

ฤทธิ์ต้านราของแบคทีเรียแลคติก และการประยุกต์ใช้ เพื่อป้องกันการเน่าเสียของเมล็ดข้าว

Antifungal effect of lactic acid bacteria and application in prevention of rice grain spoilage

จรัสลักษณ์ เพชรวัง^{1*}, ธัญมาศ พิณราช¹, กัลยารัตน์ พุ่มคง¹, สุกัญญา พรหมทอง¹,
อติพล พัทธิยะ¹ และ สุรพล ฐิติชนากุล¹

Jaraslak Pechwang^{1*}, Thanyamart Phinrart¹, Kanlayarat Pumkong¹,
Sukanya Promthong¹, Atiphon Phatthiya¹ and Suraphon Thitithanakul¹

บทคัดย่อ: การทดสอบฤทธิ์ต้านราของแบคทีเรียแลคติกจำนวน 6 ไอโซเลท: TMP28, TMP04, TNP06, TOP01, TOP04 และ TNN01 ในการยับยั้ง *Aspergillus* sp. จำนวน 3 ไอโซเลท (BP01, BP03 และ BG04) พบว่าแบคทีเรียแลคติกทั้ง 6 ไอโซเลทสามารถยับยั้งการเจริญของ *Aspergillus* sp. ทั้ง 3 ไอโซเลทได้ และเมื่อใช้ส่วนผสมของอาหารเหลวปราศจากเซลล์มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการงอกของสปอร์ *Aspergillus* sp. พบว่าส่วนผสมของอาหารเหลวปราศจากเซลล์ของแบคทีเรียแลคติกทุกไอโซเลทสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ BP01, BP03 และ BG04 ได้ในช่วง 85.0-97.7%, 88.5-97.4% และ 74.1-98.5% ตามลำดับ เมื่อทดสอบการยับยั้งการเจริญ *Aspergillus* sp. บนเมล็ดข้าวเปลือกพบว่าส่วนผสมของอาหารเหลวปราศจากเซลล์ของแบคทีเรียแลคติก ทั้ง 6 ไอโซเลทสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ *Aspergillus* sp. ทั้ง 3 ไอโซเลทได้ โดยไม่พบการเจริญของเส้นใยราในระยะเวลา 7 วัน

คำสำคัญ: กิจกรรมต้านรา, แบคทีเรียแลคติก, เมล็ดข้าว

ABSTRACT: The anti-fungal abilities of 6 isolates of Lactic acid Bacteria (LABs): TMP28, TMP04, TNP06, TOP01, TOP04 and TNN01 isolated from fermented Soybean were evaluated against *Aspergillus* sp. (BP01, BP03 and BG04). The results indicated 6 isolates of LABs were found to possess inhibition against all 3 *Aspergillus* sp. The effect on spore germination of cell free supernatants (CFS) of LABs over *Aspergillus* sp. were evaluated. The effect on spore germination of BP01, BP03 and BG04 showed the inhibition range from 85.0 to 97.7%, 88.5 to 97.4% and 74.1 to 98.5%, respectively. The anti-fungal assay on rice grains investigated that CFS from 6 isolates of LABs showed the anti-fungal effect over all 3 *Aspergillus* sp. isolates since the hyphal growth were not investigated in 7 days of the experiment.

Keywords: antifungal activity, lactic acid bacteria, rice grain

¹ สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตสุราษฎร์ธานี

Program in Agricultural Science and Technology, Faculty of Sciences and Industrial Technology,
Prince of Songkla University, SuratThani Campus

* Corresponding author: Jaraslak.p@psu.ac.th

บทนำ

ราเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดการเน่าเสียและเสื่อมคุณภาพของผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรโดยเฉพาะอย่างยิ่งธัญพืช ซึ่งราที่มักพบว่าเป็นสาเหตุของการเน่าเสียของธัญพืช ได้แก่ *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Fusarium* และ *Mucor* (Gerez et al., 2013; Gupta and Srivastava, 2014) นอกจากนี้ทำให้เกิดการเน่าเสียแล้ว ราชางชนิดยังผลิตสารพิษที่เป็นอันตราย เช่น aflatoxins, fumonisins, ochratoxins และ zearalenone เป็นต้น (Dalié, et al., 2010) การป้องกันการเน่าเสียของธัญพืชจากราทำได้หลายวิธี ทั้งวิธีทางกายภาพ เช่น การฉายรังสี การทำแห้ง และวิธีทางเคมีโดยใช้สารเคมี เช่น ฟอรัมาลดีไฮด์และสารในกลุ่มปรอทอินทรีย์ ซึ่งการใช้สารเคมีนอกจากจะส่งผลกระทบต่อสุขภาพและสิ่งแวดล้อมแล้ว ยังอาจชักนำให้ราเกิดการต้านทานต่อสารเคมีดังกล่าวได้ (Gupta and Srivastava, 2014) ปัจจุบันจึงมีผู้สนใจใช้วิธีทางชีวภาพโดยนำแบคทีเรียแลคติก (Lactic Acid Bacteria) มาใช้เพื่อควบคุมการเจริญและลดการสร้างสารพิษของรา (Guimarães, et al., 2018) แบคทีเรียแลคติกเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ เจริญได้ทั้งสภาวะที่มีและไม่มีอากาศ และผลิตภัณฑ์เป็นผลิตภัณฑ์หลักจากการหมักคาร์โบไฮเดรตแบคทีเรียแลคติกมีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก และสามารถสร้างสารประกอบซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของราได้ เช่น กรดอินทรีย์ แบคทีริโอซินและรอยเทอริน เป็นต้น (Dalié, et al., 2010) โดยมีรายงานการใช้แบคทีเรียแลคติกใน

การยับยั้ง *Aspergillus* spp. และ *Penicillium* spp. บนเมล็ดข้าวสาลี และสามารถยืดอายุผลิตภัณฑ์จากข้าวสาลีได้ (Gerez et al., 2013) แต่การประยุกต์ใช้แบคทีเรียแลคติกในการยับยั้งราในด้านการเกษตร รวมถึงการป้องกันการเน่าเสียที่มีสาเหตุจากราของเมล็ดข้าวและธัญพืชยังมีรายงานไม่มากนัก จึงเป็นที่น่าสนใจในการนำแบคทีเรียแลคติกมาประยุกต์ใช้เพื่อยับยั้งราที่เป็นสาเหตุของการเน่าเสียของเมล็ดพืช ในงานวิจัยนี้ได้นำแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากถั่วเน่า ซึ่งเป็นอาหารหมักพื้นบ้านมาศึกษาคุณสมบัติในการยับยั้ง *Aspergillus* sp. และทดสอบการยับยั้งการเจริญของ *Aspergillus* sp. บนเมล็ดข้าวเปลือก

วิธีการศึกษา

การยับยั้ง *Aspergillus* sp. ของแบคทีเรียแลคติกด้วย Agar plate overlay assay

นำแบคทีเรียแลคติกที่แยกจากถั่วเน่าจำนวน 6 ไอโซเลท ได้แก่ TMP04, TMP28, TNP06, TOP01, TOP04 และ TNN01 มาทดสอบการยับยั้ง *Aspergillus* sp. BP01, BP03 และ BG04 ด้วย Agar plate overlay assay (Cheong et al., 2014) โดยนำแบคทีเรียแลคติกที่เลี้ยงใน de Man Rogosa and Sharpe broth (MRS broth) (10^6 spore/ml) ปริมาตร 5 μ l หยดลงบน de Man Rogosa and Sharpe agar (MRS agar) บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนับสปอร์รวม 100 สปอร์ โดยใช้ MRS broth แทน CFS เป็นชุดควบคุมคำนวณเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งการงอกของสปอร์ดังนี้

$$\frac{\text{จำนวนของสปอร์ที่งอกในชุดควบคุม} - \text{จำนวนของสปอร์ที่งอกในชุดการทดลอง}}{\text{จำนวนของสปอร์ที่งอกของชุดควบคุม}} \times 100$$

การยับยั้งการเจริญของ *Aspergillus* sp. บนเมล็ดข้าวเปลือกของ CFS จากแบคทีเรียแลคติก

ฆ่าเชื้อบริเวณผิวของเมล็ดข้าวเปลือกด้วย 0.1% NaClO แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 - 4 ครั้ง แช่เมล็ดข้าวเปลือกใน CFS ที่เติม Tween 80 (0.01%) เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำเมล็ดข้าวเปลือกวางบนจานเพาะเชื้อรอให้แห้ง จากนั้นหยดสารแขวน

ลอยสปอร์ (10^4 spore/ml) ปริมาตร 10 μ l บนเมล็ดข้าวเปลือกนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 7 วัน ทำการทดลองซ้ำละ 10 เมล็ด จำนวน 5 ซ้ำ สังเกตจำนวนเมล็ดข้าวเปลือกที่มีการเจริญของเส้นใยราในวันที่ 2 และ 7 นำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์การพบเส้นใยราบนเมล็ดข้าวเปลือก ดังนี้

$$\frac{\text{จำนวนของเมล็ดข้าวเปลือกที่พบเส้นใยรา}}{\text{จำนวนของเมล็ดข้าวเปลือกทั้งหมดในชุดทดลอง}} \times 100$$

การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ผลทางสถิติโดยการทดสอบแบบ Completely Randomized Design (CRD) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$) และ 99% ($P < 0.01$) ด้วยโปรแกรม SPSS (Statistical Package for the Social Sciences)

ผลการศึกษาและวิจารณ์

การยับยั้ง *Aspergillus sp.* ของแบคทีเรียแลคติก ด้วย Agar plate overlay assay

ผลการทดสอบความสามารถของ CFS จากแบคทีเรียแลคติกจำนวน 6 ไอโซเลตในการยับยั้งการเจริญของเส้นใย *Aspergillus sp.* จำนวน 3 ไอโซเลต ซึ่งแยกได้จากถั่วเหลืองได้แก่ BP01, BP03 และ BG04 พบว่า CFS จากแบคทีเรียแลคติก TMP04, TMP28, TNP06, TOP01, TOP04 และ TNN01 สามารถยับยั้งการเจริญของ *Aspergillus sp.* ทั้ง 3 ไอโซเลตได้ (Table 1 and Figure 1)

Table 1 Antifungal activity of lactic acid bacteria against *Aspergillus sp.* Results are expressed as the clear inhibition halo is visible around bacteria colony. MRS broth was used as a control experiment

LABs	<i>Aspergillus sp.</i>		
	BP01	BP03	BG04
TMP04	+	+	+
TMP28	+	+	+
TNP06	+	+	+
TOP01	+	+	+
TOP04	+	+	+
TNN01	+	+	+
MRS broth	-	-	-

(+) Clear inhibition halo, (-) No clear inhibition halo

จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง *Aspergillus*, *Fusarium* และ *Penicillium* ของแบคทีเรียแลคติกจำนวน 95 ไอโซเลต (Gerez et al., 2009) พบว่าสารที่ทำหน้าที่ในการยับยั้งรา ได้แก่ กรดอะซิติกและฟีนิลแลคติกจากการทดสอบการยับยั้งการเจริญของราที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์จากข้าวโพด ได้แก่ *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* และ *Rhizopus* ด้วยแบคทีเรียแลคติก จำนวน 53 ไอโซเลต (Tatsadjieu et al., 2016) พบว่าราถูกยับยั้งได้โดยกรดอินทรีย์และสารประกอบอื่น ๆ ที่ผลิตโดยแบคทีเรียแลคติก เช่น คาร์บอนไดออกไซด์ ไฮโดรเจน

เปอร์ออกไซด์ เอทานอล และแบคเทอริโอซิน และในทดสอบการยับยั้งราด้วย *Lactobacillus plantarum* CE42, *L.pantarum* CE60, *L.pantarum* CE84, *Lactobacillus curvatus* และ *Pediococcus pentosaceus* (Maninia et al., 2016) พบว่าแบคทีเรียแลคติกดังกล่าวสามารถยับยั้ง *Aspergillus oryzae* และ *A. niger* ได้ ซึ่งการยับยั้งเกิดจากสารประกอบที่แบคทีเรียแลคติกสร้างขึ้น ได้แก่ กรดแลคติก, กรดอะซิติก, ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์, แบคเทอริโอซิน, กรดฟอรัมิค, ฟีนิลแลคติก, carpronin acid, สารกลุ่ม diacetyl ethanol และสารปฏิชีวนะ

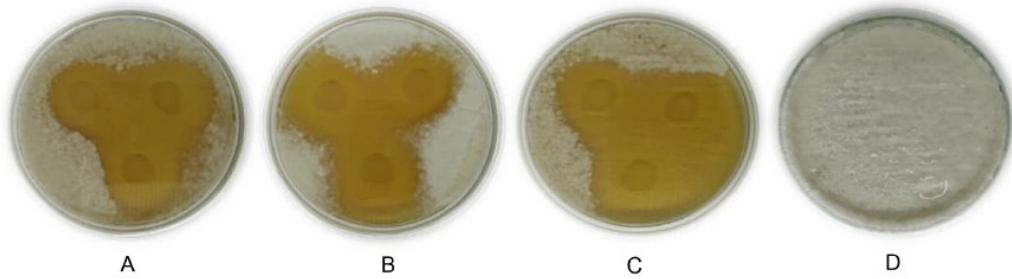


Figure 1 Antifungal activity against *Aspergillus* sp. BP01 (A), BP03 (B) and BG04 (C) by lactic acid bacteria TMP28. No effect is noticeable using MRS broth as a control experiment (D)

การยับยั้งการงอกของสปอร์ *Aspergillus* sp. ของ CFS จากแบคทีเรียแลคติก

จากผลทดสอบความสามารถของ CFS ในการยับยั้งการงอกของสปอร์ *Aspergillus* sp. พบว่า CFS จากแบคทีเรียแลคติกทุกไอโซเลทสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ *Aspergillus* sp. ทั้ง 3 ไอโซเลทได้ โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ในช่วง 74.1-98.5% (Table 2) จากการทดสอบการยับยั้งการงอกของสปอร์ *A. niger* CH₁₀₁, *Penicillium* sp. CH₁₀₂, *Fusarium graminearum* CH₁₀₃, *Penicillium digitatum* INTA2 และ *Geotrichum* sp. โดย *Lactobacillus fermentum* CRL251 (Gerez et al., 2013) พบว่าสามารถยับยั้งการงอกสปอร์ *Penicillium* sp. CH₁₀₂ และ *P. digitatum* INTA2 ได้ถึง 62% และ 96% ตามลำดับ ทั้งนี้การยับยั้งการงอกของสปอร์อาจเกิดจากกรดอินทรีย์ที่แบคทีเรียแลคติกสร้างขึ้น มีผลทำให้ pH ของ CFS ลดต่ำกว่า 3.50 ซึ่งเป็นช่วง pH ที่สามารถยับยั้งการเจริญของราและแบคทีเรียบางชนิดได้และจากการศึกษาการใช้ CFS ที่ได้จากจาก *L. plantarum* MYS44 ในการยับยั้งงอกของสปอร์ *Aspergillus parasiticus* พบว่า *L. Plantarum* MYS44 ผลิตสาร 8-Octadecanoic acid และ methyl ester

ซึ่งสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ *A. parasiticus* ได้ (PoomachandraRao et al., 2017)

การยับยั้งการเจริญของ *Aspergillus* sp. บนเมล็ดข้าวเปลือกของ CFS จากแบคทีเรียแลคติก

เมื่อนำ CFS จากแบคทีเรียแลคติกทั้ง 6 ไอโซเลทมายับยั้งการเจริญของ *Aspergillus* sp. ทั้ง 3 ไอโซเลทบนเมล็ดข้าวเปลือก พบว่าสามารถยับยั้งได้ดีโดยไม่พบเส้นใยราตลอดระยะเวลา 7 วันที่ใช้ในการทดลอง (Table 3) ขณะที่ในชุดควบคุมพบเส้นใยราบนเมล็ดข้าวเปลือกในวันที่ 2 (28±8.4- 32±8.4%) และในวันที่ 7 พบเส้นใยราบนเมล็ดข้าวเปลือกทุกเมล็ด (100%) จากรายงานของ Quattrinia et al. (2018) ได้ใช้ *L. plantarum* ITEM17215 ในการยับยั้งการเจริญของ *Fusarium verticilliooides* พบว่า *L. plantarum* ITEM17215 สามารถยับยั้งการเจริญของ *F. verticilliooides* บนเมล็ดข้าวสาลีได้ ทั้งนี้การยับยั้งการงอกของสปอร์บนเมล็ดข้าวสาลี เกิดจาก *L. plantarum* ITEM17215 ผลิตสารซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้ง ได้แก่ กรดเบนโซอิก, 1,2-dihydroxybenzene, p-hydroxyphenyllactic acid และ 3-phenyllactic acid

Table 2 Percent of spore germination inhibition of *Aspergillus* sp. (BP01, BP03 and BG04) by CFS from LABs after 48 hr. of incubation

LABs	Inhibition (%)		
	BP01	BP03	BG04
TMP04	91.8± 2.0 ^a	97.4± 2.2 ^a	94.1 ± 5.1 ^a
TMP28	95.3± 4.1 ^a	88.5± 0.0 ^b	97.1± 2.5 ^a
TNP06	97.7± 4.1 ^a	97.4 ± 4.4 ^a	98.5 ± 2.5 ^a
TOP01	94.3± 5.4 ^a	97.4 ± 4.4 ^a	97.1± 2.5 ^a
TOP04	97.7± 5.5 ^a	97.4 ± 4.4 ^a	95.6± 3.5 ^a
TNN01	85.0 ± 0.0 ^b	92.3 ± 3.9 ^a	74.1± 3.5 ^a
p – value	*	*	ns

Values are expressed as mean±SD. Mean value with different letters in the same column are significantly different (P<0.05).

Table 3 Antifungal activity of tested LABs against *Aspergillus* sp. (BP01, BP03 and BG04) on rice grain. The table shows incidence of hyphal growth on rice grains on the 2 and 7 days after fungal spore inoculation and control experiment with MRS broth

LABs	Incidence (%)					
	BP01		BP03		BG04	
	2 days	7 days	2 days	7 days	2 days	7 days
TMP04	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
TMP28	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
TNP06	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
TOP01	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
TOP04	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
TNN01	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
MRS broth	28±8.4 ^b	100 ^b	24±5.5 ^b	100 ^b	32±8.4 ^b	100 ^b
P-value	**	**	**	**	**	**

Values are expressed as mean±SD. Mean value with different letters in the same column are significantly different (P<0.01).

สรุป

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านราของแบคทีเรียแลคติก TMP04, TMP28, TNP06, TOP01, TOP04 และ TNN01 ในการยับยั้งการเจริญของ *Aspergillus* sp. (BP01, BP03 และ BG04) แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียแลคติกทุกไอโซเลตสามารถยับยั้งการ

เจริญของ *Aspergillus* sp. ทั้ง 3 ไอโซเลตได้ทั้งการทดลองในอาหารเลี้ยงเชื้อและบนเมล็ดข้าวเปลือกซึ่งผลการทดลองที่ได้สามารถนำไปสู่การประยุกต์ใช้แบคทีเรียแลคติกในการยืดอายุการเก็บรักษารัษฎัญพืชเพื่อลดการใช้สารเคมีซึ่งเป็นประโยชน์ต่อเกษตรกรและส่งผลดีต่อสุขภาพผู้บริโภคและสิ่งแวดล้อม

เอกสารอ้างอิง

- Cheong, E. Y., A.Sandhu, J.Jayabalan, T. T.Le, N. T. Nhiep, H. T.Ho, and M. S. Turner. 2014. Isolation of lactic acid bacteria with antifungal activity against the common cheese spoilage mould *Penicillium commune* and their potential as biopreservatives in cheese. *Food Control*. 46: 91-97.
- Dalié, D.K.D., A.M.Deschamps, andF. Richard-Forget.2010. Lactic acid bacteria – Potential for control of mould growth and mycotoxins:A review. *Food Control*. 21: 370-380.
- Gerez, C.L., M. I. Torino, G.Rollan, and G.Font de Valdez.2009. Prevention of bread mould spoilage by using lactic acid bacteria with antifungal properties. *Food Control*. 20: 144-148.
- Gerez, C.L.,M.J.Torres, G.Font de Valdez,and G.Rollan. 2013. Control of spoilage fungi by lactic acid bacteria. *Biological Control*. 64: 231-237.
- Guimarães, A., A. Santiago, J.A.Teixeira, A.Venâncio, and L. Abrunhosa. 2018. Anti-aflatoxigenic effect of organic acids produced by *Lactobacillus plantarum*. *International Journal of Food Microbiology*. 264: 31-38.
- Gupta, R., and S. Srivastava.2014. Antifungal effect of antimicrobial peptides (AMPs LR14) derived from *Lactobacillus plantarum* strain LR/14 and their applications in prevention of grain spoilage. *Food Microbiology*. 42: 1-7.
- Maninia, F., M. C. Casiraghia, K. Poutanenb, C. M. Brascad, D.Erbaa, and C. Plumed-Ferrerb. 2016. Characterization of lactic acid bacteria isolated from wheat bran sourdough. *LWT - Food Science and Technology*. 66: 275-283.
- Poornachandra Rao, K., B. V.Deepthi, S. Rakesh, T. Ganesh, A. Premila, and M. Y. Sreenivasa. 2017. Antiaflatoxin potential of cell-free supernatant from *Lactobacillus plantarum* MYS44 against *Aspergillus parasiticus*. *Probiotic &Antimicro. Prot. Prot*. 10: 1-10.
- Quattrinia, M., C. Bernardi, M. Stuknyete, F. Masotti, A. Passera, G. Ricci, L. Vallone, I. De Noni, M.Brasca, M. G. Fortina. 2018. Functional characterization of *Lactobacillus pantarum* ITEM 17215: A potential biocontrol agent of fungi with plant growth promoting traits, able to enhance the nutritional value of cereal products. *Food Research International*. 106: 936-944.
- Tatsadjieu, L. N., R. Tchikoua, and C. M. M. Funtong. 2016. Antifungal activity of lactic acid bacteria against molds isolated from corn and fermented corn paste. *American Journal of Microbiological research*. 4: 90-100.