การเสริมยีสต์ในอาหารเพื่อลดสารพิษอะฟลาทอกซิน และเพิ่มการย่อยได้ของอาหารโคนมในระบบหลอดทดลอง

Supplemental isolated yeast for decrease aflatoxin and improve dairy cattle feed digestibility in in vitro system

มาลินี อินทะนู[1], วิโรจน์ ภัทรจินดา[1*], มัลลิกา คงเกียรติขจร[2], ยุพิน ผาสุข[1], วิทยา สุริยาสถาพร[3] และ John K. Bernard[4]

Malinee Intanoo[1], Virote Pattarajinda[1], Mallika B. Kongkeitkajorn[2], Yupin Phasuk[1], Witaya Suriyasathaporn[3] and John K. Bernard[4]

บทคัดย่อ: การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการเสริมยีสต์ที่คัดแยกได้จากของเหลวในกระเพาะหมักของโคนมต่อการทำลายสารพิษอะฟลาทอกซินชนิดบี 1 (AFB1) และผลการย่อยได้ของอาหารโคนมในระบบหลอดทดลอง ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด 3 x 3 จัดปัจจัยการทดลองแบบแฟคทอเรียล เทียบกับกลุ่มควบคุม โดยปัจจัยการทดลองประกอบด้วยยีสต์ 3 ชนิด คือ *Kluyveromyces marxianus* CPY1 (CPY1), *K. marxianus* RSY5 (RSY5), *P. kudriavzevii* YSY2 (YSY2) และระดับของการเสริม 3 ระดับ คือ 107, 108 และ 109 CFU/mL ผลการทดลองพบว่าชนิดของยีสต์และระดับของการเสริมไม่มีอิทธิพลร่วมกันต่อการย่อยได้ของสิ่งแห้งในระบบหลอดทดลอง (P>0.05) เมื่อเสริมยีสต์ CPY1 และ RSY5 ที่ระดับ 108 CFU/mL พบว่าเพิ่มค่าการย่อยได้ของสิ่งแห้งสูงสุด (in vitro dry matter digestibility, IVDMD) เมื่อเทียบกับ YSY2 (80.71 และ 80.07 vs 77.52% ตามลำดับ, P<0.05) และค่าการย่อยได้ของ IVNDFD และ IVADFD ไม่แตกต่างกัน (P>0.05) และเมื่อพิจารณาความสามารถต่อการทำลาย AFB1 พบว่าเมื่อเสริมยีสต์ RSY5, YSY2 ที่ระดับ 107, 108, 109 CFU/mL และ ยีสต์ CPY1 ที่ระดับ 108, 109 CFU/mL ทำให้ค่าการทำลาย AFB1 สูงสุด (P<0.01) โดยหากเสริมยีสต์ที่ระดับ 109 CFU/mL ส่งผลให้ค่าการทำลาย AFB1 มากกว่า 87% โดยไม่ส่งผลกระทบเชิงลบต่อค่าการย่อยได้ของสิ่งแห้งและเยื่อใย ดังนั้นการเสริมยีสต์ *K. marxianus* และ *P. kudriavzevii* จึงเป็นแนวทางในการลดการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินจากอาหารโคนมได้

คำสำคัญ: สารพิษจากเชื้อรา, จุลินทรีย์, อาหารสัตว์

---

[1] ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น 40002
Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, Khon Kaen Thailand 40002

[2] ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น 40002
Department of Biotechnology, Faculty of Technology, Khon K aen University, Khon Kaen, Thailand 40002

[3] ภาควิชาคลินิกสัตว์บริโภค คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ.เชียงใหม่ 50100
Department of Feed Animal Clinics, Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand 50100

[4] Department of Animal and Dairy Science, The University of Georgia, Tifton, USA 31793

[*] Corresponding author: virotekku@hotmail.com

ABSTRACT: Aflatoxin B1 (AFB1) is the most prevalent mycotoxin produced by *Aspergillus flavus*. It is classified as a group 1 carcinogen and when consumed by young animals can be extremely toxic. Long-term intake of AFB1 by lactating dairy cows reduces feed efficiency and milk production. Previous research has reported that AFB1 can be degraded by certain rumen microbes. The objective of this in vitro study was to examine the effect of isolated ruminal yeast with AFB1 detoxifying potential on in vitro nutrient digestibility and AFB1 detoxification. The completely randomized design included ten treatments; including a control and three yeast isolates with AFB1 detoxification properties supplemented at three concentrations. Yeast isolates were identified as *Kluyveromyces marxianus* CPY1 (CPY1), *K. marxianus* RSY5 (RSY5), and *P. kudriavzevii* YSY2 (YSY2), and these were included at: 107, 108 or 109 CFU/mL. No interaction of inoculum concentration and yeast strain were observed for in vitro DM, IVNDFD and IVADFD (P>0.05). The IVDMD was higher (P<0.05) for CPY1 and RSY5 at 108 CFU/mL compared with that of YSY2 at the same concentration (80.71 and 80.07 vs 77.52%, respectively, P<0.05). No differences (P>0.05) were observed in NDF or ADF digestibility among treatments. Degradation of AFB1 after 48 h of incubation was maximal for: all concentrations of RSY5, YSY2 incubations containing 107, 108 and 109 CFU/mL; and CPY1 incubations containing 108 and 109 CFU/mL compared with remaining treatments (P<0.01). Results of this trial indicated that supplementing AFB1 detoxifying yeast at 109 CFU/mL degraded over 87% of AFB1 without any adverse effect on in vitro DM, NDF or ADF digestibility. These yeast isolates offer an alternative approach to reduce aflatoxins contamination in milk and dairy products.
Keywords: mycotoxins, microorganism, animals feed

บทนำ

อะฟลาทอกซิน (Aflatoxins) เป็นสารพิษจากเชื้อรา (Mycotoxins) ที่ผลิตจากเชื้อราตระกูล Aspergillus sp. (A. flavus and A. parasiticus) โดยอะฟลาทอกซินชนิดบี1, บี2, จี1 และ จี2 (AFB1, AFB2, AFG1 และ AFG2) พบในอาหารและวัตถุดิบอาหาร ส่วนอะฟลาทอกซินชนิดเอ็ม1 และ เอ็ม2 (AFM1 และ AFM2) เป็นสารเมตาบอไลท์ ของ AFB1 และ AFB2 ตามลำดับ ซึ่งพบในน้ำนมและผลิตภัณฑ์นม โดย AFB1 เป็นชนิดที่อันตรายต่อมนุษย์และสัตว์มากที่สุด (Abdallah et al., 2015; Kara and Ince, 2014) เมื่อโคนมได้รับ AFB1 เป็นเวลานานส่งผลทำให้การเคลื่อนไหวของกระเพาะหมัก ปริมาณการกินได้ อัตราการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหารและผลผลิตน้ำนมลดลง อีกทั้งยังส่งผลต่อระบบภูมิคุ้มกันและระบบสืบพันธุ์ ทำให้อัตราการผสมติดลดลง (Zain, 2011) จากการศึกษาวิจัยเพื่อหาแนวทางลดการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินในอาหารโคนมที่ผ่านมาพบว่า มีทั้งการศึกษาวิธีทางกายภาพ ทางเคมีและทางชีวภาพ โดยการใช้วิธีทางกายภาพและทางเคมียังมีข้อจำกัดต่อการนำมาใช้ เนื่องจากการใช้สารเคมีหรือสารดูดซับสารพิษในอาหารโคนม ทำให้เกิดผลกระทบเชิงลบต่อการใช้ประโยชน์ของวิตามินและแร่ธาตุในอาหารโคนม เป็นต้น (Wu et al., 2009) ทำให้แนวทางการใช้วิธีการทางชีวภาพเพื่อลดการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินในอาหารโคนมจึงนิยมมากขึ้น เนื่องจากปลอดภัยกับตัวสัตว์และสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการใช้อาหารของโคนมได้ (Jiang et al., 2018) จากการศึกษาวิจัยที่ผ่านมา ผู้วิจัยได้คัดแยกและจำแนกยีสต์ทำลาย AFB1 จากของเหลวในกระเพาะหมักของโคนม เพื่อนำมาใช้เสริมในอาหารโคนมในรูปของโปรไบโอติก (probiotic) พบว่ายีสต์ K. marxianus CPY1, K. marxianus RSY5, P. kudriavzevii YSY2 มีประสิทธิ- ภาพในการทำลาย AFB1 ใน Toxin media (Intanoo et al., 2018) ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการทำลาย AFB1 ของยีสต์ K. marxianus CPY1, K. marxianus RSY5, P. kudriavzevii YSY2 และการย่อยได้ของสิ่งแห้งในระบบหลอดทดลอง ที่จำลองสภาวะในกระเพาะหมักของโคนม เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาวิธีการทำลายสารพิษจากเชื้อราในอาหารโคนมต่อไป

วิธีการศึกษา

การศึกษาครั้งนี้ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ 3 x 3 ที่จัดปัจจัยการทดลองแบบแฟคทอเรียล เทียบกับกลุ่มควบคุม มี 10 ทรีตเมนต์ ทรีตเมนต์ละ 4 ซ้ำ โดยปัจจัยการทดลองประกอบด้วยปัจจัย A คือ ยีสต์ 3 ชนิด คือ K. marxianus CPY1 (CPY1), K. marxianus RSY5 (RSY5), P. kudriavzevii YSY2 (YSY2) และ ปัจจัย B คือ ระดับการเสริม 3 ระดับ คือ 107, 108 และ 109 CFU/mL เพื่อหาประสิทธิภาพการทำลาย AFB1 และการย่อยได้ของสิ่งแห้ง (In vitro dry matter digestibility, IVDMD) โดยใช้เครื่อง Daisy II Incubator (Ankom Technology, Fairport, NY) (Adesogan, 2005) โดยแหล่งของเหลวจากกระเพาะหมักใช้โคนมพันธุ์ Holstein Friesian น้ำหนักประมาณ 500 kg ระยะแห้งนม จำนวน 1 ตัว โดยใช้ท่อดูดของเหลวที่เชื่อมต่อกับปั๊มสุญญากาศ สอดผ่านทางปากไปยังกระเพาะหมัก เก็บตัวอย่างปริมาณ 1,000 mL (Tilley and Terry, 1963) จากนั้นเตรียม F 57 Filter bag นำไปล้างด้วย Acetone 3 - 5 นาที และทิ้งให้แห้งโดยไม่ต้องอบ ชั่งและบันทึกน้ำหนัก (W1) จากนั้นชั่งอาหาร TMR จำนวน 0.25 g/1ซ้ำ ใส่ลงใน Filter bag บันทึกน้ำหนัก (W2) ปิดผนึกปากถุงด้วยลวดความร้อน และนำ F 57 Filter bag (ถุงเปล่า) ชั่งน้ำหนักและปิดผนึกเช่นเดียวกับถุงที่ใส่ตัวอย่างอาหารเพื่อใช้เป็น Correction factor (C1) จากนั้นนำสารละลายบัฟเฟอร์จำนวน 1,600 mL (Solution A ปริมาณ 1,330 mL: 10 g/L KH_2PO_4, 0.5 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.5 g/L NaCl, 0.1 g/L $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.5 g/L urea และ Solution B ปริมาณ 266 mL: 15.0 g/L Na_2CO_3, 1.0 g/L $Na_2S \cdot 9H_2O$) ผสมลงใน Digestion jar แล้วนำไปใส่ใน Daisy II Incubator ปรับอุณหภูมิของ Digestion jar ให้คงที่ ที่อุณหภูมิ 39 0C ประมาณ 20 – 30 นาที เติม Rumen inoculum ปริมาณ 400 mL/digestion jar ร่วมกับการเติมเชื้อยีสต์ที่คัดแยกได้และสารละลาย AFB1 โดยความเข้มข้นสุดท้ายอยู่ที่ 200 ng/mL จากนั้นไล่อากาศด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นเวลา 30 วินาทีและปิดฝาให้แน่น ที่อุณหภูมิ 39±1 0C เป็นเวลา 48 ชม. เมื่อบ่มเสร็จสิ้น นำ F 57 Filter bag มาล้างให้สะอาดแล้วล้างด้วย NDF solution ที่อุณหภูมิ 90 0C เป็นเวลา 75 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 90 0C เป็นเวลา 5 นาที 2 ครั้ง แล้วแช่ด้วย Acetone เป็นเวลา 3- 5 นาที จากนั้นอบให้แห้งและบันทึกน้ำหนัก (W3) เพื่อใช้คำนวณหาค่าการย่อยได้ของวัตถุแห้ง IVDMD (%) = (100 – ((W3 – (W1 x C1)) x 100) / W2 (เมื่อ W1 = น้ำหนักถุงเริ่มต้น; W2 = น้ำหนักตัวอย่างอาหาร; W3 = น้ำหนักถุง + น้ำหนักตัวอย่างอาหารหลังบ่ม; C1 = Blank bag correction) จากนั้นนำ F 57 Filter bag ที่อบแห้งไปวิเคราะห์ปริมาณ NDF และ ADF ตามวิธีการของ Cherney et al. (2004) สำหรับการเก็บตัวอย่างเพื่อประเมินการทำลายสารพิษ AFB1 โดยเก็บตัวอย่าง Rumen fluid inoculums ในชั่วโมงที่ 0, 3, 6, 9, 12, 24 และ 48 ปริมาตร 1 ml นำมาปั่นเหวี่ยง 1,000 rpm นาน 10 นาที จากนั้นนำมาวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ AFB1 ที่เหลือโดยวิธี Enzyme-linked immunusorbent assay (ELISA) (Upadhaya et al., 2009) และนำข้อมูลมาวิเคราะห์หาค่าความแปรปรวน (Analysis of variances, ANOVA) และเปรียบเทียบค่าความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยในแต่ละกลุ่มการทดลองด้วยวิธี Duncan's new multiple rang test (DMRT) โดยใช้ SAS University edition (2015).

ผลการศึกษาและวิจารณ์

จากผลการศึกษาการเสริมยีสต์ทำลายสารพิษ AFB1 ที่ระดับแตกต่างกันในอาหาร TMR เพื่อทดสอบการย่อยได้ของสิ่งแห้งและประสิทธิภาพการทำลาย AFB1 ในระบบหลอดทดลอง พบว่าชนิดของยีสต์และระดับของการเสริมไม่มีอิทธิพลร่วมกันต่อค่าการย่อยได้ของสิ่งแห้ง ($P>0.05$) โดยเมื่อเสริมยีสต์ CPY1 และ RSY5 ที่ระดับ 108 CFU/mL พบว่าเพิ่มค่าการย่อยได้ของสิ่งแห้งสูงสุด เมื่อเทียบกับ YSY2 (80.71 and 80.07 vs 77.52%, Respectively, $P<0.05$) ซึ่งการเสริมยีสต์ที่ระดับ 108 CFU/mL นั้น ทำให้ค่าการย่อยได้ของสิ่งแห้งเพิ่มขึ้นถึง 6 % เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($P<0.05$) และค่าการย่อยได้ของ IVNDFD และ IVADFD ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) (Table 1) และเมื่อพิจารณาความสามารถการ

ทำลาย AFB1 พบว่า ชนิดของยีสต์และระดับของการเสริมมีอิทธิพลร่วมกันต่อค่าการทำลาย AFB1 อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (P<0.01) เมื่อเสริมยีสต์ RSY5, YSY2 ที่ระดับ 107, 108, 109 CFU/mL และ ยีสต์ CPY1 ที่ระดับ 108, 109 CFU/mL ทำให้ค่าการทำลาย AFB1 สูงสุด (P<0.01) โดยหากเสริมยีสต์ที่ระดับ 109 CFU/mL ส่งผลให้ประสิทธิภาพการทำลาย AFB1 มากกว่า 87% ซึ่งมีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น 48.61 % เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ภายใน 48 ชม. (P<0.01) โดยไม่ส่งผลกระทบเชิงลบต่อค่าการย่อยได้ของสิ่งแห้งและเยื่อใย (Table 2) จากการรายงานของ Caroline et al. (2010) การเสริมยีสต์ Saccharomyces cerevisiae จะช่วยกระตุ้นการทำงานและการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในกระเพาะหมัก ทำให้ค่าการย่อยได้ของสิ่งแห้งเพิ่มขึ้นถึง 33.4% รวมทั้งยีสต์ยังเป็นแหล่งโปรตีนให้แก่จุลินทรีย์ในกระเพาะหมัก นอกจากนี้ยีสต์ยังสามารถกระตุ้นกระบวนการหมักย่อยในกระเพาะหมัก โดยกระตุ้นการเจริญเติบโตและการทำงานของแบคทีเรียในกลุ่มย่อยเยื่อใย (Fibrolytic bacteria) (Ando et al., 2005) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Tang et al. (2008) พบว่าการเสริมยีสต์ในอาหารโคนม ส่งผลให้ค่าการย่อยได้ของสิ่งแห้งเพิ่มขึ้นโดยไปกระตุ้นการเจริญเติบโตของโปรโตซัวและ cellulolytic bacteria อีกทั้งการศึกษาประสิทธิภาพของยีสต์ต่อการทำลายสารพิษ AFB1 พบว่าเมื่อเสริม S. cerevisiae ที่ระดับ 107 CFU/mL สามารถทำลายสารพิษ AFB1 ได้ถึง 41 - 94% (Dogi et al., 2011)

สรุปผลการศึกษา

การศึกษาสรุปได้ว่าชนิดของยีสต์และระดับของการเสริมไม่มีอิทธิพลร่วมกันต่อค่าการย่อยได้ของสิ่งแห้ง แต่มีอิทธิพลร่วมกันต่อประสิทธิภาพการทำลาย AFB1 ในระบบหลอดทดลอง โดยเมื่อเสริมยีสต์ K. marxianus และ P. kudriavzevii ที่ระดับ 108 CFU/mL นั้น ทำให้ค่าการย่อยได้ของสิ่งแห้งเพิ่มขึ้นถึง 6 % และหากเสริมยีสต์ K. marxianus และ P. kudriavzevii ที่ระดับ 109 CFU/mL ส่งผลให้ประสิทธิภาพการทำลาย AFB1 เพิ่มขึ้น 48.61 % ภายใน 48 ชม. ดังนั้นการเสริมยีสต์ K. marxianus และ P. kudriavzevii ในอาหารโคนมจึงเป็นแนวทางสำคัญในการเพิ่มประสิทธิภาพการใช้อาหารของโคนม และลดการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินในอาหารโคนม น้ำนม และผลิตภัณฑ์นมได้

Table 1 The effects of yeast isolates and inoculant concentration (CFU/mL) on IVDMD, IVNDFD and IVADFD in TMR diets

Item[1]		Digestibility[2], %		
I	L	IVDMD	IVNDFD	IVADFD
K. marxianus CPY1	10^7	77.31[ab]	62.97	45.67
	10^8	80.71[a]	62.99	45.87
	10^9	77.16[ab]	64.75	45.21
K. marxianus RSY5	10^7	77.25[ab]	63.71	46.78
	10^8	80.07[ab]	63.41	46.21
	10^9	76.96[b]	64.24	47.33
P. kudriavzevii YSY2	10^7	78.95[ab]	64.45	45.03
	10^8	77.52[ab]	65.39	45.43
	10^9	76.69[b]	65.53	46.09
	Control	76.20[ab]	63.47	45.85
	SEM	1.09	1.41	0.75
	P-value[3]			
	I	ns	ns	ns
	L	*	ns	ns
	I*L	ns	ns	ns

[a-b] Means within a column with different superscripts differ (P<0.05); [1] I = Isolates, L = concentration inoculums level (CFU/mL); [2] IVDMD = *in vitro* dry matter digestibility, IVNDFD = *in vitro* neutral detergent fiber digestibility, IVADFD = *in vitro* acid detergent fiber digestibility; [3] * = Significant at P<0.05, ns = no significant at P>0.05; Control = Non-supplementation culture; SEM = Standard error of mean.

Table 2 The effects of yeast and bacteria isolates from ruminal fluids on aflatoxin B_1 detoxification at different concentrations (CFU/mL)

Item[1]		Aflatoxin B_1 detoxification, %					
I	L	3h	6h	9h	12h	24h	48h
K. marxianus CPY1	10^7	21.62^{d}	37.54^{d}	68.49^{d}	71.63^{f}	79.80^{d}	77.91^{d}
	10^8	25.19^{b}	42.88^{b}	75.40^{c}	78.07^{d}	85.92^{b}	84.25^{c}
	10^9	29.79^{a}	44.87^{a}	78.12^{b}	84.98^{b}	89.06^{a}	87.34^{b}
K. marxianus RSY5	10^7	19.95^{e}	35.55^{e}	77.23^{b}	79.38^{d}	82.78^{c}	84.56^{c}
	10^8	22.88^{c}	37.44^{d}	79.80^{b}	83.57^{b}	86.50^{b}	87.02^{b}
	10^9	26.39^{b}	39.06^{c}	83.15^{a}	85.87^{b}	87.39^{b}	88.17^{b}
P. kudriavzevii YSY2	10^7	11.15^{h}	34.24^{e}	70.37^{d}	75.40^{e}	79.95^{d}	82.94^{c}
	10^8	14.45^{g}	38.80^{c}	74.93^{c}	81.37^{c}	84.98^{b}	86.24^{b}
	10^9	17.17^{f}	41.73^{b}	83.36^{a}	87.23^{a}	89.06^{a}	90.58^{a}
	Control	2.88^{i}	18.81^{f}	46.55^{e}	49.69^{g}	51.94^{e}	60.95^{e}
	SEM	0.15	0.12	0.18	0.20	0.13	0.11
	P-value[2]						
	I	**	**	**	**	**	**
	L	**	**	**	**	**	**
	I*L	**	**	**	**	**	**

[a-g] Means within a column with different superscripts differ (P<0.05); [1] I = Isolates, L = concentration inoculums level (CFU/mL); 2 ** = Highly significant at P<0.01; Control = Non-supplementation culture; SEM = Standard error of mean.

คำขอบคุณ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณโครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก (คปก.) ภายใต้สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และกลุ่มวิจัยโคนมทนร้อน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่สนับสนุนแหล่งทุนการศึกษาวิจัย สถานีทดลองและฝึกอบรมเกษตรกรรมร้อยเอ็ด ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ และภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น สถานที่ศึกษาวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

Abdallah, M. F., G. Girgin, and T. Baydar. 2015. Occurrence, Prevention and Limitation of Mycotoxins in Feeds. Anim. Feed Sci. Technol. 15:471–490.

Adesogan, A.T. 2005. Effect of bag type on the apparent digestibility of feeds in ANKOM Daisy II incubators. Anim. Feed Sci. Technol. 119:333¬–344.

Ando, S., Y. Nishiguchi, K. Hayasaka, Y. Yoshihara, J. Takahashi, and H. Iefuji. 2005. Effects of strains of Saccharomyces cerevisiae and incubation conditions on the in vitro degradability of yeast and roughage. Asian-Aust J. Anim. Sci. 18:354–357.

Caroline, C. W., T. Awano, S. Ando, S. A. Abdulrazak, and T. Ichinohe. 2010. Effect of yeast supplementation on in vitro ruminal degradability of selected browse species from Kenya. J. Food Agric. Environ. 8(2):553–557.

Cherney, D. J. R., J. H. Cherney, and L. E. Chase. 2004. Lactation performance of Holstein cows fed rescue, orchard grass, or alfalfa silage. J. Dairy Sci. 87:2268–2276.

Dogi, C. A., R. Armando, R. Ludueña, A. de Moreno de LeBlanc, C. A. R. Rosa, A. Dalcero, and L. Cavaglieri. 2011. Saccharomyces cerevisiae strains

retain their viability and aflatoxin B1 binding ability under gastrointestinal conditions and improve ruminal fermentation. Food Addit. Contam. 28:1705–1711.

Intanoo, M., M. B. Kongkeitkajorn, V. Pattarajinda, J. K. Bernard, T. R. Callaway, W. Suriyasathaporn, and Y. Phasuk. 2018. Isolation and screening of aflatoxin-detoxifying yeast and bacteria from ruminal fluids to reduce aflatoxin B1 contamination in dairy cattle feed. J. Appl. Microbiol. 125:1603–1613.

Jiang, Y., I. M. Ogunade, D. H. Kim, X. Li, A. A. Pech-Cervantes, K. G. Arriola, A. S. Oliveira, J. P. Driver, L. F. Ferraretto, C. R. Staples, D. Vyas, and A. T. Adesogan. 2018. Effect of adding clay with or without a Saccharomyces cerevisiae fermentation product on the health and performance of lactating dairy cows challenged with dietary aflatoxin B1. J. Dairy Sci. 101:3008–3020.

Kara, R., and S. Ince. 2014. Aflatoxin M1 in buffalo and cow milk in Afyonkarahisar, Turkey. Food Addit. Contam. 1:7–10.

SAS. 2015. SAS University edition: Statistics, Version 6 ed. SAS Inst., Inc., Cary, NC.

Tang, S. X., G. O. Tayo, Z. L. Tan, Z. H. Sun, L. X. Shen, C. S. Zhou, W. J. Xiao, G. P. Ren, X. F. Han, and S. B. Shen. 2008. Effects of yeast culture and fibrolytic enzyme supplementation on in vitro fermentation characteristics of low-quality cereal straws. J. Anim. Sci. 86:1164–1172.

Tilley, J. M. A., and R. A. Terry. 1963. A two – stage technique for the in vitro digestion of forage crops. J. Brit. Grassland Soc. 18:104–111.

Wu, Q., A. Jezkova, Z. Yuan, L. Pavlikova, V. Dohnal, and K. Kuca. 2009. Biological degradation of aflatoxins. Drug Metab. Rev. 41:1–7.

Zain, M. E. 2011. Impact of mycotoxins on humans and animals Journal of Saudi Chemical Society.15:129–144.