



โครงการ  
การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การคัดแยก คัดเลือก และประเมินความเป็นปฏิปักษ์ของยีสต์ต่อราที่ผลิต  
โอคราทอกซินเอในตัวอย่างกาแฟช่วงต้นของกระบวนการผลิตหลังการเก็บเกี่ยว  
Isolation, Selection and Evaluation of Antagonistic Activity of Post-  
Harvest Yeasts against Ochratoxigenic fungi

ชื่อนิสิต นางสาวจิตโสภณ สมัครกาล เลขประจำตัว 5832305923

ภาควิชา จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา 2561

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการทางวิชาการที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการทางวิชาการที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of senior projects in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)  
are the senior project authors' files submitted through the faculty.



## โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการ : การคัดแยก คัดเลือก และประเมินความเป็นปฏิปักษ์ของยีสต์ที่แยกได้จาก  
ตัวอย่างกาแฟหลังการเก็บเกี่ยวต่อราที่ผลิตโอคราทอกซินเอ

นิสิตในโครงการ : นางสาวจิตโสภณ สมัครกาล เลขประจำตัวนิสิต 5832305923

อาจารย์ที่ปรึกษา : ผศ.ดร. ชีวานันท์ เดชอุปกาล ศิริสมบุญ

### บทคัดย่อ

การปนเปื้อนของราและสารพิษจากราโดยเฉพาะโอคราทอกซินเอระหว่างกระบวนการแปรรูปกาแฟเป็นหนึ่งในปัญหาสำคัญและเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค จึงมีความจำเป็นในการหาแนวทางเพื่อลดการปนเปื้อนของราที่ผลิตโอคราทอกซินเอในกาแฟ การใช้ยีสต์ปฏิปักษ์เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพเป็นหนึ่งในแนวทางที่ได้รับความสนใจ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกและคัดเลือกยีสต์จากตัวอย่างผลกาแฟสุก เมล็ดกาแฟหมัก น้ำหมักกาแฟ และเมล็ดกาแฟกะลา จากมูลนิธิโครงการหลวง 3 แห่ง ในจังหวัดเชียงใหม่ ประเทศไทย และเพื่อประเมินความเป็นปฏิปักษ์ของยีสต์ที่คัดแยกได้ต่อราที่ผลิตโอคราทอกซินเอ พบว่า ตัวอย่างเมล็ดกาแฟหมักมีจำนวนยีสต์มากที่สุดโดยเฉพาะตัวอย่างจากศูนย์พัฒนาโครงการหลวงตีนตก ( $1.32 \times 10^8$  โคโลนีต่อกรัม) คัดแยกยีสต์ทั้งหมดได้ 121 ไอโซเลต จากตัวอย่างกาแฟทั้งหมดยกเว้นเมล็ดกาแฟกะลา จัดกลุ่มยีสต์ตามลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งได้ 19 กลุ่ม ศึกษาลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์และคุณสมบัติทางชีวเคมี และคัดเลือกยีสต์ 15 ไอโซเลต ไปทดสอบประสิทธิภาพต่อการต้านการเจริญของราที่ผลิตโอคราทอกซินเอ พบว่ายีสต์มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของราที่ผลิตโอคราทอกซินเอ โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งระหว่าง  $2.5 \pm 3.54$  ถึง  $30.0 \pm 3.54$  เปอร์เซ็นต์

Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University

Project title : Isolation, Selection and Evaluation of Antagonistic Activity  
of Post-Harvest Yeasts against Ochratoxigenic fungi  
Investigator : Miss Chitsophin Samakkarn ID 5832305923  
Advisor : Cheewanun Dachoupan Sirisomboon, Assistant  
Professor, Ph.D.

---

### Abstract

The contamination of fungi and mycotoxins especially ochratoxin A (OTA) during the coffee processing is a serious problem and dangerous to all consumers. It is necessary to find a way to decrease the contamination of ochratoxigenic fungi in coffee. One of the most popular prevalent is to use antagonistic yeasts as a biological control. The objectives of this study were to isolate and select yeasts from cherry coffee, fermented coffee, fermented water and parchment coffee and to evaluate the antagonistic activity of isolated yeasts against ochratoxigenic fungi. The results show that the highest average yeast count is from yeast from fermented coffee ( $1.32 \times 10^8$  CFU/g). 121 Isolates were selected and can be classified into 19 groups based their morphology on agar medium. Then, they were tested for growth characteristics in media, cell morphology and biochemical characteristics. 15 selected isolates were tested for their antagonistic activity against ochratoxigenic fungi. The selected yeasts had the ability to reduce the growth of ochratoxigenic fungi with the inhibition percentage between  $2.5 \pm 3.54$  to  $30.0 \pm 3.54$ .

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการการเรียนการสอนเสริมประสบการณ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี อันเนื่องมาจาก ความกรุณาและอนุเคราะห์ของ ผศ.ดร. ชีวานันท์ เตชอุปการ ศิริสมบุรณ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ที่ให้ความรู้ คำแนะนำ คำปรึกษาและข้อคิดเห็นต่าง ๆ ที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อโครงการตลอด ระยะเวลาของการทำวิจัย ตลอดจนความอนุเคราะห์ในการปรับปรุงแก้ไขโครงการวิจัยฉบับนี้ให้สำเร็จ ลุล่วงไปด้วยดี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณคณะอาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัยทุกท่าน ที่ให้ความรู้และคำแนะนำต่าง ๆ อันเป็นประโยชน์ต่องานวิจัยฉบับนี้และต่อตัว ผู้วิจัยในอนาคต

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน ที่ได้ ให้ความช่วยเหลือ ให้คำแนะนำ และอำนวยความสะดวกด้านอุปกรณ์เครื่องมือ และ สารเคมีในงานวิจัย

ขอขอบคุณโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมสร้างประสบการณ์ ฝ่ายวิชาการจุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย ที่ได้อนุเคราะห์เงินทุนสนับสนุนงานวิจัย

ขอขอบคุณพี่ ๆ ระดับปริญญาโทและเพื่อนระดับปริญญาตรี สมาชิกห้องวิจัย 1904/14 ทุกคนที่คอย ให้คำปรึกษา คำแนะนำและคอยช่วยเหลือตลอดจนเป็นกำลังใจให้ผู้วิจัยในการทำโครงการ นี้เสมอมา

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา สมาชิกทุกคนในครอบครัว และเพื่อน ๆ ที่ให้ โอกาส ให้การสนับสนุนและความช่วยเหลือตลอดจนเป็นกำลังใจแก่ผู้วิจัยในการทำโครงการนี้เสมอมา

ด้วยความเคารพอย่างสูง

จิตโสภณ สมัครกาล

## สารบัญ

หัวข้อ	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูปภาพ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 อุปกรณ์ สารเคมีและวิธีดำเนินการทดลอง	15
บทที่ 3 ผลการทดลอง	22
บทที่ 4 สรุปและวิจารณ์ผล	39
รายการอ้างอิง	42
ภาคผนวก	49

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1.1	ผลผลิตกาแฟของโลก ปี พ.ศ. 2553/54-2558/59	5
1.2	ปริมาณและมูลค่าการส่งออกเมล็ดกาแฟดิบ เมล็ดกาแฟคั่ว และกาแฟสำเร็จรูปของประเทศไทยในปี พ.ศ. 2554 - 2558	6
1.3	ราและสารพิษจากราที่สำคัญในอาหาร	8
3.1	จำนวนยีสต์ทั้งหมดในตัวอย่างกาแฟแต่ละชนิด	23
3.2	จำนวนไอโซเลตของยีสต์ทั้งหมดจากตัวอย่างกาแฟแต่ละชนิด	24
3.3	ลักษณะการเจริญของยีสต์ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างกาแฟจำนวน 19 กลุ่ม	26
3.4	ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์และลักษณะเด่นของยีสต์ทั้ง 19 กลุ่ม	28
3.5	ผลการทดสอบทางชีวเคมีของยีสต์ทั้ง 19 กลุ่ม	34
3.6	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของ <i>Aspergillus carbonarius</i> TK4.2 โดยยีสต์ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างกาแฟ	37
3.7	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของรา TK19 โดยยีสต์ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างกาแฟ	38
ค.1	ลักษณะการเจริญของ <i>Aspergillus carbonarius</i> TK4.2 เมื่อทดสอบความเป็นปฏิปักษ์ของยีสต์ด้วยวิธี dual culture เทียบกับชุดควบคุม	52
ค.2	ลักษณะการเจริญของ <i>Aspergillus carbonarius</i> TK4.2 เมื่อทดสอบความเป็นปฏิปักษ์ของยีสต์ด้วยวิธี dual culture เทียบกับชุดควบคุม	56

## สารบัญรูปภาพ

รูป		หน้า
1.1	องค์ประกอบของเนื้อเยื่อของผลกาแฟ	2
1.2	ชนิดของเมล็ดกาแฟเมื่อแบ่งตามกระบวนการผลิต	4
1.3	โครงสร้างทางเคมีของโอคราทอกซิน	9
2.1	การเลี้ยงยีสต์ร่วมกับราด้วยวิธี dual culture	21
3.1	ลักษณะตัวอย่างกาแฟทั้ง 4 ประเภทที่เก็บจากมูลนิธิโครงการหลวง	22
3.2	การเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวของยีสต์	25
3.3	การเลี้ยง <i>Aspergillus carbonarius</i> TK4.2 ร่วมกับยีสต์รหัส Y18 ด้วยวิธี dual culture เมื่อผ่านไป 7 วัน	37
3.4	การเลี้ยงรา TK18 ร่วมกับยีสต์รหัส Y00 ด้วยวิธี dual culture เมื่อผ่านไป 7 วัน	38



## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1. กาแฟ

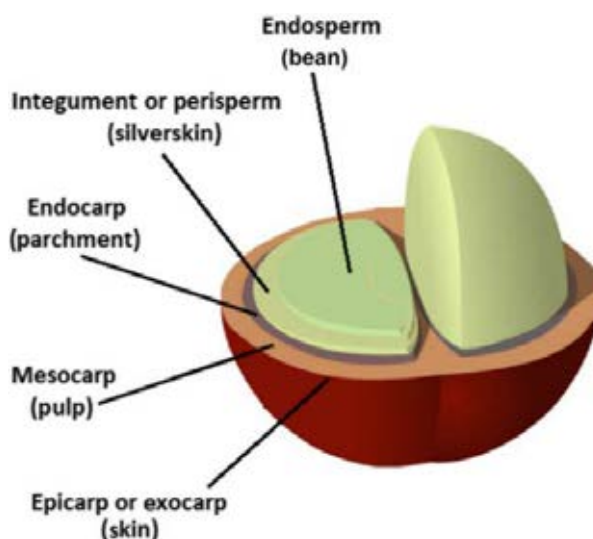
กาแฟ เป็นเครื่องดื่มที่ได้รับความนิยมเป็นอย่างมากในปัจจุบัน ทำมาจากเมล็ดกาแฟซึ่งได้จากต้นกาแฟ กาแฟเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจเป็นอย่างมากเนื่องจากการเพาะปลูกในมากกว่า 70 ประเทศทั่วโลก เป็นสินค้าส่งออกที่สำคัญ และกาแฟสาร (กาแฟซึ่งยังไม่ผ่านการคั่ว) เป็นหนึ่งในสินค้าทางการเกษตรซึ่งมีการซื้อขายกันมากที่สุดในโลก (Pendergrast และคณะ, 2009) กาแฟสายพันธุ์ที่สำคัญในทางเศรษฐกิจที่นิยมนำมาบริโภค คือ สายพันธุ์อาราบิกา (*Arabica Coffee: Coffea arabica*) และสายพันธุ์โรบัสตา (*Robusta Coffee : Coffea canephora var. Robusta*) (N'Diaye และคณะ)

กาแฟ (Genus *Coffea*) เป็นพืชในวงศ์เข็ม (Family Rubiaceae) เป็นพืชยืนต้น มีลักษณะเป็นไม้พุ่มขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ มีลักษณะเด่นที่สังเกตได้ง่าย คือ มีใบเดี่ยว แต่ละใบออกตรงข้ามกัน ซึ่งใบในแต่ละคู่จะตั้งฉากกัน ลักษณะของใบมักเป็นรูปเข็ม (Malavolta, 1995) กาแฟมีถิ่นกำเนิดดั้งเดิมอยู่ในป่าซึ่งมีสภาพแวดล้อมชุ่มชื้นและมีร่มเงา แต่เดิมมีแหล่งเพาะปลูกอยู่ในแถบทวีปแอฟริกาและลาตินอเมริกา ส่วนในปัจจุบันพบการปลูกกาแฟเกือบทั่วทุกมุมโลก เช่น กาแฟสายพันธุ์อาราบิกาส่วนใหญ่ปลูกในลาตินอเมริกา แอฟริกาตะวันออก และเอเชีย ส่วนกาแฟสายพันธุ์โรบัสตาปลูกในแอฟริกาตะวันตกและแอฟริกากลางไปจนถึงเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และบางส่วนของประเทศบราซิล (Duran , 2008) ในประเทศไทยกาแฟสายพันธุ์โรบัสตาพบปลูกมากบริเวณภาคใต้ของประเทศไทยในจังหวัดชุมพร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช กระบี่ พังงา และ ระนอง (กรมวิชาการเกษตร, 2018) เนื่องจากกาแฟโรบัสตาเจริญเติบโตได้ดีในพื้นที่ราบต่ำที่มีอากาศร้อนชื้น ที่ความสูงเหนือระดับน้ำทะเลตั้งแต่ 500 - 2,000 ฟุต ลักษณะเด่นของสายพันธุ์โรบัสตา คือ ใบซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าใบของสายพันธุ์ อาราบิกา กาแฟสายพันธุ์โรบัสตาปลูกง่าย ทนแล้ง มีความทนทานต่อโรคได้ดี และให้ผลผลิตสูงกว่าแต่มีรสขมและฝาดเนื่องจากมีปริมาณคาเฟอีนสูง ส่วนกาแฟสายพันธุ์อาราบิกาเป็นกาแฟพันธุ์ที่เหมาะสมสำหรับปลูกในพื้นที่ที่มีความสูงจากระดับน้ำทะเลตั้งแต่ 1,500 - 3,000 ฟุตขึ้นไป จึงพบปลูกมากในแถบภาคเหนือของไทย บริเวณสามเหลี่ยมทองคำ เช่น จังหวัดลำปาง ลำพูน

เชียงใหม่ เชียงราย เป็นต้น (กรมวิชาการเกษตร, 2018) มีคุณสมบัติโดดเด่นในเรื่องของกลิ่นและรสชาติที่ดี และมีปริมาณของคาเฟอีนเพียงครึ่งหนึ่งของกาแฟสายพันธุ์โรบัสตา (Jose, 2017 ; Vignoli, 2011)

### 1.1 องค์ประกอบของผลกาแฟ

ผลกาแฟ (cherry coffee) มีลักษณะรูปร่างกลมหรือรีแตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ของกาแฟ โดยทั่วไปผลกาแฟจะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1-1.5 เซนติเมตร ซึ่งภายในจะบรรจุเมล็ดกาแฟ (coffee bean) หรือเรียกว่าส่วนเนื้อเมล็ด (perisperm) ไร่ และมีส่วนผนังผล (pericarp) ซึ่งประกอบด้วยเนื้อเยื่อหลายชั้น ได้แก่ (1) ผนังผลชั้นนอก (exocarp หรือ skin) เนื้อเยื่อบริเวณนี้เริ่มแรกจะมีสีเขียวเมื่อเริ่มสุกจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองและเป็นสีแดงเมื่อสุกเต็มที่ โดยจะมีสารที่มีลักษณะคล้ายขี้ผึ้ง (wax) เคลือบบริเวณผิวช่วยในการป้องกันผลกาแฟ (2) ผนังผลชั้นกลาง (mesocarp หรือ pulp) บริเวณนี้จะมีลักษณะเป็นเมือก (mucilage) และมีส่วนเนื้อของผลอยู่ด้วย (3) ผนังผลชั้นใน (endocarp หรือ parchment) บริเวณนี้จะอยู่ติดกับผนังผลชั้นใน มีลักษณะบาง ส่วนเนื้อเมล็ด (perisperm) ประกอบไปด้วย (1) ส่วนที่ห่อหุ้มเมล็ด (silverskin) มีส่วนประกอบหลักคือ พอลิแซ็กคาไรด์ ที่เป็นเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส โมโนแซ็กคาไรด์ โปรตีน และพอลิฟีนอล (2) เมล็ดจริง (bean หรือ seed หรือ endosperm) ประกอบด้วยเมล็ดที่มีลักษณะกลมรีจำนวน 2 เมล็ด ดังแสดงในภาพที่ 1.1 (Elias, 1978 ; Avallone และคณะ, 2001)



ภาพที่ 1.1 องค์ประกอบของเนื้อเยื่อของผลกาแฟ (Batista และคณะ, 2016)

## 1.2 กระบวนการผลิตและแปรรูปกาแฟ

ในกระบวนการผลิตกาแฟหลังจากการเก็บเกี่ยวสำหรับนำไปแปรรูปต้องแยกเมล็ดออกจากเนื้อเยื่อชั้นนอกทำให้มีความชื้นลดลงจาก 65 เปอร์เซ็นต์ เหลือเพียง 10-15 เปอร์เซ็นต์ เรียกว่า เมล็ดกาแฟสาร (green coffee) (Trugo และคณะ, 1984; Teixeira และคณะ, 1995) ซึ่งกระบวนการผลิตกาแฟสารโดยทั่วไปมี 2 กระบวนการ คือ กระบวนการแบบเปียก (wet process) และกระบวนการแบบแห้ง (dry process) (Batista และคณะ, 2009)

กระบวนการผลิตกาแฟแบบเปียก (wet process) เป็นกระบวนการที่ให้เมล็ดกาแฟที่มีคุณภาพดี เนื่องจากสามารถควบคุมปัจจัยต่างๆ ได้ง่าย ซึ่งกระบวนการนี้มักใช้กับกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้า โดยผลกาแฟสุกหลังการเก็บเกี่ยวจะถูกนำมาปอกเปลือกด้วยเครื่องจักรเพื่อเอาเปลือกชั้นนอกออก เหลือเป็นเมล็ดกาแฟที่มีเมือกติดอยู่ จากนั้น หมักในถังหมักขนาดใหญ่เพื่อกำจัดเยื่อเมือกโดยใช้ระยะเวลาในการหมัก 24-36 ชั่วโมง ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิของพื้นที่และความหนาของชั้นเยื่อเมือก หลังผ่านกระบวนการหมักจะล้างเมล็ดกาแฟด้วยน้ำสะอาด เพื่อตัดสิ่งเจือปนออก จากนั้นนำไปตากแดดจนแห้งอย่างสม่ำเสมอเพื่อไล่ความชื้น โดยเมล็ดกาแฟหลังผ่านกระบวนการข้างต้นเรียกว่า เมล็ดกาแฟกะลา (parchment coffee) ซึ่งเมล็ดกาแฟกะลาที่แห้งดีแล้วจะถูกบรรจุไว้ในกระสอบเพื่อรอการสีเป็นเมล็ดกาแฟสาร (green coffee) สำหรับนำไปแปรรูปต่อไป (Putthapongh, 2012)

กระบวนการผลิตกาแฟแบบแห้ง (dry process) เป็นกระบวนการที่มักจะใช้กับกาแฟสายพันธุ์โรบัสต้า ทำได้โดยการนำผลกาแฟสุกหลังการเก็บเกี่ยวมาตากบนพื้นที่สำหรับตากกาแฟหรือพื้นปูนคอนกรีต โดยใช้ความร้อนจากแสงอาทิตย์ และเกลี่ยเพื่อให้ผลกาแฟสุกแห้งอย่างสม่ำเสมอ จนมีความชื้นเหลือเพียง 12.5 เปอร์เซ็นต์ มีระยะเวลาในการตากประมาณ 3-4 สัปดาห์ ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิของพื้นที่และสภาพอากาศ ผลกาแฟสุกที่ผ่านการตากแห้งแล้วจะถูกนำไปกะเทาะเปลือกด้วยเครื่องสีกาแฟ จะได้เป็นเมล็ดกาแฟสาร (green coffee) สำหรับนำไปแปรรูปต่อไป (ปาริชาติ, 2016)

ชนิดของเมล็ดกาแฟเมื่อแบ่งตามกระบวนการผลิต แบ่งได้เป็น 4 ชนิด คือ

- (1) ผลกาแฟสุกหรือกาแฟเชอร์รี่ (cherry coffee) คือ ผลกาแฟที่สุกแล้ว มีผิวสีแดง (ภาพที่ 1.2 ก)
- (2) กาแฟกะลา (parchment coffee) คือ เมล็ดกาแฟจากผลกาแฟสุก ที่ผ่านการเอาเนื้อผลและเปลือกออก แต่ยังคงเหลือส่วนผนังผลชั้นในไว้ ซึ่งผ่านการตากแห้งแล้ว (ภาพที่ 1.2 ข)
- (3) กาแฟสาร (green coffee) คือ เมล็ดกาแฟกะลาที่ผ่านกระบวนการสีเพื่อเอาส่วนผนังผลชั้นในออก (ภาพที่ 1.2 ค)

(4) กาแฟคั่ว (roasted coffee) คือ เมล็ดกาแฟสารที่ผ่านกระบวนการคั่ว พร้อมนำไปบดเป็นผง มีกลิ่นหอม มีสีน้ำตาลที่เกิดจากการคั่ว (ภาพที่ 1.5)  
(ไทยเกษตรศาสตร์, 2013)



ภาพที่ 1.2 ผลกาแฟสุก (ก) กาแฟกะลา (ข) กาแฟสาร (ค) กาแฟคั่ว (ง)

ที่มา: <http://www.coffee-hat.com/eng/Coffeepedia/Coffee-Cherry-and-Tea>

<https://www.urwaldkaffee.de/regionen/sierra-nevada-kolumbien/29/rohkafee-kogi-cafe>

<https://pixabay.com/photos/green-coffee-coffee-beans-coffee-927604>

<https://www.urwaldkaffee.de/regionen/sierra-nevada-kolumbien/29/rohkafee-kogi-cafeteyuna-5-kg> (สืบค้นเมื่อ 10 เมษายน 2019)

### 1.3 สถานการณ์การผลิตและการค้ากาแฟ

ปัจจุบันกาแฟเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของโลก ผลผลิตกาแฟของโลก มีประมาณ 8 ล้านตัน เป็นกาแฟอาราบิก้า 62 เปอร์เซ็นต์ พันธุ์โรบัสต้า 38 เปอร์เซ็นต์ (สถาบันอาหาร, 2558) ประเทศไทยผลิตกาแฟได้น้อยกว่าความต้องการบริโภคภายในประเทศบางส่วนต้องนำเข้าจากต่างประเทศ ประเทศที่ผลิตกาแฟได้มากที่สุด คือ บราซิล โดยให้ผลผลิตมากกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ของโลก ในทุก ๆ ปี รองลงมาคือ เวียดนาม และโคลัมเบีย ตามลำดับ (USDA, 2017) ในช่วงปี พ.ศ. 2553/54-2558/59 ผลผลิตกาแฟของโลก เพิ่มขึ้น 2.07 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 1.1

ตารางที่ 1.1 ผลผลิตกาแฟของโลก ปี พ.ศ. 2553/54-2558/59

ประเทศ	จำนวนผลผลิตกาแฟในแต่ละปี (ล้านตัน)						อัตราผลผลิตที่เพิ่มขึ้น (ร้อยละ)
	2553/54	2554/55	2555/56	2556/57	2557/58	2558/59	
บราซิล	3.270	2.952	3.456	3.432	3.258	2.964	1.44
เวียดนาม	1.165	1.56	1.59	1.79	1.644	1.758	8.61
โคลัมเบีย	0.512	0.459	0.596	0.752	0.798	0.804	14.39
อินโดนีเซีย	0.56	0.498	0.63	0.57	0.528	0.636	0.17
เอธิโอเปีย	0.368	0.379	0.39	0.381	0.389	0.39	1.17
ฮอนดูรัส	0.239	0.336	0.284	0.264	0.3	0.354	2.16
อินเดีย	0.302	0.314	0.318	0.305	0.326	0.318	1.25
ยูกันดา	0.193	0.185	0.216	0.231	0.213	0.228	4.28
เม็กซิโก	0.24	0.258	0.279	0.237	0.198	0.204	-4.59
กัวเตมาเล	0.238	0.265	0.241	0.211	0.202	0.199	-5.41
ไทย	0.0042	0.041	0.038	0.039	0.026	0.031	-9.6
อื่นๆ	1.296	1.387	1.259	1.259	1.09	1.121	-5.14
รวม	8.425	8.634	9.297	9.342	8.972	9.007	2.07

ที่มา : กระทรวงเกษตรสหรัฐอเมริกา สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร (2559)

ในช่วงปี พ.ศ. 2554 – 2558 ปริมาณผลผลิตของประเทศไทยไม่เพียงพอต่อความต้องการของผู้บริโภค เนื่องจากตลาดกาแฟมีการขยายตัวเป็นอย่างมาก และผลผลิตในประเทศที่ลดลงเพราะราคาตกต่ำ ทำให้การส่งออกเมล็ดกาแฟดิบของไทยลดลงถึง 22.40 เปอร์เซ็นต์ เพราะความต้องการบริโภคกาแฟในประเทศเพิ่มมากขึ้น ส่วนเมล็ดกาแฟคั่วมีการส่งออกเพิ่มขึ้น จาก 137 ตันเป็น 177 ตัน หรือเพิ่มขึ้น 9.23 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกาแฟสำเร็จรูปมีการส่งออกเพิ่มขึ้นจาก 5,263 ตัน เป็น 7,595 ตัน หรือเพิ่มขึ้น 6.12 เปอร์เซ็นต์ (กรมศุลกากร, 2559) ดังแสดงในตารางที่ 1.2

**ตารางที่ 1.2** ปริมาณและมูลค่าการส่งออกเมล็ดกาแฟดิบ เมล็ดกาแฟคั่ว และกาแฟสำเร็จรูปของประเทศไทยในปี พ.ศ. 2554 - 2558

ปี	เมล็ดกาแฟดิบ		เมล็ดกาแฟคั่ว		กาแฟสำเร็จรูป		กาแฟสำเร็จรูปอื่นๆ	
	ปริมาณ	มูลค่า	ปริมาณ	มูลค่า	ปริมาณ	มูลค่า	ปริมาณ	มูลค่า
2554	720	102	137	30	5263	906	36719	3806
2555	1969	161	116	33	7260	1130	40142	4468
2556	270	45	98	31	1621	303	51548	5389
2557	399	63	168	47	6316	860	57624	5933
2558	450	79	177	46	7595	1007	16823	4874
อัตราเพิ่ม (ร้อยละ)	-22.40	-13.49	9.23	12.85	6.12	-0.61	8.85	8.09

หมายเหตุ : ปริมาณ(ตัน) , มูลค่า(บาท)

ที่มา : กรมศุลกากร (2559)

## 2. สารพิษจากรา

สารพิษจากรา (mycotoxin) คือ สารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) ที่ผลิตจากรา สารนี้เป็นพิษหรือทำให้เกิดผลกระทบเชิงลบต่อสิ่งที่มีชีวิตต่าง ๆ โดยเฉพาะในสัตว์และในมนุษย์ ซึ่งเมื่อได้รับเข้าไปแม้ในปริมาณเพียงเล็กน้อยจะทำให้เกิดอาการพิษ (mycotoxicosis) แต่ไม่สามารถถ่ายทอดจากคนหนึ่งไปสู่คนอื่นได้ สาเหตุเกิดจากการรับประทานอาหารที่มีการปนเปื้อนของราและ/หรือสารพิษจากรา ตั้งแต่ในช่วงการเพาะปลูก การเก็บเกี่ยว การเก็บรักษาและการนำผลผลิตทางการเกษตรมาผลิตเป็นอาหาร (Bennett และคณะ, 2013)

การปนเปื้อนของสารพิษที่เกิดขึ้นภายหลังการเก็บเกี่ยวและระหว่างการเก็บรักษา อันเนื่องมาจากปัจจัยต่าง ๆ เช่น ความชื้น อุณหภูมิ และปริมาณออกซิเจน ซึ่งปัจจัยต่าง ๆ เหล่านี้เป็นปัจจัยที่ส่งผลให้ราเจริญและผลิตสารพิษได้ ราสำคัญที่ผลิตสารพิษจากรา ได้แก่ ราในสกุล *Aspergillus*, *Penicilium*, *Alternaria* และ *Fusarium* (Kaushal และคณะ, 1998) สารพิษที่ราผลิตนี้ส่งผลเสียต่อสุขภาพของมนุษย์และสัตว์แบบเฉียบพลันและเรื้อรัง โดยส่งผลกระทบต่อระบบต่าง ๆ ในร่างกาย และยังส่งผลเสียต่อทารกในครรภ์ รวมไปถึงสารพิษจากราบางชนิดยังเป็นสารก่อมะเร็งอีกด้วย (D'Mello, 2003) สารพิษจากราที่ปนเปื้อนในอาหารและส่งผลกระทบต่อสุขภาพของมนุษย์และสัตว์ที่ต้องควบคุมปริมาณและมีการตรวจสอบ ได้แก่ อะฟลาทอกซิน (aflatoxins), ฟูโมนิซิน (fumonisin B1 and B2), ดีออกซีนิวาลินอล (deoxynivalenol หรือ DON), โอคราทอกซินเอ (ochratoxin A), ที-2 ทอกซิน (T-2 toxin) และพาทุลิน (patulin) (Mazumder และคณะ, 2001) ตารางที่ 1.3 ราและสารพิษจากราที่มักพบปนเปื้อนในอาหาร

ตารางที่ 1.3 ราและสารพิษจากราที่สำคัญในอาหาร

สารพิษ	ราที่ผลิต
อะฟลาทอกซิน	<i>Aspergillus flavus</i>
	<i>Aspergillus parasiticus</i>
ฟูโมนิซิน	<i>Fusarium verticillioides</i>
	<i>Fusarium proliferatum</i>
ดีออกซีนิวาลินอล	<i>Fusarium culmorum</i>
	<i>Fusarium graminearum</i>
โอคราทอกซินเอ	<i>Aspergillus ochraceus</i>
	<i>Aspergillus carbonarius</i>
	<i>Penicillium verrucosum</i>
ที-2 ทอกซิน	<i>Fusarium sporotrichioides</i>
	<i>Fusarium poae</i>
พาทุลิน	<i>Penicillium expansum</i>

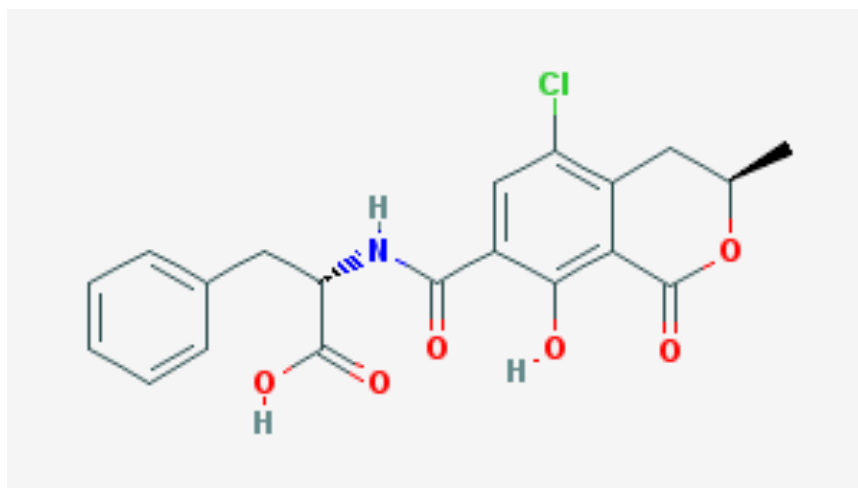
ที่มา: ดัดแปลงจาก Ahmed และคณะ (2015)

### 3. โอคราทอกซินเอ

โอคราทอกซินเอ (ochratoxin A) เป็นสารพิษจากราที่ถูกพบครั้งแรกในทางตอนใต้ของแอฟริกา จาก *Aspergillus ochraceus* (Bayman และคณะ, 2002) ปัจจุบันพบว่าโอคราทอกซินเป็นสารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิซึ่งผลิตจากราสายใยหลายชนิดในสกุล *Aspergillus* และ *Penicillium* (Ahmed และคณะ, 2015)

โอคราทอกซินเอมีสูตรโมเลกุล คือ  $C_{20}H_{18}ClNO_6$  มวลโมเลกุลเท่ากับ 403.815 กรัมต่อโมล มีโครงสร้างเป็น pentaketide ของ L- $\beta$ -phenylalanine สองโมเลกุลจับกันด้วยพันธะเอไมล์ (ภาพที่ 1.3) โอคราทอกซินเอเป็นกรดอินทรีย์ชนิดอ่อน มีลักษณะเป็นก้อนผลึกไม่มีสีหรือมีสีขาว มีจุดหลอมเหลวที่ 169 องศาเซลเซียส และละลายน้ำได้เล็กน้อย โอคราทอกซินเอเป็นสารประกอบที่มีความเสถียรทางเคมี ดังนั้น การแปรรูปอาหารด้วยความร้อนธรรมดาจึงไม่สามารถลดปริมาณของโอคราทอกซินในอาหารและเครื่องดื่มได้ (El khoury และคณะ, 2010; National Center for Biotechnology Information, 2018)





ภาพที่ 1.3 โครงสร้างทางเคมีของโอคราทอกซิน

ที่มา: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov> (สืบค้นเมื่อ 17 สิงหาคม 2018)

### 3.1 ความเป็นพิษของโอคราทอกซินเอ

โอคราทอกซินเอได้รับการยืนยันว่าเป็นพิษและเป็นสารก่อมะเร็งในสัตว์ โดยมีไต่เป็นอวัยวะเป้าหมายหลัก และส่งผลต่อระบบประสาทของหนู ทำให้ระบบประสาทส่วนกลางของหนูพิการ เมื่อได้รับโอคราทอกซินเป็นเวลานาน (Duarte และคณะ, 2011) ผลกระทบอื่น ๆ ของโอคราทอกซิน ได้แก่ ภูมิคุ้มกันบกพร่อง (Bondy และคณะ, 2000; Pestka และคณะ, 1994) การยับยั้งการสังเคราะห์โมเลกุล การเพิ่มกระบวนการ lipid peroxidation และการยับยั้ง mitochondrial respiration (Kuiper-Goodman และคณะ, 1989; Marquardt และคณะ, 1992) นอกจากนี้ โอคราทอกซินยังถูกสงสัยว่าเป็นสาเหตุของโรคไตในมนุษย์ (Barnes และคณะ, 1977; Castegnaro และคณะ, 2006; Elling และคณะ, 1977; Pfohl-Leszkowicz และคณะ, 2002; Sattler และคณะ, 1977) และโรคไตอักเสบเรื้อรัง (CIN) อีกด้วย (Abid และคณะ, 2003)

The International Agency for Research on Cancer (IARC) ได้จัดให้โอคราทอกซินเอเป็นสารก่อมะเร็งในกลุ่ม 2B ซึ่งเป็นกลุ่มสารที่อาจจะก่อมะเร็งในมนุษย์ (Fazekas และคณะ, 2005; IARC, 1993)

### 3.2 ราที่ผลิตโอคราทอกซินเอ

ราสายใยในสกุล *Aspergillus* และ *Penicillium* เป็นราที่สามารถผลิตโอคราทอกซินเอ ซึ่งพบปนเปื้อนในกาแฟรวมถึงอาหารแปรรูปและผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรหลายชนิด ซึ่งราทั้งสองสกุลจะผลิตโอคราทอกซินเอในช่วงหลังการเก็บเกี่ยวหรือในช่วงเก็บรักษา โดยสามารถผลิตโอคราทอกซินเอในช่วงระหว่างเพาะปลูกได้เช่นกัน หากมีอากาศร้อนและแห้ง (Padro และคณะ, 2005) ราในสกุล *Penicillium* ถูกพบว่าผลิตโอคราทอกซินเอ ในผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรที่ปลูกในแถบยุโรป เนื่องจาก *P. verrucosum* จะเจริญได้ดีในอุณหภูมิต่ำ (Pardo และคณะ, 2005; Ilic และคณะ, 2007) ส่วนราในสกุล *Aspergillus* ที่พบผลิตโอคราทอกซินเอ แบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ ราดำ หรือ *Aspergillus* section *Nigri* (black aspergilli) เช่น *A. carbonarius* และ *A. niger* อีกกลุ่มหนึ่ง คือ *Aspergillus* section *Circumdati* เช่น *A. westerdijkiae*, *A. ochraceus* และ *A. steynii* (Valle และคณะ, 2018) โดย *A. carbonarius* เป็นสายพันธุ์ที่สำคัญเนื่องจากผลิตโอคราทอกซินเอได้สูงกว่าสายพันธุ์อื่นๆ จะพบปนเปื้อนมากในองุ่น และผลไม้แห้งในเขตร้อน (Noomin และคณะ, 2008)

### 4. ยีสต์

ยีสต์ (Yeast) เป็นสิ่งมีชีวิตชนิดยูแคริโอต เป็นจุลินทรีย์เซลล์เดียว ถูกจัดเป็นสมาชิกของอาณาจักรฟังไจ โดยยีสต์เป็นสิ่งมีชีวิตที่มีวิวัฒนาการมาจากสิ่งมีชีวิตหลายเซลล์ (Kurtzman CP และคณะ, 2006) พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ สามารถใช้สารอาหารในการเจริญได้หลากหลาย การเจริญเติบโตของยีสต์ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิและเงื่อนไขอื่นๆ เช่น ความชื้น ค่าความเป็นกรด-เบส รวมถึงปริมาณออกซิเจน (Pantelides และคณะ, 2015)

ยีสต์ถูกนำมาใช้ประโยชน์ในการเป็นแบบจำลองของสิ่งมีชีวิตชนิดยูแคริโอต และนำมาเป็นหัวเชื้อในการหมัก (Ciani และคณะ, 2010) รวมไปถึงการถูกนำไปใช้ในการยับยั้งโรคที่เกิดจากราและสารพิษที่ราผลิต (Liu และคณะ, 2013)

#### 4.1 ยีสต์ที่พบในเมล็ดกาแฟ

ในกระบวนการผลิตเมล็ดกาแฟแบบเปียก (wet process) หลังจากนำเมล็ดกาแฟสุกมาปอกเปลือกผ่านเครื่องปอกเปลือก และกำจัดเมือกที่ติดกับผนังผลชั้นในออกโดยการหมัก ซึ่งพบว่ายีสต์ที่พบในเมล็ดกาแฟมีความสามารถในการเป็นกล้าเชื้อหรือหัวเชื้อในการหมัก ซึ่งสามารถตัดแยกจากวิธีทางชีวเคมีและโมเลกุล และพบว่า *Pichia fermentans* และ *Pichia kluyveri* ถูกพบมากที่สุด นอกจากนี้ *Candida glabrata*, *Candida quercitrusa*, *Pichia guilliermondii*, *Pichia caribbica* *Saccharomyces* sp. และ *Hanseniaspora opuntiae* ยังถูกพบในกาแฟด้วยเช่นกัน ซึ่งตรวจสอบแล้วพบว่ายีสต์ที่พบในเมล็ดกาแฟนอกจากจะช่วยเป็นหัวเชื้อในการหมักแล้วบางชนิดยังมีส่วนช่วยในการผลิตสารเอสเทอร์ที่มีรสเปรี้ยว และเพิ่มการสะสมของสารหอมระเหยระหว่างการหมักได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Pereira และคณะ, 2014)

จากงานวิจัยของ Pires และคณะ (2017) เกี่ยวกับการศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ในน้ำเสียของกระบวนการแปรรูปเมล็ดกาแฟ พบแบคทีเรีย ราสายใย และยีสต์ โดยยีสต์สายพันธุ์ที่ถูกพบมาก ได้แก่ *Hanseniaspora uvarum*, *Torulaspota delbrueckii*, *Saturnispora gosingsensis*, *Kazachstania gamospora* และ *Wickerhamomyces anomalus*

Pereira และคณะ (2016) ได้ตัดแยกยีสต์ในเมล็ดกาแฟและระบุชนิดด้วยวิธีทางชีวเคมีและวิธีทางโมเลกุลจากตัวอย่างกาแฟ พบยีสต์ทั้งหมด 8 สกุล ได้แก่ *Pichia*, *Debaryomyces*, *Candida*, *Clavispora*, *Klyveromyces*, *Yarrowia*, *Sporobolomyces* และ *Torulaspota*

#### 5. ยีสต์ตัวควบคุมชีวภาพ

การควบคุมทางชีวภาพของผัก ผลไม้ และธัญพืช โดยใช้ยีสต์ปฏิปักษ์เป็นแนวทางหนึ่งในการลดปัญหาการใช้สารเคมีซึ่งถูกควบคุมด้วยกฎระเบียบที่เข้มงวดมากขึ้น โดยในช่วงสองทศวรรษที่ผ่านมาได้มีการแยกยีสต์จากแหล่งต่าง ๆ รวมไปถึงจากผิวหรือเปลือกของผักผลไม้และเมื่อนำไปตรวจสอบพบว่ายีสต์มีศักยภาพในการเป็นตัวควบคุมชีวภาพ โดยในสภาวะต่าง ๆ เช่น อุณหภูมิ ความชื้น ค่าความเป็นกรด-เบส การเกิดออกซิเดชัน การขาดสารอาหาร ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้ยีสต์มีชีวิตและมีความสามารถในการป้องกันโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ การใช้ยีสต์ปฏิปักษ์เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพ นิยมใช้ยีสต์สายพันธุ์ที่พบทั่วไปตามบริเวณนั้น ๆ เช่น บนพื้นผิวของผัก ผลไม้ เนื่องจากยีสต์เหล่านั้นสามารถใช้สารอาหารบริเวณนั้นได้ และเป็นยีสต์กลุ่มหลักที่มีการเจริญซึ่งอาจผลิตสาร

บางอย่างเพื่อช่วยส่งเสริมการเจริญของพืชได้ดีกว่ายีสต์ปฏิปักษ์ที่คัดแยกมาจากบริเวณอื่น ๆ (Liu และคณะ, 2013) โดยการเลือกยีสต์มาใช้เป็นตัวควบคุมชีวภาพ จะพิจารณาจากคุณสมบัติที่เหมาะสม ได้แก่ สามารถเจริญได้ในภาวะที่มีพื้นผิวแห้ง สามารถผลิตสารเมแทบอลิต์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของราก่อโรค สามารถใช้สารอาหารได้หลากหลายและรวดเร็ว ทนสารเคมีหรือสารฆ่าราได้ รวมไปถึงไม่ก่อโรค และเป็นอันตรายต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม (Wisniewski, 1992)

### 5.1 การใช้ยีสต์ปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของราที่ผลิตสารพิษ

ยีสต์ถูกนำมาทดสอบความสามารถในการลดการเจริญของราที่ผลิตสารพิษในอาหารและผลผลิตทางการเกษตรหลายครั้ง จากงานวิจัยของ Pantelides และคณะ ในปี (2015) พบว่ายีสต์ที่คัดแยกได้จากองุ่นในประเทศไซปรัสมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้างสปอร์ของ *Aspergillus tubingensis* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ผลิตโอคราทอกซินเอที่พบมากในฟาร์มองุ่นไวน์ของประเทศไซปรัสเมื่อทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ รวมไปถึงพบการยับยั้งการเจริญของราสายพันธุ์ดังกล่าวเมื่อนำมาทดลองบนผิวองุ่นอีกด้วย รวมถึงงานวิจัยของ Bleve และคณะ (2006) ซึ่งให้เห็นว่ายีสต์ที่พบบนผิวขององุ่นมีศักยภาพในการควบคุม *A. carbonarius* และ *A. niger*

นอกจากนี้ยังมีการใช้ยีสต์หัวเชื้อผสมเพื่อเพิ่มความสามารถในการเป็นตัวควบคุมชีวภาพ เพื่อช่วยส่งเสริมการเจริญร่วมกันของยีสต์ ซึ่งส่งผลในการช่วยเพิ่มความสามารถในการยับยั้งรามากกว่า 1 สายพันธุ์เนื่องจากมีกลไกการยับยั้งราที่หลากหลายมากขึ้น และยังช่วยในการลดอัตราการเกิดโรคได้มากขึ้น (Sharma และคณะ, 2009) โดยจากการทดลองของ Kepetanakou และคณะ (2012) พบว่าการใช้ยีสต์ผสมสามารถลดปริมาณโอคราทอกซินที่ผลิตได้ถึง 60 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การใช้ยีสต์เดี่ยวสามารถลดปริมาณโอคราทอกซินที่ผลิตได้เพียง 5-15 เปอร์เซ็นต์ แต่งานวิจัยของ Peromingo และคณะ (2018) พบว่ายีสต์ *Debaryomyces hansenii* ที่แยกได้จากแฮมแห้ง มีประสิทธิภาพในการลดปริมาณโอคราทอกซินเอที่ *P. verrucosum* strain FHSCC Pv45 ผลิตได้ในสภาวะระหว่างการหมักของผลิตภัณฑ์โดยพบว่า *D. hansenii* มีกลไกสำคัญในการลดการแสดงออกของยีนที่สำคัญในกระบวนการผลิตโอคราทอกซินเอใน *P. verrucosum* strain FHSCC Pv45 แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของราดังกล่าวได้

## 5.2 การใช้ยีสต์ปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของราที่ผลิตสารพิษในเมล็ดกาแฟ

จากการทดลองของ Masoud และคณะ (2006) ในการทดสอบความสามารถของ *Pichia anomala*, *Pichia kluyveri* และ *Hanseniaspora uvarum* ที่คัดแยกได้จากกระบวนการหมักกาแฟ ในการยับยั้งการเจริญและการผลิตโอคราทอกซินเอของ *Aspergillus ochraceus* พบว่ายีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์ สามารถยับยั้งการเจริญของราได้ และจากรายงานการวิจัยของ Pereira และคณะ (2016) พบว่า *Pichia fermentans* LPBYB13, *Sporobolomyces roseus* LPBY7E, *Candida* sp. LPBY11B ที่คัดแยกได้จากเมล็ดกาแฟมีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *Aspergillus westerdijkiae* ซึ่งเป็นราที่ผลิตโอคราทอกซินเอ อีกทั้งยีสต์ที่ถูกระบุชนิดในงานวิจัยของ Silva และคณะ (2008) สามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ของรา และสามารถนำไปใช้ควบคุมการเจริญของ *Aspergillus niger* รวมถึงราสายใยสกุลอื่น ๆ ในกระบวนการหมักกาแฟได้

จากการศึกษาผลกระทบของสารที่ยีสต์ผลิตระหว่างกระบวนการแปรรูปกาแฟ ได้แก่ *P. anomala*, *P. kluyveri* และ *H. uvarum* ต่อการเจริญและการผลิตโอคราทอกซินเอของ *A. ochraceus* พบว่าเอสเทอร์และแอลกอฮอล์ที่ยีสต์ผลิต ได้แก่ ethyl acetate, isobutyl acetate, 2-phenyl ethyl acetate, ethyl propionate และ isoamyl alcohol โดยสารที่ยีสต์ผลิตที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญและการผลิตโอคราทอกซินเอมากที่สุดคือ 2-phenyl ethyl acetate

จากงานวิจัยของ Velmourougane และคณะ (2011) พบว่าการเติมยีสต์ระหว่างกระบวนการแปรรูปผลกาแฟสุกหรือกาแฟเชอร์รี่กาแฟสายพันธุ์อาราบิก้าและโรบัสตาสามารถควบคุม *A. niger* และ *A. ochraceus* รวมถึงควบคุมปริมาณโอคราทอกซินเอได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยไม่ส่งผลกระทบต่อคุณภาพของกาแฟ และผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นยีสต์มีศักยภาพในการเป็นตัวควบคุมทางชีวภาพเชิงพาณิชย์ในการแปรรูปกาแฟ และพบว่าเป็นวิธีการที่ประหยัดและคุ้มค่าในการควบคุม *A. ochraceus* และปริมาณโอคราทอกซินเอในกระบวนการแปรรูปผลกาแฟสุกหรือกาแฟเชอร์รี่

#### 4.4 กลไกที่ยีสต์ปฏิบัติการใช้เพื่อยับยั้งการเจริญของรา

ยีสต์มีกลไกสำคัญหลักๆ ในการยับยั้งการเจริญของรา 2 กลไก คือ การแย่งชิงพื้นที่หรือสารอาหารที่ราใช้ในการเจริญ และการผลิตสารเมแทบอไลต์เพื่อยับยั้งการเจริญ โดยในช่วง 24 ชั่วโมงแรก ยีสต์ปฏิบัติการใช้กลไกในการแย่งชิงสารอาหารในการเจริญของรา ดังนั้น ยีสต์ปฏิบัติการใช้เป็นตัวควบคุมชีวภาพจึงต้องมีคุณสมบัติที่สามารถเจริญได้อย่างรวดเร็ว ส่งผลให้อาหารถูกใช้จนหมด ทำให้ราไม่มีสารอาหารเพียงพอในการเจริญ (Li และคณะ, 2008) จากนั้น ยีสต์จะใช้กลไกการสร้างสารเมแทบอไลต์ที่ส่งผลต่อการเจริญของรา เช่น อิลิซิเตอร์ (elicitors) ซึ่งเป็นสารที่ช่วยกระตุ้นให้พืชสร้างกลไกในการป้องกันตัวเองจากรา (Chan และคณะ, 2007) ยีสต์มีกลไกเพิ่มจำนวนตัวเองเพื่อเพิ่มสถานะความเป็นกรด (Hershkovitz และคณะ, 2012) รวมไปถึงการสร้างเอนไซม์หรือสารประเภทไบโอฟิล์ม สำหรับย่อยผนังเซลล์ของรา (Bar-Shimon และคณะ, 2004) เป็นต้น

ยีสต์บางชนิด เช่น *Pichia guilliermondii* และ *Candida oleophila* มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เพื่อย่อยผนังเซลล์รา (Nunes, 2012) เอนไซม์ที่พบมากได้แก่ บีตา-1, 3-กลูแคนเนส ( $\beta$ -1, 3-glucanase) และไคตินเนส (chitinase) นอกจากนี้ยีสต์บางสายพันธุ์ยังสามารถผลิตคิลเลอร์ท็อกซิน (killer toxin) ที่มีผลในการยับยั้งราหรือฟังไจต่างชนิดได้ เช่น *P. anomala*, *Pichia burtonii*, *D. hansenii* และ *Saccharomyces cerevisiae* (Druvefors, 2004) เป็นต้น

นอกจากกลไกในการยับยั้งการเจริญของราที่ผลิตสารพิษแล้ว ยังสามารถใช้ยีสต์เพื่อลดปริมาณสารพิษจากราได้ โดยพบว่า ยีสต์สามารถผลิตเอนไซม์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารพิษจากรา และ เซลล์ของยีสต์ยังมีคุณสมบัติในการดูดซับสารพิษจากรา (Jard และคณะ, 2011) ทำให้สามารถใช้ยีสต์เพื่อช่วยในการลดปริมาณการปนเปื้อนของรารวมไปถึงสารพิษที่ราผลิตได้

#### วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดแยกและคัดเลือกยีสต์จากตัวอย่างผลกาแฟสุก เมล็ดกาแฟหมัก น้ำหมักกาแฟ และเมล็ดกาแฟกะลา
2. เพื่อประเมินความเป็นปฏิปักษ์ของยีสต์ที่คัดแยกได้ต่อราที่ผลิตไอคราทอกซินเอ

## บทที่ 2

### อุปกรณ์ สารเคมีและวิธีดำเนินการทดลอง

#### อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. กรวยกรองขนาด 50 มิลลิลิตร บริษัท Pyrex, Germany
2. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงยี่ห้อ Olympus รุ่น CH30 บริษัท อีพอร์แอล อินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด, Japan
3. เครื่องชั่ง (Electronic balance) รุ่น PG6002-S และ AG285 บริษัท Mettler Toledo, Switzerland
4. เครื่องตีบดผสม (Stomacher) บริษัท IUL Instruments, Spain
5. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ รุ่น SS-325 และ ES-315 ยี่ห้อ Tomy, Japan
6. เครื่องปั่นผสม (Vortex mixer) รุ่น Gene 2 บริษัท Scientific Industries, USA
7. เครื่องเปลี่ยนอากาศเป็นแก๊สไนโตรเจน บริษัท Peak Scientific
8. เครื่องวัดค่าพีเอช (pH meter) รุ่น S20-K Seven-Easy บริษัท Mettler Toledo, USA
9. จานเลี้ยงเชื้อแก้วขนาด 15 x 100 มิลลิลิตร บริษัท Pyrex, Germany
10. ตู้บ่มเชื้อ (Incubators) อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ประกอบในประเทศไทย
11. ตู้บ่มเชื้อ (Incubators) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ยี่ห้อ Contherm Scientific, New Zealand
12. ตู้เย็น อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ยี่ห้อ SANDEN INTERCOOL, Thailand
13. ตู้เขี่ยเชื้อ รุ่น V6-T ขนาด 2 x 4 ฟุต บริษัท Mammert, Germany และตู้เขี่ยเชื้อ รุ่น Mark 11 ยี่ห้อ Clean บริษัท Lab service, Thailand
14. ตู้อบแห้ง บริษัท Contherm Scientific, New Zealand
15. ถุงสำหรับตีบด (Stomacher bag)
16. ถุงมือยาง ยี่ห้อ SRI TRANG GLOVES บริษัท สยามเซมเพอร์เมต, Thailand
17. ถุงมือไนไตรล์ ยี่ห้อ SemperGuard บริษัท สยามเซมเพอร์เมต, Thailand
18. ปีกเกอร์ ขนาด 20, 200, 500 มิลลิลิตร บริษัท Pyrex, Germany
19. ฟาสเจอร์ปีเปตต์แก้วขนาด 230 มิลลิลิตร ยี่ห้อ Qualicolor, Germany

20. แผ่นพาราฟิล์ม บริษัท Mennasha, Thailand
21. ไมโครปิเปตต์ขนาด 20, 200, 1000 ไมโครลิตร บริษัท Eppendorf, Germany
22. ไมโครปิเปตต์ขนาด 5 ไมโครลิตร บริษัท Eppendorf, Germany
23. หลอดทดลอง ขนาด 16 x 150 มิลลิลิตร บริษัท Pyrex, Germany
24. หลอดทดลองฝาเกลียว ขนาด 13 x 100 มิลลิลิตร บริษัท Pyrex, Germany
25. หลอดทดลองฝาเกลียว ขนาด 16 x 150 มิลลิลิตร บริษัท Pyrex, Germany
26. หลอดไมโครเซนติฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร บริษัท Axygen, Germany
27. ซีมาไซโตมิเตอร์ บริษัท Precicolor, Germany

### เคมีภัณฑ์

1. Bacto Yeast Carbon Base บริษัท Difco Laboratories, USA
2. Bacto Yeast Nitrogen Base บริษัท Difco Laboratories, USA
3. Potato Dextrose Agar (PDA) บริษัท Difco Laboratories, USA
4. HPLC Grade methanol บริษัท Merck, Germany
5. กรดฟอร์มิก ( $\text{CH}_2\text{O}_2$ ) บริษัท Merck, Germany
6. กรดอะซิติก ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) บริษัท Merck, Germany
7. กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (conc. HCl)
8. กลูโคส (Glucose) บริษัท HiMedia Laboratories
9. กาแลคโทส (Galactose) บริษัท HiMedia Laboratories
10. ซูโครส (Sucrose) บริษัท Sigma Laboratories, USA
11. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) บริษัท Merck, Germany
12. โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) บริษัท Merck, Germany
13. โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น (conc. NaOH)
14. ไซโลส (Xylose) บริษัท Sigma Laboratories, USA
15. น้ำกลั่น
16. น้ำปลอดประจุ
17. ผงวุ้น (agar) บริษัท Difco Laboratories, USA



18. ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) บริษัท HiMedia Laboratories Pvt.Ltd., India
19. ผงสกัดจากมอลต์ (malt extract) บริษัท HiMedia Laboratories Pvt.Ltd., India
20. โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) บริษัท Merck, Germany
21. เพปไทน์ (peptone) บริษัท HiMedia Laboratories Pvt.Ltd., India
22. โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) บริษัท Merck, Germany
23. เมทานอล ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) บริษัท Merck, Germany
24. เมทิลีนบลู (Methylene blue)
25. มอลโทส (Maltose)
26. แลคโทส (Lactose) บริษัท Oxoid Laboratories, England
27. อะซิโตไนไตรล์ ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ) บริษัท Merck, Germany

## วิธีดำเนินการทดลอง

### 1. การสุ่มเก็บตัวอย่างกาแฟหลังการเก็บเกี่ยว

เก็บตัวอย่างกาแฟจากสถานีวิจัยโครงการหลวงแม่หลอด ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงป่าเมี่ยง และศูนย์พัฒนาโครงการหลวงตีนตก ช่วงฤดูเก็บเกี่ยวในเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2561 โดยมีข้อมูลของสภาพอากาศ ลักษณะพื้นที่ และอุณหภูมิเฉลี่ย ดังนี้

- สถานีวิจัยโครงการหลวงแม่หลอด ครอบคลุมพื้นที่ 5,205 ไร่ มีความสูงจากระดับน้ำทะเลปานกลาง 600 - 1,000 เมตร พื้นที่ส่วนใหญ่เป็นบริเวณเชิงเขาและที่ราบระหว่างหุบเขา อุณหภูมิเฉลี่ย 28 องศาเซลเซียส (มูลนิธิโครงการหลวง, 2012)
- ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงป่าเมี่ยง ครอบคลุมพื้นที่ 75,506 ไร่ มีความสูงจากระดับน้ำทะเล 650 - 1,500 เมตร ลักษณะภูมิประเทศเป็นภูเขาสลับซับซ้อนมีความลาดชัน อุณหภูมิเฉลี่ย 23 องศาเซลเซียส (มูลนิธิโครงการหลวง, 2012)
- ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงตีนตก ครอบคลุมพื้นที่ 21,656 ไร่ มีความสูงจากระดับน้ำทะเล 750 - 1,300 เมตร พื้นที่ส่วนใหญ่เป็นป่าดิบเขาและป่าเบญจพรรณ มีที่ราบเชิงเขาบางส่วน สภาพป่าอุดมสมบูรณ์ อุณหภูมิเฉลี่ย 23 องศาเซลเซียส (มูลนิธิโครงการหลวง, 2012)

ซึ่งทั้ง 3 โครงการตั้งอยู่ในพื้นที่ของจังหวัดเชียงใหม่ เก็บตัวอย่างเป็นเมล็ดกาแฟพันธุ์อะราบิกา 4 ชนิด แบ่งเป็น ผลกาแฟสุก 6 ตัวอย่าง เมล็ดกาแฟหมัก 6 ตัวอย่าง เมล็ดกาแฟกะลา 4 ตัวอย่าง และน้ำหมักกาแฟ 5 ตัวอย่าง รวม 21 ตัวอย่าง เก็บตัวอย่างละ 1 กิโลกรัม แบบสุ่ม เก็บตัวอย่างใส่ในถุงพลาสติกแบบซิปล็อค ส่วนตัวอย่างน้ำหมักกาแฟเก็บตัวอย่าง 1 ลิตร ใส่ในขวดพลาสติกปิดฝา ตัวอย่างที่ได้จะนำมาทำการทดลองทันที หรือเก็บตัวอย่างไว้ที่ -20 องศาเซลเซียสเพื่อรอทำการทดลองในขั้นต่อไป

### 2. การคัดแยกและหาปริมาณยีสต์ทั้งหมดจากตัวอย่างกาแฟหลังการเก็บเกี่ยว

คัดแยกและหาปริมาณยีสต์ทั้งหมดด้วยวิธีการ Dilution plating (Pitt และ Hocking, 2009) โดยตัวอย่างน้ำหมักกาแฟนำไปเจือจางด้วย 0.1 เปอร์เซ็นต์ peptone water (ภาคผนวก ข) ให้มีความเข้มข้น 100, 1,000 และ 10,000 เท่า ส่วนตัวอย่างกาแฟ ได้แก่ ผลกาแฟสุก เมล็ดกาแฟหมัก และเมล็ดกาแฟกะลา มาชั่งแบบสุ่มตัวอย่างละ 50 กรัม ในถุงสำหรับตีบด (Stomacher bag) แช่ใน 0.1 เปอร์เซ็นต์ peptone water ปริมาตร 450 มิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปตีบดด้วยเครื่องตีบดผสม (Stomacher) 2 นาที นำตัวอย่างมาเจือจางให้มีความเข้มข้น 100, 1,000 และ

10,000 เท่า จากนั้น นำไป spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast Extract Peptone Dextrose (YPD) Agar (ภาคผนวก ก) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน นับจำนวนโคโลนีของยีสต์ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ รายงานผลเป็นจำนวนโคโลนีต่อกรัมของกาแฟ (Colony Forming Unit (CFU)/g)

ตรวจดูลักษณะโคโลนีของยีสต์เพื่อคัดแยกยีสต์ออกมาโดยการ Streak plate ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD Agar เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยวและบริสุทธิ์ เพื่อใช้แยกยีสต์ที่มีลักษณะแตกต่างกัน นำยีสต์ที่เป็นเชื้อบริสุทธิ์มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนี ได้แก่ ขนาด สี ขอบ ผิว และศึกษาลักษณะรูปร่างของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เก็บตัวอย่างยีสต์ที่แยกได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Yeast Mold (YM) Agar (ภาคผนวก ก) เลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เพื่อให้ยีสต์เจริญเต็มที่ และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ถ่ายเชื้อเดือนละ 1 ครั้ง

### 3. การจัดจำแนกยีสต์ที่คัดแยกได้

จัดจำแนกยีสต์ที่แยกได้จากข้อ 2. ตามลักษณะการเจริญ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และลักษณะทางสรีรวิทยา โดยดัดแปลงจากวิธีของ Kreger (1984)

#### 3.1 ศึกษาลักษณะการเจริญ

ศึกษาการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งและอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวโดยใช้ YM media บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยการ streak เชื้อลงบน YM agar บ่มเป็นเวลา 2 วัน เพื่อศึกษา ลักษณะของโคโลนี ได้แก่ สี ขอบ รูปร่าง ความมัน ความต้าน ผิว และลักษณะเป็นเมือก และเขี่ยเชื้อลงใน YM broth สังเกตลักษณะการเจริญของเชื้อโดยดูลักษณะการลอยเป็นฝ้าที่ผิวหรือตกตะกอนอยู่ที่ก้นหลอด

#### 3.2 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ศึกษารูปร่างลักษณะของเซลล์ โดยนำยีสต์จาก YM broth ที่บ่ม 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 วัน มาทำ wet mount ด้วย Methylene blue นำไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์

#### 3.3 ศึกษาลักษณะการสืบพันธุ์

ศึกษาการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศจากการทำ wet mount ด้วย Methylene blue แล้วตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยสังเกตลักษณะการสืบพันธุ์แบบต่าง ๆ เช่น การแบ่งตัวแบบ fission การแตกหน่อแบบ unipolar, bipolar หรือ multipolar เป็นต้น

### 3.4 ศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยา

ศึกษาความสามารถในการหมักน้ำตาลโดยเชื้อเลี้ยงลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Yeast Nitrogen Base ซึ่งมีน้ำตาลที่ต้องการศึกษาอยู่ 2 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน พร้อมหลอดดักก๊าซ โดยน้ำตาลที่ใช้ศึกษา คือ กลูโคส กาแลกโทส ซูโครส มอลโทส และ แลคโทส ศึกษาโดยดูการเกิดแก๊สในหลอดดักแก๊ส

ศึกษาความสามารถในการใช้น้ำตาลโดยเชื้อเลี้ยงลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Yeast Nitrogen Base ซึ่งมีน้ำตาลที่ต้องการศึกษาอยู่ 0.5 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ศึกษาโดยดูความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 24-48 ชั่วโมง (ศึกษาความขุ่นของอาหารจากการใช้กระดาษที่มีเส้นที่ขีดหนาประมาณ 2-3 มิลลิเมตร สังเกตเส้นบนกระดาษจากการวางกระดาษไว้ด้านหลังของหลอดทดลอง ในกรณีที่เกิดแล้วเห็นขอบของเส้นแสดงว่าเชื้อไม่เจริญหรือเจริญน้อยมากให้บันทึกเป็น + ถ้าสังเกตเห็นขอบของเส้นบาง ๆ แสดงว่ามีเชื้อเจริญปานกลางบันทึกเป็น ++ และถ้ามองไม่เห็นเส้นปรากฏอยู่แสดงว่าเชื้อเจริญได้ดีมากบันทึกเป็น +++ โดยน้ำตาลที่ใช้ศึกษา คือ กลูโคส กาแลกโทส ซูโครส มอลโทส แลคโทส และไซโลส

ศึกษาความสามารถในการใช้เกลือไนเตรทโดยเชื้อเลี้ยงลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Yeast Carbon Base ที่มี Potassium nitrate (ภาคผนวก ข) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ศึกษาโดยดูความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 3 วัน วัน (ศึกษาความขุ่นของอาหารจากการใช้กระดาษที่มีเส้นที่ขีดหนาประมาณ 2-3 มิลลิเมตร สังเกตเส้นบนกระดาษจากการวางกระดาษไว้ด้านหลังของหลอดทดลอง ในกรณีที่เกิดแล้วเห็นขอบของเส้นแสดงว่าเชื้อไม่เจริญหรือเจริญน้อยมากให้บันทึกเป็น + ถ้าสังเกตเห็นขอบของเส้นบาง ๆ แสดงว่ามีเชื้อเจริญปานกลางบันทึกเป็น ++ และถ้ามองไม่เห็นเส้นปรากฏอยู่แสดงว่าเชื้อเจริญได้ดีมากบันทึกเป็น +++)

### 4. การประเมินผลความเป็นปฏิปักษ์ของยีสต์ต่อราที่ผลิตโอคราทอกซินเอ

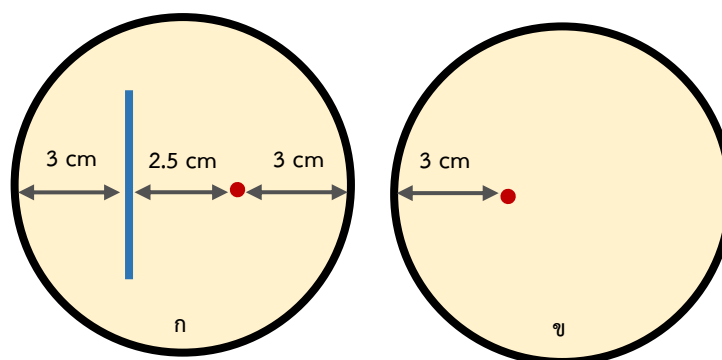
ทดสอบประสิทธิภาพของยีสต์ต่อการต้านการเจริญและการผลิตโอคราทอกซินเอของราที่ผลิตโอคราทอกซินเอ ได้แก่ *Aspergillus carbonarius* TK4.2 (พัฒนชิตา ธนาตลศิริฐิติกุล, 2011) และไอโซเลต TKI9 ที่คัดแยกจากตัวอย่างเมล็ดกาแฟกะลา ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงตีนตก ด้วยวิธี Dual culture (Pantelides และคณะ, 2016) เตรียมยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM Broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นนำยีสต์มาเลี้ยงร่วมกับราที่ผลิตโอคราทอกซินเอในเมล็ดกาแฟหลังการเก็บเกี่ยว โดยชิตยีสต์ที่เตรียมไว้ลงบนจานอาหารเลี้ยง

เชื้อแข็ง Potato Dextrose Agar หรือ PDA (ภาคผนวก ก) เป็นเส้นตรงห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8.5 เซนติเมตร ประมาณ 3 เซนติเมตร จากนั้นหยดสารแขวนลอยสปอร์รา ความเข้มข้น  $10^6$  สปอร์ต่อมิลลิลิตร 20 ไมโครลิตร ลงอีกฝั่งของจานอาหารเลี้ยงเชื้อให้ห่างจากขอบประมาณ 3 เซนติเมตร และห่างจากรอยขีดของยีสต์ 2.5 เซนติเมตร (ภาพที่ 2.1 ก) ป่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ศึกษาการเจริญเติบโตและความเป็นปฏิปักษ์ของยีสต์เปรียบเทียบกับชุดควบคุมดังภาพ 2.1 ข (ชุดควบคุมมีเพียงสารแขวนลอยสปอร์รา ความเข้มข้น  $10^6$  สปอร์ต่อมิลลิลิตร 20 ไมโครลิตรเพียงอย่างเดียว) จากการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีรา บันทึกผลเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (%inhibition) ตามสูตรดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง} = \frac{A - B}{A} \times 100$$

A หมายถึง เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีราชุดควบคุม

B หมายถึง เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีราชุดทดสอบ



ภาพที่ 2.1 การเลี้ยงยีสต์ร่วมกับบราด้วยวิธี dual culture (ก) และชุดควบคุม (ข)

- หมายถึง รอยขีดของยีสต์
- หมายถึง สารแขวนลอยสปอร์รา

### บทที่ 3

#### ผลการทดลอง

#### 1. การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างเป็นเมล็ดกาแฟพันธุ์อะราบิกา 4 ชนิด รวม 21 ตัวอย่าง จากมูลนิธิโครงการหลวง 3 แห่งในจังหวัดเชียงใหม่ แบ่งเป็น ผลกาแฟสุก 6 ตัวอย่าง เมล็ดกาแฟหมัก 6 ตัวอย่าง เมล็ดกาแฟกะลา 4 ตัวอย่าง และ น้ำหมักกาแฟ 5 ตัวอย่าง ลักษณะตัวอย่างกาแฟแต่ละประเภทที่พบ คือ

- ผลกาแฟสุก เป็นผลกาแฟเชอร์รี่สีแดง หรือแดงม่วง มีเศษดินและใบไม้ปะปนอยู่
- เมล็ดกาแฟหมัก เป็นเมล็ดกาแฟยังไม่ผ่านการขัดสีมีเมือกหุ้มอยู่แช่ในน้ำ
- น้ำหมักกาแฟ ลักษณะสีขุ่น เป็นเมือกจากเมือกของเมล็ดกาแฟ สีเหลืองขุ่น หรือสีน้ำตาล มีเศษฝุ่น และกิ่งไม้ปะปนมาด้วย
- เมล็ดกาแฟกะลา เป็นเมล็ดกาแฟยังไม่ผ่านการขัดสี ผ่านการตากแดดลักษณะแห้ง บางตัวอย่างมีฝุ่นปะปนอยู่จำนวนหนึ่ง



ภาพที่ 3.1 ลักษณะผลกาแฟสุก (ก) เมล็ดกาแฟหมัก (ข) เมล็ดกาแฟกะลา (ค) และน้ำหมักกาแฟ (ง)

## 2. การคัดแยกและหาปริมาณยีสต์ทั้งหมดจากตัวอย่างกาแฟหลังการเก็บเกี่ยว

จากการคัดแยกและหาจำนวนยีสต์ทั้งหมดจากตัวอย่างกาแฟหลังการเก็บเกี่ยวด้วยวิธี Dilution plating และนับจำนวนโคโลนีของยีสต์ พบว่าตัวอย่างกาแฟที่มีจำนวนยีสต์ที่นับได้มากที่สุด ได้แก่ เมล็ดกาแฟหมักจากศูนย์พัฒนาโครงการหลวงตีนตก จำนวน  $1.32 \times 10^8$  โคโลนีต่อกรัม ผลกาแฟสุกจากสถานีวิจัยโครงการหลวงแม่หลอด จำนวน  $9.18 \times 10^7$  โคโลนีต่อกรัม น้ำหมักกาแฟจากศูนย์พัฒนาโครงการหลวงตีนตก  $1.30 \times 10^8$  โคโลนีต่อกรัม โดยพบว่า ตัวอย่างเมล็ดกาแฟกะลาจากสถานีวิจัยโครงการหลวงแม่หลอด  $5.16 \times 10^7$  โคโลนีต่อกรัม นับจำนวนโคโลนีของยีสต์ได้น้อยที่สุด (ตารางที่ 3.1)

ตารางที่ 3.1 จำนวนยีสต์ทั้งหมดในตัวอย่างกาแฟแต่ละชนิด (CFU/g)

ตัวอย่างกาแฟ	สถานที่เก็บตัวอย่าง		
	แม่หลอด (M)	ป่าเมียง (P)	ตีนตก (T)
ผลกาแฟสุก (C)	MC1 = $7.11 \times 10^7$ MC2 = $7.92 \times 10^7$ MC3 = $9.18 \times 10^7$	PC1 = $8.28 \times 10^7$	TC1 = $5.49 \times 10^7$ TC2 = $8.55 \times 10^7$
เมล็ดกาแฟหมัก (F)	MF1 = $2.43 \times 10^7$ MF2 = $4.30 \times 10^7$ MF3 = $5.27 \times 10^7$ MF4 = $1.22 \times 10^8$	PF1 = $9.81 \times 10^7$	TF1 = $1.32 \times 10^8$
น้ำหมักกาแฟ (W)	MW1 = $1.27 \times 10^8$ MW2 = $8.42 \times 10^7$ MW3 = $1.16 \times 10^8$	PW = $7.94 \times 10^7$	TW = $1.30 \times 10^8$
เมล็ดกาแฟกะลา (B)	MB1 = $5.72 \times 10^6$ MB2 = $5.94 \times 10^6$ MB3 = $5.16 \times 10^7$	PB1 = $2.00 \times 10^7$	

ตรวจดูลักษณะโคโลนีของยีสต์เพื่อคัดแยกยีสต์ออกมาโดยการ Streak plate ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD Agar เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยวและบริสุทธิ์ทั้งหมด 121 ไอโซเลต เป็นตัวอย่างกาแฟจากสถานีวิจัยโครงการหลวงแม่หลอด จำนวน 72 ไอโซเลต ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงป่าเมี่ยง จำนวน 29 ไอโซเลต และจากศูนย์พัฒนาโครงการหลวงตีนตก จำนวน 20 ไอโซเลต และแบ่งเป็นยีสต์จากตัวอย่างผลกาแฟสุก เมล็ดกาแฟหมัก และน้ำหมักกาแฟ จำนวน 41, 51 และ 29 ไอโซเลต ตามลำดับ (ตารางที่ 3.2)

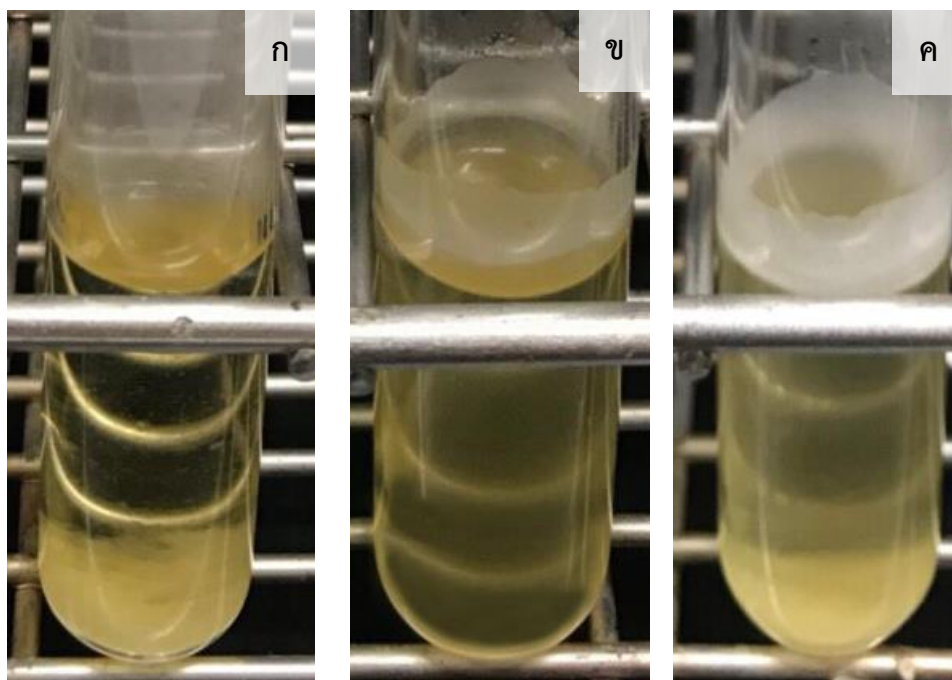
**ตารางที่ 3.2** จำนวนไอโซเลตของยีสต์ทั้งหมดจากตัวอย่างกาแฟแต่ละชนิด (ไอโซเลต)

ตัวอย่างกาแฟ	สถานที่เก็บตัวอย่าง			รวม
	แม่หลอด (M)	ป่าเมี่ยง (P)	ตีนตก (T)	
ผลกาแฟสุก (C)	24	8	9	41
เมล็ดกาแฟหมัก (F)	30	16	5	51
น้ำหมักกาแฟ (W)	18	5	6	29
เมล็ดกาแฟกะลา (B)	0	0	0	0
รวม	72	29	20	<b>121</b>



### 3. การจัดจำแนกยีสต์ที่คัดแยกได้

นำยีสต์ทั้ง 121 ไอโซเลตมาจัดกลุ่มยีสต์ตามลักษณะโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง ออกเป็น 19 กลุ่ม เพื่อนำไปศึกษาศึกษาลักษณะการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ YMA และ YM broth พบว่ายีสต์ทั้ง 19 กลุ่ม เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งพบโคโลนีสีชมพู สีขาวครีม สีขาวใส สีเหลืองครีม และสีเหลือง ลักษณะขอบโคโลนีพบทั้งขอบเรียบและขอบหยัก พบลักษณะผิวของโคโลนีแบบมันวาว และแบบด้าน บางกลุ่มมีลักษณะโคโลนีเป็นเมือก สำหรับลักษณะการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว พบการเจริญแบบตกตะกอน (Flocculation) ดังภาพที่ 3.2 ก จำนวน 15 กลุ่ม เจริญแบบเป็นฝ้า ด้านบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (Pellicle) ดังภาพที่ 3.2 ข จำนวน 9 กลุ่ม และเจริญทั้ง 2 แบบ ดังภาพที่ 3.2 ค จำนวน 4 กลุ่ม (ตารางที่ 3.3)



ภาพที่ 3.2 การเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวของยีสต์กลุ่มที่ 15 แบบ flocculation (ก), ยีสต์กลุ่มที่ 11 แบบ pellicle (ข) และยีสต์กลุ่มที่ 16 แบบ flocculation และ pellicle (ค)

ตารางที่ 3.3 ลักษณะการเจริญของยีสต์ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างกาแฟจำนวน 19 กลุ่ม ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว หลังผ่านไป 2 วัน

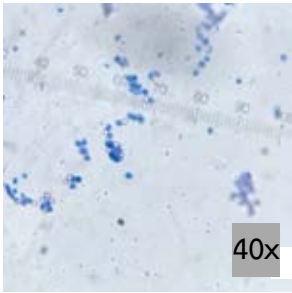

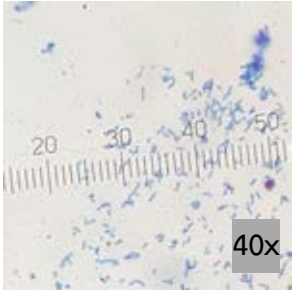

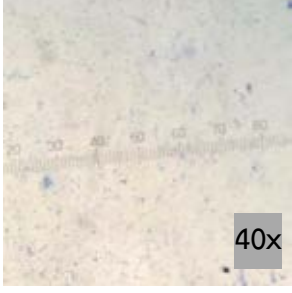

กลุ่ม	ลักษณะการเจริญ ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง	ลักษณะการเจริญ ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว
1	โคโคโลนีสีชมพู มีความมันวาว ขอบเรียบ รูปร่างกลม ผิวเรียบ	Flocculation
2	โคโคโลนีสีขาวครีมขนาดเล็ก มีความมัน ขอบเรียบ รูปร่างกลม ผิวเรียบ	Flocculation
3	โคโคโลนีสีเหลืองครีม มีความมันวาว ขอบเลอะ และมีลักษณะเป็นเมือก	Flocculation
4	โคโคโลนีสีขาวครีม มีความมันวาว ขอบเลอะ และมีลักษณะเป็นเมือก	Flocculation
5	โคโคโลนีสีขาวใสขนาดเล็ก มีความมัน ขอบเรียบ รูปร่างกลม ผิวเรียบ	Flocculation
6	โคโคโลนีสีขาว ผิวด้าน ขอบหยักเล็กน้อย รูปร่างเป็นวงรี ไม่แน่นอน ผิวขรุขระ	Pellicle
7	โคโคโลนีสีขาวครีม ผิวด้าน ขอบหยักเล็กน้อย รูปร่างเป็นวงรีไม่แน่นอน ผิวขรุขระ	Flocculation
8	โคโคโลนีสีขาวใสขนาดเล็ก มีความมัน ขอบเรียบ รูปร่างกลม ผิวเรียบ	Pellicle
9	โคโคโลนีสีขาวใสขนาดเล็ก มีความมัน ขอบเลอะกระจาย รูปร่างกลม ผิวเรียบ	Pellicle
10	โคโคโลนีสีขาวครีม มีความมันวาว ขอบเลอะ และมีลักษณะเป็นเมือก	Flocculation
11	โคโคโลนีสีขาว ผิวด้าน ขอบหยักเล็กน้อย รูปร่างเป็นวงรี ไม่แน่นอน ผิวขรุขระ	Pellicle
12	โคโคโลนีสีเหลืองอ่อนขนาดเล็ก มีความมัน ขอบเรียบ รูปร่างกลม ผิวเรียบ	Flocculation

ตารางที่ 3.3 ลักษณะการเจริญของยีสต์ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างกาแฟจำนวน 19 กลุ่ม ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว หลังผ่านไป 2 วัน (ต่อ)

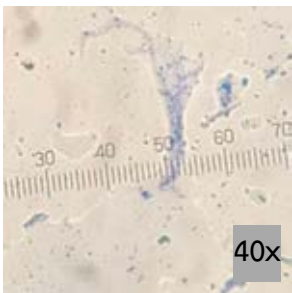

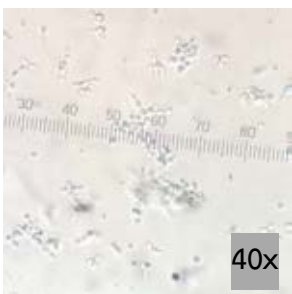

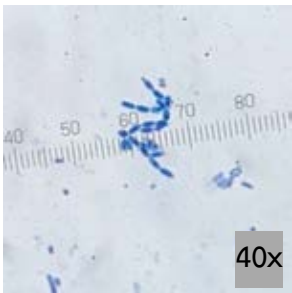

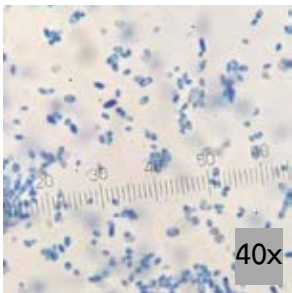

กลุ่ม	ลักษณะการเจริญ ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง	ลักษณะการเจริญ ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว
13	โคโลนีสีขาวครีม ผิวด้าน ขอบบางลง รูปร่างเป็นวงรีไม่ แน่นอน ผิวขรุขระ	Flocculation and Pellicle
14	โคโลนีสีขาวครีม ผิวด้าน ขอบหยักเล็กน้อย รูปร่างเป็น วงรีไม่แน่นอน ผิวขรุขระ	Flocculation and Pellicle
15	โคโลนีสีขาว มีความมัน ขอบเรียบ รูปร่างกลม ผิว เรียบ	Flocculation
16	โคโลนีสีขาวครีม ผิวด้าน ขอบหยักเล็กน้อย รูปร่างเป็น วงรีไม่แน่นอน ผิวขรุขระ	Flocculation and Pellicle
17	โคโลนีสีขาวครีมขนาดเล็ก มีความมัน ขอบเรียบ รูปร่างกลม ผิวเรียบ	Flocculation
18	โคโลนีสีขาวครีมขนาดเล็ก มีความมัน ขอบเรียบ รูปร่างกลม ผิวเรียบ	Flocculation and Pellicle
19	โคโลนีสีขาวครีม ผิวด้าน ขอบหยักเล็กน้อย รูปร่างเป็น วงรีไม่แน่นอน ผิวขรุขระ	Pellicle

ศึกษาลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยดูลักษณะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ พบว่ายีสต์มีการสืบพันธุ์แบบแตกหน่อ (budding) และแบบแบ่งตัว (fission) พบ germ tube ในยีสต์กลุ่มที่ 1 และ 15 โดยรวบรวมลักษณะเด่นของยีสต์ทั้ง 19 กลุ่ม ลักษณะใต้กล้องจุลทรรศน์ และภาพบนอาหารเลี้ยงเชื้อดังแสดงในตารางที่ 3.4

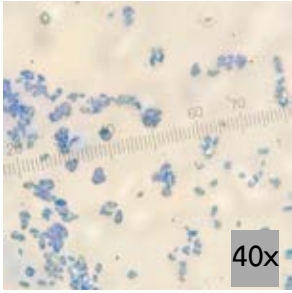

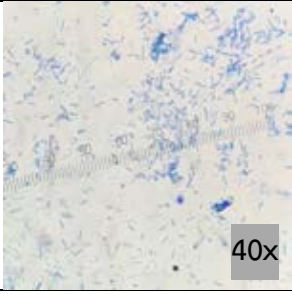

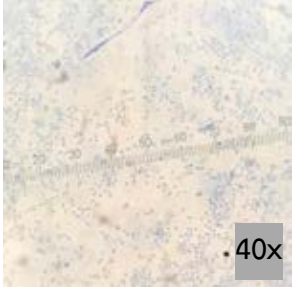

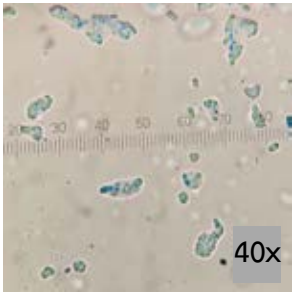

**ตารางที่ 3.4** ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ลักษณะเด่น และโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ YM agar เมื่อผ่านไป 2 วัน ของยีสต์ทั้ง 19 กลุ่ม

กลุ่ม	ลักษณะเด่น	ลักษณะใต้กล้องจุลทรรศน์	โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ
1	โคโลนีสีชมพู มันวาว โคโลนีแบบ butyrous ลักษณะการแบ่งเซลล์ แบบ budding พบ germ tube	 40x	
2	โคโลนีผิวเรียบ สีขาว ลักษณะการแบ่งเซลล์ แบบ fission	 40x	
3	โคโลนีสีครีมปนเหลือง มันวาว มีลักษณะเยิ้ม โคโลนีแบบ butyrous ลักษณะการแบ่งเซลล์ แบบ budding	 40x	

ตารางที่ 3.4 ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ลักษณะเด่น และโคโลนิบนอาหารเลี้ยงเชื้อ YM agar เมื่อผ่านไป 2 วัน ของยีสต์ทั้ง 19 กลุ่ม (ต่อ)

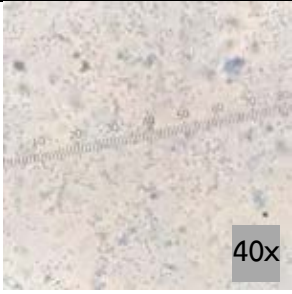
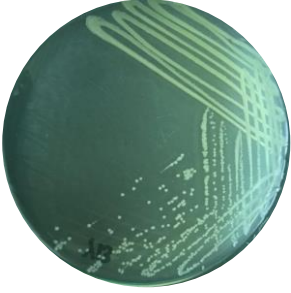
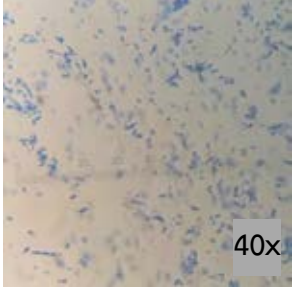
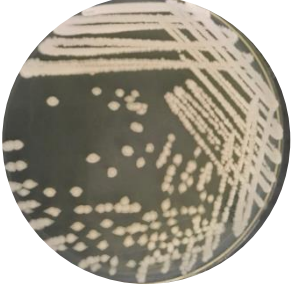
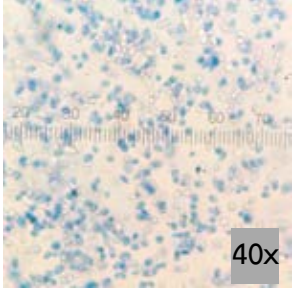

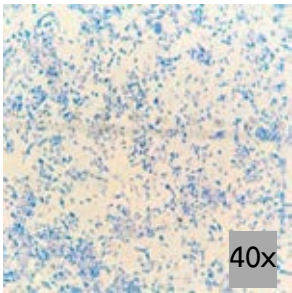

กลุ่ม	ลักษณะเด่น	ลักษณะใต้กล้องจุลทรรศน์	โคโลนิบนอาหารเลี้ยงเชื้อ
4	โคโลนีสีขาวปนครีม มันวาว มีลักษณะ เยิ้ม โคโลนีแบบ butyrous ลักษณะการแบ่ง เซลล์แบบ budding		
5	โคโลนีผิวเรียบ สีขาว ใส ลักษณะการแบ่ง เซลล์แบบ budding		
6	โคโลนีสีขาว ผิวด้าน ขอบไม่เรียบ ลักษณะการแบ่ง เซลล์แบบ fission		
7	โคโลนีสีขาว ผิวด้าน ขอบไม่เรียบ ลักษณะการแบ่ง เซลล์แบบ fission		

ตารางที่ 3.4 ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ลักษณะเด่น และโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ YM agar เมื่อผ่านไป 2 วัน ของยีสต์ทั้ง 19 กลุ่ม (ต่อ)

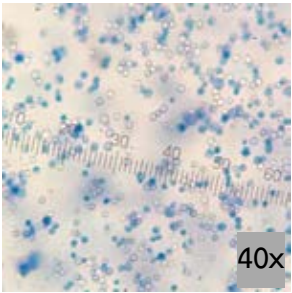
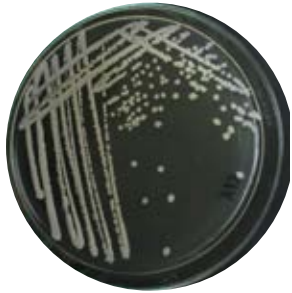
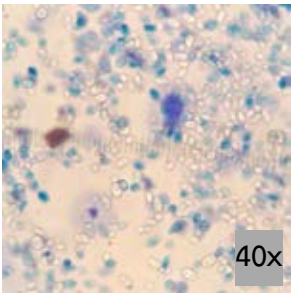
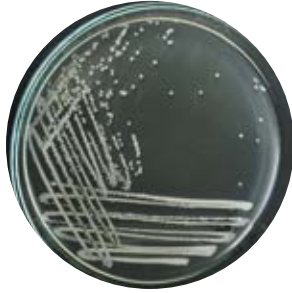
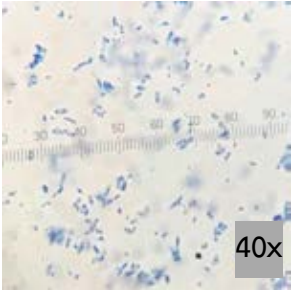

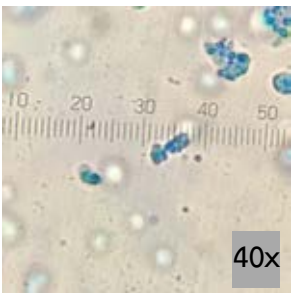

กลุ่ม	ลักษณะเด่น	ลักษณะใต้กล้องจุลทรรศน์	โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ
8	โคโลนีสีขาวขอบขาว ใส มันวาว โคโลนี แบบ butyrous ลักษณะการแบ่ง เซลล์แบบ fission	 40x	
9	โคโลนีสีขาวเหลือง มันวาว ลักษณะการแบ่ง เซลล์แบบ fission	 40x	
10	โคโลนีสีขาวปนครีม มันวาว มีลักษณะ เยิ้ม โคโลนีแบบ butyrous ลักษณะการแบ่ง เซลล์แบบ budding	 40x	
11	โคโลนีสีขาว ผิวด้าน ขอบไม่เรียบ ลักษณะการแบ่ง เซลล์แบบ budding	 40x	



ตารางที่ 3.4 ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ลักษณะเด่น และโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ YM agar เมื่อผ่านไป 2 วัน ของยีสต์ทั้ง 19 กลุ่ม (ต่อ)

กลุ่ม	ลักษณะเด่น	ลักษณะใต้กล้องจุลทรรศน์	โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ
12	โคโลนีสีขาวครีม ลักษณะการแบ่ง เซลล์แบบ budding	 40x	
13	โคโลนีสีขาว ผิวด้าน ขอบไม่เรียบ ลักษณะการแบ่ง เซลล์แบบ fission	 40x	
14	โคโลนีสีขาว ผิวด้าน ขอบไม่เรียบ ลักษณะการแบ่ง เซลล์แบบ budding	 40x	
15	โคโลนีสีขาว ขอบ เรียบ ลักษณะการแบ่ง เซลล์แบบ budding เห็น germ tube	 40x	

ตารางที่ 3.4 ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ลักษณะเด่น และโคโลนิบนอาหารเลี้ยงเชื้อ YM agar เมื่อผ่านไป 2 วัน ของยีสต์ทั้ง 19 กลุ่ม (ต่อ)

รหัส	ลักษณะเด่น	ลักษณะใต้กล้องจุลทรรศน์	โคโลนิบนอาหารเลี้ยงเชื้อ
16	โคโลนีสีขาว ผิวด้าน ขอบเรียบ ลักษณะการแบ่ง เซลล์แบบ budding		
17	โคโลนีสีขาว ขอบ เรียบ ลักษณะการแบ่ง เซลล์แบบ budding		
18	โคโลนีสีขาว ขอบ เรียบ ลักษณะการแบ่ง เซลล์แบบ fission		
19	โคโลนีสีขาว ผิวด้าน ขอบไม่เรียบ ลักษณะการแบ่ง เซลล์แบบ fission		



จากการทดสอบทางชีวเคมีโดยศึกษาการหมักน้ำตาล 5 ชนิด ได้แก่ กลูโคส กาแลกโทส ซูโครส มอลโทส และ แลคโทส พบว่า ยีสต์สามารถหมักกลูโคสได้ 12 กลุ่ม หมักกาแลกโทสได้ 3 กลุ่ม และหมักซูโครสได้ 7 กลุ่ม โดยยีสต์ทุกกลุ่มไม่สามารถหมักมอลโทสและแลคโทสได้ และศึกษาความสามารถในการใช้น้ำตาล 6 ชนิด คือ กลูโคส กาแลกโทส ซูโครส มอลโทส แลคโทส และไซโลส รวมถึงศึกษาความสามารถในการใช้เกลือไนเตรท พบว่ายีสต์ ทั้ง 19 กลุ่ม มีความสามารถในการใช้ไซโลส 13 กลุ่ม มอลโทส 14 กลุ่ม แลคโทส 5 กลุ่ม กลูโคส 15 กลุ่ม กาแลกโทส 4 กลุ่ม ซูโครส 9 กลุ่ม และเกลือไนเตรท 6 กลุ่ม ดังแสดงในตารางที่ 3.5

ตารางที่ 3.5 ผลการทดสอบทางชีวเคมีของยีสต์ทั้ง 19 กลุ่ม

กลุ่ม	Fermentation					Assimilation						ไนเตรท
	maltose	lactose	glucose	galactose	sucrose	xylose	maltose	lactose	glucose	galactose	sucrose	
1	-	-	-	-	-	+++	+	-	++		++	-
2	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	++	+
3	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
4	-	-	+	+	+	+	++	+	+	-	-	+
5	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
6	-	-	+	-	+	+	-	-	++	-	+	-
7	-	-	+	-	+	+	+	-	++	-	+	-
8	-	-	+	-	+	+++	++	-	++	++	+	-
9	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-
10	-	-	+	-	+	-	+	++	+	-	-	-
11	-	-	+	-	-	+++	+++	-	++	++	++	-
12	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+

ตารางที่ 3.5 ผลการทดสอบทางชีวเคมีของยีสต์ทั้ง 19 กลุ่ม (ต่อ)

กลุ่ม	Fermentation					Assimilation						ไนเตรท
	maltose	Lactose	glucose	galactose	sucrose	xylose	maltose	lactose	glucose	galactose	sucrose	
13	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-
14	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+++	-
15	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
16	-	-		-	-	+	-	-	+	-	-	+
17	-	-	+	-	-	-	+++	+	+	+	++	+
18	-	-	+	-	-	+++	+++	-	-	-	-	-
19	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-

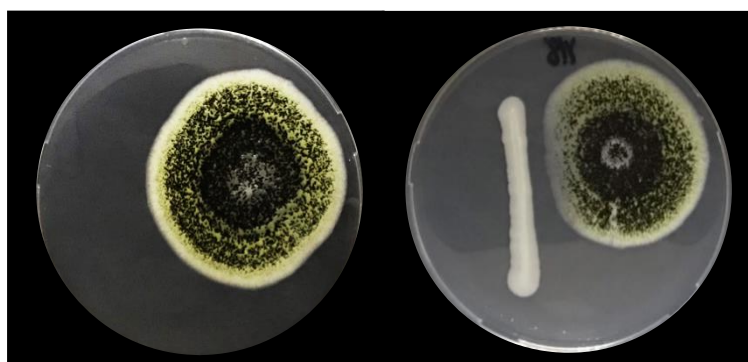
#### 4. การประเมินผลความเป็นปฏิปักษ์ของยีสต์ต่อราที่ผลิตโอคราทอกซินเอ

นำยีสต์ทั้งหมด 15 ไอโซเลตที่คัดแยกได้จากเมล็ดกาแฟตัวอย่าง มาประเมินความเป็นปฏิปักษ์ต่อราที่มีความสามารถในการผลิตโอคราทอกซินเอ ได้แก่ *A. carbonarius* TK4.2 (พันธุ์ซิดา ธาราดลศิริรัฐติกุล, 2011) และรา TKI9 ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างเมล็ดกาแฟกลาของศูนย์พัฒนาโครงการหลวงตีนตก โดยคัดเลือกยีสต์ 4 กลุ่ม จาก 5 กลุ่มที่มีหน้าตาใกล้เคียงกัน และเลือกตัวแทนของแต่ละกลุ่มกลุ่มละ 1 ไอโซเลต เลี้ยงยีสต์ร่วมกับราแบบ dual culture บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งพบว่ายีสต์ 15 ไอโซเลต มีประสิทธิภาพในการลดการเจริญและการสร้างสปอร์ของ *A. carbonarius* TK4.2 จำนวน 14 ไอโซเลต โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ระหว่าง  $2.5 \pm 3.54$  ถึง  $30.0 \pm 3.54$  เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3.6) โดยยีสต์ Y02 ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของราได้ และพบว่ายีสต์ Y18 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *A. carbonarius* TK4.2 มากที่สุด (ภาพที่ 3.3) โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง  $30.0 \pm 3.54$  เปอร์เซ็นต์ และ พบว่ายีสต์ทั้ง 15 ไอโซเลต มีประสิทธิภาพในการลดการเจริญและการสร้างสปอร์ของรา TK4.2 โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ระหว่าง  $14.1 \pm 3.33$  ถึง  $30.6 \pm 1.66$  เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3.7) และพบว่ายีสต์ Y18 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของรา TKI9 มากที่สุด (ภาพที่ 3.4) โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง  $30.6 \pm 1.66$  เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 3.6 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของ *A. carbonarius* TK4.2 โดยยีสต์ที่

คัดแยกได้จากตัวอย่างกาแฟ

กลุ่ม	รหัสเชื้อ	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของราเฉลี่ย (%inhibition $\pm$ SD)
1	Y01	7.5 $\pm$ 3.54
2	Y02	0 $\pm$ 0
4	Y04	2.5 $\pm$ 3.54
6	Y07	10.0 $\pm$ 0
7	Y08	15.0 $\pm$ 0
8	Y09	10.0 $\pm$ 7.07
9	Y10	5.0 $\pm$ 0
10	Y11	9.0 $\pm$ 1.41
11	Y12	20.0 $\pm$ 0
12	Y13	30.0 $\pm$ 0
14	Y15	12.5 $\pm$ 3.54
15	Y16	12.5 $\pm$ 3.54
17	Y18	30.0 $\pm$ 3.54
18	Y19	19.0 $\pm$ 1.41
19	Y20	30.0 $\pm$ 0



ภาพที่ 3.3 การเลี้ยง *A. carbonarius* TK4.2 ร่วมกับยีสต์รหัส Y18 ด้วยวิธี dual culture บน YM agar บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เมื่อผ่านไป 7 วัน เทียบกับชุดควบคุม

ตารางที่ 3.7 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของรา TK19 โดยยีสต์ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างกาแฟ

กลุ่ม	รหัสเชื้อ	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของราเฉลี่ย (%inhibition $\pm$ SD)
1	Y01	25.3 $\pm$ 2.30
2	Y02	14.1 $\pm$ 3.33
4	Y04	21.8 $\pm$ 2.50
6	Y07	21.8 $\pm$ 0.83
7	Y08	20.6 $\pm$ 0.83
8	Y09	28.2 $\pm$ 9.98
9	Y10	15.9 $\pm$ 5.82
10	Y11	31.2 $\pm$ 2.50
11	Y12	18.8 $\pm$ 3.33
12	Y13	24.7 $\pm$ 1.66
14	Y15	24.1 $\pm$ 7.49
15	Y16	31.8 $\pm$ 3.33
17	Y18	37.6 $\pm$ 1.66
18	Y19	35.3 $\pm$ 3.33
19	Y20	21.8 $\pm$ 2.50



ภาพที่ 3.4 การเลี้ยงรา TK19 ร่วมกับยีสต์รหัส Y18 ด้วยวิธี dual culture บน YM agar ป่มที่ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เมื่อผ่านไป 7 วัน เทียบกับชุดควบคุม

## บทที่ 4

### สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาโดยคัดแยกยีสต์ปฏิกิริยาจากตัวอย่างกาแฟ 4 ประเภทในพื้นที่โครงการหลวง 3 แห่ง ในจังหวัดเชียงใหม่ ได้แก่ สถานีวิจัยโครงการหลวงแม่หลอด ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงป่าเมี่ยง และศูนย์พัฒนาโครงการหลวงตีนตก ช่วงฤดูเก็บเกี่ยวในเดือนพฤศจิกายน ด้วยวิธี Dilution plating บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast Potato Dextrose Agar นับจำนวนโคโลนีของยีสต์ และคัดแยกยีสต์ทั้งหมด 121 ไอโซเลต ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้าของคุณ Silva และคณะ (2000) ที่คัดแยกจุลินทรีย์ประจำถิ่นจากกระบวนการแปรรูปกาแฟ พบยีสต์ในระหว่างกระบวนการแปรรูปกาแฟทั้งในผลกาแฟสุก และในระหว่างกระบวนการหมัก โดยพบยีสต์จำนวนมากในระหว่างกระบวนการหมัก และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Pires และคณะ (2017) เกี่ยวกับการศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ในน้ำเสียของกระบวนการแปรรูปเมล็ดกาแฟ พบแบคทีเรีย ราสายใย และยีสต์ รวมไปถึง Pereira และคณะ (2014) พบยีสต์หลายสายพันธุ์โดย *P. fermentans* และ *P. kluyveri* ถูกพบมากที่สุดในการบวนการผลิตเมล็ดกาแฟแบบเปียก ที่ถูกพบรองลงมาคือ *C. glabrata*, *C. quercitrusa*, *Saccharomyces* sp. , *P. guilliermondii*, *P. caribbica* และ *H. opuntiae*

ยีสต์ทั้ง 121 ไอโซเลตถูกจัดกลุ่มเป็น 19 กลุ่ม ตามลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง และลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อนำไปศึกษาศึกษาลักษณะการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง YMA และอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM broth, ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และนำไปทดสอบทางชีวเคมี พบว่าลักษณะการเจริญของยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเป็นแบบตกตะกอน (Flocculation) จำนวน 15 กลุ่ม เจริญแบบเป็นฝ้าด้านบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (Pellicle) จำนวน 9 กลุ่ม และเจริญทั้ง 2 แบบ จำนวน 4 กลุ่ม เมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบการแบ่งเซลล์ของยีสต์แบบแตกหน่อ (budding) และแบบแบ่งตัว (fission) ส่วนการทดสอบทางชีวเคมีพบว่ายีสต์ส่วนมากมีความสามารถในการหมักน้ำตาลกลูโคสและซูโครสได้ และยีสต์ทุกกลุ่มไม่สามารถหมักน้ำตาลมอลโทสและแลคโทสได้ ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลที่พบว่ากลูโคสและซูโครสเป็นคาร์โบไฮเดรตในผลไม้ (Loren, 2019) ซูโครสเป็นหนึ่งในองค์ประกอบสำคัญในการเกิดกลิ่นและรสชาติที่จำเพาะของกาแฟ (Avelino และคณะ, 2005) และพบว่ายีสต์ ทั้ง 19 กลุ่ม มีความสามารถในการใช้ไซโลส 13 กลุ่ม, มอลโทส 14 กลุ่ม, แลคโทส 5

กลุ่ม, กลูโคส 15 กลุ่ม, กาแลคโทส 4 กลุ่ม, ซูโครส 9 กลุ่ม และเกลือไนเตรท 6 กลุ่ม ซึ่งมีผลการทดลองบางส่วนสอดคล้องกับงานวิจัยที่ทดสอบยีสต์ที่คัดแยกได้ในระหว่างกระบวนการแปรรูปกาแฟโรบัสตาในการใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน โดยพบว่าน้ำตาลที่ยีสต์สามารถใช้ในกระบวนการหมักและการเจริญได้ มีทั้ง กลูโคส แลคโทส มอลโทส แซคคาโรส และราฟฟิโนส รวมทั้งสามารถใช้เกลือไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนได้ (Van และ Castelein, 1971)

คัดเลือกยีสต์ 15 ไอโซเลตเพื่อทดสอบประสิทธิภาพของยีสต์ต่อการต้านการเจริญและการผลิตโอคราทอกซินเอของราด้วยวิธี Dual culture โดยเมื่อเลี้ยงยีสต์ตัวอย่างร่วมกับ *A. carbonarius* TK4.2 พบว่ายีสต์ 14 ไอโซเลตมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของราชนิดนี้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น โดยมีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งอยู่ระหว่าง  $2.5 \pm 3.54$  ถึง  $30.0 \pm 3.54$  เปอร์เซ็นต์ โดยพบว่ายีสต์ Y18 มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการยับยั้งการเจริญของรา โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง  $30.0 \pm 3.54$  เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเลี้ยงยีสต์ตัวอย่างร่วมกับราที่ผลิตโอคราทอกซินเอที่คัดแยกจากตัวอย่างเมล็ดกาแฟกะลาของศูนย์พัฒนาโครงการหลวงตีนตก รหัส TK19 พบว่ายีสต์ทั้ง 15 ไอโซเลตมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของราชนิดนี้ โดยมีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งอยู่ระหว่าง  $14.1 \pm 3.33$  ถึง  $30.6 \pm 1.66$  เปอร์เซ็นต์ โดยพบว่ายีสต์ Y18 มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการยับยั้งการเจริญของรา โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง  $30.6 \pm 1.66$  เปอร์เซ็นต์ โดยยีสต์ Y18 มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการยับยั้งการเจริญของราทั้งสองชนิด และคาดว่าเป็นยีสต์ในสกุล *Candida* เนื่องจากลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ลักษณะการแบ่งเซลล์ และผลการทดสอบทางชีวเคมีมีความสอดคล้องกับยีสต์ในสกุล *Candida* (Kreger, 1984) และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Bleve และคณะ (2005) ที่พบว่ายีสต์สกุล *Candida* เป็นหนึ่งในยีสต์ประจำถิ่นที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *A. carbonarius* บนองุ่น นอกจากนี้ยังพบยีสต์ในสกุล *Candida* ในกระบวนการผลิตเมล็ดกาแฟแบบเปียก (Bleve และคณะ, 2005) และในเมล็ดกาแฟ (Pereira และคณะ, 2016)

โดยคาดว่ากลไกที่ยีสต์ใช้ในการเป็นปฏิปักษ์ต่อราที่ผลิตโอคราทอกซินเอ คือการแย่งชิงพื้นที่หรือสารอาหารที่เราใช้ในการเจริญ และการผลิตสารเมแทบอลิต์เพื่อยับยั้งการเจริญ โดยในช่วง 24 ชั่วโมงแรก ยีสต์ปฏิปักษ์จะใช้กลไกในการแย่งชิงสารอาหารในการเจริญของรา ดังนั้นยีสต์ปฏิปักษ์ที่ใช้เป็นตัวควบคุมชีวภาพจึงต้องมีคุณสมบัติที่สามารถเจริญได้อย่างรวดเร็ว ส่งผลให้อาหารถูกใช้จนหมดทำให้ราไม่มีสารอาหารเพียงพอในการเจริญ (Li และคณะ, 2008) จากนั้นยีสต์จะใช้กลไกการสร้างสาร



เมแทบอลิต์ที่ส่งผลต่อการเจริญของรา เช่น อลิซิเตอร์ (elicitors) ซึ่งเป็นสารที่ช่วยกระตุ้นให้พืชสร้างกลไกในการป้องกันตัวเองจากรา (Chan และคณะ, 2007) หรือมีกลไกเพิ่มจำนวนตัวเองเพื่อเพิ่มสถานะความเป็นกรด (Hershkovitz และคณะ, 2012) รวมไปถึงการสร้างเอนไซม์สำหรับย่อยผนังเซลล์ของรา (Bar-Shimon และคณะ, 2004) เป็นต้น

### เอกสารอ้างอิง

- กรมวิชาการเกษตร. (2018). ยุทธศาสตร์กาแฟ 2560-2564. (ออนไลน์). แหล่งที่มา: <http://www.doa.go.th/hort/wpcontent/uploads/2018/11/ยุทธศาสตร์กาแฟ-2564>. (17 ธันวาคม 2018)
- กระทรวงเกษตรสหรัฐอเมริกา สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. (2016). กาแฟ. (ออนไลน์). แหล่งที่มา: [http://www.oae.go.th/ewt\\_news.=17388&filename=index](http://www.oae.go.th/ewt_news.=17388&filename=index). (17 ธันวาคม 2018)
- ปาริชาติ เทียนจุมพล. (2016). กระบวนการจัดการหลังการเก็บเกี่ยวกาแฟอะราบิกาและโรบัสตาในประเทศไทยกับการปนเปื้อนสารโอคราทอกซิน. (ออนไลน์). แหล่งที่มา: <http://www.phtnet.org/2016/12/334/>. (17 ธันวาคม 2018)
- มูลนิธิโครงการหลวง Royal Project Foundation. (2012). สถานีวิจัยโครงการหลวงแม่หลอด. (ออนไลน์). แหล่งที่มา: <http://www.royalprojectthailand.com/station-maelod>. (20 มีนาคม 2019)
- มูลนิธิโครงการหลวง Royal Project Foundation. (2012). ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงป่าเมี่ยง. (ออนไลน์). แหล่งที่มา: <http://royalprojectthailand.com/pamieng>. (20 มีนาคม 2019)
- มูลนิธิโครงการหลวง Royal Project Foundation. (2012). ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงตีนตก. (ออนไลน์). แหล่งที่มา: <http://royalprojectthailand.com/teentok>. (20 มีนาคม 2019)
- ไทยเกษตรศาสตร์. (2013). การเก็บเกี่ยวและกรรมวิธีการผลิตเมล็ดกาแฟ. (ออนไลน์). แหล่งที่มา: <http://www.thaikasetsart.com/กระบวนการผลิตเมล็ดกาแฟ>. (20 มีนาคม 2019)
- Ahmed, A., Ismaiel, J., Papenbrock, (2015). Mycotoxins: Producing Fungi and Mechanisms of Phytotoxicity. *Agriculture* 2015, 5, 492-537.
- Avelino, J., Barboza, B., Araya, J., C., Fonseca, C., Davrieux, F., Guyot, B., & Cilas, C. (2005). Effects of slope exposure, altitude and yield on coffee quality in two altitude terroirs of Costa Rica, Orosi and Santa María de Dota. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(11), 1869-1876.
- Barnes, J. M., Carter, R. L., Peristianis, G. C., Austwick, P. K. C., Flynn, F. V., & Aldridge, W. N. (1977). Balkan (endemic) nephropathy and a toxin-producing strain of *Penicillium verrucosum* var *cyclopium*: An experimental model in rats. *The Lancet*, 309(8013), 671-675.

- Bar-Shimon, M., Yehuda, H., Cohen, L., Weiss, B., Kobeshnikov, A., Daus, A., Goldway, M., Wisniewski, M. & Droby, S. (2004) Characterization of extracellular tytic enzymes produced by the yeast biocontrol agent *Candida oleophita*. *Curr Genet*, 45(3), 140-148.
- Batista, L. R., Chalfoun, S. M., Silva, C. F., Cirillo, M., Varga, E. A., & Schwan, R. F. (2009). Ochratoxin A in coffee beans (*Coffea arabica* L.) processed by dry and wet methods. *Food control*, 20(9), 784-790..
- Bayman, P., Baker, J. L., Doster, M. A., Michailides, T. J., & Mahoney, N. E. (2002). Ochratoxin production by the *Aspergillus ochraceus* group and *Aspergillus alliaceus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68(5), 2326-2329.
- Bennett J. W., & Klich M. (2003). Mycotoxins. *Clin Microbiol.* 16(3), 497–516.
- Bleve, G., Grieco, F., Cozzi, G., Logrieco, A., & Visconti, A. (2006). Isolation of epiphytic yeasts with potential for biocontrol of *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* on grape. *International journal of food microbiology*, 108(2), 204-209.
- Braham, J. E., & Bressani, R. Eds., INCAP, Panamá. ; Avallone et al., Microbiological and biochemical study of coffee fermentation. *Curr. Microbiol*, 42:252–256.
- Chan. z., Qin, G, Xu, X. Li. B., & Tian, S. (2007), Proteome approach to characterize proteins induced by antagonist yeast and salicylic acid in peach fruit. *Journal of proteome research*, 6(5), 1677-1688
- Ciani, M., Comitini, F., Mannazzu, I., & Domizio, P. (2010). Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non-Saccharomyces yeasts in winemaking. *FEMS yeast research*, 10(2), 123-133.
- Coffee Hat. (2015). Coffee Cherry and Tea. (ออนไลน์). แหล่งที่มา: <http://www.coffee-hat.com/eng/Coffeepedia/Coffee-Cherry-and-Tea> (10 เมษายน 2019)
- D'Mello, J. F. (Ed.). (2003). *Food safety: contaminants and toxins*. CABI.
- Druvefors, U. Å. (2004). Yeast biocontrol of grain spoilage moulds: Mode of action of *Pichia anomala*. Department of Microbiology, Swedish University of Agricultural Sciences.
- Duarte, S. C., Pena, A., & Lino, C. M. (2011). Human ochratoxin A biomarkers—from exposure to effect. *Critical reviews in toxicology*, 41(3), 187-212.

- Eliás, L. G. (1978). Composición química de la pulpa de café y otros subproductos. Pulpa de Café. Composición, Tecnología y Utilización. Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá, Ciudad de Guatemala, Guatemala, 19-29.
- Faith Duran. (2009). Coffee Basics: The Difference between Arabica and Robusta. Kitchn. (ออนไลน์). แหล่งที่มา: <https://www.thekitchn.com/coffee-basics> (18 พฤษภาคม 2018)
- Fazekas, B., Tar, A., & Kovács, M. (2005). Ochratoxin A content of urine samples of healthy humans in Hungary. *Acta Veterinaria Hungarica*, 53(1), 35-44.
- Garcia, M. V., Mallmann, C. A., & Copetti, M. V. (2018). Aflatoxigenic and ochratoxigenic fungi and their mycotoxins in spices marketed in Brazil. *Food research international*, 106, 136-140.
- Hagelberg, S., Hult, K., & Fuchs, R. (1989). Toxicokinetics of ochratoxin A in several species and its plasma-binding properties. *Journal of Applied Toxicology*, 9(2), 91-96.
- Haighton, L. A., Lynch, B. S., Magnuson, B. A., & Nestmann, E. R. (2012). A reassessment of risk associated with dietary intake of ochratoxin A based on a lifetime exposure model. *Critical reviews in toxicology*, 42(2), 147-168.
- Hershkovitz v, Ben-Dayana, C., Raphael. G. Pasmanik-Chor, M. Liu, J., Belausov, E. Aly, R, Wisniewski M. & Droby, s. (2012). Global changes in gene expression of grapefruit peel tissue in response to the yeast biocontrol agent *Metschnikowia fructicola*. *Mol Plant Pathol*, 13(4), 338-349.
- IARC. (1993). IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: some naturally. Lyon: International Agency for Research on Cancer. pp. 489–521.
- Jard, G. Liboz, T., Mathieu F. Guyonvarch, A & Lebrih A. (2011) Review of mycotoxin reduction in food and feed: from prevention in the field to detoxification by adsorption or transformation. *Food Addit Contam part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 28(11), 1590-1609.
- Jose Luis (2017). "The disease that could change how we drink coffee". BBC: In depth, Food. (ออนไลน์). แหล่งที่มา: <http://www.reviewfund.com/article> (18 พฤษภาคม 2018)

- Kapetanakou A. E, Kollias, J. N, Drosinos, E. H. & Skandamis, P. N. (2012) Inhibition of *A. carbonarius* growth and reduction of ochratoxin A by bacteria and yeast composites of technological importance in culture media and beverages. *Int J Food Microbiol*, (15203), 91-99.
- Kaushal K., Shinha, Deepak Bhatnagar. (1998). Mycotoxins in pre-harvest contamination of agricultural crops. *Mycotoxins in Agriculture and Food Safety*, 1, 1-44.
- Khoury A, & Atoui A., (2010). Ochratoxin A: general overview and actual molecular status. *Toxins* 2010, 2(4), 461-493
- Krogh, P. (1972). Mycotoxic porcine nephropathy: a possible model for Balkan endemic nephropathy. *Endemic nephropathy*, 266.
- Kuiper-Goodman, T., & Scott, P. M. (1989). Risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A. *Biomedical and environmental sciences: BES*, 2(3), 179-248.
- Kurtzman, C. P., & Piškur, J. (2006). Taxonomy and phylogenetic diversity among the yeasts. In *Comparative Genomics* (pp. 29-46). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Liu, J., Sui, Y., Wisniewski, M., Droby, S., & Liu, Y. (2013). Utilization of antagonistic yeasts to manage postharvest fungal diseases of fruit. *International journal of food microbiology*, 167(2), 153-160.
- 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 yeasts. *Biological control*, 46(2), 187-193.
- Loren C., PH.D., (2019). Sugar Content of Fruit. (ออนไลน์). แหล่งที่มา: <https://thepaleodiet.com/fruits-and-sugars>. (29 เมษายน 2019)
- Mark. (2009). "Coffee second only to oil?". *Tea & Coffee Trade Journal*. (ออนไลน์). แหล่งที่มา: <https://www.highbeam.com/doc/1G1-198849799.html> (18 พฤษภาคม 2018)
- Marquardt R., R., & Frohlich A., A. (1992). A review of recent advances in understanding ochratoxicosis. *J Anim Sci*. 70, 3968–3988.
- Moruno, E. G., Sanlorenzo, C., Boccaccino, B., & Di Stefano, R. (2005). Treatment with yeast to reduce the concentration of ochratoxin A in red wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 56(1), 73-76.

- Masoud, W., Bjørg Cesar, L., Jespersen, L., & Jakobsen, M. (2004). Yeast involved in fermentation of *Coffea arabica* in East Africa determined by genotyping and by direct denaturing gradient gel electrophoresis. *Yeast*, 21(7), 549-556.
- 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(14), 1133-1142.
- Mazumder, P. M., & Sasmal, D. (2001). Mycotoxins—limits and regulations. *Ancient science of life*, 20(3), 1.
- N'Diaye, V. Poncet, J. Louarn, S. Hamon, M. Noirot, (2005). Genetic differentiation between *Coffea liberica* var. *liberica* and *C. liberica* var. *Dewevrei* and comparison with *C. canephora*. *Plant Systematics and Evolution*, 253(1–4), 95–104.
- Noonim P., Mahakarnchanakul W., Nielsen K. F., Frisvad J. C., & Samson R. A. (2008). Isolation, identification and toxigenic potential of ochratoxin A-producing *Aspergillus* species from coffee beans grown in two regions of Thailand. *International journal of food microbiology*, 128, 197-202.
- Nunes, C., A. (2012). Biological control of postharvest diseases of fruit. *European Journal of Plant Pathology*, 133(1), 181-196.
- Pantelides, I. S., Christou, O., Tsolakidou, M. D., Tsalas, 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.
- Pereira de Melo, G. V., Soccol, V. T., Pandey, A., Medeiros, A. B. P., Lara, J. M. R. A., Gollo, AL., & Soccol, C. R. (2014). Isolation, selection and evaluation of yeasts for use in fermentation of coffee beans by the wet process. *International journal of food microbiology*, 188, 60-66.
- Pereira de Melo, G. V., Beux, M., Pagnoncelli, M. G. B., Soccol, V. T., Rodrigues, C., & Soccol, C. R. (2016). Isolation, selection and evaluation of antagonistic yeasts and lactic acid bacteria against ochratoxigenic fungus *Aspergillus westerdijkiae* on coffee beans. *Letters in applied microbiology*, 62(1), 96-101.

- Peromingo, B., Núñez, F., Rodríguez, A., Alía, A., & Andrade, M. J. (2018). Potential of yeasts isolated from dry-cured ham to control ochratoxin A production in meat models. *International journal of food microbiology*, 268, 73-80.
- Pfohl-Leszkowicz, A., Petkova-Bocharova, T., Chernozemsky, I. N., & Castegnaro, M. (2002). Balkan endemic nephropathy and associated urinary tract tumours: a review on aetiological causes and the potential role of mycotoxins. *Food additives & contaminants*, 19(3), 282-302.
- Pires, J. F., de Souza Cardoso, L., Schwan, R. F., & Silva, C. F. (2017). Diversity of microbiota found in coffee processing wastewater treatment plant. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(12), 211.
- Pitt, J. I., & Hocking, A. D. (2009). *Fungi and food spoilage* (Vol. 519). New York: Springer.
- Sattler, T. A., Dimitrov, T., Hall, P. W. (1977). Relation between endemic (Balkan) nephropathy and urinary-tract tumours. *Lancet*. 1, 278–280.
- Silva, C. F., Batista, L. R., Abreu, L. M., Dias, E. S., & Schwan, R. F. (2008). Succession of bacterial and fungal communities during natural coffee (*Coffea arabica*) fermentation. *Food microbiology*, 25(8), 951-957.
- Silva, C. F., Schwan, R. F., Dias, E. S., & Wheals, A. E. (2000). Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea arabica* in Brazil. *International journal of food microbiology*, 60(2-3), 251-260.
- Teixeira, A. A., Brando, C. H. J., Thomaziello, R. A. & Teixeira, R. (1995). In: *Espresso Coffee: The Science of Quality*, pp. 91–95.
- The National Center for Biotechnology Information. (2018). Alpha - Ochratoxin. (ออนไลน์). แหล่งที่มา: [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ochratoxin\\_alpha](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ochratoxin_alpha) (18 พฤษภาคม 2018)
- Trugo, L. C., & Macrae, R. (1984). Chlorogenic acid composition of instant coffees. *Analyst*, 109(3), 263-266.
- Van Pee, W., & Castelein, J. (1971). The yeast flora of fermenting robusta coffee. *East african agricultural and forestry journal*, 36(3), 308-310.

- Velmourougane, K., Bhat, R., Gopinandhan, T. N., & Panneerselvam, P. (2011). Management of *Aspergillus ochraceus* and Ochratoxin-A contamination in coffee during on-farm processing through commercial yeast inoculation. *Biological Control*, 57(3), 215-221.
- Vettorazzi, A., & de Cerain, A. L. (2016). Mycotoxins as food carcinogens. In *Environmental Mycology in Public Health* (pp. 261-298). Academic Press.
- Vignoli, J., A. Bassoli, D. G. Benassi, M. T. (2011). Antioxidant activity, polyphenols, caffeine and melanoidins in soluble coffee: The influence of processing conditions and raw material. *Food Chemistry*, Elsevier Ltd. 124 (3), 863–868.
- Wilson, C. L., & Wisniewski, M. E. (1989). Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: an emerging technology. *Annual review of phytopathology*, 27(1), 425-441.
- Joint, F. A. O., WHO Expert Committee on Food Additives, & World Health Organization. (2002). Evaluation of certain mycotoxins in food: fifty-sixth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives.
- Yarrow, D. (1998). Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts. In *The yeasts* (pp. 77-100). Elsevier.



## ภาคผนวก

## ภาคผนวก ก

## สูตรและวิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

## 1. Yeast Extract Peptone Dextrose (YPD)

ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	10.0	กรัม
เพปไทน์ (peptone)	20.0	กรัม
เด็คโทส (dextrose)	20.0	กรัม
ผงวุ้น (agar)	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	ลิตร

ละลายส่วนผสมให้เข้ากันนำไปนึ่งเพื่อฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

## 2. Yeast Mold (YM)

ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	3.0	กรัม
ผงสกัดจากมอลต์ (malt extract)	3.0	กรัม
เพปไทน์ (peptone)	5.0	กรัม
เด็คโทส (dextrose)	10.0	กรัม
ผงวุ้น (agar)	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	ลิตร

ละลายส่วนผสมให้เข้ากันนำไปนึ่งเพื่อฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

## 3. Potato Dextrose Agar (PDA)

อาหารสำเร็จรูป PDA (Difco Laboratories, USA)	39.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	ลิตร

ละลายส่วนผสมให้เข้ากันนำไปนึ่งเพื่อฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

## ภาคผนวก ข

### สารเคมีและวิธีการในการทดลอง

#### 1. สารละลายเพปไทน์ 0.1 เปอร์เซ็นต์ (0.1% peptone water)

เพปไทน์ 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งเพื่อฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

#### 2. อาหารสำหรับทดสอบการใช้คาร์บอน (carbon assimilation medium)

Bacto Yeast Nitrogen Base	6.7	กรัม
แหล่งคาร์บอนที่ใช้	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	ลิตร

ละลายส่วนผสมให้เข้ากันนำไปนึ่งเพื่อฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

#### 3. อาหารสำหรับทดสอบการหมักคาร์บอน (carbon fermentation medium)

Bacto Yeast Nitrogen Base	6.7	กรัม
แหล่งคาร์บอนที่ใช้	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	ลิตร

ละลายส่วนผสมให้เข้ากันนำไปนึ่งเพื่อฆ่าเชื้อพร้อมหลอดดักแก๊สที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เติม bromocresol purple เพื่อให้สังเกตเห็นแก๊สในหลอดดักแก๊สได้ง่ายขึ้น

#### 4. อาหารสำหรับทดสอบการใช้เกลือไนโตรท (nitrate assimilation medium)

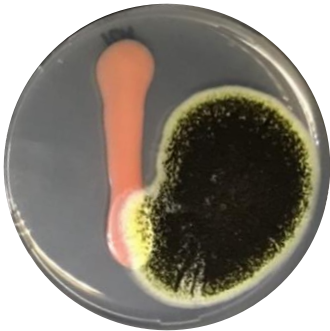

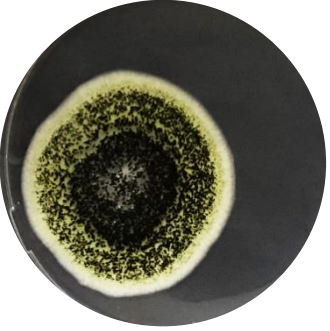
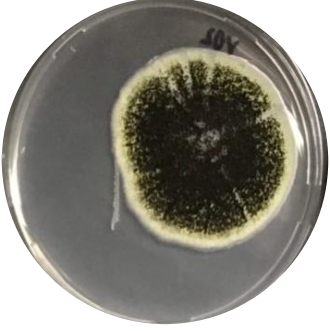
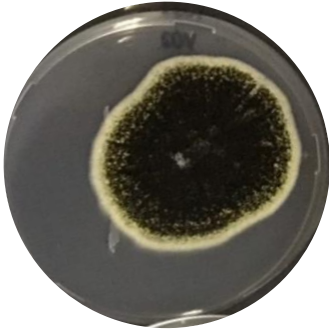

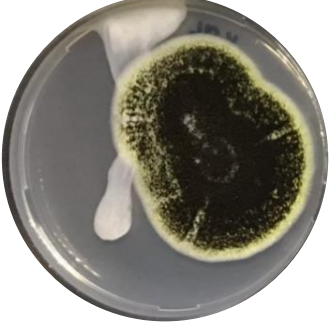
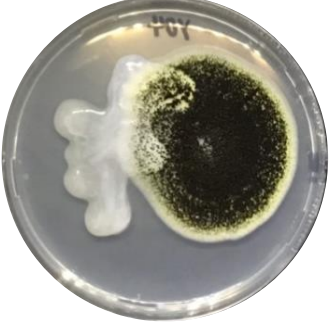
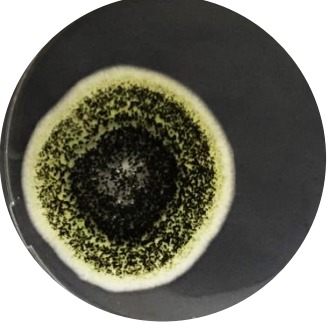
Bacto Yeast Carbon Base	11.7	กรัม
KNO <sub>3</sub>	0.78	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	ลิตร


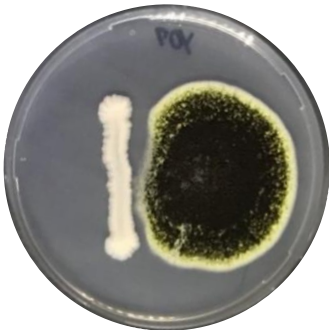
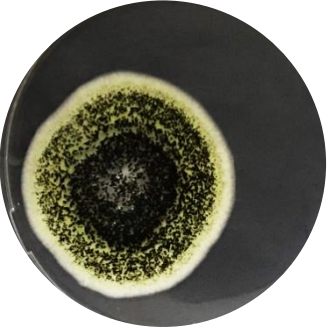
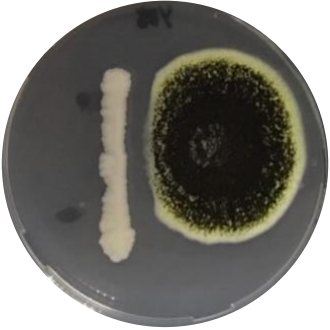
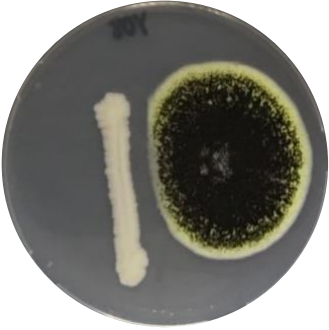

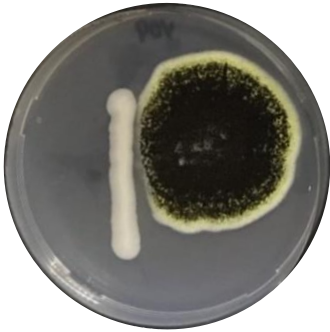
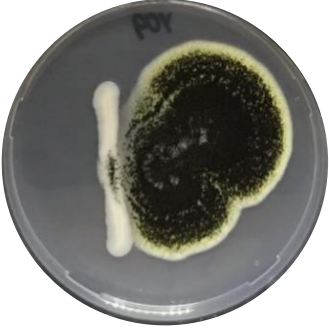
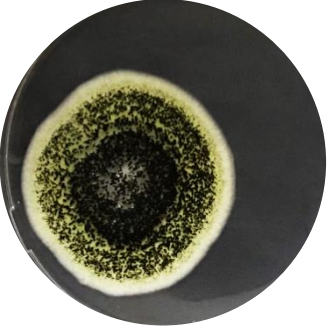
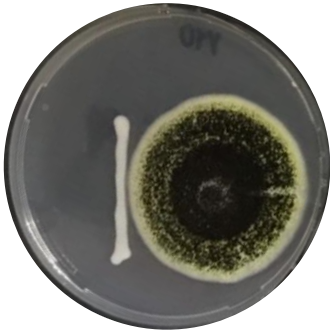
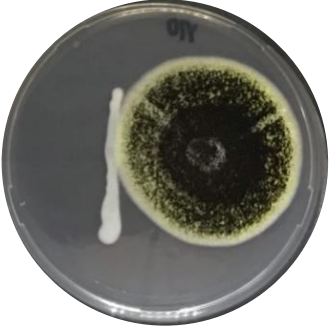
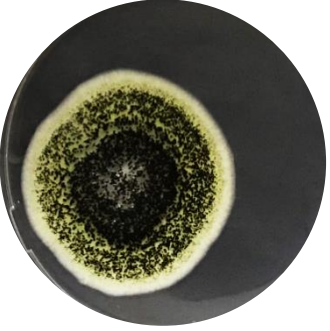
ละลายส่วนผสมให้เข้ากันนำไปนึ่งเพื่อฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

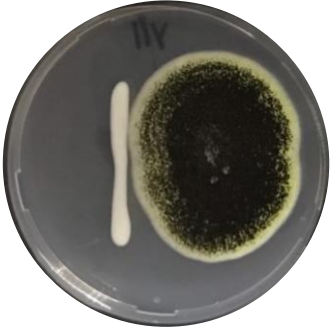
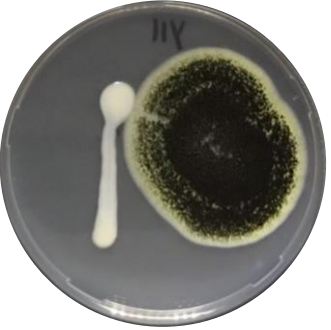
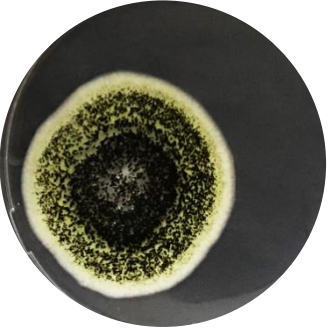
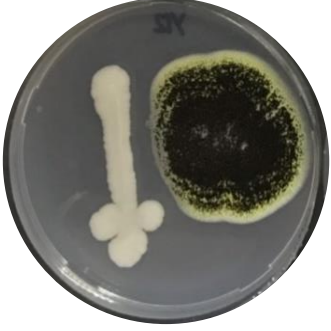


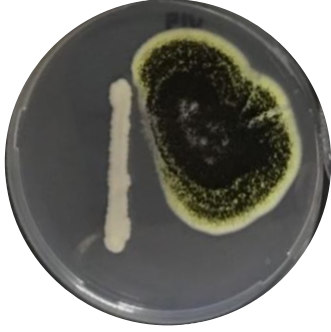

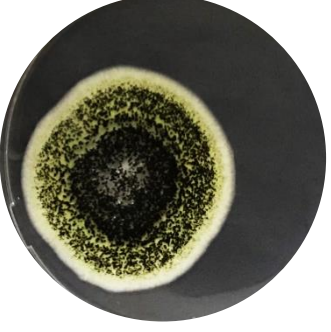
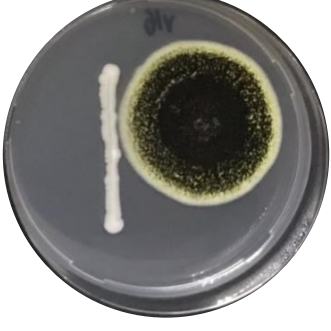

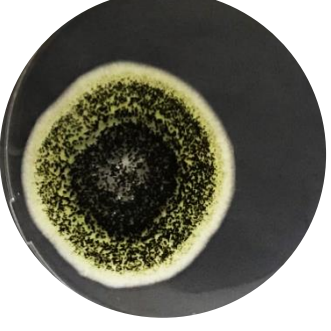
## ภาคผนวก ค

## ข้อมูลดิบ

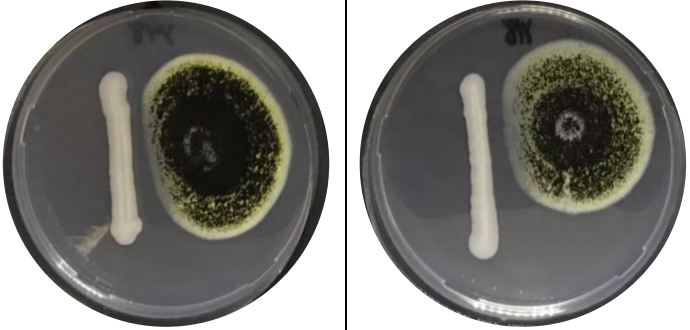
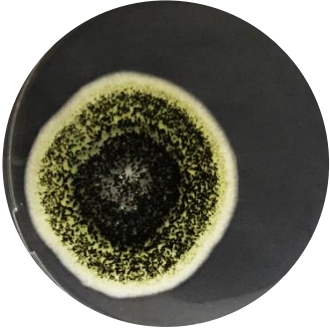
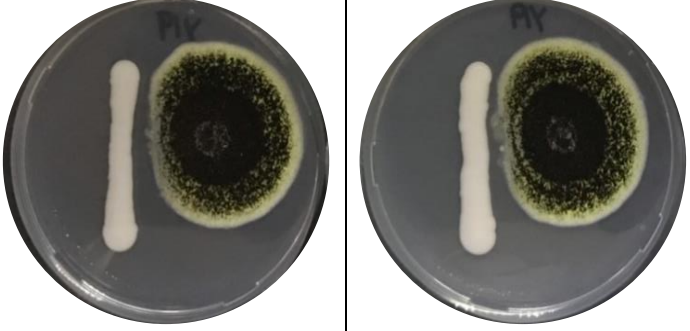

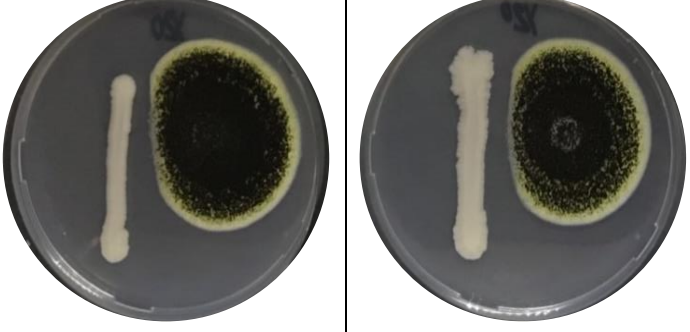

ตารางที่ ค.1 ลักษณะการเจริญของ *Aspergillus carbonarius* TK4.2 เมื่อทดสอบความเป็นปฏิปักษ์ของยีสต์ด้วยวิธี dual culture เทียบกับชุดควบคุม

รหัสเชื้อ	การเลี้ยงยีสต์ร่วมกับราด้วยวิธี dual culture		ชุดควบคุม
Y01			
Y02			
Y04			




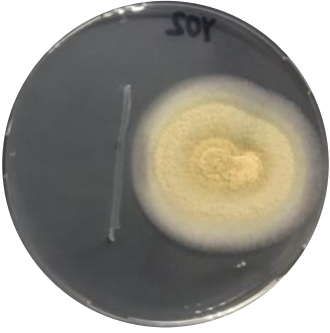





รหัส เชื้อ	การเลี้ยงยีสต์ร่วมกับราด้วยวิธี dual culture		ชุดควบคุม
Y07			
Y08			
Y09			
Y10			

รหัส เชื้อ	การเลี้ยงยีสต์ร่วมกับราด้วยวิธี dual culture		ชุดควบคุม
Y11			
Y12			
Y15			
Y16			






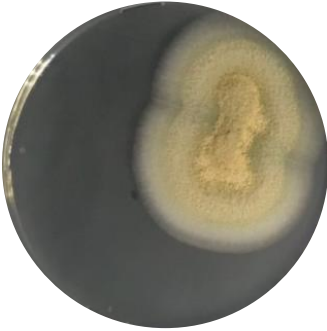









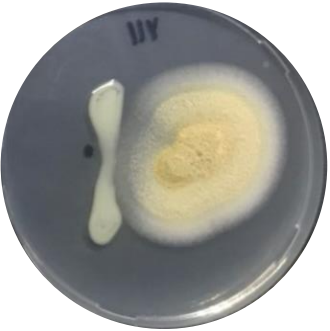






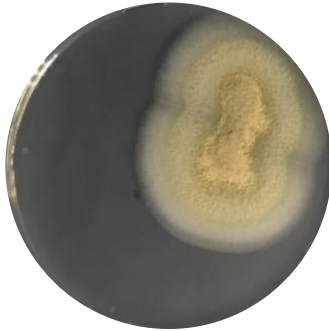



รหัส เชื้อ	การเลี้ยงยีสต์ร่วมกับราด้วยวิธี dual culture	ชุดควบคุม
Y18		
Y19		
Y20		













ตารางที่ ค.2 ลักษณะการเจริญของรา TK19 เมื่อทดสอบความเป็นปฏิปักษ์  
ของยีสต์ด้วยวิธี dual culture เทียบกับชุดควบคุม

รหัสเชื้อ	การเลี้ยงยีสต์ร่วมกับราด้วยวิธี dual culture		ชุดควบคุม
Y01			
Y02			
Y04			



รหัสเชื้อ	การเลี้ยงยีสต์ร่วมกับราด้วยวิธี dual culture		Control
Y07	 Petri dish showing dual culture of yeast and mold. The yeast is on the left, and the mold is on the right. The mold has a distinct, fuzzy appearance.	 Petri dish showing dual culture of yeast and mold. The yeast is on the left, and the mold is on the right. The mold has a distinct, fuzzy appearance.	 Petri dish showing the control culture, which is a single mold culture with a distinct, fuzzy appearance.
Y08	 Petri dish showing dual culture of yeast and mold. The yeast is on the left, and the mold is on the right. The mold has a distinct, fuzzy appearance.	 Petri dish showing dual culture of yeast and mold. The yeast is on the left, and the mold is on the right. The mold has a distinct, fuzzy appearance.	 Petri dish showing the control culture, which is a single mold culture with a distinct, fuzzy appearance.
Y09	 Petri dish showing dual culture of yeast and mold. The yeast is on the left, and the mold is on the right. The mold has a distinct, fuzzy appearance.	 Petri dish showing dual culture of yeast and mold. The yeast is on the left, and the mold is on the right. The mold has a distinct, fuzzy appearance.	 Petri dish showing the control culture, which is a single mold culture with a distinct, fuzzy appearance.
Y10	 Petri dish showing dual culture of yeast and mold. The yeast is on the left, and the mold is on the right. The mold has a distinct, fuzzy appearance.	 Petri dish showing dual culture of yeast and mold. The yeast is on the left, and the mold is on the right. The mold has a distinct, fuzzy appearance.	 Petri dish showing the control culture, which is a single mold culture with a distinct, fuzzy appearance.

รหัสเชื้อ	การเลี้ยงยีสต์ร่วมกับราด้วยวิธี dual culture	Control	
Y11	 Petri dish showing dual culture of yeast and mold. The yeast is a vertical white streak on the left, and the mold is a circular yellowish growth on the right. The label 'Y11' is visible at the top.	 Petri dish showing dual culture of yeast and mold. The yeast is a vertical white streak on the left, and the mold is a circular yellowish growth on the right. The label 'Y11' is visible at the top.	 Petri dish showing the control mold growth, a circular yellowish growth.
Y12	 Petri dish showing dual culture of yeast and mold. The yeast is a vertical white streak on the left, and the mold is a circular yellowish growth on the right. The label 'Y12' is visible at the top.	 Petri dish showing dual culture of yeast and mold. The yeast is a vertical white streak on the left, and the mold is a circular yellowish growth on the right. The label 'Y12' is visible at the top.	 Petri dish showing the control mold growth, a circular yellowish growth.
Y13	 Petri dish showing dual culture of yeast and mold. The yeast is a vertical white streak on the left, and the mold is a circular yellowish growth on the right. The label 'Y13' is visible at the top.	 Petri dish showing dual culture of yeast and mold. The yeast is a vertical white streak on the left, and the mold is a circular yellowish growth on the right. The label 'Y13' is visible at the top.	 Petri dish showing the control mold growth, a circular yellowish growth.
Y15	 Petri dish showing dual culture of yeast and mold. The yeast is a vertical white streak on the left, and the mold is a circular yellowish growth on the right. The label 'Y15' is visible at the top.	 Petri dish showing dual culture of yeast and mold. The yeast is a vertical white streak on the left, and the mold is a circular yellowish growth on the right. The label 'Y15' is visible at the top.	 Petri dish showing the control mold growth, a circular yellowish growth.

รหัสเชื้อ	การเลี้ยงยีสต์ร่วมกับราด้วยวิธี dual culture		Control
Y16	 A petri dish showing a white yeast streak on the left and a yellowish mold colony on the right, with a clear zone of inhibition between them.	 A petri dish showing a white yeast streak on the left and a yellowish mold colony on the right, with a clear zone of inhibition between them.	 A petri dish showing a single yellowish mold colony with a clear zone of inhibition.
Y18	 A petri dish showing a white yeast streak on the left and a yellowish mold colony on the right, with a clear zone of inhibition between them.	 A petri dish showing a white yeast streak on the left and a yellowish mold colony on the right, with a clear zone of inhibition between them.	 A petri dish showing a single yellowish mold colony with a clear zone of inhibition.
Y19	 A petri dish showing a white yeast streak on the left and a yellowish mold colony on the right, with a clear zone of inhibition between them.	 A petri dish showing a white yeast streak on the left and a yellowish mold colony on the right, with a clear zone of inhibition between them.	 A petri dish showing a single yellowish mold colony with a clear zone of inhibition.
Y20	 A petri dish showing a white yeast streak on the left and a yellowish mold colony on the right, with a clear zone of inhibition between them.	 A petri dish showing a white yeast streak on the left and a yellowish mold colony on the right, with a clear zone of inhibition between them.	 A petri dish showing a single yellowish mold colony with a clear zone of inhibition.