



โครงการ การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ ยึดปฏิบัติที่แยกได้จากเมื่อดกาแพต่อการเจริญและการผลิตสารพิษจากรา

ชื่อนิสิต นางสาวพิลัมภา ทองอ่อน รหัสประจำตัว 5932337023

ภาควิชา จุลชีววิทยา
ปีการศึกษา 2562

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อโครงการ ยีสต์ปฏิสัมพันธ์ที่แยกได้จากเมล็ดกาแฟต่อการเจริญและการผลิตสารพิษ
จากรา
โดย นางสาวฟิล์มภา ทองอ่อน รหัสนิต 5932337023
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชิวานันท์ เดชอุปการ ศิริสมบุญ
ปีการศึกษา 2562

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับโครงการฉบับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาบัณฑิต ในรายวิชา 2312499 โครงการวิทยาศาสตร์

..... หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)

คณะกรรมการสอบโครงการ

..... อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชิวานันท์ เดชอุปการ ศิริสมบุญ)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ปานัน เรืองสำราญ)

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

เรื่อง

อีสต์ปักษ์ที่แยกได้จากเมล็ดกาแฟ
ต่อการเจริญและการผลิตสารพิษจากรา

โดย

นางสาวพิลัมภา ทองอ่อน เลขประจำตัว 5932337023

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชิวานันท์ เดชอุปการ ศิริสมบูรณ์

โครงการนี้เป็นส่วนหนึ่งของหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ประจำปีการศึกษา 2562

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการ : ยีสต์ปฏิปักษ์ที่แยกได้จากเมล็ดกาแฟต่อการเจริญและการผลิต
สารพิษจากรา

นิสิตในโครงการ : นางสาวพัลลภา ทองอ่อน รหัสนิสิต 5932337023

อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชิวานันท์ เดชอุปการ ศิริสมบุญ

บทคัดย่อ

สารพิษจากราเป็นสิ่งปนเปื้อนที่พบได้บ่อยในอาหารและผลผลิตทางการเกษตรรวมถึงเมล็ดกาแฟ ยีสต์ปฏิปักษ์ได้รับความสนใจใช้เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพในการต้านราที่สร้างสารพิษเพื่อลดผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภค ในการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความเป็นปฏิปักษ์ของยีสต์ที่แยกได้จากเมล็ดกาแฟ (ไอโซเลต Y08 และ Y20) ต่อการเจริญและการผลิตสารพิษจากราของ *Aspergillus carbonarius* ที่ผลิตโอคราทอกซิน และ *Aspergillus flavus* ที่ผลิตอะฟลาทอกซิน ผลการทดสอบพบว่ายีสต์ Y08 และ Y20 สามารถยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษจากราได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยกลไกที่สำคัญในการยับยั้ง คือ การผลิตและปลดปล่อยสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่าย ซึ่งจากการทดสอบพบว่า ยีสต์ทั้ง 2 ไอโซเลตสามารถยับยั้งการเจริญของรา (70-80 เปอร์เซ็นต์) และลดการผลิตสารพิษจากราได้เกือบ 100 เปอร์เซ็นต์

Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University

Project title : Antagonistic yeasts isolated from coffee bean against growth of toxigenic fungi and their toxin production

Investigator : Miss Pilampa Tongon ID 5932337023

Advisor : Cheewanun Dachoupan Sirisomboon, Assistant Professor, Ph.D.

Abstract

Mycotoxins are a common contaminant frequently found in foods and agricultural products, including coffee beans. Antagonistic yeast are interesting to be widely used as a biological control agents against mycotoxigenic fungi in order to reduce the effects on the health of consumers. The objective of this study was to evaluate the antagonistic activity of yeasts (Y08 and Y20) isolated from coffee beans against the growth and mycotoxin production of ochratoxigenic fungi *Aspergillus carbonarius* and aflatoxigenic fungi *Aspergillus flavus*. The results showed that yeast Y08 and Y20 could inhibit the growth and mycotoxin production of both mycotoxigenic fungi effectively. The major mechanism was the production and releasing of volatile organic compounds. The results showed that they could inhibit the growth of both fungi (70-80% inhibition) and reduced the production of mycotoxins by almost 100%.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี อันเนื่องมาจากความกรุณาและอนุเคราะห์ของ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชีวานันท์ เดชอุปการ ศิริสมบุญรณ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ที่ให้ความรู้ คำแนะนำ คำปรึกษาและข้อคิดเห็นต่าง ๆ ที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อโครงการตลอดระยะเวลาของการทำงานวิจัยนี้ ตลอดจนความอนุเคราะห์ในการปรับปรุงแก้ไขโครงการวิจัยนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณในความเมตตาของอาจารย์เป็นอย่างสูงมา ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณคณะอาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน ที่ให้ความรู้และคำแนะนำต่าง ๆ ที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัยฉบับนี้ รวมถึงต่อตัวผู้วิจัยเอง

ขอขอบคุณพี่ ๆ เจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการใช้อุปกรณ์และสารเคมีต่าง ๆ ภายในภาควิชา

ขอขอบคุณพี่ ๆ ในห้องปฏิบัติการ 1904/14 ทุกคนอันได้แก่ นางสาวพิชามญชุ์ โสมา นางสาวพิชชาภา เอี่ยมลออ และนางสาวภาสนันท์ พันธุมะโอภาส ตลอดจนเพื่อนร่วมห้องปฏิบัติการ นางสาวฉนวนวรรณ พรหมอารักษ์ ที่ให้ความช่วยเหลือในการทำปฏิบัติการ รวมถึงคอยให้คำแนะนำต่าง ๆ ตลอดการทำโครงการวิจัยฉบับนี้

ขอขอบคุณเพื่อน ๆ นิสิตชั้นปีที่ 4 ที่ช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง นายจิรายุส ขาวสังข์ นางสาวณัฐมณ วาจรัส นายธนพล กุลวิวัฒน์ และนายทรงเกียรติ สุขมงคลชัย นอกจากนี้ยังมีเพื่อน ๆ ในกลุ่มที่คอยช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจทั้งด้านการเรียน และการทำโครงการวิจัยนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ คุณองชองอุ และคุณคิมจงฮยอน ที่เป็นกำลังใจ เป็นแรงผลักดัน และเป็นความผ่อนคลายที่มีความหมายกับผู้วิจัยตลอดการศึกษาและทำโครงการงานวิจัยนี้เป็นอย่างมาก

ขอขอบคุณครอบครัว คุณพ่อ คุณแม่ และน้องสาวที่คอยส่งเสริม สนับสนุน และเป็นกำลังใจให้แก่ผู้วิจัยเสมอมา และสุดท้ายขอขอบคุณตัวเองที่อดทนและพยายามเป็นอย่างมากต่อการทำงานวิจัยฉบับนี้ จนสำเร็จลุล่วง

ด้วยความเคารพอย่างสูง

ฟิลัมภา ทองอ่อน

สารบัญ

หัวข้อ	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูปภาพ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีดำเนินงานวิจัย	12
บทที่ 3 ผลการทดลอง	19
บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง	24
เอกสารอ้างอิง	26
ภาคผนวก	31

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า	
1.1	สารพิษจากราที่ส่งผลกระทบต่อสุขภาพของมนุษย์และสายพันธุ์ราที่สร้าง	2
1.2	การกำหนดปริมาณการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอในผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร และอาหารชนิดต่าง ๆ จากทั่วโลก	8
3.1	การยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษของรา <i>A. carbonarius</i> และ <i>A. flavus</i> โดยการเลี้ยงร่วมกับยีสต์ Y08 และยีสต์ Y20 ด้วยวิธี Dual culture บนอาหาร PDA บ่มที่ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน	21
3.2	การยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษของรา <i>A. carbonarius</i> และ <i>A. flavus</i> จากการผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ Y08 และยีสต์ Y20 ซึ่งเลี้ยงยีสต์และราด้วยกันโดยไม่มีการสัมผัสกัน	22
ค.1	ลักษณะการเจริญของรา <i>A. carbonarius</i> ที่เลี้ยงร่วมกับยีสต์ Y08 และยีสต์ Y20 เพื่อทดสอบความเป็นปฏิปักษ์ของยีสต์ ด้วยวิธี dual culture เทียบกับชุดควบคุม ที่ทดลองแยกกัน 3 การทดลอง	34
ค.2	ลักษณะการเจริญของรา <i>A. flavus</i> ที่เลี้ยงร่วมกับยีสต์ Y08 และยีสต์ Y20 เพื่อทดสอบความเป็นปฏิปักษ์ของยีสต์ ด้วยวิธี dual culture เทียบกับชุดควบคุม ที่ทดลองแยกกัน 3 การทดลอง	35
ค.3	ลักษณะการเจริญของรา <i>A. carbonarius</i> ที่เลี้ยงร่วมกับยีสต์ Y08 และยีสต์ Y20 โดยไม่สัมผัสกัน เพื่อทดสอบการผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ เทียบกับชุดควบคุม ที่ทดลองแยกกัน 3 การทดลอง	36
ค.4	ลักษณะการเจริญของรา <i>A. flavus</i> ที่เลี้ยงร่วมกับยีสต์ Y08 และยีสต์ Y20 โดยไม่สัมผัสกัน เพื่อทดสอบการผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ เทียบกับชุดควบคุม ที่ทดลองแยกกัน 3 การทดลอง	37
ค.5	การเจริญของรา <i>A. carbonarius</i> ที่เลี้ยงร่วมกับยีสต์ Y08 และยีสต์ Y20 เพื่อทดสอบความเป็นปฏิปักษ์ของยีสต์ ด้วยวิธี dual culture เทียบกับชุดควบคุม ที่ทดลองแยกกัน 3 การทดลอง	38
ค.6	การผลิตโอคราทอกซินเอของรา <i>A. carbonarius</i> ที่เลี้ยงร่วมกับยีสต์ Y08 และ ยีสต์ Y20 เพื่อทดสอบความเป็นปฏิปักษ์ของยีสต์ ด้วยวิธี dual culture เทียบกับชุดควบคุม ที่ทดลองแยกกัน 3 การทดลอง	38

- ค.7 การเจริญของรา *A. flavus* ที่เลี้ยงร่วมกับยีสต์ Y08 และยีสต์ Y20 เพื่อทดสอบความเป็นปฏิปักษ์ของยีสต์ ด้วยวิธี dual culture เทียบกับชุดควบคุม ที่ทดลองแยกกัน 3 การทดลอง 38
- ค.8 การผลิตอะฟลาทอกซินบีของรา *A. flavus* ที่เลี้ยงร่วมกับยีสต์ Y08 และ ยีสต์ Y20 เพื่อทดสอบความเป็นปฏิปักษ์ของยีสต์ ด้วยวิธี dual culture เทียบกับชุดควบคุม ที่ทดลองแยกกัน 3 การทดลอง 39
- ค.9 การเจริญของรา *A. carbonarius* ที่เลี้ยงร่วมกับยีสต์ Y08 และยีสต์ Y20 โดยไม่สัมผัสกัน เพื่อทดสอบการผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ เทียบกับชุดควบคุม ที่ทดลองแยกกัน 3 การทดลอง 39
- ค.10 การผลิตโอคราทอกซินเอของรา *A. carbonarius* ที่เลี้ยงร่วมกับยีสต์ Y08 และ ยีสต์ Y20 โดยไม่สัมผัสกัน เพื่อทดสอบการผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ เทียบกับชุดควบคุม ที่ทดลองแยกกัน 3 การทดลอง 39
- ค.11 การเจริญของรา *A. flavus* ที่เลี้ยงร่วมกับยีสต์ Y08 และยีสต์ Y20 โดยไม่สัมผัสกัน เพื่อทดสอบการผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ เทียบกับชุดควบคุม ที่ทดลองแยกกัน 3 การทดลอง 40
- ค.12 การผลิตอะฟลาทอกซินบีของรา *A. flavus* ที่เลี้ยงร่วมกับยีสต์ Y08 และ ยีสต์ Y20 โดยไม่สัมผัสกัน เพื่อทดสอบการผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ เทียบกับชุดควบคุม ที่ทดลองแยกกัน 3 การทดลอง 40

สารบัญรูปภาพ

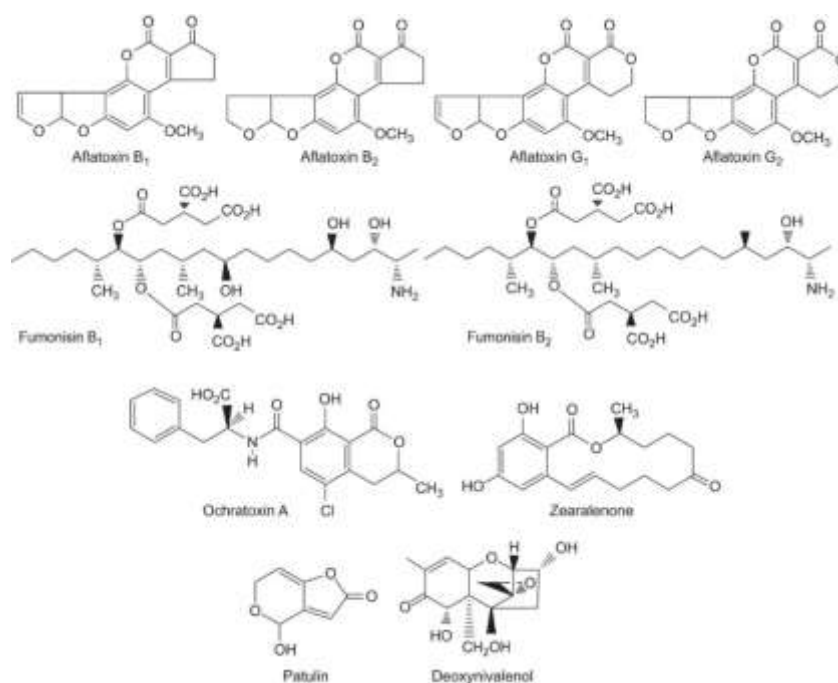
ภาพที่	หน้า
1.1 ตัวอย่างโครงสร้างของสารพิษจากราที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร	1
1.2 ลักษณะของ <i>A. flavus</i> เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์	4
1.3 โครงสร้างของโอคราทอกซินเอ	6
1.4 ลักษณะ conidial head (ก) และ เซลล์โคนีเดีย (ข) ของ <i>A. carbonarius</i> ภายใต้กล้องจุลทรรศน์	7
1.5 เซลล์ยีสต์ที่สีบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อ	9
2.1 การทดสอบความเป็นปฏิปักษ์ของยีสต์ต่อรา ด้วยวิธี Dual culture	16
3.1 การเจริญของยีสต์ Y08 ในแต่ละเวลา เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YPD บ่มแบบเขย่า 200 รอบต่อนาที 30 องศาเซลเซียส	19
3.2 การเจริญของยีสต์ Y20 ในแต่ละเวลา เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YPD บ่มแบบเขย่า 200 รอบต่อนาที 30 องศาเซลเซียส	20
3.3 ลักษณะโคโลนีของรา <i>A. carbonarius</i> (ก-ค) และ <i>A. flavus</i> (ง-ข) ในการทดสอบความเป็นปฏิปักษ์ของยีสต์ด้วย dual culture หลังการบ่ม 7 วัน โดย ก และ ง เป็นชุดควบคุม, ข และ จ บ่มร่วมกับยีสต์ Y08 และ ค และ ง บ่มร่วมกับยีสต์ Y20	21
3.4 ลักษณะโคโลนีของรา <i>A. carbonarius</i> (ก-ค) และ <i>A. flavus</i> (ง-ข) หลังการบ่ม 7 วัน โดย ก และ ง เป็นชุดควบคุม, ข และ จ บ่มร่วมกับยีสต์ Y08 และ ค และ ง บ่มร่วมกับยีสต์ Y20	22

บทที่ 1

บทนำ

สารพิษจากรา (Mycotoxins)

สารพิษจากราเป็นสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) ของราสายใย ซึ่งเป็นอันตรายต่อสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังเมื่อบริโภค สูดดม หรือสัมผัส ทำให้เกิดสะสมในอวัยวะและเนื้อเยื่อต่าง ๆ ซึ่งมักจะเกิดผ่านการบริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อนรา เช่น ธัญพืช ผลไม้ นม และผลิตภัณฑ์แปรรูปต่าง ๆ แล้วก่อให้เกิดโรค Mycotoxicosis อุบัติการณ์ของการปนเปื้อนราเกิดได้ในแต่ละฤดูกาลและจำเพาะต่อสิ่งบริโภคต่าง ๆ และสารพิษจากราที่ปนเปื้อนในอาหารมักพบร่วมกับการเจริญของรา (Marin และคณะ 2013) ราที่สร้างสารพิษมักเจริญบนอาหารจำพวกธัญพืช ผลไม้แห้ง ถั่ว เป็นต้น สามารถพบการเจริญของราเหล่านี้ในผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรได้ทั้งในขั้นตอนก่อนการเก็บเกี่ยว หลังการเก็บเกี่ยว และระหว่างการเก็บรักษาที่ไม่ถูกต้อง องค์การอาหารและการเกษตรแห่งสหประชาชาติ (Food and agriculture organization of the United Nations; FAO) คาดว่ามีการปนเปื้อนของสารพิษจากราถึง 25 เปอร์เซ็นต์ ของธัญพืชทั่วโลก (Wan และคณะ 2019) ปัจจุบันมีการค้นพบสารพิษจากราหลายชนิด แต่ส่วนใหญ่เป็นสารพิษจากราที่พบได้ทั่วไป ซึ่งปัจจุบันได้ตระหนักถึงปัญหาด้านสุขภาพของมนุษย์และสัตว์ ได้แก่ อะฟลาทอกซิน โอคราทอกซินเอ พาทูลิน ฟูโมนิซิน ซีราเลนิน และนิวาเลนอลหรือดีออกซินิวาเลนอล (WHO 2018) สารพิษจากราส่วนใหญ่เป็นสารเคมีที่มีโครงสร้าง (ภาพที่ 1.1) ที่เสถียรและสามารถคงอยู่ในอาหารแม้ผ่านกระบวนการทำอาหารแล้ว



ภาพที่ 1.1 ตัวอย่างโครงสร้างของสารพิษจากราที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร (Reddy และคณะ 2010)

สารพิษจากราถูกผลิตขึ้นโดยราสายใยหลายสกุลที่สำคัญ เช่น *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Fusarium* และ *Clavisep* เป็นต้น ซึ่งราเหล่านี้สามารถพบได้ในผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรที่กระบวนการผลิต แปรรูป และจัดเก็บที่ไม่ได้มาตรฐาน โดยเฉพาะในสภาพที่เป็นผลิตภัณฑ์อาหารที่มีค่าวอเตอร์แอกทิวิตีที่สูงมากพอ จะเสริมการเจริญและการสร้างสารพิษเหล่านี้ สารพิษต่าง ๆ ถูกผลิตขึ้นจากราแต่ละสายพันธุ์และสภาพที่แตกต่างกัน อะฟลาทอกซินถูกสร้างขึ้นโดยราในสกุล *Aspergillus* ส่วนโอคราทอกซินเอมาจากราทั้งในสกุล *Aspergillus* และ *Penicillium* ฟุโมนิซินและซีราเลโนนส่วนใหญ่ถูกผลิตขึ้นจากราในสกุล *Fusarium* (Marin และคณะ 2013)

เนื่องจากผลกระทบต่อสุขภาพทั้งในมนุษย์ (ตารางที่ 1.1) และสัตว์ทำให้ประเทศทั่วโลกรวมถึงองค์กรนานาชาติเกิดความตระหนักและมีการควบคุมปริมาณการปนเปื้อนของสารพิษจากราทั้งในอาหารคน อาหารสัตว์ และผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรต่าง ๆ ให้อยู่ในปริมาณที่ไม่ส่งผลกระทบต่อสุขภาพทั้งคนและสัตว์ ทั้งนี้ปัญหาการปนเปื้อนสารพิษจากราในผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรยังส่งผลต่อเศรษฐกิจอีกด้วย (Medina-Córdova และคณะ 2016)

ตารางที่ 1.1 สารพิษจากราที่ส่งผลกระทบต่อสุขภาพของมนุษย์และสายพันธุ์ราที่สร้าง

สารพิษจากรา	สายพันธุ์รา	แหล่งปนเปื้อน	ผลต่อสุขภาพ
อะฟลาทอกซิน	<i>A. flavus</i> , <i>A. parasiticus</i>	ข้าวโพด, ข้าว, ข้าวสาลี, ข้าวฟ่าง, ถั่ว, พืชตระกูล มะเดื่อ	เนื้องอกในตับ, ตับแข็ง, มะเร็งตับ, โรคขาดโปรตีนและพลังงาน
โอคราทอกซินเอ	<i>A. ochraceus</i> , <i>P. verrucosum</i> , <i>A. carbonarius</i>	ธัญพืช, เมล็ดกาแฟ, องุ่นแห้ง, ไวน์	ไตอักเสบ, เนื้องอกในกระเพาะปัสสาวะ
ดีออกซินิวาเลนอล	<i>F. graminearum</i> , <i>F. culmorum</i>	ธัญพืชและผลิตภัณฑ์จาก ธัญพืช	คลื่นไส้อาเจียน, ปวดท้อง, ท้องเสีย, ปวดศีรษะ, วิงเวียน
ซีราเลโนน	<i>F. graminearum</i> , <i>F. culmorum</i>	ธัญพืชและผลิตภัณฑ์จาก ธัญพืช	พัฒนาการเข้าสู่วัยรุ่นเร็วเกินควรใน เด็กผู้หญิง, มะเร็งปากมดลูก
ฟุโมนิซิน	<i>F. verticillioides</i> , <i>F. proliferatum</i>	ข้าวโพดและผลิตภัณฑ์ จากข้าวโพด, ข้าวฟ่าง	มะเร็งหลอดอาหาร
พาทุลิน	<i>P. expansum</i>	แอปเปิ้ลและน้ำแอปเปิ้ล	ทำลายระบบทางเดินอาหารและ ระบบหายใจ ดีเอ็นเอและเอนไซม์

ดัดแปลงมาจาก Reddy และคณะ 2010

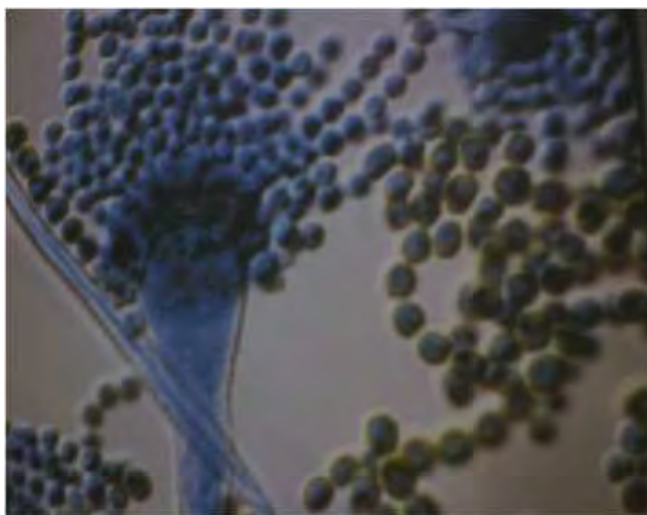
อะฟลาทอกซิน (Aflatoxin)

อะฟลาทอกซินถูกค้นพบครั้งแรกในช่วงปี ค.ศ. 1960 จากการตายของไก่วงกว่า 1000 ตัวในประเทศอังกฤษ แล้วพบว่าสาเหตุการตายมาจากสารพิษจากถั่วลิสงที่มีการปนเปื้อนราที่ไก่วงเหล่านั้นบริโภคเข้าไป (Klich 2007) ปัจจุบันอะฟลาทอกซินถูกจัดให้เป็นสารก่อมะเร็งในกลุ่มที่ 1 ตามการจัดกลุ่มขององค์การวิจัยมะเร็งนานาชาติ (International Agency for Research on Cancer; IARC) คือ เป็นสารที่ได้รับการยืนยันว่าก่อมะเร็งในมนุษย์ (Bocate และคณะ 2019) และยังสามารถก่อโรคอื่น ๆ ในสัตว์มีกระดูกสันหลัง (Armando และคณะ 2012)

อะฟลาทอกซินเป็นสารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิที่ได้จากวิถีโพลีคีไทด์ (Polyketide pathway) ซึ่งเป็นสารพิษจากราที่เป็นอนุพันธ์ของสารประกอบไดฟิวแรนโนคูมาริน (Difuranocoumarin) แสดงโครงสร้างดังภาพที่ 1.1 จำแนกออกเป็น 4 ชนิด ตามสีของการเรืองแสงภายใต้แสงเหนือม่วง (Ultraviolet light) และมีตัวเลขระบุที่บ่งชี้ถึงระยะการเคลื่อนที่สัมพัทธ์บนโครมาโตกราฟีแบบผิวนางได้แก่ B₁, B₂, G₁ และ G₂ (Klich 2007) โดยอะฟลาทอกซินชนิด B₁ เป็นชนิดที่พบได้ง่ายในธรรมชาติและพบการปนเปื้อนอย่างแพร่หลายในทั้งอาหารคนและอาหารสัตว์ รวมถึงมีความเป็นพิษมากกว่าชนิดอื่น (Gallo และคณะ 2016) นอกจากนี้ ยังมีอะฟลาทอกซินชนิด M₁ ที่เกิดจากการเติมหมู่ไฮดรอกซิลบนโมเลกุลของอะฟลาทอกซินชนิด B₁ ในกระบวนการเมแทบอลิซึม (Hydroxylated metabolite) โดยจากการศึกษาก่อนหน้าพบว่าอะฟลาทอกซิน B₁ ประมาณ 0.3-6.2 เปอร์เซ็นต์ จะเกิดปฏิกิริยาดังกล่าวกลายเป็นอะฟลาทอกซิน M₁ อะฟลาทอกซินชนิดนี้มักพบในน้ำนมของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Iqbal และคณะ 2015)

อะฟลาทอกซินถูกผลิตจากราในสกุล *Aspergillus* section *Flavi* โดยเฉพาะ *A. flavus*, *A. parasiticus* และ *A. nomius* เป็นต้น ซึ่งในแต่ละชนิดมีความสามารถในการผลิตอะฟลาทอกซินแตกต่างกัน (Marin และคณะ 2013) ซึ่ง *A. flavus* เป็นราที่พบการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรได้และเป็นสาเหตุที่สำคัญของการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินในผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร (Klich 2007) *A. flavus* เป็นสิ่งมีชีวิตในอาณาจักรฟังไจ ไฟลัม Ascomycota ชั้น Ascomycetes อันดับ Eurotiales วงศ์ Trichocomaceae เป็นราสายใยสายพันธุ์หลักที่ผลิตอะฟลาทอกซินโดยเฉพาะชนิด B₁ ซึ่งเป็นสารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิจากวิถีโพลีคีไทด์ *A. flavus* พบได้ทั่วไปในพื้นที่เขตร้อนมีความสามารถในการก่อโรคในทั้งพืชและสัตว์รวมทั้งในแมลง เรียกว่า Asperillois (Fakruddin และคณะ 2015) โดยเฉพาะในธัญพืช เช่น ก่อโรคฝักเน่าในข้าวโพด โรคกล้าเน่า และรากเน่าในถั่วลิสงหรือโรคอะฟลาโรท (Aflaroot) ซึ่งมีอาการใบเหลือง เนื้อเยื่อตาย และรากฝอยไม่เจริญ รวมถึงการผลิตอะฟลาทอกซินของ *A. flavus* ยับยั้งการเจริญของรากฝอยของต้นยาสูบ (Klich 2007) ซึ่งพบได้ทั่วไปในดินซึ่งมีบทบาทเป็นผู้ย่อยสลาย *A. flavus* สามารถเจริญได้ในอุณหภูมิตั้งแต่ 4-42 องศาเซลเซียส เจริญได้ดีที่สุด คือ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดต่างประมาณ 6.5 (Ahmed และคณะ 2016) และเจริญที่ค่าออกเตอร์แอกทิวิตี้ที่แตกต่างกันไปในแต่ละสภาวะ การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศจะใช้สปอร์ที่เรียกว่า โคนิเดีย (conidia) และในช่วงฤดูหนาวจะมีโครงสร้างที่เรียกว่า sclerotia เพื่อให้สามารถดำรงชีวิตได้ในสภาวะที่ไม่เหมาะสม *A. flavus* แบ่งได้เป็น 2 สายพันธุ์ตามขนาดของ sclerotia ได้แก่ สายพันธุ์ L มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง sclerotia มากกว่า 400

ไมโครเมตร และ สายพันธุ์ S มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางต่ำกว่า 400 ไมโครเมตร ซึ่งสายพันธุ์ L มีความสามารถในการผลิตอะฟลาทอกซินเพียงแค่ชนิด B เท่านั้น แต่สายพันธุ์ S สามารถผลิตได้ทั้งชนิด B และ G (Amaike และ Keller 2011) *A. flavus* เมื่อถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจะสร้างโคโลนีลักษณะแตกต่างกันออกไปในแต่ละชนิดของอาหาร โดยจากการศึกษาที่ผ่านมา เมื่อเลี้ยงในอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เจริญเป็นโคโลนีสีเขียวมะนาว และเมื่อส่องใต้กล้องจุลทรรศน์พบก้านชูสปอร์ (conidiophore) ผนังหนาและไม่มีสี conidia ขนาดประมาณ 3-5 ไมโครเมตร และเส้นใยมีผนังกั้น ดังภาพที่ 1.2 (Fakruddin และ คณะ 2015) ในขณะที่อีกการศึกษาหนึ่งกล่าวว่าเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดต่าง 5.5 และค่าวอเตอร์แอกทิวิตี 0.99 ราชนิดนี้แพร่กระจายได้ง่ายโดยเฉพาะในสภาวะที่แห้งแล้ง โดยมีโคโคนีเดียที่สามารถปลิวไปกับลมได้และการมีแมลงรบกวนยังช่วยแพร่กระจายและเสริมการติดเชื้อราชนิดนี้ในธัญพืชอีกด้วย (Amaike และ Keller 2011)



ภาพที่ 1.2 ลักษณะของ *A. flavus* เมื่อทำการส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Fakruddin และคณะ 2015)

อะฟลาทอกซินเป็นสารพิษที่ก่อโรคในคนอย่างรุนแรงแม้ได้รับในปริมาณน้อยทั้งในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม รวมถึงสัตว์มีกระดูกสันหลังบางชนิดด้วย โดยเฉพาะชนิด B₁ ซึ่งพบได้ง่ายในผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรจากการปนเปื้อนของราในขั้นตอนต่าง ๆ ของการผลิต ทั้งก่อนการเก็บเกี่ยวที่อาจเป็นผลมาจากสภาวะแห้งแล้งที่เสริมการเจริญเติบโตของ *A. flavus* รวมถึงในขั้นตอนการเก็บรักษาที่ไม่ได้มาตรฐาน เก็บในสภาวะที่เหมาะสมกับการเจริญและการผลิตสารพิษของเชื้อรา ซึ่งผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรเหล่านี้จะถูกแปรรูปต่อไปเป็นอาหารคนและสัตว์เพื่อบริโภค ทำให้สารพิษที่ปนเปื้อนเข้าสู่ร่างกายและมีการสะสมในเนื้อเยื่อ โดยอะฟลาทอกซินจะเข้าสู่ตับเป็นอวัยวะเป้าหมายแรก โรคที่เกิดจากการได้รับอะฟลาทอกซินเรียกว่า อะฟลาทอกซิโคซิส (aflatoxicoses) มีลักษณะอาการทั้งแบบเฉียบพลันและเรื้อรัง อาการแบบเฉียบพลันเกิดจากการได้รับอะฟลาทอกซินเข้าไปในปริมาณมาก จะมีอาการตกเลือด ตับวายเฉียบพลัน บวมหน้า และทำให้เสียชีวิต (Paterson และคณะ 2018) ส่วนอาการแบบเรื้อรัง อาการจะเกิดขึ้นอย่างช้า ๆ เช่น โรคมะเร็งหรือภูมิคุ้มกันถูกกดการทำงาน และยังเป็นสารที่ทำให้เกิดการ

กลายพันธุ์ด้วย (Bennet และ Klich 2003) เคยมีการรายงานว่ามีผู้เป็นโรคตับอักเสบและเสียชีวิตจำนวนมากจากการบริโภคข้าวโพดที่พบการปนเปื้อน *A. flavus* (Krishnamachari และคณะ 1975) อะฟลาทอกซิน B₁ เมื่อเข้าสู่ตับจะถูกเมแทบอลิต์กลายเป็น AFB₁-8,9-exo-epoxide และ AFB₁-8,9-endo-epoxide แล้วไปจับกับดีเอ็นเอที่เบสกวานีน ทำให้เกิด GC-TA transversion และเกิดการกลายพันธุ์ (Marin และคณะ 2013) นอกจากนี้ยังมีรายงานการเกิดโรคเยื่อหุ้มหัวใจอักเสบในเด็ก 7 เปอร์เซ็นต์ ที่ติดเชื้อ *A. flavus* (Soler และคณะ 2018) บทบาทการเป็นสารก่อมะเร็งของอะฟลาทอกซินเกิดจากการได้รับเข้าสู่ร่างกายเป็นเวลานานโดยเฉพาะชนิด B₁ ทำให้เป็นมะเร็งตับรวมถึงไต ปอด และลำไส้อีกด้วย (Amaike และ Keller 2011)

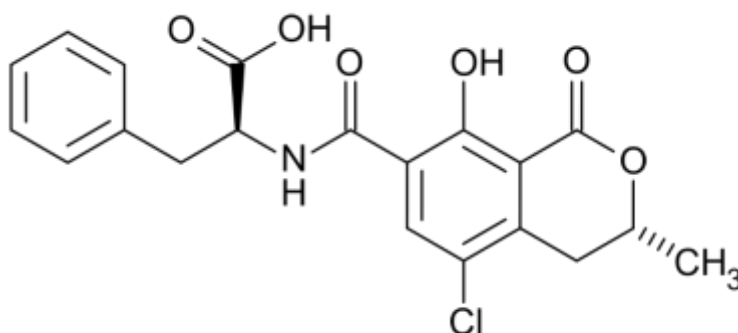
การปนเปื้อนอะฟลาทอกซินและราที่สร้างอะฟลาทอกซินอย่าง *A. flavus* ส่งผลต่อเศรษฐกิจเป็นอย่างมากในอุตสาหกรรมอาหารคนและอาหารสัตว์ เช่น ธัญพืช โดยเฉพาะข้าวโพดที่ได้รับการจัดการอย่างไม่เหมาะสม และถูกทำให้อยู่ในสภาวะที่เสริมการเจริญของ *A. flavus* (Cary และคณะ 2011) หรือในธัญพืชที่มีไขมันเป็นส่วนประกอบหลัก และยังแพร่กระจายได้ง่าย (Amaike และ Keller 2011) ในประเทศไทยเคยมีการศึกษาว่า ในปี 2013-2014 จากการสุ่มตรวจการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินในถั่วลิสง พบว่ามีการปนเปื้อนถึง 80 เปอร์เซ็นต์ จากตัวอย่างถั่วลิสงที่ยังไม่ได้รับการแปรรูปทั้งหมด ซึ่งการปนเปื้อนเฉลี่ยอยู่ที่ประมาณ 68.22 นาโนกรัมต่อกรัม (Kooprasertying และคณะ 2016)

การปนเปื้อนที่อันตรายนี้ส่งผลให้ต้องมีการควบคุมปริมาณการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหาร (Paterson และคณะ 2018) ในประเทศไทย กระทรวงสาธารณสุขกำหนดให้มีการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินทุกชนิดในอาหารไม่เกิน 20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 98 พ.ศ. 2529) ในต่างประเทศมีการควบคุมการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินอย่างเข้มงวด เช่น สหภาพยุโรปกำหนดให้มีปริมาณการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินปี 1 ในธัญพืชไม่เกิน 4 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ประเทศสหรัฐอเมริกามีการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินในอาหารไม่เกิน 20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม เป็นต้น (Papiya และ Sasmal 2001)

โอคราทอกซินเอ (Ochratoxin A)

โอคราทอกซินเอถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1965 จากการตรวจหาสารเมแทบอลิต์ของรา *Aspergillus ochraceus* ที่แยกจากข้าวโพดในประเทศสหรัฐอเมริกา (Bennet และ Klich 2003) โอคราทอกซินเอเป็นกรดอินทรีย์อ่อน มีค่า pKa เท่ากับ 7.1 มวลโมเลกุลเท่ากับ 403.8 กรัมต่อโมล เป็นสารที่มีความเสถียรสูงจึงยากต่อการกำจัดเมื่อมีการปนเปื้อน (El Khoury และ Atoui 2010) มีโครงสร้างที่ประกอบด้วยหมู่พาราคลอโรฟีโนลิก (para-chlorophenolic group) ที่มีไดไฮโดรไอโซคูมาลิน (dihydroisocoumarin) เชื่อมกันด้วยพันธะเอไมด์ (amide-linked) กลายเป็นสารประกอบแอล-ฟีนิลอะลานีน (L-phenylalanyl) มีโครงสร้างดังที่แสดงในภาพ ที่ 1.3 นอกจากนี้โอคราทอกซินเอแล้วยังมีโอคราทอกซินชนิดอื่น ๆ ที่เหมือนกัน เช่น โอคราทอกซินบี โอคราทอกซินซี ความแตกต่างขึ้นอยู่กับหมู่ฟังก์ชันที่ต่างกันออกไป ในแต่ละตำแหน่ง (El Khoury และ Atoui 2010) รวมถึงโอคราทอกซินชนิดแอลฟาที่เป็นอนุพันธ์ของโอคราทอกซินเอที่เกิดจากการไฮโดรไลซิสโอคราทอกซินเอ ซึ่งเป็นชนิดที่พบ

ได้บ่อย มีโครงสร้างคล้ายกับกรดอะมิโนฟีนิลอะลานีน สารพิษจากราชนิดนี้จึงมีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่มีกรดอะมิโนฟีนิลอะลานีนเป็นสารตั้งต้น โดยเฉพาะเอนไซม์ Phe-tRNA synthetase ส่งผลให้การสังเคราะห์โปรตีนลดลง อีกทั้งยังกระตุ้นการให้เกิดการตายของเซลล์ (apoptosis) หลาย ๆ ประเภท (Marin และคณะ 2013)



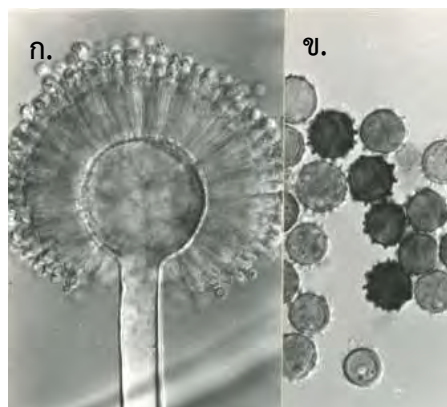
ภาพที่ 1.3 โครงสร้างของโอคราโทอกซินเอ

https://en.wikipedia.org/wiki/Ochratoxin_A#/media/File:Ochratoxin_A.svg

โอคราโทอกซินเอถูกผลิตจากราสายใย 2 สกุกที่สำคัญ ได้แก่ *Aspergillus* และ *Penicillium* โดยเฉพาะ *A. carbonarius*, *A. niger* และ *P. verrucosum* เป็นต้น (Bennet และ Klich 2003) *A. carbonarius* สามารถสร้างโอคราโทอกซินเอได้ดีในภูมิอากาศเขตอบอุ่นและเขตร้อน ตรวจพบได้ในผลผลิตทางการเกษตรและผลผลิตทางปศุสัตว์หลายชนิดที่มีการปนเปื้อนของราที่ผลิต เช่น ธัญพืชและผลิตภัณฑ์จากธัญพืช กาแฟ โกโก้ องุ่น เครื่องเทศ ผลไม้ และเนื้อ เป็นต้น (Zhu และคณะ 2015) ในขณะที่ ในประเทศที่มีอากาศเย็น การปนเปื้อนของโอคราโทอกซินเอมีสาเหตุมาจากราที่สร้างโอคราโทอกซินสายพันธุ์ที่เจริญได้ดีในสภาวะที่อุณหภูมิต่ำ เช่น *P. verrucosum* (El Khoury และ Atoui 2010)

A. carbonarius เป็นราสายใยในสกุก *Aspergillus* section *Nigri* หรือ black *Aspergilli* มีลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ดังภาพที่ 1.4 *A. carbonarius* เป็นหนึ่งในราสายพันธุ์หลักที่ผลิตโอคราโทอกซินเอ สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าวอเตอร์แอกทิวิตี้ประมาณ 0.95-0.99 และสภาวะที่เหมาะสมต่อผลิตโอคราโทอกซินเอมากที่สุดคือที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ค่าวอเตอร์แอกทิวิตี้ 0.95-0.98 ความสามารถในการเจริญของเส้นใยและการสร้างสารโอคราโทอกซินเอจะลดลงเมื่อค่าวอเตอร์แอกทิวิตี้ลดลง (Belli และคณะ 2005) อย่างไรก็ตามยังมีปัจจัยอื่น ๆ ที่มีผลต่อการเจริญของรา *A. carbonarius* เช่น ค่าความเป็นกรดต่าง สารอาหารที่ได้รับ เป็นต้น *A. carbonarius* เจริญและก่อโรคในพืชได้ เช่น โรคผลเน่า (black rot) ในองุ่น (Ayoub Reverberi และคณะ 2011) ราชนิดนี้ปนเปื้อนได้ง่ายโดยเฉพาะในองุ่นที่มีการจัดการที่ไม่เหมาะสม ในขั้นตอนทั้งก่อนและหลังการเก็บเกี่ยวและทำให้เกิดโรคเน่า (Fiori และคณะ 2014) เคยมีการศึกษา

สุ่มตัวอย่างผลไม้แห้ง 50 ชนิดจากตลาดในประเทศสเปนพบการปนเปื้อน *A. carbonarius* ถึง 58 เปอร์เซ็นต์ และจาก *A. carbonarius* ที่ตรวจพบทั้งหมด มีถึง 96.7% ที่ผลิตโอคราทอกซินเอ (ABARCA และคณะ 2003)



ภาพที่ 1.4 ลักษณะ conidial head (ก.) และ เซลล์โคนิเดีย (ข.) ของ *A. carbonarius* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (http://web-tmk.bcrc-firdi.net/fungi/fungal_detail.jsp?id=FU200802210018)

โอคราทอกซินเอเป็นสารพิษจากราที่เป็นอันตรายต่อมนุษย์และสัตว์ ผลกระทบจากสารพิษนี้จะแตกต่างกันไปขึ้นกับปริมาณและสายพันธุ์ที่ได้รับ (Haschek และ Voss 2013) โอคราทอกซินเอถูกจัดให้เป็นสารก่อมะเร็ง โดยองค์การวิจัยมะเร็งนานาชาติ อยู่ในกลุ่ม 2B คือ เป็นสารที่มีความเป็นไปได้ที่จะก่อมะเร็งในมนุษย์และสัตว์ เป็นอันตรายต่อไตของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตจากโรค Balkan endemic nephropathy รวมถึงเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดโรค Tunisian nephropathy อีกด้วย (El Khoury และ Atoui 2010) โอคราทอกซินเอเป็นสาเหตุให้เกิดมะเร็งเซลล์ตับและไต และยังพบการเกิดเนื้องอกที่ตับและมะเร็งหลอดอาหารจากการได้รับสารโอคราทอกซินเอ การได้รับโอคราทอกซินเอในขณะตั้งครรภ์ส่งผลให้เกิดความผิดปกติของระบบประสาทส่วนกลางของทารกได้ และยังทำให้เซลล์ประสาทและสมองเกิดความเสียหาย โอคราทอกซินเอสามารถผ่านรกเข้าไปสะสมอยู่ในตัวอ่อนในครรภ์ (fetus) แล้วส่งผลให้ทารกเกิดความผิดปกติในด้านรูปร่างและภูมิคุ้มกันได้ โอคราทอกซินเอในปริมาณที่น้อยก็ทำให้เกิดการกดการทำงานของภูมิคุ้มกันได้ กระตุ้นให้เซลล์ที่เนื้อเยื่ออ่อนน้ำเหลืองเกิดการตาย อีกทั้งยังมีความเป็นไปได้ว่า โอคราทอกซินเอจะมีบทบาทให้การยับยั้งการเพิ่มจำนวนของทีเซลล์ (T-lymphocyte) และบีเซลล์ (B-lymphocyte) โดยไปยับยั้งอินเตอร์ลิวคิน 2 (IL-2) และตัวรับสัญญาณของอินเตอร์ลิวคิน 2 (El Khoury และ Atoui 2010) ในแต่ละประเทศมีการกำหนดปริมาณการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอที่แตกต่างกัน ตัวอย่างดังเช่นตารางที่ 1.2 ในประเทศไทย มีการกำหนดปริมาณการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอในเมล็ดกาแฟอาราบิก้าและโรบัสต้าที่ 10 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ 2561)

ตารางที่ 1.2 การกำหนดปริมาณการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอในผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรและอาหารชนิดต่าง ๆ จากทั่วโลก

ผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรและอาหาร	ประเทศ	ปริมาณการปนเปื้อนโอคราทอกซิน (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)
ข้าว	เวียดนาม	23.75
	สเปน	3.6
	ตูนีเซีย	4.4
ข้าวโพด	ตุรกี	6.38
ข้าวสาลี	ตุรกี	0.75
ขนมปัง	สเปน	2.19
ข้าวบาร์เลย์	เกาหลี	0.8

ดัดแปลงมาจาก Duarte และคณะ 2010

การป้องกันการปนเปื้อนของรา

เนื่องจากการปนเปื้อนของราและสารพิษจากราในขั้นตอนการผลิตต่าง ๆ ทำให้เกิดการเน่าเสียของอาหารและก่อโรค รวมถึงส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจโดยเฉพาะในทางอุตสาหกรรม เพื่อป้องกันผลเสียที่เกิดขึ้นนี้ ในภาคการผลิตต้องมีการจัดการกับปัญหาการปนเปื้อนนี้ ซึ่งวิธีการจัดการที่เหมาะสมมีความแตกต่างกันไปในแต่ละขั้นตอน เช่น การใช้สารเคมีฆ่ารา การใช้สารกันบูด การใช้ยาปฏิชีวนะ เป็นต้น อย่างไรก็ตามก็มีการจำกัดปริมาณการใช้สารเคมีดังกล่าว ในขั้นตอนก่อนการเก็บเกี่ยว ซึ่งควรปฏิบัติตามหลัก GAP (good agriculture practice) (Paterson และคณะ 2018) ในขั้นตอนหลังการเก็บเกี่ยวและการเก็บรักษาวัตถุดิบมีการป้องกันการปนเปื้อนทั้งในทางกายภาพและทางเคมี ยังมีการใช้สารเคมีฆ่าราเป็นวิธีเบื้องต้นอาจทำในรูปแบบของการเคลือบบนผิววัตถุดิบ นอกจากนี้ยังมีการใช้วิธีการป้องกันวิธีอื่น ๆ เช่น การฆ่าเชื้อด้วยโอโซน คลอรีน ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดต่างและอุณหภูมิ และการฉายรังสีฆ่าเชื้อ เป็นต้น ส่วนในขั้นตอนการแปรรูปและการบรรจุวัตถุดิบมักป้องกันการปนเปื้อนในทางสุขลักษณะที่ดีของโรงงาน เช่น การใช้ระบบ HACCP (hazard analysis critical control point) และการจัดการสภาพแวดล้อมและศักยภาพของเครื่องมือที่ดี (Leyva Salas และคณะ 2017)

อย่างไรก็ตามการใช้สารเคมีฆ่าราามีผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภคและเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม มีการศึกษาพบว่า การใช้สารเคมีฆ่าราเป็นเวลานานจะกระตุ้นให้ราเกิดการทนทานและอาจผลิตสารพิษที่ไม่พึงประสงค์ได้ (Farbo และคณะ 2018) ด้วยเหตุนี้จึงมีการตระหนักถึงปริมาณการใช้ มีการควบคุมปริมาณการใช้ในผลิตภัณฑ์แต่ละประเภท (Perez และคณะ 2017) ในปัจจุบัน มีวิธีการทางเลือกที่ลดปัญหาจากการใช้สารเคมีฆ่า

ราสังเคราะห์โดยวิธีการควบคุมทางชีวภาพมาควบคุมการปนเปื้อนของราและการผลิตสารพิษโดยการใช้จุลินทรีย์แทน (Medina-Córdoba และคณะ 2016) การควบคุมทางชีวภาพ คือ การใช้จุลินทรีย์ที่เป็นปฏิปักษ์มายับยั้งการเจริญหรือการสร้างสารพิษของสิ่งมีชีวิตที่ก่อโรคในเจ้าบ้าน เช่น จุลชีพที่เป็นเชื้อก่อโรคหรือแมลงที่เป็นศัตรูพืชเพื่อควบคุมการก่อให้เกิดอันตราย (Pal และ McSpadden Gardener 2006)

ยีสต์ (Yeast)

ยีสต์ เป็นสิ่งมีชีวิตในกลุ่มยูคาริโอต เป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียว จัดอยู่ในอาณาจักรฟังไจ ส่วนใหญ่อยู่ในไฟลัม Ascomycota สามารถพบได้ทั่วไปในดินหรือพืชต่าง ๆ เป็นต้น ยีสต์ส่วนใหญ่สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อ (Budding) ดังภาพที่ 1.5 บางชนิดสืบพันธุ์แบบแบ่งตัว (Fission) (Encyclopaedia Britannica 2020) ในปัจจุบัน ยีสต์ถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะอุตสาหกรรมอาหาร เช่น การผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ การผลิตขนมปัง เป็นต้น



ภาพที่ 1.5 เซลล์ยีสต์ที่สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อ (Encyclopaedia Britannica 2020)

ปัจจุบันมีการใช้ยีสต์ที่เป็นปฏิปักษ์ในการเป็นสารควบคุมทางชีวภาพอย่างแพร่หลายแทนการใช้สารเคมีฆ่าราเพื่อควบคุมการก่อโรคของเชื้อราที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรต่าง ๆ ในช่วงหลายปีที่ผ่านมาได้มีการศึกษาที่คัดแยกยีสต์จากแหล่งธรรมชาติและผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรที่หลากหลาย มาทดสอบความสามารถในการเป็นปฏิปักษ์ของยีสต์ต่อราก่อโรค เพื่อการนำไปใช้เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพ (Lui และคณะ 2013) ในงานวิจัยของ Gustavo Cordero-Bueso และคณะ (2017) ศึกษาการใช้ยีสต์ที่แยกได้จากงุ่นเป็นตัวควบคุมทางชีวภาพในการควบคุมราก่อโรคในงุ่น ลักษณะเด่นที่ทำให้ยีสต์ถูกใช้เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพได้แก่ 1.) สามารถเจริญได้อย่างรวดเร็วเมื่อเทียบกับราสายใย 2.) เป็นจุลชีพที่ต้องการสารอาหารไม่ซับซ้อน ทำให้ง่ายต่อการเลี้ยง และ 3.) มีความสามารถในการเจริญบนพื้นที่แห้งหรือในหลาย ๆ สภาวะ เพื่อแย่งสารอาหารและพื้นที่ในการเจริญได้ดี ซึ่งกลไกทำการต่อต้านรานี้ประกอบด้วยกลไกทางกายภาพและชีวเคมีที่หลากหลาย เช่น การแย่งชิง

พื้นที่และสารอาหาร การหลั่งเอนไซม์จำเพาะหรือการสร้างสารยับยั้งจุลชีพ นอกจากนี้ยีสต์ยังมีความสามารถในการลดการสร้างพิษจากราอีกด้วย (Medina-Córdoba และคณะ 2016)

การสร้างสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายเป็นอีกหนึ่งกลไกสำคัญที่ยีสต์ปฏิบัติใช้ในการยับยั้งราก่อโรค มีการศึกษาพบว่ายีสต์บางสายพันธุ์มีความสามารถในการผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายไปยับยั้งการเจริญและการสร้างสปอร์ของราที่ปนเปื้อนในเมล็ดกาแฟ (de Melo Pereira, Beux และคณะ 2016) มีงานวิจัยที่ศึกษาความสามารถและกลไกของยีสต์ในการเป็นปฏิปักษ์ต่อราและการลดการผลิตสปอร์จากรา งานวิจัยของ Belén Peromingo และคณะ (2018) พบว่ายีสต์ *Debaryomyces hansenii* สามารถลดการเจริญของรา *P. verrucosum* ได้ รวมถึงงานวิจัยของ Randa Zeidan และคณะ (2018) แสดงให้เห็นว่า สารอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ *Lachancea thermotolerans* มีประสิทธิภาพในการควบคุมการเจริญของ *Fusarium graminearum*, *A. parasiticus* และ *P. verrucosum* ได้ และลดการผลิตอะฟลาทอกซินของ *A. parasiticus* และ ตีออกซิโนวาเลนอนของ *F. graminearum* องค์ประกอบของสารอินทรีย์ระเหยง่ายดังกล่าวถูกคาดว่าเป็น 2-phenylethanol และมีการศึกษากลไกของสารอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ที่ส่งผลถึงการเจริญและการผลิตสปอร์จากราในระดับพันธุกรรม (Hua และคณะ 2014) จากการศึกษาของ Farbo และคณะ (2018) แสดงให้เห็นว่า สารอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ที่ไม่มีความสามารถในการหมักและยีสต์ที่มีความสามารถในการหมักต่ำ สามารถยับยั้งการเจริญและการผลิตโอคราทอกซินเอจาก *A. carbonarius* และ *A. ochraceus* ได้อย่างมีนัยสำคัญ สารอินทรีย์ระเหยง่ายนี้ส่งผลให้เกิดการลดการแสดงออกของยีนสำคัญในวิถีชีวสังเคราะห์ของโอคราทอกซินเอและเมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบของสารเคมีระเหยง่ายของยีสต์เหล่านั้น พบว่าเป็นสาร 2-phenylethanol นอกจากนี้ความสามารถในการเป็นปฏิปักษ์เหล่านี้

ในด้านความปลอดภัย ยีสต์ส่วนใหญ่ถูกรับรองว่าเป็น Generally recognized as safe (GRAS) คือ เป็นสารที่สามารถใส่ลงในอาหารได้อย่างปลอดภัย ซึ่งยีสต์มักถูกใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น การทำขนมปัง การผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ ตลอดจนการนำยีสต์มาใช้ในการปรับปรุงรสชาติเครื่องดื่ม เป็นต้น ยีสต์จึงถูกคาดหวังกับการใช้เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพและปลอดภัยในการควบคุมราที่ผลิตสปอร์จากราในอาหาร (Randa และคณะ 2018)

ซึ่งในงานวิจัยก่อนหน้า (จิตโสภิน สมักรกาล 2561) ได้มีการคัดแยกยีสต์จากเมล็ดกาแฟอาราบิก้าจากโครงการในพระราชดำริ จากสถาบันวิจัยโครงการหลวงแม่หลอด ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงตีนตก และศูนย์พัฒนาโครงการหลวงป่าเมี่ยง จังหวัดเชียงใหม่ ซึ่งยีสต์ถูกนำมาคัดแยก ศึกษาลักษณะต่าง ๆ และประเมินผลการเป็นปฏิปักษ์เบื้องต้น ผู้วิจัยจึงเลือกยีสต์ที่แสดงผลการเป็นปฏิปักษ์สูงมาทดสอบในงานวิจัยนี้

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย คือ 1.) เพื่อทดสอบความสามารถในการเป็นปฏิปักษ์ของยีสต์ที่แยกได้จากเมล็ดกาแฟต่อการเจริญและการผลิตสารพิษจากราของ *A. flavus* และ *A. carbonarius* และ 2.) เพื่อทดสอบความสามารถในการผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายเพื่อยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษจากราทั้ง 2 ชนิด

บทที่ 2

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. กรวยกรองขนาด 50 มิลลิลิตร บริษัท Pyrex, Germany
2. กระดาษกรอง Whatman, USA
3. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงยี่ห้อ Olympus รุ่น CH30 บริษัท อีฟอรัมแอล อินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด, Japan
4. เครื่องชั่ง (Electronic balance) รุ่น PG6025 และ A6285 บริษัท Mettler, Toledo, Switzerland
5. เครื่องโซนิเคเตอร์ ยี่ห้อ Babdelin Electronic, USA
6. เครื่องดูดอากาศ (suction)
7. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ รุ่น SS-325 และ ES-315 ยี่ห้อ Tomy, Japan
8. เครื่องปั่นผสม (Vortex mixer) รุ่น Gene 2 บริษัท Scientific industries, USA
9. เครื่องเปลี่ยนอากาศเป็นแก๊สไนโตรเจน บริษัท Peak Scientific
10. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ยี่ห้อ Thermo Scientific Biomate 3S, Germany
11. เครื่องวัดค่าความเป็นกรดต่าง (pH meter) รุ่น S20- K Seven Easy บริษัท Mettler Toledo, USA
12. จานเลี้ยงเชื้อแก้วขนาด 15x100 มิลลิลิตร บริษัท Pyrex, Germany
13. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส
14. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ยี่ห้อ Caotberm, Scientific, Newzealand
15. ตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า (Incubator shaker) อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส
16. ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ยี่ห้อ SANDEN INTERCOOL, Thailand
17. ตู้เขี่ยเชื้อรุ่น V6-T ขนาด 24 ฟุต บริษัท Mammertt germany และตู้เขี่ยเชื้อ รุ่น Mark 11 ยี่ห้อ Clean บริษัท Lab service, Thailand

18. ตู้อบแห้ง บริษัท Sontherm Scientific, Newzealand
19. ถุงมือยาง SRITRANG GLOVES บริษัท สยามเซมเพอร์เมต, Thailand
20. ถุงมือไนไตรล์ ยี่ห้อ Semperguard บริษัท สยามเซมเพอร์เมต, Thailand
21. ปีกเกอร์แก้ว ขนาด 20, 200 และ 500 มิลลิลิตร บริษัท Pyrex, Germany
22. พาสเจอร์ปีเปตต์แก้ว ขนาด 230 มิลลิลิตร ยี่ห้อ Qualicolor, Germany
23. แผ่นพาราฟิล์ม บริษัท Mennasha, Thailand
24. ไมโครปีเปตต์ ขนาด 5, 20, 200 และ 1000 ไมโครลิตร บริษัท Eppendorf, Germany
25. หลอดทดลอง ขนาด 16x150 มิลลิลิตร บริษัท Pyrex, Germany
26. หลอดทดลองฝาเกลียว ขนาด 13x100 มิลลิลิตร บริษัท Pyrex, Germany
27. หลอดทดลองฝาเกลียว ขนาด 16x150 มิลลิลิตร บริษัท Pyrex, Germany
28. หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร บริษัท Axygen, Germany
29. ฮีมาไซโตมิเตอร์ บริษัท Precicolor, Germany

เคมีภัณฑ์

1. Potato Dextrose Agar (PDA) บริษัท Difco Laboratories, USA
2. HPLC Grade methanol บริษัท Merck, Germany
3. กรดฟอร์มิก (CH_2O) บริษัท Merck, Germany
4. กรดอะซิติก (CH_2COOH) บริษัท Merck, Germany
5. กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (conc. HCL)
6. โซเดียมคลอไรด์ (Nacl) บริษัท Merck, Germany
7. โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) บริษัท Merck, Germany
8. โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น (conc. NaOH)
9. น้ำกลั่น

10. น้ำปลอดประจุ
11. ผงวุ้น (agar) บริษัท Difco Laboratories, USA
12. ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) บริษัท HiMedia Laboratories Pvt.Ltd., India
13. ผงสกัดจากมอลต์ (malt extract) บริษัท HiMedia Laboratories Pvt.Ltd., India
14. โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) บริษัท Merck, Germany
15. เพปโทน (peptone) บริษัท HiMedia Laboratories Pvt.Ltd., India
16. โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) บริษัท Merck, Germany
17. เมทานอล (CH_2OH) บริษัท Merck, Germany
18. เมทิลีนบลู (Methylene blue)
19. อะซิโตไนไตรล์ (CH_2CN) บริษัท Merck, Germany

จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ ได้รับมาจากคลังจุลินทรีย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1. *Aspergillus carbonarius* สายพันธุ์ TK4.2
2. *Aspergillus flavus* สายพันธุ์ M3T8R403
3. ยีสต์ไอโซเลต Y08 ซึ่งแยกมาจากสถาบันวิจัยโครงการหลวงแม่หลอด และศูนย์พัฒนาโครงการหลวงตีนตก จังหวัดเชียงใหม่ ประเทศไทย
4. ยีสต์ไอโซเลต Y20 ซึ่งแยกมาจากสถาบันวิจัยโครงการหลวงแม่หลอด ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงตีนตก และศูนย์พัฒนาโครงการหลวงป่าเมี่ยง จังหวัดเชียงใหม่ ประเทศไทย

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

1.1 ยีสต์

นำยีสต์ที่แยกได้จากเมล็ดกาแฟอาราบิก้าจากโครงการในพระราชดำริ 2 ไอโซเลต ได้แก่ Y08 ที่แยกได้จากสถาบันวิจัยโครงการหลวงแม่ฮ่องสอนและศูนย์พัฒนาโครงการหลวงตีนตก และยีสต์ Y20 ที่แยกได้จากสถาบันวิจัยโครงการหลวงแม่ฮ่องสอน ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงตีนตก และศูนย์พัฒนาโครงการหลวงป่าเมี่ยง จังหวัดเชียงใหม่ ซึ่งถูกทดสอบในเบื้องต้นแล้วว่ามีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของรา *A. carbonarius* มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Yeast extract-Malt extract (YM agar plate) (ภาคผนวก ก) ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน แล้วเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.2 รา

นำราที่ใช้ในการศึกษา 2 ชนิด ได้แก่ *A. flavus* สายพันธุ์ M3T8R403 และ *A. carbonarius* สายพันธุ์ TK4.2 มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Potato Dextrose Agar (PDA plate) (ภาคผนวก ก) แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 7 วัน แล้วเก็บรักษาในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส

2. การศึกษาระยะการเจริญของยีสต์เพื่อหาระยะเวลาการเจริญช่วงมิดล็อก (mid log phase)

นำยีสต์โคลนเดี่ยวจากยีสต์ที่เลี้ยงไว้บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง YM มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วบ่มที่ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น นำยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ใส่ลงอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Yeast extract Peptone Dextrose (YPD) (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 80 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ บ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างมาวัดการเจริญด้วยวิธีสเปกโตรโฟโตเมตริกทุก ๆ 1 ชั่วโมง จนถึงชั่วโมงที่ 28 และหลังจากนั้นทุก ๆ 2 ชั่วโมงจนครบ 48 ชั่วโมง โดยวัดค่า OD ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร แล้วนำค่า OD มาเขียนกราฟการเจริญของยีสต์ จากนั้นพิจารณาหาระยะเวลาการเจริญช่วงมิดล็อกเพื่อไปใช้ในการทดสอบต่อไป

3. การทดสอบการเป็นปฏิปักษ์ของยีสต์ต่อการเจริญและการผลิตสารพิษจากรา

3.1 เตรียมสารแขวนลอยเซลล์ยีสต์

นำยีสต์โคลนเดี่ยวจากยีสต์ที่เลี้ยงไว้บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง YM มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น นำยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM ปริมาตร 250 ไมโครลิตร มาเลี้ยงต่อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เวลาในการบ่มเป็นไปตามระยะเวลาการเจริญช่วงมิดล็อกของแต่ละไอโซเลตจากผลการทดลองข้อ 2. หลังจากบ่มแบ่งอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียีสต์เจริญปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำมาปั่นตกเซลล์แล้วล้างเซลล์ด้วยสารละลาย PBS (ภาคผนวก ข) นับจำนวนเซลล์ยีสต์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ (hemacytometer) ให้ได้ความเข้มข้นเซลล์ 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

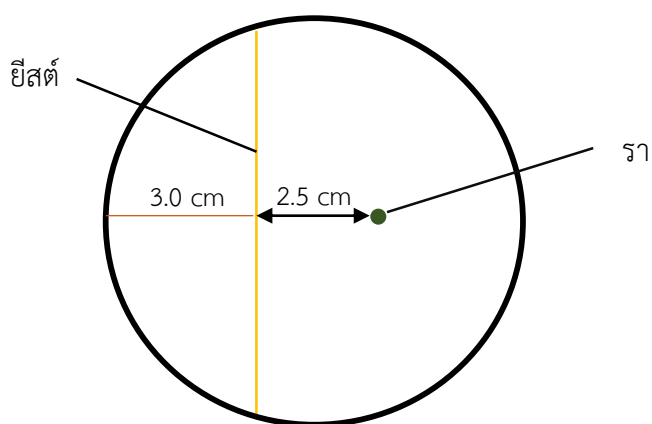
3.2 เตรียมสารแขวนลอยสปอร์รา

นำรามาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส 7 วัน แล้วนำราที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แข็ง PDA มาชุดเอาสปอร์รา โดยใช้ Physiological water (ภาคผนวก ข) แล้วนำไปนับจำนวนสปอร์ราให้ได้ความ เข้มข้นสปอร์ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

3.3 ทดสอบการยับยั้งการเจริญของราด้วยวิธี Dual culture (Pantelides และคณะ 2015)

ทำการทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA โดยนำสารแขวนลอยเซลล์ยีสต์ (จากข้อ 3.1) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร มาขีดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 เซนติเมตร ยาวจากบนจนสุดขอบ จานด้านล่าง จากนั้นนำสารแขวนลอยสปอร์รา (จากข้อ 3.2) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อใน จานเดียวกัน ห่างจากเส้นที่ขีดเซลล์ยีสต์ 2.5 เซนติเมตร (ภาพที่ 6) รอจนแห้งแล้วนำไปบ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ทำทั้งหมด 3 ซ้ำ โดยชุดควบคุมเป็นจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ขีดด้วยสารละลาย PBS ที่ไม่มีเซลล์ยีสต์ วัดความสามารถในการยับยั้งเจริญของราโดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีราหลังจากการบ่ม 7 วัน แล้วนำมา คำนวณเทียบกับชุดควบคุม

$$\% \text{ การยับยั้ง} = \frac{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีชุดควบคุม} - \text{เส้นผ่านศูนย์กลางชุดทดสอบ}}{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีชุดควบคุม}} \times 100\%$$



ภาพที่ 2.1 การทดสอบความเป็นปฏิปักษ์ของยีสต์ต่อรา ด้วยวิธี Dual culture

3.4 ทดสอบการยับยั้งการผลิตสารพิษจากรา

หลังจากวัดการเจริญในข้อ 3.3 นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อมาเจาะรูอาหารเลี้ยงเชื้อบริเวณรอบโคโลนีราและในโคโลนีราทั้งหมด 6 ชิ้น ด้วยพาสเจอร์ปีเปตต์แก้ว โดยเจาะตำแหน่งเดียวกันในทุก ๆ ชุดทดสอบและชุดควบคุม แล้วนำมาสกัดสารพิษจากรา ทำโดยนำขวดสกัดพร้อมฝาซึ่งน้ำหนักก่อนและหลังใส่วันทั้ง 6 ชิ้น แล้วชั่งน้ำหนักวัน จากนั้นเติมสารสกัดโอคราทอกซินเอ (เมทานอล : กรดฟอร์มิก อัตราส่วน 25 : 1) ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร สำหรับ *A. carbonarius* ส่วน *A. flavus* เติมสารสกัดอะฟลาทอกซินบี 1 (เมทานอล) ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร นำไปใส่เครื่องโซนิเคเตอร์ 15 นาที แล้วกรองส่วนวันออกจากสารสกัด นำสารที่สกัดได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ไประเหยแห้งด้วยแก๊สไนโตรเจนจนแห้งสนิท แล้วนำมาเติมเฟสเคลื่อนที่ (อะซิโตนไตรล : น้ำปลอดประจุ : กรดอะซิติก อัตราส่วน 49.5 : 49.5 : 1 สำหรับโอคราทอกซินเอ และ อะซิโตนไตรล : น้ำปลอดประจุ : เมทานอล อัตราส่วน 20 : 60 : 20 สำหรับอะฟลาทอกซินบี 1) กรองสารผ่านหัวกรองสำเร็จขนาด 0.22 ไมโครเมตร แล้วส่งวิเคราะห์ปริมาณสารพิษด้วยวิธีโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography: HPLC) ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย แล้วนำผลที่ได้มาคำนวณหาปริมาณโอคราทอกซินเอและอะฟลาทอกซินบี 1

การวัดปริมาณสารพิษจากรา อะฟลาทอกซินบี 1 ใช้คอลัมน์ C18 (150x 4.60 มิลลิเมตร, 5 ไมโครเมตร) เครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนส์ที่มี excitation wavelength เท่ากับ 365 นาโนเมตร และ emission wavelength เท่ากับ 435 นาโนเมตร อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และ retention time คือ 7 นาที ในส่วนของโอคราทอกซินเอใช้คอลัมน์ C18 (250x 4.60 มิลลิเมตร, 5 ไมโครเมตร) เครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนส์ที่มี excitation wavelength เท่ากับ 333 นาโนเมตร และ emission wavelength เท่ากับ 477 นาโนเมตร อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และ retention time เป็น 10 นาที

4. ทดสอบความสามารถในการผลิตสารอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์เพื่อยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษจากรา

นำสารแขวนลอยสปอร์รา (จากข้อ 3.2) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA นำสารแขวนลอยเซลล์ยีสต์ (จากข้อ 3.1) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร มากระจายเชื้อให้ทั่วบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง YPD รอจนจานอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมดแห้งแล้วนำจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่มีสารสปอร์ราและจานอาหารเลี้ยงเชื้อ YPDA ที่มีเซลล์ยีสต์มาประกบเข้าหากัน โดยจานที่เซลล์ยีสต์อยู่ด้านบน และจานที่มีสปอร์ราอยู่ด้านล่าง พันพาราฟิล์ม 2 ชั้นเพื่อป้องกันการรั่วไหลของสารอินทรีย์ระเหยง่าย จากนั้นนำไปบ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน แล้ววัดผลการยับยั้งเจริญของราเช่นเดียวกับข้อ 3.3 และวัดผลการยับยั้งการผลิตสารพิษดังข้อ 3.4

5. ทดสอบผลของสภาวะต่าง ๆ ต่อการผลิต และประสิทธิภาพของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายจากยีสต์

แปรผันสภาวะต่าง ๆ ในการเลี้ยงยีสต์ร่วมกับรา ได้แก่ อุณหภูมิในการบ่มยีสต์ร่วมกับรา ค่าความเป็นกรดต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อของยีสต์ และความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงเชื้อของยีสต์

5.1 การแปรผันอุณหภูมิ

นำสารแขวนลอยสปอร์รา (จากข้อ 3.2) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA นำสารแขวนลอยเซลล์ยีสต์ (จากข้อ 3.1) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร กระจายเชื้อให้ทั่วบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง YPD รोजนจานอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมดแห้งแล้วนำจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่มีสารสปอร์ราและจานอาหารเลี้ยงเชื้อ YPDA ที่มีเซลล์ยีสต์มาประกบเข้าหากัน โดยจานที่เซลล์ยีสต์อยู่ด้านบน และจานที่มีสปอร์ราอยู่ด้านล่าง พันพาราฟิล์ม 2 ชั้นเพื่อป้องกันการรั่วไหลของสารอินทรีย์ระเหยง่าย จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน แล้ววัดผลการยับยั้งเจริญของราเช่นเดียวกับข้อ 3.3 และวัดผลการยับยั้งการผลิตสารพิษดังข้อ 3.4

5.2 การแปรผันค่าความเป็นกรดต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อของยีสต์

นำสารแขวนลอยสปอร์รา (จากข้อ 3.2) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA นำสารแขวนลอยเซลล์ยีสต์ (จากข้อ 3.1) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร กระจายเชื้อให้ทั่วบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง YPD ที่ถูกปรับค่าความเป็นกรดต่างต่างกัน (4, 5 และ 6) รोजนจานอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมดแห้งแล้วนำจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่มีสารสปอร์ราและจานอาหารเลี้ยงเชื้อ YPDA ที่มีเซลล์ยีสต์มาประกบเข้าหากัน โดยจานที่เซลล์ยีสต์อยู่ด้านบน และจานที่มีสปอร์ราอยู่ด้านล่าง พันพาราฟิล์ม 2 ชั้นเพื่อป้องกันการรั่วไหลของสารอินทรีย์ระเหยง่าย จากนั้นนำไปบ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน แล้ววัดผลการยับยั้งเจริญของราเช่นเดียวกับข้อ 3.3 และวัดผลการยับยั้งการผลิตสารพิษดังข้อ 3.4

5.3 การแปรผันความเข้มข้นของสารอาหารของยีสต์

นำสารแขวนลอยสปอร์รา (จากข้อ 3.2) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA นำสารแขวนลอยเซลล์ยีสต์ (จากข้อ 3.1) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร กระจายเชื้อให้ทั่วบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง YPD ที่ความเข้มข้นต่างกันได้แก่ 0.1 เท่า 0.5 เท่า และ 1.0 เท่า รोजนจานอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมดแห้งแล้วนำจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่มีสารสปอร์ราและจานอาหารเลี้ยงเชื้อ YPDA ที่มีเซลล์ยีสต์มาประกบเข้าหากัน โดยจานที่เซลล์ยีสต์อยู่ด้านบน และจานที่มีสปอร์ราอยู่ด้านล่าง พันพาราฟิล์ม 2 ชั้นเพื่อป้องกันการรั่วไหลของสารอินทรีย์ระเหยง่าย จากนั้นนำไปบ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน แล้ววัดผลการยับยั้งเจริญของราเช่นเดียวกับข้อ 3.3 และวัดผลการยับยั้งการผลิตสารพิษดังข้อ 3.4

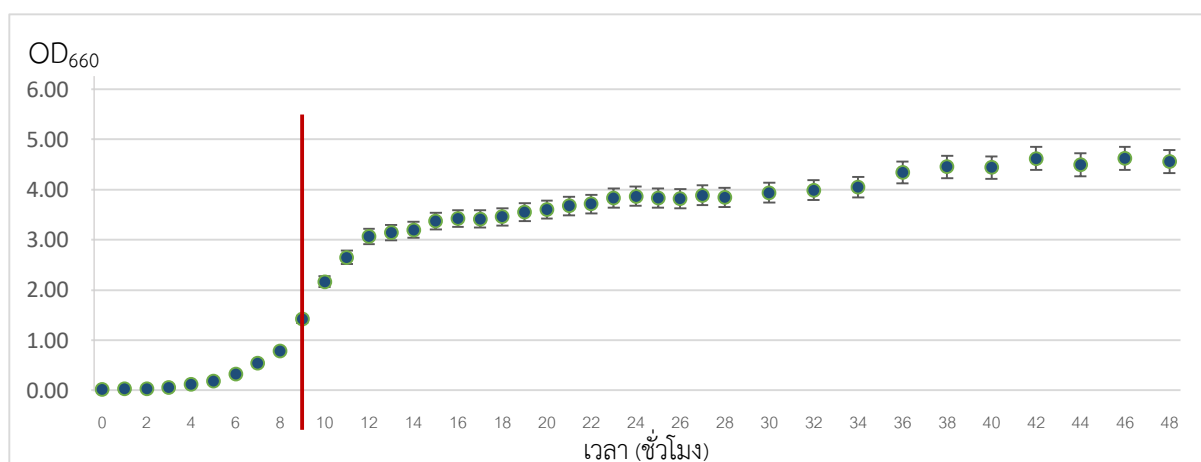
บทที่ 3

ผลการทดลอง

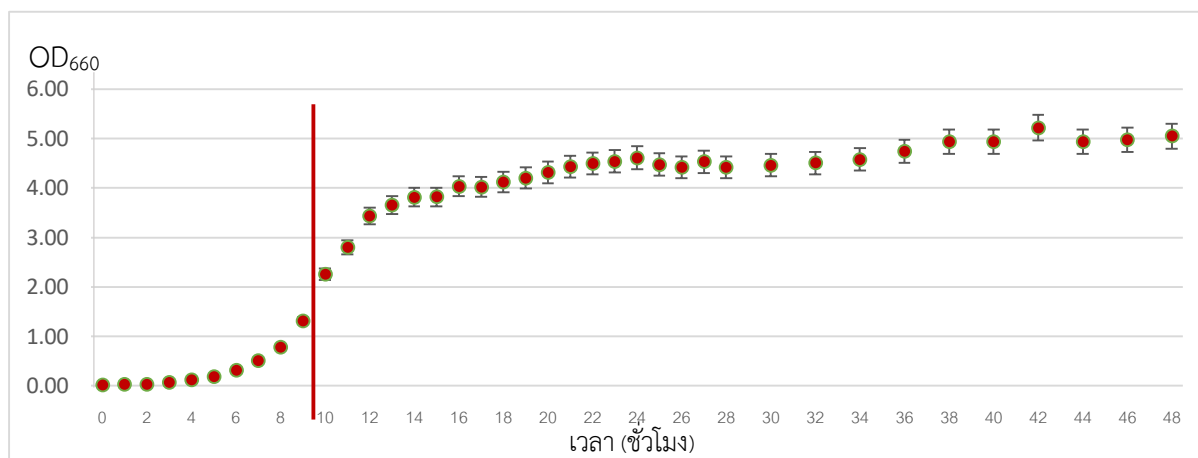
1. ระยะเวลาเจริญของยีสต์

นำยีสต์สายพันธุ์ Y08 และ Y20 เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YPD บ่มแบบเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ผลการเจริญของยีสต์ Y08 (ภาพที่ 3.1) พบว่าที่เวลาดั้งแต่ชั่วโมงที่ 0-6 การเจริญยังไม่เพิ่มขึ้นมากนัก ซึ่งคาดว่าเป็นระยะพัก (lag phase) หลังจากนั้นพบว่าการเจริญเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วหลังจาก ชั่วโมงที่ 6 ถึงชั่วโมงที่ 12 ซึ่งเป็นระยะ log phase และหลังชั่วโมงที่ 12 การเจริญค่อนข้างคงที่จนจบการทดลอง เมื่อพิจารณาช่วงตรงกลางของระยะ log phase (mid log phase) ของยีสต์ Y08 คือ ชั่วโมงที่ 9 ของการเจริญ

การเจริญของยีสต์ Y20 (ภาพที่ 3.2) แสดงให้เห็นระยะพักในช่วงชั่วโมงที่ 0-6 หลังจาก 6 ชั่วโมงการเจริญเพิ่มขึ้นเป็นทวีคูณจนถึงชั่วโมงที่ 13 และหลังจากนั้นการเจริญคงที่ ดังนั้นระยะเวลาการเจริญช่วงมิดล็อกของยีสต์ Y20 คือ ชั่วโมงที่ 9.5 ของการเจริญในอาหาร YPD



ภาพที่ 3.1 การเจริญของยีสต์ Y08 ในแต่ละเวลา เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YPD บ่มแบบเขย่า 200 รอบต่อนาที 30 องศาเซลเซียส

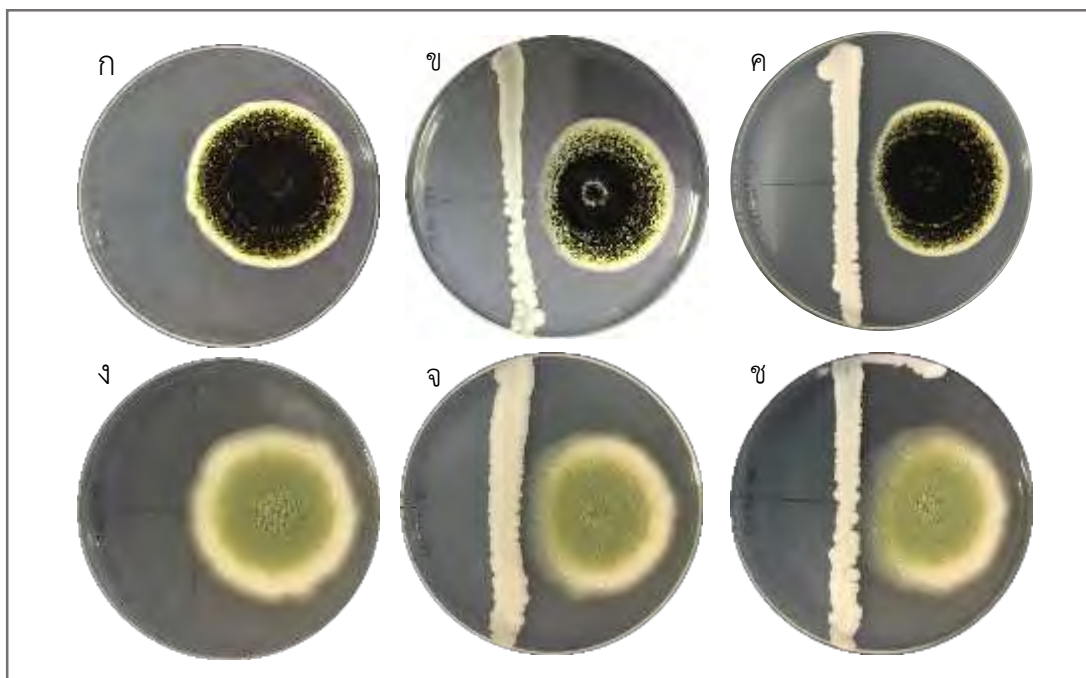


ภาพที่ 3.2 การเจริญของยีสต์ Y20 ในแต่ละเวลา เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YPD บ่มแบบเขย่า 200 รอบ ต่อนาที 30 องศาเซลเซียส

2. การเป็นปฏิปักษ์ของยีสต์ต่อการเจริญและการผลิตสารพิษจากรา

การทดสอบการเป็นปฏิปักษ์ของยีสต์ด้วยการเลี้ยงยีสต์และราพร้อมกันด้วยวิธี Dual culture บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA (ตารางที่ 3.1) พบว่ายีสต์ทั้ง 2 ไอโซเลต สามารถยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษจากราทั้ง 2 ชนิดได้ เมื่อสังเกตลักษณะโคโลนีรา (ภาพที่ 3.3) พบว่า มีขนาดลดลง เมื่อเทียบกับชุดควบคุม แต่ยังคงมีการสร้างสปอร์ และโคโลนีราไม่สามารถเจริญที่บรอยซิดของยีสต์ได้ การยับยั้ง *A. carbonarius* โดยยีสต์ Y08 และ Y20 (ตารางที่ 3.1) ให้ผลการยับยั้งการเจริญที่ใกล้เคียงกันคือ 17.86 ± 2.61 เปอร์เซ็นต์ และ 19.39 ± 2.99 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่เลี้ยงราโดยไม่มียีสต์ การยับยั้งการผลิตโอคราทอกซินเอพบวารา *A. carbonarius* ที่เลี้ยงร่วมกับยีสต์ Y08 ผลิตโอคราทอกซินเอลดลงถึง 37.08 ± 16.81 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบชุดควบคุม

ผลการเป็นปฏิปักษ์ต่อรา *A. flavus* (ตารางที่ 3.1) โดยการใช้ยีสต์ Y08 และยีสต์ Y20 ยับยั้งการเจริญของราได้ไม่แตกต่างกัน เมื่อเทียบกับชุดควบคุม *A. flavus* ที่เลี้ยงร่วมกับยีสต์ผลิตอะฟลาทอกซินปีลดลงใกล้เคียงกัน คือ 37.08 ± 16.81 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเลี้ยงกับยีสต์ Y08 และ 38.17 ± 15.70 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเลี้ยงกับยีสต์ Y20



ภาพที่ 3.3 ลักษณะโคโลนีของรา *A. carbonarius* (ก-ค) และ *A. flavus* (ง-ช) ในการทดสอบความเป็นปฏิปักษ์ของยีสต์ด้วย dual culture บนอาหาร PDA หลังการบ่ม 7 วัน โดย ก และ ง เป็นชุดควบคุม, ข และ จ บ่มร่วมกับยีสต์ Y08 และ ค และ ง บ่มร่วมกับยีสต์ Y20

ตารางที่ 3.1 การยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษของรา *A. carbonarius* และ *A. flavus* โดยการเลี้ยงร่วมกับยีสต์ Y08 และยีสต์ Y20 ด้วยวิธี Dual culture บนอาหาร PDA บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

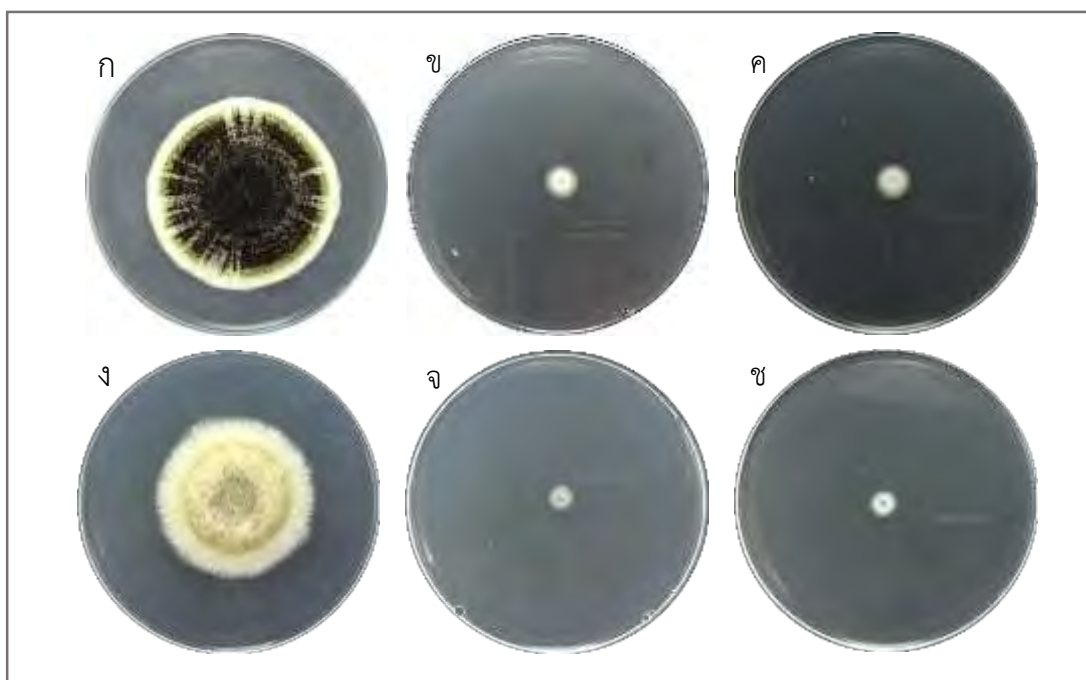
รา	ยีสต์	การเจริญ	การผลิตสารพิษจากรา
<i>A. carbonarius</i>	Y08	17.86% ± 2.61	37.08% ± 16.81
	Y20	19.39% ± 2.99	31.81% ± 16.20
<i>A. flavus</i>	Y08	20.85% ± 4.91	39.86% ± 7.29
	Y20	19.80% ± 4.82	38.17% ± 15.70

3. การผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์

จากการทดสอบเลี้ยงยีสต์และราร่วมกันโดยไม่สัมผัสกัน และป้องกันการรั่วไหลของสาร เมื่อสังเกตที่ลักษณะของโคโลนีรา (ภาพที่ 3.4) ขนาดโคโลนีของชุดควบคุมและชุดทดสอบมีความแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด ซึ่งโคโลนีของราที่เลี้ยงร่วมกับยีสต์มีขนาดเล็กมากอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเทียบกับชุดควบคุม และพบเพียงเส้นใยสีขาวของราและไม่พบการสร้างสปอร์จากราทั้ง 2 สายพันธุ์ ในขณะที่ชุดควบคุมที่ไม่มีการเลี้ยงร่วมกับรามีการสร้างสปอร์ ผลของการเจริญเทียบกับชุดควบคุม (ตารางที่ 3.2) พบว่ายีสต์ทั้ง 2 ไอโซเลต สามารถยับยั้งการเจริญของ

ราทั้ง 2 สายพันธุ์ได้สูง การยับยั้งการเจริญของ *A. carbonarius* โดยยีสต์ Y08 และ Y20 ใกล้เคียงกันคือ 78.97 ± 2.89 เปอร์เซ็นต์ และ 78.00 ± 4.77 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม ตามลำดับ ในขณะที่การยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* ก็ไม่ต่างกันมากนัก โดยยีสต์ Y08 ให้ผลการยับยั้ง 80.70 ± 3.48 เปอร์เซ็นต์ และยีสต์ Y20 ยับยั้งได้ 77.26 ± 2.73 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม

ในส่วนของการลดการผลิตสารพิษพบว่ายีสต์ Y08 และ ยีสต์ Y20 สามารถลดการผลิตสารพิษจากทั้ง *A. carbonarius* และ *A. flavus* ได้เกือบ 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม



ภาพที่ 3.4 ลักษณะโคโลนีของรา *A. carbonarius* (ก-ค) และ *A. flavus* (ง-ซ) หลังการบ่ม 7 วัน โดย ก และ ง เป็นชุดควบคุม, ข และ จ บ่มร่วมกับยีสต์ Y08 และ ค และ ง บ่มร่วมกับยีสต์ Y20

ตารางที่ 3.2 การยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษของรา *A. carbonarius* และ *A. flavus* จากการผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ Y08 และยีสต์ Y20 ซึ่งเลี้ยงยีสต์และราร่วมกันโดยไม่มีการสัมผัสกัน

รา	ยีสต์	การเจริญ	การผลิตสารพิษจากรา
<i>A. carbonarius</i>	Y08	$78.97\% \pm 2.89$	$99.94\% \pm 0.06$
	Y20	$78.00\% \pm 4.77$	$99.98\% \pm 0.02$
<i>A. flavus</i>	Y08	$80.70\% \pm 3.48$	$99.80\% \pm 0.15$
	Y20	$77.26\% \pm 2.73$	$99.91\% \pm 0.09$

4. ผลของการแปรผันสถานะต่าง ๆ ของยีสต์

เนื่องจากสถานการณ์การระบาดของโรค COVID-19 การประกาศสถานการณ์ฉุกเฉินในทุกเขตท้องที่ทั่วราชอาณาจักร และประกาศจากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยให้หยุดการเรียนการสอนชั่วคราว เนื่องจากเหตุการณ์ดังกล่าว ทำให้ผู้วิจัยไม่สามารถทำปฏิบัติการตามที่วางแผนไว้ได้ จึงไม่มีผลการทดลองในส่วนนี้

บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

การทดสอบหาระยะการเจริญของยีสต์ไอโซเลต Y08 และยีสต์ไอโซเลต Y20 โดยการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YPD บ่มแบบเขย่า 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ยีสต์ Y08 มีระยะการเจริญระหว่างกลาง log phase คือ ชั่วโมงที่ 9 และยีสต์ Y20 มีช่วงกลาง log phase ชั่วโมงที่ 9.5 ซึ่งช่วงเวลากลาง log phase นี้ ถูกนำไปใช้ในการบ่มยีสต์เพื่อเตรียมสารละลายเซลล์ยีสต์ในการทดลอง

การทดสอบการเป็นปฏิปักษ์ของยีสต์ของยีสต์ไอโซเลต Y08 และไอโซเลต Y20 ต่อรา *A. carbonarius* และรา *A. flavus* เมื่อนำยีสต์และรามาล้างร่วมกันด้วยวิธี dual culture พบว่ายีสต์ทั้ง 2 ไอโซเลตสามารถลดการเจริญและการผลิตสารพิษจากราทั้ง 2 ชนิดได้ จะเห็นได้ว่าผลการยับยั้งเจริญและการลดการผลิตโอคราทอกซินเอเป็นไปในทางเดียวกัน คือ การยับยั้งการเจริญที่สูงจะควบคู่มากับการลดการผลิตโอคราทอกซินเอที่มาก อาจเป็นไปได้ว่าปริมาณโอคราทอกซินเอที่ลดลงเป็นผลมาจากการเจริญที่ลดลง ซึ่งถูกยับยั้งโดยการเลี้ยงร่วมกับยีสต์ ด้วยกลไกต่าง ๆ ของยีสต์ การแย่งชิงพื้นที่และสารอาหารเป็นกลไกเบื้องต้นที่ยีสต์แสดงความเป็นปฏิปักษ์ต่อราก่อโรค ยีสต์สามารถใช้สารใช้คาร์โบไฮเดรตและไนโตรเจนได้อย่างหลากหลายรูปแบบทั้งน้ำตาลโมเลกุลคู่และน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (Spadaro และ Droby 2016) ในงานวิจัยของ Filonow (2010) พบว่ายีสต์ปฏิปักษ์มีความสามารถในการใช้น้ำตาลได้มากกว่า *Botrytis cinerea* ที่ก่อโรคบนผลแอปเปิ้ล และความสามารถในการใช้น้ำตาลได้ดีของยีสต์นี้ยังลดการเจริญของสปอร์ของราก่อโรค นอกจากนี้ในการศึกษาของ Kwasiborski และคณะ (2014) แสดงให้เห็นว่า การใช้ยีสต์ *Pichia anomala* ในช่วง log phase ทดสอบความเป็นปฏิปักษ์บนผลแอปเปิ้ลที่มีรา *B. cinerea* ทำให้ Pentose phosphate pathway (PPP) ทำงานมากขึ้น ยีสต์จึงต้องการพลังงานมากขึ้น เป็นเหตุให้ยีสต์ใช้สารอาหารและยึดครองพื้นที่บนผลแอปเปิ้ลได้ดี นอกจากนี้ในงานวิจัยของ Cubai และคณะ พบว่าเมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ของ *S. cerevisiae* มาใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อของรา *A. carbonarius* และ *A. ochraceus* สามารถลดการเจริญของเส้นใยราทั้ง 2 ชนิด และลดการผลิตโอคราทอกซินได้ดี ซึ่งเป็นไปได้ว่ายีสต์เหล่านี้ อาจมีความสามารถในการผลิตและปลดปล่อยสารเมแทบอลิไทน์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เลี้ยงร่วมกับรา ในงานวิจัยของ Medina-Córdoba และคณะ (2016) พบว่ายีสต์ *Debaryomyces hansenii* มีความสามารถในการผลิตสารต้านราในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์และสารต้านราที่มีความสามารถในการแพร่บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง ทำให้ราเจริญได้ลดลงโดยเฉพาะ *Aspergillus* sp. และยีสต์ดังกล่าวยังสามารถผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยราได้เช่นกัน

อีกกลไกหนึ่งที่ถูกพิจารณาว่ายีสต์ใช้ในการต้านรา คือ การผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายที่มีองค์ประกอบของสารที่ยับยั้งรา เมื่อทดสอบความสามารถของยีสต์ทั้ง 2 ไอโซเลตในการผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายเพื่อยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษ จากการเลี้ยงยีสต์และราร่วมกัน โดยไม่ให้สัมผัสกัน ผลลัพธ์แสดงให้เห็นว่า ยีสต์ทั้ง 2 ไอโซเลตสามารถผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายได้ และสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายที่ยีสต์ผลิตและปลดปล่อยออกมานี้ สามารถยับยั้งการเจริญของราทั้ง 2 ชนิดได้ในเปอร์เซ็นต์ที่สูง และ

สารอินทรีย์ระเหยง่ายเหล่านี้ยังสามารถยับยั้งการผลิตสารพิษของราทั้ง 2 สายพันธุ์ได้เกือบ 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มียีสต์ การผลิตสารพิษจากราทั้ง 2 ชนิดที่ลดลงอย่างมาก อาจเป็นผลมาจากการที่สารอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ยับยั้งการเจริญของราได้มาก ซึ่งเห็นได้ว่าการมีการเจริญน้อยมากเมื่อเทียบกับชุดควบคุม ทำให้การผลิตสารพิษน้อยลงเช่นเดียวกัน จากการศึกษาของ Farbo และคณะ (2018) แสดงให้เห็นว่ายีสต์สามารถผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายที่สามารถยับยั้งการเจริญและการผลิตโอคราทอกซินเอจาก *A. carbonarius* และ *A. ochraceus* ได้อย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ในการศึกษาความเป็นปฏิปักษ์ของยีสต์ โดย Randa และคณะ (2018) พบว่ายีสต์ *Lachancea thermotolerans* สามารถผลิตสารอินทรีย์ระเหยง่ายมายับยั้งการเจริญของราที่ผลิตสารพิษได้ ในงานวิจัยของ Farbo และคณะ (2018) แสดงให้เห็นว่า สารอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ปฏิปักษ์มีความสามารถในการกวดการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับชีววิถีการสังเคราะห์โอคราทอกซินเอในรา *A. carbonarius* และ *A. ochraceus* ซึ่งองค์ประกอบหลักของสารอินทรีย์ระเหยง่ายนั้น ถูกวิเคราะห์ว่าเป็นสาร 2-phenylethanol และการศึกษาของ Chang และคณะ (2015) บอกว่า 2-phenylethanol ส่งผลต่อการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินของ *A. flavus* โดยการได้รับ 2-phenylethanol ทำให้ *A. flavus* ถูกกระตุ้นการเจริญในระดับหนึ่งและหยุดการเจริญ ซึ่งการเจริญนี้จะส่งผลไปยังการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตอะฟลาทอกซิน นอกจากนี้ยังมีการศึกษา Humphis และคณะ (2002) ที่บอกว่าสารอินทรีย์ระเหยง่ายที่ผลิตจาก *Trichoderma* sp. สามารถเปลี่ยนแปลงการสังเคราะห์โปรตีนของรา *Serpular lacrymans* และสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายนี้ยังอาจเปลี่ยนแปลงกิจกรรมต่าง ๆ ของเอนไซม์ของราที่ส่งผลต่อการเจริญ (Wheatley 2002) งานวิจัยของ Hua และคณะ (2014) ก็บอกว่า ยีสต์ *P. anomala* สามารถผลิตสารอินทรีย์ระเหยง่าย 2-phenylethanol และสารดังกล่าวนี้สามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ การเจริญของเส้นใย และการผลิตอะฟลาทอกซินของ *A. flavus* โดยสารระเหย 2-phenylethanol ไปทำให้กลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตอะฟลาทอกซินเกิดการแสดงออกที่ลดลงอย่างมากกว่า 10,000 เท่า

จากผลการทดลองในการศึกษานี้ สรุปได้ว่ายีสต์ไอโซเลต Y08 และไอโซเลต Y20 ที่แยกได้จากเมล็ดกาแฟมีความสามารถในการเป็นปฏิปักษ์ต่อราที่สร้างสารพิษโดยกลไกที่สำคัญ คือ การผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่าย ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของรา และการสร้างสปอร์ รวมทั้งลดการผลิตสารพิษจากราได้เกือบ 100 เปอร์เซ็นต์ การศึกษาเพิ่มเติมที่ได้วางแผนไว้ คือ การระบุสายพันธุ์ยีสต์ที่เป็นปฏิปักษ์เพื่อวิเคราะห์ความสามารถในการเกิดโรคและความปลอดภัยเมื่อถูกนำมาใช้ในอาหาร ซึ่งคาดว่ายีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์จากเป็นยีสต์ในสกุล *Debaryomyces* เนื่องจากลักษณะโคโลนีที่คล้ายกัน รวมถึงยีสต์สกุลนี้มีการศึกษาว่าสามารถผลิตสารอินทรีย์ระเหยง่ายที่ใช้ในการยับยั้งรา (Luis G.H. และคณะ 2018) การศึกษานี้จึงสามารถใช้เป็นหลักฐานที่ชี้ให้เห็นว่า ยีสต์ Y08 และยีสต์ Y20 สามารถนำมาพัฒนาเพื่อใช้เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพได้ ซึ่งอาจถูกนำไปใช้ในการกำจัดสารพิษจากราในเมล็ดกาแฟ ในขั้นตอนกระบวนการหมักเมล็ดกาแฟได้อย่างมีประสิทธิภาพ

เอกสารอ้างอิง

- ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ . พ.ศ. 2561. กำหนดมาตรฐานสินค้าการเกษตร, 16 พฤษภาคม 2563.
http://www.ratchakitcha.soc.go.th/DATA/PDF/2561/E/287/T_0004.PDF
- ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ . พ.ศ. 2561. กำหนดมาตรฐานสินค้าการเกษตร, 16 พฤษภาคม 2563.
http://www.ratchakitcha.soc.go.th/DATA/PDF/2562/E/006/T_0005.PDF
- ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 98. พ.ศ. 2529. เรื่อง มาตรฐานอาหารที่มีสารปนเปื้อน, 23 กุมภาพันธ์ 2563. http://food.fda.moph.go.th/law/data/announ_moph/P98.pdf
- Ahmed M., et al. 2016. Growth response of *Aspergillus flavus* IMS1103 isolated from poultry feed. Asian J Med Biol Res. 2(2): 221-228.
- Amaike S. and N. P. Keller. 2011. *Aspergillus flavus*. Annu Rev Phytopathol. 49: 107-133.
- Armando M. R., et al. 2012. *Saccharomyces cerevisiae* strains and the reduction of *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin B1 production at different interacting environmental conditions, in vitro. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess. 29(9): 1443-1449.
- Ayoub F., et al. 2011. Early detection of *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* on table grape: a tool for quality improvement. Food Addit Contam. 27(9): 1285-1293.
- Belén P., et al. 2018. Potential of yeasts isolated from dry-cured ham to control ochratoxin A production in meat models. Int J Food Microbiol. 268: 73-80.
- Belli N., et al. 2005. *Aspergillus carbonarius* growth and ochratoxin A production on a synthetic grape medium in relation to environmental factors. J Appl Microbiol. 98(4): 839-844.
- Bennet J.W. and M. Klich. 2003. Mycotoxins. Clin Microbiol Rev. 16: 497-516.
- Bocate K.P., et al. 2019. Antifungal activity of silver nanoparticles and simvastatin against toxigenic species of *Aspergillus*. Int J Food Microbiol. 291: 79-86.
- Cabaiu L., et al. 2012. A *Saccharomyces cerevisiae* wine strain inhibits growth and decreases ochratoxin A biosynthesis by *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus ochraceus*. Toxins 4(12): 1468-1481.

- Chang P.K., et al. 2015. Suppressions of aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus flavus* by 2-phenylethanol is associated with stimulated growth and decreased degradation of branched-chain amino acids. *Toxins* 7: 3887-3902.
- El Khoury A. and A. Atoui. 2010. Ochratoxin a: general overview and actual molecular status. *Toxins (Basel)*. 2(4): 461-493.
- Encyclopaedia Britannica. 2020. Yeast, 30 March 2020.
<https://www.britannica.com/science/yeast-fungus>
- Fakruddin M., et al. 2015. Characterization of aflatoxin producing *Aspergillus flavus* from food and feed samples. *Springerplus*. 4: 159.
- Farbo M.G., et al. 2018. Effect of yeast volatile organic compounds on ochratoxin A-producing *Aspergillus carbonarius* and *A. ochraceus*. *Int J Food Microbiol* 284: 1-10.
- FDA. 2018. Mycotoxins, 28 April 2019. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/mycotoxins>
- Filonow A.B. 2010. Role of competition for sugars by yeasts in the biocontrol of gray mold of apple. *Biocontrol Sci Technol*. 8: 243-256.
- Fiori S., et al. 2014. Biocontrol activity of four non- and low-fermenting yeast strains against *Aspergillus carbonarius* and their ability to remove ochratoxin A from grape juice. *Int J Food Microbiol*. 189: 45-50.
- Gallo A., et al. 2016. Effect of temperature and water activity on gene expression and aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus flavus* on almond medium. *Int J Food Microbiol*. 217: 162-169.
- Gustova C.B., et al. 2017. Rapid and not culture-dependent assay based on multiplex PCR-SSR analysis for monitoring inoculated yeast strains in industrial wine fermentations. *Arch. Microbiol*. 199: 145-153.
- Haschek W.M. and K.A. Voss. 2013. Mycotoxins. *Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology*: 1187-1258.
- Hua S.S.T. 2014. The major volatile compound 2-phenylethanol from the biocontrol yeast, *Pichia anomala*, inhibits growth and expression of aflatoxin biosynthetic genes of *Aspergillus flavus*. *Mycotoxin Res*. 30(2): 71-78.

- Humphris S.N., et al. 2002. The effect of volatile microbial secondary metabolites on protein synthesis in *Serpula lacrymans*. FEMS Microbiol Lett. 210: 215-219.
- Iqbal S.Z., et al. 2015. Aflatoxin M1 in milk and dairy products, occurrence and recent challenges: A review. Trends Food Sci Technol. 46(1): 110-119.
- K.A.V.R. Krishnamachari, et al. 1975. Hepatitis due to aflatoxicosis: An outbreak in Western India. Lancet. 1(7915): 1061-1063.
- Klich M.A. 2007. *Aspergillus flavus*: the major producer of aflatoxin. Mol Plant Pathol. 8(6): 713-722.
- Kooprasertying P., et al. 2016. Exposure assesment of alatoxins in Thai peanut consumption. Cogent Food Agric. 2:1204683.
- Kwasiborski A., et al. 2014. Identification of metabolic pathways expressed by *Pichia anomala* Kh6 in the presence of the pathogen *Botrytis cinerea* on apple: New possible targets for biocontrol improvement. PLoS One. 9(3): e91434
- Leyva Salas M., et al. 2017. Antifungal microbial agents for food biopreservation-A review. Microorganisms. 5(3): 37.
- Lui J., et al. 2013. Review: Utilization of antagonistic yeast to manage postharvest fungal disease of friut. Int J Food Microbiol. 167: 153-160.
- Luis G.H., et al. 2018. Mechanisms employed by *Debaryomyces hansenii* in biological control of anthracnose disease on papaya fruit. Postharvest Biol Tec. 139: 31-37.
- M.L. Abarca, et al. 2003. *Aspergillus carbonarius* as the main source of ochratoxin A contamination in dried vine fruits from the spanish market. J Food Prot. 66: 504-506.
- Marin S., et al. 2013. Mycotoxins: occurrence, toxicology, and exposure assessment. Food Chem Toxicol. 60: 218-237.
- Medina-Córdova N., et al. 2016. Biocontrol activity of the marine yeast *Debaryomyces hansenii* against phytopathogenic fungi and its ability to inhibit mycotoxins production in maize grain (*Zea mays L.*). Biol Control. 97: 70-79.
- Pal K.K. and B. McSpadden Gardener. 2006. Biological control of plant pathogens. The Plant Health Instructor. 5: 1-25.

- Pantelides I., et al. 2015. Isolation, identification and *in vitro* screening of grapevine yeasts for the control of black aspergilli on grapes. *Biol control*. 88: 46-53
- Paterson R.R.M., et al. 2018. Predominant mycotoxins, mycotoxigenic fungi and climate change related to wine. *Food Res Int*. 103: 478-491.
- Papiya M. and D. Sasmal. 2001. Mycotoxins-Limits and regulations. *Anc Sci Life*. 20(3): 1-19
- Perez M.F., et al. 2017. Antagonistic yeasts for the biological control of *Penicillium digitatum* on lemons stored under export conditions. *Biol Control*. 115: 135-140.
- Randa Z., et al. 2018. Application of low-fermenting yeast *Lachancea thermotolerans* for the control of toxigenic fungi *Aspergillus parasiticus*, *Penicillium verrucosum* and *Fusarium graminearum* and their mycotoxins. *Toxins*. 10(6): 242.
- Reddy K.R.N., et al. 2010. An overview of mycotoxin contamination in foods and its implications for human health. *Toxin Reviews*. 29(1): 3-26.
- Romer Labs. 2016. Worldwide Mycotoxin Regulations, 29 April 2019. <https://www.romerlabs.com/en/knowledge-center/knowledge-library/articles/news/worldwide-mycotoxin-regulations/>
- Soler J.A.V., et al. 2018. *Aspergillus flavus* endocarditis in an immunocompetent child. Case report. *Med Mycol Case Rep*. 22: 48-51.
- Spadaro D. and Droby S. 2018. Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: The importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. *Trends Food Sci Technol* 47: 39-49.
- Wan J., et al. 2019. Physical properties, antifungal and mycotoxin inhibitory activities of five essential oil nanoemulsions: Impact of oil compositions and processing parameters. *Food Chem*. 291: 199-206.
- Wheatley R.E. 2002. The consequences of volatile organic compound mediated bacterial and fungal interactions. *Anton Leeuw Int J.G*. 81: 357-364.
- World Health Organization. 2018. Mycotoxins, 7 February 2020. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/mycotoxins>

Zhu C., et al. 2015. Inhibition of the growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus ochraceus* *in vitro* and *in vivo* through antagonistic yeasts. Food Control 50: 125-132.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Yeast Extract Peptone Dextrose (YPD)

ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	10.0	กรัม
เพปโตน (peptone)	20.0	กรัม
เดกซ์โทรส (dextrose)	20.0	กรัม
ผงวุ้น (agar)	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

2. Yeast Mold (YM)

ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	3.0	กรัม
ผงสกัดจากมอลต์ (malt extract)	3.0	กรัม
เพปโตน (peptone)	5.0	กรัม
เดกซ์โทรส (dextrose)	10.0	กรัม
ผงวุ้น (agar)	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

3. Potato Dextrose Agar (PDA)

อาหารสำเร็จรูป PDA (Difco Laboratories, USA)	39.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

ภาคผนวก ข

สูตรและวิธีการเตรียมสารเคมี

1. สารละลาย PBS

โซเดียมคลอไรด์	0.81	กรัม
โพแทสเซียมคลอไรด์	0.02	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรฟอสเฟต	0.02	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตไดไฮเดรต	0.30	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน ปรับความเป็นกรดต่างให้เท่ากับ 7.2 จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

2. สารละลาย Physiological water


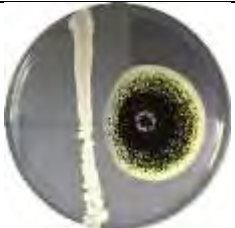
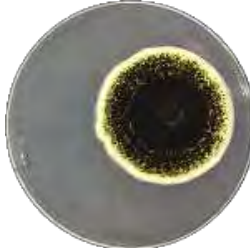












โซเดียมคลอไรด์	0.85	กรัม
สารลดแรงตึงผิว (Tween 80)	1.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที



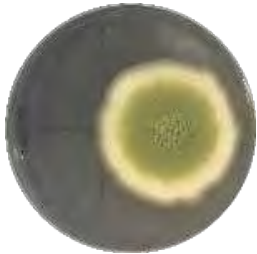
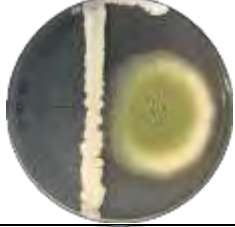











ภาคผนวก ค

ข้อมูลดิบ


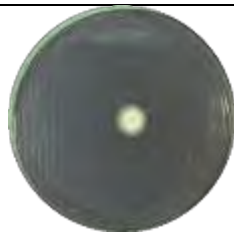













ตารางที่ ค.1 ลักษณะการเจริญของรา *A. carbonarius* ที่เลี้ยงร่วมกับยีสต์ Y08 และยีสต์ Y20 เพื่อทดสอบความเป็นปฏิปักษ์ของยีสต์ ด้วยวิธี dual culture เทียบกับชุดควบคุม ที่ทดลองแยกกัน 3 การทดลอง

การทดลอง	ยีสต์	การเลี้ยงร่วมกันของยีสต์กับรา		ชุดควบคุม
1	Y08			
	Y20			
2	Y08			
	Y20			
3	Y08			
	Y20			





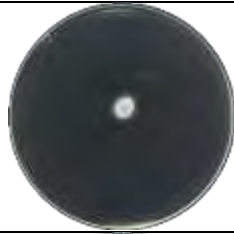










ตารางที่ ค.2 ลักษณะการเจริญของรา *A. flavus* ที่เลี้ยงร่วมกับยีสต์ Y08 และยีสต์ Y20 เพื่อทดสอบความเป็นปฏิปักษ์ของยีสต์ ด้วยวิธี dual culture เทียบกับชุดควบคุม ที่ทดลองแยกกัน 3 การทดลอง

การทดลอง	ยีสต์	การเลี้ยงร่วมกันของยีสต์กับรา		ชุดควบคุม
1	Y08			
	Y20			
2	Y08			
	Y20			
3	Y08			
	Y20			

ตารางที่ ค.3 ลักษณะการเจริญของรา *A. carbonarius* ที่เลี้ยงร่วมกับยีสต์ Y08 และยีสต์ Y20 โดยไม่สัมผัสกัน เพื่อทดสอบการผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ เทียบกับชุดควบคุม ที่ทดลองแยกกัน 3 การทดลอง

การทดลอง	ยีสต์	การเลี้ยงร่วมกันของยีสต์กับรา		ชุดควบคุม
1	Y08			
	Y20			
2	Y08			
	Y20			
3	Y08			
	Y20			

ตารางที่ ค.4 ลักษณะการเจริญของรา *A. flavus* ที่เลี้ยงร่วมกับยีสต์ Y08 และยีสต์ Y20 โดยไม่สัมผัสกัน เพื่อทดสอบการผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ เทียบกับชุดควบคุม ที่ทดลองแยกกัน 3 การทดลอง

การทดลอง	ยีสต์	การเลี้ยงร่วมกันของยีสต์กับรา		ชุดควบคุม
1	Y08			
	Y20			
2	Y08			
	Y20			
3	Y08			
	Y20			

ตารางที่ ค.5 การเจริญของรา *A. carbonarius* ที่เลี้ยงร่วมกับยีสต์ Y08 และยีสต์ Y20 เพื่อทดสอบความเป็นปฏิปักษ์ของยีสต์ ด้วยวิธี dual culture เทียบกับชุดควบคุม ที่ทดลองแยกกัน 3 การทดลอง

การทดลอง	ยีสต์	การเลี้ยงร่วมกันของยีสต์กับรา (มิลลิเมตร)		ชุดควบคุม (มิลลิเมตร)
1	Y08	41.0	42.0	52.0
	Y20	41.0	41.0	
2	Y08	44.0	43.0	53.0
	Y20	43.0	44.0	
3	Y08	48.0	45.0	55.0
	Y20	42.0	47.0	

ตารางที่ ค.6 การผลิตโอคราทอกซินเอของรา *A. carbonarius* ที่เลี้ยงร่วมกับยีสต์ Y08 และยีสต์ Y20 เพื่อทดสอบความเป็นปฏิปักษ์ของยีสต์ ด้วยวิธี dual culture เทียบกับชุดควบคุม ที่ทดลองแยกกัน 3 การทดลอง

การทดลอง	ยีสต์	การเลี้ยงร่วมกันของยีสต์กับรา (นาโนกรัมต่อกรัม)		ชุดควบคุม (นาโนกรัมต่อกรัม)
1	Y08	194.68	267.68	575.32
	Y20	230.38	319.09	
2	Y08	292.47	257.13	378.39
	Y20	311.41	328.42	
3	Y08	389.01	410.77	526.40
	Y20	356.56	404.25	

ตารางที่ ค.7 การเจริญของรา *A. flavus* ที่เลี้ยงร่วมกับยีสต์ Y08 และยีสต์ Y20 เพื่อทดสอบความเป็นปฏิปักษ์ของยีสต์ ด้วยวิธี dual culture เทียบกับชุดควบคุม ที่ทดลองแยกกัน 3 การทดลอง

การทดลอง	ยีสต์	การเลี้ยงร่วมกันของยีสต์กับรา (มิลลิเมตร)		ชุดควบคุม (มิลลิเมตร)
1	Y08	46	48	55.0
	Y20	45	45	
2	Y08	48	50	63
	Y20	48	50	
3	Y08	48	47	64
	Y20	46	45	

ตารางที่ ค.8 การผลิตอะฟลาทอกซินบีของรา *A. flavus* ที่เลี้ยงร่วมกับยีสต์ Y08 และยีสต์ Y20 เพื่อทดสอบความเป็นปฏิปักษ์ของยีสต์ ด้วยวิธี dual culture เทียบกับชุดควบคุม ที่ทดลองแยกกัน 3 การทดลอง

การทดลอง	ยีสต์	การเลี้ยงร่วมกันของยีสต์กับรา (นาโนกรัมต่อกรัม)		ชุดควบคุม (นาโนกรัมต่อกรัม)
1	Y08	505.11	474.05	755.66
	Y20	402.50	443.74	
2	Y08	376.12	338.14	603.48
	Y20	327.54	244.68	
3	Y08	419.12	288.26	626.72
	Y20	479.04	550.05	

ตารางที่ ค.9 การเจริญของรา *A. carbonarius* ที่เลี้ยงร่วมกับยีสต์ Y08 และยีสต์ Y20 โดยไม่สัมผัสกัน เพื่อทดสอบการผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ เทียบกับชุดควบคุม ที่ทดลองแยกกัน 3 การทดลอง

การทดลอง	ยีสต์	การเลี้ยงร่วมกันของยีสต์กับรา (มิลลิเมตร)		ชุดควบคุม (มิลลิเมตร)
1	Y08	13.0	13.0	53.0
	Y20	14.0	14.0	
2	Y08	10.0	10.0	53.0
	Y20	11.0	12.0	
3	Y08	11.0	10.0	59.0
	Y20	11.0	10.0	

ตารางที่ ค.10 การผลิตโอคราทอกซินของรา *A. carbonarius* ที่เลี้ยงร่วมกับยีสต์ Y08 และยีสต์ Y20 โดยไม่สัมผัสกัน เพื่อทดสอบการผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ เทียบกับชุดควบคุม ที่ทดลองแยกกัน 3 การทดลอง

การทดลอง	ยีสต์	การเลี้ยงร่วมกันของยีสต์กับรา (นาโนกรัมต่อกรัม)		ชุดควบคุม (นาโนกรัมต่อกรัม)
1	Y08	0.30	0.36	204.05
	Y20	0.04	0.09	
2	Y08	0.53	0.33	443.88
	Y20	0.13	0.09	
3	Y08	0.22	0.10	350.75
	Y20	0.21	0.02	

ตารางที่ ค.11 การเจริญของรา *A. flavus* ที่เลี้ยงร่วมกับยีสต์ Y08 และยีสต์ Y20 โดยไม่สัมผัสกัน เพื่อทดสอบการผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ เทียบกับชุดควบคุม ที่ทดลองแยกกัน 3 การทดลอง

การทดลอง	ยีสต์	การเลี้ยงร่วมกันของยีสต์กับรา (มิลลิเมตร)		ชุดควบคุม (มิลลิเมตร)
1	Y08	11.0	10.0	57
	Y20	14.0	12.0	
2	Y08	8.0	8.0	49
	Y20	11.0	9.0	
3	Y08	13.0	12.0	54
	Y20	14.0	13.0	

ตารางที่ ค.12 การผลิตอะฟลาทอกซินบีของรา *A. flavus* ที่เลี้ยงร่วมกับยีสต์ Y08 และยีสต์ Y20 โดยไม่สัมผัสกัน เพื่อทดสอบการผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ เทียบกับชุดควบคุม ที่ทดลองแยกกัน 3 การทดลอง

การทดลอง	ยีสต์	การเลี้ยงร่วมกันของยีสต์กับรา (นาโนกรัมต่อกรัม)		ชุดควบคุม (นาโนกรัมต่อกรัม)
1	Y08	0.14	0.10	174.75
	Y20	0.10	0.00	
2	Y08	0.70	0.84	225.54
	Y20	0.53	0.35	
3	Y08	1.09	0.16	350.44
	Y20	0.07	0.16	