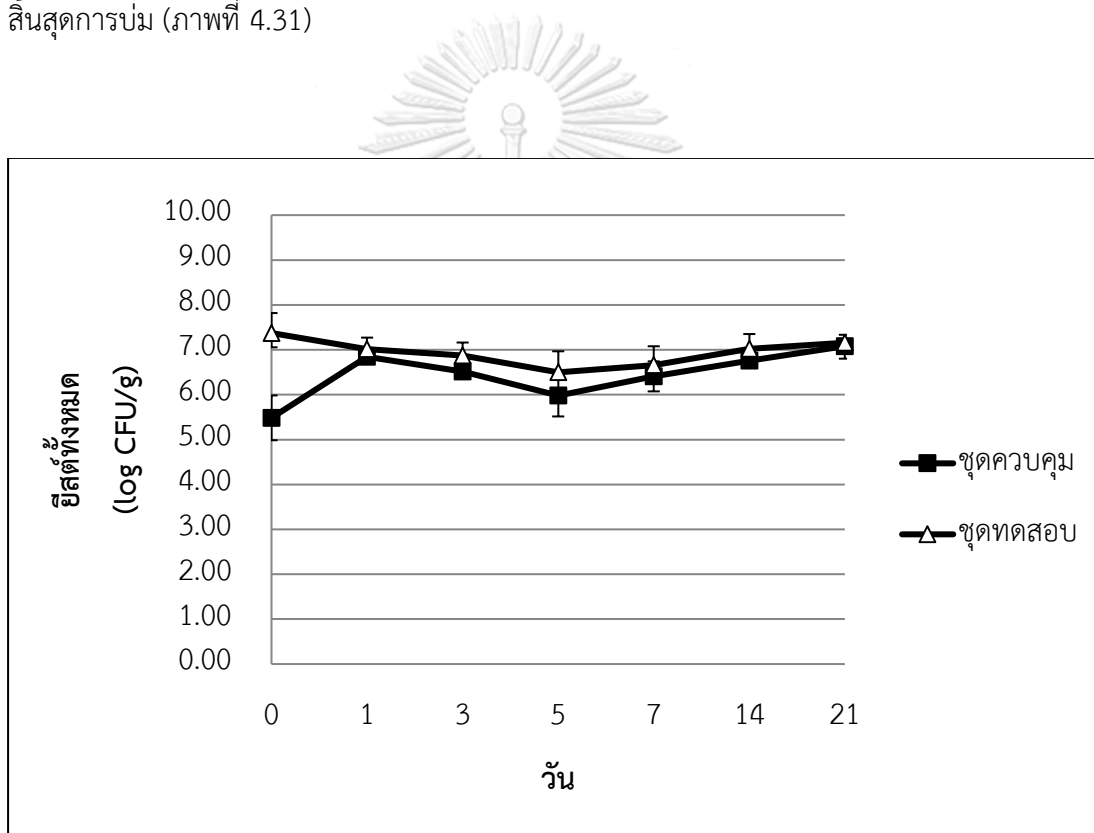
ผลการนับจำนวนแล็กติกแอซิดแบคทีเรียทั้งหมดในไซเลจข้าวโพด พบว่า ในชุดทดสอบและชุดควบคุมมีแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของจำนวนแล็กติกแอซิดแบคทีเรียใกล้เคียงกัน อย่างไรก็ตาม ในชุดทดสอบมีจำนวนมากกว่าเล็กน้อย จำนวนแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในชุดทดสอบมีจำนวนเริ่มต้นเท่ากับ 7.87 ± 0.32 log CFU/กรัม หลังจากนั้น มีจำนวนเพิ่มขึ้นและมีจำนวนสูงที่สุดในวันที่ 5 (9.03 ± 0.03 log CFU/กรัม) และมีจำนวนลดลงเล็กน้อยจนสิ้นสุดการบ่มเท่ากับ 8.10 ± 0.36 log CFU/กรัม สำหรับชุดควบคุมมีจำนวนแล็กติกแอซิดแบคทีเรียเริ่มต้นเท่ากับ 6.88 ± 0.55 log CFU/กรัม และมีจำนวนเพิ่มขึ้นจนมีจำนวนสูงที่สุดในวันที่ 3 ของการบ่ม (8.79 ± 0.07 log CFU/กรัม) และมีจำนวนลดลงเล็กน้อยจนสิ้นสุดการบ่มเท่ากับ 8.01 ± 0.74 log CFU/กรัม (ภาพที่ 4.30)



ภาพที่ 4.30 จำนวนแล็กติกแอซิดแบคทีเรียทั้งหมดในไซเลจข้าวโพดที่เติม *A. flavus* และแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ร่วมกับยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalous* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 (ชุดทดสอบ) และเติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม)

จำนวนยีสต์ทั้งหมด

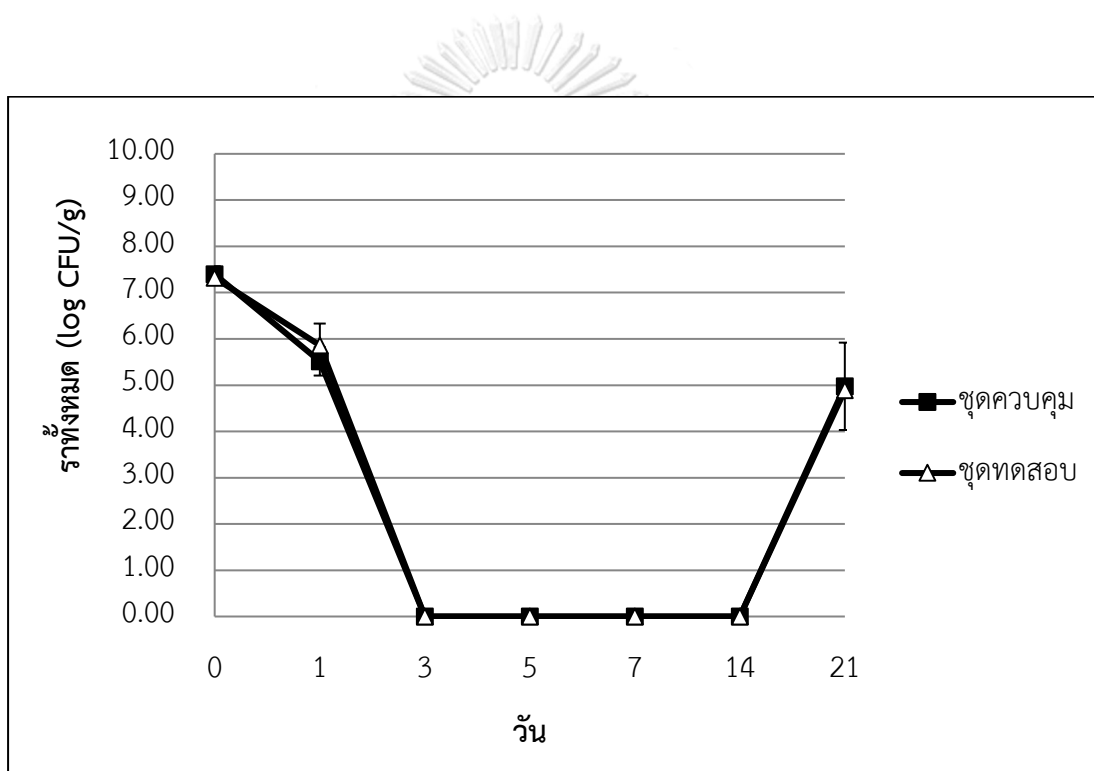
ผลการนับจำนวนยีสต์ทั้งหมดในไซเลจข้าวโพด พบว่า ในวันที่ 0 จำนวนยีสต์ในชุดทดสอบ (7.37 ± 0.45 log CFU/กรัม) มากกว่าจำนวนยีสต์ในชุดควบคุม (5.48 ± 0.50 log CFU/กรัม) หลังจากนั้น ในชุดทดสอบและชุดควบคุมมีจำนวนยีสต์ใกล้เคียงกัน โดยจำนวนยีสต์ในชุดทดสอบมีจำนวนลดลงเรื่อยๆ จนมีจำนวนน้อยที่สุดในวันที่ 5 (6.50 ± 0.47 log CFU/กรัม) หลังจากนั้น มีจำนวนเพิ่มขึ้นจนเมื่อสิ้นสุดการบ่มมีจำนวนยีสต์เท่ากับ 7.16 ± 0.18 log CFU/กรัม สำหรับชุดควบคุมมีจำนวนเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในวันที่ 1 และมีจำนวนยีสต์เท่ากับ 7.08 ± 0.05 log CFU/กรัม เมื่อสิ้นสุดการบ่ม (ภาพที่ 4.31)



ภาพที่ 4.31 จำนวนยีสต์ทั้งหมดในไซเลจข้าวโพดที่เติม *A. flavus* และแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ร่วมกับยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 (ชุดทดสอบ) และเติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม)

จำนวนราทั้งหมด

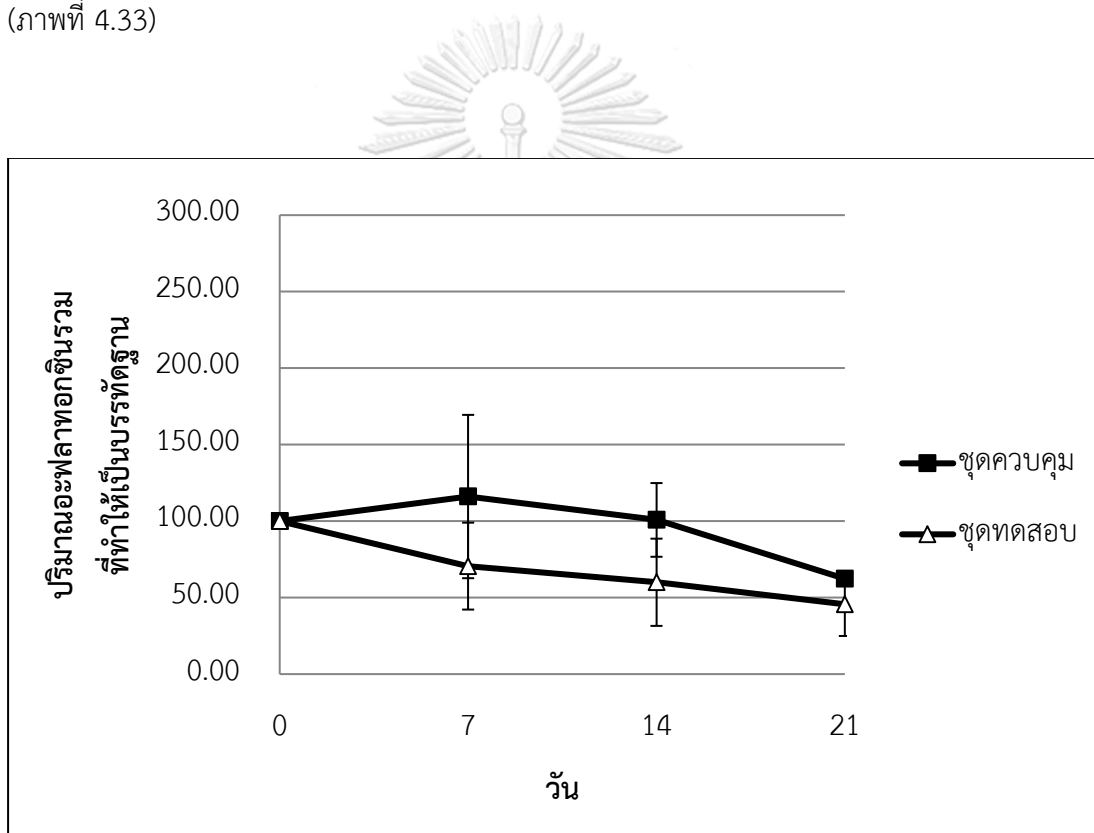
จากการนับจำนวนราทั้งหมดในไซเลจข้าวโพดพบว่า ทั้งในชุดทดสอบและชุดควบคุมมีจำนวนราและแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงไปในทิศทางเดียวกัน โดยในชุดทดสอบและชุดควบคุมมีจำนวนราเริ่มต้นเท่ากับ 7.32 ± 0.11 และ 7.40 ± 0.17 log CFU/กรัม ตามลำดับ และมีจำนวนลดลงอย่างต่อเนื่องจนกระทั่งไม่พบการเจริญของราในวันที่ 3 หลังจากนั้นเริ่มมีจำนวนเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในวันที่ 14 จนสิ้นสุดการป่ม โดยในวันที่ 21 มีจำนวนราเท่ากับ 4.90 ± 0.14 log CFU/กรัม และ 4.98 ± 0.94 log CFU/กรัม ตามลำดับ (ภาพที่ 4.32)



ภาพที่ 4.32 จำนวนราทั้งหมดในไซเลจข้าวโพดที่เติม *A. flavus* และแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ร่วมกับยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalous* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 (ชุดทดสอบ) และเติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม)

ปริมาณอะฟลาทอกซินรวม

จากการวิเคราะห์ปริมาณอะฟลาทอกซินรวมในวันที่ 0, 7, 14 และ 21 แล้วนำค่าปริมาณอะฟลาทอกซินรวมมาทำให้เป็นบรรทัดฐาน พบว่า ทั้งในชุดทดสอบมีปริมาณอะฟลาทอกซินรวมบรรทัดฐานน้อยกว่าชุดควบคุมตลอดระยะเวลาการบ่ม โดยในชุดทดสอบมีแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงปริมาณอะฟลาทอกซินรวมบรรทัดฐานลดลงในวันที่ 14 มีปริมาณอะฟลาทอกซินรวมบรรทัดฐานเท่ากับ 60.02 ± 28.51 และชุดควบคุมมีแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงปริมาณอะฟลาทอกซินรวมบรรทัดฐานลดลงในวันที่ 14 มีปริมาณอะฟลาทอกซินรวมบรรทัดฐานเท่ากับ 100.78 ± 24.09 (ภาพที่ 4.33)



ภาพที่ 4.33 ปริมาณอะฟลาทอกซินรวมที่ทำให้เป็นบรรทัดฐานในไซเลจข้าวโพดที่เติม *A. flavus* และแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ร่วมกับยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 (ชุดทดสอบ) และเติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม)

จากการทดสอบความสามารถของยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 และแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ต่อการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินรวมของ *A. flavus* ในไซเลจข้าวโพดร่วมกับจุลินทรีย์ประจำถิ่น เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองดังกล่าว พบว่า จำนวนราในชุดทดสอบของทุกๆ กรรมวิธีมีจำนวนลดลงจากวันแรกของการบ่มอย่างเห็นได้ชัด และพบการเจริญของราอีกครั้งในช่วงท้ายของการบ่ม โดยการใช้ยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 เช่นเดียวกับการใช้แล็กติกแอซิดแบคทีเรียร่วมกับยีสต์ผสม (*L. paracasei* AN3 + *W. anomalus* MSCU 0652 + *K. marxianus* MSCU 0655) ไม่พบการเจริญของราตั้งแต่วันที่ 3 ของการบ่ม แต่มีการเจริญของราอีกครั้งในช่วงท้ายของการบ่ม (ตารางที่ 4.8)

ตารางที่ 4.8 จำนวนราทั้งหมดในไซเลจข้าวโพดเมื่อเติมแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย (*L. paracasei* AN3) ยีสต์ผสม (*W. anomalus* MSCU 0652 + *K. marxianus* MSCU 0655) และแล็กติกแอซิดแบคทีเรียร่วมกับยีสต์ผสม (*L. paracasei* AN3 + *W. anomalus* MSCU 0652 + *K. marxianus* MSCU 0655) (ชุดทดสอบ) เปรียบเทียบกับไซเลจข้าวโพดที่เติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 21 วัน

วัน	จำนวนราในกรรมวิธีต่างๆ (log CFU/กรัม)								
	แล็กติกแอซิดแบคทีเรีย			ยีสต์ผสม			แล็กติกแอซิดแบคทีเรียและยีสต์ผสม		
	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ	% ยับยั้ง*	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ	% ยับยั้ง*	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ	% ยับยั้ง*
0	6.65±0.06	6.67±0.04	-0.30	6.60±0.09	6.66±0.01	-0.90	7.40±0.17	7.32±0.11	1.08
1	5.40±0.87	5.33±1.19	1.30	6.30±0.11	6.23±0.01	1.11	5.52±0.31	5.86±0.47	-6.16
3	3.44±0.46	3.75±0.63	-9.01	4.19±1.00	0.00	100	0.00	0.00	0.00
5	4.26±0.13	0.00	100	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
7	3.90±1.64	0.00	100	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
14	0.00	5.37±1.96	-	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
21	5.10±0.25	5.25±0.18	-2.94	5.05±0.89	4.25±0.22	15.84	4.98±0.94	4.89±0.14	1.81

* เมื่อเทียบกับชุดควบคุมในวันเดียวกัน

จากการวิเคราะห์ปริมาณอะพลาทอกซินรวมในไซเลจข้าวโพดตามกรรมวิธีต่างๆ พบว่า มีเพียงชุดทดสอบของการใช้ยีสต์ผสมแล็กติกแอซิดแบคทีเรียที่มีแนวโน้มของปริมาณอะพลาทอกซินรวมที่ลดลงจากชุดทดสอบในวันแรกของกรรมวิธีเดียวกัน เมื่อพิจารณาจากเปอร์เซ็นต์การลดลงเปรียบเทียบระหว่างชุดทดสอบและชุดควบคุมในกรรมวิธีเดียวกันพบว่า การใช้แล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 สามารถลดการผลิตอะพลาทอกซินรวมของเราได้ดีที่สุดในวันที่ 14 ของการบ่ม โดยมีเปอร์เซ็นต์การลดลงเท่ากับ 47.47 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.9)

ตารางที่ 4.9 ปริมาณอะพลาทอกซินรวมในไซเลจข้าวโพดเมื่อเติมแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย (*L. paracasei* AN3) ยีสต์ผสม (*W. anomalous* MSCU 0652 + *K. marxianus* MSCU 0655) และแล็กติกแอซิดแบคทีเรียร่วมกับยีสต์ผสม (*L. paracasei* AN3 + *W. anomalous* MSCU 0652 + *K. marxianus* MSCU 0655) (ชุดทดสอบ) เปรียบเทียบกับไซเลจข้าวโพดที่เติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 21 วัน

วัน	ปริมาณอะพลาทอกซินรวมในกรรมวิธีต่างๆ (นาโนกรัมต่อกรัม)								
	แล็กติกแอซิดแบคทีเรีย			ยีสต์ผสม			แล็กติกแอซิดแบคทีเรียและยีสต์ผสม		
	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ	% ลดลง*	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ	% ลดลง*	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ	% ลดลง*
0	121.50±94.25	135.62±103.86	-11.62	22.03±16.41	26.90±25.31	-22.10	83.33±31.84	102.83±25.26	-23.40
7	185.00±83.80	165.00±60.08	10.81	49.13±40.59	43.05±39.35	12.38	90.70±28.50	85.10±18.77	6.17
14	164.67±22.70	86.50±1.50	47.47	80.42±76.36	65.23±61.78	18.89	63.83±24.68	45.50±19.49	28.71
21	181.67±77.97	142.00±22.27	21.84	56.70±59.69	68.43±67.60	-20.69	59.10±44.68	46.20±34.21	21.83

* เมื่อเทียบกับชุดควบคุมในวันเดียวกัน

แต่เนื่องจากปริมาณอะพลาทอกซินรวมของทุกกรรมวิธีในวันที่ 0 ของการบ่ม มีปริมาณอะพลาทอกซินรวมตั้งต้นทั้งในชุดทดสอบและชุดควบคุมที่ไม่เท่ากัน ทำให้การนำมาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของยีสต์และแล็กติกแอซิดแบคทีเรียต่อการลดการผลิตอะพลาทอกซินรวมของเราเป็นไปได้ยาก (ตารางที่ 4.9) ดังนั้น เพื่อให้ค่าเริ่มต้นของอะพลาทอกซินรวมเท่ากันและนำไปเปรียบเทียบกับกรรมวิธีต่างๆ ได้ จึงใช้วิธีเทียบปริมาณอะพลาทอกซินรวมให้เป็นบรรทัดฐานดังแสดงในตารางที่ 4.10 พบว่า เมื่อพิจารณาเปอร์เซ็นต์การลดลงของอะพลาทอกซินรวมบรรทัดฐานในวันที่ 21 ของการบ่ม เมื่อเทียบกับชุดควบคุมในวันเดียวกัน การใช้แล็กติกแอซิดแบคทีเรียสามารถลดปริมาณอะพลาทอกซินรวมบรรทัดฐานเท่ากับ 36.31 เปอร์เซ็นต์ และการใช้แล็กติกแอซิดแบคทีเรียร่วมกับยีสต์ผสมสามารถลดปริมาณอะพลาทอกซินรวมบรรทัดฐานเท่ากับ 26.78 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อพิจารณาเปอร์เซ็นต์การลดลงของอะพลาทอกซินรวมในวันที่ 21 ของการบ่มเทียบกับปริมาณอะพลา

ทอกซินเริ่มต้น พบว่า การใช้แล็กติกแอซิดแบคทีเรียร่วมกับยีสต์ผสมสามารถลดปริมาณอะฟลาทอกซินรวมบรรทัดฐานเท่ากับ 54.36 เปอร์เซ็นต์ แต่การใช้แล็กติกแอซิดแบคทีเรียและการใช้ยีสต์ผสมไม่สามารถลดปริมาณอะฟลาทอกซินรวมได้ (ตารางที่ 4.10)

ตารางที่ 4.10 ปริมาณอะฟลาทอกซินรวมที่ทำให้เป็นบรรทัดฐานในไซเลจข้าวโพดเมื่อเติมแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย (*L. paracasei* AN3) ยีสต์ผสม (*W. anomalus* MSCU 0652 + *K. marxianus* MSCU 0655) และแล็กติกแอซิดแบคทีเรียร่วมกับยีสต์ผสม (*L. paracasei* AN3 + *W. anomalus* MSCU 0652 + *K. marxianus* MSCU 0655) (ชุดทดสอบ) เปรียบเทียบกับไซเลจข้าวโพดที่เติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 21 วัน

วัน	ปริมาณอะฟลาทอกซินรวมที่ทำให้เป็นบรรทัดฐานในกรรมวิธีต่างๆ (เปอร์เซ็นต์)								
	แล็กติกแอซิดแบคทีเรีย			ยีสต์ผสม			แล็กติกแอซิดแบคทีเรียและยีสต์ผสม		
	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ	% ลดลง*	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ	% ลดลง*	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ	% ลดลง*
0	100.00±0.00	100.00±0.00	0.00	100.00±0.00	100.00±0.00	0.00	100.00±0.00	100.00±0.00	0.00
7	207.92±111.28	145.80±74.04	29.88	274.30±103.75	246.85±123.25	10.01	116.07±53.38	70.59±28.40	39.18
14	185.16±86.16	118.70±88.86	35.89	385.00±112.78	238.23±11.60	38.12	100.78±24.09	60.02±28.51	40.44
21	164.81±63.53	104.97±43.35	36.31	307.59±132.05	381.80±227.88	-24.13	62.33±3.61	45.64±20.73	26.78

* เมื่อเทียบกับชุดควบคุมในวันเดียวกัน

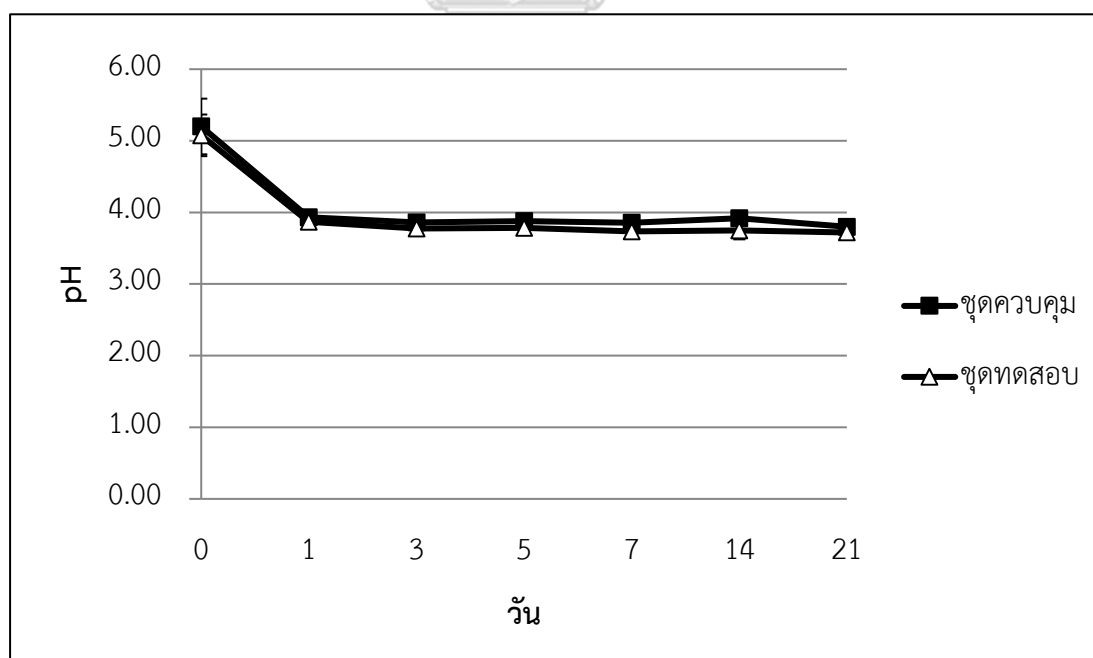
จากผลการทดลองข้างต้นแสดงให้เห็นว่าการใช้แล็กติกแอซิดแบคทีเรียร่วมกับยีสต์ผสมมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญและลดการผลิตอะฟลาทอกซินรวมในไซเลจข้าวโพดตลอดเชื้อและไซเลจข้าวโพดร่วมกับจุลินทรีย์ประจำถิ่นได้ดีกว่าการใช้ยีสต์หรือแล็กติกแอซิดแบคทีเรียเพียงอย่างเดียว ดังนั้น จึงได้นำแล็กติกแอซิดแบคทีเรียร่วมกับยีสต์ผสมจากการทดลองดังกล่าว มาศึกษาปริมาณความเข้มข้นของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียต่อยีสต์ที่เหมาะสมต่อการยับยั้งการเจริญและลดการผลิตอะฟลาทอกซินรวมของ *A. flavus* ในไซเลจข้าวโพดร่วมกับจุลินทรีย์ประจำถิ่นต่อไป

4.5 การทดสอบผลของปริมาณความเข้มข้นและอัตราส่วนของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียและยีสต์ผสมต่อการยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินรวมในไซเลจข้าวโพดร่วมกับจุลินทรีย์ประจำถิ่น

4.5.1 *L. paracasei* AN3 ต่อยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 เท่ากับ $10^8:10^6$

ความเป็นกรด-เบส

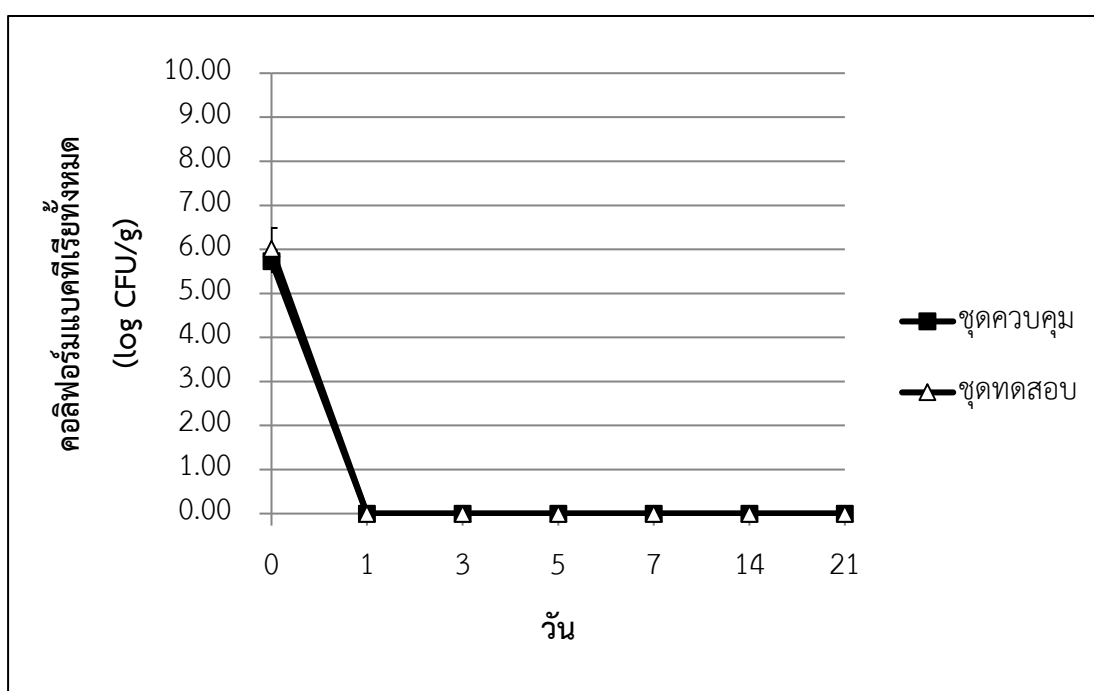
เมื่อนำตัวอย่างข้าวโพดปลอดเชื้อทั้งในชุดทดสอบที่เติมแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ร่วมกับยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 ($10^8:10^6$) และชุดควบคุมที่เติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียวมาวัดค่าความเป็นกรด-เบส พบว่าค่าความเป็นกรด-เบสของชุดทดสอบและชุดควบคุมมีค่าใกล้เคียงกันและมีแนวโน้มในทิศทางเดียวกันตลอดระยะเวลาการบ่ม โดยค่าความเป็นกรด-เบสเริ่มต้นของชุดทดสอบมีค่าเท่ากับ 5.08 ± 0.39 และชุดควบคุมมีค่าเท่ากับ 5.20 ± 0.29 หลังจากนั้น ค่าความเป็นกรด-เบสของทั้ง 2 ชุดลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 1 และคงที่ตลอดระยะเวลาการบ่ม ในวันที่ 21 ของการบ่ม ชุดทดสอบมีค่าเท่ากับ 3.72 ± 0.09 และชุดควบคุมมีค่าเท่ากับ 3.80 ± 0.08 ดังแสดงในภาพที่ 4.34



ภาพที่ 4.34 ค่าความเป็นกรด-เบสของไซเลจข้าวโพดที่เติม *A. flavus* และแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ร่วมกับยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 ($10^8:10^6$) (ชุดทดสอบ) และเติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม)

จำนวนคอลิฟอร์มแบคทีเรีย

จำนวนคอลิฟอร์มแบคทีเรียในไซเลจข้าวโพดในชุดทดสอบและชุดควบคุม มีจำนวนคอลิฟอร์มเริ่มต้นในวันที่ 0 เท่ากับ 6.02 ± 0.47 และ 5.73 ± 0.25 log CFU/กรัม ตามลำดับ หลังจากนั้นไม่พบการเจริญของคอลิฟอร์มแบคทีเรียจนถึงสิ้นสุดระยะเวลาการบ่ม ทั้งในชุดทดสอบและชุดควบคุม (ภาพที่ 4.35)

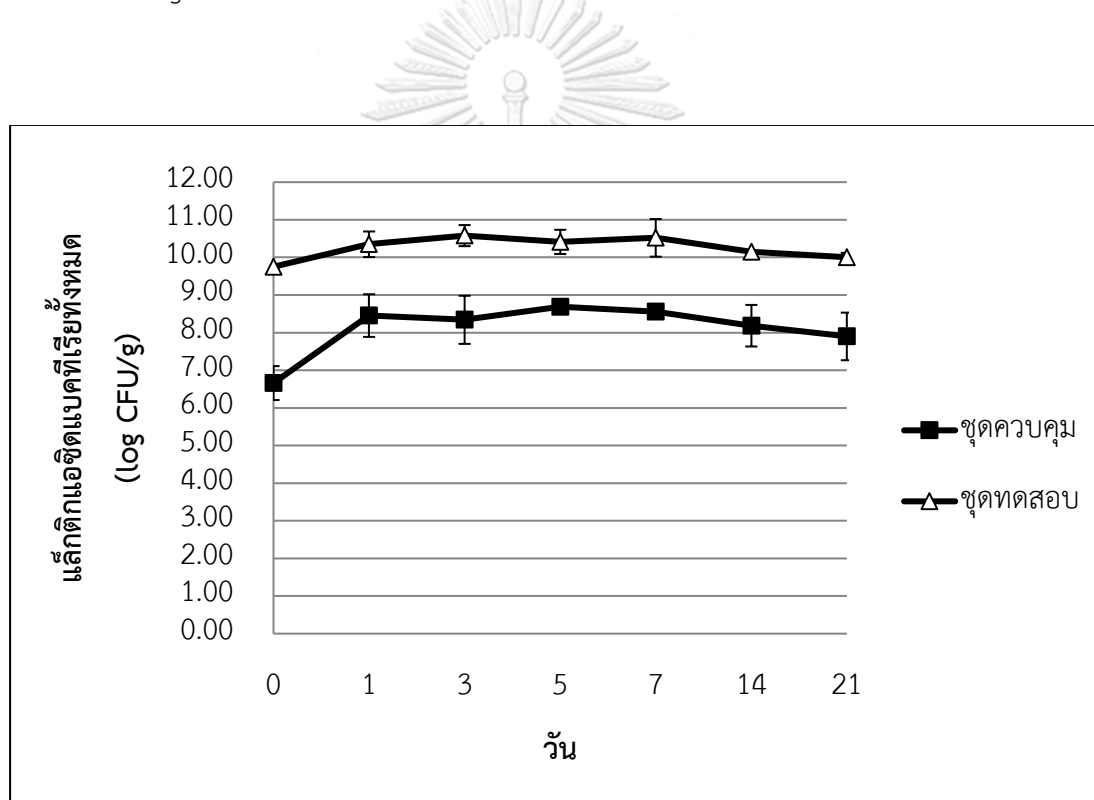


CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาพที่ 4.35 จำนวนคอลิฟอร์มแบคทีเรียในของไซเลจข้าวโพดที่เติม *A. flavus* และแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ร่วมกับยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 ($10^8:10^6$) (ชุดทดสอบ) และเติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม)

จำนวนแล็กติกแอซิดแบคทีเรียทั้งหมด

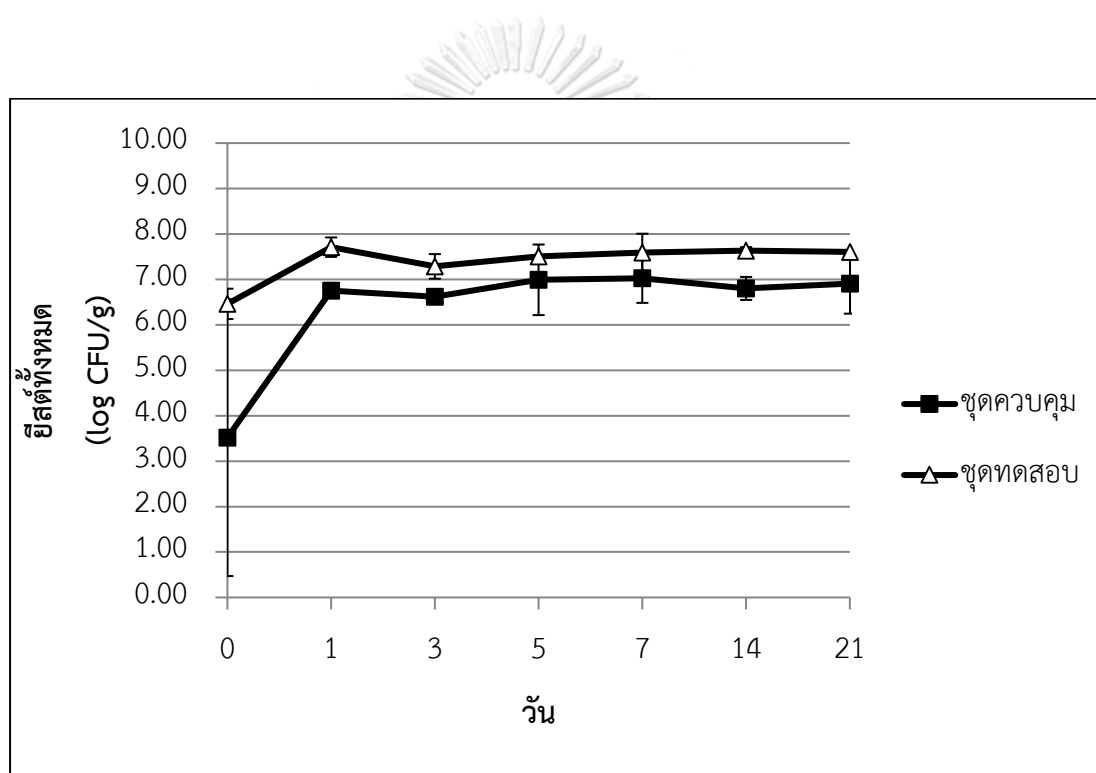
จำนวนแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในไซเลจข้าวโพดชุดทดสอบมีจำนวนมากกว่าชุดควบคุมอย่างชัดเจนตลอดการทดลอง โดยในชุดทดสอบและชุดควบคุมมีจำนวนแล็กติกแอซิดแบคทีเรียเริ่มต้นเท่ากับ 9.75 ± 0.06 และ 6.66 ± 0.45 log CFU/กรัม ตามลำดับ ชุดทดสอบมีจำนวนแล็กติกแอซิดแบคทีเรียสูงสุดในวันที่ 3 ของการบ่ม (10.58 ± 0.28 log CFU/กรัม) หลังจากนั้น มีจำนวนแล็กติกแอซิดแบคทีเรียลดลงเพียงเล็กน้อยและค่อนข้างคงที่จนถึงสิ้นสุดการบ่ม สำหรับในชุดควบคุมพบว่า มีจำนวนเพิ่มขึ้นในวันที่ 1 และมีจำนวนแล็กติกแอซิดแบคทีเรียสูงสุดเท่ากับ 8.69 ± 0.06 log CFU/กรัม ในวันที่ 5 ของการบ่ม (ภาพที่ 4.36)



ภาพที่ 4.36 จำนวนแล็กติกแอซิดแบคทีเรียทั้งหมดในของไซเลจข้าวโพดที่เติม *A. flavus* และแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ร่วมกับยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 ($10^8:10^6$) และเติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม)

จำนวนยีสต์ทั้งหมด

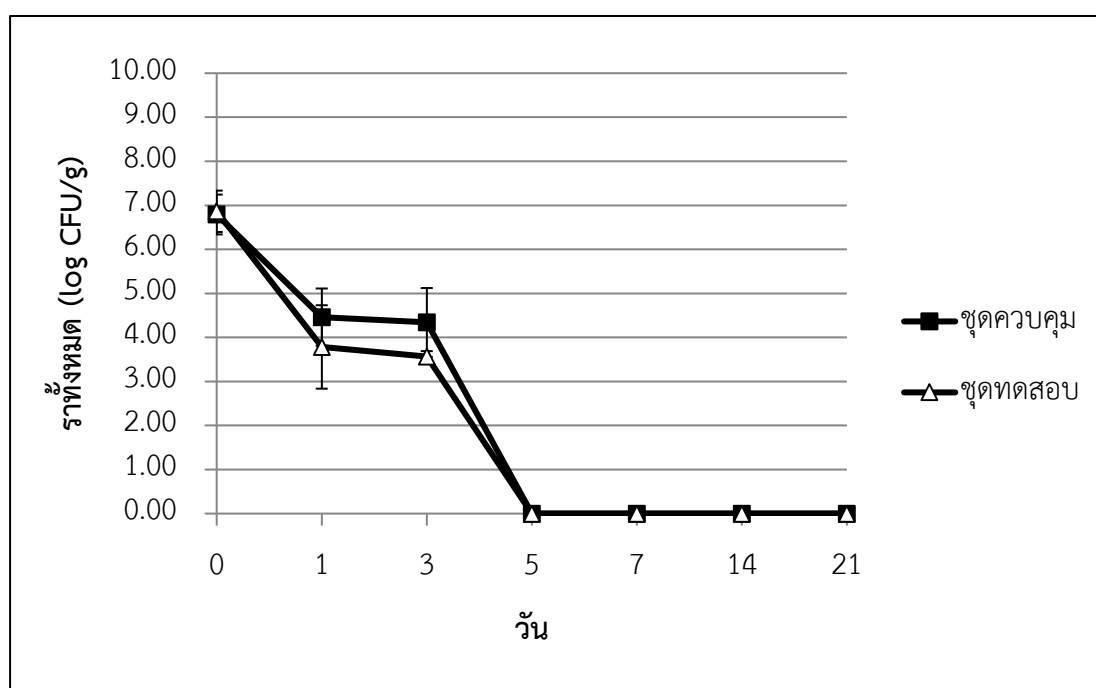
จากการนับจำนวนยีสต์ทั้งหมดในไซเลจข้าวโพด พบว่า จำนวนยีสต์ในชุดทดสอบมีมากกว่าในชุดควบคุมตั้งแต่วันที่ 0 ของการบ่ม มีค่าเท่ากับ 6.46 ± 0.33 และ 3.52 ± 3.05 log CFU/กรัม ตามลำดับ และมีจำนวนเพิ่มขึ้นในวันที่ 1 (7.71 ± 0.21 และ 6.75 ± 0.01 log CFU/กรัม ตามลำดับ) หลังจากนั้น ทั้งชุดทดสอบและชุดควบคุมมีจำนวนยีสต์ที่ค่อนข้างคงที่จนกระทั่งสิ้นสุดระยะเวลาการบ่ม (7.61 ± 0.04 log CFU/กรัม สำหรับชุดทดสอบ และ 6.91 ± 0.66 log CFU/กรัม สำหรับชุดควบคุม) (ภาพที่ 4.37)



ภาพที่ 4.37 จำนวนยีสต์ทั้งหมดในของไซเลจข้าวโพดที่เติม *A. flavus* และแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ร่วมกับยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 (10^8 : 10^6) (ชุดทดสอบ) และเติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม)

จำนวนราทั้งหมด

ผลการนับจำนวนราทั้งหมดในไซเลจข้าวโพดพบว่า จำนวนราทั้งในชุดทดสอบและชุดควบคุมมีแนวโน้มใกล้เคียงกัน โดยมีจำนวนราเริ่มต้นเท่ากับ 6.86 ± 0.47 log CFU/กรัม ในชุดทดสอบ และเท่ากับ 6.79 ± 0.45 log CFU/กรัม ในชุดควบคุม หลังจากนั้น จำนวนราลดลงทั้งในชุดทดสอบและชุดควบคุม และลดลงอย่างต่อเนื่องจนไม่พบการเจริญของราในวันที่ 5 ของการบ่ม (ภาพที่ 4.38)

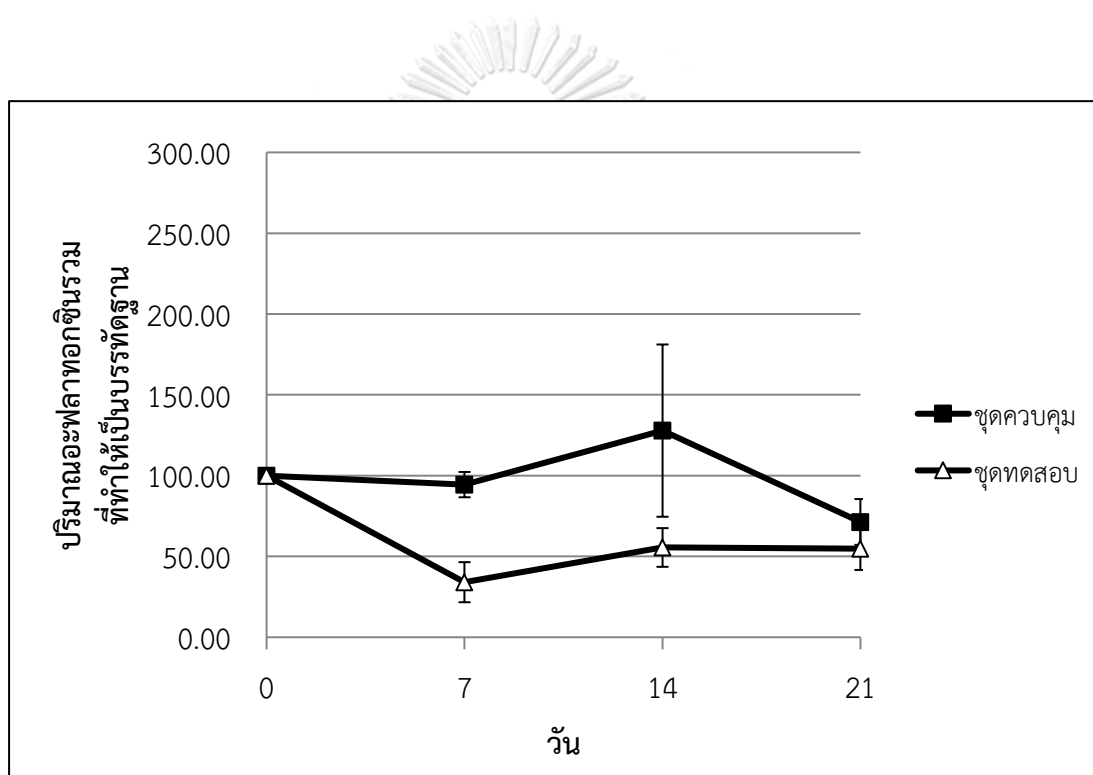


CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาพที่ 4.38 จำนวนราทั้งหมดในของไซเลจข้าวโพดที่เติม *A. flavus* และแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ร่วมกับยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalous* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 (10^8 : 10^6) (ชุดทดสอบ) และเติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม)

ปริมาณอะฟลาทอกซินรวม

จากการวิเคราะห์ปริมาณอะฟลาทอกซินรวมในวันที่ 0, 7, 14 และ 21 แล้วนำค่าปริมาณอะฟลาทอกซินรวมมาทำให้เป็นบรรทัดฐานพบว่า ในชุดทดสอบมีปริมาณอะฟลาทอกซินรมน้อยกว่าชุดควบคุมตลอดระยะเวลาการบ่ม โดยในชุดทดสอบมีปริมาณอะฟลาทอกซินรวมลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 7 และเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในวันที่ 14 เมื่อสิ้นสุดการทดลองมีค่าเท่ากับ 54.77 ± 13.14 สำหรับชุดควบคุมมีปริมาณอะฟลาทอกซินรวมลดลงมากที่สุดในวันที่ 21 ของการบ่ม ซึ่งมีค่าเท่ากับ 71.33 ± 14.17 (ภาพที่ 4.39)

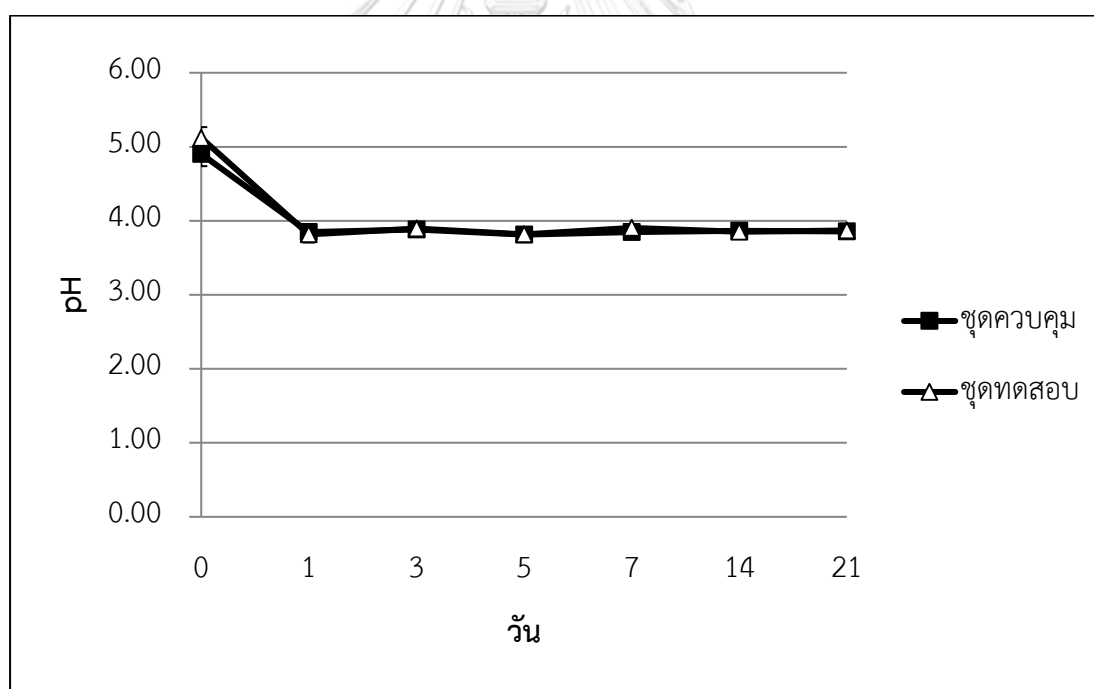


ภาพที่ 4.39 ปริมาณอะฟลาทอกซินรวมของไซเลจข้าวโพดที่เติม *A. flavus* และแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ร่วมกับยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalous* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 ($10^8:10^6$) (ชุดทดสอบ) และเติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม)

4.5.2 *L. paracasei* AN3 ต่อยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 เท่ากับ $10^6:10^8$

ความเป็นกรด-เบส

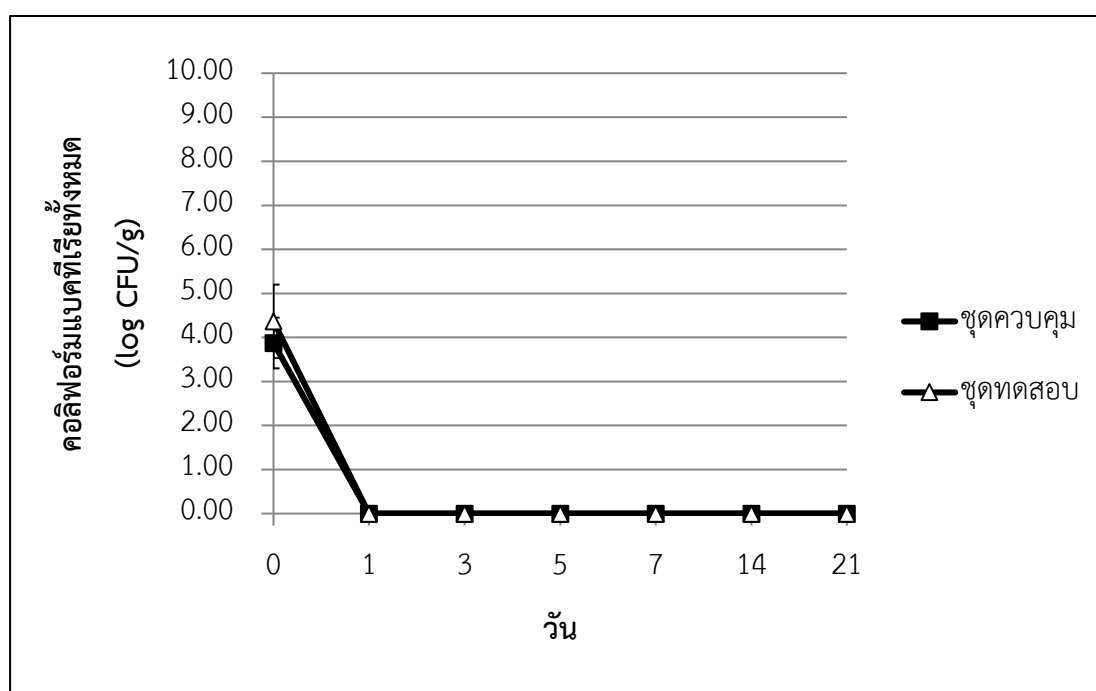
ค่าความเป็นกรด-เบสของชุดทดสอบที่เติมแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ร่วมกับยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 ($10^6:10^8$) และชุดควบคุมที่เติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว มีค่าใกล้เคียงกันตลอดระยะเวลาการบ่ม โดยค่าความเป็นกรด-เบสเริ่มต้นของชุดทดสอบและชุดควบคุมในวันที่ 0 มีค่าเท่ากับ 5.12 ± 0.17 และ 4.90 ± 0.15 ตามลำดับ หลังจากนั้นมียาลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 1 และคงที่จนสิ้นสุดการบ่ม โดยมีค่าความเป็นกรด-เบสในวันที่ 21 ของการบ่มเท่ากับ 3.87 ± 0.07 ในชุดทดสอบ และมีค่าเท่ากับ 3.86 ± 0.03 ในชุดควบคุม (ภาพที่ 4.40)



ภาพที่ 4.40 ค่าความเป็นกรด-เบสของไซเลจข้าวโพดที่เติม *A. flavus* และแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ร่วมกับยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 ($10^6:10^8$) (ชุดทดสอบ) และเติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม)

จำนวนคอลิฟอร์มแบคทีเรีย

ผลการนับจำนวนคอลิฟอร์มแบคทีเรียในไซเลจข้าวโพดชุดทดสอบและชุดควบคุม แสดงในภาพที่ 4.41 พบว่า จำนวนคอลิฟอร์มแบคทีเรียในวันที่ 0 มีจำนวนคอลิฟอร์มแบคทีเรีย เท่ากับ 4.37 ± 0.83 log CFU/กรัม ในชุดทดสอบ และ 3.87 ± 0.58 log CFU/กรัม ในชุดควบคุม หลังจากนั้นไม่พบการเจริญของคอลิฟอร์มแบคทีเรียอีกจนสิ้นสุดการบ่ม (ภาพที่ 4.41)

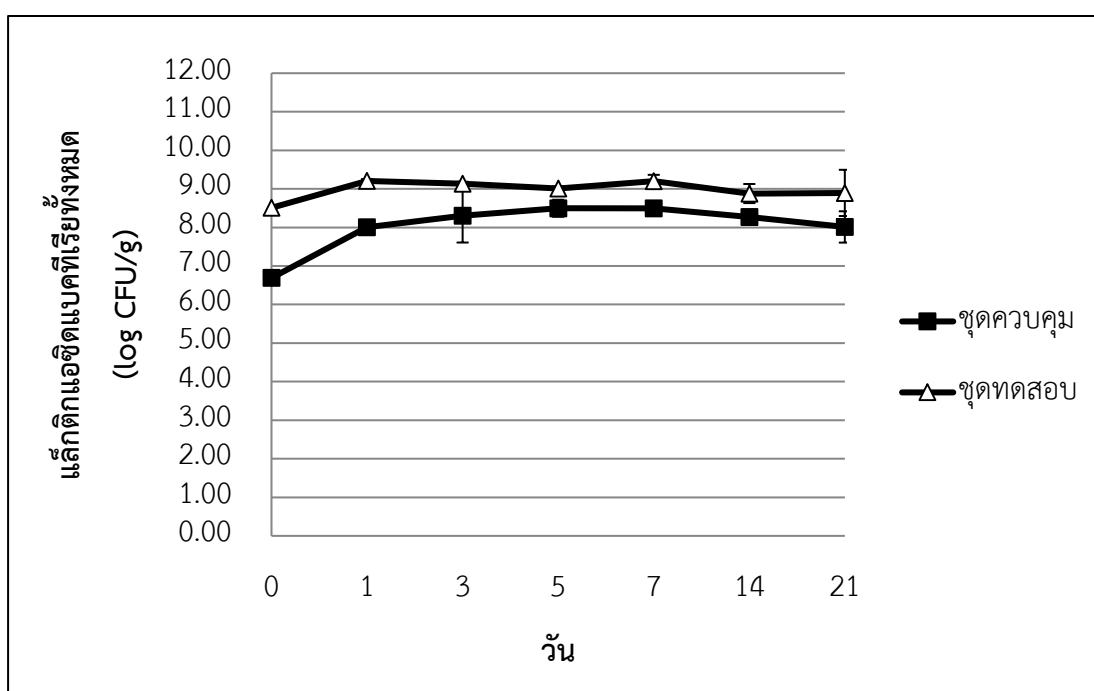


CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาพที่ 4.41 จำนวนคอลิฟอร์มแบคทีเรียในของไซเลจข้าวโพดที่เติม *A. flavus* และแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ร่วมกับยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalous* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 ($10^6:10^8$) (ชุดทดสอบ) และเติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม)

จำนวนแล็กติกแอซิดแบคทีเรียทั้งหมด

จำนวนแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในชุดทดสอบมีค่ามากกว่าชุดควบคุมอย่างชัดเจนในวันที่ 0 ซึ่งในชุดทดสอบมีค่าเท่ากับ 8.51 ± 0.02 และในชุดควบคุมมีค่าเท่ากับ 6.69 ± 0.10 log CFU/กรัม หลังจากนั้น มีจำนวนเพิ่มขึ้นในวันที่ 1 และมีจำนวนค่อนข้างคงที่จนสิ้นสุดการบ่ม (8.90 ± 0.60 log CFU/กรัม สำหรับชุดทดสอบ และ 8.01 ± 0.41 log CFU/กรัม สำหรับชุดควบคุม) (ภาพที่ 4.42)

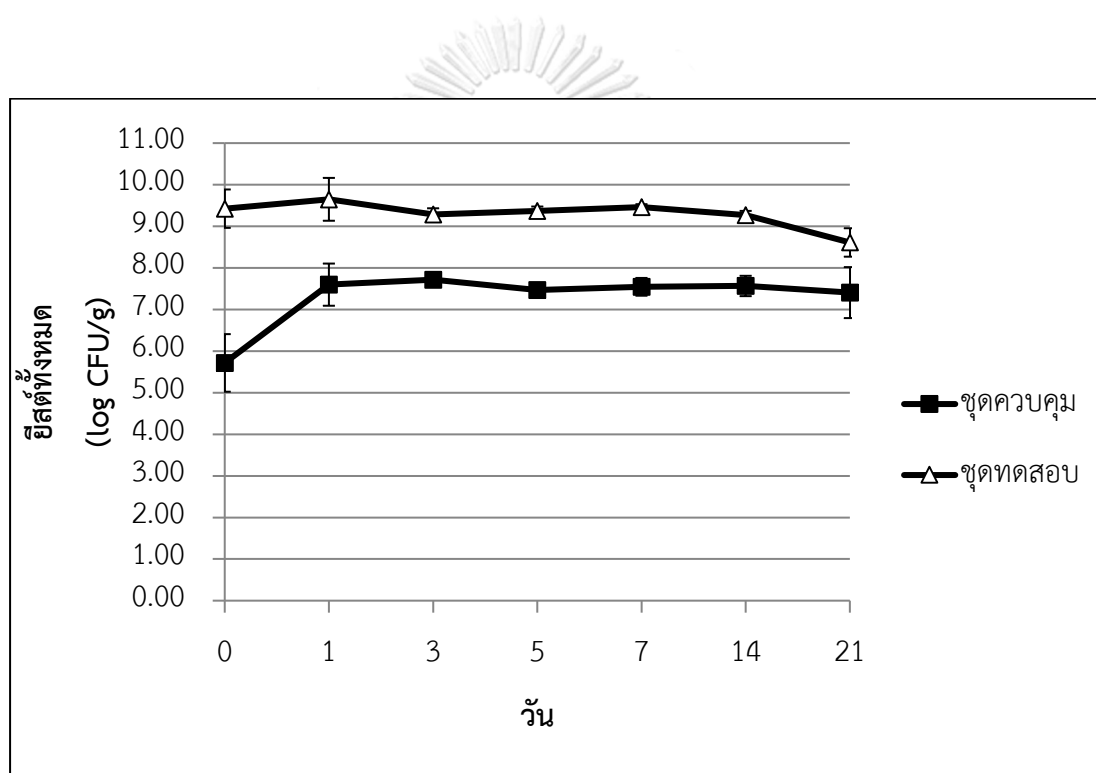


CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาพที่ 4.42 จำนวนแล็กติกแอซิดแบคทีเรียทั้งหมดในของไหลเจจข้าวโพดที่เติม *A. flavus* และแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ร่วมกับยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 ($10^6:10^8$) (ชุดทดสอบ) และเติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม)

จำนวนยีสต์ทั้งหมด

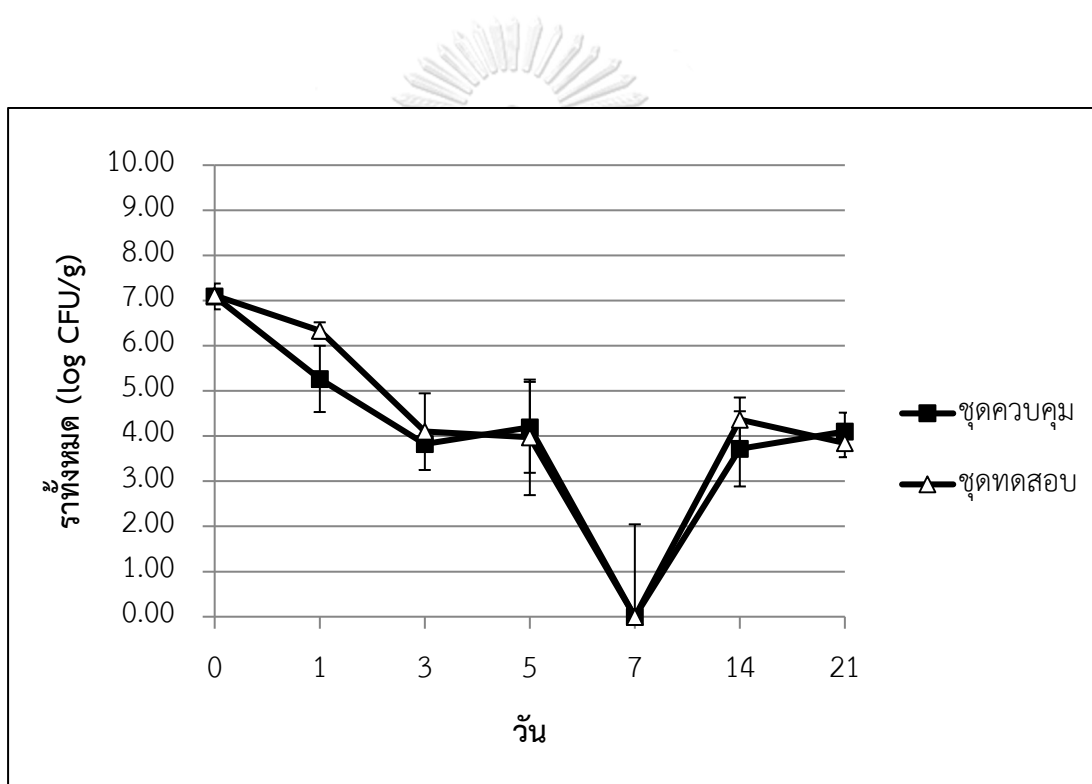
จากผลการนับจำนวนยีสต์ทั้งหมดในไซเลจข้าวโพด พบว่า จำนวนยีสต์ในชุดทดสอบมีจำนวนสูงกว่าชุดควบคุมตลอดการทดลอง จำนวนยีสต์ในชุดทดสอบเริ่มต้นเท่ากับ 9.42 ± 0.46 log CFU/กรัม และมีจำนวนคงที่จนถึงวันที่ 14 ของการบ่ม เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาการบ่มมีจำนวนยีสต์ลดลงเล็กน้อย (8.61 ± 0.34 log CFU/กรัม) สำหรับในชุดควบคุมที่พบว่า มีจำนวนยีสต์เริ่มต้นเท่ากับ 5.72 ± 0.69 log CFU/กรัม จากนั้น มีจำนวนยีสต์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในวันที่ 1 ของการบ่ม และมีค่าคงที่จนถึงสิ้นสุดระยะเวลาการบ่ม (ภาพที่ 4.43)



ภาพที่ 4.43 จำนวนยีสต์ทั้งหมดในของไซเลจข้าวโพดที่เติม *A. flavus* และแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ร่วมกับยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 (10^6 : 10^8) (ชุดทดสอบ) และเติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม)

จำนวนราทั้งหมด

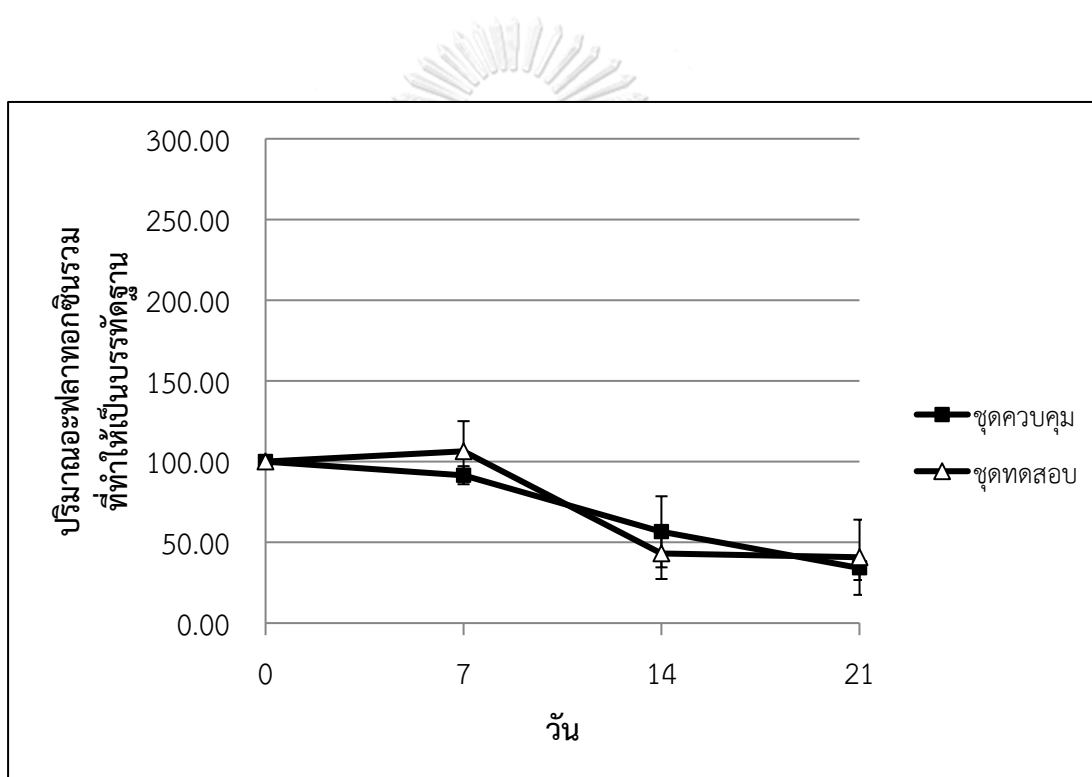
ผลการนับจำนวนราทั้งหมดพบว่า จำนวนราในชุดทดสอบและชุดควบคุมมีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกัน โดยมีจำนวนราเริ่มต้นเท่ากับ 7.11 ± 0.14 log CFU/กรัม ในชุดทดสอบ และ 7.09 ± 0.29 log CFU/กรัม ในชุดควบคุม หลังจากนั้น มีจำนวนราลดลงเรื่อยๆ จนไม่พบการเจริญของราในวันที่ 7 ของการบ่ม และพบการเจริญของยีสต์อีกครั้งในวันที่ 14 จนสิ้นสุดระยะเวลาของการทั้งในชุดทดสอบและชุดควบคุม (3.85 ± 0.32 log CFU/กรัม และ 4.10 ± 0.42 log CFU/กรัม ตามลำดับ) (ภาพที่ 4.44)



ภาพที่ 4.44 จำนวนราทั้งหมดในของไซเลจข้าวโพดที่เติม *A. flavus* และแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ร่วมกับยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 (10^6 : 10^8) (ชุดทดสอบ) และเติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม)

ปริมาณอะฟลาทอกซินรวม

จากวิเคราะห์ปริมาณอะฟลาทอกซินรวมในวันที่ 0, 7, 14 และ 21 แล้วนำค่าปริมาณอะฟลาทอกซินรวมมาทำให้เป็นบรรทัดฐานพบว่า ปริมาณอะฟลาทอกซินรวมบรรทัดฐานในชุดทดสอบและชุดควบคุมมีค่าใกล้เคียงกันและมีแนวโน้มในทิศทางเดียวกันตลอดการทดลอง โดยมีค่าคงที่จนถึงวันที่ 7 ก่อนจะลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 14 และมีค่าคงที่จนถึงสิ้นสุดระยะเวลาการบ่มซึ่งมีค่าเท่ากับ 40.77 ± 23.29 สำหรับในชุดทดสอบ และ มีค่าเท่ากับ 34.13 ± 7.43 สำหรับชุดควบคุม (ภาพที่ 4.45)



ภาพที่ 4.45 ปริมาณอะฟลาทอกซินรวมของไซเลจข้าวโพดที่เติม *A. flavus* และแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ร่วมกับยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalous* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 ($10^6:10^8$) (ชุดทดสอบ) และเติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม)

จากการทดสอบประสิทธิภาพของแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ร่วมกับ ยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 มีความเข้มข้น เท่ากับ $10^6:10^6$ (ผลการทดลองข้อ 4.3), $10^8:10^6$ และ $10^6:10^8$ CFU/กรัม ในการยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินของ *A. flavus* เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองดังกล่าว พบว่า ในกรรมวิธีของ แล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ร่วมกับยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ $10^6:10^6$ และ $10^6:10^8$ CFU/กรัม สามารถยับยั้งการเจริญของราได้ในวันที่ 3 และ 7 ตามลำดับ และมีการเจริญของราอีกครั้งหลังจากวันที่ 14 จนถึงสิ้นสุดระยะเวลาการบ่ม แต่ในกรรมวิธีของแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ร่วมกับ ยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 ที่มีความเข้มข้น เท่ากับ $10^8:10^6$ CFU/กรัม สามารถยับยั้งราได้ดีกว่ากรรมวิธีอื่นๆ โดยไม่พบการเจริญของราหลังจาก วันที่ 5 จนถึงสิ้นสุดการบ่ม (ตารางที่ 4.11)

ตารางที่ 4.11 จำนวนราทั้งหมดของไซเลจข้าวโพดที่เติม *A. flavus* และแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ร่วมกับยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 มีความเข้มข้นเท่ากับ $10^6:10^6$, $10^8:10^6$ และ $10^6:10^8$ CFU/กรัม (ชุดทดสอบ) เทียบกับไซเลจ ข้าวโพดที่เติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม)

วัน	จำนวนราทั้งหมดในกรรมวิธีต่างๆ (log CFU/กรัม)								
	แล็กติกแอซิดแบคทีเรียและยีสต์ผสม $10^6:10^6$			แล็กติกแอซิดแบคทีเรียและยีสต์ผสม $10^8:10^6$			แล็กติกแอซิดแบคทีเรียและยีสต์ผสม $10^6:10^8$		
	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ	% ยับยั้ง*	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ	% ยับยั้ง*	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ	% ยับยั้ง*
0	7.40±0.17	7.32±0.11	1.08	6.79±0.45	6.86±0.47	-1.03	7.09±0.29	7.11±0.14	-0.28
1	5.52±0.31	5.86±0.47	-6.16	4.46±0.65	3.78±0.95	15.25	5.27±0.73	6.34±0.18	-20.30
3	0.00	0.00	0.00	4.34±0.78	3.57±0.12	17.74	3.83±0.07	4.10±0.85	-7.05
5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	4.19±1.01	3.97±1.28	5.25
7	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
14	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	3.72±0.83	4.37±0.49	-17.47
21	4.98±0.94	4.89±0.14	1.81	0.00	0.00	0.00	4.10±0.42	3.85±0.32	6.10

* เมื่อเทียบกับชุดควบคุมในวันเดียวกัน

จากผลการตรวจวัดปริมาณอะฟลาทอกซินรวมในไซเลจข้าวโพดที่เติมแกล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ร่วมกับยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalous* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 มีความเข้มข้นเท่ากับ $10^6:10^6$ (ผลการทดลองข้อ 4.3), $10^8:10^6$ และ $10^6:10^8$ CFU/กรัม (ชุดทดสอบ) และไซเลจข้าวโพดที่เติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม) พบว่า ไซเลจข้าวโพดในชุดทดสอบทั้ง 3 กรรมวิธี มีแนวโน้มของปริมาณอะฟลาทอกซินรวมลดลงอย่างต่อเนื่องตลอดระยะเวลาการบ่มเมื่อเปรียบเทียบในชุดทดสอบจากกรรมวิธีเดียวกัน และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณอะฟลาทอกซินรวมในชุดควบคุมและชุดทดสอบในแต่ละกรรมวิธี พบว่า ทั้ง 3 กรรมวิธีในแต่ละช่วงเวลาการวิเคราะห์ (วันที่ 0, 7, 14 และ 21) มีปริมาณอะฟลาทอกซินรวมในชุดทดสอบน้อยกว่าชุดควบคุม ยกเว้นในกรรมวิธีที่เติมแกล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ร่วมกับยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalous* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 ในอัตราส่วน $10^6:10^6$ มีปริมาณอะฟลาทอกซินรวมในชุดทดสอบที่วันที่ 0 ของการบ่มมากกว่าชุดควบคุม (ตารางที่ 4.12)

ตารางที่ 4.12 ปริมาณอะฟลาทอกซินรวมในไซเลจข้าวโพดที่เติม *A. flavus* และแกล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ร่วมกับยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalous* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 มีความเข้มข้นเท่ากับ $10^6:10^6$, $10^8:10^6$ และ $10^6:10^8$ CFU/กรัม (ชุดทดสอบ) เทียบกับไซเลจข้าวโพดที่เติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม)

วัน	ปริมาณอะฟลาทอกซินรวมในกรรมวิธีต่างๆ (นาโนกรัมต่อกรัม)								
	แกล็กติกแอซิดแบคทีเรียและยีสต์ผสม $10^6:10^6$			แกล็กติกแอซิดแบคทีเรียและยีสต์ผสม $10^8:10^6$			แกล็กติกแอซิดแบคทีเรียและยีสต์ผสม $10^6:10^8$		
	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ	% ลดลง*	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ	% ลดลง*	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ	% ลดลง*
0	83.33±31.84	102.83±25.26	-23.40	77.00±20.61	69.17±7.08	10.17	101.83±6.60	67.17±36.91	34.04
7	90.70±28.50	85.10±18.77	6.17	92.00±22.29	23.00±6.00	75.00	93.50±11.50	67.33±26.55	27.99
14	63.83±24.68	45.50±19.49	28.71	73.00±19.84	38.33±9.09	47.49	58.00±23.44	25.17±4.54	56.60
21	59.10±44.68	46.20±34.21	21.83	53.00±52.94	38.33±33.33	27.68	34.50±5.77	23.00±10.44	33.33

* เมื่อเทียบกับชุดควบคุมในวันเดียวกัน

แต่เนื่องจากปริมาณอะฟลาทอกซินรวมของทุกกรรมวิธีในวันที่ 0 ของการบ่ม มีปริมาณอะฟลาทอกซินรวมตั้งต้นทั้งในชุดทดสอบและชุดควบคุมที่ไม่เท่ากัน ทำให้การนำมาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ร่วมกับยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalous* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 ต่อการลดการผลิตอะฟลาทอกซินรวมของเราเป็นไปได้ยาก (ตารางที่ 4.12) ดังนั้น เพื่อให้ค่าเริ่มต้นของอะฟลาทอกซินรวมเท่ากัน และนำไปเปรียบเทียบกับกรรมวิธีต่างๆ ได้ จึงใช้วิธีเทียบปริมาณอะฟลาทอกซินรวมให้เป็นบรรทัดฐานดังแสดงในตารางที่ 4.13 พบว่า การใช้แล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ร่วมกับยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalous* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 ในอัตราส่วน $10^6:10^6$ และ $10^8:10^6$ CFU/กรัม สามารถลดปริมาณอะฟลาทอกซินรวมได้ใกล้เคียงกัน เมื่อสิ้นสุดการบ่มมีปริมาณอะฟลาทอกซินรวมลดลงเท่ากับ 26.78 และ 23.22 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเทียบกับชุดควบคุมในวันเดียวกัน และมีปริมาณอะฟลาทอกซินรวมลดลงเท่ากับ 54.36 และ 45.23 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเทียบกับปริมาณอะฟลาทอกซินรวมเริ่มต้น โดยการใช้แล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ร่วมกับยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalous* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 ในอัตราส่วน $10^8:10^6$ CFU/กรัม สามารถลดปริมาณอะฟลาทอกซินรวมได้ดีที่สุดในวันที่ 7 ของการบ่ม เท่ากับ 63.94 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม (ตารางที่ 4.13)

ตารางที่ 4.13 ปริมาณอะฟลาทอกซินรวมที่ทำให้เป็นบรรทัดฐานในไซเลจข้าวโพดที่เติม *A. flavus* และแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ร่วมกับยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalous* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 มีความเข้มข้นเท่ากับ $10^6:10^6$, $10^8:10^6$ และ $10^6:10^8$ CFU/กรัม (ชุดทดสอบ) เทียบกับไซเลจข้าวโพดที่เติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม)

วัน	ปริมาณอะฟลาทอกซินรวมที่ทำให้เป็นบรรทัดฐานในกรรมวิธีต่างๆ								
	แล็กติกแอซิดแบคทีเรียและยีสต์ผสม			แล็กติกแอซิดแบคทีเรียและยีสต์ผสม			แล็กติกแอซิดแบคทีเรียและยีสต์ผสม		
	$10^6:10^6$			$10^8:10^6$			$10^6:10^8$		
ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ	% ลดลง*	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ	% ลดลง*	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ	% ลดลง*	
0	100.00±0.00	100.00±0.00	0.00	100.00±0.00	100.00±0.00	0.00	100.00±0.00	100.00±0.00	0.00
7	116.07±53.38	70.59±28.40	39.18	94.44±7.84	34.06±12.40	63.94	91.59±5.60	106.41±18.68	-16.18
14	100.78±24.09	60.02±28.51	40.44	127.86±53.29	55.55±11.98	56.55	56.54±22.01	43.19±15.88	23.61
21	62.33±3.61	45.64±20.73	26.78	71.33±14.17	54.77±13.14	23.22	34.13±7.43	40.77±23.29	-19.46

* เมื่อเทียบกับชุดควบคุมในวันเดียวกัน

4.6 ทดสอบผลของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียและยีสต์ต่อคุณค่าทางโภชนาของไซเลจข้าวโพด

จากการนำข้าวโพดเลี้ยงสัตว์มาเติมหัวเชื้อแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ร่วมกับยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ $10^8:10^6$ CFU/กรัม ที่ให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินจาก *A. flavus* ดีที่สุด และหมักเป็นเวลา 0, 7, 14 และ 21 วัน และส่งวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาของไซเลจข้าวโพดได้แก่ ความชื้น วัตถุแห้ง โปรตีนรวม ไขมัน เยื่อใยรวม เถ้า แคลเซียม ฟอสฟอรัส และวิเคราะห์ผนังเซลล์พืชในรูปของ Neutral detergent fiber (NDF) และ Acid detergent fiber (ADF) และพลังงานรวม ตามวิธีในข้อ 3.3.7 พบว่า เมื่อเปรียบเทียบโภชนาของไซเลจข้าวโพดสด (ชุดควบคุมวันที่ 0) และไซเลจข้าวโพดจากชุดทดสอบ (เติมแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ร่วมกับยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ $10^8:10^6$ CFU/กรัม) ในแต่ละระยะเวลาการบ่ม พบว่า ไซเลจข้าวโพดในแต่ละระยะเวลาการบ่ม มีปริมาณวัตถุแห้งลดลงจากไซเลจข้าวโพดสดอย่างต่อเนื่อง นอกจากนี้ ยังมีปริมาณโปรตีน ไขมัน และ NDF ในไซเลจข้าวโพดเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อเทียบกับข้าวโพดสด และเมื่อเทียบไซเลจข้าวโพดชุดควบคุมและชุดทดสอบในวันที่ 0, 7, 14 และ 21 พบว่า ชุดทดสอบมีค่าโภชนาเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อเทียบกับชุดควบคุม ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า ชุดทดสอบมีค่าทางโภชนาไม่แตกต่างกันเมื่อเทียบกับชุดควบคุมในแต่ละระยะเวลาของการบ่ม และการเติมหัวเชื้อแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ร่วมกับยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ $10^8:10^6$ CFU/กรัม ลงในไซเลจข้าวโพดไม่มีผลต่อคุณค่าทางโภชนาของไซเลจข้าวโพด

ตารางที่ 4.14 คุณค่าทางโภชนาของไซเลจข้าวโพดที่เติมแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ร่วมกับยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 (ชุดทดสอบ) เทียบกับไซเลจข้าวโพดที่ไม่มีการเติมหัวเชื้อ (ชุดควบคุม) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 21 วัน

โภชนา (เปอร์เซ็นต์ น้ำหนัก แห้ง)	ตัวอย่าง							
	วันที่ 0	วันที่ 7		วันที่ 14		วันที่ 21		
	ชุดควบคุม (ข้าวโพดสด)	ชุด ทดสอบ	ชุด ควบคุม	ชุด ทดสอบ	ชุด ควบคุม	ชุด ทดสอบ	ชุด ควบคุม	ชุด ทดสอบ
วัตถุแห้ง	24.65	24.01	22.46	21.23	21.49	20.52	19.96	20.08
โปรตีน	8.11	8.20	8.99	9.09	10.19	9.36	9.62	10.31
ไขมัน	1.22	1.71	2.54	2.26	2.28	1.95	2.61	2.39
เยื่อใย	26.13	26.86	26.67	27.60	29.41	31.73	28.86	31.42
เถ้า	7.63	7.21	7.48	7.96	8.24	8.14	7.62	8.42
NDF	56.80	56.06	63.00	64.34	61.70	63.79	66.88	68.92
ADF	32.25	32.07	33.04	34.39	35.83	38.65	37.32	37.90
แคลเซียม	0.41	0.33	0.36	0.42	0.51	0.39	0.40	0.45
ฟอสฟอรัส	0.24	0.25	0.31	0.24	0.28	0.24	0.25	0.30
พลังงาน*	4004.38	4071.97	4001.02	4005.04	4204.00	4205.56	4036.77	4192.13

* หน่วย Ca/gDM

บทที่ 5

วิจารณ์

5.1. การทดสอบประสิทธิภาพของยีสต์และแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินรวมของ *A. flavus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากการศึกษาผลของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อการยับยั้งการเจริญและการลดการผลิตอะฟลาทอกซินรวมของ *A. flavus* ด้วยวิธี Dual Culture Technique พบว่า การใช้ยีสต์ (*W. anomalous* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655) และแบคทีเรีย (*L. casei* AN2 และ *L. paracasei* AN3) ทั้งแบบเดี่ยวและแบบผสมสามารถยับยั้งการเจริญของราได้เพียงเล็กน้อย (10-20 เปอร์เซ็นต์) ในขณะที่ราผลิตอะฟลาทอกซินรวมลดลงสูงสุด 43.25 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเลี้ยงร่วมกับยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalous* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 และลดลง 35.64 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3

ยีสต์ได้รับความสนใจอย่างยิ่งในการศึกษาค้นคว้าวิจัยเพื่อนำมาใช้เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพเพื่อควบคุมการเจริญของราที่ก่อโรคพืชทั้งก่อนและหลังการเก็บเกี่ยว รวมทั้งราที่ผลิตสารพิษที่ปนเปื้อนในอาหารและผลผลิตทางการเกษตร Niba และคณะ (2014) พบว่า *W. anomalous* มีประสิทธิภาพในการลดการปนเปื้อนของราที่พบในระหว่างการเก็บเกี่ยว ได้แก่ *Arthrinium arundinis*, *A. melleus*, *Bionectria ochroleuca* และ *Pleoporaled* sp. ที่พบในข้าวโพดเมื่อผ่านช่วงระยะการเก็บรักษาเป็นเวลา 2 เดือน Geng และคณะ (2011) ศึกษาการใช้ยีสต์ *K. marxianus* ร่วมกับโซเดียมไบคาร์บอเนตในการควบคุมการเจริญของ *P. digitatum* ในผลมะนาว พบว่า สามารถยับยั้งการเจริญของราได้โดยไม่ทำให้ผลผลิตเสียหาย ซึ่งสามารถนำไปใช้เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพในขั้นตอนหลังการเก็บเกี่ยวได้ Nally และคณะ (2013) พบว่า *S. cerevisiae* สามารถยับยั้งการเจริญของรา *B. cinerea* ที่ก่อให้เกิดการเน่าขององุ่นที่ใช้ในการผลิตไวน์ได้ และยีสต์ยังสามารถยับยั้งการผลิตสารพิษจากราได้ Penna และ Etcheverry (2006) ได้ศึกษาความสามารถของยีสต์ *Kluyveromyces* sp. ในการยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินของ *A. flavus* และ *A. parasiticus* พบว่า ยีสต์ดังกล่าวสามารถยับยั้งการเจริญและลดการผลิตอะฟลาทอกซินของราทั้งสองสายพันธุ์ได้ นอกจากนี้ การใช้จุลินทรีย์ผสมเป็นตัวควบคุมทางชีวภาพให้ประสิทธิภาพการยับยั้งที่ดีกว่าการใช้จุลินทรีย์เพียงชนิดเดียว เช่น รายงานของ Janisiewicz (1996) ได้ทดสอบความสามารถ

ของยีสต์ผสมในการยับยั้งการเจริญของรา *P. expansum* ที่ก่อโรคในผลแอปเปิ้ล พบว่า ยีสต์ผสมสามารถลดการเจริญของราได้ดีกว่ายีสต์เดี่ยว

ยีสต์มีหลายกลไกในการยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษจากรา สามารถผลิตเมแทบอไลต์ เช่น สารประกอบอินทรีย์ระเหยง่าย (2-ฟีนิลเอทานอล 1,3,5,7-ไซโคลออกทาเททราอิน และ 3-เมทิล-1-บิวทานอล) เอนไซม์ (บีตา-1,3-กลูคาเนส โพรตีเอส ไฟเทส และเพกตินเนส) เป็นต้น นอกจากนี้ยังสามารถแย่งชิงพื้นที่และอาหารเพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของราได้ (Hua และคณะ, 2014; Huang และคณะ, 2011; Olstorpe และ Passoth, 2011; Wilson และคณะ, 1991) จากงานวิจัยก่อนหน้านี้ Parafati และคณะ (2015) ศึกษากลไกการควบคุมทางชีวภาพของ *S. cerevisiae*, *W. anomalus*, *M. pulcherrima* และ *A. pullulans* ที่คัดแยกได้จากอาหารหลายชนิดต่อการเจริญของ *B. cinerea* ที่ทำให้เกิดโรคก้านเน่าในองุ่นหลังการเก็บเกี่ยว พบว่า *A. pullulans* และ *W. anomalus* สามารถสร้าง บีตา-1,3-กลูคาเนส ซึ่งมีสมบัติในการย่อยองค์ประกอบของผนังเซลล์ของราได้ และจากงานวิจัยของ Fiori และคณะ (2014) ได้ทดสอบความสามารถในการใช้ยีสต์ที่ไม่เกิดการหมักและยีสต์ที่เกิดการหมักได้ต่ำ ในการยับยั้งการเจริญของ *A. carbonarius* ที่สามารถผลิตโอคราทอกซินเอในการผลิตเครื่องดื่ม เช่น ไวน์ และน้ำองุ่น พบว่า ยีสต์สามารถผลิตสารอินทรีย์ระเหยง่าย ซึ่งส่งผลกระทบต่อสารสร้างสปอร์ของราทำให้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราเปลี่ยนแปลงได้โดยเส้นใยของราจะเป็นสีขาวและไม่สร้างสปอร์ และยังสามารถดูดซับปริมาณโอคราทอกซินในน้ำองุ่นได้อีกด้วย Medina-Córdova และคณะ (2016) รายงานว่ายีสต์สายพันธุ์ *D. hansenii* สามารถยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษจากราของ *M. circinelloides*, *Aspergillus* sp., *F. proliferatum* และ *F. subglutinans* ในเมล็ดข้าวโพดได้ โดยใช้กลไกการแข่งขันในการแย่งอาหารและพื้นที่ในการเจริญ รวมถึงสามารถผลิตการประกอบต่างๆ และสารอินทรีย์ระเหยง่าย ได้โดยไม่ส่งผลกระทบต่อองค์ประกอบทางเคมีและแร่ธาตุของเมล็ดข้าวโพด Gao และ Daugulis (2009) และ Hua และคณะ (2014) รายงานว่า *K. marxianus* และ *P. anomala* สามารถผลิตสาร 2-ฟีนิลเอทานอล ที่สามารถยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ของ *A. flavus* ได้ Masoud และคณะ (2005) พบว่า *Pichia* spp มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญและการผลิตโอคราทอกซินเอของ *A. ochraceus* โดยการผลิตสารประกอบเอสเทอร์และแอลกอฮอล์ ซึ่งพบว่า 2-ฟีนิลเอทิลอะซิเตต มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของราได้ดีที่สุด

แล็กติกแอซิดแบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์อีกหนึ่งชนิดที่นิยมใช้เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพเพื่อยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชทั่วไปและราผลิตสารพิษได้เช่นกัน Trias และคณะ (2008) รายงาน

ว่า แล็กติกแอซิดแบคทีเรียสามารถยับยั้งการเจริญของ *P. expansum*, *Monilinia laxa*, และ *B. cinerea* ซึ่งเป็นราก่อโรคในพืชได้ และงานวิจัยของ Zamani-Zadeh และคณะ (2014) รายงานว่า *L. plantarum* A7 สามารถยับยั้ง *Botrytis* spp. ซึ่งเป็นราก่อโรคในผลสตรอว์เบอร์รี่ได้อย่างสมบูรณ์ เมื่อใช้ร่วมกับน้ำมันหอมระเหย Khanafari และคณะ (2007) รายงานว่า *L. plantarum* สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* โดยการยับยั้งการเจริญของสปอร์ราในข้าวโพด Prema และคณะ (2008) พบว่า *L. plantarum* ที่คัดแยกได้จากไซเลจหญ้าสามารถยับยั้งการเจริญและชะลอการปนเปื้อนของ *A. fumigatus* และ *R. stolonifer* ได้ นอกจากนี้ แล็กติกแอซิดแบคทีเรียยังมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการผลิตสารพิษจากราได้ Asurmendi และคณะ (2014) พบว่า แล็กติกแอซิดแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากธัญพืชที่ใช้ผลิตเบียร์สามารถยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 ของ *A. flavus* และ *A. parasiticus* ที่ปนเปื้อนในวัตถุดิบได้ Dogi และคณะ (2015) รายงานว่า *L. rhamnosus* RC007 สามารถยับยั้งการเจริญของราที่สร้างสารพิษ ได้แก่ *A. fumigatus*, *A. flavus* และ *A. parasiticus* ในไซเลจข้าวโพด

แล็กติกแอซิดมีหลายกลไกในการยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษจากรา เช่น การแย่งพื้นที่และสารอาหารในการเจริญ และการผลิตเมแทบอไลต์ต่างๆ ได้แก่ ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ กรดอินทรีย์ (กรดแล็กติกและกรดโพรพิโอนิก) สารประกอบโปรตีน ไซคลิกไดเพปไทด์ ((cyclo (L-Leu-L-Pro) และ cyclo (L-Phe-L-Pro)) และสารประกอบฟีนอลิก (กรด 3-ฟีนิลแล็กติก) เป็นต้น (Dal Bello และคณะ, 2007; Magnusson และ Schnurer, 2001; Trias และคณะ, 2008; Valan Arasu และคณะ, 2013) จากรายงานของ Magnusson และคณะ (2003) พบว่า สารประกอบไซคลิกไดเพปไทด์และสารประกอบอื่นๆ ที่ผลิตโดย *L. coryniformis*, *L. plantarum* และ *Pediococcus pentosaceus* สามารถใช้เป็นสารต้านราได้ เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Yang และ Chang (2010) พบว่า *L. plantarum* AF1 ที่คัดแยกได้จากกิมจิ ซึ่งสามารถผลิตสาร cyclo (Leu-Leu) ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญและลดการผลิตสารพิษจากรา *A. flavus* ได้ Rather และคณะ (2013) ทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งของ *L. plantarum* YML007 ที่คัดแยกได้จากกิมจิ ซึ่งสามารถยับยั้งรา *A. oryzae*, *A. flavus* และ *F. oxysporum* แล็กติกแอซิดแบคทีเรียดังกล่าวสามารถผลิตสารประกอบประเภทโปรตีนขนาดเล็กกว่า 1256.617 Da ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของราโดยการทำลายเส้นใยของรา ทำลายผนังเซลล์ และทำให้ขนาดเส้นใยของราเล็กลง Sangmanee และ Hongpattarakere (2014) พบว่า *L. plantarum* K35 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินของ *A. flavus* และ *A. parasiticus* โดยผลิตสารต้านราที่ทนความร้อน

และทนต่อเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีน ได้แก่ ทริปซิน และโปรตีนเนสเค ซึ่งส่งผลทำให้ผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์เสียหาย

5.2 การทดสอบความสามารถของยีสต์และแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินรวมในไซเลจข้าวโพดปลอดเชื้อ

จากการทดสอบประสิทธิภาพของยีสต์และแล็กติกแอซิดแบคทีเรียที่เรียปฏิบัติในการยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินรวมของ *A. flavus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า ยีสต์ผสมระหว่างระหว่าง *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 และกับแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 มีประสิทธิภาพดีที่สุด จึงนำมาศึกษาผลของยีสต์ผสม แล็กติกแอซิดแบคทีเรีย และแล็กติกแอซิดแบคทีเรียร่วมกับยีสต์ผสมในการยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินรวมของ *A. flavus* ในไซเลจข้าวโพดปลอดเชื้อ ซึ่งเป็นสับสเตรตจริง พบว่า ค่าความเป็นกรด-เบสในทุกชุดทดสอบมีค่าความเป็นกรด-เบสน้อยกว่าชุดควบคุมที่เลี้ยง *A. flavus* เพียงอย่างเดียว ซึ่งในชุดทดสอบนั้นมีค่าลดลงตั้งแต่วันที่ 1 และคงที่ไปจนถึงสิ้นสุดระยะเวลาการบ่ม โดยเมื่อใช้แล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ทำให้ค่าความเป็นกรด-เบสต่ำที่สุดในวันที่ 21 ของการบ่มเท่ากับ 3.42 ± 0.03 รองลงมา ได้แก่ การใช้แล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ร่วมกับยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 และการใช้ยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 (3.98 ± 0.25 และ 4.38 ± 0.06 ตามลำดับ)

กระบวนการหมักไซเลจเกิดจากการทำงานของแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย (lactic acid bacteria) ในภาวะไร้อากาศ ซึ่งแล็กติกแอซิดแบคทีเรียจะใช้คาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำได้ (water-soluble carbohydrate) เป็นสับสเตรตเพื่อผลิตกรดอินทรีย์ โดยเฉพาะกรดแล็กติก ส่งผลให้ค่าความเป็นกรด-เบสของไซเลจลดลง โดยทั่วไปไซเลจข้าวโพดมักมีค่าความเป็นกรด-เบสประมาณ 3.6-4.5 ค่าความเป็นกรด-เบสที่ลดลงอย่างรวดเร็วจะสามารถยับยั้งจุลินทรีย์อื่นที่ไม่ต้องการ รวมถึงยับยั้งแอกทิวิตีของเอนไซม์ฟิซได้ (Kung, 2001)

จากการศึกษาการยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* ในไซเลจข้าวโพดปลอดเชื้อจากชุดทดสอบต่างๆ พบว่า ชุดทดสอบที่ใช้ยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 สามารถยับยั้งการเจริญของเราได้ดีที่สุด โดยจำนวนราลดลงอย่างรวดเร็วตั้งแต่วันที่ 1 จนกระทั่งไม่พบการเจริญของเราในวันที่ 3 ของการบ่ม รองลงมา ได้แก่ ชุดทดสอบที่ใช้แล็กติกแอซิด

แบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ร่วมกับยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 ซึ่งมีจำนวนราลดลงอย่างต่อเนื่อง จนไม่พบการเจริญของราตั้งแต่วันที่ 7 จนสิ้นสุดการบ่ม สำหรับชุดทดสอบที่ใช้แล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 มีจำนวนราใกล้เคียงกับในชุดควบคุม

จากผลการทดลองในข้อ 4.1 พบว่า *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* ในระดับ *in vitro* ได้ และเมื่อมาทดสอบในไซเลจข้าวโพด (*in vivo*) ยีสต์ดังกล่าวยังคงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของราได้เป็นอย่างดี ซึ่งก่อนหน้านี้มีรายงานหลายฉบับที่แสดงให้เห็นถึงความสามารถของยีสต์ *W. anomalus* และ *K. marxianus* ที่ใช้เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพ เช่น Repečkienė และคณะ (2013) พบว่า *S. cerevisiae*, *Geotrichum fermentans*, *K. marxianus* และ *M. pulcherrima* มีประสิทธิภาพในการลดปริมาณสารพิษจากราในแป้งสาลีได้ดีกว่าตัวอย่างชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมยีสต์ ทั้งนี้ เนื่องจากยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้ทั้งในภาวะที่มีออกซิเจนและมีออกซิเจนน้อย เมื่อเลี้ยงร่วมกับรา ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่เจริญได้ในภาวะที่มีออกซิเจน จึงทำให้ยีสต์สามารถแย่งชิงออกซิเจนมาใช้ในการเจริญเติบโตได้ดีกว่ารา เช่นเดียวกับรายงานของ Druvefors และคณะ (2002) พบว่า *P. anomalus* สามารถยับยั้งการเจริญของรา *P. roqueforti* ในข้าวสาลีที่มีความชื้นสูงได้ตั้งแต่ 1 เดือนแรก และพบว่า มีปริมาณออกซิเจนต่ำลงภายใน 1 วัน และมีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์สูงขึ้น 80-90 เปอร์เซ็นต์ใน 1 เดือนแรก รายงานของ Armando และคณะ (2013) ทดสอบประสิทธิภาพของ *S. cerevisiae* RC008 และ RC016 ในการยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษจากรา ได้แก่ *A. carbonarius* และ *F. graminearum* พบว่า ในภาวะที่มีออกซิเจน ยีสต์สามารถยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษจากราได้ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่เลี้ยงราเพียงอย่างเดียว และในภาวะที่ลดปริมาณออกซิเจนลงพบว่า ยีสต์ยังคงลดการเจริญของราได้แต่มีประสิทธิภาบน้อยกว่าในภาวะที่มีออกซิเจน ดังนั้น ในกระบวนการหมักหากควบคุมปริมาณออกซิเจนให้มีอยู่อย่างจำกัด (ในภาวะไร้อากาศมากที่สุด) ยีสต์จะยังสามารถแย่งชิงออกซิเจนกับราเพื่อการเจริญเติบโตและคงคุณภาพไซเลจที่สีไว้ได้

ในกรณีของแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย จากการทดลองพบว่า แล็กติกแอซิดแบคทีเรียสามารถยับยั้งการเจริญของราได้เพียงเล็กน้อย แม้ว่าแล็กติกแอซิดแบคทีเรียจะสามารถผลิตกรดแล็กติกซึ่งทำให้ค่าความเป็นกรด-เบสของไซเลจข้าวโพดต่ำลงอย่างมากก็ตาม จากรายงานก่อนหน้านี้ที่ศึกษาเกี่ยวกับปัจจัยต่างๆ ที่ส่งผลต่อการเจริญของรา พบว่า ราสามารถเจริญเป็นเส้นใยและสร้างสปอร์ได้

ในภาวะที่มีค่าความเป็นกรด-เบสต่ำกว่า 4.5-5 (Abubakar และคณะ, 2013; López-Malo และคณะ, 2005) จึงสอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้ ในกรณีที่ใช้แล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ที่ยับยั้งการเจริญของราได้น้อยแม้จะมีค่าความเป็นกรด-เบสในไซเลจข้าวโพดต่ำก็ตาม

จากการศึกษาการลดการผลิตอะฟลาทอกซินรวมของ *A. flavus* ซึ่งพิจารณาจากปริมาณอะฟลาทอกซินรวมที่ทำให้เป็นบรรทัดฐาน พบว่า เมื่อสิ้นสุดการบ่ม ชุดทดสอบที่ใช้แล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ร่วมกับยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 สามารถลดการผลิตอะฟลาทอกซินรวมได้ดีที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การลดลงเท่ากับ 35.11 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม และเท่ากับ 31.87 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับปริมาณอะฟลาทอกซินรวมเริ่มต้น รองลงมา คือ ชุดทดสอบที่ใช้ยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 สามารถลดปริมาณอะฟลาทอกซินรวมเท่ากับ 23.70 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม และเท่ากับ 29.20 เมื่อเทียบกับปริมาณอะฟลาทอกซินรวมเริ่มต้น และชุดทดสอบที่ใช้แล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 สามารถลดการผลิตอะฟลาทอกซินรวมได้เท่ากับ 20.08 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม และเท่ากับ 2.42 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับปริมาณอะฟลาทอกซินรวมเริ่มต้น ตามลำดับ

แม้ว่ายีสต์และแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในทุกชุดทดสอบจะสามารถยับยั้งการเจริญของราได้ แต่ปริมาณอะฟลาทอกซินรวมถูกตรวจพบตั้งแต่ก่อนการบ่ม ทั้งนี้ เนื่องมาจากปริมาณอะฟลาทอกซินรวมที่วิเคราะห์ได้เป็นผลมาจากการสะสมอยู่ในสปอร์ราแฉวนลอย ซึ่งถูกเติมลงไปไซเลจข้าวโพดไม่ได้มาจากการผลิตของรา แต่หลังจากการหมักเริ่มต้นพบว่า ปริมาณอะฟลาทอกซินรวมลดลงอย่างต่อเนื่อง ซึ่งอาจเกิดจากรากูยับยั้งการเจริญเติบโต หรือเกิดจากยีสต์และแล็กติกแอซิดแบคทีเรียสามารถลดปริมาณอะฟลาทอกซินรวมด้วยการดูดซับที่ผนังเซลล์ ปริมาณอะฟลาทอกซินรวมจึงลดลง มีหลายงานวิจัยรายงานว่า องค์ประกอบของผนังเซลล์ของยีสต์ เช่น ปีตากลูแคน กลูโคแมนแนน และ แมนแนนโอลิโกแซ็กคาไรด์ มีความสามารถในการจับกับสารพิษจากราได้ (Oguz และ Parlat, 2004; Raju และ Devegowda, 2002; Yiannikouris และ คณะ, 2004) โดยประสิทธิภาพของยีสต์ในการจับกับสารพิษจากราจะขึ้นอยู่กับชนิดของสารพิษจากรา ความเข้มข้นของจุลินทรีย์ และปริมาณของผนังเซลล์ทั้งหมด (Pfliegler และคณะ, 2015) จากงานวิจัยของ Petersson และคณะ (1998) ได้ศึกษาพบว่า เชื้อผสมระหว่าง *P. anomala* และ *S. cerevisiae* สามารถลดการปนเปื้อนของไอคราทอกซินเอที่ผลิตโดย *P. verrucosum* ทั้งในระดับห้องปฏิบัติการ และในข้าวสาลี Karaman และคณะ (2005) รายงานว่า เมื่อผสมผนังเซลล์ของยีสต์ในส่วนของกลูโค

แมนแนนลงในอาหารสัตว์ พบว่า สามารถลดการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินในไก่ไข่ได้ นอกจากนี้ ยีสต์สามารถย่อยสลายสารพิษจากราได้ Peteri และคณะ (2007) พบว่า *P. rhodozyma* และ *X. dendrorhous* สามารถลดโอคราทอกซินเอในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ โดยการสร้างเอนไซม์คาร์บอกซีเพปติเดส (carboxypeptidase) ซึ่งสามารถเปลี่ยนโอคราทอกซินเอให้เป็นโอคราทอกซินแอลฟา ที่มีความเป็นพิษน้อยกว่าโอคราทอกซินเอ Patharajan และคณะ (2011) พบว่า *M. pulcherrima* MACH1 สามารถย่อยสลายโอคราทอกซินเอได้มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในเวลา 15 วัน

เช่นเดียวกับแล็กติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถลดปริมาณสารพิษจากราโดยการย่อยสลาย และดูดซับสารพิษจากรา Lahtinen และคณะ (2004) รายงานว่า ผนังเซลล์ของ *L. rhamnosus* strain GG ในส่วนของเพปติโดไกลแคนสามารถจับกับอะฟลาทอกซินบี 1 ที่ผลิตโดย *Aspergillus* sp. นอกจากนี้ *Leuconostoc* และ *Streptococcus* สามารถจับกับสารประกอบบางชนิดได้ ซึ่งสามารถใช้กลไกนี้ของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในการกำจัดสิ่งปนเปื้อนในอาหารรวมถึงสารพิษจากราได้ (Dalié และคณะ, 2010) Haskard และคณะ (2001) พบว่า *L. rhamnosus* GG และ *L. rhamnosus* LC-705 มีประสิทธิภาพในการจับกับอะฟลาทอกซินบี 1 ได้ดี โดยค่าความเป็นกรด-เบสที่เปลี่ยนแปลงไป (2.7 และ 10) ไม่ส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพการจับอะฟลาทอกซินของแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย Peltonen และคณะ (2001) พบว่า *L. amylovorus* และ *L. rhamnosus* สามารถจับกับอะฟลาทอกซินบี 1 ในสารละลายได้มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลาอันรวดเร็ว และสามารถคงประสิทธิภาพในการจับกับสารพิษได้เป็นเวลา 72 ชั่วโมง Zinedine และคณะ (2005) พบว่า *Lactobacillus* ที่คัดแยกได้จากแป้งเปรี้ยวสามารถจับกับอะฟลาทอกซินบี 1 จากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวได้ดีกว่า *Pediococcus* และ *Leuconostoc* ซึ่งสามารถลดปริมาณอะฟลาทอกซินได้ 1.80 ถึง 44.89 เปอร์เซ็นต์ และ *L. rhamnosus* Lb50 มีประสิทธิภาพมากที่สุด เท่ากับ 45 เปอร์เซ็นต์ Oluwafemi และคณะ (2010) ศึกษาการย่อยสลายอะฟลาทอกซินบี 1 ในเมล็ดข้าวโพดของแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย พบว่า *L. plantarum* มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารพิษมากที่สุด (30-45 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งประสิทธิภาพในการย่อยสลายขึ้นอยู่กับปริมาณอะฟลาทอกซินเริ่มต้น อย่างไรก็ตาม กลไกในการดูดซับสารพิษจากราของยีสต์และแล็กติกแอซิดแบคทีเรียอาจช่วยลดปริมาณสารพิษจากราที่ปนเปื้อนในไซเลจได้ แต่สารพิษจากรายังคงถูกดูดซับไว้ในผนังเซลล์ของยีสต์และแล็กติกแอซิดแบคทีเรานั้นๆ หากสัตว์บริโภคไซเลจที่มียีสต์และแล็กติกแอซิดแบคทีเรียดังกล่าวเข้าไป สารพิษจากราที่อยู่ผนังเซลล์ของยีสต์และแล็กติกแอซิดแบคทีเรียอาจส่งผลกระทบต่อสุขภาพของสัตว์ได้ ยีสต์และแล็ก

ดิกแอซิดแบคทีเรียที่มีกลไกในการดูดซับสารพิษจากราจึงไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นหัวเชื้อในการหมักไซเลจ ซึ่งมีงานวิจัยก่อนหน้านี้รายงานว่ายีสต์บางชนิดไม่สามารถดูดซับสารพิษจากราได้ เช่น งานวิจัย Scott และคณะ (1995) รายงานว่า ผนังเซลล์ของ *S. cerevisiae* ไม่สามารถดูดซับฟูโมนิซินในน้ำข้าวบาเลย์หมักได้ เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Angioni และคณะ (2007) รายงานว่า *S. cerevisiae* และ *K. apiculata* ไม่สามารถดูดซับโอคราทอกซินเอด้วยกลไกการดูดซับของผนังเซลล์ Patharajan และคณะ (2011) พบว่า *M. pulcherrima* และ *P. guillieumonodii* สามารถดูดซับโอคราทอกซินเอได้น้อย แต่สามารถย่อยสลายโอคราทอกซินเอได้มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ และมีงานวิจัยก่อนหน้านี้รายงานว่าแล็กติกแอซิดแบคทีเรียบางชนิดไม่สามารถดูดซับสารพิษจากราได้เช่นกัน เช่น งานวิจัยของ Abrunhosa และคณะ (2014) รายงานว่า *P. parvulus* มีประสิทธิภาพในการดูดซับโอคราทอกซินเอได้เพียง 1.3 เปอร์เซ็นต์ แต่สามารถย่อยสลายโอคราทอกซินเอได้ถึง 50 และ 90 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 6 และ 19 ชั่วโมง ตามลำดับ

จากการศึกษาผลของยีสต์ผสม แล็กติกแอซิดแบคทีเรีย และแล็กติกแอซิดแบคทีเรียร่วมกับยีสต์ผสมในการยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินรวมของ *A. flavus* ในไซเลจข้าวโพดปลอดเชื้อ สรุปได้ว่า เมื่อใช้สับสเตรตจริง ในภาวะไร้อากาศและค่าความเป็นกรด-เบสต่ำของไซเลจข้าวโพด ยีสต์ผสมและแล็กติกแอซิดแบคทีเรียดังกล่าวสามารถเจริญและเพิ่มจำนวนได้ และยังคงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินของ *A. flavus* ขึ้นตอนต่อมาจึงนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินของ *A. flavus* ในไซเลจข้าวโพดร่วมกับจุลินทรีย์ประจำถิ่น

5.3 การทดสอบความสามารถของยีสต์และแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินรวมในไซเลจข้าวโพดร่วมกับจุลินทรีย์ประจำถิ่น

เมื่อทดสอบความสามารถของยีสต์ผสม แล็กติกแอซิดแบคทีเรีย และแล็กติกแอซิดแบคทีเรียร่วมกับยีสต์ผสมในการยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินรวมในไซเลจข้าวโพดร่วมกับจุลินทรีย์ประจำถิ่น ค่าความเป็นกรด-เบสของชุดทดสอบต่างๆ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่เลี้ยง *A. flavus* เพียงอย่างเดียว ลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 1-2 วันแรกของการบ่ม และมีค่าความเป็นกรด-เบสลดลงต่ำสุดใกล้เคียงกันประมาณ 3.65 ถึง 3.84 และไม่แตกต่างกับชุดควบคุม การลดลงของค่าความเป็นกรด-เบสในไซเลจ อาจเนื่องมาจากจุลินทรีย์ประจำถิ่นที่สามารถผลิตกรดได้ เช่น *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* และ *Leuconostoc* ซึ่งสามารถผลิตกรดแล็กติกได้จากกระบวนการหมักน้ำตาล (Muck, 2010)

จำนวนคอลิฟอร์มแบคทีเรียที่นับได้จากชุดทดสอบและชุดควบคุมทั้ง 3 แบบ พบว่ามีการเจริญของคอลิฟอร์มแบคทีเรียในวันแรกของการบ่ม หลังจากนั้น ไม่พบการเจริญของคอลิฟอร์มแบคทีเรียตั้งแต่วันที่ 1 จนถึงสิ้นสุดการบ่ม จากการทดลองของ Niba และคณะ (2014) รายงานว่า *W. anomalous* สามารถผลิตกรดอะมิโน เช่น อะลานีน แอสพาร์ติก และไกลซีน ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *Enterobacteriaceae* และการเจริญของราในกระบวนการเก็บรักษาข้าวโพดที่มีความชื้น โดยไม่ส่งผลต่อคุณค่าทางโภชนาการของข้าวโพด Olstorpe และ Passoth (2011) พบว่า *P. anomalous* สามารถผลิตเอทิลอะซิเตตได้จากการใช้น้ำตาลกลูโคส ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของ *Enterobacteriaceae* ในระหว่างกระบวนการเก็บรักษาเมล็ดธัญพืชได้ ต่อมา Olstorpe และคณะ (2012) พบว่า จำนวนคอลิฟอร์มแบคทีเรียลดลงจนไม่พบการเจริญอีกในไซเลจข้าวโพดที่ใช้ยีสต์เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพ อาจเนื่องมาจากการลดลงของค่าความเป็นกรด-เบสที่ลดลงจากกระบวนการหมักของยีสต์ในไซเลจข้าวโพด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Chen และคณะ (2005) รายงานว่า ค่าความเป็นกรด-เบสที่ต่ำลงในกระบวนการหมักสามารถยับยั้งการเจริญของคอลิฟอร์มแบคทีเรียได้ เนื่องจาก คอลิฟอร์มแบคทีเรียไม่ทนต่อภาวะความเป็นกรด-เบสต่ำในกระบวนการหมัก และจากรายงานของ Muck (2010) และ Driehuis (2013) พบว่า เมื่อไซเลจอยู่ในภาวะที่มีค่าความเป็นกรด-เบสต่ำอย่างรวดเร็ว (ต่ำกว่า 4.5) จะสามารถยับยั้งการเจริญของคอลิฟอร์มแบคทีเรีย รวมถึงแบคทีเรียในสกุล *Listeria* และ *Clostridium* ในไซเลจได้

จากการวิเคราะห์ปริมาณแล็กติกแอซิดแบคทีเรียและยีสต์ พบว่า ชุดทดสอบที่มีการเติมแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย และ/หรือ ยีสต์ มีจำนวนแล็กติกแอซิดแบคทีเรียและยีสต์มากกว่าในชุดควบคุมที่เติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว โดยทั่วไปจุลินทรีย์ประจำถิ่นที่พบในไซเลจมีหลายชนิด อาทิเช่น แล็กติกแอซิดแบคทีเรีย เอนเทอโรแบคทีเรีย แบคทีเรียในสกุล *Clostridium* แบคทีเรียในสกุล *Bacillus* แบคทีเรียในสกุล *Listeria* ยีสต์ และรา โดยแล็กติกแอซิดแบคทีเรียประจำถิ่นในไซเลจข้าวโพดมีหลายสายพันธุ์ เช่น แล็กติกแอซิดแบคทีเรียในสกุล *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus* และ *Leuconostoc* เป็นต้น (Muck, 2010) ซึ่งจากการทดลอง พบว่า จำนวนแล็กติกแอซิดแบคทีเรียและยีสต์มีจำนวนเพิ่มมากขึ้นจากที่เติมลงไป อาจเนื่องมาจาก แล็กติกแอซิดแบคทีเรียสามารถเจริญได้ดีในภาวะไร้อากาศของกระบวนการหมักไซเลจ โดยใช้คาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำได้เป็นสับสเตรตเพื่อผลิตกรดอินทรีย์ เช่น กรดแล็กติก ส่งผลให้ค่าความเป็นกรด-เบสของพืชหมักต่ำลง จากการเจริญของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในภาวะไร้อากาศและทำให้ค่าความเป็นกรด-เบสของไซเลจต่ำลงนี้ ช่วยยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในอากาศที่ไม่เป็นประโยชน์หรือก่อให้เกิดการเน่าเสียของพืชหมักได้ เช่น

คอลีฟอร์มแบคทีเรีย และรา (Bolsen และคณะ, 1996) เพื่อคงคุณภาพของไซเลจและช่วยยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการได้ (Schmidt และ Kung, 2010; Weinberg และคณะ, 2010)

ยีสต์ประจำถิ่นในไซเลจข้าวโพดมีอยู่ด้วยกันหลายชนิด เช่น *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia anomala* และ *Kazachstania unispora* รวมทั้งยีสต์ในสกุล *Torulopsis*, *Candida* *Issatchenkia*, *Hansenula* และ *Endomycopsis* สามารถเจริญได้ในภาวะที่มีหรือไม่มีอากาศก็ได้ แต่จะเจริญได้ดีในที่ที่มีอากาศ ในภาวะไร้อากาศของกระบวนการหมักไซเลจ ยีสต์จะเกิดกระบวนการหมักได้ผลผลิตเป็นเอทานอลและแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ถ้าอยู่ในภาวะที่มีอากาศ ยีสต์บางสายพันธุ์สามารถใช้กรดแล็กติกเพื่อผลิตแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ (Santos และคณะ, 2017) ดังนั้น ไซเลจข้าวโพดบริเวณที่ไม่มีอากาศจะเกิดกระบวนการหมักโดยแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย และพื้นผิวด้านนอกของไซเลจข้าวโพดที่อาจสัมผัสอากาศสามารถเกิดกระบวนการหมักโดยยีสต์ได้ แต่เนื่องจากยีสต์บางชนิดสามารถใช้กรดแล็กติกในกระบวนการหมักได้ ดังนั้น อาจทำให้ค่าความเป็นกรด-เบสของไซเลจข้าวโพดสูงขึ้นเล็กน้อย และเสี่ยงต่อการปนเปื้อนจุลินทรีย์อื่น เช่น รา เป็นต้น

การวิเคราะห์จำนวนราทั้งหมด พบว่า ทุกชุดทดสอบสามารถยับยั้งการเจริญของราได้แตกต่างกัน ซึ่งในชุดทดสอบที่ใช้ยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 มีจำนวนราทั้งหมดน้อยที่สุดเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (4.25 ± 0.22 log CFU/กรัม) รองลงมาได้แก่ ชุดทดสอบที่ใช้แล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 และยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 มีจำนวนราทั้งหมดในวันที่ 21 ของการบ่มเท่ากับ 4.89 ± 0.14 log CFU/กรัม ซึ่งราส่วนใหญ่ที่พบในไซเลจข้าวโพดที่ใช้ทำการทดลอง คือ ราในสกุล *Aspergillus* จากหลายงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่า ราส่วนใหญ่ที่ผลิตสารพิษที่พบการปนเปื้อนสูงในไซเลจ ได้แก่ ราในสกุล *Fusarium*, *Penicillium* และ *Aspergillus* (Dunière และคณะ, 2013; Keller และคณะ, 2013; Richard และคณะ, 2007; Roige และคณะ, 2009) Richard และคณะ (2007) ศึกษาการปนเปื้อนของราและสารพิษจากราในไซเลจที่เก็บรักษาเป็นระยะเวลา 11 เดือน พบว่า *Aspergillus* และ *Fusarium* เป็นราที่พบมากในไซเลจข้าวโพด และพบสารพิษจากรา ได้แก่ อะฟลาทอกซินบี 1 โอคราทอกซินเอ ซีราลีโนน และฟูโมนิซินบี 1 และไกลโอทอกซิน เป็นต้น โดยพบการปนเปื้อนของสารพิษจากราในปริมาณที่สูงบริเวณด้านล่างของไซเลจ Gonzalez Pereyra และคณะ (2008) พบว่า ในตัวอย่างไซเลจข้าวโพดมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ มีการปนเปื้อน *Aspergillus* และ *Fusarium* มากกว่า 1×10^4 CFU/กรัม ราส่วนใหญ่ที่พบ คือ *A. flavus* และ *F. verticillioides* รองลงมาได้แก่ *A. fumigatus*, *A. niger* และ *F. verticillioides* และพบการปนเปื้อนของอะฟลา

ทอกซิน คือออกซิโนวาสีโนล ซีราลีโนน และฟูโมนิซินในไซเลจข้าวโพดอีกด้วย Alonso และคณะ (2011) พบว่า ไซเลจข้าวโพดในเดือนเมษายนถึงเดือนพฤษภาคม เดือนมิถุนายนถึงเดือนกรกฎาคม และเดือนธันวาคม พบการปนเปื้อนของ *Aspergillus* ในทุกตัวอย่าง ซึ่งราส่วนใหญ่ที่พบคือ *Aspergillus* section *Flavi* และพบการปนเปื้อนรามากในบริเวณด้านบนและด้านล่างของไซเลจ

จากการวิเคราะห์ปริมาณอะฟลาทอกซินรวมในไซเลจข้าวโพดที่ทำให้เป็นบรรทัดฐานของทุกชุดทดสอบ พบว่า ชุดทดสอบที่ใช้แล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ร่วมกับยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 สามารถลดการผลิตอะฟลาทอกซินรวมของราได้ดีที่สุด โดยในวันที่ 21 ของการบ่ม มีปริมาณอะฟลาทอกซินรวมลดลงเท่ากับ 26.78 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม และเท่ากับ 54.36 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับปริมาณอะฟลาทอกซินรวมเริ่มต้น รองลงมา คือ ชุดทดสอบที่ใช้แล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ซึ่งมีปริมาณอะฟลาทอกซินรวมลดลงเท่ากับ 36.31 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม แต่ไม่สามารถลดปริมาณอะฟลาทอกซินรวมได้เมื่อเทียบกับปริมาณอะฟลาทอกซินเริ่มต้น สำหรับในชุดทดสอบที่ใช้ยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 พบว่า ไม่สามารถลดอะฟลาทอกซินรวมได้ เมื่อเทียบกับชุดควบคุมและปริมาณอะฟลาทอกซินรวมเริ่มต้น ซึ่งพบปริมาณอะฟลาทอกซินรวมเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนสิ้นสุดการบ่ม

จากผลการทดลองที่ได้จากไซเลจข้าวโพดปลอดเชื้อและไซเลจข้าวโพดปกติจะเห็นได้ว่ามีความสอดคล้องกัน ชุดทดสอบที่ใช้ยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 สามารถยับยั้งการเจริญของราได้อย่างมีประสิทธิภาพทั้งในไซเลจข้าวโพดปลอดเชื้อและในไซเลจข้าวโพดปกติ แต่ไม่สามารถลดปริมาณอะฟลาทอกซินรวมได้ สำหรับผลการลดปริมาณอะฟลาทอกซินรวม ชุดทดสอบที่ใช้แล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ร่วมกับยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 สามารถลดปริมาณอะฟลาทอกซินรวมได้ในไซเลจข้าวโพดปลอดเชื้อและในไซเลจข้าวโพดร่วมกับจุลินทรีย์ประจำถิ่น นอกจากนี้ ยังสามารถยับยั้งการเจริญของราได้เช่นกัน

จากผลการทดลองดังกล่าวข้างต้นสรุปได้ว่า การใช้แล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ร่วมกับยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* และอะฟลาทอกซินรวมในไซเลจข้าวโพดได้ โดยสามารถลดค่าความเป็นกรด-เบส และคงค่าความเป็นกรด-เบสตัวไว้ตลอดการทดลอง ช่วยยับยั้งการเจริญของรา

และช่วยชะลอการเจริญของราในไซเลจข้าวโพดได้ รวมถึงช่วยยับยั้งการเจริญของคอลิฟอร์มแบคทีเรียได้ตลอดการทดลอง นอกจากนี้ ยังช่วยลดอะฟลาทอกซินรวมได้อย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับชุดควบคุมและชุดทดสอบอื่นๆ โดยแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 สามารถผลิตกรดแล็กติกที่สามารถลดการเจริญของจุลินทรีย์อื่น เช่น รา ได้ และยีสต์ผสม (*W. anomalous* และ *K. marxianus*) ที่เจริญได้ทั้งในภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ สามารถเกิดกระบวนการหมักและใช้กรดแล็กติกที่ผลิตจากแล็กติกแอซิดแบคทีเรียได้เพื่อการเจริญเติบโต และสามารถยับยั้งการเจริญของราที่ผิวด้านนอกของไซเลจข้าวโพดที่สัมผัสอากาศ

อย่างไรก็ตาม ผลการทดลองที่ได้จากการใช้แล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ร่วมกับยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalous* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 เพื่อยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินของรา ร่วมกับจุลินทรีย์ประจำถิ่นนั้นได้ผลการทดสอบที่ไม่แตกต่างกันอย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบจำนวนราในชุดทดสอบและชุดควบคุม ทั้งนี้ อาจเนื่องมาจากปริมาณเชื้อตั้งต้นที่ทำการทดสอบนั้นมีความเข้มข้นน้อยกว่าจุลินทรีย์ประจำถิ่นในไซเลจข้าวโพด ซึ่งทำให้ในชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมจุลินทรีย์ประจำถิ่นนั้นสามารถยับยั้งการเจริญของราที่เติมเข้าไปได้เช่นเดียวกัน ทำให้จำนวนราที่นับได้ไม่แตกต่างกัน ปริมาณเชื้อตั้งต้นจึงเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญในการนำไปใช้ประโยชน์ในการควบคุมทางชีวภาพ ซึ่งมีความสำคัญต่อการเจริญและการผลิตเมแทบอลิต์ของยีสต์และแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย ดังนั้น ในการนำไปใช้ประโยชน์นั้นจึงต้องคำนึงถึงปริมาณเชื้อตั้งต้นเพื่อให้แล็กติกแอซิดแบคทีเรียและยีสต์ผสมมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของราได้ดีที่สุด

5.4 การทดสอบผลของปริมาณความเข้มข้นและอัตราส่วนของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียและยีสต์ผสมต่อการยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินรวมในไซเลจข้าวโพดร่วมกับจุลินทรีย์ประจำถิ่น

จากการศึกษาค่าความเป็นกรด-เบสในไซเลจข้าวโพดในแต่ละกรรมวิธี พบว่า ค่าความเป็นกรด-เบสของไซเลจข้าวโพดในชุดควบคุมและชุดทดสอบลดลงอย่างรวดเร็วภายในวันแรกของการบ่ม และคงที่จนถึงสิ้นสุดระยะเวลาการบ่ม ทั้งนี้ อาจเนื่องมาจากแล็กติกแอซิดแบคทีเรียที่เป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นและจากที่เติมลงไปไซเลจข้าวโพดสามารถผลิตกรด ซึ่งทำให้ค่าความเป็นกรด-เบสลดลงได้เช่นเดียวกัน และสอดคล้องกับค่าความเป็นกรด-เบสของไซเลจข้าวโพดเดิมก่อนมีการเติมยีสต์และแล็กติกแอซิดแบคทีเรียลงไป ที่มีค่าความเป็นกรด-เบสค่อนข้างต่ำ (Muck, 1988; Muck, 2013) เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Basso และคณะ (2012) รายงานว่า ค่าความเป็นกรด-เบสที่ลดลงในไซเลจ

ข้าวโพดที่เติมหัวเชื้อ *L. buchneri* และไซเลจในชุดควบคุม ไม่มีความแตกต่างกัน และงานวิจัยของ Muck (2004) พบว่า ไซเลจที่เติมหัวเชื้อแล็กติกแอซิดแบคทีเรียและชุดควบคุม มีค่าความเป็นกรด-เบสไม่แตกต่างกัน สำหรับผลการนับจำนวนคอลลีฟอร์มแบคทีเรียในทุกการทดลอง พบว่า ไม่มีการเจริญของคอลลีฟอร์มแบคทีเรียในวันที่ 1 ของการบ่มจนสิ้นสุดระยะเวลาการบ่ม

การเติมแล็กติกแอซิดแบคทีเรียลงในไซเลจข้าวโพดในอัตราส่วนที่มากกว่ายีสต์ ($10^8:10^6$ CFU/กรัม) มีจำนวนแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในชุดทดสอบมากกว่าชุดควบคุมอย่างชัดเจน และมากกว่ากรรมวิธีอื่นๆ เช่นเดียวกับจำนวนยีสต์ในกรรมวิธีที่เติมยีสต์ลงในไซเลจข้าวโพดในอัตราส่วนที่มากกว่าแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย ($10^6:10^8$ CFU/กรัม) พบว่า มีจำนวนยีสต์ในชุดทดสอบมากกว่าในชุดควบคุม แตกต่างจากกรรมวิธีอื่นๆ ที่มีจำนวนยีสต์ในชุดทดสอบและชุดควบคุมใกล้เคียงกัน

ไซเลจที่เติมแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ร่วมกับยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalous* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ $10^8:10^6$ CFU/กรัม สามารถยับยั้งการเจริญของราได้ดีกว่ากรรมวิธีอื่นๆ เนื่องจาก จำนวนราลดลงอย่างรวดเร็วและไม่พบการเจริญของราอีกหลังจากวันที่ 5 ของการบ่ม แต่ในกรรมวิธีอื่นนั้น ถึงแม้ว่าราจะมีจำนวนลดลงอย่างรวดเร็วเช่นเดียวกัน แต่ยังพบการเจริญของราอีกครั้งหลังวันที่ 7 ของการบ่ม และมีจำนวนเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนสิ้นสุดระยะเวลาการบ่ม

ปริมาณอะฟลาทอกซินรวมในไซเลจที่เติมแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ร่วมกับยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalous* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 ซึ่งนำมาทำให้เป็นบรรทัดฐาน พบว่า การใช้แล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ร่วมกับยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalous* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 ในอัตราส่วน $10^8:10^6$ CFU/กรัม สามารถลดปริมาณอะฟลาทอกซินรวมได้ดีที่สุดในวันที่ 7 ของการบ่ม เท่ากับ 63.94 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม และเมื่อสิ้นสุดการบ่ม ในกรรมวิธีที่เติมแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ร่วมกับยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalous* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ $10^6:10^6$ และ $10^8:10^6$ CFU/กรัม สามารถลดปริมาณอะฟลาทอกซินรวมได้ใกล้เคียงกันเท่ากับ 26.78 และ 23.22 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม และมีเปอร์เซ็นต์การลดลงเท่ากับ 54.36 และ 45.23 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเทียบกับปริมาณอะฟลาทอกซินเริ่มต้น

จากรายงานก่อนหน้านี พบว่า เมื่อปรับเปลี่ยนปริมาณหัวเชื้อยีสต์เริ่มต้นในกระบวนการหมัก จะมีผลต่ออัตราการเจริญและการผลิตเมแทบอไลต์ของยีสต์ โดยมีผลต่อกระบวนการหายใจระดับเซลล์ นอกจากนี้ ยังสามารถกระตุ้นให้เกิดการผลิตสารที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของยีสต์ได้ (Pflieger และคณะ, 2015; Wang และคณะ, 2008) เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Zheng และคณะ (2004) รายงานว่า เมื่อความเข้มข้นเซลล์ของเชื้อปฏิปักษ์สูงขึ้นจะทำให้การก่อโรครจากราลดลงมากขึ้น และพบว่า สารแขวนลอยเซลล์ *Rhodotorula glutinis* มีความเข้มข้น 1×10^9 เซลล์/มิลลิลิตร สามารถยับยั้งการยับยั้ง *P. digitatum* ที่ก่อโรคในส้มได้ดีที่สุด

5.5 ทดสอบผลของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียและยีสต์ต่อคุณค่าทางโภชนาของไซเลจข้าวโพด

ผลการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาของไซเลจที่เติมแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ร่วมกับยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 ความเข้มข้นเท่ากับ $10^8:10^6$ CFU/กรัม ที่คัดเลือกได้เปรียบเทียบกับไซเลจที่ไม่มีการเติมเชื้อลงไป พบว่า ไซเลจข้าวโพดหมักมีปริมาณวัตถุแห้งลดลงจากไซเลจข้าวโพดสด ทั้งนี้ อาจเนื่องมาจากการเติมจุลินทรีย์ในอาหารเหลวลงในไซเลจข้าวโพดและจุลินทรีย์ประจำถิ่นสามารถใช้เพื่อการเจริญได้ เช่น น้ำตาลหรือแป้งที่ละลายน้ำได้บางชนิดมีปริมาณเพิ่มมากขึ้น ทำให้เกิดความชื้นเพิ่มขึ้นเล็กน้อยจึงมีวัตถุแห้งลดลง เพื่อให้คุณค่าทางโภชนาของไซเลจข้าวโพดที่เติมจุลินทรีย์ลงไปคงคุณค่าไว้เทียบเท่ากับไซเลจข้าวโพดสด ดังนั้น ควรลดระยะเวลาที่ใช้ในการหมักให้สั้นลง ซึ่งจะทำให้สารอาหารถูกจุลินทรีย์ที่เติมลงไปและจุลินทรีย์ประจำถิ่นนำไปใช้เพียงเล็กน้อยและยังคงมีคุณค่าทางโภชนาใกล้เคียงกับไซเลจข้าวโพดสด นอกจากนี้ ไซเลจข้าวโพดหมักในแต่ละระยะเวลาการบ่มมีคุณค่าทางโภชนาบางประการที่เพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับข้าวโพดสดในชุดควบคุมวันที่ 0 ของการบ่ม เนื่องจาก ไซเลจข้าวโพดมีปริมาณวัตถุแห้งลดลง ทำให้ความเข้มข้นของคุณค่าทางโภชนาต่อน้ำหนักแห้งสูงขึ้นตามไปด้วย และเมื่อเปรียบเทียบคุณค่าทางโภชนาของไซเลจข้าวโพดชุดควบคุมแต่ละระยะเวลาการบ่มแล้ว ไซเลจข้าวโพดในชุดทดสอบมีคุณค่าทางโภชนาไม่แตกต่างกับไซเลจข้าวโพดในชุดควบคุม ดังนั้น แล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ร่วมกับยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 ความเข้มข้นเท่ากับ $10^8:10^6$ CFU/กรัม ที่เติมลงในไซเลจข้าวโพดจึงไม่ทำให้คุณค่าทางโภชนาของไซเลจข้าวโพดเสียไป และยังคงคุณค่าทางโภชนาไว้เมื่อเทียบกับไซเลจข้าวโพดในชุดควบคุมควบคุมในวันเดียวกัน ทั้งนี้ Jatkauskas และ Vrotniakiene (2011) รายงานว่า เมื่อเทียบกับพืชสดก่อนหมักไซเลจ ไซเลจข้าวโพดชุดทดสอบที่เติมแล็กติกแอซิดแบคทีเรียมีปริมาณน้ำหนักร้อยละน้อยกว่าพืชสดก่อนหมัก เนื่องจากการเติมแล็กติกแอซิด

แบคทีเรียทำให้ค่าความเป็นกรด-เบสในกระบวนการหมักไซเลจลดลง และทำให้ลดการสูญเสียปริมาณน้ำหนักรวมของไซเลจเมื่อเทียบกับชุดควบคุมในวันเดียวกันที่ไม่เติมแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย เช่นเดียวกับรายงานของ Kung และคณะ (2003) พบว่าแล็กติกแอซิดแบคทีเรียช่วยเพิ่มปริมาณน้ำหนักรวมในไซเลจได้เมื่อเทียบกับไซเลจชุดควบคุมที่ไม่เติมแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย นอกจากนี้ มีอีกหลายวิจัยที่พบว่า การเติมจุลินทรีย์ลงในไซเลจเพื่อส่งเสริมกระบวนการหมักนั้น ไม่ส่งผลต่อปริมาณ NDF และ ADF ในไซเลจเมื่อเทียบกับชุดควบคุม (Kung, 2001; Nowak และคณะ, 2004; Ridla และ Uchida, 1999) ดังนั้น ในกระบวนการหมักไซเลจนั้น การคงคุณค่าทางโภชนาการของพืชอาหารสัตว์ไว้คือสิ่งที่สำคัญ

จากผลการทดลองทั้งหมดสรุปได้ว่า แล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 และยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalous* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญและลดการผลิตอะฟลาทอกซินรวมของ *A. flavus* ในระดับ *in vitro* และเมื่อนำมาทดสอบในไซเลจข้าวโพดปลอดเชื้อและไซเลจข้าวโพดร่วมกับจุลินทรีย์ประจำถิ่นพบว่า แล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ร่วมกับยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalous* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 สามารถใช้สารอาหารจากไซเลจข้าวโพดในการเจริญและเพิ่มจำนวน และยังคงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญและลดการผลิตอะฟลาทอกซินรวมของรา นอกจากนี้ แล็กติกแอซิดแบคทีเรียยังสามารถผลิตกรดทำให้ไซเลจข้าวโพดมีค่าความเป็นกรด-เบสลดลง ซึ่งเป็นปัจจัยหนึ่งในการลดจำนวนราในไซเลจข้าวโพด รวมทั้งยังสามารถลดการเจริญของคอลิฟอร์มแบคทีเรียซึ่งเป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นที่อาจก่อให้เกิดโรคกับสัตว์จากการกินไซเลจเป็นอาหาร เช่นเดียวกับยีสต์ที่สามารถแย่งพื้นที่ในการเจริญเติบโตของราที่ผิวหน้าของไซเลจที่สัมผัสกับอากาศได้ ดังนั้น แล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ร่วมกับยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalous* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 จึงมีประสิทธิภาพร่วมกันในการยับยั้งการเจริญและลดการผลิตอะฟลาทอกซินรวมของ *A. flavus* ในไซเลจข้าวโพด และเมื่อทดสอบความเข้มข้นของแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ร่วมกับยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalous* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 ที่เหมาะสม พบว่า การเติมแล็กติกแอซิดแบคทีเรียที่ความเข้มข้นมากกว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญและลดการผลิตอะฟลาทอกซินรวมของราได้ดีที่สุด เนื่องจากสามารถเจริญเติบโตได้ดีในกระบวนการหมัก ผลิตกรดแล็กติกที่ช่วยลดค่าความเป็นกรด-เบสและช่วยลดการเจริญของราได้ ส่งผลให้ปริมาณอะฟลาทอกซินรวมในไซเลจข้าวโพดมีค่าลดลงตามไปด้วย นอกจากนี้ ยีสต์บางชนิดสามารถใช้กรดแล็กติกที่ผลิตจากแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในการเจริญเติบโต

และช่วยเสริมการยับยั้งการเจริญของราในไซเลจข้าวโพดได้ นอกจากนี้ การเติมแล็กติกแอซิด
แบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ร่วมกับยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K.*
marxianus MSCU 0655 ที่คัดเลือกได้ยังคงคุณค่าทางโภชนะของไซเลจข้าวโพดไว้ ซึ่งมี
ประสิทธิภาพในการนำไปใช้ในการหมักไซเลจข้าวโพดเพื่อผลิตเป็นอาหารสัตว์ได้ต่อไป



รายการอ้างอิง

- Abrunhosa, L. Ines, A. Rodrigues, A.I. Guimaraes, A. Pereira, V.L. Parpot, P. Mendes-Faia, A. & Venancio, A. (2014). Biodegradation of ochratoxin A by *Pediococcus parvulus* isolated from Douro wines. *Int J Food Microbiol* 188, 45-52.
- Abubakar, A. Suberu, H. Bello, I. Abdulkadir, R. Daudu, O. & Lateef, A. (2013). Effect of pH on mycelial growth and sporulation of *Aspergillus parasiticus*. *J Plant Sci* 1, 64-67.
- Alberts, J.F. Engelbrecht, Y. Steyn, P.S. Holzappel, W.H. & van Zyl, W.H. (2006). Biological degradation of aflatoxin B1 by *Rhodococcus erythropolis* cultures. *Int J Food Microbiol* 109, 121-126.
- Alonso, V. ML, G.I.P. Armando, M. Dogi, C. Dalcerro, A. Rosa, C. Chiacchiera, S. & Cavaglieri, L. (2011). Silage Contribution to Aflatoxin B1 Contamination of Dairy Cattle Feed (NY,USA: InTech).
- Alonso, V.A. Pereyra, C.M. Keller, L.A. Dalcerro, A.M. Rosa, C.A. Chiacchiera, S.M. & Cavaglieri, L.R. (2013). Fungi and mycotoxins in silage: an overview. *J Appl Microbiol* 115, 637-643.
- Amigot, S.L. Fulgueira, C.L. Bottai, H. & Basílico, J.C. (2006). New parameters to evaluate forage quality. *Postharvest Biol Tech* 41, 215-224.
- Angioni, A. Caboni, P. Garau, A. Farris, A. Orro, D. Budroni, M. & Cabras, P. (2007). In vitro interaction between ochratoxin A and different strains of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata*. *J Agr Food Chem* 55, 2043-2048.
- Armando, M.R. Dogi, C.A. Poloni, V. Rosa, C.A. Dalcerro, A.M. & Cavaglieri, L.R. (2013). In vitro study on the effect of *Saccharomyces cerevisiae* strains on growth and mycotoxin production by *Aspergillus carbonarius* and *Fusarium graminearum*. *Int J Food Microbiol* 161, 182-188.
- Armando, M.R. Dogi, C.A. Rosa, C.A. Dalcerro, A.M. & Cavaglieri, L.R. (2012a). *Saccharomyces cerevisiae* strains and the reduction of *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin B1 production at different interacting environmental

conditions, in vitro. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess 29, 1443-1449.

- Armando, M.R. Pizzolitto, R.P. Dogi, C.A. Cristofolini, A. Merkis, C. Poloni, V. Dalcerro, A.M. & Cavaglieri, L.R. (2012b). Adsorption of ochratoxin A and zearalenone by potential probiotic *Saccharomyces cerevisiae* strains and its relation with cell wall thickness. J Appl Microbiol 113, 256-264.
- Ashbell, G. & Weinberg, Z. (2006). Silage Production and Utilization. Food and Agriculture Organization, FAO Electronic Library.
- Assaf, J.C. Atoui, A. Khoury, A.E. Chokr, A. & Louka, N. (2018). A comparative study of procedures for binding of aflatoxin M1 to *Lactobacillus rhamnosus* GG. Braz J Microbiol 49, 120-127.
- Asurmendi, P. Pascual, L. Dalcerro, A. & Barberis, L. (2014). Incidence of lactic acid bacteria and *Aspergillus flavus* in brewer's grains and evaluation of potential antifungal activity of these bacteria. J stored prod res 56, 33-37.
- Baird, R. Trigiano, R. Windham, G. Williams, P. Kelley, R. Abbas, H. Moulton, J. & Scruggs, M. (2006). Comparison of aflatoxigenic and nonaflatoxigenic isolates of *Aspergillus flavus* using DNA amplification fingerprinting techniques. Mycopathologia 161, 93-99.
- Basso, F.C. Bernardes, T.F. Roth, A.P.d.T.P. Lodo, B.N. Berchielli, T.T. & Reis, R.A. (2012). Fermentation and aerobic stability of corn silage inoculated with *Lactobacillus buchneri*. R Bras Zootec 41, 1789-1794.
- Bates, G. (2009). SP434D Corn Silage (The University of Tennessee Agricultural Extension Service).
- Bautista-Rosales, P.U. Calderon-Santoyo, M. Servín-Villegas, R. Ochoa-Álvarez, N.A. & Ragazzo-Sánchez, J.A. (2013). Action mechanisms of the yeast *Meyerozyma caribbica* for the control of the phytopathogen *Colletotrichum gloeosporioides* in mangoes. Biol Contr 65, 293-301.
- Baytok, E. AKSU, T. KARSLI, M.A. & MURUZ, H. (2005). The effects of formic acid, molasses and inoculant as silage additives on corn silage composition and ruminal fermentation characteristics in sheep. Turk J Vet Anim Sci 29, 469-474.

- Bbosa, G.S. Kitya, D. Lubega, A. Ogwal-Okeng, J. Anokbonggo, W.W. & Kyegombe, D.B. (2013). Review of the Biological and Health Effects of Aflatoxins on Body Organs and Body Systems (NY, USA: InTech).
- Bejaoui, H. Mathieu, F. Taillandier, P. & Lebrihi, A. (2004). Ochratoxin A removal in synthetic and natural grape juices by selected oenological *Saccharomyces* strains. *J Appl Microbiol* 97, 1038-1044.
- Bennett, G. & Richard, J. (1996). Main content area Influence of processing on *Fusarium* mycotoxins in contaminated grains. *Food Tech* 50, 235-238.
- Bennett, J.W. & Klich, M. (2003). Mycotoxins. *Clinical microbiology reviews* 16, 497-516.
- Blankson, G.K. & Mill-Robertson, F.C. (2016). Aflatoxin contamination and exposure in processed cereal-based complementary foods for infants and young children in greater Accra, Ghana. *Food Contr* 64, 212-217.
- Bleve, G. Grieco, F. Cozzi, G. Logrieco, A. & Visconti, A. (2006). Isolation of epiphytic yeasts with potential for biocontrol of *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* on grape. *Int J Food Microbiol* 108, 204-209.
- Bolsen, K.K. Ashbell, G. & Weinberg, Z.G. (1996). Silage fermentation and silage additives - Review. *Asian-Australas J Anim Sci* 9, 483-494.
- CAST (2003). Council for Agricultural Science and Technology: Mycotoxins, Risks in Plant Animal, and Human Systems (AMES, Iowa: Task Force Report).
- Cazzaniga, D. Basilio, J. Gonzalez, R. Torres, R. & De Greef, D. (2001). Mycotoxins inactivation by extrusion cooking of corn flour. *Lett Appl Microbiol* 33, 144-147.
- Chanchaichaovivat, A. Panijpan, B. & Ruenwongsa, P. (2008). Putative modes of action of *Pichia guilliermondii* strain R13 in controlling chilli anthracnose after harvest. *Biol Contr* 47, 207-215.
- Cheli, F. Campagnoli, A. & Dell'Orto, V. (2013). Fungal populations and mycotoxins in silages: From occurrence to analysis. *Anim Feed Sci Technol* 183, 1-16.
- Chen, Y. Sela, S. Gamburg, M. Pinto, R. & Weinberg, Z.G. (2005). Fate of *Escherichia coli* during ensiling of wheat and corn. *Appl Environ Microbiol* 71, 5163-5170.
- Choi, H. Kim, Y.-W. Hwang, I. Kim, J. & Yoon, S. (2012). Evaluation of *Leuconostoc citreum* HO12 and *Weissella koreensis* HO20 isolated from kimchi as a starter culture for whole wheat sourdough. *Food Chem* 134, 2208-2216.

- Chung, T.C. Axelsson, L. Lindgren, S.E. & Dobrogosz, W.J. (2009). In Vitro Studies on Reuterin Synthesis by *Lactobacillus reuteri*. *Microb Ecol Health Dis* 2, 137-144.
- Collins, G.J. & Rosen, J.D. (1981). Distribution of T-2 toxin in wet-milled corn products. *J Food Sci* 46, 877-879.
- Cortes-Zavaleta, O. Lopez-Malo, A. Hernandez-Mendoza, A. & Garcia, H.S. (2014). Antifungal activity of lactobacilli and its relationship with 3-phenyllactic acid production. *Int J Food Microbiol* 173, 30-35.
- D'Mello, J.P.F. & Macdonald, A.M.C. (1997). Mycotoxins. *Anim Feed Sci Technol* 69, 155-166.
- da Silva, J.B. Pozzi, C.R. Mallozzi, M.A. Ortega, E.M. & Corrêa, B. (2000). Mycoflora and occurrence of aflatoxin B1 and fumonisin B1 during storage of Brazilian sorghum. *J Agr Food Chem* 48, 4352-4356.
- da Silva, T.C. da Silva, L.D. Santos, E.M. Oliveira, J.S. & Perazzo, A.F. (2017). Importance of the Fermentation to Produce High-Quality Silage (InTech).
- Dal Bello, F. Clarke, C.I. Ryan, L.A.M. Ulmer, H. Schober, T.J. Ström, K. Sjögren, J. van Sinderen, D. Schnürer, J. & Arendt, E.K. (2007). Improvement of the quality and shelf life of wheat bread by fermentation with the antifungal strain *Lactobacillus plantarum* FST 1.7. *J Cereal Sci* 45, 309-318.
- Dalié, D.K.D. Deschamps, A.M. & Richard-Forget, F. (2010). Lactic acid bacteria – Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. *Food Contr* 21, 370-380.
- De Roma, A. Rossini, C. Ritieni, A. Gallo, P. & Esposito, M. (2017). A survey on the Aflatoxin M1 occurrence and seasonal variation in buffalo and cow milk from Southern Italy. *Food Contr* 81, 30-33.
- Deepthi, B.V. Poornachandra Rao, K. Chennapa, G. Naik, M.K. Chandrashekhara, K.T. & Sreenivasa, M.Y. (2016). Antifungal attributes of *Lactobacillus plantarum* MYS6 against fumonisin producing *Fusarium proliferatum* associated with poultry feeds. *PLoS One* 11.
- Del Palacio, A. Bettucci, L. & Pan, D. (2016). *Fusarium* and *Aspergillus* mycotoxins contaminating wheat silage for dairy cattle feeding in Uruguay. *Braz J Microbiol* 47, 1000-1005.

- Dhanasekaran, D. Shanmugapriya, S. Thajuddin, N. & Panneerselvam, A. (2011). Aflatoxins and aflatoxicosis in human and animals. In Aflatoxins-Biochemistry and Molecular Biology, D.R.G. Guevara-Gonzalez, ed. (InTech).
- Di Francesco, A. Ugolini, L. Lazzeri, L. & Mari, M. (2015). Production of volatile organic compounds by *Aureobasidium pullulans* as a potential mechanism of action against postharvest fruit pathogens. *Biol Contr* 81, 8-14.
- Dogi, C.A. Fochesato, A. Armando, R. Pribull, B. de Souza, M.M. da Silva Coelho, I. Araujo de Melo, D. Dalcerro, A. & Cavaglieri, L. (2013). Selection of lactic acid bacteria to promote an efficient silage fermentation capable of inhibiting the activity of *Aspergillus parasiticus* and *Fusarium graminearum* and mycotoxin production. *J Appl Microbiol* 114, 1650-1660.
- Dogi, C.A. Pellegrino, M. Poloni, V. Poloni, L. Pereyra, C.M. Sanabria, A. Pianzola, M.J. Dalcerro, A. & Cavaglieri, L. (2015). Efficacy of corn silage inoculants on the fermentation quality under farm conditions and their influence on *Aspergillus parasiticus*, *A. flavus* and *A. fumigatus* determined by q-PCR. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 32, 229-235.
- Driehuis, F. (2013). Silage and the safety and quality of dairy foods: a review. *Agr Food Sci* 22, 16-34.
- Droby, S. & Chalutz, E. (1994). Mode of action of biocontrol agents of postharvest diseases. In: Wilson, C.L., Wisniewski, M.E. (Eds.), *Biological Control of Postharvest Diseases: Theory and Practice*. CRC Press, Inc, 63-76.
- Druvefors, U. (2004). Yeast biocontrol of grain spoilage mold. (Doctoral dissertation, Swedish University of Agricultural Sciences). Retrieved January 17, 2005, from Epsilon Dissertations and Graduate Theses Archive Web site: <http://diss-epsilon.slu.se/archive/00000552/>.
- Druvefors, U. Jonsson, N. Boysen, M.E. & Schnürer, J. (2002). Efficacy of the biocontrol yeast *Pichia anomala* during long-term storage of moist feed grain under different oxygen and carbon dioxide regimens. *FEMS yeast research* 2, 389-394.
- Dube, H. (2013). *An introduction to fungi* (India: Scientific Publishers).

- Dunière, L. Sindou, J. Chaucheyras-Durand, F. Chevallier, I. & Thévenot-Sergentet, D. (2013). Silage processing and strategies to prevent persistence of undesirable microorganisms. *Anim Feed Sci Technol* 182, 1-15.
- El-Nezami, H. Kankaanpaa, P. Salminen, S. & Ahokas, J. (1998). Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind a common food carcinogen, aflatoxin B1. *Food Chem Toxicol* 36, 321-326.
- El-Shanawany, A.A. Mostafa, M.E. & Barakat, A. (2005). Fungal populations and mycotoxins in silage in Assiut and Sohag governorates in Egypt, with a special reference to characteristic *Aspergilli* toxins. *Mycopathologia* 159, 281-289.
- Elferink, S. Driehuis, F. Gottschal, J.C. & Spoelstra, S.F. (2000). Silage fermentation processes and their manipulation. *FAO Plant Production and Protection Papers*, 17-30.
- Etschmann, M. Sell, D. & Schrader, J. (2003). Screening of yeasts for the production of the aroma compound 2-phenylethanol in a molasses-based medium. *Biotechnol Lett* 25, 531-536.
- Fan, Q. & Tian, S. (2001). Postharvest biological control of grey mold and blue mold on apple by *Cryptococcus albidus* (Saito) Skinner. *Postharvest Biol Tech* 21, 341-350.
- FAO (2004). Food and Agriculture Organization of the United Nations: Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003 (Rome, Italy).
- Fialho, M.B. Toffano, L. Pedroso, M.P. Augusto, F. & Pascholati, S.F. (2009). Volatile organic compounds produced by *Saccharomyces cerevisiae* inhibit the in vitro development of *Guignardia citricarpa*, the causal agent of citrus black spot. *World J Microbiol Biotechnol* 26, 925-932.
- Fiori, S. Urgeghe, P.P. Hammami, W. Razzu, S. Jaoua, S. & Migheli, Q. (2014). Biocontrol activity of four non- and low-fermenting yeast strains against *Aspergillus carbonarius* and their ability to remove ochratoxin A from grape juice. *Int J Food Microbiol* 189, 45-50.
- Fonseca, G.G. Gombert, A.K. Heinzle, E. & Wittmann, C. (2007). Physiology of the yeast *Kluyveromyces marxianus* during batch and chemostat cultures with glucose as the sole carbon source. *FEMS yeast research* 7, 422-435.

- Fonseca, G.G. Heinzle, E. Wittmann, C. & Gombert, A.K. (2008). The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Appl Microbiol Biotechnol* 79, 339-354.
- Friel, D. Pessoa, N.M.G. Vandenbol, M. & Jijakli, M.H. (2007). Separate and combined disruptions of two exo- β -1, 3-glucanase genes decrease the efficiency of *Pichia anomala* (strain K) biocontrol against *Botrytis cinerea* on apple. *Mol Plant Microbe Interact* 20, 371-379.
- Gao, F. & Daugulis, A.J. (2009). Bioproduction of the aroma compound 2-phenylethanol in a solid-liquid two-phase partitioning bioreactor system by *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnol Bioeng* 104, 332-339.
- Gardner, H. Koltun, S. Dollear, F. & Rayner, E. (1971). Inactivation of aflatoxins in peanut and cottonseed meals by ammoniation. *J Am Oil Chem Soc* 48, 70-73.
- Garon, D. Richard, E. Sage, L. Bouchart, V. Pottier, D. & Lebailly, P. (2006). Mycoflora and multimycotoxin detection in corn silage: experimental study. *J Agr Food Chem* 54, 3479-3484.
- Geng, P. Chen, S. Hu, M. Rizwan-Ul-Haq, M. Lai, K. Qu, F. & Zhang, Y. (2011). Combination of *Kluyveromyces marxianus* and sodium bicarbonate for controlling green mold of citrus fruit. *Int J Food Microbiol* 151, 190-194.
- Gerez, C.L. Torres, M.J. Font de Valdez, G. & Rollán, G. (2013). Control of spoilage fungi by lactic acid bacteria. *Biol Contr* 64, 231-237.
- Gil-Serna, J. Patino, B. Cortes, L. Gonzalez-Jaen, M.T. & Vazquez, C. (2011). Mechanisms involved in reduction of ochratoxin A produced by *Aspergillus westerdijkiae* using *Debaryomyces hansenii* CYC 1244. *Int J Food Microbiol* 151, 113-118.
- Giobbe, S. Marceddu, S. Scherm, B. Zara, G. Mazzarello, V.L. Budroni, M. & Migheli, Q. (2007). The strange case of a biofilm-forming strain of *Pichia fermentans*, which controls *Monilinia* brown rot on apple but is pathogenic on peach fruit. *FEMS Yeast Res* 7, 1389-1398.
- Gizachew, D. Szonyi, B. Tegegne, A. Hanson, J. & Grace, D. (2016). Aflatoxin contamination of milk and dairy feeds in the Greater Addis Ababa milk shed, Ethiopia. *Food Control* 59, 773-779.

- Gomah, N. & Zohri, A. (2014). Inhibition of fungal growth and *Fusarium* toxins by selected cultures of lactic acid bacteria. *J Microbial Biochem Technol* 7, 2.
- Gomah, N.H. Ragab, W. & Bullerman, L. (2009). Inhibition of fungal growth and aflatoxin B1 production by some *Lactobacillus* Strains. *Assiut Journal of Agriculture & Science* 40, 27-36.
- Gonzalez Pereyra, M.L. Alonso, V.A. Sager, R. Morlaco, M.B. Magnoli, C.E. Astoreca, A.L. Rosa, C.A. Chiacchiera, S.M. Dalcerro, A.M. & Cavaglieri, L.R. (2008). Fungi and selected mycotoxins from pre- and postfermented corn silage. *J Appl Microbiol* 104, 1034-1041.
- Guijarro, B. Melgarejo, P. Torres, R. Lamarca, N. Usall, J. & De Cal, A. (2007). Effects of different biological formulations of *Penicillium frequentans* on brown rot of peaches. *Biol Contr* 42, 86-96.
- Hamed, H.A. Moustafa, Y.A. & Abdel-Aziz, S.M. (2011). In vivo efficacy of lactic acid bacteria in biological control against *Fusarium oxysporum* for protection of tomato plant. *Life Sci J* 8, 462-468.
- Haskard, C.A. El-Nezami, H.S. Kankaanpaa, P.E. Salminen, S. & Ahokas, J.T. (2001). Surface binding of aflatoxin B(1) by lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol* 67, 3086-3091.
- Heathcote, J.G. & Hibbert, J. (1978). *Aflatoxins: chemical and biological aspects* (Amsterdam, Netherlands: Elsevier Scientific Publishing Co.).
- Henderson, N. (1993). Silage additives. *Anim Feed Sci Technol* 45, 35-56.
- Hua, S.S. Beck, J.J. Sarreal, S.B. & Gee, W. (2014). The major volatile compound 2-phenylethanol from the biocontrol yeast, *Pichia anomala*, inhibits growth and expression of aflatoxin biosynthetic genes of *Aspergillus flavus*. *Mycotoxin Res* 30, 71-78.
- Huang, R. Li, G. Zhang, J. Yang, L. Che, H. Jiang, D. & Huang, H. (2011). Control of postharvest Botrytis fruit rot of strawberry by volatile organic compounds of *Candida intermedia*. *Phytopathology* 101, 859-869.
- Hussein, H.S. & Brasel, J.M. (2001). Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology* 167, 101-134.

- IARC (1993). Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines, and mycotoxins. International Agency for Research on Cancer *1*, 489.
- Janisiewicz, W. (1996). Ecological diversity, niche overlap, and coexistence of antagonists used in developing mixtures for biocontrol of postharvest diseases of apples. *Phytopathology* *86*, 473-479.
- Janisiewicz, W. Tworowski, T. & Sharer, C. (2000). Characterizing the mechanism of biological control of postharvest diseases on fruits with a simple method to study competition for nutrients. *Phytopathology* *90*, 1196-1200.
- Janisiewicz, W.J. & Korsten, L. (2002). Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annu Rev Phytopathol* *40*, 411-441.
- Jard, G. Liboz, T. Mathieu, F. Guyonvarc'h, A. & Lebrihi, A. (2011). Review of mycotoxin reduction in food and feed: from prevention in the field to detoxification by adsorption or transformation. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* *28*, 1590-1609.
- Jatkauskas, J. & Vrotniakiene, V. (2011). The effects of silage inoculants on the fermentation and aerobic stability of legume-grass silage. *Zemdirbyste Agriculture* *98*: 367-374.
- Johnston, C.I. Singleterry, R. Reid, C. Sparks, D. Brown, A. Baldwin, B. Ward, S.H. & Williams, W.P. (2012). The fate of aflatoxin in corn fermentation. *Nat Resour* *03*, 126-136.
- Kabak, B. Dobson, A.D. & Var, I. (2006). Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* *46*, 593-619.
- Kamika, I. Ngbolua, K.-t.-N. & Tekere, M. (2016). Occurrence of aflatoxin contamination in maize throughout the supply chain in the Democratic Republic of Congo. *Food Contr* *69*, 292-296.
- Karaman, M. Basmacioglu, H. Ortatatli, M. & Oguz, H. (2005). Evaluation of the detoxifying effect of yeast glucomannan on aflatoxicosis in broilers as assessed by gross examination and histopathology. *Br Poultry Sci* *46*, 394-400.
- Karunaratne, A. Wezenberg, E. & Bullerman, L.B. (1990). Inhibition of mold growth and aflatoxin production by *Lactobacillus* spp. *J Food Protect* *53*, 230-236.

- Kask, S. Adamberg, K. Orłowski, A. Vogensen, F.K. Møller, P.L. Ardö, Y. & Paalme, T. (2003). Physiological properties of *Lactobacillus paracasei*, *L. danicus* and *L. curvatus* strains isolated from Estonian semi-hard cheese. *Food Res Int* 36, 1037-1046.
- Keller, L.A.M. González Pereyra, M.L. Keller, K.M. Alonso, V.A. Oliveira, A.A. Almeida, T.X. Barbosa, T.S. Nunes, L.M.T. Cavaglieri, L.R. & Rosa, C.A.R. (2013). Fungal and mycotoxins contamination in corn silage: Monitoring risk before and after fermentation. *J stored prod res* 52, 42-47.
- Khanafari, A. Soudi, H. & Miraboulfathi, M. (2007). Biocontrol of *Aspergillus flavus* and aflatoxin B1 production in corn. *Iranian Journal of Environmental Health Science & Engineering* 4, 163-168.
- Klein, G. Pack, A. Bonaparte, C. & Reuter, G. (1998). Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *International journal of food microbiology* 41, 103-125.
- Kogkaki, E.A. Natskoulis, P.I. Magan, N. & Panagou, E.Z. (2015). Effect of interaction between *Aspergillus carbonarius* and non-ochratoxigenic grape-associated fungal isolates on growth and ochratoxin A production at different water activities and temperatures. *Food Microbiol* 46, 521-527.
- Kumar, S.N. Mohandas, C. & Nambisan, B. (2013). Purification of an antifungal compound, cyclo(l-Pro-d-Leu) for cereals produced by *Bacillus cereus* subsp. *thuringiensis* associated with entomopathogenic nematode. *Microbiol Res* 168, 278-288.
- Kumi, J. Mitchell, N. Asare, G. Dotse, E. Kwaa, F. Phillips, T. & Ankrah, N. (2014). Aflatoxins and fumonisins contamination of home-made food (weanimix) from cereal-legume blends for children. *Ghana medical journal* 48, 121-126.
- Kung, J.L. (2001). Silage fermentation and additives. *Science and Tehcnology in the Feed Industry* 17, 145-159.
- Kung, L. Stokes, M. & Lin, C. (2003). Silage additives. *Agronomy* 42, 305-360.
- Kurtzman, C.P. (2011). Phylogeny of the ascomycetous yeasts and the renaming of *Pichia anomala* to *Wickerhamomyces anomalus*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 99, 13-23.

- Lahtinen, S.J. Haskard, C.A. Ouwehand, A.C. Salminen, S.J. & Ahokas, J.T. (2004). Binding of aflatoxin B1 to cell wall components of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. *Food Addit Contam* 21, 158-164.
- Laitila, A. Sarlin, T. Kotaviita, E. Huttunen, T. Home, S. & Wilhelmson, A. (2007). Yeasts isolated from industrial maltings can suppress *Fusarium* growth and formation of gushing factors. *J Ind Microbiol Biotechnol* 34, 701-713.
- Lavermicocca, P. Valerio, F. Evidente, A. Lazzaroni, S. Corsetti, A. & Gobbetti, M. (2000). Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B. *Appl Environ Microbiol* 66, 4084-4090.
- Li, B.Q. Zhou, Z.W. & Tian, S.P. (2008). Combined effects of endo- and exogenous trehalose on stress tolerance and biocontrol efficacy of two antagonistic yeasts. *Biol Contr* 46, 187-193.
- Li, H. Zhang, S. Lu, J. Liu, L. Uluko, H. Pang, X. Sun, Y. Xue, H. Zhao, L. & Kong, F. (2014). Antifungal activities and effect of *Lactobacillus casei* AST18 on the mycelia morphology and ultrastructure of *Penicillium chrysogenum*. *Food Contr* 43, 57-64.
- Lima, J.R. Gondim, D.M.F. Oliveira, J.T.A. Oliveira, F.S.A. Gonçalves, L.R.B. & Viana, F.M.P. (2013). Use of killer yeast in the management of postharvest papaya anthracnose. *Postharvest Biol Tech* 83, 58-64.
- Liu, P. Cheng, Y. Yang, M. Liu, Y. Chen, K. Long, C.-a. & Deng, X. (2014). Mechanisms of action for 2-phenylethanol isolated from *Kloeckera apiculata* in control of *Penicillium* molds of citrus fruits. *BMC microbiology* 14, 242.
- López-Malo, A. Alzamora, S.M. & Palou, E. (2005). *Aspergillus flavus* growth in the presence of chemical preservatives and naturally occurring antimicrobial compounds. *Int J Food Microbiol* 99, 119-128.
- Lu, L. Lu, H. Wu, C. Fang, W. Yu, C. Ye, C. Shi, Y. Yu, T. & Zheng, X. (2013). *Rhodosporidium paludigenum* induces resistance and defense-related responses against *Penicillium digitatum* in citrus fruit. *Postharvest Biol Tech* 85, 196-202.

- MacDonald, P. Edwards, R.A. Greenhalgh, J.F.D. & Morgan, C.A. (2002). Animal Nutrition (Prentice Hall).
- Magnusson, J. (2003). Antifungal activity of lactic acid bacteria. In *Universitatis agriculturae Sueciae* (Uppsala: Agraria), pp. 38.
- Magnusson, J. & Schnurer, J. (2001). *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. *Appl Environ Microbiol* 67, 1-5.
- Magnusson, J. Strom, K. Roos, S. Sjogren, J. & Schnurer, J. (2003). Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 219, 129-135.
- Malekinejad, H. Aghazadeh-Attari, J. Rezabakhsh, A. Sattari, M. & Ghasemsoltani-Momtaz, B. (2015). Neurotoxicity of mycotoxins produced in vitro by *Penicillium roqueforti* isolated from maize and grass silage. *Hum Exp Toxicol* 34, 997-1005.
- Mann, G. Codifer, L. Gardner, H. Koltun, S. & Dollear, F. (1970). Chemical inactivation of aflatoxins in peanut and cottonseed meals. *J Am Oil Chem Soc* 47, 173-176.
- Mansfield, M.A. Jones, A.D. & Kuldau, G.A. (2008). Contamination of fresh and ensiled maize by multiple *Penicillium* mycotoxins. *Phytopathology* 98, 330-336.
- MAPA (1988). Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply: Regulation n° 07 from November 9th 1988 (Portaria n° 07, de 9 de novembro de 1988).
- Masoud, W. Poll, L. & Jakobsen, M. (2005). Influence of volatile compounds produced by yeasts predominant during processing of *Coffea arabica* in East Africa on growth and ochratoxin A (OTA) production by *Aspergillus ochraceus*. *Yeast* 22, 1133-1142.
- Mauch, A. Dal Bello, F. Coffey, A. & Arendt, E. (2010). The use of *Lactobacillus brevis* PS1 to in vitro inhibit the outgrowth of *Fusarium culmorum* and other common *Fusarium* species found on barley. *Int J Food Microbiol* 141, 116-121.
- McAllister, T. & Hristov, A. (2000). The fundamentals of making good quality silage. *Adv Dairy Technol* 12, 381-399.
- Medeiros, F.H.V.d. Martins, S.J. Zucchi, T.D. Melo, I.S.d. Batista, L.R. & Machado, J.d.C. (2012). Biological control of mycotoxin-producing molds. *Ciência e Agrotecnologia* 36, 483-497.

- Medina-Córdova, N. López-Aguilar, R. Ascencio, F. Castellanos, T. Campa-Córdova, A.I. & Angulo, C. (2016). Biocontrol activity of the marine yeast *Debaryomyces hansenii* against phytopathogenic fungi and its ability to inhibit mycotoxins production in maize grain (*Zea mays* L.). *Biol Contr* 97, 70-79.
- Mesquita, A.R.C.d. Silveira, L.P.d.M. Cruz Filho, I.J.D. Lima, V.F.d. Silveira Filho, V.D.M. Araujo, A.A. Silva, T.L.D. Araújo, K.D.F. & Macedo, L.D.S. (2017). Metabolism and physiology of Lactobacilli: a review. *Journal of Environmental Analysis and Progress* 2, 115.
- MoH, P.R.C. (2011). Ministry of Health: Maximum residue level of mycotoxin in food-national regulations for food safety. National Standard No 2761-2011.
- Mohd-Setapar, S. Abd-Talib, N. & Aziz, R. (2012). Review on crucial parameters of silage quality. *APCBEE Procedia* 3, 99-103.
- Morales, H. Sanchis, V. Usall, J. Ramos, A.J. & Marin, S. (2008). Effect of biocontrol agents *Candida sake* and *Pantoea agglomerans* on *Penicillium expansum* growth and patulin accumulation in apples. *Int J Food Microbiol* 122, 61-67.
- Muccilli, S. Wemhoff, S. Restuccia, C. & Meinhardt, F. (2013). Exoglucanase-encoding genes from three *Wickerhamomyces anomalus* killer strains isolated from olive brine. *Yeast* 30, 33-43.
- Muck, R. (1988). Factors influencing silage quality and their implications for management. *J Dairy Sci* 71, 2992-3002.
- Muck, R. (2013). Recent advances in silage microbiology. *Agr Food Sci* 22, 3-15.
- Muck, R.E. (2004). Effects of corn silage inoculants on aerobic stability. *Transactions of the ASAE* 47, 1011.
- Muck, R.E. (2010). Silage microbiology and its control through additives. *R Bras Zootec* 39, 183-191.
- Nally, M.C. Pesce, V.M. Maturano, Y.P. Toro, M.E. Combina, M. de Figueroa, L.C. & Vazquez, F. (2013). Biocontrol of fungi isolated from sour rot infected table grapes by *Saccharomyces* and other yeast species. *Postharvest Biol and Tech* 86, 456-462.

- Ndagano, D. Lamoureux, T. Dortu, C. Vandermoten, S. & Thonart, P. (2011). Antifungal activity of 2 lactic acid bacteria of the *Weissella* genus isolated from food. *J Food Sci* 76, M305-311.
- Niba, A.T. Su-lin, L.L. & Olstorpe, M. (2014). Biocontrol efficacy of *Wickerhamomyces anomalus* in moist maize storage. *Afr J Biotechnol* 13, 4208-4214.
- Nourozian, J. Etebarian, H.R. & Khodakaramian, G. (2006). Biological control of *Fusarium graminearum* on wheat by antagonistic bacteria. *Songklanakarin J Sci Technol* 28, 29-38.
- Nout, M.J.R. Bouwmeester, H.M. Haaksma, J. & Van Dijk, H. (1993). Fungal growth in silages of sugarbeet press pulp and maize. *J Agr Sci* 121, 323.
- Nowak, W. Potkanski, A. & Wylegala, S. (2004). The effect of additives on quality and nutrient degradability and digestibility of round bale silage. *S Afr J Anim Sci* 34.
- Nybogård, L. (2016). Biopreservation effects with *Wickerhamomyces anomalus* after 2 months moist airtight storage of sorghum. In Department of Microbiology (Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences).
- O'Brien, M. Egan, D. O'Kiely, P. Forristal, P.D. Doohan, F.M. & Fuller, H.T. (2008). Morphological and molecular characterisation of *Penicillium roqueforti* and *P. paneum* isolated from baled grass silage. *Mycol Res* 112, 921-932.
- Obagwu, J. & Korsten, L. (2003). Integrated control of citrus green and blue molds using *Bacillus subtilis* in combination with sodium bicarbonate or hot water. *Postharvest Biol Tech* 28, 187-194.
- Oguz, H. & Parlak, S. (2004). Effects of dietary mannanoligosaccharide on performance of Japanese quail affected by aflatoxicosis. *S Afr J Anim Sci* 34, 144-148.
- Ohmomo, S. Nitisinprasert, S. Kraykaw, D. Laemkorn, P. Tanomwongwattana, S. & Hiranpradit, S. (2004). Evaluation of lactic acid bacteria isolates for silage fermentation inoculant in Thailand by using a modified pouch method. *Jpn Agr Res Q* 38, 199-208.
- Oliveira, M.S. Rocha, A. Sulyok, M. Krska, R. & Mallmann, C.A. (2017). Natural mycotoxin contamination of maize (*Zea mays* L.) in the South region of Brazil. *Food Contr* 73, 127-132.

- Olstorpe, M. & Passoth, V. (2011). *Pichia anomala* in grain biopreservation. *Antonie Van Leeuwenhoek* 99, 57-62.
- Olstorpe, M. Schnürer, J. & Passoth, V. (2012). Growth inhibition of various *Enterobacteriaceae* species by the yeast *Hansenula anomala* during storage of moist cereal grain. *Appl Environ Microbiol* 78, 292-294.
- Oluwafemi, F. Kumar, M. Bandyopadhyay, R. Ogunbanwo, T. & Ayanwande, K.B. (2010). Bio-detoxification of aflatoxin B1 in artificially contaminated maize grains using lactic acid bacteria. *Toxin Reviews* 29, 115-122.
- Oro, L. Feliziani, E. Ciani, M. Romanazzi, G. & Comitini, F. (2018). Volatile organic compounds from *Wickerhamomyces anomalus*, *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces cerevisiae* inhibit growth of decay causing fungi and control postharvest diseases of strawberries. *Int J Food Microbiol* 265, 18-22.
- Ozer, Ç. & Altuğ, T. (1995). Aflatoksin detoksifikasyonu amacıyla geliştirilen teknikler. *Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Dergisi* 13, 119-138.
- Pantelides, I.S. Christou, O. Tsolakidou, M.-D. Tsaltas, D. & Ioannou, N. (2015). Isolation, identification and in vitro screening of grapevine yeasts for the control of black aspergilli on grapes. *Biol Contr* 88, 46-53.
- Parafati, L. Vitale, A. Restuccia, C. & Cirvilleri, G. (2015). Biocontrol ability and action mechanism of food-isolated yeast strains against *Botrytis cinerea* causing post-harvest bunch rot of table grape. *Food Microbiol* 47, 85-92.
- Patharajan, S. Reddy, K.R.N. Karthikeyan, V. Spadaro, D. Lore, A. Gullino, M.L. & Garibaldi, A. (2011). Potential of yeast antagonists on invitro biodegradation of ochratoxin A. *Food Contr* 22, 290-296.
- Pearson, T.C. Wicklow, D.T. & Pasikatan, M.C. (2004). Reduction of aflatoxin and fumonisin contamination in yellow corn by High-Speed Dual-Wavelength Sorting. *Cereal Chem* 81, 490-498.
- Peltonen, K. El-Nezami, H. Haskard, C. Ahokas, J. & Salminen, S. (2001). Aflatoxin B1 binding by dairy strains of lactic acid bacteria and Bifidobacteria. *J Dairy Sci* 84, 2152-2156.

- Penna, M.L. & Etcheverry, M. (2006). Impact on growth and aflatoxin B1 accumulation by *Kluyveromyces* isolates at different water activity conditions. *Mycopathologia* 162, 347-353.
- Peteri, Z. Teren, J. Vagvolgyi, C. & Varga, J. (2007). Ochratoxin degradation and adsorption caused by astaxanthin-producing yeasts. *Food Microbiol* 24, 205-210.
- Petersson, S. Hansen, M.W. Axberg, K. Hult, K. & SchnÜRer, J. (1998). Ochratoxin A accumulation in cultures of *Penicillium verrucosum* with the antagonistic yeast *Pichia anomala* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Mycol Res* 102, 1003-1008.
- Petruzzi, L. Sinigaglia, M. Corbo, M.R. Beneduce, L. & Bevilacqua, A. (2013). Ochratoxin A removal by *Saccharomyces cerevisiae* strains: effect of wine-related physicochemical factors. *J Sci Food Agric* 93, 2110-2115.
- Pfliegler, W.P. Pusztahelyi, T. & Pocsí, I. (2015). Mycotoxins - prevention and decontamination by yeasts. *J Basic Microbiol* 55, 805-818.
- Pitt, R. (1990). *Silage and hay preservation* (New York, US: Northeast Regional Agricultural Engineering Service).
- Pizzolitto, R.P. Bueno, D.J. Armando, M.R. Cavaglieri, L. Dalcerro, A.M. & Salvano, M.A. (2011). Binding of aflatoxin B1 to lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae* in vitro: a useful model to determine the most efficient microorganism. In *Aflatoxins-biochemistry and molecular biology*, D.R.G. Guevara-Gonzalez, ed. (Croatia: InTech).
- Pons, W. Cucullu, A. Lee, L. Janssen, H. & Goldblatt, L. (1972). Kinetic study of acid-catalyzed conversion of aflatoxins B1 and G1 to B2a and G2a. *J Am Oil Chem Soc* 49, 124-128.
- Prandini, A. Tansini, G. Sigolo, S. Filippi, L. Laporta, M. & Piva, G. (2009). On the occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products. *Food Chem Toxicol* 47, 984-991.
- Prema, P. Smila, D. Palavesam, A. & Immanuel, G. (2008). Production and characterization of an antifungal compound (3-Phenyllactic Acid) produced by *Lactobacillus plantarum* strain. *Food and Bioprocess Tech* 3, 379-386.

- Pu, L. Jingfan, F. Kai, C. Chao-an, L. & Yunjiang, C. (2014). Phenylethanol promotes adhesion and biofilm formation of the antagonistic yeast *Kloeckera apiculata* for the control of blue mold on citrus. *FEMS Yeast Res* 14, 536-546.
- Qin, G. Tian, S. & Xu, Y. (2004). Biocontrol of postharvest diseases on sweet cherries by four antagonistic yeasts in different storage conditions. *Postharvest Biol and Tech* 31, 51-58.
- Raju, M. & Devegowda, G. (2002). Esterified-glucomannan in broiler chicken diets-contaminated with aflatoxin, ochratoxin and T-2 toxin: Evaluation of its binding ability (in vitro) and efficacy as immunomodulator. *Asian Australas J Anim Sci* 15, 1051-1056.
- Rather, I.A. Seo, B.J. Rejish Kumar, V.J. Choi, U.H. Choi, K.H. Lim, J.H. & Park, Y.H. (2013). Isolation and characterization of a proteinaceous antifungal compound from *Lactobacillus plantarum* YML007 and its application as a food preservative. *Lett Appl Microbiol* 57, 69-76.
- Reddy, K. Farhana, N. Salleh, B. & Oliveira, C. (2010). Microbiological control of mycotoxins: present status and future concerns. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology* 2, 1078-1086.
- Regulation ((EU) 1881/2006). Commission Regulation (EC) No. 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Union L*, 5-24.
- Repečkienė, J. Levinskaitė, L. Paškevičius, A. & Raudonienė, V. (2013). Toxin-producing fungi on feed grains and application of yeasts for their detoxification. *Pol J Vet Sci* 16.
- Richard, E. Heutte, N. Bouchart, V. & Garon, D. (2009). Evaluation of fungal contamination and mycotoxin production in maize silage. *Anim Feed Sci Technol* 148, 309-320.
- Richard, E. Heutte, N. Sage, L. Pottier, D. Bouchart, V. Lebailly, P. & Garon, D. (2007). Toxigenic fungi and mycotoxins in mature corn silage. *Food Chem Toxicol* 45, 2420-2425.

- Ridla, M. & Uchida, S. (1999). Comparative study on the effects of combined treatments of lactic acid bacteria and cellulases on the fermentation characteristic and chemical composition of Rhodesgrass (*Chloris gayana* Kunth.) and italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) silages. *Asian Australas J Anim Sci* 12, 525-530.
- Rizzello, C.G. Cassone, A. Coda, R. & Gobbetti, M. (2011). Antifungal activity of sourdough fermented wheat germ used as an ingredient for bread making. *Food Chem* 127, 952-959.
- Rocha, S.N. Abrahão-Neto, J. & Gombert, A.K. (2011). Physiological diversity within the *Kluyveromyces marxianus* species. *Antonie Van Leeuwenhoek* 100, 619.
- Roige, M.B. Aranguren, S.M. Riccio, M.B. Pereyra, S. Soraci, A.L. & Tapia, M.O. (2009). Mycobiota and mycotoxins in fermented feed, wheat grains and corn grains in Southeastern Buenos Aires Province, Argentina. *Rev Iberoam Micol* 26, 233-237.
- Rowghani, E. Zamiri, M.J. & Seradj, A.R. (2008). The chemical composition, rumen degradability, in vitro gas production, energy content and digestibility of olive cake ensiled with additives. *Iranian Journal of Veterinary Research* 9, 213-221.
- Ruadrew, S. Craft, J. & Aidoo, K. (2013). Occurrence of toxigenic *Aspergillus* spp. and aflatoxins in selected food commodities of Asian origin sourced in the West of Scotland. *Food Chem Toxicol* 55, 653-658.
- Russo, P. Arena, M.P. Fiocco, D. Capozzi, V. Drider, D. & Spano, G. (2017). *Lactobacillus plantarum* with broad antifungal activity: A promising approach to increase safety and shelf-life of cereal-based products. *Int J Food Microbiol* 247, 48-54.
- Sangmanee, P. & Hongpattarakere, T. (2014). Inhibitory of multiple antifungal components produced by *Lactobacillus plantarum* K35 on growth, aflatoxin production and ultrastructure alterations of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Food Contr* 40, 224-233.
- Santos, A. & Marquina, D. (2004). Killer toxin of *Pichia membranifaciens* and its possible use as a biocontrol agent against grey mould disease of grapevine. *Microbiology* 150, 2527-2534.
- Santos, A.O. Avila, C.L. & Schwan, R.F. (2013). Selection of tropical lactic acid bacteria for enhancing the quality of maize silage. *J Dairy Sci* 96, 7777-7789.

- Santos, M.C. Golt, C. Joerger, R.D. Mechor, G.D. Mourao, G.B. & Kung, L., Jr. (2017). Identification of the major yeasts isolated from high moisture corn and corn silages in the United States using genetic and biochemical methods. *J Dairy Sci* *100*, 1151-1160.
- Sassahara, M. Pontes Netto, D. & Yanaka, E.K. (2005). Aflatoxin occurrence in foodstuff supplied to dairy cattle and aflatoxin M1 in raw milk in the North of Parana state. *Food Chem Toxicol* *43*, 981-984.
- Scherm, B. Ortu, G. Muzzu, A. Budroni, M. Arras, G. & Migheli, Q. (2003). Biocontrol activity of antagonistic yeasts against *Penicillium expansum* on apple. *J Plant Pathol*, 205-213.
- Schmidt, R. & Kung, L. (2010). The effects of *Lactobacillus buchneri* with or without a homolactic bacterium on the fermentation and aerobic stability of corn silages made at different locations. *J Dairy Sci* *93*, 1616-1624.
- Schütz, H. & Radler, F. (1984). Anaerobic reduction of glycerol to propanediol-1.3 by *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus buchneri*. *Syst Appl Microbiol* *5*, 169-178.
- Scott, P. Kanhere, S. Lawrence, G. Daley, E. & Farber, J. (1995). Fermentation of wort containing added ochratoxin A and fumonisins B1 and B2. *Food Additives & Contaminants* *12*, 31-40.
- Scott, P.M. (1998). Industrial and farm detoxification processes for mycotoxins. *Revue de Medecine Veterinaire (France)*.
- Scott, P.M. (2001). Analysis of agricultural commodities and foods for *Alternaria* mycotoxins. *Journal of AOAC International* *84*, 1809-1817.
- Shantha, T. & Sreenivasa Murthy, V. (1977). Photo-destruction of aflatoxin in groundnut oil. *Indian J Chem Tech* *15*, 453-454.
- Sharma, R.R. Singh, D. & Singh, R. (2009). Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biol Contr* *50*, 205-221.
- Shetty, P.H. & Bhat, R.V. (1999). A physical method for segregation of fumonisin-contaminated maize. *Food Chem* *66*, 371-374.

- Shetty, P.H. Hald, B. & Jespersen, L. (2007). Surface binding of aflatoxin B1 by *Saccharomyces cerevisiae* strains with potential decontaminating abilities in indigenous fermented foods. *Int J Food Microbiol* 113, 41-46.
- Shetty, P.H. & Jespersen, L. (2006). *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontaminating agents. *Trends Food Sci Tech* 17, 48-55.
- Singh, P. & Cotty, P.J. (2017). Aflatoxin contamination of dried red chilies: Contrasts between the United States and Nigeria, two markets differing in regulation enforcement. *Food Contr* 80, 374-379.
- Sjogren, J. Magnusson, J. Broberg, A. Schnurer, J. & Kenne, L. (2003). Antifungal 3-Hydroxy Fatty Acids from *Lactobacillus plantarum* MiLAB 14. *Appl Environ Microbiol* 69, 7554-7557.
- Spadaro, D. & Droby, S. (2016). Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: The importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. *Trends Food Sci Tech* 47, 39-49.
- Spadaro, D. Vola, R. Piano, S. & Gullino, M.L. (2002). Mechanisms of action and efficacy of four isolates of the yeast *Metschnikowia pulcherrima* active against postharvest pathogens on apples. *Postharvest Biol Tech* 24, 123-134.
- Stiles, J. & Bullerman, L. (2002). Inhibition of *Fusarium* species and mycotoxin production by *Bacillus pumilus* NEB1 and *Lactobacillus rhamnosus* VT1. Paper presented at: Proceedings of 13th International Reinhardtsbrunn Symposium In: Modern Fungicides and Antifungal Compounds III Agro Concept GmbH Dehne HW, Gisi U, Kuck KH, Russell PE, Bonn LH (Eds), Germany.
- Strom, K. Sjogren, J. Broberg, A. & Schnurer, J. (2002). *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo(L-Phe-L-Pro) and cyclo(L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) and 3-phenyllactic acid. *Appl Environ Microbiol* 68, 4322-4327.
- Suphamid, S. Bilal, S.M. & Kumar, A.A. (2018). Synergistic antifungal effects of thyme essential oil and *Lactobacillus plantarum* cell-free supernatant against *Penicillium* spp. and in situ effects. *Journal of Food Processing and Preservation* 42, e13400.

- Sydenham, E.W. Stockenstrom, S. Thiel, P.G. Shephard, G.S. Koch, K.R. & Marasas, W.F. (1995). Potential of alkaline hydrolysis for the removal of fumonisins from contaminated corn. *J Agr Food Chem* 43, 1198-1201.
- Teniola, O.D. Addo, P.A. Brost, I.M. Farber, P. Jany, K.D. Alberts, J.F. van Zyl, W.H. Steyn, P.S. & Holzapfel, W.H. (2005). Degradation of aflatoxin B(1) by cell-free extracts of *Rhodococcus erythropolis* and *Mycobacterium fluoranthenorans* sp. nov. DSM44556(T). *Int J Food Microbiol* 105, 111-117.
- Titterton, M. & Bareeba, F.B. (2000). Grass and legume silages in the tropics (Rome: Food and Agriculture Organization (FAO)), pp. 43-50.
- Tola, M. Kebede, B. & Yildiz, F. (2016). Occurrence, importance and control of mycotoxins: A review. *Cogent Food & Agriculture* 2.
- Trenholm, H.L. Charmley, L.L. Prelusky, D.B. & Warner, R.M. (1992). Washing procedures using water or sodium carbonate solutions for the decontamination of three cereals contaminated with deoxynivalenol and zearalenone. *J Agr Food Chem* 40, 2147-2151.
- Trias, R. Baneras, L. Montesinos, E. & Badosa, E. (2008). Lactic acid bacteria from fresh fruit and vegetables as biocontrol agents of phytopathogenic bacteria and fungi. *Int Microbiol* 11, 231-236.
- Usall, J. Ippolito, A. Squisella, M. & Neri, F. (2016). Physical treatments to control postharvest diseases of fresh fruits and vegetables. *Postharvest Biol Tech* 122, 30-40.
- Valan Arasu, M. Jung, M.W. Ilavenil, S. Jane, M. Kim, D.H. Choi, G.J. Lim, Y.C. Al-Dhabi, N.A. & Choi, K.C. (2013). Isolation and characterization of antifungal compound from *Lactobacillus plantarum* KCC-10 from forage silage with potential beneficial properties. *J Appl Microbiol* 115, 1172-1185.
- Walker, G.M. (2011). *Pichia anomala*: cell physiology and biotechnology relative to other yeasts. *Antonie Van Leeuwenhoek* 99, 25-34.
- Walters, D. Raynor, L. Mitchell, A. Walker, R. & Walker, K. (2004). Antifungal activities of four fatty acids against plant pathogenic fungi. *Mycopathologia* 157, 87-90.

- Wang, H. Yan, Y. Wang, J. Zhang, H. & Qi, W. (2012). Production and characterization of antifungal compounds produced by *Lactobacillus plantarum* IMAU10014. *PLoS one* 7, e29452.
- Wang, Y. Bao, Y. Shen, D. Feng, W. Yu, T. Zhang, J. & Zheng, X.D. (2008). Biocontrol of *Alternaria alternata* on cherry tomato fruit by use of marine yeast *Rhodospiridium paludigenum* Fell & Tallman. *Int J Food Microbiol* 123, 234-239.
- Weinberg, Z. Khanal, P. Yildiz, C. Chen, Y. & Arieli, A. (2010). Effects of stage of maturity at harvest, wilting and LAB inoculant on aerobic stability of wheat silages. *Anim Feed Sci Technol* 158, 29-35.
- Wilson, C.L. Wisniewski, M.E. Biles, C.L. McLaughlin, R. Chalutz, E. & Droby, S. (1991). Biological control of post-harvest diseases of fruits and vegetables: alternatives to synthetic fungicides. *Crop protection* 10, 172-177.
- Yang, E.J. & Chang, H.C. (2010). Purification of a new antifungal compound produced by *Lactobacillus plantarum* AF1 isolated from kimchi. *Int J Food Microbiol* 139, 56-63.
- Yiannikouris, A. Francois, J. Poughon, L. Dussap, C.-G. Bertin, G. Jeminet, G. & Jouany, J.-P. (2004). Adsorption of zearalenone by β -D-glucans in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *J Food Protect* 67, 1195-1200.
- Yitbarek, M.B. & Tamir, B. (2014). Silage Additives: Review. *Open J Appl Sci* 04, 258-274.
- Zain, M.E. (2011). Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society* 15, 129-144.
- Zamani-Zadeh, M. Soleimani-Zad, S. Sheikh-Zeinoddin, M. & Goli, S.A.H. (2014). Integration of *Lactobacillus plantarum* A7 with thyme and cumin essential oils as a potential biocontrol tool for gray mold rot on strawberry fruit. *Postharvest Biol Tech* 92, 149-156.
- Zhang, D. Spadaro, D. Garibaldi, A. & Gullino, M.L. (2011). Potential biocontrol activity of a strain of *Pichia guilliermondii* against grey mold of apples and its possible modes of action. *Biol Contr* 57, 193-201.

- Zhang, J. Xie, J. Zhou, Y. Deng, L. Yao, S. & Zeng, K. (2017a). Inhibitory effect of *Pichia membranaefaciens* and *Kloeckera apiculata* against *Monilinia fructicola* and their biocontrol ability of brown rot in postharvest plum. *Biol Contr* 114, 51-58.
- Zhang, X. Lin, Z. Apaliya, M. Gu, X. Zheng, X. Zhao, L. Abdelhai, M.H. Zhang, H. & Hu, W. (2017b). The possible mechanisms involved in citrinin elimination by *Cryptococcus podzolicus* Y3 and the effects of extrinsic factors on the degradation of citrinin. *J Microbiol Biotechnol* 27, 2119-2128.
- Zhao, Z. Liu, N. Yang, L. Deng, Y. Wang, J. Song, S. Lin, S. Wu, A. Zhou, Z. & Hou, J. (2015). Multi-mycotoxin analysis of animal feed and animal-derived food using LC-MS/MS system with timed and highly selective reaction monitoring. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 407, 7359-7368.
- Zheng, X.D. Zhang, H.Y. & Sun, P. (2004). Biological control of postharvest green mold decay of oranges by *Rhodotorula glutinis*. *European Food Research and Technology* 220, 353-357.
- Zhou, X. & Li, Y. (2015). Chapter 3 - Supragingival Microbes. In *Atlas of Oral Microbiology* (Academic Press), pp. 41-65.
- Zhu, C. Shi, J. Jiang, C. & Liu, Y. (2015). Inhibition of the growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus ochraceus* in vitro and in vivo through antagonistic yeasts. *Food Contr* 50, 125-132.
- Zinedine, A. Faid, M. & Benlemlih, M. (2005). In vitro reduction of aflatoxin B1 by strains of lactic acid bacteria isolated from Moroccan sourdough bread. *Int J Food Microbiol* 7, 67-70.
- กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ (2537). ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดลักษณะของอาหารสัตว์เสื่อมคุณภาพ.
- กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ (2547). มาตรฐานพืชอาหารสัตว์หมักคุณภาพดี. 1-23.
- กระทรวงสาธารณสุข (2529). ประกาศจากกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 98 พ.ศ.2529 เรื่อง มาตรฐานอาหารที่มีสารปนเปื้อน.
- กวิณ เจริญยงค์ (2556). การคัดแยกและจำแนกแลคติกแอซิดแบคทีเรียในข้าวโพดสายพันธุ์ CP-KKK หมัก จากประเทศไทยและข้าวโพดหมักเชิงพาณิชย์จากประเทศจีน (โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย).

- คณะกรรมการจัดทำมาตรฐานอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้องของประเทศไทย (2551). ความต้องการโภชนะของโคเนื้อในประเทศไทย (โรงพิมพ์คลังนานาวิทยา).
- ชาลิสสา แสงบัว (2558). การควบคุมการเจริญและการผลิตสารพิษของราในข้าวโพดหมักด้วยแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย (ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาจุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย).
- โนทัย กิตติกำแหง (2554). การปนเปื้อนราสกุล *Aspergillus* ที่สร้างอะฟลาทอกซินปี 1 และโอคราทอกซินเอในเมล็ดข้าวไทย (วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย).
- บุญล้อม ชีวะอิสระกุล (2531). สมรรถภาพในการผลิตและการย่อยได้ของแกะที่ได้รับต้นข้าวโพดหวานหลังเก็บฝักหมักร่วมกับข้าวโพดบดเปรียบเทียบกับหญ้าขนสด. รายงานการประชุมสัมมนาทางวิชาการโครงการอาหารสัตว์ไทย-เยอรมัน เรื่อง "การใช้วัสดุท้องถิ่นเป็นอาหารสัตว์" (คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่).
- พีระพล มารุ่งเรือง (2559). การใช้ยีสต์ปฏิชีวนะเพื่อยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษจากราของ *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus carbonarius* (ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาจุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย).
- ภัทรภร ทศพงษ์ (2556). การผลิตสัตว์เคี้ยวเอื้อง (Ruminants Production) (เอกสารประกอบการเรียนการสอน สำหรับนิสิตสาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหารสัตว์ภาควิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร).
- เยาวมาลย์ คำเจริญ (2545). ความเป็นพิษของอะฟลาทอกซินต่อปศุสัตว์. รายงานการแก้ปัญหาอะฟลาทอกซินในอาหารโคนมตามโครงการแก้ปัญหาอะฟลาทอกซินในอาหารและอาหารสัตว์แบบครบวงจรในส่วนรับผิดชอบของกรมปศุสัตว์ ปีงบประมาณ 2539-2543, pp. 130-144.
- สายัณห์ ทัดศรี (2547). พิษอาหารสัตว์เขตร้อน (กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์).
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร (2560). สถานการณ์สินค้าเกษตรที่สำคัญและแนวโน้มปี 2561. 230.



ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารและวิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหาร MRS (de Man Rogosa and Sharpe)

อาหารสำเร็จรูป MRS	55 กรัม
--------------------	---------

ผงวุ้น (สำหรับทำอาหารแข็ง)	1.5 กรัม
----------------------------	----------

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

2. อาหารแข็ง PDA (potato dextrose agar)

อาหารสำเร็จรูป PDA	39 กรัม
--------------------	---------

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

3. อาหารแข็ง MacConkey

อาหารสำเร็จรูป MacConkey	50 กรัม
--------------------------	---------

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

4. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง YPD (Yeast extract-Peptone-Dextrose)

ผงสารสกัดยีสต์	10 กรัม
----------------	---------

เพปไทน์	20 กรัม
---------	---------

น้ำตาลเดกซ์โทรส	20 กรัม
-----------------	---------

ผงวุ้น (สำหรับทำอาหารแข็ง)	15 กรัม
----------------------------	---------

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร จากนั้น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

5. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM (Yeast extract-malt extract)

ผงสารสกัดยีสต์	3 กรัม
ผงสารสกัดมอลต์	3 กรัม
เพปโทน	5 กรัม
น้ำตาลเดกซ์โทรส	10 กรัม

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร จากนั้น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที



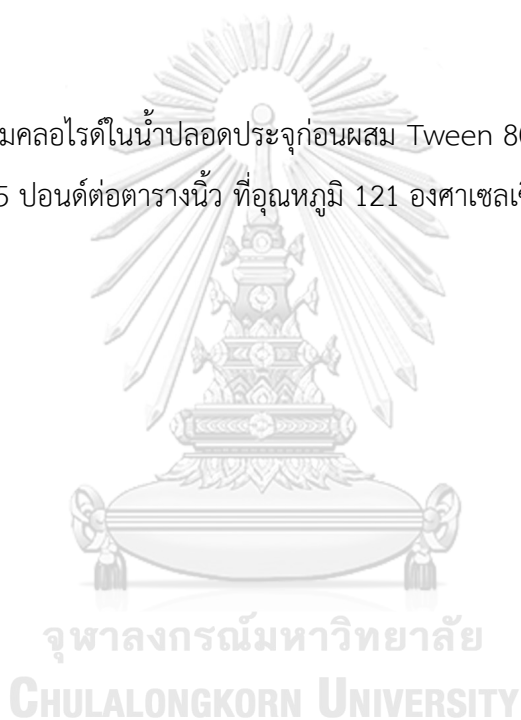
ภาคผนวก ข

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. สารละลายที่ใช้เตรียมสเปกตรัม

โซเดียมคลอไรด์	0.85 กรัม
Tween 80	1 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	100 มิลลิลิตร

ละลายโซเดียมคลอไรด์ในน้ำปลอดประจุก่อนผสม Tween 80 ให้เข้ากัน จากนั้น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที



ภาคผนวก ค



(ก)



(ข)



(ค)



(ง)



(จ)

ภาพที่ ค.1 (ก) ต้นข้าวโพดพร้อมฝักอายุ 70 วัน จากพื้นที่เพาะปลูกในอำเภอบางเลน จังหวัดนครปฐม, (ข) ข้าวโพดในระหว่างกระบวนการสับ, (ค) ข้าวโพดสับแล้ว, (ง) ข้าวโพดปลดเชือกก่อนหมัก, (จ) ตัวอย่างไซเลจข้าวโพดชุดทดสอบหลังผ่านกระบวนการหมัก 21 วัน

ภาคผนวก ง

ตารางที่ ง.1 เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีราจากการทดสอบประสิทธิภาพของยีสต์ปฏิักษ์ในการยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* โดยวิธี Dual Culture Technique บนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน

ยีสต์	เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีรา (เซนติเมตร)
ชุดควบคุมของยีสต์เดี่ยว	5.85±0.13
ชุดควบคุมของยีสต์ผสม	5.62±0.43
<i>W. anomalus</i> MSCU 0652	4.96±0.08
<i>K. marxianus</i> MSCU 0655	4.83±0.12
<i>W. anomalus</i> MSCU 0652 + <i>K. marxianus</i> MSCU 0655	4.81±0.11

ตารางที่ ง.2 ปริมาณอะฟลาทอกซินรวมจากการทดสอบประสิทธิภาพของยีสต์ปฏิักษ์ในการยับยั้งการผลิตอะฟลาทอกซินของ *A. flavus* บนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน

ยีสต์	ปริมาณอะฟลาทอกซินรวม (นาโนกรัมต่อกรัม)
ชุดควบคุมของยีสต์เดี่ยว	39,500.00±3,772.27
ชุดควบคุมของยีสต์ผสม	59,300.00±17,722.33
<i>W. anomalus</i> MSCU 0652	38,400.00±1,907.88
<i>K. marxianus</i> MSCU 0655	36,000.00±2,718.46
<i>W. anomalus</i> MSCU 0652 + <i>K. marxianus</i> MSCU 0655	33,266.67±5,750.07

ตารางที่ ง.3 เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีราจากการทดสอบประสิทธิภาพของแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย
 ปฏิบัติในการยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* โดยวิธี Dual Culture Technique บนอาหาร MRS
 เป็นเวลา 7 วัน

ชุดทดสอบ	เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีรา (เซนติเมตร)
ชุดควบคุมแล็กติกแอซิดแบคทีเรียเดี่ยว	8.41±0.08
ชุดควบคุมแล็กติกแอซิดแบคทีเรียผสม	8.50±0.00
<i>L. casei</i> AN2	6.68±0.21
<i>L. paracasei</i> AN3	6.90±0.17
<i>L. casei</i> AN2 + <i>L. paracasei</i> AN3	6.83±0.15

ตารางที่ ง.4 ปริมาณอะฟลาทอกซินรวมจากการทดสอบประสิทธิภาพของแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย
 ปฏิบัติในการยับยั้งการผลิตอะฟลาทอกซินรวมของ *A. flavus* บนอาหาร MRS เป็นเวลา 7 วัน

ชุดทดสอบ	ปริมาณอะฟลาทอกซินรวม (นาโนกรัมต่อกรัม)
ชุดควบคุมแล็กติกแอซิดแบคทีเรียเดี่ยว	11,400.00±700.00
ชุดควบคุมแล็กติกแอซิดแบคทีเรียผสม	10,400.00±3,300.00
<i>L. casei</i> AN2	8,900.00±8,352.25
<i>L. paracasei</i> AN3	7,333.33±4,623.13
<i>L. casei</i> AN2 + <i>L. paracasei</i> AN3	8,450.00±676.39

ตารางที่ ง.5 ค่าความเป็นกรด-เบสของไซเลจข้าวโพดปลอดเชื้อเมื่อเติมแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย (*L. paracasei* AN3) ยีสต์ผสม (*W. anomalus* MSCU 0652 + *K. marxianus* MSCU 0655) และแล็กติกแอซิดแบคทีเรียร่วมกับยีสต์ผสม (*L. paracasei* AN3 + *W. anomalus* MSCU 0652 + *K. marxianus* MSCU 0655) (ชุดทดสอบ) เปรียบเทียบกับไซเลจข้าวโพดปลอดเชื้อที่เติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 21 วัน

ระยะเวลา การบ่ม (วัน)	ค่าความเป็นกรด-เบสในกรรมวิธีต่างๆ					
	แล็กติกแอซิดแบคทีเรีย		ยีสต์ผสม		แล็กติกแอซิดแบคทีเรีย และยีสต์ผสม	
	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ
0	4.69±0.12	4.66±0.10	4.67±0.05	4.69±0.16	4.95±0.25	4.94±0.18
1	4.74±0.09	3.99±0.22	4.79±0.04	4.52±0.07	4.77±0.12	4.20±0.07
3	4.76±0.16	3.47±0.03	4.89±0.06	4.64±0.09	4.87±0.15	4.14±0.01
5	4.80±0.05	3.45±0.02	4.87±0.07	4.50±0.11	4.87±0.06	4.03±0.09
7	4.90±0.10	3.43±0.05	4.80±0.11	4.51±0.12	4.84±0.25	3.98±0.25
14	4.78±0.04	4.02±0.04	5.01±0.08	4.38±0.06	4.90±0.40	4.18±0.04
21	5.25±0.16	3.42±0.03	5.09±0.31	4.39±0.01	4.95±0.31	4.05±0.09

ตารางที่ ง.6 จำนวนแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในไซเลจข้าวโพดปลอดเชื้อเมื่อเติมแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย (*L. paracasei* AN3) ยีสต์ผสม (*W. anomalous* MSCU 0652 + *K. marxianus* MSCU 0655) และแล็กติกแอซิดแบคทีเรียร่วมกับยีสต์ผสม (*L. paracasei* AN3 + *W. anomalous* MSCU 0652 + *K. marxianus* MSCU 0655) (ชุดทดสอบ) เปรียบเทียบกับไซเลจข้าวโพดปลอดเชื้อที่เติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 21 วัน

ระยะเวลา การบ่ม (วัน)	จำนวนแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในกรรมวิธีต่างๆ (log CFU/กรัม)		
	แล็กติกแอซิดแบคทีเรีย	ยีสต์ผสม	แล็กติกแอซิดแบคทีเรียและยีสต์ผสม
0	8.03±0.19	-	7.58±0.02
1	9.27±0.11	-	8.81±0.03
3	9.47±0.05	-	9.01±0.12
5	9.36±0.15	-	8.92±0.10
7	9.17±0.07	-	8.83±0.04
14	8.20±0.38	-	8.92±0.06
21	8.07±0.24	-	8.85±0.13

ตารางที่ ๗.7 จำนวนยีสต์ในไซเลจข้าวโพดปลอดเชื้อเมื่อเติมแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย (*L. paracasei* AN3) ยีสต์ผสม (*W. anomalous* MSCU 0652 + *K. marxianus* MSCU 0655) และแล็กติกแอซิดแบคทีเรียร่วมกับยีสต์ผสม (*L. paracasei* AN3 + *W. anomalous* MSCU 0652 + *K. marxianus* MSCU 0655) (ชุดทดสอบ) เปรียบเทียบกับไซเลจข้าวโพดปลอดเชื้อที่เติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 21 วัน

ระยะเวลา การบ่ม (วัน)	จำนวนยีสต์ในกรรมวิธีต่างๆ (log CFU/กรัม)		
	แล็กติกแอซิดแบคทีเรีย	ยีสต์ผสม	แล็กติกแอซิดแบคทีเรียและยีสต์ผสม
0	-	6.16±0.04	6.69±0.26
1	-	7.95±0.09	7.77±0.23
3	-	7.74±0.11	7.25±0.07
5	-	7.59±0.19	7.22±0.02
7	-	7.62±0.27	7.30±0.10
14	-	7.17±0.18	7.69±0.13
21	-	7.01±0.18	7.91±0.12

ตารางที่ ๖.8 ค่าความเป็นกรด-เบสของไซเลจข้าวโพดเมื่อเติมแกล็กติกแอซิดแบคทีเรีย (*L. paracasei* AN3) ยีสต์ผสม (*W. anomalus* MSCU 0652 + *K. marxianus* MSCU 0655) และแกล็กติกแอซิดแบคทีเรียร่วมกับยีสต์ผสม (*L. paracasei* AN3 + *W. anomalus* MSCU 0652 + *K. marxianus* MSCU 0655) (ชุดทดสอบ) เปรียบเทียบกับไซเลจข้าวโพดที่เติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 21 วัน

ระยะเวลา การบ่ม (วัน)	ค่าความเป็นกรด-เบสในกรรมวิธีต่างๆ					
	แกล็กติกแอซิดแบคทีเรีย		ยีสต์ผสม		แกล็กติกแอซิดแบคทีเรีย และยีสต์ผสม	
	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ
0	4.32±0.05	4.32±0.06	4.43±0.15	4.45±0.16	4.44±0.19	4.35±0.08
1	4.13±0.02	4.03±0.02	3.98±0.03	3.98±0.09	4.14±0.07	4.00±0.10
3	3.85±0.09	3.77±0.02	3.86±0.00	3.92±0.01	3.90±0.01	3.81±0.07
5	3.82±0.09	3.71±0.07	3.87±0.06	3.84±0.04	3.80±0.05	3.77±0.12
7	3.89±0.13	3.74±0.15	3.95±0.08	3.92±0.05	3.78±0.06	3.77±0.02
14	3.74±0.09	3.65±0.14	3.84±0.06	3.89±0.08	3.84±0.07	3.74±0.05
21	3.93±0.06	3.79±0.05	3.92±0.07	3.89±0.09	3.76±0.06	3.68±0.08

ตารางที่ ๑.9 จำนวนคอลิฟอร์มแบคทีเรียในไซเลจข้าวโพดเมื่อเติมแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย (*L. paracasei* AN3) ยีสต์ผสม (*W. anomalus* MSCU 0652 + *K. marxianus* MSCU 0655) และแล็กติกแอซิดแบคทีเรียร่วมกับยีสต์ผสม (*L. paracasei* AN3 + *W. anomalus* MSCU 0652 + *K. marxianus* MSCU 0655) (ชุดทดสอบ) เปรียบเทียบกับไซเลจข้าวโพดที่เติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 21 วัน

ระยะเวลา การบ่ม (วัน)	จำนวนคอลิฟอร์มแบคทีเรียในกรรมวิธีต่างๆ (log CFU/กรัม)					
	แล็กติกแอซิดแบคทีเรีย		ยีสต์ผสม		แล็กติกแอซิดแบคทีเรีย และยีสต์ผสม	
	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ
0	5.14±0.40	5.02±0.60	5.56±0.37	5.68±0.14	4.62±0.61	4.16±0.42
1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
7	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
14	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
21	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

ตารางที่ ง.10 จำนวนแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในไซเลจข้าวโพดเมื่อเติมแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย (*L. paracasei* AN3) ยีสต์ผสม (*W. anomalus* MSCU 0652 + *K. marxianus* MSCU 0655) และแล็กติกแอซิดแบคทีเรียร่วมกับยีสต์ผสม (*L. paracasei* AN3 + *W. anomalus* MSCU 0652 + *K. marxianus* MSCU 0655) (ชุดทดสอบ) เปรียบเทียบกับไซเลจข้าวโพดที่เติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 21 วัน

ระยะเวลา การบ่ม (วัน)	จำนวนแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในกรรมวิธีต่างๆ (log CFU/กรัม)					
	แล็กติกแอซิดแบคทีเรีย		ยีสต์ผสม		แล็กติกแอซิดแบคทีเรีย และยีสต์ผสม	
	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ
0	7.04±0.48	7.90±0.07	7.94±0.22	7.88±0.18	6.88±0.55	7.87±0.32
1	5.05±1.26	8.85±0.09	8.80±0.13	8.71±0.16	7.56±0.49	8.67±0.23
3	8.89±0.04	9.10±0.03	8.89±0.12	8.83±0.06	8.79±0.07	8.73±0.47
5	8.55±0.11	9.01±0.04	8.58±0.08	8.58±0.03	8.55±0.12	9.03±0.03
7	8.42±0.29	8.87±0.10	8.67±0.12	8.59±0.06	8.20±0.15	8.71±0.02
14	8.81±0.33	8.70±0.05	7.74±0.04	7.77±0.13	7.42±0.58	8.53±0.19
21	8.00±0.48	8.58±0.06	7.90±0.05	7.65±0.31	8.01±0.74	6.10±0.36

ตารางที่ ง.11 จำนวนยีสต์ในไซเลจข้าวโพดเมื่อเติมแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย (*L. paracasei* AN3) ยีสต์ผสม (*W. anomalus* MSCU 0652 + *K. marxianus* MSCU 0655) และแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย ร่วมกับยีสต์ผสม (*L. paracasei* AN3 + *W. anomalus* MSCU 0652 + *K. marxianus* MSCU 0655) (ชุดทดสอบ) เปรียบเทียบกับไซเลจข้าวโพดที่เติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 21 วัน

ระยะเวลา การบ่ม (วัน)	จำนวนยีสต์ในกรรมวิธีต่างๆ (log CFU/กรัม)					
	แล็กติกแอซิดแบคทีเรีย		ยีสต์ผสม		แล็กติกแอซิดแบคทีเรีย และยีสต์ผสม	
	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ
0	5.99±0.54	6.24±0.73	6.74±0.25	7.96±0.09	5.48±0.50	7.37±0.45
1	6.84±0.60	6.80±0.58	7.31±0.16	8.27±0.03	6.84±0.09	7.02±0.25
3	8.88±0.03	9.09±0.02	6.82±0.15	7.94±0.18	6.52±0.14	6.87±0.29
5	6.79±0.98	7.15±0.44	7.11±0.11	7.89±0.30	5.98±0.46	6.50±0.47
7	7.69±0.36	7.54±0.97	6.95±0.07	7.69±0.30	6.41±0.33	6.66±0.42
14	7.41±0.72	8.06±1.11	7.10±0.10	7.99±0.21	6.76±0.06	7.02±0.33
21	6.97±0.26	6.94±0.08	7.90±0.05	7.65±0.31	7.08±0.05	7.16±0.18

ตารางที่ ค.12 ค่าความเป็นกรด-เบสของไซเลจข้าวโพดที่เติม *A. flavus* และแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ร่วมกับยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 มีความเข้มข้นเท่ากับ $10^6:10^6$, $10^8:10^6$ และ $10^6:10^8$ CFU/กรัม (ชุดทดสอบ) เทียบกับไซเลจข้าวโพดที่เติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม)

ระยะเวลา การป่ม (วัน)	ค่าความเป็นกรด-เบสในกรรมวิธีต่างๆ					
	แล็กติกแอซิดแบคทีเรีย และยีสต์ผสม $10^6:10^6$		แล็กติกแอซิดแบคทีเรีย และยีสต์ผสม $10^8:10^6$		แล็กติกแอซิดแบคทีเรีย และยีสต์ผสม $10^6:10^8$	
	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ
0	4.44±0.19	4.35±0.08	5.20±0.29	5.08±0.39	4.90±0.15	5.12±0.17
1	4.14±0.07	4.00±0.10	3.93±0.04	3.87±0.03	3.85±0.11	3.82±0.07
3	3.90±0.01	3.81±0.07	3.86±0.03	3.78±0.05	3.88±0.00	3.89±0.04
5	3.80±0.05	3.77±0.12	3.88±0.05	3.78±0.05	3.81±0.02	3.82±0.05
7	3.78±0.06	3.77±0.02	3.86±0.01	3.74±0.04	3.85±0.05	3.90±0.03
14	3.84±0.07	3.74±0.05	3.92±0.12	3.75±0.01	3.86±0.03	3.85±0.10
21	3.76±0.06	3.68±0.08	3.80±0.08	3.72±0.09	3.86±0.03	3.87±0.07

ตารางที่ ง.13 จำนวนคอลิฟอร์มแบคทีเรียในไซเลจข้าวโพดที่เติม *A. flavus* และแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ร่วมกับยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 มีความเข้มข้นเท่ากับ $10^6:10^6$, $10^8:10^6$ และ $10^6:10^8$ CFU/กรัม (ชุดทดสอบ) เทียบกับไซเลจข้าวโพดที่เติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม)

ระยะเวลา การบ่ม (วัน)	จำนวนคอลิฟอร์มแบคทีเรียในกรรมวิธีต่างๆ (log CFU/กรัม)					
	แล็กติกแอซิดแบคทีเรีย และยีสต์ผสม $10^6:10^6$		แล็กติกแอซิดแบคทีเรีย และยีสต์ผสม $10^8:10^6$		แล็กติกแอซิดแบคทีเรีย และยีสต์ผสม $10^6:10^8$	
	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ
0	4.62±0.61	4.16±0.42	5.73±0.25	6.02±0.47	3.87±0.58	4.37±0.83
1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
7	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
14	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
21	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

ตารางที่ ง.14 จำนวนแบคทีเรียในไซเลจข้าวโพดที่เติม *A. flavus* และแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ร่วมกับยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 มีความเข้มข้นเท่ากับ $10^6:10^6$, $10^8:10^6$ และ $10^6:10^8$ CFU/กรัม (ชุดทดสอบ) เทียบกับไซเลจข้าวโพดที่เติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม)

ระยะเวลา การป่ม (วัน)	จำนวนแบคทีเรียในกรรมวิธีต่างๆ (log CFU/กรัม)					
	แบคทีเรีย และยีสต์ผสม $10^6:10^6$		แบคทีเรียและ ยีสต์ผสม $10^8:10^6$		แบคทีเรีย และยีสต์ผสม $10^6:10^8$	
	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ
0	6.88±0.55	7.87±0.32	6.66±0.45	9.75±0.06	6.69±0.10	8.51±0.02
1	7.56±0.49	8.67±0.23	8.45±0.57	10.35±0.34	8.00±0.07	9.21±0.05
3	8.79±0.07	8.73±0.47	8.34±0.64	10.58±0.28	8.30±0.69	9.13±0.05
5	8.55±0.12	9.03±0.03	8.69±0.06	10.41±0.32	8.50±0.22	9.01±0.05
7	8.20±0.15	8.71±0.02	8.56±0.08	10.52±0.50	8.50±0.07	9.20±0.16
14	7.42±0.58	8.53±0.19	8.18±0.55	10.15±0.03	8.27±0.13	8.88±0.25
21	8.01±0.74	6.10±0.36	7.90±0.63	10.00±0.12	8.01±0.41	8.90±0.60

ตารางที่ ง.15 จำนวนยีสต์ในไซเลจข้าวโพดที่เติม *A. flavus* และแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย *L. paracasei* AN3 ร่วมกับยีสต์ผสมระหว่าง *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 มีความเข้มข้นเท่ากับ $10^6:10^6$, $10^8:10^6$ และ $10^6:10^8$ CFU/กรัม (ชุดทดสอบ) เทียบกับไซเลจข้าวโพดที่เติม *A. flavus* เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม)

ระยะเวลา การป่ม (วัน)	จำนวนยีสต์ในกรรมวิธีต่างๆ (log CFU/กรัม)					
	แล็กติกแอซิดแบคทีเรีย และยีสต์ผสม $10^6:10^6$		แล็กติกแอซิดแบคทีเรีย และยีสต์ผสม $10^8:10^6$		แล็กติกแอซิดแบคทีเรีย และยีสต์ผสม $10^6:10^8$	
	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ
0	5.48±0.50	7.37±0.45	3.52±3.05	6.46±0.33	5.72±0.69	9.42±0.46
1	6.84±0.09	7.02±0.25	6.75±0.01	7.71±0.21	7.60±0.51	9.65±0.51
3	6.52±0.14	6.87±0.29	6.62±0.05	7.29±0.27	7.72±0.09	9.29±0.15
5	5.98±0.46	6.50±0.47	6.99±0.78	7.50±0.02	7.47±0.09	9.37±0.10
7	6.41±0.33	6.66±0.42	7.02±0.54	7.59±0.41	7.55±0.21	9.46±0.07
14	6.76±0.06	7.02±0.33	6.80±0.25	7.63±0.08	7.57±0.24	9.27±0.10
21	7.08±0.05	7.16±0.18	6.91±0.66	7.61±0.04	7.41±0.61	8.61±0.34

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวทรงศรณีย์ รุ่งชัยวัฒนกุล เกิดเมื่อวันที่ 5 เมษายน พ.ศ. 2536 ที่จังหวัดนครราชสีมา สำเร็จการศึกษาในระดับปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม จากภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ในปีการศึกษา 2557 และเข้ารับการศึกษต่อในระดับปริญญาโท สาขาจุลชีววิทยาและเทคโนโลยีทางจุลินทรีย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2558

ผลงานเผยแพร่

ส่วนหนึ่งของงานวิจัยนี้ได้เข้าร่วมนำเสนอผลงานในการประชุมทางวิชาการระดับนานาชาติ The 29th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference: TSB 2016 ระหว่างวันที่ 23-25 พฤศจิกายน 2560 ณ โรงแรมสวิสโซเทล เลอ คองคอร์ด กรุงเทพมหานคร ในหัวข้อเรื่อง Inhibition of *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin contamination in corn silage using antagonistic yeasts and lactic acid bacterium

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY