



โครงการ การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ ผลของแบคทีเรียกรดแลคติกปฏิบั้กซ์ต่อการเจริญและการผลิตสารพิษ
จากราของ *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus carbonarius*


ชื่อนิสิต นางสาวมณวรรณ พรหมอาร์ักษ์ รหัสประจำตัว 5932320323

ภาควิชา จุลชีววิทยา
ปีการศึกษา 2562


คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


หัวข้อโครงการ ผลของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ป้องกันต่อการเจริญและการผลิตสารพิษ
จากราของ *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus carbonarius*
โดย นางสาวธมนวรรณ พรหมอารักษ์ 5932320323
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชีวานันท์ เดชอุปกการ ศิริสมบุรณ์
ปีการศึกษา 2562

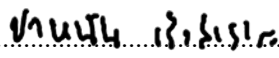
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับโครงการฉบับนี้เป็น
ส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาบัณฑิต ในรายวิชา 2312499 โครงการวิทยาศาสตร์


..... หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิช)

คณะกรรมการสอบโครงการ


..... อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชีวานันท์ เดชอุปกการ ศิริสมบุรณ์)


..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิช)


..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ปาหนัน เริงสำราญ)

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

เรื่อง

ผลของแบคทีเรียกรดแลคติกปฏิชีวน์ต่อการเจริญและการผลิตสารพิษจากราของ
Aspergillus flavus และ *Aspergillus carbonarius*

โดย

นางสาวธมนวรรณ พรหมอารักษ์
รหัสประจำตัว 5932320323

อาจารย์ที่ปรึกษาในโครงการ
ผศ.ดร.ชิวานันท์ เดชอุปการ ศิริสมบุญ

โครงการนี้เป็นส่วนหนึ่งของหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ประจำปีการศึกษา 2562

ภาคจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการ : ผลของแบคทีเรียกรดแลคติกปฏิชีวน์ต่อการเจริญและการผลิตสารพิษจากราของ *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus carbonarius*

อาจารย์ที่ปรึกษา : ผศ.ดร.ชิวานันท์ เดชอุปการ ศิริสมบุญ

จัดทำโดย : นางสาวธมนวรรณ พรหมอาร์ักษ์ รหัสประจำตัว 5932320323
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

การปนเปื้อนราและสารพิษจากราในกาแฟส่งผลกระทบต่อคุณภาพกาแฟ ก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจ และสุขภาพของผู้บริโภค ซึ่งในปัจจุบันวิธีการควบคุมทางชีวภาพโดยใช้จุลินทรีย์ปฏิชีวน์เพื่อลดการปนเปื้อนราในอาหารและผลผลิตทางการเกษตรมีความต้องการเพิ่มขึ้นโดยเฉพาะแบคทีเรียกรดแลคติก โครงการนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียกรดแลคติกปฏิชีวน์ ไอโซเลท MW2A ที่แยกได้จากน้ำหมักจากกระบวนการผลิตเมล็ดกาแฟอาราบิก้า และไอโซเลท PF1B ที่แยกได้จากเมล็ดกาแฟหมัก ต่อการเจริญและการผลิตสารพิษจากรา *Aspergillus flavus* M3T8R403 และ *Aspergillus carbonarius* TK4.2 จากผลการทดลองพบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกทั้งสองไอโซเลทมีประสิทธิภาพต่ำในการยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* และ *A. carbonarius* (น้อยกว่า 25 เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง) สำหรับการผลิตสารพิษจากรา พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกทั้งสองไอโซเลทมีประสิทธิภาพสูงในการลดการผลิตโอคราทอกซินเอของ *A. carbonarius* (ลดลงมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์) อย่างไรก็ตาม แบคทีเรียกรดแลคติกทั้งสองไอโซเลทไม่สามารถลดการผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ได้

Project Title : Effect of antagonistic activity of lactic acid bacteria on growth and mycotoxin production of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus carbonarius*

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

Investigator : Miss Thamonwan Promarak Student ID 5932320323
Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University

Abstract

Fungal and mycotoxin contaminations in coffee affect on the coffee qualities, the economic loss and the consumer health. Currently, the biological control using antagonistic microorganism to reduce the fungal contamination in foods and agricultural products shows the increasing demand, especially lactic acid bacteria. The aim of this project was to study the effect of the antagonistic activity of lactic acid bacteria MW2A isolated from fermented water from arabica coffee processing and PF1B isolated from fermented coffee beans on the growth and mycotoxin production of *A. flavus* M3T8R403 and *A. carbonarius* TK4.2. From the results, both lactic acid bacteria showed low efficiency against *A. flavus* and *A. carbonarius* growth (< 25 %inhibition). For mycotoxin production, both lactic acid bacteria were highly effective to reduce ochratoxin A production of *A. carbonarius* (> 80 %reduction). However, the isolates could not reduce aflatoxin B1 production.

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์นี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีด้วยความช่วยเหลืออย่างยิ่งจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชีวานันท์ เดชอุปกาล ศิริสมบุญ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ที่กรุณาถ่ายทอดความรู้ ให้คำปรึกษา คำแนะนำ ที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัยนี้ อีกทั้งยังดูแลและเป็นกำลังใจที่ดีเสมอ รวมถึงกรุณาตรวจทาน ปรับปรุงแก้ไข ทำให้รายงานฉบับนี้สมบูรณ์และสำเร็จตามวัตถุประสงค์ที่ได้ตั้งไว้ ผู้วิจัยจึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบคุณทุนโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ จากงบประมาณของภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอกราบขอบพระคุณคุณคณาจารย์และเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ รวมถึงความช่วยเหลือต่าง ๆ ทำให้งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณสมาชิกห้องวิจัย 1904/14 ทุกคน สำหรับความเมตตา ความช่วยเหลือ คำแนะนำ และเป็นกำลังใจให้ผู้วิจัยเสมอมา

ขอขอบคุณรุ่นพี่ เพื่อน รุ่นน้องทุกคนในภาควิชาจุลชีววิทยาและคณะอื่น ๆ ที่คอยให้คำแนะนำ ความช่วยเหลือ ดูแลเอาใจใส่และเป็นกำลังใจที่ดีอย่างเสมอมา

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณสมาชิกในครอบครัวทุกคนที่คอยสนับสนุนและช่วยเหลือ สนับสนุน ตลอดจนให้กำลังใจ จนทำให้งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญภาพ	จ
สารบัญตาราง	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการทดลอง	19
บทที่ 3 ผลการทดลอง	28
บทที่ 4 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	33
เอกสารอ้างอิง	39

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1.1 ลักษณะโครงสร้างทางเคมีของอะฟลาทอกซินชนิดต่าง ๆ	4
1.2 ลักษณะโครงสร้างของโอคราทอกซินเอ	10
1.3 โครงสร้างรอยเทอรินรูปแบบต่าง ๆ	16
2.1 ก) ลักษณะการเลี้ยงเชื้อด้วยวิธี Dual culture technique	24
2.1 ข) วิธีการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีรา หลังจากบ่มครบ 7 วัน	24
2.2 วิธีการเจาะวุ้นบริเวณโคโลนีราเพื่อนำมาวิเคราะห์ปริมาณสารพิษจากกรา	27
3.1 กราฟการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลท LAB-MW2A	28
3.2 กราฟการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลท LAB-PF1B	29
3.3 การเจริญของรา <i>A. flavus</i> เมื่อเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียกรดแลคติกปฏิปักษ์	30
3.4 การเจริญของรา <i>A. carbonarius</i> เมื่อเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียกรดแลคติกปฏิปักษ์	31

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1.1 ราและสารพิษจากราที่พบปนเปื้อนในอาหาร	3
1.2 สมบัติทางกายภาพและทางเคมีของอะฟลาทอกซินชนิดต่าง ๆ	5
1.3 ระดับการปนเปื้อนสูงสุดที่ยอมรับได้ของอะฟลาทอกซินในอาหาร	9
1.4 ระดับการปนเปื้อนสูงสุดที่ยอมรับได้ของโอคราทอกซินในอาหาร	13
1.5 สายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตสารประกอบที่มีสมบัติในการยับยั้งรา	15
2.1 ชุดทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียกรดแลคติกปฏิชีวนะในการยับยั้งการเจริญ <i>A. flavus</i> และ <i>A. carbonarius</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อ	25
2.2 ชุดทดสอบประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกปฏิชีวนะในการยับยั้งการเจริญ <i>A. flavus</i> และ <i>A. carbonarius</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อ	26
3.1 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียกรดแลคติกปฏิชีวนะในการยับยั้งการเจริญของ <i>A. flavus</i>	30
3.2 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียกรดแลคติกปฏิชีวนะในการยับยั้งการเจริญของ <i>A. carbonarius</i>	31
3.3 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียกรดแลคติกปฏิชีวนะในการยับยั้งการผลิตอะฟลาทอกซินปี 1	32
3.4 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียกรดแลคติกปฏิชีวนะในการยับยั้งการผลิตโอคราทอกซินเอ	32

บทที่ 1

บทนำ

กาแฟ

กาแฟเป็นเครื่องดื่มที่ได้รับความนิยมแพร่หลายทั่วโลก ส่งผลให้ปริมาณความต้องการบริโภคกาแฟของโลกเพิ่มขึ้น โดยในปี 2560/2561 มีอัตราการขยายตัวอยู่ที่ 1.06 เปอร์เซ็นต์ของประเทศที่มีความต้องการกาแฟมากที่สุด ได้แก่ สหภาพยุโรป สหรัฐอเมริกา บราซิล ญี่ปุ่น ตามลำดับ รวมคิดเป็นสัดส่วนสูงถึง 64 เปอร์เซ็นต์ของความต้องการทั้งหมด (กรมพัฒนาธุรกิจการค้า, 2562) ทำให้กาแฟเป็นสินค้าส่งออกที่สำคัญเป็นอันดับ 2 ของโลก รองจากน้ำมันดิบ (Haile และคณะ, 2019) เมื่อปี พ.ศ. 2547 กาแฟเป็นสินค้าการเกษตรส่งออกที่ทำรายได้เป็นอันดับหนึ่งในจำนวน 12 ประเทศ (FAO statistical, 2004) ซึ่งประเทศบราซิลเป็นผู้นำในการผลิตและส่งออกกาแฟ โดยเฉพาะกาแฟอาราบิก้า ตามด้วยอินโดนีเซีย เอธิโอเปีย และฟิลิปปินส์ (Haile และคณะ, 2019)

สำหรับประเทศไทย แหล่งนำเข้าเมล็ดกาแฟหลัก คือ ประเทศเวียดนาม (78.63 เปอร์เซ็นต์) อินโดนีเซีย (17.68 เปอร์เซ็นต์) และลาว (1.98 เปอร์เซ็นต์) แหล่งนำเข้าผลิตภัณฑ์กาแฟที่สำคัญ ได้แก่ ประเทศมาเลเซีย (46.54 เปอร์เซ็นต์) สาธารณรัฐเกาหลี (22.88 เปอร์เซ็นต์) และเนเธอร์แลนด์ (7.20 เปอร์เซ็นต์) (กรมการค้าต่างประเทศ, 2557) ในขณะที่ตลาดส่งออกหลักของประเทศไทย ได้แก่ ประเทศโปแลนด์ และสหรัฐอเมริกา คิดเป็นสัดส่วนถึง 82 เปอร์เซ็นต์ของการส่งออกทั้งหมด โดยมีปริมาณการส่งออกกาแฟทั้งหมด ประมาณ 7,392 ตัน ส่วนตลาดส่งออกไปยังประเทศเพื่อนบ้าน เช่น พม่า (25 เปอร์เซ็นต์) เวียดนาม (15 เปอร์เซ็นต์) และกัมพูชา (3 เปอร์เซ็นต์) ส่วนใหญ่เป็นเมล็ดกาแฟสายพันธุ์โรบัสต้า เนื่องจากสัดส่วนผลผลิตมากกว่า เจริญเติบโตเร็วกว่า ดูแลง่ายกว่าและราคาถูกกว่าสายพันธุ์อาราบิก้า และผลิตภัณฑ์ส่งออกของประเทศไทยส่วนใหญ่เป็นกาแฟสำเร็จรูป (97-98 เปอร์เซ็นต์) (Economic Intelligence Center, 2558; สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร, 2552) อย่างไรก็ตาม แนวโน้มการส่งออกในอนาคตของกาแฟไทยขึ้นอยู่กับนโยบายของภาครัฐในแต่ละปี ในปัจจุบันรัฐบาลได้สนับสนุนธุรกิจกาแฟ โดยจัดทำแผนยุทธศาสตร์กาแฟ ปี พ.ศ. 2560-2564 เน้นสร้างให้ประเทศไทยเป็นศูนย์กลางทางการค้ากาแฟในอาเซียน (กรมส่งเสริมอุตสาหกรรม, 2562) ซึ่งตลาดกาแฟของแต่ละประเทศในอาเซียนมีความแตกต่างกัน เนื่องจากสถานะเศรษฐกิจและวัฒนธรรม รวมไปถึงพฤติกรรมบริโภคที่แตกต่างกันของประชากรในแต่ละประเทศ (Economic Intelligence Center, 2558)

จุลินทรีย์ในเมล็ดกาแฟ

อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของต้นกาแฟพันธุ์โรบัสต้า คือ ระหว่าง 22-26 องศาเซลเซียส และกาแฟพันธุ์อาราบิก้า คือ ระหว่าง 18-22.5 องศาเซลเซียส (CAC, 2009) ซึ่งอุณหภูมิช่วงเดียวกันนี้เหมาะสมต่อการเจริญของราที่ผลิตสารโอคราทอกซินเอ สุกุลราที่สำคัญและพบการปนเปื้อนในกาแฟ ได้แก่ *Aspergillus*, *Penicilium*, *Fusarium* และ *Cladosporium* (Kusumaningrum และคณะ, 2019) แม้ว่าอุณหภูมิที่ใช้คั่วเมล็ดกาแฟจะสามารถกำจัดการปนเปื้อนราได้ แต่ยังคงเหลือสปอร์รา ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากเมล็ดกาแฟเกิดการปนเปื้อนของสปอร์ที่หลงเหลืออยู่ เช่น ตัวอย่างผงกาแฟดำในประเทศมาเลเซีย ทั้งหมด 20 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อนของราหลายสกุลใน 8 ตัวอย่าง (Rahim และคณะ, 2011) การปนเปื้อนของรามักเกิดขึ้นตั้งแต่ช่วงก่อนการเก็บเกี่ยว ระหว่างการเก็บเกี่ยว และหลังการเก็บเกี่ยว ได้แก่ กระบวนการผลิตเมล็ดกาแฟ กระบวนการแปรรูปกาแฟ การขนส่ง และการเก็บรักษา อีกทั้งสปอร์ราอาจถูกพัดจากบริเวณผิวดินไปยังผลกาแฟได้ ทำให้เราสามารถเข้าไปเจริญและผลิตสารพิษในผลกาแฟได้ (พัฒนาจิตา ธราดลศิริรัฐติกุล, 2557) เมื่อผู้บริโภคดื่มกาแฟที่ปนเปื้อนสารพิษจากราเข้าไปในร่างกาย เนื่องจากสารพิษจากราจะเข้าไปทำลายดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ และโปรตีน (พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์, 2556) ซึ่งความเป็นพิษที่เกิดขึ้นอาจเป็นได้ทั้งแบบเฉียบพลันและเรื้อรัง ขึ้นอยู่กับลักษณะความเป็นพิษ ปริมาณที่ได้รับ อายุ และเพศ รวมถึงชนิดของพันธุ์สัตว์ (สำนักตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์, 2550)

นอกจากนั้น ในกาแฟยังพบการปนเปื้อนของแบคทีเรียในผลกาแฟช่วงหลังการเก็บเกี่ยว และในระหว่างกระบวนการผลิตเมล็ดกาแฟ ได้แก่ Enterobacteriaceae เช่น *Klebsiella pneumoniae* แบคทีเรียกรดแลคติก เช่น *Lactococcus* spp. และ *Leuconostoc* spp. แบคทีเรียกรดอะซิติก เช่น *Gluconobacter* spp. แบคทีเรียในดิน เช่น *Dyella kyungheensis* (De Bruyn และคณะ, 2017)

ราและสารพิษจากรา

ประเทศไทยตั้งอยู่ในเขตร้อนใกล้เส้นศูนย์สูตร ลักษณะภูมิอากาศเป็นแบบร้อนชื้น มีความหลากหลายทางชีวภาพ เหมาะสมต่อการเจริญของราที่ปนเปื้อนในอาหาร ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญต่ออุตสาหกรรมอาหารและสาธารณสุขทั่วโลก นอกจากนี้ วิธีปฏิบัติทางการเกษตรที่ไม่ถูกต้อง ความหลากหลายของฤดูกาล สภาพอากาศ และวิธีการเก็บรักษาที่ไม่เหมาะสม ทำให้เกิดการปนเปื้อนของราที่อยู่ในสกุล *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* และ *Claviceps* ได้ (Taheur และคณะ, 2019) ราบางชนิดยังสามารถผลิตสารพิษ (mycotoxin) ซึ่งเกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึมทุติยภูมิ (secondary metabolism) สารพิษจากราที่สำคัญและพบปนเปื้อนในอาหาร ได้แก่ อะฟลาทอกซิน โอคราทอกซิน ฟูโมนิซิน พาฟูลิน เป็นต้น โดยสารพิษจากราอาจเป็นพิษต่อสุขภาพของมนุษย์และสัตว์ เช่น เป็นสารก่อมะเร็ง สารพิษต่อระบบประสาท พิษต่อไต พิษต่อระบบภูมิคุ้มกันและระบบฮอร์โมน (Guimarães และคณะ, 2018) อีกทั้งก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจอย่างมีนัยสำคัญ อาหารที่มักพบการปนเปื้อนสารพิษจากรา แสดงดังในตารางที่ 1.1

ตารางที่ 1.1 ราและสารพิษจากราที่พบปนเปื้อนในอาหาร

สารพิษจากรา	สายพันธุ์รา	อาหารที่มักพบการปนเปื้อน
อะฟลาทอกซิน	<i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus parasiticus</i>	ถั่วลิสง ธัญพืช นมวัว ข้าวฟ่าง และเครื่องเทศ
โอคราทอกซิน	<i>Aspergillus ochraceus</i> <i>Aspergillus sulphureus</i> <i>Penicillium verucosum</i>	อาหารสัตว์ อุ่น ไวน์ กาแฟ และเมล็ดธัญพืชที่เก็บในโรงเรือน
ไตรโคทีซีน	<i>Fusarium poae</i> <i>Fusarium sporotrichioides</i> <i>Fusarium acuminatum</i> <i>Fusarium equiseti</i>	ข้าวสาลี ข้าวบาร์เลย์ ข้าวโพด ข้าวโอ๊ต บักวีต ข้าวฟ่าง และอาหารสัตว์
ซีราลีโนน	<i>Fusarium graminearum</i> <i>Fusarium culmorum</i> <i>Fusarium cerealis</i>	ข้าวสาลี ข้าวบาร์เลย์ ข้าวโพด ข้าวโอ๊ต ข้าวฟ่าง ถั่ว และอาหารสัตว์
ฟูโมนิซิน	<i>Fusarium verticillioides</i> <i>Fusarium proliferatum</i>	หน่อไม้ฝรั่ง ข้าวโพด และธัญพืชต่าง ๆ รวมถึงผลิตภัณฑ์จากธัญพืช
พาทุลิน	<i>Penicillium expansum</i> <i>Penicillium cyclopium</i>	แอปเปิ้ล ลูกแพร์ และน้ำผลไม้

ที่มา: ดัดแปลงจาก Perczak และคณะ (2018)

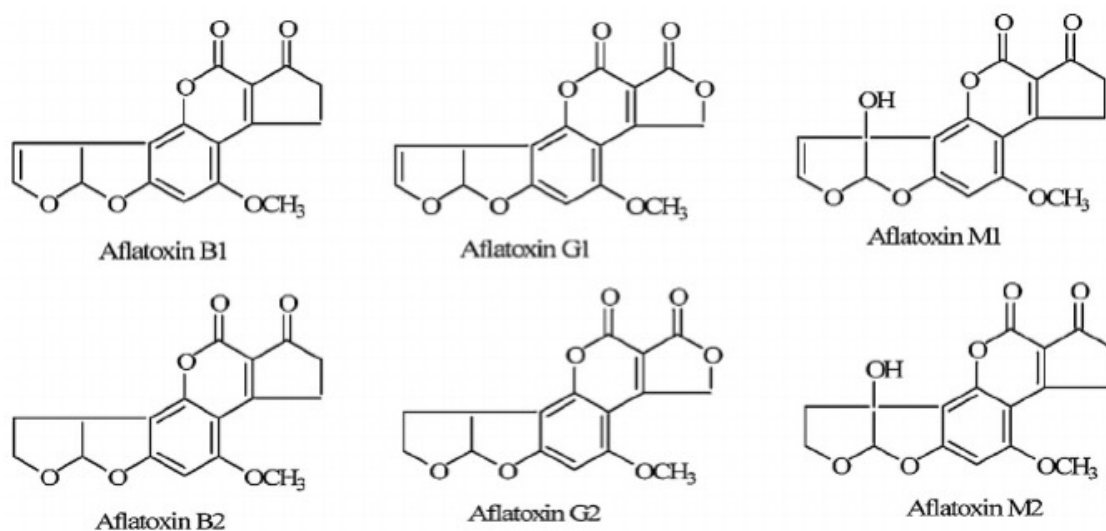
ปัจจุบันทั่วโลกตระหนักถึงอันตรายของสารพิษจากราที่ปนเปื้อนในอาหารและผลิตผลทางการเกษตร ซึ่งการปนเปื้อนเกิดได้ในทุกขั้นตอนการผลิต ตั้งแต่แปลงปลูกจนถึงกระบวนการเก็บรักษาของผู้บริโภค เพื่อคุ้มครองความปลอดภัยของผู้บริโภค แต่ละประเทศจึงกำหนดระดับปริมาณสูงสุดของสารพิษจากราที่อนุญาตให้ปนเปื้อนในอาหารและผลิตผลทางการเกษตรได้ ซึ่งข้อกำหนดที่แตกต่างกันในแต่ละประเทศขึ้นอยู่กับข้อมูลพื้นฐานที่ใช้อย่างยิ่ง โดยพิจารณาจากข้อมูลทางด้านพิษวิทยา โอกาสความเสี่ยงของผู้บริโภคที่จะได้รับสารพิษ โอกาสการเกิดสารพิษจากราในแต่ละประเทศ ความเป็นไปได้ที่จะควบคุมการปนเปื้อน รวมไปถึงขีด

ความสามารถของวิธีการที่ใช้ในการตรวจสอบวิเคราะห์ระดับของสารพิษจากรา (กรมวิชาการเกษตร, 2560; โสภณ วงศ์แก้ว และคณะ, 2554)

อะฟลาทอกซิน (Aflatoxins)

อะฟลาทอกซินเป็นหนึ่งในสารพิษจากราที่สำคัญ พบครั้งแรกในปี พ.ศ. 2504 ส่วนใหญ่ผลิตจากราสายใย 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *A. flavus*, *A. parasiticus* และ *Aspergillus nomius* สารพิษอะฟลาทอกซินสามารถจำแนกเป็น 6 ชนิด ได้แก่ บี 1 (AFB₁), บี 2 (AFB₂), จี 1 (AFG₁), จี 2 (AFG₂), เอ็ม 1 (AFM₁) และเอ็ม 2 (AFM₂) โดยบี (B) หมายถึง บลู (blue) คือ ลักษณะของสารนี้จะเรืองแสงสีฟ้า เมื่อดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ขนาดความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร ส่วนจี (G) หมายถึง กรีน (green) คือ ลักษณะของสารนี้จะเรืองแสงสีเขียว เมื่อดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ขนาดความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร และเอ็ม (M) หมายถึง สารที่พบในน้ำนมวัว (สารานุกรมไทยเล่มที่ 14) เมื่อสัตว์ได้รับอะฟลาทอกซินบี 1 และอะฟลาทอกซินบี 2 เข้าสู่ร่างกาย กระบวนการเมแทบอลิซึมของสัตว์จะเปลี่ยนสารพิษดังกล่าวเป็นอะฟลาทอกซินเอ็ม 1 และอะฟลาทอกซินเอ็ม 2 ตามลำดับ ซึ่งจะพบการปนเปื้อนในน้ำนมของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและผลิตภัณฑ์จากนม (Hussein และคณะ, 2001; Zain, 2011)

โครงสร้างทางเคมีของอะฟลาทอกซินแต่ละชนิดแตกต่างกัน โดยอะฟลาทอกซินบี 1 อะฟลาทอกซินจี 1 และอะฟลาทอกซินเอ็ม 1 มีพันธะคู่ที่บริเวณวงแหวนที่ 1 เท่านั้น และพบหมู่ lactone บริเวณวงแหวนที่ 5 ของอะฟลาทอกซินจี 1 และอะฟลาทอกซินจี 2 เท่านั้น (ธรรมศักดิ์ สมมาตย์, 2533) ซึ่งความแตกต่างของอะฟลาทอกซินบีและอะฟลาทอกซินเอ็ม คือ อะฟลาทอกซินเอ็มทั้งสองชนิดพบหมู่ไฮดรอกซีที่ตำแหน่งคาร์บอนระหว่างวงแหวนที่ 1 และ 2 ดังภาพที่ 1.1



ภาพที่ 1.1. ลักษณะโครงสร้างทางเคมีของอะฟลาทอกซินชนิดต่าง ๆ (Zhang และคณะ, 2014)

สมบัติทางกายภาพของอะฟลาทอกซิน คือ ลักษณะผลึกใส เรืองแสงภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ละลายน้ำได้และละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น คลอโรฟอร์ม เมทานอล เบนซีน และอะซีโตน ทนความร้อนได้ถึงระดับอุณหภูมิ 260-270 องศาเซลเซียส ดังนั้น การใช้ความร้อนในรูปของการต้ม อบ คั่ว นึ่ง หรือการใช้ความดันไอน้ำไม่สามารถทำลายอะฟลาทอกซินได้ แต่อะฟลาทอกซินเสื่อมสลายได้ภายใต้ อัลตราไวโอเล็ต แสงแดด รังสีแกมมา (IARC, 2002) ในสารละลายไฮโปรคลอไรด์ แอมโมเนีย ต่าง และ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (สถาบันอาหาร, 2554) สมบัติทางเคมีของอะฟลาทอกซิน คือ เป็นสารประกอบ ประเภทเฮเทอโรไซคลิก (heterocyclic compound) ในกลุ่มไดฟรานโนคูมาริน (difranocoumarin) (Cole และคณะ, 1981) สมบัติทางกายภาพและทางเคมีของอะฟลาทอกซินแต่ละชนิด แสดงในตารางที่ 1.2

ตารางที่ 1.2 สมบัติทางกายภาพและทางเคมีของอะฟลาทอกซินชนิดต่าง ๆ

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

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

อะฟลาทอกซินปนเปื้อนในอาหารและผลผลิตทางเกษตรหลายชนิด เช่น ข้าวโพด ข้าวฟ่าง ข้าวสาลี เมล็ดกาแฟ ถั่วลิสง อัลมอนต์ เครื่องเทศ น้ำผลไม้ ไวน์ นมและผลิตภัณฑ์จากนม (Bbosa และคณะ, 2013; Johnston และคณะ, 2012) สายพันธุ์ราที่ผลิตอะฟลาทอกซินเป็นหลัก คือ *A. flavus* และ *A. parasiticus* มักพบในดินและโรงเก็บผลผลิตทางการเกษตร โดย *A. parasiticus* พบการปนเปื้อนบ่อยในเมล็ดพืชน้ำมัน และสามารถผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 อะฟลาทอกซินบี 2 อะฟลาทอกซินจี 1 และอะฟลาทอกซินจี 2 ในขณะที่ *A. flavus* พบการปนเปื้อนบ่อยในธัญพืช (ข้าวสาลี ข้าวบาร์เลย์ ข้าวโอ๊ต) และสามารถผลิตอะฟลาทอกซินชนิดบี 1 และอะฟลาทอกซินบี 2 (Jakić-Dimić และคณะ, 2009) ซึ่งการปนเปื้อนเกิดได้ตั้งแต่กระบวนการเพาะปลูก ระหว่างการเก็บเกี่ยว การขนส่ง และการเก็บรักษา (Bbosa และคณะ, 2013)

ความเป็นพิษของอะฟลาทอกซิน

องค์การวิจัยโรคมะเร็งนานาชาติ (International Agency for Research on Cancer; IARC) จัดให้อะฟลาทอกซินปี 1 เป็นสารก่อมะเร็งกลุ่ม 1 หมายความว่า เป็นสารก่อมะเร็งในมนุษย์ ส่วนอะฟลาทอกซินปี 2 จี 1 และจี 2 จัดอยู่ในกลุ่มสารที่อาจก่อมะเร็งในมนุษย์ (Da Silva และคณะ, 2015)

มนุษย์สามารถได้รับอะฟลาทอกซินเข้าสู่ร่างกายได้ทั้งทางตรง โดยบริโภคผลผลิตทางการเกษตรที่ปนเปื้อนอะฟลาทอกซิน และทางอ้อม โดยมนุษย์บริโภคผลิตภัณฑ์จากสัตว์ที่ปนเปื้อนอะฟลาทอกซิน ซึ่งสัตว์เหล่านั้นได้รับจากการบริโภคอาหารที่มีส่วนผสมของผลผลิตทางการเกษตรที่ปนเปื้อนอะฟลาทอกซิน ซึ่งอะฟลาทอกซินปี 1 เป็นพิษต่อสุขภาพ เช่น เป็นสารก่อมะเร็ง สารก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ พิษต่อตับ พิษต่อทารกในครรภ์และพิษต่อระบบภูมิคุ้มกัน ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญในการเกิดโรค ได้แก่ มะเร็งตับ ตับอักเสบ ตับแข็ง สมออักเสบ นอกจากนี้ ยังพบความผิดปกติที่อวัยวะอื่นร่วมด้วย เช่น เซลล์ปอดผิดปกติ เซลล์หลอดลมผิดปกติ (อภิษฐา ช่างสุพรรณ, 2548)

โดยทั่วไปในกลุ่มสัตว์เศรษฐกิจที่มีอายุน้อยจะมีความไวต่อพิษมากกว่าสัตว์ที่มีอายุมาก ซึ่งลูกเป็ด (สัตว์ปีก) และลูกสุกร (สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม) ไวต่อพิษของอะฟลาทอกซินมากที่สุด นอกจากนั้นสัตว์ที่ได้รับปริมาณอะฟลาทอกซินสูงในระยะเวลาดำเนินชีวิต อาจเกิดอาการความเป็นพิษเฉียบพลัน (acute toxicity) ส่วนใหญ่มีพยาธิสภาพที่คล้ายกัน ได้แก่ อวัยวะภายในมีจุดเลือดออก (haemorrhage) ตับถูกทำลาย (acute liver damage) ท่อน้ำดีบวม (bile duct hyperplasia) ตับโตผิดปกติ (enlarged hepatic cells) และบวมน้ำ (oedema) (Wogan, 1996; เขาวมาลย์ คำเจริญ และคณะ, 2543) นอกจากนั้นสัตว์จะมีอาการซึม เบื่ออาหาร น้ำหนักลด หมดแรง และตายภายใน 72 ชั่วโมง กรณีที่สัตว์ได้รับปริมาณอะฟลาทอกซินต่ำเป็นระยะเวลานาน ส่วนใหญ่จะมีอัตราการเจริญเติบโตลดลง กินอาหารน้อยลง ระบบภูมิคุ้มกันบกพร่อง และสมรรถนะในการสืบพันธุ์ลดลง ซึ่งสัตว์ที่แสดงอาการเหล่านี้มักตรวจพบอาการตับแข็ง (cirrhosis) และมะเร็งตับ (liver cancer) (อัจฉรา พัฒนเดช, 2543; โสภณ วงศ์แก้ว และคณะ, 2554) นอกจากนี้ ยังส่งผลกระทบต่อผลผลิตเนื้อ นม ไข่ลดลง คุณภาพไข่ลดลง เปลือกไข่บางลง (อภิษฐา ช่างสุพรรณ, 2548)

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของอะฟลาทอกซินหลังจากเข้าสู่ร่างกาย พบว่าปริมาณอะฟลาทอกซิน 80-90 เปอร์เซ็นต์ จะขับออกจากร่างกายผ่านทางปัสสาวะและอุจจาระ ส่วนที่เหลือ 10-20 เปอร์เซ็นต์จะดูดซึมเข้าสู่ระบบหมุนเวียนเลือดที่บริเวณลำไส้เล็ก และสะสมอยู่ในเนื้อเยื่อตับและไต ซึ่งหากไม่มีการรับสารพิษเข้าสู่ร่างกายเพิ่ม ร่างกายจะขับปริมาณอะฟลาทอกซินเกือบทั้งหมดออกไปภายใน 24 ชั่วโมง โดยกรณีของอะฟลาทอกซินปี 1 ซึ่งเป็นชนิดที่มีความเป็นพิษร้ายแรงกว่าชนิดอื่น หลังจากย้ายมาสะสมที่ตับจะเปลี่ยนโครงสร้างให้กลายเป็น epoxide ซึ่งมีความสามารถสูงในการจับกับโปรตีน ดีเอ็นเอ และอาร์เอ็นเอ รวมถึงองค์ประกอบของเซลล์ตับ กลายเป็นโครงสร้างในรูปของ adducts ขององค์ประกอบนั้น ซึ่งการเข้าจับกับองค์ประกอบของเซลล์ตับเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดสภาพพยาธิวิทยาและมะเร็งในเซลล์ตับ (Ritchie, 2011; โสภณ วงศ์แก้ว และคณะ, 2554) อย่างไรก็ตามความเป็นพิษของอะฟลาทอกซินขึ้นกับหลายปัจจัย ได้แก่ ชนิด อายุ น้ำหนัก เพศ ปริมาณที่ได้รับ และสิ่งแวดล้อม (อัจฉรา พัฒนเดช, 2543)

อุบัติการณ์

เมื่อปี พ.ศ. 2504 รายงานเกี่ยวกับการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินปริมาณสูงมากในกากถั่วลิสงที่นำเข้าจากประเทศบราซิล ซึ่งเป็นสาเหตุให้ไก่กังว่งในประเทศอังกฤษล้มตายมากกว่า 100,000 ตัว เนื่องจากในขณะนั้นยังไม่มีผู้ใดทราบสาเหตุการตายของไก่กังว่ง จึงได้เรียกชื่อโรคดังกล่าวว่า Turkey X disease ต่อมาถูกเปลี่ยนชื่อเป็นโรคที่เกิดจากความเป็นพิษของอะฟลาทอกซิน (aflatoxicosis) เนื่องจากสามารถแยกรา *A. flavus* จากถั่วลิสงได้ ทำให้พบว่าสาเหตุที่แท้จริงเกิดจากสารพิษที่ราผลิต (Sargeant และคณะ, 1961; Blount, 1961) เมื่อปี พ.ศ. 2517 ประเทศอินเดียรายงานการระบาดของโรคตับอักเสบเฉียบพลันที่เกิดจากพิษของอะฟลาทอกซิน ซึ่งเกิดการระบาดในพื้นที่รัฐทางตอนเหนือของอินเดียจำนวน 150 หมู่บ้าน มีจำนวนผู้ป่วยอย่างน้อย 397 ราย และเสียชีวิตมากกว่า 106 ราย ผู้ป่วยส่วนใหญ่เป็นเด็ก และแสดงอาการไข้ขึ้นสูง ตัวเหลืองคล้ายดีซ่าน และท้องมาน ผลการชันสูตรศพผู้เสียชีวิต พบว่า เนื้อเยื่อตับถูกทำลาย เส้นเลือดในตับอุดตัน และท่อน้ำดีบวม เมื่อตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารพิษจากราในข้าวโพด ซึ่งเป็นผลผลิตทางการเกษตรที่ชาวบ้านนิยมนำมาประกอบอาหาร (อาหารหลัก) พบการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินในข้าวโพดสูงถึง 15 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม แสดงว่าผู้ป่วยบริโภคข้าวโพดที่ปนเปื้อนอะฟลาทอกซินในปริมาณสูงถึง 2-6 กรัมต่อวัน เป็นเวลาติดต่อกันหลายวัน นอกจากนี้พบการรายงานคล้ายกันในประเทศไต้หวัน อุกันดาและเยอรมัน (Krishnamachare และคณะ, 1975; ศูนย์พิษวิทยารามาธิบดี, 2563) เมื่อปี พ.ศ. 2524 ในอำเภอมามาซาโคส ประเทศเคนยา รายงานการระบาดของโรคตับอักเสบเฉียบพลันที่เกิดจากพิษของอะฟลาทอกซินปี 1 ที่ปนเปื้อนในข้าวโพด ปริมาณ 3,200-12,000 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม พบผู้ป่วยจำนวน 20 ราย และเสียชีวิต 12 ราย (Nagindu และคณะ, 1982) จากวิกิพีเดียแล้งช่วงกลางปี พ.ศ. 2555 ในทวีปอเมริกาเหนือและยุโรป โดยเฉพาะในประเทศสหรัฐอเมริกา พบปริมาณการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินในข้าวโพดสูงกว่าค่ามาตรฐานความปลอดภัยของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาสหรัฐอเมริกา (U.S. Food and Drug Administration; USFDA) ที่ 20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ, 2555) ในประเทศจีนและแถบแอฟริการายงานการตรวจพบปริมาณอะฟลาทอกซินในปีสภาวะของผู้ป่วย ซึ่งอัตราเสี่ยงในการเกิดมะเร็งประมาณ 3.8 เท่า และถ้าหากติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีด้วย ความเสี่ยงจะเพิ่มขึ้น เป็น 12.5 เท่า ซึ่งเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเป็นจุดเริ่มต้นในการเกิดมะเร็งตับ และอะฟลาทอกซินเป็นปัจจัยส่งเสริมในการเกิดมะเร็งตับ (สำนักงานกองทุนสนับสนุนการสร้างเสริมสุขภาพ, 2556) ในประเทศเวียดนามรายงานปัญหาการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินในพริกป่นและพริกแห้งที่สุ่มสำรวจจากร้านอาหารทั้งหมด 262 แห่ง ใน 10 เมืองท่องเที่ยว ได้แก่ กรุงฮานอย ดานัง กวางนาม กวางาย โฮจิมินห์ ด่งหัท ด่งนาย บ่าเสียด-หวงเต่า และหวิญฟุก พบปริมาณการปนเปื้อนอะฟลาทอกซิน 36 เปอร์เซ็นต์ โดยกระทรวงเกษตรฯ เวียดนาม พบว่าพริกป่นและพริกแห้งที่พบการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินนั้นเกือบทั้งหมดเป็นผลิตภัณฑ์ที่ปลูกเอง กระบวนการผลิตและรักษาคุณภาพอาหารจึงไม่ได้มาตรฐาน (Voice online, 2561)

สำหรับประเทศไทย พบการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินในตัวอย่างสมุนไพรจากร้านขายยาแผนไทยที่จังหวัดสงขลา โดยพืชสมุนไพรที่ปนเปื้อนอะฟลาทอกซินปี 1 สูงกว่ามาตรฐานที่กำหนดโดยคณะกรรมการยุโรป ได้แก่ แสมสาร (1,101.8 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) ผาง (655.9 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) ชีเหล็ก (583.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) และข้าวเย็นเหนือ (572.5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) (อัจฉรา พัฒนเดช, 2543) ต่อมาในช่วงปี พ.ศ. 2549-2552 พบอาหารแห้งที่ปนเปื้อนอะฟลาทอกซินเกินมาตรฐานที่ประกาศกระทรวงสาธารณสุขกำหนดไว้ (มากกว่า 20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) โดยผลิตภัณฑ์อาหารแห้งที่ปนเปื้อนอะฟลาทอกซินสูงเป็น 3 อันดับแรก ได้แก่ ถั่วลิสงคั่ว ถั่วป่น และพริกแห้ง (กองสุขาภิบาลอาหาร, 2554) เมื่อวันที่ 3 ธันวาคม พ.ศ. 2551 สำนักงานเกษตรประเทศญี่ปุ่นประจำกรุงโตเกียว ได้รับแจ้งปัญหาการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินในข้าวไทยที่ประเทศญี่ปุ่นซื้อไว้ 24 ตัน โดยปริมาณอะฟลาทอกซินในข้าว เท่ากับ 4 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (อมรา ชินภูติ และคณะ, 2552)

ข้อกำหนดปริมาณของอะฟลาทอกซินในอาหาร

จากความเป็นพิษของราและการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซิน ทำให้หลายประเทศจัดตั้งข้อกำหนดระดับปริมาณสูงสุดของสารพิษจากราที่อนุญาตให้ปนเปื้อนในอาหารและผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร เช่น ประเทศแคนาดากำหนดระดับการปนเปื้อนสูงสุดของอะฟลาทอกซินรวมในถั่ว ไม่เกิน 15 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ประเทศอียิปต์กำหนดระดับการปนเปื้อนสูงสุดของอะฟลาทอกซินรวมในข้าวโพด ไม่เกิน 20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ประเทศญี่ปุ่นกำหนดระดับการปนเปื้อนสูงสุดของอะฟลาทอกซินปี 1 ในอาหารทุกชนิด ไม่เกิน 10 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ประเทศสวีเดนกำหนดระดับการปนเปื้อนสูงสุดของอะฟลาทอกซินปี 1 ในอาหารสำหรับโคนม ไม่เกิน 1.5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม นอกจากนี้ ทางตลาดร่วมอเมริกาใต้ (Mercosur) กำหนดระดับการปนเปื้อนสูงสุดของอะฟลาทอกซินรวมในถั่วลิสง ข้าวโพด และผลิตภัณฑ์จากข้าวโพด ไม่เกิน 20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (Ismail และคณะ, 2018; FAO, 2004) และคณะกรรมการยุโรป (European Commission; EU) กำหนดระดับการปนเปื้อนสูงสุดของอะฟลาทอกซินในอาหาร แสดงดังในตารางที่ 1.3

หน่วยงานกำหนดมาตรฐานการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินในประเทศไทย ได้แก่ ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กำหนดปริมาณสูงสุดของอะฟลาทอกซินในถั่วลิสง ไม่เกิน 20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งสอดคล้องกับข้อกำหนดในประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 98 (2529) ออกตามความในพระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ.2522 กำหนดให้มีอะฟลาทอกซินทุกชนิดในอาหารทั่วไปได้ไม่เกิน 20 ไมโครกรัมในอาหาร 1 กิโลกรัม (ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2557)

ตารางที่ 1.3 ระดับการปนเปื้อนสูงสุดที่ยอมรับได้ของอะฟลาทอกซินในอาหาร โดยคณะกรรมการอาหารยุโรป

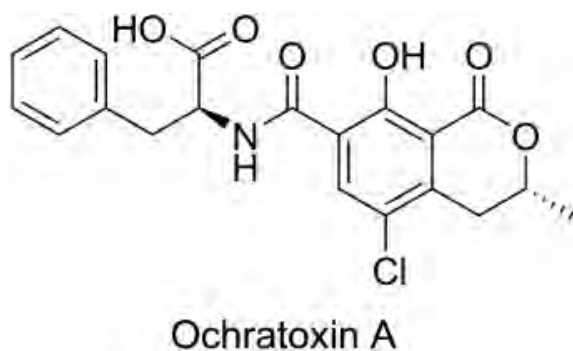
อาหาร	ระดับการปนเปื้อนสูงสุดที่ยอมรับ (µg/kg)		
	ปี 1	รวมปี 1 ปี 2 จี 1 และจี 2	
อะฟลาทอกซิน			
ถั่ว	อัลมอนต์ ถั่วพิสตาชิโอ และแอฟริคอตที่ผ่านกระบวนการคัดเลือก หรือกระบวนการถนอมอาหารด้วยวิธีทางกายภาพอื่น ก่อนการบริโภค หรือใช้เป็นส่วนประกอบในอาหาร	12.0	15.0
	อัลมอนต์ ถั่วพิสตาชิโอ และแอฟริคอตที่สามารถบริโภคได้ทันทีและใช้เป็นส่วนประกอบในอาหาร	8.0	10.0
ผลไม้	ผลไม้อบแห้งที่ผ่านกระบวนการคัดเลือก หรือ	5.0	10.0
อบแห้ง	กระบวนการถนอมอาหารด้วยวิธีทางกายภาพอื่น ก่อนการบริโภค หรือใช้เป็นส่วนประกอบในอาหาร		
	ผลไม้อบแห้งและผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปที่สามารถบริโภคได้ทันทีและใช้เป็นส่วนประกอบในอาหาร	2.0	4.0
ข้าวโพดและข้าว	ข้าวโพดและข้าวที่ผ่านกระบวนการคัดเลือก หรือถนอมอาหารด้วยวิธีทางกายภาพอื่น ก่อนการบริโภค หรือใช้เป็นส่วนประกอบในอาหาร	5.0	10.0
เครื่องเทศ	สกุลเครื่องเทศ ได้แก่ <i>Capsicum</i> spp. (พริก พริกป่น พริกคาเยน และพริกปาปริกา) <i>Piper</i> spp. (พริกไทยขาว และพริกไทยดำ) <i>Myristica fragrans</i> (จันทน์เทศ) <i>Zingiber officinale</i> (ขิง) <i>Curcuma longa</i> (ขมิ้น) เครื่องปรุงที่มีส่วนผสมของเครื่องเทศที่กล่าวไปข้างต้นชนิดเดียวหรือมากกว่าหนึ่งชนิด	5.0	10.0

ที่มา: ดัดแปลงจาก European Commission regulation No 165/2010

โอคราทอกซินเอ (Ochratoxin A)

โอคราทอกซินเอเป็นสารพิษจากรา พบครั้งแรกในปี พ.ศ. 2508 เกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึมทุติยภูมิของราสายใยสกุล *Aspergillus* และ *Penicillium* ซึ่งราสกุล *Aspergillus* ที่สำคัญและมักพบการปนเปื้อนในอาหาร ได้แก่ *Aspergillus section Nigri* ได้แก่ *A. carbonarius* และ *A. niger* และราสกุล *Aspergillus section Circumdati* ได้แก่ *Aspergillus westerdijkiae*, *Aspergillus ochraceus* และ *Aspergillus steynii* (Noonim และคณะ, 2008) โดยประเทศที่มีภูมิอากาศร้อนชื้น มักพบการปนเปื้อนของโอคราทอกซินที่ผลิตจากราสกุล *Aspergillus* ส่วนประเทศที่มีภูมิอากาศเย็น มักพบการปนเปื้อนของโอคราทอกซินที่ผลิตจากราสกุล *Penicillium* อย่างไรก็ตาม ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการสร้างสารพิษจากรา ได้แก่ สายพันธุ์รา สารอาหารในอาหารที่ปนเปื้อน อุณหภูมิ ความชื้นสัมพัทธ์ แสง ปริมาณออกซิเจน และระยะเวลาที่ปนเปื้อน (Dhanasekaran และคณะ 2011; Zain, 2011)

โอคราทอกซินเอมีโครงสร้างทางเคมี (ภาพที่ 1.2) เป็น pentaketide และมีชื่อทาง IUPAC คือ 7-(L-β-phenylalanylcarbonyl)-carboxyl-5-chloro-8-hydroxy-3,4-dihydro-3R-methylisocoumarin (พณณชิตา ธราดลศิริฐิติกุล, 2557) ซึ่งประกอบด้วย สารประกอบ phenylalanine ที่เชื่อมต่อกับสารประกอบวงแหวน isocoumarin ด้วยพันธะเอไมด์ (N-H group) (ศุภวัฒน์ โพธิมงคลกุล, 2549) มีลักษณะเป็นก้อนผลึกสีขาว ไม่มีกลิ่น มีจุดหลอมเหลวที่ 169 องศาเซลเซียส และมีสูตรโมเลกุล คือ $C_{20}H_{18}ClNO_6$ มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 403.8 กรัมต่อโมล (Pohland และคณะ, 1992)



ภาพที่ 1.2. ลักษณะโครงสร้างของโอคราทอกซินเอ (Haschek, 2013)

โอคราทอกซินเอปนเปื้อนในอาหารและผลิตผลทางการเกษตรหลายชนิด ได้แก่ ธัญพืช ผลไม้อบแห้ง เมล็ดกาแฟ เครื่องเทศ เนื้อสัตว์ ไส้กรอก แฮม เบคอน เบียร์ และไวน์ (Haschek, 2013; พณณชิตา ธราดลศิริฐิติกุล, 2557) โดยพบการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอในผลไม้อบแห้งหลายชนิด ทั้งขั้นตอนก่อนการเก็บเกี่ยวและหลังการเก็บเกี่ยว โดยเฉพาะในระหว่างกระบวนการทำให้แห้งและการเก็บรักษา (สุพวี วนศิริกุล, 2557)

อย่างไรก็ตาม โอคราทอกซินไม่สามารถถูกทำลายได้ด้วยกระบวนการหุงต้มปกติ และกระบวนการผลิตกาแฟ (การคั่วเมล็ดกาแฟ หรือการชงกาแฟ) เช่น กาแฟที่ปนเปื้อนโอคราทอกซินเอ เมื่อผ่านกระบวนการคั่วที่อุณหภูมิ 400-490 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2.5-10 นาที ปริมาณสารพิษลดลงได้มากที่สุด 69-96 เปอร์เซ็นต์ (Van de Stegen และคณะ, 2001)

ความเป็นพิษของโอคราทอกซิน

องค์การวิจัยโรคมะเร็งนานาชาติ (IARC) จัดให้โอคราทอกซินเอ เป็นสารก่อมะเร็งในมนุษย์กลุ่ม 2B หมายความว่า อาจเป็นสารก่อมะเร็งในมนุษย์ นอกจากนี้ โอคราทอกซินเอยังเป็นสารก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ พิษต่อไต พิษต่อตับ และพิษต่อทารกในครรภ์ อีกทั้งส่งผลกระทบต่อระบบประสาทส่วนกลาง (Guimarães และคณะ, 2018; Tahour และคณะ, 2019) ซึ่งความเป็นพิษของโอคราทอกซินมีผลกระทบต่อการทำงานของไต โดยเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะไตวายทั้งแบบเฉียบพลันและแบบเรื้อรัง ขึ้นกับปริมาณสารพิษที่ได้รับ นอกจากนี้ อาจเกิดการฝ่อของเยื่อบุท่อไตและการรั่วของโปรตีนออกมาทางปัสสาวะ ผู้ป่วยมักมีอาการเริ่มต้นโดยทั่วไป เช่น เบื่ออาหาร ซึม อ่อนเพลีย ปวดศีรษะ ซึ่งความรุนแรงของอาการจะสัมพันธ์กับเซลล์ของท่อไตที่ถูกทำลาย อีกทั้งขัดขวางการสังเคราะห์โปรตีน ดีเอ็นเอ และอาร์เอ็นเอ ตลอดจนส่งเสริมให้เกิดการทำลายเซลล์จากสารอนุมูลอิสระ ซึ่งเป็นผลจากการกระตุ้นให้เกิดกระบวนการลิพิดออกซิเดชัน (อานาจ พัวพลเทพ, 2562)

โอคราทอกซินเอสามารถส่งผลกระทบต่อสุกร โดยสุกรที่ได้รับอาหารที่ปนเปื้อนโอคราทอกซินเอเป็นประจำ ปริมาณ 0.2-4.0 ไมโครกรัมต่อกรัม อาจเกิดอาการความเป็นพิษเรื้อรัง ซึ่งก่อให้เกิดความเสียหายต่อหลายอวัยวะและเนื้อเยื่อ ได้แก่ ตับ ทางเดินอาหาร ไต และเนื้อเยื่อระบบภูมิคุ้มกัน ทำให้สุกรไวต่อการติดเชื้อก่อโรคต่าง ๆ และประสิทธิภาพในการสืบพันธุ์ลดลง สุกรส่วนใหญ่แสดงอาการท้องเสีย ปริมาณการกินน้ำเพิ่มขึ้น ตับซีดและพอกไขมัน ปอดบวม น้ำ การทำงานของไตเสียหาย เลือดออกที่ลำไส้ มีเลือดในอุจจาระและปัสสาวะ และการรั่วของโปรตีนออกมาทางปัสสาวะ อีกทั้งสุกรมีอัตราการเจริญเติบโตลดลง ส่วนสัตว์ปีกได้รับผลกระทบของโอคราทอกซินต่อการทำงานของไต โดยรบกวนการสร้างวิตามินดี 3 และการเผาผลาญของแคลเซียม ส่งผลให้คุณภาพเปลือกไข่ไม่ดี เปลือกแตกมากขึ้น อัตราการฟักลดลง และอัตราการผสมติดลดลง ซึ่งสัตว์เศรษฐกิจที่มีอายุน้อยจะมีความไวต่อพิษมากกว่าสัตว์ที่มีอายุมาก (Haschek, 2013; Biomin, 2563) นอกจากนี้ ในสัตว์ทดลอง (หนู สุกร และนก) ที่ได้รับโอคราทอกซินเป็นเวลานาน จะเกิดการเสื่อมสภาพและสร้างพังผืดที่ไต ทำให้ความหนาของผนังไตและเส้นเลือดฝอยภายในไตมีขนาดเล็กลง (พีระพล มารุ่งเรือง, 2559)

อุบัติการณ์

ในปี พ.ศ. 2495 ประเทศในแถบคาบสมุทรบอลข่าน ได้แก่ ประเทศบอสเนีย บัลแกเรีย โครเอเชีย รูมาเนีย และเซอร์เบีย เกิดโรคระบาดไตอักเสบเรื้อรัง (Balkan endemic nephropathy; BEN) ทำให้ระบบ

การทำงานของไตผิดปกติ และเกิดการเสื่อมของหลอดเลือดไต (Meca และคณะ, 2010; Mally และคณะ, 2007) โดยระยะแรกจะไม่มีอาการของโรค การดำเนินโรคจะเป็นไปอย่างช้า ๆ จนเริ่มเกิดความเป็นพิษเรื้อรัง และเกิดภาวะไตวายในที่สุด ซึ่งคาดว่าสาเหตุจากโอคราทอกซินที่ปนเปื้อนในอาหาร ต่อมาในปี พ.ศ. 2539 พบโอคราทอกซินเอในน้ำอุงุ่นและไวน์ในประเทศสวิตเซอร์แลนด์ (Zimmerli และคณะ, 1996) ประเทศอัลจีเรียพบโอคราทอกซินเอในข้าวสาลี 40 ตัวอย่างจากทั้งหมด 85 ตัวอย่าง มีการปนเปื้อนโอคราทอกซินเออยู่ระหว่าง 0.21-41.55 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (Riba และคณะ, 2008) ต่อมาในช่วงปลายปี พ.ศ. 2547 ถึง 2548 เกิดโรคไตของสุนัขเพิ่มสูงขึ้นในประเทศไทยและประเทศไต้หวัน ซึ่งสุนัขเหล่านี้มีประวัติการทานอาหารเม็ดยี่ห้อหนึ่งที่ผลิตในประเทศไทย จากการศึกษาหาสาเหตุพบว่า มีการตกค้างของโอคราทอกซินเอในข้าวและข้าวโพดที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตอาหารสุนัข (ศุภวัฒน์ โพธิมงคลกุล, 2549) ตลาดในประเทศตุรกีพบการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอในเครื่องเทศ ได้แก่ พริกแดงแห้ง พริกไทยดำป่น และยี่หระ โดยปริมาณการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอ เท่ากับ 12.34, 0.34 และ 0.06 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ (Ozbey และคณะ, 2012)

สำหรับประเทศไทย ช่วงปี พ.ศ. 2549-2550 มีรายงานตัวอย่างเมล็ดกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้าปนเปื้อนราสกุล *Aspergillus* section *Circumdati* ได้แก่ *A. westerdijkiae* และ section *Nigri* ได้แก่ *A. niger* และมีปริมาณการปนเปื้อนโอคราทอกซินเออยู่ในช่วง 0.6-5.5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ในขณะที่ตัวอย่างเมล็ดกาแฟสายพันธุ์โรบัสต้าปนเปื้อนราสกุล *Aspergillus* section *Nigri* ได้แก่ *A. carbonarius* และ *A. niger* และมีปริมาณการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอในเมล็ดกาแฟอยู่ในช่วง 1.5-8.9 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (Noonim และคณะ, 2008)

ข้อกำหนดปริมาณของโอคราทอกซินเอในอาหาร

จากความเป็นพิษของราและการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอในอาหาร ทำให้หลายประเทศจัดตั้งข้อกำหนดระดับปริมาณสูงสุดของสารพิษจากราที่อนุญาตให้ปนเปื้อนในอาหารและผลิตผลทางการเกษตร เช่น ประเทศจีนกำหนดระดับการปนเปื้อนสูงสุดของโอคราทอกซินในกาแฟดิบ ไม่เกิน 5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ประเทศมาเลเซียกำหนดระดับการปนเปื้อนสูงสุดของโอคราทอกซินเอในถั่วและกาแฟดิบ ไม่เกิน 5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม สาธารณรัฐเกาหลีกำหนดระดับการปนเปื้อนสูงสุดของโอคราทอกซินเอในเมล็ดกาแฟและกาแฟคั่ว ไม่เกิน 5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ประเทศบราซิลกำหนดระดับการปนเปื้อนสูงสุดของโอคราทอกซินเอในธัญพืช ไม่เกิน 20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ประเทศอินโดนีเซียกำหนดระดับการปนเปื้อนสูงสุดของโอคราทอกซินเอในเครื่องเทศ ไม่เกิน 20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ประเทศอิตาลีกำหนดระดับการปนเปื้อนสูงสุดของโอคราทอกซินเอในอาหาร ไม่เกิน 4 นาโนกรัมต่อกิโลกรัม (Romer Labs, 2016) นอกจากนี้ คณะกรรมาธิการยุโรป (European Commission; EU) กำหนดระดับการปนเปื้อนสูงสุดของโอคราทอกซินเอในอาหาร ดังตารางที่ 1.4

สำหรับประเทศไทย ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กำหนดปริมาณสูงสุดของโอคราทอกซินเอ ทั้งในเมล็ดกาแฟโรบัสต้าและอาราบิก้า ไม่เกิน 10 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2561; ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2562)

ตารางที่ 1.4 ระดับการปนเปื้อนสูงสุดที่ยอมรับได้ของโอคราทอกซินในอาหาร โดยคณะกรรมการอาหารยุโรป

อาหาร	ระดับการปนเปื้อนสูงสุดที่ยอมรับ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
โอคราทอกซิน เอ	
ธัญพืช	ธัญพืชที่ยังไม่ผ่านกระบวนการ 5.0
	ธัญพืชที่ผ่านกระบวนการ และธัญพืชที่สามารถบริโภคได้ทันที ยกเว้นธัญพืชในอาหารเด็กอ่อนและอาหารเสริม 3.0
	ธัญพืชในอาหารเด็กอ่อน 0.50
กาแฟ	เมล็ดกาแฟคั่ว และ เมล็ดกาแฟคั่วบด (ยกเว้น กาแฟสำเร็จรูป) 5.0
	กาแฟสำเร็จรูป 10.0
เครื่องเทศ	<i>Piper</i> spp. (พริกไทยขาว และพริกไทยดำ) 15
	<i>Myristica fragrans</i> (จันทน์เทศ)
	<i>Zingiber officinale</i> (ขิง)
	<i>Curcuma longa</i> (ขมิ้น)
	<i>Capsicum</i> spp. (พริก พริกป่น พริกคาเยน และพริกปาปริกา) 20
	เครื่องปรุงที่มีส่วนผสมของเครื่องเทศที่กล่าวไปข้างต้นชนิดเดียวหรือมากกว่าหนึ่งชนิด 15

ที่มา: ดัดแปลงจาก European Commission regulation No 1881/2006

การควบคุมและสารพิษจากรา

การปนเปื้อนราและสารพิษจากราในอาหารและผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรส่งผลกระทบต่อคุณภาพของอาหาร และสุขภาพของมนุษย์และสัตว์ อีกทั้งยังก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจอย่างมีนัยสำคัญ จึงต้องมีวิธีการควบคุมอาหารและผลผลิตให้มีคุณภาพและปลอดภัย โดยวิธีปฏิบัติทางการเกษตรที่ดี (good agricultural practices; GAPs) เพื่อจัดการขั้นตอนการผลิตในแปลงปลูก ซึ่งเทคนิคการเก็บเกี่ยวที่เหมาะสมและการเก็บรักษาที่ถูกต้องเป็นสิ่งสำคัญสำหรับการลดการปนเปื้อนในผลผลิต ทำให้ผลผลิตมีคุณภาพและปลอดภัย (Guimarães และคณะ, 2018) นอกจากนี้ อาจใช้วิธีการแปรรูปและถนอมอาหาร ดังต่อไปนี้ วิธีทาง

กายภาพ ได้แก่ การตากแห้ง การให้ความร้อน การฉายรังสี การใช้คลื่นอัลตราโซนิก การใช้ความดันสูง และการกรอง ซึ่งข้อเสียของวิธีทางกายภาพ คือ ทำให้คุณภาพของอาหารลดลง ส่วนวิธีทางเคมี ได้แก่ การใช้สารสังเคราะห์ที่ยับยั้งการเจริญของราและกรดอินทรีย์ ข้อเสียของวิธีนี้ คือ ปริมาณจำกัดและอาจเกิดการสะสมของสารเคมีตกค้างในอาหาร ซึ่งอาจเป็นสาเหตุของการเกิดโรค เช่น มะเร็ง ภูมิแพ้ (Taheur และคณะ, 2019)

อย่างไรก็ตามผู้บริโภคมีความต้องการอาหารที่ดีต่อสุขภาพและปลอดภัย ทำให้วิธีการควบคุมทางชีวภาพได้รับความสนใจมากขึ้น โดยนำกลุ่มจุลินทรีย์ที่ปลอดภัย (generally recognized as safe bacteria; GRAS) ซึ่งผ่านการยอมรับจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (food and drug administration; FDA) ว่าสามารถใช้เติมลงในอาหารได้อย่างปลอดภัย ซึ่งปริมาณการใช้เป็นไปตามข้อกำหนดตามหลักเกณฑ์วิธีการที่ดีในการผลิตอาหาร (good manufacturing practice; GMP) ตัวอย่างจุลินทรีย์ปลอดภัย ได้แก่ แบคทีเรียกรดแลคติก ซึ่งจัดเป็น probiotic หรือแบคทีเรียที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย เมื่อร่างกายได้รับในปริมาณที่เหมาะสมจะเป็นประโยชน์ต่อสุขภาพ จึงนำมาใช้ประโยชน์ในการถนอมอาหารและการหมักอาหาร โดยประกาศกระทรวงสาธารณสุข เล่ม 128 ตอนพิเศษ 86 ง หน้า 21 จำกัดความของจุลินทรีย์โพรไบโอติก หมายถึง จุลินทรีย์ที่มีชีวิต ซึ่งเมื่อร่างกายได้รับในปริมาณที่เพียงพอจะทำให้เกิดผลที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพ (ประกาศกระทรวงสาธารณสุข, 2554)

แบคทีเรียกรดแลคติก

แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก ลักษณะรูปร่างเป็นท่อนหรือกลม ไม่มีการสร้างสปอร์ ทนต่อกรดได้ดี ผลิตกรดแลคติก ไม่สามารถสังเคราะห์เอนไซม์คะตะเลส แต่สังเคราะห์เอนไซม์ superoxide dismutase เพื่อกำจัดอนุมูลอิสระ (reactive oxygen species; ROS) เจริญในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (anaerobic bacteria) แต่มีบางสายพันธุ์ที่ทนต่อออกซิเจนในระดับปริมาณต่ำได้ นอกจากนี้แบคทีเรียกรดแลคติกนำมาใช้ประโยชน์ในการถนอมอาหารและเครื่องดื่ม ทำให้อาหารมีคุณภาพดีขึ้นและสามารถเก็บอาหารได้นานขึ้น แบคทีเรียกรดแลคติกที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรม เช่น *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* และ *Lactobacillus* (Dalié และคณะ, 2010; Perczak และคณะ, 2018)

แบคทีเรียกรดแลคติกสร้างพลังงานจากกระบวนการหมักคาร์โบไฮเดรต เกิดกรดแลคติกจากปฏิกิริยา 2 แบบ ได้แก่ ผลิตแลคเตทอย่างเดียว (homofermentatation) และผลิตแลคเตทกับสารอื่น ๆ ในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน (heterofermentation) โดยแบคทีเรียแลคติกกลุ่ม homofermentatation จะหมักน้ำตาลแล้วผลิตกรดแลคติกเพียงอย่างเดียว ตัวอย่างกลุ่มนี้ เช่น *Streptococcus*, *Pediococcus* และ *Lactobacillus* (บางสายพันธุ์) ส่วนแบคทีเรียแลคติกกลุ่ม heterofermentation หมักน้ำตาลแล้วผลิตกรดแลคติกประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์และที่เหลือจะผลิตเอทานอลกับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ตัวอย่างกลุ่มนี้ เช่น *Leuconostoc* และ *Lactobacillus* (บางสายพันธุ์) (Perczak และคณะ, 2018)

ความสามารถของแบคทีเรียกรดแลคติกที่เป็นปฏิปักษ์ต่อรา

แบคทีเรียกรดแลคติกบางสายพันธุ์มีสมบัติยับยั้งราได้ เนื่องจากปัจจัยต่าง ๆ เช่น การเติบโตแบบแข่งขัน สภาพความเป็นกรดเบส และการผลิตสารยับยั้งรา เป็นต้น ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกสร้างสารประกอบหรือโมเลกุลขนาดเล็กในการยับยั้งรา เช่น กรดอินทรีย์ ส่วนใหญ่เป็นกรดแลคติกและกรดอะซีติก (Langa และคณะ, 2014) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แบคเทอริโอซิน รอยเทอริน สารประกอบพีนอลิกและกรดไขมันหมู่ไฮดรอกซิล เป็นต้น (Taheur และคณะ, 2019) (ตารางที่ 1.5) อย่างไรก็ตาม ต้องคำนึงถึงปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างสารประกอบของแบคทีเรียกรดแลคติกด้วย โดยมีปัจจัยสำคัญ ได้แก่ ระยะเวลาพักตัวของเชื้อ (incubation times) อาหารเลี้ยงเชื้อ และค่าความเป็นกรดเบส (Dalié และคณะ, 2010)

ตารางที่ 1.5 สายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตสารประกอบที่มีสมบัติในการยับยั้งรา

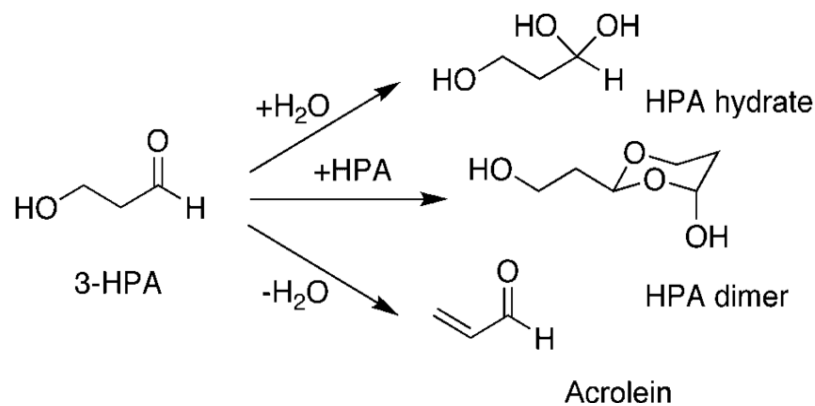
แบคทีเรียกรดแลคติก	สารประกอบเมแทบอลิต์
<i>Lactobacillus reuteri</i>	รอยเทอริน กรดอะซีติก กรดพีนิลแลคติก
<i>L. plantarum</i>	กรดพีนิลแลคติก 3,6-bis(2-methylpropyl)-2,5-piperazinedion 2-hydroxy-4-methylpentanoic acid, peptides-cyclo (Leu-Pro), cyclo (Phe-Pro)
<i>Pediococcus acidilactici</i>	สารประกอบพีนอลิก
<i>L. paracasei subsp. paracasei</i>	กรดแลคติก กรดโพธิโธนิค กรดอะซีติก กรดซัคซินิก กรดไฮดรอกซีพีนิลแลคติก กรดพีนิลแลคติก

ที่มา: ดัดแปลงจาก Perczak และคณะ (2018)

ตัวอย่างงานวิจัยที่ใช้แบคทีเรียกรดแลคติกยับยั้งการเจริญของรา

จากงานวิจัยของ Chung และคณะ (1989) รายงานเกี่ยวกับกลไกการยับยั้งราของรอยเทอริน (reuterin; 3-HPA) โดย *L. reuteri* สามารถผลิตรอยเทอรินที่มีฤทธิ์ยับยั้ง *A. flavus* และ *Fusarium sambucium* ซึ่งรอยเทอรินเป็นสารประกอบประเภทอัลดีไฮด์ โมลโมเลกุลต่ำ มีความคงตัวในสถานะความเป็นกรดเบสในช่วงกว้าง สามารถละลายน้ำได้ มีหมู่อัลดีไฮด์ที่มีความว่องไวในการทำปฏิกิริยาสูง จึงสามารถทำปฏิกิริยากับสารประกอบต่าง ๆ ในสารละลายได้อย่างรวดเร็ว มีโครงสร้างหลายรูปแบบ ดังแสดงในรูปที่ 1.3 อาจจับตัวกันเป็นคู่กลายเป็นโครงสร้างที่อยู่ในรูป HPA dimer หรืออาจมีน้ำอยู่ในโมเลกุล ทำให้อยู่ใน HPA hydrate หรือเกิดการสูญเสียน้ำออกจากโมเลกุล ทำให้อยู่ในรูปอะครอลีน (acrolein) (สุจิตรา เตโซ และคณะ, 2558) ส่วนใหญ่ *Lactobacillus reuteri* สามารถผลิตรอยเทอรินในระหว่างกระบวนการหมักกลีเซอรอลภายใต้สภาวะไม่มีออกซิเจน โดยใช้เอนไซม์กลีเซอรอลดีไฮเดรทาส (glycerol dehydratase) เพื่อเปลี่ยนกลีเซอรอลให้เป็นรอยเทอริน (Talarico และคณะ, 1998) แบคทีเรียสกุล *Lactobacillus* สายพันธุ์อื่น ได้แก่ *L. coryniformis*, *L. fermentum*, *L. plantarum* และ *L. collinoides* สามารถผลิตรอยเทอรินได้

เช่นกัน โดยความสามารถในการผลิตรอยเทอรินขึ้นอยู่กับการมียีนกลีเซอรอลดีไฮเดรราเทส (gld gene) ที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์กลีเซอรอลดีไฮเดรราเทส โดยรอยเทอรินมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์หลายชนิด ได้แก่ แบคทีเรีย ยีสต์ รา และโปรโตซัว เนื่องจากหมู่อัลดีไฮด์จะทำปฏิกิริยากับโปรตีน และสารประกอบที่มีหมู่ไธออล (thiol group) และเอมีนปฐมภูมิ (primary amine) ทำให้โปรตีน และสารประกอบไม่สามารถทำงานได้ปกติ (สุจิตรา เตโซ และคณะ, 2558) อีกทั้งรอยเทอรินสามารถกีดขวางการทำงานของเอนไซม์ไรโบนิวคลีโอไทด์ ไรด์กเทส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ทำให้ยับยั้งการเจริญเติบโตของราสกุล *Aspergillus* และ *Fusarium* ได้ (Perczak และคณะ, 2018)



รูปที่ 1.3. โครงสร้างรอยเทอรินรูปแบบต่าง ๆ (Schaefer และคณะ, 2010)

งานวิจัยของ Magnussorn และคณะ (2001) รายงานว่า *L. coryniformis* subsp. *coryniformis* Si3 สามารถผลิตสารต้านราเป็นสารประเภทโปรตีนขนาดเล็ก (3 kDa) ทนความร้อนได้ดี และมีประสิทธิภาพในการยับยั้งราที่สูงสุดในช่วงค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 3 ถึง 6 และสามารถยับยั้งราได้หลายสายพันธุ์ เช่น *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *P. roqueforti* และ *M. hiemalis*

จากงานวิจัย Lavermicocca และคณะ (2003) ได้ศึกษากรดอินทรีย์ ได้แก่ กรดพีนิลแลคติก (PLA) และกรดไฮดรอกซีพีนิลแลคติก (OH-PLA) ของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศเซลล์ของ *L. plantarum* พบว่าสารประกอบทั้งสองมีฤทธิ์ยับยั้งรา โดย PLA มีประสิทธิภาพสูงสุด และความเข้มข้นของ PLA น้อยกว่า 7.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรนั้นเพียงพอที่จะยับยั้งการเจริญเติบโตของราทั้ง 14 สายพันธุ์ได้ 90 เปอร์เซ็นต์ และพบว่า มีการทำงานร่วมกันระหว่างกรดแลคติก และกรด PLA ทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของราเพิ่มขึ้นประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ของการยับยั้งด้วยกรด PLA

งานวิจัยของ Ammor และคณะ (2006) รายงานว่า ความเป็นกรด เป็นปัจจัยหลักที่เกี่ยวข้องกับความสามารถของแบคทีเรียกรดแลคติกในการยับยั้งรา ซึ่งการหลั่งสารเหล่านี้จะทำให้ค่าความเป็นกรดเบสลดลง ทำให้สภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม จึงควบคุมปริมาณจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในผลิตภัณฑ์อาหารและจุลินทรีย์ท้องถิ่นในลำไส้ของมนุษย์ได้

จากงานวิจัยของ Dalié และคณะ (2010) รายงานเกี่ยวกับกลไกการยับยั้งราของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ส่วนใหญ่จะผลิตเมื่อมีออกซิเจน และเนื่องจากไม่สามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลสได้ จึงมีการสะสมของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ที่มีส่วนประกอบของไขมัน (lipid membrane) และที่โปรตีนในเซลล์รา ทำให้เกิดการยับยั้งราได้

จากงานวิจัยของ Djossou และคณะ (2011) ได้ศึกษาแบคทีเรียกรดแลคติกในไซเลจกาแพ พบว่า *Lactobacillus plantarum* สามารถผลิตกรดอินทรีย์ เพื่อยับยั้งการเจริญของรา *A. carbonarius* ที่ปนเปื้อนในเมล็ดกาแพโรบัสตาได้

จากงานวิจัยของ Cortés-Zavaleta และคณะ (2014) ศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ต่าง ๆ ในการยับยั้งราที่ทำให้อาหารเน่าเสีย พบว่า น้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศเซลล์ของ *L. acidophilus* ATCC-4495 มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งรา *P. expansum* (33.74 เปอร์เซ็นต์) *Botrytis cinerea* (66.82 เปอร์เซ็นต์) และ *Colletotrichum gloeosporioides* (41.57 เปอร์เซ็นต์) ส่วน *L. casei* 21/1 มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งรา *A. flavus* (35.36 เปอร์เซ็นต์)

จากงานวิจัยของ De Melo Pereira และคณะ (2016) ได้ศึกษาแบคทีเรียกรดแลคติกในเมล็ดกาแพที่อยู่ในขั้นตอนการหมัก ได้แก่ *Lactobacillus* sp., *Lactobacillus brevis*, *L. plantarum* และ *Lactobacillus paracasei* สามารถยับยั้งการเจริญของรา *Aspergillus westerdijkiae* ได้ และสามารถยับยั้งได้มากขึ้นเมื่ออยู่ร่วมกับยีสต์

จากงานวิจัยของ Perczak และคณะ (2018) ศึกษาความสามารถของแบคทีเรียแลคติกยับยั้งการเจริญเติบโตของรา โดยแบคทีเรียแลคติกกลุ่ม heterofermentation สามารถผลิตกรดอะซีติกและกรดโพรพิโอนิก (ไม่สามารถแยกจากกันได้ด้วยค่าความเป็นกรดเบส) นอกจากนี้ ยังสามารถดูดซึมกรดอะมิโนที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ราได้อีกด้วย กรดโพรพิโอนิกที่มีความเป็นกรดเบสต่ำ ช่วยเพิ่มความสามารถในการต้านราที่ความเข้มข้นเกลือได้หลากหลาย

กลไกที่แบคทีเรียกรดแลคติกใช้ลดปริมาณสารพิษจากรา อาจเกิดจากกลไกการดูดซับสารพิษจากรา โดยอาศัยส่วนประกอบของชั้นผนังเซลล์ ซึ่งกระบวนการนี้เป็นกระบวนการที่ผันกลับได้ และการผลิตสารยับยั้งรา เช่น กรดอินทรีย์ จะทำให้สภาวะภายในเซลล์ราไม่เหมาะสม โดยกรดอินทรีย์สามารถแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าไปในเซลล์รา ทำให้ค่าความต่างศักย์ของโปรตอนในเซลล์มีสภาวะเป็นกลางมากขึ้น เมื่อผ่านเข้าไปในเซลล์แล้ว จะทำให้ค่าความเป็นกรดเบสภายในเซลล์ต่ำลง จึงยับยั้งการทำงานของกระบวนการเมแทบอลิซึมในเซลล์ราได้ โดยประสิทธิภาพในการดูดซับจะขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ เช่น ชนิดสารพิษจากรา ปริมาณสารพิษที่สะสมสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติก ชนิดและปริมาณกรดอินทรีย์ และสภาวะแวดล้อม (Dalié และคณะ, 2010; Taheur และคณะ, 2019)

ตัวอย่างงานวิจัยที่ใช้แบคทีเรียกรดแลคติกลดปริมาณสารพิษจากรา

จากงานวิจัยของ Zinedine และคณะ (2005) ศึกษาความสามารถของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากแป้งเปรี้ยวในการลดปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกสกุล *Lactobacillus* สามารถจับกับอะฟลาทอกซินบี 1 ได้ดีกว่า *Pediococcus* และ *Leuconostoc* โดย *L. rhamnosus* Lb50 มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการลดปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 เท่ากับ 45 เปอร์เซ็นต์

จากงานวิจัยของ Fuchs และคณะ (2008) รายงานความสามารถของแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละสายพันธุ์ในการยับยั้งสารพิษจากรา โดย *L. acidophilus* สามารถยับยั้งได้ดีที่สุด (97 เปอร์เซ็นต์) รองลงมาคือ *Bifidobacterium longum* (58 เปอร์เซ็นต์) *L. plantarum* (44 เปอร์เซ็นต์) *L. lactis* (34 เปอร์เซ็นต์) *L. casei* (31 เปอร์เซ็นต์) และ *L. bulgaricus* (29 เปอร์เซ็นต์) ตามลำดับ

จากงานวิจัยของ Gomah และคณะ (2014) พบว่า *L. paracasei* subsp. *paracasei* สามารถลดปริมาณการผลิตสารพิษจากรา *Fusarium* ได้แก่ ตีออกซีนิวาลินอล (56.8 เปอร์เซ็นต์) ซีราลีโนน (73.0 เปอร์เซ็นต์) และฟูโมนิซินบี (76.5 เปอร์เซ็นต์) แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของราได้

จากงานวิจัยของ Da Silva และคณะ (2015) พบว่า ยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* และแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถลดความเป็นพิษของสารพิษจากราในอาหาร โดยการดูดซับบนผนังเซลล์ของรา โดยยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* มีความสำคัญในการผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์และเชื้อเพลิงชีวภาพ ส่วนแบคทีเรียกรดแลคติกมีความสำคัญในอุตสาหกรรมอาหาร ช่วยป้องกันการปนเปื้อนจุลินทรีย์ที่เป็นอันตราย

งานวิจัยของ Taheur และคณะ (2019) รายงานว่า กลไกที่ใช้ลดปริมาณสารพิษจากรา เกิดจากกลไกการดูดซับของแบคทีเรียกรดแลคติก ด้วยสารเมแทบอลิต์ที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติก เช่น กรดอินทรีย์ การผลิตสารเหล่านี้จะทำให้เกิดสภาวะภายในเซลล์ราไม่เหมาะสม โดยกรดเหล่านี้สามารถแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าไปในเซลล์รา ทำให้เกิดการหยุดชะงักของเยื่อหุ้มเซลล์ กลไกภายในเซลล์ราจึงหยุดการทำงาน

จากงานวิจัยของกาญจนารักษ์ สุดเสงี่ยม (2019) ได้คัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกในตัวอย่างกาแฟหลังการเก็บเกี่ยวและประเมินผลการเป็นปฏิปักษ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกต่อราที่ผลิตโอคราทอกซินเอ พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลท MW2A ที่แยกได้จากน้ำหมักเมล็ดกาแฟของสถานีวิจัยโครงการหลวงแม่หลอด และไอโซเลท PF1B ที่แยกได้จากเมล็ดกาแฟหมักของศูนย์พัฒนาโครงการหลวงป่าเมี่ยง ให้ผลการยับยั้งการเจริญของราที่ผลิตโอคราทอกซินได้ดี เมื่อเทียบกับแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลทอื่น ๆ อย่างไรก็ตามงานวิจัยดังกล่าวยังไม่ทราบผลการเป็นปฏิปักษ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกต่อราที่ผลิตอะฟลาทอกซินและกลไกของแบคทีเรียกรดแลคติกปฏิปักษ์ที่แน่ชัดในการยับยั้งรา

ดังนั้น โครงการนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาความสามารถและกลไกของแบคทีเรียกรดแลคติกปฏิปักษ์ ไอโซเลท MW2A และ PF1B ต่อการเจริญและการผลิตสารพิษจากราของ *A. flavus* และ *A. carbonarius*

บทที่ 2

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. กรวยกรอง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 50 มิลลิเมตร บริษัท Pyrex, Germany
2. กระจกปิดสไลด์ ขนาด 22 x 28 มิลลิเมตร บริษัท Manzel-Glaser, Germany
3. กระดาษกรองเบอร์ 1 ขนาด 110 มิลลิเมตร บริษัท Whatman, USA
4. กระบอกฉีดยา (syringe) ขนาด 1, 10 และ 20 มิลลิลิตร บริษัท Nipro, USA
5. กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแบบธรรมดา ยี่ห้อ Olympus บริษัท อีฟอ์แอล อินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด, Japan
6. ขวดรูปخمพู่ ขนาด 250 และ 1,000 มิลลิลิตร บริษัท Pyrex, Germany
7. ขวดใส่สารละลาย ขนาด 500 และ 1000 มิลลิลิตร บริษัท Duran, Germany
8. เครื่องชั่ง รุ่น PG6002-5 และ AG285 บริษัท Mettler Toledo, Switzerland
9. เครื่องดูดจ่ายสารละลาย (pipette aid) รุ่น YP17CAF0004076 บริษัท DLAB Scientific, China
10. เครื่องนิ่งฆ่าเชื้อไอน้ำ รุ่น SS-325 และ ES-315 บริษัท Tomy Digital Biology, Japan
11. เครื่องนิ่งฆ่าเชื้อไอน้ำ บริษัท Kakusan, Japan
12. เครื่องปั่นผสม (vortex mixer) รุ่น G-560E บริษัท Scientific Industries, USA
13. เครื่องเปลี่ยนอากาศเป็นแก๊สไนโตรเจน ยี่ห้อ Peak scientific, UK
14. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV-visible spectrophotometer) บริษัท Thermo Scientific Biomate 3S, USA
15. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-เบส (pH meter) รุ่น Seven Easy บริษัท Mettler Toledo, Thailand
16. เครื่องหมุนเหวี่ยง บริษัท Kubota Laboratory, Japan
17. จานเพาะเลี้ยงเชื้อแก้ว (petri dish) ขนาด 15 x 100 มิลลิเมตร บริษัท Pyrex, England
18. ชุดกรองสุญญากาศ บริษัท Merck Millipore, USA
 - กรวยกรองแก้ว ปริมาตร 300 มิลลิลิตร
 - กระดาษกรอง ขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร
 - ขวดรูปخمพู่ ขนาด 1,000 มิลลิลิตร
 - คีบ์ล็อกอะลูมิเนียม
 - เครื่องปั๊ม
 - จุกสุญญากาศ

19. ชุดโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)
 - คอลัมน์ (column) C18 ขนาด 250 x 4.6 มิลลิเมตร, 5 ไมโครลิตร รุ่น Luna บริษัท Phenomenex, USA
 - คอลัมน์ (column) C18 ขนาด 150 x 4.6 มิลลิเมตร, 5 ไมโครลิตร รุ่น Luna บริษัท Phenomenex, USA
 - เครื่องตรวจวัดชนิดฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence detector) รุ่น Prostar บริษัท Varian, USA
 - เครื่องปั๊ม autosample รุ่น Prostar บริษัท Varian, USA
20. ตู้เขี่ยเชื้อ รุ่น Mark II ยี่ห้อ Clean บริษัท Lab Service, Thailand
21. ตู้เขี่ยเชื้อ รุ่น V6-T ขนาด 2 x 4 ฟุต บริษัท Lab Micro, Thailand
22. ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส บริษัท Memmert, Thailand
23. ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บริษัท Memmert, Thailand
24. ตู้เย็น อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส บริษัท Sandenintercool, Thailand
25. ตู้แช่จุดเยือกแข็งต่ำ อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส บริษัท Sandenintercool, Thailand
26. ตู้อบแห้ง บริษัท Contherm Scientific Limited, New Zealand
27. ถุงมือไนไตรล์ ยี่ห้อ SemperGuard รุ่น 0537 บริษัท Siamsempered, Thailand
28. ถุงมือยาง ยี่ห้อ ศรีตรังโกลฟ์, Thailand
29. ที่วางหลอดทดลอง (test tube rack)
30. ปีกเกอร์ ขนาด 250, 500 และ 1000 มิลลิลิตร บริษัท Pyrex, Germany
31. ปิเปตต์แก้ว ขนาด 1 มิลลิลิตร ยี่ห้อ Qualicolor, Germany
32. แผ่นพาราฟิล์ม บริษัท Menasha, Thailand
33. พาสเจอร์ปิเปตต์แก้ว ขนาด 150 มิลลิลิตร ยี่ห้อ Volac, UK
34. ไมโครปิเปตต์ ขนาด 20, 200, 1000 และ 5000 มิลลิลิตร บริษัท Eppendorf, Germany
35. ไมโครปิเปตต์ทิวป์ (Micropipette tip) ขนาด 200 และ 1000 มิลลิลิตร ยี่ห้อ Hycon บริษัท Biomed, Thailand
36. สไลด์ ขนาด 25.6 x 76.2 มิลลิเมตร ยี่ห้อ Sali Brand, China
37. หลอดเซนตริฟิวก์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ยี่ห้อ Hycon บริษัท Biomed, Thailand
38. หลอดทดลองขนาด 10 x 100 และ 22 x 200 มิลลิเมตร บริษัท Pyrex, Germany
39. หลอดทดลองฝาเกลียว ขนาด 13 x 100 มิลลิลิตร บริษัท Pyrex, Germany
40. หัวกรองสำเร็จรูป ชนิด Polyethersulfon (PES) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 25 มิลลิเมตร ขนาดรูพรุน 0.2 ไมโครเมตร ยี่ห้อ Whatman, USA
41. หัวกรองสำเร็จรูป ชนิด Polyetrafluoroethylene (PTFE) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 13 มิลลิเมตร ขนาดรูพรุน 0.22 ไมโครเมตร บริษัท Lubitech Technologies, China

42. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น WB14 บริษัท Memmert, Germany
43. อ่างอัลตราโซนิก (ultrasonic bath) รุ่น SONOREX RX 100 บริษัท Bandelin Electronic, Germany
44. ฮีมาไซโตมิเตอร์ (hemocytometer) ยี่ห้อ Boeco, Germany

เคมีภัณฑ์

1. กรดฟอร์มิก (CH_2O_2) บริษัท Merck, Germany
2. กรดอะซิติก (CH_3COOH) บริษัท Merck, Germany
3. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) บริษัท Merck, Germany
4. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) บริษัท Ajax Finechem, Australia
5. ผงวุ้น บริษัท Difco Laboratories, USA
6. โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) บริษัท Merck, Germany
7. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) บริษัท Merck, Germany
8. เมทานอล (CH_3OH) บริษัท Merck, Germany
9. สารละลายมาตรฐานอะฟลาทอกซินบี 1 บริษัท Sigma-Aldich, USA
10. สารละลายมาตรฐานโอคราทอกซินเอ บริษัท Sigma-Aldich, USA
11. อะซิโตนไทรล์ (CH_3CN) ยี่ห้อ RCI Labscan บริษัท V.S.CHEM HOUSE, Thailand
12. de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) Agar บริษัท Difco Laboratories, USA
13. Peptone บริษัท HiMedia Laboratories, India
14. Potato Dextrose Agar บริษัท Difco Laboratories, USA
15. Potato Dextrose Broth บริษัท Difco Laboratories, USA
16. Tween 80 บริษัท Merck, Germany

จุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ

1. *Aspergillus carbonarius* TK4.2
2. *Aspergillus flavus* M3T8R403
3. แบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลท MW2A (LAB-MW2A)
4. แบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลท PF1B (LAB-PF1B)

จุลินทรีย์ที่ใช้ทั้งหมดในงานวิจัยถูกเก็บรักษาที่คลังจุลินทรีย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีดำเนินงานวิจัย

2.1 การติดตามการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติก

นำแบคทีเรียกรดแลคติก LAB-MW2A และ LAB-PF1B มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว จากนั้น นำโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ติดตามการเจริญของแบคทีเรียโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ทุก 20 นาทีใน 4 ชั่วโมงแรก หลังจากนั้นวัดทุก 1 ชั่วโมง จนครบ 24 ชั่วโมง แล้วนำไปสร้างกราฟสังเกตการเจริญของเชื้อ เพื่อใช้แบคทีเรียกรดแลคติกในช่วง mid-log phase เป็นหัวเชื้อสำหรับการทดลองขั้นต่อไป

2.2 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์

2.2.1 การเตรียมเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกแขวนลอย

นำแบคทีเรียกรดแลคติก LAB-MW2A และ LAB-PF1B มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว จากนั้น นำโคโลนีเดี่ยวที่แยกได้มาเตรียมเป็น working culture ในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ต่อมา ถ่ายหัวเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่ได้ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS 5 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง 30 นาที และ 6 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกเจริญอยู่ในช่วง mid log phase จากนั้น นำเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกถ่ายลงหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกด้วย phosphate buffered saline (PBS) (ภาคผนวก ข) ผสมให้เข้ากันและปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 2 ครั้ง แล้วละลายตะกอนเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกด้วย PBS

2.2.2 การเตรียมสปอร์ราแขวนลอย

นำ *A. flavus* M3T8R403 และ *A. carbonarius* TK4.2 มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Potato dextrose agar (PDA) (ภาคผนวก ก) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้น ขูดสปอร์ราโดยใช้ physiological water (ภาคผนวก ข) นับจำนวนสปอร์ราที่ได้ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ ปรับปริมาณความเข้มข้นสปอร์ให้ได้ประมาณ 1×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

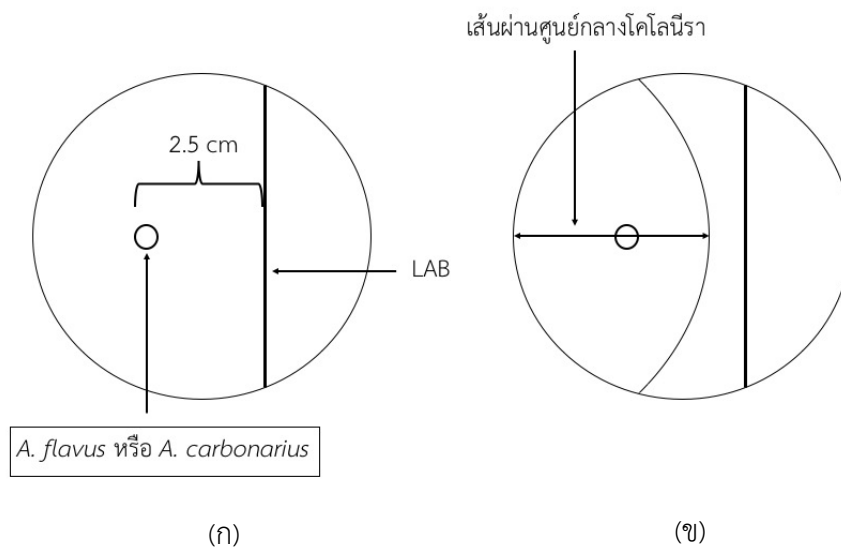
2.2.3 การเตรียมน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกแบบผง

นำแบคทีเรียกรดแลคติก LAB-MW2A และ LAB-PF1B มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้น นำเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกมาปั่นเหวี่ยงที่ 8,500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำไปกรองผ่านหัวกรองสำเร็จรูปที่มีขนาดรูพรุน 0.22 ไมโครเมตร แล้วเก็บน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกโดยทำให้เป็นผงผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze-drying) ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.3 ศึกษาความสามารถของแบคทีเรียกรดแลคติกปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษจากราของ *A. flavus* M3T8R403 และ *A. carbonarius* TK4.2

ศึกษาความสามารถของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งสองไอโซเลทในการยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษจากราของ *A. flavus* และ *A. carbonarius* ด้วยวิธี Dual culture ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Pantelides และคณะ (2015) โดยใช้ห้วงเชื้อเชื้อขีตเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกแขวนลอยจากข้อ 2.2.1 ให้เป็นเส้นตรงลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS แล้วหยดสปอร์ราแขวนลอยจากข้อ 2.2.2 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ให้ห่างจากรอยขีตเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติก 2.5 เซนติเมตร (ภาพที่ 2.1 ก) รอให้แห้งสนิท แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS ที่ขีต MRS ที่ปราศจากเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นเส้นตรงและหยดสปอร์ราแขวนลอย ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เป็นชุดควบคุม จากนั้น วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีรา (ภาพที่ 2.1 ข) ณ วันที่ 7 ของการบ่ม ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของรา จากนั้นสกัดและวิเคราะห์ปริมาณอะฟลาทอกซินและโอคราทอกซินเอตามวิธีในข้อ 2.5

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง} = \frac{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีราของชุดควบคุม} - \text{เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีราของชุดทดสอบ}}{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีราของชุดควบคุม}} \times 100$$



ภาพที่ 2.1 (ก) ลักษณะการเลี้ยงเชื้อด้วยวิธี Dual culture technique (ข) วิธีการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีรา หลังจากบ่มครบ 7 วัน

2.4 ศึกษากลไกของแบคทีเรียกรดแลคติกในการยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* M3T8R403 และ *A. carbonarius* TK4.2

2.4.1 ทดสอบความสามารถของแบคทีเรียกรดแลคติกในการยับยั้งการเจริญของรา ด้วยวิธี Agar spot assay ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Hassan และคณะ (2008)

การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียกรดแลคติกในการยับยั้งการเจริญของรา ทำได้โดยแบ่งชุดทดสอบเป็น 3 รูปแบบ คือ เซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกแขวนลอย น้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติก (cell-free supernatant; CFS) และน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกที่ผ่านการให้ความร้อน (heated cell-free supernatant) (ตารางที่ 2.1) โดยใช้เซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกแขวนลอยจากข้อ 2.2.1 ส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติก และน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกที่ผ่านการให้ความร้อน เตรียมโดยบ่มแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารเหลว MRS ให้อยู่ในช่วง mid-log phase จากนั้นนำมากรอง เพื่อแยกเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกออก ได้เป็นน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติก แล้วแบ่งส่วนหนึ่งไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ได้เป็นน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกที่ผ่านการให้ความร้อน

สำหรับการทดสอบความสามารถในการยับยั้งรา ทำได้โดยหดยดเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกแขวนลอย น้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติก หรือน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกที่ผ่านการให้ความร้อน ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS จำนวน 2 หยด บ่มที่อุณหภูมิ 30

องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำมาเททับผิวหน้าด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (0.8% agar) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่มีสปอร์ราแขวนลอยจากข้อ 2.2.2 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร วางทิ้งไว้ให้แข็ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้ววัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณที่เกิดการยับยั้งการเจริญของรา โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว PBS และ MRS เป็นชุดควบคุมสำหรับเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกแขวนลอยและน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติก

ตารางที่ 2.1 ชุดทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียกรดแลคติกปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* และ *A. carbonarius* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ชุดทดสอบ	แบคทีเรียกรดแลคติก
ชุดควบคุม 1	ใช้ PBS แทนเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกแขวนลอย
ชุดควบคุม 2	ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS แทนน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติก
1	LAB-MW2A (เซลล์แขวนลอย)
2	LAB-PF1B (เซลล์แขวนลอย)
3	LAB-MW2A (น้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์)
4	LAB-PF1B (น้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์)
5	LAB-MW2A (น้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ที่ผ่านการให้ความร้อน)
6	LAB-PF1B (น้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ที่ผ่านการให้ความร้อน)

2.4.2 ทดสอบความสามารถของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกในการยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* M3T8R403 และ *A. carbonarius* TK4.2 ด้วยวิธี Agar diffusion

การทดสอบความสามารถของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกในการยับยั้งการเจริญของรา ทำได้โดยแบ่งชุดทดสอบเป็น 2 รูปแบบ คือ น้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติก (cell-free supernatant; CFS) และน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกที่ผ่านการให้ความร้อน (heated cell-free supernatant) (ตารางที่ 2.2) โดยเตรียมน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติก และน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกที่ผ่านการให้ความร้อน เช่นเดียวกับข้อ 2.4.1

สำหรับการทดสอบความสามารถในการยับยั้งรา ทำได้โดยหยดน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติก หรือน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกที่ผ่านการให้ความร้อน ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในหลุมอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS ที่กระจายสปอร์ราแขวนลอยจากข้อ 2.2.2 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ไว้แล้ว จากนั้น บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้ววัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณที่เกิดการยับยั้งการเจริญของรา โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS เป็นชุดควบคุม

ตารางที่ 2.2 ชุดทดสอบประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกปฏิบัฏยั้งการเจริญของ *A. flavus* และ *A. carbonarius* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ชุดทดสอบ	แบคทีเรียกรดแลคติก
ชุดควบคุม	ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS แทนน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติก
1	LAB-MW2A (น้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์)
2	LAB-PF1B (น้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์)
3	LAB-MW2A (น้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ที่ผ่านการให้ความร้อน)
4	LAB-PF1B (น้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ที่ผ่านการให้ความร้อน)

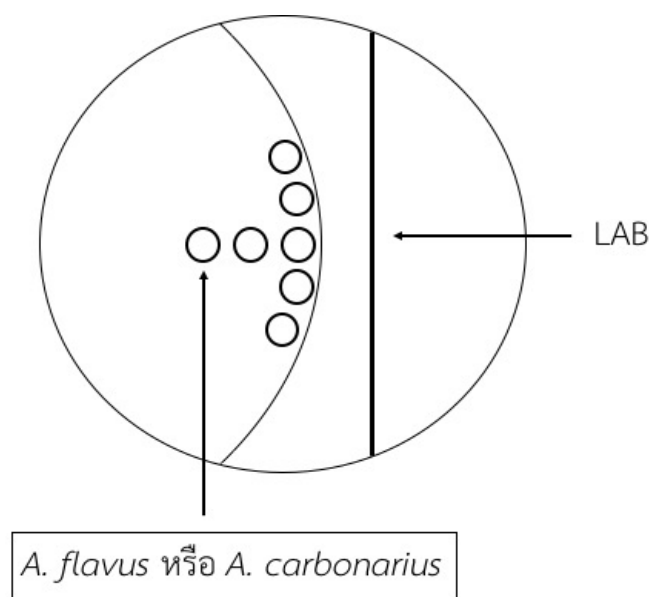
2.4.3 หาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถยับยั้งการเจริญของรา (Minimum Inhibitory Concentration: MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถฆ่าราได้ (Minimum Fungicidal Concentration: MFC)

นำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละชนิดในภาวะที่ให้ผลการยับยั้งการเจริญของราดีที่สุดจากข้อ 2.4.1 และ 2.4.2 เพื่อหาค่า MIC และ MFC โดยเติมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว PDB 180 ไมโครลิตร ลงในจานหลุม 96 หลุม (96 well plate) แล้วเติมน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกแบบผงจากข้อ 2.2.3 ที่ละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ลงในหลุมแรก เจือจางความเข้มข้นจากหลุมแรกจนได้ค่าความเข้มข้นที่แตกต่างกัน แล้วเติมสปอร์ราแขวนลอยจากข้อ 2.2.2 ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุมที่มีน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน สังเกตการเจริญของราจากความขุ่นของแต่ละหลุม ทำการทดลอง 3 ซ้ำ เพื่อหาค่า MIC และนำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกจากค่าความเข้มข้นที่ไม่พบการเจริญของราในหลุม ปริมาตร 10 ไมโครลิตร มากระจายลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ เพื่อหาค่า MFC

2.5 การสกัดและวิเคราะห์ปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 และโอคราทอกซินเอ

ชั่งน้ำหนักขวดสกัดพร้อมฝา จากนั้นจะอุ่นอาหารที่มีโคโลนีของรา หลังบ่มเป็นเวลา 7 วัน จำนวน 6 ชิ้น (ภาพที่ 2.2) ใส่ในขวดสกัด แล้วนำไปชั่งน้ำหนักอีกครั้ง แล้วเติมเมทานอล ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร เพื่อสกัดอะฟลาทอกซินบี 1 หรือเติมเมทานอลผสมกรดฟอร์มิก ในอัตราส่วน 25:1 ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร เพื่อสกัดโอคราทอกซินเอ ใส่ในอ่างอัลตราโซนิก เป็นเวลา 15 นาที นำไปกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 แล้วระเหยแห้งด้วยแก๊สไนโตรเจนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จากนั้น เติมนิวคลีเอตสำหรับอะฟลาทอกซินบี

1 (อะซีโทไนไตรล์ : น้ำปลอดประจุ : เมทานอล เท่ากับ 20:60:20) หรือเฟสเคลื่อนที่สำหรับโอคราทอกซินเอ (อะซีโทไนไตรล์ : น้ำปลอดประจุ : กรดอะซีติก เท่ากับ 49.5:49.5:1) แล้วกรองผ่านหัวกรองสำเร็จรูปที่มีขนาดรูพรุน 0.22 ไมโครเมตร แล้วนำส่วนของเหลวไปส่งวิเคราะห์หาปริมาณสารพิษด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี อาคารสถาบัน 2 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับอะฟลาทอกซินบี 1 วิเคราะห์ผ่านคอลัมน์ C18 (150 x 4.60 มิลลิเมตร, 5 ไมโครเมตร) โดยใช้เครื่องตรวจวัดชนิดฟลูออเรสเซนซ์ excitation wavelength (λ_{exc}) เท่ากับ 365 นาโนเมตร และ emission wavelength (λ_{em}) เท่ากับ 435 นาโนเมตร ควบคุมให้มีอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และ retention time (RT) เท่ากับ 7 นาที สำหรับโอคราทอกซินเอ วิเคราะห์ผ่านคอลัมน์ C18 (250 x 4.60 มิลลิเมตร, 5 ไมโครเมตร) โดยใช้เครื่องตรวจวัดชนิดฟลูออเรสเซนซ์ excitation wavelength (λ_{exc}) เท่ากับ 333 นาโนเมตร และ emission wavelength (λ_{em}) เท่ากับ 477 นาโนเมตร ควบคุมให้มีอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และ retention time (RT) เท่ากับ 10 นาที



ภาพที่ 2.2 วิธีการเจาะวุ้นบริเวณโคโลนีราเพื่อนำมาวิเคราะห์ปริมาณสารพิษจากรา

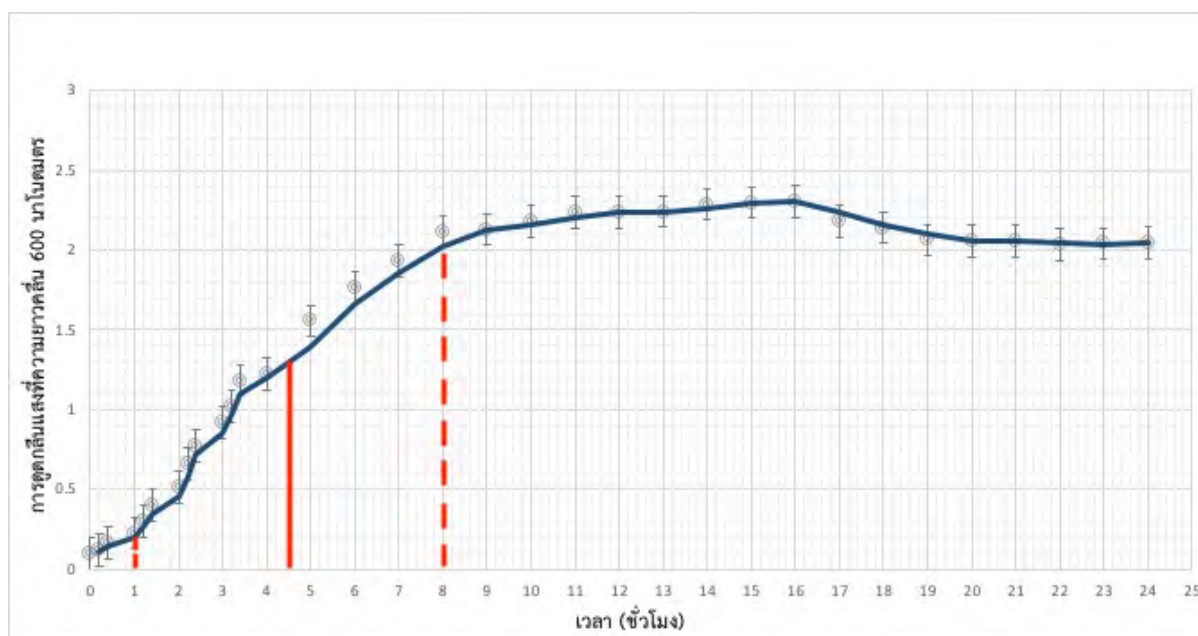
บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 การเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติก

3.1.1 การติดตามการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลท LAB-MW2A

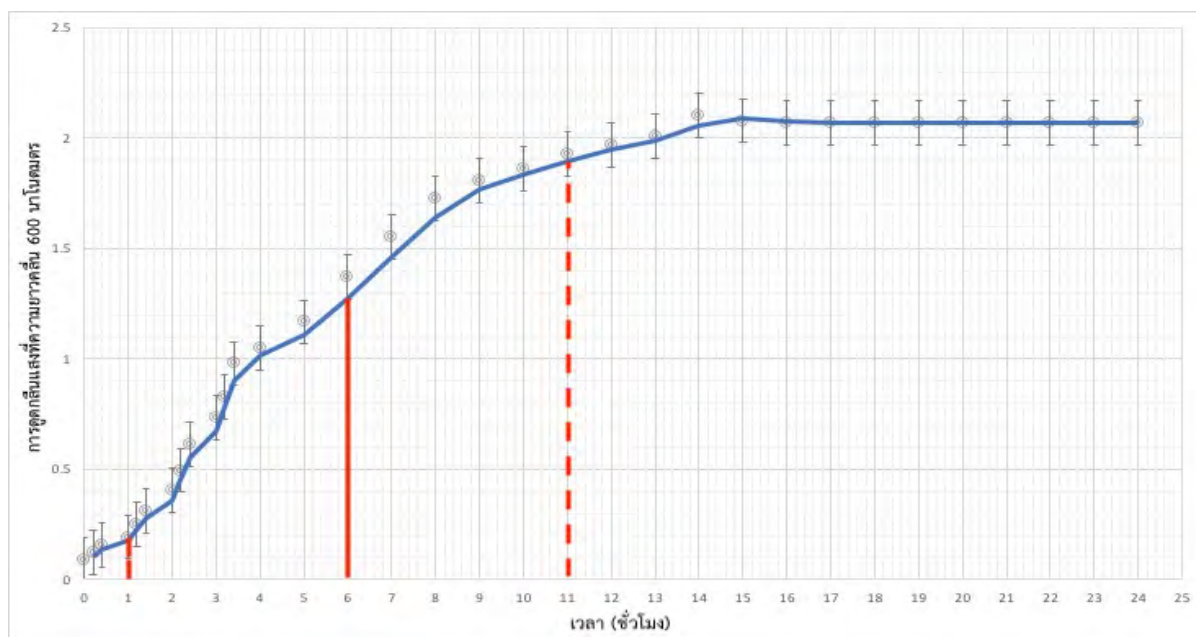
ผลการติดตามการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลท LAB-MW2A โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกมีช่วงการเจริญในระยะเอกซ์โพเนนเชียลที่ 1-8 ชั่วโมง และมีระยะ mid log phase ที่ 4 ชั่วโมง 30 นาที ดังแสดงในภาพที่ 3.1



ภาพที่ 3.1 กราฟการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลท LAB-MW2A ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

3.1.2 การติดตามการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลท LAB-PF1B

ผลการติดตามการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลท LAB-PF1B โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกมีช่วงการเจริญในระยะเอ็กซ์โพเนนเชียลที่ 1-11 ชั่วโมง และมีระยะ mid log phase ที่ 6 ชั่วโมง ดังแสดงในภาพที่ 3.2



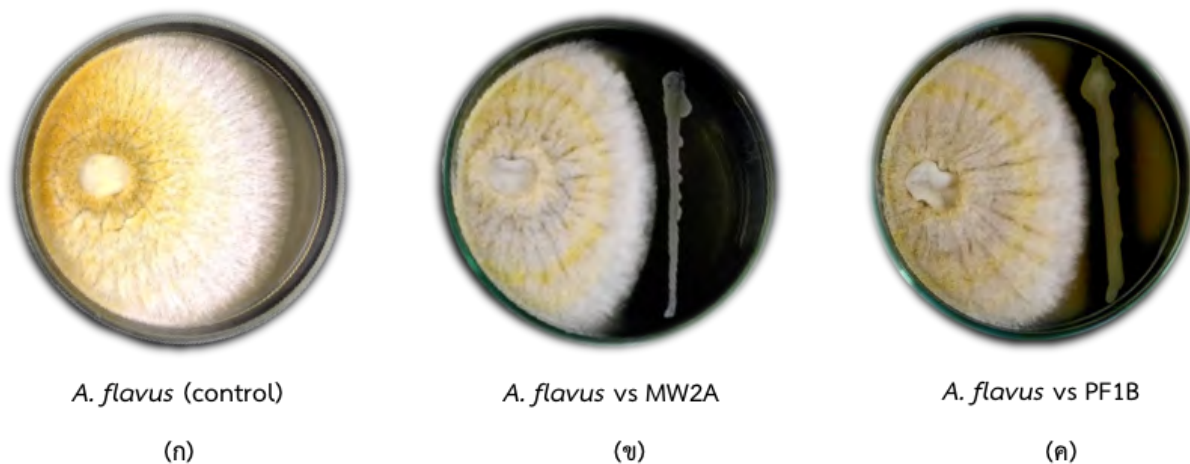
ภาพที่ 3.2 กราฟการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลท LAB-PF1B ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

3.2 การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียกรดแลคติกปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษจากราของ *A. flavus* M3T8R403 และ *A. carbonarius* TK4.2 ด้วยวิธี Dual culture

3.2.1 การยับยั้งการเจริญของรา *A. flavus*

จากผลการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียกรดแลคติกปฏิปักษ์แต่ละไอโซเลทในการยับยั้งการเจริญของรา *A. flavus* ด้วยวิธี Dual culture พบว่า ในชุดทดสอบที่เลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกร่วมกับรา ไม่พบการเจริญของเส้นใยราที่บริเวณใกล้กับรอยเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติก (ภาพที่ 3.3) นอกจากนี้สปอร์รา มีสีจางลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุม (ภาพที่ 3.3) เมื่อพิจารณาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญจากตารางที่ 3.1 พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลท PF1B ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของราสูงสุด เท่ากับ 24.93

เปอร์เซ็นต์ ส่วนไอโซเลท MW2A ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของรา เท่ากับ 24.11 เปอร์เซ็นต์ โดยแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งสองไอโซเลทมีความสามารถในการยับยั้งราไม่แตกต่างกัน



ภาพที่ 3.3 การเจริญของรา *A. flavus* เมื่อเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียกรดแลคติกปฏิปักษ์ด้วยวิธี Dual culture บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน (ก) ชุดควบคุม (ข) LAB-MW2A ที่เลี้ยงร่วมกับรา *A. flavus* และ (ค) LAB-PF1B ที่เลี้ยงร่วมกับ *A. flavus*

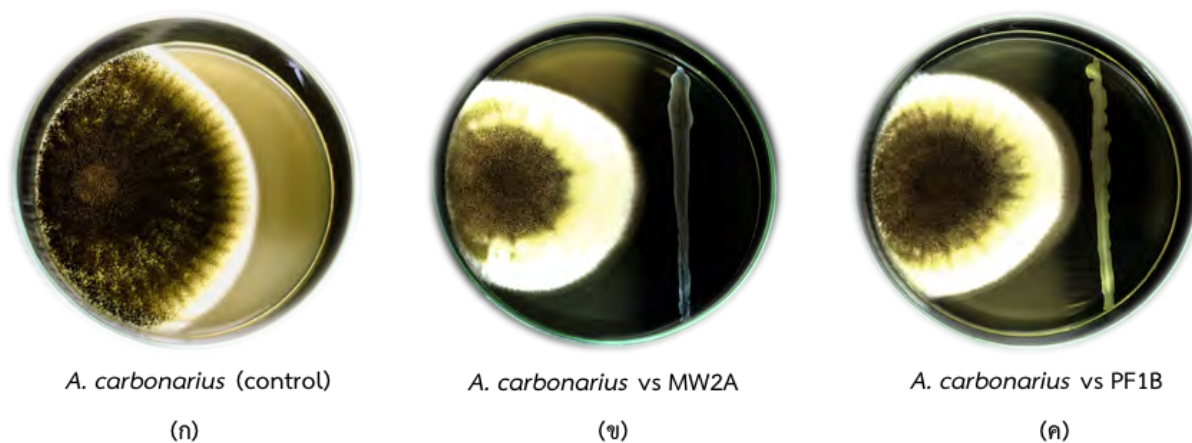
ตารางที่ 3.1 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียกรดแลคติกปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของรา *A. flavus* ด้วยวิธี Dual culture บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

การทดลอง	ขนาดของโคโลนีรา (เซนติเมตร)*	การยับยั้งการเจริญ (เปอร์เซ็นต์)*
ชุดควบคุม	8.0 ± 0.17	-
LAB-MW2A	6.07 ± 0.21	24.11 ± 3.84
LAB-PF1B	6.00 ± 0.43	24.93 ± 6.23

*ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ

3.2.2 การยับยั้งการเจริญของรา *A. carbonarius*

จากผลการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียกรดแลคติกปฏิปักษ์แต่ละไอโซเลทในการยับยั้งการเจริญของรา *A. carbonarius* ด้วยวิธี Dual culture พบว่า ในชุดทดสอบที่เลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกร่วมกับรา ขนาดโคโลนีราลดลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุม และไม่พบการเจริญของเส้นใยราที่บริเวณใกล้กับรอยเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติก (ภาพที่ 3.4) นอกจากนี้สปอร์ราที่มีสีจางลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุม (ภาพที่ 3.4) เมื่อพิจารณาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญจากตารางที่ 3.2 พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลท MW2A ยับยั้งการเจริญได้ดีกว่า PF1B โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของรา เท่ากับ 21.37 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 3.4 การเจริญของรา *A. carbonarius* เมื่อเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียกรดแลคติกปฏิชีวน์ด้วยวิธี Dual culture บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน (ก) ชุดควบคุม (ข) LAB-MW2A ที่เลี้ยงร่วมกับรา *A. carbonarius* และ (ค) LAB-PF1B ที่เลี้ยงร่วมกับ *A. carbonarius*

ตารางที่ 3.2 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียกรดแลคติกปฏิชีวน์ในการยับยั้งการเจริญของรา *A. carbonarius* ด้วยวิธี Dual culture บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

การทดลอง	ขนาดของโคโลนีรา (เซนติเมตร)*	การยับยั้งการเจริญ (เปอร์เซ็นต์)*
ชุดควบคุม	6.63 ± 0.15	-
LAB-MW2A	5.22 ± 0.58	21.37 ± 8.57
LAB-PF1B	5.40 ± 0.40	18.56 ± 6.59

*ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ

3.2.3 การยับยั้งการผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ของ *A. flavus*

จากผลการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียกรดแลคติกปฏิชีวน์แต่ละไอโซเลทในการยับยั้งการผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ของ *A. flavus* พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกทั้งสองไอโซเลท ไม่มีประสิทธิภาพในการลดปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 โดย *A. flavus* ที่เลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียกรดแลคติกผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ได้เพิ่มมากขึ้น เมื่อเทียบกับชุดควบคุม ดังแสดงในตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียกรดแลคติกปฏิบั้กซ์ในการยับยั้งการผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ของ *A. flavus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง MRS ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

การทดลอง	การผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 (นาโนกรัมต่อกรัม)*	การลดลงของอะฟลาทอกซินบี 1 (เปอร์เซ็นต์)*
ชุดควบคุม	27.34 ± 4.77	-
LAB-MW2A	82.52 ± 21.17	-208.58 ± 110.72
LAB-PF1B	135.75 ± 45.21	-381.42 ± 117.87

*ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ

3.2.4 การยับยั้งการผลิตโอคราทอกซินเอของ *A. carbonarius*

จากผลการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียกรดแลคติกปฏิบั้กซ์แต่ละไอโซเลทในการยับยั้งการผลิตโอคราทอกซินเอของ *A. carbonarius* พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกทั้งสองไอโซเลทสามารถลดการผลิตโอคราทอกซินเอได้ โดยแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลท MW2A มีประสิทธิภาพในการลดปริมาณโอคราทอกซินเอ ได้ดีกว่าไอโซเลท PF1B เล็กน้อย โดยให้เปอร์เซ็นต์การลดลงของโอคราทอกซินเอมากที่สุด เท่ากับ 84.32 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 3.4

ตารางที่ 3.4 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียกรดแลคติกปฏิบั้กซ์ในการยับยั้งการผลิตโอคราทอกซินเอของ *A. carbonarius* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง MRS ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

การทดลอง	การผลิตโอคราทอกซินเอ (นาโนกรัมต่อกรัม)*	การลดลงของโอคราทอกซินเอ (เปอร์เซ็นต์)*
ชุดควบคุม	378.50 ± 76.27	-
LAB-MW2A	57.72 ± 21.93	84.32 ± 6.31
LAB-PF1B	70.49 ± 23.27	80.59 ± 7.12

*ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ

บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

เนื่องจากงานวิจัยฉบับนี้เป็นการศึกษาต่อจากงานวิจัยของกาญจนารณ์ สุดเสงี่ยม (2019) ซึ่งได้คัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกในตัวอย่างกาแฟหลังการเก็บเกี่ยวและประเมินผลการเป็นปฏิปักษ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกต่อราที่ผลิตโอคราทอกซินเอ ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกปฏิปักษ์ที่ได้จากการคัดแยกมี 2 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท MW2A และ PF1B ที่แยกได้จากน้ำหมักเมล็ดกาแฟของสถานีวิจัยโครงการหลวงแม่หลอดและเมล็ดกาแฟหมักของศูนย์พัฒนาโครงการหลวงป่าเมี่ยง อย่างไรก็ตาม งานวิจัยดังกล่าวยังไม่ทราบผลการเป็นปฏิปักษ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกต่อราที่ผลิตอะฟลาทอกซินและกลไกของแบคทีเรียกรดแลคติกปฏิปักษ์ที่แน่ชัดในการยับยั้งรา ดังนั้น งานวิจัยฉบับนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสามารถและกลไกของแบคทีเรียกรดแลคติกปฏิปักษ์ไอโซเลท MW2A และ PF1B ต่อการเจริญและการผลิตสารพิษจากรา *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus carbonarius*

4.1 การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียกรดแลคติกปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษของรา *A. flavus* M3T8R403 และ *A. carbonarius* TK4.2 ด้วยวิธี Dual culture

จากการศึกษาผลของแบคทีเรียกรดแลคติกปฏิปักษ์ต่อการยับยั้งการเจริญและสารพิษจากราของ *A. flavus* และ *A. carbonarius* ด้วยวิธี Dual culture พบว่า การใช้แบคทีเรียกรดแลคติกทั้งไอโซเลท MW2A และ PF1B สามารถยับยั้งการเจริญของรา *A. flavus* และ *A. carbonarius* ได้เล็กน้อยและมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของราใกล้เคียงกัน โดยเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของราอยู่ในช่วงตั้งแต่ 18.56 ถึง 24.93 เปอร์เซ็นต์ ส่วนความสามารถของแบคทีเรียกรดแลคติกปฏิปักษ์ในการลดปริมาณการผลิตสารพิษจากรา พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกทั้งไอโซเลท MW2A และ PF1B ไม่สามารถลดปริมาณการผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 ได้ แต่แบคทีเรียกรดแลคติกทั้งไอโซเลท MW2A และ PF1B สามารถลดการผลิตโอคราทอกซินเอได้สูงใกล้เคียงกัน โดยเปอร์เซ็นต์การลดลงของปริมาณโอคราทอกซินเออยู่ในช่วงตั้งแต่ 80.59 ถึง 84.32 เปอร์เซ็นต์

อย่างไรก็ตามผลการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งไอโซเลท MW2A และ PF1B ในการลดปริมาณโอคราทอกซินเอ เป็นสิ่งสำคัญ เนื่องจากโอคราทอกซินเอเป็นสารพิษจากราที่มักพบปนเปื้อนในเมล็ดกาแฟ งานวิจัยของ Benites และคณะ (2017) รายงานการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอในเมล็ดกาแฟคั่วและเมล็ดกาแฟคั่วบดในประเทศโปรตุเกส โดยมีปริมาณโอคราทอกซินเอเฉลี่ย 1.84 และ 1.45 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ งานวิจัยของ Barcelo และคณะ (2018) รายงานการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอในกาแฟหลังการเก็บเกี่ยวในประเทศฟิลิปปินส์ จากการศึกษาพบว่า ผลกาแฟสายพันธุ์โรบัสต้าที่อยู่

ระหว่างขั้นตอนการตากแห้งมีปริมาณโอคราทอกซินเอ สูงถึง 120.2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ส่วนผลกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้าที่อยู่ระหว่างขั้นตอนการเก็บรักษามีปริมาณโอคราทอกซินเอเฉลี่ย 46.7 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

แบคทีเรียกรดแลคติกนิยมใช้เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพ เพื่อควบคุมการเจริญและการผลิตสารพิษจากรา เนื่องจากแบคทีเรียกรดแลคติก จัดเป็นแบคทีเรียที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย (probiotics) เมื่อร่างกายได้รับในปริมาณที่เหมาะสมจะเป็นประโยชน์ต่อสุขภาพ จึงนำมาใช้ประโยชน์ในการถนอมอาหารทำให้เพิ่มคุณค่าทางอาหารสูงขึ้น อีกทั้งมีงานวิจัยจำนวนมาก รายงานเกี่ยวกับความสามารถของแบคทีเรียกรดแลคติก ในการยับยั้งการเจริญเติบโตและการผลิตสารพิษจากรา ได้แก่ งานวิจัยของ Tropcheva และคณะ (2014) รายงานว่า *L. brevis* ที่แยกได้จากอาหารพื้นเมืองของบัลแกเรีย ชื่อ “katak” สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *P. claviforme* *A. awamori* และ *A. niger* ได้อย่างสมบูรณ์ แต่สามารถยับยั้ง *A. flavus* และ *Trichoderma viride* ได้เล็กน้อย งานวิจัยของ Gomah และคณะ (2014) รายงานว่า *L. paracasei* subsp. *paracasei* สามารถลดปริมาณการผลิตสารพิษจากราสกุล *Fusarium* ได้แก่ ตีออกซีนิวาทีนอล ซีราลีโนน และฟูโมนิซินบี โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 56.8 เปอร์เซ็นต์ 73.0 เปอร์เซ็นต์ และ 76.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่ไม่ยับยั้งการเจริญของรา และพบว่า *L. rhamnosus* สามารถยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษจากราได้อย่างสมบูรณ์ งานวิจัยของ Luz และคณะ (2018) รายงานว่า ในการจำลองถังหมักให้อยู่ในสภาวะคล้ายกับกระบวนการย่อยอาหาร พบว่า *L. johnsonii* มีประสิทธิภาพดีที่สุด โดยสามารถลดปริมาณโอคราทอกซินเอ ได้ถึง 97.4 เปอร์เซ็นต์ จากงานวิจัยของ Taheur และคณะ (2019) รายงานว่า แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* อยู่ในช่วงตั้งแต่ 0 ถึง 51.67 เปอร์เซ็นต์ และ *A. carbonarius* อยู่ในช่วงตั้งแต่ 0 ถึง 45.56 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่มีสายพันธุ์ใดที่สามารถยับยั้งการเจริญของราอย่างสมบูรณ์ โดย *L. kefir* FR7 มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* (51.67 เปอร์เซ็นต์) และ *A. carbonarius* (45.56 เปอร์เซ็นต์) อีกทั้งแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 4 สายพันธุ์ สามารถยับยั้งการผลิตสารพิษโอคราทอกซินเออยู่ในช่วงตั้งแต่ 27.41 ถึง 75.26 เปอร์เซ็นต์

แบคทีเรียกรดแลคติกมีหลายกลไกในการยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษจากรา ได้แก่ การแย่งสารอาหาร การผลิตสารเมแทบอลิต์ เช่น กรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ สารประกอบฟีนอลิก และกรดไขมัน เป็นต้น งานวิจัยของ Karunaratne และคณะ (1990) รายงานเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดเบสและการแย่งชิงสารอาหารในการเจริญ รวมถึงการผลิตสารเมแทบอลิต์ของ *L. acidophilus*, *L. bulgaricus* และ *L. plantarum* สามารถยับยั้งการเจริญและสารพิษจากรา *A. flavus* subsp. *parasiticus* NRRL 2999 ได้ งานวิจัยของ Ruggirello และคณะ (2019) รายงานว่า *L. fermentum* และ *L. plantarum* สามารถยับยั้งรา *A. flavus*, *P. citrinum*, *P. griseofulvum*, *A. niger* และ *A. fumigatus* และสามารถผลิตกรดอินทรีย์ในการยับยั้งราอีกด้วย งานวิจัยของ Cortés-Zavaleta และคณะ (2014) ศึกษาการผลิตกรดฟีนอลแลคติก ซึ่งมีคุณสมบัติยับยั้งรา โดยผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกหลายสายพันธุ์ พบว่า มีการยับยั้งการเจริญเติบโตของราที่ทดสอบอยู่ในช่วงตั้งแต่ 3 ถึง 67 เปอร์เซ็นต์ และพบผลการยับยั้งที่มีการเสริมฤทธิ์กันระหว่างกรดฟีนอลแลคติก และกรดอินทรีย์ชนิดอื่น จากงานวิจัยของ Taheur และคณะ (2019)

รายงานว่าการใช้กลไกที่ใช้ในการยับยั้งการเจริญของราเกิดจากการเจริญเติบโตแบบแข่งขันกันระหว่างแบคทีเรียกรดแลคติกกับราทั้งในเรื่องของสารอาหารและพื้นที่ และกลไกที่ใช้ลดปริมาณสารพิษจากราเกิดจากกลไกการดูดซับของแบคทีเรียกรดแลคติก โดยอาศัยส่วนประกอบของชั้นผนังเซลล์ และการผลิตสารยับยั้งรา เช่น กรดอินทรีย์ จะทำให้สภาวะภายในเซลล์ราไม่เหมาะสม โดยกรดอินทรีย์สามารถแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าไปในเซลล์รา ทำให้ค่าความต่างศักย์ของโปรตอนในเซลล์มีสภาวะเป็นกลางมากขึ้น เมื่อผ่านเข้าไปในเซลล์แล้วจะทำให้ค่าความเป็นกรดเบสภายในเซลล์ต่ำลง จึงยับยั้งการทำงานของกระบวนการเมแทบอลิซึมในเซลล์ราได้ โดยประสิทธิภาพในการดูดซับจะขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ เช่น ชนิดสารพิษจากรา ปริมาณสารพิษที่สะสม สายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติก ชนิดและปริมาณกรดอินทรีย์ และสภาวะแวดล้อม (Dalié และคณะ, 2010; Taheur และคณะ, 2019) งานวิจัยของ Lahtinen และคณะ (2004) รายงานว่า อะฟลาทอกซิน บี 1 สามารถจับกับเพปติโดไกลแคน ซึ่งเป็นส่วนประกอบผนังเซลล์ของ *L. rhamnosus* GG ได้ งานวิจัยของ Haskard และคณะ (2001) ทดสอบความคงทนในภาวะสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ ผ่านการนึ่งด้วยความดันสูง การสันเส้เทียนด้วยคลื่นอัลตราโซนิก อุณหภูมิ และค่าความเป็นกรดเบส พบว่า สภาวะเหล่านั้นไม่ส่งผลต่อการจับกันระหว่างอะฟลาทอกซิน บี 1 และผนังเซลล์ของแบคทีเรียกรดแลคติก *L. rhamnosus* GG นอกจากนี้ กรดไขมันเป็นเมแทบอลิต์อีกชนิดหนึ่งที่เกิดจากแบคทีเรียกรดแลคติก มีสมบัติในการยับยั้งราได้ งานวิจัยของ Sjogren และคณะ (2003) รายงานว่า *L. plantarum* MiLAB 14 สามารถผลิตกรดไขมันไฮดรอกซีได้ ซึ่งสารดังกล่าวมีความสามารถต้านราได้เมื่อมีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 10 ถึง 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ผลการทดลองที่คาดว่าจะได้รับ

4.2 ศึกษากลไกของแบคทีเรียกรดแลคติกในการยับยั้งการเจริญของรา

เนื่องจากผลการทดลองข้อ 3.2.3 พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกทั้งไอโซเลท MW2A และ PF1B ไม่มีประสิทธิภาพในการลดปริมาณอะฟลาทอกซิน บี 1 ดังนั้น ในขั้นตอนการทดลองที่ 2.4 จะทดสอบการเจริญเฉพาะรา *A. carbonarius*

4.2.1 ผลการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียกรดแลคติกในการยับยั้งการเจริญของรา *A. carbonarius* TK4.2 ด้วยวิธี Agar spot assay

จากผลการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียกรดแลคติกปฏิปักษ์แต่ละสายพันธุ์ในการยับยั้งการเจริญของรา ด้วยวิธี Agar spot assay ตามชุดการทดลองในตารางที่ 2.1 จึงคาดก่ามผลการทดลองว่า ตำแหน่งเหนือจุดหยดแบคทีเรียกรดแลคติกจะเกิดบริเวณยับยั้งการเจริญของรา (clear zone) และแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถยับยั้งการเจริญของรา *A. carbonarius* ได้ แต่การเปรียบเทียบความสามารถของเซลล์กรดแลคติกแขวนลอย น้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติก และน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์

แบคทีเรียกรดแลคติกที่ผ่านการให้ความร้อน คาดว่า ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของรา อาจแตกต่างกัน เนื่องจากปัจจัยต่าง ๆ ได้แก่ สายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลคติก สารประกอบเมแทบอลิต์ทั้งชนิดและปริมาณที่แบคทีเรียกรดแลคติกผลิตได้ อีกทั้งยังขึ้นกับสิ่งแวดล้อมที่ใช้ในการทดลอง เช่น อุณหภูมิ สารอาหารที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ แสง และความชื้น

หากเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกแขวนลอยยับยั้งการเจริญของราได้ดีกว่า แสดงว่า กลไกการยับยั้งการเจริญของรา อาจเกิดจากเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกผลิตสารเมแทบอลิต์และหลั่งออกมานอกเซลล์ ทำให้สารเมแทบอลิต์เกิดการแพร่ไปยังอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีราเจริญอยู่ จึงยับยั้งการเจริญของราได้ ขณะที่น้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถยับยั้งการเจริญของราได้ด้วย จึงยืนยันได้ว่า เกิดจากสารเมแทบอลิต์ เช่น กรดอินทรีย์ ที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกระหว่างการเจริญและหลั่งออกมานอกเซลล์อยู่ในน้ำเลี้ยงเชื้อ อย่างไรก็ตาม หากเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกแขวนลอยเท่านั้นที่ยับยั้งการเจริญของราได้ แสดงว่า เซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกผลิตสารเมแทบอลิต์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งรา ซึ่งสารเมแทบอลิต์ชนิดนี้จะผลิตขึ้นเมื่อได้รับการกระตุ้นจากราเท่านั้น แต่ในสภาวะการเจริญปกติของแบคทีเรียกรดแลคติกจะไม่ผลิตเมแทบอลิต์ชนิดนี้ จากงานวิจัยของ Taheur และคณะ (2019) รายงานว่า เซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกแขวนลอยมีประสิทธิภาพในการยับยั้งราได้ดีกว่าน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ของแบคทีเรียกรดแลคติก โดยเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติก *L. kefir* FR7 มีประสิทธิภาพดีสุดในการยับยั้งรา *A. flavus* และ *A. carbonarius* แต่ น้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ของแบคทีเรียกรดแลคติก สามารถยับยั้งการเจริญของรา *A. flavus* และ *A. carbonarius* ได้ลดลง เมื่อเทียบกับเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกแขวนลอย อย่างไรก็ตาม น้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ (ปรับค่า pH เป็นกลาง) ของแบคทีเรียกรดแลคติกทุกสายพันธุ์ ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของราได้ อีกทั้งเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกมีประสิทธิภาพดีสุดในการยับยั้งการผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 ปี 2 และ โอคราทอกซินเอ งานวิจัยของ Cortés-Zavaleta และคณะ (2014) รายงานว่า น้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ของ *L. casei* 21/1 มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* งานวิจัยของ Guimarães และคณะ (2018) รายงานว่า *L. plantarum* สามารถผลิตกรดอินทรีย์ในการยับยั้งรา ได้แก่ กรดแลคติก กรดฟีนิลแลคติก (PLA) กรดไฮดรอกซีฟีนิลแลคติก (OH-PLA) และกรดแลคติกอินโดล (ILA) ซึ่งความเป็นกรดมีอิทธิพลต่อความสามารถของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ในการยับยั้งรา ดังนั้น ผู้วิจัยจึงทำการทดลองข้อ 2.4.2 เพื่อยืนยันอีกครั้งว่า น้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกยับยั้งราได้

4.2.2 ผลการทดสอบความสามารถของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติก ในการยับยั้งการเจริญของรา *A. carbonarius* TK4.2 ด้วยวิธี Agar diffusion

จากผลการทดสอบความสามารถของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกในการยับยั้งการเจริญของรา ด้วยวิธี Agar spot assay ตามชุดการทดลองในตารางที่ 2.2 จึงคาดการณ์ผลการทดลองว่า น้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถยับยั้งการเจริญของรา *A. carbonarius* ได้ โดยสังเกตเห็นบริเวณยับยั้งรอบหลุมที่เติมน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติก และยืนยันได้ว่า เกิด

จากสารเมแทบอลิท์ที่อยู่ในน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติก ถึงแม้ว่าวิธี Agar spot assay และ Agar diffusion ใช้ปริมาณน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกไม่เท่ากัน แต่ทดลองด้วยวิธีที่แตกต่างกัน อาจทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเราได้แตกต่างกัน และทั้งสองวิธีให้ผลการทดลองไปในทิศทางเดียวกัน

หากน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกที่ผ่านการให้ความร้อน มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเราไม่แตกต่างจากน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติก แสดงว่า สารเมแทบอลิท์ที่อยู่ในน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกทนต่อความร้อนและความดันไอน้ำ ทำให้ไม่เกิดการสูญเสียประสิทธิภาพในการยับยั้งเรา จากงานวิจัยของ Guimarães และคณะ (2018) รายงานว่า น้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ของ *L. plantarum* UM55 สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* ได้เล็กน้อย แต่ลดการผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 ได้ค่อนข้างดี และเมื่อนำไปทำให้เกิดการสูญเสียสภาพด้วยวิธีให้ความร้อน ปรับค่าความเป็นกรดเบสให้เป็นกลาง และย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอส พบว่า น้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ที่ผ่านการให้ความร้อน และย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอส สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* และลดการผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 ไม่แตกต่างจากน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ แต่น้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ที่ปรับค่าความเป็นกรดเบสให้เป็นกลาง ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเราและลดการผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 ลดลง งานวิจัยของ Gerez และคณะ (2009) รายงานว่า น้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่นำไปให้ความร้อนหรือย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอส สามารถยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินจากเรา *F. graminearum*, *Penicillium* sp. และ *A. niger* ได้ แต่น้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ที่ปรับค่าความเป็นกรดเบส เท่ากับ 6 ไม่สามารถยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินได้

4.3.3 ผลของค่าความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถยับยั้งการเจริญของเรา (Minimum Inhibitory Concentration: MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถฆ่าเราได้ (Minimum Fungicidal Concentration: MFC)

ในขั้นตอนการหาค่า MIC และ MFC จะนำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกที่ให้ผลการยับยั้งการเจริญของเราดีที่สุดจากข้อ 3.3.1 และ 3.3.2 มาใช้ในการวิเคราะห์ รวมถึงยังไม่ทราบสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละไอโซเลทที่ใช้ในงานวิจัยนี้ ดังนั้น ผู้วิจัยจึงไม่สามารถคาดการณ์ผลการทดลองนี้ได้ หากค่า MIC กับ MFC น้อย หมายถึง น้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกมีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเจริญและฆ่าเรา ตามลำดับ อย่างไรก็ตามค่า MIC จะต้องมีแนวโน้มในทิศทางเดียวกันกับ MFC จากงานวิจัยของ Taheur และคณะ (2019) รายงานว่า น้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ของ *L. kefir* FR7 เพียง 10 เปอร์เซ็นต์สามารถยับยั้งการเจริญของเรา *A. flavus* ได้ และ 30 เปอร์เซ็นต์ สามารถยับยั้งการเจริญของเรา *A. carbonarius* ได้ ส่วนค่า MFC ของแบคทีเรียกรดแลคติกทุกสายพันธุ์ ในการยับยั้งเรา *A. flavus* และ *A. carbonarius* อยู่ในช่วงตั้งแต่ 40-100 เปอร์เซ็นต์ งานวิจัย Lavermicocca และคณะ (2003) ศึกษาผลของกรดอินทรีย์ PLA และ OH-PLA ของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ของ *L. plantarum* พบว่า

สารประกอบทั้งสองมีฤทธิ์ยับยั้งรา โดย PLA มีประสิทธิภาพสูงสุด และความเข้มข้นของ PLA น้อยกว่า 7.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นั้นเพียงพอที่จะยับยั้งการเจริญของราทั้ง 14 สายพันธุ์ได้สูงถึง 90 เปอร์เซ็นต์ (MIC₉₀) และพบการออกฤทธิ์ร่วมกันระหว่างกรดแลคติก และกรด PLA ทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญของรา เพิ่มขึ้น ประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ของการยับยั้งด้วย PLA

จากผลการศึกษาทั้งหมดแสดงให้เห็นว่า แบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลท MW2A และ PF1B ที่แยกได้จากน้ำหมักเมล็ดกาแฟของสถานีวิจัยโครงการหลวงแม่หลอดและเมล็ดกาแฟหมักของศูนย์พัฒนาโครงการหลวงป่าเมี่ยง สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* และ *A. carbonarius* ได้เล็กน้อย เมื่อเทียบกับชุดควบคุม สำหรับการยับยั้งการผลิตสารพิษจากรา พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลท MW2A และ PF1B มีประสิทธิภาพสูงในการลดการผลิตโอคราทอกซินเอของ *A. carbonarius* อย่างไรก็ตาม แบคทีเรียกรดแลคติกทั้งสองไอโซเลทไม่สามารถลดการผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ได้ โดยงานวิจัยฉบับนี้แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของแบคทีเรียกรดแลคติกในการยับยั้งรา ซึ่งเป็นข้อดีที่มีคุณประโยชน์เพื่อเป็นแนวทางประยุกต์ใช้แบคทีเรียกรดแลคติกทั้งสองสายพันธุ์ในการควบคุมทางชีวภาพของกระบวนการผลิตกาแฟ เพื่อควบคุมการเจริญและการผลิตสารพิษจากราของ *A. carbonarius* อย่างไรก็ตาม งานวิจัยในภายภาคหน้าควรทำการศึกษากลไกของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งสองไอโซเลทในการยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษจากราของ *A. carbonarius* รวมถึงการส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติก เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ต่อการศึกษาเพิ่มเติมในด้านข้อมูลศักยภาพการยับยั้งราของแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีสายพันธุ์ใกล้เคียงกับไอโซเลทของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ใช้ในงานวิจัยฉบับนี้

เอกสารอ้างอิง

- กาญจนารณ์ สุดเสงี่ยม. การคัดแยก การคัดเลือก และการประเมินผลของแบคทีเรียกรดแลคติกที่เป็น
 ปฏิปักษ์ต่อราที่ผลิตโอคราทอกซินเอในเมล็ดกาแฟหลังการเก็บเกี่ยว [โครงการการเรียนการสอนเพื่อ
 เสริมประสบการณ์ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต]. กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2561.
 กรมการค้าต่างประเทศ. สินค้ากาแฟ [อินเทอร์เน็ต]. 2557 [เข้าถึงเมื่อ 30 เม.ย. 2563]. เข้าถึงได้จาก
<http://www.dft.go.th/th-th/กฎหมาย/cid/57>
- กรมวิชาการเกษตร. กาแฟโรบัสตา [อินเทอร์เน็ต]. 2560 [เข้าถึงเมื่อ 30 เม.ย. 2563]. เข้าถึงได้จาก
<http://it.doa.go.th/vichakan/news.php?newsid=16>
- กองสุขาภิบาล สำนักอนามัย. การศึกษาวิจัยเรื่อง ระยะเวลาและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการรอจำหน่าย
 ผลิตภัณฑ์อาหารแห้งประเภทถั่วลิสง [อินเทอร์เน็ต]. 2554 [เข้าถึงเมื่อ 30 เม.ย. 2563]. เข้าถึงได้จาก
<http://www.foodsanitation.bangkok.go.th/pdf/research/วิจัยถั่วลิสง.pdf>
- ชาลิสสา แสงบัว. การควบคุมการเจริญและการผลิตสารพิษของราในข้าวโพดหมักด้วยแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย
 [วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต]. กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2558.
- ทรงศรภรณ์ รุ่งชัยวัฒน์กุล. การยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินของ *Aspergillus flavus* ในไซเลจ
 ข้าวโพดโดยใช้ยีสต์และแล็กติกแอซิดแบคทีเรียปฏิปักษ์ [วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร
 มหาบัณฑิต]. กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2560.
- ธรรมศักดิ์ สมมาตย์. สารพิษอะฟลาทอกซินในถั่วลิสง. รายงานการสัมมนาถั่วลิสงแห่งชาติ ครั้งที่ 9 ณ
 โครงการชลประทานลำพระเพลิง จังหวัดนครราชสีมา; 2533. หน้า 113-134.
- ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่องกำหนดมาตรฐานสินค้าเกษตร : ถั่วลิสง. (2557, 28 พฤศจิกายน).
 ราชกิจจานุเบกษา. เล่ม 131 ตอนพิเศษ 243 ง. หน้า 6-25.
- ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่องกำหนดมาตรฐานสินค้าเกษตร : เมล็ดกาแฟโรบัสตา. (2561, 14
 พฤศจิกายน). ราชกิจจานุเบกษา. เล่ม 135 ตอนพิเศษ 287 ง. หน้า 4-17.
- ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่องกำหนดมาตรฐานสินค้าเกษตร : เมล็ดกาแฟอะราบิกา. (2562, 8
 มกราคม). ราชกิจจานุเบกษา. เล่ม 136 ตอนพิเศษ 6 ง. หน้า 5-17.
- ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่องมาตรฐานอาหารที่มีสารปนเปื้อน ฉบับที่ 98 พ.ศ. 2529.
- ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่องการใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติกในอาหาร พ.ศ. 2554. (2554, 3 สิงหาคม).
 ราชกิจจานุเบกษา. เล่ม 128 ตอนพิเศษ 86 ง. หน้า 21-25.
- พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์. Mycotoxin/ไมโคทอกซิน [อินเทอร์เน็ต]. 2556 [เข้าถึงเมื่อ 30 เม.ย. 2563]. เข้าถึง
 ได้จาก [http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1080/mycotoxin-ไมโคทอกซิน%](http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1080/mycotoxin-ไมโคทอกซิน%20(25)
 20(25

- พีระพล มารุ่งเรือง. การใช้ยีสต์ปฏิชีวนะเพื่อยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษจากราของ *A. flavus* และ *A. carbonarius* [วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต]. กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2559.
- พัฒนชิตา ธราตลศิริจิตกุล. การตรวจหาการปนเปื้อนราและโอคราทอกซินเอในเมล็ดกาแฟสดโดยใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี [วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต]. กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2557.
- เยาวมาลย์ คำเจริญ. ความเป็นพิษของอะฟลาทอกซินต่อปศุสัตว์. ใน: รายงานการแก้ปัญหา อะฟลาทอกซินในอาหารโคนมตามโครงการแก้ปัญหาอะฟลาทอกซินในอาหารและอาหาร สัตว์แบบครบวงจรในสวนรับผิดชอบของกรมปศุสัตว์ ปีงบประมาณ 2539-2543; 2545. หน้า 130- 144.
- ศุภวัฒน์ โพธิมงคลกุล. ความสัมพันธ์ระหว่างสารพิษเชื้อราอ้อคราท็อกซินเอตกค้างในไตกับพยาธิสภาพที่ไตของสุนัขที่ป่วยด้วยโรคไตวายเรื้อรัง [วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต]. กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2549.
- ศูนย์พิษวิทยารามาธิบดี. สารพิษจากรา [อินเทอร์เน็ต]. 2563 [เข้าถึงเมื่อ 30 เม.ย. 2563]. เข้าถึงได้จาก <https://med.mahidol.ac.th/poisoncenter/th/pois-cov/Fungi>
- สถาบันอาหาร กระทรวงอุตสาหกรรม. อะฟลาทอกซิน [อินเทอร์เน็ต]. 2563 [เข้าถึงเมื่อ 30 เม.ย. 2563]. เข้าถึงได้จาก <http://fic.nfi.or.th/foodsafety/>
- สุจิตรา เต๋อไซ และสมบุรณ์ ธนาศุภวัฒน์. สารรอยเทอรินจากแบคทีเรียผลิตภัณฑ์กึ่งดัด. วารสารวิทยาศาสตร์ มข. 2558;3:380-394
- สุพี วนศิริกุล. เนตรา สมบุรณ์แก้ว. อัจฉราพร ศรีจูดานู และอมรา ชินภูติ. ศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อราและสารโอคราทอกซิน เอ ในผลไม้แห้งและการลดปริมาณสารพิษโดยใช้วิธีทางกายภาพ. วารสารวิชาการเกษตร ปีที่ 32. 2557;2:188-200
- โสภณ วงศ์แก้ว และสนั่น จอกลอย. อะฟลาทอกซินในถั่วลิสง: ข้อเสนอวิธีแก้ปัญหา. เกษตร 39 ฉบับพิเศษ 3. 2554;1-11.
- สำนักงานกองทุนสนับสนุนการสร้างเสริมสุขภาพ. อะฟลาทอกซินรา [อินเทอร์เน็ต]. 2556 [เข้าถึงเมื่อ 30 เม.ย. 2563]. เข้าถึงได้จาก <https://www.thaihealth.or.th>
- สำนักงานตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์. สารพิษจากรา (Mycotoxins) [อินเทอร์เน็ต]. 2550 [เข้าถึงเมื่อ 30 เม.ย. 2563]. เข้าถึงได้จาก <http://www.dld.go.th/qcontrol/images/stories/gfeed/knowledge-toxin.pdf%20>
- สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน). “กาแฟ” [อินเทอร์เน็ต]. 2552 [เข้าถึงเมื่อ 30 เม.ย. 2563]. เข้าถึงได้จาก www.arda.or.th.
- สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ. อะฟลาทอกซินแฝงพิษ แฝงอันตรายสะสม. วารสารเพื่อการเตือนภัยสินค้าเกษตรและอาหาร ปีที่ 4. 2555.

อภิษฐา ช่างสุพรรณ. อะฟลาทอกซิน (Aflatoxin) ในผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร [อินเทอร์เน็ต]. 2548 [เข้าถึงเมื่อ 30 เม.ย. 2563]. เข้าถึงได้จาก http://www.dss.go.th/images/st-article/bsp_1_2548_aflatoxin.pdf

อัจฉรา พัฒนเดช. เชื้อรา *Aspergillus* ที่สร้างอะฟลาทอกซินในพืชสมุนไพรตากแห้ง [วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต]. สงขลา: มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์; 2543.

อมรา ชินภูติ และศุภรา อัคคะสารกุล. การปนเปื้อนของสารอะฟลาทอกซิน ปี 1 และสารโอคราทอกซิน เอ ในข้าวกล้องและข้าวขาว. วารสารวิชาการข้าว ปีที่ 3 ฉบับที่ 2. 2552.

อมรา วงศ์พุทธพิทักษ์ และคณะ. สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชนฯ เล่มที่ 14. กรุงเทพฯ: โครงการสารานุกรมไทยสำหรับเยาวชนฯ; 2553

อำนาจ พัวพลเทพ. สารพิษจากเชื้อรา: ภัยเงียบในอาหาร [อินเทอร์เน็ต]. 2562 [เข้าถึงเมื่อ 30 เม.ย. 2563]. เข้าถึงได้จาก https://thaimycotoxin.org/wp-content/uploads/2019/06/สารพิษจากเชื้อรา_ภัยเงียบในอาหาร.pdf

Ammor S., Tauveron G., Dufour E. and Chevallier I. (2006). Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility: 1—screening and characterization of the antibacterial compounds. *Food Control*, 17:454–461

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

Bbosa G.S., Kitya D., Lubega A., Okeng J.O., Anokbonggo W.W. and Kyegombe D.B. (2013). Review of the Biological and Health Effects of Aflatoxins on Body Organs and Body Systems. In Razzaghi-Abyaneh M. (Ed.) *Aflatoxins-Recent Advances and Future Prospects* (InTech). 239-265

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

Bianchini A. and Bullerman L.B. (2010). Biological control of molds and mycotoxins in foods. In M. Appell, et al. (Ed.) *Mycotoxin prevention and control in agriculture*. (ACS Symposium Series; American Chemical Society, Washington, DC).

Biomin. สัตว์ปีกและสุกร [อินเทอร์เน็ต]. 2563 [เข้าถึงเมื่อ 30 เม.ย. 2563]. เข้าถึงได้จาก <https://www2.biomin.net/th/ชนิดสัตว์/>

- Blount W.P. (1961). Turkey “X” disease. *Turkeys*, 9:55-58
- Chung T.C., Axelsson L.T., Lindgren, S.E. and Dobrogosz W.J. (1989). *In vitro* studies on reuterin synthesis in *Lactobacillus reuteri*. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 2:137-144.
- Cizeikiene D., Juodeikiene G., Paskevicius A. and Bartkiene E. (2013). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against pathogenic and spoilage microorganism isolated from food and their control in wheat bread. *Food Control*, 21:539-545
- CAC. Code of practice for the prevention and reduction of ochratoxin A contamination in coffee [อินเทอร์เน็ต]. 2552 [เข้าถึงเมื่อ 30 เม.ย. 2563]. เข้าถึงได้จาก <http://www.codexalimentarius.org/input/download/standards/>
- Cole R.J. and Cox R.H. (1981). Handbook of toxic fungal metabolites. New York: Academic Press
- Cortés-Zavaleta O., López-Malo A., Hernández-Mendoza A. and García, H. (2014). Antifungal activity of *lactobacilli* and its relationship with 3-phenyllactic acid production. *International Journal of Food Microbiology*, 173:30–35.
- Economic Intelligence Center (EIC). ตลาดกาแฟในอาเซียน-โอกาสที่มาพร้อมกับความซับซ้อนทางธุรกิจ [อินเทอร์เน็ต]. 2558 [เข้าถึงเมื่อ 30 เม.ย. 2563]. เข้าถึงได้จาก <https://www.scbeic.com/th/detail/product/1258>
- European commission. (2006). Commission regulation (EU) No 1881/2006 of 19 December 2006, setting maximum levels for certain contaminations in foodstuffs. *Official Journal of the European Union L*, 1-29.
- European commission. (2010). Commission regulation (EU) No 165/2010 of 26 February 2010, setting maximum levels for certain contaminations in foodstuffs as regards aflatoxins. *Official Journal of the European Union L*, 50:8-12.
- FAO (2004). Food and Agriculture Organization of the United Nations: Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003 (Rome, Italy).
- Dalié D.K.D., Deschamps A.M. and Forget F.R. (2010). Lactic acid bacteria-Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. *Food Control*, 21(4):370-380
- Da Silva J.F., Peluzio J.M., Prado G., Madeira J.E., Silva, M.O., et al. (2015). Use of Probiotics to Control Aflatoxin Production in Peanut Grains. *The Scientific World Journal*, 1:1-8.

- De Melo Pereira G.V., Beux M., Pagnoncelli M.G., Soccol V.T., Rodrigues C. and Soccol C.R. (2016). Isolation, selection and evaluation of antagonistic yeasts and lactic acid bacteria against ochratoxigenic fungus *Aspergillus westerdijkiae* on coffee beans. *Letters in Applied Microbiology*, 62:96-101
- De Bruyn F., Zhang S.J., Pothagos V., Torres J., Lambot C., et al. (2017). Exploring the impacts of post harvest processing on the microbiota and metabolite profiles during green coffee bean production. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(1)02398-16
- Dhanasekaran D., Shanmugapriya S., Thajuddin N. and Panneerselvam A. (2011). Aflatoxins and aflatoxicosis in human and animals. In *Aflatoxins-Biochemistry and Molecular Biology* (InTech).
- Djossou S., Perraud-Gaime I., Mirleau F.L., Rodriguez-Serrano G., Karou G., et al. (2011). Robusta coffee beans post-harvest microflora: *Lactobacillus plantarum* sp. as potential antagonist of *Aspergillus carbonarius*. *Anaerobe*, 17(6):267-272.
- Fuchs S., Sontag G., Stidl R., Ehrlich V., Kundi M. and Knasmuller S. (2008). Detoxification of patulin and ochratoxin A, two abundant mycotoxins, by lactic acid bacteria. *Food and Chemical Toxicology*, 46:1398-407.
- Gerez C.L., Torino M.I., Rollán G. and de Valdez G.F. (2009). Prevention of bread mould spoilage by using lactic acid bacteria with antifungal properties. *Food Control*, 20:144-148.
- Ghazvini R.D., Kouhsari E., Zibafar E., Hashemi S.J., Aminiand A. and Niknejad F. (2016). Antifungal activity and aflatoxin degradation of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus fermentum* against toxigenic *Aspergillus parasiticus*. *The Open Microbiology Journal*, 10:197-201.
- Gomah N. and Zohri A. (2014). Inhibition of fungal growth and *Fusarium* toxins by selected cultures of lactic acid bacteria. *Journal of Microbial and Biochemical Technology*, 7:2.
- Guimarães A., Santiago A., Teixeira J.A., Venâncio A. and Abrunhosa L. (2018). Anti-aflatoxigenic effect of organic acids produced by *Lactobacillus plantarum*. *International Journal of Food Microbiology*, 1-6.
- Haile M. and Kang W.H. (2019). The role of microbes in coffee fermentation and their impact on coffee quality (Review article). *Journal of Food Quality*, 1-6.

- Haschek W.M. and Voss K.A. (2013). Chapter 39-Mycotoxins. In: Haschek W.M., Rousseaux C.G. and Wallig M.A, editors. 3rd ed. London: Academic Press, p. 1187-1258
- Hashemi M. and Taherimaslak Z. (2014). Separation and determination of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ in pistachio samples based on magnetic solid phase extraction followed by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Analytical methods*, 6:7663-7673.
- Haskard C.A., El-Nezami H.S., Kankaanpaa P.E., Salminen S. and Ahokas J.T. (2001). Surface binding of aflatoxin B (1) by lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 67:3086-3091.
- Hassan Y. I. and Bullerman L. B. (2008). Antifungal activity of *Lactobacillus paracasei* ssp. Tolerans isolated from a sourdough bread culture. *International Journal of Food Microbiology*, 121:112-115.
- Hussein H.S. and Brasel J.M. (2001). Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*, 167:101-34.
- IARC. (2002). Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, 82:1-556.
- Ismail A., Gonçalves B.L., de Neeff D.V., Ponzilacqua B., Coppa C.F.S.C., Hintzsche H., et al. (2018). Aflatoxin in foodstuffs: Occurrence and recent advances in decontamination. *Food Research International*, 113:74-85.
- Jakić-Dimić D., Nešić K. and Petrović M. (2009). Contamination of cereals with aflatoxins, metabolites of fungi *Aspergillus flavus*. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 25:1203-8.
- Johnston C.I., Singleterry R., Reid C., Sparks D., Brown A., et al. (2012). The fate of aflatoxin in corn fermentation. *Natural Resource*, 3:126-136
- Karunaratne A., Wezenberg E. and Bullerman L.B. (1990). Inhibition of mold growth and aflatoxin production by *Lactobacillus* spp. *Journal of Food Protection*, 53:230-236
- Krishnamachari K.A., Bhat R.V., Nagaragen V. and Tilak T.B.G. (1975). Hepatitis due to aflatoxin-An outbreak in West India. *Lancet*, 1061-1063.
- Kusumaningrum H.D. and Rasyidah M.M. (2019). Prevalence of spoilage mold in coffee before and after brewing. *Food Research*, 3(6):720-726

- Lahtinen S.J., Haskard C.A., Ouwehand A.C., Salminen S.J. and Ahokas J.T. (2004). Binding of aflatoxin B1 to cell wall components of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. *Food Additives and Contaminants*, 21:158-164.
- Langa S., Martín-Cabrejas I., Montiel R., Landete J.M., Medina M. and Arqués J.L. (2014). Combined antimicrobial activity of reuterin and diacetyl against foodborne pathogens. *Journal of Dairy Science*, 97:6116-21.
- Lavermicocca P., Valerio F. and Visconti A. (2003). Antifungal activity of phenyllactic acid against molds isolated from bakery products. *Applied and Environmental Microbiology*, 69:634-640
- Luz C., Saladino F., Luciano F.B., Mañes J. and Meca G. (2017). *In vitro* antifungal activity of bioactive peptides produced by *Lactobacillus plantarum* against *Aspergillus parasiticus* and *Penicillium expansum*. *LWT-Food Science and Technology*, 81:128-135.
- Magnussorn J., Strom K., Roos S., Sjogren J. and Schnurer J. (2003). Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 219:129-135.
- Mally A., Hard G.C. and Dekant W. (2007). Ochratoxin A as a potential etiologic factor in endemic nephropathy: Lessons from toxicity studies in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 45(11):2254-2260.
- Meca G., Blaiotta G. and Ritieni A. (2010). Reduction of ochratoxin A during the fermentation of Italian red wine Moscato. *Food Control*, 21(4):579-583
- Nagindu A., Johnson P.K., Kenya P.R., Ngira J.A., Ocheng D.M., Nandwa H., et al. (1982). Outbreak of acute hepatitis caused by aflatoxin poisoning in Kenya. *Lancet*, 1:1346-1348.
- Noonim P., Mahakarnchanakul W., Nielsen K.F., Frisvad J.C. and Samson R.A. (2008). Isolation, identification and toxigenic potential of ochratoxin A producing *Aspergillus* species from coffee beans grown in two regions of Thailand. *International Journal of Food Microbiology*, 128: 197-202.
- Ozbey F. and Kabak B. (2012). Natural co-occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in spices. *Food control*, 28(2):354-361.

- Pantelides I.S., Christou O., Tsolakidou M.D., Tsaltas D. and Ioannou N. (2015). Isolation identification and *in vitro* screening of grapevine yeasts for the control of black *Aspergilli* on grapes. *Biological Control*, 88:46-53.
- Perczak A., Goliński P., Bryła M., and Waśkiewicz A.g. (2018) The efficiency of lactic acid bacteria against pathogenic fungi and mycotoxins. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 69:32-45.
- Pohland A.E., Nesheim S. and Friedman L. (1992.) Ochratoxin A: A Review (Technical report). *Pure and Applied Chemistry*, 64(7):1029-1046.
- Riba A., Mokrane S., Mathieu F., Lebrihi A. and Sabaou N. (2008). Mycoflora and ochratoxin A producing strains of *Aspergillus* in Algerian wheat. *International Journal of Food Microbiology*, 122:85-92.
- Ritchie J.C. Aflatoxin [อินเทอร์เน็ต]. 2554 [เข้าถึงเมื่อ 30 เม.ย. 2563]. เข้าถึงได้จาก <http://www.worldscibooks.com/medsci/p108.html>.
- Romer Labs. Worldwide Mycotoxin Regulations. [อินเทอร์เน็ต]. 2559 [เข้าถึงเมื่อ 30 เม.ย. 2563]. เข้าถึงได้จาก <https://www.romerlabs.com/en/knowledge-center/knowledge-library/articles/news/worldwide-mycotoxin-regulations/>
- Ruggirello M., Nucera D., Cannoni M.C., Peraino A., Rosso F., et al. (2019). Antifungal activity of yeasts and lactic acid bacteria isolated from cocoa bean fermentations. *Food Research International*, 115:519-525.
- Sargeant K., Sheridan A., Kelly J.O. and Carnaghan R.B.A. (1961). Toxicity associated with certain samples of groundnuts. *Nature*, 192:1096-1097.
- Sangmanee P. and 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 Control*, 40:224-233.
- Schaefer L., Auchtung T.A., Hermans K.E., Whitehead D., Borhan B. and Britton R.A. (2010). The antimicrobial compound reuterin (3-hydroxypropionaldehyde) induces oxidative stress via interaction with thiol groups. *Microbiology*, 156:1589-1599.
- Sjogren J., Magnussorn J., Broberg A., Schnurer J. and Kenne L. (2003). Antifungal 3-hydroxy fatty acids from *Lactobacillus plantarum* MiLAB 14. *Applied and Environmental Microbiology*, 69:7554-7557

- Taheur F.B., Mansour C., Kouidhi B. and Chaieb K. (2019). Use of lactic acid bacteria for the inhibition of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus carbonarius* growth and mycotoxin production. *Toxicon*, 166:15-23
- Talarico T.L. and Dobrogosz W.J. (1989). Chemical characterization of an Antimicrobial Substances Produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 674-679
- Tropcheva R., Nikolova D., Evstatieva Y. and Danova S. (2014). Antifungal activity and identification of *Lactobacilli*, isolated from traditional dairy product “katak”. *Anaerobe*, 28:78–84.
- Van der Stegen G.H., Essens P.J. and van der Lijn J. (2001). Effect of roasting conditions on reduction of ochratoxin A. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49:4713-4715.
- Voice online. เดือน ‘พริกเวียดนาม’ มีสารก่อมะเร็ง ‘อะฟลาทอกซิน’ [อินเทอร์เน็ต]. 2561 [เข้าถึงเมื่อ 30 เม.ย. 2563]. เข้าถึงได้จาก <https://voicetv.co.th/read/H1xML-hAf>
- Yang E.J. and Chang H.C. (2010). Purification of a new antifungal compound produced by *Lactobacillus plantarum* AF1 isolated from kimchi. *International Journal of Food Microbiology*, 139:56-63.
- Zain M.E. (2011). Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society*, 15:129-144.
- Zhang X., Kuča K., Dohnal V., Dohnalová L., Wu Q. and Wu C. (2014). Military potential of biological toxins. *Journal of Applied Biomedicine*, 12:63-77.
- Zinedine A., Faid M. and Benlemlih M. (2005). *In vitro* reduction of aflatoxin B1 by strains of lactic acid bacteria isolated from Moroccan sourdough bread. *International Journal of Agriculture and Biology*, 7:67-70.
- Zimmerli B. and Dick R. (1996). Ochratoxin A in table wine and grape-juice: occurrence and risk assessment. *Food Additives and Contaminants*, 13:655-688.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

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

อาหารสำเร็จรูป MRS	22	กรัม
แคลเซียมคาร์บอเนต	2	กรัม
ผงวุ้น	6	กรัม

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

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

อาหารสำเร็จรูป MRS	5.5	กรัม
--------------------	-----	------

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

3. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA (Potato Dextrose Agar)

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

ละลายอาหารสำเร็จรูปในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

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

อาหารสำเร็จรูป PDB	4.8	กรัม
ผงวุ้น	0.16	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้ง 2 ชนิด ในน้ำกลั่นปริมาตร 200 มิลลิลิตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข
สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. สารละลายที่ใช้เตรียมสปอร์ราแขวนลอย (physiological water)

โซเดียมคลอไรด์	0.85	กรัม
Tween 80	1	มิลลิลิตร

ละลายโซเดียมคลอไรด์ในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วผสมกับ Tween 80 ให้เข้ากัน แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. สารละลายเปปโตน (peptone water)

เปปโตน	0.45	กรัม
--------	------	------

ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 450 มิลลิลิตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

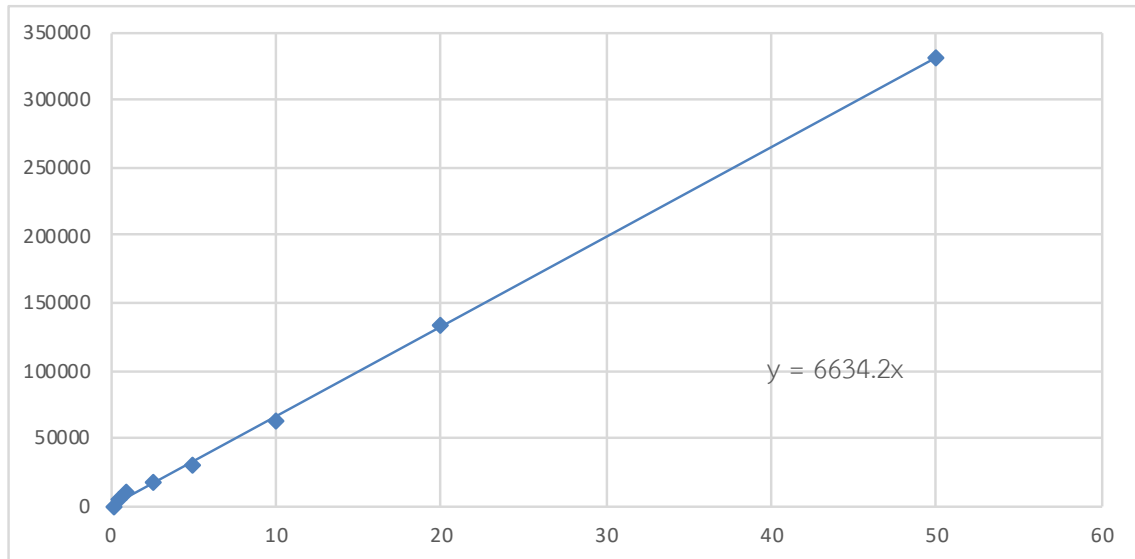
3. สารละลายน้ำเกลือฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffered saline; PBS, pH 7.2)

โซเดียมคลอไรด์	3.24	กรัม
โพแทสเซียมคลอไรด์	0.08	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.08	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	1.3	กรัม

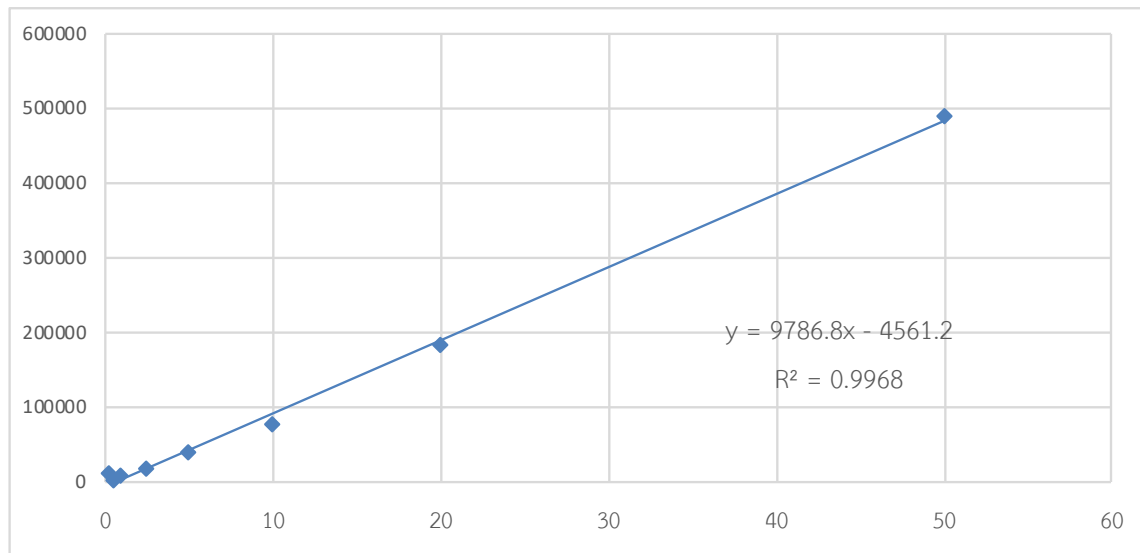
ละลายส่วนผสมทั้ง 4 ชนิด ในน้ำกลั่นปริมาตร 400 มิลลิลิตร แล้วปรับค่าความเป็นกรดเบสให้เท่ากับ 7.2 ด้วย conc. HCl หรือ NaOH จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ค
กราฟมาตรฐานสารพิษจากรา

1. กราฟมาตรฐานอะฟลาทอกซินบี 1



2. กราฟมาตรฐานไอคราทอกซินเอ



ภาคผนวก ง

ตารางที่ ง.1 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี *A. flavus* M3T8R403 ที่เลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียกรดแลคติก ด้วยวิธี Dual culture บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ณ วันที่ 7 ของการบ่ม

แบคทีเรีย กรดแลคติก	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี <i>A. flavus</i> (เซนติเมตร)					
	ซ้ำ 1*		ซ้ำ 2*		ซ้ำ 3*	
	ซ้ำ 1.1	ซ้ำ 1.2	ซ้ำ 2.1	ซ้ำ 2.2	ซ้ำ 3.1	ซ้ำ 3.2
control	7.9	7.9	7.8	8	8.2	8.2
LAB-MW2A	6.3	6.3	6.0	6.1	5.8	5.9
LAB-PF1B	6.1	6.5	6.0	6.0	5.2	6.2

*ทำการทดลองต่างวันกันในแต่ละซ้ำของการทดสอบ

ตารางที่ ง.2 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี *A. carbonarius* TK4.2 ที่เลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียกรดแลคติก ด้วยวิธี Dual culture บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ณ วันที่ 7 ของการบ่ม

แบคทีเรีย กรดแลคติก	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี <i>A. carbonarius</i> (เซนติเมตร)					
	ซ้ำ 1*		ซ้ำ 2*		ซ้ำ 3*	
	ซ้ำ 1.1	ซ้ำ 1.2	ซ้ำ 2.1	ซ้ำ 2.2	ซ้ำ 3.1	ซ้ำ 3.2
control	6.5	6.7	6.9	6.5	6.6	6.6
LAB-MW2A	5.9	5.3	5.5	5.4	4.2	5.0
LAB-PF1B	5.7	5.1	5.0	5.0	5.8	5.8

*ทำการทดลองต่างวันกันในแต่ละซ้ำของการทดสอบ

ภาคผนวก จ

ตารางที่ จ.1 ปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 ของ *A. flavus* M3T8R403 จากการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียกรดแลคติกปฏิชีวนะในการยับยั้งการผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ณ วันที่ 7 ของการบ่ม

แบคทีเรีย กรดแลคติก	การผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 (นาโนกรัมต่อกรัม)					
	ซ้ำ 1*		ซ้ำ 2*		ซ้ำ 3*	
	ซ้ำ 1.1	ซ้ำ 1.2	ซ้ำ 2.1	ซ้ำ 2.2	ซ้ำ 3.1	ซ้ำ 3.2
control	28.97	34.01	27.35	29.41	20.08	24.24
LAB-MW2A	46.88	74.79	103.51	88.14	78.70	103.10
LAB-PF1B	113.45	150.73	188.64	183.61	84.35	93.73

*ทำการทดลองต่างวันกันในแต่ละซ้ำของการทดสอบ

ตารางที่ จ.2 ปริมาณโอคราทอกซินเอของ *A. carbonarius* TK4.2 จากการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียกรดแลคติกปฏิชีวนะในการยับยั้งการผลิตโอคราทอกซินเอบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ณ วันที่ 7 ของการบ่ม

แบคทีเรีย กรดแลคติก	การผลิตโอคราทอกซินเอ (นาโนกรัมต่อกรัม)					
	ซ้ำ 1*		ซ้ำ 2*		ซ้ำ 3*	
	ซ้ำ 1.1	ซ้ำ 1.2	ซ้ำ 2.1	ซ้ำ 2.2	ซ้ำ 3.1	ซ้ำ 3.2
control	386.04	407.97	437.45	466.05	277.42	296.04
LAB-MW2A	93.79	59.71	57.22	35.50	65.66	34.45
LAB-PF1B	74.05	112.79	43.46	58.13	66.15	68.36

*ทำการทดลองต่างวันกันในแต่ละซ้ำของการทดสอบ