



โครงการ การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ ผลของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายจากยีสต์ต่อการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซิน
ของ *Aspergillus flavus*

ชื่อนิสิต นางสาวภัทราภรณ์ วงษ์เพ็ง รหัสประจำตัว 6032341023

ภาควิชา จุลชีววิทยา
ปีการศึกษา 2563

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ ผลของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายจากยีสต์ต่อการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินของ
Aspergillus flavus

Effect of yeast volatile organic compounds on growth and aflatoxin production of
Aspergillus flavus

ชื่อนิสิต นางสาวภัทราภรณ์ วงษ์เพ็ง

รหัสประจำตัว 6032341023

ภาควิชา จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา 2563

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อโครงการ

ผลของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายจากยีสต์

ต่อการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินของ *Aspergillus flavus*

โดย

นางสาวภัทรภรณ์ วงษ์เพ็ง เลขประจำตัว 6032341023


อาจารย์ที่ปรึกษา

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชิวานันท์ เดชอุปกการ ศิริสมบุญณ์


ปีการศึกษา

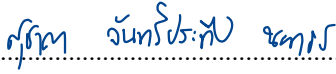
2563

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับโครงการฉบับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาบัณฑิต ในรายวิชา 2312499 โครงการวิทยาศาสตร์



..... หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา
(ศาสตราจารย์ ดร.ธนาภัทร ปาลกะ)

คณะกรรมการสอบโครงการ


..... อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชิวานันท์ เดชอุปกการ ศิริสมบุญณ์)


..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุชาดา จันทรประทีป นภাত্র)


..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.เอกวัล ลือพร้อมชัย)


..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.อรุทัย ภิญญาคง)

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

เรื่อง

ผลของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายจากยีสต์
ต่อการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินของ *Aspergillus flavus*

โดย

นางสาวภัทราภรณ์ วงษ์เพ็ง เลขประจำตัว 6032341023

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชิวานันท์ เดชอุปการ ศิริสมบูรณ์

โครงการนี้เป็นส่วนหนึ่งของหลักสูตรปริญญาบัณฑิตวิทยาศาสตร์บัณฑิต

ประจำปีการศึกษา 2563

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ภาคจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการ : ผลของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายจากยีสต์
ต่อการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินของ *Aspergillus flavus*

นิสิตในโครงการ : นางสาวภัทราภรณ์ วงษ์เพ็ง เลขประจำตัว 6032341023

อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชิวานันท์ เดชอุปการ ศิริสมบุญ

บทคัดย่อ

ปัจจุบันวิธีการควบคุมทางชีวภาพโดยใช้ยีสต์ปฏิบั้กซ์ในการต้านราเป็นวิธีหนึ่งที่ได้รับคามสนใจเป็นอย่างมากเพื่อลดผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภค การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความเป็นปฏิบั้กซ์ของยีสต์ไอโซเลต Y08 และ Y20 ที่แยกได้จากเมล็ดกาแฟ ต่อการยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* M3T8R4G3 และศึกษากลไกสำคัญในการยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซิน ผลการทดสอบพบว่า ยีสต์ปฏิบั้กซ์ทั้งสองไอโซเลตสามารถยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินของ *A. flavus* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยใช้กลไกสำคัญในการยับยั้ง คือ การผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายที่มีผลต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเส้นใยรา ยีสต์ปฏิบั้กซ์ทั้งสองไอโซเลตสามารถยับยั้งการเจริญของราได้ 40-60 เปอร์เซ็นต์ และลดการผลิตอะฟลาทอกซินได้มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ และสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายที่ยีสต์ผลิตมากที่สุด คือ เอทานอล

Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University

Project title : Effect of yeast volatile organic compounds on growth
and aflatoxin production of *Aspergillus flavus*

Investigator : Miss Patraporn Wongpeng ID 6032341023

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

Abstract

Currently, the biological control using antagonistic yeast is one of the particular interest to reduce the effects on the health of consumers. The objective of this study were to evaluate the antagonistic activity of antagonistic yeasts (Y08 and Y20 isolated from coffee beans) against the growth of *A. flavus* M3T8R4G3 and to examine the main antagonistic mechanism against the fungal growth and aflatoxin production. The results showed that all yeasts could effectively inhibit the growth and aflatoxin production of *A. flavus*. The main antagonistic mechanism was the production of VOCs effecting hyphal morphology. Both yeast isolates were able to inhibit the fungal growth in the range of 40-70% of inhibition and to reduce aflatoxin production more 90% of reduction. The major volatile organic compound produced by yeast was ethanol.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี อันเนื่องมาจากความกรุณาและอนุเคราะห์ของผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชีวานันท์ เดชอุปกการ ศิริสมบุญ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการที่กรุณาถ่ายทอดความรู้ ให้คำปรึกษา และคำแนะนำ ที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อโครงการตลอดระยะเวลาของการทำงานวิจัยนี้ ตลอดจนความอนุเคราะห์ในการปรับปรุงแก้ไขโครงการวิจัยนี้ให้สำเร็จตามวัตถุประสงค์ที่ได้ตั้งใจไว้ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณในความเมตตาของอาจารย์เป็นอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์และเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความรู้ คำแนะนำต่าง ๆ ที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัยฉบับนี้รวมถึงต่อตัวผู้วิจัยเอง และให้ความช่วยเหลือ อำนวยความสะดวกในการใช้อุปกรณ์และสารเคมีต่าง ๆ ภายในภาควิชา

ขอขอบคุณที่ ๆ ในห้องปฏิบัติการ 1904/14 ทุกคน ได้แก่ นางสาวพิชชาภา เอี่ยมลออ นางสาวภาสนันท์ พันธุ์มะโอภาส และนายนริชัญญ์ เนตรประดิษฐ์ ตลอดจนเพื่อนร่วมห้องปฏิบัติการ นางสาวณัฐธิดา ตันติเจริญการ ที่คอยช่วยเหลือในการทำปฏิบัติการ รวมถึงคอยให้คำแนะนำต่าง ๆ ตลอดการทำโครงการวิจัยฉบับนี้

ขอขอบคุณเพื่อน ๆ นิสิตชั้นปีที่ 4 ที่คอยช่วยเหลือต่าง ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง นางสาวญาณิกา ฉันทโชติ นายธเนศ ศรีโมรา นางสาวธัญญาพร สุนทรวารี นางสาวนภัสวรรณ ธรรมสวัสดิ์ และนางสาวศิริระประภา เหล่ามุล ที่คอยช่วยเหลือและเป็นกำลังใจในการทำโครงการวิจัยนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณวงก๊อตเซเว่น ประกอบไปด้วย คุณมาร์คต้วน คุณอิมแจบอม คุณแจ็กสันหวัง คุณปาร์คจินยอง คุณชเวยองแจ คุณแบมแบม และคุณคิมยูคยอม วงเอ็นซีที ประกอบไปด้วย คุณคิมโดยอง และคุณฮวังอินจุน ที่เป็นแรงใจและแรงผลักดันที่มีความหมายกับผู้วิจัยตลอดการศึกษาและทำโครงการวิจัยนี้เป็นอย่างมาก

ขอขอบคุณทุกคนครอบครัวที่คอยสนับสนุนผู้วิจัยเสมอมา และสุดท้ายขอขอบคุณตัวเองที่อดทนและพยายามต่อการทำงานวิจัยฉบับนี้จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ด้วยความเคารพอย่างสูง

ภัทราภรณ์ วงษ์เพ็ญ

สารบัญ

หัวข้อ	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	จ
สารบัญรูปภาพ.....	ฉ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
บทที่ 2 อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย.....	15
บทที่ 3 ผลการทดลอง.....	23
บทที่ 4 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	31
เอกสารอ้างอิง.....	37
ภาคผนวก ก.....	48
ภาคผนวก ข.....	49
ภาคผนวก ค.....	50

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
ตารางที่ 1.1	ตัวอย่างสารพิษจากราและผลผลิตทางการเกษตรที่พบการปนเปื้อน.....	2
ตารางที่ 1.2	ข้อกำหนดการควบคุมปริมาณอะฟลาทอกซินที่พบในอาหารชนิดต่าง ๆ ได้สูงสุด โดยคณะกรรมการการยุโรป (European Commission: EU).....	6
ตารางที่ 1.3	ตัวอย่างข้อกำหนดปริมาณอะฟลาทอกซินรวมสูงสุดที่สามารถพบได้ในอาหารประเภทต่าง ๆ ตามข้อกำหนดของแต่ละประเทศ.....	7
ตารางที่ 1.4	สารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายจากยีสต์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของรา.....	13
ตารางที่ 3.1	การเจริญของ <i>A. flavus</i> M3T8R4G3 เมื่อเลี้ยงร่วมกับยีสต์ปฏิปักษ์ทั้งสองไอโซเลตด้วยวิธี Dual culture บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน.....	24
ตารางที่ 3.2	การเจริญของ <i>A. flavus</i> M3T8R4G3 เมื่อทดสอบความสามารถในการสร้างสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ปฏิปักษ์ด้วยวิธี face to face double petri dish assay บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน.....	28
ตารางที่ 3.3	ชนิดของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายที่ผลิตจากยีสต์ไอโซเลต Y08 และ Y20 เมื่อบ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน วิเคราะห์โดยเครื่อง GC-MS Chromatography.....	30

สารบัญรูปภาพ

รูปที่		หน้า
รูปที่ 1.1	โครงสร้างทางเคมีของอะฟลาทอกซินแต่ละชนิด.....	3
รูปที่ 2.1	การทดสอบด้วยวิธี Dual culture บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เพื่อทดสอบความสามารถของยีสต์ปฏิปักษ์เบื้องต้นในการยับยั้งการเจริญของ <i>A. flavus</i>	19
รูปที่ 3.1	การเจริญของ <i>A. flavus</i> M3T8R4G3 เมื่อเลี้ยงร่วมกับยีสต์ปฏิปักษ์ด้วยวิธี Dual culture บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน.....	23
รูปที่ 3.2	การเจริญของ <i>A. flavus</i> M3T8R4G3 เมื่อเลี้ยงร่วมกับยีสต์ปฏิปักษ์ด้วยวิธี Agar spot assay บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน.....	25
รูปที่ 3.3	การเจริญของ <i>A. flavus</i> M3T8R4G3 เมื่อเลี้ยงร่วมกับยีสต์ไอโซเลต Y08 เพื่อทดสอบความสามารถของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ยีสต์ระยะ mid log phase และ late log phase ในการยับยั้งการเจริญของราด้วยวิธี Agar diffusion assay.....	26
รูปที่ 3.4	การเจริญของ <i>A. flavus</i> M3T8R4G3 เมื่อเลี้ยงร่วมกับยีสต์ไอโซเลต Y20 เพื่อทดสอบความสามารถของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ยีสต์ระยะ mid log phase และ late log phase ในการยับยั้งการเจริญของราด้วยวิธี Agar diffusion assay.....	26
รูปที่ 3.5	การเจริญของ <i>A. flavus</i> M3T8R4G3 เมื่อทดสอบความสามารถในการสร้างสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ปฏิปักษ์ด้วยวิธี face to face double petri dish assay บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน.....	27
รูปที่ 3.6	ลักษณะเส้นใยบริเวณขอบโคโลนีของ <i>A. flavus</i> M3T8R4G3 จากกล้อง Scanning Electron Microscope (SEM) เมื่อทดสอบผลของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ไอโซเลต Y08 บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน.....	29
รูปที่ 3.7	โครมาโทแกรมของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายในสัดส่วนที่มากที่สุดที่ผลิตจากยีสต์ไอโซเลต Y08.....	30

บทที่ 1

บทนำ

1.1 สารพิษจากรา (Mycotoxins)

สารพิษจากรา (mycotoxins) มาจากคำว่า “myco” รวมกับ “toxin” มีรากศัพท์มาจากภาษากรีกคำว่า “mykes” หมายถึงรา และ “toxikon” ที่หมายถึงสารพิษ (IARC, 1993) เป็นสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) ที่เป็นพิษต่อมนุษย์และสัตว์ ผลิตจากราสายใยหลายชนิด (Zain, 2011) เป็นอันตรายต่อสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังเมื่อบริโภค สูดดม หรือสัมผัส ทำให้เกิดการสะสมในอวัยวะและเนื้อเยื่อต่าง ๆ ซึ่งมักเกิดผ่านการบริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อนรา (Marin และคณะ, 2013) เมื่อได้รับในปริมาณเพียงเล็กน้อยจะทำให้เกิดอาการพิษ (mycotoxicosis) แต่ไม่สามารถถ่ายทอดจากคนหนึ่งไปสู่อีกคนหนึ่งได้ การปนเปื้อนของราหรือสารพิษจากราเกิดขึ้นตั้งแต่ในช่วงการเพาะปลูก การเก็บเกี่ยว การเก็บรักษา และการนำผลผลิตทางการเกษตรมาผลิตเป็นอาหาร (Bennett และ Klich, 2013) องค์การอาหารและการเกษตรแห่งสหประชาชาติ (Food and Agriculture Organization of the United Nation: FAO) ระบุว่ากว่า 25 เปอร์เซ็นต์ของผลผลิตทางการเกษตรทั่วโลกพบการปนเปื้อนของสารพิษจากรา (อำนาจ พัวพลเทพ, 2562)

สารพิษจากราสามารถแบ่งตามชนิดของราที่ผลิตสารพิษได้ 4 กลุ่ม ได้แก่ 1) สารพิษจากราสกุล *Aspergillus* spp. สารพิษจากรากลุ่มนี้มักพบการปนเปื้อนในวัตถุดิบอาหาร เช่น ข้าวโพด ธัญพืชต่าง ๆ พืชน้ำมัน กากถั่วเหลือง ข้าวสาลี ข้าวโอ๊ต ข้าวบาร์เลย์ ข้าวฟ่าง ถั่วชนิดต่าง ๆ และเครื่องเทศ เป็นต้น สารพิษจากราในกลุ่มนี้ที่สำคัญและมีผลกระทบต่อสุขภาพของมนุษย์และสัตว์ ได้แก่ อะฟลาทอกซิน (aflatoxins) ทำให้เกิดพิษต่อตับและโอคราทอกซิน (ochratoxins) ทำให้เกิดพิษต่อไต 2) สารพิษจากราสกุล *Fusarium* spp. มีมากมายหลายชนิด และพบมากกว่า 20 ชนิด ที่สามารถผลิตสารพิษจากราได้ สารพิษจากราในกลุ่มนี้ที่สำคัญและส่งผลกระทบต่อสุขภาพของมนุษย์และสัตว์ ได้แก่ ไตรโคทีซีน (trichothecenes) เช่น ทีทูทอกซิน (T-2 toxin), ดีออกซินิวาลีนอล (deoxynivalenol) และนิวาไลน์อล (nivalenol) 3) สารพิษจากราสกุล *Penicillium* spp. สามารถก่อโรคทั้งในมนุษย์และสัตว์ ส่วนใหญ่พบการปนเปื้อนของสารพิษในเมล็ดธัญพืช เช่น ข้าว ข้าวโพด ถั่วลิสง เมล็ดกาแฟ สารพิษจากราในกลุ่มนี้ที่สำคัญ ได้แก่ พาทุลิน (patulin) และซิไทรนิน (citrinin) เป็นต้น และ 4) สารพิษจากรา กลุ่มอื่น ๆ เช่น เออร์กอต (ergot) ซึ่งเป็นสารพิษที่ผลิตจาก *Clavisep* spp. (อำนาจ พัวพลเทพ, 2562)

การปนเปื้อนของสารพิษจากราอาจเกิดขึ้นได้ทุกขั้นตอนตั้งแต่การเพาะปลูก การเลี้ยงสัตว์ การฆ่าหรือชำแหละ การเก็บเกี่ยว การแปรรูป การบรรจุ การขนส่ง การเก็บรักษา เป็นต้น (สำนักสุขาภิบาลอาหารและน้ำ กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข, 2557) ในขณะที่การปนเปื้อนของสารพิษจากราในอาหารมักเกิดขึ้นภายหลังการเก็บเกี่ยวและระหว่างการเก็บรักษา อันเนื่องมาจากปัจจัยต่าง ๆ เช่น ความชื้น อุณหภูมิ และปริมาณออกซิเจน ซึ่งปัจจัยเหล่านี้เป็นปัจจัยที่ส่งผลให้ราเจริญและผลิตสารพิษได้ (Kaushal และ Deepak, 1998) ตัวอย่างการปนเปื้อนของสารพิษจากราในผลผลิตทางการเกษตรชนิดต่าง ๆ แสดงในตารางที่ 1.1

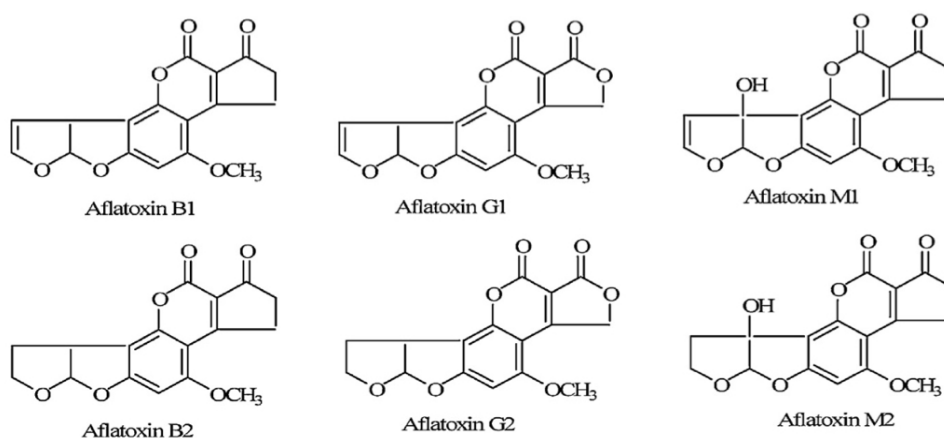
ตารางที่ 1.1 ตัวอย่างสารพิษจากราและผลผลิตทางการเกษตรที่พบการปนเปื้อน

สารพิษจากรา	ตัวอย่างราที่ผลิตสารพิษ	ตัวอย่างผลผลิตทางการเกษตรที่พบการปนเปื้อน
อะฟลาทอกซิน	<i>A. flavus</i>	ข้าวโพด ข้าวสาลี ข้าวโอ๊ต ข้าวบาร์เลย์
	<i>A. parasiticus</i>	ข้าวฟ่าง ถั่วชนิดต่าง ๆ
โอคราทอกซิน	<i>A. carbonarius</i>	เมล็ดกาแฟ เมล็ดโกโก้ ไวน์ เบียร์
	<i>A. ochraceus</i>	ผลไม้แห้ง เครื่องเทศ
ไตรโคทีซิน	<i>F. culmorum</i>	ธัญพืช ผลิตภัณฑ์จากธัญพืชต่าง ๆ
	<i>F. graminearum</i>	
ซีราลีโนน	<i>F. culmorum</i>	ธัญพืช ผลิตภัณฑ์จากธัญพืชต่าง ๆ
	<i>F. graminearum</i>	
ฟูโมนิซิน	<i>F. proliferatum</i>	ข้าว ข้าวโพด ข้าวฟ่าง
	<i>F. oxysporum</i>	
พาทุลิน	<i>P. expansum</i>	ผลไม้ชนิดที่มีความเป็นกรดน้อย เช่น แอปเปิ้ล ลูกแพร์ พืช เป็นต้น

ที่มา : ดัดแปลงมาจาก อำนาจ พัวพลเทพ, 2562

1.2 อะฟลาทอกซิน (Aflatoxins)

อะฟลาทอกซิน (aflatoxins) เป็นสารพิษที่พบการปนเปื้อนในอาหารและผลผลิตทางการเกษตรทั่วโลก (Liu และคณะ, 2006) ถูกผลิตจากราในสกุล *Aspergillus* section *Flavi* โดยเฉพาะ *A. flavus*, *A. parasiticus* และ *A. nomius* เป็นต้น (Marin และคณะ, 2013) จัดเป็นสารพิษที่เกิดขึ้นจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโมเลกุล มีคุณสมบัติทางชีวภาพต่อคน สัตว์ และพืช (บดีนทร์ บุตรอินทร์, 2555) ในธรรมชาติมีอะฟลาทอกซิน 4 ชนิด ได้แก่ อะฟลาทอกซินบี 1, บี 2, จี 1 และจี 2 ซึ่งมีความเป็นพิษเรียงลำดับจากมากไปน้อย ได้แก่ อะฟลาทอกซินบี 1, อะฟลาทอกซินจี 1, อะฟลาทอกซินบี 2 และอะฟลาทอกซินจี 2 โดย อะฟลาทอกซินบี 1 เป็นชนิดที่พบบ่อยและมีพิษรุนแรงที่สุด (จุฑารัตน์ เล้าสุทธิพงษ์ และคณะ, 2562) แล้วยังพบการปนเปื้อนมากที่สุดในพืชผลทางการเกษตร เช่น ข้าวโพด ข้าว ถั่วเหลือง และถั่วลิสง เป็นต้น (Jibangyang และคณะ, 2020) โครงสร้างทางเคมีสามารถแบ่งอะฟลาทอกซินออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ 1) กลุ่มอะฟลาทอกซินชนิดบี เป็นสารพวก bis-furano-isocoumarin และ 2) กลุ่มอะฟลาทอกซินชนิดจี เป็นสาร isocoumarin (บดีนทร์ บุตรอินทร์, 2555) สถาบันวิจัยมะเร็งนานาชาติ (International Agency for Research on Cancer: IARC) ซึ่งเป็นหน่วยงานในสังกัดองค์การอนามัยโลก ได้จัดประเภทของสารอะฟลาทอกซินไว้ในกลุ่มที่ 1 คือ เป็นสารก่อมะเร็งสำหรับมนุษย์ (Murphy และคณะ, 2006) นอกจากนี้ ยังมีอะฟลาทอกซินเอ็ม 1 และเอ็ม 2 ซึ่งเป็นอะฟลาทอกซินที่พบในน้ำนมวัวซึ่งเกิดจากการเปลี่ยนรูปของอะฟลาทอกซินบี 1 และบี 2 ที่ปนเปื้อนในอาหารสัตว์โดยกลไกของร่างกายสัตว์ (จุฑารัตน์ เล้าสุทธิพงษ์ และคณะ, 2562) โครงสร้างทางเคมีของอะฟลาทอกซินชนิดต่าง ๆ แสดงในรูปที่ 1.1



รูปที่ 1.1 โครงสร้างทางเคมีของอะฟลาทอกซินแต่ละชนิด (Zhang และคณะ, 2014)

คุณสมบัติทางกายภาพของอะฟลาทอกซิน มีลักษณะเป็นผลึกใส เรืองแสงภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ละลายน้ำได้ และละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น คลอโรฟอร์ม เบนซีน เมทานอล เอทานอล และอะซีโตน คุณสมบัติที่สำคัญของอะฟลาทอกซิน คือ สามารถทนความร้อนได้ถึงระดับอุณหภูมิ 260-270 องศาเซลเซียส ดังนั้น การใช้ความร้อนในรูปของการต้ม อบ คั่ว นึ่ง หรือการใช้ความดันไอน้ำ ไม่สามารถทำลายอะฟลาทอกซินได้ แต่สามารถถูกทำลายได้โดยไฮเปอร์คลอไรท์ แอมโมเนีย เบส และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เสื่อมสลายภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต แสงแดด และรังสีแกมมา (IARC, 2002)

ความเป็นพิษของอะฟลาทอกซินต่อร่างกายมนุษย์และสัตว์แตกต่างกันออกไป ขึ้นอยู่กับอวัยวะเป้าหมาย ปริมาณ และระยะเวลาที่ได้รับอะฟลาทอกซินเข้าสู่ร่างกาย (Dhanasekaran และคณะ, 2011) มนุษย์สามารถได้รับอะฟลาทอกซินเข้าสู่ร่างกายได้ทั้งทางตรง โดยบริโภคอาหารที่เป็นผลผลิตทางการเกษตรที่ปนเปื้อนอะฟลาทอกซิน และทางอ้อมโดยการบริโภคผลิตภัณฑ์จากสัตว์ที่ปนเปื้อนอะฟลาทอกซิน ซึ่งสัตว์เหล่านั้นได้รับจากการบริโภคอาหารที่มีส่วนผสมของผลผลิตทางการเกษตรที่ปนเปื้อนอะฟลาทอกซิน ซึ่งอะฟลาทอกซินปี 1 เป็นพิษต่อสุขภาพร่างกายของมนุษย์ เช่น เป็นสารก่อมะเร็ง สารก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ พิษต่อทารกในครรภ์ เป็นต้น (อภิษฐา ช่างสุพรรณ, 2548) และความเป็นพิษของอะฟลาทอกซินปี 1 ที่สะสมในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น วัว อาจส่งผลกระทบต่อการทำงานของร่างกายหลายประการทั้งแบบเฉียบพลันและเรื้อรัง เช่น เบื่ออาหาร เกิดความเครียด น้ำหนักตัวลดลง เชื่องซึม ท้องร่วง ภูมิคุ้มกันของร่างกายลดลง และส่งผลให้คุณภาพและปริมาณของน้ำนมที่ผลิตได้ลดลง นอกจากนี้ ยังสัมพันธ์กับความเข้มข้นของอะฟลาทอกซินเอ็ม 1 ในน้ำนมที่ปนเปื้อนตามปริมาณความเข้มข้นของอะฟลาทอกซินปี 1 ที่สะสมในร่างกายของวัวด้วย (Dhanasekaran และคณะ, 2011) ผลกระทบจากการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินโดยเฉพาะอะฟลาทอกซินปี 1 ที่สำคัญอีกประการหนึ่ง คือ เกิดภาวะขาดแคลนอาหาร ส่งผลทั้งในมนุษย์และสัตว์ เนื่องจากอะฟลาทอกซินปี 1 สามารถทำลายเนื้อเยื่อของผนังลำไส้เล็ก ทำให้เกิดความผิดปกติในการดูดซึมสารอาหารได้ (Lamplugh และ Hendrickse, 1982; Tchana และคณะ, 2010) จากงานวิจัยของ de Vries และคณะ (1990) พบว่า ประชากรวัยเด็กในประเทศแอฟริกา โดยเฉพาะเด็กที่เป็นโรคขาดโปรตีนอย่างรุนแรงชนิดมาราสมัสและควาซิออร์กอร์ มักพบปริมาณอะฟลาทอกซินปี 1 ปนอยู่ในเลือดสูงกว่าปกติ โดยอะฟลาทอกซินปี 1 เป็นสารเมแทบอลิต์หลักในผู้ป่วยจากโรคมาราสมัสและควาซิออร์กอร์ ความเป็นพิษของอะฟลาทอกซินแบบเฉียบพลันนั้นมักเกิดในเด็กมากกว่าผู้ใหญ่ มีอาการชักและหมดสติ เนื่องจากความผิดปกติของตับและสมอง น้ำตาลในเลือดลดลง สมองบวม มีการคั่งของไขมันในอวัยวะต่าง ๆ เช่น ตับ ไต หัวใจ และปอด บางครั้งมีการตรวจพบอะฟลาทอกซินในตับของผู้ป่วย สำหรับผู้ใหญ่หากได้รับสารพิษชนิดนี้เข้าไปเป็นจำนวนมาก หรือแม้เป็นจำนวนน้อยแต่ได้รับเป็นประจำ อาจเกิดการสะสมทำให้เกิดอาการชัก

หายใจลำบาก ตับถูกทำลาย หัวใจและสมองบวม นอกจากนี้ ยังเป็นสาเหตุของโรคมะเร็งตับ เกิดไขมันมากในตับ และพังพืดในตับ (สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข กระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 2, 2561) อะฟลาทอกซินหลังจากเข้าสู่ร่างกาย พบว่า ปริมาณอะฟลาทอกซิน 80-90 เพอร์เซ็นต์ จะขับออกจากร่างกายผ่านทางปัสสาวะและอุจจาระ ส่วนที่เหลืออีก 10-20 เพอร์เซ็นต์ จะดูดซึมเข้าสู่ระบบหมุนเวียนเลือดที่บริเวณลำไส้เล็กและสะสมอยู่ในเนื้อเยื่อตับและไต หากไม่ได้รับสารพิษเข้าสู่ร่างกายเพิ่มร่างกายจะขับปริมาณอะฟลาทอกซินเกือบทั้งหมดออกภายใน 24 ชั่วโมง โดยอะฟลาทอกซินปี 1 ซึ่งเป็นชนิดที่มีความเป็นพิษร้ายแรงกว่าชนิดอื่น หลังจากย้ายมาสะสมที่ตับจะเปลี่ยนโครงสร้างทำให้มีความสามารถสูงในการจับกับโปรตีน ดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ รวมถึงองค์ประกอบของเซลล์ตับ ซึ่งการจับกับองค์ประกอบของเซลล์ตับเป็นสาเหตุหลักสำคัญที่ทำให้เกิดสภาพพยาธิวิทยาและมะเร็งในเซลล์ตับ (Ritchie, 2011; โสภณ วงศ์แก้ว และคณะ, 2554)

ในประเทศไทยการควบคุมปริมาณการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหารตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข กำหนดให้มีปริมาณอะฟลาทอกซินปนเปื้อนในอาหารได้ไม่เกิน 20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ฉบับที่ 98, 2529) ในต่างประเทศมีการควบคุมการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินอย่างเข้มงวด เช่น สหภาพยุโรปกำหนดให้มีปริมาณอะฟลาทอกซินปี 1 ปนเปื้อนในธัญพืชได้ไม่เกิน 4 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ประเทศสหรัฐอเมริกากำหนดให้มีปริมาณอะฟลาทอกซินปนเปื้อนในอาหารได้ไม่เกิน 20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม เป็นต้น (Papiya และ Sasmal, 2001) หลายประเทศมีข้อกำหนดและกฎหมายเพื่อควบคุมปริมาณการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินในอาหาร อย่างเช่น ข้อกำหนดของคณะกรรมาธิการยุโรป (European Commission: EU) ที่มีการใช้ร่วมกันในประเทศสมาชิกและในอีกหลายประเทศ และตัวอย่างข้อกำหนดของแต่ละประเทศที่ใช้ในการควบคุมปริมาณการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินในอาหาร แสดงในตารางที่ 1.2 และ 1.3 ตามลำดับ

ตารางที่ 1.2 ข้อกำหนดการควบคุมปริมาณอะฟลาทอกซินที่พบในอาหารชนิดต่าง ๆ ได้สูงสุด โดยคณะกรรมการอาหารยุโรป (European Commission: EU)

ชนิดของอาหาร	ปริมาณอะฟลาทอกซินรวมสูงสุด (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)
ถั่วลิสง เมล็ดพืชที่ใช้ผลิตน้ำมัน แอลมอนด์ พิสทาซิโอ เฮเซนต์ ที่ผ่านกระบวนการทางกายภาพก่อนผลิตเป็นอาหาร	15
ผลิตภัณฑ์จากถั่วลิสง เมล็ดพืชที่ใช้ผลิตน้ำมัน พร้อมบริโภคร	4
ผลิตภัณฑ์จากแอลมอนด์ พิสทาซิโอ เฮเซนต์ พร้อมบริโภคร	10
ผลไม้แห้งที่ผ่านกระบวนการทางกายภาพก่อนผลิตอาหาร	10
ผลไม้แห้งและผลิตภัณฑ์จากผลไม้แห้งพร้อมบริโภคร	4
ธัญพืชทุกชนิดและผลิตภัณฑ์จากธัญพืช	4
ข้าวและข้าวโพดที่ใช้ประกอบอาหาร	10
เครื่องเทศ เช่น พริกต่าง ๆ พริกป่น พริกไทย ขิง ขมิ้น จันทร์เทศ	10
ธัญพืชที่ใช้ผลิตอาหารสำหรับเด็ก	0.10
อาหารที่ผลิตขึ้นเพื่อใช้ทางการแพทย์	0.10
นมดิบ นมที่ผ่านการให้ความร้อน และผลิตภัณฑ์จากนม	0.05

ที่มา : ดัดแปลงจากประกาศของกรรมาธิการยุโรป Commission Regulation (EU) No. 165/2010

ตารางที่ 1.3 ตัวอย่างข้อกำหนดปริมาณอะฟลาทอกซินรวมสูงสุดที่สามารถพบได้ในอาหารประเภทต่าง ๆ ตามข้อกำหนดของแต่ละประเทศ

ประเทศ	ประเภทของอาหาร	ปริมาณอะฟลาทอกซินรวมสูงสุดที่ยอมรับได้ (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)
เกาหลีใต้	ธัญพืชและผลิตภัณฑ์จากธัญพืช ผลไม้แห้ง	15
แคนาดา	ถั่วและผลิตภัณฑ์จากถั่ว	15
จีน	ข้าวโพดและผลิตภัณฑ์จากข้าวโพด	20
ชิลี	อาหารทุกชนิด	5
ญี่ปุ่น	อาหารทุกชนิด	10
ฟิลิปปินส์	อาหารทุกชนิด	20
มาเลเซีย	อาหารทุกชนิด	35
เม็กซิโก	ธัญพืชและผลิตภัณฑ์จากธัญพืช	20
สหภาพยุโรป	ถั่วต่าง ๆ ธัญพืช ผลไม้แห้ง ที่เป็นวัตถุดิบประกอบอาหาร	4
สหรัฐอเมริกา	อาหารทุกชนิด ยกเว้น นม	20
สิงคโปร์	อาหารทุกชนิด	5
อินเดีย	อาหารทุกชนิด	30
อินโดนีเซีย	อาหารทุกชนิด	35
ฮ่องกง	ถั่วและผลิตภัณฑ์จากถั่ว	20

ที่มา : ดัดแปลงจาก Anukul และคณะ, 2013; Ismail และคณะ, 2018

1.3 การควบคุมการปนเปื้อนสารพิษจากรา

การปนเปื้อนสารพิษจากราในผลผลิตทางการเกษตร สามารถเกิดขึ้นได้ตลอดกระบวนการทั้งก่อนการเก็บเกี่ยวและหลังการเก็บเกี่ยว (Chinphuti และคณะ, 2007) ปัจจุบันการปนเปื้อนสารพิษจากราในอาหารยังคงเป็นปัญหาที่ส่งผลกระทบต่อสุขภาพของมนุษย์และสัตว์ และส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจโดยเฉพาะทางอุตสาหกรรม ดังนั้น จึงจำเป็นต้องมีวิธีจัดการและควบคุมการปนเปื้อน เริ่มตั้งแต่การคัดเลือกวัตถุดิบที่ดีในการผลิต การล้างและคัดแยกวัตถุดิบให้สะอาด ใช้ภาชนะและอุปกรณ์ที่สะอาด เป็นต้น (สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา, 2547) วิธีการควบคุมการปนเปื้อนจากราที่ดีที่สุด ได้แก่ การป้องกันไม่ให้เกิดการปนเปื้อนสารพิษจากราหรือการปนเปื้อนราที่สามารถผลิตสารพิษได้ การลดการปนเปื้อนสารพิษจากรา และการตรวจสอบเพื่อติดตามหาโอกาสที่จะเกิดการปนเปื้อนของสารพิษจากรา (Wagacha และ Muthomi, 2008)

การป้องกันการเจริญและการลดการปนเปื้อนของราในผลผลิตทางการเกษตรเริ่มตั้งแต่ในแปลงเพาะปลูก สิ่งสำคัญในการลดการปนเปื้อนของรา คือ การควบคุมปัจจัยต่าง ๆ ที่ส่งผลต่อการเจริญของรา (Mohapatra และคณะ, 2017) ในปัจจุบันมีหลายวิธี ได้แก่ 1) วิธีทางกายภาพ เป็นการลดการปนเปื้อนของราจากภายนอกได้ทำตั้งแต่ก่อนการเก็บเกี่ยว เช่น การคัดแยกผลผลิตที่เสียหายทิ้ง การล้างทำความสะอาด การทำให้แห้ง การใช้รังสี การกรอง การดูดซับ และใช้ความร้อนเพื่อฆ่าเชื้อ (Betina, 1989; Luo และคณะ, 2018) การป้องกันการเจริญของราด้วยวิธีนี้จะสามารถคงความสดและรักษาคุณภาพของผลผลิตไว้ได้ (Lurie, 1998) และยังเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการลดการปนเปื้อนจากรา 2) วิธีทางเคมี เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพอย่างมากในการลดการปนเปื้อนของรา สารเคมีสามารถเกิดปฏิกิริยาเคมีได้หลายกระบวนการเพื่อลดการปนเปื้อนจากรา แต่ต้องคำนึงถึงความปลอดภัยต่อมนุษย์และสัตว์ (He และคณะ, 2010) การใช้สารเคมีมีข้อจำกัดในเรื่องของความปลอดภัยอาจเกิดเป็นสารพิษตกค้างอยู่ในอาหารได้และยังทำให้คุณค่าของอาหารเปลี่ยนไป (Awad และคณะ, 2010; Tiwari และคณะ, 2010) และ 3) วิธีทางชีวภาพ ถือเป็นวิธีหนึ่งที่ปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อมและได้รับความนิยมเป็นอย่างมาก โดยใช้จุลินทรีย์หรือเอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์ (Taylor และ Draughon, 2001)

1.4 การควบคุมทางชีวภาพ

การควบคุมทางชีวภาพ เป็นวิธีหนึ่งที่ได้รับคามนิยมโดยใช้สิ่งมีชีวิตหรือจุลินทรีย์มายับยั้งหรือทำลายเชื้อก่อโรคเพื่อไม่ให้เกิดความเสียหายต่อพืช (Jaibangyang และคณะ, 2020) ในปัจจุบันผลผลิตทางการเกษตรชนิดต่าง ๆ มุ่งเน้นให้มีระบบการผลิตเพื่อให้ได้ผลผลิตที่มีความปลอดภัยต่อทั้งผู้ผลิต ผู้บริโภค และสิ่งแวดล้อม ด้วย

เหตุนี้การจัดการโรคพืชโดยวิธีทางชีวภาพ จึงเป็นวิธีการหนึ่งที่มีวัตถุประสงค์เพื่อทดแทนหรือลดปริมาณการใช้สารเคมีให้น้อยลง โดยใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์เป็นตัวควบคุมโรค (Tongsri และคณะ, 2016)

งานวิจัยหลายฉบับมีการรายงานเกี่ยวกับการนำจุลินทรีย์หลายชนิดมาใช้ในการควบคุมโรคพืชทั้งก่อนการเก็บเกี่ยวและหลังการเก็บเกี่ยวอย่างกว้างขวาง แต่มีจุลินทรีย์ไม่กี่ชนิดเท่านั้นที่มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมโรคพืช ในหลายประเทศได้มีการพัฒนาจุลินทรีย์เหล่านี้ ซึ่งประกอบไปด้วย แบคทีเรีย รา และยีสต์ ให้เป็นชีวผลิตภัณฑ์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพืชให้ดี (Tongsri และคณะ, 2016) จากงานวิจัยของ Canamas และคณะ (2011) ได้ศึกษาการใช้ผลิตภัณฑ์จากแบคทีเรีย *Pantoea agglomerans* ในแปลงปลูกส้ม สามารถลดการเกิดโรคผลเน่าที่มีสาเหตุมาจากรา *Penicillium digitatum* ได้ดีกว่าการใช้ตัวจุลินทรีย์ และได้ศึกษาการใช้ยีสต์ *Candida sake* CPA-1 ร่วมกับสารเคลือบผิว นีตพ่นแปลงองุ่นเพื่อช่วยลดการเกิดโรคผลเน่าที่มีสาเหตุจากรา *Botrytis cinerea* ภายหลังการเก็บเกี่ยวได้ดีกว่าการใช้ยีสต์เพียงอย่างเดียว นอกจากนี้ สารเคลือบผิวยังมีประสิทธิภาพในการช่วยให้ยีสต์มีความคงทนและมีชีวิตรอดได้นานยิ่งขึ้น และงานวิจัยของ Akila และคณะ (2011) ได้ศึกษาการใช้แบคทีเรีย *Pseudomonas solanacearum* Pf1 ร่วมกับสารสกัดจากพืชในการควบคุมโรคเหี่ยวของกล้วยที่เกิดจากรา *F. oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc)

กลไกในการเข้าทำลายเชื้อก่อโรคพืชของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มีหลายรูปแบบ ได้แก่ การเป็นปรสิต (parasitism) การสร้างสารปฏิชีวนะ (antibiosis) การผลิตเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ของเชื้อโรคพืช (production of cell wall degrading enzymes) การแข่งขันเพื่อครอบครองพื้นที่และอาหาร (competition for nutrients and space) และการชักนำให้พืชมีความต้านทานโรค (induction of disease resistance in plant) ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้มักมีหลายกลไกร่วมกันในการควบคุมโรคพืช (Tongsri และคณะ, 2016)

1.5 การควบคุมทางชีวภาพโดยยีสต์ปฏิปักษ์

ยีสต์เป็นสิ่งมีชีวิตจำพวกยูแคริโอตที่มีเซลล์เดี่ยวถูกนำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหารตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน (Wisniewski และคณะ, 2007) เนื่องจากยีสต์มีลักษณะที่เลี้ยงง่าย เจริญเติบโตเร็ว พบได้ง่ายในพื้นที่ผิว และสภาวะต่าง ๆ (Türker, 2014) นอกจากนี้ เมแทบอลิต์ที่ยีสต์ผลิตขึ้นมีความปลอดภัยต่อมนุษย์และสัตว์ รวมทั้งไม่ทำลายผลผลิตทางการเกษตร (Wisniewski และคณะ, 2007) ซึ่งถือเป็นข้อดีของการใช้ยีสต์เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพ และยีสต์หลายสายพันธุ์ถูกระบุว่าเป็นตัวควบคุมทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพในการต้านราที่ผลิตสารพิษจากราได้ (Jaibangyang และคณะ, 2020)

งานวิจัยหลายฉบับได้ศึกษาความสามารถของยีสต์ปฏิปักษ์ที่ใช้เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพ ซึ่งมีผลในการยับยั้งการเจริญของราที่ผลิตสารพิษจากรา จากงานวิจัยของ Niknejad และคณะ (2012) ได้ทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินปี 1, ปี 2, จี 1 และจี 2 จากราในสกุล *Aspergillus* โดยใช้ *Candida parapsilosis* พบว่า ยีสต์สามารถยับยั้งการเจริญของราได้อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อทดสอบที่ความแตกต่างของอุณหภูมิและระยะเวลาในการบ่ม นอกจากนี้ ยีสต์สามารถลดการผลิตอะฟลาทอกซินได้ตั้งแต่ 54-99 เปอร์เซ็นต์ และสามารถลดการผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 ได้สูงที่สุด (99.59 เปอร์เซ็นต์) และงานวิจัยของ Ponsone และคณะ (2011) ได้ศึกษาความสามารถของยีสต์ *Kluyveromyces thermotolerans* ที่สามารถควบคุมรา *A. carbonarius*, *A. niger* และโอคราทอกซินในองุ่นได้ นอกจากนี้ ยังมีการใช้ยีสต์หัวเชื้อผสมเพื่อเพิ่มความสามารถในการเป็นตัวควบคุมทางชีวภาพ เพื่อช่วยส่งเสริมการเจริญร่วมกันของยีสต์ ซึ่งส่งผลในการช่วยเพิ่มความสามารถในการยับยั้งรามากกว่า 1 สายพันธุ์ เนื่องจากมีกลไกการยับยั้งราที่หลากหลายมากขึ้น และยังช่วยในการลดอัตราการเกิดโรคได้มากขึ้น (Sharma และคณะ, 2009) จากงานวิจัยของ Kepetanakou และคณะ (2012) ได้ศึกษาการใช้ยีสต์ผสมสามารถลดปริมาณโอคราทอกซินที่ผลิตได้ถึง 60 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การใช้ยีสต์เดี่ยวสามารถลดปริมาณโอคราทอกซินที่ผลิตได้เพียง 5-15 เปอร์เซ็นต์

1.6 กลไกการควบคุมทางชีวภาพโดยยีสต์ปฏิปักษ์

ปัจจุบันการใช้ยีสต์ปฏิปักษ์ในการเป็นตัวควบคุมทางชีวภาพมีอย่างแพร่หลาย เพื่อลดการใช้สารเคมีในการฆ่าราเพื่อควบคุมการก่อโรคของราที่ปนเปื้อนในผลผลิตทางการเกษตรชนิดต่าง ๆ การศึกษากลไกการควบคุมทางชีวภาพโดยยีสต์ปฏิปักษ์มีความสำคัญเป็นอย่างมาก เนื่องจากสามารถนำไปพัฒนาประสิทธิภาพในการเป็นตัวควบคุมทางชีวภาพของยีสต์ได้ ซึ่งยีสต์ใช้กลไกที่สำคัญในการเป็นปฏิปักษ์ ได้แก่ การแย่งชิงพื้นที่การเจริญและสารอาหาร การสร้างเอนไซม์ เช่น β -1,3-กลูคาเนส เพื่อย่อยสลายผนังเซลล์ของรา และการสร้างสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่าย (Volatile Organic Compounds: VOCs) (El-Tarabily และ Sivasithamparam และคณะ, 2006)

การแย่งชิงพื้นที่การเจริญและสารอาหาร

ยีสต์เจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว ทำให้สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ได้ในอัตราที่เร็วและมากกว่าร่าก่อโรค ซึ่งลดจำนวนลงตามพื้นที่ในการเจริญที่ลดลงไปด้วย จากงานวิจัยของ Droby และคณะ (1991) ได้ศึกษาความสามารถ

ของยีสต์ *Pichia guilliermondii* ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Botrytis cinerea* ที่ก่อโรคในผลแอปเปิ้ล และ *P. digitatum* ที่ก่อโรคในผลองุ่น ได้ดีที่สุดเมื่อทดสอบที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของยีสต์ที่สูงถึง 10^{10} CFUต่อมิลลิลิตร ในช่วง 24 ชั่วโมงแรก ยีสต์มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว ดังนั้น การแย่งชิงพื้นที่การเจริญและสารอาหารกับราจึงเป็นกลไกสำคัญที่ยีสต์สามารถยับยั้งการเจริญของราได้ เมื่อผ่านช่วง 24 ชั่วโมงแรกไปแล้ว ยีสต์จะแข่งขันเพื่อแย่งชิงอาหารกับรา ร่วมกับการแข่งขันเพื่อแย่งชิงพื้นที่ในการเจริญเพื่อป้องกันผลผลิตจากราก่อโรค (Li และคณะ, 2008; Liu และคณะ, 2012)

การสร้างสารยับยั้งการเจริญและย่อยสลายผนังเซลล์ของรา

เป็นกลไกสำคัญอย่างหนึ่งในการยับยั้งการเจริญของรา ซึ่งการสร้างสาร siderophores สามารถยับยั้งการเจริญของราก่อโรคในพืชได้ จากงานวิจัยของ Calvente และคณะ (2001) ได้ศึกษาความสามารถของยีสต์ *Rhodotorula* sp. ที่สามารถผลิตกรด rhodotorulic ซึ่งเป็น siderophore ที่สามารถยับยั้งการงอกสปอร์ของราก่อโรคในพืชได้หลายชนิด นอกจากนี้ สารยับยั้งบางชนิดที่ยีสต์ผลิตสามารถย่อยผนังเซลล์ของราก่อโรคได้ งานวิจัยของ Winiewski และคณะ (1991) ได้ศึกษาความสามารถของยีสต์ *P. guilliermondii* ที่สามารถจับกับเส้นใยของ *B. cinerea* และ *Penicillium* sp. แล้วทำให้เส้นใยของราเกิดการเว้าเข้าด้านในและย่อยผนังเซลล์บางส่วนไปในที่สุด และงานวิจัยของ Marish และคณะ (2002) พบว่า เอนไซม์ β -1,3-กลูคาเนส ที่สร้างจาก *Pichia membranifaciens* สามารถยับยั้งการเจริญของ *Botrytis cinerea* ในผลองุ่นได้

การกระตุ้นภูมิคุ้มกันของพืช

ยีสต์ปฏิปักษ์สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันของพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพในพืชผลทางการเกษตร โดยเฉพาะบริเวณที่เกิดบาดแผล ทำให้เกิดกระบวนการป้องกันตัวเองหรือเสริมสร้างภูมิคุ้มกันให้กับพืช ยีสต์สามารถกระตุ้นที่บริเวณผิวของผลผลิตทางการเกษตรต่อต้านการติดเชื้อของราก่อโรค โดยสร้างสารยับยั้งบางชนิดหรือซ่อมแซมส่วนที่เสียหาย (Spadaro และ Droby, 2016) โดยยีสต์ปฏิปักษ์จะกระตุ้นให้พืชสร้างสารยับยั้ง เช่น ฟีนอลอะลานิน แอมโมเนีย-ไลเอส, โฟโทอะลีซิน เพอร์ออกซิเดส และเอทิลีน เป็นต้น จากงานวิจัยของ Yao และ Tian (2005) ได้ศึกษาการถูกกระตุ้นให้เกิดการสร้างเอนไซม์ไคตินเอส, β -1,3-กลูคาเนส, ฟีนอลอะลานิน แอมโมเนีย-ไลเอส และโฟโทอะลีซิน เพอร์ออกซิเดส ในผลลูกพีช โดย *Cryptococcus laurentii* และมีการเติมกรดเมทิลจัสโมนิก ซึ่งสามารถกระตุ้นให้เกิดการป้องกันของเซลล์ได้ดีกว่ากระตุ้นด้วยยีสต์เพียงอย่างเดียว

การสร้างสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่าย

การผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายเป็นอีกหนึ่งกลไกสำคัญที่ยีสต์ใช้ในการยับยั้งราก่อโรค จากงานวิจัยของ Zeidan และคณะ (2018) ได้ศึกษาสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายที่ผลิตโดยยีสต์ *Lachancea thermotolerans* ที่มีประสิทธิภาพในการการป้องกันมะเขือเทศจากราก่อโรค งานวิจัยของ Francesco และคณะ (2015) ได้ทดสอบความสามารถของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายที่สร้างจาก *A. pullulans* L1 และ *A. pullulans* L8 เพื่อยับยั้งการเจริญของรา 5 ชนิด ได้แก่ *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum acutatum*, *P. expansum*, *P. digitum* และ *P. italicum* พบว่า สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ราได้ดีเมื่อทดสอบในระดับห้องปฏิบัติการ นอกจากนี้ เมื่อทดสอบในผลแอปเปิ้ลและผลส้มที่มีการเติมราลงไปร่วมกับการใช้สารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายจากยีสต์ พบว่า สามารถลดการเจริญของราลงได้ 88 เปอร์เซ็นต์ โดยเมื่อวิเคราะห์ชนิดของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายที่ยีสต์ผลิตทั้งสองสายพันธุ์ พบว่า เป็นสารประกอบประเภท 2-ฟีนิล, 1-บิวทานอล-3-เมทิล, 1-บิวทานอล-2-เมทิล 1-โพรพานอล-2-เมทิล เป็นต้น และงานวิจัยของ Toffano และคณะ (2017) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายที่ผลิตจาก *Sacharomyces cerevisiae* เพื่อใช้เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพต่อโรคเน่าจาก *Phyllosticta citricarpa* ในผลส้มหลังการเก็บเกี่ยว พบว่า สารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายที่ผลิตจากยีสต์ปฏิปักษ์สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยและการงอกของสปอร์ได้ ซึ่ง *S. cerevisiae* สามารถสร้างสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายได้หลายชนิด ได้แก่ เอทานอล (มีปริมาณมากที่สุด), 3-เมทิล-1-บิวทานอล, 2-เมทิล-1-บิวทานอล และเอทิลอะซีเตต เป็นต้น ปัจจุบันมีการนำยีสต์ที่สามารถผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายมาใช้ในการควบคุมทางชีวภาพ ตัวอย่างของยีสต์ที่สามารถผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายเพื่อยับยั้งการเจริญของรา แสดงในตารางที่ 1.4

ตารางที่ 1.4 สารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายจากยีสต์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของรา

ชนิดของยีสต์	ชนิดของสารประกอบอินทรีย์ ระเหยง่ายที่ยีสต์ผลิต	ชนิดของราที่ยับยั้ง	อ้างอิง
<i>S. cerevisiae</i> ACBL-52	3-เมทิล-1-บิวทานอล 2-เมทิล-1-บิวทานอล	<i>P. digitatum</i>	de Souza และคณะ, 2018
<i>S. cerevisiae</i> CR-1	เอทานอล 3-เมทิล-1-บิวทานอล 2-เมทิล-1-บิวทานอล ฟีนิลเอทิลแอลกอฮอล์	<i>G. citricarpa</i>	Fialho และคณะ, 2010
<i>C. sake</i> 41E	3-เมทิลบิวทิล เฮกซานเอต 3-เมทิลบิวทิล เพนทาโนเอต 2-เมทิลโพรพิล เฮกซานเอต เพนทิลเฮกซานเอต	<i>B. cinerea</i> <i>P. expansum</i>	Arrarte และคณะ, 2017
<i>P. anomala</i> WRL-076	2-ฟีนิลเอทานอล	<i>A. flavus</i>	Hua และคณะ, 2014
<i>W. anomalus</i>	2-ฟีนิลเอทานอล ไอโซบิวทานอล	<i>B. cinerea</i>	Oro และคณะ, 2018

ยีสต์หลายชนิดถูกรับรองว่าเป็น Generally recognized as safe (GRAS) สามารถใส่ลงในอาหารได้อย่างปลอดภัย และยีสต์มักถูกใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น การทำขนมปัง การผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ ตลอดจนการนำยีสต์มาใช้ในการปรับปรุงรสชาติเครื่องดื่ม เป็นต้น ยีสต์จึงได้รับความสนใจเพื่อใช้เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพและปลอดภัยในการควบคุมราที่ผลิตสารพิษจากราในอาหาร (Zeidan และคณะ, 2018)

จากงานวิจัยก่อนหน้า จิตโสภิต สมัครกาล (2561) ได้คัดเลือกยีสต์จากเมล็ดกาแฟอาราบิก้าจากโครงการในพระราชดำริ จากสถาบันวิจัยโครงการหลวงแม่หลอด ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงตีนตก และศูนย์พัฒนาโครงการหลวงป่าเมี่ยง จังหวัดเชียงใหม่ และยีสต์ที่คัดเลือกได้ถูกทดสอบความเป็นปฏิปักษ์เบื้องต้นต่อราที่ผลิตสารพิษจากรา โดยพบว่ายีสต์ไอโซเลต Y08 และ Y20 ให้ผลการทดสอบที่ดีกว่ายีสต์ไอโซเลตอื่นแต่ยังไม่ทราบถึงกลไกสำคัญที่ยีสต์ใช้ในการเป็นปฏิปักษ์ต่อราที่ผลิตสารพิษ

ดังนั้น งานวิจัยฉบับนี้จึงมีวัตถุประสงค์ เพื่อทดสอบความสามารถของยีสต์ปฏิปักษ์ไอโซเลต Y08 และ Y20 ต่อการยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* และศึกษากลไกสำคัญที่ยีสต์ปฏิปักษ์ใช้ในการยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินของ *A. flavus* รวมถึงศึกษาชนิดของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่าย (VOCs) ที่สำคัญที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินของ *A. flavus*

บทที่ 2

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย

2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. กรวยกรอง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 50 มิลลิลิตร บริษัท Pyrex Germany
2. กระดาษกรอง เบอร์ 1 ขนาด 110 มิลลิลิตร ยี่ห้อ Whatman, USA
3. กระบอกฉีดยา (syringe) ขนาด 1 และ 5 มิลลิลิตร บริษัท Nipro, USA
4. กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแบบธรรมดา ยี่ห้อ Olympus บริษัท อีฟอ์แอล อินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด, Japan
5. กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแบบสเตอริโอ ยี่ห้อ Olympus บริษัท อีฟอ์แอล อินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด, Japan
6. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด รุ่น JSM-IT500HR บริษัท Jeol จำกัด
7. ขวดใส่สารละลาย ขนาด 500 มิลลิลิตร บริษัท Duran, Germany
8. เครื่องชั่ง รุ่น PG6002-5 และ AG285 บริษัท Mettler Toledo, Switzerland
9. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (autoclave) รุ่น SS-325 และ ES-315 บริษัท Tomy, Japan
10. เครื่องปั่นผสม (vortex mixer) รุ่น G-560E บริษัท Scientific Industries, USA
11. เครื่องเปลี่ยนอากาศเป็นแก๊สไนโตรเจน ยี่ห้อ Peak scientific, UK
12. เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) บริษัท Kubota Laboratory, Japan
13. จานเพาะเชื้อแก้ว (petri dish) บริษัท Pyrex, Germany
14. ชุดกรองสุญญากาศ บริษัท Merk Milipore, USA
 - กรวยกรองแก้ว ปริมาตร 300 มิลลิลิตร
 - กระดาษกรอง ขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร
 - ขวดรูปخمพู่ ขนาด 1000 มิลลิลิตร
 - คีบล็อกลูมิเนียม
 - เครื่องปั๊ม
 - จุกสุญญากาศ
15. ชุดแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรมิเตอร์ (Gas Chromatography-Mass Spectrometry: GC-MS)
 - คอลัมน์ (column) HP-INNOWAX ขนาด 30 x 0.25 มิลลิเมตร ปริมาตร 0.25 ไมโครลิตร

16. ชุดโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography: HPLC)
 - คอลัมน์ (column) C18 ขนาด 150 x 4.6 มิลลิลิตร 5 ไมโครลิตร รุ่น Luna บริษัท Phenomenex, USA
 - เครื่องตรวจวัดชนิดฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence detector) รุ่น Prostar บริษัท Varian, USA
 - เครื่องปั๊ม autosample รุ่น Prostar บริษัท Varian, USA
17. ตู้เย็บเชื้อ รุ่น V6-T ขนาด 2 x 4 ฟุต บริษัท Lab Micro, Thailand
18. ตู้บ่มเชื้อ (incubator) รุ่น D06064 บริษัท Memmert, Germany
19. ตู้บ่มเชื้อ (incubator) อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ประกอบในประเทศไทย
20. ตู้บ่มเชื้อ (incubator) อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บริษัท Memmert, Thailand
21. ตู้บ่มเชื้อ (incubator) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ยี่ห้อ Conthem Scientific, New Zealand
22. ตู้เย็น อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส บริษัท Sandenintercool, Thailand
23. ตู้อบแห้ง บริษัท Conthem Scientific, New Zealand
24. ถังมือยาง ยี่ห้อ ศรีตรังโกลฟ์, Thailand
25. ปีกเกอร์ ขนาด 250, 500 และ 1000 มิลลิลิตร บริษัท Pryrex, Germany
26. ปิเปตต์แก้ว ขนาด 1 มิลลิลิตร ยี่ห้อ Qualicolor, Germany
27. แผ่นพาราฟิล์ม บริษัท Menasha, Thailand
28. พาสเจอร์ปิเปตต์แก้ว ขนาด 150 มิลลิลิตร ยี่ห้อ Volac, UK
29. ไมโครปิเปตต์ ขนาด 20, 200, 1000 และ 5000 มิลลิลิตร บริษัท Eppendorf, Germany
30. ไมโครปิเปตต์ทิป (micropipette tip) ขนาด 200 และ 1000 มิลลิลิตร ยี่ห้อ Hycon บริษัท Biomed, Thailand
31. สไลด์ ขนาด 25.6 x 76.2 มิลลิเมตร ยี่ห้อ Sali Brand, China
32. หลอดเซนทรีฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ยี่ห้อ Hycon บริษัท Biomed, Thailand
33. หลอดทดลอง ขนาด 16 x 150 มิลลิลิตร บริษัท Pyrex, Germany
34. หลอดทดลองฝาเกลียว ขนาด 13 x 100 มิลลิลิตร บริษัท Pyrex, Germany
35. หลอดทดลองฝาเกลียว ขนาด 16 x 150 มิลลิลิตร บริษัท Pyrex, Germany
36. หัวกรองสำเร็จ ชนิด Polytetrafluoroethylene (PTFE) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 13 มิลลิเมตร ขนาดรูพรุน 0.22 ไมโครเมตร บริษัท Lubitech Technologies, China

37. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น WB14 บริษัท Memmert, Germany
38. อ่างอัลตราโซนิก (ultrasonic bath) รุ่น SONOREX RX 100 บริษัท Bandelin Electronic, Germany
39. ฮีมาไซโทมิเตอร์ ยี่ห้อ Boeco, Germany

2.2 เคมีภัณฑ์

1. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) บริษัท Merck, Germany
2. ผงวุ้น บริษัท Difco Laboratories, USA
3. เมทานอล (CH₃OH) บริษัท Merk, Germany
4. สารละลายมาตรฐานอะฟลาทอกซินบี 1 บริษัท Sigma-Aldich, USA
5. อะซิโตนไนด์รล์ (CH₃CN) ยี่ห้อ RCI Labsacn บริษัท V.S.CHM HOUSE, Thailand
6. D-glucose anhydrous บริษัท HiMedia Laboratories, India
7. Methanol (HPLC Grade) บริษัท Merck, Germany
8. Malt extract powder บริษัท HiMedia Laboratories, India
9. Peptone บริษัท HiMedia Laboratories, India
10. Potato Dextrose Agar บริษัท Difo Laboratories, USA
11. Potato Dextrose Broth บริษัท Difo Laboratories, USA
12. Tween 80 บริษัท Merck, Germany
13. Yeast extract powder บริษัท HiMedia Laboratories, India

2.3 จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. *Aspergillus flavus* M3T8R4G3
2. ยีสต์ไอโซเลต Y08 ซึ่งคัดแยกมาจากเมล็ดกาแฟอาราบิก้า จากสถาบันวิจัยโครงการหลวงแม่ฮ่องสอน และศูนย์พัฒนาโครงการหลวงตีนตก จังหวัดเชียงใหม่ ประเทศไทย
3. ยีสต์ไอโซเลต Y20 ซึ่งคัดแยกมาจากเมล็ดกาแฟอาราบิก้า จากสถาบันวิจัยโครงการหลวงแม่ฮ่องสอน ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงตีนตก และศูนย์พัฒนาโครงการหลวงป่าเมี่ยง จังหวัดเชียงใหม่ ประเทศไทย

จุลินทรีย์ที่ใช้ทั้งหมดในงานวิจัยถูกเก็บรักษาที่คลังจุลินทรีย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.4 วิธีดำเนินงานวิจัย

2.4.1 การเตรียมจุลินทรีย์

2.4.1.1 เซลล์ยีสต์แขวนลอย

นำยีสต์ปฏิปักษ์ไอโซเลต Y08 และ Y20 ที่ได้รับจากคลังจุลินทรีย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง Yeast Malt extract (YM) (ภาคผนวก ก) บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้น นำโคโลนีเดี่ยวที่แยกได้ใช้เป็นหัวเชื้อยีสต์มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายลงอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM หลอดใหม่ ปริมาตร 250 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส โดยยีสต์ไอโซเลต Y08 บ่มเป็นเวลา 9 ชั่วโมง และยีสต์ไอโซเลต Y20 บ่มเป็นเวลา 9 ชั่วโมง 30 นาที เพื่อให้ได้เซลล์ยีสต์ในระยะเวลาการเจริญช่วง mid log phase (ฟิล์มภาพ ตองอ่อน, 2562) จากนั้น นำยีสต์ถ่ายลงหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำมาปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนยีสต์ด้วยสารละลาย Phosphate buffered saline (PBS) (ภาคผนวก ข) ผสมให้เข้ากันปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 2 ครั้ง จากนั้น ละลายตะกอนยีสต์ด้วยสารละลาย PBS และนับจำนวนเซลล์ยีสต์ด้วยฮีมาไซโทมิเตอร์ให้ความเข้มข้น 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

2.4.1.2 สปอร์ราแขวนลอย

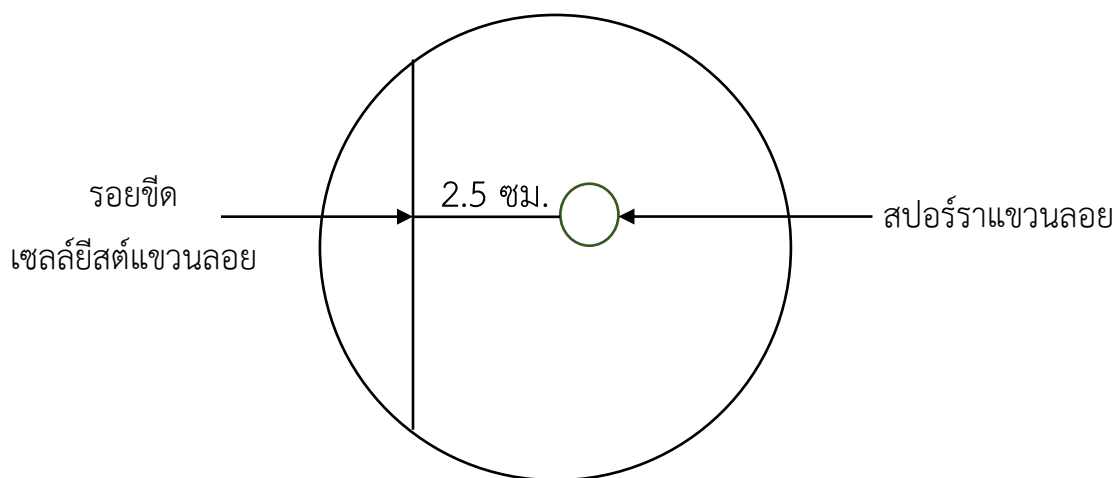
นำ *A. flavus* M3T8R4G3 ที่สามารถผลิตอะฟลาทอกซิน (โนทัย กิตติกำแหง, 2554) จากคลังจุลินทรีย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) (ภาคผนวก ก) บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน แล้วเก็บสปอร์ราด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับ Tween 80 ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ที่ปราศจากเชื้อ และนับจำนวนสปอร์ราให้ความเข้มข้นสปอร์ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

2.4.2 การทดสอบความสามารถของยีสต์ปฏิภักษ์เบื้องต้นในการยับยั้งการเจริญของ *A. flavus*

2.4.2.1 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญด้วยวิธี Dual culture

นำเซลล์ยีสต์แขวนลอยทั้งสองไอโซเลตจากข้อ 2.4.1.1 มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* M3T8R4G3 ด้วยวิธี Dual culture ดัดแปลงมาจากวิธีของ Pantelides และคณะ (2015) โดยใช้ลูปชีดเซลล์ยีสต์แขวนลอยให้เป็นเส้นตรงลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA แล้วหยดสปอร์ราแขวนลอยจากข้อ 2.4.1.2 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ให้ห่างจากรอยชีดยีสต์ 2.5 เซนติเมตร (รูปที่ 2.1) รองนแห้งสนิท แล้วนำไปบ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ชีดด้วยสารละลาย PBS ที่ปราศจากเซลล์ยีสต์ แล้วหยดสปอร์ราแขวนลอยห่างจากรอยชีดสารละลาย PBS 2.5 เซนติเมตร เป็นชุดควบคุม ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง หลังจากบ่มครบตามกำหนดแล้ว วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของรา นำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของรา ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง} = \frac{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีราชุดควบคุม}}{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีราชุดควบคุม} - \text{เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีราชุดทดสอบ}} \times 100$$



รูปที่ 2.1 การทดสอบด้วยวิธี Dual culture บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

เพื่อทดสอบความสามารถของยีสต์ปฏิภักษ์เบื้องต้นในการยับยั้งการเจริญของ *A. flavus*

2.4.2.2 การทดสอบความสามารถของยีสต์ปฏิปักษ์ในการสร้างสารยับยั้งการเจริญเมื่อเลี้ยงร่วมกับรา

นำเซลล์ยีสต์แขวนลอยทั้งสองไอโซเลตจากข้อ 2.4.1.1 มาทดสอบความสามารถในการสร้างสารยับยั้งการเจริญเมื่อเลี้ยงร่วมกับ *A. flavus* M3T8R4G3 ด้วยวิธี Agar spot assay ดัดแปลงมาจากวิธีของ Sangmanee และ Hogpattarakere (2014) โดยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Yeast extract Peptone Dextrose (YPD) (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้น หยดสารแขวนลอยเซลล์ยีสต์ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำนวน 2 ตำแหน่ง ตำแหน่งละ 10 ไมโครลิตร บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน จากนั้น เทอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (วุ้น 0.8 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่ผสมด้วยสปอร์ราแขวนลอยจากข้อ 2.4.1.2 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง YPD ที่มีการเจริญของยีสต์ บ่มต่อที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน โดยชุดควบคุมใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ YPD ที่ไม่หยดสารแขวนลอยเซลล์ยีสต์ ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง หลังจากบ่มครบตามกำหนดแล้ว สังเกตบริเวณที่มีการยับยั้งการเจริญของรา

2.4.2.3 การทดสอบน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ยีสต์ในการยับยั้งการเจริญของรา

เลี้ยงยีสต์ทั้งสองไอโซเลตในอาหารเชื้อเหลว YM บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส จนถึงระยะ mid log phase ซึ่งยีสต์มีอัตราการเจริญสูงที่สุด โดยยีสต์ไอโซเลต Y08 บ่มเป็นเวลา 9 ชั่วโมง และยีสต์ไอโซเลต Y20 บ่มเป็นเวลา 9 ชั่วโมง 30 นาที และจนถึงระยะ late log phase ซึ่งเป็นช่วงการเจริญที่เหมาะสมต่อการสร้างเมแทบอลิทุติยภูมิ โดยยีสต์ไอโซเลต Y08 บ่มเป็นเวลา 12 ชั่วโมง และยีสต์ไอโซเลต Y20 บ่มเป็นเวลา 13 ชั่วโมง (ฟิล์มภา ต่ออ่อน, 2562) จากนั้น แยกน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ยีสต์ โดยใช้หัวกรองสำเร็จ ชนิด Polyetrafluoroethylene (PTFE) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 13 มิลลิเมตร ขนาดรูพรุน 0.22 ไมโครเมตร แล้วแบ่งครึ่งหนึ่งไปให้ความร้อนที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ได้น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ที่ผ่านการให้ความร้อน จากนั้น ทดสอบด้วยวิธี Agar diffusion assay ดัดแปลงมาจากวิธีของ Balouiri และคณะ (2016) โดยกระจายสปอร์ราแขวนลอย ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA แล้วนำไปเจาะหลุมจำนวน 2 หลุม จากนั้น หยดน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากยีสต์ทั้ง 2 รูปแบบ ได้แก่ น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ที่ผ่านและไม่ผ่านการให้ความร้อนที่ได้จากช่วงการเจริญระยะ mid log phase และ late log phase ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในหลุมที่เจาะไว้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่กระจายสปอร์ราแขวนลอย และเจาะหลุมหยดอาหารเลี้ยงเชื้อ YM เป็นชุดควบคุม ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง หลังจากบ่มครบตามกำหนดแล้ว สังเกตบริเวณยับยั้งการเจริญของรารอบหลุมทดสอบ

2.4.3 การทดสอบความสามารถของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่าย (volatile organic Compounds: VOCs) ของยีสต์ต่อการยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษของรา

2.4.3.1 การทดสอบการสร้างสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษของรา

ทดสอบความสามารถของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายที่ผลิตจากยีสต์ปฏิปักษ์ด้วยวิธี face to face double petri dish assay ดัดแปลงมาจากวิธีของ Fiori และคณะ (2014) โดยนำเซลล์ยีสต์แขวนลอยแต่ละไอโซเลตจากข้อ 2.4.1.1 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร กระจายบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง YPD จากนั้น หยดสปอร์ราแขวนลอยจากข้อ 2.4.1.2 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงตรงกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA รอให้แห้งสนิท แล้วนำจานอาหารเลี้ยงยีสต์ (YPD) และจานอาหารเลี้ยงรา (PDA) ประกบเข้ากัน โดยให้จานอาหารเลี้ยงราอยู่ด้านบนแล้วพันจานอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองด้วยพาราฟิล์ม บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ใช้จานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่เลี้ยงราประกบด้วยจานอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง YPD ที่ปราศจากยีสต์เป็นชุดควบคุม ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง หลังจากบ่มครบตามกำหนดแล้ว วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรา คำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของราเทียบกับชุดควบคุม สังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีด้วยตาเปล่า แล้วนำเส้นใยราที่สังเกตเห็นการยับยั้งชัดเจนไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope: SEM) เปรียบเทียบกับเส้นใยราในชุดควบคุม ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จากนั้นเจาะอาหารเลี้ยงรา (PDA) ตรงกลางโคโลนี จำนวน 6 ชิ้น นำไปสกัดและวิเคราะห์ปริมาณอะฟลาทอกซินปี 1 ตามการทดลองในข้อ 2.4.5.2

2.4.3.2 การทดสอบความสามารถในการลดการผลิตสารพิษจากรา

หลังจากวัดการเจริญของรา ในข้อ 2.4.5.1 นำรามาสกัดอะฟลาทอกซินปี 1 ตามวิธีของ Dachoupan และคณะ (2009) โดยเจาะอาหารเลี้ยงเชื้อบริเวณโคโลนีของ *A. flavus* M3T8R4G3 จำนวน 6 ชิ้น ใส่ในขวดสกัดซึ่งนำหนักขวดสกัดทั้งก่อนและหลังใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อคำนวณหาน้ำหนักของอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้น เติมนเมทานอลเพื่อสกัดอะฟลาทอกซินปี 1 ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร สกัดสารพิษจากราโดยใช้อ่างอัลตราโซนิก เป็นเวลา 15 นาที แล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 เมื่อได้สารสกัดแล้วให้นำสารสกัดปริมาตร 1 มิลลิลิตร ไประเหยด้วยแก๊สไนโตรเจนที่ 40 องศาเซลเซียส จากนั้น เติมนเฟสเคลื่อนที่สำหรับอะฟลาทอกซินปี 1 (อะซีโทไนไตรล์ : น้ำปลอดประจุ : เมทานอล อัตราส่วน 20:60:20) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปกรองใส่ขวดไวโอลผ่านหัวกรองสำเร็จรูปที่มี

ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 13 มิลลิเมตร ขนาดรูพรุน 0.22 ไมโครเมตร แล้วส่งวิเคราะห์ปริมาณอะฟลาทอกซินด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography: HPLC) ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย วิเคราะห์ปริมาณอะฟลาทอกซินปี 1 โดยใช้คอลัมน์ C18 (150 x 4.6 มิลลิเมตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตร) ตรวจวัดด้วยเครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ที่มี excitation wavelength เท่ากับ 365 นาโนเมตร และ emission wavelength เท่ากับ 435 นาโนเมตร มีอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ที่ 40 องศาเซลเซียส โดย retention time (RT) ของอะฟลาทอกซินปี 1 เท่ากับ 7 นาที

2.4.3.3 การวิเคราะห์ชนิดของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ปฏิปักษ์

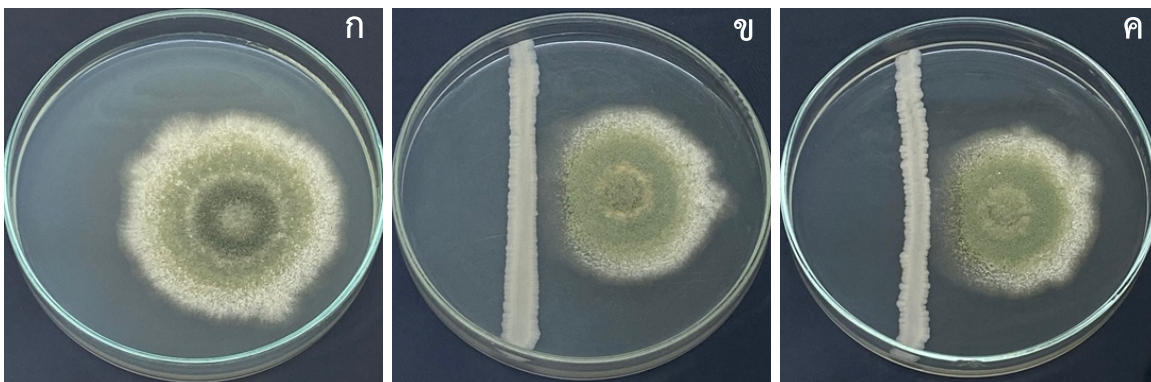
เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง YPD ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในขวดบรรจุสารขนาด 20 มิลลิลิตร หยอดเซลล์ยีสต์แขวนลอยจากข้อ 2.4.1.1 บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นส่งวิเคราะห์ชนิดของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายที่ยีสต์ผลิตได้โดยวิธี Headspace Gas Chromatography-Mass Spectrometry (Headspace GC-MS) ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย วิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS ยี่ห้อ Agilent 7890B และ Agilent 7633 ALS เชื่อมต่อกับ Agilent 7000C GC/MS Triple Quadrupole MSD model ใช้คอลัมน์ HP-INNOWAX ขนาด 30 x 0.25 มิลลิเมตร ปริมาตร 0.25 ไมโครลิตร ใช้รูปขนาด 1 มิลลิลิตร เพื่อวิเคราะห์สารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที โดยมีอัตราส่วนของ split ratio เท่ากับ 50:1 อยู่ที่ 180 องศาเซลเซียส มีแก๊สฮีเลียมเป็นตัวพาด้วยอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิเริ่มต้นที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และเพิ่มเป็น 230 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที โดยมีอัตราการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิเท่ากับ 5 องศาเซลเซียสต่อนาที สำหรับการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลจะวิเคราะห์ในช่วง 33-500 เมตรต่อเอิร์ต กำหนดแหล่งกำเนิดประจุไฟฟ้าที่ 230 องศาเซลเซียส ใช้พลังงาน 70 อิเล็กตรอนโวลต์ วิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลโดยกำหนดอุณหภูมิในการถ่ายโอนมวลสารที่ 250 องศาเซลเซียส

บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 การทดสอบความสามารถของยีสต์ปฏิปักษ์เบื้องต้นในการยับยั้งการเจริญของ *A. flavus*

จากการนำ *A. flavus* M3T8R4G3 ที่มีความสามารถในการผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 มาเลี้ยงร่วมกับยีสต์ไอโซเลต Y08 และ Y20 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ด้วยวิธี Dual culture บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เพื่อทดสอบความสามารถของยีสต์ปฏิปักษ์เบื้องต้นในการยับยั้งการเจริญของราพบว่า *A. flavus* M3T8R4G3 เลี้ยงร่วมกับยีสต์ปฏิปักษ์ทั้งสองไอโซเลต มีขนาดโคโลนีที่เล็กลงเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่เลี้ยงราเพียงอย่างเดียว เมื่อพิจารณาลักษณะของโคโลนีราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA พบว่า *A. flavus* M3T8R4G3 สร้างเส้นใยราสีขาวและสร้างสปอร์สีเขียวซึ่งไม่แตกต่างจากราในชุดควบคุม และสามารถสังเกตเห็นบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้นใกล้กับรอยขีดของยีสต์ทั้งสองไอโซเลตที่ใช้ทดสอบ (รูปที่ 3.1) เมื่อพิจารณาผลการยับยั้งการเจริญของราจากค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (ตารางที่ 3.1) พบว่า ยีสต์ทั้งสองไอโซเลตสามารถยับยั้งการเจริญของราได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยยีสต์ไอโซเลต Y08 สามารถยับยั้งการเจริญของราได้ดีที่สุด ด้วยเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของราเท่ากับ 19.00 ± 1.37 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3.1)



รูปที่ 3.1 การเจริญของ *A. flavus* M3T8R4G3 เมื่อเลี้ยงร่วมกับยีสต์ปฏิปักษ์ด้วยวิธี Dual culture บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน (ก) ชุดควบคุมที่เลี้ยงราเพียงอย่างเดียว, (ข) ยีสต์ไอโซเลต Y08 และ (ค) ยีสต์ไอโซเลต Y20

ตารางที่ 3.1 การเจริญของ *A. flavus* M3T8R4G3 เมื่อเลี้ยงร่วมกับยีสต์ปฏิปักษ์ทั้งสองไอโซเลต ด้วยวิธี Dual culture บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

ชุดทดสอบ	การเจริญของรา	
	เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (เซนติเมตร)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง
ชุดควบคุม	6.00±0.00	
ยีสต์ไอโซเลต Y08	4.86±0.07 ^a	19.00±1.37 ^a
ยีสต์ไอโซเลต Y20	4.71±0.15 ^a	18.09±3.07 ^a

* ตัวอักษรที่เหมือนกันในแต่ละแถวแสดงความไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

3.2 การทดสอบความสามารถของยีสต์ปฏิปักษ์เบื้องต้นในการสร้างสารยับยั้งการเจริญเมื่อเลี้ยงร่วมกับรา

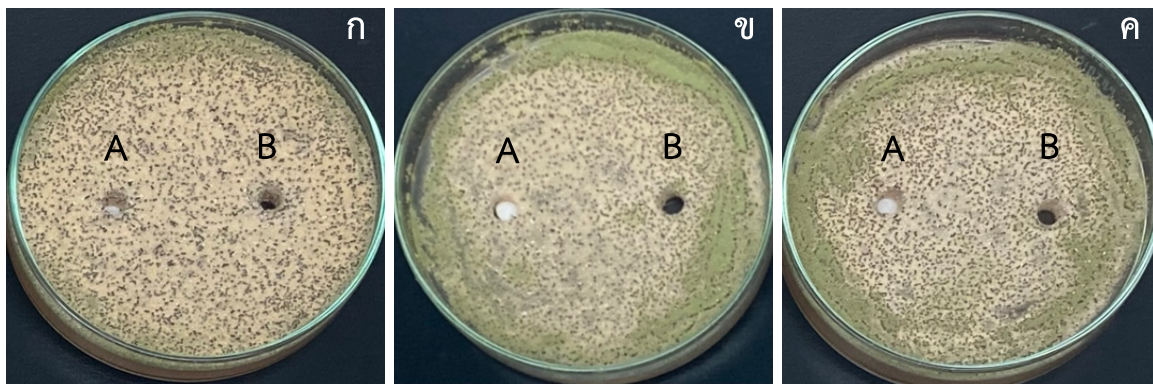
จากผลการทดลองในข้อ 3.1 พบว่า ยีสต์ปฏิปักษ์ทั้งสองชนิดมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของราได้ ดังนั้น เพื่อศึกษาหากกลไกที่ยีสต์ใช้ในการควบคุมการเจริญของรา จึงทดสอบความสามารถของยีสต์ปฏิปักษ์ในการสร้างสารยับยั้งการเจริญของราด้วยวิธี Agar spot assay พบว่า เมื่อเลี้ยงราที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (จุน 0.8 เปอร์เซ็นต์) ที่อยู่ด้านเหนือโคโลนียีสต์ปฏิปักษ์ที่เจริญอยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD เป็นเวลา 7 วัน แล้วสังเกตลักษณะการเจริญของรา พบว่าการเจริญของ *A. flavus* M3T8R4G3 เบบางเหนือโคโลนีของยีสต์ทั้งสองไอโซเลต และเกิดบริเวณยับยั้งชัดเจนเหนือโคโลนีของยีสต์เป็นบริเวณกว้าง เมื่อเทียบกับชุดควบคุม (รูปที่ 3.2)



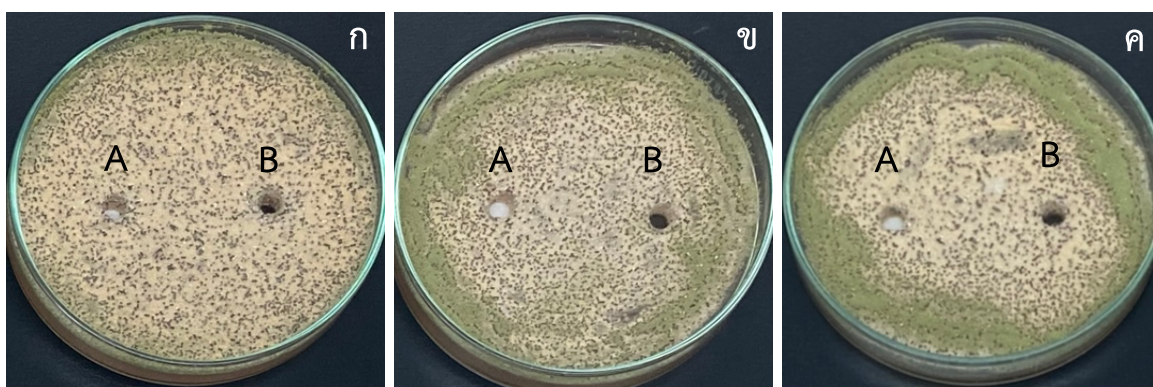
รูปที่ 3.2 การเจริญของ *A. flavus* M3T8R4G3 เมื่อเลี้ยงร่วมกับยีสต์ปฏิปักษ์ด้วยวิธี Agar spot assay บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน (ก) ชุดควบคุมที่เลี้ยงร่วมกับราเพียงอย่างเดียว, (ข) ยีสต์ไอโซเลต Y08 และ (ค) ยีสต์ไอโซเลต Y20

3.3 ทดสอบความสามารถของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ยีสต์ในการยับยั้งการเจริญของรา

จากผลการทดลองในข้อ 3.2 แสดงให้เห็นว่า ยีสต์ปฏิปักษ์ที่ใช้ทดสอบทั้งสองไอโซเลตสามารถสร้างสารเมแทบอลิต์ที่สามารถแพร่ผ่านอาหารเลี้ยงเชื้อและมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* M3T8R4G3 จึงทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นของสารเมแทบอลิต์ที่ยีสต์ปฏิปักษ์ทั้งสองไอโซเลตผลิตขึ้นด้วยวิธี Agar diffusion assay โดยทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของราจากน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ยีสต์ที่ได้จากการเจริญระยะ mid log phase และ late log phase ใน 2 รูปแบบ คือ น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ที่ผ่านการให้ความร้อนและไม่ผ่านการให้ความร้อน ซึ่งผลการทดสอบแสดงในรูปที่ 3.3 และ 3.4 สำหรับยีสต์ไอโซเลต Y08 และ Y20 ตามลำดับ พบว่า น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ทั้งในระยะ mid log phase และ late log phase ของยีสต์ทั้งสองไอโซเลตที่ผ่านและไม่ผ่านการให้ความร้อน ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* M3T8R4G3 ได้ เนื่องจากไม่พบบริเวณยับยั้งรอบหลุมที่มีการทดสอบ นอกจากนี้ ราในชุดทดสอบสามารถเจริญและสร้างสปอร์สีเขียวไม่แตกต่างจากราในชุดควบคุม (รูปที่ 3.3 และ 3.4)



รูปที่ 3.3 การเจริญของ *A. flavus* M3T8R4G3 เมื่อเลี้ยงร่วมกับยีสต์ไอโซเลต Y08 เพื่อทดสอบความสามารถของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ยีสต์ระยะ mid log phase และ late log phase ในการยับยั้งการเจริญของราด้วยวิธี Agar diffusion assay หลุม A ทดสอบด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ที่ผ่านการให้ความร้อน หลุม B ทดสอบด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ที่ไม่ผ่านการให้ความร้อน บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน (ก) ชุดควบคุม (ข) น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ไอโซเลต Y08 ระยะ mid log phase และ (ค) น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ไอโซเลต Y08 ระยะ late log phase

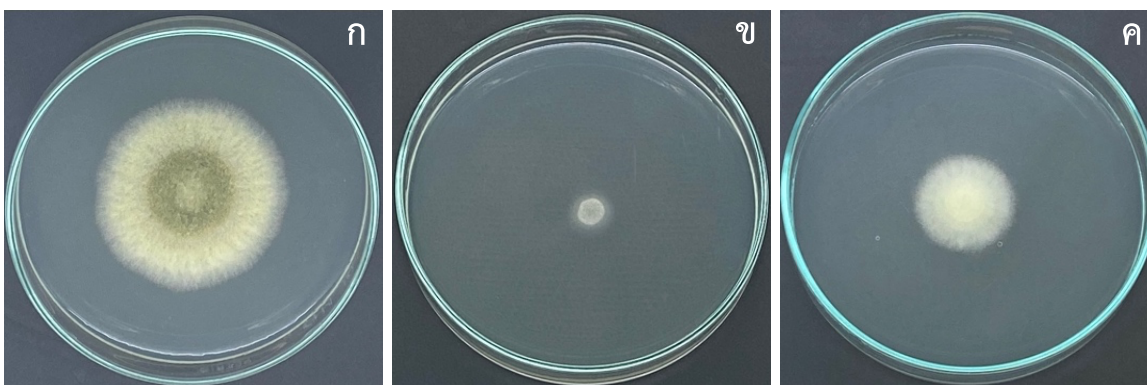


รูปที่ 3.4 การเจริญของ *A. flavus* M3T8R4G3 เมื่อเลี้ยงร่วมกับยีสต์ไอโซเลต Y20 เพื่อทดสอบความสามารถของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ยีสต์ระยะ mid log phase และ late log phase ในการยับยั้งการเจริญของราด้วยวิธี Agar diffusion assay หลุม A ทดสอบด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ที่ผ่านการให้ความร้อน หลุม B ทดสอบด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ที่ไม่ผ่านการให้ความร้อน บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน (ก) ชุดควบคุม (ข) น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ไอโซเลต Y20 ระยะ mid log phase และ (ค) น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ไอโซเลต Y20 ระยะ late log phase

3.4 การทดสอบความสามารถของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่าย (volatile organic compounds: VOCs) ของยีสต์ต่อการยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษของรา

3.4.1 ทดสอบการสร้างสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษของรา

เมื่อนำ *A. flavus* M3T8R4G3 ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA มาเลี้ยงร่วมกับยีสต์แต่ละไอโซเลตที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง YPD ด้วยวิธี face to face double petri dish assay พบว่า ลักษณะโคโลนีของราเป็นลักษณะเส้นใยสีขาว เกิดการสร้างสปอร์ และมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของราเล็กกว่าชุดควบคุมอย่างชัดเจน โดยเฉพาะในชุดทดสอบที่เลี้ยงร่วมกับยีสต์ไอโซเลต Y08 (รูปที่ 3.5) ที่สามารถยับยั้งการเจริญของราได้สูงสุดเท่ากับ 64.81 ± 1.03 เปอร์เซ็นต์ สำหรับยีสต์ไอโซเลต Y20 โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของราเท่ากับ 49.50 ± 1.04 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3.2) สำหรับการผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 พบว่า ราที่เลี้ยงร่วมกับยีสต์ปฏิปักษ์ทั้งสองไอโซเลตผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 ลดลงใกล้เคียงกันและลดลงมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ โดยเฉพาะเมื่อเลี้ยงร่วมกับยีสต์ไอโซเลต Y08 สามารถลดการผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 ได้มากที่สุด เท่ากับ 94.54 ± 0.06 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3.2)



รูปที่ 3.5 การเจริญของ *A. flavus* M3T8R4G3 เมื่อทดสอบความสามารถในการสร้างสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ปฏิปักษ์ด้วยวิธี face to face double petri dish assay บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน (ก) ชุดควบคุมที่เลี้ยงราเพียงอย่างเดียว, (ข) ยีสต์ไอโซเลต Y08 และ (ค) ยีสต์ไอโซเลต Y20

ตารางที่ 3.2 การเจริญและการผลิตอะพลาทอกซินปี 1 ของ *A. flavus* M3T8R4G3 เมื่อทดสอบความสามารถในการสร้างสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่าย โดยสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายที่สร้างจากยีสต์ปฏิปักษ์ด้วยวิธี face to face double petri dish assay บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

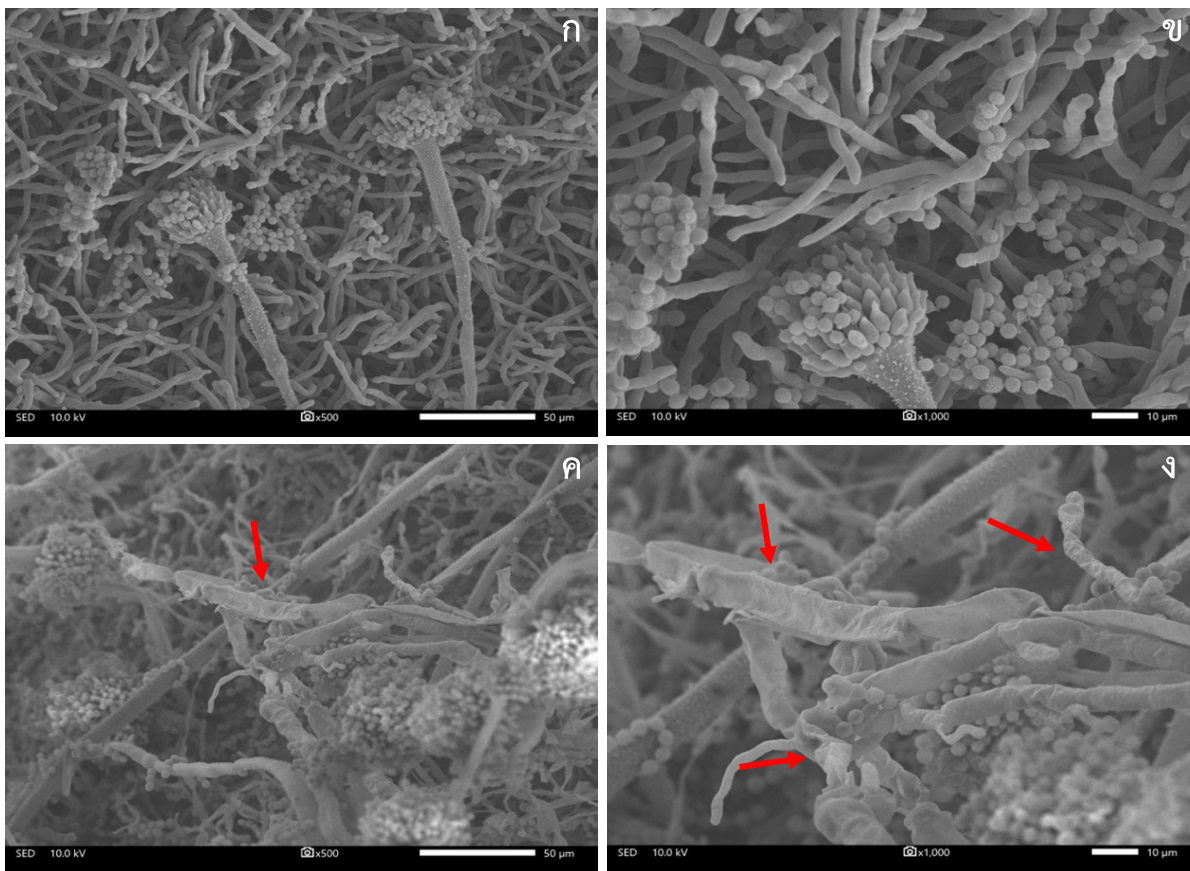
ชุดทดสอบ	การเจริญของรา		การผลิตอะพลาทอกซินปี 1	
	เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (เซนติเมตร)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง	ปริมาณอะพลาทอกซินปี 1 (นาโนกรัมต่อกรัม)	เปอร์เซ็นต์การลดลง
ชุดควบคุม	6.00±0.44		751.00±87.56	
ยีสต์ไอโซเลต Y08	1.83±1.03 ^a	64.81±1.03 ^a	37.93±0.02 ^a	94.95±0.03 ^a
ยีสต์ไอโซเลต Y20	3.03±1.04 ^a	49.50±1.04 ^a	41.00±0.05 ^a	94.54±0.06 ^a

* ตัวอักษรที่เหมือนกันในแต่ละแถวแสดงความไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

3.4.2 วิเคราะห์ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราโดยใช้ Scanning Electron Microscope (SEM)

จากผลการทดลองที่ได้จากข้อ 3.4.1 พบว่า ยีสต์ไอโซเลต Y08 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* M3T8R4G3 ได้ดีที่สุด และลดการผลิตอะพลาทอกซินได้ใกล้เคียงกับยีสต์ไอโซเลต Y20 ดังนั้น จึงนำราที่เลี้ยงร่วมกับยีสต์ไอโซเลตดังกล่าวมาวิเคราะห์ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่เลี้ยงราเพียงอย่างเดียวด้วยเครื่อง Scanning Electron Microscope (SEM) โดยเลือกวิเคราะห์บริเวณขอบของโคโลนีรา

รูปที่ 3.6 แสดงลักษณะเส้นใยบริเวณขอบโคโลนีของ *A. flavus* M3T8R4G3 พบว่า ลักษณะเส้นใยบริเวณขอบของโคโลนีของราเมื่อเลี้ยงร่วมกับยีสต์ไอโซเลต Y08 ที่กำลังขยาย 500 เท่า มีลักษณะบางสลับแบน ผิดปกติกว่าเส้นใยราในชุดควบคุม (รูปที่ 3.6ค) และเมื่อเพิ่มกำลังขยายเป็น 1000 เท่า พบว่า ลักษณะเส้นใยบางสลับแบนผิดปกติชัดเจนขึ้นและพบลักษณะเส้นใยบิดเป็นเกลียวผิดรูปเมื่อเทียบกับชุดควบคุม (รูปที่ 3.6ง)

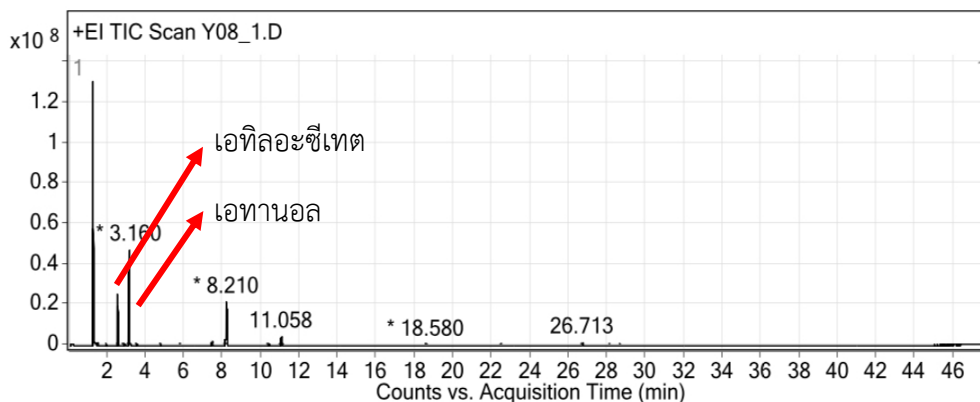


รูปที่ 3.6 ลักษณะเส้นใยบริเวณขอบโคโลนีของ *A. flavus* M3T8R4G3 จากกล้อง Scanning Electron Microscope (SEM) เมื่อทดสอบผลของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ไอโซเลต Y08 บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน (ก, ข) ชุดควบคุมเมื่อเลี้ยงราเพียงอย่างเดียวที่กำลังขยาย 500 และ 1000 เท่า ตามลำดับ (ค, ง) ชุดทดสอบเมื่อเลี้ยงราร่วมกับยีสต์ไอโซเลต Y08 ที่กำลังขยาย 500 และ 1000 เท่า ตามลำดับ ลูกศรสีแดงแสดงลักษณะเส้นใยของราที่สับสนผิดปกติ

3.4.3 วิเคราะห์ชนิดของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ปฏิปักษ์

ผลการวิเคราะห์หาชนิดของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายที่ผลิตจากยีสต์ไอโซเลต Y08 ด้วยวิธี GC-MS analysis แสดงในรูปที่ 3.7 พบว่า ยีสต์ไอโซเลต Y08 สามารถผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายชนิดเอทานอล ได้ปริมาณมากที่สุด (retention time, RT เท่ากับ 3.160 นาที) รองลงมาได้แก่ เอทิลอะซิเตต (RT เท่ากับ 2.533 นาที) (รูปที่ 3.7) และตารางที่ 3.3 แสดงชนิดของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายทั้งหมดที่ยีสต์ไอโซเลต Y08 ผลิตได้ พบว่า ยีสต์ไอโซเลต Y08 สามารถผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายได้ 10 ชนิด ได้แก่ อะซีตัลดีไฮด์ เอทิลอะซิเตต บิวทานอล, 3-เมทิล เอทานอล กรดโพรพานอิก, เอทิลเอสเทอร์ 1-โพรพานอล, 2-เมทิล 1-บิวทานอล, 3-

เมทิล-, อะซีเทต 1-บิวทานอล, 3-เมทิล-, โพรพานอเอต 1-บิวทานอล, 3-เมทิล และกรดแอสติค, 2-ฟีนิลเอทิลเอสเทอร์



รูปที่ 3.7 โครมาโทแกรมของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายในสัดส่วนที่มากที่สุดที่ผลิตจากยีสต์ไอโซเลต Y08

ตารางที่ 3.3 ชนิดของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายที่ผลิตจากยีสต์ไอโซเลต Y08 เมื่ออบที่ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 วัน วิเคราะห์โดยเครื่อง GC-MS Chromatography

สารประกอบอินทรีย์ระเหยง่าย	ยีสต์ไอโซเลต Y08 RA (%)
อะซีตัลดีไฮด์	1.06
เอทิลอะซีเทต	27.76
บิวทานอล, 3-เมทิล	0.73
เอทานอล	100
กรดโพรพานอิก, เอทิลเอสเทอร์	0.88
1-โพรพานอล, 2-เมทิล	3.16
1-บิวทานอล, 3-เมทิล-, อะซีเทต	40.74
1-บิวทานอล, 3-เมทิล-, โพรพานอเอต	0.78
1-บิวทานอล, 3-เมทิล	7.65
กรดแอสติค, 2-ฟีนิลเอทิลเอสเทอร์	2.13

บทที่ 4 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การทดสอบความสามารถของยีสต์ปฏิปักษ์เบื้องต้นในการยับยั้งการเจริญของ *A. flavus*

การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* M3T8R4G3 โดยใช้ยีสต์ปฏิปักษ์ไอโซเลต Y08 และ Y20 ด้วยวิธี Dual culture ทำให้ทราบถึงความสามารถในการเป็นตัวควบคุมทางชีวภาพของยีสต์ปฏิปักษ์เบื้องต้น จากผลการทดลอง พบว่า ยีสต์ไอโซเลต Y08 และ Y20 มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* M3T8R4G3 ได้ใกล้เคียงกัน (19.00 ± 1.37 และ 18.09 ± 3.07 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) ปัจจุบันมีรายงานการศึกษาการใช้ยีสต์เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพ เพื่อยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชและราที่ผลิตสารพิษหลายชนิด รวมทั้งราที่ผลิตอะฟลาทอกซิน จากงานวิจัยของ Hernández-Montiel และคณะ (2010) ได้ศึกษาความสามารถของยีสต์ *Debaryomyces hansenii* ที่คัดแยกจากน้ำทะเลและเปลือกของผลมะนาวแม็กซิกกัน พบว่า *D. hansenii* สามสายพันธุ์ ได้แก่ *D. hansenii* DhhBCS06, *D. hansenii* LL1 และ *D. hansenii* LL2 สามารถลดการเกิดโรคเน่าเสียจากราในผลมะนาวแม็กซิกกันหลังจากการเก็บเกี่ยวผลผลิตได้มากถึง 80 เปอร์เซ็นต์ และงานวิจัยของ Zhang และคณะ (2017) พบว่า *Pichia membranaefaciens* และ *Kloeckera apiculata* มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *Monilinia fructicola* ซึ่งก่อให้เกิดโรคเน่าในผลลูกพลัมหลังการเก็บเกี่ยว โดยยีสต์ทั้งสองชนิดสามารถลดการงอกของสปอร์และการเจริญของเส้นใยราได้อย่างมีนัยสำคัญ ยีสต์มีกลไกที่สำคัญหลายอย่างที่ใช้ควบคุมราก่อโรค ซึ่งการแย่งชิงพื้นที่และสารอาหารเป็นกลไกเบื้องต้นที่ยีสต์แสดงความเป็นปฏิปักษ์ต่อราก่อโรค เนื่องจากยีสต์สามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ในอัตราที่เร็วกว่าราก่อโรค ทำให้จำนวนราก่อโรคและพื้นที่ในการเจริญลดลง จากงานวิจัย Afsah-Hejri (2013) พบว่า ยีสต์ที่คัดแยกมาจากต้นถั่วพิทาชิโอ ได้แก่ *Pseudozyma fusiformata*, *Cryptococcus albidus*, *Rhodotorula fragaria*, *Cryptococcus hungaricus* และ *Rhodotorula hinula* สามารถยับยั้งการเจริญ การงอกของสปอร์รา และการผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 ของ *A. flavus* ได้ โดย *P. fusiformata* สามารถลดการงอกของสปอร์ราได้ดีที่สุด (84.6 เปอร์เซ็นต์) และ *C. albidus* สามารถลดน้ำหนักแห้งรวมของราได้มากที่สุด (77.9 เปอร์เซ็นต์) ทั้งนี้ การลดลงของน้ำหนักแห้งและการงอกของสปอร์ราอาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับการแย่งชิงอาหารของยีสต์กับรา และงานวิจัยของ Hua และคณะ (2019) ในการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* โดยใช้ยีสต์ *Wickerhamomyces anomalus* ด้วยวิธี Dual culture พบว่า สามารถยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินของ *A. flavus* ได้ โดยสามารถลดจำนวนสปอร์ราได้มากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ และยังสามารถลดการ

แสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตอะฟลาทอกซินของราได้ นอกจากนี้ ยังพบว่ายีสต์สามารถใช้คาร์โบไฮเดรตและไนโตรเจนได้ในรูปแบบน้ำตาลโมเลกุลคู่และน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (Spadaro และ Droby, 2016)

4.2 การทดสอบความสามารถของน้ำยีสต์ปฏิปักษ์เบื้องต้นในการสร้างสารยับยั้งการเจริญเมื่อเลี้ยงร่วมกับรา

นอกจากการแย่งชิงพื้นที่และสารอาหารแล้ว กลไกสำคัญอีกอย่างหนึ่งที่ยีสต์ใช้ในการควบคุมรากล่อโรค คือการสร้างสารยับยั้งการเจริญของรา เริ่มจากการทดสอบสารยับยั้งเมื่อเลี้ยงยีสต์ปฏิปักษ์ร่วมกับรากับวิธี Agar sport assay จากผลการทดลอง พบว่า ไม่มีการเจริญของ *A. flavus* M3T8R4G3 เหนือโคโลนีของยีสต์ทั้งสองไอโซเลต และสังเกตเห็นบริเวณยับยั้งชัดเจน แสดงว่ายีสต์ไอโซเลต Y08 และ Y20 ผลิตสารยับยั้งการเจริญของราและสารนั้นสามารถแพร่ผ่านอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (วุ้น 0.8 เปอร์เซ็นต์) จากงานวิจัยของ Medina-Córdova และคณะ (2016) พบว่า ยีสต์ *Debaryomyces hansenii* มีความสามารถในการผลิตสารต้านราในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ และผลิตสารต้านราที่มีความสามารถในการแพร่ผ่านอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งได้ ทำให้ราเจริญลดลง โดยเฉพาะ *Aspergillus* sp. และยีสต์ *D. hansenii* ยังสามารถผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยราได้อีกด้วย งานวิจัยของ Tayel และคณะ (2013) ในการทดสอบความสามารถของ *Pichia anomala* ในการผลิตเอนไซม์ β -1,3-กลูคาเนส ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารต้านการเจริญของรา และทดสอบผลของเอนไซม์ต่อการเจริญของเส้นใยรา *A. flavus* พบว่า ยีสต์สามารถผลิตเอนไซม์ทั้งสองชนิดได้ดี เมื่อบ่มราร่วมกับ *P. anomala* และสังเกตลักษณะของเส้นใยราผ่านกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) พบว่า เมื่อบ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง เส้นใยของรามีรูปร่างผิดปกติ เกิดการแตกออกของเซลล์อย่างชัดเจน งานวิจัยของ Nally และคณะ (2015) พบว่า *Kluyveromyces marxianus* BKm128 และ *K. marxianus* BKm145 สามารถยับยั้งการเจริญของ *Aspergillus terreus* ได้ โดยผลิตเอนไซม์ลามินาเรเนส เพื่อทำลายผนังเซลล์ของรา และผลิต siderophore เพื่อแย่งชิงธาตุเหล็กที่สำคัญต่อการเจริญของรา รวมทั้งสามารถผลิตเอนไซม์ β -1,3-กลูคาเนส เพื่อยับยั้งการงอกของสปอร์ราได้ งานวิจัยของ Banani และคณะ (2014) ได้ตัดต่อยีนที่สามารถสร้างเอนไซม์โปรติเอสของ *Aureobasidium pullulans* PL5 ใส่ใน *Pichia pastoris* KM71 และทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของรากล่อโรคในผลแอปเปิ้ล ได้แก่ *Monilinia fructicola*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata* และ *Penicillium expansum* พบว่า *P. pastoris* KM71 สามารถสร้างเอนไซม์โปรติเอสและยับยั้งการงอกของสปอร์ *M. fructicola* และ *B. cinerea* ได้ดี ทำให้เส้นใยของรารวมขึ้น เมื่อสังเกตใต้กล้องจุลทรรศน์ และงานวิจัยของ Nally และคณะ (2015) ในการศึกษากลไกของยีสต์ที่สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญต่อรากล่อโรคเน่าในผล

อู๋น พบว่า *Saccharomyces cerevisiae* สามารถผลิตเอนไซม์ลามีนารีเนสและโคติเนส เป็นเอนไซม์ที่สามารถทำลายโครงสร้างของผนังเซลล์ราได้ และผลิตสาร siderophore เพื่อใช้ในการแย่งธาตุเหล็ก ซึ่งเป็นธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของรากอโรค

4.3 ทดสอบความสามารถของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ยีสต์ในการยับยั้งการเจริญของรา

จากผลการทดลองข้างต้นทำให้ทราบว่ายีสต์ปฏิปักษ์สามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของราได้ จึงศึกษาต่อไปว่ายีสต์ปฏิปักษ์ผลิตสารยับยั้งดังกล่าวในช่วงใดของการเจริญและศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของสารยับยั้งดังกล่าว ด้วยวิธี Agar diffusion assay จากผลการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ทั้งสองไอโซเลตที่เจริญในระยะ mid log phase และ late log phase ที่ผ่านและไม่ผ่านการให้ความร้อนในการยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* M3T8R4G3 พบว่า น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ทั้งสองไอโซเลตในทุกชุดทดสอบไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* M3T8R4G3 ได้ แสดงให้เห็นว่าสารที่อยู่ในน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ทั้งสองไอโซเลตไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* M3T8R4G3 อย่างไรก็ตาม ผลการทดสอบด้วยวิธี Agar sport assay แสดงให้เห็นว่ายีสต์ทั้งสองไอโซเลตสามารถผลิตสารยับยั้งซึมผ่านอาหารเลี้ยงเชื้อได้ แสดงว่าสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งดังกล่าวอาจถูกผลิตขึ้นเมื่อมีการเจริญร่วมกับราเท่านั้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Zhu และคณะ (2015) ในการศึกษาผลของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* M114 เพื่อยับยั้งการงอกของสปอร์รา *A. carbonarius* พบว่า เมื่อเลี้ยงราร่วมกับยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YPD เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นแยกน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ออกจากตะกอนเซลล์ยีสต์ และนำน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ไปเลี้ยงร่วมกับราเป็นเวลา 96 ชั่วโมง สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ราได้อย่างมีประสิทธิภาพ จึงสรุปได้ว่าเมื่อมีการเจริญของราร่วมกับยีสต์ ยีสต์จะสามารถผลิตสารที่สามารถยับยั้งการเจริญของราอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อได้

4.4 การทดสอบความสามารถของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่าย (volatile organic compounds: VOCs) ของยีสต์ต่อการยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษของรา

4.4.1 การทดสอบการสร้างสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษของรา

กลไกสำคัญอีกหนึ่งประการของยีสต์ปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษจากรา ได้แก่ การสร้างสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายจากยีสต์ ทดสอบด้วยวิธี face to face double petri dish assay พบว่า

ยีสต์ปฏิปักษ์ทั้งสองไอโซเลตสามารถสร้างสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของราได้อย่างมีประสิทธิภาพ (49-64 เปอร์เซ็นต์) และลดการผลิตอะฟลาทอกซินอย่างชัดเจน (94 เปอร์เซ็นต์) โดยสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ไอโซเลต Y08 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งดีที่สุด ยับยั้งการเจริญ (64.81±1.03 เปอร์เซ็นต์) และยับยั้งการผลิตอะฟลาทอกซิน (94.95±0.03 เปอร์เซ็นต์) จากงานวิจัยของ Jibangyang และคณะ (2020) ได้ศึกษาผลของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ที่คัดแยกได้จากใบของธัญพืชต่าง ๆ พบว่า saprophytic yeasts ที่แยกได้จากใบพืชมีกลไกในการผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโต การงอกของโคนิเดีย และลดการผลิตอะฟลาทอกซินในเมล็ดข้าวโพดที่ปนเปื้อน *A. flavus* A39 สารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายที่ผลิตโดย saprophytic yeasts มีประสิทธิภาพในการเป็นตัวควบคุมทางชีวภาพเพื่อควบคุมการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินที่ผลิตจาก *A. flavus* ในระหว่างการเก็บรักษาเมล็ดพืช งานวิจัยของ Chang และคณะ (2015) พบว่า 2-ฟีนิลเอทิลแอลกอฮอล์ ส่งผลต่อการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินของ *A. flavus* โดยการได้รับ 2-ฟีนิลเอทิลแอลกอฮอล์ ทำให้ *A. flavus* ถูกกระตุ้นการเจริญในระดับหนึ่งและหยุดการเจริญไป ซึ่งการเจริญนี้จะส่งผลไปยังการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตอะฟลาทอกซิน และงานวิจัยของ Farbo และคณะ (2018) พบว่า ยีสต์สามารถผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายที่สามารถยับยั้งการเจริญและการผลิตโอคราทอกซินออกจาก *Aspergillus carbonarius* และ *Aspergillus ochraceus* ได้อย่างมีนัยสำคัญ

4.4.2 วิเคราะห์ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราโดยใช้ Scanning Electron Microscope (SEM)

จากผลการทดสอบความสามารถในการผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ เพื่อยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษจากราของ *A. flavus* M3T8R4G3 พบว่า ยีสต์ไอโซเลต Y08 สามารถยับยั้งการเจริญได้ดีที่สุด และลดการผลิตสารพิษจากราได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้น จึงนำเส้นใยราบริเวณขอบโคโลนีที่เลี้ยงร่วมกับยีสต์ไอโซเลต Y08 มาวิเคราะห์ลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) จากผลการวิเคราะห์ พบว่า เส้นใยของ *A. flavus* M3T8R4G3 ที่เลี้ยงร่วมกับยีสต์ไอโซเลต Y08 มีลักษณะลึบแบนผิดปกติแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างชัดเจน แสดงให้เห็นว่า สารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายที่ผลิตจากยีสต์ไอโซเลต Y08 มีผลต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรา ทำให้มีการเจริญและการพัฒนาของเส้นใยราที่ผิดปกติ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Farbo และคณะ (2018) ในการทดสอบผลของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายที่ผลิตจากยีสต์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. ochraceus* และ *A. carbonarius* ที่ปนเปื้อนในผลองุ่น จากการทดสอบพบว่า เส้นใยของราทั้งสองชนิดบริเวณขอบของโคโลนีราที่เลี้ยงร่วมกับยีสต์ปฏิปักษ์ เมื่อนำมาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) มีลักษณะแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างชัดเจน เส้นใยมีการจับตัวเป็นก้อนและที่ปลายของเส้นใยเกิดการบวม ทำให้เซลล์แตกหลายตำแหน่ง

4.4.3 วิเคราะห์ชนิดของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ปฏิปักษ์

จากผลการวิเคราะห์ชนิดของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ไอโซเลต Y08 ด้วยวิธี GC-MS analysis พบว่า ยีสต์ไอโซเลต Y08 สามารถผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายได้หลายชนิด โดยผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายชนิดเอทานอลมากที่สุด จากงานวิจัยของ Hua และคณะ (2014) ได้วิเคราะห์ชนิดของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายที่ผลิตจาก *P. anomala* WRL-076 (*W. anomalus*) และศึกษาผลของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายที่ผลิตจากยีสต์ปฏิปักษ์ต่อการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 ของ *A. flavus* พบว่า *P. anomala* WRL-076 ผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายชนิด 2-ฟีนิลเอทานอล โดย 2-ฟีนิลเอทานอล สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยราและการงอกของสปอร์ราได้ พบบริเวณยับยั้งชัดเจนเมื่อทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง นอกจากนี้ 2-ฟีนิลเอทานอล ยังมีผลต่อยีนที่สำคัญในการสังเคราะห์อะฟลาทอกซินปี 1 และงานวิจัยของ Masoud และคณะ (2005) พบว่า *P. anomala* สามารถผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายเพื่อยับยั้งการเจริญของ *A. ochraceus* ได้หลายชนิด ได้แก่ เอทิลอะซีเตต ไอโอบิวทิลอะซีเตต 2-ฟีนิลเอทิลอะซีเตต และเอทิลโพรพิโอเนต โดยผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายชนิดเอทิลอะซีเตตในปริมาณมากที่สุด และพบอีกว่า 2-ฟีนิลเอทิลอะซีเตต เป็นสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายที่สำคัญในการยับยั้งการผลิตไอคราทอกซินเอของรา

จากผลการทดสอบทั้งหมดข้างต้นสามารถสรุปได้ว่า ยีสต์ปฏิปักษ์ทั้งสองไอโซเลต ได้แก่ ยีสต์ไอโซเลต Y08 และ Y20 มีความสามารถในการเป็นตัวควบคุมทางชีวภาพในระดับ *in vitro* เพื่อยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษจากรา *A. flavus* M3T8R4G3 ได้ โดยมีกลไกสำคัญ ได้แก่ การสร้างสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่าย จากการทดสอบ พบว่า ยีสต์ไอโซเลต Y08 มีประสิทธิภาพในการสร้างสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่าย เพื่อยับยั้งการเจริญของราและลดการผลิตสารพิษจากราได้ดีที่สุด จากผลการทดลองข้างต้นสามารถใช้เป็นหลักฐานในการศึกษาการใช้ยีสต์ปฏิปักษ์ในการเป็นตัวควบคุมทางชีวภาพในอาหารและผลผลิตทางการเกษตรต่อไป และสามารถนำไปพัฒนาประสิทธิภาพของยีสต์ปฏิปักษ์เพื่อใช้ในการควบคุมการเจริญและการผลิตสารพิษจากราให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

ข้อเสนอแนะ

1. ระบุชนิดของยีสต์เพื่อทราบข้อมูลเกี่ยวกับยีสต์มากขึ้น การเป็นเชื้อก่อโรค
2. ศึกษาผลของปัจจัยต่าง ๆ ต่อการผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์
3. การทดสอบประสิทธิภาพของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ในการควบคุมการเจริญและการผลิตสารพิษจากราในตัวอย่างอาหารจริง เช่น ธัญพืชต่าง ๆ

เอกสารอ้างอิง

- Afsah-Hejri, L. (2013). Saprophytic yeasts: effective biocontrol agent against *Aspergillus flavus*. *International Food Research Journal*, 20, 3403-3409.
- Akila, R., Rajendran, L., Harish, S., Saveetha, K., Raguchander, T. & Samiyappan, R. (2011). Combined application of botanical formulations and biocontrol agents for the management of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense* (Foc) causing Fusarium wilt in banana. *Biological Control*, 57, 175-183.
- Anukul, N., Vangnai, K. & Mahakarnchanakul W. (2013). Significance of regulation limits in Mycotoxin contamination in Asia and risk management programs at the national level. *Journal of Food and Drug analysis*, 21, 227-241.
- Awad, W.A., Ghareeb, K., Bohm, J. & Zentek, J. (2010). Decontamination and detoxification Strategies for the *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol in animal feed and effectiveness of microbial biodegradation. *Food Additives and Contaminants*, 27, 510-520.
- Banani, H., Spadaro, D., Zhang, D., Matic, S., Garibaldi, A. & Gullino, M.L. (2014). Biocontrol activity of an alkaline serine protease from *Aureobasidium pullulans* expressed in *Pichia pastoris* against four postharvest pathogens on apple. *International Journal of Food Microbiology*, 182-183.
- Bennett, J.W. & Klich, M. (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 16, 497-516.
- Betina, V. (1989). Mycotoxins: chemical, biological and environmental aspects. *Bioactive molecules*, 114-50.

- Calvente, V., de Orellano, M.E., Sansone, G., Benuzzi, D. & Sanz de Tosetti, M.I. (2001). Effect of nitrogen source and pH on siderophore production by *Rhodotorula* strains and their application to biocontrol of phytopathogenic molds. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 26, 226-229.
- Cañamás, T.P., Viñas, I., Torres, R., Usall, J. & Solsona C. (2011). Field applications of improved formulations of *Candida sake* CP-1 for control of *Botrytis cinerea* in grapes. *Biological Control*, 56, 150-158.
- Chinphuti, A., Atkhasarakun, S. & Trikarunasawat C. (2007). Controlling of *Aspergillus flavus* growth and inhibition of aflatoxin production using common edible herb extracts. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, 93-111.
- Dachoupakan, C., Ratomahenina, R., Martinez. V., Guiraud, J.P., Baccou, J.C. & Schorr-Galindo, S. (2009). Study of the phenotypic and genotypic biodiversity of potentially ochratoxigenic black aspergilla isolated from grapes. *International Journal of Food Microbiology*, 132, 14-23.
- de Vries, H.R., Maxwell, S.M. & Hendrickse, R.G. (1990). Aflatoxin excretion in children with kwashiorkor or marasmic kwashiorkor – a clinical investigation. *Mycopathologia*, 110, 1-9.
- Dhanasekaran, D., Shanmugapriya, S., Thajuddin, N. & Panneerselvam, A. (2011). Aflatoxins and Aflatoxins in human and animals. *Aflatoxin-Biochemistry and Molecular Biology*, 221-254.
- Dropy, S., Chalutz, E. & Wilson, C.L. (1991). Antagonistic microorganisms as biocontrol agents of postharvest diseases of fruit and vegetables. *Postharvest News Information*, 2, 169-173.

- El-Tarabily, K.A. & Sivasithamparam, K. (2006). Potential of yeasts as biocontrol agents of soil-born fungal plant pathogens and as plant growth promoter. *Mycoscience*, 47, 25-35.
- EU. (2010). European Commission (EC) Commission Regulation (EC) No 165/2010 of 26 February 2010 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards aflatoxins. *Official Journal of the European Union*, 50, 8-12.
- FAO, Food and Agriculture Organization. (2008). Worldwide regulations for mycotoxins in food and Feed in 2003. *FAO Food and Nutrition Paper*, 81, 1-80.
- Farbo, M.G., Urgeghe, P.P., Fiori, S., Marcello, A., Oggiano, S., Balmas, V., Hassan, Z.U., Jaoua, S. & Migheli, Q. (2018). Effect of yeast volatile organic compounds on ochratoxin A-producing *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus ochraceus*. *Internantional Journal of Food Microbiology*, 28, 1-10.
- Fiori, S., Urgeghe, P.P., Hammami, W., Razzu, S., Jaoua, S. & Migheli, Q. (2014). Biocontrol activity of four non- and low-fermenting yeast strains against *Aspergillus carbonarius* and their ability to remove ochratoxin A from grape juice. *International Journal Food Microbiology*, 189, 45-50.
- He, J., Zhou, T., Young, J.C., Boland, G.J. & Scott, P.M. (2010). Chemical and biological transformation for detoxification of trichothecene mycotoxins in human and animal food chains: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 21, 67-76.
- Hernández-Montiel, L.G., Ochoa, J.L., Troyo-Diéguez, E. & Larralde-Corona, C.P. (2010). Biocontrol of postharvest blue mold (*Penicillium italicum* Wehmer) on Mexican lime by marine and citrus *Debaryomyces hansenii* isolates. *Postharvest Biology and Technology*, 56, 181-187.

- Hua, S.S.T., Beak, J.J., Sarreal, S.B.L. & Gee, W. (2014). The major volatile compound 2-phenylethanol from the biocontrol yeast, *Pichia anomala*, inhibits growth and expression of aflatoxins biosynthetic genes of *Aspergillus flavus*. *Mycotoxin Research*, 30, 71-78.
- Hua, S.S.T., Sarreal, S.B., Chang, P.K. & Yu, J. (2019). Transcriptional regulation of aflatoxin biosynthesis and condition in *Aspergillus flavus* by *Wickerhamomyces anomala* WRL-076 for reduction of aflatoxin contamination. *Toxins*, 11, 81.
- IARC. (1993). Some naturally occurring substance, food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. Monograph on Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. *International Agency for Research on Cancer*, 56, 489.
- IARC. (2002). Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene, and styrene. *IARC Monograph on Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, 81, 1-556.
- Ismail, A., Goncalves, B.L., de Neef, D.V., Ponzilacqua, B., Coppa, C.F.S.C., Hintzsche, H., Sajid, M., Cruz, A.G., Corassin, C.H. & Oliveira, C.A.F. (2018). Aflatoxin in foodstuff: occurrence and recent advances in decontamination. *Food Research International*, 113, 74-85.
- Jaibangyang, S., Nasanit, R. & Limtong, S. (2020). Biological control of aflatoxin-producing *Aspergillus flavus* by volatile organic compound-producing antagonistic yeasts. *BioControl*, [http://doi.org/10.1007/s10526-020-09996-9\(01234567](http://doi.org/10.1007/s10526-020-09996-9(01234567)
- Lamplugh, S.M. & Hendrickse, R.G. (1982). Aflatoxins in the livers of children with kwashiorkor. *Annals of Triopical Paediatrics*, 2, 101-104.

- Li, B.Q., Zhou, Z.W. & Tian, S.P. (2008). Combined effects of endo- and exogenous trehalose on Stress tolerance and biocontrol efficacy of two antagonistic yeast. *Biological Control*, 46, 187-193.
- Liu, J., Wisniewski, M., Droby, S., Noreli, J., Hershkovitz, V., Tian, S. & Farrell, R. (2012). Increase in antioxidant gene transcripts, stress tolerance and biocontrol efficacy of *Candida olephila* following sublethal oxidative stress exposure. *FEMS Microbiology Ecology*, 80, 578-590.
- Liu, Z., Gao, J. & Yu, J. (2006). Aflatoxins in stored maize and rice grains in Liaoning Province, China. *Journal of Stored Products Research*, 42, 468-479.
- Luo, Y., Liu, X. & Li, J. (2018). Updating techniques on controlling mycotoxins – a review. *Food Control*, 89, 123-132.
- Lurie, S. (1998). Postharvest heat treatments of horticultural crops. *Horticultural Reviews*, 22, 91-121.
- Marin, S., Ramos, A.J., Cano-Sancho, G. & Sanchis, V. (2013). Mycotoxin: occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food and Chemical Toxicology*, 60, 218-237.
- Masoud, W., Poll, L. & Jakobsen, M. (2005). Influence of volatile compounds produced by yeasts predominant during processing of *Coffea arabica* in East Africa on growth and ochratoxin A (OTA) production by *Aspergillus ochraceus*. *Yeast*, 22, 1133-1142.
- Mohapatra, D., Kumar, S., Kotwaliwale, N. & Singh, K.K. (2017). Critical factors responsible for fungi growth in stored food grains and non-chemical approaches for their control. *Industrial Crops and Products*, 108, 162-182.

- Murphy, P.A., Hendrich, S., Landgren, C. & Bryant, C.M. (2006). Food mycotoxins: An update. *Journal of Food Science*, 71, 51-56.
- Nally, M.C., Pesce, V.M., Maturano, Y.P., Assaf, L.A.R., Toro, M.E., de Figueroa, L.I.L & Vazquez, F. (2015). Antifungal Modes of Action of *Saccharomyces* and Other Biocontrol Yeasts Against Fungi Isolated from Sour and Grey Rots. *International Journal of Food Microbiology*, 204, 91-100.
- Niknejad, F., Zaini, F., Farmarzi, M.A., Amini, M., Kordbacheh, P., Mahmoudi, M. & Safera, M. (2012). *Candida parasilosis* as a potent biocontrol agent against growth and aflatoxin production by *Aspergillus* species. *Iranian Journal Public Health*, 41, 72-80.
- Pantelides, L.S., Christou, O., Tsolakidou, M.D., Tsaltas, D. & Ioannou, N. (2015). Isolation identification and *in vitro* screening of grapevine yeasts for the control of black aspergilli on grapes. *Biological Control*, 88, 46-53.
- Papiya, M. & Sasmal, D. (2001). Mycotoxins-Limits and regulations. *Anc Sci Life*, 20, 1-19.
- Ponsone, M.L., Chiotta, M.L., Combina, M., Dalcerro A. & Chulze, S., (2011). Biocontrol as a strategy to reduce the impact of ochratoxin A and *Aspergillus* section *Nigri* in grapes. *International Journal Food Microbiol*, 151, 70-77.
- Ritchie, J.C. Aflatoxin [อินเทอร์เน็ต]. 2554 [เข้าถึงเมื่อ 16 พ.ค. 2564]. เข้าถึงได้จาก <http://www.worldscibook.com/medsci/p108.html>.

- Sangmanee, P. & Hongpattarakere, T. (2014). Inhibitor of multiple antifungal components produced by *Lactobacillus plantarum* K35 on growth, aflatoxin production and ultratructure alterations of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Food Control*, 40, 224-233.
- Sharma, R.R., Singh, D. & Singh, R. (2009). Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonistics: a review. *Biological Control*, 50, 205-221.
- Spadaro, D. & Droby, S. (2016). Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: the importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. *Trends in Food Science & Technology*, 47, 39-49.
- Tayel, A.A., El-Tras, W.F., Moussa, S.H. & El-Agamy, M.A. (2013). Antifungal action of *Pichia anomala* against aflatoxigenic *Aspergillus flavus* and its application as a feed supplement. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93, 3259-3265.
- Taylor, W.J. & Draughon, F.A. (2001). *Nannocystis exedens*: A potential biocompetitive agent against *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Journal of Food Protection*, 64, 1030-1034.
- Tchana, A.N., Moundipa, P.E. & Tcnouanguiep, F.M. (2010). Aflatoxin contamination in food and Body fluids in relation to malnutrition and cancer status in Cameroon. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 7, 178-188.
- Tiwari, B.K., Brennan, C.S., Curran, T., Gallagher, E., Cullen, P.J. & O'Donnell, C.P. (2010). Application of ozone in grain processing. *Journal of Cereal Science*, 51, 248-255.

- Toffano, L., Fialho, M.B. & Paascholati, S.F. (2017). Potential of fumigation of orange fruits with volatile organic compounds produced by *Saccharomyces cerevisiae* to control citrus black spot disease at postharvest. *Biological Control*, 108, 77-82.
- Tongsri, V., Sonngkumarn, P. & Somsiri S. (2016). Leaf Spot Characteristics of *Phomopsis durionis* on durian (*Durio zibethinus murray*) and Latent Infection of the Pathogen. *ACTA Universitatis Agriculturae ET Silviculturae Mendelianae brunensis*, 64, 185-193.
- Türker, M. (2014). Yeast biotechnology: diversity and applications. In: 27th VH yeast conference: advances in science and industrial production of baker's yeast, Istanbul. 14-15 April 2014 1-26.
- Wagacha, J.M. & Muthomi, J.M. (2008). Mycotoxin problem in Africa: Current status, implications to food safety and health and possible management strategies. *International Journal of Food Microbiology*, 124, 1-12.
- Wisniewski, M., Biles, C., Droby, S., Mclauhlin, R., Wlison, C. & Chalutz, E. (1991). Mode of action of the postharvest biocontrol yeast, *Pichia guilliermondii*. I. Characterization of attachment to *Botrytis cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathogen*, 39, 245-258.
- Yao, H.J. & Tian, S.P. (2005). Effect of a biocontrol agent and methyl jasmonate on postharvest diseases of peach fruit and the possible mechanism involved. *Journal of Applied Microbiology*, 98, 941-950.
- Zain, M.E. (2011). Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society*, 15, 129-144.

Zhang, J., Xie, J., Zhou, Y., Deng, L., Yao, S. & Zeng, K. (2017). Inhibitory effect of *Pichia membranaefaciens* and *Kllockera apiculata* against *Monilinia fruticola* and their biocontrol ability of brown rot in postharvest plum. *Biological Control*, 114, 51-58.

Zhu, C., Shi, J., Jiang, C. & Liu, Y., (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.

จุฑารัตน์ เล้าสุทธิพงษ์ และณลิน บุญสุพ. การศึกษาปริมาณอะฟลาทอกซินในวัตถุดิบอาหารสัตว์ และอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูป [อินเทอร์เน็ต]. 2561 [เข้าถึงเมื่อวันที่ 25 เม.ย. 2564]. เข้าถึงได้จาก https://afvc.dla.go.th/webnew/images/stories/Document/vichakan/622_0122_031.pdf

บดีนทร์ บุตรอินทร์. การปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินในพริกป่นที่จำหน่ายในตลาดสดเขตเทศบาลนครเชียงใหม่ [อินเทอร์เน็ต]. 2555 [เข้าถึงเมื่อวันที่ 25 เม.ย. 2564]. เข้าถึงได้จาก http://cmuir.ac.th/bistream/6653943832/27904/5/nutr41055dc_ch2.pdf

ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ฉบับที่ 2. กำหนดมาตรฐานสินค้าการเกษตร [อินเทอร์เน็ต]. 2561 [เข้าถึงเมื่อวันที่ 10 เม.ย. 2564]. เข้าถึงได้จาก http://www.ratchakicha.soc.go.th/DATA/PDF/2561/E/287/T_0004.PDF

ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ฉบับที่ 2. กำหนดมาตรฐานสินค้าการเกษตร [อินเทอร์เน็ต]. 2561 [เข้าถึงเมื่อวันที่ 10 เม.ย. 2564]. เข้าถึงได้จาก http://www.ratchakicha.soc.go.th/DATA/PDF/2562/E/006/T_0005.PDF

ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 98. มาตรฐานอาหารที่มีสารปนเปื้อน [อินเทอร์เน็ต]. 2529 [เข้าถึงเมื่อวันที่ 10 เม.ย. 2564]. เข้าถึงได้จาก http://food.fda.moph.go.th/law/data/announ_moph/P98.pdf

สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. แนวทางการผลิตอาหารตามหลักเกณฑ์วิธีการที่ดี (จี.เอ็ม.พี)

[อินเทอร์เน็ต]. 2547 [เข้าถึงเมื่อวันที่ 25 เม.ย. 2564]. เข้าถึงได้จาก <http://food.fda.moph.go.th/data/document/2555/Unit/Know%20Ckeck/12.General%20GMP.pdf>

สำนักสุขาภิบาลอาหารและน้ำ กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข. คู่มือการปฏิบัติงานด้านสุขาภิบาลอาหารและ

น้ำ สำหรับสาธารณสุขอำเภอ [อินเทอร์เน็ต]. 2557 [เข้าถึงเมื่อวันที่ 25 เม.ย. 2564]. เข้าถึงได้จาก http://www.skko.moph.go.th/dward/document_file/environment/common_form_upload_file/20151103145745_1634486071.pdf

อภิษฐา ช่างสุพรรณ. อะฟลาทอกซิน (Aflatoxin) ในผลผลิตทางการเกษตร [อินเทอร์เน็ต]. 2548 [เข้าถึงเมื่อ 16

พ.ค. 2564]. เข้าถึงได้จาก http://www.dss.go.th/images/st-article/bsp_1_2548_aflatoxin.pdf

อำนาจ พัวพลเทพ. สารพิษจากเชื้อรา: ภัยเงียบในอาหาร [อินเทอร์เน็ต]. 2552 [เข้าถึงเมื่อวันที่ 10 เม.ย. 2564].

เข้าถึงได้จาก https://thaimycotoxin.org/wp-content/uploads/2019/06/สารพิษจากเชื้อรา_ภัยเงียบในอาหาร.pdf

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
สูตรและวิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Potato Dextrose Agar (PDA)

อาหารสำเร็จรูป PDA (Difco Laboratories, USA)	39	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

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

2. Yeast Extract Peptone Dextrose (YPD)

ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	10.0	กรัม
เพปโทน (peptone)	20.0	กรัม
เดกซ์โทรส (dextrose)	20.0	กรัม
ผงวุ้น (agar)	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

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

3. Yeast Mold (YM)

ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	3.0	กรัม
ผงสกัดจากมอลต์ (malt extract)	3.0	กรัม
เพปโทน (peptone)	5.0	กรัม
เดกซ์โทรส (dextrose)	10.0	กรัม
ผงวุ้น (agar)	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

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

ภาคผนวก ข
สูตรและวิธีการเตรียมสารเคมี

1. เฟสเคลื่อนที่สำหรับอะฟลาทอกซินบี 1

เมทานอล	200	มิลลิลิตร
อะซีโตไนไตรล์ (HPLC grade)	200	มิลลิลิตร
น้ำปลอดประจุ	600	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน แล้วกรองด้วยชุดกรองผ่านกระดาษกรองขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร

2. ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate Bufffered Saline, PBS pH 7.2)

โซเดียมคลอไรด์	8.0	กรัม
โพแทสเซียมคลอไรด์	0.2	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรฟอสเฟต	0.24	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตไดไฮเดรต	1.44	กรัม
น้ำปลอดประจุ	800	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน ปรับความเป็นกรด-ด่าง ให้เท่ากับ 7.2 จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำปลอดประจุ จนมีปริมาตรเท่ากับ 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

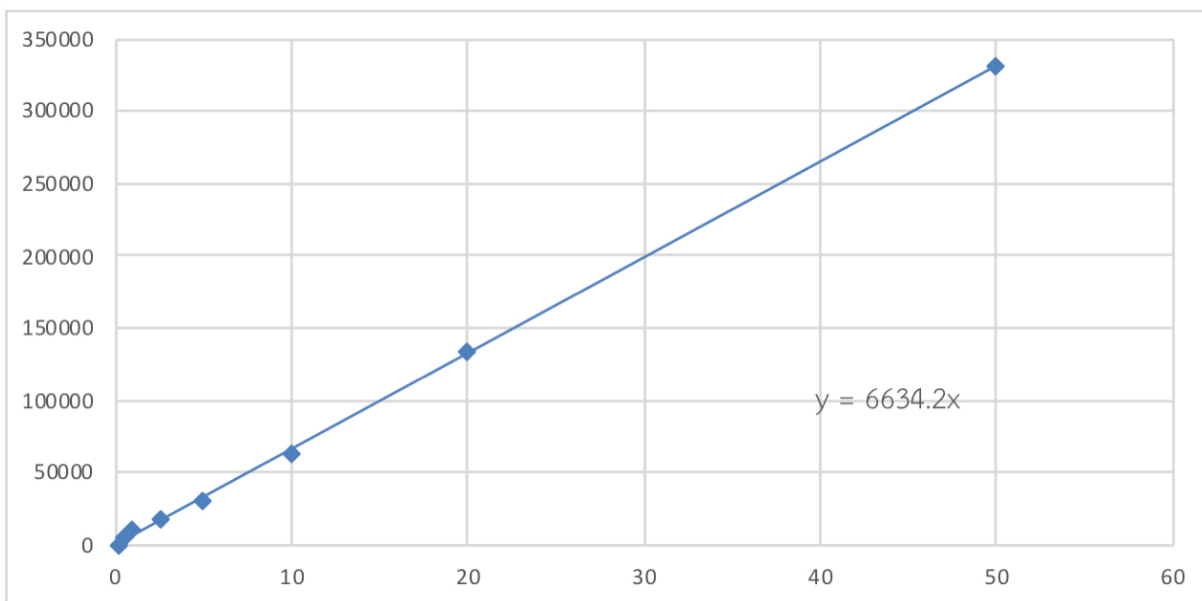
3. สารแขวนลอยสปอร์รา (Physiological water)

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

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

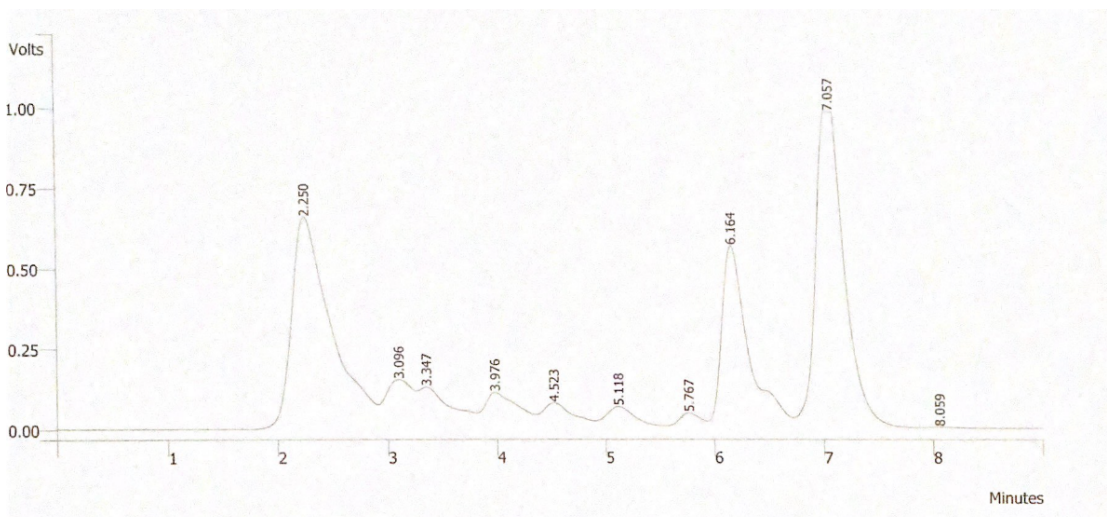
ภาคผนวก ค
กราฟมาตรฐานสารพิษจากกรา

1. กราฟมาตรฐานอะฟลาทอกซินบี 1



Retention Time (RT) : 7 นาที

2. โครมาโทแกรมของอะฟลาทอกซินบี 1



Retention Time (RT) : 7 นาที

3. การคำนวณปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1

$$\text{ปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1} = \frac{A}{[B \times 2.5 \text{ (ปริมาตรเมทานอลที่ใช้ในการสกัด(ml))} \times C \times (1/D)]}$$

โดย A คือ พื้นที่ใต้กราฟ

B คือ สัมประสิทธิ์หน้า X ของกราฟมาตรฐานอะฟลาทอกซินบี 1

C คือ เฟสเคลื่อนที่ ที่เติมลงในอะฟลาทอกซินบี 1 ที่สกัดได้ (เท่า)

D คือ น้ำหนักฐาน (กรัม)

หน่วย นาโนกรัมต่อกรัม