



การใช้ *Saccharomyces cerevisiae* ดูดซับสารพิษ
aflatoxin B₁ และ ochratoxin A

โดย

นางสาววรภาพร รัตนเสนา

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ปีการศึกษา 2557
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

การใช้ *Saccharomyces cerevisiae* ดูดซับสารพิษ
aflatoxin B₁ และ ochratoxin A

โดย

นางสาววราพร รัตนเสนา



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ปีการศึกษา 2557
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์



Using *Saccharomyces cerevisiae* to absorb
aflatoxin B₁ and ochratoxin A

BY

MISS WARAPORN RATTANASENA



A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS
FOR THE DEGREE OF MASTER DEGREE OF SCIENCE IN
FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY
SCIENCE AND TECHNOLOGY
THAMMASAT UNIVERSITY
ACADEMIC YEAR 2014
COPYRIGHT OF THAMMASAT UNIVERSITY

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

วิทยานิพนธ์

ของ

นางสาววราพร รัตนเสนา

เรื่อง

การใช้ *Saccharomyces cerevisiae* ดูดซับสารพิษ aflatoxin B₁ และ ochratoxin A

ได้รับการตรวจสอบและอนุมัติ ให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

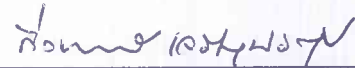
เมื่อ วันที่ 31 กรกฎาคม พ.ศ. 2558

ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์



(รองศาสตราจารย์ ดร. จารุณี โลกาสุวรรณ)

กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์



(รองศาสตราจารย์ ดร. กิ่งแก้ว เจริญพรสุข)

กรรมการสอบวิทยานิพนธ์และผู้ทรงคุณวุฒิ



(ดร. สุภาพ อัจฉริยศรีพงศ์)

กรรมการสอบวิทยานิพนธ์



(ดร. ภูมินาถ ชื่นชมรัตน์)

คณบดี



(รองศาสตราจารย์ ปกรณ์ เสริมสุข)

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การใช้ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ดูดซับสารพิษ aflatoxin B ₁ และ ochratoxin A
ชื่อผู้เขียน	นางสาววราพร รัตนเสนา
ชื่อปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา/คณะ/มหาวิทยาลัย	สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รองศาสตราจารย์ ดร. กิ่งแก้ว เจริญพรสุข
ปีการศึกษา	2557

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการวิจัยเพื่อศึกษาความสามารถของ *Saccharomyces cerevisiae* 4 สายพันธุ์ คือ TISTR 5013, TISTR 5049, TISTR 5059 และ TISTR 5343 ในการดูดซับ aflatoxin B₁ (AFB₁) และ ochratoxin A (OTA) โดยเริ่มด้วยการทดสอบประสิทธิภาพการลดปริมาณสารพิษใน phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4) ด้วยการนำเซลล์ยีสต์ที่ตายแล้วจากการนิ่งแช่เชื้อด้วยไอน้ำแรงดันสูงผสมกับ PBS (pH 7.4) ที่มี AFB₁ และ OTA อย่างละ 100 ppb ผลจากการศึกษาพบว่า สายพันธุ์ TISTR 5013 และ TISTR 5049 ลด AFB₁ ใน PBS ลง 50.19% และ 49.40% ตามลำดับ ซึ่งดีกว่าการทดสอบด้วยสายพันธุ์ TISTR 5059 และ TISTR 5343 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) สอดคล้องกับการดูดซับ OTA เซลล์ *S. cerevisiae* TISTR 5013 และ TISTR 5049 สามารถลด OTA ใน PBS (pH 7.4) ลงได้มากกว่า 70% ซึ่งให้ผลดีกว่าการทดสอบด้วยอีกสองสายพันธุ์ โดยปริมาณ β -glucan ที่ตรวจพบไม่สัมพันธ์กับประสิทธิภาพการดูดซับสารพิษใน PBS และเมื่อนำเซลล์ *S. cerevisiae* TISTR 5013 และ TISTR 5049 มาทดสอบใน PBS (pH 7.4) ที่มีเฉพาะ AFB₁ เพียงชนิดเดียวพบว่าสัดส่วนของสารพิษลดลงได้มากกว่า PBS ที่มีทั้ง AFB₁ และ OTA จากนั้นคัดเลือกเฉพาะ *S. cerevisiae* TISTR 5013 ที่สามารถดูดซับสารพิษได้ดีที่สุดมาทดสอบการดูดซับสารพิษภายใต้สภาวะจำลองทางเดินอาหารไก่พบว่าเซลล์ยีสต์ยังคงเข้าจับกับ AFB₁ และ OTA ได้มากกว่า 40% โดยสารผสมที่มาจากสภาวะจำลองข้างต้นถูกนำมาทดสอบยืนยันความเป็นพิษกับไร่น้ำอาร์ทีเมีย พบว่ากลุ่มทดลองที่เติมเซลล์ยีสต์ลงในอาหารไก่เพื่อดูดซับสารพิษจะมีสัดส่วนอาร์ทีเมียที่แสดงอาการผิดปกติและการตายลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

คำสำคัญ : ยีสต์ ออคราทอกซิน เอ อะฟลาทอกซิน ปี 1 อาหารสัตว์ อาร์ทีเมีย

Thesis Title	Using <i>Saccharomyces cerevisiae</i> to absorb aflatoxin B ₁ and ochratoxin A
Author	Miss Waraporn Rattanasena
Degree	Master degree of Science
Department/Faculty/University	Food Science and Technology Science and Technology Thammasat University
Thesis Advisor	Associate Professor Kingkeaw Charoenpornsook, Ph.D.
Academic Years	2014

ABSTRACT

The objective of this research was to study the absorption ability of 4 *Saccharomyces cerevisiae* strains (TISTR 5013, TISTR 5049, TISTR 5059, and TISTR 5343) to reduce aflatoxin B₁ (AFB₁) and ochratoxin A (OTA). An experiment was done to test efficiency of autoclaved yeast cells in phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4), which a mixture of AFB₁ 100 ppb and OTA 100 ppb was added. The results indicated that TISTR 5013 and TISTR 5049 reduced AFB₁ 50.19% and 49.40% respectively, which were higher than TISTR 5059 and TISTR 5343 ($p < 0.05$). Similarly, *S. cerevisiae* TISTR 5013 and TISTR 5049 reduced OTA more than 70%, which were higher than other strains. Whereas proportion of β -glucan was not correlated with toxin reduction rates. Toxin absorption of *S. cerevisiae* TISTR 5013 and TISTR 5049 in PBS (pH 7.4) that had only AFB₁ tended to be higher than the combination of AFB₁ and OTA. In digestive model, autoclaved *S. cerevisiae* TISTR 5013 remained to absorb AFB₁ and OTA more than 40%. The mixtures from digestive model were evaluated toxicity with *Artemia*. Filtrate from yeast-added feed caused significant lower deflection and death *Artemia* ($p < 0.05$).

Keywords : aflatoxin B₁, ochratoxin A, *Saccharomyces cerevisiae*

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลงด้วยดี ข้าพเจ้าใคร่ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. กิ่งแก้ว เจริญพรสุข (อาจารย์ที่ปรึกษา) รองศาสตราจารย์ ดร. จารุณี โลกสุวรรณ (ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์) ดร. สุภาพ อัจฉริยศรีพงศ์ (ผู้ทรงคุณวุฒิด้านจุลชีววิทยา) และ ดร. ภูมิภักดิ์ ชื่นชมรัตน์ ได้กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำในการวิเคราะห์ข้อมูลและเรียบเรียงรายงานวิทยานิพนธ์ฉบับนี้อันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการจัดทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบคุณคุณพิไล กวีศรัย (นักวิทยาศาสตร์ชำนาญการพิเศษ หัวหน้างานสารพิษจากเชื้อรา) คุณชัชวาลย์ โรจนทรัพย์ คุณยุพา ผาลิวังค์ และคุณจิรพรรณ ตีรรักษา (นักวิทยาศาสตร์การแพทย์) และบุคลากรในกลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ ที่ให้คำปรึกษา คำแนะนำ ประสานงาน และดำเนินการตรวจวิเคราะห์สารพิษจากเชื้อรา

ขอขอบคุณคุณกาญจนา โมธินา คุณภาวดี ฉิงทองคำ และคุณสนุน โสนนอก นักวิทยาศาสตร์ประจำห้องปฏิบัติการคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ที่ให้คำปรึกษาและอำนวยความสะดวกในการดำเนินการวิจัย

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและบริษัท ศูนย์วิทยาศาสตร์เบทาโกร จำกัด ภายใต้โครงการพัฒนานักวิจัยและงานวิจัยเพื่ออุตสาหกรรม-พว.ระดับปริญญาโท ตามสัญญาเลขที่ MSD56I0112 โดยความเห็นในรายงานผลการวิจัยเป็นของผู้รับทุน สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและบริษัท ศูนย์วิทยาศาสตร์เบทาโกร จำกัด ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป และขอขอบคุณทุนสนับสนุนการวิจัยจากกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ภายใต้ “ทุนวิจัยทั่วไป” ตามสัญญาเลขที่ ทน 44/2557 ประจำปีงบประมาณ 2557

ขอขอบคุณ ดร.มงคล เวสรัสซวยย์ คุณเทวา อุปธารปรีชา สพ.ญ.อรรณพ พักขำ และ ดร. เกรียงไกร สถาพรวานิชย์ ที่ให้คำปรึกษาและอำนวยความสะดวกในการดำเนินการวิจัยท้ายที่สุดขอขอบพระคุณครอบครัวที่ให้การสนับสนุนและเป็นกำลังใจจนสามารถทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงด้วยดี

หากผลการศึกษานี้มีข้อบกพร่องประการใด ผู้ศึกษาขอน้อมรับไว้เพื่อปรับปรุงแก้ไขในการศึกษาครั้งต่อไป

นางสาววราพร รัตนเสนา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย	(1)
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	(2)
กิตติกรรมประกาศ	(3)
สารบัญตาราง	(9)
สารบัญภาพ	(14)
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา	3
1.3 ขอบเขตของการศึกษา	3
1.4 ระเบียบวิธีการศึกษา	3
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
บทที่ 2 วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
2.1 Aflatoxins	8
2.2 Ochratoxin A	10
2.3 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12
2.4 แนวทางการควบคุมและแก้ไขปัญหาสารพิษจากเชื้อรา	14
2.5 สภาวะทางเดินอาหารสัตว์ปีก	18
2.6 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในอาหารโดยวิธี Kjeldahl	20
2.7 การทดสอบความเป็นพิษโดยใช้ไร่น้ำ	20
2.7.1 อาร์ทีเมีย	21
2.7.2 ไร่น้ำนางฟ้า	23

บทที่ 3 วิธีการวิจัย	25
3.1 การเตรียมเชื้อ <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	25
3.1.1 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเพื่อศึกษา การเจริญเติบโตและเก็บเซลล์ <i>S. cerevisiae</i>	25
3.1.2 สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ศึกษาการเจริญเติบโตและแยกเก็บเซลล์	26
3.1.3 สถานที่ทำการทดลองและเก็บข้อมูล	26
3.1.4 การเพาะเลี้ยงเพื่อศึกษาการเจริญเติบโตและแยกเก็บเซลล์ <i>S. cerevisiae</i>	26
3.2 การทดลองเปรียบเทียบประสิทธิภาพการดูดซับสารพิษ aflatoxin B ₁ และ ochratoxin A ใน PBS ของเชื้อ <i>S. cerevisiae</i> 4 สายพันธุ์	27
3.2.1 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลองเปรียบเทียบ ประสิทธิภาพการดูดซับสารพิษ aflatoxin B ₁ และ ochratoxin A ใน PBS	27
3.2.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลองเปรียบเทียบประสิทธิภาพ การดูดซับสารพิษ aflatoxin B ₁ และ ochratoxin A ใน PBS	28
3.2.3 สถานที่ทำการทดลองและเก็บข้อมูล	29
3.2.4 การเตรียมสารพิษมาตรฐาน	29
3.2.5 การทดลองเปรียบเทียบประสิทธิภาพการดูดซับสารพิษ aflatoxin B ₁ และ ochratoxin A ใน PBS ของเชื้อ <i>S. cerevisiae</i> 4 สายพันธุ์	30
3.2.6 การทดลองเปรียบเทียบประสิทธิภาพการดูดซับสารพิษ aflatoxin B ₁ ใน PBS	33
3.3 การเติมเซลล์ <i>S. cerevisiae</i> ลงในอาหารไก่เนื้อเพื่อเพิ่ม crude protein	35
3.3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลองเปรียบเทียบ crude protein ในอาหารไก่เนื้อที่มีการเติมเซลล์ <i>S. cerevisiae</i>	35

3.3.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลองเปรียบเทียบ crude protein ในอาหารไก่เนื้อที่มีการเติมเซลล์ <i>S. cerevisiae</i>	36
3.3.3 สถานที่ทำการทดลองและเก็บข้อมูล	36
3.3.4 การทดสอบ Kjeldahl Nitrogen Analysis ของ cell suspension และตรวจวัดน้ำหนักแห้งของเซลล์ <i>S. cerevisiae</i> (AOAC, 1990)	36
3.3.5 การผสมเซลล์ <i>S. cerevisiae</i> ลงในอาหารไก่เนื้อและทดสอบ Kjeldahl Nitrogen Analysis	37
3.4 การทดสอบประสิทธิภาพ <i>S. cerevisiae</i> ดูดซับสารพิษ aflatoxin B ₁ และ ochratoxin A ในสภาวะจำลองทางเดินอาหาร	37
3.4.1 อุปกรณ์และเครื่องมือในการทดสอบประสิทธิภาพ <i>S. cerevisiae</i> ดูดซับสารพิษ aflatoxin B ₁ และ ochratoxin A ในสภาวะ จำลองทางเดินอาหาร	37
3.4.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพ <i>S. cerevisiae</i> ดูดซับสารพิษ aflatoxin B ₁ และ ochratoxin A ในสภาวะจำลองทางเดินอาหาร	39
3.4.3 สถานที่ทำการทดลองและเก็บข้อมูล	39
3.4.4 การเตรียมสารพิษมาตรฐาน	39
3.4.5 การเตรียมอาหารไก่เนื้อปนเปื้อนสารพิษ aflatoxin B ₁ และ ochratoxin A	40
3.4.6 การทดสอบประสิทธิภาพ <i>S. cerevisiae</i> ดูดซับสารพิษ aflatoxin B ₁ และ ochratoxin A ในสภาวะจำลองทางเดินอาหาร	41
3.5 การทดสอบความเป็นพิษของอาหารไก่เนื้อที่ปนเปื้อน aflatoxin B ₁ และ ochratoxin A หลังผสมกับเซลล์ <i>S. cerevisiae</i> โดยใช้โรน้าเป็นสัตว์ทดลอง	43
3.5.1 อุปกรณ์และเครื่องมือในการทดสอบความเป็นพิษของอาหารไก่เนื้อ โดยใช้โรน้าเป็นสัตว์ทดลอง	43
3.5.2 สารเคมีในการทดสอบความเป็นพิษของอาหารไก่เนื้อโดยใช้โรน้า เป็นสัตว์ทดลอง	44
3.5.3 การเพาะเลี้ยงโรอาร์ทีเมีย	44
3.5.4 การเพาะเลี้ยงโรน้านางฟ้าไทย	45
3.5.5 การทดสอบอุณหภูมิที่อาร์ทีเมียและโรน้านางฟ้าไทยรอดชีวิตได้	45
3.5.6 การทดสอบสารละลายที่อาร์ทีเมียและโรน้านางฟ้าไทยรอดชีวิตได้	45
3.5.7 การทดสอบความเป็นพิษของ aflatoxin B ₁ และ ochratoxin A ที่มีต่ออาร์ทีเมีย	46

3.5.8 การทดสอบความเป็นพิษของอาหารไก่เนื้อที่ปนเปื้อน aflatoxin B ₁ และ ochratoxin A หลังผสมกับเซลล์ <i>S. cerevisiae</i> โดยใช้ไร่น้ำเป็นสัตว์ทดลอง	47
3.6 การทดสอบเปรียบเทียบปริมาณของ β -glucan ของเชื้อ <i>S. cerevisiae</i> 4 สายพันธุ์	48
3.6.1 อุปกรณ์ในการสกัดและตรวจวัดปริมาณ β -glucan	48
3.6.2 สารเคมีในการสกัดและตรวจวัดปริมาณ β -glucan	48
3.6.3 การสกัด β -glucan จากผนังเซลล์ยีสต์และตรวจวัดปริมาณ β -glucan	48
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	50
4.1 การศึกษาสมบัติการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	50
4.2 ประสิทธิภาพการดูดซับสารพิษ aflatoxin B ₁ และ ochratoxin A ใน Phosphate buffer saline ของเชื้อ <i>S. cerevisiae</i> 4 สายพันธุ์	51
4.2.1 การทดสอบเปรียบเทียบประสิทธิภาพการดูดซับสารพิษ aflatoxin B ₁ และ ochratoxin A ใน phosphate buffer saline ของเชื้อ <i>S. cerevisiae</i> 4 สายพันธุ์	51
4.2.2 การทดสอบเปรียบเทียบประสิทธิภาพการดูดซับสารพิษ aflatoxin B ₁ ใน PBS ของเชื้อ <i>S. cerevisiae</i> สายพันธุ์ TISTR 5013 และ TISTR 5049	57
4.3 การเติมเซลล์ <i>S. cerevisiae</i> ลงในอาหารไก่เนื้อเพื่อเพิ่ม crude protein	58
4.3.1 การทดสอบ Kjeldahl Nitrogen Analysis ของ cell suspension และตรวจวัดน้ำหนักแห้งของเซลล์ <i>S. cerevisiae</i>	58
4.3.2 การเติมเซลล์ <i>S. cerevisiae</i> ลงในอาหารไก่เนื้อและทำการทดสอบเปรียบเทียบ crude protein ที่เพิ่มขึ้นในอาหารด้วย Kjeldahl nitrogen analysis	59
4.4 ประสิทธิภาพ <i>S. cerevisiae</i> ในการดูดซับสารพิษ aflatoxin B ₁ และ ochratoxin A ในสภาวะจำลองทางเดินอาหาร	60

	(8)
4.4.1 Bioaccessibility ของ aflatoxin B ₁ และ ochratoxin A ในสภาวะจำลองทางเดินอาหาร	60
4.4.2 การดูดซับสารพิษ aflatoxin B ₁ และ ochratoxin A ของ <i>S. cerevisiae</i> TISTR 5013 ในสภาวะจำลองทางเดินอาหาร	62
4.5 การทดสอบความเป็นพิษของอาหารไก่เนื้อที่ปนเปื้อน aflatoxin B ₁ และ ochratoxin A หลังผสมกับเซลล์ <i>S. cerevisiae</i> โดยใช้โรน้าเป็นสัตว์ทดลอง	65
4.5.1 การทดสอบอุณหภูมิที่อาร์ทีเมียและโรน้านางฟ้ารอดชีวิตได้	65
4.5.2 การทดสอบสารละลายที่อาร์ทีเมียและโรน้านางฟ้าไทยรอดชีวิตได้	68
4.5.3 การทดสอบความเป็นพิษของ aflatoxin B ₁ และ ochratoxin A ที่มีต่ออาร์ทีเมีย	70
4.5.4 การทดสอบความเป็นพิษของอาหารไก่เนื้อที่ปนเปื้อน aflatoxin B ₁ และ ochratoxin A หลังผสมกับเซลล์ <i>S. cerevisiae</i> โดยใช้โรน้าเป็นสัตว์ทดลอง	75
4.6 การทดสอบเปรียบเทียบปริมาณของ β -glucan ของเชื้อ <i>S. cerevisiae</i> 4 สายพันธุ์	78
บทที่ 5 สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ	79
5.1 สรุปผลการศึกษา	79
5.2 ข้อเสนอแนะ	81
รายการอ้างอิง	82
ภาคผนวก	105
ภาคผนวก ก รูปภาพ	106
ภาคผนวก ข ผลการทดลอง	115
ภาคผนวก ค ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ	122
ประวัติผู้เขียน	129

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 สภาวะที่เหมาะสมกับการสร้างสารพิษของเชื้อรา	6
2.2 รายงานผลการสำรวจ ochratoxin A ที่ปนเปื้อนในอาหารและ วัตถุดิบอาหารสัตว์	11
3.1 สรุปลักษณะทดลองศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการดูดซับสารพิษ aflatoxin B ₁ และ ochratoxin A ใน PBS ของเซลล์ <i>S. cerevisiae</i> แต่ละสายพันธุ์	31
3.2 สภาวะเครื่อง HPLC ที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณ aflatoxin B ₁ และ ochratoxin A	33
3.3 กลุ่มทดลองศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการดูดซับสารพิษ aflatoxin B ₁ ใน PBS ของเซลล์ <i>S. cerevisiae</i>	34
3.4 กลุ่มทดลองการทดสอบประสิทธิภาพ <i>S. cerevisiae</i> ดูดซับสารพิษ aflatoxin B ₁ และ ochratoxin A ในสภาวะจำลอง ทางเดินอาหาร	40
4.1 เปอร์เซ็นต์ของสารพิษ AFB ₁ ที่ลดลง ใน PBS หลังจากนำไปป้อนกับ <i>S. cerevisiae</i> ที่ตายแล้วที่อุณหภูมิ 40 °C นาน 4 ชั่วโมงและ นำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ELISA	54
4.2 เปอร์เซ็นต์ของสารพิษ AFB ₁ ที่ลดลงใน PBS หลังจากนำไปป้อนกับ <i>S. cerevisiae</i> ที่ตายแล้ว ที่อุณหภูมิ 40 °C นาน 4 ชั่วโมงและ นำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC	55
4.3 เปอร์เซ็นต์ของสารพิษ OTA ที่ลดลงใน PBS หลังจากนำไปป้อนกับ <i>S. cerevisiae</i> ที่ตายแล้ว ที่อุณหภูมิ 40 °C นาน 4 ชั่วโมงและ นำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ELISA	55
4.4 เปอร์เซ็นต์ของสารพิษ OTA ที่ลดลงใน PBS หลังจากนำไปป้อนกับ <i>S. cerevisiae</i> ที่ตายแล้ว ที่อุณหภูมิ 40 °C นาน 4 ชั่วโมงและ นำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC	56

4.5	เปอร์เซ็นต์การลดลงของสารพิษ AFB ₁ ใน PBS หลังจากนำไปหมักกับ <i>S. cerevisiae</i> TISTR 5013 หรือ TISTR 5049 ที่อุณหภูมิ 40 °C นาน 4 ชั่วโมงและนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ELISA	58
4.6	น้ำหนักเซลล์ <i>S. cerevisiae</i> อบแห้งและ Total Kjeldahl nitrogen ของ cell suspension 10 ¹⁰ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร	59
4.7	crude protein (กรัมต่อ 100 กรัม) ของอาหารไก่เนื้อ จากการเติม เซลล์ตายของ <i>S. cerevisiae</i>	59
4.8	ผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นของ AFB ₁ และ OTA ด้วยเทคนิค ELISA ของสารละลายในกลุ่ม negative control และ positive control	61
4.9	เปอร์เซ็นต์การลดลงของสารพิษ AFB ₁ หลังจากนำไปผสมกับ <i>S. cerevisiae</i> TISTR 5013 ในสภาวะทดสอบที่มีอาหารไก่เนื้อ และสภาวะจำลองทางเดินอาหารจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ELISA	63
4.10	เปอร์เซ็นต์การลดลงของสารพิษ OTA หลังจากนำไปผสมกับ <i>S. cerevisiae</i> TISTR 5013 ในสภาวะทดสอบที่มีอาหารไก่เนื้อและสภาวะจำลองทางเดินอาหารและนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ELISA	63
4.11	เปอร์เซ็นต์การลดลงของสารพิษ OTA และ AFB ₁ ในอาหารไก่เนื้อที่ผสมกับ <i>S. cerevisiae</i> TISTR 5013 ภายใต้สภาวะจำลองทางเดินอาหาร และนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC	64
4.12	การทดสอบอุณหภูมิที่อาร์ทีเมียและไร่น้ำนางฟ้าไทยรอดชีวิตได้	67
4.13	การทดสอบสารละลายที่อาร์ทีเมียและไร่น้ำนางฟ้าไทยรอดชีวิตได้	69
4.14	การทดสอบความเป็นพิษของ AFB ₁ ที่มีต่ออาร์ทีเมีย	71
4.15	การทดสอบความเป็นพิษของ AFB ₁ ปนเปื้อน ในอาหารไก่เนื้อที่มีต่ออาร์ทีเมีย	72
4.16	การทดสอบความเป็นพิษของ OTA ที่มีต่ออาร์ทีเมีย	73
4.17	การทดสอบความเป็นพิษของ OTA ปนเปื้อน ในอาหารไก่เนื้อที่มีต่ออาร์ทีเมีย	74
4.18	ค่า EC ₅₀ จากการติดตามการทดสอบความเป็นพิษของ AFB ₁ และ OTA	74

4.19 ผลการทดสอบความเป็นพิษของอาหารไก่เนื้อที่ปนเปื้อน AFB ₁ และ OTA หลังผสมกับเซลล์ <i>S. cerevisiae</i> โดยทดลองในสารละลาย PBS (pH7.4)	77
4.20 ผลการทดสอบความเป็นพิษของอาหารไก่เนื้อที่ปนเปื้อน AFB ₁ และ OTA หลังผสมกับเซลล์ <i>S. cerevisiae</i> โดยทดลองในสภาวะ จำลองทางเดินอาหารไก่เนื้อ	77
4.21 ปริมาณ β -glucan ของเซลล์ <i>S. cerevisiae</i>	78
ข1 ผลการวิเคราะห์ความเข้มข้น AFB ₁ ใน PBS (pH7.4) หลังจากนำไปบ่มกับ <i>S. cerevisiae</i> อบแห้งที่อุณหภูมิ 40 °C นาน 4 ชั่วโมง (การทดลอง 3.2.5)	115
ข2 ผลการวิเคราะห์ความเข้มข้น OTA ใน PBS (pH7.4) หลังจากนำไปบ่มกับ <i>S. cerevisiae</i> อบแห้งที่อุณหภูมิ 40 °C นาน 4 ชั่วโมง (การทดลอง 3.2.5)	116
ข3 ผลการวิเคราะห์ความเข้มข้น AFB ₁ ใน PBS (pH7.4) หลังจากนำไปบ่มกับ <i>S. cerevisiae</i> TISTR 5013 หรือ TISTR 5049 ที่อุณหภูมิ 40 °C นาน 4 ชั่วโมง และนำมาวิเคราะห์ความเข้มข้นสารพิษใน PBS ด้วยเทคนิค ELISA (การทดลอง 3.2.6)	117
ข4 ผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นของ AFB ₁ ด้วยเทคนิค ELISA ในการทดสอบ ประสิทธิภาพการดูดซับสารพิษของเซลล์ <i>S. cerevisiae</i> TISTR 5013 ที่ผ่าน การนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำแรงดันสูงโดยดำเนินการทดลองภายใต้สภาวะจำลอง ทางเดินอาหาร (การทดลอง 3.4.6)	118
ข5 ผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นของ OTA ด้วยเทคนิค ELISA ในการทดสอบ ประสิทธิภาพการดูดซับสารพิษของเซลล์ <i>S. cerevisiae</i> TISTR 5013 ที่ผ่าน การนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำแรงดันสูงมาแล้วโดยดำเนินการทดลองภายใต้ สภาวะจำลองทางเดินอาหาร (การทดลอง 3.4.6)	119
ข6 ผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นของ AFB ₁ ด้วยเทคนิค HPLC ในการทดสอบ ประสิทธิภาพการดูดซับสารพิษของเซลล์ <i>S. cerevisiae</i> TISTR 5013 ที่ผ่าน การนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำแรงดันสูงมาแล้วโดยดำเนินการทดลองภายใต้ สภาวะจำลองทางเดินอาหาร (การทดลอง 3.4.6)	120

ข7 ผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นของ OTA ด้วยเทคนิค HPLC ในการทดสอบประสิทธิภาพการดูดซับสารพิษของเซลล์ <i>S. cerevisiae</i> TISTR 5013 ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำแรงดันสูงมาแล้วโดยดำเนินการทดลองภายใต้สภาวะจำลองทางเดินอาหาร (การทดลอง 3.4.6)	121
ค1 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติเปอร์เซ็นต์การลดลงของสารพิษ AFB ₁ ใน PBS (pH 7.4) หลังจากนำไปป้อนกับ <i>S. cerevisiae</i> ที่อุณหภูมิ 40 °C นาน 4 ชั่วโมงและนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ELISA	122
ค2 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติเปอร์เซ็นต์การลดลงของสารพิษ AFB ₁ ใน PBS (pH 7.4) หลังจากนำไปป้อนกับ <i>S. cerevisiae</i> ที่อุณหภูมิ 40 °C นาน 4 ชั่วโมงและนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC	122
ค3 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติเปอร์เซ็นต์การลดลงของสารพิษ OTA ใน PBS (pH 7.4) หลังจากนำไปป้อนกับ <i>S. cerevisiae</i> ที่อุณหภูมิ 40 °C นาน 4 ชั่วโมงและนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ELISA	123
ค4 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติเปอร์เซ็นต์การลดลงของสารพิษ OTA ใน PBS (pH 7.4) หลังจากนำไปป้อนกับ <i>S. cerevisiae</i> ที่อุณหภูมิ 40 °C นาน 4 ชั่วโมงและนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC	123
ค5 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติเปอร์เซ็นต์การลดลงของสารพิษ AFB ₁ ใน PBS (pH 7.4) หลังจากนำไปป้อนกับ <i>S. cerevisiae</i> TISTR 5013 หรือ TISTR 5049 ที่อุณหภูมิ 40 °C นาน 4 ชั่วโมงและนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ELISA	124
ค6 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ crude protein (กรัมต่อ 100 กรัม) ของอาหารไก่เนื้อ	124
ค7 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติเปอร์เซ็นต์การลดลงของสารพิษ AFB ₁ หลังจากนำไปผสมกับ <i>S. cerevisiae</i> TISTR 5013 ในสภาวะทดสอบที่มีอาหารไก่และสภาวะจำลองทางเดินอาหารจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ELISA	125
ค8 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติเปอร์เซ็นต์การลดลงของสารพิษ OTA หลังจากนำไปผสมกับ <i>S. cerevisiae</i> TISTR 5013 ในสภาวะทดสอบที่มีอาหารไก่และสภาวะจำลองทางเดินอาหารและนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ELISA	125

- ค9 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติการทดสอบความเป็นพิษด้วยอาร์ทีเมียของ
อาหารไก่ที่ปนเปื้อน AFB₁ และ OTA หลังผสมกับเซลล์ *S. cerevisiae*
ในสารละลาย PBS (pH 7.4) และสภาวะจำลองทางเดินอาหาร
ณ ชั่วโมงที่ 3 ของการทดลอง 126
- ค10 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติการทดสอบความเป็นพิษด้วยอาร์ทีเมียของ
อาหารไก่ที่ปนเปื้อน AFB₁ และ OTA หลังผสมกับเซลล์ *S. cerevisiae*
ในสารละลาย PBS (pH 7.4) และสภาวะจำลองทางเดินอาหาร
ณ ชั่วโมงที่ 6 ของการทดลอง 126
- ค11 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติการทดสอบความเป็นพิษด้วยอาร์ทีเมียของ
อาหารไก่ที่ปนเปื้อน AFB₁ และ OTA หลังผสมกับเซลล์ *S. cerevisiae*
ในสารละลาย PBS (pH 7.4) และสภาวะจำลองทางเดินอาหาร
ณ ชั่วโมงที่ 9 ของการทดลอง 127
- ค12 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติการทดสอบความเป็นพิษด้วยอาร์ทีเมียของ
อาหารไก่ที่ปนเปื้อน AFB₁ และ OTA หลังผสมกับเซลล์ *S. cerevisiae*
ในสารละลาย PBS (pH 7.4) และสภาวะจำลองทางเดินอาหาร
ณ ชั่วโมงที่ 12 ของการทดลอง 127
- ค13 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติปริมาณ β -glucan ของเซลล์ *S. cerevisiae* 128

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 โครงสร้างผนังเซลล์ <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	13
3.1 ขั้นตอนการทดสอบประสิทธิภาพการดูดซับสารพิษของ <i>S. cerevisiae</i> ภายใต้สภาวะจำลองทางเดินอาหารของไก่	42
3.2 ขั้นตอนการเตรียมสารทดสอบสำหรับอาร์ทีเมียและไร่น้ำนางฟ้า	46
4.1 จลนพลศาสตร์การเจริญของเชื้อ <i>S. cerevisiae</i> สายพันธุ์ TISTR 5013, TISTR 5049, TISTR 5343, และ TISTR 5059	50
ก1 การเพาะเลี้ยง <i>S. cerevisiae</i> ใน Potato dextrose broth บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เขย่าความเร็ว 100 รอบต่อนาทีด้วยเครื่อง Incubator shaker	106
ก2 อุปกรณ์การวัดค่าความขุ่นของเชื้อ <i>S. cerevisiae</i> ที่เพาะเลี้ยงใน ใน Potato dextrose broth ด้วยเครื่อง spectrophotometer	106
ก3 อุปกรณ์กรองและล้างเก็บเซลล์ <i>S. cerevisiae</i>	107
ก4 การเจือจางและนับจำนวนเซลล์ด้วย Hemocytometer	107
ก5 สารผสม cell suspension กับสารมาตรฐาน aflatoxin B ₁ และสารมาตรฐาน ochratoxin A ใน eppendorps	107
ก6 ชุดทดสอบ Aflatoxin ELISA Test kit (ScreenEZ [®])	108
ก7 ชุดทดสอบ RIDASCREEN [®] FAST Ochratoxin A	108
ก8 ขวด Mini Uniprep Syringeless filter สำหรับกรองและ บรรจุสารสำหรับการฉีด HPLC	109
ก9 เครื่องวิเคราะห์ HPLC Agilent 1100 Series	109
ก10 สารที่ได้จากการกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.4 ในการทดลอง ข้อ 3.4.6 การทดสอบประสิทธิภาพ <i>S. cerevisiae</i> ดูดซับ สารพิษ aflatoxin B ₁ และ ochratoxin A ในสภาวะจำลองทางเดินอาหาร	110
ก11 (1) การปล่อยสารผสมผ่าน Immunoaffinity column (2) การ elute สารพิษออกจาก Immunoaffinity column โดยใช้ methanol	110
ก12 อุปกรณ์การเตรียมน้ำเค็มสำหรับเพาะอาร์ทีเมียและไขอาร์ทีเมีย	111
ก13 อาหารไร่น้ำนางฟ้า ไขไร่น้ำนางฟ้าไทย และถุงผ้าบรรจุไข่	111
ก14 การเพาะเลี้ยงไร่น้ำนางฟ้าไทย	112
ก15 microtiterplate ในการทดสอบอาร์ทีเมียและอาร์ทีเมียอายุไม่เกิน 1 วัน	112

ก16 การทดสอบสภาวะเบื้องต้นที่ไร่น้ำนางฟ้ารอดชีวิตได้	112
ก17 กล้องจุลทรรศน์ดิจิทัลที่ใช้ในการดูพฤติกรรมอาร์ทีเมีย	113
ก18 สารสกัด β -glucan จากเซลล์ <i>S. cerevisiae</i> โดยการต้มด้วยต่าง	113
ก19 ชุดทดสอบ Enzytec™ Color Gluca Test®	114
และการตรวจวัดปริมาณ β -glucan ด้วย spectrophotometer	



บทที่ 1

บทนำ

สารพิษจากเชื้อรา (Mycotoxins) เป็นผลผลิตทุติยภูมิ (secondary metabolites) ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นมาช่วงระหว่างการเจริญเติบโตของเชื้อราบางสายพันธุ์ ได้แก่ *Cladosporium* spp., *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Fusarium* spp., *Alternaria* spp., เป็นต้น ปัจจุบันมีรายงานการค้นพบและจัดแบ่งสารพิษจากเชื้อราออกเป็น 300-400 ชนิด (Berthiller *et al.*, 2007; Bryden, 2012; Fujimoto, 2011; Sweeney และ Dobson, 1998) สารพิษที่มีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมอาหารสัตว์และถูกกล่าวถึงในรายงานของ EU SCAN (2003) ได้แก่ aflatoxin B₁, ergot sclerotia, deoxynivalenol, และ (โดยเฉพาะ fumonisin B₁) การปนเปื้อนสารพิษจากเชื้อราในวัตถุดิบอาหารสัตว์กลุ่มธัญญาหารต่างๆ สามารถตรวจพบได้ตั้งแต่ขณะเพาะปลูก หลังจากเก็บเกี่ยวและนำมาเก็บรักษาในสภาวะที่ไม่เหมาะสม เป็นการเพิ่มโอกาสที่เชื้อราจะผลิตสารพิษออกมามากขึ้น แม้ผ่านเข้าสู่กระบวนการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์อาหารสำเร็จรูปสารพิษจะยังคงอยู่ เนื่องจากโมเลกุลของสารพิษมีความคงตัวสูงและไม่สลายตัวในความร้อนระดับของการแปรรูปอาหาร (Bryden, 2012) เมื่อสัตว์กินอาหารที่มีการปนเปื้อนจะเกิดความเป็นพิษต่อตัวสัตว์และมีการตกค้างต่อมายังผู้บริโภคทั้งในรูปสารตั้งต้นและอนุพันธ์ (EFSA, 2004; Monaci *et al.*, 2005) ความเป็นพิษของสารพิษจากเชื้อราเกิดในหลายระบบของร่างกายได้แก่ ก่อให้เกิดความชำรุดเสียหายของเนื้อเยื่อและอวัยวะในร่างกาย กัดการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันและระบบการกำจัดสารพิษ ทำให้ระบบประสาทเสียสมดุล ระบบสืบพันธุ์บกพร่องจนถึงก่อให้เกิดลูกวิรูป และสารพิษจากเชื้อราหลายชนิดถูกจัดเป็นสารก่อมะเร็ง เช่น aflatoxins, ochratoxin A, fumonisin, เป็นต้น (CAST, 2003; JECFA, 2001)

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัญหาการปนเปื้อนสารพิษจากเชื้อราที่สืบเนื่องต่อกันมาในห่วงโซ่การผลิตอาหาร ยังคงมีรายงานการตรวจพบมาโดยตลอด ทั้งในวัตถุดิบอาหารสัตว์และในผลิตภัณฑ์จากสัตว์ หน่วยงานเกี่ยวกับอาหารปลอดภัยระดับชาติและระหว่างประเทศจึงกำหนดกฎเกณฑ์มาตรฐานปริมาณการปนเปื้อน ออกมาตรการในการควบคุมป้องกัน จนถึงการแก้ปัญหาเพื่อลดความสูญเสียจากการบริโภคอาหารที่มีสารพิษจากเชื้อรา แนวทางการศึกษาเพื่อลดปริมาณการปนเปื้อนในระหว่างเพาะปลูกและเก็บรักษาได้แก่ การพัฒนาพันธุ์กรรมพืชที่ทนต่อโรค แมลงและเชื้อรา (Marks and Wyatt, 1979; Munkvold, 2003) การใช้เชื้อจุลินทรีย์เพื่อกดการเจริญเติบโตและยับยั้งการสร้างสารพิษจากเชื้อรา (biocontrol) (De Felice *et al.*, 2008) ใช้มาตรการควบคุมการผลิตด้วยระบบ HACCP (Hazard Analysis Critical Control Points system) (Aldred and Magan, 2004) แต่แนวทางการป้องกัน

นั้นต้องประกอบไปด้วยความร่วมมือของหลายภาคส่วนของหน่วยการผลิต ซึ่งยากต่อการคงรักษาให้ปฏิบัติได้อย่างถูกต้องและสม่ำเสมอทั่วกัน จึงนำมาสู่การศึกษาเพื่อแก้ปัญหาวัตถุดิบที่มีสารพิษจากเชื้อรา เพื่อให้คนหรือสัตว์ที่ต้องบริโภคอาหารเหล่านี้ได้รับสารพิษในปริมาณที่น้อยที่สุดภายใต้ข้อจำกัดทางธุรกิจ การกำจัดหรือลด bioavailability ของสารพิษจากเชื้อราโดยวิธีการทางเคมีและกายภาพ เช่น การคัดเลือกวัตถุดิบ การฉายรังสี การใช้ความร้อน การใช้ตัวทำละลายสกัดสารพิษออกมา เป็นต้น วิธีการเหล่านี้ต้องใช้พลังงานและค่าใช้จ่ายในการดำเนินการค่อนข้างสูงและอาจส่งผลกระทบต่อคุณภาพของวัตถุดิบ (Afifi *et al.*, 2003; Huwig *et al.*, 2001; Kabak, 2009; Rustom, 1997) วิธีการจุลชีววิทยาจึงเป็นทางเลือกที่ได้รับความสนใจ ได้แก่ การใช้เชื้อจุลินทรีย์ดูดซับสารพิษจากเชื้อรา โดยเฉพาะการศึกษาเกี่ยวกับการเติมเซลล์ยีสต์หรือกลุ่ม Lactic acid bacteria ลงในอาหารเพื่อลดความเป็นพิษอันเกิดจากสารพิษจากเชื้อราที่ปนเปื้อนมากับวัตถุดิบ (Kapetanakou *et al.*, 2012; Pizzolitto *et al.*, 2012a; Shetty *et al.*, 2007; Velmourougane *et al.*, 2011) ทำให้ปัจจุบันประเทศไทยมีการนำเข้าสินค้าจำพวกตัวดูดซับสารพิษจากเชื้อราเพื่อใช้ผสมลงในอาหารสัตว์ ซึ่งมีราคาค่อนข้างสูงส่งผลกระทบต่อต้นทุนการผลิต ขณะที่การศึกษาโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่มีการจัดจำหน่ายในประเทศมีงานวิจัยออกมาไม่มากนัก ผู้วิจัยจึงนำเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม GRAS (General Recognized as Safe) ได้แก่ *Saccharomyces cerevisiae* ที่มีจำหน่ายในประเทศมาทดสอบทางห้องปฏิบัติการถึงประสิทธิภาพการดูดซับสารพิษจากเชื้อรา

นอกจากคุณสมบัติในการเข้าจับกับสารพิษแล้ว เมื่อผ่านเข้าสู่ทางเดินอาหารโมเลกุลของสารพิษไม่ควรหลุดออกจากเซลล์ ในการศึกษาครั้งนี้จึงยืนยันผลการใช้ในอาหารสัตว์โดยทดสอบศักยภาพการดูดซับสารพิษของเชื้อภายใต้สภาวะจำลองทางเดินอาหารไก่ เพื่อประเมิน bioavailability ที่ร่างกายจะมีโอกาสได้รับสารพิษ แต่เพียงการทดสอบในห้องปฏิบัติการอาจไม่เพียงพอที่จะสรุปได้ว่า หลังจากโมเลกุลของสารพิษถูกดูดซับด้วยเซลล์ *S. cerevisiae* แล้วนั้นความเป็นพิษของสารพิษจากเชื้อราจะลดลง จึงมีหลายการศึกษาวิจัยที่นำมาทดสอบกับสัตว์ทดลอง ได้แก่ หนูและไก่ (Madrigal-Santillán *et al.*, 2006; Matur *et al.*, 2011; Zaghini *et al.*, 2007) การทดสอบในลักษณะดังกล่าวต้องใช้งบประมาณที่สูงและมีสถานที่เหมาะสม ด้วยข้อจำกัดเหล่านี้การทดสอบความเป็นพิษจึงปรับมาใช้กับโรน้าที่สามารถเลี้ยงได้ง่าย ดำเนินการในพื้นที่จำกัดและมีค่าใช้จ่ายลดลง (Dvorak *et al.*, 2012)

คุณสมบัติอื่นของ *S. cerevisiae* ที่เป็นผลดีต่ออุตสาหกรรมการผลิตอาหารสัตว์คือการเป็นแหล่งโปรตีนเซลล์เดียว เนื่องจากเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* มีส่วนประกอบที่เป็นโปรตีนอยู่สูง (ประมาณ 45-55 % ของน้ำหนักแห้ง) โดยมีกรดอะมิโนชนิดจำเป็น ได้แก่ ไลซีน ทรีโอนีน ไอโซลิวซีน วาลีน ซีสทีอีน เมไทโอนีน และทริปโตเฟน ในสัดส่วนที่มากกว่าปลาป่นและกากถั่วเหลือง (Boze *et al.*, 1992) จึงอนุมานได้ว่าการเติมเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* อาจส่งผลให้สัดส่วนของโปรตีนในอาหารสัตว์สูงขึ้น

1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา

ศึกษาประสิทธิภาพการการดูดซับสารพิษ 2 ชนิดคือ aflatoxin B₁ และ ochratoxin A ด้วยเซลล์ *Saccharomyces cerevisiae* 4 สายพันธุ์และนำไปประยุกต์ใช้ในอาหารไก่เนื้อ

1.3 ขอบเขตของการศึกษา

1.3.1 การศึกษาคุณสมบัติในการเจริญเติบโต (growth curves) ของเชื้อ *S. cerevisiae* 4 สายพันธุ์จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

1.3.2 ทดสอบเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเซลล์ *S. cerevisiae* 4 สายพันธุ์ในการลด aflatoxin B₁ และ ochratoxin A ในสารละลาย Phosphate buffer saline (PBS; pH7.4)

1.3.3 ทดสอบเปรียบเทียบสัดส่วนของ crude protein ในอาหารไก่เนื้อที่ทำการเติมเซลล์ *S. cerevisiae* ลงไป

1.3.4 ทดสอบประสิทธิภาพการดูดซับ aflatoxin B₁ และ ochratoxin A ที่ปนเปื้อนในอาหารไก่เนื้อภายใต้สภาวะจำลองทางเดินอาหารไก่ โดยใช้เซลล์ *S. cerevisiae* ที่คัดเลือกมาเพียง 1 สายพันธุ์

1.3.5 ทดสอบประสิทธิภาพการลดปริมาณสารพิษ aflatoxin B₁ และ ochratoxin A ที่ปนเปื้อนในอาหารไก่เนื้อด้วยเซลล์ *S. cerevisiae* โดยใช้โรน้าเป็นสัตว์ทดลอง

1.3.6 ทดสอบเปรียบเทียบปริมาณของ β -glucan ที่สกัดมาจากเซลล์ *S. cerevisiae* 4 สายพันธุ์

1.4 ระเบียบวิธีการศึกษา

1.4.1 ศึกษาคุณสมบัติการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. cerevisiae* 4 สายพันธุ์ คือ TISTR 5013, TISTR 5049, TISTR 5059, และ TISTR 5343 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยเพื่อเก็บเซลล์ในช่วง log phase มาทำการทดลองต่อไป

1.4.2 ทดสอบเปรียบเทียบประสิทธิภาพการดูดซับ aflatoxin B₁ และ ochratoxin A ในสารละลาย Phosphate buffer saline (PBS; pH7.4) ของเซลล์ตาย *S. cerevisiae* ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำแรงดันสูงแล้ว 4 สายพันธุ์ โดยทำการผสมเซลล์ *S. cerevisiae* ลงใน PBS ที่มีสารพิษทั้งสองชนิดและทำการบ่มที่อุณหภูมิ 40 °C นาน 4 ชั่วโมง จากนั้นตรวจวัดความเข้มข้นของสารพิษที่คงเหลือใน PBS เพื่อเทียบเคียงเป็นเปอร์เซ็นต์ของสารพิษที่ลดลงจากการถูกดูดซับ (%Reduction)

1.4.3 ทำการเติมเซลล์ *S. cerevisiae* ลงในอาหารไก่เนื้อกลุ่มละ 1 สายพันธุ์ในปริมาณที่ใกล้เคียงกันและใช้เทคนิค Kjeldahl Nitrogen Analysis วิเคราะห์หาสัดส่วนของ crude protein ที่เพิ่มขึ้นในอาหารไก่เนื้อ

1.4.4 คัดเลือก *S. cerevisiae* ที่ดูดซับ aflatoxin B₁ และ ochratoxin A ใน PBS ได้ดีที่สุดเพียง 1 สายพันธุ์ มาทำการทดสอบประสิทธิภาพการดูดซับสารพิษสารพิษทั้งสองชนิดที่ปนเปื้อนในอาหารไก่เนื้อภายใต้สภาวะจำลองทางเดินอาหารไก่ จากนั้นนำของเหลวที่ได้จากสภาวะจำลองมาทดสอบความเป็นพิษโดยใช้โรน้าเป็นสัตว์ทดลอง

1.4.5 เปรียบเทียบปริมาณสาร β -glucan ที่ได้มาจากการสกัดเซลล์ *S. cerevisiae* ทั้ง 4 สายพันธุ์ด้วยสารละลายต่าง

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

คัดเลือกได้สายพันธุ์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ที่สามารถดูดซับ aflatoxin B₁ และ ochratoxin A ได้ดีและเป็นแหล่งโปรตีนราคาถูกที่มีความปลอดภัยต่อสัตว์ เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตอาหารสัตว์ นำมาซึ่งการลดความสูญเสียอันเกิดจากปัญหาสารพิษจากเชื้อราปนเปื้อนในห่วงโซ่อาหารและลดต้นทุนการผลิตอาหารสัตว์

บทที่ 2

วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ปัญหาสารพิษจากเชื้อราก่อให้เกิดความสูญเสียในระบบห่วงโซ่อาหารที่ยังคงไม่มีแนวทางการจัดการหรือควบคุมได้อย่างเบ็ดเสร็จสมบูรณ์ อีกทั้งภาวะโลกร้อน (Climate change) และความแห้งแล้งของพื้นที่เกษตรกรรมยังเป็นปัจจัยโน้มนำให้เกิดสารพิษจากเชื้อรามากขึ้นทุกภูมิภาคทั่วโลก (Paterson and Lima, 2011) ความสูญเสียเริ่มต้นมาจากวัตถุดิบอาหารสัตว์ปนเปื้อนเชื้อราที่สามารถผลิตสารพิษออกมาซึ่งได้แก่ *Alternaria* spp., *Aspergillus* spp., *Cladosporium* spp., *Fusarium* spp., และ *Penicillium* spp., เป็นต้น (Brase et al., 2009; Cole et al., 2003; Miller, 1998; Moss, 1991) สารพิษจากเชื้อราสร้างออกมาในระยะ stationary phase ภายใต้สภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิตของเชื้อ เมื่อเชื้อราได้รับความกดดันหรือความเครียดทางกายภาพ ชีวภาพ หรือทางเคมี ส่งผลไปยังปฏิกิริยา reduction ของสารกลุ่มคีโตนที่ใช้ในการสังเคราะห์กรดไขมัน (กรดไขมันเหล่านี้เป็นสารปฐมภูมิที่เชื้อราใช้เป็นแหล่งพลังงานในการเจริญเติบโต) แล้วเกิดปฏิกิริยา condensation ขึ้นแทน ผลผลิตที่ได้จึงเป็นสารประกอบ polyketone ซึ่งก็คือสารพิษจากเชื้อรา โดยสามารถแบ่งเชื้อราออกได้เป็นสองกลุ่มตามสภาพแวดล้อมในการเจริญเติบโต คือ เชื้อราที่เจริญในแปลงเพาะปลูกก่อนทำการเก็บเกี่ยว ได้แก่ *Fusarium* spp. จะสร้างสารพิษในกลุ่ม zearalenone, trichothecenes (เช่น T-2 toxin, DON, เป็นต้น) และ fumonisins ซึ่งการติดเชื้อราในแปลงเกษตรจะทำให้เมล็ดพืชผ่อหรือตาย หลังผ่านการเก็บเกี่ยวเชื้อรากลุ่มแรกจะหยุดการเจริญเติบโตและตายลงในเวลาไม่กี่เดือน (โดยสารพิษยังคงอยู่) จากนั้นเชื้ออีกกลุ่มที่เจริญได้ดีในระหว่างการเก็บรักษาจะเพิ่มจำนวนขึ้น ได้แก่ *Aspergillus* spp. และ *Penicillium* spp. ซึ่งอาจพบการเจริญและสร้างสารพิษระหว่างเพาะปลูกได้บ้างแต่ไม่โดดเด่นเท่า *Fusarium* spp. สารพิษสำคัญที่เกิดจากเชื้อรากลุ่มหลังนี้คือ aflatoxins และ ochratoxins (เสริมพันธุ์, 2554; Alberto and Maria, 2006)

รายงานการตรวจพบสารพิษจากเชื้อราจึงเริ่มตั้งแต่ระยะการเพาะปลูกพืชวัตถุดิบ จนเมื่อทำการเก็บเกี่ยวและเก็บรักษาก่อนที่จะนำมาแปรรูปล้วนเป็นช่วงเวลาที่เชื้อรามีโอกาสในการสร้างสารพิษออกมาและสะสมอยู่ในวัตถุดิบ (Bryden, 2009; Petterson, 2004) โดยสภาวะที่เหมาะสมกับการสร้างสารพิษของเชื้อราคือ วัตถุดิบหรืออาหารที่มีค่า water activity (a_w) ค่อนข้างสูงและอยู่ในช่วงอุณหภูมิสิ่งแวดล้อมทั่วไป ซึ่งพบได้ทั้งระยะก่อนและหลังการเก็บเกี่ยว (ตารางที่ 2.1)

ตารางที่ 2.1 สภาวะที่เหมาะสมกับการสร้างสารพิษของเชื้อรา

Microorganism (mycotoxins)	อุณหภูมิ (°C)	a _w	สารพิษ	อ้างอิง
<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. parasiticus</i>	33	0.99	aflatoxins	Hill <i>et al.</i> , 1985
<i>Aspergillus ochraceus</i>	30	0.98	ochratoxins	Ramos <i>et al.</i> , 1998
<i>Penicillium verrucosum</i>	25	0.90- 0.98	ochratoxins	Cairns <i>et al.</i> , 2003
<i>Aspergillus carbonarius</i>	15 - 20	0.85 - 0.90	ochratoxins	Mitchell <i>et al.</i> , 2003
<i>Fusarium verticillioides</i> , <i>F. proliferatum</i>	10 - 30	0.93	fumonisin	Marin <i>et al.</i> , 1999
<i>Fusarium verticillioides</i> , <i>F. proliferatum</i>	11	0.90	deoxynivalenol	Hope & Magan, 2003
<i>Fusarium graminearum</i>	25 - 30	0.98	zearalenone	Sanchis, 2004
<i>Penicillium expansum</i>	0 - 25	0.95 - 0.99	patulin	Sanchis, 2004

เมื่อผ่านขั้นตอนการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์อาหารสัตว์สำเร็จรูปก็ยังสามารถตรวจพบสารพิษตกค้างได้ เนื่องจากอุณหภูมิที่ใช้ในการแปรรูปอาหารสัตว์เฉลี่ยอยู่ที่ 70-90 °C แต่สารพิษจากเชื้อราหลายชนิดมีความทนทานต่อความร้อนสูงไม่สลายไปในระหว่างกระบวนการผลิต จากนั้นสัตว์ในฟาร์มที่ได้รับอาหารซึ่งมีการปนเปื้อนสารพิษจากเชื้อราก็มีโอกาสที่จะสะสมสารพิษในร่างกายและส่งต่อมายังผู้บริโภค โดยมีรายงานการตรวจพบสารพิษจากเชื้อราในผลิตภัณฑ์จากสัตว์ทั้งในรูปแบบของเนื้อสัตว์ นม และไข่ (Hussain *et al.*, 2010; JECFA, 2001; Prandini *et al.*, 2009; Toscani *et al.*, 2007; Veldman, 1992)

ความเป็นพิษของสารพิษจากเชื้อราแบ่งตามกลุ่มอาการและความร้ายแรงจากการได้รับสารพิษเป็น 3 รูปแบบดังนี้

1) Acute primary mycotoxicoses เกิดจากการที่ร่างกายได้รับสารพิษจากเชื้อราหนึ่งหรือมากกว่าหนึ่งชนิดในปริมาณที่สูง จึงมีอาการที่แสดงออกมาอย่างชัดเจนตามอวัยวะเป้าหมายที่สารพิษเข้าทำลาย เช่น เมื่อ aflatoxins เข้าสู่ร่างกายจะพบการอักเสบและเนื้อตายที่บริเวณตับ ส่วน zearalenone ส่งผลให้อวัยวะสืบพันธุ์อักเสบบวมแดง ขณะที่ ochratoxins ทำให้ไตทำงานผิดปกติ เป็นต้น แต่ความเสียหายไม่เกิดแค่เพียงกับอวัยวะข้างต้นเท่านั้น ยังคงมีผลข้างเคียงอื่นๆ จากการได้รับสารพิษจากเชื้อราด้วยได้แก่ ภาวะกดภูมิคุ้มกัน ระบบการกำจัดสารพิษบกพร่อง สมดุลอนุมูลอิสระในร่างกายถูกทำลาย เป็นต้น (Bryden, 2009)

2) Chronic primary mycotoxicoses เกิดจากการที่ร่างกายได้รับสารพิษจากเชื้อราหนึ่งหรือมากกว่าหนึ่งชนิดในปริมาณต่ำ เป็นระยะเวลายาวนานและสะสมอยู่ในร่างกาย อาการที่พบไม่เด่นชัดแต่มักเป็นกลุ่มอาการแทรกซ้อนจากความบกพร่องของอวัยวะหรือระบบการทำงานของร่างกายบางส่วน เช่น ความไม่สมบูรณ์พันธุ์ การเจริญเติบโตช้า เบื่ออาหาร อ่อนเพลีย ติดเชื้อได้ง่าย เป็นต้น สารพิษที่สัตว์หรือคนได้รับส่วนหนึ่งจะถูกขับออกไปทางระบบการกำจัดสารพิษของร่างกาย ส่วนที่ยังคงเหลือตกค้างอยู่จะเกิดการสะสมทั้งในรูปของสารตั้งต้นและ metabolites (EFSA, 2004; Monaci *et al.*, 2005; Tangni *et al.*, 2009) ซึ่งอาจมีความเป็นพิษคงเดิม เพิ่มขึ้นหรือลดลง

3) Chronic secondary mycotoxicoses เกิดจากการที่มนุษย์หรือสัตว์ได้รับสารพิษจากเชื้อราผ่านทาง การบริโภคผลิตภัณฑ์จากสัตว์ที่มีสารพิษจากเชื้อราสะสมตกค้างอยู่ อันเกิดจากการที่สัตว์บริโภคอาหารที่มีสารพิษจากเชื้อราปนเปื้อน การแสดงอาการในลักษณะนี้ไม่แตกต่างจากรูปแบบที่สอง กล่าวคือ อาการที่พบไม่เด่นชัดแต่มักเป็นกลุ่มอาการแทรกซ้อนจากความบกพร่องของอวัยวะหรือระบบการทำงานของร่างกายบางส่วน

ร่างกายคนหรือสัตว์บริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อนสารพิษจากเชื้อรา เมื่ออาหารเข้าสู่ระบบการย่อย สารพิษจะถูกดูดซึมผ่านเข้าสู่กระแสโลหิตในหลายช่องทางขึ้นกับโครงสร้างโมเลกุล จากนั้นจะแพร่กระจายไปตามอวัยวะต่างๆ และเกิดกระบวนการ biotransformation บางส่วนหรือทั้งหมด จนถูกขับออกไป แต่พบว่าสารพิษส่วนหนึ่งยังคงสะสมอยู่ในร่างกาย ความเป็นพิษจึงอาจมาจากสารตั้งต้นที่ไม่ถูก metabolism หรือจากสารอนุพันธ์ที่เกิดขึ้น (Bammier *et al.*, 2000; IARC, 1993; Pfohl-Leskowicz and Manderville, 2007) การตรวจหาสารพิษจากเชื้อราในวัตถุดิบมีโอกาพบสารพิษหลายตัวร่วมกัน มีหลายการศึกษาพบว่าสารพิษจากเชื้อราที่ปนเปื้อนในอาหารพร้อมกัน จะมีฤทธิ์เสริมกันในการทำลายสุขภาพร่างกายของสัตว์ที่บริโภคเข้าไป การศึกษาของ Huff และ Doerr (1981) พบว่าไก่ที่กินอาหารปนเปื้อนทั้ง aflatoxin และ ochratoxin A จะมีสุขภาพที่แย่กว่าไก่ที่กินอาหารที่มีสารพิษเพียงชนิดเดียว และการศึกษาของ Prabu และคณะ (2013) พบว่ากระต่ายพันธุ์นิวซีแลนด์ไวท์ (New zealand white) ที่ได้รับ aflatoxin B₁ ร่วมกับ ochratoxin A จะพบรอยโรคที่ตับและไตมากกว่ากลุ่มที่ได้รับสารพิษเพียงชนิดเดียว

ความเสียหายของร่างกายจากการได้รับสารพิษขึ้นอยู่กับกลุ่มปัจจัยหลักดังนี้

1) พันธุกรรม ได้แก่ ชนิดและสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิต ส่งผลต่อองค์ประกอบในร่างกายทั้งในส่วนของ receptor ต่อโมเลกุลสารต่างๆ และระบบการกำจัดสารพิษที่แตกต่างกัน

2) ชนิดของสารพิษ ปริมาณสารพิษที่ร่างกายได้รับ ช่องทางที่สารพิษเข้าสู่ร่างกาย รวมถึงการได้รับสารพิษเพียงชนิดเดียวหรือหลายชนิดร่วมกัน

3) ลักษณะทางสรีรวิทยาของสิ่งมีชีวิต ได้แก่ อายุ ระดับฮอร์โมน โภชนาการ สมดุลจุลินทรีย์โดยเฉพาะในทางเดินอาหาร และภาวะการติดเชื้อและปรสิตต่างๆ

4) สภาวะแวดล้อม ได้แก่ สภาพอากาศ มลภาวะ การเลี้ยงดูและการจัดการต่างๆ

(Baldwin *et al.*, 1983; Bryden, 1982, 2007; CAST, 2003; Marks and Wyatt, 1979; Oswald and Taranu, 2008; Wild, 2007; Wild and Gong, 2010)

นอกจากปัจจัยทั้งสี่ที่กล่าวมาแล้ว Kabak (2009) และการศึกษาของ Versantvoort และคณะ (2005) พบว่าโครงสร้างของสารประกอบในอาหาร (food matrix) มีผลต่อสัดส่วนของสารพิษ aflatoxin B₁ และ ochratoxin A ที่ถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกาย (bioaccessibility) โดยในสภาวะทางเดินอาหารของสัตว์จะมีเพียงสารละลายอิเล็กโทรไลต์ บัฟเฟอร์ และเอนไซม์เท่านั้น ไม่มีสารเคมีที่มีคุณสมบัติเหมือนสารสกัด เช่น acetonitrile, methanol, เป็นต้น ความสามารถในการละลายของสารพิษออกมาจากอาหารอาจลดลง โมเลกุลสารพิษจึงยังคงแทรกตัวอยู่ในอาหารที่ไม่ถูกย่อยและถูกขับออกนอกร่างกายในรูปของอุจจาระ เมื่อร่างกายได้รับสารพิษลดลง ความเสียหายของร่างกายที่ตามมาก็จะน้อยกว่าการได้รับสารพิษในปริมาณที่เข้มข้น

2.1 Aflatoxins

Aflatoxins เป็นสารพิษที่เกิดจากเชื้อรากลุ่ม *Aspergillus flavus* และ *A. parasiticus* เมื่อแบ่งตามโครงสร้างเคมีพบมากถึง 18 ชนิด และชนิดที่มีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคมะเร็งคือ aflatoxin B₁, B₂, M₁, และ G₁ (IARC, 1993) แหล่งที่พบ aflatoxins ตามธรรมชาติคือ ธัญพืชต่างๆ โดยเฉพาะข้าวโพด ข้าวสาลี ถั่วลิสง ข้าว และผลิตภัณฑ์จากเมล็ดธัญพืช เช่น น้ำมันและกากน้ำมันต่างๆ (กากเมล็ดฝ้าย กากถั่วลิสง กากเมล็ดทานตะวัน ฯลฯ) นอกจากนี้ก็พบได้ใน มันสำปะหลัง ผลไม้แห้ง ไม้กระบอก เครื่องเทศ ไวน์ กาแฟ ถั่วต่างๆ ผลไม้ และน้ำผลไม้ (Shephard, 2008) จากรายงานการสำรวจสารพิษ aflatoxins ที่ปนเปื้อนในวัตถุดิบอาหารสัตว์แถบประเทศในยุโรปโดย Rodrigues และ Naehrer ระหว่างปี 2009 และ 2010 พบว่ามีการปนเปื้อนอยู่ 15% จาก 169 ตัวอย่าง ปริมาณการปนเปื้อนสูงสุดอยู่ที่ 103 พีพี ส่วนการสำรวจในประเทศไทยโดย Charoenpornsook และ Kavisarasai ปี 2005 พบว่า มี aflatoxin B₁ (AFB₁) ปนเปื้อนในอาหารสัตว์ที่ทำการสุ่มตรวจเฉลี่ย 7.56 พีพี และในปี 2007 การสำรวจ AFB₁ ที่ตกค้างในตับไก่พบว่ามีปริมาณ 0.21-54.90 พีพี และจากรายงานของศูนย์ตรวจสอบอาหารและวัตถุดิบทางการเกษตร (Food and Agricultural Materials Inspection Center; FAMIC) แห่งประเทศญี่ปุ่น ที่ทำการสุ่มตรวจติดตามการปนเปื้อน AFB₁ ในวัตถุดิบอาหารสัตว์ระหว่างเดือนเมษายน 2013 ถึงเดือนมีนาคม 2014 พบว่ายังคงมีการปนเปื้อนอยู่แต่ปริมาณสารพิษค่อนข้างต่ำเช่น ข้าวโพดจากอเมริกาพบ AFB₁ 11.6 พีพี มันสำปะหลังจากไทยพบ 0.6 พีพี กากถั่วเหลืองจากอินเดียพบ 5 พีพี เป็นต้น (FAMIC, 2014) ซึ่งตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ (ประเทศไทย) เรื่องกำหนดลักษณะของอาหารสัตว์เสื่อมคุณภาพ พ.ศ. 2537 ระบุให้กากถั่วเหลืองและรำข้าว ต้องมี AFB₁ ไม่เกิน 50 พีพี กากถั่วลิสงต้องมี AFB₁ ไม่เกิน 500 พีพี ข้าวโพดมี AFB₁ ไม่เกิน 100 พีพี อาหารสำเร็จรูปไก่ไข่และไก่เนื้อ

มี AFB₁ ไม่เกิน 100 พีพีบี ซึ่งการศึกษาของ Matur และคณะ (2011) พบว่า อาหารไก่ที่มี AFB₁ 100 พีพีบี ยังคงส่งผลต่อการทำงานของตับและมีแนวโน้มที่ปริมาณเซลล์เม็ดเลือดขาวลดต่ำลง ขณะที่ USDA (U.S. Food and Drug Administration) และกฎหมายประเทศญี่ปุ่นกำหนดให้อาหารสัตว์ และวัตถุดิบตั้งต้นพบ AFB₁ ปนเปื้อนได้ไม่เกิน 20 พีพีบี แต่ไม่มีข้อกำหนดของหน่วยงานใดที่ระบุหรือ จำกัดปริมาณสารพิษจากเชื้อราในกรณีพบการปนเปื้อนสารพิษหลายชนิดร่วมกัน

คุณสมบัติของ aflatoxin คือ ละลายน้ำได้เล็กน้อย ละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ การสลายโมเลกุล AFB₁ ด้วยความร้อนต้องใช้อุณหภูมิสูงกว่า 160 °C ขึ้นไป (Raters and Matissek, 2008) ความเป็นพิษของ AFB₁ มีทั้งแบบเฉียบพลันและเรื้อรัง โดยเฉพาะพิษต่อตับที่มีความรุนแรงมากที่สุด ส่วนอื่นที่ได้รับผลกระทบคือ ไต สมอง ระบบภูมิคุ้มกัน ระบบสืบพันธุ์ และระบบการสังเคราะห์ DNA RNA รวมไปถึงการสังเคราะห์โปรตีน AFB₁ จึงมีบทบาทเป็นทั้งสารก่อมะเร็ง สารก่อการกลายพันธุ์ สารกดภูมิคุ้มกันและสารก่อลูกวิรูป (ทำให้ตัวอ่อนผิดปกติ) (CAST, 2003) นอกจากนี้พบว่า เมื่อดูดซึม AFB₁ เข้าสู่ร่างกายจะมีผลทำให้ค่าทางโลหิตวิทยาเปลี่ยนแปลงไปจากปกติ (Denli *et al.*, 2009, Matur *et al.*, 2011) และ AFB₁ สามารถเหนี่ยวนำให้เกิด lipid peroxidation มากขึ้นส่งผลให้ปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระในร่างกายลดลง (Abdel-Wahhab and Aly, 2003; Choudhary and Verma, 2005)

หลังจากคนหรือสัตว์บริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อน AFB₁ ส่วนใหญ่จะถูกดูดซึมแบบ passive diffusion ที่บริเวณลำไส้เล็กส่วนต้นเข้าสู่กระแสโลหิต โมเลกุล AFB₁ บางส่วนจะเปลี่ยนรูปเป็น aflatoxicol จากนั้นเอนไซม์ cytochrome-P450 ที่ผลิตจากเซลล์ตับจะเปลี่ยน AFB₁ เป็น aflatoxicol, hydroxylated metabolites (ได้แก่ aflatoxin M₁, Q₁, และ P₁) ที่มีความเป็นพิษลดลงและขับออกจากร่างกายได้ง่ายขึ้น และ AFB₁ ที่คงค้างเหลือจะอยู่ในรูปของ aflatoxin B₁-8,9 epoxide ที่มีความเป็นพิษมากขึ้น ซึ่ง aflatoxin B₁-8,9 epoxide บางส่วนที่หลงเหลือจากการขับทิ้งออกไปนอกร่างกายจะก่อให้เกิดความเสียหายกับหลายระบบเนื่องจากโมเลกุลของ aflatoxin B₁-8,9 epoxide เข้าจับกับกรดอะมิโนโดยเฉพาะไลซีนและอัลบูมินทำให้เซลล์เนื้อเยื่อของอวัยวะชำรุดเสียหาย รวมถึงการเข้าทำลายสารพันธุกรรมเหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งและการกลายพันธุ์ ช่องทางหลักที่ร่างกายใช้ในการกำจัด AFB₁ และ metabolites คือ ผ่านทางปัสสาวะและน้ำดี โดย aflatoxin M₁ (AFM₁) ก็จัดเป็น metabolite ตัวหนึ่งของ AFB₁ ซึ่งเกิดตามมาหลังจากการที่สัตว์ได้รับ AFB₁ เข้าสู่กระบวนการ metabolism ของร่างกาย และขับสารพิษออกมากับน้ำนมและปัสสาวะในรูป AFM₁ จึงสามารถพบ aflatoxin ในนมและผลิตภัณฑ์นมได้ (Bammier *et al.*, 2000; Kumagai, 2010)

กระบวนการเมตาบอลิซึมสารพิษทั้งในร่างกายคนและสัตว์จะทำให้สารพิษบางส่วนที่เปลี่ยนรูปไปมีความเป็นพิษมากขึ้น แต่อุนพันธ์ที่เกิดขึ้นบางชนิดก็มีความเป็นพิษคงเดิมหรือลดลง วิธีการทางห้องปฏิบัติการเพื่อตรวจหา AFB₁ ที่ปนเปื้อนในอาหาร ได้แก่ Biosensors, ELISA, HPLC, Capillary electrophoresis, Mass spectrometry, เป็นต้น ซึ่งแต่ละการตรวจวิเคราะห์จะมีความ

ไวและความจำเพาะแตกต่างกัน ข้อจำกัดในการตรวจ aflatoxins และ metabolites ของสารพิษนั้น มีค่าใช้จ่ายสูงและต้องอาศัยบุคลากรที่มีความชำนาญในการทดสอบและแปลผล จึงทำให้การสำรวจตรวจสอบสารพิษจากเชื้อราในแต่ละห่วงโซ่การผลิตอาหารทำได้ไม่ครอบคลุม

2.2 Ochratoxin A

เชื้อราที่สามารถสังเคราะห์สารพิษ ochratoxins ได้มีหลายชนิด ได้แก่ *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus carbonarius*, *Penicillium verrucosum*, *Penicillium viridicatum*, และ *Penicillium nordicum* (van der Merwe *et al.* 1965; Pitt, 1987; Frisvad *et al.*, 2004) อนุพันธ์ของ ochratoxins ได้แก่ ochratoxin A (OTA), ochratoxin B (OTB), ochratoxin C (OTC), 4-R-hydroxyochratoxin (4R-OH OTA), 4-S-hydroxyochratoxin A (4S-OH OTA), 4-hydroxyochratoxin B (4-OH OTB), 10-hydroxy-ochratoxin A (10-OH OTA), ochratoxin α (OT α), และ ochratoxin β (OT β) โดย OTA มีความเป็นพิษมากที่สุด (IARC, 1993; Pfohl-Leszkowicz and Manderville, 2007) OTA พบได้ในธัญพืชเป็นส่วนใหญ่ เช่น ข้าวสาลี ข้าวโพด ข้าวโอ๊ต ข้าวบาร์เลย์ เมล็ดกาแฟและถั่วเหลือง นอกจากนี้ยังสามารถพบ OTA ในผลไม้พวกองุ่นได้ ดังนั้น เมื่อนำวัตถุดิบไปผ่านการแปรรูปจึงมีรายงานการตรวจพบ OTA ได้จาก แป้ง กาแฟ ถั่วเหลือง ซีเรียล กาแฟ ผลไม้อบแห้ง ไวน์ น้ำองุ่น และเมื่อสัตว์บริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อน OTA ก็จะสามารถในร่างกาย จึงพบว่าผลิตภัณฑ์จากสัตว์เช่น ชีส ไส้กรอก แฮม เบคอน ก็มีรายการตรวจพบ OTA เช่นกัน (Sage *et al.*, 2004; Vanesa and Ana, 2013; Jaimez *et al.*, 2004)

ตารางที่ 2.2 รายงานผลการสำรวจ ochratoxin A ที่ปนเปื้อนในอาหารและวัตถุดิบอาหารสัตว์

วัตถุดิบ/อาหาร	รายงานการปนเปื้อน (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)	อ้างอิง
อาหารไก่	0.5	Jaimez <i>et al.</i> , 2004
	27	Dalcero <i>et al.</i> , 2002
ข้าวโพด	3.95	Jaimez <i>et al.</i> , 2004
	5.29	Majeed <i>et al.</i> , 2013
กากปาล์ม	3.19	Jaimez <i>et al.</i> , 2004
ข้าวฟ่าง	>100	Thirumala-Devi <i>et al.</i> , 2002
รำข้าว	10-100	Thirumala-Devi <i>et al.</i> , 2002
น้ำมัน	0.07-0.11	Pattono <i>et al.</i> , 2011
ข้าว	1.0-27.3	Gonzalez <i>et al.</i> , 2006
ผลิตภัณฑ์จากเนื้อหมู	1- 314.09	Bertuzzi <i>et al.</i> , 2013
เนื้อไก่	0.03	Jørgensen, 1998
เนื้อหมู	0-2.9	Jørgensen and Petersen, 2002

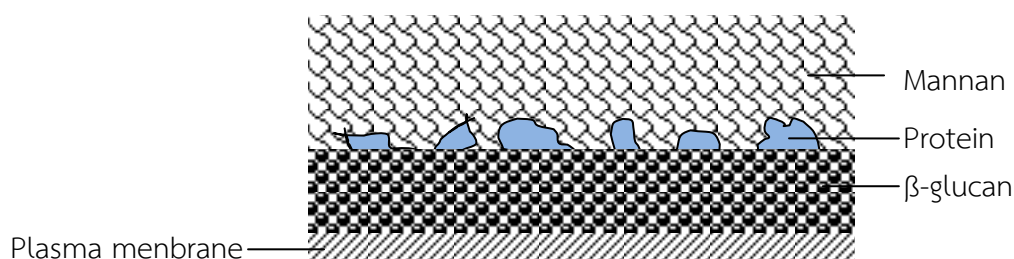
คุณสมบัติของโมเลกุล OTA มีความคงตัวสูง โดยมีจุดหลอมเหลวอยู่ที่อุณหภูมิ 96 °C และสลายตัวที่อุณหภูมิสูงถึง 180 °C (Raters and Matissek, 2008) ทำให้วัตถุดิบอาหารที่เกิดการปนเปื้อน OTA เมื่อเข้าสู่กระบวนการเก็บรักษา การเตรียมและการแปรรูปจึงไม่สามารถทำลายสารพิษลงได้ ส่งผลให้ยังคงตรวจพบ OTA ในปริมาณที่ใกล้เคียงกับวัตถุดิบตั้งต้น (Schiavone *et al.*, 2008; Monaci *et al.*, 2005) กระบวนการ metabolism หลังจากร่างกายคนหรือสัตว์ได้รับสารพิษสามารถตรวจพบ OTA ได้ทั้งในรูปสารตั้งต้นเดิมและรูปอนุพันธ์อื่น โดยเมื่อร่างกายคนหรือสัตว์กินอาหารปนเปื้อน OTA สารพิษจะดูดซึมเข้าทางกระเพาะและลำไส้เล็ก โดยเฉพาะการที่ OTA ละลายได้ดีในไขมันจึงดูดซึมผ่านส่วน jejunum ของลำไส้เข้าไปพร้อมกับน้ำดีและเข้าสู่กระแสโลหิตผ่านทาง enterohepatic circulation OTA ส่วนหนึ่งจะถูกกำจัดออกทางปัสสาวะและน้ำดี แต่การขับสารพิษออกจากร่างกายเป็นไปได้ช้าเนื่องจากโมเลกุล OTA ที่ถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสโลหิตมีการจับกับ serum protein โดยเฉพาะ albumin ดังนั้นค่าครึ่งชีวิตของ OTA ในร่างกายคนที่ได้รับผ่านทางทางกินจึงนานถึง 35.5 วัน ส่วน OTA ที่กำจัดออกไม่หมดจึงสะสมอยู่ตามเนื้อเยื่อไต ตับ กล้ามเนื้อ และไขมัน (Roth *et al.*, 1988; Kumagai, 1988) ซึ่งการศึกษาในคนพบว่า เซลล์ตับและระบบเมตาบอลิซึมของร่างกายจะมีการเปลี่ยนรูป OTA เป็น metabolite ได้ค่อนข้างน้อยจึงสามารถตรวจพบได้ในรูปของสารตั้งต้น (Marin *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2011)

ความเป็นพิษของ OTA เบื้องต้นจะเกี่ยวข้องกับการขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ในกระบวนการ metabolism ของฟีนอลอะลาีน เนี่ยวนำให้เกิดอนุมูลอิสระจากปฏิกิริยา oxidation และกระบวนการนำส่งโมเลกุลสารต่างๆ ที่บริเวณเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรียกระทบต่อการสร้าง ATP ซึ่งมีการศึกษาที่ยืนยันว่า OTA เป็นพิษต่อระบบท่อไตและตับ มีฤทธิ์กดภูมิคุ้มกัน เนี่ยวนำให้เกิดลูกวิรูป (teratogen) และเป็นสารก่อมะเร็ง (EFSA 2006; IARC, 1993) อวัยวะที่ได้รับผลกระทบจาก OTA ที่เด่นชัดที่สุดคือไต โดยเฉพาะระบบท่อไตส่วนต้นและตับที่จะพบลักษณะไกลโคเจนสะสมมากผิดปกติ นอกจากนี้ก็มีรายงานการสำรวจในประชากรสุขภาพปกติสามารถตรวจพบสารพิษ OTA อยู่ในกระแสโลหิตและปัสสาวะได้เป็นการบ่งชี้ว่า ผู้บริโภคได้รับสารพิษ OTA มาอย่างต่อเนื่องและมีการสะสมในร่างกาย (Gilbert *et al.*, 2001)

นอกจาก ochratoxin A จะมีความเป็นพิษสูงแล้ว อนุพันธ์ที่เกิดจากการเปลี่ยนรูปของโมเลกุลสารพิษเริ่มต้นหลายชนิดยังคงมีความเป็นพิษต่อร่างกาย เช่น ochratoxin B, ochratoxin C, ochratoxin α , ochratoxin β , 4-R-hydroxyochratoxin A, เป็นต้น การตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อหาค่าของ ochratoxin ทั้งหมดนั้นมีข้อจำกัดค่อนข้างมาก ปัจจุบันเทคนิคที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์หา OTA ได้แก่ ELISA, HPLC, Mass spectrometry, Biosensors, และ Capillary electrophoresis, เป็นต้น โดยทั่วไปวิธีการตรวจเหล่านี้จะมีต้นทุนค่าใช้จ่ายในการตรวจค่อนข้างสูง และต้องใช้ความชำนาญทั้งการทดสอบและการแปลผล ทำให้การสำรวจตรวจสอบสารพิษจากวัตถุดิบที่นำมาเป็นอาหารคนและสัตว์นั้นอยู่ในวงจำกัดและไม่นิยมตรวจติดตามอย่างสม่ำเสมอ โดยกฎหมายของประเทศไทยไม่มีกฎหมายระบุถึงปริมาณ OTA สูงสุดที่พบได้ในอาหารสัตว์ แต่จะอ้างอิงบังคับใช้ตาม EU Commission Recommendation (2006) ที่กำหนดให้วัตถุดิบอาหารสัตว์มี OTA ปนเปื้อนได้ไม่เกิน 250 พิกพิและในอาหารสัตว์สำเร็จรูปสำหรับไก่เนื้อต้องมี OTA ไม่เกิน 100 พิกพิ

2.3 *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae เป็นจุลินทรีย์ในสกุลยีสต์เซลล์เดียวที่พบได้ทั่วไปตามธรรมชาติและในอาหารที่บริโภคหลายชนิด จัดเป็นจุลินทรีย์กลุ่มยูคาริโอตที่มีผนังเซลล์เป็นส่วนประกอบ 26-32 % ของน้ำหนักแห้ง โครงสร้างหลักของผนังเซลล์คือ polysaccharides ได้แก่ β -1,3 glucan, β -1,6 glucan, mannoprotein (mannan เกาะกับโปรตีนด้วยพันธะโควาเลนต์), และ chitin (Klis *et al.*, 2006)



รูปที่ 2.1 โครงสร้างผนังเซลล์ *Saccharomyces cerevisiae*

สัดส่วนขององค์ประกอบและการจัดเรียงตัวของโมเลกุลต่างๆ ในโครงสร้างผนังเซลล์จะผันแปรไปตามสายพันธุ์ สภาพะในการเจริญเติบโต เช่น pH อุณหภูมิ ปริมาณออกซิเจน สารอาหารที่ได้รับและระยะการเจริญเติบโต (Naruemon *et al.*, 2013) โดยพบว่าเมื่อเซลล์เข้าสู่ช่วง stationary phase จากภาวะอาหารที่มีอยู่จำกัดเช่น มีแหล่งคาร์บอนหรือไนโตรเจนซึ่งจำเป็นต่อการเจริญเติบโตเหลือในปริมาณที่น้อย โครงสร้างผนังเซลล์จะปรับเปลี่ยนให้มีความหนาและทนทานต่อการย่อยของเอนไซม์ zymolyase และ glucanase มากขึ้น จำนวนของ disulfide bridge ในผนังเซลล์จะเพิ่มขึ้น 6-7 เท่า ความพรุนและสมบัติการเป็นเยื่อเลือกผ่าน (permeability) ต่อ macromolecules ลดลงเนื่องจากมี mannoproteins สะสมที่ผนังเซลล์ขึ้นนอกมากขึ้นเมื่อเทียบกับช่วง log phase หรือ exponential phase (de Nobel *et al.*, 1990) รวมถึงสัดส่วนและโครงสร้างโมเลกุลของโปรตีนในผนังเซลล์จะมีการเปลี่ยนแปลงไป เช่น mannosyl phosphorylation จะเพิ่มขึ้นในช่วงปลายของ exponential phase จนเข้าสู่ระยะ stationary phase (Durán และ Nombela, 2004)

S. cerevisiae สามารถสืบพันธุ์ได้ทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ โดยทั่วไปเชื่อจะเพิ่มจำนวนด้วยการแตกหน่อแบบหลายชั่วโดยรอบเซลล์ทุก ๆ ด้าน เมื่อเซลล์ลูกแยกออกจากเซลล์แม่บนเซลล์แม่จะปรากฏรอยแผลจากการแตกหน่อ (bud scar) เป็นส่วนโค้งนูนที่ประกอบด้วยผนังเซลล์ที่มีวงแหวนไคตินล้อมรอบ ส่วนเซลล์ลูกจะปรากฏรอยแผลจากการเกิดหน่อเช่นกัน (birth scar) แต่จะพบไคตินในปริมาณที่น้อยกว่าและไม่นูนเท่ารอยแผลที่เซลล์แม่ (Walker, 1998) ในอุตสาหกรรมการผลิตอาหารมีการนำเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* มาใช้ประโยชน์ในหลากหลายแนวทาง เช่น การผลิตอาหารหมักดอง เครื่องดื่ม สารปรุงแต่งเพิ่มกลิ่นรส ผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ เป็นแหล่งของโปรตีน วิตามินบี มีส่วนประกอบที่ช่วยเสริมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันและระบบการกำจัดสารพิษของร่างกาย เพิ่มสมดุลระบบต่อต้านอนุมูลอิสระ รวมไปถึงการใช้เป็นเชื้อกลุ่ม probiotics หรือผลิตสาร prebiotics ที่ช่วยป้องกันการรุกรานของเชื้อก่อโรคในลำไส้ (Akramiené *et al.*, 2007; Brown and Gordon, 2003; Fuller, 1989; Gao *et al.*, 2008; Huff *et al.*, 2010 Krizkova *et al.*, 2001;) และมีรายงานการศึกษาวิจัยที่ใช้องค์ประกอบของผนังเซลล์ของยีสต์คือ mannanoligosaccharides เข้าจับกับเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่มี mannose-specific type-I fimbriae เพื่อป้องกันการ colonization ของตัวเชื้อและเพิ่มโอกาสให้จุลินทรีย์ที่มีประโยชน์สามารถเพิ่มจำนวนได้ดีขึ้น (Firon *et al.*, 1984;

Gibson and Wang, 1994; Shoaf-Sweeney and Hutkins, 2008; Zopf and Roth, 1996) รวมไปถึงมีการศึกษาทดลองที่ใช้เชื้อ *S. cerevisiae* เป็นเชื้อ biocontrol ในทางเกษตรกรรมเพื่อป้องกันการเจริญเติบโตของเชื้อราและป้องกันการผลิตสารพิษ (Shalaby and El-Nady, 2008; Nally *et al.*, 2012; Kapetanakou *et al.*, 2012) ส่วนการเป็นแหล่งโปรตีนเซลล์เดียวพบว่า *S. cerevisiae* ให้ปริมาณโปรตีนสูง (45-55 % ของน้ำหนักแห้ง) และประกอบไปด้วยกรดอะมิโนกลุ่มที่จำเป็นหลายชนิด ได้แก่ ไลซีน ทรีโอนีน ซีสทีอีน เมไทโอนีน ทริปโตเฟน ไอโซลิวซีน ฟีนิลอะลานีน และวาเลอีน ในสัดส่วนที่สูงกว่าปลาป่นและกากถั่วเหลือง (Boze *et al.*, 1992)

2.4 แนวทางการควบคุมและแก้ไขปัญหาสารพิษจากเชื้อรา

ความคงตัวของสารพิษจากเชื้อราที่ปนเปื้อนในวัตถุดิบอาหารทำให้ไม่สามารถย่อยสลายหรือกำจัดออกโดยไม่ส่งผลต่อคุณภาพของอาหาร สารพิษถูกส่งต่อจากห่วงโซ่อาหารหนึ่งไปอีกห่วงโซ่หนึ่งซึ่งท้ายที่สุดแล้วมนุษย์ก็จะเป็นผู้รับสารพิษเหล่านั้นแล้วเกิดการเจ็บป่วยทุกสภาพตามมา จึงมีการศึกษาวิจัยเพื่อควบคุมตั้งแต่ต้นตอของการเกิดสารพิษ การปนเปื้อนของสารพิษมากับวัตถุดิบ และในอุตสาหกรรมการผลิตอาหาร กลไกการเกิดพิษรวมไปถึงแนวทางลดผลกระทบจากสารพิษนั้นๆ

หนึ่งในแผนการศึกษาเพื่อป้องกันการปนเปื้อนสารพิษจากเชื้อราคือ การวิเคราะห์ด้วยระบบ Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP system) โดยพิจารณาความเสี่ยงที่พืชจะเกิดการปนเปื้อนเชื้อราและผลิตสารพิษตามมา แนวทางการวิเคราะห์แบ่งแยกออกเป็นส่วนๆ ตามขั้นตอนการผลิตเริ่มตั้งแต่การเตรียมแปลงเพาะปลูก การเก็บเกี่ยวและการเก็บรักษาจนถึงการจัดจำหน่ายออกไปซึ่งอาจแบ่งตามแผนการผลิตได้ดังนี้

- 1) การจัดเตรียมเมล็ดพันธุ์ที่มีคุณภาพดี สมบูรณ์ สะอาดไม่มีการปนเปื้อน คัดเลือกสายพันธุ์ที่เหมาะสมกับพื้นที่เพาะปลูก ทนทานต่อโรคและแมลงในท้องที่ รวมถึงอาจมีการนำพืชตัดต่อพันธุกรรมที่มีคุณสมบัติพิเศษมาใช้ (Miller *et al.*, 1985; Munkvold, 2003; Munkvold *et al.*, 1999)

- 2) การเตรียมแปลงเพาะปลูกที่เหมาะสมกับลักษณะของดินและพืชที่จะเพาะปลูก ต้องมีระยะเวลาการพักหลังการเก็บเกี่ยวที่เพียงพอก่อนเพาะปลูกพืชในรอบถัดมาและควรปลูกพืชหมุนเวียนไม่ใช่พื้นที่เดิมปลูกซ้ำๆรอบการผลิต (Sutton, 1982)

- 3) การวางแผนช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเพาะปลูกและเก็บเกี่ยว เพื่อลดความเสี่ยงต่อการที่พืชจะติดเชื้อรา โดยอิงข้อมูลสภาพอากาศ ฤดูกาลการระบาดของโรคพืชและแมลง รวมถึงความต้องการของภาคอุตสาหกรรม (Munkvold, 2003)

- 4) ระหว่างการเพาะปลูกต้องควบคุมปัจจัยเสี่ยงที่อาจส่งผลให้พืชติดเชื้อราเช่น ลดการใช้ปุ๋ยกลุ่ม ammonium nitrate ที่ส่งผลให้เชื้อ *Fusarium* spp. เจริญดีขึ้น (Martin *et al.*,

1991; Teich, 1987) การเลือกใช้สารเคมีที่เหมาะสมป้องกันการติดเชื้อรา โรคพืช และแมลง (Elmholt *et al.*, 1993; Guynot *et al.*, 2005) และประยุกต์ใช้สิ่งมีชีวิตกลุ่ม biocontrol (Bacon *et al.*, 2001; De Felice *et al.*, 2008) เป็นต้น

5) การดูแลแปลงเพาะปลูกต้องลดโอกาสที่พืชจะเกิดความเครียดจากปัจจัยต่างๆ เช่น ความแห้งแล้ง สารอาหารในดินไม่เพียงพอ เป็นต้น

6) ระหว่างการเก็บเกี่ยว ต้องใช้ความระมัดระวังไม่ให้เกิดการฉีกขาดหรือบอบช้ำและควบคุมให้มีความชื้นต่ำที่สุด

7) การเก็บรักษา ต้องมีระบบการป้องกันโรค แมลงและสัตว์พาหะต่างๆ ควบคุมอุณหภูมิความชื้นให้เหมาะสม จัดเก็บในสถานที่สะอาดและมีการระบายอากาศที่ดี และอาจเพิ่มขั้นตอนของการลดความชื้นในผลผลิตก่อนการเก็บ รวมถึงการกำหนดระยะเวลาการเก็บเกี่ยว การเก็บรักษาจนถึงการจัดจำหน่ายออกไปให้เส้นที่สุกจะช่วยลดโอกาสที่เชื้อราจะเจริญเติบโตและผลิตสารพิษออกมา

หลายประเทศที่มีการนำระบบการวิเคราะห์ความเสี่ยง (HACCP) มาปรับใช้กับภาคส่วนเกษตรกรรมเช่น สหราชอาณาจักร ออสเตรเลีย กลุ่มประเทศในยุโรป ซึ่งนอกจากจะเป็นการลดความเสี่ยงในของปัญหาสารพิษจากเชื้อราบนเปื้อนในวัตถุดิบแล้ว ยังส่งเสริมให้ได้ผลผลิตที่ดี มีปริมาณมากขึ้นและมีคุณภาพสูง แต่แนวทางการป้องกันนั้นต้องประกอบไปด้วยความร่วมมือของหลายภาคส่วนของหน่วยการผลิต มีการลงทุนที่สูง บุคลากรต้องมีความรู้ความเข้าใจที่ดีต่อแนวทางปฏิบัติ จึงยากต่อการที่จะคงรักษาให้ทุกขั้นตอนดำเนินไปอย่างถูกต้อง ครอบคลุมและสม่ำเสมอทั่วกัน เมื่อไม่สามารถควบคุมการปนเปื้อนของสารพิษจากเชื้อราได้การศึกษาเพื่อแก้ปัญหาที่เข้ามามีบทบาทมากขึ้น หนึ่งในหลากหลายวิธีที่ได้รับความสนใจคือ การใช้ตัวดูดซับสารพิษ ซึ่งมีทั้งสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ โดยสารอนินทรีย์ที่นำมาใช้ในการดูดซับสารพิษได้แก่ clay ที่ทำจากสารประกอบพวก silicates และ aluminosilicates มีการผลิตออกมาจำหน่ายหลากหลายรูปแบบ เช่น hydrated sodium calcium aluminosilicates และ phyllosilicates ของสาร montmorillonite (magnesium hydrated) และ นอกจากนี้ยังมีการนำ clay จากภูเขาไฟมาจำหน่ายในรูปของ bentonite และ zeolite โดยอาศัยกลไกที่สารพิษจากเชื้อราจะถูกดูดซับเข้าไปในโครงสร้างที่มีรูพรุนและดักจับไว้ด้วยประจุไฟฟ้าของธาตุในโมเลกุล ซึ่งมีรายงานยืนยันการใช้ว่าได้ผลดีกับ aflatoxins (Smith *et al.*, 1994) แต่การใช้สารอนินทรีย์ดังกล่าว ก็อาจพบปัญหาจากการที่ clay เข้าแย่งจับ micronutrients ทำให้ร่างกายสัตว์มีโอกาสเกิดภาวะขาดแร่ธาตุ วิตามินและ trace elements บางตัวได้ (Moshtaghian *et al.*, 1991; Ward *et al.*, 1991) อีกทั้งยังเสี่ยงต่อการปนเปื้อนสารพวก dioxins ที่มาจากการเผาไหม้ด้วยส่วนสารอนินทรีย์กลุ่มอื่นๆ ได้แก่ activated charcoal พบว่าสามารถลด bioavailability ของ T-2 toxin (Bratich *et al.*, 1990; Fricke and Jorge., 1990; Galey *et al.*, 1987) และ DON ได้ แต่ไม่ได้รับความนิยมในการเติมหรือผสมลงในอาหารเพราะมีผลต่อรสชาติ เนื้อสัมผัสและลักษณะ

ปรากฏของอาหาร (Avantaggiato *et al.*, 2004) ส่วนสารอินทรีย์ที่นำมาใช้ในการดูดซับสารพิษจากเชื้อราได้แก่ กากใย (fiber) ที่ได้จากพืชสามารถช่วยดูดซับและลดความเป็นพิษได้ รวมไปถึงผนังเซลล์ของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ที่มีการศึกษาวิจัยเพื่อใช้ลดการสะสมของสารพิษจากเชื้อรา aflatoxins, ochratoxins, และ T-2 toxin ในร่างกายสัตว์ (Aly *et al.*, 2004; Aravind *et al.*, 2003; Bueno *et al.*, 2007; Yiannikouris *et al.*, 2004) การใช้เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ในการหมักหรือบ่มอาหารสามารถลดการสร้างสารพิษจากเชื้อราและลดความเป็นพิษลงได้ เช่น ในการผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ เมล็ดกาแฟ อาหารหมักดอง เบเกอรี่ (Shetty and Jespersen, 2006.; Kapetanakou *et al.*, 2012; Pizzolitto *et al.*, 2012a Velmourougane *et al.*, 2011;) มีการศึกษาถึงกลไกการทำงานของ β -d-glucan ที่เป็นส่วนประกอบในโครงสร้างของผนังเซลล์ยีสต์จะเกิดพันธะไฮโดรเจนและแรง van der Waals กับโมเลกุล zearalenone เกิดเป็น glucans-mycotoxin complexes ขึ้นมา (Yiannikouris *et al.*, 2004) สารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นนี้จะมีความทนทานต่อความเป็นกรด-ด่างที่เปลี่ยนแปลงไปตลอดทางเดินอาหาร และ glucan ยังมีคุณสมบัติช่วยสร้างร่างกายในการเป็น immunomodulator ช่วยลดผลกระทบจากการบริโภคอาหารปนเปื้อนสารพิษจากเชื้อราที่มีฤทธิ์กดการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน (Gao *et al.*, 2008) และในการศึกษาวิจัยของ Armando และคณะ (2012) ได้หาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณผนังเซลล์จากการวัดด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของเชื้อ *S. cerevisiae* กับประสิทธิภาพในการดูดซับ OTA พบว่าปริมาณผนังเซลล์ที่ได้จากการวัดความหนาของผนังเซลล์และขนาดเซลล์ไม่สัมพันธ์กับความสามารถในการเข้าจับกับโมเลกุล OTA ซึ่งสอดคล้องกับกับสมมติฐานจากการศึกษาของ Lee และคณะ (2003) ซึ่งกล่าวไว้ว่า องค์ประกอบที่ผนังเซลล์ของเชื้อแต่ละสายพันธุ์จะมีความแตกต่างกันไปจึงส่งผลต่อ affinity ในการสร้างพันธะกับโมเลกุลสารพิษ บวกกับ binding sites ที่เข้าจับกับสารพิษมีจำนวนจำกัดแตกต่างกันตามโครงสร้างของผนังเซลล์

งานวิจัยที่ศึกษาประสิทธิภาพของ *S. cerevisiae* ในการดูดซับสารพิษจากเชื้อรา มีดังนี้

1) Shetty และคณะ (2007) ทดสอบประสิทธิภาพของ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ A18 ที่เพาะแยกมาจากอาหารหมักพื้นเมืองในแอฟริกา ในการดูดซับสารพิษ aflatoxin B₁ โดยศึกษาปัจจัยระยะการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ อุณหภูมิในการเจริญเติบโต คุณสมบัติการมีชีวิตของตัวเชื้อ และระยะเวลาในการที่เชื้อสัมผัสกับสารพิษ พบว่าช่วงต้น log phase เชื้อยีสต์จะมีประสิทธิภาพดีที่สุดในการดูดซับ aflatoxin B₁ (สูงกว่าช่วง stationary phase ประมาณ 2 เท่า) อุณหภูมิในการเพาะเชื้อเลี้ยงเชื้อยีสต์ที่ต่ำถึง 15 °C จะมีผลลดทอนประสิทธิภาพในการเข้าจับกับสารพิษ และเซลล์ยีสต์ที่ตายจากการนั่งแช่เชื้อด้วยไอน้ำแรงดันสูงหรือการเติม 2M HCL จะให้ประสิทธิภาพในการดูดซับสารพิษดีกว่าเชื้อยีสต์ที่ยังมีชีวิตอยู่

2) Pizzolitto และคณะ (2012a) ได้ศึกษาการใช้เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ที่เพาะแยกจากอุจจาระไก่เพื่อดูดซับ aflatoxin B₁ พบว่าเชื้อสามารถดูดซับสารพิษในหลอดทดลองได้ 18-82 %

ขึ้นกับสายพันธุ์และความเข้มข้นของสารพิษที่ปนเปื้อนและเมื่อนำเชื้อไปทดสอบโดยผ่านสภาวะจำลองสภาพทางเดินอาหารที่มีการปรับความเป็นกรด-ด่างและเติมเอนไซม์ลงไปพบว่า *S. cerevisiae* ที่นำมาทดสอบทุกสายพันธุ์มีอัตราการรอดชีวิตมากกว่า 80% ของเชื้อเริ่มต้น

3) Matur และคณะ (2011) ได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพของ Alphamune GTM ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ประกอบด้วย β -glucan และ mannanoligosaccharides จากผนังเซลล์ชั้นนอกของ *S. cerevisiae* ในการลดความเป็นพิษของ aflatoxins ที่ปนเปื้อนในอาหารไก่แม่พันธุ์ โดยการเติม Alphamune GTM ลงในอาหารไก่และติดตามค่าทางโลหิตวิทยาและเซลล์ระบบภูมิคุ้มกัน พบว่าช่วยลดผลข้างเคียงจากความเป็นพิษของ aflatoxins ลงได้และทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (non specific immune system) ดีขึ้น

4) Meca และคณะ (2010) ทำการทดสอบประสิทธิภาพการดูดซับ ochratoxin A ของยีสต์ *S. cerevisiae* 16 สายพันธุ์ที่เพาะแยกได้จาก Italian wine Moscato พบว่า เมื่อนำน้ำองุ่นที่มีการปนเปื้อน ochratoxin A มาหมักกับเชื้อยีสต์นาน 7, 14, และ 21 วัน พบว่าเซลล์ยีสต์สามารถลดปริมาณสารพิษได้สูงสุดถึง 50% โดยผนังเซลล์เป็นองค์ประกอบหลักในการกำจัดสารพิษ การทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Bejaoui และคณะ (2004) ที่มีการนำเชื้อยีสต์ *Saccharomyces* spp. หลายสายพันธุ์มาช่วยลด ochratoxin A ในการผลิตไวน์และยังพบว่าเซลล์ยีสต์ที่ผ่านความร้อนหรือกรดจะมีประสิทธิภาพในการดูดซับสารพิษที่ดีขึ้นกว่าเซลล์ที่มีชีวิต โดยบางสายพันธุ์มีความสามารถในการดูดซับสารพิษสูงถึง 75%

5) Armando และคณะ (2012) ได้ดำเนินการศึกษาโดยใช้เชื้อ *S. cerevisiae* 4 สายพันธุ์ดูดซับ OTA พบว่า เมื่อผ่านสภาวะจำลองสภาพทางเดินอาหารที่ pH 2 และมีการเติม bile salts ลงไป OTA ซึ่งเข้าจับกับ *S. cerevisiae* จะไม่หลุดออกแต่กลับพบว่าในสภาวะทางเดินอาหารปริมาณ OTA อิสระที่ตรวจพบได้มีแนวโน้มลดต่ำลง ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการที่สารพิษเกิดการสลายตัวหรือมีโครงสร้างโมเลกุลเปลี่ยนไปเนื่องจากเอนไซม์กลุ่มที่ย่อยโปรตีนหรือสภาวะจำลองดังกล่าวอาจส่งผลให้เชื้อ *S. cerevisiae* มีประสิทธิภาพในการดูดซับสารพิษสูงขึ้น

ปัจจัยที่มีผลต่อความแข็งแรงของพันธะระหว่าง β D-glucans กับโมเลกุลสารพิษจากเชื้อรา นอกจากองค์ประกอบและการจัดเรียงตัวของโมเลกุลในโครงสร้างผนังเซลล์แล้ว ยังมีปัจจัยแวดล้อมอื่นๆ เช่น อุณหภูมิ ระยะเวลาที่ผนังเซลล์ได้สัมผัสกับสารพิษ สัดส่วนระหว่างปริมาณเซลล์และความเข้มข้นของสารพิษ ความเป็นกรด-ด่าง โมเลกุลของสารอื่นๆ ที่อยู่แวดล้อม และการมีชีวิตของเซลล์ นอกจากประสิทธิภาพในการดูดซับสารพิษจากเชื้อราแล้ว องค์ประกอบในผนังเซลล์ โดยเฉพาะ glucan ยังเข้ามามีบทบาทต่อสุขภาพร่างกายคนหรือสัตว์ที่บริโภคด้วย จากการศึกษาของ Kogan และ Kocher (2007) พบว่าสารกลุ่ม polysaccharides ที่เป็นองค์ประกอบในโครงสร้างผนังเซลล์ *S. cerevisiae* มีความเกี่ยวข้องกับการผลิตสารเคมีในระบบภูมิคุ้มกัน และเข้าจับกับ receptor ที่เซลล์เม็ดเลือดขาวช่วยกระตุ้นการทำงานของภูมิคุ้มกันระดับเซลล์และตามเยื่อบุผิว สอดคล้องกับ

การศึกษาของ William และคณะ (1996) ที่พบว่า β -d-glucan ช่วยส่งเสริมการทำงานของเม็ดเลือดขาวกลุ่ม macrophages และ neutrophils

จากข้อมูลข้างต้นจะพบว่า β -glucan ที่เป็นส่วนประกอบในผนังเซลล์ยีสต์มีบทบาทต่อการลดความเป็นพิษจากสารพิษจากเชื้อราทั้งในด้านของการดูดซับสารพิษและส่งเสริมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน สัดส่วนของปริมาณ β -glucan ในผนังเซลล์จึงอาจเป็นค่าที่นำมาใช้ในการชี้บ่งประสิทธิภาพของการดูดซับสารพิษได้ ซึ่งมาตรฐานของ AOAC ได้กำหนดวิธีการตรวจวัดปริมาณของ β -glucan โดยใช้เอนไซม์ย่อยผนังเซลล์และตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค High Performance Anion Exchange Chromatography (AOAC 995.16: Enzymatic Insoluble glucans and mannans: High Performance Anion Exchange Chromatography Coupled with Pulsed Electrochemical Detection) การตรวจวิเคราะห์ตามมาตรฐานนี้มีค่าใช้จ่ายสูงและยังไม่มีห้องปฏิบัติการที่รองรับการทดสอบด้วยเทคนิคนี้ในประเทศไทย ซึ่งนอกจากวิธีการการย่อยผนังเซลล์ด้วยเอนไซม์แล้วยังมีการศึกษาปริมาณ β -glucan ในผนังเซลล์ *S. cerevisiae* ด้วยการต้มที่อุณหภูมิ 90 °C ในสารละลายต่างเพื่อย่อยให้ β -glucan ละลายออกจากโครงสร้างผนังเซลล์และทำการวิเคราะห์ปริมาณ β -glucan ในสารละลาย (Lee และ Lee, 2001) ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีค่าใช้จ่ายต่ำกว่าและสามารถทำได้ง่ายในห้องปฏิบัติการ

2.5 สภาวะทางเดินอาหารสัตว์ปีก

ระบบทางเดินอาหารของสัตว์ปีกต่างจากระบบทางเดินอาหารของสัตว์กระเพาะเดี่ยวทั่วไป โดยมีกระเพาะอาหารถึง 3 ส่วน (บุญเสริมและบุญล้อม, 2542; Duke, 1993; Leeson and Summer, 2001) ระบบทางเดินอาหารของสัตว์ปีก มีองค์ประกอบดังนี้

1) ปาก (beak) ปากของสัตว์ปีกจะเป็นงอยที่แหลมคม ภายในไม่มีฟัน ใช้จิกอาหารกลืนลงกระเพาะโดยอาหารที่กลืนลงไปจะไม่ผ่านการเคี้ยว ภายในช่องปากมีต่อมน้ำลายที่ผลิตสารคัดหลั่งเพื่อหล่อลื่นอาหารและเอนไซม์ amylase ระยะเวลาที่อาหารอยู่ในช่องปากของสัตว์ปีกค่อนข้างสั้น อาหารส่วนมากจะอ่อนนุ่มลงและถูกย่อยภายในช่องปากได้เล็กน้อย

2) หลอดอาหาร (esophagus) ภายในหลอดอาหารมีสารคัดหลั่ง (mucus) อยู่จำนวนมากเพื่อให้อาหารไหลลื่นอย่างรวดเร็วลงไปยังกระเพาะพัก

3) กระเพาะพัก (crop) เป็นส่วนหนึ่งของหลอดอาหารที่ขยายออกสำหรับเป็นที่เก็บอาหารระยะแรกและทำให้อาหารอ่อนนุ่มลง ในส่วนของกระเพาะพักไม่มีการหลั่งเอนไซม์ amylase ออกมาแต่สามารถพบเอนไซม์จากต่อมน้ำลายที่ผสมมากับอาหารหรือมีแบคทีเรียซึ่งอาศัยในกระเพาะพักสร้างน้ำย่อยออกมา จึงพบว่ามีกรย่อยสารจำพวกแป้งและน้ำตาลได้ โดยระยะเวลาที่อาหารอยู่ในกระเพาะพักประมาณ 30 นาที

4) กระเพาะแท้ (proventriculus) มีหน้าที่หลั่งน้ำย่อย pepsinogen สารหล่อลื่นและกรด hydrochloric ออกมาผสมกับอาหาร เพื่อรักษาสภาวะค่า pH ภายในกระเพาะอาหารอยู่ที่ 0.5-2.5 บวกกับกระเพาะแท้มีการบีบตัวเพื่อช่วยในการคลุกเคล้าและย่อยอาหารได้ดีขึ้น โดยที่ไก่จะมีการหลั่งน้ำย่อยประมาณ 8.8 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักตัวหนึ่งกิโลกรัมต่อชั่วโมง ซึ่งเป็นปริมาณที่มากกว่าในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ระยะเวลาที่อาหารอยู่ในกระเพาะแท้ประมาณ 15 นาที

5) กระเพาะบดหรือกิน (gizzard) ทำหน้าที่บดย่อยอาหารให้แตกละเอียด โดยภายในอาจมีกรวดสะสมอยู่เพื่อช่วยบดย่อยอาหาร ค่า pH ในกระเพาะบดอยู่ที่ประมาณ 2.6 และระยะเวลาที่อาหารอยู่ในกระเพาะบดราว 90 นาที

6) ลำไส้เล็ก (small intestine) ในสัตว์ปีกสามารถแยกแยะลำไส้เล็ก 3 ส่วนออกจากกันได้อย่างชัดเจน โดยลำไส้เล็กตอนต้น (duodenum) จะยึดติดกันภายในเป็นรูปตัวยู ระหว่างตัวยูมีตับอ่อนติดอยู่ แต่ลำไส้เล็กส่วน jejunum และ ileum เป็นส่วนของท่อยาวที่เปิดถึงกันต่อเนื่องถึงกัน ลำไส้เล็กนอกจากจะเป็นส่วนที่มีการย่อยอาหารแล้วยังทำหน้าที่ดูดซึมสารอาหารเข้าสู่ร่างกายด้วย เอนไซม์ที่พบในลำไส้เล็กมีหลายชนิดได้แก่ trypsin, maltase, carboxypeptidase, dipeptidase, amylase, aminopeptidase, lipase, chymotrypsin, และ sucrase ซึ่งเอนไซม์หลักที่มีบทบาทในการย่อยโปรตีนคือ trypsin และ chymotrypsin ส่วน lipase ทำงานร่วมกับน้ำดีเพื่อการย่อยไขมันในอาหาร นอกจากกลไกการย่อยอาหารด้วยเอนไซม์แล้วลำไส้ยังมีการบีบตัวเพื่อคลุกเคล้าและทำให้อาหารเคลื่อนตัวไป รวมถึงการย่อยบางส่วนเกิดจากเชื้อจุลินทรีย์ซึ่งอาศัยอยู่ในลำไส้ (Normal flora) ระยะเวลาที่อาหารอยู่ในลำไส้เล็กประมาณ 90 นาที

7) ไส้ติ่ง (caca) อยู่ระหว่างรอยต่อของลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่ มี 2 ข้าง ในสัตว์ปีกที่ถูกเลี้ยงด้วยอาหารสำเร็จรูป ส่วนของไส้ติ่งไม่มีหน้าที่ในการย่อยอาหาร เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถย่อยกากใยได้มีปริมาณน้อย และผนังด้านในของไส้ติ่งจะมีการดูดซึมน้ำกลับเข้าสู่กระแสโลหิตบางส่วน

8) ลำไส้ใหญ่ (large intestine) ทำหน้าที่รองรับกากอาหารที่ร่างกายดูดซึมไปใช้แล้ว และมีการดูดซึมน้ำและอิเล็กโทรไลต์บางส่วนกลับเข้าร่างกาย pH ที่ลำไส้ใหญ่อยู่ที่ 6-6.5 ระยะเวลาที่อาหารอยู่ในลำไส้ใหญ่ประมาณ 15 นาที

9) ทวาร (vent) เป็นที่ขับกากอาหารออกจากร่างกายและเป็นบริเวณที่ท่อนำไข่ของสัตว์ปีกเพศเมียมาเปิดเพื่อการออกไข่

10) ตับ (liver) ทำหน้าที่ผลิตน้ำดีและเก็บสะสมไวท์ถึงน้ำดี ตับมีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาบอลิซึมสารอาหาร กำจัดหรือเปลี่ยนรูปสารพิษ เป็นแหล่งสะสมสารอาหารและแหล่งกักเก็บพลังงาน ผลิตเม็ดเลือดแดง เกล็ดเลือดและสารเกี่ยวกับการแข็งตัวของเลือด รวมไปถึงหน้าที่ในการทำลายเม็ดเลือดแดงที่หมดอายุ

11) ตับอ่อน (pancrease) ทำหน้าที่ผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยอาหาร ได้แก่ amylase, dipeptidase, trypsin, chymotrypsin, carboxypeptidase, aminopeptidase, และ lipase นอกจากนี้ตับอ่อนยังมีหน้าที่หลั่งสาร buffer (sodium bicarbonate) เพื่อควบคุม pH ในลำไส้ให้อยู่ที่ 6-8 และผลิตฮอร์โมน เช่น insulin และ glucagon ที่เกี่ยวข้องกับเมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรตในร่างกาย

2.6 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในอาหารโดยวิธี Kjeldahl

Kjeldahl method เป็นการตรวจวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในอาหารและอาหารสัตว์ที่นิยมกันทั่วไป พัฒนาขึ้นโดยนักเคมีชาวเดนมาร์ก ชื่อ Johan Kjeldahl ในระหว่างปี ค.ศ. 1849-1900 (Thiex and Manson, 2002; Thiex *et al.*, 2002) เพื่อหาปริมาณไนโตรเจนในสารประกอบอินทรีย์ วิธีการทดสอบมี 3 ขั้นตอนหลักคือ การย่อย การกลั่น และการไตเตรท โดยการทดสอบนี้เป็นที่ยอมรับจากห้องปฏิบัติการทั่วโลกมากกว่า 10,000 แห่ง ค่าปริมาณโปรตีนที่ได้จากเทคนิคนี้เรียกว่า “crude protein” หรือโปรตีนหยาบ ซึ่งได้รับการยอมรับว่าเป็นวิธีมาตรฐานสากลสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณ crude protein ในตัวอย่างอาหารและวัสดุทางการเกษตร โดยวิธีมาตรฐานในการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในอาหารสัตว์ที่นิยมในปัจจุบันได้แก่ AOAC Official method 2001.11 (The Association of Official Analytical Chemists [AOAC], 2012) และ ISO 5983-2 (The International Organization for Standardization (ISO), 2005 ในประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม (ประเทศไทย) ฉบับที่ 3443 (พ.ศ. 2548))

หลักการของ Kjeldahl method คือ การคำนวณปริมาณโปรตีนในรูปของไนโตรเจนทั้งหมดที่มีอยู่ในตัวอย่าง โดยการย่อยสลายโปรตีนซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโนที่มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบในโมเลกุล ไนโตรเจนที่ถูกปลดปล่อยออกมาจะถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของแอมโมเนีย การตรวจวัดปริมาณของแอมโมเนียที่ได้เป็นตัวบ่งบอกทางอ้อมถึงปริมาณไนโตรเจนที่มี

2.7 การทดสอบความเป็นพิษโดยใช้ไรน้ำ

ไรน้ำจัดเป็นสัตว์ทดลองที่ได้รับความสนใจในการนำมาทดสอบความเป็นพิษสารหลายชนิด เนื่องจากเพาะเลี้ยงได้ง่าย ราคาถูก ทำการทดลองในพื้นที่จำกัดได้ และให้ผลการทดสอบรวดเร็ว จึงมีหลายการศึกษาวิจัยที่เลือกไรน้ำมาเป็น biotest โดยเฉพาะการทดสอบพิษของสารที่ยากต่อการทดสอบได้แก่ สารอนุพันธ์ สารผสม สารที่ไม่เสถียร สารที่ละลายได้ต่ำ เป็นต้น (OECD, 2000)

2.7.1 อาร์ทีเมีย

อาร์ทีเมียหรือไรกิ้งน้ำเค็ม (*Artemia* spp.; brine shrimp) เป็นสัตว์น้ำใน class Crustacea พบได้ตามแหล่งน้ำเค็มทั่วโลก สามารถมีชีวิตอยู่ได้ในช่วงความเค็มกว้าง คือ 3-300 พีพีที โดยสภาวะที่เหมาะสมกับการเพาะเลี้ยงในห้องทดลองมีค่าความเค็มอยู่ที่ 60 พีพีที ในช่วงอุณหภูมิ 20-25 °C (Lenz and Browne, 1991; Dumitrascu, 2011) อาร์ทีเมียสามารถสืบพันธุ์ได้ 2 วิธีคือการออกลูกเป็นตัวอ่อนที่เรียกว่า นอเพลียส (nauplius) และการออกไข่ (cyst) โดยตัวอ่อนที่ฟักออกมาระยะแรก เรียกว่า อินสตาร์วัน (Instar I) อาร์ทีเมียใช้ระยะเวลาในการฟักออกจากไข่ 15-48 ชั่วโมง อินสตาร์วันมีรูปร่างคล้ายลูกแพร์หรือรูปไข่ มีความยาว 400-500 ไมครอน หรือ 0.40-0.52 มิลลิเมตร มีสีส้มแกมน้ำตาลของไข่แดง (yolk) ประมาณ 12 ชั่วโมงถัดมาตัวอ่อนจะมีการลอกคราบและเติบโตเป็นตัวอ่อนระยะที่ 2 (Instar II) ซึ่งจะเริ่มกินอาหารและมีรูปร่างลักษณะเปลี่ยนแปลงไปจากเดิมเข้าสู่ระยะอินสตาร์ต่อไป โดยใช้เวลา 7-15 วัน จนกลายเป็นอาร์ทีเมียตัวเต็มวัย (adult) ที่สามารถสืบพันธุ์ได้ (อนันต์ และคณะ, 2536; Dumitrascu, 2011) ในงานทดลองทั่วไปจะใช้อาร์ทีเมียช่วงระยะตัวอ่อน nauplius หรือ Instar I มาทดสอบความเป็นพิษแบบเฉียบพลัน (Mayorga, 2010; Nunes, 2006) งานวิจัยที่นำอาร์ทีเมียมาทดสอบความเป็นพิษของสารพิษจากเชื้อราและสารพิษอื่นๆ มีดังนี้

1) Harwig และ Scott (1971) ได้นำตัวอ่อนของอาร์ทีเมีย (*Artemia salina*) ที่อายุไม่เกิน 12 ชั่วโมงมาทดสอบความเป็นพิษของสารพิษจากเชื้อราโดยใช้วิธี disc screening method พบว่าอาร์ทีเมียมีความไวต่อสารพิษจากเชื้อรามากถึง 10 ชนิด ได้แก่ diacetoxyscirpenol, T-2 toxin, aflatoxins B₁ และ G₁, ochratoxin A, rubratoxin B, stemphone, gliotoxin, kojic acid, และ sterigmatocystin

2) Prior (1979) ทำการศึกษาวิจัยโดยนำอาหารสัตว์ 4 ชนิดคือ ธัญพืช ฟาง อาหารสัตว์สำเร็จรูป และหญ้าหมัก มาสกัดด้วย chloroform หรือ methanol และระเหยตัวทำละลายออก จากนั้นเติม brine shrimp medium (pH 6.5) และตัวอ่อนอาร์ทีเมียลงไปเป็นระยะเวลา 16 ชั่วโมง พบว่า อัตราการตายของอาร์ทีเมียในสารสกัดจากธัญพืช ฟาง อาหารสัตว์สำเร็จรูป และหญ้าหมักเป็น 22, 21, 34, และ 77% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกลุ่มทดลองที่ใช้อาหารสัตว์ซึ่งปนเปื้อนสารพิษจากเชื้อรา aflatoxin B₁, ochratoxin A และ T-2 toxin พบว่าสัดส่วนของอาร์ทีเมียที่ตายไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยอาจเป็นผลจากสารอื่นๆ ที่พบในอาหารสัตว์มีผลให้ตัวอ่อนอาร์ทีเมียตายลง

3) Varó และคณะ (2000) ทดสอบความเป็นพิษของ chlorpyrifos โดยใช้อาร์ทีเมีย (*Artemia parthenogenetica*) 3 ระยะคือ ตัวอ่อน (nauplii) ระยะวัยรุ่น (juveniles) และตัวเต็มวัย (adults) ผู้วิจัยติดตามสัดส่วนของอาร์ทีเมียที่ตายหลังสัมผัสกับสารพิษเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ภายใต้อุณหภูมิ 20±0.5 °C ในที่มืดและไม่มีการให้อาหาร พบว่าช่วงวัยของอาร์ทีเมียที่นำมาใช้มีผล

ทำให้ความไวต่อสารพิษแตกต่างกัน โดยค่า LC_{50} บ่งชี้ว่าอาร์ทีเมียระยะตัวเต็มวัยจะมีความไวต่อสารพิษมากที่สุด รองลงมาคือระยะวัยรุ่นและระยะตัวอ่อนจะมีความไวต่อสารพิษน้อยที่สุด

4) Hartl และ Humpf (2000) ทำการทดสอบความเป็นพิษของ fumonisins โดยใช้ตัวอ่อนของ *Artemia salina* บรรจุลงใน microwell plates และปิดด้วยพาราฟิล์มใสที่แสงส่องถึงได้โดยตรง ควบคุมอุณหภูมิการทดลองอยู่ที่ 24-26 °C และเขย่า plates ด้วยความเร็วรอบ 140 รอบต่อนาที จากนั้นติดตามสัดส่วนการตายของอาร์ทีเมียหลังสัมผัสกับสารพิษ 48 ชั่วโมง พบว่าอนุพันธ์ของ fumonisins ทุกตัวที่นำมาใช้ในการทดสอบ ได้แก่ fumonisin B₁, fumonisin B₂, hydrolysed fumonisin B₁, N-carboxymethyl-fumonisin B₁, N-Palmitoyl-hydrolysed fumonisin B₁, และ hydrolysed fumonisin B₂ ล้วนมีความเป็นพิษต่ออาร์ทีเมีย

5) Caldwell และคณะ (2003) ทำการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจาก diatom และ short chain aldehydes โดยใช้ไข่และตัวอ่อนของอาร์ทีเมีย (*Artemia salina*) บรรจุลงใน microwell plates ที่มีสารทดสอบอยู่ ระหว่างที่อาร์ทีเมียสัมผัสกับสารพิษภายใต้อุณหภูมิ 15 °C มีการเติมอากาศหรือออกซิเจนเป็นระยะจนครบ 24 และ 72 ชั่วโมง หลังติดตามจำนวนไข่อาร์ทีเมียที่ไม่ฟักออกมาและการตายของตัวอ่อน พบว่าที่ 72 ชั่วโมง ค่า 50% efficient concentration (EC_{50}) ของสารพิษมีแนวโน้มลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับผลการติดตามในชั่วโมงที่ 24

6) Bartolomé และ Sánchez-Fortún (2005) ทดสอบความเป็นพิษของสารฆ่าเชื้อ benzalkonium chloride (BKC) โดยใช้อาร์ทีเมีย (*Artemia franciscana*) 3 ช่วงอายุคือ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง และระยะเวลาที่อาร์ทีเมียสัมผัสกับ BKC คือ 120 นาที ควบคุมอุณหภูมิการทดสอบที่ 25 °C และทำการทดลองในที่มืด พบว่าค่า LC_{50} จะลดลงเมื่อใช้อาร์ทีเมียที่มีอายุมากขึ้น เป็นการบ่งชี้ว่าอาร์ทีเมียที่อายุมากขึ้นมีความทนทานต่อ BKC ลดลง

7) Duraković และคณะ (2011) ศึกษาความเป็นพิษของ aflatoxin M₁ ในน้ำนมด้วยวิธี disc screening method ใช้อุณหภูมิการทดสอบที่ 20, 25, 30, 35 และ 40 °C เป็นระยะเวลานาน 48-96 ชั่วโมงพบว่า อาร์ทีเมียจะมีความไวต่อสารพิษสูงสุดที่อุณหภูมิ 30 °C คำนวณค่า LC_{50} คือ 0.4 ไมโครกรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 30 โดยอุณหภูมิที่ต่ำลงคือ 20 °C อาร์ทีเมียซึ่งสัมผัสกับสารพิษจะมีการตายช้าลง โดยพบว่า LC_{50} อยู่ที่ 2.5 ไมโครกรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 60

เมื่อเทียบเคียงจากหลายการศึกษาพบว่า แต่ละงานวิจัยจะกำหนดสถานะควบคุมในการทดลองที่แตกต่างกันไป เนื่องจากในการทดสอบความเป็นพิษโดยใช้อาร์ทีเมียนั้นผู้วิจัยต้องคำนึงถึงปัจจัยพื้นฐานอันส่งผลต่อการรอดชีวิตของอาร์ทีเมียในกลุ่มควบคุมและความไวต่อสารพิษที่นำมาทดสอบ ได้แก่ สายพันธุ์ของอาร์ทีเมีย คุณภาพของไข่ สภาพการฟักออกจากไข่ อายุหรือระยะการเจริญเติบโต ชนิดของภาชนะบรรจุ อุณหภูมิสิ่งแวดล้อม คุณภาพน้ำ ความเข้มข้นของสารพิษ ระยะเวลาการสัมผัสกับสารพิษ เป็นต้น (Vanhaecke *et al.*, 1980) ดังนั้นก่อนทำการทดสอบความ

เป็นพิษโดยใช้อาร์ทีเมียเป็นสัตว์ทดลองผู้วิจัยต้องดำเนินการทดสอบเบื้องต้นเพื่อยืนยันสถานะควบคุมต่างๆ สำหรับงานทดลองเพื่อลดปัจจัยที่กระทบต่อความคลาดเคลื่อนที่มีโอกาสเกิดขึ้นตามมา

2.7.2 ไร่น้ำนางฟ้า

ไร่น้ำนางฟ้า (Fairy Shrimps) เป็นสัตว์น้ำจำพวกกุ้งอยู่ใน order Anostraca เหมือนอาร์ทีเมีย อาศัยตามแหล่งน้ำจืดธรรมชาติ พบได้มากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทย นักวิชาการของกรมประมงได้เริ่มดำเนินการศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงไร่น้ำนางฟ้ามาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2530 โดยเรียกไร่น้ำชนิดนี้ว่า “อาร์ทีเมียน้ำจืด” เนื่องจากเป็นสัตว์น้ำที่มีความสำคัญทางการประมง นำมาใช้เป็นอาหารมีชีวิตที่สำคัญต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ โดยเฉพาะการอนุบาลลูกปลาขนาดเล็กและใช้เลี้ยงปลาสวยงาม ไร่น้ำนางฟ้าที่มีรายงานการค้นพบในประเทศไทย ได้แก่ ไร่น้ำนางฟ้าไทย (*Branchinella thailandensis*) ไร่น้ำนางฟ้าสิรินธร (*Streptocephalus sirindhornae*) และไร่น้ำนางฟ้าสยาม (*Streptocephalus siamensis*) (Sanoamuang et al., 2000, 2002; Sanoamuang and Saengphan, 2006)

ไข่ของไร่น้ำนางฟ้าไทยจะใช้เวลาในการฟักประมาณ 6-24 ชั่วโมง ตัวอ่อนของไร่น้ำที่ฟักออกจากไข่จะมีขนาดค่อนข้างเล็กมาก ตัวอ่อนจะต้องการอาหารหลังจากฟักออกจากไข่ได้ประมาณ 4-6 ชั่วโมง และเจริญเติบโตด้วยวิธีการลอกคราบ จำนวนและอัตราการลอกคราบขึ้นอยู่กับอุณหภูมิและคุณภาพอาหาร เมื่ออายุ 5-7 วันไร่น้ำจะมีความยาวประมาณ 10 มิลลิเมตร เจริญเป็นตัวเต็มวัยและมีความสมบูรณ์เพศที่อายุ 7-14 วัน (ละออสศรี, 2548) ปัจจุบันยังไม่มีรายงานอย่างเป็นทางการในส่วนของการทดสอบความเป็นพิษของสารพิษจากเชื้อราในไร่น้ำนางฟ้า แต่มีความพยายามในการนำไร่น้ำชนิดนี้มาทดแทนการใช้กุ้งน้ำเค็มเพื่อทดสอบสารพิษอื่นๆ เช่น ยาฆ่าแมลง สารพิษในสมุนไพร สารตกค้างในแหล่งน้ำทิ้ง เป็นต้น (Boonsoong, 2012; Dumont and Munuswamy, 1997; Mayorga, 2010) เนื่องจากไร่น้ำนางฟ้ามีขนาดใหญ่กว่าทำให้การศึกษาได้ง่าย มีราคาถูกกว่าการนำเข้าอาร์ทีเมียและเพาะเลี้ยงได้ง่ายในน้ำจืด

งานวิจัยของ Boonsoong และ Bullangpoti (2012) ได้ทดลองนำไร่น้ำนางฟ้าไทย (*Branchinella thailandensis*) อายุไม่เกิน 24 ชั่วโมงมาทำการทดสอบความเป็นพิษของสารในกลุ่ม glyphosate (Roundup®) และ carbosulfan ติดตามการตายของตัวอ่อนไร่น้ำชั่วโมงที่ 6, 12 และ 24 ของการทดลองโดยไม่มีการให้อาหาร พบว่าการตายของตัวอ่อนสัมพันธ์กับสารพิษที่เข้มข้นมากขึ้น โดยมี median lethal concentration (LC₅₀) ณ ชั่วโมงที่ 24 ของ glyphosate (Roundup®) และ carbosulfan อยู่ที่ 0.319 และ 0.702 พีพีเอ็ม เมื่อเทียบเคียงกับการศึกษาของ Ripley และคณะ (2003) ที่นำ San Diego fairy shrimp (*Branchinecta sandiegonensis*) มาทดสอบความเป็นพิษของ glyphosate (Roundup®) และ malathion โดยใช้ไร่น้ำที่อายุไม่เกิน 24 ชั่วโมงทดสอบที่ความเป็นพิษที่อุณหภูมิ 20 °C โดยไม่มีการให้อาหารพบว่า LC₅₀ ของ glyphosate (Roundup®) และ malathion อยู่ที่ 11.8 และ 24.45 พีพีเอ็ม จากสองงานวิจัยที่กล่าวมา บ่งชี้ว่าในสารพิษกลุ่ม

เดียวกันแต่ใช้โรน่านางฟ้าต่างสายพันธุ์ในการทดสอบความเป็นพิษ LC_{50} ที่ได้อาจมีค่าแตกต่างกัน ซึ่งนอกจากสายพันธุ์แล้ว ช่วงอายุหรือระยะการเจริญเติบโต และระยะเวลาที่โรน่านางฟ้าเป็นสัตว์ทดลองผู้วิจัยต้องทำการทดสอบเบื้องต้นถึงปัจจัยของกลุ่มควบคุมและช่วงเวลาที่เหมาะสมกับรูปแบบทดลอง โดยต้องมีอัตราการรอดชีวิตของโรน่านางอย่างน้อย 80-90% เพื่อควบคุมการตายของโรน่านางจากปัจจัยที่ไม่เกี่ยวข้องกับการศึกษาอื่นทำให้เกิดผล false positive ออกไป (Lahr, 1997)



บทที่ 3

วิธีการวิจัย

3.1 การเตรียมเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae*

3.1.1 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเพื่อศึกษาการเจริญเติบโตและเก็บเซลล์ *S. cerevisiae*

- เชื้อ *S. cerevisiae* 4 สายพันธุ์ซื้อจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ได้แก่ TISTR 5013 (wine production yeast), TISTR 5049 (california wine yeast), TISTR 5343 (single cell protein), และ TISTR 5059 (bread yeast)

- กระบอกตวงขนาด 1,000, 500, และ 100 มิลลิลิตร

- เครื่องชั่งดิจิตอล (Weighing machine analytical balance SartoriusTM BP210S)

- Spectrophotometer (Thermo Scientific รุ่น GENESYS 20)
- Disposal cuvette 1.6 มิลลิลิตร (SarstedtTM)
- Autopipette 50 ไมโครลิตรและ 1-100 ไมโครลิตร (MicroPette PlusTM)
- Electronic pipette 50-1,000 ไมโครลิตร (AvegeneTM S1000)
- Tips 1,000 ไมโครลิตร (BiolineTM) และ 200 ไมโครลิตร (KirgenTM)
- Incubator shaker (New Brunswick Scientific รุ่น Innova 4000)
- เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave TOMY SX-700)
- ตู้บ่มเชื้อ 30 ± 1 °C
- กล้องจุลทรรศน์ (Olympus CH-2)
- ตะเกียงแอลกอฮอล์
- จานเพาะเลี้ยงเชื้อแบบแก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 100 มิลลิเมตร
- ซ้อนตักสาร
- หัวงักเชื้อ (Inoculating loop)
- Vacuum pump
- ชุดกรองเชื้อ (Vacuum filter holder; Millipore®)
- แผ่นกรองเชื้อชนิด cellulose nitrate (Sterile filter membrane with gridded 47 มิลลิเมตร 0.45 ไมโครเมตร; Millipore®)
- ตู้อบลมร้อน (WTE binderTM)

- ปีกเกอร์ขนาด ขนาด 50, 100, 150, และ 250 มิลลิลิตร
- Erlenmeyer flask ขนาด 125 มิลลิลิตรและ 500 มิลลิลิตร
- กระดาษวัดค่า pH (Merck™)
- ถุงมือยางชนิดไม่มีแป้ง

3.1.2 สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ศึกษาการเจริญเติบโตและแยกเก็บเซลล์

- น้ำกลั่นปลอดเชื้อ
- Potato dextrose agar (HIMEDIA™, pH 5.5)
- Potato dextrose broth (Difco™, pH 5.5)
- 10% Tartaric acid (AR grade Univar®, Ajax Finechem)
- 95% Alcohol (Industrial grade)

3.1.3 สถานที่ทำการทดลองและเก็บข้อมูล

ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ (เลขที่ 99 หมู่ 18 ถ.พหลโยธิน ต.คลองหนึ่ง อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี)

3.1.4 การเพาะเลี้ยงเพื่อศึกษาการเจริญเติบโตและแยกเก็บเซลล์ *S. cerevisiae*

1) เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar (PDA) ด้วยการละลายอาหารในน้ำกลั่นและนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ภายใต้ความดัน 15 psi นาน 15 นาที (autoclave) จากนั้นรอให้อุณหภูมิอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงมาที่ประมาณ 50 °C วัดค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ กรณีที่พบว่า pH สูงกว่า 5.5 ปรับให้เป็นกรดด้วยการเติมสารละลาย 10% Tartaric acid และเทลงในจานเพาะเชื้อ

2) เพาะเลี้ยงเชื้อ *S. cerevisiae* บน PDA บ่มที่ 30 °C นาน 4 วัน

3) เตรียมอาหาร Potato dextrose broth (PDB) ด้วยการละลายอาหารเลี้ยงเชื้อในน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำแรงดันสูง จากนั้นรอให้อุณหภูมิอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงมาที่ประมาณ 50 °C ทำการวัดค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ กรณีที่พบว่า pH สูงกว่า 5.5 ปรับให้เป็นกรดด้วยการเติมสารละลาย 10% Tartaric acid และเทลงในจานเพาะเชื้อ

4) นำเชื้อ *S. cerevisiae* ที่เจริญบน PDA มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว PDB บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เขย่าความเร็ว 100 รอบต่อนาทีด้วยเครื่อง Incubator shaker ศึกษาคุณสมบัติในการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. cerevisiae* ทั้ง 4 สายพันธุ์ โดยเก็บข้อมูลค่าความขุ่น (Turbidity) ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 540 nm ทุก 1 ชั่วโมงจัดทำเป็นกราฟการเจริญเติบโตของเชื้อ (Growth curve)

5) เพาะเลี้ยงเชื้อ *S. cerevisiae* ในอาหาร PDB เมื่อเข้าสู่ช่วง log phase จึงนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำแรงดันสูง และเก็บเซลล์ที่ตายแล้วด้วยการนำมารองผ่านแผ่น cellulose

nitrate (Sterile filter membrane pore size 0.45 μm .) และล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 2 ครั้ง เก็บรักษาเซลล์ที่ได้จากการกรองโดยการอบแห้งในตู้อบลมร้อนอุณหภูมิ 80 °C เพื่อใช้สำหรับทุกการทดลองในงานวิจัยนี้

3.2 การทดลองเปรียบเทียบประสิทธิภาพการดูดซับสารพิษ aflatoxin B₁ และ ochratoxin A ใน PBS ของเชื้อ *S. cerevisiae* 4 สายพันธุ์

3.2.1 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลองเปรียบเทียบประสิทธิภาพการดูดซับสารพิษ aflatoxin B₁ และ ochratoxin A ใน PBS

- เซลล์ที่ตายแล้วของ *S. cerevisiae* 4 สายพันธุ์ (จากข้อ 3.1)
- Volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร
- หลอดทดลองแก้วพร้อมฝา
- กล้องจุลทรรศน์ (Olympus CH-2)
- Hemocytometer และ cover slide (Neubauer improved, BOECOTM)
- หลอด Eppendorp
- Centrifuge tube
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (HETTICH EBA 12R Centrifuge)
- Spectrophotometer (UNICAM UV/Vis Spectrophotometer UV2)
- Disposal cuvette 1.6 มิลลิลิตร (SarstedtTM)
- Autopipette 50 ไมโครลิตรและ 1-100 ไมโครลิตร (MicroPette PlusTM)
- Electronic pipette 50-1,000 ไมโครลิตร (AvegeneTM S1000)
- Tips 1,000 ไมโครลิตร (BiolineTM) และ 200 ไมโครลิตร (KirgenTM)
- Incubator shaker (New Brunswick Scientific รุ่น Innova 4000)
- ชุดทดสอบ aflatoxin ELISA Test kit (Limit of detection 0.4 พีพีบี;

ScreenEZ[®] บริษัท สยามอินเตอร์ควอลิตี้ จำกัด) ประกอบด้วย

- 1) Micro ELISA plate เคลือบด้วย antibodies ต่อ aflatoxin B₁ (96 หลุม)
- 2) AFB₁-HRP conjugate จำนวน 6 หลอด (100 ไมโครลิตรต่อหลอด)
- 3) Substrate 12 มิลลิลิตรและ conjugate buffer ปริมาณ 8 มิลลิลิตร
- 4) Washing buffer 60 มิลลิลิตร (10 x 0.01 M PBS + 0.05% tween 20)
- 5) สารมาตรฐาน aflatoxin B₁ 0, 0.2, 0.5, 1, 2, และ 5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร
- 6) Stop solution (0.3 M phosphoric acid) 12 มิลลิลิตร

- ชุดทดสอบ ochratoxin A ELISA Test kit (Limit of detection 5 พีพีบี;
RIDASCREEN[®] FAST ochratoxin A R-Biopharm) ประกอบด้วย

1) Microtiter plate เคลือบด้วย antibodies ต่อ Anti-ochratoxin A
antibodies (48 หลุม)

2) Peroxidase conjugated ochratoxin A 3 มิลลิลิตร

3) Anti-ochratoxin A monoclonal antibody 3 มิลลิลิตร

4) Substrate/Chromogen 10 มิลลิลิตร

5) สารมาตรฐาน ochratoxin A 0, 1, 2, 4 และ 8 พีพีบี

6) Stop solution (1 N sulfuric acid) 14 มิลลิลิตร

- Microplate reader for ELISA (Tecan SunriseTM)

- เครื่องเขย่าสาร (Vortex-Genie[®] 2 - Scientific Industries, Inc.)

- นาฬิกาจับเวลา

- Nitrogen evaporator (OrganomationTM)

- เครื่อง HPLC (Agilent 1100 Series) ประกอบด้วย fluorescence
detector, photochemical reactor ที่มีหลอด UV ความยาวคลื่น 254 nm และ PTFE tubing
1/16 นิ้ว od ยาว 25 เมตร (AuraTM)

- HPLC Column ชนิด Inertsil C18 ODS-3 ขนาด 150x4.6 มิลลิเมตร id
ขนาด particle 5 ไมโครเมตร (GL ScienceTM)

- Vial Mini Uniprep Syringeless filter ชนิด Nylon 0.45 ไมโครเมตร
(WhatmanTM)

- ถังมือยางป้องกันสารเคมีชนิดไม่มีแป้ง

3.2.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลองเปรียบเทียบประสิทธิภาพการดูดซับสารพิษ

aflatoxin B₁ และ ochratoxin A ใน PBS

- สารพิษมาตรฐาน aflatoxin B₁ 3 พีพีเอ็ม ใน benzene:acetonitrile (98:2)
(SupelcoTM)

- สารพิษมาตรฐาน ochratoxin A 50 พีพีเอ็มใน benzene:acetic acid (99:1)
(SupelcoTM)

- Phosphate buffer saline (PBS pH 7.4; Sigma-Aldrich[®])

- น้ำกลั่นปลอดเชื้อ (Sterile deionized water)

- Methanol (HPLC grade FisherTM, Sigma-Aldrich[®])

- Acetonitrile (Sigma-Aldrich[®])

- Acetic acid (Sigma-Aldrich[®])

3.2.3 สถานที่ทำการทดลองและเก็บข้อมูล

ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ (เลขที่ 99 หมู่ 18 ถ.พหลโยธิน ต.คลองหนึ่ง อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี) และห้องปฏิบัติการทดสอบคุณภาพอาหารสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ (เลขที่ 91 หมู่ 4 ต.บางกะดี อ.เมือง จ.ปทุมธานี)

3.2.4 การเตรียมสารพิษมาตรฐาน

1) การเตรียมสารมาตรฐาน aflatoxin B₁ (AOAC 970.44, 2005)

นำสารมาตรฐาน aflatoxin B₁ (AFB₁) ความเข้มข้นเริ่มต้น 3 พีพีเอ็มที่ละลายอยู่ใน benzene:acetonitrile (98:2) มาระเหยตัวทำละลายออกด้วย nitrogen evaporator จนแห้งและเติม methanol ปรับความเข้มข้นเป็น 1 พีพีเอ็มจากนั้นนำไปสอบเทียบโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 350 nm คำนวณตามสูตร

$$\text{ความเข้มข้นของ AFB}_1 \text{ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)} = \frac{A \times MW \times 1,000}{\epsilon} \quad (3.1)$$

A = ค่าการดูดกลืนแสงที่ 350 nm (Absorbance)

MW = Molecular weight ของ aflatoxin B₁ คือ 312

ϵ = Molecular absorptivity ของตัวทำละลาย methanol คือ 21,500 โมล/ลิตร/เซนติเมตร ในการทดสอบประสิทธิภาพการดูดซับสารพิษใน PBS สารมาตรฐาน aflatoxin B₁ ถูกเจือจางลงด้วย methanol HPLC grade ให้มีความเข้มข้น 600 พีพีบี

2) การเตรียมสารมาตรฐาน ochratoxin A (Bacha *et al.*, 1988).

นำสารมาตรฐาน ochratoxin A (OTA) ความเข้มข้นเริ่มต้น 50 พีพีเอ็มที่ละลายอยู่ใน benzene: acetic acid (99:1) มาระเหยตัวทำละลายออกด้วย nitrogen evaporator จนแห้งและเติม methanol ปรับความเข้มข้นเป็น 1 พีพีเอ็มจากนั้นนำไปสอบเทียบโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 333 nm คำนวณตามสูตร

$$\text{ความเข้มข้นของ OTA (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)} = \frac{A \times MW \times 1,000}{\epsilon} \quad (3.2)$$

A = ค่าการดูดกลืนแสงที่ 333 nm (Absorbance)

MW = Molecular weight ของ ochratoxin A คือ 403.8

ϵ = Molar extinction coefficient ของตัวทำละลาย methanol คือ 5,500 โมล/ลิตร/เซนติเมตร ในการทดสอบประสิทธิภาพการดูดซับสารพิษใน PBS สารมาตรฐาน ochratoxin A ถูกเจือจางลงด้วย methanol HPLC grade ให้มีความเข้มข้น 600 พีพีบี

3.2.5 การทดลองเปรียบเทียบประสิทธิภาพการดูดซับสารพิษ aflatoxin B₁ และ ochratoxin A ใน PBS ของเชื้อ *S. cerevisiae* 4 สายพันธุ์

1) เติม PBS (pH7.4) ลงในเซลล์ที่ตายแล้วของ *S. cerevisiae* อบแห้ง (จากข้อ 3.1) ทำให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยการใช้ autopipette ดูดขึ้นลง จากนั้นนำมาเจือจางแบบ ten-fold dilution ด้วย PBS (pH7.4) เพื่อนับจำนวนเซลล์ด้วย hemocytometer เตรียม cell suspension ของ *S. cerevisiae* ทั้ง 4 สายพันธุ์เป็น 4 ระดับคือ 10^7 , 10^8 , 10^9 , และ 10^{10} เซลล์ต่อมิลลิลิตร

2) การทดลองมีกลุ่มควบคุม 2 กลุ่มดังนี้

- negative control ใช้ PBS (pH 7.4) 200 ไมโครลิตรผสมกับ methanol HPLC grade 50 ไมโครลิตร

- positive control ใช้ PBS (pH 7.4) 200 ไมโครลิตรผสมกับสารมาตรฐาน aflatoxin B₁ (600 พีพีบี) 50 ไมโครลิตรและสารมาตรฐาน ochratoxin A (600 พีพีบี) 50 ไมโครลิตร โดยความเข้มข้นสุดท้ายของสารพิษทั้งสองชนิดเป็น 100 พีพีบี

3) ผสม cell suspension 200 ไมโครลิตรเข้ากับสารมาตรฐาน aflatoxin B₁ (600 พีพีบี) 50 ไมโครลิตรและสารมาตรฐาน ochratoxin A (600 พีพีบี) 50 ไมโครลิตรโดยความเข้มข้นสุดท้ายของสารพิษทั้งสองชนิดคือ 100 พีพีบี

กลุ่มทดลองมีทั้งหมด 16 กลุ่ม (*S. cerevisiae* 4 สายพันธุ์ x ปริมาณเซลล์ 4 ระดับ) กลุ่ม negative control 1 กลุ่มและกลุ่ม positive control 1 กลุ่ม รวมเป็น 18 กลุ่ม ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 สรุปกลุ่มทดลองศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการดูดซับสารพิษ aflatoxin B₁ และ ochratoxin A ใน PBS ของเซลล์ *S. cerevisiae* แต่ละสายพันธุ์

กลุ่มที่	กลุ่มทดลอง	ความเข้มข้นสารพิษ* (พีพีบี)		ปริมาณเซลล์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)
		AFB ₁	OTA	
1	Negative control	0	0	0
2	Positive control*	100	100	0
3		100	100	10 ⁷
4	<i>S. cerevisiae</i> TISTR	100	100	10 ⁸
5	5013	100	100	10 ⁹
6		100	100	10 ¹⁰
7		100	100	10 ⁷
8	<i>S. cerevisiae</i> TISTR	100	100	10 ⁸
9	5049	100	100	10 ⁹
10		100	100	10 ¹⁰
11		100	100	10 ⁷
12	<i>S. cerevisiae</i> TISTR	100	100	10 ⁸
13	5059	100	100	10 ⁹
14		100	100	10 ¹⁰
15		100	100	10 ⁷
16	<i>S. cerevisiae</i> TISTR	100	100	10 ⁸
17	5343	100	100	10 ⁹
18		100	100	10 ¹⁰

4) สารผสมทั้ง 18 กลุ่มถูกบ่มที่อุณหภูมิ 40 °C นาน 4 ชั่วโมง เขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1800g อุณหภูมิ 25°C นาน 15 นาที เพื่อแยกเก็บส่วนน้ำใสด้านบน (supernatant) ไปวิเคราะห์ปริมาณสารพิษ โดยแบ่ง supernatant ออกเป็น 3 ส่วนดังนี้

ส่วนที่ 1 เจือจาง supernatant ด้วย PBS อัตราส่วน 1:19 (dilution factor เท่ากับ 20) เพื่อใช้ในการทดสอบหาปริมาณ aflatoxin B₁ ด้วยชุดทดสอบ aflatoxin ELISA Test kit (ScreenEZ[®]) โดยมีขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ดังนี้

- หยดสารพิษมาตรฐานหรือสารตัวอย่าง 50 ไมโครลิตรลงในหลุมทดสอบ
- หยด AFB₁-HRP conjugate 50 ไมโครลิตรลงในทุกหลุมทดสอบ จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ในที่มืดเป็นเวลา 20 นาที
- เทสารในหลุมทดสอบทิ้งและล้างด้วย washing buffer 3 ครั้ง
- หยด substrate 100 ไมโครลิตรลงในหลุมทดสอบ และบ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดนาน 5 นาที และหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม stop solution 100 ไมโครลิตรลงในหลุมทดสอบ
- อ่านผลด้วย ELISA Reader ที่ความยาวคลื่น 450 nm.

ส่วนที่ 2 เจือจาง supernatant ด้วย 35% methanol อัตราส่วน 1:13 (dilution factor เท่ากับ 14) เพื่อการทดสอบหาปริมาณ ochratoxin A ด้วย ochratoxin A ELISA Test kit (RIDASCREEN[®] FAST ochratoxin A)

- ปิเปตสารละลายมาตรฐานหรือตัวอย่าง 50 ไมโครลิตรลงในหลุมทดสอบตามด้วยการเติม Peroxidase conjugated ochratoxin A ปริมาตร 50 ไมโครลิตรลงในทุกหลุมทดสอบ
- หยด Anti-ochratoxin A monoclonal antibody 50 ไมโครลิตรลงในทุกหลุมทดสอบ บ่มในที่มืดนาน 10 นาทีที่อุณหภูมิห้อง
- เทสารในหลุมทดสอบทิ้งและล้าง microtiter plate ด้วยน้ำกลั่นหลุมละ 250 ไมโครลิตรทั้งหมด 3 รอบและเติม substrate/chromogen ปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงในแต่ละหลุม บ่มในที่มืดนาน 5 นาทีที่อุณหภูมิห้อง
- เติม stop solution ปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงในแต่ละหลุม
- อ่านค่าความเข้มข้นของสารพิษด้วยการนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

ส่วนที่ 3 เจือจาง supernatant ด้วย methanol HPLC grade และกรองด้วย Vial Mini Uniprep Syringeless filter เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อนำไปทดสอบยืนยันผลด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ต่อไป โดยใช้สภาวะดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 สภาวะเครื่อง HPLC ที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณ aflatoxin B₁ และ ochratoxin A

HPLC conditions	aflatoxin B ₁	ochratoxin A
Column	C18 ODS-3 150x4.6 มิลลิเมตร	C18 ODS-3 150x4.6 มิลลิเมตร
Moblie phase	methanol:water:acetonitrile (45:55:5)	water:acetonitrile:acetic acid (99:99:2)
Flow rate (มิลลิลิตรต่อนาที)	1	1
Detector	Fluorescence detector Ex : 360 nm Em : 440 nm	Fluorescence detector Ex : 333 nm Em : 477 nm
Injection volume (ไมโครลิตร)	10	20
Retention time (นาที)	12.60-15.50	10.30-11.40
Limit of detection (พีพีบี)*	0.7	1.0

* ค่า Limit of detection มาจากผลการสอบเทียบเครื่องมือของห้องปฏิบัติการ

5) นำค่าความเข้มข้นสารพิษใน supernatant ที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์มาคำนวณเปอร์เซ็นต์ของสารพิษที่ลดลง (%Reduction) ตามสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์ของสารพิษที่ลดลง} = \frac{\text{ความเข้มข้นสารพิษในกลุ่ม positive control} - \text{ความเข้มข้นสารพิษในกลุ่มทดลอง}}{\text{ความเข้มข้นสารพิษในกลุ่ม positive control}} \times 100 \quad (3.3)$$

ดำเนินการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำโดยผลการทดสอบถูกนำมาวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS ver. 11.5 for window เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's New Multiple Range Test กำหนดระดับนัยสำคัญ 0.05

3.2.6 การทดลองเปรียบเทียบประสิทธิภาพการดูดซับสารพิษ aflatoxin B₁

ใน PBS

1) คัดเลือก *S. cerevisiae* 2 สายพันธุ์ที่มีเปอร์เซ็นต์ของสารพิษใน PBS ที่ลดลงจากการทดสอบประสิทธิภาพการดูดซับสารพิษ aflatoxin B₁ และ ochratoxin A ในข้อ 3.2.5 ได้สูง มาทดสอบประสิทธิภาพการดูดซับสารพิษ aflatoxin B₁ เพียงชนิดเดียว โดยทำการเตรียม cell suspension ของ *S. cerevisiae* ทั้ง 2 สายพันธุ์เป็น 4 ระดับคือ 10⁷, 10⁸, 10⁹, และ 10¹⁰ เซลล์ต่อมิลลิลิตรด้วย hemocytometer

2) การทดลองมีกลุ่มควบคุม 2 กลุ่มดังนี้

- negative control ใช้ PBS (pH 7.4) 200 ไมโครลิตรผสมกับ methanol HPLC grade 100 ไมโครลิตร

- positive control ใช้ PBS (pH 7.4) 200 ไมโครลิตรผสมกับสารมาตรฐาน aflatoxin B₁ (600 พีพีบี) 50 ไมโครลิตรและสารมาตรฐาน ochratoxin A (600 พีพีบี) 50 ไมโครลิตร โดยความเข้มข้นสุดท้ายของสารพิษทั้งสองชนิดเป็น 100 พีพีบี

3) ผสม cell suspension 200 ไมโครลิตรกับสารมาตรฐาน aflatoxin B₁ (600 พีพีบี) 50 ไมโครลิตรและ methanol 50 ไมโครลิตร โดยความเข้มข้นสุดท้ายของ aflatoxin B₁ คือ 100 พีพีบี รวมกลุ่มทดลองทั้งหมดเป็น 10 กลุ่ม ดังตาราง 3.3

ตารางที่ 3.3 กลุ่มทดลองศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการดูดซับสารพิษ aflatoxin B₁

ใน PBS ของเซลล์ *S. cerevisiae*

กลุ่มที่	กลุ่มทดลอง	ความเข้มข้นของ AFB ₁ (พีพีบี)	ปริมาณเซลล์ <i>S. cerevisiae</i> (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)
1	Negative control	0	0
2	Positive control*	100	0
3	<i>S. cerevisiae</i> TISTR 5013	100	10 ⁷
4		100	10 ⁸
5		100	10 ⁹
6		100	10 ¹⁰
7	<i>S. cerevisiae</i> TISTR 5049	100	10 ⁷
8		100	10 ⁸
9		100	10 ⁹
10		100	10 ¹⁰

4) สารผสมทั้ง 10 กลุ่มถูกบ่มที่อุณหภูมิ 40 °C นาน 4 ชั่วโมง เขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1800g อุณหภูมิ 25 °C นาน 15 นาที เพื่อแยกเก็บส่วนน้ำใสด้านบน (supernatant) ไปเจือจางด้วย PBS เพื่อตรวจวิเคราะห์ความเข้มข้นของ aflatoxin B₁ ด้วยชุดทดสอบ aflatoxin ELISA Test kit (ScreenEZ[®]) ตามขั้นตอนในข้อ 3.2.5 (5)

ดำเนินการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำโดยผลการทดสอบถูกนำมาวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS ver. 11.5 for window เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's New Multiple Range Test กำหนดระดับนัยสำคัญ 0.05

3.3 การเติมเซลล์ *S. cerevisiae* ลงในอาหารไก่เนื้อเพื่อเพิ่ม crude protein

3.3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลองเปรียบเทียบ crude protein ในอาหารไก่เนื้อที่มีการเติมเซลล์ *S. cerevisiae*

- เซลล์ที่ตายแล้วของ *S. cerevisiae* 4 สายพันธุ์ (จากข้อ 3.1)
- หลอดทดลองแก้วพร้อมฝา
- กล้องจุลทรรศน์ (Olympus CH-2)
- Hemocytometer และ cover slide (Neubauer improved, BOECO™)
- ปีกเกอร์ขนาด 50, 100, 150, และ 250 มิลลิลิตร
- Erlenmeyer flask ขนาด 125 มิลลิลิตรและ 500 มิลลิลิตร
- กระบอกตวงขนาด 500 และ 100 มิลลิลิตร
- เครื่องชั่งดิจิตอล (Weighing machine analytical balance Sartorius™

BP210S)

- Autopipette 1-100 ไมโครลิตร (MicroPette Plus™)
- Electronic pipette 50-1,000 ไมโครลิตร (Avegene™ S1000)
- Tips 1,000 ไมโครลิตร (Bioline™) และ 200 ไมโครลิตร (Kirgen™)
- เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave TOMY SX-700)
- ตู้อบลมร้อน (WTE binder™)
- ภาชนะอลูมิเนียม (Moisture can)
- โถดูดความชื้น (Desiccator)
- ซ้อนตักสาร
- ตะเกียงแอลกอฮอล์
- ชูตปั่นบดตัวอย่าง (Waring® Commercial Blender)
- ถังร้อนพลาสติกบรรจุตัวอย่างและถังกระดาษ
- เครื่องโม่บดตัวอย่าง (Retsch® ZM200)
- กระดาษห่อตัวอย่างสำหรับย้อมมี sucrose 0.7 กรัมเป็นส่วนประกอบ
- Digestion tube
- Digestion block (Büchi digestion units K-435)
- Distillation unit (Büchi distillation units K-355)
- Scrubber (Büchi b414)
- Automatic burette และ conical flasks
- อาหารไก่เนื้อ (BTG Feedmill No. 203T)

3.3.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลองเปรียบเทียบ crude protein ในอาหารไก่เนื้อที่มี การเติมเซลล์ *S. cerevisiae*

- น้ำกลั่นปลอดเชื้อ (Sterile deionized water)
- Catalyst tablets ประกอบด้วย potassium sulfate และ copper(II) sulfate pentahydrate
- Sulfuric acid (AR grade RCI Labscan™)
- สารละลาย hydrogen peroxide ประกอบด้วย H_2O_2 30 กรัมในสารละลาย 100 มิลลิลิตร
- สารละลาย 40% และ 0.1M sodium hydroxide
- สารละลาย Indicator ได้แก่ Methyl red (Methyl red 100 มิลลิกรัมละลายใน methanol 100 มิลลิลิตร) และ Bromocresol green (Bromocresol green 100 มิลลิกรัมละลายใน methanol 100 มิลลิลิตร)
- สารละลาย 4% boric acid
- Hydrochloric acid (AR grade RCI Labscan™)
- Ammonium sulfate
- Ammonium iron(II) sulfate

3.3.3 สถานที่ทำการทดลองและเก็บข้อมูล

ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ (เลขที่ 99 หมู่ 18 ถ.พหลโยธิน ต.คลองหนึ่ง อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี) และ บริษัท ศูนย์วิทยาศาสตร์เบทาโกร จำกัด สาขาฉะเชิงเทรา (219 หมู่ 1 ตำบลช่องสาริกา อำเภอนาน้อย จ.ฉะเชิงเทรา 15220)

3.3.4 การทดสอบ Kjeldahl Nitrogen Analysis ของ cell suspension และ ตรวจวัดน้ำหนักแห้งของเซลล์ *S. cerevisiae* (AOAC, 1990)

1) อบอุ่นเซลล์ในตู้อบที่อุณหภูมิ 103 ± 2 °C นาน 3 ชั่วโมง จากนั้นย้ายภาชนะใส่ลงในโถดูดความชื้น พักรอจนอุณหภูมิภาชนะเท่ากับอุณหภูมิห้องและทำการชั่งน้ำหนัก

2) เตรียม cell suspension 10^{10} เซลล์ต่อมิลลิลิตรของ *S. cerevisiae* ที่ตายแล้วจากการนิ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำแรงดันสูงสายพันธุ์ละ 200 มิลลิลิตร จากนั้นแบ่งออกเป็นสองส่วนดังนี้

ส่วนที่ 1 บรรจุ cell suspension 100 มิลลิลิตรลงในภาชนะอุณหภูมิเย็น (ข้อ 1) และนำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 103 ± 2 °C นาน 4 ชั่วโมง จากนั้นย้ายภาชนะบรรจุใส่ลงในโถดูดความชื้นและพักรอจนอุณหภูมิภาชนะเท่ากับอุณหภูมิห้อง จากนั้นทำการชั่งน้ำหนัก เพื่อคำนวณเทียบเคียงน้ำหนักแห้งของเซลล์ *S. cerevisiae* ที่เติมลงในอาหารไก่เนื้อ

ส่วนที่ 2 บรรจุ cell suspension 100 มิลลิลิตรลงในขวดแก้วสีชาปอดเชื้อ เพื่อตรวจวิเคราะห์ Kjeldahl Nitrogen Analysis (มาตรฐาน ISO 5983-2, 2005) ที่ห้องปฏิบัติการ ศูนย์วิทยาศาสตร์เบทาโกร สาขาลพบุรี

3.3.5 การผสมเซลล์ *S. cerevisiae* ลงในอาหารไก่เนื้อและทดสอบ Kjeldahl

Nitrogen Analysis

1) เติมน้ำกลั่นปอดเชื้อลงในเซลล์ *S. cerevisiae* อบแห้ง (จากข้อ 3.1) ทำการนับจำนวนเซลล์ด้วย hemocytometer จากนั้นผสม cell suspension ลงในอาหารไก่เนื้อ 100 กรัม โดยใช้สัดส่วนเป็น 10^{10} เซลล์ต่ออาหารไก่เนื้อ 1 กรัม

2) ปั่นผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันและอบแห้งที่อุณหภูมิ 103 ± 2 °C นาน 4 ชั่วโมง (ความชื้นหลังอบแห้งไม่เกิน 16% ตามมาตรฐานคุณภาพอาหารสัตว์ของบริษัทผู้ผลิต)

3) นำอาหารไก่เนื้อที่ผสมเซลล์ *S. cerevisiae* บรรจุลงในถุงพลาสติกปอดเชื้อ และถูกระดาษป้องกันแสงเพื่อส่งทดสอบ Kjeldahl Nitrogen Analysis (มาตรฐาน ISO 5983-2, 2005) ที่ห้องปฏิบัติการศูนย์วิทยาศาสตร์เบทาโกร สาขาลพบุรี โดยมีขั้นตอนการทดสอบดังนี้

- ย่อยตัวอย่างด้วย sulfuric เข้มข้นร่วมกับใส่ catalyst tablets
 - กลั่นแอมโมเนียด้วยการเติม NaOH เพื่อทำปฏิกิริยากับเกลือ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ และเติม boric acid เพื่อจับก๊าซแอมโมเนีย
 - นำสารละลาย boric acid ซึ่งจับก๊าซแอมโมเนียไว้มาไตเตรตกับสารละลายมาตรฐาน sulfuric acid เพื่อหาปริมาณไนโตรเจน
 - นำปริมาตรสารละลาย sulfuric acid ที่ใช้ในการไตเตรตมาคำนวณหาปริมาณไนโตรเจนแล้วคูณกับ Kjeldahl factor ได้เป็นค่าโปรตีนหยาบ (crude protein)
- ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำโดยผลการทดสอบถูกนำมาวิเคราะห์ทางสถิติด้วย โปรแกรม SPSS ver. 11.5 for window เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's New Multiple Range Test กำหนดระดับนัยสำคัญ 0.05

3.4 การทดสอบประสิทธิภาพ *S. cerevisiae* ดูดซับสารพิษ aflatoxin B₁ และ ochratoxin A ในสภาวะจำลองทางเดินอาหาร

3.4.1 อุปกรณ์และเครื่องมือในการทดสอบประสิทธิภาพ *S. cerevisiae* ดูดซับ

สารพิษ aflatoxin B₁ และ ochratoxin A ในสภาวะจำลองทางเดินอาหาร

- เซลล์ *S. cerevisiae* อบแห้ง (จากข้อ 3.1)
- อาหารไก่เนื้อ (BTG Feedmill No. 203T)
- หลอดทดลองแก้วพร้อมฝา

- กล้องจุลทรรศน์ (Olympus CH-2)
- Hemocytometer และ cover slide (Neubauer improved, BOECOTM)
- Volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร
- กระบอกตวงขนาด 50, 100, และ 500 มิลลิลิตร
- Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตรพร้อมฝาปิด
- Spectrophotometer (UNICAM UV/Vis Spectrophotometer UV2)
- Disposal cuvette 1.6 มิลลิลิตร (SarstedtTM)
- Autopipette 50 ไมโครลิตรและ 1-100 ไมโครลิตร (MicroPette PlusTM)
- Electronic pipette 50-1,000 ไมโครลิตร (AvegeneTM S1000)
- Tips 1,000 ไมโครลิตร (BiolineTM) และ 200 ไมโครลิตร (KirgenTM)
- Incubator shaker (New Brunswick Scientific รุ่น Innova 4000)
- ชุดทดสอบ aflatoxin ELISA Test kit (Limit of detection 0.4 พีพีบี;

ScreenEZ[®] บริษัท สยามอินเตอร์ควอลิตี้ จำกัด)

- ชุดทดสอบ ochratoxin A ELISA Test kit (Limit of detection 5 พีพีบี;

RIDASCREEN[®] FAST ochratoxin A R-Biopharm)

- Microplate reader for ELISA (Tecan SunriseTM)
- เครื่องเขย่าสาร (Vortex-Genie[®] 2 - Scientific Industries, Inc.)
- นาฬิกาจับเวลา
- Nitrogen evaporator (OrganomationTM)
- เครื่อง HPLC (Agilent 1100 Series)
- HPLC Column ชนิด Inertsil C18 ODS-3
- Vial Mini Uniprep Syringeless filter ชนิด Nylon 0.45 ไมโครเมตร.

(WhatmanTM)

- ตู้อบลมร้อน (WTE binderTM)
- ปีกเกอร์ขนาด 50, 100, 150, และ 250 มิลลิลิตร
- กระดาษวัดค่า pH (MerckTM)
- กระดาษกรอง No.4, 125 mm. (WhatmanTM)
- Filter glass microfiber GF/C, 47 mm. (WhatmanTM)
- กระบอกฉีดยาพลาสติกขนาด 5 มิลลิลิตร (Disposal syringe NIPROTM)
- ถุงมือยางป้องกันสารเคมีชนิดไม่มีแป้ง
- Immunoaffinity column สำหรับ aflatoxin B₁ และ ochratoxin A (Alfa-

Ochraprep[®] R-Biopharm)

3.4.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพ *S. cerevisiae* ดูดซับสารพิษ aflatoxin B₁ และ ochratoxin A ในสถานะจำลองทางเดินอาหาร

- สารพิษมาตรฐาน aflatoxin B₁ 25 พีพีเอ็มใน acetonitrile (TrilogyTM)
- สารพิษมาตรฐาน ochratoxin A 10 พีพีเอ็มใน methanol (TrilogyTM)
- Phosphate buffer saline (PBS pH 7.4; Sigma-Aldrich[®])
- น้ำกลั่นปลอดเชื้อ (Sterile deionized water)
- Methanol (HPLC & AR grade FisherTM, HPLC grade Sigma-Aldrich[®])
- Acetonitrile (HPLC grade Sigma-Aldrich[®])
- Acetic acid (HPLC grade Sigma-Aldrich[®])
- α -amylase from *Bacillus* sp. (Sigma-Aldrich[®])
- Potassium chloride (AR grade QR $\ddot{e}$ CTM)
- Sodium Chloride (AR grade Univar[®], Ajax Finechem)
- Bile salts (Fluka[®])
- Pepsin from porcine gastric mucosa (Sigma-Aldrich[®])
- Trypsin from bovine pancreas (Sigma-Aldrich[®])
- Lipase from porcine pancreas (Sigma-Aldrich[®])
- α -chymotrypsin from bovine pancreas (Sigma-Aldrich[®])
- Sodium bicarbonate (AR grade CARLO ERBA ReagentTM)
- Sodium hydroxide pellet (AR grade QR $\ddot{e}$ CTM)
- Hydrochloric Acid (AR grade RCI LabscanTM)

3.4.3 สถานที่ทำการทดลองและเก็บข้อมูล

ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ (เลขที่ 99 หมู่ 18 ถ.พหลโยธิน ต.คลองหนึ่ง อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี) และ ห้องปฏิบัติการทดสอบคุณภาพอาหารสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ (เลขที่ 91 หมู่ 4 ต.บางกะดี อ.เมือง จ.ปทุมธานี)

3.4.4 การเตรียมสารพิษมาตรฐาน

- 1) การเตรียมสารมาตรฐาน aflatoxin B₁ (AOAC 970.44, 2005)
เหมือนข้อ 3.2.4(1)
- 2) การเตรียมสารมาตรฐาน ochratoxin A (Bacha *et al.*, 1988).
เหมือนข้อ 3.2.4(2)

3.4.5 การเตรียมอาหารไก่เนื้อปนเปื้อนสารพิษ aflatoxin B₁ และ ochratoxin A

1) นำอาหารไก่เนื้อที่ไม่มีการปนเปื้อนสารพิษ aflatoxin B₁ และ ochratoxin A (จากการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC) มาทำการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำแรงดันสูง (อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 psi นาน 15 นาที) ตามด้วยการอบแห้งในตู้อบลมร้อน 103±2 °C นาน 4 ชั่วโมงและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -18 °C

2) ปั่นบดอาหารไก่เนื้อด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูงและแบ่งอาหารไก่เนื้อที่บดละเอียดแล้วลงใน flask กลุ่มละ 5 กรัมจำนวน 12 flasks ตามกลุ่มทดลองที่จัดแบ่งเป็น 12 ชุดดังตารางที่ 3.4

3) คัดเลือก *S. cerevisiae* 1 สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพการดูดซับ aflatoxin B₁ และ ochratoxin A ใน PBS (pH 7.4) ได้ดีที่สุด และทำการเตรียมเซลล์ *S. cerevisiae* ที่ตายแล้วในรูปของ cell suspension โดยกำหนดปริมาตรเป็น 5 มิลลิลิตรต่ออาหารไก่เนื้อ 5 กรัม ที่ปริมาณเซลล์ 3 ระดับตามกลุ่มทดลองในตาราง 3.4 แต่กลุ่มทดลองที่ 1, 2, 3, 4, 8, และ 9 ใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อแทนการเติม cell suspension

ตารางที่ 3.4 กลุ่มทดลองการทดสอบประสิทธิภาพ *S. cerevisiae* ดูดซับสารพิษ aflatoxin B₁ และ ochratoxin A ในสภาวะจำลองทางเดินอาหาร

กลุ่มที่	กลุ่มทดลอง	สารพิษในอาหารไก่เนื้อ (พีพีบี)		เซลล์ <i>S. cerevisiae</i> ในอาหารไก่เนื้อ (เซลล์ต่อกรัม)	สารละลาย
		AFB ₁	OTA		
1	Negative control I	0	0	0	Methanol
2	Positive control I	100	100	0	Methanol
3	Negative control II	0	0	0	PBS
4	Positive control II	100	100	0	PBS
5	Experiment I	100	100	10 ⁸	PBS
6	Experiment III	100	100	10 ⁹	PBS
7	Experiment V	100	100	10 ¹⁰	PBS
8	Negative control III	0	0	0	GI
9	Positive control III	100	100	0	GI
10	Experiment II	100	100	10 ⁸	GI
11	Experiment IV	100	100	10 ⁹	GI
12	Experiment VI	100	100	10 ¹⁰	GI

จากตารางที่ 3.4 กลุ่มทดลองที่ 1 และ 2 เติมสารละลาย 70%methanol (ข้อ 3.4.6(1)) กลุ่มที่ 3, 4, 5, 6, และ 7 ทำการทดลองใน PBS (pH 7.4) (ข้อ 3.4.6(2)) และกลุ่มที่ 8, 9, 10, 11, และ 12 ทำการทดลองภายใต้สภาวะจำลองทางเดินอาหารไก่ (ข้อ 3.4.6(2))

อาหารไก่เนื้อสำหรับกลุ่มทดลองที่ 1, 3 และ 8 เติม methanol (HPLC grade) ที่ไม่มีสารพิษ 1 มิลลิลิตร ส่วนอาหารไก่เนื้อสำหรับกลุ่มทดลองที่ 2, 4-7 และ 9-12 เติม aflatoxin B₁ ความเข้มข้น 1 พีพีเอ็ม และ ochratoxin A ความเข้มข้น 1 พีพีเอ็ม อย่างละ 500 ไมโครลิตรต่ออาหารไก่เนื้อ 5 กรัม ได้ความเข้มข้นของสารพิษที่ปนเปื้อนในอาหารเป็น 100 พีพีเอ็ม

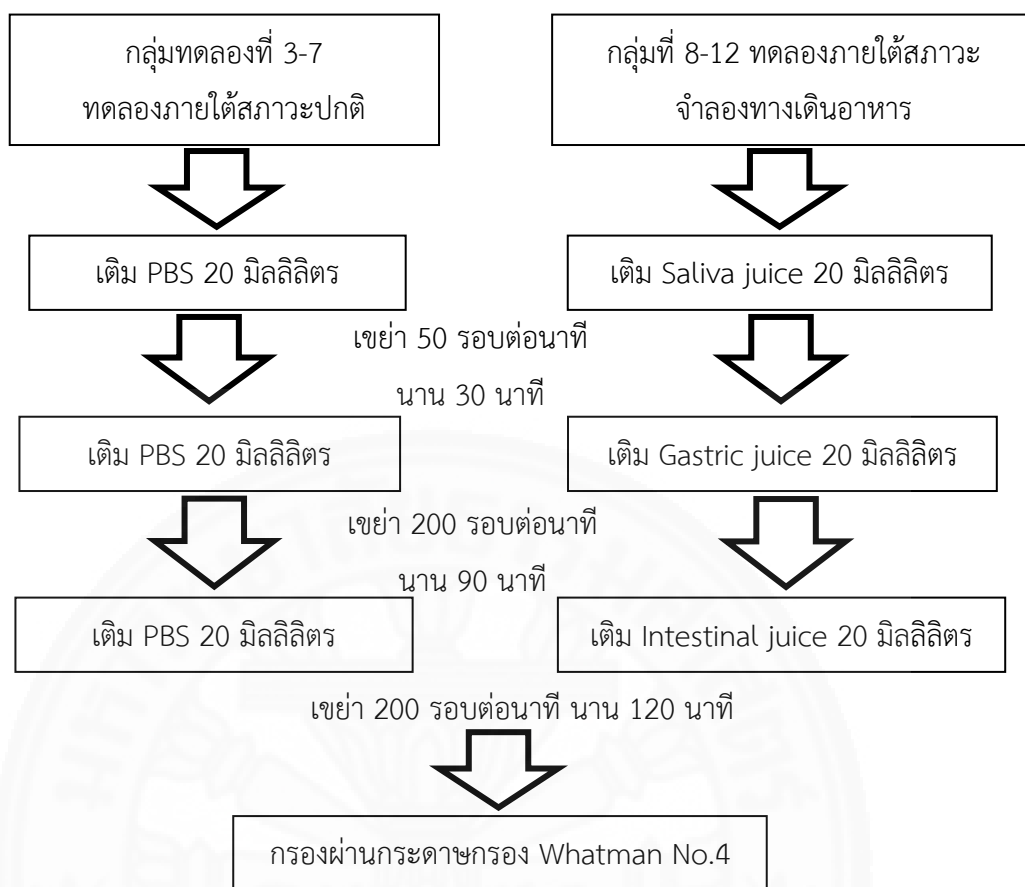
3.4.6 การทดสอบประสิทธิภาพ *S. cerevisiae* ดูดซับสารพิษ aflatoxin B₁ และ ochratoxin A ในสภาวะจำลองทางเดินอาหาร

1) กลุ่มทดลองที่ 1 (negative control I) และ 2 (positive control I) ทำการวิเคราะห์ปริมาณสารพิษโดยการสกัดด้วย 70%methanol ดังนี้

- เติม 70%methanol 65 มิลลิลิตรและเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที นาน 30 นาที

- ตั้งทิ้งไว้เพื่อให้ของเหลวด้านบนแยกส่วนและนำมารองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.4

2) ทดสอบประสิทธิภาพในการดูดซับสารพิษของ *S. cerevisiae* ภายใต้สภาวะจำลองทางเดินอาหาร (ดัดแปลงจากการศึกษาของ Avantaggiato และคณะ (2003) และ Pizzolitto และคณะ (2012a)) ดังรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 ขั้นตอนการทดสอบประสิทธิภาพการดูดซับสารพิษของ *S. cerevisiae* ภายใต้สภาวะจำลองทางเดินอาหารของไก่

- Saliva juice ประกอบด้วย เอนไซม์ α -amylase 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (6,200 IU ต่อมิลลิลิตร) ใน saline solution (0.85% NaCl) ปรับ pH หลังผสมกับอาหารให้อยู่ที่ 4.5 ด้วย HCl
- Gastric juice ประกอบด้วย เอนไซม์ pepsin 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (1,200 IU ต่อมิลลิลิตร) ในสารละลายที่ประกอบไปด้วย NaCl 0.125 M, KCl 0.007 M, และ NaHCO_3 0.045 M ปรับ pH หลังผสมกับอาหารให้อยู่ที่ประมาณ 2 ด้วย HCl
- Intestinal juice ประกอบด้วย เอนไซม์ trypsin 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (13,000 IU ต่อมิลลิลิตร), α -chymotrypsin 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (40 IU ต่อมิลลิลิตร), lipase 75 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (37,000 IU ต่อมิลลิลิตร) และ bile salt 0.3% (wt v^{-1}) ปรับ pH หลังผสมกับอาหารให้อยู่ที่ประมาณ 6.2 ด้วย NaOH

3) นำสารผสมที่กรองได้จากข้อ 3.4.6(1) และ 3.4.6(2) แบ่งเป็น 2 ส่วนดังนี้

ส่วนที่ 1 นำสารผสมที่กรองได้กลุ่มละ 2 มิลลิลิตรเจือจางด้วย PBS (pH7.4) 48 มิลลิลิตรปรับ pH ให้อยู่ที่ 7.4 ด้วย NaOH หรือ HCl และนำไปกรองด้วย filter glass microfiber อีกครั้งเพื่อนำไปผ่าน Immunoaffinity column (3.4.6(4))

ส่วนที่ 2 สารผสมที่เหลือทั้งหมดกรองผ่าน filter glass microfiber เพื่อใช้ในการทดสอบความเป็นพิษด้วยโรน้า (ข้อที่ 3.5.8)

4) นำสารที่ได้จากการกรองด้วย filter glass microfiber (ข้อ 3.4.6(3) ส่วนที่ 1) มาผ่าน Immunoaffinity column โดยปล่อยให้ไหลลงตามแรงโน้มถ่วง จากนั้นล้าง column โดยใช้ PBS (pH7.4) 20 มิลลิลิตรและ elute สารพิษออกจาก column โดยทำการ backflushing (การดูดและปล่อยตัวทำละลายขึ้นลงหลายๆ รอบ เพื่อให้โมเลกุลของสารพิษหลุดออกหมด) ด้วย methanol HPLC grade 2 มิลลิลิตร

5) Eluents ที่ได้จากการทดลองถูกนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ELISA ดังนี้

- วิเคราะห์หาปริมาณ aflatoxin B₁ ด้วยชุดทดสอบ aflatoxin ELISA Test kit (ScreenEZ[®])

- วิเคราะห์หาปริมาณ ochratoxin A ด้วยชุดทดสอบ ochratoxin A ELISA Test kit (RIDASCREEN[®] FAST ochratoxin A)

การทดลองครั้งที่ 3 นอกจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ELISA แล้ว eluents จะถูกนำมากรองด้วย Vial Mini Uniprep Syringeless filter เพื่อนำไปทดสอบยืนยันด้วยเทคนิค HPLC โดยใช้สภาวะตามตารางที่ 3.2 ผลการทดลองที่มาจากทดสอบด้วยเทคนิค ELISA ทั้ง 3 ซ้ำถูกนำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์การลดลงของสารพิษและวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS ver. 11.5 for window ทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's New Multiple Range Test โดยกำหนดระดับนัยสำคัญ 0.05

3.5 การทดสอบความเป็นพิษของอาหารไก่เนื้อที่ปนเปื้อน aflatoxin B₁ และ ochratoxin A หลังผสมกับเซลล์ *S. cerevisiae* โดยใช้โรน้าเป็นสัตว์ทดลอง

3.5.1 อุปกรณ์และเครื่องมือในการทดสอบความเป็นพิษของอาหารไก่เนื้อโดยใช้โรน้าเป็นสัตว์ทดลอง

- อุปกรณ์เพาะเลี้ยงโรน้า ได้แก่ สายยางต่อปั๊มลม ปั๊มลมชนิดปรับความแรงได้ ข้อต่อสายยาง กล้องโพรหม โหลแก้ว ถังบรรจุไซโรน้า อาหารโรน้านางฟ้า ช้อนขนาดเล็ก เกลือสำหรับปลาทะเล อุปกรณ์วัดความเค็ม (Glass hydrometer) และกระดาษทิชชูขาว

- ไซโรน้านางฟ้าไทย (*Branchinella thailandensis*)

- ไซอาร์ทีเมีย (*Artemia* sp.)
- ตู้เย็นขนาดเล็ก (GoodyTM)
- เทอร์โมมิเตอร์
- Autopipette 50 ไมโครลิตรและ 1-100 ไมโครลิตร (MicroPette PlusTM)
- Electronic pipette 50-1,000 ไมโครลิตร (AvegeneTM S1000)
- Tips 1,000 ไมโครลิตร (BiolineTM) และ 200 ไมโครลิตร (KirgenTM)
- ตู้อบลมร้อน (WTE binderTM)
- ปีกเกอร์ขนาด 500 และ 1,000 มิลลิลิตร
- ถุงมือยางป้องกันสารเคมีชนิดไม่มีแป้ง
- กล้องจุลทรรศน์ดิจิทัล (RoHSTM)
- microtiter plate
- ขวดแก้ว 3 มิลลิลิตร
- แวนชยาย
- ชุดหลอดไฟมีไส้แบบไส้ 100 วัตต์
- กระดาษกรอง No.4, 125 mm. (WhatmanTM)

3.5.2 สารเคมีในการทดสอบความเป็นพิษของอาหารไก่เนื้อโดยใช้น้ำเป็น สัตรทดลอง

- สารกรองจากข้อ 3.4.6(6) ส่วนที่ 2
- สารพิษมาตรฐาน aflatoxin B₁ (TrilogyTM)
- สารพิษมาตรฐาน ochratoxin A (TrilogyTM)
- Phosphate buffer saline (PBS pH 7.4; Sigma-Aldrich[®])
- น้ำกลั่นปลอดเชื้อ (Sterile reverse osmosis water)
- Methanol (AR grade FisherTM)
- Sodium hypochlorite as available Chlorine 6% w/w (Haite[®])

3.5.3 การเพาะเลี้ยงไรอาร์ทีเมีย

- 1) เตรียมน้ำโดยเติมเกลือสำหรับปลาทะเลในน้ำ reverse osmosis (R.O.) ได้ความเค็มประมาณ 10-35 พีพีที
- 2) บรรจุไซอาร์ทีเมียลงในถุงบรรจุและนำไปแช่ในน้ำ reverse osmosis (R.O.) นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการฟอกเปลือกไข่ด้วยการแช่ในสารละลาย Haite[®] ในน้ำ R.O. (อัตราส่วน 1:50) นาน 15 นาที และล้างไซอาร์ทีเมียด้วยน้ำ R.O. จนหมดกลิ่น Haite[®]

3) นำถุงบรรจุไข่อาร์ทีเมียใส่ลงในน้ำเค็มที่เตรียมไว้และครอบภาชนะด้วยกระดาษทึบพรางแสงทิ้งไว้ประมาณ 20 ชั่วโมง (ตัวอ่อนอาร์ทีเมียจะฟักในระยะเวลา 15- 48 ชั่วโมง) นำตัวอ่อนที่ฟักออกมาไม่เกิน 24 ชั่วโมงใช้ในการทดสอบความเป็นพิษ

3.5.4 การเพาะเลี้ยงไร่น้ำนางฟ้าไทย

1) นำไข่ไร่น้ำนางฟ้าไทยแบ่งออกจากแคปซูลบรรจุลงในถุงบรรจุไข่และวางถุงไข่ใต้หลอดไฟให้ความร้อนประมาณ 15 นาทีเพื่ออุ่นไข่ไร่น้ำเป็นการกระตุ้นให้ไข่เกิดการฟัก

2) แخذถุงบรรจุไข่ไร่น้ำนางฟ้าไทยลงในน้ำ R.O. และครอบภาชนะด้วยกระดาษทึบพรางแสงโดยที่อุณหภูมิ 32-36 °C ตัวอ่อนไร่น้ำนางฟ้าจะฟักออกมาภายใน 24 ชั่วโมง มองเห็นได้ด้วยการใช้แว่นขยาย

3) เตรียมอาหารสำหรับตัวอ่อนไร่น้ำด้วยการขยี้อาหารไร่น้ำผ่านถุงกรองตาละเอียดและกรองกากส่วนที่ไม่ละลายออก หยดให้อาหารไร่น้ำวันละ 2-3 ครั้งและเปลี่ยนถ่ายหรือเติมน้ำ R.O. วันละ 20-50% ตามสภาพน้ำ ระยะเวลาในการเลี้ยงไร่น้ำ 5-7 วันให้มีขนาดลำตัวประมาณ 1 เซนติเมตรเพื่อนำมาทดสอบความเป็นพิษ

3.5.5 การทดสอบอุณหภูมิที่อาร์ทีเมียและไร่น้ำนางฟ้าไทยรอดชีวิตได้

1) ดูดอาร์ทีเมียด้วย autopipette ครั้งละ 1 ตัวต่อน้ำเกลือ 100 ไมโครลิตร ปล่อยลงใน microtiter plate กำหนดให้ 1 หลุมมีอาร์ทีเมีย 2 ตัว (200 ไมโครลิตรต่อหลุม) โดยแบ่งอาร์ทีเมียออกเป็นสองกลุ่ม กลุ่มละ 50 ตัว โดยกลุ่มที่ 1 วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ส่วนกลุ่มที่ 2 นำไปวางในตู้เย็น ติดตามบันทึกอุณหภูมิและจำนวนอาร์ทีเมียตาย (ไม่มีการเคลื่อนไหวใน 10 วินาที) ทุก 3 ชั่วโมงจนครบ 48 ชั่วโมง โดยในระหว่างการทดลองไม่มีการให้อาหารและไม่มีการเติมอากาศหรือออกซิเจนให้กับอาร์ทีเมียทุกกลุ่ม

2) ดูดไร่น้ำนางฟ้าไทยด้วย autopipette ครั้งละ 1 ตัวต่อน้ำ 200 ไมโครลิตร ปล่อยลงในขวดแก้ว กำหนดให้ 1 ขวดมีไร่น้ำนางฟ้าไทย 5 ตัว (1,000 ไมโครลิตรต่อขวด) แบ่งออกเป็นสองกลุ่มกลุ่มละ 50 ตัว โดยกลุ่มที่ 1 วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ส่วนกลุ่มที่ 2 นำไปวางในตู้เย็น ติดตามบันทึกอุณหภูมิและจำนวนไร่น้ำนางฟ้าตาย (ไม่เคลื่อนไหวใน 10 วินาที) ทุก 3 ชั่วโมง จนครบ 48 ชั่วโมง โดยระหว่างการทดลองไม่มีการให้อาหารและไม่มีการเติมอากาศหรือออกซิเจนให้กับไร่น้ำทุกกลุ่ม

3.5.6 การทดสอบสารละลายที่อาร์ทีเมียและไร่น้ำนางฟ้าไทยรอดชีวิตได้

(ดัดแปลงจากการศึกษาของ Prior (1979))

1) เตรียมสารทดสอบ 4 ชนิดคือ น้ำ reverse osmosis (R.O.), methanol, PBS (pH7.4), และสารละลายอาหารไก่เนื้อใน PBS (pH7.4) โดยใช้อัตราส่วนอาหาร 1 กรัมต่อ PBS 12 มิลลิลิตรที่ทำการกรองและนำส่วนใสที่ได้มาทดสอบ

2) หยดสารทดสอบทั้ง 4 กลุ่มลงใน microtiter plate หลุมละ 200 ไมโครลิตร กลุ่มละ 50 หลุม จากนั้นนำไปอบแห้งที่ 80 °C เป็นเวลา 90 นาที เพื่อใช้ในการทดสอบอาร์ทีเมีย

3) นำสารทดสอบทั้ง 4 กลุ่มหยดลงในขวดแก้วขวดละ 1 มิลลิลิตรกลุ่มละ 20 ขวด จากนั้นนำไปอบแห้งที่ 80 °C นาน 90 นาที เพื่อใช้ในการทดสอบไร่น้ำนางฟ้าไทย



รูปที่ 3.2 ขั้นตอนการเตรียมสารทดสอบสำหรับอาร์ทีเมียและไร่น้ำนางฟ้า

4) ดูดอาร์ทีเมียด้วย autopipette ครั้งละ 1 ตัวต่อน้ำเกลือ 100 ไมโครลิตร ปล่อยลงใน microtiter plate ที่เตรียมไว้ในข้อ 3.5.6 (2) หลุมละ 2 ตัว (1 หลุมมี 200 ไมโครลิตร) ทำการทดสอบทั้งหมด 200 ตัว (สภาวะละ 50 ตัว) และนำไปวางในตู้เย็นอุณหภูมิ 15-20 °C ติดตามจำนวนอาร์ทีเมียที่แสดงอาการผิดปกติเช่น ว่ายน้ำข้างลง ว่ายวนเสียสมดุล หยุดนิ่งขยับได้เพียงรยางค์ จนถึงตาย (ไม่มีการเคลื่อนไหวตัวใน 10 วินาที) ทุก 3 ชั่วโมงจนครบ 48 ชั่วโมง โดยในระหว่างการทดลองไม่มีการให้อาหารและไม่มีการเติมอากาศหรือออกซิเจนให้กับไร่น้ำทุกกลุ่ม

5) ดูดไร่น้ำนางฟ้าไทยด้วย autopipette ครั้งละ 1 ตัวต่อน้ำ 200 ไมโครลิตร ปล่อยลงในขวดแก้วที่เตรียมไว้ในข้อ 3.5.6 (3) ขวดละ 5 ตัว (1 ขวดมี 1,000 ไมโครลิตร) ทำการทดสอบทั้งหมด 200 ตัว (สภาวะละ 50 ตัว) และนำไปวางในตู้เย็นอุณหภูมิ 15-20 °C ติดตามจำนวนไร่น้ำนางฟ้าไทยที่แสดงอาการผิดปกติเช่น ว่ายน้ำข้างลง ว่ายวนเสียสมดุล หยุดนิ่งขยับได้เพียงรยางค์ จนถึงตาย (ไม่เคลื่อนไหวใน 10 วินาที) ทุก 3 ชั่วโมงจนครบเวลา 48 ชั่วโมง ในระหว่างการทดลองไม่มีการให้อาหารและไม่มีการเติมอากาศหรือออกซิเจนให้กับไร่น้ำทุกกลุ่ม

3.5.7 การทดสอบความเป็นพิษของ aflatoxin B₁ และ ochratoxin A ที่มีต่อ อาร์ทีเมีย (ดัดแปลงจากการศึกษาของ Hartl และ Humpf (2000))

1) นำสารพิษมาตรฐานละลายใน methanol ทดสอบกับอาร์ทีเมียกลุ่มละ 100 ตัว (50 หลุม หลุมละ 2 ตัว) แบ่งเป็น 3 กลุ่มดังนี้

กลุ่มที่ 1 ไม่มีสารพิษ (Negative control)

กลุ่มที่ 2 ได้รับสารพิษ aflatoxin B₁ ที่ 3 ระดับ คือ 1, 5, และ 10 พีพีบี

กลุ่มที่ 3 ได้รับสารพิษ ochratoxin A ที่ 3 ระดับ คือ 1, 5, และ 10 พีพีบี
เติม methanol (กลุ่ม Negative control) หรือสารพิษลงในหลุมทดสอบของ
microtiter plate หลุมละ 200 ไมโครลิตร และนำไปอบแห้ง

2) เตรียมสารละลายอาหารไก่เนื้อใน PBS (pH7.4) อัตราส่วนอาหาร 1 กรัม ต่อ
PBS 12 มิลลิตร และทำการเติม methanol (กลุ่ม Negative control) หรือสารพิษมาตรฐานลงไป
แบ่งเป็น 3 กลุ่มดังนี้

กลุ่มที่ 1 ไม่มีสารพิษ (Negative control)

กลุ่มที่ 2 เติมสารพิษ aflatoxin B₁ ที่ 3 ระดับ คือ 1, 5, และ 10 พีพีบี

กลุ่มที่ 3 เติมสารพิษ ochratoxin A ที่ 3 ระดับ คือ 1, 5, และ 10 พีพีบี

โดยทำการหยดสารทดสอบหลุมละ 200 ไมโครลิตรลงใน microtiter plate
และนำไปอบแห้ง ทำการทดสอบกับอาร์ทีเมียกลุ่มละ 100 ตัว (50 หลุม)

3) ดูดอาร์ทีเมียด้วย autopipette ครั้งละ 1 ตัวต่อน้ำเกลือ 100 ไมโครลิตรหยด
ลงใน microtiter plate ที่เตรียมไว้ข้างต้น หลุมละ 2 ตัว (200 ไมโครลิตร) จากนั้นนำไปวางในตู้เย็น
อุณหภูมิ 15-20 °C ติดตามจำนวนอาร์ทีเมียที่แสดงอาการผิดปกติ เช่น ว่ายน้ำช้าลง ว่ายวนเสียสมดุล
หยุดนิ่งขยับได้เพียงรยางค์ จนถึงการตาย (ไม่มีการเคลื่อนไหวใน 10 วินาที) ทุก 3 ชั่วโมงจนครบ 48
ชั่วโมง โดยบันทึกเวลาและจำนวนอาร์ทีเมียที่แสดงอาการผิดปกติ โดยในระหว่างการทดลองไม่มีการ
ให้อาหารและไม่มีการเติมอากาศหรือออกซิเจนให้กับไร่น้ำทุกกลุ่ม

3.5.8 การทดสอบความเป็นพิษของอาหารไก่เนื้อที่ปนเปื้อน aflatoxin B₁ และ

ochratoxin A หลังผสมกับเซลล์ *S. cerevisiae*

โดยใช้ไร่น้ำเป็นสัตว์ทดลอง

1) นำสารผสมจากข้อ 3.4.6(6) ส่วนที่ 2 หลังกรองผ่าน filter glass microfiber
มาหยดใส่ microtiter plate หลุมละ 200 ไมโครลิตรกลุ่มละ 20 หลุมและนำไปอบแห้งที่ 80 °C นาน
90 นาที

2) ดูดอาร์ทีเมียด้วย autopipette ครั้งละ 1 ตัวต่อน้ำเกลือ 100 ไมโครลิตรหยด
ลงใน microtiter plate ที่เตรียมไว้ข้างต้น หลุมละ 2 ตัว (200 ไมโครลิตร) จากนั้นนำไปวางในตู้เย็น
(อุณหภูมิ 15-20 °C) ติดตามจำนวนอาร์ทีเมียที่เกิดอาการผิดปกติ เช่น ว่ายน้ำช้าลง ว่ายวนเสียสมดุล
หยุดนิ่งขยับได้เพียงรยางค์ จนถึงการตาย (ไม่มีการเคลื่อนไหวในเวลา 10 วินาที) ทุก 3 ชั่วโมง โดยใน
ระหว่างการทดสอบไม่มีการให้อาหารและไม่มีการเติมอากาศหรือออกซิเจนให้กับไร่น้ำทุกกลุ่ม

เนื่องจากการทดลองในข้อ 3.4 ทำทั้งหมด 3 ซ้ำ ดังนั้น การทดสอบความเป็นพิษ
ด้วยอาร์ทีเมียจึงทำทั้งหมด 3 ซ้ำเช่นกัน โดยใช้อาร์ทีเมียกลุ่มทดลองละ 50 ตัว (25 หลุม) และนำผล
การทดสอบมาวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS ver. 11.5 for window เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย
โดยใช้ Duncan's New Multiple Range Test กำหนดระดับนัยสำคัญ 0.05

3.6 การทดสอบเปรียบเทียบปริมาณของ β -glucan ของเชื้อ *S. cerevisiae* 4 สายพันธุ์

3.6.1 อุปกรณ์ในการสกัดและตรวจวัดปริมาณ β -glucan

- หลอด centrifuge พลาสติกขนาด 14 มิลลิลิตร
- เครื่องชั่งดิจิทัล (Weighing machine analytical balance SartoriusTM BP210S)
- Disposal cuvette 4.0 มิลลิลิตร (SarstedtTM)
- Electronic pipette 50-1,000 ไมโครลิตร (AvegeneTM S1000)
- Tips 1,000 ไมโครลิตร (BiolineTM)
- Waterbath
- กระดาษวัดค่า pH (MerckTM)
- เซลล์ *S. cerevisiae* 4 สายพันธุ์ที่ทำการอบแห้ง (จากข้อ 3.1)
- ถังมืออย่างป้องกันสารเคมีชนิดไม่มีแป้
- กล้องจุลทรรศน์ (Olympus CH-2)
- Hemocytometer และ cover slide (Neubauer improved, BOECOTM)
- เครื่องเขย่าสาร (Vortex-Genie[®] 2 - Scientific Industries, Inc.)
- ปีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร
- Spectrophotometer (Thermo Scientific รุ่น GENESYS 20)
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (HETTICH EBA 12R Centrifuge)
- ชุดทดสอบวัดปริมาณ β -glucan (EnzytecTM Color Gluca Test[®] (Limit of detection 77.24 พีพีเอ็ม, อ้างอิงจากเอกสารใบรับรองชุดทดสอบ)) ประกอบด้วย Solution A และ calibrator set 6 ขวด (β -glucan 0, 100, 200, 300, 400, และ 500 พีพีเอ็ม)

3.6.2 สารเคมีในการสกัดและตรวจวัดปริมาณ β -glucan

- น้ำกลั่นปลอดเชื้อ (Sterile deionized water)
- Acetic acid (AR grade RCI LabscanTM)
- Sodium hydroxide pellet (AR grade QRëCTM)

3.6.3 การสกัด β -glucan จากผนังเซลล์ยีสต์ (ดัดแปลงจากการศึกษาของ Lee และ Lee (2001)) และตรวจวัดปริมาณ β -glucan

1) เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อลงในเซลล์ *S. cerevisiae* อบแห้ง (จากข้อ 3.1) ทำให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยการใช้เครื่องเขย่าสาร จากนั้นนำมาเจือจางแบบ ten-fold dilution นับจำนวนเซลล์ด้วย hemocytometer เตรียม cell suspension ของ *S. cerevisiae* 10^{10} เซลล์ต่อมิลลิลิตร 2 มิลลิลิตร

2) เติม 2%NaOH 5 มิลลิลิตรลงใน cell suspension ของ *S. cerevisiae* และนำไปเขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องเขย่าสารนาน 1 นาที นำไปบ่มใน waterbath ที่ 90 °C นาน 5 ชั่วโมง

3) นำออกจาก waterbath เมื่อหลอดทดสอบเย็นลงเติม acetic acid เพื่อปรับค่า pH ให้เป็นกลาง จากนั้นเติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรครบ 10 มิลลิลิตร (dilution factor=5)

4) นำสารผสมไปปั่นเหวี่ยงที่ 3,000g อุณหภูมิ 25 °C นาน 10 นาที เพื่อนำส่วนน้ำใสด้านบนที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณ β -glucan ด้วยชุดทดสอบ Enzytec™ Color Gluca Test® โดยมีขั้นตอนการทดสอบดังนี้

- เติม Solution A ลงใน cuvette 3 มิลลิลิตร ตามด้วยการผสมสารมาตรฐานหรือสารตัวอย่าง 0.2 มิลลิลิตร

- บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที และอ่านผลด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 550 nm โดยใช้น้ำกลั่น (DI water) เป็น blank

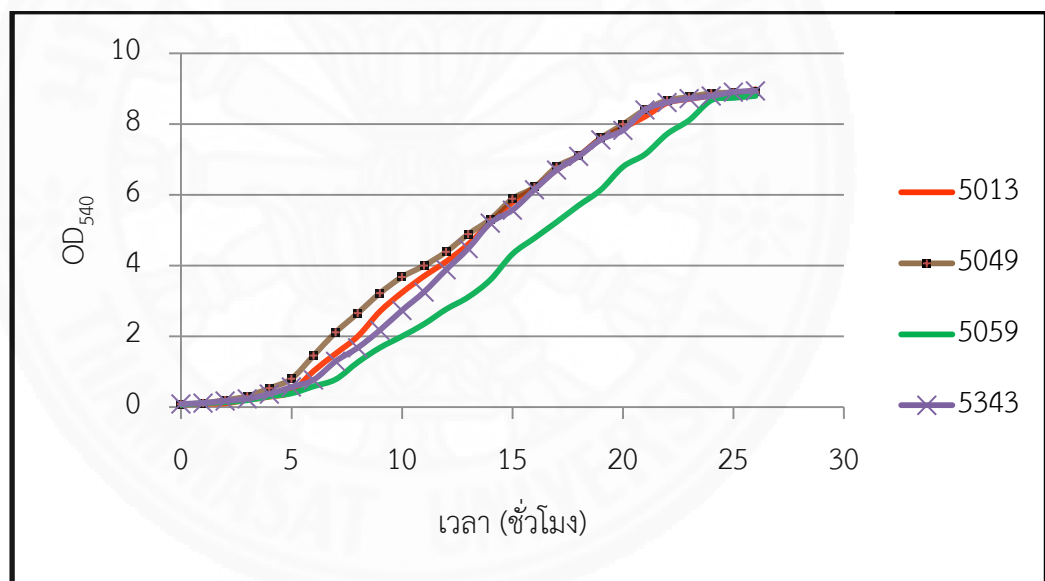
ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ โดยผลการทดสอบถูกนำมาวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS ver. 11.5 for window และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's New Multiple Range Test กำหนดระดับนัยสำคัญ 0.05

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 การศึกษาสมบัติการเจริญเติบโตของเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae*

จลนพลศาสตร์การเจริญของเชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ TISTR 5013, TISTR 5049, TISTR 5343, และ TISTR 5059 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose broth ณ ช่วงเวลาการศึกษา ตั้งแต่เริ่มเพาะเชื้อจนถึงชั่วโมงที่ 26 ในระดับห้องปฏิบัติการภายใต้อุณหภูมิ 30 °C เขย่าความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที โดยวัดค่า optical density (OD) ทุกชั่วโมง เมื่อจำนวนเซลล์มีปริมาณมากขึ้น suspension จะขุ่นมากขึ้นแสงผ่าน cuvette ไปได้น้อยลง ส่งผลให้ค่า %transmittance ต่ำลง ส่วนค่า OD สูงขึ้นจากนั้นนำไปสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง OD กับระยะเวลาในการศึกษา (รูปที่ 4.1)



รูปที่ 4.1 จลนพลศาสตร์การเจริญของเชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ TISTR 5013, TISTR 5049, TISTR 5343, และ TISTR 5059

จากการศึกษาพบว่า การเจริญเติบโตของ *S. cerevisiae* ณ ช่วงเวลาตั้งแต่เริ่มเพาะเชื้อจนถึงชั่วโมงที่ 26 สามารถจำแนกระยะเวลาการเจริญเติบโตออกเป็น 3 ระยะ ดังนี้

1) ระยะ lag phase คือ ระยะที่เชื้อ *S. cerevisiae* เริ่มปรับตัวเข้ากับสิ่งแวดล้อมใหม่ จำนวนยีสต์จึงเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ โดยระยะ lag phase ของสายพันธุ์ TISTR 5049 คือช่วงเวลาตั้งแต่ 0 ถึง 5 ชั่วโมง ขณะที่สายพันธุ์ TISTR 5013 และ TISTR 5343 คือช่วงเวลาตั้งแต่ 0 ถึง 6 ชั่วโมง และสายพันธุ์ TISTR 5059 คือช่วงเวลาตั้งแต่ 0 ถึง 7 ชั่วโมง

2) ระยะ log หรือ exponential phase คือ ระยะที่เชื้อ *S. cerevisiae* เจริญเติบโต และเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว ระยะ log phase ของสายพันธุ์ TISTR 5049 คือช่วงเวลาตั้งแต่ 5 ถึง 22 ชั่วโมงขณะที่สายพันธุ์ TISTR 5013 และ TISTR 5343 คือช่วงเวลาตั้งแต่ 6 ถึง 22 ชั่วโมงและสายพันธุ์ TISTR 5059 คือช่วงเวลาตั้งแต่ 7 ถึง 24 ชั่วโมง

3) ระยะ stationary phase คือระยะที่เชื้อ *S. cerevisiae* มีการเจริญเติบโตคงที่ซึ่งในระยะนี้เซลล์ยีสต์ที่เพิ่มขึ้นและตายลงมีจำนวนใกล้เคียงกัน โดยช่วง log phase ของสายพันธุ์ TISTR 5049, TISTR 5013 และ TISTR 5343 คือเริ่มตั้งแต่ชั่วโมงที่ 22 ขณะที่สายพันธุ์ TISTR 5059 เริ่มตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24

4.2 ประสิทธิภาพการดูดซับสารพิษ aflatoxin B₁ และ ochratoxin A ใน Phosphate buffer saline ของเชื้อ *S. cerevisiae* 4 สายพันธุ์

4.2.1 การทดสอบเปรียบเทียบประสิทธิภาพการดูดซับสารพิษ aflatoxin B₁ และ ochratoxin A ใน phosphate buffer saline ของเชื้อ *S. cerevisiae* 4 สายพันธุ์

ในการศึกษานี้เลือกใช้เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* มาเป็นตัวดูดซับสารพิษจากเชื้อรา เนื่องจากมีหลายงานวิจัยที่ทดลองใช้เซลล์ *S. cerevisiae* สำหรับการลดหรือกำจัดความเป็นพิษของสารพิษจากเชื้อราโดยนำมาใส่ในอาหารสัตว์ แล้วพบว่าเซลล์ยีสต์สามารถลดความรุนแรงของความเป็นพิษที่เกิดขึ้นได้ (Aravind *et al.*, 2003; Celyk *et al.*, 2003; Matur *et al.*, 2011) และด้วยคุณสมบัติเด่นของผนังเซลล์ยีสต์ที่มีองค์ประกอบจำพวก β -glucan และ mannanoligosaccharide ซึ่งมีฤทธิ์ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันและต้านอนุมูลอิสระได้ (Akramien *et al.*, 2007; Devegowda *et al.*, 1996; Krizková *et al.*, 2001) โดยผู้วิจัยคัดเลือกเชื้อ *S. cerevisiae* 4 สายพันธุ์ มาทดสอบเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการดูดซับสารพิษจากเชื้อรา ประกอบด้วยสายพันธุ์ TISTR 5013 (wine production yeast) และ TISTR 5049 (california wine yeast) ได้เคยผ่านการทดสอบเบื้องต้นมาแล้วว่ามีประสิทธิภาพในการดูดซับสารพิษ ochratoxin A (OTA) ได้ดี ส่วนอีก 2 สายพันธุ์คือ TISTR 5343 (single cell protein), และ TISTR 5059 (bread yeast) ที่คัดเลือกมาทดสอบเปรียบเทียบเนื่องจาก *S. cerevisiae* TISTR 5343 เป็นเชื้อยีสต์ที่มีคุณสมบัติในการเป็นแหล่งโปรตีนเซลล์เดียว ถ้าในกรณีที่ยีสต์สายพันธุ์นี้ให้ประสิทธิภาพการเข้าจับสารพิษที่ดี จะสามารถพัฒนาต่อไปให้มีประโยชน์ในการใช้ได้หลายแง่มุมมากขึ้น ในขณะที่ *S. cerevisiae* TISTR 5059 เป็นเชื้อยีสต์ที่ใช้สำหรับการหมักขนมปังซึ่งเป็นอาหารที่ผู้บริโภคมีความคุ้นเคย จึงสามารถนำมาดัดแปลงพัฒนาต่อไปเป็นแหล่งอาหารที่ดีต่อสุขภาพของคนกินได้ โดยรูปแบบการศึกษาจะมีกลุ่มควบคุมทั้ง negative control และ positive control เพื่อใช้เป็นฐานข้อมูลในการเปรียบเทียบสัดส่วนของสารพิษที่ถูก

เซลล์ยีสต์ดูดซับไป ส่วนกลุ่มทดลองจะทำการทดสอบประสิทธิภาพของเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* ทั้ง 4 สายพันธุ์ ใน 4 ระดับคือ 10^7 , 10^8 , 10^9 , และ 10^{10} เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยอ้างอิงจากงานวิจัยที่เคยมีการศึกษาทดลองมาก่อนว่า จำนวนเซลล์ในปริมาณดังกล่าวสามารถใช้ในการลดความเข้มข้นของสารพิษจากเชื้อราได้อย่างมีนัยสำคัญ ตลอดการทดลองนี้จะใช้ *S. cerevisiae* ในรูปของเซลล์ตายจากการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำแรงดันสูง (อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 psi นาน 15 นาที) ล้างด้วยน้ำกลั่น และเก็บรักษาในรูปเซลล์อบแห้ง เนื่องจากในการศึกษาประสิทธิภาพการดูดซับสารพิษจากเชื้อที่ผ่านมามีงานวิจัยที่พบว่าเซลล์ตายของ *S. cerevisiae* มีประสิทธิภาพการดูดซับสารพิษที่สูงกว่าเซลล์ที่มีชีวิต (Bejaoui *et al.*, 2004; Pizzolitto *et al.*, 2012b.; Shetty *et al.*, 2007)

งานวิจัยมีเป้าหมายหลักที่จะคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์ที่เหมาะสมสำหรับการใช้ในอาหารไก่เนื้อ สภาวะการทดสอบประสิทธิภาพการดูดซับสารพิษจึงมาจากค่าปกติของร่างกายไก่เนื้อ คือ ควบคุมอุณหภูมิตลอดการทดลองที่ 40 °C และใช้เวลาที่เซลล์ยีสต์สัมผัสกับสารพิษนาน 4 ชั่วโมง สอดคล้องกับค่าเฉลี่ยระยะเวลาเริ่มจากไก่กินอาหารและอาหารเดินทางผ่านลงมาจนถึงสิ้นสุดทางเดินอาหารเป็น 4 ชั่วโมง โดยความเป็นกรดต่างในทางเดินอาหารของไก่เนื้อจะมีค่า pH ที่ต่างกันมากคือ ในกระเพาะบดมีค่า pH ประมาณ 2.6 ส่วนในลำไส้เล็กมี pH อยู่ที่ 6.2 (Duke, 1993) โดยความเป็นกรดต่างเป็นปัจจัยหนึ่งซึ่งส่งผลต่อประสิทธิภาพการดูดซับสารพิษของผนังเซลล์ยีสต์ (Armando *et al.*, 2010; Pizzolitto *et al.*, 2012a) ในการทดสอบเบื้องต้นเพื่อตัดปัจจัยเรื่องของค่าความเป็นกรดต่างออกไป ผู้วิจัยจึงเลือกใช้สารละลาย phosphate buffer saline ที่มีค่า pH เป็นกลาง (PBS; pH 7.4) สมมติเสมอเท่ากันตลอดการทดลอง

ความเข้มข้นของสารพิษ aflatoxin B₁ (AFB₁) และ ochratoxin A (OTA) ใน PBS (pH 7.4) กลุ่ม positive control จากการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ELISA คือ 102.46 พีพีบี และ 99.75 พีพีบี ตามลำดับ ส่วนผลการวิเคราะห์ AFB₁ และ OTA ด้วยเทคนิค HPLC คือ 93.69 พีพีบี และ 95.24 พีพีบี ตามลำดับ โดยเกณฑ์มาตรฐานเทคนิคการตรวจวิเคราะห์สารพิษจากเชื้อราของ European Union commission regulation (EC) No 401/2006 of 23 February 2006 กำหนด %Recovery ของกลุ่ม positive control ในการตรวจวิเคราะห์ AFB₁ ความเข้มข้น 1-10 พีพีบีและมากกว่า 10 พีพีบีอยู่ที่ 70-110 % และ 80-110% ตามลำดับ และการตรวจวิเคราะห์ OTA ความเข้มข้นน้อยกว่า 1 พีพีบีและความเข้มข้น 1-10 พีพีบีอยู่ที่ 50-120% และ 70-110% ตามลำดับ โดย %Recovery เป็นการนำค่าที่ตรวจวิเคราะห์ได้มาเทียบเคียงกับสารพิษเริ่มต้นที่มีอยู่จริงว่ามีสัดส่วนที่ใกล้เคียงกันหรือไม่ ซึ่งนำมาใช้ประกอบการยืนยันความน่าเชื่อถือของเทคนิคการตรวจวิเคราะห์สารเคมี โดยคำนวณจากสูตร

$$\% \text{Recovery} = \frac{\text{ความเข้มข้นสารพิษในกลุ่ม positive control ที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์ (พีพีบี)}}{\text{ความเข้มข้นสารพิษเริ่มต้น (พีพีบี)}} \times 100 \quad (4.1)$$

เมื่อเทียบเคียงผลการตรวจวิเคราะห์ของสารพิษทั้งสองชนิดในกลุ่ม positive control ซึ่งมีความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 100 พีพีบี ใน PBS (pH7.4) หลังจากผ่านการบ่มที่อุณหภูมิ 40 °C นาน 4 ชั่วโมง พบว่า %Recovery ที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์สารพิษด้วยเทคนิค ELISA ของ AFB₁ และ OTA คือ 102.46 % และ 99.75% ตามลำดับและ %Recovery จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ของ AFB₁ และ OTA คือ 93.69 % และ 95.24 % ตามลำดับ (ตามตาราง ข1 และ ข2) โดย %Recovery ของ AFB₁ จากการทดลองนี้อยู่ในช่วงที่สอดคล้องตามมาตรฐานของ European Union commission regulation แต่ไม่มีข้อกำหนดที่ครอบคลุมช่วงที่ทำการศึกษาของ OTA คือ 100 พีพีบี จึงใช้เกณฑ์มาตรฐานของ CVM Guidance for Industry #3, “General Principles for Evaluating the Safety of Compounds Used in Food-Producing Animals” ซึ่งกำหนดหลักเกณฑ์ในการตรวจวิเคราะห์ไว้ 2 ช่วงคือ สารเคมีที่มีความเข้มข้นไม่เกิน 100 พีพีบี %Recovery ที่ยอมรับได้คือ 80-110% สารเคมีที่มีความเข้มข้นน้อยกว่า 100 พีพีบี %Recovery ที่ยอมรับได้คือ 60-110% เมื่อนำมาเทียบเคียงกับ %Recovery ของ OTA จากการทดลองนี้พบว่าผลการวิเคราะห์อยู่ในช่วงที่สอดคล้องกับเกณฑ์มาตรฐาน

ผลการตรวจวิเคราะห์ระหว่างเทคนิค ELISA และ HPLC มีผลการทดสอบออกมาแตกต่างกันเล็กน้อยอาจสืบเนื่องมาจากช่วงเวลาที่ทำทดสอบแตกต่างกัน กล่าวคือ การตรวจวัดความเข้มข้นของสารพิษด้วยเทคนิค ELISA จะดำเนินการทดสอบทันทีหลังจากสิ้นสุดการทดลองในแต่ละชุด แต่การตรวจวัดด้วย HPLC สารทดสอบจะถูกนำไปเจือจางด้วย methanol HPLC grade ตามด้วยการกรองผ่าน Vial Mini Uniprep Syringeless filter และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อรอการตรวจวิเคราะห์ซึ่งระยะเวลาในการเก็บรักษานานประมาณ 7-14 วันอาจส่งผลให้สารพิษบางส่วนสลายตัวไป รวมถึงความไวและความจำเพาะในการทดสอบทั้งสองเทคนิคนับเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลให้ค่าการตรวจวิเคราะห์ออกมามีความคลาดเคลื่อนกัน

ผลการทดสอบประสิทธิภาพการดูดซับ AFB₁ และ OTA ในการทดลองที่ 3.2.5 นำมาคำนวณเป็นค่าเปอร์เซ็นต์ของสารพิษที่ลดลง (ตารางที่ 4.1, 4.2, 4.3, 4.4 และ 4.5) จากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์ของสารพิษที่ลดลง} = \frac{\text{ความเข้มข้นสารพิษในกลุ่ม positive control} - \text{ความเข้มข้นสารพิษในกลุ่มทดลอง}}{\text{ความเข้มข้นสารพิษในกลุ่ม positive control}} \times 100 \quad (4.2)$$

ค่าเปอร์เซ็นต์ของสารพิษที่ลดลงคือ สัดส่วนร้อยละของความเข้มข้นสารพิษที่ลดลงในสารละลาย PBS (pH7.4) คำนวณจากส่วนต่างระหว่างความเข้มข้นสารพิษในกลุ่ม positive control ที่ไม่มีการเติม *S. cerevisiae* กับความเข้มข้นสารพิษจากกลุ่มทดลองที่มีเติม *S. cerevisiae* โดยใช้ความเข้มข้นของสารพิษที่เหลืออยู่ใน PBS จากการตรวจวิเคราะห์ ณ จุดสิ้นสุดของการทดลอง (หลังผ่านการบ่มที่อุณหภูมิ 40 °C นาน 4 ชั่วโมง) ค่าเปอร์เซ็นต์ของสารพิษที่ลดลงจึงเป็นตัวแทนของปริมาณสารพิษที่ถูกดูดซับด้วยเซลล์ *S. cerevisiae*

จากผลการทดลองพบว่าเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* ทั้ง 4 สายพันธุ์สามารถดูดซับสารพิษ AFB₁ และ OTA ใน PBS ได้ โดยจำนวนเซลล์ใน PBS ที่สูงขึ้นแปรผกผันกับปริมาณสารพิษอิสระใน PBS ที่ลดลง กล่าวคือ กลุ่มทดลองที่เติมเซลล์ *S. cerevisiae* มากขึ้น เปอร์เซ็นต์ของสารพิษที่ลดลงจะสูงขึ้นและเมื่อเปรียบเทียบที่ปริมาณ 10⁹ และ 10¹⁰ เซลล์ต่อมิลลิลิตร เซลล์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ TISTR 5013 และ TISTR 5049 มีแนวโน้มในการดูดซับ AFB₁ ที่ดีกว่าสายพันธุ์ TISTR 5059 และ TISTR 5343 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 4.1) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดสอบประสิทธิภาพการดูดซับ OTA กล่าวคือ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ TISTR 5013 และ TISTR 5049 ที่ระดับ 10⁹ และ 10¹⁰ เซลล์ต่อมิลลิลิตร สามารถดูดซับ OTA ได้ดีกว่าอีกสองสายพันธุ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยผลวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า เปอร์เซ็นต์ของสารพิษ AFB₁ ที่ลดลงระหว่างเทคนิค ELISA และ HPLC ไม่มีความแตกต่างกัน ($p = 0.632$) (ตาราง ข1) แต่ผลวิเคราะห์ทางสถิติแสดงค่าเปอร์เซ็นต์ของสารพิษ OTA ที่ลดลงระหว่างเทคนิค ELISA และ HPLC มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตาราง ข2) ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการที่ทั้งสองเทคนิคมีค่า Limit of detection (LOD) ที่แตกต่างกันกล่าวคือ ชุดทดสอบ RIDASCREEN® FAST ochratoxin A มีค่า LOD จากการสอบเทียบของบริษัทผู้ผลิตคือ 5 พีพีบี ขณะที่การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC มี LOD จากการสอบเทียบเครื่องมือของทางห้องปฏิบัติการอยู่ที่ 1 พีพีบี ส่งผลให้ความไว (sensitivity) ในการวิเคราะห์ความเข้มข้นของ OTA ด้วยเทคนิค ELISA ต่ำกว่าการใช้เทคนิค HPLC

ตารางที่ 4.1 เปอร์เซ็นต์ของสารพิษ AFB₁ ที่ลดลง ใน PBS หลังจากนำไปปฏิกิริยากับ *S. cerevisiae* ที่ตายแล้ว ที่อุณหภูมิ 40 °C นาน 4 ชั่วโมงและนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ELISA

ปริมาณเซลล์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	เปอร์เซ็นต์ของสารพิษ AFB ₁ ที่ลดลง ใน PBS (mean±S.D.)			
	TISTR 5013	TISTR 5049	TISTR 5059	TISTR 5343
10 ⁷	1.54±0.37 ^{aA}	0.79±0.03 ^{aA}	5.06±0.09 ^{bA}	1.09±0.11 ^{aA}
10 ⁸	7.90±1.87 ^{aB}	15.35±0.41 ^{bB}	15.17±0.81 ^{bB}	12.91±1.91 ^{bB}
10 ⁹	29.09±1.08 ^{cC}	28.37±1.02 ^{bCC}	26.31±1.09 ^{bC}	18.69±1.97 ^{aC}
10 ¹⁰	50.19±1.88 ^{bD}	49.40±3.18 ^{bD}	35.58±1.16 ^{aD}	35.76±1.39 ^{aD}

a-c แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในแถวแนวนอน

A-D แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในสดมภ์

ตารางที่ 4.2 เปอร์เซ็นต์ของสารพิษ AFB₁ ที่ลดลงใน PBS หลังจากนำไปบ่มกับ *S. cerevisiae* ที่ตายแล้วที่อุณหภูมิ 40 °C นาน 4 ชั่วโมงและนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC

ปริมาณเซลล์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	เปอร์เซ็นต์ของสารพิษ AFB ₁ ที่ลดลงใน PBS (mean±S.D.)			
	TISTR 5013	TISTR 5049	TISTR 5059	TISTR 5343
10 ⁷	1.47±0.41 ^{aA}	0.86±0.07 ^{aA}	5.02±0.13 ^{bA}	1.07±0.13 ^{aA}
10 ⁸	7.58±0.80 ^{aB}	15.22±1.11 ^{bB}	14.30±1.35 ^{bB}	13.06±1.85 ^{bB}
10 ⁹	32.57±1.67 ^{cC}	29.43±0.94 ^{cC}	25.64±1.24 ^{bC}	20.20±2.69 ^{aC}
10 ¹⁰	49.81±5.96 ^{bD}	48.80±4.24 ^{bD}	36.66±0.57 ^{aD}	34.37±1.99 ^{aD}

a-c แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ในแถวแนวนอน

A-D แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ในสดมภ์

ตารางที่ 4.3 เปอร์เซ็นต์ของสารพิษ OTA ที่ลดลงใน PBS หลังจากนำไปบ่มกับ *S. cerevisiae* ที่ตายแล้ว ที่อุณหภูมิ 40 °C นาน 4 ชั่วโมงและนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ELISA

ปริมาณเซลล์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	เปอร์เซ็นต์ของสารพิษ OTA ที่ลดลงใน PBS (mean±S.D.)			
	TISTR 5013	TISTR 5049	TISTR 5059	TISTR 5343
10 ⁷	3.84±0.26 ^{aA}	2.96±0.05 ^{aA}	2.99±0.17 ^{aA}	5.50±0.46 ^{bA}
10 ⁸	11.44±0.49 ^{cB}	7.57±0.45 ^{aB}	10.60±1.76 ^{bcB}	8.62±0.57 ^{abB}
10 ⁹	31.59±1.52 ^{cC}	29.41±1.68 ^{cC}	14.53±2.73 ^{aC}	26.50±1.18 ^{bC}
10 ¹⁰	77.41±1.09 ^{cD}	76.63±3.03 ^{cD}	67.21±1.09 ^{aD}	71.68±1.00 ^{bD}

a-c แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ในแถวแนวนอน

A-D แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ในสดมภ์

ตารางที่ 4.4 เปอร์เซนต์ของสารพิษ OTA ที่ลดลงใน PBS หลังจากนำไปบ่มกับ *S. cerevisiae* ที่ตายแล้วที่อุณหภูมิ 40 °C นาน 4 ชั่วโมงและนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC

ปริมาณเซลล์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	เปอร์เซนต์ของสารพิษ OTA ที่ลดลงใน PBS (mean±S.D.)			
	TISTR 5013	TISTR 5049	TISTR 5059	TISTR 5343
10 ⁷	3.87±0.58 ^{abA}	2.64±0.21 ^{aA}	2.90±0.23 ^{aA}	5.59±0.79 ^{bA}
10 ⁸	10.33±0.42 ^{bB}	7.07±0.88 ^{aB}	10.67±0.81 ^{bB}	8.27±0.65 ^{aB}
10 ⁹	29.28±0.51 ^{cC}	29.80±1.05 ^{cC}	16.16±1.34 ^{aC}	25.66±1.33 ^{bC}
10 ¹⁰	76.41±0.76 ^{cD}	77.32±1.61 ^{cD}	63.59±2.10 ^{aD}	70.85±1.30 ^{bD}

a-c แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในแถวแนวนอน

A-D แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในสดมภ์

จากผลการทดลองที่ได้นี้สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Shetty และคณะ (2007) ที่พบว่ายีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ A18 และ 26.1.11 ที่ตายจากการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำแรงดันสูง สามารถดูดซับ aflatoxin B₁ (AFB₁) ในสารละลาย PBS (pH 6.0) ได้ดี แต่ในผลการทดลองของ Shetty และคณะ (2007) จะพบว่ามีการลดการลดลงของสารพิษที่สูงกว่าในการทดลองนี้มาก เมื่อเปรียบเทียบกับที่ 10⁹ เซลล์ต่อมิลลิลิตร เท่ากันพบว่าการดูดซับ AFB₁ สูงถึง 70% ขณะที่ในการทดลองนี้ให้สัดส่วนของ AFB₁ ที่ลดลงไม่ถึง 30% โดยปัจจัยควบคุมที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการดูดซับสารพิษจากการทดลองที่แตกต่างกันได้แก่ สายพันธุ์ *S. cerevisiae* ค่า pH ของ PBS และอุณหภูมิในการบ่มสารพิษกับเซลล์ยีสต์ ส่วนประสิทธิภาพในการดูดซับ OTA สอดคล้องกับผลการทดลองของ Bejaoui และคณะ (2004) ที่พบว่า เซลล์ยีสต์ที่ตายแล้วมีประสิทธิภาพสูงในการดูดซับสารพิษ OTA ที่ปนเปื้อนในน้ำองุ่นโดยไม่มีผลต่อรสชาติของเครื่องดื่ม

ผนังด้านนอกของเซลล์ *S. cerevisiae* ประกอบด้วย polysaccharides จำพวก glucan และ mannan เป็นส่วนใหญ่ โดยมี chitin, protein, lipid และ organic material เพียงเล็กน้อย glucan ที่พบได้ในผนังเซลล์ยีสต์มี 2 ชนิด คือ β -1,3 glucan และ β -1,6 glucan โดยองค์ประกอบของผนังเซลล์นั้นสามารถผันแปรไปได้ตามสายพันธุ์ ระยะการเจริญเติบโต และสภาวะในการเพาะเลี้ยง (Alberghina, 2012; Calleja, 1987; Klis, 2002) รวมถึงการนำไปฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำแรงดันสูงจะทำให้เซลล์ตายอย่างสมบูรณ์และมีผลต่อโครงสร้างของผนังเซลล์พบว่า protein บางส่วนจะถูก denature และโครงข่ายของ polysaccharides มีรพูนมากขึ้น ขนาดรูพรุนใหญ่ขึ้นและเซลล์มี permeability ลดลง ส่งผลให้ binding sites ที่ผนังเซลล์เปิดออก (Kasperkovitz *et al.*, 2011) และองค์ประกอบในผนังเซลล์อาจเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ดของสารในกลุ่ม polysaccharides ทำให้เกิดสารประกอบใหม่ขึ้นมาที่อาจช่วยในการเข้าจับกับโมเลกุลสารพิษ (Bejaoui *et al.*, 2004; Rahaie

et al., 2010; Zlotnik *et al.*, 1984) เซลล์ยีสต์ที่ตายแล้วนั้นจะไม่มีกระบวนการ metabolism ในการเปลี่ยนสารพิษไปอยู่ในรูปอื่นหรือขับออกสารพิษออก เมื่อไม่มี metabolic activation การเข้าจับจึงไม่สามารถที่จะสร้างพันธะ covalent ขึ้นมาได้ จึงมีโอกาสเป็นไปได้ว่าองค์ประกอบที่พื้นผิวของผนังเซลล์จุลินทรีย์ต้องอาศัยพันธะ non covalent ในการเข้าจับกับโมเลกุลสารพิษ (Haskard *et al.*, 2000) ซึ่งในงานวิจัยของ Pizzolitto และคณะ (2012b) พบว่าผนังเซลล์เป็นส่วนสำคัญที่มีบทบาทในการดูดซับสารพิษ fumonisin B₁ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดสอบกับสารพิษจากเชื้อราชนิดอื่นๆ เช่น zealarenone, aflatoxin B₁, ochratoxin A เป็นต้น (Armando *et al.*, 2012; Jouany *et al.*, 2005; Nunez, 2008; Matur *et al.*, 2011; Mendoza *et al.*, 2011) กลไกที่ผนังเซลล์ยีสต์เข้าจับหรือดูดซับโมเลกุลสารพิษจากเชื้อรายังไม่เป็นที่ยืนยัน จากการศึกษาของ Jouany และคณะ (2005) ได้แสดงให้เห็นว่า β -glucan ที่ผนังเซลล์จะเกิดพันธะไฮโดรเจนและอาศัยแรง van der Waals จับเข้ากับ zealarenone เกิดเป็นโมเลกุลเชิงซ้อนซึ่งพันธะดังกล่าวอาจมีการหลุดออกจากกันได้ ทำให้การดูดซับสารพิษไม่เป็นแบบถาวร

4.2.2 การทดสอบเปรียบเทียบประสิทธิภาพการดูดซับสารพิษ aflatoxin B₁ ใน PBS ของเชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ TISTR 5013 และ TISTR 5049

จากผลการทดสอบประสิทธิภาพการดูดซับสารพิษ AFB₁ ใน PBS (pH 7.4) ของเซลล์ *S. cerevisiae* TISTR 5013 และ TISTR 5049 ที่ 10¹⁰ เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อนำไปเทียบเคียงกับการทดสอบก่อนหน้าที่มีการเติมสารพิษ AFB₁ ร่วมกับ OTA (ตารางที่ 4.5) พบว่ากลุ่มที่เติม AFB₁ เพียงชนิดเดียวมีเปอร์เซ็นต์การลดลงของสารพิษสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการที่สารพิษสองชนิดมี binding site บนผนังเซลล์ที่ซ้อนทับกันหรือการดูดซับโมเลกุลสารพิษหนึ่งไปมีผลขัดขวางการเข้าจับกับโมเลกุลสารพิษอีกชนิด (Bueno, 2007) ผลทดสอบในการทดลองนี้แตกต่างกับผลการศึกษาของ Pizzolitto และคณะ (2012b) ที่พบว่าสารละลายที่มีสารพิษจากเชื้อราสองชนิดพร้อมกันคือ aflatoxin B₁ (1.5, 3.75, 7.5, และ 15 พีพีที) และ fumonisin B₁ (20 หรือ 100 พีพีเอ็ม) การดูดซับสารพิษเข้าสู่ผนังเซลล์ยีสต์ในสภาวะที่ยังไม่เกิดภาวะอิ่มตัวจะไม่มีผลรบกวนหรือลดทอนประสิทธิภาพการเข้าจับกับ binding site ที่ผนังเซลล์ยีสต์เปอร์เซ็นต์การลดลงของสารพิษในสารละลายจึงไม่แตกต่างกันระหว่างการทดลองที่ใช้สารพิษเพียงชนิดเดียวกับการทดลองในสภาวะที่มีสารพิษสองชนิดร่วมกัน

ตารางที่ 4.5 เปอร์เซนต์การลดลงของสารพิษ AFB₁ ใน PBS หลังจากนำไปหมักกับ *S. cerevisiae* TISTR5013 หรือ TISTR 5049 ที่อุณหภูมิ 40 °C นาน 4 ชั่วโมงและนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ELISA

ปริมาณเซลล์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	เปอร์เซนต์การลดลงของสารพิษ AFB ₁ ใน PBS (mean±S.D.)			
	<i>S. cerevisiae</i> TISTR 5013		<i>S. cerevisiae</i> TISTR 5049	
	PBS มี AFB ₁	PBS มี AFB ₁ + OTA	PBS มี AFB ₁	PBS มี AFB ₁ + OTA
10 ⁷	1.55±0.51 ^{aA}	1.54±0.37 ^{aA}	1.25±0.09 ^{aA}	0.79±0.03 ^{aA}
10 ⁸	11.75±1.55 ^{bB}	7.90±1.87 ^{aB}	15.77±1.11 ^{cB}	15.35±0.41 ^{cB}
10 ⁹	27.5±1.27 ^{aC}	29.09±1.08 ^{aC}	29.38±1.32 ^{aC}	28.37±1.02 ^{aC}
10 ¹⁰	64.10±1.88 ^{cD}	50.19±1.88 ^{aD}	60.62±0.28 ^{bD}	49.40±3.18 ^{aD}

a-c แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในแถวแนวนอน

A-D แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในสตรัมภ์

4.3 การเติมเซลล์ *S. cerevisiae* ลงในอาหารไก่เนื้อเพื่อเพิ่ม crude protein

4.3.1 การทดสอบ Kjeldahl Nitrogen Analysis ของ cell suspension และ

ตรวจวัดน้ำหนักแห้งของเซลล์ *S. cerevisiae* (AOAC, 1990)

ผลการทดสอบเบื้องต้นโดยนำเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำแรงดันสูงและล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 2 ครั้ง มาทำการเตรียมให้อยู่ในรูป cell suspension 10¹⁰ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นสัดส่วนที่ให้ประสิทธิภาพการดูดซับสารพิษได้สูง (จากการทดลองที่ 3.2) และนำไปวิเคราะห์ Kjeldahl Nitrogen Analysis พบว่ามี crude protein ที่ได้จากการวิเคราะห์ต่ำมาก (ตารางที่ 4.6) ซึ่งเป็นผลมาจากการสูญเสียไนโตรเจนจากเซลล์เป็นส่วนประกอบหลักในเซลล์ *S. cerevisiae* ที่มีโปรตีนอยู่มากที่สุด โดยพบทั้งในรูปที่ละลายอยู่และรูปที่เป็นโมเลกุลขนาดใหญ่จับกลุ่มรวมกันแขวนลอยอยู่ การนำเซลล์ไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำแรงดันสูงจะทำลายพันธะ hydrogen พันธะ non covalent และพันธะ covalent บางส่วน (Campbell *et al.*, 1978) ส่งผลให้โปรตีนถูก denature โครงสร้างผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์เปิดออกตามมาด้วยการที่เซลล์สูญเสีย permeability ไส้โทพลาสซึมและออร์แกเนลล์ต่างๆ จึงไหลออกไปนอกเซลล์ โดยเฉพาะในระหว่างการกรองและล้างเซลล์ สัดส่วนของกรดอะมิโนและสารประกอบไนโตรเจนที่หลงเหลืออยู่จึงน้อยมาก (Kasperkovitz *et al.*, 2011)

ตารางที่ 4.6* น้ำหนักเซลล์ *S. cerevisiae* อบแห้งและ Total Kjeldahl nitrogen ของ cell suspension 10^{10} เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

สายพันธุ์ <i>S. cerevisiae</i>	น้ำหนักเซลล์อบแห้ง (กรัมต่อ cell suspension 100 มิลลิลิตร)	Total Kjeldahl nitrogen (มิลลิกรัมต่อ cell suspension 100 มิลลิลิตร)
TISTR 5013	0.1302	25.8
TISTR 5049	0.272	8.9
TISTR 5059	0.1627	11.6
TISTR 5343	0.1404	12.5

(*ข้อมูลในตารางเป็นการทดสอบเบื้องต้นเพียง 1 ซ้ำจึงไม่สามารถวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยทางสถิติได้)

4.3.2 การเติมเซลล์ *S. cerevisiae* ลงในอาหารไก่เนื้อและทำการทดสอบ

เปรียบเทียบ crude protein ที่เพิ่มขึ้นในอาหารด้วย

Kjeldahl nitrogen analysis

จากตารางที่ 4.6 บ่งชี้ว่า cell suspension ที่เตรียมขึ้นจากเชื้อ *S. cerevisiae* ที่ตายแล้วในการศึกษานี้มีส่วนของ crude protein อยู่เล็กน้อยมาก เมื่อเติมลงในอาหารสัตว์โดยใช้อัตราส่วน *S. cerevisiae* 10^{10} เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตรผสมกับอาหารไก่เนื้อ 100 กรัมและทำการอบแห้งจะได้อัตราส่วนเป็น *S. cerevisiae* 10^{10} เซลล์ต่ออาหารไก่เนื้อ 1 กรัม โดยมีน้ำหนักแห้งของเซลล์ที่เพิ่มขึ้นมาในอาหารสัตว์ 0.1-0.2 กรัมและนำไปทดสอบ Kjeldahl Nitrogen Analysis จึงพบว่าค่า crude protein ที่ได้จากอาหารไก่เนื้อกลุ่มควบคุมที่ไม่มีการเติมเซลล์ยีสต์กับอาหารไก่เนื้อที่ผสมเซลล์ยีสต์ลงไปไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.216$) ดังตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 crude protein (กรัมต่อ 100 กรัม) ของอาหารไก่เนื้อ จากการเติมเซลล์ตายของ *S. cerevisiae*

Kjeldahl nitrogen analysis	อาหาร กลุ่มควบคุม (ไม่เติมเซลล์)	อาหารเติมเซลล์ <i>S. cerevisiae</i> (mean±S.D.)			
		TISTR 5013	TISTR 5049	TISTR 5059	TISTR 5343
Crude protein (Nx6.25) (กรัมต่อ 100 กรัม)	25.89±0.30	25.81±0.05	26.15±0.48	24.65±1.47	26.17±0.41

เซลล์ยีสต์ที่ตายแล้วจากการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำแรงดันสูงในการทดลองนี้แม้จะไม่สามารถเป็นแหล่งโปรตีนให้กับสัตว์ได้ แต่ข้อดีของการเสริมเซลล์ยีสต์ในอาหารที่นอกเหนือจากการดูดซับสารพิษยังคงมีอยู่ กล่าวคือ ผนังเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* มีองค์ประกอบที่ได้รับความสนใจในทางการแพทย์คือ β -glucan ซึ่งในระบบการย่อยอาหารของคนและไก่ไม่สามารถย่อยผนังเซลล์ที่เป็น oligosaccharides เหล่านี้ได้ แต่อาศัยจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารย่อยบางส่วนจนได้โมเลกุลของ β -glucan ออกมา ซึ่งนอกจากคุณสมบัติในการดูดซับกับสารพิษจากเชื้อราแล้ว β -glucan ยังมีประโยชน์ในด้านที่สามารถลดผลกระทบจากการที่ร่างกายได้รับสารพิษลงด้วยเช่น ลดภาวะการกดภูมิคุ้มกัน ช่วยในกลไกต้านอนุมูลอิสระ ป้องกันการการเข้าทำลายสารพันธุกรรม เป็นต้น (Abdel-Wahhab *et al.*, 2003; Akramien, 2007; Brown and Gordon, 2003; Cisneros *et al.*, 1996, Naruemon *et al.*, 2013)

4.4 ประสิทธิภาพ *S. cerevisiae* ในการดูดซับสารพิษ aflatoxin B₁ และ ochratoxin A ในสภาวะจำลองทางเดินอาหาร

4.4.1 Bioaccessibility ของ aflatoxin B₁ และ ochratoxin A ในสภาวะจำลองทางเดินอาหาร

จากการทดลองข้อ 3.4.5 และ 3.4.6 หลังจากทำการเตรียมอาหารไก่เนื้อ 5 กรัมที่ปนเปื้อนสารพิษ AFB₁ และ OTA อย่างละ 100 พีพีบี และตามด้วยการเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อหรือ cell suspension ของ *S. cerevisiae* ที่ตายแล้ว 5 มิลลิลิตรและสารละลาย PBS (pH 7.4) หรือน้ำย่อยจำลองสภาวะทางเดินอาหารทางเดินอาหารรวมทั้งหมด 60 มิลลิลิตร ในการทดลองแต่ละกลุ่มจึงมีส่วนที่เป็นของเหลว 65 มิลลิลิตร (ส่วนของอาหารไก่เนื้อจะถูกกรองแยกออกไป) เมื่อคำนวณความเข้มข้นโดยประมาณจากการเจือจางด้วยตัวทำละลายจะได้รับความเข้มข้นของสารพิษแต่ละชนิดสูงสุดคือ 7.69 พีพีบี ในกลุ่มทดลองที่ 2 (Positive control I) ซึ่งใช้ 70% methanol 65 มิลลิลิตรเป็นตัวทำละลายพบว่า ตรวจพบว่ามี AFB₁ และ OTA อยู่ที่ 7.72 พีพีบี และ 6.42 พีพีบี คิดสัดส่วนเป็น 100.39% และ 83.49% ตามลำดับเมื่อเทียบกับค่าประมาณการณณ์ ขณะที่กลุ่มทดลองที่ 4 (Positive control II) ซึ่งไม่มีการเติมสารสกัด methanol ลงไป มีเพียงสารละลาย PBS ตรวจพบว่ามี AFB₁ และ OTA อยู่ที่ 4.53 พีพีบี และ 4.22 พีพีบี เมื่อเทียบกับค่าประมาณการณณ์คิดสัดส่วนเป็น 58.91% และ 54.87% ตามลำดับ และในกลุ่มทดลองที่ 6 (Positive control III) ซึ่งไม่มีการเติมสารสกัด methanol ลงไปแต่ใช้สารละลายของเอนไซม์กับอเล็กโทรไลต์เพื่อจำลองสภาวะในทางเดินอาหารไก่เนื้อ ตรวจพบว่ามี AFB₁ และ OTA อยู่ที่ 2.7 พีพีบีและ 2.61 พีพีบี เมื่อเทียบกับค่าประมาณการณณ์คิดสัดส่วนเป็น 35.11% และ 33.94% ตาม ลำดับ (ตารางที่ 4.8)

ตารางที่ 4.8 ผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นของ AFB₁ และ OTA ด้วยเทคนิค ELISA ของสารละลายในกลุ่ม negative control และ positive control

กลุ่มที่	กลุ่มทดลอง	<i>S. cerevisiae</i> ในอาหารไก่เนื้อ (เซลล์ต่อกรัม)	สารละลาย	ความเข้มข้นสารพิษ ในของเหลว (พีพี) (mean±S.D.)	
				AFB ₁	OTA
1	Negative control I	0	Methanol	0	0
2	Positive control I	0	Methanol	7.72±0.11	6.42±0.08
3	Negative control II	0	PBS	0	0
4	Positive control II	0	PBS	4.53±0.11	4.22±0.23
5	Negative control III	0	GI	0	0
6	Positive control III	0	GI	2.7±0.05	2.61±0.22

สารพิษ AFB₁ และ OTA ภายใต้สภาวะที่มีอินทรีย์วัตถุ (อาหารไก่เนื้อ) ส่งผลต่อปริมาณโมเลกุลสารพิษอิสระในของเหลวที่มีโอกาสถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกาย (bioaccessibility) โดยกลุ่ม positive control II อาหารไก่เนื้อที่เติม PBS (pH7.4) โมเลกุลของ AFB₁ และ OTA บางส่วนที่ไม่ละลายใน PBS จะยังคงอยู่ภายในโครงสร้างของอาหาร เป็นผลมาจากการที่ PBS มีประสิทธิภาพในการแทรกซึมเข้าสู่เนื้อเยื่อของอาหารได้ต่ำกว่าสารสกัดคือ 70% methanol ในกลุ่ม positive control I ที่จัดเป็นตัวทำละลายอินทรีย์หลักในการใช้สกัดสารพิษจากเชื้อราที่ปนเปื้อนในอาหาร เนื่องจากสามารถทำละลายได้ทั้งสารที่มีขั้วและไม่มีขั้ว (Rahmani, 2009) ส่วนการทดสอบภายใต้สภาวะจำลองทางเดินอาหารที่มีเอนไซม์และเอนไซม์ต่างๆ พบว่าตรวจพบสารพิษ AFB₁ และ OTA อิสระในของเหลวทดลองนั้นสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Kabak และคณะ (2009) ที่พบว่าองค์ประกอบของอาหารต่างชนิดกันมีผลต่อปริมาณสารพิษอิสระที่ละลายในของเหลวได้แตกต่างกัน ซึ่งสารผสมในแต่ละตัวทำละลายมีผลโดยตรงต่อความสามารถในการละลายของสารพิษ นอกจากนี้การเติมสารเพื่อปรับสภาพให้ใกล้เคียงกับทางเดินอาหารส่งผลให้สารพิษทำให้มีโครงสร้างโมเลกุล

เปลี่ยนไปจึงไม่สามารถตรวจพบได้ เช่น กรด HCl สามารถสลายโมเลกุล AFB₁ ได้บางส่วน (Aly and Hathout, 2011) และเอนไซม์ในทางเดินอาหาร เช่น chymotrypsin สามารถไฮโดรไลส์ OTA เป็น OTα ที่มีความเป็นพิษลดลง (Pitout, 1969)

4.4.2 การดูดซับสารพิษ aflatoxin B₁ และ ochratoxin A ของ *S. cerevisiae*

TISTR 5013 ในสถานะจำลองทางเดินอาหาร

ในการศึกษาของ Pizzolitto และคณะ (2012b) พบว่า โมเลกุลของสารพิษที่เข้าจับกับผนังเซลล์ของ *S. cerevisiae* จะหลุดออกเมื่อถูกชะล้างด้วยสารสกัดคือ acetonitrile ดังนั้นอาหารไก่เนื้อที่มีการเติมเซลล์ยีสต์ลงไป เมื่อนำมาทดสอบทางห้องปฏิบัติการโดยใช้สารสกัดตามมาตรฐานของ AOAC (2005) อันได้แก่ acetonitrile, methanol, เป็นต้น จะพบว่าความเข้มข้นสารพิษที่ตรวจวิเคราะห์ได้จะมีค่าใกล้เคียงกับสารพิษเริ่มต้น การเติมเซลล์ยีสต์ลงในอาหารไก่เนื้อจึงมิได้มุ่งหวังเพื่อให้ผลการทดสอบ ทางห้องปฏิบัติการของ AFB₁ และ OTA ในอาหารไก่เนื้อมีค่าลดลงในระดับที่ผ่านเกณฑ์มาตรฐานตามกฎหมาย ผู้ผลิตในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ต้องควบคุมคุณภาพวัตถุดิบให้มีสารพิษจากเชื้อราปนเปื้อนน้อยที่สุด เมื่อผลิตออกมาในรูปอาหารสำเร็จรูปที่อาจพบการปนเปื้อนสารพิษจากเชื้อราในระดับต่ำตามที่กฎหมายควบคุมแล้วนั้น จึงพิจารณาเติมเซลล์ยีสต์ลงไปเพื่ออาศัยกลไกการดูดซับโมเลกุลของสารพิษเข้าสู่โครงสร้างผนังเซลล์ยีสต์ เป็นการลดโอกาสที่สารพิษจะถูกดูดซึมผ่านทางเดินอาหารเข้าสู่กระแสโลหิตและเดินทางไปตามเนื้อเยื่ออวัยวะอื่นตามมา กระบวนการดูดซับสารพิษส่วนใหญ่เกิดในช่วงเวลาที่สัตว์ได้รับอาหารเข้าสู่ทางเดินอาหาร เนื่องจากการผสมคลุกเคล้าจากการบิตัวของอวัยวะลำเลียงอาหารโดยมีสารคัดหลั่งที่ออกมาเป็นสื่อกลางผนวกกับน้ำย่อยที่ทำให้โครงสร้างอาหารที่สัตว์กินเข้าไปแตกตัวออก เพิ่มโอกาสให้โมเลกุลสารพิษซึ่งหลุดออกมาเข้าจับกับโครงสร้างผนังเซลล์ของยีสต์ (Aoudia *et al.*, 2008; Baptista *et al.*, 2004)

จากการผลการทดสอบประสิทธิภาพการดูดซับสารพิษใน PBS ข้างต้น (ตารางที่ 4.1, 4.3, และ 4.5) พบว่า *S. cerevisiae* TISTR 5013 ที่ 10¹⁰ เซลล์ต่อมิลลิลิตรให้เปอร์เซ็นต์การลดลงของสารพิษดีที่สุดเมื่อเทียบกับยีสต์อีกสามสายพันธุ์ จึงเลือก *S. cerevisiae* TISTR 5013 มาทำการทดสอบประสิทธิภาพการดูดซับสารพิษกับอาหารไก่เนื้อภายใต้สภาวะจำลองทางเดินอาหาร (ข้อ 3.4.5 และ 3.4.6) พบว่าประสิทธิภาพการดูดซับ AFB₁ และ OTA ของเซลล์ยีสต์ยังคงอยู่ โดยพบว่ากลุ่มทดลองที่มีปริมาณเซลล์สูงขึ้นก็จะมีเปอร์เซ็นต์การลดลงของสารพิษที่มากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 4.9 และ 4.10) เปอร์เซ็นต์การลดลงของสารพิษที่เพิ่มขึ้นจากการตรวจพบสารพิษในของเหลวลดลงส่งผลให้โอกาสที่ AFB₁ และ OTA จะถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสโลหิตลดลง ไก่เนื้อที่ได้รับอาหารไก่ซึ่งเติมเซลล์ตายของ *S. cerevisiae* TISTR 5013 ก็จะมีความปลอดภัยมากขึ้น และการที่ไก่เนื้อกินผนังเซลล์หรือองค์ประกอบของเซลล์เข้าไปในปริมาณมากนั้นไม่ก่อให้เกิดอันตรายกับสุขภาพหรือมีผลเสียต่อการเจริญเติบโตของสัตว์ (Elmusharaf *et al.*, 2007; Jung *et al.*, 2010; Reisinger *et al.*, 2012)

ตารางที่ 4.9 เปอร์เซนต์การลดลงของสารพิษ AFB₁ หลังจากนำไปผสมกับ *S. cerevisiae* TISTR 5013 ในสภาวะทดสอบที่มีอาหารไก่เนื้อและสภาวะจำลองทางเดินอาหาร จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ELISA

ปริมาณเซลล์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	เปอร์เซนต์การลดลงของสารพิษ AFB ₁ (mean±S.D.)	
	PBS+อาหารไก่เนื้อ	สภาวะจำลองทางเดินอาหาร
10 ⁸	24.87±0.53 ^{bA}	9.87±0.76 ^{aA}
10 ⁹	28.15±3.04 ^{aA}	32.49±7.12 ^{aB}
10 ¹⁰	41.51±1.39 ^{aB}	43.27±1.54 ^{aC}

a-b แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ในแถวแนวนอน

A-C แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ในสดมภ์

ตารางที่ 4.10 เปอร์เซนต์การลดลงของสารพิษ OTA หลังจากนำไปผสมกับ *S. cerevisiae* TISTR 5013 ในสภาวะทดสอบที่มีอาหารไก่เนื้อและสภาวะจำลองทางเดินอาหารและ นำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ELISA

ปริมาณเซลล์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	เปอร์เซนต์การลดลงของสารพิษ OTA (mean±S.D.)	
	PBS+อาหารไก่เนื้อ	สภาวะจำลองทางเดินอาหาร
10 ⁸	32.03±2.36 ^{bA}	5.92±4.21 ^{aA}
10 ⁹	40.12±2.30 ^{aB}	41.60±3.33 ^{aB}
10 ¹⁰	61.45±1.90 ^{bC}	46.84±2.43 ^{aC}

a-b แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ในแถวแนวนอน

A-C แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ในสดมภ์

ตารางที่ 4.11 เปอร์เซนต์การลดลงของสารพิษ OTA และ AFB₁ ในอาหารไก่เนื้อที่ผสมกับ *S. cerevisiae* TISTR 5013 ภายใต้สภาวะจำลองทางเดินอาหารและนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC

ปริมาณเซลล์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	เปอร์เซนต์การลดลงของ AFB ₁		เปอร์เซนต์การลดลงของ OTA	
	PBS+อาหารไก่เนื้อ	สภาวะจำลองทางเดินอาหาร	PBS+อาหารไก่เนื้อ	สภาวะจำลองทางเดินอาหาร
10 ⁸	25.47	10.82	27.80	8.63
10 ⁹	26.40	29.85	39.27	30.98
10 ¹⁰	42.52	43.28	59.02	45.88

(ข้อมูลในตารางเป็นการทดสอบยืนยันผลด้วยเทคนิค HPLC เพียง 1 ชั่วโมงจึงไม่สามารถวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยทางสถิติได้)

เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างกลุ่มที่เติม PBS ในอาหารไก่เนื้อกับกลุ่มที่ทดลองภายใต้สภาวะจำลองทางเดินอาหาร พบว่าที่ปริมาณเซลล์ *S. cerevisiae* 10⁸ เซลล์ต่อกรัม มีเปอร์เซนต์การลดลงของ AFB₁ ต่ำลงลงแต่ที่สัดส่วนปริมาณเซลล์ 10⁹ และ 10¹⁰ เซลล์ต่อกรัม เปอร์เซนต์การลดลงของสารพิษ AFB₁ จากทั้งสองสภาวะมีค่าที่ใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 4.9) ขณะที่ประสิทธิภาพการดูดซับ OTA เมื่อผ่านสภาวะจำลองทางเดินอาหารที่ปริมาณเซลล์ยีสต์ 10⁸ และ 10¹⁰ เซลล์ต่อกรัม เปอร์เซนต์การลดลงของสารพิษ OTA ต่ำลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 4.10 และ 4.11) สภาวะแวดล้อมในการทดสอบนับเป็นปัจจัยที่ขัดขวางความสามารถของผนังเซลล์ในการเข้าจับกับสารพิษ ซึ่งอาจส่งผลต่อการนำไปใช้งานจริงในภาคอุตสาหกรรม โดยเฉพาะสภาวะที่มีอาหารหรือสารอินทรีย์เข้ามา โมเลกุลของสารพิษจะแทรกตัวไปอยู่ในโครงสร้างของอาหาร นับเป็นอุปสรรคที่เซลล์ยีสต์จะเข้าจับกับสารพิษได้ สอดคล้องกับการศึกษาของ Kabak และคณะ (2009) ที่ทำการทดสอบประสิทธิภาพเชื้อ probiotics กลุ่ม lactic acid bacteria (LAB) ในการดูดซับ AFB₁ และ OTA ที่ปนเปื้อนในถั่ว pistachio และอาหารทารกภายใต้สภาวะจำลองทางเดินอาหารพบว่า เปอร์เซนต์การลดลงของ AFB₁ และ OTA สูงสุดอยู่ที่ 37% และ 73% ตาม ลำดับ จากโครงสร้างผนังเซลล์ที่เป็น polysaccharides เหมือนกันและกลไกการเข้าจับสารพิษของ LAB กับ *S. cerevisiae* ที่ใช้ในการศึกษานี้มีความใกล้เคียงกัน จึงเป็นการยืนยันได้ว่า สารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นระหว่าง polysaccharides ที่ผนังเซลล์กับโมเลกุลสารพิษเมื่อเคลื่อนตัวไปตามทางเดินอาหาร บางส่วนของพันธะที่จับกันจะไม่หลุดออกและยังคงประสิทธิภาพในการดูดซับสารพิษไว้ แต่ปัจจัยแวดล้อมที่นับว่ามีผลต่อการเข้าจับกับสารพิษ เช่น pH โครงสร้าง matrix ของอาหาร และต้องคำนึงถึงว่าองค์ประกอบของน้ำย่อยในทางเดินอาหารเองมีผลทำให้สารพิษเปลี่ยนโครงสร้างโมเลกุลไป

พันธะที่เกิดขึ้นระหว่างสารพิษกับผนังเซลล์ก็มีโอกาสผันแปรไปด้วย รวมถึงความเป็นพิษอาจลดลงหรือคงเดิมซึ่งต้องอาศัยการทดสอบยืนยันด้วย toxicity test

การศึกษาของ Celyk และคณะ (2003) และ Santin และคณะ (2003) พบว่าการเติมเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* และผนังเซลล์ยีสต์ลงในอาหารสัตว์สามารถลดความเป็นพิษที่มาจกสารพิษจากเชื้อราได้ จึงอนุมานได้ว่าสารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นระหว่างเซลล์ยีสต์กับสารพิษมีความคงตัวเพียงพอที่จะผ่านทางเดินอาหารออกไปได้ งานวิจัยของ Yiannikouris และคณะ (2004) ได้ศึกษาถึงบทบาทของ β -D glucans ในการดูดซับสารพิษ zearalenone ภายใต้อัตรา pH 3.0, 6.0, และ 8.0 พบว่าที่ pH เป็นกรดและกลางจะให้อัตราการดูดซับสารพิษดีที่สุด (64–77%) ขณะที่ในสภาวะ pH ที่เป็นด่างการดูดซับสารพิษจะลดลง เนื่องมาจากสภาวะ pH ที่แตกต่างกันส่งผลให้ conformation ของโมเลกุล β -D glucans เปลี่ยนไปและมีการศึกษาถึงพันธะระหว่าง β -D glucan กับสารพิษพบว่าเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนจากพันธะที่มีแรงดึงดูดอ่อนๆ เช่น พันธะไฮโดรเจน และแรง van der Waals นอกจาก β -D glucans แล้วยังมีการศึกษาที่บ่งชี้ว่า mannan บนผนังเซลล์ *S. cerevisiae* ก็มีบทบาทในการดูดซับและลดความเป็นพิษของ aflatoxins (Baptista *et al.*, 2004, Devegowda *et al.*, 1996;) ochratoxin A และ T-2 toxin (Raju and Devegowda, 2000) โดยการที่โมเลกุลสารพิษจะหลุดออกจากผนังเซลล์ยีสต์อนุมานว่าเกิดได้ใน 2 สาเหตุคือ จากการชะล้างของสารสกัดต่างๆ เช่น methanol, acetonitrile, เป็นต้น (Pizzolitto *et al.*, 2012b) และจากการที่ผนังเซลล์ยีสต์ถูกย่อยสลาย การย่อยผนังเซลล์ยีสต์ต้องใช้คลื่นความถี่สูงหรือความร้อนร่วมกับการใช้สารเคมีหรือเอนไซม์ (Dallies *et al.*, 1998, Kwiatkowski *et al.*, 2009; Tam *et al.*, 2013) โดยเอนไซม์ที่สามารถย่อยผนังเซลล์ยีสต์ได้แก่ zymolase, glucanase, เป็นต้น (de Nobel *et al.*, 1990; Knorr *et al.*, 1979) กลุ่มเอนไซม์เหล่านี้จะผลิตโดยเชื้อจุลินทรีย์ที่พบได้ในทางเดินอาหารของสัตว์กินพืชเพื่อทำหน้าที่ในการหมักย่อยกากใยแต่ไม่พบในทางเดินอาหารของไก่หรือมนุษย์ (Duke, 1993) จึงมีโอกาสเป็นไปได้ยากในการที่พันธะระหว่างโมเลกุลของสารพิษกับองค์ประกอบในผนังเซลล์จะหลุดออกจากกันจากการที่ผนังเซลล์ถูกย่อยสลาย

4.5 การทดสอบความเป็นพิษของอาหารไก่เนื้อที่ปนเปื้อน aflatoxin B₁ และ ochratoxin A หลังผสมกับเซลล์ *S. cerevisiae* โดยใช้โรน้าเป็นสัตว์ทดลอง

4.5.1 การทดสอบอุณหภูมิที่อาร์ทีเมียและโรน้านางฟ้ารอดชีวิตได้

การศึกษานี้ผู้วิจัยได้ทำการทดสอบเบื้องต้นเพื่อควบคุมปัจจัยอันส่งผลต่อการตายของโรน้าโดยศึกษาแหล่งข้อมูลจากหลายส่วนทั้งในเอกสารอ้างอิงและสอบถามประสบการณ์ของผู้ชำนาญการต่างๆ และทำการทดสอบจริงในภาคของห้องปฏิบัติการ โดยเริ่มจากการคัดสรรช่วงอายุที่เหมาะสมเพื่อนำมาใช้ในการทดลอง โดยพบว่าหลายงานวิจัยจะใช้อาร์ทีเมียและโรน้านางฟ้าในช่วง

อายุที่ไม่เกิน 24 ชั่วโมง (Boonsoong and Bullangpoti, 2012; Harwig and Scott, 1971; Lahr, 1997; Prior, 1979) เนื่องจากไรน้ำทั้งสองชนิดในช่วงอายุดังกล่าวจะยังคงอาศัยอาหารจากไข่แดง (yolk) ที่หลงเหลืออยู่ทำให้ไม่มีความจำเป็นต้องให้อาหาร ซึ่งนอกจากจะสะดวกกับการปฏิบัติงานแล้ว อาหารที่ให้ไรน้ำและของเสียที่เพิ่มขึ้นในสภาวะแวดล้อมอาจเป็นตัวแปรที่ทำให้ผลการศึกษาก่อออกมาไม่สม่ำเสมอ โดยในการทดสอบเบื้องต้นพบว่า อาร์ทีเมียที่ฟักออกมาใหม่เมื่อทำการย้ายลง microtiter plates ที่ใช้ในการทดลองโดยไม่มีการเติมอากาศหรือออกซิเจนพบว่า ในระยะเวลา 24 ชั่วโมงอาร์ทีเมียส่วนใหญ่สามารถมีชีวิตรอดอยู่ได้ที่อุณหภูมิห้อง (32-36 °C) ขณะที่ไรน้ำนางฟ้าไทยที่ฟักออกจากไข่ไม่เกิน 24 ชั่วโมง หลังจากทำการย้ายลง microtiter plates โดยไม่มีการเติมอากาศหรือออกซิเจนที่อุณหภูมิห้อง ไรน้ำนางฟ้าจะอ่อนแอลงและตายภายในระยะเวลา 1-3 ชั่วโมง ผู้วิจัยจึงต้องทดสอบใช้ไรน้ำนางฟ้าที่หลายช่วงอายุโดยปรับขนาดภาชนะที่ใส่ให้เหมาะสมจนพบว่า ไรน้ำนางฟ้าไทยที่อายุ 5 วัน (ความยาวลำตัวประมาณ 1 เซนติเมตร) หลังจากทำการย้ายลงขวดแก้วขนาด 3 มิลลิลิตร โดยไม่มีการเติมอากาศหรือออกซิเจนที่อุณหภูมิห้อง ไรน้ำนางฟ้าสามารถรอดชีวิตอยู่ได้ประมาณ 12 ชั่วโมงซึ่งเพียงพอต่อการติดตามการทดสอบความเป็นพิษ จากนั้น จึงออกแบบการศึกษาเปรียบเทียบอุณหภูมิที่เหมาะสมโดยนำไรน้ำทั้งสองชนิดย้ายลงภาชนะทดลองและแบ่งไรน้ำออกเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกทำการวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง ส่วนที่สองนำไปใส่ในตู้เย็นขนาดเล็ก (อุณหภูมิอยู่ในช่วง 15-20 °C) การลดอุณหภูมิลงนอกจากเป็นการป้องกันในภาชนะระเหยออกไปแล้วยังช่วยลดกระบวนการ metabolism ของไรน้ำลงได้ ส่งผลให้เกิดการลอกคราบช้าลง อ้างอิงจากผลการศึกษาของ Sorgeloos และคณะ (1978) ที่พบว่าอุณหภูมิ 24 °C อาร์ทีเมียจะลอกคราบเป็นระยะ Instar II ในระยะเวลา 16 ชั่วโมงขณะที่อุณหภูมิ 20 °C อาร์ทีเมียต้องใช้เวลาราว 35 ชั่วโมงในการลอกคราบเป็นระยะ Instar II ที่มีความอ่อนแอลงและตายง่ายกว่าระยะ Instar I นอกจากนี้ อาร์ทีเมีก่อนลอกคราบที่ยังอาศัยอาหารจากไข่แดง เซลล์เยื่อผนังทางเดินอาหารจะสัมผัสกับสารละลายในน้ำน้อยกว่า อาร์ทีเมียที่ผ่านการลอกคราบมาแล้วและเริ่มกินอาหารที่ลอยอยู่ในของเหลว ส่งผลให้หลังลอกคราบ อาร์ทีเมียจะมีความไวต่อสารพิษมากขึ้นและอ่อนแอลงจากการขาดอาหาร อาร์ทีเมียจะตายง่ายขึ้น (Benesch, 1969) จากตารางที่ 4.12 เปรียบเทียบอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการรอดชีวิตของอาร์ทีเมียและไรน้ำนางฟ้าไทย พบว่าไรน้ำทั้งสองชนิดในตู้เย็นที่มีอุณหภูมิ 15-20 °C จะมีอัตราการรอดชีวิตที่มากกว่าและยาวนานกว่าไรน้ำที่วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง (ตารางที่ 4.12) อาจเป็นผลมาจากภาชนะที่วางในตู้เย็นมีการระเหยของน้ำน้อยกว่ากลุ่มที่วางไว้ที่อุณหภูมิห้องทำให้ความเข้มข้นของสารต่างๆ โดยเฉพาะของเสียเช่น สารกลุ่มแอมโมเนีย ในน้ำไม่เปลี่ยนแปลงมากจนไรน้ำทั้งสองชนิดเกิดความเครียด นอกจากนี้ อาร์ทีเมียตามธรรมชาติจะอาศัยอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่มีอุณหภูมิในช่วง 6-30 °C (Nunes, 2006) และไรน้ำนางฟ้าไทยจะดำรงชีวิตได้ในน้ำที่มีอุณหภูมิไม่เกิน 35 °C (นุกุล, 2555) โดยอุณหภูมิที่สูงขึ้นส่งผลให้อาร์ทีเมียและไรน้ำนางฟ้าไทยต้องการออกซิเจนในกระบวนการ metabolism มากขึ้น (Dumitrascu, 2011; Hazelwood and Hazelwood, 1985) ซึ่งการทดลอง

นี้ไม่มีการเติมอากาศหรือออกซิเจนลงในน้ำ ไร่น้ำทั้งสองชนิดที่วางไว้ในอุณหภูมิห้องจึงมีความเครียดทั้งจากปัจจัยของอุณหภูมิที่สูงขึ้นและออกซิเจนในน้ำที่ไม่เพียงพอ ทำให้น้ำอ่อนแอและตายลง เมื่อเปรียบเทียบระหว่างอาร์ทีเมียและไร่น้ำนางฟ้าไทยจะพบว่าอาร์ทีเมียรอดชีวิตได้ยาวนานกว่าและมีอัตราการตายที่น้อยกว่าไร่น้ำนางฟ้าไทย เพราะอาร์ทีเมียสามารถปรับตัวได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนต่ำและทนทานต่อการอยู่ในน้ำที่มีความเข้มข้นมากขึ้นหลายเท่าตัว (Dumitrascu, 2011) ผนวกกับการที่ตัวอ่อนอาร์ทีเมียยังคงอาศัยอาหารจากถุงไข่แดง ขณะที่ไร่น้ำนางฟ้าไทยในการทดลองนี้มีอายุ 5 วันต้องการอาหารจากแหล่งน้ำซึ่งในการทดลองนี้ไม่มีการให้อาหารทำให้ไร่น้ำนางฟ้าไทยเกิดภาวะการขาดแคลนอาหารและพลังงาน ส่งผลให้มีระยะเวลาในการรอดชีวิตที่สั้นลง

ตารางที่ 4.12 การทดสอบอุณหภูมิที่อาร์ทีเมียและไร่น้ำนางฟ้าไทยรอดชีวิตได้

ชั่วโมงที่	อาร์ทีเมียตาย (%)		ไร่น้ำนางฟ้าไทยตาย (%)		อุณหภูมิห้อง (°C)	อุณหภูมิตู้เย็น (°C)	
	อุณหภูมิห้อง	ตู้เย็น	อุณหภูมิห้อง	ตู้เย็น			
0	ปกติ 100%	ปกติ 100%	ปกติ 100%	ปกติ 100%	35	22	
3					35	19	
6			ตาย 2%		36	18	
9			ตาย 10%		35	20	
12			ตาย 48%	35	20		
15				ตาย 6%	34	19	
18	ตาย 4%	33	18				
21	ตาย 8%	ปกติ 100%	ตาย 72%	ตาย 8%	32	19	
24	ตาย 14%		ตาย 84%		33	20	
27			ตาย 100%			32	17
30				ตาย 14%	32	16	
33				ตาย 26%	34	15	
36	ตาย 48%			35	20		
39				ตาย 28%	36	19	
42				ตาย 42%	34	19	
45	ตาย 66%			ตาย 2%	ตาย 82%	32	18
48				ตาย 8%	ตาย 90%	33	17

4.5.2 การทดสอบสารละลายที่อาร์ทีเมียและไร่น้ำนางฟ้าไทยรอดชีวิตได้

ก่อนการนำไร่น้ำไปทดสอบความเป็นพิษของสารพิษจากเชื้อราที่ปนเปื้อนในอาหารต้องทำการเลี้ยงและปรับสภาวะที่อาร์ทีเมียและไร่น้ำนางฟ้าไทยสามารถรอดชีวิตได้มากกว่า 90% ตลอดช่วงเวลาของการทดลอง โดยทดสอบอาร์ทีเมียและไร่น้ำนางฟ้าไทยอยู่ในสารละลาย 4 สภาวะ คือ น้ำกลั่น R.O., methanol, PBS (pH7.4), และสารละลายอาหารไก่เนื้อใน PBS (pH7.4) ใช้สัตว์ทดลองทั้งหมด 200 ตัว (สภาวะละ 50 ตัว) หลังจากนำสารทดสอบมาบรรจุในภาชนะและอบแห้ง จากนั้นจึงลำเลียงอาร์ทีเมียในน้ำเกลือและไร่น้ำนางฟ้าไทยในน้ำ R.O. ลงไปในภาชนะพบว่า อาร์ทีเมียสามารถรอดชีวิตมากกว่า 90% ใน microtiter plates ที่มีน้ำ R.O., methanol และ PBS อบแห้งได้นานถึง 48 ชั่วโมงและใน microtiter plates ที่มีสารละลายอาหารไก่เนื้อใน PBS อบแห้ง นั้นอาร์ทีเมียสามารถรอดชีวิตมากกว่า 90% ได้เพียง 12 ชั่วโมง สอดคล้องกับการศึกษาของ Prior (1979) ที่พบว่าองค์ประกอบในอาหารสัตว์มีผลกดดันทำให้ตัวอ่อนอาร์ทีเมียอ่อนแอลงและตายเร็วขึ้น โดยคาดว่าเป็นสารกลุ่ม long chain fatty acids ที่มีความเป็นพิษต่ออาร์ทีเมีย (Curtis *et al.*, 1974) ซึ่งในการทดลองของ Prior ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์คือ chloroform หรือ methanol ในการสกัดสารต่างๆ จากอาหารสัตว์ หลังจากกระเหยสารสกัดออกและเติมอาร์ทีเมียใน brine shrimp medium (pH 6.5) จากนั้นติดตามจำนวนอาร์ทีเมียที่ตาย ณ ชั่วโมงที่ 16 พบว่าอัตราการตายของอาร์ทีเมียในกลุ่มที่ทดสอบกับสารสกัดจากอาหารสัตว์และธัญพืชอยู่ในช่วง 20-30% ซึ่งสูงกว่าในผลของการทดลองนี้ที่พบอัตราการตายในชั่วโมงที่ 15-21 อยู่ที่ 10% อาจเป็นผลมาจากส่วนประกอบของวัตถุดิบอาหารสัตว์ตั้งต้นมีความแตกต่างกันและในงานวิจัยนี้ใช้ PBS (pH7.4) เป็นตัวทำละลายในอาหารไก่เนื้อส่งผลให้สารกลุ่ม long chain fatty acids ที่มีความเป็นพิษต่ออาร์ทีเมียละลายออกมาได้น้อยกว่าการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ จำนวนอาร์ทีเมียที่ตายจึงพบในสัดส่วนที่ต่ำกว่า

ขณะที่ไร่น้ำนางฟ้าไทยอายุ 5 วันสามารถรอดชีวิตมากกว่า 90% ในภาชนะบรรจุที่มีน้ำ R.O. และ methanol อบแห้งได้นาน 21-24 ชั่วโมง แต่ในขวดที่มี PBS และสารละลายอาหารไก่เนื้อใน PBS อบแห้งนั้นไร่น้ำนางฟ้าที่ถูกลำเลียงลงไปจะตายภายใน 3-5 นาทีจึงไม่สามารถนำมาใช้ทดสอบความเป็นพิษในการทดลองนี้ได้ (ตารางที่ 4.13)

ตารางที่ 4.13 การทดสอบสารละลายที่อาร์ทีเมียและไร่น้ำนางฟ้ารอดชีวิตได้

ชั่วโมง ที่	กลุ่มทดลอง											
	อาร์ทีเมีย				ไร่น้ำนางฟ้า							
	น้ำ R.O.	Methanol	PBS	อาหารไก่ เนื้อใน PBS	น้ำ R.O.	Methanol	PBS	อาหารไก่ เนื้อใน PBS				
0	ปกติ 100%	ปกติ 100%	ปกติ 100%	ปกติ 100%	ปกติ 100%	ปกติ 100%	ตาย 100% ใน 3- 5 นาที่	ตาย 100% ใน 3-5 นาที่				
3				ว่ายน้ำ ผิดปกติ 6%								
6												
9												
12				ว่ายน้ำ ผิดปกติ 8% และ ตาย 2%	ว่ายน้ำ ผิดปกติ 10% และ ตาย 10%	ว่ายน้ำ ผิดปกติ 8%						
15				ว่ายน้ำ ผิดปกติ								
18				ผิดปกติ	ว่ายน้ำ ผิดปกติ 6% และ	ว่ายน้ำ ผิดปกติ 8%						
21				ตาย 10%	ตาย 2%	ตาย 12%						
24				ตาย 24%	ว่ายน้ำ ผิดปกติ	ว่ายน้ำ ผิดปกติ						
27				ว่ายน้ำ ผิดปกติ 14% และ ตาย 30%	12% และ ตาย 14%	18% และ ตาย 12%						
30					ตาย 42%	ตาย 34%						
33												
36												
39												
42			ว่ายน้ำ ผิดปกติ 2%	ว่ายน้ำ ผิดปกติ 2% และ ตาย 4%	ว่ายน้ำ ผิดปกติ	ตาย 68%			ตาย 74%			
45												
48	ว่ายน้ำ ผิดปกติ 2% และ ตาย 2%	ตาย 6%										4% และ ตาย 4%

4.5.3 การทดสอบความเป็นพิษของ aflatoxin B₁ และ ochratoxin A

ที่มีต่ออาร์ทีเมีย

เมื่อปรับสภาวะที่เหมาะสมให้อาร์ทีเมียสามารถรอดชีวิตได้แล้วต้องทำการทดสอบยืนยันถึงความเป็นพิษของ AFB₁ และ OTA ที่มีต่ออาร์ทีเมีย โดยการทดสอบความเป็นพิษจากสารพิษมาตรฐานและสารพิษในสารละลายอาหารไก่เนื้อ 3 ระดับ (ความเข้มข้นเริ่มต้น 1, 5, และ 10 พีพีบี) พบว่า การทดสอบความเป็นพิษจากสารพิษมาตรฐาน AFB₁ พบว่า ที่ความเข้มข้น 1 พีพีบี เริ่มพบการว่ายน้ำผิดปกติและหยุดว่ายน้ำของอาร์ทีเมียบางส่วน ณ ชั่วโมงที่ 15 และมีการตาย 5% ณ ชั่วโมงที่ 18 ส่วนกลุ่มที่มี AFB₁ เข้มข้น 5 พีพีบี เริ่มพบอาร์ทีเมียบางส่วนว่ายน้ำผิดปกติหรือหยุดว่ายน้ำของ ณ ชั่วโมงที่ 12 และมีอาร์ทีเมียตาย 3% ชั่วโมงที่ 15 พบอาร์ทีเมียว่ายน้ำผิดปกติ 27% และตาย 23% เมื่อครบ 24 ชั่วโมงมีอาร์ทีเมียตาย 49% และหยุดว่ายน้ำ 12% เมื่อติดตามจนถึง 48 ชั่วโมงพบว่ามีอาร์ทีเมียตาย 53% ส่วนกลุ่มที่มี AFB₁ เข้มข้น 10 พีพีบี เริ่มพบการว่ายน้ำผิดปกติและหยุดว่ายน้ำของอาร์ทีเมียบางส่วน ณ ชั่วโมงที่ 9 โดยยังไม่พบการตาย ชั่วโมงที่ 15 พบอาร์ทีเมียว่ายน้ำผิดปกติ 36% และตาย 32% เมื่อครบ 24 ชั่วโมงมีอาร์ทีเมียตาย 60% เมื่อติดตามจนถึง 48 ชั่วโมงพบว่ามีอาร์ทีเมียตาย 86% (ตาราง 4.14) ผลการทดสอบด้วยสารพิษมาตรฐานเจือจางในสารละลายอาหารไก่เนื้อใน PBS โดยพบว่า กลุ่มควบคุมที่ไม่มีสารพิษอาร์ทีเมียจะเริ่มแสดงอาการว่ายน้ำผิดปกติและตาย 2% ณ ชั่วโมงที่ 9 เมื่อครบชั่วโมงที่ 12 มีการตาย 6% ส่วนหลุมทดสอบที่มี AFB₁ 1 พีพีบี อาร์ทีเมียจะเริ่มแสดงอาการว่ายน้ำผิดปกติและหยุดว่ายน้ำ ณ ชั่วโมงที่ 9 และชั่วโมงที่ 12 มีการตาย 7% ส่วนหลุมทดสอบที่มี AFB₁ 5 พีพีบี อาร์ทีเมียจะเริ่มแสดงอาการว่ายน้ำผิดปกติและหยุดว่ายน้ำ ณ ชั่วโมงที่ 6 และชั่วโมงที่ 9 พบว่ามีอาร์ทีเมียหยุดนิ่งไม่ว่ายน้ำ 28% และตาย 32% เมื่อถึงชั่วโมงที่ 12 พบว่ามีอาร์ทีเมียตาย 54% หลุมทดสอบที่มี AFB₁ 10 พีพีบี อาร์ทีเมียจะเริ่มแสดงอาการว่ายน้ำผิดปกติและหยุดว่ายน้ำ ณ ชั่วโมงที่ 6 และชั่วโมงที่ 9 พบว่ามีอาร์ทีเมียหยุดนิ่งไม่ว่ายน้ำ 29% และตาย 45% เมื่อถึงชั่วโมงที่ 12 พบว่ามีอาร์ทีเมียตาย 78% (ตาราง 4.15)

ตารางที่ 4.14 การทดสอบความเป็นพิษของ AFB₁ ที่มีต่ออาร์ทีเมีย

ชั่วโมงที่	กลุ่มควบคุม (0 พีพีบี)	ความเข้มข้นของ AFB ₁ และอาการของอาร์ทีเมีย		
		1 พีพีบี	5 พีพีบี	10 พีพีบี
0	ปกติ 100%	ปกติ 100%	ปกติ 100%	ปกติ 100%
3				
6				
9			ว่ายนํ้าผิดปกติและ หยุดว่ายนํ้า 8%	
12		ว่ายนํ้าผิดปกติและ หยุดว่ายนํ้า 5% ตาย 3%		
15		ว่ายนํ้าผิดปกติ และหยุดว่ายนํ้า 4%	ว่ายนํ้าผิดปกติ 27% และตาย 23%	ว่ายนํ้าผิดปกติ 36% และตาย 32%
18				
21		ตาย 5%	หยุดว่ายนํ้า 12% และตาย 49%	ตาย 60%
24				
27				
30				ว่ายนํ้าผิดปกติและ หยุดว่ายนํ้า 6% ตาย 58%
33				
36			ว่ายนํ้าผิดปกติและ หยุดว่ายนํ้า 18% ตาย 49%	ตาย 62%
39				
42			ว่ายนํ้าผิดปกติและ หยุดว่ายนํ้า 30% ตาย 53%	ตาย 86%
45				
48				

ตารางที่ 4.15 การทดสอบความเป็นพิษของ AFB₁ ปนเปื้อนในอาหารไก่เนื้อที่มีต่ออาร์ทีเมีย

ชั่วโมงที่	กลุ่มควบคุม (0 พีพีบี)	ความเข้มข้นของ AFB ₁ และอาการของอาร์ทีเมีย		
		1 พีพีบี	5 พีพีบี	10 พีพีบี
0	ปกติ 100%	ปกติ 100%	ปกติ 100%	ปกติ 100%
3			ว่ายน้ำผิดปกติและ หยุดว่ายน้ำ 11%	ว่ายน้ำผิดปกติและ หยุดว่ายน้ำ 17%
6				
9	ว่ายน้ำผิดปกติ 6%ตาย 2%	ว่ายน้ำผิดปกติ และหยุดว่ายน้ำ 9%	หยุดนิ่งไม่ว่ายน้ำ 28% และตาย 32%	หยุดนิ่งไม่ว่ายน้ำ 29% และตาย 45%
12	ว่ายน้ำผิดปกติ 5%ตาย 6%	ว่ายน้ำผิดปกติ และหยุดว่ายน้ำ 14% ตาย 7%	ตาย 54%	ตาย 78%

กลุ่มควบคุมและอาร์ทีเมียในหลุมทดสอบที่มี OTA 1 พีพีบี อาร์ทีเมียยังคงรอดชีวิตและไม่แสดงอาการผิดปกติจนถึงชั่วโมงที่ 48 ส่วนหลุมทดสอบที่มี OTA 5 พีพีบี อาร์ทีเมียมีลักษณะของการว่ายน้ำผิดปกติเช่น ว่ายน้ำช้าลง ว่ายวนหรือเสียการทรงตัวในชั่วโมงที่ 21 และ 24 แต่ติดตามอาการหลังจากนั้นคือชั่วโมงที่ 27 เป็นต้นไปกลับพบว่าอาการผิดปกติดังกล่าวหายไป ส่วนกลุ่มทดลองที่มี OTA 10 พีพีบี ในหลุมทดสอบพบว่าอาร์ทีเมียเริ่มแสดงความผิดปกติที่ 30 ชั่วโมง และมีอัตราการตายถึง 56% ที่ 36 ชั่วโมง (ตาราง 4.16) ซึ่งผลการทดสอบด้วยสารพิษมาตรฐานจะแตกต่างจากกลุ่มที่ใช้สารพิษมาตรฐานเจือจางในสารละลายอาหารไก่เนื้อใน PBS โดยพบว่า กลุ่มควบคุมที่ไม่มีสารพิษอาร์ทีเมียจะเริ่มแสดงอาการว่ายน้ำผิดปกติ ณ ชั่วโมงที่ 9 และเริ่มพบการตาย 3% ในชั่วโมงที่ 12 ส่วนหลุมทดสอบที่มี OTA 1 และ 5 พีพีบี อาร์ทีเมียจะเริ่มแสดงอาการว่ายน้ำผิดปกติ ณ ชั่วโมงที่ 6 พบบางส่วนจะหยุดนิ่ง ไม่ว่ายน้ำโดยยังสามารถขยับร่างกายได้และมีการตาย 8% ณ ชั่วโมงที่ 9 เมื่อถึงชั่วโมงที่ 12 พบว่ามีอาร์ทีเมียที่ว่ายน้ำผิดปกติและหยุดว่ายน้ำมากกว่า 30% และตาย 24% ส่วนหลุมทดสอบที่มี OTA 10 พีพีบี อาร์ทีเมียจะเริ่มแสดงอาการว่ายน้ำผิดปกติ ณ ชั่วโมงที่ 6 และ ณ ชั่วโมงที่ 9 พบว่ามีอาร์ทีเมียหยุดนิ่งไม่ว่ายน้ำมากถึง 39% และมีการตาย 26% เมื่อถึงชั่วโมงที่ 12 พบว่าอาร์ทีเมียในกลุ่มนี้มีการตายถึง 64% (ตาราง 4.17)

ตารางที่ 4.16 การทดสอบความเป็นพิษของ OTA ที่มีต่ออาร์ทีเมีย

ชั่วโมงที่	กลุ่มควบคุม (0 พีพีบี)	ความเข้มข้นของ OTA และอาการของอาร์ทีเมีย		
		1 พีพีบี	5 พีพีบี	10 พีพีบี
0	ปกติ 100%	ปกติ 100%	ปกติ 100%	ปกติ 100%
3				
6				
9				
12				
15				
18				
21				
24			ว่ายน้ำผิดปกติ 18%	
27			ปกติ 100%	ว่ายน้ำผิดปกติ 24 %
30				
33				
36				
39				
42				
45				
48	ปกติ 100%	ว่ายน้ำผิดปกติหรือ หยุดว่ายน้ำ 7% ตาย 56%		

ตารางที่ 4.17 การทดสอบความเป็นพิษของ OTA ปนเปื้อนในอาหารไก่เนื้อที่มีต่ออาร์ทีเมีย

ชั่วโมงที่	กลุ่มควบคุม (0 พีพีบี)	ความเข้มข้นของ OTA และอาการของอาร์ทีเมีย		
		1 พีพีบี	5 พีพีบี	10 พีพีบี
0	ปกติ 100%	ปกติ 100%	ปกติ 100%	ปกติ 100%
3				
6				
9	ว่ายนํ้าผิดปกติ 6%	ว่ายนํ้าผิดปกติและ หยุดว่ายนํ้า 7% ตาย 8%	ว่ายนํ้าผิดปกติและ หยุดว่ายนํ้า 15% ตาย 8%	หยุดนิ่งไม่ว่ายนํ้า 39% และตาย 26%
12	ว่ายนํ้าผิดปกติ 4% และตาย 3%	ว่ายนํ้าผิดปกติและ หยุดว่ายนํ้า 30% ตาย 24%	ว่ายนํ้าผิดปกติและ หยุดว่ายนํ้า 34% ตาย 24%	หยุดนิ่งไม่ว่ายนํ้า 11% และตาย 64%

ตารางที่ 4.18 ค่า EC₅₀ จากการติดตามการทดสอบความเป็นพิษของ AFB₁ และ OTA

สารตั้งต้น	ชั่วโมงที่อาร์ทีเมีย สัมผัสกับสารพิษ	ค่า EC ₅₀	
		AFB ₁ (พีพีบี)	OTA (พีพีบี)
สารมาตรฐานใน methanol	12	-	-
	24	6.83	-
	36	6.52	9.63
	48	4.55	9.63
สารพิษปนเปื้อนในอาหารไก่เนื้อ	9	5.7	8.10
ทำละลายด้วย PBS	12	5.34	4.29

จากการทดสอบเบื้องต้นนี้เป็นการยืนยันว่าสารพิษ AFB₁ และ OTA มีความเป็นพิษต่ออาร์ทีเมียเหมือนกับในการศึกษาของ Harwig และ Scott (1971) โดยผลการทดลองข้างต้นบ่งชี้ว่า ความเข้มข้นของสารพิษ ระยะเวลาที่สัมผัสกับสารพิษ และสภาวะแวดล้อมของสารผสมที่ละลายในน้ำเกลือล้วนมีผลกระทบกับความไวต่อสารพิษที่ส่งผลให้พบอาร์ทีเมียแสดงอาการผิดปกติและการตายในระยะเวลาที่สั้นลงซึ่งสอดคล้องกับผลการทดสอบของ George-Ares และคณะ (2003) นอกจากนี้ เมื่อนำผลการทดสอบความเป็นพิษของ AFB₁ และ OTA ต่ออาร์ทีเมียคำนวณออกมาเป็น

ค่า 50% Effective Concentration (EC_{50}) โดยคิดมาจากการเทียบเคียงค่าความเข้มข้นของสารพิษที่ส่งผลให้อาร์ทีเมียจำนวนครึ่งหนึ่งของกลุ่มทดลองนั้นๆ ได้รับผลกระทบจากสารพิษ ผลกระทบจากสารพิษในการศึกษานี้หมายถึง ลักษณะท่าทางการว่ายน้ำที่เปลี่ยนแปลงไปจากเดิมจนถึงการตาย โดยค่า EC_{50} ที่ได้จากการทดสอบนี้ (ตารางที่ 4.18) บ่งชี้ว่า AFB_1 มี EC_{50} ที่ต่ำกว่า OTA ดังนั้นในความเข้มข้นที่เท่ากัน AFB_1 จะทำให้อาร์ทีเมียจำนวนครึ่งหนึ่งแสดงอาการผิดปกติและตายมากกว่าและใช้ระยะเวลาการสัมผัสกับสารพิษที่สั้นกว่ากลุ่มที่ทำการทดสอบกับ OTA สอดคล้องกับผลการวิจัยของ Yamamoto และคณะ (1974) ที่ทำการทดสอบความเป็นพิษของ AFB_1 และ OTA ด้วย *Artemia salina* โดยแสดงออกมาเป็นค่า LC_{50} ซึ่งมาจากการคำนวณความเข้มข้นของสารพิษที่มีผลทำให้อาร์ทีเมียครึ่งหนึ่งตาย LC_{50} ของ AFB_1 จะต่ำกว่า OTA อยู่ประมาณกึ่งหนึ่ง แม้ว่าคุณสมบัติของสารพิษทั้งสองชนิดนั้นมีฤทธิ์คล้ายคลึงกันในการเป็นสารกลุ่ม cytotoxic substances ที่เหนี่ยวนำเซลล์ให้เกิดการตายแบบ apoptosis โดยทำให้สารพันธุกรรมชำรุดเสียหาย (genotoxic) รบกวนการผลิตโปรตีน และมีบทบาทในการเป็นอนุมูลอิสระอันนำมาซึ่งปฏิกิริยา oxidation ก่อให้เกิดสารกลุ่ม peroxide ที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์และโครงสร้างเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิต (Alberto and Maria, 2006; CAST, 2003) แต่จากการศึกษาของ Halbin และคณะ (2013) พบว่าเมื่อเซลล์ได้รับสารพิษในระดับต่ำความร้ายแรงของ AFB_1 จะมากกว่า OTA หลายเท่าตัวทั้งในด้านที่ทำให้เซลล์เกิดภาวะเครียดกดดันจากปฏิกิริยา oxidation แบบลูกโซ่และการทำให้เซลล์ตายโดยตรงจากตัวสารพิษ ส่วนในกลุ่มทดลองที่ใช้สารละลายอาหารไก่เนื้อใน PBS (pH 7.4) เพิ่มขึ้นมาเป็นปัจจัยที่ทำให้อาร์ทีเมียมีความเครียดและอ่อนแอลงพบว่าอาร์ทีเมียจะใช้เวลาในการสัมผัสกับสารพิษลดลงและมีค่า EC_{50} ที่ต่ำลง ปัจจัยสภาวะแวดล้อมที่อาร์ทีเมียอยู่ถือเป็นส่วนสำคัญที่จะมีผลกับความไวต่อสารพิษที่นำมาทดสอบ

4.5.4 การทดสอบความเป็นพิษของอาหารไก่เนื้อที่ปนเปื้อน aflatoxin B₁ และ

ochratoxin A หลังผสมกับเซลล์ *S. cerevisiae* โดยใช้โรน้าเป็นสัตร์ทดลอง

กลไกของการดูดซับสารพิษจากเชื้อราของเซลล์ยีสต์ที่ตายแล้วอยู่ในรูปแบบทางกายภาพที่เกิดพันธะขึ้นระหว่างโครงสร้างผนังเซลล์กับโมเลกุลของสารพิษจากเชื้อรา โดยไม่มีปฏิกิริยาเคมีที่ทำให้สารพิษมีการเปลี่ยนโครงสร้างโมเลกุลไป แต่จะเข้าจับกันอยู่ในรูปของสารประกอบเชิงซ้อนที่สามารถหลุดออกจากกันได้ (Haskard *et al.*, 2001; Peltonen *et al.*, 2001; Hernandez-Mendoza *et al.*, 2009) สารประกอบเชิงซ้อนที่ผนังเซลล์ยีสต์เป็นลักษณะของ polysaccharides ที่มีพันธะแน่นหนา มีโครงข่ายแข็งแรง ในทางทฤษฎีแล้วกระบวนการย่อยตามปกติของร่างกายไก่เนื้อหรือมนุษย์จะไม่สามารถย่อยผนังเซลล์เหล่านี้ได้และขับออกจากร่างกายไปพร้อมกับอุจจาระ แต่ด้วยเหตุที่พันธะระหว่างโมเลกุลสารพิษกับองค์ประกอบของผนังเซลล์ยีสต์สามารถหลุดออกจากกันได้ จึงมีโอกาสดังกล่าวที่สารพิษจะถูกร่างกายดูดซึมเข้าสู่กระแสโลหิตได้บางส่วน ดังนั้น การทดสอบประสิทธิภาพการดูดซับสารพิษในสภาวะจำลองทางเดินอาหาร นอกจากการตรวจวิเคราะห์ความเข้มข้นของสารพิษที่หลงเหลือในของเหลวแล้ว มีความจำเป็นที่ผู้วิจัยต้องดำเนินการทดสอบ

ยืนยันว่าหลังจากเติมเซลล์ยีสต์ลงไปสามารถช่วยลดความเป็นพิษลงหรือไม่ จึงต้องทดสอบยืนยันด้วยการทำ toxicity test ซึ่งสามารถทำได้หลายลักษณะทั้งในเซลล์เพาะเลี้ยงจนถึงในสัตว์ทดลอง การทดสอบที่ดีที่สุดที่ต้องทำในสัตว์หรือคนที่ได้รับผลิตภัณฑ์อาหารที่มีการปนเปื้อนสารพิษตามจริง แต่ด้วยข้อจำกัดทั้งในปัจจัยด้านพื้นที่และงบประมาณผู้วิจัยจึงปรับมาใช้โรน้าเป็นสัตว์ทดลอง โดยในการศึกษานี้คืออาร์ทีเมีย เนื่องจาก อาร์ทีเมียเป็นสัตว์ที่มีความไวต่อสารพิษจากเชื้อรา โดยมีงานวิจัยที่ยืนยันได้ว่า AFB₁ และ OTA มีความเป็นพิษต่อตัวอ่อนอาร์ทีเมีย และอาร์ทีเมียสามารถปรับตัวเข้ากับสภาวะแวดล้อมที่มีความหลากหลายทั้งในส่วนของอุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง สารประกอบต่างๆ ในน้ำเกลือ จนถึงปริมาณออกซิเจนในน้ำ อีกทั้งอาหารที่อาร์ทีเมียสามารถกินได้คือ สาหร่ายหรือเซลล์ยีสต์ (Dvorak *et al.*, 2012)

ผลการนำสารผสมที่ได้จากการทดสอบประสิทธิภาพการดูดซับสารพิษในอาหารไก่เนื้อมาทดสอบความเป็นพิษด้วยอาร์ทีเมีย ค่า EC₅₀ ของการทดสอบในสภาวะที่มีสารพิษเพียงชนิดเดียวจากผลการทดลองก่อนหน้านี้ (ตาราง 4.18) ไม่สามารถนำมาเทียบเคียงกับผลการทดลองในตารางที่ 4.19 และ 4.20 ได้ เนื่องจาก AFB₁ และ OTA มีฤทธิ์ส่งเสริมกันให้เกิดความเป็นพิษมากขึ้น จากค่าสัดส่วนร้อยละอาร์ทีเมียที่ผิดปกติและตาย ผลการทดสอบของกลุ่มที่ทำในสารละลาย PBS เมื่อนำไปเทียบเคียงกับกลุ่มทดสอบที่ใช้สารพิษเพียงชนิดเดียวอาจพบว่ามีตัวเลขที่ไม่ต่างกันมากนัก แต่อาร์ทีเมียในกลุ่มทดลองที่มีทั้ง AFB₁ และ OTA ปนเปื้อนในอาหารสัตว์จะเริ่มพบอาการว่ายน้ำผิดปกติหรือตายได้ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 3 ซึ่งเร็วกว่ากรณีทดสอบด้วยสารพิษเพียงชนิดเดียว (ตารางที่ 4.15 และ 4.17) เนื่องจาก AFB₁ และ OTA เป็นสารพิษที่มีการเสริมฤทธิ์กันทั้งในกลไกที่ทำให้เซลล์เกิดการตายแบบ apoptosis (Harutyunyan, 2015) และการเหนี่ยวนำให้เกิด lipid peroxydation (Halbin *et al.*, 2013)

ตารางที่ 4.19 ผลการทดสอบความเป็นพิษของอาหารไก่เนื้อที่ปนเปื้อน AFB₁ และ OTA
หลังผสมกับเซลล์ *S. cerevisiae* โดยทดลองในสารละลาย PBS (pH7.4)

กลุ่ม ทดลอง	ความเข้มข้นสารพิษ (พีพีพี) (mean+S.D.)		อาร์ทีเมียที่ผิดปกติและตาย (%) (mean+S.D.)			
	AFB ₁	OTA	ชั่วโมงที่ 3	ชั่วโมงที่ 6	ชั่วโมงที่ 9	ชั่วโมงที่ 12
3	0	0	0 ^a	0 ^a	6.00±2.00 ^a	8.00±4.00 ^a
4	4.53±0.11	4.22±0.23	12.67±4.16 ^b	33.33±16.17 ^c	52.00±8.00 ^{bc}	77.33±13.61 ^d
5	3.41±0.10	2.87±0.23	6.00±5.29 ^{ab}	26.67±6.11 ^c	52.00±8.00 ^{bc}	67.33±4.16 ^{cd}
6	3.26±0.17	2.52±0.04	4.67±6.43 ^{ab}	24.67±15.14 ^c	43.33±13.32 ^{bc}	56.00±18.33 ^{bc}
7	2.65±0.11	1.62±0.06	4.67±8.08 ^{ab}	18.67±7.02 ^{bc}	33.33±4.16 ^b	46.67±8.08 ^b

a-d แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของร้อยละอาร์ทีเมียที่ผิดปกติและตาย ($p<0.05$) ในสดมภ์

ตารางที่ 4.20 ผลการทดสอบความเป็นพิษของอาหารไก่เนื้อที่ปนเปื้อน AFB₁ และ OTA
หลังผสมกับเซลล์ *S. cerevisiae* โดยทดลองในสภาวะจำลองทางเดินอาหารไก่เนื้อ

กลุ่ม ทดลอง	ความเข้มข้นสารพิษ (พีพีพี) (mean+S.D.)		อาร์ทีเมียที่ผิดปกติและตาย (%) (mean+S.D.)			
	AFB ₁	OTA	ชั่วโมงที่ 3	ชั่วโมงที่ 6	ชั่วโมงที่ 9	ชั่วโมงที่ 12
8	0	0	2.67±2.31 ^a	4.67±1.15 ^a	10.00±2.00 ^a	14.67±1.15 ^a
9	2.7±0.05	2.61±0.22	18.67±2.31 ^{cd}	44.00±10.58 ^c	72.67±18.48 ^d	79.33±14.05 ^d
10	2.44±0.06	2.45±0.10	17.33±9.02 ^{bc}	26.00±5.29 ^b	48.00±19.70 ^{bc}	65.33±17.01 ^{cd}
11	1.82±0.17	1.52±0.04	8.67±7.57 ^{abc}	26.00±8.00 ^b	35.33±12.22 ^b	49.33±8.08 ^{bc}
12	1.53±0.03	1.38±0.1	8.00±5.29 ^{ab}	21.33±7.57 ^b	34.67±6.43 ^b	40.67±12.22 ^b

a-e แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของร้อยละอาร์ทีเมียที่ผิดปกติและตาย ($p<0.05$) ในสดมภ์

จากตารางที่ 4.19 และ 4.20 พบว่าการเติมเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* สามารถลดความเข้มข้นของ AFB₁ และ OTA ในของเหลวลงได้ และเมื่อนำสารละลายมาทดสอบความเป็นพิษโดยใช้อาร์ทีเมียเป็นสัตว์ทดลองพบว่าได้ผลที่สอดคล้องกัน กล่าวคือ กลุ่มของอาหารไก่เนื้อปนเปื้อนสารพิษที่มีการเติมเซลล์ *S. cerevisiae* จะพบจำนวนอาร์ทีเมียที่แสดงอาการว่ายน้ำผิดปกติหรือตายลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) แต่ความแตกต่างทางสถิติของอาร์ทีเมียที่ผิดปกติและตายระหว่างกลุ่มที่เติมเซลล์ยีสต์ในแต่ละระดับยังไม่แตกต่างกันอย่างชัดเจน ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการที่ปริมาณสารพิษมีความแตกต่างกันน้อยมาก อาร์ทีเมียซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตเมื่อได้รับสารพิษร่างกายจะมีการปรับตัวเพื่อขับพิษออกและมีกลไกทางสรีรวิทยาแก้ไขความผิดปกติที่เกิดจากสารพิษได้ ส่วนความแตกต่าง

ระหว่างการทดสอบภายใต้สภาวะที่เดิมสารละลาย PBS (pH7.4) กับสภาวะจำลองทางเดินอาหารไก่ เมื่อนำมาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า พบว่าไม่มีผลต่อสัดส่วนของอาร์ทีเมียที่ผิดปกติและตายในแต่ละ ชั่วโมง ($p=0.568, 0.399, 0.064$, และ 0.941)

4.6 การทดสอบเปรียบเทียบปริมาณของ β -glucan ของเชื้อ *S. cerevisiae* 4 สายพันธุ์

เซลล์ *S. cerevisiae* ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำแรงดันสูงและย่อยด้วยสารละลาย 2%NaOH ที่อุณหภูมิ 90 °C จะได้ทั้ง β -1,3 glucan และ β -1,6 glucan ออกมา เมื่อทำการตรวจวิเคราะห์พบว่า *S. cerevisiae* สายพันธุ์ TISTR 5013 มีปริมาณ β -glucan สูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ขณะที่สายพันธุ์ TISTR 5049 มีปริมาณ β -glucan น้อยที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) (ตารางที่ 4.21)

ตารางที่ 4.21 ปริมาณ β -glucan ของเซลล์ *S. cerevisiae*

สายพันธุ์ <i>S. cerevisiae</i>	ปริมาณ β -glucan (พีพีเอ็ม)
TISTR 5013	711.67 $\pm$ 2.89 ^d
TISTR 5049	398.33 $\pm$ 7.64 ^a
TISTR 5059	516.67 $\pm$ 10.41 ^c
TISTR 5343	441.33 $\pm$ 12.06 ^b

a-b แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

เมื่อนำปริมาณ β -glucan ที่ตรวจพบมาหาความสัมพันธ์กับประสิทธิภาพในการดูดซับสารพิษจากเชื้อราพบว่า ไม่มีความสอดคล้องทางกันสถิติ โดยค่า correlation coefficient ระหว่างปริมาณ β -glucan กับเปอร์เซ็นต์การลดลงของ OTA คือ 0.184 และค่า correlation coefficient ระหว่างปริมาณ β -glucan กับเปอร์เซ็นต์การลดลงของ AFB₁ คือ 0.369 ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการสกัด β -glucan ยังไม่สามารถทำได้อย่างสมบูรณ์ การที่ยืนยันถึงความสัมพันธ์ขององค์ประกอบในเซลล์ยีสต์กับความสามารถในการดูดซับสารพิษนั้นต้องทดสอบด้วยเทคนิคหลายๆ แบบและควรเพิ่มการตรวจวัดส่วนประกอบอื่นที่มีอิทธิพลต่อความสามารถในการดูดซับสารพิษ เช่น mannoprotein, mannan-oligosaccharide, เป็นต้น

บทที่ 5

สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการศึกษา

1) วัตถุประสงค์หลักของงานวิจัยนี้คือ การคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ที่มีศักยภาพการดูดซับสารพิษ aflatoxin B₁ (AFB₁) และ ochratoxin A (OTA) เพื่อนำองค์ความรู้ที่ได้มาเป็นพื้นฐานในการพัฒนาต่อไปสำหรับประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตอาหารไก่เนื้อ ตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ (ประเทศไทย) เรื่องกำหนดลักษณะของอาหารสัตว์เสื่อมคุณภาพ พ.ศ. 2537 บังคับใช้ให้อาหารสำเร็จรูปสำหรับไก่เนื้อมี AFB₁ ไม่เกิน 100 พีพีบี และใน EU Commission Recommendation (2006) ระบุว่า อาหารสัตว์สำเร็จรูปสำหรับไก่เนื้อต้องมี OTA ปนเปื้อนไม่เกิน 100 พีพีบี จากกฎเกณฑ์ที่กล่าวมาส่งผลให้อาหารไก่เนื้อที่มีจำหน่ายในท้องตลาดจะถูกควบคุมให้มีการปนเปื้อนสารพิษทั้งสองชนิดในระดับต่ำอย่างละไม่เกิน 100 พีพีบี ขณะที่งานวิจัยบางส่วนที่ยืนยันว่า อาหารไก่ซึ่งปนเปื้อนสารพิษ AFB₁ ระดับต่ำคือ 100 พีพีบี ส่งผลต่อการทำงานของตับและมีแนวโน้มที่ปริมาณเม็ดเลือดขาวลดต่ำลง (Matur *et al.*, 2011) โดยอาหารที่มีสารพิษ AFB₁ และ OTA ปนเปื้อนอยู่ร่วมกันจะเสริมฤทธิ์รบกวนการทำงานของอวัยวะสำคัญในร่างกายและทำให้สัตว์มีอัตราการเจริญเติบโตช้าลง (Prabu *et al.*, 2013; Sawarkar *et al.*, 2011) ตลอดการศึกษานี้จึงกำหนดให้การปนเปื้อนอยู่ในรูปที่มีสารพิษ AFB₁ และ OTA ร่วมกันและกำหนดความเข้มข้นของสารพิษทั้งสองชนิดอย่างละ 100 พีพีบี ซึ่งสอดคล้องกับมาตรฐานอาหารไก่เนื้อที่มีโอกาสพบได้จริงในอุตสาหกรรม โดยผู้วิจัยมุ่งหวังว่าเมื่อนำ *S. cerevisiae* ที่ผ่านการทดสอบเบื้องต้นทางห้องปฏิบัติการมาช่วยในการลดความเป็นพิษจากอาหารที่มีการปนเปื้อนสารพิษจากเชื้อรา AFB₁ และ OTA ในระดับต่ำ ลดโอกาสที่ไก่จะได้รับอาหารซึ่งมีสารพิษปนเปื้อนลงและลดการตกค้างในห่วงโซ่อาหารที่จะสืบทอดมายังผู้บริโภคต่อไป การทดลองนี้ได้นำ *S. cerevisiae* ที่ผ่านการนิ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำแรงดันสูงจนอยู่ในรูปเซลล์ตายแล้ว 4 สายพันธุ์ (TISTR 5013, TISTR 5049, TISTR 5059, และ TISTR 5343) มาทำการทดสอบเปรียบเทียบประสิทธิภาพการดูดซับสารพิษทั้งสองชนิดในสารละลาย PBS (pH 7.4) พบว่า *S. cerevisiae* TISTR 5013 และ TISTR 5049 ที่ 10¹⁰ เซลล์ต่อมิลลิลิตร สามารถลดปริมาณ AFB₁ ใน PBS (pH7.4) ลง 50% และ *S. cerevisiae* TISTR 5059 และ TISTR 5343 สามารถลด AFB₁ ใน PBS (pH7.4) ได้ 35% ส่วนผลการดูดซับ OTA พบว่า สายพันธุ์ TISTR 5013, TISTR 5049 และ TISTR 5343 ที่ 10¹⁰ เซลล์ต่อมิลลิลิตรสามารถลดปริมาณ OTA ใน PBS (pH7.4) ลงได้มากกว่า 70% และ สายพันธุ์ TISTR 5059 ลด OTA ใน PBS (pH7.4) ลงได้ 67%

2) ผลทดสอบการดูดซับสารพิษ AFB₁ เพียงชนิดเดียวพบว่า มีแนวโน้มที่ประสิทธิภาพการดูดซับสารพิษหรือเปอร์เซ็นต์การลดลงของสารพิษที่ได้สูงกว่าการทดสอบโดยใช้สารพิษ 2 ชนิด

ร่วมกัน โดยผลการทดลองพบว่า *S. cerevisiae* TISTR 5013 ที่ 10^{10} เซลล์ต่อมิลลิลิตรมีเปอร์เซ็นต์การลดลงของ AFB₁ ใน PBS (pH7.4) อยู่ที่ 64% ซึ่งสูงกว่าสายพันธุ์ TISTR 5049 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับเปอร์เซ็นต์การลดลงของสารพิษใน PBS (pH7.4) ที่ผสมทั้ง AFB₁ และ OTA พบว่ากลุ่มทดลองที่มีสารพิษ AFB₁ เพียงชนิดเดียวมีค่าเปอร์เซ็นต์การลดลงของสารพิษสูงขึ้นอยู่ประมาณ 10% ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการที่ binding site ของผนังเซลล์ต่อสารพิษทั้ง AFB₁ และ OTA มีส่วนทับซ้อนกันหรือการเกิดพันธะของสารพิษชนิดหนึ่งกับโครงสร้างผนังเซลล์มีผลเบียดบังการเข้าจับสารพิษอีกชนิดได้

3) *S. cerevisiae* TISTR 5013 ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำแรงดันสูงจนอยู่ในรูปของเซลล์ตายยังคงมีประสิทธิภาพในการดูดซับสารพิษ AFB₁ และ OTA ได้ดีภายใต้สภาวะจำลองทางเดินอาหาร โดยการเติมเซลล์ยีสต์ที่ปริมาณ 10^9 และ 10^{10} เซลล์ต่อกรัมจะสามารถลดความเข้มข้นของสารพิษทั้งสองชนิดในของเหลวลง 30-50% เป็นการลดโอกาสที่สารพิษจะถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายสัตว์ ช่วยลดความเสี่ยงของความเป็นพิษที่เกิดขึ้นตามมา งานวิจัยได้ทดสอบยืนยันความเป็นพิษในอาหารไก่เนื้อที่ลดลงด้วยการทำ toxicity test โดยใช้อาร์ทีเมียเป็นสัตว์ทดลองพบว่า กลุ่มที่มีการเติมเซลล์ *S. cerevisiae* TISTR 5013 ลงในอาหารไก่เนื้อเพื่อดูดซับสารพิษ AFB₁ และ OTA ช่วยลดจำนวนอาร์ทีเมียที่เกิดความผิดปกติและตายลงได้ โดยกลุ่มทดลองที่มีสารพิษและไม่เติมเซลล์ยีสต์พบว่าอาร์ทีเมียว่ายน้ำผิดปกติและตายประมาณ 40% ส่วนกลุ่มทดลองที่ผสม *S. cerevisiae* TISTR 5013 10^9 และ 10^{10} เซลล์ต่อกรัมจะมีสัดส่วนของอาร์ทีเมียที่ได้รับผลกระทบจากสารพิษลดลง 15-20% ซึ่งในทางภาคอุตสาหกรรม ไก่เนื้อที่ได้รับอาหารซึ่งมีความเป็นพิษน้อยที่สุดหรือไม่มีสารพิษปนเปื้อนเลยก็จะลดอุปสรรคที่มารบกวนการเจริญเติบโต ส่งผลให้ผู้เลี้ยงมีผลประกอบการที่ดีตามมา

4) ผลจากการนำเซลล์ตายของ *S. cerevisiae* ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำแรงดันสูงผสมอาหารไก่เนื้อและนำไปวิเคราะห์ค่า crude protein ด้วยเทคนิค Kjeldahl nitrogen analysis พบว่าสัดส่วนของโปรตีนไม่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เนื่องจากเซลล์ยีสต์ที่เติมลงในอัตราส่วน 10^{10} เซลล์ต่ออาหาร 100 กรัมมี crude protein อยู่เพียง 10-25 มิลลิกรัมซึ่งน้อยมากไม่เพียงพอที่จะเป็นแหล่งโปรตีนให้กับสัตว์ได้

5) ผลการวิเคราะห์ปริมาณ β -glucan จากเซลล์อบแห้งของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ที่ทำการย่อยด้วยสารละลาย NaOH พบว่า สายพันธุ์ TISTR 5013 มี β -glucan สูงสุดคือ 711 พีพีเอ็ม ตามด้วยสายพันธุ์ TISTR 5343 และ TISTR 5059 ที่ตรวจพบ β -glucan จากการสกัดได้ 411 และ 516 พีพีเอ็ม ตามลำดับ โดยสายพันธุ์ TISTR 5049 มี β -glucan น้อยที่สุดคือ 398 พีพีเอ็ม เมื่อนำปริมาณ β -glucan ไปหาความสัมพันธ์กับประสิทธิภาพการดูดซับสารพิษ AFB₁ และ OTA ใน PBS (pH7.4) พบว่าไม่มีความสอดคล้องกัน

5.2 ข้อเสนอแนะ

1) การทดสอบตัวดูดซับสารพิษจากเชื้อราเพื่อนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตปศุสัตว์ มีความจำเป็นที่ต้องทดสอบในสัตว์ทดลองในภาคสนามจริง โดยสามารถใช้หลักการเก็บและวิเคราะห์ข้อมูลโดยไม่ต้องทำการเติมสารพิษลงในอาหารสัตว์ การทดสอบในภาคสนามอาจจำเป็นต้องใช้ระยะเวลาการเก็บข้อมูลที่นานอย่างน้อย 2-3 ปีเพื่อลดปัจจัยแวดล้อมที่ทำให้ผลสรุปการทดลองออกมาผิดพลาด

2) ตัวดูดซับสารพิษที่มาจากเซลล์ซึ่งสามารถเพาะเลี้ยงได้เอง นอกจากช่วยลดความเสี่ยงให้สัตว์ที่ได้รับอาหารแล้ว ยังลดต้นทุนการผลิตทั้งในแง่การผลิตอาหารสัตว์และต้นทุนการผลิตปศุสัตว์ด้วย

รายการอ้างอิง

- นุกูล แสงพันธุ์. 2555. การเพาะเลี้ยงอาหารมีชีวิตร. พิมพ์ครั้งที่ 1. สุพรรณบุรี: แผนกวิชาประมง วิทยาลัยเกษตรและเทคโนโลยีสุพรรณบุรี.
- บุญเสริม ชีวะอิสระกุล และบุญล้อม ชีวะอิสระกุล. 2542. พื้นฐานสัตวศาสตร์. เชียงใหม่: ภาควิชา สัตวบาล คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ (ประเทศไทย) เรื่องกำหนดลักษณะของอาหารสัตว์เสื่อม คุณภาพ พ.ศ. 2537, ราชกิจจานุเบกษา ฉบับประกาศทั่วไป เล่มที่ 112 ตอนพิเศษ 2 ง (10 กุมภาพันธ์ 2538): 153-154.
- ประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม (ประเทศไทย) ฉบับที่ 3443 (พ.ศ. 2548) เรื่องกำหนดมาตรฐาน ผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมอาหารสัตว์-วิธีวิเคราะห์โปรตีน เล่ม 2 วิธีย่อยโดยใช้แทนหุ้มให้ความร้อนและใช้ไอน้ำกลั่น, ราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 123 ตอนที่ 16 ง (23 กุมภาพันธ์ 2549): 23. บทแนบท้าย (ISO 5983 – 2 : 2005): 1-16.
- ละออศรี เสนาเมือง. 2548. “ไร่นานางฟ้า” ทดแทนอาร์ทีเมีย ม. ขอนแก่นเร่งผลิตมือเพาะ. นิตยสารสัตว์น้ำ 17(196): 132-140.
- เสริมพันธุ์ สุนทรชาติ. 2554. รู้จักสารพิษจากเชื้อรามากกว่าอะฟลาทอกซิน. จดหมายข่าวกรม ปศุสัตว์ (สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ) 10(6): 1-3.
- อนันต์ ต้นสุตะพานิช, นกตล ภูพานิช, ธนัญช์ สังกรธนกิจ และธงชัย เพิ่มงาม. 2536. คู่มือการ เพาะเลี้ยงและการใช้ประโยชน์จากอาร์ทีเมีย. กรุงเทพมหานคร: ส่วนเผยแพร่การประมง สำนักพัฒนาและถ่ายทอดเทคโนโลยีการประมง กรมประมง.
- Abdel-Wahhab, M. A. and Aly, S. E. 2003. Antioxidants and radical scavenging properties of vegetable extracts in rats fed aflatoxin-contaminated diet. Journal of Agricultural and Food Chemistry 51: 2409–2414.
- Afifi, A. F., Foad, M. A., and Fawzi, E. M. 2003. Effect of gamma irradiation on elimination of aflatoxins produced by apple mycoflora in apple fruits. Acta Microbiologica Polonica 52: 379–386.
- Akramien, D., Kondrotas, A., Didžiapetrien, J., and Kvelaitis, E. 2007. Effects of β -glucans on the immune system. Medicina (Kaunas) 43(8): 597-606.

- Alberghina, L., Mavelli, G., Drovandi, G., Palumbo, P., Pessina, S., Tripodi, F., Coccetti, P., and Vanoni, M. 2012. Cell growth and cell cycle in *Saccharomyces cerevisiae*: Basic regulatory design and protein-protein interaction network. *Biotechnology Advances* 30: 52–72.
- Alberto G. and Maria L. M. 2006. *Mycotoxins and Mycotoxicosis in Animals and Humans*. Mexico City, Mexico: Victor Mireles Communications.
- Aldred, D. and Magan, N. 2004. The use of HACPP in the control of mycotoxins: the case of cereals. In *Mycotoxins in Food*, ed. Magan, N. and Olsen, M., 139–173. Cambridge : Woodhead Publishing.
- Aly, S. E. and Hathout, A. S. 2011. Fate of aflatoxin B(1) in contaminated corn gluten during acid hydrolysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 91(3): 421-427.
- Aly, S. E., Abdel-Galil, M. M., and Abdel-Wahhab, M. A. 2004. Application of adsorbent agents technology in the removal of aflatoxin B₁ and fumonisin B₁ from malt extract. *Food and Chemical Toxicology* 42(11): 1825–1831.
- Aoudia N., Tangni E. K., and Larondelle Y. 2008. Distribution of ochratoxin A in plasma and tissues of rats fed a naturally contaminated diet amended with micronized wheat fibres: Effectiveness of mycotoxin sequestering activity. *Food and Chemical Toxicology* 46: 871–878.
- Aravind, K. L., Patil, V. S., Devegowda, G., Umakantha, B., and Ganpules P. 2003. Efficacy of esterified glucomannan to counteract mycotoxicosis in naturally contaminated feed on performance and serum biochemical and hematological parameters in broilers. *Poultry Science* 82(4): 571–576.
- Armando, M. R., Pizzolitto, R.P., Dogi, C. A., Cristofolini, A., Merkis, C., Poloni, V., Dalcero, A. M., and Cavaglieri, L.R. 2012. Adsorption of ochratoxin A and zearalenone by potential probiotic *Saccharomyces cerevisiae* strains and its relation with cell wall thickness. *Journal of Applied Microbiology* 113: 256–264.

- Association of Official Analytical Chemist (AOAC). 1990. Official Methods of Analysis, Association of Analytical Chemists 5th edition. pp. 1121-1180. Washington D. C. USA.
- Association of Official Analytical Chemist (AOAC). 2005. Natural toxins. Chapter 49 in AOAC Official Method of Analysis 18th edition, ed. Horwitz, W. and Latimer, G. W., 3-45. USA: AOAC International SUITE 500.
- Avantaggiato, G., Havenaar, R., and Visconti, A. 2003. Assessing the zearalenone-binding activity of adsorbent materials during passage through a dynamic in vitro gastrointestinal model. *Food and Chemical Toxicology* 41: 1283–1290.
- Avantaggiato, G., Havenaar, R., and Visconti, A. 2004. Evaluation of the intestinal absorption of deoxynivalenol and nivalenol by an in vitro gastrointestinal model, and the binding efficacy of activated carbon and other adsorbent materials. *Food and Chemical Toxicology* 42: 817–824.
- Bacha, H., Hadidane, R., Creppy, E. E., Regnault, C., Ellouze, F., and Dirheimer, G. 1988. Monitoring and identification of fungal toxins in food products, animal feed and cereal in Tunisia. *Journal of Stored Products Research* 24: 199–206.
- Bacon, C. W., Yates, I. E., Hinton, D. M., and Filmore, M. 2001. Biological control of *Fusarium moniliforme* in maize. *Environmental Health Perspectives* 109 (Supplement 2): 325–343.
- Baldwin, R. S., Williams, R. D., and Terry, M. K. 1983. Zeranol: a review of the metabolism, toxicology and analytical methods for detection of tissue residues. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 3: 9–25.
- Bammier, T. K., Slone, D. H., and Eaton, D. L. 2000. Effects of dietary oltipraz and ethoxyquin on aflatoxin B₁ biotransformation in non-human primates. *Toxicological Sciences* 54(1): 30-41.
- Baptista, A. S., Horii, J., Calori-Domingues, M. A., da Gloria, E. M., Salgado, J. M., and Vizioli, M. R. 2004. The capacity of mannoooligosaccharides thermolyzed yeast and active yeast to attenuate aflatoxicosis. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 20: 475–481.

- Bartolomé, M. C. and Sánchez-Fortún, S. 2005. Acute Toxicity and Inhibition of Phototaxis Induced by Benzalkonium Chloride in *Artemia franciscana* Larvae. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 75:1208–1213.
- Bejaoui, H., Mathieu, F., Taillandier, P., and Lebrihi, A. 2004. Ochratoxin A removal in synthetic and natural grape juices by selected oenological *Saccharomyces* strains. *Journal of Applied Microbiology* 97(5): 1038-44.
- Bejaoui, H., Mathieu, F., Taillandier, P., and Lebrihi, A. 2006. Black *aspergilli* and ochratoxin A production in French vine-yards. *International Journal of Food Microbiology* 111(S1): S46–52.
- Benesch, R. 1969. Zur ontogenie und morphologie von *Artemia salina* L. *Zoologische Jahrbücher* 86: 307-458.
- Berthiller, F., Sulyok, M., Krska, R., and Schuhmacher, R. 2007. Chromatographic methods for the simultaneous determination of mycotoxins and their conjugates in cereals. *International Journal of Food Microbiology* 119: 33–37.
- Bertuzzi, T., Guala, A., Morlacchini, M., and Pietri, A. 2013. Direct and indirect contamination with ochratoxin A of ripened pork products. *Food Control* 34(1): 79–83.
- Boonsoong, B., Bullangpoti, V. 2012. Acute toxicity of Roundup and carbosulfan to the Thai fairy shrimp, *Branchinella thailandensis*. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences* 77(4): 431-437.
- Boze, H., Moulin, G., and Galzy, P. 1992. Production of food and fodder yeasts. *Critical Reviews in Biotechnology* 12: 65-86.
- Brase, S., Encinas, A., Keck, J., and Nising, C. F. 2009. Chemistry and biology of mycotoxins and related fungal metabolites. *Chemical Reviews* 109: 3903–4399.
- Bratich, P. M., Buck, W. B., and Haschek, W. M. 1990. Prevention of T-2 toxin-induced morphologic effects in the rat by highly activated charcoal. *Archives of Toxicology* 64: 251–253.
- Brown, G. D. and Gordon, S. 2003. Fungal beta-glucans and mammalian immunity. *Immunity* 19: 311–315.

- Bryden, W. L. 2007. Mycotoxins in the food chain: human health implications. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* 16(supplement1): 95–101.
- Bryden, W. L. 2009. Mycotoxins and mycotoxicoses: significance, occurrence and mitigation in the food chain. in *General and Applied Toxicology*, ed. Ballantyne, B., Marrs, T., and Syversen, T., 3529–3553. Chichester, UK: John Wiley & Sons Ltd.
- Bryden, W. L. 2012. Mycotoxin contamination of the feed supply chain: Implications for animal productivity and feed security. *Animal Feed Science and Technology* 173: 134–158.
- Bryden, W. L. 1982. Aflatoxin and animal production: an Australian perspective. *Food technology in Australia* 34: 216–223.
- Bueno, D. J., Casale, C.H., Pizzolitto, R. P., Salvano, M. A., and Oliver, G. 2007. Physical adsorption of aflatoxin B₁ by lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae*: a theoretical model. *Journal of Food Protection* 70(9): 2148–2154.
- Cairns, V., Hope, R., and Magan, N. 2003. Environmental factors and competing microflora affect growth and ochratoxin production by *Penicillium verrucosum* on wheat grain. *Aspects of Applied Biology* 68: 81–90.
- Caldwell, G. S., Bentley, M. G., and Olive, P. J. W. 2003. The use of a brine shrimp (*Artemia salina*) bioassay to assess the toxicity of diatom extracts and short chain aldehydes. *Toxicon* 42: 301–306.
- Calleja, G. B. 1987. Cell aggregation. pp. 165-238. In Rose A. H. and Harrison J. S. (eds.). *The Yeasts. Vol.2 Yeast and the Environment*. Academic Press, London.
- Campbell, L. K., Knox, K. W., and Wicken, A. J. 1978. Extractability of cell wall polysaccharide from lactobacilli and streptococci by autoclaving and by dilute acid. *Infection and Immunity* 22: 842-851.
- Celyk, K., Denly, M., and Savas, T. 2003. Reduction of toxic effects of aflatoxin by using baker yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in growing broiler chicken diets. *Revista Brasileira de Zootecnia* 32: 615–619.

- Choudhary, A. and Verma, R. J. 2005. Ameliorative effects of black tea extract on aflatoxin-induced lipid peroxidation in the liver of mice. *Food and Chemical Toxicology* 43: 99–104.
- Cisneros, R. L., Gibson, F. C., and Tzianabos, A. O. 1996. Passive transfer of poly-(1-6)-beta-glucotriosyl-(1-3)-beta-glucopyranose glucan protection against lethal infection in an animal model of intra-abdominal sepsis. *Infection and Immunity* 64: 2201–2205.
- Cole, R. J., Scheweikert, M. A., and Jarvis, B. B. 2003. *Handbook of Secondary Fungal Metabolites*. 1-3. California, USA: Academic Press.
- Council for Agricultural Science and Technology (CAST). 2003. Chapter 6 Mycotoxicoses of animals in *Mycotoxins: Risks in Plant, Animal, and Human Systems* 58-85. Task Force report No.139 Iowa, USA.
- Curtis, R. F., Coxon, D. T., and Levett, G. 1974. Toxicity of fatty acids in assays for mycotoxins using the brine shrimp (*Artemia salina*). *Food and Cosmetics Toxicology* 12(2): 233–235.
- Dalcero, A., Magnoli, C., Hallak, C., Chiacchiera, S. M., Palacio, G., and Da Rocha Rosa, C. A. 2002. Detection of ochratoxin A in animal feeds and capacity to produce this mycotoxin by *Aspergillus* section *Nigri* in Argentina. *Food additives and Contaminants* 19: 1065–1072.
- Dallies, N., François, J. and Paquet, V. 1998. A new method for quantitative determination of polysaccharides in the yeast cell wall. Application to the cell wall defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14: 1297–1306.
- De Felice, D. V., Solfrizzo, M., De Curtis, F., Lima, G., Visconti, A., and Castoria, R. 2008. Strains of *Aureobasidium pullulans* can lower ochratoxin A contamination in wine grapes. *Phytopathology* 98: 1261–1270.
- De Nobel, J. G., Klis, F.M., Munnik, T., Priem, J. and Ende, H. V. D. 1990. An Assay of Relative Cell Wall Porosity in *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* and *Schizosaccharomyces pombe*. *YEAST* 6: 483-490.

- Denli, M., Blandon, J. C., Guynot, M. E., Salado, S., and Perez, J. F. 2009. Effects of dietary AflaDetox on performance, serum biochemistry, histopathological changes, and aflatoxin residues in broilers exposed to aflatoxin B₁. *Poultry Science* 88: 1444–1451.
- Devegowda, G., Arvind, B. I. R., and Morton, M. G. 1996. *Saccharomyces cerevisiae* and mannanoligosaccharides to counteract aflatoxicosis in broilers. *Proceedings of Australian poultry science symposium Sydney* : 103–106.
- Duke, G. E. 1993. *Dukes' Physiology of Domestic Animals*. Eleventh edition. United States of America: Comstock Publishing Associates.
- Dumitrascu, M. 2011. *Artemia salina*. *Balneo-Research Journal* 2(4): 119-122.
- Dumont, H. J. and Munuswamy, N. 1997. The potential of freshwater Anostraca for technical applications. *Hydrobiologia* 358: 193-197.
- Duraković, L., Blažinkov, M., Skelin, A., Sikora, S., Delaš, F., Mrkonjić-Fuka, M., Huić-Babić, K., Redžepović, S. 2011. Temperature-dose relationships with aflatoxin M₁ in milk on the brine shrimp (*Artemia salina*) larvae. *Mljekarstvo* 61(2): 145-153.
- Durán, A. and Nombela, C. 2004. Fungal cell wall biogenesis: building a dynamic interface with the environment. *Microbiology* 150: 3099–3103.
- Dvorak, P., Benova, K., and Vitek, J. 2012. Alternative Biotest on *Artemia franciscana*. in *Ecotoxicology*, ed. Begum, G. Rijeka, Croatia: InTech.
- EFSA. 2004. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to Aflatoxin B₁ as undesirable substance in animal feed (Question No. EFSA-Q-2003-035). Adopted on 3 February 2004. *The EFSA Journal* 39: 1–27.
- Elmholt, S., Frisvad, J. C., and Thrane, U. 1993. The influence of fungicides on soil mycoflora with special attention to tests of fungicide effects on soil-borne pathogens. in *Pesticide Interactions in Crop Production: Beneficial and Deleterious Effects*, ed. Altman, J., 227-243. New York: CRC Press.

- Elmusharaf, M. A., Peek, H. W., Nollet, L., and Beynen, A. C. 2007. The effect of an in-feed mannanoligosaccharide preparation (MOS) on a coccidiosis infection in broilers. *Animal Feed Science and Technology* 134: 347–354.
- EU Commission Recommendation 2006. The presence of deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, T-2 and HT-2 and fumonisins in products intended for animal feeding. *Official Journal of the European Union*, No. 2006/576/EC: L 229/7-9.
- EU. 2006. Laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. *European Union COMMISSION REGULATION (EC) No 401/2006 of 23 February 2006*: L70/30-L70/32.
- European Commission, Health & Consumer Protection Directorate General. 2003. *Mycotoxins In Opinion of the Scientific Committee on Animal Nutrition on Undesirable Substances in Feed (Adopted on 20 February 2003)* EU SCAN Report: 6-24.
- European Food Safety Authority (EFSA). 2006. Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to ochratoxin A in food. *The EFSA Journal* 365: 1-56.
- European Union. 2002. Commission directive 2002/26/EC of 13 March 2002 laying down the sampling methods and the methods of analysis for the official control of the levels of ochratoxin A in foodstuffs. *Official Journal of the European Union Communities* L75: 38–43.
- FAO. 2003. *Manual on the Application of the HACCP System in Mycotoxin Prevention and Control*. 2nd ed. Rome, Italy.
- Firon, N., Ofek, I., and Sharon, N. 1984. Carbohydrate-binding sites of the mannose-specific fimbrial lectins of enterobacteria. *Infection and Immunity* 43: 1088–1090.

- Food and Agricultural Materials Inspection Center (FAMIC) 2014. Annual Reports on Surveillance and Monitoring for Harmful Chemical Substances in Animal Feed (in the fiscal year 2013) [Online]. Available from: http://www.famic.go.jp/ffis/oie/sub2_h25_gaiyou_e.html Accessed November 11, 2014.
- Fricke, R. F. and Jorge, J. 1990. Assessment of efficacy of activated charcoal for treatment of acute T-2 toxin poisoning. *Journal of Toxicology-Clinical Toxicology* 28: 421–431.
- Frisvad, J. C., Frank, J. M., Houbraken, J. A. M. P., Kuijpers, A. F. A., and Samson, R. A. 2004. New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*. *Studies in Mycology* 50: 23–43.
- Fujimoto, H. 2011. Yeasts and Molds: Mycotoxins: Classification, Occurrence and Determination. In *Encyclopedia of Dairy Sciences*, ed. Fuquay, J. W., 792–800. 2nd ed. Academic Press: San Diego, California, USA.
- Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology* 66: 365–378.
- Galey, F. D., Lambert, R. J., Busse, M., and Buck, W. B. 1987. Therapeutic efficacy of superactive charcoal in rats exposed to oral lethal doses of T-2 toxin. *Toxicon* 25: 493–499.
- Gao, J., Zhang, H. J., Yu, S. H., Wu, S. G., Yoon, I., Quigley, J., Gao, Y. P., Qi, G. H. 2008. Effects of yeast culture in broiler diets on performance and immunomodulatory functions. *Poultry Science* 87: 1377–1384.
- George-Ares, A.; Febbo, E. J.; Letinski, D. J.; Yarusinsky, J.; Safadi, R. S., and Aita, A. F. 2003. Use of Brine Shrimp (*Artemia*) in Dispersant Toxicity Tests: Some Caveats. In: *Proceedings of International Oil Spill Conference*, 2003.
- Gibson, G. R. and Wang, X. 1994. Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria. *Journal of Applied Bacteriology* 77: 412–420.
- Gilbert, J., Brereton, P., and MacDonald, S. 2001. Assessment of dietary exposure to ochratoxin A in the UK using a duplicate diet approach and analysis of urine and plasma samples. *Food Additives & Contaminants* 18(12):1088-1093.

- Gonzalez, L., Juan, C., Soriano, J. M., Moltó, J. C., and Mañes, J. 2006. Occurrence and daily intake of ochratoxin A of organic and non-organic rice and rice products. *International Journal of Food Microbiology* 107: 223–227.
- Guynot, M. E., Marin, S., Seto, L., Sanchis, V., and Ramos, A. J. 2005. Screening for antifungal activity of some essential oils against common spoilage fungi of bakery products. *Food Science and Technology International* 11: 25–32.
- Halbin, K. J., Kouakou, B., and Dago, G. 2013. Low level of Ochratoxin A enhances Aflatoxin B₁ induced cytotoxicity and lipid peroxydation in both human intestinal (Caco-2) and hepatoma (HepG2) cells lines. *International Journal of Nutrition and Food Sciences* 2(6): 294-300.
- Hartl, M. and Humpf, H. U. Toxicity assessment of fumonisins using the brine shrimp (*Artemia salina*) bioassay. *Food and Chemical Toxicology* 38: 1097-1102.
- Harutyunyan, T. A. 2015. Apoptosis-inducing effect of aflatoxin B₁, ochratoxin a and zearalenone combination in rat hepatocytes. *Chemistry and Biology* 1: 50-52.
- Harwig, J. and Scott, P. M. 1971. Brine shrimp (*Artemia salina* L.) Larvae as a screening system for fungal toxins. *Apply Microbiology* 21(6): 1011-1016.
- Haskard, C., Binnion, C., and Ahokas, J. 2000. Factors affecting the sequestration of aflatoxin by *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. *Chemico-Biological Interactions* 128: 39-49.
- Haskard, C., El-Nezami, H., Kankaanpää, P., Salminen, S., and Ahokas, J. 2001. Surface binding of aflatoxin B₁ by lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 67(7): 3086-3091
- Hazelwood, D. H. and Hazelwood, S. E. 1985 The effect of temperature on oxygen consumption in four species of freshwater fairy shrimp (Crustacea: Anostraca). *Freshwater Invertebrate Biology* 4: 133–137.
- Hernandez-Mendoza, A., Garcia, H. S., and Steele, J. L. 2009. Screening of *Lactobacillus casei* strains for their ability to bind aflatoxin B₁. *Food and Chemical Toxicology* 47: 1064-1068.

- Hill, R. A., Wilson, D. M., McMillan, W. W., Widstrom, N. W., Cole, R. J., Sander, T. H., and Blakenship, P. D. 1985. Ecology of the *Aspergillus flavus* group and aflatoxin formation in maize and groundnut. In *Trichothecenes and other mycotoxins*, ed. Lacey J., 79-95 Chichester, UK: John Wiley & Sons Ltd.
- Hope, R. and Magan, N. 2003. Two dimensional environmental profiles of growth, deoxynivalenol and nivalenol production by *Fusarium culmorum* on a wheat-based substrate. *Letters in Applied Microbiology* 37: 70–74.
- Huff, G. R., Huff, W. E., Farnell, M. B., Rath, N. C., Solis De Los Santos, F., and Donoghue, A. M. 2010. Bacterial clearance, heterophil function, and hematological parameters of transport-stressed turkey poultz supplemented with dietary yeast extract. *Poultry Science* 89: 447–456.
- Huff, W. E. and Doerr, J. A. 1981. Synergism between aflatoxin and ochratoxin A in broiler chickens. *Poultry Science* 60: 550-555.
- Hussain, Z., Khan, M. Z., Khan, A., Javed, I., Saleemi, M. K., Mahmood, S., and Asi, M. R. 2010. Residues of aflatoxin B₁ in broiler meat: Effect of age and dietary aflatoxin B₁ levels. *Food and Chemical Toxicology* 48: 3304-3307.
- Huwig, A., Freimund, S., Käppeli, O., and Dutler H. 2001. Mycotoxin detoxification of animal feed by different adsorbents. *Toxicology Letters* 122(2): 179–188.
- IARC. 1993. Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. in *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans* 56: 489-521. Lyon, France: World Health Organization.
- Jaimez, J., Fente, C. A., Franco, C. M., Cepeda, A., and Vázquez, B. I. 2004. A survey of the fungal contamination and presence of ochratoxin A and zearalenone on Spanish feed and raw materials. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 84: 832–840.
- JECFA. 2001. Safety evaluation of certain mycotoxins in foods. WHO Food Additive Series 47 International Programme on Chemical Safety. World Health Organisation, Geneva.

- Jørgensen, K. 1998. Survey of pork, poultry, coffee, beer and pulses for ochratoxin A. Food Additives and Contaminants. Part A. Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment 15: 550–554.
- Jørgensen, K. and Petersen, A. 2002. Content of ochratoxin A in paired kidney and meat samples from healthy Danish slaughter pigs. Food Additives and Contaminants 19: 562–567.
- Jouany, J. P., Yiannikouris, A., and Bertin, G. 2005. The chemical bonds between mycotoxins and cell wall components of *Saccharomyces cerevisiae* have been identified. Archiva Zootechnica 8: 26-50.
- Jung, E. Y., Lee, H. S., Chang, U. J., Bae, S. H., Kwon, K. H., and Suh, H. J. 2010. Acute and subacute toxicity of yeast hydrolysate from *Saccharomyces cerevisiae*. Food and Chemical Toxicology 48: 1677–1681.
- Kabak, B. 2009. The fate of mycotoxins during thermal food processing. Journal of the Science of Food and Agriculture 89(4): 549–554.
- Kapetanakou, A. E., Kollias, J. N., Drosinos, E. H., and Skandamis, P. N. 2012. Inhibition of *A. carbonarius* growth and reduction of ochratoxin A by bacteria and yeast composites of technological importance in culture media and beverages. International Journal of food microbiology 152: 91–99.
- Kasperkovitz, P. V., Khan, N. S., Tam, J. M., Mansour, M. K., Davids, P. J., and Vyas J. M. 2011. Toll-like receptor 9 modulates macrophage antifungal effector function during innate recognition of *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*. Infection and Immunity 79(12): 4858–4867.
- Klis, F. M., Boorsma, A., and de Groot, P. W. J. 2006. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 23: 185–202.
- Klis, F. M., Mol, P., Hellingwerf, K., and Brul, S. 2002. Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiology Reviews 26: 239–256.
- Knorr, D., Shetty, K. J., and Kinsella, J. E. 1979. Enzymatic lysis of yeast cell walls. Biotechnology and Bioengineering 21(11): 2011–2021.

- Kogan, G. and Kocher, A. 2007. Role of yeast cell wall polysaccharides in pig nutrition and health protection. *Livestock Science* 109: 161–165.
- Krizková, L., Duracková, Z., Sandula, J., Sasinková, V., and Krajcovic, J. 2001. Antioxidative and antimutagenic activity of yeast cell wall mannans in vitro. *Mutation Research* 497: 213–222.
- Kumagai, S. 1988. Effects of plasma ochratoxin A and luminal pH on the jejuna absorption of Ochratoxin A in rats. *Food and Chemical Toxicology* 26, 753–758.
- Kumagai, S. 2010. The fate of aflatoxin B₁ in animal. *Mycotoxin* 60(1): 7-16.
- Kumar, A. M. S. and Ali, A. J. 2014. Effect of two organophosphorus pesticides on the reproductive bionomics of freshwater fairy shrimp *streptocephalus dichotomus* (baird, 1860) (crustacea: anostraca). *International Journal of Bioassays* 3(09): 3307-3312.
- Kwiatkowski, S., Thielen, U., Glenney, P., and Moran, C. 2009. A study of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall glucans. *Journal of the Institute of Brewing*: 115(2): 151-158.
- Lahr, J. 1997. Ecotoxicology of organisms adapted to life in temporary freshwater ponds in arid and semi-arid regions. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 32: 50–57.
- Lee, J. N. and Lee, D. Y. 2001. Purification of soluble beta- glucan with Immune enhancing Activity from the cell wall of yeast. *Bioscience Biotechnology Biochemistry* 65 (4): 837-841.
- Lee, Y., El-Nezami, H., Haskard, C., Gratz, S., Puong, K., Salminen, S., and Mykkänen, H. 2003. Kinetics of adsorption and desorption of aflatoxin B₁ by viable and nonviable bacteria. *Journal of Food Protection* 66(3): 426-430.
- Leeson, S. and Summers, J. D. 2001. Scott's nutrition of the chicken. 4th ed. Guelph-Ontario, Canada: University Books.
- Lenz, P., and Browne, R. 1991. *Artemia* Ecology in *Artemia Biology*, ed. Browne, R. A. Sorgeloos, P., and Trotman, C. N. T., pp. 237–254. Florida: BocaRaton.

- Majeed, S., Iqbal, M., Asi, M. R., and Iqbal, S. Z. 2013. Aflatoxins and ochratoxin A contamination in rice, corn and corn products from Punjab, Pakistan. *Journal of Cereal Science* 58(3): 446–450.
- Marin, D. E., Tăranu, I., Tabuc, C., and Burgehelea, M. 2009. Ochratoxin: nature, origin, metabolism and toxic effects in pigs. *Archiva Zootechnica* 12(1): 5-17.
- Marin, S., Magan, N., Serra, J., Ramos, A. J., Canela, R., and Sanchis, V. 1999. Fumonisin B₁ production and growth of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* in maize, wheat, and barley grain. *Journal of Food Protection* 64: 921–24.
- Marks, H. L. and Wyatt, R. D. 1979. Genetic resistance to aflatoxin in Japanese quail. *Science* 206: 1329–1330.
- Martin, R. A., MacLeod, J. A., and Caldwell, C. 1991. Influences of production inputs on incidence of infection by *Fusarium* species on cereal seed. *Plant Disease* 75: 784-788.
- Matur, E., Ergul, E., Akyazi, I., Eraslan, E., Inal, G., Bilgic, S., and Demircan H. 2011. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* extract on haematological parameters, immune function and the antioxidant defence system in breeder hens fed aflatoxin contaminated diets. *British Poultry Science* 52(5): 541—550.
- Mayorga, P., Pérez, K. R., Cruz, S. M., and Cáceres, A. 2010. Comparison of bioassays using the anostracan crustaceans *Artemia salina* and *Thamnocephalus platyurus* for plant extract toxicity screening. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 20(6): 897-903.
- Meca, G., Blaiotta, G., and Ritieni, A. 2010. Reduction of ochratoxin A during the fermentation of Italian red wine moscato. *Food Control* 21: 579-583.
- Mendoza, A. H., Jimenez, L. R., and Garcia, H. S. 2011. Assessment of Aflatoxin B₁ Binding to *Lactobacillus reuteri* by Microscopy and Fluorescence. *Techniques Food Biotechnology* 25: 140-150.

- Miller, J. D. 1998. Global significance of mycotoxins. In ed. Miraglia, M., van Egmond, H., Brera, C., Gilbert, J. *Mycotoxins and Phycotoxins Developments in Chemistry, Toxicology and Food Safety*, 3–15. Fort Collins, Colorado USA: Alaken Inc.
- Miller, J. D., Young, J. C., and Sampson, D. R. 1985 Deoxynivalenol and *Fusarium* head blight resistance in spring cereals. *Journal of Phytopathology* 113: 359–367.
- Mitchell, D., Aldred, D., and Magan, N. 2003. Impact of ecological factors on growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* from different regions of Europe. *Aspects of Applied Biology* 68: 109–16.
- Monaci, L. , F. Palmisano, R. Matrella, and G. Tantillo. 2005. Determination of ochratoxin A at part-per-trillion level in Italian salami by immunoaffinity clean-up and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A* 1090: 184–187.
- Moshtaghian, J., Parsons, C. M., Leeper, R. W., Harrison, P. C., and Koelkebeck, K. W. 1991. Effect of sodium aluminosilicate on phosphorus utilization by chicks and laying hens. *Poultry Science* 70: 955-962.
- Moss, M. O. 1991. Mycology of cereal grain and grain products. in ed. Chelkowski, J., *Cereal Grain: Mycotoxins, Fungi and Quality in Drying and Storage*, 23-51. New York: Elsevier Science Publishing Inc.
- Munkvold, G. P. 2003. Cultural and genetic approaches to managing mycotoxins in maize. *Annual Review of Phytopathology* 41: 99–116.
- Munkvold, G. P., Hellmich, R. L., and Rice, L. G. 1999. Comparison of fumonisin concentrations in kernels of transgenic Bt maize hybrids and non-transgenic hybrids. *Plant Disease* 83: 130–138.

- Nally, M. C., Pesce, V. M., Maturano, Y. P., Muñoz, C. J., Combina, M., Toro, M. E., Castellanos de Figueroa, L. I., and Vazquez, F. 2012. Biocontrol of *Botrytis cinerea* in table grapes by non-pathogenic indigenous *Saccharomyces cerevisiae* yeasts isolated from viticultural environments in Argentina. *Postharvest Biology and Technology* 64: 40–48.
- Naruemon, M., Romanee, S., Cheunjit, P., Xiao, H., McLandsborough, L. A., and Pawadee, M. 2013. Influence of additives on *Saccharomyces cerevisiae* β -glucan production. *International Food Research Journal* 20(4): 1953-1959.
- Nunes, B. S., Carvalho, F. D., Guilhermino, L. M., and Stappen, G.V. 2006. Review Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing. *Environmental Pollution* 144: 453-462.
- Nunez, Y. P., Pueyo, E., Carrascosa, A. V., and Martinez-Rodriguez, A. J. 2008. Effects of aging and heat treatment on whole yeast cells and yeast cell walls and on adsorption of ochratoxin A in a wine model system. *Journal of food protection* 71: 1496–1499.
- OECD. 2000. Guidance document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures. *OECD series on testing and assessment* 23: 12-19.
- Oswald, I. P. and Taranu, I. 2008. *Mycotoxins in Farm Animals*. Kerala: Transworld Research Network.
- Paterson R. R. M. and Lima N. 2011. Further mycotoxin effects from climate change. *Food Research International* 44: 2555–2566.
- Pattono, D., Gallo, P. F., and Civera, T. 2011. Detection and quantification of Ochratoxin A in milk produced in organic farms. *Food Chemistry* 127: 374–377.
- Peltonen, K., El-Nezami, H., Haskard, C., Ahokas, J., and Salminen, S. 2001. Aflatoxin B₁ binding by dairy strains of lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Journal of Dairy Science* 84(10): 2152-2156.
- Petterson, H. 2004. Controlling mycotoxins in animal feeds. In ed. Magan, N. and Olsen, M., *Mycotoxins in Food*, 262–304. Cambridge: Woodhead Publishing.

- Pfohl-Leszkowicz, A. and Manderville, R. A. 2007. Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. *Molecular Nutrition & Food Research* 51: 61–99.
- Pitout, M. J. 1969. The hydrolysis of ochratoxin a by some proteolytic enzymes. *Biochemical Pharmacology* 18(2): 485-491.
- Pitt, J. I. 1987. *Penicillium viridicatum*, *Penicillium verrucosum*, and production of ochratoxin A. *Applied and Environmental Microbiology* 53: 266–269.
- Pizzolitto, R. P., Armando, M. R., Combina, M., Cavaglieri, L. R., Dalcerro, A. M., and Salvano M. A. 2012a. Evaluation of *Saccharomyces cerevisiae* strains a probiotic agent with aflatoxin B₁ adsorption ability for use in poultry feedstuffs. *Journal of Environmental Science and Health Part B* 47: 933–941.
- Pizzolitto, R. P., Salvano M. A., and Dalcerro A. M. 2012b. Analysis of fumonisin B₁ removal by microorganisms in co-occurrence with aflatoxin B₁ and the nature of the binding process. *International Journal of Food Microbiology* 156: 214–221.
- Prabu, P. C., Dwivedia, P., and Sharma, A. K. 2013. Toxicopathological studies on the effects of aflatoxin B₁, ochratoxin A and their interaction in New Zealand White rabbits. *Experimental and Toxicologic Pathology* 65: 277– 286.
- Prandini, A., Sigolo, S., Filippi, L., Battilani, P., and Piva, G. 2009. Review of predictive models for *Fusarium* head blight and related mycotoxin contamination in wheat. *Food and Chemical Toxicology* 47(5): 927–931.
- Prior, M. G. 1979. Evaluation of Brine Shrimp (*Artemia salina*) Larvae as a Bioassay for Mycotoxins in Animal Feedstuffs. *Canadian Journal of Comparative Medicine* 43: 352-355.
- Rahaie, S., Razavi, S. H., and Emam Jomeh, Z. 2010. The ability of *Saccharomyces cerevisiae* strain in aflatoxin reduction in pistachio nut. *Iranian Journal of Food Science and Technology* 7(1): 81-88.

- Rahmani, A., Jinap, S., and Soleimany, F. 2009. Qualitative and quantitative analysis of mycotoxins. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 8: 202-251.
- Raju, M. V. L. N., and Devegowda, G. 2000. Influence of esterified glucomannan on performance and organ morphology, serum biochemistry and haematology in broilers exposed to individual and combined mycotoxicosis (aflatoxin, ochratoxin and T-2 toxin). *British Poultry Science* 41: 640–650.
- Ramos, A. J., Labernia, N., Marin, S., Sanchis, V., and Magan, N. 1998. Effect of water activity and temperature on growth and ochratoxin production by three strains of *Aspergillus ochraceus* on a barley extract medium and on barley grains. *International Journal of Food Microbiology* 44: 133–40.
- Raters, M. and Matissek, R. 2008. Thermal stability of aflatoxin B₁ and ochratoxin A. *Mycotoxin Research* 24(3): 130-134.
- Reisinger, N., Ganner, A., Masching, S., Schatzmayr, G., and Applegate, T. J. 2012. Efficacy of a yeast derivative on broiler performance, intestinal morphology and blood profile. *Livestock Science* 143: 195–200.
- Ripley, B. J., Davis, K. C., Carter, B. J., and Simovich, M. A. 2003. Toxicity of malathion and Roundup[®] to the San Diego fairy shrimp. *Transactions of the Western Section of the Wildlife Society* 39: 13-21.
- Rodrigues, I. and Naehrer, K. 2012. Prevalence of mycotoxins in feedstuffs and feed surveyed worldwide in 2009 and 2010. *Phytopathologia Mediterranea* 51: 175–192.
- Roth, A., Chakor, K., Creppy, E. E., Kane, A., Rösenthaller, R., and Dirheimer, G. 1988. Evidence for an enterohepatic circulation of ochratoxin A in mice. *Toxicology* 48: 293-308.
- Rustom, I. Y. S. 1997. Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods. *Food Chemistry* 59(1): 57–67.

- Sage, L., Garon, D., and Seigle-Murandi, F. 2004. Fungal microflora and ochratoxin A risk in French vineyards. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 5764–5768.
- Sanchis, V. 2004. Environmental conditions affecting mycotoxins. in *Mycotoxins in food: detection and control*, ed. Magan, N. and Olsen, M., 174-189 Boca Raton, Florida: Chemical Rubber Company Press.
- Sanoamuang, L. and Saengphan, N. 2006. A new species of *Streptocephalus* fairy shrimp (Crustacea, Anostraca) with tetrahedral cysts from central Thailand. *International Review of Hydrobiology* 91: 250-256.
- Sanoamuang, L., Murugan, G., Weekers, G. P. H. H. and Dumont, H. J. 2000. *Streptocephalus sirindhornae*, new species of freshwater fairy shrimp (Anostraca) from Thailand. *Journal of Crustacean Biology* 20: 559-565.
- Sanoamuang, L., Saengphan, N. and Murugan, G. 2002. First record of the family Thamnocephalidae (Crustacea: Anostraca) from Southeast Asia and description of a new species of *Branchinella*. *Hydrobiologia* 486: 63-69.
- Santin, E., Paulilo, A. C., Maiorka, A., Nakaghi, L. S. O., Macan, M., and de Silva, A. V. F. 2003. Evaluation of the efficiency of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall to ameliorate the toxic effects of aflatoxin in broilers. *International Journal of Poultry Science* 2: 241–344.
- Sawarkar, A. R., Sonkusale, P. M., Kurkure, N. V., Jangade, C. R., Maini, S., and Ravikanth, K. 2011. Experimental aflatoxin and ochratoxin induced mixed mycotoxicosis in broilers and its amelioration with herbomineral toxin binder 'Toxiroak Gold'. *International Journal of Poultry Science* 10(7): 560-566.
- Schiavone, A., Cavallero, C., Girotto, L., Pozzo, L., Antoniazzi, S., and Cavallarin, L. 2008. A survey on the occurrence of ochratoxin A in feeds and sera collected in conventional and organic poultry farms in Northern Italy. *Italian Journal of Animal Science* 7: 495-503.
- Shalaby, M. E. and El-Nady, M. F. 2008. Application of *Saccharomyces cerevisiae* as a biocontrol agent against *Fusarium* infection of sugar beet plants. *Acta Biologica Szegediensis* 52(2): 271-275.

- Shephard, G. S. 2008. Impact of mycotoxins on human health in developing countries. *Food Additives & Contaminants* 25: 146–151.
- Shetty, P. H. and Jespersen, L. 2006. *Saccharomyces cerevisiae* and Lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontaminating agents. *Trends in food science & technology* 17: 48-55.
- Shetty, P. H., Hald, B., and Jespersen, L. 2007. Surface binding of aflatoxin B₁ by *Saccharomyces cerevisiae* strains with potential decontaminating abilities in indigenous fermented foods. *International Journal of Food Microbiology* 113: 41-46.
- Shoaf-Sweeney, K. D. and Hutkins, R. W. 2008. Chapter 2 adherence, antiadherence, and oligosaccharides. Preventing pathogens from sticking to the host. *Advances in Food and Nutrition Research* 55: 101–161.
- Smith, E. E., Phillips, T. D., Ellis, J. A., Harvey, R. B., Kubena, L. F., Thompson, J., and Newton, G. 1994. Hydrated sodium calcium aluminosilicate reduction of AFM₁ residues in dairy goat milk. *Journal of Animal Science* 72: 677-682.
- Sorgeloos, P., Remiche-Van Der Wielen, C., and Persoone, G. 1978. The use of *Artemia* nauplii for toxicity tests-a critical analysis. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2: 249-255.
- Sutton, J. C. 1982. Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 4: 195–209.
- Sweeney, M. J. and Dobson, A. D. W. 1998. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *International Journal of Food Microbiology* 43: 141–158.
- Tam, T. M., Duy, N. Q., Minh, N. P., and Dao, D. T. A. 2013. Optimization of beta-glucan extraction from waste brewer's yeast *saccharomyces cerevisiae* using autolysis, enzyme, ultrasonic and combined enzyme – ultrasonic treatment. *American Journal of Research Communication* 1(11): 149-158.

- Tangni, E. K., Waegeneers, N., Van Overmeire, I., Goeyens, L., and Pussemier, L. 2009. Mycotoxin analyses in some home produced eggs in Belgium reveal small contribution to the total daily intake. *Science of the total environment* 407: 4411–4418.
- Teich, A. H. 1987. Less wheat scab with urea than with ammonium nitrate fertilisers. *Cereal Research Communication* 15: 35–38.
- The Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 2012. Official Methods of Analysis of AOAC International 19th edition. Virginia, USA.
- Thiex, J. N. and Manson, H. 2002. New AOAC standard for crude protein determinations in animal feed, forage, grain and oilseed using tecatorkjeltec equipment. *Focus* 26 (2): 10-12.
- Thiex, J. N., Manson, H., Anderson, S. and Persson, J. 2002. Determination of crude protein in animal feed, forage, grain, and oilseeds by using block digestion with a copper catalyst and steam distillation into boric acid: Collaborative Study. *Journal of AOAC International* 85 (2): 309-317.
- Thirumala-Devi, K., Mayo, M. A., Reddy, G., and Reddy, D. V. 2002. Occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in Indian poultry feeds. *Journal of Food Protection* 65(8): 1338-40.
- Toscani, T., Moseriti, A., Dossena, A., Dall'Asta, C., Simoncini, N., and Virgili, R. 2007. Determination of ochratoxin A in dry-cured meat products by a HPLC-FLD quantitative method. *Journal of Chromatography B* 855: 242–248.
- USFDA CVM. 2006. Guidance for Industry #3. General principles for evaluating the safety of compounds used in food-producing animals [Online]. Available from:
<http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/GuidanceComplianceEnforcement/GuidanceforIndustry/ucm123817.htm> Accessed June 27, 2015.
- Van der Merwe, K. J., Steyn, P. S., Fourie, L., Scott, D. B., and Theron, J. J. 1965. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus*. *Nature* 205: 1112–1113.

- Vanesa, D. and Ana P. 2013. Occurrence of Ochratoxin A in coffee beans, ground roasted coffee and soluble coffee and method validation. *Food Control* 30: 675-678.
- Vanhaecke, P.; Persoone, G.; Claus, C.; and Sorgeloos, P. 1980. Research on the development of a short term standard toxicity test with *Artemia nauplii*, in The brine shrimp *Artemia* : Proceedings of the International Symposium on the brine shrimp *Artemia salina* (Corpus Christi, Texas, USA, August 20-23, 1979),ed. Persoone, G., pp. 263-285.
- Varó, I., Serrano, R., Pitarch, E., Amat, F., López, F. J., and Navarro, J. C. 2000. Toxicity and Bioconcentration of Chlorpyrifos in Aquatic Organisms: *Artemia parthenogenetica* (Crustacea), *Gambusia affinis*, and *Aphanius iberus* (Pisces). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 65: 623–630.
- Veldman, A., Meijjs, J. A. C., Borggreve, G. J., and Heeres-van-der-Tol, J. J. 1992. Carry over of aflatoxin from cows' food to milk. *Animal Production* 55: 163–168.
- Velmourougane, K., Bhat, R., Gopinandhan, T. N., and Panneerselvam, P. 2011. Management of *Aspergillus ochraceus* and Ochratoxin-A contamination in coffee during on-farm processing through commercial yeast inoculation. *Biological Control* 57: 215–221.
- Versantvoort, C. H. M., Oomen, A. G., De Kamp, E. V., Rompelberg, C. J. M., and Sips, A. J. A. M. 2005. Applicability of an in vitro digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food. *Food and Chemical Toxicology* 43: 31–40.
- Walker, G. M. 1998. *Yeast Physiology and Biotechnology*. Chichester, England: John Wiley and Sons.
- Ward, T. L., Watkins, K. L., Southern, L. L., Hoyt, P. G., and French, D. D. 1991. Interactive effects of sodium zeolite-A and copper in growing swine: growth, and bone and tissue mineral concentrations. *Journal of Animal Science* 69: 726–733.

- Wild, C. P. 2007. Aflatoxin exposure in low and middle income countries: the critical interface of agriculture and health. *Food and Nutrition Bulletin* 28: S372–S380.
- Wild, C. P. and Gong, Y. Y. 2010. Mycotoxins and human disease: a largely ignored global health issue. *Carcinogenesis* 31: 71–82.
- Williams, D. L., Mueller, A., and Browder, W. 1996. Glucan-based macrophage stimulators. *Clinical Immunotherapy* 5: 392–399.
- Wu, Q. H., Dohnal, V., Huang, L. L., Kuca, K., Wang, X., Chen, G. Y., and Yuan, Z. H. 2011. Metabolic pathways of ochratoxin A. *Current Drug Metabolism* 12: 1–10.
- Yamamoto, K., Tsubouchi, H., Moriyama, S., and Sakabe, Y. 1974. A study on toxicity test of mycotoxins on the brine shrimp (*Artemia salina*). *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* 15(1): 11–17.
- Yiannikouris, A., Francois, J., Poughon, L., Dussap, C. G., Bertin, G., Jeminet, G., and Jouany, J. P. 2004. Adsorption of zearalenone by β -d-glucans in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Journal of Food Protection* 67: 1195–1200.
- Zaghini, A., Simioli, M., Roncada, P., and Rizzi, L. 2007. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* and esterified glucomannan on residues of Ochratoxin A in kidney, muscle and blood of laying hens. *Italian Journal of Animal Science* 6(Supplement 1): 737–739.
- Zhang, A. W., Lee, B. D., Lee, S. K., Lee, K. W., An, G. H., Song, K. B., and Lee, C. H. 2005. Effects of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) cell components on growth performance, meat quality, and ileal mucosa development of broiler chicks. *Poultry Science* 84: 1015–1021.
- Zlotnik, H., Fernandez, M. P., Bowers, B., and Cabib, E. 1984. *Saccharomyces cerevisiae* mannoproteins form an external cell wall layer that determines wall porosity. *Journal of Bacteriology* 159: 1018–1026.
- Zopf, D. and Roth, S. 1996. Oligosaccharide anti-infective agents. *The Lancet* 347: 1017–1021.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

รูปภาพ



รูปที่ ก1 การเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* ใน Potato dextrose broth บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C
เขย่าความเร็ว 100 รอบต่อนาทีด้วยเครื่อง Incubator shaker



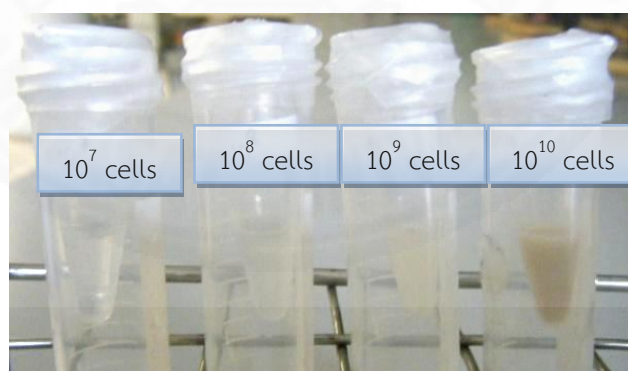
รูปที่ ก2 อุปกรณ์การวัดค่าความขุ่นของเชื้อ *S. cerevisiae* ที่เพาะเลี้ยงใน Potato dextrose broth
ด้วยเครื่อง spectrophotometer



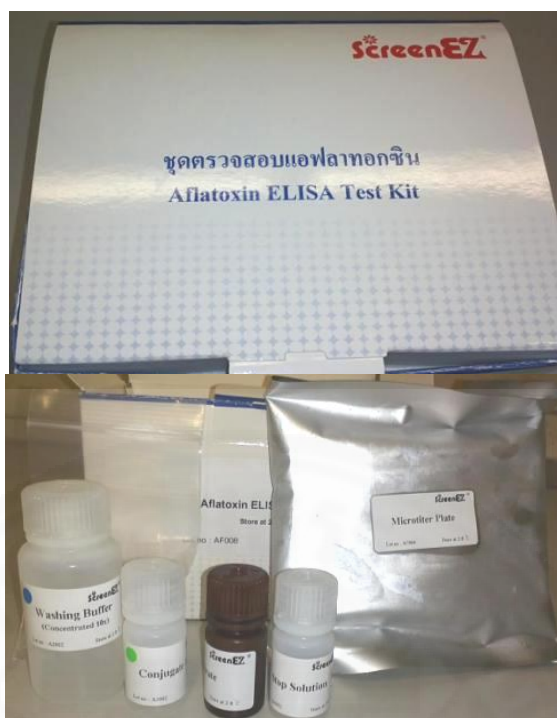
รูปที่ ก3 อุปกรณ์กรองและล้างเก็บเซลล์ *S. cerevisiae*



รูปที่ ก4 การเจือจางและนับจำนวนเซลล์ด้วย Hemocytometer



รูปที่ ก5 สารผสม cell suspension กับสารมาตรฐาน aflatoxin B₁ และ
สารมาตรฐาน ochratoxin A ใน eppendorps



รูปที่ ก6 ชุดทดสอบ Aflatoxin ELISA Test kit (ScreenEZ®)



รูปที่ ก7 ชุดทดสอบ RIDASCREEN® FAST Ochratoxin A



รูปที่ ๓๘ ขวด Mini Uniprep Syringeless filter สำหรับกรองและบรรจุสารสำหรับการฉีด HPLC



รูปที่ ๓๙ เครื่องวิเคราะห์ HPLC Agilent 1100 Series

กลุ่มที่เติมสารละลาย PBS (pH 7.4)	กลุ่มที่ผ่านสภาวะจำลองทางเดินอาหาร
	

รูปที่ ก10 สารที่ได้จากการกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.4 ในการทดลองข้อ 3.4.6 การทดสอบประสิทธิภาพ *S. cerevisiae* ดูดซับสารพิษ aflatoxin B₁ และ ochratoxin A ในสภาวะจำลองทางเดินอาหาร



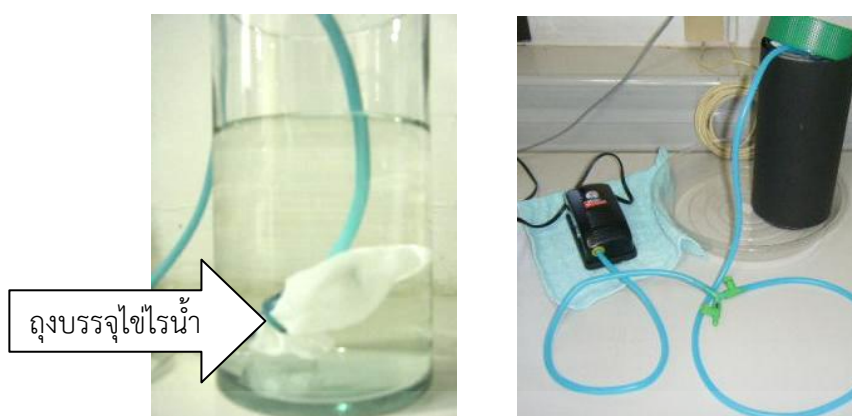
รูปที่ ก11 (1) การปล่อยสารผสมผ่าน Immunoaffinity column
(2) การ elute สารพิษออกจาก Immunoaffinity column โดยใช้ methanol



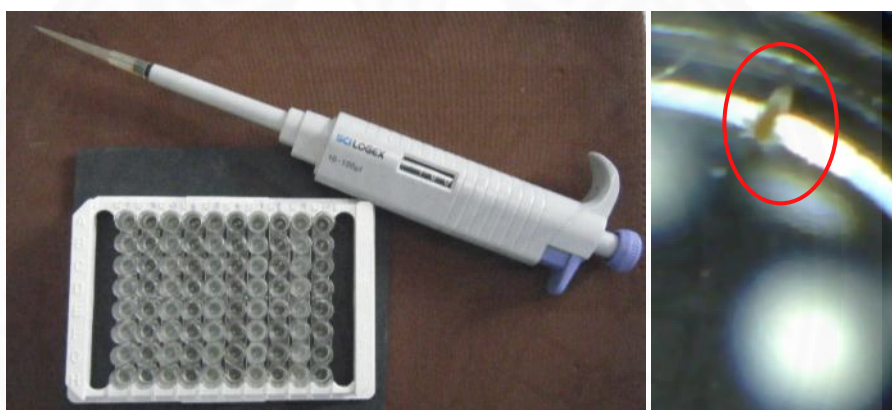
รูปที่ ก12 อุปกรณ์การเตรียมน้ำเค็มสำหรับเพาะอาร์ทีเมียและไซอาร์ทีเมีย



รูปที่ ก13 อาหารไร้น้ำนางฟ้า ไซไร้น้ำนางฟ้าไทย และถุงผ้าบรรจุไซ



รูปที่ ก14 การเพาะเลี้ยงไร้น้ำนางฟ้าไทย



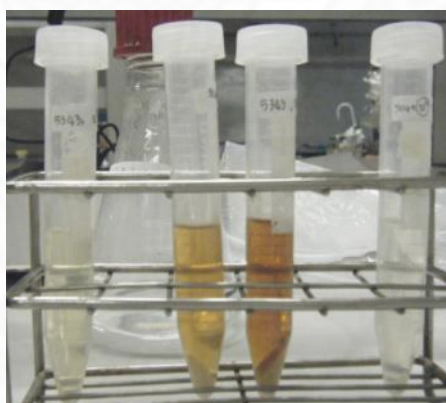
รูปที่ ก15 microtiterplate ในการทดสอบอาร์ทีเมียและอาร์ทีเมียอายุไม่เกิน 1 วัน (วงกลมสีแดง)



รูปที่ ก16 การทดสอบสถานะเบื้องต้นที่ไร้น้ำนางฟ้ารอดชีวิตได้



รูปที่ ก17 กล้องจุลทรรศน์ดิจิทัลที่ใช้ในการดูพฤติกรรมอาร์ทีเมีย



รูปที่ ก18 สารสกัด β -glucan จากเซลล์ *S. cerevisiae* โดยการต้มด้วยต่าง



รูปที่ ก19 ชุดทดสอบ EnzytecTM Color Gluca Test[®] และการตรวจวัดปริมาณ β -glucan ด้วย spectrophotometer

ภาคผนวก ข

ผลการทดลอง

ตาราง ข1 ผลการวิเคราะห์ความเข้มข้น AFB₁ ใน PBS (pH 7.4) หลังจากนำไปบ่มกับ *S. cerevisiae* อบแห้งที่อุณหภูมิ 40 °C นาน 4 ชั่วโมง (การทดลอง 3.2.5)

กลุ่ม ที่	กลุ่มทดลอง	ความเข้มข้น AFB ₁ (พีพีบี) (mean±S.D.)		เปอร์เซ็นต์การลดลงของ สารพิษ AFB ₁	
		ELISA	HPLC	ELISA	HPLC
1	Negative control	0	0	-	-
2	Positive control	102.46±8.9	93.69±5.76	-	-
3	<i>S. cerevisiae</i> TISTR 5013 (cells/mL.)	10 ⁷	100.86±8.43	92.30±5.49	1.54±0.37
4		10 ⁸	94.31±7.59	86.59±5.62	7.90±1.87
5		10 ⁹	72.72±7.32	63.21±4.87	29.09±1.08
6		10 ¹⁰	51.15±6.27	47.14±7.25	50.19±1.88
7	<i>S. cerevisiae</i> TISTR 5049 (cells/mL.)	10 ⁷	101.65±8.81	92.88±5.67	0.79±0.03
8		10 ⁸	86.76±7.93	79.40±4.13	15.35±0.41
9		10 ⁹	73.44±7.19	66.14±4.74	28.37±1.02
10		10 ¹⁰	51.84±5.53	47.89±3.54	49.40±3.18
11	<i>S. cerevisiae</i> TISTR 5059 (cells/mL.)	10 ⁷	97.28±8.53	88.99±5.49	5.06±0.09
12		10 ⁸	86.88±7.02	80.24±3.95	15.17±0.81
13		10 ⁹	75.54±7.24	69.65±3.97	26.31±1.09
14		10 ¹⁰	65.92±4.42	59.36±4.12	35.58±1.16
15	<i>S. cerevisiae</i> TISTR 5343 (cells/mL.)	10 ⁷	101.34±8.70	92.68±5.72	1.09±0.11
16		10 ⁸	89.13±5.98	81.38±3.30	12.91±1.91
17		10 ⁹	83.31±7.51	74.72±4.36	18.69±1.97
18		10 ¹⁰	65.84±6.24	61.42±2.39	35.76±1.39

ตาราง ข2 ผลการวิเคราะห์ความเข้มข้น OTA ใน PBS (pH 7.4) หลังจากนำไปหมักกับ *S. cerevisiae* อบแห้งที่อุณหภูมิ 40 °C นาน 4 ชั่วโมง (การทดลอง 3.2.5)

กลุ่ม ที่	กลุ่มทดลอง	ความเข้มข้น OTA (พีพีบี) (mean±S.D.)		เปอร์เซ็นต์การลดลงของ สารพิษ OTA		
		ELISA	HPLC	ELISA	HPLC	
1	Negative control	0		-	-	
2	Positive control	99.75±2.73		-	-	
3	<i>S. cerevisiae</i> TISTR 5013 (cells/ml.)	10 ⁷	95.91±2.44	91.56±2.40	3.84±0.26	3.87±0.58
4		10 ⁸	88.32±1.92	85.40±1.97	11.44±0.49	10.33±0.42
5		10 ⁹	68.26±3.15	67.34±0.87	31.59±1.52	29.28±0.51
6		10 ¹⁰	22.53±1.01	22.48±1.17	77.41±1.09	76.41±0.76
7	<i>S. cerevisiae</i> TISTR 5049 (cells/ml.)	10 ⁷	96.80±2.67	92.72±1.67	2.96±0.05	2.64±0.21
8		10 ⁸	92.19±2.60	88.50±0.98	7.57±0.45	7.07±0.88
9		10 ⁹	70.43±3.00	66.85±1.38	29.41±1.68	29.80±1.05
10		10 ¹⁰	23.35±3.49	21.59±1.55	76.63±3.03	77.32±1.61
11	<i>S. cerevisiae</i> TISTR 5059 (cells/ml.)	10 ⁷	96.76±2.51	92.48±1.90	2.99±0.17	2.90±0.23
12		10 ⁸	89.15±0.81	85.09±2.49	10.60±1.76	10.67±0.81
13		10 ⁹	85.24±2.98	79.87±2.85	14.53±2.73	16.16±1.34
14		10 ¹⁰	32.72±1.85	34.70±2.70	67.21±1.09	63.59±2.10
15	<i>S. cerevisiae</i> TISTR 5343 (cells/ml.)	10 ⁷	94.25±2.17	89.92±2.50	5.50±0.46	5.59±0.79
16		10 ⁸	91.15±2.56	87.35±1.27	8.62±0.57	8.27±0.65
17		10 ⁹	73.33±3.02	70.78±0.19	26.50±1.18	25.66±1.33
18		10 ¹⁰	28.26±1.61	27.76±1.22	71.68±1.00	70.85±1.30

ตาราง ข3 ผลการวิเคราะห์ความเข้มข้น AFB₁ ใน PBS (pH 7.4) หลังจากนำไปบ่มกับ *S. cerevisiae* TISTR 5013 หรือ TISTR 5049 ที่อุณหภูมิ 40 °C นาน 4 ชั่วโมง และนำมาวิเคราะห์ความเข้มข้นสารพิษใน PBS ด้วยเทคนิค ELISA (การทดลอง 3.2.6)

กลุ่มที่	กลุ่มทดลอง		ความเข้มข้น AFB ₁ (พีพี) (mean±S.D.)	
			PBS มี AFB ₁	เปอร์เซ็นต์การลดลงของสารพิษ
1	Negative control		0	-
2	Positive control		100.58±0.73	-
3	<i>S. cerevisiae</i> TISTR 5013 (cells/ml.)	10 ⁷	99.03±0.66	1.55±0.51
4		10 ⁸	88.76±1.14	11.75±1.55
5		10 ⁹	72.92±0.85	27.5±1.27
6		10 ¹⁰	36.10±1.63	64.10±1.88
7	<i>S. cerevisiae</i> TISTR 5049 (cells/ml.)	10 ⁷	99.33±0.66	1.25±0.09
8		10 ⁸	84.72±0.66	15.77±1.11
9		10 ⁹	71.02±1.01	29.38±1.32
10		10 ¹⁰	39.61±0.29	60.62±0.28

ตาราง ข4 ผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นของ AFB₁ ด้วยเทคนิค ELISA ในการทดสอบประสิทธิภาพการดูดซับสารพิษของเซลล์ *S. cerevisiae* TISTR 5013 ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำแรงดันสูง โดยดำเนินการทดลองภายใต้สภาวะจำลองทางเดินอาหาร (การทดลอง 3.4.6)

กลุ่มที่	กลุ่มทดลอง	เซลล์ <i>S. cerevisiae</i> ในอาหารไก่เนื้อ (cells/g.)	สารละลาย	ความเข้มข้น AFB ₁ ในของเหลว (พีพี) (mean±S.D.)	เปอร์เซ็นต์การ ลดลงของ สารพิษ (mean±S.D.)
1	Negative control I	0	MeOH	0	-
2	Positive control I	0	MeOH	7.72±0.11	-
3	Negative control II	0	PBS	0	-
4	Positive control II	0	PBS	4.53±0.11	-
5	Experiment I	10 ⁸	PBS	3.41±0.10	24.87±0.53
6	Experiment III	10 ⁹	PBS	3.26±0.17	28.15±3.04
7	Experiment V	10 ¹⁰	PBS	2.65±0.11	41.51±1.39
8	Negative control III	0	GI	0	-
9	Positive control III	0	GI	2.7±0.05	-
10	Experiment II	10 ⁸	GI	2.44±0.06	9.87±0.76
11	Experiment IV	10 ⁹	GI	1.82±0.17	32.49±7.12
12	Experiment VI	10 ¹⁰	GI	1.53±0.03	43.27±1.54

(MeOH คือ สารละลาย 70%methanol, PBS คือ phosphate buffer saline (pH 7.4) และ GI คือ สารผสมจำลองสภาวะทางเดินอาหารไก่)

ตาราง ข5 ผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นของ OTA ด้วยเทคนิค ELISA ในการทดสอบประสิทธิภาพการดูดซับสารพิษของเซลล์ *S. cerevisiae* TISTR 5013 ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำแรงดันสูงมาแล้วโดยดำเนินการทดลองภายใต้สภาวะจำลองทางเดินอาหาร (การทดลอง 3.4.6)

กลุ่มที่	กลุ่มทดลอง	เซลล์ <i>S. cerevisiae</i> ในอาหารไก่เนื้อ (cells/g.)	สารละลาย	ความเข้มข้น OTA ในของเหลว (พีพี) (mean±S.D.)	เปอร์เซ็นต์ การลดลงของ สารพิษ (mean±S.D.)
1	Negative control I	0	MeOH	0	-
2	Positive control I	0	MeOH	6.42±0.08	-
3	Negative control II	0	PBS	0	-
4	Positive control II	0	PBS	4.22±0.23	-
5	Experiment I	10 ⁸	PBS	2.87±0.23	32.03±2.36
6	Experiment III	10 ⁹	PBS	2.52±0.04	40.12±2.30
7	Experiment V	10 ¹⁰	PBS	1.62±0.06	61.45±1.90
8	Negative control III	0	GI	0	-
9	Positive control III	0	GI	2.61±0.22	-
10	Experiment II	10 ⁸	GI	2.45±0.10	5.92±4.21
11	Experiment IV	10 ⁹	GI	1.52±0.04	41.60±3.33
12	Experiment VI	10 ¹⁰	GI	1.38±0.1	46.84±2.43

(MeOH คือ สารละลาย 70% methanol, PBS คือ phosphate buffer saline (pH 7.4) และ GI คือ สารผสมจำลองสภาวะทางเดินอาหารไก่)

ตาราง ข6 ผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นของ AFB₁ ด้วยเทคนิค HPLC ในการทดสอบประสิทธิภาพการดูดซับสารพิษของเซลล์ *S. cerevisiae* TISTR 5013 ที่ผ่านการนิ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำแรงดันสูงมาแล้วโดยดำเนินการทดลองภายใต้สภาวะจำลองทางเดินอาหาร (การทดลอง 3.4.6)

กลุ่มที่	กลุ่มทดลอง	เซลล์ <i>S. cerevisiae</i> ในอาหารไก่เนื้อ (cells/g.)	สารละลาย	ความเข้มข้น AFB ₁ ในของเหลว (พีพีบี)	เปอร์เซ็นต์ การลดลง ของสารพิษ
1	Negative control I	0	MeOH	0	-
2	Positive control I	0	MeOH	7.59	-
3	Negative control II	0	PBS	0	-
4	Positive control II	0	PBS	4.28	-
5	Experiment I	10 ⁸	PBS	3.19	25.47
6	Experiment III	10 ⁹	PBS	3.15	26.40
7	Experiment V	10 ¹⁰	PBS	2.46	42.52
8	Negative control III	0	GI	0	-
9	Positive control III	0	GI	2.68	-
10	Experiment II	10 ⁸	GI	2.39	10.82
11	Experiment IV	10 ⁹	GI	1.88	29.85
12	Experiment VI	10 ¹⁰	GI	1.52	43.28

(MeOH คือ สารละลาย 70%methanol, PBS คือ phosphate buffer saline (pH 7.4) และ GI คือ สารผสมจำลองสภาวะทางเดินอาหารไก่)

ตาราง ข7 ผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นของ OTA ด้วยเทคนิค HPLC ในการทดสอบประสิทธิภาพการดูดซับสารพิษของเซลล์ *S. cerevisiae* TISTR 5013 ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำแรงดันสูงมาแล้ว โดยดำเนินการทดลองภายใต้สภาวะจำลองทางเดินอาหาร (การทดลอง 3.4.6)

กลุ่มที่	กลุ่มทดลอง	เซลล์ <i>S. cerevisiae</i> ในอาหารไก่เนื้อ (cells/g.)	สารละลาย	ความเข้มข้น OTA ในของเหลว (พีพีบี)	เปอร์เซ็นต์ การลดลง ของสารพิษ
1	Negative control I	0	MeOH	0	-
2	Positive control I	0	MeOH	6.33	-
3	Negative control II	0	PBS	0	-
4	Positive control II	0	PBS	4.1	-
5	Experiment I	10^8	PBS	2.96	27.80
6	Experiment III	10^9	PBS	2.49	39.27
7	Experiment V	10^{10}	PBS	1.68	59.02
8	Negative control III	0	GI	0	-
9	Positive control III	0	GI	2.55	-
10	Experiment II	10^8	GI	2.33	8.63
11	Experiment IV	10^9	GI	1.76	30.98
12	Experiment VI	10^{10}	GI	1.38	45.88

(MeOH คือ สารละลาย 70%methanol, PBS คือ phosphate buffer saline (pH 7.4) และ GI คือ สารผสมจำลองสภาวะทางเดินอาหารไก่)

ภาคผนวก ค

ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ

ตาราง ค1 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติเปอร์เซ็นต์การลดลงของสารพิษ AFB₁ ใน PBS (pH 7.4)

หลังจากนำไปหมักกับ *S. cerevisiae* ที่อุณหภูมิ 40 °C นาน 4 ชั่วโมงและ
นำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ELISA

Dependent Variable: AFB1REDU

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	11952.967 ^a	17	703.116	341.262	.000
Intercept	20815.421	1	20815.421	10102.912	.000
STRAIN	11947.327	15	796.488	386.581	.000
REP	5.640	2	2.820	1.369	.270
Error	61.810	30	2.060		
Total	32830.197	48			
Corrected Total	12014.777	47			

^a. R Squared = .995 (Adjusted R Squared = .992)

ตาราง ค2 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติเปอร์เซ็นต์การลดลงของสารพิษ AFB₁ ใน PBS (pH 7.4)

หลังจากนำไปหมักกับ *S. cerevisiae* ที่อุณหภูมิ 40 °C นาน 4 ชั่วโมงและ
นำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC

Dependent Variable: AFB1REDU

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	12064.503 ^a	17	709.677	157.517	.000
Intercept	21173.880	1	21173.880	4699.671	.000
STRAIN	12044.576	15	802.972	178.224	.000
REP	19.927	2	9.964	2.212	.127
Error	135.162	30	4.505		
Total	33373.546	48			
Corrected Total	12199.665	47			

^a. R Squared = .989 (Adjusted R Squared = .983)

ตาราง ค3 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติเปอร์เซ็นต์การลดลงของสารพิษ OTA ใน PBS (pH 7.4)

หลังจากนำไปหมักกับ *S. cerevisiae* ที่อุณหภูมิ 40 °C นาน 4 ชั่วโมงและ
นำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ELISA

Dependent Variable: OTAREduc

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	36491.539 ^a	17	2146.561	1162.384	.000
Intercept	37713.804	1	37713.804	20422.400	.000
STRAIN	36485.510	15	2432.367	1317.151	.000
REP	6.029	2	3.014	1.632	.212
Error	55.401	30	1.847		
Total	74260.744	48			
Corrected Total	36546.940	47			

a. R Squared = .998 (Adjusted R Squared = .998)

ตาราง ค4 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติเปอร์เซ็นต์การลดลงของสารพิษ OTA ใน PBS (pH 7.4)

หลังจากนำไปหมักกับ *S. cerevisiae* ที่อุณหภูมิ 40 °C นาน 4 ชั่วโมงและ
นำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC

Dependent Variable: OTAREduc

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	35469.901 ^a	17	2086.465	1838.572	.000
Intercept	36366.581	1	36366.581	32045.867	.000
STRAIN	35469.278	15	2364.619	2083.678	.000
REP	.622	2	.311	.274	.762
Error	34.045	30	1.135		
Total	71870.526	48			
Corrected Total	35503.945	47			

a. R Squared = .999 (Adjusted R Squared = .998)

ตาราง ค5 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติเปอร์เซ็นต์การลดลงของสารพิษ AFB₁ ใน PBS (pH 7.4)

หลังจากนำไปหมักกับ *S. cerevisiae* TISTR 5013 หรือ TISTR 5049

ที่อุณหภูมิ 40 °C นาน 4 ชั่วโมงและนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ELISA

Dependent Variable: AFB1REDU

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	20927.638 ^a	15	1395.176	657.551	.000
Intercept	29187.576	1	29187.576	13756.207	.000
STRAIN	20420.407	7	2917.201	1374.887	.000
TOXIN	160.894	1	160.894	75.830	.000
STRAIN * TOXIN	346.337	7	49.477	23.319	.000
Error	67.897	32	2.122		
Total	50183.110	48			
Corrected Total	20995.534	47			

a. R Squared = .997 (Adjusted R Squared = .995)

ตาราง ค6 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ crude protein (กรัมต่อ 100 กรัม) ของอาหารไก่เนื้อ

Dependent Variable: NITROGEN

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	5.712 ^a	6	.952	1.569	.284
Intercept	8805.334	1	8805.334	14508.527	.000
STR	4.605	4	1.151	1.897	.216
REP	1.047	2	.524	.863	.462
Error	4.248	7	.607		
Total	9274.305	14			
Corrected Total	9.961	13			

a. R Squared = .573 (Adjusted R Squared = .208)

ตาราง ค7 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติเปอร์เซ็นต์การลดลงของสารพิษ AFB₁ หลังจากนำไปผสมกับ

S. cerevisiae TISTR 5013 ในสภาวะทดสอบที่มีอาหารไก่และสภาวะจำลอง

ทางเดินอาหาร จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ELISA

Dependent Variable: AFB1REDU

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1960.520 ^a	5	392.104	11.221	.000
Intercept	16228.693	1	16228.693	464.440	.000
CELLS	1878.968	2	939.484	26.887	.000
REP	42.013	2	21.006	.601	.564
CONDITIO	39.540	1	39.540	1.132	.308
Error	419.310	12	34.942		
Total	18608.522	18			
Corrected Total	2379.830	17			

a. R Squared = .824 (Adjusted R Squared = .750)

ตาราง ค8 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติเปอร์เซ็นต์การลดลงของสารพิษ OTA หลังจากนำไปผสมกับ

S. cerevisiae TISTR 5013 ในสภาวะทดสอบที่มีอาหารไก่และสภาวะจำลอง

ทางเดินอาหารและนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ELISA

Dependent Variable: OTARED

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	4610.503 ^a	5	922.101	17.882	.000
Intercept	25982.121	1	25982.121	503.871	.000
CELLS	3784.955	2	1892.478	36.701	.000
CONDITIO	769.758	1	769.758	14.928	.002
REP	55.790	2	27.895	.541	.596
Error	618.781	12	51.565		
Total	31211.405	18			
Corrected Total	5229.284	17			

a. R Squared = .882 (Adjusted R Squared = .832)

ตาราง ค9 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติการทดสอบความเป็นพิษด้วยอาร์ทีเมียของอาหารไก่ที่ปนเปื้อน

AFB₁ และ OTA หลังผสมกับเซลล์ *S. cerevisiae* ในสารละลาย PBS (pH 7.4)

และสภาวะจำลองทางเดินอาหาร ณ ชั่วโมงที่ 3 ของการทดลอง

Dependent Variable: SIGNDEAD

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	400.556 ^a	12	33.380	4.203	.002
Intercept	363.594	1	363.594	45.781	.000
GROUP	296.667	9	32.963	4.150	.003
SOLVENT	2.667	1	2.667	.336	.568
Error	182.667	23	7.942		
Total	1242.000	36			
Corrected Total	583.222	35			

^a. R Squared = .687 (Adjusted R Squared = .523)

ตาราง ค10 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติการทดสอบความเป็นพิษด้วยอาร์ทีเมียของอาหารไก่ที่ปนเปื้อน

AFB₁ และ OTA หลังผสมกับเซลล์ *S. cerevisiae* ใน PBS (pH 7.4)

และสภาวะจำลองทางเดินอาหาร ณ ชั่วโมงที่ 6 ของการทดลอง

Dependent Variable: SIGNDEAD

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1585.139 ^a	12	132.095	7.225	.000
Intercept	1944.377	1	1944.377	106.351	.000
GROUP	1362.033	9	151.337	8.278	.000
SOLVENT	13.500	1	13.500	.738	.399
Error	420.500	23	18.283		
Total	6209.000	36			
Corrected Total	2005.639	35			

^a. R Squared = .790 (Adjusted R Squared = .681)

ตาราง ค11 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติการทดสอบความเป็นพิษด้วยอาร์ทีเมียของอาหารไก่ที่ปนเปื้อน

AFB₁ และ OTA หลังผสมกับเซลล์ *S. cerevisiae* ใน PBS (pH 7.4)

และสภาวะจำลองทางเดินอาหาร ณ ชั่วโมงที่ 9 ของการทดลอง

Dependent Variable: SIGNDEAD

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	4173.806 ^a	12	347.817	12.648	.000
Intercept	4637.681	1	4637.681	168.643	.000
GROUP	4059.767	9	451.085	16.403	.000
SOLVENT	104.167	1	104.167	3.788	.064
Error	632.500	23	27.500		
Total	17613.000	36			
Corrected Total	4806.306	35			

a. R Squared = .868 (Adjusted R Squared = .800)

ตาราง ค12 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติการทดสอบความเป็นพิษด้วยอาร์ทีเมียของอาหารไก่ที่ปนเปื้อน

AFB₁ และ OTA หลังผสมกับเซลล์ *S. cerevisiae* ใน PBS (pH 7.4)

และสภาวะจำลองทางเดินอาหาร ณ ชั่วโมงที่ 12 ของการทดลอง

Dependent Variable: SIGNDEAD

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	6421.389 ^a	12	535.116	17.824	.000
Intercept	10141.225	1	10141.225	337.796	.000
GROUP	5899.367	9	655.485	21.834	.000
SOLVENT	.167	1	.167	.006	.941
Error	690.500	23	30.022		
Total	29512.000	36			
Corrected Total	7111.889	35			

a. R Squared = .903 (Adjusted R Squared = .852)

ตาราง ค13 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติปริมาณ β -glucan ของเซลล์ *S. cerevisiae*

Dependent Variable: BGLUCAN

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	173180.833 ^a	5	34636.167	366.413	.000
Intercept	3207468.000	1	3207468.000	33931.486	.000
STRAIN	173107.333	3	57702.444	610.428	.000
REP	73.500	2	36.750	.389	.694
Error	567.167	6	94.528		
Total	3381216.000	12			
Corrected Total	173748.000	11			

a. R Squared = .997 (Adjusted R Squared = .994)

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาววราพร รัตนเสนา
วันเดือนปีเกิด	26 กันยายน 2523
วุฒิการศึกษา	ปีการศึกษา 2547: สัตวแพทยศาสตรบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ทุนการศึกษา	ปีงบประมาณ 2556: ทุนอุดหนุนจากสำนักงานกองทุน สนับสนุนการวิจัยและบริษัท ศูนย์วิทยาศาสตร์เบทาโกร จำกัด ภายใต้โครงการพัฒนานักวิจัยและงานวิจัยเพื่อ อุตสาหกรรม ปีงบประมาณ 2557 ทุนวิจัยทั่วไปสำหรับนักศึกษา ระดับบัณฑิตศึกษา กองทุนวิจัย
มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์	
ผลงานวิชาการ	วราพร รัตนเสนา และ กิ่งแก้ว เจริญพรสุข. 2558. การใช้เชื้อ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> เป็น ตัวดูดซับสารพิษอะฟลาทอกซิน ปี 1 และออกราทอกซิน เอ. วารสารวิชาการ มทร.สุวรรณ ภูมิ 3(1): 19-27.
ประสบการณ์ทำงาน	2558- ปัจจุบัน: ที่ปรึกษาระบบคุณภาพ บริษัท คิว คอมแพค จำกัด 2549 -2554 หัวหน้าส่วน: แผนกประกันคุณภาพ บริษัทปี ฟู้ดส์โปรดักส์ อินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด 2547-2549: พนักงานขายเวชภัณฑ์สัตว์ บริษัทเจริญ โมคภัณฑ์ อินเธิกซ์ จำกัด 2546-2547: พนักงานขายเวชภัณฑ์สัตว์ บริษัท เอ็ม จี ฟาร์มา จำกัด